



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

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ SPERM DNA FRAGMENTATION ΣΤΗ ΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ
ΚΑΙ ΤΗΝ ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΕΜΒΡΥΩΝ

ΘΕΟΦΑΝΩ ΜΠΟΥΝΑΡΤΖΗ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΛΑΡΙΣΑ
Σεπτέμβριος 2012

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟΣ ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΙΩΑΝΝΗΣ Ε. ΜΕΣΣΗΝΗΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπων: Δρ. Γεώργιος-Σπυρίδων Ανυφαντής Κλινικός Εμβρυολόγος
Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή : Ιωάννης Ε. Μεσσήνης,
Καθηγητής Μαιευτικής- Γυναικολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
Ασπασία Τσέζου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	4
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	5
Αίτια κατακερματισμού του DNA των σπερματοζωαρίων	7
Απόπτωση	7
Κάπνισμα	8
Ιατρογενής βλάβη	9
Αυξημένη θερμοκρασία των όρχεων	10
Λοιμώξεις και φλεγμονές του γεννητικού συστήματος	10
Ακτινοβολία	10
Ελαττωματικές Πρωταμίνες	11
Ενεργές Ρίζες Οξυγόνου (EPO- ROS)	11
Ορμονικοί Παράγοντες	11
Ηλικία	12
Κιρσοκήλη	12
Ατμοσφαιρική ρύπανση	12
Κατακερματισμός DNA σπερματοζωαρίων και ικανότητα γονιμοποίησης	13
Μέθοδοι προσδιορισμού του κατακερματισμού του DNA	16
Μέθοδος SCD (Sperm Chromatin Dispersion- Διασπορά της χρωματίνης των σπερματοζωαρίων)	16
Παράγοντες που επηρεάζουν τη διαγνωστική αξία των μεθόδων προσδιορισμού του κατακερματισμού του DNA	18
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	20
Σκοπός	20
Ιστορικό	21
Σπερμοδιάγραμμα	21
Προσδιορισμός του κατακερματισμού του DNA	22
Εκτίμηση γονιμοποίησης - αξιολόγηση εμβρύων	26
Στατιστική ανάλυση	27
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	28
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	33
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	40

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο κατακερματισμός του DNA (Sperm DNA fragmentation-SDF) των σπερματοζωαρίων είναι μία επιπλέον παράμετρος που μελετάται για τη διερεύνηση της ανδρικής υπογονιμότητας. Είναι ένας νέος δείκτης που επιτρέπει το βελτιωμένο διαχωρισμό των δειγμάτων σπέρματος σε υψηλής και χαμηλής ποιότητας, καθώς θεωρείται ότι είναι σε θέση να παρέχει μία πιο αξιόπιστη πρόβλεψη πιθανής εγκυμοσύνης ή το ρίσκο μίας ενδεχόμενης αποβολής.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να βρεθεί το ποσοστό του κατακερματισμού του DNA των σπερματοζωαρίων σε δείγματα σπέρματος που χρησιμοποιήθηκαν σε τεχνικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (IVF και ICSI) και να διερευνηθεί εάν επηρεάζει το ποσοστό γονιμοποίησης, καθώς και την ποιότητα των εμβρύων.

Χρησιμοποιήθηκαν 55 δείγματα σπέρματος, 13 από αυτά χρησιμοποιήθηκαν σε IVF και 42 σε ICSI. Εφαρμόστηκε η μέθοδος της διασποράς της χρωματίνης (Sperm Chromatin Dispersion – SCD) με τη βοήθεια του διαγνωστικού kit Halosperm® G2 της εταιρείας Halotech. Τα σπερματοζωάρια παρατηρήθηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο μετά από χρώση με χρωστική 'Diff Quick' και κατηγοριοποιήθηκαν ανάλογα με την έκταση της άλω γύρω από την κεφαλή των σπερματοζωαρίων σε φυσιολογικά, εκφυλισμένα και σε αυτά που έχουν κατακερματισμένο DNA.

Από τα αποτελέσματα φάνηκε να υπάρχει αρνητική συσχέτιση μεταξύ του ποσοστού κατακερματισμένου DNA και της συγκέντρωσης καθώς και της προωθητικής κίνησης των σπερματοζωαρίων. Βρέθηκε επίσης συσχέτιση μεταξύ του ποσοστού κατακερματισμένου DNA και των ακίνητων σπερματοζωαρίων. Δε βρέθηκε να υπάρχει συσχέτιση με το ποσοστό γονιμοποίησης ή το ποσοστό κυήσεων, ενώ φάνηκε να υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την ποιότητα των εμβρύων, όταν το ποσοστό του κατακερματισμένου DNA υπερβαίνει το 20%.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η υπογονιμότητα δεν αφορά μεμονωμένα τον άνδρα ή τη γυναίκα, αλλά αναφέρεται πάντα στο ζευγάρι. Ορίζεται ως η μη επίτευξη κύησης μετά από ένα έτος ελεύθερων σεξουαλικών επαφών (Thonneau P et al., 2005).

Οι μέθοδοι της ιατρικώς υποβοηθούμενης αναπαραγωγής έχουν θεραπεύσει τον ανδρικό παράγοντα της υπογονιμότητας. Με τις μεθόδους IVF (in vitro fertilization) και ICSI (intra-cytoplasmic sperm injection) άντρες με олиγοζωοσπερμία, αποφρακτική και μη-αποφρακτική αζωοσπερμία, μπορούν να τεκνοποιήσουν. Δυστυχώς η ασφάλεια αυτών των μεθόδων είναι ακόμη αμφιλεγόμενη. Αυτό συμβαίνει γιατί μέσω αυτών των μεθόδων παρακάμπτουμε τα όρια της φυσικής επιλογής. Οι υπογόνιμοι άντρες έχουν υψηλότερο ποσοστό βλαβών στο DNA τους σε σχέση με τους γόνιμους, αν και αυτό δεν αποτρέπει μία πιθανή εγκυμοσύνη. Πειραματικά όμως η εμβρυική αλλά και μεταγεννητική ανάπτυξη σχετίζεται με το ποσοστό βλαβών στο DNA (Evenson et al., 1999, Fernandez-Gonzalez et al., 2008, Gandini et al. 2004, Kodama et al., 1997, Spano et al., 2000, Zini et al., 2001).

Η διάγνωση της ανδρικής υπογονιμότητας βασίζεται στην ανάλυση του σπέρματος ως προς τη συγκέντρωση, την κινητικότητα και τη μορφολογία όπως έχει προταθεί από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (ΠΟΥ), (WHO, 2010). Είναι πλέον γνωστό ότι οι παράμετροι του σπέρματος δίνουν μόνο έως ένα βαθμό προγνωστικές και διαγνωστικές πληροφορίες (Guzick et al., 2001, Jequier, 2005, Pacey, 2006, Lewis, 2007). Για αυτό το λόγο είναι απαραίτητοι νέοι δείκτες που να επιτρέπουν το βελτιωμένο διαχωρισμό των δειγμάτων σπέρματος σε υψηλής και χαμηλής ποιότητας, καθώς και να παρέχουν μία πιο αξιόπιστη πρόβλεψη πιθανής εγκυμοσύνης ή το ρίσκο μίας ενδεχόμενης αποβολής.

Η ακεραιότητα του DNA των σπερματοζωαρίων είναι μία αποδεκτή επιπλέον παράμετρος της ποιότητας του σπέρματος και δείκτης πρόβλεψης του γονιμοποιητικού δυναμικού (Zini and Sigman, 2009, Barratt, 2010, Barratt and De Jonge, 2010). Η ακεραιότητα του DNA είναι απαραίτητη ώστε να διασφαλιστεί ότι τα σπερματοζωάρια που χρησιμοποιούνται για τη

γονιμοποίηση είναι ικανά να υποστηρίξουν τη μετέπειτα εμβρυική ανάπτυξη (Morris et al., 2002, Virro et al., 2004). Η έγχυση σπερματοζωαρίων με αποδεδειγμένη ακεραιότητα του DNA σε ωάρια μπορεί να αποτελέσει μία επιπλέον θεραπευτική προσέγγιση στην θεραπεία της υπογονιμότητας με ICSI. Κάποιες μελέτες έχουν δείξει ότι τα επίπεδα του κατακερματισμού του DNA των σπερματοζωαρίων συνδέονται με χαμηλής ποιότητας σπέρμα (Irvine et al, 2000, Acharya et al., 2005) σε αντίθεση με άλλες που κρίνουν ότι η ακεραιότητα του DNA των σπερματοζωαρίων είναι ανεξάρτητη από τις συμβατικές παραμέτρους και μπορεί να συνυπολογιστεί αθροιστικά (Giwerzman et al., 2003). Ο κατακερματισμός του DNA των σπερματοζωαρίων έχει αναγνωριστεί ως μία πιθανή εξήγηση περιπτώσεων ιδιοπαθούς υπογονιμότητας (Saleh et al., 2002).

Τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει μελέτες για να αξιολογήσουν τη σημασία του κατακερματισμού του DNA των σπερματοζωαρίων και την επίδρασή του στη γονιμοποίηση. Παρόλο που ακόμη και σήμερα είναι ένα αμφιλεγόμενο ζήτημα υπάρχουν στοιχεία που αποδεικνύουν την αρνητική του επίδραση τόσο στη φυσιολογική σύλληψη (Evenson and Wixon, 2008) όσο και στις μεθόδους υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (Larson et al., 2002). Τα σπερματοζωάρια συνεισφέρουν κατά τη γονιμοποίηση το απλοειδές γενετικό υλικό και το κεντροσωμάτιο, που είναι απαραίτητο για τη διαίρεση του κυττάρου. Ο κατακερματισμός του DNA του σπερματοζωαρίου μπορεί να έχει επίπτωση στη γονιμοποίηση, την ποιότητα του εμβρύου, την επίτευξη της κύησης, αφού οι θραύσεις της έλικας είναι σε θέση να αποδιοργανώσουν την αναπαραγωγική διαδικασία. Τέλος θα πρέπει να αναφερθεί ότι κατακερματισμός του DNA των σπερματοζωαρίων δεν παρατηρείται μόνο σε υπογόνιμους άνδρες αλλά ένα μικρό ποσοστό κατακερματισμού συναντάται και σε σπερματοζωάρια ανδρών αποδεδειγμένα γόνιμων (Spano M. et al., 2000., Zini A. et al., 2001., Kodama H. et al., 1997).

Στην περίπτωση της IVF το ποσοστό γονιμοποίησης συσχετίζεται αρνητικά με τον κατακερματισμό του DNA των σπερματοζωαρίων (Huang et al., 2005) και ο κατακερματισμός του DNA των σπερματοζωαρίων έχει αρνητικές επιπτώσεις στα ποσοστά επίτευξης κύησης (Borini et al., 2006, Benchai et al., 2007). Στις περιπτώσεις ICSI έχει επίσης καταγραφεί ότι μειωμένο

ποσοστό γονιμοποίησης και μειωμένο ποσοστό εμφύτευσης των εμβρύων συσχετίζεται άμεσα με το επίπεδο του κατακερματισμού του DNA των σπερματοζωαρίων (Lopes et al., 1998, Bouchaib et al., 2003, Larson-Cook et al., 2003, Bungum et al., 2004, Gandini et al., 2004). Επιπλέον ο κατακερματισμός του DNA των σπερματοζωαρίων έχει συνδεθεί με υψηλό ποσοστό αποβολών (Zini and Sigman, 2009). Οι δοκιμασίες ελέγχου της ακεραιότητας της του DNA των σπερματοζωαρίων μπορούν να βοηθήσουν στην επιλογή της καταλληλότερης μεθόδου και την πρόβλεψη της έκβασης των μεθόδων της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, θα πρέπει όμως να οριοθετηθούν ώστε να έχουν κλινική διαγνωστική αξία (Bungum et al., 2007).

Αίτια κατακερματισμού του DNA των σπερματοζωαρίων

Ο κατακερματισμός του DNA χαρακτηρίζεται από θραύσεις τόσο της μονής, όσο και της διπλής έλικας του DNA. Μπορεί να εμφανιστεί στους όρχεις, στην επιδιδυμίδα ή κατά την εκσπερμάτιση. Ορισμένες καταστάσεις έχουν συσχετισθεί με αυξημένο ποσοστό σπερματοζωαρίων με κατακερματισμό στο DNA, παρότι οι παθογενετικοί μηχανισμοί δεν είναι ακόμη γνωστοί.

Απόπτωση

Πιθανολογείται ότι ο κατακερματισμός του DNA είναι αποτέλεσμα της διαταραχής της απόπτωσης αφού ο κυτταρικός μηχανισμός που επιτρέπει στην γεννητική σειρά (germ cell line) να ολοκληρώσει την απόπτωση απενεργοποιείται κατά τη σπερματογένεση (Sakkas et al., 1999). Ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος των σπερματοζωαρίων κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής σπερματογένεσης έχει ως αποτέλεσμα τον αφανισμό του 75% των δυνητικών σπερματοζωαρίων. Κατά τη διάρκεια της σπερμιογένεσης, οι σπερματίδες που ωριμάζουν χάνουν προοδευτικά την ικανότητά τους να επιδιορθώνουν τυχόν βλάβες του DNA, καθώς επίσης και να αντιδρούν σε αυτές μέσω του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (απόπτωση). Έτσι, θραύσεις του DNA που προκαλούνται κατά τη συμπίκνωση της χρωματίνης ή και αργότερα μπορεί να διαφύγουν από τους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς και να παραμείνουν στο ώριμο

σπερματοζωάριο. Η προχωρημένη ηλικία καθώς και τοξίνες έχουν συσχετιστεί με μειωμένα επίπεδα απόπτωσης γενετικών κυττάρων και αυξημένα ποσοστά εκσπερμάτισης σπερματοζωαρίων που φέρουν βλάβες στο DNA τους. Σε αυτούς τους άνδρες έχει διακοπεί η φυσιολογική διαδικασία του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (Singh et al., 2003).

Σε μερικές περιπτώσεις, η διαδικασία της απόπτωσης δεν ολοκληρώνεται, με αποτέλεσμα σπερματοζωάρια που έχουν ήδη μπει στη διαδικασία της απόπτωσης να φθάνουν μέχρι την εκσπερμάτιση. Η μορφολογία αυτών των σπερματοζωαρίων μπορεί να μην επηρεάζεται καθόλου (Burrello et al., 2004).

Στους άνδρες με παθολογικές παραμέτρους στο σπερμοδιάγραμμα, σε αντίθεση με αυτούς με φυσιολογικές, έχει βρεθεί υψηλό ποσοστό αποπτωτικά σημασμένων σπερματοζωαρίων (Sakkas et al., 1999, Shen et al., 2002), υποδεικνύοντας ότι τα σπερματοζωάρια αυτά έχουν διαφύγει από την αποπτωτική διαδικασία (Sakkas et al., 1999). Η παράμετρος του αριθμού των σπερματοζωαρίων πιθανόν να μην επηρεάζεται σε τόσο μεγάλο βαθμό, παρά την κακή ποιότητα του σπερματικού DNA. Έχει προταθεί ότι άνδρες με μειωμένη σπερματογένεση μπορεί να μην παράγουν αρκετά σπερματοζωάρια ώστε να ενεργοποιήσουν σωστά τη διαδικασία της απόπτωσης (Francavilla et al., 1998). Συγκριτικά με τα σωματικά κύτταρα, το DNA των σπερματοζωαρίων του ανθρώπου εμφανίζει περισσότερες περιοχές μερικώς αποδιοργανωμένου DNA, δηλαδή περιοχές με χαλαρή συμπύκνωση (Muriel et al., 2004), 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 σπερματοζωάριο σε σχέση με τα σωματικά κύτταρα (Fernandez et al., 1998). Είτε πρόκειται για παραμονή θραύσεων στις έλικες του DNA είτε για ανωμαλίες του πακεταρίσματος της χρωματίνης, το τελικό αποτέλεσμα είναι τα σπερματοζωάρια να καθίστανται περισσότερα ευάλωτα σε βλάβες μετά το επίπεδο των όρχεων.

Κάπνισμα

Το κάπνισμα, εκτός από τις μεταλλαξιγόνες ιδιότητές του, επιδρά αρνητικά και στην ποιότητα του σπέρματος και συγκεκριμένα στον αριθμό, την

κινητικότητα και τη μορφολογία των σπερματοζωαρίων (Kunzle et al., 2003, Sofikitis et al., 1995). Πρόσφατα, έχει βρεθεί ότι το κάπνισμα έχει αρνητική επίδραση στην ακεραιότητα του DNA, καθώς οι καπνιστές παρουσιάζουν υψηλότερο ποσοστό σπερματοζωαρίων με κατακερματισμένο DNA σε σύγκριση με τους μη καπνιστές. Θεωρείται δεδομένο ότι το κάπνισμα αυξάνει την παραγωγή των ROS από τα λευκοκύτταρα και συνεπώς αυξάνει και τις κατατμήσεις του DNA (Potts et al., 1999). Έχει αποδειχθεί ότι το σπερματικό DNA των καπνιστών είναι περισσότερο ευάλωτο σε εξωγενείς προσβολές, εξαιτίας ελαττωμένων συγκεντρώσεων αντιοξειδωτικών παραγόντων στο σπερματικό πλάσμα (Fraga et al., 1996).

Ιατρογενής βλάβη

Η βλάβη του DNA των σπερματοζωαρίων μπορεί να είναι ιατρογενής, όπως σε πρωτόκολλα προετοιμασίας του σπέρματος για υποβοηθούμενη αναπαραγωγή, όπου πραγματοποιείται επανειλημμένη φυγοκέντρωση και απομόνωση σπερματοζωαρίων από το πλούσιο σε αντιοξειδωτικούς παράγοντες σπερματικό πλάσμα (Agarwal et al., 2003). Η προετοιμασία του σπέρματος είναι στις περισσότερες περιπτώσεις απαραίτητη, προκειμένου να απομακρυνθούν τα παθολογικά σπερματοζωάρια και να εμπλουτισθεί το σπέρμα. Μελέτες έχουν δείξει ότι η παρατεταμένη παραμονή του σπέρματος σε θερμοκρασία δωματίου (Gosálvez et al., 2009) ή στους 37°C (Dalzell et al., 2004) μετά από φυγοκέντρωση σε διαβάθμιση πυκνότητας (density gradient centrifugation) μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση του ποσοστού κατακερματισμού του DNA. Παρ' όλα αυτά, η φυγοκέντρωση σε διαβάθμιση πυκνότητας φαίνεται να αποτελεί την καλύτερη μέθοδο προετοιμασίας του σπέρματος (Zini et al. 1999, Angelopoulos et al., 1998, Larson et al., 1999, Sakkas et al., 2000, Tomlinson et al., 2001, Twigg et al., 1998), ενώ θα πρέπει να αποφεύγονται οι περιττές καθυστερήσεις. Επίσης, τα σπερματοζωάρια που λαμβάνονται από τους όρχεις με FNA ή με TESE στερούνται του προστατευτικού περιβάλλοντος του σπερματικού πλάσματος (Agarwal et al., 2003). Η κρυοσυντήρηση και, ιδιαίτερα, η διαδικασία ψύξης - απόψυξης μπορεί επίσης να επηρεάζουν την ακεραιότητα του σπερματικού

DNA (Kalthur et al., 2008). Γι' αυτό προτείνεται η προσθήκη αντιοξειδωτικών παραγόντων.

Αυξημένη θερμοκρασία των όρχεων

Η τεχνητή αύξηση της θερμοκρασίας των όρχεων αποδείχτηκε ότι αυξάνει την αναλογία ιστονών σε σχέση με των πρωταμινών και προκαλεί αστάθεια στο DNA των σπερματοζωαρίων (Banks S. et al., 2005). Επηρεάζει κυρίως τα σπερμιογόνια και τα πρωτογενή σπερματοκύτταρα. Πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι μπορεί να οδηγήσει σε βλάβη του σπερματικού DNA, είτε άμεσα είτε λόγω αύξησης της αναλογίας ιστονών / πρωταμινών (Sailer et al., 1997).

Λοιμώξεις και φλεγμονές του γεννητικού συστήματος

Οι λοιμώξεις και οι φλεγμονές του γεννητικού συστήματος έχει αναφερθεί ότι σχετίζονται με βλάβη του DNA των σπερματοζωαρίων, καθώς υψηλά ποσοστά κατακερματισμένου DNA έχουν βρεθεί σε δείγματα σπέρματος με αυξημένη συγκέντρωση λευκοκυττάρων (Alvarez et al., 2002). Αυτό, πιθανότατα, οφείλεται στην αυξημένη παραγωγή Ελεύθερων Ριζών Οξυγόνου (ΕΡΟ) κατά τη σπερμιογένεση ή / και στη δράση μεσολαβητών της φλεγμονής, όπως οι κυτοκίνες (Comhaire et al., 1999). Επιπρόσθετα, οι εμπύρετες λοιμώξεις, όπως η γρίπη, μπορούν, να επηρεάσουν τη δομή της χρωματίνης του σπερματοζωαρίου (Evenson et al., 2000).

Ακτινοβολία

Ο καρκίνος των όρχεων και η νόσος του Hodgkin, δύο από τις πιο συχνές κακοήθειες νεοπλασίες στους άνδρες αναπαραγωγικής ηλικίας, σχεδόν πάντα επηρεάζουν την ποιότητα του σπέρματος και την ακεραιότητα του DNA του σπερματοζωαρίου, ακόμη και πριν από τη θεραπεία (O'Flaherty et al., 2008). Η χημειοθεραπεία και η ακτινοθεραπεία, που εφαρμόζονται σε αυτές τις περιπτώσεις, είναι υπεύθυνες για επιπρόσθετη βλάβη του DNA των σπερματοζωαρίων, καθώς ασκούν κυταροτοξική δράση στο σπερματικό επιθήλιο και επηρεάζουν αναστρέψιμα την ανδρική γονιμότητα. Η έκταση της βλάβης στο DNA είναι εξαρτώμενη από τη δόση και τη διάρκεια έκθεσης

(Morris, 2002). Η αποκατάσταση της σπερματογένεσης μπορεί να συμβεί πολλά έτη μετά τη θεραπεία (Fossa et al., 1997).

Ελαττωματικές Πρωταμίνες

Ένα σημαντικό ποσοστό υπογόνιμων ανδρών (5-15%) παρουσιάζουν ανεπάρκεια των πρωταμινών (Aoki VW. et al., 2005). Μελέτες σε διαγονιδιακά ζώα με ελαττωματικές πρωταμίνες συσχετίζουν την μειωμένη γονιμοποιητική ικανότητα του σπέρματος *in vitro* (IVF) με την παρουσία DNA βλαβών εξαιτίας της ανεπάρκειας των πρωταμινών (Cho C. et al., 2003). Οι βλάβες του DNA των σπερματοζωαρίων προκύπτουν κατά τη σπερμιογένεση, κατά τη διάρκεια της οποίας οι ιστόνες αντικαθίστανται από τις πρωταμίνες.

Ενεργές Ρίζες Οξυγόνου (ROS)

Οι ενεργές ρίζες οξυγόνου (ROS) παράγονται από μη φυσιολογικά σπερματοζωάρια και ειδικότερα από σπερματοζωάρια που κατά την ωρίμανση δεν έχουν αποβάλλει την περίσσεια του κυτταροπλάσματος τους. Επίσης ROS παράγονται και από λευκοκύτταρα που είναι παρόντα στο σπέρμα. Υψηλά επίπεδα ROS έχουν ανιχνευτεί στο 25% των ανδρών με υπογονιμότητα και έχουν ενοχοποιηθεί για την πρόκληση βλαβών του DNA σπέρματος (Irvine et al., 2000). Όπως και στην περίπτωση των ελαττωματικών πρωταμινών έτσι και στην περίπτωση των ROS που προέρχονται από μη φυσιολογικά σπερματοζωάρια, οι βλάβες στο DNA εμφανίζονται κατά τη σπερμιογένεση (Gomez et al., 1996).

Ορμονικοί Παράγοντες

Πειραματικά δεδομένα αποδεικνύουν ότι οι βλάβες στο DNA των σπερματοζωαρίων μπορούν να προκαλούνται από ορμονικές διαταραχές. Για παράδειγμα η ύπαρξη μη λειτουργικών υποδοχέων της FSH σε ποντίκια μείωσαν τα επίπεδα πυρηνικών πρωταμινών των σπερματοζωαρίων, αύξησαν τα επίπεδα κατατμήσεων του DNA και επηρέασαν αρνητικά τη γονιμότητά τους (Xing et al., 2003).

Ηλικία

Η πατρική ηλικία έχει μελετηθεί σε σχέση με τις παραμέτρους του σπέρματος, τις χρωμοσωμικές ανωμαλίες και τη γονιμότητα. Συγκεκριμένα σε ολιγοασθενοτερατοσπερμικούς άνδρες η αύξηση της ηλικίας συνδέεται με χαμηλό όγκο σπέρματος, χαμηλότερο ποσοστό φυσιολογικών σε μορφολογία σπερματοζωαρίων και ελαττωμένη κινητικότητα (Kidd SA. et al., 2001). Αντίθετα θετική συσχέτιση διαπιστώθηκε μεταξύ ηλικίας και συγκέντρωσης σπέρματος (Irvine S. et al., 1996, Andolz P. et al., 1999). Η ηλικία των ανδρών επίσης σχετίζεται αρνητικά με τη σταθερότητα του πυρηνικού DNA των σπερματοζωαρίων καθώς η αύξηση της πατρικής ηλικίας επιφέρει κακό πακετάρισμα της χρωματίνης και σπασίματα της δίκλωνης αλυσίδας του DNA (Wyrobek A. et al., 2006, Singh NP. et al., 2003, Schmid TE. et al., 2007).

Κιρσοκήλη

Η κιρσοκήλη έχει ταυτιστεί με την ανώμαλη παρουσία περίσσειας κυτταροπλάσματος στα σπερματοζωάρια. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η περίσσεια κυτταροπλάσματος παρατηρείται συχνά στην περίπτωση ανεβασμένων επιπέδων των ROS στο σπέρμα υπογόνιμων ανδρών (Fischer MA. Et al., 2003). Συνεπώς οι βλάβες του DNA είναι ανάλογες με τα επίπεδα οξειδωτικού στρες στο σπέρμα ανδρών που πάσχουν από κιρσοκήλη (Saleh RA. et al., 2003). Βέβαια η ακεραιότητα του DNA έχει αποδειχτεί ότι βελτιώνεται σε σημαντικό βαθμό μετά από χειρουργική επέμβαση (Zini A. et al., 2005).

Ατμοσφαιρική ρύπανση

Επιδημιολογικές μελέτες έχουν συσχετίσει την έκθεση σε εντομοκτόνα και την ατμοσφαιρική ρύπανση με υψηλά επίπεδα βλάβης του DNA των σπερματοζωαρίων (Rubes et al., 2005). Πρόσφατη έρευνα υποστήριξε την υπόθεση ότι άνδρες ομόζυγοι όσον αφορά την έλλειψη της γλουταθειόνης-S-τρανσφεράσης M1 έχουν περιορισμένη ικανότητα αδρανοποίησης των ενεργών μεταβολιτών των καρκινογόνων πολυκυκλικών υδρογονανθράκων,

που είναι ιδιαίτερα αυξημένοι σε ατμοσφαιρική ρύπανση. Επομένως, οι άνδρες αυτοί είναι περισσότερο ευάλωτοι στην πρόκληση βλάβης στη χρωματίνη των σπερματοζωαρίων, σε περιπτώσεις ατμοσφαιρικής ρύπανσης (Rubes et al., 2007).

Κατακερματισμός DNA σπερματοζωαρίων και ικανότητα γονιμοποίησης

Για άνδρες υπογόνιμους υπάρχει πάντοτε η υποψία για την ύπαρξη υψηλών επιπέδων DNA κατατμήσεων ακόμα και αν τα σπερματοζωάρια αυτών φέρουν φυσιολογική μορφολογία (Avendaño C et al., 2009). Η συγκέντρωση του σπέρματος διαπιστώθηκε ότι μπορεί να μειώνεται παρουσία υψηλών επιπέδων DNA κατατμήσεων. Ομοίως τα ποσοστά της προωθητικής κινητικότητας και της φυσιολογικής μορφολογίας των σπερματοζωαρίων ελαττώνονται με την αύξηση των κατατμήσεων (Sills ES. et al., 2004). Η ζωτικότητα των σπερματοζωαρίων είναι ανεξάρτητη από την παρουσία κατακερματισμένου πυρηνικού DNA. Τα σπερματοζωάρια με βλάβη στο DNA παραμένουν ικανά να γονιμοποιήσουν ένα ωάριο (Lopes et al., 1998, Gandini et al., 2004, Aitken et al., 1998). Ωστόσο, το ερώτημα που εγείρεται είναι, εάν η βλάβη του DNA έχει επίδραση στη φυσιολογική ανάπτυξη του εμβρύου, αφού θα μπορούσε να προκαλέσει διαταραχές της ανάπτυξης του εμβρύου, αποτυχία της εμφύτευσης ή αυξημένη πιθανότητα αποβολής (Borini et al., 2006, Seli et al., 2004, Genesca et al., 1992, Parinaud et al., 1993, Twigg et al., 1998, Carrell et al., 2003, Evenson et al., 1999). Έχει παρατηρηθεί ότι, τόσο το ωάριο όσο και το πρώιμο έμβρυο, έχουν την ικανότητα επιδιόρθωσης δομικών ανωμαλιών του DNA (Ahmadi et al., 1999). Η ικανότητα του ωαρίου για επιδιόρθωση τυχόν βλάβης του πατρικού DNA εξαρτάται από το βαθμό της βλάβης, αλλά επηρεάζεται σημαντικά από την ποιότητα του κυτταροπλάσματος και του γονιδιώματός του. Σε γενικές γραμμές, οι θραύσεις της μονής έλικας καθώς και οι αλκαλο/οξεο-δεσμευτικές θέσεις (alkali/acid labile sites) είναι ευκολότερο να διορθωθούν από τις θραύσεις της διπλής έλικας. Ωστόσο, υπάρχουν ενδείξεις ότι οι ορισμένα ένζυμα, όπως οι πολυμεράσες, μπορούν να επιδιορθώνουν και θραύσεις της διπλής έλικας (García-Díaz et al., 2000). Μελέτες σε πειραματόζωα έδειξαν ότι το ωάριο έχει την ικανότητα να επιδιορθώνει τυχόν βλάβη του DNA, όταν

αυτή δεν ξεπερνά το 8% (Ahmadi et al., 1999, García-Díaz et al., 2000). Εάν όμως ο μηχανισμός επιδιόρθωσης του DNA δεν είναι λειτουργικός ή έχει διαταραχθεί, είτε από ενδογενείς π.χ. Ελεύθερες Ρίζες Οξυγόνου είτε από εξωγενείς παράγοντες (π.χ. ακτινοβολία, περιβαλλοντικές τοξίνες), τότε η επιδιόρθωση του πατρικού DNA δεν είναι δυνατή. Επιπρόσθετα, η ποιότητα του ωαρίου επηρεάζεται δραματικά από την ηλικία της γυναίκας. Αντίστοιχα, η ποιότητα του DNA του σπερματοζωαρίου φαίνεται να επηρεάζεται από την πατρική ηλικία. Αυτός είναι ένας επιπρόσθετος παράγοντας που μπορεί να εξηγήσει τα χαμηλά ποσοστά κύησης σε γυναίκες προχωρημένης ηλικίας (Belloc et al., 2008) Εάν η βλάβη στο DNA του εμβρύου είναι πάνω από ένα όριο και δεν έχει επιδιορθωθεί, αυτό μπορεί να εξηγήσει τη διακοπή της ανάπτυξης του εμβρύου που παρατηρείται τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* μετά την εμφύτευση, ακόμη και εάν ο καρυότυπος είναι φυσιολογικός. Αυτός ο τύπος της βλάβης, που εκφράζεται κατά την εμφύτευση του εμβρύου ή / και μετά από αυτή, χαρακτηρίζεται ως όψιμη πατρική επίδραση (late paternal effect). Ωστόσο, κάθε βλάβη στο DNA του εμβρύου δεν είναι πατρικής προέλευσης. Αντίθετα, μπορεί να προέρχεται από το ωάριο. Για παράδειγμα οι ανευπλοειδίες που παρατηρούνται στα έμβρυα είναι, ως επί το πλείστον, μητρικής προέλευσης (Fragouli et al., 2006., Sher et al., 2007). Επομένως, οι επιπτώσεις των θραύσεων του DNA του σπερματοζωαρίου στη γονιμοποίηση και την εμβρυϊκή ανάπτυξη εξαρτώνται από το βαθμό της βλάβης του DNA σε συνδυασμό με την ικανότητα του ωαρίου να επιδιορθώνει αυτή τη βλάβη. Η βλάβη του DNA στο σπερματοζωάριο μπορεί να αφορά τόσο το πυρηνικό όσο και το μιτοχονδριακό DNA και μπορεί να προκληθεί είτε κατά την παραγωγή είτε κατά τη μεταφορά των σπερματικών κυττάρων. Φαίνεται ότι πιο σημαντική για την ακεραιότητα του DNA είναι η βλάβη που προκαλείται μετά το επίπεδο των όρχεων, κατά τη μεταφορά των σπερματοζωαρίων στην επιδιδυμίδα. Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώνεται από μελέτες που δείχνουν ότι ο κατακερματισμός του DNA είναι υψηλότερος σε σπερματοζωάρια που απομονώνονται από την ουρά της επιδιδυμίδας και από εκσπερμάτιση σε σύγκριση με σπερματοζωάρια που απομονώνονται από τους όρχεις (Greco et al., 2005, Ollero et al., 2001, Suganuma et al, 2005). Ωστόσο, δεν αποκλείεται διαταραχές στη σπερματογένεση στο επίπεδο των όρχεων να καθιστούν τα

σπερματοζωάρια πιο ευάλωτα για βλάβη σε μεταγενέστερο επίπεδο. Οι ακριβείς μηχανισμοί που οδηγούν σε θραύσεις της DNA έλικας παραμένουν ακόμα ασαφείς. Έχουν προταθεί τρεις βασικές θεωρίες: διαταραχή του μηχανισμού της απόπτωσης, ελαττωματική συμπύκνωση της χρωματίνης των σπερματοζωαρίων, και βλάβη από οξειδωτικό στρες. Η συμμετοχή κασπασών στη διαδικασία της απόπτωσης ευνοεί τον κατακερματισμό του DNA στα σπερματοζωάρια. (Kim et al., 2001). Υψηλές συγκεντρώσεις EPO έχουν συσχετισθεί με θραύσεις της διπλής και της μονής έλικας του DNA, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι αποτελούν έναν από τους βασικότερους παράγοντες που συμβάλλουν στον κατακερματισμό του DNA (Agarwal et al., 2003, Aitken et al., 2001). Οι θραύσεις της μονής έλικας είναι δυνατό να διορθωθούν από το ωάριο ή το έμβρυο. Αντίθετα, οι εκτεταμένες θραύσεις της διπλής έλικας του DNA του σπερματοζωαρίου πρακτικά δεν μπορούν να διορθωθούν και επομένως παραμένουν στο αναπτυσσόμενο έμβρυο. Οι δύο βασικές πηγές υπέρμετρης παραγωγής EPO στο σπέρμα είναι τα λευκοκύτταρα και τα σπερματοζωάρια με κυτταροπλασματικό υπόλειμμα (Aitken et al., 1992). Ανώριμα σπερματοζωάρια παράγουν υψηλές συγκεντρώσεις EPO και μπορούν να προκαλέσουν βλάβη σε ώριμα σπερματοζωάρια κατά την κοινή τους δίοδο από την επιδιδυμίδα (Ollero et al., 2001). Τα επιθηλιακά κύτταρα της επιδιδυμίδας φαίνεται ότι συμβάλλουν στη βλάβη του DNA των σπερματοζωαρίων, είτε μέσω της παραγωγής EPO, όπως είναι η υδροξυλική ρίζα και το οξειδίο του αζώτου, είτε μέσω της ενεργοποίησης των κασπασών και των ενδονουκλεασών των σπερματοζωαρίων από φυσικοχημικούς παράγοντες (Britan et al., 2006). Θεωρητικά, στην πρώτη περίπτωση, η βλάβη θα μπορούσε να αποφευχθεί με τη λήψη αντιοξειδωτικών παραγόντων, οι οποίοι όμως θα ήταν αναποτελεσματικοί στη δεύτερη περίπτωση. Εξαιτίας αυτής της δραστηριότητάς της, θα μπορούσε να θεωρηθεί ότι η επιδιδυμίδα λειτουργεί και ως ένας δεύτερος, μετά τα κύτταρα Sertoli, ελεγκτικός μηχανισμός για τον περιορισμό των ελαττωματικών σπερματοζωαρίων (Suganuma et al., 2005). Επιπρόσθετα, έχει βρεθεί ότι η βλάβη που προκαλείται στο DNA των ευάλωτων σπερματοζωαρίων είναι τόσο μεγαλύτερη όσο προχωρούν στην επιδιδυμίδα και τον εκσπερματικό πόρο. Τα ώριμα σπερματοζωάρια

στερούνται κυτταροπλάσματος, που αποτελεί την κύρια πηγή αντιοξειδωτικών παραγόντων. Ωστόσο, 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.

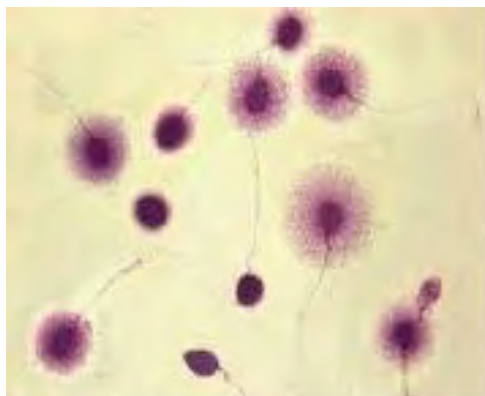
Μέθοδοι προσδιορισμού του κατακερματισμού του DNA

Ένα σημαντικό θέμα, όσον αφορά στις μεθόδους προσδιορισμού του κατακερματισμού του DNA είναι το εάν προσδιορίζουν θραύσεις της μονής ή / και της διπλής έλικας του DNA, καθώς, επίσης, το εάν απαιτούν ένα αρχικό προπαρασκευαστικό στάδιο αποδιάταξης (denaturation) του DNA προκειμένου να ανιχνευθούν οι θραύσεις. Οι μέθοδοι προσδιορισμού διακρίνονται σε άμεσες και 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 το όξινο ή αλκαλικό pH. Επομένως, στη δεύτερη περίπτωση δεν πρόκειται για πραγματικές θραύσεις, αλλά για αλκαλο/οξεο-δεσμευτικές θέσεις. 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 τεχνική ανίχνευσης της δομής της χρωματίνης (SCSA), 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).

Μέθοδος SCD (Sperm Chromatin Dispersion)

Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην αρχή ότι, μετά την επίδραση οξέος που προκαλεί αποδιάταξη του DNA των σπερματοζωαρίων και την απομάκρυνση των πυρηνικών πρωτεϊνών, εφόσον υπάρχουν θραύσεις σε αυτό, δεν

σχηματίζεται η χαρακτηριστική άλως που παρατηρείται όταν το DNA είναι φυσιολογικό (Fernandez et al., 2003). Συγκεκριμένα, όταν σπερματοζωάρια χωρίς κατακερματισμένο DNA τοποθετούνται σε αγαρόζη 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 (Fernandez et al., 2003). Προκειμένου να αποφευχθεί η επίδραση της διαφοράς του μεγέθους των πυρήνων των σπερματοζωαρίων, το μέγεθος της άλως υπολογίζεται από το λόγο της επιφάνειας της άλως προς την επιφάνεια ολόκληρου του πυρηνοειδούς (Fernandez et al., 2003). 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 περιορισμένα ακόμη κλινικά δεδομένα.



Εικόνα 1. Μέθοδος SCD. Διακρίνονται τα σπερματοζωάρια με ακέραια χρωματίνη, τα οποία σχηματίζουν τη χαρακτηριστική άλω και αυτά με θραύσεις στο DNA χωρίς άλω.

Ανεξάρτητα από την τεχνική προσδιορισμού, όλες οι μέθοδοι ανιχνεύουν τον κατακερματισμό του DNA συνολικά, είτε, δηλαδή, εντοπίζεται σε εξόνια, που είναι περιοχές που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, είτε σε ιντρόνια, που είναι «σιωπηλές» περιοχές του γονιδιώματος. Τα ιντρόνια αποτελούν το 90% του

DNA. Είναι προφανές ότι θραύσεις σε θέσεις γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες αναμένεται να είναι περισσότερο επιβλαβείς, σε σχέση με αυτές που εντοπίζονται σε σιωπηλές περιοχές (Zini et al., 2001). Ωστόσο, τυχόν βλάβη ακόμη και σε αυτές τις περιοχές θα μπορούσε να επηρεάσει αρνητικά τη δομή του DNA. Προς το παρόν, καμία μέθοδος δεν μπορεί να προσδιορίσει αυτόν τον παράγοντα, με αποτέλεσμα να μην μπορεί να υπάρξει διαφοροποίηση μεταξύ του κατακερματισμού με ή χωρίς κλινική σημασία. Πρέπει να τονιστεί ότι το μόνο που έχει πραγματικά σημασία είναι η κατάσταση του DNA του μοναδικού σπερματοζωαρίου που θα γονιμοποιήσει το ωάριο. Τόσο κατά τη γονιμοποίηση με φυσικό τρόπο όσο και κατά την εφαρμογή μεθόδων υποβοηθούμενης αναπαραγωγής δεν αποκλείεται να επιλεγεί ένα φυσιολογικό σπερματοζωάριο, ακόμη κι εάν το ποσοστό κατακερματισμού του DNA του συνολικού πληθυσμού των σπερματοζωαρίων είναι υψηλό. Αυτό που αποτελεί πρόκληση για το μέλλον είναι να επιτευχθεί ο προσδιορισμός της έκτασης της βλάβης στο συγκεκριμένο σπερματοζωάριο, χωρίς αυτό να συνεπάγεται την καταστροφή του. Μεγάλης αξίας θα ήταν επίσης η ανάπτυξη τεχνικών προετοιμασίας του σπέρματος που να διευκολύνουν την απομάκρυνση των προβληματικών σπερματοζωαρίων και να περιορίζουν την επιλογή μεταξύ των φυσιολογικών.

Παράγοντες που επηρεάζουν την προγνωστική αξία των μεθόδων προσδιορισμού του κατακερματισμού του DNA

- Single vs. Double-stranded DNA fragmentation: Γενικά ο κατακερματισμός του DNA μονής αλυσίδας έχει καλύτερη πρόγνωση και είναι πιο εύκολο να επιδιορθωθεί από το ωάριο ή το έμβρυο
- Ποσοστό σπερματοζωαρίων με κατακερματισμένο DNA: Όσο μεγαλύτερο είναι το ποσοστό των σπερματοζωαρίων που έχουν επηρεαστεί, τόσο μικρότερη είναι η πιθανότητα για ένα σπερματοζωάριο με ακέραιο DNA να γονιμοποιήσει το ωάριο

- Ποσοστό DNA fragmentation στο σπερματοζωάριο: Όσο μεγαλύτερη είναι η βλάβη τόσο πιο δύσκολα θα επιδιορθωθεί από το ωάριο ή το έμβρυο
- Πρωτογενής ή δευτερογενής βλάβη του DNA
- Μέθοδος προσδιορισμού : Μέθοδοι που υπολογίζουν άμεσα τη βλάβη (TUNEL, COMET σε ουδέτερο pH) έχουν μεγαλύτερη διαγνωστική αξία από τις έμμεσες που χρησιμοποιούν οξύ ή αλκαλικό pH (SCSA, SCD, COMET σε αλκαλικό pH).
- Κωδικοποιούσες και μη κωδικοποιούσες περιοχές του DNA που επηρεάζονται: Το 90% του DNA αποτελείται από μη κωδικοποιούσες περιοχές. Έτσι, η πιθανότητα να συμβεί η βλάβη σε εξώνια είναι πολύ μικρή.
- Ικανότητα του ωαρίου να επιδιορθώνει τη βλάβη του DNA του σπερματοζωαρίου σε τεχνικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής: Η επιδιορθωτική ικανότητα του ωαρίου ως προς τον κατακερματισμό του DNA του σπερματοζωαρίου εξαρτάται από την έκταση της βλάβης και από την κυτταροπλασματική και πυρηνική ωριμότητα των ωαρίων.
- Ικανότητα του εμβρύου να επιδιορθώνει τη βλάβη του DNA του σπερματοζωαρίου: Εξαρτάται από την έκταση της βλάβης και από την ποιότητα του εμβρύου. Η ιδιότητα αυτή μπορεί να ελεγχθεί in vitro μετά από βιοψία στο στάδιο των 8 κυττάρων ή προτιμότερο από κύτταρα τροφοεκτοδέρματος στο στάδιο της βλαστοκύστης
- Αριθμός MII ωαρίων: Έχοντας μεγαλύτερο αριθμό MII ωαρίων αυξάνεται η πιθανότητα για ένα σπερματοζωάριο με ακέραιο DNA να γονιμοποιήσει ένα MII ωάριο με αποτέλεσμα μεγαλύτερο αριθμό υψηλής ποιότητας εμβρύων. Τα ποσοστά εγκυμοσύνης θα είναι χαμηλότερα σε περιπτώσεις υψηλού κατακερματισμού DNA των σπερματοζωαρίων (Duran et al., 2002).

- Επεξεργασία του σπέρματος: Κατά την επεξεργασία του σπέρματος είναι πιθανόν να προκληθούν ιατρογενείς βλάβες στο DNA. Υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των βλαβών στο DNA με τη φυγοκέντρωση δειγμάτων ανώριμων σπερματοζωαρίων με υψηλά επίπεδα ROS, ή/και παρουσία πολυάριθμων λευκοκυττάρων ή μετά από μακρόχρονη παραμονή στον κλίβανο δειγμάτων μετά την επεξεργασία δειγμάτων με υψηλό δυναμικό οξειδωτικού στρες (Lewis et al., 2008).

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Σκοπός

Ο σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας να διαπιστώσουμε εάν υπάρχει συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα του κατακερματισμού του DNA των σπερματοζωαρίων και στην ικανότητα γονιμοποίησης αυτών και δεύτερον εάν υπάρχει συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα του κατακερματισμού του DNA των σπερματοζωαρίων και στην ποιότητα των εμβρύων που προκύπτουν μετά από τεχνικές της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής.

Τα άτομα που αποτέλεσαν το δείγμα της μελέτης προήλθαν από την μονάδα υποβοηθούμενης αναπαραγωγής του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας κατά το χρονικό διάστημα Απρίλιος 2012- Ιούλιος 2012. Τα 55 ζευγάρια προσήλθαν στην μονάδα υποβοηθούμενης αναπαραγωγής για διαφορετικά αίτια υπογονιμότητας. Συγκεκριμένα 21,21% λόγω σαλπιγγικού παράγοντα, 7,58% λόγω ενδομητρίωσης, 6,06% λόγω ορμονολογικών ανωμαλιών, 40,91% λόγω ανδρικού παράγοντα ενώ, 15,15% για άλλο λόγο και 9,09% λόγω ανεξήγητης υπογονιμότητας.

Οι ασθενείς που εισήλθαν στην μελέτη πληρούσαν τα παρακάτω κριτήρια:

- Ηλικία άνω των 18 ετών.
- Αποτυχία επίτευξης κύησης μετά από τουλάχιστον 12 μήνες ελεύθερων σεξουαλικών επαφών.
- Θεραπεία υπογονιμότητας με μεθόδους IVF και ICSI
- Συγκέντρωση σπερματοζωαρίων ίση ή μεγαλύτερη των 2 εκατομμυρίων ανά ml

Ιστορικό

Έγινε λεπτομερής λήψη του ιστορικού, ιδιαίτερα όσον αφορά στις πληροφορίες τις απαραίτητες για τη διάγνωση του αιτίου της υπογονιμότητας των ζευγαριών. Ιδιαίτερη έμφαση δόθηκε στην ύπαρξη συστηματικών νοσημάτων, στη λήψη φαρμάκων, καθώς και στη χρήση καπνού και αλκοόλ. Επίσης καταγράφηκε το ύψος και το βάρος τους για προσδιορισμό του ΔΜΣ. Στα πλαίσια του εργαστηριακού ελέγχου έγινε σπερμοδιάγραμμα. Το δείγμα σπέρματος που χρησιμοποιήθηκε ήταν νωπό σε όλα τα περιστατικά, και η λήψη του έγινε την ίδια μέρα που έγινε η ωοληψία και η IVF ή η ICSI κατά περίπτωση.

Σπερμοδιάγραμμα

Το σπερμοδιάγραμμα πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες της 5ης έκδοσης του εγχειριδίου του ΠΟΥ για την εξέταση του σπέρματος (World Health Organization, 2010). Σε όλους τους άνδρες που συμμετείχαν στη μελέτη ζητήθηκε αποχή από εκσπερμάτιση διάρκειας 2 - 4 ημερών, καθώς και προσοχή στη λήψη του δείγματος, ώστε να αποφευχθεί τυχόν απώλεια ιδιαίτερα του πρώτου κλάσματος, που χαρακτηρίζεται από υψηλές τιμές όσον αφορά τον αριθμό και την κινητικότητα. Την πρώτη ώρα μετά την εκσπερμάτιση μετρήθηκε η κινητικότητα σε Makler chamber. Η εξέταση έγινε σε οπτικό μικροσκόπιο με μεγέθυνση x400. Η κινητικότητα των σπερματοζωαρίων αξιολογήθηκε ως εξής:

- Προωθητική κίνηση (Progressive motility - PR) Τα σπερματοζωάρια κινούνται ενεργά είτε ευθύγραμμα είτε σχηματίζοντας μεγάλο κύκλο, ανεξάρτητα από την ταχύτητα
- Μη προωθητική κίνηση (Non-progressive motility - NP): Παρατηρείται απουσία της πρόσθιας προωθητικής κίνησης, για παράδειγμα τα σπερματοζωάρια κινούνται σε μικρούς κύκλους ή επιτόπια είτε η κίνηση του μαστιγίου δύσκολα εντοπίζεται.
- Ακίνησία (Immotility - IM)

Στη συνέχεια ελέγχθηκε το δείγμα για την παρουσία συσσωρεύσεων και συγκολλήσεων. Ακολούθησε προσδιορισμός της συγκέντρωσης των

σπερματοζωαρίων στο Makler chamber σε οπτικό μικροσκόπιο με μεγέθυνση x400. Επίσης εκτιμήθηκε η παρουσία σφαιρικών και άλλων κυττάρων.

Προσδιορισμός του κατακερματισμού του DNA

Για τον προσδιορισμό του κατακερματισμού του DNA των σπερματοζωαρίων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος SCD (Sperm Chromatin Dispersion-Διασπορά χρωματίνης Σπερματοζωαρίων) με οπτικό μικροσκόπιο. Το αποτέλεσμα εκφράζεται ως ποσοστό % των σπερματοζωαρίων με κατακερματισμένο DNA. Για την εφαρμογή της μεθόδου SCD χρησιμοποιήθηκαν αντιδραστήρια Halosperm[®] G2 της εταιρείας Halotech. (HALOTECH DNA SL PTM Parque Científico de Madrid, C/ Faraday, 7. Planta 1. Oficina 1.08. Campus de Cantoblanco. 28049 Madrid, Spain)(εικόνα 2). Η χρήση ήπιου οξέος που αποδιατάσσει το δίκλωνο μόριο του DNA σε συνδυασμό με τη λύση των πρωταμινών δημιουργεί μία άλω αποσυμπυκνωμένης χρωματίνης γύρω από την κεφαλή του σπερματοζωαρίου όταν το DNA είναι ακέραιο ενώ αυτή απουσιάζει όταν το DNA του σπερματοζωαρίου παρουσιάζει κατατμήσεις. Η απεικόνιση διευκολύνεται με τη χρήση της χρωστικής Diff Quick (υδατικό διάλυμα μπλε του μεθυλενίου και εωσίνης) και η παρατήρηση πραγματοποιείται σε οπτικό μικροσκόπιο. Χαρακτηριστικό πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ότι κατά την επεξεργασία του σπέρματος με τα διάφορα αντιδραστήρια διατηρούνται ακέραιες οι ουρές των σπερματοζωαρίων. Έτσι κατά την παρατήρηση στο οπτικό μικροσκόπιο γίνεται σαφώς η διάκριση μεταξύ σπερματοζωαρίων και άλλων κυτταρικών τύπων του σπέρματος. Επιπρόσθετα η συγκεκριμένη μέθοδος δεν απαιτεί ακριβό εξοπλισμό για την ανάλυση, ενώ τα αντιδραστήρια που απαιτούνται αλλά δεν περιέχονται στο kit, έχουν μικρό κόστος. Τα δείγματα σπέρματος ήταν μέγιστης συγκέντρωσης 20 εκατομμυρίων/ml και τα δείγματα μεγαλύτερης συγκέντρωσης αραιώθηκαν σε PBS ώστε να επιτευχθεί συγκέντρωση 15 εκατομμυρίων/ml, ώστε να είναι εφικτή η παρατήρηση στο μικροσκόπιο.



Εικόνα 2: Halosperm® G2 της εταιρείας Halotech

Το συγκεκριμένο kit περιλαμβάνει τα παρακάτω υλικά:

- 1 tube του 1ml αγαρόζη
- 10 διπλές αντικειμενοφόρους πλάκες με κάθε μια να διαθέτει θέση για το δείγμα (S) και θέση για το control (C)
- Eppendorf tubes
- Αποδιατακτικό Διάλυμα (Denaturant Agent) των 10ml
- Διάλυμα Λύσης (Lysis Solution) των 10ml
- Διάλυμα Χρώσης A (Staining Solution A) των 10ml
- Διάλυμα Χρώσης B (Staining Solution B) των 10ml
- Float

Εκτός των υλικών του Kit χρησιμοποιήθηκαν επίσης:

- Διάλυμα Phosphate-buffered saline (PBS)
- Αποσταγμένο νερό (water for injection)
- Αιθανόλη 70%
- Αιθανόλη 100%

Για κάθε δείγμα ξεχωριστά τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο 100°C erpendorf tube σε float για 5 λεπτά με 50μl αγαρόζης ώστε αυτή να ρευστοποιηθεί. Στη συνέχεια, διατηρήθηκε σε υδατόλουτρο 37 °C για 5 λεπτά ώστε να εξισορροπηθεί η θερμοκρασία. Έπειτα προστέθηκαν 25μl από το δείγμα σπέρματος και αναδεύτηκαν με την υγρή αγαρόζη με τη βοήθεια πιπέτας. Κατόπιν έγινε η επίστρωση 8μl από το κυτταρικό αιώρημα σε αντικειμενοφόρες πλάκες και αφού καλύφθηκε με καλυπτρίδα τοποθετήθηκε στο ψυγείο στους 4 °C για να στερεοποιηθεί η αγαρόζη και να μονιμοποιηθεί το δείγμα στην αντικειμενοφόρο πλάκα.

Ακολούθησε η επεξεργασία του δείγματος σε θερμοκρασία δωματίου (22 °C). Αφού αφαιρέθηκε η καλυπτρίδα, η αντικειμενοφόρος πλάκα παρέμεινε σε οριζόντια θέση για την υπόλοιπη διαδικασία. Εφαρμόστηκε το διάλυμα 1, ο αποδιατακτικός παράγοντας για 7 λεπτά. Το διάλυμα αυτό περιέχει HCl αραιωμένο σε αποσταγμένο νερό και αποδιατάσσει τα μικρά δίκλωνα κομμάτια του DNA των σπερματοζωαρίων που έχουν προκύψει από κατάτμηση (Fernández JL. et al., 2005). Αφού απομακρύνθηκε με κλίση της αντικειμενοφόρου πλάκας εφαρμόστηκε το διάλυμα 2, το διάλυμα λύσης για 20 λεπτά και απομακρύνθηκε επίσης με κλίση της αντικειμενοφόρου πλάκας. Το Διάλυμα Λύσης έχει την ιδιότητα να απομακρύνει μεμβράνες και πυρηνικές πρωτεΐνες- πρωταμίνες. Ακολούθησε πλύση με απεσταγμένο νερό για 5 λεπτά και αφυδάτωση σε δύο στάδια με 70% αιθανόλη και 100% αιθανόλη, διαδοχικά για 2 λεπτά σε κάθε στάδιο. Τέλος, οι αντικειμενοφόροι πλάκες αφέθηκαν να στεγνώσουν στον αέρα. Η χρώση έγινε με χρωστική "Diff-Quick" που την παρείχε το Halosperm® G2. Οι χρωστικές είναι μίξη υδατικών διαλυμάτων εωσίνης και μπλε του μεθυλενίου σε διάλυμα μεθανόλης. Το δείγμα βάφτηκε διαδοχικά σε δύο στάδια, αρχικά με το διάλυμα 3 (eosinophilic xanthene) και με το διάλυμα 4 (basophilic thiazine) για 7 λεπτά αντίστοιχα. Οι χρωστικές αφαιρέθηκαν όπως σε όλα τα στάδια της διαδικασίας με κλίση της αντικειμενοφόρου πλάκας σε κάθετη θέση και πάνω σε διηθητικό χαρτί, η οποία τελικά αφέθηκε να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου. Ο προσδιορισμός του ποσοστού των σπερματοζωαρίων με κατακερματισμένο DNA έγινε με παρατήρηση και αξιολόγηση περίπου 400 σπερματοζωαρίων σε οπτικό μικροσκόπιο. Παρατηρήθηκαν διαφορετικά πεδία από δύο παρατηρητές,

μετρήθηκαν από 200 σπερματοζωάρια περίπου και στη συνέχεια βγήκε ο μέσος όρος των δύο μετρήσεων. Στην εικόνα 3 φαίνονται οι 5 διαφορετικές κατηγορίες σπερματοζωαρίων που διακρίνονται μετά την επεξεργασία με το Halosperm® G2. Η εκτίμηση του κατακερματισμένου DNA βασίστηκε στην παρουσία και το μέγεθος της χαρακτηριστικής άλω γύρω από τον πυρήνα νουκλεοειδών. Στην κατηγορία 1 και 2 ανήκουν τα σπερματοζωάρια χωρίς κατακερματισμό στο DNA τους. Στην κατηγορία 1 (Big Halo) η άλως γύρω από τον πυρήνα του σπερματοζωαρίου είναι μεγάλη, και η διάμετρός της είναι μεγαλύτερη ή ίση με τη μικρότερη διάμετρο του πυρήνα νουκλεοειδών. Στην κατηγορία 2 (Medium Halo) η άλως είναι μεσαίου μεγέθους. Στις κατηγορίες 3, 4 και 5 ανήκουν τα σπερματοζωάρια με κατακερματισμό του DNA (Fragmented και Degraded). Η κατηγορία 3 (Small Halo) διακρίνεται από την μικρή άλω γύρω από τον πυρήνα, που έχει έκταση έως και το 1/3 της μικρότερης διαμέτρου του πυρήνα. Η κατηγορία 4 (No Halo) ξεχωρίζει από την απουσία της χαρακτηριστικής άλω. Η κατηγορία 5 (Degraded) περιλαμβάνει τα εκφυλισμένα σπερματοζωάρια. Δεν παρατηρείται η χαρακτηριστική άλως, ενώ ο πυρήνας έχει υποστεί ανεπαίσθητη χρώση. Κατά την παρατήρηση δεν πρέπει να συγχέουμε τα σπερματοζωάρια με άλλα κύτταρα και δεν πρέπει να τα συμπεριλαμβάνουμε στις μετρήσεις μας. Εύκολα μπορούμε να διακρίνουμε την παρουσία ή την απουσία της ουράς. Για τον προσδιορισμό του ποσοστού των σπερματοζωαρίων με κατακερματισμένο DNA (DNA Fragmentation Index) χρησιμοποιήθηκε ο τύπος

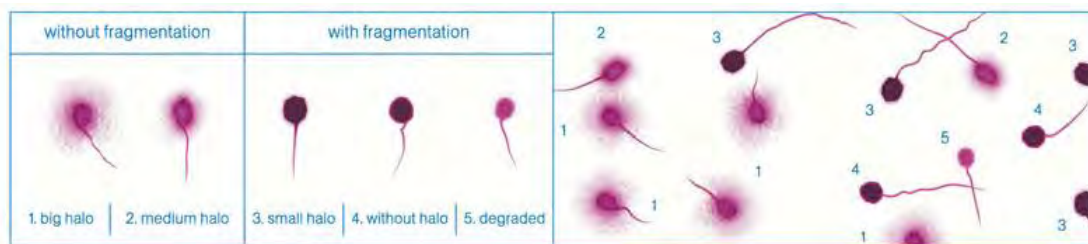
$$SDFI(\%) = (Fragmented + Degraded) \times 100 / \text{Σύνολο σπερματοζωαρίων}$$

Στην παρούσα μελέτη προσδιορίσαμε δύο δείκτες.

$$SDF1 = (Fragmented + Degraded) \times 100 / \text{Σύνολο σπερματοζωαρίων}$$

και

$$SDF2 = (Fragmented) \times 100 / \text{Σύνολο σπερματοζωαρίων} - Degraded$$



Εικόνα 3: Κατηγορίες σπερματοζωαρίων μετά την επεξεργασία με Halosperm

Εκτίμηση γονιμοποίησης- Αξιολόγηση εμβρύων

Η εκτίμηση της γονιμοποίησης έγινε 16-18 ώρες μετά την ICSI ή 18-20 ώρες μετά την IVF. Το ποσοστό γονιμοποίησης εκφράστηκε ως ο λόγος των ωαρίων με 2 προπυρήνες (2PN) προς τον ολικό αριθμό των ωαρίων. Αποτυχία γονιμοποίησης σημειώθηκε με την απουσία προπυρήνων, με την παρουσία ενός ή περισσότερων από δύο προπυρήνων, ή με την αρατήρηση εκφυλισμένων ωαρίων. Το ποσοστό φυσιολογικής διαίρεσης (cleavage rate) εκφράστηκε ως ο λόγος των φυσιολογικά διαιρούμενων εμβρύων προς τον αριθμό των φυσιολογικά γονιμοποιημένων ωαρίων. Τα έμβρυα αξιολογήθηκαν και βαθμολογήθηκαν δύο ή τρεις μέρες μετά την ωοληψία, πριν την εμβρυομεταφορά. Τα έμβρυα αξιολογήθηκαν μορφολογικά από τον αριθμό των βλαστομεριδίων (4-8 βλαστομερίδια), από το ποσοστό κυτταροπλασματικών κατατμήσεων (σε κλίμακα 1-4 με το 4 να αντιπροσωπεύει την απουσία κατατμήσεων), από τη συμμετρία των βλαστομεριδίων (σε κλίμακα 1-2 με το 2 να αντιπροσωπεύει τα κανονικά βλαστομερίδια). Για παράδειγμα, ένα έμβρυο με 8 κανονικά (ισομεγέθη) βλαστομερίδια και απουσία κυτταροπλασματικών κατατμήσεων θα συγκεντρώσει σύνολο βαθμών 14, ενώ ένα έμβρυο με 5 μη κανονικά (ανισομεγέθη) βλαστομερίδια και 10% έως 20% κυτταροπλασματικές κατατμήσεις (κλίμακα 2) θα συγκεντρώσει 8 βαθμούς.

Για κάθε ασθενή, η συνολική βαθμολογία των εμβρύων (CES - Cumulative Embryo Score) υπολογίστηκε με το άθροισμα της βαθμολογίας του κάθε εμβρύου και η μέση βαθμολογία της ποιότητας των εμβρύων (MSEQ-Mean Score Embryo Quality) λήφθηκε με τη διαίρεση

του CES προς τον αριθμό των διαθέσιμων εμβρύων. Δύο ή τρεις ημέρες μετά την ωοληψία και μετά την αξιολόγηση της ποιότητας των εμβρύων, δύο έως τέσσερα επιλεγμένα έμβρυα (ανάλογα με το την ηλικία της γυναίκας, τον αριθμό των διαθέσιμων εμβρύων και σύμφωνα με την ελληνική νομοθεσία) μεταφέρθηκαν στη μήτρα. Ως MSET (Mean Score of Embryos Transferred) ορίστηκε ο λόγος του αθροίσματος της βαθμολογίας του κάθε μεταφερόμενου εμβρύου προς τον αριθμό των εμβρύων που μεταφέρθηκαν στη μήτρα. (Anifandis et al. 2010)

Η αξιολόγηση και η βαθμολογία των εμβρύων ήταν τυφλή και ανεξάρτητη από την εκτίμηση του ποσοστού του κατακερματισμού του DNA των σπερματοζωαρίων και έγινε από τον κλινικό εμβρυολόγο της μονάδας υποβοηθούμενης αναπαραγωγής.

Στατιστική ανάλυση

Για τη στατιστική ανάλυση των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα SPSS Statistics v19.(SPSS, Inc. Chicago, IL, USA). P-value 2-tailed 0.01 θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική. Η ανάλυση περιέλαβε Pearson Correlations καθώς και t-test.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Πίνακας 1: Περιγραφικά χαρακτηριστικά ανδρών και γυναικών που συμμετέχουν στη μελέτη

	N=55	Μέση τιμή ± Τυπική απόκλιση
ΑΝΔΡΕΣ	Ηλικία	38.71 ± 5.02
	ΔΜΣ	26.82 ± 2.93
	Κάπνισμα	49.09% (27/55)
	Αλκοόλ	7.27% (4/55)
ΓΥΝΑΙΚΕΣ	Ηλικία	36.36 ± 4.89
	ΔΜΣ	24.28 ± 4.12
	Κάπνισμα	4% (22/55)
	Αλκοόλ	3.64% (2/55)

Πίνακας 2: Περιγραφικά χαρακτηριστικά παραμέτρων του σπέρματος

	N=55	Μέση τιμή ± Τυπική απόκλιση
Όγκος (ml)		3.37 ± 1.64
Συγκέντρωση (x 10 ⁶ /ml)		42.44 ± 39.25
PR		44.09 ± 18.73
NP		20.47 ± 10.23
IM		35.47 ± 20.31
SDF1 (%)		36.10 ± 13.14
SDF2 (%)		27.88 ± 11.42

Πίνακας 3: Περιγραφικά εμβρυολογικά χαρακτηριστικά

N=55	Μέση τιμή ± Τυπική απόκλιση		
Μέθοδος	IVF + ICSI (N=55)	IVF (N=13)	ICSI (N=42)
Αριθμός ωαρίων	4.89 ± 4.05	7.15 ± 6.12	4.19 ± 2.92
MII	2.55 ± 2.49	-	3.33 ± 2.34
Ποσοστό γονιμοποίησης (%)	71.85	65.06	73.94
Ποσοστό διαίρεσης (%)	83.47	73.9	86.43
CES	19.55 ± 14.44	29.38 ± 20.51	16.5 ± 10.54
MSEQ	7.42 ± 3.03	8.02 ± 3.80	7.23 ± 2.78
MSET	8.25 ± 3.12	9.36 ± 3.77	7.9 ± 2.86
Κύηση	21.82% (12/55)	23.08% (3/13)	21.43% (9/42)

Πίνακας 4. Συσχέτιση SDF 1/ SDF2 με τη γονιμοποίηση και την ποιότητα των εμβρύων

		SDF1	SDF2	Ποσοστό γονιμοποίησης (%)	Ποσοστό διαίρεσης (%)	CES	MSEQ	MSET
SDF1	Pearson	1	0.938**	0.148	0.048	-0.075	0.093	0.066
	Correlation		0.000	0.281	0.727	0.587	0.498	0.633
	Sig. (2-tailed)							
SDF2	Pearson	0.938**	1	0.115	0.059	-0.072	0.098	0.066
	Correlation			0.401	0.667	0.599	0.479	0.632
	Sig. (2-tailed)	0.000						
Ποσοστό γονιμοποίησης (%)	Pearson	0.148	0.115	1	0.222	-0.063	-0.001	0.056
	Correlation	0.281	0.401		0.103	0.646	0.995	0.686
	Sig. (2-tailed)							
Ποσοστό διαίρεσης (%)	Pearson	0.048	0.059	0.222	1	0.171	0.534**	0.385**
	Correlation	0.727	0.667	0.103		0.211	0.000	0.004
	Sig. (2-tailed)							
CES	Pearson	-0.075	-0.072	-0.063	0.171	1	0.492**	0.647**
	Correlation	0.587	0.599	0.646	0.211		0.000	0.000
	Sig. (2-tailed)							
MSEQ	Pearson	0.093	0.098	-0.01	0.534**	0.492**	1	0.908**
	Correlation	0.498	0.479	0.995	0.000	0.000		0.000
	Sig. (2-tailed)							
MSET	Pearson	0.066	0.066	0.056	0.385**	0.647**	0.908**	1
	Correlation	0.633	0.632	0.686	0.004	0.000	0.000	
	Sig. (2-tailed)							

Πίνακας 5: Συσχέτιση SDF1, SDF2 και παραμέτρων σπερμοδιαγράμματος

		SDF1	SDF2	Ηλικία	ΔΜΣ	Όγκος (ml)	Συγκέντρωση (x 10 ⁶ /ml)	PR	NP	IM
SDF1	Pearson Correlation	1	0.938**	0.037	0.024	0.057	-0.444**	-0.427**	-0.240	0.515**
			0.000	0.787	0.859	0.679	0.001	0.001	0.078	0.000
	Sig. (2-tailed)									
SDF2	Pearson Correlation	0.938**	1	0.114	0.057	0.094	-0.360**	-0.407**	-0.194	0.472**
		0.000		0.406	0.677	0.495	0.007	0.002	0.155	0.000
	Sig. (2-tailed)									
Ηλικία	Pearson Correlation	0.037	0.114	1	0.006	-0.047	0.141	-0.168	0.171	0.067
		0.787	0.406		0.964	0.735	0.304	0.222	0.213	0.626
	Sig. (2-tailed)									
ΔΜΣ	Pearson Correlation	0.024	0.057	0.006	1	0.049	0.061	0.022	0.139	-0.090
		0.859	0.677	0.964		0.722	0.659	0.874	0.310	0.516
	Sig. (2-tailed)									
Όγκος (ml)	Pearson Correlation	0.057	0.094	-0.047	0.049	1	-0.183	0.063	0.238	-0.180
		0.679	0.495	0.735	0.722		0.182	0.650	0.080	0.188
	Sig. (2-tailed)									
Συγκέντρωση (x 10⁶/ml)	Pearson Correlation	-0.444**	-0.360**	0.141	0.061	-0.183	1	0.345**	0.119	-0.377**
		0.001	0.007	0.304	0.659	0.182		0.010	0.387	0.005
	Sig. (2-tailed)									
PR	Pearson Correlation	-0.427**	-0.407**	-0.168	0.022	0.063	0.345**	1	-0.106	-0.865**
		0.001	0.002	0.222	0.874	0.650	0.010		0.441	0.000
	Sig. (2-tailed)									
NP	Pearson Correlation	-0.240	-0.194	0.171	0.139	0.238	0.119	-0.106	1	-0.408**
		0.078	0.155	0.213	0.310	0.080	0.387	0.441		0.002
	Sig. (2-tailed)									
IM	Pearson Correlation	0.515**	0.472**	0.067	-0.090	-0.180	-0.377**	-0.865**	-0.408**	1
		0.000	0.000	0.626	0.516	0.188	0.005	0.000	0.002	
	Sig. (2-tailed)									

Πίνακας 6: Συσχέτιση Γονιμοποίησης και ποιότητας εμβρύων για SDF1 <20% και SDF≥20%

	SDF1		Τυπικό σφάλμα		P value
	Μέση τιμή ± Τυπική απόκλιση				
	≥ 20.00 N=50	< 20.00 N=5	≥ 20.00 N=50	< 20.00 N=5	
Γονιμοποίηση	73.3 ± 24.04	57.38 ± 37.26	3.4	16.66	0.185 0.399
Διαίρεση	84.21 ± 26	76 ± 43.36	3.68	19.39	0.530 0.697
CES	19.68 ± 12.77	18.2 ± 28.53	1.81	12.76	0.829 0.914
MSEQ	7.67 ± 2.72	4.87 ± 4.97	0.38	2.22	0.047 0.278
MSET	8.53 ± 2.64	5.4 ± 5.9	0.37	2.64	0.031 0.303
Κύηση	0.24 ± 0.43	0	0.06	0	0.223 0

Πίνακας 7 : Συσχέτιση Γονιμοποίησης και ποιότητας εμβρύων για SDF2 <20% και SDF≥20%

	SDF2		Τυπικό σφάλμα		P value
	Μέση τιμή ± Τυπική απόκλιση				
	>= 20.00 N=41	< 20.00 N=14	>= 20.00 N=41	< 20.00 N=14	
Γονιμοποίηση	71.91 ± 24.55	71.68 ± 28.96	3.83	7.74	0.977 0.979
Διαίρεση	85.52 ± 77.44	24.42 ± 35.54	3.81	9.50	0.348 0.440
CES	20.27 ± 17.43	12.64 ± 19.17	1.97	5.12	0.530 0.612
MSEQ	7.78 ± 6.36	2.55 ± 4.06	0.40	1.09	0.130 0.235
MSET	8.62 ± 7.14	2.51 ± 4,40	0.39	1.18	0.126 0.249
Κύηση	0.24 ± 0.14	0.43 ± 0.36	0.07	0.10	0.439 0.401

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στον πίνακα 1 παρατηρούμε τα περιγραφικά χαρακτηριστικά των ατόμων που έλαβαν μέρος στη μελέτη. Η μέση ηλικία των ανδρών ήταν 38.71 έτη και των γυναικών 36.36 έτη. Ο μέσος ΔΜΣ των ανδρών ήταν 26.82 ενώ των γυναικών 24.28. Οι άνδρες ήταν καπνιστές σε ποσοστό 49.19% ενώ οι γυναίκες μόλις σε ποσοστό 4%. Κατανάλωση αλκοόλ πέραν του φυσιολογικού έκανε το 7.27% των ανδρών και 3.64% των γυναικών.

Στον πίνακα 2 παρατηρούμε τις μέσες τιμές των παραμέτρων του σπερμοδιαγράμματος. Ο μέσος όγκος του σπέρματος των 55 ανδρών ήταν 3.37 ml, η μέση συγκέντρωση $42.44 \times 10^6/\text{ml}$, η προωθητική κίνηση 44.09%, η μη προωθητική κίνηση 20.47% ενώ το ποσοστό των ακίνητων σπερματοζωαρίων ανήλθε σε 35.47%.

Στον πίνακα 3 φαίνεται η έκβαση της γονιμοποίησης, της ποιότητας των εμβρύων και η επίτευξη κύησης μετά από τεχνικές IVF και ICSI. Από τα 55 περιστατικά, τα 13 αφορούσαν σε IVF. Ο μέσος αριθμός ωαρίων που λήφθηκε ανά γυναίκα ήταν 7, ενώ το ποσοστό γονιμοποίησης και διαίρεσης ανήλθε σε 65.06% και 73.9% αντίστοιχα. Το CES ήταν 29.38, το MSEQ 8.02 και το MSET 9.36. Από τα 13 περιστατικά τα 3 πέτυχαν κύηση.

Από τα 55 περιστατικά, τα 42 αφορούσαν σε ICSI. Ο μέσος αριθμός ωαρίων που λήφθηκε ανά γυναίκα ήταν 4, MII τα 3 ενώ το ποσοστό γονιμοποίησης και διαίρεσης ανήλθε σε 73.94% και 86.43% αντίστοιχα. Το CES ήταν 16.5, το MSEQ 7.23 και το MSET 7.9. Από τα 42 περιστατικά τα 9 πέτυχαν κύηση.

Στον πίνακα 4 περιγράφεται η συσχέτιση των SDF1 και SDF2 με τη γονιμοποίηση και την ποιότητα των εμβρύων. Οι δύο δείκτες συσχετίζονται άμεσα μεταξύ τους, αλλά δεν φαίνεται να επηρεάζουν το ποσοστό γονιμοποίησης ή τη βαθμολογία των εμβρύων. Όπως ήταν αναμενόμενο παρατηρείται συσχέτιση μεταξύ του ποσοστού διαίρεσης, του CES, του MSEQ και του MSET.

Στον πίνακα 5 φαίνεται η συσχέτιση μεταξύ των δεικτών SDF1 και SDF2 με τις παραμέτρους του σπερμοδιαγράμματος. Παρατηρούμε ότι άνδρες με χαμηλή συγκέντρωση σπερματοζωαρίων, και ακόμα όσοι παρουσιάζουν χαμηλά επίπεδα προωθητικής κίνησης έχουν υψηλά επίπεδα κατακερματισμένου DNA. Επίσης, αυξημένα επίπεδα ακίνητων σπερματοζωαρίων σχετίζονται άμεσα με υψηλό δείκτη SDF1 και SDF2.

Στον πίνακα 6 παρατηρούμε ότι για $SDF1 \geq 20\%$ φαίνεται να υπάρχει μία στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την ποιότητα των εμβρύων (MSEQ και MSET). Παρόλα αυτά δε μπορούμε να βγάλουμε ασφαλή συμπεράσματα, διότι δεν προχωρήσαμε σε καμπύλη ROC, λόγω μικρού δείγματος. Αντίθετα στον πίνακα 7 δεν υπάρχει συσχέτιση του SDF2 με την ποιότητα των εμβρύων.

Sperm DNA fragmentation και μέθοδοι υποβοηθούμενης αναπαραγωγής

Έως πρόσφατα, οι κλασσικές παράμετροι του σπερμοδιαγράμματος έχουν δώσει απογοητευτικά αποτελέσματα, όσον αφορά στην πρόβλεψη του αποτελέσματος της IVF (Agarwal et al., 2003). Πολυάριθμες μελέτες έχουν διερευνήσει τη σχέση μεταξύ του κατακερματισμού του DNA των σπερματοζωαρίων και της πιθανότητας κύησης μετά από κλασική IVF και ICSI, με αντικρουόμενα αποτελέσματα. Σε γενικές γραμμές, οι παλαιότερες μελέτες ήταν πιο αισιόδοξες σχετικά με την προγνωστική 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 (Evenson et al., 1999, Spanò et al., 2000, Larson et al., 2000). Τιμές DFI μεγαλύτερες από 27%, προσδιοριζόμενες με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής με τη χρωστική «πορτοκαλί της ακριδίνης», θεωρήθηκαν ασύμβατες με την επίτευξη κύησης (Larson et al., 2000).

Πιο πρόσφατες μελέτες, ωστόσο, απέτυχαν να επιβεβαιώσουν αυτά τα ευρήματα, πετυχαίνοντας κυήσεις με IVF ή / και ICSI με τιμές DFI αρκετά μεγαλύτερες από 27% (Bungum et al., 2004, Bungum et al 2007, Payne et al., 2005 Boe-Hansen et al., 2006, Gandini et al., 2004). Υψηλά επίπεδα

κατακερματισμού του DNA έχουν σχετιστεί με χαμηλότερα ποσοστά κύησης μετά από κλασική IVF και ICSI (Borini et al., 2006, Henkel et al., 2004, Virro et al., 2004). Ωστόσο, οι περισσότερες μελέτες υποστηρίζουν ότι υπάρχει συσχέτιση των επιπέδων του κατακερματισμού του DNA των σπερματοζωαρίων με το ποσοστό γονιμοποίησης, ιδιαίτερα στην κλασική IVF, αλλά όχι με το ποσοστό κύησης ή το ποσοστό ζώντος νεογνού (Bungum et al., 2004, Benchaib et al., 2007, Payne et al., 2005, Boe-Hansen et al., 2006, Gandini et al., 2004, Huang et al., 2005, Lin et al., 2008). Στη μελέτη των Payne et al., 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 (Gandini et al., 2004). Πράγματι, δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων της ICSI και της IVF για $DFI \leq 27\%$ (Boe-Hansen et al., 2006) ή $\leq 30\%$. 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% (Boe-Hansen et al., 2006). 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. (Collins et al., 2008). Γενικά, ο κατακερματισμός του DNA των σπερματοζωαρίων βρέθηκε να σχετίζεται στατιστικά σημαντικά, αν και ασθενώς, με την κύηση όμως δεν θεωρείται κλινικά σημαντική και επαρκής για την διάκριση μεταξύ των ζευγαριών που θα επιτύχουν και εκείνων που δε θα επιτύχουν κύηση. 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 και καμία συσχέτιση μεταξύ κατακερματισμού και ποσοστού κύησης μετά από ICSI (Zini and Sigman, 2009). Αρκετές μελέτες αναφέρουν αυξημένο κίνδυνο αυτόματων αποβολών σε περιπτώσεις υψηλού επιπέδου κατακερματισμού του DNA (Evenson et al., 1999, Benchaib et al, 2007, Virro et al., 2004, Carell et al., 2003). Άλλες, όμως, δεν επιβεβαιώνουν αυτήν την παρατήρηση (Bungum et al., 2007, Lin et al., 2008). Μια μετα-ανάλυση επτά μελετών έδειξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ του κατακερματισμού του DNA και του ποσοστού αποβολών μετά από IVF και ICSI (Zini and Sigman, 2009). Δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά αναφορικά με τη μέθοδο που εφαρμόστηκε (IVF ή ICSI). 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 της τιμής του κατακερματισμού του DNA των σπερματοζωαρίων μέσα στο χρόνο. Επιπρόσθετα, παρότι ένας μικρός αριθμός *in vitro* ή *in vivo* μεθοδολογικά μελετών υποστηρίζει ότι η χορήγηση αντιοξειδωτικών παραγόντων έχει θετικό αποτέλεσμα στον κατακερματισμό του DNA (Fraga et al., 1991, Greco et al., 2005), 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 παρακάμπτουν ορισμένα από τα εμπόδια της φυσικής επιλογής, τα οποία αποτρέπουν τη γονιμοποίηση και την κύηση σε περίπτωση πολύ ελαττωματικών σπερματοζωαρίων. Οι μακροπρόθεσμες συνέπειες της εφαρμογής αυτών των μεθόδων στους απογόνους είναι ακόμη 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, στην εμφάνιση καρκίνου της παιδικής ηλικίας (Ji et al., 1997) και στην εμφάνιση νοσημάτων

που σχετίζονται με το γενετικό αποτύπωμα (imprinting diseases) (Cox et al., 2002). Μέχρι σήμερα, έχει όντως αναφερθεί αυξημένος κίνδυνος συγγενών ανωμαλιών μετά από ICSI (Bonduelle et al., 2005), αλλά οι συγκεκριμένες επιπτώσεις του αυξημένου επιπέδου κατακερματισμού του DNA παραμένουν ακόμα ασαφείς. Από ορισμένους συγγραφείς προτείνεται, σε περιπτώσεις υψηλού ποσοστού κατακερματισμού του DNA, η χρησιμοποίηση σπερματοζωαρίων από τους όρχεις, τα οποία λαμβάνονται είτε με αναρρόφηση (TESA) είτε με βιοψία (TESE) (Evenson et al., 1999) Πρόσφατη μελέτη σε ζευγάρια με σοβαρού βαθμού κατακερματισμό του DNA (Sakkas et al., 2010) έδειξε υψηλό ποσοστό επίτευξης κύησης από τους πρώτους κύκλους TESA-ICSI και, μάλιστα, υψηλότερο σε σύγκριση με τη χρησιμοποίηση σπερματοζωαρίων από την εκσπερμάτιση. Το ποσοστό εμφύτευσης ήταν επίσης υψηλότερο, ενώ αντίθετα σημαντικά χαμηλότερο ήταν το ποσοστό αυτόματης αποβολής. Ωστόσο, η χρησιμοποίηση σπερματοζωαρίων από τους όρχεις ενέχει και κινδύνους, αφού κατακερματισμός του DNA μπορεί να συμβεί και στο επίπεδο του σπερματικού επιθηλίου, ενώ και ο κίνδυνος χρωμοσωμικών ανωμαλιών, όπως ανευπλοειδίων, αναμένεται να είναι μεγαλύτερος, αφού παρακάμπτεται η επιδιδυμίδα, η οποία ασκεί σημαντικό ρόλο στην εκλεκτική απομάκρυνση των προβληματικών σπερματοζωαρίων (Egozcue et al., 2005).

Ο δείκτης SDF αποτελεί αντικείμενο αντιπαράθεσης μεταξύ των ερευνητών. Μερικές μελέτες υποστηρίζουν ότι όταν ο δείκτης $SDF \geq 30\%$, το δυναμικό των σπερματοζωαρίων για φυσιολογική γονιμοποίηση είναι ιδιαίτερα χαμηλό (Evenson et al., 2002). Το ποσοστό του κατακερματισμένου DNA που μπορεί να αντιπροσωπεύει εκτεταμένη βλάβη, μπορεί να επηρεάσει αρνητικά το αποτέλεσμα της γονιμοποίησης (Saleh et al., 2002). Υψηλά επίπεδα SDF έχουν συσχετιστεί με μειωμένα ποσοστά γονιμοποίησης, ποιότητα εμβρύων και επίτευξης κύησης (Avendaño et al., 2010, Larson-Cook et al., 2003, Lopes et al., 1998, Virro et al., 2004, Zini et al., 2008), ενώ υπάρχουν και μελέτες που το διαψεύδουν (Collins et al., 2008, Lin et al., 2008, Zini and Libm, 2006). Δεν υπάρχουν αρκετές πληροφορίες για τα όρια του SDF για το δυναμικό γονιμοποίησης του σπέρματος ενός άνδρα, ενώ για κάθε μέθοδο τα όρια αυτά διαφέρουν (Duran et al, 2002, Sergerie et al., 2005). Το ωοκύτταρο είναι σε

θέση να επιδιορθώνει εξωγενείς και ενδογενείς βλάβες του DNA (Ashwood-Smith and Edwards, 1996). Παίζει σημαντικό ρόλο στη διερεύνηση των κινδύνων για αυτόματη αποβολή και στη συχνότητα γεννήσεων απογόνων με γενετικές ανωμαλίες πατρικής προέλευσης (Marchetti et al., 2007). Σύμφωνα με την παρούσα μελέτη, το SDF δε φαίνεται να επηρεάζει το ποσοστό γονιμοποίησης, την ποιότητα των εμβρύων, το ποσοστό κλινικών κυήσεων ή το ποσοστό αυτόματων αποβολών. Παρόμοια αποτελέσματα δημοσιεύτηκαν πρόσφατα από τους Esbert et al., 2011. Σε παλαιότερες μελέτες θεωρήθηκε ότι το SDF επηρεάζει αρνητικά το ποσοστό γονιμοποίησης (Cebesoy et al., 2006, Lopes et al., 1998). Όμως είχε ήδη παρατηρηθεί ότι το σπερματοζώριο με υψηλό ποσοστό SDF μπορεί να γονιμοποιήσει το ωάριο, αλλά η εμβρυϊκή ανάπτυξη είναι άμεσα σχετιζόμενη με το βαθμό του SDF (Ahmadi et al., 1999). Ο Greening το 2007 πρότεινε ότι αυξάνοντας τη συχνότητα της εκσπερμάτισης, θα μπορούσε να μειωθεί το ποσοστό SDF, επειδή μειώνεται ο χρόνος παραμονής στην επιδιδυμίδα κι έτσι μειώνεται η έκθεση σε ελεύθερες ρίζες οξυγόνου. Οι Bungum et al. το 2008 παρατήρησαν ότι η επεξεργασία του σπέρματος αφαιρεί ένα σημαντικό ποσοστό με SDF ενώ οι Younglai σημειώνουν ότι δεν αυξάνεται ο SDF μετά από επεξεργασία.

Η ανάπτυξη του εμβρύου και η επακόλουθη κύηση είναι δυνατή ακόμη και με υψηλά ποσοστά SDF (Bungum et al., 2004, Gandini et al., 2004, Huang et al., 2005, Payne et al., 2005). Τα ποσοστά SDF και τα ποσοστά επίτευξης κύησης δε συσχετίζονται. Η κλινική σημασία του SDF δεν είναι απολύτως εξακριβωμένη. Είναι δύσκολο να γίνουν συγκρίσεις, διότι κάθε εργαστήριο χρησιμοποιεί διαφορετική μέθοδο, που έχει διαφορετικά όρια. Ο SDF μπορεί να αποτελέσει δείκτη δυναμικού αυτόματων αποβολών μετά από τεχνικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (Larson-Cook et al., 2003). Οι Evenson και Wixon το 2006 με μετα-ανάλυση δείχνουν ότι αν ο SDF είναι μικρότερος από 30% είναι πιο πιθανό να επιτευχθεί μια τελειόμηνη κύηση, την ίδια στιγμή που οι Virro et al., το 2004 προτείνουν ότι το 39% των αυτόματων αποβολών συσχετίζεται με SDF μεγαλύτερο από 30%. Πρόσφατη μελέτη επιβεβαιώνει ότι υψηλός δείκτης SDF συσχετίζεται με αυτόματη αποβολή, αλλά και με χαμηλή συγκέντρωση σπέρματος. Το υψηλό ποσοστό SDF δεν επηρεάζει

απαραίτητα το ποσοστό γονιμοποίησης, αλλά οι συνέπειες μπορεί να είναι καταστροφικές για τα έμβρυα, αφού το εμβρυϊκό γονιδίωμα ενεργοποιείται μετά τη δεύτερη διαίρεση και μπορεί να οδηγήσει σε πρώιμη αποβολή αμέσως μετά την εμφύτευση (Kennedy et al., 2011). Αυτό έρχεται να το διαψεύσει μία νεότερη μελέτη όπου σε ασθενείς με καθ'έξιν αποβολές ή επαναλαμβανόμενη αποτυχία εμφύτευσης δε βρέθηκε να υπάρχει συσχέτιση μεταξύ του δείκτη SDF και του ποσοστού ανευπλοειδίας των εμβρύων (Bronet et al., 2012). Επίσης βρέθηκε ότι μετά την επεξεργασία του σπέρματος ενδεχομένως να αυξάνεται ο SDF, σε αντίθεση με άλλες μελέτες που υποστήριζαν ότι δεν υπάρχει συσχέτιση μετά από επεξεργασία (Meseguer et al., 2011). Υψηλά ποσοστά SDF έχουν συσχετιστεί με τετατοζωοσπερμία και υψηλά ποσοστά χρωμοσωμικών ανωμαλιών (Tang et al., 2010), με φορείς δομικών χρωμοσωμικών ανωμαλιών (Perrin et al., 2009) και υψηλά επίπεδα ανευπλοειδίας στα σπερματοζωάρια με υψηλό SDF (Muriel et al., 2007).

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης με ήδη προϋπάρχουσες, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι τείνει να εξαλειφθεί η υπόθεση ότι ο κατακερματισμός του DNA ευθύνεται για χαμηλά ποσοστά γονιμοποίησης και χαμηλή ποιότητα εμβρύων σε τεχνικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Αντίθετα θα πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω η επίδραση του κατακερματισμού στην ποιότητα των εμβρύων μετά το στάδιο ενεργοποίησης του εμβρυϊκού γονιδιώματος και την πιθανότητα να είναι η αιτία για την αποτυχία εμφύτευσης ή μη σωστή εμβρυϊκή ανάπτυξη με πιθανό αποτέλεσμα την αυτόματη αποβολή. Χρήσιμο επίσης θα ήταν να γίνεται ο προσδιορισμός του κατακερματισμού του DNA σε επεξεργασμένο δείγμα και να βρεθούν τεχνικές που να προσδιορίζουν το ποσοστό κατακερματισμού σε ζωντανό σπερματοζωάριο που θα μπορεί στη συνέχεια να χρησιμοποιηθεί στις τεχνικές IVF και ICSI.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Acharyya S, Kanjilal S, Bhattacharyya AK. Does human sperm nuclear DNA integrity affect embryo quality? *Indian J Exp Biol* 2005; 43:1016–1022.

Agarwal A, Said TM. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Hum Reprod Update* 2003; 9: 331-45.

Ahmadi A, Ng SC. Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa. *J ExpZool* 1999 284: 696-704.

Alvarez JG, Sharma RK, Ollero M, Saleh RA, Lopez MC, Thomas AJ, Jr., Evenson DP, Agarwal A. Increased DNA damage in sperm from leukocytospermic semen samples as determined by the sperm chromatin structure assay. *Fertil Steril* 2002 78: 319-29.

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: 451-62.

Aitken RJ, Gordon E, Harkiss D, Twigg JP, Milne P, Jennings Z, Irvine DS. Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biol Reprod* 1998 59(5): 1037-46.

Aitken RJ, Krausz C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction* 2001 122: 497-506.

Andolz P, Bielsa MA, Vila J. Evolution of semen quality in Northeastern Spain: a study in 22,759 infertile men over a 36 year period. *Hum Reprod* 1999;14:731–5.

Angelopoulos T, Moshel YA, Lu L, Macanas E, Grifo JA, Krey LC. Simultaneous assessment of sperm chromatin condensation and morphology before and after separation procedures: effect on the clinical outcome after in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1998 69: 740-7.

Anifandis G, Dafopoulos K, Messini CI, Chalvatzas N, Messinis IE. Effect of the position of the polar body during ICSI on fertilization rate and embryo development. *Reprod Sci.* 2010 Sep;17(9):849-53.

Aoki VW, Moskovtsev SI, Willis J, et al. DNA integrity is compromised in protamine-deficient human sperm. *J Androl* 2005; 26:741–748.

Ashwood-Smith MJ, Edwards RG. DNA repair by oocytes. *Mol Hum Reprod.* 1996 Jan;2(1):46-51.

Avendaño C, Franchi A, Taylor S, Morshedi M, Bocca S, Oehninger S. Fragmentation of DNA in morphologically normal human spermatozoa. *Fertil Steril.* 2009;91:1077-84.

Avendaño C, Franchi A, Duran H, Oehninger S. DNA fragmentation of normal spermatozoa negatively impacts embryo quality and intracytoplasmic sperm injection outcome. *Fertil Steril.* 2010 Jul;94(2):549-57.

Banks S, King SA, Irvine DS, Saunders PT. Impact of a mild scrotal heat stress on DNA integrity in murine spermatozoa. *Reproduction* 2005; 129:505–514.

Barratt CL. Male infertility joins the translational medicine revolution. Sperm DNA: from basic science to clinical reality. *Mol Hum Reprod*. 2010 Jan;16(1):1-2.

Barratt CL, De Jonge CJ. Clinical relevance of sperm DNA assessment: an update. *Fertil Steril*. 2010 Nov;94(6):1958-9.

Belloc S, Cohen-Bacrie P, Benkhalifa M, Cohen-Bacrie M, De Mouzon J, Hazout A, Ménézo Y. Effect of maternal and paternal age on pregnancy and miscarriage rates after intrauterine insemination. *Reprod Biomed Online* 2008 17 (3): 392-7.

Benchaib M, Braun V, Lornage J, Hadj S, Salle S, Lejeune H, Guerin J. Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. *Hum Reprod* 2003;18:1023–1028.

Benchaib M, Lornage J, Mazoyer C, Lejeune H, Salle B, Francois Guerin J. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as a prognostic indicator of assisted reproductive technology outcome. *Fertil Steril* 2007;87:93–100.

Boe-Hansen GB, Fedder J, Ersboll AK, Christensen P. The sperm chromatin structure assay as a diagnostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod* 2006 21: 1576-82.

Bonduelle M, Wennerholm UB, Loft A, Tarlatzis BC, Peters C, Henriët S, Mau C, Victorin-Cederquist A, Van SA, Balaska A, Emberson JR, Sutcliffe AG. 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* 2005 20: 413-9.

Borini A, Tarozzi N, Bizzaro D, Bonu MA, Fava L, Flamigni C, Coticchio G. Sperm DNA fragmentation: paternal effect on early post-implantation embryo development in ART. *Hum Reprod* 2006;21:2876–2881.

Britan A, Maffre V, Tone S, Drevet JR. Quantitative and spatial differences in the expression of tryptophan-metabolizing enzymes in mouse epididymis. *Cell Tissue Res* 2006 324: 301-10.

Bronet F, Martínez E, Gaytán M, Liñán A, Cernuda D, Ariza M, Nogales M, Pacheco A, San Celestino M, Garcia-Velasco JA. Sperm DNA fragmentation index does not correlate with the sperm or embryo aneuploidy rate in recurrent miscarriage or implantation failure patients. *Hum Reprod*. 2012 Jul;27(7):1922-9.

Bungum M, Humaidan P, Spano M, Jepson K, Bungum L, Giwercman A. The predictive value of sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters for the outcome of intrauterine insemination, IVF and ICSI. *Hum Reprod* 2004;19:1401–1408.

Bungum M, Humaidan P, Axmon A, Spano M, Bungum L, Erenpreiss J, Giwercman A. Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome. *Hum Reprod*. 2007 Jan;22(1):174-9.

Bungum M, Spanò M, Humaidan P, Eleuteri P, Rescia M, Giwercman A. Sperm chromatin structure assay parameters measured after density gradient centrifugation are not predictive for the outcome of ART. *Hum Reprod*. 2008 Jan;23(1):4-10.

Burrello N, Arcidiacono G, Vicari E, Asero P, Di Benedetto D, De Palma A, Romeo R, D'Agata R, Calogero AE. Morphologically normal spermatozoa of patients with secretory oligo asthenoteratozoospermia have an increased aneuploidy rate. *Hum Reprod* 2004 19(10): 2298-302.

Carrell DT, Liu L, Peterson CM, Jones KP, Hatasaka HH, Erickson L, Campbell B. Sperm DNA fragmentation is increased in couples with unexplained recurrent pregnancy loss. *Arch Androl* 2003 49: 49-55.

Cebesoy FB, Aydos K, Unlu C. Effect of sperm chromatin damage on fertilization ratio and embryo quality post-ICSI. *Arch Androl.* 2006 Sep-Oct;52(5):397-402.

Cho C, Jung-Ha H, Willis WD, et al. Protamine 2 deficiency leads to sperm DNA damage and embryo death in mice. *Biol Reprod* 2003; 69:211–217.

Collins JA, Barnhart KT, Schlegel PN, Do sperm DNA integrity tests predict pregnancy with in vitro fertilization? *Fertil Steril* 2008 89: 823-31.

Comhaire FH, Mahmoud AM, Depuydt CE, Zalata AA, Christophe AB, Mechanisms and effects of male genital tract infection on sperm quality and fertilizing potential: the andrologist's viewpoint. *Hum Reprod Update* 1999 5: 393-8.

Cox GF, Burger J, Lip V, Mau UA, Sperling K, Wu BL, Horsthemke B, Intracytoplasmic sperm injection may increase the risk of imprinting defects. *Am J Hum Genet* 2002 71: 162-4.

Dalzell LH, McVicar CM, McClure N, Lutton D, Lewis SE, Effects of short and long incubations on DNA fragmentation of testicular sperm. *Fertil Steril* 2004 82: 1443-5.

Duran EH, Morshedi M, Taylor S, Oehninger S. Sperm DNA quality predicts intrauterine insemination outcome: a prospective cohort study. *Hum Reprod.* 2002 Dec;17(12):3122-8.

Egozcue J, Sarrate Z, Codina-Pascual M, Egozcue S, Oliver-Bonet M, Blanco J, Navarro J, Benet J, Vidal F, Meiotic abnormalities in infertile males. *Cytogenet Genome Res* 2005 111: 337-42.

Esbert M, Pacheco A, Vidal F, Florensa M, Riqueros M, Ballesteros A, Garrido N, Calderón G. Impact of sperm DNA fragmentation on the outcome of IVF with own or donated oocytes. *Reprod Biomed Online.* 2011 Dec;23(6):704-10.

Evenson DP, Jost LK, Marshall D, Zinaman MJ, Clegg E, Purvis K, de Angelis P, Claussen OP. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod.* 1999 Apr;14(4):1039-49.

Evenson DP, Jost LK, Corzett M, Balhorn R, Characteristics of human sperm chromatin structure following an episode of influenza and high fever: a case study. *J Androl* 2000 21: 739-46.

Evenson DP, Larson KL, Jost LK, Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J Androl* 2002 23: 25-43.

Evenson DP, Wixon R. Clinical aspects of sperm DNA fragmentation detection and male infertility. *Theriogenology.* 2006 Mar 15;65(5):979-91

Evenson DP, Wixon R. Data analysis of two in vivo fertility studies using Sperm Chromatin Structure Assay-derived DNA fragmentation index vs. pregnancy outcome. *Fertil Steril* 2008;90:1229–1231.

Fernandez JL, Goyanes VJ, Ramiro-Diaz J, Gosalvez J, Application of FISH for in situ detection and quantification of DNA breakage. *Cytogenet Cell Genet* 1998 82: 251-6.

Fernandez JL, Muriel L, Rivero MT, Goyanes V, Vazquez R, Alvarez JG, The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *J Androl* 2003 24: 59-66.

Fernández JL, Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, Gosálvez J, Enciso M, LaFromboise M, De Jonge C. Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. *Fertil Steril*. 2005 Oct;84(4):833-42.

Fernández-Gonzalez R, Moreira PN, Pérez-Crespo M, Sánchez-Martín M, Ramirez MA, Pericuesta E, Bilbao A, Bermejo-Alvarez P, de Dios Hourcade J, de Fonseca FR, Gutiérrez-Adán A. Long-term effects of mouse intracytoplasmic sperm injection with DNA-fragmented sperm on health and behavior of adult offspring. *Biol Reprod*. 2008 Apr;78(4):761-72.

Fischer MA, Willis J, Zini A. Human sperm DNA integrity: correlation with sperm cytoplasmic droplets. *Urology* 2003; 61:207–211.

Fraga CG, Motchnik PA, Shigenaga MK, Helbock HJ, Jacob RA, Ames BN, Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991 88: 11003-6.

Fraga CG, Motchnik PA, Wyrobek AJ, Rempel DM, Ames BN, Smoking and low antioxidant levels increase oxidative damage to sperm DNA. *Mutat Res* 1996 351: 199-203.

Fragouli E, Wells D, Thornhill A, Serhal P, Faed MJ, Harper JC, Delhanty JD, Comparative genomic hybridization analysis of human oocytes and polar bodies. *Hum Reprod* 2006 21(9): 2319-28.

Francavilla S, D'Abrizio P, Rucci N, Silvano G, Properzi G, Straface E, Cordeschi G, Necozone S, Gnassi L, Arizzi M, Ulisse S, Fas and Fas ligand expression in fetal and adult human testis with normal or deranged spermatogenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 2000 85: 2692-700.

Fossa SD, De AP, Kraggerud SM, Evenson D, Theodorsen L, Clausen OP, Prediction of posttreatment spermatogenesis in patients with testicular cancer by flow cytometric sperm chromatin structure assay. *Cytometry* 1997 30: 192-6.

Gandini L, Lombardo F, Paoli D, Caruso F, Eleuteri P, Leter G, Ciriminna R, Culasso F, Dondero F, Lenzi A et al. Full-term pregnancies achieved with ICSI despite high levels of sperm chromatin damage. *Hum Reprod* 2004;19:1409–1417.

García-Díaz M, Domínguez O, López-Fernández LA, de Lera LT, Saníger ML, Ruiz JF, Párraga M, García-Ortiz MJ, Kirchhoff T, del Mazo J, Bernad A, Blanco L, DNA polymerase lambda (Pol lambda), a novel eukaryotic DNA polymerase with a potential role in meiosis. *J Mol Biol* 2000 301(4): 851-67.

Genesca A, Caballin MR, Miro R, Benet J, Germa JR, Egozcue J, Repair of human sperm chromosome aberrations in the hamster egg. *Hum Genet* 1992 89: 181-6.

Giwerzman A, Richthoff J, Hjollund H, Bonde JP, Jepson K, Frohm B, Spano M. Correlation between sperm motility and sperm chromatin structure assay parameters. *Fertil Steril* 2003;80:1404–1412.

Gomez E, Buckingham DW, Brindle J, et al. Development of an image analysis system to monitor the retention of residual cytoplasm by human spermatozoa: correlation with biochemical markers of the cytoplasmic space, oxidative stress, and sperm function. *J Androl* 1996; 17:276–287.

Gosálvez J, Cortés-Gutiérrez EI, Nuñez R, Fernández JL, Caballero P, López-Fernández C, Holt WV, A dynamic assessment of sperm DNA fragmentation versus sperm viability in proven fertile human donors. *Fertil Steril* 2009 92(6):1915-9.

Greco E, Iacobelli M, Rienzi L, Ubaldi F, Ferrero S, Tesarik J, Reduction of the incidence of sperm DNA fragmentation by oral antioxidant treatment. *J Androl* 2005 26: 349-53.

Greco E, Romano S, Iacobelli M, Ferrero S, Baroni E, Minasi MG, Ubaldi F, Rienzi L, Tesarik J, ICSI in cases of sperm DNA damage: beneficial effect of oral antioxidant treatment. *Hum Reprod* 2005 20: 2590-4.

Greco E, Scarselli F, Iacobelli M, Rienzi L, Ubaldi F, Ferrero S, Franco G, Anniballo N, Mendoza C, Tesarik J, Efficient treatment of infertility due to sperm DNA damage by ICSI with spermatozoa. *Hum Reprod* 2005 20(1): 226-30.

Greening D.J. Frequent ejaculation. a pilot study of changes in sperm DNA damage and semen parameters using daily ejaculation *Fertil Steril* 88: (Suppl 1), S19-S20

Guzick DS, Overstreet JW, Factor-Litvak P, Brazil CK, Nakajima ST, Coutifaris C, Carson SA, Cisneros P, Steinkampf MP, Hill JA, Xu D, Vogel DL; Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men.National Cooperative Reproductive Medicine Network. *N Engl J Med*. 2001 Nov 8;345(19):1388-93.

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.

Huang CC, Lin DP, Tsao HM, Cheng TC, Liu CH, Lee MS. Sperm DNA fragmentation negatively correlates with velocity and fertilisation rates but might not affect pregnancy rates. *Fertil Steril* 2005;84:130–140.

Irvine S, Cawood E, Richardson D, MacDonald E, Aitken J. Evidence of deteriorating semen quality in the United Kingdom: birth cohort study in 577 men in Scotland over 11 years. *BMJ* 1996;312:467–71.

Irvine DS, Twigg JP, Gordon EL, Fulton N, Milne PA, Aitken RJ. DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *J Androl* 2000;21:33–44.

Jequier AM. Is quality assurance in semen analysis still really necessary? A clinician's viewpoint. *Hum Reprod*. 2005 Aug;20(8):2039-42.

Ji BT, Shu XO, Linet MS, Zheng W, Wacholder S, Gao YT, Ying DM, Jin F, Paternal cigarette smoking and the risk of childhood cancer among offspring of nonsmoking mothers. *J Natl Cancer Inst* 1997 89: 238-44.

Kalthur G, Adiga SK, Upadhya D, Rao S, Kumar P, Effect of cryopreservation on sperm DNA integrity in patients with teratospermia. *Fertil Steril* 2008 89: 1723-7.

Kennedy C, Ahlering P, Rodriguez H, Levy S, Sutovsky P. Sperm chromatin structure correlates with spontaneous abortion and multiple pregnancy rates in assisted reproduction. *Reprod Biomed Online*. 2011 Mar;22(3):272-6.

Kidd SA, Eskenazi B, Wyrobek AJ. Effects of male age on semen quality and fertility: a review of the literature. *Fertil Steril* 2001;75:237–48.

Kim JM, Ghosh SR, Weil AC, Zirkin BR, Caspase-3 and caspase activated deoxyribonuclease are associated with testicular germ cell apoptosis resulting from reduced intratesticular testosterone. *Endocrinology* 2001 142: 3809-16.

Kodama H, Yamaguchi R, Fukuda J, Kasai H, Tanaka T. Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients. *Fertil Steril*. 1997 Sep;68(3):519-24.

Kunzle R, Mueller MD, Hanggi W, Birkhauser MH, Drescher H, Bersinger NA, Semen quality of male smokers and nonsmokers in infertile couples. *Fertil Steril* 2003 79: 287-91.

Larson KL, Brannian JD, Timm BK, Jost LK, Evenson DP, Density gradient centrifugation and glass wool filtration of semen remove spermatozoa with damaged chromatin structure. *Hum Reprod* 1999 14: 2015-9.

Larson KL, DeJonge CJ, Barnes AM, Jost LK, Evenson DP. Sperm chromatin structure assay parameters as predictors of failed pregnancy following assisted reproductive techniques. *Hum Reprod* 2000;15:1717–1722.

Larson-Cook KL, Brannian JD, Hansen KA, Kasperson KM, Aamold ET, Evenson DP. Relationship between the outcomes of assisted reproductive techniques and sperm DNA fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay. *Fertil Steril* 2003; 80:895–902.

Lewis SE, Agbaje I, Alvarez J. Sperm DNA tests as useful adjuncts to semen analysis. *Syst Biol Reprod Med*. 2008 May-Jun;54(3):111-25.

Lin MH, Kuo-Kuang LR, Li SH, Lu CH, Sun FJ, Hwu YM, 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* 2008 90: 352-9.

Lopes S, Sun JG, Jurisicova A, Meriano J, Casper RF. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilisation in intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1998;69:528–532

Marchetti F, Essers J, Kanaar R, Wyrobek AJ. Disruption of maternal DNA repair increases sperm-derived chromosomal aberrations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Nov 6;104(45):17725-9.

Meseguer M, Santiso R, Garrido N, García-Herrero S, Remohí J, Fernandez JL. Effect of sperm DNA fragmentation on pregnancy outcome depends on oocyte quality. *Fertil Steril*. 2011 Jan;95(1):124-8

Morris ID, Sperm DNA damage and cancer treatment. *Int J Androl* 2002 25:255-61.

Morris ID, Iltott S, Dixon L, Brison DR. The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophoresis (Comet assay) and its relationship to fertilization and embryo development. *Hum Reprod*. 2002 Apr;17(4):990-8.

Muriel L, Segrelles E, Goyanes V, Gosálvez J, Fernandez JL, Structure of human sperm DNA and background damage, analysed by in situ enzymatic treatment and digital image analysis. *Mol Hum Reprod* 2004 10: 203-9.

Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, Gosálvez J, Alvarez JG, Fernández JL. Increased aneuploidy rate in sperm with fragmented DNA as determined by the sperm chromatin dispersion (SCD) test and FISH analysis. *J Androl*. 2007 Jan-Feb;28(1):38-49. Epub 2006 Aug 9.

O'Flaherty C, Vaisheva F, Hales BF, Chan P, Robaire B, Characterization of sperm chromatin quality in testicular cancer and Hodgkin's lymphoma patients prior to chemotherapy. *Hum Reprod* 2008 23: 1044-52.

Ollero M, Gil-Guzman E, Lopez MC, Sharma RK, Agarwal A, Larson K, Evenson D, Thomas AJ Jr, Alvarez JG, Characterization of subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: implications in the diagnosis and treatment of male infertility. *Hum Reprod* 2001 16(9): 1912-21.

Pacey AA. Is quality assurance in semen analysis still really necessary? A view from the andrology laboratory. *Hum Reprod*. 2006 May;21(5):1105-9.

Parinaud J, Mieusset R, Vieitez G, Labal B, Richoille G, Influence of sperm parameters on embryo quality. *Fertil Steril* 1993 60(5): 888-92.

Payne JF, Raburn DJ, Couchman GM, Price TM, Jamison MG, Walmer DK, Redefining the relationship between sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay and outcomes of assisted reproductive techniques. *Fertil Steril* 2005 84: 356-64.

Perrin A, Caer E, Oliver-Bonet M, Navarro J, Benet J, Amice V, De Braekeleer M, Morel F. DNA fragmentation and meiotic segregation in sperm of carriers of a chromosomal structural abnormality. *Fertil Steril*. 2009 Aug;92(2):583-9.

Potts RJ, Newbury CJ, Smith G, Notarianni LJ, Jefferies TM, Sperm chromatin damage associated with male smoking. *Mutat Res* 1999 423: 103-11.

Rubes J, Selevan SG, Evenson DP, Zudova D, Vozdova M, Zudova Z, Robbins WA, Perreault SD, Episodic air pollution is associated with increased DNA fragmentation in human sperm without other changes in semen quality. *Hum Reprod* 2005 20: 2776-83.

Rubes J, Selevan SG, Sram RJ, Evenson DP, Perreault SD, GSTM1 genotype influences the susceptibility of men to sperm DNA damage associated with exposure to air pollution. *Mutat Res* 2007 625: 20-8.

Sailer BL, Sarkar LJ, Bjordahl JA, Jost LK, Evenson DP, Effects of heat stress on mouse testicular cells and sperm chromatin structure. *J Androl* 1997 18: 294- 301.

Sakkas D, Mariethoz E, St John JC, Abnormal sperm parameters in humans are indicative of an abortive apoptotic mechanism linked to the Fas-mediated pathway. *Exp Cell Res* 1999 251: 350-5.

Sakkas D, Manicardi GC, Tomlinson M, Mandrioli M, Bizzaro D, Bianchi PG, Bianchi U, The use of two density gradient centrifugation techniques and the swim-up method to separate spermatozoa with chromatin and nuclear DNA anomalies. *Hum Reprod* 2000 15(5): 1112-6.

Sakkas D, Alvarez JG, Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertil Steril* 2010 93 (4): 1027-36.

Saleh R, Agarwal A, Nelson D, Nada E, El-Tonsy M, Alvarez E, Thomas AJ, Sharma R. Increased sperm nuclear DNA damage in normozoospermic infertile men: a prospective study. *Fertil Steril* 2002;78:313–318.

Saleh RA, Agarwal A, Sharma RK, et al. Evaluation of nuclear DNA damage in spermatozoa from infertile men with varicocele. *Fertil Steril* 2003; 80:1431–1436.

Seli E, Gardner DK, Schoolcraft WB, Moffatt O, Sakkas D, Extent of nuclear DNA damage in ejaculated spermatozoa impacts on blastocyst development after in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2004 82: 378-83.

Sergerie M, Laforest G, Bujan L, Bissonnette F, Bleau G. Sperm DNA fragmentation: threshold value in male fertility. *Hum Reprod*. 2005 Dec;20(12):3446-51.

Shen HM, Dai J, Chia SE, Lim A, Ong CN. Detection of apoptotic alterations in sperm in subfertile patients and their correlations with sperm quality. *Hum Reprod* 2002 17: 1266-73.

Sher G, Keskinetepe L, Keskinetepe M, Ginsburg M, Maassarani G, Yakut T, Baltaci V, Kotze D, Unsal E. Oocyte karyotyping by comparative genomic hybridization provides a highly reliable method for selecting "competent" embryos, markedly improving in vitro fertilization outcome: a multiphase study. *Fertil Steril* 2007 87(5): 1033-40.

Sills ES, Fryman JT, Perloe M, Michels KB, Tucker MJ. Chromatin fluorescence characteristics and standard semen analysis parameters: correlation observed in andrology testing among 136 males referred for infertility evaluation. *J Obstet Gynaecol* 2004;24:74-7.

Singh NP, Muller CH, Berger RE. Effects of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm. *Fertil Steril* 2003; 80:1420-1430.

Smit M, Dohle GR, Hop CJ. Clinical correlates of the biological variation of sperm DNA fragmentation in infertile men attending an andrology outpatient clinic. *Int J Androl* 2007;30:48-55.

Sofikitis N, Miyagawa I, Dimitriadis D, Zavos P, Sikka S, Hellstrom W. Effects of smoking on testicular function, semen quality and sperm fertilizing capacity. *J Urol* 1995 154: 1030-4.

Spanò M, Bonde JP, Hjøllund HI, Kolstad HA, Cordelli E, Leter G. Sperm chromatin damage impairs human fertility. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. *Fertil Steril*. 2000 Jan;73(1):43-50.

Suganuma R, Yanagimachi R, Meistrich ML. Decline in fertility of mouse sperm with abnormal chromatin during epididymal passage as revealed by ICSI. *Hum Reprod* 2005 20: 3101-8.

Tang SS, Gao H, Zhao Y, Ma S. Aneuploidy and DNA fragmentation in morphologically abnormal sperm. *Int J Androl*. 2010 Feb;33(1):e163-79

Thonneau P, Marchand S, Tallec A, Ferial ML, Ducot B, Lansac J, Lopes P, Tabaste JM, Spira A. Incidence and main causes of infertility in a resident population (1.850.000) of three French regions (1988-1989). *Hum Reprod* 1991 6(6): 811-6.

Tomlinson MJ, Moffatt O, Manicardi GC, Bizzaro D, Afnan M, Sakkas D. Interrelationships between seminal parameters and sperm nuclear DNA damage before and after density gradient centrifugation: implications for assisted conception. *Hum Reprod* 2001 16: 2160-5.

Twigg J, Irvine DS, Houston P, Fulton N, Michael L, Aitken RJ. Iatrogenic DNA damage induced in human spermatozoa during sperm preparation: protective significance of seminal plasma. *Mol Hum Reprod* 1998 4: 439-45.

Twigg JP, Irvine DS, Aitken RJ. Oxidative damage to DNA in human spermatozoa does not preclude pronucleus formation at intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1998 13: 1864-71.

Virro MR, Larson-Cook KL, Evenson DP. 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*. 2004 May;81(5):1289-95.

WHO (World Health Organization, Department of Reproductive Health and Research) WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen, 5th edn. Geneva, Italy: WHO Press, 2010.

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 Natl Acad Sci USA* 2006;103:9601–6.

Xing W, Krishnamurthy H, Sairam MR. Role of follitropin receptor signaling in nuclear protein transitions and chromatin condensation during spermatogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 312:697–701.

Younglai EV, Holt D, Brown P, Jurisicova A, Casper RF. Sperm swim-up techniques and DNA fragmentation. *Hum Reprod*. 2001 Sep;16(9):1950-3.

Zini A, Mak V, Phang D, Jarvi K. Potential adverse effect of semen processing on human sperm deoxyribonucleic acid integrity 1999 72: 496-9.

Zini A, Bielecki R, Phang D, Zenzes MT. Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men. *Fertil Steril*. 2001 Apr;75(4):674-7.

Zini A, Blumenfeld A, Libman J, Willis J. Beneficial effect of microsurgical varicocelectomy on human sperm DNA integrity. *Hum Reprod* 2005; 20:1018–1021.

Zini A, Libman J. Sperm DNA damage: importance in the era of assisted reproduction. *Curr Opin Urol*. 2006 Nov;16(6):428-34

Zini A, Boman JM, Belzile E, Ciampi A. Sperm DNA damage is associated with an increased risk of pregnancy loss after IVF and ICSI: systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod*. 2008 Dec;23(12):2663-8.

Zini A, Sigman M. Are tests of sperm DNA damage clinically useful? Pros and cons. *J Androl*. 2009 May-Jun;30(3):219-29.