



ΤΡΙΜΗΝΙΑΙΑ ΕΚΔΟΣΗ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΑΝΔΡΟΛΟΓΙΚΗΣ ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ

ΑΝΗΡ

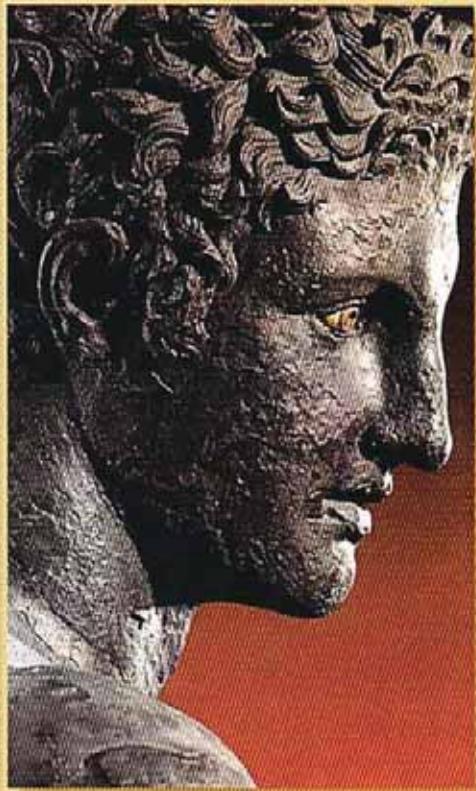
ΕΠΙΣΗΜΗ ΕΚΔΟΣΗ
ΤΗΣ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ
ΑΝΔΡΟΛΟΓΙΚΗΣ ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ

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



ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑ
Της Γραμματικής
ΚΕΜΠΤΛΑΦ.
ΑΡ. ΔΔ. 797/94



MEDLINE, ΓΡΑΜΜΟΥ 20, 152 35 ΒΡΙΛΗΣΣΑ

ΙΔΙΟΚΤΗΣΙΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ-ΕΚΔΟΤΗΣ:

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΑΝΔΡΟΛΟΓΙΚΗ ΕΤΑΙΡΕΙΑ

Ενδοκρινολογικό Τμήμα Νοσοκομείου "ΕΛΕΝΑ ΒΕΝΙΖΕΛΟΥ"

Πλατεία Ε. Βενιζέλου 2 - Αθήνα 115 21

Τηλ.: 210 64 11156 - 210 6402179 - Fax : 210 6411156

Copyright - Ελληνική Ανδρολογική Εταιρεία

Συντετμημένος Τίτλος: ANHP

ISSN 1108-3522

ΕΚΔΟΤΕΣ: X. Ασβέστης, E. Κούκκου

Τριμηνιαία έκδοση

Εκδίδεται σε 2000 αντίτυπα.

Επιμέλεια εκτύπωσης, σελιδοποίηση: MEDLINE

"ANIR" is published quarterly as the official Journal of the Hellenic Society of Andrology

Copyright: Hellenic Society of Andrology

Short title: ANIR

ISSN 1108-3522

Correspondance: Ch. Asvestis, E. Koukkou,

Endocrine Department

"Elena Venizelou" Hospital, 2, E. Venizelou Square,
115 21 Athens, Greece

Tel : 210 6411156, 210 6402179, Fax : 210 6411156

E-mail:hel-soc-andro@ath.forthnet.gr

Το περιοδικό "ANHP" είναι τριμηνιαία έκδοση της Ελληνικής Ανδρολογικής Εταιρείας. Σκοπός έχει την ενημέρωση των ιατρών πάνω σε θέματα που αφορούν την Ανδρολογία. Τα άρθρα που δημοσιεύονται αφορούν τον ευρύ τομέα του ενδιαφέροντός της, από τη μοριακή και γενετική πλευρά ως το νεοαναδυόμενο πεδίο των προβλημάτων στον γηράσκοντα άνδρα. Στα περιεχόμενα θα περιλαμβάνονται ανασκοπήσεις, άρθρα σύνταξης, ερευνητικές εργασίες, ενδιαφέροντα περιστατικά αλλά και παρουσιάσεις δραστηριοτήτων της Εταιρείας με κείμενα συμποσίων, στρογγύλων τραπεζών, διαλέξεων, που θα διοργανώνει η Εταιρεία. Τέλος, (μέσω του περιοδικού) θα προβάλλονται αξιόλογες εργασίες δημοσιευμένες σε διεθνή περιοδικά ενώ θα γίνεται και ενημέρωση για γεγονότα και εκδηλώσεις που αφορούν την Ανδρολογία στον Ελληνικό και διεθνή χώρο.

ANHP

ΕΠΙΣΗΜΗ ΕΚΔΟΣΗ
ΤΗΣ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ
ΑΝΔΡΟΛΟΓΙΚΗΣ ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ

ANIR

OFFICIAL JOURNAL
OF THE HELLENIC SOCIETY
OF ANDROLOGY

ΚΩΔΙΚΟΣ: 4310

COPYRIGHT

Τα δημοσιευμένα άρθρα είναι ιδιοκτησία του περιοδικού "ANHP" και απαγορεύεται μερική ή ολική αναδημοσίευσή τους χωρίς την έγγραφη συγκατάθεση του Διευθυντού Σύνταξης. Για την αναπαραγωγή εικόνων, σχεδίων και πινάκων απαιτείται επίσης σχετική έγκριση και αναφορά της πηγής.

ΓΡΑΜΜΑΤΕΙΑ

E. Βενάκη,

Ενδοκρινολογικό Τμήμα Νοσοκομείου "ΕΛΕΝΑ ΒΕΝΙΖΕΛΟΥ"

ΔΙΑΦΗΜΙΣΕΙΣ

Για την καταχώρηση διαφημίσεων οι ενδιαφερόμενοι παρακαλούνται να επικοινωνούν με την Εταιρία MEDLINE, Τηλ: 210 6828708, 210 6828278, FAX: 210 6828771, e-mail: medline@otenet.gr (Υπεύθυνη: Χριστίνα Τσαρούχα)

**ΔΙΟΙΚΗΤΙΚΟ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟ
ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΑΝΔΡΟΛΟΓΙΚΗΣ ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ**

ΠΡΟΕΔΡΟΣ: Χάρης Ασβέστης, Ουρολόγος

ΑΝΤΙΠΡΟΕΔΡΟΣ: Ρωξάνη Αγγελοπούλου, Αναπλ. Καθηγήτρια Ιστολογίας και Εμβρυολογίας

ΓΕΝΙΚΟΣ ΓΡΑΜΜΑΤΕΑΣ: Θεοδοσία Ζεγκινιάδου, Βιολόγος

ΕΙΔΙΚΟΣ ΓΡΑΜΜΑΤΕΑΣ: Σταματίνα Χ. Νικοπούλου, Ενδοχρινολόγος

TAMIAS: Κωνσταντίνος Μαυρομάτης, Μαιευτήρας-Γυναικολόγος

ΜΕΛΗ: Νικόλαος Σοφικίτης, Ουρολόγος

Σ. Τουρνής, Ενδοχρινολόγος

ΣΥΝΤΑΚΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΔΙΕΥΘΥΝΤΕΣ ΣΥΝΤΑΞΗΣ:

Χ. Ασβέστης, Ουρολόγος

Ε. Κούκκου, Ενδοχρινολόγος

ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΡΙΑ:

Ε. Βενάκη, Ενδοχρινολόγος

ΥΠΕΥΘΥΝΟΙ ΥΛΗΣ:

Δ. Γουλής, Ενδοχρινολόγος

Κ. Μαυρομάτης, Μαιευτήρας-Γυναικολόγος

Σ.Χ. Νικοπούλου, Ενδοχρινολόγος

Ε. Ανδρέου, Ενδοχρινολόγος

Ε. Σπυρόπουλος, Ουρολόγος

ΔΙΟΡΘΩΣΕΙΣ:

Α. Δεσύπρης, Κλινικός Βιοχημικός

Αγγελοπούλου Ρωξάνη Ενδοχρινολόγος

Αναπλιώτου Μαργαρίτα Ενδοχρινολόγος

Αργυρίου Αναστάσιος Βιολόγος

Βαϊδάκης Νικόλαος Ψυχίατρος

Βλασποπούλου Βαρβάρα Ενδοχρινολόγος

Γεωργόπουλος Νεοκλής Ενδοχρινολόγος

Γκέκας Αριστομένης Ουρολόγος

Ζεγκινιάδου Θεοδοσία Βιολόγος

Ηλίας Ιωάννης Ενδοχρινολόγος

Θωμόπουλος Ανδρέας Ενδοχρινολόγος

Λυμπερόπουλος Γεώργιος Βιολόγος-Βιοχημικός

Μαραβελάκης Πέτρος Στατιστικολόγος

Μαυρουδής Κωνσταντίνος Ενδοχρινολόγος

Μιχαλάκης Γεώργιος Ουρολόγος

Πάγκαλος Κωνσταντίνος Γενετιστής

Πανίδης Δημήτριος Ενδοχρινολόγος

Πόθος Αλέξιος Μαιευτήρας-Γυναικολόγος

Σοφικίτης Νικόλαος Ουρολόγος

Τασόπουλος Χρήστος Ενδοχρινολόγος

Τουρνής Συμεών Ενδοχρινολόγος

ΟΔΗΓΙΕΣ ΠΡΟΣ ΤΟΥΣ ΣΥΓΓΡΑΦΕΙΣ

Το περιοδικό ANHP, έκδοση της Ελληνικής Ανδρολογικής Εταιρείας έχει στόχο τη συνεχή επιμόρφωση των ασχολούμενων στο χώρο της Ανδρολογίας και την προαγωγή του γνωστικού αγτικειμένου της στον ελληνικό χώρο. Για την πραγμάτωση αυτού του σκοπού δημοσιεύονται στο περιοδικό:

1. **Άρθρα Σύνταξης.** Σύντομες ανασκοπήσεις σε επίκαιρα και αμφιλεγόμενα θέματα, που γράφονται με προτροπή της συντακτικής επιτροπής. Όταν εκφράζουν συλλογικά τη Σύνταξη του περιοδικού, είναι ανυπόγραφα. Στις άλλες περιπτώσεις είναι ενυπόγραφα.
2. **Γενικά Θέματα.** Σχετίζομενα με την Ανδρολογία.
3. **Ανασκοπήσεις.** Ολοκληρωμένες αναλύσεις ιατρικών θεμάτων, στις οποίες υπογραμμίζονται οι σύγχρονες απόψεις. Γίνονται δεκτές ανασκοπήσεις μέχρι δύο συγγραφέων.
4. **Ερευνητικές εργασίες.** Κλινικές δοκιμές ή μη, πειραματικές έρευνες προοπτικού ή αναδρομικού χαρακτήρα, που πραγματοποιήθηκαν με βάση το ερευνητικό πρωτόκολλο, το οποίο να περιγράφεται αναλυτικά στη μεθοδολογία. Περιέχουν πρωτόδημοσιευμένα αποτελέσματα.
5. **Ενδιαφέρουσες περιπτώσεις.** Γίνονται δεκτά άρθρα εφόσον αφορούν νέα και πολύ σπάνια νοσήματα ή νοσήματα εμφανίζοντα ιδιαιτέροτης ως προς την κλινική τους εκδήλωση ή τη διερευνητική τους προσπέλαση ή έχει ακολουθηθεί νέα θεραπευτική μεθόδουση με ελεγμένο αποτελέσμα. Επίσης στα άρθρα αυτά μπορούν να παρουσιασθούν πρωτότυπες περιπτώσεις προς συζήτηση με τους αναγνώστες του περιοδικού.
6. **Επίκαιρα θέματα.** Σύντομη περιγραφή των τελευταίων απόψεων σε συγκεκριμένα θέματα.
7. **Πρακτικά από σεμινάρια και στρογγυλά τραπέζια** ή κείμενα από διάλεξεις.
8. **Περίληψη άρθρων της διεθνούς βιβλιογραφίας συνοδευόμενη από σύντομο σχόλιο.** Δημοσιεύονται ενυπόγραφα.
9. **Γράμματα προς τη Σύνταξη.** Περιέχουν κρίσεις για δημοσιεύμένα άρθρα, πρόδρομα αποτελέσματα εργασιών, παρατηρήσεις για ανεπιθύμητες ενέργειες, κρίσεις για το περιοδικό κλπ. Δημοσιεύονται ενυπόγραφώς.

Προηγούμενη ταυτόχρονη δημοσίευση. Τα άρθρα που υποβάλλονται στο περιοδικό ANHP δεν μπορεί να έχουν υποβληθεί ταυτόχρονα για δημοσίευση σε άλλα περιοδικά. Το γεγονός πρέπει να βεβαιώνεται από επιστολή - δήλωση του πρώτου συγγραφέα προς τον Διευθυντή Σύνταξης. Όμως επιτρέπεται η υποβολή εργασιών μέρος των οποίων έχει δημοσιευθεί ή παρουσιασθεί με μορφή περίληψης σε Ελληνικό Διεθνές Συνέδριο.

Όλα τα χειρόγραφα συνοδεύονται από επιστολή που υπογράφεται από τον υπεύθυνο για την αλληλογραφία συγγραφέα. Η συνοδευτική επιστολή πρέπει να περιλαμβάνει δήλωση ότι τα χειρόγραφα έχουν εγκριθεί και από όλους τους υπόλοιπους συγγραφείς, οι οποίοι και συνυπογράφουν την επιστολή.

Προετοιμασία του χειρόγραφου. Η γλωσσική ομοιομορφία των άρθρων είναι απαραίτητη. Τα άρθρα που υποβάλλονται για δημοσίευση πρέπει να είναι γραμμένα στη δημοτική και με το μονοτονικό σύστημα.

Το περιοδικό ANHP έχει αποδεχθεί το σύστημα Vancouver και εφαρμόζει το ελληνικό πρότυπο γραφής βιοιατρικών κειμένων.

Τα άρθρα πρέπει να είναι δακτυλογραφημένα με διπλό διάστημα σε λευκό χαρτί, από τη μια πλευρά των σελίδων, με περιθώρια τουλάχιστον 2,5 cm. Τα εξής κεφάλαια αρχίζουν σε ιδιαίτερη σελίδα: η σελίδα με τον τίτλο, η περίληψη και οι λέξεις ευρετηρίου, το κείμενο, οι ευχαριστίες, η αγγλική περίληψη, οι βιβλιογραφικές παραπομπές, οι πίνα-

κες, οι εικόνες και οι υπότιτλοι των εικόνων. Όλες οι σελίδες αριθμούνται, αρχίζοντας από τη σελίδα τίτλου.

Σελίδα τίτλου. Περιλαμβάνει (α) τον τίτλο του άρθρου, ο οποίος πρέπει να είναι σύντομος (μέχρι 12 λέξεις), (β) το όνομα και τον τίτλο του συγγραφέα (-ων), (γ) το ίδρυμα ή το εργαστήριο, από το οποίο προέρχεται η εργασία και η προέλευση του συγγραφέα, (δ) το όνομα, τη διεύθυνση και το τηλέφωνο του συγγραφέα για αλληλογραφία και ανάτυπα, (ε) πηγές που ενδεχομένως ενίσχυσαν και βοήθησαν στην πραγματοποίηση της εργασίας, (στ) αν υπάρχουν διαφωνούντες με την εργασία.

Περίληψη και λέξεις ευρετηρίου. Η περίληψη δεν πρέπει να υπερβαίνει τις 300 λέξεις, ενώ για τα επίκαιρα θέματα και τις περιγραφές περιπτώσεων ασθενών τις 200 λέξεις. Για τις ανασκοπήσεις πρέπει να εφαρμόζονται οι περιγραφικές περιλήψεις (descriptive), που αναφέρουν συνοπτικά όλα τα κεφάλαια που περιέχει το άρθρο και σημαντικά συμπεράσματα. Οι περιλήψεις των ερευνητικών εργασιών πρέπει να χωρίζονται σε τέσσερις παραγράφους, οι οποίες φέρουν κατά σειρά την ακόλουθη επικεφαλίδα. Σκοπός, Υλικό-Μέθοδος, Αποτελέσματα, Συμπεράσματα. Μετά την περίληψη παρατίθενται 3-10 λέξεις κλειδιά. Οι λέξεις αυτές πρέπει να αντιστοιχούν στους διεθνείς όρους που χρησιμοποιείται Index Medicus.

Κείμενο. Οι ερευνητικές εργασίες αποτελούνται συνήθως από: Εισαγωγή, Υλικό και Μέθοδοι, Αποτελέσματα και Συζήτηση. Η εισαγωγή περιλαμβάνει τις απαραίτητες βιβλιογραφικές παραπομπές και αναφέρει το λόγο για τον οποίο πραγματοποιήθηκε η εργασία.

Στη μεθοδολογία περιγράφεται το πρωτόκολλο, με βάση το οποίο εξελίχθηκε η έρευνα. Αναφέρονται λεπτομερώς ο τρόπος επιλογής ασθενών ή οποιουδήποτε υλικού, καθώς και η μεθόδος που εφαρμόσθηκε, ώστε η ίδια έρευνα να μπορεί να αναπαραχθεί από μελλοντικούς ερευνητές. Στην περίπτωση ερευνών που αφορούν ανθρώπους, πρέπει να τονίζεται ότι η έρευνα πραγματοποιήθηκε με βάση την Υπουργική απόφαση Αριθ. Αθ/10983/1 {ΦΕΚ 886/Β 20-12-84} για τη "Διεξαγωγή Κλινικών Δοκιμών φαρμάκων και την προστασία του ανθρώπου" και η οποία παραπέμπει στη Διακήρυξη του Ελσίνκι (1975). Οι φαρμακευτικές ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη πρέπει να αναφέρονται με την κοινόχρηστη ονομασία τους. Περιγράφεται το υλικό που αξιολογήθηκε κατά τη διάρκεια της μελέτης και το κεφάλαιο ολοκληρώνεται με τα στατιστικά κριτήρια που χρησιμοποιήθηκαν.

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ολοκληρωμένα και σύντομα. Όσα αναφέρονται σε πίνακες, δεν επαναλαμβάνονται στο κείμενο.

Στη συζήτηση περιγράφονται οι προοπτικές που διανοίγονται με τα αποτελέσματα της μελέτης, καθώς και τα τελικά συμπεράσματα. Δεν επαναλαμβάνονται όσα έχουν αναφερθεί στα αποτελέσματα. Επίσης, μπορεί να γίνει σύγκριση με τα αποτελέσματα άλλων ομοιειδών εργασιών. Συνδέονται τα αποτελέσματα με τους στόχους της μελέτης, αποφεύγονται όμως αυθαίρετα συμπεράσματα, που δεν προκύπτουν από τα αποτελέσματα της εργασίας.

Ευχαριστίες. Απευθύνονται μόνο προς τα άτομα, που έχουν βοηθήσει ουσιαστικά.

Στα υπόλοιπα είδη άρθρων, το κείμενο διαμορφώνεται ανάλογα με τις απατήσεις και τους στόχους του συγγραφέα. Στις ενδιαφέρουσες περιπτώσεις ασθενών προηγείται η εισαγωγή και ακολουθούν η περιγραφή της περιπτώσεως και η συζήτηση.

Βιβλιογραφικές παραπομπές. Αριθμούνται στο κείμενο με αύξοντα αριθμό, ανάλογα με τη σειρά που εμφανίζονται. Σε περίπτωση αναφοράς σε ονόματα συγγραφέων στο κείμενο, εφόσον είναι ξένοι, μετά το επώνυμο του πρώτου συγγραφέα ακολουθεί η συντομογραφία et al., ενώ στους Έλληνες συγγραφείς "και συν". Εφόσον οι συγγραφείς είναι δύο, μεταξύ των επωνύμων τοποθετείται η λέξη "και".

Όλες οι βιβλιογραφικές παραπομπές του κειμένου - και μόνον αυτές - πρέπει να υπάρχουν στο βιβλιογραφικό κατάλογο.

Ο αριθμός των βιβλιογραφικών παραπομών πρέπει να περιορίζεται στον τελείως απαραίτητο. Στις ανασκοπήσεις, οι βιβλιογραφικές παραπομπές πρέπει να είναι μέχρι 200. Στα άρθρα επικαιρότητας (επίκαιρα θέματα, άρθρα Σύνταξης) θα πρέπει να αναφέρονται μόνο 5-6 άρθρα ή μονογραφίες, για τα οποία ο συγγραφέας πιστεύει ότι είναι απαραίτητα για την ολοκληρωμένη πληροφόρηση του αναγνώστη στο θέμα. Η σύνταξη του βιβλιογραφικού καταλόγου γίνεται αριθμητικώς, με βάση τον αύξοντα αριθμό και τη σειρά των βιβλιογραφικών παραπομών στο κείμενο. Αναφέρονται τα επώνυμα και τα αρχικά των ονομάτων όλων των συγγραφέων μέχρι έξι (όταν είναι περισσότεροι ακολουθεί η ένδειξη *et al.*), ο τίτλος της εργασίας, η συντομογραφία του τίτλου του περιοδικού, το έτος, ο τόμος, η πρώτη και η τελευταία σελίδα της δημοσιεύσεως π.χ. You CH, Lee KY, Chey WY, Menguy R. *Electrogastrographic study of patients with unexplained nausea. Gastroenterology* 1980; 79:311-314.

Σε περίπτωση που δεν αναφέρεται όνομα συγγραφέως, σημειώνεται η λέξη Ανώνυμος (για ελληνική δημοσίευση) ή Anonymus π.χ. Anonymous. *Coffee drinking and cancer of the pancreas (Editorial). Br Med J* 1981; 283:628.

Παραπομπές που αναφέρονται σε εργασίες που δημοσιεύονται σε συμπληρώματα (supplements) εκδόσεων, πρέπει να συνοδεύονται με τον αριθμό του συμπληρώματος, που σημειώνεται σε παρένθεση, μετά τον τόμο. Π.χ. *Blood*, 54 (Suppl 1):26. Οι συντμήσεις των τίτλων των περιοδικών πρέπει να γίνονται με βάση το Index Medicus. Δεν τοποθετούνται τελείες στα ακρώνυμα των συγγραφέων και στις συντμήσεις των περιοδικών. Στη βιβλιογραφία των επίκαιρων θεμάτων, παραλείπονται οι τίτλοι των εργασιών. Για την καταχώρηση συγγραμάτων ή μονογραφιών στο βιβλιογραφικό κατάλογο, αναφέρονται στη σειρά τα επώνυμα και τα αρχικά των συγγραφέων, ο τίτλος, ο αριθμός εκδόσεως, ο εκδότης, η πόλη εκδόσεως, το έτος και οι σελίδες της αναφοράς. Η αναφορά σε κεφάλαιο βιβλίου πρέπει να γίνεται με τον ακόλουθο τρόπο: Παπαβασιλείου ΙΩ. Πρωτόζωα. Στο: Παθογόνοι μύκητες και παράσιτα. BHTA, Αθήνα, 1983:67-113.

Αν η βιβλιογραφική παραπομπή αποτελεί κεφάλαιο συγγράμματος που έχει γραφτεί από άλλον συγγραφέα, η αναφορά γίνεται ως εξής: Weinstein L, Swartz MN. Pathogenic properties of invading microorganisms. In: (Στο): Sodeman WA ed Pathologic Physiology. Saunders, Philadelphia, 1987: 457-472.

Μη δημοσιευμένες εργασίες καθώς και "προσωπικές επικοινωνίες" δεν χρησιμοποιούνται ως βιβλιογραφικές παραπομπές. Άρθρα, που έχουν γίνει δεκτά για δημοσίευση, μπορούν να περιληφθούν στη βιβλιογραφία. Στην τελευταία περίπτωση, μετά τη συντομογραφία του περιοδικού σημειώνεται η ένδειξη "υπό δημοσίευση".

Αγγλική περιλήψη. Περιλαμβάνει τα ονόματα των συγγραφέων και την ιδιότητά τους, τον τίτλο της εργασίας και το (δρυμά ή το εργαστήριο από το οποίο προέρχεται η εργασία. Η περιλήψη δεν πρέπει να υπερβαίνει τις 300 λέξεις, ενώ για τα επίκαιρα θέματα και τις περιγραφές περιπτώσεων ασθενών τις 200 λέξεις. Για τις ανασκοπήσεις πρέπει να εφαρμόζονται οι περιγραφικές περιλήψεις (descriptive), που αναφέρουν συνοπτικά όλα τα κεφάλαια που περιέχει το άρθρο και σημαντικά συμπεράσματα. Οι περιλήψεις των ερευνητικών εργασιών πρέπει να χωρίζονται σε πέντε παραγράφους, οι οποίες φέρουν κατά σειρά την ακόλουθη επικεφαλίδα. Aim, Material, Methods, Results, Conclusions. Μετά την περιλήψη παρατίθενται 3-10 λέξεις, απαραίτητες για τη σύνταξη των ευρετηρίων του περιοδικού (Key words). Η ποιότητα των αγγλικών περιλήψεων πρέπει να είναι αρκετά ικανοποιητική, επειδή αποτελεί σημαντικό κριτήριο αποδοχής του περιοδικού στους

διεθνείς καταλόγους βιοιατρικών περιοδικών (Index Medicus).

Αρίθμηση κεφαλαίων σε ανασκοπήσεις, επίκαιρα θέματα. Όλα τα κεφάλαια αριθμούνται με αραβικούς αριθμούς: 1, 2, 3 κλπ. Τα υποκεφάλαια φέρουν τον αριθμό του αρχικού κεφαλαίου, τελεία και ακολουθεί ο αριθμός του υποκεφαλαίου: 1.1., 1.2 ή 1.1.1., 1.2.1. κ.ο.κ.

Πίνακες. Δακτυλογραφούνται με διπλό διάστημα, σε χωριστή σελίδα. Αριθμούνται με τη σειρά που εμφανίζονται στο κείμενο, με αραβικούς αριθμούς. Πρέπει να φέρουν περιεκτική και σύντομη επεξήγηση, ώστε για την κατανόησή τους να μην είναι απαραίτητο να καταφύγει ο αναγνώστης στο κείμενο. Κάθε στήλη φέρει επεξηγηματική και σύντομη επικεφαλίδα. Οι επεξηγήσεις των συντομογραφιών καθώς και οι λοιπές διευκρινίσεις γίνονται στο τέλος του πίνακα.

Εικόνες. Τα σχήματα, σχεδιασμένα με σινική μελάνη και οι φωτογραφίες πρέπει να στέλνονται στο πρωτότυπο, ώστε να είναι κατάλληλα για άμεση φωτογραφική αναπαραγωγή και εκτύπωση. Στο πίσω μέρος τους να γράφονται με μολύβι ο αριθμός της εικόνας, ένα βέλος που να δείχνει το άνω μέρος και οι συγγραφείς. Τοποθετούνται σε φάκελο, ανάμεσα σε δύο σκληρά χαρτόνια, για να μην τσακιστούν στη μεταφορά. Οι τίτλοι των εικόνων πρέπει να αναγράφονται με τον αριθμό που αντιστοιχεί στην εικόνα σε χωριστό χαρτί. Επεξηγήσεις σχετικές με τις εικόνες μπορούν να αναφερθούν στον τίτλο. Για το μέγεθος των εικόνων συμβουλεύετε το σχήμα του περιοδικού. Εφόσον χρησιμοποιούνται φωτογραφίες ασθενών, το πρόσωπο δεν πρέπει να φαίνεται. Στην αντίθετη περίπτωση επιβάλλεται έγγραφη συγκατάθεση του ασθενούς για τη δημοσίευση της φωτογραφίας. Όλες οι εικόνες αναφέρονται στο κείμενο και αριθμούνται με αραβικούς αριθμούς.

Ονοματολογία. Οι συγγραφείς πρέπει να χρησιμοποιούν τους παγκοσμίως παραδεκτούς τίτλους. Για την επιλογή των όρων και των ονομάτων (ουσιών, οντοτήτων, οργανισμών, νοσημάτων κλπ), κρίνεται σκόπιμο οι συγγραφείς να συμβουλεύονται το Λεξιλόγιο Βιοιατρικής Ορολογίας MeSH-ΕΛΛΑΣ. Έκδοση IATPOTEK, Αθήνα, 1991.

Μετρήσεις. Μετρήσεις μήκους, ύψους, βάρους και όγκου πρέπει να αναφέρονται σε μετρικές μονάδες (μέτρο, χιλ., λίτρο) ή στις υποδιαιρέσεις τους. Οι θερμοκρασίες πρέπει να δίνονται σε βαθμούς Κελσίου. Οι αρτηριακές πιέσεις πρέπει να δίνονται σε χιλιοστά στήλης υδραργύρου.

Διόρθωση τυπογραφικών δοκιμών. Πραγματοποιείται μία φορά από τους συγγραφείς. Εκτεταμένες μεταβολές δεν γίνονται δεκτές.

Ανάτυπα. Απαγορεύεται η φωτοτυπική αναπαραγωγή των δημοσιευμένων εργασιών. Η προμήθεια από τους συγγραφείς ανατύπων γίνεται αποκλειστικά από την εταιρία MEDLINE. Οι συγγραφείς επιβαρύνονται με το κόστος τους. Τα ανάτυπα παραγγέλλονται κατά τη διόρθωση των δοκιμών.

Χειρόγραφα εργασιών που δημοσιεύονται, δεν επιστρέφονται στους συγγραφείς.

Υποβολή χειρογράφου: Τα χειρόγραφα αποστέλλονται στη διεύθυνση: X. ΑΣΒΕΤΗΣ, E. KOΥΚΚΟΥ

ΠΕΡΙΟΔΙΚΟ ΑΝΗΡ

ΕΝΔΟΚΡΙΝΟΛΟΓΙΚΟ ΤΜΗΜΑ - ΠΓΝ ΜΑΙΕΥΤΗΡΙΟ "ΕΛΕΝΑ ΒΕΝΙΖΕΛΟΥ"

Πλ. Ε. Βενιζέλου 2-115 21 ΑΘΗΝΑ

Η εργασία ταχυδρομείται σε φάκελο από χοντρό χαρτί, εσωκλείοντας τις φωτογραφίες και τη δισκέττα (εφ' όσον υπάρχει) μέσα σε σκληρό χαρτόνι. Εάν η αποστολή γίνεται μέσω των Ελληνικών ταχυδρομείων να μην ακολουθείται συστημένη διαδικασία.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΑΦΙΕΡΩΜΑ: Ακεραιότητα του DNA και ανευπλοειδία των σπερματοζωαρίων
ΠΡΟΣΚΕΚΛΗΜΕΝΟΣ ΕΚΔΟΤΗΣ: ΡΩΣΑΝΗ ΑΓΓΕΛΟΠΟΥΛΟΥ

- 162** Σημείωμα Σύνταξης, X. Ασβέστης, E. Κούκκου
- 163** Εξελικτική θεώρηση των φυλοκαθοριστικών μηχανισμών στο ζωικό βασίλειο, P. Μανωλάκον, P. Αγγελοπούλου
- 169** ICSI και εμβρυϊκή ανευπλοειδία σε ζευγάρια με επαναλαμβανόμενη αποτυχία εμφύτευσης (Repeated Implantation Failure-RIF) στο πλαίσιο προεμφυτευτικού ελέγχου (PGS), A. Μαντζουράτου και Συν.
- 173** Σπέρμα και Ανευπλοειδία στους υπογόνιμους άνδρες, A. Μαντζουράτου, P. Αγγελοπούλου, Λ. Ξανθόπουλον, JD-A Delhanty
- 178** Ο κατακερματισμός του DNA των σπερματοζωαρίων: Παθολογική φυσιολογία, Εργαστηριακός προσδιορισμός και κλινική σημασία, Π-Δ. Κανταρτζή και Συν.
- 192** Τρίτη Ηλικία και κατάσταση του DNA των σπερματοζωαρίων, P. Αγγελοπούλου, Θ. Ζεγκινάδου, Δ.Γ. Γουλής, A. Νικολάου
- 198** Εντυπώσεις από το Σεμινάριο της ESHRE στη Θεσσαλονίκη (ESHRE CAMPUS SYMPOSIUM ON REPRODUCTIVE ANDROLOGY), Θ. Ζεγκινάδου
- 199** Διαταραχές της στύσης και μεταβολικό σύνδρομο: Η Βαρδεναφίλη από τη σκοπιά του Ενδοκρινολόγου, A.Γ. Κουθούρης, Δ.Γ. Γουλής
- 206** Πρόγραμμα 6ου Πανευρωπαϊκού Συνεδρίου Ανδρολογίας

ΣΗΜΕΙΩΜΑ ΣΥΝΤΑΞΗΣ

Βασική εξέταση στη διερεύνηση του υπογόνιου ανδρα, είναι φυσικά το σπερμοδιάγραμμα, στο οποίο από κοινού με τον ορμονολογικό έλεγχο βασίζεται ο κλινικός γιατρός για την αξιολόγηση και αιτιολόγηση της ανδρικής συμμετοχής στην υπογονιμότητα του ζευγαριού. Οι εξετάσεις όμως αυτές μόνον σε λίγες περιπτώσεις διαφωτίζουν πλήρως τα αίτια της υπογονιμότητας.

Τα τελευταία χρόνια καινοτόμοι εργαστηριακές τεχνικές επιτρέπουν την προσέγγιση του προβλήματος σε επίπεδο κυτταρικού πυρήνα και ακόμα πιο εστιασμένα σε μοριακό επίπεδο.

Το τεύχος αυτό του περιοδικού ANHP, με το οποίο και ολοκληρώνεται μια πορεία δέκα και πλέον παραγωγικών ετών, είναι επικεντρωμένο στις καινούργιες αυτές εργαστηριακές τεχνικές και την κλινική τους σημασία στην αξιολόγηση της ανδρικής υπογονιμότητας. Το επιμελήθηκε, ως προσκεκλημένη εκδότρια, η κ. Ρωξάνη Αγγελοπούλου, αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιστολογίας και Εμβρυολογίας της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ, η οποία είναι και συν- συγγραφέας των εργασιών που δημοσιεύονται.

Σαν συμπλήρωμα των εργαστηριακών αυτών άρθρων και της γνώσης που προσφέρουν, στο τεύχος αυτό καταγράφονται τα κύρια σημεία και συμπεράσματα του Πανευρωπαϊκού Συνεδρίου που διοργανώθηκε τον Οκτώβριο του 2009 στη Θεσσαλονίκη από την ESHRE (European Society for Human Reproduction and Embryology) με θέμα "Εργαστηριακή Ανδρολογία και εφαρμογή της στην κλινική πράξη".

Τέλος επειδή η γονιμότητα προϋποθέτει στυτική λειτουργία, το εν λόγω τεύχος ολοκληρώνεται με μια ανασκόπηση σχετική με τον ευεργετικό ρόλο αναστολέων της φωσφοδιαστέρασης σε ασθενείς με Μεταβολικό Σύνδρομο που εμφανίζουν Στυτική Δυσλειτουργία.

Ελπίζουμε ότι η γνώση που θα αποκομίσουμε με την μελέτη του τεύχους αυτού θα μας εξοικειώσει στις δυνατότητες του εργαστηρίου και θα διευρύνει τη διαγνωστική μας σκέψη.

Με συναδελφικούς χαιρετισμούς,

Χάρης Ασβέστης-Ευτυχία Κούκκου

ΕΞΕΛΙΚΤΙΚΗ ΘΕΩΡΗΣΗ ΤΩΝ ΦΥΛΟΚΑΘΟΡΙΣΤΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΣΤΟ ΖΩΙΚΟ ΒΑΣΙΛΕΙΟ

ΠΑΝΑΓΙΩΤΑ ΜΑΝΩΛΑΚΟΥ MD, ΡΩΞΑΝΗ ΑΓΓΕΛΟΠΟΥΛΟΥ MD, PhD

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΙΣΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΕΜΒΡΥΟΛΟΓΙΑΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ-ΕΚΠΑ

Περίληψη

Μελετώντας τις στρατηγικές καθορισμού του φύλου που παρατηρούνται σε διάφορα μέλη του ζωϊκού βασιλείου, παρατηρούμε μια ποικιλία μηχανισμών που αντικατοπτρίζουν διαφορετικά στάδια εξέλιξης. Κατώτεροι οργανισμόι, όπως η *Drosophila melanogaster* και ο *C.elegans*, τείνουν να καταφεύγουν κατά κύριο λόγο στη χρήση γονιδίων-διακοπών για τον καθορισμό του φύλου. Τα γονίδια αυτά ελέγχονται από το λόγο των Χ χρωμοσωμάτων προς τα αυτοσώματα, μια διεργασία που λαμβάνει χώρα σε κάθε κύτταρο χωριστά και χωρίς την παρουσία φυλετικών ορμονών, μια λεπτομέρεια που επιτρέπει την ανάπτυξη αληθινά ερμαφρόδιτων οργανισμών. Παραλλαγές του γονιδιακού καθορισμού του φύλου παρατηρούνται και στα έντομα, όπου με τις κατάλληλες προσαρμογές δύνανται να εξυπηρετήσουν τις ανάγκες ενός απλοδιπλοειδικού αναπαραγωγικού συστήματος. Αντίθετα, σε άλλα είδη, όπως τα ερπετά, το φύλο δεν εξαρτάται από γονιδιακούς μηχανισμούς, αλλά από τις περιβαλλοντικές συνθήκες, και πιο συγκεκριμένα τη θερμοκρασία, ενώ σε πολλά είδη φαριών και αμφιβίων η θερμοκρασία δρα παράλληλα με τις γονοτυπικές οδηγίες για τον καθορισμό του φύλου. Ακόμη και ο χρωμοσωματικός καθορισμός του φύλου που παρατηρείται σε ανώτερα εξελικτικά είδη μπορεί να παρουσιάζει διάφορες παραλλαγές, όπως ο συνδυασμός με καθαρά γονιδιακά στοιχεία στα μαρσπιφόρα και η χρήση διαφορετικών ζευγών φυλετικών χρωμοσωμάτων με αναστροφή του ετερογαμετικού και ομογαμετικού φύλου, όπως στα πτηνά.

Λέξεις κλειδιά: φύλο, εξέλιξη, αυτοσώματα, φυλετικά χρωμοσώματα, απλοδιπλοειδής αναπαραγωγή, ερμαφρόδιτο, θερμοεξαρτώμενος φυλοκαθορισμός, ZW.

Abstract

The study of sex determination strategies across the animal kingdom leads to the observation that there is a vast variety of mechanisms, reflecting different stages of evolution. Lower organisms, such as *Drosophila melanogaster* and *C.elegans*, tend to resort to the use of switch-genes for determining sex. These genes are dependent on the ratio of sex chromosomes to autosomes, a process that takes place in each cell separately and sparing the presence of sex hormones, a detail that allows for the development of true hermaphrodites. Variations of this gene-dependent sex determination scheme can also be observed in insects, where with the appropriate adjustments they can serve the needs of a haplodiploid reproduction system. On the other hand, other species, such as reptiles, do not resort to genetic mechanisms, but rather environmental factors, such as temperature, to determine sex, whereas in many fish and amphibians temperature acts in concordance with genotypic instructions. Even the chromosomal sex determination observed in species placed higher on the evolution scale can present with interesting variations, such as its combination with gene-dependent elements, as in marsupials, and the use of a different set of sex chromosomes and the reversal of the homogametic and heterogametic sexes, as in birds.

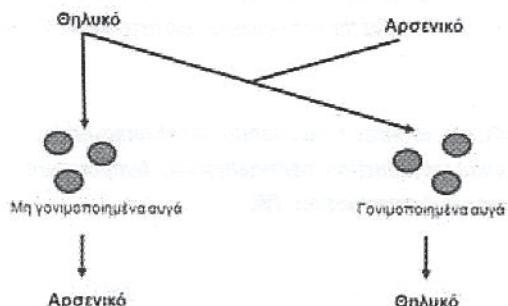
Key words: sex, evolution, autosomes, sex chromosomes, haplodiploid reproduction, hermaphrodite, temperature-dependent sex determination, ZW.

1. Εισαγωγή

Ο καθορισμός του φύλου, όπως τον συναντάμε στον άνθρωπο, είναι το αποτέλεσμα μιας μακράς εξελικτικής διαδικασίας. Στη σύγχρονη εποχή, πληροφορίες για τα στάδια της διαδικασίας αυτής μπορούμε να αντλήσουμε μέσα από τη μελέτη των μηχανισμών καθορισμού του φύλου που συναντάμε σε διάφορα άλλα είδη του ζωικού βασιλείου και τα οποία αντιπροσωπεύουν διαφορετικές καταλήξεις της ίδιας εξελικτικής διαδικασίας. Ένα βασικό χαρακτηριστικό των μηχανισμών αυτών είναι ότι παρουσιάζουν αρκετές ομοιότητες, ειδικά σε είδη που ανήκουν στην ίδια ομοταξία, αλλά και κοινά στοιχεία με αντίστοιχους μηχανισμούς που παρατηρούνται σε είδη με μεγάλη εξελικτική απόσταση μεταξύ τους. Από την άλλη πλευρά, όμως, η διατύπωση διαφορετικών αναγκών στα πλαίσια των διαφορετικών συνθηκών υπό τις οποίες αναπτύσσονται οι διάφοροι οργανισμοί έχει σαν αποτέλεσμα και την ύπαρξη σημαντικών διαφορών. Η αναζήτηση των διαφορών αυτών και ο τρόπος με τον οποίο εξυπηρετούν διαφορετικά γενετικά συστήματα παρέχει πολύτιμες πληροφορίες, οι οποίες μπορούν στη συνέχεια να χρησιμοποιηθούν και σε ένα γενικότερο πλαίσιο πέρα από τον καθορισμό του φύλου.

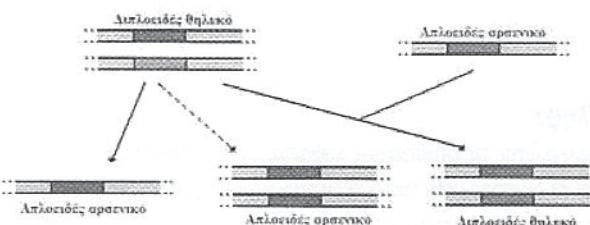
2. Καθορισμός του φύλου σε απλοδιπλοειδή αναπαραγωγικά συστήματα

Ένας από τους πιο ενδιαφέροντες μηχανισμούς καθορισμού του φύλου συναντάται σε πολλά είδη μυρμηγκιών, σφηκών και μελισσών που έχουν υιοθετήσει τον απλοδιπλοειδή τρόπο αναπαραγωγής. Τα είδη αυτά έχουν τη δυνατότητα να γεννούν τόσο γονιμοποιημένα αυγά, που τυπικά αναπτύσσονται σε διγονεϊκά διπλοειδή θηλυκά, όσο και αγονιμοποίητα αυγά, που οδηγούν σε μονογονεϊκά απλοειδή αρσενικά (Εικόνα 1). Υπάρχουν διάφοροι μηχανισμοί καθορισμού του φύλου που μπορούν να υποστηρίζουν ένα τέτοιο σύστημα αναπαραγωγής. Ένας από τους πιο γνωστούς είναι ο συμπληρωματικός καθορισμός του φύλου μονού γονιδιακού τόπου (single locus complementary sex determination, sl-CSD).



Εικόνα 1. Σχηματική αναπαράσταση ενός απλοδιπλοειδικού συστήματος αναπαραγωγής.

Ο μηχανισμός αυτός οφείλει την ονομασία του στο μονό γονιδιακό τόπο από τον οποίο καθορίζεται το φύλο του εκάστοτε οργανισμού. Τα διπλοειδή θηλυκά έχουν κατά κανόνα δύο διαφορετικά αλληλόμορφα, είναι δηλαδή ετεροζυγώτες ως προς το συγκεκριμένο γονιδιακό τόπο, σε αντίθεση με τα απλοειδή αρσενικά που διαθέτουν ένα μοναδικό αλληλόμορφο και μπορούν να θεωρηθούν ημιζυγωτικά (Εικόνα 2). Ο μόνος άλλος δυνατός συνδυασμός, δηλαδή η παρουσία δύο ίδιων αλληλομόρφων για το γονιδιακό αυτό τόπο, έχει τη δυνατότητα να οδηγήσει στην ανάπτυξη ομοζυγωτών διπλοειδών αρσενικών. Θα πρέπει να σημειωθεί ωστόσο ότι τα διπλοειδή αρσενικά σε είδη με συμπληρωματικό καθορισμό του φύλου είναι σε γενικές γραμμές στείρα, ή δεν τους επιτρέπεται να αναπαραχθούν ή έστω να επιζήσουν, πολλές φορές και από τα άλλα μέλη των κοινωνιών μέσα στις οποίες εμφανίζονται (1).



Εικόνα 2. Ο συμπληρωματικός καθορισμός του φύλου μονού γονιδιακού τόπου είναι ένας από τους πιο βασικούς μηχανισμούς καθορισμού του φύλου στα απλοδιπλοειδή συστήματα αναπαραγωγής.

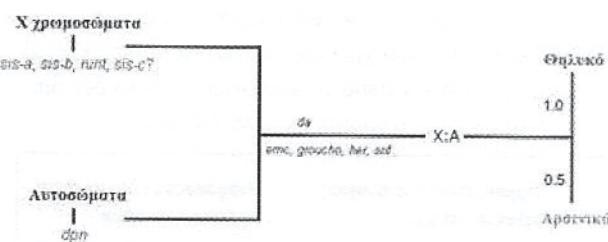
Η λεπτομέρεια αυτή έχει ιδιαίτερη σημασία, διότι ασκεί ενάντια εξελικτική πίεση σε πληθυσμούς με μεγαλύτερα ποσοστά αιμομιξίας (2). Σε έναν τέτοιο πληθυσμό, αυξάνεται η πιθανότητα να υπάρξει ζευγάρωμα μεταξύ δύο ατόμων που φέρουν ένα κοινό αλληλόμορφο για τον συγκεκριμένο γονιδιακό τόπο. Σε μια τέτοια περίπτωση, που μπορεί να περιγραφεί και πιο απλά με τον όρο εφάμιλλο ζευγάρωμα, οι μισοί διπλοειδείς απόγονοι είναι ομοζυγώτες αρσενικά αντί για ετεροζυγώτες και θηλυκά, με αποτέλεσμα, σύμφωνα και με όσα αναφέρθηκαν παραπάνω, να αφαιρούνται ουσιαστικά από το αναπαραγωγικό δυναμικό του πληθυσμού αναφοράς.

3. Απλός γονιδιακός καθορισμός του φύλου

Ο απλός γονιδιακός καθορισμός του φύλου μπορεί ίσως να μελετηθεί καλύτερα χρησιμοποιώντας ως παράδειγμα το μηχανισμό που έχει επιστρατεύσει ένας από τους πιο γνωστούς οργανισμούς μοντέλα, η *Drosophila melanogaster*. Στην

προκειμένη περίπτωση, η επιλογή μεταξύ αρσενικού και θηλυκού βασίζεται εξ ολοκλήρου στην επιτυχή έκφραση ή μη ενός και μόνο γονιδίου, που θεωρείται και το γονίδιο διακόπτης για τον καθορισμό του φύλου. Αυτό που διακρίνει τον απλό γονιδιακό καθορισμό του φύλου, όπως τον συναντάμε στη *Drosophila melanogaster*, από άλλους παρόμοιους μηχανισμούς καθορισμούς του φύλου που επίσης χρησιμοποιούν την έκφραση ή μη ενός και μόνο γονιδίου ως ένα από τα πρωταρχικά τους στάδια, όπως ισχύει και με το γονίδιο του TDF για παράδειγμα στον άνθρωπο, είναι ότι στον απλό γονιδιακό φυλοκαθορισμό η έκφραση του γονιδίου αυτού είναι αναγκαία και ικανή συνθήκη για την ανάπτυξη του ενός ή του άλλου φύλου. Χωρίς την εμπλοκή ορμονών του φύλου ή άλλων διακυττάριων σηματοδοτικών μορίων, η επιλογή του αρσενικού ή θηλυκού φαινότυπου είναι μια διαδικασία που λαμβάνει χώρα σε κάθε κύτταρο χωριστά, ενώ εξαρτάται από ένα συγκεκριμένο γονίδιο και μόνο.

Ειδικότερα για τη *Drosophila melanogaster*, το γονίδιο αυτό λαμβάνει την ονομασία *sxl* (sex-lethal). Η έκφρασή του ή μη ρυθμίζεται από το λόγο των X χρωμοσωμάτων προς τα αυτοσώματα, μια αναλογία που ανιχνεύεται στα πρώιμα στάδια της ανάπτυξης με τη βοήθεια μορίων που αντιπροσωπεύουν τον αριθμό των X χρωμοσωμάτων, όπως τα προϊόντα των γονιδίων *sisterless-a* (*sis-a*), *sisterless-b* (*sis-b*), *runt* και *īsow* και το *sisterless-c* (*sis-c*), καθώς και μορίων που αντιπροσωπεύουν τον αριθμό των αυτοσωμάτων, όπως το *deadpan* (*dpn*), σε συνδυασμό με προϊόντα γονιδίων της μητέρας, όπως τα *daughterless* (*da*), *extracrochaetae* (*emc*), *groucho*, *hermaphrodite* (*her*) και *sans fille* (*snf*) (3-5) (Εικόνα 3).



Εικόνα 3. Στη *Drosophila melanogaster* το φύλο καθορίζεται από την αναλογία των Χχρωμοσωμάτων προς τα αυτοσώματα.

Η λεπτή ισορροπία μεταξύ των γονιδίων αυτών, όπως εγκαθιδρύεται νωρίς κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, οδηγεί στη ενεργοποίηση ενός πρώιμου υποκινητή του *sxl* στα θηλυκά και μόνο. Η πρώιμη μορφή αυτή της *sxl* πρωτεΐνης, που απουσιάζει στα αρσενικά, στη συνέχεια καθοδηγεί με συγκεκριμένο τρόπο τη συρραφή των εξωνίων του mRNA που προ-

κύπτει από την ενεργοποίηση του ώριμου υποκινητή του *sxl*. Η ελεύθερη συρραφή των εξωνίων, όπως λαμβάνει χώρα στα αρσενικά, οδηγεί σε μια μη λειτουργική μορφή της πρωτεΐνης. Αντίθετα, μόνο η καθοδηγούμενη συρραφή τους, αρχικά από την πρώιμη *sxl* και στη συνέχεια από την αντίστοιχη ώριμη μορφή της, μπορεί να επιτρέψει την παραγωγής της λειτουργικής μορφής της πρωτεΐνης (4,6).

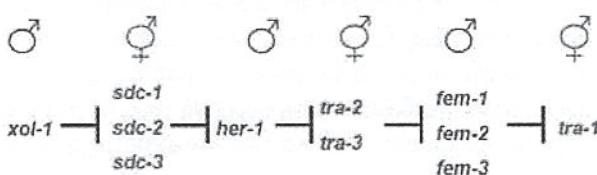
Μόλις εδραιωθεί η έκφραση της πρωτεΐνης *sxl*, ακολουθεί η ρύθμιση ενός καταρράκτη γονιδίων που ελέγχουν κάθε συνιστώσα του καθορισμού του φύλου. Οφείλει ωστόσο να σημειωθεί ότι, περά από το *sxl*, η εναλλακτική συρραφή εξωνίων παρατηρείται και σε άλλα γονίδια που σχετίζονται με τον καθορισμό του φύλου, τόσο στη *Drosophila melanogaster* όσο και σε άλλα είδη (7,8).

4. Απλός γονιδιακός καθορισμός του φύλου σε ερμαφρόδιτα είδη

Μια από τις πιο ενδιαφέρουσες παραλλαγές του απλού γονιδιακού καθορισμού του φύλου παρατηρείται σε έναν άλλο οργανισμό μοντέλο, το νηματώδη σκώληκα *C.elegans*. Η ιδιαιτερότητα του οργανισμού αυτού είναι ότι τα δύο φύλα του συνίστανται σε αρσενικό και ερμαφρόδιτο. Τα ερμαφρόδιτα άτομα στην προκειμένη περίπτωση είναι εξειδικευμένα θηλυκά που στο τέταρτο και τελικό στάδιο νύμφης παράγουν έναν περιορισμένο αριθμό σπερματοζωαρίων, τα οποία αποθηκεύονται στην προσωρινή γεννητική σειρά. Μία τέτοια διαδικασία ωστόσο προϋποθέτει την προσωρινή ενεργοποίηση των γονιδίων του «αρσενικού φαινότυπου» για μια συγκεκριμένη περίοδο και μόνο στα κύτταρα της γεννητικής σειράς.

Μία τέτοια διαδικασία συμπεριλαμβάνει την παρεμβολή επιπλέον γονιδίων στη συνήθη γονιδιακή αλληλουχία που ακολουθεί το αρχικό γονίδιο διακόπτη. Στην προκειμένη περίπτωση, στη θέση του *sxl* ως γονίδιο διακόπτης για τον καθορισμό του φύλου δρα η πρωτεΐνη *XOL-1* (*XO lethal*), τα επίπεδα της οποίας εξαρτώνται από την αναλογία X χρωμοσωμάτων προς τα αυτοσώματα (3,10). Αυτό επιτυγχάνεται με τη βοήθεια των πρωτεΐνων *SEX-1* και *FOX-1* που δρουν στο μεταγραφικό και μετα-μεταγραφικό επίπεδο αντίστοιχα (11). Τα επίπεδα της πρωτεΐνης *XOL-1* στη συνέχεια ελέγχουν έναν καταρράκτη γονιδίων, τελικό προϊόν του οποίου μπορεί να θεωρηθεί η πρωτεΐνη *TRA-1* (*transformer-1*) που παράγεται στα ερμαφρόδιτα άτομα (12, 13) (Εικόνα 4).

Τον πιο ουσιαστικό ρόλο στη διαφοροποίηση των γεννητικών κυττάρων με τη μορφή της σπερματογένεσης ή της ωογέ-



Εικόνα 4. Η γονιδιακή αλληλουχία που οδηγεί από την πρωτεΐνη διακόπτη *XOL-1* στην τελική πρωτεΐνη *TRA-1*.

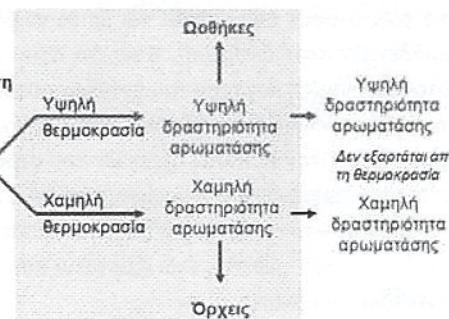
νεσης παιζει η πρωτεΐνη *TRA-2*. Η παρουσία της στα ώριμα ερμαφρόδιτα άτομα εξασφαλίζει την ενεργό ωογένεση καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής ενός ερμαφρόδιτου σκώληκα, σε αντίθεση με τα αρσενικά, όπου η απουσία της επιτρέπει τη σπερματογένεση. Κατά το τέταρτο στάδιο νύμφης στα ερμαφρόδιτα άτομα, μια ομάδα γονιδίων που εκφράζονται στα κύτταρα της γεννητικής σειράς, στα οποία συμπεριλαμβάνονται τα *fog-2*, *gld-1* και *laf-1*, αναστέλλουν από μόνα τους την έκφραση της πρωτεΐνης *TRA-2*, επιτρέποντας με τον τρόπο αυτό προσωρινά την σπερματογένεση χωρίς να επηρεάσουν τις υπόλοιπες εκφράσεις του καθορισμού του φύλου. Με την ενηλικίωση του ερμαφρόδιτου σκώληκα, η δράση των γονιδίων αυτών παύει και ενεργοποιείται πλέον μόνιμα η διαδικασία της ωογένεσης (13,14).

5. Θερμοεξαρτώμενος καθορισμός του φύλου

Από την άλλη πλευρά, μεγάλος αριθμός ερπετών και το σύνολο σχεδόν των κροκοδειλοειδών δεν καταφεύγουν σε γονιδιακούς μηχανισμούς ή την ύπαρξη φυλετικών χρωμοσωμάτων για τον καθορισμό του φύλου. Στα είδη αυτά, ο παράγοντας ο οποίος καθορίζει το φύλο είναι η θερμοκρασία του περιβάλλοντος κατά τη διάρκεια μιας συγκεκριμένης περιόδου της επώασης των αυγών. Η περίοδος αυτή αποκαλείται χαρακτηριστικά θερμοευαίσθητη περίοδος και τείνει να καταλαμβάνει το μέσο τριτημόριο της επώασης.

Ο θερμοεξαρτώμενος καθορισμός του φύλου επιτυγχάνεται ελέγχοντας τη δραστηριότητα της αρωματάσης, του ενζύμου που ευθύνεται για τη μετατροπή των ανδρογόνων σε οιστρογόνα. Στα ερπετά, ενώ η στεροειδογένεση ξεκινά πολύ νωρίς κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, η δραστηριότητα της αρωματάσης παραμένει σε γενικές γραμμές χαμηλή. Η έναρξη της θερμοευαίσθητης περιόδου όμως μπορεί να μεταβάλλει τη δραστηριότητα του ενζύμου ανάλογα με τη θερμοκρασία του περιβάλλοντος, με διαφορετικό τρόπο για κάθε είδος. Για παράδειγμα, στις χελώνες γλυκού και αλμυρού νερού, οι υψηλές περιβαλλοντικές θερμοκρασίες ευδώνουν τη δραστηριότητα της αρωματάσης, σε αντίθεση με τις πιο ψυχρές συνθήκες

όπου η δραστηριότητα της αρωματάσης παραμένει χαμηλή. Αυτές οι διαφορές στα επίπεδα δραστικότητας του ενζύμου είναι σε θέση στη συνέχεια να καθοδηγήσουν τη διαφοροποίηση της αδιαφοροποίητης γονάδας σε όρχι ή ωοθήκη. Η ολοκλήρωση της διαφοροποίησης αυτή σημαίνει και τη λήξη της θερμοευαίσθητης περιόδου, πέρα από την οποία η δραστηριότητα του ενζύμου αρωματάση δεν εξαρτάται πλέον από το περιβάλλον (15) (Εικόνα 5).



Εικόνα 5. Η θερμοκρασία του περιβάλλοντος κατά τη διάρκεια της θερμοευαίσθητης περιόδου της επώασης επηρεάζει τη δραστηριότητα της αρωματάσης, που με τη σειρά της καθοδηγεί τη διαφοροποίηση των γονάδων σε όρχεις ή ωοθήκες. Μετά το τέλος της θερμοευαίσθητης περιόδου, η περιβαλλοντική θερμοκρασία παύει να έχει οποιαδήποτε επιρροή.

Ο περιβαλλοντικός καθορισμός του φύλου ωστόσο δεν αποκλείει πάντα την παρουσία και γονιδιακών στοιχείων. Για παράδειγμα, σε αρκετά ψάρια και αμφίβια παρατηρείται ένας συνδυασμός γονοτυπικού και θερμοεξαρτώμενου καθορισμού του φύλου. Ο συνδυασμός βέβαια δύο ανεξάρτητων μηχανισμών που μπορούν να αντίκεινται ο ένας στον άλλο, έχει σαν αποτέλεσμα την εμφάνιση του φαινομένου της αντιστροφής του φύλου, ένας όρος που χρησιμοποιείται για να περιγράψει την ύπαρξη οργανισμών όπου το φαινοτυπικό φύλο δεν βρίσκεται σε συμφωνία με το γονοτυπικό (16) (Πίνακας 1).

Θερμοκρασίες δημιουργίας θηλυκών ατόμων	Θερμοκρασίες δημιουργίας αρσενικών ατόμων
XX (ZW)	Θηλυκό (σε συμφωνία με το γονότυπο)
XY (ZZ)	Αρσενικό ή θηλυκό (αντίθετα με το γονότυπο)

Πίνακας 1. Ο συνδυασμός γονοτυπικού και θερμοεξαρτώμενου καθορισμού του φύλου, δύο ανεξάρτητων μηχανισμών που μπορούν να αντίκεινται ο ένας στον άλλο, έχει σαν αποτέλεσμα την εμφάνιση του φαινομένου της αντιστροφής του φύλου, όπου το φαινοτυπικό φύλο δεν βρίσκεται σε αντιστοιχία με το γονοτυπικό.

6. Συνδυασμός χρωμοσωμικού και γονιδιακού καθορισμού του φύλου

Στην τάξη των μαρσιποφόρων ο καθορισμός του φύλου ελέγχεται από ένα συνδυασμό χρωμοσωμικών και γονιδιακών μηχανισμών. Το χρωμοσωμικό στοιχείο στηρίζεται στην παρουσία ενός ζεύγος X και Y χρωμοσωμάτων που συγγενεύουν με το αντίστοιχο ζεύγος φυλετικών χρωμοσωμάτων στα πλακούντοφόρα θηλαστικά. Όντως, το Y χρωμόσωμα των μαρσιποφόρων διατηρεί την ιδιότητα να καθοδηγεί τη διαφοροποίηση της αδιαφοροποίησης γονάδας σε όρχι αντί για ωοθήκη (17). Ωστόσο, η γοναδική διαφοροποίηση με τη σειρά της δεν ελέγχει όλες τις πλευρές της λοιπής φυλετικής διαφοροποίησης. Για παράδειγμα, ο σχηματισμός των μαστικών αδένων και του οσχέου λαμβάνει χώρα πριν τη διαφοροποίηση των γονάδων και δεν εξαρτάται από τις ορμόνες του φύλου, αλλά από ένα γονίδιο που εδράζεται στο X χρωμόσωμα (18). Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα σε ανευπλοειδικές διαταραχές των φυλετικών χρωμοσωμάτων να παρατηρούνται διαφορετικοί συνδυασμοί παθολογικών φαινοτύπων. Έτσι, για παράδειγμα, έχει παρατηρηθεί ότι ζώα με γονότυπο XXY έχουν όρχεις, αλλά και μάρσιπο με μαστικούς αδένες, ενώ ζώα με γονότυπο XO έχουν μόνο ένα άδειο όσχεο χωρίς όρχεις αντί για μάρσιπο (18.19) (Πίνακας 2).

	XX Μάρσιπος και μαστικοί αδένες	X Όσχεο
Παρουσία Y	XXY Όρχεις και μάρσιπος με μαστικούς αδένες	XY Φυσιολογικό αρσενικό
Απουσία Y	XX Φυσιολογικό θηλυκό	XO Άδειο όσχεο χωρίς όρχεις αντί για μάρσιπο

Πίνακας 2. Ο συνδυασμός χρωμοσωμικού και γονιδιακού καθορισμού του φύλου στα μαρσιποφόρα έχει σαν αποτέλεσμα την εμφάνιση διαφορετικών παθολογικών φαινοτύπων σε ανευπλοειδικές διαταραχές των φυλετικών χρωμοσωμάτων.

7. Ο χρωμοσωμικός καθορισμός του φύλου από την άλλη πλευρά

Μια τελευταία παραλλαγή καθορισμού του φύλου προς διερεύνηση αποτελεί ο χρωμοσωμικός καθορισμός του φύλου όπως παρατηρείται στα πτηνά. Σε αυτή την ομοταξία οργανισμών παρατηρείται ένα ζεύγος φυλετικών χρωμοσωμάτων, όπως και στα θηλαστικά. Στα πτηνά όμως το ομογαμετικό φύλο είναι το αρσενικό, το οποίο συμβολίζεται και ως ZZ, ενώ

το επερογαμετικό είναι το θηλυκό, που συμβολίζεται ως ZW.

Επειδή τα Z και W φυλετικά χρωμοσώματα είναι απόγονοι διαφορετικού ζεύγους αυτοσωμάτων από ότι τα X και Y των θηλαστικών, και ως εκ τούτου δεν συγγενεύουν με αυτά, είναι φυσικό να υποθέσουμε ότι όσα γνωρίζουμε για το χρωμοσωμικό καθορισμό του φύλου στα θηλαστικά δεν ισχύει και για τα πτηνά. Αντίθετα, η παρούσα ερευνητική δραστηριότητα εστιάζεται στο να εντοπίσει πού εδράζεται ο γενετικός διακόπτης για τον καθορισμό του φύλου (20). Η μία κυρίαρχη θεωρία ισχυρίζεται ότι το φύλο μπορεί να εξαρτάται από τον αριθμό των Z χρωμοσωμάτων, όπως στη Drosophila melanogaster και τον C.elegans, με υποψήφιο γονίδιο το DMRT1 που εδράζεται στα Z χρωμοσώματα (21,22). Η αντίπαλή της θεωρία ισχυρίζεται ότι το καθοριστικό στοιχείο για το φύλο είναι η παρουσία του W χρωμοσώματος, ακολουθώντας το παράδειγμα των πλακούντοφόρων θηλαστικών, με υποψήφια γονίδια αφενός το FET1 και αφετέρου τα ομόλογα WPKCI και ZPKCI που εδράζονται στα W και Z χρωμοσώματα αντίστοιχα (20-22).

Με σκοπό να διερευνηθεί ποιος από τους δύο προτεινόμενους μηχανισμούς είναι πιθανότερο να ισχύει, το ενδιαφέρον έχει στραφεί στη μελέτη των ανευπλοειδικών διαταραχών των φυλετικών χρωμοσωμάτων Z και W. Πειραματικά μοντέλα δείχνουν ότι ζώα με γονότυπο ZZZ φέρουν όρχεις, αλλά είναι στείρα, ενώ ZWW ζώα πεθαίνουν σε πρώιμα στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης. Αντίθετα, ζώα με γονότυπο ZZW φαίνεται να αναπτύσσονται ως αμφίφυλοι οργανισμοί. Ενώ έχουν θηλυκό φαινότυπο κατά την εκκόλαψη, προσεγγίζουν έναν πιο αρσενικό φαινότυπο κατά τη σεξουαλική ωρίμανση. Ακολουθώντας το παράδειγμα των μαρσιποφόρων επομένως, δεν αποκλείεται στην πραγματικότητα να ισχύει ένας συνδυασμός των προτεινόμενων μηχανισμών (21,23).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Zayed A. Effective population size in Hymenoptera with complementary sex determination. *Heredity* 2004; 93:627-630.
2. Stalhut JK, Cowan DP. Single-locus complementary sex determination in the inbreeding wasp Euodynerus foraminatus Saussure (Hymenoptera: Vespidae). *Heredity* 2004; 92:189-196.
3. Αγγελοπούλου Ρ, Λαζαράνος Γ, Μανωλάκου Π, Μαντάς Δ. Εξέλιξη των μηχανισμών καθορισμού του φύλου. *ANHP* 2006; 8:91-102.
4. Penalva LOF, Sanchez L. RNA binding protein sex-lethal (sxl) and control of Drosophila sex determination and dosage compensation. *Microbiol Mol Biol Rev* 2003; 67:343-359.
5. MacDougall C, Harbison D, Bownes M. The developmental consequences of alternate splicing in sex determination and differentiation in Drosophila. *Dev Biol* 1995; 172:353-376.
6. Keyes LN, Cline TW, Schedl P. The primary sex determination signal of Drosophila acts on the level of transcription. *Cell* 1992; 68:933-943.
7. Lalli E, Ohe K, Latorre E, Bianchi ME, Sassone-Corsi P. Sexy splicing: regulatory interplays governing sex determination from Drosophila to mammals. *J Cell Sci* 2003; 116:441-445.
8. De Loof A, Huybrechts R. "Insects do not have sex hormones": a myth? *Gen Comp Endocrinol* 1998; 111:245-260.
9. Kuwabara PE, Perry MD. It ain't over till it's ova: germline sex determination in *C.elegans*. *BioEssays* 2001; 23:596-604.
10. Meyer BJ. Sex in the worm; counting and compensating X-chromosome dose. *TIG* 2000; 16:247-253.
11. Carmi I, Kopczynski JB, Meyer BJ. The nuclear hormone receptor SEX-1 is an X-chromosome signal that determines nematode sex. *Nature* 1998; 396:168-173.
12. Kuwabara PE, Kimble J. Molecular genetics of sex determination in *C.elegans*. *TIG* 1992; 8:164-168.
13. Stothard P, Pilgrim D. Sex determination gene and pathway evolution in nematodes. *BioEssays* 2003; 25:221-231.
14. Puoti A, Pugnale P, Belfiore M, Scappi AC, Saudan Z. RNA and sex determination in *Caenorhabditis elegans*. *EMBO reports* 2001; 2:889-904.
15. Pieau C, Dorizzi M. Oestrogens and temperature-dependent sex determination in reptiles: all is in the gonads. *J Endocrin* 2004; 181:367-377.
16. Sarre SD, Georges A, Quinn A. The ends of a continuum: genetic and temperature-dependent sex determination in reptiles. *BioEssays* 2004; 26:639-645.
17. Graves JAM, Shetty S. Sex from W to Z: evolution of vertebrate sex chromosomes and sex determining genes. *J Exp Zool* 2001; 290:449-462.
18. Pask A, Benfree MB. Sex determining genes and sexual differentiation in marsupials. *J Exp Zool* 2001; 290:588-596.
19. Pask A, Marshall Graves JA. Sex chromosomes and sex-determining genes: insights from marsupials and monotremes. *CMLS Cell Mol Life Sci* 1999; 55:864-875.
20. Pace HC, Brenner C. Feminizing chicks: a model for avian sex determination based on titration of Hint enzyme zctivity and the predicted structure of an Asw-Hint heterodimer. *Genome Biology* 2003; 4:R18.
21. Ellegren H. Hens, cocks and avian sex determination. A quest for genes on Z or W? *Embo reports* 2001; 2:192-196.
22. Smith CA, Sinclair AH. Sex determination. insights from the chicken. *BioEssays* 2004; 26:120-132.
23. Clinton M, Haines LC. An overview of factors influencing sex determination and gonadal development in birds. *CMLS Cell Mol Life Sci* 1999; 55:876-886.

ICSI ΚΑΙ ΕΜΒΡΥΪΚΗ ΑΝΕΥΠΛΟΕΙΔΙΑ ΣΕ ΖΕΥΓΑΡΙΑ ΜΕ ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΗ ΑΠΟΤΥΧΙΑ ΕΜΦΥΤΕΥΣΗΣ (REPEATED IMPLANTATION FAILURE-RIF) ΣΤΟ ΠΛΑΙΣΙΟ ΠΡΟ-ΕΜΦΥΤΕΥΤΙΚΟΥ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ (PGS)

MANTZOYRATOU ANNA PHD¹, AGGELOPOULOU RΩΞΑΝΗ MD, PHD², ΞΑΝΘΟΠΟΥΛΟΥ ΛΕΩΝΗ PHD¹, DELHANTY JOY DOROTHY-ANN PHD, MRCPATH¹,

¹INSTITUTE FOR WOMEN'S HEALTH, UNIVERSITY COLLEGE LONDON, CENTRE FOR PGD, LONDON WC1E 6HX, UK AND THE ASSISTED CONCEPTION UNIT, UNIVERSITY COLLEGE LONDON HOSPITALS FOUNDATION TRUST, LONDON, UK, ²ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΙΣΤΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΕΜΒΡΥΟΛΟΓΙΑΣ, ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΕΚΠΑ

Περίληψη

Ζευγάρια με επαναλαμβανόμενη αποτυχία εμφύτευσης (RIF), μετά την εφαρμογή *in vitro* γονιμοποίησης (IVF) παρουσιάζουν αυξημένη συχνότητα εμφάνισης μεταζυγωτικών ανωμαλιών στα έμβρυα τους. Αυτό μπορεί να υποδηλώνει έναν υποκείμενο παράγοντα προδιάθεσης ανευπλοείδίας στους γαμέτες και τα έμβρυα. Η προδιάθεση αυτή μπορεί, επίσης, να αφορά στις διαδικασίες IVF που δεν είναι μέρος του φυσικού ανθρώπινου αναπαραγωγικού κύκλου. Οι πληροφορίες που αναφέρονται αφορούν σε έμβρυα προ-εμφυτευτικού σταδίου από 56 κύκλους RIF/PGS και FISH με δύο κύκλους υβριδοποίησης για τα χρωμοσώματα 13, 15, 16, 18 21 και 22. Στη μελέτη αυτή συμπεριλαμβάνονται και ζευγάρια με RIF που αναφέρουν στο ιστορικό τους 36 συνολικά προσπάθειες γονιμοποίησης μετά την ενδοκυτταροπλασματική έγχυση σπερματοζωαρίου (ICSI) και 20 κύκλους IVF. Τα αποτελέσματα δείχνουν μια σημαντική διαφορά των έμβρυων με: 1) απλό μωσαϊκισμό, 2) μωσαϊκισμό με ανευπλοείδια και 3) διπλοειδικό/χαοτικό μωσαϊκισμό μεταξύ των ομάδων ICSI - RIF και IVF - RIF. Το γεγονός αυτό μπορεί να σημαίνει ότι στην ομάδα ICSI - RIF η γονιμοποίηση και τα πρώτα στάδια της έμβρυϊκής ανάπτυξης έγιναν φυσιολογικά αλλά ακολούθησαν ανακριβείς μιτωτικές διαιρέσεις.

Λέξεις ευρετηρίου: Ενδοκυτταροπλασματική έγχυση σπερματοζωαρίου (ICSI), έμβρυϊκή ανευπλοείδια, προ-εμφυτευτικός γενετικός έλεγχος (PGS), επαναλαμβανόμενη αποτυχία εμφύτευσης (RIF).

Abstract

Couples with repeated implantation failure (RIF) present an increased risk of postzygotic abnormalities in their embryos. This might be due to parental factors predisposing to embryonic aneuploidy. Predisposition to aneuploidy can also be conferred to embryos by the various IVF procedures that are not part of the natural reproductive cycle. The aim of this study was to detect any differences in the aneuploidy patterns within the RIF-PGS couples, in relation to the insemination method (ICSI or IVF) used, which would suggest susceptibility to different types of chromosomal errors and identify risk factors. The RIF group included couples that had experienced failure of implantation in routine IVF three or more times. There were 36 ICSI and 20 IVF cycles within the RIF group. The average maternal age was 37 for the IVF group and 35 for the ICSI group. Detailed follow up data were obtained from 56 RIF/PGS cycles for chromosomes 13, 15, 16, 18 21 and 22 using FISH and two rounds of hybridisation. A significant difference was found in the distribution of mosaic embryos ($p<0.05$), the distribution of aneuploid mosaic embryos ($p<0.05$) and the distribution of the diploid chaotic mosaic embryos ($p<0.001$). Therefore paternal sperm factors that caused ICSI might be responsible for certain types of mosaicism and consequently for some aspects of repeated implantation failure.

Keywords: ICSI, embryonic aneuploidy, Intra Cytoplasmic Sperm Injection (ICSI), Pre-Implantation Genetic Screening (PGS), Repeated Implantation Failure (RIF).

1. Εισαγωγή

Η προ-εμφυτευτική γενετική επιλογή ή PGS είναι η μεγαλύτερη κατηγορία κλινικής εφαρμογής προ-εμφυτευτικού γενετικού ελέγχου παγκοσμίως (1). Εφαρμόζεται συνήθως σε ζευγάρια που διατέχουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης χρωμοσωματικών ανωμαλιών στα έμβρυα που δημιουργούνται με τη διαδικασία της εξωσωματικής γονιμοποίησης (IVF). Αυτά τα ζευγάρια ανήκουν σε 3 κυρίως κατηγορίες: ι) υπογονιμότητας λόγω προχωρημένης ηλικίας της μητέρας (συνήθως πάνω από 37 ετών), ii) επαναλαμβανομένων αποβολών (τρεις ή περισσότερες) και iii) επαναλαμβανομένης αποτυχίας της εφαρμοσθείσας IVF (RIF- με τρεις ή περισσότερες αποτυχημένες προσπάθειες IVF).

Με την πρόοδο στις τεχνικές της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής πολλοί υπογόνιμοι άνδρες κατάφεραν να έχουν βιολογικούς απογόνους, πράγμα αδύνατο κάτω από φυσιολογικές συνθήκες. Εντούτοις, από την υπάρχουσα βιβλιογραφία φαίνεται ότι, το σπέρμα των υπογόνιμων ανδρών παρουσιάζει μεγαλύτερη τάση εμφάνισης ανευπλοειδίας, σε σχέση με τον γενικό πληθυσμό και μειωμένη συχνότητα ανασυνδυασμού (2) ιδιαίτερα για τα χρωμοσώματα 13, 18, 21 και X, Y (3,4). Επίσης, η παρουσία στο σπέρμα σπερματοζωαρίων ανώμαλης μορφολογίας συνδέεται με αυξημένα ποσοστά ανευπλοειδίας (5,6). Αυτές οι μελέτες δείχνουν ότι για τα ζευγάρια που υπόκεινται σε IVF λόγω ανδρικής υπογονιμότητας υπάρχει μία μεγάλη σειρά παραγόντων που θα πρέπει να εξεταστούν. Αν και το σπέρμα διατίθεται ευκολότερα για μελέτη από τα ανθρώπινα ωοκύτταρα, αρκετοί μηχανισμοί που προδιαθέτουν σε εμφάνιση ανευπλοειδίας στους αρσενικούς γαμέτες δεν έχουν ακόμα πλήρως διευκρινιστεί. Είναι επίσης ενδιαφέρον ότι, ορισμένοι άνδρες με φυσιολογικό καρυότυπο παρουσιάζουν υψηλό κίνδυνο ανευπλοειδίας των σπερματοζωαρίων τους και μάλιστα για όλα τα χρωμοσώματα. Αυτό έδειξε μία αναφορά από τους Tomascik-Cheeseman *et al.* (7) όπου σε ένα ζευγάρι με τέσσερις διαδοχικές εγκυμοσύνες με τρισωμικά έμβρυα παρατηρήθηκε αυξημένη συχνότητα ανευπλοειδίας στα σπερματοζωάρια του συζύγου.

Στα έμβρυα προ-εμφυτευτικού σταδίου έχει αναφερθεί ένα ευρύ φάσμα γενετικών λαθών (8-11) μεταξύ των οπίων η χρωμοσωμική ανευπλοειδία ενέχεται σε ποσοστό 50 - 80%. Επιπλέον, υπάρχουν μελέτες που δείχνουν ότι ένα πολύ μεγάλο μέρος αυτών των λαθών οφείλεται σε μεταζυγωτικά-μιτωτικά γεγονότα που επισυμβαίνουν κατά τη διάρκεια της μίτωσης στα εμβρυϊκά κύτταρα και σε έναν πολύ μικρότερο βαθμό κατά τη διάρκεια της μείωσης στους γαμέτες. Ακόμη, δείχνουν ότι στο προ-εμφυτευτικό στάδιο υπάρχει μια μεγαλύτερη ποικιλία χρωμοσωμικών ανωμαλιών που δεν ήταν παλαιότερα

ανιχνεύσιμες από τον προγεννητικό έλεγχο, δεδομένου ότι τα περισσότερα από αυτά τα έμβρυα θα χάνονταν είτε πριν από το στάδιο της εμφύτευσης είτε πριν από το στάδιο της διαπιστωμένης εγκυμοσύνης. Το σημαντικότερο εύρημα είναι η συνύπαρξη στο ίδιο έμβρυο κανονικών και ανώμαλων ομάδων κυττάρων.

Έχουν ήδη συγκεντρωθεί αρκετά στοιχεία από ζευγάρια που παρουσιάζουν επαναλαμβανόμενη αποτυχία εμφύτευσης (RIF) μετά την IVF και όπως φαίνεται η παρουσία σύνθετων ανωμαλιών στα έμβρυα τους είναι συχνή (11,12). Αυτό πιθανώς να εισάγει την έννοια του προδιαθεσικού παράγοντα προς μεταζυγωτική ανευπλοειδία των έμβρυων σε αυτή την ομάδα ζευγαριών. Οι λόγοι που προκαλούν αυτή την κατάσταση δεν είναι ακόμα πλήρως κατανοητοί.

Η προδιάθεση ανευπλοειδίας στους γαμέτες και τα έμβρυα μπορεί επίσης να αφορά στις διαδικασίες IVF, που δεν είναι μέρος του φυσικού ανθρώπινου αναπαραγωγικού κύκλου. Αρκετές είναι μέχρι σήμερα οι περιπτώσεις αναφοράς προβλημάτων που συνδέουν τις γενετικές ανωμαλίες των έμβρυων με τις τεχνικές της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Συγκεκριμένα, η ενδοκυτταροπλασματική έγχυση σπερματοζωαρίου (ICSI) έχει προκαλέσει αρκετή ανησυχία σχετικά με τη δυνατότητα μετάδοσης μεταλλαγμένων γονιδίων, επειδή πολλά από τα φυσικά εμπόδια που παρεμβάλλονται κατά τη γονιμοποίηση παρακάμπτονται σε αυτή τη μέθοδο (3). Επιπλέον, ένας μεγάλος αριθμός χρωμοσωμικών ανωμαλιών στα έμβρυα προκύπτει ενδεχομένως από την εφαρμογή αυτής της τεχνικής (13).

Ο στόχος αυτής της μελέτης ήταν να ανιχνευθούν οι διαφορές που μπορεί να υπάρχουν στους παρατηρούμενους τύπους ανευπλοειδίας στα έμβρυα ζευγαριών με RIF σε σχέση με την εφαρμοσθείσα μέθοδο γονιμοποίησης (ICSI ή IVF). Εξετάζεται, επίσης αν υπάρχουν ισχυρά δεδομένα που θα ενίσχυνται την άποψη της προδιάθεσης δημιουργίας συγκεκριμένων χρωμοσωμικών ανωμαλιών στο έμβρυο.

2. Μέθοδοι

Η ομάδα RIF περιλαμβάνει 36 ICSI και 20 κύκλους IVF. Η μέση ηλικία της μητέρας ήταν 37 έτη για την ομάδα IVF και 35 έτη για την ομάδα ICSI. Οι διαδικασίες IVF και PGS/PGD, η συλλογή των δειγμάτων, η προετοιμασία και η ανάλυση FISH έγιναν όπως περιγράφονται στο Mantzouratou *et al.* (11). Λεπτομερή στοιχεία ελήφθησαν από 56 κύκλους RIF/PGS για τα χρωμοσώματα 13, 15, 16, 18, 21 και 22 χρησιμοποιώντας FISH με δύο κύκλους υβριδοποίησης.

Χρησιμοποιήθηκε συνδυασμός δύο μειγμάτων ανιχνευτών. Ο πρώτος περιείχε 3 αλληλουχίες, μία για την ανίχνευση ενός ειδικού τόπου του χρωμοσώματος 13 (Retinoblastoma gene, RB-1, located at region 13q14), μία για την ανίχνευση του χρωμοσώματος 21 και μία για την ανίχνευση επαναλαμβανόμενης κεντρομεριδιακής αλληλουχίας CEP για την αναγνώριση του χρωμοσώματος 18 (D18Z1). Ο δεύτερος περιείχε 2 επαναλαμβανόμενες κεντρομεριδιακές αλληλουχίες CEP (για την αναγνώριση των χρωμοσωμάτων 15 (D15Z4) και 16 (D16Z3)) και μία για την ανίχνευση ενός ειδικού τόπου του χρωμοσώματος 22 (22q11.2, Brc gene). Η αποδιάταξη των δειγμάτων έγινε σε διάλυμα φορμαμίδης / 20X SSC που τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας $75 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Μετά την αφυδάτωση και το στέγνωμα, εφαρμόστηκε το μείγμα των ανιχνευτών στα επιχρίσματα. Ο υβριδισμός έγινε στους 37°C σε υγρή ατμόσφαιρα και διήρκεσε όλη τη νύχτα. Την επομένη, οι επιστρώσεις τοποθετήθηκαν σε διάλυμα 0,3% (NP-40) / SSC 0,4X, στους $73 \pm 1^{\circ}\text{C}$ για 2min. Ακολούθησε σειρά εκπλύσεων σε διαλύματα SSC ανξανομένης πυκνότητας, για την απομάκρυνση των μη ειδικών μορίων και των μη υβριδισθέντων ανιχνευτών. Μετά, οι αντικειμενοφόρες πλάκες καλύφθηκαν με Vectashield - DAPI και διατηρήθηκαν στο σκοτάδι στους 4°C . Η παρατήρηση των δειγμάτων έγινε με μικροσκόπιο φθορισμού Zeiss - Axioscope, εφοδιασμένο με τριπλό φίλτρο για την ταυτόχρονη ανίχνευση σε φάσμα κόκκινο, πράσινο και μπλε. Το φάσμα aqua εξετάστηκε χωριστά, με ειδικό φίλτρο.

3. Αποτελέσματα

Ο πίνακας 1 παρουσιάζει συνολικά τα αποτελέσματα από τα έμβρυα της ομάδας RIF. Το σχήμα 1 εξηγεί τις κύριες διαφορές στους τύπους της ανευπλοειδίας των έμβρυων μεταξύ των κύκλων IVF και ICSI στην ομάδα RIF. Καμία σημαντική διαφορά δεν βρέθηκε μεταξύ των κύκλων IVF και ICSI στην ομάδα RIF για τα έμβρυα με κανονικό και χαοτικό τύπο και τα έμβρυα με μειωτικά σφάλματα. Το αποτέλεσμα μπορεί να σημαίνει ότι αυτές οι παράμετροι δεν επηρεάζονται από τη μέθοδο γονιμοποίησης. Εντούτοις, παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στην κατανομή των απλών μωσαϊκών έμβρυων ($p<0.05$), στην κατανομή των ανευπλοειδών μωσαϊκών έμβρυων ($p<0.05$) και στην κατανομή των διπλοειδών χαοτικών μωσαϊκών έμβρυων ($p<0.001$). Το ποσοστό των ανευπλοειδών μωσαϊκών έμβρυων ήταν υψηλότερο στην ομάδα IVF-RIF γεγονός που αντανακλά, ενδεχομένως τη μεγαλύτερη ηλικία της μητέρας σε αυτή την ομάδα.

Πίνακας 1. Αποτελέσματα για την εμβρυϊκή ανευπλοειδία από ζευγάρια με RIF

Αριθμός κύκλων	56
Μέση ηλικία μητέρας (y)	36 (εύρος 26-44)
Αρ. Εμβρύων με βιοψία	50 (μέσος όρος 9 ± 3.5)
Έμβρυα κανονικά στη βιοψία	94 (20.3%), (μέσος όρος 1.6 ± 1.1)
Έμβρυα με περαιτέρω μελέτη	300
Ομοιόμορφα ανώμαλα έμβρυα	8/300 (2.7%)
Χαοτικά έμβρυα	178/300 (59.3%)
Τύποι μωσαϊκών έμβρυων	114/300 (38%)
Ανευπλοειδή μωσαϊκά	29/114 (25.4%)
Διπλοειδή / ανευπλοειδή μωσαϊκά	15/114 (13.2%)
Διπλοειδή / χαοτικά μωσαϊκά	11/114 (9.6%)
Άλλο	39/114 (34.2%)
Έμβρυα με μειωτικά σφάλματα	26/300 (8.7%), (μέσος όρος 0.46 ± 0.7)



* Σημαντικές στατιστικές διαφορές

Εικόνα 1. Εμβρυϊκή ανευπλοειδία από κύκλους PGS με IVF ή ICSI για ζευγάρια με RIF

4. Συζήτηση

Συγκρίνοντας τους κύκλους ICSI και IVF της ομάδας ζευγαριών με RIF διαπιστώθηκε ότι δεν υπήρξε καμία σημαντική διαφορά στην κατανομή κανονικών, χαοτικών και ομοιόμορφα ανωμάλων έμβρυων καθώς και στην κατανομή έμβρυων με μειωτικά σφάλματα. Οι τύποι αυτοί των έμβρυων ανωμαλίων για τα ζευγάρια με RIF δεν ήταν απλώς μια συνέπεια της μεθόδου γονιμοποίησης ή της χρησιμοποίησης σπερματοζωάριων κακής ποιότητος αλλά αποτελούσαν χαρακτηριστικό όλων των ζευγαριών αυτής της ομάδας. Μπορεί, επομένως, να υποτεθεί ότι αποτελεί ένα προδιαθεσικό παράγοντα στη μιτωτική ανευπλοειδία.

Εντούτοις, μια σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων ICSI-RIF και IVF-RIF βρέθηκε στα έμβρυα με: 1) απλό μωσαϊκό, με 2) ανευπλοειδή μωσαϊκόμενό και με 3) διπλοειδή/χαοτικό μωσαϊκόμενό. Ενώ τα ανευπλοειδή μωσαϊκά έμβρυα

απαντούσαν συχνότερα στην ομάδα IVF-RIF, περισσότερα διπλοειδή/χαοτικά έμβρυα παρατηρήθηκαν στην ομάδα ICSI-RIF έναντι της ομάδας IVF (46% vs. 8.8%). Επιπλέον, δεδομένου ότι οι μη ικανοποιητικές παράμετροι του χρησιμοποιηθέντος σπέρματος οδήγησαν σε ICSI για αυτήν την υποομάδα RIF, είναι πιθανόν στοιχεία του πατρικού γονιδιώματος να ευθύνονται για την υψηλή συχνότητα των μωσαϊκισμού στα έμβρυα και τις επαναλαμβανόμενες αποτυχίες εμφύτευσης. Στους άνδρες με διαταραχές της σπερματογένεσης τουλάχιστον 70% των σπερματοζωαρίων είναι ανευπλοειδή (14). Αυξανόμενος εμβρυικός μωσαϊκισμός έχει αναφερθεί και σε κύκλους με TESE (μωσαϊκισμός 52%) (15). Σε μια μελέτη από τους Gianaroli *et al.* (16) παρατηρήθηκε ότι η αύξηση της παρατηρούμενης ανευπλοειδίας στα έμβρυα ήταν ανάλογη της σοβαρότητας διαταραχής των παραμέτρων του σπέρματος. Σημείωσαν επίσης, ότι στους ασθενείς με RIF οι συχνότερες ατέλειες ήταν σύνθετες ανωμαλίες όπως απλοειδία και πολυπλοειδία.

Αυτό που προκύπτει από την παρούσα μελέτη σε σχέση με τις προαναφερθείσες είναι ότι η χρησιμοποίηση σπέρματος με παθολογικές παραμέτρους στο σπερμοδιάγραμμα προδιαθέτει, ίσως, στην εμφάνιση μιτωτικής ανευπλοειδίας στα έμβρυα. Επιπλέον, όπως έχει αναφερθεί σε μία μελέτη, άνδρες με ολιγοασθενοτεραζωοσπερμία (OAT) και φυσιολογικό καρυότυπο παρουσίαζαν αυξημένο ποσοστό ανευπλοειδίας στα λεμφοκύτταρά τους (FISH με το X, το Y και το 12) (17).

Μια άλλη εξήγηση θα ήταν ότι το πρόβλημα προκύπτει από το κεντροσωμάτιο που κληρονομείται από το σπερματοζωάριο, το οποίο χρησιμοποιείται στο σχηματισμό της ατράκτου και, συνεπώς, ελέγχει τις μιτωτικές διαιρέσεις μετά τη γονιμοποίηση. Επειδή η χρησιμοποίηση σπερματοζωαρίων παθολογικής μορφολογίας συνεπάγεται και μορφολογικές ατέλειες στο κεντροσωμάτιο (18) είναι δυνατόν τα συστατικά του κεντροσωματίου να μην λειτουργούν σωστά μετά την ICSI με αποτέλεσμα οι ακολουθούσες κυτταρικές διαιρέσεις του ζυγώτη να είναι ανώμαλες. Επιπλέον, μία μελέτη από τους Palermo *et al.* (19) παρουσίασε αυξημένο ποσοστό μωσαϊκισμού στα έμβρυα που προήλθαν από ωοκύτταρα στα οποία εγχύθηκαν τμήματα σπερματοζωαρίου (κεφαλή ή ουρά) και όχι ολόκληρο σπερματοζωάριο.

Συμπερασματικά οι ανωτέρω παρατηρήσεις δείχνουν ότι, στην ομάδα ICSI - RIF ο αριθμός των μωσαϊκών έμβρυων παρουσιάζεται αυξημένος, ανεξάρτητα από την ηλικία της μητέρας. Τα ζευγάρια ICSI - RIF παράγουν μωσαϊκά έμβρυα με μια κανονική και μία χαοτική ομάδα κυττάρων πολύ συχνότερα από τα ζευγάρια IVF-RIF, ανεξάρτητα από την ηλικία της μητέρας. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι, στην ομάδα ICSI - RIF πολλά έμβρυα αρχίζουν την ανάπτυξή τους με φυσιολογι-

κές κυτταρικές διαιρέσεις αλλά ακολουθούν ανακριβείς μιτωτικές διαιρέσεις. Είναι, επομένως πιθανόν, ορισμένοι παράγοντες του σπέρματος να προδιαθέτουν στη δημιουργία εμβρύων με μιτωτική αστάθεια και να ευθύνονται για την επαναλαμβανομένη αποτυχία της εμφύτευσης.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Sermon KD, Michiels A, Harton G, Moutou C, Repping S, Scriven PN *et al.* ESHRE PGD Consortium data collection VI: cycles from January to December 2003 with pregnancy follow-up to October 2004. *Hum Reprod* 2007; 22: 323-336.
- Rives N, Saint Clair A, Mazurier S, Sibert L, Simeon N, Joly G *et al.* Relationship between clinical phenotype, semen parameters and aneuploidy frequency in sperm nuclei of 50 infertile males. *Hum Genet* 1999; 105: 266-272.
- Rubio C, Gil-Salom M, Simon C, Vidal F, Rodrigo L, Minguez Y *et al.* Incidence of sperm chromosomal abnormalities in a risk population: relationship with sperm quality and ICSI outcome. *Hum Reprod* 2001; 16: 2084-2092.
- Ma S, Ferguson KA, Arsovská S, Moens P, Chow V. Reduced recombination associated with the production of aneuploid sperm in an infertile man: a case report. *Hum Reprod* 2006; 21: 980-985.
- Lewis-Jones I, Aziz N, Seshadri S, Douglas A, Howard P. Sperm chromosomal abnormalities are linked to sperm morphologic deformities. *Fertil Steril* 2003; 79: 212-215.
- Morel F, Douet-Guilbert N, Moerman A, Duban B, Marchetti C, Delobel B *et al.* Chromosome aneuploidy in the spermatozoa of two men with globozoospermia. *Mol Hum Reprod* 2004; 10: 835-838.
- Tomascik-Cheeseman LM, Lowe XR, Eskenazi B, Kidd S, Nath J, Moore D *et al.* A father of four consecutive trisomic pregnancies with elevated frequencies of associated aneuploid sperm. *Am J Med Genet Part A* 2006; 140A: 1840-1845.
- Ruangvutilert P, Delhaney JD, Rodeck CH, Harper JC. FISH analysis on day 5 post-insemination of human arrested and blastocyst stage embryos. *Prenat Diagn* 2000; 20: 552-560.
- Magli MC, Jones GM, Gras L, Gianaroli L, Korman I, Trounson AO *et al.* Chromosomal abnormalities in embryos. *Mol & Cell Endocrinol* 2001; 183: s29-s34.
- Clouston HJ, Herbert M, Fenwick J, Murdoch AP, Wolstenholme J. Cytogenetic analysis of human blastocysts. *Prenat Diagn* 2002; 22: 1143-1152.
- Mantzouratou A, Mania A, Fragouli E, Xanthopoulou L, Tashkandi S, Fordham K *et al.* Variable aneuploidy mechanisms in embryos from couples with poor reproductive histories undergoing preimplantation genetic screening. *Hum Reprod*, 2007; 22: 1844-1853.
- Vouillaire L, Collins V, Callaghan T, McBain J, Williamson R, Wilton L. High incidence of complex chromosome abnormality in cleavage embryos from patients with repeated implantation failure. *Fert Ster* 2007; 87: 1053-1058.
- Ludwig M, Geipel A, Berg C, Gembruch U, Schwinger E, Diedrich K. Is intracytoplasmic sperm injection itself an indication to perform preimplantation genetic diagnosis (PGD)? About PGD, invasive prenatal diagnosis and genetic sonography. *Fetal Diagn Ther* 2001; 16: 68-82.
- Griffin D, Finch K. The genetic and cytogenetic basis of male infertility. *Hum Fertil* 2005; 8: 19-26.
- Silber S, Escudero T, Lenahan K, Abdelhadi I, Kilani Z, Munne S. Chromosomal abnormalities in embryos derived from testicular sperm extraction. *Fertil Steril* 2003; 79: 30-38.
- Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP. Sperm and blastomere aneuploidy detection in reproductive genetics and medicine. *J.Histochem Cytochem* 2005; 53: 261-267.
- De Palma A, Burrello N, Barone N, D'Agata R, Vicari E, Calogero AE. Patients with abnormal sperm parameters have an increased sex chromosome aneuploidy rate in peripheral leukocytes. *Hum Reprod* 2005; 20: 2153-2156.
- Sathananthan AH. Paternal centrosomal dynamics in early human development and infertility. *J Assist Reprod Genet* 1998; 15: 129-139.
- Palermo GD, Colombo LT, Rosenwaks Z. The human sperm centrosome is responsible for normal syngamy and early embryonic development. *Rev Reprod* 1997; 2: 19-27.

ΣΠΕΡΜΑ ΚΑΙ ΑΝΕΥΠΛΟΕΙΔΙΑ ΣΤΟΥΣ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΥΣ ΑΝΔΡΕΣ

MANTZOYRATOU ANNA PHD¹, AGGELOPOULOU RΩΞΑΝΗ MD, PHD², ΞΑΝΘΟΠΟΥΛΟΥ ΛΕΩΝΗ PHD¹, DELHANTY JD-A PHD, MRCPATH¹

¹ INSTITUTE FOR WOMEN'S HEALTH, UNIVERSITY COLLEGE LONDON, CENTRE FOR PGD, LONDON WC1E 6HX, UK AND THE ASSISTED CONCEPTION UNIT, UNIVERSITY COLLEGE LONDON HOSPITALS FOUNDATION TRUST, LONDON, UK

²ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΙΣΤΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΕΜΒΡΥΟΛΟΓΙΑΣ, ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΕΚΠΑ

Περίληψη

Τα τελευταία χρόνια, έχει δοθεί μεγάλη ώθηση στη μελέτη των χρωμοσωμικών ανωμαλιών των σπερματοζωαρίων στους υπογόνιμους άνδρες επειδή η τεχνική ICSI κατέστησε δυνατή για αυτά τα άτομα την απόκτηση απογόνων. Όπως φαίνεται στις περισσότερες μελέτες οι υπογόνιμοι άνδρες παρουσιάζουν αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης ανευπλοειδίας και χρωμοσωμικών ανωμαλιών στα σπερματοζωάρια τους και κατ' επέκταση στους απογόνους τους, ακόμα και όταν έχουν κανονικό καρυότυπο. Επιπλέον από τη μελέτη της μείωσης κατά τη σπερματογένεση φαίνεται ότι αυτά τα άτομα παρουσιάζουν σημαντική ελάττωση της συχνότητας του χρωμοσωμικού ανασυνδυασμού. Τέοια λάθη καθιστούν τα γεννητικά τους κύτταρα ευαίσθητα στη διακοπή της μειωτικής διαίρεσης κατά τη σπερματογένεση και την παραγωγή των ανευπλοειδών γαμετών. Είναι όμως απαραίτητο να διευκρινιστούν περαιτέρω οι μηχανισμοί δημιουργίας ανευπλοειδών στα σπερματοζωάρια και να τυποποιηθούν οι παράγοντες που αυξάνουν τον κίνδυνο της ανευπλοειδίας.

Λέξεις κλειδιά: υπογονιμότητα, σπέρμα, ανευπλοειδία, ICSI, μείωση, χρωμοσωμικός ανασυνδυασμός.

Abstract

Over the last few years there has been considerable prompting for the study of chromosomal anomalies in the sperm of infertile men, since the ICSI technique has rendered it possible for these individuals to father children. A large number of studies report that infertile men have an increased rate of aneuploidy and chromosomal anomalies in their spermatozoa and, by extension, their offspring, even when their own karyotype is classified as normal. Studies of meiosis during spermatogenesis have indicated that men suffering from infertility have a significantly reduced frequency of chromosomal recombination. Such missteps render the spermatocytes vulnerable to interruptions of the meiotic division during spermatogenesis and the production of aneuploid gametes. It is obvious, however, that the factors that are responsible for the increased risk of aneuploidy in human sperm have yet to be fully determined.

Key words: infertility, sperm, aneuploidy, meiosis, ICSI, chromosomal recombination.

1. Σπέρμα και ανευπλοειδία σε άνδρες με υπογονιμότητα

Η υπογονιμότητα είναι ένα αυξανόμενο πρόβλημα που έχει επιπτώσεις περίπου στο 10-15% των ζευγαριών που προσπαθούν να αποκτήσουν βιολογικούς απογόνους (1,2). Το 50% αυτής αποδίδεται στον ανδρικό παράγοντα και συνεχώς προκύπτουν γενετικές αιτίες που σχετίζονται με την ανδρική υπογονιμότητα. Οι ειδικοί επιστήμονες έχουν αρχίσει να συνδέουν την κατάσταση αυτή με ατέλειες στη μειωτική διαίρεση, κατά τη σπερματογένεση, με λάθη στη χρωμοσωμική σύναψη και τον ανασυνδυασμό, καθώς επίσης και με τα αυξανόμενα επίπεδα ανευπλοειδίας των σπερματοζωαρίων στο σπέρμα (3,4).

Η συχνότητα της ανευπλοειδίας των σπερματοζωαρίων βρίσκεται σε σημαντικά υψηλότερα επίπεδα στους υπογόνιμους άνδρες συγκριτικά με το γενικό πλυθυσμό. Υπολογίζεται ότι υπάρχει τριπλάσια αύξηση στη συχνότητα ανευπλοειδίας στο σπέρμα ατόμων που πάσχουν από υπογονιμότητα (3,4). Οι αυξανόμενες συχνότητες της ανευπλοειδίας είναι ανάλογες με τη σοβαρότητα της βλάβης που οδηγεί σε διαταραχή της γονιμότητας (5,6). Έτσι, για όλους τους σημαντικούς τύπους ανδρικής υπογονιμότητας έχουν αναφερθεί αυξημένα ποσοστά ανευπλοειδίας στο σπέρμα.

Στη μελέτη από τους Martin *et al.* (5) η μέση συχνότητα της δισωμίας για τους ασθενείς με ήπια, μέτρια και σοβαρή ολιγοσπερμία ήταν 0.17%, 0.24% και 0.30%, αντίστοιχα. Επίσης, σε άλλη μελέτη βρέθηκε ότι το ποσοστό της ανευπλοειδίας στο σπέρμα και το ποσοστό του δείκτη κερματισμού του DNA σε άνδρες με τερατοζωοσπερμία ήταν κατά πολύ μεγαλύτερο από αυτό της ομάδας ελέγχου (7). Από αρκετές έρευνες για διαφορετικούς τύπους ανδρικής υπογονιμότητας φαίνεται ότι υπάρχει άμεση συσχέτιση των ανωμάλων παραμέτρων του σπέρματος κακής ποιότητας και της ανευπλοειδίας (8-10).

Η ανάπτυξη της τεχνικής της ενδοκυτταροπλασματικής έγχυσης σπερματοζωαρίου - ICSI έχει βελτιώσει τις πιθανότητες για απόκτηση τέκνου από τα άτομα με εξαιρετικά ανώμαλες παραμέτρους σπέρματος. Καθώς όμως η φυσική επιλογή του υγιούς σπερματοζωαρίου, που θα συνδεθεί στον υποδοχέα του στη διαφανή ζώνη, παρακάμπτεται σε αυτή τη διαδικασία έχουν ανακύψει ανησυχίες και ερωτήματα για τον υψηλό κίνδυνο των χρωμοσωμικών ανευπλοειδιών που μπορεί να προκληθούν στο κύνημα από τη χρήση κακής ποιότητας πατρικών γαμετών (11). Ο πιθανός κίνδυνος φαίνεται να επιβεβαιώνεται από την καταγραφείσα αυξημένη συχνότητα εμφάνισης χρωμοσωμικών ανευπλοειδιών πατρικής προέλευσης, σε σχέση με το γενικό πληθυσμό, στα παιδιά που συλλαμβάνονται μετά

την ICSI. (12-14). Αυτή η αύξηση στις χρωμοσωμικές ανωμαλίες μετά την ICSI υπολογίζεται ότι κυμαίνεται στο 2-3% των κυήσεων.

Υπάρχουν διάφοροι παράγοντες που ενοχοποιούνται για αυτήν την αύξηση. Κάποιες μελέτες προτείνουν ότι η υπογονιμότητα, ιδιαίτερα η ολιγοασθενοτερατοζωοσπερμία - OAT και η μη αποφρακτική αζωοσπερμία - NOA, μπορεί να έχει δυσμενείς επιπτώσεις στην επιτυχία της ICSI, με ελάχιστα ποσοστά εμφύτευσης και τις χαμηλότερες συχνότητες βιοχημικής και κλινικής εγκυμοσύνης (15). Η κατάσταση μπορεί να οφείλεται κυρίως στην αυξημένη ανευπλοειδία που παρουσιάζουν οι άνδρες με OAT και NOA. Αυτό επιβεβαιώνεται και σε μια πρόσφατη μελέτη από τους Nikolopoulos *et al.* (16) όπου βρέθηκαν σημαντικά υψηλότερες συχνότητες ανευπλοειδίας στους ανεπιτυχείς κύκλους ICSI έναντι των κύκλων εκείνων, στους οποίους επιτεύχθηκε κλινική εγκυμοσύνη.

Άλλες μελέτες δείχνουν ότι η ανδρική υπογονιμότητα μπορεί να προδιαθέτει στην εμφάνιση ανευπλοειδίας και μωσαϊκισμού στα έμβρυα που προέρχονται από ICSI (6,17,18). Ενδιαφέρον έχει η μελέτη από τους Vialard *et al.* (18) που διαπιστώνουν ότι στα ζευγάρια που παρουσιάζουν επαναλαμβανόμενη αποτυχία στις IVF/ICSI, η ανευπλοειδία στο σπέρμα του πατέρα βρίσκεται σε υψηλά επίπεδα. Επιπλέον, σε μία έρευνα για την επαναλαμβανόμενη ακούσια διακοπή της εγκυμοσύνης βρέθηκε ότι μερικοί ασθενείς με κανονικές παραμέτρους σπέρματος μπορεί να παρουσιάσουν αύξηση στην ανευπλοειδία που ίσως να επηρεάζει την συνέχιση της κύησης (19). Είναι βέβαια γνωστό ότι, η προσπάθεια καθορισμού της συμβολής του πατρικού γονιδιώματος στις επαναλαμβανόμενες αποβολές, περιορίζεται, συνήθως, στη ανάλυση του καρυοτύπου. Άλλα, ένας φυσιολογικός καρυότυπος λεμφοκυττάρων περιφερικού αίματος δεν αποκλείει την παρουσία χρωμοσωμικών ανωμαλιών στα σπερματοζωάρια. Οι διαταραχές αυτές μπορεί να προκύπτουν, *de novo*, στη σειρά των γεννητικών κυττάρων και η συχνότερα εμφανιζόμενη αφορά στη διακοπή της μειωσης και σε ανωμαλίες σύναψης των χρωμοσωμάτων. Επομένως, είναι αναγκαία και η κυτταρογενετική μελέτη των σπερματοζωαρίων για να διαπιστωθεί με ακρίβεια η χρωμοσωμική τους σύσταση. Σήμερα, με την τεχνική του φθορίζοντα υβριδισμού *in situ* - FISH σε αποσυμπυκνωμένους πυρήνες σπερματοζωαρίων έχει επιβεβαιωθεί σε μεγάλο ποσοστό η ανευπλοειδία στις επαναλαμβανόμενες αποβολές (15, 19).

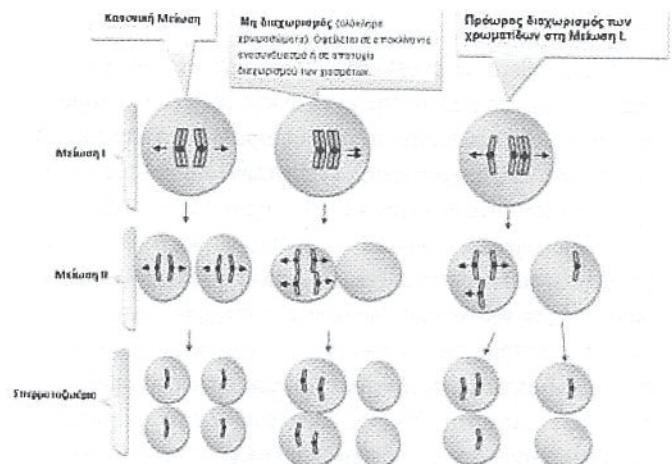
Το ερώτημα του ρόλου της προχωρημένης ηλικίας του πατέρα σε σχέση με τον αυξημένο κίνδυνο ανευπλοειδίας στους απογόνους δεν έχει επιβεβαιωθεί απολύτως διότι αναφέρονται και ορισμένα αντιφατικά αποτελέσματα. Δηλαδή, σε

μερικές μελέτες έχει διαπιστωθεί μικρή επίδραση της ηλικίας στην παρουσία φυσιολογικού αριθμού χρωμοσωμάτων στα σπερματοζώαρια (20-24) ενώ σε άλλες δεν αναφέρεται κάποια σχέση μεταξύ αυτών των δύο μεγεθών στο σπέρμα (25-27). Ενδιαφέρον παρουσιάζει η μελέτη των Wyrobek *et al.* (24), που συγκρίνει τα αποτελέσματα επίδρασης της μεγάλης ηλικίας του πατέρα στην εμφάνιση διαφόρων γενετικών διαταραχών στο ανθρώπινο σπέρμα (αυξημένο δείκτη κερματισμού - DFI, ακεραιότητα χρωματίνης, μεταλλάξεις γονιδίων, και αριθμητικές χρωμοσωματικές ανωμαλίες). Τα συμπεράσματα αυτά δείχνουν ότι η μεγάλη ηλικία του πατέρα σχετίζεται με μειωμένη επιτυχία εγκυμοσύνης και με αυξημένο κίνδυνο δημιουργίας απογόνων με γονιδιακές μεταλλάξεις ή με σύνδρομο Apert. Δεν φαίνεται όμως να συνδέεται με αυξημένο κίνδυνο για Klinefelter, Turner, XXX, και XYY ή τριπλοειδή έμβρυα.

2. Λάθη στη μείωση και συχνές χρωμοσωματικές ανωμαλίες στο σπέρμα

Τα λάθη στο διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων κατά τη μείωση, αναφερόμενα με τον όρο μη-διαχωρισμός, δημιουργούνται από διάφορους μηχανισμούς. Η αποτυχία του διαχωρισμού των χιασμάτων ή ο αποκλίνων ή αλλαγμένος ανασυνδυασμός, μεταξύ των ομολόγων χρωμοσωμάτων κατά τη διάρκεια της μείωσης, έχουν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ανευπλοειδών γαμετών (28). Επιπλέον, ο πρώτος διαχωρισμός των διστενών χρωμοσωμάτων στη διάρκεια της μετάφασης μπορεί να οδηγήσει στο σχηματισμό μονοσθενών χρωμοσωμάτων που διαχωρίζονται τυχαία σε κάθε πόλο (29) και να προκαλέσει, επίσης, αριθμητικές ανωμαλίες των χρωμοσωμάτων. Τα μονοσθενή χρωμοσώματα ίσως προδιαθέτουν σε πρόωρο διαχωρισμό των χρωματίδων τους, με αποτέλεσμα την εμφάνιση γαμετών με ανευπλοειδία μετά την ανάφαση II. Η καθυστέρηση της ανάφασης ενέχεται, επίσης, στην παραγωγή ανωμαλιών (30). Τέτοια λάθη έχουν συνήθως ολέθρια αποτέλεσμα στους γαμέτες και στην εμβρυική ανάπτυξη. Μερικά παραδείγματα των μηχανισμών ανευπλοειδίας στη μείωση παρουσιάζονται στο σχήμα 1.

Οι Warren *et al.* (31) παρατήρησαν αρχικά ελαττωμένα επίπεδα ανασυνδυασμού στο χρωμόσωμα 21 στις μειώσεις με τρισωμία 21. Περαιτέρω μελέτες και σε άλλα χρωμοσώματα έδειξαν ότι ο απών, μειωμένος ή αποκλίνων ανασυνδυασμός σχετίζεται με τον μη - διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων (32, 33). Συνολικά διαπιστώθηκε ότι οι μεταβολές στο πρότυπο ανασυνδυασμού αποτελούν κύριο χαρακτηριστικό των περισσότερων MI τρισωμιών.



Σχήμα 1. Μειωτικά λάθη κατά τη σπερματογένεση. Παρουσιάζονται η κανονική μείωση και παραδείγματα μη διαχωρισμού των χρωμοσωμάτων ή πρόωρου διαχωρισμού των χρωματίδων. Σημειώστε ότι στην περίπτωση του πρόωρου διαχωρισμού των χρωματίδων, μπορούν να προκύψουν και κανονικοί γαμέτες μετά τη μετάφαση II

Σε άρρενα άτομα με ανώμαλες παραμέτρους σπέρματος έχει μελετηθεί η επίδραση του μειωμένου ανασυνδυασμού και έχει βρεθεί ότι συνυπάρχει με ένα ευρύ φάσμα λαθών συμπεριλαμβανομένων των ελλιπών συνάψεων των χρωμοσωμάτων (34-37). Τα λάθη αυτά είναι επιβλαβή για τη σπερματογένεση και οδηγούν στην ελάττωση των παραγομένων σπερματοζωάριών ή/και στη σημαντική αύξηση της συχνότητας εμφάνισης ανευπλοειδίας στον αρσενικό γαμέτη. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η περίπτωση ενός άνδρα με τερατοζωοσπερμία, ο οποίος παρουσιάζει μειωμένο χρωμοσωματικό ανασυνδυασμό για τα XY, αυξημένο ποσοστό ανευπλοειδίας αλλά και πρόωρο διαχωρισμό των αδερφών χρωματίδων στη μείωση II (38).

Επιπλέον, στα πειραματόζωα έχουν προσδιοριστεί μερικά γονίδια που παρεμποδίζουν τη δημιουργία του συναπτονηματικού συμπλέγματος και όταν καταργείται η λειτουργία τους προκαλείται ανευπλοειδία. Συγκεκριμένα, στα ποντίκια που λείπει η πρωτεΐνη spc3 (synaptonemal complex πρωτεΐνη 3) παρατηρήθηκε ελαττωματικός διαχωρισμός των χρωμοσωμάτων κατά τη μείωση (39). Άλλη μία μετάλλαξη για το γονίδιο mlh1 (ένα γονίδιο επιδιόρθωσης του DNA) στα ποντίκια, είχε ως αποτέλεσμα να μειωθεί σημαντικά ο ανασυνδυασμός και ως επακόλουθο την αύξηση των χρωμοσωματικών λαθών μετά την ανάφαση I (40). Πρόσφατα έχουν αναφερθεί έρευνες για τον ανασυνδυασμό σε ανθρώπινα σπερματοκύτταρα με την χρήση αντισωμάτων για τα SPC3 και MLH1. Από τα πρώτα αποτελέσματα φαίνεται η άμεση σχέση του ατελούς χρωμοσωματικού ανασυνδυασμού με την αυξημένη ανευπλοειδία στο σπέρμα

(41, 42).

Επιπρόσθετα, οι μεταλλάξεις των γονιδίων που εμπλέκονται σε όλες τις φάσεις της κυτταρικής διαίρεσης μπορούν, θεωρητικά, να προδιαθέσουν τα κύτταρα στην ανευπλοειδία. Για παράδειγμα, οι πρωτεΐνες των σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου είναι δυνατόν να ευθύνονται για τη μη δημιουργία χρωμοσωμάτων ανωμαλιών στο σπέρμα (43, 44). Εάν γίνει μετάλλαξη που καθιστά ανενεργή αυτά τα γονίδια, θα ακολουθήσει αύξηση του αριθμού των σπερματοζωαρίων με ανευπλοειδία. Στο σπέρμα των φυσιολογικών ανδρών, παρατηρούνται σπερματοζωάρια με αριθμητικές χρωμοσωματικές ανωμαλίες σε ποσοστό τουλάχιστον 2% (45). Επιπλέον, όλα τα χρωμοσώματα συμμετέχουν στο μη - διαχωρισμό αλλά σε μερικές μελέτες φαίνεται ότι τα χρωμοσώματα 21, 22 και X, Y παρουσιάζουν μεγαλύτερη συχνότητα τέτοιου σφάλματος (35, 46, 47).

Οι πιο σοβαρές επιπτώσεις τις ανευπλοειδίας στο σπέρμα εμφανίζονται στις μελέτες που ερεύνησαν την προέλευση της ανευπλοειδίας σε προϊόντα αποβολών (28, 48-52). Για τον πατρικό μη - διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων 18 και 21, είναι συχνότερα τα λάθη της μείωσης II. Ο πίνακας 1 παρουσιάζει την τρέχουσα γνώση για την προέλευση των λαθών στα μεμονωμένα χρωμοσώματα. Πιο πρόσφατα μελετήθηκε και ο τρόπος μη - διαχωρισμού των χρωμοσωμάτων 13 και 22. Η μελέτη αυτή έδειξε ότι, όλα τα πατρικά λάθη προήλθαν από την μείωση II (53). Παρατηρήθηκε, επίσης, μειωμένος ή αποκλίνων (33% των περιπτώσεων) ανασυνδυασμός σε όλες τις περιπτώσεις σφάλματος του χρωμοσώματος 13.

Πίνακας 1. Μειωτική προέλευση τρισωμίας

Τρισωμία	Προέλευση (%)					
	Πατρική M1	Πατρική MII	Μητρική M1	Μητρική MII	Μετα-ζυγωτική	
2	28	-	53	13	6	
7	-	-	17	26	57	
8	-	-	50	50	50	
13	3	5	57	34	1	
14	-	19	37	37	8	
15	-	15	72	9	4	
16	-	-	100	-	-	
18	-	-	33	59	8	
21	2	2	70	24	3	
22	2	-	86	10	2	
XXY	50	-	25	15	9	
XXX	-	-	63	17	20	

Προσαρμοσμένο από Hassold and Hunt, 2001 και Hassold *et al.*, 2007 (28, 49).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- de Kretser DM. Male infertility. Lancet 1997, 349:787-790.
- Swerdloff RS, Overstreet JW, Sokol RZ, Rajfer J. UCLA conference. Infertility in male. Ann Intern Med 1985, 103:906-919.
- Shi Q, Martin RH. Aneuploidy in human sperm: a review of the frequency and distribution of aneuploidy, effects of donor age and lifestyle factors. Cytogenet Cell Genet 2000, 90:219-226.
- Tempest HG, Martin RH. Cytogenetic risks in chromosomally normal infertile men. Curr Opin Obst Gynecol 2009, 21:223-227.
- Martin RH, Rademaker AW, Greene C, Ko E, Hoang T, Barclay L, et al. A comparison of the frequency of sperm chromosome abnormalities in men with mild, moderate, and severe oligozoospermia. Biol Reprod 2003, 69:535-539.
- Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP. Sperm and blastomere aneuploidy detection in reproductive genetics and medicine. J Histochem Cytochem 2005, 53:261-267.
- Tang SS, Gao H, Zhao Y, Ma S. Aneuploidy and DNA fragmentation in morphologically abnormal sperm. Int J Androl 2010, 33:e163-e179.
- Kahraman S, Findikli N, Biricik A, Oncu N, Ogur C, Sertylel S, et al. Preliminary FISH studies on spermatozoa and embryos in patients with variable degrees of teratozoospermia and a history of poor prognosis. Reprod Biomed Online 2006, 12:752-761.
- Collodel G, Capitani S, Baccetti B, Pammolli A, Moretti E. Sperm aneuploidies and low progressive motility. Hum Reprod 2007, 22:893-898.
- Achard V, Paulmyer-Lacroix O, Mercier G, Porcu G, Saisas-Magnan J, Metzler-Guillemain C, et al. Reproductive failure in patients with various percentages of macronuclear spermatozoa: high level of aneuploid and polyploid spermatozoa. J Androl 2007, 28:600-606.
- Chandley AC, Hargreave TB. Genetic anomaly and ICSI. Hum Reprod 1996, 11:930-932.
- Van Opstal D, Los FJ, Ramlakhan S. Determination of the parent of origin in nine cases of prenatally detected chromosome aberrations found after intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod 1997, 12:682-686.
- Aboulghar H, Aboulghar M, Mansour R, Serour G, Amin Y, Al-Inany H. A prospective controlled study of karyotyping for 430 consecutive babies conceived through intracytoplasmic sperm injection. Fertil Steril 2001, 76:249-254.
- Bonduelle M, Van Assche E, Joris H, Keymolen K, Devroey P, Van Steirteghem A, et al. Prenatal testing in ICSI pregnancies: incidence of chromosomal anomalies in 1586 karyotypes and relation to sperm parameters. Hum Reprod 2002, 17:2600-2614.
- Rubio C, Gil-Salom M, Simon C, Vidal F, Rodrigo L, Minguez Y, et al. Incidence of sperm chromosomal abnormalities in a risk population: relationship with sperm quality and ICSI outcome. Hum Reprod 2001, 16:2084-2092.
- Nicopoullos JD, Gilling-Smith C, Almeida PA, Homa S, Nice L, Tempest H, et al. The role of sperm aneuploidy as a predictor of the success of intracytoplasmic sperm injection? Hum Reprod 2008, 23:240-250.
- Mantzouratou A, Mania A, Fragogianni E, Xanthopoulou L, Tashkandi S, Fordham K, et al. Variable aneuploidy mechanisms in embryos from couples with poor reproductive histories undergoing preimplantation genetic screening. Hum Reprod 2007, 22:1844-1853.
- Vialard F, Hammoud I, Molina-Gomes D, Wainer R, Bergere M, Albert M, et al. Gamete cytogenetic study in couples with implantation failure: aneuploidy rate is increased in both couple members. J Assist Reprod Genet 2008, 25:539-545.
- Collodel G, Giannerini V, Pasquarelli NA, Federico MG, Comodo F, Moretti E. TEM and FISH studies in sperm from men of couples with recurrent pregnancy loss. Andrologia 2009, 41:352-360.
- Asada H, Sueoka K, Hashiba T, Kuroshima M, Kobayashi N, Yoshimura Y. The effects of age and abnormal sperm count on the nondisjunction of spermatozoa. J Assist Reprod Genet 2000, 17:51-59.

- 21.** Bosch M, Rajmil O, Martinez-Pasarell O, Egozcue J, Templado C. Linear increase of diploidy in human sperm with age: a four-colour FISH study. *Eur J Hum Genet* 2001; 9:533-538.
- 22.** Rubes J, Vozdova M, Oracova E, Perreault SD. Individual variation in the frequency of sperm aneuploidy in humans. *Cytogenet Genome Res* 2005; 111:229-236.
- 23.** 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.
- 24.** Wyrobek AJ, Eskenazi B, Young S, Arnheim N, Tiemann-Boege I, Jabs EW, et al. Advancing age has differential effects on DNA damage, chromatin integrity, gene mutations, and aneuploidies in sperm. *Proc Nat Acad Sci U S A* 2006; 103:9601-9606.
- 25.** Luetjens CM, Rolf C, Gassner P, Werny JE, Nieschlag E. Sperm aneuploidy rates in younger and older men. *Hum Reprod* 2002; 17:1826-1832.
- 26.** Dakouane M, Albert M, Bergere M, Sabbagh C, Brayotel F, Vialard F, et al. Aging and spermatogenesis: an histologic, cytogenetic and apoptosis study. *Gynecol Obstet Fertil* 2005; 33:659-664.
- 27.** Plastira K, Angelopoulou R, Mantas D, Msaouel P, Lyrakou S, Plastiras A, et al. The effects of age on the incidence of aneuploidy rates in spermatozoa of oligoasthenozoospermic patients and its relationship with ICSI outcome. *Int J Androl* 2007; 30:65-72.
- 28.** Hassold TJ, Hunt P. To Err (meiotically) is human: The genesis of human aneuploidy. *Nature Genetics* 2001; 2:280-291.
- 29.** Angell R. First-Meiotic-Division Nondisjunction in Human Oocytes. *Am J Hum Genet* 1997; 61:23-32.
- 30.** Delhaney JD. Mechanisms of aneuploidy induction in human oogenesis and early embryogenesis. *Cytogenet Genome Res* 2005; 111:237-244.
- 31.** Warren AC, Chakravarti A, Wong C, Slaugenhoupt SA, Halloran SL, Watkins PC, et al. Evidence for reduced recombination on the nondisjoined chromosomes 21 in Down syndrome. *Science* 1987; 237:652-654.
- 32.** Lamb NE, Feingold E, Savage A, Avramopoulos D, Freeman S, Gu Y, et al. Characterization of susceptible chiasma configurations that increase the risk for maternal nondisjunction of chromosome 21. *Hum Mol Genet* 1997; 6:1391-1399.
- 33.** Savage AR, Petersen MB, Pettay D, Taft L, Allran K, Freeman SB, et al. Elucidating the mechanisms of paternal non-disjunction of chromosome 21 in humans. *Hum Mol Genet* 1998; 7:1221-1227.
- 34.** Rives N, Saint Clair A, Mazurier S, Sibert L, Simeon N, Joly G, et al. Relationship between clinical phenotype, semen parameters and aneuploidy frequency in sperm nuclei of 50 infertile males. *Hum Genet* 1999; 105:266-272.
- 35.** Sun F, Oliver-Bonet M, Liehr T, Starke H, Turek P, Ko E, et al. Analysis of non-crossover bivalents in pachytene cells from 10 normal men. *Hum Reprod* 2006; 21:2335-2339.
- 36.** Ferguson KA, Wong EC, Chow V, Nigro M, Ma S. Abnormal meiotic recombination in infertile men and its association with sperm aneuploidy. *Hum Mol Genet* 2007; 16:2870-2879.
- 37.** Sun F, Mikhaail-Philips M, Oliver-Bonet M, Ko E, Rademaker A, Turek P, et al. Reduced meiotic recombination on the XY bivalent is correlated with an increased incidence of sex chromosome aneuploidy in men with non-obstructive azoospermia. *Mol Hum Reprod* 2008; 14:399-404.
- 38.** Uroz L, Rajmil O, Templado C. Premature separation of sister chromatids in human male meiosis. *Hum Reprod* 2008; 23:982-987.
- 39.** Yuan L, Liu JG, Hoja MR, Wilbertz J, Nordqvist K, Hoog C. Female germ cell aneuploidy and embryo death in mice lacking the meiosis-specific protein SCP3. *Science* 2002; 296:1115-1118.
- 40.** Woods LM, Hodges CA, Baart E, Baker SM, Liskay M, Hunt PA. Chromosomal influence on meiotic spindle assembly: abnormal meiosis I in female Mlh1 mutant mice. *J Cell Biol* 1999; 145:1395-1406.
- 41.** Sanderson M, Hassold T, Carrell D. Proteins involved in meiotic recombination: A role in male infertility? *Syst Biol Reprod Med* 2008; 54:57-74.
- 42.** Ferguson K, Leung S, Jiang D, Ma S. Distribution of MLH1 foci and inter-focal distances in spermatocytes of infertile men, *Hum Reprod* 2009; 24:1313-1321.
- 43.** Mateizel Verheyen G, Van Assche E, Tournaye H, Liebaers I, Van Steirteghem A. FISH analysis of chromosomes X, Y and 18 abnormalities in testicular sperm from azoospermic patients, *Hum Reprod* 2002; 17:2249-2257.
- 44.** Lewis-Jones I, Aziz N, Seshadri S, Douglas A, Howard P. Sperm chromosomal abnormalities are linked to sperm morphologic deformities. *Fertil Steril* 2003; 79:212-215.
- 45.** Martin RH. Meiotic chromosome abnormalities in human spermatogenesis. *Reprod Toxicol* 2006; 22:142-147.
- 46.** Martin R, Ko E, Rademaker A. Distribution of aneuploidy in human gametes: comparison between human sperm and oocytes. *Am J Med Genet* 1991; 39:321-331.
- 47.** Williams BJ, Ballenger CA, Malter HE, Bishop F, Tucker M, Zwingman TA, et al. Non-disjunction in human sperm: results of fluorescence in situ hybridization studies using two and three probes. *Hum Mol Genet* 1993; 2:1929-1936.
- 48.** Hassold TJ, Abruzzo M, Adkins K, Griffin D, Merrill M, Millie E, et al. Human aneuploidy: incidence, origin, and etiology. *Environ Mol Mutagen* 1996; 28:167-175.
- 49.** Hassold T, Hall H, Hunt P. The origin of human aneuploidy: where we have been, where we are going. *Hum Mol Genetics* 2007; 16:R203-R208.
- 50.** Nicolaïdis P, Petersen MB. Origin and mechanisms of non-disjunction in human autosomal trisomies. *Hum Reprod* 1998; 13:313-319.
- 51.** Rubio C, Simon C, Vidal F, Rodrigo L, Pehlivan T, Remohi J, et al. Chromosomal abnormalities and embryo development in recurrent miscarriage couples. *Hum Reprod* 2003; 18:182-188.
- 52.** Stephenson MD, Awartami KA, Robinson WP. Cytogenetic analysis of miscarriages from couples with recurrent miscarriage: a case-control study. *Hum Reprod* 2002; 17:446-451.
- 53.** Bugge M, Collins A, Hertz JM, Eiberg H, Lundsteen C, Brandt CA, et al. Non-disjunction of chromosome 13. *Hum Mol Genet* 2007; 16:2004-2010.

Ο ΚΑΤΑΚΕΡΜΑΤΙΣΜΟΣ ΤΟΥ DNA ΤΩΝ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΩΝ: ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ, ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ

ΠΕΡΣΕΦΟΝΗ – ΔΗΜΗΤΡΑ ΚΑΝΤΑΡΤΖΗ¹, ΕΛΕΥΘΕΡΙΟΣ ΓΙΑΛΑΜΑΣ¹, ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ ΧΑΤΖΗΜΕΛΕΤΙΟΥ¹, ΡΩΖΑΝΗ ΑΓΓΕΛΟΠΟΥΛΟΥ², ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ Γ. ΓΟΥΛΗΣ¹

¹ΜΟΝΑΔΑ ΕΝΔΟΚΡΙΝΟΛΟΓΙΑΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ, Α' ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ – ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ, ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ

²ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΙΣΤΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΕΜΒΡΥΟΛΟΓΙΑΣ, ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ, ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

Περίληψη

Η ανασκόπηση αυτή επικεντρώνεται σε θέματα που σχετίζονται με τον κατακερματισμό του DNA των σπερματοζωαρίων (*sperm DNA fragmentation*), όπως η αιτιολογία, οι εργαστηριακές τεχνικές που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό του και η κλινική του σημασία. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση του κατακερματισμού του DNA διακρίνονται στις άμεσες και τις έμμεσες. Οι άμεσες ανιχνεύουν τις πραγματικές θραύσεις του DNA, ενώ οι έμμεσες προσδιορίζουν ποσοτικά την ευπάθεια του DNA για θραύση, που προκαλείται μετά από επίδραση εξωγενών παραγόντων. Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες άμεσες μέθοδοι είναι η TUNEL (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-mediated Nick End Labeling), η COMET (Single Cell Gel Electrophoresis) και η NT (In-Situ Nick Translation). Οι πιο συχνές έμμεσες μέθοδοι είναι η κυτταρομετρία ροής με τη χρωστική «πορτοκαλί της ακριδίνης», η μικροσκοπική μέθοδος της χρωστικής «πορτοκαλί της ακριδίνης» (AO), η DBD-FISH (DNA Break Detection - Fluorescence In Situ Hybridization) και η SCD (Sperm Chromatin Dispersion). Ο κατακερματισμός του DNA των σπερματοζωαρίων αποτελεί μια νέα παράμετρο για την εκτίμηση της ανδρικής υπογονιμότητας και έναν πιθανό προγνωστικό παράγοντα του αποτελέσματος των μεθόδων υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (Assisted Reproduction Techniques – ART). Παρότι αρκετά υποσχόμενος, υπάρχουν ακόμα επιφυλάξεις, όχι μόνο αναφορικά με τη χρησιμότητά του ως προγνωστικού παράγοντα γονιμότητας, αλλά και ως προς τι ακριβώς προσδιορίζει. Οι διαφοροποιήσεις στα πρωτόκολα μεταξύ των εργαστηρίων, η έλλειψη τιμών αναφοράς και τα αντικρουόμενα στοιχεία των ερευνών σχετικά με την κλινική σημασία του αποτελούν ανασταλτικούς παράγοντες για την ένταξη του κατακερματισμού του DNA στην καθιερωμένη διαγνωστική διερεύνηση του υπογόνιμου άνδρα.

Abstract

This review focuses on pivotal issues related to sperm DNA fragmentation, such as its etiology, associated conditions, laboratory techniques and clinical significance. The assays used for the assessment of sperm DNA fragmentation can be distinguished into direct and indirect. Direct assays try to detect the actual DNA breaks, while indirect assays quantify the susceptibility of sperm DNA to break after an external insult, such as acid treatment. The most commonly used direct assays are Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-mediated Nick End Labeling (TUNEL), Single Cell Gel Electrophoresis (COMET) and In-Situ Nick Translation (NT) assay. Most common indirect assays are flow cytometric acridine orange assay, Acridine Orange test (AO), DNA Break Detection-Fluorescence In Situ Hybridization (DBD-FISH) and Sperm Chromatin Dispersion test (SCD). DNA fragmentation constitutes a new parameter for the evaluation of male factor subfertility and a possible predictor of the outcome of assisted reproduction techniques (ART). Although promising, there are still concerns regarding not only its usefulness as a fertility predictive factor, but also about what it actually measures. Protocol variations among laboratories worldwide, lack of reference values and absence of conclusive evidence regarding its clinical significance still prevent its establishment in the routine diagnostic investigation of the subfertile man.

1. Εισαγωγή

Τα σπερματοζωάρια είναι απαραίτητα στη φυσική και την υποβοηθούμενη γονιμοποίηση, τόσο για τα μηνύματα που μεταφέρουν, όσο και για το ότι αποτελούν τους φορείς αυτών των μηνυμάτων. Ασφαλώς, στην τεχνική της Ενδοωαριακής Έγχυσης Σπερματοζωαρίων (Inter-Cytoplasmic Sperm Injection - ICSI), η συνεισφορά τους περιορίζεται στα μεταφέρομενα μηνύματα. Αυτά περιλαμβάνουν το απλοειδές γένωμα, το κεντροσωμάτιο, που είναι απαραίτητο για τη διαίρεση του κυττάρου, καθώς και σημαντικούς παράγοντες για την ανάπτυξη του πλακούντα. Καθώς το DNA του σπερματοζωαρίου συνεισφέρει κατά το ήμισυ στο γενετικό υλικό του απογόνου, το παθολογικό DNA, με τη μορφή του κατακερματισμένου DNA (DNA fragmentation), δηλαδή με πολυάριθμες θραύσεις της έλικας, μπορεί να αποδιοργανώσει την αναπαραγωγική διαδικασία. Φαίνεται, επομένως, λογικό ότι ο κατακερματισμός του DNA του σπερματοζωαρίου μπορεί να έχει επίπτωση στη γονιμοποίηση, την κυοφορία και τη γέννηση ενός υγιούς παιδιού.

Η ανασκόπηση αυτή επικεντρώνεται σε θέματα που σχετίζονται με τον κατακερματισμό του DNA των σπερματοζωαρίων. Περιλαμβάνει βασικές γνώσεις, όπως η δομή και η συμπύκνωση της χρωματίνης, αλλά κυρίως αναφέρεται σε κλινικά ζητήματα, όπως η αιτιολογία, οι σχετιζόμενες καταστάσεις (κάπνισμα, λοιμώξεις, καρκίνος των όρχεων), οι εργαστηριακές τεχνικές και η κλινική σημασία του κατακερματισμού του DNA των σπερματοζωαρίων. Απότερος στόχος είναι η ενημέρωση του επαγγελματία της υγείας σε αυτό το ταχέως αναπτυσσόμενο πεδίο της ανθρώπινης αναπαραγωγής.

2. Δομή και συμπύκνωση της χρωματίνης

Στα θηλαστικά, η χρωματίνη των σπερματοζωαρίων διαφέρει από αυτή των σωματικών κυττάρων ως προς τη δομή και τη σύσταση. Πράγματι, η χρωματίνη των σπερματοζωαρίων εμφανίζει την πιο συμπαγή δομή ανάμεσα σε όλα τα ευκαρυοτικά κύτταρα. Αυτή η συμπαγής δομή είναι σημαντική για τη διατήρηση της ακεραιότητας του γενετικού υλικού κατά τη δίοδο του από το ανδρικό και το γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα (1).

Η βασική μονάδα της χρωματίνης είναι το νουκλεόσωμα. Αποτελείται από 146 ζεύγη βάσεων DNA, τα οποία ελίσσονται 1.76 φορές γύρω από ένα οκταμερές πυρηνικών ιστονών, αποτελούμενο από τέσσερα ζεύγη μορίων: H2A, H2B, H3 και H4 (2). Οι ιστόνες H3 και H4 συνδέονται μεταξύ τους σχηματίζοντας ένα H3-H4 διμερές. Δύο διμερή σχηματίζουν ένα (H3-

H4)² τετραμερές, γύρω από το οποίο ελίσσονται οι έλικες του DNA. Στις δύο πλευρές του τετραμερούς συνδέονται τα ετεροδιψερή H2A and H2B. Επιπλέον, δύο γειτονικά νουκλεοσώματα συνδέονται με μία ιστόνη H1 (2). Έξι νουκλεοσώματα που περιστρέφονται το ένα γύρω από το άλλο σχηματίζουν ένα σωληνοειδές (solenoid) (3). Η περιέλιξη του DNA γύρω από τα οκταμερή των ιστονών προκαλεί τη δημιουργία υπερελικώσεων στη διπλή έλικα, με τρόπο που θα ξετύλιγε τη διπλή έλικα, εάν οι δεσμοί μεταξύ των βάσεων των δύο έλικων είχαν διασπαστεί. Επομένως, το ευκαρυωτικό DNA χαρακτηρίζεται από αρνητική υπερελικωση (4). Ο όγκος, ωστόσο, του πυρήνα των σπερματοζωαρίων είναι σημαντικά μικρότερος από αυτόν των σωματικών κυττάρων. Έτσι, το DNA των σπερματοζωαρίων δεν θα μπορούσε να οργανωθεί σε νουκλεοσώματα, επειδή αυτό θα απαιτούσε το 213% του συνολικού πυρηνικού όγκου (5). Επομένως, απαιτείται μια πιο συμπαγής οργάνωση του DNA.

Η δομή της χρωματίνης των σπερματοζωαρίων είναι όμοια με εκείνης των σωματικών κυττάρων μέχρι τη δεύτερη μειωτική διαίρεση, που οδηγεί από τα σπερματοκύτταρα στις στρογγυλές σπερματίδες. Κατά τη διάρκεια της σπερμιογένεσης, ωστόσο, η νουκλεοσωματική οργάνωση της χρωματίνης εξαφανίζεται και αντικαθίσταται από τη δομή των λείων (smooth fibrils) (6). Οι περισσότερες ιστόνες απομακρύνονται από το DNA και αντικαθίστανται αρχικά από μεταβατικές πρωτεΐνες και στη συνέχεια από πρωταμίνες, οι οποίες είναι υπεύθυνες για την τελική συμπύκνωση και σταθεροποίηση της σπερματικής χρωματίνης. Οι πρωταμίνες έχουν περίπου το μισό μέγεθος των ιστονών. Στον άνθρωπο υπάρχουν δύο τύποι πρωταμινών: η P1, πρωτεΐνη που συντίθεται άμεσα και η P2, που προκύπτει από την πρωτεόλυση ενός πρόδρομου μορίου (7). Ωστόσο, το ανθρώπινο σπερματοζωάριο διατηρεί σε ποσοστό περίπου 15% ιστόνες, οι οποίες σχηματίζουν λιγότερο συμπαγείς νουκλεοσωματικές δομές (8), που ανευρίσκονται κυρίως στην περιφέρεια του πυρήνα και στις ακολουθίες των τελομερών.

Το σύμπλεγμα πρωταμίνης - DNA σχηματίζεται καθώς οι πρωταμίνες τοποθετούνται κατά μήκος μέσα στις ελάσσονες αύλακες της έλικας του DNA, εξουδετερώνοντας με τον τρόπο αυτό τις αρνητικά φορτισμένες φωσφορικές ομάδες. Επιπλέον, το σύμπλεγμα πρωταμίνης - DNA της μιας έλικας εφαρμόζει μέσα στη μείζονα αύλακα μιας γειτονικής παραλληλής έλικας DNA, έτσι ώστε οι DNA έλικες να είναι τοποθετημένες δίπλα - δίπλα, με γραμμικό τρόπο, μέσα στον πυρήνα (4). Η δομή της χρωματίνης σταθεροποιείται περαιτέρω και γίνεται πιο συμπαγής με το σχηματισμό πολλαπλών δισουλφιδικών δεσμών μεταξύ υπολειμμάτων κυστεΐνης, τόσο εντός

τον ίδιον του μορίου των πρωταμινών όσο και μεταξύ τους (9). Η οργάνωση με γραμμικό τρόπο του DNA μέσα στον πυρήνα έρχεται σε συμφωνία με την παρατήρηση ότι το DNA των σπερματοζωαρίων δεν παρουσιάζει αρνητική υπερελίκωση. Με αυτόν τον τρόπο, το DNA μπορεί να οργανωθεί σταθερά σε πολύ μικρό όγκο.

Στα σωματικά κύτταρα, η χρωματίνη οργανώνεται περαιτέρω τρισδιάστατα, καθώς συνδέεται ανά 60.000 περίπου ζεύγη βάσεων με την πυρηνική ουσία (nuclear matrix), σχηματίζοντας βρόχους DNA (DNA loops) (10). Η λειτουργία του DNA εξαρτάται από την κατάλληλη οργάνωσή του, καθώς τα ενεργά γονίδια είναι κοντά στην περιοχή σύνδεσης με την πυρηνική ουσία και οι θέσεις έναρξης της αντιγραφής του DNA συνδέονται με την πυρηνική ουσία (4). Η χρωματίνη των σπερματοζωαρίων, παρότι είναι μεταγραφικά ανενεργή, είναι επίσης οργανωμένη σε βρόχους που έχουν περίπου το μισό μέγεθος από αυτούς των σωματικών κυττάρων (11).

Στα ώριμα σπερματοζώαρια, η χρωματίνη βρίσκεται συμπιεσμένη στο 1/6 του όγκου που καταλαμβάνεται αντίστοιχα από τον πυρήνα των σωματικών κυττάρων (3), σχηματίζοντας ένα συμπυκνωμένο πατρικό γένωμα με ένα συμπαγή και υδροδυναμικό πυρήνα, που διευκολύνει την ταχύτερη κίνηση των σπερματοζωαρίων προς το ωάριο. Επιπλέον, πιθανολογείται ότι οι πρωταμίνες αποτελούν φορείς ενός γενετικού αποτυπώματος, που μπορεί να επηρεάζει την επανενεργοποίηση του πατρικού γενώματος κατά τη γονιμοποίηση (12).

3. Μηχανισμοί πρόκλησης κατακερματισμού στο DNA των σπερματοζωαρίων

Ο κατακερματισμός του DNA χαρακτηρίζεται από θραύσεις τόσο της μονής, όσο και της διπλής έλικας του DNA. Κατά τη διάρκεια της σπερμιογένεσης, η σπερματίδη που ωριμάζει προοδευτικά την ικανότητά της να επιδιορθώνει τυχόν βλάβες του DNA, καθώς επίσης και να απαντά σε αυτές μέσω του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (απόπτωση). Έτσι, θραύσεις του DNA που προκαλούνται κατά τη συμπύκνωση της χρωματίνης ή και αργότερα μπορεί να διαφύγουν από τους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς και να παραμείνουν στο ώριμο σπερματοζώαριο. Από την άλλη πλευρά, έχει παρατηρηθεί ότι τόσο το ωάριο όσο και το πρώιμο έμβρυο έχουν την ικανότητα επιδιόρθωσης δομικών ανωμαλιών του DNA μέχρι ενός συγκεκριμένου σημείου (13). Επομένως, οι επιπτώσεις των θραύσεων του DNA στη γονιμοποίηση και την εμβρυϊκή ανάπτυξη εξαρτώνται από το βαθμό της βλάβης του DNA σε συνδυασμό με την ικανότητα του ωαρίου να επιδιορ-

θώνει αυτή τη βλάβη, μια ικανότητα που μπορεί να ελαττώνεται με την αύξηση της ηλικίας της γυναίκας.

Οι ακριβείς μηχανισμοί που οδηγούν σε θραύσεις της DNA έλικας παραμένουν ακόμα ασαφείς. Έχουν προταθεί τρεις βασικές θεωρίες: η ελαττωματική συμπύκνωση της χρωματίνης των σπερματοζωαρίων, η αποτυχημένη απόπτωση (abortive apoptosis) και το οξειδωτικό stress.

3.1. Ελαττωματική συμπύκνωση της χρωματίνης των σπερματοζωαρίων

Κατά τη διάρκεια της μείωσης, η πρόκληση των θραύσεων της διπλής έλικας του DNA από νουκλεάσες της οικογένειας SPO11 είναι απαραίτητη για τον επιχιασμό (crossing-over) των χρωμοσωμάτων (13). Φυσιολογικά οι θραύσεις αυτές αποκαθίστανται μέχρι την ολοκλήρωση της πρώτης μειωτικής διαίρεσης, καθώς, σε αντίθετη περίπτωση, η διαδικασία της μείωσης δεν μπορεί να συνεχισθεί (14). Γίνεται, επομένως, κατανοητό ότι η ύπαρξη ενός ελαττωματικού μηχανισμού ελέγχου θα μπορούσε να οδηγήσει στην παρουσία μόνιμων θραύσεων της DNA έλικας στο σπερματοζώαριο.

Κατά το στάδιο της στρογγυλής και της επιμήκους σπερματίδας παρατηρούνται φυσιολογικά υψηλά επίπεδα της ενδογενούς νουκλεάσης DNA τοποϊσομεράσης II, καθώς και θραύσεις του DNA. Φαίνεται πως οι θραύσεις αυτές, που στην πραγματικότητα είναι θραύσεις του δίκλωνου DNA, είναι απαραίτητες κατά τη διάρκεια της σπερμιογένεσης. Η τοποϊσομεράση II προκαλεί θραύσεις στην έλικα του DNA με σκοπό να διευκολύνει την αντικατάσταση των ιστονών, αρχικά από μεταβατικές πρωτεΐνες και στη συνέχεια από πρωταμίνες (15). Υπό φυσιολογικές συνθήκες, το ίδιο ένζυμο επανασυγκολλά της θραύσεις αυτές κατά τη διοδο του σπερματοζωαρίου από την επιδιδυμίδα, αποκαθιστώντας την ακεραιότητα του DNA πριν την εκσπερμάτιση. Ωστόσο, σε περίπτωση που η συγκολλητική δράση της τοποϊσομεράσης II είναι ανεπαρκής ή παρεμποδίζεται από κάποιον αναστατωτικό εξωγενή παράγοντα, οι θραύσεις μπορεί να παραμείνουν στο εξωθούμενο σπερματοζώαριο.

Συγκριτικά με τα σωματικά κύτταρα, το DNA των σπερματοζωαρίων του ανθρώπου εμφανίζει περισσότερες περιοχές μερικώς αποδιοργανωμένου DNA, δηλαδή περιοχές με χαλαρή συμπύκνωση (16), που είναι περισσότερο ευάλωτες σε θραύση υπό την παρουσία ενός βλαπτικού παράγοντα. Το γεγονός αυτό θα μπορούσε να εξηγήσει την παρουσία μεγαλύτερου αριθμού τυχαίων βλαβών του DNA στο σπερματοζώαριο σε σχέση με τα σωματικά κύτταρα (17).

Από τα δύο είδη πρωταμινών που έχουν εντοπιστεί στον άνθρωπο, η P2 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη σταθερότητα και στη συμπύκνωση της χρωματίνης, σχηματίζοντας δισουλφιδικούς δεσμούς, τόσο μεταξύ των πρωταμινών όσο και εντός του ίδιου του μορίου της. Χαμηλά επίπεδα της P2 πρωταμίνης και αυξημένη αναλογία P1:P2, εξαιτίας παραμονής των ιστονών ή ανεπαρκούς επεξεργασίας του πρόδρομου μορίου της P1, έχουν βρεθεί σε υπογόνιμους άνδρες (18).

3.2. Αποτυχημένη απόπτωση

Ο όρος αυτός (abortive apoptosis) περιγράφει την κατάσταση κατά την οποία αρχίζει μεν η απόπτωση, αλλά δεν ολοκληρώνεται (19). Η απόπτωση ή προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος αποτελεί ένα ιδιαίτερο είδος κυτταρικού θανάτου και χαρακτηρίζεται από μια σειρά μορφολογικών και βιοχημικών μεταβολών που οδηγούν στην αποτελεσματική μείωση του αριθμού των κυττάρων στους ιστούς, χωρίς να προκαλείται φλεγμονώδης αντίδραση. Όπως και σε άλλους ιστούς, έτσι και στους όρχεις, η απόπτωση παίζει σημαντικό ρόλο για την ιστική ομοιόταση: λαμβάνει χώρα φυσιολογικά και συμβάλλει στον έλεγχο του υπέρμετρου πολλαπλασιασμού των κυττάρων της σπερματικής σειράς (20). Τα κύτταρα της σπερματικής σειράς πολλαπλασιάζονται κλωνικά μέσα από πολλούς κύκλους μίτωσης και μείωσης κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης. Επομένως, είναι απαραίτητη η ύπαρξη ενός μηχανισμού ελέγχου και επίβλεψης με σκοπό τον περιορισμό του αριθμού τους, έτσι ώστε να μπορούν να υποστηριχθούν από τα κύτταρα Sertoli. Στον ανθρώπινο όρχι, από ένα σπερματογόνιο προκύπτουν περίπου 100 σπερματίδες, πολύ λιγότερες από τις θεωρητικά αναμενόμενες 4.096 (21), γεγονός που υποδεικνύει το σημαντικό ρόλο της απόπτωσης. Στα κύτταρα της σπερματικής σειράς, η απόπτωση γίνεται με τη βοήθεια της πρωτεΐνης Fas, μιας μεμβρανικής πρωτεΐνης τύπου I που ανήκει στην οικογένεια του υποδοχέα του παράγοντα νέκρωσης των όγκων – αυξητικού παράγοντα των νεύρων (Tumor Necrosis Factor - Nerve Growth Factor) (22). Η σύνδεση της πρωτεΐνης Fas με τον Fas συνδέτη (Fas ligand - FasL) οδηγεί φυσιολογικά στην αποδόμηση των κυττάρων μέσω της απόπτωσης (22). Τα κύτταρα Sertoli εκφράζουν τον FasL, συμβάλλοντας έτσι στον περιορισμό του αριθμού των αναπτυσσόμενων σπερματικών κυττάρων. Η συμμετοχή κασπασών στη διαδικασία της απόπτωσης ευνοεί τον κατακερματισμό του DNA στα σπερματοζωάρια. Η σύνδεση Fas/FasL έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των κασπασών 8 και 9, οι οποίες με τη σειρά τους μεταφέρουν το μήνυμα σε δραστικές κασπάσες, όπως η 3. Η τελευταία θεωρείται ότι ενεργοποιεί την ενεργοποιούμενη από κασπάση δεοξυριβονουκλεάση (Caspase-

Activated Deoxyribonuclease – CAR), προκαλώντας βλάβη στο DNA και οδηγώντας τελικά στην αποδόμησή του (23).

Στους άνδρες με παθολογικές παραμέτρους στο σπερμοδιάγραμμα, σε αντίθεση με αυτούς με φυσιολογικές, το ποσοστό των αποπτωτικά σημασμένων σπερματοζωαρίων μπορεί να είναι υψηλό (19, 24), υποδεικνύοντας ότι τα σπερματοζωάρια αυτά έχουν διαφύγει από την αποπτωτική διαδικασία, δηλαδή έχουν υποστεί αποτυχημένη απόπτωση. Αν αυτό είναι αληθές, τότε η παράμετρος του αριθμού των σπερματοζωαρίων πιθανόν να μην επηρεάζεται σε τόσο μεγάλο βαθμό, παρά την κακή ποιότητα του σπερματικού DNA. Αναφορικά με την αιτιολογία της αποτυχημένης απόπτωσης, έχει προταθεί ότι άνδρες με μειωμένη σπερματογένεση μπορεί να μην παράγουν αρκετά σπερματοζωάρια ώστε να ενεργοποιήσουν σωστά τη διαδικασία της απόπτωσης (25).

3.3. Οξειδωτικό stress

Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (Reactive Oxygen Species - ROS) είναι οξειδωτικοί παράγοντες, οι οποίοι σε χαμηλές συγκεντρώσεις, έχουν σημαντικό φυσιολογικό ρόλο. Για παράδειγμα, το H_2O_2 , παίζει ρόλο στην υπερδραστήρια κίνηση της ουράς που είναι σημαντική για την ενεργοποίηση (capacitation) του σπερματοζωαρίου (26). Επιπλέον, οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου είναι σημαντικές για την υπεροξείδωση των λιπιδίων αυξάνοντας τη διεισδυτική ικανότητα των σπερματοζωαρίων, που είναι απαραίτητη για να διασχίσουν τη διαφανή ζώνη (1, 27).

Το οξειδωτικό stress εμφανίζεται στο σπέρμα όταν παράγονται ελεύθερες ρίζες οξυγόνου σε υψηλότερα επίπεδα από τις αντιοξειδωτικές ικανότητες του σπερματικού πλάσματος (28). Το σπερματικό πλάσμα είναι πλούσιο στα αντιοξειδωτικά ένζυμα καταλάση και υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, που καταλύουν τη διάσπαση του H_2O_2 σε H_2O και O_2 . Εκτός όμως από τους αντιοξειδωτικούς παράγοντες του σπέρματος, η μεγάλη συμπύκνωση του DNA είναι σημαντική για την προστασία του έναντι των οξειδωτικών προσβολών.

Το σπερματοζωάριο είναι ιδιαίτερα ευάλωτο σε οξειδωτική βλάβη εξαιτίας της υψηλής περιεκτικότητας της πλασματικής του μεμβράνης σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (1). Οι δύο βασικές πηγές υπέρμετρης παραγωγής ελεύθερων ριζών οξυγόνου στο σπέρμα είναι τα λευκοκύτταρα και τα σπερματοζωάρια με κυτταροπλάσματικό υπόλειμμα (28). Υψηλά επίπεδα ελευθέρων ριζών έχουν συσχετισθεί με θραύσεις της διπλής και της μονής έλικας του DNA, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου είναι ένας από τους βασικότερους

παράγοντες που συμβάλλουν στον κατακερματισμό του DNA (29, 30).

Παρότι οι μηχανισμοί που οδηγούν στον κατακερματισμό του DNA δεν είναι ακόμα πλήρως κατανοητοί, φαίνεται ότι αλληλοεπηρεάζονται, καθώς μια μη φυσιολογική συμπύκνωση της χρωματίνης καθιστά το σπερματοζωάριο πιο ευάλωτο σε περιβαλλοντικές προσβολές, όπως η υπέρμετρη παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου.

4. Καταστάσεις που σχετίζονται με τον κατακερματισμό του DNA

Ορισμένες καταστάσεις έχουν συσχετισθεί με αυξημένο ποσοστό σπερματοζωαρίων με βλάβη στο DNA, παρότι οι παθογενετικοί μηχανισμοί παραμένουν ακόμα αδιευκρίνιστοι.

Το κάπνισμα, εκτός από τις μεταλλαξιογόνες ιδιότητές του, επιδρά αρνητικά και στην ποιότητα του σπέρματος και συγκεκριμένα στον αριθμό, την κινητικότητα και τη μορφολογία των σπερματοζωαρίων (31, 32). Πρόσφατα, έχει βρεθεί ότι το κάπνισμα έχει επίσης αρνητική επίδραση στην ακεραιότητα του DNA, καθώς οι καπνιστές παρουσιάζουν υψηλότερο ποσοστό σπερματοζωαρίων με κατακερματισμένο DNA σε σύγκριση με τους μη καπνιστές (33). Έχει αποδειχθεί ότι το σπερματικό DNA των καπνιστών είναι περισσότερο ευάλωτο σε εξωγενείς προσβολές εξαιτίας ελαττωμένων επιπέδων αντιοξειδωτικών παραγόντων στο σπερματικό πλάσμα (34).

Οι λοιμώξεις του γεννητικού συστήματος έχει επίσης αναφερθεί ότι σχετίζονται με βλάβη του DNA των σπερματοζωαρίων, καθώς υψηλά ποσοστά κατακερματισμένου DNA έχουν βρεθεί σε δείγματα σπέρματος με αυξημένη συγκέντρωση λευκοκυττάρων (35). Αυτό, πιθανότατα, οφείλεται στην αυξημένη παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου (36) ή / και στη δράση μεσολαβητών της φλεγμονής, όπως οι κυτοκίνες, κατά τη σπερμιογένεση (37). Επιπλέον, οι εμπύρετες λοιμώξεις, όπως η γρίπη, μπορούν, επίσης, να επηρεάσουν τη δομή της χρωματίνης του σπερματοζωαρίου (38).

Ο καρκίνος των όρχεων και η νόσος του Hodgkin, δύο από τις πιο συχνές κακοήθεις νεοπλασίες στους άνδρες αναπαραγωγικής ηλικίας, σχεδόν πάντα επηρεάζουν την ποιότητα του σπέρματος και την ακεραιότητα του DNA του σπερματοζωαρίου, ακόμα και πριν από τη θεραπεία (39). Ασφαλώς, η χημειοθεραπεία και η ακτινοθεραπεία, που συχνά εφαρμόζονται σε αυτές τις περιπτώσεις, είναι υπεύθυνες για επιπρόσθετη βλάβη του DNA των σπερματοζωαρίων. Η αποκατάσταση της σπερματογένεσης μπορεί να συμβεί πολλά έτη μετά τη θεραπεία (40).

Η βλάβη του DNA των σπερματοζωαρίων μπορεί, ακόμη, να είναι ιατρογενής, όπως σε πρωτόκολλα προετοιμασίας του σπέρματος για υποβοηθούμενη αναπαραγωγή, όπου πραγματοποιείται επανειλημμένη φυγοκέντρηση και απομόνωση σπερματοζωαρίων από το πλούσιο σε αντιοξειδωτικούς παράγοντες σπερματικό πλάσμα (29). Επίσης, τα σπερματοζωάρια που λαμβάνονται από τους όρχεις με βιοψία δια λεπτής βελόνης (Fine Needle Aspiration - FNA) ή με ανοιχτή βιοψία (Testicular Sperm Extraction - TESE) στερούνται του προστατευτικού περιβάλλοντος του σπερματικού πλάσματος (29). Η κρυοσυντήρηση και, ιδιαίτερα, η διαδικασία ψύξης - απόψυξης επηρεάζουν επίσης την ακεραιότητα του σπερματικού DNA (41).

Πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι η υπερθερμία των όρχεων μπορεί να οδηγήσει σε βλάβη του σπερματικού DNA είτε άμεσα είτε λόγω αύξησης της αναλογίας ιστονών / πρωταμινών (42). Επιπλέον, έχει αποδειχθεί πειραματικά ότι ποντίκια με απάλειψη (knock-out) του γονιδίου του υποδοχέα της FSH παρουσιάζουν ελαττωμένα επίπεδα πρωταμινών, ελαττωμένη τεστοστερόνη και αυξημένα επίπεδα βλάβης του DNA των σπερματοζωαρίων (43). Τέλος, επιδημιολογικές μελέτες έχουν συσχετίσει την έκθεση σε εντομοκτόνα και την ατμοσφαιρική ρύπανση με υψηλά επίπεδα βλάβης του DNA των σπερματοζωαρίων (44).

5. Μέθοδοι προσδιορισμού του κατακερματισμού του DNA

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση του κατακερματισμού του DNA των σπερματοζωαρίων διακρίνονται σε άμεσες και σε έμμεσες. Οι άμεσες ανιχνεύουν τις υπάρχουσες θραύσεις στο DNA, ενώ οι έμμεσες μέθοδοι προσδιορίζουν ποσοτικά την ευπάθεια του DNA των σπερματοζωαρίων για θραύση που προκαλείται μετά από επίδραση εξωγενών παραγόντων, όπως η επίδραση οξεός. Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες άμεσες μέθοδοι είναι η TUNEL (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-mediated Nick End Labeling), η COMET (Single Cell Gel Electrophoresis) και η NT (In-Situ Nick Translation). Οι πιο συχνές έμμεσες μέθοδοι είναι η κυτταρομετρία ροής με τη χρωστική «πορτοκαλί της ακριδίνης», η μικροσκοπική μέθοδος της χρωστικής «πορτοκαλί της ακριδίνης» (AO), η DBD-FISH (DNA Break Detection - Fluorescence In Situ Hybridization) και η SCD (Sperm Chromatin Dispersion).

5.1. Άμεσες μέθοδοι

5.1.1. Μέθοδος TUNEL

Η μέθοδος TUNEL στηρίζεται στην ενσωμάτωση νουκλεοτιδίων τριφωσφορικής δεοξυουριδίνης (deoxyuridine triphosphate - dUTP) σε θραύσεις μονής και διπλής έλικας, σε μια αντίδραση που καταλύεται από το ένζυμο τελική δεοξυνουκλεοτιδυλ-τρανσφεράση (terminal deoxynucleotidyl transferase - TdT). Τα νουκλεοτίδια dUTP είναι σημαντικά έτσι ώστε να είναι δυνατή η ανίχνευση των σπερματοζωαρίων με κατακερματισμένο DNA με μικροσκόπιο φθορισμού, με οπτικό μικροσκόπιο ή με κυτταρομετρία ροής (45). Το αποτέλεσμα εκφράζεται ως ποσοστό (%) των σπερματοζωαρίων με κατακερματισμένο DNA. Όσον αφορά τα πλεονεκτήματα της μέθοδου, εκτός από την ανίχνευση πραγματικών θραύσεων του DNA, ο απαιτούμενος εξοπλισμός δεν είναι ακριβός, η μικροσκοπική μέθοδος μπορεί να πραγματοποιηθεί ακόμα και αν ανευρίσκονται ελάχιστα σπερματοζωάρια, ενώ η κυτταρομετρία ροής επιτρέπει την εκτίμηση χιλιάδων κυττάρων και μπορεί να χρησιμοποιηθεί τόσο σε νωπά όσο και σε κατεψυγμένα δείγματα. Σχετικά με τα μειονεκτήματα, υπάρχουν ποικίλα τεχνικά πρωτόκολλα που χρησιμοποιούνται στα διάφορα εργαστήρια, με αποτέλεσμα να μην έχουν ακόμα προσδιοριστεί αξιόπιστες τιμές αναφοράς. Ένα σημαντικό ζήτημα σχετικά με τη μικροσκοπική μέθοδο είναι ο γρήγορος αποχρωματισμός που παρατηρείται κατά την εξέταση των αντικειμενοφόρων πλακών. Προκειμένου να ξεπερασθεί αυτό το πρόβλημα, η μέθοδος έχει τροποποιηθεί με τη χρησιμοποίηση ενός συστήματος σήμανσης που στηρίζεται στην υπεροξειδάση, η οποία δρα ως καταλύτης και παράγει ένα έντονο σήμα από τα χρωμογόνα υποστρώματα, δίνοντας έτσι το χρόνο να μετρηθούν περισσότερα σπερματοζωάρια για μεγαλύτερη ακρίβεια (3). Συμπερασματικά, η μέθοδος TUNEL είναι μια ευαίσθητη μέθοδος για την άμεση ανίχνευση θραύσεων της έλικας του DNA, χωρίς να απαιτείται εξειδικευμένος εξοπλισμός.

5.1.2. Μέθοδος COMET

Στη μέθοδο COMET, τα σπερματοζωάρια τοποθετούνται σε λεπτή στιβάδα αγαρόζης σε πλάκα μικροσκοπίου και υφίστανται λύση, ηλεκτροφόρηση και χρώση με φθορίζουσα χρωστική που συνδέεται με το DNA. Με αυτόν τον τρόπο, το κατακερματισμένο DNA, που έχει μικρότερο μοριακό βάρος, μεταναστεύει προς την άνοδο, ενώ το ακέραιο, μη κατακερματισμένο DNA παραμένει στην κεφαλή του κομήτη (46). Έτσι, τα σπερματοζωάρια με μεγάλο βαθμό κατακερματισμού του DNA παρουσιάζουν ουρά κομήτη με μεγαλύτερο μήκος και μεγαλύτερη ένταση φθορισμού. Η μέθοδος απαιτεί τη χρησι-

μοποίηση μικροσκοπίου φθορισμού και το αποτέλεσμα εκφράζεται σε ποσοστό σπερματοζωαρίων με «μακριά ουρά». Υπάρχουν δύο είδη της μεθόδου COMET, η αλκαλική και η ουδέτερη. Η αλκαλική μέθοδος πραγματοποιείται σε αλκαλικές συνθήκες (pH > 10), με αποτέλεσμα το DNA των σπερματοζωαρίων να υφίσταται αποδιάταξη και να αναγνωρίζονται θραύσεις τόσο της μονής όσο και της διπλής έλικας DNA. Έτσι, όμως, μπορεί να υπερεκτιμηθεί ο αριθμός των θραύσεων του DNA εξαιτίας της μετατροπής αλκαλεο-δεσμευτικών θέσεων (alkali-labile sites) σε θραύσεις (46, 47). Η ουδέτερη μέθοδος (pH < 9) προσδιορίζει μόνο τις θραύσεις στη διπλή έλικα, αφού οι συνθήκες κάτω από τις οποίες πραγματοποιείται δεν προκαλούν αποδιάταξη του DNA (47). Αυτό σημαίνει ότι η ουδέτερη μέθοδος πιθανότατα αναγνωρίζει θραύσεις με μεγαλύτερη κλινική σημασία. Γενικά, πάντως, η μέθοδος COMET είναι μια απαιτητική και χρονοβόρα δοκιμασία με μεγάλη διακύμανση μεταξύ των μετρήσεων (inter-assay variability), γεγονός που καθιστά δύσκολο τον προσδιορισμό τιμών αναφοράς με κλινική χρησιμότητα (47).

5.1.3. Μέθοδος NT

Αυτή η μέθοδος προσδιορίζει ποσοτικά την ενσωμάτωση νουκλεοτιδίων τριφωσφορικής δεοξυουριδίνης dUTPs σε θραύσεις μονής έλικας, με μια αντίδραση που καταλύεται από το ένζυμο DNA πολυμεράση I. Απαραίτητη είναι η χρήση μικροσκοπίου φθορισμού. Η παράμετρος που προσδιορίζεται είναι το ποσοστό σπερματοζωαρίων με ενσωματωμένα dUTPs. Αν και η τεχνική είναι απλή, η μέθοδος NT είναι λιγότερο ευαίσθητη σε σύγκριση με άλλες μεθόδους, ενώ ακόμα δεν έχουν καθιερωθεί τιμές αναφοράς (47).

5.2. Εμμεσες μέθοδοι

5.2.1. Κυτταρομετρία ροής με τη χρωστική «πορτοκαλί της ακριδίνης»

Η μέθοδος αυτή (Flow cytometric acridine orange assay) εκτιμά την ευπάθεια της χρωματίνης των σπερματοζωαρίων για κατακερματισμό μετά την επίδραση ήπιου οξέος. Στηρίζεται στις μεταχρωματικές ιδιότητες της χρωστικής «πορτοκαλί της ακριδίνης», η οποία όταν συνδέεται με δίκλων DNA εκπέμπει πράσινο φθορισμό, ενώ όταν συνδέεται με μονόκλων DNA κόκκινο. Με τη μέθοδο αυτή προσδιορίζεται το DFI (DNA Fragmentation Index), που εκφράζει την αναλογία «κόκκινος» / («κόκκινος» + «πράσινος») φθορισμός και αντιπροσωπεύει το ποσοστό των σπερματοζωαρίων με κατακερματισμένο DNA. Επίσης, μία άλλη παράμετρος που προσδιορί-

ζεται είναι το HDS (High DNA Stainability), δηλαδή το ποσότο των σπερματοζωαρίων με έντονη χρώση του DNA, που αντιστοιχεί σε ανώριμες μορφές με ανεπαρκή συμπύκνωση της χρωματίνης. Η κυτταρομετρία ροής δίνει τη δυνατότητα εκτίμησης 5.000 – 10.000 σπερματοζωαρίων μέσα σε λίγα λεπτά και έχει μεγάλη διακριτική ικανότητα όσον αφορά το φθορισμό, καθώς χρησιμοποιεί 1024 χρωματικά κανάλια (1). Συνεπώς, η μέθοδος αυτή είναι πιο αντικειμενική συγκριτικά με το ανθρώπινο μάτι και παρουσιάζει υψηλή επαναληψιμότητα. Στα πλεονεκτήματά της συγκαταλέγεται η δυνατότητα χρησιμοποίησης τόσο νωπών όσο και κατεψυγμένων δειγμάτων. Πρόκειται για μια τυποποιημένη τεχνική που έχει χρησιμοποιηθεί στις περισσότερες δημοσιευμένες μελέτες (47). Η εφαρμογή της στα ανδρολογικά εργαστήρια είναι περιορισμένη, κυρίως εξαιτίας του ακριβού εξοπλισμού και του λογισμικού που απαιτείται, αλλά και επειδή τα αποτελέσματα μπορεί να επηρεαστούν ακόμα και από μικρές τροποποιήσεις στις συνθήκες διεξαγωγής της (48). Επιπλέον, ορισμένα δείγματα είναι δύσκολο να προσδιοριστούν εξαιτίας του πολύ μικρού αριθμού σπερματοζωαρίων (< 10.000 / mL) ή της παρουσίας μεγάλης ποσότητας κυτταρικών υπολειμμάτων (debris) (1).

5.2.2. Μικροσκοπική μέθοδος της χρωστικής πορτοκαλί της ακριδίνης (AO)

Η μικροσκοπική μέθοδος AO είναι μια απλοποιημένη παραλλαγή της κυτταρομετρικής τεχνικής (49). Προσδιορίζει την ευπάθεια της χρωματίνης των σπερματοζωαρίων για θραύση, με την *in situ* επίδραση οξεός. Υπολογίζει την μεταχρωματική αλλαγή του φθορισμού της χρωστικής από πράσινο (φυσιολογικό DNA) σε κόκκινο (κατακερματισμένο DNA). Το αποτέλεσμα εκφράζεται σε ποσοστό σπερματοζωαρίων με κόκκινο φθορισμό. Παρότι πρόκειται για μια απλή τεχνική που δεν απαιτεί ακριβό εξοπλισμό, έχει αρκετά μειονεκτήματα. Υπάρχουν δυσκολίες στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων εξαιτίας του ασαφούς χρώματος, της ετερογενούς χρώσης των αντικειμενοφόρων πλακών και του γρήγορου αποχρωματισμού (1), γεγονός που απαιτεί την αξιολόγηση των πλακών αμέσως μετά τη χρώση. Επιπρόσθετα, επειδή το πορτοκαλί της ακριδίνης απορροφάται από το γυαλί, και οι αντικειμενοφόρες πλάκες και οι καλυπτρίδες δεν είναι τελείως επίπεδες, είναι πιθανόν οι κατά τόπους υψηλότερες και χαμηλότερες συγκεντρώσεις της χρωστικής να δώσουν ψευδή αποτελέσματα (1).

5.2.3. Μέθοδος DBD-FISH

Η μέθοδος αυτή επιτρέπει την *in situ* ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό θραύσεων του DNA σε ολόκληρο το γένωμα ή εντός περιοχών του DNA με συγκεκριμένη αλλη-

λουχία (17). Τα σπερματοζωάρια απογυμνώνονται από τις πρωτεΐνες, υφίστανται αφυδάτωση και στη συνέχεια τοποθετούνται σε ένα αλικαλικό διάλυμα που προκαλεί αποδιάταξη του κατακερματισμένου DNA. Ακολούθως τα δείγματα επωάζονται με DNA ανιχνευτές (probes), που υβριδοποιούνται με τις θέσεις μονόκλων DNA και παράγουν ένα σήμα. Η ποσότητα του φθορισμού είναι ανάλογη με τον βαθμό κατακερματισμού του DNA. Η μέθοδος DBD-FISH μπορεί να πραγματοπιθεί ακόμα και στην περίπτωση μικρού αριθμού σπερματοζωαρίων, αλλά δεν χρησιμοποιείται συχνά και τα κλινικά δεδομένα είναι περιορισμένα (48).

5.2.4. Μέθοδος SCD

Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην αρχή ότι, μετά την επίδραση οξέος που προκαλεί αποδιάταξη του DNA των σπερματοζωαρίων και την απομάκρυνση των πυρηνικών πρωτεΐνων, εφόσον υπάρχουν θραύσεις σε αυτό, δεν σχηματίζεται η χαρακτηριστική άλως που παρατηρείται όταν το DNA είναι φυσιολογικό (50). Συγκεκριμένα, όταν σπερματοζωάρια χωρίς κατακερματισμένο DNA τοποθετούνται σε πηκτή αγαρόδης 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 κατακερματισμού του DNA, η άλως δεν μπορεί να σχηματιστεί ή είναι πολύ μικρή (50). Προκειμένου να αποφευχθεί η επίδραση της διαφοράς του μεγέθους των πυρήνων των σπερματοζωαρίων, το μέγεθος της άλω υπολογίζεται από το λόγο της επιφάνειας της άλω προς την επιφάνεια ολόκληρου του «πυρηνοειδούς» (50). Το αποτέλεσμα εκφράζεται ως ποσοστό των σπερματοζωαρίων με πολύ μικρή ή καθόλου άλω. Η παρατήρηση γίνεται με μικροσκόπιο φθορισμού ή φωτεινού πεδίου. Σε αντίθεση με άλλες μεθόδους, η δοκιμασία SCD δεν στηρίζεται στον καθορισμό της έντασης του χρώματος ή του φθορισμού. Πρόκειται για μια σχετικά απλή τεχνική, αλλά με περισσέμενα ακόμη κλινικά δεδομένα.

Πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι υπάρχει σημαντική συσχέτιση μεταξύ των αποτελεσμάτων των μεθόδων κυτταρομετρία ροής με τη χρωστική «πορτοκαλί της ακριδίνης», TUNEL και SCD. Και οι τρεις μέθοδοι παρουσιάσαν παρόμοια αποτελέσματα όσον αφορά στην εκτίμηση του κατακερματισμού του DNA. Αντίθετα, η μικροσκοπική μέθοδος AO έδειξε διαφορετικά και αυξημένα επίπεδα συγκριτικά με τις υπόλοιπες μεθόδους (51).

Ανεξάρτητα από την τεχνική προσδιορισμού, όλες οι μέθοδοι προσπαθούν να υπολογίσουν το βαθμό του κατακερματισμού του DNA, ανεξάρτητα από την περιοχή του γενώματος

στην οποία εντοπίζεται. Είναι προφανές ότι θραύσεις που αφορούν συγκεκριμένα γονίδια είναι πιο επιβλαβείς σε σχέση με άλλες που εντοπίζονται σε «σιωπηλές» περιοχές του γενώματος (48). Προς το παρόν, καμία μέθοδος δεν μπορεί να προσδιορίσει αυτόν τον παράγοντα και έτσι δεν μπορεί να υπάρξει διαφοροποίηση μεταξύ του κατακερματισμού με ή χωρίς κλινική σημασία.

6. Κλινική σημασία του κατακερματισμού του DNA

6.1. Φυσιολογική σύλληψη

Προοπτική μελέτη σχετικά με την επίδραση του κατακερματισμού του DNA προσδιορισμένου με κυτταρομετρία ροής με τη χρωστική «πορτοκαλί της ακριδίνης» σε ζευγάρια άγνωστης γονιμότητας που επιθυμούσαν πρώτη κύηση έδειξε ότι η γονιμοποιητική ικανότητα παρουσίαζε σημαντική ελάττωση όταν το DFI ήταν μεγαλύτερο από 20% και ήταν ιδιαίτερα μικρή για $DFI > 40\%$ (52). Το DFI εμφάνιζε σημαντική συσχέτιση με τη γονιμοποιητική ικανότητα ακόμα και μετά από διόρθωση για τα πιθανά αίτια υπογονιμότητας της γυναίκας. Επιπλέον, βρέθηκε ότι το DFI μπορούσε να προβλέψει τη γονιμοποιητική ικανότητα, ανεξάρτητα από την τιμή του αριθμού των σπερματοζωαρίων.

Μια παρόμοια δεύτερη μελέτη (53) έδειξε ότι το 84% των ζευγαριών που πέτυχαν σύλληψη μέσα στους τρεις πρώτους μήνες ελεύθερων επαφών παρουσίαζε $DFI \leq 15\%$, ενώ κανένα δεν είχε $DFI \geq 30\%$. Όλα τα ζευγάρια με $DFI \geq 30\%$ πέτυχαν κύηση μόνο μετά τους τρεις πρώτους μήνες ή δεν πέτυχαν καθόλου κύηση στο τέλος της δωδεκάμηνης περιόδου παρακολούθησης. Προκαλεί εντύπωση, ωστόσο, η παρατήρηση ότι ποσοστό μεγαλύτερο του 50% αυτών που δεν πέτυχαν κύηση στους δώδεκα μήνες, οι οποίοι εξ ορισμού θεωρούνται υπογόνιμοι, είχαν $DFI \leq 15\%$. Το DFI ήταν σημαντικά υψηλότερο στα ζευγάρια που πέτυχαν σύλληψη μετά τους τρεις πρώτους μήνες ή δεν πέτυχαν καθόλου σύλληψη σε σύγκριση με τα ζευγάρια που πέτυχαν σύλληψη κατά τους τρεις πρώτους μήνες. Επίσης, βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ανδρών που πέτυχαν σύλληψη κατά τους τρεις πρώτους μήνες και των ανδρών που παρακολούθησαν από ιατρείο υπογονιμότητας. Παρά την σύσταση των συγγραφέων να χρησιμοποιούνται σπερματοζώαρια με λήψη από τους όρχεις σε περίπτωση υψηλού DFI (53), δεν υπάρχουν κλινικά δεδομένα να υποστηρίζουν μια τέτοια περέμβαση.

Το όριο του 30% για το DFI έχει περιγραφεί από τους συγγραφείς ως το φαινόμενο της «κορυφής του παγόβουνου». Αυτό σημαίνει ότι, αν και μόνο το 30% των σπερματοζωαρίων

αναγνωρίζονται ως παθολογικά, μπορεί να υπάρχουν βλάβες του DNA και στον υπόλοιπο πληθυσμό των σπερματοζωαρίων, οι οποίες δεν μπορούν να αναγνωριστούν με τις τεχνικές που χρησιμοποιούνται σήμερα. Έχουν καθιερωθεί οι ακόλουθες τέσσερις κατηγορίες για το DFI, όπως αυτό προσδιορίζεται με κυτταρομετρία ροής με τη χρωστική «πορτοκαλί της ακριδίνης»: άριστο (< 15%), καλό (15 – 24%), ικανοποιητικό (25 – 30%) και πτωχό (> 30%) (1).

Μια πρόσφατη μετα-ανάλυση των δύο παραπάνω μελετών έδειξε ότι σημαντικό λόγο πιθανοτήτων επίτευξης κύησης (Odds Ratio - OR) 6,54 (95% διάστημα εμπιστοσύνης 1,71 – 24,91) και 7,58 (95% διάστημα εμπιστοσύνης 2,54 – 22,67), για ζευγάρια με $DFI < 30\%$ και $< 40\%$, αντίστοιχα (54). Ωστόσο, οι ερευνητές δεν έλαβαν υπόψη τον επιπολασμό της υπογονιμότητας στον υπό μελέτη πληθυσμό (48).

6.2. Ανδρική υπογονιμότητα

Πολλές μελέτες, χρησιμοποιώντας διάφορες τεχνικές, έχουν δείξει ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στον κατακερματισμό του DNA των σπερματοζωαρίων μεταξύ γόνιμων και υπογόνιμων ανδρών, ή τουλάχιστον ανδρών που παρακολουθούνται από ιατρείο υπογονιμότητας (50, 52-53, 55-56). Ωστόσο, παρά τη σημαντική διαφορά, σε όλες σχεδόν τις μελέτες παρατηρείται μια εκτεταμένη αλληλοεπικάλυψη των τιμών ανάμεσα στους γόνιμους και στους υπογόνιμους ανδρες. Επιπρόσθετα, δεν έχουν ακόμη καθιερωθεί ή δεν έχουν γίνει ευρέως αποδεκτές τιμές αναφοράς για τη διάκριση μεταξύ των δύο ομάδων. Για παράδειγμα, στη μελέτη των Sergerie *et al.*, που έθεσε το 20% ως όριο στην κυτταρομετρική μέθοδο TUNEL για τη διάκριση μεταξύ γόνιμων και υπογόνιμων ανδρών, με εναισθησία 96,9% και ειδικότητα 89,4% οι υψηλότερες τιμές κατακερματισμού του DNA των σπερματοζωαρίων στην ομάδα των γόνιμων ήταν 43,8%, ενώ η χαμηλότερη τιμή στην ομάδα των υπογόνιμων ήταν 14,6% (55).

Η κιρσοκήλη θεωρείται η πιο συχνή από τις γνωστές αιτίες της ανδρικής υπογονιμότητας. Έχουν αναφερθεί σημαντικά υψηλότερα επίπεδα κατακερματισμού του DNA, όπως προσδιορίστηκαν με ποικίλες τεχνικές, σε άνδρες με κιρσοκήλη ακόμα και με φυσιολογικές παραμέτρους σπερμοδιαγράμματος, σε σύγκριση τόσο με γόνιμους άνδρες (57, 58), όσο και με δότες με φυσιολογικές παραμέτρους σπερμοδιαγράμματος (59-61). Οι μελέτες επίσης έδειξαν συσχέτιση μεταξύ της βλάβης του DNA των σπερματοζωαρίων και της οξειδωτικής βλάβης που προκαλείται από υπέρμετρη παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου (60, 61). Σε εφήβους με κιρσοκήλη βρέθηκε υψηλότερο ποσοστό σπερματοζωαρίων με κατακερματισμό

του DNA σε σχέση με υγή ομάδα ελέγχου της ίδιας ηλικίας, παρότι δεν παρατηρήθηκε καμία διαφοροποίηση στις κλασικές παραμέτρους του σπερμοδιαγράμματος (63). Καμία συσχέτιση δε βρέθηκε μεταξύ του βαθμού της κιρσοκήλης και του βαθμού κατακερματισμού του DNA (63). Το αποτέλεσμα της επέμβασης διόρθωσης της κιρσοκήλης στον κατακερματισμό του DNA διερευνήθηκε από μία μελέτη (64). Οι ερευνητές παρατήρησαν στατιστικά σημαντική ελάττωση στο ποσοστό σπερματοζωαρίων με κατακερματισμό μετεγχειρητικά (27,7% έναντι 24,6%, $p < 0,05$), χωρίς σημαντική βελτίωση στις κλασικές παραμέτρους του σπερμοδιαγράμματος. Αν και στατιστικά σημαντική, η ελάττωση αυτή δεν είναι επαρκής για να θεωρηθεί κλινικά αξιόλογη. Άλλωστε, θα μπορούσε να αποδοθεί σε τυχαίες διακυμάνσεις της παραμέτρου μέσα στο χρόνο, καθώς δεν υπήρχε ομάδα ελέγχου.

Φαίνεται πως υπάρχει συσχέτιση, αν και ασθενής, μεταξύ των κλασικών παραμέτρων του σπερμοδιαγράμματος και του βαθμού κατακερματισμού του DNA. Σε μερικές μελέτες, δε βρέθηκε καμία συσχέτιση, οδηγώντας έτσι στην υπόθεση ότι ο κατακερματισμός του DNA των σπερματοζωαρίων θα μπορούσε να είναι ένας ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας της ανδρικής γονιμότητας. Έχει αναφερθεί αρνητική συσχέτιση ανάμεσα στο βαθμό κατακερματισμού του DNA και στον αριθμό των σπερματοζωαρίων (52-53, 60, 65-67), την κινητικότητα (24, 53, 60, 65-67), τη μορφολογία (24, 52-53, 60, 65, 67) και, ιδιαίτερα, τη μορφολογία της κεφαλής (68). Επιπλέον, έχει βρεθεί αρνητική συσχέτιση με τον αριθμό των συνολικά κινούμενων σπερματοζωαρίων, όπως αυτός υπολογίστηκε με αυτόματους αναλυτές (Computer Assisted Semen Analysis - CASA), καθώς και θετική συσχέτιση με την προχωρημένη ηλικία του άνδρα και τη διάρκεια της αποχής (69). Σημαντικές συσχετίσεις βρέθηκαν, ακόμη, ανάμεσα στο ποσοστό φυσιολογικών μορφολογικά σπερματοζωαρίων και το ποσοστό του HDS (70). Σε αντίθεση με την αρνητική συσχέτιση που συνήθως ανευρίσκεται μεταξύ του κατακερματισμού του DNA και του αριθμού των σπερματοζωαρίων, σε μια μελέτη των Shen *et al.* βρέθηκε θετική συσχέτιση, που ενισχύει τη θεωρία της αποτυχημένης απόπτωσης αναφορικά με την αιτιολογία του κατακερματισμού του DNA (24). Συμπερασματικά, ο κατακερματισμός του DNA των σπερματοζωαρίων και οι κλασικές παράμετροι του σπερμοδιαγράμματος είναι μάλλον συμπληρωματικοί παράγοντες παρά αυστηρά συσχετιζόμενοι. Αυτό ίσως φαίνεται και από το απροσδόκητο εύρημα ότι ένας άνδρας με στρογγυλοκεφαλία (globozoospermia), δηλαδή με παρουσία σπερματοζωαρίων με στρογγυλές κεφαλές σε ποσοστό 100%, αναφέρθηκε να έχει κατακερματισμό DNA σε επίπεδο γόνιμου άνδρα (71).

Στην κυτταρομετρία ροής με τη χρωστική «πορτοκαλί της ακριδίνης» έχει αναφερθεί αρκετές φορές DFI με διακύμανση μικρότερη του 10% μεταξύ των μετρήσεων (within-donor coefficient of variation - CV) (1, 53), ενισχύοντας έτσι την άποψη ότι ο κατακερματισμός του DNA παρουσιάζει μικρότερη διακύμανση στο χρόνο στον ίδιο άνδρα σε σχέση με τις παραμέτρους του σπερμοδιαγράμματος. Ωστόσο, σε μια πρόσφατη μελέτη, ο μέσος CV ήταν 29% για επανελημμένες μετρήσεις, καταρρίπτοντας έτσι τον παραπάνω ισχυρισμό (72). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι το 37% των ανδρών με DFI > 30% κατά την πρώτη μέτρηση είχε DFI < 30% κατά τη δεύτερη, ενώ το 27% των ανδρών με DFI μεταξύ 21 και 30% κατά την πρώτη μέτρηση είχε DFI > 30% κατά τη δεύτερη (72).

Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι τιμές κατακερματισμού του DNA που προσδιορίζονται με διαφορετικές τεχνικές δεν μπορούν να συγκριθούν. Επίσης, δεν μπορούν να συγκριθούν τιμές που λαμβάνονται από διαφορετικά εργαστήρια ακόμη κι αν χρησιμοποιούν την ίδια τεχνική, καθώς πολλοί εργαστηριακοί παράγοντες και διαφοροποιήσεις στο πρωτόκολλο εφαρμογής μπορούν να επηρεάσουν σημαντικά τα αποτελέσματα (73).

6.3. Μέθοδοι υποβοηθούμενης αναπαραγωγής

Η διάγνωση της αιτίας της υπογονιμότητας αποτελεί το πρώτο βήμα στην αντιμετώπιση του υπογόνιου ζευγαριού. Ο απότερος στόχος είναι η γέννηση ενός υγιούς παιδιού. Η πρόσφατη ταχεία εξέλιξη των μεθόδων υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (Assisted Reproduction Techniques - ART) επιβάλλει την ανεύρεση νέων, πιο ισχυρών προγνωστικών παραγόντων με σκοπό την επιλογή της καταλληλότερης μεθόδου σε κάθε περίπτωση και την πρόβλεψη του αποτελέσματος με όσο το δυνατόν μεγαλύτερη ακρίβεια.

6.3.1. Ενδομήτρια Σπερματέγχυση

Η ενδομήτρια σπερματέγχυση (Intra-Uterine Insemination - IUI) είναι η λιγότερο παρεμβατική μέθοδος και, ως εκ τούτου, μία από τις πρώτες επιλογή σε περιπτώσεις ήπιας υπογονιμότητας οφειλόμενης στον άνδρα. Υψηλά επίπεδα κατακερματισμού του DNA των σπερματοζωαρίων έχουν γενικά σχετιστεί με χαμηλότερα ποσοστά κυήσεων και γεννήσεων με IUI (62, 74-76). Μελέτες που χρησιμοποίησαν είτε τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής με τη χρωστική «πορτοκαλί της ακριδίνης» είτε τη μέθοδο TUNEL έδειξαν ότι ο βαθμός του κατακερματισμού του DNA ήταν σημαντικά μικρότερος σε δείγμα-

τα που οδήγησαν σε κύηση σε σχέση με εκείνα που δεν οδήγησαν (62, 76). Επιπλέον, για κατακερματισμό του DNA μεγαλύτερο από 12%, όπως προσδιορίστηκε με τη μέθοδο TUNEL, δεν επιτεύχθηκαν κυήσεις, ενώ η παρουσία υψηλότερων επιπέδων βλαβών του DNA των σπερματοζωαρίων σχετίστηκε με αποβολές (76). Σύμφωνα με τη μεθοδολογικά ορθότερη μελέτη, η πιθανότητα κύησης και γέννησης ήταν σημαντικά υψηλότερη στην ομάδα με $DFI \leq 27\%$ και $HDS \leq 10\%$, σε σύγκριση με την ομάδα που είχε $DFI > 27\%$ ή $HDS > 10\%$, προσδιορίζόμενα με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής με τη χρωστική «πορτοκαλί της ακριδίνης» (74). Εντούτοις, συγκρίνοντας τις ομάδες με και χωρίς βιοχημική κύηση, κλινική κύηση ή γέννηση, δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές όσον αφορά το DFI (74). Ο λόγος πιθανοτήτων στην ομάδα με $DFI \leq 27\%$ και $HDS \leq 10\%$ ήταν 12 για βιοχημική κύηση, 9,9 για κλινική κύηση και 8,7 για γέννηση. Η συγκεκριμένη μελέτη επεκτάθηκε αργότερα χρησιμοποιώντας τον ουδό του 30% για το DFI, δίνοντας παρόμοια αποτελέσματα (75).

Σύμφωνα με την παραπάνω μελέτη, για ποσοστό κλινικών κυήσεων 20% η θετική προγνωστική αξία (Positive Predictive Value - PPV) ήταν 97% και η αρνητική προγνωστική τιμή (Negative Predictive Value - NPV) 24%. Αυτό σημαίνει ότι η πιθανότητα κύησης θα ήταν 3% σε περίπτωση παθολογικού DFI και 24% σε περίπτωση φυσιολογικού DFI. Αυτή η διαφορά οδηγεί στο συμπέρασμα ότι σε ζευγάρια με υψηλά επίπεδα κατακερματισμού του DNA των σπερματοζωαρίων είναι προτιμότερο να εφαρμοστεί η εξωσωματική γονιμοποίηση (IVF) ή η ενδωαριακή έγχυση σπερματοζωαρίων (ICSI) παρά η σπερματέγχυση (IUI) (48). Ωστόσο, η εναισθησία της μεθόδου ήταν μόνο 20,7% (δηλαδή, αποτυχία να προβλεφθεί η επίτευξη κύησης στο 80% των περιπτώσεων), περιορίζοντας σημαντικά την κλινική της σημασία.

6.3.2. Εξωσωματική Γονιμοποίηση και Ενδωαριακή Έγχυση Σπερματοζωαρίων

Η κλασική IVF είναι μια πιο παρεμβατική μέθοδος και η ICSI ο τελικός τρόπος αντιμετώπισης σοβαρών περιπτώσεων ανδρικής υπογονιμότητας. Έως πρόσφατα, οι κλασικές παράμετροι του σπερμοδιαγράμματος έχουν δώσει απογοητευτικά αποτελέσματα, όσον αφορά στην πρόβλεψη του αποτελέσματος της IVF (29). Κατά τα τελευταία έτη, ο κατακερματισμός του DNA των σπερματοζωαρίων προωθείται διεθνώς ως ένας πολλά υποσχόμενος εναλλακτικός προγνωστικός παράγοντας.

Πολυάριθμες μελέτες έχουν διερευνήσει τη σχέση μεταξύ του κατακερματισμού του DNA των σπερματοζωαρίων και της πιθανότητας κύησης μετά από κλασική IVF και ICSI, με

αντικρουνόμενα αποτελέσματα. Σε γενικές γραμμές, οι παλαιότερες μελέτες ήταν πιο αισιόδοξες σχετικά με την αξία του κατακερματισμού του DNA. Στην αρχή υποστηρίχθηκε ότι είναι απίθανο να επιτευχθεί κύηση με υψηλό επίπεδο κατακερματισμού του DNA των σπερματοζωαρίων και προτάθηκαν όρια πάνω από τα οποία δεν μπορούσε να υπάρξει κύηση (52-53, 77). Τιμές DFI μεγαλύτερες από 27%, προσδιορίζόμενες με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής με τη χρωστική «πορτοκαλί της ακριδίνης», θεωρήθηκαν ασύμβατες με την επίτευξη κύησης (77). Πιο πρόσφατες μελέτες, ωστόσο, απέτυχαν να επιβεβαιώσουν αυτά τα ευρήματα, πετυχαίνοντας κυήσεις με IVF ή / και ICSI με τιμές DFI αρκετά μεγαλύτερες από 27% (66, 68, 74-75, 78).

Υψηλά επίπεδα κατακερματισμού του DNA έχουν σχετιστεί με χαμηλότερα ποσοστά κύησης μετά από κλασική IVF και ICSI (79-81). Ωστόσο, οι περισσότερες μελέτες υποστηρίζουν ότι υπάρχει συσχέτιση των επίπεδων του κατακερματισμού του DNA των σπερματοζωαρίων με το ποσοστό γονιμοποίησης, ιδιαίτερα στην κλασική IVF, αλλά όχι με το ποσοστό κύησης ή γέννησης (65-66, 68, 74, 78, 82-83). Στη μελέτη των Payne *et al.* (66) εξάλλου, υπήρξε το απροσδόκητο εύρημα ότι άνδρες με χαμηλό ποσοστό κατακερματισμού ($DFI \leq 9\%$) ήταν λιγότερο πιθανό να πετύχουν κύηση. Προκειμένου να επιλεγεί η καταλληλότερη μέθοδος σε κάθε περίπτωση, έχει διατυπωθεί η υπόθεση ότι η ακεραιότητα του DNA των σπερματοζωαρίων έχει ιδιαίτερη σημασία όταν η γονιμοποίηση πραγματοποιείται κάτω από πιο φυσιολογικές συνθήκες, όπως η κλασική IVF (78). Πράγματι, δε βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων της ICSI και της IVF για $DFI \leq 27\%$ (68, 74) ή $\leq 30\%$ (75). Ωστόσο, στην ομάδα με $DFI > 27\%$ ή $> 30\%$, τα αποτελέσματα της ICSI ήταν σαφώς ανώτερα από αυτά της κλασικής IVF. Προτάθηκε ότι το $DFI > 27\%$ έχει μεγάλη ειδικότητα αναφορικά με τη μη επίτευξη κλινικής κύησης στην κλασική IVF, που προσεγγίζει το 97% (68). Επομένως, σε περιπτώσεις υψηλού ποσοστού κατακερματισμού του DNA, η ICSI θα πρέπει να θεωρείται η μέθοδος εκλογής.

Μια πρόσφατη συστηματική ανασκόπηση και μετα-ανάλυση ήταν ιδιαίτερα αποκαλυπτική για το κατά πόσο η τιμή του κατακερματισμού του DNA μπορεί να προβλέψει το αποτέλεσμα της IVF και της ICSI. Στην ανάλυση συμπεριλήφθηκαν δεκατρείς μελέτες, που περιείχαν 18 εκτιμήσεις των προγνωστικής αξίας της ακεραιότητας του DNA (84). Σε εννέα μελέτες χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της κυτταρομετρίας ροής με τη χρωστική «πορτοκαλί της ακριδίνης» και σε τέσσερις η μέθοδος TUNEL. Όλες οι μελέτες είχαν ως τελικό καταληκτικό σημείο την επίτευξη «κύησης», αν και ο ακριβής ορισμός

περιελάμβανε από τη βιοχημική κύηση μέχρι τη γέννηση. Ο διαγνωστικός λόγος πιθανοτήτων (Diagnostic Odds Ratio - DOR) (δηλαδή η πιθανότητα παθολογικού αποτελέσματος σε περίπτωση μη κύησης προς την πιθανότητα παθολογικού αποτελέσματος σε περίπτωση κύησης) κυμαίνοταν στις διάφορες μελέτες από 0,44 έως 10,1 και μόνο σε τέσσερις από τις 18 ήταν στατιστικά σημαντικός. Γενικά, ο κατακερματισμός του DNA των σπερματοζωαρίων βρέθηκε να σχετίζεται στατιστικά σημαντικά, αν και ασθενώς, με την κύηση (DOR 1,44, 95% διάστημα εμπιστοσύνης 1,03 – 2,03). Αυτή η ασθενής συσχέτιση δεν μπορεί να θεωρηθεί κλινικά σημαντική και επαρκής για τη διάκριση μεταξύ των ζευγαριών που θα επιτύχουν και εκείνων που δε θα επιτύχουν κύηση. Καμία από τις μεθόδους κυτταρομετρία ροής με τη χρωστική «πορτοκαλί της ακριδίνης» και TUNEL δεν ήταν περισσότερο προγνωστική ως προς την επίτευξη κύησης. Επιπλέον, παρά το ότι παρατηρήθηκε μια τάση για υψηλότερο DOR στην IVF σε σχέση με την ICSI, η διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Επομένως, δεν υπάρχουν επαρκείς ενδείξεις για την καθιέρωση του κατακερματισμού του DNA ως προγνωστικού παράγοντα για την επίτευξη κύησης μετά από IVF και ICSI.

Αυτές οι παρατηρήσεις έρχονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα άλλων ερευνητών που δείχνουν στατιστικά σημαντική, αν και ασθενή, συσχέτιση μεταξύ του κατακερματισμού του DNA των σπερματοζωαρίων και του ποσοστού κύησης μετά από IVF (συνδυασμένος λόγος πιθανοτήτων 1,57, 95% διάστημα εμπιστοσύνης 1,18 – 2,07, $p < 0,05$) και καμία συσχέτιση μεταξύ κατακερματισμού και ποσοστού κύησης μετά από ICSI (συνδυασμένος λόγος πιθανοτήτων 1,14, 95% διάστημα εμπιστοσύνης 0,86 – 1,54, $p = 0,65$) (48).

Αρκετές μελέτες αναφέρουν αυξημένο κίνδυνο αυτόματων αποβολών σε περιπτώσεις υψηλού επιπέδου κατακερματισμού του DNA (53, 65, 81, 85). Άλλες, όμως, δεν επιβεβαιώνουν αυτήν την παρατήρηση (75, 83). Μια μετα-ανάλυση επτά μελετών έδειξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ του κατακερματισμού του DNA και του ποσοστού αποβολών μετά από IVF και ICSI (συνδυασμένος λόγος πιθανοτήτων 2,48, 95% διάστημα εμπιστοσύνης 1,52 – 4,04, $p < 0,001$) (48). Δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά αναφορικά με τη μέθοδο που εφαρμόσθηκε (IVF ή ICSI). Για ποσοστό αποβολών 18%, η μέση PPV υπολογίστηκε στο 37% και η NPV στο 90%, που σημαίνει ότι σε περίπτωση υψηλού επιπέδου κατακερματισμού του DNA το ποσοστό αποβολής εκτιμάται σε 37%, ενώ σε περίπτωση φυσιολογικού επιπέδου σε 10%. Ωστόσο, εξαιτίας της μικρής ευαισθησίας, της τάξης του 40%, τα επίπεδα του κατακερματισμού του DNA δεν θα μπορούσαν να προβλέψουν το 60% των περιπτώσεων αποβολών. Από την άλλη

πλευρά, με την PPV να είναι 37%, το 63% των ζευγαριών με υψηλά επίπεδα κατακερματισμού του DNA θα είχε μία μια επιτυχή τελειόμηνη κύηση.

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι στις περισσότερες μελέτες και για όλες τις μεθόδους υποβοηθούμενης αναπαραγωγής η μέτρηση του κατακερματισμού του DNA πραγματοποιήθηκε στο ίδιο δείγμα σπέρματος που χρησιμοποιήθηκε και για τη γονιμοποίηση, σε μια στιγμή δηλαδή όπου όλες οι αποφάσεις είχαν ήδη ληφθεί. Θα ήταν περισσότερο χρήσιμο να μελετηθεί ο κατακερματισμός του DNA σε προγενέστερο δείγμα. Στην περίπτωση αυτή θα είχε ληφθεί υπόψη η διακύμανση μέσα στο χρόνο της τιμής του κατακερματισμού του DNA των σπερματοζωαρίων. Επιπλέον, παρότι ένας μικρός αριθμός *in vitro* ή πτωχών μεθοδολογικά μελετών υποστηρίζει ότι η χορήγηση αντιοξειδωτικών παραγόντων έχει θετικό αποτέλεσμα στον κατακερματισμό του DNA (86-88), δεν υπάρχουν αποδεδειγμένες θεραπείες για την ελάττωση του κατακερματισμού και την πιθανή βελτίωση των αποτελεσμάτων των μεθόδων υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Τέλος, όλες οι μέθοδοι υποβοηθούμενης αναπαραγωγής και ιδιαίτερα η ICSI υπερπρηδούν ορισμένα από τα εμπόδια της φυσικής επιλογής, τα οποία αποτρέπουν τη γονιμοποίηση και την κύηση σε περίπτωση πολύ ελαττωματικών σπερματοζωαρίων. Οι συνέπειες της εφαρμογής αυτών των μεθόδων στους απογόνους, ιδιαίτερα μακροπρόθεσμα, είναι ακόμα άγνωστες. Τα παιδιά ανδρών με αυξημένα επίπεδα κατακερματισμού του DNA θα πρέπει να παρακολουθούνται, με σκοπό να καθορισθεί η επίπτωση της βλάβης του σπερματικού DNA στη γονιμότητά τους (30), στην εμφάνιση καρκίνου της παιδικής ηλικίας (30, 89) και στην εμφάνιση νοσημάτων που σχετίζονται με το γενετικό αποτύπωμα (*imprinting diseases*) (89, 90). Μέχρι σήμερα, έχει όντως αναφερθεί αυξημένος κίνδυνος συγγενών ανωμαλιών μετά από ICSI (91), αλλά οι συγκεκριμένες επιπτώσεις του αυξημένου επιπέδου κατακερματισμού του DNA παραμένουν ακόμα ασαφείς.

7. Συμπεράσματα

Η πρόσφατη εισαγωγή στην κλινική πράξη του προσδιορισμού του κατακερματισμού του DNA των σπερματοζωαρίων καθιστά τον τελευταίο μία από τις πλέον σύγχρονες παραμέτρους στη διαγνωστική προσέγγιση του υπογόνιμου άνδρα αλλά και πιθανό προγνωστικό παράγοντα του αποτελέσματος των μεθόδων υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Αδιαμφισβήτητα, υπάρχουν ακόμη αρκετές επιφυλάξεις αναφορικά τόσο με τη χρησιμότητά του ως προγνωστικού παράγοντα γονιμότητας, όσο και με το τι ακριβώς προσδιορίζει. Σε κάθε περίπτωση, οι βιβλιογραφικές αναφορές συγκλίνουν στο ότι ο

κατακερματισμός του DNA αποτελεί σημαντική εξέταση η οποία, σε συνδυασμό με την κλινική εξέταση, το σπερμοδιαγράμμα και τον ορμονικό έλεγχο, συμπληρώνει τη διαγνωστική προσέγγιση του υπογόνιου άνδρα. Οι πιθανές ενδείξεις εφαρμογής της περιλαμβάνουν:

1. την εδραίωση της διάγνωσης του αιτίου της υπογονιμότητας, που αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την επιλογή του καταλληλότερου τρόπου αντιμετώπισης. Ως παράδειγμα, στην περίπτωση της κιρσοκήλης είναι χρήσιμη για τον προσδιορισμό της βαρύτητας της βλάβης.
2. την παρακολούθηση της θεραπείας. Η βελτίωση του ποσοστού κατακερματισμού του DNA των σπερματοζωαρίων αποτελεί ένδειξη επιτυχίας της θεραπευτικής αντιμετώπισης. Προς την κατεύθυνση αυτή, θα ήταν χρήσιμο να διαζαχθούν περισσότερες μελέτες, σχετικά με την επίδραση μιας θεραπευτικής παρέμβασης, όπως η χειρουργική αποκατάσταση της κιρσοκήλης ή η χορήγηση αντιοξειδωτικών παραγόντων, στον κατακερματισμό του DNA.
3. την επιλογή μεταξύ IUI, κλασικής IVF και ICSI. Σε περιπτώσεις χαμηλού ποσοστού κατακερματισμού του DNA, σε συνδυασμό πάντοτε με τις παραμέτρους του σπερμοδιαγράμματος, είναι σκόπιμο να επιλεγούν λιγότερο παρεμβατικές μέθοδοι, όπως η IUI ή η IVF. Αντίθετα, η ICSI φαίνεται ως θεραπεία επιλογής σε περιπτώσεις υψηλού ποσοστού κατακερματισμού. Σε περιπτώσεις όπου οι παράμετροι του σπερμοδιαγράμματος είναι οριακές και η υπογονιμότητα θεωρείται ως επί το πλείστον ανεξήγητη, ο κατακερματισμός του DNA θα μπορούσε να αποτελεί μία πιθανή αιτία και να οδηγήσει σε περισσότερο παρεμβατικές μεθόδους αντιμετώπισης.
4. επιδημιολογικές μελέτες. Στη σημερινή εποχή των δυσμενών κλιματικών και οικολογικών μεταβολών, ο προσδιορισμός του κατακερματισμού του DNA σε μελέτες σχετικές με την επίδραση της ρύπανσης του περιβάλλοντος, της διατροφής και, γενικά, του τρόπου ζωής φαίνεται εξαιρετικά σημαντικός. Άλλωστε, τα σπερματοζωάρια αποτελούν κύτταρα του σώματος στα οποία έχουμε ένκολη πρόσβαση, με το επιπρόσθετο χαρακτηριστικό ότι η βλάβη του DNA τους ενέχει τον κίνδυνο δυσμενών επιδράσεων, όχι μόνο για τους άμεσους απογόνους, αλλά και για τις μέλλουσες γενεές.

Μεγάλη επιστημονική πρόκληση για το άμεσο μέλλον αποτελεί ο προσδιορισμός του κατακερματισμού του DNA στα ίδια τα σπερματοζωάρια που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν για ICSI και, μάλιστα, σε συγκεκριμένες θέσεις του γονιδιώματος. Προς το παρόν, παρά τις διαφοροποιήσεις στα πρωτόκολλα μεταξύ των εργαστηρίων και την έλλειψη κοινά απο-

δεκτών τιμών αναφοράς, η αξιολόγηση του κατακερματισμού του DNA μπορεί να εφαρμόζεται ως συμπληρωματική εξέταση, σε επιλεγμένα περιστατικά ανδρικής υπογονιμότητας.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **Evanson DP, Larson KL, Jost LK**, 2002 Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J Androl* 23: 25-43.
2. **Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ**, 1997 Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389: 251-60.
3. **Andrabi SM**, 2007 Mammalian sperm chromatin structure and assessment of DNA fragmentation. *J Assist Reprod Genet* 24: 561-9.
4. **Ward WS, Coffey DS**, 1991 DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. *Biol Reprod* 44: 569-74.
5. **Pogany GC, Corzett M, Weston S, Balhorn R**, 1981 DNA and protein content of mouse sperm. Implications regarding sperm chromatin structure. *Exp Cell Res* 136: 127-36.
6. **Dadoune JP**, 2003 Expression of mammalian spermatozoal nucleoproteins. *Micros Res Tech* 61: 56-75.
7. **Green GR, Balhorn R, Poccia DL, Hecht NB**, 1994 Synthesis and processing of mammalian protamines and transition proteins. *Mol Reprod Dev* 37: 255-63.
8. **Tanphaichitr N, Sobhon P, Taluppeth N, Chalermisarachai P**, 1978 Basic nuclear proteins in testicular cells and ejaculated spermatozoa in man. *Exp Cell Res* 117: 347-56.
9. **Loir M, Lanneau M**, 1984 Structural function of the basic nuclear proteins in ram spermatids. *J Ultrastruct Res* 86: 262-72.
10. **Nelson WG, Pienta KJ, Barrack ER, Coffey DS**, 1986 The role of the nuclear matrix in the organization and function of DNA. *Annu Rev Biophys Biophys Chem* 15: 457-75.
11. **Ward WS, Partin AW, Coffey DS**, 1989 DNA loop domains in mammalian spermatozoa. *Chromosoma* 98: 153-9.
12. **Rousseaux S, Caron C, Govin J, Lestrat C, Faure AK, Khochbin S**, 2005 Establishment of male-specific epigenetic information. *Gene* 345: 139-53.
13. **Ahmadi A, Ng SC**, 1999 Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa. *J Exp Zool* 284: 696-704.
14. **Bannister LA, Schimenti JC**, 2004 Homologous recombinational repair proteins in mouse meiosis. *Cytogenet Genome Res* 107: 191-200.
15. **McPherson SM, Longo FJ**, 1993 Nicking of rat spermatid and spermatozoa DNA: possible involvement of DNA topoisomerase II. *Dev Biol* 158: 122-30.
16. **Muriel L, Segrelles E, Goyanes V, Gosálvez J, Fernandez JL**, 2004 Structure of human sperm DNA and background damage, analysed by *in situ* enzymatic treatment and digital image analysis. *Mol Hum Reprod* 10: 203-9.
17. **Fernandez JL, Goyanes VJ, Ramiro-Diaz J, Gosálvez J**, 1998 Application of FISH for *in situ* detection and quantification of DNA breakage. *Cytogenet Cell Genet* 82: 251-6.
18. **de YL, Ballesca JL, Vanrell JA, 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: 755-9.
19. **Sakkas D, Mariethoz E, St John JC**, 1999 Abnormal sperm parameters in humans are indicative of an abortive apoptotic mechanism linked to the Fas-mediated pathway. *Exp Cell Res* 251: 350-5.
20. **Rodriguez I, Ody C, Araki K, Garcia I, Vassalli P**, 1997 An early and massive wave of germinal cell apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis. *EMBO J* 16: 2262-70.

21. Woolveridge I, Morris ID, 2000 Apoptosis in male reproductive toxicology. In: Roberts R, editor. *Apoptosis in toxicology*. New York/London: Taylor and Francis, p 72-87.
22. 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: 1169-78.
23. Kim JM, Ghosh SR, Weil AC, Zirkin BR, 2001 Caspase-3 and caspase-activated deoxyribonuclease are associated with testicular germ cell apoptosis resulting from reduced intratesticular testosterone. *Endocrinology* 142: 3809-16.
24. Shen HM, Dai J, Chia SE, Lim A, Ong CN, 2002 Detection of apoptotic alterations in sperm in subfertile patients and their correlations with sperm quality. *Hum Reprod* 17: 1266-73.
25. Francavilla S, D'Abizio P, Rucci N, Silvano G, Properzi G, Straface E, Cordeschi G, Necozione S, Gnessi L, Arizzi M, Ulisse S, 2000 Fas and Fas ligand expression in fetal and adult human testis with normal or deranged spermatogenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 2692-700.
26. Bize I, Santander G, Cabello P, Driscoll D, Sharpe C, 1991 Hydrogen peroxide is involved in hamster sperm capacitation in vitro. *Biol Reprod* 44: 398-403.
27. Aitken RJ, Clarkson JS, Fishel S, 1989 Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. *Biol Reprod* 41: 183-97.
28. Aitken RJ, Buckingham D, West K, Wu FC, Zikopoulos K, Richardson DW, 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: 451-62.
29. Agarwal A, Said TM, 2003 Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Hum Reprod Update* 9: 331-45.
30. Aitken RJ, Krausz C, 2001 Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction* 122: 497-506.
31. Kunzle R, Mueller MD, Hanggi W, Birkhauser MH, Drescher H, Bersinger NA, 2003 Semen quality of male smokers and nonsmokers in infertile couples. *Fertil Steril* 79: 287-91.
32. Sofikitis N, Miyagawa I, Dimitriadis D, Zavos P, Sikka S, Hellstrom W, 1995 Effects of smoking on testicular function, semen quality and sperm fertilizing capacity. *J Urol* 154: 1030-4.
33. Potts RJ, Newbury CJ, Smith G, Notarianni LJ, Jefferies TM, 1999 Sperm chromatin damage associated with male smoking. *Mutat Res* 423: 103-11.
34. Fraga CG, Motchnik PA, Wyrobek AJ, Rempel DM, Ames BN, 1996 Smoking and low antioxidant levels increase oxidative damage to sperm DNA. *Mutat Res* 351: 199-203.
35. Alvarez JG, Sharma RK, Ollero M, Saleh RA, Lopez MC, Thomas AJ, Jr., Evenson DP, Agarwal A, 2002 Increased DNA damage in sperm from leukocytospermic semen samples as determined by the sperm chromatin structure assay. *Fertil Steril* 78: 319-29.
36. Comhaire FH, Mahmoud AM, Depuydt CE, Zalata AA, Christophe AB, 1999 Mechanisms and effects of male genital tract infection on sperm quality and fertilizing potential: the andrologist's viewpoint. *Hum Reprod Update* 5: 393-8.
37. Cohen PE, Pollard JW, 1995 Cytokines and growth factors in reproduction. In: Bronson R, editor. *Reproductive Immunology*. Cambridge, MA: Blackwell Science.
38. Evenson DP, Jost LK, 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: 739-46.
39. O'Flaherty C, Vaisheva F, Hales BF, Chan P, Robaire B, 2008 Characterization of sperm chromatin quality in testicular cancer and Hodgkin's lymphoma patients prior to chemotherapy. *Hum Reprod* 23: 1044-52.
40. Fossa SD, De AP, Kragerud SM, Evenson D, Theodorsen L, Clausen OP, 1997 Prediction of posttreatment spermatogenesis in patients with testicular cancer by flow cytometric sperm chromatin structure assay. *Cytometry* 30: 192-6.
41. Kalthur G, Adiga SK, Upadhye D, Rao S, Kumar P, 2008 Effect of cryopreservation on sperm DNA integrity in patients with teratospermia. *Fertil Steril* 89: 1723-7.
42. Sailer BL, Sarkar LJ, Bjordahl JA, Jost LK, Evenson DP, 1997 Effects of heat stress on mouse testicular cells and sperm chromatin structure. *J Androl* 18: 294-301.
43. Xing W, Krishnamurthy H, Sairam MR, 2003 Role of follitropin receptor signaling in nuclear protein transitions and chromatin condensation during spermatogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 312: 697-701.
44. Rubes J, Selevan SG, Evenson DP, Zudova D, Vozdova M, Zudova Z, Robbins WA, Perreault SD, 2005 Episodic air pollution is associated with increased DNA fragmentation in human sperm without other changes in semen quality. *Hum Reprod* 20: 2776-83.
45. Gorczyca W, Gong J, Darzynkiewicz Z, 1993 Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays. *Cancer Res* 53: 1945-51.
46. Klaude M, Eriksson S, Nygren J, Ahnstrom G, 1996 The comet assay: mechanisms and technical considerations. *Mutat Res* 363: 89-96.
47. Erenpreiss J, Spano M, Erenpreisa J, Bungum M, Giwercman A, 2006 Sperm chromatin structure and male fertility: biological and clinical aspects. *Asian J Androl* 8: 11-29.
48. Zini A, Sigman M, 2009 Are tests of sperm DNA damage clinically useful? Pros and cons. *J Androl* 30: 219-29.
49. Tejada RI, Mitchell JC, Norman A, Marik JJ, Friedman S, 1984 A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence. *Fertil Steril* 42: 87-91.
50. Fernandez JL, Muriel L, Rivero MT, Goyanes V, Vazquez R, Alvarez JG, 2003 The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *J Androl* 24: 59-66.
51. Chohan KR, Griffin JT, Lafromboise M, De Jonge CJ, Carrell DT, 2006 Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm. *J Androl* 27: 53-9.
52. Spano M, Bonde JP, Hjollund HI, Kolstad HA, Cordelli E, Leter G, 2000 Sperm chromatin damage impairs human fertility. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. *Fertil Steril* 73: 43-50.
53. Evenson DP, Jost LK, Marshall D, Zinaman MJ, Clegg E, Purvis K, de AP, Claussen OP, 1999 Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod* 14: 1039-49.
54. Evenson DP, Wixon R, 2008 Data analysis of two in vivo fertility studies using Sperm Chromatin Structure Assay-derived DNA fragmentation index vs. pregnancy outcome. *Fertil Steril* 90: 1229-31.
55. Sergerie M, Laforest G, Bujan L, Bissonnette F, Bleau G, 2005 Sperm DNA fragmentation: threshold value in male fertility. *Hum Reprod* 20: 3446-51.
56. Zini A, Bielecki R, Phang D, Zenzes MT, 2001 Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men. *Fertil Steril* 75: 674-7.
57. Enciso M, Muriel L, Fernandez JL, Goyanes V, Segrelles E, Marcos M, Montejo JM, Ardoi M, Pacheco A, Gosálvez J, 2006 Infertile men with varicocele show a high relative proportion of sperm cells with intense nuclear damage level, evidenced by the sperm chromatin dispersion test. *J Androl* 27: 106-11.
58. Saleh RA, Agarwal A, Sharma RK, Said TM, Sikka SC, Thomas AJ, Jr, 2003 Evaluation of nuclear DNA damage in spermatozoa from infertile men with varicocele. *Fertil Steril* 80: 1431-6.
59. Chen CH, Lee SS, Chen DC, Chien HH, Chen IC, Chu YN, Liu JY, Chen WH, Wu GJ, 2004 Apoptosis and kinematics of ejaculated spermatozoa in patients with varicocele. *J Androl* 25: 348-53.

- 60.** Smith R, Kaune H, Parodi D, Madariaga M, Rios R, Morales I, Castro A, 2006 Increased sperm DNA damage in patients with varicocele: relationship with seminal oxidative stress. *Hum Reprod* 21: 986-93.
- 61.** Wu GJ, Chang FW, Lee SS, Cheng YY, Chen CH, Chen IC, 2009 Apoptosis-related phenotype of ejaculated spermatozoa in patients with varicocele. *Fertil Steril* 91: 831-7.
- 62.** Saleh RA, Agarwal A, Nada EA, El-Tonsy MH, Sharma RK, Meyer A, Nelson DR, Thomas AJ, 2003 Negative effects of increased sperm DNA damage in relation to seminal oxidative stress in men with idiopathic and male factor infertility. *Fertil Steril* 79 Suppl 3: 1597-605.
- 63.** Bertolla RP, Cedenho AP, Hassun Filho PA, Lima SB, Ortiz V, Srougi M, 2006 Sperm nuclear DNA fragmentation in adolescents with varicocele. *Fertil Steril* 85: 625-8.
- 64.** Zini A, Blumenfeld A, Libman J, Willis J, 2005 Beneficial effect of microsurgical varicocelectomy on human sperm DNA integrity. *Hum Reprod* 20: 1018-21.
- 65.** Benchaib M, Lornage J, Mazoyer C, Lejeune H, Salle B, Francois GJ, 2007 Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as a prognostic indicator of assisted reproductive technology outcome. *Fertil Steril* 87: 93-100.
- 66.** Payne JF, Raburn DJ, Couchman GM, Price TM, Jamison MG, Walmer DK, 2005 Redefining the relationship between sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay and outcomes of assisted reproductive techniques. *Fertil Steril* 84: 356-64.
- 67.** Velez de la Calle JF, Muller A, Walschaerts M, Clavere JL, Jimenez C, Wittemer C, Thonneau P, 2008 Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as assessed by the sperm chromatin dispersion test in assisted reproductive technology programs: results of a large prospective multicenter study. *Fertil Steril* 90: 1792-9.
- 68.** Boe-Hansen GB, Fedder J, Ersboll AK, Christensen P, 2006 The sperm chromatin structure assay as a diagnostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod* 21: 1576-82.
- 69.** Cohen-Bacrie P, Belloc S, Menezo YJ, Clement P, Hamidi J, Benkhalfa M, 2009 Correlation between DNA damage and sperm parameters: a prospective study of 1,633 patients. *Fertil Steril* 91: 1801-5.
- 70.** Zini A, Phillips S, Courchesne A, Boman JM, Baazeem A, Bissonnette F, Kadoch J, San GM, 2009 Sperm head morphology is related to high deoxyribonucleic acid stainability assessed by sperm chromatin structure assay. *Fertil Steril* 91: 2495-500.
- 71.** Larson KL, Brannian JD, Singh NP, Burbach JA, Jost LK, Hansen KP, Kreger DO, Evenson DP, 2001 Chromatin structure in globozoospermia: a case report. *J Androl* 22: 424-31.
- 72.** Erenpreiss J, Bungum M, Spano M, Elzanaty S, Orbidan J, Giwercman A, 2006 Intra-individual variation in sperm chromatin structure assay parameters in men from infertile couples: clinical implications. *Hum Reprod* 21: 2061-4.
- 73.** Boe-Hansen GB, Ersboll AK, Christensen P, 2005 Variability and laboratory factors affecting the sperm chromatin structure assay in human semen. *J Androl* 26: 360-8.
- 74.** Bungum M, Humaidan P, Spano M, Jepson K, Bungum L, Giwercman A, 2004 The predictive value of sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters for the outcome of intrauterine insemination, IVF and ICSI. *Hum Reprod* 19: 1401-8.
- 75.** Bungum M, Humaidan P, Axmon A, Spano M, Bungum L, Erenpreiss J, Giwercman A, 2007 Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome. *Hum Reprod* 22: 174-9.
- 76.** Duran EH, Morshedi M, Taylor S, Oehninger S, 2002 Sperm DNA quality predicts intrauterine insemination outcome: a prospective cohort study. *Hum Reprod* 17: 3122-8.
- 77.** Larson KL, DeJonge CJ, Barnes AM, Jost LK, Evenson DP, 2000 Sperm chromatin structure assay parameters as predictors of failed pregnancy following assisted reproductive techniques. *Hum Reprod* 15: 1717-22.
- 78.** Gandini L, Lombardo F, Paoli D, Caruso F, Eleuteri P, Leter G, Ciriminna R, Culasso F, Dondero F, Lenzi A, Spano M, 2004 Full-term pregnancies achieved with ICSI despite high levels of sperm chromatin damage. *Hum Reprod* 19: 1409-17.
- 79.** Borini A, Tarozzi N, Bizzaro D, Bonu MA, Fava L, Flamigni C, Coticchio G, 2006 Sperm DNA fragmentation: paternal effect on early post-implantation embryo development in ART. *Hum Reprod* 21: 2876-81.
- 80.** Henkel R, Hajimohammad M, Stalf T, Hoogendijk C, Mehnert C, Menkveld R, Gips H, Schill WB, Kruger TF, 2004 Influence of deoxyribonucleic acid damage on fertilization and pregnancy. *Fertil Steril* 81: 965-72.
- 81.** Virro MR, Larson-Cook KL, Evenson DP, 2004 Sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters are related to fertilization, blastocyst development, and ongoing pregnancy in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertil Steril* 81: 1289-95.
- 82.** Huang CC, Lin DP, Tsao HM, Cheng TC, Liu CH, Lee MS, 2005 Sperm DNA fragmentation negatively correlates with velocity and fertilization rates but might not affect pregnancy rates. *Fertil Steril* 84: 130-40.
- 83.** Lin MH, Kuo-Kuang LR, Li SH, Lu CH, Sun FJ, Hwu YM, 2008 Sperm chromatin structure assay parameters are not related to fertilization rates, embryo quality, and pregnancy rates in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection, but might be related to spontaneous abortion rates. *Fertil Steril* 90: 352-9.
- 84.** Collins JA, Barnhart KT, Schlegel PN, 2008 Do sperm DNA integrity tests predict pregnancy with in vitro fertilization? *Fertil Steril* 89: 823-31.
- 85.** Carrell DT, Liu L, Peterson CM, Jones KP, Hatasaka HH, Erickson L, Campbell B, 2003 Sperm DNA fragmentation is increased in couples with unexplained recurrent pregnancy loss. *Arch Androl* 49: 49-55.
- 86.** Fraga CG, Motchnik PA, Shigenaga MK, Helbock HJ, Jacob RA, Ames BN, 1991 Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 11003-6.
- 87.** Greco E, Iacobelli M, Rienzi L, Ubaldi F, Ferrero S, Tesarik J, 2005 Reduction of the incidence of sperm DNA fragmentation by oral antioxidant treatment. *J Androl* 26: 349-53.
- 88.** Greco E, Romano S, Iacobelli M, Ferrero S, Baroni E, Minasi MG, Ubaldi F, Rienzi L, Tesarik J, 2005 ICSI in cases of sperm DNA damage: beneficial effect of oral antioxidant treatment. *Hum Reprod* 20: 2590-4.
- 89.** Ji BT, Shu XO, Linet MS, Zheng W, Wacholder S, Gao YT, Ying DM, Jin F, 1997 Paternal cigarette smoking and the risk of childhood cancer among offspring of nonsmoking mothers. *J Natl Cancer Inst* 89: 238-44.
- 90.** Cox GF, Burger J, Lip V, Mau UA, Sperling K, Wu BL, Horsthemke B, 2002 Intracytoplasmic sperm injection may increase the risk of imprinting defects. *Am J Hum Genet* 71: 162-4.
- 91.** Bonduelle M, Wennerholm UB, Loft A, Tarlatzis BC, Peters C, Henriot S, Mau C, Victorin-Cederquist A, Van SA, Balaska A, Emberson JR, Sutcliffe AG, 2005 A multi-centre cohort study of the physical health of 5-year-old children conceived after intracytoplasmic sperm injection, in vitro fertilization and natural conception. *Hum Reprod* 20: 413-9.

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 υπογοναδισμού όψιμης έναρξης παρατηρούνται και αρκετές ανωμαλίες στους όρχεις ενώ η παραγωγή ώριμων σπερματοζωαρίων 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 διείσδυσης στο ωοκύτταρο. Η χρησιμοποίηση τέτοιων σπερματοζωαρίων για γονιμοποίηση *in vitro* ή ICSI οδηγεί συνήθως σε αδυναμία αποσυμπύκνωσης του πυρήνα του σπερματοζωαρίου 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 αλλοιωσεις 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 επίτεδα $ROS > 0.0185 \times 10^6$ 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 σπερματοζώαρια. 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 διαπιστώνεται 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 σπερματοζώαρια νεαρών (4 μηνών) και γηραιών (21 μηνών) αρουραίων, που συλλέγονται από την κεφαλή και την ουρά της επιδιδυμίδας, διαπιστώνεται:

1. μειωμένη δραστηριότητα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GPX1, GPX4) και της δισμούντασης του υπεροξειδίου (SOD) στα σπερματοζώαρια 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 δισουλφοδιλικών δεσμών (ανάμεσα στις ομάδες SH δύο μορίων κυστεϊνης της ίδιας ή διαφορετικών πεπτιδικών αλυσίδων) στις πρωταμίνες (28). Λιγότεροι δισουλφοδιλικοί 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 σπερματοζώαρια των ηλικιωμένων πειραματοζώων (27)
3. αυξημένη παραγωγή των υπεροξειδίων του υδρογόνου (H_2O_2) και του αζώτου ($O_2^- N_2$)
4. Δραματική αύξηση της λιπιδικής υπεροξειδώσης στα σπερματοζώαρια των ηλικιωμένων αρουραίων. Πρόκειται για κυτταρική βλάβη, η οποία επάγεται από τα διαχέομενα υπεροξειδία με στόχο τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Συνήθως, αρχίζει με αφάρεση 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 ριζών, η οποία αν δεν σταματήσει, με κάποιο τρόπο, μπορεί να οδηγήσει στην καταστροφή του κυττάρου. Τα σπερματοζώαρια, σε αντίθεση προς άλλα κύτταρα, λόγω της ιδιαίτερης δομής τους είναι επιρρεπή 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 αφοραίων 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 επάγονται οι ρίζες OH- οδηγεί καταρχήν στο σχηματισμό 8-OH-γονανίνης και 8-OH-2'-δεσοξυγουανοσίνης ενώ στη συνέχεια γίνεται ο κερματισμός του μονόκλωνου DNA (9). Οι ίδιες ρίζες μπορούν να επάγονται και τον κερματισμό του δίκλωνου DNA με την ενεργοποίηση κασπασών και ενδονουκλεασών των σπερματοζωαρίων. Η διάκριση αυτή αναφέρεται διότι, στην πρώτη περίπτωση, η βλάβη επιδιορθώνεται 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 παράγονται 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 χειροτερεύονται 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) αυξάνονται, 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 υποβοηθούμενης 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 δισμουτάση 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 επιδιδυμίτιδα 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 κρυψοφρογία, 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 αυξάνονται 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 ελλειπή 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 θράυσεις των χρωμοσωμάτων και οι σημειακές μεταλλάξεις αυξάνονται 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 ωκυττάρου 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 «Καποδιστρία», 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. Ιδιαιτερότητες 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, Swerdlow 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, Sinowitz 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, Cedeno 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, Eskanazi 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, Juricicova 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.

ΣΕΜΙΝΑΡΙΟ ΣΤΗΝ ΑΝΔΡΟΛΟΓΙΑ (ESHRE CAMPUS SYMPOSIUM ON REPRODUCTIVE ANDROLOGY)

Ένα ακόμη ενδιαφέρον μετεκπαιδευτικό σεμινάριο της European Society of Human Reproduction & Embryology (ESHRE), διοργανώθηκε τον Οκτώβριο του 2009 στη Θεσσαλονίκη. Συγκεκριμένα το τμήμα Ανδρολογίας της ESHRE, το Special Interest Group in Andrology (SIGA) οργάνωσε στη Θεσσαλονίκη μετεκπαιδευτική συνάντηση με θέμα: «Αναπαραγωγική Ανδρολογία: Συνδέοντας το εργαστήριο με την κλινική πράξη».

Το συνέδριο έλαβε χώρα στις 1-3 Οκτωβρίου 2009, στο Ξενοδοχείο « Ηλέκτρα Παλλάς » στη Θεσσαλονίκη. Την τοπική διοργάνωση ανέλαβε, ως εκπρόσωπος της SIGA- ESHRE, η βιολόγος κ. Θεοδοσία Ζεγκινιάδου σε συνεργασία με την Α' Μαιευτική Γυναικολογική κλινική του ΑΠΘ στο Νοσοκομείο «Παπαγεωργίου», τον καθηγητή και διευθυντή της κλινικής Βασίλη Ταρλατζή και τον επίκουρο καθηγητή Δημήτρη Γουλή.

Το πρόγραμμα της συνάντησης κάλυψε όλα τα σύγχρονα θέματα που αφορούν τόσο την εργαστηριακή όσο και την κλινική Ανδρολογία. Τον αρχικό χαιρετισμό απήγινε ο καθηγητής Β.Ταρλατζής, ενώ στη συνέχεια ο καθηγητής Ι.Παπαδήμας, ανοίγοντας τις εργασίες του συνεδρίου, αναφέρθηκε στην συνεχώς αυξανόμενη σημασία που αποκτά η επιστήμη της Ανδρολογίας σήμερα.

Μετά από δύο εξαίρετες παρουσιάσεις του ρόλου των δύο γαμετών στην αναπαραγωγή έγινε εκτενής αναφορά στις καινούργιες οδηγίες που αναμένεται ότι θα συμπεριληφθούν στο 5ο εγχειρίδιο της ΠΟΥ, το οποίο βρίσκεται στο στάδιο της εκτύπωσης. Ιδιαίτερα, όπως τονίστηκε από τον προηγούμενο πρόεδρο της SIGA, Dr Lars Björndahl., μεγάλη σημασία στην προσέγγιση της ανδρικής υπογονιμότητας έχουν οι νέες τιμές αναφοράς που διαφοροποιούνται σημαντικά. Παραμένοντας στον εργαστηριακό χώρο έγινε μνεία στο μεγάλο θέμα της κατάψυξης σπέρματος και την σημασία της στην εξασφάλιση της γονιμότητας σε ιδιαίτερες περιπτώσεις όπως αυτές του καρκίνου και της χημειοθεραπείας ή ακτινοβολίας, στο επίσης μεγάλου ενδιαφέροντος θέμα του οξειδωτικού στρες και της σχέσης του με τη γονιμοποιητική ικανότητα του σπέρματος καθώς και στη σημασία των λειτουργικών δοκιμασιών στην αξιολόγηση της γονιμοποιητικής ικανότητας ενός δείγματος σπέρματος. Η σημασία της μορφολογίας των σπερματοζωαρίων τονίστηκε από τον Dr Roelof Menkvelt, τον τωρινό πρόεδρο της SIGA, τον επιστήμονα που ουσιαστικά άλλαξε τον τρόπο αξιολόγησης της μορφολογίας, εισάγοντας τα αυστηρά κριτήρια εκτίμησής της, ενώ τέλος, ο ποιοτικός έλεγχος των εξετάσεων σπέρματος, ένα θέμα μεγάλης σημασίας για την αξιοπιστία κάθε εργαστηρίου, αναλύθηκε από τον Dr Hose Gastilla, που είναι co-ordinator της SIGA-ESHRE.

Πλήρης και εκτενής ήταν και η αναφορά που έγινε στα κλινικά θέματα. Η προσέγγιση του υπογόνιμου άνδρα στην κλινική πράξη, από το ιστορικό, την κλινική εξέταση αλλά και τον εργαστηριακό έλεγχο παρουσιάστηκαν από τους ομιλητές μέσα από τα νεώτερα δεδομένα, ενώ οι θεραπευτικές προτάσεις και προσεγγίσεις δεν ήταν δυνατόν να παραληφθούν. Ο προβληματισμός για την ιδιαίτερα διαδεδομένη χρήση των μεθόδων της υποστηριζόμενης αναπαραγωγής συζητήθηκε εκτενώς και συμπληρώθηκε με την παρουσίαση από τον καθ. Ταρλατζή των δεδομένων της υγείας των παιδιών που γεννήθηκαν με τη χρήση τους. Τέλος, τόσο η επίδραση του περιβάλλοντος στην ανδρική γονιμότητα και την ποιότητα του σπέρματος όσο και τα δεδομένα από τη διαφοροποίηση της ποιότητας του σπέρματος σε χώρες της Ευρώπης αποτέλεσαν αντικείμενο ιδιαίτερων παρουσιάσεων και συζητήσεων. Η συνάντηση έκλεισε με την πολύ ενδιαφέρουσα παρουσίαση του καθηγητού Δ. Χατζηχρήστου ο οποίος σκιαγράφησε με το δικό του γλαφυρό τρόπο τη σχέση της σεξουαλικής δυσλειτουργίας με την υπογονιμότητα, καθιστώντας σαφές στο ακροατήριο, για ακόμη μια φορά, την αναγκαιότητα μιας περισσότερο σφαιρικής θεώρησης του σημαντικού αυτού θέματος.

Η βιολογία της Αναπαραγωγής παρουσιάζει στις μέρες μας υψηλό επιστημονικό και κλινικό ενδιαφέρον. Συνεχώς παρουσιάζονται νέες επιστημονικές ανακοινώσεις, θεραπευτικές καινοτομίες, κατευθυντήριες οδηγίες από τους αρμόδιους φορείς αλλά και ηθικά διλήμματα – πυροδοτώντας συχνά θερμές αντιπαραθέσεις ανάμεσα όχι μόνο στους ειδικούς που ασχολούνται με το αντικείμενο, αλλά και στους νομοθέτες, τα MME και το ευρύ κοινό. Το συνέδριο της Θεσσαλονίκης, έδωσε τη δυνατότητα, σε γιατρούς και επιστήμονες που εργάζονται στο χώρο να ανταλλάξουν δεδομένα και να συζητήσουν προβλήματα και καινοτομίες.

Αυτό άλλωστε αποτελεί και τον κύριο στόχο για την ESHRE η οποία με παρόμοιες επιστημονικές εκδηλώσεις, που καλύπτουν όλο το χώρο της αναπαραγωγής, δίνει τη δυνατότητα όχι μόνο σε όλους τους ασχολούμενους με αυτήν αλλά και στα MME να ενημερωθούν και να συζητήσουν με τους ειδικούς για τις τελευταίες επιστημονικές εξελίξεις.

Από την οργανωτική επιτροπή

Dr Θεοδοσία Ζεγκινιάδου

ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ ΤΗΣ ΣΤΥΣΗΣ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ: Η ΒΑΡΔΕΝΑΦΙΛΗ ΑΠΟ ΤΗ ΣΚΟΠΙΑ ΤΟΥ ΕΝΔΟΚΡΙΝΟΛΟΓΟΥ

ΑΚΥΛΑΣ-ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΚΟΥΘΟΥΡΗΣ, ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ Γ. ΓΟΥΛΗΣ

ΜΟΝΑΔΑ ΕΝΔΟΚΡΙΝΟΛΟΓΙΑΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ, Α' ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ - ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ, ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ

Περίληψη

Η σεξουαλική υγεία αποτελεί αναπόσπαστο μέρος της συνολικής υγείας του ανθρώπου. Μεταβολές στον τρόπο ζωής, που περιλαμβάνουν ελάττωση του σωματικού βάρους, υιοθέτηση της μεσογειακού τύπου δίαιτας και περισσότερη σωματική άσκηση ασκούν ευεργετική επίδραση στη σεξουαλική υγεία του άνδρα. Παρ' όλη τη σχετική έλλειψη δεδομένων, ο υπογοναδισμός και οι διαταραχές της στύσης είναι επιδημιολογικά συνδεδεμένες με το μεταβολικό σύνδρομο και το διαβήτη τύπου 2. Γι' αυτό, σε κάθε ασθενή με διαταραχές της στύσης πρέπει να διερευνώνται όλοι οι παράγοντες κινδύνου για καρδιαγγειακή νόσο και να αντιμετωπίζονται έγκαιρα, ώστε, όχι μόνο να βελτιώνεται η στυτική λειτουργία, αλλά να αποτρέπονται και τα καρδιαγγειακά συμβάματα. Ο ρόλος της βαρδεναφίλης σε ασθενείς με διαταραχές της στύσης και συνυπάρχουσες καταστάσεις, όπως αρτηριακή υπέρταση, σακχαρώδης διαβήτης, δυσλιπιδαιμία και στεφανιαία νόσος, εμφανίζεται να είναι ευεργετικός, με δεδομένες την αποτελεσματικότητα του φαρμάκου και το χαμηλό ποσοστό ανεπιθύμητων ενεργειών. Η συγχορήγηση τεστοστερόνης - βαρδεναφίλης αποτελεί μια ενδιαφέρουσα προσέγγιση, σε επιλεγμένες περιπτώσεις ανδρών με διαταραχές της στύσης και ελαττωμένη libido.

Όροι ευρετηρίου: βαρδεναφίλη, στυτική δυσλειτουργία, υπογοναδισμός, τεστοστερόνη

Summary

Sexual health comprises a cardinal part of man's general health. Lifestyle modifications, including body weight loss, adoption of a Mediterranean type of diet and increase in physical exercise, exert a beneficiary influence to sexual health. Despite the relative lack of high quality data, hypogonadism and erectile dysfunction are related, from an epidemiological point of view, to metabolic syndrome and diabetes mellitus type 2. Therefore, all risk factors for cardiovascular disease have to be investigated for and treated promptly to every man with erectile dysfunction, in an attempt not only to improve the erectile function but to prevent cardiovascular incidents as well. The therapeutic role of vardenafil to men with erectile dysfunction and other co-existing conditions, such as arterial hypertension, diabetes, dyslipidemia and coronary heart disease, appears to be beneficiary, considering the efficacy of the drug and the low incidence of adverse effects. Co-administration of testosterone and vardenafil constitutes an interesting approach to selected cases of men with erectile dysfunction and loss of libido.

Keywords: vardenafil; erectile dysfunction; hypogonadism; testosterone

1. Εισαγωγή

Ο κύριος σκοπός αυτού του ανασκοπικού άρθρου είναι να παρουσιασθούν τα δεδομένα που συνδέουν τη σεξουαλική δυσλειτουργία στον άνδρα, που εκφράζεται ως διαταραχές της στύσης (ΔΣ), με παράγοντες του μεταβολικού συνδρόμου (ΜΣ), όπως η δυσλιπιδαιμία, η υπέρταση, ο σακχαρώδης διαβήτης, η παχυσαρκία και τα νοσήματα του καρδιαγγειακού συστήματος (ΚΑΝ). Από την άποψη της Παθολογικής Φυσιολογίας, οι δύο αυτές οντότητες συνδέονται, όχι αναπόσπαστα, μέσω της ελάττωσης των επιπέδων της τεστοστερόνης (Τ), καθώς σε ικανό ποσοστό περιπτώσεων ΔΣ οι άνδρες είναι υπογοναδικοί. Σε πολλές όμως περιπτώσεις, οι άνδρες παραπονούνται μόνο για ΔΣ, χωρίς να έχει αναγνωρισθεί και αντιμετωπισθεί η ύπαρξη παραγόντων του ΜΣ.

Δευτερεύοντα σκοπό της ανασκόπησης αποτελεί η παρουσίαση των δεδομένων που αφορούν στην αποτελεσματικότητα και την ασφάλεια της βαρδεναφίλης σε ασθενείς με ΜΣ και ΔΣ, είτε αυτή χορηγείται ως μονοθεραπεία, είτε σε συνδυασμό με Τ.

2. Αιτιολογία των διαταραχών της στύσης

Οι ΔΣ ορίζονται ως η συστηματική αδυναμία για διατήρηση της στύσης. Η επίπτωση των ΔΣ κυμαίνεται από 2% σε άνδρες μικρότερους των 40 ετών, 5 - 15% σε άνδρες 40 έως 70 ετών και έως 86% σε άνδρες μεγαλύτερους των 80 ετών (1). Οι ΔΣ οφείλονται σε ενδοκρινικά, ψυχογενή φαρμακευτικά, περιβαλλοντικά και άλλα αίτια (Πίνακας 1) (2, 3). Σε αυτήν την ενότητα θα συζητηθεί ο υπογοναδισμός ως αίτιο ΔΣ.

Πίνακας 1. Αίτια στυτικής δυσλειτουργίας.

- Ενδοκρινικά
 - υπογοναδισμός
 - υπερπρολακτιναιμία
 - μαγαλακρία
 - διαταραχή του άξονα "υποθάλαμος – υπόφυση – θυρεοειδής"
 - διαταραχή του άξονα "υποθάλαμος – υπόφυση – επινεφρίδια"
- Ψυχογενή
- Φαρμακευτικά
 - αντι-υπερτασικά
 - β-αναστολείς: προπανολόλη
 - κεντρικής δράσης: ρεζερπίνη
 - διουρητικά: σπιρονολακτόνη
 - αντιψυχωτικά
 - αντικαταθλιπτικά
- Περιβαλλοντικά
 - κάπνισμα
 - αλκοόλ

● ναρκωτικά

- Προχωρημένη ηλικία
- υπογοναδισμός όψιμης έναρξης
- Μεταβολικό σύνδρομο
- παχυσαρκία

Ο υπογοναδισμός διακρίνεται σε πρωτοπαθή ή υπεργοναδοτροπικό και σε δευτεροπαθή ή υπογοναδοτροπικό. Ο πρώτος οφείλεται είτε σε συγγενή (σύνδρομο Kleinefelter) είτε σε επίκτητα αίτια (μεταπαρωτιδική ορχίτιδα, χημειοθεραπεία), ενώ ο δεύτερος σε διαταραχές στον άξονα "υποθάλαμος – υπόφυση – όρχεις". Για το διαχωρισμό των δύο αυτών ειδών υπογοναδισμού απαιτείται εκτίμηση της θυλακιοτρόπου ορμόνης (FSH), της ωχρινοτρόπου ορμόνης (LH), της ολικής Τ, της προλακτίνης και της δεσμευτικής πρωτεΐνης των στεροειδών του φύλου (SHBG). Η ελεύθερη Τ αποτελεί, θεωρητικά, πιο ακριβή δείκτη εκτίμησης του υπογοναδισμού, σε σύγκριση με την ολική Τ. Καθώς όμως ο προσδιορισμός των συγκεντρώσεών της είναι πολύ δύσκολος από τεχνική άποψη, υπολογίζεται έμμεσα από τα επίπεδα της ολικής Τ και της SHBG (4).

Υψηλές συγκεντρώσεις FSH και LH ορού σε συνδυασμό με ελαττωμένες συγκεντρώσεις ολικής Τ είναι ενδεικτικές πρωτοπαθούς υπογοναδισμού, με βλάβη στο σπερματικό επιθήλιο και τα κύτταρα Leydig. Αντίθετα, χαμηλές συγκεντρώσεις FSH και LH ορού σε συνδυασμό με ελαττωμένες συγκεντρώσεις ολικής Τ είναι ενδεικτικές δευτεροπαθούς υπογοναδισμού. Σε ηλικιωμένους άνδρες παρατηρούνται χαμηλότερες συγκεντρώσεις Τ σε σύγκριση με νεότερους. Τέλος, σε παχύσαρκους άνδρες παρατηρούνται χαμηλότερες συγκεντρώσεις SHBG, με αποτέλεσμα την ελάττωση και των συγκεντρώσεων της ελεύθερης Τ (4).

Αξίζει να σημειωθεί ότι αν και, σε γενικές γραμμές, οι συγκεντρώσεις της Τ συμβαδίζουν με την κλινική εικόνα του υπογοναδισμού, σε πολλές περιπτώσεις άνδρες με χαμηλές συγκεντρώσεις Τ έχουν φυσιολογική libido, ενώ, αντίθετα, άλλοι άνδρες είναι ιδιαίτερα εναίσθητοι ακόμα και σε πολύ μικρές ελαττώσεις των συγκεντρώσεων της Τ.

3. Η αμφίδρομη σχέση υπογοναδισμού / διαταραχών στύσης και μεταβολικού συνδρόμου / καρδιαγγειακής νόσου

3.1. Επιδημιολογικά δεδομένα

Η επιδημιολογική παρατήρηση ότι οι άνδρες εμφανίζουν υψηλότερα ποσοστά ΚΑΝ σε σύγκριση με τις γυναίκες (5), οδηγούσε, έως πρόσφατα, στο επισφαλές συμπέρασμα ότι η Τ αποτελεί παράγοντα κινδύνου για την εκδήλωση στεφανιαίας νόσου. Στην πραγματικότητα, σε αντίθεση με το παλαιό

δόγμα, οι χαμηλές συγκεντρώσεις T είναι αυτές που συσχετίζονται με κεντρικού τύπου παχυσαρκία, διαβήτη, KAN και ΔΣ.

Το ΜΣ, κατά τη σύγχρονη θεώρησή του, δεν αποτελεί παθολογική οντότητα, αλλά ένα μεταβατικό στάδιο προς μία νόσο. Σε επιδημιολογικές μελέτες βρέθηκε ότι ασθενείς με ΜΣ, χωρίς διαβήτη, που παρακολουθήθηκαν για μέσο χρονικό διάστημα 8,6 ετών είχαν σχετικό κίνδυνο 3,7 για εμφάνιση KAN (5, 6). Επιπρόσθετα, μακροχρόνιες μελέτες έδειξαν ότι τα χαμηλές συγκεντρώσεις T και SHBG αποτελούν παράγοντες κινδύνου για εμφάνιση ΜΣ, ακόμα και σε άνδρες με δεικτή μάζας σώματος (BMI) μικρότερο από 25 kg/m². Ως αποτέλεσμα, η σχέση μεταξύ χαμηλής T και ΜΣ φαίνεται να είναι αμφίδρομη: η χαμηλή T προδιαθέτει για κεντρικού τύπου παχυσαρκία και η παχυσαρκία ελαττώνει την παραγωγή T (5).

3.2. Κλινικά δεδομένα

Δίπλα στις καθιερωμένες παραμέτρους του ΜΣ, όπως η παχυσαρκία, η δυσλιπιδιαμία, η υπέρταση και ο διαβήτης, αρχίζουν να τοποθετούνται και οι ΔΣ. Έτσι, όταν ένας άνδρας παραπονείται για ΔΣ, η τελευταία δεν θα πρέπει να εκλαμβάνεται ως μεμονωμένη παθολογική κατάσταση, αλλά ως έκφραση γενικότερης έκπτωσης της υγείας του και, όχι σπάνια, πρόγγελος του ΜΣ. Ο κοινός παρονομαστής της KAN και των ΔΣ φαίνεται πως είναι η βλάβη του ενδοθήλιου.

Με ένα μέσο χρονικό διάστημα 2,5 - 3 ετών από την εκδήλωση των ΔΣ έως την εκδήλωση της KAN (5), το ερώτημα που τίθεται είναι: "Ενδείκνυται ενδελεχής διερεύνηση και επιθετική προσέγγιση σε άνδρες με ΔΣ, που είναι ασυμπτωματικοί για KAN?". Στη μεγάλη πλεοψηφία των δημοσιευμένων μελετών, οι ΔΣ αναφέρονται και αντιμετωπίζονται ως επακόλουθα συμβάματα της KAN και όχι ως πρόδρομα συμπτώματα, καθώς οι ασθενείς με στεφανιαία νόσο πολύ σπάνια ερωτούνται για την υπαρξη ΔΣ.

Το γεγονός αυτό τονίζει τη σημασία του καλού ιστορικού σε άνδρες με ΔΣ, αλλά ασυμπτωματικούς για KAN. Τα ερωτήματα πρέπει να περιλαμβάνουν την ανεξήγητη κόπωση και τη δύσπνοια σε φάση κατάκλισης, καθώς και τον τρόπο ζωής (δίαιτα, άσκηση, κάπνισμα) και το οικογενειακό ιστορικό διαβήτη και KAN. Η κλινική εξέταση περιλαμβάνει τον προσδιορισμό της αρτηριακής πίεσης, του σωματικού βάρους και του BMI, ενώ ο εργαστηριακός έλεγχος τη γλυκόζη και το λιπιδαιμικό profile. Τέλος, στη διερεύνηση ρουτίνας πρέπει να περιλαμβάνεται το ηλεκτροκαρδιογράφημα ενώ, σε επιλεγμένες περιπτώσεις, διενεργείται υπερηχοκαρδιογράφημα, δοκιμασία κόπωσης ή σπινθηρογράφημα με θάλιο (7). Ως συνέπεια, οι άνδρες με ΔΣ είναι πολλές φορές αναγκαίο να προσεγγίζονται από ομάδα ιατρών διαφόρων ειδικοτήτων, που να περιλαμβά-

νει ουρολόγο, ενδοκρινολόγο και καρδιολόγο.

4. Υπογοναδισμός όψιμης έναρξης

Το θέμα της ανεπάρκειας των ανδρογόνων στο γηράσκοντα άνδρα απασχολεί όλο και περισσότερο τόσο την επιστημονική κοινότητα, όσο και το ευρύ κοινό. Επιπρόσθετα, υπάρχει το εύλογο ενδιαφέρον της φαρμακευτικής βιομηχανίας, δεδομένης της μεγάλης αύξησης που παρατηρείται στον ανδρικό πληθυσμό άνω των 50 ετών. Για την κατάσταση αυτή έχουν προταθεί μια σειρά όρων, όπως ανδρικό κλιμακτήριο, ανδρόπαυση, ανδρογονοπενία, μερικός υπογοναδισμός και PADAM (Partial Androgen Deficiency in the Aging Male). Ωστόσο ο όρος που φαίνεται να επικρατεί στη βιβλιογραφία είναι ο LOH (Late Onset Hypogonadism).

Η έκπτωση της γοναδικής λειτουργίας στον άνδρα, σε αντίθεση με τη γυναίκα, είναι μια βαθμιαία και μακροχρόνια διαδικασία. Οι συγκεντρώσεις της ελεύθερης T ορού ελαττώνονται βαθμιαία, περίπου κατά 1% ετησίως, μετά την ηλικία των 50 ετών (8). Καθώς η πτώση των συγκεντρώσεων της T συνεχίζεται, με την πάροδο της ηλικίας, το ποσοστό των ανδρών με LOH αυξάνεται. Για να τεθεί η διάγνωση του LOH πρέπει υποχρεωτικά να συνδυάζονται η κλινική εκτίμηση (συμπτώματα και σημεία υπογοναδισμού) με την εργαστηριακή επιβεβαίωση (ελαττωμένες συγκεντρώσεις T).

Τα κλινικά χαρακτηριστικά του LOH περιλαμβάνουν ελάττωση της libido και των στύσεων, μεταβολές του θυμικού και της νοητικής ικανότητας, ελάττωση της μυϊκής μάζας, της τρίχωσης και της οστικής πυκνότητας και αύξηση του σπλαγχνικού λίπους (8). Για τη διάγνωση του LOH απαιτείται και εργαστηριακή επιβεβαίωση. Η επικρατέστερη άποψη είναι ότι ο LOH επιβεβαιώνεται με την ανεύρεση ολικής T ορού, σε συγκεντρώσεις δύο σταθερών αποκλίσεων χαμηλότερα από τις φυσιολογικές συγκεντρώσεις νεαρών ανδρών. Σε περίπτωση οριακών τιμών, η ολική T θα πρέπει να επαναλαμβάνεται και να προσδιορίζονται παράλληλα οι γοναδοτροπίνες του ορού (1, 8). Ασφαλώς, η ελάττωση των συγκεντρώσεων της T δεν αποτελεί τη μοναδική ορμονική μεταβολή που συνοδεύει το γήρας. Μεταξύ άλλων, έχουν παρατηρηθεί ελάττωση της θεικής δεϋδροεπιανδροστερόνης (DHEA-S), της αυξητικής ορμόνης (GH), της μελατονίνης, της ελεύθερης οιστραδιόλης (E2), της θυροξίνης (T4), καθώς και αύξηση των κορτικοστεροειδών και της λεπτίνης (8).

5. Ο θεραπευτικός ρόλος της βαρδεναφίλης

Η στύση επιτυγχάνεται με την ενεργοποίηση της γοναυλοκυκλάσης (cGMP) από το μονοξείδιο του αζώτου (NO). Η

cGMP έχει αγγειοδιασταλτικές ιδιότητες και αυξάνει τη ροή του αίματος στα σηραγγώδη σώματα του πέους. Αντίθετα, για να επιτευχθεί η χάλαση των σηραγγώδων σωμάτων, που σηματοδοτεί το πέρας της στύσης, η cGMP πρέπει να αποδομηθεί από το ένζυμο φωσφοδιεστεράση-5 (PDE-5) (9). Οι αναστολείς της PDE-5 (PDE-5 Inh) αναστέλλουν τη δράση της, με αποτέλεσμα την παράταση της αγγειοδιασταλτικής δράσης του cGMP και, τελικά, την ενίσχυση της στύσης (9).

Ένας από τους σύγχρονους PDE-5 Inh είναι η βαρδεναφίλη, η οποία απορροφάται γρήγορα και επιτυγχάνει μέγιστη συγκέντρωση στο πλάσμα μεταξύ 30 λεπτών και 2 ωρών, με τη δράση της να διαρκεί 6 ώρες (9). Η χορήγησή της συστίνεται να γίνεται πριν το φαγητό. Η βαρδεναφίλη, ως περιφερικός αγγειοδιαστολέας, μπορεί να προκαλέσει πτώση της αρτηριακής πίεσης, με ήπια και παροδική όμως δράση. Ως αποτέλεσμα, μπορεί να συγχορηγηθεί με αντιυπερτασικά σκευάσματα (10). Σε συγχορήγησή της με α-αναστολέις, όπως σε περιπτώσεις υπερπλασίας προστάτη, πρέπει να χορηγηθεί 6 ώρες μετά τον α-αναστολέα. Γενικά, είναι καλά ανεκτή, με κύρια αντένδειξη την απαγόρευση της συγχορήγησής της με νιτρώδεις παράγοντες σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο (9).

Οι PDE-5 Inh, και ειδικότερα η βαρδεναφίλη, επάγουν την παραγωγή των προγονικών ενδοθηλιακών κυττάρων (Endothelial Progenitor Cells - EPC) του μυελού των οστών, που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αναδόμηση του ενδοθηλίου των αρτηριδίων (11). Πιο συγκεκριμένα, τα EPC έχουν την ικανότητα να εισέρχονται στη συστηματική κυκλοφορία και να εγκαθίστανται στο ενδοθήλιο, όπου μετατρέπονται σε ώριμα ενδοθηλιακά κύτταρα και αποκαθιστούν τις τοπικές βλάβες. Αντίθετα, η απόπτωση των ενδοθηλιακών κυττάρων συνεπάγεται τη φλεγμονή, τη μετανάστευση μονοκυττάρων και τη δράση προφλεγμονώδων κυτοκινών, με τελικό αποτέλεσμα την εναπόθεση λίπους και τη δημιουργία αθηρωματικής στένωσης των αρτηριδίων. Η μετανάστευση των EPC στο ενδοθήλιο των αρτηριδίων ενισχύεται από τη δράση της T, τόσο άμεσα, με μηχανισμό που δεν είναι ακόμη ξεκάθαρος, όσο και έμμεσα, μέσω της θετικής επίδρασης της T στο σύστημα NO / cGMP (11). Συνεπώς, η συγχορήγηση T και βαρδεναφίλης θα μπορούσε όχι μόνο να βελτιώσει τη ροή του αίματος στα σηραγγώδη σώματα αλλά και να δράσει ευεργετικά στην αναδόμηση του επιθηλίου των αγγείων (9, 11).

5.1. Βαρδεναφίλη και διαταραχές της στύσης

Οι ΔΣ είναι ένα παγκόσμιο φαινόμενο, με 152 εκατομμύρια άνδρες στην Ευρώπη και την Αμερική να δηλώνουν ότι πάσχουν από αυτές. Η επίπτωση αυξάνεται από 2,3% στην ηλικία των 30 ετών σε 53,4% στην ηλικία των 60 ετών (10). Σε

συγκριτικές *in vivo* μελέτες σε πειραματόζωα, η δράση της βαρδεναφίλης αποδείχθηκε ανώτερη ή όχι υποδεέστερη από αυτήν της σιλδεναφίλης (12). Σε κλινικές μελέτες, η χορήγηση βαρδεναφίλης στη δοσολογία των 10 και 20 mg αύξησε το ποσοστό των επιτυχών σεξουαλικών συνενρέσεων, βελτιώνοντας σημαντικά τη σκληρότητα του πέους και τη χρονική διάρκεια της στύσης.

5.2. Βαρδεναφίλη και σακχαρώδης διαβήτης

Οι ΔΣ αποτελούν πολύ συχνή κατάσταση σε ασθενείς που πάσχουν από σακχαρώδη διαβήτη, με την επίπτωση να κυμαίνεται από 35% έως 70%, δηλαδή, περίπου, τρεις φορές υψηλότερη από ότι στον γενικό πληθυσμό (13). Από τα 171 εκατομμύρια ασθενών με διαβήτη, σε παγκόσμιο επίπεδο, το 10% των περιπτώσεων αφορά διαβήτη τύπου 1, κατάσταση στην οποία η επίπτωση των ΔΣ είναι 30% υψηλότερη σε σύγκριση με το διαβήτη τύπου 2 (13).

Η πτωχή γλυκαυγκή ρύθμιση έχει ως αποτέλεσμα βιοχημικές αλλοιώσεις, που επηρεάζουν την ενδοθηλιακή λειτουργία και, επακόλουθα, τη στύση. Οι επιπλοκές που σχετίζονται με το διαβήτη, όπως η μικροαγγειοπάθεια, η μακροαγγειοπάθεια, η δυσλιπιδαιμία και η υπέρταση, συντελούν στις ΔΣ, οι οποίες εμφανίζονται πιο πρώιμα σε σχέση με το γενικό πληθυσμό και σε σοβαρότερη μορφή. Επιπρόσθετα, η ανταπόκριση στη θεραπεία είναι μικρότερη, εξαιτίας της πολυπαραγοντικής φύσης της νόσου.

Η εισαγωγή στην κλινική πράξη των PDE-5 Inh βοήθησε σημαντικά στην αντιμετώπιση των ΔΣ σε ασθενείς με διαβήτη. Σε *in vitro* αλλά και *in vivo* μελέτες βρέθηκε ότι η βαρδεναφίλη είναι αποτελεσματικότερη της σιλδεναφίλης στην αντιμετώπιση των ΔΣ σε αυτούς τους ασθενείς (12). Σε τυχαιοποιημένη διπλή-τυφλή μελέτη στη Γερμανία (13), 318 ασθενείς με διαβήτη τύπου 1 και μέση ηλικία 50 ετών χωρίστηκαν σε δύο ομάδες: οι 163 έλαβαν αγωγή με βαρδεναφίλη σε δόσεις 5 έως 20 mg, για 12 εβδομάδες, και οι 155 εικονικό φάρμακο για το ίδιο χρονικό διάστημα. Κύρια παράμετρος της μελέτης ήταν η ποιότητα και η διάρκεια της στύσης. Στο πέρας των 12 εβδομάδων, όσον αφορά την ποιότητα της στύσης, η ομάδα της βαρδεναφίλης παρουσίασε βελτίωση κατά 73% έναντι 53% των μαρτύρων. Όσον αφορά τη διάρκεια της στύσης, η ομάδα της βαρδεναφίλης είχε ικανοποιητικά αποτελέσματα στο 32,5% έναντι 8,7% των μαρτύρων. Η βαρδεναφίλη ήταν πολύ καλά ανεκτή, με μικρό ποσοστό ανεπιθύμητων ενεργειών.

5.3. Βαρδεναφίλη και αρτηριακή υπέρταση

Η αρτηριακή υπέρταση αποτελεί σοβαρό επιβαρυντικό παράγοντα για την εμφάνιση ΔΣ και την πιο συνηθισμένη

παθολογική κατάσταση που συνυπάρχει με αυτές (10). Εκτός από τη βλάβη του ενδοθηλίου, οι ΔΣ επιτείνονται και από την αντιυπερτασική αγωγή που λαμβάνουν οι ασθενείς, όπως οι αναστολείς του ενζύμου της αγγειοτενσίνης, οι αναστολείς των διαύλων ασθεστίου, οι αναστολείς των β-υποδοχέων και τα διουρητικά (10).

Η βαρδεναφίλη οφείλει τη δράση της στις αγγειοδιασταλτικές της ιδιότητες. Σε πολλές μελέτες αιμοδυναμικής, όπου συγχορηγήθηκαν αντιυπερτασικά σκευάσματα και βαρδεναφίλη, βρέθηκε ότι οι ουσίες δρουν συνεργικά στην ελάττωση της αρτηριακής πίεσης, ενώ οι ανεπιθύμητες ενέργειες της βαρδεναφίλης εξακολουθούν να παραμένουν πολύ σπάνιες (9). Σε μια τυχαιοποιημένη, διπλή-τυφλή μελέτη (10), 398 άνδρες με ΔΣ χωρίστηκαν σε δύο ομάδες: αυτοί που έλαβαν αγωγή με βαρδεναφίλη, σε δόσεις 5 έως 20 mg, για 12 εβδομάδες, και αυτοί που έλαβαν εικονικό φάρμακο, για το ίδιο χρονικό διάστημα. Ο σκοπός της μελέτης ήταν να ελεγχθεί αν η χορήγηση της βαρδεναφίλης σε ασθενείς με υπέρταση, υπο αγωγή με ένα ή περισσότερα αντιυπερτασικά, είναι αποτελεσματική και καλά ανεκτή. Κύρια παράμετρος της μελέτης ήταν η ποιότητα και η διάρκεια της στύσης. Υπήρξε σημαντική βελτίωση των παραμέτρων της στύσης στην ομάδα της βαρδεναφίλης έναντι των μαρτύρων, χωρίς σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες ή σημαντικές αιμοδυναμικές αλλαγές. Ωστόσο, σε ασθενείς που λάμβαναν αναστολείς των β-υποδοχέων, η συγχορήγηση της βαρδεναφίλης ήταν λιγότερο αποτελεσματική συγκριτικά με συνδυασμό άλλων αντιυπερτασικών και, ιδιαίτερα, με αναστολείς του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτενσίνης.

5.4. Βαρδεναφίλη και δυσλιπιδαιμία

Η δυσλιπιδαιμία επιφέρει σημαντικές βλάβες στο αγγειακό ενδοθήλιο και, φυσικά, επηρεάζει τόσο τα στεφανιαία αγγεία, όσο και τα αγγεία του πέους, που ευθύνονται για τη στύση. Ολοένα και περισσότερες ενδείξεις υποδεικνύουν ότι οι ΔΣ αποτελούν έναν πρώιμο δείκτη εμφάνισης συστηματικής αθηρωμάτωσης (6). Έτσι, η συνύπαρξη ΔΣ και δυσλιπιδαιμίας θεωρείται πολύ σημαντικός παράγοντας κινδύνου για εμφάνιση KAN. Ως αποτέλεσμα, οι δύο καταστάσεις πρέπει να διερευνούνται και να αντιμετωπίζονται ταυτόχρονα, τόσο με μεταβολή του τρόπου ζωής, που περιλαμβάνει δίαιτα και σωματική άσκηση, όσο και με την κατάλληλη φαρμακευτική αγωγή.

Υπάρχουν αρκετές ενδείξεις ότι η ταυτόχρονη αντιμετώπιση της δυσλιπιδαιμίας και των ΔΣ, συνήθως με συγχορήγηση στατινών και βαρδεναφίλης, ελαττώνει τον κίνδυνο για KAN (14, 15). Ωστόσο, απαιτούνται περισσότερες μελέτες, όπως:

- Προοπτικές μελέτες ανδρών με ΔΣ, αιμοδυναμικών για KAN, και σύγκρισή τους με συνομήλικους άνδρες χωρίς ΔΣ, όσον αφορά την εμφάνιση KAN.
- Διερεύνηση της πιθανής βελτίωσης της ενδοθηλιακής λειτουργίας, μετά από χορήγηση PDE-5 Inh.
- Διερεύνηση της πιθανής βελτίωσης των ΔΣ μετά από αντιμετώπιση των παραγόντων κινδύνου για KAN, χωρίς χορήγηση PDE-5 Inh.

5.5. Βαρδεναφίλη και παράμετροι του σπέρματος

Μελέτες σε άνδρες που λαμβάνουν βαρδεναφίλη έδειξαν σημαντικά μεγαλύτερο συνολικό αριθμό σπερματοζωαρίων ανά εκσπερμάτιση, καλύτερη κινητικότητα και καλύτερη μορφολογία των σπερματοζωαρίων (16). Ο μηχανισμός που έχει προταθεί για να ερμηνεύεται αυτήν την παρατήρηση είναι ότι η βαρδεναφίλη βελτιώνει την εκκριτική λειτουργία του προστάτη. Αν τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιωθούν, οι PDE-5 Inh, και ειδικότερα η βαρδεναφίλη, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως επικουρικοί παράγοντες στην αντιμετώπιση της ανδρικής υπογονινότητας.

6. Ο θεραπευτικός ρόλος της τεστοστερόνης

Όπως συζητήθηκε στην ενότητα 3, υπάρχει αμφίδρομη σχέση μεταξύ χαμηλών επιπέδων T και παραγόντων του ΜΣ, όπως η κεντρικού τύπου παχυσαρκία. Τα λιποκύτταρα παράγουν κυτοκίνες, όπως η λεπτίνη, που δρα σε υποδοχείς στα κύτταρα Leydig και αναστέλλει την έκκριση T, που προκαλείται από τη δράση της LH ή της hCG (17). Η υπερινσουλιναιμία που παρατηρείται σε διαβήτη τύπου 2 μπορεί, επίσης, να αναστέλλει την έκκριση T, δρώντας σε υποδοχείς στα κύτταρα Leydig. Επιπρόσθετα, η αντίσταση στην ινσουλίνη διαταράσσει την έκκριση της LH (18). Τέλος, η T επιδρά στα πρόδρομα μεσεγχυματικά κύτταρα, προωθώντας τον πολλαπλασιασμό των μυοβλαστών και αναστέλλοντας αυτόν των λιποβλαστών (18). Το γεγονός αυτό ερμηνεύει την αναλογία μυών - λίπους στους ευγοναδικούς και τους υπογοναδικούς άνδρες.

6.1. Τεστοστερόνη και διαταραχές στύσης

Με βάση αυτό το παθοφυσιολογικό υπόβαθρο, η χορήγηση T αναμένεται να έχει ευεργετική επίδραση σε ασθενείς με υπογοναδισμό και ΜΣ. Πράγματι, σε μια πρόσφατη μελέτη 22 ασθενών (18), μέσης ηλικίας 58 ετών, με ΜΣ, υπογοναδισμό και ΔΣ βρέθηκε ότι η υποκατάσταση T για 12 εβδομάδες οδήγησε σε σημαντική βελτίωση των μεταβολικών παραμέτρων. Η libido και οι ΔΣ βελτιώθηκαν σε περισσότερους από το 50% των ασθενών, αλλά όχι στο σύνολό τους.

Αντίθετα, σε μελέτες που έγιναν σε ασθενείς με καρκίνο του προστάτη και “ολικό ανδρογονικό αποκλεισμό”, με αντιανδρογόνα και αγωνιστές της GnRH, διαπιστώθηκε αύξηση της εναπόθεση λίπους σε συνδυασμό με αύξηση της ινσουλίνης, της γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης, της ολικής χοληστερόλης και των τριγλυκεριδίων, με παράλληλη ελάττωση της HDL-χοληστερόλης (19).

Η δράση της T στο κεντρικό και το περιφερικό νευρικό σύστημα όσον αφορά τη libido αλλά και την έναρξη και διατήρηση των στύσεων είναι τεκμηριωμένη (20). Πιο πρόσφατες μελέτες, έδειξαν ότι η ανεπαρκής δράση των ανδρογόνων στον πεικό ιστό έχει ως αποτέλεσμα, μεταξύ των άλλων, ελαττωμένη γονιδιακή έκφραση της PDE-5, γεγονός που εξηγεί τη χαμηλή αποτελεσματικότητα των PDE-5 Inh στους άνδρες με υπογοναδισμό (4).

Σε μελέτες που έγιναν σε ανθρώπινο σηραγγώδη ιστό, βρέθηκε ότι η T, επιδρώντας στους διαύλους καλίου (K^+ channels), προάγει την είσοδο ιόντων καλίου προς το κυτταρόπλασμα αλλά και την έξοδο ιόντων ασβεστίου προς το διάμεσο χώρο, διατηρώντας με αυτόν τον τρόπο, την ηλεκτροχημική ισορροπία της κυτταροπλασματικής μεμβράνης (21). Έτσι, αποτρέπεται η ενεργοποίηση της κινάσης της μυοσίνης, της σύσπασης των μυϊκών ινιδίων και, τελικά, της αγγειοσυστολής των σηραγγώδων αγγείων (21).

Σε έρευνες που έγιναν για την επίδραση της T στο αγγειακό επιθήλιο, βρέθηκε ότι η T αυξάνει την έκφραση των ανδρογονικών υποδοχέων στις μικρές αρτηρίες και αποτρέπει τη δημιουργία αθηρωματικής πλάκας (17). Σε πειραματόζωα, η T προκαλεί αγγειοδιαστολή στα στεφανιαία αλλά και σε άλλα αγγεία (17). Συνολικά, η T εμφανίζει “ουδέτερα προς θετικά” αποτελέσματα στο καρδιαγγειακό σύστημα, έτσι ώστε να μην αντενδείκνυται η χορήγησή της σε ασθενείς με KAN (22).

6.2. Τεστοστερόνη και βαρδεναφίλη

Με δεδομένη την πολυπαραγοντική φύση του μηχανισμού της στύσης, η μονοθεραπεία με T δεν εμφανίζει υψηλή αποτελεσματικότητα, σε ασθενείς με ΔΣ που δεν πληρούν τα κριτήρια του υπογοναδισμού. Από την άλλη μεριά, σημαντικό ποσοστό ανδρών με ΔΣ και συνυπάρχουσες παθολογικές καταστάσεις, όπως παράγοντες του ΜΣ, δεν ανταποκρίνεται στη μονοθεραπεία με βαρδεναφίλη.

Με βάση αυτά τα δεδομένα, σε μια σειρά μελετών συγχρηγήθηκε T και βαρδεναφίλη για την αντιμετώπιση των ΔΣ. Σε άνδρες με ΔΣ, ΜΣ και ήπιο υπογοναδισμό, η προσθήκη γέλης T 1% στη βαρδεναφίλη οδήγησε σε σημαντική βελτίωση της libido και των ΔΣ (23). Σε άλλες μελέτες, η χορήγηση T

βελτίωσε σημαντικά τις ΔΣ, διαμέσου της ενίσχυσης της δράσης των PDE-5 Inh, σε άνδρες με τεκμηριωμένη διάγνωση LOH (17).

Η συγχορήγηση T - βαρδεναφίλης εμφάνισε ευεργετικά αποτελέσματα σε ασθενείς με νεφρική ανεπάρκεια και διαβήτη τύπου 2. Πιο συγκεκριμένα, η χορήγηση T, ενδομιτικά, πριν τη χορήγηση βαρδεναφίλης, ήταν περισσότερο αποτελεσματική για τις ΔΣ, συγκριτικά με τη χορήγηση μόνο βαρδεναφίλης (24).

Ασφαλώς, η χορήγηση βαρδεναφίλης δεν βελτιώνει τη libido αλλά, ακόμη και σε σοβαρού βαθμού υπογοναδισμό, μπορεί να βελτιώσει τις νυκτερινές στύσεις. Όταν τα επίπεδα T ορού αποκατασταθούν, με τη χορήγηση εξωγενούς T, η συγχορήγηση PDE-5 Inh μπορεί να βελτιώσει τη στυτική ανταπόκριση σε οπτικά και ψυχογενή ερεθίσματα (2).

Η συγχορήγηση T και βαρδεναφίλης έχει ένδειξη μόνο σε ασθενείς με υπογοναδισμό, που εμφανίζουν ΔΣ και ελαττωμένη libido. Προς το παρόν, δεν υπάρχουν τυχαιοποιημένες μελέτες που να εκτιμούν την σχέση κινδύνου - οφέλους, όσον αφορά τη χορήγηση T σε ασθενείς με ΔΣ, χωρίς υπογοναδισμό (17).

7. Συμπεράσματα

Η σεξουαλική υγεία αποτελεί αναπόσπαστο μέρος της συνολικής υγείας του ανθρώπου. Μεταβολές στον τρόπο ζωής, που περιλαμβάνουν ελάττωση του σωματικού βάρους, νιοθέτηση της μεσογειακού τύπου δίαιτας και συστηματική σωματική άσκηση, ασκούν ευεργετική επίδραση στη σεξουαλική υγεία του άνδρα (5, 6).

Παρ' όλη τη σχετική έλλειψη δεδομένων, ο υπογοναδισμός και οι ΔΣ είναι επιδημιολογικά συνδεδεμένες με το ΜΣ και το διαβήτη τύπου 2. Γ' αυτό, σε κάθε άνδρα με ΔΣ πρέπει να διερευνώνται, να αναγνωρίζονται και να αντιμετωπίζονται έγκαιρα όλοι οι παράγοντες κινδύνου για KAN, ώστε, όχι μόνο να βελτιώνεται η στυτική λειτουργία, αλλά να αποτρέπονται και τα καρδιαγγειακά συμβάματα (7, 15, 25).

Ο ρόλος της βαρδεναφίλης σε ασθενείς με ΔΣ και συνυπάρχουσες καταστάσεις, όπως αρτηριακή υπέρταση, σακχαρώδης διαβήτης, δυσλιπιδαιμία και στεφανιαία νόσος, εμφανίζεται να είναι ευεργετικός, με δεδομένες την αποτελεσματικότητα του φαρμάκου και το χαμηλό ποσοστό ανεπιθύμητων ενεργειών. Η συγχορήγηση T - βαρδεναφίλης αποτελεί μια ενδιαφέρουσα προσέγγιση, σε επιλεγμένες περιπτώσεις ανδρών με ΔΣ και ελαττωμένη libido.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **Forti G, Corona G, Petrone L, Manucci E, Cilotti A, Maggi M.** Aging and erectile dysfunction: A national and International perspective. *Anir* 2005, 7:177-180.
2. **Lenzi A, Lombardo F, Jannini EA.** Endocrine aetiology of erectile dysfunction. *Anir* 2005, 7:165-167.
3. **Koukkou E, Adamopoulos DA.** Environmental and drug-induced erectile dysfunction. *Anir* 2005, 7:171-176.
4. **Caretta N, Ferlin A, Palego PF, Foresta C.** Endocrine regulation of erection. *Anir* 2005, 7:159-161.
5. **Shabsigh R, Arver S, Channer KS, Eardley I, Fabri A, Gooren L, Heufelder A, Jones H, Mervin S, Zitzmann M.** The triad of erectile dysfunction, hypogonadism and the metabolic syndrome. *Int J Clin Pract* 2008, 62:791-798.
6. **Shabsigh R.** Testosterone therapy in erectile dysfunction. *Aging Male* 2004, 7:312-318.
7. **Jackson G.** Erectile dysfunction and vascular risk: let's get it right. *Eur Urol* 2006, 50:660-661.
8. **Παπαδήμας Ι, Γουλής ΔΓ.** Θεραπευτική αντιμετώπιση του γηράσκοντα άνδρα. *Ανήρ* 2002, 4:213-217.
9. **Reffelmann T, Kloner R.** Vardenafil: a selective PDE5-inhibitor for the treatment of erectile dysfunction. *Expert Opin Pharmacother* 2007, 8:965-974.
10. **van Ahlen H, Wahle K, Kupper W, Yassin A, Reblin T, Neureither N.** Safety and efficacy of vardenafil a selective PDE5-inhibitor in patients with erectile dysfunction and arterial hypertension, treated with antihypertensives. *J Sex Med* 2005, 2:856-864.
11. **Foresta C, di Mambro A, Caretta N, de Toni L, Zuccarello D, Ferlin A.** Effect of vardenafil on endothelial progenitor cells in hypogonadal hypogonadal patients: the role of testosterone treatment. *Clin Endocr* 2009, 71:412-416.
12. **Traish A, Kim N.** Is vardenafil superior or non-inferior to sildenafil in the management of erectile dysfunction? Revisiting the physiological, biochemical and clinical evidence. *J Sex Med* 2008, 5:1762-1769.
13. **Ziegler D, Merfort F, van Ahlen H, Yassin A, Reblin T, Neureither N.** Efficacy and safety of flexible dose vardenafil in men with type 1 diabetes and erectile dysfunction. *J Sex Med* 2006, 3:883-891.
14. **Miner M, Billups KL.** Erectile dysfunction and dyslipidemia: Relevance and role of PDE-inhibitors and statins. *J Sex Med* 2008, 5:1066-1078.
15. **Tikkanen MJ, Jackson G, Tammela T, Asmann G, Palomaki A, Kuppari M, Olsson A.** Erectile dysfunction as a risk factor for coronary heart disease: implications for prevention. *Int J Clin Pract* 2007, 61:265-268.
16. **Dimitriadis F, Giannakis D, Pardalidis N, Zikopoulos K, Paraskevaidis E, Giotitsas N, Kalabokis V, Tsounapi P, Baltogiannis D, Georgiou I, Saito M, Watanabe T, Miyagawa I, Sofikitis N.** Effects of phosphodiesterase-5 inhibitors on sperm parameters and fertilizing capacity. *Asian J Androl* 2008, 10:115-133.
17. **Buvat J, Bou Jaoude G.** Significance of hypogonadism in erectile dysfunction. *World J Urol* 2006, 24:657-667.
18. **Yassin I, Saad F, Gooren LJ.** Metabolic syndrome androgen deficiency and erectile dysfunction never come alone. *Andrologia* 2008, 40:259-264.
19. **Brock G, Nehra A, Lipschultz L, Karlin G, Gleave M, Seger M, Nathan HP.** Safety and efficacy of vardenafil for the treatment of men with erectile dysfunction after radical prostatectomy. *J Urol* 2003, 170:1278-1283.
20. **Gooren LJ, Saad F.** Recent insights into androgen action on the anatomical and physiological substrate of penile erection. *Asian J Androl* 2006, 8:3-9.
21. **Hyun Han D, Chae MR, Jae Hun Jung MA, Insuk So, Kwan Park J, Wong Lee S.** Effect of testosterone on potassium channel opening in human corporal smooth muscle cells. *J Sex Med* 2008, 5:822-832.
22. **Francavilla S, Bocchio M, Pellicione F, Mihalca R.** Vasculogenic erectile dysfunction and role of nitric oxide in penile erection. *Anir* 2005, 7:162-164.
23. **Shabsigh R, Kaufman J, Steidle C, Padma-Nathan H.** Randomised study of testosterone gel as adjunctive therapy to PDE5-inhibitors in hypogonadal men with erectile dysfunction who do not respond to PDE5-inhibitors alone. *J Urol* 2004, 172:658-663.
24. **Greco EA, Spera G, Aversa A.** Combining testosterone and PDE inhibitors in erectile dysfunction: basic rationale and clinical evidences. *Eur Urol* 2006, 50:940-947.
25. **Jackson G.** The metabolic syndrome and erectile dysfunction: multiple vascular risk factors and hypogonadism. *Eur Urol* 2006, 50:426-427.

SCIENTIFIC PROGRAMME
6th European Congress of Andrology

Megaron Moussikis, Athens, Greece

Wednesday 29.09.2010

	Nikos Skalkotas Auditorium	Hall A
10.00-12.00		Satellite event 1
12.00-14.00		Satellite event 2
14.00-14.30	Break	Break
14.30-16.30	Post-graduate event 1 <i>Diagnosis of male infertility: state of the art</i>	Post-graduate event 2 <i>Assessment of male reproductive function in laboratory animals</i>
16.30-17.00	Break	Break
17.00-18.30	Post-graduate event 3 <i>Imaging of reproductive tract in man</i>	Post-graduate event 4 <i>Reproductive Toxicology in animals</i>
18.30-19.00	Break	Break
19.00-19.30	Opening ceremony	
19.30-20.15	Presidential lecture <i>Stem cells in Andrology</i>	
20.15	Welcome reception	

Thursday 30.09.2010

	Nikos Skalkotas Auditorium	Hall A
09.00-10.30	Symposium 1 <i>Obesity and testicular function</i>	Symposium 2 <i>Hot topics in Andrology</i>
10.30-11.00	Plenary lecture 1 (ASA) <i>Different approaches in genomic analysis</i>	
11.00-11.30	Break	Break
11.30-13.30	Symposium 3 <i>Testicular and prostate cancer</i>	Symposium 4 <i>Pediatric and adolescence Andrology</i>
13.30-15.00	Long break	Satellite event 3
15.00-17.00	Selected oral presentations 1 (1-12)	Selected oral presentations 2 (13-24)
17.00-17.30	Break	Break
17.30-19.00	Poster tour (Nikos Skalkotas Foyer)	
19.00-20.30	EAA General Assembly	

Friday 01.10.2010

	Nikos Skalkotas Auditorium	Hall A
09.00-10.30	Symposium 5 <i>Epididymal function</i>	Symposium 6 <i>Young researchers session</i>
10.30-11.00	Plenary lecture 2 (IJA)	
11.00-11.30	Break	Break
11.30-13.30	Symposium 7 <i>Management of male factor subfertility</i>	Symposium 8 <i>Spermatogenesis</i>
13.30-15.00	Long break	Satellite event 4
15.00-17.00	Selected oral presentations 3 (25-36)	Selected oral presentations 4 (37-48)
17.00-17.15	Break	Break
17.15-17.45	Plenary lecture 3 <i>Hypogonadotropic hypogonadism</i>	
17.45-18.00	Closing Remarks	

Post-graduate events**• PG₁: Diagnosis of male infertility: state of the art**

- o Chairperson
 - Forti G (ITA), Nieschlag E
- o Semen analysis: WHO update
 - Barratt C (UK)
- o The role of DNA fragmentation
 - Borini A (ITA)
- o Genetic analysis
 - Krausz C (ITA)
- o Metabolomics
 - Le Bizec B (FRA)

• PG₂: Assessment of male reproductive function in laboratory animals

- o Chairperson
 - Poutanen M (FIN)
- o Morphological and imaging analysis
 - Saunders P (UK)
- o Fertility testing
 - Sipilä P (FIN)
- o Effect of genetic manipulation on male fertility
 - Poutanen M (FIN)
- o Reproductive hormone analysis
 - Tena-Sempere M (ESP)

• PG₃: Imaging of reproductive tract in man

- o Chairperson
 - Lenzi A (ITA), Jannini EA (ITA)
- o Ultrasonography: Testis and accessory glands
 - Isidori AM (ITA)
- o Invasive diagnostic tests: a dilemma between appropriateness and ethics
 - Fabbri A (ITA)
- o Histopathology of the testis
 - Schulze W (GER)

• PG₄: Reproductive Toxicology in animals

- o Chairperson:
 - Jegou B (FRA), Sharpe R (UK)
- o Fetal gonadal assay
 - Jegou B (FRA)
- o Multi-generation tests
 - Christiansen S (DAN)
- o Omics in Reproductive Toxicology
 - Primig M (FRA)

Satellite symposia

- ST₁: Androgen replacement therapy
- ST₂: Male osteoporosis
- ST₃: Erectile dysfunction

Plenary lectures

- L₁
 - Chairperson
 - Wu F (UK)
 - Presidential lecture: *Stem cells in Andrology*
- L₂
 - Chairperson
 - Baldi E (ITA)
 - ASA lecture: *Different approaches in genomic analysis*
 - Carroll D (USA)
- L₃
 - Chairperson
 - Rajpert-De Meyts E (DAN)
 - IJA lecture
 - TBA
- L₄
 - Chairperson
 - Huhtaniemi I (UK)
 - Hypogonadotropic hypogonadism
 - Raivio T (FIN)

Oral presentations

- O₁: Presentations 1-12
 - Chairpersons
 - Giwercman A (SWE), Papadimas J (GRE)
- O₂: Presentations 13-24
 - Chairpersons
 - Slowikowska J (POL), Koukkou E (GRE)
- O₃: Presentations 25-36
 - Chairpersons
 - Mieusset R (FRA), Kopa Zs (HUN)
- O₄: Presentations 37-48
 - Chairpersons
 - Simoni M (ITA), Panidis D (GRE)

Poster presentations

- P₁
 - Chairpersons
 - TBA (country), Abrahamian-Michalaki A (GRE)
- P₂
 - Chairpersons
 - TBA (country), Mavrommatis C (GRE)

Symposia

- S₁: Obesity and testicular function
 - Chairpersons
 - Mallidis C (GER), Nicopoulou S (GRE)
 - Relationship to fertility
 - Baker HWG (AUS)
 - Relationship to hypogonadism
 - Foresta C (ITA)
 - Relationship to male puberty
 - Juul A (DAN)
- S₂: Hot topics in Andrology
 - Chairpersons
 - Meinhardt A (GER), Goulis DG (GRE)
 - TBA
- S₃: Testicular and prostate cancer
 - Chairpersons
 - Damber JE (SWE), Asvestis Ch (GRE)
 - Genetics
 - Visakorpi T (FIN)
 - Genetic and environmental factors
 - Hemminki K (GER)
 - Testicular carcinoma in situ and incidentalomas
 - Dieckmann KP (GER)
 - Update on management of prostate cancer
- S₄: Developmental disorders of the penis
 - Chairpersons
 - Toppari J (FIN), Dacou-Voutetakis E (GRE)
 - Ontogeny
 - Sharpe R (UK)
 - Effects of chemical exposures
 - Main K (DAN)

- o *Micropenis*
 - Hughes I (UK)
- o *Hypospadias*
 - Kalfa N (FRA)
- **S₅:** Epididymal function
 - o Chairpersons
 - Haidl G (GER), Angelopoulou R (GRE)
 - o *Knock-out genes*
 - Krutskikh A (RUS)
 - o *Epididymo-orchitis: basic aspects*
 - Lustig L (ARG)
 - o *Epididymo-orchitis: clinical implications*
 - Schuppe HC (GER)
- **S₆:** Young researchers session
 - o Chairpersons
 - TBA
- **S₇:** Management of male factor subfertility
 - o Chairpersons
 - Adamopoulos DA (GRE), Colpi GM (ITA)
 - o *Progressively deteriorating semen quality: The role of ART*
 - Yavetz H (ISR)
 - o *Options for medical management*
 - Francavilla S (ITA)
 - o *Controversies on TESE mode*
 - Diemer T (GER)
 - o *Varicocele: an update*
 - Sofikitis N (GRE)
- **S₈:** Spermatogenesis – basic aspects
 - o Chairpersons
 - Kula K (POL), Krausz C
 - o *Small RNAs*
 - Kotaja N (FIN)
 - o *Copy number variants*
 - Giwercman Y (SWE)
 - o *Regulation of meiosis*
 - Baarends WM (NET)
- **S₉:** Erectile dysfunction (may be transformed to ST3 or ST4)
 - o Chairpersons
 - Weidner W (GER), Hatzichristou D (GRE)
 - o Is erectile dysfunction an indicator of poor health?
 - Hatzichristou D (GRE)
 - o *Effects of PDE5-inhibitors on semen quality*
 - TBA
 - o *Extra-gonadal functions of PDE5-inhibitors*
 - Maggi M (ITA)