

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ- ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΘΕΜΑ: Συσχέτιση της ποιότητας των ανθρώπινων σπερματοζωαρίων με την λειτουργικότητα των μιτοχονδρίων τους.



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΤΟΥ ΦΟΙΤΗΤΗ: ΓΑΒΡΙΗΛ ΕΛΕΥΘΕΡΙΟΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ : ΔΡ. ANNA-ΜΑΡΙΑ Γ. ΨΑΡΡΑ

UNIVERSITY OF THESSALY  
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES  
DEP. OF BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY



SUBJECT: Correlation of human sperm quality with mitochondrial functionality.



*DIPLOMA PROJECT OF THE STUDENT: GAVRIIL ELEFThERIOS*

*SUPERVISOR PROFESSOR: DR. ANNA- MARIA G. PSARRA*

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας (ΤΒΒ), της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (Π.Θ.). Τα δείγματα παρελήφθησαν από την μονάδα υποβοηθούμενης αναπαραγωγής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας.

Υπεύθυνη Καθηγήτρια:

**Ψαρρά Άννα-Μαρία**, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας ΤΒΒ, Π.Θ.

Τριμελής Επιτροπή:

- **Ψαρρά Άννα-Μαρία**, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας ΤΒΒ, Π.Θ.
- **Δαπόντε Αλέξανδρος**, Αναπληρωτής Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας Ιατρικού Τμήματος, Π.Θ.
- **Ανυφαντής Γεώργιος**, Λέκτορας Εμβρυολογίας Ιατρικού Τμήματος, Π.Θ.

## Πίνακας περιεχομένων

Περίληψη:.....	6
Abstract: .....	7
1.Εισαγωγή.....	8
1.1 Σπερματογένεση.....	8
1.1.1 Φάσεις της σπερματογένεσης.....	8
1.1.2 Πολλαπλασιασμός των σπερματογονίων .....	8
1.1.3 Μείωση.....	9
1.1.4 Σπερμιόγένεση .....	10
1.1.5 Ρύθμιση της σπερματογένεσης.....	11
1.2 Μορφολογία του σπερματοζωαρίου .....	12
1.3 Ακροσωμική αντίδραση .....	14
1.4 Μοριακοί κινητήρες: .....	14
1.5 Μιτοχόνδρια.....	15
1.5.1 Μιτοχόνδρια σπερματοζωαρίων.....	17
1.5.2 Οξειδωτική φωσφορυλίωση στα μιτοχόνδρια: .....	17
1.5.3 Συσχέτιση μιτοχονδριακής λειτουργικότητας με τη διαδικασία της απόπτωσης ...	19
1.5.5 Ανακάλυψη μιτοχονδριακών νόσων:.....	19
1.6 Εξέταση του σπέρματος: .....	21
1.6.1 Αρχική μακροσκοπική εξέταση: .....	21
1.6.2 Αρχική μικροσκοπική εξέταση: .....	22
1.6.3 Κινητικότητα του σπέρματος .....	22
1.6.4 Ζωτικότητα σπέρματος .....	23
1.6.5 Αριθμός σπερματοζωαρίων .....	24
1.6.6 Υπολογισμός κυττάρων πέραν των σπερματοζωαρίων.....	25
1.6.7 Τεχνικές χρώσης .....	25
1.6.8 Μορφολογία των σπερματοζωαρίων .....	26
1.6.9 Αξιολόγηση των λευκοκυττάρων του σπέρματος.....	34
1.6.10 Αξιολόγηση ανώριμων γεννητικών κυττάρων του σπέρματος.....	34
1.6.11 Έλεγχος του σπέρματος για την παρουσία αντισωμάτων .....	36
1.7. Ανδρική Υπογονιμότητα .....	38
1.7.1 Αιτίες υπογονιμότητας.....	38
1.7.2 Διάγνωση Ανδρικής Υπογονιμότητας.....	41
2. Σκοπός: .....	43

3. Πειραματικό μέρος.....	44
3.1 Όργανα/ Υλικά:.....	44
3.1.1 Όργανα: .....	44
3.1.2 Χημικά: .....	44
3.1.3 Αναλώσιμα: .....	44
3.2 Ανοσοϊστοχημική μελέτη (IHC) .....	46
3.3 Φυγοκέντρωση:.....	47
3.4 Η αρχή της διαδικασίας :.....	48
3.5 Παρατήρηση στο μικροσκόπιο:.....	50
3.6 Διαδικασία ποσοτικοποίησης μιτοχονδριακού σήματος: .....	50
3.7 Δοκιμασία t στατιστικού test .....	51
4. Αποτελέσματα .....	52
5. Συζήτηση.....	57
Βιβλιογραφία .....	58

## Περίληψη:

Τα μιτοχόνδρια αποτελούν κομβικό ρυθμιστή της φυσιολογικής λειτουργίας των κυττάρων δεδομένου του σημαντικού τους ρόλου σε ποικίλες κυτταρικές λειτουργίες, όπως είναι μεταξύ άλλων η παραγωγή ενέργειας, η βιοσύνθεση της αίμης, ο καταβολισμός των λιπαρών οξέων, η παραγωγή ελευθέρων ριζών και η επαγωγή απόπτωσης. Δεδομένου ότι οι διαδικασίες αυτές φαίνεται να σχετίζονται άμεσα ή έμμεσα με την κινητικότητα και την γήρανση των σπερματοζωαρίων και κατά συνέπεια με την υπογονιμότητα, η παρούσα διπλωματική εργασία σκοπό έχει τη συσχέτιση της ποιότητας των ανθρώπινων σπερματοζωαρίων με την κατανομή και την λειτουργικότητα των μιτοχονδρίων τους.

Για την επίτευξη του στόχου αυτού, δείγματα από δότες σπερματοζωαρίων παρελήφθησαν από την Μονάδα Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας και αναλύθηκαν περαιτέρω, όσο αφορά την λειτουργικότητα των μιτοχονδρίων τους, εφαρμόζοντας βιοχημικές μεθόδους, στο τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας στο Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

## **Abstract:**

Mitochondria are key regulators of cells' physiology given their important role in various cellular functions, including energy production, biosynthesis of heme, fatty acids catabolism, generation of free radicals, and induction of apoptosis. Since these processes are proposed to be associated directly or indirectly, with sperm mobility and aging, therefore, with infertility, this thesis aims to examine whether human sperm quality is associated with mitochondrial functionality.

To achieve this objective, samples of sperm donors were received from the Assisted Reproduction Unit of the Department of Obstetrics and Gynecology Clinic of the University Hospital of Larissa and further biochemically analysed as regards their mitochondrial functionality in the Department of Biochemistry and Biochemistry, of the University of Thessaly.

# 1.Εισαγωγή

## 1.1 Σπερματογένεση

Σπερματογένεση είναι η διαδικασία της παραγωγής των σπερματοζωαρίων, αποτελεί μια συνεχή και περιοδική διαδικασία, που ξεκινά από την εφηβεία και συνεχίζεται κατά τη μεγαλύτερη διάρκεια της ζωής του άνδρα. Η σπερματογένεση λαμβάνει χώρα στο σπερματικό επιθήλιο των σπερματικών σωληναρίων. Κατά την εμβρυογένεση, αρχέγονα βλαστικά ή στελεχιαία κύτταρα μεταναστεύουν στους όρχεις και μετατρέπονται σε ανώριμα βλαστικά κύτταρα, που ονομάζονται σπερματογόνια. Τα σπερματογόνια διατάσσονται σε δύο ή τρεις στοιβάδες, στην εσωτερική επιφάνεια των σπερματικών σωληναρίων. Τα μόνα άλλα κύτταρα των σωληναρίων κατά αυτήν την χρονική περίοδο είναι τα κύτταρα Sertoli, που είναι σωματικά (διπλοειδή) κύτταρα, τα οποία δεν στηρίζουν απλώς τα βλαστικά κύτταρα, αλλά διαδραματίζουν έναν πολύ σημαντικό ρόλο στην αλληλουχία των γεγονότων της σπερματογένεσης. Κατά την εφηβεία, τα σπερματογόνια εισέρχονται στον κύκλο της σπερματογένεσης ανά τακτά χρονικά διαστήματα και κατά ομάδες, που ονομάζονται γενεές. Η ωρίμανση των κυττάρων που ανήκουν στην ίδια γενεά διακρίνεται σε διαδοχικές μιτωτικές, μειωτικές και μεταμειωτικές φάσεις. Τα σπερματογόνια πολλαπλασιάζονται με συνεχείς μιτωτικές διαιρέσεις. Στη συνέχεια, ορισμένα από αυτά, υφίστανται μείωση για να δώσουν, τελικά, γένεση στις απλοειδικές σπερματίδες, που με τη σειρά τους θα μετατραπούν σε σπερματοζωάρια. Τα σπερματογόνια βρίσκονται στη βάση της πυραμίδας της σπερματογένεσης. Μπορούν να ανανεώνονται και να παράγουν ένα μεγάλο αριθμό διαφοροποιημένων βλαστικών κυττάρων. Η διατήρηση της φυσιολογικής σπερματογένεσης και, επακόλουθα, της γονιμότητας προϋποθέτει την ύπαρξη ισορροπίας μεταξύ της ανανέωσης των σπερματογονίων και της διαφοροποίησής τους προς σπερματοζωάρια. Αυτές οι δύο διαδικασίες ρυθμίζονται τόσο από τη γονιδιακή έκφραση στα σπερματογόνια όσο και από εξωγενή σήματα, όπως διαλυτούς παράγοντες και μόρια προσκόλλησης από το ορχικό μικροπεριβάλλον, που ονομάζεται φωλιά. Η διαδικασία της σπερματογένεσης, δηλαδή η παραγωγή σπερματοζωαρίων από σπερματογόνια, διαρκεί συνολικά 74 ημέρες, περίπου.

### 1.1.1 Φάσεις της σπερματογένεσης

Η σπερματογένεση χωρίζεται σε τρεις φάσεις, οι οποίες, ανάλογα με τη χρονική σειρά με την οποία λαμβάνουν χώρα, είναι ο πολλαπλασιασμός των σπερματογονίων, η μείωση και η σπερμιόγνεση.

### 1.1.2 Πολλαπλασιασμός των σπερματογονίων

Η πρώτη φάση, αυτή του πολλαπλασιασμού των σπερματογονίων, περιλαμβάνει τη διαίρεσή τους, τόσο για να αντικαταστήσουν τον εαυτό τους όσο και για να παράγουν έναν αριθμό κυττάρων που θα μετατραπούν σε ώριμα σπερματοζωάρια.

Με βάση την εμφάνιση του πυρήνα τους, διακρίνονται τρεις λειτουργικά διαφορετικοί τύποι σπερματογονίων: τα τύπου A βαθυχρωματικά (dark - Ad), τα τύπου A ωχρά (pale - Ap) και τα



τύπου Β σπερματογόνια (B). Τα σπερματογόνια τύπου Α παραμένουν εκτός του αιματο-ορχικού φραγμού και συνεχίζουν να διαιρούνται από την εφηβεία έως το θάνατο. Με τον τρόπο αυτό, διατηρείται μια δεξαμενή γαμετών που, θεωρητικά τουλάχιστον, διατηρεί τη γονιμοποιητική ικανότητα του άνδρα έως μια προχωρημένη ηλικία. Τα σπερματογόνια Ad δεν οδηγούν άμεσα στην παραγωγή σπερματοζωαρίων. Κύριος ρόλος τους είναι να διατηρούν έναν ικανό αριθμό βλαστικών κυττάρων. Η διαίρεσή τους μπορεί να ακολουθήσει δύο δρόμους: είτε προς την παραγωγή δύο σπερματογονίων Ad, όμοιων προς το αρχικό, είτε προς την παραγωγή δύο σπερματογονίων Ar. Αντίθετα, τα σπερματογόνια Ar διαιρούνται μιτωτικά για να παράγουν όμοια κύτταρα - κλώνους, που ενώνονται μεταξύ τους με κυτταροπλασματικές γέφυρες, που επιτρέπουν το συντονισμό των περαιτέρω διαιρέσεων. Τελικά, τα σπερματογόνια Ar διαφοροποιούνται σε σπερματογόνια τύπου Β.

Στη συνέχεια, τα σπερματογόνια τύπου Β θα διαιρεθούν μιτωτικά προς σπερματοκύτταρα πρώτης τάξης, που αποτελούν ενδιάμεσα διπλοειδικά κύτταρα. Στην πρώτη αυτή φάση της σπερματογένεσης, τα σπερματογόνια μεταναστεύουν προς τον αυλό των σπερματικών σωληναρίων, κινούμενα μεταξύ των κυττάρων Sertoli. Καθώς τα τελευταία είναι μεγάλα κύτταρα, με πλούσιο κυτταρόπλασμα, περιβάλλουν τα σπερματογόνια σε όλη τους την πορεία. Τα σπερματογόνια που περνούν τις συνδέσεις των κυττάρων Sertoli υφίστανται δομικές αλλαγές και μετατρέπονται στα μεγάλα σπερματοκύτταρα πρώτης τάξης.

Τα κύτταρα Sertoli διαχωρίζουν το τοίχωμα του σπερματικού σωληναρίου στο βασικό διαμέρισμα, όπου ανευρίσκονται κυρίως σπερματογόνια και το παρα-αυλικό διαμέρισμα, όπου ανευρίσκονται πιο προηγμένα κύτταρα της σπερματογένεσης. Έτσι, το βασικό διαμέρισμα βρίσκεται πριν και το παρα-αυλικό μετά τον αιματο-ορχικό φραγμό.

Ασφαλώς, η θέση την οποία έχουν τα κύτταρα στο σπερματικό επιθήλιο δεν είναι τυχαία, καθώς υπάρχει υψηλού βαθμού αρχιτεκτονική οργάνωση: ομάδες παρόμοιων λειτουργικά κυττάρων τοποθετούνται κοντά μέσα στο σπερματικό επιθήλιο, με τα πλέον ώριμα κύτταρα προς στη βασική μεμβράνη και τα πλέον ώριμα προς τον αυλό.

Καθώς τα σπερματοκύτταρα πρώτης τάξης ετοιμάζονται για να εισέλθουν στη μακράς διάρκειας πρόφαση της πρώτης μειωτικής διαίρεσης (μείωση I), μετακινούνται από τη βασική μεμβράνη του σπερματικού σωληναρίου προς τον αυλό. Σε αυτό το σημείο, τα σπερματοκύτταρα δεσμεύονται από τα κύτταρα Sertoli μέσω ειδικών κυτταρικών συνδέσεων. Μπροστά από το σπερματοκύτταρο, η σύνδεση μεταξύ δύο γειτονικών κυττάρων Sertoli λύεται, ενώ μια νέα σύνδεση σχηματίζεται από την άλλη πλευρά, κλείνοντας έτσι μια ανατομική και λειτουργική «πόρτα», πίσω από το σπερματοκύτταρο.

### 1.1.3 Μείωση

Η δεύτερη αυτή φάση αποτελείται από δύο κυτταρικές διαιρέσεις του σπερματοκυττάρου πρώτης τάξης, που συνοδεύονται από ένα μόνο διπλασιασμό των χρωμοσωμάτων.

Η πρόφαση της πρώτης μειωτικής διαίρεσης (πρόφαση I) καταλαμβάνει περισσότερο από το 90% της συνολικής διάρκειας της μείωσης. Η πρόφαση I διαιρείται σε τέσσερα επιμέρους στάδια: το στάδιο της λεπτοταινίας, της ζυγοταινίας, της παχυταινίας και της διπλοταινίας.

Κατά τη διάρκεια του σταδίου της λεπτοταινίας, τα χρωμοσώματα αρχίζουν να συμπυκνώνονται ενώ σχηματίζονται και θραύσεις και στις δύο αλυσίδες του DNA (double-strand breaks - DSBs). Οι DSBs θα χρησιμεύσουν, αργότερα, στον ανασυνδυασμό των ομόλογων χρωμοσωμάτων. Κατά τη διάρκεια του σταδίου της ζυγοταινίας, οι αδελφές χρωματίδες αρχίζουν να ζευγαρώνουν και να σχηματίζουν συνάψεις (synaptonemal complexes - SCs). Πρόκειται για πρωτεϊνικές δομές, που συνθέτονται από δύο αξονικά στοιχεία κατά μήκος των αδελφών χρωματίδων, και που συνδέονται με ένα κεντρικό στοιχείο, το οποίο ενώνει ως «φερμουάρ» τα δύο αξονικά στοιχεία. Η σύναψη ολοκληρώνεται στο στάδιο της παχυταινίας, όπου και συμβαίνει ο ομόλογος ανασυνδυασμός. Η πρόφαση I ολοκληρώνεται με το στάδιο της διπλοταινίας, όπου ξεκινά ο διαχωρισμός των χρωμοσωμάτων και τα SCs αρχίζουν να εξαφανίζονται.

Μετά την πρόφαση I ακολουθεί η μετάφαση, ανάφαση και τελόφαση της πρώτης μειωτικής διαίρεσης, με τελικά προϊόντα δύο σπερματοκύτταρα δεύτερης τάξης για κάθε σπερματοκύτταρο πρώτης τάξης. Κατά τη διάρκεια της δεύτερης μειωτικής διαίρεσης, οι αδελφές χρωματίδες διαχωρίζονται και διαιρούνται για να παραχθούν οι κυκλικές σπερματίδες. Στο τέλος αυτής της φάσης, από ένα σπερματοκύτταρο πρώτης τάξης θα έχουν σχηματιστεί τέσσερις σπερματίδες, που η κάθε μία περιέχει μια απλοειδική ομάδα χρωμοσωμάτων. Πολλά σημεία της διαδικασίας της μείωσης ρυθμίζονται από επιγενετικές τροποποιήσεις.

#### 1.1.4 Σπερμιογένεση

Η σπερμιογένεση είναι η μακρά φάση της σπερματογένεσης κατά την οποία οι απλοειδικές σπερματίδες μετατρέπονται σε σπερματοζωάρια. Οι βασικές μεταβολές που λαμβάνουν χώρα είναι ο σχηματισμός της κεφαλής και της ουράς του σπερματοζωαρίου και η απώλεια του κυτταροπλάσματος του.

Η φάση της σπερμιογένεσης χωρίζεται σε τέσσερις επιμέρους φάσεις: Κατά την πρώτη φάση (φάση Golgi) σχηματίζεται το ακροσωμικό κυστίδιο, η χρωματίνη της κάθε σπερματίδας συμπυκνώνεται δημιουργώντας μια συμπαγή μάζα και ο πυρήνας περιβάλλεται από ένα μεμβρανικό παράγωγο του συστήματος Golgi. Κατά τη δεύτερη φάση (φάση Cap), το ακροσωμικό κυστίδιο μετακινείται προς τον πυρήνα της στρογγυλής σπερματίδας και αρχίζει να σχηματίζεται ο πρόδρομος της ουράς (μαστίγιο) από το κεντριόλιο. Κατά την τρίτη φάση (ακροσωμιακή φάση), ο πυρήνας της σπερματίδας επιμηκύνεται και σχηματίζεται το ακρόσωμα, που περιέχει ένζυμα απαραίτητα για τη διείσδυση του σπερματοζωαρίου στο ωάριο. Τέλος, κατά την τέταρτη φάση (φάση της ωρίμανσης), τα μιτοχόνδρια συγκεντρώνονται γύρω από το μαστίγιο, το οποίο διαμορφώνεται πλήρως. Καθώς ο σχηματισμός του σπερματοζωαρίου προχωρά, το μεγαλύτερο μέρος του κυτταροπλάσματος αποβάλλεται. Το τελικό στάδιο της μεταμόρφωσης της σπερματίδας σε σπερματοζωάριο αποτελεί ο σχηματισμός της πολύπλοκης ουράς από το αξονημάτιο, που αποτελείται από δύο εσωτερικά μονά και εννέα εξωτερικά διπλά μικροσωληνάρια. Στη συνέχεια, το σπερματοζωάριο οδηγείται στην επιδιδυμίδα, όπου ωριμάζει, παραμένοντας εκεί για άλλες 21 ημέρες, και καθίσταται ικανό για γονιμοποίηση.

## 1.1.5 Ρύθμιση της σπερματογένεσης

### 1.5.1.1 Αιματο-ορχικός φραγμός

Ο αιματο-ορχικός φραγμός είναι, επίσης, γνωστός ως φραγμός των κυττάρων Sertoli ή φραγμός του σπερματικού επιθηλίου. Η έννοια του αιματο-ορχικού φραγμού είναι γνωστή εδώ και δεκαετίες και φαίνεται ότι είναι διαφορετικός από άλλους, αντίστοιχους φραγμούς αίματος - ιστών. Ως παράδειγμα, ο αιματο-εγκεφαλικός φραγμός αποτελείται από συνδέσεις των ενδοθηλιακών κυττάρων των τριχοειδών, που συνεπικουρούνται από τα μυοεπιθηλιακά κύτταρα. Αντίθετα, τα τριχοειδή αγγεία του διάμεσου ιστού των όρχεων συνεισφέρουν ελάχιστα στη λειτουργία του αιματο-ορχικού φραγμού.

Ο αιματο-ορχικός φραγμός επιτελεί πολλές λειτουργίες που είναι ιδιαίτερα σημαντικές για τη σπερματογένεση. Εμποδίζει εκλεκτικά τη δίοδο του νερού, των ηλεκτρολυτών, των ιόντων, των ορμονών και των ουσιών που δρουν παρακρινικά, ρυθμίζοντας, με αυτόν τον τρόπο, τόσο το είδος όσο και την ποσότητα των ουσιών που απαιτούνται για την ανάπτυξη των απλοειδικών σπερματίδων. Ο αιματο-ορχικός φραγμός αποτελεί, επίσης, την ανοσολογική πύλη για το διαχωρισμό των αντιγόνων, που εκφράζονται προσωρινά κατά την μετα-μειωτική εξέλιξη των σπερματογονίων, από το ανοσολογικό σύστημα του ξενιστή, με σκοπό την αποτροπή της παραγωγής αντί-σπερματικών αντισωμάτων. Τέλος, ο αιματο-ορχικός φραγμός προσδίδει πολικότητα στα κύτταρα του όρχη, καθώς άλλες ουσίες εκκρίνονται προς το διάμεσο χώρο, άλλες προς τα βλαστικά κύτταρα και άλλες προς τον αυλό των σπερματικών σωληναρίων. Στα κύτταρα Sertoli, ο πυρήνας βρίσκεται κοντά στη βασική μεμβράνη και κάθε ένα από αυτά συνδέεται με κυτταροπλασματικές αποφυάδες με 30 έως 50, περίπου, βλαστικά κύτταρα, που βρίσκονται σε διαφορετικά στάδια της ανάπτυξής τους.

Δομικά ο αιματο-ορχικός φραγμός αποτελείται από:

1. Μεμβρανικές πρωτεΐνες:
  - α) των στενών συνδέσεων : occludins, claudins, tricellulin, JAMs, CAR
  - β) των συνδέσεων που ομοιάζουν με δεσμοσώματα: desmogleins, δεσμοκολλίνη και
  - γ) των χασματοσυνδέσεων: κοννεξίνες, N-καντχερίνες, nectins
2. Συμπλέγματα ρυθμιστικών και δομικών πρωτεϊνών
3. Μεταφορείς φαρμάκων

Η λειτουργία του αιματο-ορχικού φραγμού ρυθμίζεται από:

- Συντονισμένες δράσεις των κυτοκινών και της τεστοστερόνης
- Πρωτεϊνικές κινάσες
- Πρωτεΐνες πολικότητας: Par, Pals1
- Τοπικούς ρυθμιστικούς μηχανισμούς

### 1.5.1.2 Δράση των ανδρογόνων

Η τεστοστερόνη, το βασικό ανδρογόνο, παράγεται τοπικά από τα κύτταρα Leydig, με αποτέλεσμα τα επίπεδά της στον όρχη του ενήλικα να παραμένουν σταθερά υψηλά. Οι υποδοχείς των ανδρογόνων (androgen receptor - AR) στον όρχη εντοπίζονται μόνο στα

σωματικά κύτταρα, και συγκεκριμένα στα κύτταρα Sertoli, που αποτελούν και το βασικό στόχο της ορμόνης, στα περιωληναριακά κύτταρα, στις λείες μυϊκές ίνες του τοιχώματος των αγγείων και στα κύτταρα Leydig. Αντίθετα, οι AR δεν εκφράζονται στα κύτταρα της σπερματογένεσης, με αποτέλεσμα τα τελευταία να μην αποτελούν άμεσους στόχους της δράσης της τεστοστερόνης. Παρ' όλο που ο ρόλος της τεστοστερόνης στη σπερματογένεση είναι γνωστός από δεκαετίες, δεν έχουν αποσαφηνιστεί πλήρως οι μηχανισμοί με τους οποίους δρα για να υποστηρίξει τη σπερματογένεση. Πειραματικές μελέτες σε αρουραίους έχουν δείξει ότι, εκτός από την κλασική οδό του AR, υπάρχουν και μη κλασικοί μηχανισμοί δράσης της τεστοστερόνης κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης

#### Κλασική οδός δράσης

Η τεστοστερόνη, μέσω του AR, ρυθμίζει τη γονιδιακή έκφραση. Πιο συγκεκριμένα, διαχέεται μέσα από την κυτταροπλασματική μεμβράνη και αλληλεπιδρά με τους AR υποδοχείς, που βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα, συνδεδεμένοι με θερμοευαίσθητες πρωτεΐνες (heat shock proteins - HSP). Με τον τρόπο αυτό, οι AR υφίστανται προσαρμοστικές μεταβολές, απελευθερώνονται από τις HSPs και μεταναστεύουν προς τον πυρήνα. Εκεί, συνδέονται με ειδικές αλληλουχίες του DNA, τα στοιχεία απόκρισης στα ανδρογόνα (androgen response elements - AREs) και επιστρατεύουν συν-ενεργοποιητές και συν-αναστολείς για να ρυθμίσουν τη μεσολαβούμενη από την τεστοστερόνη μεταγραφή. Αυτός ο μηχανισμός, που αποτελεί την κλασική οδό δράσης της τεστοστερόνης, απαιτεί τουλάχιστον 30 έως 40 λεπτά για να μεταβάλλει τη γονιδιακή έκφραση και ώρες για να παράγει σημαντικά επίπεδα νέων πρωτεϊνών.

#### Μη κλασική οδός δράσης

Η μη κλασική οδός της τεστοστερόνης ξεκινά με τη σύνδεση της τεστοστερόνης στον AR, είτε στο κυτταρόπλασμα είτε κοντά στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Η σύνδεση αυτή οδηγεί στη φωσφορυλίωση της Src-κινάσης, που βρίσκεται αγκυροβολημένη στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Η τελευταία φωσφορυλιώνει τον υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (epidermal growth factor receptor - EGFR), ο οποίος, με τη σειρά του, ενεργοποιεί τον καταρράκτη της MAP-κινάσης, πιθανόν μέσω φωσφορυλίωσης της Raf-κινάσης και ενεργοποίησης της MEK-κινάσης. Στη συνέχεια, η αλληλουχία των ενεργοποιήσεων περιλαμβάνει την ERK-κινάση, την p90-RSK-κινάση και τη φωσφορυλίωση του παράγοντα μεταγραφής CREB, με τελικό στόχο τη διέγερση των στοιχείων απάντησης του cAMP (cAMP response elements - CREs), την επιστράτευση συν-ενεργοποιητών και τη μεταγραφή των γονιδίων.

Δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί αν η τεστοστερόνη δρα κυρίως μέσω της κλασικής ή της μη κλασικής οδού, όσον αφορά την υποστήριξη της σπερματογένεσης. Η ταυτοποίηση των εξαρτώμενων από την τεστοστερόνη παραγόντων, που απαιτούνται για τη σπερματογένεση θα προσφέρει νέους στόχους για την ανδρική αντισύλληψη αλλά και νέες δυνατότητες για τη θεραπεία της υπογονιμότητας.

## 1.2 Μορφολογία του σπερματοζωαρίου

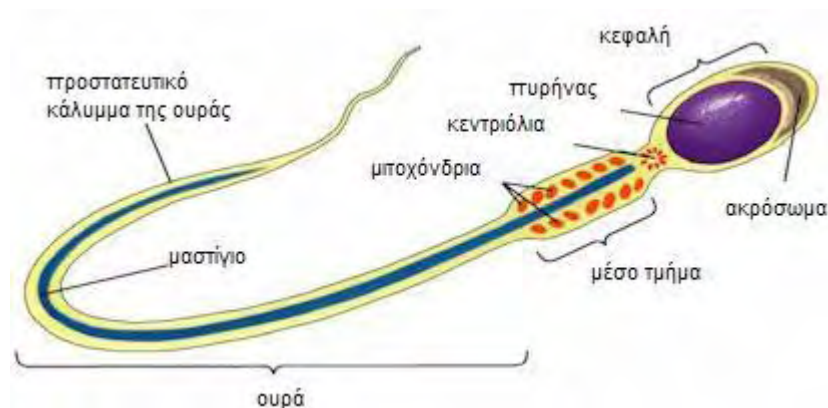
Οι δύο κύριες λειτουργίες του σπερματοζωαρίου είναι η μεταφορά των 23 απλοειδών χρωμοσωμάτων του στο ωάριο και η ενεργοποίηση της διεργασίας ανάπτυξης του ζυγώτη.

Το σπερματοζωάριο έχει ολικό μήκος 50 μm και αποτελείται από τρεις μορφολογικά και λειτουργικά διακριτές περιοχές: την κεφαλή, τον αυχένα ή μέσο τμήμα και την ουρά ή μαστίγιο. Η κεφαλή του φυσιολογικού σπερματοζωαρίου έχει σχήμα ωοειδές, μήκος 3-5 μm, πλάτος 2-3 μm και πάχος 1,5 μm. Αποτελείται από τον πυρήνα και το ακρόσωμα, τα οποία καλύπτονται από την πυρηνική μεμβράνη και το μετα-ακροσωμικό έλυτρο. Ο πυρήνας περιέχει το γενετικό υλικό του άνδρα. Το DNA των σπερματοζωαρίων έχει λίγο διαφορετική δομή από το DNA των διπλοειδών (σωματικών) κυττάρων: το DNA βρίσκεται συμπυκνωμένο στον μικρότερο δυνατό όγκο, έτσι ώστε να εξοικονομείται χώρος. Το ακρόσωμα καλύπτει τα πρόσθια δύο τρίτα του πυρήνα και αποτελείται από δύο τμήματα, το πρόσθιο και το τμήμα του ισημερινού.

Το πρόσθιο τμήμα του ακροσώματος περιέχει πρωτεολυτικά ένζυμα όπως ακροσίνη, θρυψίνη, υαλουρονιδάση και πρωτεάσες, τα οποία κατά την ακροσωμική αντίδραση απελευθερώνονται και υδρολύουν τη μάζα των κοκκιωδών κυττάρων και τη διαφανή ζώνη του ωαρίου με σκοπό να υποβοηθηθεί η διείσδυση του σπερματοζωαρίου και η συγχώνευσή του με το ωάριο. Ο ισημερινός δεν περιέχει ένζυμα αλλά παίζει σημαντικό ρόλο στην ένωση του σπερματοζωαρίου με το ωάριο. Η κυτταρική μεμβράνη καλύπτει την κεφαλή, τον αυχένα και την ουρά. Ωστόσο, κατά την ακροσωμική αντίδραση ρήγνυται μόνο η μεμβράνη της κεφαλής και όχι της ουράς, με συνέπεια να μην επηρεάζεται η κινητικότητα του σπερματοζωαρίου.

Το μετα-ακροσωμικό έλυτρο είναι μια πάχυνση της κυτταρικής μεμβράνης μεταξύ του οπισθίου άκρου του ακροσώματος και του οπίσθιου δακτυλίου. Παίζει ρόλο στην αναγνώριση του σπερματοζωαρίου από το ωάριο και την ένωσή τους. Ο αυχένας ή μέσο τμήμα συνδέει την κεφαλή με την ουρά, έχει μήκος 5-7 μm και πλάτος 1 μm. Περιέχει το αξονικό νημάτιο που περιβάλλεται από ινίδια με κυκλωτερή διάταξη και 1-2 κεντροσωμάτια. Ο αυχένας περιλαμβάνει μιτοχόνδρια, ενζυμικά συστήματα γλυκόλυσης και οξείδωσης και προσδίδει την απαραίτητη ενέργεια για την επιβίωση και την κινητικότητα. Η ουρά έχει μήκος 40-50 μm, αποτελείται από δέκα συνολικά ζεύγη ινιδίων (ένα κεντρικό και εννέα περιφερικά) και προσδίδει στο σπερματοζωάριο τη χαρακτηριστική κινητικότητά του.

Εικόνα 1: Αρχιτεκτονική δομή σπερματοζωαρίου



### 1.3 Ακροσωμική αντίδραση

Στη διαφανή ζώνη του ωαρίου υπάρχουν ειδικοί υποδοχείς των σπερματοζωαρίων. Έτσι μόνο ανθρώπινα σπερματοζωάρια μπορούν να προσδεθούν στη διαφανή ζώνη ανθρώπινων ωαρίων, διασφαλίζοντας τον βιολογικό φραγμό. Η σύνδεση του σπερματοζωαρίου με τη διαφανή ζώνη πυροδοτεί την ακροσωμική αντίδραση. Κατά την αντίδραση αυτή προκαλείται τήξη της κυτταρικής μεμβράνης και της εξωτερικής ακροσωμικής μεμβράνης, οπότε δημιουργούνται ανοίγματα, διά μέσου των οποίων απελευθερώνεται το ακροσωμικό περιεχόμενο. Πριν την ακροσωμική αντίδραση πρέπει να γίνει η ενεργοποίηση των σπερματοζωαρίων. Η ενεργοποίηση είναι η απομάκρυνση ή η διαφοροποίηση διαφόρων ουσιών που καλύπτουν την κυτταρική μεμβράνη. Σε αυτές συγκαταλέγεται ιδίως ο παράγοντας αναστολής της ενεργοποίησης. Φυσιολογικά, η ενεργοποίηση αρχίζει με την είσοδο των σπερματοζωαρίων στην προωορρηκτική αλκαλική τραχηλική βλέννα και ολοκληρώνεται κατά τη διαδρομή τους στην κοιλότητα της μήτρας έως και στον ισθμό των σαλπίνγων. Σπουδαίο ρόλο στην αναστολή της ενεργοποίησης παίζει το σπερματικό πλάσμα με τις πρωτεΐνες που περιέχει και ιδιαίτερα με τον παράγοντα αναστολής της ενεργοποίησης. Συνεπώς, βασική λειτουργία του σπερματικού πλάσματος είναι η προστασία των σπερματοζωαρίων αμέσως μετά την εκσπερμάτιση από το δυσμενές όξινο περιβάλλον του κόλπου, η παροχή θρεπτικών ουσιών όπως η φρουκτόζη, καθώς και η αναστολή του φαινομένου της ενεργοποίησης και της πρόωρης ακροσωμικής αντίδρασης (που θα είχε ως συνέπεια την ταχεία απώλεια της γονιμοποιητικής τους ικανότητας). Όταν το σπερματοζωάριο φθάσει στο ωάριο θα λάβει χώρα σύντηξη μεταξύ της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και του ισημερινού της κεφαλής του, με αποτέλεσμα την είσοδό του στο ωάριο.

### 1.4 Μοριακοί κινητήρες:

Οι οργανισμοί από τον άνθρωπο ως τα βακτήρια μετακινούνται προκειμένου να προσαρμοστούν στις αλλαγές του περιβάλλοντος, να κινηθούν προς την τροφή τους ή να απομακρυνθούν από τον κίνδυνο. Τα κύτταρα αυτά καθ' αυτά δεν είναι στατικά. Αντίθετα αποτελούν συναθροίσεις μετακινούμενων πρωτεϊνών, νουκλεϊκών οξέων και οργανιδίων. Είναι αξιοσημείωτο ότι οι βασικοί μηχανισμοί που προκαλούν τη μυϊκή συστολή είναι οι ίδιοι με εκείνους που καθοδηγούν τα διάφορα οργανίδια σε καθορισμένες πορείες στο εσωτερικό των κυττάρων. Πολλές από τις πρωτεΐνες που παίζουν καθοριστικούς ρόλους στη διεργασία μετατροπής τη χημικής ενέργειας που βρίσκεται με την μορφή ATP σε κινητική ενέργεια είναι μέλη της οικογένειας πρωτεϊνών NTPασων με θηλιά P. Αυτοί οι μοριακοί κινητές είναι ομόλογοι με πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην επιτέλεση άλλων διεργασιών όπως οι G πρωτεΐνες στη σύνθεση πρωτεϊνών στην σηματοδότηση και αλλού.

Τα ευκαρυωτικά κύτταρα διαθέτουν τρεις οικογένειες πρωτεϊνικών μοριακών συνοδών: τις μυοσίνες, τις κινησίνες και τις δυνεΐνες. Αυτές οι πρωτεΐνες κινούνται κατά μήκος τροχιών που καθορίζονται από την ακτίνη και τους μικροσωληνίσκους του κυτταροσκελετού, συμμετέχοντας έτσι στην κίνηση κυττάρων ή οργανισμών καθώς και στην ενδοκυτταρική μεταφορά πρωτεϊνών, κυστιδίων και οργανιδίων. Παρά τις σημαντικές διαφορές ως προς το μέγεθος και την έλλειψη ανιχνεύσιμης ομοιότητας στο επίπεδο της αλληλουχίας αμινοξέων, οι πρωτεΐνες αυτές είναι ομόλογες, περιέχοντας τις πυρηνικές δομές της οικογένειας των NTPασων με θηλιά P. Η ικανότητα αυτών των πυρηνικών δομών να αλλάζουν στερεοδιάταξη

σε απόκριση στην πρόσδεση και την υδρόλυση τριφωσφορικών νουκλεοζιτών αποτελεί καθοριστική ιδιότητα για την λειτουργία του μοριακού κινητήρα. Οι πρωτεϊνικοί κινητήρες αποτελούνται από κινητήριες περιοχές που προσκολλώνται σε επιμήκεις δομές οι οποίες χρησιμεύουν για να ενισχύσουν τις αλλαγές της στερεοδιάταξης στις πυρηνικές δομές και να συνδέουν τις διάφορες πυρηνικές περιοχές μεταξύ τους ή και με άλλες δομές.

Η κινησίνη και η δυνεΐνη κινούνται κατά μήκος των μικροσωληνίσκων και όχι κατά μήκος της ακτίνης που κινείται η μυσίνη. Οι μικροσωληνίσκοι είναι πολυμερή που αποτελούνται από σωληνίνη  $\alpha$  και  $\beta$ , δύο παρόμοιες πρωτεΐνες που προσδέουν νουκλεοτίδια γουανίνης. Κάθε μικροσωληνίσκος περιέχει 13 πρωτονημάτια με εναλλασσόμενες υπομονάδες σωληνίνης  $\alpha$  και  $\beta$ . Όπως και η ακτίνη έτσι και οι μικροσωληνίσκοι εμφανίζουν πολικότητα. Τα ένα άκρο που ονομάζεται αρνητικό αγκυροβολεί κοντά στο κέντρο του κύτταρου, ενώ το θετικό άκρο εκτείνεται προς την επιφάνεια του κύτταρου. Οι μικροσωληνίσκοι είναι κύρια συστατικά των κροσσών και των μαστιγίων που υπάρχουν σε ορισμένα ευκαρυωτικά κύτταρα. Παραδείγματος χάριν, τα σπερματοζώρια προωθούνται με την κίνηση των μικροσωληνίσκων του μαστίγιου τους. Οι μικροσωληνίσκοι που υπάρχουν σε αυτές τις δομές έχουν κοινή αρχιτεκτονική οργάνωση. Ένα δεμάτιο από μικροσωληνίσκους που ονομάζεται αξόνημα περιβάλλεται από μια μεμβράνη που εφάπτεται με την κυτταρική μεμβράνη. Το αξόνημα αποτελείται από μια περιφερειακή ομάδα εννέα ζευγών μικροσωληνίσκων που περιβάλλουν δυο μονούς μικροσωληνίσκους. Αυτό το επαναλαμβανόμενο μοτίβο ονομάζεται συχνά διάταξη 9+2. Η δυνεΐνη προκαλεί την κίνηση ενός μέλους από κάθε ζεύγος σε σχέση με το άλλο, προκαλώντας έτσι την κάμψη όλης της δομής.

## 1.5 Μιτοχόνδρια

Τα μιτοχόνδρια παίζουν εξαιρετικά σπουδαίο ρόλο στην εύρυθμη και ομαλή λειτουργία των κυττάρων και κατ' επέκταση του ίδιου του οργανισμού. Οι βιολογικές διεργασίες στις οποίες συμμετέχουν περιλαμβάνουν την οξειδωτική φωσφορυλίωση, το οξειδωτικό στρες και την απόπτωση. Μάλιστα, δεν είναι λίγα τα νοσήματα, τα οποία σχετίζονται με μιτοχονδριακές δυσλειτουργίες, ορισμένα από τα οποία είναι και ιδιαίτερα σοβαρά, όπως διάφορες νευρομυοπάθειες, κάποιες μορφές σακχαρώδους διαβήτη συνδυαζόμενες με άλλες παθήσεις όπως η κώφωση και οι εγκεφαλοπάθειες.

Είναι γνωστό, ότι τα μιτοχόνδρια, έχουν το δικό τους γενετικό υλικό (mtDNA) και εξειδικευμένα ριβοσώματα που ελέγχουν την έκφραση μιτοχονδριακών πρωτεϊνών. Το mtDNA κωδικοποιεί μόλις 13 πρωτεΐνες οι οποίες είναι απαραίτητες για την επιτέλεση βασικών λειτουργιών των μιτοχονδρίων όπως είναι η αντιγραφή, η μεταγραφή, η μετάφραση και ορισμένες από τις πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην οξειδωτική φωσφορυλίωση.

Δομικά κάθε μιτοχόνδριο αποτελείται από 4 διακριτές δομές οι οποίες επικοινωνούν μεταξύ τους. Οι δομές αυτές είναι: η *εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη* (outer mitochondrial membrane, OMM) η *εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη* (inner mitochondrial membrane, IMM), ο *διαμεμβρανικός χώρος* και η *μιτοχονδριακή μήτρα*.

Η αρχιτεκτονική οργάνωση των μιτοχονδρίων χαρακτηρίζεται από πλαστικότητα. Τα συστατικά του μπορούν να διασπώνται ή να συγχωνεύονται προκαλώντας την αλλαγή του σχήματος από ωοειδές σε νηματοειδές. Τα μιτοχονδριακά συστατικά δεν συνδέονται μόνο μεταξύ τους αλλά και με άλλες δομές όπως είναι το ενδοπλασματικό δίκτυο και ο κυτταροσκελετός.

Μια από τις σημαντικές διαδικασίες που λαμβάνει χώρα στα μιτοχόνδρια είναι η παραγωγή ATP μέσω οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Στο IMM εντοπίζεται ένα πλήθος συμπλόκων τα οποία συμμετέχουν στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων. Κατά την εκτέλεση των οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων δημιουργείται μία χημειο-οσμωτική διαβάθμιση πρωτονίων κατά μήκος της IMM που τελικά οδηγεί στην παραγωγή ATP.

Πέρα από την συμμετοχή στην σύνθεση ATP η αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων (ETC) συμμετέχει στην παραγωγή δραστικών ελεύθερων ριζών οξυγόνου (ROS). Οι ROS συμμετέχουν στην μεταγωγή σημάτων αλλά, όταν παράγονται με ανεξέλεγκτο τρόπο μπορούν να προκαλέσουν οξειδωτικές βλάβες στα κύτταρα .

*Εικόνα 2: Ρόλοι μιτοχονδρίων στην σπερματογένεση και την γονιμότητα του σπέρματος*



S. Rajender et al. / Mitochondrion 10 (2010) 419–428

Έχουν γίνει πολλές πειραματικές προσεγγίσεις προκειμένου να προσδιοριστεί ο ρόλος των μιτοχονδρίων στην αναπαραγωγική βιολογία. Όπως είδαμε, τα μιτοχόνδρια αποτελούν το σημείο παραγωγής ενέργειας καθώς επίσης και ελεύθερων ριζών. Η ενέργεια που παράγεται καταναλώνεται προκειμένου τα σπερματοζωάρια να κινηθούν μέσα στην βλέννα του σπέρματος, τον τράχηλο της μήτρας και τελικά να φτάσουν στο σημείο όπου θα γίνει η γονιμοποίηση του ωαρίου. Επομένως, είναι λογικό να υποθέτουμε πως η ελαττωματική λειτουργία τους συνδέεται με καταστάσεις υπογονιμότητας και κυτταρικής απόπτωσης. Επιπρόσθετα, τα μιτοχόνδρια αποτελούν το σημείο έναρξης της βιοσύνθεσης στεροειδών ορμονών. Η χοληστερόλη μετατρέπεται σε προγνεσολόνη (πρόδρομο μόριο όλων των στεροειδών ορμονών) μέσω της δράσης του κυτοχρώματος P450 της IMM. Η διαδικασία αυτή απαιτεί την κατανάλωση ενέργειας με την μορφή ATP.



### 1.5.1 Μιτοχόνδρια σπερματοζωαρίων

Περίπου 72-80 μιτοχόνδρια εντοπίζονται στο μέσο τμήμα ενός φυσιολογικού ανθρώπινου σπερματοζωαρίου (Ankel-Simons and Cummins., 1996; Cummins, 1998; St. John et al., 2000). Ο αριθμός αυτός είναι αρκετά υψηλός αν αναλογιστούμε το μικρό μέγεθος του κυττάρου (είναι το μικρότερο κύτταρο στο αρσενικό άτομο) καθώς και το γεγονός πως ένα σπερματοζώαριο είναι πλήρως διαφοροποιημένο κύτταρο. Επίσης, γνωρίζουμε ότι κατά την γονιμοποίηση το αρσενικό παρέχει στο ζυγωτό μόνο το χρωμοσωμικό υλικό του πυρήνα. Τα μιτοχόνδρια δεν ενσωματώνονται στο ζυγωτό.

Τα μιτοχόνδρια των γεννητικών κυττάρων αλλάζουν κατά τη διαδικασία της σπερματογένεσης: ενώ τα σπερματογόνια και τα πρωτογενή σπερματοκύτταρα διαθέτουν φυσιολογικά μιτοχόνδρια, τα δευτερογενή σπερματοκύτταρα και οι σπερματίδες διαθέτουν μιτοχόνδρια με πιο συμπυκνωμένες δομές. Επιπρόσθετα, κατά τη σπερμιογένεση, ταυτόχρονα με την απώλεια μέρους του κυτταροπλάσματος παρατηρείται απώλεια των μιτοχονδρίων. Τα εναπομείναντα μιτοχόνδρια αναδιατάσσονται σε σωληνοειδείς δομές γύρω από το πρόσθιο τμήμα του εννιαμερούς ODF (εξωτερικές πυκνές ίνες) και το αξόνημα σχηματίζοντας το μέσο τμήμα (Otani et al., 1988; Ho & Wey., 2007). Σε αυτού του είδους αναδιατάξεις, σημαντικό ρόλο διαδραματίζει η κίνηση της ελαφριάς αλυσίδας 3 (KLC3). Πρόκειται για μια πρωτεΐνη που μπορεί να συνδέεται ταυτόχρονα και με το ODF και με την πορίνη της OMM σχηματίζοντας μια γέφυρα. Μεταλλάξεις που προκαλούν την παραγωγή ελαττωματικών KLCs πρωτεϊνών σχετίζονται με μείωση της ποιότητας του σπέρματος και την γονιμότητας του (Zhang et al., 2012).

Μεγάλο ενδιαφέρον προξένησε το γεγονός πως σπερματοζώαρια από άλλους οργανισμούς - πλην θηλαστικών- που ζουν σε περιβάλλοντα με χαμηλή συγκέντρωση O<sub>2</sub> δεν διαθέτουν μιτοχόνδρια (Balsamo et al., 2007), υποδεικνύοντας ότι κατά την σπερμιογένεση υπάρχουν μηχανισμοί που οδηγούν στην απομάκρυνση των μιτοχονδρίων που δεν χρειάζεται ο οργανισμός.

Από όλα τα προηγούμενα συμπεραίνουμε ότι το χρονικό διάστημα που η λειτουργικότητα των μιτοχονδρίων είναι άμεσα συνυφασμένη με την φυσιολογική λειτουργία των σπερματοζωαρίων ξεκινά από την παραγωγή τους στην επιδιδυμίδα, την εκσπερμάτιση, την μεταφορά στον θηλυκό αναπαραγωγικό σωλήνα και την σύνδεση σπερματοζωαρίου-ωαρίου. Οποιαδήποτε αλλαγή στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα, το τρασκριπτώμα, το πρωτεϊνώμα ή το μεταβόλωμα που επηρεάζει την λειτουργικότητα των μιτοχονδρίων πιθανώς να επηρεάζει και την λειτουργικότητα των σπερματοζωαρίων άρα και την γονιμοποιητική ικανότητα.

### 1.5.2 Οξειδωτική φωσφορυλίωση στα μιτοχόνδρια:

Γνωρίζουμε ότι η γλυκόζη μπορεί να μεταβολιστεί αναερόβια σε πυροσταφυλικό οξύ και να συνθέσει ATP μέσω της γλυκολυτικής πορείας. Εντούτοις, η γλυκόλυση αποκομίζει ένα κλάσμα μόνο της ATP που είναι διαθέσιμη από την γλυκόζη. Η πηγή της μεγαλύτερης ποσότητας ATP που παράγεται στον μεταβολισμό προέρχεται από την αερόβια επεξεργασία της γλυκόζης η οποία αρχίζει με την πλήρη οξείδωση των παραγώγων της γλυκόζης σε διοξείδιο του άνθρακα. Αυτή η οξείδωση λαμβάνει χώρα στον κύκλο του κιτρικού οξέος.

Πρόκειται για είναι ένα σύνολο βιοχημικών αντιδράσεων που αποτελούν την τελική κοινή πορεία για την οξείδωση των καύσιμων οργανικών μορίων. Τα περισσότερα καύσιμα μόρια εισέρχονται στον κύκλο ως ακετυλο-συνένζυμο Α. Κάτω από αερόβιες συνθήκες το πυροσταφυλικό που προκύπτει από την γλυκόζη αποκαρβοξυλιώνεται οξειδωτικά για να σχηματιστεί το ακετυλο-συνένζυμο Α. Στους ευκαρυώτες, οι αντιδράσεις του κύκλου του κιτρικού οξέος λαμβάνουν χώρα μέσα στα μιτοχόνδρια.

Τα μιτοχόνδρια παράγουν την περισσότερη ATP που χρειάζονται τα αερόβια κύτταρα μέσω της κοινής προσπάθειας του κύκλου του κιτρικού οξέος που λαμβάνει χώρα στη μιτοχονδριακή μήτρα και της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης που πραγματοποιείται στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη. Κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση η σύνθεση ATP είναι συζευγμένη με την ροή ηλεκτρονίων από το NADH ή το FADH<sub>2</sub> προς το O<sub>2</sub>, μέσω μιας βαθμίδωσης συγκέντρωσης πρωτονίων μεταξύ των δύο πλευρών της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης. Η ροή ηλεκτρονίων έχει ως αποτέλεσμα την άντληση πρωτονίων έξω από την μιτοχονδριακή μήτρα προς τον διαμεμβρανικό χώρο και την παραγωγή ενός μεμβρανικού δυναμικού. Οι φορείς ηλεκτρονίων στο αναπνευστικό σύστημα της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης είναι οι κινόνες, οι φλαβίνες, τα σύμπλοκα σιδήρου-θείου, οι ομάδες αίμης των κυτοχρωμάτων και τα ιόντα χαλκού. Η αναπνευστική αλυσίδα αποτελείται από τέσσερα σύμπλοκα (τρεις αντλίες πρωτονίων και μια φυσική σύνδεση με τον κύκλο του κιτρικού οξέος). Η ροή ηλεκτρονίων δια μέσω των συμπλόκων οδηγεί σε άντληση πρωτονίων από την πλευρά της μήτρας προς το διαμεμβρανικό χώρο. Δημιουργείται έτσι μια πρωτονιοκίνητη δύναμη η οποία αποτελείται από μια βαθμίδωση pH και ένα μεμβρανικό δυναμικό. Μέσω της ροής αυτής ωθείται η συνθάση του ATP να συνθέσει ATP μέσα στην μιτοχονδριακή μήτρα.

Όσον αφορά στην γονιμότητα, γενετικές βλάβες στα μιτοχόνδρια μπορεί να έχουν αντίκτυπο στην φυσιολογία των σπερματοζωαρίων και κατ' επέκταση στην κινητικότητα τους (Folgero et al., 1993; Spiropoulos et al., 2002a). Μελέτες σε σπέρμα ποντικών έδειξαν ότι η απώλεια ακόμα και των μισών αντιγράφων mtDNA δεν επηρεάζει την γονιμότητα (Wai et al., 2010). Αυτή η μείωση, όπως προαναφέρθηκε, παρατηρείται κατά την διάρκεια της σπερματογένεσης (Larsson et al., 1997). Ακόμα δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως γιατί ο μικρότερος αριθμός αντιγράφων mtDNA είναι επωφελής για τα σπερματοζωάρια. Σε ολιγοσπερμικά και ασθενοσπερμικά δείγματα βρέθηκαν αυξημένα επίπεδα mtDNA (Tremellen, 2008), ενισχύοντας την άποψη πως η μείωση του αριθμού των αντιγράφων mtDNA στο σπέρμα μειώνει την πιθανότητα της ROS-εξαρτώμενης καταστροφής του mtDNA άρα κατ' επέκταση προφυλλάσει τη λειτουργικότητα του σπέρματος.

Η πλειοψηφία των κληρονομήσιμων ασθενειών mtDNA εμφανίζεται με συχνότητα 1/5000 (Elliott et al., 2008) και οφείλεται σε μεταλλάξεις οι οποίες δεν επιδιορθώνονται με τη δράση της γ-DNA πολυμεράσης. Ο μηχανισμός επιδιόρθωσης ακόμα δεν έχει αποσαφηνιστεί ωστόσο, έχει προταθεί η άποψη πως η επιλεκτική επιδιόρθωση επιβλαβών μεταλλάξεων είναι πιο αποτελεσματική όταν ο αριθμός των αντιγράφων είναι μικρός (Wai et al., 2010).

### 1.5.3 Συσχέτιση μιτοχονδριακής λειτουργικότητας με τη διαδικασία της απόπτωσης

Το ανθρώπινο σπέρμα περιέχει πολλούς αποπτωτικούς δείκτες που πιθανώς συνδέονται τόσο με την μείωση της λειτουργικότητας σπερματοζωαρίων που το DNA τους έχει καταστραφεί όσο και με την απομάκρυνσή τους από τον θηλυκό αναπαραγωγικό σωλήνα (Ramalho-Santos et al., 2009; Aiten & Koppers, 2011).

Το εξωγενές αποπτωτικό μονοπάτι βρέθηκε ότι είναι ενεργό στο ανθρώπινο σπέρμα (Sakkas et al., 1999) για αυτό και οι προσπάθειες επικεντρώθηκαν στο ρόλο του ενδογενούς μονοπατιού (εξαρτώμενο από τα μιτοχόνδρια) στο οποίο συμμετέχει μεγάλος αριθμός προ-αποπτωτικών και αντι-αποπτωτικών μορίων της οικογένειας BCL. Συγκεκριμένα, οι αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες Bcl-Xl βρέθηκαν σε μεγαλύτερα επίπεδα σε μη φυσιολογικά/ ανώριμα δείγματα σπέρματος (Cayli et al., 2004). Από την άλλη μεριά, σε ώριμα σπέρματα βρέθηκαν τόσο προ-αποπτωτικές όσο και αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες Bcl-x ωστόσο, τα αποτελέσματα αυτά δεν μπόρεσαν να συσχετιστούν με παραμέτρους του σπέρματος (Sakkas et al., 2002).

Δύο ακόμα σημαντικοί αποπτωτικοί δείκτες που μελετήθηκαν είναι η εξωκυττάρωση της φωσφατίδυλο-σερίνης (PS) και η ενεργότητα των κασπασών. Ενεργοποιημένες κασπάσες (συμμετέχουν στο τελικό στάδιο της απόπτωσης) βρέθηκαν κυρίως σε σπέρματα χαμηλής ποιότητας και μειωμένης γονιμότητας (Weng et al., 2002; Gruneward et al., 2008; Kotwicka et al., 2008; Almeida et al., 2011). Οι κασπάσες αυτές είναι η κασπάση 9 η οποία ενεργοποιείται από το μιτοχονδριακό αποπτωτικό μονοπάτι που ακολουθεί μετά την ενεργοποίηση του κυτοχρώματος c και την κασπάση 3 που ενεργοποιείται και από τα δύο μονοπάτια. Η δραστηριότητα τους εντοπίζεται στο μέσο τμήμα (Weng et al., 2002; Paasch et al., 2004a) (όπου δηλαδή και τα μιτοχόνδρια), ελαττώνοντας την κινητικότητα του σπέρματος (Paasch et al., 2004b; Gruneward et al., 2005; Espinoza et al., 2009; Kim et al., 2012).

### 1.5.5 Ανακάλυψη μιτοχονδριακών νόσων:

Όπως αρμόζει σε ένα οργανίδιο που είναι τόσο απαραίτητο στην παραγωγή μεταβολικής ενέργειας, η δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων μπορεί να οδηγήσει σε παθολογικές καταστάσεις. Ο αριθμός των νοσημάτων που μπορούν να αποδοθούν σε μιτοχονδριακές μεταλλάξεις αυξάνεται διαρκώς, παράλληλα με την αυξανόμενη κατανόηση της βιοχημείας και της γενετικής των μιτοχονδρίων. Η πρώτη μιτοχονδριακή νόσος που κατανοήθηκε ήταν η κληρονομική οπτική νευροπάθεια Leber, μια μορφή τύφλωσης που προσβάλλει τα άτομα μέσης ηλικίας και οφείλεται σε μεταλλάξεις στην οξειδοαναγωγή του ζεύγους NADH-Q. Ορισμένες από τις μεταλλάξεις αυτές παρεμποδίζουν τη χρήση του NADH, ενώ άλλες παρεμποδίζουν τη μεταφορά ηλεκτρονίων στο συνένζυμο Q. Οι συσσωρευμένες μεταλλάξεις στα μιτοχονδριακά γονίδια μπορεί να συμβάλουν στη γήρανση, σε νευροεκφυλιστικά νοσήματα και στον καρκίνο.

Το ανθρώπινο ωάριο περιέχει πολλές χιλιάδες μορίων μιτοχονδριακού DNA, ενώ το σπερματοζώαριο περιέχει μόνο μερικές εκατοντάδες και επομένως η επίδρασή του στον γονότυπο είναι μικρή. Επειδή τα κληρονομούμενα από τη μητέρα μιτοχόνδρια έχουν μαζική

παρουσία στα κύτταρα και επειδή ενδέχεται οι μεταλλάξεις να μην αφορούν όλα τα μιτοχόνδρια, οι παθολογικές διεργασίες στα νοσήματα αυτά μπορεί να είναι πολύ πολύπλοκες. Ακόμη και μέσα σε μία οικογένεια όπου τα μέλη της έχουν την ίδια μετάλλαξη, τυχαίες μεταβολές στον αριθμό των μιτοχονδρίων με τη μετάλλαξη οδηγούν σε μεγάλες διαφορές τόσο ως προς τη φύση και τη βαρύτητα των συμπτωμάτων της παθολογικής κατάστασης όσο και ως προς τον χρόνο εκδήλωσης της κλινικής εικόνας. Ανεπάρκειες στην κυτταρική αναπνοή είναι διπλά επικίνδυνες καθώς δεν μειώνεται μόνο η μεταγωγή ενέργειας, αλλά αυξάνεται και η πιθανότητα παραγωγής δραστικών ενώσεων οξυγόνου. Όργανα τα οποία εξαρτώνται σε πολύ μεγάλο βαθμό από την οξειδωτική φωσφορλίωση, (όπως το νευρικό σύστημα και η καρδιά) είναι πολύ ευαίσθητα σε μεταλλάξεις του μιτοχονδριακού DNA.

#### Πειραματικές μελέτες συσχέτισης μιτοχονδριακής λειτουργικότητας και ποιότητας του σπέρματος:

##### 1) Μιτοχονδριακή δομή:

a) Μέσο τμήμα και μιτοχονδριακή ακεραιότητα: τα σπερματοζωάρια από ασθενοσπερμικά δείγματα έχουν κοντύτερα μέσα τμήματα και λιγότερες μιτοχονδριακές συστοιχίες, ελαττωματικά μιτοχόνδρια με διογκωμένα ενδομεμβρανικά κενά ή/και διασκορπισμένες-αποδιοργανωμένες ακρολοφίες. (Mundy et al., 1995; Pelliccione et al., 2011)

##### 2) Μιτοχονδριακό γονιδίωμα:

a) Αναδιατάξεις mtDNA: παρά τα συγκρουόμενα αποτελέσματα διάφορων δημοσιεύσεων όσον αφορά στα ακριβή σημεία των μεταλλάξεων, είναι κοινώς αποδεκτό ότι η συσσώρευση mtDNA μεταλλάξεων σχετίζεται άμεσα με την μείωση της λειτουργικότητας των σπερματοζωαρίων. (St John et al., 2005, 2007)

b) Ποσότητα mtDNA: δείγματα σπέρματος με χαμηλή ποιότητα έχουν μη φυσιολογικό αριθμό αντιγράφων mtDNA. (Diez-Sanchez et al., 2003; May-Panloup et al., 2003; Amaral et al., 2007; Song & Lewis, 2008)

c) Έκφραση πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην διατήρηση του mtDNA: δείγματα σπέρματος με χαμηλή ποιότητα έχουν χαμηλά επίπεδα TFAM (Mitochondrial Transcription Factor A) και γ-DNA πολυμεράσης. (Amaral et al., 2007)

##### 3) Μιτοχονδριακό τρανσκρίπτωμα (mtRNA):

a) Επίπεδα mtRNA: σπερματοζωάρια από ασθενοσπερμικά δείγματα έχουν αλλοιωμένα επίπεδα συγκεκριμένων mtRNAs (βρέθηκε με αξιοποίηση της τεχνικής των μικροσυστοιχιών). (Jodar et al., 2012)

##### 4) Μιτοχονδριακό πρωτέομα:

a) Επίπεδα πρωτεϊνών: διαφορετικά επίπεδα έκφρασης αρκετών μιτοχονδριακών πρωτεϊνών σε δείγματα σπέρματος με χαμηλή ποιότητα. (Amaral et al., 2007; Zhao et al., 2007; Martinez-Heredia et al., 2008; Chan et al., 2009; Siva et al., 2010; Parte et al., 2012)

b) Ενζυμική δραστηριότητα: συσχέτιση της δραστηριότητας των ETC ενζύμων με τις παραμέτρους του σπέρματος. (Ruiz-Pesini et al., 1998, 2000a)

##### 5) Μεταβολισμός στα μιτοχόνδρια/παραγωγή ενέργειας:

- a) Λειτουργικότητα ETC και οξειδωτικής φωσφορυλίωσης: επώαση σπερματοζωαρίων με διαφορετικούς αναστολείς του ETC προκαλεί ποικιλόμορφη ελάττωση της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων. (Ruiz-Pesini et al., 2000b; St John et al., 2005)
  - b) MMP: συσχέτιση μεταξύ MMP του σπέρματος, λειτουργικών παραμέτρων του σπέρματος (συμπεριλαμβανομένης της κινητικότητας) και της ικανότητας γονιμοποίησης. (Troiano et al., 1998; Marchetti et al., 2002, 2004, 2012; Amaral & Ramalho-Santos, 2010; Paoli et al., 2011; Sousa et al., 2011)
  - c) Κατανάλωση οξυγόνου και λειτουργικότητα αναπνοής: συσχέτιση της κατανάλωσης οξυγόνου και της αναπνευστικής λειτουργίας με την κινητικότητα του σπέρματος. (Ferramosca et al., 2008, 2012; Stendardi et al., 2011)
- 6) Άλλες μελέτες:
- a) Παραγωγή ROS: τα μιτοχόνδρια αποτελούν την κύρια πηγή ROS στο σπέρμα. (Koppers et al., 2008; Kothari et al., 2010)
  - b) Μιτοχονδριακό αποπτωτικό μονοπάτι: μιτοχονδριακής προέλευσης ROS φαίνεται να επάγουν το αποπτωτικό μονοπάτι στο σπέρμα. (Aitken et al., 2012c)
  - c)  $Ca^{2+}$  σηματοδότηση: τα μιτοχόνδρια των σπερματοζωαρίων μπορούν να προσλαμβάνουν  $Ca^{2+}$  και να λειτουργούν σαν ενδοκυτταρικές αποθήκες, ωστόσο ο ρόλος τους στην σηματοδότηση δεν έχει ακόμα αποσαφηνιστεί. (Costello et al., 2009)

## 1.6 Εξέταση του σπέρματος:

Το σπέρμα έχει δύο κύρια ποσοτικά χαρακτηριστικά:

- α) τον συνολικό αριθμό των σπερματοζωαρίων
- β) τον όγκο του υγρού που περιέχει συστατικά αδένων

Πολύ σημαντική είναι η φύση των σπερματοζωαρίων. Με τον όρο φύση εννοούμε την μορφολογία, την κινητικότητα, την γονιμοποιητική ικανότητα καθώς επίσης και την σύσταση του σπερματικού υγρού που συντελεί στην ορθή λειτουργία του σπέρματος.

### 1.6.1 Αρχική μακροσκοπική εξέταση:

Κάθε ανάλυση δείγματος πρέπει να ξεκινάει μετά τα πρώτα 30 λεπτά και όχι μετά το πέρας της πρώτης ώρας για την αποφυγή αφυδάτωσης ή αλλαγών στην θερμοκρασία που μπορεί να επηρεάσει την ποιότητα του σπέρματος. Αμέσως μετά την εκσπερμάτιση, το δείγμα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου προκειμένου να υγροποιηθεί και να ομογενοποιηθεί.

Σε πρώτη φάση γίνεται εκτίμηση του ιξώδους τοποθετώντας το δείγμα σε μια γυάλινη πλάκα και αφήνοντάς το να κινηθεί με κινητήρια δύναμη το βάρος του (όχι πάνω από 2 cm).

Εκτίμηση της εμφάνισης της εκσπερμάτισης: ένα τυπικό δείγμα σπέρματος έχει μία ομοιογενή γκρι-οπαλίζουσα εμφάνιση. Σε δείγματα με πολύ χαμηλή συγκέντρωση μπορεί να εμφανίζεται διαφανές ενώ το χρώμα μπορεί να ποικίλει ανάλογα με τα συστατικά των τροφών ή την λήψη φαρμάκων και βιταμινών.

**Όγκος** του σπέρματος: ο όγκος κάθε εκσπερμάτισης καθορίζεται κυρίως από συστατικά που εκκρίνονται από τον προστάτη, την επιδιδυμίδα και τους επιθηλιακούς αδένες. Ο ακριβής προσδιορισμός του όγκου είναι σημαντικός για τον σωστό υπολογισμό του αριθμού των σπερματοζωαρίων αλλά και των μη-σπερματικών κυττάρων σε κάθε δείγμα. Σαν κατώτερο όριο όγκου ενός φυσιολογικού δείγματος θεωρείται το 1,5ml.

**pH** του σπέρματος: το pH του σπέρματος αντικατοπτρίζει την ισορροπία μεταξύ των τιμών pH των ουσιών που εκκρίνονται από τους αδένες και κυρίως των αλκαλικών συστατικών από τον επιθηλιακό αδένα και των όξινων από τον προστάτη. Η μέτρηση πρέπει να γίνεται πριν το πέρας της πρώτης ώρας για να μην επηρεαστούν τα αποτελέσματα από την απώλεια CO<sub>2</sub>. Σε ένα φυσιολογικό δείγμα το pH κυμαίνεται μεταξύ 6.0 και 10.0.

### **1.6.2 Αρχική μικροσκοπική εξέταση:**

Παρατήρηση του δείγματος σε μικροσκόπιο αναστροφής φάσης σε μεγέθυνση 100x. Με αυτόν τον τρόπο λαμβάνονται πληροφορίες για τη σχηματιζόμενη βλέννα, για τις συναθροίσεις και τα συσσωματώματα του σπέρματος, καθώς και για την παρουσία άλλων κυττάρων πλην των σπερματοζωαρίων, όπως είναι τα επιθηλιακά κύτταρα και τα λευκοκύτταρα τα οποία έχουν κλινική σημασία. Αυτά τα επιπρόσθετα κυτταρικά στοιχεία μπορούν να χαρακτηρισθούν με παρατήρηση στο μικροσκόπιο σε μεγέθυνση 1000x ή με μεγαλύτερη ακρίβεια με μέτρηση της ενεργότητας περοξυδάσης. Ύστερα, το δείγμα παρατηρείται σε μεγέθυνση (200x και 400x) για την εκτίμηση της κινητικότητας και του αριθμού των σπερματοζωαρίων. Τα μη ειδικά συσσωματώματα μεταξύ σπερματοζωαρίων και βλέννας, μη-σπερματικών κυττάρων ή αποικοδομημένων ουσιών πρέπει να προσδιοριστούν. Επίσης, τα σπερματοζωάρια τείνουν ,μέσω των δομών της κεφαλής και της ουράς, να συγκολλούνται μεταξύ τους. Ανάλογα με το ποσοστό συγκόλλησης των σπερματοζωαρίων κατατάσσουμε τα δείγματα σε 4 κατηγορίες:

- επίπεδο 1: απομονωμένα, <10 σπερματοζωάρια ανά συγκολλητική μονάδα, πολλά ελεύθερα σπερματοζωάρια
- επίπεδο 2: μέτρια, 10-50 σπερματοζωάρια ανά συγκολλητική μονάδα, ελεύθερα σπερματοζωάρια
- επίπεδο 3: μεγάλα, >50 σπερματοζωάρια ανά συγκολλητική μονάδα, ύπαρξη λίγων ελεύθερων σπερματοζωαρίων
- επίπεδο 4: πολύ μεγάλα, όλα τα σπερματοζωάρια αποτελούν μέρος συγκολλητικών μονάδων τα οποία και συνδέονται μεταξύ τους.

### **1.6.3 Κινητικότητα του σπέρματος**

Η κινητικότητα του σπέρματος σχετίζεται με τα ποσοστά εγκυμοσύνης (Jouannet et al., 1988; Larsen et al., 2000; Zinaman et al., 2000). Η εκτίμηση της πρέπει να γίνει άμεσα μετά την υγροποίηση και την ομογενοποίηση του δείγματος περίπου μισή ώρα μετά την εκσπερμάτιση και σε συνθήκες δωματίου. Πιθανή καθυστέρηση μπορεί να δώσει εσφαλμένα αποτελέσματα λόγω εξάτμισης και μεταβολών στην θερμοκρασία και το pH του δείγματος.

Μέσω ενός απλού συστήματος ταξινόμησης, τα σπερματοζωάρια κατηγοριοποιούνται σε:

1. κινητικά σπερματοζωάρια με προωθητική κίνηση (PR): είναι ιδιαίτερα κινητικά και κινούνται είτε σε ευθεία γραμμή είτε στο εσωτερικό ενός μεγάλου κυκλικού πεδίου
2. κινητικά σπερματοζωάρια χωρίς προωθητική κίνηση (NP): κινούνται ελάχιστα εντός ενός μικρού πεδίου
3. τα ακίνητα σπερματοζωάρια (IM).

Κατά τον χαρακτηρισμό της κινητικότητας είναι σημαντικό να διακριθεί το σύνολο των κινητικών σπερματοζωαρίων (PR+NP) από τα ακίνητα σπερματοζωάρια (IM).

Κατώτερα όρια αναφοράς:

Κατώτερο όριο αναφοράς συνολικής κινητικότητας (PR+NP) : 40%

Κατώτερο όριο αναφοράς προωθητικής κινητικότητας (PR): 32%

#### **1.6.4 Ζωτικότητα σπέρματος**

Η ζωτικότητα του σπέρματος μπορεί να υπολογιστεί μετρώντας την ακεραιότητα της μεμβράνης των σπερματοζωαρίων. Η διαδικασία αυτή είναι ακόμα πιο σημαντικό να γίνει σε δείγματα που τα κινητικά σπερματοζωάρια αποτελούν λιγότερο από το 40% των ολικών σπερματοζωαρίων. Το ποσοστό των ζωντανών σπερματοζωαρίων υπολογίζεται ταυτοποιώντας εκείνα τα σπερματοζωάρια που οι μεμβράνες τους παραμένουν άθικτες. Αυτό μπορεί να γίνει είτε μέσω διαδικασιών που περιλαμβάνουν την χρήση χρωστικών ή μέσω παρατήρησης ανάπτυξης οιδήματος. Στην δεύτερη περίπτωση μόνο τα ζωντανά σπερματοζωάρια θα παρουσιάσουν οίδημα σε υποτονικό διάλυμα. Σημαντικό λοιπόν, είναι να γνωρίζουμε αν ένα ακίνητο σπερματοζωάριο είναι ζωντανό ή νεκρό.

##### **1.6.4.1 Εκτίμηση ζωτικότητας μέσω eosin-nigrosin**

Είναι μια τεχνική που περιλαμβάνει την χρήση της χρωστικής nigrosin. Αυτή η χρωστική δίνει την δυνατότητα για καλύτερη παρατήρηση της κεφαλής κάθε σπερματοζωαρίου σε σχέση με το υπόλοιπο οπτικό πεδίο (background) (Björndahl et al., 2003).

Μετα την εκτέλεση του αντίστοιχου πρωτοκόλλου τα σπερματοζωάρια του δείγματος παρατηρούνται σε μικροσκόπιο φωτεινού πεδίου. Τα σπερματοζωάρια των οποίων οι κεφαλές χρωματίστηκαν κόκκινες ή έντονα ροζ θεωρούνται νεκρά (κατεστραμμένη μεμβράνη) ενώ τα σπερματοζωάρια με άσπρες ή ελαφρώς ροζ κεφαλές καταγράφονται ως ζωντανά (άθικτη μεμβράνη).

Κατώτερο όριο ζωτικότητας από την παραπάνω πειραματική τεχνική είναι το 58%.

##### **1.6.4.2 Εκτίμηση ζωτικότητας μέσω υποτονικού οιδήματος (HOS test)**

Αποτελεί μια εναλλακτική τεχνική για την εκτίμηση της ζωτικότητας των σπερματοζωαρίων και χρησιμοποιείται κυρίως σε περιπτώσεις που πρέπει να αποφευχθεί η χρώση των σπερματοζωαρίων. Σπερματοζωάρια με άθικτες κυτταρικές μεμβράνες σχηματίζουν οίδημα

5 λεπτά αφότου επωαστούν σε υποτονικό διάλειμμα. Ο χρόνος επώασης στο υποτονικό διάλυμα είναι πολύ σημαντικός καθώς μετά από 30 λεπτά η δομή του οιδήματος σταθεροποιείται. Έτσι, για θεραπευτικούς λόγους τα σπερματοζωάρια πρέπει να επωαστούν σε υποτονικό διάλυμα για 5 λεπτά ενώ για διαγνωστικούς σκοπούς η επώαση μπορεί να γίνει και για 30 λεπτά (Jeyendran et al., 1984; Hossain et al., 1998).

Τα κατώτερα όρια του HOS test συμπίπτουν με αυτά της τεχνικής eosin-negrosin (58%).

### 1.6.5 Αριθμός σπερματοζωαρίων

Ο ακριβής αριθμός σπερματοζωαρίων και η συγκέντρωσή τους ανά εκσπερμάτωση σχετίζονται τόσο με τα ποσοστά εγκυμοσύνης (WHO, 1996; Zinaman et al., 2000) όσο και με την πιθανότητα σύλληψης (Bonde et al., 1998; Larsen et al., 2000). Για φυσιολογικές εκσπερμάσεις, όταν ο σπερματικός σωλήνας λειτουργεί φυσιολογικά και υπάρχει ένα διάστημα αποχής από σεξουαλικές επαφές ο αριθμός των σπερματοζωαρίων στην εκσπερμάτωση αντικατοπτρίζει την κατάσταση λειτουργίας των όρχεων (Handelsman et al., 1984; WHO, 1987; Andersen et al., 2000; Behre et al., 2000) και για τον λόγο αυτό αποτελεί ένα μέτρο της ικανότητας παραγωγής σπερματοζωαρίων (MacLeod & Wang, 1979). Η συγκέντρωση των σπερματοζωαρίων στο σπέρμα είναι άμεσα συνυφασμένη με την γονιμότητα και τα ποσοστά εγκυμοσύνης. Επηρεάζεται από τις εκκρίσεις του σπερματικού σωλήνα και του προστάτη και είναι μια μη ειδική τεχνική εκτίμησης της λειτουργίας των όρχεων (Eliasson, 1975).

Οι όροι *συνολικός αριθμός σπερματοζωαρίων* και *συγκέντρωση σπερματοζωαρίων* δεν είναι συνώνυμοι. Η συγκέντρωση αναφέρεται στον αριθμό των σπερματοζωαρίων ανά μονάδα όγκου και είναι ένα μέτρο κατά πόσο αραιό ή πυκνό είναι ένα δείγμα. Ο ολικός αριθμός των σπερματοζωαρίων αναφέρεται στον ολικό αριθμό των σπερματοζωαρίων σε μια εκσπερμάτωση και υπολογίζεται πολλαπλασιάζοντας την συγκέντρωση με τον όγκο του σπέρματος.

Κατώτερα όρια αναφοράς για την συγκέντρωση του σπέρματος:  $15 \times 10^6$ /ml.

Κατώτερα όρια αναφοράς για τον συνολικό αριθμό των σπερματοζωαρίων:  $39 \times 10^6$  ανά εκσπερμάτωση.

#### 1.6.5.1 Χαμηλός αριθμός σπερματοζωαρίων: Κρυπτοσπερμία και πιθανότητα αζωοσπερμίας

Αν δεν παρατηρηθούν σπερματοζωάρια τότε ορθά μπορεί να χαρακτηριστεί η κατάσταση ως αζωοσπερμία. Για να χρησιμοποιηθεί αυτός ο όρος είναι σημαντικό να μην παρατηρηθούν καθόλου σπερματοζωάρια στο ίζημα ενός φυγοκεντρημένου δείγματος (Eliasson, 1975).

Πρέπει όμως να λαμβάνονται σοβαρά υπόψη οι συνθήκες της φυγοκέντρωσης (χρόνος και στροφές) (Lindsay et al., 1995; Jaffe et al., 1998) καθώς επίσης και η ποσότητα του ιζήματος που εξετάζεται. Μετά από μια φυγοκέντρωση, η κινητικότητα και η συγκέντρωση μπορεί να υποτιμηθεί (Mortimer, 1994a; Cooper et al., 2006).



### 1.6.6 Υπολογισμός κυττάρων πέραν των σπερματοζωαρίων

Η παρουσία μη σπερματικών κυττάρων στο σπέρμα μπορεί να είναι ένδειξη της καταστροφής των όρχεων (ανώριμα σπερματικά κύτταρα), παθολογικής κατάστασης των αγωγών (ακτινωτοί θύσανοι) ή φλεγμονής των αδένων (λευκοκύτταρα). Ο αριθμός των μη σπερματικών κυττάρων στο σπέρμα (επιθηλιακά κύτταρα, “κυκλικά κύτταρα” ή μεμονωμένες ουρές και κεφαλές σπερματοζωαρίων) μπορεί να υπολογιστεί με την χρήση αιμοκυτταρόμετρου. Ωστόσο δείγματα που έχουν αραιωθεί προκειμένου να μετρηθούν τα σπερματοζωάρια μπορεί να βρίσκονται σε υπερβολικά αραιωμένη κατάσταση όσον αφορά την ακριβή εκτίμηση των μη σπερματικών κυττάρων. Θυμίζουμε ότι μια εναλλακτική μέθοδος για τον υπολογισμό των κυττάρων αυτών είναι η χρήση του ενζύμου περοξυδάσης.

Πίνακας 1: Συγκεντρωτικά τα όρια αναφοράς σύμφωνα με το WHO 2010 CRITERIA

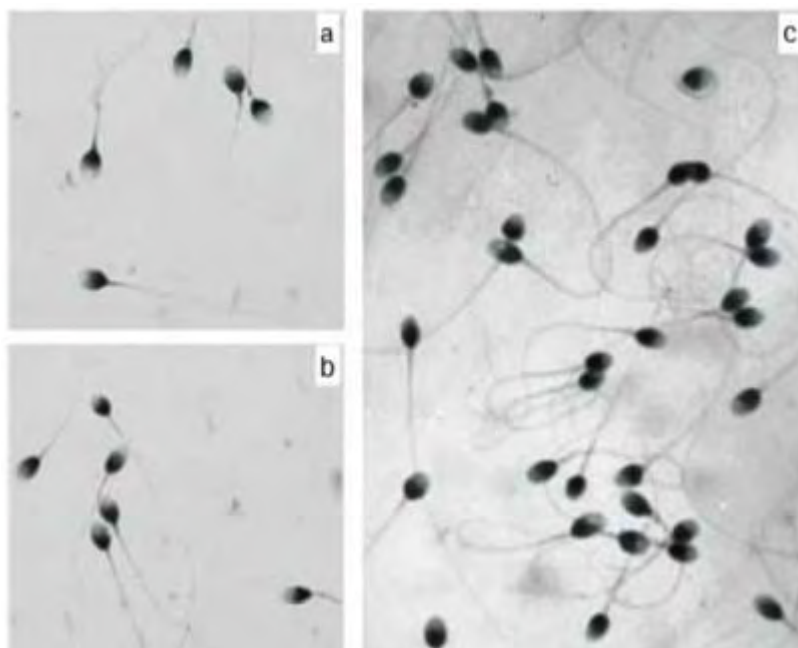
Παράμετροι	Κατώτερα όρια αναφοράς
Όγκος του σπέρματος (ml)	1.5 (1.4-1.7)
Ολικός αριθμός σπερματοζωαρίων ( $10^6$ /εκσπερμάτιση)	39 (33-46)
Συγκέντρωση του σπέρματος ( $10^6$ /ml)	15 (12-16)
Συνολική κινητικότητα (PR+NP, %)	40 (38-42)
Πρωθητική κινητικότητα (PR, %)	32 (31-34)
Ζωτικότητα (ζωντανά σπερματοζωάρια, %)	58 (55-63)
Μορφολογία σπερματοζωαρίων (φυσιολογικές δομές, %)	4 (3.0-4.0)
pH	$\geq 7.2$
Λευκοκύτταρα θετικά προς τη περοξυδάση ( $10^6$ ανά ml)	$< 1.0$
MAR test (κινητικά σπερματοζωάρια με δεσμευμένα σωματίδια, %)	$< 50$
Κινητικά σπερματοζωάρια με αναδιπλωμένα άκρα, %	$< 50$
Ψευδάργυρος του σπέρματος ( $\mu\text{mol}$ /εκσπερμάτιση)	$\geq 2.4$
Φρουκτόζη του σπέρματος ( $\mu\text{mol}$ /εκσπερμάτιση)	$\geq 13$
Γλυκοσιδάση του σπέρματος (mU/εκσπερμάτιση)	$\geq 20$

### 1.6.7 Τεχνικές χρώσης

Υπάρχουν διάφορες τεχνικές οι οποίες περιλαμβάνουν την χρήση χρωστικών και χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό των μορφολογικών χαρακτηριστικών των σπερματοζωαρίων. Οι πιο αποτελεσματικές χρωστικές που χρησιμοποιούνται πήραν το όνομα του επιστήμονα από τον οποίον ανακαλύφθηκαν και είναι οι εξής: Paranicolau, Shorr και Diff-Quick χρώσεις. Και με τις τρεις χρώσεις η κεφαλή του σπερματοζωαρίου χρωματίζεται με ανοιχτό μπλε χρώμα στην ακροσωμική περιοχή και σκούρο μπλε στην μετα-ακροσωμική περιοχή.

Σε κάθε περίπτωση αφού ακολουθηθεί το κατάλληλο πρωτόκολλο χρώσης ακολουθεί μικροσκοπική παρατήρηση σε μεγέθυνση 100x. Για την παραλαβή υψηλής πιστότητας εικόνων χρησιμοποιείται ένα υγρό με δείκτη διάθλασης (περίπου 1.5) όμοιο με αυτόν των κυττάρων και της αντικειμενοφόρου πλάκας. Το υγρό αυτό τοποθετείται μεταξύ του φακού και της καλυπτρίδας της αντικειμενοφόρου πλάκας

Εικόνα 3: (a,b) αποτελέσματα Shorr χρώσης σπερματοζωαρίων που απομονώθηκαν από την διάφανη ζώνη.(c) αποτελέσματα Papanicolaou χρώσης σπερματοζωαρίων που απομονώθηκαν από την ενδοτραχηλική μήτρα ύστερα από συνουσία.



(a,b) Liu et al. (2003). (c) Menkveld & Kruger (1990)

### 1.6.8 Μορφολογία των σπερματοζωαρίων

Η ποικιλία στην μορφολογία των ανθρώπινων σπερματοζωαρίων καθιστά δύσκολη την αξιολόγησή τους, ωστόσο παρατηρήσεις σπερματοζωαρίων τα οποία παρελήφθησαν από το γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα και συγκεκριμένα από την μετα-συνουσιακή ενδοτραχηλική βλέννα (Fredricsson & Björk, 1977; Menkveld et al., 1990) και την διάφανη ζώνη (Menkveld et al., 1991; Liu & Baker, 1992a) βοήθησαν στην εξαγωγή συμπερασμάτων για την πιθανή δομή των γόνιμων σπερματοζωαρίων .

Η φιλοσοφία του συστήματος κατηγοριοποίησης είναι να οριοθετήσει ποιος υποπληθυσμός σπερματοζωαρίων θεωρείται φυσιολογικός όσον αφορά την ικανότητα γονιμοποίησης. Χρησιμοποιώντας αυτές τις κατευθυντήριες γραμμές βρέθηκε ότι και σε γόνιμους και σε στείρους άντρες το ποσοστό των φυσιολογικών κυττάρων κυμαίνεται μεταξύ 0-30% και μάλιστα, πολύ λίγα δείγματα αποτελούνται από φυσιολογικά σπερματοζωάρια σε ποσοστό μεγαλύτερο του 25% (Menkveld et al., 2001).

Επιπρόσθετα, τα σπερματοζωάρια που απομονώθηκαν από την διαφανή ζώνη εμφανίζουν πολύ μεγάλες μορφολογικές ομοιότητες. Και σε αυτή την περίπτωση όμως, το εύρος των μορφολογικών διαφορών που παρουσίαζαν αυτά τα σπερματοζωάρια ήταν επίσης μεγάλο (Liu et al., 2003). Ένα κοινό χαρακτηριστικό είναι πως ελάχιστα σπερματοζωάρια εμφανίζουν ελαττωματικές δομές στην κεφαλή, στο μέσο και στο κυρίαρχο τμήμα.

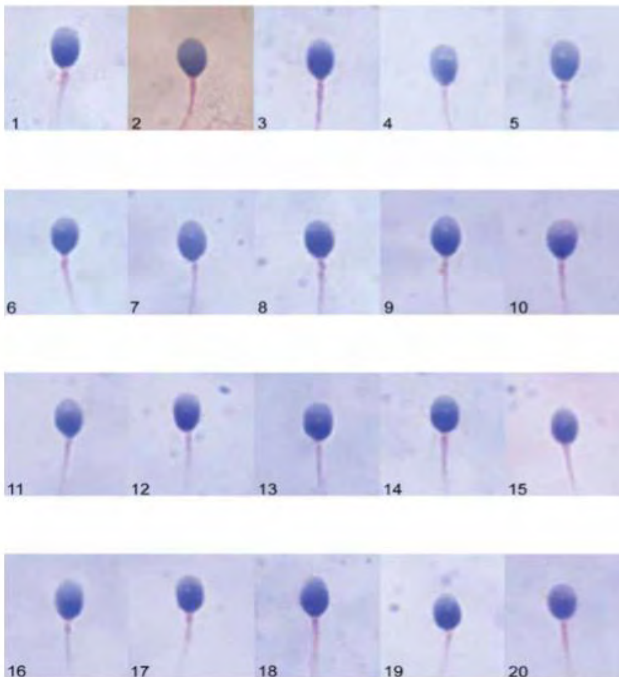
### 1.6.8.1 Κατηγοριοποίηση των μορφολογικά φυσιολογικών σπερματοζωαρίων

Κατά την αξιολόγηση της μορφολογίας των σπερματοζωαρίων πρέπει να αντιμετωπιστεί ένα πλήθος προβλημάτων. Τα προβλήματα αυτά σχετίζονται με την έλλειψη αντικειμενικότητας και με παραλλαγές κατά την ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

Όπως προαναφέρθηκε, ένα σπερματοζωάριο δομικά αποτελείται από την κεφαλή, τον λαιμό, το μέσο τμήμα, το κυρίαρχο τμήμα και ένα τελικό τμήμα. Το τελικό τμήμα είναι δύσκολο να παρατηρηθεί στο μικροσκόπιο και έτσι, το σπερματοζωάριο πρακτικά αποτελείται από την κεφαλή (με τον λαιμό) και την ουρά (μέσο και κυρίαρχο τμήμα). Για να θεωρηθεί ένα σπερματοζωάριο φυσιολογικό θα πρέπει τόσο η κεφαλή όσο και η ουρά να είναι μορφολογικά φυσιολογικά. Οτιδήποτε παρεκκλίνει των φυσιολογικών ορίων θα πρέπει να θεωρείται μη φυσιολογικό.

- Η κεφαλή θα πρέπει να είναι λεία, τμηματικά οργανωμένη και να έχει ένα σχετικά κυκλικό σχήμα. Στην κεφαλή εντοπίζεται μια διακριτή περιοχή που ονομάζεται ακροσωμική και αποτελεί το 40-70% του τμήματος της κεφαλής. Η ακροσωμική περιοχή δεν πρέπει να περιέχει μεγάλα κενοτόπια και μέχρι δυο μικρά κενοτόπια που συνολικά να καταλαμβάνουν το 20% της κεφαλής. Η μετα-ακροσωμική περιοχή δεν πρέπει να περιέχει κενοτόπια.
- Το μέσο τμήμα πρέπει να είναι λεπτό και να έχει περίπου το ίδιο μήκος με την κεφαλή. Ο κύριος άξονας πρέπει να είναι ευθυγραμμισμένος με τον κύριο άξονα της κεφαλής.
- Το κύριο τμήμα πρέπει να έχει ομοιόμορφο διαμέτρημα σε όλο του το μήκος και να είναι λεπτότερο από το μέσο τμήμα. Έχει μήκος περίπου 45μm (δηλαδή περίπου 10 φορές το μήκος της κεφαλής). Μπορεί να αναδιπλώνεται σχηματίζοντας έναν βρόχο αλλά όχι με οξεία γωνία.

Εικόνα 4: Παραδείγματα μορφολογικά φυσιολογικών σπερματοζωαρίων



Πίνακας 2: Αξιολόγηση μορφολογίας σπερματοζωαρίων

Εικόνα	Σχήμα κεφαλής	Σχόλια για το μέσο τμήμα	Γενική κατηγοριοποίηση
1	φυσιολογικό	φυσιολογικό	φυσιολογικό
2	φυσιολογικό	φυσιολογικό	φυσιολογικό
3	φυσιολογικό	φυσιολογικό	φυσιολογικό
4	φυσιολογικό	φυσιολογικό	φυσιολογικό
5	φυσιολογικό	φυσιολογικό	φυσιολογικό
6	φυσιολογικό	φυσιολογικό	φυσιολογικό
7	φυσιολογικό	φυσιολογικό	φυσιολογικό
8	φυσιολογικό	φυσιολογικό	φυσιολογικό
9	φυσιολογικό	φυσιολογικό	φυσιολογικό
10	φυσιολογικό	φυσιολογικό	φυσιολογικό
11	φυσιολογικό	φυσιολογικό	φυσιολογικό
12	φυσιολογικό	φυσιολογικό	φυσιολογικό
13	φυσιολογικό	φυσιολογικό	φυσιολογικό
14	φυσιολογικό	φυσιολογικό	φυσιολογικό
15	φυσιολογικό	φυσιολογικό	φυσιολογικό
16	φυσιολογικό	φυσιολογικό	φυσιολογικό
17	φυσιολογικό	φυσιολογικό	φυσιολογικό
18	φυσιολογικό	φυσιολογικό	φυσιολογικό
19	φυσιολογικό	φυσιολογικό	φυσιολογικό
20	φυσιολογικό	φυσιολογικό	φυσιολογικό













#### 1.6.8.2 Κατηγοριοποίηση μορφολογικά μη φυσιολογικών σπερματοζωαρίων.

Γενικά, ένα ανθρώπινο δείγμα σπέρματος αποτελείται από σπερματοζωάρια με διάφορους τύπους δομικών ανωμαλιών. Παθολογικές καταστάσεις της επιδιδυμίδας ή ελαττωματική σπερματογένεση μπορούν να αυξήσουν αισθητά τα ποσοστά των μορφολογικά μη φυσιολογικών σπερματοζωαρίων. Συνήθως τα μη φυσιολογικά σπερματοζωάρια είναι λιγότερο ή και καθόλου γόνιμα ανάλογα με τον τύπο της ανωμαλίας που φέρουν. Πολλές ελαττωματικές δομές έχουν συσχετιστεί με αυξημένα επίπεδα θρυμματισμού του DNA (Gandini et al., 2000), με ελαττωματικές χρωμοσωμικές δομές (Lee et al., 1996), με ανώριμο δίκτυο χρωματίνης (Dapoune et al., 1988) ή με καταστάσεις ανευπλοειδίας (Devillard et al., 2002; Martin et al., 2003). Κατά κύριο λόγο, έμφαση δίνεται σε ανωμαλίες της κεφαλής και ύστερα σε ανωμαλίες της ουράς.

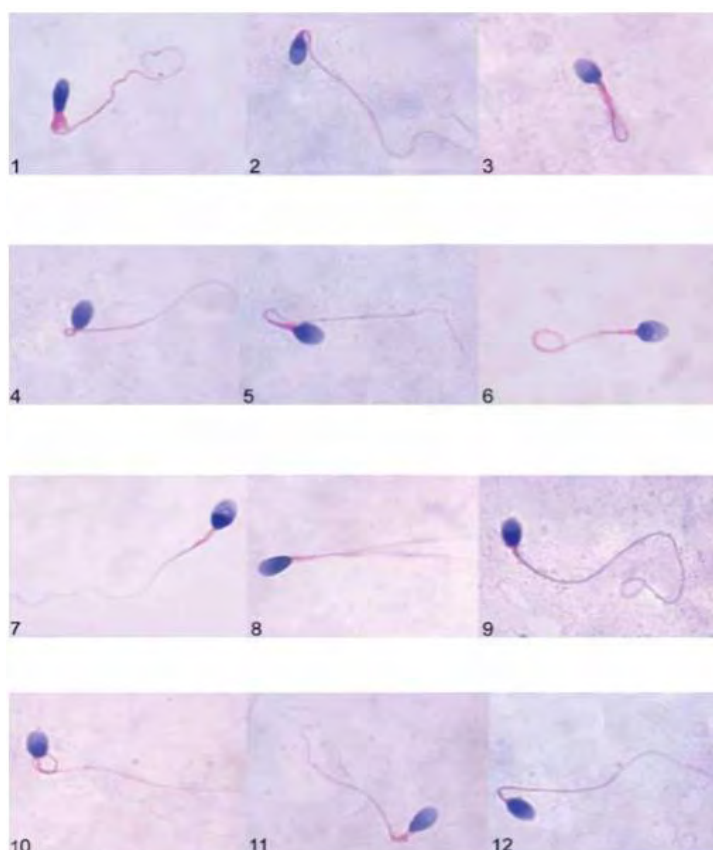
- Ανωμαλίες της κεφαλής: μεγάλη, μικρή, απιοειδής, άμορφη κεφαλή. Κεφαλή που αποτελείται από περισσότερα από δύο κενοτόπια ή η περιοχή των κενοτόπιων καταλαμβάνει >20% της συνολικής έκτασης της κεφαλής. Επίσης, τα κενοτόπια μπορεί να βρίσκονται στην μετα-ακροσωμική περιοχή. Ανωμαλίες της κεφαλής μπορεί να οφείλονται στην ακροσωμική περιοχή (<40% ή >70% της συνολικής έκτασης της κεφαλής). Τέλος, εντοπίζονται σπερματοζωάρια με δύο κεφαλές ή με συνδιασμούς των παραπάνω περιπτώσεων.
- Ανωμαλίες του λαιμού και του μέσου τμήματος: ασύμμετρη εισαγωγή του μέσου τμήματος στην κεφαλή, ακανόνιστο σχήμα, λυγισμένο, υπερβολικά λεπτό ή συνδιασμός αυτών.

- Ανωμαλίες του κυρίαρχου τμήματος (ουρά): κοντό, πολλαπλό, σπασμένο, απότομες κάμψεις, ακανόνιστο πλάτος, περιελιγμένο, δομή φουρκέτας ή συνδιασμός αυτών.
- Κυτταροπλασματική σταγόνα (Excess residual cytoplasm, ERC): σχετίζεται με την παραγωγή μη φυσιολογικών σπερματοζωαρίων λόγω λαθών που γίνονται κατά την διάρκεια της σπερματογένεσης. Τα σπερματοζώαρια αυτά χαρακτηρίζονται από μεγάλα κυτταροπλάσματα ακανόνιστου μεγέθους που καταλαμβάνουν >30% της κεφαλής.

Εικόνα 5: Μη φυσιολογικές δομές σπερματοζωαρίων

Φυσιολογική μορφή	
Άμορφες κεφαλές	
Μεγάλες (στρογγυλές) κεφαλές	
Μικρές κεφαλές (κεφαλές καρφίτσας)	
Επιμήκεις κεφαλές	
Διπλές κεφαλές	
Απουσία ουράς	
Ουρά φουρκέτας	
Περιελιγμένη ουρά	
Κεκαμμένη ουρά	
Πολλαπλή ουρά	
Κυτταροπλασματικό υπόλοιπο	

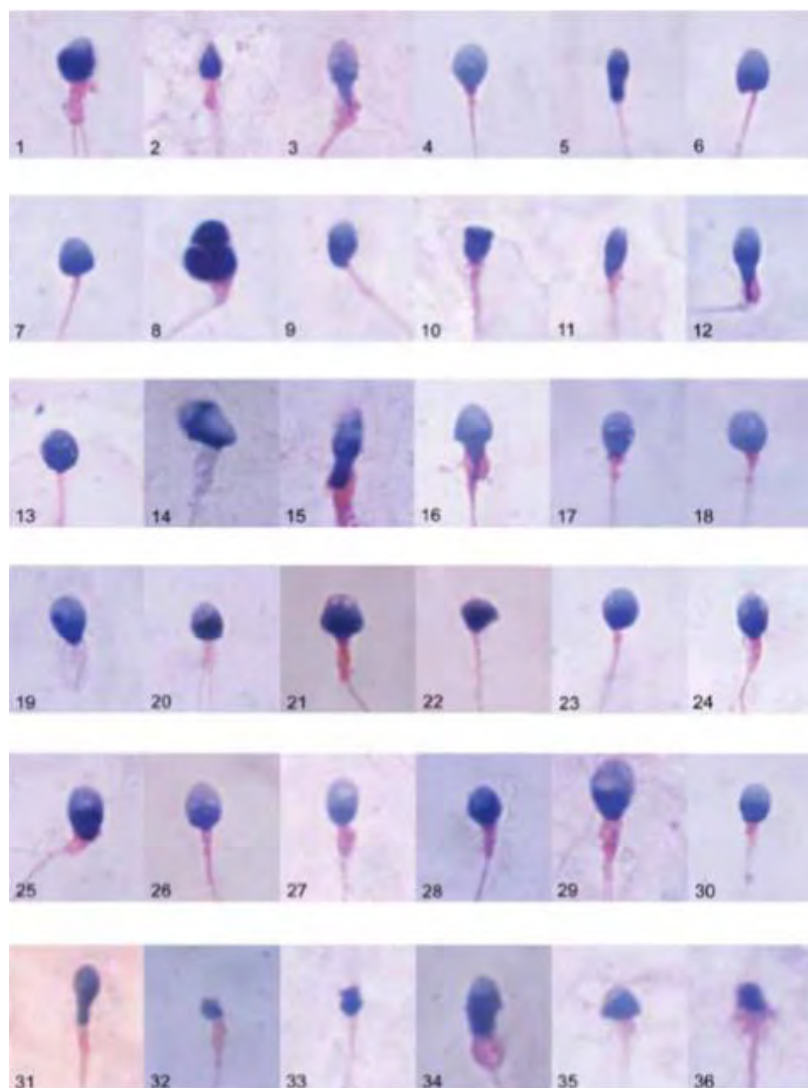
Εικόνα 6: Παραδείγματα μορφολογικά μη φυσιολογικών σπερματοζωαρίων



Πίνακας 3: Αξιολόγηση μορφολογίας σπερματοζωαρίων

Εικόνα	Σχήμα κεφαλής	Σχόλια για την κεφαλή	Σχόλια για το μέσο τμήμα	Σχόλια για το κυρίαρχο τμήμα	Γενική κατηγοριοποίηση
1	μη φυσιολογικό		ERC		μη φυσιολογικό
2	φυσιολογικό		Λυγισμένο	φυσιολογικό	μη φυσιολογικό
3	μη φυσιολογικό	>70% ακρ		βρόχος	μη φυσιολογικό
4	φυσιολογικό		Λυγισμένο	φυσιολογικό	μη φυσιολογικό
5	φυσιολογικό		πυκνό	βρόχος	μη φυσιολογικό
6	μη φυσιολογικό	PA κεν		σπειροειδές	μη φυσιολογικό
7	φυσιολογικό				φυσιολογικό
8	φυσιολογικό			διπλό	μη φυσιολογικό
9	μη φυσιολογικό			σπειροειδές	μη φυσιολογικό
10	μη φυσιολογικό		λυγισμένο, σημ.εισ	σπειροειδές	μη φυσιολογικό
11	φυσιολογικό		πυκνό	λυγισμένο	μη φυσιολογικό
12	φυσιολογικό		λυγισμένο	φυσιολογικό	μη φυσιολογικό

Εικόνα 7: Παραδείγματα μορφολογικά μη-φυσιολογικών σπερματοζωαρίων



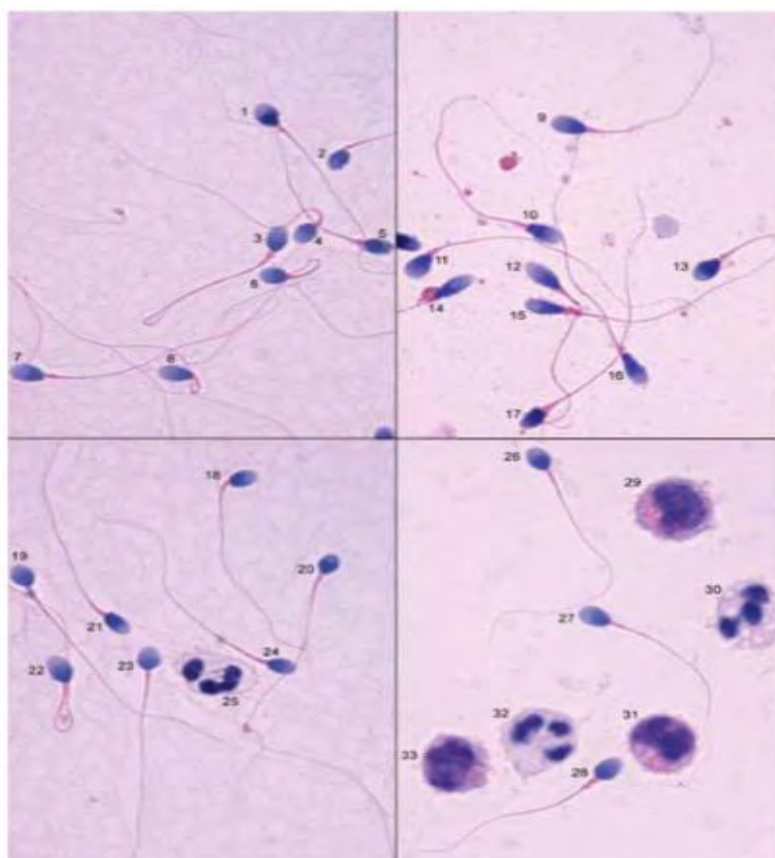
Πίνακας 4: Αξιολόγηση μορφολογίας σπερματοζωαρίων

Εικόνα	Σχήμα κεφαλής	Σχόλια για την κεφαλή	Σχόλια για το μέσο τμήμα	Σχόλια για το κυρίαρχο τμήμα	Γενική κατηγοριοποίηση	Γενικά σχόλια
1	μη φυσιολογικό	κωνικό	πυκνό		μη φυσιολογικό	
2	μη φυσιολογικό				μη φυσιολογικό	
3	μη φυσιολογικό		σημ.εξ		μη φυσιολογικό	
4	μη φυσιολογικό	σφαιρικό			μη φυσιολογικό	
5	μη φυσιολογικό	σφαιρικό			μη φυσιολογικό	
6	μη φυσιολογικό	κωνικό			μη φυσιολογικό	
7	μη φυσιολογικό	κωνικό			μη φυσιολογικό	
8	μη φυσιολογικό	άμορφο	πυκνό		μη φυσιολογικό	
9	μη φυσιολογικό	σφαιρικό	πυκνό		μη φυσιολογικό	
10	μη φυσιολογικό	κωνικό	σημ.εξ, πυκνό		μη φυσιολογικό	
11	-				-	2 κύτταρα

12	μη φυσιολογικό	>2 κεν, PA κεν			μη φυσιολογικό	
13	μη φυσιολογικό				μη φυσιολογικό	
14	φυσιολογικό	PA κεν			μη φυσιολογικό	
15	-				-	κεφαλή καρφίτσας
16	μη φυσιολογικό	μικρό			μη φυσιολογικό	
17	μη φυσιολογικό	μεγάλο			μη φυσιολογικό	
18	φυσιολογικό		πυκνό		μη φυσιολογικό	
19	μη φυσιολογικό		πυκνό		μη φυσιολογικό	
20	μη φυσιολογικό	>2 κεν	insert		μη φυσιολογικό	
21	φυσιολογικό	>70% ακρ			μη φυσιολογικό	
22	μη φυσιολογικό	>70% ακρ			μη φυσιολογικό	
23	μη φυσιολογικό	<40% ακρ, μικρό			μη φυσιολογικό	
24	μη φυσιολογικό	<40% ακρ, μικρό			μη φυσιολογικό	
25	μη φυσιολογικό	<40% ακρ, μικρό			μη φυσιολογικό	
26	μη φυσιολογικό	>70% ακρ			μη φυσιολογικό	
27	μη φυσιολογικό	<40% ακρ, >2 κεν	σημ.εξ		μη φυσιολογικό	
28	φυσιολογικό	>2 κεν			μη φυσιολογικό	
29	μη φυσιολογικό	κωνικό			μη φυσιολογικό	
30	μη φυσιολογικό	κωνικό			μη φυσιολογικό	
31	μη φυσιολογικό	κωνικό			μη φυσιολογικό	
32	φυσιολογικό		πυκνό		μη φυσιολογικό	
33	φυσιολογικό		πυκνό		μη φυσιολογικό	
34	μη φυσιολογικό	<40% ακρ	πυκνό		μη φυσιολογικό	
35	μη φυσιολογικό		πυκνό, λυγισμένο		μη φυσιολογικό	
36	-				-	κεφαλή καρφίτσας



Εικόνα 8: Παραδείγματα μορφολογικά μη φυσιολογικών σπερματοζωαρίων



Αριθμός	Σχήμα κεφαλής	Σχόλια για την κεφαλή	Σχόλια για το μέσο τμήμα	Σχόλια για το κυρίαρχο τμήμα	Γενική κατηγοριοποίηση	Γενικά σχόλια
1	μη φυσιολογικό		σημ. εισ.		μη φυσιολογικό	
2	μη φυσιολογικό		σημ. εισ.		μη φυσιολογικό	
3	φυσιολογικό		πυκνό	βρόχος	μη φυσιολογικό	
4	φυσιολογικό				φυσιολογικό	
5	μη φυσιολογικό	>2 κεν, <40% ακρ	πυκνό		μη φυσιολογικό	
6	φυσιολογικό			βρόχος	μη φυσιολογικό	
7	μη φυσιολογικό		σημ. εισ.		μη φυσιολογικό	
8	φυσιολογικό			βρόχος	μη φυσιολογικό	
9	μη φυσιολογικό	>70% ακρ, κωνικό			μη φυσιολογικό	
10	μη φυσιολογικό	κωνικό			μη φυσιολογικό	
11	φυσιολογικό		πυκνό		μη φυσιολογικό	2 κύτταρα
12	μη φυσιολογικό	κωνικό			μη φυσιολογικό	
13	φυσιολογικό	<40% ακρ	πυκνό		μη φυσιολογικό	
14	μη φυσιολογικό	κωνικό	πυκνό, ERC		μη φυσιολογικό	> ένα τρίτο
15	μη φυσιολογικό	κωνικό	πυκνό		μη φυσιολογικό	
16	μη φυσιολογικό	κωνικό			μη φυσιολογικό	
17	μη φυσιολογικό	άμορφο	πυκνό		μη φυσιολογικό	

18	φυσιολογικό				φυσιολογικό	
19	φυσιολογικό				μη φυσιολογικό	
20	μη φυσιολογικό				μη φυσιολογικό	
21	μη φυσιολογικό				μη φυσιολογικό	
22	φυσιολογικό	>70% ακρ		βρόχος	μη φυσιολογικό	
23	φυσιολογικό				φυσιολογικό	
24	φυσιολογικό				φυσιολογικό	
25						πολυμορφοπύρηνο
26	φυσιολογικό				φυσιολογικό	
27	φυσιολογικό				φυσιολογικό	
28	φυσιολογικό	>70% ακρ			μη φυσιολογικό	
29						μονοκύτταρο
30						πολυμορφοπύρηνο
31						μονοκύτταρο
32						πολυμορφοπύρηνο
33						μονοκύτταρο

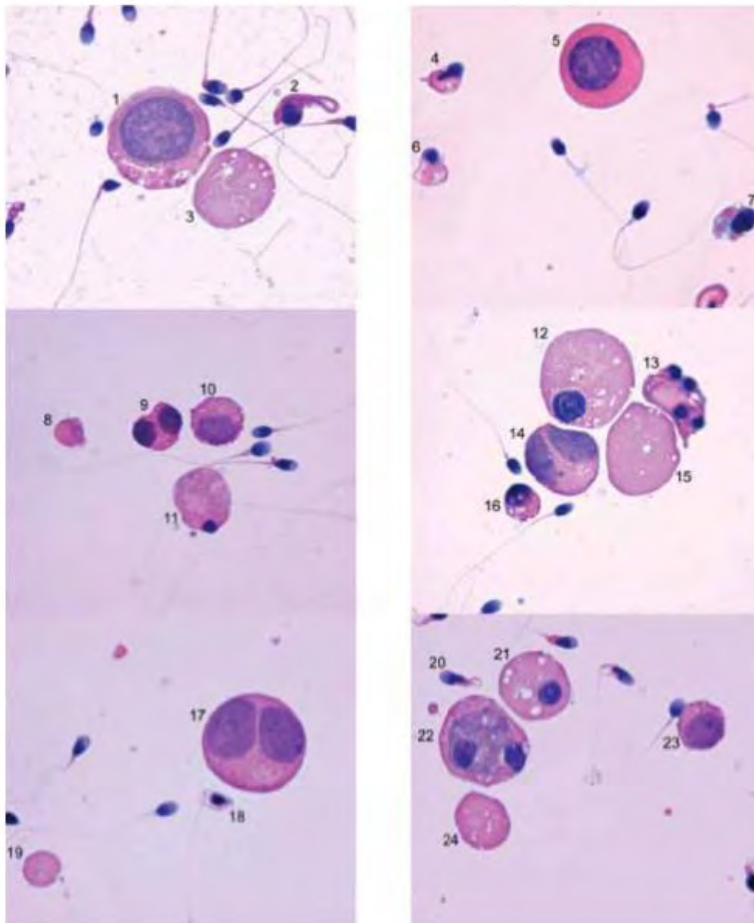
### 1.6.9 Αξιολόγηση των λευκοκυττάρων του σπέρματος

Τα λευκοκύτταρα, κυρίως τα πολυμορφοπύρηννα λευκοκύτταρα, βρίσκονται στην πλειοψηφία των ανθρώπινων εκσπερματίσεων (Tomlinson et al., 1993; Johanisson et al., 2000). Μπορούν να διακριθούν από τις σπερματίδες και τα σπερματοκύτταρα σε ένα δείγμα σπέρματος μέσω της τεχνικής χρώσης Papanicolaou. Αρκετές φορές τα πολυμορφοπύρηννα σπερματοζώαρια μπορούν λανθασμένα να αναγνωριστούν ως πολυμορφοπύρηννες σπερματίδες καθώς μορφολογικά μοιάζουν σε μεγάλο βαθμό. Σημαντική βοήθεια στην ταυτοποίηση παρέχει το μέγεθος των πυρήνων: στα μονοκύτταρα το μέγεθος του πυρήνα μπορεί να κυμαίνεται από 7μm στα λεμφοκύτταρα μέχρι και 15μm στα μακροφάγα. Ένας άλλος ενζυμικός τρόπος ταυτοποίησης και ποσοτικοποίησης των λευκοκυττάρων είναι η χρήση του ενζύμου περοξυδάση (Wolff, 1995; Johanisson et al., 2000).

### 1.6.10 Αξιολόγηση ανώριμων γεννητικών κυττάρων του σπέρματος

Τα γεννητικά κύτταρα συνήθως αποτελούν σπερματίδες και σπερματοκύτταρα, αλλά σπάνια σπερματογόνια. Μπορούν να ταυτοποιηθούν με την χρήση χρωστικών, όμως ορισμένες φορές είναι δύσκολο να διακριθούν από κύτταρα της φλεγμονής όταν αυτά εκφυλίζονται. Η ταυτοποίηση των γεννητικών κυττάρων βασίζεται σε τεχνικές χρώσεων, το μέγεθος και το σχήμα του πυρήνα, την απουσία ενδοκυττάριας περοξυδάσης και στην απουσία ειδικών για τα λευκοκύτταρα αντιγόνων. Όσον αφορά το μέγεθος του πυρήνα τα σπερματογόνια, που σπάνια βρίσκονται στο σπέρμα, έχουν πυρήνα μεγέθους 8μm, τα σπερματοκύτταρα έχουν πυρήνα μεγέθους 10μm και οι σπερματίδες περίπου 5μm.

Εικόνα 9: Παραδείγματα ανώριμων γεννητικών κυττάρων



Πίνακας 5: Πίνακας αξιολόγησης μορφολογίας σπερματοζωαρίων

Κύτταρο	Τύπος κυττάρου
1	μακροφάγο
2	μη φυσιολογικό σπερματοζώαριο
3	κυτταρόπλασμα
4	μη φυσιολογικό σπερματοζώαριο
5	σπερματοκύτταρο
6	μη φυσιολογικό σπερματοζώαριο
7	μη φυσιολογικό σπερματοζώαριο
8	κυτταρόπλασμα
9	εκφυλισμένη σπερματίδα
10	σπερματοκύτταρο
11	εκφυλισμένη σπερματίδα
12	σπερματίδα
13	εκφυλισμένη σπερματίδα
14	διαιρούμενη σπερματίδα
15	κυτταρόπλασμα
16	εκφυλισμένη σπερματίδα
17	διαιρούμενη σπερματίδα
18	μη φυσιολογικό σπερματοζώαριο
19	κυτταρόπλασμα
20	μη φυσιολογικό σπερματοζώαριο
21	σπερματίδα
22	μακροφάγο
23	σπερματοκύτταρο
24	κυτταρόπλασμα

Πίνακας 6: Πίνακας επεξήγησης συντομογραφιών

<40% ακρ	Λιγότερο από 40% της κεφαλής καταλαμβάνεται από το ακρόσωμα
>70% ακρ	Περισσότερο από 70% της κεφαλής καταλαμβάνεται από το ακρόσωμα
>ένα τρίτο	Μη φυσιολογικό κυτταρόπλασμα
<ένα τρίτο	Φυσιολογικό κυτταρόπλασμα
Άμορφο	Σχήμα κεφαλής
Λυγισμένο	Μη φυσιολογική γωνίωση
Κυτταρόπλασμα	Είτε περίσσεια κυτταροπλασματικού υπολείμματος είτε κυτταροπλασματική σταγόνα, εξαρτάται από το μέγεθος
CD	Κυτταροπλασματική σταγόνα
Επιθηλιακό κύτταρο	Από το ανδρικό αναπαραγωγικό σύστημα
ERC (Excess residual cytoplasm)	Περίσσεια κυτταροπλασματικού υπολείμματος
Κωνικό	Σχήμα κεφαλής
Κεν	Κενοτόπιο
>2 κεν	Περισσότερα από 2 κενοτόπια
If PP ok	Δεν απεικονίζεται ολόκληρο το κυρίαρχο τμήμα (αν είναι φυσιολογικό τότε και το σπέρμα πρέπει να θεωρηθεί φυσιολογικό)
Σημ.Εισ	Το σημείο εισόδου της ουράς μη συμμετρικά τοποθετημένο στον άξονα της κεφαλής
Σημ.Εξ	Ελαττωματικό σημείο εξόδου
Βρόχος	Ουρά αναδιπλωμένη στον εαυτό της
Μακροφάγο	Φαγοκυτταρικό λευκοκύτταρο
Μονοκύτταρο	Μονοπύρηνιο λευκοκύτταρο
Σπερματίδα	Ανώριμο γεννητικό κύτταρο
Επικάλυψη	Η κεφαλή σκιάζεται από την ουρά
PA κεν (post-acrosomal)	Κενοτόπιο στην μετα-ακροσωμική περιοχή
Κεφαλή καρφίτσας	Όχι σπέρμα, απουσία χρωματίνης
Πολυμορφοπύρηνιο	Πολυμορφοπύρηνιο λευκοκύτταρο
Απιοειδές	Σχήμα κεφαλής
Σφαιρικό	Σχήμα κεφαλής
Μικρό	Μέγεθος κεφαλής
Σπερματοκύτταρο	Ανώριμο γεννητικό κύτταρο
πυκνό, διπλό, μη φυσιολογικό, σπειροειδές, εκφυλισμένο λευκοκύτταρο, εκφυλισμένη σπερματίδα, ελαττωματικό	Αυτονόητες επεξηγήσεις

### 1.6.11 Έλεγχος του σπέρματος για την παρουσία αντισωμάτων

Γενικά, η παρουσία αντισωμάτων στο σπέρμα αποτελεί μια από τις κυρίες αιτίες συγκόλλησης των σπερματοζωαρίων μεταξύ τους (ουρά με ουρά, κεφαλή με κεφαλή, κεφαλή με ουρά). Βέβαια, απλά και μόνο η παρουσία τους στο σπέρμα δεν συνεπάγεται αυτόματα και συγκόλληση των σπερματοζωαρίων.

Τα αντισώματα του σπέρματος ( anti-sperm antibodies: ASAs) ανήκουν σχεδόν αποκλειστικά σε δυο τάξεις των ανοσοσφαιρινών: IgA και IgG. Οι ανοσοσφαιρίνες IgM λόγω του μεγάλου τους μεγέθους σπάνια ανιχνεύονται στο σπέρμα. Κλινικά πιο σημαντική κρίνεται η παρουσία αντισωμάτων IgA στο σπέρμα. Υπάρχουν δύο είδη δοκιμασιών για την ανίχνευση αντισωμάτων:

1. Άμεσες τεχνικές: είναι τεχνικές που ανιχνεύουν αντισώματα στα σπερματοζωάρια. Έχουν περιγραφεί δύο τέτοιες τεχνικές. Η μία ονομάζεται δοκιμασία ανίχνευσης

αντισωμάτων σπέρματος (MAR) (Bronson et al., 1984) και η δεύτερη δοκιμασία ανοσοσφαιριδίων (IB) (Bronson et al., 1982; Clarke et al., 1982,1985). Τα πρωτόκολλα των τεχνικών αυτών ποικίλουν αρκετά αλλά και τα δύο απαιτούν την παρατήρηση σε μικροσκόπιο.

2. Έμμεσες τεχνικές: είναι τεχνικές που ανιχνεύουν αντισώματα στο σπέρμα. Σε αυτές τις τεχνικές, το διάλυμα που εξετάζεται για την παρουσία ASAs έχει αραιωθεί και απενεργοποιηθεί με θέρμανση. Το διάλυμα αυτό επωάζεται με σπερματοζωάρια δοτή τα οποία δεν περιέχουν αντισώματα ούτε σπερματικό υγρό. Αν υπάρχουν ASAs τότε αυτά θα προσκολληθούν στα σπερματοζωάρια του δοτή, τα οποία στη συνέχεια ταυτοποιούνται με μία από τις άμεσες τεχνικές. Για την παραλαβή αξιόπιστων συμπερασμάτων είναι σημαντικό η επώαση να κρατήσει αρκετή ώρα για να πραγματοποιηθούν οι απαραίτητες αντιδράσεις (συνήθως 10 λεπτά). Δεν πρέπει να ξεχνάμε όμως, ότι καθώς ο χρόνος περνάει η κινητικότητα των σπερματοζωαρίων μειώνεται και η επιτυχία του τεστ είναι άμεσα συνυφασμένη με την κινητικότητα.

Με καμιά από τις προαναφερθείσες τεχνικές δεν μπορούν να ανιχνευτούν κυτταροτοξικά αντισώματα τα οποία σκοτώνουν σπερματοζωάρια.

**Πίνακας 7: Συγκεντρωτικά οι παθολογικές καταστάσεις του σπέρματος**

Αζωοσπερμία	Απουσία σπερματοζωαρίων στην εκσπερμάτιση.
Αιμοσπερμία (ή αιματοσπερμία)	Παρουσία ερυθροκυττάρων στην εκσπερμάτιση.
Ασθenoσπερμία	Ποσοστό σπερματοζωαρίων με προωθητική κίνηση μικρότερη του φυσιολογικού.
Ασθενoτερατοσπερμία	Ποσοστά σπερματοζωαρίων με προωθητική κίνηση και μορφολογικά φυσιολογικών σπερματοζωαρίων κάτω από τα όρια αναφοράς.
Ασπερμία	Όγκος εκσπερμάτισης μηδενικός.
Κρυπτοσπερμία	Απουσία σπερματοζωαρίων στην εκσπερμάτιση σε πρώτη εκτίμηση, αλλά ύπαρξη τους σε μικρή συγκέντρωση μετά από φυγοκέντρωση.
Λευκοσπερμία (ή λευκοκυτταροσπερμία)	Παρουσία λευκοκυττάρων στην εκσπερμάτιση μεγαλύτερη του φυσιολογικού.
Νεκροσπερμία	Μικρό ποσοστό ζωντανών και υψηλό ποσοστό ακίνητων σπερματοζωαρίων στην εκσπερμάτιση.
Ολιγοασθενoσπερμία	Ολική συγκέντρωση σπερματοζωαρίων και ποσοστό σπερματοζωαρίων με προωθητική κίνηση κάτω από τα όρια αναφοράς.
Ολιγοασθενoτερατοσπερμία	Ολική συγκέντρωση σπερματοζωαρίων και ποσοστά μορφολογικά φυσιολογικών σπερματοζωαρίων και σπερματοζωαρίων με προωθητική κίνηση κάτω από τα όρια αναφοράς.
Ολιγοσπερμία	Ολική συγκέντρωση σπερματοζωαρίων κάτω από τα όρια αναφοράς.
Ολιγοτερατοσπερμία	Ολική συγκέντρωση σπερματοζωαρίων και ποσοστό μορφολογικά φυσιολογικών σπερματοζωαρίων κάτω από τα όρια αναφοράς.
Τερατοζωοσπερμία	Ποσοστό μορφολογικά φυσιολογικών σπερματοζωαρίων κάτω από τα όρια αναφοράς .

## 1.7. Ανδρική Υπογονιμότητα

Η ανδρική υπογονιμότητα σχετίζεται με τη χαμηλή παραγωγή σπερματοζωαρίων, με την ακινησία, ή την αστοχία τους, καθώς και με τα εμπόδια που αποτρέπουν την έξοδο του σπέρματος. Ασθένειες, τραυματισμοί, χρόνια προβλήματα υγείας, επιλογές του τρόπου ζωής, και άλλοι παράγοντες μπορούν να εμπλακούν στην αιτία της ανδρικής υπογονιμότητας.

Η ανδρική γονιμότητα είναι μια σύνθετη διαδικασία. Για να πραγματοποιηθεί η σύλληψη πρέπει να συμβούν τα ακόλουθα:

Για να μπορέσουν να παραχθούν υγιή σπερματοζωάρια, προϋπόθεση είναι η ανάπτυξη και ο σχηματισμός των ανδρικών αναπαραγωγικών οργάνων κατά τη διάρκεια της εφηβείας. Τουλάχιστον ο ένας από τους δύο όρχεις θα πρέπει να λειτουργεί σωστά και το σώμα να παράγει τεστοστερόνη και άλλες ορμόνες απαραίτητες για την ενεργοποίηση και τη διατήρηση της παραγωγής σπερματοζωαρίων. Μόλις τα σπερματοζωάρια παραχθούν από τους όρχεις, λεπτοί σωλήνες τα μεταφέρουν για να αναμιχθούν με το σπερματικό υγρό και κατά την εκσπερμάτιση να εξαχθούν από το πέος. Είναι σημαντικό να υπάρχουν αρκετά σπερματοζωάρια στο σπέρμα. Εάν ο αριθμός τους είναι μικρός, μειώνονται οι πιθανότητες ένα από αυτά να γονιμοποιήσει το ωάριο. Χαμηλή θεωρείται η συγκέντρωση των σπερματοζωαρίων, όταν αναλογούν λιγότερα από 15 εκατομμύρια σπερματοζωάρια ανά ml σπέρματος, ή λιγότερα από 39 εκατομμύρια ανά εκσπερμάτιση. Τα σπερματοζωάρια πρέπει να έχουν σωστό σχήμα και ικανότητα κίνησης. Αν η κινητικότητα τους, ή η μορφολογία των σπερματοζωαρίων δεν είναι φυσιολογικές, είναι πολύ πιθανό να μην καταφέρουν να φτάσουν στο ωάριο.

### 1.7.1 Αιτίες υπογονιμότητας

#### 1.7.1.1 Ιατρικές αιτίες:

Τα προβλήματα στην ανδρική γονιμότητα μπορεί να προκληθούν από διάφορα ζητήματα υγείας και ιατρικές θεραπείες εκ των οποίων κάποια είναι:

- *Κιρσοκήλη:* Πρόκειται για ένα οίδημα των φλεβών που καταλήγουν στους όρχεις και συνιστά βασική αιτία της ανδρικής υπογονιμότητας, γιατί περιορίζει τη φυσιολογική διαδικασία μείωσης της θερμοκρασίας στον όρχη και οδηγεί σε λιγότερα σπερματοζωάρια και μικρότερη κινητικότητα.
- *Λοιμώξεις:* Κάποιες λοιμώξεις είναι πιθανό να επηρεάσουν την παραγωγή και την υγεία των σπερματοζωαρίων, ή να προκαλέσουν έλκη που εμποδίζουν τη δίοδο του σπέρματος. Αυτές περιλαμβάνουν κάποια σεξουαλικά μεταδιδόμενα νοσήματα, όπως είναι τα χλαμύδια και η γονόρροια, η φλεγμονή στον προστάτη (προστατίτιδα) και η φλεγμονή των όρχεων εξαιτίας της παρωτίτιδας (παρωτιτιδική ορχίτιδα).
- *Προβλήματα με την εκσπερμάτιση:* Η παλίνδρομη εκσπερμάτιση συμβαίνει όταν το προϊόν της εκσπερμάτισης εισέρχεται στην ουροδόχο κύστη κατά τον οργανισμό, αντί να εξέρχεται από την κορυφή του πέους. Διάφορα προβλήματα υγείας μπορούν να προκαλέσουν την παλίνδρομη εκσπερμάτιση, συμπεριλαμβανομένων του διαβήτη, των τραυματισμών της σπονδυλικής στήλης, της λήψης φαρμάκων και του

χειρουργείου στην ουροδόχο κύστη, τον προστάτη, ή την ουρήθρα. Κάποιοι άνδρες με τραυματισμούς στη σπονδυλική στήλη, ή συγκεκριμένα νοσήματα δεν εκσπερματίζουν, αν και παράγουν φυσιολογικά σπερματοζωάρια.

- *Αντισώματα που επιτίθενται στα σπερματοζωάρια:* Πρόκειται για κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, τα οποία λανθασμένα αναγνωρίζουν τα σπερματοζωάρια ως βλαβερούς εισβολείς και επιχειρούν να τα εξαλείψουν.
- *Όγκοι:* Τόσο οι καρκινικοί, όσο και οι καλοήθεις όγκοι μπορεί να προσβάλουν τα ανδρικά αναπαραγωγικά όργανα απευθείας ή να επηρεάσουν τους αδένες, όπως είναι η υπόφυση που απελευθερώνουν ορμόνες απαραίτητες για την αναπαραγωγή. Σε κάποιες περιπτώσεις το χειρουργείο, η ακτινοβολία ή η χημειοθεραπεία που διεξάγονται για την αντιμετώπιση του όγκου, βάλλουν την ανδρική γονιμότητα.
- *Κρυψορχία:* Σε κάποια αγόρια κατά την εμβρυική ζωή ο ένας ή και οι δύο όρχεις δεν καταφέρνουν να κατέβουν από την κοιλιακή χώρα στο όσχεο. Είναι πιθανό οι άνδρες που είχαν κρυψορχία να είναι λιγότερο γόνιμοι.
- *Ορμονικές διαταραχές:* Η υπογονιμότητα μπορεί να είναι το αποτέλεσμα διαταραχής στη λειτουργία των όρχεων ή να οφείλεται σε μη φυσιολογική λειτουργία άλλων ορμονικών συστημάτων που περιλαμβάνουν τον υποθάλαμο, την υπόφυση, τον θυροειδή αδένα και τα επινεφρίδια. Η χαμηλή τεστοστερόνη (ανδρικός υπογοναδισμός) και τα άλλα ορμονικά προβλήματα έχουν έναν αριθμό υποκείμενων αιτιών.
- *Ελλείμματα του σπερματικού πόρου:* Οι σωλήνες που μεταφέρουν τα σπερματοζωάρια μπορεί να προσβληθούν από κάποια ασθένεια ή έναν τραυματισμό. Σε κάποιους άνδρες το εμπόδιο δημιουργείται στο τμήμα του όρχεως που συγκεντρώνει το σπέρμα, την επιδιδυμίδα, σε κάποιους άλλους στον έναν, ή και τους δύο πόρους που μεταφέρουν τα σπερματοζωάρια έξω από τους όρχεις. Οι άνδρες που πάσχουν από κυστική ίνωση, ή από κάποια άλλη κληρονομούμενη νόσο, είναι πιθανό να γεννηθούν χωρίς σπερματικούς πόρους.
- *Χρωμοσωμικά ελλείμματα:* Οι κληρονομούμενες διαταραχές όπως είναι το σύνδρομο Klinefelter, στο οποίο ένας άνδρας γεννιέται με δύο X χρωμοσώματα κι ένα Y αντί για ένα X κι ένα Y που είναι το φυσιολογικό, προκαλούν διαταραγμένη ανάπτυξη των ανδρικών αναπαραγωγικών οργάνων. Άλλα γενετικά σύνδρομα που σχετίζονται με την υπογονιμότητα περιλαμβάνουν την κυστική ίνωση, το σύνδρομο του Kallmann, του Young και του Kartagener.
- *Προβλήματα κατά τη συνουσία:* Περιλαμβάνουν τη δυσκολία στην επίτευξη, ή διατήρηση μιας στύσης ικανής για συνουσία (στυτική δυσλειτουργία), την πρόωρη εκσπερμάτιση, την επώδυνη συνουσία, διάφορες ανατομικές ανωμαλίες, όπως είναι ο υποσπαδίας, κατάσταση κατά την οποία το ουρηθρικό στόμιο βρίσκεται στην κάτω πλευρά του πέους, καθώς και ψυχολογικά προβλήματα, ή προβλήματα στη σχέση που επηρεάζουν τη σεξουαλική πράξη.
- *Κοιλιοκάκη:* Είναι μια διαταραχή στην πέψη που προκαλείται από μια ευαισθησία του οργανισμού στη γλουτένη και μπορεί να προκαλέσει ανδρική υπογονιμότητα. Η γονιμότητα μπορεί να βελτιωθεί μετά από την υιοθέτηση μιας διατροφής χωρίς γλουτένη.

- **Φάρμακα:** Η θεραπεία υποκατάστασης της τεστοστερόνης, η μακροπρόθεσμη χρήση αναβολικών στεροειδών, η χημειοθεραπεία, κάποια αντιμυκητιασικά φάρμακα, ορισμένα φάρμακα για το έλκος, καθώς και κάποια άλλα φάρμακα μπορεί να διαταράξουν τη φυσιολογική παραγωγή των σπερματοζωαρίων και να μειώσουν την αναπαραγωγική ικανότητα του άνδρα.

#### 1.7.1.2 Περιβαλλοντικές αιτίες:

Η υπερέκθεση σε συγκεκριμένα περιβαλλοντικά στοιχεία που περιλαμβάνουν υψηλή θερμοκρασία, τοξίνες και χημικές ουσίες μπορεί να μειώσουν την παραγωγή και τη λειτουργία των σπερματοζωαρίων. Οι συγκεκριμένες περιβαλλοντικές αιτίες της υπογονιμότητας περιλαμβάνουν:

- **Βιομηχανικά χημικά:** η εκτεταμένη έκθεση σε ουσίες όπως είναι το βενζένιο, το ξυλένιο, το τολουένιο, τα παρασιτοκτόνα, τα ζιζανιοκτόνα, οι οργανικοί διαλύτες, τα υλικά βαφής και το μόλυβδο μπορεί να συμβάλλει στο μειωμένο αριθμό σπερματοζωαρίων.
- **Η έκθεση σε βαρέα μέταλλα:** Η έκθεση στο μόλυβδο, ή σε άλλα βαρέα μέταλλα μπορεί επίσης να προκαλέσει υπογονιμότητα.
- **Ακτινοβολία:** Η έκθεση σε ακτινοβολία μπορεί να μειώσει την παραγωγή σπέρματος αν και συχνά επανέρχεται σε φυσιολογικά επίπεδα. Σε υψηλές δόσεις ακτινοβολίας ωστόσο, η παραγωγή σπερματοζωαρίων μπορεί να υποστεί μια μόνιμη μείωση.
- **Η υπερθέρμανση των όρχεων:** Η συχνή χρήση της σάουνας, ή τα ζεστά μπάνια, μπορεί να μειώσουν παροδικά τον αριθμό των σπερματοζωαρίων. Η υιοθέτηση της καθιστής στάσης για μεγάλα χρονικά διαστήματα, η επιλογή στενών ενδυμάτων, ή η εργασία με ατ για πολύ ώρα, μπορεί να αυξήσουν τη θερμοκρασία στο όσχεο και να μειώσουν ελαφρώς την παραγωγή σπερματοζωαρίων.

#### 1.7.1.3 Αιτίες που σχετίζονται με την υγεία και τον τρόπο ζωής

- **Στεροειδή:** Η λήψη των αναβολικών στεροειδών για τη διέγερση της μυϊκής δύναμης και ανάπτυξης μπορεί να προκαλέσουν συρρίκνωση των όρχεων και μείωση της παραγωγής σπερματοζωαρίων.
- **Κατανάλωση αλκοόλ:** Η κατανάλωση αλκοόλ μπορεί να μειώσει τα επίπεδα τεστοστερόνης, να προκαλέσει στυτική δυσλειτουργία και να μειώσει την παραγωγή σπερματοζωαρίων. Νοσήματα του ήπατος που προκαλούνται από την κατάχρηση αλκοόλ, μπορεί επίσης να οδηγήσουν σε προβλήματα υπογονιμότητας.
- **Επάγγελμα:** Κάποια επαγγέλματα αυξάνουν το κίνδυνο υπογονιμότητας, συμπεριλαμβανομένων αυτών που σχετίζονται με εκτεταμένη χρήση υπολογιστών, εναλλασσόμενο ωράριο κι εργασιακό στρες.
- **Κάπνισμα:** Οι άνδρες που καπνίζουν μπορεί να έχουν μικρότερη συγκέντρωση σπερματοζωαρίων, σε σύγκριση με αυτούς που δεν καπνίζουν. Το παθητικό κάπνισμα μπορεί επίσης να επηρεάσει την ανδρική γονιμότητα.



- *Συναισθηματικό στρες*: Το στρες μπορεί να αλληλεπιδράσει με συγκεκριμένες ορμόνες, απαραίτητες για την παραγωγή σπερματοζωαρίων. Το σοβαρό και παρατεταμένο στρες που συχνά σχετίζεται με την υπογονιμότητα μπορεί να επηρεάσει τον αριθμό των σπερματοζωαρίων.
- *Σωματικό βάρος*: Η παχυσαρκία μπορεί να προκαλέσει ορμονικές αλλαγές με επίπτωση στην ανδρική γονιμότητα.
- *Παρατεταμένη ποδηλασία*: Συνιστά έναν ακόμα αιτιολογικό παράγοντα της ανδρικής υπογονιμότητας εξαιτίας της υπερθέρμανσης των όρχεων που προκαλεί. Σε κάποιες περιπτώσεις, η πίεση από το κάθισμα του ποδηλάτου στο περίνεο, τη περιοχή πίσω από τους όρχεις, μπορεί να προκαλέσει μούδιασμα στο πέος και στυτική δυσλειτουργία

### 1.7.2 Διάγνωση Ανδρικής Υπογονιμότητας

Σε περιπτώσεις πολλών ζευγαριών μπορεί να συντρέχουν παραπάνω από μια αιτίες για το πρόβλημα υπογονιμότητας που αντιμετωπίζουν. Συχνά χρειάζεται να διεξαχθεί ένας αριθμός εξετάσεων για να καθοριστεί η αιτία της υπογονιμότητας, αν και κάποιες φορές δεν είναι δυνατός ο καθορισμός της. Οι διαγνωστικές εξετάσεις για τα προβλήματα υπογονιμότητας συνήθως περιλαμβάνουν:

*Γενική φυσική κατάσταση και ιατρικό ιστορικό*: Περιλαμβάνει την εξέταση των γεννητικών οργάνων και τη λήψη ιστορικού σχετικά με κληρονομούμενες καταστάσεις, χρόνια προβλήματα υγείας, ασθένειες, τραυματισμούς ή χειρουργεία που θα μπορούσαν να επηρεάσουν τη γονιμότητα. Ο ιατρός μπορεί επίσης να ρωτήσει σχετικά με τις σεξουαλικές συνήθειες και τη σεξουαλική ανάπτυξη κατά τη διάρκεια της εφηβείας.

*Ανάλυση σπέρματος*: Το σπέρμα που παράγεται μέσω της αυτοϊκανοποίησης τοποθετείται κατά την εκσπερμάτιση μέσα ένα ειδικό δοχείο. Η όλη διαδικασία λαμβάνει χώρα στο ιατρείο και το σπέρμα αποστέλλεται σε εργαστήριο για να εκτιμηθούν η ποσότητα, η κινητικότητα και η μορφολογία των σπερματοζωαρίων. Το εργαστήριο επίσης θα ελέγξει το σπέρμα για προβλήματα, όπως είναι για παράδειγμα οι λοιμώξεις. Συχνά υπάρχει μια διακύμανση στις τιμές των σπερματοζωαρίων ανάμεσα στα δείγματα και για αυτό τις περισσότερες φορές γίνονται διαδοχικές αναλύσεις δειγμάτων, ώστε να διασφαλιστεί ένα αξιόπιστο αποτέλεσμα. Εάν η ανάλυση σπέρματος είναι φυσιολογική, ο ιατρός είναι πιθανό να συστήσει τον έλεγχο της αναπαραγωγικής υγείας του συντρόφου πριν συνεχίσει με περαιτέρω εξετάσεις για την ανδρική υπογονιμότητα.

Οι επιπλέον εξετάσεις που μπορεί να βοηθήσουν στον εντοπισμό της αιτίας της ανδρικής υπογονιμότητας περιλαμβάνουν:

*Υπερηχογράφημα όσχεος*: Κατά την εξέταση αυτή χρησιμοποιούνται ηχητικά κύματα υψηλής συχνότητας για την παραγωγή εικόνων μέσα στο σώμα. Το υπερηχογράφημα όσχεος θα βοηθήσει τον ιατρό να δει τυχόν εμπόδια, ή άλλα προβλήματα που υπάρχουν στους όρχεις, ή τις υποστηρικτικές δομές.

*Διορθικός υπέρηχος:* Μια μικρή ράβδος εισέρχεται με τη βοήθεια λιπαντικού από το ορθό και βοηθά στον έλεγχο του προστάτη. Ο ιατρός μπορεί να εξετάσει τη διαβατότητα των σωληνίσκων και των πόρων που μεταφέρουν το σπέρμα.

*Ορμονικές εξετάσεις:* Οι ορμόνες που παράγονται από την υπόφυση, τον υποθάλαμο και τους όρχεις παίζουν σημαντικό ρόλο στη σεξουαλική ανάπτυξη και την παραγωγή σπερματοζωαρίων. Οι ανωμαλίες σε άλλα ορμονικά, ή οργανικά συστήματα, μπορεί επίσης να συνεισφέρουν στην υπογονιμότητα. Μια εξέταση αίματος μετρά τα επίπεδα της τεστοστερόνης και των άλλων ορμονών.

*Ανάλυση ούρων μετά από εκσπερμάτιση:* Η ανεύρεση σπερματοζωαρίων στα ούρα μπορεί να δείχνει ότι αντί να εξαχθούν από το πέος κατά την εκσπερμάτιση, τα σπερματοζωάρια επιστρέφουν στην ουροδόχο κύστη, κατάσταση η οποία ονομάζεται παλίνδρομη εκσπερμάτιση.

*Γενετικά τεστ:* Όταν η συγκέντρωση των σπερματοζωαρίων είναι πολύ χαμηλή, μπορεί να εμπλέκονται γενετικοί λόγοι. Μια εξέταση αίματος μπορεί να αποκαλύψει εάν υπάρχουν λεπτές αλλαγές στο Ψ χρωμόσωμα, το οποίο είναι σημάδι γενετικής ανωμαλίας. Τα γενετικά τεστ μπορεί επίσης να διεξαχθούν για τη διάγνωση διάφορων συγγενών ή κληρονομούμενων συνδρόμων.

*Βιοψίες όρχεων:* Το τεστ διεξάγεται με τη συλλογή δείγματος από τον όρχη με τη βοήθεια μιας βελόνας. Τα αποτελέσματα της βιοψίας θα δείξουν εάν η παραγωγή σπερματοζωαρίων είναι φυσιολογική. Εάν είναι, τότε μάλλον το πρόβλημα βρίσκεται στη μεταφορά των σπερματοζωαρίων.

*Εξέταση αντισπερμικών αντισωμάτων.* Η εξέταση αυτή ελέγχει εάν υπάρχουν κύτταρα του ανοσοποιητικού, αντισώματα δηλαδή, που επιτίθενται στα σπερματοζωάρια. Είναι πολύ πιθανό να υπάρχουν τα αντισώματα αυτά μετά από τη διεξαγωγή χειρουργείου αναστροφής βαζεκτομής.

*Εξειδικευμένα τεστ για τη λειτουργία των σπερματοζωαρίων:* Μπορεί να χρησιμοποιηθούν για τον έλεγχο της βιωσιμότητας των σπερματοζωαρίων μετά την εκσπερμάτιση, την ικανότητα τους να διεισδύσουν σε ένα ωάριο, καθώς και για τον εντοπισμό προβλημάτων κατά την προσκόλληση τους σε αυτό. Εάν ο αριθμός των σπερματοζωαρίων που έχει ένας άνδρας είναι χαμηλός, τότε το να είναι υγιή τα σπερματοζωάρια αυτά, είναι πολύ σημαντικός παράγοντας για τη γονιμότητα

## 2. Σκοπός:

Όπως είδαμε και παραπάνω, η λειτουργία των μιτοχονδρίων των σπερματοζωαρίων συμβάλει σε πολύ μεγάλο βαθμό στην ποιότητα του σπέρματος. Η ελαττωματική ή μειωμένη λειτουργικότητα τους συνεπάγεται με μειωμένη κινητικότητα των σπερματοζωαρίων, άρα και με κακή ποιότητα του σπέρματος. Για τον λόγο αυτό, έγινε μία προσπάθεια με εφαρμογή ειδικών φθοριζόντων ιχνηθετών και χρήση μικροσκοπίας φθορισμού, έλεγχου της πιθανής συσχέτισης της λειτουργικότητας και κατανομής των μιτομιτοχονδρίων, με την ποιότητα του σπέρματος, η οποία ενδεχομένως να μπορεί να αξιοποιηθεί μελλοντικά σαν δείκτης γονιμότητας δειγμάτων σπέρματος. Πρόκειται για μια σχετικά σύντομη πειραματική διαδικασία ποιοτικής αλλά και ποσοτικής εκτίμησης μιτοχονδριακού σήματος με άμεσα αποτελέσματα.

## 3. Πειραματικό μέρος

### 3.1 Όργανα/ Υλικά:

#### 3.1.1 Όργανα:

- Φωτόμετρο Spectronic® 20 GENESYS™
- Incubator: New Brunswick (an Eppendorf Company) Galaxy 170S
- Μικροσκόπιο φθορισμού: LEICA DM 2000
- Ψυχόμενη κάμερα φθορισμού: OPTIMOS Q IMAGING
- Προγράμματα επεξεργασίας εικόνων από την κάμερα φθορισμού: Q Capture Pro v.7.05™ και ImageJ 1.50b
- Φυγόκεντρος Helme Z36HK

#### 3.1.2 Χημικά:

- MitoTracker Red CMXRos (Invitrogen)
- HOECHST 33342 (Sigma)
- FBS Gibco® (Life Technologies - Invitrogen)
- Παρασκεύασμα με βάση την πολυβινυλική αλκοόλη PVA (Sigma), που αποσκοπεί στην επικάλυψη των δειγμάτων και προστασία του φθορισμού.
- Αιθανόλη (Panreac και Merck)
- Μεθανόλη (Merck)
- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)

#### 3.1.3 Αναλώσιμα:

- Βαθμονομημένοι σωλήνες με καπάκι (falcons) (15 mL)
- Πλαστικά σωληνάκια τύπου eppendorfs (1.5 mL, 2.0 mL)
- Πιπέττες ορολογικές - Serological (2, 5, 10 mL)
- Πιπέττες τύπου Gilson (0.2-10 μL, 20-200 μL και 100-1000 μL)
- Ρύγχη (0.2-10 μL, 20-200 μL και 100-1000 μL)
- Πιπέτες Pasteur πλαστικές με *poir βαθμονομημένες*
- Καλυπτρίδες coverslips
- Αντικειμενοφόρες πλάκες μικροσκοπίου επικαλυμμένες με πολυλυσίνη
- Αυτόματος πιπεταδόρος
- Στυλό Dacopen

Πίνακας 8: Αρχείο δειγμάτων

Αριθμός δείγματος	a	b	c	d	C (εκ/ml)	V (ml)	Βάρος	Ύψος	Ηλικία	Κάπνισμα	Αλκοόλ
1	0	28	16	56	41	1,4	108	1.86	44	10/μέρα	
3	6	64	12	18	27	4,4	106	1,92	34	όχι	
4	21	54	18	7	38	8,2	80	1,74	40	20/μέρα	
5	12	56	20	12	33	1,7	90	1,8	34	30/μέρα	όχι
6	40	32	12	16	68	2,8	100	1,8	27	όχι	όχι
7	10	42	30	18	65	2,2	80	1,85			
8	7	25	45	23	83	3,7	78	1,7		όχι	όχι
9	9	35	20	36	14	5,7	77	1,75		όχι	1-2/βδομάδα
10	15	40	25	20	10	2,7	75	1,77		15/μέρα	όχι
11	12	43	21	17	32	4,2				15/μέρα	όχι
13	24	48	6	22	110	7.5	82	1,85	39	όχι	όχι
14	0	40	20	40	4	0,9			41	7/μέρα	όχι
15	5	45	10	40	38	0,6	95	1,8	34	20/μέρα	όχι
16	0	15	10	75	49		100	1,76	50	7/μέρα	λίγο
17	10	54	16	20	68	3,8	34		34		
18	5	53	13	29	32	5,5	75	1,8	41	15/μέρα	όχι
19	15	36	6	43	19	3,5	110	1,75	39	30/μέρα	όχι
20	0	24	15	61	4	3	87	1,85		όχι	όχι
21	15	43	20	22	32	4,2	113	1,87		20/μέρα	όχι
22	0	20	10	70	3	4,3	95	1,84		όχι	2/βδομάδα
25	15	35	20	30	85	2,4	90	1,78		15/μέρα	1/μέρα
26	13	56	9	22	72	1,7	85	1,8		όχι	όχι
27	0	70	20	10	5	1,2				15/μέρα	2/βδομάδα
28	2	62	18	18	72	1,2	87	1,78		20/μέρα	1/μέρα
29	14	59	8	19	16	2,9	88	1,8		όχι	όχι
30	8	54	14	24	90	1,9	72	1,65		όχι	όχι
31	5	20	40	35	14	0,7	92	1,9		όχι	όχι
32	6	50	14	30	25	3,7	84	1,72		όχι	όχι
33	4	52	20	24	5	2,2	80	1,8	39	40-50/μέρα	όχι
34	6	48	15	31	115	1,1	115	1,85	35	20/μέρα	όχι
35	14	50	25	11	37	1,2	93	1,81		10/μέρα	όχι
36	11	69	12	16	75	3,4	120	1,78		20/μέρα	όχι
37	7	40	18	35	42	1,7			35		
38	12	50	10	28	19	3,6	95	1,78		30/μέρα	4/βδομάδα
39	8	55	21	16	170	1,4	78	1,7	39	όχι	όχι
40	3	24	15	58	65	1,3			45		
41	0	10	15	75	4	3,6			45		
42	0	42	33	25	150	2,1	78	1,7	39	όχι	όχι
43	10	55	16	19	65	3,1	87	1,8	42	όχι	όχι
44	0	41	20	39	8	3	100	1,75	37	20/μέρα	όχι

45	5	66	21	8	46	2,5	91	1,87	43	30/μέρα	1/βδομάδα
46	0	34	8	58	2	3,8	100	1,88	32	όχι	λίγο
47	36	38	16	10	120	2,5	85	1,7	45	5/μέρα	2/βδομάδα
48	7	46	20	27	35	3,9	100	1,86	37	20/μέρα	2/βδομάδα
49	19	57	2	22	22	2,5	105	1,78	38	20/μέρα	1/μέρα
50	0	32	24	44	14	3,4	90	1,94	46	όχι	όχι
51	6	39	12	43	122	2,8	92	1,9	36	όχι	2/βδομάδα
52	16	44	16	24	25	3,5	84	1,72	42	όχι	όχι
53	12	37	4	47	38	4,8	102	1,86	41	όχι	όχι
54	0	44	40	16	7	2,4	94	1,78	38	όχι	όχι
55	16	57	0	27	12	5,1	72	1,68	38	40/μέρα	όχι
56	6	47	2	45	6	3,2	70	1,82	35	20/μέρα	όχι
57	23	31	4	42	30	1,2	95	1,8	35	20/μέρα	όχι
58	22	47	6	25	48	5,3	105	1,94	37	30/μέρα	όχι

Πίνακας 9: Κατηγοριοποίηση δειγμάτων

κινητικότητα a+b<40 (ασθενοσπερμικά)	a+b%	C<15 εκ/ml (ολιγοσπερμικά)	εκ/ml
Δείγμα 1	28	Δείγμα 9	14
Δείγμα 8	32	Δείγμα 10	10
Δείγμα 14	40	Δείγμα 14	4
Δείγμα 16	15	Δείγμα 20	4
Δείγμα 20	24	Δείγμα 22	3
Δείγμα 22	20	Δείγμα 27	5
Δείγμα 31	25	Δείγμα 31	14
Δείγμα 40	27	Δείγμα 33	5
Δείγμα 41	10	Δείγμα 41	4
Δείγμα 46	34	Δείγμα 44	8
Δείγμα 50	32	Δείγμα 46	2
		Δείγμα 50	14
		Δείγμα 54	7
		Δείγμα 56	6

### 3.2 Ανοσοϊστοχημική μελέτη (IHC)

Η ανοσοϊστοχημεία είναι μία μέθοδος που βασίζεται στη χρήση ειδικών αντισωμάτων και χρησιμοποιείται ευρέως για την ανάλυση της κατανομής ενός μακρομορίου σε ένα κύτταρο ή σε έναν ιστό. Τα αντισώματα παράγονται έναντι οποιουδήποτε σχεδόν μορίου πρωτεΐνης ή υδατάνθρακα μετά από ένεση του σε ένα ζώο. Η τεχνική αυτή μπορεί να εφαρμοστεί είτε σε ολόκληρα, άθικτα, κύτταρα και οργανισμούς είτε σε μονιμοποιημένα παρασκευάσματα και τομές αυτών. Τα άθικτα δείγματα έχουν το πλεονέκτημα ότι παρέχουν τρισδιάστατη εικόνα της κατανομής ενώ οι τομές προσφέρουν καλύτερη διακριτική ανάλυση. Τα

αντισώματα μπορεί να είναι συζευγμένα είτε με μία ομάδα, όπως η ροδαμίνη, είτε με ένα ένζυμο όπως η αλκαλική φωσφατάση, γεγονός που επιτρέπει την ανίχνευσή του. Όταν χρησιμοποιείται φθορίζον αντίσωμα το δείγμα μπορεί να εξεταστεί άμεσα σε μικροσκόπιο φθορισμού. Γενικά, οι μέθοδοι φθορισμού είναι απλοί, διότι περιλαμβάνουν λιγότερα βήματα και παρέχουν τη δυνατότητα ανίχνευσης σε ένα δείγμα περισσότερων του ενός αντιγόνου, καθώς υπάρχει η δυνατότητα χρήσης διαφορετικών φθορίζουσών ομάδων στα αντισώματα. Παράλληλα είναι δυνατή η χρήση ειδικών φθορίζόντων ιχνηθετών, οι οποίοι σημαίνουν απ' ευθείας, χωρίς την χρήση αντισωμάτων, συγκεκριμένα υποκυτταρικά οργανίδια, αλληλεπιδρώντας ειδικά με συγκεκριμένα συστατικά τους.

MitoTracker Red CMXRos: Πρόκειται για μία κόκκινη φθορίζουσα χρωστική η οποία χρωματίζει τα μιτοχόνδρια ζωντανών κυττάρων και η συσσώρευση του σήματος εξαρτάται από την κατάσταση της μεμβράνης. Διεγείρεται στα 579nm και εκπέμπει στα 599nm. Μοριακός τύπος:  $C_{32}H_{32}Cl_2N_2O$ . (Samudio I, 2005)

HOECHST 33342: Πρόκειται για μια χρωστική νουκλεϊκών οξέων που χρωματίζει τους πυρήνες κυττάρων. Όταν συνδέεται στο dsDNA εκπέμπει μπλε φθορίζον χρωμα. Διεγείρεται στα 350nm και εκπέμπει στα 461nm. Μοριακός τύπος:  $C_{27}H_{37}Cl_3N_6O_4$ . (Smolewski P, 2001)

### 3.3 Φυγοκέντρηση:

Η φυγοκέντρηση είναι μία διαδικασία διαχωρισμού μιγμάτων κατά την οποία γίνεται χρήση της φυγοκέντρου δύναμης. Κατά την φυγοκέντρηση τα βαρέα στοιχεία του μίγματος πηγαίνουν στο πυθμένα του σωληναρίου, ενώ τα ελαφρύτερα παραμένουν πάνω από τον πυθμένα. Τα στοιχεία που πηγαίνουν στο πυθμένα αποτελούν το ίζημα και τα στοιχεία που βρίσκονται στην επιφάνεια αποτελούν το υπερκείμενο. Συνήθως το υπερκείμενο μεταγγίζεται σε χωριστό σωληνάριο οπότε ίζημα και υπερκείμενο διαχωρίζονται πλήρως.

#### Μονάδες μέτρησης

Το ποσοστό της φυγοκέντρησης ορίζεται από την γωνιακή ταχύτητα που μετράται σε στροφές ανά λεπτό (Reps per minute ή RPM) και την επιτάχυνση εκφραζόμενη σε g. Ο συντελεστής μετατροπής μεταξύ RPM και g εξαρτάται από την ακτίνα του δείγματος στο στροφέιο της φυγόκεντρου.

#### Αρχή λειτουργίας

Η φυγοκέντρωση αποτελεί μια από τις πιο χρήσιμες πρακτικά εφαρμογές της κυκλικής κίνησης. Από την φυσική είναι γνωστό ότι τα στερεά σωματίδια αιωρούμενα μέσα σε υγρό με μικρή πυκνότητα έχουν πτωτική τάση κάτω από την επίδραση της βαρύτητας. Η ταχύτητα με την οποία πέφτουν τελικά εξαρτάται από μια σειρά παραγόντων, όπως είναι το σχήμα και το μέγεθος των αιωρούμενων σωματιδίων και η διαφορά πυκνότητας της στερεάς φάσεως.

Σύμφωνα με τον νόμο του Stokes, όσο μεγαλώνει η δύναμη της τεχνητά δημιουργούμενης βαρύτητας τόσο και πιο γρήγορα διαχωρίζεται η στερεά φάση από την υγρή. Η δύναμη που απαιτείται για να μπορέσει να διατηρηθεί ένα σωματίδιο σε κυκλική κίνηση σταθερής ακτίνας και ταχύτητας είναι ανάλογη με τη μάζα του.

Στις φυγόκεντρες συσκευές επιτυγχάνονται δυνάμεις μεγαλύτερες από τη βαρύτητα.

### 3.4 Η αρχή της διαδικασίας :

Μετά την παραλαβή των δειγμάτων πραγματοποιούμε μία πρώτη αραιώση 500ml δείγματος με 1ml PBS 1x και ύστερα αργή και ήπια ανάδευση. Στη συνέχεια φυγοκεντρούμε το δείγμα στις 2000 στροφές σε θερμοκρασία 18°C για 5 λεπτά. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε 100 μl PBS 1x από τα οποία μεταφέρουμε 10μl σε νέο erpendorf και αραιώνουμε εκ νέου με 1 ml PBS 1x. Τα δύο erpendorfs φυγοκεντρούνται στις ίδιες συνθήκες για δεύτερη φορά και απομακρύνουμε προσεκτικά κάθε υπερκείμενο.

Το ίζημα από τα 90 μl φυλάσσεται σε ψυγείο σε θερμοκρασία -80°C.

Το ίζημα από τα 10μl επαναδιαλυτοποιείται με 20-80μl μείγματος χρωστικών CMXRos και HOECHST διαλυτοποιημένες σε θρεπτικό μέσο DMEM.

Πιο συγκεκριμένα, σε δείγματα με υψηλή συγκέντρωση σπερματοζωαρίων ανά ml επαναδιαλυτοποιούμε με 80μl mix, επιτυγχάνοντας με αυτό τον τρόπο μία επιπλέον αραιώση που θα επιτρέψει την λήψη ευδιάκριτης εικόνας μεμονωμένων σπερματοζωαρίων με τη χρήση ειδικής κάμερας προσαρμοσμένης στο μικροσκόπιο φθορισμού.

Το mix με τις χρωστικές παρασκευάζεται ως εξής:

Αντιδραστήρια	Όγκοι
DMEM	300 μl
HOECHST (1 mg/ml)	0.3 μl
CMXRos (0,1 mM)	0.6 μl

Οι χρωστικές HOECHST και CMX είναι φωτοευαίσθητες για τον λόγο αυτό προφυλάσσουμε τα erpendorfs με αλουμινόχαρτο έτσι ώστε να μην εκτίθενται στο φως.

Ακολουθεί προετοιμασία της αντικειμενοφόρου πλάκας. Καταγράφεται ο αριθμός του δείγματος, η ημερομηνία επεξεργασίας του καθώς και η αραιώση που πραγματοποιήθηκε. Με το ειδικό στυλό Dacopen δημιουργούμε μικρές περιοχές όπου θα προστεθεί το δείγμα μας (2-4 περιοχές σε κάθε πλακάκι ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων και των αραιώσεων). Στην συνέχεια προσθέτουμε το δείγμα μας το οποίο, μετά την επαναδιαλυτοποίηση, βρίσκεται στο σκοτάδι προκειμένου να προφυλαχτούν οι φωτοευαίσθητες χρωστικές. Σε κάθε περιοχή Dacopen προσθέτουμε μια συνολική ποσότητα 20μl, η σύσταση όμως κάθε φορά εξαρτάται από την αρχική συγκέντρωση του εκάστοτε δείγματος. Για ένα πυκνό δείγμα μεταφέρουμε σε μια περιοχή 10μl δείγματος και άλλα 10μl από το mix χρωστικών. Για το ίδιο δείγμα σε μια δεύτερη περιοχή προστίθενται 5μl δείγματος και 15μl mix. Με αυτό τον τρόπο καταφέρνουμε επιπλέον αραιώσεις των αρχικών συγκεντρώσεων των δειγμάτων. Για δείγματα που η αρχική συγκέντρωση είναι χαμηλή προστίθενται διαφορετικές ποσότητες δείγματος και mix χρωστικών. Σε μια περιοχή προστίθενται 20μl από το επαναδιαλυτοποιημένο δείγμα με τις χρωστικές και σε μια άλλη περιοχή 15μl από το δείγμα και 5μl mix χρωστικών.

Για να κατανοηθεί καλύτερα αυτή η διαδικασία ακολουθεί από ένα παράδειγμα για την κάθε περίπτωση.



*Δείγμα 43: αρχική συγκέντρωση  $65 \times 10^6$  /ml, άρα σε κάθε ml βρίσκονται 65 εκατομμύρια σπερματοζωάρια. Μεταφέραμε 0,5ml από το δείγμα σε νέο errendorf (άρα η διαδικασία συνεχίζεται με  $32,5 \times 10^6$  κύτταρα ), προσθέσαμε 1ml PBS 1x και ακολουθεί φυγοκέντρωση σε συνθήκες που περιγράφηκαν παραπάνω. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται με 100μl PBS από τα οποία τα 10 προστίθενται σε νέο errendorf ( άρα  $3,2 \times 10^6$  κύτταρα ) μαζί με 1ml PBS 1x. Νέα φυγοκέντρωση και επαναδιαλυτοποίηση με 40μl μίχ χρωστικών από τα οποία μεταφέραμε 10μl (περιοχή 1) και 5μl (περιοχή 2)στην αντικειμενοφόρο πλάκα. Οι δύο περιοχές συμπληρώθηκαν με 10μl και 15μl μίχ χρωστικών αντίστοιχα (Υπενθύμιση: τελικός όγκος σε κάθε περιοχή 20μl). Έτσι, στην περιοχή 1 έχουμε 812.000 κύτταρα και στην περιοχή 2 406.000 κύτταρα κατά προσέγγιση.*

*Δείγμα 44: αρχική συγκέντρωση  $8 \times 10^6$  /ml. Ύστερα από τις δύο φυγοκεντρώσεις παραλάβαμε ένα ίζημα στο οποίο παρέμειναν 400.000 κύτταρα τα οποία επαναδιαλυτοποιήθηκαν με 40μl μίχ χρωστικών. Από το επαναδιαλυτοποιημένο ίζημα μεταφέραμε στην περιοχή 1 20μl ( άρα 200.000 κύτταρα) και στην περιοχή 2 10μl και 10μl μίχ (άρα 100.000 κύτταρα).*

Να σημειώνουμε ότι οι αραιώσεις αυτές πέρα από το ότι συμβάλουν στην καλύτερη παρατήρηση στο μικροσκόπιο έχουν και μια επιπρόσθετη σημασία καθώς δίνουν την δυνατότητα για έλεγχο της επαναληψιμότητας των αποτελεσμάτων.

Οι χειρισμοί απαιτούν ταχύτητα και, στο βαθμό που είναι δυνατόν, αποφυγή έκθεσης στο φως. Η αντικειμενοφόρος πλάκα με τις περιοχές Dacoren τοποθετείται σε ειδική συσκευή η οποία καλύπτεται σε όλη της την επιφάνεια με αλουμινόχαρτο και τοποθετείται σε κλίβανο στους 37 °C για μια ώρα. Η συσκευή αυτή περιέχει στο εσωτερικό της δύο επίπεδα. Στην βάση τοποθετείται ένα σφουγγάρι με απιονισμένο νερό και στο δεύτερο επίπεδο, ακριβώς από πάνω, η αντικειμενοφόρος πλάκα. Το νερό συμβάλει στην ενυδάτωση του περιβάλλοντος της πλάκας και στην αποφυγή της εξάτμισης των δειγμάτων που θα ήταν καταστροφικό για την συνέχεια του πειράματος. Ανά τακτά διαστήματα, κατά την διάρκεια της επώασης, επιβεβαιώνουμε πως σε κάθε περιοχή dacoren διατηρείται ο αρχικός όγκος δείγματος και δεν έχει επέλθει εξάτμιση. Μετά το πέρας της επώασης παραλαμβάνουμε την αντικειμενοφόρο πλάκα, απομακρύνουμε με πιπέτα προσεκτικά την ποσότητα του δείγματος που έμεινε σε κάθε περιοχή και πραγματοποιούμε 3 πλύσεις με PBS 1x σε κάθε περιοχή. Μετά την τρίτη πλύση προστίθενται από 20μl μεθανόλης. Η μεθανόλη είναι οργανικός διαλύτης και λανθασμένη τοποθέτησή της μπορεί να διαλύσει τα όρια μιας περιοχής. Για τον λόγο αυτόν πρέπει να προστίθεται προσεκτικά και σε σημείο που δεν προκαλείται υπερχειλίση. Αφήνουμε για 10 λεπτά στο σκοτάδι την αντικειμενοφόρο πλάκα και ακολουθούν νέες πλύσεις με PBS 1x αμέσως μετά την απομάκρυνση της μεθανόλης.

Μετά την τελευταία πλύση προστίθεται σε όλη την έκταση της πλάκας κατάλληλη ποσότητα PVA ισάριθμη με το πλήθος των δειγμάτων και με προσοχή τοποθετείται μια καλυπτρίδα η οποία πρέπει να καλύπτει κάθε περιοχή Dacoren. Επίσης, μετά την τοποθέτηση της καλυπτρίδας πρέπει να απομακρύνουμε φυσαλίδες αέρα που έχουν εγκλωβιστεί μεταξύ της αντικειμενοφόρου πλάκας και της καλυπτρίδας. Η αντικειμενοφόρος πλάκα τοποθετείται στο σκοτάδι στους 4 °C overnight και την επόμενη μέρα παρατηρείται σε μικροσκόπιο φθορισμού για λήψη εικόνων και επεξεργασία αποτελεσμάτων .

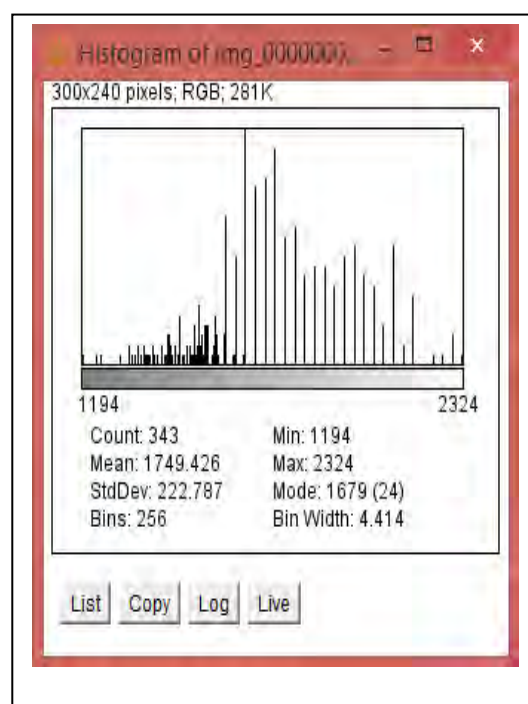
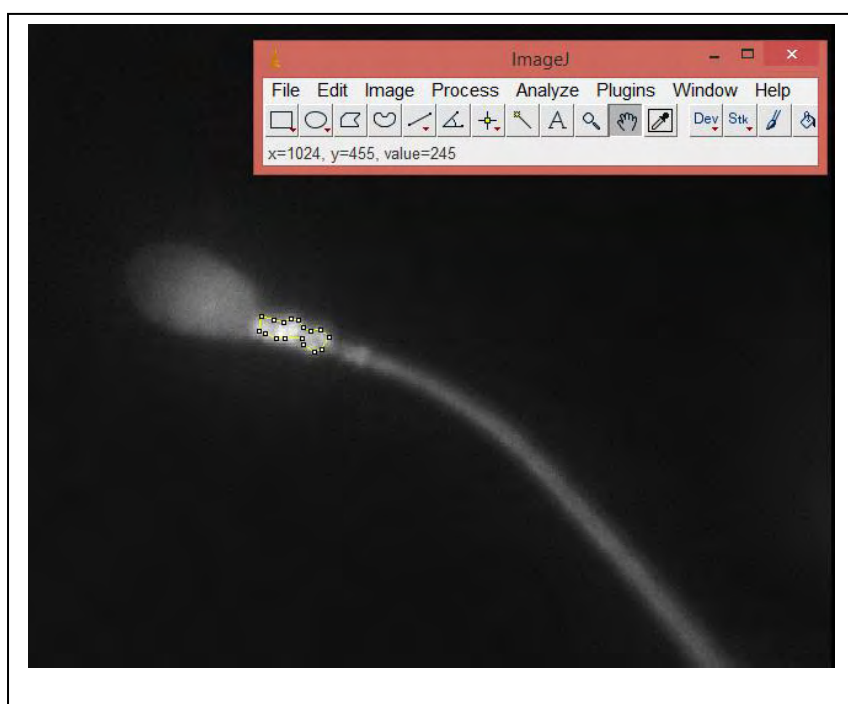
### 3.5 Παρατήρηση στο μικροσκόπιο:

Κάθε δείγμα παρατηρήθηκε σε μεγεθύνσεις 63x και 100x. Για τις μεγεθύνσεις αυτές τοποθετήθηκε λάδι (1-2 σταγόνες ανά αντικειμενοφόρο πλάκα) απαραίτητο τόσο για την προστασία των φακών όσο και για την παρατήρηση των δειγμάτων. Για την λήψη φωτογραφιών χρησιμοποιήθηκε η ψυχόμενη κάμερα Optimos. Για κάθε οπτικό πεδίο που μας ενδιαφέρει λαμβάνουμε δύο φωτογραφίες. Η μία μας δίνει το οπτικό σήμα των μιτοχονδρίων (λόγω της χρωστικής CMXRos) και η άλλη την εικόνα του πυρήνα κάθε σπερματοζωαρίου (λόγω της χρωστικής HOECHST). Σε κάθε περιοχή σχηματιζόμενη από το dascopen της αντικειμενοφόρου πλάκας λαμβάνουμε όσο το δυνατόν περισσότερες φωτογραφίες προκειμένου να έχουμε ένα αντιπροσωπευτικό δείγμα.

Πρέπει να τονίσουμε, όμως, ότι οι διαδικασίες παρατήρησης και λήψης φωτογραφιών πρέπει να γίνουν σε σύντομο σχετικά χρονικό διάστημα καθώς η παρατεταμένη έκθεση στο φως προκαλεί εξασθένιση του σήματος και κατά συνέπεια καταστροφή του.

### 3.6 Διαδικασία ποσοτικοποίησης μιτοχονδριακού σήματος:

Για την ποσοτικοποίηση του σήματος χρησιμοποιείται το πρόγραμμα Image J 1.50b. Για κάθε δείγμα επιλέγονται οι εικόνες που κρίνουμε ότι είναι καλές ποιοτικά (ευδιάκριτα, μεμονωμένα σπερματοζώαρια) και μπορούν να αξιοποιηθούν για την λήψη πληροφοριών. Σε κάθε εικόνα μετράμε την μέση οπτική πυκνότητα (Mean) και την τυπική απόκλιση (StdDev) των μιτοχονδρίων κάθε σπερματοζωαρίου μέσω της δημιουργίας ιστογράμματος:



Στη συνέχεια τα αποτελέσματα καταγράφονται ως εξής:

μεγέθυνση-αραίωση-δείγμα	
Όνομα εικόνας	Mean
Συγκεντρωτικός μέσος όρος τιμών	

Παράδειγμα:

Χ100 5 ul δείγμα 46	
Όνομα εικόνας	Mean
img_000000000_000	1.991.921
img_000000002_000	1.159.430
img_000000004_000	1.822.514
img_000000007_000	1.176.756
<b>Συγκεντρωτικός μέσος όρος τιμών</b>	<b>1.537.655</b>

### 3.7 Δοκιμασία t στατιστικού test

Το t στατιστικό test ενός δείγματος (single sample t-test) χρησιμοποιεί δεδομένα που προέρχονται από ένα δείγμα για να ελέγξει υποθέσεις που σχετίζονται με τη μέση τιμή ενός πληθυσμού όταν η διακύμανση του αρχικού πληθυσμού είναι άγνωστη. Σε αυτή τη στατιστική μέθοδο γίνεται μία εκτίμηση της διακύμανσης του πληθυσμού με τη βοήθεια της διακύμανσης του δείγματος. Η μηδενική υπόθεση δηλώνει και πάλι μία συγκεκριμένη τιμή για την μέση τιμή του άγνωστου πληθυσμού που προκύπτει από την αλλαγή της ανεξάρτητης μεταβλητής. Για την εύρεση των κρίσιμων περιοχών επιλέγεται ένα επίπεδο σημαντικότητας.

Στη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία, η δοκιμασία t στατιστικού test χρησιμοποιείται προκειμένου να εξετάσουμε αν οι διαφορές των συγκρινόμενων τιμών μεταξύ, α) φυσιολογικών δειγμάτων και δειγμάτων με  $a+b < 40\%$  και β) φυσιολογικών δειγμάτων και δειγμάτων με  $C < 15\%$  είναι στατιστικά σημαντικές (Πίνακας 15).

## 4. Αποτελέσματα

Σε πρώτη φάση οι εικόνες που ελήφθησαν με την χρήση της ψυχόμενης κάμερας, παρατηρούνται για την εξαγωγή οπτικών-ποιοτικών συμπερασμάτων. Τα συμπεράσματα αυτά αφορούν τα σήματα φθορισμού που αντιπροσωπεύουν τα ζωντανά μιτοχόνδρια του εκάστοτε σπερματοζωαρίου (θυμίζουμε ότι η χρωστική CMXRos χρωματίζει μόνο τα λειτουργικά μιτοχόνδρια). Για κάθε δείγμα γίνεται εκτίμηση της έκτασης και της έντασης του σήματος προκειμένου να προσδιοριστεί η κατανομή των μιτοχονδρίων. Στη συνέχεια γίνεται συγκριτική ανάλυση μεταξύ φυσιολογικών, ασθενοσπερμικών και ολιγοσπερμικών δειγμάτων προκειμένου να διαπιστωθούν διαφορές που σχετίζονται με το μιτοχονδριακό σήμα.

Φαίνεται λοιπόν, ότι σε δείγματα με συγκέντρωση ή/και κινητικότητα κάτω από τα κατώτερα φυσιολογικά όρια το μιτοχονδριακό σήμα εξασθενεί. Αυτό πρακτικά σημαίνει ότι μπορεί να γίνει συσχέτιση της ποιότητας του δείγματος με την λειτουργικότητα των μιτοχονδρίων. Πρέπει να επισημάνουμε όμως, ότι ένα δείγμα σπέρματος αποτελείται από διαφορετικούς πληθυσμούς σπερματοζωαρίων (PR, NP, IM). Έτσι, είναι εύκολα αντιληπτό ότι σε ένα ασθενοσπερμικό ( ή ολιγοσπερμικό) δείγμα υπάρχει ένας αριθμός φυσιολογικών σπερματοζωαρίων και το αντίστροφο. Το γεγονός αυτό μας εφιστά την προσοχή κατά την εξαγωγή συμπερασμάτων και έτσι πρέπει να ελέγχουμε όσο το δυνατόν περισσότερα σπερματοζωάρια από κάθε δείγμα προκειμένου να λάβουμε ασφαλή συμπεράσματα.

Στις εικόνες που ακολουθούν παρουσιάζονται μερικά παραδείγματα απο τις διαφορές που παρατηρήθηκαν:

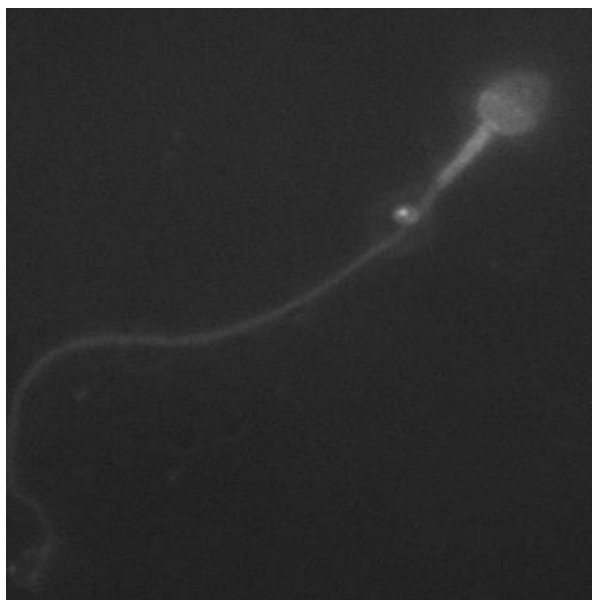


Image 1: ενδεικτικό παράδειγμα σπερματοζωαρίου φυσιολογικού δείγματος (δείγμα 48)

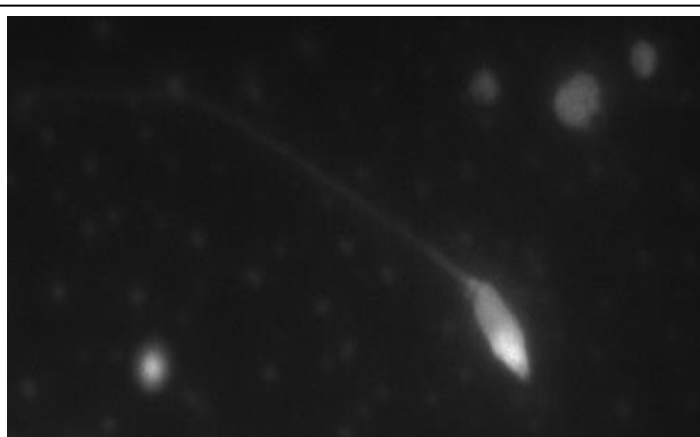


Image 2: ενδεικτικό παράδειγμα σπερματοζωαρίου ολιγοσπερμικού δείγματος (δείγμα 46)

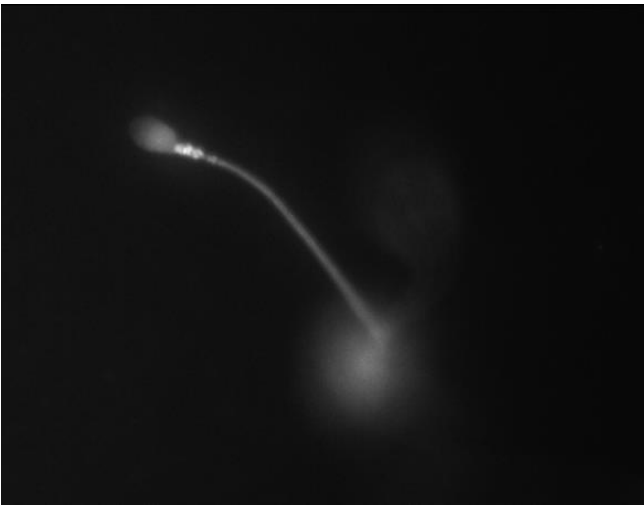


Image 3: ενδεικτικό παράδειγμα σπερματοζωαρίου φυσιολογικού δείγματος (δείγμα 47)

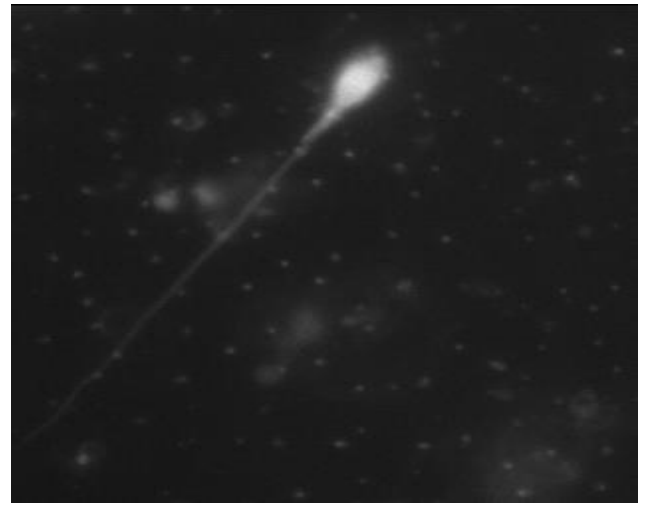


Image 4: ενδεικτικό παράδειγμα σπερματοζωαρίου ασθενοσπερμικού δείγματος (δείγμα 50)

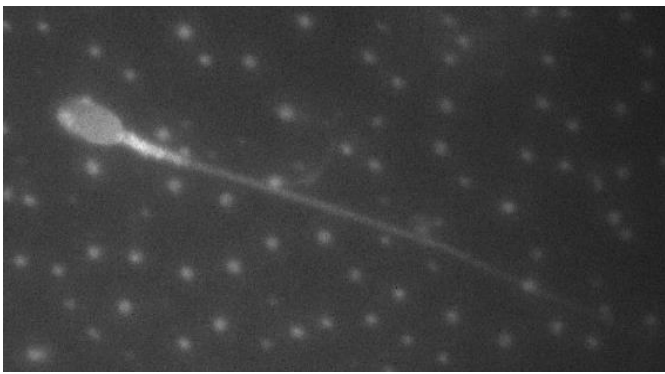


Image 5: ενδεικτικό παράδειγμα σπερματοζωαρίου φυσιολογικού δείγματος (δείγμα 35)

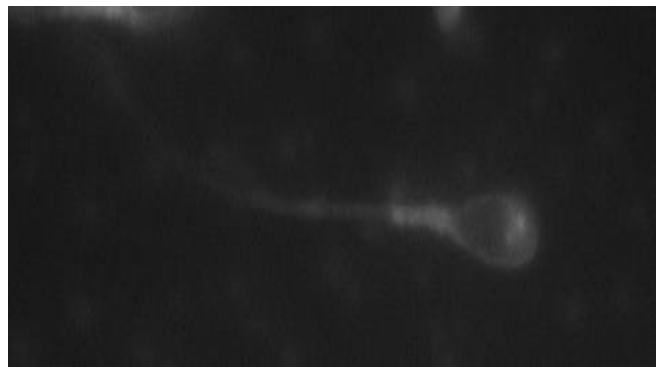


Image 6: ενδεικτικό παράδειγμα σπερματοζωαρίου oligosπερμικού δείγματος (δείγμα 27)

Για την επαλήθευση και τον έλεγχο της εγκυρότητας των έως τώρα αποτελεσμάτων ακολούθησε ποσοτικοποίηση των σημάτων φθορισμού προκειμένου να μελετηθούν οι παρατηρούμενες διαφορές και σε επίπεδο αριθμών (ποσοτική ανάλυση).

Παρατίθενται οι πίνακες με την ποσοτικοποίηση της έντασης ανά μονάδα επιφάνειας της σήμανσης των μιτοχονδρίων, κατηγοριοποιημένα ανά:

- *σύνολο των δειγμάτων (Πίνακας 11),*
- *δειγμάτων με χαρακτηριστικά εντός φυσιολογικών ορίων (Πίνακας 12),*
- *δειγμάτων με  $a+b < 40\%$  (Πίνακας 13),*
- *δειγμάτων με  $C < 15$  εκ. κυτ./ml (Πίνακας 14)*

Πίνακας 10: Παρουσίαση των συγκεντρωτικών μέσων όρων όλων των δειγμάτων

Αριθμός δείγματος	Συγκεντρωτικός μέσος όρος τιμών Mean $\pm$ StdDev ανά δείγμα	Αριθμός σπερματοζωαρίων που ποσοτικοποιήθηκαν ανά δείγμα
δείγμα 25	398191,5 $\pm$ 45859,6	4
δείγμα 26	368322,4 $\pm$ 76721,8	8
δείγμα 27	818023,0 $\pm$ 384863,7	8
δείγμα 28	338799,5 $\pm$ 38742,4	4
δείγμα 29	524633,5 $\pm$ 176441,9	8
δείγμα 30	461045,8 $\pm$ 86959,0	8
δείγμα 32	398259,8 $\pm$ 58270,1	6
δείγμα 33	391255,0 $\pm$ 68473,0	3
δείγμα 34	400564,0 $\pm$ 58077,3	19
δείγμα 35	879808,1 $\pm$ 341945,1	13
δείγμα 37	1704061,2 $\pm$ 587985,0	37
δείγμα 38	705232,0 $\pm$ 142087,4	19
δείγμα 39	941692,8 $\pm$ 348139,0	32
δείγμα 40	386530,0 $\pm$ 76052,1	11
δείγμα 41	468227,6 $\pm$ 112532,4	19
δείγμα 42	613264,2 $\pm$ 284846,4	12
δείγμα 43	1842870,4 $\pm$ 1131352,7	47
δείγμα 44	1178710,4 $\pm$ 808302,0	12
δείγμα 45	1505912,4 $\pm$ 512983,2	60
δείγμα 46	1825084,4 $\pm$ 834070,3	31
δείγμα 47	1400176,7 $\pm$ 733052,0	49
δείγμα 48	796032,9 $\pm$ 271029,2	27
δείγμα 50	483736,2 $\pm$ 242061,9	24
δείγμα 51	3725773,7 $\pm$ 2389207,0	57
δείγμα 52	2472093,5 $\pm$ 1162972,6	25
δείγμα 53	773260,2 $\pm$ 166394,4	39
δείγμα 58	391655,2 $\pm$ 93020,4	6
<b>Συνολικός αριθμός σπερματοζωαρίων που ποσοτικοποιήθηκαν</b>	586	
<b>Συγκεντρωτικός μέσος όρος τιμών Mean (<math>\pm</math>StdDev)</b>	1406170,461 ( $\pm$ 1325725,45)	

Πίνακας 11: Παρουσίαση των συγκεντρωτικών μέσων όρων των δειγμάτων εντός φυσιολογικών ορίων

Αριθμός δείγματος	Συγκεντρωτικός μέσος όρος τιμών Mean ανά δείγμα	Αριθμός σπερματοζωαρίων που ποσοτικοποιήθηκαν ανά δείγμα
δείγμα 25	398191,5	4
δείγμα 26	368322,4	8
δείγμα 28	338799,4	4
δείγμα 29	524633,5	8
δείγμα 30	461045,8	8
δείγμα 32	398259,8	6
δείγμα 34	400564,0	19
δείγμα 35	879808,1	13

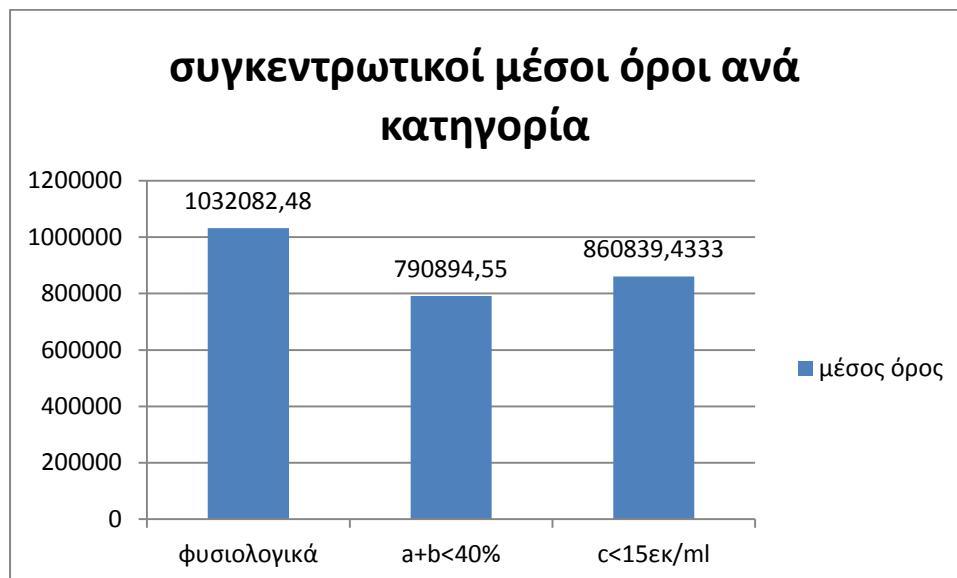
δείγμα 37	1704061,0	37
δείγμα 38	705232,0	19
δείγμα 39	941692,8	32
δείγμα 42	613264,3	12
δείγμα 43	1842870,4	47
δείγμα 45	1505912,4	60
δείγμα 47	1400176,7	49
δείγμα 48	796032,9	27
δείγμα 51	3725773,7	57
δείγμα 52	2472093,5	25
δείγμα 53	773260,2	39
δείγμα 58	391655,2	6
<b>Συνολικός αριθμός σπερματοζωαρίων που ποσοτικοποιήθηκαν</b>		480
<b>Μέσος όρος των τιμών των μέσω όρων, Mean (<math>\pm</math> StdDev)</b>		1031842,54 ( $\pm$ 868929,798)

Πίνακας 12: Παρουσίαση των συγκεντρωτικών μέσων όρων των δειγμάτων με a+b<40%

Αριθμός δείγματος	a+b %	Συγκεντρωτικός μέσος όρος τιμών Mean ανά δείγμα	Αριθμός σπερματοζωαρίων που ποσοτικοποιήθηκαν ανά δείγμα
Δείγμα 40	27	386530,0	11
Δείγμα 41	10	468227,6	19
Δείγμα 46	34	1825084,4	31
Δείγμα 50	32	483736,2	24
<b>Συνολικός αριθμός σπερματοζωαρίων που ποσοτικοποιήθηκαν</b>			85
<b>Μέσος όρος των τιμών των μέσω όρων, Mean (<math>\pm</math> StdDev)</b>			790894,55 ( $\pm$ 690777,231)

Πίνακας 13: Παρουσίαση των συγκεντρωτικών μέσων όρων των δειγμάτων με C<15 εκ. κυτ./ml

Αριθμός δείγματος	C<15 εκ. κυτ./ml	Συγκεντρωτικός μέσος όρος τιμών Mean ανά δείγμα	Αριθμός σπερματοζωαρίων που ποσοτικοποιήθηκαν ανά δείγμα
Δείγμα 27	5	818023,0	8
Δείγμα 33	5	391255,0	3
Δείγμα 41	4	468227,6	19
Δείγμα 44	8	1178710,4	12
Δείγμα 46	2	1825084,4	31
Δείγμα 50	14	483736,2	24
<b>Συνολικός αριθμός σπερματοζωαρίων που ποσοτικοποιήθηκαν</b>			97
<b>Μέσος όρος των τιμών των μέσω όρων, Mean (<math>\pm</math> StdDev)</b>			860839,4333 ( $\pm$ 556687,3439)



Διάγραμμα 1: Παρουσίαση συγκεντρωτικών μέσων όρων ανά κατηγορία

Αλλαγή τιμών στο διάγραμμα

Για την ποσοτικοποίηση του σήματος που λαμβάνεται μετά την λήψη εικόνων και επεξεργασία αυτών, ελήφθησαν οι μέσοι όροι των τιμών που προκύπτει από την ποσοτικοποίηση του σήματος για κάθε δείγμα. Δεδομένου ότι τόσο ο αριθμός των εικόνων που ελήφθησαν για κάθε δείγμα, όσο και ο αριθμός των σπερματοζωαρίων σε κάθε εικόνα διαφοροποιείται από δείγμα σε δείγμα, για την τελική εξαγωγή του μέσου όρου ανά περίπτωση (α) υψηλής κινητικότητας, β) a+b<40, και γ) c<15 Χ10<sup>6</sup> /ml] ελήφθησαν οι μέσοι όροι των μέσων τιμών ανά περίπτωση. Έτσι ελαχιστοποιείται η υποκειμενικότητα από παρατήρηση σε παρατήρηση που οφείλεται σε διαφορετικό κυρίως αριθμό εξεταζόμενων σπερματοζωαρίων. Εφαρμόζοντας το ttest οι διαφορές των δειγμάτων με β) a+b<40, και γ) c<15 Χ10<sup>6</sup> /ml σε σχέση με το control δεν είναι στατιστικά σημαντικές. Παρόλα αυτά παρατηρούμε την αναμενόμενη μείωση μιτοχονδριακής σήμανσης στο σύνολο των δειγμάτων με την μικρότερη κινητικότητα (ασθενοσπερμικών) και συγκέντρωση (ολιγοσπερμικών) σε σχέση με τα δείγματα μάρτυρες, αποδεκτής κινητικότητας. Γεγονός που υποδηλώνει ότι τα αποτελέσματά μας συνάδουν με τα αποτελέσματα της διεθνούς βιβλιογραφίας. Και πιθανώς η παρατήρηση μεγαλύτερου αριθμού δειγμάτων κυρίως (ασθενοσπερμικών, ολιγοσπερμικών) ή/και η χρήση άλλου στατιστικού test πιθανώς να αναδείξει την στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ αυτών.

Πίνακας 14: Αποτελέσματα t-test

Συγκρινόμενοι πληθυσμοί δειγμάτων	t-test value
φυσιολογικά/ a+b<40%	0,56914921
φυσιολογικά/ C<15%	0,577038664



## 5. Συζήτηση

Από προηγούμενες πειραματικές μελέτες έχει διαπιστωθεί η σπουδαιότητα της ορθής λειτουργίας των μιτοχονδρίων των σπερματοζωαρίων στην αναπαραγωγική βιολογία. Ο κύριος λόγος είναι η άμεση συμβολή τους στην παραγωγή ενέργειας με την μορφή ATP η οποία αξιοποιείται σε μεγάλο βαθμό για την κίνηση των σπερματοζωαρίων. Κινητικότητα ενός σπερματοζωαρίου εντός των φυσιολογικών ορίων συνεπάγεται, έως ένα βαθμό, και αυξημένη γονιμοποιητική ικανότητα. Πιθανή δυσλειτουργία τους, πέρα από μείωση της ικανότητας γονιμοποίησης έχει αποδειχτεί ότι μπορεί να επάγει την διαδικασία γήρανσης και απόπτωσης των κυττάρων καθώς και την εκδήλωση νευροεκφυλιστικών νοσημάτων και καρκίνου. Από τα παραπάνω είναι εύκολα αντιληπτό γιατί το ενδιαφέρον μας στρέφεται στην προσπάθεια συσχέτισης της ποιότητας των ανθρώπινων σπερματοζωαρίων με την λειτουργικότητα των μιτοχονδρίων τους. Προσπαθήσαμε δηλαδή, με την εφαρμογή ενός σχετικά απλού και άμεσου πρωτοκόλλου να μελετήσουμε αν μπορεί να αξιοποιηθεί η ανά μονάδα επιφάνειας σήμανσης των μιτοχονδρίων σαν δείκτης γονιμότητας σε δείγματα σπέρματος.

Από την ανάλυση των πειραματικών αποτελεσμάτων, τόσο σε ποιοτικό όσο και ποσοτικό επίπεδο, φαίνεται ότι πράγματι μπορεί να επιτευχθεί αυτή η συσχέτιση. Ολιγοσπερμικά και ασθenoσπερμικά δείγματα υπολογίστηκαν να έχουν χαμηλότερο συγκεντρωτικό μέσο όρο τιμών Mean όσον αφορά τη σήμανση των μιτοχονδρίων σε σχέση με τα φυσιολογικά δείγματα. Η διαφορά μεταξύ των τιμών υπολογίστηκε δείχνει να δεν είναι στατιστικά σημαντική, ωστόσο πρέπει να ελεγχθεί μεγαλύτερος και αντιπροσωπευτικότερος αριθμός δειγμάτων ή/και εφαρμογή άλλων μεθόδων στατιστικής ανάλυσης για την επαλήθευση και εξαγωγή έγκυρων αποτελεσμάτων.

Μελλοντικές έρευνες θα μπορούσαν να επικεντρωθούν στον έλεγχο τόσο της υποκυτταρικής κατανομής όσο και ποσοτικής έκφρασης των υποδοχέων στεροειδών ορμονών με μεθόδους ανοσοϊστοχημείας και ανοσοαποτύπωσης κατά Western. Τα ανδρογόνα και τα οιστρογόνα είναι στεροειδείς ορμόνες, των οποίων η βιοσύνθεση ξεκινά στο εσωτερικό των μιτοχονδρίων. Οι ορμόνες αυτές έχει βρεθεί ότι διαδραματίζουν σπουδαίο ρόλο στη ρύθμιση και την διατήρηση της φυσιολογικής της λειτουργίας του σπέρματος.

## Βιβλιογραφία

1. Aitken RJ & Koppers AJ 2011 Apoptosis and DNA damage in human spermatozoa. *Asian Journal of Andrology* 13 36–42.
2. Andersen AG et al. (2000). High frequency of sub-optimal semen quality in an unselected population of young men. *Human Reproduction*, 15:366-372.
3. Ankel-Simons, F., Cummins, J.M., 1996. Misconception about mitochondria and mammalian fertilization: implications for theories on human evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 13859–13863
4. Anesti V & Scorrano L 2006 The relationship between mitochondrial shape and function and the cytoskeleton. *Biochimica et Biophysica Acta* 1757 692–699.
5. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K & Walter P 2008 *Molecular Biology of the Cell*, 5th edn. New York: Garland Publishing
6. Almeida C, Cunha M, Ferraz L, Silva J, Barros A & Sousa M 2011 Caspase-3 detection in human testicular spermatozoa from azoospermic and nonazoospermic patients. *International Journal of Andrology* 34 e407–e414.
7. Amaral A, Castillo J, Estanyol JM, Ballesca JL, Ramalho-Santos J & Oliva R 2013 Human sperm tail proteome suggests new endogenous metabolic pathways. *Molecular and Cellular Proteomics* 12 330–342.
8. Amaral, A., Lourenco, B., Marques, M., Ramalho-Santos, J., (2013). Mitochondria functionality and sperm quality. *Reproduction* 146: 163–174
9. Balsamo M, Guidi L, Pierboni L, Marotta R, Todaro MA & Ferraguti M 2007 Living without mitochondria: spermatozoa and spermatogenesis in two species of Urodasya (Gastrotricha, Macrotrichida) from dysoxic sediments. *Invertebrate Biology* 126 1–9.
10. Behre HM et al. (2000). Diagnosis of male infertility and hypogonadism. In: Nieschlag E, Behre HM, eds. *Andrology, male reproductive health and dysfunction*. Berlin, Springer: 92.
11. Björndahl L, Kvist U (2003). Sequence of ejaculation affects the spermatozoon as a carrier and its message. *Reproductive Biomedicine Online*, 7:440-448.
12. Björndahl L et al. (2004). Why the WHO recommendations for eosin–nigrosin staining techniques for human sperm vitality assessment must change. *Journal of Andrology*, 25:671-678.
13. Boman AL, Zhang C, Zhu X, Kahn RA *Mol Biol Cell* (2000) 11:1241-1255.
14. Bonde JP et al. (1998). Relation between semen quality and fertility: a population-based study of 430 first-pregnancy planners. *Lancet*, 352:1172-1177.
15. Bronson RA et al. (1982). Detection of sperm specific antibodies on the spermatozoa surface by immunobead binding. *Archives of Andrology*, 9:61.
16. Bronson RA et al. (1984). Sperm antibodies: their role in infertility. *Fertility and Sterility*, 42:171-183.
17. Campello S & Scorrano L 2010 Mitochondrial shape changes: orchestrating cell pathophysiology. *EMBO Reports* 11 678–684.
18. Cayli S, Sakkas D, Vigue L, Demir R & Huszar G 2004 Cellular maturity and apoptosis in human sperm: creatine kinase, caspase-3 and Bcl-XL levels in mature and diminished maturity sperm. *Molecular Human Reproduction* 10 365–372. (doi:10.1093/molehr/gah050)

19. Chalah, T., Brillard, J. P. (1998). Comparison of assessment of fow L sperm viability by Eosin-nigrosin and dual fluorescence (SYBR-14/PI). Elsevier Science Inc, Theriogenology 50: 487-493.
20. Clarke GN et al. (1982). Immunoglobulin class of sperm-bound antibodies in semen. In: Bratanov K, ed. Immunology of reproduction. Sofia, Bulgarian Academy of Sciences Press: 482-485.
21. Clarke GN et al. (1985). Detection of sperm antibodies in semen using the Immunobead test: a survey of 813 consecutive patients. American Journal of Reproductive Immunology and Microbiology, 7:118-123
22. Cooper TG et al. (2006). Azoospermia: virtual reality or possible to quantify? Journal of Andrology, 27:483-490.
23. Costello S, Michelangeli F, Nash K, Lefievre L, Morris J, Machado-Oliveira G, Barratt C, Kirkman-Brown J & Publicover S 2009 Ca<sup>2+</sup>-stores in sperm: their identities and functions. Reproduction 138 425–437.
24. Cummins, J., 1998. Mitochondrial DNA in mammalian reproduction. Rev. Reprod. 3, 172–182
25. Dadoune JP et al. (1988). Correlation between defects in chromatin condensation of human spermatozoa stained by aniline blue and semen characteristics. Andrologia, 20:211-217.
26. Devillard F et al. (2002). Polyploidy in large-headed sperm: FISH study of three cases. Human Reproduction, 17:1292-1298.
27. Elliott, H.R., Samuels, D.C., Eden, J.A., Relton, C.L., Chinnery, P.F., 2008. Pathogenic mitochondrial DNA mutations are common in the general population. Am. J. Human Genet. 83, 254–260
28. Eliasson R (1975). Analysis of semen. In: Behrman SJ, Kistner RW, eds. Progress in Infertility, 2nd ed. New York, Little, Brown: 691-713.
29. Espinoza JA, Paasch U & Villegas JV 2009 Mitochondrial membrane potential disruption pattern in human sperm. Human Reproduction 24 2079–2085. (doi:10.1093/humrep/dep120)
30. Evenson, D.P., Wixon, R., 2006. Clinical aspects of sperm DNA fragmentation detection and male infertility. Theriogenology 15, 979–991
31. Fredricsson B, Björk G (1977). Morphology of postcoital spermatozoa in the cervical secretion and its clinical significance. Fertility and Sterility, 28:841-845.
32. Gandini L et al. (2000). Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa. Human Reproduction, 15:830-839.
33. Graham, J. K., Kunze, E., Hammerstedt, R. H., (1990). Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity and mitochondrial function using flow cytometry. Biology of reproduction 43: 55-64.
34. Greaves LC, Reeve AK, Taylor RW & Turnbull DM 2012 Mitochondrial DNA and disease. Journal of Pathology 226 274–286.
35. Grunewald S, Paasch U, Said TM, Sharma RK, Glander HJ & Agarwal A 2005 Caspase activation in human spermatozoa in response to physiological and pathological stimuli. Fertility and Sterility 83 (Suppl 1) 1106–1112.

36. Grunewald S, Said TM, Paasch U, Glander HJ & Agarwal A 2008 Relationship between sperm apoptosis signalling and oocyte penetration capacity. *International Journal of Andrology* 31 325–330.
37. Handelsman DJ et al. (1984). Testicular function in potential sperm donors: normal ranges and the effects of smoking and varicocele. *International Journal of Andrology*, 7:369-382.
38. Ho HC & Wey S 2007 Three dimensional rendering of the mitochondrial sheath morphogenesis during mouse spermiogenesis. *Microscopic Research and Technique* 70 719–723.
39. Hossain AM et al. (1998). Time course of hypo-osmotic swellings of human spermatozoa: evidence of ordered transition between swelling subtypes. *Human Reproduction*, 13:1578-1583.
40. Jaffe TM et al. (1998). Sperm pellet analysis: a technique to detect the presence of sperm in men considered to have azoospermia by routine semen analysis. *Journal of Urology*, 159:1548-1550.
41. Jeyendran RS et al. (1984). Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to the other semen characteristics. *Journal of Reproduction and Fertility*, 70:219-228.
42. Johansson E et al. (2000). Evaluation of “round cells” in semen analysis: a comparative study. *Human Reproduction Update*, 6:404-412.
43. Johnsen O, Eliasson R (1987). Evaluation of a commercially available kit for the colorimetric determination of zinc in human seminal plasma. *International Journal of Andrology*, 10:435-440.
44. Jouannet P et al. (1988). Male factors and the likelihood of pregnancy in infertile couples. I. Study of sperm characteristics. *International Journal of Andrology*, 11:379-394
45. Kotwicka M, Filipiak K, Jedrzejczak P & Warchol JB 2008 Caspase-3 activation and phosphatidylserine membrane translocation in human spermatozoa: is there a relationship? *Reproductive BioMedicine Online* 16 657–663.
46. Larsen L et al. (2000). Computer-assisted semen analysis parameters as predictors for fertility of men from the general population. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. *Human Reproduction*, 15:1562-1567.
47. Larsson, N.G., Oldfors, A., Garman, J.D., Barsh, G.S., Clayton, D.A., 1997. Downregulation of mitochondrial transcription factor A during spermatogenesis in humans. *Human Mol. Genet.* 6, 185–191
48. Lindsay KS et al. (1995). Classification of azoospermic samples. *Lancet*, 345:1642.
49. Liu DY, Baker HWG (1992a). Morphology of spermatozoa bound to the zona pellucida of human oocytes that failed to fertilize in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility*, 94:71-84.
50. Liu DY, Baker HWG (2003). Disordered zona pellucida induced acrosome reaction and failure of in-vitro fertilization in patients with unexplained infertility. *Fertility and Sterility*, 79:74-80.
51. Liu DY et al. (2003). Low proportions of sperm can bind to the zona pellucida of human oocytes. *Human Reproduction*, 18:2382-2389.

52. MacLeod J, Wang Y (1979). Male fertility potential in terms of semen quality: a review of the past, a study of the present. *Fertility and Sterility*, 31:103-116.
53. Martin RH et al. (2003). A comparison of the frequency of sperm chromosome abnormalities in men with mild, moderate, and severe oligozoospermia. *Biology of Reproduction*, 69:535-539
54. May-Panloup, P., Chretien, M.F., Savagner, F., Vasseur, C., Jean, M., Malthiery, Y., Reynier, P., 2003. Increased sperm mitochondrial DNA content in male infertility. *Human Reprod.* 18, 550–556.
55. Menkveld R et al. (1991). Sperm selection capacity of the human zona pellucida. *Molecular Reproduction and Development*, 30:346-352.
56. Menkveld R et al. (2001). Semen parameters, including WHO and strict criteria morphology, in a fertile and subfertile population: an effort towards standardization of in-vivo thresholds. *Human Reproduction*, 16:1165-1171.
57. Midzak AS, Chen H, Aon MA, Papadopoulos V & Zirkin BR 2011 ATP synthesis, mitochondrial function, and steroid biosynthesis in rodent primary and tumor Leydig cells. *Biology of Reproduction* 84, 976–985.
58. Mortimer D (1994a). *Practical laboratory andrology*. Oxford, Oxford University Press.
59. Nichols DG & Ferguson SJ 2002 *Bioenergetics*, 3rd edn. Amsterdam: Academic Press
60. Nunnari J & Suomalainen A 2012 *Mitochondria: in sickness and in health*. *Cell* 148 1145–1159.
61. Olson GE & Winfrey VP 1990 Mitochondria–cytoskeleton interactions in the sperm midpiece. *Journal of Structural Biology* 103 13–22.
62. Otani H, Tanaka O, Kasai K & Yoshioka T 1988 Development of mitochondrial helical sheath in the middle piece of the mouse spermatid tail: regular dispositions and synchronized changes. *Anatomical Record* 222 26–33.
63. Paasch U, Grunewald S, Agarwal A & Glandera HJ 2004a Activation pattern of caspases in human spermatozoa. *Fertility and Sterility* 81 (Suppl 1) 802–809.
64. Paasch U, Grunewald S, Dathe S & Glander HJ 2004b Mitochondria of human spermatozoa are preferentially susceptible to apoptosis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1030 403–409.
65. Patron M, Raffaello A, Granatiero V, Tosatto A, Merli G, De Stefani D, Wright L, Pallafacchina G, Terrin A, Mammucari C et al. 2013 The mitochondrial calcium uniporter (MCU): molecular identity and physiological roles. *Journal of Biological Chemistry* 288 10750–10758.
66. Perchec, G., Jeulin, C., Cosson, J., André, F., Billard, R., (1995). Relationship between sperm ATP content and motility of carp spermatozoa. *Journal of Cell Science* 108: 747-753
67. Ramalho-Santos J 2011 A sperm's tail: the importance of getting it right. *Human Reproduction* 26 2590–2591.
68. Ramalho-Santos J & Amaral S 2013 Mitochondria and mammalian reproduction. *Molecular and Cellular Endocrinology* .
69. Ramalho-Santos J, Varum S, Amaral S, Mota PC, Sousa AP & Amaral A 2009 Mitochondrial functionality in reproduction: from gonads and gametes to embryos and embryonic stem cells. *Human Reproduction Update* 15 553–572.

70. Rizzuto R, De Stefani D, Raffaello A & Mammucari C 2012 Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 13 566–578.
71. Rajender, S., Rahul, P., Ali Mahdi, A., (2010). Mitochondria, spermatogenesis and male infertility. Elsevier B.V, *Mitochondrion* 10: 419–428.
72. Rowland AA & Voeltz GK 2012 Endoplasmic reticulum–mitochondria contacts: function of the junction. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 13 607–625.
73. Sakkas D, Mariethoz E & St John JC 1999 Abnormal sperm parameters in humans are indicative of an abortive apoptotic mechanism linked to the Fas-mediated pathway. *Experimental Cell Research* 251 350–355.
74. Sakkas D, Moffatt O, Manicardi GC, Mariethoz E, Tarozzi N & Bizzaro D 2002 Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. *Biology of Reproduction* 66 1061–1067.
75. Samudio I, Konopleva M, Hail N, Shi YX, McQueen T, Hsu T, Evans R, Honda T, Gribble GW, Sporn M, Gilbert HF, Safe S, Andreeff MJ *Biol Chem* (2005) 280:36273-36282
76. Smolewski P, Bedner E, Gorczyca W, Darzynkiewicz Z, *Cytometry* (2001) 44:355-360
77. St. John, J.C., Sakkas, D., Barratt, C.L., 2000. A role for mitochondrial DNA and sperm survival. *J. Androl.* 21, 189–199.
78. Stocco D & McPhaul M 2006 Physiology of testicular steroidogenesis. In Knobil and Neill's *Physiology of Reproduction*, 3rd edn, pp 977–1016. Ed. Je Neill. St Louis, MO, USA: Academic Press/Elsevier.
79. Spiropoulos, J., Turnbull, D.M., Chinnery, P.F., 2002a. Can mitochondrial DNA mutations cause sperm dysfunction? *Mol. Human Reprod.* 8, 719–721
80. Schon EA, DiMauro S & Hirano M 2012 Human mitochondrial DNA: roles of inherited and somatic mutations. *Nature Reviews. Genetics* 13 878–890.
81. Suhee, K., Cansu, A., Yuksel, A., (2013). Effects of various physical stress factors on mitochondrial function and reactive oxygen species in rat spermatozoa. *Reprod Fertil Dev.* Author manuscript 25(7) : 1051-1064
82. Thangaraj, K., Joshi, M.B., Reddy, A.G., Rasalkar, A.A., Singh, L., 2003. Sperm mitochondrial mutations as a cause of low sperm motility. *J. Androl.* 24, 388– 392.
83. Tomlinson MJ et al. (1993). Prospective study of leukocytes and leukocyte subpopulations in semen suggests they are not a cause of male infertility. *Fertility and Sterility*, 60:1069-1075.
84. Tremellen, K., 2008. Oxidative stress and male infertility—a clinical perspective. *Human Reprod. Update* 14, 243–258
85. Wai, T., Ao, A., Zhang, X., Cyr, D., Dufort, D., Shoubridge, E.A., 2010. The role of mitochondrial DNA copy number in mammalian fertility. *Biol. Reprod.*, in press.
86. Wei Dong, Z., Zhan, Z., Li Ting, J., Lin Lin, Z., Teng, F., Yu Shan, L., Peng, W., Lin, S., Ying, S., Hui Zhen, Z., 2014. Oxygen free radicals and mitochondrial signaling in oligospermia and asthenospermia. *Molecular medicine reports* 10: 1875-1880
87. Weng SL, Taylor SL, Morshedi M, Schuffner A, Duran EH, Beebe S & Oehninger S 2002 Caspase activity and apoptotic markers in ejaculated human sperm. *Molecular Human Reproduction* 8 984–991.

88. WHO (1987). (prepared by Comhaire F et al.) Towards more objectivity in diagnosis and management of male infertility. *International Journal of Andrology*, (Suppl. 7): 22-24.
89. WHO (1996). Task Force for the Regulation of Male Fertility. Contraceptive efficacy of testosterone-induced azoospermia and oligozoospermia in normal men. *Fertility and Sterility*, 65:821-829
90. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, (2010). WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5<sup>th</sup> edition
91. Wolff H (1995). The biologic significance of white blood cells in semen. *Fertility and Sterility*, 63:1143-1157.
92. Zhang Y, Ou Y, Cheng M, Saadi HS, Thundathil JC & van der Hoorn FA 2012 KLC3 is involved in sperm tail midpiece formation and sperm function. *Developmental Biology* 366 101–110.
93. Zinaman MJ et al. (2000). Semen quality and human fertility: a prospective study with healthy couples. *Journal of Andrology*, 21:145-153
94. Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Stryer, L. Βιοχημεία. Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης, Τόμος Ι.
95. Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Stryer, L. Βιοχημεία. Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης, Τόμος ΙΙ.
96. Slack, J. M. W., (2007) Βασικές αρχές βιολογίας ανάπτυξης. Ακαδημαϊκές εκδόσεις Μπάσδρα και ΣΙΑ Ο.Ε.
97. Νικολαΐδου Α, Κοντοδημόπουλος Ν, Οικονομίδης Π. Οργάνωση Εργαστηρίων και Τεχνολογία Οργάνων. Έκδοση Παιδαγωγικού Ινστιτούτου Υπουργείου Παιδείας δια βίου μάθησης και Θρησκευμάτων, Αθήνα 2001.