



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΟΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΣΤΗΝ ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΡΑΞΗ

**ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΓΕΝΩΜΙΚΩΝ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΩΝ ΤΩΝ
ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΤΕΛΟΜΕΡΩΝ ΣΤΑ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΑ**

ΕΥΘΑΛΙΑ ΜΟΥΣΤΑΚΛΗ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

Δ Ι Δ Α Κ Τ Ο Ρ Ι Κ Η Δ Ι Α Τ Ρ Ι Β Η

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2024



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΟΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΣΤΗΝ ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΡΑΞΗ

**ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΓΕΝΩΜΙΚΩΝ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΩΝ ΤΩΝ
ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΤΕΛΟΜΕΡΩΝ ΣΤΑ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΑ**

ΕΥΘΑΛΙΑ ΜΟΥΣΤΑΚΛΗ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

Δ Ι Δ Α Κ Τ Ο Ρ Ι Κ Η Δ Ι Α Τ Ρ Ι Β Η

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2024

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

Ημερομηνία αίτησης της κας Μουστακλή Ευθαλίας: 27-1-2021

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: Γ.Σ. αριθμ. 960^α/21-4-2021

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων:

Γεωργίου Ιωάννης, Καθηγητής Ιατρικής Γενετικής και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Μαιευτικής-Γυναικολογίας

Μέλη:

Κωλέττας Ευάγγελος, Αναπληρωτής Καθηγητής Μοριακής Κυτταρικής Βιολογίας
Τσιλίδης Κωνσταντίνος, Αναπληρωτής Καθηγητής Υγιεινής με έμφαση στην Επιδημιολογία

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 21-4-2021

«Μελέτη και ταυτοποίηση γενωμικών ανασυνδυασμών σε κυτταρικές σειρές»

Ανασυγκρότηση Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: Γ.Σ. 1080^α/14-12-2023

Επιβλέπων:

Γεωργίου Ιωάννης, Καθηγητής Ιατρικής Γενετικής και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Μαιευτικής-Γυναικολογίας

Μέλη:

Τσιλίδης Κωνσταντίνος, Αναπληρωτής Καθηγητής Υγιεινής με έμφαση στην Επιδημιολογία
Ζαχαρίου Αθανάσιος, Επίκουρος Καθηγητής Ουρολογίας

Τροποποίηση τίτλου θέματος: Γ.Σ. 1080^α/14-12-2023

«Μελέτη και ταυτοποίηση γενωμικών ανασυνδυασμών των μιτοχονδρίων και των τελομερών στα σπερματοζωάρια»

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ 1095^α/23-4-2024

1. Γεωργίου Ιωάννης, Καθηγητής Ιατρικής Γενετικής και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Μαιευτικής-Γυναικολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
2. Τσιλίδης Κωνσταντίνος, Καθηγητής Υγιεινής με έμφαση στην Επιδημιολογία του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
3. Ζαχαρίου Αθανάσιος, Επίκουρος Καθηγητής Ουρολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
4. Μακρυδήμας Γεώργιος, Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
5. Σκέντου Χαρίκλεια, Επίκουρη Καθηγήτρια Μαιευτικής-Γυναικολογίας με έμφαση στην Εμβρυομητρική Ιατρική του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
6. Μαρκούλα Σοφία, Επίκουρη Καθηγήτρια Νευρολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
7. Ζηκόπουλος Κωνσταντίνος, Ομότιμος Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας με έμφαση στην Υποβοηθούμενη Αναπαραγωγή του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 15-5-2024

Ιωάννινα 22-5-2024

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Σπυρίδων Κονιτσιώτης

Καθηγητής Νευρολογίας



...στην οικογένειά μου

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Ορισμένοι παράγοντες όπως το μεγαλύτερο προσδόκιμο ζωής, η μεγαλύτερη πρόσβαση στην αντισύλληψη και ο μεταγενέστερος γάμος έχουν αυξήσει σημαντικά τη μέση ηλικία των πατέρων κατά την πρώτη εγκυμοσύνη. Όπως έχει αποδειχθεί σε αρκετές μελέτες, οι γυναίκες άνω των 35 ετών έχουν αυξημένο κίνδυνο υπογονιμότητας, προβλήματα εγκυμοσύνης, αυθόρμητες αποβολές, συγγενείς δυσπλασίες και μεταγεννητικά προβλήματα. Υπάρχουν διαφορετικές απόψεις σχετικά με το εάν η ηλικία του πατέρα επηρεάζει την ποιότητα του σπέρματός του ή την ικανότητά του να κάνει παιδί. Σε έναν άνδρα δεν υπάρχει ενιαίος αποδεκτός ορισμός της τρίτης ηλικίας και πολλές μελέτες έχουν αναφέρει αντιφατικά ευρήματα στη βιβλιογραφία, ιδιαίτερα όσον αφορά τα κριτήρια που εξετάζονται συχνότερα. Είναι γεγονός ότι όλο και περισσότερα στοιχεία δείχνουν ότι η ηλικία του πατέρα συμβάλλει στην αύξηση της ευαισθησίας των απογόνων του σε κληρονομικές ασθένειες.

Έχει αποδειχθεί ότι υπάρχει μια άμεση συσχέτιση μεταξύ της πατρικής ηλικίας και της μειωμένης ποιότητας του σπέρματος και της λειτουργίας των όρχεων. Γενετικές ανωμαλίες, όπως μεταλλάξεις του DNA και χρωμοσωμικές ανευπλοειδίες, και επιγενετικές τροποποιήσεις, όπως η σίγαση βασικών γονιδίων, έχουν συνδεθεί όλα με τα προχωρημένα χρόνια του πατέρα. Η ηλικία του πατέρα έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζει τα αποτελέσματα της αναπαραγωγής και της γονιμότητας, όπως το ποσοστό επιτυχίας της εξωσωματικής γονιμοποίησης (IVF), της ενδοκυτταροπλασματικής έγχυσης σπέρματος (ICSI) και του ποσοστού πρόωρων γεννήσεων. Αρκετές ασθένειες, όπως ο αυτισμός, η σχιζοφρένεια, οι διπολικές διαταραχές και η παιδιατρική λευχαιμία, έχουν συνδεθεί με τα προχωρημένα χρόνια του πατέρα. Ως εκ τούτου, η ενημέρωση των υπογόνιμων ζευγαριών για τις ανησυχητικές συσχετίσεις μεταξύ των μεγαλύτερων πατέρων και της αύξησης των ασθενειών των απογόνων τους είναι ζωτικής σημασίας, ώστε να μπορούν να καθοδηγούνται αποτελεσματικά στα αναπαραγωγικά τους χρόνια.

Προηγούμενες έρευνες έχουν τεκμηριώσει τον ζωτικό ρόλο των τελομερών στην ανθρώπινη γονιμότητα. Τα τελομερή αποτελούν προϋποθέσεις για τη διατήρηση της ακεραιότητας των χρωμοσωμάτων αποτρέποντας την απώλεια γενετικού υλικού μετά από γεγονότα αντιγραφής. Λίγα είναι γνωστά για τη συσχέτιση μεταξύ του μήκους των τελομερών του σπέρματος και της μιτοχονδριακής ικανότητας συμπεριλαμβανομένων της δομής και της λειτουργίας του. Τα μιτοχόνδρια παράγουν τριφωσφορική αδενοσίνη μέσω οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (OXPHOS), η οποία είναι απαραίτητη για την κινητικότητα του σπέρματος και τη δημιουργία αντιδραστικών ειδών οξυγόνου. Ενώ μια μέτρια συγκέντρωση αντιδραστικών ριζών οξυγόνου είναι κρίσιμη για τη σύντηξη και τη γονιμοποίηση ωαρίων-σπερματοζωαρίων, η υπερβολική παραγωγή αυτών σχετίζεται κυρίως με τη βράχυνση των τελομερών, τον κατακερματισμό του DNA του σπέρματος και τις αλλαγές στο πρότυπο μεθυλίωσης που οδηγεί σε ανδρική υπογονιμότητα ή/και στειρότητα. Αυτή η ανασκόπηση στοχεύει να επισημάνει τη λειτουργική σύνδεση μεταξύ της βιογένεσης των μιτοχονδρίων και του μήκους των τελομερών στην ανδρική υπογονιμότητα, καθώς οι μιτοχονδριακές βλάβες έχουν καταστροφική επίδραση στο

μήκος των τελομερών, οδηγώντας τόσο σε επιμήκυνση των τελομερών όσο και σε επαναπρογραμματισμό της μιτοχονδριακής βιοσύνθεσης. Επιπλέον, στοχεύει να ρίξει φως στο πώς τόσο η ινοσιτόλη όσο και τα αντιοξειδωτικά μπορούν να επηρεάσουν θετικά την ανδρική γονιμότητα.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή διερευνήθηκε σε πρώτη φάση η πιθανή συσχέτιση του μιτοχονδριακού περιεχόμενου του σπέρματος και η αναλογία μιτοχονδριακού DNA (mtDNA) προς πυρηνικό DNA (nDNA) σε σχέση με τον δείκτη μάζας σώματος και την κινητικότητα του σπέρματος. Στη συνέχεια, μελετήθηκε η συσχέτιση μεταξύ του σχετικού μήκους των τελομερών, του μιτοχονδριακού περιεχομένου και της αναλογίας mtDNA προς nDNA στο ανθρώπινο σπέρμα. Τα αποτελέσματα προέκυψαν από την μελέτη και εκτίμηση συνολικά 100 ανδρών που υποβλήθηκαν είτε σε εξωσωματική γονιμοποίηση είτε προήλθαν για εξετάσεις σπερμοδιαγράμματος. Η Μονάδα εξωσωματικής γονιμοποίησης του Μαιευτικού και Γυναικολογικού Τμήματος του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων, Ιωαννίνων, παρείχε τα δείγματα σπέρματος. Σκοπός της έρευνας ήταν η αξιολόγηση του μιτοχονδριακού περιεχομένου και της αναλογίας μιτοχονδριακού προς πυρηνικού DNA και εάν αυτά κατ' επέκταση επηρεάζουν το σχετικό μήκος των τελομερών ανάλογα με το δείκτη μάζας σώματος. Η παρούσα μελέτη χωρίζεται σε δύο μέρη, το γενικό και το ειδικό. Το γενικό μέρος περιλαμβάνει τη βιβλιογραφική ανασκόπηση του ανδρικού αναπαραγωγικού συστήματος, των μιτοχονδρίων και των τελομερών καθώς και την σημασία των αντιοξειδωτικών στην ανδρική γονιμότητα. Το ειδικό μέρος περιλαμβάνει τον πειραματικό σχεδιασμό, τα υλικά μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν, τη συζήτηση και τα τελικά συμπεράσματα της μελέτης.

Η έρευνα πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής στην Κλινική Πράξη του Τμήματος Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Πολυάριθμα άτομα έχουν συνεισφέρει μοναδικά στη σύνταξη αυτής της διδακτορικής διατριβής. Σε όλη τη διαδικασία, από την επινόηση του πειράματος μέχρι τη σύνθεση του χειρόγραφου, είχα την τύχη να συνεργαστώ με άτομα που επέδειξαν με συνέπεια τις πιο αγνές προθέσεις και έδωσαν ανιδιοτελώς σε αυτό το έργο. Συγκεκριμένα, θέλω να εκφράσω την ειλικρινή μου ευγνωμοσύνη σε ορισμένους ανθρώπους:

- Τον κ. Ιωάννη Γεωργίου, καθηγητή του εργαστηρίου Ιατρικής Γενετικής στην Κλινική Πράξη του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για την επιστημονική καθοδήγηση που παρείχε καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής. Ιδιαίτερα θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για τις εύστοχες συμβουλές, παρατηρήσεις και διορθώσεις των δημοσιεύσεων σε επιστημονικά περιοδικά που προηγήθηκαν οι οποίες είχαν καταλυτική σημασία και για τη συγγραφή του παρόντος κειμένου.
- Τον κ. Αθανάσιο Ζαχαρίου επίκουρο καθηγητή Ουρολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για την πολύτιμη συμβολή του στη διενέργεια αυτής της μελέτης. Οι ευγενικές παρατηρήσεις του αποτέλεσαν πολύτιμο οδηγό για την πορεία και ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής.

- Τον κ. Κωνσταντίνο Τσιλίδη αναπληρωτή καθηγητή του εργαστηρίου Υγιεινής και Επιδημιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για την ορθή καθοδήγηση προκειμένου να γίνει σωστή στατιστική αξιολόγηση των αποτελεσμάτων μας. Σε αυτόν οφείλω και την άριστη, πλέον, χρήση αρκετών στατιστικών προγραμμάτων.
- Τον κ. Κωνσταντίνο Ζηκόπουλο ομότιμο καθηγητή Μαιευτικής και Γυναικολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για την επιστημονική καθοδήγηση που παρείχε στη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής, αλλά και για το ειλικρινές και συγκινητικό ενδιαφέρον που επέδειξε, σε δύσκολες για μένα περιόδους. Επίσης, θα ήθελα να τον ευχαριστήσω διότι επέδειξε υπομονή και πίστη προς το άτομο μου, ακόμα και σε στιγμές που ούτε η ίδια δεν το έκανα.
- Τα μέλη του «αδελφού» εργαστηρίου Ιατρικής Γενετικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων όσο και τα μέλη του παρόντος εργαστηρίου, Ιωάννα, Χάρη και Αθανασία, για την βοήθεια, τη στήριξη που παρείχαν και τις όμορφες στιγμές που περάσαμε αυτά τα χρόνια. Ένα ξεχωριστό ευχαριστώ ,όμως, στην Δρ. Γεωργία Τσίρκα για την εκπληκτική συνεργασία και στήριξή της στις δύσκολες στιγμές. Πάνω από όλα, όμως, την ευχαριστώ για τη φιλία της.

Προσωπικά θα ήθελα να εκφράσω ένα μεγάλο ευχαριστώ στους γονείς μου, Στέφανο και Αναστασία για την αδιάκοπη στήριξή τους και ενθάρρυνσή τους σε όλα μου τα όνειρα και τις προσπάθειες. Επίσης, ένα μεγάλο ευχαριστώ στον αδελφό μου Κωνσταντίνο που αν και μακριά με στήριξε ψυχολογικά με τον τρόπο του για τις αμέτρητες φορές που σκέφτηκα να τα παρατήσω. Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην «οικογένεια» που επέλεξα, τους φίλους μου, και ιδιαίτερα στην παιδική μου φίλη Βαρβάρα για την ακλόνητη φιλία που μοιραζόμαστε από την παιδική ηλικία. Η παρουσία όλων ήταν μια συνεχής πηγή χαράς και υποστήριξης στη ζωή μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	17
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	19
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ^ο ΑΝΔΡΙΚΟ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ.....	21
1.1 ΚΑΘΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΔΙΑΠΛΩΣΗ ΤΟΥ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ.....	21
1.2 ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΚΑΙ ΤΡΟΠΟΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ.....	23
1.3 ΣΠΕΡΜΑΤΟΓΕΝΕΣΗ.....	25
1.4 ΟΡΜΟΝΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ.....	28
1.5 ΣΠΕΡΜΑΤΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΙ ΣΠΕΡΜΙΩΣΗ.....	29
1.6 ΜΕΙΩΣΗ.....	32
1.7 ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΤΗΣ ΧΡΩΜΑΤΙΝΗΣ ΤΟΥ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΟΥ.....	33
1.7.1 ΣΥΜΠΥΚΝΩΣΗ ΤΟΥ DNA ΜΕΣΩ ΠΡΩΤΑΜΙΝΩΝ.....	34
1.7.2 ΠΡΩΤΑΜΙΝΗ – ΤΟΡΟΕΙΔΗ DNA.....	35
1.7.3 ΤΟΜΕΙΣ ΒΡΟΧΟΥ DNA ΤΩΝ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΩΝ.....	36
1.7.4 ΤΡΙΤΟΤΑΓΕΙΣ ΔΟΜΕΣ ΤΗΣ ΧΡΩΜΑΤΙΝΗΣ ΤΟΥ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΟΥ.....	36
1.8 ΒΛΑΒΗ ΣΤΟ DNA ΤΟΥ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΟΥ.....	36
1.9 ΑΙΤΙΕΣ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑΣ.....	38
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ^ο ΤΟ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΟ.....	39
2.1 ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΟΥ.....	39
2.2 ΒΑΣΙΚΗ ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΩΝ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΩΝ.....	40
2.3 ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟΥ DNA.....	42
2.4 ΜΗ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟ DNA ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ.....	43
2.4.1 ΑΛΛΑΓΕΣ ΣΤΟ ΚΕΝΤΡΟΜΕΡΙΔΙΟ.....	44
2.4.2 ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΣΤΟΝ ΠΥΡΗΝΑ ΤΟΥ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΟΥ.....	45
2.4.3 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗΣ ΚΑΙ ΑΠΟΔΟΜΗΣΗΣ ΤΩΝ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΩΝ.....	45
2.5 ΜΙΤΟΦΑΓΙΑ.....	46
2.6 ΣΠΕΡΜΑΤΙΚΟ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ.....	47
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ^ο ΤΕΛΟΜΕΡΗ.....	54
3.1 ΒΑΣΙΚΗ ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΕΛΟΜΕΡΩΝ.....	54
3.2 ΤΕΛΟΜΕΡΗ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΧΡΩΜΑΤΙΝΗ.....	56
3.3 ΤΕΛΟΜΕΡΗ ΚΑΙ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑ.....	59
3.4 ΠΑΤΡΙΚΗ ΗΛΙΚΙΑ ΚΑΙ ΜΗΚΟΣ ΤΕΛΟΜΕΡΩΝ.....	61
3.4.1 ΜΟΝΤΕΛΑ ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΗΣ ΕΠΙΜΗΚΥΝΣΗΣ ΤΕΛΟΜΕΡΩΝ (ALT).....	63
3.4.2 ΜΗ ΟΜΟΛΟΓΗ ΤΕΛΙΚΗ ΕΝΩΣΗ.....	66
3.4.3 ΟΜΟΛΟΓΟΣ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ.....	67
3.5 ΤΕΛΟΜΕΡΗ ΚΑΙ ΤΡΟΠΟΣ ΖΩΗΣ.....	68
3.6 ΜΙΤΟΦΑΓΙΑ ΚΑΙ ΤΕΛΟΜΕΡΗ.....	71
3.7 ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ ΚΑΙ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΤΑ ΤΕΛΟΜΕΡΗ ΚΑΙ ΤΑ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑ.....	74
3.7.1 ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ, ΤΕΛΟΜΕΡΗ ΚΑΙ ΑΝΔΡΙΚΗ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑ.....	76
ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	81
ΣΚΟΠΟΣ.....	83
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	85
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ^ο ΥΛΙΚΑ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	87
4.1 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΣΥΜΜΕΤΕΧΟΝΤΩΝ ΚΑΙ ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ.....	87
4.2 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ ΓΙΑ ΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ IN VITRO.....	88
4.2.1 ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΜΕ ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΗΣΗ ΣΕ ΜΕΣΩ ΔΙΑΒΑΘΜΙΣΕΩΝ ΠΥΚΝΟΤΗΤΩΝ.....	88

4.2.2 ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΣΕ ΜΕΣΩ ΔΙΑΦΟΡΙΚΗΣ ΠΛΕΥΣΗΣ...	89
4.3 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ	89
4.4 ΕΚΧΥΛΙΣΗ DNA ΑΠΟ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΑ.....	90
4.5 ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ DNA ΠΟΥ ΑΠΟΜΟΝΩΘΗΚΕ.....	91
4.6 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΥ, ΣΧΕΤΙΚΟΥ ΑΡΙΘΜΟΥ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΩΝ ΚΑΙ ΛΟΓΟΥ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟΥ ΠΡΟΣ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ DNA.....	91
4.6.1 ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΔCt ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΗΣ ΣΧΕΤΙΚΗΣ ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟΥ DNA.....	92
4.6.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΣΧΕΤΙΚΟΥ ΜΗΚΟΥΣ ΤΩΝ ΤΕΛΟΜΕΡΩΝ.....	93
4.6.2.1 ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΟΣΟΤΙΚΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ: ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΔCq ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΟ ΚΙΤ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΑΗΤLQ	93
4.7 ΣΤΑΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....	94
 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ^ο ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	 97
5.1 ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ, ΣΧΕΤΙΚΟΣ ΑΡΙΘΜΟΣ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΩΝ ΚΑΙ ΑΝΑΛΟΓΙΑ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟΥ ΠΡΟΣ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ DNA.....	97
5.1.1 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΟΥ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΥ	98
5.1.2 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΟΥ ΣΧΕΤΙΚΟΥ ΑΡΙΘΜΟΥ ΑΝΤΙΓΡΑΦΩΝ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟΥ DNA	100
5.1.3 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΑΛΟΓΙΑΣ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟΥ ΠΡΟΣ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ DNA	101
5.2 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΟΥ ΣΧΕΤΙΚΟΥ ΜΗΚΟΥΣ ΤΩΝ ΤΕΛΟΜΕΡΩΝ ΜΕ ΤΟ ΔΕΙΚΤΗ ΜΑΖΑΣ ΣΩΜΑΤΟΣ, ΤΟ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ ΚΑΙ ΤΗΝ ΑΝΑΛΟΓΙΑ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟΥ ΠΡΟΣ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ DNA.....	105
5.3 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕΤΑΞΥ ΤΟΥ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΣΧΕΤΙΚΟΥ ΜΗΚΟΥΣ ΤΩΝ ΤΕΛΟΜΕΡΩΝ.....	107
5.4 ΣΥΣΧΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΛΟΓΟΥ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟΥ ΠΡΟΣ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ DNA ΜΕ ΤΟ ΣΧΕΤΙΚΟ ΜΗΚΟΣ ΤΩΝ ΤΕΛΟΜΕΡΩΝ.....	108
 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 ^ο ΣΥΖΗΤΗΣΗ	 113
6.1 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΟΥ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΥ, ΤΟΥ ΣΧΕΤΙΚΟΥ ΑΡΙΘΜΟΥ ΑΝΤΙΓΡΑΦΩΝ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟΥ DNA ΚΑΙ ΤΗΣ ΑΝΑΛΟΓΙΑΣ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟΥ ΠΡΟΣ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ DNA ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΟ ΔΕΙΚΤΗ ΜΑΖΑΣ ΣΩΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΤΗΝ ΚΙΝΗΤΙΚΟΤΗΤΑ.....	114
6.2 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΟΥ ΣΧΕΤΙΚΟΥ ΜΗΚΟΥΣ ΤΩΝ ΤΕΛΟΜΕΡΩΝ ΜΕ ΤΟ ΔΕΙΚΤΗ ΜΑΖΑΣ ΣΩΜΑΤΟΣ, ΤΟ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ ΚΑΙ ΤΗΝ ΑΝΑΛΟΓΙΑ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟΥ ΠΡΟΣ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ DNA.....	118
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 ^ο ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	116
ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ.....	129
A. ΠΕΡΙΛΗΨΗ	131
B. ABSTRACT	135
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	139

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

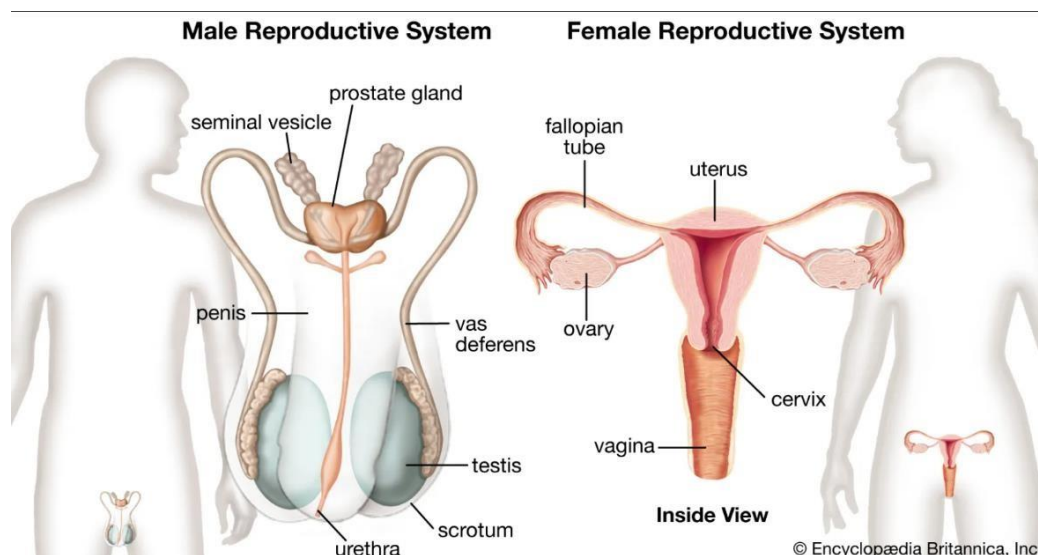
ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο

ΑΝΔΡΙΚΟ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

1.1 ΚΑΘΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΔΙΑΠΛΑΣΗ ΤΟΥ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ

Το αναπαραγωγικό σύστημα των θηλαστικών και του ανθρώπου εμφανίζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον ως προς την ανάπτυξη και την εξέλιξή του. Εμφανίζεται στα αρχικά στάδια της εμβρυογένεσης και είναι το πρώτο σύστημα το οποίο αναπτύσσεται ενώ αποτελεί το τελευταίο σύστημα που τίθεται σε λειτουργία κατά την ήβη. Τόσο στα αρσενικά όσο και στα θηλυκά άτομα το αναπαραγωγικό σύστημα είναι άρρηκτα συνδεδεμένο με το ουροποιητικό σύστημα, από εμβρυολογική άποψη, καθώς και τα δύο συστήματα προέρχονται από το γεννητικό σύστημα είναι ανεξάρτητο από το ουροποιητικό.



Εικόνα 1 Ανατομία του αρσενικού και θηλυκού αναπαραγωγικού συστήματος (Harrison, R. J.. "Human reproductive system." Encyclopedia Britannica, December 23, 2023. <https://www.britannica.com/science/human-reproductive-system>).

Στα αρχικά στάδια της εμβρυογένεσης το αναπαραγωγικό σύστημα του αρσενικού και του θηλυκού εμβρύου αναπτύσσονται με τον ίδιο ακριβώς τρόπο μέχρι την 6^η εβδομάδα. Αν και το φύλο του εμβρύου καθορίζεται γενετικά αμέσως μετά τη γονιμοποίηση από την παρουσία (άρρεν) ή την απουσία (θήλυ) του Y χρωμοσώματος, οι γονάδες αρχίζουν να διαφοροποιούνται μορφολογικά σε όρχεις ή ωθήκες μετά την 7^η εβδομάδα(1). Μέχρι την 6^η εβδομάδα οι καταβολές των γονάδων και των δύο φύλων αναπτύσσονται με τον ίδιο τρόπο, στάδιο γνωστό ως στάδιο αδιαφοροποίητων αναπαραγωγικών γονάδων ή αμφίπλευρο στάδιο. Στο τέλος της αμφίπλευρης φάσης το γεννητικό σύστημα και των

δου φύλων αποτελείται από τις γονάδες και τα δύο συστήματα γεννητικών πόρων (μεσονεφρικοί πόροι ή πόροι Wolff και παραμεσονεφρικοί πόροι ή πόροι Muller)(2).

Οι γονάδες των θηλαστικών προέρχονται από τον άξονα Αορτή – Μεσόνεφρος – Γονάδες (Aorta – Mesonephros – Gonads, AMG). Ο άξονας AMG έχει μεσοδερμική προέλευση, συγκεκριμένα κατά την 4^η εβδομάδα το σπλαχνικό μεσόδερμα χωρίζεται σε τρεις διακριτές δομές τη ραχιαία αορτή, τη γεννητική ταινία και το μεσόνεφρο. Κατά την εμβρυική ανάπτυξη η ραχιαία αορτή παράγει τα αιμοποιητικά στελεχειαία κύτταρα που είναι απαραίτητα για την αιμοποίηση του εμβρύου, ο μεσόνεφρος σχηματίζει τη βασική μονάδα των νεφρών ενώ η γεννητική ταινία θα δώσει τις γονάδες(3).

Η πρώτη καταβολή των γονάδων (γεννητικοί κρημνοί) εμφανίζεται από τον πολλαπλασιασμό του επιθηλίου και την πυκνώση του μεσεγγύματος κατά μήκος του μεσόνεφρου και του μεσεντερίου. Την 4^η εβδομάδα ανάπτυξης παράγονται τα αρχέγονα γαμετικά κύτταρα (Primordial Germ Cells, PGCs) εξωγοναδικώς από το ενδόδερμα και εμφανίζονται σε διάσπαρτος πληθυσμός στο ενδόδερμα του λεκιθικού σάκου, κοντά στην αλλαντοίδα. Τα PGCs μεταναστεύουν με αμοιβαδοειδείς κινήσεις, την 5^η εβδομάδα ανάπτυξης, από το λεκιθικό ασκό μέσω του μεσεντέρου και εγκαθίστανται στους γεννητικούς κρημούς την 6^η εβδομάδα(4). Σε περίπτωση που τα PGCs δεν φτάσουν στις αρχέγονες γονάδες τότε οι γονάδες δε θα αναπτυχθούν. Τόσο κατά τη διάρκεια όσο και πριν την άφιξη των PGCs στους γεννητικούς κρημούς τα επιθηλιακά κύτταρα των γονάδων πολλαπλασιάζονται δημιουργώντας τις αρχέγονες δοκίδες και εισέρχονται στο μεσέγγυμα. Έτσι, η αδιαφοροποίητη γονάδα αποτελείται εξωτερικά από το επιθήλιο και εσωτερικά από το μεσέγγυμα. Το μεσέγγυμα δομικά αποτελείται από τις φλοιώδεις και τις μυελώδεις περιοχές(5,6).

Στα άρρενα άτομα η διαδικασία της φυλετικής διαφοροποίησης της αρχέγονης γονάδας σε όρχι διακρίνεται στην πρωτογενή και δευτερογενή φυλετική διαφοροποίηση. Η πρωτογενής φυλετική διαφοροποίηση εξαρτάται από την ύπαρξη και την έκφραση του γονιδίου SRY (sex-determining region). Το SRY γονίδιο βρίσκεται στη φυλοκαθοριστική περιοχή του βραχέος σκέλους του χρωμοσώματος Y και η έκφρασή του αποτελεί τον καθοριστικό παράγοντα διαφοροποίησης των όρχεων (Testis Determining Factor, TDF)(7). Η έκφραση του SRY σηματοδοτεί την ενεργοποίηση ενός συνόλου γονιδίων του χρωμοσώματος Y και των αυτοσωμικών χρωμοσωμάτων τα οποία συμμετέχουν και αυτά στην εξέλιξη των αδιαφοροποίητων γονάδων σε όρχεις. Στα θηλαστικά η έλλειψη του χρωμοσώματος Y και η ύπαρξη του X αλλά και μεταλλάξεις του SRY ή των εμπλεκόμενων γονιδίων οδηγούν στη διαφοροποίηση των αρχέγονων γονάδων σε ωοθήκες(1,8). Η έκφραση του SRY γονιδίου και των εμπλεκόμενων γονιδίων από τα κύτταρα των δοκίδων επάγει τη διαφοροποίηση των κυττάρων της μυελώδους περιοχής του μεσεγγύματος σε προ-Sertoli κύτταρα.

Στη δευτερογενή διαφοροποίηση έχουμε την ανάπτυξη και διαφοροποίηση των πόρων Wolff και των εκφυλισμό των πόρων Muller. Στα αρσενικά έμβρυα στη δευτερογενή φυλετική διαφοροποίηση σημαντικό ρόλο έχουν οι ορμόνες τεστοστερόνη, η οποία παράγεται από τα κύτταρα Leydig, και η αντιμιλλέρια ορμόνη (Anti – Mullerian Hormone, AMH) η οποία εκκρίνεται από τα προ-Sertoli κύτταρα. Η AMH είναι μια γλυκοπρωτεΐνη μεγέθους 560 αμινοξέων και ανήκει στην οικογένεια των αυξητικών παραγόντων μετασχηματισμού (Transforming Growth Factor, TGF). Η έκφραση της AMH στα αρσενικά έμβρυα ξεκινάει κατά την 8^η εβδομάδα ανάπτυξης και προκαλεί υποστροφή και εκφυλισμό του παραμεσονεφρικού πόρου μέχρι τη 10^η εβδομάδα. Η AMH δρα έμμεσα στους υποδοχείς AMH-τύπου II (Anti – Mullerian hormone receptor II, Amhr-II) των μεσεγχυματικών κυττάρων τα οποία περιβάλλουν το παραμεσονεφρικό πόρο και όχι άμεσα στα επιθηλιακά κύτταρα του πόρου(6).

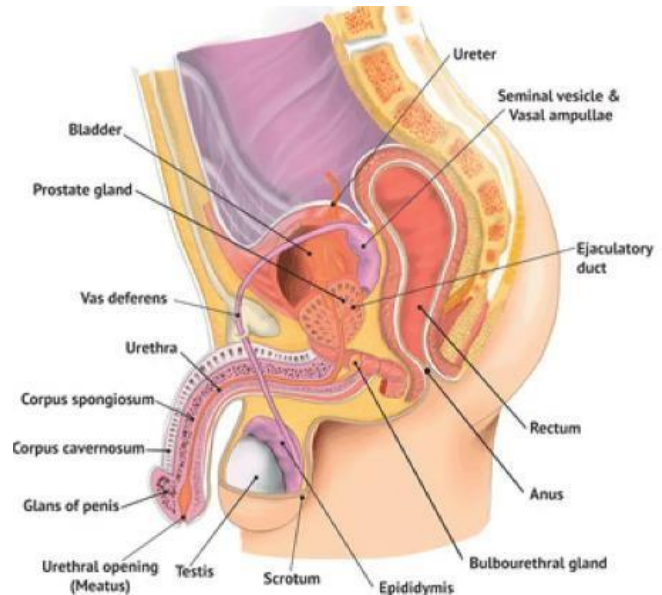
Παράλληλα με την έκφραση της AMH παρατηρείται και ο σχηματισμός των κυττάρων Leydig. Το μεσέγχυμα του γενετικού κρημνού κατά την 8^η εβδομάδα αρχίζει να διαφοροποιείται σε κύτταρα Leydig. Τα κύτταρα Leydig παράγουν το κύριο ανδρογόνο των όρχεων, την τεστοστερόνη. Η τεστοστερόνη εισέρχεται στα κύτταρα στόχους και παραμένει ως έχει ή μετατρέπεται σε διυδροστερόνη με την επίδραση της 5- α -αναγωγάσης. Η τεστοστερόνη επάγει τη διαφοροποίηση του γεννητικού πόρου (επιδιδυμίδας, σπερματικό πόρο, σπερματοδόχες κύστες) ενώ η διυδροστερόνη επάγει το σχηματισμό των έξω γεννητικών οργάνων(4–6). Επίσης κατά τον 5^ο μήνα της ανάπτυξης τα Leydig κύτταρα αρχίζουν να μειώνονται σε αριθμό με αποτέλεσμα τα επίπεδα της τεστοστερόνης να παραμένουν χαμηλά μέχρι την ήβη, όπου και εμφανίζονται πάλι τα Leydig για τη σπερματογένεση τα κύτταρα Sertoli και Leydig μετά την εφηβεία συμμετέχουν τόσο στον ορμονικό έλεγχο της σπερματογένεσης όσο και στη φαγοκυττάρωση των σπερματοζωαρίων.

Τέλος, πρέπει να σημειωθεί ότι από το μεσονεφρικό πόρο μετά την εκβλάστηση των σπερματοδόχων κύστεων, σχηματίζεται ένα τμήμα του σπερματικού πόρου, το οποίο βρίσκεται περιφερικά των δύο σπερματοδόχων κύστεων και ονομάζεται εκσπερματικός πόρος.

1.2 ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΚΑΙ ΤΡΟΠΟΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ

Το ανδρικό αναπαραγωγικό σύστημα περιλαμβάνει τα εξωτερικά γεννητικά όργανα (το πέος, τους όρχεις και το όσχεο) και τα εσωτερικά μέρη, συμπεριλαμβανομένου του προστάτη, του σπερματικού αγγείου και της ουρήθρας. Η γονιμότητα και τα σεξουαλικά χαρακτηριστικά του φύλου εξαρτώνται από την κανονική λειτουργία του

αναπαραγωγικού σας συστήματος, καθώς και από τις ορμόνες που απελευθερώνονται από τον εγκέφαλο(9).



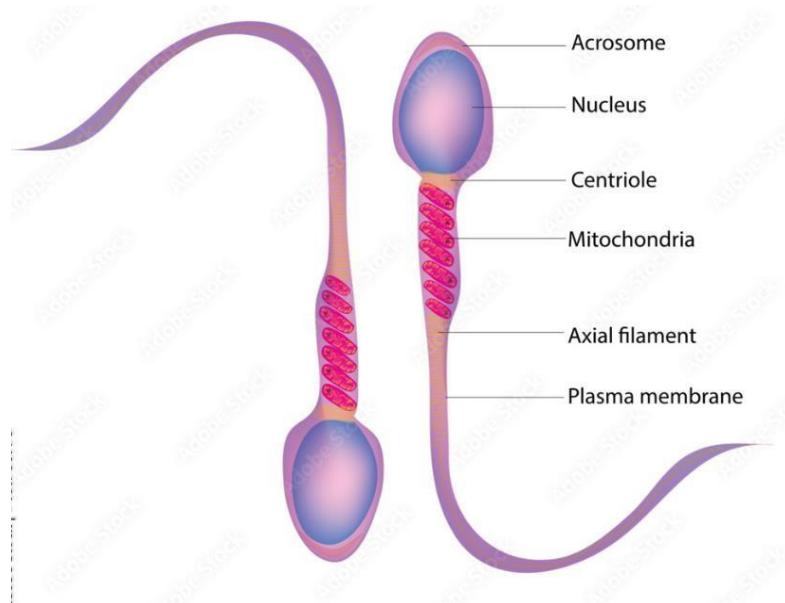
Σχήμα 2 Διάγραμμα που δείχνει τα εξωτερικά και εσωτερικά μέρη του ανδρικού αναπαραγωγικού συστήματος (Girsh E, editor. Physiology of the Male Reproductive System. In: A Textbook of Clinical Embryology. Cambridge: Cambridge University Press; 2021. p. 13–27.)

Οι βασικές λειτουργίες των οργάνων που απαρτίζουν το ανδρικό αναπαραγωγικό σύστημα είναι:

- Η παραγωγή, η διατήρηση και η μεταφορά του σπερματικού υγρού στο οποίο περιέχονται τα σπερματικά κύτταρα. Το σπερματικό υγρό αποτελεί προστασία για τα σπερματοζωάρια.
- Η απόσυρση του σπέρματος και
- Η παραγωγή και έκκριση των ανδρικών ορμονών του φύλου

Ολόκληρο το ανδρικό αναπαραγωγικό σύστημα εξαρτάται από τις ορμόνες. Οι ορμόνες είναι χημικές ουσίες που διεγείρουν ή ρυθμίζουν τη δραστηριότητα στα κύτταρα ή τα όργανα. Η έκκριση της υποθαλαμικής ορμόνης απελευθέρωσης γοναδοτροπίνης (GnRH) διεγείρει την παραγωγή της ωχρινοτρόπου ορμόνης (LH) και της ωοθυλακιοτρόπου ορμόνης (FSH) από την υπόφυση. Η LH μεταφέρεται στην κυκλοφορία του αίματος στους όρχεις, όπου διεγείρει τα κύτταρα Leydig να παράγουν τεστοστερόνη: μπορεί να λειτουργήσει ως ανδρογόνο (μέσω αλληλεπίδρασης με υποδοχείς ανδρογόνων), αλλά μπορεί επίσης να αρωματιστεί για να παράγει οιστρογόνα. Οι όρχεις, με τη σειρά τους,

ανατροφοδοτούν τον υποθάλαμο και την υπόφυση μέσω της έκκρισης τεστοστερόνης και αναστολίνης, σε έναν βρόχο αρνητικής ανάδρασης για τον περιορισμό της παραγωγής GnRH και γονοδοτροπίνης. Τόσο τα ανδρογόνα όσο και η FSH δρουν στους υποδοχείς εντός των υποστηρικτικών σωματικών κυττάρων, των κυττάρων Sertoli, για να διεγείρουν διάφορες λειτουργίες που απαιτούνται για τη βέλτιστη παραγωγή σπέρματος. Η σπερματογένεση είναι η διαδικασία με την οποία τα ανώριμα αρσενικά γεννητικά κύτταρα διαιρούνται, υφίστανται μείωση και διαφοροποιούνται σε εξαιρετικά εξειδικευμένα απλοειδή σπερματοζωάρια. Η βέλτιστη σπερματογένεση απαιτεί τη δράση τόσο της τεστοστερόνης (μέσω υποδοχέων ανδρογόνων) όσο και της FSH(9).



Σχήμα 3 Η ανατομία του ανθρώπινου σπερματοζωαρίου. Επιγραμματικά, τα μέρη του σπερματοζωαρίου είναι κατά σειρά ξεκινώντας από πάνω προς τα κάτω: το ακρόσωμα, ο πυρήνας, το κεντριόλιο, τα μιτοχόνδρια, το μαστίγιο και η πλασματική μεμβράνη.

1.3 ΣΠΕΡΜΑΤΟΓΕΝΕΣΗ

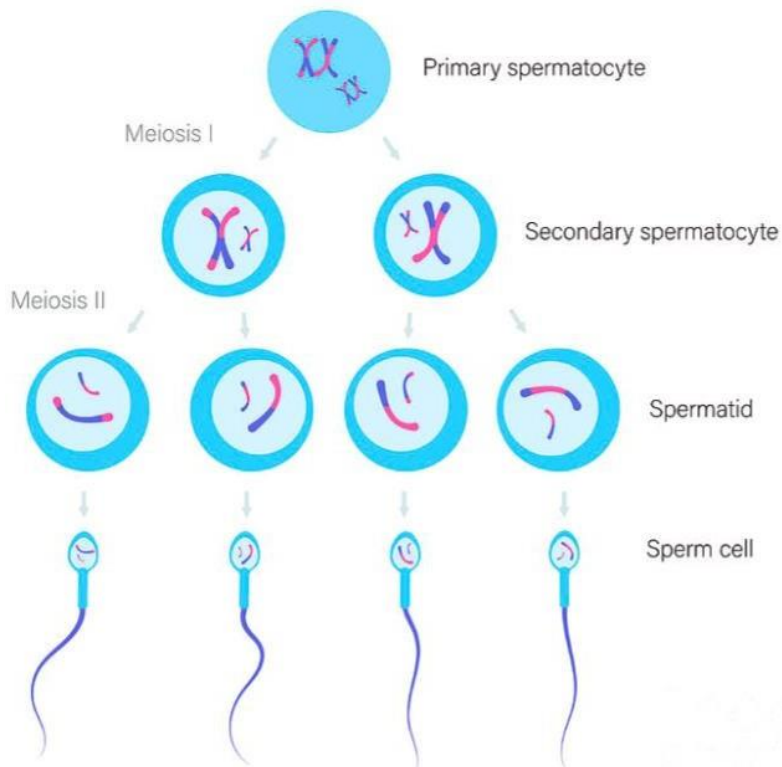
Η σπερματογένεση είναι η διαδικασία με την οποία τα πρόδρομα γεννητικά κύτταρα που ονομάζονται σπερματογονία υφίστανται μια σύνθετη σειρά διαιρέσεων για να δημιουργήσουν σπερματοζωάρια. Η διαδικασία αυτή λαμβάνει χώρα μέσα στο σπερματοφόρο επιθήλιο, μια σύνθετη δομή που αποτελείται από γεννητικά κύτταρα και ακτινικά προσανατολισμένα υποστηρικτικά σωματικά κύτταρα που ονομάζονται κύτταρα Sertoli. Τα τελευταία κύτταρα εκτείνονται από τη βασική μεμβράνη των σπερματογωγών σωληναρίων για να φτάσουν στον αυλό. Τα κυτταροπλασματικά προφίλ των κυττάρων

Sertoli είναι εξαιρετικά πολύπλοκα καθώς αυτό το κύτταρο επεκτείνει μια σειρά διεργασιών που περιβάλλουν τα γειτονικά γεννητικά κύτταρα σε ένα δενδρόβιο μοτίβο.

Η σπερματογένεση μπορεί να χωριστεί σε τρεις κύριες φάσεις: (i) τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των σπερματογονίων, (ii) τη μείωση και (iii) τη σπερμιογένεση που αντιπροσωπεύει μια σύνθετη μεταμόρφωση των στρογγυλών απλοειδών γεννητικών κυττάρων στην εξαιρετικά εξειδικευμένη δομή του σπερματοζωαρίου. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι, καθώς τα γεννητικά κύτταρα διαιρούνται και διαφοροποιούνται μέσω αυτών των φάσεων, δεν διαχωρίζονται πλήρως μετά τη μίτωση, αλλά παραμένουν ενωμένα με μεσοκυτταρικές γέφυρες. Αυτές οι μεσοκυτταρικές γέφυρες πιστεύεται ότι διευκολύνουν τις βιοχημικές αλληλεπιδράσεις επιτρέποντας το συγχρονισμό της ωρίμανσης των γεννητικών κυττάρων καθώς είναι παρούσες σε όλα τα στάδια της σπερματογένεσης(5).

Η σπερματογένεση λαμβάνει χώρα εντός των σπερματοφόρων σωληναρίων του όρχεως. Αυτά τα σωληνάρια σχηματίζουν μακριές σπειροειδείς θηλιές που περνούν στο μεσοθωράκιο του όρχεως και ενώνονται με ένα αναστομωτικό δίκτυο σωληναρίων, το ορχικό δίκτυο. Τα σπερματοζωάρια εξέρχονται από τους όρχεις μέσω του ορχικού δικτύου και εισέρχονται στους απαγωγούς πόρους πριν από τη διέλευση τους και την τελική ωρίμανση στην επιδιδυμίδα. Οι σπερματοφόροι σωληνίσκοι αποτελούνται από το σπερματοφόρο επιθήλιο: τα σωματικά κύτταρα Sertoli και τα αναπτυσσόμενα αρσενικά γεννητικά κύτταρα σε διάφορα στάδια ανάπτυξης. Γύρω από το σπερματοφόρο επιθήλιο υπάρχει ένα στρώμα βασικής μεμβράνης και στρώματα τροποποιημένων μυοϊνοβλαστικών κυττάρων που ονομάζονται περισωληνοειδή μυοειδή κύτταρα. Μεταξύ των σωληναρίων βρίσκεται ο διάμεσος χώρος που περιέχει αίμα και λεμφικά αγγεία, ανοσοκύτταρα συμπεριλαμβανομένων των μακροφάγων και των λεμφοκυττάρων και τα στεροειδογόνα κύτταρα Leydig.

Η διαδικασία της σπερματογένεσης ξεκινά στον εμβρυϊκό όρχι, όταν ο πληθυσμός των κυττάρων Sertoli προσδιορίζεται στον εμβρυϊκό όρχι υπό την επίδραση καθοριστικών παραγόντων του ανδρικού φύλου, όπως το SRY και το SOX9. Τα πρόσφατα καθορισμένα κύτταρα Sertoli περικλείουν και σχηματίζουν δομές σπερματοφόρου λώρου και κατευθύνουν τα αρχέγονα γεννητικά κύτταρα για να δεσμευτούν στο αρσενικό μονοπάτι της γονιδιακής έκφρασης. Τα εμβρυϊκά κύτταρα Sertoli πολλαπλασιάζονται και οδηγούν σε επιμήκυνση του σπερματοφόρου λώρου. Αυτή η διαδικασία εξαρτάται επίσης από παράγοντες που εκκρίνονται από τα κύτταρα Leydig. Στον νεογνικό όρχι, τα αρχέγονα γεννητικά κύτταρα υφίστανται περαιτέρω ωρίμανση και μεταναστεύουν στο υπόγειο των σπερματοφόρων σωληναρίων όπου παρέχουν μια δεξαμενή πρόδρομων γεννητικών κυττάρων για τη μεταγεννητική σπερματογένεση(10).



Εικόνα 4 Η πορεία της σπερματογένεσης στον άνθρωπο. Το πρωτογενές σπερματοκύτταρο (primary spermatocyte) θα υποβληθεί σε μείωση I για να δώσει δύο δευτερογενή σπερματοκύτταρα (secondary spermatocyte). Στη συνέχεια, κάθε δευτερογενές σπερματοκύτταρο θα υποστεί μείωση II για να παραχθούν τέσσερις σπερματίδες (spermatid, δύο από κάθε δευτερογενές σπερματοκύτταρο). Τέλος, οι σπερματίδες θα μεταμορφωθούν στα σπερματοζωάρια (sperm cell).

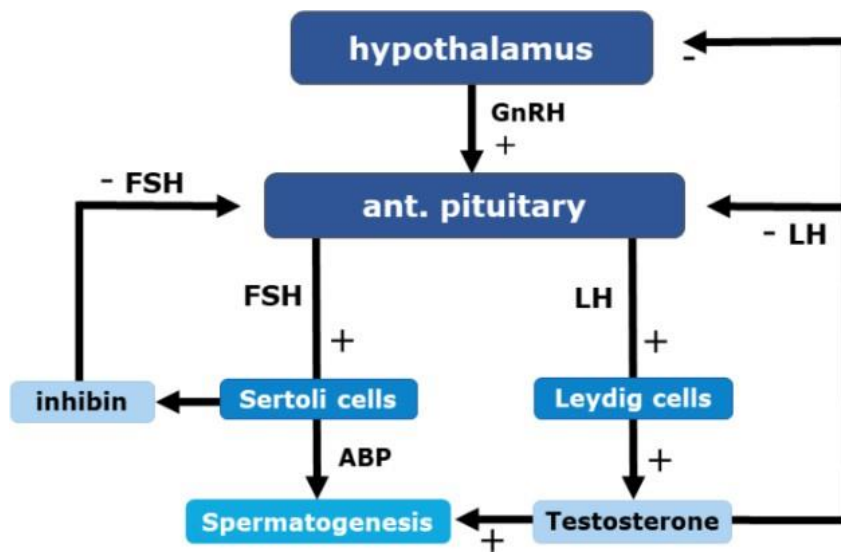
Τα σπερματογονία είναι ο πιο ανώριμος τύπος γεννητικών κυττάρων. Αυτός ο ετερογενής πληθυσμός περιλαμβάνει σπερματογονικά βλαστοκύτταρα, τα οποία αυτοανανεώνονται καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής τους για να παρέχουν μια δεξαμενή βλαστικών κυττάρων διαθέσιμα για σπερματογένεση, καθώς και πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα που διαφοροποιούνται και δεσμεύονται να εισέλθουν στη μείωση.

Η ανάπτυξη των σπερματογονίων είναι ορμονικά ανεξάρτητη και ως τέτοια είναι παρούσα ακόμη και απουσία GnRH. Τα σπερματογονία τελικά διαφοροποιούνται σε σπερματοκύτταρα που προχωρούν μέσω της διαδικασίας της μείωσης που ξεκινά με τη σύνθεση του DNA με αποτέλεσμα έναν τετραπλοειδή γαμέτη. Κατά τη διάρκεια της μακράς μειωτικής πρόφασης, η οποία διαρκεί περίπου δύο εβδομάδες, τα ομόλογα χρωμοσώματα ζευγαρώνουν και συμβαίνει μειωτικός ανασυνδυασμός. Αυτό περιλαμβάνει την επαγωγή και την επιδιόρθωση θραυσμάτων διπλού κλώνου DNA που επιτρέπουν την ανταλλαγή γενετικών πληροφοριών μεταξύ συζευγμένων χρωμοσωμάτων, δημιουργώντας έτσι γενετική ποικιλομορφία μεταξύ των γαμετών. Στο τέλος της πρόφασης, τα μειωτικά κύτταρα προχωρούν μέσω δύο γρήγορων και διαδοχικών αναγωγικών διαιρέσεων για να δώσουν απλοειδή σπερματοζωάρια. Η

ολοκλήρωση της μείωσης εξαρτάται απόλυτα από τη δράση των ανδρογόνων στα κύτταρα Sertoli. απουσία ανδρογόνου, δεν θα παραχθούν απλοειδή σπερματοζώαρια.

1.4 ΟΡΜΟΝΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

Η διαδικασία της σπερματογένεσης είναι μια πολύπλοκη διαδικασία η οποία υπόκειται σε ορμονικό έλεγχο. Οι κύριες ορμόνες στη γαμετογένεση είναι δυο γοναδοτροπίνες: 1) η ωχρινοποιητική ορμόνη (Luteinizing Hormone, LH) και 2) η θυλακιοτρόπος ορμόνη (Follicle-stimulating Hormone, FSH), οι οποίες διεγείρονται από τη γοναδοεκλυτίνη (Gonadotropin Releasing Hormone, GnRH). Η GnRH εκλύεται από τον υποθάλαμο κατά κύματα. Η GnRH προκαλεί τη διέγερση των γοναδοτρόπων κυττάρων της υπόφυσης, τα οποία εκκρίνουν τις γοναδοτροπίνες, FSH και LH. Στη συνέχεια, η LH προκαλεί τη διέγερση των κυττάρων Leydig για την παραγωγή της τεστοστερόνης. Η παραγωγή της τεστοστερόνης έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία αρνητικής ανάδρασης, μεταξύ του υποθαλάμου και της υπόφυσης, με σκοπό τον ορμονικό έλεγχο. Η τεστοστερόνη που απελευθερώνεται προσδένεται στα κύτταρα Sertoli για την επαγωγή της σπερματογένεσης. Η FSH διεγείρει τα κύτταρα Leydig για την παραγωγή της ανδρογονοδεσμευτικής πρωτεΐνης (Androgen binding protein, ABP), η οποία προσδένεται στην τεστοστερόνη επιτρέποντάς της να περάσει από τις συνδέσεις που δημιουργούνται μεταξύ των συμπλόκων Sertoli – Sertoli. Επιπλέον, η FSH διεγείρει τα κύτταρα Sertoli τα οποία παράγουν την ανασταλτίνη (inhibin), η οποία καταστέλλει την παραγωγή της GnRH, και την ακτιβίνη (activin) η οποία διεγείρει την παραγωγή της GnRH(11).



Εικόνα 5 Ο ορμονικός έλεγχος του ανδρικού αναπαραγωγικού συστήματος μεσολαβείται από τον υποθάλαμο (hypothalamus), την πρόσθια υπόφυση (anterior pituitary) και τους όρχεις.

Τα κύτταρα Sertoli κατά τη σπερματογένεση θρέφουν τα γαμετικά κύτταρα και τα εκθέτουν σε ορμονικό έλεγχο. Είναι, επίσης, υπεύθυνα για τη φαγοκυττάρωση των ανώριμων σπερματοζωαρίων αλλά και για την έκκριση σπερματικού υγρού το οποίο επιτρέπει τη μεταφορά των σπερματοζωαρίων από τα σπερματοφόρα σωληνάρια στην επιδιδυμίδα για τα τελικά στάδια ωρίμανσης(10).

1.5 ΣΠΕΡΜΙΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΙ ΣΠΕΡΜΙΩΣΗ

Ο μετασχηματισμός μιας στρογγυλής σπερματίδας σε σπερματοζώαριο αντιπροσωπεύει μια σύνθετη σειρά γεγονότων που συνιστούν τη διαδικασία της σπερμιογένεσης. Στη φάση αυτή, δε συμβαίνουν κυτταρικές διαιρέσεις, αλλά ένα συμβατικό στρογγυλό κύτταρο μετατρέπεται σε σπερματοζώαριο με ικανότητα κίνησης. Τα βασικά βήματα αυτής της διαδικασίας ταυτίζονται μεταξύ όλων των ειδών και αποτελούνται από:

- το σχηματισμό του ακροσωμίου
- τις αλλαγές του πυρήνα
- την ανάπτυξη του μαστίγιου ή της ουράς του σπέρματος
- την αναδιοργάνωση του κυτταροπλάσματος και των κυτταρικών οργανιδίων και
- τη διαδικασία απελευθέρωσης από το κύτταρο Sertoli που ονομάζεται σπερμίωση (spermiation).

Ο σχηματισμός του ακροσώματος ξεκινά με τη σύνθεση μίας σειράς κόκκων από το σύμπλεγμα Golgi. Αυτά μεταναστεύουν για να έρθουν σε επαφή με την πυρηνική μεμβράνη όπου σχηματίζουν μια περιοχή που μοιάζει με καπάκι και εφαρμόζει στο 30% με 50% περίπου της πυρηνικής μεμβράνης. Η βιογένεση του ακροσώματος ξεκινά στην πρώιμη ανάπτυξη της στρογγυλής σπερματίδας και σταδιακά επεκτείνεται ως ένα «κάλυμμα» πάνω από τον πυρήνα καθώς οι στρογγυλές σπερματίδες διαφοροποιούνται περαιτέρω(12).

Μόλις το ακρόσωμα επεκταθεί πλήρως, οι στρογγυλές σπερματίδες εισέρχονται στη φάση της επιμήκυνσης της σπερμιογένεσης. Καθώς αρχίζει η επιμήκυνση της σπερματίδας, ο πυρήνας πολώνεται στη μία πλευρά του κυττάρου και έρχεται σε στενή θέση με την κυτταρική μεμβράνη σε μια περιοχή όπου καλύπτεται από το ακροσωμικό κάλυμμα. Λίγο μετά από αυτή την πόλωση, η χρωματίνη της σπερματίδας αρχίζει να συμπυκνώνεται ορατά, σχηματίζοντας προοδευτικά μεγαλύτερους και πυκνότερους κόκκους ηλεκτρονίων μαζί με μια αλλαγή στο σχήμα του συμπυκνωμένου πυρήνα. Αυτή η αλλαγή στο σχήμα του πυρήνα ποικίλλει σημαντικά μεταξύ των ειδών. Η συμπύκνωση της χρωματίνης επιτυγχάνεται με την αντικατάσταση των πλούσιων σε λυσίνη ιστονών με μεταβατικές πρωτεΐνες οι οποίες με τη σειρά τους αντικαθίστανται στη συνέχεια από πρωταμίνες πλούσιες σε αργινίνη. Η χρωματίνη της σπερματίδας, στη συνέχεια, γίνεται εξαιρετικά σταθεροποιημένη και ανθεκτική στην πέψη από το ένζυμο DNase. Με αυτές τις αλλαγές σχετίζεται τόσο μια αξιοσημείωτη μείωση του όγκου του πυρήνα καθώς και η διακοπή της γονιδιακής μεταγραφής. Επομένως, η επακόλουθη φάση επιμήκυνσης της σπερματίδας προχωρά απουσία μεταγραφής ενεργού γονιδίου.

Κατά την έναρξη της επιμήκυνσης της σπερματίδας, σχηματίζεται μια σύνθετη δομή με βάση μικροσωληνίσκους, γνωστή ως μανσέτα (manchette). Το δίκτυο των μικροσωληνίσκων προέρχεται από έναν περιπυρηνικό δακτύλιο στη βάση του ακροσώματος και εκτείνεται προς τα έξω μέσα στο κυτταρόπλασμα. Η μανσέτα είναι εντελώς αντίθετη με την πυρηνική μεμβράνη και πιστεύεται ότι συμμετέχει στη διαμόρφωση της πυρηνικής κεφαλής, ασκώντας, ίσως, μια δύναμη στον πυρήνα καθώς προοδευτικά κινείται περιφερικά προς το οπίσθιο τμήμα του πυρήνα.

Ο σχηματισμός της ουράς εμφανίζεται πρώιμα κατά τη σπερμιογένεση στη φάση της στρογγυλής σπερματίδας, όταν μια νηματοειδής δομή αναδύεται από ένα από τα ζεύγη κεντριολίων που βρίσκονται κοντά στο σύμπλεγμα Golgi. Σε συνδυασμό με τις μεταβαλλόμενες σχέσεις πυρήνα - κυτταροπλάσματος, το αναπτυσσόμενο μαστίγιο και το ζεύγος των κεντριολίων τοποθετούνται σε ένα βόθρο στον πυρήνα στον αντίθετο πόλο από το ακρόσωμα. Ο κεντρικός πυρήνας του αξονικού νήματος των μαστιγίων, που ονομάζεται αξόνημα, αποτελείται από εννέα διπλούς μικροσωληνίσκους που περιβάλλουν δύο μονούς κεντρικούς μικροσωληνίσκους, το οποίο αντιπροσωπεύει ένα κοινό μοτίβο που βρίσκεται στις βλεφαρίδες. Αυτή η βασική δομή τροποποιείται στην

περιοχή της άρθρωσής της με τον πυρήνα μέσω του σχηματισμού μιας πολύπλοκης δομής γνωστής ως συνδετικό κομμάτι.

Η μεταμόρφωση των μαστιγίων προχωρά κατά τη φάση της επιμήκυνσης, καθώς αποκτά τη χαρακτηριστική περιοχή του λαιμού, μεσαία, κύρια και ακραία κομμάτια. Η ανάπτυξη των μαστιγίων πιστεύεται ότι περιλαμβάνει έναν μηχανισμό γνωστό ως Intra-Manchette Transport (IMT), ο οποίος προτείνεται να είναι παρόμοιος με τα συστήματα Intra-Flagellar Transport (IFT) που χρησιμοποιούνται σε άλλα κύτταρα με βλεφαρίδες. Το IMT περιλαμβάνει πρωτεΐνες που «μετακινούνται» από τον πυρήνα του σπερματοειδούς προς το αναπτυσσόμενο μαστίγιο μέσω μοριακών κινητήρων που ταξιδεύουν κατά μήκος «ίχνων» μικροσωληνίσκων και νηματοειδούς ακτίνης.

Το μεσαίο και το κύριο κομμάτι περιέχουν τα συστατικά του μιτοχονδριακού και του ινώδους περιβλήματος, αντίστοιχα, και περιλαμβάνουν τις εξωτερικές πυκνές ίνες. Τα βιοχημικά χαρακτηριστικά αυτών των συστατικών της ουράς του σπέρματος αναδύονται. Ενώ αυτά τα συστατικά παρέχουν κάποια δομική σταθερότητα στην ουρά, τα στοιχεία δείχνουν ότι μπορεί να χρησιμεύσουν ως μοριακό ικρίωμα για την τοποθέτηση βασικών ενζύμων που είναι κρίσιμα για την επιτυχή κινητικότητα του σπέρματος. Ο σχηματισμός του μιτοχονδριακού περιβλήματος συμβαίνει τη στιγμή της τελικής αναδιοργάνωσης του κυτταροπλάσματος και των οργανιδίων της σπερματίδας. Τα μιτοχόνδρια που είχαν παραμείνει γύρω από την περιφέρεια του συσσωματώματος των σπερματίδων συγκεντρώνονται γύρω από το εγγύς τμήμα του μαστιγίου για να σχηματίσουν μια πολύπλοκη ελικοειδή δομή.

Οι ώριμες επιμήκεις σπερματίδες υφίστανται μια περαιτέρω πολύπλοκη αναδιαμόρφωση κατά τη διάρκεια της σπερμίωσης, τη διαδικασία με την οποία τα ώριμα σπερματοζωάρια αναδιαμορφώνονται και στη συνέχεια απελευθερώνονται από τα κύτταρα Sertoli πριν από το πέρασμά τους στην επιδιδυμίδα. Αυτή η αναδιαμόρφωση περιλαμβάνει την αφαίρεση εξειδικευμένων συνδέσμων πρόσφυσης που έχουν εξασφαλίσει σφιχτή προσκόλληση της σπερματίδας στο κύτταρο Sertoli κατά τη διάρκεια της διαδικασίας επιμήκυνσής της, περαιτέρω αναδιαμόρφωση της κεφαλής και του ακροσώματος της σπερματίδας και η αφαίρεση του εκτεταμένου κυτταροπλάσματος για την παραγωγή του βελτιωμένου σπερματοζωαρίου.

Το κυτταρόπλασμα της σπερματίδας μεταναστεύει σε μια ουραία θέση γύρω από την ουρά και μειώνεται σημαντικά σε όγκο. Μερικές παρατηρήσεις υποδηλώνουν ότι οι παρατάσεις του κυτταροπλάσματος των κυττάρων Sertoli στέλνουν προεξοχές που μοιάζουν με δάχτυλο οι οποίες κολπίζουν την κυτταρική μεμβράνη του σπερματοζωαρίου κυτταροπλάσματος και κυριολεκτικά «τραβούν» το υπολειπόμενο κυτταρόπλασμα από τη σπερματίδα. Τα υπολείμματα του κυτταροπλάσματος των σπερματίδων σχηματίζουν αυτό που ονομάζεται υπολειπόμενο σώμα. Τα υπολειμματικά σώματα περιέχουν μιτοχόνδρια, λιπίδια και ριβοσωμικά σωματίδια και

φαγοκυτταρώνονται και μετακινούνται στη βάση του κυττάρου Sertoli όπου διασπώνται με λυσοσωμικούς μηχανισμούς. Η τελική απελευθέρωση σπερματοζωαρίων στο τέλος της σπερμίωνσης είναι ένα στιγμιαίο γεγονός και πιθανότατα περιλαμβάνει καταρράκτες σηματοδότησης που εξαρτώνται από τη φωσφορυλίωση εντός του κυττάρου Sertoli με αποτέλεσμα αλλαγές στη συγκολλητική φύση των μορίων κυτταρικής προσκόλλησης, με αποκορύφωμα το κύτταρο Sertoli να «απαλλαγεί» της ώριμης σπερματίδας. Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά της σπερμίωνσης είναι σχετικά διατηρημένα μεταξύ των ειδών, ιδιαίτερα μεταξύ των θηλαστικών. Η σπερμίωνση είναι πολύ ευαίσθητη σε διαταραχή από φαρμακολογικούς ρυθμιστές και από παράγοντες που καταστέλλουν τις γοναδοτροπίνες και η αποτυχία της σπερμίωνσης μπορεί να αναγνωριστεί από την παρουσία ώριμων επιμηκών πυρήνων σπερματίδων που φαγοκυτταρώνονται από τα κύτταρα Sertoli(13).

1.6 ΜΕΙΩΣΗ

Μείωση είναι η διαδικασία με την οποία οι γαμέτες υφίστανται αναγωγική διαίρεση για να δώσουν μία απλοειδής σπερματίδα και κατά την οποία διασφαλίζεται η γενετική ποικιλότητα του γαμέτη μέσω της ανταλλαγής γενετικού υλικού. Κατά τη διάρκεια της μείωσης I, αρχίζει η σύνθεση DNA, οδηγώντας σε έναν τετραπλοειδή γαμέτη. Η ανταλλαγή γενετικών πληροφοριών επιτυγχάνεται κατά τη διάρκεια του μειωτικού ανασυνδυασμού, ο οποίος περιλαμβάνει την επαγωγή σπασίματος διπλού κλώνου DNA (double strand breaks, DSBs) κατά τη σύζευξη ομόλογων χρωμοσωμάτων και την επακόλουθη επιδιόρθωση των DSBs χρησιμοποιώντας ομόλογα χρωμοσώματα ως πρότυπα. Μόλις ολοκληρωθεί η ανταλλαγή γενετικού υλικού, τα κύτταρα προχωρούν μέσω δύο διαδοχικών αναγωγικών διαιρέσεων για να δώσουν απλοειδή σπερματοζωάρια. Αυτή η διαδικασία διέπεται από γενετικά προγραμματισμένα συστήματα σημείων ελέγχου(14,15).

Η μείωση αρχίζει όταν τα σπερματογόνια τύπου B χάνουν την επαφή τους με τη βασική μεμβράνη και σχηματίζουν πρωτογενή σπερματοκύτταρα από προλεπτοταινία. Τα πρωτογενή σπερματοκύτταρα του προλεπτενίου ξεκινούν τη σύνθεση του DNA και αρχίζει η συμπύκνωση των μεμονωμένων χρωμοσωμάτων, με αποτέλεσμα την εμφάνιση λεπτών νημάτων στον πυρήνα που προσδιορίζουν το στάδιο της λεπτοταινίας. Σε αυτό το στάδιο, κάθε χρωμόσωμα αποτελείται από ένα ζεύγος χρωματίδων. Καθώς τα κύτταρα κινούνται στο στάδιο της ζυγοταινίας, υπάρχει περαιτέρω πάχυνση αυτών των χρωματιδίων και το ζευγάρωμα των ομόλογων χρωμοσωμάτων. Η περαιτέρω διεύρυνση του πυρήνα και η συμπύκνωση των ζευγών των ομόλογων χρωμοσωμάτων, που ονομάζονται δισθενή, παρέχει τα πυρηνικά χαρακτηριστικά του πρωτογενούς σπερματοκυττάρου σταδίου παχυταινίας. Σε αυτό το στάδιο, υπάρχει ανταλλαγή

γενετικού υλικού μεταξύ ομόλογων χρωμοσωμάτων που προέρχονται από μητρικές και πατρικές πηγές, διασφαλίζοντας έτσι τη γενετική ποικιλότητα των γαμετών. Οι θέσεις ανταλλαγής γενετικού υλικού χαρακτηρίζονται από την εμφάνιση χιασμάτων και αυτά γίνονται ορατά όταν τα ομόλογα χρωμοσώματα διαχωρίζονται ελαφρώς κατά τη διάρκεια του διπλοταινίας. Η ανταλλαγή γενετικού υλικού περιλαμβάνει θραύση κλώνου DNA και επακόλουθη επιδιόρθωση(9).

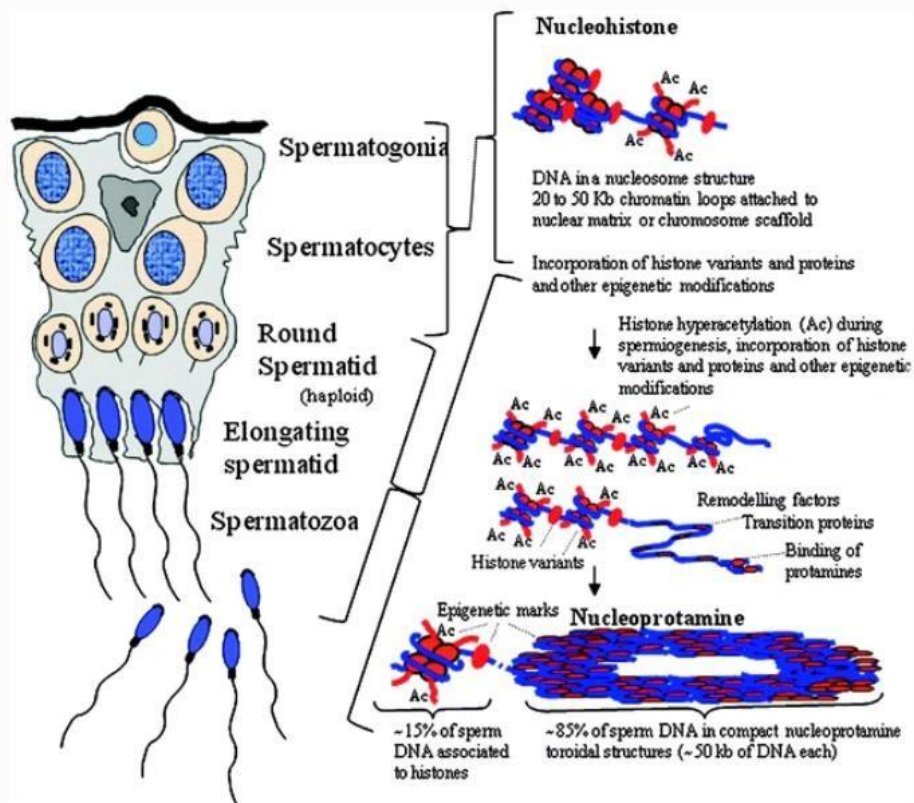
Το στάδιο της διπλοταινίας αναγνωρίζεται με μερικό διαχωρισμό των ομόλογων ζευγών χρωμοσωμάτων που εξακολουθούν να παραμένουν ενωμένα στα χιάσματά τους και το καθένα εξακολουθεί να αποτελείται από ένα ζεύγος χρωματίδων. Με τη διάλυση της πυρηνικής μεμβράνης, τα χρωμοσώματα ευθυγραμμίζονται σε μια άτρακτο και κάθε μέλος του ομόλογου ζεύγους μετακινείται σε αντίθετους πόλους της ατράκτου κατά τη διάρκεια της ανάφασης. Τα θυγατρικά κύτταρα που προκύπτουν ονομάζονται δευτερογενή σπερματοκύτταρα και περιέχουν τον απλοειδή αριθμό των χρωμοσωμάτων, αλλά, δεδομένου ότι κάθε χρωμοσώμα αποτελείται από ένα ζεύγος χρωματίδων, το περιεχόμενο του DNA εξακολουθεί να είναι διπλοειδές. Μετά από μια σύντομη ενδιάμεση φάση, η οποία στον άνθρωπο αντιπροσωπεύει περίπου έξι ώρες, τα δευτερογενή σπερματοκύτταρα ξεκινούν μια δεύτερη μειωτική διαίρεση κατά την οποία οι χρωματίδες κάθε χρωμοσώματος μετακινούνται σε αντίθετους πόλους της ατράκτου σχηματίζοντας θυγατρικά κύτταρα που είναι γνωστά ως στρογγυλά σπερματοζωάρια. Η μειωτική ωρίμανση στον άνθρωπο χρειάζεται περίπου 24 ημέρες για να προχωρήσει από το στάδιο της προλεπτοταινίας στο σχηματισμό στρογγυλών σπερματίδων(9).

1.7 ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΤΗΣ ΧΡΩΜΑΤΙΝΗΣ ΤΟΥ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΟΥ

Η οργάνωση της πυρηνικής χρωματίνης που υπάρχει στα σωματικά κύτταρα είναι επίσης παρούσα στα πρώιμα γεννητικά κύτταρα, όπως τα σπερματογονία μέσω του πρώτου απλοειδούς κυτταρικού τύπου, των στρογγυλών σπερματογονίων. Καθώς τα στρογγυλά σπερματοζωάρια προχωρούν σε σπερματοζωάρια, η χρωματίνη συμπυκνώνεται καθώς οι ιστόνες αντικαθίστανται από πρωταμίνες σε μεταγενέστερα στάδια της σπερματογένεσης, μέσω μιας διαδικασίας που περιλαμβάνει πρωτεΐνες μετάβασης σε ορισμένα είδη όπως ο άνθρωπος, το ποντίκι, ο αρουραίος ή το πρόβατο. Αυτό οδηγεί σε έναν εξαιρετικά συμπυκνωμένο πυρήνα που χαρακτηρίζεται από μεταγραφική αποσιώπηση(16).

1.7.1 ΣΥΜΠΥΚΝΩΣΗ ΤΟΥ DNA ΜΕΣΩ ΠΡΩΤΑΜΙΝΩΝ

Οι πρωταμίνες έχουν περίπου το μισό μέγεθος των ιστονών, που περιέχουν 50 έως 110 αμινοξέα. Έχουν επίσης υψηλότερο θετικό φορτίο λόγω της υψηλότερης περιεκτικότητάς τους σε λυσίνη και αργινίνη, επιτρέποντάς τους να συνδέονται αποτελεσματικά με την κύρια αύλακα του DNA κάθε 10 έως 15 ζεύγη βάσεων DNA σε κάθε στροφή διπλής έλικας. Στο γονιδίωμα των θηλαστικών, υπάρχουν δύο τύποι πρωταμινών (οικογένεια πρωταμίνης 1 και πρωταμίνης 2). Ενώ η πρώτη πρωτεΐνη υπάρχει σε όλα τα σπέρματα θηλαστικών, η πρωταμίνη 2 βρίσκεται μόνο σε ανθρώπους, πρωτεύοντα, ποντίκια, κουνέλια και επιβήτορες. Η παρουσία της πρωταμίνης 2 σε αυτά τα είδη είναι απαραίτητη για το σχηματισμό σπέρματος, καθώς τα knock - out για το PRM2 οδήγησαν σε στειρότητα και η περίσσεια έκφρασης της πρωταμίνης 1 οδήγησε σε αλλοιώσεις της μορφολογίας του σπέρματος και πρόωρη συμπύκνωση του DNA. Έτσι, ενώ η πρωταμίνη 1 είναι επαρκής για την πλήρη συμπύκνωση της χρωματίνης του σπέρματος σε ορισμένα είδη, η πρωταμίνη 2 φαίνεται να αυξάνει μόνο τη συμπύκνωση από την πρωταμίνη 1(17).



Εικόνα 6 Σχηματική αναπαράσταση των κύριων αλλαγών της χρωματίνης που συμβαίνουν κατά τη μετάβαση νουκλεοϊστόνης – νουκλεοπρωταμίνης στη σπερμιογένεση και την επακόλουθη αποσυσκευασία νουκλεοπρωταμίνης και ανασύσταση της δομής νουκλεοϊστόνης κατά τη γονιμοποίηση.

Η σύνδεση των πρωταμινών προσδίδει 44 φορές μικρότερο όγκο της χρωματίνης σε σύγκριση με τα ηπατικά κύτταρα. Αυτή η συμπύκνωση DNA που υπάρχει στα σπερματοζωάρια οδηγεί σε ισχυρή προστασία του γενετικού περιεχομένου από γονοτοξική δραστηριότητα, ένα βασικό χαρακτηριστικό που επιτρέπει την αδιάλειπτη παράδοση γενετικής πληροφορίας στο έμβρυο, περιορίζοντας τις μεταλλάξεις και διασφαλίζοντας τη διαιώνιση του είδους. Ωστόσο, κατά τη γονιμοποίηση, αυτή η εξαιρετικά συμπυκνωμένη χρωματίνη πρέπει να αποκατασταθεί ως λειτουργικά ενεργή χρωματίνη. Η διαδικασία αυτή απαιτεί την αντικατάσταση των πρωταμινών από ιστόνες στον αρσενικό πυρήνα κατά την οποία και άλλες πρωτεΐνες πιστεύεται ότι εισάγονται στο πατρικό γονιδίωμα(17).

1.7.2 ΠΡΩΤΑΜΙΝΗ – ΤΟΡΟΕΙΔΗ DNA

Η δέσμευση των πρωταμινών με το DNA οδηγεί σε μια σημαντική υπερδομή του DNA, τον σχηματισμό δακτυλιοειδών συμπλεγμάτων DNA-πρωταμίνης περίπου 50 κιλοβάσεων, που υπολογίζεται ότι έχουν διάμετρο μεταξύ 60 και 100 νανόμετρα και πάχος 20 νανόμετρα. Η βιοχημική διαμόρφωση των πρωταμινών και η περιεκτικότητά τους σε κυστεΐνη οδηγεί στην παρουσία μιας σημαντικής μετα-μεταφραστικής τροποποίησης: των ομοιοπολικών δισουλφιδικών δεσμών που παράγονται μεταξύ γειτονικών πρωταμινών. Αυτή η δέσμευση μεταξύ πρωταμινών οδηγεί σε σταθεροποίηση των δακτυλιοειδών δομών καθιστώντας τις ανθεκτικές σε γονοτοξικούς παράγοντες ως νουκλεάσες και πιο ανθεκτικές στην οξειδωτική βλάβη(18).

Οι διαδοχικές δακτυλιοειδείς δομές παραμένουν συνδεδεμένες μέσω ενός μη συμπυκνωμένου DNA, της περιοχής σύνδεσης του δακτυλίου (toroid linker regions, TLR). Επιπλέον, οι περιοχές συνδέτη σπειροειδούς είναι περιοχές που θα μπορούσαν να παραμείνουν συμπυκνωμένες από ιστόνες, οι οποίες ορισμένες έρευνες έχουν δείξει ότι μπορεί να έχουν ρόλο στα πρώιμα έμβρυα, καθώς μπορεί να είναι η πηγή επιγενετικών τροποποιήσεων που επηρεάζουν την έκφραση γονιδίων στην πρώιμη ανάπτυξη. Ωστόσο, ο συγκεκριμένος εντοπισμός τροποποιημένων ιστονών κατά μήκος του γονιδιώματος του ώριμου σπέρματος εξακολουθεί να είναι ένα αμφιλεγόμενο θέμα, καθώς ορισμένες μελέτες βρήκαν αυξημένη παρουσία σε πλούσιες σε γονίδια περιοχές, ενώ άλλες έχουν βρει την παρουσία ιστονών σε επαναλαμβανόμενες, διαγονιδιακές περιοχές. Βέβαια, απαιτούνται περαιτέρω πειράματα που δεν βασίζονται στη χρήση εξωτερικών νουκλεασών προκειμένου να διευκρινιστούν αυτά τα αμφιλεγόμενα αποτελέσματα, όπως προτείνεται από τους Yamaguchi και τους συνεργάτες. Επιπλέον, δια-ειδικές διαφορές μπορεί επίσης να επηρεάζουν αυτά τα αποτελέσματα, καθώς έχουν βρεθεί διαφορετικά επίπεδα ιστονών στους ανθρώπους (από 3% έως 15%), στα ποντίκια (από 1% έως 15%) και στα μαρσιποφόρα (50%)(18).

1.7.3 ΤΟΜΕΙΣ ΒΡΟΧΟΥ DNA ΤΩΝ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΩΝ

Παρά τη συμπύκνωση του DNA σε τοροειδή από τις πρωταμίνες, έχει αποδειχθεί ότι το DNA του σπέρματος οργανώνεται επίσης σε τομείς βρόχου DNA που συνδέονται στις βάσεις τους σε πρωτεϊνική πυρηνική μήτρα. Η οργάνωση των περιοχών των βρόχων μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης και μπορεί να κληρονομηθεί από το έμβρυο. Έχουμε επίσης παράσχει στοιχεία ότι η προσκόλληση αυτών των περιοχών βρόχου είναι η θέση απαρχής της αντιγραφής του DNA στο ζυγώτη, υποδηλώνοντας ότι το έμβρυο κληρονομεί τα λειτουργικά τμήματα χρωματίνης(19).

1.7.4 ΤΡΙΤΟΤΑΓΕΙΣ ΔΟΜΕΣ ΤΗΣ ΧΡΩΜΑΤΙΝΗΣ ΤΟΥ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΟΥ

Ορισμένες έρευνες που διεξήχθησαν μέσω μικροσκοπίας κατάψυξης και ατομικής δύναμης έδειξαν ενδείξεις τριτοταγών δομών στη χρωματίνη του σπέρματος. Αυτές οι δομές μπορεί να αποτελούνται από παράλληλες στοίβες ελασματοειδών φύλλων παράλληλες με τον μακρύ άξονα σε ταύρους, κουνέλια και άνδρες [18, 48]. Άλλες μελέτες που διεξήχθησαν στα τέλη της δεκαετίας του ενενήντα έδειξαν την παρουσία σωματιδίων που μοιάζουν με νουκλεοσώματα στην πυρηνική περιφέρεια, η οποία είναι σύμφωνη με το μοντέλο τοποθέτησης των χρωμοσωμάτων στο σπέρμα, όπου τα τελομερή θα συμπυκνώνονταν σε ιστόνες και θα προσκολλώνται στο εσωτερικό πυρηνικό μεμβράνη προς την περιφέρεια του κυττάρου [50-52]. Επιπλέον, έχουν περιγραφεί διαφορετικές χρωμοσωμικές περιοχές στους πυρήνες του σπέρματος, καθώς η οργάνωση των χρωμοσωμάτων δεν είναι τυχαία, όπως περιγράφεται και για τους πυρήνες των σωματικών κυττάρων. Επομένως, τόσο η δομή της χρωματίνης του σπερματοζωαρίου όσο και η χρωμοσωμική οργάνωση μπορεί να έχουν επιπτώσεις στη λειτουργία του σπέρματος πριν και μετά τη γονιμοποίηση.

1.8 ΒΛΑΒΗ ΣΤΟ DNA ΤΟΥ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΟΥ

Δύο πιθανές αιτίες βλάβης του DNA είναι η ανώμαλη πρωταμίνωση και η αλλοιωμένη συμπύκνωση των πρωταμινών(20–22). Υπογόνιμα αρσενικά παρουσιάζουν μια ανώμαλη P1/P2 αναλογία εξαιτίας της έλλειψης πρωταμινών, πράγμα που έχει συνδεθεί με το 15% των ιστονών να μην έχει μετατραπεί σε πρωταμίνες(23). Το οξειδωτικό στρες είναι η αιτία για άνω του 80% της θραύσης του DNA που έχει παρατηρηθεί σε περιπτώσεις όπως η μόλυνση, η λοίμωξη, ή διαφορετικές κλινικές διαγνώσεις ανδρικής υπογονιμότητας(24). Τα αντιδραστικά είδη οξυγόνου είναι πιο πιθανό να αναπτυχθούν εάν τα αποθέματα αντιοξειδωτικών εξαντληθούν, γεγονός που προκαλεί οξειδωτικό στρες. Ο

κατακερματισμός του DNA λόγω μονόκλωνης ή δίκλωνης θραύσης μπορεί να ποσοτικοποιηθεί με την ανάλυση δομής χρωματίνης σπέρματος (Sperm Chromatin Semen Assay) ή το τελικό τεστ επισήμανσης dUTP nick-end (TUNEL) με τη μεσολάβηση της δεοξυνουκλεοτιδυλικής τρανσφεράσης. Σε μια δοκιμασία TUNEL, η απόπτωση και η νέκρωση είναι επίσης ορατές(25).

Ωστόσο, η απόπτωση και η νέκρωση δεν μπορούν να διαχωριστούν. Συγκριτικά με τα σωματικά κύτταρα, η απόπτωση του σπέρματος ρυθμίζεται σε τρία διαφορετικά επίπεδα: την πλασματική μεμβράνη (μέσω υποδοχέων Fas), τον πυρήνα (που προκαλεί την ανοδική ρύθμιση του γονιδίου Bax και την καθοδική ρύθμιση της έκφρασης Bcl-2) και το κυτόπλασμα (μέσω της ενεργοποίησης του Bax γονιδίου και την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c και τον καταρράκτη κασπάσης στο κυτοσόλιο)(26,27). Το κατεστραμμένο DNA και τα εκτεθειμένα υπολείμματα φωσφατιδυλοσερίνης στη μεμβράνη του πλάσματος και στα μιτοχόνδρια είναι δύο δείκτες απόπτωσης που μπορούν να παρατηρηθούν στην υπερδομική εξέταση του σπέρματος που εκσπερματώθηκε. Η απόπτωση που μοιάζει με έκτρωση αποδεικνύεται από κυτταροπλασματικά θραύσματα, εσφαλμένη συσσώρευση χρωματίνης και/ή βλάβη του DNA σε ανώριμο/ανώμαλο σπέρμα(28).

Η αποπτωτική απόπτωση είναι μια διαδικασία που συμβαίνει κατά τη διάρκεια της εκσπερμάτωσης και επιτρέπει στα σπερματοζώαρια που έχουν καθοριστεί για αποβολή να ξεφύγουν από τον θάνατο, γεγονός που μειώνει την ποιότητα του σπέρματος. Αυτό οφείλεται κυρίως στο επιπλέον κυτταρόπλασμα που βρίσκεται στο σπέρμα με μορφολογικές ανωμαλίες(29,30). Έρευνα με βάση τις αναλύσεις Annexin V και TUNEL αποκάλυψε ότι περισσότερο από το 40% των κυττάρων που προορίζονταν για απομάκρυνση ήταν παρόντα στο σπερματικό εκσπερμάτισμα. Η ενεργοποίηση του PARP και της κασπάσης-3 μπορεί να οδηγήσει σε βλάβη του DNA. Οι διαφορετικές λειτουργίες του PARP-1, όπως η ικανότητά του να δεσμεύει νουκλεοσώματα και να υποστηρίζει το σχηματισμό συμπαγών, μεταγραφικά περιορισμένων δομών χρωματίνης, έχουν συνδεθεί τόσο με τη βλάβη του DNA όσο και με την απόπτωση. Επιπλέον, οι πρωταμίνες προκαλούν πυρηνική συστολή, η οποία σχετίζεται με την πυρηνική αναδιαμόρφωση. Η διαδικασία της απόπτωσης τίθεται σε εφαρμογή όταν η βλάβη και η επιδιόρθωση του DNA γίνονται όλο και πιο γρήγορα. Δεδομένου ότι η κάθαρση του PARP-1 συμβαίνει πριν από τον κατακερματισμό του DNA, χρησιμεύει ως πρώιμος δείκτης απόπτωσης(31). Ωστόσο, η απόπτωση δεν μπορεί να ευθύνεται για όλες τις βλάβες στο DNA στα σπερματοζώαρια που έχουν εκσπερματωθεί. Οι μεταλλάξεις και ο χρωμοσωμικός διαχωρισμός μπορεί να προκαλέσουν βλάβη στο DNA και ακατάλληλη ταξινόμηση χρωμοσωμάτων κατά τη διάρκεια της μείωσης(32–34).

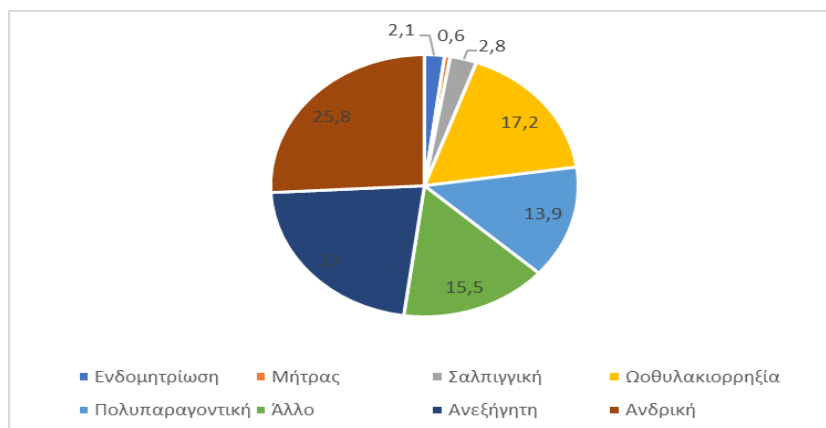
Η ανδρική υπογονιμότητα έχει συνδεθεί με την ένταση του κατακερματισμού του DNA(35). Αρκετές μελέτες, έχουν δείξει ότι ο κατακερματισμός του DNA των ανδρών αυξάνεται με την ηλικία. Αυτοί ανακάλυψαν ότι άνδρες άνω των 45 ετών είχαν τιμές

κατακερματισμένου DNA που ήταν διπλάσιες από αυτές που καθορίστηκαν για άνδρες κάτω των 30 ετών. Στατιστικά, η διαφορά είναι σημαντική (15,2 % και 32%, αντίστοιχα)(36). Τα ποσοστά DFI κυμαίνονταν από 29% σε 21% σε 26% στις ηλικιακές ομάδες 30 – 35, 35 – 40 και 40 – 45, αντίστοιχα. Μια σχετική μελέτη ανακάλυψε συγκριτικά αποτελέσματα που δείχνουν ότι το ποσοστό των σπερματοζωαρίων με σοβαρά κατεστραμμένο DNA ήταν σημαντικά υψηλότερο στην ομάδα 36-57 ετών από ό,τι στην ομάδα 20-35 ετών. Άνδρες με νορμοζωοσπερμία είχαν ένα 5% υψηλότερο DFI πριν από την ηλικία των 40 σε σχέση με άνω των 40. Οι τιμές DFI ήταν 8% υψηλότερες σε άνδρες ηλικίας > 40 ετών σε σχέση με άνδρες <40 ετών σε μια μελέτη απόμων με ολιγοασθενοτεροζωοσπερμία. Οι πατέρες μεγαλύτερης ηλικίας ενδέχεται να έχουν ένα υψηλότερο ρίσκο κατακερματισμένου DNA, σύμφωνα με έρευνα του Barrosο και των συνεργατών. Ο έλεγχος ρουτίνας για κατακερματισμένο DNA σε άνδρες μεγαλύτερης ηλικίας συστήνεται προκειμένου οι ασθενείς να ενημερωθούν για τους πιθανούς κινδύνους(37).

Όπως αναμενόταν, η έκφραση της φωσφατιδυλοσερίνης μειώνεται με την ηλικία, καθιστώντας την λιγότερο αξιόπιστη ένδειξη της ποιότητας του σπέρματος. Ως σήμα απόπτωσης, η μετατόπιση της φωσφατιδυλοσερίνης στη μεμβράνη του σπέρματος είναι σημαντικά πιο διαδεδομένη σε άνδρες άνω των 40 ετών. Η ηλικία ενός άνδρα φαίνεται επίσης να προκαλεί μεγαλύτερη βλάβη στο DNA του σπέρματος. Ο μεγαλύτερος χρόνος έως τη σύλληψη και η υπογονιμότητα έχουν συνδεθεί με βλάβη στο DNA του σπέρματος. Σύμφωνα με μελέτες, η βλάβη του DNA είναι πιο ακριβής δείκτης της εγκυμοσύνης από τα τυπικά χαρακτηριστικά του σπέρματος. Ομοίως, η βλάβη του DNA έχει συνδεθεί με μειωμένα ποσοστά σύλληψης μετά από ενδομήτρια σπερματέγχυση(38).

1.9 ΑΙΤΙΕΣ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑΣ

Στην παρακάτω εικόνα φαίνονται οι βασικές αιτίες υπογονιμότητας με τα αντίστοιχα ποσοστά επί τοις εκατό(39).



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο ΤΟ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΟ



2.1 ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΤΟΥ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΟΥ

Τα μιτοχόνδρια είναι ημιαυτόνομα οργανίδια που βρίσκονται σχεδόν σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα. Αν και η προέλευση των μιτοχονδρίων εξακολουθεί να είναι αμφιλεγόμενη, είναι μια ευρέως αποδεκτή υπόθεση ότι η προέλευση των μιτοχονδρίων οφείλεται στην ενδοσυμβίωση των προγόνων των ευκαρυωτικών κυττάρων και των α-πρωτεοβακτηρίων. Το προγονικό ευκαρυωτικό κύτταρο ήταν αρχικά ένας αερόβιος οργανισμός στον οποίο το οξυγόνο όχι μόνο μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή ενέργειας, αλλά λειτουργούσε και ως τοξικό. Ωστόσο, κατά τη ενδοσυμβιωτική διαδικασία με τα α-πρωτεοβακτήρια που μεταβολίζουν το οξυγόνο, το προγονικό ευκαρυωτικό κύτταρο απέκτησε την ικανότητα να χρησιμοποιεί οξυγόνο για παραγωγή ενέργειας μέσω οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (ΟΧΡΗΟΣ). Το ΟΧΡΗΟΣ είναι πολύ πιο αποτελεσματικό στην παραγωγή ενέργειας από την αναερόβια γλυκόλυση (ένα μόριο γλυκόζης αποδίδει δύο μόρια ATP (τριφωσφορική αδενοσίνη) με γλυκόλυση, αλλά 36 μόρια ATP μέσω του ΟΧΡΗΟΣ). Συνεπώς, ο ευκαρυωτικός οργανισμός που απέκτησε τα μιτοχόνδρια έχει αποκτήσει ένα τεράστιο επιλεκτικό πλεονέκτημα για να ευημερήσει(40).

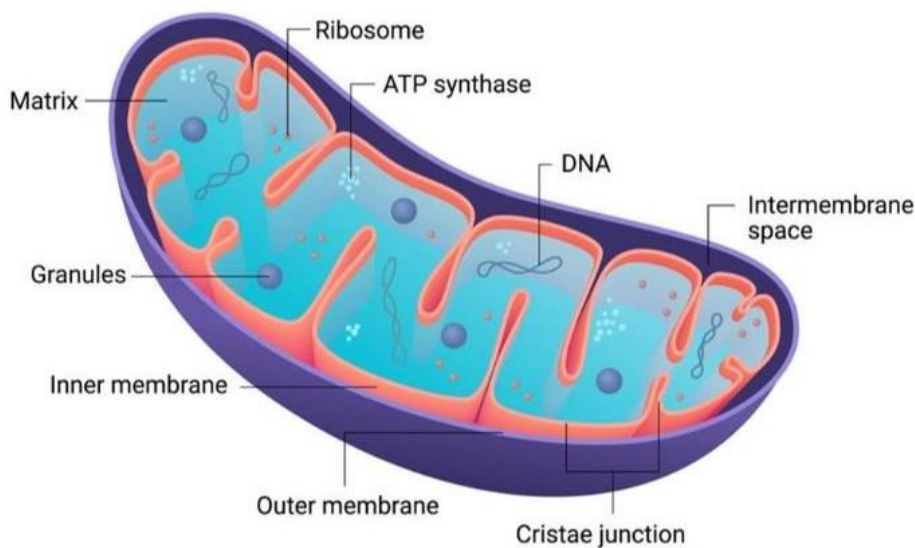
Συγκεκριμένα, το σπερματοζώαριο περιέχει έναν αριθμό μιτοχονδρίων που κυμαίνεται από 50 έως 75 τα οποία βρίσκονται στο μεσαίο τμήμα του (αυχένα σπερματοζωαρίου). Η

δομή και η λειτουργία των μιτοχονδρίων του σπέρματος είναι ουσιαστικά παρόμοια με τα μιτοχόνδρια στα σωματικά κύτταρα. Τα μιτοχόνδρια παράγουν ενέργεια για την κίνηση του σπερματοζωαρίου. Όπως και τα μιτοχόνδρια στα σωματικά κύτταρα, έτσι και αυτά του σπερματοζωαρίου περιέχουν το δικό τους DNA, το μιτοχονδριακό DNA (mitochondrial DNA, mtDNA). Αυτή η δομή των μιτοχονδρίων του σπέρματος ονομάζεται «μιτοχονδριακό περίβλημα». Αν και η δομή και η λειτουργία των μιτοχονδρίων του σπέρματος είναι ουσιαστικά παρόμοια με εκείνα των σωματικών κυττάρων, τα μιτοχόνδρια του σπέρματος παρουσιάζουν σχήμα ημισελήνου. Αυτή η χαρακτηριστική δομή, που ονομάζεται «κάψουλα μιτοχονδρίων», σχηματίζεται από δισουλφιδικούς δεσμούς μεταξύ των πρωτεϊνών πλούσιων σε κυστεΐνη και προλίνη. Τα μιτοχόνδρια του σπέρματος γίνονται μηχανικά σταθερά και ανθεκτικά στο υπο-οσμωτικό περιβάλλον λόγω της μιτοχονδριακής κάψας(41).

Πρόσφατα, αναφέρθηκε ότι μία από τις πρωτεΐνες που αποτελούν την κάψουλα των μιτοχονδρίων είναι η υπεροξειδάση του υδροϋπεροξειδίου του φωσφολιπιδίου της γλουταθειόνης (PHGPx). Σύμφωνα με αυτήν την αναφορά, κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης, η μιτοχονδριακή PHGPx παίζει ρόλο στην αρχική αντιοξειδωτική της λειτουργία. Ωστόσο, στο ώριμο σπέρμα, με το σχηματισμό των διαμοριακών δισουλφιδικών δεσμών μεταξύ των μιτοχονδριακών PHGPx, η πρωτεΐνη χάνει την ενζυματική της δραστηριότητα και χρησιμοποιείται ως δομική πρωτεΐνη για το μιτοχονδριακό περίβλημα. Πιο πρόσφατα, αναφέρθηκε ότι ορισμένες περιπτώσεις ανδρικής υπογονιμότητας έχουν αναφερθεί ότι εμπλέκονται στο χαμηλότερο επίπεδο έκφρασης της μιτοχονδριακής PHGPx του σπέρματος στον άνθρωπο. Περαιτέρω μελέτες για το σπέρμα PHGPx είναι απαραίτητες για να αποκαλυφθεί ολόκληρη η λειτουργία αυτής της πρωτεΐνης(40).

2.2 ΒΑΣΙΚΗ ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΩΝ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΩΝ

Τα μιτοχόνδρια πρόκειται για ένα κυτταροπλασματικό οργανίδιο το οποίο διαδίδεται μόνο με τη διάσπαση των προϋπαρχόντων μιτοχονδρίων. Το οργανίδιο αποτελείται από διπλές μεμβράνες, μια εξωτερική μεμβράνη και μια εσωτερική μεμβράνη. Αυτές οι δύο μεμβράνες χωρίζουν περαιτέρω τα μιτοχόνδρια σε δύο διαμερίσματα, τη μήτρα και τον ενδομεμβρανικό χώρο. Η μήτρα αποτελεί τον χώρο που περιβάλλεται από την εσωτερική μεμβράνη και ενδομεμβρανικός χώρος ορίζεται το ενδιάμεσο μεταξύ της εξωτερικής και της εσωτερικής μεμβράνης. Η εξωτερική μεμβράνη πιστεύεται ότι προέρχεται από την εμβρυϊκή μεμβράνη πλάσματος ξενιστή η οποία είναι διαπερατή σε μόρια με το μοριακό βάρος να είναι σχεδόν μικρότερο από 10 kDa (Εικ. 7)(40).



Εικόνα 7 Η δομή του μιτοχονδρίου.

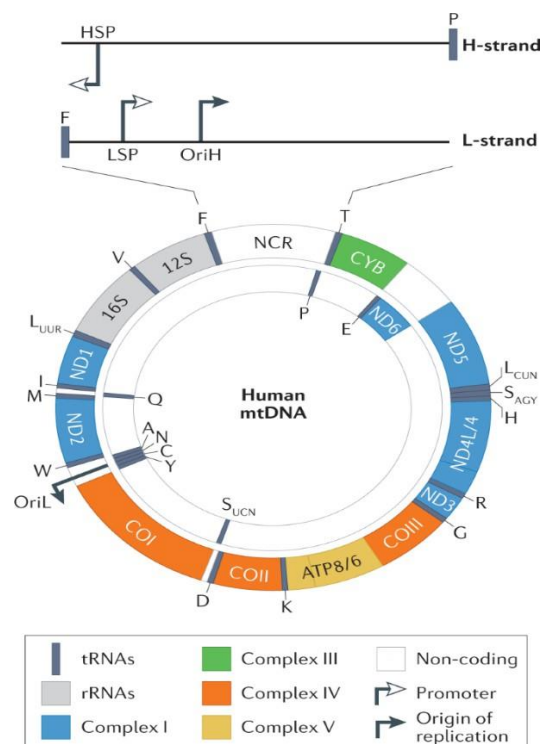
Αντίθετα, η εσωτερική μεμβράνη είναι εξαιρετικά αδιαπέραστη και όλα τα μόρια και τα ιόντα απαιτούν ειδικούς μεταφορείς για να εισέλθουν στη μήτρα. Καθώς η εσωτερική μεμβράνη σχηματίζει μια βαθιά πτυχή στη μήτρα, που ονομάζεται *cristae*, η επιφάνεια της εσωτερικής μεμβράνης είναι μεγαλύτερη από αυτή της εξωτερικής. Στην εσωτερική μεμβράνη, τέσσερα διακριτά σύμπλοκα που εκτείνονται σε μεμβράνη, που ονομάζονται σύμπλοκα αναπνευστικής αλυσίδας, NADPH (ανηγμένη δινουκλεοτιδική φωσφορική νικοτιναμδική αδενίνη) αφυδρογονάση, ηλεκτρική αφυδρογονάση, κυτόχρωμα *bc1* και οξειδάση κυτοχρώματος III και III, αντίστοιχα, καθώς και η συνθάση ATP (σύμπλεγμα V) εντοπίζονται. Αυτά τα σύμπλοκα αναπνευστικής αλυσίδας (αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων) περιλαμβάνουν το ΟΧΡΗΟΣ που είναι απαραίτητο για τη δημιουργία του ATP. Στη μήτρα, υπάρχουν τα ένζυμα που εμπλέκονται στον κύκλο του κιτρικού οξέος, η οξείδωση του λιπαρού οξέος και των αμινοξέων, διάφορα ενδιάμεσα μεταβολικά υποστρώματα, το νεοσυντιθέμενο ATP, το μιτοχονδριακό DNA και τα μιτοχονδριακά ριβοσώματα(42).

Τα μιτοχόνδρια αλλάζουν το σχήμα τους, κινούνται στο κυτταρόπλασμα και υφίστανται διακλάδωση καθώς και σύντηξη και σχάση. Ο αριθμός των μιτοχονδρίων αποδεικνύεται ότι ρυθμίζεται σύμφωνα με την ενεργειακή ζήτηση στους μεμονωμένους ιστούς και κύτταρα, αν και ο μηχανισμός αυτής της ρύθμισης είναι ακόμα ασαφής. Αντίθετα, η περίσσεια των μιτοχονδρίων αφομοιώνεται από το λυσόσωμα ή το πρωτεάσωμα. Εκτός από την παραγωγή ενέργειας από το ΟΧΡΗΟΣ, τα μιτοχόνδρια εμπλέκονται στον μεταβολισμό των αμινοξέων, των λιπαρών οξέων, των φυλλικών οξέων, των ουρικών οξέων και των νουκλεοτιδίων και στη ρύθμιση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης ιόντων

Ca²⁺. Επίσης, η απελευθέρωση του κυτοχρώματος c, που είναι μια διαμεμβρανώδης πρωτεΐνη που εμπλέκεται στο ΟΧΡΗΟΣ, από τον διαμεμβρανικό χώρο αποδεικνύεται ότι είναι ένα από τα κεντρικά μονοπάτια της απόπτωσης(43).

2.3 ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟΥ DNA

Το ανθρώπινο μιτοχονδριακό γονιδίωμα περιλαμβάνει ένα κυκλικό χρωμόσωμα 16.569 ζευγών βάσεων DNA (mtDNA), το οποίο βρέθηκε να εμφανίζεται ως ένα ή περισσότερα αντίγραφα σε κάθε μιτοχόνδριο. Κάθε κλώνος του ανθρώπινου mtDNA ταξινομείται στον κλώνο H (βαρύ) και στον κλώνο L (ελαφρύ) ανάλογα με τη διαφορά του «βάρους». Το mtDNA κωδικοποιεί τα 13 πολυπεπίδια που είναι μέρη των υπομονάδων των συμπλοκών της αναπνευστικής αλυσίδας: σύμπλοκα I, III, IV και σύμπλοκο V (ATP συνθάση)(42,44). Το mtDNA κωδικοποιεί, επίσης, δύο μιτοχονδριακά ριβοσωμικά RNA (rRNAs) και 22 RNA μεταφοράς (tRNAs) που χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση πρωτεϊνών στο οργανίδιο. Τα γονίδια για αυτές τις πρωτεΐνες και τα RNA είναι στενά συσκευασμένα χωρίς εσώνια στο κυκλικό DNA (Εικ. 8).



Εικόνα 8 Το ανθρώπινο μιτοχονδριακό γονιδίωμα DNA με επισημασμένα γονίδια και περιοχές ελέγχου(45).

Η έκφραση των γονιδίων mtDNA δεν ρυθμίζεται από μεμονωμένο υποκινητή του μεμονωμένου γονιδίου αλλά από έναν προαγωγέα στον κλώνο H (HSP) και έναν στον

υποκινητή L (HLP). Και οι δύο πρωτογενείς μεταγραφές από τους κλώνους H και L περιέχουν πολλαπλά γονίδια. Αυτές οι μεταγραφές δημιουργούνται μετά την ενεργοποίηση των HSP και LSP από έναν παράγοντα μεταγραφής, τον mtTFA. Τα rRNA και tRNA παράγονται από τη διάσπαση των πρωτογενών μεταγραφών. Επιπλέον, τα ώριμα mRNA για τα σύμπλοκα της αναπνευστικής αλυσίδας παράγονται με την προσθήκη πολύ-A στα επεξεργασμένα πρωτεύοντα μεταγραφήματα. Οι δύο διακριτές μεγαλύτερες και βραχύτερες πρωτογενείς μεταγραφές δημιουργούνται από τον κλώνο H με τον εναλλακτικό τερματισμό της μεταγραφής με τη χρήση του παράγοντα τερματισμού της μεταγραφής (mTERF: ανθρώπινος παράγοντας τερματισμού της μεταγραφής του ανθρώπινου μιτοχονδρίου 17). Τα επίπεδα των rRNAs ρυθμίζονται από την αναλογία των επιπέδων αυτών των δύο μεταγραφών H-κλώνου. Αξίζει να σημειωθεί ότι ορισμένα κωδικόνια που χρησιμοποιούνται στα γονίδια mtDNA είναι διαφορετικά από αυτά που χρησιμοποιούνται στο πυρηνικό DNA. Για παράδειγμα, το κωδικόνιο UGA που αντιστοιχεί στο κωδικόνιο λήξης στο πυρηνικό DNA χρησιμοποιείται για την τρυπτοφάνη στα γονίδια mtDNA(46).

Η συντριπτική πλειοψηφία των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών είναι απαραίτητες για τη διατήρηση και τη ρύθμιση της λειτουργίας του οργανιδίου. δηλαδή οι δομικές πρωτεΐνες, τα μέρη των υπομονάδων των συμπλοκών της αναπνευστικής αλυσίδας, οι μιτοχονδριακές DNA και RNA πολυμεράσες, οι παράγοντες τερματισμού τόσο της μεταγραφής όσο και της μετάφρασης και μεταγραφής, τα ένζυμα επεξεργασίας RNA, οι μιτοχονδριακές ριβοσωμικές πρωτεΐνες, οι συνθάσες αμινοάκυλο tRNA, και πολλές άλλες πρωτεΐνες κωδικοποιούνται στο πυρηνικό γονιδίωμα. Αυτές οι πρωτεΐνες συντίθενται στο κυτταρόπλασμα και μεταφέρονται στα μιτοχόνδρια μέσω των μεταφορέων, οι οποίοι αποτελούνται από τα ενσωματωμένα σύμπλοκα πολύ-υπομονάδων της μεμβράνης, με τη βοήθεια των κυτταροπλασματικών και μιτοχονδριακών συνοδών. Τα μιτοχονδριακά και πυρηνικά γονίδια πιστεύεται ότι εκφράζονται συντονισμένα σύμφωνα με τις ενεργειακές απαιτήσεις(40).

2.4 ΜΗ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟ DNA ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ

Στα ανθρώπινα σπερματοζώαρια, ένα αντίγραφο του mtDNA υπάρχει σε ένα μιτοχόνδριο κατά μέσο όρο. Η αλληλουχία του mtDNA στο σπερματοζώαριο είναι πανομοιότυπη με αυτή των σωματικών κυττάρων, αλλά η δραστηριότητα επιδιόρθωσης του DNA στο σπέρμα είναι μικρότερη από αυτή των σωματικών κυττάρων ή απουσιάζει εντελώς. Επομένως, αν και το ώριμο σπέρμα παράγεται από το μιτωτικό κύτταρο (σπερματογονία) και η διάρκεια ζωής είναι πολύ μικρότερη από αυτή των σωματικών κυττάρων, οι μεταλλάξεις του mtDNA αποδεικνύεται ότι συσσωρεύονται ταχύτερα στο

σπερματοζωάριο. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει την αναγκαιότητα της μητρικής κληρονομιάς του mtDNA (η αποβολή του mtDNA του σπέρματος στο γονιμοποιημένο ωάριο). Αντιθέτως, εξαιτίας της αδυναμίας μετάδοσης του mtDNA του σπέρματος σε έναν απόγονο, τα μιτοχόνδρια του σπέρματος δεν χρειάζεται να επιδιορθώσουν την ανωμαλία του mtDNA, ούτε να εξαλείψουν το μη φυσιολογικό mtDNA. Συνεπώς, τα μιτοχόνδρια του σπερματοζωαρίου αναφέρεται ότι δε διαθέτουν μηχανισμό επιδιόρθωσης του mtDNA. Με βάση αυτές τις πληροφορίες, πολλοί ερευνητές έχουν ασχοληθεί με τις διάφορες μεταλλάξεις, διπλασιασμούς και διαγραφές στο mtDNA του ανθρώπινου σπέρματος και μελέτησαν τη σχέση μεταξύ του ανώμαλου mtDNA και της κίνησης του σπερματοζωαρίου. Ωστόσο, πρόσφατες αναφορές έχουν αποκαλύψει ότι ανώμαλο mtDNA παρατηρείται στο 84-86% του «φυσιολογικού» γόνιμου σπέρματος και η αναλογία του μη φυσιολογικού mtDNA ως προς το mtDNA άγριου τύπου δε συσχετίζεται με την κίνηση του σπέρματος.

Η ασθενοζωοσπερμία και η ανδρική υπογονιμότητα, από την άλλη πλευρά, προκαλούνται από ένα τμήμα του κληρονομικού τύπου ελαττωματικού mtDNA, το οποίο είναι η μετάλλαξη διαγραφής του mtDNA που δημιουργείται από τις ανωμαλίες του πυρηνικού γονιδίου για τη διατήρηση του mtDNA. Ωστόσο, μεταξύ των καθημερινών κλινικών περιπτώσεων ολιγοασθενοζωοσπερμίας, υπάρχει μόνο ένας μικρός αριθμός περιπτώσεων κληρονομικού είδους ελαττωματικού mtDNA.

2.4.1 ΑΛΛΑΓΕΣ ΣΤΟ ΚΕΝΤΡΟΜΕΡΙΑΙΟ

Είναι ευρέως γνωστό ότι υπάρχει μια δραματική αύξηση της χρωμοσωμικής αστάθειας λόγω της γήρανσης, αλλά ο μηχανισμός που ευθύνεται για αυτήν την αύξηση παραμένει ασαφής. Οι Ohshima και οι συνεργάτες διαπίστωσαν ότι οι σχεδόν γηρασμένοι άνθρωποι ινοβλάστες είχαν σημαντικό επιπολασμό μιτωτικών ανωμαλιών, όπως η μιτωτική ολίσθηση και η ατελής μίτωση. Υπήρχε ισχυρή συσχέτιση μεταξύ του αριθμού των ανωμαλιών του κεντροσώματος και του βαθμού λανθασμένης χρωμοσωμικής ευθυγράμμισης στα κύτταρα που βρίσκονταν στη μετάφαση. Μια ειδική ανάλυση για τα κεντρομερή με χρήση φθορίζοντα ανιχνευτή για in situ υβριδισμό, έδειξε μια σύνδεση μεταξύ της χρωμοσωμικής ανευσωμίας και του υπερδιπλασιασμού του κεντροσώματος. Αυτά τα ευρήματα αποδεικνύουν ότι η αυξημένη χρωμοσωμική αστάθεια με την ηλικία μπορεί να προκληθεί από ανώμαλο διπλασιασμό των κεντροσωμάτων, που σχετίζεται με την κυτταρική γήρανση(47). Η αναδιάταξη των μικροσωληνίσκων και των κεντροσωμάτων είναι σημαντική κατά τη φάση G2/M. Οι πρωτεϊνικές κινάσες που σχετίζονται με το κεντρόσωμα, όπως το Plk, γίνονται λιγότερο ενεργές καθώς τα κύτταρα γερνούν(48,49). Η διαίρεση των βλαστοκυττάρων επιβραδύνεται με την ηλικία, η οποία

συσχετίζεται με μειωμένη σπερματογένεση, ένα φαινόμενο που συνδέεται με τον εσφαλμένο προσανατολισμό του κεντροσώματος(50).

2.4.2 ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΣΤΟΝ ΠΥΡΗΝΑ ΤΟΥ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΟΥ

Τα σπερματοζώαρια υφίστανται περισσότερες αθροιστικές κυτταρικές διαιρέσεις από τα ωοκύτταρα, καθώς διαιρούνται ή υποβάλλονται συνεχώς σε σπερματογένεση κατά τη διάρκεια της αναπαραγωγικής ζωής. Αρκετές ασύμμετρες προ μειωτικές σπερματογονικές διαιρέσεις εμπλέκονται στη σπερματογένεση επειδή οι όρχις των ηλικιωμένων ανδρών είναι πιο ευαίσθητοι στις καταστροφικές συνέπειες του οξειδωτικού στρες. Καθώς η σπερματογένεση είναι μια συνεχής διαδικασία, τα σπερματοζώαρια μπορούν έτσι να αποκτήσουν de novo μονονουκλεοτιδικές παραλλαγές ή μεταλλάξεις. Οι de novo μεταλλάξεις μπορεί να προκύψουν τόσο από λανθασμένη επιδιόρθωση του DNA όσο και από μετα-μειωτική αναδιαμόρφωση της χρωματίνης(51).

Επιπλέον, η χρωμοσωμική ανευπλοειδία ήταν πιο συχνή στα σπερματοζώαρια των μεγαλύτερων πατέρων(52). Σύμφωνα με εκτιμήσεις, η ηλικία του πατέρα αυξάνει την πιθανότητα των απογόνων να αποκτήσουν μια de novo μετάλλαξη κατά 4% ετησίως(53). Τα χρωμοσώματα ενός σπέρματος έχουν διπλασιαστεί 150 φορές όταν ένας άνδρας είναι 20 ετών και 840 φορές μέχρι τα 50 του χρόνια. Αυτή η υψηλότερη πιθανότητα σφαλμάτων αντιγραφής στη βλαστική σειρά αυξάνει το ρυθμό μετάλλαξης de novo στα σπερματοζώαρια. Το πρόβλημα επιδεινώνεται από βλάβες σε συστήματα ευαίσθητα στην ηλικία, όπως η αντιγραφή και η επισκευή του DNA. Σε μια σχετική μελέτη, διαπιστώθηκε ότι ο επιπολασμός των de novo μεταλλάξεων αυξάνεται με την ηλικία(53). Η μέση ετήσια αύξηση του ρυθμού μετάλλαξης de novo είναι περίπου δύο ζεύγη βάσεων(53). Επίσης, η ίδια έρευνα ανακάλυψε ότι η ηλικία του πατέρα είναι ένας σημαντικός παράγοντας στην κληρονομικότητα των μεταλλάξεων στους απογόνους. Αυτό αυξάνει την πιθανότητα μετάδοσης μιας γενετικής ασθένειας από έναν γέρο πατέρα στους απογόνους του. Οι μεταλλάξεις στον FGFR (υποδοχέας του αυξητικού παράγοντα ινοβλαστών) είναι η βασική αιτία των ασθενειών με την επίδραση της πατρικής ηλικίας(54).

2.4.3 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗΣ ΚΑΙ ΑΠΟΔΟΜΗΣΗΣ ΤΩΝ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΩΝ ΤΟΥ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ ΣΕ ΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΩΑΡΙΑ

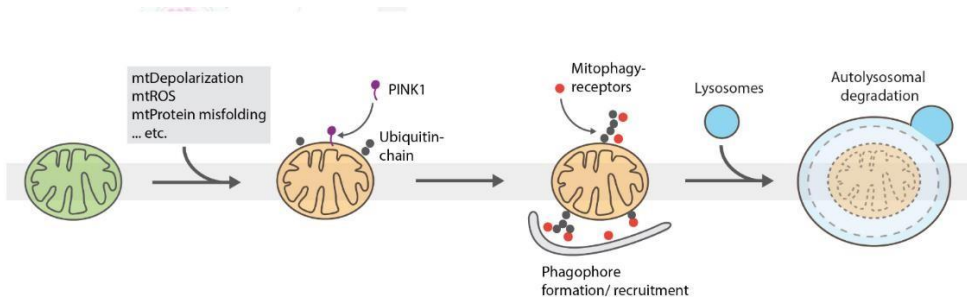
Το πατρικό mtDNA αποτελεί μόνο ένα μικρό κλάσμα του mtDNA στο γονιμοποιημένο ωάριο. Τα πατρικά μιτοχόνδρια εισέρχονται σε ένα ωάριο κατά τη γονιμοποίηση και στη

συνέχεια αποικοδομούνται γρήγορα νωρίς στην εμβρυογένεση. Έτσι, το mtDNA του αρσενικού γαμέτη δε μεταδίδεται στον απόγονο. Ο τρόπος κληρονομικότητας του mtDNA έχει δύο βιολογικές έννοιες. Καταρχάς, συμβάλλει στη διατήρηση της κατάστασης ομοπλασμίας στο γονιμοποιημένο ωάριο και κατά δεύτερον ευνοείται η αποφυγή μετάδοσης του ανώμαλου mtDNA του σπερματοζωαρίου στον απόγονο. Σε μια πρόσφατη μελέτη, προτάθηκε μια θεωρία για τον πιθανό μηχανισμό αποικοδόμησης. Τα μιτοχόνδρια του σπέρματος επισημάνθηκαν με ουβικιτίνη, έναν δείκτη για την αποικοδόμηση πρωτεΐνης, και τα μιτοχόνδρια του σπέρματος αποικοδομήθηκαν ειδικά από το πρωτεάσωμα στο γονιμοποιημένο ωάριο(55).

2.5 ΜΙΤΟΦΑΓΙΑ

Η μιτοφαγία είναι μια ειδική μορφή αυτοφαγίας, η οποία ρυθμίζει τον μιτοχονδριακό κύκλο. Υπάρχουν τουλάχιστον δύο κύριοι μηχανισμοί με τους οποίους τα μιτοχόνδρια προορίζονται για μιτοφαγία: με μεσολάβηση ουβικιτίνης και με μεσολάβηση διαμεμβρανικού υποδοχέα. Η πιθανή μιτοφαγία που προκαλείται από κινάση 1- (PINK1-) που προκαλείται από PTEN είναι μια επιλεκτική διαδικασία κατά την οποία τα μιτοχόνδρια εκπολώνονται πρώτα μετά από μιτοχονδριακή βλάβη που προκαλείται από διάφορους παράγοντες όπως τα αντιδραστικά είδη οξυγόνου (ROS) ή η βλάβη του μιτοχονδριακού DNA, και στη συνέχεια τα κατεστραμμένα μιτοχόνδρια μπορεί να προσλάβουν τον υποδοχέα αυτοφαγίας για σχηματισμό αυτοφαγοσωμάτων γύρω από τα μιτοχόνδρια και να συγχωνευθούν με λυσοσώματα προκειμένου να αποδομηθούν(56).

Λόγω του κινδύνου κατεστραμμένων ή γηρασμένων μιτοχονδρίων στο κύτταρο, η έγκαιρη εξάλειψη των μη φυσιολογικών μιτοχονδρίων μέσω της μιτοφαγίας είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της μιτοχονδριακής ισορροπίας και της ακεραιότητας του κυττάρου. Για παράδειγμα, οι νευρώνες εξαρτώνται αυστηρά από την παραγωγή του μιτοχονδριακού ATP και η ακριβής και σωστή αποδόμηση των δυσλειτουργικών μιτοχονδρίων από τη μιτοφαγία είναι απαραίτητη για τη διατήρηση του ελέγχου της ποιότητας και της ποσότητας των μιτοχονδρίων στους νευρώνες(57).



Εικόνα 9 Η κανονική οδός μιτοφαγίας καθοδηγείται από τη συσσώρευση PINK1 κατά την εκπόλωση των μιτοχονδρίων, την πολύ-ουβικουϊτίνωση μέσω του Parkin και τη στρατολόγηση υποδοχέων μιτοφαγίας στη μιτοχονδριακή επιφάνεια. Η μεμβράνη απομόνωσης/φαγοφόρος σχηματίζεται γύρω από το σημασμένο οργανίδιο που ακολουθείται από ενζυματική αποικοδόμηση στο αυτολυσόσωμα.

Η κατανόηση της σχέσης μεταξύ μιτοφαγίας και κυτταρικού θανάτου είναι σημαντική για την κατανόηση της παθογένεσης της νόσου. Τα βασικά επίπεδα μιτοφαγίας είναι σημαντικά για τη διατήρηση της κυτταρικής ομοιόστασης και την προστασία των κυττάρων από τη συσσώρευση δυσλειτουργικών μιτοχονδρίων. Επιπλέον, υπάρχει μια διασταύρωση μεταξύ της μιτοφαγίας και των μονοπατιών κυτταρικού θανάτου. Ο χειρισμός των πρωτεϊνών που ρυθμίζουν τη μιτοχονδριακή ακεραιότητα και μιτοφαγία αντιπροσωπεύει μελλοντικούς θεραπευτικούς στόχους για τη διατήρηση της βιωσιμότητας των κυττάρων και την πρόληψη της ανάπτυξης της νόσου. Ως εκ τούτου, είναι σημαντικό να αποκτηθούν γνώσεις σχετικά με τους μηχανισμούς που ρυθμίζουν την ισορροπία μεταξύ μιτοφαγίας και θανάτου, τόσο υπό φυσιολογικές συνθήκες όσο και σε παθολογικές καταστάσεις(58).

2.6 ΣΠΕΡΜΑΤΙΚΟ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ

Το σπερματικό οξειδωτικό στρες υποτίθεται ότι είναι μία από τις πολυάριθμες συνέπειες του τομέα που συμβάλλουν στην αιτιολογία της δυσλειτουργίας και της βλάβης του DNA του σπέρματος στην ανδρική υπογονιμότητα. Ο σχηματισμός και η αποβολή των ROS από τα αντιοξειδωτικά του σπέρματος είναι εκτός ισορροπίας, η οποία είναι η κύρια αιτία του σπερματικού οξειδωτικού στρες. Στην πραγματικότητα, τα επίπεδα OS του σπέρματος δεν είναι υψηλά στους γόνιμους άνδρες, αν και είναι παρόντα στο ένα τέταρτο των υπογόνιμων ανδρών(59). Η ρυθμιζόμενη παραγωγή αυτών των ROS είναι απαραίτητη τόσο για τη φυσική γονιμοποίηση όσο και για τη φυσιολογία του σπέρματος, συμπεριλαμβανομένης της υπερενεργοποίησης του σπέρματος, της χωρητικότητας και της απόκρισης ακροσωμάτων.

Το σπερματικό πλάσμα και τα ίδια τα σπερματοζωάρια είναι άφθονα σε αντιοξειδωτικά που προστατεύουν τα σπερματοζωάρια από το οξειδωτικό στρες, ιδιαίτερα στο στάδιο

μετά τους όρχεις. Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, η δισμουτάση του υπεροξειδίου και η καταλάση είναι όλα ενζυμικά αντιοξειδωτικά υψηλού μοριακού επιπέδου που βρίσκονται στο σπερματικό πλάσμα(60). Οι άνδρες που έχουν έλλειψη αυτών των ενζύμων δεν μπορούν να συλλάβουν, γεγονός που καταστρέφει το DNA στο σπέρμα τους. Το μεγαλύτερο μέρος του αντιοξειδωτικού δυναμικού του σπέρματος αποτελείται από μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά όπως ασκορβικό οξύ, α-τοκοφερόλη, πυροσταφυλικό, γλουταθειόνη, L-καρνιτίνη, ταυρίνη και υποταυρίνη, τα οποία βρίσκονται στο σπερματικό υγρό. Η βήτα καροτίνη, η λευκωματίνη, το πυροσταφυλικό και η ουμπικινόλη υπάρχουν επίσης στο σπερματικό πλάσμα(61).

Πολυάριθμες μελέτες έχουν δείξει ότι η σπερματική αντιοξειδωτική ικανότητα μειώνεται σε υπογόνιμους άνδρες με υψηλότερες συγκεντρώσεις ROS σε σύγκριση με άτομα με φυσιολογικά επίπεδα ROS. Ωστόσο, δεν είναι ακόμη σαφές πώς η μειωμένη αντιοξειδωτική ικανότητα του σπέρματος επηρεάζει την αποτυχία του σπερματοζωαρίου. Για το εάν οι υψηλές συγκεντρώσεις ROS στο σπέρμα των υπογόνιμων ανδρών είναι αποτέλεσμα της αυξημένης παραγωγής ROS, της μειωμένης ικανότητας αφαίρεσης ROS ή και των δύο, αποτελεί αντικείμενο έντονης συζήτησης. Σε περίπτωση που το σώμα είναι ικανό να αντισταθμίσει τα ROS, τα διαιτητικά αντιοξειδωτικά συμπληρώματα μπορεί να είναι χρήσιμα για όσους έχουν την τάση να παράγουν ROS όπως κάνουν οι καπνιστές(58).

Οποιαδήποτε διάσπαση της ομοιοστατικής ισορροπίας μεταξύ του σχηματισμού ROS και της αντιοξειδωτικής ικανότητας στο σπερματικό πλάσμα του ανθρώπινου σπέρματος οδηγεί σε οξειδωτικό στρες όταν τα εξαιρετικά αντιδραστικά ROS κατακλύζουν τα αντιοξειδωτικά αμυντικά συστήματα(62). Ο κατακερματισμός του DNA του σπέρματος στους πυρήνες και τα μιτοχόνδρια, η υπεροξειδωση των λιπιδίων και η απόπτωση, συμπεριλαμβανομένης της μιτοφαγίας και της λιποφαγίας, μπορεί να είναι όλα αρνητικά αποτελέσματα υψηλής συγκέντρωσης ROS(63).

Αν και η συστηματική ανεπάρκεια αντιοξειδωτικών δεν έχει ακόμη συνδεθεί με την ανδρική υπογονιμότητα, είναι πιθανό ορισμένοι υπογόνιμοι άνδρες να εμφανίσουν ανεπάρκεια βιταμίνης C. Οι ερευνητές έχουν εξετάσει την επίδραση της διατροφικής κατανάλωσης αντιοξειδωτικών (βιταμίνη C, E και -καροτίνη) στη βλάβη του DNA του σπέρματος μέχρι στιγμής, αλλά δεν έχει βρεθεί μια σύνδεση μεταξύ αυτών των μεταβλητών.

Τα ROS αποτελούν, πράγματι, ένα βασικό παράγοντα στο 30 με 80% των περιπτώσεων ανδρικής υπογονιμότητας. Η κακή δυνατότητα αναπαραγωγής έχει συνδεθεί με την υπερβολική παραγωγή ROS και οξειδωτικού στρες (OS). Τόσο τα ROS όσο και το OS έχουν συνδεθεί με τον κατακερματισμό του DNA του σπερματοζωαρίου, με μειωμένη ανάπτυξη και γονιμοποίηση εμβρύων, χαμηλά ποσοστά εμφύτευσης, υψηλά ποσοστά αποβολών και απώλεια εγκυμοσύνης. Για να διατηρηθεί η κανονική λειτουργία των κυττάρων, πολλά αντιοξειδωτικά συστατικά πρέπει να υπάρχουν στις σωστές ποσότητες σε κάθε

κυτταρικό τύπο κυττάρου, αλλά αυτές οι απαιτήσεις ποικίλλουν ανάλογα με τον τύπο κυττάρου(58).

Τα αντιοξειδωτικά αντιμετωπίζουν τον κίνδυνο να θέσουν τους ασθενείς σε μειωτικό στρες, το οποίο θα μπορούσε να βλάψει τη γονιμότητά τους, εάν χορηγηθούν σε άτομα που δεν αντιμετωπίζουν οξειδωτική επίθεση. Σε ένα από τα πολλά παραδείγματα, ανακαλύφθηκε ότι η χορήγηση αντιοξειδωτικών βιταμινών, ψευδάργυρου και σεληνίου σε άνδρες με υψηλά επίπεδα βλάβης του DNA στα σπερματοζωάρια τους προκάλεσε μειωτικό στρες, το οποίο μπορεί να χαρακτηριστεί από μια δραματική αποσυμπύκνωση της χρωματίνης του σπέρματος. Αυτό πιθανότατα προκλήθηκε από τη μείωση των δισουλφιδικών γεφυρών στο δίκτυο πρωταμίνης που σταθεροποιούν τον πυρήνα του σπερματοζωαρίου(58).

Αν δεν διακοπεί η ομοιοστατική ισορροπία μεταξύ αντιοξειδωτικών και ROS, το ανδρικό αναπαραγωγικό σύστημα θα επηρεαστεί αρνητικά, οδηγώντας στην εμφάνιση διαταραχών του σπέρματος. Τα ROS έχουν βρεθεί ότι έχουν επιβλαβείς επιδράσεις στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα, στις κυτταρικές μεμβράνες και στα αποπτωτικά μονοπάτια, όχι μόνο στο σπέρμα. Η συσχέτιση που περιλαμβάνει υψηλά ποσοστά παραγωγής ROS και κατακερματισμό του DNA του σπέρματος είναι επωφελής καθώς το μέτριο επίπεδο κατακερματισμού του DNA προκύπτει από την υπερβολική παραγωγή ROS(64). Μειώνοντας την ενδοκυτταρική παραγωγή ROS, ενισχύοντας τη μιτοχονδριακή αναπνευστική δραστηριότητα και λειτουργία και αποτρέποντας τον κυτταρικό θάνατο που προκαλείται από ROS μέσα στα μιτοχόνδρια, η ανθρώπινη υπομονάδα TERT (hTERT) προστατεύει τα κύτταρα από τη θνησιμότητα που προκαλείται από το οξειδωτικό στρες. Η πυρηνική υπομονάδα hTERT κατευθύνεται στα μιτοχόνδρια υπό συνθήκες χαμηλού στρες και δημιουργίας ROS λόγω μιας N-τερματικής αλληλουχίας οδηγού.

Ο Majzoub και οι συνεργάτες αξιολόγησαν την κατάσταση οξείδωσης του σπέρματος και τον κατακερματισμό του DNA του σε σχέση με τη μορφολογία του σπερματοζωαρίου. Συγκεκριμένα, οι ανωμαλίες της κεφαλής του σπερματοζωαρίου ήταν πολύ πιο συχνές σε υπογόνιμους άνδρες παρά σε γόνιμους (54% έναντι 48%). Επιπλέον, υπάρχουν θετικές συνδέσεις μεταξύ της κατάστασης της οξείδωσης και του κατακερματισμού του DNA του σπέρματος σε σχέση με ελαττώματα της κεφαλής του σπερματοζωαρίου. Η κινητικότητα και η βιωσιμότητα του σπέρματος συσχετίστηκαν αρνητικά με τα ROS και τον κατακερματισμό του DNA(65).

Η αντιοξειδωτική ικανότητα των υπογόνιμων ανδρών και ο κατακερματισμός του DNA του σπέρματος φαίνεται να συσχετίζονται θετικά. Η κίρσοκλήλη αποτελεί το βασικό παράδειγμα που χρησιμοποιείται για να αιτιολογηθεί ο επαγόμενος κατακερματισμός του DNA λόγω των ROS. Ο Tahamtan και οι συνεργάτες αξιολόγησαν τα τελομερή των σπερματοζωαρίων και των λευκοκυττάρων σε υπογόνιμους άνδρες με κίρσοκλήλη και φανέρωσαν τη σχέση μεταξύ αυτών των δύο παραμέτρων με το οξειδωτικό στρες και τις

λειτουργικές δοκιμασίες σπέρματος(66). Σύμφωνα με μια μελέτη βασισμένη σε στείρα αρσενικά με οξειδωτικό στρες και κρισοκήλη, παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων του μονοξειδίου του αζώτου, της 8-υδροξυ-2'-δεοξυγουανοσίνης, της εξανοϋλ-λυσίνης και της υπεροξειδικής δισμουτάσης μετά από κρισοκηλεκτομή(67).

Μια καλά ισορροπημένη διατροφή είναι συνήθως γνωστό ότι περιλαμβάνει αντιοξειδωτικά, μέταλλα και βιταμίνες. Ως εκ τούτου, φαίνεται σαν μια καλή στρατηγική η χορήγηση αντιοξειδωτικών για τη μείωση των επιπέδων ROS και τη βελτίωση της ποιότητας του σπέρματος. Τα αντιοξειδωτικά ως θεραπευτικά, ωστόσο, εξακολουθούν να ερευνώνται για τα ακριβή πλεονεκτήματα, τις δυσμενείς επιπτώσεις και τη δοσολογία τους. Δεδομένου ότι τα αντιοξειδωτικά μπορούν να ληφθούν μέσω διαδικτύου και χωρίς ιατρική συνταγή, θεωρούνται υγιεινά συμπληρώματα που είναι απολύτως φυσικά(68).

Επί του παρόντος, δεν υπάρχουν επαρκή στοιχεία που να υποστηρίζουν τη χρήση αντιοξειδωτικών συμπληρωμάτων, σύμφωνα με μια συναινετική δήλωση της Ευρωπαϊκής Εταιρείας Ανθρώπινης Εμβρυολογίας. Πρόσφατα στοιχεία δείχνουν ότι η βιταμίνη C και E, ο ψευδάργυρος, το φυλλικό οξύ και το σελήνιο είναι τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα εμπορικά συμπληρώματα. Ο παρακάτω πίνακας υπογραμμίζει τον μηχανισμό δράσης διαφόρων μη ενζυματικών αντιοξειδωτικών που περιλαμβάνονται στα συμπληρώματα υπογονιμότητας καθώς και την επίδρασή τους στις παραμέτρους του σπέρματος(69).

Πίνακας 1 Τα αντιοξειδωτικά ως θεραπεία στην ανδρική υπογονιμότητα και το πρότυπο δράσης τους στο σπερματοζώαριο. Τα αποτελέσματα in vivo και in vitro παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα(58).

ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ	ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ IN VIVO	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ IN VITRO
Βιταμίνη E	Εξουδετέρωση των ελεύθερων ριζών (Hsieh et al 2002)	Βελτίωση της κινητικότητας του σπέρματος (Souleiman Souleiman et al 1996)	Βελτίωση σύνδεσης με τη διαφανή ζώνη του μη γονιμοποιημένου ανθρώπινου ωοκυττάρου σε μια ανταγωνιστική δοκιμασία δέσμωσης ζώνης (Kessopoulou et al 1995)
Βιταμίνη C	Εξουδετέρωση των ελεύθερων ριζών (Akmal et al 2006(70))	Βελτίωση της κινητικότητας και της μορφολογίας του σπέρματος όταν χρησιμοποιείται ως συμπλήρωμα στην κρισοκεκτομή (Cyrus, Kabir, Goodarzi, and Moghimi 2015)	Η προσθήκη πριν από την κρυσυντήρηση μπορεί να μειώσει τις βλάβες του DNA μόνο σε υπογόνιμους άνδρες (Branco, Garcez, Pasqualotto, Erdtman & Salvador 2010)

Βιταμίνη E + Βιταμίνη C		ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	
		Μείωση DFI	<ul style="list-style-type: none"> Αύξηση κινητικότητας σπέρματος LPO μείωση Χαμηλή Βιταμίνη C: αύξηση DFI Υψηλή Βιταμίνη C: μείωση DFI
L-καρνιτίνη	Εξουδετέρωση των ελεύθερων ριζών και χρήση ως πηγή ενέργειας (Showell et al 2014)	Βελτίωση της ζωτικότητας και της κινητικότητας του σπέρματος, αυξημένα ποσοστά εγκυμοσύνης (Vicari & Calogero 2001)	Βελτίωση της κινητικότητας του σπέρματος. Οι ασθενείς με χαμηλότερο επίπεδο λευκοκυττάρων στο σπέρμα είχαν σημαντικά υψηλότερη ανταπόκριση στη θεραπεία (Balercia et al 2005)
		<ul style="list-style-type: none"> • Αύξηση πυκνότητας και κινητικότητας σπέρματος • Μείωση DFI 	
Συνένζυμο Q10	Καθαρίζει τις ελεύθερες ρίζες στη μιτοχονδριακή μεταφορά (Nadjarzadeh et al 2014)	Αύξηση συγκέντρωσης, κινητικότητας και φυσιολογικής μορφολογίας σπέρματος. Βελτίωση ποσοστών εγκυμοσύνης (Safarinejad, Shafiei 2012)	Βελτίωση της μορφολογίας του σπέρματος, της καταλάσης και της υπεροξειδικής δισμουτάσης (Nadjarzadeh et al 2014)
		<ul style="list-style-type: none"> • Αύξηση πυκνότητας, κινητικότητας και TAC του σπέρματος • Μείωση επιπέδων ROS και DFI 	
Βιταμίνη C + Βιταμίνη E + Συνένζυμο Q10		<ul style="list-style-type: none"> • Αύξηση πυκνότητας, κινητικότητας σπέρματος 	
Φολικό οξύ	Διατηρεί την ακεραιότητα του DNA του σπέρματος (Wong et al 2002)	Αύξηση της συνολικής φυσιολογικής συγκέντρωσης σπέρματος μετά από 26 εβδομάδες θεραπείας σε υπογόνιμους άνδρες (Wong et al 2002)	Χαμηλά επίπεδα που σχετίζονται με αυξημένη βλάβη στο DNA του σπέρματος (Box meer et al 2009)
Καροτενοειδή	Δραστηριότητα δέσμησης ελεύθερων ριζών (Johnson 2002)	Βασική συγκέντρωση σπέρματος (καμία βελτίωση) Οι υψηλότερες βασικές συγκεντρώσεις είχαν σημαντική βελτίωση με αυξημένα ποσοστά εγκυμοσύνης (Gupta and Kumar 2002)	Πρόληψη μειωμένης κινητικότητας ισχαιμικής/αναστροφής και μειωμένων ανωμαλιών στα σπερματοζωάρια (Hekimoglu et al 2009)
Σελήνιο	Ενίσχυση της κινητικότητας του σπέρματος και της ομοιόστασης του OS (Ahsan, Kamran & Raza 2014)	Βελτίωση σε όλες τις παραμέτρους του σπέρματος σε σύγκριση με το εικονικό φάρμακο (Safarinejad and Safarinejad 2009)	Προστατεύει την πλασματική μεμβράνη του σπέρματος από οξειδωτικές βλάβες και την παραγωγή MDA στη μεμβράνη του σπέρματος (Safarinejad & Safarinejad 2009)

Ψευδάργυρος	Σχηματισμός ελεύθερων ριζών οξυγόνου και σταθερότητα χρωματίνης σπέρματος (Zhao et al 2016)	Βελτίωση στην ποιότητα του σπέρματος, τον αριθμό των σπερματοζωαρίων, την προοδευτική κινητικότητα. Μείωση της συχνότητας εμφάνισης αντισωμάτων κατά του σπέρματος σε άνδρες με ασθενοζωοσπερμία (Omu, Dashti & Al – Othman 1998)	Ανασταλτική επίδραση του ψευδαργύρου στη δημιουργία O2 από ανθρώπινα σπερματοζωάρια και λευκοκύτταρα (Gavella and Lipovac 1998)
N-ακετυλ-κυστεΐνη (NAC)	Δραστηριότητα δέσμευσης ελεύθερων ριζών (Cifti, Verit, Savas, Yeni & Erel 2009)	Σημαντική βελτίωση στον όγκο, την κινητικότητα και το ιζώδες (Ciftci et al 2009)	Βελτίωση της ολικής κινητικότητας του σπέρματος και μείωση των επιπέδων ROS (Queda et al 1997)
Βιταμίνη E + Βιταμίνη C + Ψευδάργυρος + Σελήνιο + L-καρνιτίνη + NAC + Συνένζυμο Q10 + άλλα συστατικά		<ul style="list-style-type: none"> • Αύξηση της πυκνότητας και της κινητικότητας του σπερματοζωαρίου • Μείωση DFI και ORP 	
Βιταμίνη E + Βιταμίνη C + Ψευδάργυρος + Συνένζυμο Q10 + L-καρνιτίνη + Ασταξανθίνη		<ul style="list-style-type: none"> • Αύξηση συνολικής κινητικότητας και αριθμού σπερματοζωαρίων • Πυκνότητα και κινητικότητα σπέρματος → καμία αλλαγή 	

Πολυάριθμες μελέτες έχουν προσπαθήσει να καθορίσουν εάν η αντιοξειδωτική θεραπεία θα βελτιώσει τα χαρακτηριστικά του σπέρματος και, ως εκ τούτου, θα αυξήσει την ανδρική γονιμότητα. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι ο κατακερματισμός του DNA του σπερματοζωαρίου έχει ισχυρές επιπτώσεις στην ακεραιότητά του. Ο συνδυασμός αντιοξειδωτικής θεραπείας με L-καρνιτίνη, βιταμίνη C, συνένζυμο Q10, βιταμίνη E, ψευδάργυρο, φολικό οξύ, σελήνιο και βιταμίνη B12 έχει αυξήσει τα ποσοστά συγκέντρωσης σπέρματος και μειωμένο ποσοστό κατακερματισμένου DNA σε άνδρες με χαμηλής ποιότητας κρυστάλλους. Επιπλέον, οι άνδρες που έχουν ασθενοζωοσπερμία, ολιγοζωοσπερμία, τερατοζωοσπερμία ή αυξημένες βασικές συγκεντρώσεις σπέρματος μπορεί να ωφεληθούν από τη χρήση καροτενοειδών λόγω του μεγαλύτερου αριθμού σπερματοζωαρίων και των υψηλότερων ποσοστών εγκυμοσύνης. Η συμπλήρωση με φυτοθεραπευτικά συστατικά βρέθηκε ότι αυξάνει τα επίπεδα δισμουτάσης του υπεροξειδίου, της καταλάσης και της υπεροξειδωσής λιπιδίων στο σπέρμα στην ομάδα των ολιγοσπερμικών ανδρών(70).

Σύμφωνα με πληροφορίες που είναι διαθέσιμες μέχρι στιγμής, το OS έχει αρνητικό αντίκτυπο στην ακεραιότητα του σπέρματος και, κατά συνέπεια, στα αποτελέσματα της τεχνολογίας υποβοηθούμενης αναπαραγωγής(ART). Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η εξωσωματική γονιμοποίηση και η ενδοκυτταροπλασματική έγχυση σπέρματος (ICSI) επηρεάζονται αρνητικά από τη μέτρηση ROS στο σπερματικό πλάσμα κατά τη σύλληψη(71). Η λήψη συμπληρωμάτων βιταμίνης E, ειδικά σε άνδρες με ιστορικό

ανεπιτυχούς εξωσωματικής γονιμοποίησης, μπορεί να οδηγήσει σε καλύτερα αποτελέσματα εξωσωματικής γονιμοποίησης από ένα εικονικό φάρμακο. Επιπλέον, η συμπλήρωση συνενζύμου Q10 ενισχύει τη συγκέντρωση και την κινητικότητα του σπέρματος, γεγονός που οδηγεί σε επιτυχή ICSI(70).

Η ανδρική υπογονιμότητα προκαλείται περιστασιακά από το οξειδωτικό στρες, το οποίο προκύπτει από την ανισορροπία των αντιοξειδωτικών και των ROS και οδηγεί σε αυξημένο κατακερματισμό του DNA και ανώμαλες παραμέτρους του σπέρματος. Η υπερπαραγωγή των ROS μπορεί να μειωθεί ως αποτέλεσμα της συμπλήρωσης αντιοξειδωτικών, η οποία μπορεί να βελτιώσει την ποιότητα του σπέρματος και να αυξήσει την πιθανότητα κλινικής εγκυμοσύνης, βιώσιμων γεννήσεων και μειωμένων ποσοστών αποβολών(72). Ωστόσο, συνιστάται ιδιαίτερα η διεξαγωγή προσεκτικά σχεδιασμένων, ελεγχόμενων με εικονικό φάρμακο μελετών για τον προσδιορισμό της ακριβούς επίδρασης των αντιοξειδωτικών συμπληρωμάτων στην ανδρική γονιμότητα.

Η κατανάλωση αντιοξειδωτικών έχει αποδειχθεί ότι εμποδίζει τη βράχυνση των τελομερών. Τα αντιοξειδωτικά χρησιμοποιούνται συχνά στη θεραπεία της ανδρικής υπογονιμότητας για την εξισορρόπηση του σπερματικού οξειδωτικού στρες. Σύμφωνα με τα ευρήματα μιας παγκόσμιας έρευνας, το 85,6% των γιατρών που θεραπεύουν την ανδρική υπογονιμότητα συνιστούν τα αντιοξειδωτικά ως μέρος της αγωγής τους. Η κατανάλωση αντιοξειδωτικών ενισχύει την ακεραιότητα του DNA του σπέρματος χωρίς αρνητικές επιπτώσεις ή προβλήματα, αυξάνοντας επιπλέον τις παραμέτρους του σπέρματος. Εκτός από αυτά τα πλεονεκτήματα, τα αντιοξειδωτικά μπορούν να αποτρέψουν τα σωματικά κύτταρα από το να χάσουν το μήκος των τελομερών τους(58).

Τα αντιοξειδωτικά αλλάζουν τις πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη σηματοδότηση CREM (cAMP responsive element modulator), τη μιτοχονδριακή δραστηριότητα και την οξείδωση των πρωτεϊνών σε υποκυτταρικό επίπεδο. Επιπλέον, έχει υποστηριχθεί ότι διεγείρουν τους αντιοξειδωτικούς αμυντικούς μηχανισμούς του σπέρματος. Τα αντιοξειδωτικά θεωρούνται ότι συμβάλλουν στη διατήρηση του μήκους των τελομερών καθ' όλη τη διάρκεια της ανάπτυξης μειώνοντας το οξειδωτικό κόστος της ανάπτυξης, καθώς τα τελομερή είναι ιδιαίτερα ευάλωτα σε βλάβες που προκαλούνται από το οξειδωτικό στρες. Τα αντιοξειδωτικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως θεραπευτικά για να μειώσουν τα ROS και να ενισχύσουν την ποιότητα του σπέρματος που μπορεί, επίσης, να ωφελήσει τα τελομερή και την υπογονιμότητα(58).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο ΤΕΛΟΜΕΡΗ



3.1 ΒΑΣΙΚΗ ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΩΝ ΤΕΛΟΜΕΡΩΝ

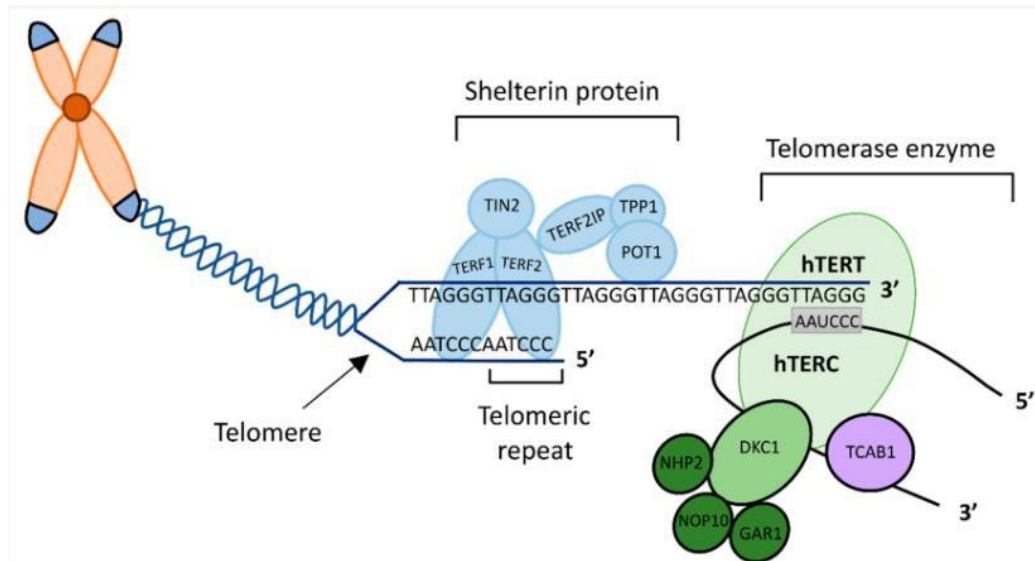
Τα τελομερή είναι ριβονουκλεϊκά σύμπλοκα στα άκρα των χρωμοσωμάτων που προστατεύουν το γονιδίωμα από τη διάβρωση, τον ανεπιθύμητο ανασυνδυασμό και την αλλοιωμένη γονιδιακή έκφραση. Τα τελομερή αναγνωρίζονται ως κύριοι παράγοντες που συμβάλλουν στην ακεραιότητα του γονιδιώματος. Το μήκος των τελομερών, στα ανθρώπινα σωματικά κύτταρα, κυμαίνεται από 5 έως 15 kb, ενώ στα γεννητικά κύτταρα είναι ίσο με 10 έως 15 kb. Είναι δομές που αποτελούνται από μη κωδικές επαναλήψεις «TTAGGG», οι οποίες είναι ιδιαίτερα πλούσιες σε γουανίνη καθιστώντας τις ευάλωτες σε οξειδωτική βλάβη(58).

Σύμφωνα με *in vitro* μελέτες, το οξειδωτικό στρες επιταχύνει τη βράχυνση των τελομερών και μειώνει τη δραστηριότητα της τελομεράσης(73). Καθώς το μήκος των τελομερών μειώνεται με τη γήρανση, ασθένειες που σχετίζονται με την ηλικία όπως ο καρκίνος, ο διαβήτης και οι καρδιαγγειακές παθήσεις έχουν συνδεθεί με αυτό. Γενικά, οι λειτουργικές ιδιότητες του χρωμοσωμικού DNA επηρεάζονται από τη μείωση του μήκους των τελομερών. Η πιθανή συμβολή του μήκους των τελομερών στην αναπαραγωγική

γήρανση προκαλεί σημαντικό ενδιαφέρον και διεγείρει τα ερευνητικά αποτελέσματα(74). Σύμφωνα με τη θεωρία που βασίζεται στα τελομερή, θα πρέπει να υπάρχει ένας βιολογικός δείκτης γήρανσης στην αναπαραγωγική γήρανση, καθώς τα τελομερή παίζουν τώρα μια ποικιλία νέων ρόλων στα κύτταρα της βλαστικής σειράς(75). Μελέτες που εξέτασαν τη λειτουργία των τελομερών του σπέρματος στην ανδρική γονιμότητα και αναπαραγωγή έχουν βρει μια συσχέτιση μεταξύ του μήκους των τελομερών του σπέρματος και της ποιότητας του σπέρματος, της ακεραιότητας του DNA και της ηλικίας(76,77).

Το μήκος των τελομερών είναι γνωστό ότι ποικίλλει μεμονωμένα και ότι μειώνεται κατά τη διάρκεια της διακοπής δράσης της τελομεράσης μετά από κάθε κυτταρική διαίρεση, η οποία τελικά προκαλεί αντιγραφική γήρανση(73). Ωστόσο, αντί για το μέσο μήκος τελομερών, το ποσοστό των βραχέων τελομερών είναι το μόνο συστατικό που απαιτείται για την πρόβλεψη της διάρκειας ζωής(78). Το ένζυμο τελομεράση έχει την ικανότητα να ελέγχει τη σταδιακή βράχυνση των τελομερών που προκαλείται από τον μηχανισμό τελικής αντιγραφής. Προκειμένου να αποφευχθεί η προσθήκη νέων επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών, η τελομεράση, ένα ολοένζυμο, προσθέτει τις επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες στο 3' άκρο των τελομερών(73). Ως ολοένζυμο, λοιπόν, που προσθέτει επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες στο 3' άκρο των τελομερών, η τελομεράση αποτρέπει την εισαγωγή νέων επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών ενώ διατηρεί παράλληλα την ικανότητα των τελομερών να λειτουργούν.

Η τελομεράση είναι μία ριβονουκλεοπρωτεΐνη που περιλαμβάνει δύο υπομονάδες: την υπομονάδα της αντίστροφης μεταγραφάσης της τελομεράσης (TERT) και την υπομονάδα τελομεράσης RNA (TERC). Μια μονή αλυσίδα τελομερικού DNA που είναι συμπληρωματικό του TERC δημιουργείται από το ένζυμο TERT και συνδέεται με την προεξοχή 3'. Ο μηχανισμός αντιγραφής του DNA συνθέτει την τελική αλυσίδα χρησιμοποιώντας τον προηγουμένως σχηματισμένο κλώνο τελομερούς DNA. Όταν η δραστηριότητα της τελομεράσης είναι ανενεργή, τα τελομερή και οι υποτελομερικές περιοχές χρησιμοποιούν εναλλακτική επιμήκυνση των τελομερών (Alternative Lengthening of Telomeres, ALT) με ομόλογο ανασυνδυασμό για να διατηρήσουν το μήκος τους(79).



Εικόνα 10 Απεικόνιση της δομής των τελομερών. Ως shelterin protein ορίζεται ένα σύμπλοκο πρωτεϊνών (TERF1, TERF2, TIN2, TERF2IP, TPP1, POT1) που βρίσκεται προσδεμένο στην τελομερική αλληλουχία. Η επιμήκυνση των τελομερών γίνεται από το ένζυμο τελομεράση (υπομονάδες του ενζύμου hTERT και hTERC)(80).

Πρόσφατα, ανακαλύφθηκε ότι το TERC έχει όντως έναν ρόλο ανεξάρτητο της τελομεράσης. Η διατήρηση των τελομερών δεν ελέγχεται μόνο από πυρηνικές διαδικασίες, σύμφωνα με πρόσφατα ευρήματα(81). Τα σήματα που προκαλούνται στο κυτταρόπλασμα ελέγχουν τις πυρηνικές δραστηριότητες, καθώς αυτή είναι η κίνηση των πρωτεϊνών, των μεταβολιτών και των μοριακών σημάτων μεταξύ του πυρήνα και των μιτοχονδρίων είναι μόνο μερικά γνωστά παραδείγματα(82). Αυτές οι από κοινού ρυθμίσεις μπορεί να είναι μεταβατικές ή να εφαρμόζονται μόνο σε ορισμένες προϋποθέσεις. Η συντήρηση των τελομερών, ο υποκυτταρικός εντοπισμός των υπομονάδων της τελομεράσης και οι μιτοχονδριακές δραστηριότητες συνδέονται στενά. Σύμφωνα με προηγούμενες έρευνες για τη γήρανση, το οξειδωτικό στρες και η φλεγμονή που προκαλείται από δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων μπορεί να επιταχύνουν την απώλεια τελομερών σε ιστούς που έχουν ολοκληρώσει τον μιτωτικό κύκλο(83). Επομένως, ασθενείς που έχουν σημαντική οξειδωτική βλάβη μπορεί να αναπτύξουν ασθένειες πρώιμης γήρανσης και κυτταρική γήρανση(84).

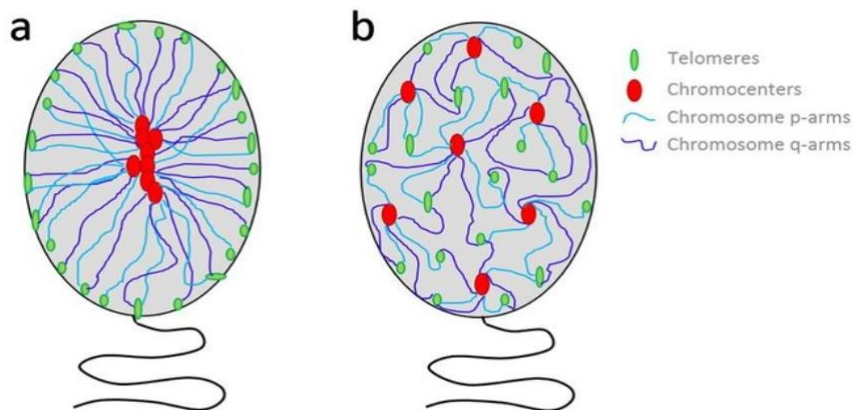
3.2 ΤΕΛΟΜΕΡΗ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΧΡΩΜΑΤΙΝΗ

Η απάντηση στο ερώτημα για το εάν το μήκος των τελομερών θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως διαγνωστικό εργαλείο για την αξιολόγηση της ποιότητας του σπέρματος και της γονιμότητας είναι αμφιλεγόμενη στη μελέτη των τελομερών των

ανδρικών γεννητικών κυττάρων. Μέχρι σήμερα, η ποιότητα της χρωματίνης του σπέρματος θεωρείται σημαντικός παράγοντας στην ανδρική γονιμότητα σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO)(85). Οι κατάλληλοι παράγοντες σπέρματος καταγράφονται σύμφωνα με το κατώτατο όρια αναφοράς (Πίνακας αντιοξειδωτικά).

Ωστόσο, ένας μικρός αριθμός μελετών έχει ανακαλύψει μια συσχέτιση μεταξύ της ανδρικής υπογονιμότητας και του μήκος των τελομερών του σπέρματος (Sperm Telomere Length, STL), υποδεικνύοντας ότι η ποιότητα της χρωματίνης του σπέρματος θα πρέπει να ληφθεί υπόψιν(86). Το λανθασμένο πακετάρισμα του DNA μπορεί να αυξήσει την ευαισθησία του DNA στο ROS που εκτίθεται, το οποίο μπορεί να προκαλέσει διατάραξη των τελομερών στο ώριμο σπέρμα. Η λευκοκυτταροσπερμία, μια μοναδική αιτία ανδρικής υπογονιμότητας που συνδέεται άμεσα με τα αυξημένα επίπεδα οξειδωτικού στρες, είναι μια από τις αιτίες(87). Περαιτέρω στοιχεία που αποδεικνύουν ότι υπάρχει σχέση μεταξύ της κατάστασης πρωταμίνωσης του σπέρματος και του μήκους των τελομερών παρέχονται από το γεγονός ότι τα σπερματοζώαρια με κακή ποιότητα DNA είναι επιρρεπή σε τέτοιες οξειδωτικές επιθέσεις(88). Μαζί με τα τυπικά χαρακτηριστικά του σπέρματος του WHO, ορισμένες έρευνες έχουν προτείνει μια σύνδεση μεταξύ βραχύτερων STL και της στειρότητας ή ολιγοσπερμίας. Είναι ενδιαφέρον να επισημάνουμε ότι το STL και το καθεστώς πρωταμίνωσης έχουν μια ισχυρή σχέση(89). Ως εκ τούτου, έχει διαπιστωθεί ότι η απορρύθμιση των τελομερών στο ώριμο σπέρμα προκαλείται από ένα ελάττωμα στη συμπύκνωση της χρωματίνης. Ωστόσο, η πιο αποδιοργανωμένη διάταξη χρωματίνης του σπέρματος μπορεί να οδηγήσει σε υψηλότερη έκθεση σε ROS.

Τα τελομερή του σπέρματος είναι εξίσου σημαντικά αφού, με εξαίρεση των γονιδίων του γονιδιώματος του σπέρματος, τα τελομερή φαίνεται να εμπλέκονται στον καθορισμό στον καθορισμό της μοίρας του ζυγώτη. Τα τελομερή του σπέρματος έχουν συσχετιστεί στενά με την ανδρική υπογονιμότητα τα τελευταία δέκα χρόνια και έχουν επισημανθεί ως σημαντικά στοιχεία για την ευημερία του απογόνου. Ανακαλύφθηκε ότι το μήκος των τελομερών του σπέρματος κυμαίνεται από 10 έως 20 kb χρησιμοποιώντας επικυρωμένες τεχνικές για τη μέτρηση του μήκους των τελομερών του σπέρματος (STL), όπως το qRT-PCR ή ο ποσοτικός φθορισμός in situ υβριδισμός (qFISH)(90,91).



Εικόνα 11 Σχηματική αναπαράσταση των προτεινόμενων μοντέλων οργάνωσης της χρωματίνης εντός των πυρήνων του σπέρματος. Α) Σχηματική αναπαράσταση του μοντέλου βρόχου φουρκέτας στο οποίο υπάρχει μια γραμμική διάταξη χρωμοκέντρων (κόκκινο), με τους βραχίονες p- και q χρωμοσώματος (ανοιχτό μπλε και σκούρο μπλε, αντίστοιχα) να εκτείνονται προς τα τελομερή (πράσινα) που είναι εντοπισμένα στην «ακραία περιφέρεια» του πυρήνα. Β) Μια εκλεπτυσμένη εκδοχή του μοντέλου που απεικονίζει μια πιο τμηματοποιημένη οργάνωση, με τελομερή και χρωμόκεντρα να εντοπίζονται σε όλο τον πυρήνα. Κατά τη γονιμοποίηση, η χρωματίνη που εντοπίζεται στην κορυφαία περιοχή και βρίσκεται κοντά στο πυρηνικό περίβλημα θα είναι οι πρώτες περιοχές του γονιδιώματος που θα εισέλθουν στο ωάριο και θα αναδιαμορφωθούν(92).

Η κυτταρική λειτουργία των καθαρισμένων πρωτογενών σπερματοκυττάρων ποντικού, έχει σημαντικά μεγαλύτερη δραστηριότητα τελομεράσης ανά κύτταρο από την κυτταρική λειτουργία των καθαρισμένων στρογγυλών σπερματίδων ποντικού. Οι σφαιρικές σπερματίδες είναι τελικά διαφοροποιημένα κύτταρα, δηλαδή δεν υφίστανται διαιρέσεις, και επομένως ο κίνδυνος για βλάβη στο μήκος των τελομερών είναι περιορισμένος(93). Δεδομένου ότι η τελομεράση σταθεροποιεί το μήκος των τελομερών, έχει βρεθεί αυξημένη έκφραση του ενζύμου κατά τα πρώιμα στάδια της σπερματογένεσης(94). Μια πρόσφατη έρευνα προτείνει ότι ενώ οι σπερματίδες και τα ώριμα σπερματοζωάρια έχουν βραχύτερα τελομερή, τα σπερματοκύτταρα διατηρούν το τελομερικό τους μήκος(95). Η τελική φάση καλείται σπερμιογένεση, κατά την οποία οι σφαιρικές σπερματίδες υποβάλλονται σε μια σειρά από εντυπωσιακές μορφολογικές αλλαγές και εξαιρετική συμπύκνωση χρωματίνης προκειμένου να διαμορφώσουν ώριμο σπερματοζωάριο με σχήμα συγκεκριμένου του είδους. Συγκεκριμένα, η τελική φάση της σπερμιογένεσης περιλαμβάνει αρκετές χρωμοσωμικές ανακατατάξεις όπως είναι η πρωταμίνωση(96,97). Η πρωταμίνωση πρόκειται για μια διαδικασία που λαμβάνει χώρα κατά τη διάρκεια της σπερμιογένεσης, η οποία μεταβάλλει το νουκλεόσωμα από μια δομή με βάση την ιστόνη

σε μια δομή με βάση την πρωταμίνη. Η επανασυσκευασία της χρωματίνης διατηρεί το 10 – 15% των ιστονών εντός του κυττάρου χωρίς να αδειάζει το κύτταρο εντελώς(98).

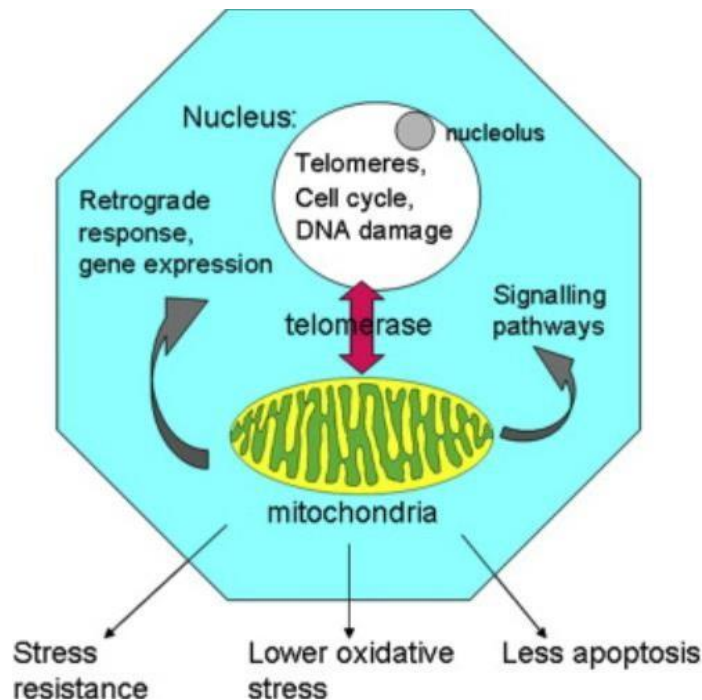
Η υπογονιμότητα, η αποτυχημένη γονιμοποίηση, η εμβρυική θνησιμότητα, η μειωμένη μακροζωία και βιωσιμότητα, η διακοπή κυτταρικής καλλιέργειας, η γενωμική αστάθεια, η απόπτωση γαμετών και οι επαναλαμβανόμενες αποβολές συνδέονται με βραχύτερο μήκος τελομερών στα γαμετικά κύτταρα. Σύμφωνα με τον Hemman και τους συνεργάτες, τα σπερματοκύτταρα με βραχύτερα τελομερή έχουν ένα σύστημα ελέγχου που τους αποτρέπει να ολοκληρώσουν το τελευταίο στάδιο της σπερμιόγένεσης και αντ' αυτού να υποβληθούν επιλεκτικά σε απόπτωση προκειμένου να μειώσουν ελαττωματικά σπερματοζωάρια ή ακόμα και σπερματοζωάρια με βραχύτερα τελομερή(99).

3.3 ΤΕΛΟΜΕΡΗ ΚΑΙ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑ

Τα τελομερή, οι υπομονάδες της τελομεράσης και τα μιτοχόνδρια έχουν συνδεθεί στενά τα τελευταία χρόνια. Η βλάβη των τελομερών έχει ως αποτέλεσμα τον επαναπρογραμματισμό της μιτοχονδριακής βιοσύνθεσης και τις μιτοχονδριακές δυσλειτουργίες, οι οποίες έχουν σημαντικές συνέπειες στη γήρανση και τις ασθένειες. Από την άλλη μεριά, οι μιτοχονδριακές δυσλειτουργίες προκαλούν βράχυνση των τελομερών. Διαφορετικές μελέτες υποδεικνύουν ότι η βράχυνση των τελομερών είναι τροποποιήσιμη, καθώς υπάρχει σημαντική μεταβλητότητα στον ρυθμό βράχυνσης των τελομερών που είναι ανεξάρτητη από τη χρονολογική ηλικία(84). Η βράχυνση των τελομερών έχει επίσης συνδεθεί με άλλους δυνητικά τροποποιήσιμους παράγοντες του τρόπου ζωής, όπως η κακή διατροφή και η σωματική αδράνεια που υποδηλώνουν την πλαστικότητα του μήκους των τελομερών. Τα ευρήματα από διάφορες μελέτες δείχνουν ότι η υγιεινή διατροφή, το χαμηλό στρες, η άσκηση και ο καλός ύπνος σχετίζονται με πιο μακριά τελομερή. Τα άτομα με τελομερή μικρότερου μήκους διατρέχουν υψηλότερο κίνδυνο χρόνιων ασθενειών και θνησιμότητας(58).

Η ρύθμιση του αριθμού αντιγράφων του μιτοχονδριακού DNA (mtDNAcn) είναι μια κρίσιμη διαδικασία που ελέγχει την έκφραση των γονιδίων mtDNA στα μιτοχόνδρια, σε αντίθεση με το πυρηνικό DNA. Για παράδειγμα, έχει αποδειχθεί ότι ο μιτοχονδριακός μεταγραφικός παράγοντας A (TFAM) είναι ζωτικής σημασίας για τη διατήρηση της μιτοχονδριακής ομοιόστασης και την κάλυψη της χαμηλής περιεκτικότητας σε mtDNA στο ώριμο ανθρώπινο σπέρμα. Ο αυξημένος αριθμός αντιγράφων μιτοχονδριακού DNA (mtDNAcn) στο ανθρώπινο σπέρμα έχει αναγνωριστεί ως δείκτης ανδρικής υπογονιμότητας, καθώς η πλειονότητα των μελετών έχει δείξει αρνητική συσχέτιση μεταξύ του αριθμού αντιγράφων mtDNA του σπέρματος και πολλών παραμέτρων του σπέρματος, όπως η συγκέντρωση σπέρματος, η κινητικότητα, η μορφολογία και η

ακεραιότητα του mtDNA(100). Μια αύξηση στο mtDNA θα μπορούσε να είναι το αποτέλεσμα μιας διαδικασίας ανάδρασης που αντισταθμίζει τα κατεστραμμένα μιτοχόνδρια.



Εικόνα 12 Η αλληλεπίδραση μεταξύ των μιτοχονδρίων και της τελομεράσης. Η τελομεράση συμβάλλει στη διατήρηση της υγείας των μιτοχονδρίων. Η υγεία των μιτοχονδρίων συμβάλλει στην αντοχή του στρες, μειωμένο οξειδωτικό στρες καθώς και μικρότερο ποσοστό απόπτωσης. Αντιθέτως, η τελομεράση στον πυρήνα συμβάλλει στη διατήρηση των τελομερών, του κυτταρικού κύκλου και της βλάβης του DNA.

Τόσο η δομή όσο και το μήκος των τελομερών είναι απαραίτητα για τη διατήρηση της ακεραιότητας του πυρηνικού γονιδιώματος. Η σπερματογένεση και η σύλληψη είναι δύο διαδικασίες άρρηκτα συνδεδεμένες με τη διατήρηση των τελομερών στα γεννητικά κύτταρα. Βασικό συστατικό της δυναμικής διατήρησης της ομοιόστασης του μήκους των τελομερών είναι η ύπαρξη δραστηριότητας τελομεράσης στα σπερματογόνα κύτταρα. Προηγούμενη έρευνα, ωστόσο, έχει δείξει ότι τόσο οι ενδογενείς όσο και οι εξωγενείς μεταβλητές, συμπεριλαμβανομένου του οξειδωτικού στρες, της φλεγμονής, της έκθεσης στο περιβάλλον και των επιλογών τρόπου ζωής, μπορεί να διαταράξουν την ομοιόσταση των τελομερών. Σύμφωνα με αρκετές μελέτες, η τελομεράση μπορεί ακόμη και να ενεργοποιηθεί σε ορισμένες περιπτώσεις, οδηγώντας σε επιμήκυνση των τελομερών. Τα χαμηλά επίπεδα έκθεσης στο αρσενικό και το οξειδωτικό στρες έχουν αποδειχθεί ότι ενισχύουν τη δραστηριότητα της τελομεράσης επιμηκώνοντας, τελικά, τα τελομερή(58).

3.4 ΠΑΤΡΙΚΗ ΗΛΙΚΙΑ ΚΑΙ ΜΗΚΟΣ ΤΕΛΟΜΕΡΩΝ

Τα τελομερή είναι οι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες νουκλεοτιδίων στο τέλος των χρωμοσωμάτων (TTAGGG). Τα άκρα των χρωμοσωμάτων στα ευκαρυωτικά κύτταρα προστατεύονται από δομές που ονομάζονται τελομερή. Ο πρωταρχικός τους ρόλος είναι να διασφαλίζουν ότι το γονιδίωμα παραμένει άθικτο(101). Η βράχυνση των τελομερών είναι χαρακτηριστικό της γήρανσης, καθώς συμβαίνει σε κάθε κυτταρικό κύκλο σε σωματικά κύτταρα(38). Προηγουμένως, τα λευκοκύτταρα χρησιμοποιούνταν ως υποκατάστατο για όλα τα σωματικά κύτταρα. Ακόμα, σε πρόσφατη έρευνα, χρησιμοποιήθηκαν τέσσερις διαφορετικοί τύποι σωματικών κυττάρων (λευκοκύτταρα, μυϊκά κύτταρα, δέρμα και λιποκύτταρα) για να διερευνηθεί η σχέση μεταξύ του μήκους των τελομερών και της γήρανσης(102). Το μήκος των τελομερών μειώθηκε με την ηλικία στα τέσσερα είδη σωματικών κυττάρων, όχι μόνο στα λευκοκύτταρα(102). Τα σωματικά κύτταρα βασίζονται στο ένζυμο τελομεράση της αντίστροφης μεταγραφάσης για να διατηρήσουν τα τελομερή τους, τα οποία περιέχουν μια πλούσια σε γουανίνη, επαναλαμβανόμενη αλληλουχία DNA(103). Υπάρχει κάποια μεταβλητότητα στις επαναλήψεις κοντά στα τελομερή. Ως αποτέλεσμα, μερικά εξαφανίζονται πάντα κατά τη διαίρεση των κυττάρων. Αν και η τελομεράση μπορεί να επιμηκύνει τα τελομερή προσθέτοντας επαναλήψεις TTAGGG, τα τελομερή μπορούν ακόμα να συντομευθούν. Η βράχυνση των τελομερών που σχετίζεται με την ηλικία προκαλείται από σφάλματα αντιγραφής του DNA(103). Ένα κύτταρο που έχει πολύ κοντά τελομερή παύει να διαιρείται και είτε διακόπτει τον κυτταρικό κύκλο είτε υφίσταται απόπτωση.

Τα γεννητικά κύτταρα και τα καρκινικά κύτταρα είναι από τα κύτταρα που πολλαπλασιάζονται πιο γρήγορα, καθώς η τελομεράση παίζει κρίσιμο ρόλο στη διατήρηση του μήκους των τελομερών. Μια σχετική έρευνα έχει δείξει ότι το μήκος των τελομερών λευκοκυττάρων (Leukocyte Telomere Length, LTL) ενός παιδιού συσχετίζεται θετικά με την ηλικία του πατέρα του κατά τη γέννηση(104–107). Το LTL συσχετίζεται θετικά με αυξημένη μακροζωία και χαμηλότερη συχνότητα αθηροσκλήρωσης. Ένα αυξημένο προσδόκιμο ζωής και ένας χαμηλότερος κίνδυνος αθηροσκλήρωσης μπορεί να είναι επωφελής για τους απογόνους των ηλικιωμένων ανδρών, όπως φαίνεται από το γεγονός ότι το LTL αυξάνεται με την ηλικία του πατέρα. Οι κόρες των ηλικιωμένων μπαμπάδων μπορεί επίσης να εμφανίσουν μια επίδραση του LTL που σχετίζεται με την ηλικία του πατέρα, καθώς το υψηλότερο LTL έχει συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο καρκίνου του μαστού.

Τα σπερματοζωάρια έχουν μακρύτερα τελομερή καθώς γερνούν, σε αντίθεση με τα σωματικά κύτταρα. Αν και ο ακριβής μηχανισμός της είναι άγνωστος, η επιμήκυνση των τελομερών μπορεί να θεωρηθεί ως βιολογική άμυνα κατά της γήρανσης παρά τη σπανιότητά της. Η μοριακή ανθεκτικότητα του ανθρώπινου είδους στη γήρανση μπορεί να είναι απαραίτητη για τη μακροπρόθεσμη επιβίωση του είδους. Απαιτείται πρόσθετη έρευνα για να επιβεβαιωθεί αυτή η διαφορά στην επέκταση της τελομεράσης των

όρχεων. Υπάρχουν στοιχεία που δείχνουν ότι το μέσο μήκος των τελομερών μπορεί να περαστεί στους απογόνους. Σύμφωνα με μια πρόσφατη μελέτη, το μήκος των τελομερών ενός παιδιού επηρεάζεται από την ηλικία του πατέρα του. Πρόσφατη έρευνα δείχνει ότι το μήκος των τελομερών ενός παιδιού επηρεάζεται σημαντικά από την δέσμευση του πατέρα του. Ο βαθμός κληρονομικότητας του μήκους των τελομερών αξιολογήθηκε χρησιμοποιώντας δεδομένα από έξι μελέτες. Το μήκος των τελομερών συσχετίστηκε αντιστρόφως με την ηλικία. Η ηλικία των ανδρών συσχετίστηκε σημαντικά με το μήκος των τελομερών, ενώ η μητρική κληρονομικότητα ήταν σημαντική για το μήκος των τελομερών(108).

Η σημασία του μήκους των τελομερών και των τελομερών στο σπέρμα παραμένει άγνωστη. Ενώ υπάρχει κάποια σχέση μεταξύ του μήκους των τελομερών του σπέρματος και του μήκους των τελομερών των λευκοκυττάρων στο ίδιο άτομο, καθώς τα άτομα μεγαλώνουν, το STL φαίνεται να αυξάνεται ενώ το LTL μειώνεται(109–111). Αυτό πιθανότατα οφείλεται σε αυξημένα επίπεδα ανάστροφης μεταγραφάσης, της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης. Τα μακρύτερα τελομερή στο σπέρμα προτιμώνται όταν η δραστηριότητα της αντίστροφης μεταγραφάσης στα γεννητικά κύτταρα είναι ισχυρή ή όταν τα βλαστοκύτταρα με βραχύτερα τελομερή καταστρέφονται από κυτταρική φθορά.

Η επίδραση του STL στη σπερματογένεση είναι άγνωστη. Μια ομάδα υγιών ατόμων ηλικίας μεταξύ 18 και 19 ετών συμμετείχε σε έρευνα που σύγκρινε το μήκος των τελομερών με τον αριθμό σπερματοζωαρίων, τη δραστηριότητα των σπερματοζωαρίων και την πατρική ηλικία κατά τη γέννηση(111). Οι άνδρες με ολιγοζωοσπερμία είχαν πολύ μικρότερο STL από τους άνδρες με νορμοζωοσπερμία και υπήρχε σαφής συσχέτιση μεταξύ των δύο μεταβλητών. Επιπλέον, διαπιστώθηκε ότι το STL των παιδιών τους επηρεαζόταν από την ηλικία των γονέων. Μια πρόσθετη μελέτη που συγκρίνει το STL δύο ομάδων αποκάλυψε ότι οι άνδρες με ιδιοπαθή ανδρική υπογονιμότητα είχαν βραχύτερα τελομερή από τους φυσιολογικούς.

Η ιδέα ότι τα τελομερή διαδραματίζουν ουσιαστικό ρόλο στη μείωση και, κατ' επέκταση, προστατεύουν τη γονιδιωματική ακεραιότητα υποστηρίχθηκε από το εύρημα ότι τα βραχύτερα τελομερή συνδέονταν με μειωμένη σπερματογένεση λόγω σφαλμάτων διαχωρισμού. Ο όρχις περιέχει πρωτογενή σπερματοκύτταρα στη μείωση I τα οποία έχουν αποδειχθεί ότι έχουν τα υψηλότερα επίπεδα δραστηριότητας τελομεράσης μεταξύ των αρσενικών γεννητικών κυττάρων. Τα βραχύτερα τελομερή ενδέχεται να συμβάλλουν στην κακή σπερματογένεση και στην ανδρική υπογονιμότητα, αν και αυτή η υπόθεση πρέπει να επιβεβαιωθεί από άλλες μελέτες. Οι αλλαγές στη σπερματογένεση μπορεί να μην είναι η βασική αιτία των κοντών τελομερών στο προϊόν εκσπερμάτωσης. Η τεχνολογία της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (Assisted Reproductive Technology, ART) επηρεάζεται από μελέτες που υποστηρίζουν ότι το σπέρμα από ολιγοζωοσπερμικά αρσενικά είχε βραχύτερα τελομερή. Η παθοφυσιολογική συσχέτιση μεταξύ STL και κακής

σπερματογένεσης και η επίδρασή της στο μήκος των τελομερών των απογόνων πρέπει να επιβεβαιωθεί, ειδικά σε ηλικιωμένα ζευγάρια όπου ο άνδρας σύντροφος είναι ολιγοζωοσπερματικός(112).

3.4.1 ΜΟΝΤΕΛΑ ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΗΣ ΕΠΙΜΗΚΥΝΣΗΣ ΤΕΛΟΜΕΡΩΝ (ALT)

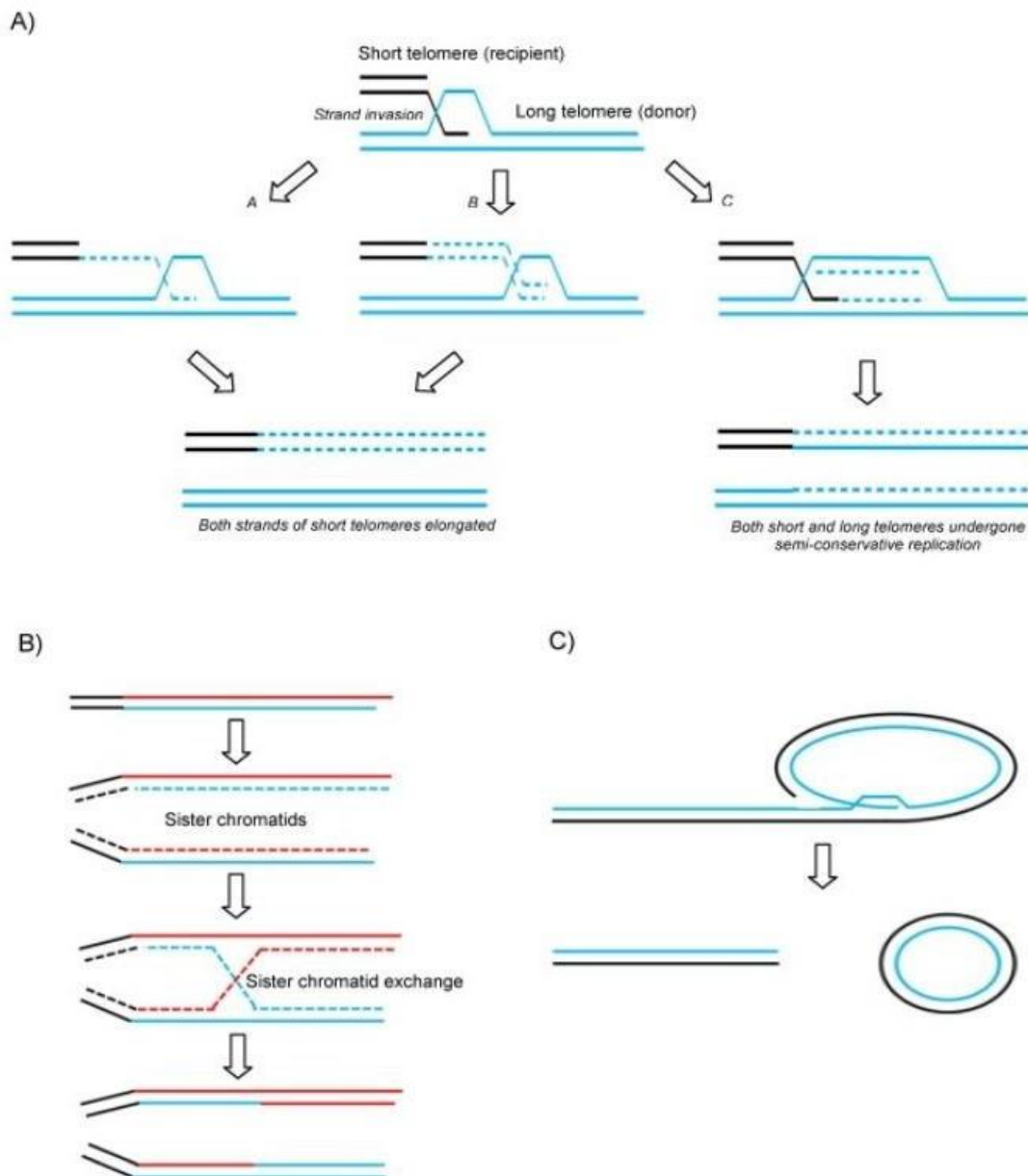
Τα επαρκώς μακρά τελομερή χρησιμεύουν για την προστασία των άκρων των χρωμοσωμάτων από σηματοδότηση με τη μεσολάβηση απόκρισης βλάβης του DNA (DDR), ενώ παρέχουν στα περισσότερα φυσιολογικά κύτταρα μια καθορισμένη διάρκεια ζωής όταν φτάσουν σε ένα εξαιρετικά μικρό μήκος. Ωστόσο, η ετεροχρωματική τους φύση και η παρεμβολή συμπλεγμάτων DNA-πρωτεΐνης και υψηλότερης τάξης δευτερογενών δομών DNA (τα τελομερή είναι πλούσιες σε G επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες που είναι επιρρεπείς σε σχηματισμό τετραπλών G) μπορούν να προκαλέσουν συχνή παύση αντιγραφής και έτσι απαιτούν τη δραστηριότητα ορισμένων οδών DDR σε φυσιολογικές συνθήκες. Επιπλέον, το πιρούνι (fork) σταματημένο σε τελομερικές επαναλήψεις δεν μπορεί να διασωθεί από μια συγκλίνουσα διχάλα, καθώς τα τελομερή αναπαράγονται με μονοκατευθυντικό τρόπο. Ως εκ τούτου, τα κύτταρα ικανά στην τελομεράση χρησιμοποιούν μία ή περισσότερες μορφές ανάλυσης πιρουιού αντιγραφής που προκαλείται από ομόλογο ανασυνδυασμό (HR). Τα κύτταρα σε εναλλακτική επιμήκυνση τελομερών (ALT) χωρίς λειτουργική τελομεράση, μορφές HR σε διάφορες μορφές (αναδιπλασιασμός DNA με μεσολάβηση ανασυνδυασμού που βασίζεται σε πρότυπο, και/αναδιπλασιασμό DNA που προκαλείται από θραύση (BIR) - μονοπάτια που χρησιμοποιούνται συνήθως στο DDR για την επίλυση στάσιμων και κατεστραμμένων διχάλων αντιγραφής) - έχει μοντελοποιηθεί να λειτουργήσει κυρίως όχι μόνο για την επίλυση των σταματημένων διχάλων αντιγραφής αλλά και για τη διατήρηση και την επιμήκυνση των τελομερών. Ο ομόλογος ανασυνδυασμός έχει μελετηθεί μόνο σε κύτταρα ALT κάτω από μη φυσιολογικές συνθήκες στις οποίες η κυτταρική σειρά ζυμομύκητα, ποντικού και ανθρώπου έχει τροποποιηθεί γενετικά, επομένως είναι δύσκολο να εκτιμηθεί πώς η ALT ενεργοποιείται παθολογικά. Ωστόσο, πολλά έχουν διαπιστωθεί την τελευταία δεκαετία για τους ρόλους των συστατικών του DDR που φαίνεται να χρησιμοποιούνται σε κυτταρικές σειρές θετικές και αρνητικές για τελομεράση. Χωρίς την παρουσία τελομεράσης ή άλλων συστατικών που καλύπτουν/προστατεύουν τα τελομερή, η ALT είναι πιθανώς μια μη ισορροπημένη διαδικασία μη ρυθμιζόμενων γεγονότων ομόλογου ανασυνδυασμού τελομερών που αντιμετωπίζουν τη βράχυνση των τελομερών χρησιμοποιώντας πρότυπα από το ίδιο τελομερές, ένα αδελφό χρωματικό τελομερές ή άλλο εξωχρωματικό t-circle DNA κοινό στα κύτταρα ALT για τη διατήρηση της κυτταρικής επιβίωσης επ' αόριστον(79).

Οι πρώτες ενδείξεις ότι οι μηχανισμοί ALT περιλαμβάνουν διαδικασίες ανασυνδυασμού προήλθαν από μελέτες στελεχών *Saccharomyces cerevisiae* με έλλειψη σε συστατικά της τελομεράσης (TLC1 ή EST1)(113,114). Τα περισσότερα από αυτά τα κύτταρα πέθαναν, αλλά εμφανίστηκαν ορισμένοι κλώνοι και ονομάστηκαν επιζώντες τύπου 1 ή τύπου 2. Βρέθηκε ότι και τα δύο εξαρτώνται από το RAD52, καθώς τα διπλά knock-out δεν ήταν βιώσιμα. Είναι ενδιαφέρον ότι οι σπάνιες αποικίες από το στέλεχος διπλού νοκ-άουτ (*tlc1/rad52*) διασώζονται με την εξάλειψη του EXO1 αποκαλύπτοντας μια πιθανή ανασταλτική λειτουργία του EXO1 σε αυτά τα στελέχη ALT(115). Περαιτέρω και ισχυρότερες αποδείξεις για έναν μηχανισμό που βασίζεται σε ανασυνδυασμό για την ALT προήλθαν από μελέτες που χρησιμοποιούν ενσωμάτωση πλασμιδίου σε μία τελομερική περιοχή. Το επισημασμένο DNA φάνηκε να μεταφέρεται από ένα τελομερές και αυξήθηκε σε αριθμό σε άλλα χρωμοσωμικά άκρα μετά από έναν αριθμό κυτταρικών διαιρέσεων(116).

Μια ποικιλία μοντέλων που βασίζονται σε ανασυνδυασμό έχουν προταθεί τώρα για να περιγράψουν πώς τα τελομερή μπορούν να διατηρηθούν και να επεκταθούν χωρίς λειτουργική δραστικότητα τελομεράσης (Εικόνα 13A και 13B). Η άνιση τελομερική αδελφή χρωματιδική ανταλλαγή (T-SCE) έχει προταθεί για τη διευκόλυνση της ALT (Εικόνα 13B). Αυτό υποστηρίζεται από το γεγονός ότι η T-SCE είναι αυξημένη σε κύτταρα ALT+ όπως μετράται με CO-FISH(117). Ωστόσο, αυτό το μοντέλο έχει τεθεί υπό έλεγχο λόγω του γεγονότος ότι δεν θα υπήρχε κανένα καθαρό κέρδος στο μήκος των τελομερών, αφού η μία αδερφή θα επιμήκυνε σε βάρος της άλλης. Ως εκ τούτου, έχει προταθεί ότι ίσως εάν όλα τα επιμήκη τελομερή διαχωριστούν στο θυγατρικό κύτταρο σε βάρος του γονικού κυττάρου, ο άνισος ανασυνδυασμός θα μπορούσε να παράγει ένα καθαρό κέρδος για την επόμενη γενιά. Ένα άλλο μοντέλο έχει προταθεί για την αντιμετώπιση αυτού του ζητήματος, το οποίο προτείνει ότι αντιγραφή που προκαλείται από θραύση (BIR) θα μπορούσε να κάνει τη δουλειά(118)(Εικόνα 13A). Ο BIR είναι ένας μηχανισμός επιδιόρθωσης που συνθέτει DNA έως και πολλές κιλοβάσεις μακριά από μια θέση θραύσης χρησιμοποιώντας ένα ομόλογο πρότυπο δότη (σε αυτή την περίπτωση τελομερικό DNA)(Εικόνα 13A). Όπως φαίνεται στα φυσιολογικά πολλαπλασιαστικά σωματικά κύτταρα, τα κύτταρα ALT χαρακτηρίζονται, επίσης, από την παρουσία εξωχρωμοσωμικών γραμμικών και κυκλοτελομερών μορίων DNA. Οι εξωχρωμοσωμικοί t-κύκλοι μπορούν αρχικά να χρησιμοποιηθούν ως ομόλογα πρότυπα για επιμήκυνση τελομερών που καθοδηγείται από HR ή απλώς να υποβληθούν σε αντιγραφή κυλιόμενου κύκλου, και οι δύο μηχανισμοί προβλέπονται για τη διευκόλυνση της ALT (Εικόνα 13C).

Πρόσφατα στοιχεία υποδηλώνουν ότι ο τελευταίος μηχανισμός της ALT χρησιμοποιείται σε φυσιολογικά σωματικά κύτταρα με έναν ισορροπημένο και ελεγχόμενο τρόπο(119). Η βράχυνση των τελομερών στα φυσιολογικά κύτταρα δεν συμβαίνει μόνο με σταδιακή τριβή, αλλά και με μια ταχύτερη μορφή περικοπής των τελομερών (TT, επίσης γνωστή ως ταχεία διαγραφή τελομερών - TRD)(119) και αυτό συμβαίνει όταν ο HR αναλύει τους t-

βρόχους σε t-κύκλους και πολλά συντομευμένα γραμμικά τελομερή. Έχει προταθεί ότι αυτό το επίπεδο δραστηριότητας είναι αυξημένο σε κύτταρα ALT στα οποία η περικοπή των τελομερών εξουδετερώνεται από αυξημένα επίπεδα επιμήκυνσης τελομερούς που προκαλείται από ομόλογο ανασυνδυασμό. Αυτό θα εξηγούσε το δραστικά ποικίλο μήκος των τελομερών και την αυξημένη ανίχνευση των t-κύκλων στα κύτταρα ALT και υποδηλώνει ότι οι ανεπαίσθητες ανισορροπίες που εμφανίζονται στη ρύθμιση της περικοπής των τελομερών συμβαίνουν μεταξύ θνητών και αθάνατων καταστάσεων.



Εικόνα 13 Προτεινόμενοι μηχανισμοί Εναλλακτικής Επιμήκυνσης. Α) Αναδιπλασιασμός που προκαλείται από θραύση. Τα μοντέλα Α και Β διαφέρουν ως προς το χρόνο της σύνθεσης του καθυστερημένου κλώνου, αλλά και τα δύο καταλήγουν σε νεοσυντιθέμενες πλούσιες σε G και C αλυσίδες στα τελομερή του δέκτη

χωρίς απώλεια από τα τελομερή του δότη. Το C δείχνει μια διχάλα αναδιπλασιασμού μονής κατεύθυνσης που δημιουργεί και ακολουθεί την ανάλυση του Holliday Junction τόσο τα τελομερή του δότη όσο και του δέκτη βιώνουν ημι-συντηρητική αντιγραφή. Β) Τελομερική-Αδελφή Χρωματιδική Ανταλλαγή και Γ) Σχηματισμός κυλιόμενου κύκλου και t-κύκλου μετά από ανάλυση t-βρόχου που παρέχει μια γραμμική δίκλωνη θραύση για επακόλουθη εισβολή μέσω HR σε ομόλογα πρότυπα(115).

3.4.2 ΜΗ ΟΜΟΛΟΓΗ ΤΕΛΙΚΗ ΕΝΩΣΗ (NON- HOMOLOGOUS END JOINING)

Η DNA-PK, η οποία αποτελείται από υπομονάδες DNA-PKcs και Ku70/80, αλληλεπιδρά με την τελομεράση, καταλύει τη μη ομόλογη τελική ένωση (NHEJ) και καταστέλλει τη φυσιολογική τελομερική δραστηριότητα ομόλογου ανασυνδυασμού – η κυρίαρχη οδός που προτείνεται να εμπλέκεται στην ALT(120). Τα άκρα των χρωμοσωμάτων των θηλαστικών είναι πολύ ευαίσθητα σε ομόλογο ανασυνδυασμό (HR) και NHEJ μαζί με λειτουργίες TRF1/TRF2 για την καταστολή των ανταλλαγών των αδελφών που διαμεσολαβούνται από που λειτουργούν στην ALT. Ομοίως, ελαττώματα σε μεσολαβητές ομόλογου ανασυνδυασμού όπως τα BRCA1 και BRCA2 έχουν αναφερθεί ότι ρυθμίζουν προς τα πάνω το NHEJ και αυτό φαίνεται να ισχύει και στα τελομερή καθώς τα κύτταρα με ανεπάρκεια BRCA1 και BRCA2 εμφανίζουν μεγάλες χρωμοσωμικές συντήξεις και αστάθεια(121). Το BRCA1 είναι γνωστό ότι ρυθμίζει την τελομεράση μέσω της μεταγραφικής ρυθμιστικής δραστηριότητάς του και συν-εντοπίζεται με το TRF2 σε κυτταρικές σειρές θετικές για τελομεράση και εντός APB κυττάρων ALT, αν και ο ρόλος του στην ALT είναι ασαφής καθώς η έκφραση μιας κυρίαρχης αρνητικής παραλλαγής του BRCA1 οδηγεί σε αυξημένο μήκος τελομεράσης σε θετικά κύτταρα αλλά όχι σε κύτταρα ALT(122).

Ο σχηματισμός των t-κύκλων στα κύτταρα ALT εξαρτάται από πρωτεΐνες ανασυνδυασμού ακτίνων X επισκευής διασταυρούμενης συμπλήρωσης 3 (XRCC3), NBS1 και Ku70/80 και η προς τα κάτω ρύθμιση οποιουδήποτε από αυτούς τους παράγοντες προκαλεί μείωση στα επίπεδα των t-κύκλων και της καταστολής της ανάπτυξης σε αυτά τα κύτταρα(123). Δεδομένου ότι το XRCC3 είναι μια πρωτεΐνη που σχηματίζει ένα σύμπλεγμα με το παράλογο Rad51C στην προαγωγή του HR(124) και οι πρωτεΐνες Ku διευκολύνουν το NHEJ, φαίνεται ότι ένα λεπτό και πολύπλοκο σύστημα που περιλαμβάνει μονοπάτια δίκλωνης θραύσης HR και NHEJ λειτουργεί στο σχηματισμό του κύκλου t. Αυτή η πολυπλοκότητα υπογραμμίζεται από το γεγονός ότι παρόλο που τα Ku70/80 και NHEJ είναι γνωστό ότι εμπλέκονται σε θετικό στην τελομεράση TMM, οι Li et al από το εργαστήριο του Reddel έδειξαν ότι τα ανθρώπινα κύτταρα SAOS2 με εξάντληση Ku70/80 δεν εμφάνισαν τις διαγραφές τελομερών που παρατηρήθηκαν σε θετικά στην τελομεράση ανθρώπινα κύτταρα χωρίς Ku70/80 και δεν εμφάνισαν καμία σημαντική διαφορά στη συνολική κατανομή των σημάτων τελομερών, ούτε αύξηση στη χρωμοσωμική αστάθεια σε σύγκριση με τα κύτταρα ALT ελέγχου(123). Σημειώθηκε μόνο μείωση του κύκλου t, υπογραμμίζοντας τον κυρίαρχο ρόλο του NHEJ στον συγκεκριμένο μηχανισμό της ALT. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, υποδηλώνουν ότι ο σχηματισμός

του t-κύκλου προκύπτει από τη διαδικασία ταχείας περικοπής των τελομερών που σχετίζεται με τη βράχυνση των τελομερών στα θετικά στην τελομεράση αλλά πιο έντονα σε κύτταρα ALT αρνητικά στην τελομεράση(119). Σε συμφωνία με μελέτες που δείχνουν έναν ρόλο για το XRCC3 στο σχηματισμό του t-κύκλου, αποδείχθηκε ότι η εξάντληση του XRCC3 είχε ως αποτέλεσμα σχεδόν την πλήρη απώλεια των t-κύκλων, όπως μετρήθηκε με ηλεκτροφόρηση 2D-gel. Ωστόσο, η εξάντληση του GEN1 δεν προκάλεσε μείωση, το υποτιθέμενο Holliday Junction που επιλύει την πρωτεΐνη ομόλογου ανασυνδυασμού, υποστηρίζοντας περαιτέρω ένα μοντέλο που περιγράφει μόνο τη συμμετοχή του NHEJ και τις ξεχωριστές δραστηριότητες ορισμένων συστατικών/υπο-διαδρομών ομόλογου ανασυνδυασμού στη διευκόλυνση της ALT.

3.4.3 ΟΜΟΛΟΓΟΣ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ (HOMOLOGOUS RECOMBINATION)

Πολλές πρωτεΐνες επιδιόρθωσης DNA που εμπλέκονται στο HR βρίσκονται σε φυσιολογικά και δυσλειτουργικά τελομερή αλλά είναι ιδιαίτερα ενεργές στην ALT, όπως συζητήθηκε προηγουμένως. Εκτός από τα συστατικά HR όπως το Rad52 και το MRN που έχουν ήδη επισημανθεί, το BLM είναι μία από τις πέντε γνωστές ελικάσες της οικογένειας RecQ που καθοδηγούνται από ATPase που διαθέτει δραστηριότητα ξετύλιξης DNA 3'-5', μετανάστευση Holliday Junctions και δραστηριότητα αποδιάταξης μονόκλωνου DNA. Αυτές οι δραστηριότητες απαιτούνται για την επίλυση εγκατεστημένων και σπασμένων πηρουινών αντιγραφής και αυτό μπορεί να λειτουργήσει πριν ή πίσω από μια διχάλα αντιγραφής τελομερούς. Στα κύτταρα ALT, το BLM είναι γνωστό ότι εντοπίζεται με TRF1 και TRF2 σε τελομερή στη φάση S που υποστηρίζει μια τέτοια λειτουργία.

Η WRN είναι μια άλλη ελικάση RecQ η οποία έχει δράση εξωνουκλεάσης και μπορεί να αλληλεπιδράσει με DNA-PKcs, RPA, MRN και Rad51 που δεν ανταποκρίνονται στις δίκλωνες θραύσεις του DNA. Η WRN κανονικά λειτουργεί για την καταστολή ακατάλληλου ανασυνδυασμού όπως το T-SCE που εμπλέκεται στην ALT και πιστεύεται ότι ξετυλίγει το DNA για να επηρεάσει την πρόσβαση της τελομεράσης στην προεξοχή 3' στο άκρο των τελομερών. Ωστόσο, η WRN βρίσκεται επίσης σε APB σε κύτταρα ALT παράλληλα με τα TRF1 και TRF2 στη φάση S όπου πιστεύεται ότι οι βρόχοι T απαιτούν ανάλυση για την προώθηση της επιμήκυνσης των τελομερών. Η κατάρριψη των συστατικών HR συμπεριλαμβανομένων των Rad51D, MUS81, BLM ή FANCA/D2 μέσω RNAi μειώνει δραματικά τα τελομερή στα κύτταρα ALT+ και σχετίζεται με μειωμένη κυτταρική επιβίωση(79,125–128). Η RTEL είναι μια ελικάση DNA που πιστεύεται ότι λειτουργεί με BLM και Mus81 στην επίλυση ενδιάμεσων ανασυνδυασμών και κλωνοποιήθηκε για πρώτη φορά το 2004, ονομάστηκε ρυθμιστής του μήκους τελομερών, καθώς τα εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα Rtel(-/-) παρουσίασαν απώλεια τελομερών και εμφάνισαν πολλές θραύσεις και συγχωνεύσεις χρωμοσωμάτων κατά τη διαφοροποίηση

in vitro(129). Επί του παρόντος είναι άγνωστο εάν το RTEL λειτουργεί σε κύτταρα με ανεπάρκεια τελομεράσης, αλλά αυτό δεν θα ήταν έκπληξη λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι άλλες ελικάσες RecQ έχουν συσχετίσει λειτουργίες στο ALT.

3.5 ΤΕΛΟΜΕΡΗ ΚΑΙ ΤΡΟΠΟΣ ΖΩΗΣ

Ένας αριθμός επιλογών τρόπου ζωής, όπως το κάπνισμα, η παχυσαρκία, η έλλειψη δραστηριότητας και η κακή διατροφή, ενδέχεται να επιταχύνουν τη βράχυνση των τελομερών, θέτοντας κάποιον σε κίνδυνο για ασθένεια ή/και πρόωρο θάνατο. Πολλά θέματα υγείας που σχετίζονται με την ηλικία, όπως η στεφανιαία νόσος, η καρδιακή ανεπάρκεια, ο διαβήτης, ο αυξημένος κίνδυνος καρκίνου, η οστεοπόρωση, μπορεί να εκδηλωθούν νωρίτερα στη ζωή όταν επιταχύνεται(78).

Τα γηραιότερα άτομα με βραχύτερα τελομερή έχουν ένα μεγαλύτερο κίνδυνο θνησιμότητας σε σχέση με αυτά με μακρύτερα τελομερή, σύμφωνα με μια ανάλυση του μήκους των τελομερών. Πολλαπλές πτυχές της υγείας και της διάρκειας ζωής μπορεί να επηρεαστούν από την υπερβολική ή γρήγορη μείωση των τελομερών. Αντίθετα, τα αθάνατα/καρκινικά κύτταρα υφίστανται γήρανση ή/και θάνατο όταν οι μηχανισμοί διατήρησης των τελομερών αναστέλλονται και η επιμήκυνση των τελομερών συνεχίζεται.

Τα τελομερή και η γήρανση φαίνεται να σχετίζονται αρνητικά με το κάπνισμα και την παχυσαρκία. Έχει δειχθεί ότι το μήκος των τελομερών και το κάπνισμα συσχετίζονται αντιστρόφως. Στα αιμοσφαίρια των χρηστών καπνού, έχει σημειωθεί μια δοσο-εξαρτώμενη αύξηση στη βράχυνση των τελομερών. Σύμφωνα με μια μελέτη στα λευκά αιμοσφαίρια γυναικών, κάθε πακέτο τσιγάρων που καπνίζεται καθημερινά οδηγεί σε επιπλέον απώλεια πέντε ζευγών βάσεων τελομερικού DNA, ανεβάζοντας την ετήσια μέση απώλεια μεταξύ 25,7 και 27,7 ζευγών βάσεων(130). Η απώλεια 7,4 χρόνων ζωής εξαιτίας της διάβρωσης των τελομερών είναι αποτέλεσμα καπνίσματος ενός πακέτου τσιγάρων κάθε μέρα για 40 χρόνια. Το μήκος των τελομερών έχει προταθεί ως βιοδείκτης για την αξιολόγηση της οξειδωτικής βλάβης που προκλήθηκε από το κάπνισμα, σύμφωνα με μια σχετική μελέτη, ως δυνητικός δείκτης γήρανσης. Επίσης, σύμφωνα με τη θεωρία των συγγραφέων, η αντιοξειδωτική θεραπεία μπορεί να σταματήσει την οξειδωτική βλάβη που καταλήγει στη βράχυνση των τελομερών. Συμπεραίνεται, λοιπόν, ότι το κάπνισμα επιταχύνει τη βράχυνση των τελομερών, αυξάνει το οξειδωτικό στρες και μπορεί να επιταχύνει τη διαδικασία της γήρανσης(131).

Το ενισχυμένο οξειδωτικό στρες και η βλάβη DNA είναι πρόσθετες συνέπειες της παχυσαρκίας. Η περίμετρος της μέσης και ο δείκτης μάζας σώματος (BMI) είναι στενά συνδεδεμένες με τα υψηλότερα επίπεδα αντιδραστικών ριζών οξυγόνου στο πλάσμα και στα ούρα(132). Ανεξαρτήτως ηλικίας, η έρευνα των Song και των συνεργατών έχει δείξει

μια ουσιαστική συσχέτιση μεταξύ του BMI και των βιοδεικτών βλάβης του DNA. Το αυξημένο οξειδωτικό στρες που σχετίζεται με την παχυσαρκία πιθανότατα προκαλείται από μια ανεξέλεγκτη παραγωγή λιποκυτταροκινών. Ο λευκός λιπώδης ιστός από παχύσαρκα ποντίκια είχε υψηλότερα επίπεδα ROS, αλλά όχι σε άλλους ιστούς, δείχνοντας ότι οι οξειδωτικοί παράγοντες που ευθύνονται για το οξειδωτικό στρες που βρίσκεται στο πλάσμα θα μπορούσαν να προέρχονται από τον λιπώδη ιστό. Επιπλέον, ο λευκός λιπώδης ιστός των παχύσαρκων ποντικών είχε σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα μεταγραφής και αντιοξειδωτική ενζυμική δράση από τα ποντίκια ελέγχου, συμπεριλαμβανομένης της καταλάσης και της δισμουτάσης(58).

Σύμφωνα με σχετική έρευνα, η ενισχυμένη οδός οξειδάσης NADPH στο συσσωρευμένο λίπος και η έλλειψη αντιοξειδωτικής άμυνας συνέβαλαν στο αυξημένο οξειδωτικό στρες σε παχύσαρκα ποντίκια. Το οξειδωτικό στρες, που ενδέχεται να καταλήξει σε βλάβη DNA, μπορεί να επιταχύνει τη βράχυνση των τελομερών. Το μήκος των τελομερών στις παχύσαρκες γυναίκες φαίνεται να είναι σημαντικά μικρότερο σε σύγκριση με τα τελομερή αδύνατων γυναικών τις ίδιες ηλικίας(130). Η παχυσαρκία φαίνεται να έχει μια πιο επιζήμια επίδραση στο μήκος των τελομερών σε σχέση με το κάπνισμα, με υπερβολική απώλεια τελομερών σε παχύσαρκους ανθρώπους που εκτιμάται ότι ισοδυναμεί με 8,8 χρόνια ζωής. Αυτά τα ευρήματα υποδηλώνουν ότι η παχυσαρκία επηρεάζει αρνητικά τα τελομερή και μπορεί να επιταχύνει άσκοπα τη γήρανση.

Τα ποσοστά μείωσης της υγείας και των τελομερών μπορούν και τα δύο να επηρεαστούν από το περιβάλλον. Η διάβρωση των τελομερών είναι επίσης σχετιζόμενη με τη γήρανση. Το μικρότερο μήκος των τελομερών στα λεμφοκύτταρα συσχετίστηκε με την υπομεθυλίωση του προαγωγέα p53, που μπορεί να οδηγήσει στη σύνθεση του p53. Η έκφραση του P53 μπορεί να περιορίσει την ανάπτυξη ή να προκαλέσει απόπτωση. Ως εκ τούτου, η έκθεση σε γονιδιοτοξικές χημικές ουσίες, που μπορεί να οδηγήσει σε βλάβη του DNA συνολικά ή πιο σοβαρή στα τελομερή, μπορεί να επιταχύνει τη γήρανση και να αυξήσει τον κίνδυνο καρκίνου.

Τα τελομερή, η ευζωία και η διάρκεια ζωής μπορούν όλα να επηρεαστούν δραματικά από το τι και πόσο τρώμε. Μια μελέτη εξέτασε τη συσχέτιση μεταξύ μιας ποικιλίας παραγόντων του τρόπου ζωής και του μήκους των τελομερών λευκοκυττάρων σε σημαντικό πληθυσμό γυναικών. Η πρόσληψη φυτικών ινών στη διατροφή συσχετίστηκε θετικά με το μήκος των τελομερών, αλλά η πρόσληψη πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, ιδιαίτερα του λινολεϊκού οξέος, και η περίμετρος της μέσης συσχετίστηκαν αρνητικά. Η μειωμένη κατανάλωση πρωτεϊνών φαίνεται επίσης να παρατείνει τη ζωή. Οι αρουραίοι ζούσαν 15% περισσότερο όταν το επίπεδο πρωτεΐνης του γεύματός τους μειώθηκε κατά 40%. Στην αρχή της ζωής τους, οι αρουραίοι στους οποίους χορηγήθηκε δίαιτα περιορισμένης πρωτεΐνης έδειξαν μακροχρόνια καταστολή της πείνας, πιο αργή ανάπτυξη και παρατεταμένη διάρκεια ζωής. Το μήκος των τελομερών στους νεφρούς αυτών των ζώων ήταν επίσης πολύ μεγαλύτερο. Η πηγή πρωτεΐνης φαίνεται επίσης να

είναι κρίσιμη, καθώς οι αρουραίοι των οποίων η καζεΐνη αντικαταστάθηκε με πρωτεΐνη σόγιας έζησαν περισσότερο και αργότερα ανέπτυξαν χρόνιες νεφροπάθειες(133,134).

Είναι γνωστό ότι η βράχυνση των τελομερών σχετίζεται με μια δίαιτα υψηλή σε αντιοξειδωτικά ωμέγα-3 λιπαρά οξέα και σχετίζεται επίσης με μια δίαιτα ανεπαρκή σε αυτά τα αντιοξειδωτικά. Το μήκος των τελομερών και τα επίπεδα των ωμέγα-3 λιπαρών οξέων στο αίμα σε αυτά τα άτομα παρακολουθήθηκαν από τους ερευνητές σε μια περίοδο πέντε ετών. Βρήκαν μια αντίστροφη συσχέτιση, η οποία δείχνει ότι τα αντιοξειδωτικά περιορίζουν τον ρυθμό βράχυνσης των τελομερών.(135)

Παρόμοια, γυναίκες που έκαναν δίαιτες χαμηλής περιεκτικότητας σε αντιοξειδωτικά είχαν μικρότερα τελομερή και μέτριο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού, ενώ όσες καταλάωναν δίαιτες υψηλής περιεκτικότητας σε αντιοξειδωτικά όπως βιταμίνη Ε, βιταμίνη C και βήτα-καροτένιο, είχαν μεγαλύτερα τελομερή και μειωμένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού. Η οξειδωτική βλάβη από ενδοκυτταρικές και εξωκυτταρικές χημικές ουσίες που βλάπτουν το DNA μπορούν να προκαλέσουν στο τελομερικό DNA, μπορεί να αποτραπεί από αντιοξειδωτικά(136).

Σχετική έρευνα έδειξε ότι η διάρκεια άσκησης σχετίζεται αρνητικά με τους βιοδείκτες βλάβης των τελομερών και του DNA, καθώς και με την έκφραση του p16, έναν βιοδείκτη για τη γήρανση στα ανθρώπινα κύτταρα. Η άσκηση βοηθά στην κινητοποίηση των άχρηστων προϊόντων για ταχύτερη κάθαρση, στη μείωση του οξειδωτικού στρες και στη προστασία του DNA και των τελομερών. Στα ποντίκια αποδείχθηκε ότι η άσκηση συνδέθηκε με αυξημένη δραστηριότητα τελομεράσης και κατέστειλε πολλές αποπτωτικές πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένων των p53 και p16. Σε σύγκριση με τους μη αθλητές, τα ανθρώπινα λευκοκύτταρα που λήφθηκαν από αθλητές εμφάνιζαν σταθερά υψηλότερη δραστηριότητα τελομεράσης και λιγότερη βράχυνση των τελομερών. Η άσκηση ίσως επιβραδύνει την εξέλιξη της γήρανσης και των διαταραχών που σχετίζονται με την ηλικία, καθώς φαίνεται να συνδέεται με τη μείωση του οξειδωτικού στρες και την αύξηση της παραγωγής πρωτεϊνών που σταθεροποιούν τα τελομερή. Το κάπνισμα, η έκθεση στη ρύπανση, η αδράνεια, η παχυσαρκία, το στρες και η κακή διατροφή επιταχύνουν τη βράχυνση των τελομερών και την οξειδωτική επιβάρυνση. Η κατανάλωση λιγότερης τροφής, η συμπλήρωση αντιοξειδωτικών στη διατροφή μας, οι φυτικές ίνες, οι πρωτεΐνες σόγιας, τα υγιή λίπη καθώς και η σωματική και πνευματική άσκηση, είναι όλοι οι τρόποι διατήρησης των τελομερών, μείωσης του κινδύνου καρκίνου, επιβράδυνσης της διαδικασίας γήρανσης και επιβράδυνσης του ρυθμού της ανάπτυξης καρκίνου. Τα τελομερή θα προστατεύονται από αυτά σε συνδυασμό με μια μεσογειακή διατροφή πλούσια σε φρούτα και δημητριακά ολικής αλέσεως(58).

3.6 ΜΙΤΟΦΑΓΙΑ ΚΑΙ ΤΕΛΟΜΕΡΗ

Η απόπτωση, η οποία ρυθμίζεται μέσω πολυάριθμων σηματοδοτικών και ρυθμιστικών μονοπατιών, είναι ο βιολογικά προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος που προκαλείται από τον κατακερματισμό του DNA. Η απόπτωση μπορεί να προκύψει από τη θραύση δίκλωνου DNA που προκαλείται εξαιτίας των ROS. Επιπλέον, τα ROS προκαλούν διατάραξη της μιτοχονδριακής μεμβράνης για τη δημιουργία του σηματοδοτικού μορίου κυτοχρώματος C που θα μπορούσε να πυροδοτήσει τις αποπτωτικές κασπάσες και να προκαλέσει την προσκόλληση της αννεξίνης-V στη φωσφατιδυλοσερίνη. Η αυξημένη παραγωγή ROS στο σπερματικό υγρό ενδέχεται να υποδεικνύει ότι οι υπογόνιμοι ασθενείς έχουν αξιόλογη μιτοχονδριακή βλάβη από τα υψηλά επίπεδα ROS(63).

Προκειμένου να διατηρηθεί η κυτταρική ομοιόσταση, η αυτοφαγία βασίζεται στη λυσοσωματική αποικοδόμηση, η οποία είναι μια καλά διατηρημένη καταβολική οδός. Τόσο η μαζική αυτοφαγία, η οποία είναι μη – επιλεκτική, και η επιλεκτική αυτοφαγία είναι πιθανές. Η επιλεκτική αυτοφαγία διαιρείται περαιτέρω σε τρεις ομάδες με βάση τα πολλά υποστρώματα που είναι διαθέσιμα: μιτοφαγία (μιτοχόνδρια), λιποφαγία (λιποσώματα), και ΕΔ – φαγία (ενδοπλασματικό δίκτυο). Εφόσον, η μιτοφαγία επηρεάζει τα μιτοχόνδρια και φαίνεται να συνδέεται με τα τελομερή(137).

Αρχικά, η μιτοφαγία συμβάλει στην εξάλειψη του πατρικού μιτοχονδριακού DNA μετά τη γονιμοποίηση και λειτουργεί μέσω της διαφοροποίησης του σπέρματος πριν τη γονιμοποίηση. Η ενδονουκλεάση G έχει αποδειχθεί ότι αφαιρεί το μεγαλύτερο μέρος του mtDNA του σπέρματος κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης. Συνεπώς, τα υπολειμματικά κενά σπερματοζωάρια παίρνουν μέρος στη δημιουργία του αυχένα των σπερματοζωαρίων. Όταν επικρατούν δυνητικά επιβλαβείς συνθήκες, συμπεριλαμβανομένου του οξειδωτικού στρες, της υποξίας, της απώλειας του μιτοχονδριακού διαμεμβρανικού δυναμικού, της αναιμίας και της συσσώρευσης μη αναδιπλωμένων πρωτεϊνών, στην πραγματικότητα συμβαίνει μιτοφαγία. Επίσης, η ενέργεια που παράγεται από τα μιτοχόνδρια του σπέρματος είναι σημαντική τόσο για τη κινητικότητα του σπερματοζωαρίου όσο και για τη γονιμοποίηση. Αξίζει να σημειωθεί ότι η σωστή διαγραφή του μιτοχονδριακού DNA μετά τη γονιμοποίηση ωφελεί και την υγεία του ατόμου και την ομοιογένεια του εμβρύου(138).

Η κρυφορχία και η ασθενοζωοσπερμία είναι στενά σχετιζόμενες με τη μιτοφαγία. Σύμφωνα με πρόσφατη βιβλιογραφία, μια αύξηση στη θερμοκρασία του σώματος έχει συνδεθεί τόσο με την καθυστέρηση της σπερματογένεσης της κρυφορχίας όσο και με την αύξηση της βλάβης στα μιτοχόνδρια που πυροδοτεί τη μιτοφαγία(139). Επιπροσθέτως, το κύριο οργανίδιο στο σπέρμα που παράγει ROS είναι τα μιτοχόνδρια. Η απόπτωση του άρρενος γαμέτη μπορεί να προκληθεί από υπερβολική παραγωγή ROS, το οποίο ενδεχομένως να οδηγήσει σε μιτοφαγία. Η μελλοντική κλινική συνάφεια για την αναγνώριση και τη διαχείριση της ανδρικής υπογονιμότητας θα καταλήξει μέσα από μια

ενδεδειγμένη έρευνα, με επίκεντρο στη σχέση μεταξύ της μιτοφαγίας και των συνθηκών που σχετίζονται με τη σπερματογένεση. Ο ακριβής μηχανισμός της ειδικής αυτοφαγίας στη σπερματογένεση δεν έχει ακόμα αποδειχθεί. Οι επιδράσεις των επιπρόσθετων τύπων επιλεκτικής αυτοφαγίας στην ανδρική γονιμότητα και τη σπερματογένεση πρέπει επομένως να αξιολογηθούν. Η κατανόηση των αλλαγών στη μιτοφαγία που συμβαίνουν καθώς γερνάμε μπορεί να υποδείξει αξιόλογα ερευνητικά έργα για την καθυστέρηση της γήρανσης και τη βελτίωση των συνεπειών στην υγεία που σχετίζονται με την ηλικία. Η μιτοφαγία μειώνει την παραγωγή των ROS, αποτρέπει τη συσσώρευση των μεταλλάξεων του μιτοχονδριακού DNA, βελτιώνει την παραγωγή ATP και αναστέλλει την αποπτωτική σηματοδότηση και την ενεργοποίηση των φλεγμονωδών κυστιδίων.

Σύμφωνα με πρόσφατη έρευνα, η βιολογία των τελομερών και η αυτοφαγία σχετίζονται. Αυξημένα κυτταροπλασματικά κενοτόπια και πρωτεΐνες που σχετίζονται με την αυτοφαγία (ATG5-ATG12, LC3-II) βρίσκονται σε κύτταρα που διέρχονται κρίση, η οποία συνδέεται με απροστάτευτα τελομερή. Τα αυτοφαγοσώματα μπορούν να προκληθούν και η σηματοδότηση mTOR μπορεί να ανασταλεί σε κακοήθη κύτταρα γλοιώματος όταν χρησιμοποιούνται τελομερή 3' ειδικά ολιγονουκλεοτίδια DNA, τα οποία μιμούνται τη θραύση του βρόχου των τελομερών(140). Επιπλέον, η TERT συνδέεται και αναστέλλει την κινάση mTORC1 σε πολυάριθμες κυτταρικές σειρές, συμπεριλαμβανομένων των HEK 293 T, HepG2, και U-2 OS, οδηγώντας στην επαγωγή της αυτοφαγίας. Κάτω από συνθήκες πείνας βασικής γραμμής και αμινοξέων, η διακοπή δράσης του TERT (knockdown) προκαλεί αύξηση των συστατικών του mTORC1(141). Αυτό βλάπτει την αυτοφαγία. Η βράχυνση των τελομερών μπορεί να επηρεάσει την p53, η οποία αναστέλλεται εν μέρει από την αυτοφαγία και η p53 μπορεί να πυροδοτήσει την αυτοφαγία ως μηχανισμό απόκρισης. Η βράχυνση των τελομερών ενδέχεται να επηρεάσει το p53, το οποίο αναστέλλεται εν μέρει από την αυτοφαγία και το p53 ενδέχεται να πυροδοτήσει την αυτοφαγία ως μηχανισμό απόκρισης.

Για τη διατήρηση φυσιολογικής ομοιόστασης, τα κύτταρα χρησιμοποιούν μια οργανωμένη και ελεγχόμενη διαδικασία που ονομάζεται αυτοφαγία προκειμένου να διασπάσουν τα συστατικά του σώματός τους(142). Η εξωπυρηνική τελομεράση, ακόμη και πριν από την ανιχνεύσιμη αρχή της βράχυνσης των τελομερών, είναι γνωστό ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη μετατόπιση που σχετίζεται με την ασθένεια στον μεσολαβητή της διαστολής που προκαλείται από τη ροή (Flow Mediated Dilation, FMD). Αυτή η δράση τελομεράσης είναι μη κανονική και μπορεί να αναστρέψει την αγγειακή δυσλειτουργία που σχετίζεται με τη στεφανιαία αρτηριακή νόσο πυροδοτώντας την αυτοφαγία (Coronary Artery Disease, CAD)(143).

Οι εμβρυικοί ινοβλάστες ποντικών παρέχουν υποστήριξη για την υπόθεση ότι η τελομεράση και η αυτοφαγία αλληλοεπιδρούν. Η υπερέκφραση της TERT ενισχύει τους δείκτες αυτοφαγίας, όπως φαίνεται από την αύξηση στη μετατροπή του LC38 I σε LC38 II, σημάδι ενισχυμένου σχηματισμού αυτοφαγοσωμάτων. Με τη σειρά του, η μείωση της

δράσης TERT μείωσε την μετατροπή του LC3I σε LC3II. Η αυτοφαγία προκλήθηκε από τη διαγονιδιακή υπερέκφραση του TERT με τρόπο που εξαρτάται από το mTORC1. Η αναστολή της τελομεράσης αναστέλλει τις αυτοφαγικές αποκρίσεις στην ισχαιμία – επαναϊμάτωση εντός του νεφρού του ποντικού, όπως αποδεικνύεται από τη μειωμένη έκφραση της LC3 II και τη συσσώρευση της p62, αποτελέσματα που υποχώρησαν από τη θεραπεία με αναστολέα mTOR(144).

Πρόσφατη έρευνα έδειξε ότι η μιτοχονδριακή μεταβολική δυσλειτουργία προηγείται της αποικοδόμησης του DNA των τελομερών. Η παρουσία ή η απουσία δομής τελομερούς είναι η κύρια διάκριση μεταξύ του μιτοχονδριακού DNA και των χρωμοσωμάτων. Ωστόσο, ο δακτύλιος D, ο επιγενετικός έλεγχος, το G – τετράπλευρο και το ετερογενές δίκλωνο, υπερτυλιγμένο DNA αποτελούν ιδιότητες που ξεχωρίζουν το DNA των τελομερών από το μιτοχονδριακό DNA υπάρχουν επίσης και στους δύο τύπους DNA υπό στέλεχος αντιγραφής.

Η κύρια λειτουργία της τελομεράσης είναι να εξουδετερώνει τη βράχυνση των τελομερών και να διατηρεί το μήκος τους. Τα τελομερή βοηθούν, επίσης, τα κύτταρα να επιβιώσουν διατηρώντας το μήκος τους. Σύμφωνα με έρευνες, η τελομεράση είναι υπεύθυνη για την απομάκρυνση της υπομονάδας TERT λόγω οξειδωτικού στρες από τους πυρήνα και τη μετεγκατάστασή της στα μιτοχόνδρια. Μειώνοντας τη μιτοχονδριακή δημιουργία των ROS, αυτός ο συνεντοπισμός του TERT και των μιτοχονδρίων διατηρεί τη λειτουργία των μιτοχονδρίων και μειώνει τη βλάβη του πυρηνικού DNA και την απόπτωση. Απροσδόκητα, τα κύτταρα που μειώνουν εξαλείφουν πλήρως την τελομεράση παρουσιάζουν μικρή ή καθόλου βλάβη στο DNA. Αντιθέτως, κύτταρα με κατάλοιπα τελομερικής δράσης έχουν μία αύξηση στη βλάβη του DNA. Στην περίπτωση αύξησης βλάβης του DNA, η τελομεράση ενδέχεται να έχει αρνητική επίδραση στα επιδιορθωτικά ένζυμα στον πυρήνα των κυττάρων. Αυτό εξηγεί επίσης γιατί, σε κάποιο βαθμό, η βλάβη του DNA εμποδίζει τη συνέχιση της λειτουργίας της τελομεράσης. Σε μια άλλη ερευνητική μελέτη, έχει αποδειχθεί ότι οι ανθρώπινοι ινοβλάστες που εκφράζουν TERT μπορούν να μειώσουν τη βλάβη που προκαλείται από το οξειδωτικό στρες στο μιτοχονδριακό DNA, το οποίο ρυθμίζεται κυρίως από την επιδιόρθωση εκτομής βάσης (Base Excision Repair, BER) και η παρουσία του hTERT δεν επηρεάζει την επισκευή του BER(145).

Παράλληλες έρευνες υποστήριξαν ότι η γήρανση δεν προκλήθηκε στην πραγματικότητα από αλλαγές στις άκρες των χρωμοσωμάτων ή οποιαδήποτε άλλη πυρηνική διαδικασία, παρά τα όσα γνωρίζουμε τώρα για τη βιολογία των τελομερών. Αντίθετα, τέτοιες έρευνες πρότειναν ότι η κύρια αιτία πρόκλησης γήρανσης είναι η μείωση της μιτοχονδριακής δράσης ή η αύξηση των ROS. Μια πρόσφατη μελέτη προτείνει ότι μια τέτοια συσχέτιση μεταξύ τελομερών και μιτοχονδρίων μπορεί να ήταν παρούσα αλλά όχι πλήρως αναγνωρισμένη. Τα τελομερή ελέγχουν τη συνολική απόδοση του μεταβολισμού δρώντας μέσω του p53(146). Η δημιουργία μιας τέτοιας σύνδεσης φαίνεται να έχει φέρει

τα μιτοχόνδρια και τον πυρήνα πιο κοντά μεταξύ τους και βοηθά στην αποσαφήνιση των θεμελιωδών αιτιών της γήρανσης.

3.7 ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ ΚΑΙ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΤΑ ΤΕΛΟΜΕΡΗ ΚΑΙ ΤΑ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑ

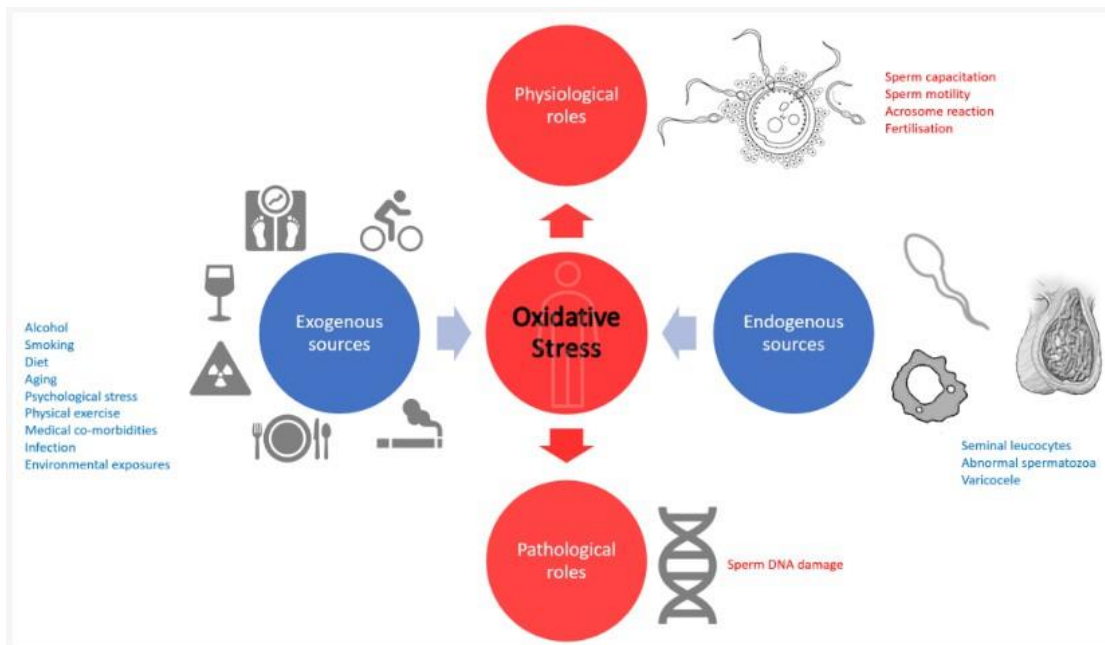
Η παραγωγή των ελεύθερων ριζών οξυγόνου (ROS), που παράγονται κυρίως από λευκοκύτταρα και ανώριμα σπερματοζωάρια στην ανδρική ουρογεννητική οδό, επηρεάζεται από έναν αριθμό κλινικών συνθηκών συμπεριλαμβανομένων της λοίμωξης ή φλεγμονής, κισσοκήλη, κρυφορχία, στρέψη των όρχεων και τοξική έκθεση. Η υπερπαραγωγή των ROS θα μπορούσε να οδηγήσει σε οξειδωτικό στρες (OS) στο σπερματικό υγρό. Πέντε τύποι αποτελούν εξωτερικές πηγές ROS: ο τρόπος ζωής, το περιβάλλον, η λοίμωξη, η ιατρογενής και οι όρχεις. Η επίδραση αυτών των στοιχείων στη δημιουργία σπερματικού ROS έχει αποτελέσει αντικείμενο πολλών ερευνών. Συγκεκριμένα, τα ROS εμπλέκονται στην ωρίμανση του μετα-ορχικού σπέρματος. Η πυρηνική συμπύκνωση των σπερματοζωαρίων ενισχύεται μέσω της συμμετοχής τους στην κατασκευή δισουλφιδικών γεφυρών κατά τη διέλευση της επιδιδυμίδας(147).

Τα τελομερή είναι γνωστό ότι αποτελούν έναν από τους στόχους του οξειδωτικού στρες. Δεδομένης της αφθονίας καταλοίπων γουανίνης στα τελομερή, τα οποία είναι ευαίσθητα στο οξειδωτικό στρες και συνεπώς πιο πιθανό να προκαλέσουν βλάβη στο DNA του σπέρματος, η υπογονιμότητα είναι το αποτέλεσμα(148). Το μήκος των τελομερών είναι γνωστό ότι ποικίλλει μεμονωμένα και μειώνεται κατά τη διάρκεια διακοπής της δράσης της τελομεράσης μετά από κάθε κυτταρική διαίρεση, που τελικά προκαλεί αντιγραφική γήρανση. Ωστόσο, εκτός από το μέσο μήκος των τελομερών, το ποσοστό των βραχέων τελομερών είναι το μόνο στοιχείο που απαιτείται για την πρόβλεψη του προσδόκιμου ζωής(78).

Τα μακρύτερα τελομερή τυπικά θεωρούνται να είναι συνδεδεμένα με τη μακροζωία και να δρουν ως προστασία έναντι της διάβρωσης που είναι αποτέλεσμα επαναλαμβανόμενης κυτταρικής διαίρεσης.

Μια επαναστατική θεωρία που προτάθηκε είναι ότι το ήπιο OS που προκαλείται από την πατρική γήρανση οδηγεί σε μια προσαρμοστική επέκταση των τελομερών στην αρσενική βλαστική σειρά, δίνοντας στα αναπτυσσόμενα σπερματοζωάρια και στους απογόνους κάποιο επίπεδο προστασίας από ένα στρεσογόνο περιβάλλον(149). Λόγω του γεγονότος ότι η τελομεράση είναι ακόμα ενεργή σε αυτά τα κύτταρα είναι εφικτή η ανάπτυξη της αρσενικής γαμετικής σειράς(150). Η απώλεια δράσης της τελομεράσης σε αυτό το σημείο στην ανάπτυξη εμποδίζει τα ώριμα σπερματοζωάρια να αναπτύξουν μια προσαρμοστική, επιμήκυνση των τελομερών σε απόκριση στο OS.

Το κάπνισμα, το ποτό, η έκθεση σε τοξίνες και η παχυσαρκία είναι ορισμένοι παράγοντες που επηρεάζουν την ανδρική υπογονιμότητα. Αρκετές μελέτες έχουν ανακαλύψει τη σχέση μεταξύ των προαναφερθέντων παραμέτρων και της ακεραιότητας του STL. Αυτοί οι περιβαλλοντικοί παράγοντες αυξάνουν σημαντικά την εμφάνιση των ROS όταν συνδυάζονται με την προχωρημένη ηλικία. Λόγω των επαναλαμβανόμενων μοτίβων και του υψηλού περιεχομένου σε γουανίνη, τα τελομερή είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στην οξειδωτική βλάβη, που καταλήγουν στο σχηματισμό 8-οξο-2-δεοξυγουανοσίνης (8-οξο-dG)(151). Έρευνα που διεξήχθη in vitro υποδεικνύει ότι οι οξειδωτικές προσβολές είναι η πιθανή αιτία διάσπασης της ακεραιότητας των τελομερών και της βράχυνσής τους. Οι ιστόνες ενδέχεται να είναι ιδιαίτερα ευαίσθητες στην οξειδωτική επίδραση όταν διατηρούνται σε τελομερικούς τόπους καθώς έχουν χαμηλή περιεκτικότητα σε δισουλφιδικούς δεσμούς(151).



Εικόνα 14 Το οξειδωτικό στρες επηρεάζεται από μια πληθώρα παραγόντων. Τέτοιοι παράγοντες μπορεί να είναι είτε εξωγενείς (αλκοόλ, κάπνισμα, διαίτα, γήρανση, κλπ.) είτε ενδογενείς (κιρσοκήλη, σπερματικά λευκοκύτταρα, ανώμαλα σπερματοζωάρια). Το οξειδωτικό στρες με τη σειρά του παίζει φυσιολογικό (χωρητικότητα και κίνηση σπερματοζωαρίου, ακρωσμική αντίδραση, γονιμοποίηση) και παθολογικό ρόλο (βλάβη DNA σπερματοζωαρίου).

Η σύνδεση μεταξύ του οξειδωτικού στρες και του μήκους των τελομερών του σπέρματος έχει εν μέρη μελετηθεί. Είναι ευρέως γνωστό ότι το οξειδωτικό στρες συμβάλει σημαντικά στη βράχυνση των τελομερών των σωματικών κυττάρων. Αναστέλλοντας τη μη τυχαία ανακατάταξη των χρωμοσωμάτων των θηλαστικών στον πυρήνα του σπέρματος, το οξειδωτικό στρες έχει αντίκτυπο στο πακετάρισμα της χρωματίνης του

σπέρματος(152). Αυξημένα σήματα τελομεράσης στον πυρήνα προκαλούνται λόγω μίας έλλειψης συμπύκνωσης χρωματίνης(87). Εξελικτικά συντηρημένα μονοπάτια επηρεάζουν τη διαδικασία της γήρανσης με συγκεκριμένους τρόπους, με συνολικά εννέα να έχουν προταθεί μέχρι στιγμής. Η γενωμική αστάθεια, η διάβρωση των τελομερών και επιγενετικές αλλαγές είναι τα πιο προφανή σημάδια γήρανσης και εμφανίζουν έναν βαθμό ταύτισης ή σύνδεσης(153). Αυτό φαίνεται λογικό ότι η αξιολόγηση της τελομεράσης παίζει ρόλο στην πρόβλεψη της παρουσίας σπερματοζωαρίων των όρχεων σε αζωοσπερμικούς άνδρες με κισσοκήλη (δηλαδή, που είναι γνωστό ότι προκαλεί έντονο οξειδωτικό στρες).

Η δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων είναι ακόμα ένα σημάδι γήρανσης, και καθώς τα κύτταρα έχουν τόσο πυρηνικό όσο και μιτοχονδριακό γονιδίωμα, αυτό είναι επίσης στενά συνδεδεμένο με τη γενωμική αστάθεια. Τα οργανίδια που παράγουν την πλειονότητα του ενδοκυτταρικού ROS είναι τα μιτοχόνδρια. Σύμφωνα με τη θεωρία των ελεύθερων ριζών, τα ROS προκαλούν βλάβη από την οξείδωση του DNA τόσο σε μιτοχονδριακούς όσο και σε πυρηνικούς ιστούς, γεγονός που οδηγεί σε συσσώρευση μεταλλάξεων που τελικά οδηγούν στη γήρανση(154).

Ωστόσο, είναι γενικά γνωστό ότι αυτή η ιδέα είναι υπεραπλουστευμένη επειδή τα ROS μπορούν να πυροδοτήσουν αντισταθμιστικές οδούς που θα μπορούσαν να αναιρέσουν τις επιβλαβείς επιπτώσεις τους. Καθώς η ποσότητα μιτοχονδριακού DNA είναι ένας συγκεκριμένος προγνωστικός δείκτης του αριθμού των μιτοχονδρίων ανά κύτταρο, η αντίστοιχη συγκέντρωση είναι ενδεικτική κυτταρικής βιοενεργειακής ικανότητας που συνδέεται επίσης με την υπογονιμότητα. Εκτός από τη μιτοχονδριακή ποσότητα, η ακεραιότητα είναι εξίσου σημαντική για την υπογονιμότητα.

3.7.1 ANΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ, ΤΕΛΟΜΕΡΑΣΗ ΚΑΙ ΑΝΔΡΙΚΗ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑ

Πράγματι, το ROS είναι ένας βασικός παράγοντας στο 30 έως 80% των περιπτώσεων ανδρικής υπογονιμότητας. Η μειωμένη δυνατότητα αναπαραγωγής έχει συνδεθεί με την υπερβολική παραγωγή ROS και OS. Τόσο το ROS όσο και το OS έχουν συνδεθεί με τον κατακερματισμό του DNA του σπέρματος (Sperm DNA Fragmentation, SDF), μειωμένη ανάπτυξη και γονιμοποίηση εμβρύων, χαμηλά ποσοστά εμφύτευσης, υψηλά ποσοστά αποβολών και απώλεια εγκυμοσύνης(58).

Προκειμένου να διατηρηθεί η κανονική λειτουργία των κυττάρων, πολλά αντιοξειδωτικά συστατικά πρέπει να υπάρχουν στις σωστές ποσότητες σε κάθε κυτταρικό τύπο κυττάρου, αλλά αυτές οι απαιτήσεις ποικίλλουν ανάλογα με τον τύπο κυττάρου. Τα αντιοξειδωτικά αντιμετωπίζουν τον κίνδυνο να θέσουν τους ασθενείς σε μειωτικό στρες, το οποίο θα μπορούσε να βλάψει τη γονιμότητά τους, εάν χορηγηθούν σε άτομα που δεν

αντιμετωπίζουν οξειδωτική επίθεση. Ένα παράδειγμα μεταξύ πολλών, αποτελεί το εύρημα ότι η χορήγηση αντιοξειδωτικών βιταμινών, ψευδάργυρου και σεληνίου σε άνδρες με υψηλά επίπεδα βλάβης του DNA στα σπερματοζώαρια τους προκάλεσε μειωτικό στρες, το οποίο μπορεί να χαρακτηριστεί από μια δραματική αποσυμπύκνωση της χρωματίνης του σπέρματος. Αυτό πιθανότατα προκλήθηκε από τη μείωση των δισουλφιδικών γεφυρών στο δίκτυο πρωταμίνης που σταθεροποιούν τον πυρήνα του σπέρματος(58).

Αν η ομοιοστατική ισορροπία μεταξύ αντιοξειδωτικών και ROS δε διακοπεί, το ανδρικό αναπαραγωγικό σύστημα θα επηρεαστεί αρνητικά, οδηγώντας στην εμφάνιση διαταραχών του σπέρματος. Το ROS έχει βρεθεί ότι έχει επιβλαβείς επιδράσεις στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα, στις κυτταρικές μεμβράνες και στα αποπτωτικά μονοπάτια, όχι μόνο στο σπέρμα. Η συσχέτιση που περιλαμβάνει υψηλά ποσοστά παραγωγής ROS και SDF είναι επωφελής καθώς το μέτριο επίπεδο SDF προκύπτει από την υπερβολική παραγωγή ROS(64). Μειώνοντας την ενδοκυτταρική παραγωγή ROS, ενισχύοντας τη μιτοχονδριακή αναπνευστική δραστηριότητα και λειτουργία και αποτρέποντας τον κυτταρικό θάνατο που προκαλείται από ROS μέσα στα μιτοχόνδρια, η ανθρώπινη TERT (hTERT) προστατεύει τα κύτταρα από τη θνησιμότητα που προκαλείται από το OS. Η πυρηνική hTERT κατευθύνεται στα μιτοχόνδρια λόγω του χαμηλού στρες και της δημιουργίας ROS μέσω μιας N-τερματικής αλληλουχίας οδηγού.

Ο Majzoub και οι συνεργάτες αξιολόγησαν την κατάσταση οξείδωσης του σπέρματος (Oxidation Reduction Potential, ORP) και το SDF σε σχέση με τη μορφολογία του σπέρματος. Συγκεκριμένα, οι ανωμαλίες της κεφαλής του σπέρματος ήταν πολύ πιο συχνές σε υπογόνιμους άνδρες παρά σε γόνιμους (54% έναντι 48%). Επιπλέον, υπάρχουν θετικές συνδέσεις μεταξύ των ORP και SDF με ελαττώματα της κεφαλής του σπέρματος. Η κινητικότητα και η βιωσιμότητα του σπέρματος συσχετίστηκαν αρνητικά με το ROS και το SDF(65).

Η αντιοξειδωτική ικανότητα των υπογόνιμων ανδρών και ο SDF φαίνεται να συσχετίζονται θετικά. Η κίρσοκλήλη είναι το κύριο παράδειγμα που χρησιμοποιείται για την απεικόνιση της ιδέας του SDF που προκαλείται από το ROS. Σε μια σχετική μελέτη, έγινε αξιολόγηση των τελομερών του σπέρματος και των λευκοκυττάρων σε υπογόνιμους άνδρες με κίρσοκλήλη και αποκάλυψαν τη σχέση μεταξύ αυτών των δύο μετρήσεων με το οξειδωτικό στρες και τις λειτουργικές δοκιμασίες σπέρματος(66). Σύμφωνα με μελέτη που πραγματοποιήθηκε από άλλη ερευνητική ομάδα, βασισμένη σε στείρα αρσενικά με OS και κίρσοκλήλη, παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων του μονοξειδίου του αζώτου, της 8-υδροξυ-2'-δεοξυγουανωσίνης, της εξανοϋλ-λυσίνης και της υπεροξειδικής δισμουτάσης μετά από κίρσοκληκτομή(67).

Μια καλά ισορροπημένη διατροφή είναι συνήθως γνωστό ότι περιλαμβάνει αντιοξειδωτικά, μέταλλα και βιταμίνες. Ως εκ τούτου, φαίνεται σαν μια καλή στρατηγική

η χορήγηση αντιοξειδωτικών για τη μείωση των επιπέδων ROS και τη βελτίωση της ποιότητας του σπέρματος. Τα αντιοξειδωτικά ως θεραπευτικά, ωστόσο, εξακολουθούν να ερευνώνται για τα ακριβή πλεονεκτήματα, τις δυσμενείς επιπτώσεις και τη δοσολογία τους. Δεδομένου ότι τα αντιοξειδωτικά μπορούν να ληφθούν μέσω Διαδικτύου και χωρίς ιατρική συνταγή, θεωρούνται υγιεινά συμπληρώματα που είναι απολύτως φυσικά(68).

Επί του παρόντος, δεν υπάρχουν επαρκή στοιχεία που να υποστηρίζουν τη χρήση αντιοξειδωτικών συμπληρωμάτων, σύμφωνα με μια συναινετική δήλωση της Ευρωπαϊκής Εταιρείας Ανθρώπινης Εμβρυολογίας (ESHRE). Πρόσφατα στοιχεία δείχνουν ότι η βιταμίνη C και E, ο ψευδάργυρος, το φολικό οξύ και το σελήνιο είναι τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα εμπορικά συμπληρώματα. Ο παρακάτω πίνακας υπογραμμίζει τον μηχανισμό δράσης διαφόρων μη ενζυματικών αντιοξειδωτικών που περιλαμβάνονται στα συμπληρώματα υπογονιμότητας καθώς και την επίδρασή τους στις παραμέτρους του σπέρματος(69).

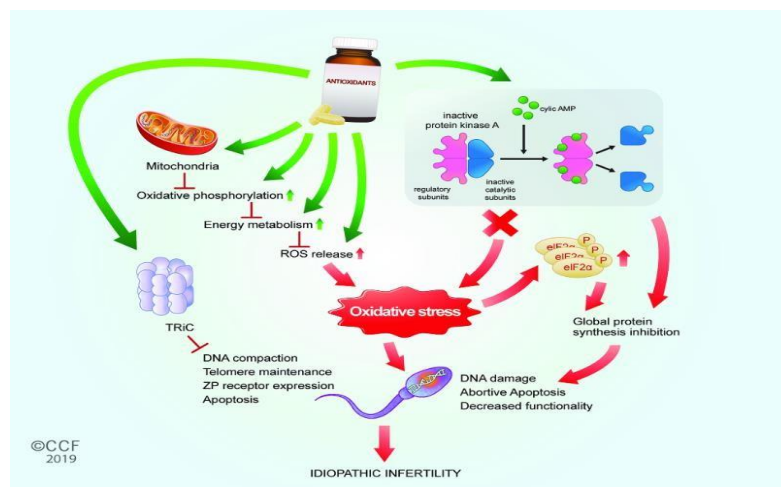
Πολυάριθμες μελέτες έχουν προσπαθήσει να καθορίσουν εάν η αντιοξειδωτική θεραπεία θα βελτιώσει τα χαρακτηριστικά του σπέρματος και, ως εκ τούτου, θα αυξήσει την ανδρική γονιμότητα. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι το SDF έχει ισχυρές επιπτώσεις στην ακεραιότητα του σπέρματος. Ο συνδυασμός αντιοξειδωτικής θεραπείας με L-καρνιτίνη, βιταμίνη C, συνένζυμο Q10, βιταμίνη E, ψευδάργυρο, φολικό οξύ, σελήνιο και βιταμίνη B12 έχει αυξήσει τα ποσοστά συγκέντρωσης σπέρματος και μειωμένο SDF σε άνδρες με χαμηλής ποιότητας κισσοκήλη. Επιπλέον, οι άνδρες που έχουν ασθενοζωοσπερμία, ολιγοζωοσπερμία, τερατοζωοσπερμία ή αυξημένες βασικές συγκεντρώσεις σπέρματος μπορεί να ωφεληθούν από τη χρήση καροτενοειδών λόγω του καλύτερου αριθμού σπέρματός τους και των υψηλότερων ποσοστών εγκυμοσύνης. Η συμπλήρωση με φυτοθεπτικά συστατικά βρέθηκε ότι αυξάνει τα επίπεδα SOD, καταλάσης και υπεροξειδωσης λιπιδίων στο σπέρμα στην ομάδα των ολιγοσπερμικών ανδρών(70).

Το OS έχει αρνητικό αντίκτυπο στην ακεραιότητα του σπέρματος και, κατά συνέπεια, στα αποτελέσματα της Τεχνολογία Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής (Assisted Reproduction Technology, ART). Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η εξωσωματική γονιμοποίηση και η μικρογονιμοποίηση (Intra-cytoplasmic Sperm Injection, ICSI) επηρεάζονται αρνητικά από τη μέτρηση ROS στο σπερματικό πλάσμα κατά τη σύλληψη(71). Η λήψη συμπληρωμάτων βιταμίνης E, ειδικά σε άνδρες με ιστορικό ανεπιτυχούς εξωσωματικής γονιμοποίησης, μπορεί να οδηγήσει σε καλύτερα αποτελέσματα εξωσωματικής γονιμοποίησης από ένα εικονικό φάρμακο. Επιπλέον, η συμπλήρωση συνενζύμου Q10 ενισχύει τη συγκέντρωση και την κινητικότητα του σπέρματος, γεγονός που οδηγεί σε επιτυχή ICSI(155).

Η ανδρική υπογονιμότητα προκαλείται περιστασιακά από το OS, το οποίο προκύπτει από την ανισορροπία των αντιοξειδωτικών και των ROS και οδηγεί σε υπερβολικό SDF και

ανώμαλες παραμέτρους του σπέρματος. Η υπερπαραγωγή ROS μπορεί να μειωθεί ως αποτέλεσμα της συμπλήρωσης αντιοξειδωτικών, η οποία μπορεί επίσης να βελτιώσει την ποιότητα του σπέρματος και να αυξήσει την πιθανότητα κλινικής εγκυμοσύνης, ζώντων γεννήσεων και μειωμένων ποσοστών αποβολών(72). Ωστόσο, συνιστάται ιδιαίτερα η διεξαγωγή σημαντικών, προσεκτικά σχεδιασμένων ελεγχόμενων με εικονικό φάρμακο μελετών για τον προσδιορισμό της ακριβούς επίδρασης των αντιοξειδωτικών συμπληρωμάτων στην ανδρική γονιμότητα.

Η κατανάλωση αντιοξειδωτικών έχει αποδειχθεί ότι εμποδίζει τη βράχυνση των τελομερών. Τα αντιοξειδωτικά χρησιμοποιούνται συχνά στη θεραπεία της ανδρικής υπογονιμότητας για την εξισορρόπηση του σπερματικού οξειδωτικού στρες. Σύμφωνα με τα ευρήματα μιας παγκόσμιας έρευνας, το 85,6% των γιατρών που θεραπεύουν την ανδρική υπογονιμότητα συνιστούν τα αντιοξειδωτικά ως μέρος της αγωγής τους. Η κατανάλωση αντιοξειδωτικών ενισχύει την ακεραιότητα του DNA του σπέρματος χωρίς αρνητικές επιπτώσεις ή προβλήματα, επιπλέον αυξάνει τις παραμέτρους του σπέρματος. Εκτός από αυτά τα πλεονεκτήματα, τα αντιοξειδωτικά μπορούν να αποτρέψουν τα σωματικά κύτταρα από το να χάσουν το μήκος των τελομερών τους. Τα αντιοξειδωτικά αλλάζουν τις πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη σηματοδότηση CREM (cAMP Responsive Element Modulator, CREM), τη μιτοχονδριακή δραστηριότητα και την οξείδωση των πρωτεϊνών σε υποκυτταρικό επίπεδο. Επιπλέον, έχει υποστηριχθεί ότι διεγείρουν τους αντιοξειδωτικούς αμυντικούς μηχανισμούς του σπέρματος. Τα αντιοξειδωτικά θεωρούνται ότι συμβάλλουν στη διατήρηση του μήκους των τελομερών καθ' όλη τη διάρκεια της ανάπτυξης μειώνοντας το οξειδωτικό κόστος της ανάπτυξης, καθώς τα τελομερή είναι ιδιαίτερα ευάλωτα σε βλάβες που προκαλούνται από το OS. Τα αντιοξειδωτικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν θεραπευτικά για να μειώσουν τα ROS και να ενισχύσουν την ποιότητα του σπέρματος που μπορεί, επίσης, να ωφελήσει τα τελομερή και την υπογονιμότητα(58).



Εικόνα 15 Επίδραση του αντιοξειδωτικού συμπληρώματος στο πρωτεϊνικό σπέρμα και η πορεία εμφάνισης ιδιοπαθούς υπογονιμότητας

ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

ΣΚΟΠΟΣ

Η υπογονιμότητα επηρεάζει το 13-15% των ζευγαριών παγκοσμίως. Είναι γεγονός ότι, περισσότερο από το 50% των υπογόνιμων ζευγαριών που χρησιμοποιούν ιατρικά υποβοηθούμενη αναπαραγωγή θεωρείται ότι έχουν πρόβλημα ανδρικού παράγοντα. Στη πλειονότητα των περιπτώσεων οι αλλοιωμένοι παράμετροι του σπέρματος οφείλονται σε ανωμαλίες του ουρογεννητικού συστήματος, όπως η δυσλειτουργία των όρχεων, η κισσοκήλη, οι λοιμώξεις των γεννητικών οργάνων και η έκθεση σε χημικές ουσίες. Κύριος απότοκος αυτών των ανωμαλιών η μειωμένη συγκέντρωση σπέρματος στο σπερματικό υγρό.

Έχει διαπιστωθεί ότι το μήκος των τελομερών αποτελεί δείκτη κυτταρικής γήρανσης και αναπαραγωγικής ωριμότητας. Τα τελομερή στα λευκοκύτταρα είναι διαφορετικά από αυτά στο σπέρμα ή στα ωάρια και δεν είναι συγκρίσιμα με κανένα από τα δύο. Με την αύξηση της ηλικίας του ανδρός το μήκος των τελομερών του σπέρματος αυξάνεται. Η θεραπευτική προσέγγιση για τη διαχείριση της υπογονιμότητας μπορεί να ενισχυθεί με την αξιολόγηση του μήκους των τελομερών στα αναπαραγωγικά κύτταρα. Όσον αφορά τη διάγνωση και την αξιολόγηση της ανδρικής και γυναικείας υπογονιμότητας, δεν έχουμε ακόμα αρκετές πληροφορίες για πιθανούς δείκτες.

Η ομοιόσταση των τελομερών μπορεί να υπάρχει όταν διατηρείται το ιδανικό μήκος τελομερών. Λόγω της απορρύθμισης των τελομερών, η μείωση μπορεί να είναι ακόμη πιο επιρρεπής σε σφάλματα, οδηγώντας σε ανεπαρκή χρωμοσωμικό διαχωρισμό και σε μεγαλύτερο ποσοστό ανευπλοειδίας. Το υπερβολικό βάρος και η παχυσαρκία έχουν γίνει μείζονες ανησυχίες για τη δημόσια υγεία παγκοσμίως ως αποτέλεσμα των αλλαγών στον σύγχρονο τρόπο ζωής, με ανησυχητικές αυξήσεις στα ποσοστά τέτοιων ατόμων στις βιομηχανικές χώρες.

Παγκοσμίως, το 13% των ενηλίκων είναι παχύσαρκοι και το 39% του πληθυσμού είναι υπέρβαρος, σύμφωνα με τα τελευταία στοιχεία. Το περιβάλλον και η γενετική παίζουν ρόλο στη μεταβολική διαταραχή γνωστή ως παχυσαρκία, η οποία επηρεάζει ολόκληρο το σώμα. Αυτή η μελέτη στοχεύει να προωθήσει τη γνώση των μοριακών μηχανισμών που κρύβονται πίσω από τη γήρανση και τις πιθανές επιπτώσεις του τρόπου ζωής και των μεταβολικών παραγόντων στην κυτταρική υγεία, διερευνώντας τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ αυτών των τριών μεταβλητών.

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι η μελέτη του μιτοχονδριακού περιεχόμενου, του σχετικού αριθμού αντιγράφων των μιτοχονδρίων καθώς και του λόγου μιτοχονδριακού προς πυρηνικού DNA σε τρεις κατηγορίες ανδρών με βάση το δείκτη μάζας σώματος: φυσιολογικοί, υπέρβαροι και παχύσαρκοι. Επίσης, προσδιορίστηκε το σχετικό μήκος των τελομερών και έγινε συσχέτιση αυτού με το μιτοχονδριακό περιεχόμενο και του λόγου μιτοχονδριακού προς πυρηνικού DNA ανάλογα με το δείκτη μάζας σώματος.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

4.1 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΣΥΜΜΕΤΕΧΟΝΤΩΝ ΚΑΙ ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ

Η παρούσα έρευνα μελέτησε 100 άνδρες οι οποίοι υποβλήθηκαν σε εξωσωματική γονιμοποίηση/ICSI. Η συλλογή των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε στη Μονάδα Γενετικής και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Μαιευτικής Γυναικολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων. Η συλλογή των δειγμάτων έγινε έπειτα από ενημέρωση και την έντυπη συγκατάθεση των δοτών με τη διαβεβαίωση για την ανωνυμία και την προστασία των προσωπικών στοιχείων.

Τα χαρακτηριστικά κάθε δείγματος σπέρματος προσδιορίστηκαν χρησιμοποιώντας τα κριτήρια του Kruger. Οι άνδρες στην ομάδα ελέγχου (control) είχαν φυσιολογικό δείκτη μάζας σώματος και φυσιολογικούς παραμέτρους σπέρματος που πληρούσαν τα πρότυπα κανονικότητας του Kruger. Εκτός από αυτές τις λεπτομέρειες, σημειώθηκαν, επίσης, ο αριθμός των σπερματοζωαρίων, η μορφολογία, η κινητικότητα, ο δείκτης κατακερματισμού του DNA και καταστάσεις όπως η κισσοκήλη, η χρήση φαρμάκων και το κάπνισμα.

Σύμφωνα με τα κριτήρια του Kruger, τα αυστηρότερα πρότυπα μορφολογίας του σπέρματος μπορεί να είναι ένας αξιόπιστος δείκτης υπογονιμότητας κατά τη διάρκεια της εξωσωματικής γονιμοποίησης (IVF). Ειδικότερα, η κεφαλή του σπέρματος πρέπει να έχει σχήμα οβάλ, κανονική και να έχει ένα λείο, σταθερό περίγραμμα. Επιπλέον, το ακρόσωμα πρέπει να είναι άθικτο. Επίσης, δεν επιτρέπονται ανωμαλίες στο μέσο και στην ουρά. Μια άλλη ένδειξη μορφολογικών ζητημάτων μπορεί να είναι οι λυγισμένες, οι πολυάριθμες ή οι κοντές ουρές καθώς και τα κουλουριασμένα, κυρτά ή ατημέλητα μεσαία κομμάτια. Τέλος, ένας υψηλός αριθμός κυτταροπλασματικών σταγονιδίων μπορεί να είναι σημάδι της ανωριμότητας του σπέρματος.

4.2 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΟΥ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ ΓΙΑ ΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ IN VITRO

Η συλλογή του σπέρματος γίνεται την ίδια μέρα που θα πραγματοποιηθεί η in vitro γονιμοποίηση και αφού έχει μεσολαβήσει ένα χρονικό διάστημα αποχής από σεξουαλική επαφή, κατά προτίμηση 3 – 5 ημέρες. Το σπερματικό υγρό, πλην των ζωντανών σπερματοζωαρίων, περιέχει στοιχεία όπως σπερματικό πλάσμα, νεκρά σπερματοζωάρια, λευκοκύτταρα, ερυθροκύτταρα, επιθηλιακά κύτταρα, μικροοργανισμούς, τα οποία αποτελούν ανασταλτικό παράγοντα της ενεργοποίησης των σπερματοζωαρίων. Η χρήση του σπέρματος στα πλαίσια της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής απαιτεί τη χρήση τεχνικών προετοιμασίας και καθαρισμού του σπέρματος που θα το καταστήσει κατάλληλο για γονιμοποίηση. Οι πιο συνηθισμένοι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται είναι ο διαχωρισμός με φυγοκέντρηση σε μέσω διαβαθμισμένων πυκνοτήτων (sperm gradient) και η τεχνική διαχωρισμού μέσω διαφορικής πλεύσης (swim up). Η επιλογή της μεθόδου εξαρτάται από το ιστορικό του ασθενούς, από την ποιότητα του σπέρματος και από τη μέθοδο γονιμοποίησης που θα ακολουθηθεί (IVF ή ICSI).

4.2.1 ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΜΕ ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΗΣΗ ΣΕ ΜΕΣΟ ΔΙΑΒΑΘΜΙΣΜΕΝΩΝ ΠΥΚΝΟΤΗΤΩΝ (SPERM GRADIENT)

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται σε δείγματα σπέρματος κακής ποιότητας, σε μορφολογία, κινητικότητα ή/και σε αριθμό. Η τεχνική στηρίζεται στο γεγονός ότι τα φυσιολογικά σπερματοζωάρια, τα ανώμαλα σπερματοζωάρια, καθώς και τα υπόλοιπα κύτταρα και βακτήρια που υπάρχουν στο σπέρμα, έχουν διαφορετικές πυκνότητες. Τα σπερματοζωάρια επιλέγονται με φυγοκέντρηση μέσω διαβαθμισμένων πυκνοτήτων. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι αναλυτικά η εξής:

- i. Το δείγμα, μετά τη συλλογή του, παραμένει στο θάλαμο βιολογικής ασφάλειας σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 20 λεπτά μέχρι να ρευστοποιηθεί.
- ii. Μεταφέρεται μια μικρή ποσότητα στη συσκευή υπολογισμού συγκέντρωσης Makler και εξετάζεται σε οπτικό μικροσκόπιο. Γίνεται έλεγχος του αριθμού των σπερματοζωαρίων, της μορφολογίας, της συγκέντρωσης και της κίνησης των σπερματοζωαρίων.
- iii. Σε ένα σωλήνα Falcon προσθέτουμε 2ml διαλύματος 80% πυκνότητας, στη συνέχεια 2ml διαλύματος 55% πάνω από το πρώτο διάλυμα και τέλος στην κορυφή μεταφέρουμε το δείγμα (55/80% Sperm Gradient, SupraSperm, Origio 10922060).
- iv. Γίνεται φυγοκέντρηση για 20 λεπτά στα 300 G. Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης, αφαιρούμε το υπερκείμενο και μεταφέρουμε το ίζημα των σπερματοζωαρίων σε νέο Falcon.
- v. Επαναιώρηση των σπερματοζωαρίων σε 2ml καλλιεργητικού μέσου (sperm medium) και φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στα 300 G.

- vi. Τέλος, ακολουθεί απομάκρυνση του υπερκείμενου και επαναιώρηση του ιζήματος ώστε να έχει την επιθυμητή συγκέντρωση σπερματοζωαρίων.

4.2.2 ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΜΕΣΩ ΔΙΑΦΟΡΙΚΗΣ ΠΛΕΥΣΗΣ (SWIM UP)

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται κατά κύριο λόγο σε δείγματα σπέρματος με φυσιολογική κινητικότητα (κινητά άνω του 60%, με καλή ή άριστη προωθητική ικανότητα 2 – 3 ώρες μετά την εκσπερμάτωση) και φυσιολογικό αριθμό σπερματοζωαρίων (20 – 200 εκατομμύρια/ml). Με την τεχνική αυτή συλλέγονται τα σπερματοζωάρια με την καλύτερη κινητικότητα. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής:

- i. Μετά τη συλλογή του, το δείγμα παραμένει στο θάλαμο βιολογικής ασφάλειας σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 20 λεπτά, μέχρι να ρευστοποιηθεί.
- ii. Μεταφέρεται μια μικρή ποσότητα στη συσκευή υπολογισμού συγκέντρωσης Makler και εξετάζεται στο οπτικό μικροσκόπιο. Ακολουθεί έλεγχος του αριθμού, της μορφολογίας, της συγκέντρωσης και της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων.
- iii. Το δείγμα τοποθετείται στον πυθμένα ενός σωλήνα (Falcon) των 15ml και προστίθεται καλλιεργητικό μέσο ειδικό για σπερματοζωάρια, αντίστοιχο όγκου (sperm medium preparation, Medicult media, Origio, Ref Num. 10695060A).
- iv. Ο σωλήνας τοποθετείται σε πλάγια θέση σε κλίβανο με CO₂ στους 37°C για μια ώρα. Τα κινητά σπερματοζωάρια θα κινηθούν προς την επιφάνεια του καλλιεργητικού μέσου.
- v. Στη συνέχεια μεταφέρουμε την υπερκείμενη ζώνη που έχει σχηματιστεί, στην οποία βρίσκονται συγκεντρωμένα τα πιο κινητά σπερματοζωάρια, σε νέο σωλήνα τύπου Falcon, προσθέτουμε 2ml καλλιεργητικού μέσου ειδικού για σπερματοζωάρια και ακολουθεί φυγοκέντρωση για περίπου 20 λεπτά στα 200 G.
- vi. Τέλος, γίνεται απομάκρυνση του υπερκείμενου και επαναιώρηση του ιζήματος ώστε να περιέχει την επιθυμητή συγκέντρωση σπερματοζωαρίων.

4.3 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ

Για την ορθή αξιολόγηση των παραμέτρων του σπέρματος, όπως η κινητικότητα, η μορφολογία, ο αριθμός των σπερματοζωαρίων και ο κατακερματισμός του DNA χρειάστηκε το δείγμα σπέρματος να είναι φρέσκο. Μέσα σε μία ώρα από την εκσπερμάτωση, τα δείγματα εξετάστηκαν χρησιμοποιώντας το σύστημα Computer Aided Semen Analysis (CASA) για να μετρηθεί με ακρίβεια η κινητικότητα. Για την ανάλυση, χρησιμοποιήσαμε το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο Zeiss® Lab.A1, μια κάμερα BASLER®, Jena,

Γερμανία και το λογισμικό CASA SPERM CLASS ANALYZER (SCA) SCA 6 Evolution από τη Microptic Automatic Diagnostic Systems SL (Βαρκελώνη, Ισπανία). Τα δείγματα στη συνέχεια καταψύχθηκαν σε θερμοκρασία -20 °C για αποθήκευση. Δεδομένου ότι η κατάψυξη δεν επηρεάζει την ποιότητα του DNA, τα δείγματα δεν χρειάζεται να είναι φρέσκα για την εξαγωγή του DNA.

4.4 ΕΚΧΥΛΙΣΗ DNA ΑΠΟ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΑ

Η εξαγωγή του DNA έγινε από το αρχικό δείγμα, αφού παρέμεινε σε θερμοκρασία είτε δωματίου είτε 37°C μέχρι να ρευστοποιηθεί (περίπου 30 λεπτά). Η εξαγωγή DNA έγινε σύμφωνα με το QIAmp Mini kit της Qiagen με ορισμένες τροποποιήσεις. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν συνοπτικά η ακόλουθη:

1. Προσθήκη 100μl σπέρματος από το δείγμα σπέρματος, σε σωληνάριο erpendorf 1,5 ml
2. Προσθήκη 10 μl πρωτεϊνάσης K και 100-200μl διαλύματος X (20 mM Tris·Cl (pH 8.0), 20 mM EDTA, 200 mM NaCl, 80 mM DTT, 4% SDS).
3. Ανάδευση για 15 δεύτερα σε vortex και επώαση στους 56°C για τουλάχιστον 1 ώρα μέχρι το διάλυμα να γίνει διαυγές. Κατά τη διάρκεια της επώασης γίνονταν συχνές αναδεύσεις σε vortex.
4. Φυγοκέντρηση για λίγα δευτερόλεπτα, για την απομάκρυνση σταγόνων από το πώμα του σωληναρίου erpendorf.
5. Προσθήκη 200μl διαλύματος AL και 200μl απόλυτης αιθανόλης (96 – 100% EtOH) και ανάδευση σε vortex για 45 δεύτερα.
6. Φυγοκέντρηση για λίγα δευτερόλεπτα, για την απομάκρυνση σταγόνων από το πώμα του σωληναρίου.
7. Το μείγμα μεταφέρεται στη στήλη διαχωρισμού (QIAmp Mini spin) η οποία τοποθετείται σε σωληνάριο συλλογής 2ml.
8. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα $\geq 6000 \times g$ για 1 λεπτό. Ακολουθεί απόρριψη του δοχείου συλλογής και τοποθέτησης ενός καινούριου (περιλαμβάνεται στο kit).
9. Προσθήκη 500 μl ρυθμιστικού διαλύματος AW1 στη στήλη διαχωρισμού και φυγοκέντρηση στα $\geq 6000 \times g$ για 1 λεπτό. Ακολουθεί απόρριψη του δοχείου συλλογής και τοποθέτησης ενός καινούριου (περιλαμβάνεται στο kit).
10. Προσθήκη 500μl ρυθμιστικού διαλύματος AW2 στη στήλη διαχωρισμού και φυγοκέντρηση στα $\geq 2000 \times g$ για 3 λεπτά. Ακολουθεί απόρριψη του δοχείου συλλογής και τοποθέτησης σε αποστειρωμένο σωληνάριο erpendorf 1.5ml (δεν περιλαμβάνεται στο kit).

11. Προσθήκη 80μl ρυθμιστικού διαλύματος ΑΕ, επώαση για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (20 - 25 ο C) και ακολουθεί φυγοκέντρηση στα $\geq 6000 \times g$ για 1 λεπτό.
12. Η στήλη διαχωρισμού απορρίπτεται και το σωληνάριο με το γενωμικό DNA αποθηκεύεται.

4.5 ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ DNA ΠΟΥ ΑΠΟΜΟΝΩΘΗΚΕ

Το γενωμικό DNA που απομονώθηκε ποσοτικοποιήθηκε με φασματοφωτόμετρο NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) για τη μέτρηση της καθαρότητας και των συγκεντρώσεων. Η καθαρότητα του DNA αξιολογήθηκε με μέτρηση της αναλογίας A260/A80 μέσω φασματοσκοπίας για την ανάλυση του DNA.

4.6. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΥ, ΣΧΕΤΙΚΟΥ ΑΡΙΘΜΟΥ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΩΝ ΚΑΙ ΛΟΓΟΥ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟΥ ΠΡΟΣ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ DNA

Η ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (qPCR) χρησιμοποιήθηκε για την αξιολόγηση αυτών των παραμέτρων. Για κάθε αντίδραση, συνδυάσαμε 0,02–0,03μg εξαγόμενου DNA, 0,25μL από κάθε 10μM forward και reverse εκκινήτη, 5μL SYBR Green Master Mix (PowerUp SYBR Green Master Mix, Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, USA), 2,5μL απεσταγμένου νερού και συνολικός όγκος 10μL. Η αντίδραση διεξήχθη σε περιστροφικό αναλυτή Corbett Rotor-Gene 3000 Real-Time (Corbett Research, Sydney, Αυστραλία) υπό τις ακόλουθες συνθήκες κύκλου: 50 °C για 2 λεπτά, 95 °C για 2 λεπτά, ακολουθούμενο από 40 κύκλους μετουσίωσης στους 95°C για 15 δευτερόλεπτα και στους 60°C για 1 λεπτό. Κάθε δείγμα εξετάστηκε εις διπλούν.

Οι εκκινήτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τόσο πυρηνικοί όσο και μιτοχονδριακοί. Το γονίδιο ανθρώπινης ισομερούδρολάσης ρετινοειδούς (RPE65) χρησίμευσε ως το γονίδιο αναφοράς πυρηνικού DNA για τον ποσοτικό προσδιορισμό του πυρηνικού DNA ενώ για τον ποσοτικό προσδιορισμό του μιτοχονδριακού DNA μια περιοχή που αντιστοιχεί σε ένα τμήμα του μιτοχονδριακά παραγόμενου RNA. Οι αλληλουχίες των εκκινήτων αποτυπώνονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 2 Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζεται η αλληλουχία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ποσοτικοποίηση του πυρηνικού και του μιτοχονδριακού DNA.

Ζεύγος εκκινητών	Αλληλουχία εκκινητών	Αμπλικόνιο ζεύγη βάσεων (bp)	Tm
Πυρηνική περιοχή (γονίδιο RPE)	Forward 5'-ATAGGAAGCCAGAGAAGAGAGACT-3'	200	60 °C
	Reverse 5'-TCTATCTCTGCGGACTTTGAGCAT-3'		
Μιτοχονδριακή περιοχή	Forward 5'-TAGAGGAGCCTGTTCTGTAATCG-3'	205	59 °C
	Reverse 5'-TAAGGGCTATCGTAGTTTTCTGG-3'		

Η σχετική περιεκτικότητα μιτοχονδριακού DNA ανά δείγμα σπέρματος προσδιορίστηκε στη συνέχεια χρησιμοποιώντας την τεχνική ΔΔCt, η οποία εξηγείται παρακάτω, για τον υπολογισμό της αναλογίας mtDNA προς nDNA.

Επιλέξαμε μια ομάδα ελέγχου και εφαρμόσαμε τις τιμές του κατωφλίου του κύκλου Ct ως εξής για τη σχετική ποσοτικοποίηση (γνωστή και ως «**μέθοδος ΔΔCt**»)(156,157):

4.6.1. ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΔCt ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΗΣ ΣΧΕΤΙΚΗΣ ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟΥ DNA

(α) Αφαιρώντας τη μέση τιμή του μιτοχονδριακού Ct από τη μέση τιμή του πυρηνικού Ct για κάθε δείγμα, όπως υποδεικνύεται $\Delta Ct = mtDNA - nDNA$.

(β) Η μέση τιμή ΔCt για την ομάδα ελέγχου, η οποία στην περίπτωση αυτή αποτελούνταν από άνδρες με φυσιολογικό δείκτη μάζας σώματος (18,5 έως 24,9 kg/m²) και φυσιολογικά χαρακτηριστικά σπέρματος.

(γ) Το ΔΔCt για κάθε δείγμα αφαιρώντας το ΔCt της ομάδας ελέγχου από τη μέση ΔCt του δείγματος, δηλαδή $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ ενός συγκεκριμένου δείγματος} - \Delta Ct \text{ της ομάδας ελέγχου}$ (157).

(δ) Εφαρμόζοντας τον τύπο $2^{-\Delta\Delta Ct}$, η διαφορά διπλασιασμού, αντιστοιχεί στο μιτοχονδριακό περιεχόμενο βάσει βιβλιογραφίας.

Οι τιμές ΔΔCt για κάθε δείγμα υπολογίζονται αφαιρώντας το ΔCt της ομάδας ελέγχου από τη μέση ΔCt του δείγματος ή $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ ενός συγκεκριμένου δείγματος} - \Delta Ct \text{ της ομάδας ελέγχου}$. Ως ομάδα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν άνδρες με φυσιολογικό δείκτη μάζας σώματος (18,5 έως 24,9 kg/m²) και φυσιολογικές παραμέτρους σπέρματος. Οι ισοδύναμες τιμές (μέση SD) ήταν οι εξής: για άνδρες με φυσιολογικό δε και μη

φυσιολογικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά σπέρματος (για άνδρες που ήταν υπέρβαροι και είχαν φυσιολογικά και μη φυσιολογικά χαρακτηριστικά σπέρματος και για άνδρες που ήταν παχύσαρκοι).

4.6.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΣΧΕΤΙΚΟΥ ΜΗΚΟΥΣ ΤΩΝ ΤΕΛΟΜΕΡΩΝ

Η μέση τιμή μήκους τελομερούς ενός πληθυσμού ανθρώπινων κυττάρων μπορεί να μετρηθεί απευθείας χρησιμοποιώντας το Absolute Human Telomere Length Quantification qPCR Assay Kit (AHTLQ) της ScienCell. Η αναγνώριση και η ενίσχυση των τελομερικών αλληλουχιών βασίζεται στη δράση του ζεύγους κατάλληλων εκκινητών. Η κανονικοποίηση των δεδομένων επιτεύχθηκε χρησιμοποιώντας το ζεύγος εκκινητών αναφοράς ενός αντιγράφου (Single Copy Reference, SRC), το οποίο αναγνωρίζει και ενισχύει την περιοχή του ανθρώπινου χρωμοσώματος 17 των 100 ζευγών βάσεων.

Μια ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση του απόλυτου μήκους τελομερούς. Κάθε δείγμα γενωμικού DNA χρησιμοποιήθηκε σε δύο ξεχωριστές διαδικασίες qPCR, η μία χρησιμοποιώντας διάλυμα εκκινητή τελομερούς και η άλλη χρησιμοποιώντας διάλυμα εκκινητή SCR. Χρησιμοποιήσαμε τα ακόλουθα συστατικά σε κάθε αντίδραση: 0,5–0,5ng/μL γενωμικού DNA, 2μL διαλύματος εκκινητή (Telomere ή SCR), 10μL κύριου μίγματος 2X GoldNStart TaqGreen qPCR, 7μL νερού χωρίς νουκλεάση σε τελικό όγκο 20μL. Η αντίδραση διεξήχθη σε περιστροφικό αναλυτή Corbett Rotor-Gene 3000 Real-Time (Corbett Research, Sydney, Australia) χρησιμοποιώντας τις συνθήκες κύκλου που αναφέρονται παρακάτω: αρχική μετουσίωση στους 95°C για 10 λεπτά, ακολουθούμενη από 32 κύκλους μετουσίωσης σε 95°C για 20 δευτερόλεπτα, αποδιάταξη στους 52 °C για 20 δευτερόλεπτα και επέκταση στους 72 °C για 45 δευτερόλεπτα. Μετά τη συλλογή δεδομένων, πραγματοποιήθηκε διατήρηση στους 25°C για 1 λεπτό.

4.6.2.1 ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΟΣΟΤΙΚΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ: ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΔCq ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΟ ΚΙΤ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΑΗΤLQ

1. Η διαφορά στον αριθμό των κύκλων ποσοτικοποίησης των τελομερών (TEL) μεταξύ των δειγμάτων γενωμικού DNA-στόχου και αναφοράς είναι γνωστή ως Cq (TEL).
2. $\Delta Cq (TEL) = Cq (TEL, \text{δείγμα στόχου}) - Cq (TEL, \text{δείγμα αναφοράς})$.
3. Για αναφορές ενός αντιγράφου, Cq (SCR) είναι ο αριθμός των κύκλων ποσοτικοποίησης που διαφέρουν μεταξύ των δειγμάτων γενωμικού DNA αναφοράς και στόχου.
4. $\Delta \Delta Cq = \Delta Cq (TEL) - \Delta Cq (SCR)$

5. Το σχετικό μήκος τελομερών του δείγματος στόχου προς το δείγμα αναφοράς (πτυχίο) = $2^{-\Delta\Delta Cq}$

4.7 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η συσχέτιση μεταξύ των δύο μεταβλητών σε κάθε περίπτωση (μιτοχονδρίου, τελομερών) αξιολογήθηκε στατιστικά χρησιμοποιώντας τον συντελεστή συσχέτισης Spearman. Για την ανάλυση των δεδομένων μεταξύ των υπό μελέτη ομάδων χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό λογισμικό SPSS. Η κατεύθυνση και ο συντελεστής συσχέτισης (r_s) μεταξύ των μεταβλητών που φαίνονται στο γράφημα αναφέρονται αριθμητικά στην ανάλυση. Τα υπολογιστικά φύλλα Microsoft Excel χρησιμοποιήθηκαν για την οργάνωση των δεδομένων εξαγωγής, των αριθμών αντιγράφων μιτοχονδριακού DNA, το σχετικό μήκος των τελομερών και των ρυθμών Ct για τη δημιουργία γραφημάτων. Η στατιστική σημασία ορίστηκε ως $p < 0,05$.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

5.1 ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ, ΣΧΕΤΙΚΟΣ ΑΡΙΘΜΟΣ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΩΝ ΚΑΙ ΑΝΑΛΟΓΙΑ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟΥ ΠΡΟΣ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ DNA

Οι τρεις ομάδες συμμετεχόντων χωρίστηκαν σύμφωνα με το δείκτη μάζας σώματος. Τριάντα από τους άνδρες είχαν φυσιολογικό δείκτη μάζας σώματος (από 18 έως 24,9 kg/m²), τριάντα οκτώ άνδρες ήταν υπέρβαροι (από 25 έως 29,9 kg/m²) και τριάντα δύο άνδρες ήταν παχύσαρκοι (κατηγορία I και II). με δείκτη μάζας σώματος μεγαλύτερο από 30 kg/m². Ο παρακάτω πίνακας εμφανίζει την ηλικία, τον αριθμό των συμμετεχόντων που εξετάστηκαν σε κάθε ομάδα, καθώς και ορισμένες παραμέτρους σπέρματος όπως η κινητικότητα, ο αριθμός των σπερματοζωαρίων και η μορφολογία.

Πίνακας 3 Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα χαρακτηριστικά και οι παράμετροι του σπέρματος των ανδρών που συμμετείχαν σε αυτή τη μελέτη.

Χαρακτηριστικά σπέρματος	Φυσιολογικοί	Υπέρβαροι	Παχύσαρκοι	p-Values
Αριθμός συμμετεχόντων	30	38	32	
Ηλικία, CI 95%	32.5 ± 4.93	36.73 ± 5.614	30 ± 3.099	2.39 × 10 ⁻²⁴
Κινητικότητα A+B (%), CI 95%	43.93 ± 6.1	40.33 ± 5.0	43.00 ± 3.6	5.26 × 10 ⁻¹²
Αριθμός σπερματοζωαρίων εκατομμύρια/mL, CI 95%	36.68 ± 1,421	25.04 ± 1,1137	89 ± 2,2742	0.0068
Μορφολογία (%), CI 95%	13.38 ± 4.6	10.14 ± 6.8	10.00 ± 5.0	2.32 × 10 ⁻¹⁰

Τα παρακάτω γραφήματα απεικονίζουν την κατανομή α. μιτοχονδριακού περιεχομένου, β. τον σχετικό αριθμό αντιγράφου του μιτοχονδριακού DNA, καθώς και γ. την αναλογία μιτοχονδριακού προς πυρηνικό DNA για τις τρεις υπό μελέτη ομάδες, φυσιολογικό, υπέρβαρο και παχύσαρκο.

Το μέσο μιτοχονδριακό περιεχόμενο, ο σχετικός αριθμός αντιγράφων mtDNA και η προοδευτική κινητικότητα σε κάθε υπό μελέτη ομάδα (φυσιολογική, υπέρβαρη και παχύσαρκτη) παρουσιάζονται γραφικά. Σε σύγκριση με τις άλλες ομάδες, η φυσιολογική ομάδα εμφάνισε υψηλότερα επίπεδα περιεκτικότητας σε mtDNA και προοδευτική κινητικότητα. Σύμφωνα με τον σχετικό αριθμό αντιγράφων mtDNA σε σύγκριση με τις τρεις κατηγορίες, το ποσοστό της υπέρβαρης ομάδας ήταν σχεδόν διπλάσιο από αυτό της φυσιολογικής ομάδας και τρεις φορές υψηλότερο από αυτό της παχύσαρκης ομάδας. Επιπλέον, παρατηρούμε ότι οι γραμμές σφαλμάτων εμφανίζουν επίσης αρνητικούς αριθμούς. Δεν υπάρχουν αρνητικές τιμές για τον σχετικό αριθμό αντιγράφων των

μιτοχονδρίων. Το γεγονός ότι η γραμμή σφάλματος για το υπερβολικό βάρος είναι αρνητική υποδηλώνει ότι τα δεδομένα μας είναι κάπως μεταβλητά και ότι ο πραγματικός μέσος όρος πληθυσμού μπορεί να είναι χαμηλότερος από τον μέσο όρο του δείγματος.

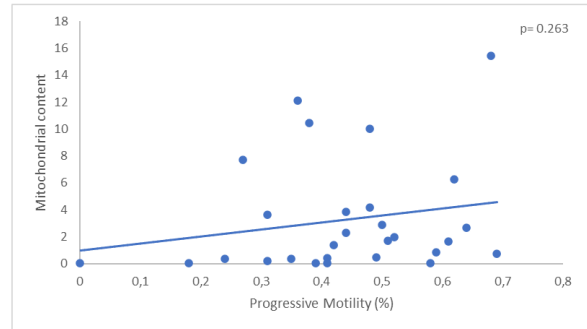
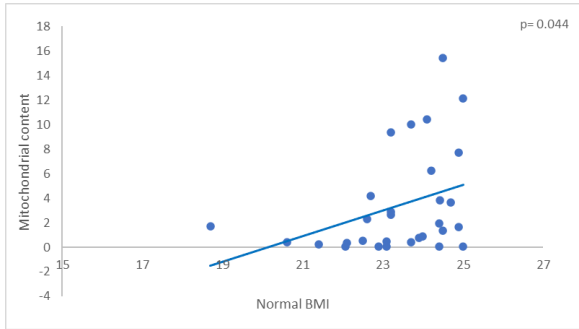
5.1.1 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΟΥ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΥ

Τα τελευταία χρόνια έχει υπάρξει μια αύξηση στις επιστημονικές αναφορές σχετικά με τη συσχέτιση μεταξύ του μιτοχονδριακού περιεχομένου σπέρματος και του δείκτη μάζας σώματος (ΔΜΣ). Τα μιτοχόνδρια είναι ζωτικά οργανίδια στα κύτταρα που κληρονομούνται από τη μητέρα μέσω του ωαρίου και είναι κρίσιμα για την παραγωγή ενέργειας. Η λειτουργία και η γονιμότητα του σπέρματος μπορεί να επηρεαστούν από αλλαγές στη μιτοχονδριακή σύνθεση του σπέρματος [18].

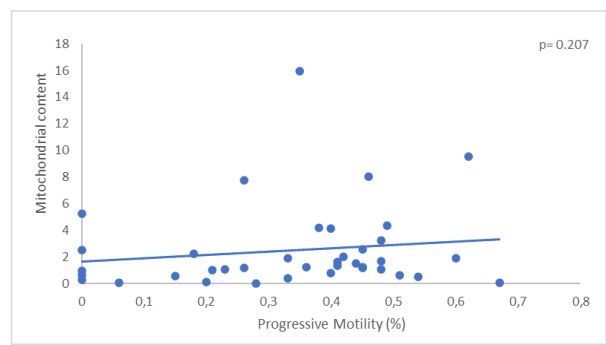
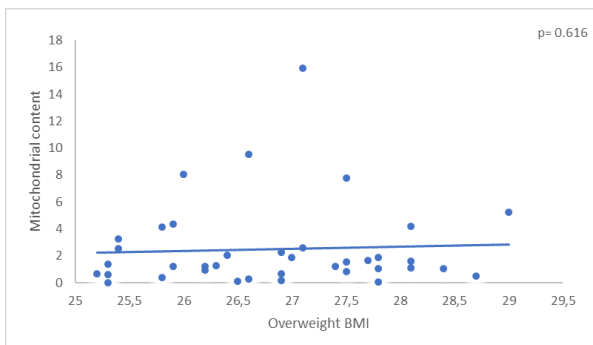
Οι μεταβολικές και ορμονικές αλλαγές που προκαλεί η παχυσαρκία πιστεύεται ότι συνδέονται με την επίδραση του ΔΜΣ στο μιτοχονδριακό περιεχόμενο του σπέρματος. Η παχυσαρκία μπορεί να προκαλέσει οξειδωτικό στρες και συστηματική φλεγμονή, τα οποία και τα δύο μπορεί να έχουν αντίκτυπο στις μιτοχονδριακές διεργασίες σε πολλούς ιστούς, συμπεριλαμβανομένου του σπέρματος. Μπορεί να υπάρχουν μεμονωμένες διαφορές στη συσχέτιση μεταξύ του ΔΜΣ και του μιτοχονδριακού φορτίου του σπέρματος. Η παχυσαρκία δεν οδηγεί πάντα σε αλλοίωση της μιτοχονδριακής σύνθεσης ή της γονιμότητας του σπέρματος [19].

Τα ευρήματα που σχετίζονται με την περιεκτικότητα σε μιτοχονδριακό DNA των ομάδων ΔΜΣ και την κινητικότητα στις τρεις εξεταζόμενες ομάδες φαίνονται παρακάτω. Το μιτοχονδριακό περιεχόμενο αυξάνεται στις τρεις ομάδες μελέτης καθώς αυξάνεται ο ΔΜΣ. Τα αποτελέσματα είναι στατιστικά σημαντικά, με τις αντίστοιχες τιμές p για τη φυσιολογική ($p = 0,044$, Εικόνα 1Α) ομάδα ($p = 0,014$, Εικόνα 3Α), ενώ για τους υπέρβαρους ($p = 0,616$, Εικόνα 2Α) και παχύσαρκους ($p = 0,148$, Εικόνα 3Α) τα αποτελέσματα δεν ήταν στατιστικά σημαντικά.

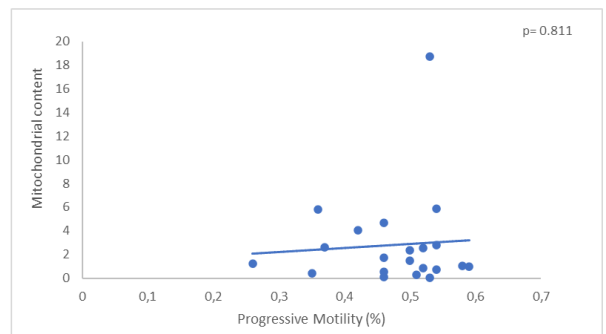
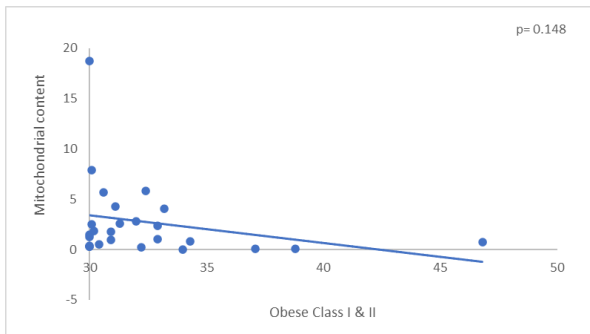
Επιπλέον, παρατηρήσαμε για το εάν η κινητικότητα του σπέρματος και η μιτοχονδριακή συγκέντρωση συνδέονται. Τα δεδομένα που βρήκαμε δεν ήταν στατιστικά σημαντικά σε καμία από τις τρεις υπό μελέτη ομάδες φυσιολογικών ($p = 0,263$, Εικόνα 1Β), υπέρβαρων ($p = 0,207$, Εικόνα 2Β) και παχύσαρκων ανδρών ($p = 0,811$, Εικόνα 3Β), αντίστοιχα.



Σχήμα 1 Αξιολόγηση περιεκτικότητας μιτοχondριακού DNA με το BMI (A) και την προοδευτική κινητικότητα (B) στην ομάδα ατόμων με φυσιολογικό BMI. Βρέθηκαν στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα μόνο για την πρώτη παράμετρο ($p = 0,044$ και $p = 0,263$, αντίστοιχα).



Σχήμα 2 Εκτίμηση της περιεκτικότητας του μιτοχondριακού DNA στην υπέρβαρη ομάδα σχετικά με το BMI ((A), $p = 0,616$) και την κινητικότητα A + B ((B), $p = 0,207$).



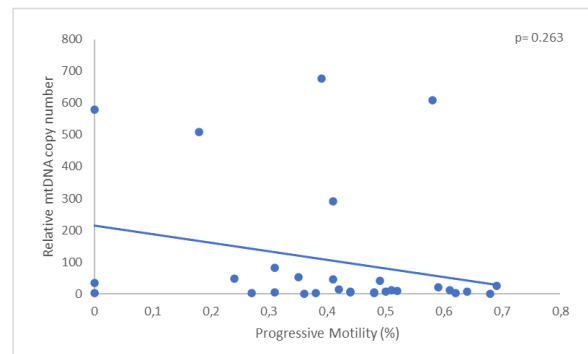
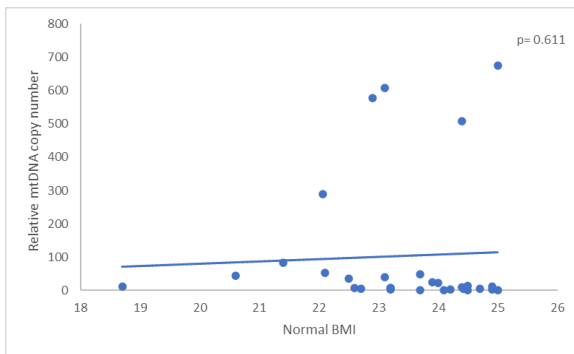
Σχήμα 3 Σύγκριση του μιτοχondριακού φορτίου της παχύσαρκης ομάδας, του BMI ((A), $p = 0,148$) και της κινητικότητας ((B), $p = 0,811$).

5.1.2. ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΟΥ ΣΧΕΤΙΚΟΥ ΑΡΙΘΜΟΥ ΑΝΤΙΓΡΑΦΩΝ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟΥ DNA

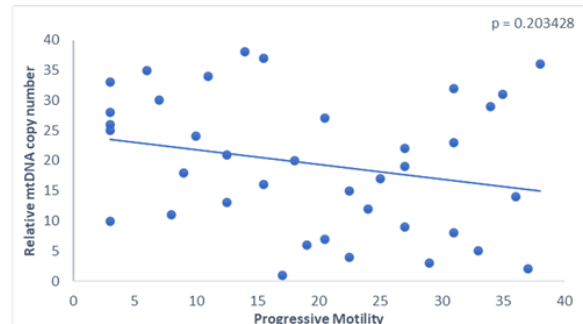
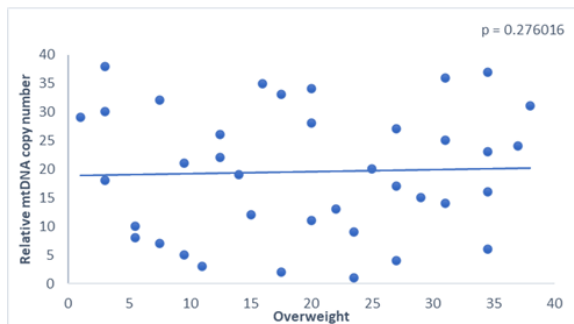
Ένας χρήσιμος δείκτης για τον προσδιορισμό του αριθμού των μιτοχονδρίων και του πόσο καλά λειτουργούν σε ένα δείγμα κυττάρου ή ιστού είναι ο σχετικός αριθμός αντιγράφων mtDNA. Μπορεί να ρίξει φως στην κυτταρική υγεία, στον ενεργειακό μεταβολισμό και στο πώς διαφορετικές μεταβλητές επηρεάζουν τη μιτοχονδριακή βιολογία. Για να εξετάσουν ένα ευρύ φάσμα βιολογικών διεργασιών και διαταραχών, οι ερευνητές χρησιμοποιούν αυτή τη μέτρηση τόσο στη βασική επιστημονική έρευνα όσο και στην κλινική διάγνωση.

Μόνο στην ομάδα με φυσιολογικό δείκτη μάζας σώματος προέκυψε σύνδεση μεταξύ του σχετικού αριθμού μιτοχονδριακού αντιγράφου και του BMI, $p = 0,039$ (Εικόνα 4A). Ωστόσο, φαίνεται ότι ο σχετικός αριθμός αντιγράφων mtDNA δεν συσχετίστηκε με το ΔΜΣ στις ομάδες ανδρών που ήταν υπέρβαροι ($p = 0,27$, Εικόνα 5A) και παχύσαρκοι ($p = 0,24$, Εικόνα 6A).

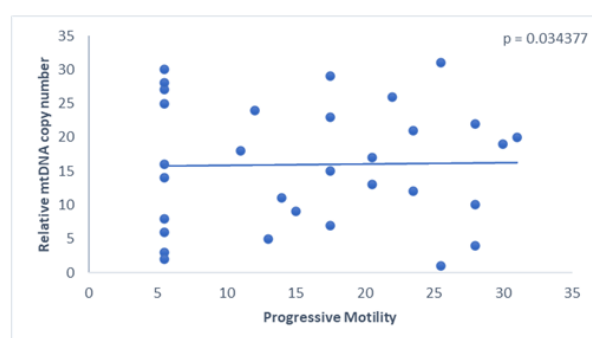
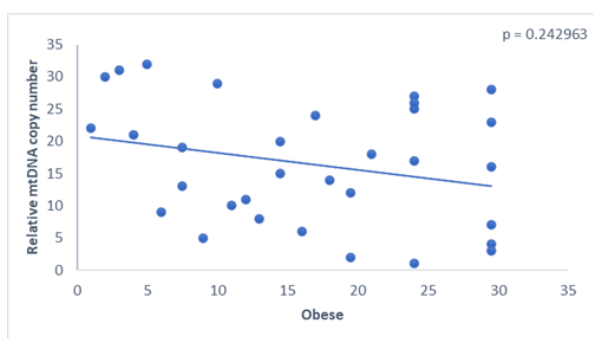
Στη συνέχεια αξιολογήθηκε η συσχέτιση μεταξύ του σχετικού αριθμού αντιγράφων mtDNA και της προοδευτικής κινητικότητας. Με τιμές $p = 0,0094$ (Εικόνα 4B) και $0,034$ (Εικόνα 6B), αντίστοιχα, φαίνεται ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ αυτών των δύο παραμέτρων τόσο στην φυσιολογική ομάδα όσο και στην ομάδα των παχύσαρκων. Από την άλλη πλευρά, ο σχετικός αριθμός αντιγράφων mtDNA στην υπέρβαρη ομάδα δεν συσχετίζεται με την κινητικότητα A + B ($p = 0,20$, Εικόνα 5B).



Σχήμα 4 Στη φυσιολογική ομάδα, το υψηλότερο φυσιολογικό BMI συσχετίστηκε με τον υψηλότερο σχετικό αριθμό αντιγράφων mtDNA ((A), $p = 0,611$), ενώ τα αντίγραφα υψηλότερης κινητικότητας κυμαίνονταν από 0,3 έως 0,7 ((B), $p = 0,263$).



Σχήμα 5 Στην υπέρβαρη ομάδα, υπήρχε θετική συσχέτιση μεταξύ του σχετικού αριθμού αντιγράφων mtDNA και του BMI (A) ενώ υπήρχε αρνητική συσχέτιση σε σύγκριση με την προοδευτική κινητικότητα (B). Οι περιπτώσεις αυτές δεν έδειξαν στατιστικά σημαντική συσχέτιση (A) $p = 0,276016$ και (B) $p = 0,203428$.

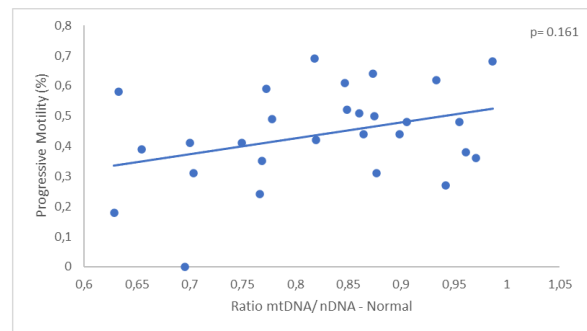
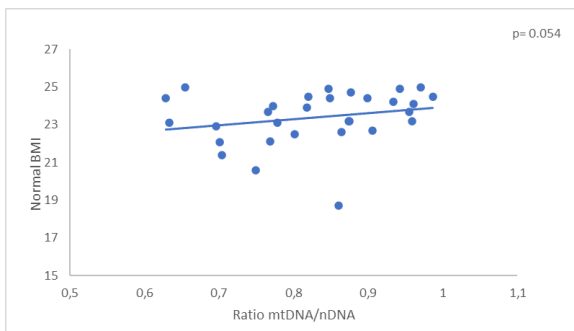


Σχήμα 6 Στην παχύσαρκτη ομάδα, η σύγκριση μεταξύ του σχετικού αριθμού αντιγράφων mtDNA και του BMI φανέρωσε μια αρνητική συσχέτιση χωρίς στατιστικά σημαντική διαφορά ((A), $p = 0,242963$). Η σχέση μεταξύ του σχετικού αριθμού αντιγράφων mtDNA και της προοδευτικής κινητικότητας συσχετίστηκε θετικά και ήταν στατιστικά σημαντική ((B), $p = 0,034377$).

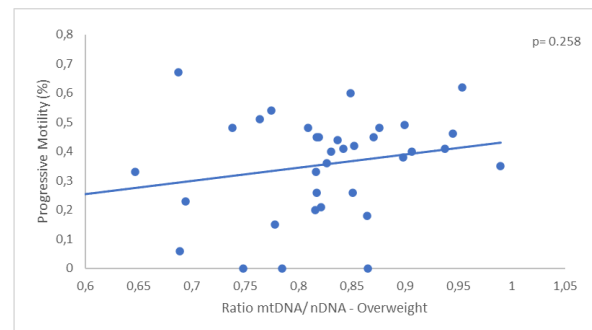
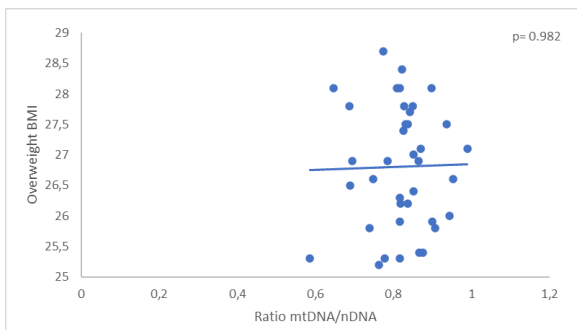
5.1.3 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΑΛΟΓΙΑΣ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟΥ ΠΡΟΣ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ DNA

Η αναλογία του μιτοχονδριακού DNA (mtDNA) προς το πυρηνικό DNA (nDNA) μπορεί να αποκαλύψει κρίσιμες πληροφορίες για μια ποικιλία βιολογικών διεργασιών και συνθηκών. Αυτή η αναλογία χρησιμοποιείται συχνά ως δείκτης για τον προσδιορισμό της ποσότητας των μιτοχονδρίων ή του πόσο καλά λειτουργούν μέσα σε ένα κύτταρο ή ιστό. Η αναλογία mtDNA προς nDNA μπορεί να αποκαλύψει πληροφορίες σχετικά με την παρουσία και τη λειτουργία των μιτοχονδρίων, το κυτταρικό στρες και τη βλάβη, τις ασθένειες και τις αποκρίσεις σε περιβαλλοντικούς παράγοντες. Κατά τη σύγκριση του δείκτη μάζας σώματος με την αναλογία mtDNA/nDNA, βρέθηκαν αποτελέσματα στατιστικά σημαντικής στη φυσιολογική και παχύσαρκτη ομάδα. Ο δείκτης μάζας σώματος κυμαίνεται στην φυσιολογική ομάδα μεταξύ 0,6 και 1 αναλογίας mtDNA/nDNA ($p = 0,096$, Εικόνα 7A). Ο λόγος φαίνεται να κατανέμεται γύρω στο 0,8 στο γράφημα του

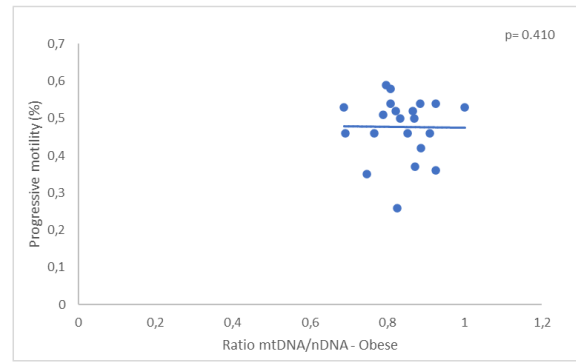
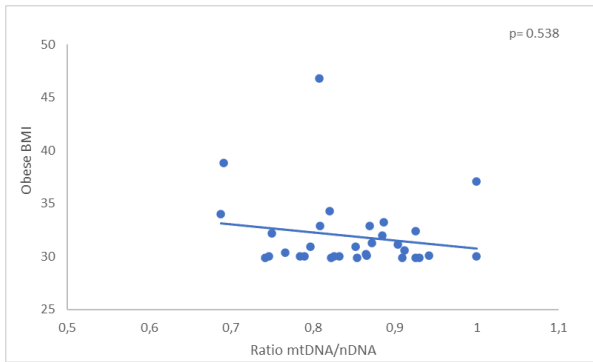
υπέρβαρου πληθυσμού ($p = 0,9822$, Εικόνα 8A), ενώ ο λόγος κατανέμεται μεταξύ 0,7 και 0,9 στο γράφημα του παχύσαρκου πληθυσμού ($p = 0,043$, Εικόνα 9A), αντίστοιχα. Τέλος, εξετάστηκε η σχέση μεταξύ κινητικότητας και αναλογίας mtDNA/nDNA. Η κατανομή των δεδομένων μεταξύ της φυσιολογικής και της υπέρβαρης ομάδας ήταν παρόμοια και στις δύο ομάδες ήταν στατιστικά σημαντικές ($p = 0,006$ (Εικόνα 7B) και $p = 0,04296$ (Εικόνα 8B), αντίστοιχα). Η προοδευτική κινητικότητα στην ομάδα των παχύσαρκων εμφανίζει μια κατανομή αναλογίας με στατιστική σημασία μεταξύ 0,8 και 1 τιμών ($p = 0,01033$, Εικόνα 9B).



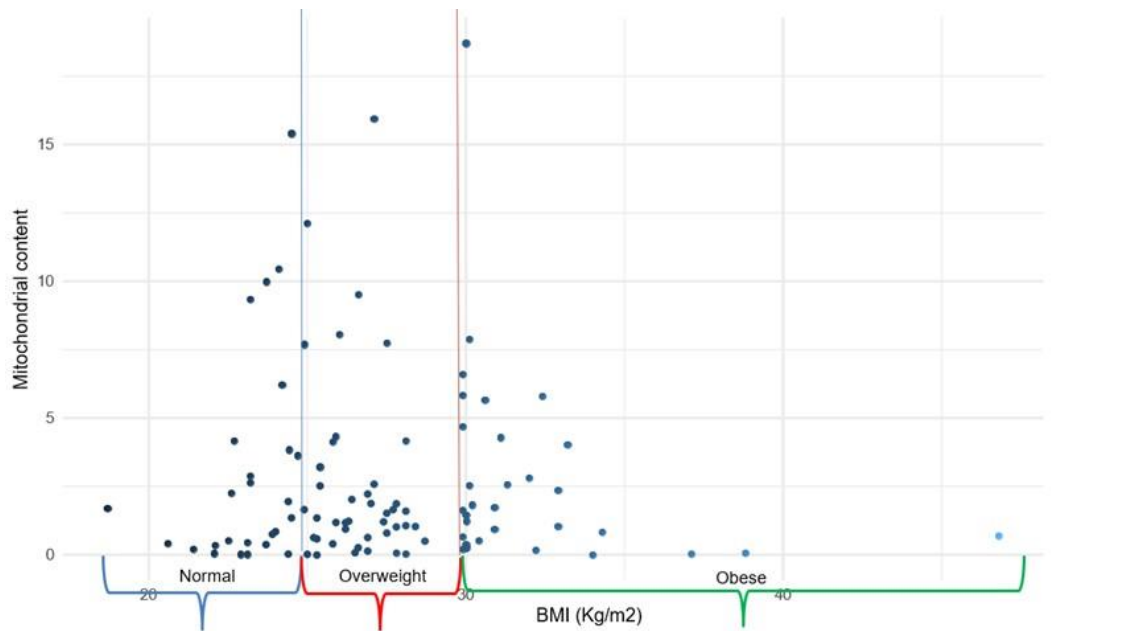
Σχήμα 7 Για την ομάδα με φυσιολογικό BMI, η αναλογία mtDNA προς nDNA και για τις δύο παραμέτρους, BMI(A) και κινητικότητα A + B (B), κυμάνθηκε μεταξύ 0,65 και 1 ($p = 0,054$ και $p = 0,161$, αντίστοιχα).



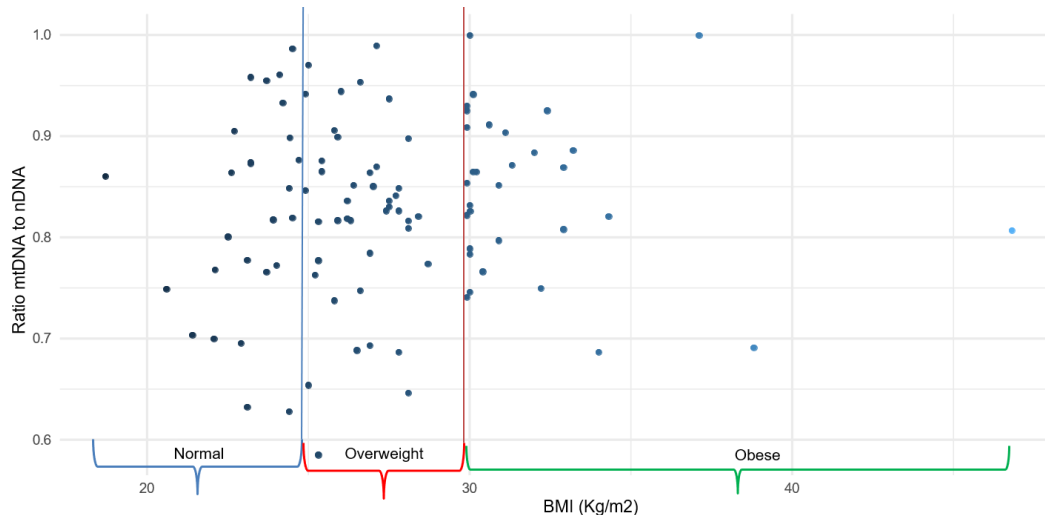
Σχήμα 8 Όσον αφορά το BMI, η αναλογία στην υπέρβαρη ομάδα εμφάνισε ένα πιο σταθερό εύρος γύρω από την τιμή του 0,8 (A), ενώ για την κινητικότητα A + B, παρατηρήσαμε διακυμάνσεις μεταξύ 0,6 και 1 (B). Τα αποτελέσματα ήταν στατιστικά σημαντικά μόνο στην περίπτωση (B) ($p = 0,9822$ και $p = 0,258$, αντίστοιχα).



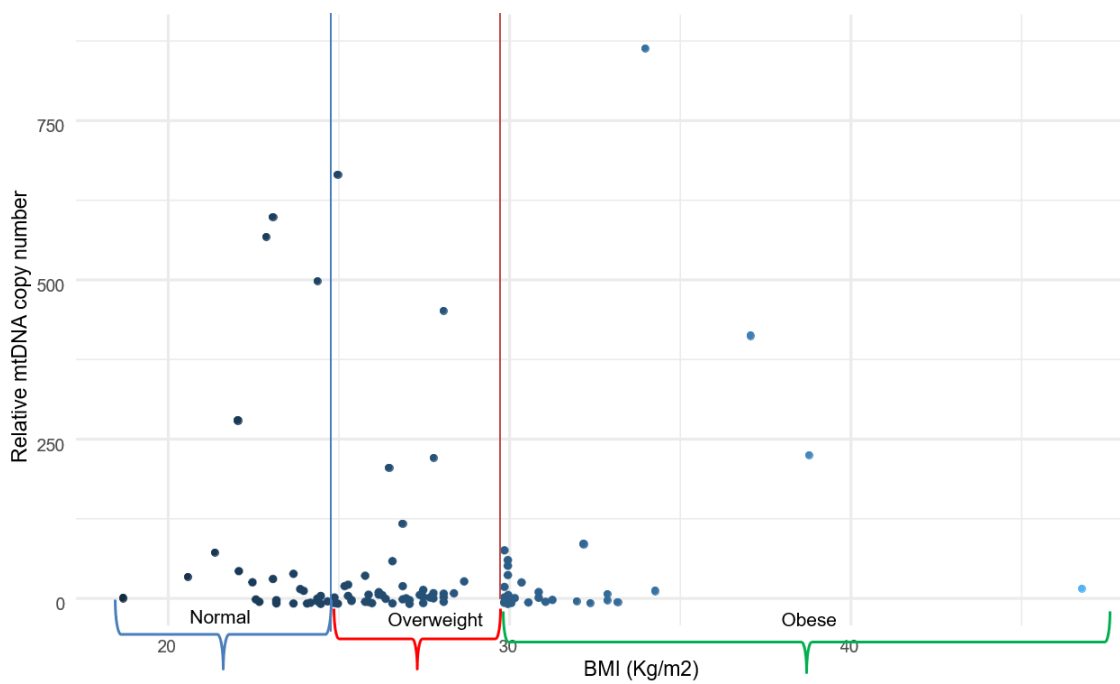
Σχήμα 9 Η αναλογία mtDNA προς nDNA τόσο για το BMI ((A), $p = 0,538$) όσο και για την προοδευτική κινητικότητα ((B), $p = 0,410$) έδειξε μια διακύμανση τιμών μεταξύ 0,7–1. Τα αποτελέσματα ήταν σημαντικά και για τις δύο παραμέτρους εξίσου.



Σχήμα 10 Στο παραπάνω διάγραμμα απεικονίζεται η κατανομή του μιτοχondριακού περιεχομένου (άξονας y) σε σχέση με τις τρεις υπό μελέτη ομάδες σύμφωνα με το δείκτη μάζας σώματος (άξονας x).



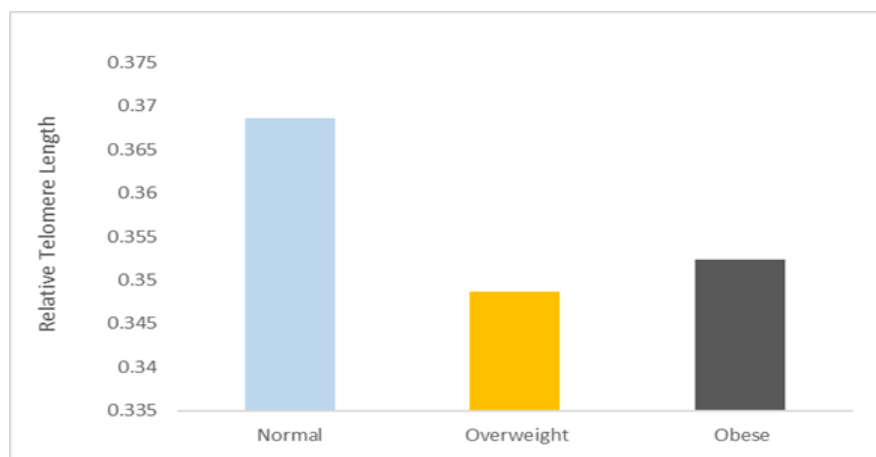
Σχήμα 11 Στο διάγραμμα απεικονίζεται η διακύμανση του λόγου μιτοχονδριακού προς πυρηνικού DNA ανάλογα με το δείκτη μάζας σώματος.



Σχήμα 12 Το παραπάνω σχήμα απεικονίζει τη συνολική διακύμανση του σχετικού αριθμού αντιγράφων μιτοχονδριακού DNA (άξονας γ) σε σχέση με το BMI (άξονας χ).

5.2 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΟΥ ΣΧΕΤΙΚΟΥ ΜΗΚΟΥΣ ΤΩΝ ΤΕΛΟΜΕΡΩΝ ΜΕ ΤΟ ΔΕΙΚΤΗ ΜΑΖΑΣ ΣΩΜΑΤΟΣ, ΤΟ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ ΚΑΙ ΤΗΝ ΑΝΑΛΟΓΙΑ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟΥ ΠΡΟΣ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ DNA

Τα άτομα χωρίστηκαν σε τρεις ομάδες ανάλογα με το ΔΜΣ τους. Οι μέσες τιμές για το σχετικό μήκος τελομερών εμφανίζονται στο παρακάτω γράφημα.

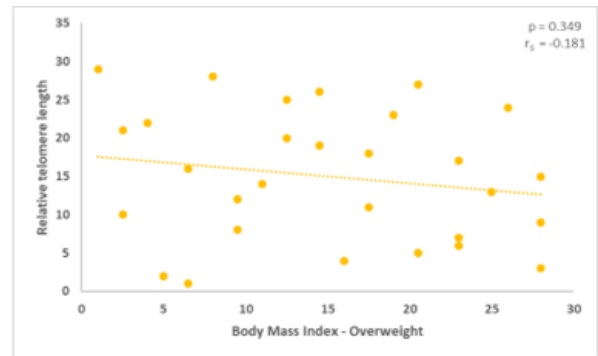
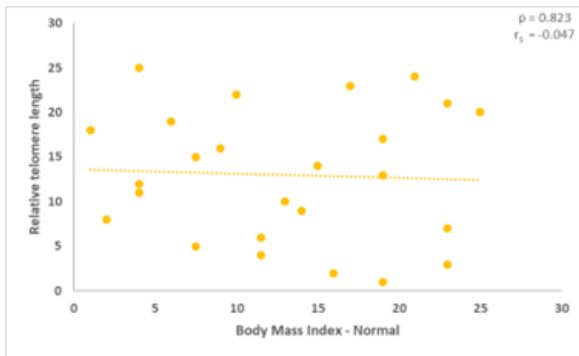


Εικόνα 15 Οι διακυμάνσεις των σχετικών μηκών των τελομερών για τις τρεις υπό μελέτη ομάδων. Ακολουθούν οι διακυμάνσεις τιμών για τους φυσιολογικούς, υπέρβαρους και παχύσαρκους πληθυσμούς.

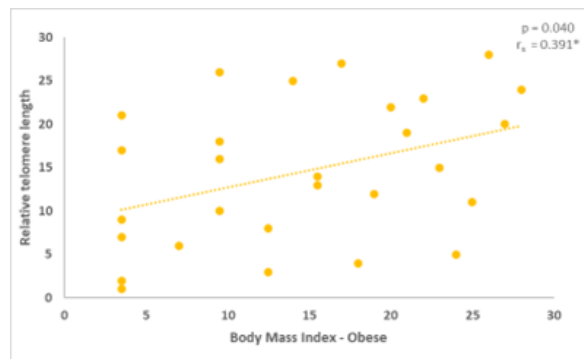
Το μήκος των τελομερών της υπέρβαρης ομάδας διαφέρει σχεδόν κατά το ήμισυ από αυτό των ομάδων με φυσιολογικό και παχύσαρκο BMI, αντίστοιχα. Ωστόσο, αυτή η διαφορά δεν είναι σημαντική από πλευράς στατιστικής ($p > 0,05$). Ενώ η διακύμανση της ομάδας των παχύσαρκων κυμαίνεται από -2 έως 3, το σχετικό μήκος των τελομερών της φυσιολογικής ομάδας κυμαίνεται μεταξύ -2 και 4. Ωστόσο, το σχετικό μήκος των τελομερών κυμαίνεται μεταξύ -1 και 2 στην ομάδα των υπέρβαρων ατόμων.

Στη συνέχεια, σε κάθε ομάδα ξεχωριστά, εξετάσαμε την αλληλεπίδραση σχετικά με το σχετικό μήκος τελομερών. Για τις τρεις ομάδες με φυσιολογικό, υπέρβαρο και παχύσαρκο BMI, εξετάστηκε το σχετικό μήκος των τελομερών, όπως φαίνεται στα παρακάτω σχήματα. Μια ουσιαστική αρνητική συσχέτιση μεταξύ του μήκους των τελομερών και της ομάδας των ατόμων με φυσιολογικό BMI.

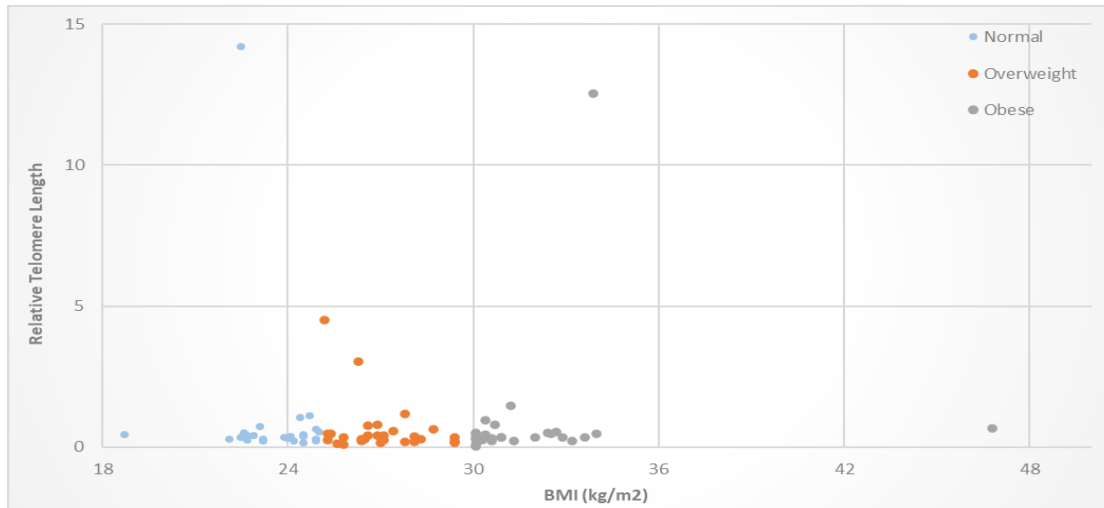
Αρνητική συσχέτιση μεταξύ του BMI και του σχετικού μήκους των τελομερών παρατηρήθηκε επίσης στην υπέρβαρη ομάδα, όπως φαίνεται στο ακόλουθο γράφημα. Τέλος, το σχετικό μήκος των τελομερών έδειξε θετική συσχέτιση με το BMI στην παχύσαρκτη ομάδα. Τα παρακάτω σχήματα απεικονίζουν το αποτέλεσμα του συντελεστή συσχέτισης του Spearman που πραγματοποιήθηκε για να εξεταστεί η σχέση μεταξύ του σχετικού μήκους τελομερών και του BMI.



Σχήμα 13 Αξιολόγηση του σχετικού μήκους των τελομερών στις ομάδες (Α) φυσιολογικών και (Β) υπέρβαρων ατόμων, αντίστοιχα. Μία αρνητική συσχέτιση παρουσιάστηκε και στις δύο περιπτώσεις ($r_s = -0,047$ και $-0,181$, αντίστοιχα). Οι τιμές p -value που σημειώθηκαν για τις δύο ομάδες δεν ήταν στατιστικά σημαντικές, (Α) $p = 0.823$ και (Β) $p = 0,349$.



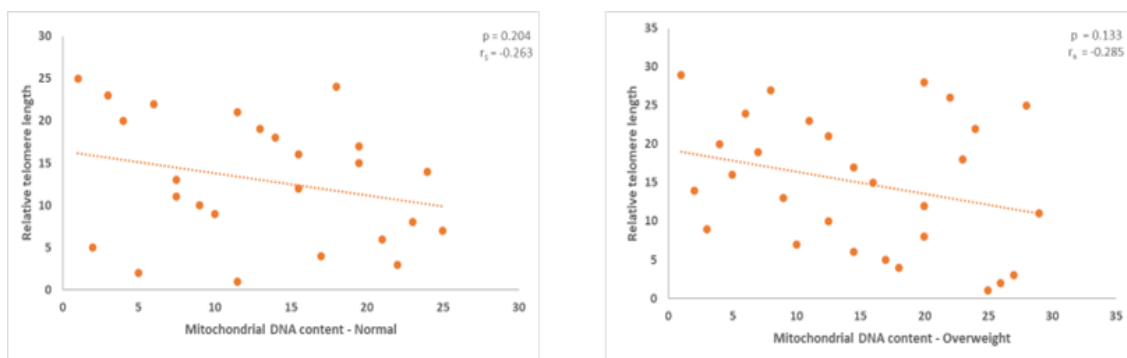
Σχήμα 14 Η μέτρηση του σχετικού μήκους των τελομερών στην ομάδα των παχύσαρκων ατόμων είχε θετική συσχέτιση με το δείκτη μάζας σώματος ($r_s = 0.391^*$, * η συσχέτιση είναι σημαντική στο επίπεδο 0,05 με δύο ουρές) και τα αποτελέσματα ήταν στατιστικά σημαντικά, $p = 0.040$.



Σχήμα 15 Η συνολική διακύμανση του σχετικού μήκους των τελομερών (άξονας γ) σε σχέση με το δείκτη μάζας σώματος (άξονας χ).

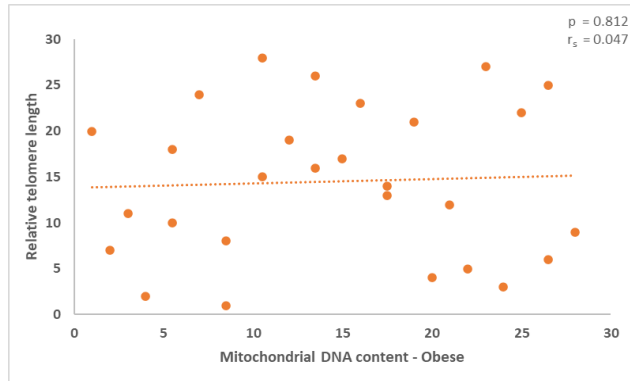
5.3 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕΤΑΞΥ ΤΟΥ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΣΧΕΤΙΚΟΥ ΜΗΚΟΥΣ ΤΩΝ ΤΕΛΟΜΕΡΩΝ

Οι συσχετίσεις των ομάδων φυσιολογικών και υπέρβαρων ατόμων μεταξύ του μιτοχονδριακού περιεχομένου DNA και του σχετικού μήκους των τελομερών αποκάλυψαν μια αρνητική συσχέτιση. Τα αποτελέσματα, τα οποία φαίνονται στα παρακάτω σχήματα, δεν ήταν στατιστικά σημαντικά, όπως υποδεικνύεται από τις τιμές p . Η τιμή p για την κανονική ομάδα ήταν 0,204 (Εικ. 12Α), ενώ ήταν 0,183 για την υπέρβαρη ομάδα (Εικ. 12Β).

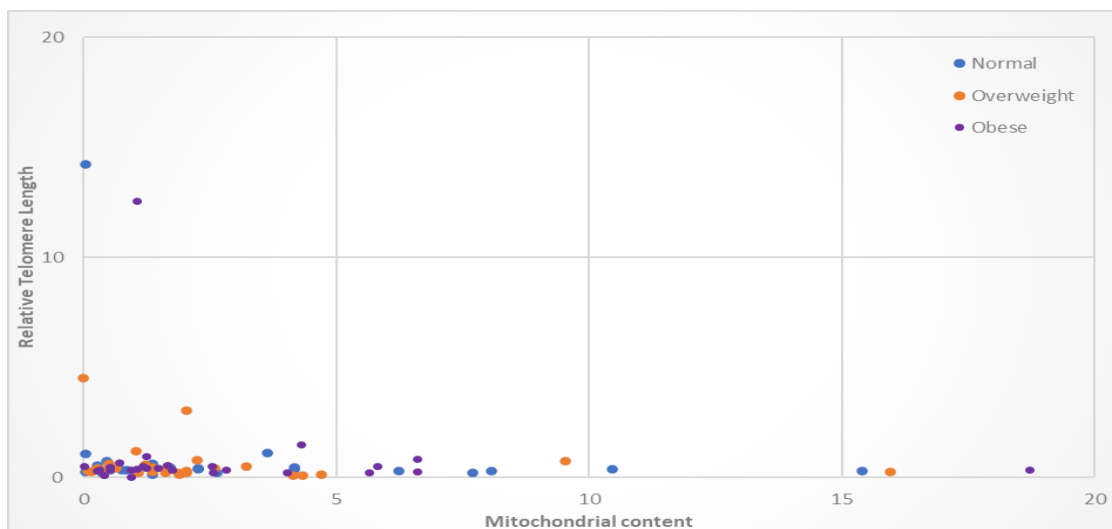


Σχήμα 16 Άνδρες στην ομάδα των φυσιολογικών και υπέρβαρων ατόμων έδειξαν μια αρνητική συσχέτιση μεταξύ αυτών των παραμέτρων. Με τις αντίστοιχες τιμές $p = 0,204$ και $p = 0,133$ που προέκυψαν για τις ομάδες, αντίστοιχα, τα αποτελέσματα δεν ήταν στατιστικά σημαντικά.

Η σύγκριση του μιτοχondριακού περιεχομένου DNA και του σχετικού μήκους τελομερών για τους άνδρες που ανήκουν στην κατηγορία των παχύσαρκων, έδειξε μια θετική συσχέτιση. Αυτή η συσχέτιση παρουσιάζεται στο παρακάτω γράφημα (Εικ. 13). Το αποτέλεσμα σε αυτή την περίπτωση ήταν στατιστικά σημαντικό, $p=0,812$.



Σχήμα 17 Στην ομάδα των παχύσαρκων, παρατηρήθηκε μια μέτρια θετική συσχέτιση μεταξύ αυτών των μεταβλητών. Τα αποτελέσματα δεν έδειξαν κάποια στατιστικά σημαντική συσχέτιση ($p = 0,812$).

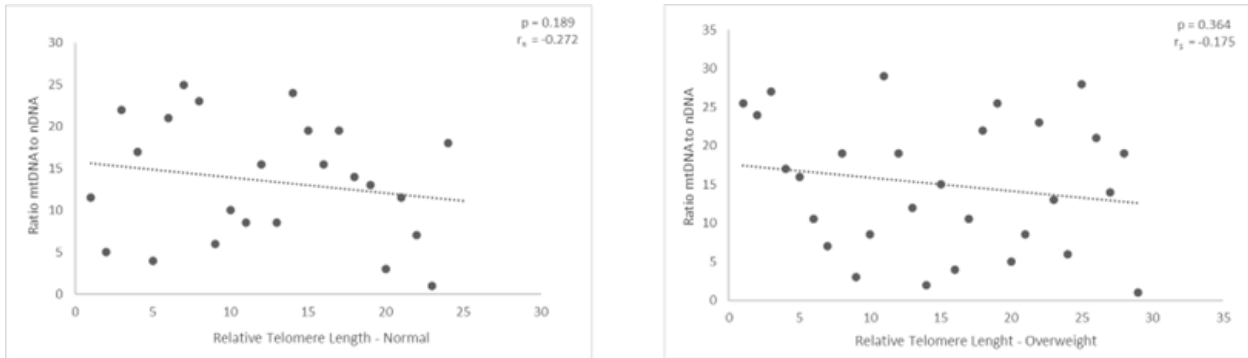


Σχήμα 18 Απεικονίζεται η σχέση του μιτοχondριακού περιεχομένου (άξονας x) και του σχετικού μήκους των τελομερών (άξονας y) για τους άνδρες και των τριών ομάδων. Με χρώμα μπλε συμβολίζονται οι άνδρες φυσιολογικού BMI, με πορτοκαλί οι άνδρες με υπέρβαρο BMI ενώ με μωβ οι άνδρες της παχύσαρκης ομάδας.

5.4 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΟΥ ΛΟΓΟΥ ΜΙΤΟΧONΔΡΙΑΚΟΥ ΠΡΟΣ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ DNA ΜΕ ΤΟ ΣΧΕΤΙΚΟ ΜΗΚΟΣ ΤΩΝ ΤΕΛΟΜΕΡΩΝ

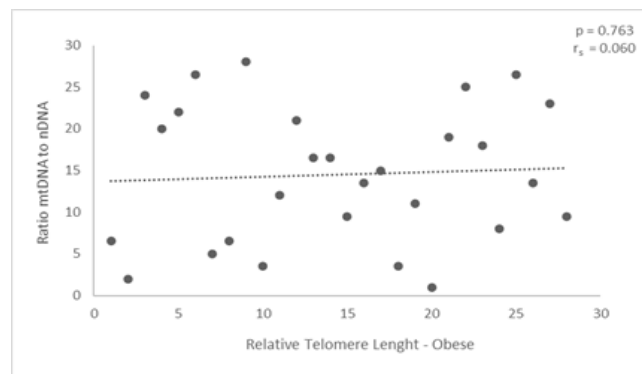
Ακολούθησε η αξιολόγηση της συσχέτισης μεταξύ του σχετικού μήκους των τελομερών και της αναλογίας του πυρηνικού προς το μιτοχondριακό DNA. Τα διαγράμματα που ακολουθούν φανερώνουν την αρνητική συσχέτιση μεταξύ αυτών των παραμέτρων σε

άνδρες με φυσιολογικό και υπέρβαρο δείκτη μάζας σώματος. Τα ευρήματα ($p = 0,189$ και $p = 0,36$, αντίστοιχα) δεν έδειξαν καμία στατιστική σημασία.

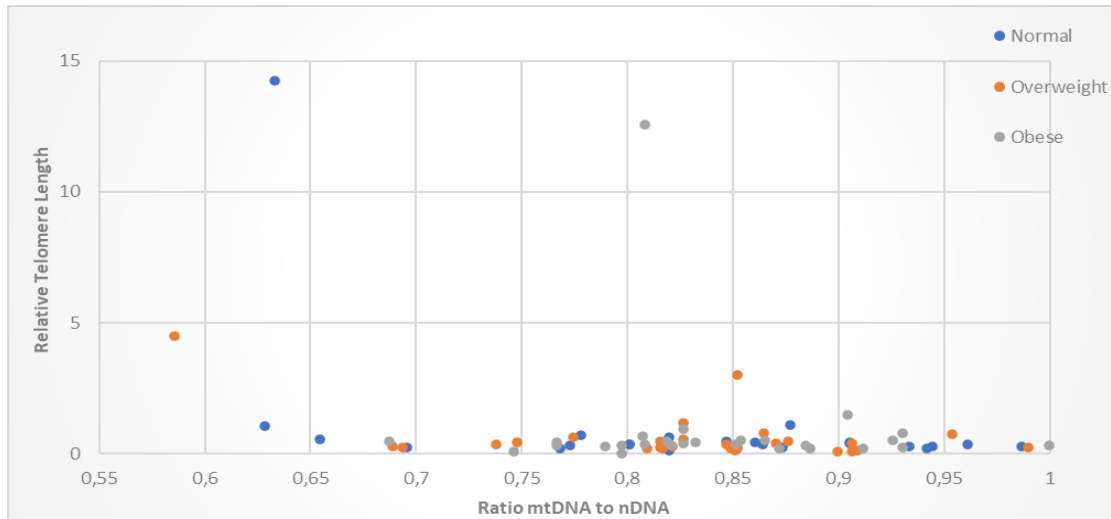


Σχήμα 19 Η αναλογία μιτοχονδριακού προς πυρηνικό DNA φαίνεται να έχει μέτρια αρνητική συσχέτιση με το σχετικό μήκος τελομερών σε άνδρες με φυσιολογικό και υπέρβαρο ΔΜΣ ($p = 0,189$ και $p = 0,364$, αντίστοιχα). Τα αποτελέσματα δεν ήταν στατιστικά σημαντικά.

Ωστόσο, τα αποτελέσματα δεν είχαν στατιστική σημασία για την ομάδα των παχύσαρκων ατόμων. Συγκεκριμένα, μια μέτρια θετική συσχέτιση μεταξύ αυτών των δύο παραμέτρων για αυτή την ομάδα, ωστόσο, η τιμή p που αντιστοιχεί είναι $0,763$. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν δεν ήταν στατιστικά σημαντικά.



Σχήμα 20 Στην ομάδα των παχύσαρκων σημειώθηκε μια μέτρια θετική σχέση μεταξύ της αναλογίας του μιτοχονδριακού προς πυρηνικού DNA και του σχετικού μήκους των τελομερών. Ωστόσο, η τιμή $p = 0,763$ υποδηλώνει ότι τα αποτελέσματα δεν ήταν στατιστικά σημαντικά.



Σχήμα 21 Η σχέση του λόγου μιτοχondριακού προς πυρηνικού DNA (άξονας x) σε σύγκριση με το σχετικό μήκος των τελομερών (άξονας y). Με χρώμα μπλε συμβολίζονται οι άνδρες φυσιολογικού BMI, με πορτοκαλί οι άνδρες με υπέρβαρο BMI ενώ με γκρι οι άνδρες της παχύσαρκης ομάδας.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6^ο

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Έχει διαπιστωθεί ότι το μήκος των τελομερών είναι δείκτης κυτταρικής γήρανσης και αναπαραγωγικής ωριμότητας. Τα τελομερή στα λευκοκύτταρα είναι διαφορετικά από αυτά στο σπέρμα ή στα ωάρια και δεν είναι συγκρίσιμα με κανένα από τα δύο. Παρουσιάζονται μειώσεις που σχετίζονται με την ηλικία στο μήκος των τελομερών των λευκοκυττάρων, ενώ εμφανίζονται απροσδόκητα κέρδη στο μήκος των τελομερών του σπέρματος. Στα στάδια μορίου και βλαστοκύστης στο πλαίσιο της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, τα εμβρυικά τελομερή υποτίθεται ότι επαναφέρουν το μήκος τους. Τα τελομερή, ωστόσο, φαίνεται να είναι μικρότερα από ό,τι προβλεπόταν στην αρχή της ανάπτυξης. Η θεραπευτική προσέγγιση για τη διαχείριση της υπογονιμότητας μπορεί να ενισχυθεί με την αξιολόγηση του μήκους των τελομερών στα αναπαραγωγικά κύτταρα. Όταν πρόκειται για τη διάγνωση και την αξιολόγηση της ανδρικής και γυναικείας υπογονιμότητας, δεν έχουμε ακόμα αρκετές πληροφορίες για πιθανούς δείκτες. Η ομοιοστάση των τελομερών μπορεί να υπάρχει όταν διατηρείται το ιδανικό μήκος τελομερών. Ως αποτέλεσμα της απορρύθμισης των τελομερών, η μείωση μπορεί να είναι ακόμη πιο επιρρεπής σε σφάλματα, οδηγώντας σε ανεπαρκή χρωμοσωμικό διαχωρισμό και σε μεγαλύτερο ποσοστό ανευπλοειδίας.

Αρκετές μελέτες εξέτασαν συγκεκριμένα τη σχέση μεταξύ του μήκους των τελομερών του σπέρματος και του μήκους των τελομερών των απογόνων. Υπάρχει, λοιπόν, σαφής επίδραση της πατρικής ηλικίας στο μήκος των τελομερών σε ορισμένα είδη, ιδιαίτερα στα τρωκτικά, τα πουλιά, τα πρωτεύοντα θηλαστικά και τους ανθρώπους, σύμφωνα με την οποία οι πατέρες που είναι μεγαλύτεροι τείνουν να έχουν απογόνους με μακρύτερα τελομερή. Δεδομένου ότι το μήκος των τελομερών του σπέρματος έχει συσχετιστεί με έναν αριθμό χαρακτηριστικών του σπέρματος, είναι προφανές ότι το μήκος των τελομερών του σπέρματος δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ο μόνος καθοριστικός παράγοντας της ποιότητας του σπέρματος και των εμβρύων, καθώς είναι δύσκολο να προσδιοριστεί η ακριβής ποσότητα του μήκους των τελομερών που υπάρχει σε κάθε αρσενικό γαμέτη που είναι ικανός της γονιμοποίησης ενός αυγού. Η πιθανότητα εμφύτευσης και συνέχισης της εγκυμοσύνης μπορεί να προβλεφθεί, καθώς και η μακροζωία των παιδιών, με την εκτίμηση του μήκους των τελομερών στο στάδιο της βλαστοκύστης.

Τα μιτοχόνδρια είναι απαραίτητα για τη διατήρηση της κυτταρικής υγείας και ζωτικότητας. Η κύρια διαδικασία για τη διατήρηση της ποσότητας και της ποιότητας των μιτοχονδρίων είναι η μιτοφαγία, η οποία υποστηρίζεται από άλλα εξειδικευμένα μονοπάτια. Μερικές μελέτες προτείνουν μια σύνδεση μεταξύ πολλών διεργασιών μιτοφαγίας που θα μπορούσαν να συνεργαστούν για να αντισταθούν στις περιβαλλοντικές πιέσεις. Αρκετές φυσιολογικές και παθολογικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένης της ανάπτυξης, της διαφοροποίησης, της γήρανσης, των

καρδιαγγειακών διαταραχών, των νευροεκφυλιστικών ασθενειών και του καρκίνου, συνδέονται με τη δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων και τη δυσλειτουργία της μιτοφαγίας. Η σημασία της ρύθμισης της ποιότητας και της ποσότητας των μιτοχονδρίων μέσω της μιτοφαγίας φαίνεται από το γεγονός ότι η εξασθενημένη μιτοφαγία συμβάλλει στη γήρανση και στις ασθένειες που σχετίζονται με την ηλικία.

Επί του παρόντος δεν υπάρχει συναίνεση σχετικά με τα αντιοξειδωτικά που πρέπει να χρησιμοποιούνται ή τη δόση που πρέπει να χρησιμοποιείται. Ωστόσο, φαίνεται ότι η κύρια πηγή ROS για όλους τους διαφορετικούς τύπους κυττάρων είναι η διαρροή ηλεκτρονίων από μιτοχόνδρια. Μπορεί να είναι χρήσιμο από αυτή την άποψη η ενίσχυση της ανάπτυξης αντιοξειδωτικών που στοχεύουν ιδιαίτερα το μιτοχονδριακό διαμέρισμα, είτε με σάρωση των ROS μέσα σε αυτά τα οργανίδια, τα οποία είναι γνωστό ότι προάγουν το σχηματισμό ROS από τη μιτοχονδριακή αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων. Όπως πάντα, ο πρωταρχικός στόχος στην ανάπτυξη αντιοξειδωτικών είναι να μειωθεί η υπερβολική παραγωγή επιβλαβών μεταβολιτών ROS διατηρώντας παράλληλα την κανονική ροή οξειδοαναγωγής που απαιτείται για την κυτταρική δραστηριότητα. Οι ευεργετικές επιδράσεις της ινοσιτόλης στη μιτοχονδριακή λειτουργία, και συνεπώς στην κινητικότητα του σπέρματος, μπορεί να αποδοθούν στην προκινητική της δράση, στις αντιοξειδωτικές και ευαισθητοποιητικές της ικανότητες στην ινσουλίνη και στις ορμονικές ρυθμιστικές της επιδράσεις.

6.1 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΟΥ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΥ, ΤΟΥ ΣΧΕΤΙΚΟΥ ΑΡΙΘΜΟΥ ΑΝΤΙΓΡΑΦΩΝ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟΥ DNA ΚΑΙ ΤΗΣ ΑΝΑΛΟΓΙΑΣ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟΥ ΠΡΟΣ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ DNA ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΟ ΔΕΙΚΤΗ ΜΑΖΑΣ ΣΩΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΤΗΝ ΚΙΝΗΤΙΚΟΤΗΤΑ

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκαν τρεις μεταβλητές, μιτοχονδριακό περιεχόμενο, ο σχετικός αριθμός αντιγράφων του μιτοχονδριακού DNA και η προοδευτική κινητικότητα, με βάση τον δείκτη μάζας σώματος των ατόμων. Ο δείκτης μάζας σώματος και η προοδευτική κινητικότητα, καθώς και το μιτοχονδριακό περιεχόμενο και η αναλογία μιτοχονδριακού DNA προς πυρηνικό DNA, παρουσιάζουν θετικές συσχετίσεις στην ομάδα υπέρβαρων και παχύσαρκων. Ο σχετικός αριθμός αντιγράφων, ωστόσο, συνδέθηκε με την κινητικότητα και όχι με τον δείκτη μάζας σώματος στην παχύσαρκτη ομάδα. Το υπερβολικό βάρος και η παχυσαρκία έχουν γίνει μείζονες ανησυχίες για τη δημόσια υγεία παγκοσμίως ως αποτέλεσμα των αλλαγών στον σύγχρονο τρόπο ζωής, με ανησυχητικές αυξήσεις στα ποσοστά τέτοιων ατόμων στις βιομηχανικές χώρες [19]. Παγκοσμίως, το 13% των ενηλίκων είναι παχύσαρκοι και το 39% του πληθυσμού είναι υπέρβαρος, σύμφωνα με τα τελευταία στοιχεία [20]. Το περιβάλλον και η γενετική παίζουν ρόλο στη μεταβολική διαταραχή γνωστή ως παχυσαρκία, η οποία επηρεάζει ολόκληρο το σώμα [21,22].

Επιπλέον, τόσο στην κανονική όσο και στην υπέρβαρη ομάδα, υπήρξε θετική συσχέτιση μεταξύ του μιτοχονδριακού περιεχομένου προοδευτικής κινητικότητας και του δείκτη

μάζας σώματος. Ωστόσο, το μιτοχονδριακό περιεχόμενο στην παχύσαρκη ομάδα συσχετίστηκε αρνητικά με το δείκτη μάζας σώματος και θετικά με την προοδευτική κινητικότητα. Στην φυσιολογική ομάδα, υπήρχε θετική συσχέτιση μεταξύ της κινητικότητας και του δείκτη μάζας σώματος καθώς και του σχετικού αριθμού αντιγράφων mtDNA. Στην ομάδα υπέρβαρων, υπήρχε θετική σχέση με το δείκτη μάζας σώματος αλλά αρνητική συσχέτιση με την κινητικότητα. Ο σχετικός αριθμός αντιγράφων mtDNA, ωστόσο, συσχετίστηκε θετικά με την κινητικότητα και αρνητικά με τον δείκτη μάζας σώματος στην παχύσαρκη ομάδα [23].

Το μέσο ανθρώπινο σπερματοζωάριο περιέχει ένα αντίγραφο mtDNA ανά μιτοχόνδριο [24]. Αν και η αλληλουχία mtDNA του σπέρματος είναι η ίδια με αυτή των σωματικών κυττάρων, η δραστηριότητα επιδιόρθωσης του DNA του σπέρματος είτε είναι σημαντικά μειωμένη είτε ανύπαρκτη [25]. Έχει αποδειχθεί ότι, για αυτό το λόγο, το σπέρμα συγκεντρώνει γρήγορα μεταλλάξεις μιτοχονδριακού DNA παρά το γεγονός ότι παράγεται από μιτωτικά κύτταρα (σπερματογονία) και έχει σημαντικά μικρότερη διάρκεια ζωής από τα σωματικά κύτταρα. [26]. Με βάση τις τρέχουσες μελέτες, το 84–86% των «φυσιολογικών» βιώσιμων σπερματοζωαρίων έχουν ελαττωματικό μιτοχονδριακό DNA και η αναλογία μη φυσιολογικού προς άγριου τύπου μιτοχονδριακού DNA δεν αντιστοιχεί στην κινητικότητα του σπέρματος [25].

Η εξάπλωση του αριθμού αντιγράφων mtDNA του σπέρματος έχει συνδεθεί με ελαττωματική σπερματογένεση [27] και μια δυσλειτουργική οδό αυτοφαγίας στη διάσπαση των μιτοχονδρίων [28]. Μεγαλύτερο αριθμό αντιγράφων μιτοχονδριακού DNA του σπέρματος συνδέθηκε με χειρότερη κινητικότητα, συγκέντρωση και συνολικό αριθμό σπερματοζωαρίων, σύμφωνα με δύο συγχρονικές έρευνες μεταξύ ανδρών συντρόφων ζευγαριών που υποβλήθηκαν σε τεστ γονιμότητας [29,30]. Επιπλέον, τρεις μελέτες έδειξαν ότι τα σπερματοζωάρια από άτομα με ελαττωματικές παραμέτρους του σπέρματος ενίσχυσαν σημαντικά τον αριθμό αντιγράφων μιτοχονδριακού DNA [27,31,32]. Αυτές οι έρευνες υποδηλώνουν ότι ο ευαίσθητος δείκτης της ακεραιότητας του ανθρώπινου σπέρματος μπορεί να είναι ο αριθμός αντιγράφων μιτοχονδριακού DNA του σπέρματος. Η κινητικότητα του σπέρματος μπορεί να επηρεαστεί από διαφορές στην ακεραιότητα του μιτοχονδριακού DNA ή στη μιτοχονδριακή δραστηριότητα, σύμφωνα με μελέτες [29].

Η προοδευτική κινητικότητα και ο αριθμός των σπερματοζωαρίων είναι δύο σημαντικές παράμετροι που χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση της ποιότητας του σπέρματος σε μια ανάλυση σπέρματος [33]. Μπορεί να υπάρχουν ορισμένοι συσχετισμοί ή λόγοι για τέτοιες παρατηρήσεις σε ορισμένες περιπτώσεις, ακόμα κι αν συνήθως δεν είναι αλήθεια ότι τα παχύσαρκα άτομα έχουν σταθερά υψηλότερη βαθμολογία σε αυτά τα μέτρα [34]. Η κατανόηση ότι η ατομική διακύμανση μπορεί να είναι σημαντική και ότι δεν θα παράγουν όλοι οι παχύσαρκοι σπέρμα εξαιρετικής ποιότητας είναι ζωτικής σημασίας. Σύμφωνα με διάφορες έρευνες ή περιστάσεις, ο υψηλός αριθμός σπερματοζωαρίων και η προοδευτική κινητικότητα της παχύσαρκης ομάδας μπορεί να εξηγηθεί από τους ακόλουθους παράγοντες: ορμονικούς παράγοντες, αυξημένη τεστοστερόνη, παράγοντες

τρόπου ζωής, προκατάληψη επιλογής, περιορισμούς της μελέτης και το γενετικό υπόβαθρο [35].

Για παράδειγμα, ένα σύστημα ανάλυσης σπέρματος με τη βοήθεια υπολογιστή (Computer Assisted Sperm Analysis System ,CASA) χρησιμοποιήθηκε για την αξιολόγηση του σπέρματος 1285 ανδρών. Σε σύγκριση με τους άνδρες κανονικού βάρους, οι παχύσαρκοι άνδρες εμφάνισαν μειωμένη συγκέντρωση και κινητικότητα σπέρματος καθώς και μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης ανωμαλιών και παραμορφώσεων στο κεφάλι του σπέρματος [12]. Επιπλέον, οι παχύσαρκοι άνδρες έχουν συνήθως μεγαλύτερο χρόνο έως την εγκυμοσύνη και μεγαλύτερη περίοδο κύησης [36]. Αυτές οι μελέτες αποκάλυψαν μια σημαντική σχέση μεταξύ της αύξησης του ανδρικού δείκτη μάζας σώματος και της μείωσης της ποιότητας του σπέρματος υπό το πρίσμα αυτό.

Η ποιότητα του σπέρματος, μια σημαντική μεταβλητή στην πρόβλεψή της, επηρεάζει σημαντικά την ανδρική γονιμότητα [37]. Τα μιτοχόνδρια είναι απαραίτητα για τη λειτουργία του σπέρματος καθώς παρέχουν την ενέργεια που απαιτείται για την κινητικότητα του σπέρματος, ένα σημαντικό συστατικό της γονιμότητας [2,38]. Η κατανόηση των πιθανών σχέσεων μεταξύ του μιτοχονδριακού περιεχομένου του σπέρματος και του λόγου μιτοχονδριακού DNA προς πυρηνικού DNA, ο δείκτης μάζας σώματος και η προοδευτική κινητικότητα παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον. Η αυξανόμενη κινητικότητα του σπέρματος, η οποία είναι απαραίτητη για να περάσει το σπέρμα από το γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα για να φτάσει και να γονιμοποιήσει το ωάριο, εξαρτάται από την κατάλληλη παροχή λειτουργικών μιτοχονδρίων [3].

Πολυάριθμες ερευνητικές μελέτες έχουν εξετάσει τη σχέση μεταξύ της ποιότητας του σπέρματος και του δείκτη μάζας σώματος. Η παχυσαρκία είναι γνωστό ότι έχει επιζήμια επίδραση στην ανδρική γονιμότητα, παρόλο που οι ακριβείς επιδράσεις του δείκτη μάζας σώματος στο μιτοχονδριακό περιεχόμενο και την αναλογία μιτοχονδριακού προς πυρηνικού DNA δεν έχουν τεκμηριωθεί επαρκώς [39]. Η έρευνα του Kozoras και των συνεργατών του έδειξε ότι με την αύξηση του δείκτη μάζας σώματος, η ποιότητα του σπέρματος μειώθηκε επίσης [40]. Ωστόσο, απαιτείται περαιτέρω έρευνα για τον προσδιορισμό των ακριβών διαδικασιών που σχετίζονται με την αναλογία μιτοχονδριακού προς πυρηνικού DNA και το μιτοχονδριακό περιεχόμενο με το δείκτη μάζας σώματος.

Η παχυσαρκία και ο υψηλός δείκτης μάζας σώματος είναι δύο ζητήματα που μπορούν να επηρεάσουν την αποπτωτική διαδικασία. Η χρόνια φλεγμονή χαμηλού βαθμού συνδέεται συχνά με την παχυσαρκία. Τα λιποκύτταρα είναι μεταξύ των τύπων κυττάρων στο σώμα που μπορεί να επηρεαστούν από αυτή τη φλεγμονή. Τα λιποκύτταρα των παχύσαρκων ατόμων έχουν την ικανότητα να απελευθερώνουν λιποκίνες και φλεγμονώδεις μεσολαβητές που διαταράσσουν τις κανονικές λειτουργίες των κυττάρων και ενθαρρύνουν τη φλεγμονή [41]. Υπάρχουν στοιχεία που υποδηλώνουν ότι μια ανισορροπία μεταξύ των διαδικασιών του θανάτου των λιποκυττάρων και της λιπογένεσης μπορεί να προκύψει από την παχυσαρκία. Το μέγεθος και η λειτουργικότητα

του λιπώδους ιστού μπορεί να επηρεαστεί από αυτή την ισορροπία, η οποία μπορεί επίσης να οδηγήσει σε μεταβολικά προβλήματα που σχετίζονται με την παχυσαρκία [42].

Η μεταβολική απορρύθμιση, που περιλαμβάνει την αντίσταση στην ινσουλίνη και τη δυσλιπιδαιμία, συνδέεται με την παχυσαρκία. Αυτές οι μεταβολικές ανισορροπίες μπορεί να έχουν επίδραση σε διαφορετικούς ιστούς και κύτταρα, το οποίο μπορεί με τη σειρά του να έχει αντίκτυπο στην απόπτωση και την κυτταρική επιβίωση [43]. Τόσο οι κυτταρικές αλλοιώσεις και η απορρύθμιση είναι συχνά παρούσες σε αυτές τις διαταραχές, οι οποίες μπορεί να επηρεάσουν τον κυτταρικό θάνατο και τη βιωσιμότητα σε προσβεβλημένους ιστούς και όργανα [44].

Επιπλέον, υπάρχουν δεδομένα που υποδηλώνουν μια σύνδεση μεταξύ του δείκτη μάζας σώματος και της ποιότητας του σπέρματος σε έναν άνδρα. Η παχυσαρκία, η οποία συχνά αντιστοιχεί σε υψηλό δείκτη μάζας σώματος, έχει αποδειχθεί σε αρκετές μελέτες ότι μειώνει τον αριθμό των σπερματοζωαρίων. Η πιθανότητα επιτυχούς γονιμοποίησης μπορεί να μειωθεί με μειωμένο αριθμό σπερματοζωαρίων [13]. Σύμφωνα με ορισμένες μελέτες, οι άνδρες που είναι υπέρβαροι ή παχύσαρκοι μπορεί να έχουν μειωμένη κινητικότητα σπέρματος τους σε σύγκριση με τους άνδρες που έχουν φυσιολογικό δείκτη μάζας σώματος. Η μη φυσιολογική μορφολογία του σπέρματος έχει συσχετιστεί με υψηλότερη συχνότητα υψηλού δείκτη μάζας σώματος, που μπορεί να θέσει σε κίνδυνο την ικανότητα του σπέρματος να διεισδύσει στο ωάριο [45,46].

Οι ορμονικές ανισορροπίες που προκαλούνται από την παχυσαρκία μπορεί να περιλαμβάνουν χαμηλά επίπεδα τεστοστερόνης και υψηλά επίπεδα οιστρογόνων. Η ποιότητα και η παραγωγή σπέρματος ενδέχεται να μειωθούν ως αποτέλεσμα αυτών των ορμονικών ανωμαλιών. Η παχυσαρκία και το οξειδωτικό στρες συνδέονται συχνά με τον κατακερματισμό του DNA και τη βλάβη των σπερματοζωαρίων [13]. Μια πιθανή αιτία της μειωμένης ποιότητας του σπέρματος είναι το οξειδωτικό στρες. Η κακή κυκλοφορία της θερμότητας που προκαλείται από το υπερβολικό σωματικό λίπος μπορεί να οδηγήσει σε υψηλότερες θερμοκρασίες του οσχέου. Οι υψηλές θερμοκρασίες των όρχεων μπορούν να βλάψουν την ποιότητα και την ποσότητα του παραγόμενου σπέρματος. Τα ζευγάρια μπορεί να δυσκολεύονται περισσότερο να συλλάβουν εάν ένας άνδρας έχει σπέρμα κακής ποιότητας. Το θετικό είναι πως η έρευνα έχει δείξει ότι οι άνδρες που είναι υπέρβαροι ή παχύσαρκοι μπορεί να δουν βελτίωση στην ποιότητα του σπέρματός τους ακολουθώντας μια ισορροπημένη διατροφή σε συνδυασμό με την άσκηση [47].

Η ανδρική γονιμότητα επηρεάζεται από τη συγκέντρωση των μιτοχονδρίων του σπέρματος και την αναλογία μιτοχονδριακού προς πυρηνικού DNA, ιδιαίτερα στο πλαίσιο της κινητικότητας του σπερματοζωαρίου [48]. Ένας νέος τομέας έρευνας σχετικά με τις συνδέσεις μεταξύ αυτών των μεταβλητών, του δείκτη μάζας σώματος και της προοδευτικής κινητικότητας έχει τη δυνατότητα να επηρεάσει σημαντικά την κατανόησή μας για την ανδρική αναπαραγωγική υγεία και την ανάπτυξη θεραπειών για την αντιμετώπιση προβλημάτων γονιμότητας που προκαλούνται από την παχυσαρκία [29,37]. Υπάρχει μια γενική κατανόηση του ρόλου των μιτοχονδρίων στη λειτουργία του σπέρματος και των επιζήμιων επιπτώσεων της παχυσαρκίας στην ανδρική γονιμότητα,

αλλά απαιτείται ακόμη περισσότερη έρευνα για να εδραιωθεί μια ακριβής σύνδεση μεταξύ του δείκτη μάζας σώματος, του μιτοχονδριακού περιεχομένου, του λόγου μιτοχονδριακού προς πυρηνικού DNA και της προοδευτικής κινητικότητας [3].

6.2 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΟΥ ΣΧΕΤΙΚΟΥ ΜΗΚΟΥΣ ΤΩΝ ΤΕΛΟΜΕΡΩΝ ΜΕ ΤΟ ΔΕΙΚΤΗ ΜΑΖΑΣ ΣΩΜΑΤΟΣ, ΤΟ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ ΚΑΙ ΤΗΝ ΑΝΑΛΟΓΙΑ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟΥ ΠΡΟΣ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ DNA

Η παχυσαρκία θεωρείται από καιρό ότι έχει επιβλαβείς επιπτώσεις στην ανδρική γονιμότητα [4]. Οι ακριβείς διαδικασίες και οι συνέπειες αυτών των περιπτώσεων στην ανδρική γονιμότητα παραμένουν ασαφείς παρά τη σημαντική πρόοδο της έρευνας. Κατά συνέπεια, αυτή η μελέτη προσφέρει μια νέα άποψη σχετικά με τη σύνδεση μεταξύ της ανδρικής γονιμότητας και των μιτοχονδρίων, του μήκους των τελομερών και του δείκτη μάζας σώματος. Αρχικά, διερευνήθηκε η σχέση μεταξύ του σχετικού μήκους των τελομερών και του δείκτη μάζας σώματος. Διαπιστώθηκε ότι η μόνη ομάδα με θετική συσχέτιση και στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα ήταν η παχύσαρκη ομάδα, υποδηλώνοντας ότι το μήκος των τελομερών επηρεάζεται από το βάρος και κατά συνέπεια την ποιότητα του σπέρματος. Όσον αφορά τις ομάδες ανδρών με φυσιολογικό και υπέρβαρο δείκτη μάζας σώματος, δεν παρατηρήθηκε κάποια συσχέτιση.

Επιπλέον, παρατηρήσαμε ότι το μέσο σχετικό μήκος τελομερών της παχύσαρκης ομάδας ήταν χαμηλότερο από αυτό των ομάδων με φυσιολογικό δείκτη μάζας σώματος. Βέβαια, το μέσο σχετικό μήκος τελομερών ήταν υψηλότερο στην παχύσαρκη ομάδα από ό,τι στην υπέρβαρη ομάδα. Αυτό το αποτέλεσμα είναι συναφές με μια διαφορετική μελέτη που χρησιμοποίησε επαρκή αριθμό συμμετεχόντων(31). Στην παρούσα μελέτη επιλέχθηκαν ασθενείς με παχυσαρκία (Δείκτης Μάζας Σώματος ≥ 30 kg/m²) από τον γενικό πληθυσμό και όχι μόνο από υπογόνιμους άνδρες, ενώ η προαναφερθείσα μελέτη στρατολόγησε ασθενείς από υπογόνιμα ζευγάρια που υποβάλλονταν στον πρώτο κύκλο εξωσωματικής γονιμοποίησης με ανδρικό δείκτη μάζας σώματος μεγαλύτερο από 28 (που περιλαμβάνει και τα δύο υπέρβαροι και παχύσαρκοι ασθενείς)(31). Θα πρέπει να ληφθεί υπόψη ένας πολύπλοκος μηχανισμός που περιλαμβάνει αμφιλεγόμενα στοιχεία, καθώς η βράχυνση των τελομερών σε παχύσαρκα άτομα μπορεί να μην είναι άμεσο αποτέλεσμα της παχυσαρκίας. Το λειτουργικό σύστημα που σχετίζεται με το βάρος και τα αυξημένα επίπεδα ROS, τα οποία προκαλούν βράχυνση των τελομερών, θα μπορούσαν να είναι ένας από τους κύριους λόγους(32). Μία από τις κύριες αιτίες θα μπορούσε να είναι το OS που σχετίζεται με το βάρος και τα αυξημένα επίπεδα ROS, τα οποία μειώνουν τα τελομερή.

Τα τελομερή, οι υπομονάδες τελομεράσης και τα μιτοχόνδρια έχουν συνδεθεί στενά τα τελευταία χρόνια. Η κύρια λειτουργία της τελομεράσης είναι να αποτρέπει τη βράχυνση και να διατηρεί το μήκος των τελομερών. Επιπλέον, τα τελομερή εμπλέκονται στη διατήρηση της βιωσιμότητας των κυττάρων. Έχει βρεθεί ότι η υπομονάδα TERT της που διεγείρεται από το οξειδωτικό στρες απομακρύνεται από τον πυρήνα και εναποτίθεται

στα μιτοχόνδρια από το ένζυμο τελομεράση. Μειώνοντας τη βιογένεση μιτοχονδριακών ROS, αυτός ο συνεντοπισμός της υπομονάδας TERT και των μιτοχονδρίων διατηρεί τη μιτοχονδριακή λειτουργία και μετριάξει τη βλάβη του πυρηνικού DNA και την απόπτωση (33,34). Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι είτε δεν υπάρχει καθόλου είτε υπάρχει πολύ μικρή βλάβη στο DNA στα κύτταρα που εξαλείφουν πλήρως την τελομεράση. Αντιθέτως, τα επίπεδα της τελομεράσης στα κύτταρα αυξάνονται ως απόκριση σε βλάβη στο κυτταρικό DNA που δεν έχει εξαλειφθεί πλήρως. Η τελομεράση, σύμφωνα με τους συγγραφείς, μπορεί να επηρεάσει αρνητικά τα ένζυμα επιδιόρθωσης των πυρήνων των κυττάρων, οδηγώντας δυνητικά σε αυξημένη βλάβη του DNA(35). Αυτό εξηγεί επίσης γιατί, σε ορισμένες περιπτώσεις, η τελομεράση δεν μπορεί να ανακάμψει πλήρως από τη βλάβη του DNA.

Η βλάβη των τελομερών έχει ως αποτέλεσμα τον επαναπρογραμματισμό της μιτοχονδριακής βιοσύνθεσης και τις μιτοχονδριακές δυσλειτουργίες, οι οποίες έχουν σημαντικές συνέπειες για τη γήρανση και τις ασθένειες. Ωστόσο, οι μιτοχονδριακές δυσλειτουργίες προκαλούν διάβρωση των τελομερών(11). Στη μελέτη μας, τα ευρήματα που προέκυψαν κατά τη σύγκριση του μιτοχονδριακού περιεχομένου και του σχετικού μήκους των τελομερών με βάση το δείκτη μάζας σώματος δεν ήταν στατιστικά σημαντικά. Ωστόσο, φαίνεται ότι υπάρχει θετική συσχέτιση για την ομάδα των παχύσαρκων ανδρών και αρνητική συσχέτιση για την φυσιολογική και υπέρβαρη ομάδα. Τέλος, διερευνήθηκε η σχέση μεταξύ της αναλογίας του μιτοχονδριακού προς πυρηνικού DNA και του σχετικού μήκους των τελομερών για κάθε μία από τις τρεις ομάδες συμμετεχόντων. Η συσχέτιση ήταν θετική για την ομάδα των παχύσαρκων και αρνητική για τη φυσιολογική και υπέρβαρη ομάδα. Ωστόσο, για όλες τις υπό μελέτη ομάδες καμία παράμετρος δεν είχε στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα.

Η βράχυνση των τελομερών και η δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων είναι χαρακτηριστικά της κυτταρικής γήρανσης. Συνδέονται στενά, με το πρώτο να επηρεάζει τη μιτοχονδριακή λειτουργία μέσω των οδών σηματοδότησης p53-PGC-1α. Ενώ η γήρανση είναι αναπόφευκτη, η ηλικιακή ανάπτυξη μπορεί να μειώσει το προσδόκιμο ζωής λόγω αυξημένων παραγόντων κινδύνου για χρόνιες ασθένειες. Διαφορετικές μελέτες υποδεικνύουν ότι η βράχυνση των τελομερών είναι τροποποιήσιμη, καθώς υπάρχει σημαντική μεταβλητότητα στον ρυθμό βράχυνσης των τελομερών που είναι ανεξάρτητη από τη χρονολογική ηλικία (36). Η φθορά των τελομερών έχει, επίσης, συνδεθεί με άλλους δυνητικά τροποποιήσιμους παράγοντες του τρόπου ζωής, όπως η κακή διατροφή και η σωματική αδράνεια που υποδηλώνουν την πλαστικότητα του μήκους των τελομερών (37,38). Ευρήματα από διαφορετικές μελέτες δείχνουν ότι η υγιεινή διατροφή, το χαμηλό στρες, η άσκηση και ο καλός ύπνος σχετίζονται με μεγαλύτερο μήκος τελομερών (39,40). Η έλλειψη άμεσων στοιχείων, η θετική συσχέτιση μεταξύ του μήκους των τελομερών του σπέρματος και του κατακερματισμού του DNA του σπέρματος σε νεαρά άτομα μπορεί να οφείλεται στην ενεργοποίηση της τελομεράσης από έναν αρνητικό παράγοντα χαμηλού επιπέδου, όπως το ήπιο οξειδωτικό στρες, που προκαλεί τόσο επέκταση του μήκους των τελομερών των σπερματοζωαρίων καθώς και γονιδιωματική βλάβη (41–43).

Η φυσιολογική διαδικασία γονιμοποίησης μπορεί να επηρεαστεί από αλλαγές στο μιτοχονδριακό DNA (mtDNA) (44–47). Ωστόσο, δεν υπάρχουν πολλές μελέτες σχετικά με πιθανές συσχετίσεις μεταξύ των τελομερών και των μιτοχονδριακών χαρακτηριστικών στο ανθρώπινο σπέρμα. Είναι ευρέως αποδεκτό ότι το mtDNA είναι ιδιαίτερα επιρρεπές σε αθροιστική μετάλλαξη και διαγραφή, είτε ως αποτέλεσμα της εγγύτητάς του με τις αναπνευστικές αλυσίδες, που παράγουν ROS, είτε επειδή δεν διαθέτει προστατευτικές ιστόνες(48). Οι οξειδωτικές προσβολές είναι γνωστό ότι επηρεάζουν τόσο το πυρηνικό όσο και το μιτοχονδριακό DNA(49). Έχει συγκεντρωθεί ένα σύνολο στοιχείων που αποδεικνύουν ότι η τελομεράση μπορεί επίσης να λειτουργήσει με τρόπους ανεξάρτητους από τελομερή και ότι, υπό το οξειδωτικό στρες, η υπομονάδα TERT μεταφέρεται μεταξύ του πυρήνα και των μιτοχονδρίων και η υπομονάδα TERC υποβάλλεται σε επεξεργασία, εισάγεται στα μιτοχόνδρια και εξάγεται πίσω στο κυτταρόπλασμα (11).

Το μήκος και η δομή των τελομερών είναι απαραίτητα για τη διατήρηση της ακεραιότητας του πυρηνικού γονιδιώματος. Η σπερματογένεση και η σύλληψη συνδέονται ειδικά με τη διατήρηση των τελομερών στα γεννητικά κύτταρα(50). Ένα βασικό συστατικό της δυναμικής διατήρησης της ομοιόστασης του μήκους των τελομερών είναι η ύπαρξη δραστηριότητας της τελομεράσης στα σπερματογόνα κύτταρα. Ήδη υπάρχουσα έρευνα, ωστόσο, έχει δείξει ότι τόσο οι ενδογενείς όσο και οι εξωγενείς μεταβλητές, συμπεριλαμβανομένου του οξειδωτικού στρες, της φλεγμονής, της έκθεσης στο περιβάλλον και των επιλογών τρόπου ζωής, μπορεί να διαταράξουν την ομοιόσταση των τελομερών (51-54). Σύμφωνα με αρκετές μελέτες, η τελομεράση μπορεί ακόμη και να ενεργοποιηθεί σε ορισμένες περιπτώσεις, οδηγώντας σε επιμήκυνση των τελομερών (51-53). Τα χαμηλά επίπεδα έκθεσης στο αρσενικό και το οξειδωτικό στρες έχουν αποδειχθεί ότι ενισχύουν τη δραστηριότητα της τελομεράσης και επιμηκύνουν τα τελομερή (54-56).

Το μέσο ανθρώπινο σπερματοζώαριο περιέχει ένα αντίγραφο μιτοχονδριακού DNA ανά μιτοχόνδριο. Αν και η αλληλουχία mtDNA του σπέρματος είναι η ίδια με αυτή των σωματικών κυττάρων, η δραστηριότητα επιδιόρθωσης του DNA του σπέρματος είτε είναι σημαντικά μειωμένη είτε ανύπαρκτη. Έχει αποδειχθεί ότι, για το λόγο αυτό, το σπέρμα συγκεντρώνει γρήγορα μεταλλάξεις στο mtDNA παρά το γεγονός ότι παράγεται από μιτωτικά κύτταρα (σπερματογονία) και έχει σημαντικά μικρότερη διάρκεια ζωής από τα σωματικά κύτταρα. Με βάση τις τρέχουσες μελέτες, το 84–86% των «φυσιολογικών» βιώσιμων σπερματοζωαρίων έχουν ελαττωματικό mtDNA και η αναλογία μη φυσιολογικού προς φυσιολογικού mtDNA δεν αντιστοιχεί στην κινητικότητα του σπέρματος.

Η προοδευτική κινητικότητα και ο αριθμός των σπερματοζωαρίων είναι δύο σημαντικές παράμετροι που χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση της ποιότητας του σπέρματος σε μια ανάλυση σπέρματος(158). Μπορεί να υπάρχουν κάποιοι συσχετισμοί ή λόγοι για τέτοιες παρατηρήσεις σε ορισμένες περιπτώσεις, ακόμη και αν συνήθως δεν είναι αλήθεια ότι τα παχύσαρκα άτομα έχουν σταθερά υψηλότερες τιμές σε αυτές τις

μετρήσεις(159). Η κατανόηση ότι η ατομική διακύμανση μπορεί να είναι σημαντική και ότι δε θα παράγουν όλοι οι παχύσαρκοι σπερματοζωάρια εξαιρετικής ποιότητας είναι ζωτικής σημασίας. Σύμφωνα με διάφορες έρευνες ή περιπτώσεις, ο υψηλός αριθμός σπερματοζωαρίων και η προοδευτική κινητικότητα των παχύσαρκων ανδρών μπορεί να εξηγηθεί από τις ακόλουθες παραμέτρους: ορμονικοί παράγοντες, αυξημένη τεστοστερόνη, παράγοντες του τρόπου ζωής, προκατάληψη επιλογής, περιορισμούς της μελέτης και γενετική.

Για παράδειγμα, ένα σύστημα ανάλυσης σπέρματος με τη βοήθεια υπολογιστή (Computer Assisted Semen Analysis, CASA) χρησιμοποιήθηκε για την αξιολόγηση του σπέρματος 1285 ανδρών. Σε σύγκριση με τους άνδρες κανονικού βάρους, οι παχύσαρκοι άνδρες εμφάνισαν μειωμένη συγκέντρωση και κινητικότητα σπέρματος, καθώς και μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης ανωμαλιών και παραμορφώσεων στην κεφαλή του σπερματοζωαρίου(160). Επιπλέον, οι παχύσαρκοι άνδρες έχουν συνήθως μεγαλύτερο χρόνο έως την εγκυμοσύνη και μεγαλύτερη περίοδο κύησης. Αυτές οι μελέτες αποκάλυψαν μια σημαντική σχέση μεταξύ της αύξησης του ανδρικού δείκτη μάζας σώματος και της μείωσης της ποιότητας του σπέρματος υπό το πρίσμα αυτό.

Η ποιότητα του σπέρματος, μια σημαντική μεταβλητή στην πρόβλεψή της, επηρεάζει σημαντικά την ανδρική γονιμότητα(161). Τα μιτοχόνδρια είναι απαραίτητα για τη λειτουργία του σπέρματος καθώς παρέχουν την ενέργεια που απαιτείται για την κινητικότητα των σπερματοζωαρίων, ένα σημαντικό συστατικό της γονιμότητας. Η κατανόηση των πιθανών σχέσεων μεταξύ του μιτοχονδριακού περιεχομένου του σπέρματος, του δείκτη μάζας σώματος, του λόγου μιτοχονδριακού προς πυρηνικού DNA και της προοδευτικής κινητικότητας, παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον. Η αυξανόμενη κινητικότητα του σπερματοζωαρίου, η οποία είναι απαραίτητη για να περάσει από το γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα και να φτάσει να γονιμοποιήσει το ωάριο, εξαρτάται από την κατάλληλη παροχή λειτουργικών μιτοχονδρίων(162).

Πολυάριθμες ερευνητικές μελέτες έχουν εξετάσει τη σχέση μεταξύ της ποιότητας του σπέρματος και του δείκτη μάζας σώματος. Η παχυσαρκία είναι γνωστό ότι έχει αρνητική επίδραση στην ανδρική γονιμότητα, παρόλο που οι ακριβείς επιδράσεις του δείκτη μάζας σώματος στο μιτοχονδριακό περιεχόμενο και την αναλογία μιτοχονδριακού προς πυρηνικού DNA δεν έχουν τεκμηριωθεί επαρκώς. Η χρόνια φλεγμονή χαμηλού βαθμού συνδέεται συχνά με την παχυσαρκία. Τα λιποκύτταρα είναι μεταξύ των τύπων κυττάρων στο σώμα που μπορεί να επηρεαστούν από αυτή τη φλεγμονή. Ιδιαίτερα, τα λιποκύτταρα των παχύσαρκων ατόμων έχουν την ικανότητα να απελευθερώνουν λιποκίνες και φλεγμονώδεις μεσολαβητές που διαταράσσουν τις κανονικές λειτουργίες των κυττάρων και ενθαρρύνουν τη φλεγμονή(163). Υπάρχουν στοιχεία που υποδηλώνουν ότι μια ανισορροπία μεταξύ των διαδικασιών του θανάτου των λιποκυττάρων και της λιπογένεσης μπορεί να προκύψει από την παχυσαρκία. Το μέγεθος και η λειτουργικότητα του λιπώδους ιστού μπορεί να επηρεαστεί από αυτή την ισορροπία, η οποία μπορεί επίσης να οδηγήσει σε μεταβολικά προβλήματα που σχετίζονται με την παχυσαρκία.

Η μεταβολική απορρύθμιση, που περιλαμβάνει την αντίσταση στην ινσουλίνη και τη δυσλιπιδαιμία, συνδέεται με την παχυσαρκία. Αυτές οι μεταβολικές ανισορροπίες μπορεί να έχουν επίδραση σε διαφορετικούς ιστούς και κύτταρα, κάτι που μπορεί να έχει επίδραση στην απόπτωση και την κυτταρική επιβίωση. Κυτταρικές αλλοιώσεις και απορρύθμιση είναι συχνά παρούσες σε αυτές τις διαταραχές, οι οποίες μπορεί να επηρεάσουν τον κυτταρικό θάνατο και τη βιωσιμότητα σε προσβεβλημένους ιστούς και όργανα(28). Επιπλέον, υπάρχουν δεδομένα που υποδηλώνουν μια σύνδεση μεταξύ του ΔΜΣ ενός άνδρα και της ποιότητας του σπέρματός του. Η παχυσαρκία, η οποία συχνά αντιστοιχεί σε υψηλό ΔΜΣ, έχει αποδειχθεί σε αρκετές μελέτες ότι μειώνει τον αριθμό των σπερματοζωαρίων. Η πιθανότητα επιτυχούς γονιμοποίησης μπορεί να μειωθεί με μειωμένο αριθμό σπερματοζωαρίων(164). Σύμφωνα με ορισμένες μελέτες, οι άνδρες που είναι υπέρβαροι ή παχύσαρκοι μπορεί να έχουν λιγότερη κινητικότητα στο σπέρμα τους σε σύγκριση με τους άνδρες που έχουν φυσιολογικό ΔΜΣ. Η μη φυσιολογική μορφολογία του σπέρματος έχει συσχετιστεί με υψηλότερη συχνότητα υψηλού ΔΜΣ, που μπορεί να θέσει σε κίνδυνο την ικανότητα του σπέρματος να διεισδύσει στο ωάριο.

Οι ορμονικές ανισορροπίες που προκαλούνται από την παχυσαρκία μπορεί να περιλαμβάνουν χαμηλά επίπεδα τεστοστερόνης και υψηλά επίπεδα οιστρογόνων. Η ποιότητα και η παραγωγή σπέρματος ενδέχεται να μειωθούν ως αποτέλεσμα αυτών των ορμονικών ανωμαλιών. Η παχυσαρκία και το οξειδωτικό στρες συνδέονται συχνά με τον κατακερματισμό του DNA και τη βλάβη των σπερματοκυττάρων(164). Μια πιθανή αιτία της μειωμένης ποιότητας του σπέρματος είναι το οξειδωτικό στρες. Η κακή κυκλοφορία της θερμότητας που προκαλείται από το υπερβολικό σωματικό λίπος μπορεί να οδηγήσει σε υψηλότερες θερμοκρασίες του οσχέου. Οι υψηλές θερμοκρασίες των όρχεων μπορούν να βλάψουν την ποιότητα και την ποσότητα του παραγόμενου σπέρματος. Τα ζευγάρια μπορεί να δυσκολεύονται περισσότερο να συλλάβουν εάν ένας άνδρας έχει σπέρμα κακής ποιότητας. Θετικά, η έρευνα έχει δείξει ότι οι άνδρες που είναι υπέρβαροι ή παχύσαρκοι μπορεί να δουν βελτίωση στην ποιότητα του σπέρματός τους ακολουθώντας μια δίαιτα και ασκώντας(165).

Ο σχετικός αριθμός αντιγράφων του μιτοχονδριακού DNA έχει συγκεντρώσει την προσοχή ως δυνητικός καθοριστικός παράγοντας της προοδευτικής κινητικότητας των σπερματοζωαρίων, ένας κρίσιμος παράγοντας για την ανδρική γονιμότητα. Τα μιτοχόνδρια τα οποία βρίσκονται στο μεσαίο τμήμα των σπερματοζωαρίων, παρέχουν την απαραίτητη ενέργεια για την κίνηση των μαστιγίων. Η ενέργεια αυτή είναι καθοριστικής σημασίας για την κινητικότητα του σπέρματος και την επιτυχή γονιμοποίηση. Αλλαγές στον σχετικό αριθμό αντιγράφων μιτοχονδριακού DNA μπορεί να επηρεάσουν την κινητικότητα του σπέρματος, επηρεάζοντας έτσι τα αποτελέσματα γονιμότητας. Υψηλότεροι αριθμοί αντιγράφων mtDNA έχουν συσχετιστεί με αυξημένη κινητικότητα σπέρματος, υποδεικνύοντας έναν πιθανό ρόλο για τη βιογένεση των μιτοχονδρίων στην ενίσχυση της ενεργειακής ικανότητας των σπερματοζωαρίων. Αντίθετα, χαμηλότεροι αριθμοί αντιγράφων μιτοχονδριακού DNA έχουν συνδεθεί με μειωμένη κινητικότητα σπερματοζωαρίων, δυνητικά αντανάκλωντας τη μειωμένη μιτοχονδριακή λειτουργία και την παραγωγή ενέργειας στα σπερματοζωάρια. Η

κατανόηση της περίπλοκης σχέσης μεταξύ του σχετικού αριθμού αντιγράφων μιτοχονδριακού DNA και της προοδευτικής κινητικότητας των σπερματοζωαρίων παρέχει πολύτιμες γνώσεις για την ανδρική αναπαραγωγική υγεία και το δυναμικό γονιμότητας, προσφέροντας πιθανές οδούς για διαγνωστικές και θεραπευτικές παρεμβάσεις που στοχεύουν στην αντιμετώπιση των προκλήσεων γονιμότητας.

Η εξάπλωση του αριθμού αντιγράφων μιτοχονδριακού DNA του σπέρματος έχει συνδεθεί με ελαττωματική σπερματογένεση και μια δυσλειτουργική οδό αυτοφαγίας στη διάσπαση των μιτοχονδρίων. Ο μεγαλύτερος αριθμός αντιγράφων μιτοχονδριακού DNA σπέρματος συνδέθηκε με ελαττωματική κινητικότητα, μειωμένη τόσο της συγκέντρωσης όσο και του συνολικού αριθμού σπερματοζωαρίων, σύμφωνα με δύο έρευνες μεταξύ των ανδρών των ζευγαριών που υποβλήθηκαν σε έλεγχο γονιμότητας. Επιπλέον, τρεις μελέτες παρατήρησης έδειξαν ότι τα σπερματοζωάρια από άτομα με ελαττωματικές παραμέτρους σπέρματος ενίσχυσαν σημαντικά τον αριθμό αντιγράφων μιτοχονδριακού DNA. Αυτές οι έρευνες υποδηλώνουν ότι ο ευαίσθητος δείκτης της ακεραιότητας του ανθρώπινου σπέρματος μπορεί να είναι ο αριθμός αντιγράφων mtDNA των σπερματοζωαρίων. Η κινητικότητα του σπέρματος μπορεί να επηρεαστεί από διαφορές στην ακεραιότητα του μιτοχονδριακού DNA ή στη μιτοχονδριακή δραστηριότητα, σύμφωνα με μελέτες(162).

Η περιεκτικότητα του μιτοχονδριακού DNA και ο δείκτης μάζας σώματος παρουσιάζουν μια πολύπλοκη αλληλεπίδραση που υπογραμμίζει την περίπλοκη σχέση μεταξύ γενετικής και μεταβολισμού. Η έρευνα δείχνει ότι οι αλλαγές στην περιεκτικότητα του μιτοχονδριακού DNA μπορεί να επηρεάσουν τη μεταβολική αποτελεσματικότητα και να συμβάλουν σε καταστάσεις όπως η παχυσαρκία. Συγκεκριμένα, οι παραλλαγές στην περιεκτικότητα του μιτοχονδριακού DNA έχουν συνδεθεί με διαφορές στον βασικό μεταβολικό ρυθμό και στην ενεργειακή δαπάνη, που με τη σειρά τους μπορεί να επηρεάσουν την τάση ενός ατόμου προς την παχυσαρκία. Κατά συνέπεια, άτομα με χαμηλότερη περιεκτικότητα μιτοχονδριακού DNA μπορεί να παρουσιάσουν μειωμένους μεταβολικούς ρυθμούς, προδιαθέτοντας δυνητικά σε υψηλότερα επίπεδα δείκτη μάζας σώματος. Αντίθετα, υψηλότερη περιεκτικότητα μιτοχονδριακού DNA μπορεί να συσχετιστεί με ενισχυμένη μεταβολική δραστηριότητα και χαμηλότερο δείκτη μάζας σώματος (162). Η αναλογία του μιτοχονδριακού DNA προς το πυρηνικό DNA έχει αναδειχθεί ως θέμα ενδιαφέροντος στο πλαίσιο του δείκτη μάζας σώματος ρίχνοντας φως στην περίπλοκη αλληλεπίδραση μεταξύ της μιτοχονδριακής λειτουργίας και της μεταβολικής υγείας. Μελέτες υποδεικνύουν ότι οι αλλαγές στην αναλογία μιτοχονδριακού προς πυρηνικού DNA μπορεί να σχετίζονται με διακυμάνσεις του δείκτη μάζας σώματος και μεταβολικές διαταραχές.

Η παρούσα διδακτορική διατριβή στοχεύει να διερευνήσει τις σχέσεις μεταξύ του μιτοχονδριακού περιεχομένου των σπερματοζωαρίων, της αναλογίας μιτοχονδριακού προς πυρηνικού DNA και της συσχέτισης με το δείκτη μάζας σώματος και την προοδευτική κινητικότητα των σπερματοζωαρίων. Επίσης, έχει ως στόχο να διερευνήσει τυχόν πιθανές σχέσεις μεταξύ του δείκτη μάζας σώματος, της μιτοχονδριακής

λειτουργίας και του σχετικού μήκους τελομερών. Η κατανόηση σχετικά με το πώς οι μεταβολικοί και γενετικοί παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν την ανδρική αναπαραγωγική υγεία, αποτελεί καίριο ζήτημα.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7^ο

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Η ανδρική υπογονιμότητα που σχετίζεται με την κινητικότητα του σπερματοζωαρίου έχει αποδοθεί στα μιτοχόνδρια ή σε ανωμαλίες του μιτοχονδριακού DNA του σπέρματος.
- Οι άνδρες με μιτοχονδριακές διαταραχές είναι γνωστό ότι πάσχουν από ανδρική υπογονιμότητα.
- Στους άνδρες με φυσιολογικό BMI το μιτοχονδριακό περιεχόμενο αυξάνεται με την αύξηση του BMI και την προοδευτική κινητικότητα.
- Στους υπέρβαρους άνδρες το μιτοχονδριακό περιεχόμενο δεν παρουσιάζει κάποια συσχέτιση με το BMI ενώ έχει θετική συσχέτιση με την προοδευτική κινητικότητα.
- Ο σχετικός αριθμός αντιγράφων μιτοχονδριακού DNA στις ομάδες φυσιολογικών και υπέρβαρων, έδειξε θετική συσχέτιση με το δείκτη μάζας σώματος ενώ αρνητική συσχέτιση για την προοδευτική κινητικότητα.
- Η σύγκριση του σχετικού αριθμού αντιγράφων μιτοχονδριακού DNA τόσο με το δείκτη μάζας σώματος όσο και με την προοδευτική κινητικότητα συσχετίστηκαν αρνητικά.
- Όσο αυξάνεται ο δείκτης μάζας σώματος αυξάνεται και το μήκος των τελομερών.
- Η μειωμένη συγκέντρωση μιτοχονδρίων ενδέχεται να συνδέεται με μακρύτερα τελομερή.
- Δεδομένου ότι η συγκέντρωση των μιτοχονδρίων και το μήκος των τελομερών είναι δείκτες της κυτταρικής ακεραιότητας και υγείας, αυτές οι συσχετίσεις ενδέχεται να έχουν αντίκτυπο στην ποιότητα του σπέρματος.
- Η ανδρική υπογονιμότητα ενδέχεται να επηρεάζεται από την ανισορροπία στον αριθμό αντιγράφων του μιτοχονδριακού DNA σε σύγκριση με το γενωμικό DNA στο σπέρμα.
- Η τελομεράση σε συνθήκες οξειδωτικού στρες εξέρχεται από τον πυρήνα και εισέρχεται στα μιτοχόνδρια για να τα προστατεύσει.
- Εάν το οξειδωτικό στρες παραμείνει η τελομεράση εξέρχεται από τα μιτοχόνδρια και εισέρχεται στον πυρήνα για να προστατέψει τα τελομερή επιμηκώνοντας τα.

ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ



A. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΤΙΤΛΟΣ «ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΓΕΝΩΜΙΚΩΝ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΩΝ ΤΩΝ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΤΕΛΟΜΕΡΩΝ ΣΤΑ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΑ»

Προηγούμενη έρευνα έχει τεκμηριώσει τον ζωτικό ρόλο των τελομερών στην ανθρώπινη γονιμότητα. Τα τελομερή αποτελούν προϋποθέσεις για τη διατήρηση της ακεραιότητας των χρωμοσωμάτων αποτρέποντας την απώλεια γενετικού υλικού μετά από γεγονότα αντιγραφής. Λίγα είναι γνωστά για τη συσχέτιση μεταξύ του μήκους των τελομερών του σπέρματος και της μιτοχονδριακής ικανότητας που περιλαμβάνει τη δομή και τις λειτουργίες του.

Τα μιτοχόνδρια είναι δομικά και λειτουργικά διακριτά οργανίδια που βρίσκονται στο μεσαίο τμήμα του σπερματοζωαρίου. Κύριος ρόλος τους αποτελεί η παραγωγή τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (OXPHOS), η οποία είναι απαραίτητη για την κινητικότητα του σπέρματος και τη δημιουργία αντιδραστικών ειδών οξυγόνου (ROS). Παρόλο που μια μέτρια συγκέντρωση ROS είναι κρίσιμη για τη σύντηξη και τη γονιμοποίηση ωαρίων-σπερματοζωαρίων, η υπερβολική παραγωγή ROS σχετίζεται, κυρίως, με τη βράχυνση των τελομερών, τον κατακερματισμό του DNA του σπέρματος και τις αλλαγές στο πρότυπο μεθυλίωσης που οδηγεί σε ανδρική υπογονιμότητα.

Η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία αποτελεί παράγοντα κινδύνου στην παθογένεση μεταβολικών διαταραχών. Σύμφωνα με τις ενεργειακές απαιτήσεις, η οξειδωτική φωσφορυλίωση και η αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων συνεργάζονται για να παράγουν ATP σε επαρκείς ποσότητες στα μιτοχόνδρια των ευκαρυωτικών κυττάρων. Η μη φυσιολογική μιτοχονδριακή δραστηριότητα προκαλεί συσσώρευση λίπους και αντίσταση στην ινσουλίνη, καθώς τα κύτταρα απαιτούν μια ισορροπία μεταξύ της παραγωγής ATP με οξειδωτική φωσφορυλίωση (OXPHOS) στα μιτοχόνδρια και της διάχυσης της βαθμίδας πρωτονίων για τη μείωση της βλάβης από τα αντιδραστικά είδη οξυγόνου (ROS). Το μιτοχονδριακό DNA είναι απαραίτητο για την κυτταρική σύνθεση ενέργειας και έχει επιπτώσεις σε διαταραχές που σχετίζονται με την ηλικία.

Τα τελομερή, τα προστατευτικά καλύμματα στα άκρα των χρωμοσωμάτων, παίζουν σημαντικό ρόλο στη γήρανση και τη γήρανση των κυττάρων, σε αντίθεση με το δείκτη μάζας σώματος, ο οποίος χρησιμοποιείται συνήθως ως μέτρο της γενικής υγείας και της παχυσαρκίας. Έχει προσδιοριστεί ότι το μήκος των τελομερών στα ανθρώπινα σπερματοζωάρια είναι περίπου 6-20kb, μεγαλύτερο από αυτό στα σωματικά κύτταρα. Η διάταξη των τελομερών στα σπερματοζωάρια, συγκεκριμένα η θέση τους κοντά στην πυρηνική μεμβράνη ή στην πυρηνική περιφέρεια, πιθανών εξυπηρετεί κάποιους σκοπούς.

Αρχικά, ενδέχεται να διευκολύνει την πρόσβαση του ωαρίου σε αυτές τις περιοχές κατά τη διάρκεια της γονιμοποίησης, επηρεάζοντας δυνητικά την ανάπτυξη των προπυρήνων. Μια άλλη εξήγηση για τη διαφορετική κατανομή των τελομερών σε σχέση με τα υπογόνιμα αρσενικά θα μπορούσε να είναι ότι η κακή θέση των τελομερών καθιστά το ωοκύτταρο λιγότερο προσβάσιμο, γεγονός που θα μπορούσε να είναι η αιτία της υπογονιμότητας. Η κατανομή των τελομερών σε αυτή την περίπτωση μπορεί να υποδηλώνει υπογονιμότητα, αλλά μπορεί επίσης να είναι η αιτία της υπογονιμότητας και όχι απλώς ένα σύμπτωμα σε έναν υπογόνιμο άνδρα. Δεδομένου ότι τα τελομερή συνδέονται με ιστόνες και τοποθετούνται κοντά στα πυρηνικά όρια, υποτίθεται ότι αυτό μπορεί να έχει λειτουργική επίδραση στη διαδικασία της γονιμοποίησης.

Σε πρώτη φάση, με τη μέθοδο της ποσοτικής αντίδρασης πολυμεράσης (q-PCR) και τη χρήση κατάλληλων ζευγών εκκινητών προσδιορίσαμε την έκφραση του μιτοχονδριακού περιεχομένου σε σπερματοζωάρια. Προσδιορίστηκε, λοιπόν, ότι στους άνδρες με φυσιολογικό ΔΜΣ το μιτοχονδριακό περιεχόμενο έχει θετική συσχέτιση τόσο με το ΔΜΣ όσο και με την προοδευτική κινητικότητα. Επίσης, στην ίδια ομάδα ο λόγος μιτοχονδριακού προς πυρηνικού DNA είχε θετική συσχέτιση με το ΔΜΣ. Στους υπέρβαρους άνδρες το μιτοχονδριακό περιεχόμενο δεν παρουσίασε κάποια συσχέτιση με το ΔΜΣ και με την προοδευτική κινητικότητα. Τέλος, για την παχύσαρκτη ομάδα ανδρών βρέθηκε ότι ο σχετικός αριθμός αντιγράφων μιτοχονδριακού DNA είχε θετική συσχέτιση με την προοδευτική κινητικότητα.

Σε δεύτερη φάση, Σε δεύτερη φάση, προσδιορίστηκε το σχετικό μήκος των τελομερών με τη χρήση της μεθόδου ποσοτικής αντίδρασης πολυμεράσης και την επιλογή κατάλληλων ζευγών εκκινητών. Αποδείχθηκε, λοιπόν, ότι στην ομάδα των παχύσαρκων ανδρών το σχετικό μήκος των τελομερών είχε θετική συσχέτιση με το ΔΜΣ. Η αξιολόγηση του σχετικού μήκους των τελομερών για τις ομάδες ανδρών με φυσιολογικό και υπέρβαρο ΔΜΣ δεν έδωσε κάποια στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα. Η τελομεράση φαίνεται, λοιπόν, ότι σε συνθήκες οξειδωτικού στρες (παχυσαρκία) εξέρχεται από τον πυρήνα και εισέρχεται στα μιτοχόνδρια για να τα προστατεύσει. Εάν το οξειδωτικό στρες παραμείνει, η τελομεράση εξέρχεται από τα μιτοχόνδρια και εισέρχεται στα τελομερή για να τα προστατέψει επιμηκύνοντάς τα.

Αυτή η ανασκόπηση στοχεύει να τονίσει τη λειτουργική σύνδεση μεταξύ της βιογένεσης των μιτοχονδρίων και του μήκους των τελομερών στην ανδρική υπογονιμότητα, καθώς οι μιτοχονδριακές βλάβες έχουν καταστροφική επίδραση στο μήκος των τελομερών, οδηγώντας τόσο σε επιμήκυνση των τελομερών όσο και σε επαναπρογραμματισμό της βιοσύνθεσης των μιτοχονδρίων. Επιπλέον, σκοπός της μελέτης αποτελεί και η διερεύνηση της σχέσης μεταξύ του μιτοχονδριακού περιεχομένου του σπέρματος και του λόγου μιτοχονδριακού προς πυρηνικού DNA σε σχέση με τον δείκτη μάζας σώματος και πώς μπορεί να επηρεάσει την προοδευτική κινητικότητα των σπερματοζωαρίων. Η κατανόηση των σχέσεων μεταξύ αυτών των σημαντικών μεταβλητών θα μας βοηθήσει

να κατανοήσουμε καλύτερα τους πιθανούς μηχανισμούς που θα μπορούσαν να συνδέσουν την κινητικότητα και την ποιότητα του σπέρματος με το δείκτη μάζας σώματος, καθώς και την περαιτέρω κατανόηση της ανδρικής γονιμότητας και της αναπαραγωγικής υγείας. Αυτή η μελέτη στοχεύει, επίσης, να προωθήσει τη γνώση των μοριακών μηχανισμών στους οποίους βασίζεται ο δείκτης μάζας σώματος, των παραγόντων και των πιθανών επιδράσεων του τρόπου ζωής και των μεταβολικών παραγόντων στην κυτταρική υγεία, διερευνώντας τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ αυτών των τριών μεταβλητών.

Σε αντίθεση με τη βλαστική σειρά, όπου τα τελομερή γενικά πιστεύεται ότι παραμένουν σταθερά σε ένα είδος, οι ανώτεροι σωματικοί ιστοί των ζώων έχουν αποδειχθεί ότι παρουσιάζουν βράχυνση των τελομερών με την ηλικία. Ένα σημάδι νεότητας και βιολογικής ικανότητας πιστεύεται ότι είναι τα μακρύτερα τελομερή στους σωματικούς ιστούς ενός ατόμου σε σύγκριση με άλλα μέλη του ίδιου είδους. Ήταν λοιπόν έκπληξη όταν πολλά εργαστήρια ανακάλυψαν ότι το σπέρμα των ηλικιωμένων ανδρών είχε μακρύτερα τελομερή, γεγονός που είχε ως αποτέλεσμα τα παιδιά τους να έχουν λευκοκύτταρα με υψηλότερο μήκος τελομερών.

Η εξέταση των τελομερών και των μιτοχονδριακών γονιδιωματικών ανασυνδυασμών στα σπερματοζωάρια αντιπροσωπεύει έναν τομέα έρευνας αιχμής με βαθιές επιπτώσεις στην κατανόηση της αναπαραγωγικής βιολογίας και των προτύπων κληρονομικότητας. Αυτή η μελέτη χρησιμοποιεί προηγμένες μοριακές τεχνικές για τη διερεύνηση της παρουσίας και της φύσης των τελομερικών και μιτοχονδριακών γονιδιωματικών αναδιατάξεων εντός των σπερματοζωαρίων. Η έρευνα στοχεύει να αποσαφηνίσει τους μηχανισμούς που διέπουν αυτούς τους ανασυνδυασμούς και να αξιολογήσει τον πιθανό αντίκτυπό τους στη γονιμότητα, τη γενετική ποικιλότητα και τη μετάδοση του μιτοχονδριακού DNA.

B. ABSTRACT

TITLE «EXPLORING TELOMERE AND MITOCHONDRIAL GENOMIC RECOMBINATIONS IN SPERMATOZOA: A COMPREHENSIVE EXAMINATION AND DETECTION STUDY»

Prior research has substantiated the vital role of telomeres in human fertility. Telomeres are prerequisites for maintaining the integrity of chromosomes by preventing the loss of genetic material following replication events. Little is known about the association between sperm telomere length and mitochondrial capacity involving its structure and functions.

Mitochondria are structurally and functionally distinct organelles that are located on the spermatozoon's midpiece. Mitochondria produce adenosine triphosphate (ATP) through oxidative phosphorylation (OXPHOS), which is necessary for sperm motility and generate reactive oxygen species (ROS). While a moderate concentration of ROS is critical for egg—sperm fusion, and fertilization, excessive ROS generation is primarily related to telomere shortening, sperm DNA fragmentation, and alterations in the methylation pattern leading to male infertility. Mitochondrial dysfunction is a risk factor in the pathogenesis of metabolic disorders. According to the energy requirements, oxidative phosphorylation and the electron transport chain work together to produce ATP in sufficient quantities in the mitochondria of eukaryotic cells. Abnormal mitochondrial activity causes fat accumulation and insulin resistance as cells require a balance between the production of ATP by oxidative phosphorylation (OXPHOS) in the mitochondria and the dissipation of the proton gradient to reduce damage from reactive oxygen species (ROS).

Telomeres, the protective caps at the ends of chromosomes, play a major role in cellular aging and senescence, in contrast to BMI, which is commonly used as a measure of general health and obesity. Mitochondrial DNA is essential for the cellular synthesis of energy and has implications for age-related disorders. It has been determined that the telomere length (TL) in human spermatozoa is roughly 6–20 kb, longer than that in somatic cells. The arrangement of telomeres in sperm cells, specifically their location near the nuclear membrane or at the nuclear periphery, may have a purpose. This purpose is theorized to facilitate the oocyte's access to these regions during fertilization, potentially influencing the growth of pronuclei. Another explanation for the differential distribution of telomeres concerning infertile males could be that poor telomere positioning makes the oocyte less accessible, which could be the cause of infertility. Telomere distribution in this case may suggest infertility, but it may also be the cause of infertility rather than just a symptom in an infertile man. Given that telomeres are histone-bound and positioned near nuclear boundaries, it is hypothesized that this may have a functional effect on the process of fertilization.

In the first phase, with the method of quantitative polymerase reaction (q-PCR) and the use of appropriate primer pairs, we determined the expression of the mitochondrial

content in spermatozoa. Thus, it was determined that in men with a normal BMI, mitochondrial content is positively correlated with both BMI and progressive motility. Also, in the same group the ratio of mitochondrial to nuclear DNA had a positive correlation with BMI. In overweight men, mitochondrial content did not show any correlation with BMI and progressive motility. Finally, for the obese group of men, relative mitochondrial DNA copy number was found to be positively correlated with progressive motility.

In a second phase, relative telomere length was determined using the quantitative polymerase chain reaction method and selection of appropriate primer pairs. It was shown, therefore, that in the group of obese men, the relative length of telomeres had a positive correlation with BMI. Evaluation of relative telomere length for the groups of men with normal and overweight BMI did not yield any statistically significant results. Telomerase seems, therefore, that in conditions of oxidative stress (obesity) it leaves the nucleus and enters the mitochondria to protect them. If oxidative stress persists, telomerase exits the mitochondria and enters the telomeres to protect them by lengthening them.

This review aims to highlight the functional connection between mitochondria biogenesis and telomere length in male infertility, as mitochondrial lesions have a damaging impact on telomere length, leading both to telomere lengthening and reprogramming of mitochondrial biosynthesis. Furthermore, it aims to shed light on how both inositol and antioxidants can positively affect male fertility. This study aims to explore the relationship between the mitochondrial content of sperm and the ratio of mitochondrial DNA to nuclear DNA in relation to body mass index (BMI) and how it may affect the progressive motility of sperm cell. Understanding the relationships between these important variables will help us better understand the possible mechanisms that could connect sperm motility and quality to BMI, as well as further our understanding of male fertility and reproductive health. This study aims to advance knowledge of the molecular mechanisms underlying BMI, the confounding factors and the possible effects of lifestyle and metabolic factors on cellular health by exploring the interactions between these three variables.

In contrast to the germline, where telomeres have generally been thought to stay constant within a species, higher animal somatic tissues have been shown to experience telomere shortening with age. A sign of youth and biological fitness has been thought to be longer telomeres in an individual's somatic tissues compared to other members of the same species. It was therefore surprising when several laboratories discovered that the sperm of older men had longer telomeres, which resulted in their children having leukocytes with higher TL.

The examination of telomere and mitochondrial genomic recombinations in spermatozoa represents a cutting-edge area of research with profound implications for understanding reproductive biology and inheritance patterns. This study employs advanced molecular techniques to investigate the presence and nature of telomeric and mitochondrial genomic rearrangements within sperm cells. The research aims to elucidate the mechanisms underlying these recombinations and assess their potential impact on

fertility, genetic diversity, and the transmission of mitochondrial DNA. The findings from this research contribute valuable insights into the fundamental processes shaping the genetic composition of sperm cells and shed light on the potential consequences for offspring health and development. Understanding the intricacies of telomere and mitochondrial genomic recombinations in spermatozoa holds promise for advancing reproductive medicine, informing assisted reproductive technologies, and addressing broader questions related to evolutionary biology and genetic inheritance.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Wilhelm D, Palmer S, Koopman P. Sex Determination and Gonadal Development in Mammals. *Physiol Rev.* 2007 Jan;87(1):1–28.
2. Eicher EM, Washburn LL. GENETIC CONTROL OF PRIMARY SEX DETERMINATION IN MICE. *Annu Rev Genet.* 1986 Dec;20(1):327–60.
3. Medvinsky AL, Dzierzak EA. Development of the definitive hematopoietic hierarchy in the mouse. *Dev Comp Immunol.* 1998 May;22(3):289–301.
4. Waters BL, Trainer TD. Development of the human fetal testis. *Pediatr Pathol Lab Med J Soc Pediatr Pathol Affil Int Paediatr Pathol Assoc.* 1996;16(1):9–23.
5. Schoenwolf GC, Bleyl SB, Brauer PR, Francis-West PH. Gametogenesis, Fertilization, and First Week. In: Larsen's Human Embryology [Internet]. Elsevier; 2009 [cited 2024 Jan 30]. p. 15–50. Available from: <https://www.elsevier.com/books-and-journals/deleted-doi>
6. Libretti S, Aeddula NR. Embryology, Genitourinary. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 [cited 2024 Feb 5]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559309/>
7. R. Harley V, N. Goodfellow P. The biochemical role of SRY in sex determination. *Mol Reprod Dev.* 1994 Oct;39(2):184–93.
8. Warne GL, Zajac JD. DISORDERS OF SEXUAL DIFFERENTIATION. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 1998 Dec;27(4):945–67.
9. Gurung P, Yetiskul E, Jialal I. Physiology, Male Reproductive System. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 [cited 2024 Jan 30]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538429/>
10. Naz RK, editor. Endocrine Disruptors: Effects on Male and Female Reproductive Systems [Internet]. 2nd ed. CRC Press; 2004 [cited 2024 Jan 30]. Available from: <https://www.taylorfrancis.com/books/9781420038866>
11. Brehm R, Steger K. Regulation of Sertoli cell and germ cell differentiation. *Adv Anat Embryol Cell Biol.* 2005;181:1–93.
12. Holstein AF, Schulze W, Davidoff M. [No title found]. *Reprod Biol Endocrinol.* 2003;1(1):107.
13. Ariel M, Cedar H, McCarrey J. Developmental changes in methylation of spermatogenesis-specific genes include reprogramming in the epididymis. *Nat Genet.* 1994 May;7(1):59–63.
14. Clermont Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol Rev.* 1972 Jan;52(1):198–236.
15. Cobb J, Handel MA. Dynamics of meiotic prophase I during spermatogenesis: from pairing to division. *Semin Cell Dev Biol.* 1998 Aug;9(4):445–50.

16. Wykes SM, Krawetz SA. The Structural Organization of Sperm Chromatin. *J Biol Chem*. 2003 Aug;278(32):29471–7.
17. Brewer LR, Corzett M, Balhorn R. Protamine-Induced Condensation and Decondensation of the Same DNA Molecule. *Science*. 1999 Oct;286(5437):120–3.
18. Ward WS, Partin AW, Coffey DS. DNA loop domains in mammalian spermatozoa. *Chromosoma*. 1989 Sep;98(3):153–9.
19. Ward WS. Organization of sperm DNA by the nuclear matrix. *Am J Clin Exp Urol*. 2018;6(2):87–92.
20. Carrell DT, Emery BR, Hammoud S. Altered protamine expression and diminished spermatogenesis: what is the link? *Hum Reprod Update*. 2007 May 1;13(3):313–27.
21. Aoki VW, Emery BR, Liu L, Carrell DT. Protamine levels vary between individual sperm cells of infertile human males and correlate with viability and DNA integrity. *J Androl*. 2006;27(6):890–8.
22. Aoki VW, Liu L, Carrell DT. Identification and evaluation of a novel sperm protamine abnormality in a population of infertile males. *Hum Reprod*. 2005 May 1;20(5):1298–306.
23. Zhang X, San Gabriel M, Zini A. Sperm nuclear histone to protamine ratio in fertile and infertile men: evidence of heterogeneous subpopulations of spermatozoa in the ejaculate. *J Androl*. 2006;27(3):414–20.
24. Agarwal A, Said TM. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Hum Reprod Update*. 2003;9(4):331–45.
25. Sharma RK, Sabanegh E, Mahfouz R, Gupta S, Thiyagarajan A, Agarwal A. TUNEL as a test for sperm DNA damage in the evaluation of male infertility. *Urology*. 2010 Dec;76(6):1380–6.
26. Baccetti B, Collodel G, Piomboni P. Apoptosis in human ejaculated sperm cells (notulae seminologicae 9). *J Submicrosc Cytol Pathol*. 1996 Oct;28(4):587–96.
27. Wolf BB, Schuler M, Echeverri F, Green DR. Caspase-3 is the primary activator of apoptotic DNA fragmentation via DNA fragmentation factor-45/inhibitor of caspase-activated DNase inactivation. *J Biol Chem*. 1999 Oct 22;274(43):30651–6.
28. Singh R, Letai A, Sarosiek K. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2019 Mar;20(3):175–93.
29. Sakkas D, Seli E, Bizzaro D, Tarozzi N, Manicardi GC. Abnormal spermatozoa in the ejaculate: abortive apoptosis and faulty nuclear remodelling during spermatogenesis. *Reprod Biomed Online*. 2003 Nov;7(4):428–32.
30. Sakkas D, Alvarez JG. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertil Steril*. 2010 Mar 1;93(4):1027–36.
31. El-Domyati MM, Al-Din ABM, Barakat MT, El-Fakahany HM, Xu J, Sakkas D. Deoxyribonucleic acid repair and apoptosis in testicular germ cells of aging fertile men: the role of the

- poly(adenosine diphosphate-ribosyl)ation pathway. *Fertil Steril*. 2009 Dec;91(5 Suppl):2221–9.
32. Moskovtsev SI, Alladin N, Lo KC, Jarvi K, Mullen JBM, Librach CL. A comparison of ejaculated and testicular spermatozoa aneuploidy rates in patients with high sperm DNA damage. *Syst Biol Reprod Med*. 2012 Jun;58(3):142–8.
 33. Brahem S, Mehdi M, Elghezal H, Saad A. Analysis of sperm aneuploidies and DNA fragmentation in patients with globozoospermia or with abnormal acrosomes. *Urology*. 2011 Jun;77(6):1343–8.
 34. Brahem S, Mehdi M, Elghezal H, Saad A. Study of aneuploidy rate and sperm DNA fragmentation in large-headed, multiple-tailed spermatozoa. *Andrologia*. 2012 Apr;44(2):130–5.
 35. Moskovtsev SI, Willis J, White J, Mullen JBM. Sperm DNA damage: correlation to severity of semen abnormalities. *Urology*. 2009 Oct;74(4):789–93.
 36. Moskovtsev SI, Willis J, Mullen JBM. Age-related decline in sperm deoxyribonucleic acid integrity in patients evaluated for male infertility. *Fertil Steril*. 2006 Feb;85(2):496–9.
 37. Singh NP, Muller CH, Berger RE. Effects of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm. *Fertil Steril*. 2003 Dec;80(6):1420–30.
 38. Kaltsas A, Moustakli E, Zikopoulos A, Georgiou I, Dimitriadis F, Symeonidis EN, et al. Impact of Advanced Paternal Age on Fertility and Risks of Genetic Disorders in Offspring. *Genes*. 2023 Feb 14;14(2):486.
 39. Brandes M, Hamilton CJCM, de Bruin JP, Nelen WLDM, Kremer J a. M. The relative contribution of IVF to the total ongoing pregnancy rate in a subfertile cohort. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2010 Jan;25(1):118–26.
 40. Hirata S, Hoshi K, Shoda T, Mabuchi T. Spermatozoon and mitochondrial DNA: Spermatozoon and mitochondrial DNA. *Reprod Med Biol*. 2002 Sep;1(2):41–7.
 41. Huang J, Liu P, Wang G. Regulation of mitochondrion-associated cytosolic ribosomes by mammalian mitochondrial ribonuclease T2 (RNASET2). *J Biol Chem*. 2018 Dec 21;293(51):19633–44.
 42. Kühlbrandt W. Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes. *BMC Biol*. 2015 Oct 29;13:89.
 43. Green A, Hossain T, Eckmann DM. Mitochondrial dynamics involves molecular and mechanical events in motility, fusion and fission. *Front Cell Dev Biol*. 2022 Oct 19;10:1010232.
 44. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*. 1981 Apr 9;290(5806):457–65.
 45. Silva-Pinheiro P, Minczuk M. The potential of mitochondrial genome engineering. *Nat Rev Genet*. 2022 Apr;23(4):199–214.

46. Bouda E, Stapon A, Garcia-Diaz M. Mechanisms of mammalian mitochondrial transcription. *Protein Sci Publ Protein Soc.* 2019 Sep;28(9):1594–605.
47. Ohshima S, Seyama A. Cellular aging and centrosome aberrations. *Ann N Y Acad Sci.* 2010 Jun;1197:108–17.
48. Ly DH, Lockhart DJ, Lerner RA, Schultz PG. Mitotic misregulation and human aging. *Science.* 2000 Mar 31;287(5462):2486–92.
49. Huang B. Genetics and biochemistry of centrosomes and spindle poles. *Curr Opin Cell Biol.* 1990 Feb;2(1):28–32.
50. Cheng J, Türkel N, Hemati N, Fuller MT, Hunt AJ, Yamashita YM. Centrosome misorientation reduces stem cell division during ageing. *Nature.* 2008 Dec 4;456(7222):599–604.
51. Grégoire MC, Massonneau J, Simard O, Gouraud A, Brazeau MA, Arguin M, et al. Male-driven de novo mutations in haploid germ cells. *Mol Hum Reprod.* 2013 Aug;19(8):495–9.
52. Lowe X, Eskenazi B, Nelson DO, Kidd S, Alme A, Wyrobek AJ. Frequency of XY sperm increases with age in fathers of boys with Klinefelter syndrome. *Am J Hum Genet.* 2001 Nov;69(5):1046–54.
53. Kong A, Frigge ML, Masson G, Besenbacher S, Sulem P, Magnusson G, et al. Rate of de novo mutations and the importance of father's age to disease risk. *Nature.* 2012 Aug 23;488(7412):471–5.
54. Glaser RL, Jiang W, Boyadjiev SA, Tran AK, Zachary AA, Van Maldergem L, et al. Paternal origin of FGFR2 mutations in sporadic cases of Crouzon syndrome and Pfeiffer syndrome. *Am J Hum Genet.* 2000 Mar;66(3):768–77.
55. Sato M, Sato K. Degradation of paternal mitochondria by fertilization-triggered autophagy in *C. elegans* embryos. *Science.* 2011 Nov 25;334(6059):1141–4.
56. Chu CT. Mechanisms of selective autophagy and mitophagy: Implications for neurodegenerative diseases. *Neurobiol Dis.* 2019 Feb;122:23–34.
57. Li S, Zhang J, Liu C, Wang Q, Yan J, Hui L, et al. The Role of Mitophagy in Regulating Cell Death. *Oxid Med Cell Longev.* 2021;2021:6617256.
58. Moustakli E, Zikopoulos A, Sakaloglou P, Bouba I, Sofikitis N, Georgiou I. Functional association between telomeres, oxidation and mitochondria. *Front Reprod Health.* 2023 Feb 20;5:1107215.
59. Smith R, Kaune H, Parodi D, Madariaga M, Rios R, Morales I, et al. Increased sperm DNA damage in patients with varicocele: relationship with seminal oxidative stress. *Hum Reprod.* 2006 Apr 1;21(4):986–93.
60. Li TK. The Glutathione and Thiol Content of Mammalian Spermatozoa and Seminal Plasma. *Biol Reprod.* 1975 Jun 1;12(5):641–6.
61. Henkel R, Sandhu IS, Agarwal A. The excessive use of antioxidant therapy: A possible cause of male infertility? *Andrologia.* 2019 Feb;51(1):e13162.

62. Poljsak B, Šuput D, Milisav I. Achieving the Balance between ROS and Antioxidants: When to Use the Synthetic Antioxidants. *Oxid Med Cell Longev*. 2013;2013:1–11.
63. Takeshima T, Usui K, Mori K, Asai T, Yasuda K, Kuroda S, et al. Oxidative stress and male infertility. *Reprod Med Biol*. 2021 Jan;20(1):41–52.
64. Agarwal A, Sharma RK, Nallella KP, Thomas AJ, Alvarez JG, Sikka SC. Reactive oxygen species as an independent marker of male factor infertility. *Fertil Steril*. 2006 Oct;86(4):878–85.
65. Majzoub A, Arafa M, Mahdi M, Agarwal A, Al Said S, Al-Emadi I, et al. Oxidation-reduction potential and sperm DNA fragmentation, and their associations with sperm morphological anomalies amongst fertile and infertile men. *Arab J Urol*. 2018 Mar;16(1):87–95.
66. Tahamtan S, Tavalae M, Izadi T, Barikrow N, Zakari Z, Lockshin RA, et al. Reduced sperm telomere length in individuals with varicocele is associated with reduced genomic integrity. *Sci Rep*. 2019 Mar 13;9(1):4336.
67. Sakamoto Y, Ishikawa T, Kondo Y, Yamaguchi K, Fujisawa M. The assessment of oxidative stress in infertile patients with varicocele. *BJU Int*. 2008 Jun;101(12):1547–52.
68. Martin-Hidalgo D, Bragado MJ, Batista AR, Oliveira PF, Alves MG. Antioxidants and Male Fertility: from Molecular Studies to Clinical Evidence. *Antioxid Basel Switz*. 2019 Apr 5;8(4):89.
69. Agarwal A, Leisegang K, Majzoub A, Henkel R, Finelli R, Panner Selvam MK, et al. Utility of Antioxidants in the Treatment of Male Infertility: Clinical Guidelines Based on a Systematic Review and Analysis of Evidence. *World J Mens Health*. 2021 Apr;39(2):233–90.
70. Ali M, Martinez M, Parekh N. Are antioxidants a viable treatment option for male infertility? *Andrologia*. 2021 Feb;53(1):e13644.
71. Durairajanayagam D. Lifestyle causes of male infertility. *Arab J Urol*. 2018 Mar;16(1):10–20.
72. Walczak-Jedrzejowska R, Wolski JK, Slowikowska-Hilczer J. The role of oxidative stress and antioxidants in male fertility. *Cent Eur J Urol*. 2013;66(1):60–7.
73. Chan SRWL, Blackburn EH. Telomeres and telomerase. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2004 Jan 29;359(1441):109–21.
74. Fice H, Robaire B. Telomere Dynamics Throughout Spermatogenesis. *Genes*. 2019 Jul 12;10(7):525.
75. Darmishonnejad Z, Zarei-Kheirabadi F, Tavalae M, Zarei-Kheirabadi M, Zohrabi D, Nasr-Esfahani MH. Relationship between sperm telomere length and sperm quality in infertile men. *Andrologia*. 2020 Jun;52(5):e13546.
76. Amirzadegan M, Sadeghi N, Tavalae M, Nasr-Esfahani MH. Analysis of leukocyte and sperm telomere length in oligozoospermic men. *Andrologia* [Internet]. 2021 Nov [cited 2022 Dec 21];53(10). Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/and.14204>
77. Ghorbani-sini R, Izadi T, Tavalae M, Azadi L, Hajian M, Rahimi Zamani M, et al. Comparison of Sperm Telomere Length between Two Sperm Selection Procedures: Density Gradient

- Centrifugation and Zeta Potential. *Int J Fertil Steril* [Internet]. 2020 Apr [cited 2022 Dec 13];14(1). Available from: <https://doi.org/10.22074/ijfs.2020.5981>
78. Shammas MA. Telomeres, lifestyle, cancer, and aging. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2011 Jan;14(1):28–34.
 79. Cesare AJ, Reddel RR. Alternative lengthening of telomeres: models, mechanisms and implications. *Nat Rev Genet*. 2010 May;11(5):319–30.
 80. Button L, Rogers B, Thomas E, Bradfield A, Alnafakh R, Drury J, et al. Telomere and Telomerase-Associated Proteins in Endometrial Carcinogenesis and Cancer-Associated Survival. *Int J Mol Sci*. 2022 Jan 6;23(2):626.
 81. Zhao Z, Pan X, Liu L, Liu N. Telomere length maintenance, shortening, and lengthening. *J Cell Physiol*. 2014 Oct;229(10):1323–9.
 82. Procházková Schrumpfová P, Schořová Š, Fajkus J. Telomere- and Telomerase-Associated Proteins and Their Functions in the Plant Cell. *Front Plant Sci*. 2016;7:851.
 83. Epel ES, Blackburn EH, Lin J, Dhabhar FS, Adler NE, Morrow JD, et al. Accelerated telomere shortening in response to life stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Dec 7;101(49):17312–5.
 84. Zheng Q, Huang J, Wang G. Mitochondria, Telomeres and Telomerase Subunits. *Front Cell Dev Biol*. 2019 Nov 6;7:274.
 85. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. 2010;271.
 86. Lopes AC, Oliveira PF, Pinto S, Almeida C, Pinho MJ, Sá R, et al. Discordance between human sperm quality and telomere length following differential gradient separation/swim-up. *J Assist Reprod Genet*. 2020 Oct;37(10):2581–603.
 87. Berby B, Bichara C, Rives-Feraille A, Jumeau F, Pizio PD, Sétif V, et al. Oxidative Stress Is Associated with Telomere Interaction Impairment and Chromatin Condensation Defects in Spermatozoa of Infertile Males. *Antioxidants*. 2021 Apr 12;10(4):593.
 88. Ko EY, Sabanegh ES, Agarwal A. Male infertility testing: reactive oxygen species and antioxidant capacity. *Fertil Steril*. 2014 Dec;102(6):1518–27.
 89. Rocca MS, Speltra E, Menegazzo M, Garolla A, Foresta C, Ferlin A. Sperm telomere length as a parameter of sperm quality in normozoospermic men. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2016 Jun;31(6):1158–63.
 90. Lafuente R, Bosch-Rue E, Ribas-Maynou J, Alvarez J, Brassesco C, Amengual MJ, et al. Sperm telomere length in motile sperm selection techniques: A qFISH approach. *Andrologia*. 2018 Mar;50(2):e12840.
 91. Samassekou O, Gadjji M, Drouin R, Yan J. Sizing the ends: normal length of human telomeres. *Ann Anat Anat Anz Off Organ Anat Ges*. 2010 Sep 20;192(5):284–91.

92. Ioannou D, Millan NM, Jordan E, Tempest HG. A new model of sperm nuclear architecture following assessment of the organization of centromeres and telomeres in three-dimensions. *Sci Rep*. 2017 Jan 31;7(1):41585.
93. Sofikitis NV, Miyagawa I, Zavos PM, Toda T, Iino A, Terakawa N. Confocal scanning laser microscopy of morphometric human sperm parameters: correlation with acrosin profiles and fertilizing capacity. *Fertil Steril*. 1994 Aug;62(2):376–86.
94. Achi MV, Ravindranath N, Dym M. Telomere Length in Male Germ Cells Is Inversely Correlated with Telomerase Activity¹. *Biol Reprod*. 2000 Aug 1;63(2):591–8.
95. Turner S, Hartshorne GM. Telomere lengths in human pronuclei, oocytes and spermatozoa. *Mol Hum Reprod*. 2013 Aug 1;19(8):510–8.
96. Gomez M, Wu J, Schreiber V, Dunlap J, Dantzer F, Wang Y, et al. PARP1 Is a TRF2-associated Poly(ADP-Ribose)Polymerase and Protects Eroded Telomeres. *Mol Biol Cell*. 2006 Apr;17(4):1686–96.
97. Darmishonnejad Z, Tavalaei M, Izadi T, Tanhaei S, Nasr-Esfahani MH. Evaluation of sperm telomere length in infertile men with failed/low fertilization after intracytoplasmic sperm injection. *Reprod Biomed Online*. 2019 Apr;38(4):579–87.
98. De Vries M, Ramos L, Housein Z, De Boer P. Chromatin remodelling initiation during human spermiogenesis. *Biol Open*. 2012 May 15;1(5):446–57.
99. Hemann MT, Rudolph KL, Strong MA, DePinho RA, Chin L, Greider CW. Telomere Dysfunction Triggers Developmentally Regulated Germ Cell Apoptosis. Blackburn EH, editor. *Mol Biol Cell*. 2001 Jul;12(7):2023–30.
100. Popova D, Bhide P, D'Antonio F, Basnet P, Acharya G. Sperm mitochondrial DNA copy numbers in normal and abnormal semen analysis: A systematic review and meta-analysis. *BJOG Int J Obstet Gynaecol*. 2022 Aug;129(9):1434–46.
101. Blackburn EH, Gall JG. A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in Tetrahymena. *J Mol Biol*. 1978 Mar 25;120(1):33–53.
102. Daniali L, Benetos A, Susser E, Kark JD, Labat C, Kimura M, et al. Telomeres shorten at equivalent rates in somatic tissues of adults. *Nat Commun*. 2013;4:1597.
103. Aubert G, Lansdorp PM. Telomeres and aging. *Physiol Rev*. 2008 Apr;88(2):557–79.
104. Unryn BM, Cook LS, Riabowol KT. Paternal age is positively linked to telomere length of children. *Aging Cell*. 2005 Apr;4(2):97–101.
105. De Meyer T, Rietzschel ER, De Buyzere ML, De Bacquer D, Van Criekinge W, De Backer GG, et al. Paternal age at birth is an important determinant of offspring telomere length. *Hum Mol Genet*. 2007 Dec 15;16(24):3097–102.
106. Njajou OT, Cawthon RM, Damcott CM, Wu SH, Ott S, Garant MJ, et al. Telomere length is paternally inherited and is associated with parental lifespan. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Jul 17;104(29):12135–9.

107. Prescott J, Du M, Wong JYY, Han J, De Vivo I. Paternal age at birth is associated with offspring leukocyte telomere length in the nurses' health study. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2012 Dec;27(12):3622–31.
108. Broer L, Codd V, Nyholt DR, Deelen J, Mangino M, Willemsen G, et al. Meta-analysis of telomere length in 19,713 subjects reveals high heritability, stronger maternal inheritance and a paternal age effect. *Eur J Hum Genet EJHG*. 2013 Oct;21(10):1163–8.
109. Kimura M, Cherkas LF, Kato BS, Demissie S, Hjelmberg JB, Brimacombe M, et al. Offspring's leukocyte telomere length, paternal age, and telomere elongation in sperm. *PLoS Genet*. 2008 Feb;4(2):e37.
110. Aston KI, Hunt SC, Susser E, Kimura M, Factor-Litvak P, Carrell D, et al. Divergence of sperm and leukocyte age-dependent telomere dynamics: implications for male-driven evolution of telomere length in humans. *Mol Hum Reprod*. 2012 Nov 1;18(11):517–22.
111. Ferlin A, Rampazzo E, Rocca MS, Keppel S, Frigo AC, De Rossi A, et al. In young men sperm telomere length is related to sperm number and parental age. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2013 Dec;28(12):3370–6.
112. Thilagavathi J, Kumar M, Mishra SS, Venkatesh S, Kumar R, Dada R. Analysis of sperm telomere length in men with idiopathic infertility. *Arch Gynecol Obstet*. 2013 Apr;287(4):803–7.
113. Lundblad V, Blackburn EH. An alternative pathway for yeast telomere maintenance rescues est1- senescence. *Cell*. 1993 Apr 23;73(2):347–60.
114. Teng SC, Zakian VA. Telomere-telomere recombination is an efficient bypass pathway for telomere maintenance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. 1999 Dec;19(12):8083–93.
115. Durant ST. Telomerase-Independent Paths to Immortality in Predictable Cancer Subtypes. *J Cancer*. 2012;3:67–82.
116. Dunham MA, Neumann AA, Fasching CL, Reddel RR. Telomere maintenance by recombination in human cells. *Nat Genet*. 2000 Dec;26(4):447–50.
117. Bailey SM. Frequent recombination in telomeric DNA may extend the proliferative life of telomerase-negative cells. *Nucleic Acids Res*. 2004 Jul 7;32(12):3743–51.
118. Royle NJ, Foxon J, Jeyapalan JN, Mendez-Bermudez A, Novo CL, Williams J, et al. Telomere length maintenance--an ALTERNative mechanism. *Cytogenet Genome Res*. 2008;122(3–4):281–91.
119. Pickett HA, Henson JD, Au AYM, Neumann AA, Reddel RR. Normal mammalian cells negatively regulate telomere length by telomere trimming. *Hum Mol Genet*. 2011 Dec 1;20(23):4684–92.
120. Celli GB, Denchi EL, de Lange T. Ku70 stimulates fusion of dysfunctional telomeres yet protects chromosome ends from homologous recombination. *Nat Cell Biol*. 2006 Aug;8(8):885–90.

121. Bodvarsdottir SK, Steinarsdottir M, Bjarnason H, Eyfjord JE. Dysfunctional telomeres in human BRCA2 mutated breast tumors and cell lines. *Mutat Res.* 2012 Jan 3;729(1–2):90–9.
122. French JD, Dunn J, Smart CE, Manning N, Brown MA. Disruption of BRCA1 function results in telomere lengthening and increased anaphase bridge formation in immortalized cell lines. *Genes Chromosomes Cancer.* 2006 Mar;45(3):277–89.
123. Li B, Reddy S, Comai L. Depletion of Ku70/80 reduces the levels of extrachromosomal telomeric circles and inhibits proliferation of ALT cells. *Aging.* 2011 Apr;3(4):395–406.
124. Liu Y, Tarsounas M, O’regan P, West SC. Role of RAD51C and XRCC3 in genetic recombination and DNA repair. *J Biol Chem.* 2007 Jan 19;282(3):1973–9.
125. Royle NJ, Méndez-Bermúdez A, Gravani A, Novo C, Foxon J, Williams J, et al. The role of recombination in telomere length maintenance. *Biochem Soc Trans.* 2009 Jun;37(Pt 3):589–95.
126. Zeng S, Yang Q. The MUS81 endonuclease is essential for telomerase negative cell proliferation. *Cell Cycle Georget Tex.* 2009 Jul 15;8(14):2157–60.
127. Zeng S, Xiang T, Pandita TK, Gonzalez-Suarez I, Gonzalo S, Harris CC, et al. Telomere recombination requires the MUS81 endonuclease. *Nat Cell Biol.* 2009 May;11(5):616–23.
128. Saharia A, Stewart SA. FEN1 contributes to telomere stability in ALT-positive tumor cells. *Oncogene.* 2009 Feb 26;28(8):1162–7.
129. Ding H, Schertzer M, Wu X, Gertsenstein M, Selig S, Kammori M, et al. Regulation of Murine Telomere Length by Rtel. *Cell.* 2004 Jun;117(7):873–86.
130. Valdes A, Andrew T, Gardner J, Kimura M, Oelsner E, Cherkas L, et al. Obesity, cigarette smoking, and telomere length in women. *The Lancet.* 2005 Aug;366(9486):662–4.
131. Babizhayev MA, Savel’yeva EL, Moskvina SN, Yegorov YE. Telomere Length is a Biomarker of Cumulative Oxidative Stress, Biologic Age, and an Independent Predictor of Survival and Therapeutic Treatment Requirement Associated With Smoking Behavior. *Am J Ther.* 2011 Nov;18(6):e209–26.
132. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest.* 2004 Dec 15;114(12):1752–61.
133. Jennings BJ, Ozanne SE, Hales CN. Nutrition, Oxidative Damage, Telomere Shortening, and Cellular Senescence: Individual or Connected Agents of Aging? *Mol Genet Metab.* 2000 Sep;71(1–2):32–42.
134. Jennings BJ, Ozanne SE, Dorling MW, Hales CN. Early growth determines longevity in male rats and may be related to telomere shortening in the kidney. *FEBS Lett.* 1999 Apr 2;448(1):4–8.
135. Farzaneh-Far R. Association of Marine Omega-3 Fatty Acid Levels With Telomeric Aging in Patients With Coronary Heart Disease. *JAMA.* 2010 Jan 20;303(3):250.

136. Song Z, Von Figura G, Liu Y, Kraus JM, Torrice C, Dillon P, et al. Lifestyle impacts on the aging-associated expression of biomarkers of DNA damage and telomere dysfunction in human blood: Measuring the influence of lifestyle on aging. *Aging Cell*. 2010 Apr 29;9(4):607–15.
137. Lv C, Wang X, Guo Y, Yuan S. Role of Selective Autophagy in Spermatogenesis and Male Fertility. *Cells*. 2020 Nov 23;9(11):2523.
138. De Gaetano A, Gibellini L, Zanini G, Nasi M, Cossarizza A, Pinti M. Mitophagy and Oxidative Stress: The Role of Aging. *Antioxid Basel Switz*. 2021 Dec 17;10(5):794.
139. Yefimova MG, Buschiazzo A, Burel A, Lavault MT, Pimentel C, Jouve G, et al. Autophagy is increased in cryptorchid testis resulting in abnormal spermatozoa. *Asian J Androl*. 2019;21(6):570–6.
140. Nassour J, Radford R, Correia A, Fusté JM, Schoell B, Jauch A, et al. Autophagic cell death restricts chromosomal instability during replicative crisis. *Nature*. 2019 Jan;565(7741):659–63.
141. Ali M, Devkota S, Roh JI, Lee J, Lee HW. Telomerase reverse transcriptase induces basal and amino acid starvation-induced autophagy through mTORC1. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016 Sep;478(3):1198–204.
142. Nussenzweig SC, Verma S, Finkel T. The Role of Autophagy in Vascular Biology. *Circ Res*. 2015 Jan 30;116(3):480–8.
143. Ait-Aissa K, Heisner JS, Norwood Toro LE, Bruemmer D, Doyon G, Harmann L, et al. Telomerase Deficiency Predisposes to Heart Failure and Ischemia-Reperfusion Injury. *Front Cardiovasc Med*. 2019 Apr 2;6:31.
144. Cheng H, Fan X, Lawson WE, Paueksakon P, Harris RC. Telomerase deficiency delays renal recovery in mice after ischemia–reperfusion injury by impairing autophagy. *Kidney Int*. 2015 Jul;88(1):85–94.
145. Martens A, Schmid B, Akintola O, Saretzki G. Telomerase Does Not Improve DNA Repair in Mitochondria upon Stress but Increases MnSOD Protein under Serum-Free Conditions. *Int J Mol Sci*. 2019 Dec 19;21(1):27.
146. Gao X, Yu X, Zhang C, Wang Y, Sun Y, Sun H, et al. Telomeres and Mitochondrial Metabolism: Implications for Cellular Senescence and Age-related Diseases. *Stem Cell Rev Rep*. 2022 Oct;18(7):2315–27.
147. Drevet JR, Aitken RJ. Oxidation of Sperm Nucleus in Mammals: A Physiological Necessity to Some Extent with Adverse Impacts on Oocyte and Offspring. *Antioxid Basel Switz*. 2020 Jan 23;9(2):95.
148. Barnes RP, Fouquerel E, Opresko PL. The impact of oxidative DNA damage and stress on telomere homeostasis. *Mech Ageing Dev*. 2019 Jan;177:37–45.
149. Aitken RJ, Drevet JR, Moazamian A, Gharagozloo P. Male Infertility and Oxidative Stress: A Focus on the Underlying Mechanisms. *Antioxidants*. 2022 Feb 2;11(2):306.

150. Ozturk S. Telomerase Activity and Telomere Length in Male Germ Cells. *Biol Reprod* [Internet]. 2015 Feb 1 [cited 2023 Feb 8];92(2). Available from: <https://academic.oup.com/biolreprod/article/2434251/Telomerase>
151. Coluzzi E, Colamartino M, Cozzi R, Leone S, Meneghini C, O'Callaghan N, et al. Oxidative Stress Induces Persistent Telomeric DNA Damage Responsible for Nuclear Morphology Change in Mammalian Cells. *Lustig AJ, editor. PLoS ONE*. 2014 Oct 29;9(10):e110963.
152. Agarwal A, Virk G, Ong C, du Plessis SS. Effect of oxidative stress on male reproduction. *World J Mens Health*. 2014 Apr;32(1):1–17.
153. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell*. 2013 Jun 6;153(6):1194–217.
154. Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol*. 1956 Jul;11(3):298–300.
155. Majzoub A, Agarwal A. Systematic review of antioxidant types and doses in male infertility: Benefits on semen parameters, advanced sperm function, assisted reproduction and live-birth rate. *Arab J Urol*. 2018 Mar;16(1):113–24.
156. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods San Diego Calif*. 2001 Dec;25(4):402–8.
157. Quiros PM, Goyal A, Jha P, Auwerx J. Analysis of mtDNA/nDNA Ratio in Mice. *Curr Protoc Mouse Biol*. 2017 Mar 2;7(1):47–54.
158. Wang C, Swerdloff RS. Limitations of semen analysis as a test of male fertility and anticipated needs from newer tests. *Fertil Steril*. 2014 Dec;102(6):1502–7.
159. Lee A, Cardel M, Donahoo WT. Social and Environmental Factors Influencing Obesity. In: Feingold KR, Anawalt B, Blackman MR, Boyce A, Chrousos G, Corpas E, et al., editors. *Endotext* [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000 [cited 2023 Oct 23]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK278977/>
160. Ramaraju GA, Teppala S, Prathigudupu K, Kalagara M, Thota S, Kota M, et al. Association between obesity and sperm quality. *Andrologia*. 2018 Apr;50(3):e12888.
161. Rahban R, Nef S. Regional difference in semen quality of young men: a review on the implication of environmental and lifestyle factors during fetal life and adulthood. *Basic Clin Androl*. 2020 Dec;30(1):16.
162. Moustakli E, Zikopoulos A, Skentou C, Bouba I, Tsirka G, Stavros S, et al. Sperm Mitochondrial Content and Mitochondrial DNA to Nuclear DNA Ratio Are Associated with Body Mass Index and Progressive Motility. *Biomedicines*. 2023 Nov 9;11(11):3014.
163. Hildebrandt X, Ibrahim M, Peltzer N. Cell death and inflammation during obesity: “Know my methods, WAT(son)”. *Cell Death Differ*. 2023 Feb;30(2):279–92.
164. Palmer NO, Bakos HW, Fullston T, Lane M. Impact of obesity on male fertility, sperm function and molecular composition. *Spermatogenesis*. 2012 Oct;2(4):253–63.

165. Hussain T, Kandeel M, Metwally E, Murtaza G, Kalhoro DH, Yin Y, et al. Unraveling the harmful effect of oxidative stress on male fertility: A mechanistic insight. *Front Endocrinol.* 2023 Feb 13;14:1070692.
166. Kimura M, Cherkas LF, Kato BS, Demissie S, Hjelmborg JB, Brimacombe M, et al. Offspring's leukocyte telomere length, paternal age, and telomere elongation in sperm. *PLoS Genet.* 2008 Feb;4(2):e37.
167. Baird DM, Britt-Compton B, Rowson J, Amso NN, Gregory L, Kipling D. Telomere instability in the male germline. *Hum Mol Genet.* 2006 Jan 1;15(1):45–51.
168. Turner KJ, Watson EM, Skinner BM, Griffin DK. Telomere Distribution in Human Sperm Heads and Its Relation to Sperm Nuclear Morphology: A New Marker for Male Factor Infertility? *Int J Mol Sci.* 2021 Jul 15;22(14):7599.