

Απόπτωση και σπερματογένεση

Η σπερματογένεση είναι μια δυναμική διεργασία πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης των γεννητικών κυττάρων, από το στάδιο του σπερματογονίου έως το στάδιο του ώριμου σπερματοζωαρίου. Στους όρχεις των θηλαστικών, ο πληθυσμός των γεννητικών κυττάρων αυξάνει, με συνεχείς μιτωτικές διαιρέσεις, πριν από την είσοδο των σπερματογονίων στη διαδικασία της διαφοροποίησης. Πρόγονος των σπερματογονίων είναι το βλαστικό γεννητικό κύτταρο. Ένα πρώτο κύμα μιτωτικού πολλαπλασιασμού των βλαστικών γεννητικών κυττάρων παρατηρείται πριν από τη γέννηση, στον εμβρυϊκό όρχι και ακολουθείται από ένα κύμα εκφύλισης με απόπτωση.^{1,2} Ορισμένοι ερευνητές θεωρούν ότι ένα δεύτερο κύμα απώλειας των σπερματογονίων είναι αναγκαίο για την έναρξη της σπερματογένεσης, στον ώριμο όρχι, ενώ άλλοι πιστεύουν ότι το φαινόμενο είναι συνεχές και διαρκεί καθόλη τη διάρκεια της ζωής του αρσενικού, με εξάρσεις σε ορισμένες περιόδους.³⁻⁵

Η αναγνώριση των αποπτωτικών κυττάρων, στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, διευκολύνεται από τη χαρακτηριστική μορφολογία που παρουσιάζουν, ενώ με την αντίδραση TUNEL ανιχνεύεται το κερματισμένο DNA *in situ*.⁶ Η παρατήρηση του χαρακτηριστικού προτύπου DNA χαμηλού μοριακού βάρους, μετά από ηλεκτροφόρηση, παρέχει τη βιοχημική επιβεβαίωση του αποπτωτικού θανάτου των γεννητικών κυττάρων, που εκτιμάται ποσοτικά στον κυτταρομετρητή ροής.^{1,4}

Το φαινόμενο του θανάτου των γεννητικών κυττάρων, στον ώριμο όρχι, έχει αναγνωριστεί ήδη από τον προηγούμενο αιώνα.^{7,8} Αφότου διαπιστώθηκε ότι για τον έλεγχο της αύξησης των κυτταρικών πληθυσμών, στον ώριμο οργανισμό, ο οποίος ισούται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό μείον την απόπτωση, είναι απαραίτητη και η προγραμματισμένη απομάκρυνση των πλεοναζόντων κυττάρων, το ενδιαφέρον των ερευνητών για τη μελέτη του φαινομένου, στο σπερματικό επιθήλιο, αναζωπυρώθηκε.

Θα πρέπει να τονιστεί ότι η παραγωγή των ώριμων αρσενικών γαμετών, κατά τη σπερματογένεση, δεν χαρακτηρίζεται ως εξαιρετικά αποδοτική διεργασία. Οι ποσοτικές μελέτες δείχνουν ότι μόνο 25% του αναμενόμενου αριθμού των σπερματοκυττάρων I παράγεται από τα σπερματογόνια A₁.³ Επιπλέον, 20% των γεννητικών κυττάρων εκφυλίζονται μεταξύ των σταδίων του σπερματοκυττάρου I και της σπερματίδας.⁹ Συγκεκριμένα, στον άνδρα, κατά την αναπαραγωγική περίοδο απομακρύνεται ένας σημαντικός αριθμός προμιτωτικών σπερματογονίων B και προμειωτικών σπερματοκυττάρων.¹⁰ Αυτό γίνεται, όπως έχει υποθεθεί, για να εξασφαλιστεί (α) ένας σταθερός αριθμός σπερματοκυττάρων, που θα εισέλθουν στην πρόφαση της πρώτης μειωτικής διαίρεσης, και (β) η άριστη σχέση μεταξύ των γεννητικών κυττάρων και των κυττάρων Sertoli.⁵

Σε μια πρόσφατη συγκριτική μελέτη εξετάστηκε η απόπτωση των σπερματοκυττάρων σε όρχεις ανθρώπου και αρουραίου, πριν από την ήβη.¹¹ Ανάλογη μελέτη έγινε και σε σπερματοκύτταρα *in vitro* και αποδείχθηκε ότι, κατά την αναπαραγωγική περίοδο, στον αρουραίο, η απόπτωση παρατηρείται κατά κύματα, στη διάρκεια του κύκλου του σπερματικού επιθηλίου.¹² Από τη σύγκριση των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης του κερματισμένου DNA, στον αρουραίο, φαίνεται ότι υπάρχει διπλάσια ποσότητα στα στάδια I και XII–XIV, σε σχέση με το στάδιο VIII, ενώ η *in situ* ανάλυση δείχνει ότι το πλέον ευάλωτο είναι το στάδιο του σπερματοκυττάρου.⁴ Τα δεδομένα αυτά τροποποιούν και συμπληρώνουν την ανάλυση του Kerr, που υποστήριζε ότι μετά το στάδιο VII παρατηρείται μαζική εκφύλιση σε όλα τα μεταγενέστερα στάδια, με μέγιστο βαθμό στο στάδιο XIV.¹³

Για την απόπτωση στο φυσιολογικό σπερματικό επιθήλιο του ανθρώπου υπάρχουν λίγες πληροφορίες, που βασίζονται σε μορφολογικές παρατηρήσεις πριν ή κατά το στάδιο της φαγοκυττάρωσης των αποπτωτικών κυττάρων, δηλαδή σε ένα από τα τελικά στάδια της αποπτωτικής διεργασίας, χωρίς να δίνονται λεπτομέρειες σχετικά με τα αρχικά στάδια, τους εμπλεκόμενους μηχανισμούς ρύθμισης και τα αίτια. Δεν είναι, ακόμη, σαφές αν η απόπτωση οφείλεται σε ένα μηχανισμό απομάκρυνσης παθολο-

γικών γεννητικών κυττάρων, τα οποία, πιθανώς, εμπεριέχουν χρωμοσωμικές ανωμαλίες, ή αν πρόκειται για διακοπή του κύκλου πολλαπλασιασμού του σπερματικού επιθήλιου.

Ορισμένες παθολογικές καταστάσεις που χαρακτηρίζονται από ανώμαλη σπερματογένεση, υπογονιμότητα ή και πλήρη έλλειψη ικανότητας προς γονιμοποίηση παρουσιάζουν μεγάλη αύξηση του αριθμού των γεννητικών κυττάρων με αποπτωτική μορφολογία. Αναφέρονται ενδεικτικά οι περιπτώσεις ανδρών που παρουσιάζουν διακοπή της σπερματογένεσης στο στάδιο του σπερματοκυττάρου ή της σπερματίδας και εκείνων με υποσπερματογένεση, σε σύγκριση με αυτούς που, αν και μη γόνιμοι, έχουν φυσιολογικό σπερματικό επιθήλιο ή σπερματικό επιθήλιο αποτελούμενο μόνο από κύτταρα Sertoli (Sertoli cell only syndrome).^{14,15} Η κρυφορχία καταλήγει σε στειρότητα, δεδομένου ότι, από το πρώτο έτος της ζωής, διαπιστώνεται μεγάλη ελάττωση των γεννητικών κυττάρων, η οποία αποδίδεται στην έκθεση των όρχεων σε αυξημένη θερμοκρασία. Τα πρώτα κύτταρα που εξαφανίζονται είναι τα σπερματοκύτταρα στο στάδιο της παχυταινίας και οι στρογγυλές σπερματίδες. Από πρόσφατες εργασίες φαίνεται ότι και στην περίπτωση της κρυφορχίας ενεργοποιείται ο αποπτωτικός μηχανισμός.^{12,16}

Είναι γνωστό ότι τα ώριμα φυσιολογικά σπερματοζωάρια παρουσιάζουν σημαντικού βαθμού συμπύκνωση της χρωματίνης, οι ιστόνες έχουν αντικατασταθεί από πρωταμίνες και το DNA είναι ανθεκτικό σε βλαπτικούς παράγοντες, όπως τα οξέα ή η αύξηση της θερμοκρασίας.¹⁷ Τα σπερματοζωάρια που δεν περιέχουν DNA υψηλής αντοχής διακρίνονται ως επί το πλείστον, αν όχι αποκλειστικά, από την ανώμαλη μορφολογία τους και η αύξηση της αναλογίας αυτών στο σπέρμα συνδυάζεται με περιορισμένη γονιμότητα ή και στειρότητα.¹⁸ Τέτοιου τύπου γαμέτες θεωρούνται «νεκροί» ως προς τη γονιμοποιητική τους ικανότητα, παρόλο που περιβάλλονται από αέρινη κυτταροπλασματική μεμβράνη και περιέχουν αέρινα μιτοχόνδρια, με αποτέλεσμα τη διατήρηση της κινητικότητάς τους. Με άλλα λόγια, τα κύτταρα αυτά παρουσιάζουν τα μορφολογικά χαρακτηριστικά της απόπτωσης.^{19,20}

Η εκατοστιαία αναλογία των αποπτωτικών σπερματοζωαρίων σε γόνιμους άνδρες κυμαίνεται, ανάλογα με τη μέτρηση, από 0,1–5,2% (πίν. 1).^{20,21} Στα σπερματοζωάρια που συγκεντρώνονται μετά από ανιούσα κίνηση (swim up) είναι της τάξης του 1,9%. Μια αύξηση που φθάνει μέχρι το 10% παρατηρείται σε πάσχοντες από φλεγμονή (περιλαμβανομένου και του AIDS) ή από κισσοκήλη. Σε

Πίνακας 1. Συχνότητα αποπτωτικών σπερματοζωαρίων στο σπέρμα γόνιμων ανδρών και σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις.^{20,21}

Γόνιμοι άνδρες	0,1–5,2%
Φλεγμονές της γεννητικής οδού	8%
Κισσοκήλη	1–10%
Άτυπες μορφές σπερματοζωαρίων	10%
Κρυφορχία	15–20%
Ανεξήγητη στειρότητα	Μέχρι 25%
Σεμίνωμα	50%

ασθενείς με κρυφορχία, η συχνότητα των αποπτωτικών σπερματοζωαρίων στο σπέρμα κυμαίνεται μεταξύ 15–20%. Οι πάσχοντες από τη νόσο του Hodgkin παρουσιάζουν αποπτωτικά σπερματοζωάρια σε ποσοστό 16,5%, ενώ σε περίπτωση σεμινώματος η αναλογία αυτή μπορεί να φθάσει μέχρι και 50%.

Οι Sun et al, σε μελέτη 298 ασθενών, έδειξαν με τη μέθοδο TUNEL και την κυτταρομετρία ροής ότι υπάρχει αρνητική σχέση μεταξύ της εκατοστιαίας αναλογίας του κερματισμένου DNA και της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων (58,3% στους γόνιμους και 18,2% στους στείρους άνδρες), της μορφολογίας (42,2% άτυπες μορφές στους γόνιμους άνδρες, 76% στους στείρους) και της συγκέντρωσης των σπερματοζωαρίων ($100,9 \times 10^6/\text{mL}$ στους γόνιμους, $15,5 \times 10^6/\text{mL}$ στους στείρους).^{21,22} Επιπλέον, διαπιστώθηκε αρνητική σχέση μεταξύ της εκατοστιαίας αναλογίας των σπερματοζωαρίων που περιέχουν κερματισμένο DNA και του βαθμού επιτυχούς γονιμοποίησης και αυλάκωσης, μετά από ενδοκυτταροπλασματική έγχυση σπερματοζωαρίων (Intra Cytoplasmic Sperm Injection, ICSI).²³

Εκτός από την απόπτωση, μια άλλη ενδογενής αιτία κερματισμού του DNA των σπερματοζωαρίων μπορεί να είναι η ανεπαρκής ωρίμανση αυτών κατά τη διάρκεια της σπερμιόγνεσης. Η κατάσταση οφείλεται, πιθανώς, σε ελλιπή πρωταμίνωση και αυτό μπορεί να αποδειχθεί μετά από χρώση με χρωμομυκίνη A₃.²³ Ενδιαφέρον, επίσης, έχει να γνωρίζουμε αν η βλάβη αφορά σε DNA μονόκλωνο ή δίκλωνο. Οι βλάβες στο μονόκλωνο DNA επιδιορθώνονται, συνήθως, κατά τη γονιμοποίηση, αλλά όταν πρόκειται για βλάβη μεγάλου μεγέθους, ο μηχανισμός αποκατάστασης είναι ελλιπής, με αποτέλεσμα διαταραχές στα αρχικά στάδια της ανάπτυξης.²⁵

Μεταξύ των εξωγενών αιτιών που προκαλούν κερματισμό του DNA των σπερματοζωαρίων αναφέρονται οι περιβαλλοντικές τοξίνες και οι ελεύθερες

ρίζες οξυγόνου.²⁶ Η συγκέντρωσή τους αυξάνει στο σπερματικό πλάσμα, σε παθολογικές καταστάσεις, κυρίως όταν συνυπάρχει και ελαττωμένη πρωταμίνωση.

Η κατανόηση των μηχανισμών ελέγχου της απόπτωσης κατά τη σπερματογένεση και η εφαρμογή νέων μεθόδων, σε συνδυασμό με την *in situ* εντόπιση των αποπτωτικών κυττάρων στο σπερματικό επιθήλιο, θα πρέπει να συμπληρώσουν τις εφαρμοζόμενες τεχνικές ρουτίνας στις περιπτώσεις διερεύνησης της ανδρικής στειρότητας. Επιπλέον, κατά την εφαρμογή της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, επιβάλλεται η ανίχνευση των αποπτωτικών σπερματοζωαρίων στο σπέρμα προς αποφυγή των δυσάρεστων αποτελεσμάτων που είναι δυνατό να προκύψουν από τη χρησιμοποίηση γαμετών με κερματισμένο DNA.

P. Αγγελοπούλου

Εργαστήριο Ιστολογίας και Εμβρυολογίας

Ιατρική Σχολή

Πανεπιστήμιο Αθηνών

- COUCOUVANIS EC, SHERWOOD SW, CARSWELL-CRUMPTON C, SPACK EG, JONES PP. Evidence that the mechanism of prenatal germ cell death in the mouse is apoptosis. *Exp Cell Res* 1993, 209:238–247
- PESCE M, DeFELICI M. Apoptosis in mouse primordial germ cells: a study by transmission scanning electron microscope. *Anat Embryol* 1994, 189:435–440
- HUCKINS C. The morphology and kinetics of spermatogonial degeneration in normal adult rats: an analysis using a simplified classification of germinal epithelium. *Anat Rec* 1978, 190:905–926
- BILLIG H, FURUTA I, RIVIER C, TAPANAINEN J, PARVINEN M, HSUEH AJW. Apoptosis in testis germ cells: Developmental changes in gonadotropin dependence and localization to selective tubule stages. *Endocrinology* 1995, 136:5–12
- RODRIGUEZ I, ODY C, ARAKI K, GARCIA I, VASSALLI P. An early and massive wave of germinal cell apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis. *EMBO J* 1997, 16:2262–2270
- GAVRIELI Y, SHERMAN Y, BEN-SASSON SA. Identification of programmed cell death *in situ* via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992, 119:493–501
- STORH P. *I efubuch der Histologie und microscopishen Anatomie des Menschen*. Gustav Fischer, Jena, 1886
- REGAUD CP. Døgønørøscence des cellules sòminales chez les mamiføres en absence de tout øtat pathologique. *C R Soc Biol* 1900, 52:268–270
- ALLAN DJ, HARMON BV, KERR JFR. Cell death in spermatogenesis. In: Potten CS (ed) *Perspectives of Mammalian Cell Death*. Oxford University Press, London, 1987:229–258
- BARTKE A. Apoptosis of male germ cells: a generalized or a cell-type specific phenomenon? (editorial). *Endocrinology* 1995, 136:3–4
- LI LH, WINE RN, CHAPIN RE. 2-methoxyacetic acid (MAA)-induced spermatocyte apoptosis in human and rat: an *in vitro* comparison. *J Androl* 1996, 17:538–549
- HEISKANEN P, BILLIG H, TOPPARI J, KALEVA M, ARSALO A, RAPOLA J ET AL. Apoptotic cell death in the normal and cryptorchid human testis: the effect of human chorionic gonadotrophin on testicular cell survival. *Pediatr Res* 1996, 40:351–356
- KERR JB. Spontaneous degeneration of germ cells in normal rat testis: assessment of cell types and frequency during the spermatogenic cycle. *J Reprod Fertil* 1992, 95:825–830
- LIN WW, LAMB DJ, WHEELER TM, ABRAMS J, LIPSHULTZ LI, KIM ED. Apoptotic frequency is increased in spermatogenic maturation arrest and hypospermatogenic states. *J Urol* 1997, 158:1791–1793
- LIN WW, LAMB DJ, WHEELER TM, ABRAMS J, LIPSHULTZ LI, KIM ED. *In situ* end-labeling of human testicular tissue demonstrates increased apoptosis in conditions of abnormal spermatogenesis. *Fertil Steril* 1997, 68:1065–1069
- YIN Y, DE WOLF WC, MORGENTALER A. Experimental cryptorchidism induces testicular germ cell apoptosis by p53-dependent and -independent pathways in mice. *Biol Reprod* 1998, 58:492–496
- DADOUNE JP. The nuclear status of human sperm cells. *Micron* 1995, 26:323–345
- EVENSON DP, DARZYNKIEWICZ Z, MELAMED MR. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science* 1980, 210:1131–1133
- GORCZYCA W, TRAGANOS F, JESIONOWSKA H, DARZYNKIEWICZ Z. Presence of DNA strand breaks and increased sensitivity of DNA *in situ* to denaturation in abnormal human sperm cells: analogy to apoptosis of somatic cells. *Exp Cell Res* 1993, 207:202–205
- BACETTI B, COLLODEL G, PIOMBONI P. Apoptosis in human ejaculated sperm cells. *J Submicrosc Cytol Pathol* 1996, 28:587–596
- GANDINI L, LOMBARDO F, PAOLI D, CAPONECCHIA L, DONDERO F. Apoptosis in ejaculated human spermatozoa. *Int J Androl* 1998, 21(Suppl 1):16
- SUN JG, JURICOVA A, CASPER RF. Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization *in vitro*. *Biol Reprod* 1997, 56:602–607
- LOPES S, SUN JG, JURICOVA A, MERIANO J, CASPER RF. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1998, 69:528–532
- SAKKAS D, MANICARDI GC, BIANCHI PG, BIZZARO D, BIANCHI U. Relationship between the presence of endogenous nicks and sperm chromatin packaging in maturing and fertilizing mouse spermatozoa. *Biol Reprod* 1995, 52:1149–1155
- SAKKAS D, MARIETHOZ E, MANICARDI GC, BIANCHI PG, BIZZARO D, BIANCHI PZ ET AL. Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Rev Reprod* 1999, 4:31–37
- LOPES S, JURICOVA A, SUN JG, CASPER RF. Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod* 1998, 13:896–900