

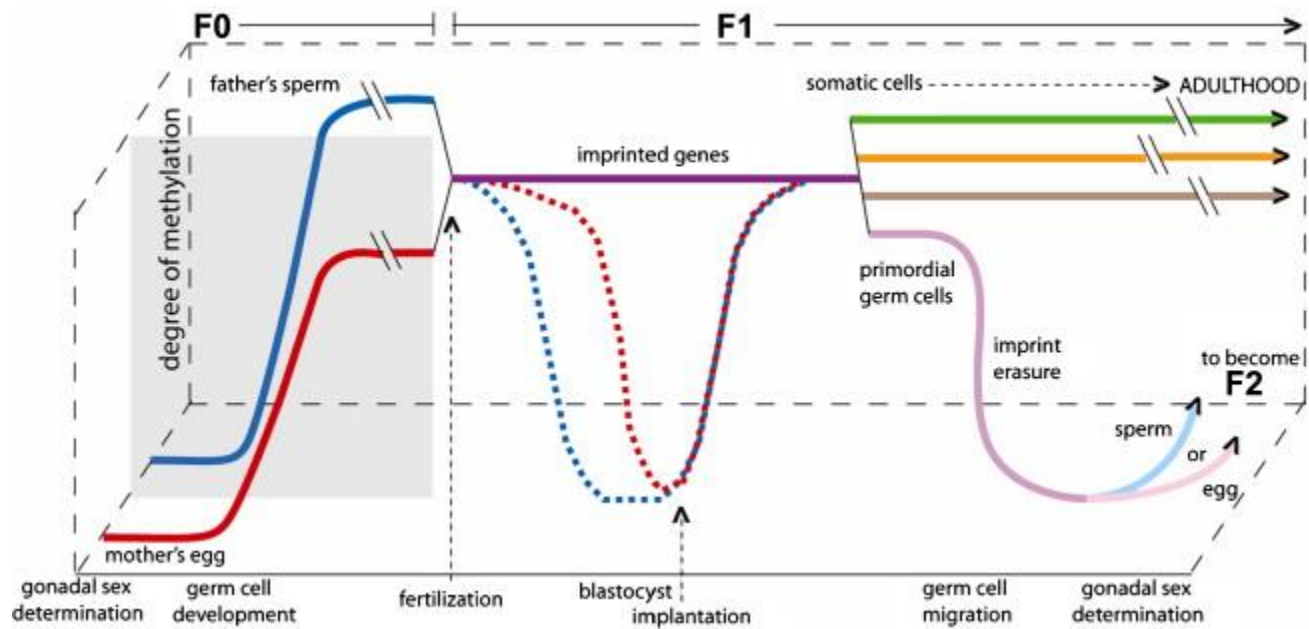
Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗΣ ΚΡΙΣΗΣ ΣΤΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΟΥ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ

Ρωξάνη Αγγελοπούλου
Ομότιμος Καθηγήτρια ΕΚΠΑ

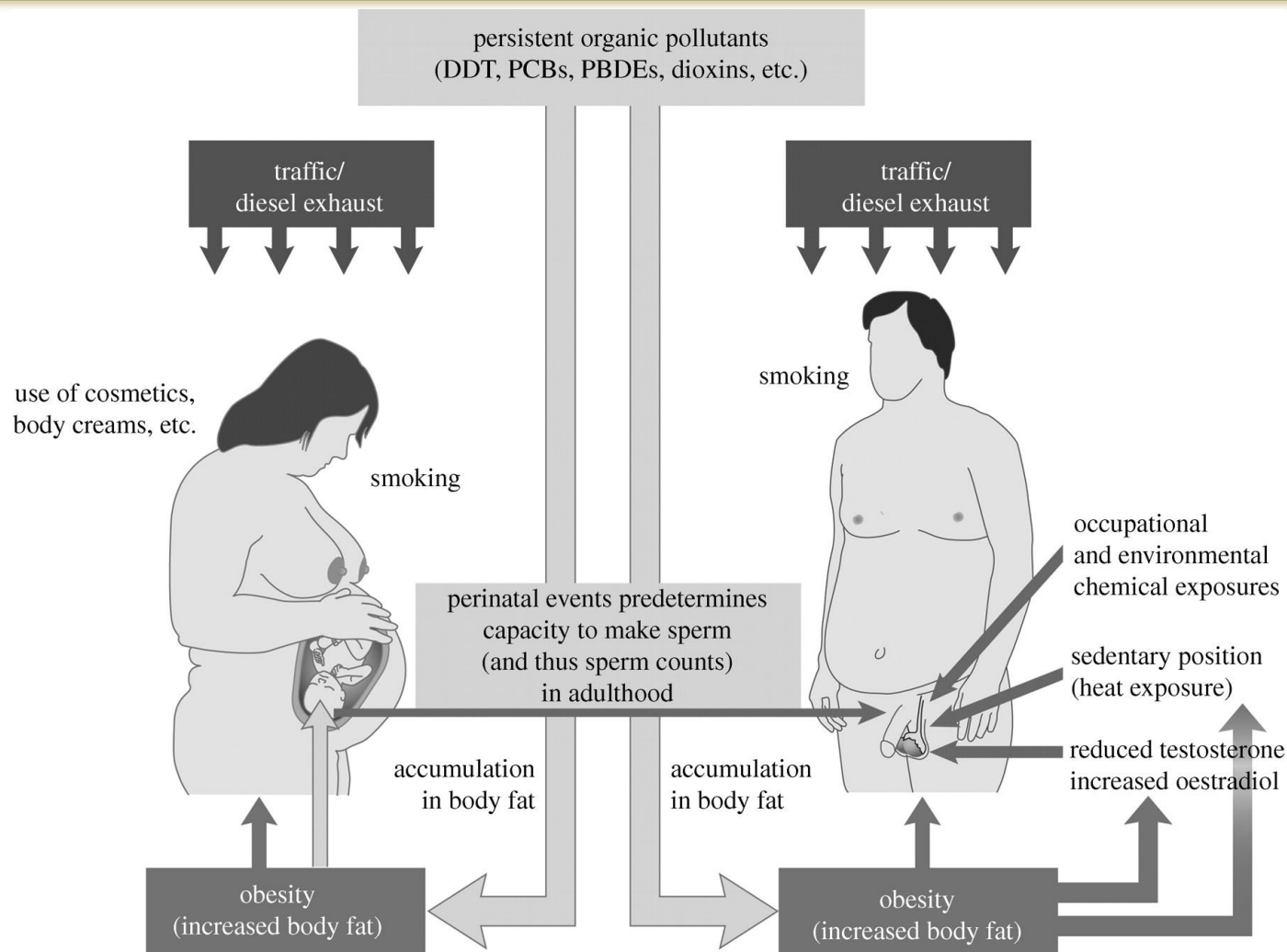
Περίοδοι κατά τις οποίες η περιβαλλοντική έκθεση επηρεάζει την F_1 κατάσταση μεθυλίωσης ενός ατόμου, επηρεάζοντας το φαινότυπο F_1 (σχήμα διαφάνεια 3).

Πρώτη είναι η περίοδος F_0 (parental) της ανάπτυξης των γεννητικών κυττάρων όταν γίνεται επαναπρογραμματισμός της κατάστασης μεθυλίωσης μετά τη διαγραφή της γονιδιακής αποτύπωσης στο σπερματοζωάριο (συμπαγής μπλε γραμμή) και το ωοκύτταρο (συμπαγής κόκκινη γραμμή).

Δεύτερη είναι η περίοδος F_1 της εμβρυϊκής ανάπτυξης, όταν απομεθυλιώνονται όλα τα υφιστάμενα γονιδιακή αποτύπωση γονίδια. Η απομεθυλίωση γίνεται γρηγορότερα στην ανδρική γεννητική σειρά (διακεκομμένη μπλε γραμμή) και ακολουθείται από τη θηλυκή (διακεκομμένη κόκκινη γραμμή). Τα μεθυλιωμένα γονίδια (συμπαγής μωβ γραμμή) διατηρούν τα χαρακτηριστικά τους και έτσι επιτρέπεται η έκφρασή τους στους σωματικούς ιστούς του ενήλικου. Τα γονίδια που δεν αποτυπώνονται απομεθυλιώνονται στο στάδιο της βλαστοκύστης.

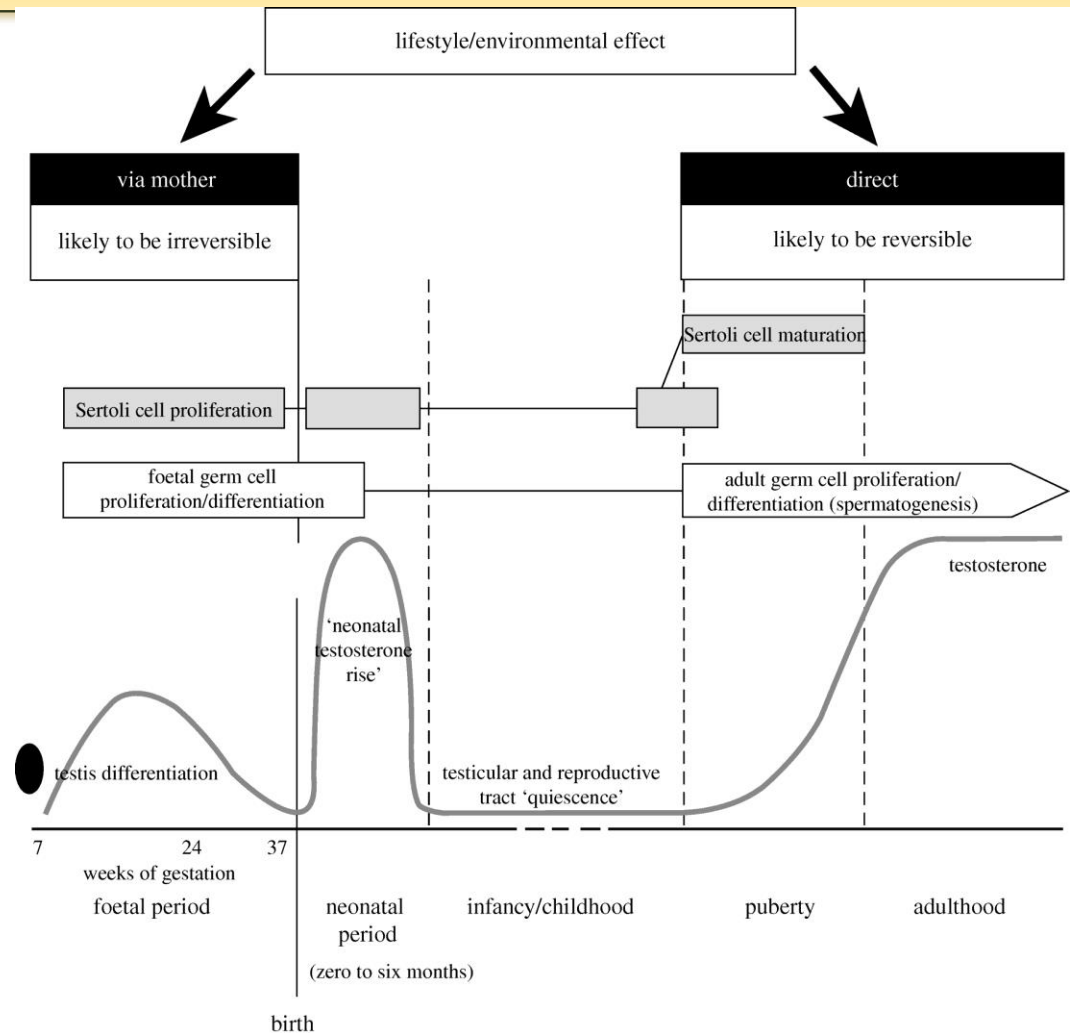


Diagrammatic illustration of the main environmental/lifestyle factors established to negatively impact on spermatogenesis and sperm counts in human males, whether via the mother during foetal development of the testis or directly on the testis during adulthood.



Sharpe R M Phil. Trans. R. Soc. B 2010;365:1697-1712

Known times at which environmental/lifestyle factors can negatively impact on spermatogenesis and sperm counts in human males in relation to the major relevant events in testis development and function.



Sharpe R M Phil. Trans. R. Soc. B 2010;365:1697-1712

R. M. SHARPE

REVIEW. ENVIRONMENT AND SPERMATOGENESIS

PHIL. TRANS. R. SOC. B (2010) TO

Επιδημιολογικές μελέτες δείχνουν ότι η έκθεση στα βαρέα μέταλλα :

- ⊙ Επηρεάζει αρνητικά τη σπερματογένεση και τη συγκέντρωση των σπερματοζωαρίων στο σπέρμα.
- ⊙ Ιδιαίτερα αναφέρονται ο μόλυβδος Pb, το κάδμιο Cd και ο υδράργυρος Hg: Tas et al.1996; Figa-Talamanca et al. 2001; Bonde & Storgaard 2002 .
- ⊙ Ρύπανση του πληθυσμού από το μόλυβδο, εκτός από τους ελαιοχρωματιστές λόγω της έκθεσής τους στα χρώματα, μπορεί να γίνει και από την κατανάλωση ορισμένων ψαριών όπως π.χ. τόνου στον οποίο έχει αναφερθεί αυξημένη συγκέντρωση του μετάλλου (Figa-Talamanca et al. 2001).

Ο ΜΟΛΥΒΔΟΣ ΚΑΙ ΤΟ ΚΑΔΜΙΟ

- ◎ Pb and Cd

είναι μη ειδικοί περιβαλλοντικοί ρύποι (nonessential environmental pollutant - δυνητικοί ρύποι) (Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR)).

- ◎ Οι ρύποι Pb και Cd συγκαταλέγονται στους ενδοκρινικούς διαταράκτες. Η έκθεση του ατόμου σε αυτούς μπορεί να προκαλέσει ανδρική υπογονιμότητα (Burdorf et al., 2006).

ΟΡΜΟΝΙΚΟΪ ΔΙΑΤΑΡΆΚΤΕΣ

Οι ορμονικοί διαταράκτες είναι χημικές ουσίες που βρίσκονται σε πολλά προϊόντα κοινής χρήσης (καθαριστικά, συντηρητικά τροφίμων, πλαστικά κ.ά.), παρεμβάλλονται στη δράση των ορμονών (στη σύνθεση, την έκκριση, την σύνδεση με τα όργανα- στόχους) και έτσι μπορούν να προκαλέσουν ενδοκρινολογικά νοσήματα. Ιδιαίτερα στο γεννητικό σύστημα επηρεάζουν την έναρξη της εφηβείας, την ανδρική γονιμότητα, τη λειτουργία των ωοθηκών και των όρχεων, τη δράση των ανδρικών και γυναικείων ορμονών.

Παραδείγματα:

Βισφενόλη Α παράγωγο του πετρελαίου που περιέχεται στα πλαστικά, στις συσκευασίες τροφίμων, στις κονσέρβες, στα ιατρικά εργαλεία και άλλα.

Αναμενόμενες δράσεις μολύβδου

- ⊙ Λιποβαρές νεογνό
- ⊙ Βλάβες σύγκλεισης νευρικού σωλήνα
- ⊙ Μειωμένη παραγωγή σπερματοζωαρίων

Αναμενόμενες δράσεις καδμίου

- ⊙ Τα αποτελέσματα δείχνουν υψηλότερα επίπεδα καδμίου στο αίμα και στο σπερματικό πλάσμα σε υπογόνιμους άνδρες σε σχέση με τους γόνιμους ή τους άνδρες στο φυσιολογικό γενικό πληθυσμό (Benoff et al. 2009);
- ⊙ Οι υπογόνιμοι άνδρες παρουσίαζαν αρνητική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων του καδμίου και της συγκέντρωσης ή της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων.
- ⊙ Τα ίδια ευρήματα παρατηρήθηκαν και σε πειραματόζωα (Benoff et al. 2008).

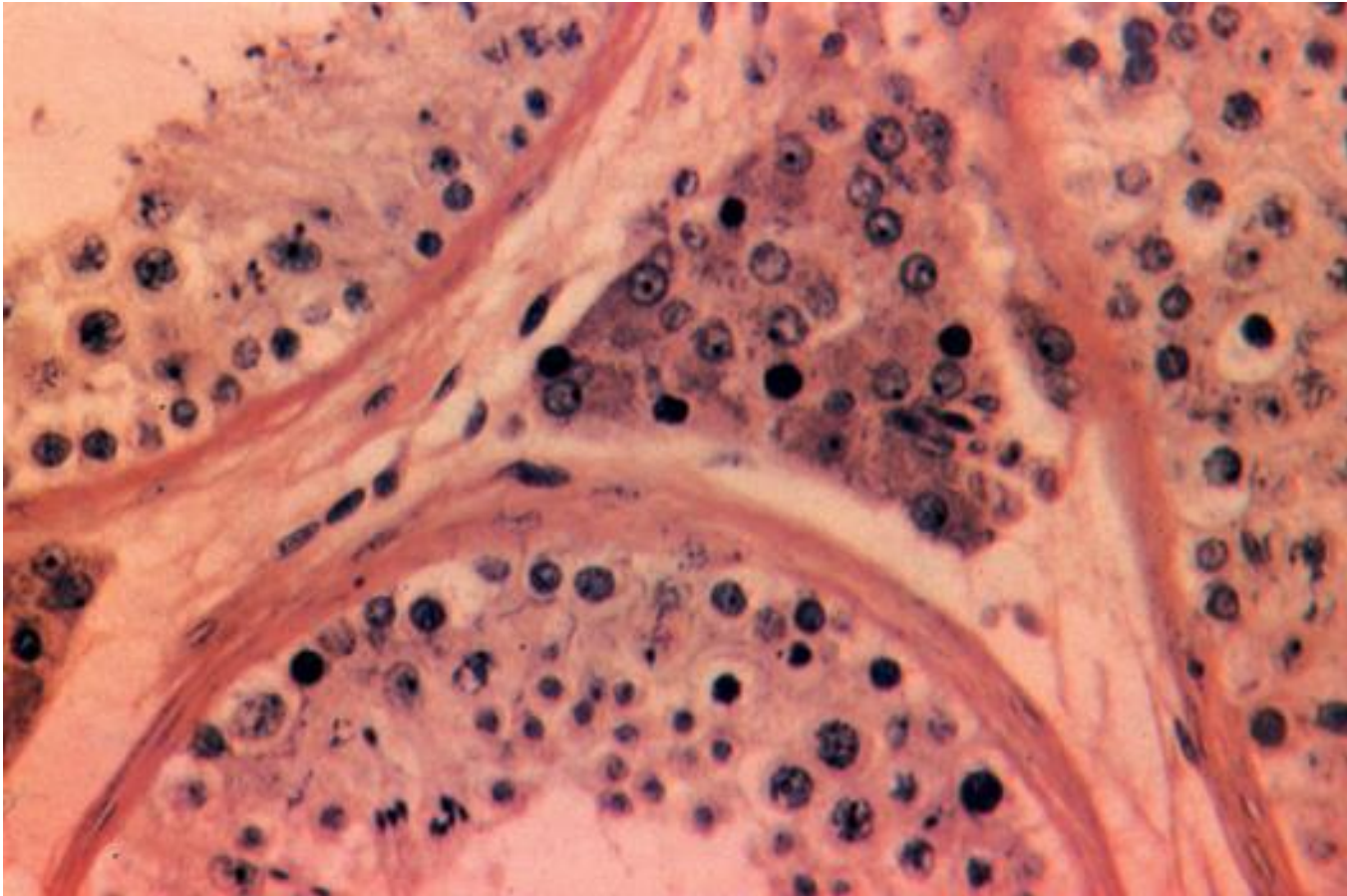
Σταδιοποίηση της αντίδρασης του ορχικού ιστού στη δράση του χλωριούχου καδμίου

- ⊙ Ελάττωση της ορχικής μάζας
- ⊙ Διαταραχή της ορχικής ιστολογίας. Προσβάλλονται όλοι οι κυτταρικοί τύποι αλλά ιδιαίτερα το σπερματικό επιθήλιο. Περιγράφονται: οξεία φάση νέκρωσης και μεταγενέστερες εκφυλιστικές αντιδράσεις.
- ⊙ Προσβάλλονται, επίσης, τα αγγεία με αιμορραγία και οίδημα του διαμέσου ιστού που παρατηρούνται από τις πρώτες ημέρες χορήγησης του CdCl₂. Κατά την ίδια περίοδο σημεία νέκρωσης παρατηρούνται στα κύτταρα Leydig.
- ⊙ Ύψωση στο διάμεσο ιστό παρατηρείται αργότερα.

Η ΑΝΑΓΕΝΝΗΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ LEYDIG

- ⊙ Από όλα τα προϋπάρχοντα κυτταρικά στοιχεία επιβιώνουν μόνο στοιχεία του συνδετικού ιστού του ινώδους χιτώνα και παρατηρείται αναγέννηση μόνο των κυττάρων Leydig μέσω μιας διεργασίας που μπορεί να παρατηρείται ακόμη και μετά 100 ημέρες από τη χορήγηση του χλωριούχου καδμίου.

KYTTÄPÄ LEYDIG

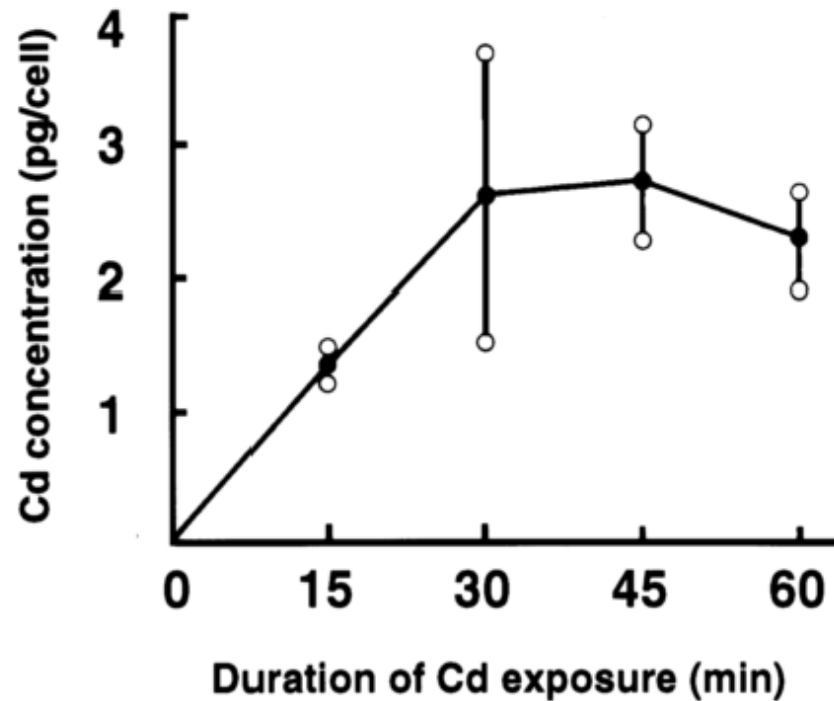


ΠΙΝΑΚΑΣ 2.1. Κύρια εκκρινόμενα προϊόντα των κυττάρων Leydig και των περιωληνιακών μυοειδών κυττάρων.

Εκκρινόμενο προϊόν	Ιδιότητες/ Λειτουργία
Κύτταρα Leydig:	
Ανδρογόνα/11β υδροξυλάση	Στεροειδή/ενδοκρινική/παρακρινική δράση
Πεπτίδια (POMC) (Pro- α -melanocortin) (ACTH, β -ενδορφίνη)	Οπιοειδή/Ρυθμιστικά της λειτουργίας των κυττάρων Sertoli και Leydig
Ανασταλτίνη	Ενδοκρινική/παρακρινική και ρυθμιστική δράση
IGF-I (Insulin-like Growth Factor)	Συντήρηση αύξησης/διαφοροποίησης
SF 1 (Steroidogenic factor 1)	Στεροειδογόνος παράγοντας
Περιωληνιακά κύτταρα:	
PMoS (Peritubular Modulator of Sertoli cell function)	Μη-μιτογόνος/Παρακρινικός τροποποιητής της λειτουργίας των κυττάρων Sertoli
Αναστολέας του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (PA-1)	
Φιμπρονεκτίνη	
Κολλαγόνο I	Στοιχεία της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας
Πρωτεογλυκάνες	
TGF α (Transforming Growth Factor) α	Προαγωγή αύξησης
TGF β (Transforming Growth Factor) β	Αναστολή αύξησης
IGF-I (Insulin-like Growth Factor)	Συντήρηση αύξησης/διαφοροποίησης

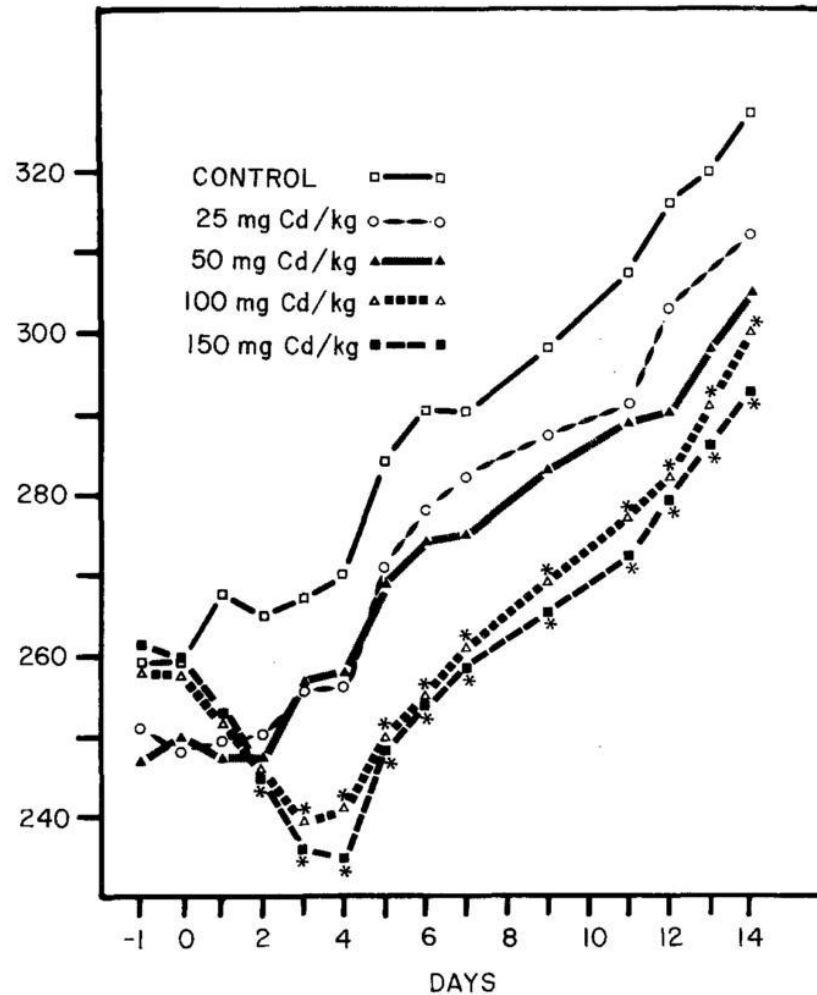
Η ΠΡΟΣΛΗΨΗ ΤΟΥ Cd ΑΠΟ ΚΥΤΤΑΡΑ B131.

Μετά 15 min από την εισαγωγή της ουσίας στο υλικό της καλλιέργειας το Cd απορροφάται γρήγορα και φθάνει στην τιμή plateau μετά 60 min.

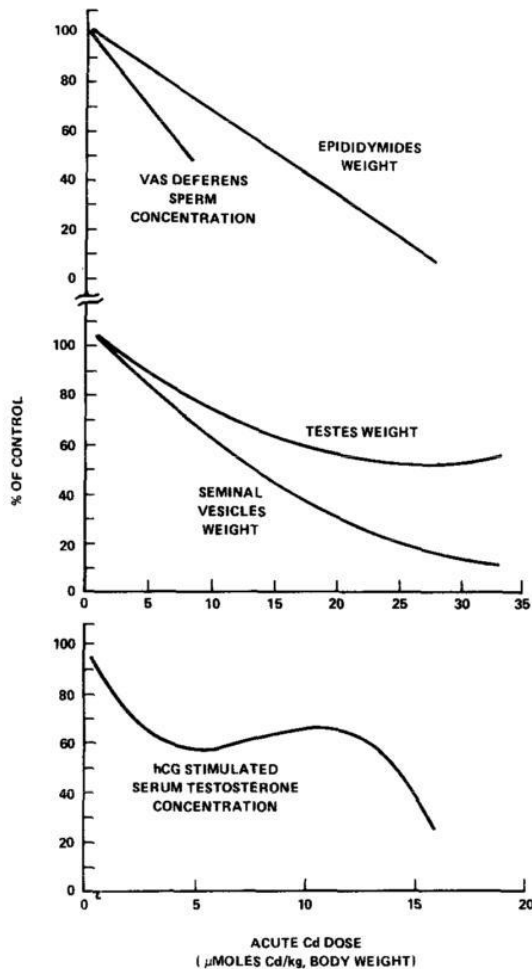


Η ΕΛΑΤΤΩΣΗ ΤΟΥ ΒΑΡΟΥΣ ΜΕΤΑ ΤΗ ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΜΙΑΣ ΔΟΣΗΣ ΚΑΔΜΙΟΥ ΣΤΟΝ ΑΡΟΥΡΑΙΟ (ΔΟΣΟ-ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΗ)

Κάθε τιμή παριστά το μέσο όρο από δεδομένα 6 πειραματοζώων. Είναι στατιστικά σημαντική αν συγκριθεί με τις τιμές που προκύπτουν όταν γίνεται σύγκριση με τους φυσιολογικούς μάρτυρες ($p < 0.05$)



ΤΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΔΟΣΗΣ-ΑΠΑΝΤΗΣΗΣ ΣΕ ΑΡΣΕΝΙΚΟΥΣ ΑΡΟΥΡΑΙΟΥΣ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΕΚΘΕΣΗ ΣΕ ΧΑΜΗΛΕΣ ΔΟΣΕΙΣ CD.



Χορηγούμενη δόση CdCl₂ (1.6 to 152 pmol Cd/kg body weight). 14 ημέρες μετά εκτιμάται η βλάβη που έχει προκληθεί στην αναπαραγωγική λειτουργία.

Προσβάλλονται λιγότερο οι ακόλουθες παράμετροι:

- Συγκέντρωση σπερματοζωαρίων,
- Βάρος σπερματοδόχων κύστεων,
- Βάρος των όρχεων και της επιδιδυμίδας και ελαττώνονται σε αναλογούσα δόση 6.45, 5.30, 4.19 και 3.45% /~mol Cd/kg, αντίστοιχα.

Η πλέον ισχυρή αντίδραση παρατηρείται στην Τεστοστερόνη του ορού (μετά τη διέγερση με HCG), η οποία μειώνεται με ρυθμό 19-22%/pmolCd/kg, σε σχέση με τον μάρτυρα (η αντίστοιχη τιμή διέγερσης).

LASKEY JW *et al.* *Toxicol Appl Pharmacol* (1984).

ΑΛΛΑΓΗ ΤΟΥ ΟΡΜΟΝΙΚΟΥ ΠΡΟΦΙΛ

Ταχεία ελάττωση των επιπέδων της τεστοστερόνης στην κυκλοφορία (και της φυσιολογικά υφισταμένης αλλά και αυτής που λαμβάνεται μετά τη διέγερση της έκκρισης από τη γοναδοτροπίνη -HCG).

ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΝΩΜΑΛΙΕΣ ΣΤΗ ΣΠΕΡΜΑΤΟΓΕΝΕΣΗ

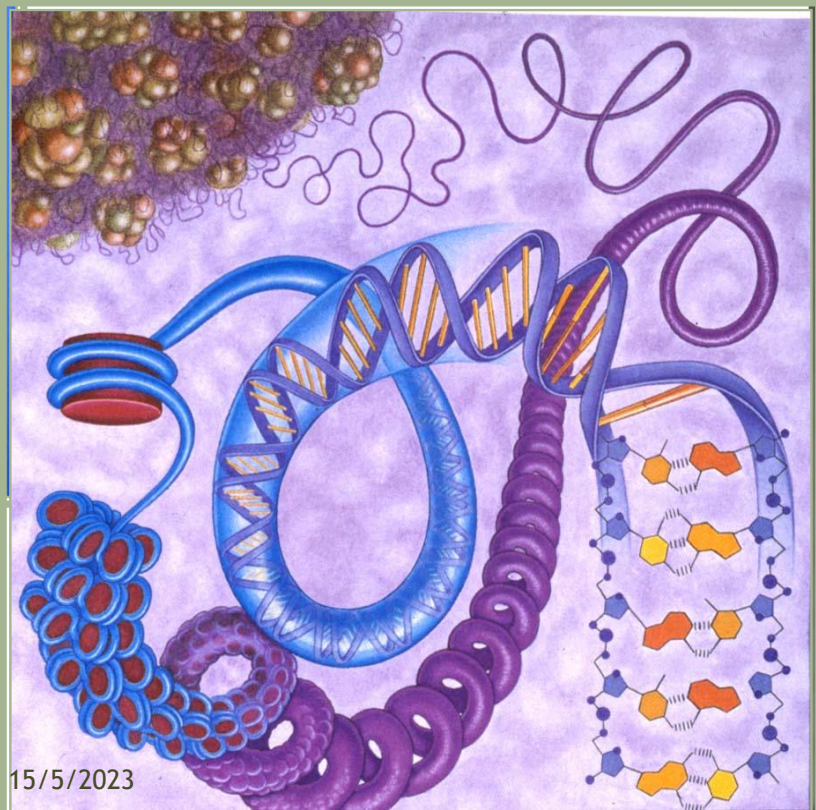
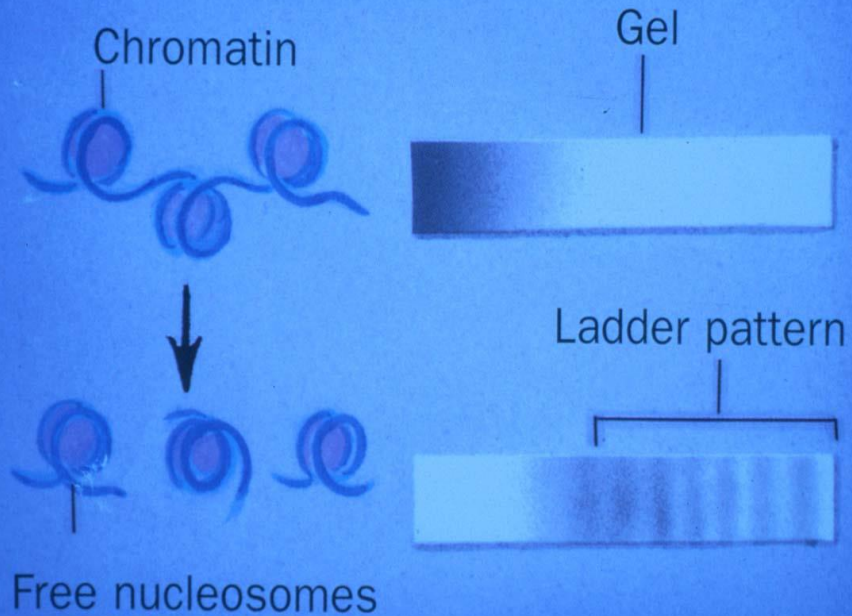
- Παρατηρούνται στον άνθρωπο και στα μικρά θηλαστικά του εργαστηρίου. Πρόκειται για κοινό χαρακτηριστικό της δράσης των 3 βαρέων μετάλλων (lead acetate, cadmium chloride, and arsenic trioxide) (Bench *et al*, 1999). Βλάπτουν κυρίως το DNA στα σπερματοκύτταρα I και από τα υπάρχοντα στοιχεία φαίνεται ότι η δράση είναι άμεσα τοξική.

IN VIVO ΤΟ $CdCl_2$ ΕΠΑΓΕΙ ΤΟΝ ΚΕΡΜΑΤΙΣΜΟ ΤΟΥ DNA ΣΤΙΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ ΤΟΥ ΟΡΧΙ ΚΑΙ ΑΥΤΟ ΠΑΡΑΤΗΡΕΪΤΑΙ ΣΤΟ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΟ ΠΡΟΤΥΠΟ ΜΕΤΑΝΑΣΤΕΥΣΗΣ ΣΤΗΝ ΠΗΚΤΗ ΤΗΣ ΑΓΑΡΟΖΗΣ.

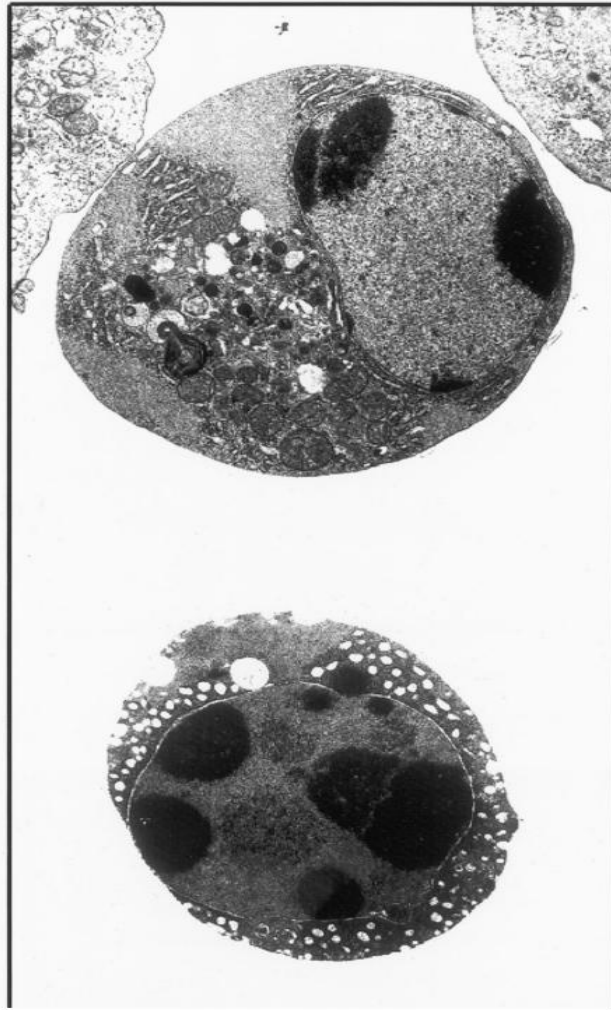
- Χαρακτηριστικό πρότυπο κλίμακας κατά τη μετανάστευση του κερματισμένου DNA (laddering) μετά τη χορήγηση $CdCl_2$ (0.03 mmol/kg 48 h).
- Η χορήγηση ενός χηλικού παράγοντα ως αντιδότη (cadmium chelating agent) εντός των πρώτων 24 h μπορεί να καταστείλει μερικές από τις αποπτωτικές αλλοιώσεις του DNA.
- Ένας τροποποιητής της βλάβης είναι το monoisoamyl *meso*-2,3-dimercaptosuccinate (Mi-ADMS). Εμποδίζει τις ιστοπαθολογικές διαταραχές μόνον αν χορηγηθεί εντός της 1^{ης} ώρας μετά την έκθεση στο $CdCl_2$.
- Αν η χορήγηση γίνει αργότερα παρατηρείται προοδευτική αποδόμηση του DNA σε ολιγονουκλεοτιδικά κλάσματα.

ΒΙΟΧΗΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ

Chromatin Fragmentation



Εικόνες στο ηλεκτρονικό
μικροσκόπιο κυττάρων B131 μετά
την έκθεση στο Cd.



C. Pandya *et al.* Effect of lead and cadmium co-exposure on testicular steroid metabolism and antioxidant system of adult male rats. *Andrologia* 2011;

Η σύγχρονη έκθεση πειραματοζώων σε Pb και Cd ακόμη και σε χαμηλά επίπεδα (0.025 mg /kg βάρους σώματος ενδοπεριτοναϊκά για 15 ημέρες) προκάλεσε:

1. Αύξηση των ROS λόγω της αύξησης της ορχικής μαλονδυαλδεΐδης (MDA) και
2. Ελάττωση της δραστηριότητας των αντιοξειδωτικών ενζύμων του ορχικού ιστού: δισμουτάση (SOD), καταλάση, G6PDH και τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST) στα μιτοχόνδρια
3. Λιπιδική υπεροξειδωση.

Εκτός των ROS προστίθεται και η άμεση βλάβη επί των μεμβρανικών δομών που προκαλείται από το Pb και το Cd (Ito *et al.*, 1985; Casalino *et al.*, 1997).

Δραματική αύξηση της λιπιδικής υπεροξειδωσης στα σπερματοζωάρια λόγω της ιδιαίτερης δομής τους (στη μεμβράνη τους περιέχουν πολυακόρεστα λιπαρά οξέα Polyunsaturated Fatty Acids - PUFA)

Λιπιδική υπεροξειδωση

κυτταρική βλάβη, η οποία επάγεται από τα διαχεόμενα υπεροξείδια με στόχο τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Συνήθως, αρχίζει με αφαίρεση ατόμων υδρογόνου από τις ρίζες OH^- και το προκύπτον διένιο αντιδρά με το O_2 και σχηματίζει μία ρίζα υπεροξειδίου ROO^- , η οποία αφαιρεί H^+ από τα λιπαρά οξέα, δημιουργουμένης έτσι μιας αυτοκαταλυομένης αντίδρασης ελευθέρων ριζών, η οποία αν δεν σταματήσει, μπορεί να οδηγήσει στην καταστροφή του κυττάρου.

Ο σημαντικότερος βλαπτικός παράγοντας είναι οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS).

Οι ROS, ιδιαίτερα όταν υπερβαίνουν τα φυσιολογικά όρια ή όταν δεν λειτουργούν τα συστήματα αναγωγής τους, προκαλούν οξειδωτικό στρες και επάγουν την απόπτωση του κυττάρου λόγω του κερματισμού του DNA που προκαλούν

Την επίδραση των ROS στη δομική ακεραιότητα του κυττάρου επιτείνουν οι ακόλουθες καταστάσεις:

- το υπερβολικό στρες,
- η κατανάλωση αλκοόλ ή ναρκωτικών,
- η ακτινοβολία,
- η χημειοθεραπεία,
- οι τραυματισμοί,
- το κάπνισμα,
- η λήψη φαρμάκων,
- η αυξημένη θερμοκρασία και
- οι χρόνιες φλεγμονές.

Οι ROS στο γεννητικό σύστημα του άρρενος

Σήμερα είναι γνωστός ο φυσιολογικός ρόλος και οι παθολογικές αποκλίσεις στις τιμές των ROS στο σπέρμα.

Χαρακτηριστικά αναφέρεται ότι **επίπεδα ROS > 0.0185**

X 10⁶ φωτόνια ανά min υποδηλώνουν

ανδρική υπογονιμότητα.

Agarwal A, Makker K, Sharma R. Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update. Am J Reprod Immunol 2008; 59: 2-11.

Η παραγωγή ROS από τα σπερματοζώαρια, μέχρι ενός ορισμένου επιπέδου, είναι απαραίτητη για τις φυσιολογικές λειτουργικές δραστηριότητες αυτών, όπως :

- την αντίδραση του ακροσώματος,
- την ενεργοποίηση,
- την κινητικότητα,
- την ωρίμανση στην επιδιδυμίδα,
- τη φυσιολογική συγκέντρωση και
- τη γονιμοποίηση

Η έλλειψη κυτταροπλάσματος στα ώριμα σπερματοζώαρια ισοδυναμεί με έλλειψη των αμυντικών αντιοξειδωτικών ενζυματικών συστημάτων, που βρίσκονται στα περισσότερα κύτταρα και έτσι γίνονται ευάλωτα στο οξειδωτικό στρες

Η συνεχής παραγωγή ROS γίνεται στα μιτοχόνδρια, τα οποία παίζουν βασικό ρόλο στη ρύθμιση της απόπτωσης σύμφωνα με ένα μοντέλο που περιλαμβάνει 3 στάδια:

1. Ενεργοποίηση των οδών μεταγωγής του σήματος (ρυθμίζεται από τα μέλη της οικογένειας των πρωτεϊνών BCL-2).
2. Διαταραχή της ομοιόστασης των μιτοχονδρίων και διαφυγή στο κυτταρόπλασμα πρωτεϊνών που θα ενεργοποιήσουν τις κασπάσες ενώ παράλληλα μεταβάλλεται η μιτοχονδριακή μεταφορά των ηλεκτρονίων, η οξειδωτική φωσφορυλίωση και η παραγωγή ATP.
3. Ενεργοποίηση των κασπασών και των νουκλεασών που θα προκαλέσουν τον κερματισμό του DNA

Induction

bax

bcl-xS

bak

bad

Nbk

ced-3

ced-4

Ice

Ich-2/TX/IcereII

IcereIII/TY

CPP32

Ich-1/Nedd-2

Mch-2

Mch-3/ICE-LAP3

Inhibition

bcl-2

bcl-xL

mel-1

A1

Ced-9

BHRF-1

LMW5

bcl-w

E1B-19K

CrmA

Ich-LS

p53

Ice ϵ

Regulation

p53

c-myc

waf-1/cip1

E2F

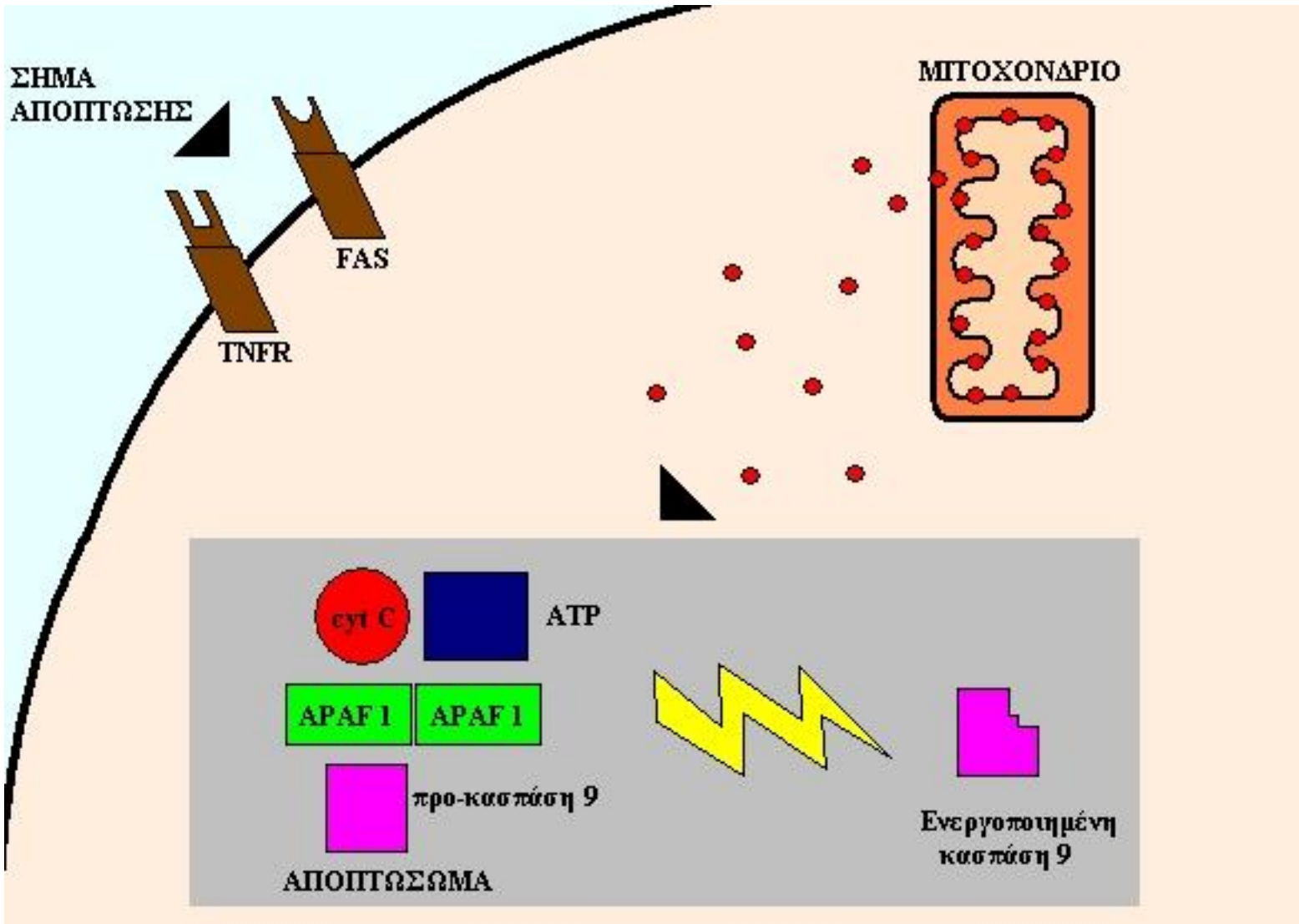
c-fos

jun

Fas/Fas ligand

cdc25

ces-2



ΣΗΜΕΙΟ ΧΩΡΙΣ ΕΠΙΣΤΡΟΦΗ

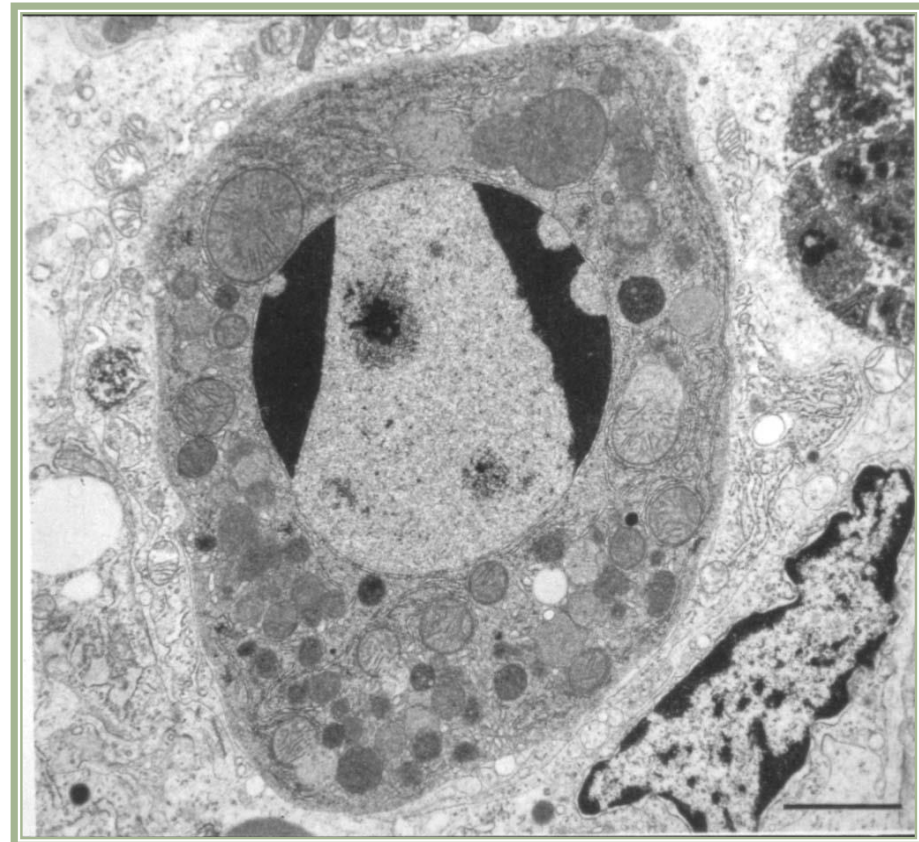
- Κασπάσες εκτελεστές (3,6,7) στον πυρήνα
- Διάσπαση του ICAD ↓

CAD (Caspase Activated DNase)



Κερματισμός του DNA

- Καρυόλυση



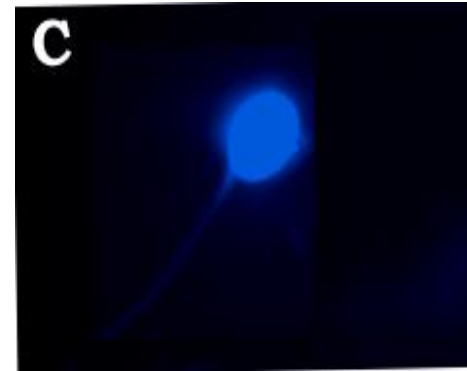
Όταν τα επίπεδα των ROS ξεπερνούν τον ουδό ικανότητας προς αποκατάσταση της βλάβης, η ενεργοποιημένη κασπάση 3 διασπά την πολυ (ADP-ριβόζη) πολυμεράση 1-PARP 1. Σταματά, τότε, η διαδικασία επιδιόρθωσης της βλάβης του DNA που καταλύεται από την PARP 1 και αρχίζει η απόπτωση

Τα μιτοχόνδρια διογκώνονται, το δυναμικό της μεμβράνης τους ελαττώνεται και ανοίγουν πόροι, οι οποίοι λειτουργούν ως διάυλοι ιόντων.

Διαφεύγουν στο κυτταρόπλασμα ROS και Ca^{2+} ενώ ταυτόχρονα αναστέλλεται η λειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας και τα επίπεδα του ATP μειώνονται.

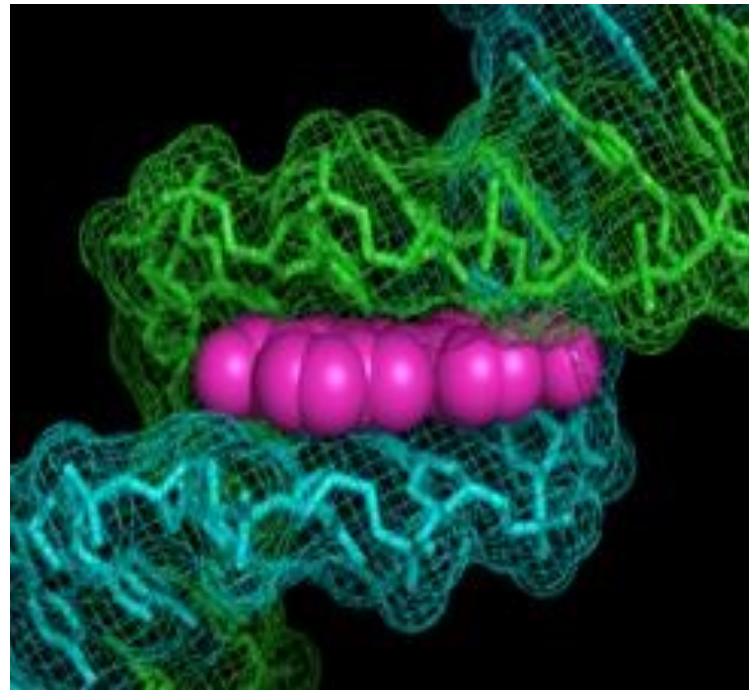
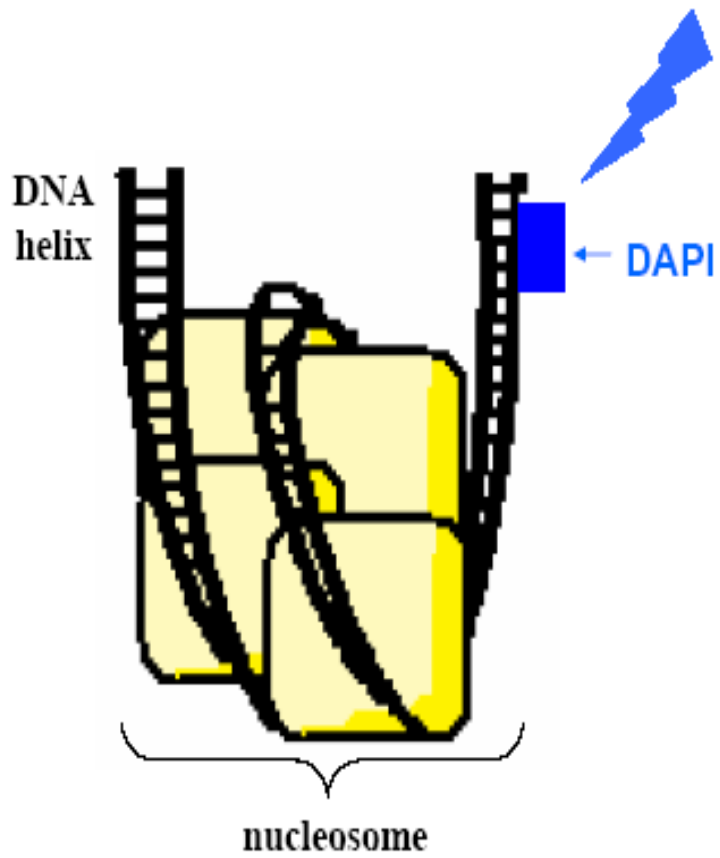
Αυτό έχει άμεσο αντίκτυπο στη φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών του αξονήματος και αλλοιώνει την ποιότητα του σπέρματος .

Ακεραιότητα του DNA των σπερματοζωαρίων

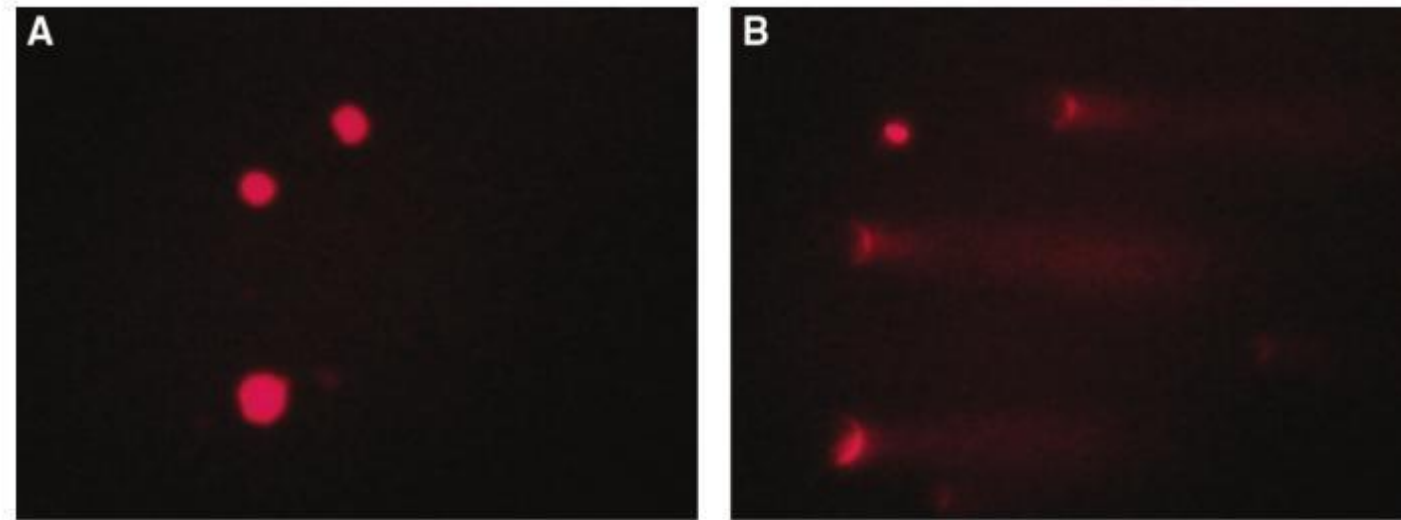


TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-nick End Labeling).

(A, B) TUNEL- θετικά σπερματοζωάρια (κερματισμός διπλής αλυσίδας του DNA) (Χρώση Texas red. (C) TUNEL-αρνητικό σπερματοζωάριο χρωματισμένο με DAPI (blue).



(A) PRIMARY SPERMATOCYTE WITHOUT DAMAGE IN ITS DNA.
(B) PRIMARY SPERMATOCYTE WITH DAMAGE IN ITS DNA.



Σπερματοκύτταρα στο στάδιο της παχυταινίας απομονωμένα από όρχεις αρουραίου. Η βλάβη του DNA (tail length) ελέγχεται με την εφαρμογή της αντίδρασης single cell gel/comet.

Μεγαλύτερη βλάβη παρατηρείται μετά τη χρόνια έκθεση (13 εβδομάδες) στα τοξικά μέταλλα.

Πρωταμίνωση: Η συμπύκνωση της χρωματίνης των σπερματοζωαρίων



CMA_3 (A, B) CMA_3 - θετικά σπερματοζωάρια (ελλειπής πρωταμίνωση του DNA). (C) CMA_3 -αρνητικό σπερματοζωάριο χρωματισμένο με DAPI (blue).

Το κάδμιο δεσμεύει τις ελεύθερες θειόλες, αντικαθιστά ή ανταγωνίζεται τον ψευδάργυρο (zinc) που δεσμεύεται φυσιολογικά στην κυστεΐνη των πρωταμινών και έτσι εμποδίζει την αποσυμπύκνωση της χρωματίνης των σπερματοζωαρίων μετά τη γονιμοποίηση.

Εναλλακτικά, η παρουσία Cadmium επί της χρωματίνης εμποδίζει και τη φυσιολογική εξέλιξη της πρωταμίνωσης.



ROS in the aging male: Model diseases with ROS-related pathophysiology

Roxani Angelopoulou*, Giagkos Lavranos, Panagiota Manolakou

Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine, National and Kapodistrian University of Athens, Mikras Atlas 75, Goudi 115 27, Athens, Greece

ARTICLE INFO

Article history:
Received 27 February 2009
Received in revised form 7 April 2009
Accepted 9 April 2009
Available online 18 April 2009

Keywords:
ROS
Aging
Oxidative stress
Infertility
Mitochondria
Spermatozoa
DNA damage
Antioxidants

ABSTRACT

The aging process is a complex biological phenomenon that can be attributed to several mechanisms. ROS (reactive oxygen species) activity is widely considered one of them, as it is associated with extensive damage in a variety of cells. For example, the gradual decrease in fertility often accompanying aging males can be traced back to oxidative stress, since ROS are released throughout life from the mitochondrial respiratory chain. Cumulative intracellular damage as a result of the increased ROS concentration affects all tissues that perform aerobic metabolism and, owing to blood circulation, anaerobic tissues as well. Naturally, other mechanisms such as cell inflammation and lack or incapacity of antioxidant enzymes also contribute to the variety of systematic distortions that characterize aging. Finally, the particularly elevated number of adult men that show, among others, a gradual deterioration in reproductive functions suggests a central role of ROS generation in senescence in general and male aging, in particular.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Reactive oxygen species (ROS), as the name suggests, are chemical structures, stable (less common) or transient (typically), based on the atom of oxygen, which mediate extensive biological interactions when they come in contact with biological tissues. These structures may be produced within an organism, as a result of conventional biochemical processes or, alternatively, they may be attributed to external stimulation by a variety of physical, chemical or biological factors of the environment. Evidently, the process of ROS production is based on an endogenous reaction, in which water or oxygen bound to organic complexes are converted to a number of high-energy products, which in turn alter covalent bonds in a number of organic substrates in the intercellular and intracellular environment. Therefore, although molecular oxygen and water are not ROS themselves, their vast presence in virtually every evolved life form constitutes the basis for the extensive damage caused by ROS action, when the tissues are exposed to some form of energy bolus.

From a chemical point of view, any form of oxygen containing a non-bound external electron is highly unstable and capable to react with a variety of organic substrates. These forms of oxygen are free chemical radicals and, as their chemical behavior suggests, they are a kind of ROS. However, one should not suppose that all ROS are

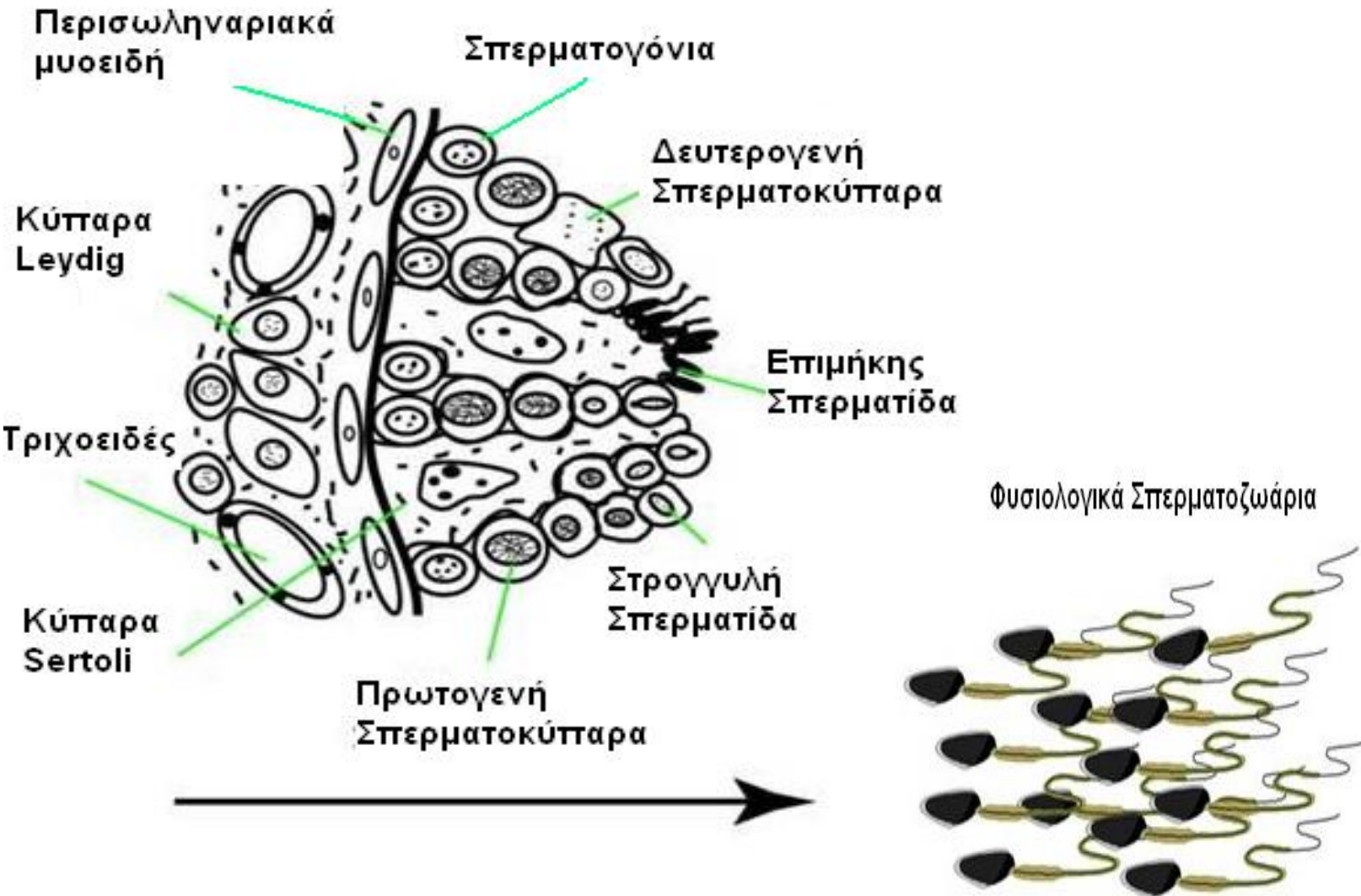
free radicals, since such a definition would exclude substances like hydrogen peroxide, the biological effects of which are identical to those of other ROS that include a non-bound electron, such as hyperoxide anion. As a result, the current ROS definition remains a functional one, based on their effect on biological tissues, while free radicals are specifically defined by their chemical structure, regardless of their activity in organisms.

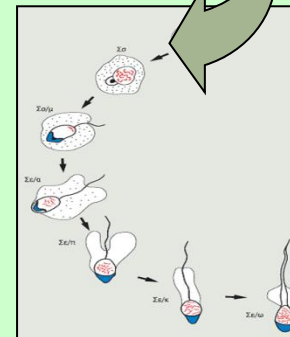
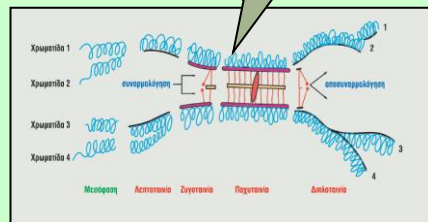
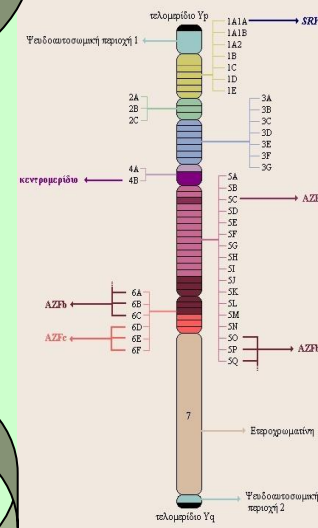
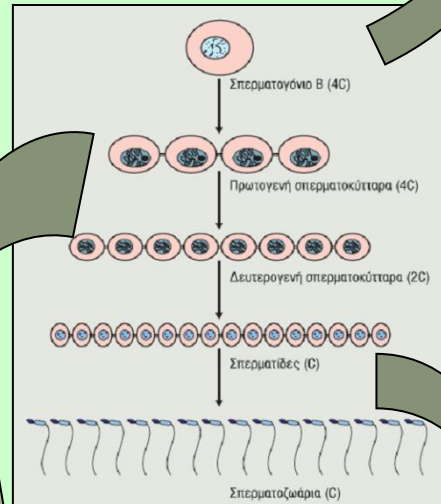
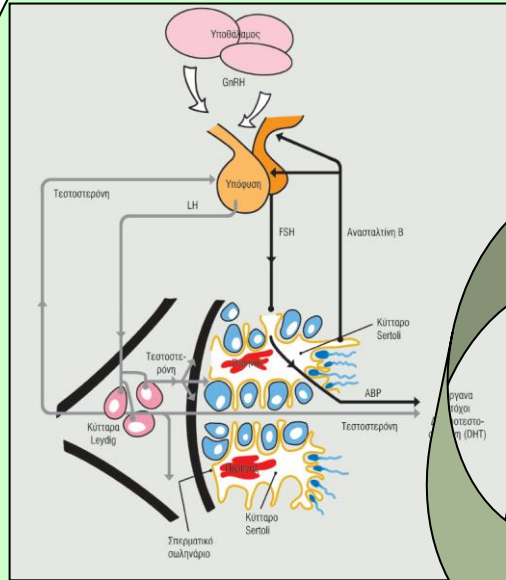
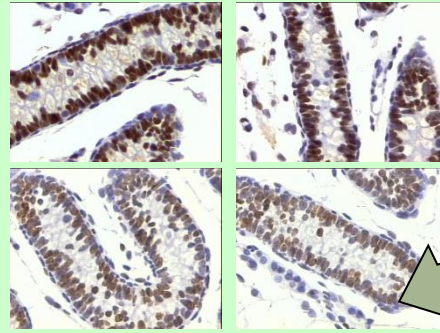
Although a large number of ROS have been described *in vivo* and *in vitro*, models of tissue damage have been developed based on the reproduction of the effect caused only by the most common mediators. The latter mainly include H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot} , $ONOO^{\cdot-}$ (the most toxic product) and $HOCl$, while any oxidized organic compound is symbolized as R^{\cdot} .

2. The role of the mitochondria

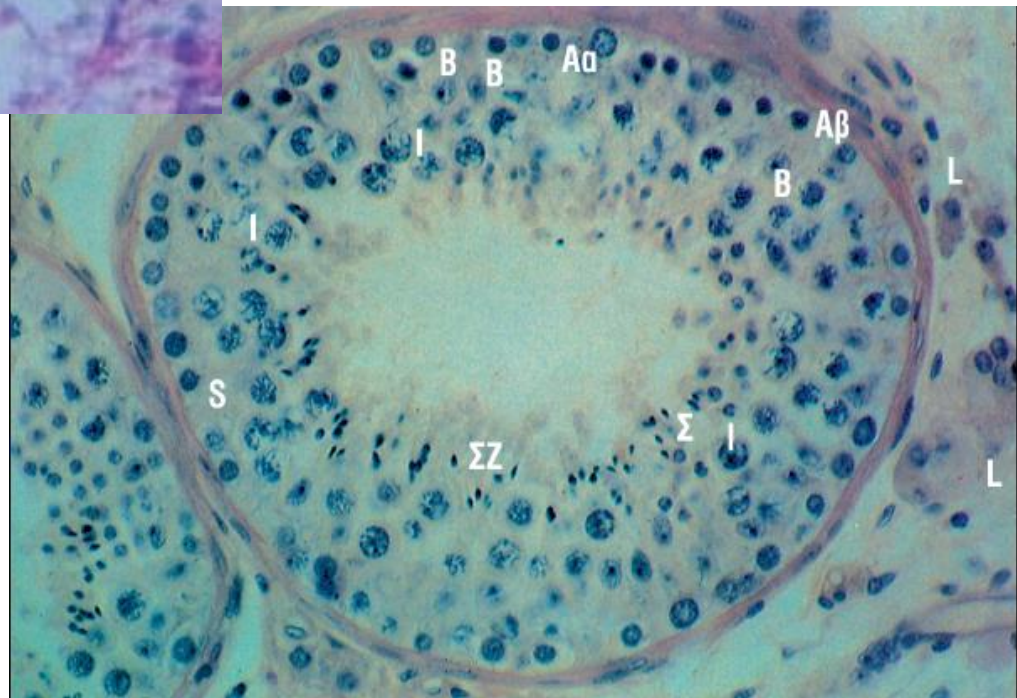
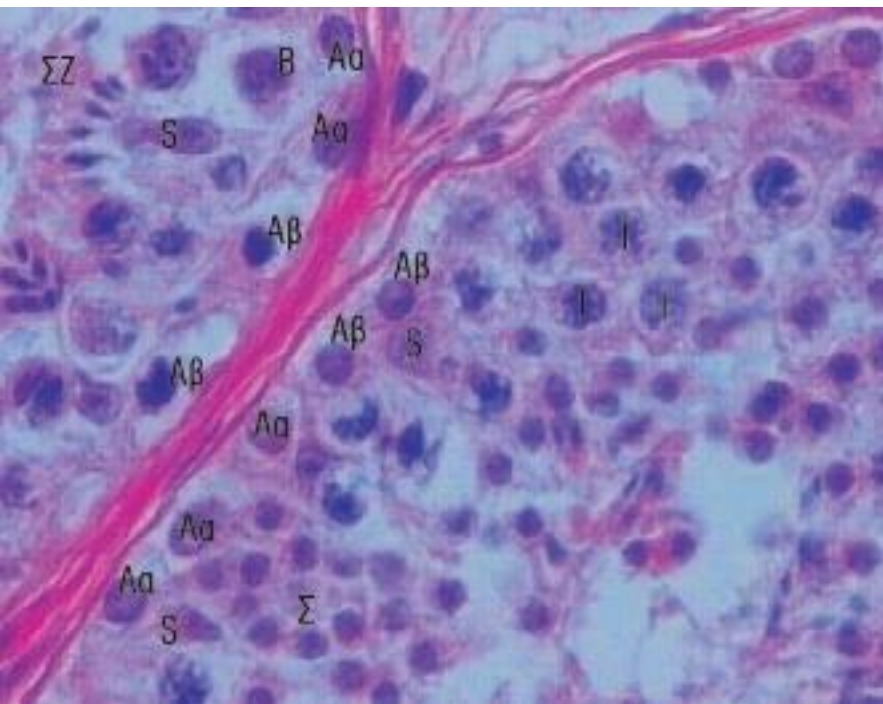
Although ROS may be produced in a number of ways, both in the body and in the external environment, the majority of them are derived from random phenomena that take place in the internal membrane of the mitochondria, where the enzymes involved in respiration and ATP-production are located. The process requires the transfer of electrons across the membrane, until they are bound to oxygen atoms. In the end of the sequence, the addition of hydrogen results in the production of water, while the proton gradient is

ΣΠΕΡΜΑΤΟΓΕΝΕΣΗ





Όταν αρχίζει η σπερματογένεση,
τα γεννητικά κύτταρα
συγκρατούνται μεταξύ
προσκείμενων κυττάρων Sertoli.
Κάθε κύτταρο Sertoli
υποστηρίζει την ανάπτυξη
συγκεκριμένου αριθμού
σπερματογονίων και, συνεπώς, ο
αριθμός των κυττάρων Sertoli
ανά όρχι, καθορίζει το μέγιστο
αριθμό των παραγόμενων
σπερματοζωαρίων.

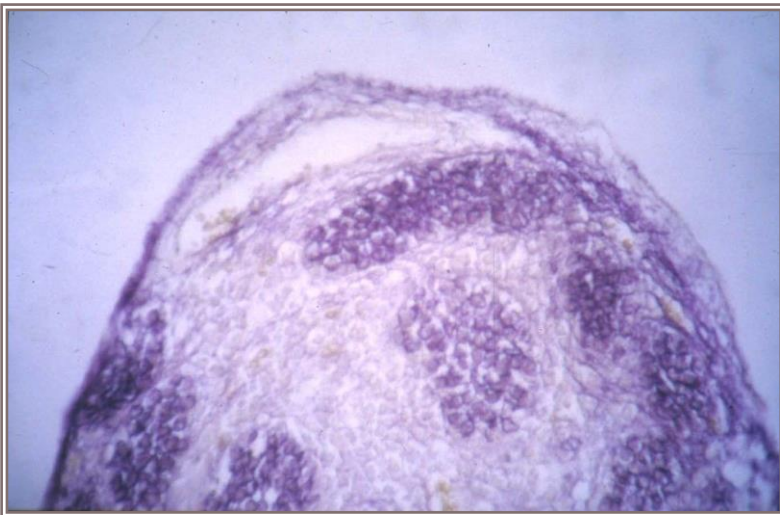


Εκκριτικό προϊόν	Ιδιότητες/ Λειτουργία
<p>Πρωτεΐνες σύνδεσης και μεταφοράς</p> <ul style="list-style-type: none"> Πρωτεΐνη που συνδέεται με τα ανδρογόνα (Androgen binding Protein - ABP) Τρανσφερίνη Σερουλοπλασμίνη Θειωμένη γλυκοπρωτεΐνη-1 Αντιγόνο M2A 	<p>Μεταφορά/ Εντόπιση ανδρογόνων στη γεννητική οδό του άρρενος.</p> <p>Μεταφορά σιδήρου</p> <p>Μεταφορά χαλκού</p> <p>Σύνδεση με σφιγγολιπίδια</p>
<p>Πρωτεάσες/ Αναστολείς</p> <ul style="list-style-type: none"> Ενεργοποιητής του πλασμινογόνου Κυκλική πρωτεΐνη -2 α₂-Μακροσφαιρίνη p27^{kip1} 	<p>Ενεργοποίηση του πλασμινογόνου</p> <p>Δράση καθεψίνης</p> <p>Αναστολή πρωτεάσης</p> <p>Αναστολή κυκλινοεξαρτώμενης κινάσης</p>
<p>Μόρια εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας + προσδέτες</p> <ul style="list-style-type: none"> Λαμινίνη Κολλαγόνα IV και I Πρωτεογλυκάνες Κυτταροκερατίνη 18 Βιμεντίνη 	<p>Σχηματισμός της βασικής μεμβράνης του σπερματικού σωληναρίου</p>
<p>Αυξητικοί παράγοντες</p> <ul style="list-style-type: none"> TGFα (Transforming Growth Factor)a TGFβ (Transforming Growth Factor)b IGF-I (Insulin-like Growth Factor) IL-1 (Interleukin-1-like factor) WT-1 (Wilm's tumor 1) GATA-1 	<p>Προαγωγή αύξησης</p> <p>Αναστολή αύξησης</p> <p>Συντήρηση αύξησης/διαφοροποίησης</p> <p>Ρύθμιση αύξησης</p>
<p>Ρυθμιστικές πρωτεΐνες</p> <ul style="list-style-type: none"> Ανασταλτίνη B Αντιμυλλέρια ορμόνη (AMH) Θειωμένη γλυκοπρωτεΐνη-2 SRY AR (υποδοχέας των ανδρογόνων) 	<p>Ενδοκρινική/Παρακρινική δράση</p> <p>Αναστολή ανάπτυξης των πόρων του Müller στο αρσενικό</p> <p>Μεμβρανικό στοιχείο των σπερματοζωαρίων - Ανοσοκατασταλτικό</p> <p>Άρρενοποίηση της αδιαφοροποίητης γονάδας</p>
<p>Μεταβολίτες</p> <ul style="list-style-type: none"> Γαλακτικό/Πυροσταφυλικό Οιστρογόνα 	

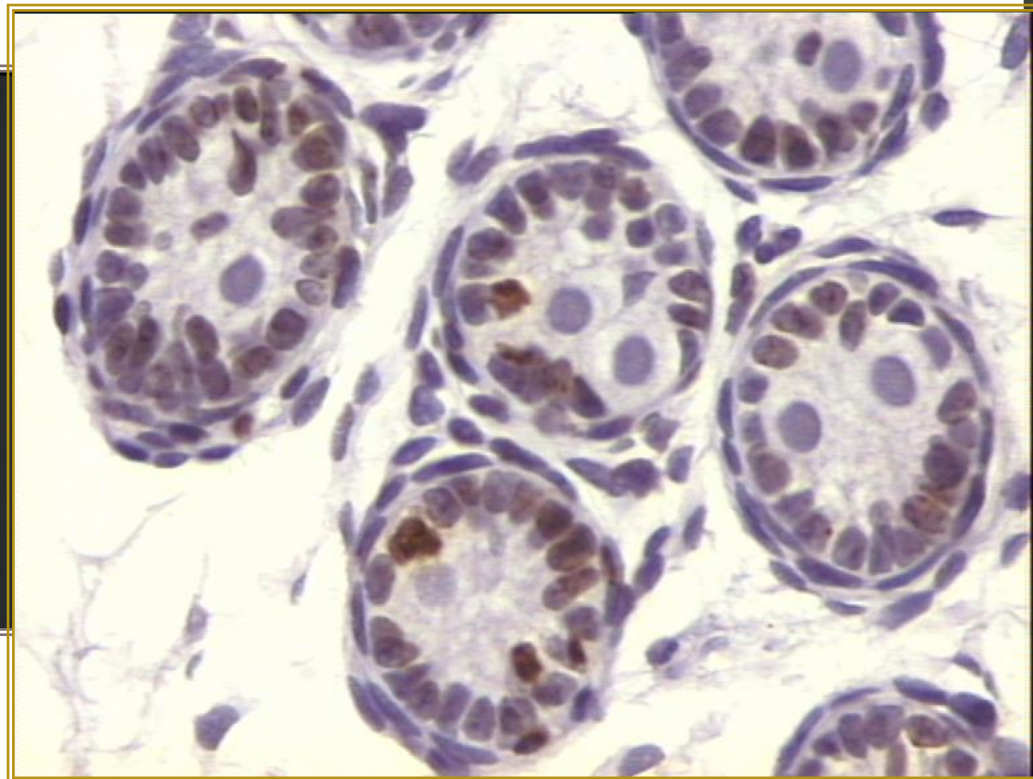
Η απάντηση του ορχικού ιστού στο cadmium chloride κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης (έμβρυα αρουραίου)

- Διαταραχή του αριθμού των γεννητικών κυττάρων,
- Ανώμαλη μετανάστευση αυτών στις γεννητικές ακρολοφίες
- ανώμαλος αριθμός αρσενικών γαμετών και
- (κατά συνέπεια) υπογονιμότητα.

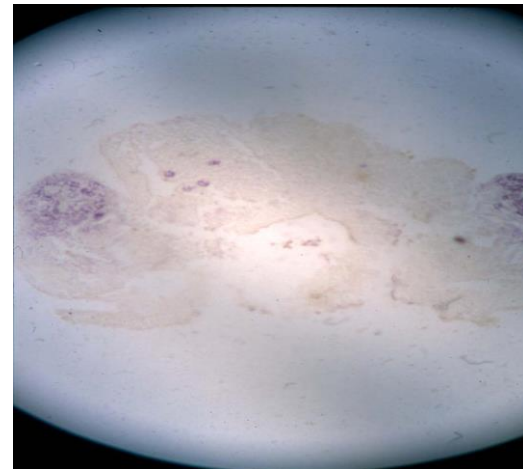
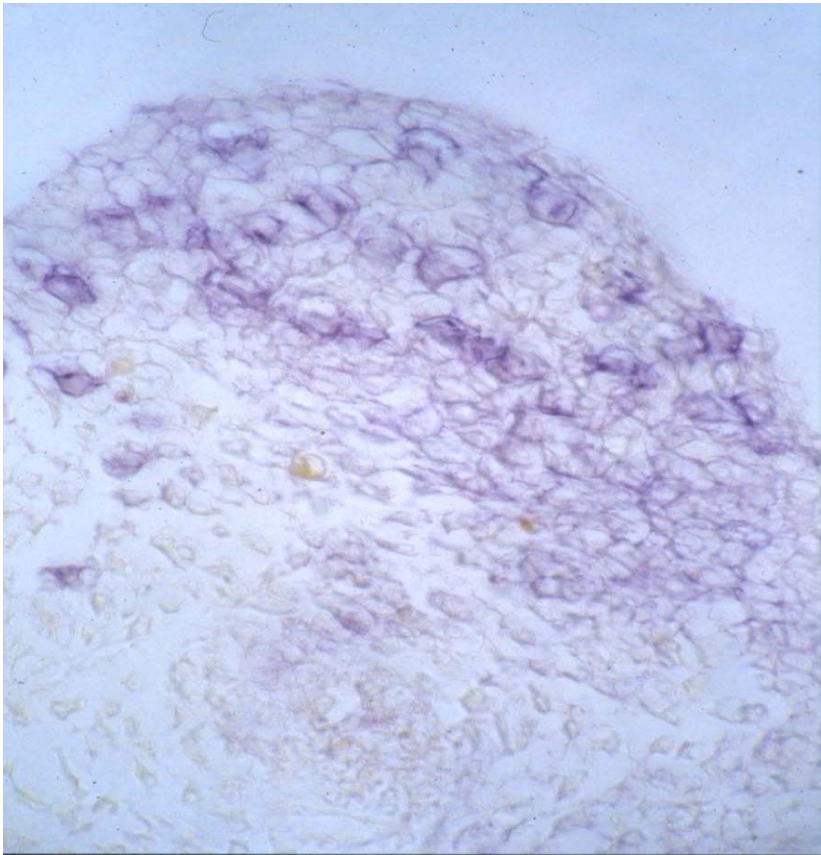
ΓΕΝΝΗΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΣΤΟΝ ΕΜΒΡΥΪΚΟ ΟΡΧΗ



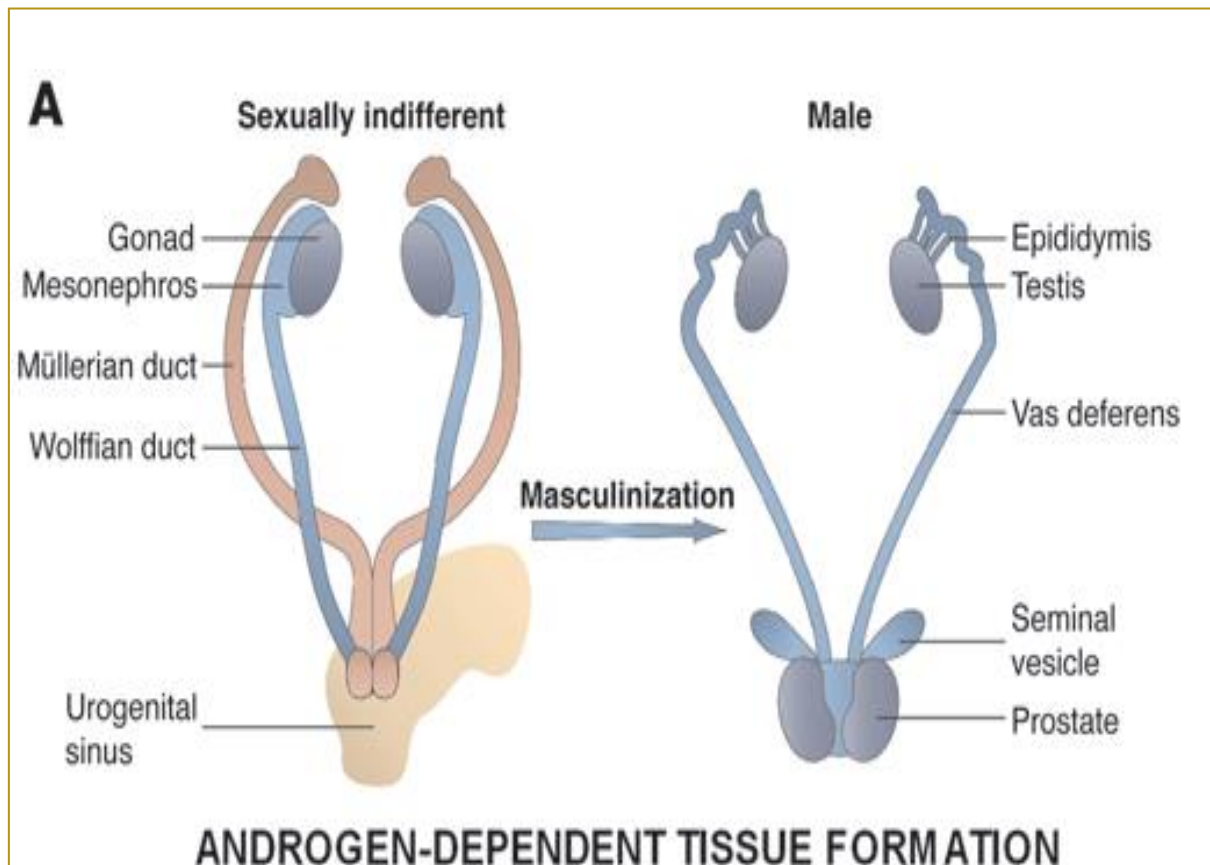
ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΙ ΠΛΗΘΥΣΜΟΙ ΣΤΟΝ ΕΜΒΡΥΪΚΟ ΟΡΧΙ

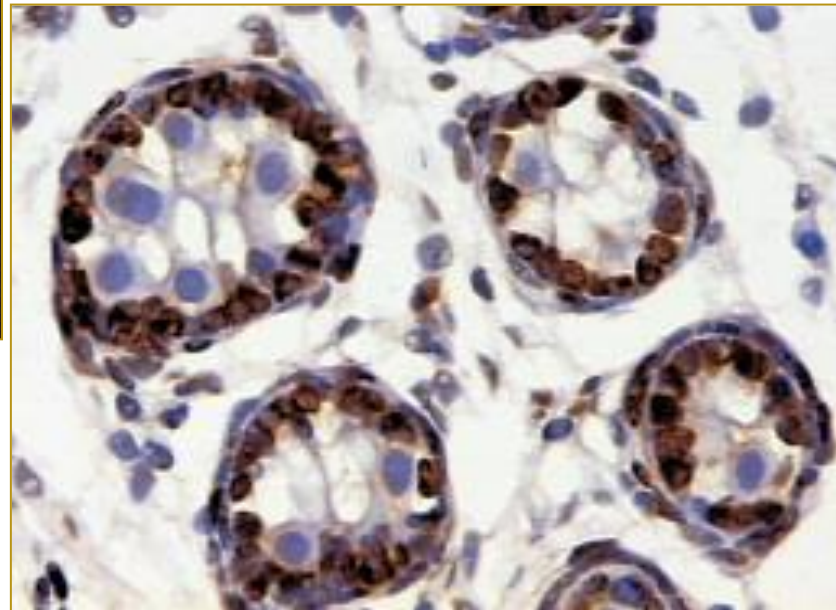
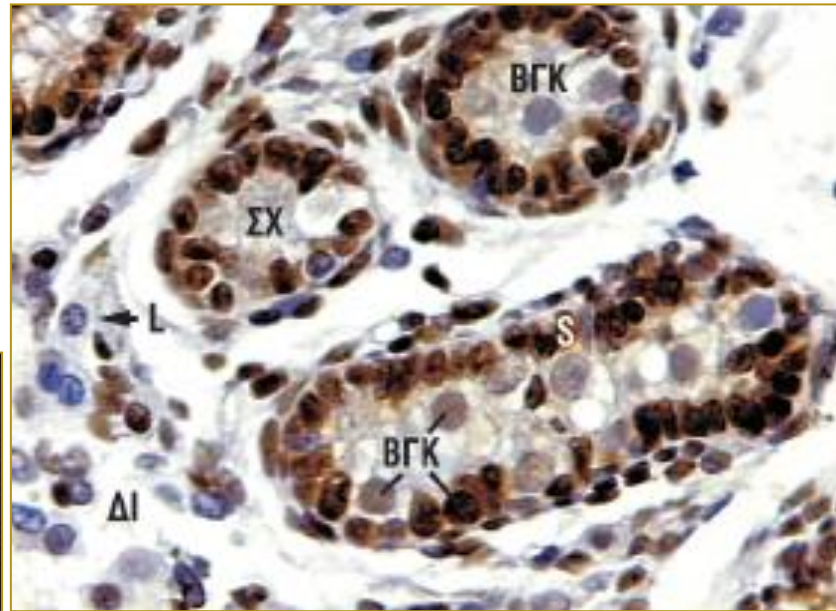
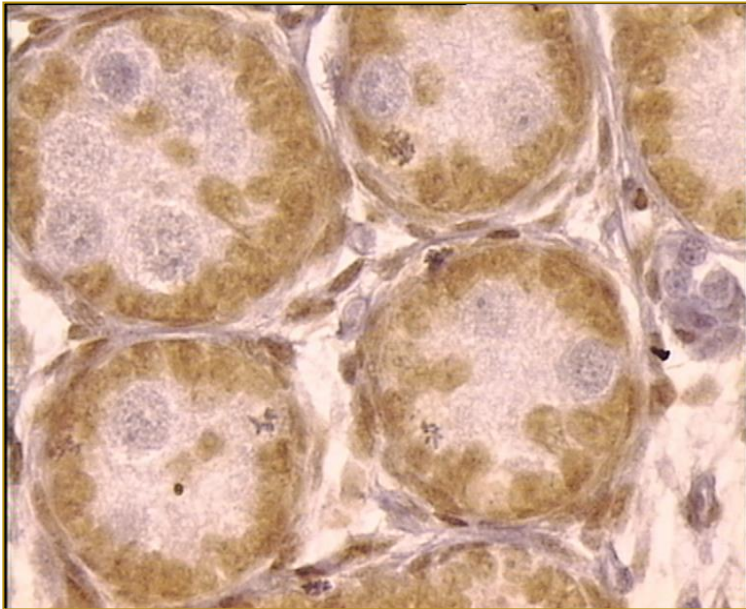


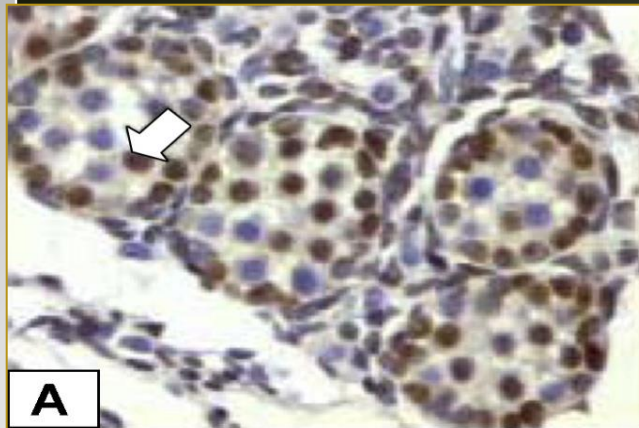
PRIMORDIAL GERM CELL POPULATION OF THE UNDIFFERENTIATED GONADAL ANLAGEN



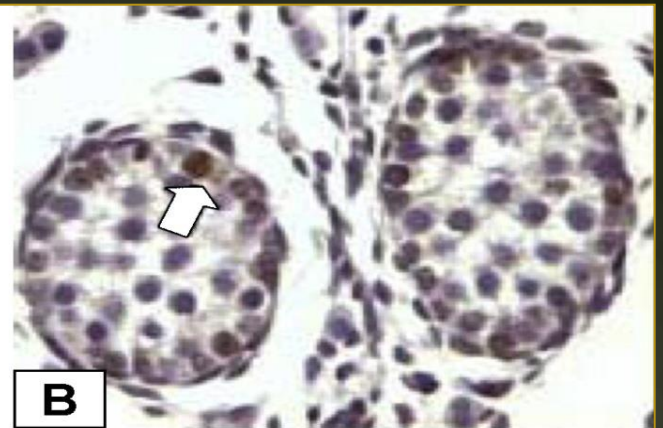
Η ΑΝΔΡΟΓΟΝΟ-ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΕΣΩΤΕΡΙΚΩΝ ΚΑΙ ΕΞΩΤΕΡΙΚΩΝ ΓΕΝΝΗΤΙΚΩΝ ΟΡΓΑΝΩΝ ΤΟΥ ΑΡΡΕΝΟΣ



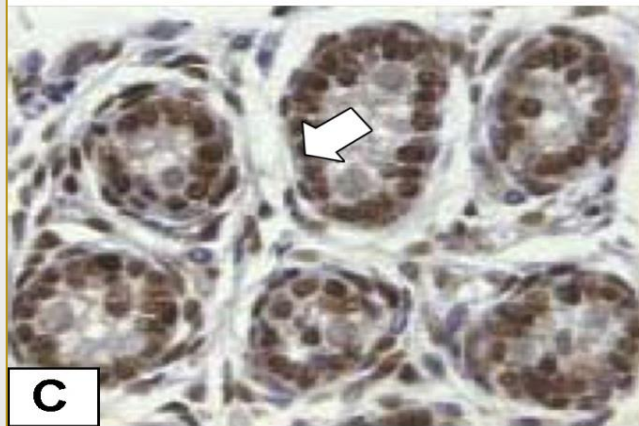




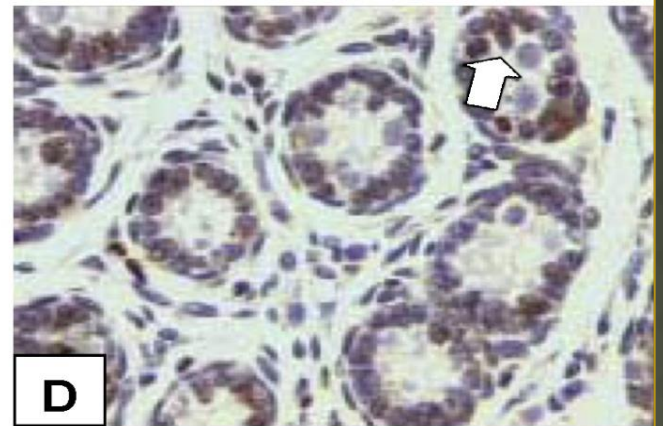
A



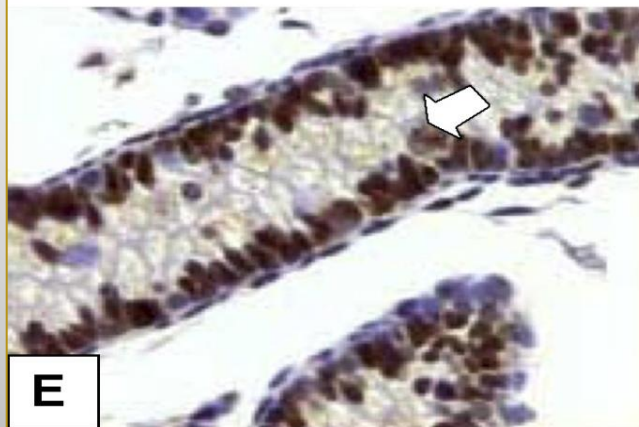
B



C



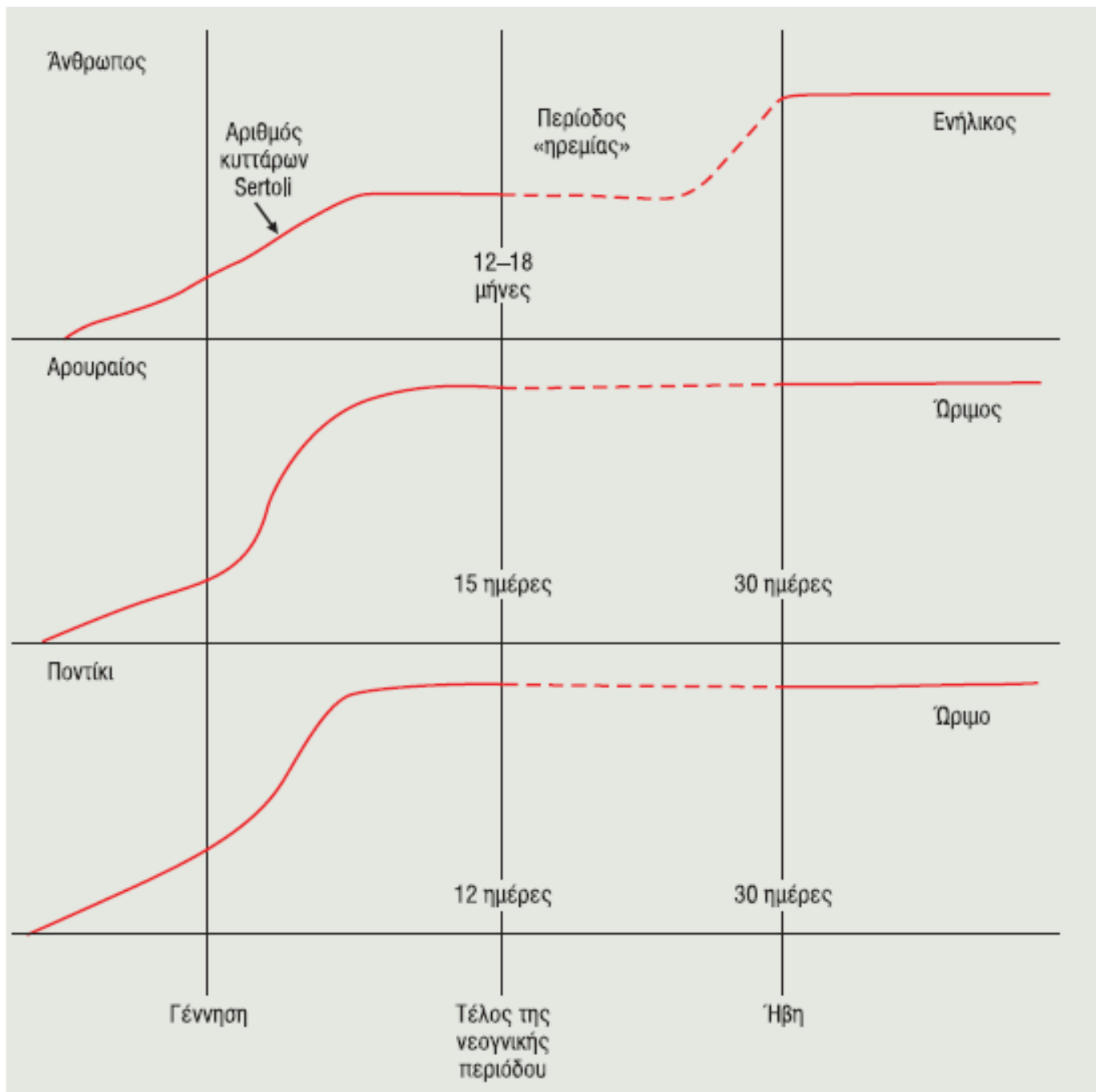
D



E

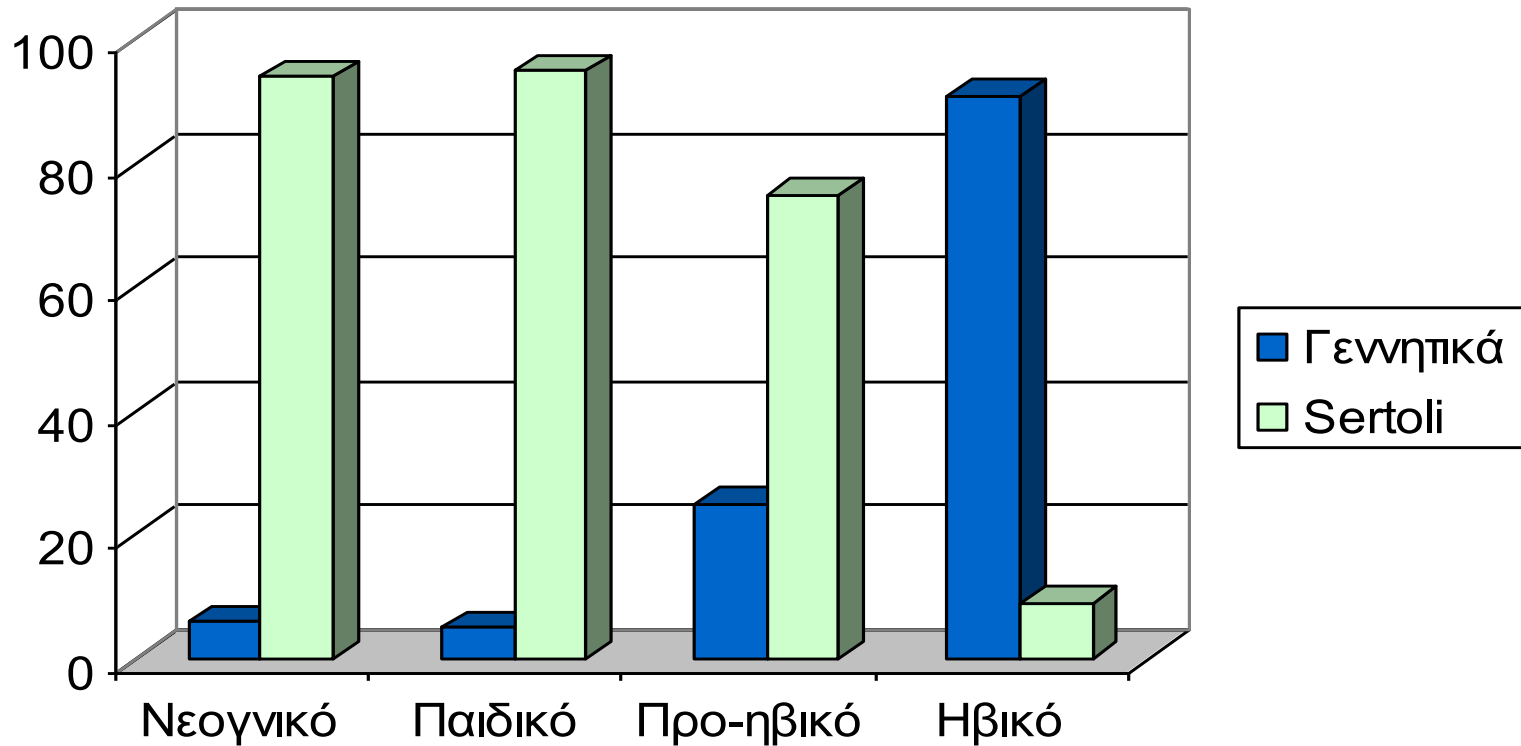


F

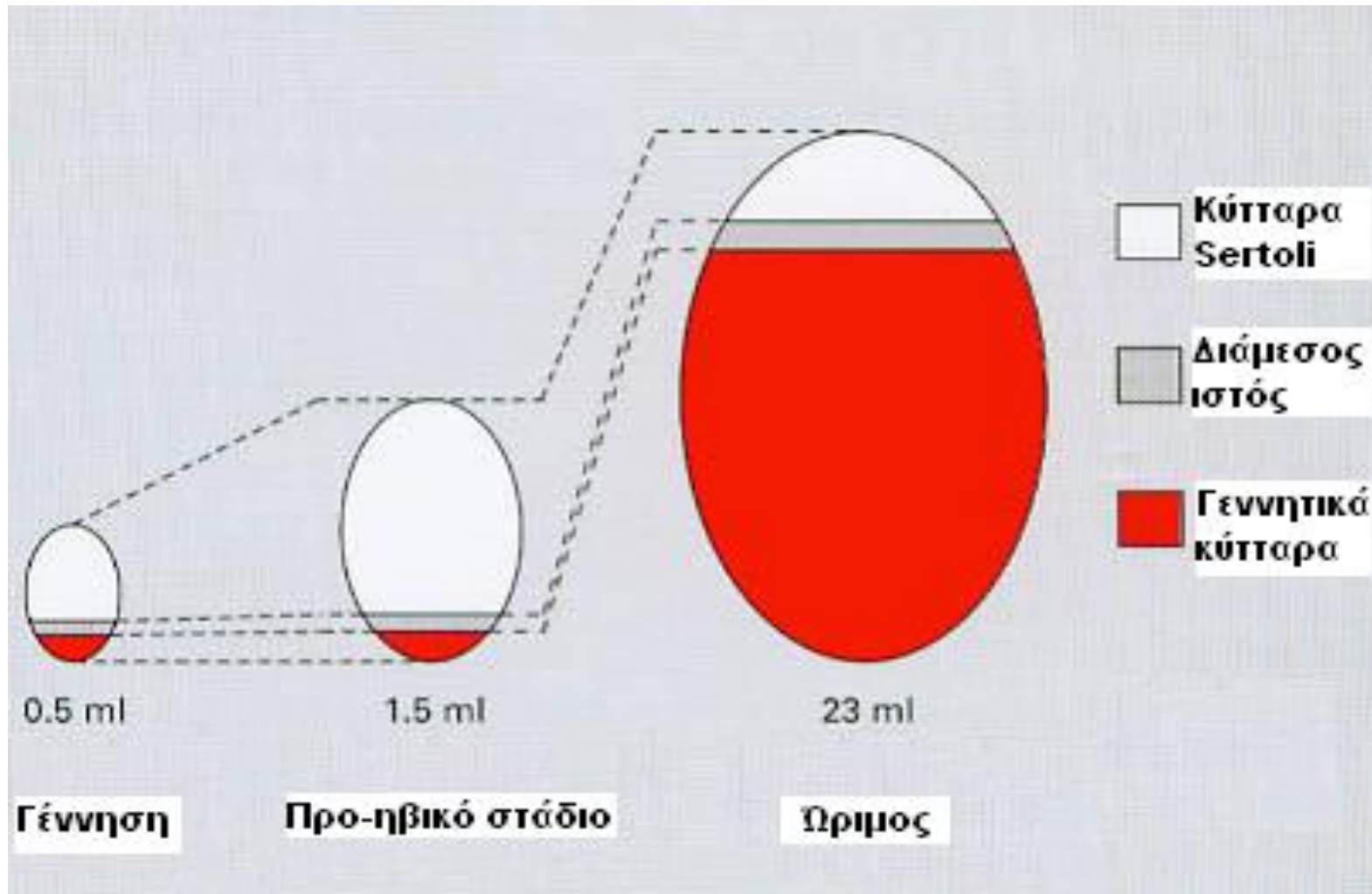


ΑΝΑΛΟΓΙΑ SERTOLI ΚΑΙ ΓΕΝΝΗΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΑΠΟ ΤΗ ΓΕΝΝΗΣΗ ΜΕΧΡΙ ΤΗΝ ΉΒΗ

Αναλογία Sertoli - γεννητικών κυττάρων



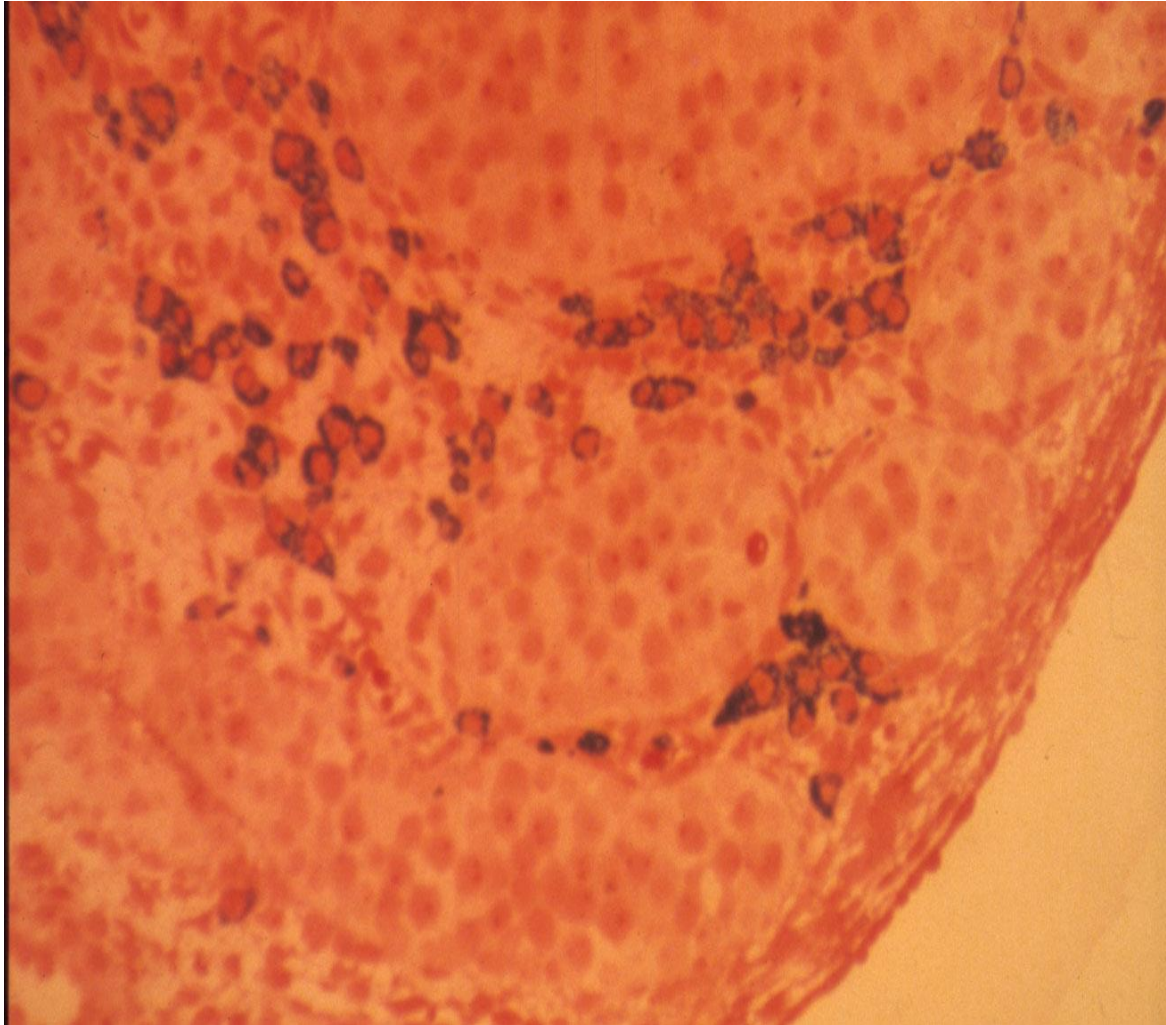
ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΟΡΧΙ ΜΕΤΑ ΤΗ ΓΕΝΝΗΣΗ



Η ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΗΣ ΤΕΣΤΟΣΤΕΡΟΝΗΣ ΑΠΟ ΤΟΥΣ ΕΜΒΡΥΪΚΟΥΣ ΟΡΧΕΙΣ

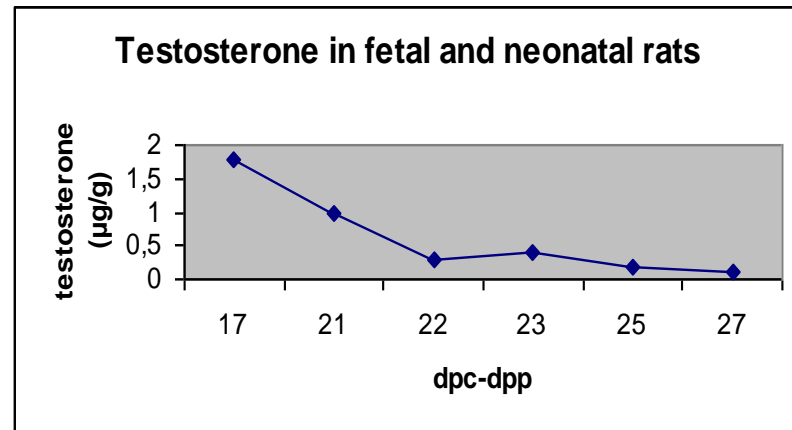
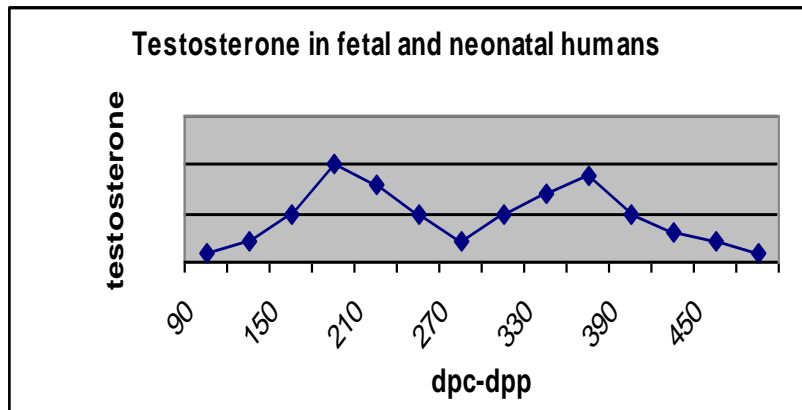
- ⦿ Οι εμβρυϊκοί όρχεις παράγουν τεστοστερόνη από την 8^η έως την 37^η εβδομάδα της κύησης στον άνθρωπο και από την E15.5 – E21.5 στον αρουραίο.
- ⦿ Αυτή η περίοδος είναι εξαιρετικά σημαντική διότι γίνεται η αρρενοποίηση της αναπαραγωγικής οδού και επομένως η διαφοροποίηση των εσωτερικών (επιδιδυμίδα, σπερματικός πόρος, σπερματοδόχες κύστεις, προστάτης) και των εξωτερικών (πέος, όσχεο, περίνεο) γεννητικών οργάνων.

EMBRYIKA KYTTAPA LEYDIG



ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΤΗΣ ΤΕΣΤΟΣΤΕΡΟΝΗΣ ΣΤΟΝ ΆΝΘΡΩΠΟ ΚΑΙ ΣΤΟΝ ΑΡΟΥΡΑΙΟ

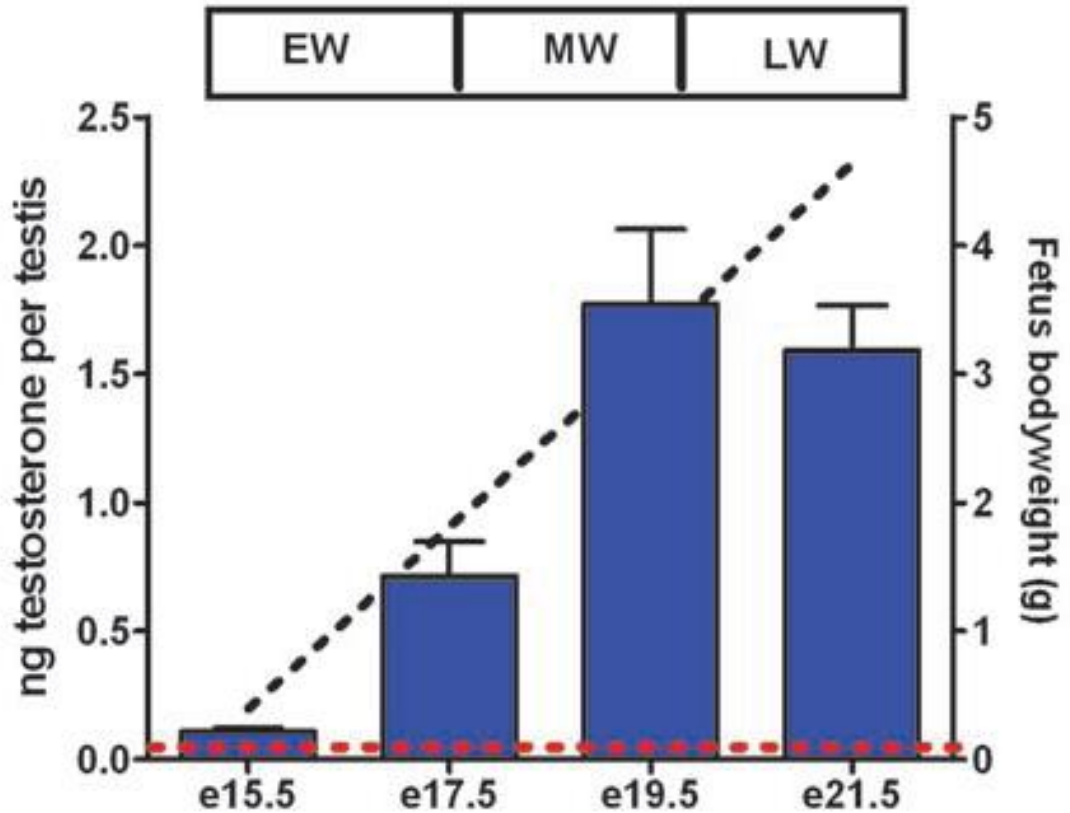
- ⊙ Στα έμβρυα και τα νεογνά του ανθρώπου (όπως και στον αρουραίο) παρατηρούνται 2 αιχμές στα επίπεδα της τεστοστερόνης.
- ⊙ Η 1η αιχμή μετράται κατά το 2ο τρίμηνο της κύησης και η 2η κατά το 1ο έτος της ζωής.



Η συγκέντρωση των ανδρογόνων κατά την εμβρυϊκή περίοδο σε αντιπροσωπευτικούς ιστούς στη φάση της μορφογένεσης.

Fetal testicular concentration (ng per testis) increases testosterone in line with mean fetal body weight (dotted line) between e15.5 and e21.5;

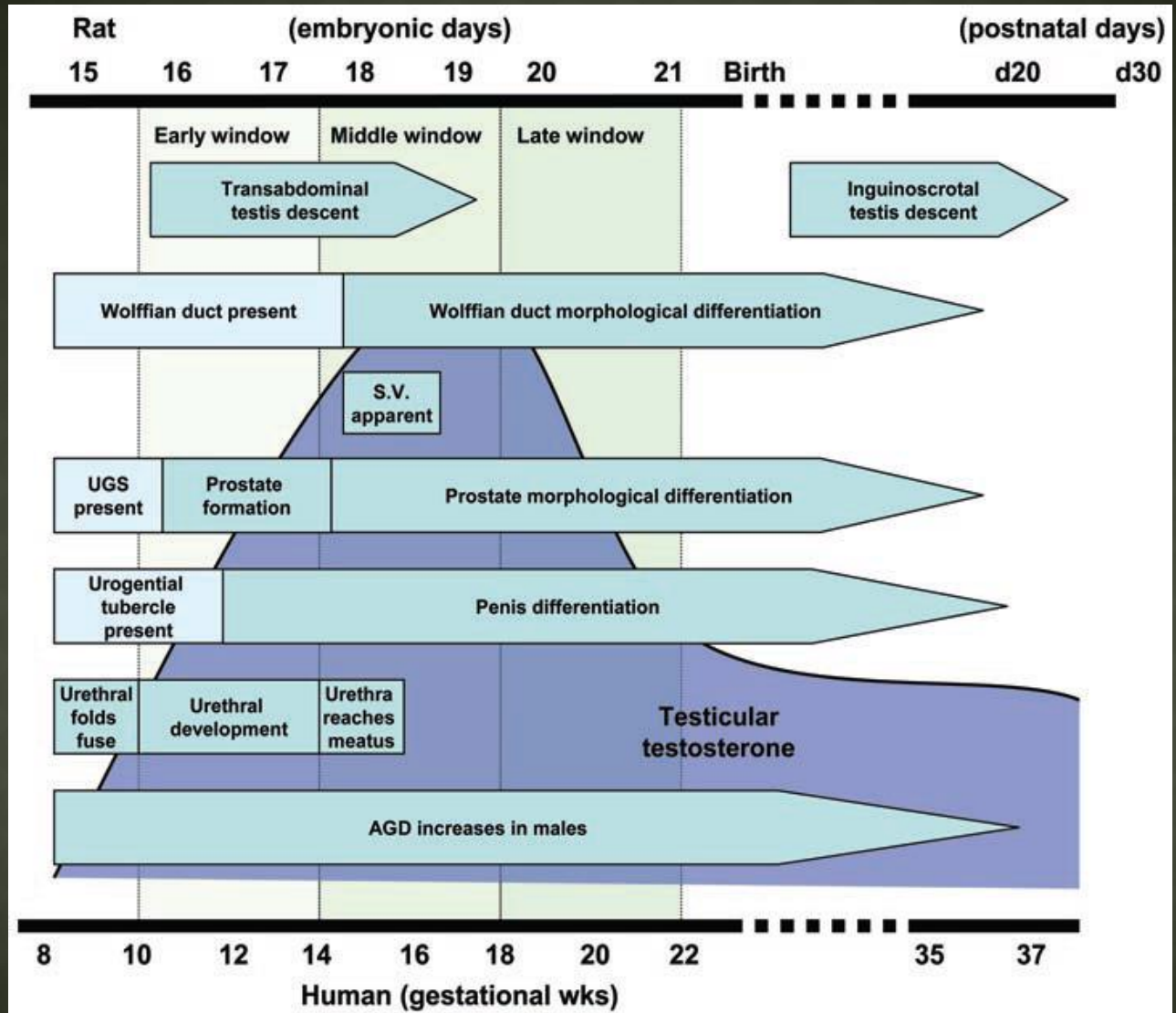
Red dotted line represents mean ovarian testosterone concentrations from e17.5 females.



Χρονολογικό διάγραμμα της ανάπτυξης της γεννητικής οδού στον άνθρωπο και τον αρουραίο σε συνδυασμό με την παραγωγή τεστοστερόνης.

Η αρρενοποίηση στα έμβρυα του αρουραίου γίνεται μεταξύ E15.5 and E19.5.

AGD (η απόσταση μεταξύ γεννητικού φύματος και πρωκτού-anogenital distance).



⊙ Ο εμβρυϊκός όρχις παράγει 3 διαφορετικές ορμόνες:

1. Τεστοστερόνη:

- ❖ διαφοροποίηση των παραγώγων των πόρων του Wolff
- ❖ εκφύλιση του κρεμαστήρα συνδέσμου της ωοθήκης (Cranial Suspensor Ligament – CSL).

2. Αντι-Μυλλέριο Ορμόνη (AMH), για την εκφύλιση των πόρων του Müller.

3. Ομοειδή της ινσουλίνης παράγοντα 3 (Insulin-like factor 3 - INSL3), για τη φάση της διακοιλιακής καθόδου των όρχεων.

- ⊙ Και οι 3 ορμόνες, εμπλέκονται στην κάθοδο των όρχεων στο όσχεο με ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα **Lim1**. Τα ανδρογόνα είναι απαραίτητα για τη βουβωνική φάση της καθόδου.

