



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
«ΒΑΣΙΚΩΝ ΒΙΟΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ (ΒΒΕ)»
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ (ΜΔΕ)

“COVID-19 ΚΑΙ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΤΙΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ
ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ”

ΔΗΜΗΤΡΑ ΑΡΧΙΜΑΝΔΡΙΤΗ, ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ: ΠΑΤΡΩΝΑ ΒΕΖΥΡΑΚΗ , ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2021

«Η έγκριση της Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)».

ΔΗΜΗΤΡΑ ΑΡΧΙΜΑΝΔΡΙΤΗ, ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ ΑΡ.ΜΗΤΡΩΟΥ:102

**“COVID-19 ΚΑΙ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΤΙΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ
ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ”.**

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗΣ:07/07/2021

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ: ΒΕΖΥΡΑΚΗ ΠΑΤΡΩΝΑ, ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΒΕΖΥΡΑΚΗ ΠΑΤΡΩΝΑ, ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΑΓΓΕΛΙΔΗΣ ΧΑΡΑΛΑΜΠΟΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΓΕΝΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΕΣΧΟΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ, ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ

I. ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο πλαίσιο του μεταπτυχιακού προγράμματος «Βασικών Βιοιατρικών Επιστημών» (BBE) της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κατά το χρονικό διάστημα 2019-2020, με κατεύθυνση την «Αναγεννητική Ιατρική».

Άμεση επιβλέπων ήταν, η κυρία Πατρόνα Βεζυράκη, Καθηγήτρια Φυσιολογίας, στην οποία οφείλω θερμότερες ευχαριστίες για την ανάθεση του παρόντος θέματος, την καθοδήγηση της και την βοήθειά της από την αρχή της μελέτης.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες, απευθύνω στα μέλη της τριμελούς επιτροπής, τον κύριο Χαράλαμπο Αγγελίδη, Καθηγητή Γενικής Βιολογίας, που με τις επίκαιρες διαλέξεις του στο πλαίσιο των μαθημάτων του μεταπτυχιακού προγράμματος, για την επιδημία του SARS-COV-2, αποτέλεσαν έναυσμα, για το θέμα της διπλωματικής εργασίας. Όπως ευχαριστώ, θερμότερα και τον κύριο Δημήτριο Πέσχο, Αναπληρωτή Καθηγητή Φυσιολογίας που με έχει τιμήσει με τη συμμετοχή του στην τριμελή επιτροπή.

Επίσης ευχαριστώ, όλους τους καθηγητές και συνεργάτες του μεταπτυχιακού που βοηθήσαν στην ομαλή διεξαγωγή των μαθημάτων.

Τέλος, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ από τα βάθη της καρδιάς μου, στην οικογένεια μου που μου παρείχαν στήριξη όλο αυτό το διάστημα, ήταν δίπλα μου σε κάθε μου βήμα.

II. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σημαντικές εξελίξεις και νέες προοπτικές ανοίγονται σήμερα ,με την εξέλιξη και την διαλεύκανση των σηματοδοτικών μονοπατιών που ρυθμίζουν τη στοχευμένη διαφοροποίηση των βλαστικών κυττάρων και βρίσκει εφαρμογή με την Αναγεννητική Ιατρική. Η κατεύθυνση αυτή της Βιολογίας, αποτελεί ένα διεπιστημονικό κλάδο που προκύπτει από την έρευνα στη Βιοχημεία, στη Γενετική , την Κυτταρική και την Μοριακή Βιολογία.

Τα βλαστικά κύτταρα είναι αδιαφοροποίητα προγεννητικά κύτταρα με ευρείες δυνατότητες διαφοροποίησης, τα οποία παρουσιάζουν την ικανότητα εξέλιξης σε κύτταρα ίδιας ή διαφορετικής κυτταρικής σειράς. Ανάλογα από πού προέρχονται, διακρίνονται σε εμβρυϊκά ή αυτά των ενηλίκων και ανάλογα με την ικανότητα διαφοροποίησης τους διακρίνονται σε ολοδύναμα, πολυδύναμα ,πλειοδύναμα, και μονοδύναμα. Πιο συγκεκριμένα, μπορούν να απομονωθούν, να καλλιεργηθούν και να διαφοροποιηθούν σε πολλαπλούς ιστικούς κυτταρικούς τύπους στο περιβάλλον του εργαστηρίου. Μέχρι σήμερα, έχουν απομονωθεί κύτταρα από διάφορους ιστούς.

Η χρήση των βλαστικών κυττάρων έχει εφαρμογή, στους τομείς της γονιδιακής και της κυτταρικής θεραπείας, καθώς και στη μελέτη της ανάπτυξης και εξέλιξης πολλών ασθενειών. Τα τελευταία έτη έχουν αναπτυχθεί ειδικές κυτταρικές σειρές βλαστοκυττάρων για συγκεκριμένες ασθένειες, που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη μελέτη νέων φαρμάκων. Παρά το γεγονός ότι σημειώνεται πλέον σαφέστατη πρόοδος στην κατανόηση της βιολογίας των βλαστικών κυττάρων, υπάρχουν αρκετοί περιορισμοί στη χρήση τους, οι οποίοι απορρέουν κυρίως από το γεγονός ότι (α) υφίστανται θέματα ηθικής φύσης στη χρήση των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων, καθώς η απομόνωσή τους προϋποθέτει την καταστροφή βλαστοκύστεων, (β) τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα αναπτύσσουν όγκους στα ποντίκια (τερατώματα) και (γ) υπάρχουν προβλήματα που ανακύπτουν σε περιπτώσεις μεταμοσχεύσεων λόγω έλλειψης ιστοσυμβατότητας.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η ανάδειξη και ανάλυση της χρησιμότητας των σπερματογλοιακών βλαστικών κυτταρών (SSCs) που αποτελούν κύτταρα, τα οποία διαφοροποιούνται ώστε να ξεκινήσει η διαδικασία που οδηγεί στο σχηματισμό του σπέρματος και η συσχέτιση τους με τις λειτουργικές παραμέτρους του σπέρματος και η επίδραση του ιού SARS-COV-2 σε αυτές.

III. ABSTRACT

Stem cells and finds application in Regenerative Medicine. This field of Biology is an interdisciplinary field resulting from research in Biochemistry, Genetics, Cellular and Molecular Biology.

Stem cells are undifferentiated prenatal cells with wide differentiation potentials, which show the ability to evolve into cells of the same or different cell line. Depending on where they come from, they are divided into embryonic or adult and depending on their ability to differentiate, they are divided into totipotent, multipotent, pluripotent and unipotent. More specifically, they can be isolated, cultured and differentiated into multiple tissue cell types in the laboratory environment. To date, cells have been isolated from various tissues.

The use of stem cells is applicable in the fields of gene and cell therapy, as well as in the study of the development and progression of many diseases. In recent years, special stem cell lines have been developed for specific diseases, which can be used in the study of new drugs.

The purpose of this study is to highlight and analyze the utility of human spermatogonial stem cells (SSCs) that are cells that differentiate to begin the process that leads to the formation of sperm and their correlation with the functional parameters of sperm and its effect SARS-COV-2 virus in them.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	I
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	II
ABSTRACT	III
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	
1.Βασικές έννοιες.....	9
1.1 Ανδρικό αναπαραγωγικό σύστημα.....	9
1.2 Σπέρμα.....	12
1.3 Μορφολογία και φυσιολογία σπερματοζωαρίου.....	13
1.4 Φυσιολογία σπέρματος.....	15
1.5 Σπερματογένεση.....	17
1.6 Στάδια σπερματογένεσης.....	19
1.7 Πολλαπλασιασμός σπερματογόνων.....	23
1.8 Μείωση σπερματοκύτταρων.....	24
1.9 Σπερμιογένεση.....	25
1.10 Ρύθμιση σπερματογένεσης.....	26
1.10.α Αιματο-ορχικός φραγμός.....	26
1.10.β Ορμονικός έλεγχος.....	27
1.11 Ωρίμανση σπερματοζωαίου.....	28
1.12 Ενεργοποίηση.....	29
1.13 Ακροσωμική αντίδραση.....	31

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

2.Βλαστικά κύτταρα-επιφανειακοί υποδοχείς.....	34
2.1 Βλαστικά κύτταρα SSCS.....	34
2.2 Προέλευση σπερματικών βλαστικών κυττάρων	37
2.3 Σπερματικά βλαστικά κύτταρα και θεραπεία ανδρικής υπογονιμότητας.....	38
2.4 CD24	43
2.5 CD34	46
2.6 CD44	49
2.7 CD45	53
2.8 CD117	57

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

3. Βλάβες στο σπερματικό DNA- εργαστηριακές τεχνικές.....	60
3.1 Κατακερματισμός του DNA των σπερματοζωαρίων	60
3.2 Πυρηνικό DNA.....	61
3.3 Μιτοχονδριακό DNA	63
3.4 Μηχανισμοί πρόκλησης κατακερματισμού στο DNA των σπερματοζωαρίων	64
3.5 Διαταραχή του μηχανισμού της απόπτωσης	67
3.6 Ελαττωματική συμπύκνωση της χρωματίνης των σπερματοζωαρίων	69
3.7 Βλάβη από οξειδωτικό στρες	70
3.8 Εργαστηριακός έλεγχος.....	73
3.9 Σπερμοδιάγραμμα.....	74
3.10 Βιοχημικός έλεγχος του σπέρματος	78
3.11 Κυτταρογενετική μελέτη	80

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

4.1 Φαινοτυπική περιγραφή	85
4.2 Μέγεθος του SARS-COV-2	85
4.3 Διαδικασία εισαγωγής του SARS-COV-2 στα κύτταρα έναρξη μόλυνσης (infection).....	86
4.4 Η μόλυνση απαιτεί υποδοχείς και συμπράγοντες	87
4.5 Ο ρόλος της spike στην είσοδο του SARS-COV-2.....	88
4.6 Η ενεργοποίηση της spike γίνεται από πρωτεάσες.....	89
4.7 Για την ιική μόλυνση απαιτείται πρωτεόλυση και της spike (ϊική) και του υποδοχέα ACE2 (κυτταρική)	89
4.8 Το σύστημα ρενίνης -αγγειοτενσίνης και το ανδρικό αναπαραγωγικό σύστημα.....	92
4.9 ACE 2 στο ανδρικό αναπαραγωγικό σύστημα.....	95
4.10 Οι υποδοχείς AT1R AT2R	96
4.11 MAS	97
4.12 TMPRSS2 ανδρικό αναπαραγωγικό σύστημα	98
4.13 SARS-COV Η ανίχνευση στο αναπαραγωγικό σύστημα και οι επιδράσεις στην γονιμότητα.....	99
4.14 Η επίδραση του SARS-COV-2 στο ανδρικό αναπαραγωγικό..... σύστημα, δια μέσου του εγκεφάλου, των οξειδωτικών..... παραγόντων – ορμονική σύνδεση	102
4.15 SARS-COV-2 και φλεγμονή.....	103
4.16 Κυτταροκίνες και ανδρική υπογονιμότητα	104
4.17 Μέθοδοι ανίχνευσης του SARS-COV-2	107
4.17.1 Τεστ ανίχνευσης αντισωμάτων έναντι του κορωνοϊού SARS –COV-2.....	107
4.17.2 Μοριακό τεστ ανίχνευσης κορωνοϊού SARS -COV-2.....	107
4.18 Συμπεράσματα.....	108
BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	110

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

1.ΒΑΣΙΚΕΣ ΕΝΝΟΙΕΣ

1.1 Ανδρικό αναπαραγωγικό σύστημα

Το ανδρικό αναπαραγωγικό σύστημα αποτελείται από έναν αριθμό οργάνων, τα οποία διαδραματίζουν σπουδαίο ρόλο στη διαδικασία της ανθρώπινης αναπαραγωγής. Τα κύρια σεξουαλικά όργανα του αρσενικού ατόμου είναι το πέος, μέσω του οποίου πραγματοποιείται η εκσπερμάτιση, η μεταφορά και η εναπόθεση εν τέλει του σπέρματος στο θηλυκό άτομο και οι όρχεις, οι οποίοι συμβάλουν στην παραγωγή του σπέρματος.

Οι όρχεις αποτελούν ουσιαστικά την τελική μορφή των γονάδων. Η διαμόρφωση των γονάδων εκτελείται κατά την προγεννητική φάση ανάπτυξης του αναπαραγωγικού συστήματος. Οι γονάδες προκύπτουν από το μεσοθηλιακό στρώμα του περιτοναίου. Πιο συγκεκριμένα, τα αρχέγονα κύτταρα των γονάδων (Primordial Germ Cells, PGCs) πρωτοεμφανίζονται στην περιοχή του λεκιθικού ασκού (Εικόνα 1). Τα αρχέγονα κύτταρα στα τέλη της τρίτης εβδομάδας της κύησης μεταναστεύουν με αμοιβαδοειδείς κινήσεις από τον λεκιθικό ασκό στην περιοχή των αδιαφοροποίητων γονάδων (αρχέγονοι γεννητικοί αδένες), όπου και φθάνουν στα τέλη της τέταρτης ή στην αρχή της πέμπτης εβδομάδας, όπου και παραμένουν σε ηρεμία (cell cycle arrest). Στην περιοχή των γονάδων παρατηρούνται και μη μεταναστεύοντα προγονικά κύτταρα τα οποία ονομάζονται γονοκύτταρα (gonocytes). (Tanaka, et al, 2005) Η διαδικασία ωρίμανσης στον άνδρα, των αρχέγονων γεννητικών κυττάρων σε ώριμο γαμέτη αρχίζει κατά την ήβη. Κατά τη γέννηση, τα γεννητικά κύτταρα του άρρενος μπορούν να αναγνωρισθούν στις γεννητικές δοκίδες του όρχεως ως κύτταρα ευμεγέθη που περιβάλλονται από στηρικτικά κύτταρα. Τα στηρικτικά κύτταρα

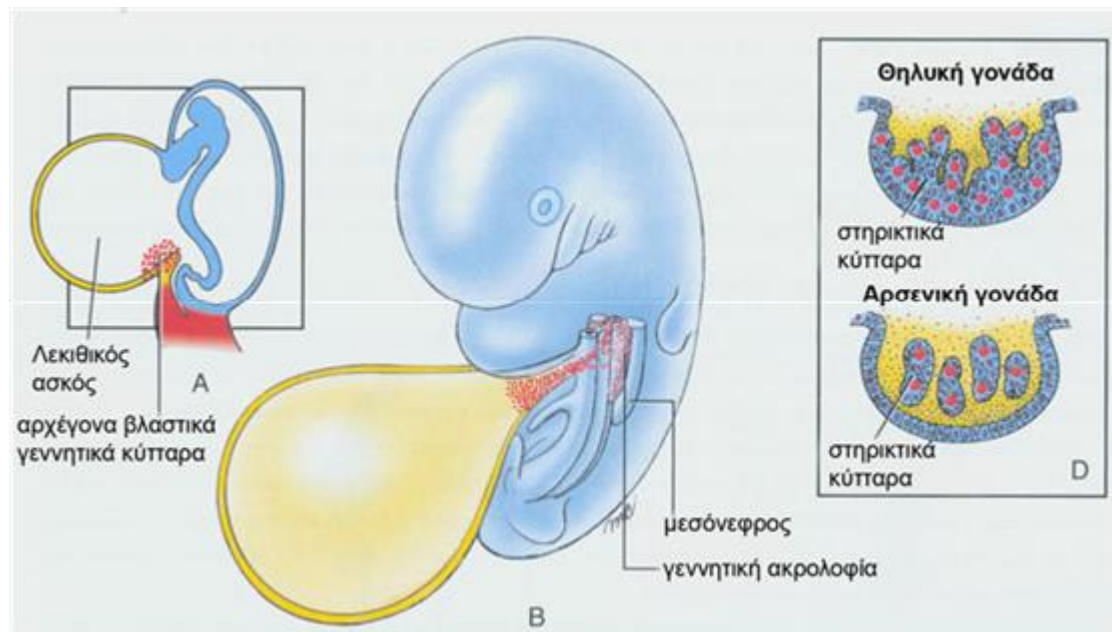
προέρχονται πιθανόν από το βλαστικό επιθήλιο του αδένου και εξελίσσονται σε στηρικτικά κύτταρα ή κύτταρα Sertoli. Λίγο πριν την ήβη, οι γεννητικές δοκίδες αποκτούν αυλό και δημιουργούνται τα σπερματικά σωληνάκια, ενώ την ίδια περίπου περίοδο τα αρχέγονα γεννητικά κύτταρα διαφοροποιούνται σε σπερματογόνια (Okabe, et al, 1998).

Οι όρχεις περιλαμβάνονται στα εσωτερικά γεννητικά όργανα και επιτελούν δύο βασικές λειτουργίες: την παραγωγή των σπερματοζωαρίων μέσω της μειωτικής διαίρεσης των γεννητικών κυττάρων εντός των σπερματικών σωληναρίων και τη σύνθεση και έκκριση των ανδρογόνων, και ειδικότερα της τεστοστερόνης, η οποία ρυθμίζει την αναπαραγωγική λειτουργία. Τα ανδρογόνα παράγονται στα κύτταρα Leydig, τα οποία τοποθετούνται στο διάμεσο μεταξύ των σπερματικών σωληναρίων. Οι όρχεις ελέγχονται από δύο γοναδοτρόπες ορμόνες του πλάγιου λοβού της υπόφυσης, την ωχρινοτρόπο (LH) και την ωοθυλακιοτρόπο (FSH). Η LH δρα στα κύτταρα Leydig ρυθμίζοντας την έκκριση της τεστοστερόνης και η FSH στα κύτταρα Sertoli, διεγείροντας τη σπερματογένεση. Και οι δύο ορμόνες ρυθμίζονται από την υποθαλαμική εκλυτική ορμόνη των γοναδοτροπινών (GnRH). Τα σπερματοζωάρια εξέρχεται τελικά από κάθε όρχι μέσω της γεννητικής οδού του ανδρικού αναπαραγωγικού συστήματος.

Η γεννητική οδός στον άνδρα αποτελείται από τις επιδιδυμίδες, τους σπερματικούς πόρους και τον εκσπερματιστικό πόρο. Οι γεννητικές οδοί εκβάλλουν στην ουρήθρα, η οποία αποτελεί τον αγωγό που διατρέχει το πέος, παροχετεύοντας τα ούρα και το σπέρμα στο εξωτερικό περιβάλλον. Κάθε επιδιδυμίδα αποτελεί μια υπόλευκη μάζα σφιχτά περιελιγμένου αγωγού. Τα σπερματοζωάρια που παράγονται στα σπερματικά σωληνάκια περνούν στην επιδιδυμίδα και ωριμάζουν κατά τη διέλευσή τους κατά μήκος αυτής.

Τμήμα των εσωτερικών γεννητικών οργάνων αποτελούν και οι επικουρικοί αδένες, οι οποίοι παρέχουν υγρά που λιπαίνουν το σύστημα των αγωγών, τρέφοντας τα σπερματοζώαρια. Πρόκειται για τις σπερματοδόχους κύστες, τον προστάτη και τους βολβοουρηθραίους αδένες.

Κατά την εφηβεία, η αυξημένη έκκριση γοναδοτροπίνης διεγείρει την παραγωγή στεροειδών ορμονών από τους όρχεις. Η έκκριση τεστοστερόνης από τους όρχεις προκαλεί τελικά την εκδήλωση των ανδρικών δευτερογενών σεξουαλικών χαρακτηριστικών (Sherwood, et al, 2016).



Εικόνα 1: Αρχέγονα κύτταρα των γονάδων (Primordial Germ Cells, PGCs) πρωτοεμφανίζονται στην περιοχή του λεκιθικού ασκού αναπτύσσονται και ωριμάζουν και διαφοροποιούνται σε σπερματοζώαρια.

1.2 Σπέρμα

Το σπέρμα αποτελείται από το σπερματικό υγρό και τα σπερματοζωάρια. Το σπερματικό υγρό περιέχει ουσίες, οι οποίες εκκρίνονται από τους επικουρικούς αδένες του γεννητικού συστήματος, τον προστάτη, τις σπερματοδόχους κύστες και τις επιδιδυμίδες. Τα σπερματοζωάρια παράγονται από τους όρχεις.

Τα σπερματοζωάρια εκκρίνονται από τις γονάδες των αρσενικών ατόμων και είναι ικανά να γονιμοποιήσουν τα ωάρια των θηλυκών ατόμων. Οι ουσίες του σπερματικού υγρού είναι απαραίτητες για την ορθή λειτουργία του σπέρματος, ενώ συμβάλλουν καθοριστικά στην επιβίωση των σπερματοζωαρίων στον κόλπο. Οι ουσίες που προσδίδουν στο σπερματικό υγρό αλκαλικό χαρακτήρα εξουδετερώνουν το όξινο pH του κόλπου επιτρέποντας στα σπερματοζωάρια να επιβιώσουν μέχρι να περάσουν στο φιλικό για αυτά περιβάλλον του τραχήλου. Στα συστατικά του σπερματικού υγρού περιλαμβάνονται οι προσταγλανδίνες και η φρουκτόζη, που προάγουν την επιβίωση των σπερματοζωαρίων και παρέχουν ένα μέσο για την κίνησή τους.

Αν και ο προστάτης αδένας παράγει μεγάλο αριθμό ουσιών, η λειτουργία του ελέγχεται ικανοποιητικά μέσω της αξιολόγησης των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών του σπερματικού υγρού και της μέτρησης των επιπέδων ψευδάργυρου (Zn) ανά εκσπερμάτιση. Για παράδειγμα, το γνωστό προστατικό αντιγόνο PSA είναι υπεύθυνο για τη ρευστοποίηση του σπερματικού υγρού. Το προστατικό έκκριμα περιέχει ακόμη πρωτεολυτικά ένζυμα, φωσφορικό και κιτρικό οξύ. Αξιόπιστο δείκτη στην εκτίμηση της λειτουργίας των σπερματοδόχων κύστεων αποτελούν τα επίπεδα της φρουκτόζης, ενώ η επιδιδυμική λειτουργία εκτιμάται αποτελεσματικά μετρώντας τα επίπεδα της ουδέτερης γλυκοσιδάσης. Κατά την εκσπερμάτιση, σπερματοζωάρια, που είχαν ωριμάσει κατά το πέρασμά τους από τις

επιδιδυμίδες,, αναμιγνύονται με τις εκκρίσεις από τους επικουρικούς αδένες του ανδρικού γεννητικού συστήματος.

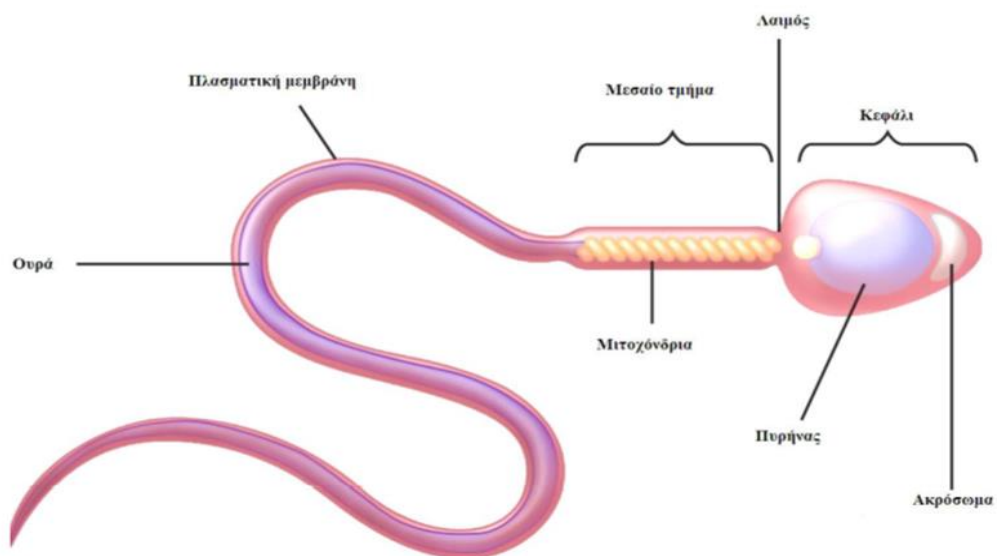
Η σύγκριση των όγκων σπέρματος πριν και μετά την απολίνωση των σπερματικών πόρων (στείρωση) αποκαλύπτει ότι το 90% περίπου του όγκου του σπέρματος προκύπτει από εκκρίσεις των επικουρικών αδένων, κυρίως του προστάτη και των σπερματοδόχων κύστεων, αλλά και των βολβοουρηθραίων αδένων και των επιδιδυμίδων (Weiske, et al, 2001, Cao,et al, 2011).

1.3 Μορφολογία και φυσιολογία σπερματοζωαρίου

Κάθε φυσιολογικό σπερματοζωάριο που παράγεται έχει συνολικό μήκος 45-50 μm και αποτελείται από τρεις μορφολογικώς και λειτουργικώς διακριτές περιοχές: την κεφαλή, τον αυχένα και το μαστίγιο (ή ουρά). Η κεφαλή ενός φυσιολογικού σπερματοζωαρίου έχει ωοειδές σχήμα, μήκος 4 έως 5,5 μm , πλάτος 2,5 έως 3,5 μm και πάχος 1,5 μm (Esteves, et al, 2015).

Αποτελείται σχεδόν αποκλειστικά από τον πυρήνα που περιέχει το DNA με όλη τη γενετική πληροφορία, ενώ το ανώτερο σημείο του καλύπτεται από μία σακοειδή δομή που ονομάζεται ακρόσωμα και είναι γεμάτο πρωτεΐνες και ένζυμα, απαραίτητα για τη δημιουργία διόδου εισαγωγής του γεννητικού υλικού του σπερματοζωαρίου στο ωάριο κατά τη γονιμοποίηση .Ο πυρήνας και το ακρόσωμα καλύπτονται, αντιστοίχως, από την πυρηνική μεμβράνη και το μετακροσωματικό έλυτρο, μία πάχυνση της κυτταρικής μεμβράνης που παίζει ρόλο στην αναγνώριση του σπερματοζωαρίου από το ωάριο και την ένωσή τους. 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 αποτέλεσμα να μην επηρεάζεται η κινητικότητα του σπερματοζωαρίου .

Ο αυχέννας είναι το σημείο όπου το διάμεσο τμήμα του σπερματοζωαρίου συνδέεται με την κεφαλή. Το διάμεσο τμήμα έχει μήκος 6 έως 10 μm, πλάτος 1 μm και περιέχει το αξονικό νημάτιο που περιβάλλεται από ινίδια με κυκλωτή διάταξη. Ο αυχέννας περιέχει 1-2 κεντροσώματα. Το κύριο χαρακτηριστικό του διάμεσου τμήματος είναι ότι αποτελείται από πυκνά διευθετημένα μιτοχόνδρια που προσδίδουν στο σπερματοζώαριο την απαραίτητη ενέργεια για την επιβίωση και κίνησή του. Η ουρά έχει μήκος περίπου 40-50 μm και το μεγαλύτερο μέρος της εκλαμβάνεται ως ένα μαστίγιο αποτελούμενο από συσταλά νημάτια που λόγω της ημιτονοειδούς προωθητικής κίνησης που παράγουν, προσδίδουν στο σπερματοζώαριο την χαρακτηριστική του κίνηση και του επιτρέπουν να κινηθεί.



Εικόνα 2: Τυπική μορφή φυσιολογικού σπερματοζωαρίου.

1.4 Φυσιολογία σπέρματος

Κατά την εκσπερμάτιση, το σπέρμα διέρχεται μέσω των αγωγών και αναμιγνύεται με υγρά των σπερματοδόχων κύστεων, του προστάτη και των βολβοουρηθραίων αδένων. Οι σπερματοδόχοι κύστες παράγουν ένα κιτρινωπό ιξώδες υγρό πλούσιο σε φρουκτόζη και άλλες ουσίες, οι οποίες αποτελούν περίπου το 70% του ανθρώπινου σπέρματος. Η προστατική έκκριση, λόγω της διϋδροτεστοστερόνης, είναι ένα υπόλευκο υγρό και περιέχει πρωτεολυτικά ένζυμα, κιτρικό οξύ, όξινη φωσφατάση και λιπίδια. Τα κύτταρα Sertoli, τα οποία είναι υπεύθυνα για την ανάπτυξη των σπερμοκυττάρων, εκκρίνουν στα σπερματικά σωληνάρια ένα υγρό, το οποίο συμβάλει στη μεταφορά του σπέρματος στους γεννητικούς πόρους. Μόλις το σπέρμα εισέλθει στην επιδιδυμίδα, τα κύρια κύτταρα εκκρίνουν τη γλυκεροφωσφοχολίνη, η οποία πιθανότατα αναστέλλει την πρόωρη κινητική ικανότητα των σπερματοζωαρίων. Οι επικουρικοί γεννητικοί πόροι, οι σπερματοδόχοι κύστες, οι αδένες του προστάτη και οι βολβοουρηθραίοι αδένες, παράγουν το μεγαλύτερο μέρος του σπερματικού υγρού.

Σημαντικό ρόλο στη φυσιολογία του σπέρματος διαδραματίζει το σπερματικό πλάσμα, το οποίο περιέχει ένα πολύπλοκο φάσμα οργανικών και ανόργανων συστατικών. Θεωρείται θρεπτικό και προστατευτικό μέσο για τα σπερματοζωάρια κατά τη διάρκεια της διέλευσής τους μέσω της γυναικείας αναπαραγωγικής οδού. Το φυσιολογικό περιβάλλον του κόλπου θεωρείται εχθρικό για τα σπερματοζωάρια, καθώς είναι όξινο, ιξώδες και περιλαμβάνει ανοσοκύτταρα. Τα συστατικά του σπερματικού πλάσματος επιχειρούν να αντισταθμίσουν αυτό το περιβάλλον. Οι βασικές αμίνες όπως η πουτρεσκίνη, η σπερμίνη, η σπερμιδίνη και η καδαβερίνη είναι υπεύθυνες για την οσμή και τη γεύση του σπέρματος. Οι συγκεκριμένες αλκαλικές βάσεις αντισταθμίζουν και ρυθμίζουν το όξινο περιβάλλον του κόλπου και

προστατεύουν το DNA του σπέρματος από την όξινη μετουσίωση (Rogers, et al, 2020).

Το σπέρμα διακρίνεται από δύο ποσοτικά χαρακτηριστικά: το συνολικό αριθμό των σπερματοζωαρίων, ο οποίος αντανακλά την παραγωγή του σπέρματος από τους όρχεις και τη βατότητα του στον αγωγό, και το συνολικό όγκο των υγρών που προκύπτουν από τους διάφορους επικουρικούς αδένες, ο οποίος αντικατοπτρίζει την εκκριτική δραστηριότητα των αδένων. Η ποιότητα του σπέρματος είναι ενδεικτική της ικανότητας του σπερματοζωαρίου να επιτύχει γονιμοποίηση. Έτσι, θεωρείται και μέτρο της γονιμότητας. Η αξιολόγηση του σπέρματος εκτιμά τόσο την ποσότητα όσο και την ποιότητα του σπέρματος (Cao, et al, 2011).

Η φύση των σπερματοζωαρίων (ζωτικότητα, κινητικότητα, μορφολογία) και η σύνθεση του σπερματικού υγρού είναι σημαντικές για τη λειτουργία των σπερματοζωαρίων. Ουσιαστικές για την κινητικότητα του σπέρματος θεωρούνται οι μικρές ποσότητες καλίου και μαγνησίου, η παρουσία επαρκών ποσοτήτων οξυγόνου στο πλάσμα, η κατάλληλη θερμοκρασία και το αλκαλικό pH. Οι θευκές χημικές ουσίες στο σπέρμα βοηθούν στην αποτροπή της διόγκωσης των σπερματοζωαρίων, ενώ η φρουκτόζη αποτελεί την κύρια θρεπτική ουσία των κυττάρων του σπέρματος.

Η ποιότητα και η ποσότητα των δειγμάτων σπέρματος ποικίλλει και εξαρτάται ενδεχομένως από τον τρόπο παραγωγής του υγρού της εκσπερμάτισης (Cao, et al, 2011). Τα δείγματα που παράγονται με αυνανισμό και συλλέγονται σε δοχεία μπορεί να είναι χαμηλότερης ποιότητας από αυτά που ανακτώνται από μη σπερματοκτόνα προφυλακτικά που χρησιμοποιούνται στη διάρκεια της συνουσίας (Zavos, et al, 1989). Η διαφορά ίσως να αντανακλά ένα διαφορετικό τύπο σεξουαλικής διέγερσης, δεδομένου ότι ο χρόνος που δαπανάται για την παραγωγή ενός δείγματος με

αυνανισμό επηρεάζει επίσης την ποιότητα του σπέρματος (Round, et al, 2002). Σε δεδομένες συνθήκες συλλογής, η ποιότητα και η ποσότητα του σπέρματος εξαρτώνται από παράγοντες που συνήθως δεν δύναται να τροποποιηθούν, όπως η παραγωγή σπέρματος από τους όρχεις, οι εκκρίσεις των βοηθητικών οργάνων, η πρόσφατη ασθένεια, καθώς και παράγοντες όπως ο χρόνος αποχής, ο οποίος πρέπει να καταγράφεται και να λαμβάνεται υπόψη στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

1.5 Σπερματογένεση

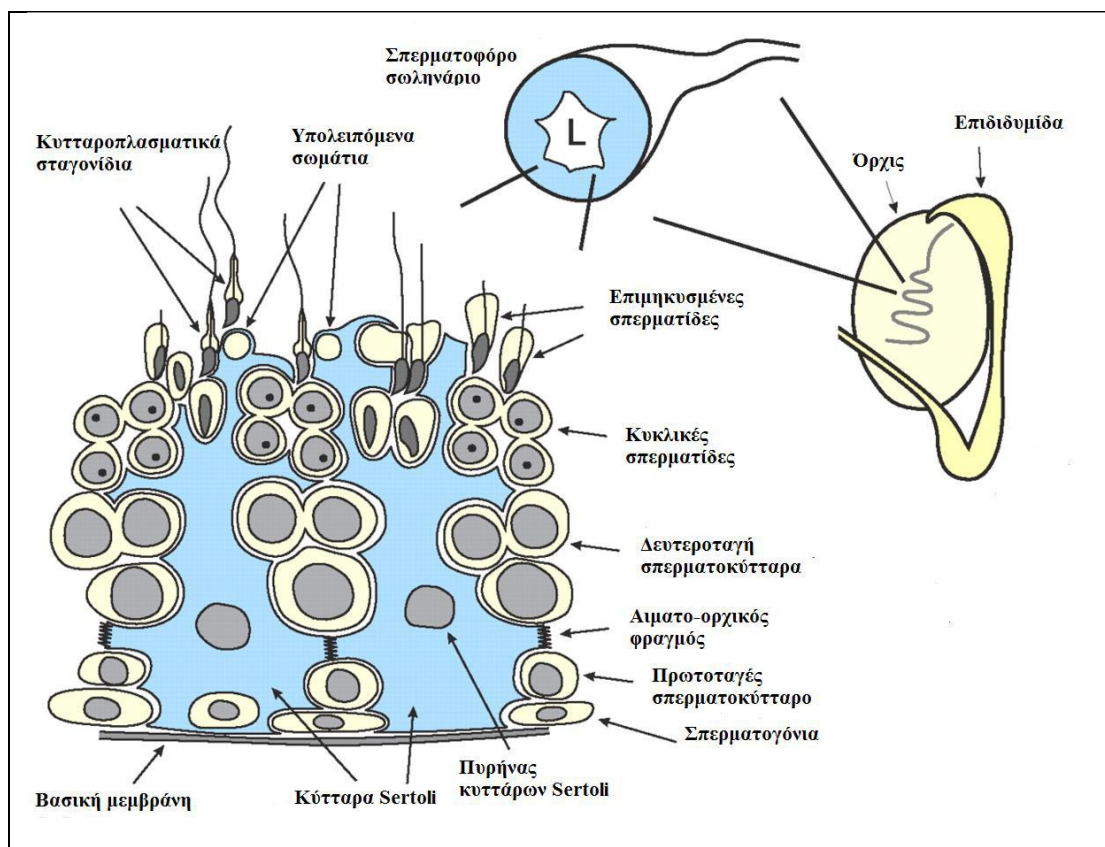
Ο όρος σπερματογένεση αναφέρεται στη διαδικασία κατά την οποία σχηματίζονται απλοειδή, λειτουργικά και ευκίνητα σπερματοζωάρια από διπλοειδή σπερματογόνια. Το σπερματοζωάριο είναι συνήθως το μικρότερο κύτταρο του οργανισμού, σε αντίθεση με το ωάριο που είναι το μεγαλύτερο. Επιτελεί δύο κύριες λειτουργίες: να επιδώσει το γονιδιωματά του στο ωάριο για γενετικό ανασυνδυασμό και να ενεργοποιήσει το αναπτυξιακό πρόγραμμα του ωαρίου. Στους άνδρες η μείωση των σπερματοκυττάρων συμπληρώνεται σε 24 ημέρες, ενώ η όλη διαδικασία της ανάπτυξης ενός σπερματογονίου σε ώριμο σπερματοζωάριο απαιτεί 74 ημέρες (Αναγνωστοπούλου, 1993).

Η σπερματογένεση, η διαδικασία της παραγωγής των σπερματοζωαρίων, αποτελεί μια συνεχή και περιοδική διαδικασία, που ξεκινά στην εφηβεία με την έναρξη της έκκρισης των γοναδοτροπινών και συνεχίζεται κατά τη διάρκεια της ζωής του άνδρα. Η σπερματογένεση λαμβάνει χώρα στο σπερματικό επιθήλιο των σπερματικών σωληναρίων. Κατά την εμβρυογένεση, τα αρχέγονα βλαστικά κύτταρα μεταναστεύουν στους όρχεις και μετατρέπονται σε ανώριμα βλαστικά κύτταρα, τα σπερματογόνια. Τα σπερματογόνια διατάσσονται σε δύο ή τρεις στοιβάδες στην εσωτερική επιφάνεια των σπερματικών σωληναρίων. Κύτταρα των σωληναρίων

αποτελούν και τα κύτταρα Sertoli, τα σωματικά διπλοειδή κύτταρα που στηρίζουν τα βλαστικά κύτταρα, διαδραματίζοντας σημαντικό ρόλο και στην αλληλουχία των γεγονότων της σπερματογένεσης.

Στην εφηβεία, τα σπερματογόνια εισέρχονται στον κύκλο της σπερματογένεσης ανά τακτά χρονικά διαστήματα και κατά ομάδες. Η ωρίμανση των κυττάρων διακρίνεται σε διαδοχικές μιτωτικές, μειωτικές και μετα-μειωτικές φάσεις. Τα σπερματογόνια πολλαπλασιάζονται με συνεχείς μιτωτικές διαιρέσεις. Στη συνέχεια, ορισμένα υφίστανται μείωση ώστε να δώσουν τελικά γένεση στις απλοειδείς σπερματίδες, οι οποίες θα μετατραπούν σε σπερματοζωάρια.

Τα σπερματογόνια μπορούν να ανανεώνονται και να παράγουν σημαντικό αριθμό διαφοροποιημένων βλαστικών κυττάρων. Η διατήρηση της φυσιολογικής σπερματογένεσης και της γονιμότητας ακολούθως, προϋποθέτει την ύπαρξη ισορροπίας μεταξύ της ανανέωσης των σπερματογονίων και της διαφοροποίησής τους σε σπερματοζωάρια. Οι δύο αυτές διαδικασίες ρυθμίζονται τόσο από τη γονιδιακή έκφραση των σπερματογονίων όσο και από εξωγενή σήματα, όπως διαλυτούς παράγοντες και μόρια προσκόλλησης του ορχικού μικροπεριβάλλοντος (Sharpe, et al, 1994).



Εικόνα 3: Τοπογραφική διεύθυνση της σπερματογένεσης

1.6 Στάδια σπερματογένεσης

Η σπερματογένεση λαμβάνει χώρα στα εκτεταμένα σπερματικά σωληνάκια των όρχεων. Τα σπερματικά σωληνάκια επενδύονται από το σπερματικό επιθήλιο και περιέχουν έναν αυλό γεμάτο υγρό, στον οποίο απελευθερώνονται τα πλήρως σχηματισμένα σπερματοζωάρια. Το σπερματικό επιθήλιο αποτελείται από δύο βασικούς κυτταρικούς τύπους, τα σωματικά και τα γαμετικά κύτταρα. Τα γαμετικά κύτταρα βρίσκονται σε διάφορα επίπεδα από τη βάση του σωληναρίου έως και τον αυλό και περιβάλλονται από το κυτταρόπλασμα των σωματικών κυττάρων Sertoli. Το κυτταρόπλασμα των κυττάρων Sertoli επεκτείνεται σε όλο το σπερματοφόρο σωληνάριο, καθώς τα συγκεκριμένα κύτταρα οφείλουν να θρέφουν τα γαμετικά κύτταρα καθ' όλη τη διάρκεια της διαφοροποίησής τους. Κατά τη σπερματογένεση, τα σπερματογόνια τοποθετούνται ανάμεσα στη βασική μεμβράνη των

σπερματοφόρων σωληναρίων και στη βάση των κυττάρων Sertoli. Στην περιφέρεια των σπερματικών σωληναρίων βρίσκονται τα κύτταρα Leydig, τα οποία μαζί με τα κύτταρα Sertoli συμμετέχουν στην ορμονική ρύθμιση της σπερματογένεσης (Suresh, et al, 2004).

Η σπερματογένεση αποτελεί μία συνεχή διαδικασία. Σε όλη τη διάρκειά της, τα πρωτοταγή γαμετικά κύτταρα παραμένουν συνδεδεμένα με τα κύτταρα Sertoli και διευθετούνται με καθορισμένη διαδοχή. Η σύνδεση που δημιουργείται μεταξύ των κυττάρων Sertoli σχηματίζει τον αιματο-ορχικό φραγμό, ο οποίος συμβάλει στην προστασία των αναπτυσσόμενων γαμετικών κυττάρων από βλαβερά παράγωγα του αίματος. Η σπερματογένεση χωρίζεται σε τρία διακριτά στάδια, στον πολλαπλασιασμό των σπερματογονίων, στη μείωση των σπερματοκυττάρων και στη σπερμιογένεση (Rex, et al, 1991)(Εικόνα 4).

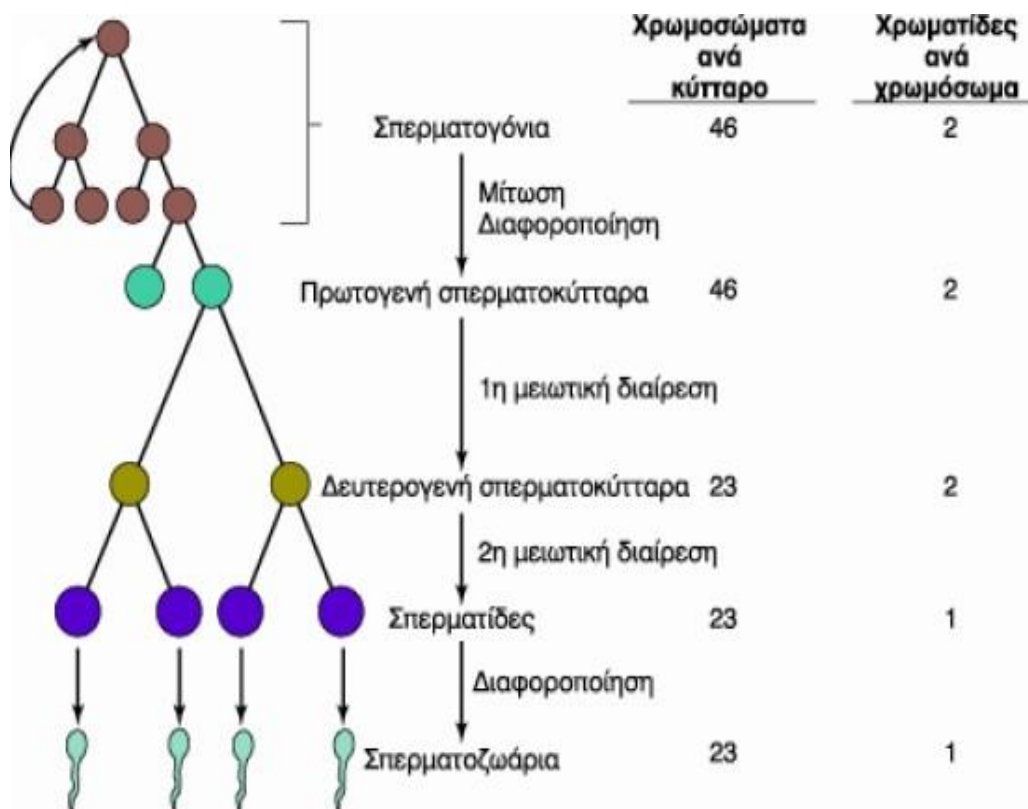
Η φάση του πολλαπλασιασμού των σπερματογονίων περιλαμβάνει τη διαίρεσή τους, τόσο για να αντικαταστήσουν τον εαυτό τους όσο και για να παράγουν έναν αριθμό κυττάρων που θα μετατραπούν σε ώριμα σπερματοζωάρια. Σε αυτή τη φάση της σπερματογένεσης, τα σπερματογόνια μεταναστεύουν προς τον αυλό των σπερματικών σωληναρίων, κινούμενα ανάμεσα στα κύτταρα Sertoli, τα οποία ως ευμεγέθη κύτταρα, περιβάλλουν τα σπερματογόνια σε όλη τους την πορεία. Τα σπερματογόνια, καθώς διέρχονται μέσω των συνδέσεων των κυττάρων Sertoli, υφίστανται δομικές αλλαγές και μετατρέπονται στα σπερματοκύτταρα πρώτης τάξης. Τα κύτταρα Sertoli διαχωρίζουν το τοίχωμα του σπερματικού σωληναρίου στο βασικό διαμέρισμα, όπου υπάρχουν κυρίως σπερματογόνια και στο παρα-αυλικό διαμέρισμα, όπου υπάρχουν πιο προχωρημένα κύτταρα της σπερματογένεσης. Έτσι, το βασικό διαμέρισμα βρίσκεται πριν και το παρα-αυλικό μετά τον αιματο-ορχικό φραγμό. Φυσικά, η θέση των κυττάρων στο σπερματικό επιθήλιο δεν είναι τυχαία,

καθώς υφίσταται σημαντικού βαθμού αρχιτεκτονική οργάνωση. Έτσι, ομάδες παρόμοιων λειτουργικά κυττάρων τοποθετούνται κοντά στο σπερματικό επιθήλιο, με τα πλέον άωρα κύτταρα να βρίσκονται στη βασική μεμβράνη και τα πλέον ώριμα στον αυλό. Καθώς τα σπερματοκύτταρα πρώτης τάξης προετοιμάζονται να εισέλθουν στην πρόφαση της πρώτης μειωτικής διαίρεσης (μείωση I), μετακινούνται από τη βασική μεμβράνη του σπερματικού σωληναρίου στον αυλό. Εκεί, τα σπερματοκύτταρα δεσμεύονται από τα κύτταρα Sertoli μέσω ειδικών κυτταρικών συνδέσεων (Griswold, et al, 2005).

Η επόμενη φάση αποτελείται από δύο κυτταρικές διαιρέσεις του σπερματοκυττάρου πρώτης τάξης, που συνοδεύονται από ένα μονάχα διπλασιασμό των χρωμοσωμάτων. Η πρόφαση της πρώτης μειωτικής διαίρεσης (πρόφαση I) καταλαμβάνει περίπου το 90% της συνολικής διάρκειας της μείωσης και διαιρείται σε τέσσερα επιμέρους στάδια: της λεπτοταινίας, της ζυγοταινίας, της παχυταινίας και της διπλοταινίας. Στο στάδιο της λεπτοταινίας, τα χρωμοσώματα συμπυκνώνονται, ενώ σχηματίζονται θραύσεις και στις δύο αλυσίδες του DNA (DSBs), οι οποίες θα χρησιμεύσουν αργότερα στον ανασυνδυασμό των ομόλογων χρωμοσωμάτων. Στο στάδιο της ζυγοταινίας, οι αδελφές χρωματίδες ζευγαρώνουν και σχηματίζουν συνάψεις (synaptonemal complexes - SCs). Πρόκειται για πρωτεϊνικές δομές, που συντίθενται από δύο αξονικά στοιχεία κατά μήκος των αδελφών χρωματίδων και συνδέονται με ένα κεντρικό στοιχείο, το οποίο ενώνει τα δύο αξονικά. Η σύναψη ολοκληρώνεται στο στάδιο της παχυταινίας, όπου και εκτυλίσσεται ο ομόλογος ανασυνδυασμός. Στο στάδιο της διπλοταινίας, επιτελείται ο διαχωρισμός των χρωμοσωμάτων και τα SCs αρχίζουν να εξαφανίζονται (Cobb, et al, 1998).

Μετά την πρόφαση I, ακολουθούν η μετάφαση, η ανάφαση και η τελόφαση της πρώτης μειωτικής διαίρεσης και τελικά προκύπτουν δύο σπερματοκύτταρα δεύτερης

τάξης για κάθε σπερματοκύτταρο πρώτης τάξης. Στη διάρκεια της δεύτερης μειωτικής διαίρεσης, οι αδελφές χρωματίδες διαχωρίζονται και διαιρούνται ώστε να παραχθούν οι κυκλικές σπερματίδες. Τελικά, από ένα σπερματοκύτταρο πρώτης τάξης σχηματίζονται τέσσερις σπερματίδες, όπου η καθεμιά περιέχει μια απλοειδή ομάδα χρωμοσωμάτων (Roeder, et al, 1997).



Εικόνα 4. Διαδικασία της σπερματογένεσης η οποία ξεκινά στην εφηβεία.

1.7 Πολλαπλασιασμός σπερματογονίων

Η πρώτη φάση της σπερματογένεσης είναι ο πολλαπλασιασμός των σπερματογονίων. Τα σπερματογόνια αποτελούν διπλοειδή κύτταρα, τα οποία διαιρούνται με συνεχείς μιτώσεις και βρίσκονται στη βασική μεμβράνη. Η διαίρεση των σπερματογονίων ξεκινά στην εφηβεία. Τα σπερματογόνια σχηματίζουν διαδοχικές γενιές σπερματογονίων, κάθε μία πιο διαφοροποιημένη από την προηγούμενη (Gupta, et al, 2006). Διακρίνονται δύο κύριες κατηγορίες σπερματογονίων, τα σπερματογόνια τύπου A και τα σπερματογόνια τύπου B (Huang, et al, 2014). Τα σπερματογόνια τύπου A παραμένουν εκτός του αιματο-ορχικού φραγμού και συνεχίζουν να διαιρούνται από την εφηβεία έως το θάνατο. Με τον τρόπο αυτό διατηρείται μια δεξαμενή γαμετικών κυττάρων που, θεωρητικά τουλάχιστον, διατηρεί τη γονιμοποιητική ικανότητα του άνδρα έως μια προχωρημένη ηλικία. Τα σπερματογόνια τύπου A διακρίνονται περαιτέρω στα σπερματογόνια Ad και Ap. Τα βαθυχρωματικά σπερματογόνια Ad (dark) διαθέτουν ωοειδή πυρήνα με βαθυχρωματική κοκκιώδη χρωματίνη και ένα κεντρικό κυστίδιο και δεν οδηγούν άμεσα στην παραγωγή σπερματοζωαρίων. Προέρχονται από τα πρώιμα γαμετικά κύτταρα (Primordial Germ Cells, PGCs) και διατηρούν μία βασική ιδιότητα των στελεχιαίων κυττάρων, την αυτοανανέωση. Η διαίρεσή τους ακολουθεί δύο δρόμους: είτε προς την παραγωγή δύο σπερματογονίων Ad όμοιων προς το αρχικό, είτε προς την παραγωγή δύο σπερματογονίων Ap. Τα αραιοχρωματικά σπερματογόνια Ap (pale) διαθέτουν υποστρόγγυλο πυρήνα με αραιοχρωματική χρωματίνη και ένα ή περισσότερα κυστίδια και πολλαπλασιάζονται σε τακτικά χρονικά διαστήματα δίνοντας νέα σπερματογόνια Ap. Τελικά, κάποια από αυτά διακόπτουν τον πολλαπλασιασμό τους και ωριμάζουν σε σπερματογόνια τύπου B. Τα σπερματογόνια

τύπου B διαθέτουν σφαιρικό πυρήνα και αποτελούν τα κύτταρα του τελευταίου σταδίου της πρώτης φάσης της σπερματογένεσης (Clemont, et al, 1972).

1.8 Μείωση σπερματοκυττάρων

Στη φάση αυτή, τα B σπερματογόνια διαιρούνται στα πρωτοταγή σπερματοκύτταρα, τα οποία ξεκινούν τις μειωτικές διαιρέσεις. Στη διάρκεια των μειωτικών διαιρέσεων, κύτταρα που βρίσκονται σε πιο προχωρημένα στάδια μείωσης και σπερματογένεσης τοποθετούνται σε διαδοχικά υψηλότερες θέσεις. Κάθε πρωτοταγές σπερματοκύτταρο διαιρείται αρχικά σε δύο δευτεροταγή σπερματοκύτταρα και ακολούθως σε τέσσερις σπερματίδες, οι οποίες είναι απλοειδή κύτταρα με 23 χρωμοσώματα. Στην πρώτη μειωτική διαίρεση των πρωτοταγών σπερματοκυττάρων, τα ομόλογα χρωμοσώματα ανταλλάσσουν γενετικό υλικό με τη διαδικασία του επιχιασμού. Τα επιχιάσματα συμβάλλουν στη γενετική ποικιλότητα, καθώς οι τέσσερις σπερματίδες που προκύπτουν από ένα πρωτοταγές σπερματοκύτταρο διαφέρουν μεταξύ τους. Μετά την πρώτη μειωτική διαίρεση προκύπτουν δύο απλοειδή δευτεροταγή σπερματοκύτταρα, τα οποία υπόκεινται σε διαίρεση παράγοντας τέσσερις σπερματίδες, με ένα αντίγραφο DNA (μία αδελφή χρωματίδα) (Rüdiger, et al, 2002). Τα αναπτυσσόμενα γαμετικά κύτταρα αποτυγχάνουν να συμπληρώσουν τις κυτταροπλασματικές τους διαιρέσεις (κυτταροκίνηση) στη διάρκεια της μίτωσης και της μείωσης. Όλα τα θυγατρικά κύτταρα παραμένουν συνδεδεμένα με κυτταροπλασματικές γέφυρες και αποτελούν ένα συγκύτιο. Οι κυτταροπλασματικές γέφυρες επιτρέπουν τη διέλευση ιόντων και μορίων. Η επικοινωνία αυτή διατηρείται έως την πλήρη και ταυτόχρονη διαφοροποίησή τους.

1.9 Σπερμιογένεση

Η τελευταία φάση της σπερματογένεσης είναι η διαφοροποίηση των σπερματιδίων σε σπερματοζωάρια. Η συγκεκριμένη διαδικασία περιλαμβάνει κυτταρική αναδόμηση με εκτεταμένη επιμήκυνση, χωρίς περαιτέρω κυτταρικές διαιρέσεις. Το σπερματοζωάριο αποτελείται από τρεις μορφολογικά λειτουργικές περιοχές που περιβάλλονται από μία πλασματική μεμβράνη: το κεφάλι, που περιέχει τον απλοειδή πυρήνα, το σώμα και την ουρά, που προωθεί το σπέρμα στο ωάριο. Το κεφάλι καταλαμβάνεται κυρίως από τον πυρήνα. Το σημείο του πυρήνα καλύπτεται από το ακρόσωμα, ένα κυστίδιο γεμάτο πρωτεΐνες και ένζυμα που παίζουν σημαντικό ρόλο στην ικανότητα διείσδυσης του σπερματοζωαρίου στο ωάριο. Το μεγαλύτερο μέρος της ουράς εκλαμβάνεται ως ένα μαστίγιο αποτελούμενο από συσταλτά νημάτια, τα οποία παράγουν μια ημιτονοειδή προωθητική κίνηση που προσδίδει στο σπερματοζωάριο ταχύτητα από 1 έως 4 mm το λεπτό. Το σώμα του σπερματοζωαρίου αποτελείται από μιτοχόνδρια, τα οποία παρέχουν την απαραίτητη ενέργεια για την κίνησή του (Vander, et al, 2011).

Κατά τη σπερμιογένεση παρατηρούνται διάφορες πυρηνικές μετατροπές. Οι μεταβολές στον πυρήνα αφορούν στη μετατροπή του σχήματος και στην εκτεταμένη συμπύκνωση της χρωματίνης. Η συμπύκνωση της χρωματίνης προσφέρει πλεονεκτήματα στο σπέρμα. Χάρη σ' αυτή, ο πυρηνικός όγκος ελαττώνεται σημαντικά και η μετακίνηση του σπέρματος απλοποιείται. Επιπλέον, η συμπύκνωση του DNA το καθιστά λιγότερο επιδεκτικό σε φυσικές βλάβες ή μεταλλάξεις κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης και της επακόλουθης μετακίνησής του στη θέση γονιμοποίησης. Η συμπύκνωση επιφέρει ριζική ελάττωση της μεταγραφικής ικανότητας. Έτσι, η μεταγραφή του αρσενικού γονιδιώματος παύει και υφίσταται ξανά μονάχα εφόσον τα γονίδια επανενεργοποιηθούν σε κάποιο στάδιο της

ανάπτυξης, μετά τη γονιμοποίηση. Η συμπύκνωση οφείλεται στην αντικατάσταση των ιστονών από πρωταμίνες, μικρές πρωτεΐνες, πλούσιες σε αργινίνη (Balhor, et al, 2007). Κατά τη σπερμιογένεση λοιπόν, τη φάση της σπερματογένεσης στην οποία οι απλοειδείς σπερματίδες μετατρέπονται σε σπερματοζώαρια, λαμβάνουν χώρα βασικές μεταβολές, όπως η απώλεια του κυτταροπλάσματος του σπερματοζωαρίου.

Στη 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. Στη φάση Cap, το ακροσωμικό κυστίδιο μετακινείται προς τον πυρήνα της στρογγυλής σπερματίδας και σχηματίζεται από το κεντριόλιο ο πρόδρομος της ουράς (μαστίγιο). Στην ακροσωμιακή φάση, ο πυρήνας της σπερματίδας επιμηκύνεται και δημιουργείται το ακρόσωμα. Στη 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. Ακολουθεί ο σχηματισμός της πολύπλοκης ουράς από το αξονημάτιο, που αποτελείται από δύο εσωτερικά μονά και εννέα εξωτερικά διπλά μικροσωληνάρια. Στη συνέχεια, το σπερματοζώαριο οδηγείται στην επιδιδυμίδα, όπου και ωριμάζει (de Kretser, et al, 1994).

1.10 Ρύθμιση σπερματογένεσης

Η σπερματογένεση, λόγω της πολυπλοκότητάς της, υπόκειται σε ρύθμιση. Η ρύθμιση πραγματοποιείται από τον αιματο-ορχικό φραγμό και από ορμόνες (Rüdiger et al, 2002).

1.10.1 Αιματο-ορχικός φραγμός

Ο αιματο-ορχικός φραγμός είναι γνωστός και ως φραγμός των κυττάρων Sertoli ή φραγμός του σπερματοφόρου επιθηλίου. Επιτελεί διάφορες λειτουργίες, ιδιαίτερα σημαντικές για τη σπερματογένεση. Εμποδίζει εκλεκτικά τη δίοδο νερού, ηλεκτρολυτών, ιόντων, ορμονών και ουσιών που δρουν παρακρινικά, ρυθμίζοντας τόσο το είδος όσο και την ποσότητα των ουσιών που είναι αναγκαίες για την ανάπτυξη των απλοειδών σπερματίδων. Συμμετέχει ακόμη στο διαχωρισμό των αντιγόνων που εκφράζονται προσωρινά κατά τη μετα-μειωτική εξέλιξη των σπερματογονίων από το ανοσολογικό σύστημα του ξενιστή, ώστε να αποτραπεί η παραγωγή των αντισπερματικών αντισωμάτων. Ο αιματο-ορχικός φραγμός προσδίδει πολικότητα στα κύτταρα του όρχι, καθώς άλλες ουσίες εκκρίνονται προς το διάμεσο χώρο, άλλες προς τα PGCs κύτταρα και άλλες προς τον αυλό των σπερματικών σωληναρίων (Huang, et al, 2014).

1.10.2 Ορμονικός έλεγχος

Η ωχρινοτρόπος ορμόνη (Luteinizing Hormone, LH) και η θυλακιοτρόπος ορμόνη (Follicle-stimulating Hormone, FSH) είναι οι κύριοι ρυθμιστές του ελέγχου της σπερματογένεσης. Εκκρίνονται από τον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης σε απόκριση διέγερσης από την ορμόνη γοναδοεκλυτίνη (Gonadotropin Releasing Hormone, GnRH) που παράγεται στον υποθάλαμο. Τα ανδρογόνα είναι επίσης απαραίτητα για τη διατήρηση της σπερματογένεσης (Schlatt, et al, 2014).

Όταν η GnRH φθάνει στην πρόσθια υπόφυση, τα κύτταρα διεγείρονται και εκκρίνουν τις ορμόνες FSH και LH. Η δράση των δύο ορμονών είναι διαφορετική στους όρχεις.

Η FSH δρα στα κύτταρα Sertoli για να διεγείρει την παραγωγή παρακρινικών παραγόντων, οι οποίοι ρυθμίζουν την σπερματογένεση και άλλες λειτουργίες των Sertoli. Αντίθετα, η LH δρα στα κύτταρα Leydig για να διεγείρει την έκκριση τεστοστερόνης. Η τεστοστερόνη μπορεί να εισέλθει στα κύτταρα Sertoli και να διευκολύνει τη σπερματογένεση.

Η έκφραση της LH και της FSH μπορεί να ανασταλεί από αρνητικές ανατροφοδοτήσεις. Η τεστοστερόνη αναστέλλει κυρίως την έκφραση της LH, είτε δρώντας στον υποθάλαμο, μειώνοντας την απελευθέρωση της GnRH και την έκκριση γοναδοτροπινών, είτε δρώντας απευθείας στην υπόφυση, προκαλώντας μειωμένη έκκριση LH σε απόκριση ενός συγκεκριμένου επιπέδου GnRH. Η FSH αναστέλλεται από την ορμόνη ανασταλτίνη (Inhibin) που δρα στην πρόσθια υπόφυση και απελευθερώνεται από τα κύτταρα Sertoli. Παρόλη την πολυπλοκότητα, η συνολική ποσότητα των GnRH, FSH, LH, τεστοστερόνης και παραγόμενου σπέρματος παραμένει σταθερή σε ημερήσια βάση σε ένα αρσενικό άτομο (Clemont, et al, 1972, Vander, et al, 2011).

1.11 Ωρίμανση σπερματοζωαρίου

Το σπερματοζωάριο αποτελείται από συγκεκριμένες δομές, οι οποίες το προετοιμάζουν για τη διέλευσή του μέσω της θηλυκής αναπαραγωγικής οδού και την αλληλεπίδρασή του με τα ωάρια. Το σπέρμα, είναι αναγκαίο να υποβληθεί σε πολλαπλές αλλαγές μετά την έξοδό του από τον όρχι, ώστε το σπερματοζωάριο να αποκτήσει την ικανότητα να γονιμοποιήσει ένα ωάριο. Κερδίζει προοδευτικά την κινητικότητα και τη γονιμοποιητική δυνατότητα, καθώς διέρχεται από την επιδιδυμίδα, επιτυγχάνοντας πλήρη ικανότητα γονιμοποίησης τη στιγμή που φθάνει

στην εγγύς επιδιδυμίδα. (Yanagimachi, et al, 1994, Quill, et al, 2002). Κατά την ωρίμανσή τους, τα σπερματοζώαρια υφίστανται τροποποιήσεις, τόσο στην ακεραιότητα όσο και στις γλυκοπρωτεΐνες της επιφανειακής μεμβράνης (Parks, et al, 1985, Gadella, et al, 2001), ενώ υπόκεινται σε μεταβολές της κατανομής και της έκφρασης των πρωτεϊνών τους. Οι μεμβρανικές αλλαγές δεν παρατηρούνται μονάχα στη μεμβράνη που επικαλύπτει την κεφαλή, αλλά και στην εξωτερική ακροσωματική μεμβράνη, ώστε να αποτραπεί το ενδεχόμενο πρόωρο ενεργοποίηση και η προαγωγή της ακροσωμικής αντίδρασης.

1.12 Ενεργοποίηση

Το σπέρμα που ωρίμασε στην επιδιδυμίδα αν και διαθέτει κινητικότητα, δεν κατέχει την ικανότητα να γονιμοποιήσει αμέσως. Η διαδικασία με την οποία ένα σπερματοζώαριο αποκτά την ικανότητα γονιμοποίησης ονομάζεται ενεργοποίηση. Η επιδιδυμική ωρίμανση και οι εκσπερματικές εκκρίσεις τροποποιούν την πρωτεϊνική και λιπιδιακή σύνθεση της μεμβράνης των σπερματοζωαρίων ώστε να προετοιμαστούν για τη διαδικασία της ενεργοποίησης, η οποία πραγματοποιείται στο γυναικείο γεννητικό σύστημα (Chang, et al, 1951, Austin, et al, 1967, Jaiswal, et al, 2002).

Η αναδιάταξη της πλασματικής μεμβράνης μέσω της επιδιδυμικής ωρίμανσης και η μετέπειτα έκκριση του σπερματικού υγρού παρέχουν ειδικούς παράγοντες, οι οποίοι αποτρέπουν την πρόωρη ενεργοποίηση (Chang, et al, 1957, Cross, et al, 1996). Οι παράγοντες αυτοί, ωθούν το σπέρμα να παραμείνει εντός του γεννητικού συστήματος της γυναίκας, οδηγώντας σε μια καθυστερημένη απόκριση, η οποία όμως εξασφαλίζει τη μέγιστη ικανότητα γονιμοποίησης. Το σπερματικό υγρό συμβάλλει στην αποφυγή

της πρόωρης ενεργοποίησης, σταθεροποιώντας τη μεμβράνη των σπερματοζωαρίων. Ο αδένας του προστάτη εκκρίνει πλούσια σε χοληστερόλη συστατικά, με σκοπό την αποφυγή της μείωσης της χοληστερόλης στο σπέρμα και την καθυστέρηση της ωρίμανσης. Η χοληστερόλη αποτελεί σημαντικό παράγοντα, καθώς το επιδιδυμικό σπέρμα, το οποίο δεν εκτίθεται σε σπερματικό υγρό, ανταποκρίνεται σε επαγόμενες από προγεστερόνη ακροσωμικές αντιδράσεις και ωριμάζει (Varong , et al, 2001). Το σπέρμα που έχει προέλθει από εκσπερμάτιση δεν ανταποκρίνεται στην προγεστερόνη παρά μόνο μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας ενεργοποίησης (Meyers, et al, 1995, Cheng, et al, 1998). Ακόμη, το σπερματικό υγρό περιέχει ενδεχομένως παράγοντες αποσύνθεσης, ενώ καλύπτει τους υποδοχείς της προγεστερόνης των σπερματοζωαρίων για την πρόληψη της πρόωρης επαγωγής της ακροσωμικής αντίδρασης.

Η διαδικασία περιλαμβάνει την απομάκρυνση όλων των παραγόντων πρόωρης ενεργοποίησης, τη δομική αναδιάταξη της πλασματικής μεμβράνης του σπέρματος, την έκθεση των υποδοχέων του στη διάφανη ζώνη (zona pellucida-ZP) και μια αλλαγή στο μοτίβο κίνησης του μαστιγίου, η οποία ονομάζεται υπερενεργοποίηση. Η υπερενεργοποίηση επιτρέπει στο σπερματοζωάριο να κινείται μέσω των κυττάρων θήκης και συμβάλλει στη διείσδυση στη ZP και στη δέσμευση στο ωοκύτταρο, ώστε να ακολουθήσει η αντίδραση του ακροσώματος. Στην πλασματική μεμβράνη του σπέρματος συμβαίνουν πολλαπλές αλλαγές κατά τη διάρκεια της ενεργοποίησης, όπως η αναδιάταξη των φωσφολιπιδίων και η μείωση της χοληστερόλης. Στο σπερματοζωάριο, η πλασματική μεμβράνη διαθέτει ασύμμετρη κατανομή των λιπιδίων μεταξύ των εσωτερικών και των εξωτερικών στρωμάτων της διπλής στιβάδας. Η δεδομένη ασύμμετρία διατηρείται από μια ATP-εξαρτώμενη αμινοφωσφολιπιδική τρανσπορτάση, η οποία αναστέλλεται από τα αυξημένα επίπεδα

ενδοκυτταρικού ασβεστίου κατά τη διάρκεια της ενεργοποίησης στο σπέρμα (Therien, et al, 2003, Müller, et al, 1994). Η διαδικασία ενεργοποίησης οδηγεί σε μετατόπιση των λιπιδίων και απομάκρυνση της χοληστερόλης από την πλασματική μεμβράνη του σπέρματος, γεγονός που διευκολύνει την αύξηση της μεμβρανικής ρευστότητας, την αποσταθεροποίηση της πλασματικής μεμβράνης, τη φωσφορυλίωση της τυροσίνης και το αυξημένο ενδοκυτταρικό pH (Rathi, et al, 2001). Η χοληστερόλη είναι σημαντικός συντελεστής της αποφυγής της πρόωρης ενεργοποίησης και οι συγκεντρώσεις της στην πλασματική μεμβράνη καθοριστικές για το ποσοστό επιτυχίας της διαδικασίας (Breitbart, et al, 1999, Zhang et al, 1999). Οι διαφορές στην αναλογία χοληστερόλης/φωσφολιπιδίου θα μπορούσαν να χρησιμεύσουν ως δυνητική πηγή μέτρησης της ικανότητας ενεργοποίησης και της ταχύτητας της αντίδρασης του ακροσώματος (Patrat, et al, 2000), παράλληλα με το ρυθμό φυσιολογικής αντίδρασης του ακροσώματος, όπου ένας μικρότερος λόγος χοληστερόλης/φωσφολιπιδίων θα επέτρεπε στο ακρόσωμα να αντιδράσει νωρίτερα. Οι αλλαγές που συμβαίνουν κατά τη διάρκεια της ενεργοποίησης διαδραματίζουν πιθανόν καθοριστικό ρόλο στην προετοιμασία του σπέρματος για την επακόλουθη αντίδραση του ακροσώματος (Barro, et al, 1967).

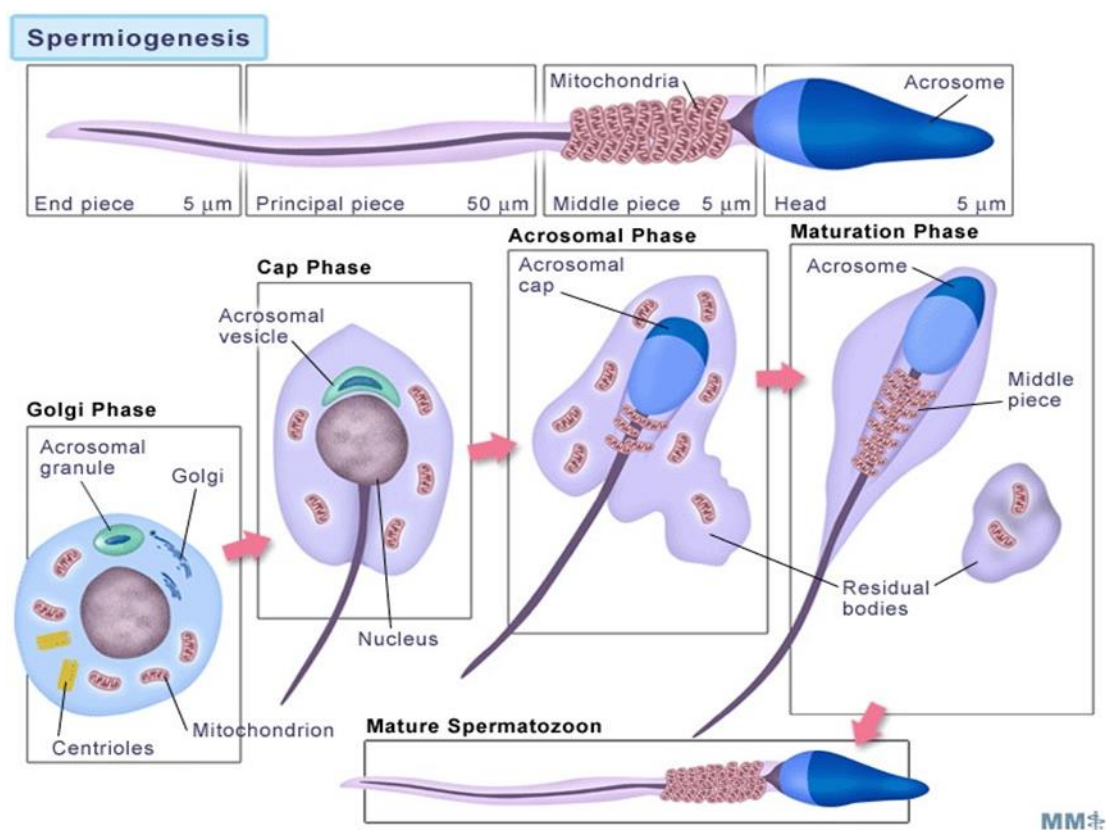
1.13 Ακροσωμική αντίδραση

Το ακρόσωμα των σπερματοζωαρίων αποτελεί έναν εκκριτικό παράγοντα, ο οποίος εντοπίζεται σε κυστίδια του συμπλέγματος Golgi και περικλείεται από την εσωτερική και την εξωτερική ακροσωματική μεμβράνη. Η ακροσωμική εξωκυττάρωση του σπέρματος προκύπτει από μια σειρά καθορισμένων συμβάντων, καταλήγοντας στη σύντηξη των κυστιδίων και της επιφανειακής μεμβράνης του πλάσματος με την εξωτερική μεμβράνη του ακροσώματος. Το ακρόσωμα του σπερματοζωαρίου επικαλύπτει τον πυρήνα στην κορυφή της κεφαλής. Η επιφανειακή μεμβράνη, η

οποία περικλείει την κορυφαία επιφάνεια της κεφαλής του σπερματοζωαρίου καλείται πλασματική μεμβράνη. Ακριβώς από κάτω, εντοπίζεται η εξωτερική ακροσωμική μεμβράνη (OAM). Η σύντηξη των δύο μεμβρανών οδηγεί στην εμφάνιση του ακροσώματος στην εξωτερική πλευρά της κεφαλής και ονομάζεται ακροσωμική αντίδραση. Η ακροσωμική μήτρα, η οποία στηρίζεται στην εξωτερική ακροσωμική μεμβράνη, περιέχει τόσο δομικά όσο και μη δομικά στοιχεία. Η σύντηξη της πλασματικής με την εξωτερική ακροσωμική μεμβράνη επιτρέπει την απελευθέρωση μη προσκολλημένων συστατικών της ακροσωμικής μήτρας, με στόχο να εκτεθεί η εσωτερική ακροσωμική μεμβράνη (IAM), η οποία καλύπτει τον πυρηνικό φάκελο. Η κεφαλή των σπερματοζωαρίων χωρίζεται σε τομείς, οι οποίοι περιέχουν διαφορετικές συγκεντρώσεις και κατανομή των συστατικών της πλασματικής μεμβράνης, την προ-ισημερινή περιοχή που υπερκαλύπτει το ακρόσωμα, την ισημερινή περιοχή και τη μετα-ισημερινή περιοχή. Μετά το πέρας της ακροσωμικής αντίδρασης, η εσωτερική ακροσωμική μεμβράνη αποτελεί συνέχεια της πλασματικής μεμβράνης της ισημερινής περιοχής (Barro, et al, 1967).

Η ακροσωμική αντίδραση του σπερματοζωαρίου χαρακτηρίζεται από την απελευθέρωση πρωτεολυτικών ενζύμων που του επιτρέπουν τη διείσδυση στη ΖΡ και την επακόλουθη έκθεση των πρωτεϊνών δέσμευσης σπερματοζωαρίων - ωοφόρου δίσκου στην εσωτερική ακροσωμική μεμβράνη (Flesch, et al, 2000) . Οι αλληλεπιδράσεις που συμβαίνουν στη διάρκεια της ακροσωμικής αντίδρασης δεν είναι πλήρως κατανοητές, ωστόσο, θεωρείται πως οι υποδοχείς που αποκαλύπτονται μέσω της ενεργοποίησης επιτρέπουν τη σύνδεση σπέρματος - ΖΡ. Η ΖΡ πυροδοτεί με τη σειρά της έναν καταρράκτη σημάτων που διεγείρουν πλήθος ενζυμικών αντιδράσεων και αυξάνουν τη συγκέντρωση του κυτταροπλασματικού ασβεστίου και του pH (Abou-Haila, et al, 2000). Όταν η ΖΡ δεσμεύεται σε επιφανειακούς Gi-

συζευγμένους (Gi) υποδοχείς και κινάσες της τυροσίνης (TK) του σπέρματος, ξεκινά μια αλληλουχία μετάδοσης σηματοδότησης. Οι υποδοχείς της πλασματικής μεμβράνης των σπερματοζωαρίων ρυθμίζουν τους μηχανισμούς ανταλλαγής νατρίου (Na^+) / υδρογόνου (H^+), δημιουργώντας την αλκαλοποίηση του κυτταροπλασματικού με την απομάκρυνση του H^+ και την αποπόλωση της πλασματικής μεμβράνης (Breitbart, et al,1997). Δεσμευμένοι Gi- υποδοχείς ενεργοποιούν την αδενυλική κυκλάση (AC), ώστε να παράγει κυκλικό AMP (cAMP), το οποίο διεγείρει την πρωτεϊνική κινάση A (PKA). Η πρωτεϊνική κινάση A ενεργοποιεί τα εξαρτώμενα από Ca^{2+} κανάλια της OAM, απελευθερώνοντας τις εσωτερικές αποθήκες του ασβεστίου και επιτρέποντας την αύξηση της συγκέντρωσης του κυτταροπλασματικού ασβεστίου (Fraser, et al,1993).



Εικόνα 5: Η διαφοροποίηση μπορεί να χωριστεί σε 4 φάσεις: 1) φάση Golgi 2) φάση καλύπτρας 3) φάση ακρόσωματος και 4) φάση ωρίμανσης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

2.ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ-ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΚΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ

2.1 Βλαστικά κύτταρα SSCs

Τα σπερματογλοιακά βλαστικά κύτταρα (SSCs) αποτελούν κύτταρα, τα οποία διαφοροποιούνται ώστε να ξεκινήσει η διαδικασία που οδηγεί στο σχηματισμό του σπέρματος (Singh, et al, 2010). Είναι αδιαφοροποίητα και καθορίζονται από την ικανότητά τους να αυτοανανεώνονται και να διαφοροποιούνται σε ώριμα σπερματοζωάρια. Παρότι είναι εξαιρετικά σημαντικά για την παραγωγή των σπερματοζωαρίων, τα SSCs ήταν δύσκολο να μελετηθούν, τόσο λόγω του μικρού αριθμού τους στους όρχεις, όσο και λόγω ζητημάτων που σχετίζονται με την ταυτοποίηση, την καλλιέργεια και την ανίχνευση της βιολογικής τους δραστηριότητας (McLean, et al,2005). Είναι ικανά να διαφοροποιηθούν σε ποικίλους τύπους σωματικών κυττάρων υπό ειδικές συνθήκες και να σχηματίσουν ακόμη και τερατώματα κατόπιν εμβολιασμού τους σε ποντίκια (Mimeault, et al,2006).

Τα SSCs ή βλαστικά κύτταρα των όρχεων, προέρχονται από αρχέγονα βλαστικά κύτταρα, τα οποία οδεύουν προς στις γονάδες κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης. Μετά τη μετανάστευσή τους στις αδιαφοροποίητες γονάδες, τα αρχέγονα βλαστικά κύτταρα διαφοροποιούνται σε πρόδρομα θηλυκά ή αρσενικά βλαστικά κύτταρα ανάλογα με τη φυλετική διαφοροποίηση των γονάδων (Capei, et al,2000).

Ακόμη και μετά την προεφηβική έναρξη της διαφοροποίησης των βλαστικών κυττάρων, η σπερματογένεση συντηρείται λόγω της ικανότητάς τους να παρέχουν συνεχώς διαφοροποιημένα σπερματογόνια. Τα SSCs είναι ικανά να αυτοανανεώνονται, να δημιουργούν πρόσθετα βλαστικά κύτταρα και κύτταρα που

προορίζονται για διαφοροποίηση. Για να διατηρηθεί η συγκεκριμένη δυνατότητά τους, είναι απαραίτητο να βρίσκονται σε ένα δεδομένο περιβάλλον ή σε μια θέση που να παρέχει τους κατάλληλους παράγοντες για την επιβίωση τους. Ποικίλα κύτταρα της βλαστικής σειράς είναι ικανά να εισέλθουν στη φάση της μείωσης σε *in vitro* συνθήκες, αν και η διαφοροποίηση των αρσενικών γεννητικών κυττάρων πραγματοποιείται αποκλειστικά στο άθικτο μικροπεριβάλλον των όρχεων, το οποίο προσφέρει μοναδικές θέσεις στα βλαστικά κύτταρα. Φυσικά, η θέση των SSCs είναι πιθανότερο να βρίσκεται κατά μήκος της βασικής μεμβράνης των σπερματικών σωληναρίων, όπου τα κύτταρα Sertoli συμβάλλουν στο μικροπεριβάλλον (McLean, et al, 2005). Τα κύτταρα Sertoli αποτελούν εξειδικευμένα κύτταρα, τα οποία παρέχουν τη θρεπτική και αρχιτεκτονική υποστήριξη που απαιτείται για την ανάπτυξη των βλαστικών κυττάρων στους ενήλικες (Itman, et al, 2006) και είναι υπεύθυνα για τη διατήρηση των SSCs. Τα κύτταρα Sertoli προάγουν το σχηματισμό θέσεων SSCs μέσω της έκκρισης ειδικών αυξητικών παραγόντων και της παραγωγής εκκρινόμενων παραγόντων από τα κύτταρα Leydig και άλλους πληθυσμούς ενδιάμεσων κυττάρων (Oatley, et al, 2011). Έως πρόσφατα, θεωρούνταν πως ένας παράγοντας των κυττάρων Sertoli, ο νευροτροπικός παράγοντας που προέρχεται από τη γλοιακή κυτταρική σειρά (GDNF) και είναι μέλος της πρωτεϊνικής υπερικογένειας TGF- β , είναι πιθανόν υπεύθυνος γι 'αυτό. Ωστόσο πλέον, υπάρχουν στοιχεία που υποδηλώνουν πως η ρύθμιση των SSCs μεταβάλλεται καθώς ο όρχις αναπτύσσεται από την προγεννητική ηλικία μέχρι την εφηβεία. Η προγεννητική περίοδος ρυθμίζεται από το GDNF και η εφηβική περίοδος από το Ets μόριο (ERM). Το ERM εντοπίζεται στα κύτταρα Sertoli, τα μόνα σωματικά κύτταρα του σπερματικού επιθηλίου, ενώ διαπιστώθηκε πως σε ενήλικους όρχεις τα κύτταρα Sertoli διατηρούν τη θέση των

SSCs. Το συγκεκριμένο μόριο είναι απαραίτητο για την ανανέωση των βλαστικών κυττάρων, τόσο στην εφηβεία όσο και στην ενήλικη ζωή (Hess, et al,2006).

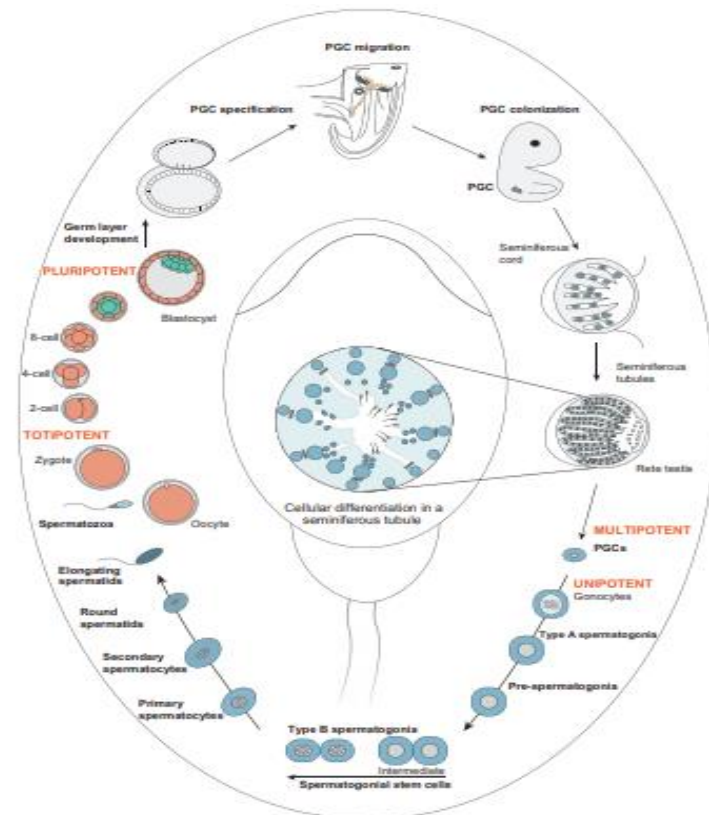
Ο αριθμός των SSCs αυξάνεται από τη γέννηση ως τη σεξουαλική ωριμότητα, όπου και εμφανίζεται ο σπερματικός σωλήνας με σκοπό να παρέχει ένα περιβάλλον, το οποίο να υποστηρίζει το σχηματισμό νέων θέσεων. Τα SSCs μπορούν ενδεχομένως να αναπτύξουν νέες θέσεις κατά την έναρξη της σπερματογένεσης (Park, et al,2009), ενώ δύνανται να εμφανίζουν διαφορετικούς φαινότυπους σε διαφορετικά βιολογικά μικροπεριβάλλοντα (Shinohara, et al,2011). Στους όρχεις, τα SSCs που βρίσκονται σε μια θέση, είναι ικανά να προκαλέσουν αναγέννηση της σπερματογένεσης ακόμη και μετά από κάποια τοξική προσβολή (Lo, et al,2005). Αντιθέτως, ενδεχόμενη βλάβη στο εξειδικευμένο μικροπεριβάλλον του κυττάρου Sertoli μπορεί να περιορίσει ή ακόμη και να αποτρέψει τη δράση των SSCs (Itman, et al, 2006). Ακόμη, θεωρείται πιθανό τα εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα να είναι ικανά να δημιουργούν in vitro SSCs που να μπορούν να παράγουν λειτουργικούς γαμέτες, ικανούς να γονιμοποιήσουν τα ωάρια (Nayernia, et al, 2006).

Πλέον, ανακύπτουν δύο κρίσιμα ζητήματα αναφορικά με την πληρέστερη αποσαφήνιση του ρόλου των σπερματογλοιακών βλαστικών κυττάρων: η αναγνώριση του σήματος που διεγείρει τα SSCs ώστε να ξεκινήσει η διαδικασία της διαφοροποίησης και ο προσδιορισμός του σήματος που διεγείρει τα SSCs για την αυτοανανέωση του πληθυσμού τους (Caires, et al,2010).

2.2 Προέλευση Σπερματικών Βλαστικών Κυττάρων

Τα SSCs προκύπτουν στους όρχεις από βλαστικά κύτταρα, τα οποία προέρχονται από αρχέγονα γεννητικά κύτταρα (PGCs) κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης. Τα PGCs συνιστούν έναν παροδικό πληθυσμό, ο οποίος παρατηρήθηκε πρωτίστως ως ένα μικρό σύμπλεγμα κυττάρων, θετικών στην αλκαλική φωσφατάση στο εμβρυϊκό στάδιο της επιβλάστης, 7 ημέρες περίπου μετά τη σύλληψη (dpc). Ο προσδιορισμός των PGCs εξαρτάται από την έκφραση των παραγόντων BMP4 και BMP8b από το εξώδερμα (Griswold, et al, 1998). Κατά το σχηματισμό της αλλαντοΐδας, τα PGCS μεταφέρονται έξω από το έμβρυο, πριν ξεκινήσουν να μεταναστεύουν ώστε να φθάσουν στις αδιαφοροποίητες γονάδες μεταξύ 8,5 dpc. Τα PGCS αναπαράγονται κατά τη διάρκεια της μεταναστευτικής φάσης και περίπου 3000 PGCS αποικίζουν στις γεννητικές θέσεις (Bendel-Stenzel, et al, 1998). Στις αρσενικές γονάδες σε περίπου 13,5 dpc, τα PGCS θα οδηγήσουν σε γονοκύτταρα, τα οποία περικλείονται στα ορχικά σωληνάκια που σχηματίζονται από πρόδρομα κύτταρα Sertoli και περισωληνοειδή κύτταρα. Ο γενικός όρος γονοκύτταρα μπορεί να υποκατηγοριοποιηθεί σε μιτωτικά (M) προσπερματογόνια, T1 προσπερματογόνια και T2 προσπερματογόνια (McCarrey, et al, 1993). Τα M-προσπερματογόνια βρίσκονται στο κέντρο των ορχικών σωληναρίων, μακριά από τη βασική μεμβράνη και συνεχίζουν να πολλαπλασιάζονται, ώσπου γίνονται T1-προσπερματογόνια και εισέρχονται στη G0 μιτωτική φάση (McLaren, et al, 2003). Τα γονοκύτταρα ξεκινούν τον πολλαπλασιασμό στη διάρκεια της πρώτης εβδομάδας μετά τη γέννηση (μετάβαση σε T2-προσπερματογόνια), ταυτόχρονα με τη μετανάστευση στη βασική μεμβράνη των ορχικών σωληναρίων (Clermont, et al, 1957). Τα T2-προσπερματογόνια που αποικίζουν στη βασική μεμβράνη δίνουν τον πρώτο κύκλο της σπερματογένεσης, ενώ εγκαθιστούν τη δεξαμενή των SSCs διατηρώντας τη

σπερματογένεση σε ολόκληρη την ενήλικη ζωή (Kluin, et al, 1981, Yoshida, et al, 2006).



Εικόνα 6 : Το αναπτυξιακό μονοπάτι που απεικονίζει την ανάπτυξη και ωρίμανση των βλαστικών κυττάρων των αρσενικών βλαστικών κυττάρων από τα αρχέγονα βλαστικά κύτταρα στο σπερματοζώαριο. Swati Sharma, et al *Human Reproduction Update*, Vol.25, No.3 pp. 275–297, 2019.

2.3 Θεραπεία Ανδρικής Υπογονιμότητας

Η ικανότητα των κυττάρων των όρχεων να προωθούν την εξέλιξη και την πλήρη διαφοροποίησή τους, θεωρείται αξιοσημείωτη (Rodriguez-Sosa, et al, 2009). Τα SSCs

διαθέτουν μια μοναδική ιδιότητα μεταξύ των βλαστικών κυττάρων των ενηλίκων, καθώς αποτελούν το μόνο αυτοανανεώσιμο πληθυσμό κυττάρων που συμβάλλουν γενετικά στην επόμενη γενιά (Lo, et al,2005).

Η γονιμότητα επηρεάζεται λόγω της έκθεσης των όρχεων σε δόσεις ακτινοβολίας και χημειοθεραπευτικούς παράγοντες, κάτι που συμβαίνει εξαιτίας της ανικανότητας διαφοροποίησης των σπερματογόνων. Μετά από κυτταροτοξικές θεραπείες, τα σπερματογόνα κύτταρα φαίνεται πως απουσιάζουν, καθώς τα σωληνάρια περιέχουν μονάχα τα κύτταρα Sertoli. Κάτι τέτοιο θα μπορούσε να οφείλεται, είτε στη θανάτωση των SSCs, είτε στην απώλεια της ικανότητας των κυττάρων Sertoli να υποστηρίξουν τη διαφοροποίηση των SSCs ή και στα δύο (Shetty, et al,2005).

Στους ασθενείς των οποίων η αντικαρκινική θεραπεία προβλέπει κλινικά πλήρη εξάντληση των SSCs, η μεταμόσχευση βλαστικών κυττάρων μπορεί να αποτελέσει επιλογή στη διατήρηση της γονιμότητας. Η τεχνική μεταμόσχευσης SSCs περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Brinster (Brinster, et al, 1994). Η αποκατάσταση της γονιμότητας μετά από μεταμόσχευση SSCs σε πειραματόζωα υποδηλώνει το θεραπευτικό δυναμικό της τεχνικής και στους ανθρώπους. Απαιτούνται φυσικά περαιτέρω έρευνες, ειδικά σε μοντέλα πρωτεύοντων. Ωστόσο, η κρυοσυντήρηση κυττάρων όρχεων και ιστών αποτελεί πλέον σημαντική πτυχή της ογκολογικής θεραπείας (Matzuk, et al,2008). Ελκυστική πρόταση στη διατήρηση της γονιμότητας συνιστά επίσης η αποθήκευση και η μεταφορά των SSCs. Τα βλαστικά κύτταρα μπορούν να καταψυχθούν ή να αποθηκευθούν πριν τη μεταφορά και να παραχθούν ακόμη γόνιμα σπερματοειδή σωληνάρια. Όταν τα SSCs συλλέχθηκαν από δότες και μεταμοσχεύθηκαν σε στείρο δέκτη, αποκαταστάθηκε μορφολογικά και λειτουργικά η φυσιολογική σπερματογένεση (Clouthier, et al, 1996). Ακόμη, βλαστικά κύτταρα παράγαγαν ώριμα σπερματοζωάρια σε όρχεις ποντικών με

ανοσοανεπάρκεια (Goossens, et al,2006). Οι συγκεκριμένοι ποντικοί ήταν σε θέση να γονιμοποιήσουν μεν τα ωοκύτταρα *in vitro*, με μειωμένους ωστόσο ρυθμούς γονιμοποίησης και ανάπτυξης. Τα νεογνά δεν παρουσίασαν ανωμαλίες, παρατηρήθηκαν όμως χαμηλότερα ποσοστά κήσεων και μικρότερο μέγεθος νεογνών σε θηλυκά ποντίκια, τα οποία γονιμοποιήθηκαν από αρσενικά, που είχαν υποβληθεί σε μεταμόσχευση (Goossens, et al, 2003). Η διαφορά ίσως οφείλεται στη χαμηλότερη κινητικότητα του επιδιδυμικού σπέρματος των μεταμοσχευμένων ζώων (Phillips, et al,2010). Επίσης, ο όρχις εμφανίζεται ανθεκτικός στα ξένα κύτταρα, κυρίως λόγω του αιματο-ορχικού φραγμού. Ο συγκεκριμένος φραγμός διατηρεί μια εκλεκτική ροή μεταξύ του υγρού του αυλού, του διάμεσου υγρού και του πλάσματος, δημιουργώντας ένα περιβάλλον ανοσολογικής προφύλαξης για τα γεννητικά κύτταρα (Nugent, et al,1997). Βέβαια, ο αριθμός και η ποιότητα των δειγμάτων του σπέρματος είναι συχνά μη ικανοποιητικός, επιδεινώνεται δε περαιτέρω με την κρυοσυντήρηση, ενώ δεν αποτελεί επιλογή για τα αγόρια πριν την εφηβεία (Shin, et al,2005).

Επί του παρόντος, οι καρκινοπαθείς άνδρες, πριν από τη λήψη δόσεων χημειοθεραπείας ή και ακτινοθεραπείας, μπορούν να προβούν σε κρυοσυντήρηση του σπέρματος, ακολουθούμενη από απόψυξη και γονιμοποίηση. Η χορήγηση τουλάχιστον τριών δειγμάτων σπέρματος με αποχή περίπου 48 ωρών μεταξύ των σπερμοληψιών, θεωρείται η ενδεδειγμένη και συνιστώμενη επιλογή (Geens, et al,2006). Οι έφηβοι και οι ενήλικες άνδρες έχουν επομένως τη δυνατότητα να κρυοσυντηρήσουν το σπέρμα τους πριν από τη θεραπεία του καρκίνου και με *in vitro* γονιμοποίηση (IVF) ή ενδοκυτταροπλασματική έγχυση σπέρματος (ICSI), να αποκτήσουν απογόνους. Αντιθέτως, τα αγόρια πριν την εφηβεία δεν είναι δυνατό να επωφεληθούν από τη συγκεκριμένη προσέγγιση, καθώς δεν έχουν ολοκληρώσει τη διαδικασία της σπερματογένεσης. Το σπερματικό τους επιθήλιο περιέχει μονάχα

κύτταρα Sertoli και διαφορετικούς τύπους σπερματογόνων, μεταξύ των οποίων και τα SSCs (Becker, et al,2007). Στην περίπτωση λοιπόν των νεαρών ασθενών που υποβάλλονται σε ακτινοθεραπεία κατά τη διάρκεια της ογκολογικής θεραπείας, μπορεί να πραγματοποιηθεί επιτυχής μεταμόσχευση SSCs και προγονικών κυττάρων Leydig (De Rooij, et al, 2006). Απαραίτητα βήματα στη διατήρηση της γονιμότητας των ηλικιακά νέων καρκινοπαθών ασθενών αποτελούν: η λήψη βιοψίας πριν τη χημειοθεραπεία, ο πολλαπλασιασμός των SSCs μέσω καλλιέργειας, η κρυοσυντήρηση των κυττάρων και η μεταμόσχευσή τους στους ασθενείς μετά τη θεραπεία (Geens, et al,2008, Jeruss, et al, 2009, Leader, et al, 2011, Ginsberg, et al,2010). Η βιοψία των όρχεων και η κρυοσυντήρηση των ιστών θεωρούνται μεν ελπιδοφόρες για τους συγκεκριμένους ασθενείς, αν και χρειάζονται επιπλέον επιστημονικές μελέτες ώστε να μεταφραστούν οι επιτυχίες της έρευνας σε πειραματόζωα σε κλινικές επιλογές στους ανθρώπους. Πρόσφατες δημοσιεύσεις υποδεικνύουν τις προσπάθειες των επιστημόνων να επιτύχουν *in vitro* τον πολλαπλασιασμό των ανθρώπινων SSCs (Hwang, et al,2010, Wyns, et al, 2010). Η διατήρηση επομένως του ιστού των όρχεων σε προέφηβους ασθενείς, θα τους επιτρέψει να εξετάσουν τις διάφορες επιλογές αποκατάστασης γονιμότητας που θα προκύψουν τις επόμενες δεκαετίες, δίνοντάς τους την ελπίδα να αποκτήσουν απογόνους με τη δική τους γενετική κληρονομιά (Schlatt, et al, 2009). Γενικώς, ο ανώριμος ιστός των όρχεων διαθέτει εκπληκτικά υψηλές δυνατότητες επιβίωσης και διαφοροποίησης ως αυτόλογο- ή ετερόλογο μόσχευμα (Lim, et al, 2010).

Τα SSCs που εντοπίζονται σε όρχεις ασθενών με μη αποφρακτική αζωοσπερμία, μπορούν να απομονωθούν και να αναπαραχθούν *in vitro*, μέσω ενός αποτελεσματικού συστήματος καλλιέργειας, παράγοντας διαφοροποιημένα γεννητικά κύτταρα με αναπτυξιακό δυναμικό (Jahnukainen, et al, 2001). Θα πρέπει ωστόσο να

ληφθεί υπόψη, πως η βιοψία των όρχεων που λαμβάνεται από καρκινοπαθή, μπορεί να περιέχει ενδεχομένως και κακόηθη κύτταρα. Τα συγκεκριμένα κύτταρα θα πρέπει να αφαιρεθούν από το κυτταρικό εναίωρημα, καθώς ένα και μόνο κακόηθες κύτταρο είναι ικανό να επαναφέρει την ασθένεια (Yeh, et al, 2009). Έτσι, η εφαρμογή αρνητικών βιοδεικτών για τα SSCs είναι απαραίτητη ώστε να διασφαλίσει τον αποκλεισμό των καρκινικών κυττάρων από τη βιοψία όρχεων, εξασφαλίζοντας έτσι την προστασία έναντι μίας ενδεχόμενης υποτροπής του όγκου (Ma, et al,2011). Υφίσταται ακόμη η ανάγκη προετοιμασίας του δέκτη, η οποία περιλαμβάνει την καταστροφή των ενδογενών γεννητικών κυττάρων και την παύση της σπερματογένεσης, ώστε τα μεταμοσχευμένα SSCs να μεταφερθούν από τον αυλό στο βασικό διαμέρισμα του σπερματικού σωλήνα και να ξεκινήσει η -προερχόμενη από τους δότες- σπερματογένεση. Με βάση πειράματα σε ποντίκια, οι κίνδυνοι που συνδέονται με τη βουσουλφάνη ή άλλες κυτταροτοξικές θεραπείες μπορούν να αποφευχθούν μέσω της θεραπείας με θερμικό σοκ (υπερθερμία), κατά τη διάρκεια της οποίας οι σπερμογονικές κόγχες διατηρούνται, ούσες σε θέση να υποστηρίξουν τη σπερματογένεση που προέρχεται από τους δότες (Ehmcke, et al,2006).

Ακόμη και αν η χημειοθεραπεία και η ακτινοθεραπεία έχουν ήδη ξεκινήσει, η συλλογή και η κρυοσυντήρηση του σπέρματος εξακολουθούν να είναι εφικτές κατά τη διάρκεια της θεραπείας, τουλάχιστον έως ότου προκύψει η αζωοσπερμία. Σε αυτές τις περιπτώσεις, οι επιπτώσεις των γοναδοτοξικών παραγόντων στο σπέρμα είναι άγνωστες. Ωστόσο, η εξαγωγή σπέρματος από τους όρχεις είναι δυνατή σε ασθενείς με μη αποφρακτική αζωοσπερμία ή καρκίνο, παρέχοντας σε συνδυασμό με τη μικρογονιμοποίηση, μια πιθανή νέα θεραπεία (Geens, et al, 2006). Οι διαφορές στη ρύθμιση της σπερματογένεσης δεν επιτρέπουν τη διαφοροποίηση των γεννητικών κυττάρων, πιθανότατα λόγω διαταραγμένης επικοινωνίας μεταξύ των μη γεννητικών

βλαστικών κυττάρων και των σπερματοζωαρίων του ποντικού (Ehmcke, et al,2006). Πλέον, οι συνθήκες καλλιέργειας μπορούν να υποστηρίξουν την πλήρη σπερματογένεση των ποντικών (Sato, et al,2011). Δεν είναι γνωστό εάν οι απόγονοι, ειδικά εκείνοι που παράγονται από κρυοσυντηρημένο ιστό, είναι υγιείς εν γένει, πάντως η γονιμότητά τους, αποτελεί απλώς ένα δείκτη για το αν οι γαμέτες είναι φυσιολογικοί ή όχι (Seandel, et al,2011).

2.4 CD24

Τα συμπλέγματα διαφοροποίησης (cluster of differentiation CD) είναι μόρια της επιφάνειας των κυττάρων, τα οποία χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό του ανοσοφαινότυπου των αντίστοιχων κυττάρων. Το CD24 είναι ένας μετατροπέας σήματος, γνωστός ως HSA (heat stable antigen). Πρόκειται για μία πρωτεΐνη που λειτουργεί ως μόριο προσκόλλησης. Η συγκεκριμένη γλυκοπρωτεΐνη εκφράζεται στην επιφάνεια των περισσότερων B λεμφοκυττάρων και των διαφοροποιούμενων νευροβλαστών, σε διάφορους κυτταρικούς τύπους όπως T-κύτταρα (Crispe, et al,1987), νευρώνες (Rougon, et al,1991), μυϊκά κύτταρα (Figarella-Branger, et al,1993), κύτταρα καρκινώματος, αλλά και στο σπέρμα. Το γονίδιο στον άνθρωπο ονομάζεται επίσης CD24 και εδράζεται στο χρωμόσωμα 6, στην περιοχή 6p21. Σημαντικό μέρος της αλληλουχίας του γονιδίου του CD24 εντοπίζεται αναλλοίωτο σε άλλες γονιδιακές περιοχές και άλλα χρωμοσώματα, όπως στο 1p36, στο 3p26, στο 15q21.3, στο 20q11.2 και στο Yq11.222, χωρίς ωστόσο να είναι γνωστή η συνεισφορά δεδομένων γονιδιακών θέσεων στο τελικό προϊόν, καθώς και η επακόλουθη μεταγραφή ή μετάφραση. Το τελικώς παραγόμενο CD24 εκφράζει μια σιαλογλυκοπρωτεΐνη στα ώριμα κοκκιοκύτταρα και σε B κύτταρα. Η κωδικοποιούμενη πρωτεΐνη συνδέεται με μια γλυκοσυλο-φωσφατιδυλ-ινοσιτόλη (glycosyl phosphatidylinositol ή GPI) στην επιφάνεια του κυττάρου (Hough, et

al,1994). Το CD24 συντίθεται ως προ-πεπτίδιο 80 αμινοξέων σε ανθρώπινα κύτταρα (Jackson, et al, 1992) και στη συνέχεια υποβάλλεται σε επεξεργασία. Η απομάκρυνση ενός σηματοδοτικού πεπτιδίου και μιας καρβοξυλικής τερματικής ουράς οδηγεί στο σχηματισμό ενός μικρότερου πεπτιδίου περίπου 30 αμινοξέων, το οποίο στη συνέχεια είναι N- και O-γλυκοζυλιωμένο (Kay, et al, 1991). Οι μεταβολές των υδατανθράκων του CD24 αντιπροσωπεύουν διαφορετικές μοριακές μάζες. Επιπλέον, οι διαφορές στη γλυκοζυλίωση ίσως αντανακλούν τη λειτουργία του κυττάρου ή του ιστού (Wenger et al,1995, Kadmon et al,1995).

Το γονίδιο του CD24 περιγράφηκε για πρώτη φορά τη δεκαετία του 1980 και για αρκετά χρόνια οι πληροφορίες ήταν συγκεχυμένες και αφορούσαν κυρίως στη λειτουργία του ως μόριο προσκόλλησης των κυττάρων, κυρίως των αιμοποιητικών. Μεταγενέστερες μελέτες απέδειξαν ότι το CD24 μεσολαβεί σε πληθώρα διακυτταρικών αλληλεπιδράσεων και συμβάλλει στον πολλαπλασιασμό και στην επιλεκτική συνδεσιμότητα του εκάστοτε κυττάρου. Το CD24 εκφράζεται σε σημαντικό βαθμό σε πλήθος καρκίνων και εμπλέκεται, τόσο στην επιτάχυνση της ανάπτυξης των όγκων, όσο και στην εμφάνιση μεταστατικών εστιών, μέσω της σύνδεσής του με την P-σελεκτίνη των αιμοπεταλίων και τη διαμεμβρανική πρωτεΐνη L1 (γνωστή και ως CD171 ή L1CAM), επάγοντας ενδοκυττάρια σηματοδοτικές οδούς. Το CD24 εμπλέκεται σίγουρα στην κυτταρική προσκόλληση και σηματοδότηση. Δρα ως προσδέτης μορίων που μοιάζουν με τη λεκτίνη (Shirasawa,et al, 1993, Sammar,et al, 1994), συμμετέχει σε αλληλεπιδράσεις κυττάρου-κυττάρου και νευρικών κυττάρων, είτε μέσω ομοτυπικών αλληλεπιδράσεων είτε μέσω ετεροτυπικών αλληλεπιδράσεων με το μόριο προσκόλλησης των νευρικών κυττάρων L1, (Hubbe, et al, 1994) και εμπλέκεται στη μεταγωγή σήματος, χωρίς ωστόσο να είναι γνωστά τα αντίστοιχα μονοπάτια. Επίσης, οι συγκεντρώσεις ενδοκυτταρικού

ασβεστίου ενισχύονται σημαντικά όταν τα λεμφοκύτταρα υφίστανται επεξεργασία με αντίσωμα αντι-CD24 (Fischer, et al, 1990), γεγονός που παρατηρείται σε νευρώνες παρεγκεφαλίδας και N2a νευροβλαστώματος.

Η χρησιμοποίηση αντι-CD24 μονοκλωνικών αντισωμάτων στην αντιμετώπιση του καρκίνου, του γαστρεντερικού συστήματος κυρίως, έχει ήδη τεθεί επί τάπητος, όπως και ο εντοπισμός της υπερέκφρασης του CD24, ως δείκτη των πρώιμων καρκινικών κυττάρων (Sagin, et al, 2008). Πρόσφατες δημοσιεύσεις υποστηρίζουν τη σχέση του CD24 με την ανάπτυξη του καρκίνου γενικά, και ειδικότερα με τον καρκίνο του μαστού και του οισοφάγου, πέραν των όγκων του γαστρεντερικού συστήματος. Υπήρξαν επίσης και συσχετίσεις των γενετικών πολυμορφισμών του γονιδίου του CD24 με το συστηματικό ερυθματώδη λύκο και τη σκλήρυνση κατά πλάκας.

Ως προς την παρουσία του CD24 στο σπέρμα, η πρώτη μελέτη κατέγραψε το CD24 ως ένα σταθερό φαινοτυπικό δείκτη μεταξύ σπερμογονικών και άλλων βλαστοκυττάρων (Kubota, et al, 2003). Μέσω πειραματικών μοντέλων έγινε αντιληπτό πως η έκφραση του CD24 είναι καίριας σημασίας στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης στον άνδρα και ρυθμίζεται ενδεχομένως από τα επίπεδα των ανδρογόνων (Overdeest, et al, 2012). Τα σπερμογονικά βλαστοκύτταρα είναι γεννητικά κύτταρα του άνδρα που αναπτύσσονται στη γέννηση. Τα συγκεκριμένα κύτταρα διατηρούν τη σπερματογένεση καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής του άνδρα με τη διαδικασία αυτο-ανανέωσης μέσω του υαλουρονικού οξέος και με την παραγωγή θυγατρικών κυττάρων που θα διαφοροποιηθούν έπειτα σε σπερματοζώαρια. Ποικιλία μελετών καταδεικνύουν πως τα σπερμογονικά βλαστοκύτταρα μπορούν να αποκτήσουν πλειοδυναμία υπό δεδομένες καλλιεργητικές συνθήκες και να καταστούν πολυδύναμα βλαστοκύτταρα της βλαστικής σειράς, εκφράζοντας δείκτες πλειοδυναμίας στα καλλιεργητικά υλικά και σχηματίζοντας τερατώματα, μέσω της

μεταμόσχευσής τους σε ανοσοκατεσταλμένα πειραματόζωα. Πρόσφατη έρευνα επεσήμανε τη δυνατότητα παραγωγής in vitro πρόδρομων νευρικών κυττάρων από πλειοδύναμα βλαστοκύτταρα με τη βοήθεια του CD24, αλλά και παραγόντων που ενισχύουν τη συγκεκριμένη δράση, όπως το ρετινοϊκό οξύ, η νογκίνη και ο αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών 8 ή FGF8 (Kim, et al, 2015).

Από τη στιγμή που το CD24 παίζει σημαντικό ρόλο σε διάφορες διακυτταρικές αλληλεπιδράσεις και εφόσον υπάρχουν ενδείξεις ότι η έκφρασή του επηρεάζεται από τα ανδρογόνα, χωρίς ωστόσο η σχέση του με τα σπερματογόνια να είναι σαφής, θα ήταν εύλογη η μελέτη του κυτταρικού αυτού δείκτη στη διερεύνηση της ανδρικής υπογονιμότητας σε περιπτώσεις όπου το αίτιο της δεν είναι προφανές.

2.5 CD34

Το CD34 είναι μια διαμεμβρανική φωσφογλυκοπρωτεΐνη, μοριακού βάρους περίπου 115 kDa, η οποία αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά σε αιμοποιητικά βλαστικά και προγονικά κύτταρα (Civin, et al, 1984). Διαθέτει μία εξωκυτταρική περιοχή, Ο-γλυκοζυλιωμένη, ενώ περιέχει και θέσεις N- γλυκοζυλίωσης. Διαθέτει επίσης, μία απλή διαμεμβρανική έλικα και μια κυτταροπλασματική ουρά με μοτίβα σύνδεσης PDZ (PSD-95-Dlg-ZO-1) (Nielsen, et al, 2008, Krause, et al, 1994). Ο συνηθέστερα περιγραφόμενος προσδέτης του CD34 είναι η L-Selectin (CD62L), ενώ δεσμεύεται και από την πρωτεΐνη CrkL (Baumheter, et al, 1993, Felschow, et al, 2001).

Το CD34 αποτελεί δείκτη της κυτταρικής επιφάνειας και εκφράζεται από ένα ευρύ φάσμα κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των αιματοποιητικών, στρωματικών, επιθηλιακών και ενδοθηλιακών κυττάρων. Αν και η λειτουργία του ως επιφανειακού αντιγόνου είναι άγνωστη, συνδέεται με την αναστολή ή τη διευκόλυνση της προσκόλλησης, τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και τη ρύθμιση της

διαφοροποίησης (Healy, et al, 1995). Τη διακριτή σχέση ανάμεσα στους κυτταρικούς τύπους CD34+ αποτελεί ουσιαστικά η δραστηριότητα τους στα προγονικά κύτταρα και στα βλαστοκύτταρα. Ο πληθυσμός των κυττάρων CD34+ παρουσιάζει ισχυρή, έντονη ικανότητα διαφοροποίησης. Η έως τώρα μελέτη του, παραπέμπει σε μια συσχέτιση μεταξύ της πλαστικότητας των κυττάρων και της έκφρασης του CD34, παράλληλα με άλλα αντιγόνα κυτταρικής επιφάνειας. Αρκετά από αυτά τα κύτταρα, επιδεικνύουν κατάσταση ηρεμίας *in vivo*, έως ότου ενεργοποιηθούν για να διαφοροποιηθούν.

Γενικά, οι κυτταρικοί τύποι που εκφράζουν το CD34 δεν παρουσιάζουν ταυτόσημες ιδιότητες. Αρκετοί συν-εκφράζουν ιστοειδικούς δείκτες παράλληλα με το CD34, υποδηλώνοντας ότι η παρουσία του CD34 υποδεικνύει ένα καθορισμένο προγονικό χαρακτήρα για το συγκεκριμένο ιστό. Η απόδειξη επ' αυτού είναι εμφανής στα μυϊκά κύτταρα, στα κύτταρα του κερατοειδούς και στα επιθηλιακά προγονικά κύτταρα. Ωστόσο, κάτι τέτοιο δεν περιορίζει αναγκαστικά τη δυνατότητα διαφοροποίησης των κυττάρων *in vitro*, με αρκετά εκ των κυττάρων CD34+ να διαθέτουν την ικανότητα διαφορετικής διαφοροποίησης (Nielsen, et al, 2009).

Αν και το CD34 αποτελεί χρήσιμο δείκτη στην ταυτοποίηση προγονικών πληθυσμών, δεν είναι από μόνο του κατάλληλο για το χαρακτηρισμό ενός κυτταρικού τύπου. Η έκφραση του CD34 από όλους τους τύπους κυττάρων, δεν είναι αποκλειστική. Προς το παρόν, δεν έχει ταυτοποιηθεί κάποιος άλλος δείκτης, ο οποίος να εμφανίζεται σε όλα τα κύτταρα, ωστόσο δείκτες όπως οι CD90, CD117, CD146 και CD133 έχουν επισημανθεί σε περισσότερους από έναν κυτταρικούς τύπους. Για να χαρακτηριστεί πλήρως ένας πληθυσμός βλαστικών κυττάρων πιθανόν απαιτείται ένα ειδικό προφίλ δείκτη, παράλληλα με κλωνικούς προσδιορισμούς και δοκιμασίες διαφοροποίησης (Lanza, et al, 2001).

Η καλλιέργεια και ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων CD34+ *in vitro* αποτελούν πρόκληση, λόγω της συσχέτισης του CD34 με την ηρεμία και της απώλειας της έκφρασής του κατά τη διαφοροποίηση. Η καλλιέργεια σε υλικό ιστού και σε μέσο που περιέχει ορό, δημιουργεί ένα περιβάλλον ανόμοιο ίσως με το *in vivo* περιβάλλον, αναγκάζοντας τα κύτταρα να πολλαπλασιασθούν και να διαφοροποιηθούν, χάνοντας το CD34. Εάν τα κύτταρα CD34+ πρόκειται να διερευνηθούν *in vitro*, απαιτούνται εξειδικευμένες συνθήκες καλλιέργειας και βελτιστοποίηση αυτών, ώστε να δημιουργηθεί ένα περιβάλλον που να προσομοιάζει την *in vivo* κατάσταση (Scherberich, et al, 2013).

Γενικά, το CD34 ως επιφανειακό αντιγόνο θεωρείται κατάλληλο για την επιλογή υποπληθυσμών προγονικών κυττάρων από ευρύτερους κυτταρικούς πληθυσμούς, συμπεριλαμβανομένων των μεσεγχυματικών κυττάρων και επομένως δε σχετίζεται μονάχα με αιμοποιητικά και ενδοθηλιακά κύτταρα. Η αναγνώρισή του ως προγονικού δείκτη θα επιτρέψει την περαιτέρω μελέτη αυτού του ξεχωριστού υποσυνόλου κυττάρων, τα οποία ενδεχομένως διαθέτουν ισχυρή ικανότητα διαφοροποίησης. Εάν επομένως βελτιστοποιηθούν οι τεχνικές καλλιέργειας και πολλαπλασιασμού των συγκεκριμένων κυττάρων, τα CD34+ (που προέρχονται από πολλούς ιστούς, οι τύποι των οποίων ίσως αντιπροσωπεύουν μια πηγή προγονικών κυττάρων), θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν κλινικά σε στρατηγικές αναγεννητικής ιατρικής.

2.6 CD44

Το CD44 είναι μια ευρέως κατανεμημένη πολυμορφική διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη με μοριακό βάρος που κυμαίνεται από 70 kDa έως 95 kDa. Παρατηρείται σημαντική ποικιλομορφία στο μέγεθος των μορίων CD44 που εκφράζονται σε διαφορετικούς τύπους κυττάρων, γεγονός που οφείλεται στις διακυμάνσεις του βαθμού γλυκοζυλίωσης και στο διαφορικό μάτισμα ≤ 10 εξονίων στην κεντρική περιοχή της μεμβράνης του εξωκυτταρικού τομέα. Στον άνθρωπο, κωδικοποιείται από το γονίδιο CD44 στο χρωμόσωμα 11, ενώ ανευρίσκεται και ως HCAM (homing cell adhesion molecule), PGP-1 (phagocytic glycoprotein-), GP90 (lymphocyte homing/adhesion receptor), ECM-III (Extracellular matrix receptor-III) και HUTCH-1. Η κυρίαρχη αιμοποιητική μορφή, CD44H, διαθέτει μοριακή μάζα 80 kDa-90 kDa και εκφράζεται από κύτταρα τόσο μεσοδερμικής όσο και νευροεξωδερμικής προέλευσης. Έχει αναγνωρισθεί και μία διαλυτή μορφή CD44 με μοριακό βάρος περίπου 70 kDa. Το CD44, ως γλυκοπρωτεΐνη της κυτταρικής επιφάνειας εμπλέκεται σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ κυττάρων. Η επικρατούσα ισομορφή του είναι το CD44s που προέρχεται από τα εξώνια 1 ως 5 και 16 ως 20. Η ισομορφή CD44v προέρχεται από παραλλαγή του ματίσματος και είναι συχνή, ενώ ειδικά στα επιθηλιακά κύτταρα απαντάται σε μεγάλο βαθμό και η ισομορφή CD44E.

Το CD44, ως πολυλειτουργικό μόριο, εμπλέκεται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, στην κυτταρική διαφοροποίηση, στην κυτταρική μετανάστευση, στην αγγειογένεση, στην παρουσίαση κυτταροκινών, χημοκινών και αυξητικών παραγόντων στους αντίστοιχους υποδοχείς, στη σύνδεση των πρωτεασών στην κυτταρική μεμβράνη, στη σηματοδότηση και στην κυτταρική επιβίωση.

Οι αναφερόμενες διαδικασίες, αν και είναι απαραίτητες για τη λειτουργία ενός φυσιολογικού κυττάρου, σχετίζονται και με χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων. Σε πειραματικά μοντέλα, αποδείχθηκε πως η δέσμευση του CD44, είτε με μονοκλωνικά αντισώματα (όπως η ειδική για το CD44 μπιβατουζουμάμπη), είτε με ολιγονουκλεοτίδια ή διαλυτές πρωτεΐνες διάχυσης, μειώνει την καρκινική δραστηριότητα των όγκων. Παραδόξως, η ενισχυμένη έκφραση του CD44 δε συνδέεται απόλυτα με την έκβαση, καθώς άλλοι τύποι καρκίνου επηρεάζονται αρνητικά και άλλοι θετικά ως προς την επιβίωσή τους. Ο νεφρικός καρκίνος και τα μη Hodgkin λεμφώματα θεωρούνται περιπτώσεις, στις οποίες η υπερέκφραση του CD44 σχετίζεται με αυξημένα ποσοστά επιβίωσης, όπως και στην περίπτωση του καρκίνου των ωοθηκών. Το CD44 ως καρκινικός δείκτης μπορεί να προσφέρει χρήσιμες πληροφορίες για την πορεία της νόσου και για το λόγο αυτό συγκεντρώνει έντονο επιστημονικό ενδιαφέρον (Naor, et al, 2002).

Το CD44 συμμετέχει σε πληθώρα κυτταρικών λειτουργιών, συμπεριλαμβανομένης της ενεργοποίησης των λεμφοκυττάρων, της επανακυκλοφορίας και της αυτοκατεύθυνσης, της αιμοποίησης και της μετάστασης των καρκινικών κυττάρων. Ως υποδοχέας του υαλουρονικού οξέος μπορεί να αλληλεπιδράσει με άλλους συνδέτες, όπως η οστεοποντίνη, τα διάφορα κολλαγόνα και οι μεταλλοπρωτεΐνάσες. Το CD44 ρυθμίζεται από μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, Μία εξ αυτών αφορά στη σιαλοφουκοσυλίωση του CD44 που προσδένει τη σελεκτίνη και ονομάζεται HCELL (Hematopoietic Cell E-selectin/L-selectin Ligand ή προσδέτης των E- και L-σελεκτινών στο αιμοποιητικό κύτταρο), μορφή που σχετίζεται ιδιαίτερα με τον καρκίνο και έχει μελετηθεί επισταμένως στον καρκίνο του εντέρου. Τα μετάγραφα του γονιδίου του CD44 υπόκεινται σε σύνθετο εναλλακτικό μάτισμα, δίδοντας γένεση σε λειτουργικά διακριτές ισομορφές, η λειτουργία των οποίων δεν έχει

αποσαφηνισθεί. Η ιδιομορφία, πάντως, του ματίσματος στην περίπτωση του CD44 είναι ενδεχομένως υπεύθυνη για την καρκινική μετάσταση (Hanley, et al, 2005).

Η κλινική χρησιμότητα του CD44 είναι ευρεία. Αποτελεί προσδιοριστικό παράγοντα ενός συστήματος ομάδων αίματος, ενώ μαζί με το CD25 χρησιμοποιείται στην πρόωμη ανίχνευση T κυττάρων στο θύμο αδένα. Το CD44 αποτελεί επίσης ενδεικτικό παράγοντα των δραστικών T κυττάρων μνήμης. Οι παραλλαγές του είναι σημαντικές στη μελέτη των πρόδρομων καρκινικών κυττάρων σε περιπτώσεις καρκίνου του μαστού, του προστάτη, της κεφαλής και του τραχήλου, αλλά και σε περιστατικά γυναικών με ενδομητρίωση. Τα πρόδρομα καρκινικά κύτταρα στον καρκίνο του μαστού φέρουν επιφανειακούς δείκτες CD44+/CD24-, οι οποίοι έχουν συσχετισθεί με βελτιωμένους χρόνους επιβίωσης σε ασθενείς με καρκίνο των ωοθηκών (Sillanpää, et al, 2003).

Το CD44 δρα ως υποδοχέας υαλουρονάνης (Aruffo, et al, 1990, Culty, et al, 1990, Miyake et al, 1990, Bajorath, et al, 2000), γεγονός που ενισχύει την υπόθεση ότι σχετίζεται με την προσκόλληση. Ωστόσο, αν και λειτουργεί ως μόριο κυτταρικής προσκόλλησης, δρα και ως υποδοχέας σηματοδότησης. Ακόμη, έχει αποδειχθεί πως το CD44 λειτουργεί και σαν υποδοχέας του υαλουρονικού οξέος σε T κύτταρα, καθώς κατευθυνόμενα αντισώματα προς την περιοχή δέσμευσης της υαλουρονάνης στο CD44 παρεμποδίζουν την ενεργοποίηση των T κυττάρων (Sugiyama, et al, 1999).

Το υαλουρονικό οξύ αυξάνει την κινητικότητα του σπέρματος του ανθρώπου και την ενδοκυτταρική συγκέντρωση του Ca^{2+} πιθανώς μέσω των υποδοχέων CD44 (Bains, et al, 2001). Ο μηχανισμός σηματοδότησης αναφορικά με τους υποδοχείς υαλουρονικού οξέος είναι αμφιλεγόμενος. Η ενεργοποίηση του υαλουρονικού οξέος ενισχύει τη φωσφορυλίωση των ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών, τη φωσφορυλίωση της

τυροσίνης, την αυτοφωσφορυλίωση των υποδοχέων και την παραγωγή τριφωσφορικής ινοσιτόλης (Ranganathan, et al,1995). Στην κυτταρική μεμβράνη του ανθρώπινου σπέρματος έχουν ταυτοποιηθεί και άλλες πρωτεΐνες δέσμησης υαλουρονικού οξέος (Kornovski, et al, 1994, Ranganathan, et al,1994) και συγκεκριμένα μία 68-kDa γλυκοπρωτεΐνη δέσμησης υαλουρονικού οξέος της κυτταρικής επιφάνειας και πρωτεΐνες υποδοχέα υαλουρονάνης με μοριακά βάρη 58 kDa και 64 kDa κλπ. Ακόμη, η δέσμηση του υαλουρονικού οξέος στον υποδοχέα PH-20, προκαλεί ταχεία αύξηση των ενδοκυτταρικών ιόντων ασβεστίου στο σπέρμα, η οποία εκτιμάται χρησιμοποιώντας το φθορίζοντα δείκτη Fluo-3 (Suarez, et al, 1993). Στο ανθρώπινο σπέρμα, η αύξηση του ενδοκυτταρικού ασβεστίου σχετίζεται με την αύξηση της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων (Serres, et al,1991, Castilla, et al, 1993).

Το CD44 δεν είχε αρχικά αναγνωρισθεί σε μεμβράνες ανθρώπινου σπέρματος. Ωστόσο, μία μελέτη ανέφερε ότι μόνο το 3% των ανώριμων γεννητικών κυττάρων σπέρματος αντέδρασαν με αντι-CD44 αντισώματα σε σύστημα κυτταρομετρίας ροής (Diekman, et al,1999). Στο ανθρώπινο σπέρμα έχουν ανευρεθεί και άλλοι δείκτες, όπως: CD52, CD4, CD55, CD46 και CD59.

Το ανθρώπινο σπερματοζωάριο εκφράζει τελικά το αντιγόνο CD44, γεγονός που έχει πιστοποιηθεί με διαφορετικές μεθόδους, όπως κυτταρομετρία ροής, ανοσοκυτταροχημεία. Στην ακροσωμική αντίδραση, το υαλουρονικό οξύ αποτελεί το κύριο συστατικό του εξωκυττάρου στρώματος στον ωοφόρο δίσκο. Κατά τη διάρκεια της γονιμοποίησης, τα ωοκύτταρα είναι καλυμμένα με υαλουρονικό οξύ, το οποίο παίζει ενεργό ρόλο στο μηχανισμό επιλογής του σπέρματος. Τα ώριμα σπερματοζωάρια, που διαθέτουν την ικανότητα να συνδέονται και να πέπτουν το υαλουρονικό οξύ είναι αυτά που έχουν και τις περισσότερες πιθανότητες να φθάσουν

στο ωοκύτταρο και να το γονιμοποιήσουν. Ο ρόλος του υαλουρονικού οξέος ως φυσιολογικού επιλεκτικού κριτή αναγνωρίζεται και *in vitro*, καθώς τα σπερματοζωάρια που συνδέονται με το υαλουρονικό οξύ είναι αυτά που έχουν ολοκληρώσει την αναπροσαρμογή της πλασματικής τους μεμβράνης, την κυτταροπλασματική τους έκπτυξη και την πυρηνική τους ωρίμανση. Επίσης, στα σπερματοζωάρια που προσδένουν ευκολότερα το υαλουρονικό οξύ δεν εντοπίζονται συνήθως χρωμοσωμικές διαταραχές. Η επιλογή των σπερματοζωαρίων με βάση την προσδεσιμότητά τους στο υαλουρονικό οξύ θα ήταν δυνατό να έχει εφαρμογές σε περιπτώσεις ICSI. Η ισχυρή ποικιλομορφία των λειτουργιών του υποδοχέα CD44 και η δράση του ως υποδοχέα του υαλουρονικού οξέος οδηγεί στη διεξαγωγή πλήθους μελετών (Castilla, et al,1993), ενώ ο προσδιορισμός του υποδοχέα του υαλουρονικού οξέος CD44 θεωρείται ύψιστης προτεραιότητας στην κατανόηση της υπογονιμότητας ανδρικής αιτιολογίας.

2.7 CD45

Το αντιγόνο CD45 είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη τύπου I, η οποία εκφράζεται στην επιφάνεια όλων των φυσιολογικών αιμοποιητικών κυττάρων εκτός από τους ώριμους ερυθροβλάστες και τα ερυθροκύτταρα. Το ενδοκυττάριο καρβοξυτελικό τμήμα του μορίου περιέχει δύο περιοχές με δράση φωσφατάσης της τυροσίνης, οι οποίες μπορούν κατά περιπτώσεις να αφαιρούν φωσφορικές ομάδες από τυροσίνες. Οι κινάσες της τυροσίνης Fyn και Lyn αποτελούν υπόστρωμα του ενδοκυττάρου τμήματος του αντιγόνου CD45. Με την αποφωσφορυλίωση των Fyn και Lyn το αντιγόνο CD45 συμμετέχει στην ενεργοποίηση των B και T λεμφοκυττάρων. Το εξοκυττάριο αμινοτελικό τμήμα του αντιγόνου CD45 ποικίλει φαινοτυπικά, λόγω του εναλλακτικού ματίσματος των εξονίων του γονιδίου που το κωδικοποιεί, έχοντας ως αποτέλεσμα την έκφραση των ισομερών CD45RA, CD45RB, CD45RC, CD45RO

που χαρακτηρίζουν διαφορετικές υπο-ομάδες λεμφοκυττάρων. Τα παρθένα (naïve) T-λεμφοκύτταρα εκφράζουν το CD45RA, ενώ η έκφραση του μορίου CD45RO χαρακτηρίζει τα T-λεμφοκύτταρα μνήμης. Στα B-λεμφοκύτταρα το αντιγόνο CD45 μπορεί να μεταβάλει τη λειτουργία μεμβρανικών υποδοχέων και να τροποποιήσει τη μεταβίβαση του ενδοκυττάρου σήματος που αφορά στη διαφοροποίηση και στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των B-λεμφοκυττάρων. Η σύνδεση του αντιγονικού υποδοχέα του B-λεμφοκυττάρου με αντίσωμα έναντι της IgM ανοσοσφαιρίνης φυσιολογικά οδηγεί σε ενεργοποίηση του B-λεμφοκυττάρου, γεγονός στο οποίο μεσολαβούν και κινάσες τυροσίνης της Src οικογένειας, όπως οι Lyn, Fyn και Blk. Σε πειραματικά μοντέλα στα οποία έχει καταργηθεί τεχνητά η έκφραση του αντιγόνου CD45, τα B-λεμφοκύτταρα δεν είναι ικανά να διαφοροποιηθούν και να πολλαπλασιασθούν κατόπιν διέγερσης με αντισώματα έναντι των IgM ανοσοσφαιρινών, ενώ διαταράσσεται και η φυσιολογική ωρίμανση των T-λεμφοκυττάρων στο θύμο. Οι διαταραχές αυτές οφείλονται στη μη ενεργοποίηση των Src κινασών από το αντιγόνο CD45 (Bataille, et al, 2003).

Το CD45, ανιχνεύεται στην κυτταρική επιφάνεια και συνιστά μία από τις κυριότερες διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες αιμοποιητικών κυττάρων. Το CD45, γνωστό ως κοινό αντιγόνο λευκοκυττάρων ή T200, συναντάται σε διάφορες ισομορφές, που προκύπτουν από το εναλλακτικό μάτιασμα των εξονίων 4 έως 7 ενός μόνο γονιδίου (Ralph, et al,1987, Saga et al,1986, Saga et al,1987,Streuli, et al,1987). Οι ισομορφές κατανέμονται μέσω του ανοσοποιητικού συστήματος με ένα κυτταροειδικό τρόπο. Η μικρότερη (180 kDa) ισομορφή εκφράζεται σε θυμοκύτταρα, ενώ η μεγαλύτερη (220 kDa) στα B κύτταρα (Thomas, et al, 1989). Οι υποκατηγορίες των T κυττάρων εκφράζουν διαφορετικά πρότυπα ισομορφών, ανάλογα με την προηγούμενη έκθεση του αντιγόνου και την κυτταρική τους λειτουργία. Η ετερογένεια του CD45

εντοπίζεται μόνο στις εξωκυτταρικές περιοχές των μελών αυτής της οικογένειας πρωτεϊνών, γεγονός που υποδηλώνει ότι συγκεκριμένοι συνδέτες μπορούν να δεσμεύσουν τις διαφορετικές CD45 ισομορφές (Thomas, et al, 1988). Ανεξάρτητα από τη χρήση του εξονίου, κάθε μέλος της οικογένειας CD45 έχει ταυτόσημους διαμεμβρανικούς και κυτταροπλασματικούς τομείς. Αν και η αλληλουχία του CD45 προσδιορίστηκε πριν από χρόνια, η ακριβής λειτουργία αυτής της οικογένειας μορίων δεν ήταν γνωστή, έως ότου καθарίσθηκε και κλωνοποιήθηκε μια πρωτεϊνική φωσφατάση τυροσίνης (PTP) από ιστό πλακούντα (Tonks, et al, 1988). Η ανάλυση αλληλουχίας έδειξε ότι η συντηρημένη κυτταροπλασματική περιοχή CD45 περιέχει δύο επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες, οι οποίες είναι ομόλογες με την PTP του πλακούντα (Charbonneau, et al, 1988). Μεταγενέστερες μελέτες με καθαρισμένο CD45 έδειξαν πως κάθε ισομορφή του CD45 έχει ενζυμική δραστηριότητα (Trowbndge, et al, 1991, Tonks, et al, 1990, Kiener et al, 1989).

Με βάση το CD45 ως πρωτότυπη ακολουθία, ένας σημαντικός αριθμός άλλων PTP ταυτοποιήθηκαν πρόσφατα, κλωνοποιήθηκαν και αλληλουχήθηκαν. Τα συγκεκριμένα ένζυμα υποδιαιρούνται στον "υποδοχέα" PTP, όπου όλα διαθέτουν μεμβρανικό τμήμα και στον "μη-υποδοχέα" PTP, όπου είναι εξ ολοκλήρου κυτταροσολικά. Το CD45 είναι το καλύτερα χαρακτηρισμένο εκ των διαμεμβρανικών PTP και αρκετές αναφορές περιγράφουν τις ενζυμικές ιδιότητές του (Streuli, et al, 1990, Johnson, et al, 1992). Είναι ακόμη απαραίτητο για την αποτελεσματική μεταγωγή σήματος μέσω ενός αριθμού επιφανειακών υποδοχέων του ανοσοποιητικού συστήματος, γεγονός που σχετίζεται με την ενζυμική του δράση. Η έκφραση του CD45 στην επιφάνεια είναι απαραίτητη για τη βέλτιστη σηματοδότηση μέσω του συμπλόκου υποδοχέα-αντιγόνου T κυττάρου (TCR) σε ένα αριθμό T κυτταρικών σειρών (Koretzky et al, 1990, Shiroo, et al, 1992). Υπάρχουν ενδείξεις ότι η έκφραση CD45 είναι απαραίτητη

για τη ρύθμιση της σηματοδότησης από άλλα επιφανειακά μόρια T-λεμφοκυττάρων όπως το CD2 (Koretzky, et al, 1991), για την αποτελεσματική σύζευξη του υποδοχέα του αντιγόνου του B κυττάρου (ανοσοσφαιρίνη επιφανείας (sIgJ) με το μηχανισμό σηματοδότησής του καθώς και για τη σηματοδότηση μέσω του υποδοχέα υψηλής συγγένειας για IgE. Μια μελέτη αναφέρει ακόμη πως τα NK κύτταρα με ανεπαρκή έκφραση του CD45 αποτυγχάνουν να σηματοδοτήσουν μέσω CD2 ή να αντιμετωπίσουν αποτελεσματικά τους στόχους (Bell, et al, 1991).

Το κυτταροπλασματικό τμήμα του CD45 δρα μέσω αποφωσφορλίωσης των κρίσιμων υπολειμμάτων τυροσίνης, ρυθμίζοντας έτσι μια ή περισσότερες PTK, οι οποίες με τη σειρά τους εκκινούν ένα δεύτερο σήμα, με αποτέλεσμα την κυτταρική ενεργοποίηση. Υποψήφιες θεωρούνται οι κινάσες οικογένειας src, tck και fyn και non-src PTK ZAP-70. Η διαθεσιμότητα των μεταλλαγμάτων με έλλειψη CD45 θα βοηθήσει στην αποσαφήνιση των δομικών χαρακτηριστικών του CD45, τα οποία είναι σημαντικά στην ικανότητα ρύθμισης της μεταγωγή σήματος και στη φυσιολογική σημασία των πρόσφατα περιγραφόμενων αλληλεπιδράσεων μεταξύ CD45 και άλλων μορίων σε λεμφοειδή κύτταρα.

Τα ισόμορφα CD45 είναι παρόντα σε όλα τα αιμοποιητικά κύτταρα, επομένως η ανίχνευση του CD45 στο ανθρώπινο σπέρμα δεν είναι κάτι νέο. Ως μόριο που χρησιμοποιείται ευρέως στην ανίχνευση των λευκοκυττάρων έχει θέση στη διερεύνηση του υπογόνιμου άνδρα. Αυξημένες συγκεντρώσεις λευκών αιμοσφαιρίων στο σπέρμα αποτελούν ένδειξη λοιμώξεων του γεννητικού συστήματος, πτωχής ποιότητας σπέρματος και αυξημένων ποσοστών αποτυχίας στην εξωσωματική γονιμοποίηση. Σύμφωνα με τον Π.Ο.Υ., το φυσιολογικό όριο για τα λευκοκύτταρα στο σπέρμα είναι 1×10^6 ανά mL, αν και δεν υπάρχει ομοφωνία της επιστημονικής κοινότητας για το δεδομένο όριο, πιθανότατα διότι δεν υπάρχει αξιόπιστη μέθοδος

προσδιορισμού και ακριβούς διάγνωσης των λευκών αιμοσφαιρίων στο σπέρμα. Επιπλέον, τα λευκοκύτταρα του σπέρματος μετρώνται με μη αυτόματο τρόπο και μόνο χρησιμοποιώντας μικροσκόπιο. Πολλές φορές ίσως και να μετρώνται λανθασμένα και ανώριμα σπερματογόνια ως λευκά αιμοσφαίρια. Ο Π.Ο.Υ. πρότεινε τη δοκιμασία υπεροξειδάσης, η οποία ως μέθοδος χωλαίνει στο ότι μετρά μονάχα τα κοκκιοκύτταρα και όχι το σύνολο των υποπληθυσμών των λευκών αιμοσφαιρίων (Ricci, et al, 2000). Η σύνδεση της λευκοκυτταροσπερμίας με αρνητική επίπτωση στα χαρακτηριστικά του σπέρματος και χαμηλά ποσοστά επιτυχούς γονιμοποίησης τεκμηριώθηκε και από το γεγονός ότι οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου που προέρχονται από τα λευκά αιμοσφαίρια επηρεάζουν καθοριστικά το σπερματικό πλάσμα και συνεπώς τα ίδια τα σπερματοζώαρια. Παρόλα αυτά, πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η λευκοκυτταροσπερμία δεν επηρεάζει σημαντικά την έκβαση των τεχνικών υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (Ricci, et al, 2015). Επομένως, η ταυτοποίηση του CD45 μέσω κυτταρομετρίας ροής αποτελεί ένα χρήσιμο διαγνωστικό εργαλείο στη διερεύνηση της ανδρικής υπογονιμότητας.

2.8 CD117

Ο υποδοχέας CD117 (c-kit) είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη με δραστηριότητα κινάσης τυροσίνης και κωδικοποιείται από το c-kit ογκογονίδιο. Συνιστά σημαντικό μέλος της οικογένειας τύπου III του υποδοχέα της κινάσης της τυροσίνης. Άλλα μόρια του υποδοχέα κινάσης τυροσίνης περιλαμβάνουν τον υποδοχέα του παράγοντα διέγερσης των μακροφάγων (M-CSFR), τον αυξητικό παράγοντα προερχόμενο από αιμοπετάλια (PDGF) και τον υποδοχέα flk2 / flk3. Ο προσδέτης του c-kit είναι ο παράγοντας βλαστικών κυττάρων (SCF), μια αιμοποιητική κυτοκίνη, η οποία παίζει σπουδαίο ρόλο στη διατήρηση της επιβίωσης των αιμοποιητικών κυττάρων, προάγοντας τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίησή τους και ρυθμίζοντας την

ανάπτυξη και την εξέλιξη τους (Chen, et al, 2002). Γενικά, το διμερές SCF σχηματίζει σύμπλοκα με δύο μόρια του εξωκυτταρικού τομέα του c-kit, ώστε να ενεργοποιήσει τη μεταγωγή σήματος και να ρυθμίσει μια ποικιλία βιολογικών δραστηριοτήτων των κυττάρων, όπως το φυσιολογικό πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των κυττάρων, την εμφάνιση όγκου, την ανάπτυξη και την μετανάστευση (Philo, et al, 1996, Nishikawa, et al, 1991, Huizinga, et al, 1995). Τα μη φυσιολογικά γονίδια έκφρασης και τα προϊόντα ανώμαλης έκφρασης, τα οποία προκαλούνται από τις μεταλλάξεις του c-kit, αποτελούν το βασικό λόγο του γαστρεντερικού στρωματικού όγκου (Antonescu, et al, 2011).

Ο ανθρώπινος υποδοχέας της κινάσης της τυροσίνης (RTK) c-kit (αναφερόμενος ως υποδοχέας βλαστοκυττάρων CD117) ταυτοποιήθηκε και χαρακτηρίστηκε ως το κυτταρικό ομόλογο του ιικού ογκογονικού v-kit (Besmer, et al, 1986). Το cDNA του c-kit απομονώθηκε αρχικά από τη βιβλιοθήκη cDNA του εμβρυϊκού εγκεφάλου. Το ανθρώπινο c-kit πρωτο-ογκογονίδιο εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 4q11-12 και έχει συνολικό μήκος 90 kb. Ο υποδοχέας c-kit (CD117) είναι μια διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη τύπου I με σχετική μοριακή μάζα 145 kDa. Το C-kit είναι εξαιρετικά συντηρημένο. Η εξωκυτταρική περιοχή περιέχει πέντε περιοχές που μοιάζουν με ανοσοσφαιρίνες (Crosier, et al, 1993). Η περιοχή της μεμβράνης κοντά στην περιοχή διμερισμού, η ενδοκυτταρική περιοχή κοντά στη μεμβράνη και η περιοχή κινάσης είναι συχνά επιρρεπείς σε μεταλλάξεις. Επιπλέον, η περιοχή η οποία περιέχει αυτοφωσφορυλιωμένη κινάση τυροσίνης, λειτουργεί ως ομοδιμερές με την κινάση φωσφατιδυλινοσιτόλης. Τα μόρια μεταγωγής σήματος ενεργοποιούνται μέσω του σχηματισμού του συμπλέγματος c-kit / SCF και ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση, την κυτταρική ανάπτυξη, τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση.

Ο υποδοχέας c-kit υφίσταται ευρέως σε αιματοποιητικά κύτταρα και άλλους κυτταρικούς ιστούς. Σε υγιή άτομα, το 1% έως 4% των βλαστικών κυττάρων του μυελού των οστών και το 60% έως 75% CD34 + αιμοποιητικών κυττάρων εκφράζουν το συγκεκριμένο υποδοχέα. Οι κυτταρικοί τύποι που εξαρτώνται από το c-kit περιλαμβάνουν αιμοποιητικά κύτταρα, γεννητικά κύτταρα, μαστοκύτταρα, κύτταρα μελανώματος και κύτταρα του γαστρεντερικού σωλήνα. Τα ωκύτταρα εκφράζουν τον υποδοχέα c-kit, ενώ τα περιβάλλοντα κοκκώδη κύτταρα εκφράζουν τον παράγοντα βλαστοκυττάρων SCF. Ο υποδοχέας εκφράζεται στο 66,3% των γαμετικών κυττάρων και των σπερματοζωαρίων, γεγονός που οφείλεται στο ότι κάθε είδος γαμετικών κυττάρων μπορεί να απομονωθεί από το ανθρώπινο σπέρμα χρησιμοποιώντας αντι-CD117 μονοκλωνικό αντίσωμα (Jian, et al,2005). Το 85% περίπου των B προγονικών κυττάρων εκφράζει τον υποδοχέα c-kit, αν και σταδιακά εξαφανίζεται λόγω κυτταρικής διαφοροποίησης και ωρίμανσης. Το 30% των CD4-, CD8-, CD3 - B κυττάρων εκφράζουν επίσης τον υποδοχέα. Επιπλέον, ο c-kit ανευρίσκεται σε επιθηλιακά κύτταρα του μαστού και νευρώνες του εγκεφάλου. Βλάβες στη λειτουργία του c-kit είναι δυνατό να προκαλέσουν μη φυσιολογική αναγέννηση του περιφερικού νεύρου και εξασθένηση της μνήμης (Kimura, et al,2004). Μελέτες σε κύτταρα c-kit + ανθρώπινου εμβρυϊκού ήπατος υποδεικνύουν ότι ο υποδοχέας c-kit παίζει ρόλο στην ανάπτυξη και στη διαφοροποίηση των βλαστοκυττάρων του ήπατος (Ling, et al, 2009).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

3. ΒΛΑΒΕΣ ΣΤΟ ΣΠΕΡΜΑΤΙΚΟ DNA- ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

3.1 Κατακερματισμός του DNA των σπερματοζωαρίων

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

Παρότι το κλασικό σπερμοδιάγραμμα αποτελεί τη βασικότερη διαγνωστική εξέταση στον άνδρα, σε ένα σημαντικό ποσοστό αποτυγχάνει να εξηγήσει την ανδρική υπογονιμότητα. Ως εκ τούτου, η έρευνα στρέφεται και σε άλλες κατευθύνσεις, ώστε να εντοπισθούν οι παράγοντες που καθιστούν ένα σπερματοζωάριο μη ικανό για φυσιολογική γονιμοποίηση. Ο κατακερματισμός του DNA αφορά τόσο στο πυρηνικό όσο και στο μιτοχονδριακό DNA (mtDNA). Το mtDNA του εμβρύου προέρχεται από τη μητέρα, καθώς τα μιτοχόνδρια του σπερματοζωαρίου παραμένουν εκτός του ωαρίου, χωρίς να συμμετέχουν στη δημιουργία του άρρενα προπυρήνα.

3.2 Πυρηνικό DNA

Στον άνθρωπο, η χρωματίνη των σπερματοζωαρίων διαφέρει από αυτή των σωματικών κυττάρων ως προς τη δομή και τη σύσταση. Πράγματι, η χρωματίνη των σπερματοζωαρίων εμφανίζει την πιο συμπαγή δομή ανάμεσα στα ευκαρυωτικά κύτταρα. Αυτή η συμπαγής δομή είναι σημαντική για τη διατήρηση της ακεραιότητας του γενετικού υλικού, κατά τη διέλευσή του από το ανδρικό και το γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα (Evenson, et al,2002).

Η βασική μονάδα της χρωματίνης είναι το νουκλεόσωμα. Αποτελείται από 146 ζεύγη βάσεων DNA, τα οποία ελίσσονται γύρω από ένα οκταμερές πυρηνικών ιστονών, αποτελούμενο από τέσσερα ζεύγη μορίων: H2A, H2B, H3 και H4 (Luger,et al, 1997). Οι ιστόνες H3 και H4 συνδέονται μεταξύ τους σχηματίζοντας ένα H3-H4 διμερές. Δύο διμερή σχηματίζουν ένα (H3-H4)₂ τετραμερές, γύρω από το οποίο ελίσσονται οι έλικες του DNA. Στις δύο πλευρές του τετραμερούς συνδέονται τα ετεροδιμερή H2A και H2B. Επιπλέον, δύο γειτονικά νουκλεοσώματα συνδέονται με μία ιστόνη H1 (Andrabi, et al,2007).

Η περιέλιξη του DNA γύρω από τα οκταμερή των ιστονών προκαλεί τη δημιουργία υπερελικώσεων στη διπλή έλικα. Επομένως, το ευκαρυωτικό DNA χαρακτηρίζεται από αρνητική υπερελίκωση (Ward,et al, 1991). Ωστόσο, ο όγκος του πυρήνα των σπερματοζωαρίων είναι σημαντικά μικρότερος από αυτόν των σωματικών κυττάρων. Έτσι, το DNA των σπερματοζωαρίων δε θα μπορούσε να οργανωθεί σε νουκλεοσώματα, καθώς θα απαιτούσε το 213% του συνολικού πυρηνικού όγκου (Pogany, et al,1981). Απαιτείται λοιπόν μια πιο συμπαγής οργάνωση του DNA.

Η δομή της χρωματίνης των σπερματοζωαρίων είναι όμοια με των σωματικών κυττάρων μέχρι τη δεύτερη μειωτική διαίρεση, που οδηγεί από τα σπερματοκύτταρα

στις στρογγυλές σπερματίδες. Ωστόσο, κατά τη διάρκεια της σπερμιογένεσης η νουκλεοσωματική οργάνωση της χρωματίνης εξαφανίζεται και αντικαθίσταται από τη δομή των λείων ινιδίων (Dadoune, et al, 2003). Οι περισσότερες ιστόνες απομακρύνονται από το DNA και αντικαθίστανται αρχικά από μεταβατικές πρωτεΐνες και στη συνέχεια από πρωταμίνες, οι οποίες είναι υπεύθυνες για την τελική συμπύκνωση και σταθεροποίηση της σπερματικής χρωματίνης. Οι πρωταμίνες έχουν περίπου το μισό μέγεθος από αυτό των ιστονών. Στον άνθρωπο υπάρχουν δύο τύποι πρωταμινών: η P1, πρωτεΐνη που συντίθεται άμεσα και η P2, που προκύπτει από την πρωτεόλυση ενός πρόδρομου μορίου (Green, et al, 1994).

Το σύμπλεγμα πρωταμίνης - DNA σχηματίζεται καθώς οι πρωταμίνες τοποθετούνται κατά μήκος, μέσα στις ελάσσονες αύλακες της έλικας του DNA, εξουδετερώνοντας με τον τρόπο αυτό τις αρνητικά φορτισμένες φωσφορικές ομάδες. Επιπλέον, το σύμπλεγμα πρωταμίνης - DNA της μιας έλικας εφαρμόζει στη μείζονα αύλακα μιας γειτονικής παράλληλης έλικας DNA, έτσι ώστε οι DNA έλικες να είναι τοποθετημένες δίπλα - δίπλα, με γραμμικό τρόπο, μέσα στον πυρήνα (Ward, et al, 1991). Η δομή της χρωματίνης σταθεροποιείται περαιτέρω και γίνεται πιο συμπαγής με το σχηματισμό πολλαπλών δισουλφιδικών δεσμών μεταξύ υπολειμμάτων κυστεΐνης, τόσο εντός του ίδιου του μορίου των πρωταμινών όσο και μεταξύ τους (Loir, et al, 1984). Η οργάνωση με γραμμικό τρόπο του DNA μέσα στον πυρήνα επικυρώνει την παρατήρηση ότι το DNA των σπερματοζωαρίων δεν παρουσιάζει αρνητική υπερέλικωση. Με τον τρόπο αυτό, το DNA μπορεί να οργανωθεί σταθερά σε ελάχιστο όγκο. Ωστόσο, το ανθρώπινο σπερματοζωάριο διατηρεί σε ποσοστό 15%, περίπου, ιστόνες, οι οποίες σχηματίζουν λιγότερο συμπαγείς νουκλεοσωματικές δομές (Tanphaichitr, et al, 1978), που ανευρίσκονται κυρίως στην περιφέρεια του πυρήνα και στις ακολουθίες των τελομερών.

Στα σωματικά κύτταρα, η χρωματίνη οργανώνεται περαιτέρω, στις τρεις διαστάσεις, καθώς συνδέεται ανά 60.000 περίπου ζεύγη βάσεων με την πυρηνική ουσία, σχηματίζοντας βρόχους DNA (Nelson, et al,1986).

Η λειτουργία του DNA εξαρτάται από την οργάνωσή του, καθώς τα ενεργά γονίδια βρίσκονται κοντά στην περιοχή σύνδεσης με την πυρηνική ουσία και οι θέσεις έναρξης της αντιγραφής του DNA συνδέονται με την πυρηνική ουσία (Ward, et al,1991). Η χρωματίνη των σπερματοζωαρίων, παρότι είναι μεταγραφικά ανενεργή, είναι επίσης οργανωμένη σε βρόχους που έχουν, περίπου, το μισό μέγεθος από αυτούς των σωματικών κυττάρων (Ward, et al,1989).

Στα ώριμα σπερματοζωάρια, η χρωματίνη βρίσκεται συμπιεσμένη στο 1/6 του όγκου σε σύγκριση με τον πυρήνα των σωματικών κυττάρων (Andrabi, et al,2007), σχηματίζοντας ένα συμπυκνωμένο πατρικό γένωμα, με συμπαγή και υδροδυναμικό πυρήνα, που διευκολύνει την ταχύτερη κίνηση των σπερματοζωαρίων προς το ωάριο. Επιπλέον, πιθανολογείται ότι οι πρωταμίνες αποτελούν φορείς ενός γενετικού αποτυπώματος, που μπορεί να επηρεάζει την επανενεργοποίηση του πατρικού γενώματος κατά τη γονιμοποίηση (Rousseaux ,et al, 2005).

3.3 Μιτοχονδριακό DNA

Το ανθρώπινο μιτοχονδριακό DNA (mtDNA) αποτελείται από 16569 ζεύγη βάσεων (St John, et al,2007) που διατάσσονται σε δυο έλικες. Η μία είναι πλούσια σε γουανίνη και χαρακτηρίζεται ως βαριά (H) και η άλλη πλούσια σε κυτοσίνη και χαρακτηρίζεται ως ελαφριά (L). Περιλαμβάνει 37 γονίδια τα περισσότερα από τα οποία κωδικοποιούν παράγοντες της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, καθώς και

μεταγραφικούς παράγοντες απαραίτητους για τη μιτοχονδριακή πρωτεϊνική σύνθεση (Lee, et al,2007). Ωστόσο, ορισμένες πρωτεΐνες των μιτοχονδρίων κωδικοποιούνται από γονίδια που εδράζονται στο πυρηνικό DNA (St John, et al,2000).

Το mtDNA είναι πιο ευπαθές από το πυρηνικό, διότι δεν περιέχει ιστόνες. Επιπλέον, βρίσκεται σε στενή σχέση με την εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, περιοχή πλούσια σε ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (EPO, Reactive Oxygen Species - ROS), οι οποίες παράγονται φυσιολογικά κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση (Beckman, et al,1998). Μάλιστα, η διαρροή αυτών των EPO καθιστά τα μιτοχόνδρια τις κύριες ενδοκυττάρειες πηγές τους. Ίσως, αυτός είναι ένας λόγος που οι πολυμορφισμοί και οι μεταλλάξεις είναι 10-17 φορές συχνότερες στο mtDNA από ό,τι στο πυρηνικό (Wallace,et al,1997). Ένας ακόμη λόγος είναι ότι τα μιτοχόνδρια στερούνται επιδιορθωτικού μηχανισμού του DNA (Bogenhagen, et al, 1999).

3.4 Μηχανισμοί πρόκλησης κατακερματισμού στο DNA των σπερματοζωαρίων

Ο κατακερματισμός του DNA χαρακτηρίζεται από θραύσεις τόσο της μονής, όσο και της διπλής έλικας του DNA. Κατά τη διάρκεια της σπερμιόγνεσης, η σπερματίδα που ωριμάζει χάνει προοδευτικά την ικανότητά της να επιδιορθώνει τυχόν βλάβες του DNA, καθώς επίσης και να απαντά σε αυτές μέσω του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (απόπτωση). Έτσι, θραύσεις του DNA που προκαλούνται κατά τη συμπύκνωση της χρωματίνης ή και αργότερα μπορεί να διαφύγουν από τους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς και να παραμείνουν στο ώριμο σπερματοζωάριο.

Τα σπερματοζωάρια με βλάβη στο DNA παραμένουν ικανά να γονιμοποιήσουν ένα ωάριο (Lopes,et al,1998, Gandini,et al,2004, Aitken, et al,1998). Ωστόσο, το ερώτημα που εγείρεται είναι, εάν η βλάβη του DNA επιδρά στη φυσιολογική ανάπτυξη του εμβρύου, αφού, λογικά, θα μπορούσε να προκαλέσει διαταραχές της ανάπτυξής του,

αποτυχία της εμφύτευσης ή αυξημένη πιθανότητα αποβολής (Borin, et al, 2006, Seli, et al,2004, Genesca,et al,1992, Parinaud, et al, 1993, Twigg, et al, 1998, Carrell, et al,2003, Evenson, et al,1991).

Τόσο το ωάριο όσο και το πρώιμο έμβρυο, έχουν την ικανότητα επιδιόρθωσης δομικών ανωμαλιών του DNA (Ahmadi, et al,1999). Η ικανότητα του ωαρίου να επιδιορθώσει τυχόν βλάβη του πατρικού DNA εξαρτάται από το βαθμό της βλάβης, αλλά επηρεάζεται σημαντικά από την ποιότητα του κυτταροπλάσματος και του γενώματός του. Σε γενικές γραμμές, οι θραύσεις της μονής έλικας καθώς και οι αλκαλο/οξο-δεσμευτικές θέσεις είναι ευκολότερο να διορθωθούν απ' ότι οι θραύσεις της διπλής έλικας. Ωστόσο, υπάρχουν ενδείξεις ότι οι ορισμένα ένζυμα, όπως οι πολυμεράσες, μπορούν να επιδιορθώνουν και θραύσεις της διπλής έλικας (Garcia-Diaz, et al,2000). Μελέτες σε πειραματόζωα έδειξαν ότι το ωάριο έχει την ικανότητα να επιδιορθώνει ενδεχόμενη βλάβη του DNA, όταν αυτή δεν ξεπερνά το 8% (Ahmadi, et al, 1999). Εάν όμως ο μηχανισμός επιδιόρθωσης του DNA δεν είναι λειτουργικός ή έχει διαταραχθεί, είτε από ενδογενείς (EPO) είτε από εξωγενείς παράγοντες (ακτινοβολία, περιβαλλοντικές τοξίνες), τότε η επιδιόρθωση του πατρικού DNA δεν είναι δυνατή. Επιπροσθέτως, η ποιότητα του ωαρίου επηρεάζεται δραματικά από την ηλικία της γυναίκας. Αντίστοιχα, η ποιότητα του DNA του σπερματοζωαρίου φαίνεται να επηρεάζεται από την πατρική ηλικία. Αυτός είναι ένας ακόμη παράγοντας που μπορεί να εξηγήσει τα χαμηλά ποσοστά κύησης σε γυναίκες προχωρημένης ηλικίας (Belloc, et al, 2008).

Εάν η βλάβη στο DNA του εμβρύου είναι πάνω από ένα κριτικό όριο και δεν έχει επιδιορθωθεί, αυτό μπορεί να εξηγήσει τη διακοπή της ανάπτυξης του εμβρύου που παρατηρείται τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* μετά την εμφύτευση, ακόμη και εάν ο καρύοτυπος είναι φυσιολογικός. Αυτός ο τύπος της βλάβης, που εκφράζεται κατά την

εμφύτευση του εμβρύου ή και μετά από αυτή, χαρακτηρίζεται ως όψιμη πατρική επίδραση. Ωστόσο, πρέπει να καταστεί σαφές ότι δεν είναι κάθε βλάβη στο DNA του εμβρύου πατρικής προέλευσης. Αντίθετα, μπορεί να προέρχεται από το ωάριο. Για παράδειγμα οι ανευπλοειδίες που παρατηρούνται στα έμβρυα είναι, ως επί το πλείστον, μητρικής προέλευσης (Fragouli, et al, 2006, Sher, et al, 2007). Επομένως, οι επιπτώσεις των θραύσεων του DNA του σπερματοζωαρίου στη γονιμοποίηση και την εμβρυϊκή ανάπτυξη εξαρτώνται από το βαθμό της βλάβης του DNA σε συνδυασμό με την ικανότητα του ωαρίου να επιδιορθώνει αυτή τη βλάβη.

Η βλάβη του DNA στο σπερματοζωάριο μπορεί να αφορά τόσο το πυρηνικό όσο και το μιτοχονδρικό DNA και μπορεί να προκληθεί είτε κατά την παραγωγή είτε κατά τη μεταφορά των σπερματικών κυττάρων. Φαίνεται ότι πιο σημαντική για την ακεραιότητα του DNA είναι η βλάβη που προκαλείται μετά το επίπεδο των όρχεων, κατά τη μεταφορά των σπερματοζωαρίων στην επιδιδυμίδα. Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώνεται από μελέτες που δείχνουν ότι ο κατακερματισμός του DNA είναι υψηλότερος σε σπερματοζωάρια που απομονώνονται από την ουρά της επιδιδυμίδας και από εκσπερμάτιση σε σύγκριση με σπερματοζωάρια που απομονώνονται από τους όρχεις (Greco, et al, 2005, Olierò, et al, 2001, Suganuma, et al, 2005). Ωστόσο, δεν αποκλείεται διαταραχές στη σπερματογένεση στο επίπεδο των όρχεων να καθιστούν τα σπερματοζωάρια πιο ευάλωτα για βλάβη σε μεταγενέστερο επίπεδο.

Οι ακριβείς μηχανισμοί που οδηγούν σε θραύσεις της DNA έλικας παραμένουν ακόμα ασαφείς. Έχουν προταθεί τρεις βασικές θεωρίες: η διαταραχή του μηχανισμού της απόπτωσης, η ελαττωματική συμπύκνωση της χρωματίνης των σπερματοζωαρίων και η βλάβη από οξειδωτικό stress.

3.5 Διαταραχή του μηχανισμού της απόπτωσης

Η απόπτωση ή προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος αποτελεί ένα ιδιαίτερο είδος κυτταρικού θανάτου και χαρακτηρίζεται από μια σειρά μορφολογικών και βιοχημικών μεταβολών, που οδηγούν στην αποτελεσματική μείωση του αριθμού των κυττάρων στους ιστούς, χωρίς να προκαλείται φλεγμονώδης αντίδραση. Όπως και σε άλλους ιστούς έτσι και στους όρχεις, η απόπτωση διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ιστική ομοιόσταση: λαμβάνει χώρα φυσιολογικά και συμβάλλει στον έλεγχο του υπέρμετρου πολλαπλασιασμού των κυττάρων της σπερματικής σειράς (Rodríguez, et al, 1997). Τα κύτταρα της σπερματικής σειράς πολλαπλασιάζονται κλωνικά κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης, μέσω πολυάριθμων κύκλων μίτωσης και μείωσης. Επομένως, είναι απαραίτητη η ύπαρξη ενός μηχανισμού επίβλεψης, με σκοπό τον περιορισμό του αριθμού τους, έτσι ώστε να μπορούν να υποστηριχθούν από τα κύτταρα Sertoli. Στον ανθρώπινο όρχι, από ένα σπερματογόνιο προκύπτουν περίπου 100 σπερματίδες, πολύ λιγότερες από τις θεωρητικά αναμενόμενες 4.096 (Woolveridge, et al, 2000), γεγονός που υποδεικνύει το σημαντικό ρόλο της απόπτωσης. Αρμόδια για την επίβλεψη της διαδικασίας της σπερματογένεσης είναι τα κύτταρα Sertoli, τα οποία ευθύνονται για την απόπτωση του 50 - 60% των σπερματικών κυττάρων που εισέρχονται στη φάση της μείωσης I.

Στα κύτταρα της σπερματικής σειράς, η απόπτωση πραγματοποιείται με τη βοήθεια της πρωτεΐνης Fas, μιας μεμβρανικής πρωτεΐνης τύπου I που ανήκει στην οικογένεια του υποδοχέα του παράγοντα νέκρωσης των όγκων - αυξητικού παράγοντα των νεύρων (Tumor Necrosis Factor - Nerve Growth Factor) (Suda, et al, 1993). Η σύνδεση της πρωτεΐνης Fas με τον Fas συνδέτη (Fas ligand - FasL) οδηγεί φυσιολογικά στην αποδόμηση των κυττάρων μέσω της απόπτωσης (Suda, et al, 1993). Τα κύτταρα Sertoli εκφράζουν τον FasL, συμβάλλοντας έτσι στον περιορισμό του αριθμού των

αναπτυσσόμενων σπερματικών κυττάρων. Η συμμετοχή κασπασών στη διαδικασία της απόπτωσης ευνοεί τον κατακερματισμό του DNA στα σπερματοζωάρια. Η σύνδεση Fas/FasL έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των κασπασών 8 και 9, οι οποίες με τη σειρά τους μεταφέρουν το μήνυμα σε δραστικές κασπάσες, όπως η 3. Η τελευταία ενεργοποιεί την ενεργοποιούμενη από κασπάση δεοξυριβονουκλεάση (Caspase- Activated Deoxyribonuclease - CAR), προκαλώντας βλάβη στο DNA και οδηγώντας τελικά στην αποδόμησή του (Kim, et al,2001).

Σε κάποιες περιπτώσεις, η διαδικασία της απόπτωσης δεν ολοκληρώνεται, με αποτέλεσμα ένα ποσοστό σπερματοζωαρίων, στα οποία έχουν ξεκινήσει οι βλάβες της απόπτωσης, να φθάνουν μέχρι την εκσπερμάτιση. Η μορφολογία αυτών των σπερματοζωαρίων μπορεί να μην επηρεάζεται καθόλου (Burrello, et al, 2004). Στους άνδρες με παθολογικές παραμέτρους σπερμοδιαγράμματος, έχει εντοπιστεί σημαντικό ποσοστό αποπτωτικά σημασμένων σπερματοζωαρίων (Shen, et al, 2002), υποδεικνύοντας ότι τα συγκεκριμένα σπερματοζωάρια διέφυγαν από την αποπτωτική διαδικασία, έχοντας υποστεί αποτυχημένη απόπτωση (abortive apoptosis) (Sakkas, et al, 1999). Εάν αυτό ισχύει, τότε η παράμετρος του αριθμού των σπερματοζωαρίων πιθανόν να μην επηρεάζεται σε τόσο μεγάλο βαθμό, παρά την κακή ποιότητα του σπερματικού DNA. Αναφορικά με την αιτιολογία της αποτυχημένης απόπτωσης, έχει προταθεί ότι άνδρες με μειωμένη σπερματογένεση μπορεί να μην παράγουν αρκετά σπερματοζωάρια ώστε να ενεργοποιήσουν σωστά τη διαδικασία της απόπτωσης (Francavilla ,et al, 2000).

Η ιδιότητα των σπερματοζωαρίων που έχουν ξεκινήσει τη διαδικασία της απόπτωσης να εκφράζουν ορισμένους δείκτες απόπτωσης, όπως ο Fas, η φωσφατιδυλσερίνη, ο Bcl-XL και η p53 μπορεί να χρησιμοποιηθεί ώστε να επιλέγονται μη αποπτωτικά σπερματοζωάρια για μικρογονιμοποίηση. Μάλιστα, έχει κυκλοφορήσει μέθοδος

διαχωρισμού των αποπτωτικών σπερματοζωαρίων, η οποία στηρίζεται στην ιδιότητα της Annexin-V να συνδέεται με τη φωσφατιδυλσερίνη που ανευρίσκεται στην εξωτερική στοιβάδα της μεμβράνης των αποπτωτικών σπερματοζωαρίων (Grünewald, et al, 2001), ώστε να απομονώνονται τα φυσιολογικά μη-αποπτωτικά σπερματοζωάρια.

3.6 Ελαττωματική συμπύκνωση της χρωματίνης των σπερματοζωαρίων

Κατά τη διάρκεια της μείωσης, η πρόκληση θραύσεων της διπλής έλικας του DNA από νουκλεάσες της οικογένειας SP011 είναι απαραίτητη για τον επιχiasμό (crossing-over) των χρωμοσωμάτων (Ahmadi, et al, 1999). Φυσιολογικά, οι θραύσεις αυτές αποκαθίστανται μέχρι την ολοκλήρωση της μείωσης I, διαφορετικά η διαδικασία της μείωσης δεν μπορεί να συνεχιστεί (Bannister, et al, 2004). Γίνεται άρα κατανοητό ότι η ύπαρξη ενός ελαττωματικού μηχανισμού ελέγχου θα μπορούσε να οδηγήσει στην παρουσία μόνιμων θραύσεων της DNA έλικας στο σπερματοζωάριο.

Κατά το στάδιο της στρογγυλής και της επιμήκους σπερματίδας παρατηρούνται φυσιολογικά υψηλές συγκεντρώσεις της ενδογενούς νουκλεάσης DNA τοποϊσομεράσης II, καθώς και θραύσεις του DNA. Οι θραύσεις αυτές, που στην πραγματικότητα είναι θραύσεις του δίκλωνου DNA, είναι απαραίτητες κατά τη διάρκεια της σπερμιογένεσης. Η τοποϊσομεράση II προκαλεί θραύσεις στην έλικα του DNA με σκοπό να διευκολύνει την αντικατάσταση των ιστονών, αρχικά από μεταβατικές πρωτεΐνες και στη συνέχεια από πρωταμίνες (McPherson, et al, 1993). Υπό φυσιολογικές συνθήκες, το ίδιο ένζυμο επανασυγκολλά τις συγκεκριμένες θραύσεις, κατά τη δίοδο του σπερματοζωαρίου από την επιδιδυμίδα, αποκαθιστώντας την ακεραιότητα του DNA πριν την εκσπερμάτιση. Ωστόσο, σε περίπτωση που η συγκολλητική δράση της τοποϊσομεράσης II είναι ανεπαρκής ή παρεμποδίζεται από

κάποιον ανασταλτικό εξωγενή παράγοντα, οι θραύσεις μπορεί να παραμείνουν στο εξωθούμενο σπερματοζώαριο.

Συγκριτικά με τα σωματικά κύτταρα, το DNA των σπερματοζωαρίων του ανθρώπου εμφανίζει περισσότερες περιοχές μερικώς αποδιοργανωμένου DNA, δηλαδή περιοχές με χαλαρή συμπύκνωση (Muriel, et al, 2004), οι οποίες είναι περισσότερο ευάλωτες σε θραύση υπό την παρουσία ενός βλαπτικού παράγοντα. Το γεγονός αυτό θα μπορούσε να εξηγήσει την παρουσία μεγαλύτερου αριθμού τυχαίων βλαβών του DNA στο σπερματοζώαριο σε σχέση με τα σωματικά κύτταρα (Fernandez, et al, 1998).

Από τα δύο είδη πρωταμινών που έχουν εντοπιστεί στον άνθρωπο, η P2 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη σταθερότητα και στη συμπύκνωση της χρωματίνης, σχηματίζοντας δισουλφιδικούς δεσμούς, τόσο μεταξύ των πρωταμινών όσο και εντός του ίδιου του μορίου της. Χαμηλές συγκεντρώσεις της P2 πρωταμίνης και αυξημένη αναλογία P1:P2, εξαιτίας παραμονής των ιστονών ή ανεπαρκούς επεξεργασίας του πρόδρομου μορίου της P1, έχουν εντοπισθεί σε υπογόνιμους άνδρες. Είτε πρόκειται για παραμονή θραύσεων στις έλικες του DNA, είτε για ανωμαλίες του πακεταρίσματος της χρωματίνης, το τελικό αποτέλεσμα είναι τα σπερματοζώαρια να καθίστανται πιο ευάλωτα σε βλάβες μετά το επίπεδο των όρχεων.

3.7 Βλάβη από οξειδωτικό stress

Ως ελεύθερη ρίζα χαρακτηρίζεται κάθε άτομο ή μόριο με ένα ή περισσότερα ελεύθερα ηλεκτρόνια. Οι EPO είναι εξαιρετικά ασταθείς οξειδωτικοί παράγοντες και αντιδρούν με πληθώρα βιοχημικών μορίων, όπως τα λιπίδια, τα αμινοξέα οι υδατάνθρακες, οι πρωτεΐνες και το DNA. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις, έχουν

σημαντικό φυσιολογικό ρόλο. Ως παράδειγμα, το H_2O_2 , παίζει ρόλο στην υπερδραστήρια κίνηση της ουράς που είναι σημαντική για την ενεργοποίηση (capacitation) του σπερματοζωαρίου (Bize, et al,1991). Επιπρόσθετα, οι EPO είναι σημαντικές για την υπεροξειδωση των λιπιδίων, αυξάνοντας τη διεισδυτική ικανότητα των σπερματοζωαρίων, που είναι απαραίτητη για να διαπεράσουν τη διαφανή ζώνη (Aitken, et al,1989).

Φυσιολογικά, οι EPO διατηρούνται σε επιτρεπτά όρια, μέσω απενεργοποίησής τους από αντιοξειδωτικούς παράγοντες, οι οποίοι αποτελούνται από ενζυμικά και μη-ενζυμικά μόρια. Οι ενζυμικοί οξειδωτικοί παράγοντες περιλαμβάνουν την υπεροξειδική δισμουτάση, το σύστημα υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης / ρεδουκτάσης της γλουταθειόνης και την καταλάση. Οι μη-ενζυμικοί παράγοντες περιλαμβάνουν ουσίες, όπως το ασκορβικό οξύ, η γλουταθειόνη, η ταυρίνη και η α-τοκοφερόλη (Agarwal, et al, 2004).

Το οξειδωτικό stress εμφανίζεται στο σπέρμα όταν παράγονται EPO σε υψηλότερες συγκεντρώσεις από τις αντιοξειδωτικές ικανότητες του σπερματικού πλάσματος (Aitken, et al, 1992). Υψηλές συγκεντρώσεις EPO έχουν συσχετισθεί με θραύσεις της διπλής και της μονής έλικας του DNA, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι αποτελούν έναν από τους βασικότερους παράγοντες που συμβάλλουν στον κατακερματισμό του DNA (Agarwal, et al, 2003, Aitken, et al, 2001). Το σπερματοζωάριο είναι ιδιαίτερα ευάλωτο σε οξειδωτική βλάβη, εξαιτίας της υψηλής περιεκτικότητας της πλασματικής του μεμβράνης σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (Evenson, et al,2002). Αναφορικά με το μηχανισμό δράσης, η υδροξυλική ρίζα, όπως και η ιονίζουσα ακτινοβολία, οδηγούν, σε πρώτο στάδιο, στη δημιουργία 8-OH-γουανίνης και 8-OH-2'-δεοξυγουανοσίνης (8-OHdG) και, σε δεύτερο στάδιο, στη δημιουργία θραύσεων της μονής έλικας του DNA (Cui, et al, 2000). Ωστόσο, η υδροξυλική ρίζα μπορεί να

προκαλέσει στη συνέχεια θραύσεις της διπλής έλικας του DNA, μέσω της ενεργοποίησης κασπασών και ενδονουκλεασών των σπερματοζωαρίων. Η σημασία αυτού του γεγονότος έγκειται στο ότι οι θραύσεις της μονής έλικας είναι δυνατό να διορθωθούν από το ωάριο ή το έμβρυο. Αντίθετα, οι εκτεταμένες θραύσεις της διπλής έλικας του DNA του σπερματοζωαρίου πρακτικά δεν μπορούν να διορθωθούν και επομένως παραμένουν στο αναπτυσσόμενο έμβρυο. Οι EPO προκαλούν βλάβη στο DNA των σπερματοζωαρίων είτε άμεσα είτε έμμεσα, μέσω της ενεργοποίησης των κασπασών και των ενδονουκλεασών. Οι δύο βασικές πηγές υπέρμετρης παραγωγής EPO στο σπέρμα είναι τα λευκοκύτταρα και τα σπερματοζωάρια με κυτταροπλάσματικό υπόλειμμα (Aitken, et al, 1992). Τα ανώριμα σπερματοζωάρια παράγουν υψηλές συγκεντρώσεις EPO και μπορούν να προκαλέσουν βλάβη σε ώριμα σπερματοζωάρια κατά την κοινή τους δίοδο από την επιδιδυμίδα (Oliero, et al, 2001). Τα επιθηλιακά κύτταρα της επιδιδυμίδας συμβάλλουν στη βλάβη του DNA των σπερματοζωαρίων, είτε μέσω της παραγωγής EPO, όπως είναι η υδροξυλική ρίζα και το οξείδιο του αζώτου, είτε μέσω της ενεργοποίησης των κασπασών και των ενδονουκλεασών των σπερματοζωαρίων από φυσικοχημικούς παράγοντες (Britan, et al, 2006). Στην πρώτη περίπτωση, η βλάβη θα μπορούσε να αποφευχθεί με τη λήψη αντιοξειδωτικών παραγόντων, οι οποίοι όμως θα ήταν αναποτελεσματικοί στη δεύτερη περίπτωση. Εξαιτίας αυτής της δραστηριότητάς της, θα μπορούσε να θεωρηθεί ότι η επιδιδυμίδα λειτουργεί και ως ένας δεύτερος, μετά τα κύτταρα Sertoli, ελεγκτικός μηχανισμός για τον περιορισμό των ελαττωματικών σπερματοζωαρίων (Suganuma, et al, 2005). Επιπρόσθετα, έχει βρεθεί ότι η βλάβη που προκαλείται στο DNA των ευάλωτων σπερματοζωαρίων είναι τόσο μεγαλύτερη όσο προχωρούν στην επιδιδυμίδα και τον εκσπερματιστικό πόρο.

Τα ώριμα σπερματοζώαρια στερούνται κυτταροπλάσματος, που αποτελεί την κύρια πηγή αντιοξειδωτικών παραγόντων. Ωστόσο, το σπερματικό πλάσμα είναι πλούσιο στα αντιοξειδωτικά ένζυμα καταλάση και υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, που καταλύουν τη διάσπαση του H_2O_2 σε H_2O και O_2 . Εκτός από τους αντιοξειδωτικούς παράγοντες του σπέρματος, η μεγάλη συμπύκνωση του DNA είναι σημαντική για την προστασία του έναντι των οξειδωτικών προσβολών.

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

3.8 Εργαστηριακός έλεγχος

Ο εργαστηριακός έλεγχος απαρτίζεται από μία σειρά διαδοχικών εξετάσεων και είναι απαραίτητος για να συμπληρώσει, να ολοκληρώσει και να επιβεβαιώσει το ιστορικό και τα ευρήματα της κλινικής εξέτασης. Το σπερμοδιάγραμμα, εάν και αποτελεί τη βασικότερη ίσως εξέταση, δε δίνει απαντήσεις σε όλα τα ερωτήματα. Αντίθετα απαιτείται σειρά εξετάσεων ορισμένες από τις οποίες γίνονται σε όλους τους άνδρες, ενώ οι υπόλοιπες όταν υπάρχουν συγκεκριμένες ενδείξεις. Ο βασικός εργαστηριακός έλεγχος περιλαμβάνει: α) ορμονικό έλεγχο, β) σπερμοδιάγραμμα, γ) βιοχημικό έλεγχο, δ) έλεγχο με απεικονιστικές εξετάσεις, ε) κυτταρογενετική μελέτη και στ) βιοψία των όρχεων.

3.9 Σπερμοδιάγραμμα

Το σπερμοδιάγραμμα είναι μία χρονοβόρα και με αρκετές τεχνικές δυσκολίες εξέταση, η οποία επιπλέον εμπεριέχει μεγάλο βαθμό υποκειμενικότητας στην εκτίμηση των επιμέρους παραμέτρων. Εν τούτοις, εξακολουθεί να αποτελεί τη βασικότερη εξέταση κατά τη διερεύνηση της αναπαραγωγικής ικανότητας ενός άνδρα.

Στην προσπάθεια να ελαχιστοποιηθούν οι εξωτερικές παράμετροι που επηρεάζουν τα αποτελέσματα του σπερμοδιαγράμματος ο ΠΟΥ έχει εκδώσει οδηγίες με τη μορφή εγχειριδίου, όπου περιγράφεται λεπτομερώς ο τρόπος με τον οποίο πρέπει να πραγματοποιείται το σπερμοδιάγραμμα (World Health Organization, 1999, 2010).

Σε γενικές γραμμές, η λήψη του σπέρματος πρέπει να γίνεται με αυνανισμό, σε ειδικό αποστειρωμένο δοχείο, αφού προηγηθεί αποχή 2 έως 7 ημερών από εκσπερμάτιση. Καλό είναι το διάστημα της αποχής να είναι 3 έως 4 ημέρες. Η λήψη πρέπει να γίνεται σε ειδικά διαμορφωμένο χώρο εντός του εργαστηρίου, όπου θα γίνει η ανάλυση του σπέρματος. Σε περίπτωση που αυτό δεν είναι εφικτό, η λήψη μπορεί να γίνει σε ιδιωτικό χώρο του ασθενούς και το δείγμα να προσκομιστεί στο εργαστήριο εντός μίας ώρας από τη λήψη. Το δείγμα πρέπει πάντα να λαμβάνεται με αυνανισμό και να μην είναι προϊόν διακεκομμένης συνουσίας.

Αρχικά, εξετάζονται οι μακροσκοπικοί χαρακτήρες του δείγματος, όπως η όψη, η χροιά, η οσμή. Τυχόν απόκλιση από το φυσιολογικό καταγράφεται. Στη συνέχεια, το δείγμα αφήνεται να ρευστοποιηθεί σε κλίβανο στους 37°C ή σε θερμοκρασία δωματίου. Η ρευστοποίηση ελέγχεται μακροσκοπικά ή / και μικροσκοπικά και μετράται ο όγκος του δείγματος σε ml, καθώς και το pH. Η γλοιότητα αξιολογείται ελέγχοντας τον τρόπο με τον οποίο ρέει το δείγμα από μία πιπέτα. Φυσιολογικά, το

σπέρμα εξέρχεται του στομίου της πιπέτας με τη μορφή μικρών σταγόνων. Στην περίπτωση που σχηματίζονται ίνες με μήκος μεγαλύτερο των 2 cm, η γλοιότητα θεωρείται αυξημένη.

Η κινητικότητα των σπερματοζωαρίων ελέγχεται αμέσως μετά τη ρευστοποίηση και οπωσδήποτε εντός μίας ώρας από την εκσπερμάτιση. Τοποθετούνται 10 μί καλά αναμειγμένου δείγματος σε αντικειμενοφόρο πλάκα και καλύπτονται με καλυπτρίδα 22 x 22 mm. Χρησιμοποιείται μικροσκόπιο αντίθεσης φάσης με μεγέθυνση $\times 400$. Αξιολογούνται το λιγότερο 200 σπερματοζωάρια, σε διπλή μέτρηση, δηλαδή το λιγότερο 400 σπερματοζωάρια στο σύνολο. Σύμφωνα με την 4η έκδοση του εγχειριδίου του ΠΟΥ, η κινητικότητα διακρίνεται σε τέσσερις κατηγορίες: ζωηρή προωθητική (a), νωθρή προωθητική (b), μη προωθητική (c) και ακινησία (d). Η κινητικότητα θεωρείται φυσιολογική, όταν η κινητικότητα τύπου a είναι $> 25\%$ και το άθροισμα $a + b > 50\%$. Σύμφωνα με τη νέα, 5η έκδοση του εγχειριδίου η αξιολόγηση της κινητικότητας έχει απλοποιηθεί και διακρίνεται σε τρεις κατηγορίες: προωθητική, μη προωθητική και ακινησία. Τιμές αναφοράς θεωρούνται: προωθητική κίνηση $> 32\%$ και άθροισμα προωθητικής και μη προωθητικής κίνησης $> 40\%$. Στο ίδιο δείγμα που εξετάζεται η κινητικότητα ελέγχεται και η παρουσία συσσωρεύσεων (μάζες που περιλαμβάνουν ακίνητα, κινητά σπερματοζωάρια, κύτταρα και κυτταρικά υπολείμματα) και συγκολλήσεων (ενωμένα κινητά σπερματοζωάρια, χωρίς παρουσία άλλων κυττάρων ή υπολειμμάτων). Μικρές συσσωρεύσεις βρίσκονται συχνά στο σπέρμα φυσιολογικών ανδρών. Όταν η παρουσία συσσωρεύσεων ή συγκολλήσεων είναι ιδιαίτερα αυξημένη, πρέπει να καταγράφεται.

Προκειμένου να υπολογιστεί η συγκέντρωση και ο συνολικός αριθμός των σπερματοζωαρίων γίνεται ήπια, αλλά καλή ανάδευση του δείγματος και στη συνέχεια

λαμβάνεται συγκεκριμένος όγκος με πιπέτα θετικής αναρρόφησης και αναμιγνύεται με ειδικό διάλυμα, ώστε να ακινητοποιηθούν τα σπερματοζώαρια και να ληφθεί κατάλληλη αραιώση του δείγματος. Για τη μέτρηση των σπερματοζωαρίων χρησιμοποιείται η βελτιωμένη πλάκα Neubauer.

Τιμές αναφοράς σύμφωνα με την 4η έκδοση του εγχειριδίου θεωρούνται τα 20 εκατομμύρια σπερματοζώαρια / ml για τη συγκέντρωση και τα 40 εκατομμύρια για το συνολικό αριθμό. Στην 5η έκδοση οι τιμές αναφοράς έχουν τροποποιηθεί και μειωθεί στα 15 εκατομμύρια / ml για τη συγκέντρωση και στα 39 εκατομμύρια για το συνολικό αριθμό.

Πρέπει να τονιστεί ότι, εάν δεν υπάρχουν καθόλου ή υπάρχουν ελάχιστα σπερματοζώαρια στο αρχικό παρασκεύασμα για τη μέτρηση της κινητικότητας, τότε πρέπει να καταγράφεται πόσα σπερματοζώαρια βρέθηκαν και εάν παρουσιάζουν κινητικότητα. Επιπλέον, πρέπει να γίνεται φυγοκέντρηση του δείγματος στα 1000 g για 15 min και το ίζημα να εξετάζεται με x 400 μεγέθυνση σε μικροσκόπιο αντίθεσης φάσης. Εάν μετά την εξέταση ολόκληρης της περιοχής της καλυπτρίδας βρεθούν κάποια σπερματοζώαρια, τότε καταγράφεται ο αριθμός και τυχόν κινητικότητά τους. Εάν δε βρεθεί ούτε ένα σπερματοζώαριο, τότε μιλούμε για αζωοσπερμία. Βέβαια, πρέπει να έχουμε υπόψη ότι ακόμη και σε αυτήν την περίπτωση είναι δυνατό να υπάρχουν κάποια σπερματοζώαρια στο δείγμα και εμείς ίσως να μην τα έχουμε εντοπίσει. Επίσης, δεν αποκλείεται η ανεύρεση σπερματοζωαρίων σε επόμενο δείγμα σπέρματος.

Η εκτίμηση της ζωτικότητας των σπερματοζωαρίων γίνεται με έλεγχο της ακεραιότητας της μεμβράνης τους. Για να περιοριστεί ο φόρτος του εργαστηρίου, είναι καλύτερο να πραγματοποιείται μόνον όταν το ποσοστό των προωθητικά

κινούμενων σπερματοζωαρίων είναι μικρότερο από 40%, οπότε έχει και μεγαλύτερη κλινική σημασία. Για την εξέταση χρησιμοποιείται η χρώση εωσίνης - νιγκροσίνης, με την οποία τα ζωντανά σπερματοζωάρια φαίνονται λευκά, ενώ τα νεκρά ερυθρά σε μαύρο φόντο. Κατά την αξιολόγηση του αποτελέσματος πρέπει να λαμβάνεται υπ' όψιν ότι το ποσοστό των νεκρών σπερματοζωαρίων δεν μπορεί να υπερβαίνει το ποσοστό των ακίνητων. Έτσι, με τη δοκιμασία αυτή μπορεί να ελεγχθεί αδρά και το εάν υπολογίστηκε σωστά η κινητικότητα. Ασφαλώς, το ποσοστό των ζωντανών σπερματοζωαρίων πρέπει να υπερβαίνει αυτό των κινητών. Ως τιμή αναφοράς θεωρείται ποσοστό ζωντανών σπερματοζωαρίων $> 58\%$.

Μία από τις βασικότερες παραμέτρους του σπερμοδιαγράμματος είναι η εκτίμηση του ποσοστού των μορφολογικά φυσιολογικών σπερματοζωαρίων. Η εξέταση της μορφολογίας είναι επίπονη και απαιτεί κατάλληλη εκπαίδευση και μεγάλη εμπειρία. Για την εξέταση της μορφολογίας γίνεται επίστρωση του δείγματος σε αντικειμενοφόρο πλάκα και χρώση αυτού. Για τη χρώση απαιτούνται χρωστικές που να επιτρέπουν τη λεπτομερή απεικόνιση όλων των τμημάτων του σπερματοζωαρίου. Ιδανικότερη θεωρείται η χρώση κατά Παπανικολάου. Υπάρχουν, ωστόσο, και προ-επιστρωμένες με χρωστικές αντικειμενοφόρες πλάκες, που μπορούν να χρησιμοποιηθούν. Πρέπει να εκτιμηθούν τουλάχιστον 200 σπερματοζωάρια σε οπτικό μικροσκόπιο, με τη χρήση καταδυτικού φακού σε μεγέθυνση $\times 1000$. Φυσιολογικό θεωρείται το σπερματοζωάριο που έχει φυσιολογικά όλα του τα τμήματα. Τιμή αναφοράς των φυσιολογικών μορφολογικά σπερματοζωαρίων στην 4η έκδοση του εγχειριδίου του Π.Ο.Υ. ήταν το 12%, ενώ στο νέο εγχειρίδιο το ποσοστό αυτό έχει μειωθεί στο 4% του συνόλου των σπερματοζωαρίων.

Στην πλάκα Neubauer, εκτός από τη συγκέντρωση των σπερματοζωαρίων, μπορεί να υπολογιστεί και η συγκέντρωση των στρογγυλών κυττάρων. Τα κύτταρα αυτά μπορεί

να είναι λευκά αιμοσφαίρια, ανώριμα κύτταρα της σπερματικής σειράς ή κύτταρα του γεννητικού συστήματος του άνδρα. Για να γίνει διαχωρισμός των κυττάρων και να υπολογιστεί η συγκέντρωση των λευκών αιμοσφαιρίων, που είναι ενδεικτικά φλεγμονής, χρησιμοποιείται η χρώση της υπεροξειδάσης, κατά την οποία τα λευκά αιμοσφαίρια χρωματίζονται ερυθρά, ενώ τα υπόλοιπα στρογγυλά κύτταρα παραμένουν ως έχουν. Συγκέντρωση λευκών αιμοσφαιρίων μεγαλύτερη από 1 εκατομμύριο / ml θεωρείται ενδεικτική φλεγμονής και χρήζει αντιμικροβιακής αγωγής. Η καλλιέργεια του σπέρματος, παρά το γεγονός ότι πραγματοποιείται συχνά, δεν θεωρείται ιδιαίτερα αξιόπιστη στην ανάδειξη της φλεγμονής.

Τα σπερματοζωάρια είναι δυνατόν να παρουσιάζουν αντισώματα στην κυτταρική τους επιφάνεια. Τα αντισώματα αυτά, κυρίως κατηγορίας IgA, έχουν ως αποτέλεσμα να συγκολλώνται τα σπερματοζωάρια μεταξύ τους, να ελαττώνεται η ικανότητα τους να διέλθουν διαμέσου της τραχηλικής βλέννης και να διεισδύσουν στη διαφανή ζώνη του ωαρίου. Ο προσδιορισμός αυτών των αντισωμάτων γίνεται με ειδικές μεθόδους, όπως η SpermMar® ή η Immunobead®.

Αξίζει να σημειωθεί ότι τα αποτελέσματα ενός σπερμοδιαγράμματος δεν μπορούν να οδηγήσουν σε ασφαλή συμπεράσματα, όσον αφορά το αναπαραγωγικό δυναμικό του άνδρα. Αυτό που τεκμαίρεται από ένα σπερμοδιάγραμμα είναι πιθανές διαταραχές της λειτουργίας του γεννητικού συστήματος και, σε μικρότερο βαθμό, μία ασαφής κατηγοριοποίηση ασθενών σε άνδρες που έχουν περισσότερες ή λιγότερες πιθανότητες να επιτύχουν γονιμοποίηση.

3.9 Βιοχημικός έλεγχος του σπέρματος

Οι βιοχημικές εξετάσεις του σπέρματος πραγματοποιούνται στο σπερματικό πλάσμα και δίνουν πληροφορίες για τη λειτουργία των επικουρικών γεννητικών αδένων.

Το σπερματικό πλάσμα απομονώνεται μετά από φυγοκέντρηση του δείγματος στα 3000 g για 15 λεπτά. Το υπερκείμενο τοποθετείται σε δοκιμαστικό σωλήνα και μπορεί να διατηρηθεί σε ψυγείο ή σε κατάψυξη (-20 °C) για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Πιο συγκεκριμένα:

Για την εκτίμηση της λειτουργίας του προστάτη μπορεί να μετρηθούν η όξινη φωσφατάση, το κιτρικό οξύ, ο ψευδάργυρος και το μαγνήσιο. Μέθοδος εκλογής είναι η μέτρηση της όξινης φωσφατάσης. Η μέτρηση της δραστηρότητας του ενζύμου μπορεί να γίνει με ανοσολογική ή φωτομετρική μέθοδο σε σπερματικό πλάσμα χωρίς κύτταρα, μετά από αραίωση, δεδομένου ότι η συγκέντρωση της φωσφατάσης στο σπερματικό πλάσμα είναι 10.000 φορές μεγαλύτερη από αυτή στο αίμα. Φυσιολογική θεωρείται τιμή > 200 IU στην εκσπερμάτιση (Heite, et al, 1979).

Για την εκτίμηση της λειτουργίας των σπερματοδόχων κύστεων μπορεί να μετρηθούν η φρουκτόζη και οι προσταγλανδίνες. Για την εκτίμηση της εκκριτικής λειτουργίας των σπερματοδόχων κύστεων προσδιορίζεται συνήθως η φρουκτόζη. Η μέθοδος προσδιορισμού είναι φωτομετρική και γίνεται σε σπερματικό πλάσμα χωρίς κύτταρα και πρωτεΐνες μετά από αραίωση. Φυσιολογικά, υπάρχουν στην εκσπερμάτιση > 13 μνηοϊ φρουκτόζης. Τελευταία, χρησιμοποιείται και ο προσδιορισμός της προσαρμοσμένης φρουκτόζης (Gonzales, et al, 1994), που συνυπολογίζει τον αριθμό των σπερματοζωαρίων του δείγματος ή της πραγματικά προσαρμοσμένης φρουκτόζης (Gonzales, et al, 2001), που συνυπολογίζει τον αριθμό των καλώς κινούμενων σπερματοζωαρίων.

Για τη εκτίμηση της λειτουργίας των επιδιδυμίδων μπορεί να μετρηθούν η ουδέτερη α-γλυκοσιδάση, η καρνιτίνη και η γλυκερυλ-φωσφορυλ-χολίνη. Η μέθοδος εκλογής είναι η μέτρηση της ουδέτερης α-γλυκοσιδάσης, δεδομένου ότι η ουδέτερη μορφή

παράγεται αποκλειστικά από τις επιδιδυμίδες. Η μέτρηση γίνεται σε σπερματικό πλάσμα χωρίς κύτταρα και η φυσιολογική τιμή είναι >13 IU / εκσπερμάτιση (Cooper, et al,1990).

Οι βιοχημικές εξετάσεις παρέχουν απαραίτητες πληροφορίες σε περιπτώσεις αζωοσπερμίας με πολύ μικρό όγκο σπέρματος. Στη συγγενή αγενεσία των σπερματοδόχων κύστεων υπάρχει αζωοσπερμία με χαμηλό όγκο σπέρματος, η φρουκτόζη σπέρματος είναι μη ανιχνεύσιμη και το pH χαμηλό. Σε περιπτώσεις πλήρους αμφοτερόπλευρης απόφραξης των εκσπερματιστικών πόρων, το δείγμα του σπέρματος θα έχει, εκτός από την αζωοσπερμία και τον χαμηλό όγκο σπέρματος ($< 0,5$ ml), πολύ χαμηλή φρουκτόζη και πιθανόν υψηλή συγκέντρωση κιτρικού οξέος. Εάν, εκτός από την απόφραξη των εκσπερματιστικών πόρων, συνυπάρχει και δυσλειτουργία του προστάτη, τότε οι συγκεντρώσεις του κιτρικού θα είναι φυσιολογικές ή χαμηλές. Σε περιπτώσεις που η απόφραξη είναι μερική, η εικόνα διαφοροποιείται (Roy, et al, 2001).

3.10 Κυτταρογενετική μελέτη

Σε περιπτώσεις αζωοσπερμίας ή σοβαρού βαθμού oligo-ασθενο-τερατοσπερμίας και όταν η κλινική εικόνα και ο υπόλοιπος εργαστηριακός έλεγχος συνηγορούν υπέρ της ύπαρξης κάποιου γενετικού αιτίου υπογονιμότητας, είναι απαραίτητο να προσδιοριστεί ο καρυότυπος του ασθενούς. Για την εξέταση απαιτείται, συνήθως, η λήψη δείγματος περιφερικού αίματος, καθώς ο καρυότυπος προσδιορίζεται στα λεμφοκύτταρα. Με τον προσδιορισμό του καρυότυπου ελέγχεται η παρουσία χρωμοσωμικών ανωμαλιών αυτοσωματικού ή φυλοσύνδετου τύπου. Χρωμοσωμικές ανωμαλίες παρουσιάζει το 6%, περίπου, των υπογόνιμων ανδρών. Όσο βαρύτερη είναι η εικόνα του σπέρματος, τόσο αυξάνεται η πιθανότητα χρωμοσωμικής βλάβης.

Έτσι, στους αζωοσπερμικούς άνδρες το ποσοστό φθάνει στο 15%. Η επίπτωση των χρωμοσωμικών ανωμαλιών μειώνεται σε 4% έως 5% στους ολιγοσπερμικούς ασθενείς και σε 1% στους άνδρες των οποίων το σπέρμα δεν έχει επηρεασμένες παραμέτρους (Matsuda, et al, 1992). Οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες μπορεί να αφορούν στον αριθμό των χρωμοσωμάτων ή στη δομή τους (π.χ. μετάθεση γενετικού υλικού).

Η παρουσία ενός πρόσθετου χρωμοσώματος X σε άρρενα άτομα χαρακτηρίζει το σύνδρομο Klinefelter. Μη αποχωρισμός των φυλετικών χρωμοσωμάτων κατά τη γαμετογένεση οδηγεί στο κλασικό σύνδρομο, ενώ εάν ο μη αποχωρισμός συμβεί κατά τη διάρκεια της μιτωτικής διαίρεσης των κυττάρων του αναπτυσσόμενου εμβρύου οδηγεί σε ποικίλου βαθμού μωσαϊκισμό (46, XY/47, XXY). Το σύνδρομο εμφανίζεται σε μία ανά 600 γεννήσεις αρρένων (Nielsen, et al, 1991). Στην κλασική του μορφή, το σύνδρομο Klinefelter χαρακτηρίζεται από φαινότυπο άρρενα με όρχεις μικρών διαστάσεων ευνουχοειδικές αναλογίες, μειωμένη τρίχωση προσώπου και σώματος και παρουσία γυναικομαστίας. Ωστόσο, δεν εμφανίζουν όλοι οι ασθενείς την πλήρη εικόνα, καθώς η γυναικομαστία παρατηρείται σε λιγότερο από το 50% των περιπτώσεων. Η καθυστέρηση της ήβης και η μειωμένη αρρενοποίηση μπορεί να παραμείνουν αδιάγνωστες και ο ασθενής να αναζητήσει ιατρική βοήθεια για τη διερεύνηση υπογονιμότητας ή για μειωμένη σεξουαλική επιθυμία. Οι συγκεντρώσεις της T είναι χαμηλές, ενώ, αντίθετα, αυτές των γοναδοτροπινών είναι υψηλές. Επιπλέον, οι συγκεντρώσεις της Eι πλάσματος είναι συνήθως αυξημένες, με συνέπεια μειωμένη αναλογία T - οιστρογόνων, γεγονός το οποίο θεωρείται αιτία της γυναικομαστίας. Το σπερμοδιάγραμμα εμφανίζει αζωοσπερμία. Σε περιπτώσεις μωσαϊκισμού, μπορεί να υπάρχουν νησίδες σπερματογένεσης στο σπερματικό επιθήλιο, με αποτέλεσμα να εντοπίζονται κάποια σπερματοζώαρια στην εκσπερμάτιση. Μελέτες έχουν συνδυάσει τις ορμονικές διαταραχές με διάφορες

μορφές καρκίνου που αναπτύσσονται στους ασθενείς με το σύνδρομο Klinefelter. Η προσοχή εστιάζεται στην κατά 50 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα ανάπτυξης καρκίνου του μαστού (Hultborn, et al, 1997).

Παρόμοια είναι η κλινική εικόνα των ασθενών με σύνδρομο de la Chapelle (XX, άρρενες). Εμφανίζουν μικρούς, σκληρούς όρχεις, συχνά γυναικομαστία, μικρό έως φυσιολογικό μέγεθος πέους και αζωοσπερμία. Η βιοψία των όρχεων συχνά καταδεικνύει σκλήρυνση των σπερματικών σωληνάρων. Οι συγκεντρώσεις της T είναι χαμηλές, σε αντίθεση με τις αυξημένες συγκεντρώσεις γοναδοτροπινών. Αντίθετα από τους χαρακτηριστικούς ασθενείς με το σύνδρομο Klinefelter, αυτοί οι ασθενείς έχουν κοντότερο ανάστημα, δεν παρουσιάζουν νοητικές διαταραχές και έχουν μια αυξημένη συχνότητα εμφάνισης υποσπαδία (Yencilek, et al, 2005). Το σύνδρομο οφείλεται σε διαταραχές κατά το διαχωρισμό των φυλετικών χρωμοσωμάτων και στην παρουσία τμήματος του Y χρωμοσώματος που φέρει το γονίδιο καθορισμού του φύλου (Sex determining region Y - SRY), με αποτέλεσμα θήλεα καρυοτυπικά άτομα να εμφανίζουν φαινότυπο άρρενος.

Άλλη χρωμοσωμική ανωμαλία είναι το σύνδρομο XYY (υπεράρρενες). Οι ασθενείς με το σύνδρομο XYY είναι χαρακτηριστικά ψηλοί, με σοβαρού βαθμού ολιγοσπερμία ή αζωοσπερμία. Αν και έχουν συνδεθεί με επιθετική και εγκληματική συμπεριφορά, η αιτία όσο και το γεγονός το ίδιο είναι αμφισβητούμενα. Μερικοί έχουν θεωρήσει ότι αυτές οι συμπεριφορές είναι συνέπεια του υψηλού αναστήματος, το οποίο μπορεί να προδιαθέσει τα άτομα σε αντικοινωνικές συμπεριφορές ή της χαμηλότερης νοημοσύνης (Gotz, et al, 1999). Το σύνδρομο XYY εμφανίζεται σε 0,1% έως 0,4% των νεογνών (Balodimos, et al, 1996).

Τα τελευταία χρόνια εξάλλου έχουν αυξηθεί πολύ οι γνώσεις μας σχετικά με γονίδια που συμμετέχουν στη σπερμιογένεση και τη διαφοροποίηση του φύλου. Με τη βοήθεια της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) μπορούν να ελεγχθούν αρκετά γονίδια που συμμετέχουν στις αναπαραγωγικές διαδικασίες.

Η ιδιοπαθής ανδρική υπογονιμότητα όταν συνδυάζεται με σοβαρή διαταραχή των παραμέτρων του σπερμοδιαγράμματος έχει συνδεθεί με μικρο-ελλείψεις (microdeletions) που εμφανίζονται στον επίτοπο (locus) της αζωοσπερμίας στο χρωμόσωμα Y (Azoospermia Factor - AZF). Αυτές οι de novo μεταλλάξεις αφορούν αρκετά γονίδια ή και οικογένειες γονιδίων στον επίτοπο AZF. Ο χαρακτήρας τους δεν έχει πλήρως διερευνηθεί ή συσχετιστεί με κάποιο κλινικό φαινότυπο. Περιλαμβάνουν τα γονίδια DAZ και DAZLA (Deleted in Azoospermia και DAZ-like autosomal) (Yen, et al, 1996), RBM (RNA Binding Motif) (Tharapel, et al, 2006) και DFFRY (Drosophila fat-facets related Y) (Ferlin, et al, 1999). Τα τρία αυτά υποψήφια γονίδια έχουν γίνει αντικείμενο ιδιαίτερης μελέτης, με αποτέλεσμα ο αρχικός επίτοπος AZF να έχει χωριστεί σε AZFa, AZFb και AZFc (Vogt, et al, 1996). Όλα βρίσκονται στο μακρό σκέλος του χρωμοσώματος Y και συγκεκριμένα στην περιοχή Yq11. Μια τέταρτη περιοχή του χρωμοσώματος Y, μεταξύ AZFb και AZFc, που καλείται AZFd, φαίνεται να έχει επιπτώσεις στη μορφολογία των σπερματοζωαρίων, αν και ακόμη δεν έχει ερευνηθεί πλήρως.

Η ταυτότητα αλλά και η ευρύτερη βιολογική σημασία των γονιδίων των περιοχών αυτών παραμένει άγνωστη, καθώς τα γονίδια αυτά απαντώνται σε πολλά αντίγραφα στο χρωμόσωμα Y ή και σε άλλα χρωμοσώματα. Επιπρόσθετα, εκφράζονται και σε άλλους ιστούς εκτός των όρχεων. Οι μεταλλάξεις αυτών των γονιδίων στο Y χρωμόσωμα απαντώνται σε αρκετούς άνδρες με αζωοσπερμία ή ολιγο-ασθενοτεροσπερμία και έχουν συνδυαστεί με την εικόνα συνδρόμου κυττάρων Sertoli

(Sertoli-cell only syndrome - SCOS) στη βιοψία των όρχεων. Συνεπώς, έχουν αρχίσει να συμπεριλαμβάνονται στη διαγνωστική διερεύνηση της ιδιοπαθούς ανδρικής υπογονιμότητας. Πρέπει να τονιστεί ότι, παρά το γεγονός ότι η ασθένεια δεν κληρονομείται αλλά είναι επίκτητη, οι μικρο-ελλείψεις αυτές μεταφέρονται στα αρρενα τέκνα, όταν εφαρμόζονται μέθοδοι υποβοηθούμενης αναπαραγωγής.

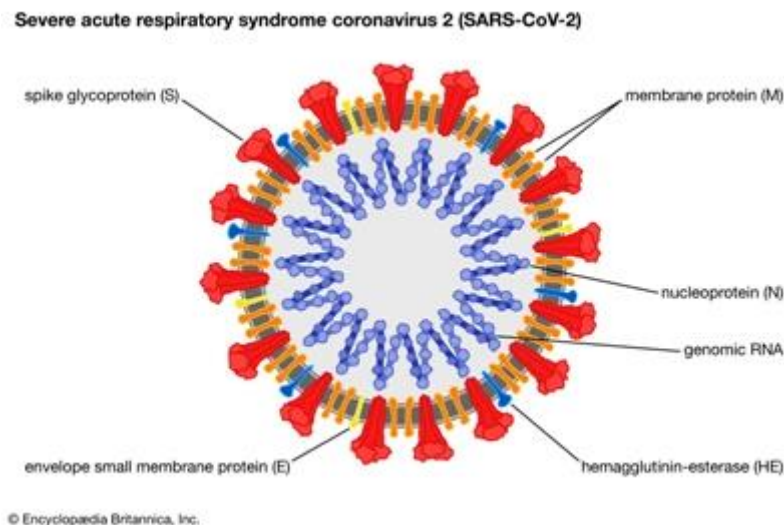
Συσχέτιση των μικρο-ελλείψεων του χρωμοσώματος Y με συγκεκριμένους κλινικούς φαινοτύπους δεν έχει επιτευχθεί. Οι άνδρες με μικρο-ελλείψεις είναι φαινοτυπικά φυσιολογικοί, με μόνη προφανή ανωμαλία τη βλάβη στη σπερματογένεση. Δεν υπάρχει επαρκής συσχέτιση μεταξύ των μικρο-ελλείψεων και της ορχικής βιοψίας, καθώς άνδρες με παρόμοιες μικρο-ελλείψεις μπορούν να έχουν διαφορετική ορχική ιστολογία. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι τα γονίδια είναι πολλά, καθώς και στο ότι πολλά από αυτά έχουν πολλαπλά αντίγραφα, ακόμη και σε αυτοσωματικά χρωμοσώματα. Συνεπώς, αν και δεν μπορούν να εξαχθούν συμπεράσματα σχετικά με τη γονιμοποιητική ικανότητα κάθε άνδρα με μικροελλείψεις, η διερεύνησή τους είναι σημαντική.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

4. COVID 19- Συσχέτιση με το ανδρικό αναπαραγωγικό σύστημα

4.1 Φαινοτυπική περιγραφή

Το 2019, ένας νέος κορωνοϊός αναγνωρίστηκε ως η αιτία της ασθένειας μέσω ενός κρούσματος της νόσου που προήλθε από την Κίνα. Ο ιός είναι πλέον γνωστός (SARS-CoV-2) και είναι υπεύθυνος για το σοβαρό σύνδρομο του οξέος αναπνευστικού συνδρόμου 2. Η γενική του περιγραφή φαίνεται στην (Εικόνα 7). Ο ιικός φάκελος αποτελείται από μια διπλή στιβάδα λιπιδίων όπου οι δομικές πρωτεΐνες μεμβράνης (M), φακέλου (E) και ακίδων (S) είναι αγκυρωμένες. Μέσα στο περίβλημα, υπάρχει το νουκλεοκαψίδιο, το οποίο σχηματίζεται από πολλαπλά αντίγραφα της πρωτεΐνης νουκλεοκαψιδίου (N), τα οποία συνδέονται με το θετικού νοήματος [(+) ή sense RNA] μονόκλωνο RNA γονιδίωμα σε μια συνεχή διαμόρφωση τύπου σφαιριδίων σε σειρά (σαν κομπολόι). Ο φάκελος διπλής στιβάδας λιπιδίων, οι πρωτεΐνες μεμβράνης και το νουκλεοκαψίδιο προστατεύουν τον ιό όταν βρίσκεται έξω από το κύτταρο ξενιστή.



Εικόνα 7: Φαινοτυπική περιγραφή του ιού

4.2 Μέγεθος του SARS-CoV-2

Οι κορωνοϊοί είναι μεγάλα πλειομορφικά σφαιρικά σωματίδια με προεξοχές βολβοειδών επιφανειών. Η μέση διάμετρος των σωματιδίων του ιού είναι περίπου 120 nm (0,12 μm). Η διάμετρος του φακέλου είναι περίπου 80 nm (0,08 μm) και οι ακίδες είναι περίπου 20 nm (0,02 μm). Ο φάκελος του ιού σε ηλεκτρονικές μικρογραφίες εμφανίζεται ως ένα ξεχωριστό ζεύγος πυκνών ηλεκτρονίων.

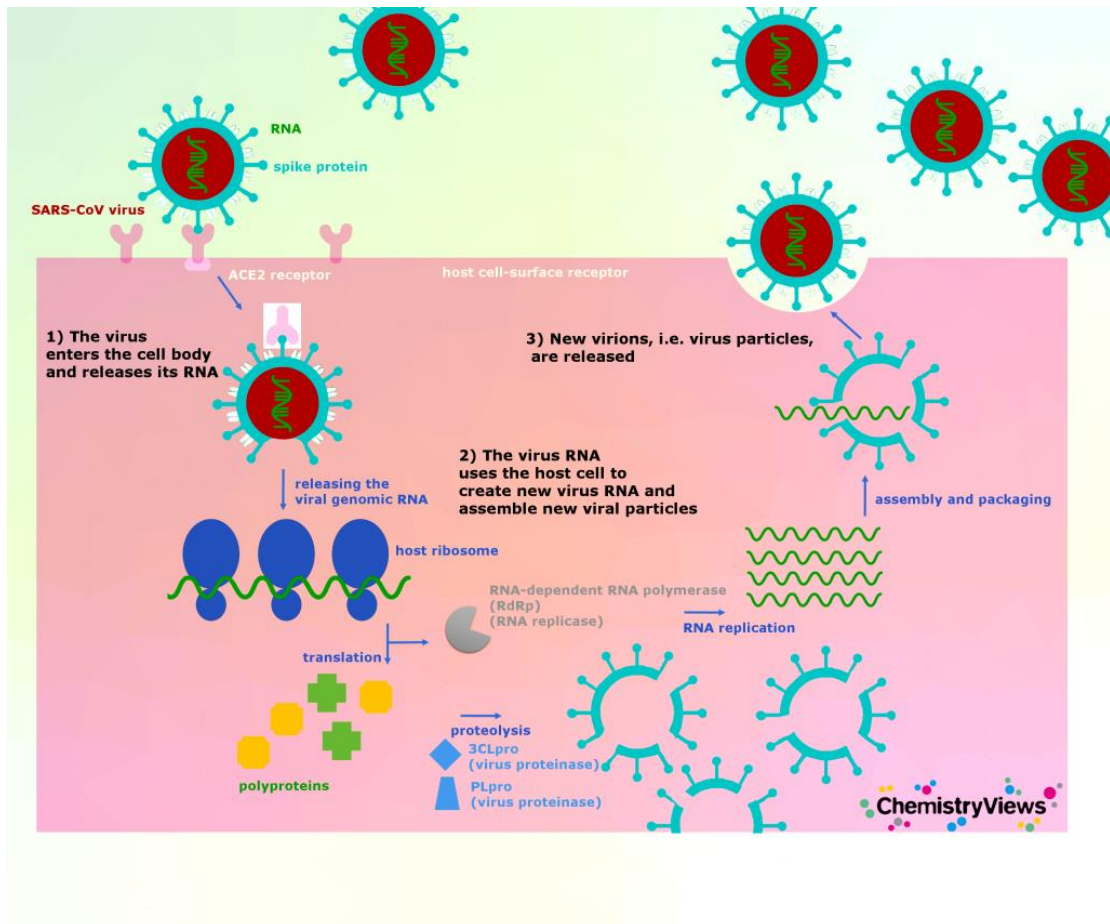
4.3 Διαδικασία της εισαγωγής SARS-CoV-2 στα κύτταρα, έναρξης μόλυνσης (INFECTION)

Οι ιικές και κυτταρικές πρωτεΐνες που κυρίως εμπλέκονται στην διαδικασία είναι η ACE-2, η TMPRSS2 και η SPIKE. Το ένζυμο μετατροπής της Αγγειοτενσίνης 2 είναι ένα ένζυμο (Μέταλλο καρβοξύ πεπτιδάση που συνδέεται στην εξωτερική επιφάνεια (κυτταρικές μεμβράνες των κυττάρων του πνεύμονα, των αρτηριών, της καρδιάς, του νεφρού και του εντέρου. Είναι ένα μεταλλοένζυμο που συνδέεται με ψευδάργυρο (Zn) και έχει εντοπιστεί στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών και άλλων κυττάρων. Ο SARS-CoV-2 χρησιμοποιεί το ένζυμο μετατροπής της αγγειοτενσίνης 2 (ACE2) ως υποδοχέα εισόδου στον ξενιστή. Η πρωτεΐνη Spike (S protein) είναι μια μεγάλη τύπου διαμεμβρανική πρωτεΐνη. Η TMPRSS2 είναι μια διαμεμβρανική πρωτεάση σερίνης. Είναι ένα ένζυμο το οποίο κωδικοποιείται από το γονίδιο TMPRSS2. Η πρωτεΐνη σχετίζεται με πολλές φυσιολογικές διεργασίες όπως η εξέλιξη, πήξη, φλεγμονή, γονιμότητα και ανοσία. Εμπλέκεται επίσης στην ενεργοποίηση των αναπνευστικών ιών (Antalis, et al, 2011, Choi, et al, 2009, Böttcher-Friebertshäuser, 2010 et al, Shulla, et al, 2011 Simmons, et al, 2013). Η TMPRSS2 χαρακτηρίζεται σαν

τύπου II είναι μια διαμεμβρανική πρωτεάση της σερίνης (TTSP) χαρακτηρίζεται από N τελικό διαμεμβρανικό τμήμα που σταθεροποιεί την πρωτεΐνη στην πλασματική μεμβράνη. Στο C τελικό άκρο είναι το καταλυτικό κέντρο της σερίνης. TMPRSS2 συντίθεται ως ζυμογόνο και ενεργοποιείται από αυτοκαταλυτική σχάση (Paoloni-Giacobino, et al, 1997, Afar ,et al ,2001).

4.4 Η μόλυνση απαιτεί υποδοχείς και συμπαράγοντες

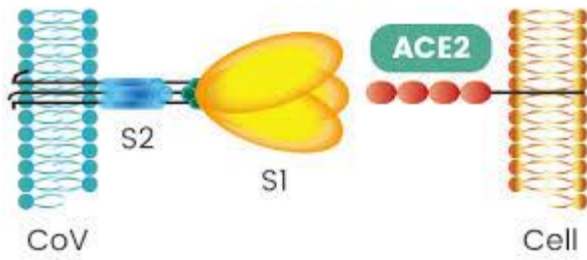
Η πρωτεΐνη ακίδα του (SPIKE) ιού προσκολλάται σε έναν υποδοχέα ACE2 στην κυτταρική επιφάνεια. Επιπλέον, ο ιός χρειάζεται έναν ή περισσότερους συμπαράγοντες για να μπορεί να διεισδύει στα κύτταρα. Πρώτα, η επιφανειακή πρωτεΐνη του Coronavirus που ονομάζεται SPIKE υποβάλλεται σε επεξεργασία μέσω πρωτεολυτικής διάσπασης από την πρωτεάση σερίνης TMPRSS2 της επιφάνειας κυττάρων. Αυτό φέρνει την πρωτεΐνη SPIKE στην ενεργή της κατάσταση στην οποία μπορεί να αλληλοεπιδράσει με τον υποδοχέα της κυτταρικής επιφάνειας και τη μεταλλοκαρβοξυπεπτιδάση ACE2. Αυτό στη συνέχεια οδηγεί στη σύντηξη της μεμβράνης του ιού με την κυτταρική μεμβράνη παρόμοια με μια φυσαλιδώδη εισαγωγή. Με τον τρόπο αυτό ο ιός εισέρχεται στο κύτταρο.



Εικόνα 8: Το ιογενές RNA γονιδίωμα εισέρχεται στο κύτταρο.

4.5 Ο ρόλος της SPIKE στην είσοδο του SARS-CoV-2

Η ακίδα πρωτεΐνης (S: SPIKE) των κοροναϊών ενσωματώνεται στον ιικό φάκελο και διευκολύνει την είσοδο του ιού στα κύτταρα στόχους. Για αυτό, η επιφανειακή μονάδα S1 συνδέεται με έναν κυτταρικό υποδοχέα ενώ η διαμεμβρανική μονάδα S2 διευκολύνει τη σύντηξη της ιικής μεμβράνης με μια κυτταρική μεμβράνη. Η σύντηξη μεμβράνης εξαρτάται από τη διάσπαση πρωτεΐνης S, από τις πρωτεάσες των κυττάρων ξενιστών στο S1 / S2. (Αγγελίδης Χ, Μια μοριακή ανάλυση του κοροναϊού SARS-COV-2 2020)



Εικόνα 9: Οι δύο σημαντικότερες περιοχές της ιϊκής πρωτεΐνης SPIKE, η S1 (περιοχή σύνδεσης στα κύτταρα) και η S2 (περιοχή σύντηξης)

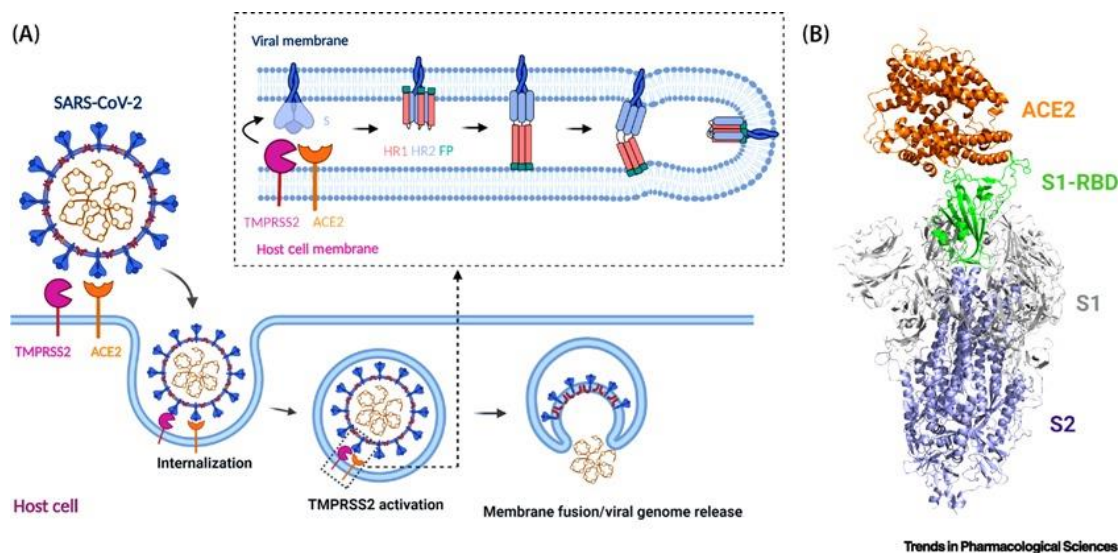
4.6 Η ενεργοποίηση της SPIKE γίνεται από πρωτεάσες

Η διάσπαση στην S1/S2 θέση είναι απαραίτητη για την SPIKE στα κύτταρα των πνευμόνων. Σε συντομία οι πρωτεΐνες SPIKE του κορωνοϊού ενεργοποιούνται από τις πρωτεάσες των κυττάρων υποδοχής. Μεταξύ των πρωτεασών οι οποίες εμπλέκονται στην ενεργοποίηση της SPIKE σε διαφορετικά είδη κυττάρων που έχουν προταθεί και οι παρακάτω: • Καθεψίνη L (προωθεί την είσοδο) • TMPRSS2 (προωθεί την είσοδο, επάγεται η μόλυνση) • Φουρίνη (προωθεί σύντηξη και την είσοδο) • Θρυψίνη • Ελαστάση

4.7 Για την ιική μόλυνση απαιτείται πρωτεόλυση της SPIKE και του υποδοχέα ACE2

Η πρωτεολυτική διάσπαση του SARS-S (SPIKE) είναι απαραίτητη για τη μολυσματική είσοδο του SARS-CoV-2 Ένα πρόσθετο επίπεδο πολυπλοκότητας έχει προστεθεί στο θέμα SPIKE / πρωτεάση από παρατηρήσεις που δείχνουν ότι όχι μόνο η SPIKE αλλά και ο υποδοχέας της, ACE2, υφίστανται πρωτεολυτική επεξεργασία. Το ACE2 είναι γνωστό ότι αποβάλλεται στον εξωκυτταρικό χώρο κατά τη διάσπαση από το σύμπλοκο ADAM17 / TACE. Η ADAM metallopeptidase domain 17

(ADAM17), επίσης ονομάζεται TACE (tumor necrosis factor- α -converting enzyme), είναι ένα 70-kDa ένζυμο το οποίο ανήκει στην οικογένεια της πρωτεΐνης ADAM που συνίσταται από δισιντεγκρίνες (disintegrins) και μεταλλοπρωτεΐνάσες (metalloproteases). Ένας υποδοχέας που ονομάζεται ένζυμο μετατροπής αγγειοτενσίνης 2 (ACE2), ο οποίος βοηθά τον ιό να συνδεθεί με κύτταρα, και ένα ένζυμο που ονομάζεται πρωτεάση διαμεμβρανικής σερίνης τύπου II (TMPRSS2). Το ένζυμο αυτό μεσολαβεί στη μόλυνση του κυττάρου. Έχει βρεθεί να εκφράζεται σε μια μικρή μειονότητα ανθρώπινων αναπνευστικών και εντερικών κυττάρων. Στηριζόμενοι στα αποτελέσματα της διεθνούς βιβλιογραφίας προτείνεται ένα υποθετικό μοντέλο για την είσοδο του κορωνοϊού στα κύτταρα με βάση την ιϊκή SPIKE και τις 2 κυτταρικές ACE και TMPRSS2 (Εικόνα 10). Υπό το προτεινόμενο μοντέλο με τον ACE2 και το TMPRSS2 αναμένουμε οι καλύτεροι ξενιστές, να είναι κύτταρα που εκφράζουν υψηλά επίπεδα και των δύο πρωτεϊνών (Αγγελίδης Χ, 2020).



Εικόνα 10: Σχηματική αναπαράσταση της εισαγωγής του ιού στα κύτταρα

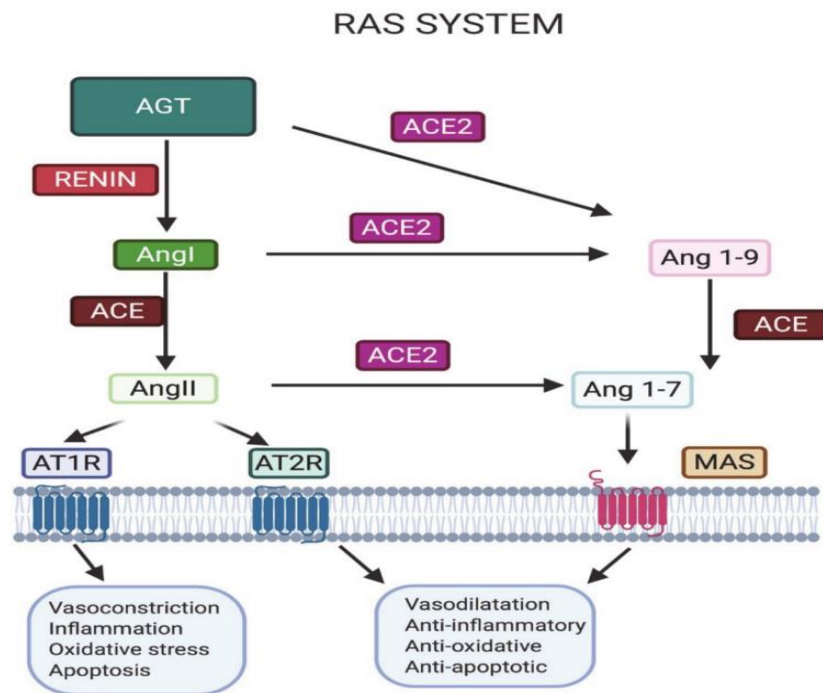
Οι υποδοχείς του ACE2 εκφράζονται στα επιθηλιακά κύτταρα των πνευμόνων, του λεπτού εντέρου, των νεφρών, της καρδιάς και των αγγείων. Είναι γνωστό ότι το ACE2 προκαλεί αγγειοδιαστολή και καρδιονεφρική προστασία οπότε ουσίες που προάγουν τη δράση του ACE2 (μετατρεπτικό ένζυμο) δοκιμάζονται και ως πιθανά αντιυπερτασικά φάρμακα (Malle et al,2020,Ou, et al,2020). Το ένζυμο μετατροπής της Αγγειοτενσίνης 2, είναι ένα ένζυμο (Μεταλλοκαρβοξυπεπτιδάσης) που συνδέεται στην εξωτερική επιφάνεια (κυτταρικές μεμβράνες), των κυττάρων του πνεύμονα, των αρτηριών, της καρδιάς, του νεφρού, του εντέρου. Αυτό το ένζυμο, συνδέεται με τον ψευδάργυρο(Zn). Ο SARS-CoV-2 (COVID-19) χρησιμοποιεί τον ACE2 ως κυτταρικό υποδοχέα, για την είσοδο του στα κύτταρα. Ο υποδοχέας, έχει εντοπιστεί στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών και των άλλων κυττάρων του ανθρώπου, που μέσω της ακίδας πρωτεΐνης spike (S), στο ACE2 προκαλεί πνευμονία ή μυοκαρδίτιδα (Malle, et al, 2020, Ou, et al,2020). Σχετικά με τη δράση του ιού στον ACE2, έχειδειχθεί ότι, η μείωση της δράσης του ACE2 στους πνεύμονες λόγω της λοίμωξης ενεργοποιεί τοπικά το σύστημα ρενίνης-αγγειοτενσίνης και την είσοδο ουδετερόφιλων, με αποτέλεσμα την επιτάχυνση και την περαιτέρω ενεργοποίηση της φλεγμονής. Σε μικρή μελέτη, ασθενείς με SARS-CoV2 εμφάνιζαν υψηλά επίπεδα Ang II τα οποία συσχετίστηκαν με το ολικό φορτίου ιού, καθώς και με το βαθμό τραυματισμού του πνεύμονα (Hoffmann, et al,2020) Η χορήγηση ανασυνδυσμένου ACE2 μπορεί να μειώσει τη διεργασία βλάβης στον πνεύμονα ασθενών, καθώς και να επιτύχει την μείωση των τιμών της Ang II (Malle, et al,2020). Η διαταραχή των επιπέδων του ACE2 στην καρδιά, του λόγω του SARS-CoV-2 συμβάλει σε μυοκαρδιακή βλάβη και σε αιμοδυναμική επιβάρυνση των ασθενών. Σε αυτό το πλαίσιο, γίνονται μελέτες με χορήγηση ανασυνδυσμένου ACE2, όπως συμβαίνει και στα αντιυπερτασικά φάρμακα .

4.8 Το σύστημα ρενίνης -αγγειοτενσίνης και το ανδρικό αναπαραγωγικό σύστημα

Ο SARS COV-2 έχει 4 δομικές πρωτεΐνες (spike) S, φάκελος (E), μεμβράνη (M) και νουκλιοεοτίδιο (N). Η επιφανειακή υπομονάδα (S1) είναι μια γλυκοπρωτεΐνη, που είναι χαρακτηριστική για την μόλυνση και είναι υπεύθυνη για τον τρόπο δράσης του ιού δεσμεύοντας τους υποδοχείς ACE2 (Mathewson, et al,2008). Για να επιτύχει την επιδρομή ο ιός χρησιμοποιεί την πρωτεΐνη S που ενισχύεται, από την κυτταρική πρωτεάση και την διαμεμβρανική πρωτεάση της σερίνης 2 (TMPRSS2) που σπάει τις θέσεις S1/S2 και S2 θέσεις. Η S2 υπομονάδα ενεργοποιεί την σύντηξη με τον ιό από την μεμβράνη του κυττάρου δέκτη. Η εισαγωγή του ιού γίνεται με την διαδικασία της ενδοκυττάρωσης (Hoffmann, et al,2020, Pascolo, et al,2020). Οι κύριοι παράγοντες ACE2 και TMPRSS2 αποτελούν τα κύρια μόρια πρόσδεσης του ξενιστή και αποτελούν στόχοι για την δράση του SARS COV-2. Υπάρχουν και άλλοι παράγοντες υπό μελέτη (Malle, et al,2020) που έχουν παρατηρηθεί in vitro, όπως είναι, διαμεμβρανικοί παράγοντες σερίνης TMPRSS4 11A, 11E και βοηθούν τον SARS COV-2 να συντηχθεί με την S πρωτεΐνη της κυτταρικής μεμβράνης (Ou, et al,2020). Η πρωτεΐνη φουρίνη προωθεί την σύντηξη και την είσοδο, συμβάλλοντας με αυτό τον τρόπο την προ-ενεργοποίηση του ιού (Hoffmann, et al,2020, Zurin, et al,2020). Στον πνεύμονα η μόλυνση από τον SARS-CoV-2, προκαλεί την μείωση της λειτουργίας των ACE2 υποδοχέων, ωθώντας το σύστημα ACE/αγγειοτενσίνης (Ang)II/Ang II τύπου 1 υποδοχέα (AT1R) συστήματος αντί ACE 2/Ang 1-7/Mas υποδοχέα (Mas) συστήματος (εικόνα 11). Τα αποτελέσματα της ενεργοποίησης AT1R, είναι η φλεγμονώδης απάντηση, στους ιστούς στόχους και στον τραυματισμό του παρεγχύματος (Kai, et al, 2020). Παρότι η κλασική εκδήλωση της SARS COV-2 σχετίζεται, με το αναπνευστικό σύστημα, δημιουργεί συστηματικές ανοσολογικές

απαντήσεις και έχει επιπτώσεις στο συκώτι (Cai, et al, 2020) νεφρούς (Durvasula, et al, 2020) στο καρδιαγγειακό σύστημα(Long, et al, 2020) στον σπλήνα, στους λεμφαδένες, στον εγκέφαλο, στους όρχεις και στο δέρμα(Duarte-Neto, et al, 2020). Όλα τα επηρεασμένα όργανα και οι ιστοί έχουν υψηλά επίπεδα ACE και TMPRSS4 (Uhlen, et al, 2015). Η μετάδοση του SARS-COV-2 γίνεται μέσω της αναπνευστικής οδού μέσω των σταγονιδίων. Υπάρχουν και ασυμπτωματικά άτομα, που αριθμούν ποσοστό, περίπου 45% από τις περιπτώσεις SARS-CoV-2. Κυρίως έχει επίδραση στους ενηλίκους και στους μεγάλους ανθρώπους. Επίσης σοβαρότερη επίπτωση και μεγαλύτερη θνησιμότητα έχει, στους άντρες. Παρατηρείται μια προδιάθεση στο φύλο, αλλά αυτό το ποσοστό μπορεί να διαφοροποιηθεί (Li, et al, 2020, Yang, et al, 2020). Η διαφοροποίηση στα φύλα ενδεχομένως να οφείλεται στους υποδοχείς ACE2, που εκφράζονται περισσότερο στις γυναίκες από ότι στους άντρες. Πιθανά, να εξαρτάται από την ρύθμιση, της παραγωγής οιστρογόνων(Liu, et al, 2010) αλλά και στη θέση μεθυλίωσης του προμώτορα του ACE2 ανάμεσα στα δυο φύλα. Στην πραγματικότητα στο χρωμόσωμα Xp22,2 χρωμοσωμική περιοχή μπορεί να γίνει η απενεργοποίηση του ACE2 στο X χρωμόσωμα. Από την άλλη η συγκέντρωση TMPRSS 2 είναι μεγαλύτερη στους άντρες από ότι στις γυναίκες. Επιπλέον μελέτες απέδειξαν, ότι τα οιστρογόνα μπορούν να ξεπεράσουν το οξειδωτικό στρές. Η υπερλειτουργία του ACE2 στις γυναίκες μπορεί να προσφέρουν προστασία, στην καταστροφή των ιστών(Bukowska, et al, 2017, Gagliardi et al, 2020). Επιπλέον υψηλά επίπεδα TMPRSS και η μειωμένη ενεργότητα της πρωτεάσης στους άνδρες μπορεί να συνεισφέρει στην επιβράδυνση του ιού (Song, et al, 2020). Η έρευνα επικεντρώνεται στον μηχανισμό που επηρεάζει ο SARS COV-2 στο αναπαραγωγικό σύστημα. Το ενδιαφέρον εντοπίζεται στο γονίδιο ACE2 σε αρχική μελέτη Cao et al (Cao, et al, 2020) που ερεύνησαν τους γενετικούς πολυμορφισμούς του ACE2 σε

διαφορετικούς πληθυσμούς.Οι ερευνητές κατέληξαν, ότι δεν είχε διαφορετική επίπτωση στα αλληλόμορφα, στους υποδοχείς του ACE2 .Σε αντίθεση Hussain et al (Hussain,et al, 2020) προσδιόρισε δυο ACE2 αλληλία, με χαμηλή ικανότητα δέσμευσης της spike πρωτεΐνη υποδεικνύοντας χαμηλή αντίσταση στην μόλυνση. Η σπουδαιότητα του συστήματος RAS ,αποτελεί έναν καταρράκτη, που διαμέσω των υποδοχέων ρυθμίζει την λειτουργία των νεφρών, ελέγχει την πίεση του αίματος και του μυϊκού τόνου κτλ. Η ρενίνη ,είναι πρωτεολυτικό ένζυμο, που συγκεντρώνεται στα κύτταρα του ήπατος και απελευθερώνεται σε απάντηση στα διαφορετικά ερεθίσματα όπως η μείωση της πίεσης του αίματος και της συγκέντρωσης του νατρίου. Με την ενεργοποίηση του αγγειοτενσογόνου, (AGT) από την ρενίνη, παράγεται η Ang I, και μετατρέπεται σε Ang II. Ο ρόλος των Ras υποδοχέων,στο ανδρικό αναπαραγωγικό σύστημα, είναι υπό διερεύνηση. Πλασματικό Ras απομονώθηκε από το ανδρικό αναπαραγωγικό σύστημα ,μέσω του αιματοορχικού φραγμού. Η σύνθεση των Ras παραγόντων είναι τοπική όπως στον προστάτη, στους όρχεις και στα σπερματοζωάρια (Leung, et al,2003). Η ρενίνη παράγεται από τα κύτταρα Leyding από όπου η Ang I, και Ang II ανιχνεύονται. Οι ορχικοί Ras υποδοχείς φαίνεται ότι σχετίζονται με την ικανότητα της αναπαραγωγής(Leung, et al,2003, Vinson, et al,1996).

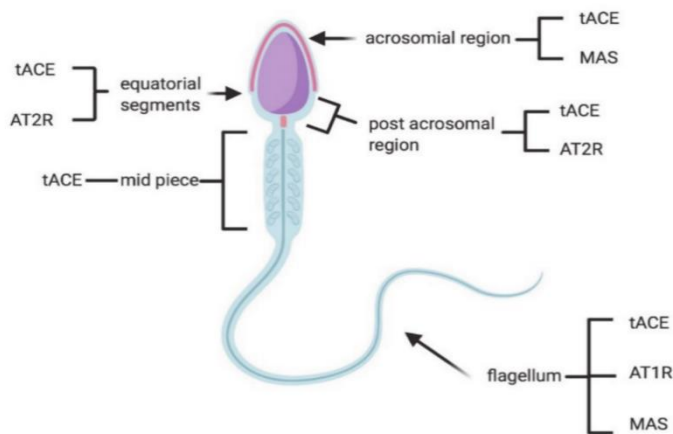


Εικόνα 11: Ο ρόλος της ρενίνης -αγγειοτενσίνης στο σύστημα Ras (Microorganisms 2020, 8, 1492 21 of 22)

4.9 ACE 2 στο ανδρικό αναπαραγωγικό σύστημα

Το ένζυμο μετατροπής της αγγειοτενσίνης 2 (ACE2), είναι μια μεμβρανική πρωτεΐνη, που αποτελείται από 805 αμινοξέα, με καταλυτικό κέντρο με ενεργότητα, Zn μεταλλοπεπτιδάσης (Fan, et al, 2020, Hikmet, et al, 2020, Kuba, et al, 2010, Li, et al, 2020, Zhang, et al, 2020, Valdés, et al, 2006). Εκφράζεται στην καρδιά, πνεύμονες και στους όρχεις. Έχει δυο ισομορφές την σωματική (sACE) και την ορχική (tACE). Οι υποδοχείς (sACE) βρίσκονται στα κύτταρα Leyding, στον προστάτη, στο επιθήλιο της επιδυμίδας (Pauls, et al, 2003). Ενώ (tACE) αποκλειστικά εντοπίζονται, στα γαμετικά κύτταρα, ειδικότερα σύστημα Golgi των σπερματίδων στα διαφορετικά της σπερμιογένεσης, στην ακροσωμική περιοχή, στην μεσαία περιοχή και στην ουρά των σπερματοζωαρίων. Ειδικότερα, η κινητικότητα του σπέρματος σχετίζεται, αρνητικά

με το ποσοστό tACE θετικών σπερματοζωαρίων ,όπως επίσης και με τον αριθμό tACE μορίων ανά σπερματοζωάριο. Είναι γνωστό ,ότι οι υποδοχείς tACE, απενεργοποιούν την βραδυκίνη (Ehlers, et al,1989)που αποτελεί ,τον διεγέρτη της κίνησης των σπερματοζωαρίων. Απουσία ή μειωμένη έκφραση των tACE, στα σπερματοζωάρια, προκαλεί χαμηλή ικανότητα γονιμοποίησης, ακόμη και αποτυχία.(Li, et al, 2014). Επιπρόσθετα ,ο ίδιος υποδοχέας tACE, συσχετίζεται και με την ποιότητα των εμβρύων (Tebbs, et al, 1999).



Εικόνα 12: Έκφραση των RAS σε διαφορετικές θέσεις στα σπερματοζωάρια

(*Microorganisms* 2020, 8, 1492 21 of 22)

4.10 Οι υποδοχείς AT1R και AT2R

Οι υποδοχείς AT1R και AT2R, έχουν την δράση των G πρωτεϊνών (George et al,2010) και έχουν στόχο την Ang II. Οι AT2R προσδέονται στην Ang II,ενώ έχουν μικρότερη συγγένεια από AT1R .Σε μελέτες ,αναφέρεται ότι σήματα από μείωση της λειτουργίας των AT2R ,έχουν ως αποτέλεσμα, την αύξηση της ενεργοποίησης AT1R ,που έχουν επίδραση στην διαφοροποίηση και στην απόπτωση(Volpe,et al, 2003).Οι υποδοχείς AT2R βρίσκονται στον προστάτη, στην επιδυμίδα και στο ανθρώπινο

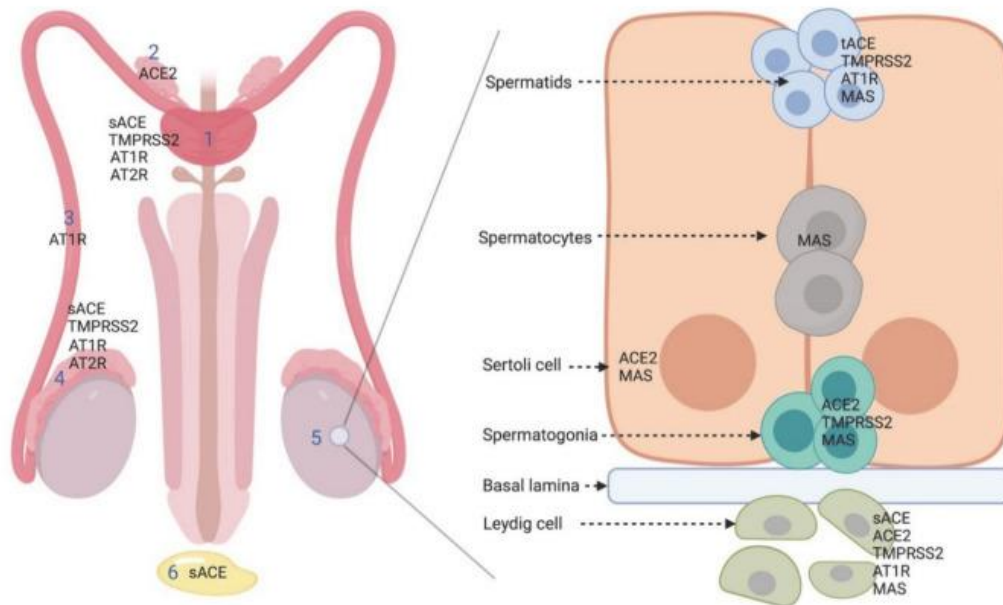
σπέρμα που είναι εντοπισμένο ισημερινό σημείο της κεφαλής και στην ακροσωμική περιοχή στα σπερματοζώαρια (Leung, et al, 2003, Dinh, et al, 2001, Gianzo, et al, 2016). Τα επίπεδα των υποδοχέων AT2R φαίνεται ότι σχετίζονται θετικά με την συγκέντρωση του σπέρματος και με την κινητικότητα. Επίσης, σχετίζονται με την κίνηση του σπέρματος και θεωρείται ότι αποτελούν σημαντική ένδειξη για την ποιότητα του σπέρματος (Gianzo, et al, 2016). Οι AT1R υποδοχείς εμφανίζονται, κατά την ανάπτυξη των σπερματίδων και στην ωρίμανσή της ουράς των σπερματοζωαρίων (Sabeur, et al, 2000, Vinson, et al, 1995, Leung, et al, 1997, Gur, et al, 1998, Wennemuth, et al, 1999). Έμφανίζονται επίσης, στα κύτταρα Leyding, στη επιδυμίδα, και στον προστάτη και σχετίζονται με την λειτουργία του σπέρματος, την γονιμότητα, στην ωρίμανση, ενδυνάμωση του σπέρματος. (Pan, et al, 2013, Leung, et al, 2003, Sabeur et al, 2000).

4.11 MAS Υποδοχείς

Οι υποδοχείς MAS έχουν την δράση, G -πρωτεϊνών υποδοχέων, είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, οι οποίες διαθέτουν περιοχές, για την πρόσδεση των συνδετών στην εξωτερική επιφάνεια της μεμβράνης. Η Ang 1-7 προσδέεται, παράγεται η ACE2 που όταν ενεργοποιηθεί, αντιτίθεται ή υποστηρίζει πολλά από τα ερεθίσματα που προέρχονται από την ενεργοποίηση της AT1R και AT2R αντίστοιχα (Young, et al, 1986, Santos, et al, 2003, Santos, et al, 2007).

Η Ang 1-7 έχει ανιχνευτεί, στα κύτταρα Leyding, στο κυτταρόπλασμα, στα κύτταρα Sertoli και στα πρώιμα σπερματοκύτταρα. (Εικόνα 13) (Reis, et al, 2010). Η παρουσία των λειτουργικών MAS υποδοχέων, εντοπίζονται στα ανθρώπινα σπερματοζώαρια. Πιο συγκεκριμένα, στην κεφαλή, στην ακροσωμική περιοχή, στην ουρά και

συμμετέχουν στην ρύθμιση της κινητικότητας του σπέρματος στους υγιείς και στους αζωοσπερμικούς.



Εικόνα 13: Στα αριστερά: το σύστημα ρενίνη-αγγειοτενσίνης (RAS) σε ανθρώπινα αρσενικά αναπαραγωγικά συστήματα. Στα δεξιά: Το σύστημα RAS σε κυτταρικό επίπεδο σε σπερματίδες, σπερματοκύτταρα, κύτταρα Sertoli, σπερματογονία, κύτταρα Leydig. (*Microorganisms* 2020, 8, 1492 21 of 22).

4.12 TMPRSS2 και ανδρικό αναπαραγωγικό σύστημα

Όπως έχουμε ήδη αναφέρει, για την εισαγωγή του ιού απαιτείται, ο παράγοντας TMPRSS2. Η έκφραση του TMPRSS2 ,στους όρχεις είναι αμφιλεγόμενη. Ο Lin et al δεν παρατήρησε την έκφραση του παράγοντα στους όρχεις. Σε αντίθεση ο Lucas (Lucas, et al,2008), ανέφερε την παρουσία τους στα κύτταρα Leydig και στην επίδιδυμίδα. Χρησιμοποιώντας την βάση (Human Protein Atlas, FANTOM5,

GETx)(Uhlen, et al, 2015, Lizio, et al,2019, Lonsdale, et al,2013) ανίχνευσε,μικρή συγκέντρωση του παράγοντα στους όρχεις. Σε πρόσφατες μελέτες, όπου χρησιμοποιήθηκαν scRNA-seq (single cell RNA sequencing workflow), εντοπίστηκαν σε μικρή συγκέντρωση στα σπερματογόνια και στις σπερματίδες (Wang, et al, 2020).Άλλες μελέτες περιγράφουν μορφές, του TMPRSS2 στο ανθρώπινο σπέρμα να αποτελούν συστατικά του προστατοσώματος, που ίσως να έχει ρόλο στη ρύθμιση του σπέρματος (Lucas, et al,2008,Chen, et al,2010).Η TMPRSS2 είναι μια πρωτεΐνη ευρέως μελετημένη στον καρκίνο του προστάτη. Η μεταγραφή TMPRSS2 ρυθμίζει τις ορμόνες και απορυθμίζεται στις σηματοδοτικές πορείες στον καρκίνο του προστάτη(Vaarala, et al, 2000, Lucas, et al, 2008, Afar, et al, 2001, Lin, et al, 1999, Ko, et al, 2015).

4.13 SARS-CoV-2 η ανίχνευση στο αναπαραγωγικό σύστημα και οι επιδράσεις στην γονιμότητα.

Τα αποτελέσματα SARS-CoV ,στο ανθρώπινο αναπαραγωγικό σύστημα, δεν έχει διασαφηνιστεί πλήρως, αν και υπάρχουν παλαιότερες μελέτες από άλλα στελέχη του κορωνοϊού.Σε κάποιες μελέτες, ασθενείς που μολύνθηκαν, από τον SARS-CoV-2 παρουσίασαν πολλές επιπλοκές, στα αναπαραγωγικά όργανα. Ανέφεραν ότι, ο ιός, επιδρά κατευθείαν στους όρχεις διαμέσου ACE 2 υποδοχέων.Πιο συγκεκριμένα η έρευνα, με την μέθοδο in situ υβριδισμό και ανοσοιστοχημεία απέδειξαν απευθείας καταστροφή στους όρχεις ,από τον ιό(Zhao, et al,2003).Ο Gu et al ανέφερε ότι σε 8 ασθενείς που είχαν πεθάνει από SARS-CoV -2 δεν παρατήρησαν ίχνη ιικού RNA σε ορχικό ιστό. Το ίδιο συμπέρασμα παρατήρησε και Ding et al (Ding, et al, 2020, Pan, et al, 2020). Σε άλλη μελέτη, που περιλαμβάνει 11 ασθενείς που ανιχνευτήκαν θετικοί

με την μέθοδο RT-PCR για SARS-CoV-2 και μετά από 30-40 ημέρες χωρίς συμπτώματα ελήφθησαν δείγματα από τους όρχεις και αναλύθηκαν με οπτικό μικροσκόπιο και δεν παρατηρήθηκε παρουσία ιού (viral particles). Παρατηρήθηκαν, δυο περιπτώσεις μικρών αλλοιώσεων και πέντε περιπτώσεις ενδιάμεσων αλλοιώσεων και τέσσερις περιπτώσεις σοβαρών αλλοιώσεων στην μορφολογία στα ημιπορώδη σωληνάκια, αλλοιώσεις στα κύτταρα Sertoli, κύτταρα Leyding όμως η σπερματογένεση δεν επηρεάστηκε. Το ερώτημα που δημιουργήθηκε είναι, εάν αυτές οι αλλοιώσεις προέρχονται από την δράση του ιού ή από επιπλοκές που δημιουργούνται από άλλους παράγοντες όπως, για παράδειγμα, ο υψηλός πυρετός (Kim, et al, 2020). Σε μια άλλη έρευνα εξετάστηκαν οι παράμετροι της ποιότητας του σπέρματος, όπως συγκέντρωση, αριθμός σπερματοζωαρίων, κινητικότητα, στις τρεις κατηγορίες ασθενών, όπως σε ασθενείς, σε ασθενείς υπό ανάρρωση και σε υγιείς. Η μέτρια λοίμωξη σχετίζεται με την αλλοίωση της ποιότητας του σπέρματος. Μπορεί να οφείλεται στην επίδραση, με τον SARS-CoV-2 αλλά και στη σοβαρότητα των συμπτωμάτων που σχετίζεται με το ιικό φορτίο στην οξεία φάση της νόσου. Οι ερευνητές τονίζουν, την επίδραση των φαρμάκων, στις ποιοτικές παραμέτρους του σπέρματος (Holtmann, et al, 2020). Είναι γνωστό, ότι ο πυρετός επιδρά, στην σπερματογένεση. Έχει διαπιστωθεί, ότι η ανδρική γονιμότητα (συγκέντρωση και κινητικότητα) μειώνεται σε 72-90 ημέρες, μετά την λοίμωξη αυτή, αλλά, η συσχέτιση δεν έχει τεκμηριωθεί ακόμη (Jung, et al, 2007). Επιπλέον, η ενεργοποίηση των κυτταροκινών και της φλεγμονής που οφείλονται στις σοβαρές επιπλοκές της νόσου και έχουν αρνητική επίδραση στην σπερματογένεση και στην επίδραση στον αιματορχικό φραγμό (Verma, et al, 2020). Τα μέχρι τώρα δεδομένα υποδηλώνουν ότι ο άξονας ACE2 / Ang 1-7 / MAS ,παίζει ρόλο στην σπερματογένεση (Pan, et al, 2013) αν και ο υποτιθέμενος μηχανισμός δράσης του ιού

στα βλαστικά κύτταρα είναι άγνωστος. Η μείωση του διαθέσιμου ACE2,στις φυσιολογικές λειτουργίες είναι πιθανό, να έχει ως αποτέλεσμα μείωση του άξονα ACE2 / Ang 1-7 / MAS, με συνέπεια την εξασθένηση της σπερματογένεσης όπως συμβαίνει και στα υπογόνιμα άτομα (Reis,et al,2010). Σε πειράματα που πραγματοποιούνται σε ποντίκια εξετάζεται η έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στη μιτοχονδριακή λειτουργία και στην σπερματογένεση στους όρχεων (Leal, et al,2009). Πράγματι, η έκκριση ανιόντων και υγρών από το επιδιδυμικό επιθήλιο ελέγχεται, από το σύστημα του RAS και έχει επίδραση στη λειτουργικότητα του συστήματος, επηρεάζοντας την ωρίμανση του σπέρματος και εξώθησή του (Leung, et al,1997) Τα επιδιδυμικά κύτταρα δημιουργούν ένα εξειδικευμένο μικροπεριβάλλον, του αυλού για την ανάπτυξη του σπέρματος, όπου η σωστή ιοντική συγκέντρωση, που χαρακτηρίζεται από χαμηλό επίπεδο των Na^+ , Cl^- και HCO_3^- , είναι σημαντική για τη ρύθμιση του PH,που συμβάλλει στη διατήρηση των σπερματοζωαρίων σε ακινησία. (Zhou, et al, 2018).Θα ήταν ενδιαφέρον να ερευνηθεί εάν και πώς αυτή η ισορροπία αλλάζει κατά τη διάρκεια της λοίμωξης. Τέλος, μια μελέτη παρέχει τα πρώτα στοιχεία,σχετικά με την αλλαγή των ορμονών, που σχετίζονται με το φύλο υπό SARS-CoV-2. Μετά τη σύγκριση της ορμόνης διέγερσης των ωοθυλακίων (FSH), της ωχρινοτρόπου ορμόνης (LH),επίπεδα τεστοστερόνης (T), προλακτίνης, ορμόνης AMH και οιστραδιόλης (E2) στο SARS-CoV-2 στους γόνιμους άνδρες ελέγχου, βρήκαν σημαντική αύξηση των επιπέδων LH και μειωμένη αναλογία T: LH, που υποδηλώνει εξασθένηση της λειτουργίας των όρχεων (Ma, et al, 2020).

4.14 Η επίδραση του SARS-CoV-2 στο ανδρικό αναπαραγωγικό σύστημα, διαμέσου του εγκεφάλου, των οξειδωτικών παραγόντων – ορμονική σύνδεση

Ο SARS-CoV-2, όπως και οι περισσότεροι ιοί εισέρχονται στο ανθρώπινο σώμα μέσω της ρινικής και από του στόματος οδούς, όπως επίσης και ιογενή σωματίδια μπορεί να σπάσουν το αίματοεγκεφαλικό φράγμα. Έχει αναφερθεί ότι τα εγκεφαλικά κύτταρα (νευρογλοιακά κύτταρα και νευρώνες) ,εκφράζουν τους υποδοχείς ACE2, καθιστώντας τους, έναν πιθανό στόχο και μπορεί να προκαλέσουν νευρωνικό θάνατο από τον SARS - CoV - 2.

Το κεντρικό νευρικό σύστημα, παίζει κρίσιμο ρόλο στον ενδοκρινικό έλεγχο και τη σπερματογένεση. Ο άξονας υποθαλάμου-υπόφυσης- όρχεων HPG, ασκεί ζωτικό ρόλο στην αναπαραγωγή και μπορεί να επιδράσει στην αναπαραγωγική ικανότητα, μέσω των ορμονών. Η ορμόνη απελευθέρωσης γοναδοτροπίνης (GnRH) που εκφράζεται από νευρώνες ,όπως ο υποθάλαμος που εκκρίνει GnRH και ενεργοποιεί την απελευθέρωση της ορμόνης διέγερσης των ωοθυλακίων (FSH) και της ωχρινοτρόπου ορμόνης (LH) από την υπόφυση. Χαμηλό επίπεδο (GnRH), προκαλεί μείωση της FSH και LH, με αποτέλεσμα τη μειωμένη λειτουργία των κυττάρων Sertoli και Leydig. Οι Ma et al. έδειξαν ότι τα SARS-CoV-2 ασθενείς, είχαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα επίπεδα LH στον ορό, αλλά μειωμένα επίπεδα τεστοστερόνης / LH και FSH από ό, τι σε υγιείς άνδρες, υποδηλώνοντας πιθανό υπογοναδισμό. Συνολικά, ασθενείς με SARS-CoV-2 βρέθηκαν να παρουσιάζουν μειωμένη αναλογία τεστοστερόνης / LH, υποδεικνύοντας πιθανή υποκλινική βλάβη. Επιπλέον, ενεργοποίηση του HPG, και κατά συνέπεια οι αυξομειώσεις, στις συγκεντρώσεις ορμονών παίζουν κρίσιμο ρόλο στην ποιότητα του σπέρματος. Από την άλλη, στην περίπτωση του SARS-CoV-2, το άγχος και οι αρνητικές διαθέσεις, όπως η κατάθλιψη και το άγχος, σχετίζονται με

χαμηλότερη έκκριση των ανδρικών ορμόνων, υψηλότερη έκκριση κορτιζόλης και προλακτίνης, με συνέπεια τις μεταβολές στην συγκέντρωση, του σπέρματος και στον υψηλότερο κατακερματισμό DNA σπέρματος, που είναι ικανά να προκαλέσουν δυσλειτουργία.Επομένως, εκτός από τις «άμεσες» επιδράσεις του στους όρχεις, ο SARS CoV-2 μπορεί επηρεάζουν έμμεσα τη γονιμότητα μέσω του κεντρικού νευρικού συστήματος.

4.15 SARS-CoV-2 και φλεγμονή

Οι ασθενείς με COVID-19 που είχαν ξαφνική επιδείνωση της νόσου μετά την έναρξη, εμφάνισαν χαρακτηριστικά φλεγμονής, όπως χαμηλά επίπεδα λεμφοκυττάρων (κύτταρα NK), υψηλότερες τιμές C-αντιδρώσας πρωτεΐνης (CRP) και προφλεγμονωδών κυτταροκινών όπως οι κυτταροκίνες (IL-6, TNF- α , IL-8) (Mahalaxmi, et al, 2020). Έτσι, έχουμε την υπερβολική και ανεξέλεγκτη απελευθέρωση προ-φλεγμονωδών παραγόντων ,όπως η ιντερφερόνη- γ . Η ιντερφερόνη - γ (INF- γ) ,παράγεται από τα CD8 δραστικά T κύτταρα, η οποία μπορεί να εμποδίσει την ιική αντιγραφή. Τα βοηθητικά και τα φλεγμονώδη T κύτταρα, απελευθερώνουν διαφορετικές, αλλά εν μέρει αλληλεπικαλυπτόμενες ομάδες κυτταροκινών, οι οποίες καθορίζουν τις ξεχωριστές δράσεις τους στο ανοσολογικό σύστημα.Τα T_{H0}(ανώριμο δραστικό T κύτταρο) από τα όποια φαίνονται, να προέρχονται και άλλες λειτουργικές κατηγορίες που εκκρίνουν επίσης κυτταροκίνες και μπορεί να έχουν κάποιες δράσεις,τα βοηθητικά T_{H2} T κύτταρα εκκρίνουν την IL-4, IL-5 IL-6, IL-10 και όλες ενεργοποιούν τα B κύτταρα. Τα φλεγμονώδη T_{H1} κύτταρα εκκρίνουν την INF- γ και τον παράγοντα νέκρωσης των όγκων- α (tumor necrosis factor TNF- α),που αποτελούν, τις βασικές κυτταροκίνες ενεργοποίησης των μακροφάγων και την λεμφοτοξίνη, η οποία είναι άμεσα κυτταροτοξική, για μερικά

κύτταρα. Η ανάπτυξη TH2 κλώνων διεγείρεται ,από την IL-4, ενώ η ανάπτυξη των TH1 και των TH0 κυττάρων, είναι βασικά ή αποκλειστικά οφειλόμενη, στην IL-2.

Η IL-4 παράγεται από την TH2, συμβάλλοντας έτσι, στην ενεργοποίηση, στην αύξηση της απόκρισης μέσω της IgG IgE και κατά συνέπεια έχουμε επαγωγή της MHC τάξεως II. Η επαγωγή συμβάλλει, στην αύξηση και επιβίωση των T κυττάρων και αναστέλλει την ενεργοποίηση των μακροφάγων. Αυξημένη παραγωγή IL-4 ,εμφανίζεται καθ 'όλη τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Η προγεστερόνη, έχει αποδειχθεί ότι προκαλεί το ίδιο, και τόσο η IL-4 όσο και η προγεστερόνη έχουν βρεθεί ότι δρουν μαζί, αναστέλλοντας την ανταπόκριση, που προκαλείται από TH1 κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης (Chatterjee, et al,2014). Η IL-4 μειώνει την παραγωγή TNF-α, IL-1, προσταγλανδίνης E2 και ανταγωνίζονται στις δράσεις της IFN-γ. Με αυτόν τον τρόπο, ενεργοποιείται η ικανότητα των μονοκυττάρων του ανθρώπου στην οξειδωση, της LDL που συμβάλλει στη μείωση της φλεγμονής (Bhattacharjee,et al, 2013).

4.16 Κυτταροκίνες και ανδρική υπογονιμότητα

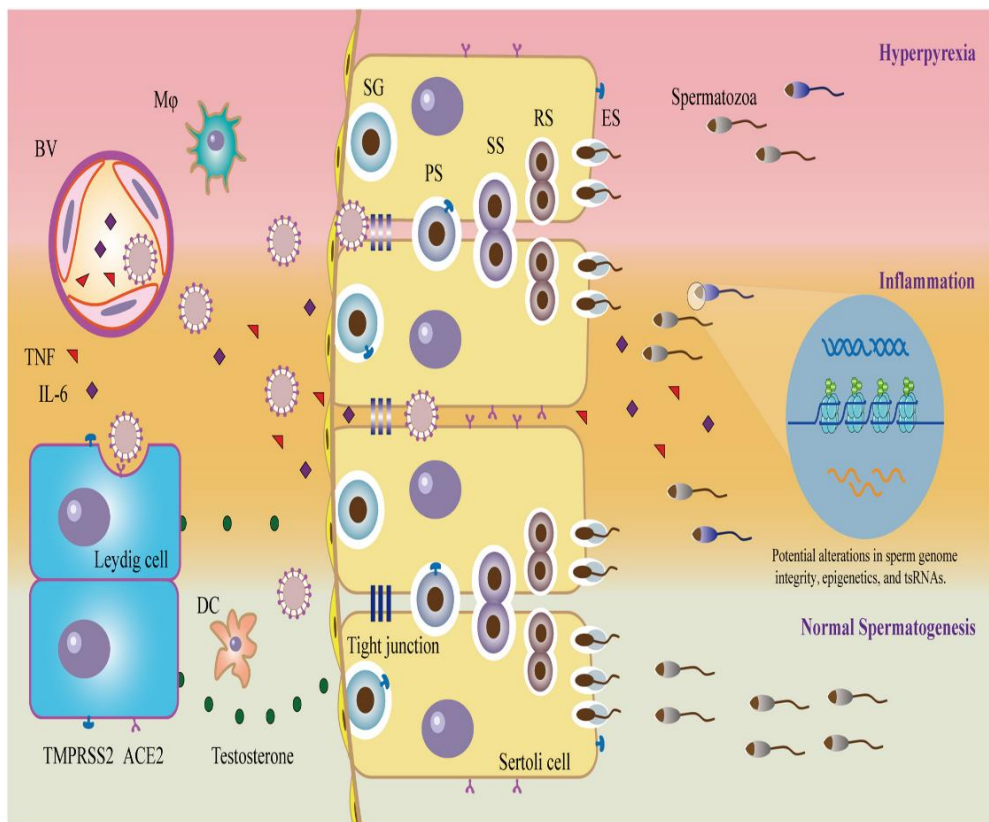
Σε κάποιες μελέτες, αναφέρεται ότι σε ορισμένες περιπτώσεις υπογονιμότητας, των ανδρών παρατηρήθηκε αυξημένη συγκέντρωση IL-4 στον ορό τους σε σχέση με μια ομάδα ανδρών που δεν είχαν προβλήματα υπογονιμότητας. (Sygiou, et al, 2018).

Σε μια άλλη μελέτη, στην ίδια ομάδα των ανδρών, βρέθηκαν χαμηλά επίπεδα TNF λόγω της αύξησης της συγκέντρωσης της IL-4 (Hassanpour, et al, 2017). Τα επίπεδα της IL-4 στο σπέρμα, αναστέλλουν την έκφραση των προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών, που απελευθερώνονται από τα μακροφάγα ή TH1 λεμφοκύτταρα ή τα μονοκύτταρα (Vicari, et al,2001). Σε πειράματα ,που έγιναν σε όρχεις αρουραίων, που προκαλείται από κάδμιο είδαν μείωση στα επίπεδα της IL-4 και την αύξηση των

κυτταροκινών με προ-φλεγμονώδη δράση (Al-Azemi, et al, 2010). Μελέτες που αφορούσαν υπογόνιμους άνδρες από το Ιράκ έδειξαν, ότι η αύξηση IL-4 προκάλεσε την ενεργοποίηση των μακροφάγων ,σημειώθηκε επίσης και μείωση των επιπέδων των κυτταροκινών που έχουν προφλεγμονώδη δράση

Ένας υποθετικός μηχανισμός, που περιγράφεται σε μελέτες είναι η συσχέτιση της IL-4 με την γονιμότητα Αρχικά ο SARS-CoV-2 μπαίνει στο σύστημα, ενεργοποιεί περαιτέρω την T_H1 που αυξάνει τα επίπεδα της IFN-γ και συμβάλλει με την σειρά της στην κυτταρική ανοσία. Από την άλλη, η ενεργοποίηση των κύτταρων της T_H2, επάγουν το επίπεδο IL-4 μέσω του μονοπατιού ενεργοποίησης JAK-STAT6. Τα επίπεδα των IgG, IgE αυξάνονται ,που με την σειρά τους, συμβάλλουν στη χυμική ανοσία και την απόπτωση.Αποτελέσματα ερευνών επιβεβαιώνουν ότι ο SARS-CoV-2 αυξάνει το επίπεδο των κυττάρων T_H2 (Abilash, et al,2020), όπως και τα υψηλά επίπεδα της IL-4 ωθούν προς το μονοπάτι της JAK-STAT6.Το μονοπάτι αυτό, θα προκαλέσει την παραγωγή προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών που σχετίζονται σε ορχίτιδα σε ορισμένες περιπτώσεις(Chen, et al, 2020). Έτσι, ασθενείς με σοβαρή λοίμωξη SARS-CoV-2, έχουν υψηλά επίπεδα κυτταροκινών πλάσματος, συμπεριλαμβανομένων των IL-2, IL-6, IL-7, IL-10, TNF-α κυτταροκινών και MCP-1 (Chen et al. 2020). Οι άνδρες ασθενείς από SARS-CoV-2, που έχουν χαμηλή απόκριση T κυττάρων ,σχετίζεται με την κακή έκβαση της νόσου (Takahashi, et al,2020). Πιο συγκεκριμένα, η IL-6 και ο TNF-α διαταράσσουν επιθετικά, την ακεραιότητα του αιματο-ορχικού φραγμού (Zhang, et al, 2014). Είναι πιθανό οι κυτταροκίνες που διέρχονται, από το αιματο-ορχικού φραγμό, να προκαλούν φλεγμονή. Προηγούμενες μελέτες, ενέπλεξαν τη διάσπαση του αιματο-ορχικού φραγμού από την IL-6 και συμβάλλει στην παθογένεση της αυτοάνοσης ορχίτιδας (Rival, et al ,2006) (Εικόνα 14).Για παράδειγμα στη μόλυνση ενηλίκων από τον ιό

Mumps (που προκαλεί παρωτίτιδα), ο TNF-α μπορεί να διαταράξει, τον αιματοορχικό φραγμό προκαλώντας ορχίτιδα και ανδρική υπογονιμότητα (Wu, et al, 2019). Η ορχίτιδα διαταράσσει, την ανοσολογική ισορροπία του μικροπεριβάλλοντος των όρχεων, επίσης βλάπτει το σπερματικό επιθήλιο και τα σπερματογονικά βλαστικά κύτταρα. Τα αποτελέσματα της βλάβης μπορεί να είναι σοβαρά και μη αναστρέψιμα.



Εικόνα 14: Πιθανές οδοί SARS-CoV-2 που επηρεάζουν το ανδρικό αναπαραγωγικό σύστημα (Reproduction 161, 2, R37-R 44)

4.17 Μέθοδοι ανίχνευσης του SARS-CoV-2

4.17.1 Τεστ ανίχνευσης αντισωμάτων έναντι του Κορωνοϊού SARS –CoV-2

Η εξέταση αντισωμάτων γίνεται με δείγμα αίματος και ενδείκνυται στις περιπτώσεις που πρέπει να διαπιστωθεί αν κάποιος έχει «περάσει» τη λοίμωξη στο πρόσφατο παρελθόν, ακόμη και αν είχε ήπια ή και καθόλου συμπτώματα. Ανιχνεύονται στον ορό του αίματος τα ειδικά για τον ιό αντισώματα που παράγει ο ανθρώπινος οργανισμός και είναι τριών ειδών: IgA, IgG και IgM. Τα αντισώματα IgM ,είναι αυτά που παρέχουν την άμυνα πρώτης γραμμής κατά τη διάρκεια των ιογενών λοιμώξεων. Τα αντισώματα IgA έναντι SARS-CoV-2 ,χρησιμοποιούνται ως δείκτης «πρώτης ανοσολογικής απόκρισης» και υποδεικνύουν πρόσφατη λοίμωξη. Τα αντισώματα IgG αποτελούν την προσαρμοσμένη και εξαιρετικής ειδικότητας προς τον ιό αντίδραση του ανοσοποιητικού. Είναι πολύ σημαντικά για την ανάπτυξη μακροχρόνιας ανοσία.

4.17.2 Μοριακό Τεστ Ανίχνευσης Κορωνοϊού SARS -CoV-2

Τα κιτ ανίχνευσης PCR σε πραγματικό χρόνο (Real time) έχουν σχεδιαστεί για τη διάγνωση του SARS-CoV-2 σε αναπνευστικά δείγματα. Η ανίχνευση γίνεται σε ένα βήμα, σε μορφή RT(Real time) όπου, η αντίστροφη μεταγραφή και η ενίσχυση της ειδικής αλληλουχίας στόχου λαμβάνει χώρα στην ίδια αντίδραση. Μεταγράφεται ο απομονωμένος στόχος RNA,έχουμε την δημιουργία συμπληρωματικού DNA, με αντίστροφη μεταγραφάση Ακολουθεί η ενίσχυση μίας διατηρημένης περιοχής των γονιδίων ORF1ab και N για SARS-CoV-2 χρησιμοποιώντας συγκεκριμένους εκκινητές και έναν φθορίζοντα σημασμένο ανιχνευτή.Το κιτ ανίχνευσης PCR SARS-CoV-2 βασίζεται στη δραστικότητα 5 'εξωνουκλεάσης της πολυμεράσης DNA.Κατά

τη διάρκεια της ενίσχυσης του DNA, το ένζυμο διασπά τον ανιχνευτή που συνδέεται με τη συμπληρωματική αλληλουχία DNA και σημαίνεται με ειδική χρωστική φθορισμού. Αυτός ο φθορισμός μπορεί να μετρηθεί σε (Real time) PCR πλατφόρμες.

4.18 Συμπεράσματα

Η βλάβη που σχετίζεται με τον SARS-CoV-2, προκαλείται από την άμεση ιική εισβολή, από την απορρύθμιση του ACE2 και από την ενεργοποίηση του φλεγμονώδους καταρράκτη ACE / Ang II / AT1R (Kai, et al, 2020). Στην πραγματικότητα, η ενεργοποίηση του RAS επιφέρει, μια ισχυρή ανοσοποιητική απόκριση που είναι πιθανώς η κύρια αιτία των κλινικών χαρακτηριστικών του SARS-CoV-2. Το σύστημα RAS, εκφράζεται ιδιαίτερα στους πνεύμονες, γεγονός που εξηγεί την κλασική εκδήλωση του SARS-CoV-2 σχετιζόμενο με το αναπνευστικό σύστημα. Παρ'όλα αυτά, οι γονιδιακές και πρωτεομικές μελέτες δείχνουν την παρουσία του συστήματος RAS σε άλλες περιοχές, συμπεριλαμβανομένων των όρχεων. Επομένως, η πιθανή επίδραση της λοίμωξης SARS-CoV-2 σε αυτά τα όργανα πρέπει να διευκρινιστεί (Esther, et al,1996, Paul, et al,2006) Ανησυχίες για την ανδρική γονιμότητα, άρχισαν να εμφανίζονται, όταν επιδημιολογικές μελέτες σχετικά με την κατανομή των φύλων αναφέρουν ότι οι άνδρες ασθενείς, επηρεάζονται περισσότερο και με αυξημένη νοσηρότητα από τη λοίμωξη SARS-CoV-2. Η έκφραση των ACE2 και άλλων RAS υποδοχέων φαίνεται να είναι ο κύριος λόγος για αυτή τη διαφορά (Gagliardi, et al,2020). Οι βιοπληροφορικές μελέτες ανέφεραν, την έντονη έκφραση του υποδοχέα ACE2 και του TMPRSS2 στους ανδρικούς αναπαραγωγικούς ιστούς και κύτταρα (σπερματογονικά βλαστικά κύτταρα, σπερματίδες και σπερματοζωάρια), υποδηλώνοντας την ιδιαίτερη ευπάθεια των όρχεων στον ιό (Zurin, et al, 2020). Το σύστημα RAS των όρχεων, φαίνεται ότι έχει σημαντικό ρόλο στην έναρξη της εφηβείας, στη σπερματογένεση, στην ενδοκρινική λειτουργία και στη

ενδυνάμωση του σπέρματος, καθώς και στην ικανότητα να επηρεάζει την ομοιόσταση των όρχεων (Pan, et al, 2013, Leung, et al, 2003, Leung, et al, 1998). Ωστόσο, προς το παρόν, δεν έχουμε ενδείξεις για το τρόπο ενεργοποίησης του AT1R έναντι του AT2R, από το σύστημα της Ang II που συμβάλλει σε μολυσματικές και φλεγμονώδεις καταστάσεις. (Aitken., et al, 2020). Ορισμένες πρόσφατες μελέτες (με μικρό αριθμό ασθενών) κατάφεραν να βρουν ιικό RNA, στο σπερματικό υγρό των προσβεβλημένων ασθενών (Li, et al, 2020) και η ορχίτιδα συσχετίστηκε με το SARS-CoV-2 (Pan, et al, 2020). Δεν είναι ακόμη σαφές, εάν η υποτιθέμενη «ζημιά» στους όρχεις, προκαλείται από το ανοσοποιητικό σύστημα ή προκαλείται από την ιική είσοδο, ανάλογα με τη σοβαρότητα των συμπτωμάτων και του υψηλού ιικού φορτίου κατά την διάρκεια της οξείας φάσης της νόσου. Επιπλέον, οι θεραπευτικές προσεγγίσεις που υιοθετούνται για την καταπολέμηση της λοίμωξης μπορεί να έχουν παράλληλη τοξικότητα που υποδηλώνει την περαιτέρω ανάγκη παρακολούθησης της λειτουργικότητας των όρχεων σε ασθενείς που έχουν αναρρώσει. Χωρίς δεδομένα σχετικά, με τη γονιμότητα, είναι διαθέσιμα στο Tocilizumab και στο Remdesivir, τα πιο πολλά υποσχόμενα φάρμακα για την καταπολέμηση SARS-CoV-2, ενώ η συνεχιζόμενη χρήση χλωροκίνης μπορεί να επηρεάσει την ποιότητα του σπέρματος (Millsop, et al, 2013). Τα στοιχεία εξακολουθούν να μην επαρκούν για να υποστηρίξουν συμπεράσματα σχετικά με αυτό το θέμα. Έχουν ξεκινήσει μελέτες παρακολούθησης που εξετάζουν μακροπρόθεσμα, την επίδραση της λοίμωξης στην ποιότητα του σπέρματος. Επίσης δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί, καθώς και η παρουσία του ιού και η μολυσματικότητα των δειγμάτων σπέρματος. Για τις διαδικασίες της εξωσωματικής, θα ήταν χρήσιμο να ερευνηθεί εάν το σπέρμα με το πλύσιμο, με φυγοκέντρηση διαβάθμισης πυκνότητας ή με μια τεχνική «swim up» καθαρίζει το σπέρμα από τον ιό, καθιστώντας ασφαλή τη χρήση του σε κύκλους εξωσωματικής

γονιμοποίησης. Συγκεκριμένα, απαιτούνται εργαστηριακές οδηγίες για την ανάληψη σπέρματος σε επείγουσες διαδικασίες, όπως κρυοσυντήρηση σε ογκολογικούς ασθενείς. Όπως προτείνονται, από τις ενώσεις αναπαραγωγικής ιατρικής παγκοσμίως, τα δεδομένα που σχετίζονται με την πιθανή μολυσματικότητα του σπερματικού υγρού, δεν αποκλείει κινδύνους τόσο για το προσωπικό όσο και για τους ασθενείς. Μελλοντικές μελέτες, για τη γονιμότητα και τον SARS-CoV-2 σε άνδρες ασθενείς, θα πρέπει να εξεταστούν και να γίνει περαιτέρω έρευνα σχετικά με το ρόλο του ACE2. Συνολικά, ο κίνδυνος παρουσίας SARS-CoV-2 στο σπέρμα φαίνεται να είναι χαμηλός. Η κατανόηση της δυναμικής του ιού, και γνωρίζοντας όλες τις πιθανές διαδρομές μετάδοσης, μας βοηθούν να καθορίσουμε, προληπτικά μέτρα που πρέπει να ληφθούν. Ιδιαίτερη σημασία έχει, η μακροχρόνια παρακολούθηση στους άνδρες, που έχουν αναφέρει συμπτώματα δυσφορίας του όρχεως ή ορχίτιδας, καθώς αυτό, μπορεί να υποδηλώνει την διαταραχή του φραγμού των όρχεων. Σε τακτά χρονικά διαστήματα, θα πρέπει να γίνονται τεστ, για την ανίχνευση του ιού. Χρειάζονται μελλοντικές μελέτες που θα εστιάσουν-στο κατά πόσον μπορούν να φανούν ολόκληρα υικά σωματίδια στο σπέρμα, στη δυνατότητα σεξουαλικής μετάδοσης και στην επίδραση του ιού στο ανδρικό αναπαραγωγικό σύστημα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**ΕΛΛΗΝΙΚΗ**

Αγγελίδης Χ, Μια μοριακή ανάλυση του κοροναϊού SARS-COV-2 2020

Ανδρονίκη Αναγνωστοπούλου Μπέη, ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ, ART of TEXT, 1993,61
85

Vander A, Sherman J et al, Φυσιολογία του ανθρώπου μηχανισμοί της λειτουργίας του οργανισμού, Π.Χ. Πασχαλίδης, 2011:845 851

Vander, A. M.D., Sherman, J D. Luciano, Ph.D., Μ. Τσακόπουλος, M.D.: Φυσιολογία του Ανθρώπου: Μηχανισμοί της Λειτουργίας του Οργανισμού, 8^η έκδοση, 2011

ΞΕΝΗ

Abilash, V., 2020. Coronaviruses pathogenesis, comorbidities and multi-organ damage—a review. *Life Sci.* 225. Kidd, P., 2003. Th1/th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Altern. Med. Rev.* 8, 223–246.

Abobaker, A., Raba, A.A. Does COVID-19 affect male fertility? *World J. Urol.* 2020.

Abou-Haila A, Tulsiani DRP. Mammalian sperm acrosome: formation, contents, and function. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2000,379:173-182.

Afar, D.E., Vivanco, I., Hubert, R.S., Kuo, J., Chen, E., Saffran, D.C., Raitano, A.B., Jakobovits, A. Catalytic cleavage of the androgen-regulated TMPRSS2 protease results in its secretion by prostate and prostate cancer epithelia. *Cancer Res.* 2001, 61, 1686–1692.

Agarwal A, Allamaneni SS, 2004 Oxidants and antioxidants in human fertility. *Middle East Fertil Soc J* 9: 187-97.

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

Ahmadi A, Ng SC, 1999 Developmental capacity of damaged spermatozoa. *Hum Reprod* 14: 2279-85.

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

Aitken RJ, Buckingham D, West K, Wu FC, Zikopoulos K, Richardson DW, 1992 Differential contribution of leucocytes and spermatozoa to the generation of reactive oxygen species in the ejaculates of oligozoospermic patients and fertile donors. *J Reprod Fertil* 94: 451-62.

Aitken RJ, Clarkson JS, Fishel S, 1989 Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. *Biol Reprod* 41: 183-97.158

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

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

Aitken, R.J. COVID-19 and human spermatozoa—Potential risks for infertility and sexual transmission? *Andrology* 2020.

Al-Azemi, M., et al., 2010. Lithium protects against toxic effects of cadmium in the rat testes. *J. Assist. Reprod. Genet.* 27, 469–476.

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

Andrabi SM, 2007 Mammalian sperm chromatin structure and assessment of DNA fragmentation. *J Assist Reprod Genet* 24: 561-9.

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

Antalis, T.M., Bugge, T.H., Wu, Q. Membrane-Anchored Serine Proteases in Health and Disease. In *Proteases in Health and Disease*-Google Libri, Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2011, pp. 1–50.

Antonescu CR. The GIST paradigm: lessons for other kinase-driven cancers. *J Pathol.* 2011,223(2):251-261

Aruffo A, Stamenkovic I, Melnick M, Underhill CB, Seed B. CD44 is the principal cell surface receptor for -yaluronate. *Cell* 1990,61:1303-13.

ASRM Patient Management and Clinical Recommendations During The Coronavirus (COVID-19) Pandemic. Available online: <https://www.asrm.org/news-and-publications/covid-19/statements/patient-managementand-clinical-recommendations-during-the-coronavirus-covid-19-pandemic/> (accessed on 20 May 2020).

Asselta, R., Paraboschi, E.M., Mantovani, A., Duga, S. ACE2 and TMPRSS2 variants and expression as candidates to sex and country differences in COVID-19 severity in Italy. *Aging* 2020, 12, 10087–10098.

Atlas, S.A. The Renin-Angiotensin Aldosterone System: Pathophysiological Role and Pharmacologic Inhibition. *J. Manag. Care Pharm.* 2007, 13, 9–20.

Austin CR. Capacitation of spermatozoa. *International Journal of Fertility* 1967,12:25-31.

Bains, R, Adeghe J, Miles D.M, Carson,R.J. Hyaluronic acid increases motility/intracellular Ca₂ concentration in human sperm in vitro. *Arch Androl* 2001,47:119–25.

Bajorath J. Molecular organization, structural features, and ligand binding characteristics of CD44, a highly variable cell surface glycoprotein with multiple functions. *Proteins Struct Funct Genet* 2000,39:103–11.

Balodimos MC, Lisce H, Irwin I, Merrill W, Dingman JF, 1966 XYY karyotype in a case of familial hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab* 26: 443-52.

Bannister LA, Schimenti JC, 2004 Homologous recombinational repair proteins in mouse meiosis. *Cytogenet Genome Res* 107: 191-200.

Barro C, Austin CR. In vitro fertilization and the sperm acrosome reaction in the hamster. *The Journal of Experimental Biology* 1967,166(3):317-323.

Barro C, Austin CR. In vitro fertilization and the sperm acrosome reaction in the hamster. *The Journal of Experimental Biology* 1967,166(3):317-323.

Baumharter S, Singer MS, Henzel W et al. Binding of L-selectin to the vascular sialomucin CD34. *Science* 1993,262:436-438.

Becker C and Jakse,G “Stem cells for regeneration of urological structures,” *European Urology*, vol. 51, no. 5, pp. 1217-1228, 2007

Beckman KB, Ames BN, 1998 The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev* 78 : 547-81.

Bell GM, Imboden JB: Characterization of a CD45-loss mutant of a natural killer cell line. *Arthritis Rheum* 199 1:34:S79.

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

Bendel-Stenzel, M., Anderson, R., Heasman, J. & Wylie, C.1998 The origin and migration of primordial germ cells in the mouse. *Semin. Cell Dev. Biol.* 9, 393-400

Besmer P, Murphy JE, George PC. et al. A new acute transforming feline retrovirus and relationship of its oncogene v-kit with the protein kinase gene family. *Nature*. 1986,320(6061):415-421

Bhattacharjee, A., et al., 2013. Il-4 and il-13 employ discrete signaling pathways for target gene expression in alternatively activated monocytes/macrophages. *Free Radic. Biol. Med.* 54, 1-16.

Bize I, Santander G, Cabello P, Driscoll D, Sharpe C, 1991 Hydrogen peroxide is involved in hamster sperm capacitation in vitro. *Biol Reprod* 44: 398-403.

Bogenghagen DF, 1999 Repair of mtDNA in vertebrates. *Am J Hum Genet* 64: 1276-81.

Bonduelle M, Wennerholm UB, Loft A, Tarlatzis BC, Peters C, Henriët S, Mau C, Victorin-Cederquist A, Van SA, Balaska A, Emberson JR, Sutcliffe AG, 2005 A multi-centre cohort study of the physical health of 5-year-old children conceived after intracytoplasmic sperm injection, in vitro fertilization and natural conception. *Hum Reprod* 20: 413-9.

Borini A, Tarozzi N, Bizzaro D, Bonu MA, Fava L, Flamigni C, Coticchio G, 2006 Sperm DNA fragmentation: paternal effect on early post-implantation embryo development in ART. *Hum Reprod* 21(11): 2876-81.

Böttcher-Friebertshäuser, E., Freuer, C., Sielaff, F., Schmidt, S., Eickmann, M., Uhlendorff, J., Steinmetzer, T., Klenk, H.-D., Garten, W. Cleavage of Influenza Virus Hemagglutinin by Airway Proteases TMPRSS2 and HAT Differs in Subcellular Localization and Susceptibility to Protease Inhibitors. *J. Virol.* 2010, 84, 5605-5614.

Breitbart H, Naor Z. Protein kinases in mammalian sperm capacitation and the acrosome reaction. *Reviews of Reproduction* 1999,4:151-159.

Breitbart H, Spungin B. The biochemistry of the acrosome reaction. *Molecular Human Reproduction* 1997,3:195-202.

Brinster R.L and Zimmermann J.W, "Spermatogenesis following male germ-cell transplantation," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 91, no. 24, pp. 11298–11302, 1994

Brinster R.L and Avarbock, M.R "Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 91, no. 24, pp. 11303–11307, 1994.

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

Bukowska, A., Spiller, L., Wolke, C., Lendeckel, U., Weinert, S., Hoffmann, J., Bornfleth, P., Kutschka, I., Gardemann, A., Isermann, B., et al. Protective regulation of the ACE2/ACE gene expression by estrogen in human atrial tissue from elderly men. *Exp. Biol. Med.* 2017, 242, 1412–1423.

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

C. Itman, S. Mendis, B. Barakat, and K. L. Loveland, "All in the family: TGF- β family action in testis development," *Reproduction*, vol. 132, no. 2, pp. 233–246, 2006.

Cai, Q., Huang, D., Yu, H., Zhu, Z., Xia, Z., Su, Y., Li, Z., Zhou, G., Gou, J., Qu, J., et al. COVID-19: Abnormal liver function tests. *J. Hepatol.* 2020.

Caires K, Broady J, and McLean D, "Maintaining the male germline: regulation of spermatogonial stem cells," *Journal of Endocrinology*, vol. 205, no. 2, pp. 133–145, 2010.

Cao, X. W., Lin, K., Li, C. Y., & Yuan, C. W. (2011). [A review of WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen (5th edition)]. *Zhonghua Nan Ke Xue = National Journal of Andrology*, 17(12), 1059–1063.

Cao, X. W., Lin, K., Li, C. Y., & Yuan, C. W. (2011). [A review of WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen (5th edition)]. *Zhonghua Nan Ke Xue = National Journal of Andrology*, 17(12), 1059–1063.

Cao, Y., Li, L., Feng, Z., Wan, S., Huang, P., Sun, X., Wen, F., Huang, X., Ning, G., Wang, W. Comparative genetic analysis of the novel coronavirus (2019-nCoV/SARS-CoV-2) receptor ACE2 in different populations. *Cell Discov.* 2020, 6.

Capel B, "The battle of the sexes," *Mechanisms of Development*, vol. 92, no. 1, pp. 89–103, 2000.

Carrel, L., Willard, H.F. X-inactivation profile reveals extensive variability in X-linked gene expression in females. *Nature* 2005, 434, 400–404.

Carrell DT, Liu L, Peterson CM, Jones KP, Hatasaka HH, Erickson L, Campbell B, 2003 Sperm DNA fragmentation is increased in couples with unexplained recurrent pregnancy loss. *Arch Andrai* 49(1): 49-55.

Castilho, A.C.S., Fontes, P.K., Franchi, F.F., Santos, P.H., Razza, E.M. Renin-Angiotensin System on Reproductive Biology. In *Renin-Angiotensin System-Past, Present and Future*, Tolekova, A.N., Ed., InTech: London, UK, 2017, ISBN 978-953-51-3351-3.

Castilla JA, Gil T, Rodriguez F, Molina J, Samaniego F, Vergara F, et al. Lack of expression of HLA antigens on immature germ cells from ejaculates with antisperm antibodies. *Am J Reprod Immunol* 1993,30: 9–14

Chang MC. A detrimental effect of seminal plasma on the fertilizing capacity of sperm. *Nature* 1957,179: 258–259.

Chang MC. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature* 1951,168:697-698.

Charbonneau H, Tonk NK, Walsh KA, Fischer EH: The leukocyte common antigen (CD45): A putative receptor-linked protein tyrosine phosphatase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:7182-718

Chatterjee, P., et al., 2014. Regulation of the anti-inflammatory cytokines interleukin-4 and interleukin-10 during pregnancy. *Front. Immunol.* 5, 253.

Chen SQ, Xiong AQ. The progress and implication of stem cell factor. *Basic Medical Sciences and Clinics.* 2002,22(5):385-390

Chen Q, Yan M, Cao Z, Li X, Zhang Y, Shi J, Feng GH, Peng H, Zhang X & Zhang Y 2016 Sperm tsRNAs contribute to intergenerational inheritance of an acquired metabolic disorder. *Science* 351 397–400.

Chen, Y.-W., Lee, M.-S., Lucht, A., Chou, F.-P., Huang, W., Havighurst, T.C., Kim, K., Wang, J.-K., Antalis, T.M., Johnson, M.D., et al. TMPRSS2, a Serine Protease Expressed in the Prostate on the Apical Surface of Luminal Epithelial Cells and Released into Semen in Prostatosomes, Is Misregulated in Prostate Cancer Cells. *Am. J. Pathol.* 2010, 176, 2986–2996.

Cheng FP, Fazeli AR, Voorhout WF, Tremoleda JL, Bevers MM, Colenbrander B. Progesterone in mare follicular fluid induces the acrosome reaction in stallion spermatozoa and enhances in vitro binding to the zona pellucida. *International Journal of Andrology* 1998,21:57-66.

Cheng FP, Gadella BM, Voorhout WF, Fazeli A, Bevers MM, Colenbrander B. Progesterone-induced acrosome reaction in stallion spermatozoa is mediated by plasma membrane progesterone receptor. *Biology of Reproduction* 1998,59:733-742.

Choi, S.-Y., Bertram, S., Glowacka, I., Park, Y.W., Pöhlmann, S. Type II transmembrane serine proteases in cancer and viral infections. *Trends Mol. Med.* 2009, 15, 303–312.

Civin CI, Strauss LC, Brovall C et al. Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J Immunol* 1984,133:157–165

Clemont Y, Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal *Physiological Reviews.* 1972 Jan, 52(1):198-236

Clemont Y, Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal, *Physiological Reviews.* 1972 Jan, 52(1):198-236

Clermont, Y. & Perey, B. 1957 Quantitative study of the cell population of the seminiferous tubules in immature rats. *Am. J. Anat.* 100, 241–267. (doi:10.1002/aja.1001000205)

Clouthier D.E, Avarbock,M.R. Maika,S.D. Hammer,R.E and BrinsterR.L, “Rat spermatogenesis in mouse testis,” *Nature*, vol. 381, no. 6581, pp. 418–421, 1996.

Cobb J,HandelMA.Dynamics of meiotic prophase I during spermatogenesis:from pairing to division. *Semin Cell Dev Biol* 1998, 9:445–50.

Cohen PE, Pollard JW, 1995 Cytokines and growth factors in reproduction. In: Bronson R, editor. *Reproductive Immunology*. Cambridge, MA: Blackwell Science.

Coleman, C.M., Frieman, M.B. Coronaviruses: Important Emerging Human Pathogens. *J. Virol.* 2014, 88, 5209–5212.

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

Cooper TG, Yeung CH, Nashan D, Jockenhovel F, Nieschlag E, 1990 Improvement in the assessment of human epididymal function by the use of inhibitors in the assay of a-glucosidase in seminal plasma. *Int J Androl* 13: 297-305.

Corona, G., Baldi, E., Isidori, A.M., Paoli, D., Pallotti, F., De Santis, L., Francavilla, F., La Vignera, S., Selice, R., Caponecchia, L., et al. SARS-CoV-2 infection, male fertility and sperm cryopreservation: A position statement of the Italian Society of Andrology and Sexual Medicine (SIAMS) (Società Italiana di Andrologia e Medicina della Sessualità). *J. Endocrinol. Investig.* 2020, 43, 1153–1157.

Crispe, I. N. and Bevan, M. J. (1987). Expression and functional significance of J11d marker on mouse thymocytes. *J. Immunol.* 138, 2013-2018.

Crosier PS, Ricciardi ST, Hall LR. et al. Expression of isoforms of the human receptor tyrosine kinase c-kit in leukemic cell lines and acute myeloid leukemia. *Blood.* 1993,82(4):1151-1158

Cross NL. Human seminal plasma prevents sperm from becoming acrosomally responsive to the agonist, progesterone: cholesterol is the major inhibitor. *Biology of Reproduction* 1996,54:138-145.

Cui J, Holmes EH, Greene TG, Liu PK, 2000 Oxidative DNA damage precedes DNA fragmentation after experimental stroke in rat brain. *FASEB J* 14: 955- 67.

Culty M, Miyake K, Kincade PW, Silorski E, Butcher EC, Underhill C. The hyaluronate receptor is a member of the CD44 (H-CAM) family of cell surface glycoproteins. *J Cell Biol* 1990,111:2765–74.

Dadoune JP, 2003 Expression of mammalian spermatozoal nucleoproteins. *Micros Res Tech* 61: 56-75.

Dai, J.-B., Wang, Z.-X., Qiao, Z.-D. The hazardous effects of tobacco smoking on male fertility. *Asian J. Androl.* 2015, 17, 954–960.

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

Darbani, B. The Expression and Polymorphism of Entry Machinery for COVID-19 in Human: Juxtaposing Population Groups, Gender, and Different Tissues. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2020, 17, 3433.

De Kretser DM, Kerr JB. Cytology of the testis. In: *the Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press, 1994

De Rooij D.G, "Rapid expansion of the spermatogonial stem cell tool box," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 103, no. 21, pp. 7939–7940, 2006.

De YL, Ballesca JL, Vanrell JA, Corzett M, Balhorn R, Oliva R, 1998 Detection of P2 precursors in the sperm cells of infertile patients who have reduced protamine P2 levels. *Fertil Steril* 69: 755-9.

Derby, C.A., Zilber, S., Brambilla, D., Morales, K.H., McKinlay, J.B. Body mass index, waist circumference and waist to hip ratio and change in sex steroid hormones: The Massachusetts Male Ageing Study. *Clin. Endocrinol.* 2006, 65, 125–131.

Deschepper, C.F., Mellon, S.H., Cumin, F., Baxter, J.D., Ganong, W.F. Analysis by immunocytochemistry and in situ hybridization of renin and its mRNA in kidney, testis, adrenal, and pituitary of the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1986, 83, 7552–7556.

Developmental Toxicology. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-7.00002-0>.

Diekman AB, Norton EJ, Klotz KL, Westbrook VA, Herr JC. Evidence for a unique N-linked glycan associated with human infertility on sperm CD52: a candidate contraceptive vaccinogen. *Immunol Rev* 1999, 171: 203–11

Ding, Y., He, L., Zhang, Q., Huang, Z., Che, X., Hou, J., Wang, H., Shen, H., Qiu, L., Li, Z., et al. Organ distribution of severe acute respiratory syndrome (SARS) associated coronavirus (SARS-CoV) in SARS patients: Implications for pathogenesis and virus transmission pathways. *J. Pathol.* 2004, 203, 622–630.

Ding, Y., Wang, H., Shen, H., Li, Z., Geng, J., Han, H., Cai, J., Li, X., Kang, W., Weng, D., et al. The clinical pathology of severe acute respiratory syndrome (SARS): A report from China. *J. Pathol.* 2003, 200, 282–289.

Dinh, D.T., Frauman, A.G., Sourial, M., Casley, D.J., Johnston, C.I., Fabiani, M.E. Identification, distribution, and expression of angiotensin II receptors in the normal human prostate and benign prostatic hyperplasia. *Endocrinology* 2001, 142, 1349–1356.

Dolhnikoff, M., Duarte-Neto, A.N., Almeida Monteiro, R.A., Silva, L.F.F., Oliveira, E.P., Saldiva, P.H.N., Mauad, T., Negri, E.M. Pathological evidence of pulmonary thrombotic phenomena in severe COVID-19. *J. Thromb. Haemost.* 2020, 18, 1517–1519.

Donaldson, S.H., Hirsh, A., Li, D.C., Holloway, G., Chao, J., Boucher, R.C., Gabriel, S.E. Regulation of the Epithelial Sodium Channel by Serine Proteases in Human Airways. *J. Biol. Chem.* 2002, 277, 8338–8345.

Duarte-Neto, A.N., Monteiro, R.A.A., Silva, L.F.F., Malheiros, D.M.A.C., Oliveira, E.P., Theodoro-Filho, J., Pinho, J.R.R., Gomes-Gouvêa, M.S., Salles, A.P.M., Oliveira, I.R.S., et al. Pulmonary and systemic involvement in COVID-19 patients assessed with ultrasound-guided minimally invasive autopsy. *Histopathology* 2020, 77, 186–197. [CrossRef]

Durvasula, R., Wellington, T., McNamara, E., Watnick, S. COVID-19 and Kidney Failure in the Acute Care Setting: Our Experience From Seattle. *Am. J. Kidney Dis.* 2020.

Dworakowska, D., Grossman, A.B. Renin-angiotensin system inhibitors in management of hypertension during the COVID-19 pandemic. *J. Physiol. Pharmacol.* 2020, 71.

E. Goossens, V. Frederickx, G. De Block, A. C. Van Steirteghem, and H. Tournaye, "Reproductive capacity of sperm obtained after germ cell transplantation in a mouse model," *Human Reproduction*, vol. 18, no. 9, pp. 1874–1880, 2003.

Ehlers, M.R., Riordan, J.F. Angiotensin-converting enzyme: New concepts concerning its biological role. *Biochemistry* 1989, 28, 5311–5318.

Ehmcke J, Wistuba J, and Schlatt, S "Spermatogonial stem cells: questions, models and perspectives," *Human Reproduction Update*, vol. 12, no. 3, pp. 275–282, 2006

Ehmcke J, Hubner K, Scholer H.R, and Schlatt S, "Spermatogonia: origin, physiology and prospects for conservation and manipulation of the male germ line," *Reproduction, Fertility and Development*, vol. 18, no. 1-2, pp. 7–12, 2006.

ESHRE Coronavirus Covid-19: ESHRE statement on pregnancy and conception. Available online: <https://www.eshre.eu/Press-Room/ESHRE-News> (accessed on 20 May 2020). *Microorganisms* 2020, 8, 1492 22 of 22

ESHRE guidance on recommencing ART treatments. Available online: <https://www.eshre.eu/PressRoom/ESHRE-News> (accessed on 20 May 2020).

Esther, C.R., Howard, T.E., Marino, E.M., Goddard, J.M., Capecchi, M.R., Bernstein, K.E. Mice lacking angiotensin-converting enzyme have low blood pressure, renal pathology, and reduced male fertility. *Lab. Invest.* 1996, 74, 953–965.

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

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

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

Fan, C., Li, K., Ding, Y., Lu, W.L., Wang, J. ACE2 Expression in Kidney and Testis May Cause Kidney and Testis Damage After 2019-nCoV Infection. *MedRxiv* 2020.

Fan, R., Mao, S.-Q., Gu, T.-L., Zhong, F.-D., Gong, M.-L., Hao, L.-M., Yin, F.-Y., Dong, C.-Z., Zhang, L.-N. Preliminary analysis of the association between methylation of the ACE2 promoter and essential hypertension. *Mol. Med. Rep.* 2017, 15, 3905–3911.

Felschow DM, McVeigh ML, Hoehn GT et al. The adapter protein CrkL associates with CD34. *Blood* 2001,97:3768–3775

Ferlin A, Moro E, Garolla A, Foresta C, 1999 Human male infertility and Y chromosome deletions: role of the AZF-candidate genes DAZ, RBM and DFFRY. *HumReprod* 14: 1710-16.

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

Ferrario, C.M., Ahmad, S., Nagata, S., Simington, S.W., Varagic, J., Kon, N., Dell'italia, L.J. An evolving story of angiotensin-II-forming pathways in rodents and humans. *Clin. Sci.* 2014, 126, 461–469.

Figarella-Branger, D. H., Moreau, J., Pelissier, F., Bianco, N. and Rougon, G. (1993). CD24, a signal-transducing molecule expressed on human B-lymphocytes, is a marker for regenerating muscle. *Acta Neuropathol.* 86,275-284.

Fischer, G. F., Majdic, O., Gadd, S. and Knapp, W. (1990). Signal transduction in lymphocytic and myeloid cells via CD24, a new member of phosphoinositol-anchored membrane molecule. *J. Immunol.* 144, 638-641.

Flesch FM, Gadella BM. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochimica et Biophysica Acta* 2000,1469:197-235.

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

Fountain, J.H., Lappin, S.L. Physiology, Renin Angiotensin System. In StatPearls, StatPearls Publishing: Treasure Island, FL, USA, 2020.

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

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

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

Fraser LR. Calcium channels play a pivotal role in the sequence of ionic changes involved in initiation of mouse sperm acrosomal exocytosis. *Molecular Reproduction and Development* 1993,36:368-376.

Gadella BM, Rathi R, Brouwers JFHM, Stout TAE, Colenbrander B. Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm. *Animal Reproduction Science* 2001,68:249-265.

Gagliardi, M.C., Tieri, P., Ortona, E., Ruggieri, A. ACE2 expression and sex disparity in COVID-19. *Cell Death Discov.* 2020, 6.

Gandini L, Lombardo F, Paoli D, Caruso F, Eleuteri P, Leter G, Ciriminna R, Culasso F, Dondero F, Lenzi A, Spanò M, 2004 Full-term pregnancies achieved with ICSI despite high levels of sperm chromatin damage. *Hum Reprod* 19(6): 1409- 17.

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

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

George, A.J., Thomas, W.G., Hannan, R.D. The renin-angiotensin system and cancer: Old dog, new tricks. *Nat. Rev. Cancer* 2010, 10, 745–759.

Gianzo, M., Muñoz-Hoyos, I., Urizar-Arenaza, I., Larreategui, Z., Quintana, F., Garrido, N., Subirán, N., Irazusta, J. Angiotensin II type 2 receptor is expressed in human sperm cells and is involved in sperm motility. *Fertil. Steril.* 2016, 105, 608–616.

Gianzo, M., Urizar-Arenaza, I., Muñoz-Hoyos, I., Larreategui, Z., Garrido, N., Casis, L., Irazusta, J., Subirán, N. Human sperm testicular angiotensin-converting enzyme helps determine human embryo quality. *Asian J. Androl.* 2018, 20, 498.

Ginsberg J.P, Carlson C.A, Lin K et al., “An experimental protocol for fertility preservation in prepubertal boys recently diagnosed with cancer: a report of acceptability and safety,” *Human Reproduction*, vol. 25, no. 1, pp. 37–41, 2010.

Gonzales GF, 1994 Corrected seminal fructose test. *Arch Andrai* 33: 17-22.

Gonzales GF, Villena A, 2001 True corrected seminal fructose level: a better marker of the function of seminal vesicles in infertile men. *Int J Androl* 24: 255-60.

Goossens, E, Frederickx V, de Block G., Van Steirteghem A., and Tournaye H., “Evaluation of in vivo conception after testicular stem cell transplantation in a mouse model shows altered post-implantation development,” *Human Reproduction* vol. 21, no. 8, pp. 2057–2060, 2006.

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

Gotz MJ, Johnstone EC, Ratcliffe SG, 1999 Criminality and antisocial behaviour in unselected men with sex chromosome abnormalities. *Psychol Med* 29: 953-62.

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

Green GR, Balhorn R, Poccia DL, Hecht NB, 1994 Synthesis and processing of mammalian protamines and transition proteins. *Mol Reprod Dev* 37: 255-63.

Griswold MD. Perspective on the function of Sertoli cells. In:griswoldMD,(ed). *Sertoli cell biology*. San Diego: Elsevier Science, 2005, p. 15–8.

Griswold, M. D. 1998 The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Semin. Cell Dev. Biol.* 9, 411–416.(doi:10.1006/scdb.1998.0203)

Grove, K.L., Speth, R.C. Rat epididymis contains functional angiotensin II receptors. *Endocrinology* 1989, 125, 223–230.

Grünewald S, Paasch U, Glander HJ, 2001 Enrichment of non-apoptotic human spermatozoa after cryopreservation by immunomagnetic cell sorting. *Cell Tissue Bank* 2: 127-33.

Gu, J., Gong, E., Zhang, B., Zheng, J., Gao, Z., Zhong, Y., Zou, W., Zhan, J., Wang, S., Xie, Z., et al. Multiple organ infection and the pathogenesis of SARS. *J. Exp. Med.* 2005, 202, 415–424.

Gu, J., Korteweg, C. Pathology and Pathogenesis of Severe Acute Respiratory Syndrome. *Am. J. Pathol.* 2007, 170, 1136–1147.

- Guo, J., Grow, E.J., Mlcochova, H., Maher, G.J., Lindskog, C., Nie, X., Guo, Y., Takei, Y., Yun, J., Cai, L., et al. The adult human testis transcriptional cell atlas. *Cell Res.* 2018, 28, 1141–1157.
- Guo, L., Zhao, S., Li, W., Wang, Y., Li, L., Jiang, S., Ren, W., Yuan, Q., Zhang, F., Kong, F., et al. Absence of SARS-CoV-2 in Semen of a COVID-19 Patient Cohort. *Andrology* 2020.
- Gupta G.S, *Proteomics of Spermatogenesis*, Springer, 2006:23 24
- Gur, Y., Breitbart, H., Lax, Y., Rubinstein, S., Zamir, N. Angiotensin II induces acrosomal exocytosis in bovine spermatozoa. *Am. J. Physiol.* 1998, 275, E87–E93.
- Hamming, I., Cooper, M.E., Haagmans, B.L., Hooper, N.M., Korstanje, R., Osterhaus, A.D.M.E., Timens, W., Turner, A.J., Navis, G., van Goor, H. The emerging role of ACE2 in physiology and disease. *J. Pathol.* 2007, 212, 1–11.
- Hassanpour, H., et al., 2017. Comparative expression analysis of hsp70, hsp90, il-4, tnf, kitlg and kit-receptor gene between varicocele-induced and non-varicocele testes of dog. *Int. J. Fertil. Steril.* 11, 148.
- He Feng Huang, Jian Zhong Sheng, *Gamete and Embryo fetal Origins of Adult Diseases, Physiology of spermatogenesis*, Springer, 2014
- Healy L, May G, Gale K et al. The stem cell antigen CD34 functions as a regulator of hemopoietic cell adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995,92:12240–12244
- He-Feng Huang, Jian-ZhongSheng, *Gameteand Embryo-fetal Origins of Adult Diseases, Physiology of spermatogenesis*, Springer, 2014
- Heite HJ, Wetterauer W, 1979 Acid phosphatase in seminal fluid: method of estimation and diagnostic significance. *Andrai* 11: 113-22.
- Hess R.A, Cooke R.S, Hofmann M.C, and Murphy K.M, “Mechanistic insights into the regulation of the spermatogonial stem cell niche,” *Cell Cycle*, vol. 5, no. 11, pp. 1164–1170, 2006.
- Hikmet, F., Méar, L., Edvinsson, Å., Micke, P., Uhlén, M., Lindskog, C. The protein expression profile of ACE2 in human tissues. *Mol. Syst. Biol.* 2020, 16, e9610.
- Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., Krüger, N., Müller, M., Drosten, C., Pöhlmann, S. The novel coronavirus 2019 (2019-nCoV) uses the SARS-coronavirus receptor ACE2 and the cellular protease TMPRSS2 for entry into target cells. *BioRxiv* 2020.
- Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., Pöhlmann, S. A Multibasic Cleavage Site in the Spike Protein of SARS-CoV-2 Is Essential for Infection of Human Lung Cells. *Mol. Cell* 2020, 78, 779–784.e5.
- Holtmann, N., Edimiris, P., Andree, M., Doehmen, C., Baston-Buest, D., Adams, O., Kruessel, J.-S., Bielfeld, A.P. Assessment of SARS-CoV-2 in human semen—a cohort study. *Fertil. Steril.* 2020, 114, 233–238.
- Hubbe, M. and Altevogt, P. (1994). Heat-stable antigen/CD24 on mouse T -lymphocytes: evidence for a costimulatory function. *Eur. J. Immunol.* 24,731-737.
- Huizinga JD, Thuneberg L, Kluppel M. et al. W/kit gene required for interstitial cells of Cajal and for intestinal pacemaker activity. *Nature.* 1995,373(6512):347-349

Hultborn R, Hanson C, Kopf I, Verbiene I, Warnhammar E, Weimarck A, Hussain, M., Jabeen, N., Raza, F., Shabbir, S., Baig, A.A., Amanullah, A., Aziz, B. Structural variations in human ACE2 may influence its binding with SARS-CoV-2 spike protein. *J. Med Virol.* 2020.

Hwang K and Lamb D.J, “New advances on the expansion and storage of human spermatogonial stem cells,” *Current Opinion in Urology*, vol. 20, no. 6, pp. 510–514, 2010.

Jackson, D., Waibel, R., Weber, E., Bell, J. and Stahel, R. A. (1992). CD24 a signal-transducing molecule expressed on human B cells is a major surface antigen on small cell lung carcinomas. *Cancer Res.* 52, 5264-5270.

Jacobo, P., Pérez, C.V., Theas, M.S., Guazzone, V.A., Lustig, L. CD4+ and CD8+ T cells producing Th1 and Th17 cytokines are involved in the pathogenesis of autoimmune orchitis. *Reproduction* 2011, 141, 249–258.

Jahnukainen K., Hou M, C. Petersen C, Setchell B, and Söder O, “Intratesticular transplantation of testicular cells from leukemic rats causes transmission of leukemia,” *Cancer Research*, vol. 61, no. 2, pp. 706–710, 2001.

Jaiswal BS, Eisenbach M. Capacitation. In:Hardy DM, editor. *Fertilization*. New York:Academic Press, 2002. p. 57-99

Jeruss J.S and Woodruff,T.K “Preservation of fertility in patients with cancer,” *New England Journal of Medicine*, vol. 360, no. 9, pp. 858–911, 2009.

Jiang XL, Fan LQ, Zhu WB. et al. Research on expression of CD117 on germ cells in human semen. *China Journal of Modern Medicine.* 2005,15(2):208-211

Jin, J.-M., Bai, P., He, W., Wu, F., Liu, X.-F., Han, D.-M., Liu, S., Yang, J.-K. Gender Differences in Patients With COVID-19: Focus on Severity and Mortality. *Front. Public Health* 2020, 8.

Jindal, S.K., Rawlins, R.G., Muller, C.H., Drobnis, E.Z. Guidelines for risk reduction when handling gametes from infectious patients seeking assisted reproductive technologies. *Reprod. Biomed. Online* 2016, 33, 121–130.

Johnson P, Ostergaard HL, Wasden C, Trowbridge IS: Mutational analysis of CD45. A leukocyte-specific protein tyrosine phosphatase. *J Biol Chem* 1992,267:8035-8041.

Jung, A., Schuppe, H.-C. Influence of genital heat stress on semen quality in humans. *Andrologia* 2007, 39, 203–215.

Kadmon, G., von Bohlen und Halbach, F., Horstkorte, R., Eckert, M., Altevogt, P. and Schachner, M. (1995). Evidence for cis interaction and cooperative signalling by the heat-stable antigen nectadrin (murine CD24) and the cell adhesion molecule L1 in neurons. *Eur. J. Neurosci.* 7, 993-1004.

Kai, H., Kai, M. Interactions of coronaviruses with ACE2, angiotensin II, and RAS inhibitors—lessons from available evidence and insights into COVID-19. *Hypertens. Res.* 2020.

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

Kay, R., Rosten, P. M. and Humphries, R. K. (1991). CD24, a signal transducer modulating B cell activation responses, is a very short peptide with a glycosyl phosphatidylinositol membrane anchor. *J. Immunol.* 147,1412-1416.

Kayaaslan, B., Korukluoglu, G., Hasanoglu, I., Kalem, A.K., Eser, F., Akinci, E., Guner, R. Investigation of SARS-CoV-2 in Semen of Patients in the Acute Stage of COVID-19 Infection. *Urol. Int.* 2020, 1–6.

Kiener PA, Mittler RS: CD45-protein tyrosine phosphatase cross-linking inhibits T cell receptor CD3-mediated activation in human T cells. *J Immunol* 1989, 143:23-38.

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

Kim, J., Thomsen, T., Sell, N., Goldsmith, A.J. Abdominal and testicular pain: An atypical presentation of COVID-19. *Am. J. Emerg. Med.* 2020, 38, 1542.e1–1542.e3.

Kim, T.S., Heinlein, C., Hackman, R.C., Nelson, P.S. Phenotypic Analysis of Mice Lacking the Tmprss2-Encoded Protease. *Mol. Cell. Biol.* 2006, 26, 965–975.

Kimura Y, Jones N, Kluppel M. et al. Targeted mutations of the juxtamembrane tyrosines in the Kit receptor tyrosine kinase selectively affect multiple cell lineages. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004,101(16):6015-6020

Kitami, Y., Okura, T., Marumoto, K., Wakamiya, R., Hiwada, K. Differential gene expression and regulation of type-1 angiotensin II receptor subtypes in the rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1992, 188, 446–452.

Kluin, P. M. & de Rooij, D. G. 1981 A comparison between the morphology and cell kinetics of gonocytes and adult type undifferentiated spermatogonia in the mouse. *Int. J. Androl.* 4, 475–493. (doi:10.1111/j.1365-2605.1981.tb00732.x)

Ko, C.-J., Huang, C.-C., Lin, H.-Y., Juan, C.-P., Lan, S.-W., Shyu, H.-Y., Wu, S.-R., Hsiao, P.-W., Huang, H.-P., Shun, C.-T., et al. Androgen-Induced TMPRSS2 Activates Matriptase and Promotes Extracellular Matrix Degradation, Prostate Cancer Cell Invasion, Tumor Growth, and Metastasis. *Cancer Res.* 2015, 75, 2949–2960.

Köhn, F.M., Dammshäuser, I., Neukamm, C., Renneberg, H., Siems, W.E., Schill, W.B., Aumüller, G. Ultrastructural localization of angiotensin-converting enzyme in ejaculated human spermatozoa. *Hum. Reprod.* 1998, 13, 604–610.

Koretzky GA, Picus J, Schultz T, Weiss A: The tyrosine phosphatase CD45 is required for T cell antigen receptor and CD2-mediated activation of a protein tyrosine kinase and interleukin 2 production. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:2037-2041

Koretzky GA, Picus J, Thomas ML, Weiss A: Tyrosine phosphatase CD45 is essential for coupling T cell antigen receptor to the phosphatidylinositol pathway. *Nature (Lond)* 1990;346:66-68.

Kornovski BS, McCoshen J, Kredenster J, Turley E. The regulation of sperm motility by a novel hyaluronan receptor. *Fertil Steril* 1994;61:935–40.

Krause DS, Ito T, Fackler MJ et al. Characterization of murine CD34, a marker for hematopoietic progenitor and stem cells. *Blood* 1994;84:691–701.

Kuba, K., Imai, Y., Ohto-Nakanishi, T., Penninger, J.M. Trilogy of ACE2: A peptidase in the renin-angiotensin system, a SARS receptor, and a partner for amino acid transporters. *Pharmacol. Ther.* 2010, 128, 119–128.

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

La Marca, A., Busani, S., Donno, V., Guaraldi, G., Ligabue, G., Girardis, M. Testicular pain as an unusual presentation of COVID-19: A brief review of SARS-CoV-2 and the testis. *Reprod. BioMedicine Online* 2020.

Lanza F, Healy L, Sutherland DR. Structural and functional features of the CD34 antigen: An update. *J Biol Regul Homeost Agents* 2001,15:1–13.

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

Lavrentyev, E.N., Malik, K.U. High glucose-induced Nox1-derived superoxides downregulate PKC-betaII, which subsequently decreases ACE2 expression and ANG(1-7) formation in rat VSMCs. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2009, 296, H106–H118.

Leader, A Lishner, M Michaeli, Jand A. Revel, “Fertility considerations and preservation in haemato-oncology patients undergoing treatment,” *British Journal of Haematology*, vol. 153, no. 3, pp. 291–308, 2011.

Leal, M.C., Pinheiro, S.V.B., Ferreira, A.J., Santos, R.A.S., Bordoni, L.S., Alenina, N., Bader, M., França, L.R. The role of angiotensin-(1-7) receptor Mas in spermatogenesis in mice and rats. *J. Anat.* 2009, 214, 736–743.

Lee HC, Wei YH, 2007 Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation and apoptosis in aging. *Exp Biol Med* 232: 592-606.

Leung, P., Sernia, C. The renin-angiotensin system and male reproduction: New functions for old hormones. *J. Mol. Endocrinol.* 2003, 263–270.]

Leung, P.S., Chan, H.C., Fu, L.X., Leung, P.Y., Chew, S.B., Wong, P.Y. Angiotensin II receptors: Localization of type I and type II in rat epididymides of different developmental stages. *J. Membr. Biol.* 1997, 157, 97–103.

Leung, P.S., Chan, H.C., Fu, L.X., Zhou, W.L., Wong, P.Y. Angiotensin II receptors, AT1 and AT2 in the rat epididymis. Immunocytochemical and electrophysiological studies. *Biochim. Biophys. Acta* 1997, 1357, 65–72.

Leung, P.S., Wong, T.P., Chung, Y.W., Chan, H.C. Androgen dependent expression of AT1 receptor and its regulation of anion secretion in rat epididymis. *Cell Biol. Int.* 2002, 26, 117–122.

Leung, P.S., Yao, X.Q., Chan, H.C., Fu, L.X., Wong, P.Y. Differential gene expression of angiotensin II receptor subtypes in the epididymides of mature and immature rats. *Life Sci.* 1998, 62, 461–468.

Li, D., Jin, M., Bao, P., Zhao, W., Zhang, S. Clinical Characteristics and Results of Semen Tests Among Men With Coronavirus Disease 2019. *JAMA Netw. Open* 2020, 3, e208292.

Li, L., Huang, T., Wang, Y., Wang, Z., Liang, Y., Huang, T., Zhang, H., Sun, W., Wang, Y. COVID-19 patients' clinical characteristics, discharge rate, and fatality rate of meta-analysis. *J. Med. Virol.* 2020, 92, 577–583.

Li, L.-J., Zhang, F.-B., Liu, S.-Y., Tian, Y.-H., Le, F., Wang, L.-Y., Lou, H.-Y., Xu, X.-R., Huang, H.-F., Jin, F. Human sperm devoid of germinal angiotensin-converting enzyme is

responsible for total fertilization failure and lower fertilization rates by conventional in vitro fertilization. *Biol. Reprod.* 2014, 90, 125.]

Li, Y., Zhou, W., Yang, L., You, R. Physiological and pathological regulation of ACE2, the SARS-CoV-2 receptor. *Pharmacol. Res.* 2020, 157, 104833.

Lim J, Sung S.Y, Kim H.J et al., “Long-term proliferation and characterization of human spermatogonial stem cells obtained from obstructive and non-obstructive azoospermia under exogenous feeder-free culture conditions,” *Cell Proliferation*, vol. 43, no. 4, pp. 405–417, 2010.

Lin, B., Ferguson, C., White, J.T., Wang, S., Vessella, R., True, L.D., Hood, L., Nelson, P.S. Prostate-localized and androgen-regulated expression of the membrane-bound serine protease TMPRSS2. *Cancer Res.* 1999, 59, 4180–4184.

Ling LZ, Ni YH, Hu YL. et al. Characteristics of C-kit+ cells derived from the human fetal liver. *Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research.* 2009,13(1):111-116

Liu, J., Ji, H., Zheng, W., Wu, X., Zhu, J.J., Arnold, A.P., Sandberg, K. Sex differences in renal angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) activity are 17 β -oestradiol-dependent and sex chromosome-independent. *Biol. Sex Differ.* 2010, 1, 6.

Lizio, M., Abugessaisa, I., Noguchi, S., Kondo, A., Hasegawa, A., Hon, C.C., de Hoon, M., Severin, J., Oki, S., Hayashizaki, Y., et al. Update of the FANTOM web resource: Expansion to provide additional transcriptome atlases. *Nucleic Acids Res.* 2019, 47, D752–D758.

Lo K.C, S. Whirlledge S, and Lamb D.J, “Stem cells: implications for urology,” *Current Urology Reports*, vol. 6, no. 1, pp. 49–54, 2005.

Loir M, Lanneau M, 1984 Structural function of the basic nuclear proteins in ram spermatids. *J Ultrastruct Res* 86: 262-72.

Long, B., Brady, W.J., Koyfman, A., Gottlieb, M. Cardiovascular complications in COVID-19. *Am. J. Emerg. Med.* 2020.

Lonsdale, J., Thomas, J., Salvatore, M., Phillips, R., Lo, E., Shad, S., Hasz, R., Walters, G., Garcia, F., Young, N., et al. The Genotype-Tissue Expression (GTEx) project. *Nat. Genet.* 2013, 45, 580–585.

Lopera Maya, E.A., van der Graaf, A., Lanting, P., van der Geest, M., Fu, J., Swertz, M., Franke, L., Wijmenga, C., Deelen, P., Zhernakova, A., et al. Lack of Association Between Genetic Variants at ACE2 and TMPRSS2 Genes Involved in SARS-CoV-2 Infection and Human Quantitative Phenotypes. *Front. Genet.* 2020, 11.

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

Loveland, K.L., Klein, B., Poeschl, D., Indumathy, S., Bergmann, M., Loveland, B.E., Hedger, M.P., Schuppe, H.-C. Cytokines in Male Fertility and Reproductive Pathologies: Immunoregulation and Beyond. *Front. Endocrinol.* 2017, 8.

Lucas, J., True, L., Hawley, S., Matsumura, M., Morrissey, C., Vessella, R., Nelson, P. The androgen-regulated type II serine protease TMPRSS2 is differentially expressed and mislocalized in prostate adenocarcinoma. *J. Pathol.* 2008, 215, 118–125.

Lucas, J.M., Heinlein, C., Kim, T., Hernandez, S.A., Malik, M.S., True, L.D., Morrissey, C., Corey, E., Montgomery, B., Mostaghel, E., et al. The Androgen-Regulated Protease TMPRSS2 Activates a Proteolytic Cascade Involving Components of the Tumor Microenvironment and Promotes Prostate Cancer Metastasis. *Cancer Discov.* 2014, 4, 1310–1325.

Ludvigsson, J.F. Systematic review of COVID-19 in children shows milder cases and a better prognosis than adults. *Acta Paediatr.* 2020, 109, 1088–1095.

Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ, 1997 Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389: 251-60.

M. Geens, E. Goossens, G. De block, L. Ning, D. Vansaen, and H. Tournaye, “Autologous spermatogonial stem cell transplantation in man: current obstacles for a future clinical application,” *Human Reproduction Update*, vol. 14, no. 2, pp. 121–129, 2008.

M. Geens, G. De Block, E. Goossens, V. Frederickx, A. Van Steirteghem, and H. Tournaye, “Spermatogonial survival after grafting human testicular tissue to immunodeficient mice,” *Human Reproduction*, vol. 21, no. 2, pp. 390–396, 2006.

Ma, L., Xie, W., Li, D., Shi, L., Ye, G., Mao, Y., Xiong, Y., Sun, H., Zheng, F., Chen, Z., et al. Evaluation of sex-related hormones and semen characteristics in reproductive-aged male COVID-19 patients. *J. Med. Virol.* 2020.

Ma.W, An L, Wu Z et al., “Efficient and safe recipient preparation for transplantation of mouse spermatogonial stem cells: pretreating testes with heat shock,” *Biology of Reproduction*, vol. 85, no. 4, pp. 670–677, 2011.

Magnan, J., Regoli, D. Characterization of receptors for angiotensin in the rat vas deferens. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 1979, 57, 417–423.

Mahalaxmi, I., et al., 2020. Covid-19 and olfactory dysfunction: a possible associative approach towards neurodegenerative diseases. *J. Cell.*

Malle, L. A map of SARS-CoV-2 and host cell interactions. *Nat. Rev. Immunol.* 2020.

Mathewson, A.C., Bishop, A., Yao, Y., Kemp, F., Ren, J., Chen, H., Xu, X., Berkhout, B., van der Hoek, L., Jones, I.M. Interaction of severe acute respiratory syndrome-coronavirus and NL63 coronavirus spike proteins with angiotensin converting enzyme-2. *J. Gen. Virol.* 2008, 89, 2741–2745.

Matsuda T, Horii Y, Ogura K, Nonomura M, Okada K, Yoshida O, 1992 [Chromosomal survey of 1001 subfertile males: incidence and clinical features of males with chromosomal anomalies]. *Hinyokika Kiyo* 38: 803-9.

Matsuyama, S., Nagata, N., Shirato, K., Kawase, M., Takeda, M., Taguchi, F. Efficient Activation of the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Spike Protein by the Transmembrane Protease TMPRSS2. *J. Virol.* 2010, 84, 12658–12664.

Matsuyama, S., Nao, N., Shirato, K., Kawase, M., Saito, S., Takayama, I., Nagata, N., Sekizuka, T., Katoh, H., Kato, F., et al. Enhanced isolation of SARS-CoV-2 by TMPRSS2-expressing cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2020, 117, 7001–7003.

Matzuk M. Mand D. Lamb J, “The biology of infertility: research advances and clinical challenges,” *Nature Medicine*, vol. 14, no. 11, pp. 1197–1213, 2008.

- McCarrey, J. 1993 Development of the germ cell. In *Cell and molecular biology of the testis* (eds C. Desjardins & L.Ewing), pp. 58–89. New York, NY: Oxford University Press.
- McLaren, A. 2003 Primordial germ cells in the mouse. *Dev. Biol.* 262, 1–15. (doi:10.1016/S0012-1606(03)00214-8)
- McLean, D.J. “Spermatogonial stem cell transplantation and testicular function,” *Cell and Tissue Research*, vol. 322, no. 1, pp. 21–31, 2005.
- McPherson SM, Longo FJ, 1993 Nicking of rat spermatid and spermatozoa DNA: possible involvement of DNA topoisomerase II. *Dev Biol* 158: 122-30.
- Meyers SA, Overstreet JW, Liu IKM, Drobnis EZ. Capacitation in vitro of stallion spermatozoa: comparison of progesterone-induced acrosome reactions in fertile and subfertile males. *Journal of Andrology* 1995,16:47-54.
- Millan, M.A., Aguilera, G. Angiotensin II receptors in testes. *Endocrinology* 1988, 122, 1984–1990.
- Millsop, J.W., Heller, M.M., Eliason, M.J., Murase, J.E. Dermatological medication effects on male fertility
- Mimeault M and Batra, “Concise review: recent advances on the significance of stem cells in tissue regeneration and cancer therapies,” *Stem Cells*, vol. 24, no. 11, pp.2319–2345, 2006.
- Miska, W., Schill, W.B. Enhancement of sperm motility by bradykinin and kinin analogs. *Arch. Androl.* 1990, 25, 63–67.
- Miyake K, Underhill CB, Lesley J, Kincade PW. Hyaluronate can function as a cell adhesion molecule and CD44 participates in hyaluronate recognition. *J Exp Med* 1990,172:69–75.
- Monsees, T.K., Miska, W., Schill, W.B. Characterization of kininases in testicular cells. *Immunopharmacology* 1996, 32, 169–171.
- Morris ID, 2002 Sperm DNA damage and cancer treatment. *Int J Androl* 25: 255-61.
- Müller K, Pomorski T, Müller P, Herrmann A. Protein-dependent translocation of aminophospholipids and asymmetric transbilayer distribution of phospholipids in the plasma membrane of ram sperm cells. *Biochemistry* 1994,33:9968-9974.
- Muriel L, Segrelles E, Goyanes V, Gosalvez J, Fernandez JL, 2004 Structure of human sperm DNA and background damage, analysed by in situ enzymatic treatment and digital image analysis. *Mol Hum Reprod* 10: 203-9.
- Naito, M., Itoh, M. REVIEW ARTICLE: Patterns of Infiltration of Lymphocytes into the Testis Under Normal and Pathological Conditions in Mice: TESTICULAR INFILTRATION OF LYMPHOCYTES. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2007, 59, 55–61.
- Nayernia K, Nolte J, Michelmann H. Wet al., “In vitro differentiated embryonic stem cells give rise to male gametes that can generate offspring mice,” *Developmental Cell*, vol. 11, no. 1, pp. 125–132, 2006.
- Nelson WG, Pienta KJ, Barrack ER, Coffey DS, 1986 The role of the nuclear matrix in the organization and function of DNA. *Annu Rev Biophys Biophys Chem* 15:457-75.
- Nielsen J, Wohler M, 1991 Chromosome abnormalities found among 34,910 newborn children: results from a 13-year incidence study in Arhus, Denmark. *Hum Genet* 87: 81-83.

Nielsen JS, McNagny KM. CD34 is a key regulator of hematopoietic stem cell trafficking to bone marrow and mast cell progenitor trafficking in the periphery. *Microcirculation* 2009,16:487–496.

Nielsen JS, McNagny KM. Novel functions of the CD34 family. *J Cell Sci* 2008,121:3683–3692.

Nishikawa S, Kusakabe M, Yoshinaga K. et al. In utero manipulation of coat color formation by a monoclonal anti-c-kit antibody: two distinct waves of c-kit-dependency during melanocyte development. *EMBO J.* 1991,10(8):2111-2118

Nugent D, Meirrow D, Brook P.F, Aubard Y, and Gosden R.G, “Transplantation in reproductive medicine: previous experience, present knowledge and future prospects,” *Human Reproduction Update*, vol. 3, no. 3, pp. 267–280, 1997.

Oakes, J.M., Fuchs, R.M., Gardner, J.D., Lazartigues, E., Yue, X. Nicotine and the renin-angiotensin system. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2018, 315, R895–R906.

Oatley M.J, Racicot K.E, and Oatley J.M, “Sertoli cells dictate spermatogonial stem cell niches in the mouse testis,” *Biology of Reproduction*, vol. 84, no. 4, pp. 639–645, 2011.

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

Okeahialam, B.N., Amadi, K., Ameh, A.S. Effect of lisinopril, an angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitor on spermatogenesis in rats. *Arch. Androl.* 2006, 52, 209–213.

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

Oran, D.P., Topol, E.J. Prevalence of Asymptomatic SARS-CoV-2 Infection: A Narrative Review. *Ann. Intern. Med.* 2020. [CrossRef] [PubMed]

Ou, X., Liu, Y., Lei, X., Li, P., Mi, D., Ren, L., Guo, L., Guo, R., Chen, T., Hu, J., et al. Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. *Nat. Commun.* 2020, 11, 1–12.

Pan, F., Xiao, X., Guo, J., Song, Y., Li, H., Patel, D.P., Spivak, A.M., Alukal, J.P., Zhang, X., Xiong, C., et al. No evidence of severe acute respiratory syndrome-coronavirus 2 in semen of males recovering from coronavirus disease 2019. *Fertil. Steril.* 2020, 113, 1135–1139.

Pan, P.-P., Zhan, Q.-T., Le, F., Zheng, Y.-M., Jin, F. Angiotensin-Converting Enzymes Play a Dominant Role in Fertility. *Int. J. Mol. Sci.* 2013, 14, 21071–21086.

Pandey, K.N., Inagami, T. Regulation of renin angiotensins by gonadotropic hormones in cultured murine Leydig tumor cells. Release of angiotensin but not renin. *J. Biol. Chem.* 1986, 261, 3934–3938. 51. Herr, D., Bekes, I., Wulff, C. Local Renin-Angiotensin System in the Reproductive System. *Front. Endocrinol.* 2013, 4.

Pandey, K.N., Maki, M., Inagami, T. Detection of renin mRNA in mouse testis by hybridization with renin cDNA probe. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1984, 125, 662–667.

- Paoli, D., Pallotti, F., Colangelo, S., Basilico, F., Mazzuti, L., Turriziani, O., Antonelli, G., Lenzi, A., Lombardo, F. Study of SARS-CoV-2 in semen and urine samples of a volunteer with positive naso-pharyngeal swab. *J. Endocrinol. Investig.* 2020.
- Paoloni-Giacobino, A., Chen, H., Peitsch, M.C., Rossier, C., Antonarakis, S.E. Cloning of the TMPRSS2 Gene, Which Encodes a Novel Serine Protease with Transmembrane, LDLRA, and SRCR Domains and Maps to 21q22.3. *Genomics* 1997, 44, 309–320.
- Parinaud J, Mieusset R, Vieitez G, Labal B, Richoilley G, 1993 Influence of sperm parameters on embryo quality. *Fertil Steril* 60(5): 888-92.
- Park, I.H., Zhao R, J. West A et al., “Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors,” *Nature*, vol. 451, no. 7175, pp. 141–146, 2009
- Parks JE, Hammerstedt RH. Developmental changes occurring in the lipid of ram epididymal sperm plasma membranes. *Biology of Reproduction* 1985,32:653-668.
- Parmegiani, L., Accorsi, A., Bernardi, S., Arnone, A., Cognigni, G.E., Filicori, M. A reliable procedure for decontamination before thawing of human specimens cryostored in liquid nitrogen: Three washes with sterile liquid nitrogen (SLN2). *Fertil. Steril.* 2012, 98, 870–875.
- Pascolo, L., Zupin, L., Melato, M., Tricarico, P.M., Crovella, S. TMPRSS2 and ACE2 Coexpression in SARS-CoV-2 Salivary Glands Infection. *J. Dent. Res.* 2020, 99, 1120–1121.
- Passos-Silva, D.G., Verano-Braga, T., Santos, R.A.S. Angiotensin-(1–7): Beyond the cardio-renal actions. *Clin. Sci.* 2013, 124, 443–456.
- Patrat C, Serres C, Jouannet P. The acrosome reaction in human spermatozoa
- Paul, M., Poyan Mehr, A., Kreutz, R. Physiology of Local Renin-Angiotensin Systems. *Physiological Reviews* 2006, 86, 747–803.
- Pauls, K., Metzger, R., Steger, K., Klonisch, T., Danilov, S., Franke, F.E. Isoforms of angiotensin I-converting enzyme in the development and differentiation of human testis and epididymis. *Andrologia* 2003, 35, 32–43.
- Pavone, C., Giammanco, G.M., Baiamonte, D., Pinelli, M., Bonura, C., Montalbano, M., Profeta, G., Curcurù, L., Bonura, F. Italian males recovering from mild COVID-19 show no evidence of SARS-CoV-2 in semen despite prolonged nasopharyngeal swab positivity. *Int. J. Impot. Res.* 2020.
- Phillips, B.T. Gassei, K. and Orwig, K.E. “Spermatogonial stem cell regulation and spermatogenesis,” *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, vol. 365, no. 1546, pp. 1663–1678, 2010.
- Philo JS, Wen J, Wypych J. et al. Human Stem Cell Factor Dimer Forms a Complex with Two Molecules of the Extracellular Domain of Its Receptor, Kit. *J Biol Chem.* 1996,271(12):6895-902
- Pogany GC, Corzett M, Weston S, Balhorn R, 1981 DNA and protein content of mouse sperm. Implications regarding sperm chromatin structure. *Exp Cell Res* 136: 127-36.
- Potts RJ, Newbury CJ, Smith G, Notarianni LJ, Jefferies TM, 1999 Sperm chromatin damage associated with male smoking. *Mutat Res* 423: 103-11.

Pound, N., Javed, M. H., Ruberto, C., Shaikh, M. A., & Del Valle, A. P. (2002). Duration of sexual arousal predicts semen parameters for masturbatory ejaculates. *Physiology and Behavior*, 76(4–5), 685–689. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(02\)00803-X](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(02)00803-X)

Prevalence of Klinefelter's syndrome in male breast cancer patients. *Anticancer Res* 17:4293-7. 1997

Qiu, L., Liu, X., Xiao, M., Xie, J., Cao, W., Liu, Z., Morse, A., Xie, Y., Li, T., Zhu, L. SARS-CoV-2 is not detectable in the vaginal fluid of women with severe COVID-19 infection. *Clin. Infect. Dis.* 2020.

Quill TA, Garbers DL. Capacitation. In:Hardy DM, editor. *Fertilization*. New York:Academic Press, 2002. p. 57-99.

Raj, V.S., Mou, H., Smits, S.L., Dekkers, D.H.W., Müller, M.A., Dijkman, R., Muth, D., Demmers, J.A.A., Zaki, A., Fouchier, R.A.M., et al. Dipeptidyl peptidase 4 is a functional receptor for the emerging human coronavirus-EMC. *Nature* 2013, 495, 251–254.

Ralph SJ, Thomas ML, Morton CC, Trowbridge IS: Structural variants of human T200 glycoprotein (leukocyte-common antigen).*EMBO J*1987,a.1251-1257.

Ramaraj, P., Kessler, S.P., Colmenares, C., Sen, G.C. Selective restoration of male fertility in mice lacking angiotensin-converting enzymes by sperm-specific expression of the testicular isozyme. *J. Clin. Investig.* 1998, 102, 371–378.

Ranganathan S, Bharadwaj A, Datta K. Hyaluronan mediates sperm motility by enhancing phosphorylation of proteins including hyaluronan binding protein. *Cell Mol Biol Res* 1995,41:467–76.

Ranganathan S, Ganguly AK, Datta K. Evidence for presence of hyaluronan binding protein on spermatozoa and its possible involvement in sperm function. *Mol Reprod Dev* 1994,38:69–76. 11.

Rathi R, Colenbrander B, Bevers MM, Gadella BM. Evaluation of in vitro capacitation of stallion spermatozoa. *Biology of Reproduction* 2001,65:462–470.

Reis, A.B., Araújo, F.C., Pereira, V.M., Dos Reis, A.M., Santos, R.A., Reis, F.M. Angiotensin (1-7) and its receptor Mas are expressed in the human testis: Implications for male infertility. *J. Mol. Histol.* 2010, 41, 75–80.

Rex A. Hess, *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis*, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1991,636:1 15

Ricci G, Granzotto M, Luppi S, Giolo E, Martinelli M, Zito G, Borelli M. Effect of seminal leukocytes on in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection outcomes. *Fertil Steril.* 2015,104(1):87-93.

Ricci G, Presani G, Guaschino S, Simeone R, Perticarari S. Leukocyte detection in human semen using flow cytometry. *Hum Reprod.* 2000,15(6):1329-37

Rival C, Theas MS, Guazzone VA & Lustig L 2006 Interleukin-6 and IL-6 receptor cell expression in testis of rats with autoimmune orchitis. *Journal of Reproductive Immunology* 70 43–58

Rival C, Theas MS, Guazzone VA & Lustig L 2006 Interleukin-6 and IL-6 receptor cell expression in testis of rats with autoimmune orchitis. *Journal of Reproductive Immunology* 70 43–58.

Roche, J.A., Roche, R. A hypothesized role for dysregulated bradykinin signaling in COVID-19 respiratory complications. *FASEB J.* 2020, 34, 7265–7269.

Rod Balhorn, The protamine family of sperm nuclear proteins, *Genome Biology*, 2007,8:227

Rodriguez I, Ody C, Araki K, Garcia I, Vassalli P, 1997 An early and massive wave of germinal cell apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis. *EMBO J* 16: 2262-70.

Rodríguez-Puertas, R. ACE2 Activators for the Treatment of Covid 19 Patients. *J. Med Virol.* 2020.

Rodriguez-Sosa J.R and Dobrinski I, “Recent developments in testis tissue xenografting,” *Reproduction*, vol. 138, no. 2, pp. 187–194, 2009

Roeder GS. Meiotic chromosomes:it takes two to tango. *Genes Dev* 1997,11:2600-21

Rogers, K. (n.d.-b). The biochemistry of semen. Retrieved April 28, 2020, from <https://archive.org/stream/biochemistryofse00mann#page/n37/mode/2up>

Rougon, G., Alterman, L. A., Dennis, K., Guo, G. X.-J and Kinnon, C. (1991). The murine heat-stable antigen: a differentiation antigen expressed in both the hemato-lymphoid and neural cell lineages. *Eur. J. Immunol.* 21, 1397-1402.

Rousseaux S, Caron C, Govin J, Lestrat C, Faure AK, Khochbin S, 2005 Establishment of male-specific epigenetic information. *Gene* 345: 139-53.

Roy S, Banerjee A, Pandey HC, Singh G, Kumari GL, 2001 Application of seminal germ cell morphology and semen biochemistry in the diagnosis and management of azoospermic subjects. *Asian J Androl* 3: 55-62.

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

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

Rüdiger W. Schulz & Takeshi Miura, Spermatogenesis and its endocrine regulation, *Fish Physiology and Biochemistry*, 2002,26:43 56

Rüdiger W. Schulz & Takeshi Miura, Spermatogenesis and its endocrine regulation, *Fish Physiology and Biochemistry*, 2002,26:43-56

Rüster, C., Wolf, G. Renin-angiotensin-aldosterone system and progression of renal disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2006, 17, 2985–2991.

Sabeur, K., Vo, A.T., Ball, B.A. Effects of angiotensin II on the acrosome reaction in equine spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 2000, 120, 135–142.

Saga Y, Tung J-S, Shen F-W, Boyse EA: Alternative use of 5' exons in the specification of Ly-5 Isoforms distinguishing hematopoietic cell lineages. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:5364-368.

Saga Y, TungJ-S, Shen F-W, BoyseEA: Sequences of Ly-5 cDNA: Isoform-related diversity of Ly-5 mRNA.*Proc Natl Acad Sci USA* 1986,83:6940-6944

Saha, L., Garg, S.K., Bhargava, V.K., Mazumdar, S. Role of angiotensin-converting enzyme inhibitor, lisinopril, on spermatozoal functions in rats. *Methods Find Exp. Clin. Pharmacol.* 2000, 22, 159–162.

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

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

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

Sammar, M., Aigner, S., Hubbe, M., Schirmacher, V., Schachner, M., Vestweber, D. and Altevogt, P. (1994). Heat-stable antigen (CD24) as ligand for mouse P-selectin. *Int. Immunol.* 6, 1027-1036

Santos, R.A.S., Ferreira, A.J. Angiotensin-(1-7) and the renin-angiotensin system. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 2007, 16, 122–128.

Santos, R.A.S., Simoes e Silva, A.C., Maric, C., Silva, D.M.R., Machado, R.P., de Buhr, I., Heringer-Walther, S., Pinheiro, S.V.B., Lopes, M.T., Bader, M., et al. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003, 100, 8258–8263.

SART Embryology Laboratory Suggestions For COVID-19. Available online: <https://www.sart.org/professionals-and-providers/covid-19-resources/embryology-laboratory-suggestions-for-covid-19/> (accessed on 20 May 2020).

Sato, T. Katagiri, K Gohbara, A et al., “In vitro production of functional sperm in cultured neonatal mouse testes,” *Nature*, vol. 471, no. 7339, pp. 504–508, 2011

Scherberich A, Di Maggio ND, McNagny KM. A familiar stranger: CD34 expression and putative functions in SVF cells of adipose tissue. *World J Stem Cells* 2013,5:1–8.

Schlatt, S, J. Ehmcke, J and Jahnukainen, K “Testicular stem cells for fertility preservation: preclinical studies on male germ cell transplantation and testicular grafting,” *Pediatric Blood and Cancer*, vol. 53, no. 2, pp. 274–280, 2009.

Seandel M and Rafii S, “In vitro sperm maturation,” *Nature*, vol. 471, no. 7339, pp. 453–455, 2011

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

Serres C, Feneux D, Berthon B. Decrease of internal free calcium and human sperm movement. *Cell Motil Cytoskel* 1991,18:228–40.

Seshagiri PB, 2001 Molecular insights into the causes of male infertility. *J Biosci* 26: 429-35.

Sharlip ID, Jarow JP, Belker AM, Lipshultz LI, Sigman M, Thomas AJ, Schlegel PN, Howards SS, Nehra A, Damewood MD, Overstreet JW, Sadovsky R, 2002 Best practice policies for male infertility. *Fertil Steril* 77(5): 873-82.

Sharpe RM. Reegulation of spermatogenesis. In: Knobil E, Neil JD (eds). The physiology of reproduction. New York: Raven Press, 1994, p. 1363–434.

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

Shen, Q., Xiao, X., Aierken, A., Liao, M., Hua, J. The ACE2 Expression in Sertoli cells and Germ cells may cause male reproductive disorder after SARS-CoV-2 Infection. *J. Cell. Mol. Med.* 2020, 24, 9472–9477.

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

Sherwood, L. (2016). Εισαγωγή στη Φυσιολογία του Ανθρώπου (8η). Ακαδημαϊκές εκδόσεις Ι. Μπάσδρα και ΣΙΑ Ο.Ε.

Shetty G and Meistrich M.L, “Hormonal approaches to preservation and restoration of male fertility after cancer treatment,” *Journal of the National Cancer Institute. Monographs*, no. 34, pp. 36–39, 2005.

Shin D, Lo K.C, and Lipshultz L.I, “Treatment options for the infertile male with cancer,” *Journal of the National Cancer Institute. Monographs*, no. 34, pp. 48–50, 2005.

Shinohara T., Ishii K., and Kanatsu-Shinohara M, “Unstable side population phenotype of mouse spermatogonial stem cells in vitro,” *Journal of Reproduction and Development*, vol. 57, no. 2, pp. 288–295, 2011.

Shirasawa, T., Akashi, T., Sakamoto, K., Takahashi, H., Maruyama, N. and Hirokawa, K. (1993). Gene expression of CD24 core peptide molecule in developing brain and developing non-neural tissues. *Dev. Dynam.* 198, 1-13.

Shirasawa, T., Akashi, T., Sakamoto, K., Takahashi, H., Maruyama, N. and Hirokawa, K. (1993). Gene expression of CD24 core peptide molecule in developing brain and developing non-neural tissues. *Dev. Dynam.* 198, 1-13.

Shiroo M, Goff L, Biffen M, Shivnan E, Alexander D: CD45-tyrosine phosphatase-activated p59k” couples the T-cell antigen receptor to pathways of diacylglycerol production, protein kinase-C activation and calcium influx. *EMBO J* 1992, 11:4887-4898.

Shulla, A., Heald-Sargent, T., Subramanya, G., Zhao, J., Perlman, S., Gallagher, T. A Transmembrane Serine Protease Is Linked to the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Receptor and Activates Virus Entry. *J. Virol.* 2011, 85, 873–882.

Sibony, M., Gasc, J.M., Soubrier, F., Alhenc-Gelas, F., Corvol, P. Gene expression and tissue localization of the two isoforms of angiotensin I converting enzyme. *Hypertension* 1993, 21, 827–835.

Siems, W.-E., Maul, B., Wiesner, B., Becker, M., Walther, T., Rothe, L., Winkler, A. Effects of kinins on mammalian spermatozoa and the impact of peptidolytic enzymes. *Andrologia* 2003, 35, 44–54.

Simmons, G., Zmora, P., Gierer, S., Heurich, A., Pöhlmann, S. Proteolytic activation of the SARS-coronavirus spike protein: Cutting enzymes at the cutting edge of antiviral research. *Antivir. Res.* 2013, 100, 605–614.

Singh, S. R. Zheng, Z. Wang H., Oh S. W., Chen X., and Hou S. X., "Competitiveness for the niche and mutual dependence of the germline and somatic stem cells in the *Drosophila* testis are regulated by the JAK/STAT signaling," *Journal of Cellular Physiology*, vol. 223, no. 2, pp. 500–510, 2010.

Sirivaidyapong S, Bevers MM, Gadella BM, Colenbrander B. Induction of the acrosome reaction in dog sperm cells is dependent on epididymal maturation: the generation of a functional progesterone receptor is involved. *Molecular Reproduction and Development* 2001,58:451-459.

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

Song, C., Wang, Y., Li, W., Hu, B., Chen, G., Xia, P., Wang, W., Li, C., Diao, F., Hu, Z., et al. Absence of 2019 novel coronavirus in semen and testes of COVID-19 patients†. *Biol. Reprod.* 2020.

Song, H., Seddighzadeh, B., Cooperberg, M.R., Huang, F.W. Expression of ACE2, the SARS-CoV-2 Receptor, and TMPRSS2 in Prostate Epithelial Cells. *Eur. Urol.* 2020, 78, 296–298.

St John JC, Bowles EJ, Amaral A, 2007 Sperm mitochondria and fertilization. *Soc Reprod Fertil* 65 (Suppl): 399-416.

St John JC, Sakkas D, Barrait CL, 2000 A role for mitochondrial DNA and sperm survival. *J Androl* 21: 189-99.155

Stanley, K.E., Thomas, E., Leaver, M., Wells, D. Coronavirus disease (COVID-19) and fertility: Viral host entry protein expression in male and female reproductive tissues. *Fertil. Steril.* 2020.

Stefan Schlatt & Jens Ehmcke, Regulation of spermatogenesis: An evolutionary biologist's perspective, *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 2014,29:2-16

Streuli M, Krueger NX, Thai T, Tang M, Saito H: Distinct functional roles of the two intracellular phosphatase like domains of the receptorlinked protein tyrosine phosphatases LCA and LAR. *EMBO J* 1990,9:2399-2407.

Streuli M. Hall LR, Saga Y, Schlossman SF, Saito H: Differential usage of three exons generates at least five different mRNAs encoding human leukocyte common antigens. *J Exp Med* 1987,166:1548-1566

Suarez SS, Varosi SM, Dai X. Intracellular calcium increases with hyperactivation in intact, moving hamster sperm and oscillates with the flagellar beat cycle. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993,90:4660–4.

Suda T, Takahashi T, Golstein P, Nagata S, 1993 Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 75: 1169-78.

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

Sugiyama K, Komada Y, Deguchi T, Zhang XL, Azuma E, Ido M, et al. CD3-mediated T cell activation is inhibited by anti-CD44 monoclonal antibodies directed to the hyaluronan-binding region. *Immunol Invest* 1999,28:185–200.

Sum, C.S., Cheung, W.T. Characterization of contractile response to angiotensin in epididymal rat vas deferens. *Pharmacology* 1995, 51, 105–111.

Suresh C. Sikka, Naz RK. Endocrine disruptors: effects on male and female reproductive system, *Endocrine disruptors and male sexual dysfunction* CRC press, 2004

Syriou, V., et al., 2018. Cytokines and male infertility. *Eur. Cytokine Netw.* 29, 73–82.
Takahashi T, Ellingson MK, Wong P, Israelow B, Lucas C, Klein J, Silva J, Mao T, Oh JE & Tokuyama M 2020 Sex differences in immune responses that underlie COVID-19 disease outcomes. *Natureng spermatogonia stage. Development* 133, 1495–1505.

Tanphaichitr N, Sobhon P, Taluppeth N, Chalermisarachai P, 1978 Basic nuclear proteins in testicular cells and ejaculated spermatozoa in man. *Exp Cell Res* 117:347-56.

Tebbs, C., Pratten, M.K., Broughton Pipkin, F. Angiotensin II is a growth factor in the peri-implantation rat embryo. *J. Anat.* 1999, 195, 75–86.

Tharapel AT, Wachtel SS 2006 PRINS for mapping single-copy genes. *Methods Mol Biol* 338: 59-67.

The ESHRE COVID-19 Working Group, Vermeulen, N., Ata, B., Gianaroli, L., Lundin, K., Mocanu, E., Rautakallio-Hokkanen, S., Tapanainen, J.S., Veiga, A. A picture of medically assisted reproduction activities during the COVID-19 pandemic in Europe. *Hum. Reprod. Open* 2020, 2020.

Therien I, Manjunath P. Effect of progesterone on bovine sperm capacitation and acrosome reaction. *Biology of Reproduction* 2003,69:1408-1415.

Thomas M. The leukocyte common antigen family. In: Paul WE, Fathman CG, Metzger H, ed. *Annual Reviews in Immunology*, Palo Alto, CA: Annual Reviews Inc., 1989:339-370.

Thomas MI, Leftancois L: Differential expression of leukocyte-common antigen famil. *Immunol Today* 1988,9:320-326.

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

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

Tonks N, Diltz CD, Fischer EH: CD45, an integral membrane protein tyrosine phosphatase. Characterization of enzyme activity. *J Biol Chem* 1990,265: 10674-10680.

Tonks NK, Diltz CD, Fischer EH: Characterization of the major protein-tyrosine-phosphatases of human placenta. *J Biol Chem* 1988,263:6722-6730

Trowbndge IS, Ostergaard HL, Johnson P: CD45: A leukocyte-specific member of the protein tyrosine phosphatase family. *Biochim Biophys Acta* 1991:1095:46-56.

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

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

Uhlen, M., Fagerberg, L., Hallstrom, B.M., Lindskog, C., Oksvold, P., Mardinoglu, A., Sivertsson, A., Kampf, C., Sjostedt, E., Asplund, A., et al. Tissue-based map of the human proteome. *Science* 2015, 347, 1260419.

Vaarala, M.H., Porvari, K.S., Kellokumpu, S., Kyllönen, A.P., Vihko, P.T. Expression of transmembrane serine protease TMPRSS2 in mouse and human tissues. *J. Pathol.* 2001, 193, 134–140.

Vaiarelli, A., Bulletti, C., Cimadomo, D., Borini, A., Alviggi, C., Ajossa, S., Anserini, P., Gennarelli, G., Guido, M., Levi-Setti, P.E., et al. COVID-19 and ART: The view of the Italian Society of Fertility and Sterility and Reproductive Medicine. *Reprod. BioMedicine Online* 2020.

Valdés, G., Neves, L.a.A., Anton, L., Corthorn, J., Chacón, C., Germain, A.M., Merrill, D.C., Ferrario, C.M., Sarao, R., Penninger, J., et al. Distribution of angiotensin-(1-7) and ACE2 in human placentas of normal and pathological pregnancies. *Placenta* 2006, 27, 200–207.

Valdivia, A., Cortés, L., Beitia, M., Totorikaguena, L., Agirregoitia, N., Corcostegui, B., Casis, L., Matorras, R., Irazusta, J., Agirregoitia, E. Role of Angiotensin-(1-7) via MAS receptor in human sperm motility and acrosome reaction. *Reproduction* 2020, 159, 241–249.

Van Doremalen, N., Bushmaker, T., Morris, D.H., Holbrook, M.G., Gamble, A., Williamson, B.N., Tamin, A., Harcourt, J.L., Thornburg, N.J., Gerber, S.I., et al. Aerosol and Surface Stability of SARS-CoV-2 as Compared with SARS-CoV-1. *N. Engl. J. Med.* 2020, 382, 1564–1567.

Verma, S., Saksena, S., Sadri-Ardekani, H. ACE2 receptor expression in testes: Implications in coronavirus disease 2019 pathogenesis†. *Biol. Reprod.* 2020, 103, 449–451.

Vicari, E., Calogero, A., 2001. Effects of treatment with carnitines in infertile patients with prostatitis-epididymitis. *Hum. Reprod.* 16, 2338–2342.

Vinson, G.P., Mehta, J., Evans, S., Matthews, S., Puddefoot, J.R., Saridogan, E., Holt, W.V., Djahanbakhch, O. Angiotensin II stimulates sperm motility. *Regul. Pept.* 1996, 67, 131–135.

Vinson, G.P., Puddefoot, J.R., Ho, M.M., Barker, S., Mehta, J., Saridogan, E., Djahanbakhch, O. Type 1 angiotensin II receptors in rat and human sperm. *J. Endocrinol.* 1995, 144, 369–378.

Vogt PH, Edelmann A, Kirsch S, Henegariu O, Hirschmann P, Kiesewetter F, Köhn FM, Schill WB, Farah S, Ramos C, Hartmann M, Hartschuh W, Meschede D, Behre HM, Castel A, Nieschlag E, Weidner W, Gröne HJ, Jung A, Engel W, Haidl G, 1996 Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11. *Hum Mol Genet* 5 (7): 933-43.

Volpe, M., Musumeci, B., De Paolis, P., Savoia, C., Morganti, A. Angiotensin II AT2 receptor subtype: An uprising frontier in cardiovascular disease? *J. Hypertens.* 2003, 21, 1429–1443.

Wallace DC, Brown MD, Lott MT, 1997 Mitochondrial genetics. In: Rimoin DL, Connor JM, Pyeritz RE, Emery AEH, eds. Emory and Rimoin's principles and practice of medical genetics. London: Churchill Livingstone: 277-332.

Walther, T., Balschun, D., Voigt, J.P., Fink, H., Zuschratter, W., Birchmeier, C., Ganten, D., Bader, M. Sustained long term potentiation and anxiety in mice lacking the Mas protooncogene. *J. Biol. Chem.* 1998, 273, 11867–11873.

Wang, W., Xu, Y., Gao, R., Lu, R., Han, K., Wu, G., Tan, W. Detection of SARS-CoV-2 in Different Types of Clinical Specimens. *JAMA* 2020, 323, 1843–1844.

Wang, Z., Xu, X. scRNA-seq Profiling of Human Testes Reveals the Presence of the ACE2 Receptor, A Target for SARS-CoV-2 Infection in Spermatogonia, Leydig and Sertoli Cells. *Cells* 2020, 9, 920.

Ward WS, Coffey DS, 1991 DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. *Biol Reprod* 44: 569-74.

Ward WS, Partin AW, Coffey DS, 1989 DNA loop domains in mammalian spermatozoa. *Chromosoma* 98: 153-9.

Weiske, W.-H. (2001). Vasectomy. *Andrologia*, 33(3), 125–134. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0272.2001.00445.x>

Wenger, R. H., Kopf, M., Nitschke, L., Lamers, M. C., Köhler, G. and Nielsen, P. J. (1995). B-cell maturation in chimaeric mice deficient for the heat stable antigen (HSA/mouse CD24). *Transgen. Res.* 4, 173-183.

Wennemuth, G., Babcock, D.F., Hille, B. Distribution and function of angiotensin II receptors in mouse spermatozoa. *Andrologia* 1999, 31, 323–325.

WHO World Health Organization. Coronavirus Disease (COVID-19) Dashboard. Available online: <https://covid19.who.int> (accessed on 26 August 2020).

Woolveridge I, Morris ID, 2000 Apoptosis in male reproductive toxicology. In: Roberts R, editor. Apoptosis in toxicology. New York/London: Taylor and Francis, p 72-87.

World Health Organization, 1999 WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. Cambridge: Cambridge University Press.

World Health Organization, 2010 WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, fifth edition.

WuH,JiangX,GaoY, Liu W, Wang F, Gong M, Chen R, Yu X, Zhang W & Gao B 2019 Mumps virus infection disrupts blood-testis barrier through the induction of TNF-alpha in Sertoli cells. *FASEB Journal* 33 12528–12540.

Wyns,C Curaba,M Vanabelle,B A. van Langendonck, and J. Donnez, “Options for fertility preservation in prepubertal boys,” *Human Reproduction Update*, vol. 16, no. 3, pp. 312–328, 2010.

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

Xu, J., Qi, L., Chi, X., Yang, J., Wei, X., Gong, E., Peh, S., Gu, J. Orchitis: A complication of severe acute respiratory syndrome (SARS). *Biol. Reprod.* 2006, 74, 410–416.

Yang, M., Chen, S., Huang, B., Zhong, J.-M., Su, H., Chen, Y.-J., Cao, Q., Ma, L., He, J., Li, X.-F., et al. Pathological Findings in the Testes of COVID-19 Patients: Clinical Implications. *Eur. Urol. Focus* 2020, 6, 1124–1129.

Yang, X., Yu, Y., Xu, J., Shu, H., Xia, J., Liu, H., Wu, Y., Zhang, L., Yu, Z., Fang, M., et al. Clinical course and outcomes of critically ill patients with SARS-CoV-2 pneumonia in Wuhan, China: A single-centered, retrospective, observational study. *Lancet Respir. Med.* 2020, 8, 475–481.

Yeh J.R and Nagano M.C, “Spermatogonial stem cell biomarkers: improved outcomes of spermatogonial transplantation in male fertility restoration?” *Expert Review of Molecular Diagnostics*, vol. 9, no. 2, pp. 109–114, 2009.

Yen PH, Chai NN, Salido EC, 1996 The human autosomal gene DAZLA: testis specificity and a candidate for male infertility. *Hum Mol Genet* 5: 2013-17.

Yencilek F, Baykal C, 2005 46 XX male syndrome: a case report. *Clin Exp Obstet Gynecol* 32: 263-4.

Yin, Y., Wunderink, R.G. MERS, SARS and other coronaviruses as causes of pneumonia: MERS, SARS and coronaviruses. *Respirology* 2018, 23, 130–137.

Young, D., Waitches, G., Birchmeier, C., Fasano, O., Wigler, M. Isolation and characterization of a new cellular oncogene encoding a protein with multiple potential transmembrane domains. *Cell* 1986, 45, 711–719.

Yoshida, S., Sukeno, M., Nakagawa, T., Ohbo, K., Nagamatsu, G., Suda, T. & Nabeshima, Y. 2006 The first round of mouse spermatogenesis is a distinctive program that lacks the self-renewing spermatogonia stage *Development* 2006,133,1495-1505

Zavos, P. M., & Goodpasture, J. C. (1989). Clinical improvements of specific seminal deficiencies via intercourse with a seminal collection device versus masturbation. *Fertility and Sterility*, 51(1), 190–193. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)60455-7](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)60455-7)

Zhang JJ, Muzs LZ, Boyle MS. Variations in structural and functional changes of stallion spermatozoa in response to calcium ionophore A23187. *Journal of Reproduction* 1999,44:199-205.

Zhang H, Yin Y, Wang G, Liu Z, Liu L & Sun F 2014 Interleukin-6 disrupts blood-testis barrier through inhibiting protein degradation or activating phosphorylated ERK in Sertoli cells. *Scientific Reports* 4 426

Zhang, J., Wu, Y., Wang, R., Lu, K., Tu, M., Guo, H., Xie, W., Qin, Z., Li, S., Zhu, P., et al. Bioinformatic Analysis Reveals That the Reproductive System is Potentially at Risk from SARS-CoV-2. *Preprints* 2020.

Zhao, J., et al., 2003. Clinical pathology and pathogenesis of severe acute respiratory syndrome. *Chin. J. Exper. Clin. Virol.* 17, 217–221

Zhao, J., Zhou, G., Sun, Y., Wang, S., Yang, J., Meng, E., Pan, D., Li, W., Zhou, X., Wang, Y., et al. Clinical pathology and pathogenesis of severe acute respiratory syndrome. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du*

Zhao, S., Lin, Q., Ran, J., Musa, S.S., Yang, G., Wang, W., Lou, Y., Gao, D., Yang, L., He, D., et al. Preliminary estimation of the basic reproduction number of novel coronavirus (2019-nCoV) in China, from 2019 to 2020: A data-driven analysis in the early phase of the outbreak. *Int. J. Infect. Dis.* 2020, 92, 214–217.

Zhou, W., De Iuliis, G.N., Dun, M.D., Nixon, B. Characteristics of the Epididymal Luminal Environment Responsible for Sperm Maturation and Storage. *Front. Endocrinol.* 2018, 9.

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

Zupin, L., Pascolo, L., Crovella, S. Is FURIN gene expression in salivary glands related to SARS-CoV-2 infectivity through saliva? *J. Clin. Pathol.* 2020. *Microorganisms* 2020, 8, 1492
15 of 22

Zupin, L., Pascolo, L., Zito, G., Ricci, G., Crovella, S. SARS-CoV-2 and the next generations: Which impact on reproductive tissues? *J. Assist. Reprod. Genet.* 2020.