

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ  
ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
«ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ»**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕΤΑΞΥ ΑΡΧΙΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ  
ΚΑΙ ΑΛΛΩΝ ΠΟΙΟΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΤΟΥ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ**

**ΧΟΥΝΟΥ ΖΩΙΤΣΑ  
ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

**ΛΑΡΙΣΑ  
Σεπτέμβριος 2010**

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟΣ ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ  
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΙΩΑΝΝΗΣ Ε. ΜΕΣΣΗΝΗΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπων: Ν. Βαμβακόπουλος

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Κ.Νταφόπουλος,  
Γ.Ανυφαντής

## **ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ**

## **ΣΕΛΙΔΑ**

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	3
A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	4
A.1 ΣΠΕΡΜΑΤΟΓΕΝΕΣΗ.....	4
A.2 ΑΝΑΛΥΣΗ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ.....	5
A.3 ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΤΙΜΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ.....	7
A.4 ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ ΚΑΙ IVF.....	8
A.5 ΑΠΟΠΤΩΣΗ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΩΝ.....	9
B. ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ.....	11
B.1 ΜΕΤΑΤΟΠΙΣΗ ΦΩΣΦΑΤΙΔΥΛΟΣΕΡΙΝΗΣ (PS).....	11
B.2 ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΚΑΣΠΑΣΩΝ.....	13
B.3 ΔΥΝΑΜΙΚΟ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΗΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ.....	13
B.4 ΚΑΤΑΤΜΗΣΗ ΤΟΥ DNA.....	14
B.5 ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ FAS.....	15
B.6 ΣΩΜΑΤΙΑ M540.....	16
B.7 ΑΛΛΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ.....	17
Γ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	18
Δ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	25

## ABSTRACT

Apoptosis is a mode of programmed cellular death based on a genetic mechanism that induces a series of cellular, morphological and biochemical alterations, leading the cell to suicide without eliciting an inflammatory response. Conventional semen analysis has limited clinical value for predicting the success rate of IVF. Mature sperm cells have been reported to express distinct markers of apoptosis-related cell damage. Some studies attempted to link apoptotic cell death in sperm with conventional seminal parameters. Several reports have demonstrated that ejaculated sperm from infertile men show ultrastructural damage as DNA fragmentation, phosphatidylserine externalization and caspases activation. While overall the data do not clearly indicate that ejaculated sperm undergo apoptosis, they do suggest that these markers might have clinical relevance as some of them could potentially be used as diagnostic tools to predict sperm dysfunction and male infertility.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η απόπτωση είναι μια μορφή προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου βασισμένη σε γενετικούς μηχανισμούς που επάγει μια σειρά κυτταρικών, μορφολογικών και βιοχημικών αλλαγών, οδηγώντας το κύτταρο σε αυτοκτονία χωρίς να προκληθεί φλεγμονώδης αντίδραση. Η τυπική ανάλυση σπέρματος έχει μειωμένη κλινική αξία στην πρόβλεψη της επιτυχίας της IVF. Έχει αναφερθεί ότι τα ώριμα σπερματικά κύτταρα εκφράζουν ευδιάκριτους δείκτες απόπτωσης που σχετίζονται με την κυτταρική καταστροφή. Μελέτες επιχειρούν να συνδέσουν τον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο των σπερματοζωαρίων με τις τυπικές παραμέτρους του σπέρματος. Έρευνες απέδειξαν ότι το εκσπερματιζόμενο σπέρμα των υπογόνιμων ανδρών εμφανίζει βλάβη στην δομή του όπως κατάτμηση του DNA, εξωτερίκευση της φωσφατυδιλοσερίνης, και ενεργότητα κασπασών. Ενώ γενικά τα δεδομένα δεν ξεκαθαρίζουν αν το εκσπερματιζόμενο σπέρμα υπόκειται σε απόπτωση, προτείνουν ότι αυτοί οι δείκτες μπορεί να έχουν κλινική εφαρμογή καθώς κάποιοι από αυτούς μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως διαγνωστικά μέσα για την πρόβλεψη της δυσλειτουργίας του σπέρματος και της ανδρικής υπογονιμότητας.

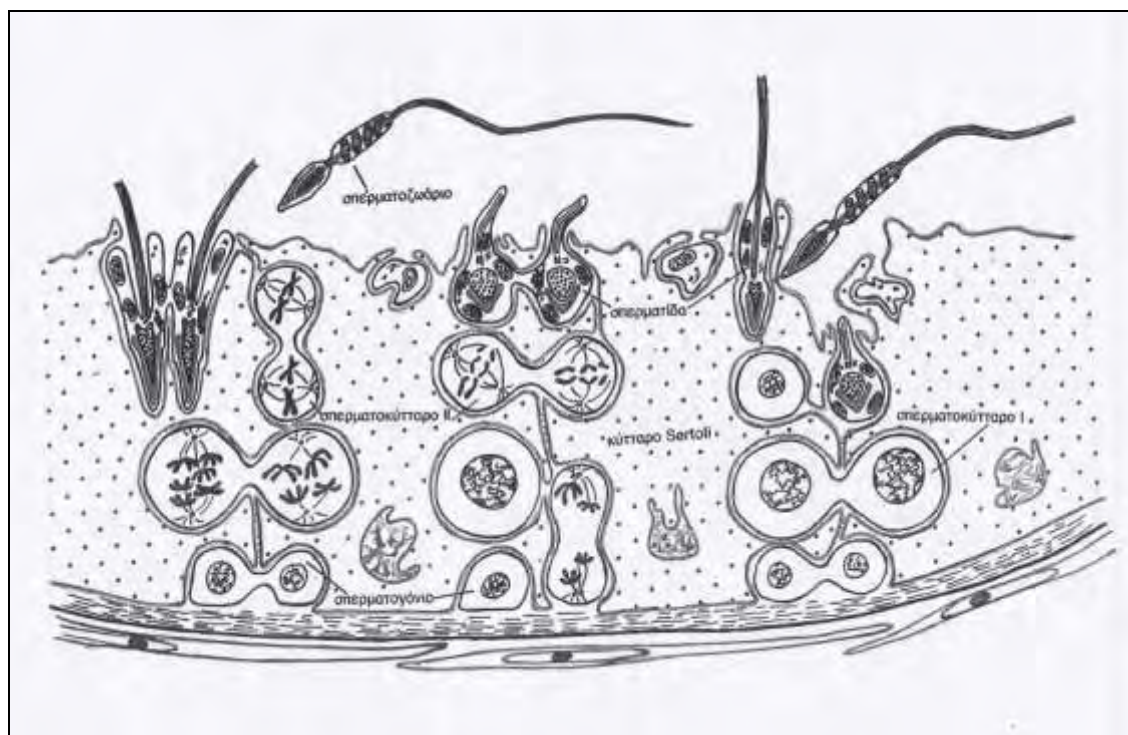
## **A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

Αρκετές από τις περιπτώσεις IVF (In Vitro Fertilization) είναι αποτέλεσμα ανδρικού παράγοντα υπογονιμότητας. Η ποιότητα του σπέρματος είναι ένας από τους παράγοντες που καθορίζουν την επιτυχία της IVF. Η ποιότητα του σπέρματος εκτιμάται μέσω της τυπικής ανάλυσης σπέρματος χρησιμοποιώντας το οπτικό μικροσκόπιο για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης, της κινητικότητας και της μορφολογίας των σπερματοζωαρίων (Hao-Bo Zhang *et al*, 2008). Ωστόσο, η τυπική ανάλυση σπέρματος έχει περιορισμένη κλινική αξία για την πρόβλεψη της επιτυχίας της IVF, καθώς 50% των ζευγαριών με αποτυχία γονιμοποίησης είχε φυσιολογική ανάλυση σπέρματος πριν την IVF (Lui and Beker, 2000). Επιπλέον, η τυπική ανάλυση σπέρματος δεν προσδιορίζει την παρουσία αποπτωτικών σπερματοζωαρίων, τα οποία μπορεί να είναι εν μέρει υπεύθυνα για τα χαμηλά ποσοστά γονιμοποίησης και εμφύτευσης στην υποβοηθούμενη αναπαραγωγή (Glander *et al.*, 1999; Weng *et al.*, 2002).

### **A.1 ΣΠΕΡΜΑΤΟΓΕΝΕΣΗ**

Η διαφοροποίηση των βλαστικών γενετικών κυττάρων στο αρσενικό αρχίζει στην ήβη. Από τα βλαστικά κύτταρα προέρχονται τα σπερματογόνια τα οποία πολλαπλασιάζονται με μίτωση στη διάρκεια της αναπαραγωγικής ζωής του αρσενικού και από αυτά, με διαφοροποίηση προκύπτουν τα πρωτογενή σπερματοκύτταρα. Αυτά αφού διπλασιάσουν το DNA τους μπαίνουν στην πρόφαση της πρώτης μειωτικής διαίρεσης. Η πρόφαση διαρκεί 16 ημέρες και αφού συμπληρωθεί το κύτταρο περνά γρήγορα στις επόμενες φάσεις και προκύπτει το δευτερογενές σπερματοκύτταρο. Αυτό μπαίνει αμέσως στη δεύτερη μειωτική διαίρεση από την οποία προκύπτουν 2 σπερματίδες. Κάθε σπερματίδα περιέχει nDNA και 23 χρωμοσώματα (Αγγελοπούλου P., 1992). Η κάθε σπερματίδα διαφοροποιείται σε σπερματοζώαριο μέσω μιας διαδικασίας που καλείτε σπερμιογένεση και η οποία τελειώνει όταν οι ανδρικοί γαμέτες αποδεσμεύονται από τα κύτταρα Sertoli στον αυλό των σπερματικών

σωληναρίων. Η διαδικασία της σπερμιογένεσης αποτελεί μια απλή κυτταρική διαφοροποίηση χωρίς διαίρεση (Lucinda L., 1999 ). Στον άνθρωπο ο κύκλος σπερματογένεσης, η διάρκεια δηλαδή εξέλιξης ενός σπερματογονίου σε ώριμο σπερματοζώαριο είναι 74 ημέρες. Η μιτωτική δραστηριότητα του σπερματικού επιθηλίου είναι πολύ έντονη και διαρκεί όλη την αναπαραγωγική ζωή. Η παραγωγή σε ένα μόνο κύκλο, ανέρχεται σε 200.000 σπερματίδες /εκ. σπερματικού σωληναρίου (Αγγελοπούλου Ρ., 1992).



**Εικόνα 1:** Σπερματογένεση. Στο τοίχωμα των σπερματικών σωληναρίων παρατηρούνται κύτταρα της σπερματικής σειράς σε διάφορα στάδια εξέλιξης που περιβάλλονται από τις κυτταροπλασματικές αποφυάδες των κυττάρων Sertoli.

## **A.2 ΑΝΑΛΥΣΗ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ**

Η ανάλυση του σπέρματος σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO) περιλαμβάνει συνοπτικά τα ακόλουθα βήματα :

**Στα πρώτα 5 λεπτά :**

- τοποθετείται το δοχείο συλλογής του δείγματος σε επωαστή (37°C) ώστε να ρευστοποιηθεί.

### Μέσα σε 30 με 60 λεπτά :

- εκτίμηση της ρευστοποίησης και της εμφάνισης του σπέρματος.
- μέτρηση του όγκου του δείγματος
- μέτρηση του pH
- μικροσκοπική παρατήρηση της εμφάνισης, της κινητικότητας και της αραίωσης που απαιτείται για τον υπολογισμό του αριθμού των σπερματοζωαρίων
- δημιουργία επιχρίσματος σπέρματος για την εκτίμηση της μορφολογίας
- εκτίμηση του αριθμού των σπερματοζωαρίων

### Μέσα σε 3 ώρες :

- τα δείγματα στέλνονται στο μικροβιολογικό εργαστήριο (αν απαιτείται)

Το δείγμα λαμβάνεται μετά από αυνανισμό και συλλέγεται σε δοχείο γυάλινο ή πλαστικό μη τοξικό για τα σπερματοζωάρια. Μη ακέραια δείγματα (ή ημιτελή) ειδικά όταν το πρώτο μέρος της εκσπερμάτισης έχει χαθεί, δεν πρέπει να εκτιμούνται. Το δείγμα θα πρέπει να διατηρείται σε θερμοκρασία από 20°C έως 37°C ώστε να αποφεύγονται μεγάλες αλλαγές της θερμοκρασίας που μπορεί να επηρεάσουν τα σπερματοζωάρια μετά την εκσπερμάτιση. Όταν το δείγμα προορίζεται για υποβοηθούμενη αναπαραγωγή η διαδικασία είναι όπως και στην περίπτωση της διάγνωσης αλλά το δοχείο συλλογής, τα tips των πιπετών και οι πιπέτες ανάδευσης πρέπει να είναι αποστειρωμένα.

Αρχικά το δείγμα εξετάζεται μακροσκοπικά όπου εκτιμάται η ρευστοποίηση, το ιξώδες, το χρώμα, ο όγκος και το pH. Η μικροσκοπική εξέταση του δείγματος γίνεται με τη χρήση ανάστροφου μικροσκοπίου και περιλαμβάνει τον έλεγχο για :

- βλεννώδεις σχηματισμούς
- συσσωματώματα και συγκολλήσεις

- την παρουσία άλλων κυττάρων εκτός των σπερματοζωαρίων (επιθηλιακά, σφαιρικά κύτταρα και απομονωμένες κεφαλές ή ουρές σπερματοζωαρίων)

και γίνεται εκτίμηση της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων και της συγκέντρωσης του δείγματος.

### **A.3 ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΤΙΜΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ**

Σύμφωνα με την τελευταία έκδοση του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (**World Health Organization**) οι φυσιολογικές τιμές των παραμέτρων είναι οι ακόλουθες :

Ρευστοποίηση: όλο το δείγμα συνήθως ρευστοποιείται μέσα σε 15 λεπτά ωστόσο σε σπάνιες περιπτώσεις μπορεί να χρειαστεί 60 λεπτά ή περισσότερο.

Όγκος: το κατώτερο όριο αναφοράς για τον όγκο είναι 1,5 ml έως 6 ml.

pH: ως κατώτερη αποδεκτή τιμή για το pH σπέρματος γόνιμων ανδρών λαμβάνεται η τιμή 7,2 και ανώτερη 8.

Συγκέντρωση: το κατώτερο όριο αναφοράς για τη συγκέντρωση των σπερματοζωαρίων θεωρείται η τιμή  $15 \times 10^6$  σπερμ./ ml.

Ολικός αριθμός: το κατώτερο όριο αναφοράς για τον ολικό αριθμό σπερματοζωαρίων είναι  $39 \times 10^6$  σπερμ./ εκσπερμάτιση.

Κινητικότητα: το κατώτερο όριο αναφοράς για την συνολική κινητικότητα (προωθητική, PR και μη προωθητική, NP) είναι 40% και το κατώτερο όριο για την προωθητική κίνηση είναι 32%. Σημείωση: η κινητικότητα του κάθε σπερματοζωαρίου κατηγοριοποιείται διαφορετικά από την προηγούμενη έκδοση του ίδιου εγχειριδίου. Διακρίνονται οι παρακάτω κινήσεις:

- Προωθητική κίνηση (Progressive motility PR): τα σπερματοζωάρια κινούνται ενεργά είτε σε ευθεία είτε κάνοντας μεγάλο κύκλο ανεξάρτητα από την ταχύτητα.



- Μη προωθητική κίνηση (Non Progressive motility NP ): όλα τα υπόλοιπα είδη κίνησης απουσία προώθησης.
- Ακινησία (Immotility IM): καμία κίνηση

Μορφολογία: το κατώτερο όριο αναφοράς για φυσιολογικές μορφές είναι 4%.

Λευκά αιμοσφαίρια:  $1.0 \times 10^6$  / ml θεωρείται η οριακή τιμή.

Βιωσιμότητα: η κατώτερη αποδεκτή τιμή είναι 58%.

Συγκολλήσεις: για να θεωρείτε φυσιολογικό το δείγμα θα πρέπει οι συγκολλήσεις να καταλαμβάνουν <20%.

Όμως τα αποτελέσματα από την ανάλυση σπέρματος παρέχουν περιορισμένη πρόβλεψη για την γονιμότητα κάθε ατόμου (Jeyendren, 2000). Αφού ο ανδρικός παράγοντας υπογονιμότητας από μόνος του ευθύνεται για το 20% των υπογόνιμων ζευγαριών και συμβάλλει σε ένα 30-40% των περιπτώσεων (Thonneau *et al.*, 1991) είναι απαραίτητο να αναπτυχθούν νέες μεθοδολογίες και τεχνικές ώστε να βελτιωθεί η κλινική διάγνωση της ανδρικής υπογονιμότητας και να προσφέρουν γνώση για τη λειτουργία του σπέρματος (Chen z. *et al.*, 2006).

#### **A.4 ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ ΚΑΙ IVF**

Είναι αναγνωρισμένο ότι τα σπερματοζωάρια υπογόνιμων ανδρών εμφανίζουν ποικίλες δομικές και λειτουργικές ανωμαλίες. Σε συνθήκες *in vitro* αυτές οι ανωμαλίες εμφανίζονται κυρίως ως αδυναμία αλληλεπίδρασης με το ωάριο, ιδίως με τη διάφανη ζώνη. Οι δυσλειτουργίες στην πρόσδεση σπερματοζωαρίου-διάφανης ζώνης, μεμονωμένα ή σε συνδυασμό με άλλες ανωμαλίες, οδηγούν σε αποτυχημένη ή μειωμένη γονιμοποιητική ικανότητα (Liu and Gordon Baker, 1992; Oehninger *et al.*, 1992,1997). Άλλες αναφερθείσες δυσλειτουργίες του σπέρματος που σχετίζονται με την ανδρική υπογονιμότητα περιλαμβάνουν μεμονωμένη κινητική ανεπάρκεια (Mortimer *et al.*, 1986), ανεπάρκεια της ικανότητας του σπερματοζωαρίου να επιτελέσει ακροσωμική αντίδραση μετά τη σύνδεση με τη διάφανη ζώνη (Liu and Baker, 1994) και αποτυχία σύντηξης σπερματοζωαρίου-ωαρίου (Aitken *et al.*, 1991).

Η ανακάλυψη και η επιτυχία του ICSI (Intracytoplasmic Sperm Injection) βοήθησε στο να ξεπεραστούν πολλά εμπόδια στη διαλογή των σπερματοζωαρίων που ήταν επιβεβλημένη για την επιλογή των κυττάρων με την καλύτερη μορφολογική και λειτουργική συμπεριφορά στην υποβοηθούμενη αναπαραγωγή. Εξαιτίας του ενδιαφέροντος για τη μεταφορά γενετικών ανωμαλιών μέσω του ICSI πρόσφατα η προσοχή έχει εστιαστεί ξανά στη γενομική ακεραιότητα των ανδρικών γαμετών (Barroso. G. *et al.*, 2000).

### **A.5 ΑΠΟΠΤΩΣΗ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΩΝ**

Η απόπτωση είναι ένα είδος προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου βασισμένη σε γενετικούς μηχανισμούς που προάγουν μια σειρά κυτταρικών, μορφολογικών και βιοχημικών αλλαγών, οδηγώντας το κύτταρο σε αυτοκτονία χωρίς να προκαλέσει φλεγμονώδη αντίδραση (Aziz, N.*et al.*, 2007). Συμμετέχει, για παράδειγμα, στην εξισορρόπηση της κλωνικής επέκτασης κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης (Sakkas D. *et al.*, 1999; Sinha Hikim AP *et al.*, 1999). Παρατηρείτε συμπύκνωση της χρωματίνης, συμπύκνωση του κυτοπλάσματος και κοίλωση των πυρηνικών και κυτταροπλασματικών μεμβρανών. Στο τέλος της διαδικασίας οι πυρήνες τεμαχίζονται και τα κύτταρα διογκώνονται και τεμαχίζονται σε αποπτωτικά σωμάτια (Anzar *et al.*, 2002). Η ανδρική γονιμότητα μπορεί να επηρεάζεται από μεταβολές στον αποπτωτικό μηχανισμό (Shen HM *et al.*, 2002). Σχετικά υψηλά ποσοστά απόπτωσης έχουν παρατηρηθεί μετά από βιοψία όρχεως σε υπογόνιμους άντρες με ποικίλου βαθμού ορχική ανεπάρκεια (Jurisicova *et al.*, 1999). Από την άλλη πλευρά, μια διαφορετική αποπτωτική διαδικασία έχει στενά συσχετιστεί με την ανδρική υπογονιμότητα, βασιζόμενη στις παρακάτω παρατηρήσεις: (α) άνδρες με αζωοσπερμία ή σοβαρής μορφής ολιγοζωοσπερμία εμφανίζουν αυξημένη συχνότητα αποπτωτικών γενετικών κυττάρων στον ορχικό ιστό συγκριτικά με αυτούς που έχουν φυσιολογική σπερματογένεση (Lin *et al.*, 1997a,b; Sinha Hikim *et al.*, 1998) και (β) ορισμένοι τοξικοί για την

αναπαραγωγή παράγοντες όπως το κάδμιο ευθύνονται για την επαγωγή της απόπτωσης των γαμετικών κυττάρων (Richburg, 2000).

Αντίθετα, η απόπτωση στο σπέρμα μετά την εκσπερμάτιση είναι λιγότερο μελετημένη (Han-Ming Shen *et al.*, 2002). Πρόσφατες μελέτες επιχειρούν να συνδέσουν τον θάνατο των αποπτωτικών κυττάρων του σπέρματος με τις τυπικές παραμέτρους του σπέρματος (Sun *et al.*, 1997; Gandini *et al.*, 2000; Irvine *et al.*, 2000). Για να εξηγήσει την παρουσία αποπτωτικών χαρακτηριστικών στο σπέρμα υπογόνιμων αντρών, οι Sakkas *et al.* (1999a) πρότειναν ότι το αποπτωτικό μονοπάτι των όρχεων μπορεί να ξέφυγε από την ορθή πορεία οδηγώντας στην αποτυχία ολοκλήρωσης του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου.

## **B. ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ**

Έχει αναφερθεί ότι τα ώριμα σπερματικά κύτταρα εκφράζουν ευδιάκριτους δείκτες κυτταρικής καταστροφής που σχετίζεται με την απόπτωση (Sun *et al.*, 1997; Sakkas *et al.*, 1999b; Barroso *et al.*, 2000; Gandini *et al.*, 2000; Muratori *et al.*, 2000; Oesterhuis *et al.*, 2000; Shen *et al.*, 2002) αν και στερούνται μεταγραφικής δραστηριότητας και έχουν μικρή ποσότητα κυτοπλάσματος (Weil *et al.*, 1998; Grunewald *et al.*, 2005). Οι κυριότεροι αποπτωτικοί δείκτες που έχουν χαρακτηριστεί είναι η μετατόπιση της φωσφατιδυλοσερίνης (PS, phosphatidylserine) στο εξωτερικό πέταλο της κυτταρικής μεμβράνης του σπερματοζωαρίου, η αυξημένη ενεργότητα των κασπασών, η παρουσία κατακερματισμένου DNA και πολλοί άλλοι που θα αναφερθούν αναλυτικά παρακάτω.

Δεν είναι ξεκάθαρο εάν οι αποπτωτικοί δείκτες που ανιχνεύονται στα σπερματοζωάρια είναι κατάλοιπα μιας αποτυχημένης αποπτωτικής διαδικασίας που ξεκίνησε πριν την εκσπερμάτιση ή εάν είναι αποτέλεσμα της απόπτωσης που ξεκίνησε στην προ-εκσπερματική φάση (Sakkas *et al.*, 1999a,b; Tesarik *et al.*, 2002; Lachaud *et al.*, 2004).

### **B.1 ΜΕΤΑΤΟΠΙΣΗ ΦΩΣΦΑΤΙΔΥΛΟΣΕΡΙΝΗΣ (PS)**

Η κυτταρική μεμβράνη αποτελεί ένα όργανο κλειδί για τη λειτουργία του σπέρματος. Η φυσιολογική γονιμοποίηση απαιτεί φυσιολογική ακεραιότητα και λειτουργία της κυτταρικής μεμβράνης του σπέρματος. Ένα αρχικό αποπτωτικό φαινόμενο στα σωματικά κύτταρα είναι η απώλεια της φωσφολιπιδικής συμμετρίας, όπως η μετατόπιση της PS από το εσωτερικό στο εξωτερικό πέταλο της μεμβράνης (Glander HJ *et al.*, 1999). Η έκθεση της PS στην εξωτερική επιφάνεια των κυττάρων αναφέρεται ως μετατόπιση της PS, προσφέροντας μια ευκαιρία για την ανίχνευση των κυττάρων που βρίσκονται στα αρχικά στάδια της απόπτωσης (Weng *et al.*, 2002).

Η εκτεθημένη φωσφατιδυλοσερίνη μαρκάρει τα κύτταρα για καταστροφή από τα φαγοκύτταρα (Fadok *et al.*, 1992, 2001; Hoffmann *et al.*, 2001) τα οποία δρουν πριν χαθεί η ακεραιότητα της κυτταρικής μεμβράνης ώστε να αποφευχθεί φλεγμονή, πόνος και επούλωση (Taylor *et al.*, 2004). Στα σπερματοζωάρια, όπως και στα υπόλοιπα κύτταρα μπορεί να ανιχνευτεί από την ασβεστοεξαρτώμενη σύνδεση της Ανεξίνης -V (AN) που είναι συνδεδεμένη με φθορίζουσα ουσία, στην μετατοπισμένη PS (Weng *et al.*, 2002). Η PS εμφανίζει ιδιαίτερη συγγένεια για την Ανεξίνη -V, μια πρωτεΐνη 35 kDa. Η κυτταρική μεμβράνη των σπερματοζωαρίων είναι φυσιολογικά αδιαπέραστη από την Ανεξίνη -V και η προσκόλληση αυτής στη μεμβράνη των σπερματοζωαρίων φανερώνει μια βλάβη στο σημείο αυτό (Marchetti C. and Marchetti P, 2005). Συνδυαστικά γίνεται χρώση με φθορίζουσα χρωστική, όπως propidium iodide (PI) η οποία επιτρέπει τη διάκριση μεταξύ ζωντανών και νεκρών σπερματοζωαρίων (Weng *et al.*, 2002). Τα σπερματοζωάρια τα οποία χρωματίζονται με propidium iodide (PI<sup>+</sup>) μόνο ή με ανεξίνη-V και propidium iodide (AN<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>) ταυτόχρονα χαρακτηρίζονται ως νεκρωτικά, ενώ αυτά που χρωματίζονται μόνο με ανεξίνη-V (AN<sup>+</sup>) χαρακτηρίζονται ως αποπτωτικά. Τα μη χρωματισμένα κύτταρα (AN<sup>-</sup>/PI<sup>-</sup>) θεωρούνται ζωντανά (Lachaud C. *et al.*, 2004).

Η εμφάνιση της PS στην εξωτερική μεμβράνη είναι χρονοεξαρτώμενη και ακολουθείται από την απώλεια της ακεραιότητας της μεμβράνης (Taylor *et al.*, 2004). Η μετατόπιση της PS προηγείται του κερματισμού του DNA και συνεπώς επιτρέπει την ανίχνευση των αποπτωτικών κυττάρων στα αρχικά στάδια της διεργασίας (Αγγελοπούλου P. και συν, 2002). Η ανίχνευση της PS στην εξωτερική μεμβράνη των σπερματοζωαρίων έχει αναφερθεί ότι προάγει άλλες μεταβολές όπως αλλαγές στην πυρηνική και κυτταροπλασματική οργάνωση και κυτταρική συμπύκνωση σε αποπτωτικά σωματίδια (Van Blerkom and Davis, 1998). Το φαινόμενο αυτό έχει συσχετιστεί με λειτουργικές αλλαγές του σπέρματος όπως το capacitation (Gadella and Harrison, 2002; De Vries *et al.*, 2003).

## **B.2 ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΚΑΣΠΑΣΩΝ**

Ίσως ένας από τους καλύτερους δείκτες απόπτωσης είναι η παρουσία αυξημένης ενεργότητας κασπασών, αλλά οι κασπάσες μπορεί να εξυπηρετούν και άλλες λειτουργίες ανεξάρτητες από την απόπτωση (Martinez *et al.*, 2002; Tesarik *et al.*, 2002; Schwerk and Schulze-Osthoff, 2003). Σήμερα θεωρείται ότι το κεντρικό συστατικό της αποπτωτικής μηχανής περιλαμβάνει ένα ή περισσότερα από τα μέλη της οικογένειας των κασπασών (Thornberry and Lazebnik, 1998). Στα υγιή κύτταρα, οι κασπάσες εκφράζονται ως ανενεργά προένζυμα (~30 kDa). Τα ένζυμα αυτά συμμετέχουν σε έναν καταρράκτη που ενεργοποιείται ως απάντηση στα προ-αποπτωτικά σημάδια και κορυφώνεται με την πρωτεόλυση των πρωτεϊνών που είναι απαραίτητες για την ομοίωση των κυττάρων και τελικά οδηγούν στο θάνατο του κυττάρου. Η κασπάση-3 είναι ο κύριος εκτελεστής μέσα σε αυτόν τον αποπτωτικό καταρράκτη (Thornberry and Lazebnik, 1998; Brill *et al.*, 1999).

Οι ενεργές κασπάσες -1, -8, -3 έχουν κυρίως ανιχνευτεί στο επίπεδο της μετα-ακροσωμικής περιοχής ενώ η κασπάση-9, που ενεργοποιείται από τα μιτοχόνδρια, εντοπίζεται στη μέση περιοχή (Paasch *et al.*, 2004). Η προκασπάση-7 είναι παρούσα σε δείγματα από φυσιολογικούς γόνιμους δότες ανεξάρτητα από το επίπεδο κινητικότητας. Η προκασπάση-9 είναι παρούσα σε κλάσματα υψηλής κινητικότητας (Taylor *et al.*, 2004). Ένας καλά χαρακτηρισμένος εξαρτώμενος από τις κασπάσες αποπτωτικός δείκτης είναι το κόψιμο και η απενεργοποίηση της πολυμεράσης της πολύ -ADP- ριβόζης (PARP, poly-ADP-ribose polymerase), ένα ένζυμο που συμμετέχει στην επιδιόρθωση του DNA (Oberhammer *et al.*, 1993; Nagata, 2000). Οι κασπάσες στα αποπτωτικά κύτταρα ανιχνεύονται με ειδικούς αντιορούς κατά των προϊόντων διάσπασής τους (Αγγελοπούλου Ρ. και συν., 2002).

## **B.3 ΔΥΝΑΜΙΚΟ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΗΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ**

Τα μιτοχόνδρια αποτελούν ένα ακόμα όργανο κλειδί για την λειτουργία των σπερματοζωαρίων. Στον άνθρωπο, υπάρχει συσχέτιση ανάμεσα στη φτωχή

μιτοχονδριακή λειτουργία που ανιχνεύεται ως μειωμένο δυναμικό μιτοχονδριακής μεμβράνης (MMP, Mitochondrial Membrane Potential), και στην ελαττωμένη κινητικότητα και μειωμένη γονιμότητα (Marchetti C. *et al.*, 2002). Τα μιτοχόνδρια είναι οι συντονιστές της απόπτωσης σε ποικιλία κυτταρικών συστημάτων καθώς συμμετέχουν σε πολλές αποπτωτικές διαδικασίες, συμπεριλαμβανομένων την ενεργοποίηση των κασπασών, και την μείωση του MMP (Green DR *et al.*, 1998). Η μείωση αυτή του δυναμικού ακολουθεί από την παραγωγή ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS) και συμβάλλουν ενεργά στο θάνατο του κυττάρου (Marchetti C. and Marchetti P, 2005).

Ποικιλία κατιονικών λιπόφιλων φθορισμοχρωμάτων έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση του δυναμικού των μιτοχονδρίων (Marchetti *et al.*, 2002; Piascecka *et al.*, 2003; Marchetti *et al.*, 2004). Αυτά τα φθορισμοχρώματα έχουν την ιδιαιτερότητα να εισέρχονται στη μήτρα των μιτοχονδρίων των ζωντανών κυττάρων ως συνάρτηση της διαφοράς δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης και η ένταση του φθορισμού που παρατηρείται είναι ανάλογη του δυναμικού της. Η εφαρμογή αυτών των φορισμομετρικών μεθόδων στην κυτταρομετρία ροής επιτρέπει μια αναπαραγωγίμη μέτρηση του δυναμικού μετά την εκσπερμάτιση (Marchetti *et al.*, 2004). Το δυναμικό των σπερματοζωαρίων των υπογόνιμων αντρών είναι σημαντικά πιο ελαττωμένο από αυτό των φυσιολογικών (Wang *et al.*, 2003).

Η μετατόπιση της φωσφατιδυλοσερίνης και η μείωση του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης είναι δύο χαρακτηριστικά των αρχικών σταδίων απόπτωσης. Αυτές οι αλλαγές προάγουν άλλες εκδηλώσεις του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου όπως η κατάτμηση του DNA (DNA fragmentation)(Agarwal A. *et al.*, 2003).

#### **B.4 ΚΑΤΑΤΜΗΣΗ ΤΟΥ DNA**

Η κατάτμηση του DNA των σπερματοζωαρίων μπορεί να οφείλεται σε ανώμαλο πακετάρισμα της χρωματίνης κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης (Gorczyca W. *et al.*, 1993; Manicardi GC *et al.*, 1995), σε

αποτυχημένη απόπτωση πριν την εκσπερμάτιση (Sakkas D. *et al.*, 1999; Sakkas D. *et al.*, 2002) ή στην εκτεταμένη παραγωγή ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS) κατά την εκσπερμάτιση (Lopes S. *et al.*, 1998; Kodama H. *et al.*, 1997; Moustafa MH. *et al.*, 2004). Η ενεργοποίηση των ενδογενών ενδονουκλεασών που προκαλούν την εκτεταμένη καταστροφή του DNA, χαρακτηριστικό της απόπτωσης στα σωματικά κύτταρα, μπορεί να είναι υπεύθυνη για την μειωμένη λειτουργικότητα των γενετικών κυττάρων της αναπαραγωγικής δεξαμενής (Gorczyca W. *et al.*, 1993). Για τον εντοπισμό της βλάβης του DNA χρησιμοποιείτε μια ποικιλία τεχνικών, όπως η SCSA (Sperm Chromatin Structure Assay), η Comet και η TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transference-mediated d UTP Nick-End Labeling) (Evenson DP *et al.*, 2002).

Η έκταση του κατάτμησης του DNA είναι στενά συνδεδεμένη με την λειτουργικότητα του σπέρματος και την ανδρική υπογονιμότητα (Sakkas *et al.*, 1999; Erenpreiss *et al.*, 2006). Σπερματοζωάρια με ανωμαλίες στο DNA τους μπορούν να γονιμοποιήσουν ένα ωάριο, να προκύψει ένα καλής ποιότητας έμβρυο αρχικού σταδίου και μετά ανάλογα με την έκταση της βλάβης του DNA αποτυγχάνει να δώσει επιτυχημένη κύηση (Ahmadi and Ng, 1999).

## **B.5 ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ FAS**

Η απόπτωση των ορχικών γαμετικών κυττάρων λαμβάνει χώρα φυσιολογικά και συνεχώς καθ' όλη τη διάρκεια ζωής. Ένας ακόμα παράγοντας που εμπλέκεται στην απόπτωση είναι η πρωτεΐνη της επιφάνειας των κυττάρων, FAS (Lee J. *et al.*, 1997). Η FAS είναι μια πρωτεΐνη τύπου I που ανήκει στην οικογένεια των παραγόντων νέκρωσης όγκων (TNF) / υποδοχέων νευρικών αυξητικών παραγόντων (NGFR) και συμμετέχει στην απόπτωση (Suda *et al.*, 1993; Krammer *et al.*, 1994; Schulze-Osthoff *et al.*, 1994). Η σύνδεση του προσδέτη του FAS (FAS ligand) ή αντι-FAS αντισώματος σκοτώνει τα κύτταρα μέσω απόπτωσης (Suda *et al.*, 1993). Ο υποδοχέας FAS έχει βρεθεί στο εκσπερματιζόμενο σπέρμα του ανθρώπου και



σχετίζεται αρνητικά με την συγκέντρωση του σπέρματος (Sakkas *et al.*, 1999, 2002).

Για την ανίχνευση της έκφρασης του FAS χρησιμοποιούνται τεχνικές όπως ανάλυση σε μικροσκόπιο φθορισμού και μη ειδικά αντι-FAS αντισώματα, δίνοντας όμως ψευδώς θετικά αποτελέσματα δυσκολεύοντας την διάκριση των διαφόρων υποπληθυσμών. Στις μέρες μας η έκφραση του υποδοχέα FAS στην επιφάνεια των σπερματοζωαρίων δεν αποτελεί αξιόπιστο δείκτη ώστε να χρησιμοποιείτε στην κλινική βιολογία.

## **B.6 ΣΩΜΑΤΙΑ M540**

Πρόσφατα ανιχνεύθηκε στο σπέρμα η ύπαρξη στρογγυλών σωματίων περιβαλλόμενων από μεμβράνη, τα επίπεδα των οποίων ήταν αρκετά υψηλά σε δείγματα μειωμένης ποιότητας σπέρματος (Muratori *et al.*, 2004) κυρίως σε όλιγοασθενοτεροζωοσπερμικά (OAT) δείγματα (Muratori *et al.*, 2005). Τα σωματία αυτά ονομάστηκαν M540 λόγω της ακτινοβολούσας χρώσης με μεροκυανίνη 540 (M540: merocyanine 540). Τα σωματία M540 είναι λιπόφιλοι σχηματισμοί, ευαίσθητα στις αλλαγές της αρχιτεκτονικής της μεμβράνης όπως αυτές που συμβαίνουν κατά την απόπτωση των σωματικών κυττάρων (Aussel *et al.*, 1993; Mower *et al.*, 1994). Επειδή τα σωματία M540 χρωματίζονται γρήγορα με M540, η μεμβράνη τους πακετάρεται διαφορετικά από αυτή των φυσιολογικών κυττάρων (Muratori *et al.*, 2004). Τα σωματία αυτά φαίνεται να είναι ετερογενή ευρήματα όσον αφορά το μέγεθος και την πυκνότητα όπως φαίνεται από την παρατήρηση στο οπτικό μικροσκόπιο και την κατανομή τους σε κλάσματα διαβαθμισμένης συγκέντρωσης (Muratori *et al.*, 2004). Επιπλέον, αρκετά από αυτά έχουν μέγεθος και πυκνότητα παρόμοια με την κεφαλή των σπερματοζωαρίων και δεν είναι εύκολη η άμεση διάκρισή τους (Muratori *et al.*, 2005).

Η φύση των σωματιδίων αυτών δεν είναι πλήρως διευκρινισμένη, αλλά δεν περιέχουν DNA και μπορεί να είναι αποτέλεσμα του εκφυλισμού των σπερματοζωαρίων (Muratori *et al.*, 2004). Πρόσφατα αναφέρθηκε ότι τα σωματία M540 είναι αποπτωτικά σωματία προερχόμενα από την απόπτωση

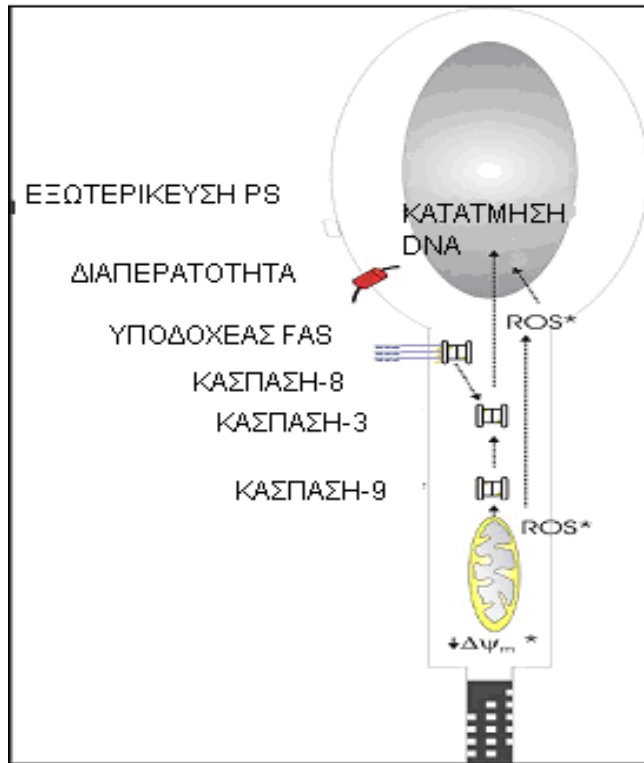
που πραγματοποιείτε στους όρχις (Muratori *et al.*, 2004), καθώς διαθέτουν αποπτωτικά χαρακτηριστικά όπως ενεργότητα κασπάσης, p53 και FAS (Marchiani *et al.*, 2007). Μέχρι τώρα, όλες οι αναλύσεις με κυτταρομετρία ροής για την κατάτμηση του DNA στα σπερματοζώαρια σε μη επεξεργασμένο δείγμα περιελάμβανε σωμάτια M540 και δεν είναι γνωστό πότε και πως η παρουσία τους επηρεάζει της μετρήσεις των παραμέτρων (Muratori *et al.*, 2004; Marchiani *et al.*, 2007).

## **B.7 ΑΛΛΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ**

Ένας παράγοντας ανεξάρτητος από την δράση των κασπασών που απελευθερώνεται από τα μιτοχόνδρια είναι ο παράγοντας επαγωγής της απόπτωσης (AIF, Apoptosis-Inducing Factor), ο οποίος μεταναστεύει στον πυρήνα όπου και συμμετέχει στην κατάτμηση του DNA (Susin *et al.*, 1999; Daugas *et al.*, 2000) και συμπύκνωση της χρωματίνης (Taylor *et al.*, 2004). Για την ανίχνευση του AIF χρησιμοποιούνται συνήθως μονοκλωνικά αντισώματα παραγόμενα σε κουνέλια (Taylor *et al.*, 2004).

Στον πυρήνα, το γονιδίωμα περιέχει γονίδια τα οποία αντιγράφονται ως απάντηση στα αποπτωτικά ερεθίσματα. Για παράδειγμα, η πρωτεΐνη p53 δρα φυσιολογικά ως ρυθμιστής του κυτταρικού κύκλου και ως καταστολέας όγκου *in vivo*. Ακολουθώντας την βλάβη του DNA, το p53 επάγει την απόπτωση προωθώντας την αυξημένη ρύθμιση της έκφρασης των προ-αποπτωτικών γονιδίων Bax, με ταυτόχρονη μείωση της έκφρασης του Bcl-2, ενός ευαίσθητου ρυθμιστή-επαγωγέα της απόπτωσης (Selivanova and Wiman, 1995).

Στο κυτταρόπλασμα, διάφορα ερεθίσματα, περιεχομένου την ενεργοποίηση του Bax της μιτοχονδριακής μεμβράνης, οδηγεί στην απελευθέρωση του κυτοχρώματος c (Gottlieb, 2001) στο κυτοσόλιο. Το κυτόχρωμα c προκαλεί έναν καταρράκτη γεγονότων τα οποία οδηγούν στην ενεργοποίηση της κασπάσης-3 (Garland and Halestrap, 1997; Chandra *et al.*, 2002; Siskind *et al.*, 2002).



**Εικόνα 2:** Σχηματική αναπαράσταση υποθετικών αποπτωτικών δεικτών που παρουσιάζονται στο εκσπερματιζόμενο σπέρμα υπογόνιμων ανδρών (Marchetti *et al.*, 2005).

## Γ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Έχει αναφερθεί σημαντική αρνητική συσχέτιση ανάμεσα στο ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων και τη βιωσιμότητα και την κινητικότητα των εκσπερματιζόμενων σπερματοζωαρίων (Marchetti *et al.*, 2002; Shen *et al.*, 2002; Weng *et al.*, 2002; Pena *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2004; Taylor *et al.*, 2004; Said *et al.*, 2005). Αντίθετα η συσχέτιση μεταξύ μορφολογίας και απόπτωσης δεν έχει ακόμα χαρακτηριστεί (Aziz, N. *et al.*, 2007).

Το ποσοστό των AN<sup>-</sup>/PI<sup>-</sup> σπερματοζωαρίων σχετίζεται θετικά με τις κλασικές παραμέτρους του σπέρματος και το δυναμικό της μιτοχονδριακής μεμβράνης (MMP) και αρνητικά με την τεχνική TUNEL(+). Τα AN<sup>-</sup>/PI<sup>-</sup> σπερματοζωάρια διαθέτουν υψηλή κινητικότητα, μειωμένη ενεργότητα κασπασών, υψηλό MMP και μειωμένο βαθμό κατάτμησης DNA (Paasch *et al.*, 2005; Said *et al.*, 2006) σε αντίθεση με τα AN<sup>-</sup>/PI<sup>+</sup> σπερματοζωάρια (Hao-Bo Zhang *et al.*, 2008), που φαίνεται να είναι είτε νεκρωτικά με αποδιοργανωμένη μεμβράνη που να αποκλείει πρόσδεση της ανεξίνης-V, είτε σε τελικά στάδια απόπτωσης (Ricci *et al.*, 2002). Τα επίπεδα πρώιμων αποπτωτικών AN<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup> και όψιμων αποπτωτικών AN<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup> σπερματοζωαρίων σχετίζονται αρνητικά με την κινητικότητα του σπέρματος (Ricci *et al.*, 2002; Said *et al.*, 2006; Hao-Bo Zhang *et al.*, 2008). Υπάρχουν δύο κύριες υποθέσεις που εξηγούν την εξωτερίκευση της φωσφατυδιλοσερίνης όπως φαίνεται στη χρώση με Ανεξίνη-V. Μπορεί να είναι ένα αρχικό γεγονός στην απόπτωση των σπερματοζωαρίων ή/και μια αντανάκλαση της ενεργοποίησης των σπερματοζωαρίων. Η ενεργοποίηση σχετίζεται με αύξηση των παραμέτρων κίνησης, ενώ η κινητικότητα μειώνεται στο αποπτωτικό σπέρμα (Hao-Bo Zhang *et al.*, 2008). Έχει παρατηρηθεί αυξημένη βλάβη στην ουρά των σπερματοζωαρίων σε AN<sup>+</sup> (αποπτωτικούς) υποπληθυσμούς (Aziz, N. *et al.*, 2007). Το ποσοστό των πρώιμων αποπτωτικών AN<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup> σπερματοζωαρίων δεν σχετίζεται με το ποσοστό των TUNEL (+) σπερματοζωαρίων αλλά το ποσοστό των όψιμων αποπτωτικών AN<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup> σπερματοζωαρίων σχετίζεται θετικά με το ποσοστό των TUNEL (+) σπερματοζωαρίων. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι η κατάτμηση του DNA λαμβάνει χώρα συνήθως

στα τελικά στάδια απόπτωσης από τη δράση των ενδοουκλεασών. Αυτή η συσχέτιση υποδηλώνει επίσης ότι τα AN<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup> σπερματοζωάρια είναι μάλλον αποπτωτικά κύτταρα παρά νεκρωτικά. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν μια αποτυχημένη απόπτωση που συμβαίνει σε αρκετούς άντρες που έχουν μειωμένες παραμέτρους σπέρματος συγκριτικά με το φυσιολογικό (Hao-Bo Zhang *et al.*, 2008). Παρότι είναι γνωστό ότι οι αλλαγές της φωσφολιπιδικής μεμβράνης γίνονται κατά την ενεργοποίηση και την έναρξη της ακροσωμικής αντίδρασης, χρειάζονται περισσότερες έρευνες ώστε να διευκρινιστεί πλήρως πότε τα αποτελέσματα πρόσδεσης της Ανεξίνης-V αποτελούν πραγματικές αποπτωτικές αλλαγές στα σπερματοζωάρια (Weng *et al.*, 2002).

Οι Taylor *et al.* (2004) αναφέρουν ότι η καταλυτική ενεργότητα κασπασών είναι υψηλότερη σε κλάσματα χαμηλής κινητικότητας (δυσκινητικά και δυσμορφικά σπερματοζωάρια) συγκριτικά με τα κλάσματα υψηλής κινητικότητας. Η ενεργότητα κασπασών είναι υψηλότερη στο εκσπερματιζόμενο σπέρμα των υπογόνιμων ανδρών συγκριτικά με τους γόνιμους. Τα αυξημένα επίπεδα των ενεργοποιημένων κασπασών μπορεί να σχετίζονται με μειωμένη ποιότητα σπέρματος και μπορεί να αποτελούν πιθανό δείκτη υπογονιμότητας (Weng *et al.*, 2002). Η παρουσία ενεργοποιημένων κασπασών εμφανίζει σημαντική συσχέτιση με μειωμένη κινητικότητα σπερματοζωαρίων σε υπογόνιμους άντρες (Weng *et al.*, 2002; Marchetti *et al.*, 2004). Σχετίζεται επίσης με μείωση της συγκέντρωσης των σπερματοζωαρίων και κακή μορφολογία (Wang *et al.*, 2003). Η ενεργοποιημένη κασπάση-3 εντοπίζεται αποκλειστικά στην περιοχή του αυχένα των σπερματοζωαρίων, γεγονός που υποδηλώνει ότι η κασπασο-εξαρτώμενη απόπτωση μπορεί να περιορίζεται στην περιοχή όπου εντοπίζονται τα μιτοχόνδρια και κατάλοιπα κυτταροπλασματικών σταγονιδίων σε μη φυσιολογικά και ανώριμα σπερματοζωάρια (Weng *et al.*, 2002). Οι ενεργές μορφές των κασπασών-3, -7 και -9 περιορίζονται στα κλάσματα μειωμένης κινητικότητας υποδεικνύοντας πως μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες για σπέρμα μειωμένης ποιότητας. Σε αντίθεση με τον πιθανό ρόλο στην υπογονιμότητα ή/και τον κυτταρικό θάνατο, οι κασπάσες στο εκσπερματιζόμενο σπέρμα μπορεί να συμμετέχουν σε τροποποιητικές λειτουργίες κατά την ενεργοποίηση (capacitation) ή/και στην ακροσωμική

αντίδραση, ενισχύοντας την είσοδο του σπερματοζωαρίου στο ωάριο κατά την γονιμοποίηση ή/και επιτελώντας μια προ-γονιμοποιητική λειτουργία (Taylor *et al.*, 2004).

Το δυναμικό της μιτοχονδριακής μεμβράνης (MMP) θεωρείται καλός δείκτης κινητικότητας των σπερματοζωαρίων. Η βλάβη των μιτοχονδρίων μπορεί να προκαλέσει μείωση κινητικότητας (Marchetti *et al.*, 2002; Cavallini *et al.*, 2006; Hao-Bo Zhang *et al.*, 2008) και να σχετίζεται με μειωμένη κινητικότητα σπερματοζωαρίων ασθενοζωοσπερμικών δειγμάτων (Hao-Bo Zhang *et al.*, 2008). Αντίθετα έχει αναφερθεί ότι το MMP εμφανίζει θετική συσχέτιση με τη συγκέντρωση και τη μορφολογία του σπέρματος (Marchetti *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2003; Hao-Bo Zhang *et al.*, 2008). Οι Marchetti *et al.* βρήκαν ότι ο καθορισμός του MMP αποτελεί το πιο ευαίσθητο τεστ για την εκτίμηση της ποιότητας του σπέρματος. Το MMP σχετίζεται αρνητικά με το ποσοστό των TUNEL (+) σπερματοζωαρίων. Το εύρημα αυτό συσχετίζει την ανδρική υπογονιμότητα με τις μιτοχονδριακές μεταβολές που παρατηρούνται κατά την απόπτωση (Hao-Bo Zhang *et al.*, 2008).

Υπάρχει μια ισχυρή συσχέτιση ανάμεσα σε βλάβες DNA ώριμων σπερματοζωαρίων και σε μειωμένες παραμέτρους σπέρματος (Sun *et al.*, 1997; Lopes *et al.*, 1998; Irvine *et al.*, 2000). Η τεχνική TUNEL είναι αυτή που κυρίως εφαρμόζεται για την ανίχνευση των κατατμήσεων του DNA. Δείγματα σπέρματος με χαμηλή συγκέντρωση και κακή μορφολογία είναι περισσότερο πιθανό να είναι TUNEL(+) σε μεγάλο ποσοστό (Sakkas *et al.*, 2002). Οι Shen, H.M. *et al.*(2002) στην έρευνά τους αναφέρουν ότι οι αποπτωτικές αλλαγές στα σπερματοζωάρια, που ανιχνεύονται με την τεχνική TUNEL, σχετίζονται με ποικίλους ανώμαλους μορφολογικούς τύπους που αφορούν βλάβες στην κεφαλή, τον αυχένα και την ουρά των σπερματοζωαρίων. Στην ίδια έρευνα αναφέρεται ότι μόνο η απόπτωση τελικής φάσης που ανιχνεύεται μετά από χρώση με Ανεξίνη-V ή με TUNEL συσχετίζεται με τις παραμέτρους του σπέρματος, ενώ τα αρχικά στάδια απόπτωσης όχι. Έχει αναφερθεί ότι οι ενεργές ρίζες οξυγόνου (ROS: Reactive Oxygen Species) αυξάνουν τη σχάση DNA ανθρώπινων σπερματοζωαρίων (Aitken *et al.*, 1998; Lopes *et al.*, 1998). Κάποιες έρευνες έδειξαν ότι δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ κατάτμησης DNA και απόπτωσης (AN<sup>+</sup> σπερματοζωάρια), που όμως μπορεί να οφείλεται στο

ότι η εξωτερίκευση της PS στη εξωτερική πλευρά της μεμβράνης και η κατάτμηση του DNA πραγματοποιούνται σε διαφορετικά στάδια (Oosterhuis *et al.*, 2000; Varum *et al.*, 2007). Πρέπει να σημειωθεί όμως ότι η κατάτμηση του DNA δεν αποτελεί πάντα αποπτωτικό δείκτη σε δείγματα εκσπερματιζόμενου σπέρματος αλλά μπορεί να σχετίζεται με τη διαδικασία πακεταρίσματος της χρωματίνης και την αντικατάσταση των ιστονών από πρωταμίνες κατά τη διάρκεια της σπερμιογένεσης (Sakkas *et al.*, 2002).

Ο αριθμός των σπερματοζωαρίων που εκφράζουν τον FAS είναι χαμηλός σε άνδρες με φυσιολογικό αριθμό σπερματοζωαρίων, αλλά είναι αυξημένος σε άνδρες με μη φυσιολογικές παραμέτρους σπέρματος (Sakkas *et al.*, 1999). Δείγματα σπέρματος με χαμηλή συγκέντρωση και κακή μορφολογία είναι περισσότερο πιθανό να εκφράζουν FAS και p53 (Sakkas *et al.*, 2002). Άντρες με μη φυσιολογικές παραμέτρους σπέρματος εκφράζουν τον FAS και το p53 σε υψηλά επίπεδα στα εκσπερματιζόμενα σπερματοζωάρια (Sakkas *et al.*, 1999; Sakkas *et al.*, 2002), ωστόσο η έκφραση του Bcl-x δεν ακολουθεί το ίδιο μοτίβο (Sakkas *et al.*, 2002). FAS(+) σπερματοζωάρια εμφανίζονται λόγω αποτυχημένης ενεργοποίησης του επαγόμενου από το FAS μονοπατιού απόπτωσης. Το πρόβλημα αυτό μπορεί να είναι ιδιοπαθές για κάποιους ασθενείς ή μπορεί να οφείλεται σε έλλειψη συγχρονισμού μεταξύ απόπτωσης και σπερματογένεσης. Στην περίπτωση αυτή, ενώ έχει ξεκινήσει η απόπτωση τα σπερματοζωάρια συνεχίζουν τη σπερματογένεση και αποτυγχάνουν να ολοκληρώσουν την απόπτωση (Sakkas *et al.*, 1999). Αυτό εξηγεί γιατί ασθενείς με μη φυσιολογικές παραμέτρους σπέρματος διαθέτουν υψηλό ποσοστό σπερματοζωαρίων που εμφανίζουν σημεία ανολοκλήρωτης σπερμιογένεσης, όπως κατάτμηση του DNA (Gorczyca *et al.*, 1993) κ.α.

Τα σωμάτια M540 μπορεί να αποτελούν αποπτωτικά σωμάτια προερχόμενα από αποτυχημένη ορχική απόπτωση. Ωστόσο τα αποπτωτικά σωμάτια μπορεί να προέρχονται από άλλους τύπους κυττάρων του γενετικού συστήματος που υφίστανται απόπτωση, όπως επιθηλιακά κύτταρα της επιδιδυμίδας ή της εκφορητικής οδού. Εφαρμογή της μεθόδου TUNEL σε συνδυασμό με χρώση PI (Propidium Iodide) επιτρέπει τη διάκριση μεταξύ των σωμάτων M540 και των σπερματοζωαρίων (Muratori *et al.*, 2008). Υψηλά

επίπεδα σωματίων M540 έχουν βρεθεί σε ασθενοτερατοζωοσπερμικά (AT) και ολιγοασθενοτερατοζωοσπερμικά (OAT) δείγματα (Marchiani *et al.*, 2007).

Σε μη αποπτωτικά δείγματα σπέρματος το ποσοστό των σπερματοζωαρίων με βλάβες στην ουρά είναι μέτριο, ενώ το ποσοστό αυτό είναι σημαντικά αυξημένο σε δείγματα αποπτωτικών σπερματοζωαρίων. Ενδιάμεσο ποσοστό σπερματοζωαρίων με οριακή μορφολογία και σπερματοζωάρια με άμορφες κεφαλές παρατηρήθηκε σε αποπτωτικά και μη αποπτωτικά δείγματα σπερματοζωαρίων. Σε μη αποπτωτικούς υποπλυθισμούς το ποσοστό κινητικότητας ήταν σημαντικά υψηλό συγκριτικά με αποπτωτικά δείγματα σπερματοζωαρίων. Δείγματα σπερματοζωαρίων με ενεργοποιημένη κασπάση-3 παρουσιάζουν σημαντική αρνητική συσχέτιση με δείγματα σπερματοζωαρίων φυσιολογικής μορφολογίας και σημαντική θετική συσχέτιση με σπερματοζωάρια με ακροσωμικές βλάβες, κυτταροπλασματικά σταγονίδια και βλάβες αυχένα και ουράς. Το ποσοστό των κινητών σπερματοζωαρίων εμφανίζει αρνητική συσχέτιση με το ποσοστό των σπερματικών κυττάρων με ενεργοποιημένη κασπάση-3 (Aziz, N. *et al.*, 2007). Η θετική συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης ή του συνολικού αριθμού των σπερματοζωαρίων και των δεικτών απόπτωσης μπορεί να εξηγηθεί, σε μερικές περιπτώσεις, από τη θεωρία της αποτυχημένης απόπτωσης. Τα κύτταρα που προορίζονται να υποστούν απόπτωση μπορεί να διαφύγουν του μηχανισμού εκκαθάρισης κατά την σπερματογένεση και η παρουσία τους στην εκσπερμάτιση συμβάλλει στη μειωμένη ποιότητα σπέρματος (Shen, H.M. *et al.*, 2002).

Τα ποσοστά απόπτωσης στο ανθρώπινο εκσπερματιζόμενο σπέρμα μπορεί να σχετίζονται με τα επίπεδα γονιμοποίησης μετά από IVF ή ICSI (Sun *et al.*, 1997; Levy *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2002). Σε μελέτες που ερευνάται η επίδραση της κατάτμησης του DNA των σπερματοζωαρίων στην αναπαραγωγή, η επικρατούσα άποψη είναι ότι σπερματοζωάρια με κερματισμένο DNA, ακόμα και αν διατηρούν την ικανότητα να γονιμοποιούν το ωάριο (Ahmadi and Ng, 1999), επηρεάζονται τα μετέπειτα στάδια με αποτέλεσμα αυξημένη αποτυχία στην ανάπτυξη του εμβρύου και αποβολές (Agarwal and Allamaneni, 2004; Lewis and Aitken, 2005; Li *et al.*, 2006). Η εκτίμηση της απόπτωσης στο σπέρμα μπορεί τελικά να χρησιμοποιηθεί σαν



προγνωστικό τεστ και σε συνδυασμό με την ανάλυση του σπέρματος για την πρόβλεψη της ανδρικής υπογονιμότητας (Chen *et al.*, 2006). Οι Marchetti *et al.* (2004) αναφέρουν ότι το ποσοστό των σπερματοζωαρίων που εμφανίζουν ενεργότητα κασπασών είναι αντιστρόφως ανάλογο με το ποσοστό γονιμοποίησης μετά από IVF. Οι ίδιοι αναφέρουν πως πρέπει ωστόσο να διερευνηθεί αν η ανίχνευση ενεργότητας κασπασών στα σπερματοζωάρια μπορεί να βελτιώσει τα κριτήρια για την επιλογή των σπερματοζωαρίων για IVF. Είναι πιθανό οι αποπτωτικοί δείκτες, όπως η κατάτμηση του DNA, η μεταβολές του MMP και η ενεργότητα κασπασών, να προσφέρουν περισσότερο ευαίσθητη πληροφόρηση από αυτή του σπερμοδιαγράμματος επιτρέποντας έτσι καλύτερη πρόγνωση για το αποτέλεσμα της IVF (Marchetti *et al.*, 2005). Συνοπτικά μπορούμε να πούμε ότι όλοι οι αποπτωτικοί δείκτες που αναφέρθηκαν παραπάνω σηματοδοτούν την απόπτωση αλλά κανείς από μόνος του δεν οδηγεί τα σπερματοζωάρια σε θάνατο. Λειτουργούν συνεργιστικά επάγοντας έναν καταρράκτη από γεγονότα. Για παράδειγμα :

- \* Η εξωτερίκευση της PS επηρεάζει την ενεργοποίηση (capacitation) των σπερματοζωαρίων (De Vries *et al.*, 2003),
- \* Οι κασπάσες εμπλέκονται εξίσου στη διαδικασία της διαφοροποίησης και της κυτταροπλασματικής ωρίμανσης των σπερματοζωαρίων (Marchetti *et al.*, 2005),
- \* Η κατάτμηση του DNA μπορεί να αποτελεί απόδειξη μη ολοκληρωμένης ωρίμανσης κατά τη διάρκεια της σπερμιογένεσης (Sakkas *et al.*, 1999),
- \* Οι λειτουργικές μεταβολές των μιτοχονδρίων έχουν συσχετιστεί με την ανδρική υπογονιμότητα ανεξάρτητα από την απόπτωση (Bourgeron *et al.*, 2000),
- \* Τέλος, ο υποδοχέας FAS δεν μεταδίδει μόνο το σήμα για απόπτωση.

## **Δ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

- Αγγελοπούλου, Ρ. (1992) **Εμβρυολογία I**: 11-15;19-20
- Αγγελοπούλου, Ρ. Κυριαζόγλου, Μ. (2002). "Τεχνικές ανίχνευσης του κερματισμένου DNA" **19(2)**:167-178
- Agarwal, A. and S. S. Allamaneni (2004). "The effect of sperm DNA damage on assisted reproduction outcomes. A review." *Minerva Ginecol* **56(3)**: 235-245.
- Agarwal, A. and T. M. Said (2003). "Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility." *Hum Reprod Update* **9(4)**: 331-345.
- Ahmadi, A. and S. C. Ng (1999). "Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa." *J Exp Zool* **284(6)**: 696-704.
- Aitken, R. J., E. Gordon, et al. (1998). "Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa." *Biol Reprod* **59(5)**: 1037-1046.
- Aitken, R. J., D. S. Irvine, et al. (1991). "Prospective analysis of sperm-oocyte fusion and reactive oxygen species generation as criteria for the diagnosis of infertility." *Am J Obstet Gynecol* **164(2)**: 542-551.
- Anzar, M., L. He, et al. (2002). "Sperm apoptosis in fresh and cryopreserved bull semen detected by flow cytometry and its relationship with fertility." *Biol Reprod* **66(2)**: 354-360.
- Aussel, C., G. Bernard, et al. (1993). "Monoclonal antibodies directed against the E2 protein (MIC2 gene product) induce exposure of phosphatidylserine at the thymocyte cell surface." *Biochemistry* **32(38)**: 10096-10101.
- Aziz, N., T. Said, et al. (2007). "The relationship between human sperm apoptosis, morphology and the sperm deformity index." *Hum Reprod* **22(5)**: 1413-1419.
- Barroso, G., M. Morshedi, et al. (2000). "Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane translocation of phosphatidylserine and oxidative stress in human spermatozoa." *Hum Reprod* **15(6)**: 1338-1344.
- Bourgeron, T. (2000). "Mitochondrial function and male infertility." *Results Probl Cell Differ* **28**: 187-210.
- Brill, A., A. Torchinsky, et al. (1999). "The role of apoptosis in normal and abnormal embryonic development." *J Assist Reprod Genet* **16(10)**: 512-519.
- Cavallini, G. (2006). "Male idiopathic oligoasthenoteratozoospermia." *Asian J Androl* **8(2)**: 143-157.
- Chandra, D., J. W. Liu, et al. (2002). "Early mitochondrial activation and cytochrome c up-regulation during apoptosis." *J Biol Chem* **277(52)**: 50842-50854.
- Chen, Z., R. Hauser, et al. (2006). "The relationship between human semen characteristics and sperm apoptosis: a pilot study." *J Androl* **27(1)**: 112-120.
- Daugas, E., S. A. Susin, et al. (2000). "Mitochondrio-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis." *FASEB J* **14(5)**: 729-739.
- de Vries, K. J., T. Wiedmer, et al. (2003). "Caspase-independent exposure of aminophospholipids and tyrosine phosphorylation in bicarbonate responsive human sperm cells." *Biol Reprod* **68(6)**: 2122-2134.
- Erenpreiss, J., M. Spano, et al. (2006). "Sperm chromatin structure and male fertility: biological and clinical aspects." *Asian J Androl* **8(1)**: 11-29.
- Evenson, D. P., K. L. Larson, et al. (2002). "Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques." *J Androl* **23(1)**: 25-43.
- Fadok, V. A., A. de Cathelineau, et al. (2001). "Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts." *J Biol Chem* **276(2)**: 1071-1077.
- Fadok, V. A., D. R. Voelker, et al. (1992). "Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages." *J Immunol* **148(7)**: 2207-2216.
- Gadella, B. M. and R. A. Harrison (2002). "Capacitation induces cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent, but apoptosis-unrelated, exposure of aminophospholipids at the apical head plasma membrane of boar sperm cells." *Biol Reprod* **67(1)**: 340-350.
- Gandini, L., F. Lombardo, et al. (2000). "Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa." *Hum Reprod* **15(4)**: 830-839.
- Garland, J. M. and A. Halestrap (1997). "Energy metabolism during apoptosis. Bcl-2 promotes survival in hematopoietic cells induced to apoptose by growth factor withdrawal by stabilizing a form of metabolic arrest." *J Biol Chem* **272(8)**: 4680-4688.

- Glander, H. J. and J. Schaller (1999). "Binding of annexin V to plasma membranes of human spermatozoa: a rapid assay for detection of membrane changes after cryostorage." *Mol Hum Reprod* **5**(2): 109-115.
- Gorczyca, W., F. Traganos, et al. (1993). "Presence of DNA strand breaks and increased sensitivity of DNA in situ to denaturation in abnormal human sperm cells: analogy to apoptosis of somatic cells." *Exp Cell Res* **207**(1): 202-205.
- Gottlieb, R. A. (2001). "Mitochondria and apoptosis." *Biol Signals Recept* **10**(3-4): 147-161.
- Green, D. R. and J. C. Reed (1998). "Mitochondria and apoptosis." *Science* **281**(5381): 1309-1312.
- Grunewald, S., U. Paasch, et al. (2005). "Sperm caspases become more activated in infertility patients than in healthy donors during cryopreservation." *Arch Androl* **51**(6): 449-460.
- Hoffmann, P. R., A. M. deCathelineau, et al. (2001). "Phosphatidylserine (PS) induces PS receptor-mediated macropinocytosis and promotes clearance of apoptotic cells." *J Cell Biol* **155**(4): 649-659.
- Irvine, D. S., J. P. Twigg, et al. (2000). "DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality." *J Androl* **21**(1): 33-44.
- Juriscova, A., S. Lopes, et al. (1999). "DNA damage in round spermatids of mice with a targeted disruption of the Pp1cgamma gene and in testicular biopsies of patients with non-obstructive azoospermia." *Mol Hum Reprod* **5**(4): 323-330.
- Kodama, H., R. Yamaguchi, et al. (1997). "Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients." *Fertil Steril* **68**(3): 519-524.
- Krammer, P. H., I. Behrmann, et al. (1994). "Regulation of apoptosis in the immune system." *Curr Opin Immunol* **6**(2): 279-289.
- Lachaud, C., J. Tesarik, et al. (2004). "Apoptosis and necrosis in human ejaculated spermatozoa." *Hum Reprod* **19**(3): 607-610.
- Lee, J., J. H. Richburg, et al. (1997). "The Fas system is a key regulator of germ cell apoptosis in the testis." *Endocrinology* **138**(5): 2081-2088.
- Levy, R. and I. Seifer-Aknin (2001). "[Apoptosis during spermatogenesis and in ejaculated spermatozoa: importance for fertilization]." *Ann Biol Clin (Paris)* **59**(5): 531-545.
- Lewis, S. E. and R. J. Aitken (2005). "DNA damage to spermatozoa has impacts on fertilization and pregnancy." *Cell Tissue Res* **322**(1): 33-41.
- Li, Z., L. Wang, et al. (2006). "Correlation of sperm DNA damage with IVF and ICSI outcomes: a systematic review and meta-analysis." *J Assist Reprod Genet* **23**(9-10): 367-376.
- Liu, C. H., H. M. Tsao, et al. (2004). "DNA fragmentation, mitochondrial dysfunction and chromosomal aneuploidy in the spermatozoa of oligoasthenoteratozoospermic males." *J Assist Reprod Genet* **21**(4): 119-126.
- Liu, D. Y. and H. W. Baker (1992). "Sperm nuclear chromatin normality: relationship with sperm morphology, sperm-zona pellucida binding, and fertilization rates in vitro." *Fertil Steril* **58**(6): 1178-1184.
- Liu, D. Y. and H. W. Baker (1994). "Disordered acrosome reaction of spermatozoa bound to the zona pellucida: a newly discovered sperm defect causing infertility with reduced sperm-zona pellucida penetration and reduced fertilization in vitro." *Hum Reprod* **9**(9): 1694-1700.
- Liu, D. Y. and H. W. Baker (2000). "Defective sperm-zona pellucida interaction: a major cause of failure of fertilization in clinical in-vitro fertilization." *Hum Reprod* **15**(3): 702-708.
- Lopes, S., A. Juriscova, et al. (1998). "Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa." *Hum Reprod* **13**(4): 896-900.
- Lopes, S., J. G. Sun, et al. (1998). "Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection." *Fertil Steril* **69**(3): 528-532.
- Lucinda, L. Veeck, (1999) "An Atlas of Human Gametes and Conceptuses":26
- Manicardi, G. C., P. G. Bianchi, et al. (1995). "Presence of endogenous nicks in DNA of ejaculated human spermatozoa and its relationship to chromomycin A3 accessibility." *Biol Reprod* **52**(4): 864-867.
- Marchetti, C., M. A. Gallego, et al. (2004). "Staining of human sperm with fluorochrome-labeled inhibitor of caspases to detect activated caspases: correlation with apoptosis and sperm parameters." *Hum Reprod* **19**(5): 1127-1134.
- Marchetti, C., N. Jouy, et al. (2004). "Comparison of four fluorochromes for the detection of the inner mitochondrial membrane potential in human spermatozoa and their correlation with sperm motility." *Hum Reprod* **19**(10): 2267-2276.

- Marchetti, C. and P. Marchetti (2005). "[Detection of apoptotic markers in human ejaculated spermatozoa as new methods in human reproductive biology]." *Gynecol Obstet Fertil* **33**(9): 669-677.
- Marchetti, C., G. Obert, et al. (2002). "Study of mitochondrial membrane potential, reactive oxygen species, DNA fragmentation and cell viability by flow cytometry in human sperm." *Hum Reprod* **17**(5): 1257-1265.
- Marchiani, S., L. Tamburrino, et al. (2007). "Characterization of M540 bodies in human semen: evidence that they are apoptotic bodies." *Mol Hum Reprod* **13**(9): 621-631.
- Martinez, F., L. Rienzi, et al. (2002). "Caspase activity in preimplantation human embryos is not associated with apoptosis." *Hum Reprod* **17**(6): 1584-1590.
- Mortimer, D., I. J. Pandya, et al. (1986). "Relationship between human sperm motility characteristics and sperm penetration into human cervical mucus in vitro." *J Reprod Fertil* **78**(1): 93-102.
- Moustafa, M. H., R. K. Sharma, et al. (2004). "Relationship between ROS production, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility." *Hum Reprod* **19**(1): 129-138.
- Mower, D. A., Jr., D. W. Peckham, et al. (1994). "Decreased membrane phospholipid packing and decreased cell size precede DNA cleavage in mature mouse B cell apoptosis." *J Immunol* **152**(10): 4832-4842.
- Muratori, M., S. Marchiani, et al. (2005). "Sperm ubiquitination positively correlates to normal morphology in human semen." *Hum Reprod* **20**(4): 1035-1043.
- Muratori, M., S. Marchiani, et al. (2008). "Nuclear staining identifies two populations of human sperm with different DNA fragmentation extent and relationship with semen parameters." *Hum Reprod* **23**(5): 1035-1043.
- Muratori, M., P. Piomboni, et al. (2000). "Functional and ultrastructural features of DNA-fragmented human sperm." *J Androl* **21**(6): 903-912.
- Muratori, M., I. Porazzi, et al. (2004). "AnnexinV binding and merocyanine staining fail to detect human sperm capacitation." *J Androl* **25**(5): 797-810.
- Nagata, S. (2000). "Apoptotic DNA fragmentation." *Exp Cell Res* **256**(1): 12-18.
- Oberhammer, F., J. W. Wilson, et al. (1993). "Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation." *EMBO J* **12**(9): 3679-3684.
- Oehninger, S., M. Mahony, et al. (1997). "Clinical significance of human sperm-zona pellucida binding." *Fertil Steril* **67**(6): 1121-1127.
- Oehninger, S., J. Toner, et al. (1992). "Prediction of fertilization in vitro with human gametes: is there a litmus test?" *Am J Obstet Gynecol* **167**(6): 1760-1767.
- Oosterhuis, G. J., A. B. Mulder, et al. (2000). "Measuring apoptosis in human spermatozoa: a biological assay for semen quality?" *Fertil Steril* **74**(2): 245-250.
- Paasch, U., S. Grunewald, et al. (2004). "Activation pattern of caspases in human spermatozoa." *Fertil Steril* **81** Suppl 1: 802-809.
- Paasch, U., S. Grunewald, et al. (2005). "Immunomagnetic removal of cryo-damaged human spermatozoa." *Asian J Androl* **7**(1): 61-69.
- Pena, F. J., A. Johannisson, et al. (2003). "Assessment of fresh and frozen-thawed boar semen using an Annexin-V assay: a new method of evaluating sperm membrane integrity." *Theriogenology* **60**(4): 677-689.
- Piasecka, M. and J. Kawiak (2003). "Sperm mitochondria of patients with normal sperm motility and with asthenozoospermia: morphological and functional study." *Folia Histochem Cytobiol* **41**(3): 125-139.
- Ricci, G., S. Peticarari, et al. (2002). "Apoptosis in human sperm: its correlation with semen quality and the presence of leukocytes." *Hum Reprod* **17**(10): 2665-2672.
- Richburg, J. H. (2000). "The relevance of spontaneous- and chemically-induced alterations in testicular germ cell apoptosis to toxicology." *Toxicol Lett* **112-113**: 79-86.
- Said, T., A. Agarwal, et al. (2006). "Selection of nonapoptotic spermatozoa as a new tool for enhancing assisted reproduction outcomes: an in vitro model." *Biol Reprod* **74**(3): 530-537.
- Said, T. M., N. Aziz, et al. (2005). "Novel association between sperm deformity index and oxidative stress-induced DNA damage in infertile male patients." *Asian J Androl* **7**(2): 121-126.
- Sakkas, D., E. Mariethoz, et al. (1999). "Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa." *Rev Reprod* **4**(1): 31-37.
- Sakkas, D., E. Mariethoz, et al. (1999). "Abnormal sperm parameters in humans are indicative of an abortive apoptotic mechanism linked to the Fas-mediated pathway." *Exp Cell Res* **251**(2): 350-355.

- Sakkas, D., O. Moffatt, et al. (2002). "Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis." *Biol Reprod* **66**(4): 1061-1067.
- Schulze-Osthoff, K., H. Walczak, et al. (1994). "Cell nucleus and DNA fragmentation are not required for apoptosis." *J Cell Biol* **127**(1): 15-20.
- Schwerk, C. and K. Schulze-Osthoff (2003). "Non-apoptotic functions of caspases in cellular proliferation and differentiation." *Biochem Pharmacol* **66**(8): 1453-1458.
- Selivanova, G. and K. G. Wiman (1995). "p53: a cell cycle regulator activated by DNA damage." *Adv Cancer Res* **66**: 143-180.
- Shen, H. M., J. Dai, et al. (2002). "Detection of apoptotic alterations in sperm in subfertile patients and their correlations with sperm quality." *Hum Reprod* **17**(5): 1266-1273.
- Sinha Hikim, A. P. and R. S. Swerdloff (1999). "Hormonal and genetic control of germ cell apoptosis in the testis." *Rev Reprod* **4**(1): 38-47.
- Siskind, L. J., R. N. Kolesnick, et al. (2002). "Ceramide channels increase the permeability of the mitochondrial outer membrane to small proteins." *J Biol Chem* **277**(30): 26796-26803.
- Suda, T., T. Takahashi, et al. (1993). "Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family." *Cell* **75**(6): 1169-1178.
- Sun, J. G., A. Jurisicova, et al. (1997). "Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro." *Biol Reprod* **56**(3): 602-607.
- Susin, S. A., H. K. Lorenzo, et al. (1999). "Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor." *Nature* **397**(6718): 441-446.
- Taylor, S. L., S. L. Weng, et al. (2004). "Somatic cell apoptosis markers and pathways in human ejaculated sperm: potential utility as indicators of sperm quality." *Mol Hum Reprod* **10**(11): 825-834.
- Tesarik, J., F. Martinez, et al. (2002). "In-vitro effects of FSH and testosterone withdrawal on caspase activation and DNA fragmentation in different cell types of human seminiferous epithelium." *Hum Reprod* **17**(7): 1811-1819.
- Thonneau, P., S. Marchand, et al. (1991). "Incidence and main causes of infertility in a resident population (1,850,000) of three French regions (1988-1989)." *Hum Reprod* **6**(6): 811-816.
- Thornberry, N. A. and Y. Lazebnik (1998). "Caspases: enemies within." *Science* **281**(5381): 1312-1316.
- Varum S, Bento C, Sousa AP, Gomes-Santos CS, Henriques P, Almeida-Santos T, Teodosio C, Paiva A, Ramalho-Santos J: Characterization of human sperm populations using conventional parameters, surface ubiquitination, and apoptotic markers. *Fertil Steril* 2007, **87**(3):572-583.
- Van Blerkom, J. and P. W. Davis (1998). "DNA strand breaks and phosphatidylserine redistribution in newly ovulated and cultured mouse and human oocytes: occurrence and relationship to apoptosis." *Hum Reprod* **13**(5): 1317-1324.
- Wang, G. R., Z. D. Zhou, et al. (2002). "[Preliminary investigation of relationship between sperm apoptosis and male infertility]." *Zhonghua Nan Ke Xue* **8**(1): 25-27.
- Wang, X., R. K. Sharma, et al. (2003). "Alterations in mitochondria membrane potential and oxidative stress in infertile men: a prospective observational study." *Fertil Steril* **80** Suppl 2: 844-850.
- Wang, X., R. K. Sharma, et al. (2003). "Oxidative stress is associated with increased apoptosis leading to spermatozoa DNA damage in patients with male factor infertility." *Fertil Steril* **80**(3): 531-535.
- Weil, M., M. D. Jacobson, et al. (1998). "Are caspases involved in the death of cells with a transcriptionally inactive nucleus? Sperm and chicken erythrocytes." *J Cell Sci* **111** ( Pt 18): 2707-2715.
- Weng, S. L., S. L. Taylor, et al. (2002). "Caspase activity and apoptotic markers in ejaculated human sperm." *Mol Hum Reprod* **8**(11): 984-991.
- World Health Organization. **WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-cervical Mucus Interaction**, 4th edn. Cambridge:Cambridge University Press, 1999.
- World Health Organization. **WHO Laboratory Manual for the Examination and processing of human semen**, 5th edn. Cambridge:Cambridge University Press, 2010.
- Zhang, H. B., S. M. Lu, et al. (2008). "Early apoptotic changes in human spermatozoa and their relationships with conventional semen parameters and sperm DNA fragmentation." *Asian J Androl* **10**(2): 227-235.