



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ  
&  
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΑΘΗΝΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΜΑΙΕΥΤΙΚΗΣ



**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
«ΕΡΕΥΝΑ ΣΤΗ ΓΥΝΑΙΚΕΙΑ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ»**

**ΤΙΤΛΟΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ**

**«ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΣΧΕΣΗΣ ΜΕΤΑΞΥ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ ΚΑΙ  
ΚΑΤΑΤΜΗΣΗΣ ΤΟΥ DNA ΣΤΗΝ ΑΝΔΡΙΚΗ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑ»**

**Όνομα μεταπτυχιακής φοιτήτριας: ΠΟΥΛΟΥ ΔΗΜΗΤΡΑ  
Ιδιότητα: ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ  
Α.Μ.: 20120231**

**Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:**

1. ΜΑΣΤΟΡΑΚΟΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ: Επιβλέπων
2. ΡΟΥΜΠΕΛΑΚΗ ΜΑΡΙΑ
3. ΑΣΒΕΣΤΗΣ ΧΑΡΑΛΑΜΠΟΣ

Αθήνα, 2018



## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε σε κέντρο υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, στην Αθήνα. Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητή Ενδοκρινολογίας της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών κ. Μαστοράκο Γεώργιο για την πολύτιμη βοήθεια του κατά την διεξαγωγή της μελέτης. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την κα Ρουμπελάκη Μαρία, Λέκτορα Αναπτυξιακής Βιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών για την συμμετοχή της στην τριμελή εξεταστική επιτροπή της παρούσας εργασίας και τέλος, τον ιατρό Ουρολόγο-Ανδρολόγο κ. Ασβέστη Χαράλαμπο για την συνεχή βοήθεια του κατά την συγγραφή της μελέτης.

Θα ήθελα να αφιερώσω την παρούσα μελέτη στον κ. Ιππίκογλου Ευθύμιο καθώς με την ουσιαστική καθοδήγηση του κατά την εκτέλεση των πειραματικών διαδικασιών και την συνολική συμβολή του επετεύχθηκε αυτή η μελέτη. Ευχαριστώ από καρδιάς τους φίλους και συναδέλφους Καλογιάννη Δημήτρη και Σπανού Σοφία για την πολύτιμη βοήθεια τους και τέλος, είμαι ευγνώμων στην οικογένεια μου και στον Μπουλαζέρη Μανώλη για την αγάπη και την υποστήριξή τους.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	iv
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	v
ABSTRACT.....	vi
1 ΑΝΔΡΙΚΗ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑ.....	1
2 ΑΝΔΡΙΚΟ ΓΕΝΝΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ.....	3
2.1 ΑΝΑΤΟΜΙΑ: ΑΝΔΡΙΚΟ ΓΕΝΝΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ.....	3
2.1.1 ΟΡΧΕΙΣ: ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ.....	3
2.2 ΟΡΜΟΝΟΛΟΓΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΑΝΔΡΙΚΟΥ ΓΕΝΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ.....	6
2.3 ΠΟΡΕΙΑ ΓΕΝΝΗΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ.....	7
2.3.1 ΣΠΕΡΜΑΤΟΓΕΝΕΣΗ.....	8
2.3.2 ΦΑΣΕΙΣ ΣΠΕΡΜΑΤΟΓΕΝΕΣΗΣ.....	8
3 ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΟ.....	13
3.1 ΔΟΜΗ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΟΥ.....	13
3.2 ΔΟΜΗ & ΣΥΜΠΥΚΝΩΣΗ ΤΟΥ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ ΣΤΟ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΟ.....	14
4 ΑΠΟΠΤΩΣΗ ΚΑΙ ΚΑΣΠΑΣΕΣ.....	17
4.1 ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ.....	17
4.2 ΚΑΣΠΑΣΕΣ.....	18
4.2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ.....	18
4.2.2 ΔΟΜΗ.....	19
4.2.3 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ.....	21
4.2.4 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ.....	23
4.2.5 ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ ΚΑΣΠΑΣΩΝ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗΣ ΤΟΥΣ.....	24
4.2.6 ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΚΑΣΠΑΣΩΝ.....	25
4.3 ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ.....	27
4.3.1 ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΘΑΝΑΤΟΥ (EXTRINSIC PATHWAY).....	27
4.3.2 ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ (INTRINSIC PATHWAY).....	28
4.4 ΡΟΛΟΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ ΣΤΑ ΓΕΝΝΗΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΟΥ ΑΝΔΡΑ.....	29
5 ΚΑΤΑΤΜΗΣΗ ΤΟΥ DNA.....	32
5.1 ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΑΤΑΤΜΗΣΗ ΤΟΥ DNA.....	32
5.2 ΘΕΩΡΙΕΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ ΚΑΤΑΤΜΗΣΗΣ ΤΟΥ DNA.....	33
5.2.1 ΕΛΛΑΤΩΜΑΤΙΚΗ ΣΥΜΠΥΚΝΩΣΗ ΧΡΩΜΑΤΙΝΗΣ.....	33
5.2.2 ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ.....	34
5.2.3 ΑΠΟΠΤΩΣΗ.....	36
5.3 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΒΛΑΒΕΣ ΣΤΟ DNA.....	37
5.4 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΚΑΤΑΚΕΡΜΑΤΙΣΜΟΥ ΤΟΥ DNA.....	39
5.5 ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΕΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ.....	41
6 ΣΚΟΠΟΣ.....	44
7 ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....	45
7.1 ΥΛΙΚΟ.....	45
7.1.1 ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΣΥΜΜΕΤΟΧΗΣ-ΑΠΟΚΛΕΙΣΜΟΥ.....	45
7.2 ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ.....	45
7.3 ΣΠΕΡΜΟΔΙΑΓΡΑΜΜΑ.....	46
7.4 ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΚΑΤΑΚΕΡΜΑΤΙΣΜΟΥ DNA.....	46
7.4.1 ΜΕΘΟΔΟΣ Sperm Chromatin Dispersion (SCD).....	46
7.4.2 ΜΕΘΟΔΟΣ TUNEL (Terminal Uridine Nick-End Labeling).....	49
7.5 ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ: ΤΕΧΝΙΚΗ FLICA (Fluorochrome-Labeled Inhibitors of Caspase).....	52
7.6 ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ.....	54
8 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....	57
9 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	58
10 ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	64

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η συσχέτιση της ενεργοποίησης των κασπασών στον καταρράκτη της απόπτωσης με την ύπαρξη κατάτμησης του DNA των σπερματοζωαρίων σε δείγματα σπέρματος ανδρών που διερευνούνταν για υπογονιμότητα. Ελέγχθηκε επίσης η συσχέτιση της απόπτωσης με τις παραμέτρους του σπερμοδιαγράμματος, αλλά και η διαφορά του ποσοστού κατακερματισμού ανάμεσα σε ασθενείς με φυσιολογικές και παθολογικές παραμέτρους σπερμοδιαγράμματος. Εξετάστηκαν 61 δείγματα σπέρματος ασθενών ηλικίας 30 έως 56 ετών με σκοπό, είτε τη διερεύνηση της γονιμότητας, είτε την πραγματοποίηση κάποιου κύκλου IVF/ICSI. Για την αξιολόγηση του κατακερματισμού χρησιμοποιήθηκαν οι τεχνικές: Sperm Chromatin Dispersion (SCD) και Terminal Uridine Nick-End Labeling (TUNEL), ενώ για την απόπτωση η τεχνική Fluorochrome-Labeled Inhibitors of Caspase (FLICA). Τα αποτελέσματα επεξεργάστηκαν με το στατιστικό πρόγραμμα SPSS (Superior Performance Software System), Version 21. Βρέθηκε, πως υπάρχει θετική συσχέτιση μεταξύ της απόπτωσης και του κατακερματισμού (μέθοδος TUNEL) ( $r=0.307$ ,  $p=0.032$ ) και υψηλότερη μέση τιμή της απόπτωσης σε σχέση με τον κατακερματισμό ( $33.5\% \pm 11.5\%$  έναντι  $14.8\% \pm 9.9\%$ ) ( $p<0.000$ ). Στη μελέτη ελέγχθηκε επίσης η συσχέτιση των βασικών παραμέτρων του σπερμοδιαγράμματος και της ενεργοποίησης των κασπασών, με στατιστικά σημαντική μόνο αυτή της συγκέντρωσης των σπερματοζωαρίων ( $r=-0.292$ ,  $p=0.024$ ). Τέλος, βρέθηκε διαφορά στο ποσοστό κατακερματισμού του DNA όταν αυτό αξιολογήθηκε με τη μέθοδο SCD, μεταξύ των ασθενών με φυσιολογικές παραμέτρους (μέση τιμή  $\pm$  τυπική απόκλιση:  $17.8\% \pm 9.2\%$ ) και των ασθενών με παθολογικές παραμέτρους σπερμοδιαγράμματος ( $25.2\% \pm 13.4\%$ ) ( $p=0.032$ ), ενώ με τη μέθοδο TUNEL η διαφορά αυτή δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Συμπερασματικά, η ανίχνευση των ενεργοποιημένων κασπασών (FLICA) σχετίζεται με το ποσοστό κατάτμησης του DNA των σπερματοζωαρίων (TUNEL) και μάλιστα μπορεί να θεωρηθεί πιο αξιόπιστος δείκτης. Το γεγονός αυτό θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την επιλογή μη αποπτωτικών σπερματοζωαρίων στα πλαίσια της εφαρμογής των τεχνικών υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, ώστε τα επιλεγμένα σπερματοζωάρια να έχουν ακέραιο γενετικό υλικό και καλή δυναμική γονιμοποίησης.

“Investigation of the relationship between apoptosis and DNA fragmentation in male infertility”

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the correlation of activated caspases in the cascade of apoptosis with the presence of DNA fragmentation of spermatozoa in sperm samples from infertile male patients. In addition, this study evaluated the relation between sperm parameters and apoptosis, as well as the difference between the percentage of DNA fragmentation in two groups of patients (with normal and abnormal sperm parameters). The patients, aged from 30 to 56 years old provided sperm sample either for fertility evaluation, or for an IVF/ICSI cycle. For the DNA fragmentation testing, two different techniques were used: the Sperm Chromatin Dispersion (SCD) and the Terminal Uridine Nick–End Labeling (TUNEL) technique, while for apoptosis the Fluorochrome-Labeled Inhibitors of Caspase (FLICA) technique was used. Data were analyzed with the statistic program SPSS (Superior Performance Software System), Version 21. It was found that there is a positive correlation ( $r=0.307$ ,  $p=0.032$ ) between apoptosis and DNA fragmentation measured with TUNEL technique. In addition, the mean of apoptosis was statistically significant different from the value of TUNEL ( $33.5\% \pm 11.5\%$  vs  $14.8\% \pm 9.9\%$ ) ( $p<0.000$ ). It was also examined the relation between sperm parameters and apoptosis, with sperm concentration to be the only parameter that correlated in a statistically significant level ( $\rho=-0.292$ ,  $p=0.024$ ). Finally, the difference between the mean of DNA fragmentation measured with SCD was statistically different between the two groups of patients (patients with normal parameters and patients with abnormal parameters) mean  $\pm$  SD:  $17.8\% \pm 9.2\%$  vs mean  $\pm$  SD:  $25.2\% \pm 13.4\%$ , ( $p=0.032$ ). In the contrary, this difference was not statistically significant different with the TUNEL technique. In conclusion, the detection of activated caspases (FLICA) is related to the percentage of DNA fragmentation (TUNEL) and it could be more reliable marker of apoptosis, as it marks the sights of apoptosis before DNA fragmentation occurs. This fact could be useful for the selection of non apoptotic spermatozoa during an IVF/ICSI cycle in order to obtain a spermatozoon with intact DNA and good fertility potential.

## **ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

# 1 ΑΝΔΡΙΚΗ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑ

Η γέννηση του πρώτου υγιούς μωρού με την βοήθεια της εξωσωματικής γονιμοποίησης (In Vitro Fertilization, IVF) το 1987, από τους Robert Edwards και Patrick Steptoe αποτέλεσε γεγονός που σηματοδότησε την αρχή μιας νέας εποχής για την αντιμετώπιση της ανθρώπινης υπογονιμότητας. Έκτοτε, έχουν γίνει τεράστια βήματα στον τομέα των τεχνικών υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (Assisted Reproduction Techniques, ART), με τεχνικές όπως η Ενδοωαριακή Έγχυση Σπερματοζωαρίων (Intra-Cytoplasmic Sperm Injection, ICSI), να δίνουν την δυνατότητα σε πολλά ζευγάρια που στο παρελθόν ήταν αδύνατον, σήμερα να μπορούν να αποκτήσουν παιδί με το δικό τους γενετικό υλικό.

Ως υπογονιμότητα ορίζεται η μη επίτευξη κύησης μετά από ένα έτος ελεύθερων σεξουαλικών επαφών (WHO, 2000). Η έννοια της υπογονιμότητας πλέον αναφέρεται στο ζευγάρι σαν ενιαία μονάδα και δεν ενοχοποιεί τον άνδρα ή την γυναίκα, παρά μόνο όταν ανευρίσκονται συγκεκριμένες αιτίες που προκαλούν ανδρική ή γυναικεία υπογονιμότητα αντίστοιχα. Η διερεύνηση ενός ζεύγους θα πρέπει να ξεκινά μετά από ένα έτος ελεύθερων σεξουαλικών επαφών. Ωστόσο, η ύπαρξη κάποιων παραγόντων, όπως αυξημένη ηλικία της γυναίκας ή επιβαρυνόμενο ατομικό ιστορικό επιτάσσει την έναρξη της διερεύνησης νωρίτερα.

Η πιθανότητα ενός υγιούς ζεύγους σε αναπαραγωγική ηλικία, που έχουν ελεύθερες σεξουαλικές επαφές να επιτύχει εγκυμοσύνη σε κάθε κύκλο είναι περίπου 20 με 25%. Η πιθανότητα σύλληψης αυξάνεται καθώς παρέρχεται ο χρόνος και φτάνει στο 60% τους πρώτους 6 μήνες, το 84% στους 12 μήνες και τέλος το 92% μετά από 48 μήνες (Kamel, 2010). Περίπου 15% των ζευγαριών που προσπαθούν να αποκτήσουν παιδί αποτυγχάνουν και αναζητούν θεραπεία για την υπογονιμότητα (WHO, 1984). Ο ανδρικός παράγοντας σαν μοναδική αιτία υπογονιμότητας εντοπίζεται στο 20% των περιπτώσεων, ενώ συνεισφέρει σε 30-40% των περιπτώσεων (Thonneau et al., 1991). Στις περιπτώσεις που δεν είναι δυνατή η διαπίστωση κάποιας αιτίας, τότε η υπογονιμότητα χαρακτηρίζεται ως ανεξήγητη.

Η ανδρική υπογονιμότητα χαρακτηρίζεται ως πρωτοπαθής, όταν δεν έχει επιτευχθεί σύλληψη ποτέ, τόσο με την ίδια όσο και με διαφορετική σύντροφο, ενώ δευτεροπαθής όταν έχει επιτευχθεί τουλάχιστον μια σύλληψη. Η κλινική εξέταση του άνδρα και η βασική εξέταση του σπέρματος, δηλαδή το σπερμοδιάγραμμα, αποτελούν τα πρώτα βήματα για την διερεύνηση της ανδρικής υπογονιμότητας. Η τελευταία έκδοση του εγχειριδίου του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (Π.Ο.Υ.) για την εξέταση του σπέρματος παρέχει τιμές αναφοράς για τις παραμέτρους του σπερμοδιαγράμματος (WHO, 2010). Η ανεύρεση απόκλισης από τις τιμές αναφοράς σε μια ή παραπάνω από τις βασικές παραμέτρους (αριθμό, κινητικότητα, μορφολογία σπερματοζωαρίων) υποδεικνύει πιθανό ανδρικό παράγοντα. Σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες της Ευρωπαϊκής Ουρολογικής Εταιρείας (European



Association of Urology, EAU) οι κυριότερες αιτίες ανδρικής υπογονιμότητας ταξινομούνται όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 1

Πίνακας 1: Κύριες αιτίες ανδρικής υπογονιμότητας

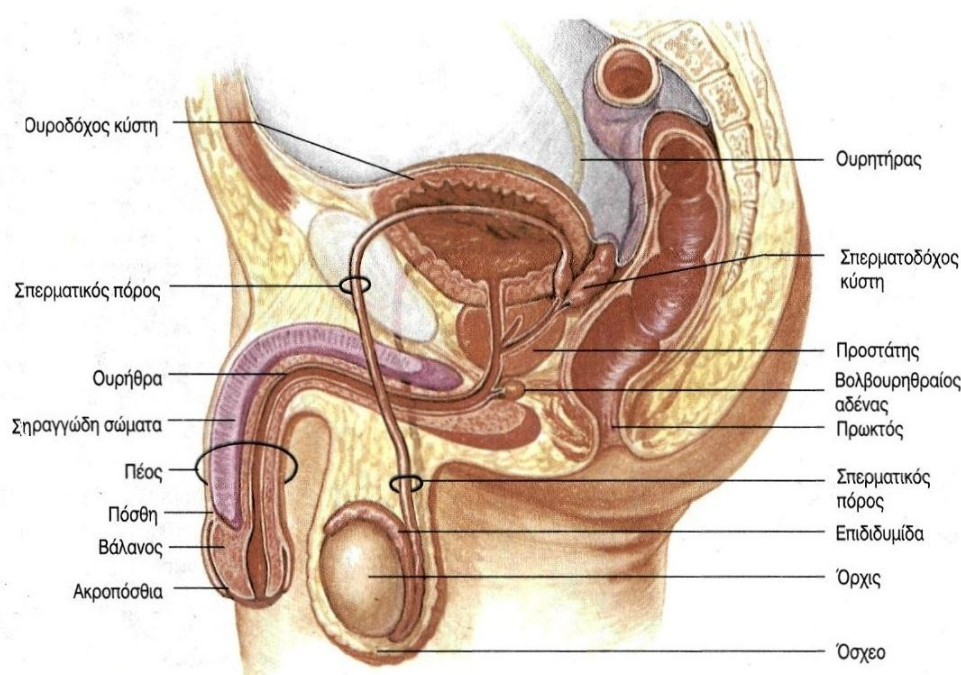
---

- Συγγενείς παράγοντες (κρυπορχία και δυσγενεσία των όρχεων, συγγενής απουσία σπερματικού πόρου)
  - Επίκτητες ουρογεννητικές ανωμαλίες (αποφράξεις, συστροφή, καρκίνος όρχεως, ορχίτιδα)
  - Λοιμώξεις ουροποιητικού
  - Αύξηση της θερμοκρασίας του οσχέου(π.χ σαν συνέπεια κισσοκήλης)
  - Ενδοκρινικές διαταραχές
  - Γενετικές ανωμαλίες (Μικροελλείψεις του Y, σύνδρομο Klinefelter, μετάλλαξη γονιδίου Κυστικής Ίνωσης)
  - Ανοσολογικοί παράγοντες
  - Συστηματικά νοσήματα
  - Εξωγενείς παράγοντες (φάρμακα, τοξίνες, ακτινοβολία, καταχρήσεις τρόπου ζωής)
  - Ιδιοπαθής
-

## 2 ΑΝΔΡΙΚΟ ΓΕΝΝΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

### 2.1 ΑΝΑΤΟΜΙΑ: ΑΝΔΡΙΚΟ ΓΕΝΝΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

Το γεννητικό σύστημα του άνδρα αποτελείται από τους γεννητικούς αδένες, δηλαδή τους δύο όρχεις, την εκφορητική οδό, η οποία περιλαμβάνει την επιδιδυμίδα, τον σπερματικό πόρο, τη σπερματοδόχο κύστη, τον εκσπερματικό πόρο και τέλος το πέος. Επίσης στο γεννητικό σύστημα του άρρενος κατατάσσονται η ουρήθρα, ο προστάτης και οι βολβοουρηθραίοι αδένες (αδένες του Cowper).



Εικόνα 1: Απεικόνιση του ανδρικού γεννητικού συστήματος. <sup>(1)</sup>

#### 2.1.1 ΟΡΧΕΙΣ: ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ

Οι δύο όρχεις έχουν σχήμα ελλειψοειδές, μήκος 4-5cm και βάρος 12-15 gr. Βρίσκονται μέσα στο όσχεο και περιβάλλονται από μια σειρά χιτώνων, οι οποίοι επιτρέπουν την διατήρηση της θερμοκρασίας σε χαμηλότερα επίπεδα σε σύγκριση με το υπόλοιπο σώμα από σε 2 έως 5°C (*Middendorff et al., 2002*). Οι όρχεις είναι μικτοί αδένες, δηλαδή αποτελούνται από εξωκρινή και ενδοκρινή μοίρα, με την εξωκρινή να είναι υπεύθυνη για την παραγωγή των σπερματοζωαρίων και την ενδοκρινή για τη σύνθεση των ορμονών του ανδρικού αναπαραγωγικού συστήματος, με κυριότερη την τεστοστερόνη.

Εξωτερικά κάθε όρχις περιβάλλεται από έναν συμπαγή ινώδη χιτώνα που διακόπτεται μόνο στο σημείο εισόδου των αγγείων του, το οποίο λέγεται μεσαύλιο

του όρχι ή ιγμόρειο σώμα. Από το ιγμόρειο σώμα εκπορεύονται ινώδη πέταλα, τα λεγόμενα διαφράγματα, τα οποία έχουν ακτινοειδή διάταξη και καταλήγουν περιφερικά στον ινώδη χιτώνα. Τα διαφράγματα σχηματίζουν 250-300 ορχικά λοβία και σε κάθε λοβίο υπάρχουν 3-4 σπερματικά σωληνάρια. Τα σπερματικά σωληνάρια περιβάλλονται από ινώδη χιτώνα και από επιθήλιο που ονομάζεται σπερματικό επιθήλιο.

Η ιστολογική εικόνα του όρχι περιλαμβάνει δύο διακριτά τμήματα: τα σπερματικά σωληνάρια (tubules seminiferous) και τον διάμεσο ιστό (interstitial tissue). Αυτά τα δύο τμήματα, αν και εμφανίζονται ανατομικά ανεξάρτητα, έχουν πολλές λειτουργικές αλληλεπιδράσεις. Τα σπερματικά σωληνάρια χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη τριών τύπων κυττάρων: των κυττάρων Sertoli, των περισωληναριακών κυττάρων (peritubular cells) και των κυττάρων του γεννητικού επιθηλίου. Το σπερματικό σωληνάριο διαχωρίζεται σε δύο διαφορετικές ανατομικά και λειτουργικά περιοχές, τη βασική περιοχή (basal region), στην οποία συναντώνται οι πρόωρες μορφές των γεννητικών κυττάρων και την παρα-αυλική περιοχή (adluminal region), στην οποία καταλήγουν οι πιο ώριμες μορφές. Ο διάμεσος ιστός περιλαμβάνει τα κύτταρα Leydig και τα μυοειδή κύτταρα (myoid cells) και αποτελεί το 12-15% του όγκου του όρχεος με το 10-20% αυτού να αποτελούν τα κύτταρα Leydig.

Τα κύτταρα Leydig είναι σημαντικά κύτταρα τόσο λειτουργικά όσο και δομικά για τον όρχι. Κατά την ανάπτυξη του άρρενος, τα βλαστικά κύτταρα Leydig μετατρέπονται σε πρόδρομα, στη συνέχεια σε εμβρυικά και τέλος στα ώριμα κύτταρα Leydig που απαντώνται στον ενήλικο άρρεν (*Ge and Hardy, 2007*). Τα ενήλικα κύτταρα Leydig χαρακτηρίζονται μορφολογικά από την ύπαρξη πλούσιου λείου ενδοπλασματικού δικτύου και μιτοχονδρίων. Άλλες χαρακτηριστικές δομές των κυττάρων αυτών αποτελούν τα κοκκία λιποφουσκίνης, τα λιποσταγονίδια, όπου πραγματοποιούνται τα αρχικά στάδια σύνθεσης της τεστοστερόνης και τέλος οι ειδικές μορφές που καλούνται κρύσταλλοι Reinke (*Johnson et al., 1990*). Εκκρηκτικά προϊόντα των κυττάρων αυτών είναι οι στεροειδείς ορμόνες με πιο σημαντική την τεστοστερόνη και ο παράγοντας Insuline-Like factor 3 (INSL-3) (*Ferlin et al., 2006*). Ρυθμιστικοί παράγοντες για τη λειτουργία των κυττάρων Leydig είναι κυρίως η LH, αλλά και οι προφλεγμονώδης κυτοκίνες, διάφοροι νευροδιαβιβαστές και τέλος, αυξητικοί παράγοντες που παράγονται από τα κύτταρα Sertoli. Εκτός των κυττάρων Leydig στον ενδιάμεσο ιστό ανευρίσκονται κύτταρα του ανοσοποιητικού όπως μακροφάγα και λεμφοκύτταρα. Τα μακροφάγα πιθανολογείται πως επηρεάζουν τη λειτουργία των κυττάρων Leydig, δηλαδή τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και την παραγωγή των στεροειδών ορμονών, μέσω της έκκρισης κυτοκινών (*Mayerhofer et al., 1999*).

Τα περισωληναριακά κύτταρα είναι μυοϊνοβλάστες, οι οποίοι δημιουργούν πολλαπλές συγκεντρικές στοιβάδες γύρω από τα σπερματικά σωληνάρια (*Holstein et al., 1996*). Είναι υπεύθυνα για τη σύνθεση παραγόντων που σχετίζονται με τη συστατικότητα των κυττάρων, όπως η δεσμίνη, η ακτίνη και η μυοσίνη. Επίσης εκκρίνουν εξωκυττάρια ουσίες και παράγοντες που τυπικά χαρακτηρίζουν τον συνδετικό ιστό, όπως κολλαγόνο, λαμίνη, βιμεντίνη, φιμπρονεκτίνη, μόρια

προσκόλλησης και ινοβλάστες (*Albrecht et al., 2006, Schell et al., 2008*). Κύρια λειτουργία των περιωληναριακών κυττάρων είναι η προώθηση των σπερματοζωαρίων προς τα ευθεία σωληνάρια (*rete testis*).

Τα κύτταρα Sertoli είναι σωματικά κύτταρα που βρίσκονται μέσα στο γεννητικό επιθήλιο (*germinal epithelium*). Εκτείνονται από τη βασική μεμβράνη έως τον αυλό των σπερματικών σωληναρίων και έχουν σαν κύριο ρόλο τη στήριξη του σπερματικού επιθηλίου. Προεφηβικά παρουσιάζονται διάχυτα και με έντονη μιτωτική δραστηριότητα, ωστόσο ο πολλαπλασιασμός τους σταματά κατά την ενήβωση, όταν τα πρώτα γεννητικά κύτταρα μπούν στην διαδικασία της μείωσης, οπότε και δημιουργούνται στενές συνδέσεις (*tight junctions*) μεταξύ τους σχηματίζοντας τον αιματο-ορχικό φραγμό (*blood-testis barrier*) (*Johnson and Boekelheide, 2002*).

Τα κύτταρα Sertoli συνθέτουν και εκκρίνουν μια πληθώρα παραγόντων όπως πρωτεΐνες, κυτοκίνες, αυξητικούς παράγοντες, στεροειδείς και πεπτιδικές ορμόνες, προσταγλανδίνες, ρυθμιστές της κυτταρικής διαίρεσης κ.α. Εκτός από στηρικτική και εκκριτική λειτουργία, τα κύτταρα Sertoli παρουσιάζουν και έντονη φαγοκυτταρική δράση, καθώς τα κύτταρα αυτά είναι υπεύθυνα για την απομάκρυνση με φαγοκυττάρωση των σπερματοζωαρίων που δεν απελευθερώνονται στον αυλό (*Russell and Griswold, 1993*). Η μορφολογία των κυττάρων αυτών είναι αυστηρά συνδεδεμένη με τις ποικίλες φυσιολογικές τους λειτουργίες. Στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων υπάρχει ενδοπλασματικό δίκτυο, τόσο λείο (σύνθεση στεροειδών), όσο και αδρό (σύνθεση πρωτεϊνών), αναπτυγμένη συσκευή Golgi (επεξεργασία και μεταφορά εκκριτικών προϊόντων), λυσοσώματα κοκκία (φαγοκυττάρωση), όπως και μικροσωληνίσκοι και ινίδια που επιτρέπουν την προσαρμογή του σχήματος του κυττάρου κατά την διάρκεια των διαφορετικών φάσεων ωρίμανσης των γεννητικών κυττάρων (*Russell and Griswold, 1993*).

Μια από τις κυριότερες λειτουργίες των κυτάρων Sertoli είναι η υποστήριξη, ο λειτουργικός και ο τοπογραφός συντονισμός της σπερματογένεσης. Ακόμα, ο αριθμός των κυττάρων Sertoli καθορίζει τόσο τον όγκο του όρχι όσο και τον ρυθμό της σπερματογένεσης καθώς κάθε κύτταρο Sertoli είναι λειτουργικά και δομικά συνδεδεμένο με συγκεκριμένο αριθμό γεννητικών κυττάρων (περίπου δέκα σπερματογόνια άνα κύτταρο Sertoli στον άνθρωπο) (*Zhengwei et al., 1998*). Επιπλέον, τα κύτταρα Sertoli είναι υπεύθυνα για την έκκριση του υγρού στον αυλό των σωληναρίων, ώστε να διατηρείται η βατότητα του αυλού και τα σπερματοζωάρια να καταλήγουν σε ένα υγρό με ειδική σύσταση.

Ιδιαίτερης σημασίας είναι ο σχηματισμός του αιματο-ορχικού φραγμού, η ενεργοποίηση του οποίου συμπίπτει με την αρχή της πρώτης μειωτικής διαίρεσης των γεννητικών κυττάρων και την παύση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων Sertoli. Ο αιματο-ορχικός φραγμός αποτελείται από μεμβρανικές πρωτεΐνες στενών συνδέσεων (*tight junctions*), συνδέσεων που ονομάζονται δεσμοσώματα (*desmosome-like junctions*) και των χασμοσυνδέσεων (*gap junctions*). Στην δημιουργία της δομής αυτής συμβάλουν πλήθος ρυθμιστικών και δομικών πρωτεϊνών (*Pointis et al., 2010*).

Λειτουργικά ο αιματο-ορχικός φραγμός επιτρέπει επιλεκτικά την είσοδο νερού, ηλεκτρολυτών, ιόντων, ορμονών και ουσιών με παρακρινική δράση, ρυθμίζοντας με αυτόν τον τρόπο, τόσο το είδος όσο και την ποσότητα των ουσιών

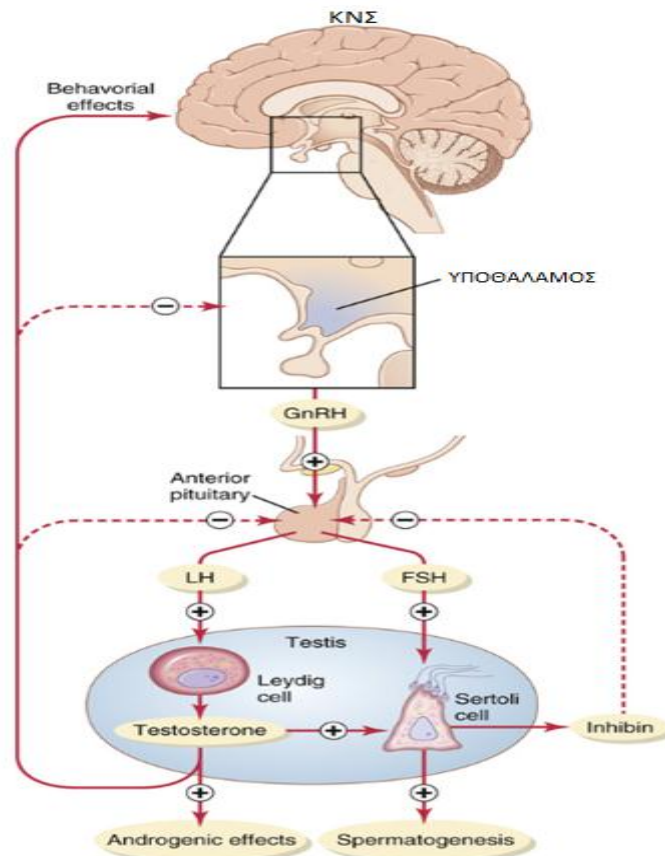
που απαιτούνται για την ανάπτυξη των σπερματίδων (Madara, 1998). Επίσης, ο αιματο-ορχικός φραγμός συντελεί στην μη αναγνώριση αντιγόνων, που εκφράζονται προσωρινά κατά την εξέλιξη των σπερματογόνιων, από το ανοσολογικό σύστημα του άνδρα και έτσι αποτρέπεται η παραγωγή αντισπερμικών αντισωμάτων (Fijak and Meinhardt, 2006).

## 2.2 ΟΡΜΟΝΟΛΟΓΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΑΝΔΡΙΚΟΥ ΓΕΝΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ

Η ρύθμιση του ανδρικού γεννητικού συστήματος βασίζεται στη λειτουργία του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-όρχεων. Πιο συγκεκριμένα, ο άξονας υποθαλάμου υπόφυσης είναι υπεύθυνος για την έκκριση των γοναδοτροπινών, οι οποίες ρυθμίζουν την ενδοκρινική λειτουργία των όρχεων και τη σπερματογένεση. Η εκλυτική ορμόνη των γοναδοτροπινών, η GnRH, εκλύεται ρυθμικά από τον υποθάλαμο με αιχμές κάθε 90-120 λεπτά, και στη συνέχεια καταλήγει διαμέσου της τοπικής μικροκυκλοφορίας στην υπόφυση, όπου διεγείρει την σύνθεση και περιοδική έκκριση των γοναδοτροπινών - της ωοθυλακιοτρόπου ορμόνης (Follicle Stimulation Hormone, FSH) και της ωχρινοτρόπου ορμόνης (Luteinizing Hormone, LH) (Elder and Dale, 2011). Η έκκριση αυτή υπόκειται σε αρνητική παλίνδρομη ρύθμιση με τη συμμετοχή ορμονών των όρχεων.

Οι LH και FSH δρούν στα κύτταρα των όρχεων αφού προηγουμένως συνδεθούν με τους υποδοχείς τους. Πιο συγκεκριμένα, η LH δρα στα κύτταρα Leydig και επάγει τη σύνθεση διαφόρων ανδρογόνων, με σημαντικότερο αυτών την τεστοστερόνη. Η τεστοστερόνη είναι ορμόνη με ιδιαίτερη σημασία για την ανάπτυξη του άρρενα, καθώς είναι υπεύθυνη για τη διαμόρφωση των γεννητικών οργάνων κατά την εμβρυϊκή ζωή, για την ανάπτυξη των δευτερευόντων χαρακτηριστικών του φύλου κατά την ενήβωση αλλά και για τη φυσιολογική πορεία της σπερματογένεσης (Weinauer, et al., 2010). Η FSH συνδέεται στους υποδοχείς της και δρα στα κύτταρα Sertoli, τα οποία παράγουν πρωτεΐνες όπως η ανασταλτίνη ή ινχιμπίνη (Inhibin), η αρωματάση και η δεσμευτική πρωτεΐνη ανδρογόνων (Androgen Binding Protein, ABP) (Walker and Cheng, 2005).

Σημαντικός παράγοντας στη ρύθμιση του αναπαραγωγικού άξονα αποτελεί ο αρνητικός παλίνδρομος μηχανισμός. Μέσω αυτού του μηχανισμού η τεστοστερόνη αναστέλλει την έκκριση της LH στον υποθάλαμο, διατηρώντας έτσι τη συγκέντρωση της στους όρχεις σε τέτοια επίπεδα ώστε να πραγματοποιείται φυσιολογικά η σπερματογένεση. Επίσης η ανασταλτίνη από τα κύτταρα Sertoli αναστέλλει την έκκριση της FSH (Boepple et al., 2008) και τέλος, οι FSH και LH παρέχουν αρνητική ανατροφοδότηση στον υποθάλαμο και επομένως ελέγχουν την απελευθέρωση της GnRH.



Εικόνα 2: Διαγραμματική απεικόνιση του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-όρχεων. Τα διακεκομμένα βέλη αναπαριστούν τον μηχανισμό αρνητικής παλίνδρομης ρύθμισης.<sup>(2)</sup>

## 2.3 ΠΟΡΕΙΑ ΓΕΝΝΗΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Τόσο οι γαμέτες του άρρενος όσο και του θήλεος ατόμου προέρχονται από ένα κοινό πληθυσμό κυττάρων που καλούνται αρχέγονα βλαστικά κύτταρα (primordial germ cells, PGCs). Αυτά τα κύτταρα γίνονται εμφανή κατά την 3η εβδομάδα ανάπτυξης του εμβρύου στη βάση της αλλαντοΐδας και στην πορεία πολλαπλασιάζονται μιτωτικά ώσπου κατά την 5η εβδομάδα μεταναστεύουν με αμοιβαδοειδείς κινήσεις στο τοίχωμα του οπίσθιου εντέρου και μέσω του ραχιαίου μεσεντερίου προς τις γοναδικές καταβολές, στις οποίες και εισβάλλουν κατά την 6η εβδομάδα (Fujimoto et al., 1977, Makabe et al., 1989). Οι γοναδικές καταβολές εμφανίζονται κατά την 4η εβδομάδα με την μορφή ενός ζεύγους επιμήκων ακρολοφιών, τις γεννητικές ακρολοφίες (genital ridges) ή γεννητικές ταινίες (De Felici, 2013). Έως την 6η εβδομάδα η αρχέγονη γονάδα παρουσιάζεται ίδια και στα δύο φύλα (Francavilla et al., 1990) και αποτελείται από το επιφανειακό επιθήλιο και το εσωτερικό βλάστημα, ενώ η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο SRY (Sex determination Region of the Y chromosome) αποτελεί τον καθοριστικό παράγοντα για την προώθηση της ανάπτυξης του άρρενος (Capel et al., 1999).

Στις αναπτυσσόμενες γονάδες του άρρενος τα αρχέγονα βλαστικά κύτταρα περιβάλλονται από τα επιθηλιακά κύτταρα των αρχέγονων φυλετικών χορδών. Τα

τελευταία μετά από διάφορα στάδια πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης θα αποτελέσουν τα στηρικτικά κύτταρα, τα κύτταρα Sertoli (*Kim et al., 2007, Piprek 2010*). Τα αρχέγονα γεννητικά κύτταρα διαφοροποιούνται σε σπερματογόνια τύπου A (spermatogonial stem cells type A), τα οποία διατάσσονται σε δύο ή τρεις στοιβάδες, στον αυλό των σπερματικών σωληναρίων και έρχονται σε επαφή με τα κύτταρα Sertoli.

### 2.3.1 ΣΠΕΡΜΑΤΟΓΕΝΕΣΗ

Η σπερματογένεση αποτελεί μια πολύπλοκη διαδικασία κυτταρικών διαιρέσεων και διαφοροποιήσεων που οδηγεί στον σχηματισμό των ώριμων γεννητικών κυττάρων (σπερματοζωαρίων) από πρόδρομες μορφές (σπερματογόνια). Είναι μια συνεχής διαδικασία αλλά με περιοδικότητα, που αρχίζει στην εφηβεία και συνεχίζεται σχεδόν σε όλη τη διάρκεια της ζωής του άνδρα. Η σπερματογένεση λαμβάνει χώρα στο σπερματικό επιθήλιο των σπερματικών σωληναρίων.

Η σύνθετη διαδικασία της διαίρεσης και διαφοροποίησης των γεννητικών κυττάρων ακολουθεί ένα πολύ ακριβές πρότυπο. Η συνολική διάρκεια της σπερματογένεσης διαρκεί 64 ημέρες, ωστόσο ορισμένοι ερευνητές θεωρούν ότι θα πρέπει να συμπεριληφθεί και το χρονικό διάστημα που απαιτεί το στάδιο της ανανέωσης των σπερματογόνιων, επομένως η συνολική διάρκεια ανέρχεται στις 74 ημέρες (*Amann, 2008*). Τα στάδια της σπερματογένεσης εμφανίζονται πλήρως ενορχηστρωμένα, τόσο χρονικά, όσο και τοπογραφικά, ολοκληρώνονται δε σύμφωνα με ένα ελικοειδές πρότυπο κατά μήκος των σπερματικών σωληναρίων (*Zannini et al., 1999*).

Η συνολική απόδοση σε σπερματοζωάρια της σπερματογένεσης καθορίζεται από τον αριθμό των σπερματογόνιων που θα εισέλθουν στη μείωση. Επιπλέον, καθοριστικό γεγονός είναι και η ενεργοποίηση της απόπτωσης στον όρχι καθώς ένα ποσοστό της τάξεως του 50% των σπερματογόνιων, των σπερματοκυττάρων αλλά και των σπερματίδων απομακρύνονται με την ενεργοποίηση του μηχανισμού του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (απόπτωση).

### 2.3.2 ΦΑΣΕΙΣ ΣΠΕΡΜΑΤΟΓΕΝΕΣΗΣ

Η διαδικασία της σπερματογένεσης μπορεί να χωριστεί σε τρεις φάσεις, η κάθε μια από τις οποίες σχετίζεται με συγκεκριμένο κυτταρικό τύπο γεννητικών κυττάρων:

- i. φάση πολλαπλασιασμού των σπερματογόνιων (Spermatocytogenesis)
- ii. φάση της μείωσης (meiosis)
- iii. φάση της σπερμιογένεσης (spermiogenesis)

#### i. ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ ΣΠΕΡΜΑΤΟΓΟΝΙΩΝ (Spermatocytogenesis)

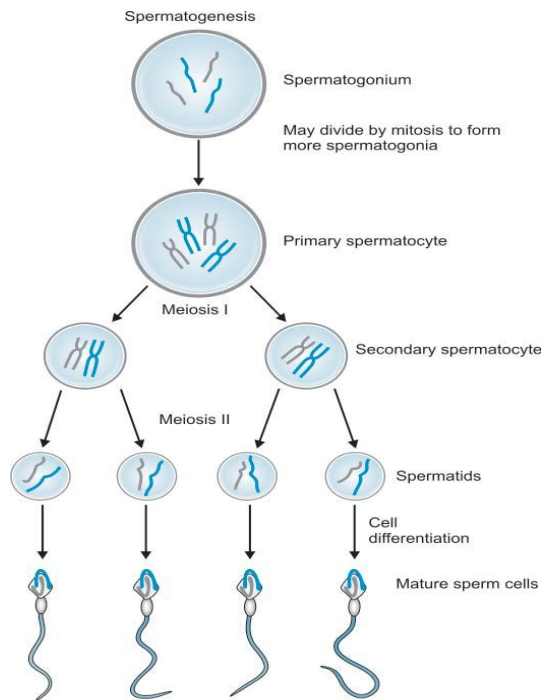
Στη φάση του πολλαπλασιασμού, τα σπερματογόνια διαιρούνται τόσο για να αντικαταστήσουν τα ίδια, όσο και για να παράγουν έναν αριθμό κυττάρων τα οποία θα μετατραπούν σε ώριμα σπερματοζωάρια. Με βάση την μορφολογία του πυρήνα τους τα σπερματογόνια διακρίνονται σε τρεις λειτουργικά διαφορετικούς τύπους: τα

τύπου A βαθυχρωματικά (dark-Ad), τα τύπου A ωχρά (pale-Ap) και τα τύπου B σπερματογόνια (Clermont, 1966a). Τα Ad σπερματογόνια δεν πολλαπλασιάζονται σε φυσιολογικές συνθήκες, αλλά αρχίζουν την μίτωση όταν ο πληθυσμός των σπερματογόνιων μειωθεί δραστικά. Με αυτόν τον τρόπο τα Ad σπερματογόνια είναι υπεύθυνα για την διατήρηση μιας δεξαμενής βλαστικών κυττάρων (Aponte, 2005). Αντιθέτως, τα Ap διαιρούνται μιτωτικά είτε προς δύο σπερματογόνια Ap (ανανέωση πληθυσμού) είτε προς δύο σπερματογόνια B (Clermont, 1966b). Τα τελευταία δημιουργούν κυτταρικές συνδέσεις μεταξύ μητρικών και θυγατρικών κυττάρων και αποτελούν καθοριστικό παράγοντα για την ποσοτική παραγωγή σπερματοζωαρίων. Τα σπερματογόνια τύπου B μετακινούνται στο παρα-αυλικό τμήμα όπου και διαιρούνται μιτωτικά προς σπερματοκύτταρα πρώτης τάξης. Η διάρκεια αυτής της φάσης είναι δεκαέξι ημέρες.

ii. ΜΕΙΩΣΗ (meiosis)

Στο πλησιέστερο προς την βασική μεμβράνη παρα-αυλικό τμήμα, τα κύτταρα υφίστανται δύο μειωτικές διαιρέσεις ώστε να δημιουργήσουν αρχικά δύο θυγατρικά δευτερογενή σπερματοκύτταρα και μετέπειτα τέσσερις πρόωρες σπερματίδες. Η μείωση αποτελεί κρίσιμη φάση της γαμετογένεσης, κατά την οποία γίνεται ανασυνδυασμός του γενετικού υλικού, μείωση του αριθμού των χρωμοσωμάτων και ανάπτυξη των σπερματίδων (Handel, 1998). Είναι η διαδικασία λοιπόν κατά την οποία τα διπλοειδή σπερματογόνια που περιέχουν 46 χρωμοσώματα μετατρέπονται σε απλοειδείς σπερματίδες με 23 χρωμοσώματα. Τα σπερματογόνια τύπου B ( $2n,2c$ ) μετατρέπονται σε σπερματοκύτταρα πρώτης τάξης, τα οποία προχωρούν σε διπλασιασμό του DNA, κατά την φάση S του κυτταρικού τους κύκλου ( $2n,4c$ ). Μετά την πρώτη μειωτική διαίρεση προκύπτουν τα σπερματοκύτταρα δεύτερης τάξης ( $1n,2c$ ) τα οποία περιέχουν απλοειδή αριθμό χρωμοσωμάτων, διπλασιασμένο. Τα κύτταρα περνούν από αυτό το στάδιο γρήγορα και συμπληρώνεται η δεύτερη μειωτική διαίρεση. Μετά τη δεύτερη μειωτική διαίρεση, από ένα σπερματοκύτταρο πρώτης τάξης θα έχουν σχηματιστεί τέσσερις σπερματίδες ( $1n,1c$ ), όπου η κάθε μια θα περιέχει μια απλοειδική ομάδα χρωμοσωμάτων (Handel et al., 2010). Να σημειωθεί ότι το n συμβολίζει το απλοειδές ή διπλοειδές αριθμό χρωμοσωμάτων, ενώ το c αντιπροσωπεύει τον αριθμό των αντιγράφων του DNA. Η πρόφαση της πρώτης μείωσης διαρκεί 1-3 εβδομάδες, ενώ οι υπόλοιπες φάσεις και ολόκληρη η δεύτερη μειωτική διαίρεση ολοκληρώνονται σε 1-2 ημέρες. Οι σπερματίδες συνεχίζουν την διαδικασία ωρίμανσης ώστε να προκύψουν τελικά τα ώριμα σπερματοζωάρια.





Εικόνα 3: Διαγραμματική απεικόνιση των σταδίων της σπερματογένεσης.<sup>(3)</sup>

### iii. ΣΠΕΡΜΙΟΓΕΝΕΣΗ (spermiogenesis)

Η σπερμιογένεση (spermiogenesis) είναι η μακρά φάση της σπερματογένεσης κατά την οποία οι απλοειδείς σπερματίδες μετατρέπονται σε σπερματοζώαρια και πραγματοποιείται σε μικρές εσοχές στην προσαύλια επιφάνεια των κυττάρων Sertoli. Οι σπερματίδες είναι στρογγυλά, μιτωτικά ανενεργά κύτταρα τα οποία μπαίνουν σε διαδικασία διαφοροποίησης με τελικό προϊόν τις επιμηκυσμένες σπερματίδες και στη συνέχεια τα ώριμα σπερματοζώαρια. Η διαφοροποίηση περιλαμβάνει μεταβολές όπως η συμπίκνωση και δομική αλλαγή του σχήματος του πυρήνα, η αντικατάσταση των ιστονών από μεταβατικές πρωτεΐνες και η ανταλλαγή με τις πρωταμίνες καθώς και η αποβολή του μεγαλύτερου τμήματος του κυτταροπλάσματος. Η σπερμιογένεση διακρίνεται σε τέσσερα στάδια: το στάδιο Golgi, το στάδιο της καλύπτρας (στάδιο Cap), το στάδιο του ακροσώματος (acrosomal) και το στάδιο ωρίμανσης.

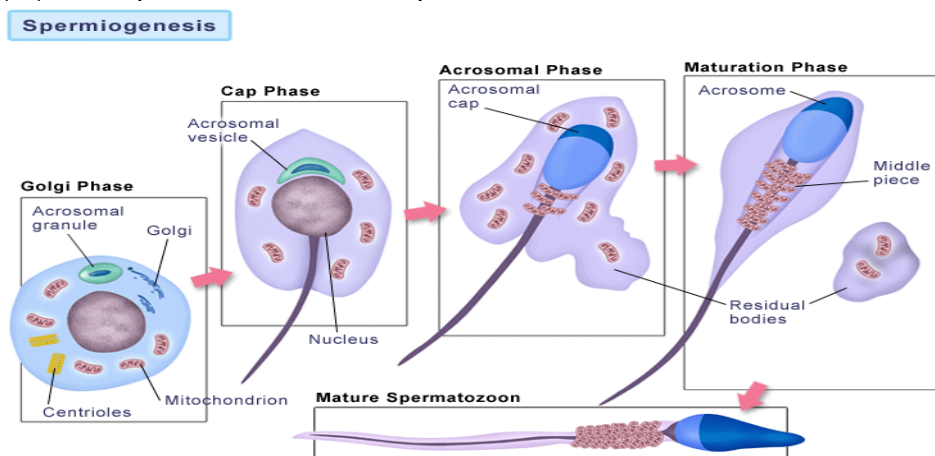
Κατά το στάδιο Golgi, σχηματίζονται τα προ-ακροσωμικά κυστίδια με υδρολυτικά ένζυμα στη συσκευή Golgi. Στην συνέχεια τα προ-ακροσωμικά κυστίδια συνενώνονται ώστε να σχηματιστεί τελικά το ακροσωμιακό κυστίδιο, το οποίο καθορίζει τον πρόσθιο πόλο του αναπτυσσόμενου σπερματοζωαρίου (*Moreno et al., 2000*), ενώ παράλληλα το κεντρόσωμα, που αποτελείται από τα δύο κεντριόλια κατευθύνεται στον οπίσθιο πόλο. Από αυτό το στάδιο ξεκινά και ο σχηματισμός του αξονήματος, το οποίο αποτελείται από δύο εσωτερικά και εννέα εξωτερικά διπλά μικροσωληνάρια (*Oko, 1998*) και αποτελεί τον κινητήριο μηχανισμό της ουράς των σπερματοζωαρίων.

Κατά τη φάση της καλύπτρας ολοκληρώνεται ο σχηματισμός της ακροσωμικής καλύπτρας με επιπέδωση του ακροσωμιακού κυστιδίου, καθώς επίσης συνεχίζεται και η ανάπτυξη του αξονήματος. Σε αυτή τη φάση καθορίζεται ο προσανατολισμός της σπερματίδας ώστε το ακρόσωμα να κατευθύνεται προς τη

βασική μεμβράνη του τοιχώματος του σπερματικού σωληναρίου και το αναπτυσσόμενο αξόνημα προς τον αυλό.

Στο επόμενο στάδιο, το στάδιο του ακροσώματος παρατηρείται η επιπέδωση και η επιμήκυνση του πυρήνα. Παράλληλα το κυτταρόπλασμα μετατοπίζεται μεταξύ της ακροσωμιακής καλύπτρας και της πρόσθιας κυτταρικής μεμβράνης προς το οπίσθιο τμήμα του κυττάρου. Ακόμα, δημιουργείται ένας περιπυρηνικός δακτύλιος με μικροσωληνικούς, ο οποίος συμβάλλει στην επιμήκυνση του πυρήνα. Σε αυτό το στάδιο αρχίζει και η συμπίκνωση του πυρήνα με αντικατάσταση των ιστονών από τις πρωταμίνες (Meistrich et al., 2003).

Κατά το στάδιο της ωρίμανσης ολοκληρώνεται η συμπίκνωση του πυρήνα. Επιπλέον δημιουργείται ο αυχέννας του σπερματοζωαρίου που αποτελεί το συνδετικό τμήμα μεταξύ κεφαλής και ουράς ενώ παράλληλα τα μιτοχόνδρια τοποθετούνται σε ελικοειδή διάταξη στο μέσο τμήμα του σπερματοζωαρίου (Cataldo et al., 1996). Κρίσιμο γεγονός στη συγκεκριμένη φάση της ωρίμανσης αποτελεί η αποβολή της περίσσειας του κυτταροπλάσματος, το υπολειμματικό σωματίο (residual body), το οποίο φαγοκυτταρώνεται από τα κύτταρα Sertoli (Oko et al., 1993).



Εικόνα 4: Συνολική παρουσίαση των σταδίων της σπερμιόγνεσης.<sup>(4)</sup>

Η απελευθέρωση των σπερματοζωαρίων από τα κύτταρα Sertoli στον αυλό των σπερματικών σωληναρίων (spermiation) είναι μια διαδικασία η οποία μπορεί να επηρεαστεί από ορμόνες, από την θερμοκρασία και από τοξίνες. Ωστόσο τα σπερματοζωάρια που εγκαταλείπουν τον όρχι δεν είναι ικανά να γονιμοποιήσουν το ωάριο. Αυτή την ικανότητα την αποκτούν τα σπερματοζωάρια καθώς περνούν στην επιδιδυμίδα (epididymal maturation) (Bedford et al., 1973). Η επιδιδυμίδα διακρίνεται σε τρία τμήματα: την κεφαλή (caput epididymis), το σώμα (corpus epididymis) και την ουρά (cauda epididymis). Κατά την παραμονή του στην επιδιδυμίδα το σπερματοζωάριο, ωριμάζει περαιτέρω και αποκτά την ικανότητα να αλληλεπιδρά με την διάφανη ζώνη (zona pellucida) του ωαρίου. Πολλά αντιγόνα που συντίθενται ως πρόδρομες μορφές στον όρχι και έχουν ρόλο στη σύνδεση και στη σύντηξη με το ωάριο ενεργοποιούνται στην επιδιδυμίδα. Επιπλέον τροποποιήσεις των σακχάρων των γλυκοπρωτεϊνών και των λιπιδίων της μεμβράνης οδηγούν σε μεταβολές στη φυσιολογία αλλά και στη χημική τους σύσταση, γεγονότα που επιτρέπουν στο σπερματοζωάριο να αλληλεπιδρά με το ωάριο (Haidl and Opper, 1997). Αν και οι

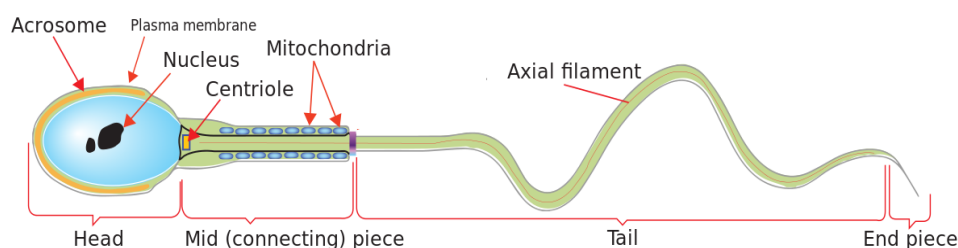
απαραίτητες μορφολογικές και δομικές αλλαγές του μαστιγίου έχουν γίνει κατά τα πρώιμα στάδια της σπερμιογένεσης, τα ορχικά σπερματοζώαρια είναι ακίνητα. Τα σπερματοζώαρια της κεφαλής της επιδιδυμίδας ξεκινούν να εμφανίζουν κίνηση και μέχρι να φτάσουν στην ουρά της επιδιδυμίδας έχουν πλήρως αποκτήσει την ικανότητα της πρόσθιας κίνησης (Cooper, 1995). Η μετακίνηση μέσα στην επιδιδυμίδα διαρκεί περίπου επτά ημέρες. Αυτή η μετακίνηση επιτυγχάνεται με τη σύσπαση των λείων μυών του επιθηλίου της επιδιδυμίδας, βοηθούμενη από τη συνεχή κίνηση του υγρού μέσα σε αυτήν. Η ειδική σύσταση του υγρού της επιδιδυμίδας συμβάλλει τόσο στην ωρίμανση του σπερματοζωαρίου όσο και στην προστασία του, καθώς πολλά συστατικά, όπως η καταλάση, η δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD), η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX) και η ρεδουκτάση της γλουταθειόνης (GRD) λειτουργούν ως αντιοξειδωτικά (Williamson *et al.* 1998). Τελικά τα ώριμα και πλήρως λειτουργικά σπερματοζώαρια αποθηκεύονται στην ουρά της επιδιδυμίδας μέχρι τη στιγμή της εκσπερμάτισης.

### 3 ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΟ

#### 3.1 ΔΟΜΗ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΟΥ

Το ώριμο σπέρματοζώαριο που προκύπτει μετά το τέλος της σπερμιόγνεσης είναι ένα κύτταρο με χαρακτηριστική δομή, η οποία αντανακλά και την πιο βασική λειτουργία του, τη μεταφορά του γενετικού υλικού του άρρενος στο ωάριο κατά τη γονιμοποίηση. Το ανθρώπινο σπέρματοζώαριο είναι ένα επίμηκες κύτταρο, μήκους περίπου 60 μm και πλάτους που κυμαίνεται από 1.0 έως 3.0 μm, το οποίο αποτελείται από την κεφαλή, τον αυχένα, και την ουρά (*Menkveld et al., 2011*).

Η κεφαλή του σπέρματοζωαρίου έχει ωοειδές σχήμα, με μήκος 3.0-5.0 μm, πλάτος 2.0-3.0 μm και πάχος 1.5 μm (*Menkveld et al., 2011*). Αποτελείται από έναν πεπλατυσμένο πυρήνα, ο οποίος περιέχει το γενετικό υλικό, σε μια πολύ συμπαγή δομή και το ακρόσωμα ή ακροσωμική καλύπτρα. Το ακρόσωμα είναι ένα εκκριτικό κυστίδιο με διπλό τοίχωμα, το οποίο έχει προέλθει από την συσκευή Golgi κατά την σπερμιόγνεση και βρίσκεται μεταξύ της πλασματικής μεμβράνης, η οποία καλύπτει ολόκληρο το σπέρματοζώαριο και του πρόσθιου τμήματος της κεφαλής. Το ακρόσωμα περιέχει ένζυμα όπως η ακροσίνη, η υαλουρονιδάση και άλλα υδρολυτικά ένζυμα που διαδραματίζουν κύριο ρόλο στη διαδικασία της γονιμοποίησης. Το ενδιάμεσο τμήμα της κεφαλής έχει ιδιαίτερη σημασία καθώς μαζί με το πρόσθιο τμήμα της μετα-ακροσωμικής περιοχής είναι τα πρώτα σημεία που γίνεται η αλληλεπίδραση με την πλασματική μεμβράνη του ωαρίου κατά τη γονιμοποίηση.



Εικόνα 5 : Δομή ανθρώπινου σπέρματοζωαρίου. <sup>(5)</sup>

Ο αυχένας του σπέρματοζωαρίου είναι το κορυφαίο τμήμα της ουράς και συνδέει την κεφαλή με την υπόλοιπη ουρά. Στον αυχένα του σπέρματοζωαρίου βρίσκεται και το κεντριόλιο, ένα οργανίδιο το οποίο κατά τη σπερμιόγνεση συμβάλλει στη δημιουργία του αξονήματος και ένα συνδετικό τμήμα που σχηματίζει τους εννέα ινώδεις δακτυλίους που περιβάλλουν το αξόνημα.

Η ουρά ή μαστίγιο του σπέρματοζωαρίου διακρίνεται σε τρεις επιμέρους περιοχές: το μέσο τμήμα, το κυρίως τμήμα και το τελικό τμήμα. Το αξόνημα είναι η δομή που διατρέχει όλη την ουρά και είναι υπεύθυνη για την κινητικότητα του σπέρματοζωαρίου. Το αξόνημα είναι ένας εξειδικευμένος κροσσός με εννέα

περιφερικές δυάδες μικροσωληνίσκων γύρω από ένα κεντρικό ζεύγος μικροσωληνίσκων. Το μέσο τμήμα του σπερματοζωαρίου περιέχει το αξόνημα που περιβάλλεται από εννέα παχείς επιμήκεις ίνες και μια εξωτερική ζώνη μιτοχονδρίων. Η υψηλή συσσώρευση των μιτοχονδρίων στο σημείο αυτό διασφαλίζει τη σύνθεση ATP ώστε να είναι δυνατή η κίνηση και η επιβίωση των σπερματοζωαρίων. (*Oko and Clermont, 1990*). Επιπλέον πρωτεϊνικές δομές όπως οι βραχιόνες δυνείνης περιβάλλουν το αξόνημα, ενισχύοντας την κίνηση του μαστιγίου (*Turner, 2003*). Το κυρίως τμήμα αποτελείται από το αξόνημα περιβαλλόμενο από τις εννέα παχείς επιμήκεις ίνες και πολυάριθμες εξωτερικές κυκλικές ίνες. Το τελικό τμήμα αποτελείται μόνο από το αξόνημα, το οποίο περιβάλλεται από την πλασματική μεμβράνη.

### **3.2 ΔΟΜΗ & ΣΥΜΠΥΚΝΩΣΗ ΤΟΥ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ ΣΤΟ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΟ**

Στα σωματικά κύτταρα βασική δομική μονάδα της χρωματίνης είναι το νουκλεόσωμα, το οποίο αποτελείται από ίσες μάζες DNA και ιστονών. Πιο συγκεκριμένα, οι πυρήνες των νουκλεοσωμάτων (core particles) φτιάχνονται από 146 ζεύγη βάσεων αριστερόστροφα τυλιγμένες γύρω από ένα οκταμερές ιστονών. Οι ιστόνες (H1, H2A, H2B, H3 και H4) είναι μικρές θετικά φορτισμένες πρωτεΐνες, που δημιουργούν ιονικούς δεσμούς με το αρνητικά φορτισμένο DNA. Οι ιστόνες H3 και H4 συνδέονται και σχηματίζουν ένα H3-H4 διμερές, ενώ δύο τέτοια διμερή δημιουργούν ένα τετραμερές γύρω από το οποίο ελίσσονται οι έλικες του DNA. Στις δύο πλευρές του τετραμερούς συνδέονται τα ετεροδιμερή H2A και H2B, ενώ δύο γειτονικά νουκλεοσώματα συνδέονται με μια ιστόνη H1 (*Lewin, 2003*). Καθώς το DNA περιελίσσεται γύρω από τα οκταμερή των ιστονών προκαλείται μια υπερελίκωση του DNA γεγονός που έχει σαν αποτέλεσμα τελικά την ύπαρξη αρνητικής υπερελίκωσης του DNA. Τα νημάτια νουκλεοσωμάτων συμπυκνώνονται περισσότερο στα σωληνοειδή, που συμπυκνώνονται περαιτέρω σε θηλιές οι οποίες συνδέονται ανά 10-100.000 βάσεις με μη ιστόνες ή πρωτεΐνες σκελετού (scaffold ή matrix) (*Lewin, 2003*).

Η χρωματίνη των σπερματοζωαρίων διαφέρει σε σύγκριση με αυτή των σωματικών κυττάρων τόσο ως προς τη σύσταση όσο και ως προς τη δομή της. Κατά τη σπερμιογένεση συντελούνται δραστικές αλλαγές στη χρωματίνη των σπερματοζωαρίων, με κυριότερη την αντικατάσταση των ιστονών από μεταβατικές πρωτεΐνες και στη συνέχεια από πρωταμίνες. Αυτές οι αντικαταστάσεις έχουν σαν στόχο την συμπύκνωση του DNA, καθώς η δομή της χρωματίνης στα σπερματοζωάρια εμφανίζει την πιο συμπυκνωμένη μορφή της ανάμεσα σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα (*Manicardi et al., 1995*). Αυτή η συμπαγής δομή επιτρέπει την προστασία του DNA κατά την μεταφορά του από το ανδρικό γεννητικό σύστημα στο γυναικείο και έτσι το πατρικό DNA καταλήγει ανέπαφο στο ωάριο. Ο όγκος του πυρήνα του σπερματοζωαρίου είναι σημαντικά μικρότερος σε σύγκριση με αυτόν των

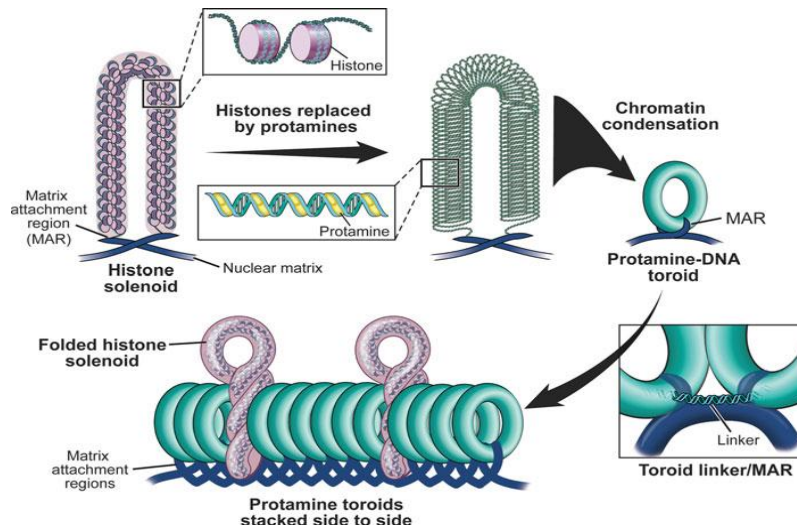
σωματικών κυττάρων, για τον λόγο αυτό είναι απόλυτα απαραίτητη η διαμόρφωση ειδικής δομής και σύστασης για το πατρικό γενετικό υλικό (*Brewer et al., 2002*). Αυτή η πιο συμπαγής δομή επιτυγχάνεται με την αντικατάσταση των ιστονών από τις πρωταμίνες.

Στον άνθρωπο εκφράζονται δύο τύποι πρωταμινών, σε σχεδόν ίσες ποσότητες: η πρωταμίνη 1 (P1), η οποία συντίθεται ως ώριμο μόριο και η πρωταμίνη 2 (P2), η οποία προκύπτει μετά από πρωτεόλυση της πρόδρομης μορφή της (*Balhorn et al., 2000*). Συγκριτικά με τις ιστόνες, οι πρωταμίνες έχουν μικρότερο μοριακό βάρος και είναι περίπου 50% πιο βασικές. Επίσης, περιέχουν σε μεγάλο βαθμό θετικά φορτισμένα αμινοξέα ιδιαίτερος αργινίνη, και είναι πλούσιες σε κατάλοιπα κυστεΐνης (*Manicardi et al., 1995*). Τα κατάλοιπα κυστεΐνης διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην επίτευξη σταθερότητας της χρωματίνης καθώς δημιουργούν δισουλφιδικούς δεσμούς μεταξύ τους, οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για τη διατήρηση του υψηλού βαθμού συμπύκνωσης της χρωματίνης και επομένως της φυσιολογικής λειτουργίας του σπερματοζωαρίου (*Balhorn et al., 2000*).

Κατά τη σπερμιόγνεση, οι πρωταμίνες αντικαθιστούν σταδιακά τις σωματικές ιστόνες. Αρχικά οι ιστόνες αντικαθίστανται από μεταβατικές πρωτεΐνες σε μια διαδικασία που εμπλέκει έντονη επαναδιάταξη του DNA (*Meistrich et al., 2003*). Στο επόμενο στάδιο των επιμηκυσμένων σπερματίδων οι μεταβατικές πρωτεΐνες αντικαθίστανται από τις πρωταμίνες. Αυτή η διαδοχική διαδικασία διευκολύνει τη μοριακή διαμόρφωση του πατρικού γονιδιώματος εντός του πυρήνα των σπερματίδων (*Carrell et al., 2007*) και πιθανώς είναι απαραίτητη για την επανενεργοποίηση του πατρικού γενώματος μετά τη γονιμοποίηση (*Aoki and Carrell, 2003*).

Οι πρωταμίνες προσδένονται στη μεγάλη αύλακα του DNA και με αυτόν τον τρόπο εξουδετερώνουν την αρνητική φόρτιση της διπλής έλικας του DNA, μεταμορφώνοντας το σε ένα ουδέτερο φορτισμένο πολυμερές (*Shaman and Ward, 2006*). Οι πρωταμίνες συμπυκνώνουν το DNA σχηματίζοντας μια συμπαγή δομή που καλείται τοροϊδές (toroids), το οποίο περιέχει περίπου 50 kb DNA. Ένα επιπλέον σημαντικό στοιχείο στη διαμόρφωση του DNA με την πρόσδεση των πρωταμινών αποτελεί η λιγότερο ελικωμένη δομή που διαμορφώνεται. Σε αντίθεση με την υπερελικωση του DNA (δηλαδή η ελίκωση της διπλής έλικας του DNA γύρω από τον εαυτό της) που παρατηρείται στα σωματικά κύτταρα, όπου οι ιστόνες προσδένονται σε κάθε 100 kb, στον πυρήνα του σπερματοζωαρίου, οι πρωταμίνες ελικώνουν το DNA περίπου σε κάθε 600kb. Έτσι το DNA πακετάρεται πιο συμπυκνωμένα, αλλά με μικρότερο βαθμό ελίκωσης (*Shaman and Ward, 2006*). Το DNA του σπερματοζωαρίου εμφανίζει ωστόσο ομοιότητα συγκριτικά με αυτό των σωματικών κυττάρων καθώς σχηματίζει θηλιές, όπου η καθεμία περιλαμβάνει 50 kb, μέγεθος ίδιο με το μέγεθος των τοροειδών. Κάθε τοροϊδές πρωταμινών συνδέεται με μια περιοχή σύνδεσης τοροειδών, η οποία παρουσιάζει μεγαλύτερη ευαισθησία σε βλάβες από ένζυμα όπως οι τοποϊσομεράσες. Κατά τη διαδικασία της αντικατάστασης των ιστονών ένα ποσοστό περίπου 15% παραμένει συνδεδεμένο στο DNA, γεγονός που δημιουργεί τμήματα του DNA λιγότερο συμπαγή, που βρίσκονται κυρίως στις ακολουθίες των τελομερών ή στις περιοχές σύνδεσης με την πυρηνική ουσία (matrix attachment region, MARs). Τα τμήματα αυτά θα μπορούσε να σχετίζονται με

οικογένειες γονιδίων που είναι σημαντικές για την κυτταρική διαφοροποίηση και την πρόωμη εμβρυϊκή ανάπτυξη (Ward, 2010).



Εικόνα 6: Οργάνωση του DNA στο σπερματοζωάριο. Η μεγαλύτερη ποσότητα του DNA είναι συμπυκνωμένη στα τοροΐδη, τα οποία είναι τοποθετημένα στην σειρά με σκοπό την μεγαλύτερη συμπύκνωση. Αυτή η δομή του τοροΐδους σταθεροποιείται χάρη στην ύπαρξη των πρωταμινών, οι οποίες εξουδετερώνουν την υπερ ελίκωση της δομής. Η ωρίμανση του σπερματοζωαρίου εμπλέκει την αντικατάσταση μέρους των ιστονών από τις πρωταμίνες, επιτρέποντας έτσι την φυσιολογική μεταφορά του πατρικού γονιδιώματος κατά την γονιμοποίηση.<sup>(6)</sup>

## 4 ΑΠΟΠΤΩΣΗ ΚΑΙ ΚΑΣΠΑΣΕΣ

### 4.1 ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ

Ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος (programmed cell death, PCD) ή απόπτωση, αποτελεί μια βιολογική διαδικασία η οποία διατηρήθηκε κατά τη φυλογενετική εξέλιξη των πολυκύτταρων οργανισμών και ρυθμίζει τη φυσιολογική ομοιόσταση τους. Η απόπτωση βασίζεται σε ένα γενετικό προγραμματισμό που είναι αναπόσπαστο κομμάτι της ανάπτυξης και λειτουργίας των οργανισμών και που έχει σαν στόχο να εξαλείψει ανεπιθύμητα ή μη αναγκαία κύτταρα με έναν εξειδικευμένο τρόπο. Αρχική αναφορά στο φαινόμενο της απόπτωσης έγινε από τον Flemming Walther το 1885 και μετέπειτα από τον γερμανό επιστήμονα Vogt Karl το 1942. Ωστόσο πιο ολοκληρωμένη περιγραφή της απόπτωσης και η διάκριση της από το φαινόμενο της νέκρωσης έγινε από τους Kerr, Wyllie και Currie το 1972 (*Kerr et al., 1972*). Για πολλά χρόνια η απόπτωση ήταν ταυτισμένη με την έννοια του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, ενώ πλέον υπάρχουν δεδομένα που υποστηρίζουν την ύπαρξη ξεχωριστών μοντέλων κυτταρικού θανάτου, όπως είναι η νέκρωση και ο αυτοφαγικός κυτταρικός θάνατος.

Ο σαφής διαχωρισμός μεταξύ των ειδών του κυτταρικού θανάτου έγινε εφικτός χάρη στα διαφορετικά μορφολογικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά των φαινομένων αυτών. Η διαδικασία της απόπτωσης συνοδεύεται από χαρακτηριστικές μεταβολές στη μορφολογία του κυττάρου όπως η συρρίκνωση του, η εμφάνιση χαρακτηριστικών προεξοχών (blebbing) στην κυτταρική μεμβράνη, η συμπύκνωση της χρωματίνης, η κατάτμηση του γενετικού υλικού και τέλος η διάσπαση του πυρήνα και ο εγκλεισμός του σε αποπτωτικά κυστίδια. Βιοχημικά χαρακτηριστικά της απόπτωσης αποτελούν ο κατακερματισμός του DNA μεταξύ των νουκλεοσωμάτων που οδηγεί σε ολιγονουκλεοσωμική κλίμακα (laddering) και η μερική αναστροφή της κυτταρικής μεμβράνης με την εμφάνιση στην εξωτερική πλευρά της του φωσφολιπιδίου φωσφατιδυλοδερίνης (PS). Ένα βασικό χαρακτηριστικό του φαινομένου της απόπτωσης είναι ο σχηματισμός των αποπτωτικών σωματίων τα οποία φαγοκυτταρώνονται, χωρίς τη δημιουργία φλεγμονώδους αντίδρασης (*Ziegler and Groscurth, 2004*).

Σε αντίθεση με την απόπτωση, που προσβάλλει μονήρη κύτταρα, η νέκρωση παρατηρείται σε ομάδες κυττάρων μετά από ένα επιβλαβές ερέθισμα και αποτελεί ένα παθητικό και ανεξέλεγκτο πρότυπο κυτταρικού θανάτου. Μορφολογικές αλλοιώσεις που παρατηρούνται στα κύτταρα κατά την νέκρωση είναι η διόγκωση του κυττάρου και των οργανιδίων του, ενώ στον πυρήνα είναι εμφανής η συγκέντρωση της χρωματίνης σε ένα μη οργανωμένο πρότυπο και η αποδόμηση του γενετικού υλικού με τυχαία διασπορά. Στο τελικό στάδιο της νέκρωσης παρατηρείται απώλεια της ακεραιότητας της κυτταρικής μεμβράνης, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση των



κυτταρικών στοιχείων στον εξωκυττάριο χώρο και την πρόκληση φλεγμονής (Ziegler and Groscurth, 2004).

Τέλος, αν και το φαινόμενο της αυτοφαγίας είναι ένα καλά μελετημένο κυτταρικό γεγονός, η άποψη ότι μπορεί να αποτελεί ένα διαφορετικό πρότυπο κυτταρικού θανάτου δεν έχει ακόμα παγιωθεί (Green and Llambi, 2015). Η αυτοφαγία αποτελεί έναν μηχανισμό κυτταρικής αυτο-αποδόμησης, μέσω του οποίου τα κύτταρα ανακυκλώνοντας τα κυτταροπλασματικά τους συστατικά, αντλούν ATP και πρωτεΐνες, ενώ αποβάλλουν πλεονάζοντα ή αλλοιωμένα οργανίδια (π.χ μιτοχόνδρια). Ο μηχανισμός της αυτοφαγίας ενεργοποιείται στα φυσιολογικά κύτταρα με σκοπό την επιβίωση τους σε δυσμενείς καταστάσεις ή σε περιπτώσεις που απαιτείται η διατήρηση της ακεραιότητας του γονιδιώματος τους. Μορφολογικά, χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη μεμβρανών που απομονώνουν κυτταρικά τμήματα και από κυστίδια που αποτελούνται από διπλή μεμβράνη και που είναι ικανά να κατακρατούν και να επεξεργάζονται το κυτταροπλασματικό φορτίο (Douglas and Llambi, 2015). Φαίνεται πως ο μηχανισμός της αυτοφαγίας συνδέεται περισσότερο με προσπάθεια επιβίωσης του κυττάρου. Πειραματικές όμως μελέτες στο έντομο *Drosophila melanogaster* υποδεικνύουν πως γονίδια που εμπλέκονται στον αυτοφαγικό μηχανισμό μπορούν να τροποποιήσουν το μονοπάτι του κυτταρικού θανάτου (Denton et al., 2009).

## 4.2 ΚΑΣΠΑΣΕΣ

### 4.2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Ο μηχανισμός του φαινομένου της απόπτωσης κατανοήθηκε σε μεγάλο βαθμό χάρη στην αναγνώριση της λειτουργίας της οικογένειας των κασπασών. Οι κασπάσες αποτελούν οικογένεια πρωτεασών κυστεΐνης, που φέρουν στο ενεργό τους κέντρο ένα κατάλοιπο κυστεΐνης και διασπών το υπόστρωμα τους κατατμίζοντας το μετά από ένα κατάλοιπο ασπαρτικού οξέος (caspase: cysteinyl aspartate-specific proteinase ή cysteinyl aspartate-specific proteinase).

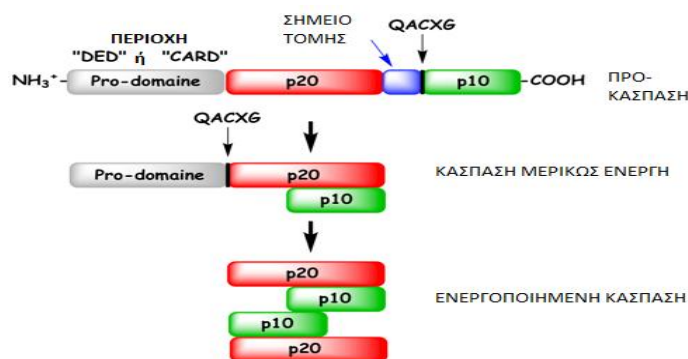
Το μετατρεπτικό ένζυμο της ιντερλευκίνης 1β (ICE, η οποία μετέπειτα ονομάστηκε κασπάση-1) είναι η πρώτη κασπάση που αναγνωρίστηκε και έγινε κατανοητός ο ρόλος της στην πρωτεολυτική ωρίμανση της προ-ιντερλευκίνης-1β στην προφλεγμονώδη, βιολογικά ενεργή μορφή της (Cerreti et al., 1992, Thornberry et al., 1992). Με αυτή την ανακάλυψη έγινε σαφές ότι η νέα αυτή τάξη πρωτεασών κυστεΐνης χαρακτηρίζεται από διακριτά δομικά στοιχεία και από την ύπαρξη ενός καταλοίπου ασπαρτικού οξέος σε συγκεκριμένη θέση του υποστρώματος.

Σχεδόν την ίδια χρονική περίοδο, ανακαλύφθηκε το μονοπάτι κυτταρικού θανάτου στον νηματώδη σκώληκα *Caenorhabditis elegans* (Ellis et al., 1991). Ένα από τα γονίδια του μονοπατιού, το *ced-3* φάνηκε να κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη (CED) που είναι υπεύθυνη για τον αποπτωτικό θάνατο πληθυσμού 131 σωματικών

κυττάρων κατά τη φυσιολογική ανάπτυξη του *C. elegans*. Μετά την κλωνοποίηση και την αλληλούχιση του γονιδίου αποκαλύφθηκε η ομολογία της πρωτεΐνης CED με την πρωτεΐνη ICE των θηλαστικών. Έγινε λοιπόν δυνατό να συσχετιστεί η πρωτεΐνη ICE με το μονοπάτι του κυτταρικού θανάτου στα θηλαστικά. Πιο συγκεκριμένα, αποκτήθηκαν πληροφορίες σχετικά με την πρωτεόλυση των κασπασών, ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό των πρωτεϊνών αυτών και ταυτοποιήθηκαν τα «θύματα» τους. Οι παρατηρήσεις αυτές έδωσαν περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τις βιοχημικές μεταβολές της ενεργοποίησης των κασπασών στο μονοπάτι του κυτταρικού θανάτου. Οι πειραματικές μελέτες που έγιναν στον *C. elegans* απέδειξαν κυρίως πως τόσο στο σύνολό του, όσο και στα μεμονωμένα στοιχεία του, το μονοπάτι της απόπτωσης, αποτελεί ένα ιδιαίτερο παράδειγμα κυτταρικού μηχανισμού που διατηρήθηκε κατά τη φυλογενετική εξέλιξη.

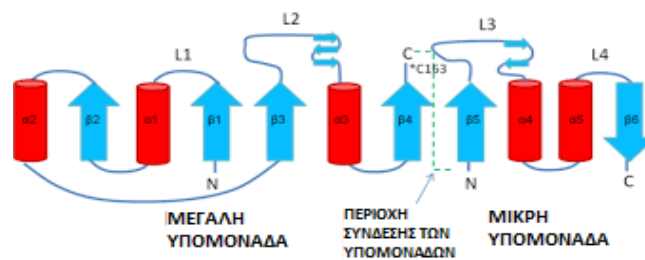
#### 4.2.2 ΔΟΜΗ

Αρχικά οι κασπάσες συντίθενται ως καταλυτικά ανενεργά προένζυμα που αποτελούνται από τρεις διακριτές περιοχές: μια αμινοτελική πρόδρομη περιοχή (prodomain), μια μεγάλη υπομονάδα (p20) που περιέχει το ενεργό κέντρο κυστεΐνης μέσα στη διατηρημένη αλληλουχία αμινοξέων QACXG, και μια μικρή καρβοξυτελική υπομονάδα (p10). Μετά την ενεργοποίηση του προενζύμου με πρωτεόλυση, απομακρύνεται η πρόδρομη περιοχή και διαχωρίζονται οι δύο υπομονάδες (Εικόνα 7).



Εικόνα 7: Η επεξεργασία του πρόδρομου μορίου των κασπασών που οδηγεί στη μερική και μετέπειτα ολοκληρωτική ενεργοποίηση των ενζύμων. <sup>(7)</sup>

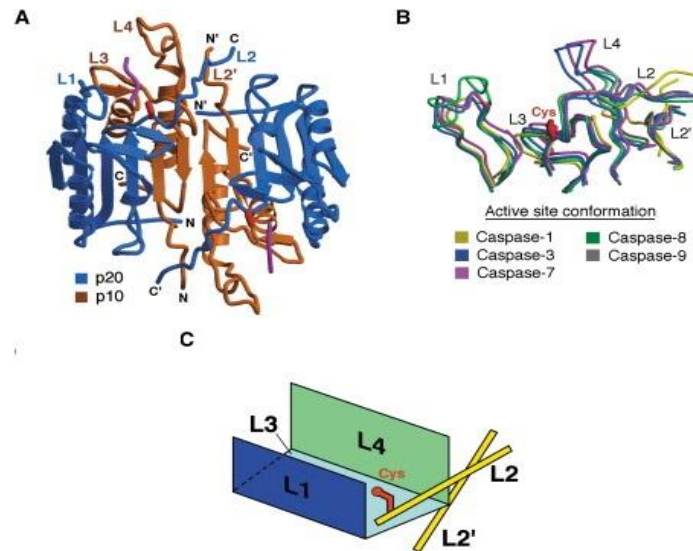
Η βασική δομική μονάδα της ενεργής κασπάσης αποτελείται από ένα ομοδιμερές της μεγάλης (p20) και της μικρής (p10) υπομονάδας. Ο ομοδιμερισμός του μορίου μεσολαβείται από υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις, όπου οι έξι β-έλικες του κάθε μονομερούς δημιουργούν ένα μονό συνεχές 12-πτυχωτό β-φύλλο. Σε κάθε πλευρά του κεντρικού β-φύλλου υπάρχουν διάφορες α-έλικες και μικρές β-έλικες, οι οποίες δημιουργούν έναν σφαιρικό φάκελο. Τα ενεργά κέντρα του ενζύμου, που δημιουργούνται από τέσσερις εξέχουσες θηλίες (L1-L4), τοποθετούνται στα δύο αντίθετα άκρα του β-φύλλου (*Li and Yuan, 2008*) (Εικόνα 8).



Εικόνα 8: Παρουσίαση των α και β- ελίκων του μονομερούς της προκασπάσης-3, τα οποία συμβάλλουν στον ομοδιμερισμό του ενζύμου. <sup>(8)</sup>

Για πολλά χρόνια, όλες οι πληροφορίες που υπήρχαν για τη δομή των ενζύμων προέρχονταν από ενεργοποιημένες κασπάσες που ήταν ομοιοπολικά συνδεδεμένες με αναστολείς τους. Η μελέτη των μορίων αυτών αποκάλυψε ότι το πρότυπο διαμόρφωσης των θέσεων των ενεργών κέντρων στα ένζυμα είναι υψηλά διατηρημένο ανάμεσα στα ένζυμα της οικογένειας των κασπασών (Εικόνα 4B) (Shi, 2002).

Από τις τέσσερις θηλιές που διαμορφώνονται, οι L1 και L4 είναι υπεύθυνες για τη δημιουργία των δύο πλαϊνών πλευρών της αύλακας όπου συνδέεται το υπόστρωμα, ενώ η L3 δημιουργεί τη βάση της διαμόρφωσης αυτής. Τέλος, η L2 θηλιά γειτνιάζει με την καταλυτική κυστεΐνη και διασχίζει την αύλακα (Εικόνα 9C). Συγκριτικά, η L1 και L3 παρουσιάζουν πιο διατηρημένο μέγεθος και σύνθεση ανάμεσα στις κασπάσες, σε αντίθεση με τις L2 και L4, που εμφανίζουν πιο μεγάλες διαφοροποιήσεις. Η L1 και μέρος της L2 (που περιέχει την καταλυτική κυστεΐνη) αποτελούν τμήμα της p20 υπομονάδας, ενώ η L3 και η L4 είναι τμήμα της p10 υπομονάδας. Κατά την ενεργοποίηση των κασπασών, η L2 θηλιά κόβεται στο αμινοτελικό άκρο της, το οποίο περιέχει την καταλυτική κυστεΐνη και στο καρβοξυ-τελικό άκρο, το οποίο σταθεροποιεί το ενεργό κέντρο του γειτονικού μονομερούς. Επομένως, ο σχηματισμός του ενεργού κέντρου ενός μονομερούς υποστηρίζεται από την L2' (δηλαδή την αντίστοιχη L2 θηλιά του άλλου ετεροδιμερούς) του γειτονικού μονομερούς (Riedl and Shi, 2004).



Εικόνα 9: (Α) Αναπαράσταση δομής της κασπάσης-3 συνδεδεμένη με αναστολέα. Οι μικρές υπομονάδες φαίνονται με πορτοκαλί και οι μεγάλες υπομονάδες με μπλε χρώμα. Ο συνδεδεμένος αναστολέας παρουσιάζεται με μωβ. Έχουν σημειωθεί οι τέσσερις επιφανειακές θηλιές που σχηματίζουν την καταλυτική αύλακα. Τα σημειωμένα με απόστροφο στοιχεία αντιπροσωπεύουν το άλλο ετεροδιμερές. Η L2' θηλιά σταθεροποιεί το ενεργό κέντρο του ετεροδιμερούς. (Β) Η διαμόρφωση του ενεργού κέντρου όλων των κασπασών είναι σχετικά διατηρημένη. Από τις τέσσερις θηλιές οι L1 και L3 είναι σχετικά διατηρημένες, ενώ οι L2 και L4 παρουσιάζουν μεγαλύτερη ποικιλότητα. Το καταλυτικό κατάλοιπο κυστεΐνης είναι σημειωμένο με κόκκινο. (C) Σχηματική απεικόνιση της διαμόρφωσης της αύλακας πρόσδεσης υποστρώματος. Η L1 και L4 σχηματίζουν δύο παράλληλες πλευρές της αύλακας, ενώ η L3 λειτουργεί σαν βάση. Η L2 θηλιά που περιέχει το καταλυτικό κατάλοιπο τοποθετείται στο ένα άκρο της αύλακας και η L2' παίζει σημαντικό ρόλο σταθεροποιώντας την διαμόρφωση των L2 και L4.<sup>(9)</sup>

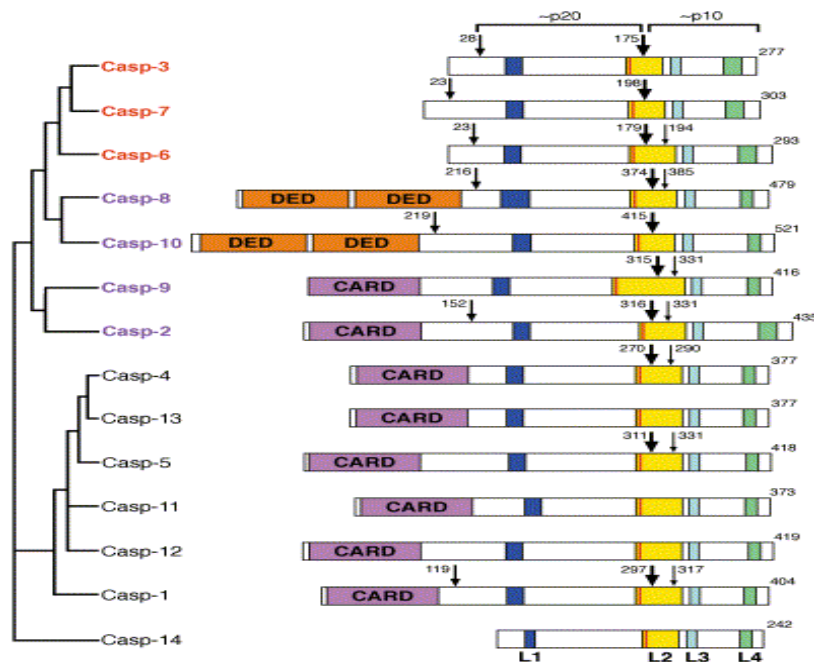
### 4.2.3 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

Μετά την ανακάλυψη του πρώτου μέλους της οικογένειας των κασπασών, της κασπάσης-1, ακολούθησε η ανακάλυψη ακόμα δεκατριών γονιδίων που κωδικοποιούν τις κασπάσες στα θηλαστικά. Στον άνθρωπινο οργανισμό συναντώνται έντεκα πρωτεΐνες που σύμφωνα με την Nomenclature Committee of International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB) ταξινομούνται ως ενδοπεπτιδάσες κυστεΐνης. Όλα τα μέλη της οικογένειας αυτής μοιράζονται κάποια κοινά χαρακτηριστικά που τις διαφοροποιούν από τις υπόλοιπες πρωτεΐνες. Για την ταξινόμηση των κασπασών έχουν προταθεί διάφοροι τρόποι και έχουν χρησιμοποιηθεί διαφορετικά κριτήρια: η φυλογενετική ανάλυση και το μέγεθος του ενζύμου.

Βάσει φυλογενετικής ανάλυσης, οι κασπάσες μπορούν να διαχωριστούν σε δύο υπο-οικογένειες: την ICE ή την CED, όπου ουσιαστικά γίνεται διαχωρισμός σε «αποπτωτικές» και «προ-φλεγμονώδεις». Αυτή η ταξινόμηση, αν και επικράτησε για αρκετά χρόνια, δεν μπορεί να είναι απόλυτη καθώς σήμερα υπάρχουν αναφορές για πολλαπλές λειτουργίες των μελών και των δύο υπο-οικογενειών (Bredesen, 2008). Η μόνη κασπάση που παραμένει στην κατηγορία των «μη αποπτωτικών» είναι η

κασπάση-14, με εξακριβωμένο ρόλο στη διαφοροποίηση των κερατινοκυττάρων (Denecker et al., 2008).

Χρησιμοποιώντας σαν κριτήριο ταξινόμησης το μέγεθος της υπο-περιοχής των κασπασών, το οποίο αντανακλά και τη θέση τους στο αποπτωτικό μονοπάτι, χωρίζονται σε εναρκτήριοιες κασπάσες (initiator caspase) και κασπάσες τελεστές (effector caspase). Τα ένζυμα της πρώτης κατηγορίας (caspase-8, -9, -10) κατέχουν μεγάλη αμινοτελική περιοχή (περίπου εκατό κατάλοιπα) και διαθέτουν ένα από τα δύο χαρακτηριστικά πρότυπα αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης-πρωτεΐνης: τις τελεστικές περιοχές θανάτου (death effector domain, DED) ή τις περιοχές στρατολόγησης κασπάσης (caspase recruitment domain, CARD), που τους επιτρέπουν να αλληλεπιδρούν με μόρια που βρίσκονται στα ανώτερα στάδια του μονοπατιού. Θα πρέπει να αναφερθεί ότι και κάποιες κασπάσες που δεν συμμετέχουν στο μονοπάτι της απόπτωσης (π.χ. caspase-1, -2, -4, -5, -11) φέρουν επίσης αυτά τα χαρακτηριστικά πρότυπα. Οι κασπάσες τελεστές (caspase-3, -6, -7), διαθέτουν μικρότερη αμινοτελική περιοχή (<τριάντα κατάλοιπα) και έχουν σαν λειτουργία να εκτελούν τα επόμενα βήματα του αποπτωτικού μονοπατιού, πρωτεολύοντας τις πρωτεΐνες στόχους.



Εικόνα 10: Εκτός από την κασπάση-11 (ποντικός), την κασπάση-12 (ποντικός) και την κασπάση-13 (βόδι), όλες οι κασπάσες της εικόνας απαντώνται στον άνθρωπο. Η φυλογενετική τους σχέση (αριστερά), φαίνεται να συσχετίζει τη λειτουργία τους κατά τη φλεγμονή ή την απόπτωση. Οι εναρκτήριοιες (initiator) κασπάσες και οι τελεστικές (effector) είναι χρωματισμένες μωβ και κόκκινες, αντίστοιχα. Η θέση της πρώτης ενεργοποιητικής κατάτμησης (μεταξύ των μεγάλων και των μικρών υπομονάδων) τονίζεται με τα μεγάλα βέλη, ενώ οι επιπρόσθετες περιοχές κατάτμησης παρουσιάζονται με τα ενδιάμεσου μήκους και τα μικρά βέλη. Σε αντίθεση με άλλα πρωτεολυτικά προένζυμα, η απομάκρυνση της αμινοτελικής πρόδρομης περιοχής από το προένζυμο δεν είναι απαραίτητη για την καταλυτική του δραστηριότητα. Το καταλυτικό κατάλοιπο κυστεΐνης υποδεικνύεται ως κόκκινη γραμμή.<sup>(10)</sup>

#### 4.2.4 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, όλα τα μέλη της οικογένειας των κασπασών αρχικά συντίθενται ως ανενεργά ένζυμα μονής αλυσίδας, με κοινά δομικά χαρακτηριστικά. Μετά την ενεργοποίηση τους, τα ένζυμα παρουσιάζουν κοινή διαμόρφωση των ενεργών τους κέντρων. Λόγω των παραπάνω, για πολλά χρόνια θεωρούνταν πως όλες οι κασπάσες μοιράζονται έναν κοινό μηχανισμό ενεργοποίησης. Ωστόσο πλέον είναι σαφές πως οι κασπάσες τελεστές απαιτούν διαφορετικά βήματα για την ενεργοποίηση τους από ότι οι εναρκτήριες κασπάσες.

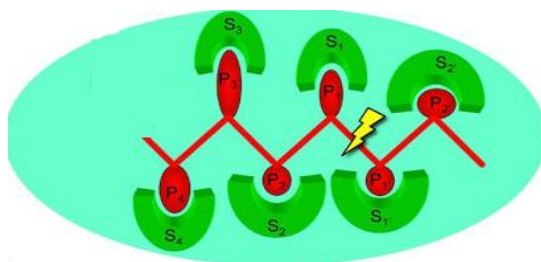
Οι κασπάσες τελεστές υφίστανται σαν διμερή στην ανενεργό τους δομή και για την ενεργοποίηση τους απαιτείται η απομάκρυνση της καταλυτικής περιοχής τους. Το πρώτο βήμα για την ενεργοποίηση τους, ο διμερισμός, έχει συμβεί ήδη, σχεδόν αμέσως μετά τη σύνθεση τους και το προένζυμο συγκρατείται από μια μικρή περιοχή σύνδεσης που διαχωρίζει τη μεγάλη από τη μικρή υπομονάδα της καταλυτικής περιοχής. Η μελέτη του προενζύμου της κασπάσης-7 προσέφερε μεγάλο όγκο πληροφοριών σχετικά με τον μηχανισμό ενεργοποίησης των ενζύμων αυτών (*Chai et al., 2001, Riedl et al., 2001*). Έγινε έτσι κατανοητός ο τρόπος με τον οποίο οι δομικές μεταβολές που υφίσταται το ανενεργό μόριο, ευνοούν τη δημιουργία των ενεργών καταλυτικών κέντρων. Πιο συγκεκριμένα, φάνηκε πως η πρωτεόλυση της περιοχής σύνδεσης στο προένζυμο επιτρέπει την επανατοποθέτηση των καταλυτικών κατάλοιπων στη σωστή διαμόρφωση και τη σωστή ευθυγράμμιση των θέσεων πρόσδεσης του υποστρώματος, διαδικασία απαραίτητη για την ενεργοποίηση του ενζύμου.

Ο μηχανισμός ενεργοποίησης των εναρκτήριων κασπασών δεν είναι πλήρως κατανοητός. Αν και στην ανενεργή τους κατάσταση τα ένζυμα υπάρχουν σαν μονομερή, μετά το σήμα ενεργοποίησης, απαιτείται το στάδιο του διμερισμού. Ο διμερισμός διευκολύνεται από τη στρατολόγηση των κασπασών σε ολιγομερείς πλατφόρμες ενεργοποίησης, οι οποίες συγκροτούνται μετά από ένα αποπτωτικό σήμα. Κάθε εναρκτήριο κασπάση έχει τη δική της πλατφόρμα ενεργοποίησης. Η πλατφόρμα ενεργοποίησης που ονομάζεται DISC (Death-Inducing Signaling Complex) στρατολογεί και ενεργοποιεί την κασπάση -8 και -10, ενώ το αποπτόσωμα είναι η πλατφόρμα ενεργοποίησης της κασπάσης-9. Υπάρχουν πρωτεΐνες που λειτουργούν σαν συμπαράγοντες (μόρια-προσαρμογείς) στις πλατφόρμες ενεργοποίησης, οι οποίοι συνδέονται ειδικά με τις υπο-περιοχές των κασπασών όπως οι DED (death effector domains) των κασπασών -8 και -10 και οι CARDS (caspase recruitment domain) των κασπασών-1, -2 και -9. Αρχικά προτάθηκε το μοντέλο «induced proximity model» (μοντέλο επαγωγής εγγύτητας), το οποίο περιέγραφε ότι οι κασπάσες είναι ικανές να αυτο-πρωτεολύονται όταν έρθουν σε επαφή με άλλες κασπάσες (*Salvesen and Dixit, 1999*). Αργότερα, το μοντέλο τροποποιήθηκε και μετονομάστηκε σε «proximity-induced dimerization» (διμερισμός προκαλούμενος από εγγύτητα) καθώς τα αποτελέσματα μελετών για την κασπάση-9 και την κασπάση-8 έδειξαν ότι ο διμερισμός των εναρκτήριων κασπασών μπορεί να οδηγήσει σε μερική ενεργοποίηση τους. Η εσωτερική πρωτεόλυση δεν ενεργοποιεί τις

κασπάσες αυτές, αλλά μάλλον ένα δευτερεύον γεγονός έχει σαν αποτέλεσμα τη μερική σταθεροποίηση των ενεργοποιημένων διμερών (*Boatright et al., 2003*).

#### 4.2.5 ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ ΚΑΣΠΑΣΩΝ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗΣ ΤΟΥΣ

Οι κασπάσες αναγνωρίζουν τουλάχιστον τέσσερα συνεχόμενα αμινοξέα στο υπόστρωμα τους (P4-P3-P2-P1) και τέμνουν μετά από το καρβοξυτελικό κατάλοιπο (P1), το οποίο είναι ένα ασπαραγινικό οξύ (Asp) (*Shi, 2002*).



Εικόνα 11: Αναπαράσταση της αναγνώρισης υποστρώματος από ενεργή κασπάση. Φαίνονται οι θέσεις P1-P4 στο υπόστρωμα και οι αντίστοιχες θέσεις S1-4 στο ένζυμο. <sup>(11)</sup>

Ενώ για την θέση P3, είναι σαφές ότι υπάρχει επιλεκτικότητα από όλες τις κασπάσες που έχουν μελετηθεί για το κατάλοιπο του γλουταμικού οξέος (Glu), αντίθετα στην θέση P4 υπάρχει μεγάλη διαφοροποίηση σχετικά με την προτίμηση συγκεκριμένου αμινοξέος, γεγονός που κάνει τις κασπάσες να δείχνουν μεγάλη εξειδίκευση για τα υποστρώματά τους. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι παρόλο που υπάρχουν πολλές πρωτεΐνες που έχουν τη σωστή αλληλουχία τετραπεπτιδίου, δεν αποτελούν υπόστρωμα των ενζύμων, κάτι που υποδεικνύει πως μεγάλο ρόλο έχει και η τριτοταγής δομή της πρωτεΐνης (*Thornberry and Lazebnik, 1998*).

Οι τέσσερις ενεργές θηλιές (L4-L1), καθορίζουν την εξειδίκευση των κασπασών για το υπόστρωμά τους. Οι θέσεις σύνδεσης (P4-P3-P2-P1) στο υπόστρωμα είναι γνωστές αντιστοίχως ως θέσεις (S4-S3-S2-S1) στο ένζυμο. Μελέτες δομής με την χρήση ομοιοπολικά συνδεδεμένου αναστολέα έδειξαν ότι αυτές οι θέσεις σύνδεσης βρίσκονται κυρίως ανάμεσα στη βάση (L3) και στις δύο πλάγιες πλευρές (L1 και L4) της αύλακας σύνδεσης υποστρώματος. Οι θέσεις S1 και S3, είναι σχεδόν πανομοιότυπες σε όλες τις κασπάσες, ενώ χωροταξικά η θέση των S2 και S4 διατηρείται στα ένζυμα αυτά.

Το P1 κατάλοιπο (Asp) αλληλεπιδρά με τρία αμετάβλητα κατάλοιπα στην θέση S1: ένα κατάλοιπο (Arg) από τη θηλιά L1, ένα κατάλοιπο (Glu) από την αρχή της θηλιάς L2 και ένα κατάλοιπο (Arg) από το τέλος της θηλιάς L3 (*Thornberry et al., 1997, Riedl and Shi, 2004*). Το τελευταίο κατάλοιπο (Arg) της L3 δημιουργεί επίσης δεσμούς υδρογόνου με το κατάλοιπο της θέσης P3, που προτιμάται να είναι ένα κατάλοιπο (Glu), στην S3 θέση. Για τη θέση S2 στις τελεστικές κασπάσες-3 και -7, υπάρχει προτίμηση για κατάλοιπα με μικρές, αλειφατικές αλυσίδες (π.χ. Ala, Val), σε αντίθεση με τις εναρκτήριες κασπάσες που δέχονται μεγαλύτερες και πιο ογκώδεις πλευρικές αλυσίδες. Η θέση S4 παρουσιάζει την μεγαλύτερη ποικιλομορφία

συγκριτικά με όλες τις κασπάσες. Μια συστηματική μελέτη με τη χρήση φθορίζοντων πεπτιδικών υποστρωμάτων, έκανε σαφή την ύπαρξη βαθμού εξειδίκευσης των καταλοίπων στην θέση P1' (*Stennicke et al., 2000*). Τα προτιμότερα κατάλοιπα για αυτή τη θέση φάνηκε να είναι τα μικρά αμινοξέα (Gly, Ala και Ser), αλλά και τα κατάλοιπα με μεγάλες αρωματικές πλευρικές αλυσίδες. Αντίθετα τα φορτισμένα κατάλοιπα και η προλίνη, είναι ανασταλτικά.

Με την πρόοδο των ερευνών, η αναγνώριση των υποστρωμάτων των κασπασών συγκέντρωσε το ενδιαφέρον των ερευνητών και πολλές μελέτες στράφηκαν στη διερεύνηση του πεδίου αυτού. Αυτό έχει αποτέλεσμα πλέον να υπάρχουν δεδομένα για μια πληθώρα πρωτεϊνών που λειτουργούν σαν υποστρώματα των κασπασών (*Fischer U. et al., 2003*). Σε αυτές τις πρωτεΐνες συγκαταλέγονται δομικές πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη στήριξη του κυτταροπλάσματος και του πυρήνα, πρωτεΐνες ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου αλλά και πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην διαβίβαση σήματος. Τέλος, άλλες κατηγορίες υποστρωμάτων των κασπασών είναι πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην αντιγραφή και επιδιόρθωση βλαβών του γενετικού υλικού και φυσικά αποπτωτικές πρωτεΐνες όπως οι τελεστικές κασπάσες.

#### 4.2.6 ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΚΑΣΠΑΣΩΝ

Αν και η πρωτεολυτική ενεργοποίηση των κασπασών αποτελεί το κύριο μονοπάτι ρύθμισης της ενεργότητας τους, τα κύτταρα διαθέτουν και άλλους ρυθμιστικούς μηχανισμούς. Λόγω της ζωτικής σημασίας για το κύτταρο, η ενεργοποίηση ή όχι των κασπασών πρέπει να ελέγχεται αυστηρά. Μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις, όπως η νιτροσυλίωση, η οξειδωση, η ουβικουιτινίωση και η φωσφορυλίωση ρυθμίζουν επίσης την ενεργότητα των κασπασών (*Earnshaw et al., 1999*). Διάφοροι ανασταλτικοί ρυθμιστές των κασπασών έχουν ταυτοποιηθεί, τόσο στον άνθρωπο, όσο και σε ιούς. Τέτοια μόρια είναι η crmA (Cytokine Response Modifier A), η P35, η v-FLIP (v-FLICE-Inhibitory Proteins) και οι IAP (Inhibitor of apoptosis proteins).

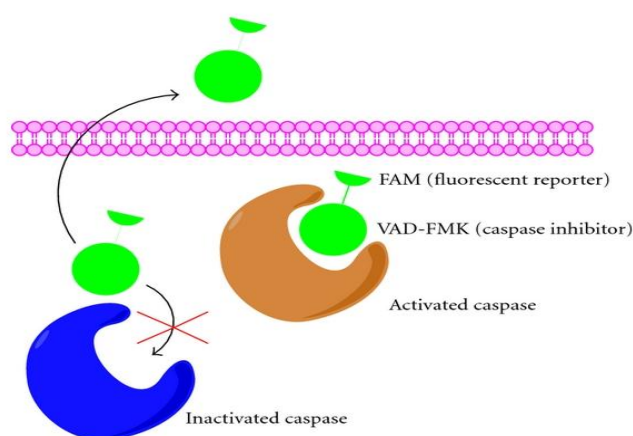
Τα μέλη της οικογένειας των IAP είναι οι πιο σημαντικοί ανασταλτικοί ρυθμιστές των κασπασών. Έως τώρα, οχτώ μέλη της οικογένειας των αναστολέων έχουν αναγνωριστεί στον άνθρωπο, μεταξύ των οποίων ο XIAP, c-IAP1, c-IAP2 και Survivin. Οι αναστολείς αυτοί έχουν την δυνατότητα να καταστέλλουν την απόπτωση μετά από επαγωγή σημάτων διέγερσης, όπως η σύνδεση με τους υποδοχείς θανάτου, με αποτέλεσμα την αναστολή συγκεκριμένων κασπασών. Στον άνθρωπο, ο ισχυρότερος και καλύτερα χαρακτηρισμένος αναστολέας είναι ο XIAP. Αν και οι περισσότεροι αναστολείς IAP συνδέονται και καταστέλλουν απευθείας την καταλυτική ενεργότητα των κασπασών, ορισμένοι λειτουργούν ρυθμίζοντας αρνητικά την έκφραση τους, δρώντας σαν E3 λιγάση, για την επακόλουθη ουβικουιτινίωση και αποδόμηση τους. Τέλος, η δράση των αναστολέων απόπτωσης υπόκειται και αυτή σε ένα μηχανισμό ελέγχου ώστε να υπάρχει η απαραίτητη ισορροπία και σε αυτό το μοριακό μονοπάτι (*Shi, 2002*).



Η ανάγκη κατανόησης του φαινομένου της απόπτωσης αλλά και η εμπλοκή του σε μια σειρά από σοβαρές ασθένειες για τον άνθρωπο, ώθησε πολλούς ερευνητές στη δημιουργία συνθετικών αναστολέων των κασπασών τόσο για θεραπευτικούς, όσο και για ερευνητικούς σκοπούς. Ένα μόριο αναστολέα θα πρέπει να χαρακτηρίζεται από υψηλή δραστικότητα, γρήγορη σύνδεση του με το μόριο-στόχο και επίσης υψηλή επιλεκτικότητα (Poreba et al., 2013).

Η βιοτίνη είναι ένα από τα πρώτα μόρια που χρησιμοποιήθηκε ευρέως για την σήμανση κατάλληλων πεπτιδικών αναστολέων των κασπασών και αποτέλεσε μόριο επιλογής λόγω των πλεονεκτημάτων που παρουσιάζει η χρήση του. Η ισχυρή και εκλεκτική σύνδεση της βιοτίνης με την στρεπταβιδίνη, επιτρέπει την εύκολη ανίχνευση του σημασμένου μορίου και την απομόνωση του από ένα μεγάλο σύνολο ανενεργών πρωτεϊνών (Sadaghiani et al., 2007). Ωστόσο η χρήση της βιοτίνης σε μελέτες in vivo ή in situ παρουσιάζει κάποιους περιορισμούς καθώς στερείται υψηλής κυτταρικής διαπερατότητας και δεν υπάρχει πρωτόκολλο για άμεση οπτική αναγνώριση του. Τέλος, η ύπαρξη ενδογενών βιτινυλιωμένων μορίων αποτελεί έναν επιπλέον ανασταλτικό παράγοντα για την χρήση του μορίου αυτού.(Sadaghiani et al., 2007).

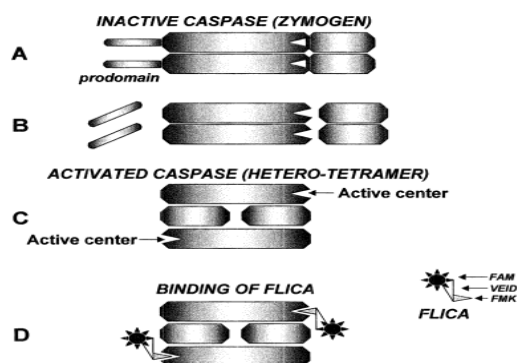
Μια άλλη κατηγορία αναστολέων είναι οι σημασμένοι με φθορίζουσα χρωστική αναστολείς των κασπασών (Fluorochrome- Labeled Inhibitors of Caspase, FLICA). Τα μόρια αυτά είναι μη τοξικά, υδατοδιαλυτά και παρουσιάζουν υψηλή κυτταρική διαπερατότητα. Πρόκειται για αναστολείς που λειτουργούν ως ψευδοϋποστρώματα και συνδέονται στο ενεργό κέντρο των κασπασών (Bedner et al., 2000).



Εικόνα 12: Αναπαράσταση σύνδεσης του αναστολέα FAM-VAD-FMK στην ενεργοποιημένη κασπάση.<sup>(12)</sup>

Οι αναστολείς χρησιμοποιούν σαν δείκτη ένα καρβοξυ φθορίζον μόριο (FAM), στο οποίο συνδέεται ένα πεπτίδιο μεθυλοκετόνης (FMK). Το πεπτίδιο αυτό συνδέεται με στοιχειομετρία 1:1 στα ενεργά κέντρα του ενζύμου (Smolewski et al., 2001). Έχουν δημιουργηθεί διάφοροι αναστολείς, που παρουσιάζουν εξειδίκευση για διάφορες κασπάσες αλλά και ένας αναστολέας που συνδέεται με όλα τα μέλη της οικογένειας των κασπασών. Η εξειδίκευση για τη σύνδεση παρέχεται από την

αλληλουχία του πεπτιδίου κατάλληλου για τη σύνδεση σε συγκεκριμένο ενεργό κέντρο των ενζύμων. Για παράδειγμα ο αναστολέας FAM-VAD-FMK προσδένεται μη αντιστρεπτά σε πολλές ενεργοποιημένες κασπάσες (κασπάση-1, -3, -4, -5, -6, -7, -8 και -9).



Εικόνα 13: (Α) Αναπαράσταση της δομής ανενεργής κασπάσης, (Β) Μορφή του ενεργοποιημένου ενζύμου με την απομάκρυνση των πρόδρομων περιοχών και τον ετεροδιμερισμό του ενζύμου, (Γ) Πρόσδεση του αναστολέα στα ενεργά κέντρα του ενεργοποιημένου ενζύμου. <sup>(13)</sup>

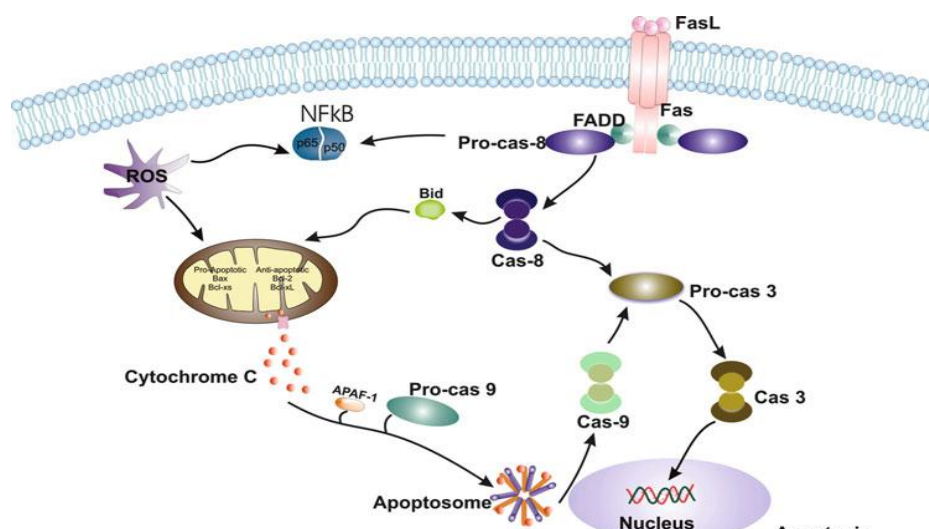
### 4.3 ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ

Στα θηλαστικά, ένα ευρύ φάσμα ερεθισμάτων μπορεί να αποτελέσει εναρκτήριο σήμα για τον καταρράκτη της απόπτωσης μέσω της ενεργοποίησης δύο μονοπατιών: του εξωγενούς μονοπατιού ή μονοπάτι υποδοχέων θανάτου (extrinsic pathway) και του ενδογενούς μονοπατιού, ή μιτοχονδριακό μονοπάτι (intrinsic pathway).

#### 4.3.1 ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΘΑΝΑΤΟΥ (EXTRINSIC PATHWAY)

Η ενεργοποίηση του εξωγενούς μονοπατιού της απόπτωσης εμπλέκει μια ομάδα υποδοχέων που χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη μιας ενδοκυτταρικής περιοχής που καλείται «περιοχή θανάτου» (death domain). Αυτοί οι υποδοχείς είναι απαραίτητοι για τη μετάδοση του αποπτωτικού σήματος. Τα μέλη της υπερικογένειας των υποδοχέων TNF (Tumor Necrosis Factor), αλληλεπιδρούν με τους συνδέτες τους (όπως ο TNF, ο συνδέτης του Fas-ο FasL/CD95L και ο TNF-related apoptosis ligand, TRAIL), και ακολουθεί ολιγομερισμός και αλλαγή διαμόρφωσης των υποδοχέων. Μετά την πρόσδεση του συνδέτη στον υποδοχέα σχηματίζεται ένα σύμπλοκο (death-inducing signaling complex, DISC) μέσω της στρατολόγησης μορίων προσαρμογέων, όπως το FADD (Fas-associated death domain), το οποίο επίσης περιέχει πρότυπο περιοχών θανάτου (DED). Το FADD επίσης περιέχει περιοχή DED και στρατολογεί την κασπάση-8 στο σύμπλοκο DISC μέσω της αλληλεπίδρασης των προτύπων DED που διαθέτουν και οι δύο πρωτεΐνες (Nagata and Golstein, 1995). Σημαντικό στοιχείο του μονοπατιού αυτού αποτελεί η αλληλεπίδραση των μορίων Fas και FasL. Ο Fas είναι ένας τύπου I διαμεμβρανικός

υποδοχέας και ανήκει στην οικογένεια των TNF/nerve growth factor. Ο Fas συνδέεται με τον συνδέτη του, τον FasL και η σύνδεση των δύο πρωτεϊνών οδηγεί στην απόπτωση όσα κύτταρα είναι σημασμένα με Fas, μέσω της ενεργοποίησης των κασπασών (Nagata, 1997). Πιο συγκεκριμένα στρατολογείται η κασπάση-8, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της εκτελεστικής κασπάσης-3 και τη συνέχιση του μονοπατιού της απόπτωσης (Philchenkov, 2003).



Εικόνα 14: Τα μονοπάτια της απόπτωσης και τα ένζυμα που συμμετέχουν. <sup>(14)</sup>

### 4.3.2 ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ (INTRINSIC PATHWAY)

Από τους πιο βασικούς ρυθμιστές του μιτοχονδριακού μονοπατιού είναι οι πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2. Μέλη της οικογένειας αυτής αποτελούν τόσο προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες, όπως οι Bax, Bak, Bad, Bcl-Xs, Bid, Bik και Bim, όσο και αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες. Θεωρείται πως η ισορροπία μεταξύ των δύο κατηγοριών είναι κρίσιμη για την επιβίωση ή την αποπτωτική πορεία του κυττάρου. Οι προαποπτωτικές πρωτεΐνες προάγουν την απόπτωση με την επαγωγή της απελευθέρωσης του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια. Το κυτόχρωμα c φυσιολογικά βρίσκεται ανάμεσα στην εξωτερική και εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και συμμετέχει στη μεταφορά ηλεκτρονίων κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση. Μετά από την ύπαρξη ενός σήματος θανάτου οι προαποπτωτικές πρωτεΐνες υφίστανται μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις, όπως φωσφορυλίωση και μετακινούνται στα μιτοχόνδρια (Scorrano and Korsmeyer, 2003). Αυτό κάνει την μιτοχονδριακή μεμβράνη διαπερατή με αποτέλεσμα την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c στο κυτταρόπλασμα (Hengartner, 2000). Στο κυτταρόπλασμα το κυτόχρωμα c συμμετέχει στο σχηματισμό του αποπτωσώματος μαζί με μόρια προσαρμογείς όπως είναι ο παράγοντας Apoptotic protease Activated Factor 1 (Apaf-1). Το σύμπλοκο αυτό είναι υπεύθυνο για την στρατολόγηση και ενεργοποίηση της κασπάσης-9, η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί τις κασπάσες τελεστές -3 και -7 για τη συνέχιση του καταρράκτη της απόπτωσης (Reed, 1997).

Αν και τα δύο μονοπάτια φαίνονται να ενεργοποιούνται διαφορετικά, εντούτοις υπάρχει μια διασύνδεση των δύο, καθώς έχει φανεί πως η προαποπτωτική

πρωτεΐνη Bid μπορεί να αποτελέσει υπόστρωμα της κασπάσης-8. Μετά την πρωτεόλυση της, η Bid μετακινείται στα μιτοχόνδρια και ακολουθεί η απελευθέρωση του κυτοχρώματος c με συνέπεια την καταστροφή του κυττάρου (Li *et al.*, 1998).

#### 4.4 ΡΟΛΟΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ ΣΤΑ ΓΕΝΝΗΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΟΥ ΑΝΔΡΑ

Η απόπτωση αποτελεί τον κύριο ρυθμιστή σε μια σειρά από φυσιολογικά φαινόμενα στα οποία εμπλέκονται τα κύτταρα της αναπαραγωγικής σειράς, τόσο στο άρρεν, όσο και στο θήλυ αναπαραγωγικό σύστημα. Θεωρητικά ένας φυσιολογικός όρχις χάνει το 75% των σπερματοζωαρίων λόγω εκφυλισμού των γεννητικών κυττάρων κατά τη σπερματογένεση (Rodriguez *et al.*, 1997). Κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης, η απόπτωση είναι ο κύριος μηχανισμός για τη διατήρηση της ομοιόστασης στον όρχι. Ο ορμονικός έλεγχος, τόσο κεντρικά με την έκκριση της FSH από την αδενούπόφυση, όσο και τοπικά από την τεστοστερόνη που εκκρίνεται από τα κύτταρα Leydig, ρυθμίζει την απόπτωση στα διάφορα στάδια της ωρίμανσης του σπερματοζωαρίου. Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν για τον έλεγχο της λειτουργίας των ορμονών έδειξαν πως η ορμονική δράση, τουλάχιστον στα τρωκτικά, πραγματοποιείται μέσω και των δύο μονοπατιών της απόπτωσης στα σπερματοκύτταρα και τις σπερματίδες, ενώ μελέτες σε άρρενες ποντικούς με ανεπάρκεια γοναδοτροπινών έδειξαν ότι ο ορμονικός έλεγχος της απόπτωσης στα σπερματογόνια γίνεται μέσω του εσωτερικού μονοπατιού (Ruwanpura *et al.*, 2008).

Η ύπαρξη χαρακτηριστικών της απόπτωσης στα σπερματοζωάρια είχε αμφισβητηθεί στο παρελθόν (Grunewald *et al.*, 2005a). Αρχικές μελέτες απέρριπταν την ύπαρξη απόπτωσης στα σπερματοζωάρια κατά την εκσπερμάτιση (Weil *et al.*, 1998), ενώ άλλοι ερευνητές θεωρούσαν ότι η ύπαρξη ενδογενών συγκολλημένων κατά την εκσπερμάτιση αποτελεί ένδειξη μη ολοκληρωμένης ωρίμανσης των σπερματοζωαρίων κατά την σπερματογένεση (Sakkas *et al.*, 1999). Εντούτοις, η ύπαρξη αποπτωτικών σημάτων στο ανθρώπινο σπερματοζωάριο ως απάντηση σε διάφορα ερεθίσματα, είναι σήμερα αποδεκτή από τους περισσότερους ερευνητές (Eley *et al.*, 2005, Barroso *et al.*, 2006, Bejarano *et al.*, 2008, Lozano *et al.*, 2009). Ενδείξεις της απόπτωσης στο ώριμο σπερματοζωάριο αφορούν κυρίως το μιτοχονδριακό μονοπάτι: ενεργοποίηση της εναρκτήριας κασπάσης-9, διαταραχή του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης, ενεργοποίηση της κύριας εκτελεστικής κασπάσης-3 και επακόλουθη κυτταρική κατάρρευση (Paasch *et al.*, 2004a, Bejarano *et al.*, 2008). Πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι η ενεργοποιημένη κασπάση-3 βρίσκεται στον αυχένα του σπερματοζωαρίου (Oehninger *et al.*, 2003), γεγονός που συμφωνεί με το ότι τα μιτοχόνδρια βρίσκονται επίσης σε αυτό το σημείο του σπερματοζωαρίου και επιπλέον με το γεγονός ότι η κασπάση-3 σχετίζεται και με το μιτοχονδριακό μονοπάτι (Nicholson, 1999).

Το σύστημα Fas είναι σημαντικό στοιχείο του εξωτερικού μονοπατιού και ενεργοποιείται τόσο στη φυσικά επαγόμενη όσο και στις περιπτώσεις της πειραματικώς επαγόμενης απόπτωσης. Η έκφραση του Fas στον όρχι έχει συσχετιστεί με τον κυτταρικό εκφυλισμό κατά τη φάση της μείωσης και με τη διακοπή της διαδικασίας ωρίμανσης κατά τη σπερματογένεση. Δεδομένα υποδεικνύουν ότι η έκφραση των γονιδίων του Fas πιθανώς να εμπλέκεται στην εξάλειψη των ελαττωματικών γεννητικών κυττάρων τα οποία παρουσιάζουν αλλοιώσεις κατά τη μειωτική ωρίμανση (*Francavilla et al., 2002*). Κατά τα πρώτα στάδια της ανάπτυξης του όρχι εμφανίζεται ένα μαζικό αποπτωτικό κύμα που συμπίπτει με το πρώτο κύκλο της σπερματογένεσης. Σκοπός αυτού του φαινομένου είναι η διατήρηση της αναλογίας μεταξύ των γεννητικών κυττάρων διαφόρων σταδίων και των κυττάρων Sertoli. Επιπλέον, τα κύτταρα Sertoli εκφράζουν FasL, το οποίο οδηγεί στην καταστροφή των γεννητικών κυττάρων που είναι σημασμένα με Fas και έτσι περιορίζεται ο πληθυσμός των γεννητικών κυττάρων σε τέτοιο αριθμό που να μπορούν να υποστηριχθούν από τα κύτταρα Sertoli (*Celik-Ozenci et al., 2006*). Αυτά τα γεγονότα έρχονται σε συμφωνία με τη θεωρία της «αποτυχημένης απόπτωσης (»abortive apoptosis«), μια θεωρία που προτείνει πως η αποπτωτική διαδικασία ξεκινάει στα γεννητικά κύτταρα, αλλά δεν ολοκληρώνεται και έτσι βρίσκουμε Fas-θετικά κύτταρα κατά την εκσπερμάτιση. Σε φυσιολογικά δείγματα λιγότερο από το 10% των σπερματοζωαρίων αντιπροσωπεύει Fas-θετικά κύτταρα, ενώ σε ολιγοσπερμικά δείγματα σπέρματος και δείγματα χαμηλής κινητικότητας και με κακή μορφολογία, τα Fas-θετικά κύτταρα κυμαίνονται από 10-50% (*Sakkas et al., 1999*). Κάποιοι ερευνητές δεν αναφέρουν την ύπαρξη Fas κατά την εκσπερμάτιση, ούτε σε δείγματα με φυσιολογικές παραμέτρους, ούτε σε δείγματα με παθολογικές παραμέτρους (*Perticarari et al., 2008*), όμως μια μετέπειτα μελέτη επιβεβαίωσε την ύπαρξη μερικής έκφρασης Fas, υποστηρίζοντας την λειτουργία της πρωτεΐνης αυτής ως αποπτωτικού δείκτη που βρίσκεται στην επιφάνεια των σπερματοζωαρίων κατά την εκσπερμάτιση (*Soleimani et al., 2010*).

Πειραματικά δεδομένα στον όρχι ποντικού έδειξαν ότι αυτό το όργανο αντιπροσωπεύει την κύρια πηγή FasL στον οργανισμό (*Suda et al., 1993*). Το σύστημα Fas εμπλέκεται στην ρύθμιση του ανοσοποιητικού και είναι υπεύθυνο για την εμφάνιση αυτοάνοσων ασθενειών σε περιπτώσεις που δεν είναι λειτουργικό. Τα κύτταρα Sertoli που έχουν ταυτοποιηθεί ως τα ορχικά κύτταρα που εκφράζουν FasL και τον υποδοχέα τους θεωρούνται τα υπεύθυνα κύτταρα για την ανοσολογική αυτονομία του όρχι (*Bellgrau et al., 1995*). Δεδομένου ότι ο FasL ανευρίσκεται στην μεμβράνη των γεννητικών κυττάρων, πιθανολογείται πως το σύστημα αυτό λειτουργεί σαν ένας μηχανισμός άμυνας έναντι των λεμφοκυττάρων που υπάρχουν στο γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα (*Riccioli et al., 2003*). Πολλοί εξωτερικοί παράγοντες προκαλούν τοξικότητα και επγωγή της απόπτωσης, με εμπλοκή του παράγοντα Fas. Για παράδειγμα η δυσφαινόλη A, ένας πιθανός ενδοκρινικός διαταράκτης και τοξικός παράγοντας για τον όρχι, επάγει στα γεννητικά κύτταρα απόπτωση μέσω Fas/FasL και στη συνέχεια ενεργοποιεί το μιτοχονδριακό μονοπάτι (*Wang et al., 2010*). Οι γονάδες επίσης είναι εξαιρετικά ευαίσθητες σε ακτινοβολία-X και στην αύξηση της θερμοκρασίας και αντιδρούν με τον ίδιο μηχανισμό.

Εκτός του εξωτερικού και το εσωτερικό αποπτωτικό μονοπάτι εμπλέκεται σε φυσιολογικές και σε παθολογικές καταστάσεις. Τα αντι αποπτωτικά μέλη της οικογένειας των Bcl-2 παίζουν κύριο ρόλο στην ενδοκυτταρική ισορροπία, πιθανότατα ελεγχόμενα από ορμόνες, καθορίζοντας ποιό κύτταρο θα επιβιώσει και ποιό όχι (Rodriguez *et al.*, 1997). Επιπλέον έχει φανεί ότι στα γεννητικά κύτταρα εκφράζονται οι πρωτεΐνες Bax, Bcl-xL, Bcl-<sub>2</sub>, Bad και Bak προτείνοντας ότι αυτές οι πρωτεΐνες εμπλέκονται στη διαφοροποίηση κατά τη σπερμιόγένεση, σε διάφορα στάδια μέσω του εσωτερικού μονοπατιού της απόπτωσης (Olderoid *et al.*, 2001). Επιπλέον, η απόπτωση είναι ο μηχανισμός που χρησιμοποιείται για την εξάλειψη των μη φυσιολογικών αρχέγονων βλαστικών κυττάρων που μεταναστεύουν από την αλλαντοΐδα ατύπως, γεγονός που θα μπορούσε να δημιουργήσει ανωμαλίες κατά την ανάπτυξη. Τα πλεονάζοντα αρχέγονα βλαστικά κύτταρα ελέγχονται από την ισορροπία των πρωτεϊνών Bcl-xL και Bax, οι οποίες καθορίζουν τη διαδικασία επιβίωσης ή θανάτου. Έτσι σε περίπτωση θανάτου, η απόπτωση πραγματοποιείται με τη μεταβολή της διαπερατότητας της μιτοχονδριακής μεμβράνης, απελευθέρωση του κυτοχρώματος c και τελικώς την κατάρρευση του κυττάρου (Rucker *et al.*, 2000).

Μια άλλη παθολογία του όρχι στην οποία εμπλέκεται η υψηλή θερμοκρασία είναι η κρυσορχία. Είναι γνωστό πως έκθεση σε μέτρια θερμοκρασία των γεννητικών κυττάρων έχει σαν αποτέλεσμα την επαγωγή της απόπτωσης. Εκτός από την ανίχνευση του FasL, η μετατόπιση του Bax στα μιτοχόνδρια, η ενεργοποίηση των κασπασών-3, -6, -9 και -7 και η απελευθέρωση του κυτοχρώματος από τα μιτοχόνδρια, έχουν παρατηρηθεί μετά την αύξηση της θερμοκρασίας και εικάζεται πως αυτός ο τύπος απόπτωσης γίνεται μέσω του μιτοχονδριακού μονοπατιού (Said *et al.*, 2004).

## 5 ΚΑΤΑΤΜΗΣΗ ΤΟΥ DNA

### 5.1 ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΑΤΑΤΜΗΣΗ ΤΟΥ DNA

Η κατάτμηση ή κατακερματισμός του DNA αποτελεί μια συχνή βλάβη του γενετικού υλικού των σπερματοζωαρίων. Με τον όρο βλάβη στο DNA έχει επικρατήσει να περιγράφεται ένα σύνολο παθολογικών καταστάσεων που αποτελείται από χρωμοσωμικές αλλαγές, όπως ελλείψεις και ανευπλοειδίες, από επιγενετικές τροποποιήσεις, μεταλλάξεις και από θραύσεις της έλικας με αποτέλεσμα τη δημιουργία κατατμήσεων μονής (single strand) ή διπλής έλικας (double strand) του DNA. Συχνά, τα τελευταία αναφέρονται ως κατακερματισμός του DNA (DNA Fragmentation) και έχουν σαν αποτέλεσμα τη μεταφορά μη φυσιολογικού πατρικού γενώματος. Σπερματοζωάρια που φέρουν βλάβη στο DNA διατηρούν φυσικά την ικανότητα να γονιμοποιήσουν το ωάριο (*Gandini et al., 2004*), χωρίς ωστόσο να έχει αποσαφηνιστεί ποιές είναι οι πιθανές επιπτώσεις στη φυσιολογική ανάπτυξη του εμβρύου από την ενσωμάτωση του πατρικού γενώματος που φέρει βλάβη.

Κατά τη διάρκεια της σπερμιόγερσης, η σπερματίδα που ωριμάζει χάνει προοδευτικά την ικανότητα επιδιόρθωσης τυχόν βλαβών στο DNA, καθώς επίσης και την ικανότητα να αντιδρά σε αυτές με επαγωγή του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου. Αντίθετα, στο ωάριο και μετέπειτα στο έμβρυο διατηρούνται μηχανισμοί που μπορούν να επιδιορθώσουν μέχρι κάποιο βαθμό βλάβες που κληρονομούνται από το πατρικό γένωμα (*Ahmadi and Ng, 1999a*). Μάλιστα, το ωάριο μπορεί να διορθώσει βλάβες στο γενετικό υλικό που μεταφέρει το σπερματοζωάριο όταν αυτές δεν ξεπερνούν το 8% του συνολικού πατρικού γονιδιώματος (*Ahmadi and Ng., 1999b*). Σε γενικές γραμμές, οι θραύσεις της διπλής έλικας είναι πιο δύσκολο να επιδιορθωθούν συγκριτικά με τις θραύσεις μονής έλικας και πιθανότατα έχουν βαρύτερες συνέπειες σε περίπτωση μη επιδιόρθωσης τους (*Brugmans et al., 2007*). Η ικανότητα του ωαρίου να ενεργοποιήσει τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την ποιότητα του κυτταροπλάσματος άλλα και από την ποιότητα του γενώματος του, παράγοντες που επηρεάζονται δραματικά από την ηλικία της γυναίκας και έτσι αιτιολογούνται τα μειωμένα ποσοστά εγκυμοσύνης, σε γυναίκες μεγαλύτερης ηλικίας (*Belloc et al., 2008*). Επιπλέον, η ποιότητα του DNA που φέρει το σπερματοζωάριο επηρεάζεται αρνητικά από την ηλικία του άνδρα (*Belloc et al., 2008*). Επομένως, οι συνέπειες της αλλοιωμένης δομής της χρωματίνης του σπερματοζωαρίου εξαρτώνται τόσο από τον τύπο και την έκταση της βλάβης στο DNA του σπερματοζωαρίου, όσο και από την ικανότητα του ωαρίου να επιδιορθώσει τη βλάβη αυτή (*Genesca et al., 1992*).

Η ύπαρξη βλάβης στο DNA εμβρύων που έχουν δημιουργηθεί in vitro και που υπερβαίνουν το όριο επιδιόρθωσης από τους ωαριακούς μηχανισμούς εξηγεί το φαινόμενο της διακοπής της ανάπτυξης τους, ακόμα και όταν ο καρύοτυπος τους

είναι φυσιολογικός. Αυτός ο τύπος βλάβης, που παρουσιάζεται κατά τη διάρκεια, ή και μετά την εμφύτευσης έχει χαρακτηριστεί και ως όψιμη πατρική επίδραση (late paternal effect). Υπάρχουν ενδείξεις ότι τα υψηλά επίπεδα βλάβης του DNA σχετίζονται με αναστολή της εξέλιξης ως το στάδιο της βλαστοκύστης (*Seli et al., 2004*). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι δεν προέρχονται όλες οι βλάβες του εμβρύου από το πατρικό γένωμα και μάλιστα έχει φανεί ότι σημαντικός αιτιολογικός παράγοντας εμφάνισης ανευπλοειδιών αποτελεί η ποιότητα του ωαρίου (*Fragouli et al., 2006, Sher et al., 2007*).

Βλάβη στο DNA του σπερματοζωαρίου μπορεί να προκληθεί τόσο κατά την παραγωγή του, όσο και κατά τη διέλευση του διαμέσου της επιδιδυμίδας, των εκσπερματικών πόρων ως την εκσπερμάτιση. Μελέτες έχουν δείξει ότι τα ποσοστά βλάβης του DNA των σπερματοζωαρίων που προέρχονται από την επιδιδυμίδα ή βρίσκονται κατά την εκσπερμάτιση παρουσιάζονται υψηλότερα συγκριτικά με εκείνα των σπερματοζωαρίων από τον όρχι (*Greco et al., 2005a, Suganuma et al., 2005*).

## **5.2 ΘΕΩΡΙΕΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ ΚΑΤΑΤΜΗΣΗΣ ΤΟΥ DNA**

Τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει εκτεταμένες προσπάθειες κατανόησης των μηχανισμών πρόκλησης κατάτμησης του DNA και έχουν προταθεί τρεις βασικές θεωρίες για την προέλευση αυτών των θραύσεων στις αλυσίδες του DNA των σπερματοζωαρίων. Οι θεωρίες αυτές σχετίζονται με τη σωστή διαμόρφωση της δομής της χρωματίνης, με την επίδραση των ελεύθερων ριζών οξυγόνου στην ακεραιότητα του γενετικού υλικού και τέλος με τη λειτουργία της απόπτωσης στα σπερματοζωάρια.

### **5.2.1 ΕΛΑΤΤΩΜΑΤΙΚΗ ΣΥΜΠΥΚΝΩΣΗ ΧΡΩΜΑΤΙΝΗΣ**

Κατά τη διάρκεια της μείωσης είναι απαραίτητη η γενετικά προγραμματισμένη εισαγωγή εγχοπών στο DNA από εξειδικευμένες νουκλεάσες, της οικογένειας SPO11 (SPO 11, initiator of meiotic double stranded breaks). Η διαδικασία αυτή επιτρέπει τον επιχιασμό (cross-over) των χρωμοσωμάτων που πραγματοποιείται στη μείωση (*Ahmadi et al., 1999b*). Φυσιολογικά, οι θραύσεις αυτές αποκαθίστανται μετά την ολοκλήρωση της μείωσης I, καθώς σε αντίθετη περίπτωση η διαδικασία δεν μπορεί να συνεχιστεί (*Bannister and Schimenti, 2004*). Εάν ωστόσο ο ελεγκτικός μηχανισμός δεν λειτουργήσει για την εξάλειψη του ελαττωματικού σπερματοζωαρίου, θα παραμείνουν μόνιμες θραύσεις στο DNA του σπερματοζωαρίου.

Κατά το στάδιο της στρογγυλής και επίμηκους σπερματίδας παρατηρούνται φυσιολογικά υψηλές συγκεντρώσεις της ενδογενούς νουκλεάσης τοποϊσομεράση II καθώς επίσης και θραύσεις στο DNA. Φαίνεται πως τα γεγονότα αυτά είναι απαραίτητα κατά την αναδιαμόρφωση της χρωματίνης ώστε να διευκολύνεται η αντικατάσταση των ιστονών από πρωταμίνες (*McPherson and Longo, 1992*). Η



τοποϊσομεράση II είναι το υπεύθυνο ένζυμο τόσο για τη δημιουργία των εγκοπών όσο και για την αποκατάστασή τους (McPherson and Longo, 1993). Η αναδίπλωση της χρωματίνης γύρω από τον νέο πυρήνα των πρωταμινών θα πρέπει να έχει ολοκληρωθεί και να έχει αποκατασταθεί η ακεραιότητα του DNA κατά τη διέλευση του σπερματοζωαρίου διαμέσου της επιδιδυμίδας. Ωστόσο αν οι προσωρινές εγκοπές δεν επιδιορθωθούν στο κατάλληλο στάδιο, τότε μπορεί να είναι ανιχνεύσιμες στα σπερματοζωάρια κατά την εκσπερμάτιση.

Η συμπαγής δομή της χρωματίνης στο σπερματοζωάριο ευνοεί τις διασυνδέσεις (cross-links) μεταξύ των δομών του DNA, αλλά και μεταξύ DNA και πρωτεϊνών. Μελέτες που επικεντρώθηκαν στην επίδραση των οιστρογόνων στη δομή της χρωματίνης των σπερματοζωαρίων έδειξαν ότι μόρια οιστρογονικών παραγώγων σχηματίζουν διμερή τα οποία δημιουργούν διασυνδέσεις στο DNA, με τέτοιο τρόπο ώστε αυτό να γίνεται ανθεκτικό στις διάφορες διαδικασίες αποδιάταξης που εφαρμόζονται κατά την τεχνική COMET, όπως χρήση αποδιατακτικών και αναγωγικών παραγόντων, άλλα και χρήση διαφόρων πρωτεασών (Bennetts et al., 2008). Έχει βρεθεί ότι διάφορες τέτοιες διασυνδέσεις της χρωματίνης απαντώνται πολύ συχνά σε πληθυσμούς ελαττωματικών σπερματοζωαρίων, αν και η μοριακή βάση του φαινομένου της υπερσταθεροποίησης δεν είναι πλήρως γνωστή (Windt et al., 1994).

Στην οργάνωση της χρωματίνης με αυτόν τον μηχανισμό σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν οι πρωταμίνες. Οι πρωτεΐνες και ειδικά η P2, είναι υπεύθυνες για τη σταθεροποίηση της δομής της χρωματίνης καθώς δημιουργούν δυσουλφιδικούς δεσμούς, τόσο μεταξύ των πρωταμινών όσο και εντός του ίδιου του μορίου τους (Manicardi et al., 1995). Χαμηλές συγκεντρώσεις της P2 και αυξημένη αναλογία P1:P2, λόγω παραμονής των ιστονών ή ανεπαρκής επεξεργασία του πρόδρομου μορίου της P1, έχουν βρεθεί σε υπογόνιμους άνδρες (de Yebra et al., 1998). Επίσης, έχει αναφερθεί αυξημένη συσχέτιση μη φυσιολογικής αναλογίας των πρωταμινών με αυξημένα επίπεδα κατάτμησης του DNA, χαμηλά ποσοστά γονιμοποίησης, χαμηλή ποιότητα εμβρύων και τέλος χαμηλά ποσοστά εγκυμοσύνης (Simon et al., 2011, García-Peiró et al., 2011). Οποιαδήποτε τροποποίηση του φυσιολογικού προτύπου οργάνωσης της χρωματίνης πιθανώς έχει σαν αποτέλεσμα τα σπερματοζωάρια να καθίστανται πιο ευάλωτα μετορχικά.

### 5.2.2 ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ

Οι Ελεύθερες Ρίζες Οξυγόνου (EPO) προσδιορίζονται ως άτομα ή μόρια οξυγόνου που έχουν ένα ή περισσότερα ελεύθερα ηλεκτρόνια και είναι ισχυροί οξειδωτικοί παράγοντες, οι οποίοι αντιδρούν με πληθώρα βιοχημικών μορίων, όπως λιπίδια, αμινοξέα, πρωτεΐνες αλλά και με το DNA. Οι EPO σε χαμηλές συγκεντρώσεις συμβάλλουν σε σημαντικές λειτουργίες του σπερματοζωαρίου. Για παράδειγμα, το υπεροξειδίο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ), εμπλέκεται στην υπερδραστική κίνηση της ουράς κατά την ενεργοποίηση (capacitation) του σπερματοζωαρίου (Bize et al., 1991). Επιπλέον, οι EPO είναι σημαντικές για την υπεροξειδωση των λιπιδίων αυξάνοντας έτσι τη διεισδυτική ικανότητα του σπερματοζωαρίου, η οποία απαιτείται

για τη σωστή αλληλεπίδραση του με τη διαφανή ζώνη του ωαρίου (*Aitken et al., 1989*).

Γενικά, τα σπερματοζωάρια διαθέτουν δύο κύριους μηχανισμούς ενάντια στις EPO: τη συμπαγή οργάνωση της χρωματίνης τους και την αντιοξειδωτική προστασία του πλάσματος. Τα ώριμα σπερματοζωάρια στερούνται κυτταροπλάσματος, που είναι κύρια πηγή αντιοξειδωτικών ουσιών. Ωστόσο, ενζυμικοί και μη παράγοντες του πλάσματος όπως η δισμουτάση του υπεροξειδίου, η καταλάση, το σύστημα υπεροξειδάση της γλουταθειόνης/ρεδουκτάση της γλουταθειόνης αλλά και ουσίες όπως το ασκορβικό οξύ, η γλουταθειόνη και η ταυρίνη συμβάλλουν στην αντιοξειδωτική προστασία ενάντια στις EPO (*Agarwal et al., 2004*). Οι βλάβες από τις EPO προκύπτουν όταν τα επίπεδα τους ξεπερνούν τις εξισορροπητικές ιδιότητες του ανδρικού γεννητικού συστήματος και του σπερματικού πλάσματος, με αποτέλεσμα την εμφάνιση του οξειδωτικού στρες (*Sikka et al., 2001*). Υψηλές συγκεντρώσεις EPO έχουν συσχετισθεί με κατάτμηση της διπλής και της μονής έλικας του DNA, με αποτέλεσμα να θεωρούνται ένας από τους βασικότερους παράγοντες που συμβάλλουν στον κατακερματισμό του DNA (*Aitken and Krausz, 2001, Agarwal et al., 2003*).

Κύριες πηγές EPO στο σπέρμα προκύπτουν από την ύπαρξη λευκοκυττάρων στο σπερματικό πλάσμα, άλλα και από τα ίδια τα σπερματοζωάρια, ειδικά από τις ανώριμες μορφές ή από τα σπερματοζωάρια με μη φυσιολογική μορφολογία κεφαλής και διατήρηση του κυτταροπλασματικού υπολείμματος (*Aitken et al., 1992*). Έρευνες έδειξαν ότι τα ανώριμα σπερματοζωάρια παράγουν υψηλές συγκεντρώσεις EPO και μπορούν να προκαλέσουν βλάβη στα ώριμα, κατά τη δίοδο τους από την επιδιδυμίδα (*Ollero et al., 2001*). Τα επιθηλιακά κύτταρα της επιδιδυμίδας φαίνεται ότι συμβάλλουν στη βλάβη του DNA των σπερματοζωαρίων, είτε μέσω της παραγωγής EPO, όπως η υδροξυλική ρίζα και το οξειδίο του αζώτου (*Britan et al., 2006*), είτε μέσω της ενεργοποίησης των κασπασών και των ενδονουκλεασών από φυσικοχημικούς παράγοντες όπως υψηλές θερμοκρασίες (*Banks et al., 2005*) και περιβαλλοντικούς παράγοντες (*Rubes et al., 2007*). Στην πρώτη περίπτωση, θεωρητικά, η βλάβη θα μπορούσε να αποφευχθεί με τη λήψη εξωγενώς αντιοξειδωτικών παραγόντων, ενώ αντίθετα κάτι τέτοιο δεν θα ήταν αποτελεσματικό στη δεύτερη περίπτωση. Η επιδιδυμίδα λοιπόν θα μπορούσε να θεωρηθεί σαν ένας επιπλέον ελεγκτικός μηχανισμός, εκτός από τα κύτταρα Sertoli, για τον περιορισμό των μη φυσιολογικών σπερματοζωαρίων (*Suganuma et al., 2005*).

Η χρωματίνη των σπερματοζωαρίων που φέρουν τέτοιου είδους βλάβη περιέχει παράγωγα βάσεων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η υδροξυλική ρίζα, όπως και η ιονίζουσα ακτινοβολία, που οδηγούν, σε πρώτο στάδιο, στη δημιουργία 8-OH-γουανίνης και 8-OH-2'-δεοξυγουανοσίνης (8-OHdG) και σε δεύτερο στάδιο στην δημιουργία θραύσεων της μονής έλικας του DNA (*Cui et al., 2000*). Ωστόσο, η υδροξυλική ρίζα μπορεί να προκαλέσει στη συνέχεια θραύσεις της διπλής έλικας του DNA, μέσω της ενεργοποίησης κασπασών και ενδονουκλεασών του σπερματοζωαρίου. Η σπουδαιότητα αυτού του γεγονότος έγκειται στο ότι οι θραύσεις της μονής έλικας του DNA είναι δυνατό να επιδιορθωθούν σε μετέπειτα στάδιο από το ωάριο ή το έμβρυο. Αντίθετα, οι εκτεταμένες θραύσεις της διπλής

έλικας πρακτικά δεν μπορούν να διορθωθούν και παραμένουν στο αναπτυσσόμενο έμβρυο.

Οι ΕΡΟ μπορούν να οδηγήσουν σε ποικίλες αλλοιώσεις της δομής του DNA, όπως σε διασυνδέσεις (*Altman et al., 1995*), σε εγκοπές στις έλικες του DNA (*Chiu et al., 1995*), αλλά και σε οξειδώσεις των βάσεων του (*Dizdaroglu, 1992*). Οι συνέπειες του φαινομένου αυτού *in vivo* δεν θα πρέπει να εγείρουν μεγάλο προβληματισμό καθώς οι αλλοιώσεις της μεμβράνης των σπερματοζωαρίων από τα αυξημένα επίπεδα ΕΡΟ καθιστούν τα συγκεκριμένα σπερματοζωάρια ανίκανα να συμμετέχουν στη διαδικασία της γονιμοποίησης. Ωστόσο ιδιαίτερος προβληματισμός παρουσιάζεται με τη χρήση της τεχνικής μικρογονιμοποίησης, με την ενδοωαριακή έγχυση σπερματοζωαρίων (ICSI), όπου αυτές οι δικλίδες ασφαλείας ακυρώνονται.

### 5.2.3 ΑΠΟΠΤΩΣΗ

Ο μηχανισμός της απόπτωσης στους όρχεις λειτουργεί φυσιολογικά ελέγχοντας τον υπέρμετρο πολλαπλασιασμό των γαμετών και περιορίζοντας τον ρυθμό πολλαπλασιασμού τους σε τέτοια επίπεδα ώστε να μην υπερβαίνουν την ικανότητα των κυττάρων Sertoli να τους υποστηρίξουν (*Rodriguez et al., 1997*). Τα κύτταρα της σπερματικής σειράς πολλαπλασιάζονται κλωνικά κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης, με πολλαπλούς κύκλους μιτώσεων και μειώσεων (*Sinha Hikim and Swerdloff, 1999*). Επομένως είναι απαραίτητη η ύπαρξη ενός μηχανισμού ελέγχου, με σκοπό τον περιορισμό του αριθμού τους, έτσι ώστε να μπορούν να υποστηριχθούν από τα κύτταρα Sertoli. Τα κύτταρα Sertoli είναι υπεύθυνα για την επαγωγή της απόπτωσης στο 50-60% όλων των γεννητικών κυττάρων που εισέρχονται στην πρώτη μειωτική διαίρεση (*Sakkas et al., 2010*).

Για τη διαδικασία της απόπτωσης στα κύτταρα της σπερματικής σειράς, εμπλέκεται η πρωτεΐνη Fas, με την προσδέση στον FasL που παράγεται από τα κύτταρα Sertoli, να αποτελεί το εναρκτήριο γεγονός της απόπτωσης (*Suda et al., 1993*). Τελικό αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας είναι η κατάτμηση του DNA και τελικά η αποδόμηση του κυττάρου. Αυτός ο μηχανισμός δεν είναι πλήρως αποτελεσματικός με συνέπεια ένα ποσοστό μη φυσιολογικών σπερματοζωαρίων να ολοκληρώνουν τη σπερματογένεση και τελικά να παρουσιάζονται στην εκσπερμάτιση, διατηρώντας πολλές φορές τυπική μορφολογία (*Burrello et al., 2004*). Σε άνδρες με παθολογικές παραμέτρους στο σπερμοδιάγραμμα, σε αντίθεση με αυτούς με φυσιολογικές παραμέτρους, έχει βρεθεί υψηλό ποσοστό αποπτωτικών σπερματοζωαρίων (*Shen et al., 2002*). Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι τα σπερματοζωάρια αυτά πιθανώς δεν ολοκλήρωσαν την αποπτωτική διαδικασία, υπέστησαν δηλαδή μια «αποτυχημένη απόπτωση» (abortive apoptosis). Ως αιτιολογία της αποτυχημένης απόπτωσης έχει προταθεί ότι οι άνδρες με μειωμένη σπερματογένεση δεν παράγουν τον απαραίτητο αριθμό σπερματοζωαρίων ούτως ώστε να ενεργοποιηθεί σωστά η διαδικασία της απόπτωσης (*Sakkas et al., 1999*).

Δεδομένα υποστηρίζουν την ύπαρξη χαρακτηριστικών της απόπτωσης και στα σπερματοζωάρια. Εκτός της κατάτμησης στο DNA, έχει βρεθεί ότι η ενεργοποίηση των κασπασών, των κύριων αποπτωτικών ενζύμων, αλλά και η εξωτερίκευση της

φωφσατιδυλοσερίνης στην μεμβράνη, χαρακτηρίζουν τον αποπτωτικό φαινότυπο όπως ακριβώς συμβαίνει και στα σωματικά κύτταρα (Weng *et al.*, 2002). Είναι πιθανό, με την εμφάνιση αποπτωτικών δεικτών σε ορισμένα σπερματοζωάρια να διασφαλίζεται η φαγοκυττάρωση τους από το γυναικείο γεννητικό σύστημα χωρίς να πυροδοτείται φλεγμονώδης αντίδραση (Kurosaka *et al.*, 2003).

Κατά την εξέλιξη των γεννητικών κυττάρων σε πλήρως διαφοροποιημένα σπερματοζωάρια χάνεται η ικανότητα του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, με τη μορφή της απόπτωσης διότι τα κύτταρα αυτά είναι μεταγραφικά και μεταφραστικά σιωπηλά. Επιπλέον, η δομική ιδιαιτερότητα του σπερματοζωαρίου καθιστά αδύνατη την επικοινωνία μεταξύ μιτοχονδρίων και πυρήνα, γεγονός που απαιτείται στο ενδογενές μονοπάτι της απόπτωσης (intrinsic pathway) στα σωματικά κύτταρα. Σε αυτή την περίπτωση, η πυροδότηση του μονοπατιού οδηγεί στην εμφάνιση ενδονουκλεασών, οι οποίες είτε απελευθερώνονται από τα μιτοχόνδρια (όπως η ενδονουκλεάση G), είτε ενεργοποιούνται στο κυτταρόπλασμα (όπως η δεοξυριβινουκλεάση που ενεργοποιείται από τις κασπάσες) και στη συνέχεια μετακινούνται στον πυρήνα όπου τέμνουν το πυρηνικό DNA. Κάτι τέτοιο στο σπερματοζωάριο είναι αδύνατο εφόσον τα μιτοχόνδρια και ο πυρήνας ανήκουν σε δύο διαφορετικά ανατομικά τμήματα του σπερματοζωαρίου (Barratt *et al.*, 2010). Φαίνεται λοιπόν πως τα ώριμα σπερματοζωάρια είναι αδύνατο να καταφύγουν στην απόπτωση και οι αποπτωτικοί δείκτες που βρίσκονται στα σπερματοζωάρια κατά τη εκσπερμάτιση αποτελούν απόδειξη της αποτυχίας του μηχανισμού για την πλήρη απομάκρυνση των ελαττωματικών σπερματοζωαρίων.

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι μια βασική διαφορά ανάμεσα στις τρεις θεωρίες έγκειται στο επίπεδο της κατάτμησης του DNA. Τόσο η αποδόμηση του DNA λόγω αποτυχημένης απόπτωσης, όσο και οι θραύσεις στις έλικες του DNA λόγω μη φυσιολογικής αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης κατά την σπερμιογένεση υποδηλώνουν την ύπαρξη ορχικής βλάβης. Αντίθετα η άποψη ότι η βλάβη προκύπτει λόγω οξειδωτικού στρες υποδεικνύει την προέλευση της βλάβης τόσο στο ορχικό όσο και στο μετορχικό στάδιο (Muratori *et al.*, 2006). Παρότι οι μηχανισμοί που οδηγούν στον κατακερματισμό του DNA δεν είναι πλήρως κατανοητοί, εντούτοις φαίνεται ότι θα μπορούσε να υπάρχει μια συσχέτιση μεταξύ των θεωριών προέλευσης, καθώς η μη φυσιολογική συμπίκνωση της χρωματίνης καθιστά το σπερματοζωάριο πιο ευάλωτο σε περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως η υπέρμετρη παραγωγή EPO.

### **5.3 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΒΛΑΒΕΣ ΣΤΟ DNA**

Με την γήρανση του άρρενος, η παραγωγή σπερματοζωαρίων δεν σταματά, ωστόσο οι γαμέτες που παράγονται χαρακτηρίζονται από προοδευτική μείωση της ποιότητάς τους και ιδιαίτερα από αλλοίωση της ακεραιότητας του γενετικού τους υλικού (Aitken and De Iulii, 2007). Ενώ δεν έχει φανεί να υπάρχει επίπτωση όσον αφορά στην εμφάνιση ανευπλοειδίας, το γενετικό υλικό των πιο ηλικιωμένων ανδρών

φαίνεται να παρουσιάζει υψηλότερο «φορτίο» μεταλλάξεων (Wyrobek *et al.*, 2006). Η μεγάλη πατρική ηλικία αποτελεί έναν ακόμα αιτιολογικό παράγοντα έκτος της μητρικής ηλικίας για την αυξημένη εμφάνιση ανωμαλιών στα έμβρυα που προκύπτουν από τέτοιους γαμέτες (Singh *et al.*, 2003, Schmid *et al.*, 2007). Αν και ο τύπος της βλάβης που απαντάται στο DNA των σπερματοζωαρίων ανδρών μεγάλης ηλικίας δεν έχει αποσαφηνιστεί είναι ωστόσο σίγουρο ότι όσο η πατρική ηλικία αυξάνει, τόσο αυξάνει και ο κίνδυνος νοσηρότητας του απογόνου. Η αυξημένη πατρική ηλικία έχει αναγνωριστεί ως παράγοντας κινδύνου για μια σειρά γενετικών ανωμαλιών όπως η αχονδροπλασία, το σύνδρομο Apert, αλλά και για μια σειρά νευρολογικών ασθενειών (Crow, 2000). Τέλος, η αυξημένη πατρική ηλικία έχει συσχετιστεί και με αυξημένο κίνδυνο αποβολών (Kleinhaus *et al.*, 2006).

Ένας ακόμα επιβαρυντικός παράγοντας για την ακεραιότητα του DNA είναι το κάπνισμα. Ο καπνός του τσιγάρου εκτός της μεταλλαξιογόνου δράσης του έχει συσχετιστεί με γενική μείωση όλων των παραμέτρων του σπέρματος: συγκέντρωση, κινητικότητα και μορφολογία (Potts *et al.*, 1999). Έχει βρεθεί ότι δείγματα που προέρχονται από καπνιστές εμφανίζουν έως και 50% υψηλότερα ποσοστά κατακερματισμού του DNA (Fraga *et al.*, 1996). Αυτό μπορεί να οφείλεται στην παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου που προέρχονται από λευκοκύτταρα. Οι μεταβολίτες των συστατικών του καπνού πιθανώς επάγουν μια φλεγμονώδη αντίδραση στο ανδρικό γεννητικό σύστημα, με επακόλουθη απελευθέρωση μορίων μεσολάβησης όπως η ιντερλευκίνη-6 και η ιντερλευκίνη-8, μόρια που μπορούν να στρατολογήσουν και να ενεργοποιήσουν τα λευκοκύτταρα (Saleh *et al.*, 2002). Αυτά με τη σειρά τους δημιουργούν υψηλά επίπεδα ελεύθερων ριζών οξυγόνου στο σπέρμα, επίπεδα που μπορεί να ξεπεράσουν την αντιοξειδωτική προστασία που προσφέρει το σπερματικό πλάσμα, με αποτέλεσμα την ύπαρξη οξειδωτικού στρες (Aitken *et al.*, 1995). Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι τα ποσοστά των αντιοξειδωτικών ουσιών που απαντώνται στο πλάσμα των καπνιστών είναι χαμηλότερα συγκριτικά με των μη καπνιστών (Fraga *et al.*, 1996).

Οι λοιμώξεις του γεννητικού συστήματος του άνδρα χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη λευκοκυττάρων (leukocytospermia), τα οποία αντιπροσωπεύουν την κύρια πηγή παραγωγής ελεύθερων ριζών οξυγόνου. Αν και οι μικρές συγκεντρώσεις των λευκοκυττάρων θεωρούνται φυσιολογικό εύρημα στο σπέρμα, μεγάλες συγκεντρώσεις λευκοκυττάρων έχουν συσχετιστεί και με αυξημένα ποσοστά κατακερματισμού του DNA (Alvarez *et al.*, 2002). Επιπλέον, εμπύρετες λοιμώξεις λόγω ιώσεων μπορεί να επηρεάσουν την ακεραιότητα του DNA (Evenson *et al.*, 2000).

Συγκεκριμένες παθολογίες του γεννητικού συστήματος όπως η υπερθερμία των όρχεων και η κισσοκήλη έχουν επίσης συσχετιστεί με αυξημένα ποσοστά βλάβης στο γενετικό υλικό των σπερματοζωαρίων αλλά και με τροποποιημένη αναλογία ιστονών-πρωταμινών στο DNA τους (Sailer *et al.*, 1997). Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι υπάρχει συσχέτιση ανάμεσα στην κισσοκήλη και στην εμφάνιση κυτταροπλασματικού υπολείμματος (ένα μορφολογικό στοιχείο το οποίο σχετίζεται με αυξημένα επίπεδα ROS) στον αυχένα των σπερματοζωαρίων και αυτό το κυτταροπλασματικό υπόλειμμα οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων βλάβης στο DNA

των υπογόνιμων ανδρών (*Fischer M.A. et al., 2003, Saleh et al., 2003a*). Επιπλέον, μελέτες έχουν αποδείξει βελτίωση του ποσοστού κατάτμησης του DNA των σπερματοζωαρίων μετά από χειρουργική επέμβαση κίρσοκλήλης (*Zini et al., 2005*).

Ο καρκίνος των όρχεων και η νόσος του Hodgkin αποτελούν δύο από τις πιο συχνές νεοπλασίες στους νέους άνδρες και έχουν άμεσα αρνητικές επιπτώσεις στην ποιότητα του σπέρματος ακόμα και πριν οι ασθενείς υποβληθούν σε θεραπεία (*O'Flaherty et al., 2008*). Επιπρόσθετα, οι ακτινοθεραπείες και οι χημειοθεραπείες που πιθανώς απαιτούνται για την αντιμετώπιση των νόσων αυτών επιβαρύνουν τόσο το σπερματικό επιθήλιο, όσο και την ακεραιότητα του DNA των σπερματοζωαρίων (*Morris, 2002*). Η αποκατάσταση της σπερματογένεσης μπορεί να επιτευχθεί μετά από πολλά έτη μετά την θεραπεία (*Fossa et al., 1997*).

Επιβαρυντικοί παράγοντες για την ακεραιότητα του DNA των γαμετών αποτελεί και μια πληθώρα ξενοβιοτικών, που προέρχονται από περιβαλλοντικούς ρύπους και που απαντώνται στον ατμοσφαιρικό αέρα. Εκτεταμένες έρευνες στον τομέα αυτό έχουν εστιαστεί τόσο στην αναγνώριση της χημικής τους σύστασης, όσο και στους μηχανισμούς δράσης αυτών των ουσιών (*Anderson et al., 2003, Evenson and Wixon, 2005, Spano et al., 2005*).

Επιπλέον αρνητική επίδραση στην ακεραιότητα του DNA έχει αναφερθεί ότι προκαλεί η επεξεργασία των δειγμάτων σπέρματος κατά την εξωσωματική (*Twigg et al., 1998*). Αν και οι τεχνικές αυτές είναι απαραίτητες για την απομάκρυνση των ακατάλληλων σπερματοζωαρίων, εντούτοις ο διαχωρισμός των σπερματοζωαρίων από το σπερματικό πλάσμα, τους στερεί την αντιοξειδωτική προστασία που αυτό προσφέρει. Επιπρόσθετες βλάβες υφίστανται οι γαμέτες κατά τις διαδικασίες κρυοσυντήρησης και απόψυξης, για τον λόγο αυτό υπάρχουν πρωτόκολλα που συνιστούν την προσθήκη επιπλέον αντιοξειδωτικών παραγόντων (*Kalthur et al., 2008*).

## **5.4 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΚΑΤΑΚΕΡΜΑΤΙΣΜΟΥ ΤΟΥ DNA**

Μέχρι σήμερα έχουν αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι για τον προσδιορισμό των επιπέδων κατακερματισμού του DNA των σπερματοζωαρίων. Σε αυτές περιλαμβάνονται τεχνικές όπως: η Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA), η Terminal Uridine Nick-End Labeling (TUNEL), η In Situ Nick Translation (ISNT), η τεχνική Comet, η DNA Breakage detection-Fluorescencein Situ Hybridization (DBD-FISH), η χρώση με πορτοκαλί της ακριδίνης (Acridine Orange, AO) και η τεχνική Sperm Chromatin Dispersion Test (SCD). Δύο βασικά στοιχεία που θα πρέπει να αναφερθούν σε αυτό το σημείο σχετίζονται πρώτον με το είδος της βλάβης που ανιχνεύει η κάθε μέθοδος, δηλαδή με την ικανότητα κάθε μεθόδου να ανιχνεύει βλάβες μονής ή διπλής αλυσίδας στο DNA και δεύτερον κατά πόσο είναι απαραίτητο ένα αρχικό προπαρασκευαστικό στάδιο αποδιάταξης προκειμένου να ανιχνευθούν οι

θραύσεις στο DNA. Με βάση τα παραπάνω οι μέθοδοι προσδιορισμού του κατακερματισμού του DNA διακρίνονται σε άμεσες και έμμεσες. Στις άμεσες μεθόδους (TUNEL, Comet, ISTN) προσδιορίζονται οι υπάρχουσες θραύσεις στο DNA. Αντίθετα, στις έμμεσες τεχνικές (AO, DBD-FISH, SCD) προσδιορίζεται ποσοτικά η ευπάθεια για θραύση του DNA, μετά από επεξεργασία σε όξινο ή αλκαλικό PH.

Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες τεχνικές αποτελούν η τεχνική TUNEL και SCSA. Αν και οι δύο αυτές τεχνικές παρουσιάζουν συγκρίσιμα αποτελέσματα, εντούτοις προσδιορίζουν διαφορετικούς τύπους βλάβης (Evenson *et al.*, 2007). Πιο συγκεκριμένα, η τεχνική TUNEL ποσοτικοποιεί τις θραύσεις μονής ή διπλής έλικας του DNA με ενσωμάτωση σημασμένων νουκλεοτιδίων, σε μια αντίδραση που καταλύεται από το ένζυμο τελική τρανσφεράση (Gorczyca *et al.*, 1993). Η τεχνική SCSA καθορίζει τον βαθμό αποδιάταξης του DNA, μετά από επεξεργασία με οξύ, με τη μέτρηση της αλλαγής χρώματος της χρωστικής πορτοκαλί της ακριδίνης από πράσινο (ένδειξη ανέπαφης διπλής έλικας) σε κόκκινο (ένδειξη αλληλεπίδρασης της χρωστικής με μονής έλικας DNA) και χρησιμοποιεί την κυτταρομετρία ροής για την αξιολόγηση των σπερματοζωαρίων (Evenson *et al.*, 1999). Μια πιο απλοποιημένη μέθοδος αποτελεί η μικροσκοπική μέθοδος AO, η οποία επίσης προσδιορίζει την ευπάθεια της χρωματίνης των σπερματοζωαρίων για θραύση, με την *in situ* επίδραση οξέος και υπολογίζει τη μεταχρωματική αλλαγή του φθορισμού της χρωστικής από πράσινο (φυσιολογικό DNA) σε κόκκινο (κατακερματισμένο DNA) με τη χρήση μικροσκοπίου φθορισμού (Hoshi *et al.*, 1996).

Άλλες τεχνικές που χρησιμοποιούνται συχνά για την ανίχνευση των επιπέδων κατακερματισμού του DNA είναι η τεχνική Comet και η τεχνική SCD. Οι δύο αυτές τεχνικές έχουν παρόμοια στάδια, όπως τον εμποτισμό σε γέλη αγαρόζης, την εφαρμογή λυτικού διαλύματος, χρώση και παρατήρηση στο μικροσκόπιο. Στην τεχνική Comet απαιτείται και ένα επιπλέον στάδιο ηλεκτροφόρησης με το οποίο διαχωρίζεται το ανέπαφο DNA, από το DNA στο οποίο υπάρχουν θραύσεις μονής ή διπλής αλυσίδας (Singh *et al.*, 1988). Στην τεχνική SCD μετράται το ποσοστό των σπερματοζωαρίων που παρουσιάζουν χαρακτηριστική άλω στην κεφαλή, η οποία υποδεικνύει την ύπαρξη ανέπαφου, χωρίς θραύσεις DNA (Fernandez *et al.*, 2003).

Η τεχνική ISTN αποτελεί μια τροποποίηση της TUNEL, καθώς και σε αυτή χρησιμοποιούνται σημασμένα νουκλεοτίδια τα οποία προσδένονται σε θραύσεις μονής έλικας, μια αντίδραση που καταλύεται από το ένζυμο DNA πολυμεράση I (Gorczyca *et al.*, 1993). Τέλος, η τεχνική DBD-FISH επιτρέπει την *in situ* ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό θραύσεων του DNA. Με τη χρήση αλκαλικού διαλύματος αποδιάταξης, επιτυγχάνεται η αποκάλυψη των μονόκλωνων θραύσεων στις οποίες υβριδοποιούνται κατάλληλα μόρια ανιχνευτών που παράγουν σήμα φθορισμού (Fernandez *et al.*, 1998).

Αν και οι μηχανισμοί με τους οποίους αξιολογείται με την κάθε μέθοδο η βλάβη του DNA ποικίλουν, οι περισσότερες τεχνικές εμφανίζουν αποτελέσματα που σχετίζονται μεταξύ τους. Η SCSA εμφανίζει θετική συσχέτιση με τεχνικές, όπως η Comet (Aravindan *et al.*, 1997), η TUNEL (Chohan *et al.*, 2006, Sailer *et al.*, 1995) και η SCD (Chohan *et al.*, 2006). Η TUNEL έχει επίσης αναφερθεί ότι παρουσιάζει

ισχυρή θετική συσχέτιση με την ΑΟ (Zini *et al.*, 2001a, b). Ωστόσο μετέπειτα δεδομένα υποστηρίζουν ότι η ΑΟ παρουσιάζει τροποποιημένα επίπεδα κατακερματισμού του DNA (Chohan *et al.*, 2006). Ενώ οι SCSA, TUNEL και SCD προβλέπουν παρόμοια επίπεδα κατακερματισμού του DNA, έχει φανεί ότι η ΑΟ συστηματικά εμφάνιζε υψηλότερα επίπεδα και δεν σχετιζόταν με αποτελέσματα της SCSA (Chohan *et al.*, 2006).

Οι παράμετροι του σπερμοδιαγράμματος όπως η συγκέντρωση, η κινητικότητα και η μορφολογία έχει φανεί ότι συστηματικά παρουσιάζουν μια αρνητική συσχέτιση με τα επίπεδα κατακερματισμού του DNA όταν αυτά μετρούνται με τεχνικές όπως COMET (Irvine *et al.*, 2000), TUNEL (Bench *et al.*, 1996, Zini *et al.*, 2001a, b), ή SCSA (Evenson *et al.*, 1999, Saleh *et al.*, 2003a, b). Αν και ο βαθμός συσχέτισης μεταξύ του κατακερματισμού και των παραμέτρων του σπεροδιαγράμματος ποικίλει μεταξύ των μελετών, όλες υποδεικνύουν πως ασθενείς με παθολογικές παραμέτρους συγκέντρωσης, κινητικότητας, μορφολογίας, έχουν αυξημένο ποσοστό κατακερματισμού του DNA. Άλλος ένα παράγοντας που θα πρέπει να εκτιμηθεί για τις τεχνικές αυτές είναι η επαναληψιμότητα σε διαφορετικές χρονικά μετρήσεις στο ίδιο άτομο. Οι παράμετροι του σπερμοδιαγράμματος μπορεί να εμφανίζουν μεγάλες αποκλίσεις ανάμεσα σε διαφορετικές μετρήσεις (Alvarez *et al.*, 2003, Amann *et al.*, 1989, Mallidis *et al.*, 1991). Συγκριτικά, μετρήσεις των επιπέδων κατακερματισμού του DNA σε διαφορετικούς χρόνους, σε ένα άτομο παρουσιάζουν καλύτερη επαναληψιμότητα όταν αυτές μετρούνται με την τεχνική TUNEL (Sergerie *et al.*, 2005a, b), ή SCSA (Evenson *et al.*, 1991, Zini *et al.*, 2001a, b).

Βασικά ερωτήματα που εγείρονται σχετικά με την πληθώρα των τεχνικών που έχουν αναπτυχθεί για την ανίχνευση της κατάτμησης του DNA αφορούν το κατά πόσο αυτές ανιχνεύουν τον ίδιο τύπο βλάβης, εάν δίνουν συγκρίσιμα αποτελέσματα και τέλος εάν αποτελούν διαδικασίες με τυποποιημένα πρωτοκόλλα. Υπάρχουν διαφορετικά δεδομένα από τη βιβλιογραφία για τα ποσοστά κατακερματισμού του DNA ανάμεσα σε γόνιμους και υπογόνιμους άνδρες. Επιπλέον, υπάρχει έλλειψη ομοφωνίας ανάμεσα στις διάφορες μελέτες που αξιολογούν την επίδραση του κατακερματισμού στα αποτελέσματα των τεχνικών υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Τα παραπάνω αντικατοπτρίζουν το βαθμό κατά τον οποίο οι διαφορετικές μέθοδοι επηρεάζουν το αποτέλεσμα (González-Marín *et al.*, 2012).

## 5.5 ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΕΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ

Σκοπός της επεξεργασίας των δειγμάτων σπέρματος πριν την εφαρμογή των τεχνικών υποβοηθούμενης αναπαραγωγής αποτελεί η απομόνωση των ιδανικών σπερματοζωαρίων με την καλύτερη ποιότητα του DNA.

Μέχρι στιγμής, υπάρχουν δύο κύριες μεθοδολογίες που χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση των ανδρών με υψηλά επίπεδα κατακερματισμού του DNA. Η πρώτη έγκειται στην επεξεργασία των δειγμάτων με τεχνικές που μπορούν να



διαχωρίσουν τα σπερματοζωάρια με αυξημένα επίπεδα βλάβης στο DNA τους από τα υπόλοιπα. Οι πιο σημαντικές από αυτές είναι η φυγοκέντρηση διαβαθμούμενης συγκέντρωσης (density gradient centrifugation) και η τεχνική “swim-up”. Όλες οι μέθοδοι δεν έχουν την ίδια αποτελεσματικότητα. Υπάρχουν μελέτες που υποστηρίζουν ότι η φυγοκέντρηση διαβαθμούμενης συγκέντρωσης έχει σαν αποτέλεσμα απομόνωση σπερματοζωαρίων που χαρακτηρίζεται από βελτιωμένες παραμέτρους μορφολογίας και κινητικότητας αλλά και ποσοστού κατάπτωσης του DNA (Sakkas *et al.*, 2000, Hammadeh *et al.*, 2001). Αντίθετα, πειραματικά δεδομένα υποδεικνύουν την τεχνική του swim-up ως λιγότερο αποτελεσματική τεχνική ως προς αυτήν την κατεύθυνση (Sakkas *et al.*, 2000, Hammadeh *et al.*, 2001). Επιπλέον, καινοτόμες τεχνικές έχουν αναπτυχθεί με σκοπό την επιλογή αποκλειστικά των σπερματοζωαρίων που παρουσιάζουν μη αποπτωτικά χαρακτηριστικά (Μαγνητικός Διαχωρισμός κυττάρων, Magnetic cell separation) (Said *et al.*, 2006). Η τεχνική αυτή δίνει την δυνατότητα επιλογής των σπερματοζωαρίων, καθώς με την χρήση σημασμένων σφαιριδίων, δεσμεύονται τα σπερματοζωάρια που παρουσιάζουν χαρακτηριστικά αποπτωτικού κυττάρου. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την απόκτηση ενός υποσυνόλου σπερματοζωαρίων με μειωμένο ποσοστό κατακερματισμού του DNA.

Μια άλλη θεραπευτική προσέγγιση βασίζεται στη χρήση συμπληρωμάτων με συστατικά που χαρακτηρίζονται για την αντιοξειδωτική τους δράση. Όπως έχει αναφερθεί, πολλά δεδομένα συνηγορούν στο ότι ιδιαίτερα σημαντικός επιβαρυντικός παράγοντας για την πρόκληση βλάβης στο DNA αποτελεί η εμφάνιση οξειδωτικού στρες στα κύτταρα. Μελέτες έδειξαν ότι ασθενείς που ακολούθησαν θεραπεία με αντιοξειδωτικά, παρουσίασαν μείωση των επιπέδων κατακερματισμού του DNA (Greco *et al.*, 2005b, Tremellen, 2008). Επιπλέον, σε ασθενείς με αυξημένο ποσοστό κατακερματισμού έχουν παρουσιαστεί ενθαρρυντικά αποτελέσματα με τη χρήση σπερματοζωαρίων που προέρχονται από τους όρχεις μετά από βιοψία (Greco *et al.*, 2005a). Τα σπερματοζωάρια αυτά αποκτούνται μετά από μικροεπέμβαση στους όρχεις (TESA, Testicular Sperm Aspiration ή TESE, Testicular Sperm Extraction) και μειώνεται έτσι η πιθανότητα να εμφανίσουν βλάβη στο DNA τους κατά την δίοδο τους διαμέσου της επιδιδυμίδας.

## **ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## 6 ΣΚΟΠΟΣ

Τις τελευταίες δεκαετίες έχει εκδηλωθεί ιδιαίτερο ενδιαφέρον στον τομέα της διερεύνησης των προβλημάτων υπογονιμότητας. Εντούτοις, ενώ στον κλάδο που αφορά στην γυναικεία υπογονιμότητα οι εξελίξεις είναι ραγδαίες, στο κομμάτι που αφορά στην ανδρική υπογονιμότητα δεν ισχύει το ίδιο. Μόλις τα τελευταία χρόνια έχει επικρατήσει η άποψη πως η βασική εξέταση του σπερμοδιαγράμματος δεν είναι επαρκής για τη διερεύνηση των προβλημάτων υπογονιμότητας ενός άνδρα. Σε αυτό λοιπόν το πλαίσιο, έχουν δημιουργηθεί τεχνικές ελέγχου για την ποιότητα του γενετικού υλικού των σπερματοζωαρίων, με σκοπό την απόκτηση επιπλέον πληροφοριών. Πληθώρα βιβλιογραφικών δεδομένων πλέον υποστηρίζουν την ύπαρξη συσχέτισης των αυξημένων ποσοστών κατακερματισμού του DNA των σπερματοζωαρίων και της απόπτωσης. Η απόπτωση αποτελεί ίσως τον πιο καλά χαρακτηρισμένο τύπο προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου και παρουσιάζει μια σειρά από χαρακτηριστικά στοιχεία, τόσο μορφολογικά, όσο και βιοχημικά.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η συσχέτιση της ενεργοποίησης των κασπασών στον καταρράκτη της απόπτωσης με την ύπαρξη κατάτμησης του DNA των σπερματοζωαρίων σε δείγματα σπέρματος ασθενών που διερευνώνται στα πλαίσια κύκλου εξωσωματικής γονιμοποίησης καθώς και η συσχέτιση της απόπτωσης με τις παραμέτρους του σπερμοδιαγράμματος.

Για την αξιολόγηση του κατακερματισμού επιλέχθηκαν δύο διαφορετικές τεχνικές: η Sperm Chromatin Dispersion (SCD) και η Terminal Uridine Nick-End Labeling (TUNEL) και για την αξιολόγηση της απόπτωσης χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης η ενεργοποίηση των κασπασών με την τεχνική (Fluorochrome- Labeled Inhibitors of Caspase, FLICA).

## **7 ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ**

### **7.1 ΥΛΙΚΟ**

Τα δείγματα που εξετάστηκαν στην παρούσα μελέτη προήλθαν από ασθενείς που απευθύνθηκαν σε μονάδα υποβοηθούμενης αναπαραγωγής στην Αθήνα. Αφορούν άνδρες που εξετάστηκαν τη χρονική περίοδο μεταξύ Σεπτεμβρίου 2015 και Φεβρουαρίου 2016, είτε με σκοπό την πραγματοποίηση κάποιου κύκλου IVF/ICSI, είτε στα πλαίσια διερεύνησης με αυτόν τον σκοπό. Για κάθε περιστατικό ασθενούς συμπληρώθηκε η κατάλληλη φόρμα στοιχείων που περιλάμβανε: το ονοματεπώνυμο, τον κωδικό ασθενούς, την ημερομηνία εξέτασης δείγματος, την ημερομηνία γέννησης και τέλος τις ημέρες αποχής από σεξουαλική δραστηριότητα πριν από την λήψη του δείγματος.

#### **7.1.1 ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΣΥΜΜΕΤΟΧΗΣ-ΑΠΟΚΛΕΙΣΜΟΥ**

Όλοι οι ασθενείς που εξετάστηκαν ήταν μεγαλύτεροι των 18 ετών, με εύρος ηλικίας από 30 έως 56 και μέση τιμή ηλικίας τα 41.2 έτη. Από τη μελέτη αποκλείστηκαν δείγματα που προήλθαν από αζωσπερμικούς ασθενείς.

### **7.2 ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ**

Η συλλογή των δειγμάτων έγινε σε έναν ειδικά διαμορφωμένο χώρο της κλινικής, ο οποίος βρίσκεται σε μικρή απόσταση από το ανδρολογικό εργαστήριο που πραγματοποιήθηκε η επεξεργασία τους. Κάθε ασθενής είχε λάβει σαφείς προφορικές και γραπτές οδηγίες για τη σωστή συλλογή του δείγματος. Κατά την ενημέρωση των ασθενών είχε δοθεί έμφαση στη σημασία ολοκληρωμένης λήψης του δείγματος, ώστε να αποφευχθεί οποιαδήποτε απώλεια, ειδικά του πρώτου κλάσματος της εκσπερμάτισης, που είναι πιο πλούσιο σε κινητά σπερματοζώαρια. Επίσης, από τον καθένα ασθενή ζητήθηκε να αναφέρει οποιασδήποτε απώλειας δείγματος ή δυσκολία κατά την διαδικασία συλλογής του και να τηρηθούν οι προτεινόμενες ημέρες αποχής από οποιαδήποτε σεξουαλική δραστηριότητα (2-7 ημέρες). Ωστόσο, υπήρξαν και δείγματα που εξετάστηκαν εκτός αυτού του χρονικού διαστήματος. Σε ελάχιστους άνδρες που δεν κατάφεραν να παρέχουν δείγμα τη δεδομένη στιγμή, ζητήθηκε να το φέρουν στην κλινική σε λιγότερο από μια ώρα από τη στιγμή την εκσπερμάτισης και να έχει σημειωθεί η ώρα της λήψης στο άποστειρωμένο δοχείο συλλογής του δείγματος. Όλα τα δείγματα προήλθαν από αυνανισμό και συλλέχθηκαν σε ειδικά αποστειρωμένα δοχεία.

## 7.3 ΣΠΕΡΜΟΔΙΑΓΡΑΜΜΑ

Αμέσως μετά την εκσπερμάτιση και τη μεταφορά του δείγματος στο ανδρολογικό εργαστήριο, το δείγμα παρέμεινε σε θερμοκρασία 37°C, σε κλίβανο Memmert μέχρι την πλήρη ρευστοποίηση του και την αξιολόγηση της κινητικότητας κατά την πρώτη ώρα μετά την εκσπερμάτιση. Η εξέταση του δείγματος ξεκινά με τον έλεγχο για την πλήρη ρευστοποίηση του μακροσκοπικά και μικροσκοπικά. Σε αυτή την φάση του ελέγχου εξετάστηκε η ομοιογένεια του δείγματος καθώς επίσης σημειώθηκε η ύπαρξη ή μη ζελατινοειδών σωματιδίων. Στην συνέχεια, μετρήθηκε ο όγκος του δείγματος σε ml, με τη βοήθεια ενός βαθμονομημένου δοχείου.

Για τη μικροσκοπική εξέταση του δείγματος χρησιμοποιήθηκε οπτικό μικροσκόπιο αντίθετης φάσης (Leica DM 2000). Σε μεγέθυνση 200 X έγινε έλεγχος του παρασκευάσματος για συγκολλήσεις και συσσωματώματα, ενώ ο έλεγχος για στρογγυλά κύτταρα (λευκοκύτταρα και ανώριμες σπερματίδες) έγινε σε τελική μεγέθυνση X 1000. Την πρώτη ώρα μετά την εκσπερμάτιση, ελέγχθηκε η κινητικότητα των σπερματοζωαρίων σε προθερμασμένη στους 37°C αντικειμενοφόρο πλάκα με αντικειμενικό φακό μεγέθυνσης 20 X. Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των σπερματοζωαρίων χρησιμοποιήθηκε η πλάκα μέτρησης Makler (Makler counting chamber, Irvine Scientific). Για την μέτρηση χρησιμοποιήθηκε φακός οπτικού μικροσκοπίου τελικής μεγέθυνσης 200 X.

Τέλος, για την αξιολόγηση των μορφολογικά τυπικών σπερματοζωαρίων δημιουργήθηκαν παρασκευάσματα ακολουθώντας πρωτόκολλο χρώσης. Το πρωτόκολλο χρώσης περιλάμβανε επώαση με την χρωστική May-Grünwald για 7 λεπτά, με προσθήκη σταγόνων απιονισμένου νερού κατά τα τελευταία 3 λεπτά, απόρριψη και συνέχεια επώαση με την χρωστική Giemsa για 10 λεπτά. Τέλος ακολούθησε στάδιο αποχρωματισμού με επώαση με απιονισμένο νερό για 5 λεπτά. Τα παρασκευάσματα αξιολογήθηκαν στο οπτικό μικροσκόπιο με καταδυτικό φακό τελικής μεγέθυνσης 1000 X. Στην αξιολόγηση χρησιμοποιήθηκαν τα κριτήρια που περιγράφονται στο εγχειρίδιο του Π.Ο.Υ. του 2010 για την εξέταση του σπέρματος (WHO, 2010).

## 7.4 ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΚΑΤΑΚΕΡΜΑΤΙΣΜΟΥ DNA

### 7.4.1 ΜΕΘΟΔΟΣ Sperm Chromatin Dispersion (SCD)

#### ΑΡΧΗ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η μέθοδος Sperm Chromatin Dispersion (SCD) καθορίζει την ευαισθησία του DNA των σπερματοζωαρίων στην αποδιάταξη μετά από επεξεργασία με οξύ και βασίζεται στην αρχή ότι η επαγόμενη αποδιάταξη του DNA σχετίζεται με την ύπαρξη ή όχι κατακερματισμού σε αυτό. Συγκεκριμένα, μετά την επίδραση οξέος, το οποίο προκαλεί αποδιάταξη του DNA και την απομάκρυνση των πυρηνικών

πρωτεϊνών, εφόσον υπάρχουν θραύσεις σε αυτό, δεν σχηματίζεται η χαρακτηριστική άλως που δημιουργείται στα σπερματοζώαρια με φυσιολογικό DNA. Όταν τα σπερματοζώαρια χωρίς κατακερματισμένο DNA τοποθετούνται σε πήκτη αγαρόζης και υφίστανται την επίδραση λυτικού διαλύματος, οι πυρήνες εμφανίζουν άλω αποτελούμενη από το DNA που έχει αποδιαταχθεί. Οι πυρήνες που έχουν υποστεί αυτήν την επεξεργασία ονομάζονται «πυρηνοειδή» (nucleoids). Σε περίπτωση ύπαρξης κατακερματισμού του DNA η άλως δεν μπορεί να σχηματιστεί ή είναι πολύ μικρή (Fernandez et al., 2003). Το αποτέλεσμα της εξέτασης εκφράζεται ως ποσοστό σπερματοζωαρίων που εμφανίζουν μικρή ή καθόλου άλω προς το σύνολο των εξεταζόμενων σπερματοζωαρίων.

### ΥΛΙΚΑ

- Αντικειμενοφόρες πλάκες, καλυπτρίδες, πιπέτες (GIBSON), tips 20μl, 200μl (SARSTEDT), δοχεία (15ml) (SARSTEDT), δοχεία eppendorf (1.5ml)
- Διάλυμα stock PBS 1X: σε δοχείο 100ml που περιείχε 90ml απιονισμένου νερού προστέθηκαν 10ml PBS 10X (10X, GIBCO, life technologies)
- Διάλυμα stock αγαρόζης: σε δοχείο που περιείχε 10ml απιονισμένου νερού προστέθηκε 0.1gr αγαρόζη (agarose low gelling temperature, SIGMA), θερμάνθηκε, αναδεύτηκε και στη συνέχεια διαχωρίστηκε σε δοχεία eppendorf.
- Διάλυμα stock HCl: σε δοχείο με 10ml απιονισμένο νερό προστέθηκαν 80μl διαλύματος υδροχλωρίου.
- Διάλυμα stock λυτικού διαλύματος (lysis buffer): 40ml απιονισμένο νερό, 10ml DTT, 0.5ml Triton-X 100, 7.25gr NaCl, 1.21gr Tris.
- Διάλυμα χρωστικής Giemsa (Giemsa azureosinmethylen blue solution, Merck): σε δοχείο που περιείχε 90ml προστέθηκαν 10 ml χρωστικής.
- Διάλυμα χρωστικής May-Grünwald (May-Grünwald's eosin-methylene blue solution, Merck).

### ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Τα στάδια της πειραματικής διαδικασίας που ακολουθήθηκαν περιγράφονται παρακάτω :

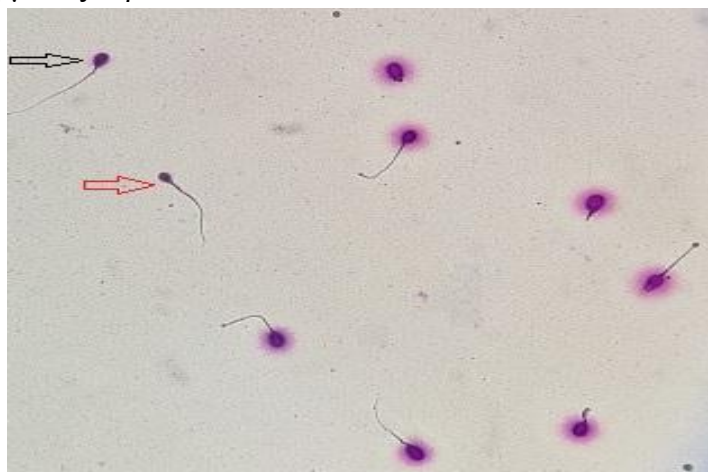
1. Σε δοχείο που περιείχε 300μl του προς εξέταση δείγμα τοποθετήθηκαν 10ml PBS 1X και ακολούθησε φυγοκέντρηση 1000 rpm για 10 λεπτά.
2. Ακολούθησε απομάκρυνση υπερκείμενου και ομογενοποίηση του ιζήματος ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι  $5-10 \times 10^6$  σπερματοζώαρια/ml.
3. Δοχείο eppendorf που περιείχε 140 μl αγαρόζη θερμάνθηκε στους 90°C μέχρι να λιώσει η αγαρόζη και διατηρήθηκε στους 37 °C για 5 λεπτά.
4. Από την αγαρόζη χρησιμοποιήθηκαν 12.5 μl ώστε να επιστρωθεί η προσημειωμένη με τον κωδικό του εξεταζόμενου δείγματος αντικειμενοφόρος πλάκα και παρέμεινε σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να στεγνώσει πλήρως.
5. Στο δοχείο eppendorf με την αγαρόζη προστέθηκαν 60 μl του δείγματος και ακολούθησε καλή ανάδευση του μίγματος.

6. Από το μίγμα χρησιμοποιήθηκαν 2 σταγόνες των 20 μl που μεταφέρθηκαν στην επιστρωμένη με αгарόζη αντικειμενοφόρο πλάκα και καλύφθηκαν με 2 καλυπτρίδες.
7. Η αντικειμενοφόρος πλάκα παρέμεινε σε θερμοκρασία 4°C για 10 λεπτά.
8. Αφαιρέθηκαν με προσοχή οι καλυπτρίδες και προστέθηκε διάλυμα HCl για 7 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
9. Απομακρύνθηκε το διάλυμα HCl και προστέθηκε το λυτικό διάλυμα (lysis solution) για 20 λεπτά.
10. Ακολούθησε έκπλυση του δείγματος με απιονισμένο νερό για 5 λεπτά.
11. Χρησιμοποιήθηκε διάλυμα 70% μεθανόλης για 2 λεπτά
12. Χρησιμοποιήθηκε διάλυμα 100% μεθανόλης για 2 λεπτά
13. Προστέθηκε χρωστική May-Grünwald για 7 λεπτά με ενδιάμεση προσθήκη 2-3 σταγόνων απιονισμένου νερού.
14. Απορρίφθηκε η χρωστική May-Grünwald και προστέθηκε διάλυμα χρωστικής Giemsa για 10 λεπτά.

Θετικά δείγματα ελέγχου επεξεργάστηκαν όπως τα υπόλοιπα μέχρι το βήμα 7. Στη συνέχεια προστέθηκαν 50μl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (300μM) ώστε να καλυφθεί όλη η επιφάνεια του δείγματος ελέγχου και ακολούθησε επώαση για 5 λεπτά. Στη συνέχεια, ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Το αποτέλεσμα ήταν τα σπερματοζώαρια του θετικού δείγματος ελέγχου να μην εμφανίζουν άλω ή να είναι πολύ μικρή

Αρνητικό δείγμα ελέγχου επεξεργάστηκε όπως τα υπόλοιπα δείγματα, χωρίς την εφαρμογή του διαλύματος του βήματος 8. Σε αυτό το δείγμα, το αποτέλεσμα ήταν η ύπαρξη σπερματοζωαρίων με χαρακτηριστική μεγάλη άλω.

Η εξέταση του δείγματος έγινε σε οπτικό μικροσκόπιο αντίθετης φάσης (Leica DM 2000). Το αποτέλεσμα των μετρήσεων εκφράστηκε σαν ποσοστό σπερματοζωαρίων που εμφανίζουν μικρή ή καθόλου άλω, ως προς το σύνολο των εξεταζόμενων σπερματοζωαρίων.



Εικόνα 15: Στο σπερματοζώαριο που σημαίνεται με το κόκκινο βέλος απουσιάζει πλήρως η χαρακτηριστική άλω, ένδειξη ύπαρξης κατακερματισμού του DNA του ενώ το σπερματοζώαριο που σημαίνεται με το μαύρο βέλος παρουσιάζει μεσαία άλω. Τα υπόλοιπα μη σημασμένα σπερματοζώαρια παρουσιάζουν ανέπαφο DNA καθώς εμφανίζουν τη χαρακτηριστική άλω.

## 7.4.2 ΜΕΘΟΔΟΣ TUNEL (Terminal Uridine Nick-End Labeling)

### ΑΡΧΗ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η τεχνική TUNEL (Terminal Uridine Nick-End Labeling) αποτελεί άμεση τεχνική ανίχνευσης των θραύσεων στο DNA. Αρχή της μεθόδου είναι η ενσωμάτωση σημασμένων νουκλεοτιδίων τριφωσφορικής δεοξουριδίνης (deoxy uridine triphosphate, dUTP) σε θραύσεις είτε μονής είτε διπλής έλικας του DNA. Η αντίδραση καταλύεται από το ένζυμο τελική δεοξυνουκλεοτιδυλ-τρανσφεράση (Terminal deoxy nucleotidyl transferase, TdT), το οποίο ενσωματώνει νουκλεοτίδια στο ελεύθερο 3'OH άκρο κάθε θράυσης. Τα νουκλεοτίδια που είναι σημασμένα επιτρέπουν την ανίχνευση σήματος στο μικροσκόπιο φθορισμού. Με αυτόν τον τρόπο κάθε σπερματοζωάριο του οποίου το DNA έχει κάποια θράυση θα δίνει σήμα φθορισμού, ενώ αντίθετα τα σπερματοζωάρια με φυσιολογικό DNA δεν θα παράγουν φθορισμό (Gorczyca *et al.*, 1993).

### ΥΛΙΚΑ

- Αντικειμενοφόρες πλάκες, πλαστικές καλυπτρίδες, πιπέτες (GIBSON), tips 20μl, 200μl (SARSTEDT), δοχεία eppendorf (1.5ml).
- Ρυθμιστικό διάλυμα εξισορρόπησης (equilibration buffer): 200 mM Potassium Cacodylate, 25 mM TrisHCL, 0.2 mM DTT, 0.25 mg/ml BSA, 2.5 Cobalt Chlorid.
- 20X SSC: 3M NaCl, 300mM Na<sub>3</sub>Citrate·H<sub>2</sub>O. Το διάλυμα αραιώνεται 1/10 με απιονισμένο νερό.
- Poly-L-lysine: 50-100μl από υδατικό διάλυμα 1.1%w/v poly-L-lysine (SIGMA).
- PBS 1X: Phosphate-buffered saline pH 7.4(GIBCO).
- 4% Φορμαλδεΰδη-PBS : το διάλυμα προετοιμάστηκε αμέσως πριν την χρήση. Σε 70 ml PBS προστέθηκαν 25ml από 16% φορμαλδεΰδη, χωρίς μεθανόλη και έγινε γίνεται προσαρμογή του PH στο 7.4 με 1N NaOH.
- 0.2% TritonX-100/PBS: σε 10ml PBS προστέθηκαν 20μlTritonX-100.
- DNase I buffer: 40mM TrisHCl (pH 7.9), 10mM NaCl, 6mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM CaCl<sub>2</sub>.
- DNase: 0.5μg σε 1μg/ml τελική συγκέντρωση.

### ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Για την πραγματοποίηση της εξέτασης χρησιμοποιήθηκαν τα αντιδραστήρια ApoAlert™ DNA Fragmentation Assay Kit, από την Clontech Laboratories, Inc. Το κλάσμα κάθε δείγματος που θα εξεταζόταν με την μέθοδο είχε μεταφερθεί σε προσημειωμένο δοχείο που ανέφερε τον κωδικό του εξεταζόμενου και την ημερομηνία της εξέτασης. Τα στάδια που ακολουθήθηκαν περιγράφονται παρακάτω:

1. Σε 300μl δείγματος προστέθηκαν 500μl PBS 1X και ακολούθησε φυγοκέντρωση στα 300g για 10 λεπτά.



2. Στην συνέχεια απορρίφθηκε το υπερκείμενο και προστέθηκαν 500μl PBS 1X με παράλληλη διάλυση του ιζήματος. Επαναλήφθηκε η φυγοκέντρωση στα 300g για 10 λεπτά.
3. Ακολούθησε επανάληψη του προηγούμενου βήματος.
4. Στη συνέχεια προστέθηκε κατάλληλη ποσότητα PBS 1X ώστε η τελική συγκέντρωση των σπερματοζωαρίων να ανέρχεται στο  $1 \times 10^6$ /ml.
5. Μεταφέρθηκαν 50-100μl δείγματος σε αντικειμενοφόρες πλάκες λυσίνης, όπου σημειώνεται ο κωδικός του εξεταζόμενου.
6. Πραγματοποιήθηκε προσεκτική επίστρωση του δείγματος στην αντικειμενοφόρο πλάκα.
7. Προστέθηκε διάλυμα φορμαλδεΐδης 4% σε PBS και επώαστηκε για 25 λεπτά στους 4°C.
8. Ακολούθησε επώαση για έκπλυση σε διάλυμα PBS 1X για 5 λεπτά.
9. Επαναλήφθηκε το στάδιο της έκπλυσης σε διάλυμα PBS 1X για 5 λεπτά.
10. Τοποθετήθηκε το δείγμα σε διάλυμα 0.2 TritonX-100/PBS και επώαστηκε για 5 λεπτά.
11. Προετοιμασία θετικού δείγματος ελέγχου (θετικό control)
  - Προσθήκη 100μl ρυθμιστικού διαλύματος DNάσης I.
  - Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.
  - Προσεκτική απομάκρυνση της περίσσειας του διαλύματος.
  - Προσθήκη 100μl ρυθμιστικού διαλύματος DNάσης I, το οποίο περιέχει 0.5-1 μg/ml DNάση.
  - Επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
  - Προσεκτική απομάκρυνση της περίσσειας του διαλύματος.
  - Τοποθέτηση 3-4 φορές σε δοχείο, ειδικό για δείγματα που επεξεργάζονται με DNάση, που περιέχει H<sub>2</sub>O.
12. Προστέθηκε σε δοχείο με διάλυμα PBS 1X για 5 λεπτά.
13. Επαναλήφθηκε η έκπλυση σε δοχείο με διάλυμα PBS 1X για 5 λεπτά.
14. Απομακρύνθηκε το δείγμα από το δοχείο του PBS 1X και απορρίφθηκε με προσοχή η περίσσεια του διαλύματος.
15. Επικαλύφθηκε η πλάκα με 100μl ρυθμιστικού διαλύματος εξισορρόπησης (equilibration buffer) και προστέθηκε πλαστική καλυπτρίδα για την καλύτερη εξάπλωση του ρυθμιστικού διαλύματος.
16. Στη συνέχεια επώαστηκε το δείγμα σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά.
17. Προετοιμασία TdT ρυθμιστικού διαλύματος επώασης της αντίδρασης
  - Τα αντιδραστήρια αποψύχονται μέχρι να αποκτήσουν θερμοκρασία δωματίου.
  - Υπολογισμός των όγκων του κάθε αντιδραστηρίου σύμφωνα με τον αριθμό των δειγμάτων, το θετικό και αρνητικό δείγμα ελέγχου.

- Πίνακας αντιδραστηρίων για μια αντίδραση:

<b>Αντιδραστήριο</b>	<b>Όγκος (σε μl)</b>
Eguilibration buffer	45
Nucleotide mix	05
TdT Enzyme	01
<b>Σύνολο</b>	<b>51</b>

18. Προετοιμασία TdT ρυθμιστικού διαλύματος επώασης αντίδρασης για αρνητικό δείγμα ελέγχου

- Σε αυτό το διάλυμα αντικαθίσταται το ένζυμο της αντίδρασης (TdT Enzyme) με απιονισμένο νερό.
19. Ακολούθησε απομάκρυνση της πλαστικής καλυπτρίδας και της περίσσειας του διαλύματος επώασης.
  20. Προστέθηκαν 50μl του TdT ρυθμιστικού διαλύματος επώασης της αντίδρασης.
  21. Στο αρνητικό δείγμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκε το ειδικό TdT ρυθμιστικό διάλυμα επώασης.
    - Από αυτό το στάδιο και μετά το δείγμα προστατεύεται από το φως, με την τοποθέτηση του σε πλαστικό σκουρόχρωμο κουτί.
  22. Τοποθετήθηκε πλαστική καλυπτρίδα και το δείγμα μεταφέρθηκε σε κλίβανο (Memmert) στους 37°C για 60 λεπτά ώστε να πραγματοποιηθεί η αντίδραση. Για την πραγματοποίηση της αντίδρασης απαιτείται αυξημένη υγρασία, για τον λόγο αυτό, κάτω από την πλάκα τοποθετούνται βρεγμένες χαρτοπετσέτες.
  23. Μετά το τέλος της επώασης απομακρύνθηκε η πλαστική καλυπτρίδα.
  24. Ο τερματισμός της αντίδρασης έγινε με μεταφορά του δείγματος σε δοχείο με διάλυμα 2X SSC και επώαστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.
  25. Ακολούθησε έκπλυση του δείγματος σε δοχείο που περιέχει PBS 1X και επώαστηκε για 5 λεπτά.
  26. Επαναλήφθηκε το βήμα έκπλυσης σε διάλυμα PBS 1X.
  27. Ακολούθησε μεταφορά του δείγματος σε δοχείο που περιέχει απιονισμένο νερό και επώαστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.
  28. Τέλος, επαναλήφθηκε πλύση σε δοχείο με απιονισμένο νερό.



Εικόνα 16: (Α) Η εικόνα του συνόλου των σπερματοζωαρίων που εξετάστηκαν, χωρίς φίλτρο φθορισμού. (Β) Εικόνα από το μικροσκόπιο φθορισμού. Παρατηρούμε ότι από όλα τα σπερματοζωάρια, μόνο ένα ήταν θετικό για κατακερματισμό, κατά την μέθοδο TUNEL.

Η εξέταση του δείγματος έγινε σε μικροσκόπιο φθορισμού με τη χρήση κατάλληλων φίλτρων. Το αποτέλεσμα των μετρήσεων εκφράστηκε σαν ποσοστό σπερματοζωαρίων που εξέπεμπαν φθορισμό, ως προς το σύνολο των εξεταζόμενων σπερματοζωαρίων.

## 7.5 ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ: ΤΕΧΝΙΚΗ FLICA (Fluorochrome-Labeled Inhibitors of Caspase)

### ΑΡΧΗ ΜΕΘΟΔΟΥ

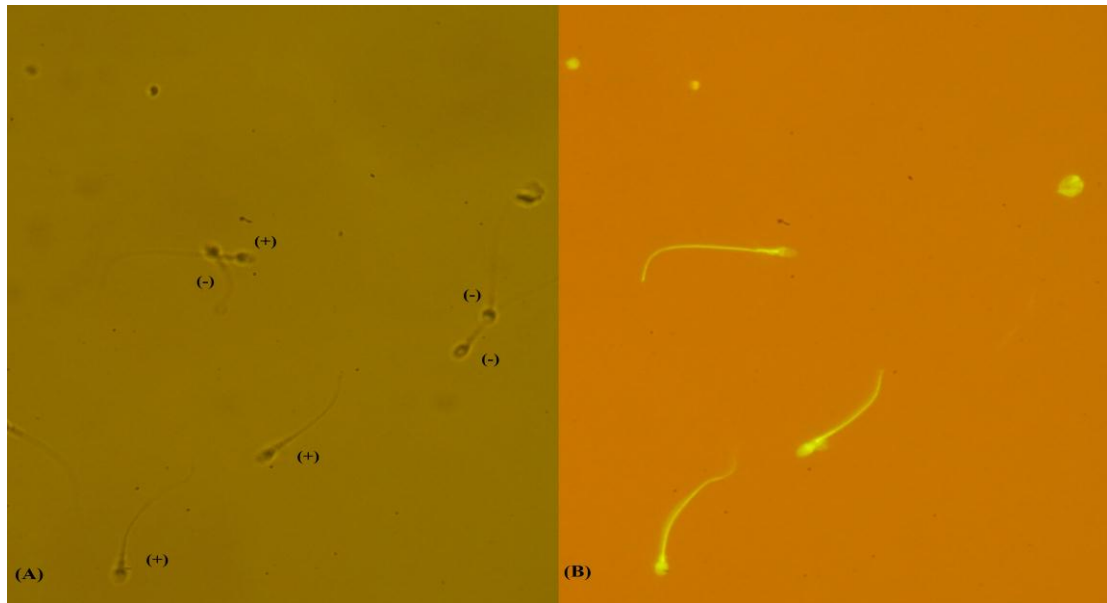
Η απόπτωση είναι συνδεδεμένη με την ενεργοποίηση των κασπασών που αποτελούν κύρια ένζυμα στον καταρράκτη της απόπτωσης. Η ενεργοποίηση των κασπασών αποτελεί βασικό στάδιο κατά την απόπτωση και σηματοδοτεί μια μη αναστρέψιμη πορεία του κυττάρου προς τον θάνατο. Η ταυτοποίηση των αποπτωτικών κυττάρων βασίζεται στην ανίχνευση ενεργοποιημένων κασπασών. Η αρχή της μεθόδου εφαρμόστηκε αρχικά για ένζυμα όπως οι εστεράσες και οι πρωτεάσες με την χρήση ραδιο-σημασμένων μορίων αναστολής, τα οποία ανιχνεύονταν με αυτοραδιογραφία (Poreba *et al.*, 2013). Στην περίπτωση των κασπασών, χρησιμοποιείται σαν δείκτης ένα καρβοξυ φθορίζον μόριο (FAM-), το οποίο συνδέεται με ένα πεπτίδιο μεθυλοκετόνης (FMK). Αυτά τα κετονικά συστατικά του αντιδραστηρίου διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη των ζωντανών και μη κυττάρων, χωρίς να είναι τοξικά για τα κύτταρα αυτά. Η ύπαρξη της πεπτιδικής αλληλουχίας βαλίνη-αλανίνη-ασπαρτικό οξύ (valyl-alanyl-aspartic acid, VAD) είναι σχεδιασμένη ώστε το μόριο να λειτουργεί σαν αναστολέας παν-κασπασών αφού προσδένεται σε ενεργοποιημένες κασπάσες-1, -3, -4, -5, -7, -8 και -9 (Ekert *et al.*, 1999).

## ΥΛΙΚΑ

- Αντικειμενοφόρες πλάκες, καλυπτρίδες, πιπέτες (GIBSON), tips 20μl, 200μl (SARSTEDT), δοχεία erpendorf (1.5ml).
- PBS 1X: Phosphate-buffered saline pH 7.4 (GIBCO).
- Dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma)
- Stock διαλύματος έκπλυσης (wash buffer 1X): προσθήκη 10ml από το wash buffer 10X, που παρέχεται από το kit αντιδραστηρίων σε 90ml απιονισμένου νερού. Το διάλυμα αναδεύτηκε καλά και φυλάχθηκε στους 2-8°C για 14 ημέρες.
- Stock διαλύματος μονιμοποίησης (fixative): προσθήκη 10ml του fixative 1/10 που παρέχεται από το kit αντιδραστηρίων σε 90ml απιονισμένου νερού.
- Ανασύσταση του 150X stock διαλύματος FAM-FLICA: στο λυοφιλοποιημένο αντιδραστήριο προστέθηκαν 50μl DMSO ώστε η συγκέντρωση να γίνει 150X. Το διάλυμα έμεινε να ομογενοποιηθεί σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε διαχωρισμός του διαλύματος σε σωλήνες τύπου erpendorf και φύλαξη στους -20°C.
- Προετοιμασία του 30X stock διαλύματος FAM-FLICA: το δοχείο erpendorf που περιέχει το διάλυμα 150X από τους -20°C έμεινε σε θερμοκρασία δωματίου για λίγα λεπτά μέχρι να ξεπαγώσει και στη συνέχεια προστέθηκαν 8μl PBS 1X (pH 7.4).

## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

1. Σε δοχείο που περιείχε 300μl του υπό εξέταση δείγματος προστέθηκαν 10ml PBS 1X και ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 1.000 rpm για 10 λεπτά.
2. Ακολούθησε απόρριψη του υπερκείμενου και το ίζημα μεταφέρθηκε σε σωλήνα τύπου erpendorf με τελικό όγκο 300μl και συγκέντρωση μικρότερη του 1x 10<sup>6</sup>.
3. Το διάλυμα 150X που φυλάσσεται στους -20°C έμεινε σε θερμοκρασία δωματίου για λίγα λεπτά μέχρι να ξεπαγώσει και στην συνέχεια προστέθηκαν 8μl PBS 1X.
4. Στο σωλήνα τύπου erpendorf που περιείχε το δείγμα προστέθηκαν τα 10μl του αντιδραστηρίου και ακολούθησε καλή ανάδευση.
5. Το δείγμα επώαστηκε για 60 λεπτά στους 37°C σε κλίβανο προφυλασσόμενο από το φως. Κατά την διάρκεια της επώασης το δείγμα αναδευόταν ώστε η αντίδραση να πραγματοποιείται σε όλο το δείγμα.
6. Για τον τερματισμό της αντίδρασης προστέθηκαν 2ml wash buffer 1X.
7. Έγινε ανάδευση και ακολούθησε φυγοκέντρηση σε 400g για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
8. Απόρριψη υπερκείμενου και διάλυση του ιζήματος.
9. Προσθήκη 1ml wash buffer 1X.
10. Έγινε ανάδευση και ακολούθησε φυγοκέντρηση σε 400g για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
11. Απορρίφθηκε το υπερκείμενο και το ίζημα διαλύθηκε ακόμη μια φορά με ποσότητα του διαλύματος έκπλυσης 1X ώστε ο τελικός όγκος να είναι 300μl.



Εικόνα 17: (Α) Εικόνα του συνόλου των προς εξέταση σπερματοζωαρίων, χωρίς το φίλτρο φθορισμού. Σημειώνονται με (+) τα θετικά για απόπτωση σπερματοζωάρια και με (-) τα αρνητικά. (Β) Η εικόνα των ίδιων σπερματοζωαρίων μετά την εφαρμογή φίλτρου φθορισμού.

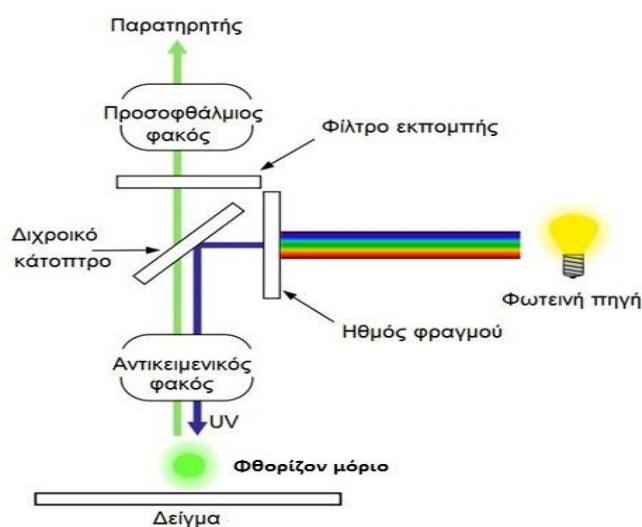
Θετικά δείγματα ελέγχου εξετάζονταν αφού πρώτα είχε γίνει επώαση τους στους 56°C για 5-10 λεπτά ώστε να γίνει επαγωγή της απόπτωσης πριν προστεθεί το αντιδραστήριο FLICA. Σαν αρνητικά δείγματα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν δείγματα στα οποία αντί του αντιδραστηρίου FLICA προστέθηκε μόνο ποσότητα του wash buffer. Η εξέταση του δείγματος έγινε σε μικροσκόπιο φθορισμού με τη χρήση κατάλληλων φίλτρων. Το αποτέλεσμα των μετρήσεων εκφράστηκε σαν ποσοστό σπερματοζωαρίων που εξέπεμπαν φθορισμό, ως προς το σύνολο των εξεταζόμενων σπερματοζωαρίων

## 7.6 ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ

Η μικροσκοπία φθορισμού είναι μια εξαιρετικά ευαίσθητη μέθοδος που βασίζεται στην αρχή ότι όταν άτομα ή μόρια που διεγείρονται με ακτινοβολία κατάλληλου μήκους κύματος, δηλαδή απορροφούν ενέργεια, τότε τα ηλεκτρόνια αυτών μετακινούνται παροδικά σε υψηλότερη ενεργειακή στοιβάδα. Μέρος της αρχικής διεγείρουσας ενέργειας καταναλώνεται, με αποτέλεσμα, κατά την επαναφορά των ηλεκτρονίων στη βασική στοιβάδα να εκπέμπεται ακτινοβολία (φθορισμός) μεγαλύτερου μήκους κύματος (μικρότερης ενέργειας). Τα μόρια που έχουν την ιδιότητα να φθορίζουν καλούνται φθοριοχρώματα ή φθοριοφόρα (fluorophores). Κάθε φθοριόχρωμα απελευθερώνει φθορίζον φως συγκεκριμένου μήκους κύματος το οποίο καθορίζεται από το ποσό της ενέργειας που καταναλώνεται κατά την διέγερση

των ηλεκτρονίων του. Έτσι κάθε φθοριόχρωμα έχει χαρακτηριστικά φάσματα απορρόφησης και εκπομπής ακτινοβολίας. Χαρακτηριστικά φθοριοχρώματα αποτελούν μόρια όπως η ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη (FITC), πορτοκαλί της ακριδίνης (Acridine Orange), με πολλές χρήσεις στην μικροσκοπία φθορισμού.

Στη βασική διάταξη ενός μικροσκοπίου φθορισμού περιλαμβάνεται μια φωτεινή πηγή, η οποία παρέχει ενέργεια με την μορφή φωτονίων. Συνήθως χρησιμοποιούνται φωτεινές πηγές μεγάλης έντασης όπως οι λυχνίες υδραργύρου (Hg) ή ξένου (Xe). Στη συνέχεια το φως της πηγής περνά από τον ηθμό διέγερσης (excitation filter), ο οποίος επιτρέπει τη διέλευση μόνο της ακτινοβολίας που διεγείρει το φθοριόχρωμα. Το διχροϊκό κάτοπτρο αποτελεί έναν ειδικά σχεδιασμένο καθρέπτη, ο οποίος επιτρέπει τη διέλευση ακτινοβολιών συγκεκριμένων μηκών κύματος και αντανακλά τις υπόλοιπες. Τοποθετείται σε γωνία  $45^\circ$  ως προς τον οπτικό άξονα και έχει κατεύθυνση προς τη φωτεινή πηγή. Με αυτόν τον τρόπο αντανακλά το φως της διέγερσης (μικρότερου μήκους κύματος) σε γωνία  $90^\circ$  και το κατευθύνει προς το δείγμα, ενώ επιτρέπει την διέλευση της ακτινοβολίας φθορισμού (μεγαλύτερου μήκους κύματος) που έχει εκπεμφθεί από το δείγμα. Μετά από το διχροϊκό κάτοπτρο η ακτινοβολία περνά μέσα από τον ηθμό εκπομπής (emission filter) ο οποίος επιτρέπει τη διέλευση μόνο της ακτινοβολίας εκπομπής προς τον προσοφθάλμιο φακό.



Εικόνα 18: Σχηματική αναπαράσταση της βασικής διάταξης ενός μικροσκοπίου φθορισμού.

Ακτινοβολία συγκεκριμένου μήκους κύματος δύναται να απορροφάται από περισσότερες από μια φθορίζουσες ουσίες και να τις διεγείρει, με αποτέλεσμα συχνά να υπάρχει επικάλυψη μεταξύ των φασμάτων εκπομπής διαφορετικών φθοριοχρωμάτων. Όταν χρησιμοποιούνται περισσότερες από μια φθορίζουσες χρωστικές θα πρέπει να επιλέγονται ώστε να έχουν όσο το δυνατόν πιο διακριτά φάσματα απορρόφησης και εκπομπής γίνεται. Ακόμα, η επιλογή των φίλτρων γίνεται ανάμεσα στις διάφορες κατηγορίες που υπάρχουν, όπως για παράδειγμα τα ευρυζωνικά φίλτρα (Wide band pass filter), τα οποία εμφανίζουν πιο έντονη διέγερση, με λιγότερη αντίθεση, ή τα φίλτρα στενής ζώνης (Narrow band pass filter) που χαρακτηρίζονται από καλύτερη αντίθεση. Για την ανίχνευση του αναστολέα των

κασπασών χρησιμοποιήθηκε φίλτρο εκπομπής εύρους 515-535nm, ενώ για την ανίχνευση των σημασμένων νουκλεοτιδίων με την τεχνική TUNEL χρησιμοποιήθηκε φίλτρο εκπομπής εύρους 500-540 nm.

## 8 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Για τη στατιστική επεξεργασία των δεδομένων της παρούσας μελέτης χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα SPSS (Superior Performance Software System), Version 21. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε επεξεργασία των αποτελεσμάτων με χρήση των μέτρων περιγραφικής στατιστικής. Για κάθε ποσοτική μεταβλητή σημειώθηκαν οι τιμές θέσης (μέση τιμή, διάμεσος), αλλά και τιμές βαθμού διασποράς (τυπική απόκλιση, διακύμανση). Στη συνέχεια οι ποσοτικές μεταβλητές ελέγχθηκαν ως προς την κανονικότητα της κατανομής τους με τη χρήση του ελέγχου Kolmogorov-Smirnov. Για τον σκοπό της μελέτης το σύνολο των δειγμάτων διαχωρίστηκε χρησιμοποιώντας ως κριτήριο την ύπαρξη ή μη τιμών μεγαλύτερων των τιμών αναφοράς για τις βασικές παραμέτρους του σπερμοδιαγράμματος (συγκέντρωση, κινητικότητα, μορφολογία). Για την κάθε μια από τις δύο κατηγορίες επαναλήφθηκαν τα μέσα περιγραφικής στατιστικής καθώς επίσης και ο έλεγχος κανονικότητας των κατανομών των ποσοτικών μεταβλητών.

Για τον έλεγχο των επιπέδων του κατακερματισμού ανάμεσα στις δύο ομάδες, (με φυσιολογικές παραμέτρους σπερμοδιαγράμματος η πρώτη και με παθολογικές η δεύτερη) όπως αυτά μετρήθηκαν με τη μέθοδο SCD, χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία του t-test για ανεξάρτητα δείγματα (independent t-test). Αντιστοίχως, ελέγχθηκαν τα επίπεδα του κατακερματισμού ανάμεσα στις δύο ομάδες, όπως αυτά μετρήθηκαν με τη μέθοδο TUNEL, χρησιμοποιώντας και πάλι τη δοκιμασία του t-test για ανεξάρτητα δείγματα.

Προκειμένου να διαπιστωθεί η ύπαρξη σχέσης μεταξύ του κατακερματισμού του DNA και της απόπτωσης χρησιμοποιήθηκε ο συντελεστής συσχέτισης του Pearson ( $r$ ), τόσο για τη μέθοδο SCD με την απόπτωση όσο και για τη μέθοδο TUNEL με την απόπτωση. Τέλος, για την διερεύνηση της σχέσης της απόπτωσης με τις παραμέτρους του σπερμοδιαγράμματος χρησιμοποιήθηκε ο συντελεστής συσχέτισης του Spearman ( $\rho$ ).



## 9 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στην μελέτη συμμετείχαν 61 ασθενείς ηλικίας από 30 έως 56 χρόνων. Οι ασθενείς προσήλθαν στην μονάδα υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, είτε στα πλαίσια διερεύνησης, είτε για την πραγματοποίηση κύκλου IVF/ICSI. Στον παρακάτω πίνακα, πίνακας 2 παρουσιάζονται τα περιγραφικά στοιχεία του συνόλου των ασθενών.

Πίνακας 2: Περιγραφικά στατιστικά του συνόλου των ασθενών

	ΕΥΡΟΣ	ΕΛΑΧΙΣΤΗ ΤΙΜΗ	ΜΕΓΙΣΤΗ ΤΙΜΗ	ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ	ΤΥΠΙΚΗ ΑΠΟΚΛΙΣΗ
ΗΛΙΚΙΑ (ΕΤΗ) (*)	26	30	56	41.2	6.0
ΑΠΟΧΗ (ΗΜΕΡΕΣ)	74	1	75	6.1	11.6
ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ (*10 <sup>6</sup> /ml) (*)	152	8	160	57.9	37.8
ΚΙΝΗΤΙΚΟΤΗΤΑ (%) (*)	55	10	65	45.5	10.8
Α (%)	30	0	30	12.7	7.0
Β (%)	45	0	45	24.4	7.1
C (%)	10	5	15	9.0	3.8
ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ (%) (*)	6	1	7	3.5	1.6

Οι παράμετροι που έχουν σημειωθεί με αστερίσκο(\*) παρουσιάζουν κανονική κατανομή συχνότητων όπως ελέγχθηκε με την δοκιμασία Kolmogorov-Smirnov.

Στα πλαίσια της σύγκρισης των μεθόδων μέτρησης του κατακερματισμού του DNA, το σύνολο των ασθενών διαχωρίστηκε σε δύο ομάδες. Από τους 61 ασθενείς που μελετήθηκαν οι 28 παρουσίασαν φυσιολογικές τιμές στις βασικές παραμέτρους του σπερμοδιαγράμματος (συγκέντρωση, κινητικότητα, μορφολογία) και αποτέλεσαν την μια ομάδα, ενώ οι υπόλοιποι 33 που παρουσίασαν σε τουλάχιστον μια από τις παραμέτρους τιμές χαμηλότερες από τις τιμές αναφοράς σύμφωνα με το εγχειρίδιο του WHO του 2010 αποτέλεσαν την δεύτερη ομάδα. Στους πίνακες 3 και 4 παρουσιάζονται τα περιγραφικά στατιστικά για την ομάδα των ασθενών με φυσιολογικές και παθολογικές παραμέτρους αντιστοίχως.

Πίνακας 3: Περιγραφικά στατιστικά της ομάδας με φυσιολογικές παραμέτρους σπερμιοδιαγράμματος

	ΕΥΡΟΣ	ΕΛΑΧΙΣΤΗ ΤΙΜΗ	ΜΕΓΙΣΤΗ ΤΙΜΗ	ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ	ΤΥΠΙΚΗ ΑΠΟΚΛΙΣΗ
ΗΛΙΚΙΑ (ΕΤΗ) (*)	24	32	56	42.4	6.5
ΑΠΟΧΗ (ΗΜΕΡΕΣ) (*)	13	2	15	4.9	3.8
ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ (*10 <sup>6</sup> /ml) (*)	137	23	160	81.3	38.1
ΚΙΝΗΤΙΚΟΤΗΤΑ (%) (*)	20	40	60	49.1	7.2
A (%) (*)	20	5	25	15	5.3
B (%) (*)	20	15	35	25.9	5.0
C (%)	10	5	15	8.7	3.8
ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ (%) (*)	2.9	4	7	5.0	0.7
ΚΑΤΑΚΕΡΜΑΤΙΣΜΟΣ SCD (%) (*)	32.0	5	37	17.8	9.2
ΚΑΤΑΚΕΡΜΑΤΙΣΜΟΣ TUNEL (%) (*)	33.7	2	35.7	13.9	9.7

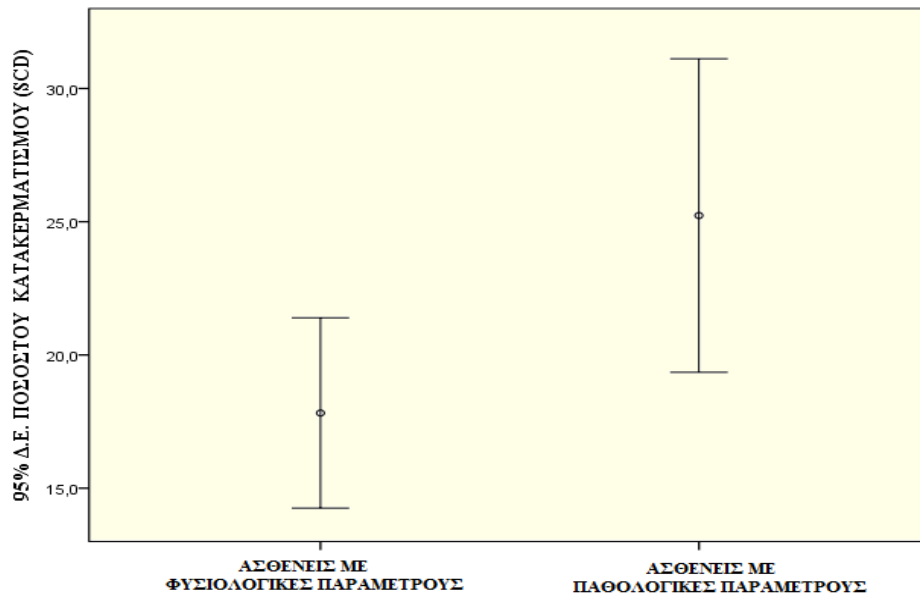
Οι παράμετροι που έχουν σημειωθεί με αστερίσκο (\*) παρουσιάζουν κανονική κατανομή συχνοτήτων όπως ελέγχθηκε με την δοκιμασία Kolmogorov-Smirnov.

Πίνακας 4: Περιγραφικά στατιστικά της ομάδας με παθολογικές παραμέτρους σπερμιοδιαγράμματος

	ΕΥΡΟΣ	ΕΛΑΧΙΣΤΗ ΤΙΜΗ	ΜΕΓΙΣΤΗ ΤΙΜΗ	ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ	ΤΥΠΙΚΗ ΑΠΟΚΛΙΣΗ
ΗΛΙΚΙΑ (ΕΤΗ) (*)	21	30	51	39.8	5.1
ΑΠΟΧΗ (ΗΜΕΡΕΣ)	74	1	75	6.2	13.9
ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ (*10 <sup>6</sup> /ml) (*)	92	8	100	38.0	23.9
ΚΙΝΗΤΙΚΟΤΗΤΑ (%) (*)	55	10	65	42.5	12.5
A (%) (*)	30	0	30	10.6	7.8
B (%) (*)	45	0	45	23.1	8.5
C (%) (*)	10	5	15	9.3	3.8
ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ (%) (*)	3.0	1	4	2.2	0.9
ΚΑΤΑΚΕΡΜΑΤΙΣΜΟΣ SCD (%) (*)	48	11	59	25.2	13.4
ΚΑΤΑΚΕΡΜΑΤΙΣΜΟΣ TUNEL (%) (*)	9.9	3.4	33.3	16.5	10.1

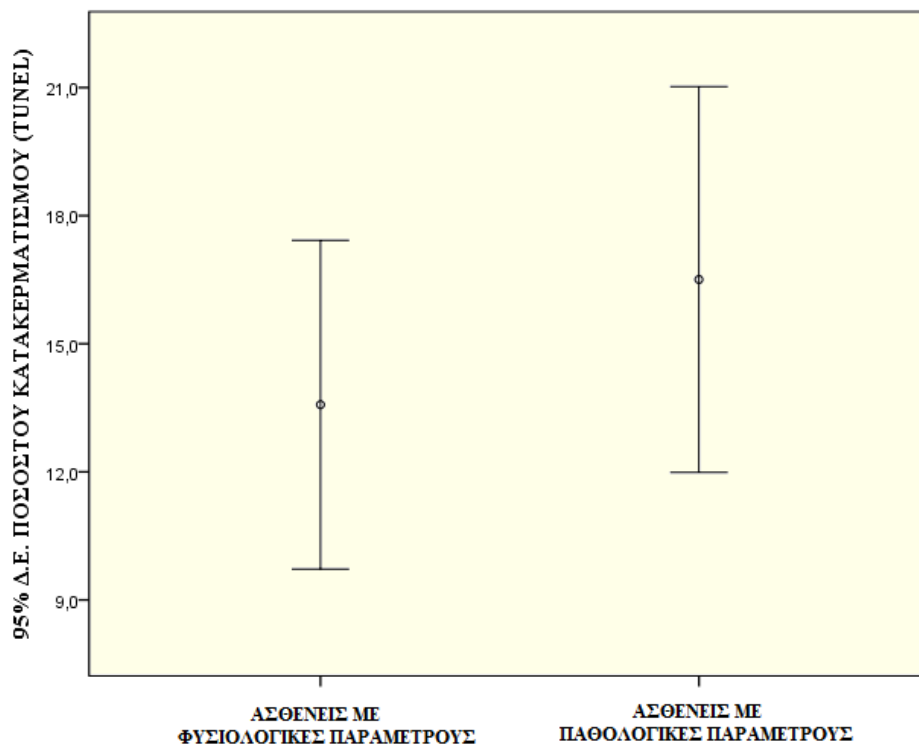
Οι παράμετροι που έχουν σημειωθεί με αστερίσκο (\*) παρουσιάζουν κανονική κατανομή συχνοτήτων όπως ελέγχθηκε με την δοκιμασία Kolmogorov-Smirnov.

Για τη μέθοδο SCD ελέγχθηκε με τη δοκιμασία του t-test για ανεξάρτητα δείγματα η διαφορά του ποσοστού κατακερματισμού στις δύο ομάδες (φυσιολογικές και παθολογικές παραμέτρους σπερμιοδιαγράμματος) και βρέθηκε ότι διαφέρουν στατιστικά σημαντικά. Πιο συγκεκριμένα, η μέση τιμή  $\pm$  τυπική απόκλιση της ομάδας των ασθενών με φυσιολογικές παραμέτρους ήταν: 17.8%  $\pm$  9.2%, ενώ η μέση τιμή της ομάδας των ασθενών με μη φυσιολογικές παραμέτρους είχε τιμή 25.2%  $\pm$  13.4%, μια διαφορά που είναι στατιστικώς σημαντική ( $p=0.032$ ).



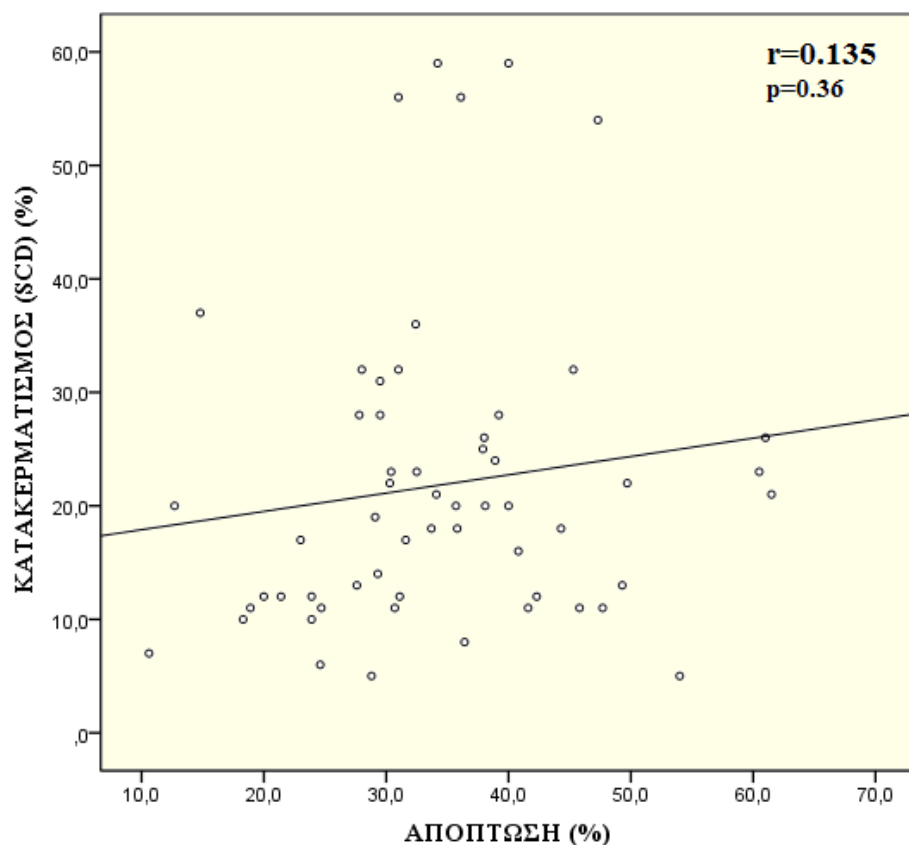
Διάγραμμα 1: Το 95% διάστημα εμπιστοσύνης για το ποσοστό κατακερματισμού όπως μετρήθηκε με την τεχνική SCD και στις τις δύο ομάδες ασθενών.

Αντιστοίχως ελέγχθηκε η διαφορά των ποσοστών του κατακερματισμού, όπως αυτά μετρήθηκαν με τη μέθοδο TUNEL και στις δύο ομάδες με την δοκιμασία του t-test για ανεξάρτητα δείγματα και η διαφορά τους δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική ( $p=0.313$ ).



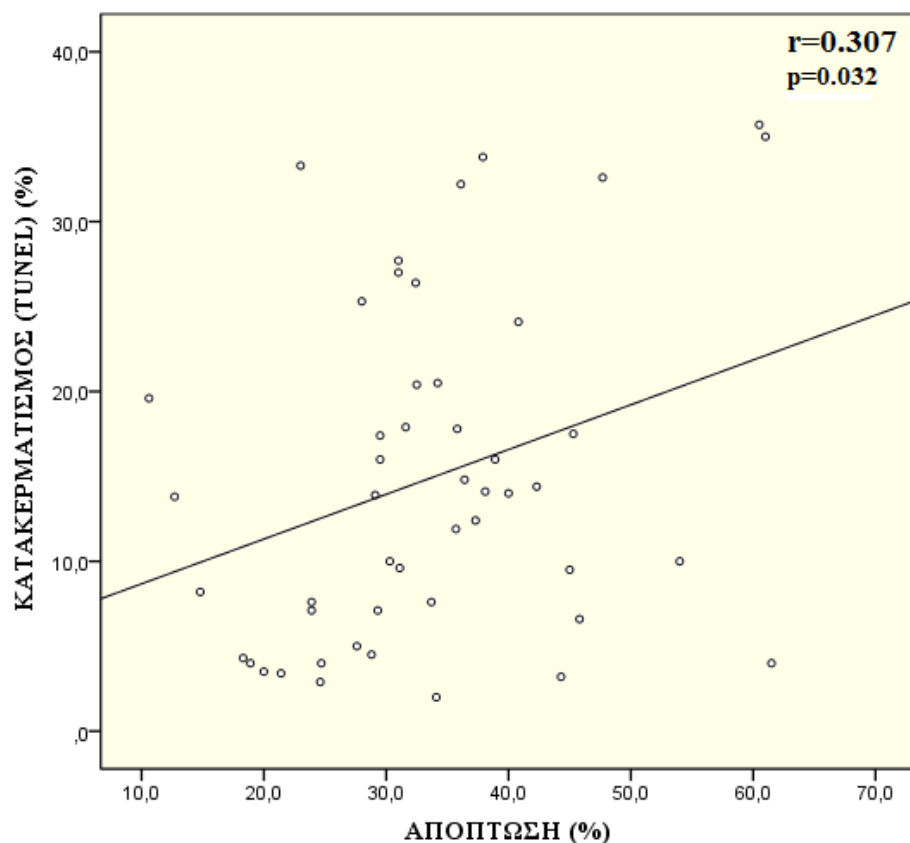
Διάγραμμα 2: Το 95% διάστημα εμπιστοσύνης για το ποσοστό κατακερματισμού όπως μετρήθηκε με την τεχνική TUNEL και στις τις δύο ομάδες ασθενών.

Για τη διερεύνηση της συσχέτισης μεταξύ του κατακερματισμού του DNA και της απόπτωσης χρησιμοποιήθηκε ο συντελεστής συσχέτισης του Pearson ( $r$ ). Για τη μέθοδο μέτρησης του κατακερματισμού όπως μετρήθηκε με τη μέθοδο SCD δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ( $p=0.316$ ).



Διάγραμμα 3: Διάγραμμα διασποράς του ποσοστού της απόπτωσης και του ποσοστού κατακερματισμού (SCD)

Αντίθετα, η μέθοδος TUNEL εμφανίζει στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την απόπτωση ( $r=0.307$ ,  $p=0.032$ ). Επιπλέον, ο έλεγχος του t-test κατά ζεύγη έδειξε στατιστικώς σημαντική την διαφορά των μέσων τιμών μεταξύ του ποσοστού κατακερματισμού με την μέθοδο TUNEL ( $14.8\% \pm 9.9\%$ ) και της απόπτωσης ( $33.5\% \pm 11.5\%$ ) ( $p<0.000$ ).



Διάγραμμα 4: Διάγραμμα διασποράς του ποσοστού της απόπτωσης και του ποσοστού κατακερματισμού (TUNEL)

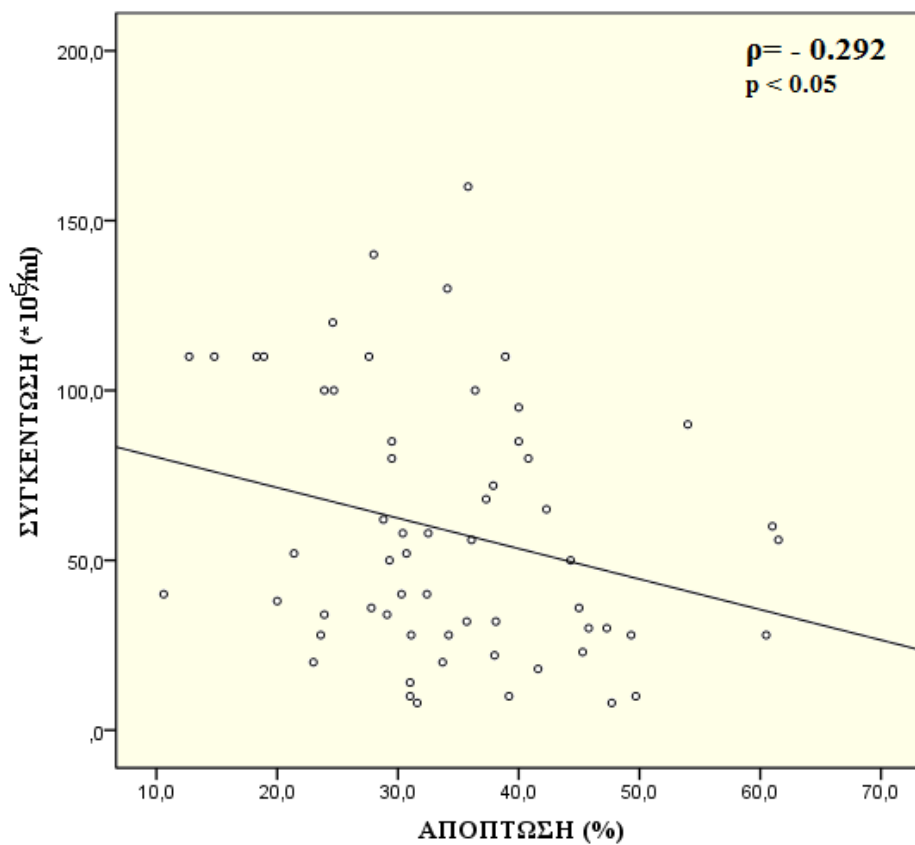
Πίνακας 6: Ο συντελεστής συσχέτισης Pearson (r) μεταξύ της απόπτωσης και του κατακερματισμού και με τις δύο μεθόδους.

ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗΣ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗΣ		
	Pearson (r)	p-value
ΚΑΤΑΚΕΡΜΑΤΙΣΜΟΣ TUNEL	0.307(*)	0.032
ΚΑΤΑΚΕΡΜΑΤΙΣΜΟΣ SCD	0.135	0.316

Για τον έλεγχο συσχέτισης μεταξύ της απόπτωσης και των παραμέτρων του σπερμοδιαγράμματος χρησιμοποιήθηκε ο συντελεστής συσχέτισης του Spearman ( $\rho$ ). Με τον έλεγχο αυτό βρέθηκε πως μόνο η παράμετρος της συγκέντρωσης παρουσιάζει στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την απόπτωση ( $\rho=-0.292$ ,  $p=0.024$ )

Πίνακας 7: Ο συντελεστής συσχέτισης Spearman ( $\rho$ ) μεταξύ της απόπτωσης και των παραμέτρων του σπερμοδιαγράμματος.

ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗΣ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗΣ		
	Spearman ( $\rho$ )	p-value
ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ (*10 <sup>6</sup> /ml)	-0.292(*)	0.024
ΚΙΝΗΤΙΚΟΤΗΤΑ (%)	-0.104	0.431
ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ (%)	-0.087	0.511



Διάγραμμα 5: Διάγραμμα διασποράς του ποσοστού της απόπτωσης και της συγκέντρωσης των σπερματοζωαρίων.

## 10 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Εδώ και δεκαετίες το σπερμοδιάγραμμα εξακολουθεί να αποτελεί τη βασική εξέταση του σπέρματος. Είναι μια εξέταση με την οποία αποκτάται μια συνολική εικόνα της λειτουργίας του ανδρικού γεννητικού συστήματος. Οι βασικές παράμετροι που εξετάζονται είναι η συγκέντρωση των σπερματοζωαρίων, η κινητικότητα και η μορφολογία τους. Για την απόκτηση συγκρίσιμων αποτελεσμάτων αλλά και την σωστή διεξαγωγή της εξέτασης όλα τα εργαστήρια οφείλουν να ακολουθούν τα πρωτόκολλα όπως περιγράφονται λεπτομερώς από τον Π.Ο.Υ. (WHO, 2010) στο τελευταίο εγχειρίδιο που εκδόθηκε το 2010 για την εξέταση του σπέρματος. Ωστόσο, η διάκριση μεταξύ γόνιμων και υπογόνιμων ανδρών βάσει των παραμέτρων του σπερμοδιαγράμματος δεν είναι δυνατή. Πλήθος ερευνητών υποστηρίζουν πως η διάκριση αυτή απαιτεί έναν πιο αποτελεσματικό δείκτη, ο οποίος να αντανακλά τελικά την ικανότητα απόκτησης υγιούς παιδιού είτε μέσω φυσιολογικής σύλληψης, είτε μετά από εφαρμογή των τεχνικών υποβοηθούμενης αναπαραγωγής.

Τα τελευταία χρόνια ο έλεγχος της ακεραιότητας του DNA των σπερματοζωαρίων κέρδισε το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας και τείνει να είναι εξέταση δεύτερης γραμμής. Αναπτύχθηκαν διάφορες τεχνικές για την ανίχνευση θραύσεων στο DNA του σπερματοζωαρίου, ενώ σε ερευνητικό επίπεδο μελετάται επίσης η απόπτωση των σπερματοζωαρίων.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η συσχέτιση της ενεργοποίησης των κασπασών στον καταρράκτη της απόπτωσης με την κατάτμηση του DNA των σπερματοζωαρίων. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης της απόπτωσης η ανίχνευση των ενεργοποιημένων ενζύμων της οικογένειας των κασπασών. Η μεθοδολογία της συγκεκριμένης τεχνικής βασίζεται στην πρόσδεση του αναστολέα των ενζύμων, ο οποίος είναι σημασμένος με ένα φθορίζον μόριο. Ο αναστολέας αυτός προσδένεται ειδικά στα ενεργά κέντρα μόνο των ενεργοποιημένων ενζύμων (Fluorochrome-Labeled Inhibitors of Caspase, FLICA).

Βρέθηκε, πως υπάρχει μια θετική συσχέτιση της απόπτωσης και του κατακερματισμού του DNA των σπερματοζωαρίων, ο οποίος μετρήθηκε με την μέθοδο TUNEL, μέθοδος που θεωρείται μέθοδος αναφοράς ( $r=0.307$ ,  $p=0.032$ ). Επιπλέον, η μέση τιμή της απόπτωσης ήταν στατιστικώς σημαντικά υψηλότερη σε σχέση με τον κατακερματισμό ( $p<0.000$ ). Στα περισσότερα δείγματα δηλαδή το ποσοστό των σπερματοζωαρίων θετικών για την ενεργοποίηση κασπασών ήταν υψηλότερο από το ποσοστό των TUNEL θετικών κυττάρων. Το γεγονός αυτό οδηγεί στην υπόθεση ότι οι αναστολείς των κασπασών θα μπορούσαν να θεωρηθούν πιο εξειδικευμένος δείκτης καθώς ανιχνεύουν τα σημάδια της απόπτωσης πριν ακόμα υπάρξει κατάτμηση στο DNA των σπερματοζωαρίων. Αντιθέτως, δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των ενεργοποιημένων κασπασών και της κατάτμησης του DNA, όταν ο κατακερματισμός μετρήθηκε με την μέθοδο SCD.

Τα δεδομένα της παρούσας μελέτης συμφωνούν τόσο με τη μελέτη των Said και συνεργατών που εξέτασε την παραπάνω συσχέτιση σε δείγματα ομάδας υγιών

δοτών ( $r=0.370$ ,  $p<0.008$ ) (*Said et al., 2006*), αλλά και με τη μελέτη των Marchetti και συνεργατών, η οποία έγινε σε δείγματα σπέρματος υπογόνιμων ανδρών και αναφέρει θετική συσχέτιση ( $R=0.60$ ,  $p<0.0001$ ) μεταξύ των θετικών για τη μέθοδο TUNEL σπερματοζωαρίων και του ποσοστού απόπτωσης (*Marchetti et al., 2004*). Μια πιο πρόσφατη μελέτη έδειξε την παραπάνω συσχέτιση σημειώνοντας ωστόσο ότι κάποιο ποσοστό κατάτμησης πιθανώς οφείλεται σε αυξημένα ποσοστά ελεύθερων ριζών οξυγόνου (EPO) στα δείγματα σπέρματος (*Muratori et al., 2015*). Παρά τις συστηματικές έρευνες, δεν έχει γίνει ακόμα ξεκάθαρο σε ποιο βαθμό οι EPO συμβάλλουν στον κατακερματισμό του DNA

Στη μελέτη ελέγχθηκε επίσης η συσχέτιση της ενεργοποίησης των κασπασών με τις βασικές παραμέτρους του σπερμοδιαγράμματος. Βιβλιογραφικά δεδομένα υποστηρίζουν την ύπαρξη αρνητικής συσχέτισης μεταξύ της ενεργοποίησης των κασπασών-3, -8 και -9 και της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων, τόσο σε νωπά δείγματα, όσο και σε δείγματα μετά την κρυοσυντήρησή τους, που προέρχονταν τόσο από υγιείς άνδρες, όσο και από υπογόνιμους ασθενείς (*Gunewald et al., 2001, Weng et al., 2002, Paasch et al., 2003, 2004b Marchetti et al., 2004, Taylor et al., 2004, Said et al., 2006*). Στην παρούσα μελέτη, ομοίως με τη μελέτη των Perticarari και συνεργατών δεν επιβεβαιώθηκε το παραπάνω εύρημα (*Perticarari et al., 2007*). Επιπλέον, με τη χρήση των σημασμένων φθορίζοντων αναστολέων των κασπασών έχει βρεθεί αρνητική συσχέτιση μεταξύ της ενεργοποίησης των κασπασών και της συγκέντρωσης των σπερματοζωαρίων (*Marchetti et al., 2004*), αποτέλεσμα που επιβεβαιώθηκε και στη μελέτη αυτή ( $\rho = -0.292$ ,  $p=0.024$ ).

Πολλές μελέτες διερεύνησαν την συσχέτιση μεταξύ της μορφολογίας των σπερματοζωαρίων και της απόπτωσης (*Gandini et al., 2000, Sakkas et al., 2002, Shen et al., 2002, Weng et al., 2002, Muratori et al., 2003, Aziz et al., 2007*). Αξίζει να σημειωθεί ότι στις μελέτες αυτές χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικά κριτήρια για την αξιολόγηση της μορφολογίας των σπερματοζωαρίων και πιο συγκεκριμένα τα κριτήρια του ΠΟΥ 1992 (*Muratori et al., 2003*), τα κριτήρια του ΠΟΥ 1999 (*Weng et al., 2002*), αλλά και τα αυστηρά κριτήρια κατά Tygerberg (*Gandini et al., 2000, Sakkas et al., 2002, Shen et al., 2002*). Σε όλες τις παραπάνω μελέτες επιβεβαιώνεται μια αρνητική συσχέτιση μεταξύ της μορφολογίας των σπερματοζωαρίων και της απόπτωσης. Μια ισχυρώς θετική συσχέτιση βρέθηκε επίσης μεταξύ των παθολογικών μορφών των σπερματοζωαρίων με ανωμαλίες στον αυχένα και της ενεργοποίησης της κασπάσης-3, γεγονός που επιβεβαιώνεται από την παρουσία της κασπάσης-3 στη μετα-ακροσωμική περιοχή των ώριμων σπερματοζωαρίων (*Paasch et al., 2004b*) και την παρουσία των μιτοχονδρίων και του κυτταροπλασματικού υπολείμματος στον αυχένα (*Weng et al., 2002*). Στην παρούσα μελέτη δεν επιβεβαιώθηκε κάποια τέτοια συσχέτιση και αυτό θα μπορούσε να εξηγηθεί από το γεγονός ότι για την αξιολόγηση της μορφολογίας δεν χρησιμοποιήθηκε κατηγοριοποίηση των τύπων ανωμαλιών στο σπερματοζωάριο (κεφαλής, αυχένα, ουράς), αλλά μετρήθηκε το ποσοστό των φυσιολογικών ως προς το σύνολο των σπερματοζωαρίων.

Προκειμένου να κατανοηθεί σε μεγαλύτερο βαθμό το φαινόμενο της απόπτωσης στα ώριμα σπερματοζωάρια, έρευνες στράφηκαν στον έλεγχο συσχέτισης μεταξύ της ενεργοποίησης των κασπασών και σε άλλους αποπτωτικούς δείκτες που



απαντώνται στα σωματικά κύτταρα. Διάφορες μελέτες έδειξαν θετική συσχέτιση μεταξύ της ενεργοποίησης των κασπασών και της διατάραξης του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης, τόσο σε δείγματα υπογόνιμων ανδρών, όσο και σε δείγματα υγιών δοτών (Marchetti et al., 2004, Grunewald et al., 2005b, Said et al., 2006). Επιπλέον, σε πολλές μελέτες εξετάστηκε η πιθανή συσχέτιση της ενεργοποίησης κασπασών με την εξωτερικήυση της φωσφατιδυλοσερίνης στη μεμβράνη των σπερματοζωαρίων, γεγονός που αποτελεί χαρακτηριστικό δείγμα αποπτωτικού κυττάρου, τουλάχιστον στα σωματικά κύτταρα. Στα αποτελέσματα για την παραπάνω συσχέτιση δεν υπάρχει ομοφωνία καθώς ορισμένες μελέτες έδειξαν μια άμεση συσχέτιση μεταξύ των δύο (Grunewald et al., 2001, Paasch et al., 2003), ενώ άλλες μελέτες συνέδεσαν την ενεργοποίηση των κασπασών με τη διαδικασία της ενεργοποίησης των σπερματοζωαρίων (capacitation) (De Vries et al., 2003). Όπως διαφαίνεται από τα παραπάνω η μελέτη του φαινομένου της απόπτωσης έχει συγκεντρώσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας, χωρίς ωστόσο να έχει γίνει απόλυτα κατανοητό. Αξίζει να σημειωθεί ότι στις διάφορες μελέτες χρησιμοποιούνται διαφορετικοί δείκτες για την αξιολόγηση της απόπτωσης και έτσι δεν είναι πάντα συγκρίσιμα τα αποτελέσματα των μελετών αυτών.

Στην παρούσα μελέτη ελέγχθηκε δευτερευόντως η διαφορά του ποσοστού κατακερματισμού του DNA ανάμεσα στην ομάδα ασθενών με φυσιολογικές παραμέτρους και σε ασθενείς με παθολογικές παραμέτρους σπέρματος και με τις δύο μεθόδους μέτρησης του κατακερματισμού. Οι μετρήσεις της τεχνικής SCD για την ομάδα των ασθενών με φυσιολογικές παραμέτρους είχαν μέση τιμή  $17,8\% \pm 9,2\%$ , ενώ η μέση τιμή της ομάδας των ασθενών με μη φυσιολογικές παραμέτρους ήταν  $25,2\% \pm 13,4\%$  ( $p=0,032$ ), διαφορά η οποία βρέθηκε στατιστικά σημαντική. Αντιθέτως, με τη μέθοδο TUNEL η διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική.

Αυτή η διαφοροποίηση στις μετρήσεις των δύο μεθόδων ίσως εξηγείται από το γεγονός ότι παρόλο που και οι δύο τεχνικές αξιολογούν τον κατακερματισμό του DNA, διαφέρει η αρχή μεθόδου για την κάθε μια. Η TUNEL ανιχνεύει απευθείας με σημασμένα νουκλεοτίδια τα σημεία εγκοπής της αλυσίδας του DNA. Επομένως το σήμα φθορισμού που ανιχνεύεται αντιπροσωπεύει όντως θραύσεις στην αλυσίδα του DNA ενώ η SCD αποτελεί έμμεση τεχνική, καθώς απαιτεί ένα επιπλέον στάδιο αποδιάταξης του DNA και βασίζεται περισσότερο στη σωστή οργάνωση του DNA του σπερματοζωαρίου, παρά σε πιθανές εγκοπές σε αυτό. Όπως φαίνεται και από τα παραπάνω μια κατηγοριοποίηση των ανδρών βάσει μόνο των παραμέτρων του σπερμοδιαγράμματος θα μπορούσε να οδηγήσει σε λανθασμένη διάγνωση υπογονιμότητας καθώς σε περίπτωση ασθενούς με φυσιολογικές παραμέτρους ίσως η διερεύνηση δεν προχωρούσε περαιτέρω, με αποτέλεσμα να μην υπάρχουν στοιχεία για την ακεραιότητα του DNA των σπερματοζωαρίων του ασθενούς. Σε αυτή λοιπόν την περίπτωση ο ασθενής θα κατατασσόταν στην κατηγορία της ανεξήγητης υπογονιμότητας. Με την χρήση της τεχνικής TUNEL δίνεται η πραγματική εικόνα όσον αφορά στην ακεραιότητα του γενετικού υλικού, και για τον λόγο αυτό χρησιμοποιείται ως η πιο κατάλληλη μέθοδος στην διερεύνηση ασθενών με ανεξήγητη υπογονιμότητα.

Μέχρι σήμερα έχουν αναπτυχθεί διάφορες τεχνικές με σκοπό την ανίχνευση θραύσεων στο DNA του σπερματοζωαρίου και υπάρχουν πολλές μελέτες που συγκρίνουν τα αποτελέσματα τους (*Sailer et al., 1995, Aravindan et al., 1997, Zini et al., 2001a, Chohan et al., 2006, Feijo and Esteves, 2014*). Μεγάλο επίσης ενδιαφέρον είχε η προσπάθεια διάκρισης μεταξύ γόνιμων και υπογόνιμων ασθενών με την χρήση της μέτρησης του κατακερματισμού του DNA ως δείκτη για την διάκριση αυτή (*Evenson et al., 1999, Zini et al., 2001a, Fernandez et al., 2003, Sergerie et al., 2005b, Giwercman et al., 2010, Sharma et al., 2010, Smit et al., 2010*). Στις περισσότερες μελέτες, το ποσοστό του κατακερματισμού στην ομάδα των υπογόνιμων ανδρών εμφανίζεται υψηλότερο συγκριτικά με στην ομάδα ελέγχου, ωστόσο το εύρος των τιμών είναι μεγάλο και υπάρχει σημαντική αλληλοεπικάλυψη μεταξύ των δύο ομάδων.

Ο μεγάλος όγκος πληροφοριών που αποκτούνται είναι δύσκολο να αξιολογηθεί καθώς σε κάθε μελέτη χρησιμοποιείται διαφορετική τεχνική μέτρησης του κατακερματισμού και επίσης διαφέρουν τα κριτήρια ορισμού της ομάδας των υπογόνιμων ασθενών. Πιο συγκεκριμένα, ορισμένες φορές ορίζονται ως υπογόνιμοι άνδρες με παθολογικές παραμέτρους του σπερμοδιαγράμματος, ενώ άλλες ως ασθενείς που καταφεύγουν σε τεχνικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Επίσης, ο τρόπος μέτρησης της κάθε μεθόδου μπορεί να επηρεάσει το αποτέλεσμα. Για παράδειγμα, οι μετρήσεις της τεχνικής TUNEL παρουσιάζουν σημαντική διαφορά ανάλογα με το αν έχει χρησιμοποιηθεί κυτταρομετρία ροής, ή μικροσκόπιο φθορισμού για την μέτρηση των TUNEL θετικών σπερματοζωαρίων (*Dominguez-Fandos et al., 2007*).

Συμπερασματικά, η χρήση ενός επιπλέον δείκτη ποιότητας, εκτός του σπερμοδιαγράμματος στα πλαίσια διερεύνησης της ανδρικής υπογονομότητας θεωρείται επιβεβλημένη ανάγκη. Ο κατακερματισμός του DNA ως δείκτης της ποιότητας των σπερματοζωαρίων μπορεί να χρησιμοποιηθεί συμπληρωματικά για την αξιολόγηση της ανδρικής υπογονομότητας, με χρήση ωστόσο μεθόδου αναφοράς, η οποία θα αξιολογεί τις πραγματικές θραύσεις στο DNA των σπερματοζωαρίων, όπως η μέθοδος TUNEL και για την οποία θα υπάρχουν καθορισμένες τιμές αναφοράς. Η χρήση της ανίχνευσης των ενεργοποιημένων κασπασών (FLICA) αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη τεχνική και μπορεί να θεωρηθεί πιο εξειδικευμένος δείκτης ποιότητας των σπερματοζωαρίων καθώς δίνει την δυνατότητα ανίχνευσης της απόπτωσης πριν ακόμα υπάρξει κατάτμηση στο DNA των σπερματοζωαρίων. Επιπλέον, η ανάπτυξη μελλοντικά μεθοδολογίας βάσει της FLICA με την οποία θα μπορούσε να γίνει επιλογή των μη αποπτωτικών σπερματοζωαρίων στα πλαίσια της εφαρμογής των τεχνικών υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, θα είχε σαν αποτέλεσμα την επιλογή σπερματοζωαρίων με ακέραιο γενετικό υλικό και καλύτερη δυναμική γονιμοποίησης.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Agarwal, A., Allamaneni, S.S., (2004) Oxidants and antioxidants in human fertility. *Middle East Fertil Soc J.*, 9(3): 187-97.
2. Agarwal, A., Said, T.M., (2003) Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Hum Reprod Update.*, 9(4): 331-45.
3. Ahmadi, A., Ng, S.C., (1999a) Developmental capacity of damaged spermatozoa. *Hum Reprod.*, 14(9): 2279-85.
4. Ahmadi, A., Ng, S.C., (1999b) Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa. *J Exp Zool.*, 284(6): 696-704.
5. Aitken, R.J., Clarkson, J.S., Fishel, S., (1989) Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. *Biol Reprod.*, 41(1): 183-97.
6. Aitken, R.J., Buckingham, D., West, K., Wu, F.C., Zikopoulos, K., Richardson, D.W., (1992) Differential contribution of leucocytes and spermatozoa to the generation of reactive oxygen species in the ejaculates of oligozoospermic patients and fertile donors. *J Reprod Fertil.*, 94(2): 451-62.
7. Aitken, R.J., Buckingham, D., Brindle, J., Gomez, E., Baker, G., Irvine, S. (1995) Analysis of sperm movement in relation to the oxidative stress created by leukocytes in washed sperm preparations and seminal plasma. *Hum Reprod.*, 10(8): 2061-2071.
8. Aitken, R.J. and Krausz, C. (2001) Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction*, 122: 497-506.
9. Aitken, R. J. and De Iuliis, G. N. (2007) Origins and consequences of DNA damage in male germ cells. *Reprod Biomedicine Online*, 14(6): 727-733.
10. Albrecht, M., Rämisch, R., Köhn, F.M., Schwarzer, J.U., Mayerhofer, A. (2006) Isolation and cultivation of human peritubular cells: A novel model for investigation of fibrotic processes in the human testis and male infertility. *J Clin Endocrinol Metab.*, 91(5):1956-1960.
11. Altman, S.A., Zastawny, T.H., Randers-Eichhorn, L., Cacciuttolo, M.A., Akman, S.A., Dizdaroglu, M., *et al.* (1995) Formation of DNA-protein cross-links in cultured mammalian cells upon treatment with iron ions. *Free Radic Biol Med.*, 19(6): 897-902.
12. Alvarez, J.G., Sharma, R.K., Ollero, M., Saleh, R.A., Lopez, M.C., Thomas, A.J., Evenson, D.P., Agarwal, A., (2002) Increased DNA damage in sperm from leukocytospermic semen samples as determined by the sperm chromatin structure assay. *Fertil Steril.*, 78(2): 319-29.
13. Alvarez, C., Castilla, J.A., Martinez, L., Ramirez, J.P., Vergara, F., Gaforio, J.J. (2003) Biological variation of seminal parameters in healthy subjects. *Hum Reprod.*, 18(10):2082-8.
14. Amann, R.P., (1989) Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately? *J Androl.*, 10(2):89-98.
15. Amann, R.P., (2008) The cycle of the seminiferous epithelium: A need to revisit? *J Androl.*, 29(5):469-487.

16. Anderson, D., Schmid, T.E., Baumgartner, A. *et al.* (2003) Oestrogenic compounds and oxidative stress (in human sperm and lymphocytes in the Comet assay). *Mut Res.*, 544(2-3), 173–178.
17. Aoki, V.W. and Carrell, D.T. (2003) Human protamines and the developing spermatid: their structure, function, expression and relationship with male infertility. *Asian J Androl.*, 5(4):315-324.
18. Aponte, P.M., van Bragt, M.P.A., de Rooij, D.G., van Pelt, A.M.M. (2005) Spermatogonial stem cells: characteristics and experimental possibilities. *APMIS*, 113(11-12):727–742.
19. Aravindan, G.R., Bjordahl, J., Jost, L.K., Evenson, D.P. (1997) Susceptibility of human sperm to in situ DNA denaturation is strongly correlated with DNA strand breaks identified by single-cell electrophoresis. *Exp Cell Res.*, 236(1):231–7.
20. Aziz, N., Buchan, I., Taylor, C., Kingsland, C.R., Lewis-Jones, I. (1996) The sperm deformity index: a reliable predictor of the outcome of oocyte fertilization in vitro. *Fertil Steril.*, 66(6):1000–1008.
21. Balhorn, R., Brewer, L., Corzett, M. (2000) DNA condensation by protamine and arginine-rich peptides: analysis of toroid stability using single DNA molecules. *Mol Reprod Dev.*, 56(2):230-234.
22. Banks, S., King, S.A., Irvine, D.S., Saunders, P.T. (2005) Impact of a mild scrotal heat stress on DNA integrity in murine spermatozoa. *Reproduction*, 129(4):505–14.
23. Bannister, L.A., Schimenti, J.C., (2004) Homologous recombinational repair proteins in mouse meiosis. *Cytogenet Genome Res.*, 107(3-4): 191-200.
24. Barratt, C.L., Aitken, R.J., Bjordahl, L., Carrell, D.T., de Boer, P., Kvist, U. *et al.* (2010) Sperm DNA: organization, protection and vulnerability: from basic science to clinical applications – a position report. *Hum Reprod.*, 25(4):824–38.
25. Barroso, G., Taylor, S., Morshedi, M., Manzur, F., Gavipo, F., Oehninger, S. (2006) Mitochondrial membrane potential integrity and plasma membrane translocation of phosphatidylserine as early apoptotic markers: a comparison of two different sperm subpopulations. *Fertil. Steril.*, 85(1):149-154.
26. Bedford, J.M., Calvin, H., Cooper, G.W. (1973) The maturation of spermatozoa in the human epididymis. *J Reprod Fertil Suppl.*, 18:199–213
27. Bedner, E., Smolewski, P., Amstad, P., Darzynkiewicz, Z. (2000) Activation of caspases measured in situ by binding of fluorochrome-labeled inhibitors of caspases (FLICA): Correlation with DNA fragmentation. *Exp Cell Res.*, 259(1):308–313.
28. Bejarano, I., Lozano, G.M., Ortiz, A., Garcia, J.F., Paredes, S.D., Rodriguez, A.B., Pariente, J.A. (2008). Caspase 3 activation in human spermatozoa in response to hydrogen peroxide and progesterone. *Fertil. Steril.*, 90(4):1340-1347.
29. Bellgrau, D., Gold, D., Selawry, H., Moore, J., Franzusoff, A., Duke, R.C. (1995) A role for CD95 ligand in preventing graft rejection. *Nature*, 377(6550):630-632.
30. Belloc, S., Cohen-Bacrie, P., Benkhalifa, M., Cohen- Bacrie, M., De, M.J., Hazout, A., *et al.* (2008) Effect of maternal and paternal age on pregnancy and miscarriage rates after intrauterine insemination. *Reprod Biomed Online*, 17(3):392–7.

31. Bench, G.S., Friz, A.M., Corzett, M.H., Morse, D.H., Balhorn, R. (1996) DNA and total protamine masses in individual sperm from fertile mammalian subjects. *Cytometry*, 23(4):263–71.
32. Bennetts, L.E., De Iuliis, G.N., Nixon, B., Kime, M., Zelski, K., McVicar et al. (2008) Impact of estrogenic compounds on DNA integrity in human spermatozoa: evidence for cross-linking and redox cycling activities. *Mutat Res.*, 641(1-2):1–11.
33. Bize, I., Santander, G., Cabello, P., Driscoll, D., Sharpe, C., (1991) Hydrogen peroxide is involved in hamster sperm capacitation in vitro. *Biol Reprod.*, 44(3): 398-403.
34. Boatright, K.M., Renatus, M., Scott, F.L., Sperandio, S., Shin, H., Pedersen, I.M. et al. (2003) A unified model for apical caspase activation. *Mol Cell.*, 11(2):529–541.
35. Boepple, P.A., Hayes, F.J., Dwyer, A.A., Raivio, T., Lee, H., Crowley, W.F., Pitteloud, N. (2008) Relative roles of inhibin B and sex steroids in the negative feedback regulation of follicle-stimulating hormone in men across the full spectrum of seminiferous epithelium function. *J Clin Endocrinol Metab.*, 93(5):1809–1814.
36. Bredesen, D. E. (2008) Programmed cell death mechanisms in neurological disease. *Curr Mol Med.*, 8(3):173–186.
37. Brewer, L., Corzett, M., Balhorn, R. (2002) Condensation of DNA by spermatid basic nuclear proteins, *Journal of Biological Chemistry*. 277(41):38895-38900.
38. Britan, A., Maffre, V., Tone, S., Drevet, J.R. (2006) Quantitative and spatial differences in the expression of tryptophan- metabolizing enzymes in mouse epididymis. *Cell Tissue Res.*, 324(2):301–10.
39. Brugmans, L., Kanaar, R., Essers, J. (2007) Analysis of DNA double-strand break repair pathways in mice. *Mutat. Res.*, 614(1-2): 95–108.
40. Burrello, N., Arcidiacono, G., Vicari, E., Asero, P., Di Benedetto, D., De Palma, A. et al. (2004) Morphologically normal spermatozoa of patients with secretory oligo-asthenoteratozoospermia have an increased aneuploidy rate. *Hum Reprod.*, 19(10):2298–302.
41. Capel, B., Albrecht, K.H., Washburn, L.L., Eicher, E.M. (1999) Migration of mesonephric cells into the mammalian gonad depends on Sry. *Mech Dev.*, 84(1-2):127–131.
42. Carrell, D.T., Emery, B.R., Hammoud, S. (2007) Altered protamine expression and diminished spermatogenesis: what is the link? *Hum Reprod Update*, 13(3):313-27.
43. Cataldo, L., Baig, K., Oko, R., Mastrangelo, M.A., Kleene, K.C. (1996) Developmental expression, intracellular localization, and selenium content of the cysteine-rich protein associated with the mitochondrial capsules of mouse sperm. *Mol Reprod Dev.*, 45(3):320–331.
44. Celik-Ozenci, C., Sahin, Z., Ustunel, I., Akkoyunlu, G., Erdogru, T., Korgun et al. (2006) The Fas system may have a role in male reproduction. *Fertil Steril.*, 85(1):1168-1178.
45. Cerretti, D.P., Kozlosky, C.J., Mosley, B., Nelson, N., Van Ness, K., Greenstreet, T.A. et al. (1992). Molecular cloning of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Science*, 256(5053): 97–100.

46. Chai, J., Wu, Q., Shiozaki, E., Srinivasula, S.M., Alnemri, E.S., Shi, Y. (2001) Crystal structure of a procaspase-7 zymogen: mechanisms of activation and substrate binding. *Cell*, 107(3):399–407.
47. Chiu, S.M., Xue, L.Y., Friedman, L.R., Oleinick, N.L. (1995) Differential dependence on chromatin structure for copper and iron ion induction of DNA double-strand breaks. *Biochemistry*, 34(8): 2653-61.
48. Chohan, K.R., Griffin, J.T., Lafromboise, M., De Jonge, C.J., Carrell, D.T. (2006) Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm. *J Androl.*, 27(1):53–9.
49. Clermont Y. (1966a) Renewal of spermatogonia in man. *Am J Anat.*, 118(2):509–529.
50. Clermont Y. (1966b) Spermatogenesis in man: a study of the spermatogonial population. *Fertil Steril.*, 17(6):705–721.
51. Cooper TG (1995) The epididymal influence on sperm maturation. *Reprod Med Rev.*, 4:141–161.
52. Crow, J. F. (2000) The origins, patterns and implications of human spontaneous mutation. *Nat Rev Genet.*, 1(1): 40–47.
53. Cui, J., Holmes, E.H., Greene, T.G., Liu, P.K., (2000) Oxidative DNA damage precedes DNA fragmentation after experimental stroke in rat brain. *FASEB J.*, 14(7): 955-67.
54. De Felici, M. (2013) Origin, migration, and proliferation of human primordial germ cells. In: Coticchio G. et al., (eds) Oogenesis. Springer, London, p19–37.
55. De Vries, K.J., Wiedmer, T., Sims, P.J., Gadella, B.M. (2003) Caspase-independent exposure of aminophospholipids and tyrosine phosphorylation in bicarbonate responsive human sperm cells. *Biol Reprod.*, 68:2122–2134.
56. Denecker, G., Ovaere, P., Vandenabeele, P., and Declercq, W. (2008) Caspase-14 reveals its secrets. *J. Cell Biol.*, 180(3):451–458.
57. Denton, D., Shrivage, B., Simin, R., Mills K, Berry DL, Baehrecke EH, Kumar S. (2009) Autophagy, not apoptosis, is essential for midgut cell death in *Drosophila*. *Curr Biol.*, 19(20): 1741–1746.
58. deYebra, L., Balleca, J.L., Vanrell, J.A., Corzett, M., Balhorn, R., Oliva, R., (1998) Detection of P2 precursors in the sperm cells of infertile patients who have reduced protamine P2 levels. *Fertil Steril.*, 69(4): 755-9.
59. Dizdaroglu, M. (1992) Oxidative damage to DNA in mammalian chromatin. *Mutat Res.*, 275(3-6): 331-42.
60. Dominguez-Fandos, D., Camejo, M.I., Balleca, J.L., Oliva, R. (2007) Human sperm DNA fragmentation: correlation of TUNEL results as assessed by flow cytometry and optical microscopy. *Cytometry A.*, 71(12):1011–8.
61. Earnshaw, W. C., Martins, L. M. and Kaufmann, S. H. (1999) Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu. Rev. Biochem.*, 68: 383–424.
62. Ekert, P. G., J. Silke and D. L. Vaux. (1999) Caspase inhibitors. *Cell Death and Differ.*, 6:1081-1086.
63. Elder K., Dale B. (Eds) (2011): In Vitro Fertilization, 3<sup>rd</sup> edition. UK, Cambridge: Cambridge University Press, p 28-49.
64. Eley, A., Hosseinzadeh, S., Hakimi, H., Geary, I., Pacey, A.A. (2005) Apoptosis of ejaculated human sperm is induced by co-incubation with *Chlamydia trachomatis* lipopolysaccharide. *Hum Reprod.*, 20(9):2601-2607.
65. Ellis, R.E., Yuan, J.Y., Horvitz, H.R. (1991) Mechanisms and functions of cell death. *Annu Rev Cell Biol.*, 7:663 – 698.

66. Evenson, D.P., Jost, L.K., Baer, R.K., Turner, T.W., Schrader, S.M. (1991) Individuality of DNA denaturation patterns in human sperm as measured by the sperm chromatin structure assay. *Reprod Toxicol.*, 5(2):115–25.
67. Evenson, D. P., Jost, L. K., Marshall, D., Zinaman, M. J., Clegg, E., Purvis, K., Claussen, O. P. (1999) Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod.*, 14(4):1039-1049.
68. Evenson, D.P., Jost, L.K., Corzett, M., Balhorn, R., (2000) Characteristics of human sperm chromatin structure following an episode of influenza and high fever: a case study. *J Androl.*, 21(5):739-46.
69. Evenson, D.P., Wixon, R. (2005) Environmental toxicants cause sperm DNA fragmentation as detected by the Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA). *Toxicol Appl Pharmacol.*, 207(2):532–537.
70. Evenson, D.P., Kasperson, K., Wixon, R.L. (2007) Analysis of sperm DNA fragmentation using flow cytometry and other techniques. *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.*, 65:93–113.
71. Feijo, C.M., Esteves, S.C. (2014) Diagnostic accuracy of sperm chromatin dispersion test to evaluate sperm deoxyribonucleic acid damage in men with unexplained infertility. *Fertil Steril.*, 101(1):58–63.
72. Ferlin, A., Arredi, B., Zuccarello, D., Garolla, A., Selice, R., Foresta, C. (2006) Paracrine and endocrine roles of insulin-like factor 3. *J Endocrinol Invest.*, 29(7):657–664.
73. Fernandez, J.L., Goyanes, V.J., Ramiro-Diaz, J., et al. (1998) Application of FISH for in situ detection and quantification of DNA breakage. *Cytogenet Cell Genet.*, 82(3-4):251-6.
74. Fernandez, J.L., Muriel, L., Rivero, M.T., et al. (2003) The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *J Androl.*, 24(1):59-66.
75. Fijak, M. and Meinhardt, A. (2006) The testis in immune privilege. *Immunol Rev.*, 213(1):66–81.
76. Fischer, U., Jänicke, R.U. and Schulze-Osthoff, K. (2003) Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death and Differ.*, 10(1):76-100.
77. Fischer, M.A., Willis, J., Zini, A. (2003) Human sperm DNA integrity: correlation with sperm cytoplasmic droplets. *Urology*, 61(1):207-211.
78. Fossa, S.D., De, A.P., Kraggerud, S.M., Evenson, D., Theodorsen, L., Clausen, O.P., (1997) Prediction of post treatment spermatogenesis in patients with testicular cancer by flow cytometric sperm chromatin structure assay. *Cytometry*, 30(4): 192-6.
79. Fraga, C. G., Motchnik, P. A., Wyrobek, A. J., Rempel, D. M., Ames, B. N. (1996) Smoking and low antioxidant levels increase oxidative damage to DNA. *Mut Res* 351(2):199–203.
80. Fragouli, E., Wells, D., Thornhill, A., Serhal, P., Faed, M.J., Harper, J.C., Delhanty, J.D., (2006) Comparative genomic hybridization analysis of human oocytes and polarbodies. *Hum Reprod.*, 21(9): 2319-28.
81. Francavilla, S., Cordeschi, G., Properzi, G., Concordia, N., Cappa, F., Pozzi, V. (1990) Ultrastructure of fetal human gonad before sexual differentiation and during early testicular and ovarian development. *J Submicrosc Cytol Pathol.*, 22(3):389–400.

82. Francavilla, S., D'Abrizio, P., Cordeschi, G., Pelliccione, F., Necozone, S., Ulises, S.; Properzi, G., Francavilla, F. (2002) Fas expression correlates with human germ cell degeneration in meiotic and post-meiotic arrest of spermatogenesis. *Mol Hum Reprod.*, 8(3):213-220.
83. Fujimoto, T., Miyayama, Y., Fuyuta, M. (1977) The origin, migration and fine morphology of human primordial germ cells. *Anat Rec.*, 188(3):315-329.
84. Gandini, L., Lombardo, F., Paoli, D., Caponecchia, L., Familiari, G., Verlengia, C. et al. (2000) Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod.*, 15:830-839.
85. Gandini, L., Lombardo, F., Paoli, D., Caruso, F., Eleuteri, P., Leter, G., et al. (2004) Full-term pregnancies achieved with ICSI despite high levels of sperm chromatin damage. *Hum Reprod.*, 19(6):1409-17.
86. García-Peiró, A., Martínez-Heredia, J., Oliver-Bonet, M., Abad, C., Amengual, M.J., Navarro et al. (2011) Protamine 1 to protamine 2 ratio correlates with dynamic aspects of DNA fragmentation in human sperm. *Fertil. Steril.*, 95(1):105-109.
87. Ge R., Hardy, M.P. (2007) Regulation of Leydig cells during pubertal development. In: Payne AH, Hardy MP (eds) *The Leydig cell in health and disease*. Humana Press, Totowa, p 55-70.
88. Genesca, A., Caballin, M.R., Miro, R., Benet, J., Germa, J.R., Egozcue, J. (1992) Repair of human sperm chromosome aberrations in the hamster egg. *Hum Genet.*, 89:181-6.
89. Giwercman, A., Lindsted, L., Larsson, M., Bungum, M., Spano, M., Levine, R.J., Rylander, L., (2010) Sperm chromatin structure assay as an independent predictor of fertility in vivo: a case-control study. *Int J Androl.*, 33(1): 221-7.
90. González-Marín, C., Gosálvez, J., Roy, R. (2012) Types, Causes, Detection and Repair of DNA Fragmentation in Animal and Human Sperm Cells *Int. J. Mol. Sci.*, 13(11):14026-14052.
91. Gorczyca, W., Traganos, F., Jesionowska, H., Darzynkiewicz, Z. (1993) Presence of DNA strand breaks and increased sensitivity of DNA in situ to degeneration in abnormal human sperm cells: analogy to apoptosis of somatic cells. *Exp Cell Res.*, 207(1):202-205.
92. Greco, E., Scarselli, F., Iacobelli, M., Rienzi, L., Ubaldi, F., Ferrero, S., et al. (2005a) Efficient treatment of infertility due to sperm DNA damage by ICSI with testicular spermatozoa. *Hum Reprod.*, 20(1):226-230.
93. Greco, E., Iacobelli, M., Rienzi, L., Ubaldi, F., Ferrero, S., Tesarik, J. (2005b) Reduction of the incidence of sperm DNA fragmentation by oral antioxidant treatment. *J Androl.*, 26(3):349-353.
94. Green, D.R., and Llambi, F. (2015). Cell Death Signaling. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 7(12).
95. Grunewald, S., Paasch, U., Glander, H.J. (2001) Enrichment of non-apoptotic human spermatozoa after cryopreservation by immunomagnetic cell sorting. *Cell Tissue Banking*, 2(3):127-133.
96. Grunewald, S., Paasch, U., Glander, H.J. and Anderegg, U. (2005a) Mature human spermatozoa do not transcribe novel RNA. *Andrologia*, 37(2-3):69-71.
97. Grunewald, S., Paasch, U., Said, T.M., Sharma, R.K., Glander, H.J., Agarwal, A. (2005b) Caspase activation in human spermatozoa in response to physiological and pathological stimuli. *Fertil Steril*, 83 (4):1106-1112.



98. Haidl, G., Opper, C. (1997) Changes in lipids and membrane anisotropy in human spermatozoa during epididymal maturation. *Hum Reprod.*, 12(12):2720–2723.
99. Hammadeh, M. E., Kühnen, A., Amer, A. S., Rosenbaum, P., Schmidt, W. (2001) Comparison of sperm preparation methods: effect on chromatin and morphology recovery rates and their consequences on the clinical outcome after in vitro fertilization embryo transfer. *Int J Androl.*, 24(6), 360–368.
100. Handel, M.A. (1998) Monitoring meiosis in gametogenesis. *Theriogenology.*, 49(2):423-30.
101. Handel, M.A., Schimenti, J.C. (2010) Genetics of mammalian meiosis: regulation, dynamics and impact on fertility. *Nat Rev Genet.*, 11(2):124-36.
102. Hengartner, M.O. (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407(6805):770–6.
103. Holstein, A.F., Maekawa, M., Nagano, T., Davidoff, M.S. (1996) Myofibroblasts in the lamina propria of human seminiferous tubules are dynamic structures of heterogeneous phenotype. *Arch Histol Cytol.*, 59(2):109–125.
104. Hoshi, K., Katayose, H., Yanagida, K., Kimura, Y., Sato, A. (1996) The relationship between acridine orange fluorescence of sperm nuclei and the fertilizing ability of human sperm. *Fertil Steril.*, 66:634-9.
105. Irvine, D.S., Twigg, J.P., Gordon, E.L., Fulton, N., Milne, P.A., Aitken, R.J. (2000) DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *J Androl.*, 21(1):33–44.
106. Johnson, K.J. and Boekelheide, K. (2002) Dynamic testicular adhesion junctions are immunologically unique. II. Localization of classic cadherins in rat testis. *Biol Reprod.*, 66(4):992–1000.
107. Johnson, L., Grumbles, J.S., Chastain, S., Goss, H.F., Petty, C.S. (1990) Leydig cell cytoplasmic content is related to daily sperm production in men. *J Androl.*, 11(2):155–160.
108. Kalthur, G., Adiga, S.K., Upadhyaya, D., Rao, S., Kumar, P., (2008) Effect of cryopreservation on sperm DNA integrity in patients with teratospermia. *Fertil Steril.*, 89(6):1723-7.
109. Kamel, R.M. (2010) Management of the infertile couple: an evidence-based protocol. *Reprod Biol Endocrinol.*, 8:21-8.
110. Kerr, J. F., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.*, 26(4): 239-257.
111. Kim Y, Bingham N, Sekido R, Parker KL, Lovell-Badge R, Capel B (2007) Fibroblast growth factor receptor 2 regulates proliferation and Sertoli differentiation during male sex determination. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 104(42):16558–16563.
112. Kleinhaus, K., Perrin, M., Friedlander, Y., Paltiel, O., Malaspina, D., Harlap, S. (2006) Paternal age and spontaneous abortion. *Obstet Gynecol.*, 108(2):369-377.
113. Kurosaka, K., Takahashi, M., Watanabe, N., Kobayashi, Y. (2003) Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages. *J Immunol.*, 171(9):4672–4679.
114. Lewin, B. (2004) Genesis VIII, Τόμοι Ι και ΙΙ. Ακαδημαϊκές Εκδόσεις Ι. Μπασδρα & ΣΙΑ. Αλεξανδρούπολη, 2

115. Li, H.; Zhu, H.; Xu, C.J., Yuan, J. (1998). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*, 94(4):491- 501
116. Li J., Yuan J. (2008). Caspase in apoptosis and beyond. *Oncogene*, 27(48): 6194-6206.
117. Lozano, G.M., Bejarano, I., Espino, J., Gonzalez, D., Ortiz, A., Garcia, J.F. et al., (2009) Relationship between caspase activity and apoptotic markers in human sperm in response to hydrogen peroxide and progesterone. *J Reprod Dev.*, 55(6):615-621.
118. Madara JL (1998) Regulation of the movement of solutes across tight junctions. *Annu Rev Physiol.*, 60:143–159.
119. Makabe, S., Nottola, S.A., Motta, P.M. (1989) Life history of the human female germ cell: ultrastructural aspects. In: Van Blerkom, J., Motta, P.M. (eds) *Ultrastructure of human gametogenesis and early embryogenesis*. Kluwer Academic, Boston, p 33–60
120. Mallidis, C., Howard, E.J., Baker, H.W. (1991) Variation of semen quality in normal men. *Int J Androl.*, 14(2):99–107.
121. Manicardi, G.C., Bianchi, P.G., Pantano, S. et al. (1995) Presence of endogenous nicks in DNA of ejaculated human spermatozoa and its relationship to chromomycin A3 accessibility. *Biol Reprod.*, 52(4):864–867.
122. Marchetti, C., Gallego, M.A., Defossez, A., Formstecher, P., Marchetti, P. (2004a) Staining of human sperm with fluorochrome-labeled inhibitor of caspases to detect activated caspases: Correlation with apoptosis and sperm parameters. *Hum Reprod* 19:1127–1134.
123. Mayerhofer, A., Frungieri, M.B., Fritz, S., Bulling, A., Jessberger, B., Vogt, H.J. (1999) Evidence for catecholaminergic, neuronlike cells in the adult human testis: Changes associated with testicular pathologies. *J Androl.*, 20(3):341–317.
124. Meistrich, M.L., Mohapatra, B., Shirley, C.R., Zhao, M. (2003) Roles of transition nuclear proteins in spermiogenesis. *Chromosoma*, 111(8):483–488
125. McPherson, S.M.G. and Longo, F.J. (1992) Localization of DNase I-hypersensitive regions during rat spermatogenesis: stage-dependent patterns and unique sensitivity of elongating spermatids. *Mol Reprod Dev.*, 31(4):268–279.
126. McPherson, S.M.G. and Longo, F.J. (1993) Nicking of rat spermatid and spermatozoa DNA: possible involvement of DNA topoisomerase II. *Dev Biol.*, 158(1):122–130.
127. Menkveld, R., Holleboom, A.G., Rhemrev, J. (2011) Measurement and significance of sperm morphology. *Asian J Androl.*, 13(1): 59–68
128. Middendorff, R., Müller, D., Mewe, M., Mukhopadhyay, A.K., Holstein, A.F., Davidoff, M.S. (2002) The tunica albuginea of the human testis is characterized by complex contraction and relaxation activities regulated by cyclic GMP. *J Clin Endocrinol Metab.*, 87(7):3486-99.
129. Moreno, R.D., Ramalho-Santos, J., Sutovsky, P., Chan, E.K., Schatten, G. (2000) Vesicular traffic and Golgi apparatus dynamics during mammalian spermatogenesis: implications for acrosome architecture. *Biol Reprod.*, 63, 89–98.
130. Morris, I.D., (2002) Sperm DNA damage and cancer treatment. *Int J Androl.*, 25(5):255-61.
131. Muratori, M., Maggi, M., Spinelli, S., Filimberti, E., Forti, G., Baldi, E. (2003). Spontaneous DNA fragmentation in swim-up selected human spermatozoa during long term incubation. *J Androl.*, 24(2):253–262.

132. Muratori, M., Marchiani, S., Maggi, M., Forti, M., Baldi E. (2006) Origin and biological significance of DNA fragmentation in human spermatozoa. *Front Biosci.*, 11:1491-9.
133. Muratori, M., Tamburrino, L., Marchiani, S., Cambi, M., Olivito, B., Azzari, C. et al. (2015). Investigation on the origin of sperm DNA fragmentation: role of apoptosis, immaturity and oxidative stress. *Mol. Med.*, 21:109–122.
134. Nagata, S. and Golstein, P. (1995) The Fas death factor. *Science*, 267(5203):1449–1456.
135. Nagata, S. (1997) Apoptosis by death factor. *Cell*, 88(3):355–365.
136. Nicholson, D.W. (1999) Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ.*, 6(11):1028-1042.
137. Oehninger, S., Morshedi, M., Weng. S.L., Taylor, S., Duran, H., Beebe, S. (2003) Presence and significance of somatic cell apoptosis markers in human ejaculated spermatozoa. *Reprod Biomedicine online.*, 7(4):469-476.
138. O'Flaherty, C., Vaisheva, F., Hales, B.F., Chan, P., Robaire, B., (2008) Characterization of sperm chromatin quality in testicular cancer and Hodgkin's lymphoma patients prior to chemotherapy. *Hum Reprod.*, 23(5): 1044-52.
139. Oko, R. and Clermont, Y. (1990) Mammalian spermatozoa: Structure and assembly of the tail. In: *Controls of Sperm Motility: Biological and Clinical Aspects*, CRC Press, Boca Raton FL, p. 3–27.
140. Oko, R., Hermo, L., Chan, P.T., Fazel, A., Bergeron, J.J. (1993) The cytoplasmic droplet of rat epididymal spermatozoa contains saccular elements with Golgi characteristics. *J Cell Biol.*, 123(4):809–821.
141. Oko, R. (1998) Occurrence and formation of cytoskeletal proteins in mammalian spermatozoa. *Andrologia*, 30(4-5):193–206.
142. Oldereid, N.N., Angelis, P.D., Wiger, R., Clausen, O.P. (2001) Expression of Bcl-2 family proteins and spontaneous apoptosis in normal human testis. *Mol Hum Reprod.*, 7(5):403-408.
143. Ollero, M., Gil-Guzman, E., Lopez, M.C., Sharma, R.K., Agarwal, A., Larson, K., et al. (2001) Characterization of subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: implications in the diagnosis and treatment of male infertility. *Hum Reprod.*, 16(9):1912–21.
144. Paasch, U., Grunewald, S., Fitzl, G., Glander, H.J. (2003) Deterioration of plasma membrane is associated with activation of caspases in human spermatozoa. *J Androl* 24:246–252.
145. Paasch, U., Grunewald, S., Dathe, S. and Glander, H.J. (2004a) Mitochondria of human spermatozoa are preferentially susceptible to apoptosis. *Ann N Y Acad Sci.*, 1030:403-409.
146. Paasch, U., Grunewald, S., Agarwal, A. Glandera, H.J. (2004b). Activation pattern of caspases in human spermatozoa. *Fertil Steril*, 81 (Suppl 1):802–809.
147. Perticarari, S., Ricci, G., Granzotto, M., Boscolo, R., Pozzobon, C., Guarnieri, S., Sartore, A., Presani, G. (2007) A new multiparameter flow cytometric method for human semen analysis. *Hum Reprod.*, 22:485–494.
148. Perticarari, S., Ricci, G., Boscolo, R., De Santis, M., Pagnini, G., Martinelli, M., Presani, G. (2008) Fas receptor is not present on ejaculated human sperm. *Hum Reprod.*, 23(6):1271-1279.
149. Philchenkov, A.A. (2003) Caspases as regulators of apoptosis and other cell functions. *Biochemistry (Mosc)*, 68(4):365–76.
150. Pipek, R.P. (2010) Molecular machinery of gonadal differentiation in mammals. *Int J Dev Biol.*, 54(5):779–786.

151. Pointis, G., Gilleron, J., Carette, D., Segretain, D. (2010) Physiological and physiopathological aspects of connexins and communicating gap junctions in spermatogenesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.*, 365(1546):1607–1620.
152. Poreba, M., Strozyk, A., Salvesen, G.S., Drag, M. (2013) Caspase substrates and inhibitors. *Cold Spring Harb. Perspect., Biol.*:5(8).
153. Potts, R.J., Newbury, C.J., Smith, G., Notarianni, L.J., Jefferies, T.M. (1999) Sperm chromatin damage associated with male smoking. *Mutat Res.*, 423(1-2):103-111.
154. Reed, J.C. (1997) Bcl-2 family proteins: regulators of apoptosis and chemoresistance in hematologic malignancies. *Semin Hematol.*, 34:9–19.
155. Riccioli, A., Salvati, L., D'Alessio, A., Starace, D., Giampietri, C., De Cesaris, P., et al., (2003) The Fas system in the seminiferous epithelium and its possible extra-testicular role. *Andrologia.* 35(1):64-70.
156. Riedl, S.J., Fuentes-Prior, P., Renatus, M., Kairies, N., Krapp, S., Huber, R. et al. (2001) Structural basis for the activation of human procaspase-7. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98(98):14790–14795.
157. Riedl, S.J. and Shi, Y. (2004) Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 5(11):897–907.
158. Rodriguez, I., Ody, C., Araki, K., Garcia, I. and Vassalli, P. (1997) An early and massive wave of germinal cell apoptosis is required for the development functional spermatogenesis. *The EMBO J.*, 16(9):2262-2270.
159. Rubes, J., Selevan, S.G., Sram, R.J., Evenson, D.P., Perreault, S.D. (2007) GSTM1 genotype influences the susceptibility of men to sperm DNA damage associated with exposure to air pollution. *Mutat Res.*, 625(1-2): 20–8.
160. Rucker, E.B., Dierisseau, P., Wagner, K.U., Garrett, L., Wynshaw-Boris, A., Flaws, J.A., Hennighausen, L. (2000). Bcl-x and Bax regulate mouse primordial germ cell survival and apoptosis during embryogenesis. *Mol Endocrinol.*, 14(7):1038-1052.
161. Russell, L.D., Griswold, M.D. (1993) The Sertoli cell. Cache River Press, Clearwater FL; p 365-390.
162. Ruwanpura, S.M., McLachlan, R.I., Stanton, P.G., Meachem, S.J. (2008) Follicle-stimulating hormone affects spermatogonial survival by regulating the intrinsic apoptotic pathway in adult rats. *Biol Reprod.*, 78(4):705-713.
163. Sadaghiani, A.M., Verhelst, S.H., Bogyo, M. (2007) Tagging and detection strategies for activity-based proteomics. *Curr Opin Chem Biol.*, 11(1): 20–28.
164. Said, T.M., Paasch, U., Glander, H.J., Agarwal, A. (2004) Role of caspases in male infertility. *Hum Reprod Update.*, 82(1):39-51.
165. Said, T., Agarwal, A., Grunewald, S., et al. (2006) Selection of nonapoptotic spermatozoa as a new tool for enhancing assisted reproduction outcomes: an in vitro model. *Biol Reprod.*, 74(3): 530–7.
166. Sailer, B.L., Jost, L.K., Evenson, D.P. (1995) Mammalian sperm DNA susceptibility to in situ denaturation associated with the presence of DNA strand breaks as measured by the terminal deoxynucleotidyl transferase assay. *J Androl.*, 16(1):80–87
167. Sailer, B.L., Sarkar, L.J., Bjordahl, J.A. (1997) Effects of heat stress on mouse testicular cells and sperm chromatin structure. *J Androl.*, 18(3):294-301.
168. Sakkas, D., Mariethoz, E., John, J.C. (1999) Abnormal sperm parameters in humans are indicative of an abortive apoptotic mechanism linked to the Fas-mediated pathway. *Exp Cell Res.*, 251(2): 350-355.

169. Sakkas, D., Manicardi, G. C., Tomlinson, M., Mandrioli, M., Bizzaro, D., Bianchi, P. G., Bianchi, U. (2000) The use of two density gradient centrifugation techniques and the swim-up method to separate spermatozoa with chromatin and nuclear DNA anomalies. *Hum Reprod.*, 15(5): 1112–1116.
170. Sakkas, D., Moffatt, O., Manicardi, G.C., Mariethoz, E., Tarozzi, N., Bizzaro, D. (2002) Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. *Biol Reprod.*, 66:1061–1067.
171. Sakkas, D., Alvarez, J.G., (2010) Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertil Steril.*, 93(4): 1027-36.
172. Saleh, R., Agarwal, A., Sharma, R., Nelson, D., Tomas, A.J. (2002) Effect of cigarette smoking on levels of seminal oxidative stress in infertile men: a prospective study. *Fertil Steril.*, 78(3):491-499.
173. Saleh, R.A., Agarwal, A., Sharma, R.K. (2003a) Evaluation of nuclear DNA damage in spermatozoa from infertile men with varicocele. *Fertil Steril.*, 80(6):1431-1436.
174. Saleh, R.A., Agarwal, A., Nada, .EA., El-Tonsy, M.H., Sharma, R.K., Meyer, A., et al. (2003b) Negative effects of increased sperm DNA damage in relation to seminal oxidative stress in men with idiopathic and male factor infertility. *Fertil Steril.* 79(13):1597–605.
175. Salvesen, G.S., Dixit, V.M. (1999) Caspase activation: the induced proximity model. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96(20):10964–10967.
176. Schell, C., Albrecht, M., Mayer, C., Schwarzer, J.U., Frungieri, M.B., Mayerhofer, A. (2008) Exploring human testicular peritubular cells: Identification of secretory products and regulation by tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Endocrinology*, 149(4):1678–1686.
177. Schmid, T. E., Eskenazi, B., Baumgartner, A., Marchetti, F., Young, S., Weldon, R., Anderson, D., Wyrobek, A. J. (2007) The effects of male age on sperm DNA damage in healthy non-smokers. *Hum Reprod.*, 22(1), 180–187.
178. Scorrano, L., Korsmeyer, S.J. (2003) Mechanisms of cytochrome c release by proapoptotic BCL-2 family members. *Biochem Biophys Res Commun.*, 304(3):437–44.
179. Seli, E., Gardner, D.K., Schoolcraft, W.B., Moffatt, O., Sakkas, D. (2004) Extent of nuclear DNA damage in ejaculated spermatozoa impacts on blastocyst development after in vitro fertilization. *Fertil Steril.*, 82(2):378
180. Sergerie, M., Laforest, G., Boulanger, K., Bissonnette, F., Bleau, G. (2005a ) Longitudinal study of sperm DNA fragmentation as measured by terminal uridine nick end-labelling assay. *Hum Reprod.*, 20:1921–7.
181. Sergerie, M., Laforest, G., Bujan, L., Bissonnette, F., Bleau, G. (2005b) Sperm DNA fragmentation: threshold value in male fertility. *Hum Reprod.*, 20(12):3446–51.
182. Shaman, J.A and Ward, W.S (2006) Sperm chromatin stability and susceptibility to damage in relation to its structure. In: De Jonge, C.J and Barratt C.L.R, The sperm cell: Production, Maturation, Fertilization, Regeneration. Cambridge University Press, p 31-48.
183. Sharma, R.K., Sabanegh, E., Mahfouz, R., Gupta, S., Thiyagarajan, A., Agarwal, A. (2010) TUNEL as a test for sperm DNA damage in the evaluation of male infertility. *Urology*, 76(6): 1380-6.

184. Shen, H.M., Dai, J., Chia, S.E., Lim, A., Ong, C.N., (2002) Detection of apoptotic alterations in sperm in subfertile patients and their correlations with sperm quality. *Hum Reprod.*, 17(5): 1266-73.
185. Sher, G., Keskinetepe, L., Keskinetepe, M., Ginsburg, M., Maassarani, G., Yakut, T. et al., (2007) Oocyte karyotyping by comparative genomichybridization [correction of hybridization] provides a highly reliable method for selecting "competent" embryos, markedly improving in vitro fertilization outcome: a multiphase study. *Fertil Steril.*, 87(5): 1033-1040.
186. Shi, Y. (2002) Mechanisms of caspase inhibition and activation during apoptosis. *Mol. Cell.*, 9(3):459-470.
187. Sikka, S.C. (2001) Relative impact of oxidative stress on male reproductive function. *Curr Med Chem.*, 8(7):851-862.
188. Simon, L., Castillo, J., Oliva, R., Lewis, S.E. (2011) Relationships between human sperm protamines, DNA damage and assisted reproduction outcomes. *Reprod. Biomed. Online*, 23(6):724-734.
189. Singh, N. P., Muller, C. H., Berger, R. E. (2003) Effects of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm. *Fertil Steril.*, 80(6): 1420-1430.
190. Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., et al. (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res.*, 175(1):184-91.
191. Sinha Hikim, A.P., Swerdloff, R.S. (1999) Hormonal and genetic control of germ cell apoptosis in the testis. *Rev Reprod.*, 4(1): 38-47.
192. Smit, M., Romijn, J.C., Wildhagen, M.F., Weber, R.F., Dohle, G.R., (2010) Sperm chromatin structure is associated with the quality of spermatogenesis in infertile patients. *Fertil Steril.*, 94 (5): 1748-52.
193. Smolewski, P., Bedner, E., Du, L., Hsieh, T.C., Wu, J.M., Phelps, D.J., Darzynkiewicz, Z. (2001) Detection of caspases activation by fluorochrome-labeled inhibitors: Multiparameter analysis by laser scanning cytometry. *Cytometry*, 44(1):73- 82.
194. Soleimani, M., Tavalae, M., Aboutorabi, R., Adib, M., Bahramian, H., Janzamin, E., Kiani, A., Nasr-Esfahani, M.H. (2010) Evaluation of Fas positive sperm and complement mediated lysis in subfertile individuals. *J Assist ReprodGenet.*, 27:477-482.
195. Spano, M., Toft, G., Hagmar, L., Eleuteri, P., Resci, a M., Rignell-Hydbom, A., Tyrkiel, W., Zvyezday, V., Bonde, J.P. (2005) Exposure to PCB and p,p'-DDE in European and Inuit populations: impact on human sperm chromatin integrity. *Hum Reprod.*, 20(12):3488-3499.
196. Stennicke, H.R., Renatus, M., Meldal, M., Salvesen, G.S. (2000) Internally quenched fluorescent peptide substrates disclose the subsite preferences of human caspases 1, 3, 6, 7 and 8. *Biochem. J* 350:563-568.
197. Suda, T., Takahashi, T., Golstein, P., Nagata, S. (1993) Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell.*, 75(6):1169-1178.
198. Sukanuma, R., Yanagimachi, R., Meistrich, M.L. (2005) Decline in fertility of mouse sperm with abnormal chromatin during epididymal passage as revealed by ICSI. *Hum Reprod.*, 20(11):3101-8.
199. Taylor, S.L., Weng, S.L., Fox, P., Duran, E.H., Morshedi, M.S., Oehninger, S., Beebe, S.J. (2004) Somatic cell apoptosis markers and pathways in human

- ejaculated sperm: Potential utility as indicators of sperm quality. *Mol Hum Reprod.*, 10:825–834.
200. Thonneau, P., Marchand, S., Tallec, A. (1991) Incidence and main causes of infertility in a resident population (1,850,000) of three French regions (1988-1989). *Hum Reprod.*, 6(6):811-816.
  201. Thornberry, N.A., Bull, H.G., Calaycay, J.R., Chapman, K.T., Howard, A.D., Kostura, M.J. et al. (1992). A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature*, 356(6372): 768–774.
  202. Thornberry, N.A., Rano, T.A., Peterson, E.P., Rasper, D.M., Timkey, T., Garcia-Calvo, M. et al. (1997) A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J Biol Chem.*, 272(29):17907–17911.
  203. Thornberry, N. A. and Lazebnik, Y. (1998) Caspases: enemies within. *Science*, 281(5381):1312–1316.
  204. Tremellen, K. (2008) Oxidative stress and male infertility – a clinical perspective. *Hum Reprod Update.*, 14(3):243–258.
  205. Turner, M. R. (2003) Tales from the tail: What do we really know review about sperm motility? *J Androl.*, 24(6):790-803.
  206. Twigg, J., Irvine, D.S., Houston, P., Fulton, N., Michael, L., Aitken, R.J., (1998) Iatrogenic DNA damage induced in human spermatozoa during sperm preparation: protective significance of seminal plasma. *Mol Hum Reprod* 4(5): 439-45.
  207. Walker, WH, Cheng, J. (2005) FSH and testosterone signaling in Sertoli cells. *Reproduction.*, 130(1):15-28.
  208. Wang, Q., Zhao, X.F., Ji, Y.L., Wang, H., Liu, P., Zhang, C., Zhang, Y., Xu, D.X. (2010) Mitochondrial signaling pathway is also involved in bisphenol A induced germ cell apoptosis in testes. *Toxicology lett.*, 199(2):129-135.
  209. Ward, WS. (2010) Function of sperm chromatin structural elements in fertilization and development. *Mol Hum Reprod.*, 16(1):30–6.
  210. Weil, M., Jacobson, M.D., Raff, M.C. (1998) Are caspases involved in the death of cells with a transcriptionally inactive nucleus? Sperm and chicken erythrocytes. *J Cell Sci.*, 111(18):2707-2715.
  211. Weinauer, G.F., Luetjens, C.M., Simoni, M., Nieschlag, E. (2010) Physiology of Testicular Function. In: Nieschlag, E., Berhe, H.M., Nieschlag, S. (Eds) Male Reproductive Health and Dysfunction 3<sup>rd</sup> Edition, Springer, p 39-44.
  212. Weng, S.L., Taylor, S.L., Morshedi, M., Schuffner, A., Duran, E.H., Beebe, S., Oehninger, S. (2002) Caspase activity and apoptotic markers in ejaculated human sperm. *Mol Hum Reprod.*, 8(11):984–991.
  213. Williamson, K., Frayne, J., McLaughlin, E.A., Hall, L. (1998) Expression of extracellular superoxide dismutase in the human male reproductive tract, detected using antisera raised against a recombinant protein. *Mol Hum Reprod.*, 4(3):235–242.
  214. Windt, M.L., De Beer, P.M., Franken, D.R., Rhemrev, J., Menkveld, R., Lombard, C.J., Kruger, T.F. (1994) Sperm decondensation and semen parameters: utilization of a simple staining technique for the evaluation of human sperm decondensation. *Andrologia*, 26(2):67–72.
  215. World Health Organisation. (2010). Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen (5th ed.). Geneva, Switzerland: WHO Press.

216. World Health Organization, (2000) Manual for the standardized investigation, diagnosis and management of the infertile male. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
217. Wyrobek, A.J., Eskenazi, B., Young, S., Arnheim, N., Tiemann-Boege, I., Jabs, E.W., Glaser, R.L., Pearson, F.S., Evenson, D. (2006) Advancing age has differential effects on DNA damage, chromatin integrity, gene mutations, and aneuploidies in sperm. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 103(25):9601–9606.
218. Zannini, C., Turchetti, S., Guarch, R., Buffa, D., Psece, C. (1999) Cell counting and three-dimensional reconstruction to identify a cellular wave in human spermatogenesis. *Ann Quant Cytol Histol* 21(4):358–362.
219. Zhengwei, Y., Wreford, N.G., Royce, P., de Kretser, D.M., McLachlan, R.I. (1998) Stereological evaluation of human spermatogenesis after suppression by testosterone treatment: heterogeneous pattern of spermatogenic impairment. *J Clin Endocrinol Metab.*, 83(4):1284–1291.
220. Ziegler, U. and Groscurth P., (2004) Morphological features of cell death. *News in Physiological Sciences.*, 19: 3, 124–128.
221. Zini, A., Bielecki, R., Phang, D., Zenzes, M.T. (2001a) Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men. *Fertil Steril.*, 75(4):674–7.
222. Zini, A., Kamal, K., Phang, D., Willis, J., Jarvi, K. (2001b) Biologic variability of sperm DNA denaturation in infertile men. *Urology*, 58(2):258–61.
223. Zini, A., Blumenfeld, A., Libman, J. (2005) Beneficial effect of microsurgical varicocelectomy on human sperm DNA integrity. *Hum Reprod.*, 20(4):1018-1021.

### **Παραπομπές εικόνων:**

- 1) <http://ebooks.edu.gr/modules/ebook/show.php/DSGL-A105/43/270,1247/>
- 2) <https://www.slideshare.net/burhanumerchaudhry/reproductive-and-hormonal-functions-of-the-male>
- 3) [https://www.researchgate.net/publication/259687319\\_Male\\_Reproductive\\_System-Anatomy\\_and\\_Physiology](https://www.researchgate.net/publication/259687319_Male_Reproductive_System-Anatomy_and_Physiology)
- 4) <http://www.writeopinions.com/spermiogenesis>
- 5) <http://www.assignmenthelp.net/physiology-of-male-reproductive-system>
- 6) Agarwal, A. and Parekattil S.J. (eds), Male infertility: Contemporary Clinical Approaches, Andrology, ART & Antioxidants. (2014), Springer New York Heidelberg Dordrecht London.
- 7) <http://biochimej.univ-angers.fr/Page2/COURS/Zsuite/5CytochromeC/1CytochromeC.htm>
- 8) <http://proteopedia.org/wiki/index.php/Caspase-3/Sandbox>



- 9) Shi, Y. (2002) Mechanisms of caspase inhibition and activation during apoptosis. *Mol. Cell.*, 9(3):459–470.
- 10) Shi, Y. (2002) Mechanisms of caspase inhibition and activation during apoptosis. *Mol. Cell.*, 9(3):459–470.
- 11) Timmer, J.C. and Salvesen, G.S. (2007) Caspase substrates. *Cell Death Differ.*, 14: 66–72.
- 12) <https://www.hindawi.com/journals/er/2012/835731/fig1/>
- 13) Smolewski, P., Bedner, E., Du, L., Hsieh, T.C., Wu, J.M., Phelps, D.J., Darzynkiewicz, Z. (2001) Detection of caspases activation by fluorochrome-labeled inhibitors: Multiparameter analysis by laser scanning cytometry. *Cytometry*, 44(1):73– 82.
- 14) Vaithinathan, S., D’Cruz S.C., Marthur, P.P. Apoptosis and Male Infertility, in: Agarwal, A. and Parekattil S.J. (eds), *Male infertility: Contemporary Clinical Approaches, Andrology, ART & Antioxidants*. (2014), Springer New York Heidelberg Dordrecht London.
- 15) [https://en.wikipedia.org/wiki/Fluorescence\\_microscope](https://en.wikipedia.org/wiki/Fluorescence_microscope)

