



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ SPERM DNA FRAGMENTATION

ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ

ΕΥΑΝΘΙΑ ΚΑΡΑΓΙΑΝΝΗ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΛΑΡΙΣΑ

Σεπτέμβριος 2012

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟΣ ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΙΩΑΝΝΗΣ Ε. ΜΕΣΣΗΝΗΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπων: Γ. Ανυφαντής Ph.D. Κλινικός Εμβρυολόγος

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

**Κ.Νταφόπουλος,
Επίκουρος Καθηγητής Μαιευτικής & Γυναικολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας**

**Ν.Βαμβακόπουλος
Καθηγητής Βιολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας**

ΕΙΣΑΓΩΓΗ	4
ΣΠΕΡΜΑΤΟΓΕΝΕΣΗ	4
ΔΝΑ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΟΥ ΚΑΙ ΔΟΜΗ ΧΡΩΜΑΤΙΝΗΣ	7
ΚΑΤΑΚΕΡΜΑΤΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΔΝΑ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ	8
ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΒΛΑΒΗΣ ΤΟΥ ΔΝΑ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ	9
ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΤΩΝ ΒΛΑΒΩΝ ΤΟΥ ΔΝΑ	12
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	13
ΣΥΛΛΟΓΗ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ	13
ΑΝΑΛΥΣΗ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ	14
ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ	15
ΔΙΑΣΠΟΡΑ ΤΗΣ ΧΡΩΜΑΤΙΝΗΣ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ (SCD)	17
ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ SCD	19
ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ ΤΩΝ ΚΑΤΑΤΜΗΣΕΩΝ ΤΟΥ ΔΝΑ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ ΣΤΟ ΟΠΤΙΚΟ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ	21
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΠΟΣΟΣΤΟΥ ΚΑΤΑΚΕΡΜΑΤΙΣΜΕΝΟΥ ΔΝΑ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΩΝ	24
ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	25
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	25
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	35
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	38

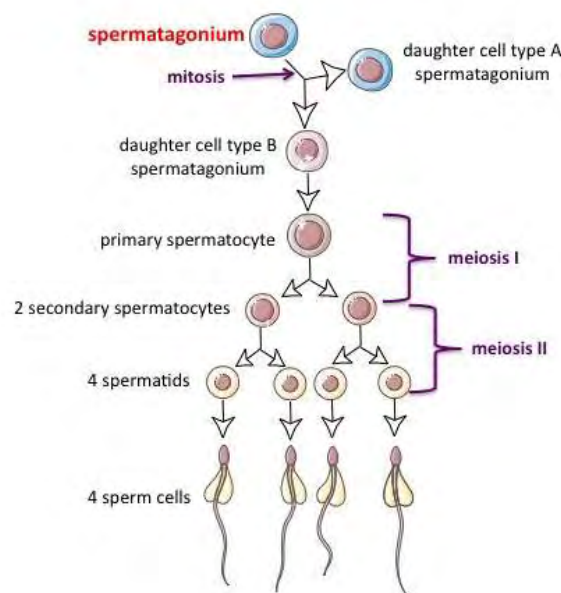
Εισαγωγή

Η ακεραιότητα του DNA σπέρματος αναγνωρίζεται ως μία νέα παράμετρος της ποιότητας του σπέρματος που δυνητικά μπορεί να προβλέψει την γονιμοποιητική ικανότητα ενός άνδρα. Είναι πλέον αποδεκτό ότι η ανδρική γονιμότητα επηρεάζεται από τον κατακερματισμό του DNA σπέρματος. Ο προσδιορισμός των επιπέδων κατατμήσεων του DNA σπερματοζωαρίων σε συνδυασμό με τις κλασικές παραμέτρους του σπέρματος όπως ορίζονται από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας μπορεί να βοηθήσουν στην επιλογή της καταλληλότερης μεθόδου γονιμοποίησης ώστε να αντιμετωπιστεί η αρνητική συνεισφορά του πατρικού γονιδιώματος. Ο προσδιορισμός των κατατμήσεων του DNA σπέρματος μπορεί να αποτελέσει σημαντικό προγνωστικό κριτήριο της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής ειδικά για ζευγάρια με χαμηλά ποσοστά εμβρυϊκής εμφύτευσης και κακής ποιότητας έμβρυα.

Σπερματογένεση

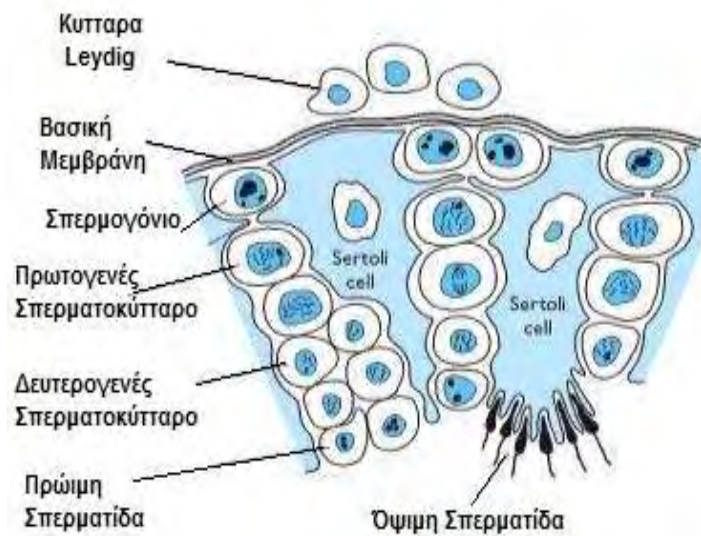
Η σπερματογένεση επιτελείται στα σπειροειδή σπερματικά σωληνάρια. Τα αδιαφοροποίητα γαμετικά κύτταρα που ονομάζονται σπερμογόνια αρχίζουν να διαιρούνται μιτωτικά κατά την εφηβεία. Τα θυγατρικά κύτταρα της πρώτης διαίρεσης επαναδιαιρούνται και αυτό επαναλαμβάνεται για ένα συγκεκριμένο αριθμό διαιρετικών κύκλων έτσι ώστε να προκύπτει ένας ολόκληρος κλώνος σπερματογονίων από κάθε πρότυπο σπερματογόνιο. Ένα από τα θυγατρικά κύτταρα καθενός κλώνου εγκαταλείπει τον κύκλο μίτωσης-διαφοροποίησης και επιστρέφει σε κατάσταση αρχέγονου σπερματογονίου, το οποίο αργότερα επανεισάγεται στη διαιρετική ακολουθία. Με αυτή τη διαδικασία παραμένει ανεξάντλητη η δεξαμενή αδιαφοροποίητων σπερματογονίων. Επιπρόσθετα με τη μίτωση διαίρεση των υπολοίπων θυγατρικών κυττάρων του κλώνου επέρχεται και η διαφοροποίηση. Τα κύτταρα που προκύπτουν από τη μιτωτική διαίρεση και τη διαφοροποίηση ονομάζονται πρωτογενή σπερματοκύτταρα. Κάθε πρωτογενές σπερματοκύτταρο αυξάνει σε μέγεθος και εισέρχεται στην πρώτη μειωτική διαίρεση για να σχηματιστούν δύο δευτερογενή σπερματοκύτταρα καθένα από τα οποία περιέχει 23 χρωμοσώματα με δύο

χρωματίδες το καθένα. Ακολούθως κάθε δευτερογενές σπερματοκύτταρο υπόκειται δεύτερη μειωτική διαίρεση και προκύπτουν δύο σπερματίδες. Συνεπώς από κάθε πρωτογενές σπερματοκύτταρο με 46 χρωμοσώματα και διπλές χρωματίδες προκύπτουν 4 σπερματίδες με καθεμία να περιέχει 23 χρωμοσώματα φέροντα μία χρωματίδη το καθένα. Ολόκληρη η διαδικασία από τα πρωτογενή σπερματοκύτταρα μέχρι το σχηματισμό σπερματοζωαρίου διαρκεί περίπου 64 μέρες.



Εικόνα 1: Σύνοψη της σπερματογένεσης.

Η τελική φάση της σπερματογένεσης είναι η διαφοροποίηση και ωρίμανση των σπερματίδων σε σπερματοζωάρια και καλείται σπερμιογένεση. Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει κυτταρική αναδόμηση με εκτεταμένη επιμήκυνση αλλά όχι νέα διαίρεση του κυτάρου (Lucinda L.,1999). Η σπερμιογένεση ολοκληρώνεται με την αποδέσμευση των σπερματοζωαρίων από τα κύτταρα Sertoli.



Η κεφαλή του σπερματοζωαρίου αποτελείται σχεδόν αποκλειστικά από τον πυρήνα που φέρει το σύνολο της γενετικής πληροφορίας. Το έσχατο σημείο του πυρήνα, το ακρόσωμα φέρει πρωτεΐνες και ένζυμα τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στη διεισδυτική ικανότητα του σπερματοζωαρίου εντός του ωαρίου. Ο αυχένας πληρείται από μιτοχόνδρια τα οποία παρέχουν την απαραίτητη ενέργεια για την κίνηση του σπερματοζωαρίου. Το μεγαλύτερο μέρος της ουράς εκλαμβάνεται ως ένα μαστίγιο αποτελούμενο από συσταλά νημάτια τα οποία παράγουν μία ημιτονοειδή κίνηση.

DNA Σπερματοζωαρίου και Δομή Χρωματίνης

Η χρωματίνη των σπερματοζωαρίων είναι σφικτά πακεταρισμένη λόγω της αλληλεπίδρασης του DNA με τον πυρήνα και τις πυρηνικές πρωτεΐνες των σπερματοζωαρίων. Κατά τη διάρκεια των όψιμων σταδίων της σπερματογένεσης, η πυρηνική αναμόρφωση των σπερματίδων και η συμπύκνωση της χρωματίνης πραγματοποιείται με αντικατάσταση των ιστονών με προσωρινές πρωτεΐνες που στη συνέχεια αντικαθίστανται από πρωταμίνες. Οι αλυσίδες του DNA σφικτά τυλιγμένες γύρω από τα μόρια των πρωταμινών σχηματίζουν την ελικοειδή δομή (Balhorn R., 1982). Δισουλφιδικοί δεσμοί ανάμεσα σε περιοχές των πρωταμινών που είναι πλούσιες σε κυστεΐνες ευθύνονται για περεταίρω σταθερότητα της δομής ενώ θεωρείται πως προστατεύουν το γονιδίωμα του σπερματοζωαρίου από εξωγενές stress όπως είναι η οξειδωση και η αύξηση της θερμοκρασίας εντός του γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος (Kosower NS. et al., 1992).

Αν και η χρωματίνη όπως αναφέρθηκε πακετάρεται με τη βοήθεια των πρωταμινών, ένα 15% του DNA παραμένει πακεταρισμένο με ιστόνες σε συγκεκριμένες γενετικές περιοχές (Gatewood JM. et al., 1987). Αυτές οι DNA αλληλουχίες είναι λιγότερο συμπυκνωμένες και ίσως αυτές σχετίζονται με την γονιμοποίηση και την πρώιμη ανάπτυξη του εμβρύου (Balhorn R., 1982.; Gatewood JM. et al., 1987). Οι συγκεκριμένες αλληλουχίες πιθανόν να αποτελούν περιοχές των τελομερών και ίσως είναι μεταξύ των πρώτων περιοχών του πυρήνα των σπερματοζωαρίων που ανταποκρίνονται στα σήματα του ωαρίου για σχηματισμό προπυρήνων (Gineitis AA. et al., 2000). Επίσης συμπλέγματα τελομερών-μικροσωληνίσκων εμπλέκονται στην κίνηση του αντρικού προπυρήνα (Chikashige Y. et al., 1994).

Όπως είναι γνωστό το μεγαλύτερο μέρος του γονιδιώματος ενός σπερματοζωαρίου εδράζεται στον πυρήνα αλλά ένα μικρό μέρος του DNA του είναι μιτοχονδριακό. Το μιτοχονδριακό DNA ενός σπερματοζωαρίου είναι μικρό με μήκος (16,5kb), κυκλικό και δε δεσμεύεται σε πρωτεΐνες όπως το πυρηνικό DNA (Anderson S. et al., 1981). Φέρει μεγάλο ποσοστό μεταλλαγών (10-100 φορές περισσότερες σε σχέση με το πυρηνικό DNA) και αυτό

αποδίδεται στην έλλειψη ιστονών και πρωταμινών καθώς και στην παρουσία ενεργών ριζών οξυγόνου (Kao SH. et al., 1998).

Κατακερματισμός του DNA σπέρματος

Η αποδιάταξη και ο κατακερματισμός αποτελούν τις κυριότερες βλάβες του DNA σπέρματος. Ο κατακερματισμός αφορά την κατάτμηση της δίκλωνης αλυσίδας του DNA ενός σπερματοζωαρίου σε μικρά δίκλινα ή μονόκλινα τμήματα. Τα αίτια για αυτή τη βλάβη καθώς και για την επακόλουθη υπογονιμότητα του ανδρός είναι πολυπαραγοντικά.

Μπορεί να περιορίζονται σε παράγοντες που αφορούν αποκλειστικά τους όρχεις αλλά μπορεί και να ευθύνονται εξωορχικοί παράγοντες για τις βλάβες του DNA του σπέρματος. Δεν έχει εξακριβωθεί μέχρι στιγμής ο ακριβής μηχανισμός της θραύσης του DNA. Το σίγουρο είναι ότι ο μηχανισμός αυτός έχει βρει τον τρόπο να παρακάμπτει τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA. Μέχρι στιγμής εικάζεται πως η αποπτωτική διαδικασία, ο ελαττωματικός μηχανισμός συμπύκνωσης της χρωματίνης και το οξειδωτικό στρες αποτελούν τις κύριες αιτίες κατάτμησης του DNA. Δεν είναι τυχαίο άλλωστε πως ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος των σπερματοζωαρίων κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής σπερματογένεσης έχει ως αποτέλεσμα τον αφανισμό του 75% των δυνητικών σπερματοζωαρίων αφού προηγουμένως έχει κατακερματιστεί το DNA αυτών. Οι εξωορχικοί παράγοντες που ευθύνονται για τον κατακερματισμό του DNA των σπερματοζωαρίων είναι αρκετοί με ορισμένους να μπορούν να αποφευχθούν ενώ άλλοι είναι αναστρέψιμοι. Πιο λεπτομερής αναφορά για τους παράγοντες που ευθύνονται για τον κατακερματισμό του DNA των σπερματοζωαρίων γίνεται στο κείμενο παρακάτω. Θα πρέπει να αναφερθεί ότι κατακερματισμός του DNA σπέρματος δεν παρατηρείται μόνο σε υπογόνιμους άνδρες αλλά ένα μικρό ποσοστό κατακερματισμού συναντάται και σε σπερματοζωάρια ανδρών αποδεδειγμένα γόνιμων (Spano M. et al., 2000.; Zini A. et al., 2001.; Kodama H. et al., 1997).

Παράγοντες βλάβης του DNA σπέρματος

Οι κυριότεροι παράγοντες που μπορεί να προκαλέσουν κατακερματισμό ή και αποδιάταξη του DNA είναι οι παρακάτω:

Ελαττωματικές Πρωταμίνες

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

Ενεργές Ρίζες Οξυγόνου (ROS)

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

Απόπτωση

Οι κατατμήσεις του DNA μπορεί να οφείλονται σε προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο των σπερματοζωαρίων.. Κατά την σπερματογένεση η απόπτωση εκτελείται στο 75% των εν δυνάμει σπερματοζωαρίων. Αυτή η επιλεκτική απόπτωση αποτρέπει την παρουσία υπερβολικά μεγάλου αριθμού γενετικών κυττάρων καθώς επίσης επιλέγει τα φυσιολογικά σπερματοζωάρια και απορρίπτει τα μη φυσιολογικά σπερματοζωάρια. Στον αντίποδα η προχωρημένη ηλικία καθώς και τοξίνες έχουν συσχετιστεί με μειωμένα επίπεδα απόπτωσης γενετικών κυττάρων και αυξημένα ποσοστά εκσπερμάτισης σπερματοζωαρίων που φέρουν βλάβες στο DNA τους. Σε αυτούς τους άνδρες έχει διακοπεί η φυσιολογική διαδικασία του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (Singh NP. et al., 2003).

Ορμονικοί Παράγοντες

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

Φλεγμονές Γενετικού Συστήματος

Οι φλεγμονές του γενετικού συστήματος του ανδρός προκαλούν αύξηση του αριθμού των λευκοκυττάρων στο σπέρμα και άρα αύξηση των παραγόμενων ROS. Συνεπώς οι φλεγμονές του γενετικού συστήματος σχετίζονται άμεσα με αυξημένα επίπεδα βλαβών στο DNA των σπερματοζωαρίων (Erenpreiss J. et al., 2002).

Φάρμακα και Ακτινοβολία

Διάφορα φάρμακα όπως αυτά της χημειοθεραπείας καθώς και διαφόρων τύπων ακτινοβολίας είναι ικανά να προκαλέσουν παρόμοιας έκτασης βλάβη στο DNA εξαρτώμενη βέβαια από τη δόση και τη διάρκεια έκθεσης (Morris ID. 2002). Για την ανάκαμψη της σπερματογένεσης μετά από τη χημειοθεραπεία μπορεί να χρειαστεί να μεσολαβήσει ένα χρονικό διάστημα μηνών ή και

χρόνων ωστόσο ή παρουσία ελαττωματικού DNA στον πυρήνα των σπερματοζωαρίων μπορεί να διαπιστωθεί και μετά το πέρας του διαστήματος αυτού υποδηλώνοντας την ισχυρή αρνητική επίδραση των χημειοθεραπευτικών φαρμάκων και της ακτινοβολίας στην ακεραιότητα του DNA.

Κάπνισμα

Το κάπνισμα έχει σχετιστεί με χαμηλές συγκεντρώσεις σπέρματος και μειωμένη κινητικότητα των σπερματοζωαρίων. Επίσης έχει συσχετιστεί με αυξημένα επίπεδα μη φυσιολογικών μορφών σπερματοζωαρίων (Potts RJ. et al., 1999; Kunzle R. et al., 2003). Θεωρείται δεδομένο ότι το κάπνισμα αυξάνει την παραγωγή των ROS από τα λευκοκύτταρα και συνεπώς αυξάνει και τις κατατμήσεις του DNA (Potts RJ. et al., 1999).

Ηλικία

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

Υπερθερμία των Όρχεων

Η τεχνητή αύξηση της θερμοκρασίας των όρχεων αποδείχτηκε ότι αυξάνει την αναλογία ιστονών σε σχέση με των πρωταμινών και προκαλεί αστάθεια στο DNA των σπερματοζωαρίων (Banks S. et al., 2005). Η υπερθερμία επηρεάζει κυρίως τα σπερμογόνια και τα πρωτογενή σπερματοκύτταρα.

Κιρσοκήλη

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

Τεχνικές ανίχνευσης των Βλαβών του DNA

Οι μέθοδοι ανίχνευσης του κατακερματισμένου DNA σπερματοζωαρίων μπορούν να διακριθούν σε άμεσες και έμμεσες. Οι άμεσες μέθοδοι εντοπίζουν τα ακριβή τμήματα DNA που προκύπτουν μετά από θραύση ενώ οι έμμεσες μέθοδοι ποσοτικοποιούν την ευαισθησία θραύσης του DNA σπέρματος. Οι συχνότερα χρησιμοποιούμενες τεχνικές είναι η Terminal Deoxynucleotidyl Transferase mediated Nick End Labeling (TUNEL), η ηλεκτροφόρηση ενός κυττάρου (COMET), η in situ Nick Translation (NT) και η «Ανίχνευση της δομής της Χρωματίνης» (SCSA). Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες έμμεσες μέθοδοι είναι η «Δοκιμασία της Ακριδίνης» , η «Ανίχνευση σπασμάτων του DNA με In situ φθορίζοντα υβριδισμό» (DBD-FISH) και η «Διασπορά της χρωματίνης σπέρματος» (SCD). Όλες οι παραπάνω τεχνικές προσδιορίζουν το σύνολο του κατακερματισμένου DNA σπερματοζωαρίων ανεξάρτητα από την περιοχή του γονιδιώματος που έχει υποστεί θραύση.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Το πειραματικό μέρος της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκε στη μονάδα Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας. Αρχικά έγινε η συλλογή και η ανάλυση σπερμοδιαγράμματος πλήθους δειγμάτων σπέρματος από τα οποία τελικά επιλέχθηκαν 92 δείγματα με συγκεκριμένα κριτήρια που αναφέρονται παρακάτω ώστε να εφαρμοστεί σε αυτά η μέθοδος «Διασπορά της Χρωματίνης Σπέρματος». Στόχος της μεθόδου είναι ο προσδιορισμός του ποσοστού κατακερματισμένου DNA σπερματοζωαρίων (%SDF). Η πειραματική διαδικασία που ακολουθείται για κάθε δείγμα περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω.

Συλλογή Σπέρματος

- Το δείγμα συλλέγεται μετά από αυνανισμό σε δωμάτιο κοντά στο εργαστήριο ώστε να περιοριστεί η έκθεση του σε διακυμάνσεις της θερμοκρασίας και για να υπάρχει σωστότερη διαχείριση του χρόνου μεταξύ συλλογής και ανάλυσης.
- Το δείγμα δίνεται μετά από σεξουαλική αποχή του ανδρός μεταξύ 2-7 ημερών. Η συλλογή του σπέρματος γίνεται σε πλαστικό δοχείο αποστειρωμένο και ελεγμένο για απαλλαγή από τοξικές ουσίες. Τα μη-ακέραια δείγματα δεν εκτιμούνται.
- Επάνω στο δοχείο καταγράφονται πληροφορίες σχετικά με το όνομα του ανδρός και την ώρα λήψης του σπέρματος.
- Το δοχείο με το σπέρμα θα πρέπει να διατηρείται εντός εργαστηρίου σε θερμοκρασία από 20 °C έως 37 °C μέχρι τη στιγμή ανάλυσης του.

Ανάλυση Σπέρματος

Η ανάλυση του σπέρματος πριν από την εκτίμηση των κατατμήσεων DNA περιλαμβάνει πάντα τη μακροσκοπική και μικροσκοπική εξέταση αυτού.

Μακροσκοπικά εκτιμάται:

- Η Ρευστοποίηση
- Το Ιξώδες
- Το Χρώμα
- Ο Όγκος
- Το pH του σπέρματος.

Μικροσκοπικά και με την βοήθεια ανάστροφου μικροσκοπίου ελέγχεται:

- Η ύπαρξη βλεννωδών σχηματισμών
- Η παρουσία συσσωματώσεων και συγκολλήσεων
- Η παρουσία άλλων κυττάρων εκτός των σπερματοζωαρίων
- Γίνεται εκτίμηση της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων και της συγκέντρωσης του σπέρματος.

Αναλυτικότερα και σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας η ανάλυση σπέρματος περιλαμβάνει σε δεδομένο χρόνο τα παρακάτω:

Εντός των 5 πρώτων λεπτών μετά τη λήψη σπέρματος:

- Το δοχείο συλλογής του σπέρματος τοποθετείται σε επωαστικό κλίβανο στους 37°C με σκοπό τη ρευστοποίηση.

Μεταξύ 30 και 60 λεπτών μετά τη λήψη σπέρματος:

- Εκτιμάται η ρευστοποίηση και η μορφολογία του σπέρματος
- Υπολογίζεται ο όγκος του δείγματος
- Εκτιμάται το pH
- Παρατηρείται μικροσκοπικά η μορφολογία και η κινητικότητα των σπερματοζωαρίων ενώ παράλληλα αξιολογείται η πιθανότητα της αραίωσης του σπέρματος.
- Υπολογίζεται ο αριθμός των σπερματοζωαρίων και συνεπώς η συγκέντρωση του σπέρματος.

Φυσιολογικές Παράμετροι Σπέρματος

Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας ορίζει ως φυσιολογικές ιδιότητες και τιμές παραμέτρων σπέρματος τις ακόλουθες:

Ρευστοποίηση: Ένα ακέραιο δείγμα σπέρματος φυσιολογικά ρευστοποιείται μέσα σε 15 min από τη λήψη του αν και σπανιότερα μπορεί να χρειαστεί χρόνος έως και 60 min για τη ρευστοποίηση. Τοποθέτηση του σπέρματος εντός επωαστικού κλιβάνου στους 37°C ή επώαση σε θερμοκρασία δωματίου με συνεχή ανάδευση μπορεί να διευκολύνει τη ρευστοποίηση και τη δημιουργία ενός ομοιογενούς δείγματος.

Ιξώδες: Μετά τη ρευστοποίηση το ιξώδες μπορεί να εκτιμηθεί με ήπια αναρρόφηση του δείγματος με σύριγγα ή πιπέτα και αφήνοντας να πέσει το σπέρμα λόγω βαρύτητας σταγόνα –σταγόνα να παρατηρήσουμε το μήκος των νημάτων που δημιουργούνται. Σπέρματα με φυσιολογικό ιξώδες δημιουργούν νήματα με μήκος μικρότερο των 2 cm.

Εμφάνιση: Ένα κανονικό σπέρμα φέρει ομοιογενές γκρι ιριδίζον χρώμα. Έχει εμφάνιση περισσότερο ή λιγότερο διαφανή εξαρτώμενη πάντα από τη συγκέντρωση των σπερματοζωαρίων.

Όγκος: Φυσιολογικά αποδεκτές τιμές του όγκου θεωρούνται όλες οι τιμές μεταξύ 1,5ml και 6ml.

pH: Ο προσδιορισμός του pH γίνεται με τη βοήθεια πεχαμετρικού χαρτιού που μετρά pH με εύρος από 6-10. Αποδεκτές τιμές pH σπέρματος βρίσκονται μεταξύ 7,2 και 8.

Συγκέντρωση: Ως κατώτερο όριο αναφοράς της συγκέντρωσης των σπερματοζωαρίων θεωρείται η τιμή 15×10^6 /ml. Η συγκέντρωση εκτιμάται πάντα με τη βοήθεια Chamber Makler ή πλάκας Neubauer.

Ολικός Αριθμός : Ως φυσιολογικό θεωρούμε το σπέρμα με ολικό αριθμό σπερματοζωαρίων ίσο ή μεγαλύτερο των 39×10^6 σπερματοζωάρια ανά εκσπερμάτιση.

Κινητικότητα : Το ποσοστό των σπερματοζωαρίων με προωθητική και μη προωθητική κινητικότητα πρέπει να είναι τουλάχιστον 40% ενώ το ποσοστό των σπερματοζωαρίων μόνο με προωθητική κινητικότητα θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 32%.

Μορφολογία: Το κατώτερο όριο φυσιολογικών μορφών σπερματοζωαρίων επί του συνόλου των σπερματοζωαρίων ενός δείγματος θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 4%.

Βιωσιμότητα: Το 58% των σπερματοζωαρίων ενός σπέρματος θα πρέπει να είναι ζώντα (κινητά ή ακίνητα). Υπάρχει πλήθος μεθόδων με τις οποίες εκτιμάται η βιωσιμότητα με σημαντικότερες τη χρήση Ιοσίνης και τη δοκιμασία περοσμητικού διαλύματος.

Συγκολλήσεις: Θεωρούμε φυσιολογικό το σπέρμα στο οποίο οι συγκολλήσεις καταλαμβάνουν λιγότερο από 20% του δείγματος.

Λευκά Αιμοσφαίρια: Για να μη θεωρηθεί ένα δείγμα παθολογικό θα πρέπει η συγκέντρωση των λευκών αιμοσφαιρίων να είναι το ανώτερο $1 \times 10^6/\text{ml}$.

Με βάση τις παραπάνω φυσιολογικές τιμές των παραμέτρων σπέρματος έχουν οριστεί καταστάσεις σπέρματος με τιμές παραμέτρων που αποκλίνουν του φυσιολογικού. Αυτές είναι:

Ολιγοζωοσπερμία: Ορίζεται η κατάσταση του σπέρματος κατά την οποία η συγκέντρωση των σπερματοζωαρίων είναι μικρότερη των $15 \times 10^6/\text{ml}$.

Ασθενοζωοσπερμία: Ορίζεται η κατάσταση σπέρματος κατά την οποία τα σπερματοζωάρια με προωθητική κινητικότητα αποτελούν λιγότερο από 32% του συνόλου.

Ολιγοασθενοζωοσπερμία : Αποτελεί συνδυασμό των δύο παραπάνω καταστάσεων δηλαδή παρουσία λιγότερων από $15 \times 10^6/\text{ml}$ σπερματοζωαρίων με λιγότερο από το 32% αυτών να παρουσιάζουν προωθητική κινητικότητα.

Διασπορά της Χρωματίνης Σπέρματος **Sperm Chromatin Dispersion (SCD)**

Για τον έλεγχο των κατατμήσεων του DNA σπέρματος χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος SCD (Sperm Chromatin Dispersion – Διασπορά Χρωματίνης Σπέρματος) και το kit Halosperm[®] G2 της εταιρίας Halotech DNA. Η χρήση ήπιου οξέος που αποδιατάσσει το δίκλωνο μόριο του DNA σε συνδυασμό με τη λύση των πρωταμινών δημιουργεί ένα στεφάνι αποσυμπυκνωμένης χρωματίνης γύρω από την κεφαλή του σπερματοζωαρίου όταν το DNA είναι ακέραιο ενώ δεν παρατηρείται αυτό το χαρακτηριστικό στεφάνι όταν το DNA του σπερματοζωαρίου παρουσιάζει κατατμήσεις. Η απεικόνιση διευκολύνεται με τη χρήση της χρωστικής Diff Quick (υδατικό διάλυμα μπλε του μεθυλενίου και διάλυμα ιοσίνης) και η παρατήρηση πραγματοποιείται σε οπτικό μικροσκόπιο.

Χαρακτηριστικό πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου πέρα από το μικρό χρονικό διάστημα που απαιτείται, είναι ότι κατά την επεξεργασία του σπέρματος με τα διάφορα αντιδραστήρια διατηρούνται ακέραιες οι ουρές των σπερματοζωαρίων. Έτσι κατά την παρατήρηση στο οπτικό μικροσκόπιο γίνεται σαφώς η διάκριση μεταξύ σπερματοζωαρίων και άλλων κυτταρικών τύπων του σπέρματος. Επιπρόσθετα η συγκεκριμένη μέθοδος δεν απαιτεί ακριβό εξοπλισμό για την ανάλυση, ενώ τα αντιδραστήρια που απαιτούνται αλλά δεν περιέχονται στο kit, έχουν μικρό κόστος.



Εικόνα 3: Το kit Halosperm G2 της εταιρίας Halotech DNA (INDAS Laboratories, Madrid, Spain).

Το συγκεκριμένο kit περιλαμβάνει τα παρακάτω υλικά:

- a. 1 σωληνάριο του 1ml με αγαρόζη
- b. 10 διπλές αντικειμενοφόρους πλάκες με κάθε μια να διαθέτει θέση για το δείγμα (S) και θέση για το control (C)
- c. Σωληνάρια Eppendorf
- d. Αποδιατακτικό Διάλυμα (Denaturant Agent) των 10ml
- e. Διάλυμα Λύσης (Lysis Solution) των 10ml
- f. Διάλυμα Χρώσης A (Staining Solution A) των 10ml
- g. Διάλυμα Χρώσης B (Staining Solution B) των 10ml
- h. Float

Εκτός των υλικών του Kit χρησιμοποιήθηκαν επίσης:

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

Πρωτόκολλο της μεθόδου SCD

Τοποθετούμε το σωληνάριο αγαρόζης με τη βοήθεια του float σε υδατόλουτρο των 95-100°C για 5min μέχρι η αγαρόζη να λιώσει. Στη συνέχεια μεταφέρουμε 50ml της λιωμένης αγαρόζης σε κάθε σωληνάριο errendorf και αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι η αγαρόζη να στερεοποιηθεί. Τα errendorf tubes αγαρόζης δύναται να αποθηκεύονται στο ψυγείο στους 4°C μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

1. Επιλέγουμε κυρίως δείγματα σπέρματος με συγκέντρωση μεταξύ 2 -20 εκατομμυρίων σπερματοζωαρίων ανά ml. Για δείγμα με μεγαλύτερη συγκέντρωση αραιώνουμε το δείγμα σπέρματος με PBS ώστε η τελική συγκέντρωση να μην είναι μεγαλύτερη από 20 εκατομμύρια σπερματοζωάρια ανά ml.
2. Για κάθε δείγμα σπέρματος τοποθετούμε ένα errendorf αγαρόζης σε υδατόλουτρο των 95-100°C για 5min μέχρι η αγαρόζη να λιώσει πλήρως. Στη συνέχεια μεταφέρουμε το errendorf αγαρόζης σε υδατόλουτρο των 37°C μέχρι η θερμοκρασία της αγαρόζης να εξισορροπηθεί.
3. Μεταφέρουμε 25ml σπέρματος στο errendorf αγαρόζης και αναδεύουμε με τη βοήθεια πιπέτας.
4. Μεταφέρουμε 8ml του μείγματος που προέκυψε στο βήμα 3 σε αντικειμενοφόρο πλάκα και καλύπτουμε με καλυπτρίδα. Αποφεύγουμε τη δημιουργία φυσαλίδων κάτω από την καλυπτρίδα. Τοποθετούμε την αντικειμενοφόρο πλάκα οριζόντια διαρκώς για το υπόλοιπο την μεθόδου.
5. Τοποθετούμε την αντικειμενοφόρο πλάκα σε μεταλλική επιφάνεια και μεταφέρουμε στο ψυγείο στους 4°C για 5 min ώστε να στερεοποιηθεί η αγαρόζη και να ακινητοποιηθούν τα σπερματοζωάρια.
6. Βγάζουμε την αντικειμενοφόρο πλάκα από το ψυγείο, αφαιρούμε την καλυπτρίδα προσεκτικά ώστε να μην αφαιρέσουμε παράλληλα και στερεοποιημένο υλικό.
7. Σε θερμοκρασία δωματίου επωάζουμε το Αποδιατακτικό Διάλυμα και το Διάλυμα Λύσης. Η αντικειμενοφόρος πλάκα μεταφέρεται σε τρυβλίο Petri. Καλύπτουμε την επιφάνεια του δείγματος με το Αποδιατακτικό

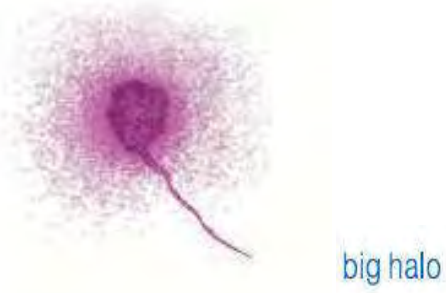

Διάλυμα για 7min. Το διάλυμα αυτό περιέχει HCl αραιωμένο σε αποσταγμένο νερό και αποδιατάσσει τα μικρά δίκλινα κομμάτια του DNA των σπερματοζωαρίων που έχουν προκύψει από κατάτμηση (Fernández JL. et al., 2005). Μετά το πέρας του χρόνου απομακρύνουμε με στράγγιση το Αποδιατακτικό Διάλυμα από την επιφάνεια του δείγματος.

8. Καλύπτουμε την επιφάνεια του δείγματος με Διάλυμα Λύσης για 20min. Το Διάλυμα Λύσης έχει την ιδιότητα να απομακρύνει μεμβράνες και πυρηνικές πρωτεΐνες. Απομακρύνουμε με στράγγιση το Διάλυμα Λύσης διατηρώντας την αντικειμενοφόρο πλάκα σε οριζόντια θέση.
9. Χρησιμοποιώντας άφθονο αποσταγμένο νερό και με τη βοήθεια πιπέτας καλύπτουμε την επιφάνεια της πλάκας για 5min με σκοπό την εκπληρωση του δείγματος. Απομακρύνουμε το νερό και αφυδατώνουμε το δείγμα μας με 70% αιθανόλη για χρόνο 2 min. Στραγγίζουμε και καλύπτουμε με αιθανόλη 100% για 2 min. Στραγγίζουμε και πάλι και αφήνουμε το πλακάκι να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου.
10. Καλύπτουμε όλη την επιφάνεια του δείγματος με το Διάλυμα Χρώσης Α (μπλε του μεθυλενίου) για 7 min, απομακρύνουμε στη συνέχεια τη χρωστική Α και καλύπτουμε με το Διάλυμα Χρώσης Β (Ιοσίνη) για επίσης 7 min. Μετά την αφαίρεση της χρωστικής Β αφήνουμε την αντικειμενοφόρο πλάκα να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου.
11. Με τη χρήση οπτικού μικροσκοπίου παρατηρούμε και καταγράφουμε τα αποτελέσματα. Αν η χρωστική είναι υπερβολικά έντονη, ξεπλένουμε το πλακάκι κάτω από νερό βρύσης. Αν η χρωστική δεν είναι επαρκής για την απεικόνιση εμβαπτίζουμε το πλακάκι σε αιθανόλη 100% και επαναλαμβάνουμε το βήμα 10.

Παρατήρηση των κατατμήσεων του DNA σπέρματος στο οπτικό μικροσκόπιο

Συνολικά παρατηρήθηκαν 92 δείγματα στο οπτικό μικροσκόπιο με ανάλυση φακού 40X . Κάθε δείγμα εξετάστηκε από δύο παρατηρήτριες κάθε μία από τις οποίες εκτίμησε την εικόνα κατάτμησης DNA (DNA fragmentation) τουλάχιστον 200 σπερματοζωαρίων ανά δείγμα. Η παρατήρηση έγινε με τη βοήθεια οπτικού μικροσκοπίου και βασίστηκε κυρίως στην παρουσία και το μέγεθος ενός περιφερειακού στεφανιού (Halo) διάσπαρτης χρωματίνης γύρω από έναν κεντρικό πυρήνα νουκλεοειδών. Κατά την παρατήρηση δεν εκτιμήθηκαν κύτταρα τα οποία δεν έφεραν τη χαρακτηριστική ουρά σπερματοζωαρίου. Κάθε σπερματοζωάριο που παρατηρείται μετά την επεξεργασία με το kit Halosperm G2 κατατάσσεται σε μια από τις παρακάτω κατηγορίες ανάλογα με την εικόνα του.

A. Σπερματοζωάρια χωρίς DNA fragmentation

<p><u>Κατηγορία 1 – Big Halo</u></p> <p>Το πλάτος του στεφανιού διάσπαρτης χρωματίνης είναι ίσο ή μεγαλύτερο από τη διάμετρο του πυρήνα νουκλεοειδών.</p>	
<p><u>Κατηγορία 2 – Medium Halo</u></p> <p>Το μέγεθος του στεφανιού είναι μικρότερο από το αντίστοιχο της κατηγορίας 1 αλλά μεγαλύτερο από οποιαδήποτε άλλης κατηγορίας.</p>	

B. Σπερματοζωάρια με DNA fragmentation

Κατηγορία 3 – Small Halo

Το πλάτος του στεφανιού διάσπαρτης χρωματίνης είναι ίσο ή μικρότερο από το 1/3 της διαμέτρου του πυρήνα.



small halo

Κατηγορία 4 – Without Halo

Δεν παρατηρείται στεφάνι διάσπαρτης χρωματίνης.



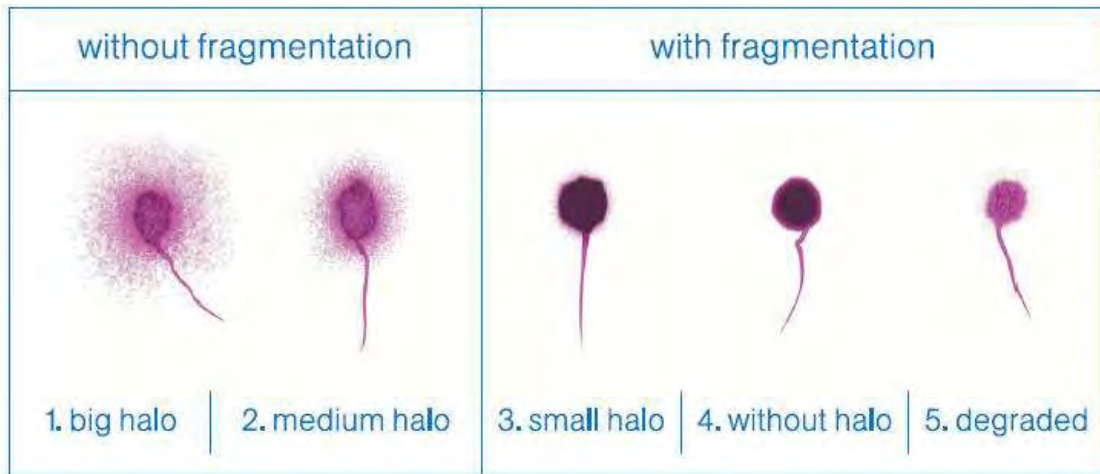
without halo

Κατηγορία 5 –Degraded

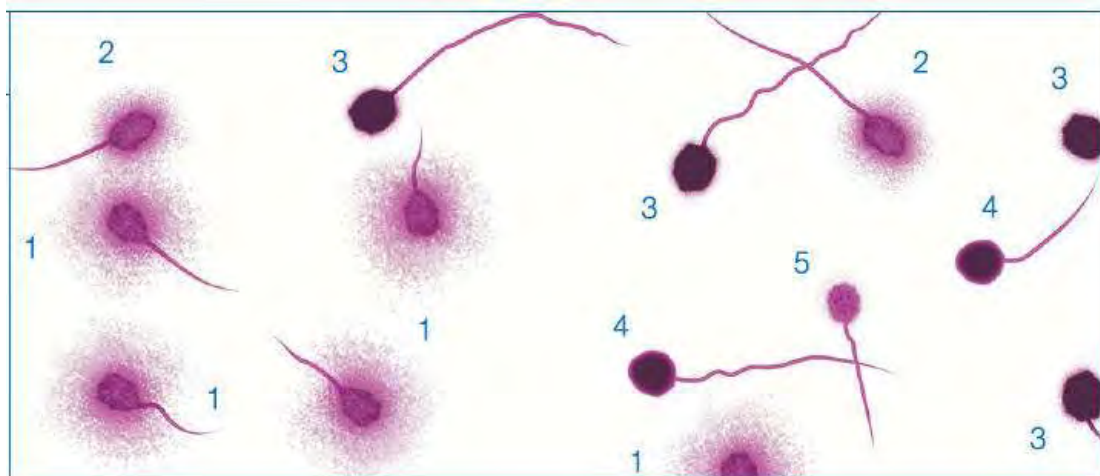
Δεν παρατηρείται στεφάνι και ο πυρήνας είναι μη φυσιολογικός ή ασθενώς βαμμένος με χρωστική.



degraded



Εικόνα 4: Συγκριτική απεικόνιση των διαφόρων κατηγοριών σπερματοζωαρίων ανάλογα με την απουσία ή παρουσία καταμήσεων του DNA.



Εικόνα 5: Παρατήρηση των κατηγοριών στο οπτικό μικροσκόπιο
1: Big Halo, 2: Medium Halo, 3: Small Halo, 4: Without Halo, 5: Degraded

Προσδιορισμός ποσοστού κατακερματισμένου DNA σπερματοζωαρίων (SDF%)

Ο δείκτης SDF1% (% Sperm DNA Fragmentation) υπολογίζεται από τον μαθηματικό τύπο:

$$SDF1\% = \frac{(\text{Fragmented} + \text{Degraded})}{\text{Total Cells Counted}} * 100$$

Όπου

Fragmented = σπερματοζωάρια με small halo + σπερματοζωάρια without halo

Υπάρχουν βέβαια κάποιες δημοσιευμένες μελέτες στις οποίες δε συμπεριλαμβάνονται τα σπερματοζωάρια που χαρακτηρίζονται ως εκφυλισμένα (Degraded) στον παραπάνω μαθηματικό τύπο. Όπως υποστηρίζουν η χρωστική Quick Diff δεν κάνει πάντοτε στο οπτικό μικροσκόπιο ευδιάκριτη τη διαφορά μεταξύ σπερματοζωαρίων που χαρακτηρίζονται “without halo” και σπερματοζωαρίων που χαρακτηρίζονται “Degraded”. Για το λόγο αυτό προς υπολογισμό του ποσοστού κατακερματισμένου DNA σπερματοζωαρίων (%SDF) εξαιρούνται τα “Degraded” σπερματοζωάρια και υπολογίζουν το %SDF χρησιμοποιώντας τον μαθηματικό τύπο:

$$SDF2\% = \frac{\text{Fragmented}}{\text{Total Cells Counted} - \text{Degraded}} * 100$$

Όπου

Fragmented = σπερματοζωάρια με small halo + σπερματοζωάρια without halo

Στην παρούσα εργασία θα χρησιμοποιήσουμε και τους δύο δείκτες ποσοστού της κατάτμησης του DNA σπερματοζωαρίων στη στατιστική ανάλυση που ακολουθεί.

Στατιστική Ανάλυση

Για τη στατιστική ανάλυση των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα SPSS Statistics v19. Το πλήθος των δειγμάτων είναι 92. Με τη βοήθεια του t-test για ανεξάρτητες μεταβλητές μελετήθηκε αν διαφέρουν οι μέσες τιμές πλήθους παραμέτρων μεταξύ 2 ομάδων που ορίστηκαν είτε με βάση τη συγκέντρωση σπέρματος είτε με βάση την τιμή των SDF1% και SDF2%. Επίσης μελετήθηκε η πιθανότητα να σχετίζονται διάφορες παράμετροι με το SDF1% και SDF2%. Ακολουθούν σε πίνακες τα αποτελέσματα της στατιστικής επεξεργασίας καθώς και η ερμηνεία αυτών.

Αποτελέσματα

Πίνακας 1 Περιγραφικά χαρακτηριστικά του συνόλου των δειγμάτων

n=92	Μέση τιμή ± Τυπική Απόκλιση	Εύρος
Ηλικία	37,6±5,4	18-54
Δείκτης Μάζας Σώματος	27,1±3,3	19,4-41
Όγκος	3,4±1,6	0,2-8,4
Συγκέντρωση	45,1-38,1	2-175
Πρωθητική Κίνηση	47,5±19,7	10-85
Μη Πρωθητική Κίνηση	18,4±10,4	0-40
Ακίνητα	34,1±19,6	0-85
SDF1 (%)	36,2	12,5-72,1
SDF2 (%)	28,3	7,8-62,9
<hr/>		
Κάπνισμα	46,7% (n=43)	5-50 τσιγάρα / ημέρα
Αλκοόλ	9,8% (n=9)	4 ποτά /εβδομάδα – 3 ποτά /ημέρα

Πίνακας 2 Περιγραφικά χαρακτηριστικά και σύγκριση ανδρών με φυσιολογική και μη φυσιολογική συγκέντρωση σπέρματος.

	Δείγματα με Συγκέντρωση <15*10 ⁶ /ml (n=23) Μέση Τιμή ± Τυπική Απόκλιση	Δείγματα με Συγκέντρωση ≥15*10 ⁶ /ml (n=69) Μέση Τιμή ± Τυπική Απόκλιση	P value
Ηλικία	37±4,9	37,8±5,6	0,544 (NS)
Δείκτης Μάζας Σώματος	27,9±4,3	26,9±2,9	0,244 (NS)
Όγκος	3,8±1,8	3,3±1,5	0,229 (NS)
Πρωθητική Κίνηση	40,5±16,8	49,9±20,2	0,047*
Μη Πρωθητική Κίνηση	15,3±10,8	19,4±10,1	0,099 (NS)
Ακίνητα	44,3±18,9	30,8±18,8	0,004*
SDF1 (%)	44,4	33,4	0,001*
SDF2 (%)	34,6	26,2	0,004*
Κάπνισμα	56,5% (n=13)	43,5% (n=30)	0,105 (NS)
Αλκοόλ	8,7% (n=2)	10,1% (n=7)	0,842 (NS)

*P<0,05

NS = Not significant=Όχι στατιστικά σημαντικό

Στον πίνακα 2 έχουμε χωρίσει το σύνολο των δειγμάτων σε 2 ομάδες με κριτήριο τη συγκέντρωση σπέρματος. Η πρώτη ομάδα αποτελείται από άνδρες με συγκέντρωση σπέρματος μικρότερη από 15*10⁶/ml ενώ η δεύτερη ομάδα αποτελείται από άνδρες με συγκέντρωση σπέρματος ίση ή μεγαλύτερη από 15*10⁶/ml. Παρατηρούμε ότι η μέση τιμή της ηλικίας, η μέση τιμή του Δείκτη Μάζας Σώματος, η μέση τιμή του όγκου σπέρματος και η μέση τιμή του αριθμού σπερματοζωαρίων μη προωθητικής κίνησης δε διαφέρει μεταξύ των ανδρών με συγκέντρωση σπέρματος μεγαλύτερη, ίση ή μικρότερη από 15*10⁶/ml. Σε κάθε μία από αυτές τις περίπτωση ισχύει P>0,05 και άρα δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων για αυτές τις παραμέτρους.

Αντίθετα παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά της μέσης τιμής του αριθμού σπερματοζωαρίων με προωθητική κίνηση, της μέσης τιμής του αριθμού σπερματοζωαρίων σε ακινησία και της μέσης τιμής του SDF1% και της μέσης τιμής του SDF2% μεταξύ των δύο ομάδων. Συγκεκριμένα η μέση τιμή των σπερματοζωαρίων με προωθητική κίνηση είναι μικρότερη και η μέση τιμή των σπερματοζωαρίων σε ακινησία είναι μεγαλύτερη στους άνδρες με μη φυσιολογική συγκέντρωση με $P=0,047$ και $P=0,004$ αντίστοιχα. Επίσης η μέση τιμή του SDF1% και SDF2% είναι μεγαλύτερη στους άνδρες με μη φυσιολογική συγκέντρωση σπέρματος με $P=0,001$ και $P=0,004$ αντίστοιχα, δηλαδή $P<0,05$ σε κάθε περίπτωση.

Επιπρόσθετα το ποσοστό των ανδρών που καπνίζουν και το ποσοστό των ανδρών που πίνουν δε διαφέρει στατιστικά σημαντικά μεταξύ των ομάδων με φυσιολογική και μη φυσιολογική συγκέντρωση σπέρματος καθώς $P=0,105$ και $P=0,842$ για το κάπνισμα και το αλκοόλ αντίστοιχα.

Συνοψίζοντας συμπεραίνουμε πως πιθανότατα οι άνδρες με συγκέντρωση σπέρματος μικρότερη των $15 \cdot 10^6/\text{ml}$ παρουσιάζουν σημαντικά υψηλότερα ποσοστά κατακερματισμένου DNA σπερματοζωαρίων ($P=0,001$ για SDF1% και $P=0,004$ για SDF2%), μεγαλύτερο αριθμό ακίνητων σπερματοζωαρίων ($P=0,004$) και μικρότερο αριθμό σπερματοζωαρίων με προωθητική κίνηση ($P=0,047$) σε σύγκριση με τους άνδρες που φέρουν συγκέντρωση ίση ή μεγαλύτερη από $15 \cdot 10^6/\text{m}$.

Πίνακας 3 Περιγραφικά χαρακτηριστικά και σύγκριση των ανδρών με βάση το SDF1%.

n=92	SDF1 ≥ 30% (n=52) Μέση Τιμή ± Τυπική Απόκλιση	SDF1 < 30% (n=40) Μέση Τιμή ± Τυπική Απόκλιση	P value
Ηλικία	37,9±5,5	37,1±5,4	0,437 (NS)
Δείκτης Μάζας Σώματος	27,4±3,6	26,9±2,8	0,496 (NS)
Όγκος	3,4±1,6	3,5±1,5	0,603 (NS)
Συγκέντρωση	31,2±28,8	63,1±41,3	0,000*
Πρωθητική Κίνηση	41±20,1	56,1±15,6	0,000*
Μη Πρωθητική Κίνηση	17,2±9,3	19,9±11,6	0,230 (NS)
Ακίνητα	41,9±20,1	24,1±13,7	0,000*
Κάπνισμα	51,9%(n=27)	40%(n=16)	0,244(NS)
Αλκοόλ	9,6 %(n=5)	10%(n=4)	0,952 (NS)

*P<0,05

NS = Not significant=Όχι στατιστικά σημαντικό

Στον πίνακα 3 συγκρίνουμε τις μέσες τιμές παραμέτρων μεταξύ της ομάδας ανδρών με SDF1≥ 30% και της ομάδας ανδρών με SDF1<30%. Η μέση τιμή της ηλικίας, η μέση τιμή του Δείκτη Μάζας Σώματος, η μέση τιμή του όγκου σπέρματος και η μέση τιμή των σπερματοζωαρίων μη πρωθητικής κίνησης δεν διαφέρει μεταξύ των δύο ομάδων διότι σε κάθε περίπτωση ισχύει P>0,05. Όμως η μέση τιμή της συγκέντρωσης σπέρματος διαφέρει μεταξύ των ομάδων αφού P=0,000 σε διάστημα εμπιστοσύνης 95%. Ομοίως η μέση τιμή των σπερματοζωαρίων πρωθητικής κινητικότητας και η μέση τιμή των σπερματοζωαρίων σε ακινησία διαφέρει μεταξύ των δύο ομάδων ανδρών με P=0,000 σε κάθε περίπτωση δηλαδή P<0,05.

Άρα πιθανότατα οι άνδρες με ποσοστό κατακερματισμένου DNA σπερματοζωαρίων (SDF1%) ίσο ή περισσότερο από 30% τείνουν να έχουν μικρότερη συγκέντρωση σπέρματος (P=0,000), λιγότερα σπερματοζωάρια με πρωθητική κίνηση (P=0,000) και τείνουν να έχουν περισσότερα ακίνητα

σπερματοζωάρια (P=0,000) σε σύγκριση με άνδρες που φέρουν κατακερματισμένο DNA σπερματοζωαρίων σε ποσοστό λιγότερο από 30%.

Πίνακας 4 Περιγραφικά χαρακτηριστικά και σύγκριση των ανδρών με βάση το SDF1%.

n=92	SDF1 ≥ 20% (n=83) Μέση Τιμή ± Τυπική Απόκλιση	SDF1 < 20% (n=9) Μέση Τιμή ± Τυπική Απόκλιση	P value
Ηλικία	37,5±5,2	37,7±7,4	0,962 (NS)
Δείκτης Μάζας Σώματος	27,2±3,3	26,5±3,2	0,509 (NS)
Όγκος	3,5±1,6	2,8±1,5	0,206 (NS)
Συγκέντρωση	39,3±33	98,4±42,1	0,000*
Πρωθητική Κίνηση	46±19,5	61,2±17,2	0,027*
Μη Πρωθητική Κίνηση	18±10,3	21,8±11,5	0,302 (NS)
Ακίνητα	36±19,3	17±13,5	0,005*
Κάπνισμα	49,4%(n=41)	22,2%(n=2)	0,541(NS)
Αλκοόλ	9,6% (n=8)	11,1% (n=1)	0,889 (NS)

*P<0,05

NS = Not significant=Όχι στατιστικά σημαντικό

Στον πίνακα 4 επαναλαμβάνουμε τη σύγκριση μέσω των τιμών των ίδιων παραμέτρων με τη διαφορά ότι οι άνδρες χωρίζονται σε δύο ομάδες με όριο το 20% κατακερματισμένου DNA σπερματοζωαρίων και όχι 30%. Ο λόγος που πραγματοποιείται και αυτή η σύγκριση είναι διότι σε κάποιες δημοσιευμένες μελέτες υποστηρίζεται ότι η ποιότητα σπέρματος είναι υποβαθμισμένη όταν το ποσοστό κατακερματισμένου DNA σπερματοζωαρίων είναι μεγαλύτερο από 30% ενώ σε άλλες μελέτες υποστηρίζεται το ίδιο αλλά για ποσοστό 20% κατακερματισμένου DNA. Από τον παραπάνω πίνακα δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων για την μέση τιμή της ηλικίας, τη μέση τιμή του Δείκτη Μάζας Σώματος, τη μέση τιμή του όγκου σπέρματος και τη μέση τιμή των σπερματοζωαρίων μη πρωθητικής κίνησης. Αυτό ισχύει διότι σε κάθε περίπτωση όπως φαίνεται και από τον

πίνακα $P > 0,05$. Όμως η μέση τιμή της συγκέντρωσης, η μέση τιμή του αριθμού σπερματοζωαρίων με προωθητική κίνηση και η μέση τιμή των ακίνητων σπερματοζωαρίων διαφέρει μεταξύ των δύο ομάδων ανδρών διότι $P = 0,000$, $P = 0,027$ και $P = 0,005$ αντίστοιχα.

Άρα οι άνδρες με ποσοστό κατακερματισμένου DNA σπερματοζωαρίων ίσο ή μεγαλύτερο από 20% τείνουν να έχουν μικρότερη συγκέντρωση σπέρματος ($P = 0,000$) και λιγότερα σπερματοζωάρια με προωθητική κίνηση ($P = 0,027$) και επίσης τείνουν να έχουν περισσότερα ακίνητα σπερματοζωάρια ($P = 0,005$) σε σύγκριση με άνδρες που φέρουν κατακερματισμένο DNA σπερματοζωαρίων λιγότερο από 20%.

Πίνακας 5 Περιγραφικά χαρακτηριστικά και σύγκριση των ανδρών με βάση το SDF2%.

n=92	SDF2 \geq 30% (n=34) Μέση Τιμή \pm Τυπική Απόκλιση	SDF2 < 30% (n=58) Μέση Τιμή \pm Τυπική Απόκλιση	P value
Ηλικία	38,2 \pm 6,5	37,2 \pm 4,7	0,380 (NS)
Δείκτης Μάζας Σώματος	27,8 \pm 3,8	26,8 \pm 3	0,158 (NS)
Όγκος	3,4 \pm 1,6	3,4 \pm 1,6	0,957 (NS)
Συγκέντρωση	25,5 \pm 25,9	56,5 \pm 39,6	0,000*
Προωθητική Κίνηση	38,9 \pm 19	52,5 \pm 18,5	0,001*
Μη προωθητική Κίνηση	16,4 \pm 9,2	19,5 \pm 10,9	0,158 (NS)
Ακίνητα	44,7 \pm 20,3	27,9 \pm 16,4	0,000*
Κάπνισμα	55,9%(n=19)	41,4%(n=24)	0,261(NS)
Αλκοόλ	8,8%(n=3)	10,3%(n=6)	0,815(NS)

* $P < 0,05$

NS = Not significant=Όχι στατιστικά σημαντικό

Πίνακας 6 Περιγραφικά χαρακτηριστικά και σύγκριση των ανδρών με βάση το SDF2%.

n=92	SDF2 ≥ 20% (n=66) Μέση Τιμή ± Τυπική Απόκλιση	SDF2 < 20% (n=26) Μέση Τιμή ± Τυπική Απόκλιση	P value
Ηλικία	38,1±5,4	36,3±5,5	0,155 (NS)
Δείκτης Μάζας Σώματος	27,3±3,5	26,7±2,9	0,400 (NS)
Όγκος	3,5±1,6	3,2±1,4	0,302 (NS)
Συγκέντρωση	35,2±31,1	70±43,1	0,000*
Πρωθητική Κίνηση	43,8±19,8	56,9±16,4	0,004*
Μη Πρωθητική Κίνηση	17,5±9,1	20,7±13	0,258 (NS)
Ακίνητα	38,7±19,5	22,4±14,6	0,000*
Κάπνισμα	47%(n=31)	46,2%(n=12)	0,893(NS)
Αλκοόλ	10,6%(n=7)	7,7% (n=2)	0,676(NS)

*P<0,05

NS = Not significant=Όχι στατιστικά σημαντικό

Στον πίνακα 5 και τον πίνακα 6 πραγματοποιούμε τις ίδιες συγκρίσεις με κριτήριο ομαδοποίησης το SDF2% των ανδρών. Στον πίνακα 5 η ομαδοποίηση γίνεται με όριο SDF2 το 30% ενώ στον πίνακα 6 η ομαδοποίηση γίνεται με όριο SDF2 το 20%. Τα συμπεράσματα που προκύπτουν και από τους δύο αυτούς πίνακες είναι όμοια και για λόγους συντομίας αναφέρονται παρακάτω μόνο τα συμπεράσματα με ανώτερο όριο καλής ποιότητας σπέρματος το 20% κατακερματισμένου DNA.

Η μέση τιμή της ηλικίας, η μέση τιμή του Δείκτη Μάζας Σώματος, η μέση τιμή του όγκου σπέρματος και η μέση τιμή του αριθμού σπερματοζωαρίων με μη πρωθητική κίνηση δεν διαφέρει μεταξύ ανδρών με ίσο, μεγαλύτερο ή μικρότερο του 20% κατακερματισμένου DNA σπερματοζωαρίων.

Αντίθετα όπως αναμέναμε και από τα αποτελέσματα του SDF1 η μέση τιμή της συγκέντρωσης, η μέση τιμή των σπερματοζωαρίων με πρωθητική κίνηση και η μέση τιμή των ακίνητων σπερματοζωαρίων διαφέρει στατιστικά

σημαντικά μεταξύ ανδρών που φέρουν SDF2 \geq 20% και ανδρών που φέρουν SDF2<20% διότι P=0,000, P=0,004 και P=0,000 αντίστοιχα.

Άρα οι άνδρες με ποσοστό κατακερματισμένου DNA σπερματοζωαρίων ίσο ή μεγαλύτερο του 20% πιθανότατα φέρουν μικρότερη συγκέντρωση σπέρματος (P=0,000) μικρότερο αριθμό σπερματοζωαρίων με προωθητική κίνηση (P=0,004) και μεγαλύτερο αριθμό ακίνητων σπερματοζωαρίων (P=0,000) σε σύγκριση με τους άνδρες που έχουν ποσοστό κατακερματισμένου DNA σπερματοζωαρίων μικρότερο από 20% .

Πίνακας 7 Συσχέτιση του SDF1% και SDF2% με διάφορες παραμέτρους

n=92	SDF1% r P value	SDF2% r P value
Ηλικία	0,050 0,637	0,090 0,396
Δείκτης Μάζας Σώματος	0,178 0,090	0,180 0,085
Όγκος	- 0,022 0,837	0,025 0,817
Συγκέντρωση	-0,508** 0,000	- 0,456** 0,000
Προωθητική Κίνηση	- 0,438** 0,000	- 0,398** 0,000
Μη Προωθητική Κίνηση	- 0,199 0,057	- 0,165 0,117
Ακίνητα	0,546** 0,000	0,487** 0,000
Κάπνισμα	0,178 0,090	0,097 0,357
Αλκοόλ	-0,065 0,539	- 0,089 0,399

**** Σημαντική συσχέτιση σε επίπεδο 0,01**

Πίνακας 8 Συσχέτιση των ποσοστών σπερματοζωαρίων Big halo, Medium halo, Small halo, Without halo, Degraded με διάφορες παραμέτρους των ανδρών.

	BIG HALO% r P value	MEDIUM HALO% r P value	SMALL HALO% r P value	WITHOUT HALO% r P value	DEGRADED % r P value
Ηλικία	-0,046 0,665	0,007 0,950	-0,014 0,896	0,138 0,189	-0,066 0,532
Δείκτης Μάζας Σώματος	-0,187 0,074	0,077 0,467	-0,009 0,932	0,164 0,118	0,143 0,174
Όγκος	-0,122 0,245	0,312** 0,002	0,023 0,825	0,075 0,480	-0,141 0,182
Συγκέντρωση	0,535** 0,000	-0,220* 0,035	-0,193 0,065	-0,382** 0,000	-0,421** 0,000
Πρωθητική Κίνηση	0,436** 0,000	-0,132 0,210	-0,147 0,163	-0,318** 0,002	-0,386** 0,000
Μη Πρωθητική Κίνηση	0,099 0,347	0,159 0,130	-0,059 0,574	-0,132 0,210	-0,194 0,064
Ακίνητα	-0,490** 0,000	0,048 0,647	0,179 0,088	0,389** 0,000	0,491** 0,000
Κάπνισμα	-0,089 0,401	-0,141 0,179	-0,110 0,299	0,090 0,391	0,274** 0,008
Αλκοόλ	0,044 0,678	0,026 0,807	-0,136 0,197	-0,047 0,654	-0,009 0,936

******Σημαντική συσχέτιση σε επίπεδο 0,01

*****Σημαντική συσχέτιση σε επίπεδο 0,05

Στον πίνακα 7 εμφανίζεται αρνητική συσχέτιση του SDF1 με τη συγκέντρωση σπέρματος με $r = -0,508$, και $P=0,000$. Επίσης το SDF1 σχετίζεται αρνητικά με τον αριθμό σπερματοζωαρίων που έχουν πρωθητική κίνηση με $r = -0,438$ και $P=0,000$ καθώς επίσης σχετίζεται θετικά με τον αριθμό των σπερματοζωαρίων σε ακινησία με $r=0,546$ και $P=0,000$. Ομοίως το SDF2 σχετίζεται αρνητικά με τη συγκέντρωση με $r = -0,456$ και $P=0,000$, αρνητικά με τον αριθμό σπερματοζωαρίων πρωθητικής κίνησης με $r = -0,398$ και $P=0,000$ και θετικά με τον αριθμό σπερματοζωαρίων σε ακινησία με $r=0,487$ και $P=0,000$. Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση των ποσοστών κατακερματισμένου DNA σπερματοζωαρίων με καμία άλλη

παράμετρο του πίνακα. Οι παραπάνω συσχετίσεις μας δείχνουν πως όταν αυξάνεται το ποσοστό κατατμήσεων του DNA σπερματοζωαρίων, τότε μειώνεται η συγκέντρωση σπέρματος, μειώνεται ο αριθμός των σπερματοζωαρίων με προωθητική κίνηση και αυξάνεται ο αριθμός των σπερματοζωαρίων που δεν κινούνται.

Στον πίνακα 8 παρατηρείται πως το ποσοστό των σπερματοζωαρίων που χαρακτηρίζονται σύμφωνα με τη μέθοδο «Διασπορά χρωματίνης σπέρματος» ως “big halo” σχετίζεται θετικά με τη συγκέντρωση σπέρματος ($r= 0,535$ και $P=0,000$), θετικά με τον αριθμό σπερματοζωαρίων με προωθητική κίνηση ($r=0,436$ και $P=0,000$) και αρνητικά με τον αριθμό των ακίνητων σπερματοζωαρίων ($r= - 0,490$ και $P=0,000$) σε επίπεδο σημαντικότητας 0,01.

Το ποσοστό των σπερματοζωαρίων που χαρακτηρίζονται ως “medium halo” φαίνεται να σχετίζεται θετικά με τον όγκο σπέρματος ($r=0,312$ και $P=0,002$) και αρνητικά με τη συγκέντρωση σπέρματος ($r= -0,220$ και $P=0,035$) σε επίπεδο σημαντικότητας 0,01 και 0,05 αντίστοιχα.

Το ποσοστό των σπερματοζωαρίων που χαρακτηρίζονται “without halo” σχετίζεται αρνητικά με τη συγκέντρωση σπέρματος ($r= -0,382$ και $P=0,000$), αρνητικά με τον αριθμό των σπερματοζωαρίων που έχουν προωθητική κίνηση ($r= -0,318$ και $P=0,002$) και θετικά με τον αριθμό ακίνητων σπερματοζωαρίων ($r=0,389$ και $P=0,000$) σε επίπεδο σημαντικότητας 0,01.

Το ποσοστό των εκφυλισμένων (Degraded) σπερματοζωαρίων συσχετίζεται αρνητικά με τη συγκέντρωση σπέρματος ($r= -0,421$ και $P=0,000$), αρνητικά με τον αριθμό των σπερματοζωαρίων που έχουν προωθητική κίνηση ($r= -0,386$ και $P=0,000$), θετικά με τον αριθμό ακίνητων σπερματοζωαρίων ($r=0,491$ και $P=0,000$) και θετικά με το κάπνισμα ($r=0,274$ και $P=0,008$) σε επίπεδο σημαντικότητας 0,01.

Συζήτηση

Οι παράμετροι του σπέρματος όπως ορίζονται από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας δε θεωρούνται από μόνοι τους αρκετά πληροφοριακοί σε ό,τι αφορά την επιλογή μεθόδου υποβοηθούμενης αναπαραγωγής και την έκβαση μιας προσπάθειας υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (Smit M et al., 2007; Cohen-Bacrie P et al.2009). Θα έλεγε κανείς ότι οι παράμετροι του σπέρματος και ο προσδιορισμός του ποσοστού κατατμήσεων του DNA έχουν εξίσου συμβολή στην επιλογή μεθόδου υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Άλλωστε ένας άνδρας χαρακτηρίζεται ως υπογόνιμος σε σχέση με την μειωμένη ικανότητα γονιμοποίησης και όχι σε σχέση με τις μη φυσιολογικές παραμέτρους του σπέρματος του. Έχει γίνει σαφές πλέον ότι η κακή ποιότητα του σπέρματος χαρακτηρίζεται όχι μόνο από μη φυσιολογικές τιμές των κλασικών παραμέτρων αλλά και από την παρουσία κατακερματισμένου DNA.

Για άνδρες υπογόνιμους συχνά παρατηρείται η ύπαρξη υψηλών επιπέδων DNA κατατμήσεων ακόμα και αν τα σπερματοζωάρια αυτών φέρουν φυσιολογική μορφολογία (Avendaño C et al., 2009). Το ποσοστό των κατατμήσεων του DNA σπέρματος διαπιστώθηκε ότι σχετίζεται αρνητικά με τη συγκέντρωση του σπέρματος (Sills ES. et al., 2004; Chen Z. et al., 2006) Ομοίως τα ποσοστά της προωθητικής κινητικότητας και της φυσιολογικής μορφολογίας των σπερματοζωαρίων σχετίζονται αρνητικά με τις κατατμήσεις του DNA. (Lopes S. et al., 1998; Giwerckman A. et al., 2003; Sills ES. et al., 2004). Σε αντίθεση με τις προαναφερθείσες παραμέτρους σπέρματος, η ζωτικότητα των σπερματοζωαρίων είναι ανεξάρτητη από την παρουσία κατακερματισμένου πυρηνικού DNA (Gosalvez et al., 2009). Στην παρούσα εργασία καταφέραμε να δείξουμε την αρνητική συσχέτιση του ποσοστού κατακερματισμένου DNA σπερματοζωαρίων με τη συγκέντρωση σπέρματος, τον αριθμό των σπερματοζωαρίων που παρουσιάζουν προωθητική κινητικότητα και επίσης βρήκαμε θετική συσχέτιση του κατακερματισμένου DNA με τον αριθμό των σπερματοζωαρίων που βρίσκονται σε κατάσταση ακινησίας.

Παράλληλα έχει γίνει προσπάθεια σε πολλές μελέτες να προσδιοριστούν οι διαφορές ανδρών με φυσιολογική συγκέντρωση σπέρματος από άνδρες με μη φυσιολογική συγκέντρωση σπέρματος συγκρίνοντας διάφορες παραμέτρους.

Για παράδειγμα σε άνδρες με ολιγοασθενοτεροσπερμία, η ηλικία φαίνεται να σχετίζεται με παραμέτρους του σπέρματος όπως ο όγκος, η συγκέντρωση, η μορφολογία η προωθητική κινητικότητα και ο κατακερματισμός του DNA (Plastira et al.,2007). Στην παρούσα εργασία δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ ανδρών με ολιγοζωοσπερμία και ανδρών με φυσιολογική συγκέντρωση σπέρματος σε ό,τι αφορά παραμέτρους όπως η ηλικία, το Δείκτης Μάζας Σώματος, ο όγκος σπέρματος, το κάπνισμα και το αλκοόλ. Ίσως απαιτείται μεγαλύτερος αριθμός δειγμάτων για να σχετιστούν οι παράμετροι αυτές με τη συγκέντρωση του σπέρματος. Σε ό,τι αφορά το κάπνισμα όμως καταφέραμε να δείξουμε πιθανή θετική συσχέτιση του καπνίσματος με το ποσοστό των εκφυλιζόμενων σπερματοζωαρίων.

Πολυάριθμες έρευνες έχουν εξετάσει την πιθανή επίδραση των κατατμήσεων του DNA σπερματοζωαρίων στη γονιμοποίηση και την ποιότητα των εμβρύων μετά από IVF και ICSI. Κάποιες μελέτες δεν έχουν καταφέρει να συσχετίσουν αρνητικά τα υψηλά ποσοστά της κατάτμηση του DNA σπέρματος με τα ποσοστά γονιμοποίησης μετά από IVF ή ICSI (Host E. et al., 2000; Larson-Cook KL. et al., 2003; Henkel R. et al., 2004). Αυτό ενδεχομένως να οφείλεται σε δύο λόγους. Οι άνδρες με κατάτμηση DNA στα περισσότερα σπερματοζωάρια τους, εξακολουθούν να διαθέτουν και μικρό αριθμό σπερματοζωαρίων με φυσιολογικό πυρηνικό DNA και με γονιμοποιητική ικανότητα. Ο δεύτερος λόγος ίσως να οφείλεται στο γεγονός ότι η γονιμοποίηση όσο και τα πρώιμα στάδια ανάπτυξης του εμβρύου φαίνεται να μην εξαρτώνται άμεσα από την ακεραιότητα του DNA σπέρματος καθώς το εμβρυϊκό γονιδίωμα δεν εκφράζεται μέχρι το στάδιο των τεσσάρων κυττάρων (μέχρι τη δεύτερη μιτωτική διαίρεση). Άλλες μελέτες έχουν καταφέρει να συσχετίσουν αρνητικά την παρουσία υψηλών επιπέδων DNA κατατμήσεως με τα ποσοστά γονιμοποίησης μετά από IVF ή ICSI καθώς και με την εμβρυϊκή διαίρεση. (Sun JG. et al., 1997; Lopes S. et al., 1998 ; Evenson DP et al.,1999; Spano M et al.,2000 ; Host E. et al., 2000; Aitken RJ et al., 2007). Στην περίπτωση της ICSI μάλιστα εξηγείται πως η τυχαία επιλογή ενός μορφολογικά φυσιολογικού σπερματοζωαρίου από ένα σπέρμα με υψηλά ποσοστά DNA κατατμήσεων δεν αποκλείει την παρουσία DNA κατατμήσεων στο συγκεκριμένο σπερματοζωάριο και άρα δεν αποκλείει την

αποτυχία της ICSI . Τέλος έχει σαφώς αποδειχτεί ότι τα ποσοστά βλαβών του DNA των σπερματοζωαρίων είναι αντιστρόφως ανάλογα των ποσοστών εγκυμοσύνης (Benchaiib M. et al., 2003; Henkel R. et al., 2004). Όπως αναφέρθηκε μετά τη δεύτερη μιτωτική διαίρεση του εμβρύου εκφράζεται το γονιδίωμα τόσο μητρικής όσο και πατρικής προέλευσης και συνεπώς η παρουσία κατακερματισμένου DNA πατρικής προέλευσης επηρεάζει την ανάπτυξη του εμβρύου και τη πορεία της εγκυμοσύνης.

Βιβλιογραφία

Vander A., Sherman J., Luciano D., Τσακόπουλος Μ.,(2001) **Human Physiology: The mechanisms of body functions**, eighth edition: 0-07-290801-7

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

Aitken RJ, De Iuliis GN. **Origins and consequences of DNA damage in male germ cells**. Reprod Biomed Online 2007;14:727–33.

Aitken RJ, Gordon E, Harkiss D, Twigg JP, Milne P, Jennings Z, et al. **Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa**. Biol Reprod 1998;59:1037–46.

Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, et al. **Sequence and organization of the human mitochondrial genome**. Nature 1981; 290:457–465

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

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

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

Balhorn R. **A model for the structure of chromatin in human sperm**. J Cell Biol 1982; 93:298–305

Benchaib M, Braun V, Lornage J, et al. **Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique**. Hum Reprod 2003; 18:1023–1028..

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

Chen Z, Hauser R, Trbovich A, Shifren JL, Dorer DJ, Godfrey-Bailey L, et al. **The relation between human semen characteristics and sperm apoptosis: a pilot study.** J Androl 2006;27:112–20.

Chikashige Y, Ding DQ, Funabiki H, et al. **Telomere-led premeiotic chromosome movement in fission yeast.** Science 1994; 264:270–273.

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

Cohen-Bacrie P, Belloc S, Ménézo YJ, Clement P, Hamidi J, Benkhalifa M. **Correlation between DNA damage and sperm parameters: a prospective study of 1,633 patients.** Fertil Steril. 2009; 91:1801-5.

Erenpreiss J, Hlevicka S, Zalkalns J. **Effect of leukocytospermia on sperm DNA integrity: a negative effect in abnormal semen samples.** J Androl 2002; 23:717–723.

Evenson D, Larson K, Jost LK. **Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparison with other techniques.** J Androl 2002;23:25–43.

Evenson DP, Jost LK, Marshall D, Zinaman MJ, Clegg E, Purvis K, et al. **Utility of the sperm chromatin assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic.** Hum Reprod 1999;14:1039–49.

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

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

Gatewood JM, Cook GR, Balhorn R, et al. **Sequence-specific packaging of DNA in human sperm chromatin.** Science 1987; 236:962–964.

Gineitis AA, Zalenskaya IA, Yau PM, et al. **Human sperm telomere-binding complex involves histone H2B and secures telomere membrane attachment.** J Cell Biol 2000; 151:1591–1598

Giwerckman A, Richthoff J, Hjøllund H, Bonde JP, Jepson K, Frohm B, Spano M. **Correlation between sperm motility and sperm chromatin structure assay parameters.** Fertil Steril 2003;80:1404–12.

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

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

Henkel R. **DNA fragmentation and its influence on fertilization and pregnancy outcome.** In: Oehninger SC, Kruger TF, eds. Male infertility. Diagnosis and treatment. London, United Kingdom: Informa Healthcare,2007:277–90..

Henkel R, Hajimohammad M, Stalf T, et al. **Influence of deoxyribonucleic acid damage on fertilization and pregnancy.** Fertil Steril 2004; 81:965–972.

Host E, Lindenberg S, Smidt-Jensen S. **The role of DNA strand breaks in human spermatozoa used for IVF and ICSI.** Acta Obstet Gynecol Scand 2000; 79:559–563.

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

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

Juriscova A, Lopes S, Meriano J, Oppedisano L, Casper RF, Varmuza S. **DNA damage in round spermatids of mice with a targeted disruption of the Pp1cygene and in testicular biopsies of patients with nonobstructive azoospermia.** Mol Hum Reprod 1999;5:323–30.

Kao SH, Chao HT, Wei YH. **Multiple deletions of mitochondrial DNA are associated with the decline of motility and fertility of human spermatozoa.** Mol Hum Reprod 1998; 4:657–666

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

Kodama H, Yamaguchi R, Fukuda J, et al. **Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients.** Fertil Steril 1997; 68:519–524.

Kosower NS, Katayose H, Yanagimachi R. **Thiol-disulfide status and acridine orange fluorescence of mammalian sperm nuclei.** J Androl 1992; 13:342–348.

Kuchino Y, Mori F, Kasai H, Inoue H, Iwai S, Miura K, et al. **Misreading of DNA templates containing 8-hydroxydeoxyguanosine at the modified base and at adjacent residues.** Nature 1987;327:77–9.

Kunzle R, Mueller MD, Hanggi W. **Semen quality of male smokers and nonsmokers in infertile couples.** Fertil Steril 2003; 79:287–291.

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

Lopes S, Juriscova A, Sun JG, Casper RF. **Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa.** Hum Reprod 1998;13:896 –900.

Lopes S, Sun JG, Juriscova A, Meriano J, Casper RF. **Sperm desoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection.** Fertil Steril 1998;69:528–32.

Lopez-Fernandez C, Perez-Liano B., Garcia-Cassado P, Gosalbez A, Arroyo F, Fernandez JL, et al. **Sperm DNA fragmentation in a random sample of the Spanish boar livestock.** Anim Reprod Sci 2006;103:87-98.

Morris ID. **Sperm DNA damage and cancer treatment.** Int J Androl 2002; 25:255–261.

Plastira K, Msaouel P, Angelopoulou R, Zanioti K, Plastiras A, Pothos A, Bolaris S, Papanisteidis N, Mantas D. **The effects of age on DNA fragmentation, chromatin packaging and conventional semen parameters in spermatozoa of oligoasthenoteratozoospermic patients.** J Assist Reprod Genet. 2007 Oct;24(10):437-43.

Potts RJ, Newbury CJ, Smith G. **Sperm chromatin damage associated with male smoking.** *Mutat Res* 1999; 423:103–111.

Sakkas D, Mariethoz E, Manicardi G, Bizzaro D, Bianchi PG, Bianchi U. **Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa.** *Rev Reprod* 1999;4:31–7.

Saleh RA, Agarwal A, Kandirali E, Sharma RK, Thomas AJ, Nada EA, et al. **Leukocytospermia is associated with increased reactive oxygen species production by human spermatozoa.** *Fertil Steril* 2002;78:1215–24.

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

Schmid TE, Eskenazi B, Baumgartner A, Marchetti F, Young S, Weldon R, et al. **The effects of male age on sperm DNA damage in healthy non-smokers.** *Hum Reprod* 2007;22:180–7.

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

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

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

Spano M, Bonde JP, Hjollund HI, Kolstad HA, Cordelli E, Leter G, et al. **Sperm chromatin damage impairs human fertility.** *Fertil Steril* 73;2000:43–50.

Sun JG, Jusiricova A, Casper RF. **Detection of desoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro.** *Biol Reprod* 1997;56:602–7.

Tesarik J, Greco E, Mendoza C. **Late, but not early, paternal effect on human embryo development is related to sperm DNA fragmentation.** *Hum Reprod* 2004;19:611–5.

World Health Organization. **WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen**, 5th edn . Cambridge : Cambridge University Press, 2010.

Wyrobek AJ, Eskenazi B, Young S, Arnheim N, Tiemann-Boege I, Jabs EW, et al. **Advancing age has differential effects on DNA damage, chromatin integrity, gene mutations, and aneuploidies in sperm**. Proc Natl Acad Sci USA 2006;103:9601–6.

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

Zini A, Bielecki R, Phang D, Zenzes MT. **Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men**. Fertil Steril 2001; 75:674–677.

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

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