



ΤΡΙΜΗΝΙΑΙΑ ΕΚΔΟΣΗ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΑΝΔΡΟΛΟΓΙΚΗΣ ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ

ΑΝΗP

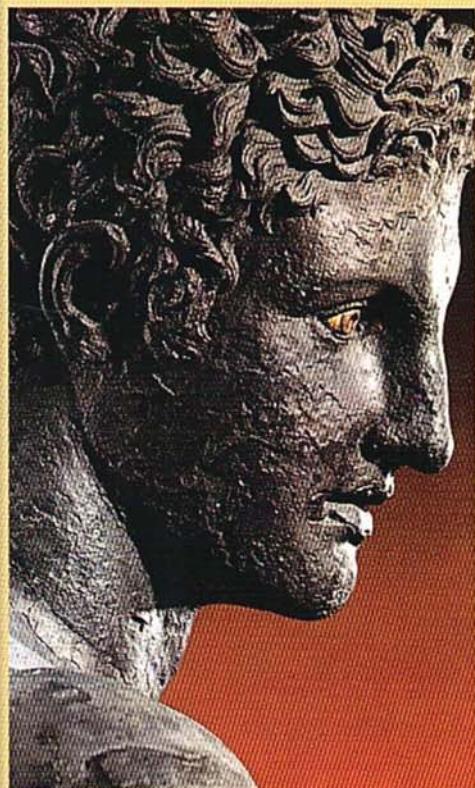
ΕΠΙΣΗΜΗ ΕΚΔΟΣΗ
ΤΗΣ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ
ΑΝΔΡΟΛΟΓΙΚΗΣ ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ

OFFICIAL JOURNAL
OF THE HELLENIC SOCIETY
OF ANDROLOGY

ΤΟΜΟΣ 11ος • ΤΕΥΧΟΣ 4° • ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ-ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ-ΔΕΚΕΜΒΡΙΟΣ 2009

ειδικό αφιέρωμα

- ΑΚΕΡΑΙΟΤΗΤΑ ΤΟΥ DNA ΚΑΙ
ΑΝΕΥΠΛΟΕΙΔΙΑ ΤΩΝ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΩΝ



ΠΛΗΡΟΜΕΝΟ
ΤΕΛΟΣ
Ταχ-Γραφεία
ΚΕΜΠΑΘ.
ΑΡ.ΑΔ. 797/94



ΕΛΤΑ
Hellenic Post
ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΗ ΤΑΧΥΓΡΑΦΙΑΣ
ΚΩΔ.4310

MEDLINE, ΓΡΑΜΜΟΥ 20, 152 35 ΒΡΙΛΗΣΙΑ

ΤΡΙΤΗ ΗΛΙΚΙΑ ΚΑΙ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΤΟΥ DNA ΤΩΝ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΩΝ

ΡΩΞΑΝΗ ΑΓΓΕΛΟΠΟΥΛΟΥ¹, ΘΕΟΔΟΣΙΑ ΖΕΓΚΙΝΙΑΔΟΥ², ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ Γ. ΓΟΥΛΗΣ³, ΑΛΚΗΣΤΗ ΝΙΚΟΛΑΟΥ⁴

¹ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΙΣΤΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΕΜΒΡΥΟΛΟΓΙΑΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ-ΕΚΠΑ,

²Α' ΟΥΡΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ, ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ, ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ,

³ΜΟΝΑΔΑ ΕΝΔΟΚΡΙΝΟΛΟΓΙΑΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ, Α' ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ – ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ, ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ, ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ,

⁴ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ, ΓΕΝΙΚΟ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΜΜΟΧΩΣΤΟΥ, ΚΥΠΡΟΣ

Περίληψη

Η κακή ποιότητα του σπέρματος λόγω της αύξησης του ποσοστού των σπερματοζωρίων με βλάβη του DNA αυτών είναι συχνό εύρημα σε άνδρες μεγάλης ηλικίας που προσέρχονται στα κέντρα υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Σε αυτά τα άτομα, εκτός από τη βαθμιαία ανάπτυξη του υπογοναδιαριού όψιμης έναρξης παρατηρούνται και αρκετές ανωμαλίες στους όρχεις ενώ η παραγωγή ώριμων σπερματοζωρίων φυσιολογικής μορφολογίας και κινητικότητας στο σπέρμα ελαττώνεται. Επειδή οι μηχανισμοί επιδιόρθωσης της βλάβης του DNA και απόπτωσης δεν λειτουργούν αποτελεσματικά στα γεννητικά κύτταρα με την πάροδο της ηλικίας δεν απομακρύνονται οι παθολογικές μορφές και συσσωρεύονται σπερματοζωάρια ανώμαλης μορφολογίας και κινητικότητας στο σπέρμα. Την κατάσταση επιδεινώνει η παρουσία δραστικών μορφών οξυγόνου - ROS και το οξειδωτικό στρες. Τα σπερματοζωάρια και τα λευκοκύτταρα είναι οι κύριες πηγές ROS στο γεννητικό σύστημα του άνδρα. Η αύξηση των ROS πάνω από τον επιτρέπομενο ουδό προκαλεί μη αντιστρέψιμη βλάβη των μεμβρανών του κυττάρου και των οργανιδών αυτού καθώς και κερματισμό του μιτοχονδριακού και πυρηνικού DNA. Η έλλειψη κυτταροπλάσματος συνεπάγεται και έλλειψη αντιοξειδωτικών ενζύμων και έτσι το σπερματοζωάριο χάνει την προστατευτική τους δράση και γίνεται ευάλωτο στο οξειδωτικό στρες. Στα άρρενα μεγάλης ηλικίας ο συνδυασμός χρονίας φλεγμονής και υπολεπτομένης εγγενούς αντιοξειδωτικής δραστηριότητας εκτρέπει την ισορροπία προς μη αντισταθμιζόμενη κυτταροτοξικότητα. Εξάλλου, όταν το σπέρμα προέρχεται από ηλικιωμένο άνδρα, τα παθολογικά σπερματοζωάρια συσσωρεύονται γύρω από το ωοκύτταρο, δεν προσδένονται στον υποδοχέα τους στη διαφανή ζώνη και δεν παρουσιάζουν μία φυσιολογική αντίδραση ακροσώματος, ούτε ικανότητα διεισδυσης στο ωοκύτταρο. Η χρησιμοποίηση τέτοιων σπερματοζωρίων για γονιμοποίηση *in vitro* ή ICSI οδηγεί συνήθως σε αδυναμία αποσυμπύκνωσης του πυρήνα του σπερματοζωρίου μέσα στο ωοκύτταρο και ανεπιτυχή γονιμοποίηση. Άλλα και αν δημιουργηθεί ζυγώτης συχνά αναφέρονται αποβολές, ανώμαλη εμβρυϊκή ανάπτυξη και ελαττωμένα ποσοστά κυήσεων.

Λέξεις ευρετηρίου: ICSI, οξειδωτικό στρες, βλάβη του DNA, δραστικές μορφές οξυγόνου - ROS, απόπτωση, υπογοναδισμός, όρχις, σπέρμα, γονιμοποίηση

Abstract

Concern that spermatozoal DNA damage increases with age derives from several studies showing abnormal reproductive outcomes among older fathers. In addition to the gradual development of late onset hypogonadism with advanced age, increased abnormalities in the testes and the conventional semen parameters can be detected in infertile individuals attending reproductive clinics, especially older men whose reproductive potential is compromised. Concomitant with the reduced DNA repair capabilities, a deficient apoptotic machinery of the germ cells is operating in the testis and this result to the accumulation of DNA-damaged spermatozoa in the semen. The situation is aggravated by the increase of reactive oxygen species - ROS and the ensuing oxidative stress. Sources of ROS in the semen are activated leukocytes and immature or abnormal spermatozoa. ROS have been related with apoptosis of spermatozoa from infertile patients and can cause irreversible damage on lipid and protein layers of sperm membranes and on nuclear and mitochondrial DNA. Also, the lack of cytoplasm in mature spermatozoa is essentially equivalent to the absence of protective antioxidant enzymes usually found in most cells, rendering the spermatozoa particularly vulnerable to oxidative stress. In the aging male context, a combination of chronic inflammation and subdued inherent antioxidant capacity shifts the overall oxidation-antioxidant equilibrium towards non-compensated ROS-induced cytotoxicity. On the other hand, spermatozoa presenting with macroscopic and microscopic morphological deficiencies, such as maturation arrest, malformations, motility limitations and dysfunctional aggregation on the oocyte peripheral membrane, which are frequently observed in elderly men, are also particularly prone to oxidative stress damage, leading to impaired zona pellucida binding, acrosomal reaction and a negative influence on the sperm - oocyte penetration capacity. The use of spermatozoa bearing double-stranded damaged DNA for *in vitro* fertilization or ICSI purposes will probably result in failure of sperm decondensation and fertilization. But even if the zygote is formed further embryo development is impaired and the pregnancy outcome rates are reduced..

Key words: Oxidative stress, spermatozoa, DNA damage, Reactive oxygen species - ROS, reproduction, fertilization.

1. Εισαγωγή

Παρόλο που το ποσοστό των ηλικιωμένων ανδρών που αποπειρώνται να αποκτήσουν απογόνους συνεχίζει να αυξάνει οι πιθανότητες επιτυχούς γονιμοποίησης, ακόμα και με τη χρήση των τεχνικών της υποβοηθουμένης αναπαραγωγής, μειώνονται και αυτό οφείλεται κυρίως στην κακή ποιότητα του σπέρματος. Η αύξηση του προσδόκιμου επιβίωσης που συνοδεύεται από την επιθυμία τεκνοποίησης σε μεγαλύτερη ηλικία, συνδυαζόμενη με την πρόοδο των τεχνικών της υποβοηθουμένης αναπαραγωγής, εξηγεί το ενδιαφέρον των ηλικιωμένων ανδρών για τη διατήρηση της γονιμότητάς τους (1, 2). Συγχρόνως, όμως αποκαλύπτει το φαινόμενο της σταδιακής έκπτωσης της αναπαραγωγικής λειτουργίας και τη βαθμιαία ανάπτυξη του υπογοναδισμού όψιμης έναρξης (LOH) στον άνδρα (3). Κατά την περίοδο της μειωμένης ανδρογονικής δραστηριότητας καταγράφονται μεταβολές στους όρχεις (πρωτογενής ορχική ανεπάρκεια), διαφοροποίηση της ευασθησίας της εκλυτικής της γοναδοτροπίνης ορμόνης (GnRH) του υποθαλάμου, ελάττωση του εύρους των ώσεων της LH από την υπόφυση προς τους όρχεις και άμβλυνση της ημερήσιας διακύμανσης LH και τεστοστερόνης (3). Περιγράφονται επίσης λειτουργικές και ιστολογικές εκφυλιστικές αλλοιώσεις στους γηραιούς όρχεις, όπως η σκλήρυνση των αρτηριολίων, η πάχυνση του ινώδους χιτώνα και της βασικής μεμβράνης, η συσσώρευση λιποφουσκίνης και η εκφύλιση των σωματικών κυττάρων Leydig και Sertoli. Η λειτουργική δραστηριότητα των κυττάρων Leydig ελαττώνεται καθώς και ο αριθμός των κυττάρων Sertoli ανά σπερματικό σωληνάριο. Παράλληλα μειώνεται και ο πληθυσμός των γεννητικών κυττάρων και ειδικότερα ο αριθμός των πρωτογενών σπερματοκυττάρων και των σπερματίδων ανά κύτταρο Sertoli. Η ημερήσια παραγωγή σπερματοζωαρίων και οι λειτουργικές τους δραστηριότητες εκπίπτουν επίσης (4).

Αυτή η απώλεια των γεννητικών κυττάρων που παρατηρείται στους ηλικιωμένους άνδρες γίνεται με απόπτωση, λόγω συνδυασμένης επίδρασης της πρωτογενούς ορχικής ανεπάρκειας και της δυσλειτουργίας του υποθαλαμικού - υποφυσιακού άξονα (5). Αντανακλάται, επίσης και στην ποιότητα του σπέρματος, αν και στα διάφορα άτομα παρατηρείται σημαντικού βαθμού απόκλιση σε κάθε μία από τις παραμέτρους του (2). Όμως, σε γενικές γραμμές, διαταράσσονται κυρίως ο όγκος του σπέρματος, η κινητικότητα και η μορφολογία των σπερματοζωαρίων. Η σημαντική ελάττωση του όγκου του σπέρματος σε συνδυασμό με τη χαμηλή περιεκτικότητα σε φρουκτόη ερμηνεύεται από την ανεπαρκή λειτουργία των επικουρικών γεννητικών αδένων, οι οποίοι, ως γνωστόν, αποτελούν τα όργανα στόχους των ανδρογόνων. Η συγκέντρωση

και ο αριθμός των σπερματοζωαρίων φαίνεται να επηρεάζεται λιγότερο αλλά αυτές οι παράμετροι θα πρέπει να ανάγονται και να συνεκτιμώνται με την συνυπάρχουσα ελάττωση του όγκου του σπέρματος (1).

2. Η απόπτωση στον όρχι και στα σπερματοζωάρια

Όπως τονίζεται σε πληθώρα εργασιών της τελευταίας εικοσαετίας οι τιμές του σπερμοδιαγράμματος που μετρώνται σε προχωρημένη ηλικία συσχετίζονται με την απόπτωση των γεννητικών κυττάρων κατά τη σπερματογένεση στον όρχι και τη βλάβη του DNA των σπερματοζωαρίων στο σπέρμα (6-8). Τα γενεσιουργά αίτια μπορεί να είναι ενδο - και εξω - ορχικά (9). Πιθανώς, ο σημαντικότερος βλαπτικός παράγοντας είναι οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS). Γενικά, την επίδραση των ROS στη δομική ακεραιότητα του κυττάρου επιτείνουν διάφορες καταστάσεις όπως για παράδειγμα το υπερβολικό στρες, η κατανάλωση αλκοόλ ή ναρκωτικών, η ακτινοβολία, η χημειοθεραπεία, οι τραυματισμοί, το κάπνισμα, η λήψη φαρμάκων, η αυξημένη θερμοκρασία και οι χρόνιες φλεγμονές. Οι ROS, ιδιαίτερα όταν υπερβαίνουν τα φυσιολογικά όρια ή όταν δεν λειτουργούν τα συστήματα αναγωγής τους, προκαλούν οξειδωτικό στρες και επάγουν την απόπτωση του κυττάρου λόγω του κερματισμού του DNA που προκαλούν (8-12). Ειδικότερα, για το γεννητικό σύστημα του άρρενος είναι σήμερα γνωστός ο φυσιολογικός ρόλος και οι παθολογικές αποκλίσεις στις τιμές των ROS. Χαρακτηριστικά αναφέρεται ότι επίπεδα $ROS > 0.0185 \times 10^6$ φωτόνια ανά min στο σπέρμα υποδηλώνουν ανδρική υπογονιμότητα (13). Πολύ ψηλότερες τιμές των ROS παρατηρούνται στους άνδρες ηλικίας > 40 ετών, σε σχέση με αυτές που μετρώνται στο σπέρμα των νεαρών ανδρών (13, 14). Έχουμε, επομένως, εδώ ένα παράδειγμα της θεωρίας της γήρανσης, σύμφωνα με το οποίο « η γήρανση επιτείνεται από τη βλάβη που προκαλούν οι ελεύθερες ρίζες » όπως πρότεινε ο Denham Harman το 1956 (15).

3. Ο ρόλος των δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS)

Οι πηγές των ROS στο σπέρμα είναι τα ενεργοποιημένα λευκοκύτταρα και τα ανώριμα ή ανώμαλα σπερματοζωάρια. Η απουσία κυτταροπλάσματος στα ώριμα σπερματοζωάρια ισοδυναμεί με έλλειψη των αμυντικών αντιοξειδωτικών ενζυματικών συστημάτων που βρίσκονται στα περισσότερα κύτταρα και έτσι τα σπερματοζωάρια είναι ευάλωτα στο οξειδωτικό στρες (16). Είναι βέβαια γνωστό ότι η παραγωγή ROS μέχρι ενός ορισμένου επιπέδου είναι απαραίτητη για τις φυσιολογικές λειτουργικές δραστηριότητες των σπερματοζωαρίων,

όπως για την αντίδραση του ακροσώματος, την ενεργοποίηση, την κινητικότητα, την ωρίμανση στην επιδιδυμίδα, αλλά και για τη φυσιολογική συγκέντρωση και τη γονιμοποίηση (8, 16, 17).

Η συνεχής παραγωγή ROS γίνεται στα μιτοχόνδρια, τα οποία παίζουν βασικό ρόλο στη ρύθμιση της απόπτωσης σύμφωνα με ένα μοντέλο που περιλαμβάνει 3 στάδια. Το πρώτο αφορά στην ενεργοποίηση των οδών μεταγωγής του σήματος και ρυθμίζεται από τα μέλη της οικογένειας των πρωτεΐνων BCL-2. Το δεύτερο αφορά στη διαταραχή της ομοιόστασης των μιτοχόνδριών και τη διαφυγή στο κυτταρόπλασμα πρωτεΐνών που θα ενεργοποιήσουν τις κασπάσες ενώ παράλληλα μεταβάλλεται η μιτοχονδριακή μεταφορά των ηλεκτρονίων, η οξειδωτική φωσφορυλίωση και η παραγωγή ATP. Το τρίτο στάδιο αφορά στην ενεργοποίηση των κασπασών και των νουκλεασών που θα προκαλέσουν τον κερματισμό του DNA (18-19). Δηλαδή, όταν τα επίπεδα των ROS ξεπερνούν τον ουδό ικανότητας προς αποκατάσταση της βλάβης, η ενεργοποιημένη κασπάση 3 διασπά την πολυ (ADP-ριβόζη) πολυμεράση 1 - PARP 1. Σταματά, τότε, η διαδικασία επιδιόρθωσης της βλάβης του DNA που καταλύεται από την PARP 1 και αρχίζει η εκτέλεση του αποπτωτικού προγράμματος (6). Οι μεταβολές που καταγράφονται στα μιτοχόνδρια περιλαμβάνουν διόγκωση αυτών και ελάττωση του δυναμικού της μεμβράνης σε συνδυασμό με τη δημιουργία πόρων οι οποίοι λειτουργούν ως δίαιυλοι ιόντων. Δια μέσου αυτών διέρχονται στο κυτταρόπλασμα ROS και Ca²⁺ ενώ ταυτόχρονα αναστέλλεται η λειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας και τα επίπεδα του ATP μειώνονται (20). Αυτό έχει άμεσο αντίκτυπο στη φωσφορυλίωση των πρωτεΐνων του αξονήματος και αλλοιώνει την ποιότητα του σπέρματος (21).

4. Οι συνέπειες του οξειδωτικού στρες στη γονιμότητα των ήλικιωμένων ανδρών

Η διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ παραγωγής των δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) αφενός και των αντιοξειδωτικών αμυντικών μηχανισμών του κυττάρου αφετέρου, που διαπιστώνται στα άτομα προχωρημένης ηλικίας, έχει άμεσο αντίκτυπο στην ποιότητα των πρωτεΐνων των λιπιδίων και του DNA των σπερματοζωαρίων (22). Όπως αναφέρθηκε, ο αρσενικός γαμέτης είναι εξαιρετικά ευαίσθητος στην οξειδωτική βλάβη και, συνεπώς, η παρατηρουμένη στα γηραιά άρρενα εκτροπή της οξειδο-αναγωγικής ισορροπίας περιπλέκει την υπάρχουσα κατάσταση της ελαττωμένης γονιμότητας (23, 24). Μελέτες για ορισμένες οξειδωτικές ουσίες όπως η μαλονδιαλδεϋδη (MDA) και το οξείδιο του αζώτου (NO) συνδυάζουν τη

γήρανση με την αύξηση αυτών στο σπέρμα (25). Επιπλέον, υπάρχουν και πειραματικά δεδομένα, που αφορούν στη σύγκριση των συγκεκριμένων οξειδωτικών ουσιών και των αντιοξειδωτικών ενζύμων δισμούντασης του υπεροξειδίου (superoxide dismutase - SOD), υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (glutathione peroxidase - GPX) καταλάσης (CAT) και του ασκορβικού οξέος (24). Από τη μελέτη της επίδρασης της ηλικίας στην αντιοξειδωτική δραστηριότητα των ανωτέρω ενζύμων, στην παραγωγή των ROS και στην έκταση της λιπιδικής υπεροξειδώσης που παρατηρείται σε σπερματοζωάρια νεαρών (4 μηνών) και γηραιών (21 μηνών) αρουραίων, που συλλέγονται από την κεφαλή και την ουρά της επιδιδυμίδας, διαπιστώνται:

1. μειωμένη δραστηριότητα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GPX1, GPX4) και της δισμούντασης του υπεροξειδίου (SOD) στα σπερματοζωάρια των γηραιών αρουραίων
2. ελαττωμένη έκφραση της GPX4 στην κεφαλή και στο μέσο τμήμα της ουράς των σπερματοζωαρίων I (26, 27). Στην κεφαλή το φαινόμενο συνδέεται άμεσα με τη συμπύκνωση της χρωματίνης κατά τη σπερμιογένεση επειδή ελαττώνεται ο αριθμός των δισουλφυδριλικών δεσμών (ανάμεσα στις ομάδες SH δύο μορίων κυστεΐνης της ίδιας ή διαφορετικών πεπτιδικών αλυσίδων) στις πρωταμίνες (28). Λιγότεροι δισουλφυδριλικοί δεσμοί σημαίνει πιο ανοικτή δομή, δηλαδή πιο ευάλωτη στην οξειδωτική βλάβη. Επιπλέον, η ελαττωμένη έκφραση της GPX4 στο μέσο τμήμα της ουράς αντανακλά υποκειμένη διαταραχή της κινητικότητας πράγμα που έχει διαπιστωθεί στα σπερματοζωάρια των ηλικιωμένων πειραματοζώων (27)
3. αυξημένη παραγωγή των υπεροξειδίων του υδρογόνου (H_2O_2) και του αζώτου ($O_2^- N_2$)
4. Δραστική αύξηση της λιπιδικής υπεροξειδώσης στα σπερματοζωάρια των ηλικιωμένων αρουραίων. Πρόκειται για κυτταρική βλάβη, η οποία επάγεται από τα διαχέομενα υπεροξειδία με στόχο τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Συνήθως, αρχίζει με αφαίρεση απόμων υδρογόνου από τις ρίζες OH- και το προκύπτον διένιο αντιδρά με το O₂ και σχηματίζει μία ρίζα υπεροξειδίου ROO⁻, η οποία αφαιρεί H⁺ από τα λιπαρά οξέα, δημιουργούμενής έτσι μιας αυτοκαταλυμένης αντίδρασης ελευθέρων ρίζων, η οποία αν δεν σταματήσει, με κάποιο τρόπο, μπορεί να οδηγήσει στην καταστροφή του κυττάρου. Τα σπερματοζωάρια, σε αντίθεση προς άλλα κύτταρα, λόγω της ιδιαίτερης δομής τους είναι επιτρεπτή στη λιπιδική υπεροξειδώση επειδή στη μεμβράνη τους περιέχουν πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (Polyunsaturated Fatty Acids-PUFA) (18, 24). Η οξειδωση αυτών διπλασιάζεται στα σπερ-

ματοζώαρια των γηραιών ατόμων και προκαλείται ανώμαλη ρευστότητα και ευκαμψία της λιπιδικής διπλοστιβάδας με αμφίβολη δυνατότητα σύντηξης με τη μεμβράνη του ωοκυττάρου κατά τη γονιμοποίηση (29). Αυτή η αύξηση της λιπιδικής υπεροξείδωσης στα σπερματοζωαρία των γηραιών αρουραίων αποτελεί ένα κλασικό μοντέλο, με το οποίο ερμηνεύεται η ανάπτυξη της υπογονιμότητας στους ηλικιωμένους άνδρες (30).

Εκτός από την άμεση βλάβη οι ROS μπορούν να προκαλέσουν και έμμεση βλάβη στα σπερματοζωαρία. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι ο κερματισμός του DNA που επάγουν οι ρίζες OH⁻ οδηγεί καταρχήν στο σχηματισμό 8-OH-γονανίνης και 8-OH-2'-δεσοξυγονανοσίνης ενώ στη συνέχεια γίνεται ο κερματισμός του μονόκλωνου DNA (9). Οι ίδιες ρίζες μπορούν να επάγουν και τον κερματισμό του δίκλωνου DNA με την ενεργοποίηση κασπασών και ενδονουκλεασών των σπερματοζωαρίων. Η διάκριση αυτή αναφέρεται διότι, στην πρώτη περίπτωση, η βλάβη επιδιόρθωνται στο ωοκύτταρο ή στο έμβρυο. Όμως, στη δεύτερη περίπτωση, η επιδιόρθωση είναι αδύνατη και ασύμβατη με την περαιτέρω ανάπτυξη του έμβρυου.

Οι μη ώριμες και οι παθολογικές μορφές των σπερματοζωαρίων παράγουν αυξημένα επίπεδα ROS. Με την τεχνική προ-ετοιμασίας του σπέρματος, κατά την οποία γίνεται φυγοκέντρηση για τη λήψη του ιζήματος που θα χρησιμοποιηθεί στην εξωσωματική γονιμοποίηση, προκαλείται συχνά βλάβη των σπερματοζωαρίων. Ακόμη, τα διαλύματα κλίσης πυκνότητας και οι εκπλύσεις χειροτερεύουν την κατάσταση επειδή σε αυτά ανακατεύονται οι άωρες με τις ώριμες μορφές και το ποσοστό των σπερματοζωαρίων με κερματισμό αυξάνεται ενώ παράλληλα μπορεί να ελαττώνεται και η ικανότητα του σπερματικού υγρού να εξουδετερώνει τις ROS (18, 31).

5. Τα κλινικά δεδομένα

Καθώς με την πάροδο της ηλικίας τα επίπεδα των δραστικών μορφών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species - ROS) αυξάνουν, τα αποτελέσματα της έκθεσης των σπερματοζωαρίων των ηλικιωμένων ανδρών στο οξειδωτικό στρες ενισχύεται και επιτείνεται το μέγεθος της βλάβης αυτών. Όλο και μεγαλύτεροι αριθμοί σπερματοζωαρίων με κερματισμένο DNA ανιχνεύονται στα δείγματα σπέρματος αυτών των ανδρών και η χρησιμοποίηση τέτοιου υλικού στις τεχνικές της υποβοήθουμενής αναπαραγωγής δεν οδηγεί σε επιτυχή γονιμοποίηση. Η κατάσταση επιδεινώνεται αν παράλληλα συνυπάρχει και χρονία φλεγμονή. Τότε οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί του σπέρματος, οι οποίοι ρυθμίζονται κυρίως από ένζυμα, όπως η δισμούταση του υπεροξειδίου και από ουσίες χαμηλού μοριακού βάρους,

όπως το β-καροτένιο ή η τρανσφερρίνη, διαταράσσονται και ο λόγος οξειδωτική - αντιοξειδωτική ισορροπία εκτρέπεται προς μία κατάσταση μη αντιστρέψιμης βλάβης με έντονα κυτταροτοξικό χαρακτήρα (32).

Το αυξημένο ποσοστό λευκοκυττάρων στο σπέρμα (λευκοκυτταροσπερμία) ισοδυναμεί με αυξημένη παραγωγή ROS, όχι μόνο από τα λευκοκύτταρα αλλά και από τα σπερματοζωαρία, μια κατάσταση που επηρεάζει αρνητικά την ποιότητα του σπέρματος. Τα επακόλουθα του οξειδωτικού στρες σε φλεγμονώδεις καταστάσεις είναι, κυρίως, η επίταση της βλάβης του DNA αφενός και οι διαταραχές στη μορφολογία και την κινητικότητα των σπερματοζωαρίων αφετέρου (33). Επί παραδείγματι, στην επιδιόρθωση παρατηρείται ελάττωση του αριθμού και της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων (34) και αύξηση του ποσοστού των σπερματοζωαρίων με κερματισμένο DNA. Ως προς την απόπτωση των γεννητικών κυττάρων στον όρχι, έχει αποδειχτεί ότι, εκτός από τις φλεγμονές του γεννητικού συστήματος, η κρυψοφρονία, οι αποφρακτικές ή/και τραυματικές βλάβες και η κιρσοκήλη χειροτερεύουν την κατάσταση (35-40). Ιδιαίτερα στην τελευταία περίπτωση, η κυτταρική απάντηση, στους όρχεις των νεαρών υπογόνιων ασθενών, είναι παρόμοια με αυτήν που παρατηρείται κατά τη γήρανση. Δηλαδή, οι χαρακτηριστικοί δείκτες της επιδιόρθωσης του DNA και της απόπτωσης αυξάνουν και στις δύο περιπτώσεις στα γεννητικά κύτταρα. Επικρατούν, δηλαδή, τα συμπτώματα του οξειδωτικού στρες και η αυξημένη πολύ-ADP-ριβοζυλίωση με έξαρση του μεταβολικού στρες που οδηγεί σε απόπτωση και νέκρωση. Άλλα ενώ στους ηλικιωμένους άνδρες η κατάσταση εγκαθίσταται βαθμιαία στα άτομα με κιρσοκήλη παρατηρείται σε νεαρή ηλικία και θεωρείται ως «πρόωρη γήρανση» των γεννητικών κυττάρων(6).

Άλλωστε, η εκτέλεση του αποπτωτικού προγράμματος και η απομάκρυνση των αποπτωτικών σωματίων κατά τη σπερματογένεση δεν γίνεται επαρκώς στους ηλικιωμένους άνδρες και έτσι τα παθολογικά σπερματοζωαρία συσσωρεύονται μέσα στα σπερματικά σωληνάρια (41). Δηλαδή, στους άνδρες μεγάλης ηλικίας με υπογοναδικό ορμονικό προφίλ, εκτός από τις ανωμαλίες στις παραμέτρους του σπέρματος και το μεγάλο ποσοστό ανωμάλων σπερματοζωαρίων με κερματισμένο DNA και έλλειπή πρωταμίνωση που αναφέραμε, το αναπαραγωγικό δυναμικό εκτίθεται και σε άλλες επιβλαβείς καταστάσεις, όπως η εξασθένηση της ικανότητας αποκατάστασης της βλάβης του DNA και η συσσώρευση παθολογικών σπερματοζωαρίων στα σπερματικά σωληνάρια λόγω έκπτωσης του αποπτωτικού μηχανισμού. Επιπλέον, οι θραύσεις των χρωμοσωμάτων και οι σημειακές μεταλλάξεις αυξάνουν εκθετικά με την ηλικία και αυτό δείχνει ότι οι μηχανισμοί επιδιόρθωσης του DNA φθίνουν (42).

Εξάλλου, τα ανώριμα σπερματοζώαρια, παθολογικής μορφολογίας και κινητικότητας που συχνά στοιβάζονται γύρω από τη μεμβράνη του ωοκυττάρου όταν πρόκειται για σπέρμα ηλικιωμένου άνδρα όχι μόνο δεν συνδέονται με τον υποδοχέα της διαφανούς ζώνης αλλά παρουσιάζουν ανεπαρκή αντίδραση ακροσώματος και αδυναμία διείσδυσης στο ωόπλασμα. Αυτό συνεπάγεται μη επιτυχή γονιμοποίηση και χαμηλό ποσοστό κύνησης(43). Άλλα και αν σχηματιστεί ο ζυγώτης στα επόμενα στάδια της ανάπτυξης του εμβρύου παρατηρούνται αποβολές, συγγενείς ανωμαλίες, νευρολογικές διαταραχές και άλλα παθολογικά σύνδρομα καθώς και ελαττωμένα ποσοστά κυήσεως.

Ευχαριστίες

Απευθύνονται στο Διευθυντή του Εργαστηρίου Ιστολογίας και Εμβρυολογίας της Ιατρικής Σχολής Καθηγητή κ. Χρήστο Κίττα για την ουσιαστική υποστήριξη στην πραγματοποίηση αυτής της εργασίας.

Το παρόν άρθρο αποτελεί μέρος της έρευνας που επιχορηγείται από το Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, στα πλαίσια του Προγράμματος «Καποδιστρίας», με κωδικό 70/4/6574 (Υπεύθυνος Έργου: Ρωξάνη Αγγελοπούλου).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Jung A, Schuppe HC, Schill WB. Comparison of semen quality in older and younger men attending an andrology clinic. *Andrologia* 2002; 34: 116-122.
- Sibert L, Rives N. Evolution des caractères spermatiques avec l'âge. *Andrologie* 2004; 14: 45-51.
- Νικοπούλου ΣΧ. Ζη ηλικία και σεξουαλικότητα. Ιδιαιτέρωτης στον άνδρα. *ANHP* 2008, 10: 42-50.
- Johnson L. Spermatogenesis and aging in the human. *J Androl* 1986; 7: 331-354.
- Wang C, Sinha Hikim AP, Lue YH, Leung A, Baravarian S, Swerdloff RS. Reproductive aging in the Brown Norway rat is characterized by accelerated germ cell apoptosis and is not altered by luteinizing hormone replacement. *J Androl* 1999; 20: 509-518.
- El-Domyati MM, Al-Din A, Barakat M, El-Fakahany H, Honig S, Xu J et al. The expression and distribution of deoxyribonucleic acid repair and apoptosis markers in testicular germ cells of infertile varicocele patients resembles that of old fertile men. *Fertil Steril* 2010; 93: 795-801.
- Angelopoulou R, Plastira K, Msaouel P. Spermatozoal sensitive biomarkers to defective protaminosis and fragmented DNA. *Reprod Biol Endocrinol* 2007; 5: 36.
- Angelopoulou R, Dadoune JP. Apoptose dans la spermatogenèse normale et pathologique. *Contracep Fertil Sex* 1999; 27: 99-106.
- Sakkas D, Alvarez JG. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome and analysis. *Fertil Steril* 2010; In Press.
- Lopes S, Jurisicova A, Sun JG, Casper RF. Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod* 1998; 13: 896-900.
- Potts RJ, Norarianni LJ, Jefferies TM. Seminal plasma reduces exogenous damage to human sperm, determined by the measurement of DNA strand breaks and lipid peroxidation. *Mutat Res* 2000; 2: 249-256.
- Agarwal A, Ramadan AS, Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril* 2003; 79: 829-843.
- Agarwal A, Makker K, Sharma R. Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update. *Am J Reprod Immunol* 2008; 59: 2-11.
- Cocuzza M, Athayde KS, Agarwal A, Sharma R, Pagani R, Lucon AM, et al. Age-related increase of reactive oxygen species in neat semen in healthy fertile men. *Urology*. 2008; 71: 490-494.
- Harman D. Free radicals in aging. *Mol Cell Biochem* 1988; 84: 155-161.
- Agarwal A, Nallella KP, Allamaneni SS, Said TM. Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature. *Reprod Biomed Online* 2004; 8: 616-627.
- de Lamirande E, Gagnon C. Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. *Hum Reprod* 1995; 10 [Suppl 1]: 15-21.
- Angelopoulou R, Kyriazoglou M. Sperm oxidative damage and the role of reactive oxygen species in male infertility. *Arch Hellenic Med* 2005, 22: 433-446.
- Kroemer G, Zamzami N, Susin SA. Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol Today* 1997; 18: 44-51.
- Polla BS, Banzet N, Dall'Ava J, Arrigo AB, Vignola AM. Les mitochondries: Carrefour entre vie et mort cellulaire: rôle des protéines de stress et conséquences sur l'inflammation. *Med Sci* 1998; 14: 18-25.
- Flaherty CO, de Lamirande E, Gagnon C. Positive role of reactive oxygen species in mammalian sperm capacitation: triggering and modulation of phosphorylation events. *Free Radic Biol Med* 2006; 41: 528-540.
- Desai N, Sabanegh E Jr, Kim T, Agarwal A. Free Radical Theory of Aging: Implications in Male Infertility. *Urology* 2010; 75: 14-19.
- Kidd SA, Eskenazi B, Wyrobek AJ. Effects of male age on semen quality and fertility: a review of the literature. *Fertil Steril* 2001; 75: 237-248.
- Weir CP, Robaire B. Spermatozoa have decreased antioxidant enzymatic capacity and increased reactive oxygen species production during aging in the Brown Norway Rat. *J Androl* 2007; 28: 229-240.
- Inal ME, Kanbak G, Sunal E. Antioxidant enzyme activities and malondialdehyde levels related to aging. *Clin Chim Acta* 2001; 305: 75-80.
- Zubkova EV, Wade M, Robaire B. Changes in spermatozoal chromatin packaging and susceptibility to oxidative challenge during aging. *Fertil Steril*. 2005; 84 Suppl 2: 1191-1198.
- Zubkova EV, Robaire B. Effect of glutathione depletion on antioxidant enzymes in the epididymis, seminal vesicles, and liver and on spermatozoa motility in the aging brown Norway rat. *Biol Reprod*. 2004; 71: 1002-1008.
- Conrad M, Moreno SG, Sinowatz F, Ursini F, Kolle S, Roveri A et al. The nuclear form of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase is a protein thiol peroxidase contributing to sperm chromatin stability. *Mol Cell Biol* 2005; 25: 7637-7644.
- Aitken RJ, Sawyer D. The human spermatozoon-not waving but drowning. *Adv Exp Med Biol* 2003; 518: 85-98.
- Mathieu C, Ecochard R, Bied V, Lornage J, Czyba JC. Cumulative conception rate following intrauterine artificial insemination with husband's spermatozoa: influence of husband's age. *Hum Reprod* 1995; 10: 1090-1097.
- Muratori M, Maggi M, Spinelli S, Filimberti E, Forti G, Baldi E. Spontaneous DNA fragmentation in swim-up selected human spermatozoa during long term incubation. *J Androl*. 2003; 24: 253-262.
- Angelopoulou R, Lavranos G, Manolakou P. ROS in the aging male: model diseases with ROS-related pathophysiology. *Reprod Toxicol* 2009; 28: 167-171.
- Saleh RA, Agarwal A, Kandirali E, Sharma RK, Thomas AJ, Nada EA, et al. Leukocytospermia is associated with increased reactive oxygen species production by human spermatozoa. *Fertil Steril* 2002; 78: 1215-1224.
- Kopa Z, Wenzel J, Papp GK, Haidl G. Role of granulocyte elastase and interleukin-6 in the diagnosis of male genital tract inflammation. *Andrologia* 2005; 37:188-194.

35. Allam JP, Fronhoffs F, Fathy A, Novak N, Oltermann I, Bieber T, et al. High percentage of apoptotic spermatozoa in ejaculates from men with chronic genital tract inflammation. *Andrologia* 2008; 40: 329-334.
36. de Lamirande E, Gagnon C. Human sperm hyperactivation in whole semen and its association with low superoxide scavenging capacity in seminal plasma. *Fertil Steril* 1993; 59: 1291-1295.
37. Aitken RJ, Buckingham D, West K, Wu FC, Zikopoulos K, Richardson DW. 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* 1992; 94: 451-462.
38. Aitken RJ, De Iuliis GN. Origins and consequences of DNA damage in male germ cells. *Reprod Biomed Online* 2007; 14: 727-733.
39. Erenpreiss J, Hlevicka S, Zalkalns J, Erenpreisa J. Effect of leukocytospermia on sperm DNA integrity: a negative effect in abnormal semen samples. *J Androl* 2002; 23: 717-723.
40. Bertolla RP, Cedenho AP, Hassun Filho PA, Lima SB, Ortiz V, Srougi M. Sperm nuclear DNA fragmentation in adolescents with varicocele. *Fertil Steril* 2006; 85: 625-628.
41. Brinkworth MH, Weinbauer GF, Bergmann M, Nieschlag E. Apoptosis as a mechanism of germ cell loss in elderly men. *Int J Androl* 1997; 20: 222-228.
42. Sloter E, Nath J, Eskenazi B, Wyrobek AJ. Effects of male age on the frequencies of germinal and heritable chromosomal abnormalities in humans and rodents. *Fertil Steril* 2004; 81: 925- 943.
43. Lopes S, Sun JG, Jurisicova A, Meriano J, Casper RF. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1998; 69: 528-532.