

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
Τμήματα Βιολογίας και Χημείας

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών
Πρωτεϊνικής Βιοτεχνολογίας



UNIVERSITY OF CRETE
Depts. of Biology & Chemistry

Joint Graduate Program in
Protein Biotechnology

ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΤΑΞΗΣ II ΑΝΤΙΓΟΝΩΝ
ΙΣΤΟΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑΣ ΣΤΑ ΑΝΘΡΩΠΙΝΑ
ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΑ ΚΑΙ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΤΩΝ
ΚΥΤΟΚΙΝΩΝ ΣΤΟ ΣΠΕΡΜΑΤΙΚΟ ΠΛΑΣΜΑ



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΒΑΡΔΑΚΗ ΚΑΤΕΡΙΝΑ

ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: ΕΙΡΗΝΗ ΑΘΑΝΑΣΑΚΗ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2011

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
Τμήματα Βιολογίας και Χημείας

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών
Πρωτεϊνικής Βιοτεχνολογίας



UNIVERSITY OF CRETE
Depts. of Biology & Chemistry

Joint Graduate Program in
Protein Biotechnology

**ANALYSIS OF HLA CLASS II ANTIGEN EXPRESSION IN
HUMAN SPERMATOZOA AND CYTOKINE LEVELS IN
THE SEMINAL PLASMA**



MSc Thesis

VARDAKI KATERINA

SUPERVISOR: I. ATHANASSAKIS

HERAKLION 2011

Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια των μεταπτυχιακών μου σπουδών, στο πρόγραμμα « Πρωτεϊνική Βιοτεχνολογία» των τμημάτων Βιολογίας-Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης. Η εργασία εκπονήθηκε εξολοκλήρου στο εργαστήριο Ανοσοβιολογίας, του τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης.

Υπεύθυνη καθηγήτρια στην παρούσα εργασία ήταν η κ. Ειρήνη Αθανασάκη. Θα ήθελα να της εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες, καταρχήν για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και με έκανε μέλος της εργαστηριακής της οικογένειας, αλλά και γιατί στάθηκε πραγματικά δίπλα μου όλο αυτό το χρονικό διάστημα, σε κάθε δύσκολη και εύκολη στιγμή, με τις πολύτιμες επιστημονικές και ανθρώπινες συμβουλές της. Το να συναντάς στη ζωή σου έναν άνθρωπο με πλούσια επιστημονική γνώση και ενδιαφέρον, με απaráμιλλο ήθος και μεγαλείο ψυχής, δεν μπορεί παρά να αποτελέσει φωτεινό παράδειγμα αλλά και κίνητρο για τη συνέχεια...

Ευχαριστώ επίσης τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, τον καθηγητή του τμήματος Βιολογίας κ. Μιχάλη Κοκκινίδη και τον επίκουρο καθηγητή του τμήματος Ιατρικής κ. Αλέξη Ζαφειρόπουλο, για τη συμμετοχή τους στην παρούσα εργασία και τις πολύτιμες συμβουλές και παρατηρήσεις τους.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους προπτυχιακούς και μεταπτυχιακούς φοιτητές του εργαστηρίου Ανοσοβιολογίας, για το χρόνο που περάσαμε μαζί, τους προβληματισμούς που μας βοήθησαν να προχωρήσουμε στο δρόμο της γνώσης και τις στιγμές που μας έφεραν πιο κοντά. Ιδιαίτερα ευχαριστώ τη Χριστιάνα Κυβελίδου που με μύησε στην ομάδα του εργαστηρίου και με βοήθησε επιστημονικά και ηθικά στην διετή πορεία μου στο μεταπτυχιακό πρόγραμμα, τη Μαρία Καλογνώμου και την Κατερίνα Μπακέλα για την πολύτιμη βοήθειά τους στην πραγματοποίηση των πειραμάτων. Εύχομαι πραγματικά να συνεχίσουμε να είμαστε συνεργάτες στην πορεία προς την ολοκλήρωση των μεταπτυχιακών μας σπουδών.

Ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στον σύζυγο και σύντροφο της ζωής μου Στέλιο, γιατί υπήρξε ο ηθικός αυτουργός στην πραγματοποίηση των μεταπτυχιακών μου σπουδών και ο συνοδοιπόρος μου σε κάθε μου επιλογή. Η αμέριστη συμπαράσταση, η αγάπη και η κατανόησή του, συνέβαλαν καθοριστικά στην ολοκλήρωση αυτής της προσπάθειας και μου έδωσαν δύναμη για να θέσω νέους στόχους στη ζωή μου.

Το πιο μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στις κόρες μου, Μαρία και Ιωάννα. Τις ευχαριστώ που υπάρχουν στη ζωή μου και δίνουν νόημα σε κάθε μου στιγμή. Τις ευχαριστώ που στο ξεκίνημα της ζωής τους μπόρεσαν να κατανοήσουν την ανάγκη

μου για γνώση και με στερήθηκαν για αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα. Η τρυφερή αγκαλιά τους είναι η δύναμη μου για το παρόν και το μέλλον...

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τη βαθιά μου ευγνωμοσύνη στους γονείς μου, που με έμαθαν να κοιτάω ψηλά και να κυνηγάω τα όνειρά μου. Τους ευχαριστώ που ήταν και είναι πάντα δίπλα μου σε κάθε μου επιλογή και μου συμπαραστέκονται ηθικά, συναισθηματικά και πρακτικά στην καθημερινότητα μου.

Στις κόρες μου,
Μαρία και Ιωάννα

Στον πατέρα μου

Περιεχόμενα

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	9
ABSTRACT.....	12
Κεφάλαιο 1 – Εισαγωγή.....	14
1.1 - Εισαγωγή	15
1.2 - Αναπαραγωγικό σύστημα άρρενος.....	17
1.2.1 - Στοιχεία ανατομίας.....	18
1.2.2 - Ιστολογική υφή και λειτουργία όρχεως.....	18
1.2.3 - Ιστολογική υφή και λειτουργία εκφορητικής οδού και επικουρικών αδένων.....	20
1.2.4 - Στοιχεία φυσιολογίας.....	21
1.2.5 - Ο άξονας υποθάλαμος - υπόφυση - όρχεις.....	21
1.2.6 - Σπερματογένεση.....	23
1.2.7 - Το ώριμο σπερματοζωάριο.....	28
1.2.8 - Σπερματικό πλάσμα - Σπέρμα.....	30
1.3 - Αλληλεπίδραση γαμετών και γονιμοποίηση.....	31
1.3.1 - Ωρίμανση (capacitation).....	31
1.3.2 - Ακροσωμιακή αντίδραση (acrosome reaction).....	32
1.3.3 - Αλληλεπίδραση σπερματοζωαρίου - ωαρίου.....	33
1.3.4 - Σύντηξη σπερματοζωαρίου - ωαρίου.....	34
1.4 - Έλεγχος σπέρματος.....	35
1.4.1 - Σπερμοδιάγραμμα.....	36
1.5 - Στοιχεία Ανοσολογίας.....	37

1.5.1	- Έμφυτη και προσαρμοστική ανοσία.....	37
1.5.2	- Το Μείζον Σύμπλεγμα Ιστοσυμβατότητας (MHC).....	39
1.5.3	- Αντιγόνα ιστοσυμβατότητας τάξης II.....	41
1.5.4	- Μη κλασσικά τάξης II αντιγόνα ιστοσυμβατότητας.....	43
1.5.5	- Το ενδοκυττωτικό μονοπάτι.....	45
1.5.6	- Έκφραση των MHC μορίων στα σπερματοκύτταρα και στο σπερματικό πλάσμα.....	46
1.5.7	- Κυτταροκίνες.....	47
1.5.8	- Υποδοχείς κυτταροκινών.....	49
1.5.9	- Παρουσία κυτταροκινών στο σπερματικό πλάσμα.....	50
1.6	- Σκοπός της εργασίας.....	51
Κεφάλαιο 2 - Υλικά και μέθοδοι.....		53
2.1	- Δείγματα σπέρματος.....	54
2.1.1	- Προσδιορισμός παραμέτρων του σπέρματος, με βάση το σπερμοδιάγραμμα.....	54
2.1.2	- Επεξεργασία δειγμάτων που προορίζονται για ανοσοφθορισμό (καθαρισμός).....	55
2.2	- Ανοσοφθορισμός.....	56
2.3	- Προετοιμασία δειγμάτων για RT-PCR.....	57
2.3.1	- Αντίστροφη μεταγραφή και αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.....	57
2.4	- Προετοιμασία δειγμάτων για ELISA.....	60
2.4.1	- Ενζυμοσύνδετη Ανοσοπροσροφητική Δοκιμή (ELISA).....	60
Κεφάλαιο 3 - Αποτελέσματα.....		62
3.1	- Ανίχνευση των μορίων DReξωτερικό, DReσωτερικό, DM, DO και CD74 με ανοσοφθορισμό.....	63
3.2	- Ανίχνευση των μεταγράφων των α και β γονιδίων των DR, DM, DO και	73

CD74	
3.3 - Ανίχνευση φλεγμονωδών (IL-2, IL-6, IFN-γ, TNF-α) και αντιφλεγμονωδών (IL-4, IL-10) κυτοκινών στο σπερματικό πλάσμα	78
3.4 - Ανίχνευση των διαλυτών sMHC I και sMHC II στο σπερματικό πλάσμα ...	82
Κεφάλαιο 4 - Συζήτηση	85
4.1 - Γενικά.....	86
4.2 - Σχολιασμός αποτελεσμάτων.....	87
4.3 - Επίλογος.....	90
BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	91
Περιεχόμενα.....	6
1.1 Εισαγωγή.....	16
1.2 Αναπαραγωγικό σύστημα άρρενος.....	18
1.2.1 Στοιχεία ανατομίας.....	20
1.2.2 Ιστολογική υφή και λειτουργία του όρχεως.....	20
1.2.3 Ιστολογική υφή και λειτουργία εκφορητικής οδού και επικουρικών αδένων.....	21
1.2.4 Στοιχεία φυσιολογίας.....	22
1.2.5 Ο άξονας υποθάλαμος – υπόφυση – όρχεις.....	22
1.2.6 Σπερματογένεση.....	25
1.2.7 Το ώριμο σπερματοζωάριο.....	30
1.2.8 Σπερματικό πλάσμα – Σπέρμα.....	32
1.3 Αλληλεπίδραση γαμετών και γονιμοποίηση.....	33
1.3.1 Ωρίμανση (capacitation).....	33
1.3.2 Ακροσωμιακή αντίδραση (acrosome reaction).....	34
1.3.3 Αλληλεπίδραση σπερματοζωαρίου – ωαρίου.....	35
1.3.4 Σύντηξη σπερματοζωαρίου – ωαρίου.....	36
1.4 Έλεγχος σπέρματος.....	37
1.4.1 Σπερμοδιάγραμμα.....	38

1.5	Στοιχεία Ανοσολογίας	39
1.5.1	Έμφυτη και προσαρμοστική ανοσία	39
1.5.2	Το Μείζον Σύμπλοκο Ιστοσυμβατότητας (MHC).....	41
1.5.3	Αντιγόνα ιστοσυμβατότητας τάξης II	43
1.5.4	Μη κλασσικά τάξης II αντιγόνα ιστοσυμβατότητας	45
1.5.5	Το ενδοκυτταρικό μονοπάτι.....	47
1.5.6	Έκφραση των MHC μορίων στα σπερματοκύτταρα και στο σπερματικό πλάσμα .	48
1.5.7	Κυτταροκίνες	49
1.5.8	Υποδοχείς κυτταροκινών	51
1.5.9	Παρουσία κυτταροκινών στο σπερματικό πλάσμα	52
1.6	Σκοπός της εργασίας	53
2.	Υλικά και μέθοδοι	56
2.1	Δείγματα σπέρματος	56
2.1.1	Προσδιορισμός παραμέτρων του σπέρματος, με βάση το σπερμοδιάγραμμα	56
2.1.2	Επεξεργασία δειγμάτων που προορίζονται για ανοσοφθορισμό (καθαρισμός) ...	57
2.2	Ανοσοφθορισμός.....	58
2.3	Προετοιμασία δειγμάτων για RT-PCR	59
2.3.1	Αντίστροφη μεταγραφή και αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.....	59
2.4	Προετοιμασία δειγμάτων για ELISA	62
2.4.1	Ενζυμοσύνδετη Ανοσοπροσοφητική Δοκιμή (ELISA)	62
3.	Αποτελέσματα	65
3.1	Ανίχνευση των μορίων DRεξωτερικό, DRεσωτερικό, DM, DO και CD74 με ανοσοφθορισμό	65
3.2	Ανίχνευση των μεταγράφων των α και β γονιδίων των DR, DM, DO και CD74.....	75
3.3	Ανίχνευση φλεγμονωδών (IL-2, IL-6, IFN-γ, TNF-α) και αντιφλεγμονωδών (IL-4, IL-10) κυτοκινών στο σπερματικό πλάσμα.....	80
3.4	Ανίχνευση των διαλυτών sMHC I και sMHC II στο σπερματικό πλάσμα	84
4.1	Γενικά.....	88

4.2	Σχολιασμός αποτελεσμάτων.....	89
4.3	Επίλογος.....	92
	Βιβλία.....	94
	Άρθρα.....	95

Περίληψη

Η ανδρική υπογονιμότητα, αναφέρεται στην αδυναμία του αρσενικού να επιτύχει εγκυμοσύνη σε ένα γόνιμο θηλυκό και αφορά το 40 – 50% των υπογόνιμων ζευγαριών. Συνήθως, η ανδρική υπογονιμότητα σχετίζεται με την ποιότητα του σπέρματος, η οποία επηρεάζεται από μία σειρά παραγόντων μεταξύ των οποίων σημαντική θέση κατέχει και ο ανοσολογικός παράγοντας. Η ιδιαιτερότητα των σπερματοζωαρίων, έναντι άλλων κυττάρων του οργανισμού, να αναπτύσσονται σε ένα ανοσολογικά απομονωμένο περιβάλλον, τα καθιστά ευαίσθητα σε αντιδράσεις αυτοανοσίας, αλλά και σε άλλες ανοσολογικές αντιδράσεις, στις οποίες συμμετέχουν κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και όχι μόνο. Το Μείζον Σύμπλεγμα Ιστοσυμβατότητας, συμμετέχει στις παραπάνω ανοσολογικές αντιδράσεις και έχει καθοριστικό ρόλο στη διαδικασία της γονιμοποίησης.

Στην παρούσα εργασία, αρχικά θελήσαμε να ανιχνεύσουμε την έκφραση των κλασσικών και μη κλασσικών αντιγόνων ιστοσυμβατότητας τάξης II (DR, DM, DO, CD74) στην επιφάνεια και στο εσωτερικό των σπερματοζωαρίων, και στη συνέχεια να συσχετίσουμε την παρουσία των αντιγόνων αυτών με τις παραμέτρους του σπέρματος όπως αυτές καθορίζονται στο σπερμοδιάγραμμα αλλά και με τη γενικότερη ποιότητα του σπέρματος. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από αυτό το κομμάτι της εργασίας, έδειξαν την παρουσία των HLA τάξης II τα οποία

μελετήσαμε. Το προφίλ έκφρασης των αντιγόνων αυτών, φάνηκε να διαφέρει από δείγμα σε δείγμα, ενώ συγχρόνως, υπάρχει καλή συσχέτιση μεταξύ της παρουσίας συγκεκριμένου αντιγόνου και συγκεκριμένης παραμέτρου του σπερμοδιαγράμματος. Έπειτα από μελέτη ανίχνευσης των μεταγραφών των ίδιων αντιγόνων, προέκυψε ένα νέο πρότυπο γονιδιακής έκφρασης το οποίο χαρακτηρίζει τα σπερματοζωάρια και δεν συναντάται σε άλλα ήδη γνωστά συστήματα έκφρασης. Ως εκ τούτου, σε σχέση με τα αντιγόνα ιστοσυμβατότητας τα οποία μελετήθηκαν, τα αποτελέσματα μας οδηγούν με ασφάλεια στο συμπέρασμα ότι τα αντιγόνα ιστοσυμβατότητας θα μπορούσαν να αποτελέσουν μία νέα διαγνωστική δοκιμή για τη διερεύνηση της ανεξήγητης υπογονιμότητας, αλλά και για την μελλοντική επιλογή του προς γονιμοποίηση γαμέτη.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν επίσης τα επίπεδα φλεγμονωδών και αντιφλεγμονωδών κυτοκινών (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ και TNF- α) στο σπερματικό πλάσμα των ίδιων δειγμάτων. Στη συνέχεια, τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τα επίπεδα των κυτοκινών, συσχέτιστηκαν με αυτά της παρουσίας των αντιγόνων ιστοσυμβατότητας αλλά και με την ποιότητα του σπέρματος. Δεν υπήρξε άμεση συσχέτιση μεταξύ των κυτοκινών και των αντιγόνων ιστοσυμβατότητας τάξης II. Υπήρξε όμως καλή συσχέτιση μεταξύ της ποιότητας του σπέρματος και της παρουσίας συγκεκριμένων κυτοκινών.

Τέλος, στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός των επιπέδων των διαλυτών αντιγόνων ιστοσυμβατότητας τάξης II στο σπερματικό πλάσμα και προσπάθεια συσχέτισης των αποτελεσμάτων αυτού του προσδιορισμού με τα αποτελέσματα από την ανίχνευση των ίδιων αντιγόνων στα σπερματοζωάρια και την ποιότητα του σπέρματος. Υπήρξε καλή συσχέτιση μεταξύ της παρουσίας των αντιγόνων ιστοσυμβατότητας τάξης II στα σπερματοζωάρια και των αντίστοιχων διαλυτών στο σπερματικό πλάσμα. Επίσης, καλή ήταν και η συσχέτιση μεταξύ των διαλυτών αντιγόνων ιστοσυμβατότητας τάξης II και της ποιότητας του σπέρματος, γεγονός που επιτρέπει τη μελλοντική χρησιμοποίηση των διαλυτών αντιγόνων ως δείκτες ποιότητας και γονιμότητας του σπέρματος.

ABSTRACT

Male infertility refers to the inability of a male to achieve pregnancy upon complication with a fertile female and accounts for the 40 - 50% of infertile cases. Usually, male infertility is associated with sperm quality, which is influenced by a number of factors. Immunological factors probably contribute to a substantial number of cases of unexplained infertility, while immunity appears to regulate ejaculation quality and fertility in humans. The specificity of spermatozoa, compared to other body cells, to develop in an immunologically privileged site, makes them susceptible to autoimmune and other immune reactions. The major histocompatibility complex is involved in all these immune responses and therefore plays a key role in the process of fertilization.

The first aim of this project was to detect the expression of classical and non classical major histocompatibility complex class II antigens (DR, DM, DO, CD74) on the membrane and cytoplasm of sperm, and correlate them to the sperm parameters determined by semen analysis to assess the overall quality of sperm. Immunofluorescence experiments detected the presence of all HLA class II studied. The expression profiles of these antigens appeared to vary from sample to sample, while there was good correlation between the presence of specific antigens and specific parameters of semen analysis. Interestingly, RT-PCR analysis detected a new

pattern of gene expression in sperm which differs from the up to now known expression systems. Therefore, based on the histocompatibility antigens studied here, it can be safely concluded that these could be used as novel diagnostic tests for investigating unexplained infertility, as well as the selection of the fertilization gamete.

The second aim of this project was to determine the levels of inflammatory and anti-inflammatory cytokines (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ and TNF- α), in the seminal plasma of the same samples. The obtained results did not show any direct correlation with the presence of these histocompatibility antigens, but the presence of specific cytokines associated with sperm quality.

Finally, in the present work, the levels of soluble class II histocompatibility antigens in the seminal plasma was determined and correlated to semen quality. The results detected a good correlation between the presence of membrane and soluble class II histocompatibility antigen on sperm and seminal plasma respectively, which was also correlated with sperm quality, enabling thus their future use as indicators of quality and fertility of sperm.

Κεφάλαιο 1 - Εισαγωγή

1.1 Εισαγωγή

Η ικανότητα αναπαραγωγής και διαίωσισης του είδους αποτελεί ένα από τα πιο θαυμαστά χαρακτηριστικά των ζωντανών οργανισμών. Στα ανώτερα ζώα και τον άνθρωπο η διαδικασία περιλαμβάνει τη μεταφορά βιολογικών πληροφοριών στους απογόνους. Επειδή η διαδικασία αυτή είναι σύνθετη και διεξάγεται σε πολλαπλά επίπεδα, οι πιθανότητες διαταραχής από ενδογενή ή εξωγενή αίτια είναι αρκετές με συνέπεια την υπογονιμότητα.

Ο όρος ανδρική υπογονιμότητα αναφέρεται στην ανικανότητα ενός άνδρα να επιτύχει εγκυμοσύνη σε ένα γόνιμο θηλυκό. Η ανδρική υπογονιμότητα συνήθως οφείλεται σε χαμηλής ποιότητας σπέρμα και αντιπροσωπεύει το 40 – 50% της υπογονιμότητας.

Τα αίτια της ανδρικής υπογονιμότητας ποικίλουν και ενδεικτικά αναφέρονται, οι παθήσεις των όρχεων και των περιβλημάτων τους, οι ενδοκρινικές παθήσεις που

συχνά έχουν ως αποτέλεσμα τη μη φυσιολογική παραγωγή των φυλετικών ορμονών, οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες, οι ανοσολογικές διαταραχές, η ιδιοπαθής ανεπάρκεια του σπερματικού επιθηλίου και τέλος οι περιβαλλοντικοί παράγοντες.

Ο ανοσολογικός παράγοντας, πιθανόν να εμπλέκεται σε ένα ουσιαστικό αριθμό περιπτώσεων ανεξήγητης υπογονιμότητας. Ένας ικανός αριθμός μελετών έχει αποδείξει ότι η ανοσία συμμετέχει σε μεγάλο βαθμό στη ρύθμιση της ποιότητας της εκσπερμάτισης και στην ανθρώπινη γονιμότητα γενικότερα.

Τα σπερματοζωάρια είναι κύτταρα τα οποία αναπτύσσονται σε μία ανοσολογικά απομονωμένη περιοχή, δεν έχουν υποβληθεί σε ανοχοποίηση και ως εκ τούτου γίνονται αντιληπτά ως «μη εαυτά» όταν εκτεθούν στο ανοσοποιητικό σύστημα. Κατά την επαφή τους με αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, αντιγόνα του σπέρματος αναγνωρίζονται ως ξένα μόρια και πυροδοτούν αυτοάνοση αντίδραση που μεσολαβείται από την έκφραση των HLA αντιγόνων.

Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η παρουσία HLA αντιγόνων στο σπέρμα επηρεάζει τον αριθμό και τη μορφολογία των σπερματοζωαρίων, τις κινηματικές παραμέτρους και τη διείσδυση των σπερματοζωαρίων στο ωάριο. Τα δεδομένα των μελετών αυτών προτείνουν συσχέτιση της παρουσίας των HLA αντιγόνων με τη γονιμοποιητική ικανότητα των σπερματοζωαρίων.

Βασικός μηχανισμός προστασίας των σπερματοζωαρίων κατά της αυτοανοσίας είναι ο αιματοορχικός φραγμός, ο οποίος αναπτύσσεται κατά την εφηβεία και σε συνεργασία με την κυτταρομεσολαβητική ρύθμιση, διασφαλίζει τη μη απόκριση σε αντιγόνα του σπέρματος. Τέτοιου είδους ανοσοκαταστολή μπορεί να προκαλείται από την παρουσία κυτταροκινών και άλλων χυμικών διαμεσολαβητών. Οι στρατηγικές άμυνας του ανοσοποιητικού συστήματος μπορεί να είναι η κύρια πηγή αυτών των κυτοκινών, αλλά και κύτταρα της γεννητικής οδού μπορεί επίσης να είναι σε θέση να εκφράσουν κυτοκίνες.

Οι συγκεντρώσεις των κυτοκινών στο σπερματικό πλάσμα, είναι δυνατόν να παρέχουν πρόσθετες πληροφορίες στην περίπτωση της ανδρικής υπογονιμότητας. Το ανθρώπινο σπέρμα περιέχει αρκετές κυτοκίνες όπως ο TNF- α , η IFN- γ και άλλες ιντερλευκίνες. Ωστόσο, οι συγκεντρώσεις των κυτοκινών στο σπερματικό πλάσμα δεν παρέχουν μόνο μια μέτρηση της απελευθέρωσής τους, αλλά αντανακλούν και σε διαφορετικές αλληλεπιδράσεις τους με τα σπερματοζωάρια. Παλαιότερες μελέτες έχουν δείξει ότι *in vitro* οι κυτοκίνες επηρεάζουν την κινητικότητα των σπερματοζωαρίων, αυξάνουν την παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου από τα σπερματοζωάρια και μειώνουν τη διεισδυτική ικανότητα των σπερματοζωαρίων.

1.2 Αναπαραγωγικό σύστημα άρρενος

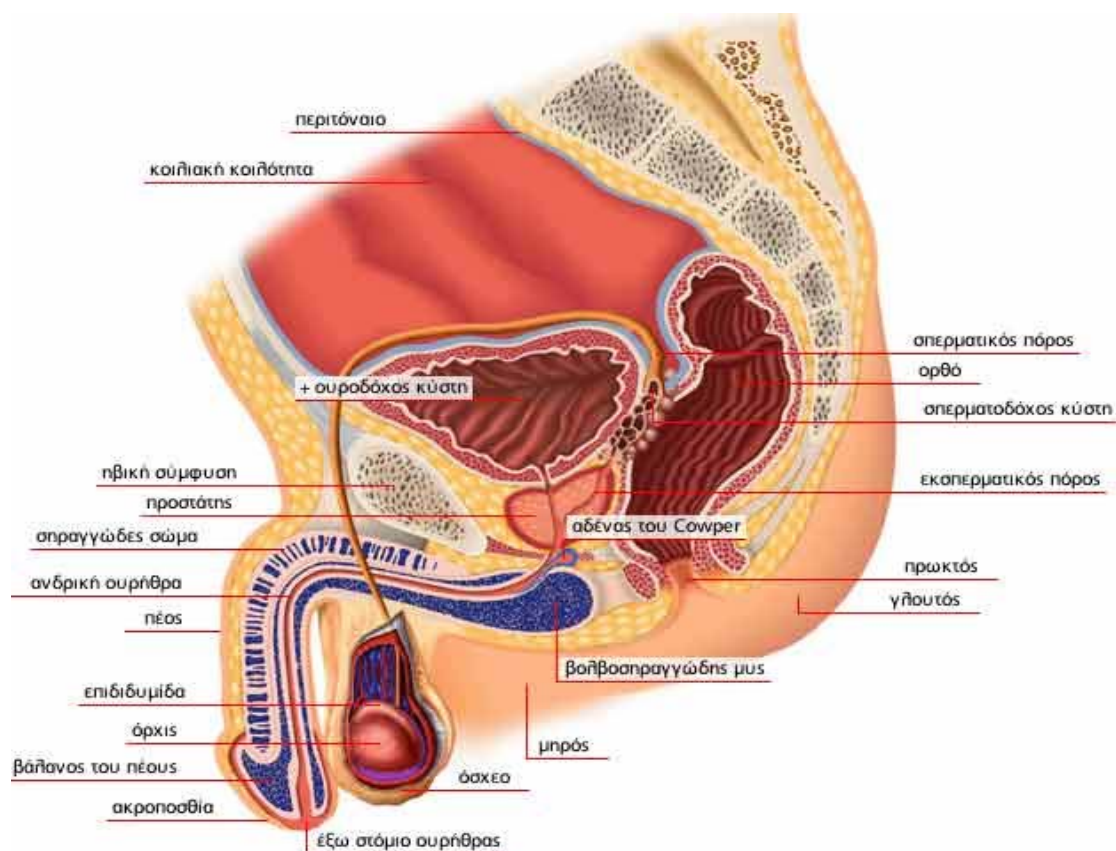
Το αναπαραγωγικό σύστημα του άνδρα περιλαμβάνει τους κύριους γεννητικούς αδένες (όρχεις ή δίδυμοι), την εκφορητική οδό του σπέρματος, τους επικουρικούς γεννητικούς αδένες και από το πέος. Συνοπτικά, το ανδρικό γεννητικό σύστημα αποτελείται από τις εξής δομές **(Εικόνα 1)**:

- I. Κύριοι γεννητικοί αδένες – ανδρικές γονάδες (όρχεις)
- II. Εκφορητική οδός σπέρματος
 1. Επιδιδυμίδες
 2. Σπερματικοί πόροι
 3. Εκσπερματιστικοί πόροι
- III. Επικουρικοί αδένες
 1. Σπερματοδόχες κύστεις
 2. Προστάτης

3. Βολβουρηθραίοι αδένες ή αδένες του Cowper

4. Αδένες του Littre

IV. Πέος



Εικόνα 1. Το ανδρικό γεννητικό σύστημα σε σχέση με το κατώτερο ουροποιητικό σύστημα

Τα σπερματοζώαρια αρχικά σχηματίζονται στον όρχι, από όπου στη συνέχεια το σπέρμα προωθείται στην επιδιδυμίδα και από εκεί στο σπερματικό πόρο, ο οποίος αμέσως πριν την είσοδό του στον προστάτη διευρύνεται σχηματίζοντας τη λήκυθο του σπερματικού πόρου. Στο προστατικό άκρο της ληκύθου εκβάλλουν οι σπερματοδόχες κύστεις και το περιεχόμενό τους, μαζί με της ληκύθου, περνά στον εκσπερματιστικό πόρο ο οποίος διασχίζει τον προστάτη και εκβάλλει στην έσω ουρήθρα. Σε κάθε εκσπερματιστικό πόρο εκβάλλουν και οι προστατικοί πόροι που ξεκινούν από τον αδενικό ιστό του προστάτη. Το τμήμα που συνδέει το αναπαραγωγικό σύστημα με το εξωτερικό περιβάλλον, είναι η ουρήθρα, η οποία εφοδιάζει το σπέρμα με βλέννα, που προέρχεται από μεγάλο αριθμό αδένων, τους αδένες του Littre, καθώς και από μεγάλους βολβουρηθραίους αδένες.

1.2.1 Στοιχεία ανατομίας

1.2.2 Ιστολογική υφή και λειτουργία του όρχεως

Ο όρχις στον άνδρα αποτελείται από ένα πολύπλοκο αλλά δραστήριο εργαστήριο, όπου εκδηλώνεται σπουδαία ενδοκρινική, παρακρινική και αυτοκρινική δράση, και παράλληλα πραγματοποιείται η παραγωγή σπέρματος.

Τα ιστολογικά στοιχεία του όρχεως στον ενήλικα περιλαμβάνουν αφενός τα σπερματικά σωληνάκια και αφετέρου τον διάμεσο ιστό με τα επί μέρους κυτταρικά στοιχεία τους.

1. Αμέσως μετά το εξωτερικό περίβλημα των σωληναρίων, στους όρχεις του ενήλικα βρίσκονται δύο τύποι ουσιωδώς διαφορετικών κυττάρων, τα βασικά ή Σερτόλεια στην περιφέρεια και τα κύτταρα του γεννητικού επιθηλίου προς το κέντρο.

α) Τα Σερτόλεια κύτταρα (Sertoli) αποτελούν ένα από τους πιο πολυδύναμους τύπους κυττάρων του οργανισμού, με πολλαπλές λειτουργικές δυνατότητες και αποστολές. Κατά την προεφηβική ηλικία τα βασικά κύτταρα παρουσιάζουν διάφορο βαθμό μιτωτικής δραστηριότητας, που όμως τερματίζεται μετά την έναρξη της ήβης. Τα κύτταρα αυτά κατά την προεφηβική ηλικία βρίσκονται διάχυτα και ακατάστατα τοποθετημένα εντός του σωληναρίου, αλλά μετά την ενήβωση διατάσσονται στην περιφέρεια και σε άμεση σχέση με τη βασική μεμβράνη. Με τον τρόπο αυτό διαμορφώνεται και ο αιματοορχικός φραγμός, που δεν υφίσταται στους προεφηβικούς όρχεις. Ο αιματοορχικός φραγμός δημιουργεί ένα προστατευμένο περιβάλλον για το σπερματικό επιθήλιο εξασφαλίζοντας τη σπερματογένεση και αποκλείοντας την προσβολή του από το σύστημα ανοσίας.

Οι λειτουργίες των κυττάρων Sertoli είναι πολλαπλές και εκτός από τη στηρικτική και τροφοδοτική αποστολή, περιλαμβάνουν τη σύνθεση και μεταβολισμό των στεροειδών ορμονών, τη σύνθεση των πεπτιδικών ορμονών και άλλων σύνθετων πρωτεϊνών, την παρακρινική ρύθμιση εντός του όρχεως και την κεντρική ρύθμιση της υποθάλαμο-υποφυσιακής έκκρισης. Η περισσότερο έκδηλη αποστολή τους είναι η υποστήριξη του σπερματικού επιθηλίου. Στη διαδικασία αυτή είναι απαραίτητη η συνεργιστική δράση της τεστοστερόνης, η οποία στον ώριμο όρχι αποτελεί τον κύριο ρυθμιστή της σπερματογένεσης.

β) Τα κύτταρα του γεννητικού επιθηλίου (germinal epithelium cells) μέσω μιας σειράς διαδοχικών σταδίων εξελίξεως μετατρέπονται από αρχέγονα σε πλήρως διαμορφωμένα και ελεύθερα σπερματοζώαρια. Η διαδικασία αυτή, γνωστή σαν

σπερματογένεση, λαμβάνει χώρα στα σπερματικά σωληνάκια του όρχεως. Οι πιο άωρες κυτταρικές μορφές του σπερματικού επιθηλίου (σπερμιογόνια και νεαρά σπερματοκύτταρα) βρίσκονται προς τα εκτός, επικαθήμενες στη βασική μεμβράνη, που αποτελείται κυρίως από κολλαγόνο και μυοειδή κύτταρα. Τα πιο ώριμα σπερματοκύτταρα και οι σπερματίδες βρίσκονται προς τον αυλό των σπερματικών σωληναρίων.

2. Ο διάμεσος ιστός (*intertubular tissue*) αποτελείται από ποικιλία επί μέρους κυτταρικών στοιχείων με κοινό χαρακτηριστικό, ότι όλα φιλοξενούνται στο μεταξύ των σπερματικών σωληναρίων χώρο. Σημαντικότερα από τα στοιχεία αυτά είναι τα μυοειδή κύτταρα, τα διάμεσα κύτταρα (*Leydig*) και τα αγγεία και νεύρα.

α) Τα σπερματικά σωληνάκια περιβάλλονται από μία λεπτή στιβάδα ινών κολλαγόνου, που επικαλύπτεται από τη στιβάδα των μυοειδών κυττάρων (*myoid cells*). Κάθε σωληνάριο περιβάλλεται από ένα ή περισσότερα τέτοια κύτταρα, που βρίσκονται μέσα σε ομάδες ινών κολλαγόνου. Τα μυοειδή κύτταρα αποτελούν μεσεγγυματικής προέλευσης κύτταρα, τα οποία συμβάλλουν στη δομική ακεραιότητα των σωληναρίων, ενώ λειτουργικά επηρεάζουν το περιβάλλον τους με την συσπαστική επίδραση που ασκούν.

β) Τα κύτταρα *Leydig*, βρίσκονται διασκορπισμένα στο διάστημα μεταξύ των σπερματικών σωληναρίων και ανήκουν σε μια ετερογενή ομάδα, που έχει δύο κυρίως τύπους. Ο πρώτος αποτελεί την άωρη και σχετικά μη εξελιγμένη μορφή κυττάρου με μικρή ανάπτυξη ενδοπλασματικού δικτύου. Ο δεύτερος τύπος, αποτελεί την ώριμη μορφή, που χαρακτηρίζεται από ένα μεγάλο και πολυεδρικό κύτταρο, με ωοειδή πυρήνα και έκδηλο πυρήνιο.

Ο ρόλος των κυττάρων *Leydig* είναι η παραγωγή ορμονών και ιδιαίτερα στεροειδών του φύλου και η ολική μάζα τους σχετίζεται ικανοποιητικά με την παραγωγή ανδρογόνων. Η αρχική φάση της διαφοροποίησης των κυττάρων αυτών αρχίζει περίπου από την 7^η εβδομάδα εμβρυικής ζωής, συνεχίζοντας για μερικούς μήνες μετά τη γέννηση την εκκριτική τους δραστηριότητα και στη συνέχεια υποστρέφονται μέχρι την έναρξη της διαδικασίας της ήβης.

1.2.3 Ιστολογική υφή και λειτουργία εκφορητικής οδού και επικουρικών αδένων

Η επιδιδυμίδα αποτελεί όχι απλά μέρος της εκφορητικής οδού του σπέρματος αλλά και χώρο λειτουργικής εξέλιξης και αποθήκευσης των σπερματοζωαρίων. Η

λειτουργική ωρίμανση επιτελείται στην κεφαλή και το σώμα, ενώ η αποθήκευση γίνεται κύρια στην ουρά. Οι κύριοι τύποι κυττάρων του επιθήλιου είναι τα βασικά, τα κύρια (*principal*) και τα κορυφαία (*capital*) από την περιφέρεια στον αυλό.

Τα σπερματικά κυστίδια έχουν τοίχωμα περιβαλλόμενο από ελαστικές ίνες και δύο μυϊκές στιβάδες, που επικαλύπτονται προς τον αυλό από το κυλινδρικό εκκριτικό επιθήλιο. Το τελευταίο εκκρίνει ένα βλενώδες υλικό που περιέχει άφθονη φρουκτόζη και άλλες θρεπτικές ουσίες, καθώς και μεγάλες ποσότητες προσταγλανδινών και ινωδογόνου. Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας της εκσπερμάτισης κάθε σπερματοδόχος κύστη εκκενώνει το περιεχόμενό της στον εκσπερματιστικό πόρο αμέσως μετά την εκκένωση των σπερματοζωαρίων από το σπερματικό πόρο. Το υλικό αυτό αυξάνει σημαντικά την ποσότητα του σπέρματος, η φρουκτόζη που περιέχει έχει σημαντική θρεπτική αξία για την επιβίωση των σπερματοζωαρίων και οι προσταγλανδίνες βοηθούν τη γονιμοποίηση κάνοντας την τραχηλική βλέννα πιο δεκτική για τα σπερματοζωάρια και προκαλώντας αντίστροφες περισταλτικές κινήσεις της μήτρας και των ωαγωγών, ώστε τα σπερματοζωάρια να μετακινηθούν προς τις ωοθήκες.

Τέλος, ο προστάτης αποτελεί αδενικό και μυϊκό σχηματισμό, που περιβάλλεται από περιτοναϊκό έλυτρο και εσωτερικά περιέχει συνδετικό και μυϊκό ιστό. Ο προστάτης αδένας εκκρίνει ένα λεπτόρρευστο, γαλακτόχρωο, αλκαλικό υγρό, που περιέχει κιτρικό οξύ, ασβέστιο και διάφορες άλλες ουσίες. Η αλκαλική αντίδραση του προστατικού υγρού μπορεί να έχει μεγάλη σημασία για την επιτυχία της γονιμοποίησης του ωαρίου, γιατί με την παρουσία του το σπερματικό υγρό εξουδετερώνει την οξύτητα των άλλων υγρών μετά την εκσπερμάτιση και αυξάνει πολύ την κινητικότητα και τη γονιμότητα των σπερματοζωαρίων.

1.2.4 Στοιχεία φυσιολογίας

1.2.5 Ο άξονας υποθάλαμος – υπόφυση – όρχεις

Η ανάπτυξη των δευτερογενών ανδρικών χαρακτηριστικών και η ανδρική σεξουαλική συμπεριφορά σχετίζονται άμεσα με τη λειτουργία των όρχεων. Τα στεροειδή και κυρίως η τεστοστερόνη διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην έκφραση του ανδρικού φαινοτύπου, στην ανάπτυξη και λειτουργία των γεννητικών οργάνων, καθώς επίσης και στη σεξουαλική λειτουργία και την ικανότητα προς γονιμοποίηση.

Ο υποθάλαμος, η υπόφυση, ο φλοιός των επινεφριδίων και οι όρχεις αποτελούν το ορμονικό γεννητικό σύστημα του άνδρα, το οποίο δρα σαν άξονας, δηλαδή το

ένα όργανο επηρεάζει τη λειτουργία του άλλου. Ο άξονας «υποθάλαμος – υπόφυση - όρχεις» λειτουργεί αμφίδρομα. Ο υποθάλαμος δέχεται ερεθίσματα από το περιβάλλον, το Κεντρικό Νευρικό Σύστημα και από τον όρχι και απελευθερώνει κατά ώσεις μία ορμόνη που λέγεται εκλυτική των γοναδοτροπινών (Gonadotropin Releasing Hormone, GnRH). Η GnRH είναι ένα δεκαπεπτίδιο που εκκρίνεται από τον τοξοειδή πυρήνα του υποθαλάμου προς το πυλαίο αγγειακό σύστημα υποθαλάμου-υπόφυσης. Στη συνέχεια μεταφέρεται προς τον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης, όπου διεγείρει την έκκριση της θυλακιοτρόπου ορμόνης (Follicle Stimulating Hormone, FSH) και της ωχρινοτρόπου ορμόνης (Luteinising Hormone, LH).

Συγκεκριμένα, η FSH είναι μια γλυκοπρωτεΐνη που παράγεται και απελευθερώνεται κατά κύματα από τα γοναδοτρόπα κύτταρα του πρόσθιου λοβού της υπόφυσης. Ασκή τη δράση της στα κύτταρα Sertoli, όπου συνδέεται με ειδικούς μεμβρανικούς υποδοχείς παράγοντας τη σύνθεση και έκκριση ειδικών πρωτεϊνών που συνδέονται με τα ανδρογόνα και τα μεταφέρουν στα όργανα – στόχους. Η έκκρισή της αναστέλλεται κυρίως από τις ανασταλτίνες (inhibins). Σε βαριές βλάβες του σπερματικού επιθηλίου η παραγωγή των ανασταλτινών, από τα κύτταρα Sertoli, μειώνεται ή/και αναστέλλεται με αποτέλεσμα η έκκριση της FSH να αυξάνεται σημαντικά. Τα αυξημένα επίπεδά της αποτελούν ισχυρό δείκτη μη επανορθώσιμης βλάβης του σπερματικού επιθηλίου.

Η LH είναι μια γλυκοπρωτεΐνη που παράγεται επίσης από τα κύτταρα του πρόσθιου λοβού της υπόφυσης. Η έκκρισή της στη συστηματική κυκλοφορία γίνεται κατά εκκριτικά κύματα, η συχνότητα των οποίων είναι χαρακτηριστική για κάθε είδος ζώου. Η συχνότητα αυτή αντανακλά και τη συχνότητα έκκρισης της GnRH. Η κύρια δράση της αφορά στα κύτταρα Leydig, όπου συνδέεται με τους ειδικούς υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης και ενεργοποιεί το μηχανισμό σύνθεσης των στεροειδικών ορμονών με κύριο εκπρόσωπο την τεστοστερόνη. Η έκκριση της LH καταστέλλεται κυρίως από την τεστοστερόνη και τα οιστρογόνα. Φαίνεται, ότι τα ανδρογόνα ασκούν την ανασταλτική τους δράση στον υποθάλαμο, ενώ τα οιστρογόνα (οιστραδιόλη) στην υπόφυση.

Η τεστοστερόνη είναι το ισχυρότερο ανδρογόνο του πλάσματος. Η σύνθεσή της γίνεται στα μιτοχόνδρια και στο ενδοπλασματικό δίκτυο των κυττάρων Leydig. Τα επινεφρίδια, εκκρίνουν μεγάλες ποσότητες ανδρογόνων, και προδρόμων της τεστοστερόνης, ωστόσο παράγουν μόνο το 5% της συνολικής ορμόνης. Στους φυσιολογικούς άνδρες, το 2 – 3% της ορμόνης κυκλοφορεί ελεύθερο και αποτελεί το βιολογικά δραστικό κλάσμα, το 40 – 50% είναι στερεά συνδεδεμένο με την SHBG, ενώ το υπόλοιπο συνδέεται χαλαρά με τις λευκωματίνες. Το κλάσμα αυτό έχει τη δυνατότητα να αποδεσμεύεται εύκολα από τις λευκωματίνες και να εισέρχεται ταχύτατα στα κύτταρα στόχους. Η ορθή εκτίμηση της βιολογικά δραστικής

τεστοστερόνης πρέπει να περιλαμβάνει, εκτός από την ελεύθερη, και τη συνδεδεμένη με λευκωματίνες ορμόνη. Η ενδοορχική συγκέντρωση της ορμόνης είναι 50 – 100 φορές υψηλότερη από ότι στο αίμα. Στον αυλό των σπερματικών σωληναρίων η τεστοστερόνη βρίσκεται συνδεδεμένη με τη δεσμεύουσα τα ανδρογόνα πρωτεΐνη (Androgen Binding Protein, ABP), η οποία αποτελεί τον ενδοσωληναριακό μεταφορέα της. Η δράση της ασκείται στους ανδρογονικούς υποδοχείς των κυττάρων Sertoli και μέσω των κυττάρων αυτών επιδρά στη σπερματογένεση. Η FSH ενισχύει τη δράση της. Στο κύτταρο, η τεστοστερόνη μπορεί να μετατραπεί από την 5-α-αναγωγή σε διυδροτεστοστερόνη και με τις δύο μορφές συνδέεται με τον υποδοχέα που την οδηγεί στον πυρήνα του κυττάρου. Εκεί παράγεται mRNA που προκαλεί σύνθεση πρωτεϊνών και άλλες εκφράσεις της δράσης των ανδρογόνων. Οι κύριες δράσεις των τελευταίων στα κύτταρα-στόχους είναι: 1) η ρύθμιση της έκκρισης των γοναδοτροπινών με τον άξονα «υποθαλάμου-υπόφυσης», 2) η έναρξη και διατήρηση της σπερματογένεσης, 3) η διαφοροποίηση του γεννητικού συστήματος του άνδρα κατά την εμβρυική ζωή και 4) η προαγωγή της σεξουαλικής ωρίμανσης κατά την ήβη.

Η αύξηση της τεστοστερόνης στο αίμα ξεκινά μια ανάδρομη διαδικασία (feedback) που αναστέλλει την απελευθέρωση της GnRH στον υποθάλαμο, με αποτέλεσμα την αναστολή της παραγωγής των γοναδοτροπινών από την υπόφυση και τον περιορισμό της παραγωγής τεστοστερόνης μέχρι τα επίπεδά της στο αίμα να επανέλθουν στα φυσιολογικά όρια. Θα πρέπει να σημειωθεί, ότι και τα παραγόμενα από τους όρχεις οιστρογόνα επίσης αναστέλλουν την έκκριση τόσο της LH όσο και της FSH.

Τα κύτταρα Leydig αποτελούν το σημαντικότερο ενδοκρινικό σύστημα του όρχεως. Βρίσκονται σε ομάδες μεταξύ των σπερματικών σωληναρίων, κατά μήκος των αγγείων και των λεμφαγγείων, όπου περιβάλλονται από μακροφάγα και κύτταρα του συνδετικού ιστού. Αποτελούν το 5-12% του συνολικού όγκου του αδένα. Η βιοσύνθεση και έκκριση των στεροειδών ορμονών διεγείρεται από την LH διαμέσου των ειδικών υποδοχέων της κυτταρικής μεμβράνης. Επιπλέον, η LH σε συνδυασμό με άλλους παράγοντες που εκκρίνονται από τα άλλα κύτταρα του όρχεως ασκεί τροφική δράση στα κύτταρα Leydig.

Τα κύτταρα Sertoli είναι ευμεγέθη, επιμήκη κύτταρα που διατάσσονται στη βασική μεμβράνη των σπερματικών σωληναρίων και εκτείνονται έως τον αυλό τους. Το περίγραμμά τους είναι ανώμαλο με πολλές διακλαδιζόμενες κυτταροπλασματικές προεκβολές που εφάπτονται με αυτές των γειτονικών κυττάρων και εγκολπώνουν τα εξελισσόμενα σπερματογόνια. Αποτελούν πολύπλοκο σύστημα που διαδραματίζει πρωτεύοντα ρόλο στη σπερματογένεση και ιδιαίτερα στη διαφοροποίηση των σπερματικών κυττάρων. Η κύρια λειτουργία τους

είναι εκκριτική. Υπό την επίδραση της FSH εκκρίνουν περισσότερες από 100 πρωτεΐνες, αυξητικούς παράγοντες, κυτοκίνες, μόρια προσκόλλησης, κ.α.

Επίσης τα κύτταρα Sertoli με τις ισχυρές διακυτταρικές συνδέσεις τους (*zonula occludens complexes*) σχηματίζουν ένα μη διαπερατό φραγμό, τον αιματοορχικό φραγμό που εμποδίζει την είσοδο των λεμφοκυττάρων και των αντισωμάτων στον αυλό των σπερματικών σωληναρίων, όπως και την είσοδο των σπερματοζωαρίων στη λεμφική και στη συστηματική κυκλοφορία. Έτσι, τα γεννητικά κύτταρα απομονώνονται από το ανοσοποιητικό σύστημα και δεν εκτίθενται σε αυτοάνοση αντίδραση. Επιπλέον, εμποδίζει την ελεύθερη διακίνηση ουσιών από το αίμα προς τα σωληνάρια, δημιουργώντας ένα προστατευμένο μικροπεριβάλλον για τη σπερματογένεση.

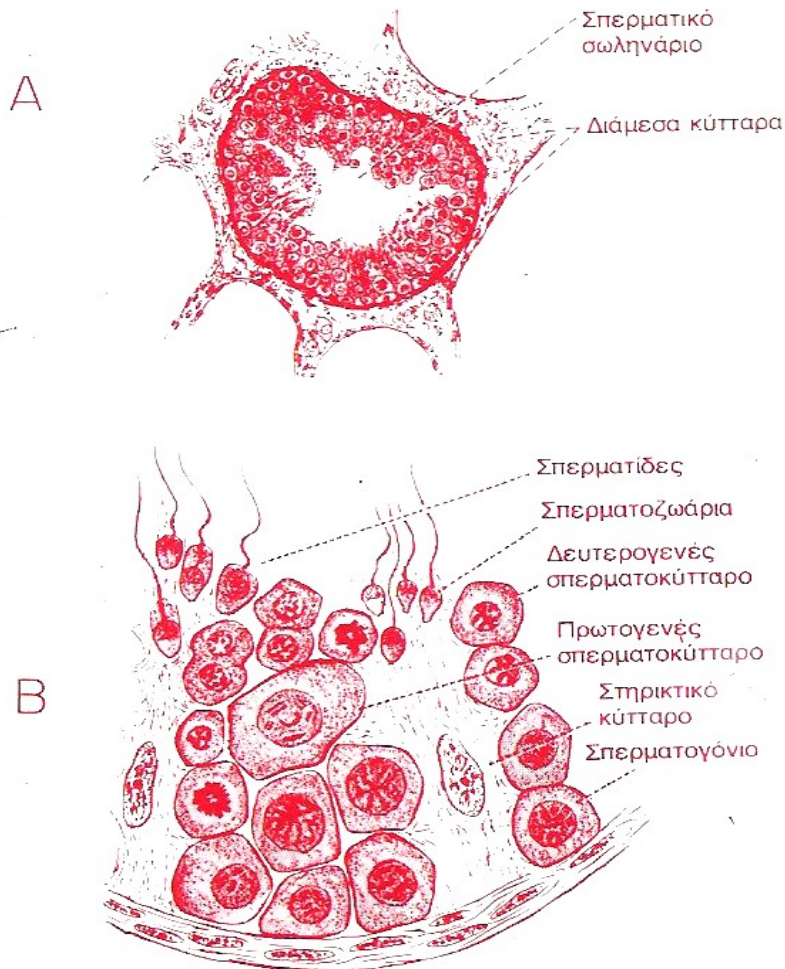
1.2.6 Σπερματογένεση

Η αναπαραγωγή του ανθρώπου γίνεται με αμφιγονία, δηλαδή με συνένωση δύο ετερόφυλων γεννητικών κυττάρων (γαμετών). Οι γαμέτες παράγονται μέσα στους γεννητικούς αδένες από άωρα γεννητικά κύτταρα με μια εξελικτική διαδικασία που ονομάζεται γαμετογένεση. Στον άνδρα οι γεννητικοί αδένες είναι οι όρχεις, οι γαμέτες τα σπερματοζωάρια, ενώ η γαμετογένεση καλείται σπερματογένεση.

Η σπερματογένεση αποτελεί τη δεύτερη λειτουργική αποστολή του γεννητικού συστήματος του άνδρα. Ήδη με την ενδοκρινική λειτουργία των όρχεων έχει γίνει δυνατή η διαφοροποίηση του φύλου, η ωρίμανση των γονάδων και χαρακτήρων του φύλου και η διαμόρφωση της κατάλληλης σεξουαλικής συμπεριφοράς, ενώ παράλληλα καθίσταται δυνατή η διαδικασία της σπερματογένεσης.

Σπερματογένεση γίνεται σε όλα τα σπερματικά σωληνάρια κατά τη διάρκεια της ενεργού σεξουαλικής ζωής, που κατά μέσον όρο αρχίζει στην ηλικία των 13 χρόνων, ως αποτέλεσμα διέγερσης των γεννητικών αδένων από τις γοναδοτρόπους ορμόνες της αδενούποψης, και συνεχίζεται καθόλη τη διάρκεια της ζωής του άνδρα. Τα σπερματοζωάρια που προκύπτουν από τη σπερματογένεση δεν είναι γενετικά πανομοιότυπα, εξαιτίας των μειωτικών χιασμάτων που εξασφαλίζουν αυτή την ετερογένεια. Στον άνδρα, ο χρόνος για την ολοκλήρωση της σπερματογένεσης είναι 64 ημέρες. Αν συνυπολογιστεί και ο χρόνος διάβασης των σπερματοζωαρίων μέσω της επιδιδυμίδας (2-11 ημέρες), τότε για να σχηματιστεί το σπερματοζωάριο και να εμφανιστεί στο σπέρμα, απαιτούνται περίπου 75 ημέρες. Πρέπει να σημειωθεί, ότι τα σπερματογόνια δεν εξελίσσονται όλα συγχρόνως, αλλά βρίσκονται σε ανόμοια

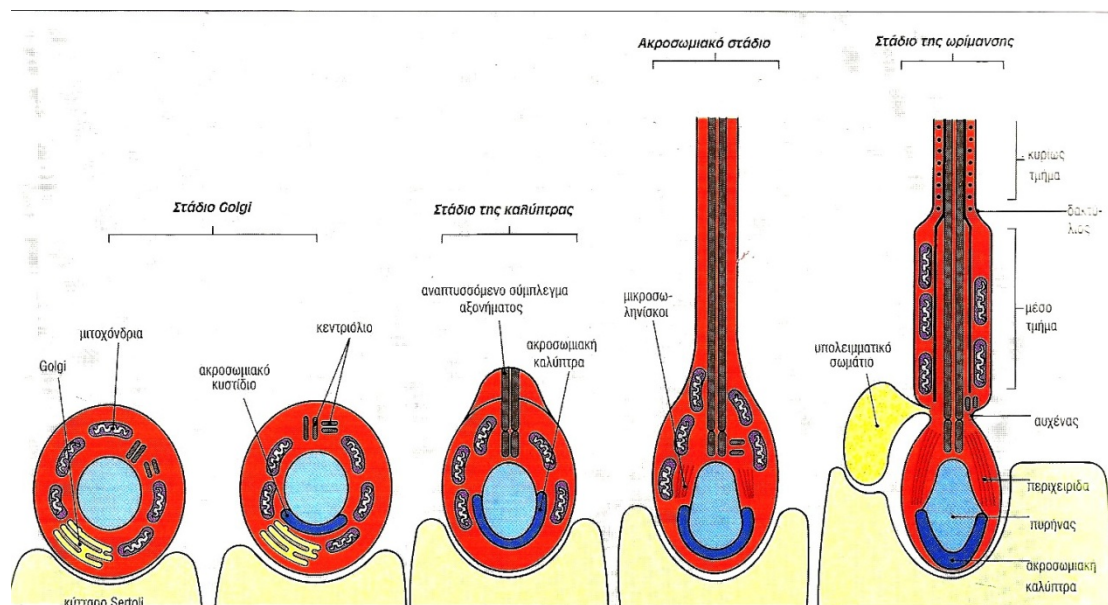
στάδια διαφοροποίησης. Έτσι εξηγείται γιατί στον άνδρα, σε αντίθεση με τη γυναίκα, έχουμε συνεχή παραγωγή ώριμων γεννητικών κυττάρων.



Εικόνα 2. Α. Εγκάρσια διατομή σπερματικού σωληναρίου. Β. Σπερματογένεση

Η διαδικασία της σπερματογένεσης μπορεί να διακριθεί σε δύο φάσεις. Η πρώτη φάση της σπερματογένεσης είναι η ανάπτυξη κάποιων σπερματογονίων σε μεγαλύτερου μεγέθους κύτταρα, τα σπερματοκύτταρα. Η φάση αυτή χαρακτηρίζεται κυρίως από μιτωτικές διαιρέσεις των σπερματογονίων, οι οποίες ανανεώνουν και κατανέμουν το γενετικό υλικό σε όσο το δυνατό περισσότερα κύτταρα. Έτσι, από τα σπερματογόνια δημιουργούνται τα σπερματοκύτταρα πρώτης τάξης. Στη συνέχεια, κάθε σπερματοκύτταρο διαιρείται, με τη διαδικασία της μείωσης, ελαττώνει τον αριθμό των χρωμοσωμάτων από 46 σε 23 και δίνει γένεση στα σπερματοκύτταρα δεύτερης τάξης. Από αυτά, με μιτωτική πάλι διαίρεση και ωρίμανση δημιουργούνται οι σπερματίδες, κάθε μια με 23 χρωμοσώματα. Η μειωτική διαίρεση είναι απαραίτητη, ώστε τα κύτταρα που θα προκύψουν από τη γονιμοποίηση των γαμετών, να έχουν το φυσιολογικό για το είδος αριθμό χρωμοσωμάτων.

Κατά τη μειωτική διαίρεση, τα πρωτογενή σπερματοκύτταρα διανύουν μια μακρά πρόφαση που διαρκεί περίπου 22 ημέρες. Κατά τη διάρκεια της πρόφασης, οι μεταβολές της δομής της πυρηνικής χρωματίνης, επιτρέπουν την αναγνώριση των σταδίων της μειωτικής πρόφασης. Τα στάδια αυτά είναι: της προλεπτοταινίας, της λεπτοταινίας, της ζυγοταινίας, της παχυταινίας και της διπλοταινίας. Η πρώτη μειωτική διαίρεση πραγματοποιείται μετά τα στάδια της όψιμης παχυταινίας/διπλοταινίας, με το σχηματισμό διπλοειδών δευτερογενών σπερματοκυττάρων, τα οποία μέσα σε λίγες ώρες υφίστανται τη δεύτερη μειωτική διαίρεση για να παράγουν απλοειδείς σπερματίδες.



Εικόνα 3. Σπερμιογένεση

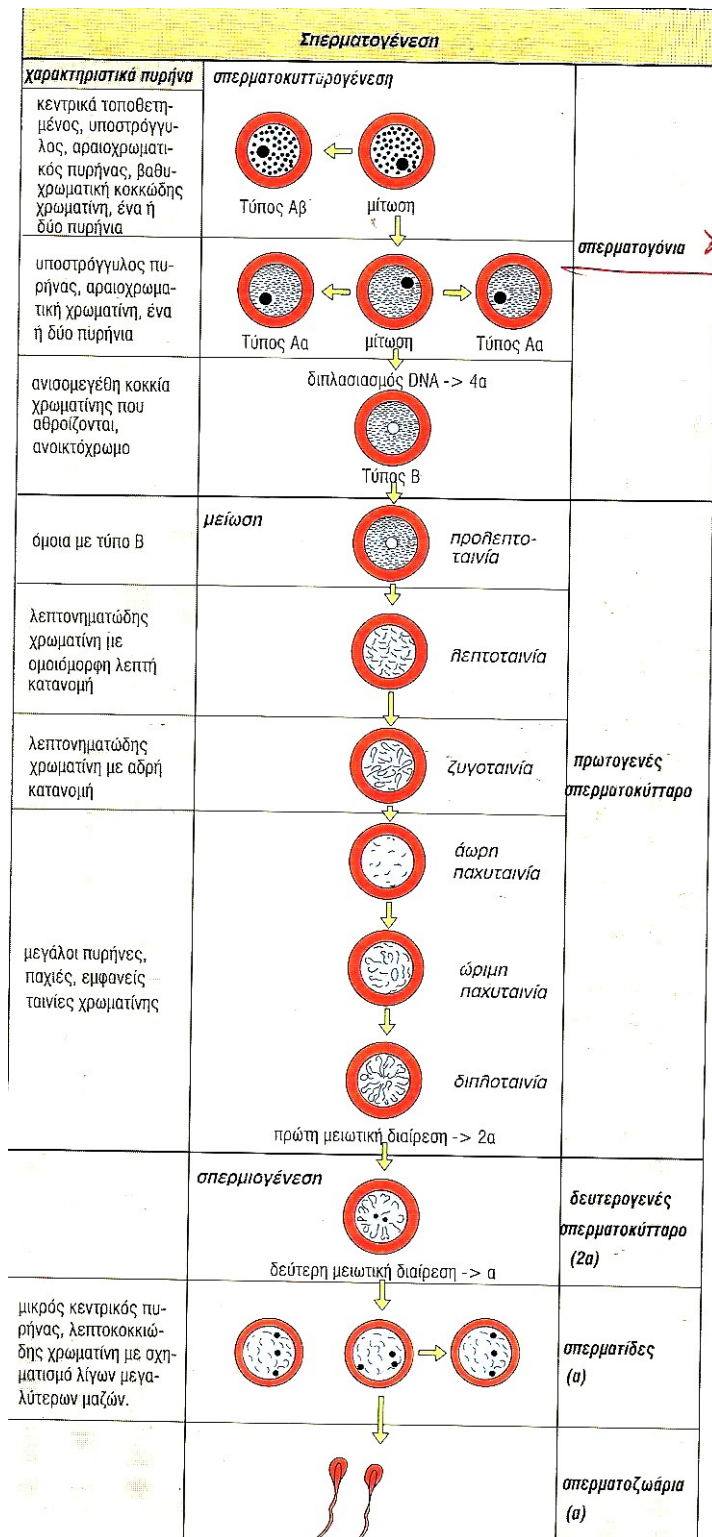
Στη συνέχεια, κατά τη δεύτερη φάση, οι απλοειδείς σπερματίδες μετατρέπονται σε σπερματοζώαρια, με μία διαδικασία γνωστή ως σπερμιογένεση. Η σπερμιογένεση μπορεί να διακριθεί σε 4 στάδια, το στάδιο Golgi, το στάδιο της καλύπτρας, το ακροσωματικό στάδιο και το στάδιο της ωρίμανσης.

Η διαδικασία της ωρίμανσης των σπερματίδων προς σπερματοζώαρια περιλαμβάνει από τη μία μεριά τη διαμόρφωση της κεφαλής και από την άλλη την ανάπτυξη της ουράς. Κατά την πρώτη φάση εμφανίζεται και αναπτύσσεται το ακρόσωμα από τον ακροσωμικό κόμβο, που βρίσκεται κάτω από τη συσκευή Golgi, διαμορφώνεται η ακροσωματική καλύπτρα στο ύψος του άνω πόλου του πυρήνα, με επέκταση προς τα κάτω, ενώ ταυτόχρονα μεταβάλλεται σημαντικά ο πυρήνας. Στις μεταβολές αυτές περιλαμβάνονται η μεταφορά του πυρήνα στην περιφέρεια με συνέπεια την επιμήκυνση της στρογγυλής μέχρι εκείνη τη στιγμή σπερματίδας, η

στεγανοποίηση της πυρηνικής μεμβράνης και η συμπύκνωση της χρωματίνης. Τελικά, κατά το στάδιο αυτό, η σπερματίδα περιστρέφεται με τέτοιο τρόπο, ώστε το ακροσώμιο να στρέφεται προς το τοίχωμα του σπερματικού σωληναρίου.

Κατά τη διάρκεια της παραπάνω διαδικασίας εμφανίζεται στο κυτταρόπλασμα της σπερματίδας το χρωματοειδές σωματίο, το οποίο μετακινείται προς τον κάτω πόλο, ώστε τελικά να σχηματίσει το δακτύλιο στο μέσο τμήμα του ώριμου σπερματοζωαρίου. Ταυτόχρονα, αρχίζει, από τον κυτταροπλασματικό σχηματισμό της σπερματίδας (*distal centriole*), η διαμόρφωση του μέσου τμήματος και της κυρίως ουράς, με σχηματισμό των μικροσωληναρίων και των κυρίων στοιχείων τους. Με την ολοκλήρωση της σπερματίδας, το κυτταρόπλασμα έχει περιοριστεί στο ελάχιστο, το σχήμα του κυττάρου έχει μεταβληθεί και η πρόωρη μορφή σπερματοζωαρίου είναι στραμμένη προς τα κύτταρα Sertoli. Η διαδικασία ολοκληρώνεται με την απελευθέρωση του σπερματοζωαρίου στο υγρό του αυλού σωληναρίου με ταυτόχρονη απομάκρυνση σημαντικού μέρους του εναπομείναντος κυτταροπλάσματος στον περιβάλλον υγρό.

Συνοπτικά, κατά τη σπερματογένεση τα μητρικά κύτταρα (σπερματογόνια) περιέχουν 46 χρωμοσώματα, εκ των οποίων δύο (X και Y) είναι τα φυλετικά. Τα σπερματογόνια με τη μιτωτική διαίρεση παράγουν πάλι σπερματογόνια, ενώ μερικές μορφές τους θα διαιρεθούν περαιτέρω σε πρωτογενή σπερματοκύτταρα. Από αυτά ξεκινά η μειωτική διαδικασία και ακολουθεί με τα δευτερογενή σπερματοκύτταρα η δεύτερη μειωτική διαίρεση, που μοιάζει με μιτωτική, εκτός από την απουσία διπλασιασμού των χρωμοσωμάτων. Ακολουθεί η διαίρεση προς σπερματίδες, που ολοκληρώνει τη σπερματογένεση, αφού τα σπερματοζωάρια αποτελούν εξελικτική μορφή των σπερματίδων.



Εικόνα 4. Σπερματογένεση και μείωση

Μετά το σχηματισμό τους μέσα στα σπερματικά σωληνάρια, τα σπερματοζώαρια κατευθύνονται προς την επιδιδυμίδα. Τα σπερματοζώαρια τα οποία προέρχονται από τα σπερματικά σωληνάρια είναι τελείως ακίνητα και δεν μπορούν να

γονιμοποιήσουν το ωάριο. Αφού παραμείνουν μέσα στην επιδιδυμίδα για 18 ώρες έως 10 ημέρες περίπου, αναπτύσσουν την ικανότητα της κίνησης, αν και κάποιος ανασταλτικός παράγοντας εμποδίζει την εκδήλωση της κινητικότητάς τους ως τη στιγμή της εκσπερμάτισης. Μέσα στην επιδιδυμίδα τα σπερματοζωάρια αποκτούν επίσης την ικανότητα της γονιμοποίησης του ωαρίου, με μια διαδικασία γνωστή ως ωρίμανση. Η επιδιδυμίδα εκκρίνει σε άφθονες ποσότητες ένα υγρό το οποίο περιέχει ορμόνες, ένζυμα και ειδικούς θρεπτικούς παράγοντες, που είναι δυνατό να παίζουν σημαντικό ή και ουσιαστικό ρόλο στην ωρίμανση των σπερματοζωαρίων.

Μικρή ποσότητα σπερματοζωαρίων μπορεί να αποθηκευτεί στην επιδιδυμίδα, στην πραγματικότητα όμως τα περισσότερα αποθηκεύονται στο σπερματικό πόρο και τη σπερματική λήκυθο. Στις περιοχές αυτές, τα σπερματοζωάρια μπορούν να παραμείνουν, διατηρώντας τη γονιμοποιητική τους ικανότητα, για αρκετούς μήνες.

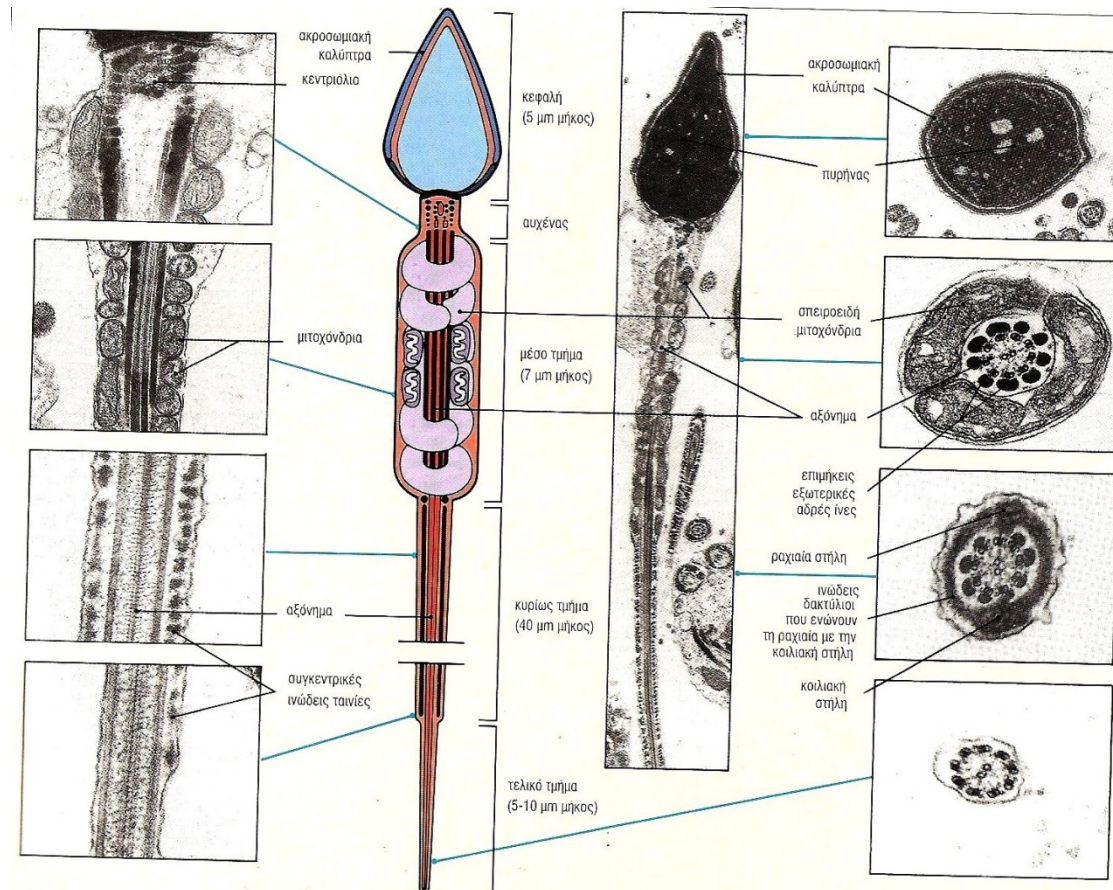
1.2.7 Το ώριμο σπερματοζωάριο

Χαρακτηριστικά του σπερματοζωαρίου όπως, η απουσία του κυτταροπλάσματος, η παρουσία της ουράς και η λειτουργική ανατομική ανεξαρτησία του, το καθιστούν μοναδικό μεταξύ των κυττάρων του σώματος. Στόχος του είναι η ασφαλής μεταφορά και διάθεση του γενετικού υλικού του, ώστε να συμβάλλει στη δημιουργία ενός βιώσιμου ζυγωτού.

Η μορφή του σπερματοζωαρίου είναι χαρακτηριστική και αποτελείται από, την κεφαλή, τον αυχένα, το μέσο τμήμα και την ουρά. Σε ένα φυσιολογικό σπερματοζωάριο, η κεφαλή έχει σχήμα ωοειδές και περίπου 60-70% του προσθίου τμήματός της περιβάλλεται από το ακροσώμιο, ένα σχηματισμό πλούσιο σε ενζυμικό περιεχόμενο. Με τη τήξη της εξωτερικής μεμβράνης, τα ακροσωμιακά πρωτεολυτικά ένζυμα μεταξύ των οποίων η ακροσίνη και το ανάλογο της θρυψίνης, απελευθερώνονται και δημιουργούν συνθήκες κατάλληλες για τη διείσδυση του πυρηνικού υλικού εντός του ωαρίου κατά τη γονιμοποίηση.

Ο αυχένας του σπερματοζωαρίου ξεκινά από την κοίλη κάτω επιφάνεια της κεφαλής και εκτείνεται μέχρι το μέσο τμήμα. Σε όλο το μήκος του αποτελείται από πυκνή δέσμη ινών, με τη βοήθεια των οποίων γίνεται η σύνδεση της κεφαλής με την ουρά. Στο μέσον του αυχένα υπάρχουν σε χαρακτηριστική διάταξη εννέα τριπλά μικροσωληνάρια χωρίς όμως το κεντρικό ζεύγος, το οποίο βρίσκεται στην ουρά.

Το κεντρικό μέρος της ουράς ονομάζεται αξόνημα, και αποτελείται από δύο χωριστούς μικροσωλήνες περιβαλλόμενους από εννέα ζεύγη μικροσωληναρίων. Οι βραχίονες που συνδέουν τους μικροσωληνίσκους είναι βραχίονες δυνείνης.



Εικόνα 5. Ωριμο σπερματοζωάριο

Το μέσο τμήμα του σπερματοζωαρίου, φιλοξενεί τα μιτοχόνδριά του, τα οποία είναι σπειροειδώς διατεταγμένα. Η διάταξη αυτή είναι χαρακτηριστική των θηλαστικών. Το τελικό μέρος του μέσου τμήματος, συνεχίζει σε σχηματισμό πυκνής σύστασης, τον δακτύλιο. Στη συνέχεια, το κύριο μέρος της ουράς είναι εφοδιασμένο με ινώδες έλυτρο, ενώ το τελικό μέρος χαρακτηρίζεται από την παρουσία 18 ανεξάρτητων μικροσωληναρίων, τα οποία δεν περιβάλλονται από το καλυπτήριο ινώδες έλυτρο.

Η ενεργητική μεταφορά του σπερματοζωαρίου οφείλεται στις κινήσεις της ουράς. Οι τελευταίες, περιλαμβάνουν περίπου 10 ρυθμικές κινήσεις ανά δευτερόλεπτο, που αρχίζουν από το ύψος του αυχένα και μεταφέρονται κυματοειδώς προς το τελικό άκρο της ουράς. Έτσι, ασκείται προωθητική ώση από το περιβάλλον υγρό,

που μεταφέρει την κεφαλή και όλο το σπερματοζωάριο προς τα εμπρός με ποικιλία ταχύτητας (10 έως 80μm ανά δευτερόλεπτο).

Η ενέργεια για την κίνηση του σπερματοζωαρίου, προκύπτει από τη μετατροπή της τριφωσφορικής (ATP) σε διφωσφορική αδενοσίνη (ADP). Μεγάλη ποσότητα ATP βρίσκεται κατά μήκος της ουράς και η ενέργεια που απελευθερώνεται κατά την αποφωσφορυλίωση της ATP, είναι επαρκής για την ταχεία κίνηση της ουράς. Η δημιουργία της κίνησης φαίνεται να προκαλείται από την αλληλεπίδραση δυνεΐνης-τουμπουλίνης κατά αναλογία προς το μοντέλο ακτίνης και μυοσίνης που λαμβάνει χώρα στη μυϊκή σύσπαση. Ως εκ τούτου, εκτός από δομικό υλικό, η δυνεΐνη προμηθεύει την ουρά με φωσφορυλάση για την ATP, κατόπιν ενεργοποίησής της από Ca^{++} και Mg^{++} .

1.2.8 Σπερματικό πλάσμα – Σπέρμα

Το σπέρμα, εκτοξεύεται από την ουρήθρα κατά τη γενετήσια πράξη και αποτελείται από τα υγρά του σπερματικού πόρου (σπερματοζωάρια) και το σπερματικό πλάσμα. Το σπερματικό πλάσμα αποτελεί το σύνολο των εκκρίσεων των σπερματοδόχων κύστεων, του προστάτη και των βλεννογόνων αδένων, ιδιαίτερα των βολβουρηθραίων. Το σπερματικό πλάσμα έχει σαν στόχο την παροδική διατήρηση των σπερματοζωαρίων σε κατάλληλο υγρό περιβάλλον, την ενεργειακή υποστήριξή τους και τη διευκόλυνσή τους για τη διείσδυση διαμέσου της τραχηλικής βλέννας.

Το μεγαλύτερο μέρος του σπέρματος αποτελείται από υγρό των σπερματοδόχων κύστεων, το οποίο εκχέεται τελευταίο και χρησιμεύει για την προώθηση των σπερματοζωαρίων από τον εκσπερματιστικό πόρο και την ουρήθρα προς τα έξω. Σημαντικό συστατικό του σπερματικού πλάσματος είναι η φρουκτόζη, παράγωγο των σπερματικών κυστιδίων, το οποίο αποτελεί το κύριο σάκχαρο στο σπερματικό πλάσμα των θηλαστικών. Σημαντικό συστατικό επίσης είναι ένα πηκτικό ένζυμο του προστατικού υγρού, το οποίο μαζί με το ινωδογόνο από τις σπερματοδόχες κύστεις, σχηματίζει ένα πήγμα, το οποίο διαλύεται στα επόμενα 15-20 λεπτά από την ινωδολυσίνη (προστατικής προέλευσης).

Το ανθρώπινο σπέρμα, εκτός των άλλων, περιέχει μεγάλο αριθμό υψηλού μοριακού βάρους πρωτεϊνών οι οποίες με τα κατάλληλα ένζυμα διασπώνται σε απλά αμινοξέα. Στο υλικό αυτό, υπάρχει επίσης μεγάλος αριθμός αντιγονικής φύσεως ουσιών, τρανσφερίνη και λακτοφερίνη καθώς και μεγάλες ομάδες ενζύμων, μεταξύ των οποίων η προστατικής προέλευσης όξινη φωσφατάση.

Στο σπερματικό πλάσμα περιέχονται επίσης στεροειδικές ορμόνες του φύλου, κυρίως ανδρογόνα, οιστρόνη και οιστραδιόλη. Υπάρχουν μεταξύ των άλλων και πεπτιδικές ορμόνες, όπως η FSH, LH, προλακτίνη και ανασταλτίνη καθώς και προσταγλανδίνες.

Τέλος, μικρές συγκεντρώσεις ηλεκτρολυτών και ιχνοστοιχείων, όπως νάτριο, κάλιο, μαγνήσιο, ασβέστιο και ψευδάργυρος, βρίσκονται στο σπερματικό πλάσμα, εκφράζοντας την εκκριτική δραστηριότητα των επικουρικών αδένων. Ποσότητες από άλλες οργανικές ουσίες, όπως κιτρικό οξύ, ινοσιτόλη και γαλακτικό οξύ μπορεί επίσης να βρεθούν στο σπερματικό πλάσμα.

Σε αντίθεση με τη φυσιολογική σημασία της σύντομης συνύπαρξης, η μακροχρόνια παραμονή των σπερματοζωαρίων στο σπερματικό πλάσμα είναι βλαπτική και το γεγονός αυτό γίνεται εμφανές από τη σημαντική αύξηση της μακροβιότητας τους μετά το διαχωρισμό τους.

1.3 Αλληλεπίδραση γαμετών και γονιμοποίηση

1.3.1 Ωρίμανση (capacitation)

Τα σπερματοζωάρια, αμέσως μετά την εκσπερμάτιση δεν είναι ικανά να διαπεράσουν τη διαφανή ζώνη (*zona pellucida*). Η τελική φάση της ωρίμανσης, η οποία έχει ονομαστεί *capacitation* και ορίζεται ως η διαδικασία με την οποία τα σπερματοζωάρια αποκτούν την ικανότητα προκειμένου να πραγματοποιήσουν την ακροσωμιακή αντίδραση και τη γονιμοποίηση των ωαρίων, είναι απαραίτητη. Η ωρίμανση είναι ένα σημαντικό και απαραίτητο στάδιο τόσο για την *in vivo* όσο και για την *in vitro* γονιμοποίηση. Πραγματοποιείται μέσα στη γυναικεία γεννητική οδό και στον άνθρωπο διαρκεί περίπου 7 ώρες. Η ωρίμανση στην ουσία περιλαμβάνει αλληλεπιδράσεις μεταξύ των σπερματοζωαρίων και των εκκρίσεων της γυναικείας γεννητικής οδού. Κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου, το γλυκοπρωτεϊνικό κάλυμμα και οι πρωτεΐνες του σπερματικού πλάσματος απομακρύνονται από την πλασματική μεμβράνη, και αποκαλύπτουν την περιοχή του ακροσώματος των σπερματοζωαρίων. Μόνο τα σπερματοζωάρια που έχουν υποστεί ωρίμανση μπορούν στη συνέχεια να διαπεράσουν τα κύτταρα του ακτινωτού στεφάνου (*corona radiata*) του ωαρίου και να πραγματοποιήσουν την ακροσωμιακή αντίδραση.

Η ωρίμανση χρησιμεύει για τη ρύθμιση της έναρξης της ακροσωμιακής αντίδρασης εντός του γυναικείου γεννητικού συστήματος, και πιθανόν έχει εξελιχθεί ως αποτέλεσμα των αλλαγών των κυττάρων που περιβάλλουν με τη μορφή νέφους το ωάριο (oocyte cumulus complex). Ένα υψηλό ποσοστό γονιμοποίησης αμέσως μετά την ωορρηξία μπορεί να απαιτήσει περαιτέρω χρονικό συντονισμό της ωρίμανσης, με την άφιξη των ωαρίων στο σημείο της γονιμοποίησης. Η επίτευξη της ωρίμανσης, προϋποθέτει την επιτυχή μεταφορά και αποθήκευση των σπερματοζωαρίων εντός της γυναικείας γεννητικής οδού.

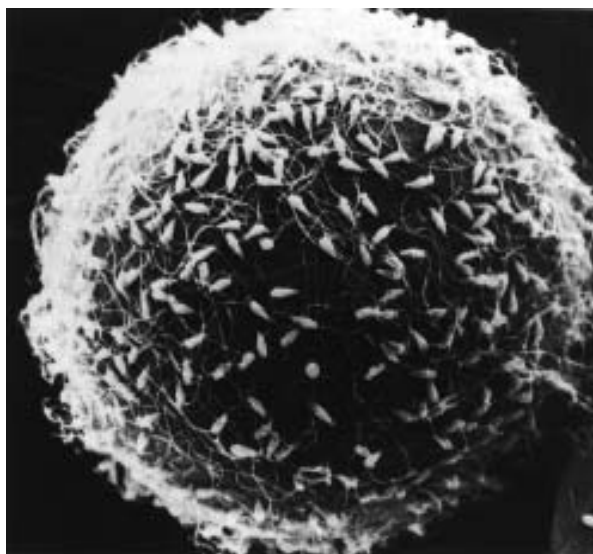
Η ωρίμανση πιθανόν περιλαμβάνει την απομάκρυνση της χοληστερόλης από τη μεμβράνη του πλάσματος του σπέρματος, με αποδέκτες στερολών που υπάρχουν στις εκκρίσεις της γυναικείας γεννητικής οδού. Μορφολογικές αλλαγές των σπερματοζωαρίων κατά την ωρίμανση είναι δύσκολο να οριστούν. Ωστόσο, παρατηρείται μία αξιοσημείωτη αλλαγή στην κινητικότητα των σπερματοζωαρίων. Μια εξαιρετικά δυναμική αλλά μη προοδευτική κίνηση, που ονομάζεται υπερενεργοποίηση (hyperactivation motility), αναπτύσσεται ως αποτέλεσμα της εισόδου Ca^{++} , προκαλώντας αυξημένη κίνηση της ουράς και ως εκ τούτου, ακραίες πλευρικές κινήσεις της κεφαλής του σπέρματος. Η υπερενεργοποίηση είναι απαραίτητη για την επίτευξη της γονιμοποίησης και της διείσδυσης του σπερματοζωαρίου εντός της στεφάνης του ωαρίου.

1.3.2 Ακροσωμιακή αντίδραση (acrosome reaction)

Το ακρόσωμα, είναι ένα μεμβρανικά συνδεδεμένο οργανίδιο, το οποίο καλύπτει το πρόσθιο ήμισυ έως και τα δύο τρίτα της κεφαλής του σπερματοζωαρίου. Με την ολοκλήρωση της ωρίμανσης, τα σπερματοζωάρια είναι έτοιμα να υποστούν την ακροσωμιακή αντίδραση. Η ακροσωμιακή αντίδραση πραγματοποιείται μετά τη δέσμευση του σπερματοζωαρίου στη διαφανή ζώνη. Είναι ένα εξωκυτοτικό γεγονός στο οποίο πραγματοποιούνται τοπικές συγχωνεύσεις μεταξύ του εξωτερικού τμήματος του ακροσώματος και της πλασματικής μεμβράνης του σπερματοζωαρίου, γεγονός το οποίο οδηγεί στο σχηματισμό κυστιδίων. Το περιεχόμενο του ακροσώματος, κυρίως τα ένζυμα υαλουρονιδάση και ακροσίνη, απελευθερώνονται στο χώρο μεταξύ των γαμετών και βοηθούν στη διείσδυση εντός της διαφανούς ζώνης. Οι μεταβολές του ακροσώματος, πιθανόν να σχετίζονται με την ενεργοποίηση της προ-ακροσίνης σε ακροσίνη.

Παρά το γεγονός ότι υαλουρονιδάση έχει παραδοσιακά θεωρηθεί ότι διευκολύνει τη διείσδυση των σπερματοζωαρίων μέσα τη στεφάνη του ωαρίου, μελέτες έχουν

δείξει ότι το ένζυμο αυτό δεν είναι το μοναδικό που απαιτείται για τη διείσδυση του σπερματοζωαρίου. Ενώ η υαλουρονιδάση μπορεί να έχει κάποια έμμεση συμμετοχή, πιστεύεται ότι η ακροσίνη, ένα ανάλογο της τρυψίνης ένζυμο, είναι κυρίως υπεύθυνη για τη διάσπαση των πρωτεϊνών της διαφανούς ζώνης. Ο ουσιαστικός ρόλος της ακροσίνης ως λυσίνης της διαφανούς ζώνης έχει αμφισβητηθεί, αλλά παρόλα αυτά, το γεγονός ότι η ακροσωματική αντίδραση είναι απαραίτητη για τη γονιμοποίηση, παραμένει.



Εικόνα 6. Πρόσδεση σπερματοζωαρίων στη διαφανή ζώνη, από φωτογραφία ηλεκτρονικού μικροσκοπίου.

1.3.3 Αλληλεπίδραση σπερματοζωαρίου - ωαρίου

Σπερματοζωάρια τα οποία έχουν πραγματοποιήσει ή όχι την ακροσωματική αντίδραση, μπορεί να γίνουν ορατά είτε δεσμευμένα στο εσωτερικό της στεφάνης των ωαρίων, είτε μερικώς ενσωματωμένα στη διαφανή ζώνη των ωαρίων που προορίζονται για *in vitro* γονιμοποίηση. Ωστόσο, μόνο τα σπερματοζωάρια τα οποία έχουν υποστεί την ακροσωματική αντίδραση μπορεί να βρίσκονται βαθιά μέσα στη διαφανή ζώνη, και όλα αυτά στο χώρο γύρω από το ωάριο δείχνουν ότι έχει ολοκληρωθεί η ακροσωματική αντίδραση. Η ολοκλήρωση της ακροσωματικής αντίδρασης είναι επίσης απαραίτητη για τη γονιμοποίηση με την τεχνική της μικροέγχυσης του σπερματοζωαρίου στο χώρο γύρω από το ωάριο.

Από τα 200-300 εκατομμύρια σπερματοζωάρια τα οποία έχουν εισέλθει στο γυναικείο γεννητικό σύστημα, μόλις τα 300-500 θα καταφέρουν να φθάσουν στο χώρο της γονιμοποίησης και μόλις ένα θα γονιμοποιήσει το ωάριο. Το σπέρμα το οποίο έχει υποστεί ενεργοποίηση διαθέτει ότι χρειάζεται ώστε να διεισδύσει εντός των κυττάρων της στεφάνης.

Η απελευθέρωση των ενζύμων του ακροσώματος, επιτρέπει στο σπέρμα να διαπεράσει τη διαφανή ζώνη και να έρθει σε επαφή με τις στιβάδες που περιβάλλουν το ωάριο. Η διαπερατότητα της διαφανούς ζώνης μεταβάλλεται καθώς η κεφαλή του σπερματοζωαρίου έρχεται σε επαφή με την επιφάνεια του ωαρίου. Η διείσδυση των σπερματοζωαρίων εντός του υλικού της διαφανούς ζώνης, είναι πρωταρχικά μηχανικό γεγονός, βοηθούμενο από την επιπλέον ισχύ που παράγεται από την υπερενεργοποίηση των σπερματοζωαρίων. Μετά την είσοδο του σπερματοζωαρίου απενεργοποιούνται οι υποδοχείς της πλασματικής μεμβράνης του ωαρίου, έτσι ώστε να διασφαλιστεί η είσοδος ενός μόνο σπερματοζωαρίου.

1.3.4 Σύντηξη σπερματοζωαρίου – ωαρίου

Το σπερματοζωάριο, σε αυτό το στάδιο, βρίσκεται στην εσωτερική πλευρά της διαφανούς ζώνης, στο χώρο που περιβάλλει το ωοκύτταρο. Το σπερματοζωάριο, έχει ολοκληρώσει πλέον την ακροσωμιακή αντίδραση, έτσι ώστε το εσωτερικό μέρος της ακροσωμιακής μεμβράνης να αποκαλύπτεται στην πρόσθια περιοχή του καλλύματος της κεφαλής του, ενώ το ισημερινό τμήμα παραμένει άθικτο. Η επαφή του σπερματοζωαρίου με τις κυτταρικές στιβάδες που περιβάλλουν το ωάριο, πιθανόν να συνεπάγεται μία διαδικασία αναγνώρισης τύπου υδατανθρακικής λεκτίνης – απτενίου για την περιοχή της κεφαλής μετά το ακρόσωμα, ενώ η κινητικότητά του παύει. Η σύντηξη του ωαρίου και του ισημερινού τμήματος τότε ξεκινά, οδηγώντας τελικά στην πλήρη εγκόλπωση του σπερματοζωαρίου, συμπεριλαμβανομένης και της ουράς, από το ωοκύτταρο.

Καθώς το κεφάλι του σπερματοζωαρίου ενσωματώνεται στο κυτταρόπλασμα του ωοκυττάρου, η προσεκτικά πακεταρισμένη χρωματίνη του πυρήνα αποσυμπυκνώνεται και οι πρωταμίνες αντικαθίστανται από ιστόνες, τις οποίες παρέχει το ωοκύτταρο. Ένας νέος πυρηνικός φάκελος σχηματίζεται, και από συστατικά του ωοκυττάρου, και έτσι σχηματίζεται ο αρσενικός προπυρήνας. Το γονιμοποιημένο πλέον ωοκύτταρο, ονομάζεται ζυγώτης.

Τη στιγμή της επαφής σπερματοζωαρίου-ωαρίου, το ωάριο ξεκινά μία φλοιώδη αντίδραση, μία διαδικασία κατά την οποία το περιεχόμενο πολλών εκκριτικών

κοκκίων που βρίσκονται στον περιφερικό φλοιό, απελευθερώνουν το περιεχόμενό τους στο χώρο γύρω από το ωοκύτταρο. Αυτή η αντίδραση η οποία λαμβάνει χώρα γύρω από την επιφάνεια του ωαρίου, στο σημείο σύντηξης του τελευταίου με το σπερματοζώαριο, είναι βασική για την παρεμπόδιση της πολυσπερμίας δηλαδή την αποφυγή της εισόδου άλλων σπερματοζωαρίων στο ήδη γονιμοποιημένο ωοκύτταρο.

Ο αρσενικός και ο θηλυκός προπυρήνας, κινούνται ο ένας προς τον άλλο, και ο πυρήνας που τους περιβάλλει, αποσυντίθεται. Τα χρωμοσώματα από τον αρσενικό και θηλυκό γαμέτη αντίστοιχα, απελευθερώνονται στο κυτταρόπλασμα και η πρώτη διαίρεση ξεκινά. Αυτή η ανάμειξη του πατρικού γενετικού υλικού σημαίνει την ολοκλήρωση της συγγαμίας, και τη δημιουργία ενός νέου γενετικά ατόμου.

1.4 Έλεγχος σπέρματος

Ο εργαστηριακός έλεγχος του σπέρματος αποτελείται από ένα πλήθος εξετάσεων, οι οποίες καλούνται να απαντήσουν σε διαφορετικές ερωτήσεις σε σχέση με την ποιότητα του σπέρματος. Η σημαντικότερη από αυτές τις εξετάσεις και εκείνη η οποία δίνει μία βασική εικόνα για τον εξεταζόμενο, είναι το σπερμοδιάγραμμα. Σε αυτό είναι απαραίτητο να προστεθούν και άλλες εξετάσεις όπως: οι μικροβιολογικές για τον έλεγχο της παρουσίας και του τύπου των μικροοργανισμών, οι βιοχημικές για τον έλεγχο της λειτουργίας των επικουρικών γεννητικών αδένων, οι ανοσολογικές για τον έλεγχο της παρουσίας των αντισπερματικών αντισωμάτων στο σπέρμα, οι λειτουργικές δοκιμασίες για τον έλεγχο των μηχανισμών που είναι απαραίτητοι για τη γονιμοποίηση του ωαρίου και τέλος, οι εξετάσεις μοριακής βιολογίας για τον έλεγχο της ποιότητας του DNA στον πυρήνα του σπερματοζωαρίου.

Η εκτίμηση των παραμέτρων του σπέρματος εμπεριέχει σε μεγάλο βαθμό τον υποκειμενικό παράγοντα. Επίσης, υπάρχουν πολλές διαφορετικές τεχνικές προσδιορισμού της ίδιας παραμέτρου, οι οποίες χρησιμοποιούνται από κάθε εργαστήριο. Επομένως, τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τις αναλύσεις σπέρματος, από διαφορετικά ή/και από το ίδιο εργαστήριο, δεν είναι συγκρίσιμα. Το γεγονός αυτό, γίνεται εντονότερο από την απουσία εξειδικευμένου προσωπικού στα ανδρολογικά εργαστήρια, αλλά και από την έλλειψη ποιοτικού ελέγχου, που καθιστά τα αποτελέσματα μη συγκρίσιμα. Τέλος, η ποιότητα του σπέρματος του ίδιου άνδρα σε διαφορετικές χρονικές στιγμές, παρουσιάζει μεγάλη διακύμανση και χρήζει ιδιαίτερης προσοχής κατά τον έλεγχό του.

Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα παραπάνω η Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας (WHO) εξέδωσε το 1980 ένα εγχειρίδιο με θέμα τις εξετάσεις σπέρματος και τις μεθόδους που πρέπει να χρησιμοποιούνται, ώστε τα αποτελέσματα που προκύπτουν από αυτές να αντιστοιχούν το περισσότερο δυνατό στην πραγματικότητα και να είναι συγκρίσιμα μεταξύ τους. Το εγχειρίδιο αυτό ανανεώνεται σύμφωνα με τα νέα δεδομένα που προκύπτουν από την έρευνα, την καθημερινή ρουτίνα του ανδρολογικού εργαστηρίου και τη βιβλιογραφία και σήμερα έχει κυκλοφορήσει η 5^η έκδοση (2010), η οποία μεταξύ των άλλων περιέχει και τις τιμές αναφοράς των διαφόρων παραμέτρων του σπέρματος, σύμφωνα με τις οποίες γίνεται η εκτίμησή τους.

1.4.1 Σπερμοδιάγραμμα

Ο έλεγχος του σπέρματος αποτελεί το πρώτο βήμα στην εργαστηριακή διαγνωστική διερεύνηση του άνδρα με πρόβλημα γονιμότητας. Το σπερμοδιάγραμμα είναι εξέταση βασικής σημασίας, γιατί δείχνει τη δυνητική γονιμότητα του άνδρα και βοηθάει στην αιτιολογική διερεύνηση του προβλήματος της υπογονιμότητας. Για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της ανάλυσης του σπέρματος, είναι απαραίτητος ο έλεγχος τουλάχιστον 2 δειγμάτων σε διάστημα 2-3 μηνών. Αυτό γίνεται, γιατί διάφοροι παράγοντες, όπως οι αυτόματες διακυμάνσεις, η ατελής συλλογή του δείγματος, το stress και οι γενικές λοιμώξεις, μπορούν να επηρεάσουν παροδικά, αλλά έντονα, την ποιότητα του σπέρματος και να οδηγήσουν σε εσφαλμένα συμπεράσματα.

Το σπερμοδιάγραμμα περιλαμβάνει τη μακροσκοπική και τη μικροσκοπική εξέταση. Κατά τη μακροσκοπική εξέταση ελέγχονται, η γλοιότητα του δείγματος, η χροιά, ο όγκος, το pH, η οσμή και η ρευστοποίησή του. Σε ένα φυσιολογικό δείγμα σπέρματος που βρίσκεται σε θερμοκρασία δωματίου η ρευστοποίηση πρέπει να ολοκληρωθεί μέσα σε μία ώρα, συνήθως όμως το δείγμα έχει ρευστοποιηθεί στα πρώτα 15 λεπτά. Το δείγμα που έχει φυσιολογική γλοιότητα πέφτει από την πιπέτα σε ξεχωριστές σταγόνες. Ο όγκος του σπέρματος είναι μεγαλύτερος από 2 ml και το pH πάνω από 7,2.

Στη μικροσκοπική εξέταση προσδιορίζεται ο αριθμός των σπερματοζωαρίων, εκτιμάται ο αριθμός και οι μορφές των στρογγυλών κυττάρων, η κινητικότητα και η μορφολογία των σπερματοζωαρίων.

Η μέτρηση του αριθμού των σπερματοζωαρίων γίνεται συνήθως με τη βοήθεια κυτταρόμετρου Neubauer ή άλλων κυτταρομέτρων. Στο κυτταρόμετρο Neubauer

εκτός από τον αριθμό των σπερματοζωαρίων προσδιορίζεται και ο αριθμός των στρογγυλών κυττάρων του δείγματος. Τα κύτταρα αυτά μπορεί να είναι είτε κύτταρα της λευκής σειράς ή κύτταρα της σπερματικής σειράς. Κατά τη μέτρηση της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων παρατηρούνται τέσσερις τύποι κίνησης: η ζωηρή προωθητική, η νωθρή προωθητική, η επιτόπια κίνηση και τα ακίνητα σπερματοζωάρια. Η μέτρηση της κινητικότητας μπορεί επίσης να γίνει με τη χρήση αυτόματων αναλυτών. Τέλος, η μέτρηση της μορφολογίας των σπερματοζωαρίων, είναι μέτρηση η οποία δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί σε νωπή σταγόνα. Για το σκοπό αυτό τα σπερματοζωάρια αρχικά μονιμοποιούνται και κατόπιν βάφονται με ειδικές χρωστικές ουσίες. Η WHO συστήνει τη χρήση της μεθόδου κατά Παπανικολάου ή την χρώση Shorr, με τις οποίες μπορεί να εκτιμηθεί το μέγεθος και το σχήμα της κεφαλής, του αυχένα και της ουράς του σπερματοζωαρίου. Η εκτίμηση της μορφολογίας των σπερματοζωαρίων προϋποθέτει μακροχρόνια εκπαίδευση και εμπειρία. Υπάρχουν πάρα πολλές μορφολογικές ανωμαλίες στο σπερματοζωάριο που δεν αναφέρονται χωριστά. Θεωρείται ότι ένα σπερματοζωάριο έχει φυσιολογική μορφολογία όταν η κεφαλή, ο αυχέννας και η ουρά πληρούν τα κριτήρια της φυσιολογικότητας. Με βάση τα κριτήρια αυτά τα φυσιολογικά σπερματοζωάρια πρέπει να έχουν συγκεκριμένο μήκος και πλάτος, ξεκάθαρα διαγραμμένο ακρόσωμα, να μην έχουν βλάβη στον αυχένα ή στην ουρά και να μην υπάρχει κυτταροπλασματικό υπόλειμμα.

Ένα φυσιολογικό δείγμα σπέρματος με βάση τα δεδομένα της WHO που δημοσιεύτηκαν το 2010 στην 5^η έκδοση, πρέπει να έχει αριθμό σπερματοζωαρίων ≥ 15 εκατομμύρια/ml, το σύνολο των σπερματοζωαρίων με προωθητική κίνηση να είναι $\geq 32\%$, ενώ το σύνολο των κινούμενων $\geq 40\%$. Τέλος, το σύνολο των τυπικών μορφών σε ένα φυσιολογικό δείγμα θα πρέπει να είναι $\geq 4\%$.

1.5 Στοιχεία Ανοσολογίας

1.5.1 Έμφυτη και προσαρμοστική ανοσία

Η ανοσολογική απόκριση συνδέεται με δύο μηχανισμούς, της έμφυτης και της προσαρμοστικής ανοσίας. Τόσο η έμφυτη όσο και η προσαρμοστική ανοσολογική απόκριση, αναγνωρίζουν κοινά αντιγόνα ή αντιγονικά πεπτίδια στους παθογόνους οργανισμούς, τα οποία σχετίζονται με συγκεκριμένους εισβολείς αντίστοιχα. Οι δύο μηχανισμοί ανοσίας συνεργάζονται για να προστατεύουν τα σπονδυλωτά από τις

μολύνσεις. Διαταραχή ενός από τους δύο μηχανισμούς, μπορεί να επηρεάσει τον οργανισμό στο σύνολό του.

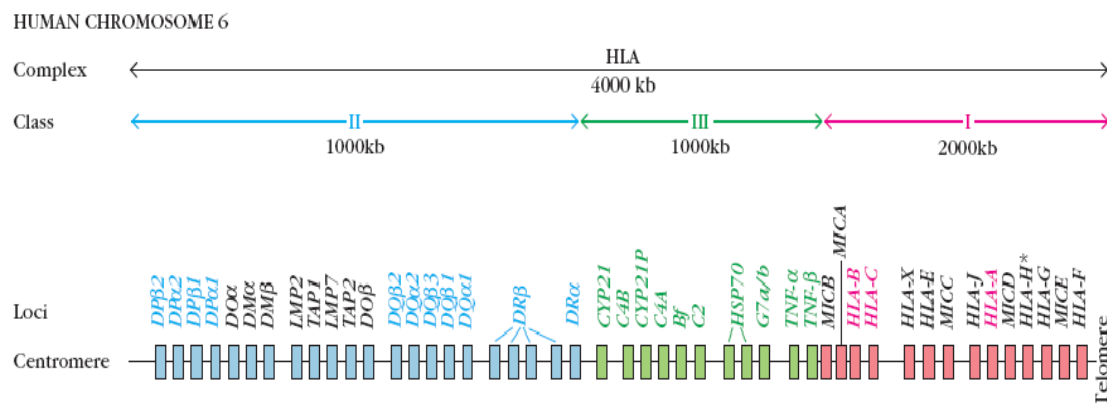
Η έμφυτη ανοσία αποτελεί την πρώτη γραμμή άμυνας έναντι των παθογόνων εισβολέων και περιλαμβάνει τέσσερις τύπους αμυντικών φραγμών: ανατομικούς, φυσιολογικούς, φαγοκυτταρικούς και φλεγμονώδεις. Η έμφυτη ανοσία στηρίζεται στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (*antigen presenting cells, APCs*), με σημαντικότερα τα δενδριτικά και τα μακροφάγα. Η απόκριση στα πλαίσια της έμφυτης ανοσίας δεν είναι ειδική καθώς στηρίζεται στην αναγνώριση μοριακών προτύπων (*PAMPs*) που είναι κοινά σε πολλούς παθογόνους μικροοργανισμούς αλλά δεν απαντώνται στον ανθρώπινο οργανισμό. Η σύνδεση ενός μοριακού προτύπου *PAMP* με τον υποδοχέα *TLR* (*Toll-like receptor*) στην επιφάνεια αντιγονοπαρουσιαστικού κυττάρου, οδηγεί στη φαγοκυττάρωση και την αντιγονοπαρουσίαση του πεπτιδίου από τα ίδια κύτταρα. Η αντιγονοπαρουσίαση, είναι το πρώτο βήμα για την έναρξη της προσαρμοστικής ανοσίας.

Η προσαρμοστική ή ειδική ανοσία έχει την ικανότητα να αναγνωρίζει συγκεκριμένους ξένους εισβολείς. Η προσαρμοστική ανοσία διαθέτει 4 χαρακτηριστικά τα οποία τη διαφοροποιούν από την έμφυτη: αντιγονική ειδικότητα, ποικιλομορφία, ανοσολογική μνήμη και αναγνώριση εαυτού/μη εαυτού. Συστατικά στοιχεία της προσαρμοστικής ανοσίας είναι τα T και B λεμφοκύτταρα. Τα T λεμφοκύτταρα έχουν την ιδιότητα να αναγνωρίζουν τους στόχους εντοπίζοντας τα επεξεργασμένα αντιγονικά πεπτίδια στην επιφάνεια των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων. Τα μόρια που είναι υπεύθυνα για την παρουσίαση των πεπτιδικών αντιγόνων στα T λεμφοκύτταρα είναι μεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από ένα σύμπλεγμα γονιδίων του Μείζονος Συμπλόκου Ιστοσυμβατότητας (*Major Histocompatibility complex, MHC*). Η ανοσολογική απόκριση στα πλαίσια της προσαρμοστικής ανοσίας επιτυγχάνεται κατόπιν επαφής με ειδικά επεξεργασμένα αντιγονικά πεπτίδια που εμφανίζονται στην επιφάνεια των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων. Μόλις το ανοσοποιητικό σύστημα αναγνωρίσει και ανταποκριθεί σε ένα αντιγόνο, εμφανίζει ανοσολογική μνήμη, δηλαδή, μια δεύτερη επαφή με το ίδιο αντιγόνο, επάγει μια πιο ισχυρή ανοσοαπόκριση. Στην περίπτωση της επαναμόλυνσης από το ίδιο αντιγόνο, η ανοσοαπόκριση είναι ταχύτερη λόγω μνήμης.

1.5.2 Το Μείζον Σύμπλοκο Ιστοσυμβατότητας (MHC)

Το MHC αποτελείται από ένα στενά συνδεδεμένο σύμπλεγμα γονιδίων, του οποίου τα προϊόντα παίζουν σημαντικό ρόλο στη διακυτταρική αναγνώριση και τη διάκριση του εαυτού από το μη εαυτό. Το MHC σύμπλοκο, συμμετέχει τόσο στην έμφυτη όσο και στην κυτταρομεσολαβητική ανοσία. Τα MHC μόρια λειτουργούν ως αντιγονοπαρουσιαστικές δομές, αφού τα T κύτταρα αναγνωρίζουν ένα αντιγόνο μόνο όταν αυτό είναι συνδεδεμένο με ένα μόριο MHC. Έτσι, το σύνολο των MHC μορίων ενός οργανισμού, επηρεάζει το ρεπερτόριο των αντιγόνων στα οποία τα T_H και T_C του ατόμου μπορούν να ανταποκριθούν.

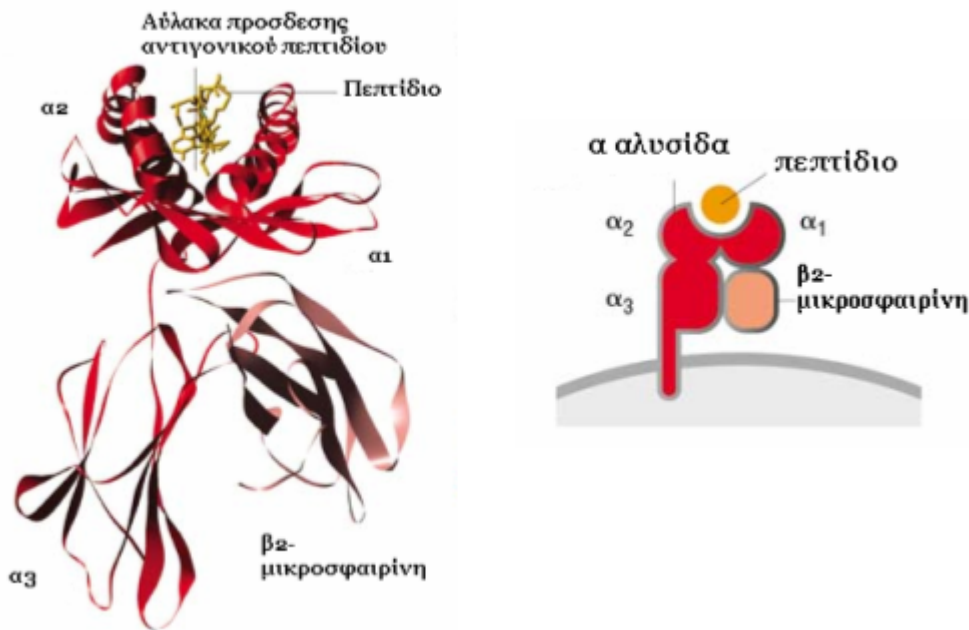
Το MHC αναφέρεται ως σύμπλεγμα HLA (Human Lymphocyte Antigens) στον άνθρωπο και είναι μία συλλογή από γονίδια που διατάσσονται μέσα σε μία μακρά συνεχόμενη περιοχή του DNA στο μικρό βραχίονα του χρωμοσώματος 6. Τα γονίδια MHC οργανώνονται σε περιοχές που κωδικοποιούν τρεις τάξεις μορίων.



Εικόνα 7. Γονιδιωματικός χάρτης του MHC στον άνθρωπο

1. Τα κλασικά τάξης I μόρια του MHC κωδικοποιούνται από τρία διαφορετικά γονίδια στον άνθρωπο, τα HLA-A, -B, και -C. Σε πρόσφατες μελέτες έχουν περιγραφεί επιπλέον λειτουργικά γονίδια τα οποία εμφανίζουν μεγάλη ομοιότητα με τα κλασικά τάξης I γονίδια. Ονομάζονται μη κλασικά τάξης I αντιγόνα και περιλαμβάνουν τα HLA-E, -F και -G γονίδια. Τα τελευταία παρουσιάζουν ιστοειδική κατανομή σε αντίθεση με τα κλασικά τάξης I γονίδια τα οποία εκφράζονται σε σχεδόν όλα τα εμπύρνηνα κύτταρα. Η κύρια λειτουργία των προϊόντων των γονιδίων τάξης I είναι η παρουσίαση πεπτιδικών αντιγόνων στα CD8⁺ T_C κύτταρα και η ενεργοποίηση της κυτταρικής ανοσίας κατά των μικροβιακών μολύνσεων και των καρκινικών κυττάρων.

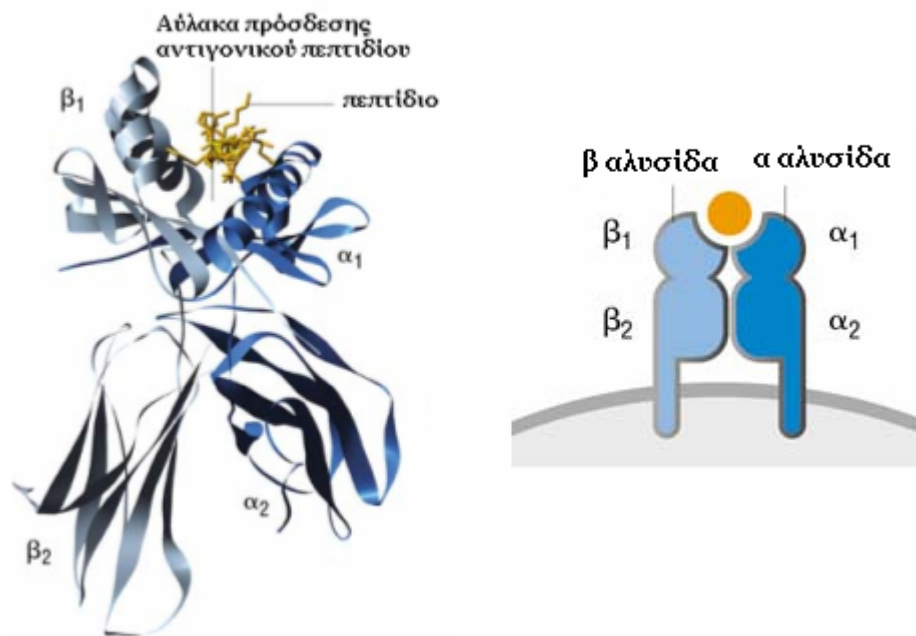
Οι τάξης I γλυκοπρωτεΐνες σχηματίζονται από δύο αλυσίδες και έχουν μοριακό βάρος περίπου 44 kDa. Η βαριά αλυσίδα αποτελείται από το εξωκυττάριο τμήμα, που διακρίνεται σε τρεις δομές σφαιρινών (α_1 , α_2 , και α_3), το διαμεμβρανικό και το κυτταροπλασματικό τμήμα. Ο πολυμορφισμός των κλασσικών τάξης I μορίων εντοπίζεται κυρίως στις α_1 και α_2 δομές. Η βαριά αλυσίδα συνδέεται μη ομοιοπολικά με την β_2 -μικροσφαιρίνη (β_2m). Οι α_1 και α_2 δομές σχηματίζουν τη θέση πρόσδεσης του αντιγόνου, ενώ η α_3 δομή ευθύνεται για τη σύνδεση με την β_2 -μικροσφαιρίνη.



Εικόνα 8. Δομή των μορίων MHC I

2. Τα κλασσικά τάξης II αντιγόνα κωδικοποιούνται από τους γονιδιακούς τόπους HLA-DR, DP, DQ, ενώ τα μη κλασσικά τάξης II αντιγόνα από τους τόπους HLA-DM και -DO. Σε αντίθεση με τα τάξης I, τα τάξης II μόρια, εκφράζονται ως ετεροδιμερή, αποτελούμενα από μια α αλυσίδα μοριακού βάρους 34 kDa και μία β αλυσίδα μοριακού βάρους 28 kDa. Οι διαφορετικοί ισότυποι των τάξης II μορίων κωδικοποιούνται από διαφορετικά α και β γονίδια. Με εξαίρεση την DR α αλυσίδα, όλες οι αλυσίδες των κλασσικών τάξης II αντιγόνων παρουσιάζουν αξιοσημείωτο πολυμορφισμό. Η κάθε μία από τις δύο αλυσίδες αποτελείται από δύο εξωκυτταρικές δομές (α_1 , α_2 και β_1 , β_2 αντίστοιχα), από μία διαμεμβρανική και μία κυτταροπλασματική δομή. Οι α_1 και β_1 δομές απαρτίζουν τη θέση πρόσδεσης του αντιγόνου.

Τα τάξης II αντιγόνα, εκφράζονται κυρίως στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (μακροφάγα, δενδριτικά και B κύτταρα), και εμπλέκονται στην έναρξη της ανοσολογικής απόκρισης, χάρη στην ικανότητά τους να εμφανίζουν αντιγόνα, που προέρχονται από το ενδοκυτταρικό μονοπάτι, στα CD4⁺ T_H κύτταρα.



Εικόνα 9. Δομή των μορίων MHC II

3. Τα τάξης III αντιγόνα κωδικοποιούνται από τους γονιδιακούς τόπους C4, C2 και BF. Η περιοχή MHC τάξης III περιβάλλεται από τις περιοχές τάξης I και II και κωδικοποιεί μόρια που είναι κρίσιμα στην ανοσολογική λειτουργία, ενώ έχουν λίγα κοινά στοιχεία με τα τάξης I και II μόρια. Τα προϊόντα της περιοχής MHC τάξης III συμπεριλαμβάνουν τα συστατικά του συμπληρώματος και κυτταροκίνες φλεγμονής, συμπεριλαμβανομένου του παράγοντα νέκρωσης όγκων (Tumor Necrosis Factor, TNF) και των πρωτεϊνών θερμικού σοκ.

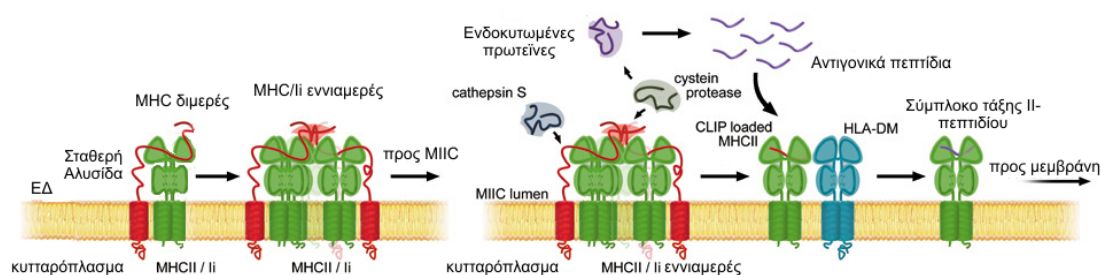
1.5.3 Αντιγόνα ιστοσυμβατότητας τάξης II

Οι δύο αλυσίδες των τάξης II αντιγόνων ιστοσυμβατότητας, συντίθενται στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ΕΔ) ως τύπου I διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες και στη συνέχεια συνδέονται με μία τρίτη πρωτεΐνη, που αποτελεί τη σταθερή αλυσίδα Ii. Η διαμεμβρανική αλυσίδα είναι επίσης μία τύπου II διαμεμβρανική πρωτεΐνη, η οποία

λειτουργεί ως ειδικό συνοδό (chaperone) μόριο των τάξης II. Η Ii δρα ως ένα είδος ψευδοϋποστρώματος καλύπτοντας με ένα μικρό της τμήμα που ονομάζεται CLIP (Class II associated Ii peptide) την αύλακα πρόσδεσης πεπτιδίου του τάξης II μορίου, εμποδίζοντας την πρόωρη κατάληψη της θέσης αυτής από μη σωστό αντιγόνο και επιπλέον κατευθύνει την μετακίνηση και την έξοδο του συμπλόκου από το ενδοπλασματικό δίκτυο.

Οι λειτουργίες της Ii συνοπτικά είναι: α) βοηθά στη διαμόρφωση της κατάλληλης στερεοδιάταξης των τάξης II μορίων, β) ελέγχει την έξοδο του τάξης II-Ii συμπλόκου από το ενδοπλασματικό δίκτυο και την κυκλοφορία του κατά μήκος του ενδοκυττωτικού μονοπατιού, γ) εμποδίζει την πρόσδεση πεπτιδίου μέσα στο ενδοπλασματικό δίκτυο ή στο μονοπάτι έκκρισης και ρυθμίζει το περιβάλλον πρωτεόλυσης στα ενδοσώματα (Riese and Charman, 2000).

Ενώ οι περισσότερες πρωτεΐνες κατευθύνονται μέσω του συμπλέγματος Golgi στην πλασματική μεμβράνη η Ii οδηγεί τα τάξης II στο σύστημα των ώριμων ενδοσωμάτων και σε συγκεκριμένα κυστίδια που καλούνται MIICs (MHC class II-containing compartments) (Neefjes & Ploegh, 1992). Στα MIICs υπάρχουν οι κατάλληλες πρωτεάσες για την διάσπαση της Ii η οποία απομακρύνεται αφήνοντας μόνο το CLIP πεπτίδιο στην αύλακα του τάξης II μορίου. Επιπλέον εντοπίζονται οι απαραίτητες πρωτεάσες, αναγωγάσες και άλλα συνοδά μόρια για την επεξεργασία των αντιγονικών επιτόπων, που έχουν εισέλθει είτε με πινοκύττωση είτε με ενδοκύττωση μέσω υποδοχέων (Lennon-Dumenil et al., 2002). Τέλος στα MIICs συνεντοπίζεται και το HLA-DM μόριο το οποίο μεσολαβεί στην απομάκρυνση του CLIP από την αύλακα του τάξης II και στην αντικατάστασή του από αντιγονικά πεπτίδια (Sanderson et al., 1994).



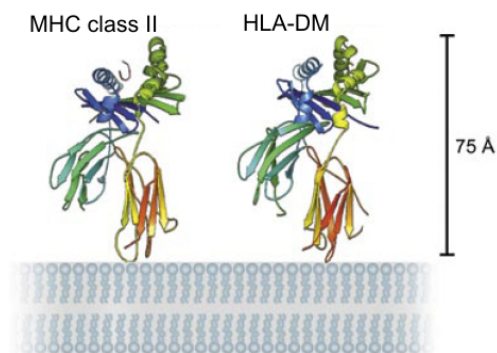
Εικόνα 10. Μονοπάτι αντιγονοπαρουσίασης μέσω τάξης II μορίων

1.5.4 Μη κλασσικά τάξης II αντιγόνα ιστοσυμβατότητας

Τα κλασσικά τάξης II μόρια, DR, DQ και DP, έχουν μελετηθεί εκτενώς από τα μέσα της δεκαετίας του '80, ενώ τα DM και DO εντοπίστηκαν στις αρχές της δεκαετίας του '90. Τα μη κλασσικά DM και DO, ταξινομήθηκαν βάση της DNA ομολογίας τους και της ομοιότητας στη διαμόρφωση της δομής τους, στο MHC.

Το HLA-DM μόριο είναι μία διαμεμβρανική μη πολυμορφική πρωτεΐνη με πολύ μεγάλη ομοιότητα με τα κλασσικά τάξης II μόρια. Σχηματίζεται από μία α και μία β αλυσίδα (ετεροδιμερές), που αποτελείται συνολικά από 261 – 263 αμινοξέα. Οι δύο πλησιέστερες στην κυτταρική μεμβράνη δομές, είναι ομόλογες της C1 δομής των Ig μορίων, της β2-μικροσφαιρίνης και της α3 δομής των τάξης I αλυσίδων. Οι δύο εξωτερικές δομές περιέχουν συντηρημένα αμινοξέα, χαρακτηριστικά των κλασσικών τάξης II αλυσίδων και σχηματίζουν αυλάκι σύνδεσης πεπτιδίου παρόμοιο με αυτό των HLA-DR μορίων (Kelly et al., 1991).

Παρά την ομοιότητα των –DM διμερών με τα αντιγονοπαρουσιαστικά τάξης II σύμπλοκα, τα μόρια αυτά εμφανίζουν διαφορετική εξειδικευμένη δράση. Τα αβ ετεροδιμερή του DM συντίθενται επίσης στο Ενδοπλασματικό δίκτυο και στη συνέχεια μετακινούνται στα MHCs κυστίδια μέσω ενός μοτίβου τύπου τυροσίνης, που υπάρχει στην κυτταροπλασματική επικράτεια της DMβ αλυσίδας. Αν και το DM συσσωρεύεται στα MHCs είναι δυνατόν να ανακυκλώνεται διαμέσου της μεμβράνης πάλι με τη βοήθεια του μοτίβου τυροσίνης της β αλυσίδας (Arndt et al. - 2000, Van Lith et al., 2001).



Εικόνα 10. Δομική ομοιότητα του μη-κλασσικού τάξης II ετεροδιμερούς αβ HLA-DM με τα κλασσικά τάξης II μόρια (HLA-DR)

Αρχικά, προτάθηκε η άποψη ότι το DM ετεροδιμερές θα μπορούσε να είναι ένα νέο συνοδό μόριο, ικανό να προσδένει πεπτίδια και να λειτουργεί ως προστατευτικό μέσο μεταφοράς πεπτιδίων στα κατάλληλα κυστίδια, όπου τα κυστίδια αυτά θα συνδεθούν με τα τάξης II ή θα χρησιμοποιηθούν για την

απομάκρυνση της Ii (Fling et al., 1994 – Morris et al., 1994). Σήμερα, θεωρείται πλέον δεδομένο ότι το HLA-DM δεν μπορεί να προσδεθεί με αντιγονικό πεπτίδιο, επομένως δεν είναι δυνατόν να δρα ως μεταφορέας πεπτιδίου, αλλά είναι αυτό που διασπά και απομακρύνει τη μεταβλητή αλυσίδα από το τάξης II μόριο, επιτρέποντάς του να συνδεθεί με το αντιγόνο (Brocke et al., 2002). Αναλυτικότερα, το DM φαίνεται να σταθεροποιεί μια κατάσταση «ανοιχτής» δομής του τάξης II μορίου στην οποία μπορεί να προσδένονται αντιγονικά πεπτίδια. Η πρόσδεση ενός πεπτιδίου χαμηλής συγγένειας στην αύλακα του μορίου δημιουργεί ένα ασταθές σύμπλοκο το οποίο απουσία του DM θα οδηγούσε το τάξης II σε συσώρευση και αποδιάταξη. Το DM όμως μπορεί αντικαθιστώντας το πεπτίδιο με άλλο υψηλότερης συγγένειας μέσα από ένα κύκλο φόρτωσης-εκφόρτωσης να «σώσει» το τάξης II μόριο και να το οδηγήσει ξανά σε μια ενεργή κατάσταση. Φαίνεται δηλαδή ότι το DM μέσω από έναν τέτοιο μηχανισμό κατάλυσης επηρεάζει τη διαμόρφωση του τάξης II και έτσι καθορίζει το ρεπερτόριο των αντιγονικών πεπτιδίων, που δυνητικά μπορούν να παρουσιαστούν (Busch et al., 2005).

Τα δεύτερο μη κλασσικό τάξης II μόριο, το οποίο κωδικοποιείται από τα DOA και DOB γονίδια στον HLA γενετικό τόπο, αποτελείται από δύο αλυσίδες την α και β, οι οποίες σχηματίζουν ετεροδιμερή (Tonnellet et al., 1985 - Young & Trowsdale, 1990). Όπως και το DM έτσι και το DO έχει πολύ μεγάλη ομοιότητα σε επίπεδο αλληλουχίας με το DR γεγονός κάτι που σημαίνει ότι τα δύο μόρια προέκυψαν με πρόσφατο διπλασιασμό γονιδίου. Το μόριο DO είναι επίσης πολύ συντηρημένο και διαθέτει στην κυτταροπλασματική του επικράτεια σήμα μετακίνησης στα λυσοσωμάτα. Αντίθετα όμως με την DMβ αλυσίδα η DOβ διαθέτει δύο σήματα μετακίνησης, ένα τύπου δι-λευκίνης και ένα τύπου τυροσίνης (Van Lith et al., - 2001).

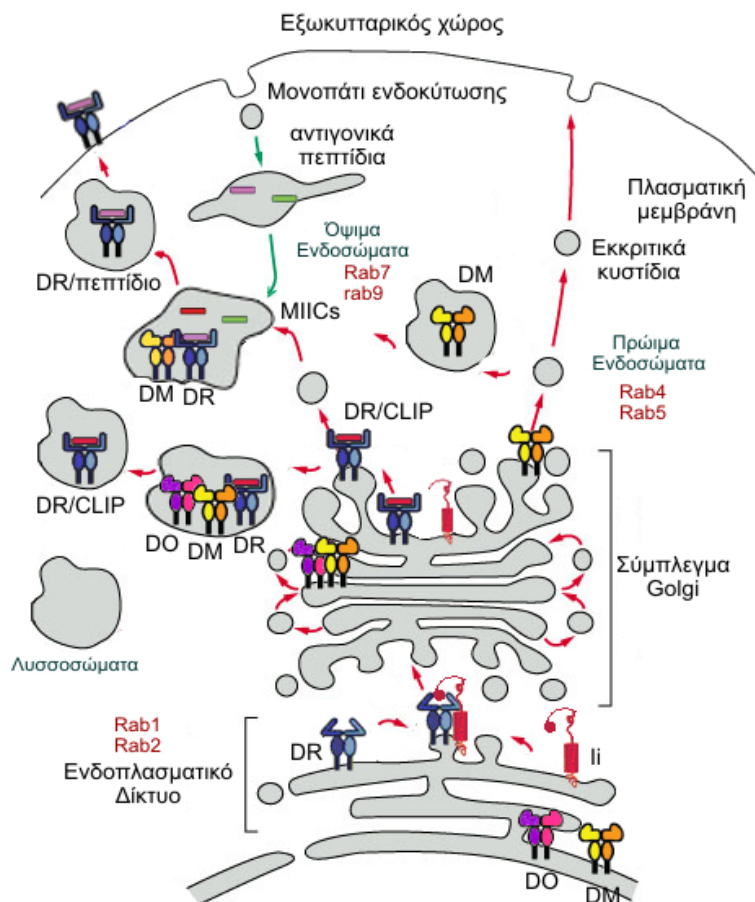
Αρχικά υποστηρίχθηκε η άποψη ότι η έκφραση των DO αλυσίδων περιορίζεται στα B λεμφοκύτταρα και στα επιθηλιακά κύτταρα του θύμου αδένος (Douek and Altmann, 1997 – Karlsson et al., 1991 – Surch et al., 1992). Πιο πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι εκφράζεται τόσο σε δενδριτικά κύτταρα (Liljedahl et al., 1998) και σε κύτταρα μελανώματος (Korshofer et al., 1998a), όσο και σε μακροφάγα.

Στα B κύτταρα τα DO ετεροδιμερή συνδέονται ισχυρά με τα DM μόρια κατά την ενδοκυτταρική μεταφορά τους στα ενδοσωμικά/λυσοσωμικά διαμερίσματα (Liljedahl et al., 1998) και ανακυκλώνονται στη διαδρομή MHC/κυτταρική μεμβράνη (van Lith et al., 2001). Η έξοδος των DO από το Ε.Δ, απαιτεί τη σύνδεσή τους με τα DM (Liljedahl et al., 1996), γεγονός που σημαίνει ότι τα DO μόρια στην ουσία ρυθμίζουν την λειτουργία των DM. Η ρύθμιση αυτή αναφέρεται στη «φόρτωση» του αντιγόνου στα τάξης II μόρια στο pH που διαθέτουν τα MHC κυστίδια. Αντίθετα, όταν οι B-υποδοχείς συνδέονται ασθενώς με το αντιγόνο, ελευθερώνουν το

αντιγονικό τους φορτίο νωρίς στα πρώιμα ενδοσώματα, στα οποία το DO φαίνεται να εμποδίζει τη σύνδεση τάξης II και αντιγόνου. Με αυτό τον τρόπο, η DO πρωτεΐνη οδηγεί την ανοσολογική απόκριση σε παραγωγή υψηλής συγγένειας αντισωμάτων, ενώ παράλληλα μειώνει την ενεργοποίηση των μη ισχυρά διεγερμένων Β λεμφοκυττάρων, εμποδίζοντας την παραγωγή χαμηλής συγγένειας αντισωμάτων (Brocke et al., 2002).

1.5.5 Το ενδοκυττωτικό μονοπάτι

Η αντιγονοπαρουσίαση μέσω τάξης II μορίων του MHC είναι αποτέλεσμα σύζευξης δύο ενδοκυτταρικών μονοπατιών, του μονοπατιού ενδοκύττωσης όπου κινούνται τα ενδοκυττωμένα εξωγενή αντιγόνα και του ενδοσωμικού μονοπατιού διαμέσω του οποίου μετακινούνται τα τάξης II μόρια από το ενδοπλασματικό δίκτυο όπου συντίθενται, στο σύμπλεγμα Golgi και τέλος στα MIICs κυστίδια όπου συναντούν τα ενδοκυττωμένα και επεξεργασμένα αντιγόνα.



Εικόνα 11. Σχηματική αναπαράσταση του ενδοσωμικού και ενδοκυττωτικού μονοπατιού

Τα πρώιμα ενδοσώματα (early endosomes, EE), είναι τα πρώτα κυστίδια στα οποία οδηγείται το υλικό ενδοκύττωσης. Είναι κυστίδια με ελαφρά όξινο pH, τα οποία περιέχουν πρωτεολυτικά κυρίως ένζυμα και διακρίνονται από την παρουσία του υποδοχέα της τρανσφερίνης (transferin receptor, TfR)(Kleijmeer et al., 1997). Στη συνέχεια, τα όψιμα ενδοσώματα (late endosomes, LE), που είναι περισσότερο όξινα και περιέχουν κάποια συστατικά όπως πρωτεάσες και γλυκοπρωτεΐνες Lamp1 και 2, οι οποίες χρησιμοποιούνται ως μάρτυρες λυσοσωμικών διαμερισμάτων, περιέχουν τον υποδοχέα της μανόζης που απουσιάζει από τα λυσοσώματα (Gauze et al., 1988). Τελευταία εμφανίζονται τα λυσοσώματα που εμφανίζουν χαμηλό pH, είναι πλούσια σε υδρολυτικά ένζυμα και συσσωρεύουν άχρηστες για το κύτταρο ουσίες.

Η βιοσυνθετική οδός των τάξης II μορίων ξεκινάει με τη σύνθεση τους στο ενδοπλασματικό δίκτυο (Jones, 1979 - Machamer, 1982). Από εκεί στη συνέχεια συνδέονται με τη μη-μεταβλητή αλυσίδα Ii. Αρχικά σχηματίζονται τριμερή μη-μεταβλητών αλυσίδων που στη συνέχεια ενώνονται με τρία ετεροδιμερή τάξης II σχηματίζοντας έτσι ένα εννιαμερές σύμπλοκο $(\alpha\beta Ii)_3$ (Roche, 1991 - Cresswell, 1996). Στο σημείο αυτό, η σύνδεση του τάξης II μορίου με την μη-μεταβλητή αλυσίδα αποτρέπει την πρόωρη σύνδεση του μορίου με ενδογενή πεπτίδια και βοηθάει την σωστή αναδίπλωση του ετεροδιμερούς και την επακόλουθη καθοδήγηση του μέσω του Συστήματος Golgi προς το ενδοκυτταρικό μονοπάτι, καθώς η μη-μεταβλητή αλυσίδα περιέχει μηνύματα οδηγούς στην κυτταροπλασματική της ουρά (Bakke, 1990 - Chervonsky, 1994). Στη συνέχεια το μεγαλύτερο μέρος της μη-μεταβλητής αλυσίδας αποικοδομείται σταδιακά και τελικά παραμένει συνδεδεμένο το CLIP (Cresswell, 1994). Όταν τα κυστίδια που μεταφέρουν τάξης II μόρια συντηχθούν με τα όψιμα ενδοσώματα, λόγω αλλαγής του pH το CLIP αποσυνδέεται και τη θέση του μπορεί να καταλάβει ένα καταλληλότερο μόριο. Η διαδικασία αυτή συμβαίνει στα κυστίδια MIICs (Peters, 1991 - Qui, 1994 - Tulp, 1994 - West, 1994). Στο εσωτερικό αυτών των κυστιδίων τα τάξης II μόρια του MHC συναντούν τα πεπτίδια τα οποία έχουν προέλθει από πρωτεόλυση πρωτεϊνών του ίδιου του κυττάρου ή από ενδοκύττωση εξωγενών αντιγόνων. Τελικά μετά την πρόσδεση ενός πεπτιδίου υψηλής συγγένειας το σύμπλοκο μεταφέρεται στην μεμβράνη.

1.5.6 Έκφραση των MHC μορίων στα σπερματοκύτταρα και στο σπερματικό πλάσμα

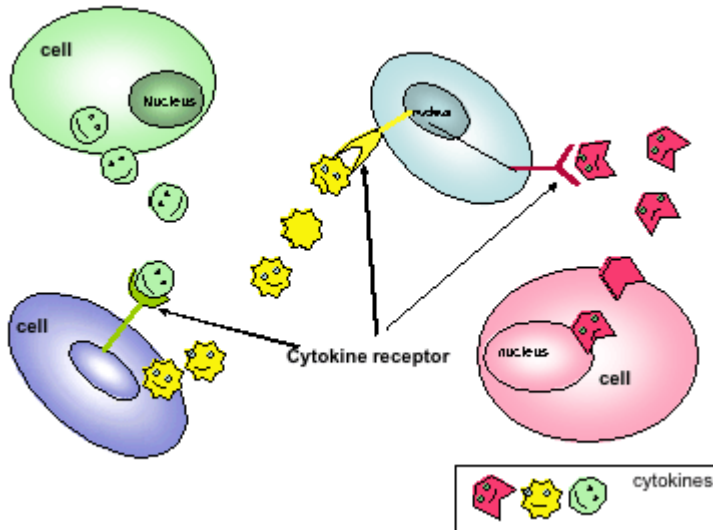
Είναι γνωστό, ότι τα μόρια MHC τάξης I, εκφράζονται γενικά στα περισσότερα εμπύρηννα κύτταρα, αλλά το επίπεδο της έκφρασής τους διαφέρει μεταξύ των διαφόρων κυτταρικών τύπων. Κάποιοι κυτταρικοί τύποι (π.χ. σπερματοκύτταρα,

νευρώνες), φαίνεται να στερούνται όλων των μορίων MHC τάξης I, σε συγκεκριμένα στάδια διαφοροποίησής τους. Αντίθετα, τα μόρια τάξης II εκφράζονται μόνο στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, κυρίως στα μακροφάγα, δένδριτικά κύτταρα και B κύτταρα.

Η παρουσία μορίων MHC τάξης I και II τόσο στην επιφάνεια των σπερματοζωαρίων όσο και στο σπερματικό πλάσμα, αποτελεί αντικείμενο μελέτης για πολλά χρόνια, χωρίς σαφή αποτελέσματα. Το γεγονός ότι τα ώριμα σπερματοζωάρια στα οποία μπορούν να εφαρμοστούν οι τεχνικές ανίχνευσης των μορίων MHC αποτελούν το τελευταίο στάδιο ωρίμανσης των συγκεκριμένων κυττάρων, καθιστά δύσκολη την ανίχνευση των μορίων αυτών σε πιο πρώιμα στάδια. Αρχικά, διατυπώθηκε η άποψη ότι κατά τη διάρκεια της σπερμιόγερσης και της περαιτέρω ωρίμανσης των σπερματοζωαρίων στην επιδιδυμίδα, μία σειρά από MHC μόρια εμφανίζονται στην επιφάνεια των σπερματοζωαρίων, ενώ άλλα είναι μη ανιχνεύσιμα (Ali Jassim et al., 1989). Σε επόμενες μελέτες, υπήρξε συσχέτιση της παρουσίας του HLA-DR μορίου με την μείωση της υπερενεργοποίησης των σπερματοζωαρίων και της διεισδυτικής τους ικανότητας σε zona-free ωάρια. Επίσης, η παρουσία του HLA-DP μορίου, φαίνεται να επηρεάζει το συνολικό αριθμό των σπερματοζωαρίων, τη γραμμικότητα της κίνησής τους και τη γονιμοποιητική τους ικανότητα, ενώ η ταυτόχρονη παρουσία των μορίων HLA-DR και HLA-DP, επηρεάζει την συγκέντρωση, την κίνηση και τη γονιμοποιητική ικανότητα των σπερματοζωαρίων (Philip J. Chan., 1993). Τέλος, σε πιο πρόσφατες μελέτες, ανιχνεύτηκαν HLA-DR, -DP και DQ σε χαμηλές συγκεντρώσεις σε υγιείς άνδρες, ενώ MHC τάξης I δεν ανιχνεύτηκαν στην ίδια ομάδα ανδρών (Bishara et al., 1987).

1.5.7 Κυτταροκίνες

Οι κυτταροκίνες (cytokines), είναι ρυθμιστικές πρωτεΐνες ή γλυκοπρωτεΐνες χαμηλού μοριακού βάρους, που εκκρίνονται κυρίως από λευκοκύτταρα αλλά και από διάφορους άλλους κυτταρικούς τύπους του σώματος, ως απάντηση σε ένα πλήθος ερεθισμάτων. Οι κυτταροκίνες δεσμεύονται σε ειδικούς μεμβρανικούς υποδοχείς των κυττάρων στόχων, πυροδοτώντας μηχανισμούς μεταγωγής μηνύματος, με απώτερο στόχο τη μεταβολή του προτύπου της γονιδιακής τους έκφρασης. Η ευαισθησία ενός κυττάρου-στόχου στην επίδραση μιας συγκεκριμένης κυτταροκίνης εξαρτάται από την παρουσία του κατάλληλου ειδικού υποδοχέα στη μεμβράνη του. Οι κυτταροκίνες και οι υποδοχείς τους επιδεικνύουν υψηλή συγγένεια στη μεταξύ τους σύνδεση.



Εικόνα 11. Σχηματική αναπαράσταση σύνδεσης κυτταροκίνης – υποδοχέα

Μία κυτταροκίνη είναι δυνατόν να συνδέεται σε υποδοχέα πάνω στο ίδιο κύτταρο, εκδηλώνοντας την αυτοκρινή (autocrine) της δράση. Είναι επίσης δυνατόν, να δεσμεύεται σε υποδοχείς που βρίσκονται σε κύτταρα στόχους κοντά στο κύτταρο που την παράγει, εκδηλώνοντας έτσι την παρακρινή (paracrine) της δράση. Τέλος, σε μικρότερο βαθμό, μπορεί να προσδένεται σε κύτταρα στόχους που βρίσκονται σε μεγάλη απόσταση από το κύτταρο που την παράγει και τότε παρουσιάζει ενδοκρινή (endocrine) δράση. Οι ιδιότητες των κυτταροκινών συνοψίζονται σε αυτές του πλεονασμού, της συνέργειας, του ανταγωνισμού καθώς και της επαγωγής φαινομένων ενίσχυσης, έτσι ώστε να επιτυγχάνεται η ρύθμιση της κυτταρικής δραστηριότητας.

Οι κυτταροκίνες διακρίνονται δομικά σε τέσσερις οικογένειες: τις αιμοποιητίνες, τις ιντερφερόνες, τις χημειοκίνες και τους παράγοντες νέκρωσης όγκων. Μέλη της ίδιας οικογένειας κυτοκινών, διαφέρουν στις αμινοξικές τους ακολουθίες αλλά εμφανίζουν ομοιότητα στο πρότυπο αναδίπλωσης της πολυπεπτιδικής τους αλυσίδας. Γενικά, οι κυτταροκίνες έχουν μοριακή μάζα μικρότερη των 30 kDa.

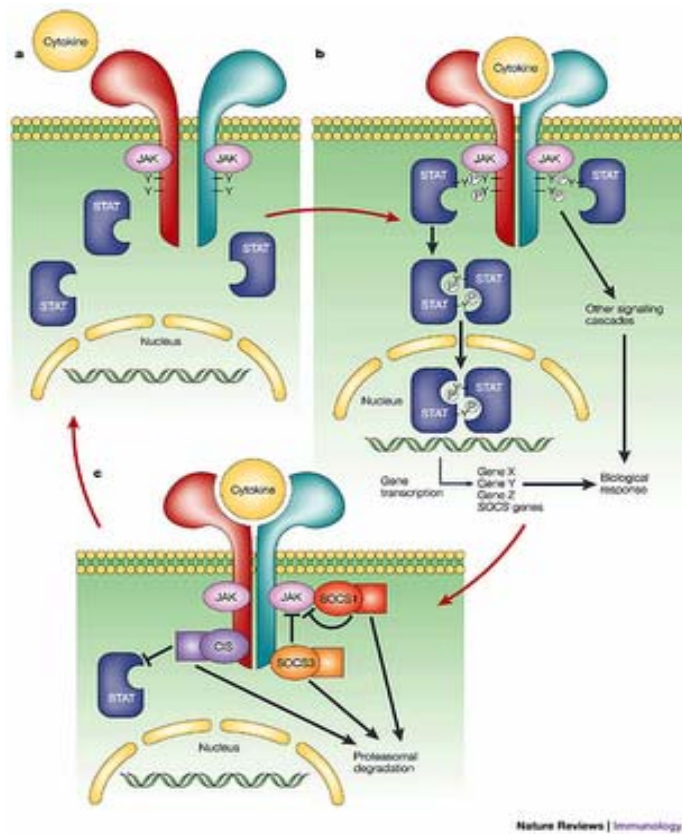
Οι κυτταροκίνες διαθέτουν πολλαπλές βιολογικές λειτουργίες. Μεταξύ αυτών είναι η ανάπτυξη κυτταρομεσολαβητικής και χυμικής ανοσίας, η επαγωγή ανάπτυξης φλεγμονής, η ρύθμιση της αιμοποίησης, ο έλεγχος του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης και η διαδικασία επούλωσης τραυμάτων. Οι δράση των κυτταροκινών δεν είναι αντιγονοειδική. Έτσι, μπορούν να επηρεάσουν οποιαδήποτε κύτταρα προσεγγίσουν, αρκεί τα τελευταία να διαθέτουν τους κατάλληλους υποδοχείς. Συνήθως, ένα κύτταρο-στόχος δέχεται τη συνδυασμένη δράση περισσότερων από μίας κυτταροκινών.

1.5.8 Υποδοχείς κυτταροκινών

Οι κυτταροκίνες, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, για να πραγματοποιήσουν τη βιολογική τους δράση, πρέπει να συνδεθούν με ειδικούς υποδοχείς που εκφράζονται στην επιφάνεια των κυττάρων στόχων. Οι υποδοχείς των διαφόρων κυτταροκινών, ενώ διαφέρουν εντελώς δομικά, μπορούν να συμπεριληφθούν στις 5 ακόλουθες οικογένειες: υποδοχείς της υπεροικογένειας των ανοσοσφαιρινών, οικογένεια υποδοχέων τάξης I (γνωστή και ως οικογένεια των υποδοχέων της αιμοποιητίνης), οικογένεια υποδοχέων τάξης II (γνωστή και ως οικογένεια των υποδοχέων της ιντερφερόνης), οικογένεια υποδοχέων TNF και τέλος, οικογένεια υποδοχέων χημειοκινών.

Πολλοί από τους υποδοχείς που δεσμεύουν κυτταροκίνες και λειτουργούν στα πλαίσια του ανοσοποιητικού και του αιμοποιητικού συστήματος, ανήκουν στην οικογένεια των υποδοχέων τάξης I. Η σύνδεση των υποδοχέων με τις κυτταροκίνες ενεργοποιεί μονοπάτια μεταγωγής μηνυμάτων. Η διαδικασία σηματοδότησης, διαμέσου των περισσότερων υποδοχέων τάξεων I και II, περιλαμβάνει 5 βήματα, τα οποία αποτελούν τη βάση ενός ενοποιημένου προτύπου μεταγωγή του μηνύματος.

- α) Η α αλυσίδα του υποδοχέα της κυτταροκίνης είναι υπεύθυνη κυρίως για τη σύνδεση με την κυτταροκίνη και λιγότερο για τη σηματοδότηση, ενώ η β αλυσίδα είναι υπεύθυνη κυρίως για τη σηματοδότηση και λιγότερο για τη σύνδεση.
- β) Διαφορετικές ανενεργές μορφές πρωτεϊνικών κινασών τυροσίνης (JAK) συνδέονται με διαφορετικές υπομονάδες του υποδοχέα (α αλυσίδα του υποδοχέα).
- γ) Η πρόσδεση της κυτταροκίνης επάγει τη σύνδεση των δύο ξεχωριστών υπομονάδων του υποδοχέα και την ενεργοποίηση των JAKs που συνδέονται με τον υποδοχέα.
- δ) Από τη στιγμή που ενεργοποιούνται οι JAK δημιουργούν σημεία πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων STAT (Signal Transducers and Activators of transcription, STAT), μέσω φωσφορυλίωσης συγκεκριμένων καταλοίπων τυροσίνης, των υπομονάδων του υποδοχέα της κυτταροκίνης.
- ε) Τέλος, μετά τη φωσφορυλίωση του κομβικού καταλοίπου της τυροσίνης, οι μεταγραφικοί παράγοντες STAT μετατοπίζονται από τα σημεία πρόσδεσης του υποδοχέα στη μεμβράνη, προς τον πυρήνα, και από εκεί ξεκινούν τη μεταγραφή συγκεκριμένων γονιδίων.



Εικόνα 12. Γενικό πρότυπο μεταγωγής μηνυμάτων, που ακολουθείται από τους περισσότερους υποδοχείς τάξεων I και II

1.5.9 Παρουσία κυτταροκινών στο σπερματικό πλάσμα

Το ανθρώπινο σπέρμα περιέχει μία σειρά κυτταροκινών, μεταξύ των οποίων ο TNF- α και διάφορες ιντερλευκίνες. Οι κυτταροκίνες εκκρίνονται στο σπερματικό πλάσμα ως ανοσολογική απόκριση ενάντια σε κάποια «μόλυνση» της ουρογεννητικής οδού ή ακόμα και ως ανοσολογική απόκριση ενάντια σε κάποια αυτοάνοση αντίδραση. Οι κυτταροκίνες που απελευθερώνονται από διάφορους τύπους κυττάρων στην ανδρική ουρογεννητική οδό, είναι σε θέση να επηρεάσουν αισθητά το λειτουργικό ρόλο του σπέρματος και κατ' επέκταση τη γονιμοποιητική του ικανότητα. Η παρουσία των κυτταροκινών στο σπερματικό πλάσμα, έχει συσχετισθεί με αρνητική συνήθως επίδραση στις παραμέτρους του σπέρματος. Παρουσία *in vitro* κυτταροκινών στο σπερματικό πλάσμα, έχει σχετιστεί με μείωση της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων, αύξηση της παραγωγής των δραστικών ριζών οξυγόνου και μείωση της διεισδυτικής ικανότητας των σπερματοζωαρίων στα ωάρια (Brigitte Dousset et al., 1997). Παρουσία IL-1, IL-6 και TNF- α στο σπερματικό πλάσμα, συσχετίζεται αρνητικά με τον αριθμό των κινούμενων σπερματοζωαρίων,

αλλά και με το συνολικό αριθμό τους, με τη βιωσιμότητα των σπερματοζωαρίων, το pH και τις μορφολογικές τους αλλοιώσεις (Matthias S.Gruschwitz et al., 1996). Τέλος, έκθεση του οργανισμού σε IFN- γ και TNF- α , αυξάνει τα επίπεδα των HLA τάξης I στο σπέρμα (Bishara et al., 1987).

1.6 Σκοπός της εργασίας

Το συνεχώς αυξανόμενο ενδιαφέρον των νέων επιστημόνων για την ανδρολογία τις δύο τελευταίες δεκαετίες, έχει δημιουργήσει μία τεράστια γνώση για τη φυσιολογία του ανδρικού αναπαραγωγικού συστήματος και τις διαδικασίες που οδηγούν στη σύλληψη in vivo και in vitro. Ο συνδυασμός της γνώσης αυτής με την αλματώδη ανάπτυξη του τομέα της ανοσολογίας της αναπαραγωγής, έχει προσφέρει σημαντικές γνώσεις και χρήσιμα συμπεράσματα, που αφορούν σε ένα μεγάλο ποσοστό της ανδρικής υπογονιμότητας.

Ο ανδρικός παράγοντας, εμπλέκεται στο 40-50% των περιπτώσεων των υπογόνιμων ζευγαριών, ενώ σημαντικό μέρος από αυτό το ποσοστό κατέχει ο ανοσολογικός παράγοντας. Μέχρι σήμερα, υπάρχει πληθώρα μελετών για την παρουσία των αντισπερματικών αντισωμάτων στην επιφάνεια των σπερματοζωαρίων, στο σπερματικό πλάσμα, στον ορό του αίματος και στις εκκρίσεις της γυναικείας γεννητικής οδού, καθώς επίσης και για τη επίδραση των αντισωμάτων αυτών στις παραμέτρους του σπέρματος, στην γονιμοποιητική ικανότητα των σπερματοζωαρίων και στο ρόλο τους στη διαδικασία της γονιμοποίησης αυτής καθεαυτής. Περιορισμένος αριθμός μελετών έχει αναφερθεί στη παρουσία των αντιγόνων HLA τάξης I και II στο σπέρμα και στην συσχέτιση της παρουσίας τους με τις παραμέτρους του σπέρματος και τη γονιμοποιητική του ικανότητα. Το γεγονός ότι τα ώριμα σπερματοζωάρια που λαμβάνονται μετά την εκσπερμάτιση, αποτελούν το τελικό στάδιο της ωρίμανσής τους, καθιστά δύσκολη την ανίχνευση των HLA σε πρώιμα στάδια. Τέλος, υπάρχει σημαντικός αριθμός μελετών, σχετικά με την παρουσία κυτταροκινών στο σπερματικό πλάσμα, και συσχέτιση της παρουσίας αυτής με την ποιότητα του σπέρματος. Εν τούτοις, λιγότες είναι οι μελέτες που σχετίζουν την παρουσία των HLA με την έκκριση συγκεκριμένων κυτταροκινών.

Ο πρώτος στόχος της παρούσας εργασίας, είναι η ανίχνευση των HLA τάξης II στο σπέρμα και συγκεκριμένα, η ανίχνευση του κλασσικού τάξης II HLA-DR και των μη κλασσικών τάξης II HLA-DM, -DO και CD74 και η αντιστοιχία τους με τις διάφορες παραμέτρους του σπέρματος, όπως είναι η συγκέντρωση, η κίνηση, η βιωσιμότητα

και η μορφολογία των σπερματοζωαρίων. Επίσης, στόχος της εργασίας είναι η συζήτηση της συσχέτισης της παρουσίας των παραπάνω HLA τάξης II με την ανδρική γονιμότητα και με τη μελλοντική επιλογή των προς γονιμοποίηση γαμετών.

Ένας δεύτερος στόχος είναι ο προσδιορισμός των επιπέδων κάποιων προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών στο σπερματικό πλάσμα, και συγκεκριμένα της IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ και του TNF- α , εστιάζοντας στις επιπτώσεις τους στον αριθμό των σπερματοζωαρίων και στις κινηματικές τους παραμέτρους. Τέλος, σκοπός αυτής της εργασίας είναι να υπάρξει, έστω μία αδρή, συσχέτιση της παρουσίας των HLA τάξης II, με την έκκριση συγκεκριμένων κυτταροκινών στο σπερματικό πλάσμα.

Κεφάλαιο 2 – Υλικά και Μέθοδοι

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1 Δείγματα σπέρματος

Για τις ανάγκες της παρούσας εργασίας, χρησιμοποιήθηκαν 20 δείγματα ανθρώπινου σπέρματος, από δότες, σε διαδικασία διερεύνησης ανεξήγητης υπογονιμότητας αλλά με ελεύθερο ιατρικό ιστορικό ουρογεννητικού συστήματος. Τα δείγματα συλλέχτηκαν από τους δότες με εκσπερμάτιση, μετά από αυνανισμό.

2.1.1 Προσδιορισμός παραμέτρων του σπέρματος, με βάση το σπερμοδιάγραμμα

Η επεξεργασία όλων των δειγμάτων και ο προσδιορισμός των παραμέτρων του σπέρματος, πραγματοποιήθηκε μία ώρα μετά τη συλλογή. Οι τεχνικές προσδιορισμού των παραμέτρων του σπερμοδιαγράμματος, καθώς και οι τιμές αναφοράς που χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση αυτών των παραμέτρων, είναι βάση του εργαστηριακού οδηγού για την εξέταση και το χειρισμό του ανθρώπινου σπέρματος, που δημοσιεύτηκε από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, ΠΟΥ, το έτος 1999 (WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, forth edition, 1999). Στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιήθηκαν οι τιμές των παραμέτρων του σπερμοδιαγράμματος, όπως περιγράφηκε παραπάνω, αλλά το σπερμοδιάγραμμα δεν πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια της εργασίας αυτής.

Οι παράμετροι του σπερμοδιαγράμματος που χρησιμοποιήθηκαν στην εκτίμηση των αποτελεσμάτων της παρούσας εργασίας είναι η συγκέντρωση των σπερματοζωαρίων του δείγματος, ο τύπος της κίνησης των ζωντανών σπερματοζωαρίων, η ζωτικότητα τους και η μορφολογία τους. Στη συνολική εικόνα του σπερμοδιαγράμματος, λάβαμε υπόψη επίσης το pH, τη ρευστοποίηση του δείγματος, το συνολικό όγκο του δείγματος και την παρουσία στρογγυλών κυττάρων στο δείγμα (πρώιμες μορφές σπερματοζωαρίων, κύτταρα της λευκής σειράς).

Οι τιμές αναφοράς των παραμέτρων που χρησιμοποιήθηκαν, σύμφωνα με τον ΠΟΥ (1999), είναι οι εξής:

- Συγκέντρωση (αριθμός σπερματοζωαρίων/ml) ≥ 20 εκατομμύρια/ml

- Κινητικότητα % (εντός μίας ώρας από την εκσπερμάτιση): ταχεία προωθητική κίνηση $\geq 10-20\%$, συνολική (ταχεία, νωθρή) προωθητική κίνηση $\geq 50\%$.
 - Ζωτικότητα % (ποσοστό ζωντανών σπερματοζωαρίων) $\geq 50\%$
 - Μορφολογία % (ποσοστό τυπικών μορφών) $\geq 14\%$
-
- pH: 7,5 – 8,5
 - Ρευστοποίηση: εντός 20 λεπτών – εντός μίας ώρας
 - Όγκος $\geq 2,0$ ml
 - Στρογγυλά κύτταρα ≤ 1 εκατομμύριο/ml

2.1.2 Επεξεργασία δειγμάτων που προορίζονται για ανοσοφθορισμό (καθαρισμός)

Για ανοσοφθορισμό χρησιμοποιήθηκαν ιζήματα ζωντανών καθαρισμένων σπερματοζωαρίων, διαχωρισμένες από το σπερματικό πλάσμα. Ο καθαρισμός των σπερματοζωαρίων από τα νεκρά σπερματοζωάρια, τις ανώμαλες μορφές και τους άλλους τύπους κυττάρων, πραγματοποιήθηκε με συνδυασμό φυγοκέντρησης σε υγρό διαβαθμισμένης πυκνότητας.

Μέσα σε μία ώρα από τη στιγμή της εκσπερμάτισης, τοποθετούμε ικανή ποσότητα φρέσκου δείγματος, σε σωλήνα φυγοκέντρησης των 15ml, πάνω από υγρό διαβαθμισμένης πυκνότητας. Στον κενό σωλήνα αρχικά προσθέτουμε 2ml υγρού με περιεκτικότητα σε περκόλη 80% (Pure Sperm 80%, Fertipro) και πάνω από αυτό, με προσοχή για να μην ανακατευτούν τα υγρά, προσθέτουμε 2ml υγρού με περιεκτικότητα σε περκόλη 40% (Pure Sperm 40%, Fertipro). Τελευταίο, προσθέτουμε το δείγμα του σπέρματος, σε ποσότητα > 2 ml (ανάλογα με το δείγμα), πάλι με προσοχή για την αποφυγή ανάμειξης των υγρών διαφορετικής πυκνότητας. Φυγοκεντρούμε στις 1600rpm για 25 min.

Μετά το τέλος της φυγοκέντρησης, αφαιρούμε το ίζημα των κυττάρων που έχει σχηματιστεί στον πυθμένα του σωλήνα και το προσθέτουμε σε σωλήνα ο οποίος περιέχει θρεπτικό υλικό με κατάλληλο pH για το πλύσιμο του δείγματος (Sperm Wash, Fertipro). Αναδεύουμε και φυγοκεντρούμε στις 1200rpm για 10min. Επαναλαμβάνουμε τη διαδικασία του πλυσίματος για μία ακόμα φορά, και

επαναδιαλυτοποιούμε το ίζημα των καθαρών σπερματοζωαρίων σε 1ml θρεπτικού υλικού. Το δείγμα είναι έτοιμο για την πραγματοποίηση του ανοσοφθορισμού.

2.2 Ανοσοφθορισμός

Ο ανοσοφθορισμός πραγματοποιείται για την ανίχνευση και τον κυτταρικό εντοπισμό των αντιγόνων που μας ενδιαφέρουν με τη βοήθεια φθορίζοντων αντισωμάτων. Στην παρούσα εργασία, ο ανοσοφθορισμός χρησιμοποιείται τόσο για τον εντοπισμό επιφανειακών ($DR_{\text{εξωτερικό}}$), όσο και ενδοκυτταρικών αντιγόνων ($DR_{\text{εσωτερικό}}$, DM, DO, CD74). Στην δεύτερη περίπτωση τα κύτταρα πρέπει να επεξεργαστούν με τέτοιο τρόπο ώστε η μεμβράνη τους να γίνει διαπερατή (μόνιμα ή παροδικά) στα αντιδραστήρια.

Ο ανοσοφθορισμός πραγματοποιήθηκε σε δείγματα τα οποία είχαν νωρίτερα μονιμοποιηθεί σε αντικειμενοφόρο πλάκα. Μετά τη δημιουργία του κατάλληλου επιχρίσματος στην αντικειμενοφόρο πλάκα, έγινε η μονιμοποίηση με τη χρήση αιθανόλης 70%. Οι αντικειμενοφόροι πλάκες βυθίστηκαν για 5min σε διάλυμα αιθανόλης 70% και στη συνέχεια αφέθηκαν στον αέρα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για να στεγνώσουν. Η πειραματική διαδικασία του ανοσοφθορισμού που πραγματοποιήθηκε στη συνέχεια, είναι η εξής:

- ✓ Αρχικά, πλένουμε το δείγμα δύο φορές, προσθέτοντας 200λ PBS 1x.
- ✓ Κάνουμε blocking με PBS-BSA 3% w/v για τα δείγματα του εξωτερικού φθορισμού, και με PBS-BSA 3% w/v + σαπωνίνη για τα δείγματα του εσωτερικού φθορισμού. Προσθέτουμε 100λ από το αντίστοιχο αντιδραστήριο και επωάζουμε για 30min σε θερμοκρασία δωματίου.
- ✓ Πλένουμε τα δείγματα 2 φορές με 200λ PBS 1x.
- ✓ Προσθέτουμε 100λ από το κατάλληλο αντίσωμα, αραιωμένο σε PBS-BSA 1% w/v για τον εξωτερικό φθορισμό και PBS-BSA 1% w/v + σαπωνίνη για τον εσωτερικό φθορισμό. Επωάζουμε 45min σε θερμοκρασία δωματίου.
- ✓ Πλένουμε τα δείγματα 2 φορές με 200λ PBS 1x.
- ✓ Προσθέτουμε το 2^ο αντίσωμα όπου αυτό είναι απαραίτητο και επωάζουμε για 30min σε θερμοκρασία δωματίου. Στα δείγματα που δεν χρειάζονται 2^ο αντίσωμα, αφήνουμε το πλακάκι να στεγνώσει, προσθέτουμε 20λ γλυκερόλη 25% και καλυπτρίδα και είναι έτοιμα για παρατήρηση.

- ✓ Ξεπλένουμε το 2^ο αντίσωμα και ετοιμάζουμε τα δείγματα για παρατήρηση σύμφωνα με το προηγούμενο βήμα.
- ✓ Η παρατήρηση των δειγμάτων γίνεται σε απλό μικροσκόπιο φθορισμού και σε συνεστιακό μικροσκόπιο confocal.

Τα αντισώματα που χρησιμοποιούνται στον ανοσοφθορισμό είναι τα εξής:

- anti IgG-FITC Goat IgG-F(ab')₂-FITC anti mouse IgG, Sigma Cat. number A 9917 (αραίωση 1/250)
- anti IgG- RITC Goat anti-Mouse IgG F(ab')₂ - Rhodamine conjugate, Bhoeringer-Mannheim, Cat. Number 1214608 (αραίωση 1/250)
- HLA-DR Hybridoma, clone IVA12 (Mouse IgG1, κ), ATCC Cat. number HB-145 (αραίωση 1/100)
- HLA-DM-PE purified mouse anti-human monoclonal antibody PE conjugated clone MaP.DM1 (Mouse IgG1, κ), Santa Cruz Cat. number sc-32248-PE (αραίωση 1/100)
- HLA-DO purified mouse anti-human monoclonal antibody, clone DOB.L1, (Mouse IgG2b, κ), BD Pharmingen™ Cat. number 559895 (αραίωση 1/200)
- CD74-PE purified mouse anti-human monoclonal antibody PE conjugated clone By2 (IgG1) anti human li (short & long forms), Santa Cruz Cat.number sc-20062-PE (αραίωση 1/100)

2.3 Προετοιμασία δειγμάτων για RT-PCR

Στα δείγματα, πραγματοποιήθηκε μελέτη της γονιδιακής έκφρασης των κυττάρων, με τη βοήθεια της αντίδρασης της αντίστροφης μεταγραφής και της αντίδρασης πολυμερισμού σε ένα βήμα. Για την πραγματοποίηση της πειραματικής διαδικασίας, μέρος από τα δείγματα που είχαν καθαριστεί όπως περιγράφηκε παραπάνω, φυγοκεντρήθηκαν στις 10.000rpm, ώστε να διαχωριστούν τα κύτταρα. Τα ιζήματα των κυττάρων που προέκυψαν, καταψύχθηκαν στους -80°C μέχρι τη στιγμή της χρήσης τους.

2.3.1 Αντίστροφη μεταγραφή και αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

Η απομόνωση του poly-A mRNA από τα κύτταρα, έγινε με το Oligotex Direct mRNA Midi/Maxi Kit της QIAGEN σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρίας. Η διαδικασία

στηρίζεται στην πρόσδεση του poly-A mRNA σε μικροσφαιρίδια ρητίνης. Τα βήματα περιληπτικά είναι τα εξής:

- ✓ Φτιάχνουμε μίγμα OL1-β-μερκαπτοαιθανόλη 3% και προσθέτουμε 600λ από αυτό σε κάθε δείγμα. Στο ίδιο διάλυμα προσθέτουμε 1,2 ml ODB και φυγοκεντρούμε στις 10.000 rpm για 10min. Συλλέγουμε το υπερκείμενο σε καθαρό erpendorf. Το βήμα αυτό πραγματοποιείται για τη διάρρηξη των κυττάρων.
- ✓ Αφού επώασουμε τα oligotext σφαιρίδια για 5min στους 37°C στο υδατόλουτρο, προσθέτουμε 35λ από αυτά στο δείγμα, ώστε να προσδεθεί το RNA στα σφαιρίδια. Επωάζουμε για 10min σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκεντρούμε στις 12.000-15.000rpm μέχρι το υπερκείμενο να είναι διαυγές. Πετάμε το υπερκείμενο και κρατάμε το ίζημα με τα σφαιρίδια.
- ✓ Επαναδιαλυτοποιούμε το ίζημα σε 100λ OL1-β-μερκαπτοαιθανόλη 3% και προσθέτουμε επιπλέον 400λ ODB. Επωάζουμε για 3min στους 70°C και στη συνέχεια για άλλα 10min σε θερμοκρασία δωματίου. Φυγοκεντρούμε στις 10.000 rpm.
- ✓ Επαναδιαλυτοποιούμε το ίζημα σε 350λ OW1 και φορτώνουμε το δείγμα στην κολώνα, έτσι ώστε τα σφαιρίδια να συγκρατηθούν σε αυτή.
- ✓ Προσθέτουμε στην κολώνα 350λ OW2 και φυγοκεντρούμε στις 10.000rpm για 1min. Πετάμε το υγρό κάτω από την κολώνα και επαναλαμβάνουμε το βήμα.
- ✓ Αφού τοποθετήσουμε την κολώνα σε καθαρό erpendorf, προσθέτουμε 60λ OEB σε δύο φάσεις και φυγοκεντρούμε στις 10.000rpm για 1min. Με αυτό τον τρόπο, εκλούουμε το poly-A mRNA από τα σφαιρίδια. Το υπερκείμενο που προκύπτει, περιέχει το mRNA το οποίο μπορούμε να αποθηκεύσουμε στους -80°C για μελλοντική χρήση.

Η αντίδραση RT-PCR έγινε με το QIAGEN® OneStep RT-PCR Kit χρησιμοποιώντας 10μl poly-A mRNA για κάθε αντίδραση. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν σχεδιάστηκαν με το πρόγραμμα Primer3 (v.0.4.0). Για όλα τα τάξης II μόρια, επιλέχθηκαν για το σχεδιασμό των εκκινητών μη πολυμορφικές περιοχές (διαμεμβρανική και κυτταροπλασματική) που κωδικοποιούνται από τα εξόνια 3 και 4. Οι εκκινητές υβριδοποιούνται εκατέρωθεν του εσωνίου που παρεμβάλλεται μεταξύ αυτών των εξονίων, οπότε το μετάγραφο έχει διαφορετικό μέγεθος ανάλογα με το αν περιλαμβάνεται και το εσώνιο.

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Γονίδιο	Εκκινητής	Προϊόν (εξόνια)	Προϊόν (με εσώνιο)
<u>HLA-DRA</u> (NM_019111)	5' εκκινητής: GGATGAGCCTCTTCTCAAGC 3' εκκινητής: GTTCTGCTGCATTGCTTTTG	164 bp	453 bp
<u>HLA-DRB</u> (NM_002124)	5' εκκινητής: AGGCAGCATTGAAGTCAGGT 3' εκκινητής: CTCAGCATCTTGCTCTGTGC	231 bp	931
<u>HLA-DMA</u> (NM_006120):	5' εκκινητής: TTTGTCTCAGCTGTCGATGG 3' εκκινητής: CCACACAGCACATTCTCCAG	239 bp	450 bp
<u>HLA-DMB</u> (NM_002118)	5' εκκινητής: AGCCTTAACCCCTCTTACG 3' εκκινητής: CAGAAACCTTCAGGGTCTGC	182 bp	1701 bp
<u>HLA-DOA</u> (NM-002119)	5' εκκινητής: ACCATTTGTTCCGCAAGTTC 3' εκκινητής: GCATCTGGTGGTGAATAGG	142 bp	237
<u>HLA-DOB</u> (NM-002120)	5' εκκινητής: ATGTCCACTGGCCCTATCAG 3' εκκινητής: GCCACTCAGCATCTTTCTCC	180 bp	666 bp
<u>Actin beta</u> (NM_001101)	5' εκκινητής: GGACTTCGAGCAAGAGATGG 3' εκκινητής: AGCACTGTGTTGGCGTACAG	234 bp	-
<u>CD74</u>	5' εκκινητής: GCCCTGTACACAGGCTTTTC 3' εκκινητής: CATCTTGCTCACAGGCTTGG	180 bp	371 bp

Η αντίδραση έγινε σε τελικό όγκο 25λ διαλύματος QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer με 2,5 mM MgCl₂, 400μM dNTPs και 1 μM από κάθε εκκινητή, για κάθε δείγμα. Στο **1^ο βήμα** πραγματοποιείται η αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής στους 55°C για 30min. Έπειτα απαιτείται στο **2^ο βήμα** πραγματοποιείται ενεργοποίηση της HotStarTaq DNA πολυμεράσης για 15min στους 95°C. Ακολουθούν 35-40 κύκλοι πολυμερισμού που περιλαμβάνουν στο **3^ο βήμα** την αποδιάταξη του DNA για 1min στους 94°C, στο **4^ο βήμα** την υβριδοποίηση των εκκινητών για 1min στους 55°C και στο **5^ο βήμα** την επιμήκυνση για 1min στους 72°C. Η αντίδραση σταματά με το **6^ο**

βήμα της τελικής επιμήκυνσης για 10 λεπτά στους 72°C. Στη συνέχεια τα δείγματα μπορούν να παραμείνουν στους 4°C over night.

Στη συνέχεια τα δείγματα ηλεκτροφορούνται σε gel αгарόζης στα 100V. Το gel διαβάζεται σε λάμπα UV.

2.4 Προετοιμασία δειγμάτων για ELISA

Η ανίχνευση των κυτταροκινών στο σπερματικό πλάσμα γίνεται με την τεχνική της ELISA. Για την πραγματοποίηση της τεχνικής αυτής, απαιτείται το σπερματικό πλάσμα των δειγμάτων. Το σπερματικό πλάσμα, διαχωρίζεται από τα υπόλοιπα κύτταρα, με φυγοκέντρηση του φρέσκου δείγματος στις 10.000 rpm για 15 min. Στη συνέχεια το σπερματικό πλάσμα μπορεί να αποθηκευτεί στους -20°C για μελλοντική χρήση.

2.4.1 Ενζυμοσύνδετη Ανοσοπροσοφητική Δοκιμή (ELISA)

Η ELISA αποτελεί μια πολύ ευαίσθητη βιοχημική μέθοδο ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης πρωτεϊνών σε υγρά όπως ο ορός αίματος, εκχυλίσματα κυττάρων ή υπερκείμενα καλλιεργειών, σπερματικό πλάσμα κ.α. Η πρωτεΐνες αρχικά επικάθονται στα πηγάδια μιας 96άρας πλάκας και στη συνέχεια ανιχνεύονται με ένα ειδικό πρώτο αντίσωμα το οποίο μπορεί να είναι συνδεδεμένο με ένα ένζυμο ή να ανιχνεύεται με τη χρήση ενός δευτέρου αντισώματος συνδεδεμένου με ένζυμο. Η προσθήκη του κατάλληλου υποστρώματος βοηθά στην οπτικοποίηση της αντίδρασης που μπορεί να μετρηθεί με φωτόμετρο.

Για τις ανάγκες της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της Indirect ELISA. Οι κυτταροκίνες που ελέγχθηκαν είναι οι IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN-γ και ο TNF-α. Με την ίδια τεχνική πραγματοποιήθηκε η ανίχνευση των διαλυτών sMHC I και sMHC II στο σπερματικό πλάσμα των ίδιων δειγμάτων. Τα απαραίτητα αντιδραστήρια είναι τα παρακάτω:

- Coating buffer: 0.05M NaHCO₃, 0.05 Na₂CO₃ pH 9.6
- Washing buffer: PBS 1X -tween 20, 0.05%
- Blocking buffer: PBS 1X-BSA (Bovine Serum Albumin) 2%
- Ab buffer: PBS 1X-BSA 0.1%
- Υπόστρωμα-χρωμογόνο: TMB substrate-Peroxidase solution H₂O₂

- H₂SO₄ 1M
- 96-flat bottom plate
- Πρώτο αντίσωμα: μονοκλωνικό mouse anti-human IL-2, IL-4, IL-10, IFN-γ (αραίωση 1:1000), IL-6 (αραίωση 1:100) και TNF-α (αραίωση 1:500)
- Δεύτερο αντίσωμα: a-mouse IgG-POD (Fab fragment) (Boehringer-Mannheim, Germany)

Τα βήματα που ακολουθήθηκαν είναι τα εξής:

- ✓ Στρώνουμε τα δείγματα στην plate σε αραίωση 1/200 σε coating buffer και διπλές επαναλήψεις. Τελικός όγκος 100λ/well. Επωάζουμε στους 4° C για 14-18h.
- ✓ Πλένουμε 3X με το washing buffer, 200λ/well.
- ✓ Στρώνουμε το blocking buffer, 200λ/well για να παρεμποδίσουμε την μη-ειδική σύνδεση των πρωτεϊνών στα αντισώματα. Επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 2h.
- ✓ Πλένουμε 3X με το washing buffer, 200λ/well.
- ✓ Στρώνουμε το 1^ο αντίσωμα (το οποίο είναι ειδικό για την πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει) σε κατάλληλη συγκέντρωση (IL-2, -4, -10, IFN-γ, MHC I και MHC II αραίωση 1/1000, ενώ TNF-α αραίωση 1/500 και IL-6 αραίωση 1/100) σε Ab buffer. Τελικός όγκος 100λ/well. Επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 2h.
- ✓ Πλένουμε 3X με το washing buffer, 200λ/well.
- ✓ Στρώνουμε το 2^ο αντίσωμα (a-IgG peroxidase) σε συγκέντρωση 1/5000 σε Ab buffer. Τελικός όγκος 100λ/well. Επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 1h στο σκοτάδι.
- ✓ Πλένουμε 3X με το washing buffer, 200λ/well.
- ✓ Προσθέτουμε το διάλυμα χρωμογόνου-υποστρώματος σε αραίωση 1:1. Τελικός όγκος 100λ/well. Περιμένουμε μέχρις ότου τα πηγαδάκια εμφανίσουν το χαρακτηριστικό χρώμα της αντίδρασης.
- ✓ Ολοκληρώνουμε την αντίδραση με H₂SO₄. Τελικός όγκος 50λ/well.
- ✓ Μετράμε σε ELISA reader στα 450nm.

Κεφάλαιο 3 - Αποτελέσματα

3. Αποτελέσματα

3.1 Ανίχνευση των μορίων DRεξωτερικό, DRεσωτερικό, DM, DO και CD74 με ανοσοφθορισμό

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα αντιγόνα ιστοσυμβατότητας τάξης II, είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, οι οποίες συναντώνται κυρίως στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα. Υπάρχουν όμως ενδείξεις ότι η παρουσία των HLA τάξης II στους αρσενικούς γαμέτες, τα σπερματοζωάρια, σχετίζεται με τις παραμέτρους του σπέρματος, τη γονιμοποιητική ικανότητα των σπερματοζωαρίων και την τελική επιλογή του αρσενικού γαμέτη που θα γονιμοποιήσει τον θηλυκό γαμέτη. Στον άνθρωπο, ο έλεγχος των HLA τάξης II και ιδιαίτερα των μη κλασσικών, είναι αντικείμενο μελέτης ελάχιστων επιστημονικών εργασιών.

Με τη βοήθεια του ανοσοφθορισμού, είναι δυνατόν να εντοπίσουμε τα αντιγόνα ιστοσυμβατότητας που μας ενδιαφέρουν, τόσο στην επιφάνεια του κυττάρου, όσο και στο εσωτερικό του. Η χρήση ειδικών αντισωμάτων, μας εξασφαλίζει την αποφυγή της μη ειδικής σύνδεσης αντισώματος-αντιγόνου και την εντοπισμένη ανίχνευση των αντιγόνων στο κύτταρο. Η θέση του αντιγόνου στο κύτταρο, παρόλο που δεν αποτελεί αντικείμενο μελέτης της παρούσας εργασίας, έχει ιδιαίτερη σημασία για τον καθορισμό της «συμπεριφοράς» του σπερματοζωαρίου τόσο στο εσωτερικό της ανδρικής και γυναικείας γεννητικής οδού, όσο και στη συνολική πορεία του σπερματοζωαρίου κατά τη διάρκεια της γονιμοποίησης.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν 20 δείγματα σπέρματος. Η συλλογή και επεξεργασία των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στις ενότητες 2.1, 2.2 και 2.3. Για τον καθορισμό της ποιότητας των δειγμάτων, χρησιμοποιήθηκαν τα κριτήρια του ΠΟΥ (1999), όπως αναφέρθηκε στην ενότητα 2.2. Τα κριτήρια αυτά, μας επέτρεψαν να εντάξουμε όλα τα δείγματα σε 6 ομάδες, λαμβάνοντας υπόψη τις τιμές τεσσάρων παραμέτρων, της συγκέντρωσης, της κίνησης, της ζωτικότητας και της μορφολογίας. Οι ομάδες που προέκυψαν από αυτή την κατηγοριοποίηση, φαίνονται στον πίνακα 1 που ακολουθεί. Τα δείγματα που συγκέντρωσαν 5 βαθμούς από την παραπάνω αξιολόγηση, χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες (controls) στην επεξεργασία των αποτελεσμάτων. Τα δείγματα αυτά είχαν τους υψηλότερους βαθμούς και στις τέσσερις παραμέτρους.

Πίνακας 1. Ομαδοποίηση δειγμάτων με βάση τους βαθμούς που συγκεντρώνει το κάθε δείγμα κατά την αξιολόγηση του σπερμοδιαγράμματος

Ομάδα	Βαθμοί (συγκέντρωση, κίνηση, ζωτικότητα μορφολογία)
1	>4,0
2	3,5 – 4,0
3	3,25 – 3,4
4	3,0 – 3,24
5	2,0 – 2,9
6	<2,0
Βαθμοί: 5=πολύ καλό, 4= καλό, 3=μέτριο, 2=οριακό, 1=χαμηλό	

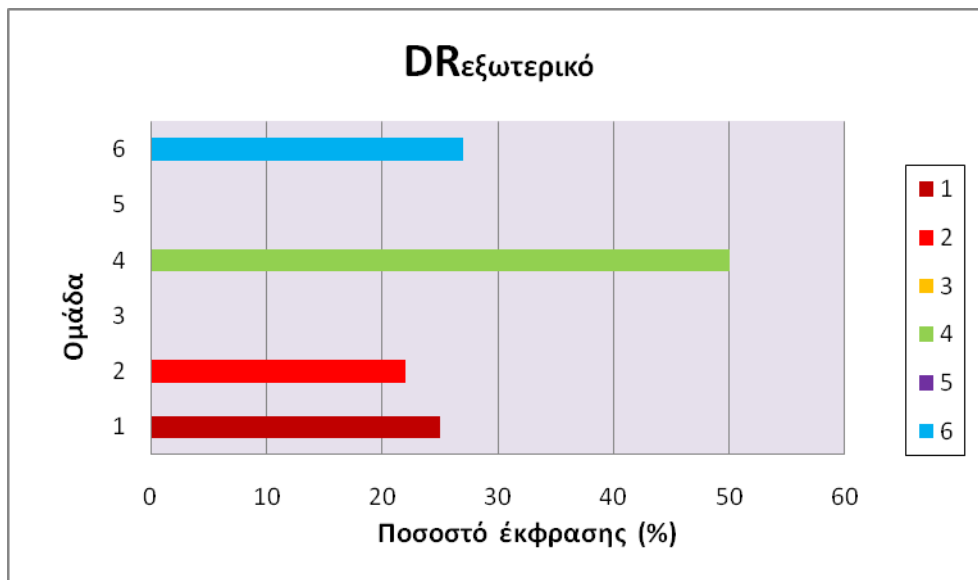
Η παρατήρηση των δειγμάτων του ανοσοφθορισμού, έγινε σε απλό μικροσκόπιο φθορισμού και σε συνεστιακό μικροσκόπιο confocal, με τη βοήθεια του οποίου πάρθηκαν και οι φωτογραφίες που ακολουθούν. Κατά την παρατήρηση, μετρήθηκαν για κάθε αντιγόνο που μελετήθηκε ξεχωριστά, το ποσοστό των κυττάρων με προσδεμένο φθορίζων αντίσωμα, πάντα σε σχέση με το δείγμα μάρτυρα (control). Τα ποσοστά που προέκυψαν φαίνονται στον πίνακα 2 που ακολουθεί.

Πίνακας 2. Αποτελέσματα ανοσοφθορισμού (%), σε σύγκριση με τον αριθμό του δείγματος, τους βαθμούς με βάση το σπερμοδιάγραμμα και την ομάδα στην οποία ανήκει το κάθε δείγμα

A.Δ	Βαθμοί	Ομάδα	DR _{εξωτερικό} (%)	DR _{εσωτερικό} (%)	DM (%)	DO (%)	CD74 (%)
10	4,5	1	15	7	0	21	0
30	4,25	1	34	51	15	23	12
11	4,5	-	0	0	0	20	0
8	4	2	8	15	20	28	0
26	3,75	2	22	48	2	44	0
35	3,75	2	22	17	6	7	3
18	3,75	2	8	8	24	90	0
33	3,5	2	49	65	10	0	15
21	3,25	-	0	72	0	21	0
6	3,25	3	0	8	20	35	0
31	3,25	3	0	6	3	0	0
23	3	-	100	44	12	22	10
34	3	4	66	74	26	20	36
40	3	4	33	70	12	10	20
20	2	-	0	5	0	28	0
19	2	5	0	0	0	0	0
24	2	5	0	0	31	4	0
25	1,5	6	32	38	7	15	0
27	1,25	6	29	40	0	0	0
28	1,75	6	20	40	20	13	0

Αναλύοντας τα αποτελέσματα του παραπάνω πίνακα 2, προκύπτουν τα εξής συμπεράσματα:

- Το HLA-DR_{εξωτερικό} εμφανίζεται, στη μεμβράνη των σπερματοζωαρίων, σε μεγαλύτερο ποσοστό στα δείγματα με μέτρια ποιότητα (ομάδα 4) και ενώ τα δείγματα της ομάδας 3 βρίσκονται πολύ κοντά σε βαθμούς, τα τελευταία εμφανίζουν μηδενική έκφραση του DR στη μεμβράνη. Η μεγάλη αυτή διαφορά, μπορεί να οφείλεται στο γεγονός, ότι οι βαθμοί της κάθε ομάδας, συγκεντρώνονται από διαφορετικές παραμέτρους και ενώ συνολικά μπορεί να είναι κοντά, ποιοτικά διαφέρουν. Φυσικά στα αποτελέσματα λαμβάνουμε πάντα υπόψη το ποσοστό σφάλματος που μπορεί να οφείλεται στην πειραματική διαδικασία. Έτσι, τα δείγματα της ομάδας 3 συγκέντρωναν περισσότερους βαθμούς στη συγκέντρωση και στην κίνηση των σπερματοζωαρίων, κάτι που δεν συνέβαινε με την ομάδα 4, ενώ η 4 αντίστροφα συγκέντρωνε λίγο περισσότερους βαθμούς στην ζωτικότητα και στη μορφολογία. Προκύπτει λοιπόν το συμπέρασμα ότι η παρουσία του DR στην μεμβράνη, σχετίζεται με την πτώση των παραμέτρων της συγκέντρωσης και της κίνησης. Το συμπέρασμα αυτό προκύπτει και από τις υπόλοιπες συνολικά ομάδες. Φυσιολογικά, στα δείγματα control, το DR εκφράζεται στη μεμβράνη σε χαμηλό ποσοστό και το ίδιο συμβαίνει και στην ομάδα 2. Αντίθετα, στις ομάδες 4 και 6 με την χαμηλότερη ποιότητα σπέρματος, έχουμε τη μεγαλύτερη έκφραση του DR_{εξωτερικό}.

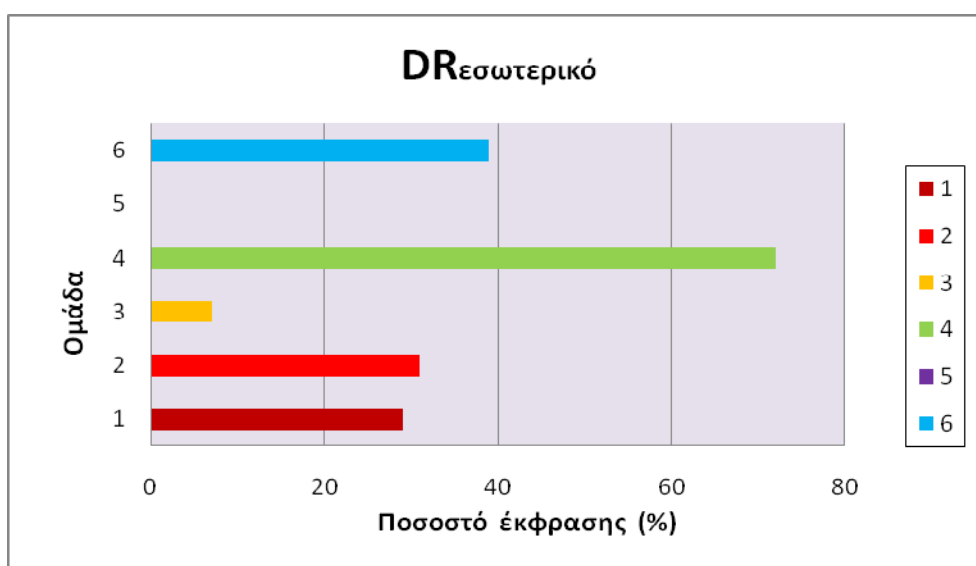


Διάγραμμα 1. Αποτελέσματα ανοσοφθορισμού έκφρασης μεμβρανικού DR (%) στις διάφορες ομάδες δειγμάτων

- Το HLA-DR_{εσωτερικό} όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα του πίνακα, φαίνεται να ακολουθεί το πρότυπο έκφρασης του DR_{εξωτερικό}. Και σε αυτή την περίπτωση, έχουμε μικρή έκφραση στις ομάδες 1, 2 και 3, οι οποίες

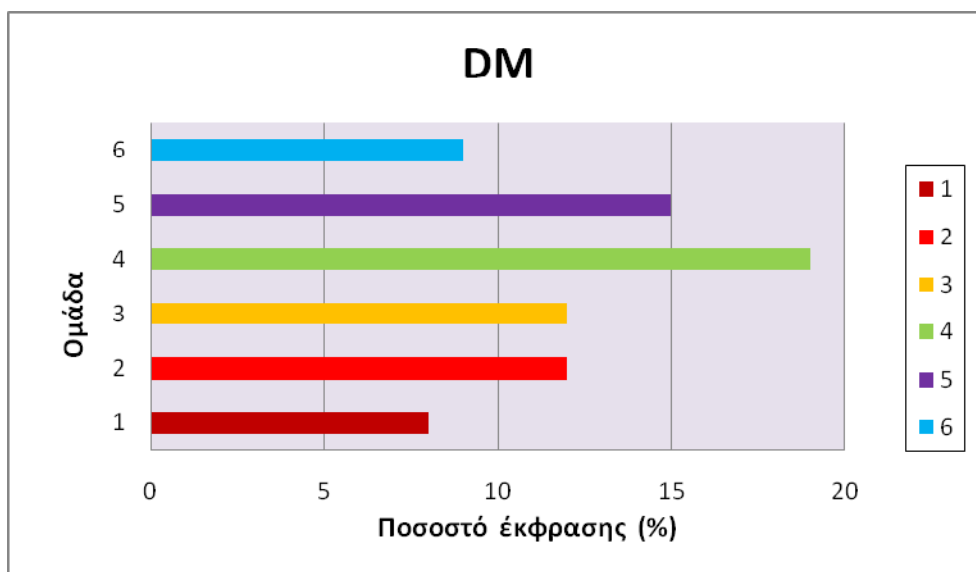
συγκεντρώνουν και τους περισσότερους βαθμούς στο σπερμοδιάγραμμα, ενώ οι ομάδες 4 και 6, με εξαίρεση την 5, εμφανίζουν τη μεγαλύτερη έκφραση του DR_{εσωτερικό}. Το αποτέλεσμα αυτό ήταν αναμενόμενο, λαμβάνοντας υπόψη τον τρόπο έκφρασης των δύο αντιγόνων, όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή.

- Συνολικά η έκφραση του HLA-DR σε ποσοστό 25-30% συνοδεύεται από καλή ποιότητα σπέρματος, όπου όλοι οι απαραίτητοι παράγοντες για την μεταφορά του στην μεμβράνη, συμπεριλαμβανομένων των HLA-DM, HLA-DO και CD74, είναι παρόντες.



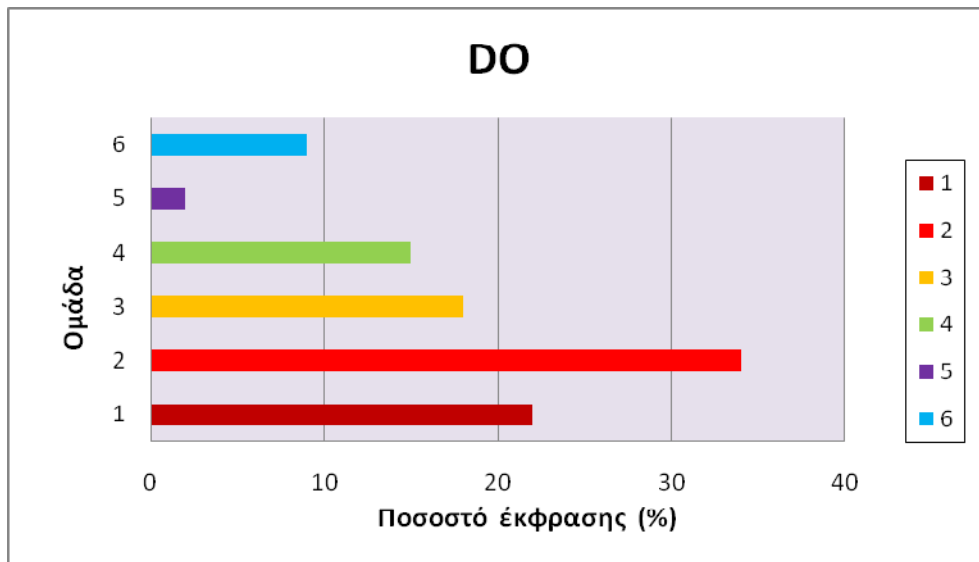
Διάγραμμα 2. Αποτελέσματα ανοσοφθορισμού έκφρασης ενδοκυττάριου DR (%) στις διάφορες ομάδες δειγμάτων

- Η έκφραση του HLA-DM, είναι παρόμοια σε όλες τις ομάδες. Μεγαλύτερο ποσοστό εμφανίζεται στις ομάδες 4 και 5 με μέτρια και οριακή ποιότητα σπέρματος. Αυτό σημαίνει ότι το DM εκφράζεται φυσιολογικά στα σπερματοζωάρια, ενώ η έκφρασή του αυξάνεται οριακά με την πτώση της συγκέντρωσης και της κίνησης των σπερματοζωαρίων. Η παρουσία του επομένως επηρεάζει σε μικρό βαθμό την ποιότητα του σπέρματος. Παρόλα αυτά φαίνεται ότι υψηλά επίπεδα έκφρασης DM καταστέλλουν την έκφραση του DR. Στην περίπτωση της ομάδας 5, το DM θα μπορούσε να σχηματίζει σύμπλοκο με το DO και ελλείψει CD74 να μην επιτρέπει την έκφραση του DR.



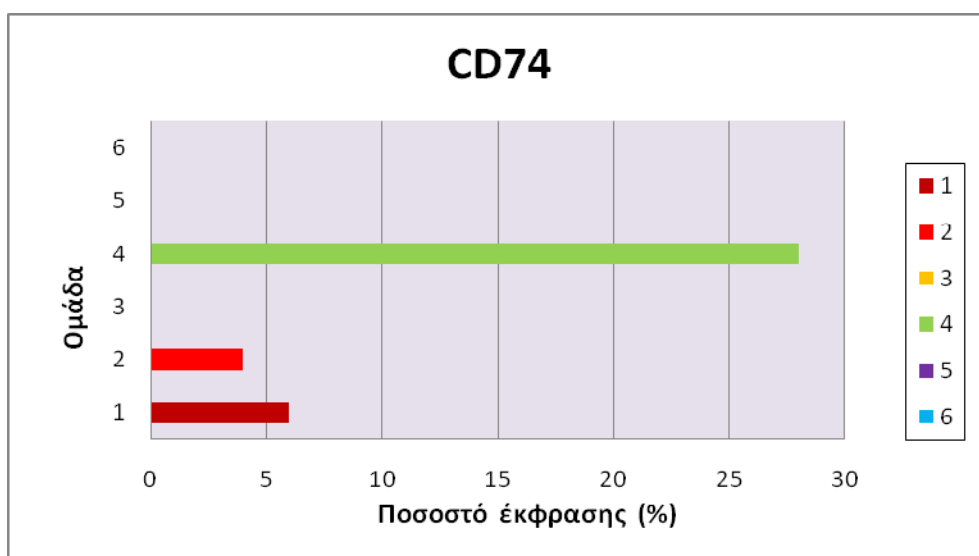
Διάγραμμα 3. Αποτελέσματα ανοσοφθορισμού έκφρασης DM (%) στις διάφορες ομάδες δειγμάτων

- Το πρότυπο έκφρασης του HLA-DO, όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα των πειραμάτων της παρούσας εργασίας, είναι εντελώς διαφορετικό από τα προηγούμενα. Σε αυτή την περίπτωση, το υψηλότερο ποσοστό έκφρασης εμφανίζουν τα δείγματα με τους περισσότερους βαθμούς στις παραμέτρους του σπέρματος, ενώ όσο πέφτει η ποιότητα του σπέρματος, μειώνεται και η έκφραση του DO. Το γεγονός αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η έκφραση του DO, συμβαδίζει με δείγματα σπέρματος καλής ποιότητας, οπότε θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι υπάρχει μία φυσιολογική έκφραση του αντιγόνου αυτού. Λαμβάνοντας υπόψη τον τρόπο έκφρασης των μη κλασικών αντιγόνων ιστοσυμβατότητας, όπως αυτός είναι γνωστός από το ενδοκυτταρικό μονοπάτι, το DO, όταν αυτό εκφράζεται, εμφανίζεται ως σύμπλοκο με το DM και το DR για να μεταφερθεί στη συνέχεια στα κυστίδια του ενδοκυτταρικού μονοπατιού. Επομένως, έκφραση του ενός, αυτόματα σημαίνει έκφραση και του άλλου αντιγόνου. Τα ποσοστά έκφρασης των δύο αυτών αντιγόνων, βρίσκονται σε ισορροπία.



Διάγραμμα 4. Αποτελέσματα ανοσοφθορισμού έκφρασης DO (%) στις διάφορες ομάδες δειγμάτων

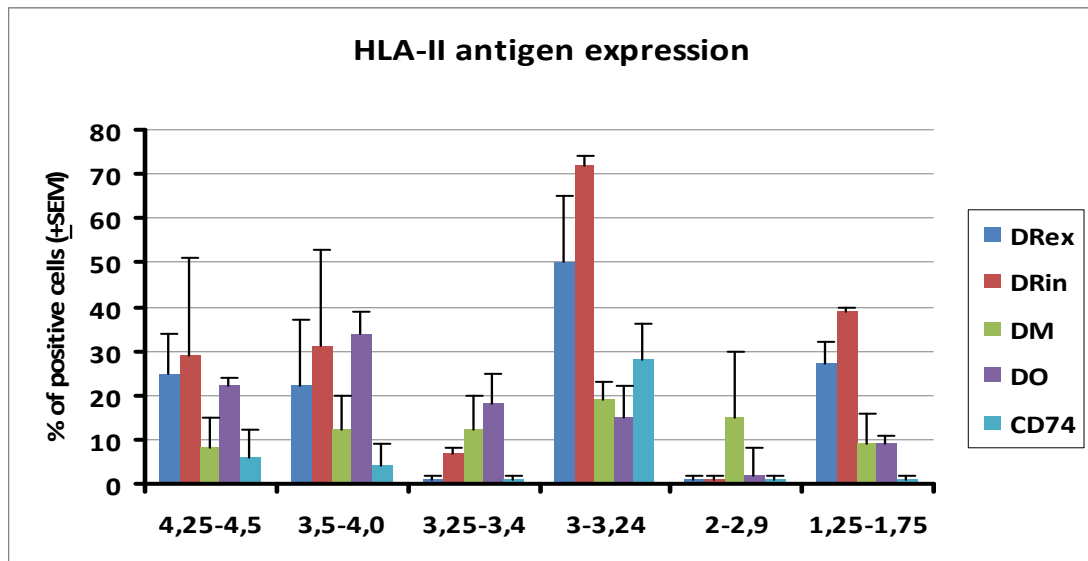
- Τέλος, το HLA-CD74 εμφανίζει μηδενική έως πολύ μικρή έκφραση σε όλες τις ομάδες, πλην της ομάδας 4 με τη μέτρια ποιότητα σπέρματος. Αξίζει να σημειωθεί ότι η ομάδα αυτή, εμφάνισε επίσης τα υψηλότερα ποσοστά έκφρασης και στα υπόλοιπα αντιγόνα (εκτός του DO), γεγονός που σημαίνει ότι το CD74 πιθανόν σχηματίζει σύμπλοκο με το DM και το DR, όπως συμβαίνει και με το πρότυπο έκφρασης των αντιγόνων αυτών σε άλλους κυτταρικούς τύπους. Συνολικά μπορούμε να πούμε ότι η απουσία του CD74 καταστέλλει την έκφραση του DR, η οποία στην περίπτωση της ομάδας 6 θα μπορούσε να διασωθεί από την παρουσία του DO.



Διάγραμμα 5. Αποτελέσματα ανοσοφθορισμού έκφρασης CD74 (%) στις διάφορες ομάδες δειγμάτων

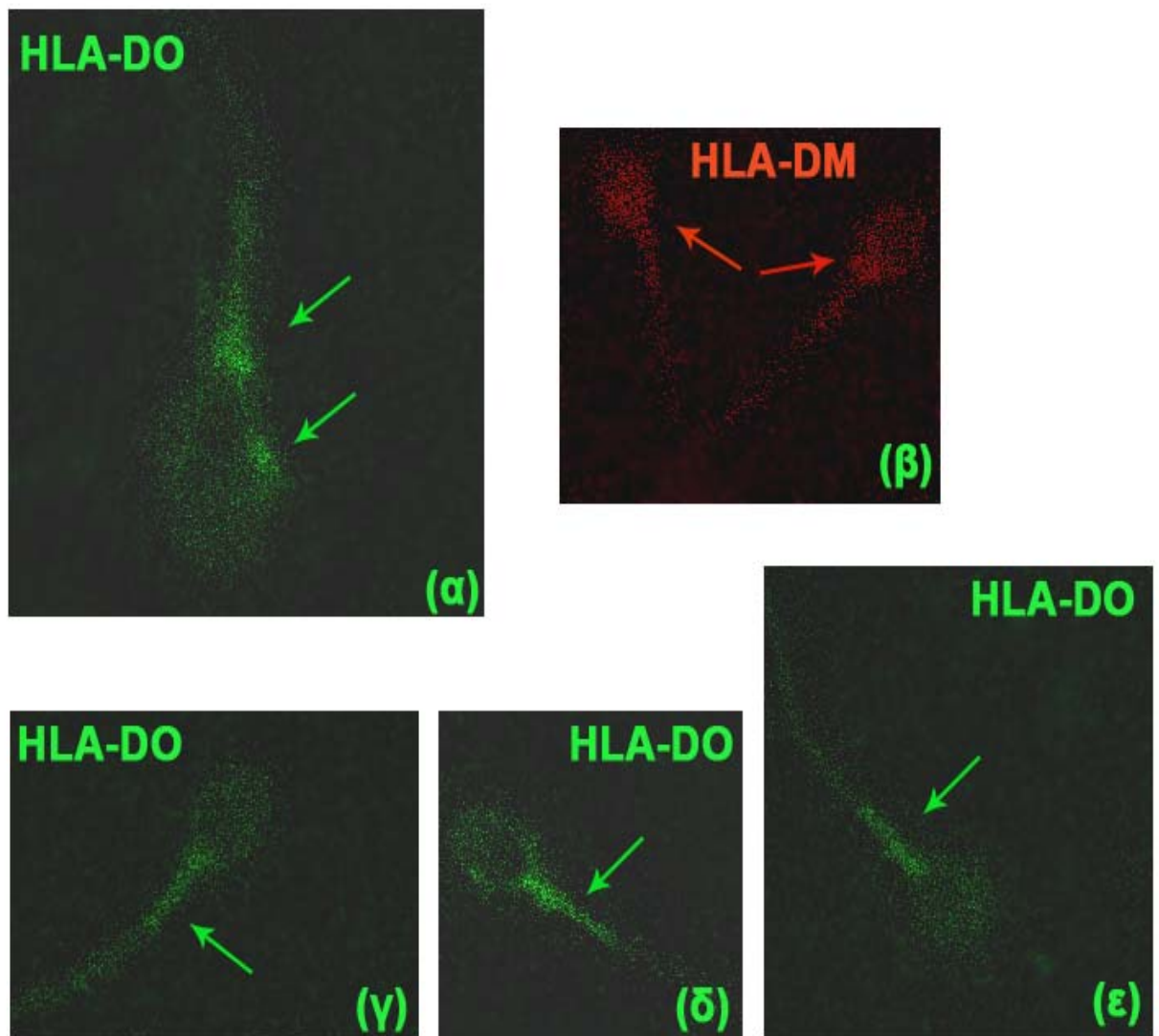
Συνοψίζοντας, τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τον ανοσοφθορισμό είναι τα εξής:

- Όπως φαίνεται και από το διάγραμμα 6 που ακολουθεί, τα δείγματα της ομάδας 1 (control), παρουσιάζουν μέτρια έκφραση του DR_{εξωτερικό}, DR_{εσωτερικό} και DO και χαμηλή έκφραση του DM και CD74. Θεωρώντας ότι τα δείγματα αυτά αντιπροσωπεύουν τα φυσιολογικά δείγματα, συμπεραίνουμε ότι τα σπερματοζωάρια εκφράζουν τάξης II αντιγόνα ιστοσυμβατότητας, κλασσικά και μη κλασσικά.
- Η ομάδα 2 εμφανίζει παρόμοιο πρότυπο έκφρασης με τα δείγματα control με μικρές ανοδικές αποκλίσεις.
- Η ομάδα 3, δεν εκφράζει DR_{εξωτερικό} και CD74, ενώ παρουσιάζει μικρή έκφραση DR_{εσωτερικό}, μέτρια DM και DO. Η αρνητική έκφραση των δύο αντιγόνων, φαίνεται να επηρεάζει την ποιότητα του σπέρματος σε μικρό βαθμό.
- Πολύ υψηλή έκφραση του DR_{εξωτερικό} και DR_{εσωτερικό}, εμφανίζουν τα δείγματα της ομάδας 4, ενώ τα ίδια δείγματα παρουσιάζουν μέτρια έκφραση του DM, DO και CD74. Η αυξημένη έκφραση των αντιγόνων, συμβαδίζει με την πτώση της ποιότητας του σπέρματος και επηρεάζει ιδιαίτερα τον αριθμό και την κίνηση των σπερματοζωαρίων.
- Η ομάδα 5 εμφανίζει μηδενική έκφραση όλων των αντιγόνων πλην του DM. Ενώ ποιοτικά βρίσκεται πολύ κοντά με την ομάδα 4, η διαφορά στην έκφραση είναι δυνατόν να οφείλεται στην πτώση διαφορετικών παραμέτρων.
- Τέλος, η ομάδα 6, συμφωνεί με την ομάδα 4, γεγονός που επιβεβαιώνει ότι η άνοδος στην έκφραση των συγκεκριμένων αντιγόνων ιστοσυμβατότητας, συμβαδίζει με την πτώση της ποιότητας του σπέρματος.
- Τα δείγματα 11, 21, 23 και 20, δεν συμπεριλήφθηκαν στην ομαδοποίηση, αφού ήταν οριακά στην αξιολόγηση του σπερμοδιαγράμματος και το γεγονός αυτό επιβεβαιώθηκε και με τη μέτρηση της έκφρασης των τάξης II, η οποία και στις τέσσερις αυτές ομάδες βρισκόταν ανάμεσα στις δύο γειτονικές ομάδες.



Διάγραμμα 6. Συνολικά αποτελέσματα ανοσοφθορισμού έκφρασης τάξης II αντιγόνων ιστοσυμβατότητας και CD74 στις διάφορες ομάδες δειγμάτων

- Από σχετικές στατιστικές δοκιμασίες που πραγματοποιήθηκαν, υπήρξε υψηλός δείκτης συσχέτισης ανάμεσα στις ομάδες και στην έκφραση των αντιγόνων ιστοσυμβατότητας που μελετήθηκαν ($R^2 > 0,5$).
- Η παρουσία ή απουσία και ο βαθμός έκφρασης των παραπάνω αντιγόνων, σχετίζεται με τη μείωση της ποιότητας του σπέρματος.
- Η χρήση ειδικών αντισωμάτων, βοήθησε στον εντοπισμό του DR στην ακροσωμιακή μεμβράνη του σπερματοζωαρίου, του DM και του DO στην κεφαλή και στον αυχένα. Χαρακτηριστικές εικόνες από συνεστιακό μικροσκόπιο, φαίνονται παρακάτω (εικόνα 13).



Εικόνα 13. Παρατήρηση κεχρωσμένων σπερματοζωαρίων με ειδικά αντισώματα, με τη βοήθεια συνεστιακού μικροσκοπίου (confocal). α, γ, δ και ε, τα κύτταρα αρχικά επωάστηκαν με ειδικό DO και στη συνέχεια σημάθηκαν με δεύτερο αντίσωμα FITC. Στις εικόνες, φαίνεται ο εντοπισμός του HLA-DO στον αυχένα και στην κυτταροπλασματική σταγόνα του σπερματοζωαρίου. β, τα κύτταρα επωάστηκαν με συνδεδεμένο αντίσωμα DM-PE. Στην εικόνα, φαίνεται ο εντοπισμός του HLA-DM στην κεφαλή και στον αυχένα του σπερματοζωαρίου.

3.2 Ανίχνευση των μεταγράφων των α και β γονιδίων των DR, DM, DO και CD74

Η reverse transcription PCR (RT-PCR), είναι μία τεχνική η οποία χρησιμοποιείται για την ανίχνευση των μεταγράφων mRNA τα οποία μας ενδιαφέρουν και μας δίνει και μία αδρή εκτίμηση της ποσότητας αυτών των μεταγράφων. Είναι δυνατόν σε ένα κύτταρο να υπάρχει το μετάγραφο ενός γονιδίου, το οποίο να μην αντιστοιχεί σε μεταφρασμένη πρωτεΐνη. Αυτό μπορεί να συμβεί για διάφορους λόγους και σε διάφορα επίπεδα, όπως είναι οι μεταγραφικές και μεταφραστικές τροποποιήσεις.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η ανίχνευση των μεταγράφων των α και β αλυσίδων των DR, DM, DO και CD74 και η συσχέτιση της παρουσίας τους με την παρουσία των αντίστοιχων πρωτεϊνών που ανιχνεύθηκαν μέσω του ανοσοφθορισμού, όπως αναλύθηκε στην προηγούμενη ενότητα. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκαν αντιπροσωπευτικά δείγματα από κάθε ομάδα και ακολουθήθηκε η πειραματική διαδικασία όπως περιγράφηκε στην ενότητα 2.6.

Για την εκτίμηση των αποτελεσμάτων των PCR, φτιάχτηκε ο πίνακας 3 που ακολουθεί, στον οποίο φαίνονται τα μετάγραφα τα οποία ανιχνεύονται. Σε πολλές περιπτώσεις, ανιχνεύτηκε εκτός από το αναμενόμενο μετάγραφο (ανάλογα με τον primer που χρησιμοποιήθηκε) και μη αναμενόμενο μετάγραφο. Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων ανιχνεύτηκε γενωμικό DNA, ενώ λίγες ήταν οι περιπτώσεις που ανιχνεύτηκε μόνο το αναμενόμενο ώριμο DNA. Στον πίνακα, φαίνεται ποιες είναι αυτές οι περιπτώσεις και τι ανιχνεύεται σε κάθε περίπτωση, σε σχέση με τις αλυσίδες των αντιγόνων που μελετάμε. Τα δείγματα είναι τοποθετημένα σε σειρά από το δείγμα με την καλύτερη ποιότητα, μέχρι το δείγμα με την πιο χαμηλή ποιότητα σπέρματος, σύμφωνα με την εκτίμηση των αντίστοιχων σπερμοδιαγραμμάτων η οποία έχει προηγηθεί. Τα συμπεράσματα τα οποία προκύπτουν από την εκτίμηση του πίνακα 3 είναι τα εξής:

Πίνακας 3. Αποτελέσματα PCR. Ανίχνευση των αναμενόμενων και μη μεταγράφων στις PCR των αντιπροσωπευτικών δειγμάτων, που πραγματοποιήθηκαν.

		PCR													
Δείγμα		DRa		DRb		DMa		DMb		DOa		DOb		CD74	
		K	Γ	K	Γ	K	Γ	K	Γ	K	Γ	K	Γ	K	Γ
	10		•		•		••				•				••
Protein		+				--				+				--	
	30	•	•	•	••		•	•			•	•		•	••
Protein		+				+				+				+	
	11		•								•				•
Protein		--				--				+				--	
	8		•	•				•			•				•
Protein		+				+				+				--	
	18		•	•				•			•				•
Protein		+				+				+				--	
	6		•			•		•			•	•	••		•
Protein		+intra				+				+				--	
	24	•	•		•	•		•			•	•		•	
Protein		--				+				+/-				--	

• αναμενόμενο μετάγραφο

• μη αναμενόμενο μετάγραφο

K: ώριμο μετάγραφο

Γ: γενωμικό μετάγραφο

- Το γενωμικό μετάγραφο της DRa αλυσίδας, ανιχνεύτηκε σε όλα τα δείγματα τα οποία μελετήθηκαν. Το ώριμο μετάγραφο της ίδιας αλυσίδας, ανιχνεύτηκε μόνο στα δείγματα 30 και 24. Στα δείγματα αυτά, ανιχνεύτηκε επίσης ώριμο μετάγραφο του CD74, γεγονός που δηλώνει ότι η έκφραση του CD74 είναι απαραίτητη για την εμφάνιση της α αλυσίδας του DR. Η ανίχνευση του γενωμικού DRb το οποίο ανιχνεύτηκε στα δείγματα 10, 30 και 24, φαίνεται επίσης να επηρεάζεται από την ανίχνευση ώριμου CD74. Τέλος, η ύπαρξη του γενωμικού CD74 είναι απαραίτητη για την ανίχνευση του DRa, αφού όπως προκύπτει από τον πίνακα, σε όλα τα δείγματα ανιχνεύτηκε επίσης γενωμικό CD74.
- Το ώριμο DRb ανιχνεύτηκε στα δείγματα 30, 8 και 18. Από τον πίνακα φαίνεται, ότι για τη μετάφραση σε πρωτεΐνη απαραίτητες είναι και οι δύο αλυσίδες του DR. Η παρουσία όμως της πρωτεΐνης στην επιφάνεια του κυττάρου δεν απαιτεί την παρουσία ώριμου μεταγράφου της μίας από τις δύο αλυσίδες. Η παρουσία γενωμικού DRa επιτρέπει την εμφάνιση της πρωτεΐνης στη μεμβράνη, ενώ DRb αλυσίδα είναι απαραίτητη για την εμφάνιση της πρωτεΐνης στη μεμβράνη, αλλά όχι για την παραμονή της στα ενδοκυττάρια διαμερίσματα.
- Το γενωμικό DMa ανιχνεύτηκε στις ομάδες 10 και 30, οι οποίες εμφάνισαν και την καλύτερη ποιότητα σπέρματος, ενώ το ώριμο DMa ανιχνεύτηκε στις ομάδες 6 και 30 με την χαμηλότερη ποιότητα σπέρματος. Το γεγονός αυτό μπορεί να σημαίνει ότι ο ρόλος του DM είναι βασικός στον καθορισμό της ποιότητας του σπέρματος. Επίσης, ώριμο DMb ανιχνεύτηκε σε όλα τα δείγματα, επομένως ο ρόλος του μπορεί να είναι συμπληρωματικός με αυτόν του CD74 στην εμφάνιση του DR.
- Η παρουσία της πρωτεΐνης DM, από ότι φαίνεται στον πίνακα, απαιτεί την ανίχνευση του ώριμου DMb μεταγράφου. Ως εκ τούτου το DM δίνει ανιχνεύσιμη πρωτεΐνη ακόμη και αν εκφράζεται ώριμο μετάγραφο της μίας μόνο αλυσίδας. Στις περιπτώσεις που απουσιάζει το DM, όπως παρατηρήθηκε στο δείγμα 11, δεν έχουμε παρουσία της DR πρωτεΐνης, ούτε στο εξωτερικό ούτε στο εσωτερικό του κυττάρου.
- Το γενωμικό DOa είναι παρών σε όλα τα δείγματα τα οποία μελετήθηκαν. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνει την αλληλεπίδραση του DO με το CD74, και δείχνει ότι η παρουσία της πρωτεΐνης καθορίζεται από την α αλυσίδα. Παρόλο που το αντίσωμα ανιχνεύει την DOβ αλυσίδα, η έκφραση εσωνίων στην DOa αλυσίδα επιτρέπει την αναγνώρισή της από το αντίσωμα που διατίθεται. Αντίθετα, η ώριμη DOb αλυσίδα, ανιχνεύτηκε μόνο στα δείγματα 6 και 24, τα οποία εμφάνιζαν πολύ χαμηλή ποιότητα σπέρματος. Ως εκ

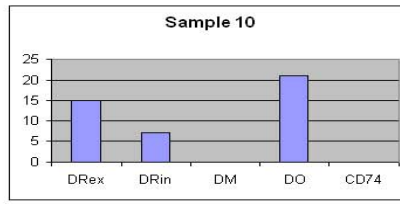
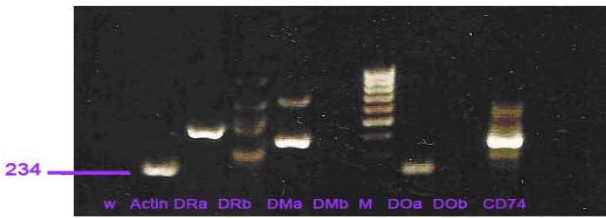
τούτου, και η παρουσία του DOb θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης της ποιότητας του σπέρματος. Επιπλέον φαίνεται ότι η έκφραση της DOb αλυσίδας αποτρέπει την εμφάνιση της πρωτεΐνης DR στην μεμβράνη.

- Όπως έχει ήδη αναφερθεί παραπάνω, το γενωμικό CD74 είναι παρών σε όλα τα δείγματα, ενώ το ώριμο μετάγραφό του, εμφανίζεται μόνο στα δείγματα 30 και 24. Το γεγονός αυτό, μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η παρουσία του γενωμικού CD74 αποτρέπει την παραγωγή ανιχνεύσιμης πρωτεΐνης, ενώ η παρουσία της πρωτεΐνης συμβαδίζει με την ανίχνευση του ώριμου μετάγραφου του CD74.

Στην παρακάτω εικόνα 14, φαίνονται τα αποτελέσματα των PCR που πραγματοποιήθηκαν στα αντιπροσωπευτικά δείγματα. Στην ίδια εικόνα, τα αποτελέσματα αυτά συγκρίνονται με τα αντίστοιχα που προέκυψαν από τον ανοσοφθορισμό και με την ποιότητα του σπέρματος για κάθε παράμετρο του σπερμοδιαγράμματος χωριστά. Τα συμπεράσματα που προκύπτουν είναι τα εξής:

- Από τα δείγματα 10 και 6, προκύπτει ότι η μέτρια μορφολογία των σπερματοζωαρίων, σχετίζεται με την παρουσία γενωμικού DRb.
- Τα δείγματα 8 και 18 είχαν πολύ καλή κίνηση, ενώ εμφάνιζαν μέτρια ζωτικότητα και συγκέντρωση. Τα δείγματα αυτά μαζί με το 30 που εμφάνιζε επίσης καλή κίνηση, χαρακτηρίζονται από την παρουσία ώριμου DRb, το οποίο φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην κίνηση των σπερματοζωαρίων. Το DRb αναφέραμε παραπάνω ότι είναι υπεύθυνο για την έκφραση της μεμβρανικής DR πρωτεΐνης, γεγονός που σημαίνει ότι η παρουσία της πρωτεΐνης αυτής στην επιφάνεια του κυττάρου, συμβάλλει στην γραμμική και ταχεία προωθητική κίνηση του σπερματοζωαρίου.
- Στα δείγματα 6 και 24, ανιχνεύτηκε γενωμικό DMa, η παρουσία του οποίου φαίνεται να επηρεάζει αρνητικά τη συγκέντρωση των σπερματοζωαρίων. Τα δείγματα αυτά, παρουσίασαν τις χαμηλότερες τιμές στην συγκέντρωση των σπερματοζωαρίων.
- Η ζωτικότητα των σπερματοζωαρίων δε φαίνεται να συνδέεται άμεσα με την ανίχνευση κάποιας ή κάποιων από τις αλυσίδες τις οποίες μελετάμε.
- Τέλος, η συνολική εικόνα του σπερμοδιαγράμματος, φαίνεται να επηρεάζεται από την παρουσία του DOb το οποίο ανιχνεύεται στα δείγματα με πολύ χαμηλή ποιότητα, όπως συμβαίνει και με την παρουσία του ώριμου DMa. Αντίθετα, το γενωμικό DMa ανιχνεύεται στα δείγματα με πολύ καλή ποιότητα σπέρματος.

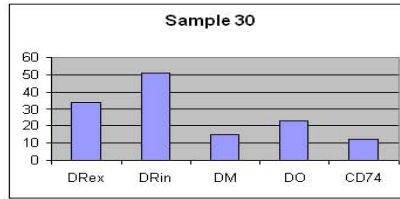
Δείγμα 10



Συγκ.	Κιν.	Ζωτ.	Μορφ.
Κ	ΠΚ	ΠΚ	Μ

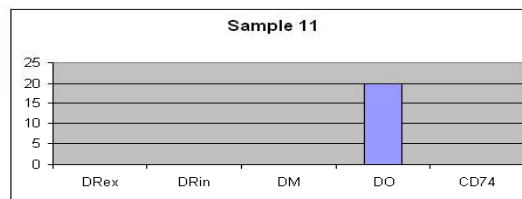
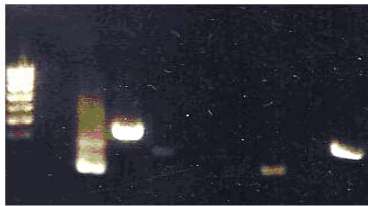
	Exons	Ex-In
Actin	234	
DRα	164	453
DRβ	231	931
DMα	239	450
DMβ	162	1701
DOα	142	237
DOβ	180	666
CD74	180	371

Δείγμα 30



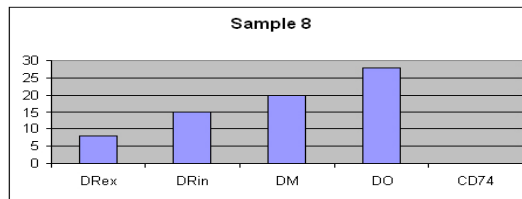
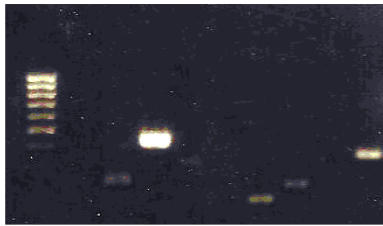
Συγκ.	Κιν.	Ζωτ.	Μορφ.
ΠΚ	Κ	Κ	ΠΚ

Δείγμα 11



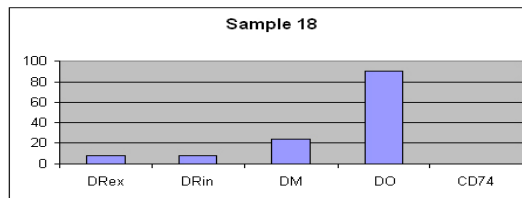
Συγκ.	Κιν.	Ζωτ.	Μορφ.
ΠΚ	Κ	Κ	ΠΚ

Δείγμα 8



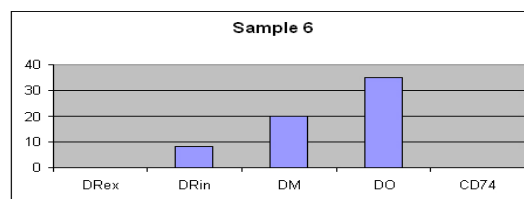
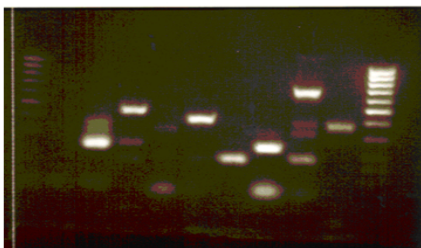
Συγκ.	Κιν.	Ζωτ.	Μορφ.
Μ	ΠΚ	Μ	ΠΚ

Sample 18



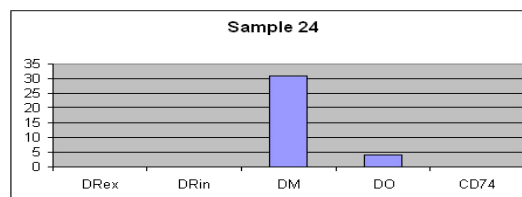
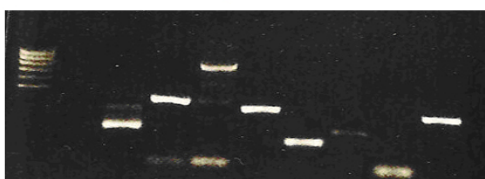
Συγκ.	Κιν.	Ζωτ.	Μορφ.
Ο	ΠΚ	Κ	Κ

Sample 6



Συγκ.	Κιν.	Ζωτ.	Μορφ.
ΚΚ	Κ	Μ	ΠΚ

Sample 24



Συγκ.	Κιν.	Ζωτ.	Μορφ.
ΚΚ	ΚΚ	ΚΚ	Κ

Εικόνα 14. Σύγκριση αποτελεσμάτων PCR, με τα αποτελέσματα του ανοσοφθορισμού και την ποιότητα του σπέρματος όπως προέκυψε από την εκτίμηση των σπερμοδιαγραμμάτων.

Τα παραπάνω αποτελέσματα μας οδηγούν στο συμπέρασμα, ότι τα αποτελέσματα του ανοσοφθορισμού δεν ταυτίζονται σε όλες τις περιπτώσεις με αυτά των PCR. Για την εμφάνιση κάποιας πρωτεΐνης MHC τάξης II στο εσωτερικό ή στην επιφάνεια του κυττάρου, δεν είναι απαραίτητη η ύπαρξη ώριμου μετάγραφου της μίας ή και των δύο αλυσίδων. Το σπέρμα, φαίνεται να ακολουθεί διαφορετικούς κανόνες ρύθμισης σε σχέση με τα μέχρι τώρα γνωστά συστήματα έκφρασης. Η εικόνα των αποτελεσμάτων που παρουσιάζονται υποδεικνύει ότι υπάρχει αλληλεπίδραση και ρύθμιση μεταξύ των διαφόρων μεταγράφων των κλασικών και μη κλασικών τάξης II αντιγόνων ιστοσυμβατότητας και του CD74, το οποίο όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα, κατέχει ρόλο κλειδί στη ρύθμιση της έκφρασης των αντιγόνων ιστοσυμβατότητας τάξης II.

3.3 Ανίχνευση φλεγμονωδών (IL-2, IL-6, IFN-γ, TNF-α) και αντιφλεγμονωδών (IL-4, IL-10) κυτοκινών στο σπερματικό πλάσμα

Ο βασικός μηχανισμός προστασίας των σπερματοζωαρίων απέναντι στην παρουσία «ξένων εισβολέων», αλλά και απέναντι στην εκδήλωση αυτοάνοσης αντίδρασης, όπως αναφέρθηκε αναλυτικότερα στην εισαγωγή, είναι ο αιματοορχικός φραγμός. Οι κυτοκίνες, εκκρίνονται από διάφορους τύπους κυττάρων της γεννητικής οδού στον άνδρα και ανιχνεύονται στο σπερματικό πλάσμα, όπου η παρουσία τους μαζί με άλλους χυμικούς διαμεσολαβητές, λειτουργεί βοηθητικά στο ρόλο του αιματοορχικού φραγμού.

Τα επίπεδα των κυτοκινών στο σπερματικό πλάσμα δεν αποτελούν μόνο μέτρηση της συγκέντρωσης των κυτοκινών αυτών στο σπερματικό πλάσμα, αλλά αντανακλούν και στις διαφορετικές αλληλεπιδράσεις των κυτοκινών αυτών με τα σπερματοζωάρια. Επίσης, παρέχουν πρόσθετες πληροφορίες για την ανδρική υπογονιμότητα και για την επίδρασή τους στην πορεία του σπερματοζωαρίου προς τον θηλυκό γαμέτη. Αυξημένη έκκριση κάποιων κυτοκινών στο σπερματικό πλάσμα, σε συνδυασμό με την ανίχνευση του αντίστοιχου υποδοχέα, αυξάνει την παραγωγή ελεύθερων ριζών στο σπέρμα, επιδρά στις παραμέτρους του σπέρματος και μεταβάλλει την ποιότητά του.

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιείται μέτρηση των επιπέδων των φλεγμονωδών IL-2, IL-6, IFN- γ , TNF- α και αντιφλεγμονωδών IL-4, IL-10 κυτοκινών. Η μέτρηση αυτή πραγματοποιείται με την τεχνική της ELISA, σύμφωνα με την πειραματική διαδικασία που περιγράφεται στην ενότητα 2.8. Η ομαδοποίηση των δειγμάτων είναι ίδια με αυτήν του ανοσοφθορισμού (ενότητα 3.1) και οι τιμές που προέκυψαν από τη φωτομέτρηση των δειγμάτων, φαίνονται στον πίνακα 3.

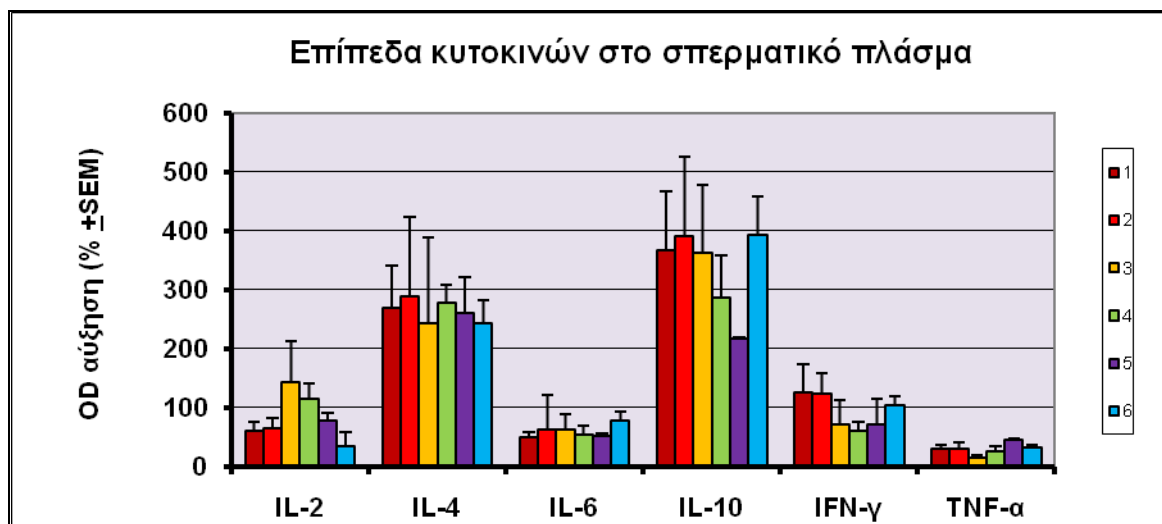
Τα συμπεράσματα που προκύπτουν από την ανάλυση των αποτελεσμάτων, είναι τα εξής:

- Τα δείγματα της ομάδας 1 παρουσιάζουν μία μικρή έκφραση των φλεγμονωδών κυτοκινών, γενικότερα. Η IL-2 και η IL-6, βρίσκονται στα ίδια επίπεδα, ενώ η IFN- γ , φαίνεται να ανιχνεύεται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις. Τέλος, ο TNF- α , βρίσκεται σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις στην ομάδα αυτή. Στην ίδια ομάδα, η έκκριση των αντιφλεγμονωδών κυτοκινών είναι πολύ μεγαλύτερη αυτής των φλεγμονωδών, με μεγαλύτερη την έκκριση της IL-10.
- Τα δείγματα της ομάδας 2, η οποία βρίσκεται πολύ κοντά σε βαθμούς με την ομάδα 1 και έχει δείγματα καλής ποιότητας, εμφανίζουν παραπλήσιες συγκεντρώσεις με τα δείγματα της ομάδας 1 τόσο στις φλεγμονώδεις όσο και στις αντιφλεγμονώδεις κυτοκίνες. Το γεγονός αυτό, υποδηλώνει ότι τα επίπεδα των συγκεκριμένων κυτοκινών, για δείγματα σπέρματος καλής ποιότητας, είναι σύμφωνα με τα επίπεδα τα οποία ανιχνεύτηκαν στις ομάδες 1 και 2.
- Στην ομάδα 3, παρατηρούμε μία αύξηση στα επίπεδα της IL-2 κατά 136% ($p < 0.001$) σε σχέση με την ομάδα 1, η οποία όμως δεν συνοδεύεται και από αύξηση στις υπόλοιπες φλεγμονώδεις κυτοκίνες. Αντίθετα, η IFN- γ και ο TNF- α , παρουσιάζουν μείωση κατά 43% ($p < 0.005$) και 55% ($p < 0.001$) σε σύγκριση με τα αντίστοιχα επίπεδα της ομάδας 1, ενώ η IL-6 κυμαίνεται στα ίδια ακριβώς επίπεδα με την ομάδα control. Όσον αφορά στις αντιφλεγμονώδεις κυτοκίνες IL-4 και IL-10 οι διαφορές που παρατηρούνται σε σχέση με την ομάδα 1 δεν είναι στατιστικά σημαντικές. Η αύξηση των επιπέδων της IL-2 σε συνδυασμό με την πτώση των επιπέδων της IL-4, θα μπορούσε να συσχετιστεί με την πτώση της ποιότητας του σπέρματος.

Πίνακας 3. Επίπεδα κυτοκινών στο σπερματικό πλάσμα, σε σχέση με τον αριθμό του δείγματος, τους βαθμούς του σπερμοδιαγράμματος και τον αριθμό της ομάδας

A.Δ	Βαθμοί	Ομάδα	IL-2	IL-4	IL-6	IL-10	IFN-γ	TNF-α
10	4,5	1	62	246	35	299	109	51
30	4,25	1	46	326	53	525	185	26
11	4,5	-	76	238	58	281	85	16
8	4	2	38	123	41	347	54	49
26	3,75	2	42	141	62	198	96	28
35	3,75	2	76	255	126	424	124	37
18	3,75	2	76	451	28	396	153	22
33	3,5	2	92	468	58	586	190	7
21	3,25	-	238	152	40	206	44	10
6	3,25	3	116	128	101	395	40	10
31	3,25	3	79	449	46	486	130	21
23	3	-	151	253	50	187	42	15
34	3	4	96	260	33	326	72	22
40	3	4	98	320	75	350	70	38
20	2	-	-	-	-	-	-	-
19	2	5	91	200	57	213	116	49
24	2	5	65	322	45	219	29	42
25	1,5	6	11	203	62	308	119	28
27	1,25	6	59	283	93	438	87	36
28	1,75	6	30	324	25	602	167	39

- Στην ομάδα 4, παρατηρείται όπως και στην ομάδα 3, αύξηση στα επίπεδα της IL-2 κατά 88% ($p < 0.001$), μείωση κατά 52% ($p < 0.001$) στα επίπεδα της IFN- γ , ενώ η IL-6 και ο TNF- α , παραμένουν στα ίδια επίπεδα με την ομάδα 1. Η έκκριση συνολικά των φλεγμονωδών κυτοκινών, βρίσκεται στα ίδια επίπεδα με τη «γειτονική» ομάδα 3. Σε αυτή την ομάδα, η IL-4 επανέρχεται στα επίπεδα της ομάδας 1, ενώ η IL-10 παρουσιάζει πτώση κατά 22% ($p < 0.005$). Η αιτιολόγηση, θα μπορούσε να είναι ίδια με της ομάδας 3, αφού οι διαφορές των δύο ομάδων σε βαθμούς και κατ' επέκταση στην ποιότητα του σπέρματος, είναι πολύ μικρές.
- Η ομάδα 5, όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα του παραπάνω πίνακα, παρουσιάζει μείωση των επιπέδων της IFN- γ (43%, $p < 0.005$) και αύξηση του TNF- α (45%, $p < 0.005$). Τα επίπεδα των υπόλοιπων φλεγμονωδών κυτοκινών είναι ίδια με αυτά της ομάδας 1. Σε αυτή την ομάδα, η IL-4 βρίσκεται στα ίδια επίπεδα, ενώ τα επίπεδα της IL-10 παρουσιάζουν 41% πτώση ($p < 0.005$). Οι αποκλίσεις που παρατηρούνται στα επίπεδα της IL-2, του TNF- α και ιδιαίτερα η πτώση της IL-10, συμβαδίζει με την πτώση στις παραμέτρους του σπέρματος.
- Τέλος, στην ομάδα 6, παρατηρούμε μείωση των επιπέδων της IL-2 (43%, $p < 0.005$), αύξηση της IL-6 (57%, $p < 0.001$), ενώ η IFN- γ και ο TNF- α κυμαίνονται στα ίδια επίπεδα με τις αντίστοιχες κυτοκίνες στην ομάδα 1. Οι αντιφλεγμονώδεις κυτοκίνες (IL-4 και IL-10) σε αυτή την ομάδα, εκκρίνονται σε παραπλήσιες συγκεντρώσεις με τα δείγματα που ορίσαμε ως control.



Διάγραμμα 7. Συνολικά αποτελέσματα επιπέδων φλεγμονωδών και αντιφλεγμονωδών κυτοκινών στο σπερματικό πλάσμα, στις διάφορες ομάδες δειγμάτων

- Γενικότερα, στα δείγματα που μελετήθηκαν, παρατηρήθηκε μεγαλύτερη έκκριση των αντιφλεγμονωδών κυτοκινών σε σύγκριση με την έκκριση των φλεγμονωδών.
- Η γενικότερη δράση των κυτοκινών και η αλληλεπίδρασή τους με τα σπερματοζώαρια, δεν εξαρτάται μόνο από τις συγκεντρώσεις τους στο σπερματικό πλάσμα, αλλά και από την ύπαρξη και τη συγκέντρωση των αντίστοιχων υποδοχέων τους. Η δράση των κυτοκινών στις περισσότερες περιπτώσεις είναι συνδυαστική με τη δράση άλλων κυτοκινών, ή άλλων παραγόντων που ανιχνεύονται στο σπερματικό πλάσμα. Επομένως η παρουσία τους, θα μπορούσε να είναι αποτέλεσμα ύπαρξης ή αλληλεπίδρασης με άλλους παράγοντες (π.χ. λευκά αιμοσφαίρια, υποδοχείς κυτοκινών, αντιγόνα ιστοσυμβατότητας, κ.α.).

3.4 Ανίχνευση των διαλυτών sMHC I και sMHC II στο σπερματικό πλάσμα

Τα αντιγόνα ιστοσυμβατότητας, είναι πρωτεΐνες τις οποίες τις συναντάμε κυρίως στην επιφάνεια ή στο εσωτερικό των κυττάρων στα οποία εκφράζεται. Παρόλα αυτά, σε πολλούς τύπους κυττάρων έχουν ανιχνευτεί αντιγόνα ιστοσυμβατότητας τάξης I και τάξης II στην εκκρινόμενη μορφή τους.

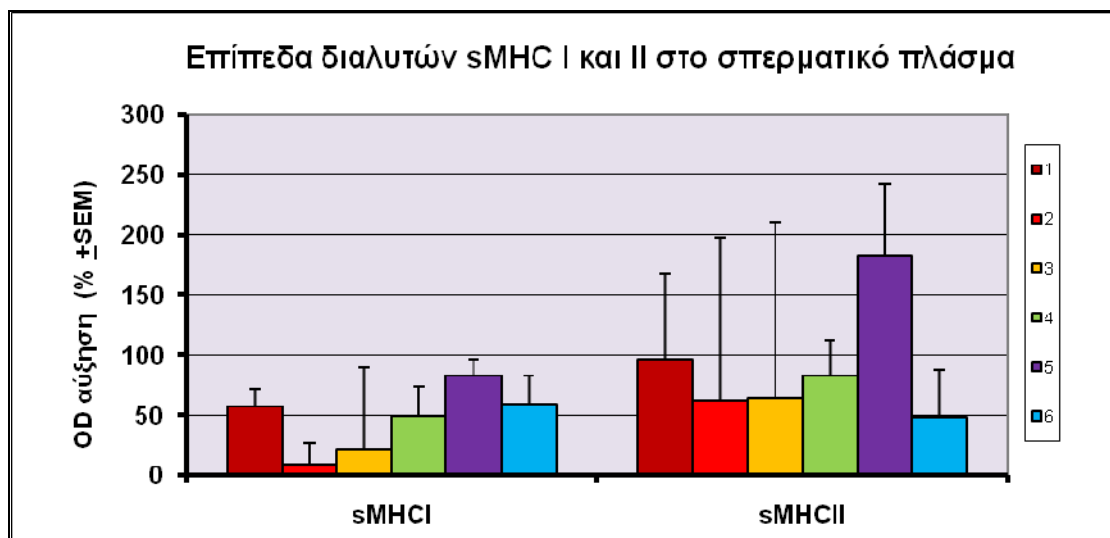
Στην παρούσα εργασία, ελέγξαμε την παρουσία διαλυτής μορφής τάξης I και τάξης II αντιγόνων ιστοσυμβατότητας, με τη βοήθεια ειδικών αντί-τάξης I και αντί-τάξης II αντισωμάτων αντίστοιχα και με βάση την τεχνική της ELISA όπως αναφέρθηκε στην ενότητα 2.8. Τα αποτελέσματα, παρουσιάζονται στον πίνακα 4.

- Όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα του πίνακα, στο σπερματικό πλάσμα ανιχνεύονται διαλυτά sMHC I σε μικρές συγκεντρώσεις. Η ομάδα 5 εμφανίζει τη μεγαλύτερη συγκέντρωση διαλυτών sMHC I, (αύξηση κατά 51% σε σύγκριση με την ομάδα 1, $p < 0.005$), ενώ η ομάδα 2 τη μικρότερη (μείωση κατά 84% σε σύγκριση με την ομάδα 1, $p < 0.001$).
- Τα χαμηλά επίπεδα διαλυτών τάξης I αντιγόνων ιστοσυμβατότητας, επιβεβαιώνουν τη θεωρία, που θέλει να απουσιάζουν τα MHC I από τα σπερματοζώαρια και κατ' επέκταση από το σπερματικό πλάσμα, σε συγκεκριμένα στάδια της εξέλιξής τους.

Πίνακας 4. Επίπεδα διαλυτών sMHC I και II στο σπερματικό πλάσμα, σε σχέση με τον αριθμό δείγματος, την ομάδα και τους βαθμούς του σπερμοδιαγράμματος

A.Δ	Βαθμοί	Ομάδα	sMHC I	sMHC II
10	4,5	1	68	105
30	4,25	1	34	62
11	4,5	-	50	116
8	4	2	78	102
26	3,75	2	5	54
35	3,75	2	5	52
18	3,75	2	5	82
33	3,5	2	23	62
21	3,25	-	13	63
6	3,25	3	24	70
31	3,25	3	30	61
23	3	-	61	100
34	3	4	1	33
40	3	4	85	117
20	2	-	-	-
19	2	5	101	173
24	2	5	66	192
25	1,5	6	60	22
27	1,25	6	59	75
28	1,75	6	23	116

- Τα διαλυτά sMHC II ανιχνεύονται σε σαφώς υψηλότερες συγκεντρώσεις στο σπερματικό πλάσμα. Τα επίπεδα τους, ακολουθούν τα επίπεδα των sMHC I στις αντίστοιχες ομάδες. Έτσι, η ομάδα 5 παρουσιάζει τις υψηλότερες συγκεντρώσεις sMHC II, (αύξηση κατά 89% σε σύγκριση με την ομάδα 1, $p < 0.001$), ενώ η ομάδα 2 τις μικρότερες συγκεντρώσεις (μείωση κατά 35% σε σύγκριση με την ομάδα 1, $p < 0.005$).
- Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα του ανοσοφθορισμού με αυτά των διαλυτών τάξης II αντιγόνων ιστοσυμβατότητας, προκύπτει το συμπέρασμα ότι τα τελευταία δεν ακολουθούν πρότυπο έκκρισης που συμβαδίζει πάντα με το πρότυπο έκφρασης των τάξης II στα κύτταρα. Έτσι, ενώ στις ομάδες 1 και 2 οι οποίες εμφανίζουν και την καλύτερη ποιότητα σπέρματος, συμφωνούν τα αποτελέσματα του ανοσοφθορισμού με αυτά των διαλυτών τάξης II, δε συμβαίνει το ίδιο και με τις υπόλοιπες ομάδες. Τη μεγαλύτερη απόκλιση παρουσιάζει η ομάδα 5, στην οποία ανιχνεύονται τα υψηλότερα επίπεδα διαλυτών τάξης II, κάτι που δεν αντιστοιχεί στα αποτελέσματα του ανοσοφθορισμού, όπου παρατηρείται η μικρότερη έκφραση των τάξης II.
- Τέλος, δεν παρατηρείται κάποια συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα των κυτοκινών και των διαλυτών τάξης I και τάξης II αντιγόνων ιστοσυμβατότητας.



Διάγραμμα 8. Συνολικά αποτελέσματα επιπέδων διαλυτών sMHC I και II στο σπερματικό πλάσμα, στις διάφορες ομάδες

Κεφάλαιο 4 – Συζήτηση

4.1 Γενικά

Η αναπαραγωγή είναι ένα απ' τα σημαντικότερα γεγονότα της ζωής. Αντικατοπτρίζει όχι μόνο την προσωπική ανάγκη και δικαίωμα του κάθε ανθρώπου για τη δημιουργία οικογένειας, αλλά αποτελεί και τον συνδεδετικό κρίκο ανάμεσα στο παρελθόν, το παρόν και το μέλλον του ανθρώπινου είδους, αλλά και κάθε είδους σε αυτό τον πλανήτη. Μπορεί κανείς να αναλογιστεί λοιπόν τη σπουδαιότητα μιας επιτυχούς κύησης, αλλά πολύ περισσότερο τη σπουδαιότητα της επιτυχίας της γονιμοποίησης.

Στις μέρες μας, η υπογονιμότητα είναι ένα φαινόμενο το οποίο απασχολεί ένα μεγάλο ποσοστό των νέων ζευγαριών και όχι μόνο. Η υπογονιμότητα αφορά κυρίως την αδυναμία δύο ανθρώπων να επιτύχουν αυτόματη σύλληψη, αλλά και την αδυναμία της γυναίκας να διατηρήσει μία εγκυμοσύνη. Σύμφωνα με εκτιμήσεις του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας, περίπου το 15 - 20% των ζευγαριών, δηλαδή ένα στα πέντε ζευγάρια που βρίσκονται σε αναπαραγωγική ηλικία, αντιμετωπίζει κάποιας μορφής δυσκολία στην προσπάθειά του να αποκτήσει απογόνους.

Τα αίτια της υπογονιμότητας είναι πολλά και ποικίλα και αναφέρονται σε διαφορετικά στάδια της διαδικασίας της γονιμοποίησης και της εγκυμοσύνης. Στην παρούσα εργασία γίνεται λόγος για την ανδρική υπογονιμότητα, η οποία κατέχει ένα σημαντικό ποσοστό, περίπου ισάξιο σε σχέση με αυτό που αναφέρεται στη γυναικεία υπογονιμότητα.

Το κέντρο βάρους της ανδρικής υπογονιμότητας, βρίσκεται στη διαδικασία ωρίμανσης των αρσενικών γαμετών, στην πορεία τους μέσα στο γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα και στην αλληλεπίδρασή τους με τους θηλυκούς γαμέτες. Οι μέχρι σήμερα γνωστές μελέτες, έχουν επικεντρωθεί σε αυτό κάθε αυτό το φαινόμενο της γονιμοποίησης και σε τεχνικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Τα κριτήρια σύμφωνα με τα οποία εκτιμάται η ποιότητα του σπέρματος, αναφέρονται σε παραμέτρους όπως ο αριθμός των σπερματοζωαρίων, η κίνηση, η ζωτικότητα τους και η μορφολογία τους. Κάθε μία από αυτές τις παραμέτρους εμπεριέχει σε ένα μεγάλο ποσοστό τον υποκειμενικό παράγοντα κατά την εκτίμησή τους. Το γεγονός αυτό δημιουργεί μη ενιαία και σταθερά κριτήρια για την εκτίμηση του σπέρματος και δημιουργεί ασάφειες στον χαρακτηρισμό ενός δείγματος ως υπογόνιμου και στον τρόπο αντιμετώπισής του.

Η ανοσολογία του σπέρματος είναι ένα κομμάτι της ανοσολογίας της αναπαραγωγής με εξαιρετικά μεγάλο ενδιαφέρον, το οποίο φαίνεται να ρίχνει φώς και να ερμηνεύει γεγονότα στη διαδικασία της γονιμοποίησης τα οποία μέχρι σήμερα δεν ήταν γνωστά και δεν είχαν μελετηθεί επαρκώς. Το μείζον σύμπλεγμα

ιστοσυμβατότητας φαίνεται να εμπλέκεται, όπως και σε πολλές άλλες περιπτώσεις, τόσο στη σωστή ωρίμανση του σπερματοζωαρίου μέσα στο ανδρικό γεννητικό σύστημα και στην αλληλεπίδραση του με άλλα κύτταρα της ανδρικής γεννητικής οδού, όσο και στην αλληλεπίδραση του σπερματοζωαρίου με κύτταρα της γυναικείας γεννητικής οδού και με το ίδιο το ωάριο.

4.2 Σχολιασμός αποτελεσμάτων

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η έκφραση των αντιγόνων ιστοσυμβατότητας τάξης II, κλασικών και μη κλασικών, και η συσχέτιση της παρουσίας των αντιγόνων αυτών με την ποιότητα του σπέρματος, όπως αυτή έχει εκτιμηθεί λαμβάνοντας υπόψη τις παραμέτρους του σπερμοδιαγράμματος.

Τα αποτελέσματα του ανοσοφθορισμού, έδειξαν ότι τα αντιγόνα ιστοσυμβατότητας τάξης II, φυσιολογικά εκφράζονται στο ώριμο σπέρμα. Το ποσοστό έκφρασής τους και ο συνδυασμός της παρουσίας τους διαφέρει από δείγμα σε δείγμα και φαίνεται να συνδέεται άμεσα με τις παραμέτρους του σπερμοδιαγράμματος, οι οποίες καθορίζουν την ποιότητα του σπέρματος.

Συγκεκριμένα, από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι τα σπερματοζωάρια εμφανίζουν φυσιολογικά σε μέτρια ποσότητα μεμβρανικό DR, η παρουσία του οποίου όπως αποδείχτηκε και στη συνέχεια από τις PCR σχετίζεται με την καλή κίνηση των σπερματοζωαρίων, οπότε συμβάλλει στην κατηγοριοποίηση των δειγμάτων σε αυτά με καλή ποιότητα σπέρματος. Μέτρια έκφραση του ενδοκυττάρου DR εμφάνισαν επίσης τα δείγματα με καλή ποιότητα, όπως αποδείχτηκε από τα αποτελέσματα του ανοσοφθορισμού. Μειωμένη ήταν η παρουσία του DO, στα δείγματα αυτά, του οποίου η β αλυσίδα όπως αποδείχτηκε από τις PCR σχετίζεται με την ελάττωση της ποιότητας του σπέρματος. Το DM στα δείγματα με καλή ποιότητα σπέρματος, ανιχνεύτηκε σε πολύ μικρές ποσότητες στα πειράματα ανοσοφθορισμού. Στις PCR που ακολούθησαν, προέκυψε το συμπέρασμα ότι η β αλυσίδα του DM σχετίζεται με την ελάττωση του αριθμού των σπερματοζωαρίων στο ml. Τέλος, το CD74 ανιχνεύτηκε σχεδόν σε όλα τα δείγματα, σε παραπλήσιες ποσότητες. Ο ρόλος του όπως αποδείχτηκε και στην πορεία της μελέτης είναι περισσότερο ρυθμιστικός στην έκφραση των διαφορετικών αντιγόνων, και δεν επηρεάζει άμεσα την ποιότητα του σπέρματος.

Τα αποτελέσματα του ανοσοφθορισμού μας έδωσαν την εικόνα της έκφρασης των HLA II στο εσωτερικό και στην επιφάνεια του σπερματοζωαρίου. Σύμφωνα με αυτά τα αποτελέσματα, όλα τα αντιγόνα τα οποία μελετήθηκαν ανιχνεύονται σε επίπεδο

πρωτεΐνης στο σπερματοζωάριο. Το ποσοστό έκφρασης τους και ο συνδυασμός της παρουσίας τους, επηρεάζει τις διάφορες παραμέτρους του σπέρματος και αντανakλά στη γενικότερη ποιότητα του δείγματος, χωρίς αυτό να σημαίνει ότι τα αποτελέσματα του ανοσοφθορισμού αρκούν για τη δημιουργία μετρήσιμων δεικτών που να καθορίζουν άμεσα την ποιότητα.

Συμπληρωματικά στον ανοσοφθορισμό, αξιολογήθηκαν τα αποτελέσματα από τις PCR. Σε αυτό το επίπεδο μελετήθηκε η ανίχνευση των μεταγράφων των γονιδίων των συγκεκριμένων αντιγόνων. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν σε κάποιες περιπτώσεις επιβεβαίωσαν τα αποτελέσματα του ανοσοφθορισμού, αλλά στην πλειοψηφία έδωσαν νέες πληροφορίες σχετικά με τη ρύθμιση της έκφρασης των αντίστοιχων γονιδίων. Έτσι, προέκυψε ένα νέο μοντέλο γονιδιακής ρύθμισης, το οποίο διαφέρει από τα μέχρι σήμερα γνωστά για άλλα συστήματα και περιλαμβάνει τροποποιήσεις σε επίπεδο μεταγραφής και μετάφρασης, οι οποίες δεν είναι μέχρι σήμερα γνωστές. Η εικόνα των αποτελεσμάτων που παρουσιάζονται υποδεικνύει ότι υπάρχει αλληλεπίδραση και ρύθμιση μεταξύ των διαφόρων μεταγράφων των κλασικών και μη κλασικών τάξης II αντιγόνων ιστοσυμβατότητας και του CD74. Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο, η παρουσία ώριμου φυσιολογικού μετάγραφου μιας αλυσίδας δεν είναι απαραίτητη για την εμφάνιση στο κύτταρο της αντίστοιχης πρωτεΐνης. Είναι δυνατόν η εμφάνιση της πρωτεΐνης να συνδυάζεται με την παρουσία μονάχα του αντίστοιχου γενωμικού DNA. Το γεγονός αυτό δεν ισχύει για την έκφραση όλων των αντιγόνων ιστοσυμβατότητας. Έτσι, η παρουσία γενωμικού DRa μπορεί να συνυπάρχει με την εμφάνιση της αντίστοιχης πρωτεΐνης στη μεμβράνη, ενώ η παρουσία της DRb αλυσίδας κρίνεται απαραίτητη. Για την εμφάνιση της πρωτεΐνης DM αρκεί το ώριμο μετάγραφο της μίας εκ των δύο αλυσίδων, ενώ το γενωμικό DOa επιτρέπει την έκφραση της πρωτεΐνης. Τέλος, η παρουσία του γενωμικού CD74, αποτρέπει την παρουσία της πρωτεΐνης.

Η ανίχνευση των μεταγράφων, ώριμων ή γενωμικών, των διαφόρων γονιδίων, φαίνεται να αντανakλά και σε συγκεκριμένες παραμέτρους του σπέρματος και να επηρεάζει τη γενικότερη εικόνα της ποιότητας του σπέρματος. Σύμφωνα λοιπόν με τα αποτελέσματα, η παρουσία του γενωμικού DRb, φαίνεται να επηρεάζει αρνητικά τη μορφολογία των σπερματοζωαρίων, ενώ η παρουσία ώριμου μετάγραφου της ίδιας αλυσίδας λειτουργεί θετικά όσον αφορά στην κίνηση των σπερματοζωαρίων. Η παρουσία γενωμικού DMa, επηρεάζει αρνητικά τη συγκέντρωση των σπερματοζωαρίων, ενώ η παρουσία του DOb φαίνεται να σχετίζεται με τη γενικότερη χαμηλή ποιότητα ενός δείγματος.

Σύμφωνα με τα παραπάνω μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η παρουσία των αντιγόνων ιστοσυμβατότητας τάξης II τα οποία μελετήθηκαν, επηρεάζουν τόσο άμεσα όσο και έμμεσα την ποιότητα του σπέρματος και αντανakλούν στη ρύθμιση

διαφορετικών παραμέτρων. Ο τρόπος με τον οποίο γίνεται αυτή η ρύθμιση δεν ακολουθεί κάποιο ήδη γνωστό μοντέλο. Το γεγονός αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η ανίχνευση των αντιγόνων αυτών, ιδιαίτερα σε επίπεδο γονιδίων, θα μπορούσε με ασφάλεια να χρησιμοποιηθεί για τον χαρακτηρισμό της ποιότητας του σπέρματος. Ο τρόπος αξιολόγησης ενός δείγματος σπέρματος, ο οποίος ακολουθείται μέχρι σήμερα παγκοσμίως, εμπεριέχει σε μεγάλο ποσοστό τον υποκειμενικό παράγοντα. Οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται δεν έχουν συγκεκριμενοποιηθεί και τα περιθώρια πειραματικού σφάλματος είναι μεγάλα. Επίσης, οι παράμετροι οι οποίες αξιολογούνται, είναι δυνατόν να μεταβάλλονται με το χρόνο, με την περιβαλλοντική επίδραση και με την κατάσταση του οργανισμού τη στιγμή της μέτρησης. Έτσι, οι μετρήσεις δεν αντιστοιχούν στην πραγματική εικόνα του συστήματος και παρέχουν απλά μία μέτρηση που αντιπροσωπεύει σε πολύ μικρό ποσοστό την πραγματικότητα. Αντίθετα, η χρήση των παραμέτρων που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία ως δείκτες μέτρησης ποιότητας ή και γονιμότητας του σπέρματος, θα μπορούσε να αποτελέσει μία ασφαλή μέθοδο, που θα ελαχιστοποιούσε τον υποκειμενικό παράγοντα και θα αντανάκλασε στην πραγματική εικόνα του συστήματος. Επίσης, τα περιθώρια παρέμβασης σε αυτή την περίπτωση θα ήταν μεγαλύτερα και τα αποτελέσματα μόνιμα.

Επιπλέον, η παρουσία αυξημένων επιπέδων διαλυτών τάξης I και τάξης II αντιγόνων ιστοσυμβατότητας στο σπερματικό πλάσμα συνοδεύεται από φτωχής ποιότητας σπέρμα, γεγονός που θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σαν δείκτης μέτρησης ποιότητας και γονιμότητας σπέρματος.

Τέλος, στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η παρουσία κάποιων φλεγμονωδών και αντιφλεγμονωδών κυτοκινών στο σπερματικό πλάσμα. Η παρουσία των κυτοκινών σχετίζεται με ποικίλες ανοσολογικές αποκρίσεις του οργανισμού, μεταξύ των οποίων και η αυτοανοσία. Υπάρχουν πολυάριθμες μελέτες για τη μέτρηση των κυτοκινών στο σπερματικό πλάσμα και είναι αρκετές αυτές που συσχετίζουν την παρουσία κάποια κυτοκίνης, (π.χ. TNF- α) με μία από τις παραμέτρους του σπερμοδιαγράμματος. Στη μελέτη αυτή, δείγματα με μέτρια ποιότητα σπέρματος, εμφάνισαν αυξημένα επίπεδα της IL-2 στο σπερματικό πλάσμα, σε σχέση με τους μάρτυρες. Επίσης, μειωμένη έκκριση της IL-10 συνδυάστηκε με δείγματα χαμηλής ποιότητας, ενώ τα επίπεδα της IL-6, του TNF- α και της IFN- γ , δεν συνδυάστηκαν με την ποιότητα του σπέρματος. Μετά την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων, καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι η αλληλεπίδραση των κυτοκινών με τα σπερματοζώα και η επίδραση τους στην ποιότητα του σπέρματος, δεν εξαρτάται μόνο από τη συγκέντρωσή τους στο σπερματικό πλάσμα, αλλά και στην παρουσία και την συγκέντρωση των αντίστοιχων υποδοχέων τους. Στις περισσότερες περιπτώσεις η δράση των κυτταροκινών είναι συνδυαστική με τη δράση άλλων κυτταροκινών ή άλλων παραγόντων που ανιχνεύονται στο σπερματικό πλάσμα.

4.3 Επίλογος

Η ανδρική υπογονιμότητα από τη σκοπιά της ανοσολογίας της αναπαραγωγής, είναι ένα σχετικά νέο επιστημονικό πεδίο που παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον και σχετίζεται με ένα εξαιρετικά υψηλό ποσοστό περιπτώσεων ανεξήγητης υπογονιμότητας. Αποτελέσματα από επιστημονικές μελέτες, ανοίγουν νέους δρόμους για την προσέγγιση της ανδρικής υπογονιμότητας, με τρόπο πιο ασφαλή και με απώτερο στόχο όχι μόνο τη διάγνωση αλλά και τη θεραπεία. Τα αντιγόνα ιστοσυμβατότητας τάξης II φαίνεται να κατέχουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της ποιότητας του σπέρματος και στη σχέση του σπερματοζωαρίου με τη γυναικεία γεννητική οδό και το θηλυκό γαμέτη. Είναι απαραίτητος ο σχεδιασμός επιστημονικών μελετών, οι οποίες θα έχουν στόχο την αποκωδικοποίηση του τρόπου ρύθμισης της έκφρασης των αντιγόνων ιστοσυμβατότητας και τη χρήση τους ως διαγνωστικούς δείκτες με κλινική σημασία. Τέλος, η μέτρηση των επιπέδων των φλεγμονωδών και αντιφλεγμονωδών κυτοκινών στο σπερματικό πλάσμα, σε επίπεδο διαγνωστικού ελέγχου, θα μπορούσε να προσφέρει πολύτιμες πληροφορίες για τη ρύθμιση του ανδρικού γεννητικού συστήματος, για την συμπεριφορά των σπερματοζωαρίων και την αλληλεπίδρασή τους με άλλα κύτταρα της γεννητικής οδού.

Βιβλιογραφία

Βιβλία

- A.Guiton, M.D. Φυσιολογία του ανθρώπου, *Ιατρικές εκδόσεις Λίτσας*, τρίτη έκδοση
- Alan Stevens, James Lowe. Ιστολογία, *Ιατρικές εκδόσεις Πασχαλίδη*
- Brigid Hogan, Frank Costantini, Elizabeth Lacy. Manipulating the mouse embryo, *Cold Spring Harbor Laboratory*, 1986
- Cooper TG, Nooman E, von Eckerdstein S, et al. World Health Organization reference values for human semen characteristics, *Human Reproduction*, 2010
- David Mortimer. Practical Laboratory Andrology, *Oxford University Press*, 1994
- Δημήτριος Α. Κούτρας, Δημήτριος Α. Αδαμόπουλος, Σωτήριος Α. Ράπτης, Αθανάσιος Μ. Σουβατζόγλου. Βασική ενδοκρινολογία, *Επιστημονικές εκδόσεις Μαρία Γ. Παρισιάνου*, Αθήνα 1994
- Δ. Πανίδης, Ι. Παπαδήμας. Ενδοκρινολογία Αναπαραγωγής, *Ελληνική Ενδοκρινολογική Εταιρία – Ελληνική Ανδρολογική Εταιρία*, Θεσσαλονίκη 2004
- Ηλίας Κ. Παπαδόπουλος. Ανδρολογία, *Ιατρικές Εκδόσεις Ζήτα*
- Janeway, C. A and Travers, P. Immunobiology, The immune system in health and disease, fifth edition
- Ι. Ματαλλιωτάκης, Δ. Πανίδης, Ε. Κουμαντάκης. Ενδοκρινολογία αναπαραγωγής, *Ιατρικές εκδόσεις Π. Χ. Πασχαλίδης*
- Lubert Stryer. Βιοχημεία I και II, *Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης*
- Richard A. Goldsby, Thomas J. Kindt, Barbara A. Osborne, Janis Kubly. Ανοσολογία, *Ιατρικές εκδόσεις Π. Χ. Πασχαλίδης*, 5^η έκδοση
- Roit, Brostoff, Mal. Ανοσολογία, *Πανεπιστημιακές εκδόσεις Παρισιάνου*, 5^η έκδοση
- Timothy D. Glover and Christopher L. R. Barratt. Male Fertility and Infertility, *Cambridge*
- T. W. Sadler. Langman's Medical Embryology, eighth edition
- World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, *Department of reproductive Health and research*, fifth edition

Άρθρα

- Ali Jassim, William Ollier, Annette Payne, Andrew Biro, R. T. D. Oliver, and Hilliard Festenstein. 1989. Analysis of HLA antigens on germ cells in human semen. *Eur J Immunol.* 19: 1215-1220
- Andreas Ziegler, Gottfried Dohr, and Barbara Uchanska-Ziegler. 2002. Possible Roles for Products of Polymorphic MHC and Linked Olfactory Receptor Genes during Selection Processes in Reproduction. *AJRI.* 48:34-42
- Bakke, O., and B. Dobberstein. 1990. MHC class II-associated invariant chain contains a sorting signal for endosomal compartments. *Cell.* 63:707-716
- Bart T. Phillips, Kathrin Gassei, and Kyle E. Orwig. 2010. Spermatogonial stem cell regulation and spermatogenesis. *Phil Trans R Soc B.* 365:1663-1678
- Brigitte Dousset, Francois Hussenet, Myriam Daudin, Louis Bujan, Bernard Foliquet, and Pierre Nabet. 1997. Seminal cytokine concentrations (LI-1 β , IL-2, IL-6, sR IL-2, sR IL-6), semen parameters and blood hormonal status in male infertility. *Human Reproduction.* 12:1476-1479
- Brocke, P., N. Garbi, F. Momburg, and G. Hammerling. 2002. HLA-DM, HLA-DO and tapasin: Functional similarities and differences. *Curr Op Immunol.* 14:22-29
- Cresswell, P. 1996. Invariant chain structure and MHC class II function. *Cell.* 84:505-507
- Dirk G de Rooij, and J Anton Grootegoedt. 1998. Spermatogonial stem cells. *Cell Biology.* 10:694-701
- D. R. Franken, and C. F. Slabber. 1982. The effect of seminal plasma from immunologic infertile men on in vitro lymphocyte cultures. *Andrologia.* 14:99-103
- Francesco Lombardo, Loredana Gandini, Franco Dondero, and Andrea Lenzi. 2001. Immunology and immunopathology of the male genital tract. Antisperm immunity in natural and assisted reproduction. *Human Reproduction.* 7:450-456
- Gordon G. Gallup, Jr., Ph.D., Rebecca L. Burch, B.S., and Steven M. Platek, B.A. 2002. Does Semen Have Antidepressant Properties? *Archives of Sexual Behavior.* 31:289-293
- James S. Cochban. 1975. Immunobiology of Reproductive Processes in Men. *Urology.* 4:367-377
- Jose M. Martin-Villa, Javier Longa's, and Antonio Arna'iz-Villena. 1999. Cyclic Expression of HLA Class I and II Molecules on the Surface of Purified Human Spermatozoa and Their Control by Serum Inhibin B Levels. *Biology of Reproduction.* 61:1381-1386

- Rupert E. Billingham and Judith R. Head. 1981. Current trends in Reproductive Immunology: An overview. *Journal of Reproductive Immunology*. 3:253-265
- Karlsson, L., A. Peleraux, R. Lindstedt, M. Liljedahl, and P. A. Peterson. 1994. Reconstitution of an operational MHC class II compartment in nonantigen-presenting cells. *Science*. 266:1569-1573
- Kelly, A.P., J. J. Monaco, S. Cho, and J. Trowsdale. 1991. Ane human HLA class II related locus, DM. *Nature*. 353:571-573
- Kleijmeer, M. J., S. Morkowski, J. M. Griffith, A. Y. Rudensky, and H. J Geuze. 1997. Major Histocompatibility Complex class II Compartments in Human and Mouse B Lymphoblasts Represent Conventional Endocytic Compartments. *The Journal of Cell Biology*. 139:639-649
- K. van der Ven, R. Fimmers, G. Engels, H. van der Ven, and D. Krebs. 2000. Evidence for major histocompatibility complex-mediated effects on spermatogenesis in humans. *Human Reproduction*. 15:189-196
- Lachlan M. Moldenhauer, Kerrilyn R. Diener, Dougal M. Thring, Michael P. Brown, John D. Hayball, and Sarah A. Robertson. 2009. Cross-Presentation of Male Seminal Fluid Antigens Elicits T Cell Activation to Initiate the Female Immune Response to Pregnancy. *J Immunol*. 182:8080-8093
- Lennon, A. M., C. Ottone, G. Riguard, L. L. Deaven, J. Longmire, M. Fellous, R. Bono, and C. Lovidan. 1997. Isolation of a B-cell-specific promoter for the human class II transactivator. *Immunogenetics*. 45:266-273
- Liljedahl, M., O. Winqvist, C. D. Surch, P. Wong, K. Ngo, L. Teyton, P. A. Peterson, A. Brunmark, A. Y. Rudensky, W. P. Fung-Leung, and C. Karlsson. 1998. Altered antigen presentation in mice lacking H2-O. *Immunity*. 8:233-243
- Liljedahl, M., T. Kuwana, W. P. Fung-Leung, M. R. Jackson, P. A. Peterson, and L. Karlsson. 1996. HLA-DO is a lysosomal resident which requires association with HLA-DM for efficient intracellular transport. *EMBO*. 15:4817-4824
- Martina Johansson, John J. Bromfield, Melinda J. Jasper, and Sarah A. Robertson. 2004. Semen activates the female immune response during early pregnancy in mice. *Immunology*. 112:290-300
- Masood Ganaie, Mahmoud AbuElhija, Eitan Lunenfeld, Nataly Cherniy, Neomi Weisze, Sarit Bar-Sheshet Itach, Haiem Breitbart, Ronnie Apte and Mahmoud Huleihel. 2009. Effect of Interleukin-1 Receptor Antagonist Gene Deletion on Male Mouse Fertility. *Endocrinology*. 150:295-303
- Matthias S. Gruschwitz, Ruth Brezinschek, and Hans-peter Brezinschek. 1996. Cytokine Levels in the Seminal Plasma of Infertile Males. *Journal of Andrology*. 17:158-163

- Morris, P., J. Shaman, M. Attaya, M. Amaya, S. Goodman, C. Bergman, J. J. Monaco, and E. Mellins. 1994. An essential role for HLA-DM in antigen presentation by class II major histocompatibility molecules. *Nature*. 368:551-554
- Neefjes, J. J. 1999. CIIV, MHC and other compartments for MHC class II loading. *Eur J Immunobiol*. 29:1421-1425
- Oscar Vera, Luis A. Vasquez, and M. Gladys Munoz. 2002. Semen quality and presence of cytokines in seminal fluid of bull ejaculates. *Theriogenology*. 60:553-558
- Philip A. Skau, and Ivar Folstad. 2004. Does immunity regulate ejaculate quality and fertility in humans? *Behavioral Ecology*. doi:10.1093/beheco/ari004
- Philippe Benaroch, Mamadi Yilla, Graca Raposo, Kouichi Ito, Kiyoshi Miwa, Hans J. Geuze, and Hidde L. Ploegh. 1995. How MHC class II molecules reach the endocytic pathway. *EMBO*. 14:37-49
- Rajesh K. Naz. 2002. Molecular and immunological characteristics of sperm antigens involved in egg binding. *Journal of Reproductive Immunology*. 53:13-23
- Richard B. Alexander, Sathibalan Ponniah, Jeffrey Hasday, and J. Richard Hebel. 1998. Elevated levels of proinflammatory cytokines in the semen of patients with chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome. *Elsevier*. 52:744-749
- Rise, J. R and A. H. Chapman. 2000. Cathepsins and compartmentalization in antigen presentation. *Curr Op Immunol*. 12:107-113
- Roche, P. A., M. S. Marks, and P. Cresswell. 1991. Formation of a nine subunit complex by HLA class II glycoproteins and the invariant chain. *Nature*. 354:392-394
- S. Mathur, L. Chao, B. A. Schulte, C. Woodley-Miller, A. Abdel-Latif, C. M. Fredericks, P. F. Rust, and H. O. Williamson. 1987. Sperm and seminal plasma antigens from autoimmune men induce immunological infertility. *Archives of Andrology*. 19:161-175
- Stacey Lee Mandelbaum, Michael R. Diamond, and Alan H. Decherney. 1986. *Journal of in Vitro Fertilization and Embryo Transfer*. 3:279-283
- Surch, C. D., E. K. Gao, H. Kosaka, D. Lo, Ahn, D. B. Murphy, L. Karlsson, P. Peterson, and J. Sprent. 1992. Two subsets of epithelial cells in the thymic medulla. *J Exp Med*. 176:495-505
- Tonnel, C., R. De Mars, and E. O. Long. 1985. DO beta: a new beta chain gene in HLA-D with a distinct regulation of expression. *EMBO J*. 4:2839-2847

- Tulp, A., D. Verwoerd, B. Dobberstein, H. L. Ploegh, and J. Pieters. 1994. Isolation and characterization of the intracellular MHC class II compartment. *Nature*. 369:120-126
- Val Davayan, Robert M. Nakamura, and Masahiko Saga. 1972. Role of Immunology in the Infertile Human. *Biology of Reproduction*. 6:443-461
- Van Lith, M., M. van Ham, A. Griekspoor, E. Tjin, D. Verwoerd, J. Calafat, H. Janssen, E. Reits, L. Pastoors, and J. Neefjes. 2001. Regulation of MHC class II antigen presentation by sorting of recycling HLA-DM/DO and class II within the multivesicular body. *Immunol*.167:884-892
- Virginia I. Scofield, Ronald Clisham, Lalita Bandyopadhyay, Paul Gladstone, Luciano Zamboni, and Raj Raghupathy. 1992. Binding of sperm to somatic cells via HLA-DR. *The Journal of Immunology*. 148:1718-1724
- West, M. A., J. M. Lucocq, and C. Watts. 1994. Antigen processing and class II MHC peptide-loading compartments in human B-lymphoblastoid cells. *Nature*. 369:147-151
- Yvonne Pannekoek, Johannes W.Trum, Otto B. Bleker, Fulko van DerVeen, Jodewijk Spanjaard, and Jakob Dankert. 2000. Cytokine concentration in seminal plasma from subfertile men are not indicative of the presence of *Ureoplasma urealyticum* or *Mycoplasma hominis* in the lower genital tract. *J Med Microbiol*. 49:697-700