

Κυτταρικός πολλαπλασιασμός και απόπτωση των γεννητικών κυττάρων

Η μίτωση και η απόπτωση παρατηρούνται σε ορισμένες φάσεις της γαμετογένεσης και είναι απαραίτητες για την ανάπτυξη των βλαστικών γεννητικών κυττάρων. Αρκετοί παράγοντες ρυθμίζουν την ισορροπία μεταξύ των δύο αυτών διεργασιών και εξασφαλίζουν τη φυσιολογική εξέλιξη της σπερματογένεσης και της ωογένεσης. Απόπτωση παρατηρείται στα γεννητικά κύτταρα κατά την εμβρυϊκή ζωή και στα δύο φύλα. Στο θηλυκό ακολουθεί τη φάση του πολλαπλασιασμού και της έναρξης της πρόφασης της μείωσης I, ενώ στο αρσενικό γίνεται αργότερα, κατά την περιγεννητική και την προνηβική περίοδο, αν και ορισμένοι πιστεύουν ότι η εκφύλιση των σπερματογονίων είναι συνεχής, διαρκεί όλη τη ζωή του αρσενικού και παρουσιάζει εξάρσεις σε ορισμένες περιόδους. Η εκτίμηση της μιτωτικής δραστηριότητας γίνεται με τη μέθοδο ανοσοϊστοχημικής εντόπισης των πυρηνικών αντιγόνων Ki-67 και PCNA, ενώ, εκτός από τη χαρακτηριστική μορφολογία των αποπτωτικών κυττάρων στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, η *in situ* αντίδραση TUNEL επιτρέπει την ανίχνευση του κερματισμένου DNA. Η παρατήρηση του χαρακτηριστικού προτύπου DNA χαμηλού μοριακού βάρους, μετά από ηλεκτροφόρηση, παρέχει τη βιοχημική επιβεβαίωση του αποπτωτικού θανάτου των γεννητικών κυττάρων, που εκτιμάται ποσοτικά στον κυτταρομετρητή ροής. Η μελέτη της έκφρασης των προαποπτωτικών και των αντιαποπτωτικών γονιδίων και η εντόπιση των αντίστοιχων πρωτεϊνών που συμμετέχουν στη φυσιολογική γαμετογένεση, καθώς και η ανάλυση των παραγόντων που εμπλέκονται στη ρύθμιση της απόπτωσης, στον όρχι και στο σπέρμα, σε συνδυασμό με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, σε φυσιολογικές συνθήκες, οδηγεί στην κατανόηση των απαραίτητων μηχανισμών διατήρησης της ομοιόστασης στις γονάδες και αποκαλύπτει τα αίτια της στειρότητας.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Παρά τη διαφορετική εξέλιξη και δραστηριότητα, τα γεννητικά κύτταρα και στα δύο φύλα κατάγονται από τον ίδιο πρόγονο, το αρχέγονο βλαστικό γεννητικό κύτταρο (πίν. 1).^{1,2} Η σειρά των γεννητικών κυττάρων, όπως άλλωστε και η σειρά των σωματικών κυττάρων, δημιουργείται κατά την περίοδο σχηματισμού των βλαστικών δερμάτων. Τα πρώτα γεννητικά κύτταρα ονομάζονται αρχέγονα βλαστικά γεννητικά κύτταρα (ΑΒΓΚ) και διατηρούν αυτή την ονομασία από τη στιγμή που πρωτοεμφανίζονται μέχρι την είσοδό τους στη γοναδική ακρολοφία. Στα αρχικά στάδια, τα ΑΒΓΚ εντοπίζονται στην εξωεμβρυϊκή περιοχή, σε όλα τα είδη. Η συγκέντρωσή τους σε αυτή τη θέση φαίνεται ότι εξασφαλίζει την ιδιότητα του πολυδύναμου κυττάρου. Το γεγονός αυτό συμβαίνει την ίδια στιγμή που καθορίζεται η τύχη των σωματικών

κυτταρικών σειρών, οι οποίες ακολουθούν συγκεκριμένες οδούς διαφοροποίησης, προκειμένου να σχηματιστούν, ακολούθως, οι διάφοροι ιστοί και τα όργανα. Αυτό επιτυγχάνεται με ευρεία μεθυλίωση του DNA, χαρακτηριστική των διαφόρων σωματικών σειρών, ενώ τα ΑΒΓΚ, την ίδια περίοδο, λόγω της εξωεμβρυϊκής τους εντόπισης, διατηρούνται σε κατάσταση υπομεθυλίωσης.²⁻⁵

Τα ΑΒΓΚ προέρχονται από την επιβλάστη και μεταφέρονται, διαμέσου της αρχικής ταινίας, στο εξωεμβρυϊκό μεσόδερμα.^{6,7} Στο ποντίκι, τα ΑΒΓΚ διακρίνονται διάσπαρτα στο εξωεμβρυϊκό μεσόδερμα, στη βάση της αλλαντοϊδας, κοντά στο ενδόδερμα του οπισθίου εντέρου. Στη θέση αυτή, που εγκολλώνεται αργότερα και ενσωματώνεται στο τοίχωμα του οπισθίου εντέρου, ανιχνεύονται τα ΑΒΓΚ σε έμβρυα ηλικίας 9 ημερών. Από εκεί μεταναστεύουν και τις επόμενες 1-2 ημέρες περνούν, διαμέσου του ραχιαίου μεσεντερίου και των

Ρ. Αγγελιοπούλου,
Β. Καραγιάννη

Εργαστήριο Ιστολογίας
και Εμβρυολογίας, Ιατρική Σχολή,
Πανεπιστήμιο Αθηνών

Proliferation and apoptosis
of germ cells

Abstract at the end of the article

Λέξεις ευρετηρίου

Απόπτωση
Γεννητικά κύτταρα
Μίτωση
Σπερματογένεση
Ωογένεση

Υποβλήθηκε 26.1.2000
Εγκρίθηκε 4.4.2000

Πίνακας 1. Συμπεριφορά των βλαστικών γεννητικών κυττάρων σε θηλυκές και αρσενικές γονάδες.

	ΧΧ	ΧΥ
<i>Μιτωτική δραστηριότητα</i>	Μόνο στα αρχικά στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης	Συνεχής
<i>1η μειωτική διαίρεση</i>	Αρχίζει κατά την εμβρυϊκή ζωή και σταματά στο στάδιο της διπλοταινίας Ολοκληρώνεται λίγο πριν από την ωορρηξία Είναι συγχρονισμένη	Αρχίζει κατά την ήβη Ολοκληρώνεται γρήγορα Δεν είναι συγχρονισμένη
<i>2η μειωτική διαίρεση</i>	Εξωγοναδική Επαγωγίμη διεργασία	Ενδογοναδική Αυτόματη διεργασία
<i>Οργάνωση</i>	Μονήρη μέσα σε ωοθυλάκια	Ομαδικά στα σπερματικά σωληνάκια
<i>Ωρίμανση και απελευθέρωση από τη γονάδα</i>	Προγραμματισμένη Αφορά σε ένα ή λίγα κύτταρα ανά κύκλο	Συνεχής Αφορά σε μεγάλο αριθμό κυττάρων

γωνιών του κοιλώματος, στις γεννητικές ακρολοφίες. Η μετανάστευση διαρκεί 5 ημέρες στο ποντίκι και τον αρουραίο και 7 ημέρες στο κουνέλι. Στο ανθρώπινο έμβρυο ΧΧ, μεταξύ 7ης και 9ης εβδομάδας παρατηρούνται στο γοναδικό αρχέγονο διάσπαρτα ΑΒΓΚ, με μορφολογικά χαρακτηριστικά μεταναστευόντων κυττάρων, σε ποσοστό 8–10% του συνόλου των κυττάρων.

Από τη 12η και τη 13η ημέρα της κύησης, στο ποντίκι και στον αρουραίο αντίστοιχα, τα ΑΒΓΚ εντοπίζονται στις γοναδικές ακρολοφίες, που προβάλλουν ως επιμήκεις παχύνσεις του κοιλωματικού επιθηλίου, από το ραχιαίο τοίχωμα του σώματος, στην εσωτερική επιφάνεια του μεσεντέριου. Όταν εισέρχονται στις γοναδικές καταβολές διατηρούν ακόμη τα χαρακτηριστικά των μεταναστευόντων κυττάρων, τα οποία βαθμιαία αντικαθίστανται. Τα ψευδοπόδια εξαφανίζονται, αποκτούν στρογγυλό σχήμα, με κεντρικό πυρήνα και τυχαία κατανομή των οργανιδίων. Η διάμετρός τους στο στάδιο αυτό είναι 14 μm. Αν και η γοναδική μορφογένεση δεν έχει ακόμη ολοκληρωθεί, τα ΑΒΓΚ δημιουργούν στενές συνάψεις με τα σωματικά κύτταρα που θα διαφοροποιηθούν σε κύτταρα Sertoli ή σε θυλακικά κύτταρα. Ορισμένα συγκεντρώνονται σε ομάδες και συνδέονται με εστιακές συνάψεις. Κατά το στάδιο αυτό, αποκαλούνται βλαστικά γεννητικά κύτταρα (ΒΓΚ).

2. ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ ΤΩΝ ΒΛΑΣΤΙΚΩΝ ΓΕΝΝΗΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ – ΜΙΤΩΣΗ/ΜΕΙΩΣΗ

Μέχρι την έναρξη της μεταναστευτικής περιόδου, κατά την οποία τα ΑΒΓΚ θα μετακινηθούν από την

αρχική εξωεμβρυϊκή θέση στις γεννητικές ακρολοφίες, η εμφάνιση και η συμπεριφορά τους, τόσο στα θηλυκά όσο και στα αρσενικά έμβρυα, είναι ίδια. Το αν θα ακολουθήσουν την αρσενική ή τη θηλυκή οδό ανάπτυξης, καθώς και το πόσο επιτυχής θα είναι η επακολουθούσα γαμετογένεση, εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων του γονότυπου τους, καθώς και του φαινότυπου της γονάδας την οποία θα εποικήσουν.^{8,9}

Διαφορά μεταξύ των αρσενικών και των θηλυκών εμβρύων παρατηρείται όταν αρχίζει η πρώτη μειωτική πρόφαση στο θηλυκό και τα ΒΓΚ περνούν από τα στάδια της λεπτοταινίας, ζυγοταινίας, παχυταινίας και σταματούν στο στάδιο της διπλοταινίας. Στο αρσενικό, αντίθετα, όλα τα ΒΓΚ πολλαπλασιάζονται καταρχήν και ακολούθως η μίτωση διακόπτεται στην G1 φάση του κυτταρικού κύκλου. Οι πρώτες εικόνες μειωτικής πρόφασης παρατηρούνται στον αρσενικό αρουραίο μετά τη γέννηση, στις 16 ημέρες, και οι όρχεις περιέχουν σπερματογόνια και πρωτογενή σπερματοκύτταρα. Στις 24 ημέρες έχουν συμπληρωθεί οι δύο μειωτικές διαιρέσεις και ορισμένα σπερματοκύτταρα ωριμάζουν σε απλοειδείς στρογγυλές σπερματίδες. Στις 32 ημέρες ολοκληρώνεται και η σπερμιογένεση και διακρίνονται επιμήκεις σπερματίδες.¹⁰

Η αύξηση του πληθυσμού των ΒΓΚ, με μιτωτική διαίρεση, αρχίζει ήδη από τη μεταναστευτική περίοδο. Στο ποντίκι, οι γονάδες των εμβρύων 14,5 ημερών περιέχουν 25×10^3 ΒΓΚ και στις 18,5 ημέρες 85×10^3 . Στον άνθρωπο, μεταξύ 7ης και 9ης εβδομάδας της κύησης, αναγνωρίζονται μεγάλα αμοιβαδοειδή ΑΒΓΚ στη γοναδική καταβολή του θήλεος και αποτελούν το 8–10% των κυττάρων. Βαθμιαία, τα μορφολογικά χαρακτηριστικά αυτών αλλάζουν, τα ψευδοπόδια εξαφανίζονται, αποκτούν στρογγυλό σχήμα, μετατρέπονται, δηλαδή, σε ΒΓΚ και ωογόνια, τα οποία πολλαπλασιάζονται με μίτωση. Ο ρυθμός του κυτταρικού πολλαπλασιασμού είναι εξαιρετικά ταχύς, με αποτέλεσμα τη θεαματική αύξηση του αριθμού των ΒΓΚ. Αναφέρεται, για παράδειγμα, ότι το 2ο μήνα της κύησης υπάρχουν 6×10^5 ωογόνια, ενώ τον 5ο μήνα ο αριθμός τους ανέρχεται σε 7×10^6 .

Ο αριθμός των ωογονίων διαφέρει από είδος σε είδος και αυτό οφείλεται στη διαφορετική διάρκεια της μιτωτικής δραστηριότητας. Στο ποντίκι και στον αρουραίο οι μίτωσεις διαρκούν μερικές ημέρες, ενώ σε θηλαστικά, όπως η αγελάδα και ο χοίρος, συνεχίζονται για αρκετές εβδομάδες. Συνήθως οι μιτωτικές διαιρέσεις ολοκληρώνονται κατά την εμβρυϊκή ζωή, αλλά στο κουνέλι και στο hamster συνεχίζονται και μετά τη γέννηση, ενώ στο χοίρο τα ωογόνια διαιρούνται μόνο μετά τη γέννηση. Τα θυγατρικά κύτταρα δεν αποχωρίζονται εντελώς αλλά

διατηρούν μεσοκυττάρια γέφυρες, οι οποίες συνδέουν ομάδες ωογονίων που χαρακτηρίζονται από εκτεταμένη επικοινωνία, με λειτουργική και μορφολογική ομοιότητα των κυττάρων.

Στον αρουραίο, μετά την εγκατάσταση των γεννητικών κυττάρων στην αδιαφοροποίητη γοναδική καταβολή, αρχίζει ο πολλαπλασιασμός, με γρήγορο ρυθμό. Έτσι, στις 14,5 ημέρες μετρώνται, στα αρσενικά έμβρυα, 20×10^3 ΒΓΚ, στις 18,5 ημέρες 125×10^3 και στις 20 ημέρες 140×10^3 . Τότε σταματά η μιτωτική δραστηριότητα. Από μετρήσεις των ΒΓΚ και στα δύο φύλα (εικ. 1) προκύπτει ότι η περίοδος της έντονης μιτωτικής δραστηριότητας εκτείνεται από τις 14,5 έως τις 18,5 ημέρες μετά τη γονιμοποίηση. Στο θηλυκό αρουραίο, ο μέγιστος αριθμός των ΒΓΚ (75×10^3) παρατηρείται στις 18,5 ημέρες και αντιστοιχεί στα 140×10^3 ΒΓΚ, που μετρώνται στο αρσενικό έμβρυο στις 20 ημέρες. Τότε σταματά η μιτωτική δραστηριότητα και αρχίζει η μείωση.¹¹⁻¹⁴

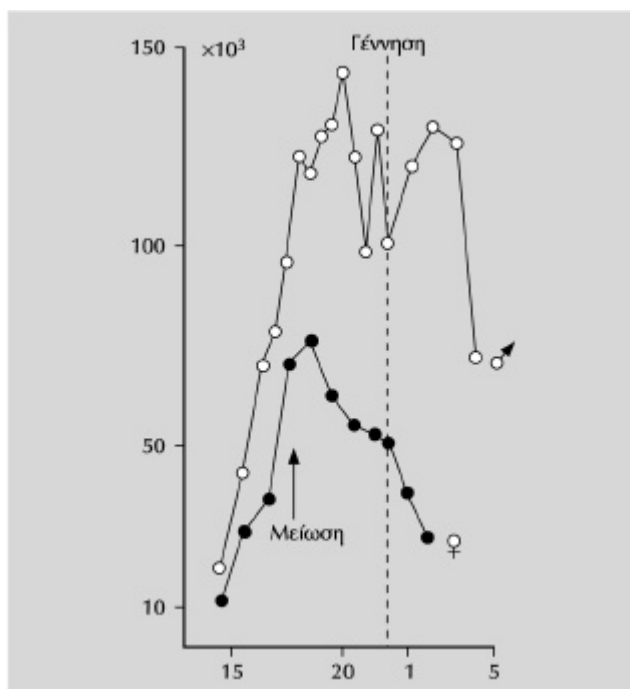
Συνεπώς, μεταξύ των δύο φύλων παρατηρείται διαφορά στον αριθμό των ΒΓΚ από τις 14,5 ημέρες της κύησης, όταν στην εμβρυϊκή ωοθήκη μετρώνται $11,5 \times 10^3$ κύτταρα και στον εμβρυϊκό όρχι 20×10^3 κύτταρα. Φαίνεται, επομένως, ότι στον εμβρυϊκό όρχι ο ρυθμός της μιτωτικής δραστηριότητας είναι ταχύτερος. Όταν σταματήσει η μιτωτική δραστηριότητα, η τύχη των γεννητικών κυττάρων είναι

διαφορετική στα δύο φύλα. Στο θηλυκό αρχίζει η πρόφαση της μείωσης I και τα ΒΓΚ μετατρέπονται σε πρωτογενή ωοκύτταρα, ενώ στο αρσενικό τα ΒΓΚ υφίστανται την επίδραση του αναστολέα της μείωσης, που εκκρίνεται από τα σωματικά κύτταρα, και εισέρχονται σε φάση ηρεμίας.¹⁵

3. ΕΚΦΥΛΙΣΗ ΤΩΝ ΓΕΝΝΗΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ - ΝΕΚΡΩΣΗ Ή ΑΠΟΠΤΩΣΗ;

Κατά την περίοδο της γαμετογένεσης, εκτός από την έντονη μιτωτική δραστηριότητα, λαμβάνει χώρα και σημαντική εκφύλιση των γεννητικών κυττάρων. Ένα πρώτο κύμα εκφύλισης παρατηρείται και στα δύο φύλα, πριν από τη γέννηση.¹⁶ Στο θηλυκό, ακολουθεί η φάση του πολλαπλασιασμού και της έναρξης της μείωσης I. Στη γυναικα, για παράδειγμα, ο πληθυσμός των γεννητικών κυττάρων είναι της τάξης των $5-7 \times 10^6$, κατά τον 5ο μήνα της κύησης, ενώ κατά τη γέννηση ο αριθμός αυτός έχει ελαττωθεί σε 7×10^5 . Στον αρουραίο, μόνο το 1/3 του αριθμού αιχμής διατηρείται στην ωοθήκη, δύο ημέρες μετά τη γέννηση, ενώ τα γεννητικά κύτταρα που μετρώνται στον όρχι την 4η ημέρα μετά τη γέννηση αντιστοιχούν στο 1/2 του αριθμού της 20ής ημέρας της κύησης (εικ. 1). Οι Beaumont και Mandl περιγράφουν τρία εκφυλιστικά κύματα των γεννητικών κυττάρων στο αρσενικό κατά την περιγεννητική περίοδο και ένα στο θηλυκό, κατά την περίοδο έναρξης της μείωσης. Ένα, ακόμη, εκφυλιστικό κύμα παρατηρείται στα σπερματογόνια πριν από την ήβη και ορισμένοι ερευνητές θεωρούν ότι είναι απαραίτητο για την έναρξη της σπερματογένεσης, ενώ άλλοι πιστεύουν ότι η εκφύλιση των σπερματογονίων είναι συνεχής, διαρκεί όλη τη ζωή του αρσενικού και παρουσιάζει εξάρσεις σε ορισμένες περιόδους.^{10,17,18}

Οι Pesce και DeFelici, μετά από ιστολογική μελέτη της μορφολογίας των εκφυλιζόμενων γεννητικών κυττάρων στο ποντίκι, με το σαρωτικό μικροσκόπιο, υποστηρίζουν ότι η εκφύλιση των ΒΓΚ μπορεί να οφείλεται σε νέκρωση ή και απόπτωση και θεωρούν ότι η έκταση της κάθε διεργασίας εξαρτάται από το στάδιο της διαφοροποίησης των ΒΓΚ. Πιστεύουν, δηλαδή, ότι τα γεννητικά κύτταρα που έχουν ήδη αρχίσει τη μείωση ακολουθούν την οδό της νέκρωσης, ενώ τα πολλαπλασιαζόμενα σπερματοκύτταρα, στον ώριμο όρχι, απομακρύνονται με απόπτωση.¹⁹ Όμως, με άλλες μελέτες ανίχνευσης των αποπτωτικών κυττάρων και ποσοτική εκτίμηση αυτών, στον κυτταρομετρητή ροής, άλλοι ερευνητές συμπεραίνουν ότι η εκφύλιση των γεννητικών κυττάρων, σε αυτό το είδος και πριν από τη γέννηση, γίνεται με απόπτωση.²⁰ Με τα σημερινά δεδομένα,²⁰⁻²² η διεργασία απομάκρυνσης των



Εικόνα 1. Βλαστικά γεννητικά κύτταρα στις γονάδες εμβρύων αρουραίου και στα δύο φύλα. Στο θηλυκό, τα περισσότερα ΒΓΚ μετρώνται στις 18,5 ημέρες της εμβρυϊκής ζωής, ενώ στο αρσενικό στις 20 ημέρες.¹³

γεννητικών κυττάρων και στα δύο φύλα ακολουθεί την οδό της απόπτωσης και, συνεπώς, ο όρος «εκφυλιστικά» κύματα θα πρέπει να αντικατασταθεί από τον όρο «αποπτωτικά».

3.1. Η απόπτωση των αρχέγονων βλαστικών γεννητικών κυττάρων *in vitro*

Απόπτωση παρατηρείται και στα ΑΒΓΚ, όταν καλλιεργούνται χωρίς τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά ή τους αναγκαίους αυξητικούς παράγοντες. Μια λεπτομερής μελέτη της *in vitro* απόπτωσης των ΑΒΓΚ, από έμβρυα ποπτικού, αποκαλύπτει ότι μετά από 4–5 ώρες καλλιέργειας ένα ποσοστό 15–20% αυτών παρουσιάζει τα τυπικά μορφολογικά χαρακτηριστικά της απόπτωσης, δηλαδή συμπύκνωση της χρωμαΐνης σε λεπτοκοκκώδεις μάζες ομογενούς υψής, που συγκεντρώνονται στην εσωτερική επιφάνεια της πυρηνικής μεμβράνης, και συμπύκνωση του κυτταροπλάσματος με συγκέντρωση των οργανιδίων και κυτταροπλασματικές προεκβολές.¹⁹ Τα κύτταρα διασπώνται και σχηματίζονται τα αποπτωτικά σωματίδια, τα οποία εκφυλίζονται τελικά με νέκρωση, σε διάστημα 12–15 ωρών καλλιέργειας. Η διαδικασία αυτή είναι μάλλον σπάνια *in vivo*, αφού τα αποπτωτικά γεννητικά κύτταρα φαγοκυτταρώνονται από τα γειτονικά σωματικά κύτταρα.

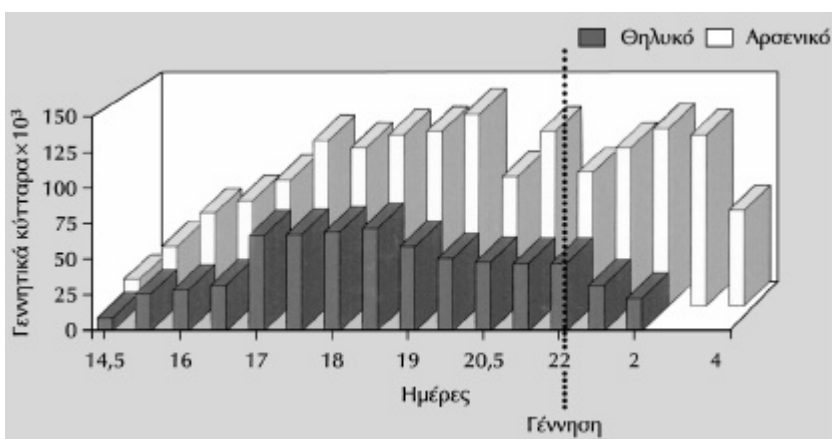
4. Η ΑΠΟΠΤΩΣΗ ΤΩΝ ΓΕΝΗΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΕΜΒΡΥΪΚΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗ

Σύμφωνα με τις παρατηρήσεις των Beaumont και Mandl και τις μεταγενέστερες μετρήσεις του Prepin, σε έμβρυα αρουραίου και των δύο φύλων, ο πληθυσμός των ΒΓΚ υπόκειται σε σημαντικές μεταβολές κατά την εμβρυϊκή περίοδο.^{11–14} Συγκεντρώσαμε τα στοιχεία που προκύπτουν από αυτές τις μετρήσεις στην εικόνα 2, στην οποία φαίνεται ο αριθμός των γεννητικών κυττάρων σε συνάρτηση με την ηλικία. Μετά τη φάση του έντονου

πολλαπλασιασμού ακολουθούν τρία αποπτωτικά κύματα στις αρσενικές γονάδες. Το πρώτο παρατηρείται μεταξύ 20ής και 21ης ημέρας της κύησης και ο αριθμός των γεννητικών κυττάρων ελαττώνεται από 140×10^3 σε 100×10^3 . Στο στάδιο αυτό επανενεργοποιείται ο μιτωτικός μηχανισμός, με αποτέλεσμα στις 21,5 ημέρες να μετρώνται 130×10^3 κύτταρα. Το δεύτερο αποπτωτικό κύμα παρατηρείται στις 22 ημέρες της κύησης, ακριβώς πριν από τη γέννηση, οπότε μετρώνται 100×10^3 κύτταρα. Μία ακόμη αύξηση παρατηρείται μετά τη γέννηση και ακολουθείται από το τρίτο αποπτωτικό κύμα, έτσι ώστε την 4η ημέρα να μετρώνται 70×10^3 κύτταρα, δηλαδή το 1/2 του αριθμού της 20ής ημέρας της κύησης. Στους νεαρούς αρουραίους ηλικίας 6 ημερών, μια νέα αύξηση της μιτωτικής δραστηριότητας συνδυάζεται με την εμφάνιση της πρώτης σειράς των σπερματογονίων τύπου Α και ο συνολικός αριθμός των γεννητικών κυττάρων ανέρχεται στα 130×10^3 , από τα οποία $50–90 \times 10^3$ είναι σπερματογόνια Α.

Σε αντίθεση προς το αρσενικό, ο αριθμός των γεννητικών κυττάρων στο θηλυκό ελαττώνεται σταθερά, έτσι ώστε δύο ημέρες μετά τη γέννηση να μετρώνται 27×10^3 κύτταρα, δηλαδή μόνο το 1/3 του αριθμού αιχμής (εικ. 2). Ειδικότερα, οι θηλυκές γονάδες των εμβρύων 14,5 ημερών περιέχουν $11,5 \times 10^3$ ΒΓΚ. Στις 18,5 ημέρες παρατηρείται ο μέγιστος αριθμός των ωογονίων, δηλαδή 75×10^3 . Στο στάδιο αυτό η μιτωτική δραστηριότητα σταματά. Ακριβώς την ίδια περίοδο συμβαίνουν δύο γεγονότα εξαιρετικής σημασίας για την αναπαραγωγική ζωή του θηλυκού: η έναρξη της πρώτης μειωτικής διαίρεσης και η ενεργοποίηση της αποπτωτικής διεργασίας.

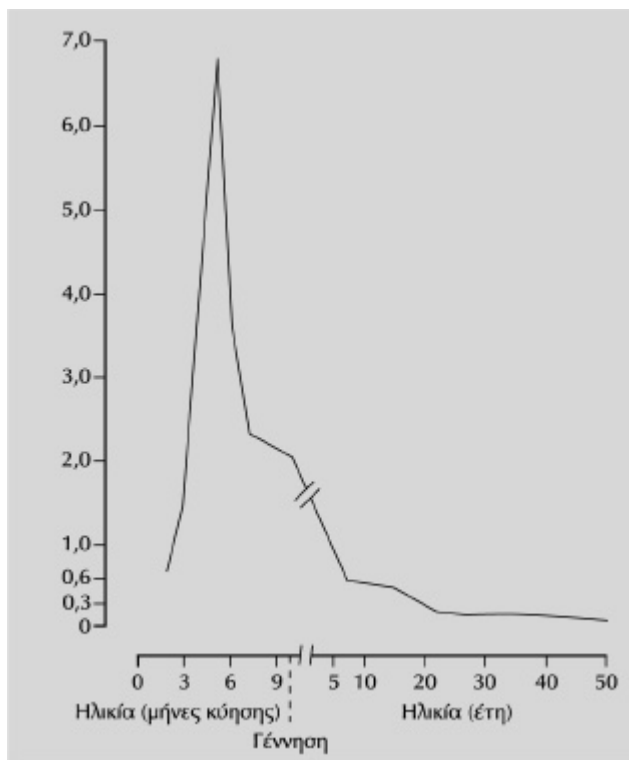
Σε μια πρόσφατη μελέτη εξετάσαμε την έκφραση του προ-αποπτωτικού γονιδίου *bax* και του αντι-αποπτωτικού γονιδίου *bcl-2* στα γεννητικά κύτταρα αρσενικού και θηλυκού αρουραίου, πριν και μετά τη γέννηση, και διαπιστώσαμε ότι και τα δύο δραστηριοποιούνται κατά



Εικόνα 2. Αριθμός βλαστικών γεννητικών κυττάρων στις γονάδες εμβρύων αρουραίου και στα δύο φύλα.

τη διάρκεια της αποπτωτικής περιόδου. Μετά τη γέννηση, η διακοπή της αποπτωτικής δραστηριότητας επιβεβαιώνεται από το γεγονός ότι δεν ανιχνεύεται πλέον η πρωτεΐνη BAX, ενώ εξακολουθεί να ανιχνεύεται η πρωτεΐνη BCL-2, με αποτέλεσμα τη διατήρηση του απομένουτος πληθυσμού των γεννητικών κυττάρων μέχρι την ήβη (μη δημοσιευμένα αποτελέσματα).

Οι ερευνητές που μελέτησαν την ωογένεση στον άνθρωπο παρατήρησαν ότι περίπου 10% των γεννητικών κυττάρων χάνονται μεταξύ της 18ης και της 20ής εβδομάδας της εμβρυϊκής ζωής. Αυτός ο κυτταρικός θάνατος θεωρείται ως κύριος μηχανισμός απομάκρυνσης των γεννητικών κυττάρων κατά την εμβρυϊκή ζωή και φαίνεται ότι περιλαμβάνει διαφορετικούς παράγοντες από αυτούς που εμπλέκονται στην ατρησία των αναπτυσσομένων ωοθυλακίων.^{21,23} Έτσι, από τα 6 ή 7×10^6 ΒΓΚ, που μετρώνται στην ωοθήκη κατά τον 5ο μήνα της κύησης, μόνο 500 ωοκύτταρα πρόκειται να απελευθερωθούν κατά τη διάρκεια των ωορρηκτικών κύκλων. Η μαζική απώλεια των γεννητικών κυττάρων γίνεται, κυρίως, κατά την ωογένεση, αλλά συνεχίζεται και μετά τη γέννηση, κατά τη διάρκεια της ωοθυλακιογένεσης (εικ. 3). Γεννητικά κύτταρα με χαρακτηριστική μορφολογία αποπτωτικών κυττάρων, στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, έχουν περιγραφεί στην εμβρυϊκή ωοθήκη



Εικόνα 3. Εξέλιξη του αριθμού των γεννητικών κυττάρων ($\times 10^6$) στην ωοθήκη κατά τη διάρκεια της ζωής της γυναίκας.²³

της γυναίκας και οι παρατηρήσεις έχουν επιβεβαιωθεί με την ανίχνευση κερματισμένου DNA, στους πυρήνες αυτών, με την *in situ* αντίδραση TUNEL.^{21,24}

Στο ποντίκι, γεννητικά κύτταρα με αποπτωτικό φαινότυπο ανιχνεύθηκαν πριν από τη γέννηση, μεταξύ 12ης και 17ης ημέρας της κύησης, και εκτιμήθηκε η ποσοστιαία αναλογία αυτών στον κυτταρομετρητή ροής.²⁰ Όπως φαίνεται στον πίνακα 2, το ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων στην εμβρυϊκή ωοθήκη είναι 4,3% τη 13η ημέρα, 2% τη 14η ημέρα, 8,7% τη 15η ημέρα και 11,3% τη 17η ημέρα.

Δεν είναι γνωστό αν η απόπτωση αφορά στα ωογόνια ή και σε πρωτογενή ωοκύτταρα που έχουν ήδη διανύσει τα αρχικά στάδια της πρόφασης της μειωτικής διαίρεσης I. Έχει, ωστόσο, προταθεί ότι η είσοδος στη μείωση, αντί της προηγουμένως ακολουθούμενης μίτωσης, αποτελεί το έναυσμα της απόπτωσης των γεννητικών κυττάρων. Η άποψη αυτή βρίσκει ολόένα και περισσότερους υποστηρικτές. Εξάλλου, η απόπτωση θεωρείται από ορισμένους ως εκδήλωση της αποτυχίας του κυττάρου να ολοκληρώσει επιτυχώς τη μιτωτική διαίρεση. Θεωρείται, δηλαδή, ως κατάληξη μιας αποτυχημένης μίτωσης, με συνέπεια τη διακοπή του πολλαπλασιασμού των γεννητικών κυττάρων. Ιδιαίτερα, κατά τη μετάβαση από τη μίτωση στη διεργασία σχηματισμού απλοειδών γαμετών, η απόπτωση χαρακτηρίζεται ως «σωτήριος» μηχανισμός απομάκρυνσης παθολογικών κυττάρων με χρωσωμικές ανωμαλίες.

5. ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ ΤΩΝ ΣΠΕΡΜΑΤΟΓΟΝΙΩΝ ΣΤΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟ ΣΠΕΡΜΑΤΙΚΟ ΕΠΙΘΗΛΙΟ

Η φυσιολογική εξέλιξη της σπερματογένεσης εξαρτάται από δύο παράγοντες: τη μιτωτική δραστηριότητα των σπερματογονίων και την απόπτωση των γεννητικών κυττάρων, κατά τη μείωση και τη σπερμιογένεση. Η εκατοστιαία αναλογία των αποπτωτικών κυττάρων, εξεταζόμενη παράλληλα με την εκατοστιαία αναλογία των μιτωτικών κυττάρων, δίνει μια πλήρη εικόνα των στοιχείων που συντελούν στην ομοίωση του σπερματικού επιθηλίου. Εξάλλου, ο έλεγχος του κυτταρικού πολλαπλασιασμού αποσκοπεί στη ρύθμιση των λειτουργικών

Πίνακας 2. Ποσοστιαία αναλογία αποπτωτικών γεννητικών κυττάρων κατά την εμβρυϊκή ζωή, στο ποντίκι.²⁰

	Ημέρα κύησης				
	12n	13n	14n	15n	17n
Θηλυκό	0,9	4,3	2,0	8,7	11,3
Αρσενικό		4,6	2,6	4,1	4,8

αλληλεπιδράσεων μεταξύ των κυττάρων του Sertoli, που δεν πολλαπλασιάζονται, και των γεννητικών κυττάρων.²⁵

Για την εκτίμηση της μιτωτικής δραστηριότητας εφαρμόζεται σήμερα η μέθοδος ανοσοϊστοχημικής εντόπισης των πυρηνικών αντιγόνων Ki-67 και PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen). Οι δύο πρωτεΐνες εκφράζονται στις διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου και η ανίχνευση αυτών, με την παραπάνω μέθοδο, έχει αντικαταστήσει παλαιότερες μεθόδους, όπως της ενσωμάτωσης ραδιενεργού θυμιδίνης ή της βρωμοδεσοξουριδίνης (BrDU).

Το πυρηνικό αντιγόνο Ki-67 υπάρχει σε δύο μορφές, μοριακού βάρους 359 και 320 kDa (πίν. 3). Εκφράζεται σε όλες τις φάσεις του κυτταρικού κύκλου, εκτός από τη φάση ηρεμίας G0 και την αρχή της φάσης G1. Κατά τη φάση G1, το αντιγόνο Ki-67 εντοπίζεται στο πυρήνιο. Στις υπόλοιπες φάσεις του κυτταρικού κύκλου ανιχνεύεται και στην πυρηνική θεμέλια ουσία. Στην αρχή της μιτωτικής πρόφασης εντοπίζεται στη συμπυκνωμένη χρωματίνη. Κατά τη μετάφαση, ανιχνεύεται στη δικτυωτή δομή που περιβάλλει τις χρωματίδες.²⁶

Το PCNA είναι πρωτεΐνη μοριακού βάρους 37 kDa, επικουρική των πολυμερασών δ και ϵ , που εμπλέκονται στις διεργασίες αποκατάστασης του DNA μετά από βλάβη.^{27,28} Στην αρχή της φάσης S το PCNA ανιχνεύεται με τη μορφή κοκκίων στην πυρηνική θεμέλια ουσία, ενώ στο τέλος της φάσης S εντοπίζεται στο πυρήνιο.²⁹ Η μέγιστη έκφρασή του παρατηρείται στις φάσεις S και G2.^{30,31}

Οι πολυμεράσες α , δ και ϵ είναι ένζυμα απαραίτητα για το διπλασιασμό του χρωμοσωμικού DNA. Το αντιγόνο PCNA σχηματίζει ένα σύμπλεγμα με τον παράγοντα διπλασιασμού C (replication factor C) και προσκολλάται στο άκρο 3'OH του νεοσυντιθέμενου RNA/DNA. Παράλληλα, αποκολλά την DNA-πολυμεράση α από το DNA, αφήνοντας τη θέση ελεύθερη για τις DNA-πολυμεράσες δ ή και ϵ . Αυτά τα ένζυμα αναγνωρίζουν το σύμπλεγμα RF-C/PCNA και συμμετέχουν στη σύνθεση της συνεχούς αλυσίδας. Το PCNA αντιδρά άμεσα με την DNA-

πολυμεράση δ και αυξάνει τη δραστηριότητά της, δηλαδή την ικανότητα αυτής να συνθέτει DNA κατά τρόπο συνεχή, χωρίς να αποκολλάται από το υπόστρωμα. Με αυτή την έννοια, το PCNA θεωρείται επικουρικό των πολυμερασών α , δ και ϵ και είναι πιθανό να εμπλέκεται στα συστήματα επιδιόρθωσης της βλάβης του DNA.

Στον άνθρωπο και τα πρωτεύοντα, τα σπερματογόνια, ανάλογα με τη μορφολογία του πυρήνα, διακρίνονται σε βαθυχρωματικά Aβ, αραιοχρωματικά Aα και κύτταρα B.¹⁸ Η ανοσοϊστοχημεία με αντίσωμα αντι-PCNA, και στα δύο είδη, έδειξε ότι και οι δύο τύποι των κυττάρων A έχουν την ικανότητα διπλασιασμού του DNA τους.

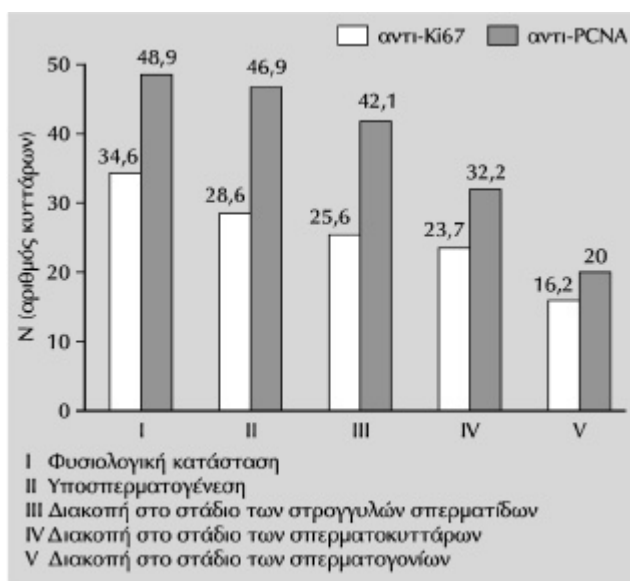
Από την ανοσοεντόπιση των Ki-67/PCNA, στον ανθρώπινο όρχι, διαπιστώθηκε ότι ο αριθμός των σπερματογονίων που πολλαπλασιάζονται είναι μεγαλύτερος από αυτόν που είχε εκτιμηθεί με απλή μέτρηση των μιτώσεων και δεν υπερέβαινε το 10%. Πράγματι, η αναλογία των σπερματογονίων που αντιδρούν στο αντίσωμα για το Ki-67 και το PCNA είναι 34,6 και 48,9, αντίστοιχα (εικ. 4). Η εκατοστιαία αναλογία των σπερματογονίων B που αντιδρούν στα αντι-Ki-67/αντι-PCNA είναι μεγαλύτερη από αυτή των σπερματογονίων A και δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές, κατά τη διάρκεια των διαφόρων σταδίων του κύκλου του σπερματικού επιθήλιου. Θα πρέπει να τονιστεί ότι το Ki-67 εκφράζεται μόνο στον πυρήνα των σπερματογονίων, ενώ το PCNA ανιχνεύεται επίσης και στον πυρήνα των πρωτογενών σπερματοκυττάρων.³⁰

6. ΑΠΟΠΤΩΣΗ ΤΩΝ ΓΕΝΝΗΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΟΝ ΟΡΧΙ

Το φαινόμενο του θανάτου των γεννητικών κυττάρων στον όρχι έχει διαπιστωθεί πριν από 100 χρόνια και χαρακτηρίστηκε ως «κυτταρική εκφύλιση που παρατηρείται σε απουσία παθολογικής κατάστασης».^{32,33} Πρόσφατα, αναζωπυρώθηκε το ενδιαφέρον των ερευνητών για την απόπτωση στο σπερματικό επιθήλιο. Η μέτρηση των αποπτωτικών κυττάρων έδειξε σημαντική αύξηση της

Πίνακας 3. Σύγκριση των αντιγόνων Ki-67 και PCNA.³⁰

	Ki-67	PCNA
Μοριακό βάρος	359 και 320 kDa	37 kDa
Κυτταρική εντόπιση	Πυρηνική θεμέλια ουσία, φάσεις S, G2, M	Πυρηνική θεμέλια ουσία, στην αρχή της φάσης S
Χρόνος υποδιπλασιασμού	~1-2 ώρες	~ 20 ώρες
Έκφραση κατά τον κυτταρικό κύκλο	Τέλος G1, S, G2, M	G1, S, G2, M
Μέγιστη έκφραση	G2, αρχή M	S, G2
Δεν εκφράζεται	G0, αρχή G1	G0
Λοιπά χαρακτηριστικά		Επικουρική πρωτεΐνη των πολυμερασών α , δ και ϵ



Εικόνα 4. Εκατοστιαία αναλογία των αντιδρώντων στα αντισώματα αντι-Ki-67 και αντι-PCNA σπερματογονίων σε σπερματικά σωληνάρια με φυσιολογική ή παθολογική σπερματογένεση.³⁰

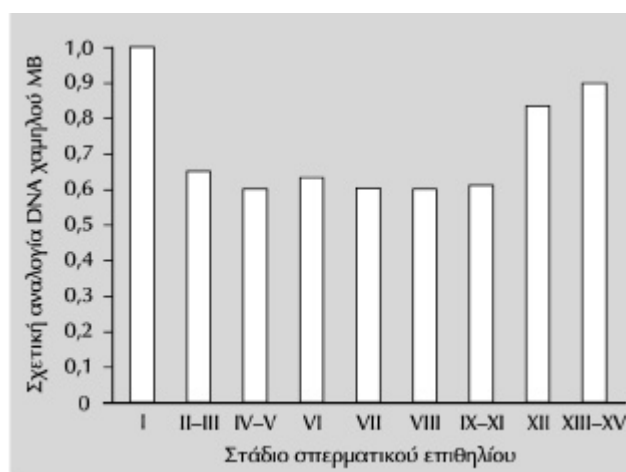
απόπτωση σε ασθενείς με υποσπερματογένεση ή διακοπή της σπερματογένεσης, είτε στο στάδιο του σπερματοκυττάρου, είτε στο στάδιο της σπερματίδας.

Κατά τη νεογνική ανάπτυξη και πριν από την ήβη, η απώλεια των γεννητικών κυττάρων ποικίλλει.¹⁰ Ένα μέρος των σπερματογονίων Β και των σπερματοκυττάρων χάνεται, με απόπτωση, προκειμένου να διατηρηθεί σταθερός ο αριθμός των γεννητικών κυττάρων που θα εισέλθουν στη μείωση και να δημιουργηθεί ο άριστος συσχετισμός μεταξύ γεννητικών κυττάρων και κυττάρων Sertoli.³⁴ Στην αρχή της ήβης, στον αρουραίο και το ποντίκι, τα σπερματογόνια πληθύνονται από ένα αποπτωτικό κύμα, που θεωρείται απαραίτητο για την έναρξη της σπερματογένεσης.^{10,17}

Σε γενικές γραμμές, τα επίπεδα ελάττωσης του αριθμού των γεννητικών κυττάρων με απόπτωση είναι αυξημένα κατά τη διάρκεια των μιτωτικών διαιρέσεων των σπερματογονίων Α, κατά τη μείωση και τη σπερμιόγνεση.³⁵ Οι ποσοτικές μελέτες στον όρχι των ώριμων αρουραίων έδειξαν ότι ένα μέρος των σπερματογονίων τύπου Α2-Α4 εκφυλίζεται με απόπτωση και από τον αρχικό πληθυσμό των σπερματογονίων Α παράγεται μόνο το 25% του θεωρητικά αναμενόμενου αριθμού των σπερματοκυττάρων Ι, στο στάδιο της προλεπτοταινίας.¹⁸ Η επιλεκτική απομάκρυνση των σπερματοκυττάρων και των σπερματιδίων είναι, επίσης, ένα συνηθισμένο φαινόμενο, δεδομένου ότι το 20% των γεννητικών κυττάρων εκφυλίζεται μεταξύ των σταδίων του σπερματοκυττάρου Ι και της σπερματίδας.³⁶

Η απόπτωση εκδηλώνεται σε ορισμένα στάδια του κύκλου του σπερματικού επιθηλίου. Στον ώριμο αρουραίο, ο κατακερματισμός του DNA, που μετράται με την ανάλυση μετά την ηλεκτροφόρηση σε ηλεκτρώματα αгарόζης, είναι περίπου διπλάσιος στα στάδια Ι και XII-XIV παρά στο στάδιο VIII (εικ. 5). Από τη μελέτη των αποπτωτικών γεννητικών κυττάρων *in situ* μετά την εφαρμογή της μεθόδου TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick End Labeling) αποδεικνύεται ότι τα σπερματοκύτταρα είναι ο κυτταρικός πληθυσμός που πλήττεται περισσότερο.¹⁰

Είναι γνωστό ότι η σπερματογένεση στον ώριμο άνδρα δεν είναι εντελώς αποδοτική διεργασία, αν ληφθεί υπόψη ότι από ένα σπερματοκύτταρο Ι παράγονται τελικά 2 σπερματίδες αντί των 4, που θεωρητικά αναμένονται.^{37,38} Ωστόσο, μέχρι σήμερα, είναι δύσκολο να εκτιμηθεί αν η απώλεια οφείλεται σε απόπτωση, σε νέκρωση ή σε απομάκρυνση κυττάρων που παρουσιάζουν χρωμοσωμικές ανωμαλίες ή διακοπή του κυτταρικού κύκλου.³⁹ Απόπτωση έχει παρατηρηθεί στον άνηθο όρχι του ανθρώπου *in vivo* και σε γεννητικά κύτταρα από ανθρώπινο όρχι, μετά από καλλιέργεια *in vitro*.^{40,41} Η ευαισθησία των γεννητικών κυττάρων στα αποπτωτικά ερεθίσματα, κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής σπερματογένεσης, ποικίλλει επίσης, ανάλογα με τα έθνη, και μεγαλύτερα επίπεδα αποπτωτικών σπερματογονίων και σπερματιδίων έχουν παρατηρηθεί στην κίτρινη φυλή σε σχέση με τη λευκή.⁴²



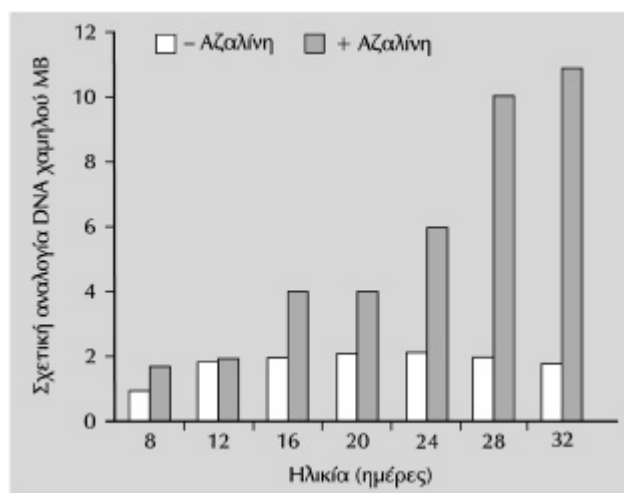
Εικόνα 5. Ανάλυση του κατακερματισμού του DNA στα κύτταρα του σπερματικού επιθηλίου του ώριμου αρουραίου. Σημειώνεται η ποσότητα διανουκλεοσωματικού DNA σε δείγματα από κάθε στάδιο. Ως τιμή για το στάδιο Ι ορίζεται αυθαίρετα η μονάδα.¹⁰

7. ΟΡΜΟΝΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΕΠΙΒΙΩΣΗΣ ΤΩΝ ΓΕΝΝΗΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Είναι γνωστός ο καθοριστικός ρόλος των γοναδοτροπινών και των ανδρογόνων στην επιβίωση των γεννητικών κυττάρων.⁴³⁻⁴⁶ Η υποφυσεκτομή ή η εξουδετέρωση των γοναδοτροπινών στην κυκλοφορία αυξάνουν την εκφύλιση των γεννητικών κυττάρων και προκαλούν, επίσης, μορφολογικές αλλαγές στο σωματικό κυτταρικό στοιχείο του όρχι.^{47,48} Η έλλειψη της LH οδηγεί σε απόπτωση των σπερματοκυττάρων στα στάδια της παχυταινίας και των στρογγυλών σπερματίδων, ενώ η στέρηση της FSH προκαλεί απόπτωση των σπερματογονίων και των σπερματοκυττάρων στο στάδιο της παχυταινίας.^{49,50} Κατά την προηβική περίοδο, η FSH θεωρείται ως ο κύριος παράγοντας επιβίωσης των γεννητικών κυττάρων, ενώ η LH και τα ανδρογόνα έχουν μικρότερη σημασία. Επειδή οι υποδοχείς της FSH βρίσκονται μόνο στα κύτταρα Sertoli, θα πρέπει ο παράγοντας επιβίωσης των γεννητικών κυττάρων να εκκρίνεται από αυτά.⁵¹ Αν χορηγηθούν γοναδοτροπίνες ή ανδρογόνα, αναστέλλεται ο κατακερματισμός του DNA, που προκαλείται από την υποφυσεκτομή.⁵² Από μια μελέτη, που πραγματοποιήθηκε σε άνδρες με κρυπορχία, στους οποίους χορηγήθηκε hCG, διαπιστώθηκε ότι η συχνότητα απόπτωσης των σπερματογονίων, κατά τον πρώτο μήνα θεραπείας, ήταν μεγαλύτερη εκείνης που παρατηρήθηκε στους άνδρες με κρυπορχία που δεν έλαβαν hCG.⁴⁰ Επίσης, θα πρέπει να τονιστεί η παρατηρούμενη διαταραχή της αναπαραγωγικής λειτουργίας στον ενήλικα μετά από χορήγηση hCG.⁵³

Στον αρουραίο, ο φυσιολογικά αναπτυσσόμενος όρχις περιέχει αποπτωτικά γεννητικά κύτταρα και αυξημένα επίπεδα κατακερματισμένου DNA. Όπως φαίνεται στην εικόνα 6, οι μεγαλύτερες τιμές παρατηρούνται από τις 16 έως τις 32 ημέρες μετά τη γέννηση. Στα ζώα ηλικίας 16 ημερών η μείωση έχει αρχίσει και οι όρχις περιέχουν σπερματογόνια και πρωτογενή σπερματοκύτταρα, στο στάδιο της παχυταινίας της πρόφασης I, με αποπτωτικά μορφολογικά χαρακτηριστικά. Η χορήγηση αζαλίνης Β (ανταγωνιστής της GnRH) κατά την προηβική περίοδο επιτείνει την απόπτωση και σχεδόν διπλάσιος του φυσιολογικού αριθμός σπερματοκυττάρων περιέχει κατακερματισμένο DNA.¹⁰

Στις 24 ημέρες έχουν συμπληρωθεί οι δύο μειωτικές διαιρέσεις και ορισμένα σπερματοκύτταρα ωριμάζουν σε απλοειδείς στρογγυλές σπερματίδες. Στα σπερματικά σωληνάρια παρατηρούνται ακόμη, σε αντίστοιχη των 20 ημερών αναλογία, αποπτωτικά κύτταρα. Το ποσοστό αυξάνει σημαντικά μετά τη χορήγηση αζαλίνης Β.



Εικόνα 6. Ποσοτική εκτίμηση του κατακερματισμένου DNA στον αναπτυσσόμενο όρχι του αρουραίου χωρίς ή με την παρουσία ανταγωνιστή της GnRH (αζαλίνη Β).¹⁰

Στις 32 ημέρες, απόπτωση παρατηρείται, επίσης, στα πρωτογενή σπερματοκύτταρα, στο στάδιο της παχυταινίας. Η έλλειψη γοναδοτροπινών προκαλεί εκτεταμένη απόπτωση και περίπου στο 70% των σπερματικών σωληναρίων παρατηρούνται αποπτωτικά κύτταρα. Οι κυτταρικοί τύποι που είναι περισσότεροι ευάλωτοι, είναι τα μειωτικά σπερματοκύτταρα και οι σπερματίδες. Από τα προαναφερθέντα διαπιστώνεται ότι η απόπτωση των γεννητικών κυττάρων μετά τη γέννηση εξαρτάται από τις γοναδοτροπίνες και φαίνεται ότι παρατηρείται σε συγκεκριμένη ηλικία, η οποία χαρακτηρίζεται ως «κρίσιμη» για την επιβίωση των γεννητικών κυττάρων. Ενώ, δηλαδή, η αζαλίνη Β επιτείνει την απόπτωση των σπερματοκυττάρων, σε αρουραίους ηλικίας μεταξύ 16–32 ημερών, φαίνεται ότι δεν έχει παρόμοια επίδραση πριν από τις 16 ημέρες ή στο ώριμο ζώο. Αυτό υποδηλώνει ότι ο ρόλος των γοναδοτροπινών, ως παραγόντων επιβίωσης των γεννητικών κυττάρων, εξαρτάται από την ηλικία. Ωστόσο, άλλοι ερευνητές παρατήρησαν αποπτωτικά γεννητικά κύτταρα σε όρχις ώριμων αρουραίων, μετά τη χορήγηση ανταγωνιστών της GnRH (GnRH A), και διαπίστωσαν ότι η μεγαλύτερη συχνότητα αφορά στα στάδια VII–VIII και IX–XI του κύκλου του σπερματικού επιθηλίου.⁵⁴ Εξάλλου, και η οιστραδιόλη επάγει την απόπτωση στο σπερματικό επιθήλιο των ώριμων αρουραίων και τη μεγαλύτερη ευαισθησία παρουσιάζουν τα στάδια IV–X.⁵⁵

8. ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ ΤΩΝ ΣΠΕΡΜΑΤΟΓΟΝΙΩΝ ΣΤΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟ ΣΠΕΡΜΑΤΙΚΟ ΕΠΙΘΗΛΙΟ

Με την ποσοτική ανάλυση των αποπτωτικών κυττάρων στο σπερματικό επιθήλιο διαπιστώθηκε σημαντική αύ-

ξηση της απόπτωσης σε παθολογικές καταστάσεις υποσπερματογένεσης ή διακοπής της ωρίμανσης στο στάδιο του σπερματοκυττάρου ή της σπερματίδας.^{56,57} Η βιοψία των όρχεων από ολιγοζωοσπερμικούς ασθενείς αποκαλύπτει την ύπαρξη πολύμορφων ανωμαλιών της σπερματογένεσης. Η κατάσταση αποκαλείται «μικτή ατροφία». Σε συνάρτηση με το βαθμό της βλάβης του σπερματικού επιθηλίου, που εκτιμάται σύμφωνα με τη μέθοδο Holstein και Schirren, ο αριθμός των ανοσοαντιδρώντων σπερματογονίων για τα αντιγόνα Ki-67/PCNA ποικίλλει σημαντικά.^{30,58} Όσο πρωιμότερη είναι η διακοπή της σπερματογένεσης, τόσο χαμηλότερη είναι η εκατοστιαία αναλογία των γεννητικών κυττάρων που αντιδρούν (εικ. 4, πίν. 4).

Όμως, οι ανωμαλίες της σπερματογένεσης που παρατηρούνται στους ολιγοζωοσπερμικούς ασθενείς δεν συνδέονται μόνο με μειωτική ή μετα-μειωτική βλάβη, αλλά και με δυσλειτουργία των σπερματογονίων. Ο πολλαπλασιασμός των σπερματογονίων που προκαλείται από την FSH γίνεται μόνον όταν τα κύτταρα αυτά είναι σε στενή επαφή με τα ήδη διαφοροποιημένα κύτταρα Sertoli. Κατά συνέπεια, μια βλάβη στην ωρίμανση των κυττάρων Sertoli θα μπορούσε να έχει άμεσο αντίκτυπο στην ανανέωση του πληθυσμού των σπερματογονίων. Με ειδικούς δείκτες για τα κύτταρα Sertoli, όπως για παράδειγμα τη βιμεντίνη και την αντι-Μυλλέρειο ορμόνη, έχει δείχθει σε έμβρυα και άνηθα ζώα ότι η διακοπή της σπερματογένεσης, όπως και η υποσπερματογένεση, συνδυάζονται με ατελή ωρίμανση αυτών.⁵⁹

8.1. Κρυφορχία

Διακοπή της σπερματογένεσης παρατηρείται σε όλες τις περιπτώσεις κρυφορχίας, είτε αυτή είναι γενετικής (τρισωμία), είτε ορμονικής (ελλιπίς δράση των ανδρογόνων), είτε ανατομικής αιτιολογίας (ανωμαλίες της ανάπτυξης του γεννητικού φύματος).⁶⁰

Οι επιπτώσεις της κρυφορχίας στην επιβίωση των γεννητικών κυττάρων έχουν μελετηθεί στον άνθρωπο,

Πίνακας 4. Ποσοστιαία αναλογία των ανοσοθετικών σπερματογονίων για τα αντισώματα αντι-Ki-67 και αντι-PCNA από βιοψίες όρχεων, σε συνάρτηση με το βαθμό αλλοίωσης του σπερματικού επιθηλίου.³⁰

Βαθμός αλλοίωσης	αντι-Ki-67(%)	αντι-PCNA(%)
10	30,2	46,5
7	30,9	44,5
1	19,9	31,4

Οι αριθμοί 1–10 αναφέρονται στην ποσοστιαία αναλογία των σπερματικών σωληναρίων που περιέχουν επιμήκεις σπερματίδες. Ο βαθμός 10 σημαίνει ότι 100% των εξετασθέντων σπερματικών σωληναρίων περιέχουν επιμήκεις σπερματίδες

το ποντίκι και τον αρουραίο.^{40,61,62} Το βάρος του όρχι ελαττώνεται και ο κατακερματισμός του DNA στα γεννητικά κύτταρα αυξάνεται. Στα πειραματόζωα που παρουσιάζουν ετερόπλευρη κρυφορχία, τα κύτταρα στον παθολογικό όρχι περιέχουν κατακερματισμένο DNA, χαμηλού μοριακού βάρους, ενώ ο ετερόπλευρος υγιής όρχις περιέχει DNA υψηλού μοριακού βάρους.

Εκτός από τα γεννητικά κύτταρα, ευαισθησία στην αύξηση της θερμοκρασίας παρουσιάζουν και τα σωματικά κύτταρα (κύτταρα Sertoli και κύτταρα Leydig). Ωστόσο, από την *in situ* ανάλυση φαίνεται ότι τα γεννητικά κύτταρα επηρεάζονται περισσότερο. Τα πρώτα κύτταρα που εξαφανίζονται είναι τα σπερματοκύτταρα στο στάδιο της παχυταινίας και οι στρογγυλές σπερματίδες.

Στην επαγωγή της κρυφορχίας εμπλέκονται τοπικοί και συστηματικοί παράγοντες. Ο ακριβής μηχανισμός δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί, αλλά με την ανάλυση της διεργασίας της απόπτωσης στους όρχεις μπορεί να κατανοηθεί καλύτερα ο ρόλος του θερμικού shock, όπως και κάθε άλλου τύπου stress, στην προκαλούμενη διαταραχή της σπερματογένεσης. Πράγματι, είναι γνωστό ότι πολλές πρωτεΐνες, όπως π.χ. τα αντι-οξειδωτικά ένζυμα, τα ένζυμα της επιδιόρθωσης του DNA και οι πρωτεΐνες του θερμικού shock (Heat Shock Proteins, HSP), παίζουν κυτταροπροστατευτικό ρόλο κατά τη διάρκεια αυτού του τύπου stress.⁶³ Σε μέτρια άνοδο της θερμοκρασίας οι HSP παράγονται από τα κύτταρα, για να εξασφαλίσουν την επιβίωσή τους, ενώ όταν η αύξηση της θερμοκρασίας είναι υπερβολική, προκαλείται νέκρωση του κυττάρου.⁶⁴ Αν αυξηθεί η παραγωγή των HSP και ιδιαίτερα της HSP 70, το κύτταρο αποκτά θερμοαντοχή και έτσι προστατεύεται από την απόπτωση.⁶⁵ Το γονίδιο της HSP 70-2 εκφράζεται ειδικά στις αρσενικές γονάδες και αν αδρανοποιηθεί, επιλεκτικά, διακόπεται η μείωση και, λόγω της αυξημένης απόπτωσης, παρατηρείται έλλειψη σπερματίδων και ώριμων σπερματοζωαρίων.⁶⁶⁻⁶⁸

Ως προς την επαγωγή και την εκτέλεση του αποπτωτικού προγράμματος που ενεργοποιείται από την αυξημένη τοπικά θερμοκρασία, πιθανολογούνται δύο οδοί: η πρώτη αφορά στα αρχικά στάδια και εξαρτάται από την p53, ενώ η δεύτερη είναι ανεξάρτητη αυτής.⁶⁹⁻⁷¹

8.2. Παράγοντες που προκαλούν βλάβη του DNA

Όπως παρατηρείται σε πληθυσμούς κυττάρων που πολλαπλασιάζονται, έτσι και τα γεννητικά κύτταρα, κατά τη σπερματογένεση, παρουσιάζουν μεγάλη ευαισθησία στους παράγοντες που προκαλούν βλάβη του DNA. Ανάλογα με τη δόση και το εφαρμοζόμενο θεραπευτικό πρωτόκολλο παρατηρείται συχνά στους καρκινοπαθείς ελαττωμένη παραγωγή σπερματοζωαρίων, αν όχι πλή-

ρης και μη αναστρέψιμη σπερματογένεση.⁷² Τα σπερματογόνια Β είναι ευαίσθητα σε δόσεις <3 Gy, ενώ τα σπερματογόνια Α παρουσιάζουν μεγαλύτερη αντοχή. Ωστόσο, μετά τη θεραπεία η αποκατάσταση της σπερματογένεσης δεν είναι πλήρης και ορισμένα σωληνάρια παραμένουν αζωοσπερμικά, παρόλο που περιέχουν σπερματογόνια.⁷³ Συνεπώς, πριν από την εφαρμογή οποιασδήποτε θεραπείας που μπορεί να προκαλέσει καταστροφή των γεννητικών κυττάρων (χημειοθεραπεία ή ακτινοβολία), συνιστάται η κρυοσυντήρηση των σπερματοζωαρίων.

Το κύτταρο διαθέτει διάφορα συστήματα για να επιδιορθώνει τις βλάβες του DNA. Μια πρωτεϊνική κινάση που εξαρτάται από το DNA ενεργοποιείται και συνδέεται με τις σπασμένες αλυσίδες. Η κινάση αυτή φωσφορυλιώνει την πρωτεΐνη p53, η οποία ενεργοποιείται επίσης όταν συνδέεται με το DNA μονής αλυσίδας.⁷⁴ Από πειραματικά δεδομένα σε ζώα φαίνεται ότι η αποκατάσταση της σπερματογένεσης δεν είναι πάντοτε πλήρης μετά από ακτινοβολία και στα σπερματικά σωληνάρια δεν παρατηρούνται μειωτικά ή μετα-μειωτικά κύτταρα, παρόλο που υπάρχουν σπερματογόνια.⁷⁵

Στα τερατοκαρκινώματα και τα σεμινώματα διαπιστώνεται υπερέκφραση του γονιδίου p53, φυσιολογικού τύπου, και δεν παρατηρούνται μεταλλάξεις που θα επηρέαζαν τη λειτουργία του. Η αποτελεσματικότητα της χημειοθεραπείας στους όγκους αυτούς, που είναι συχνά μεγάλοι και διάσπαρτοι, μπορεί να οφείλεται στην ικανότητα ορισμένων ουσιών, όπως η ετοποσίδη, να ενεργοποιούν την πρωτεΐνη p53 και να επάγουν την απόπτωση.^{76,77}

9. ΑΠΟΠΤΩΣΗ ΣΤΑ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΑ

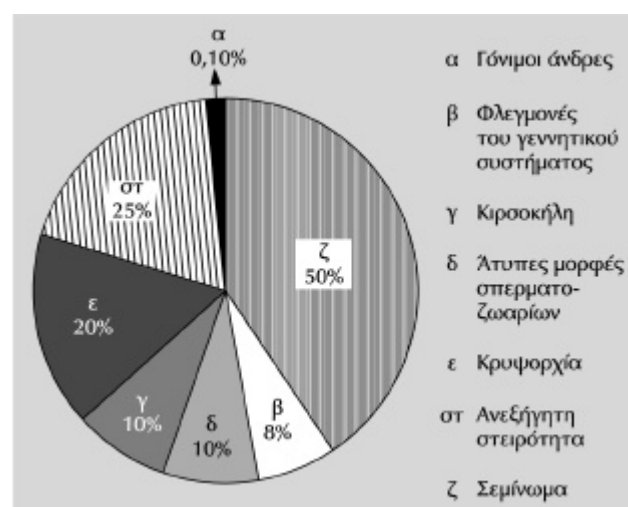
Ο πυρήνας των σπερματοζωαρίων, στο σπέρμα, χαρακτηρίζεται από υπερβολικά συμπαγή και σταθερή χρωματίνη, εντελώς διαφορετικής δομής από αυτή που παρατηρείται στη χρωματίνη των σωματικών κυττάρων.⁷⁸ Η ωρίμανση του πυρήνα κατά τη σπερμιόγνεση περιλαμβάνει δομικές και βιοχημικές μεταβολές της χρωματίνης, μεταξύ των οποίων συγκαταλέγονται η μεταβολή της δομής των νουκλεοσωμάτων, η αντικατάσταση των ιστών από μεταβατικές πρωτεΐνες, τις οποίες, ακολούθως, αντικαθιστούν οι πρωταμίνες, και η διακοπή της μεταγραφικής δραστηριότητας.^{79,80}

Στα σπερματοζωάρια των στείρων ανδρών παρατηρούνται τα μορφολογικά χαρακτηριστικά που διαπιστώνονται με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο στα αποπτωτικά σωματικά κύτταρα. Από συγκριτικές μελέτες, σε σπέρμα κακής ποιότητας, μετά την εφαρμογή της τεχνικής που ανιχνεύει τους νεκρωτικούς πυρήνες και της μεθόδου TUNEL, διαπιστώνεται ότι η αυξημένη συχνότητα εμφά-

νισης κατακερματισμένου DNA στους πυρήνες των σπερματοζωαρίων οφείλεται σε απόπτωση.^{81,82}

Η εκατοστιαία αναλογία των αποπτωτικών σπερματοζωαρίων σε γόνιμους άνδρες κυμαίνεται, ανάλογα με τη μέτρηση, από 0,1% μέχρι 5,2% (εικ. 7, πίν. 5).^{81,83} Στα σπερματοζωάρια που συγκεντρώνονται μετά από ανιούσα κίνηση (swim up) είναι της τάξης του 1,9%. Μια αύξηση που φθάνει μέχρι το 10% παρατηρείται σε πάσχοντες από φλεγμονή (περιλαμβανομένου και του AIDS) ή από κίρσοκλήλη. Σε ασθενείς με κρυπορχία, η συχνότητα των αποπτωτικών σπερματοζωαρίων στο σπέρμα κυμαίνεται μεταξύ 15–20%. Οι πάσχοντες από τη νόσο του Hodgkin παρουσιάζουν αποπτωτικά σπερματοζωάρια σε ποσοστό 16,5%, ενώ σε περίπτωση σεμινώματος η αναλογία αυτή μπορεί να φθάσει μέχρι και 50%.

Μια αρνητική σχέση παρατηρείται μεταξύ της εκατοστιαίας αναλογίας του κατακερματισμένου DNA και της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων (58,3% στους γόνιμους και 18,2% στους στείρους άνδρες), της μορφολογίας (42,2% άτυπες μορφές στους γόνιμους άνδρες, 76%



Εικόνα 7. Συχνότητα των αποπτωτικών σπερματοζωαρίων στο σπέρμα φυσιολογικών ανδρών και σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις.⁸¹

Πίνακας 5. Μέσος όρος των παραμέτρων του σπέρματος και εκατοστιαία αναλογία των αποπτωτικών σπερματοζωαρίων.⁸³

	α	β	γ	δ	ε	στ	ζ
α	0,10%						
β		8%					
γ			10%				
δ				10%			
ε					20%		
στ						25%	
ζ							50%

στους στείρους) και της συγκέντρωσης των σπερματοζωαρίων ($100,9 \times 10^6/\text{mL}$ στους γόνιμους, $15,5 \times 10^6/\text{mL}$ στους στείρους).⁸³ Επιπλέον, μια αρνητική σχέση υπάρχει μεταξύ της εκατοστιαίας αναλογίας των σπερματοζωαρίων που περιέχουν κατακερματισμένο DNA και του βαθμού επιτυχούς γονιμοποίησης και αυλάκωσης, μετά από ενδοκυτταροπλασματική έγχυση σπερματοζωαρίων (Intra Cytoplasmic Sperm Injection, ICSI).^{84,85}

Εκτός από την απόπτωση, μια άλλη ενδογενής αιτία κατακερματισμού του DNA των σπερματοζωαρίων μπορεί να είναι η ανεπαρκής ωρίμανση αυτών κατά τη διάρκεια της σπερμιόγένεσης. Η κατάσταση μπορεί να οφείλεται σε ελλιπή πρωταμίνωση και αυτό μπορεί να αποδειχθεί μετά από χρώση με χρωμομυκίνη A_3 .⁸⁶⁻⁸⁸ Εδώ θα πρέπει να σημειωθεί ότι στις επιμήκεις σπερματίδες παρατηρούνται παροδικά θραύσματα του DNA διπλής αλυσίδας, που προκαλούνται από μια ενδογενή νουκλεάση, το πιθανότερο μια DNA-τοποϊσομεράση II.^{89,90} Ο φυσιολογικός αυτός κατακερματισμός του DNA είναι απαραίτητος για την πρωταμίνωση.⁹¹ Συμβαίνει κατά την ωρίμανση των σπερματίδων στον αρουραίο, το ποντίκι και τον πίθηκο,

αμέσως πριν από την πρωταμίνωση και δεν ανιχνεύεται πλέον στις ώριμες σπερματίδες και τα σπερματοζωάρια.^{89,92} Αν μεταβληθεί η δραστηριότητα της τοποϊσομεράσης II και ιδιαίτερα η δραστηριότητα λιγκάσης, το κατακερματισμένο DNA διατηρείται και στα ώριμα σπερματοζωάρια.⁹³

Μεταξύ των εξωγενών αιτιών που προκαλούν κατακερματισμό του DNA των σπερματοζωαρίων αναφέρονται οι περιβαλλοντικές τοξίνες και οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου.⁹⁴ Η συγκέντρωσή τους αυξάνει στο σπερματικό πλάσμα, σε παθολογικές καταστάσεις, κυρίως όταν συνυπάρχει και ελαττωμένη πρωταμίνωση. Πράγματι, το σπέρμα κακής ποιότητας δεν περιέχει μόνο αυξημένα επίπεδα ελευθέρων ριζών οξυγόνου αλλά και σπερματοζωάρια με DNA ευαίσθητο στον κερματισμό, αν υποστούν οξειδωτικό stress. Ωστόσο, η κατάσταση αυτή μπορεί να αποφευχθεί με προσθήκη αντιοξειδωτικών ουσιών.⁹⁵

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Απευθύνονται στο Διευθυντή του Εργαστηρίου Ιστολογίας και Εμβρυολογίας της Ιατρικής Σχολής Καθηγητή

ABSTRACT

Proliferation and apoptosis of germ cells

R. ANGELOPOULOU, V. KARAYIANNIS

Laboratory of Histology and Embryology, Medical School, University of Athens, Greece

Archives of Hellenic Medicine 2000, 17(5):477-490

Cell proliferation and apoptosis are observed at various phases of gametogenesis and are important for germ cell development and differentiation. Numerous factors are involved in the control of both processes acting in concert to ensure the normal evolution of spermatogenesis and oogenesis. Apoptosis is the main cause of elimination of germ cells during the fetal period in both sexes. In the female, it follows the phase of intense proliferation and the entry into the meiotic prophase I. In the male, it occurs later, during the perinatal and the prepubertal period. The quantitative distribution pattern of Ki-67 protein and the proliferating cell nuclear antigen (PCNA) are used to investigate mitotic activity in gonadal biopsies during the reproductive period. The characteristic morphology of the apoptotic cells detected by the electron microscope and the *in situ* 3' end labeling procedure of nuclear DNA fragmentation enables their localisation on histological sections. The observation of low molecular weight DNA after gel fractionation and electrophoresis provides biochemical evidence of apoptotic cell death in the germ cells while quantitative estimation is made by flow cytometry. Recent advances in the understanding of the mechanism of apoptosis, the regulating role of the pro-apoptotic and anti-apoptotic genes and the different families of proteins involved in normal gametogenesis, along with analysis of the factors implicated in apoptosis of the testis and sperm in association with cell proliferation under normal conditions, should elucidate the mechanisms ensuring gonadal homeostasis and reveal the causes of infertility.

Key words: Apoptosis, Cell proliferation, Germ cells, Oogenesis, Spermatogenesis

Βιβλιογραφία

- JOST A, MAGRE S, ANGELOPOULOU R, CHARTRAIN I. Aspects of gonadal differentiation in mammals. In: *Genetic control of gamete production and function*. Proceedings of the Serono Clinical Colloquia on Reproduction 3. Grune and Stratton, Academic Press, 1982:1-14
- McLAREN A. Primordial germ cells in mammals. In: Zagris N, Duprat AM, Durston A (eds) *Organization of the early Vertebrate Embryo*. Plenum Press, New York, 1985:1-9
- MONK M, BOUBELIK M, LENHART S. Temporal and regional changes in DNA methylation in the embryonic, extra embryonic and germ cell lineages during mouse embryo development. *Development* 1987, 99:371-382
- GRANT M, ZUCOTTI M, MONK M. Methylation of CpG sites of two X-linked genes coincides with X-inactivation in the female mouse embryo but not in the germ line. *Nat Genet* 1992, 2:161-166
- KAFRI T, ARIEL M, BRANDEIS M. Developmental pattern of gene specific DNA methylation in the mouse embryo and germline. *Genes Dev* 1992, 6:7805-7814
- LAWSON KA, HAGE WJ. Clonal analysis of the origin of primordial germ cells in the mouse. In: Marsh J, Goode J (eds) *Germline Development*. Ciba Foundation Symposium, 1994, 182:68-84
- GARDNER RL, LYON MF, EVANS EP, BURTENSHAW MD. Clonal analysis of X-chromosome inactivation and the origin of the germ line in the mouse embryo. *J Embryol Exp Morphol* 1985, 88:349-363
- McLAREN A. Studies on mouse germ cells inside and outside the gonad. *J Exp Zool* 1983, 228:167-171
- UPADHYAYS, ZAMBONI L. Ectopic germ cells: natural model for the study of germ cells sexual differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982, 79:6584-6588
- BILLIG H, FURUTA I, RIVIER C, TAPANAINEN J, PARVINEN M, HSUEH AJW. Apoptosis in testis germ cells: Developmental changes in gonadotropin dependence and localization to selective tubule stages. *Endocrinology* 1995, 136:5-12
- BEAUMONT HM, MANDL AM. A quantitative study of primordial germ cells in the male rat. *J Embryol Exp Morphol* 1963, 11:715-740
- BEAUMONT HM, MANDL AM. A quantitative and cytological study of oogonia and oocytes in the foetal and neonatal rat. *Proc Roy Soc London Ser B* 1962, 155:557-579
- PREPIN J, GIBELLO-KERVAN C, CHARPENTIER G, JOST A. Number of germ cells and meiotic prophase stages in fetal rat ovaries cultured *in vitro*. *J Reprod Fert* 1985, 73:579-583
- PREPIN J, CHARPENTIER G, JOST A. Action du testicule foetal sur le nombre des cellules germinales de l'ovaire du foetus de rat, *in vitro*. *C R Acad Sci* 1985, 300:43-47
- BYSCOV AG. Regulation of meiosis in mammals. *Ann Biol Anim Biochem Biophys* 1979, 19:1251-1261
- BAKER TG. A quantitative and cytological study of germ cells in human ovaries. *Proc Roy Soc London Ser B* 1963, 158:417-433
- RODRIGUEZ I, ODY C, ARAKI K, GARCIA I, VASSALLI P. An early and massive wave of germinal cell apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis. *EMBO J* 1997, 16:262-2270
- HUCKINS C. The morphology and kinetics of spermatogonial degeneration in normal adult rats: an analysis using a simplified classification of germinal epithelium. *Anat Rec* 1978, 190:905-926
- PESCE M, DE FELICI M. Apoptosis in mouse primordial germ cells: a study by transmission, scanning electron microscope. *Anat Embryol* 1994, 189:435-440
- COUCOUVANIS EC, SHERWOOD SW, CARSWELL-CRUMPTON C, SPACK EG, JONES PP. Evidence that the mechanism of prenatal germ cell death in the mouse is apoptosis. *Exp Cell Res* 1993, 209:238-247
- DE POLA, VACCINA F, FORABOSCO A, CAVAZZUTI E, MARZONAL. Apoptosis of germ cells during human prenatal oogenesis. *Hum Reprod* 1997, 12:2235-2241
- BLANCO-RODRIGUEZ J, MARTINEZ-GARCIA C. Spontaneous germ cell death in the testis of the adult rat takes the form of apoptosis: re-evaluation of cell types that exhibit the ability to die during spermatogenesis. *Cell Prolif* 1996, 29:13-31
- MONNIAUX D, MANDON-PEPIN B, MONGET P. L'atresie folliculaire, un gaspillage programme. *Med Sci* 1999, 15:157-166
- GAVRIELI Y, SHERMAN Y, BEN-SASSON SA. Identification of programmed cell death *in situ* via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992, 119:493-501
- ANGELOPOULOU R, DADOUNE JP. Apoptose dans la spermatogenese normal et pathologique. *Contracept Fert Sex* 1999, 27:99-106
- DUCHROW M, GERDES J, SCHLUTER C. The proliferation-associated Ki-67 protein: definition in molecular terms. *Cell Prolif* 1994, 27:35-242
- WASEEM NH, LANE DP. Monoclonal antibody analysis of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA). Structural conservation and the detection of a nucleolar form. *J Cell Sci* 1990, 96:121-129
- DANTZER F, DE MURCIA G. Quelles sont les AND polymerases requises pour la replication et la reparation de l'ADN chez les eucaryotes? *Med Sci* 1998, 14:704-712
- BRAVO R, FRANK R, BLUNDELL PA, MACDONALD-BRAVO H. Cyclin/PCNA is the auxilliary protein of DNA polymerase-delta. *Nature* 1987, 326:515-517
- STEGER K, ALEITHE I, BEHRE H, BERGMANN M. The proliferation of spermatogonia in normal and pathological human seminiferous epithelium: an immunohistochemical study using monoclonal antibodies against Ki-67 protein and proliferating cell nuclear antigen. *Mol Hum Reprod* 1998, 4:227-233
- HOFSTADER F, KNUCHEL R, RUSCOFF J. Cell proliferation assessment in oncology. *Virchows Arch* 1995, 427:323-341
- STORH P. *Handbuch der Histologie und microscopischen Anatomie des Menschen*. Gustav Fischer, Jena, 1886
- REGAUD CP. Degenerescence des cellules seminales chez les mammiferes en absence de tout etat pathologique. *C R Soc Biol* 1900, 52:268-270
- BARTKE A. Apoptosis of male germ cells: a generalized or a cell-type specific phenomenon? (editorial). *Endocrinology* 1995, 136:3-4
- SUZUKI M, ABE K, YOSHINAGA K, OBINATA M, FURUSAWA M, ABE K. Specific arrest of spermatogenesis caused by apoptotic cell death in transgenic mice. *Genes Cells* 1996, 1:1077-1086
- ALLAN DJ, HARMON BV, KERR JFR. Cell death in spermatogenesis. In: Potten CS (ed) *Perspectives of Mammalian Cell Death*. Oxford University Press, London, 1987:229-258
- JOHNSON L, PETTY CS, NEAVES WB. Further quantification of human spermatogenesis: germ cell loss during prophase of meiosis and

- its relationship to daily sperm production. *Biol Reprod* 1983, 29: 207–215
38. RUSSEL LD, ETLIN RA, SINHA-HIKIM AP, CLEGG ED. *Histological and Histopathological Evaluation of the Testis*. Cache River Press, Clearwater FL, 1990
 39. CLERMONT Y. Quantitative analysis of spermatogenesis of the rat: a revised model for the renewal of spermatogenesis. *Am J Anat* 1962, 111:111–129
 40. HEISKANEN P, BILLIG H, TOPPARI J, KALEVA M, ARSALO A, RAPOLA J ET AL. Apoptotic cell death in the normal and cryptorchid human testis: the effect of human chorionic gonadotrophin on testicular cell survival. *Pediatr Res* 1996, 40:351–356
 41. LI LH, WINE RN, CHAPIN RE. 2-methoxyacetic acid (MAA)-induced spermatocyte apoptosis in human and rat: an *in vitro* comparison. *J Androl* 1996, 17:538–549
 42. SINHA HIKIM AP, WANG C, LUE Y, JOHNSON L, WANG XH, SWERDLOFF RS. Spontaneous germ cell apoptosis in humans: evidence for ethnic differences in the susceptibility of germ cells to programmed cell death. *J Clin Endocrinol Metab* 1998, 83:152–156
 43. RUSSEL LD, ALGER LE, NEQUIN LG. Hormonal control of pubertal spermatogenesis. *Endocrinology* 1987, 120:1615–1632
 44. CLERMONT Y, MORGENTALER H. Quantitative study of spermatogenesis in the hypophysectomized rat. *Endocrinology* 1955, 57: 369–382
 45. HENRIKSEN K, HAKOVIRTA H, PARVINEN M. Testosterone inhibits and induces apoptosis in rat seminiferous tubules in a stage-specific manner: *in situ* quantification in squash preparation after administration of ethane dimethane sulfonate. *Endocrinology* 1995, 136: 3285–3291
 46. HSUEH AJW, EISENHAUER K, CHUN S-Y, HSU S-Y, BILLIG H. Gonadal cell apoptosis. *Recent Prog Hormone Res* 1996, 51:433–456
 47. GOSH S, BARTKE A, GRASSO P, REICHERT LE, RUSSEL LD. Structural manifestations of the rat Sertoli cells to hypophysectomy: a correlative morphometric and endocrine study. *Endocrinology* 1992, 131:485–497
 48. RUSSEL LD, CORBIN TJ, REN HP, ARADOR A, BARTKE A, GOSH S. Structural changes in rat Leydig cells posthypophysectomy: a morphometric and endocrine study. *Endocrinology* 1992, 131:498–508
 49. MARATHE GK, SHETTY J, DIGHE RR. Selective immunoneutralization of luteinizing hormone results in the apoptotic cell death of pachytene spermatocytes and spermatids in the rat testis. *Endocrine* 1995, 3:705–709
 50. SHETTY J, MARATHE GK, DIGHE RR. Specific immunoneutralization of FSH leads to apoptotic cell death of the pachytene spermatocytes and spermatogonial cells in the rat. *Endocrinology* 1996, 137: 2179–2182
 51. VAN ALPHEN MMA, VAN DE KANT HJG, DE ROOIJ DG. Follicle-stimulating hormone stimulates spermatogenesis in the adult monkey. *Endocrinology* 1988, 123:1449–1455
 52. TAPANAINEN JS, TILLY JL, VIHKO KK, HSUEH AJW. Hormonal control of apoptotic cell death in the testis: gonadotropins and androgens as testicular survival factors. *Mol Endocrinol* 1993, 7:643–650
 53. DUNKEL L, TASKINEN S, HOVATTA O, TILLY JL, WIKSTROM S. Germ cell apoptosis after treatment of cryptorchidism with human chorionic gonadotrophin is associated with impaired reproductive function in the adult. *J Clin Invest* 1997, 100:2341–2346
 54. SINHA HIKIM AP, RAJAVASHISTH TB, SINHA HIKIM I, LUE Y, BONAVERA JJ, LEUNG A ET AL. Significance of apoptosis in the temporal and stage-specific loss of germ cells in the adult rat after gonadotropin deprivation. *Biol Reprod* 1997, 57:1193–1201
 55. BLANCO-RODRIGUEZ J, MARTINEZ-GARCIA C. Induction of apoptotic cell death in the seminiferous tubule of the adult rat testis: assessment of the germ cell types that exhibit the ability to enter apoptosis after hormone suppression by oestradiol treatment. *Int J Androl* 1996, 19:237–247
 56. LIN WW, LAMB DJ, WHEELER TM, ABRAMS J, LIPSHULTZ LI, KIM ED. Apoptotic frequency is increased in spermatogenic maturation arrest and hypospermatogenic states. *J Urol* 1997, 158:1791–1793
 57. LIN WW, LAMB DJ, WHEELER TM, ABRAMS J, LIPSHULTZ LI, KIM ED. *In situ* end-labeling of human testicular tissue demonstrates increased apoptosis in conditions of abnormal spermatogenesis. *Fertil Steril* 1997, 68:1065–1069
 58. HOLSTEIN AF, SCHIRREN C. Histological evaluation of testicular biopsies. *Fortsch Androl* 1983, 8:108–117
 59. STEGER K, REY R, KLIESCH S, LOUIS F, SCHLEICHER G, BERGMANN M. Immunohistochemical detection of immature Sertoli cell markers in testicular tissue of infertile adult men: a preliminary study. *Int J Androl* 1996, 19:122–128
 60. HSUEH AJW, EISENHAUER K, CHUN S-Y, HSU S-Y, BILLIG H. Gonadal cell apoptosis. *Recent Prog Hormone Res* 1996, 51:433–456
 61. YIN Y, HAWKINS KL, DE WOLF WC, MORGENTALER A. Heat stress causes testicular germ cells apoptosis in adult mice. *J Androl* 1997, 18:159–165
 62. SHIKONE T, BILLIG H, HSUEH AJW. Experimentally induced cryptorchidism increases apoptosis in rat testis. *Biol Reprod* 1994, 51:867–872
 63. POLLA BS, BANZET N, DALL'AVA J, ARRIGO AP, VIGNOLA AM. Les mitochondries, carrefour entre vie et mort cellulaire: roles des proteines de stress et consequences sur l'inflammation. *Med Sci* 1998, 14:18–25
 64. SELLINS KS, COHEN JJ. Hyperthermia induces apoptosis in thymocytes. *Rad Res* 1991, 126:88–95
 65. SAMALIA A, COTTER TG. Heat shock proteins increases resistance to apoptosis. *Exp Cell Res* 1996, 223:163–170
 66. DIX DJ, ALLEN JW, COLLINS BW, MORI C, NAKAMURA N, POORMAN-ALLEN P ET AL. Targeted gene disruption of Hsp70-2 results in failed meiosis, germ cell apoptosis and male infertility. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996, 93:3264–3268
 67. DIX DJ, ALLEN JW, COLLINS BW, POORMAN-ALLEN P, MORI C, BLIZARD DR ET AL. HSP70-2 is required for desynapsis of synaptonemal complexes during meiotic prophase in juvenile and adult mouse spermatocytes. *Development* 1997, 124:4595–4603
 68. MORI C, NAKAMURA N, DIX DJ, FUJIOKA M, NAKAGAWA S, SHIOTA K ET AL. Morphological analysis of germ cell apoptosis during postnatal testis development in normal and HSP 70-2 knockout mice. *Dev Dyn* 1997, 208:125–136
 69. SOCHER SA, YIN Y, DE WOLF WC, MORGENTALER A. Temperature-mediated germ cell loss in the testis is associated with altered expression of the cell-cycle regulator p53. *J Urol* 1997, 157:1986–1989
 70. YIN Y, STAHL BC, DE WOLF WC, MORGENTALER A. p53-mediated germ cell quality control in spermatogenesis. *Dev Biol* 1998, 204:165–171

71. YIN Y, DE WOLF WC, MORGENTALER A. Experimental cryptorchidism induces testicular germ cell apoptosis by p53-dependent and independent pathways in mice. *Biol Reprod* 1998, 58:492-496
72. APPERLEY JF, REDDY N. Mechanisms and management of treatment-related gonadal failure in recipients of high dose chemoradiotherapy. *Blood Rev* 1995, 9:93-116
73. KANGASNIEMI M, HUHTANIEMI I, MEISTRICH ML. Failure of spermatogenesis to recover despite the presence of A spermatogonia in the irradiated LBNF1 rat. *Biol Reprod* 1996, 54:1200-1208
74. ENOCH T, NORBURY C. Cellular responses to DNA damage: cell-cycle checkpoints, apoptosis and the roles of p53 and ATM. *Trends Biochem Sci* 1995, 20:426-430
75. BEUMER TL, ROEPERS HL, GADEMAN LS, RUTGERS DH, ROOIJ DG. P21 (Cip/WAF 1) expression in the mouse testis before and after X irradiation. *Mol Reprod Dev* 1997, 47:240-247
76. LUTZKER SG, LEVINE AJ. A functionally inactive p53 protein in teratocarcinoma cells is activated by either DNA damage or cellular differentiation. *Nat Med* 1996, 2:804-810
77. SJOBLÖM T, WEST A, LAHDETTE J. Apoptotic response of spermatogenic cells to the germ cell mutagens etoposide, adriamycin and diepoxybutane. *Environm Mol Mutagen* 1998, 33:133-148
78. WARD WS, COFFEY DS. DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. *Biol Reprod* 1991, 44:569-574
79. DADOUNE JP. The nuclear status of human sperm cells. *Micron* 1995, 26:323-345
80. POCCIA D. Remodelling of nucleoproteins during gametogenesis, fertilization, and early development. *Int Rev Cytol* 1986, 105:1-65
81. BACETTI B, COLLODEL G, PIOMBONI P. Apoptosis in human ejaculated sperm cells. *J Submicrosc Cytol Pathol* 1996, 28:587-596
82. GORCZYCA W, TRAGANOS F, JESIONOWSKA H, DARZYNKIEWICZ Z. Presence of DNA strand breaks and increased sensitivity of DNA *in situ* to denaturation in abnormal human sperm cells: analogy to apoptosis of somatic cells. *Exp Cell Res* 1993, 207:202-205
83. GANDINI L, LOMBARDO F, PAOLI D, CAPONECCHIA L, DONDERO F. Apoptosis in ejaculated human spermatozoa. *Int J Androl* 1998, 21(Suppl 1):16
84. SUN JG, JURICOVA A, CASPER RF. Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization *in vitro*. *Biol Reprod* 1997, 56:602-607
85. LOPES S, SUN JG, JURICOVA A, MERIANO J, CASPER RF. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1998, 69:528-532
86. MANICARDI GC, BIANCHI PG, PANTANO S, AZZONI P, BIZZARO D, BIANCHI U ET AL. Presence of endogenous nicks in DNA of ejaculated human spermatozoa and its relationship to chromomycin A3 accessibility. *Biol Reprod* 1995, 52:864-867
87. BIANCHI PG, MANICARDI GC, BIZZARO D, CAMPANA A, BIANCHI U, SAKKAS D. The use of the GC specific fluorochrome chromomycin A3 (CMA3), as an indicator of poor sperm quality. *J Assoc Reprod Genet* 1996, 13:246-250
88. MANICARDI GC, TOMBACCO A, BIZZARO D, BIANCHI U, BIANCHI PG, SAKKAS D. DNA strand breaks in ejaculated human spermatozoa: comparison of susceptibility to the nick translation and terminal transferase assays. *Histochem J* 1998, 30:33-39
89. McPHERSON SMG, LONGO FJ. Chromatin structure-function alterations during mammalian spermatogenesis: DNA nicking and repair in elongating spermatids. *Eur J Histochem* 1993, 37:109-128
90. McPHERSON SMG, LONGO FJ. Nicking of rat spermatid and spermatozoa DNA: possible involvement of DNA topoisomerase II. *Dev Biol* 1993, 158:122-130
91. SAKKAS D, MANICARDI GC, BIANCHI PG, BIZZARO D, BIANCHI U. Relationship between the presence of endogenous nicks and sperm chromatin packaging in maturing and fertilizing mouse spermatozoa. *Biol Reprod* 1995, 52:1149-1155
92. McPHERSON SMG, LONGO FJ. Localization of DNase I hypersensitive regions during rat spermatogenesis: stage-dependent patterns and unique sensitivity of elongating spermatids. *Mol Reprod Dev* 1992, 31:268-279
93. BIANCHI PG, MANICARDI GC, BIZZARO D, BIANCHI U, SAKKAS D. Effect of deoxyribonucleic acid protamination on fluorochrome staining and *in situ* nick-translation of murine and human mature spermatozoa. *Biol Reprod* 1993, 49:1083-1088
94. LOPES S, JURICOVA A, SUN JG, CASPER RF. Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod* 1998, 13:896-900
95. HUGHES CM, LEWIS SEM, McKELVEY-MARTIN VJ, THOMPSON W. The effect of antioxidant supplementation during Percoll preparation on human sperm DNA integrity. *Hum Reprod* 1998, 13:1240-1247

Corresponding author:

R. Angelopoulou, 54 Anagnostopoulou street, GR-106 72 Athens, Greece