



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Διπλωματική εργασία

Διερεύνηση μεταλλάξεων στο χρωμόσωμα Υ που σχετίζονται
με την υπογονιμότητα στον άνδρα



ΝΙΚΗΦΟΡΙΔΗΣ ΝΙΚΗΦΟΡΟΣ

Λάρισα 2015

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- ΜΑΜΟΥΡΗΣ ΖΗΣΗΣ

Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών του τμήματος Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

- ΜΟΥΤΟΥ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών του τμήματος Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

- ΣΑΡΑΦΙΔΟΥ ΘΕΟΛΟΓΙΑ

Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών του τμήματος Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Γενετική Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών κ. Μαμούρη Ζήση.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον Καθηγητή κ. Μαμούρη Ζήση για την ανάθεση του θέματος αυτής της μεταπτυχιακής διατριβής, τη διαρκή καθοδήγηση και τις πολύτιμες συμβουλές του στην οργάνωση και τη διεκπεραίωση των πειραμάτων.

Συγχρόνως, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Αν. Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών, κ. Μούτου Αικατερίνη καθώς και την Επ. Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών κ. Σαραφίδου Θεολογία για την συμμετοχή τους στην τριμελή συμβουλευτική επιτροπή.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον διδάκτορα κ. Σταμάτη Κωνσταντίνο, τους υποψήφιους διδάκτορες κ. Σαρρή Κωνσταντίνα και κ. Γιαννούλη Θέμη, αλλά και την μεταπτυχιακή φοιτήτρια Αλεξανδρή Χρυσάνθη για την υποστήριξη, τη βοήθεια και τη συμπαράστασή τους σε όλη τη διάρκεια διεξαγωγής των πειραμάτων, καθώς επίσης και για τις χρήσιμες και παραγωγικές συζητήσεις για θέματα της διπλωματικής.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη μονάδα υποβοηθούμενης αναπαραγωγής EMBRYOLAB για την άψογη συνεργασία και την παροχή δειγμάτων και πληροφοριών.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας που επικρατούσε μέσα στο εργαστήριο.

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	6
ABSTRACT.....	6
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	7
1.1 Η ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΤΟΥ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ ΣΕ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΑ.....	7
1.2 Η ΙΣΤΟΡΙΑ ΤΟΥ Υ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΟΣ.....	7
1.3 ΧΑΡΤΟΓΡΑΦΗΣΗ ΤΟΥ Υ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΟΣ	8
1.4 Η ΔΟΜΗ ΤΟΥ Υ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΟΣ.....	9
1.5 ΚΑΘΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΦΥΛΟΥ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ.....	10
1.6 ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΩΝ ΓΟΝΑΔΩΝ.....	13
1.7 ΤΑ ΓΟΝΙΔΙΑ ΤΟΥ Υ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΟΣ	14
1.8 ΣΠΕΡΜΑΤΟΓΕΝΕΣΗ	14
1.9 ΔΟΜΗ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΟΥ	16
1.10 ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΟΥ-ΩΟΚΥΤΤΑΡΟΥ	17
1.11 ΑΚΡΟΣΩΜΙΚΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ.....	18
1.12 ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗ & ΣΥΝΤΗΞΗ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΟΥ-ΩΟΚΥΤΤΑΡΟΥ.....	19
1.13 ΑΝΔΡΙΚΗ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑ.....	20
1.14 ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑΣ	21
1.14.1 ΑΝΑΛΥΣΗ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ	21
1.14.2 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ.....	22
1.15 ΑΙΤΙΑ ΑΝΔΡΙΚΗΣ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑΣ	24
1.15.1 ΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ.....	24
1.15.2 ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΕΣ ΑΝΩΜΑΛΙΕΣ.....	25
1.15.3 ΜΙΚΡΟΕΛΛΕΙΜΜΑΤΑ ΣΤΟ Υ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΧΕΣ AZF	25
1.15.4 ΓΟΝΙΔΙΑΚΕΣ ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ.....	27
1.15.5 ΣΥΓΓΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΕΠΙΚΤΗΤΕΣ ΑΝΩΜΑΛΙΕΣ.....	28
1.15.6 ΜΟΛΥΝΣΕΙΣ ΟΥΡΟΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ	28
1.15.7 ΕΝΔΟΚΡΙΝΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ.....	29
1.15.8 ΥΠΕΡΘΕΡΜΙΑ ΟΣΧΕΟΥ	29
1.15.9 ΑΝΟΣΟΒΙΟΛΟΓΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ	29
1.16 ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΗΣ ΑΝΔΡΙΚΗΣ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑΣ	30
1.16.1 ΕΞΩΣΩΜΑΙΚΗ ΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ (IVF)	30
1.16.2 ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ ΕΓΧΥΣΗ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΩΝ (ICSI)	30
ΣΚΟΠΟΣ.....	32

ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ	33
2.1 ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ	34
2.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΟΥ DNA	35
2.2.1. Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από σπέρμα.....	35
2.2.2 Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από αίμα	36
2.3 ΧΕΙΡΙΣΜΟΙ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ	36
2.3.1. Εκχύλιση με φαινόλη/χλωροφόρμιο	36
2.3.2. Κατακρήμνιση νουκλεϊκών οξέων με αιθανόλη	37
2.4 ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ DNA	37
2.4.1 Με χρήση φασματοφωτόμετρου	37
2.4.2 Με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης	38
2.5 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ PRC	38
2.6 ΧΡΗΣΕΙΣ ΔΕΙΚΤΩΝ STS MARKERS	39
2.7 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ	41
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	44
3.1 PCR ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΤΩΝ ΥΠΟ ΜΕΛΕΤΗ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΤΟΠΩΝ	45
3.2 ΓΟΝΙΔΙΑ ΤΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ AZF α	45
3.3 ΓΟΝΙΔΙΑ ΤΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ AZF β	47
3.4 ΠΕΡΙΟΧΗ AZF γ	48
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	51
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	53

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στις μέρες μας η υπογονιμότητα επηρεάζει την ποιότητα ζωής πολλών ζευγαριών, έχοντας ποικίλες οικονομικές, ψυχολογικές και κοινωνικές προεκτάσεις. Περίπου ένα στα έξι ζευγάρια που βρίσκονται σε αναπαραγωγική ηλικία αντιμετωπίζει προβλήματα γονιμότητας. Πρόσφατες μελέτες αποδεικνύουν ότι ο ανδρικός παράγοντας συμβάλλει σε σημαντικό βαθμό στη διαμόρφωση του προφίλ ενός υπογόνιμου ζευγαριού. Τα προβλήματα γονιμότητας μπορεί να σχετίζονται με μια σειρά σωματικών, γενετικών, περιβαλλοντικών αλλά και άλλων παραγόντων ανεξήγητης αιτιολογίας. Ένας από τους υποψήφιους αιτιολογικούς παράγοντες της ανδρικής υπογονιμότητας αφορά την ύπαρξη ελλειμμάτων σε συγκεκριμένες περιοχές του χρωμοσώματος Y. Οι περιοχές αυτές είναι οι AZFa, AZFb και AZFc, οι οποίες φαίνεται να έχουν καθοριστικό ρόλο στη διαδικασία της σπερματογένεσης, διαφοροποίησης και ομαλής λειτουργίας των σπερματοζωαρίων. Η παρουσία ελλειμμάτων στις περιοχές αυτές έχει σχετισθεί με τη μειωμένη γονιμότητα, αδυναμία σπερματογένεσης και ωρίμανσης των γαμετικών κυττάρων. Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε μελέτη των ελλειμμάτων του Y χρωμοσώματος σε ένα σύνολο υπογόνιμων ανδρών αλλά και ατόμων με φυσιολογικό φαινότυπο σπέρματος. Η διερεύνηση των ελλειμμάτων στο χρωμόσωμα Y μπορεί να εξελιχθεί σε ένα χρήσιμο εργαλείο για η διάγνωση της ανδρικής υπογονιμότητας. Άλλωστε, όσο πιο ακριβής και συγκεκριμένη είναι η διάγνωση ενός υπογόνιμου ζευγαριού, τόσο πιο ειδική και αποτελεσματική είναι η θεραπεία που εφαρμόζεται αυξάνοντας έτσι την πιθανότητα επίτευξης κύησης.

ABSTRACT

Nowadays, infertility has become a major issue, affecting the life quality of many couples, having various economic, psychological and social implications. Approximately, one in six couples of reproductive age is facing fertility problems. Recent studies show that the male factor contributes significantly to shaping the profile of an infertile couple. Fertility problems may be associated with a range of physical, genetic, environmental and other factors that still remain obscure. One of the potential etiological factors of male infertility is associated with microdeletions in certain regions of the Y chromosome, namely AZFa, b & c. AZF stands for azoospermia factor and these regions are associated with spermatogenesis, differentiation and function of the spermatozoa. Microdeletions in these regions are associated with reduced fertility, aberrant sperm production and germ cell maturation. In the current thesis, a study of the Y chromosome and specifically the AZFa, b & c regional deletions was carried out in order to identify potential differences between fertile and infertile individuals. The study was performed using PCR to amplify certain STSs flanking the three AZF regions and agarose gel electrophoresis to visualize the results; however, no microdeletions were detected in the infertile individuals. Investigating potential deletions in the Y chromosome is of high importance and may contribute in the endeavor to elucidate the molecular mechanisms from which male infertility stems, leading to an early diagnosis. Besides, an accurate diagnosis of an infertile couple will lead to a proper treatment, rendering feasible the achievement of a successful pregnancy.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Η ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΤΟΥ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ ΣΕ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΑ

Το γενετικό υλικό των ευκαρυωτικών οργανισμών είναι μοιρασμένο σε πολλά γραμμικά χρωμοσώματα. Κάθε χρωμόσωμα αποτελείται από ένα μοναδικό, γραμμικό μόριο DNA που αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες, οι οποίες διπλώνουν και συσκευάζουν τη λεπτή ίνα του DNA σε μια πιο συμπαγή δομή. Το σύμπλοκο του DNA και των πρωτεϊνών αποκαλείται χρωματίνη.

Εκτός από τα γαμετικά κύτταρα, δηλαδή τα ωάρια και τα σπερματοζωάρια, όλα τα υπόλοιπα ανθρώπινα κύτταρα, είναι διπλοειδή και περιέχουν δύο αντίγραφα του κάθε χρωμοσώματος, εκ των οποίων το ένα είναι μητρικής και το άλλο είναι πατρικής προέλευσης. Αντίθετα, οι γαμέτες όλων των ευκαρυωτών διαθέτουν ένα μόνο αντίτυπο των χρωμοσωμάτων τους και ονομάζονται απλοειδείς. Τα δύο χρωμοσώματα ενός ζευγαριού αποκαλούνται ομόλογα. Το μόνο ζεύγος μη ομόλογων χρωμοσωμάτων είναι το ζεύγος των φυλετικών χρωμοσωμάτων στους άνδρες, οι οποίοι κληρονομούν ένα χρωμόσωμα Y από τον πατέρα και ένα χρωμόσωμα X από τη μητέρα τους.

Στα κύτταρα των ευκαρυωτών το σύνολο των μεταφασικών χρωμοσωμάτων συνιστούν τον καρυότυπο που είναι μοναδικός για κάθε είδος. Στον άνθρωπο η βασική διαφοροποίηση στον καρυότυπο μεταξύ αρσενικών και θηλυκών ατόμων είναι η παρουσία των φυλετικών χρωμοσωμάτων. Ο καρυότυπος των αυτοσωμικών χρωμοσωμάτων δεν διαφέρει σε άτομα του ίδιου είδους (εκτός αν υπάρχει κάποια χρωμοσωμική ανωμαλία), αλλά είναι διαφορετικός μεταξύ των ατόμων που ανήκουν σε διαφορετικά είδη. Ο άνθρωπος έχει 46 χρωμοσώματα συγκεντρωμένα σε 22 ζεύγη αυτοσωμικών χρωμοσωμάτων συν τα δύο φυλετικά χρωμοσώματα που είναι XX για τη γυναίκα και XY για τον άνδρα. (Μαμούρης, Μούτου, Ζίφα, 2008)

1.2 Η ΙΣΤΟΡΙΑ ΤΟΥ Y ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΟΣ

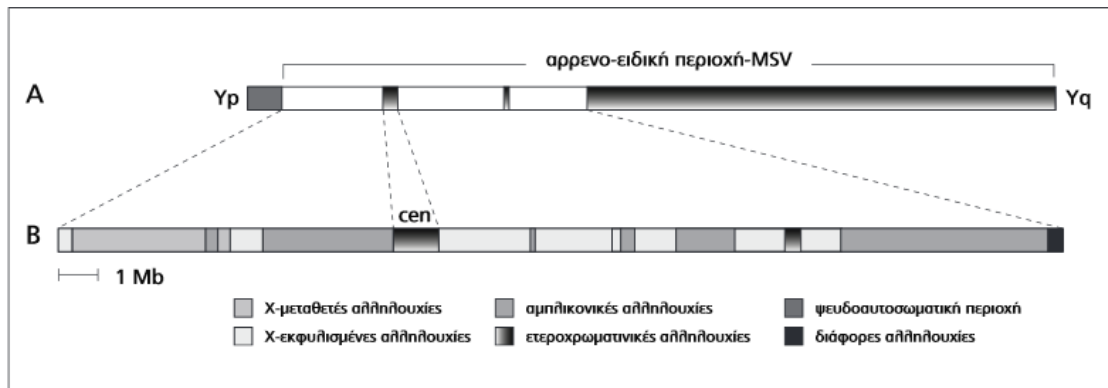
Έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές μελέτες ώστε να προσδιοριστεί η δομή, η οργάνωση και ο λειτουργικό ρόλος του Y χρωμοσώματος. Οι πρώτες μελέτες επικεντρώθηκαν στη μεντελική ανάλυση του ανθρώπινου γενεαλογικού δέντρου. Στις αρχικές δεκαετίες του εικοστού αιώνα, οι υπέρμαχοι της Μεντελικής κληρονομικότητας διατύπωσαν τρεις τρόπους κληρονομικότητας στον άνθρωπο: την αυτοσωμική υπολειπόμενη, την αυτοσωμική επικρατούσα και τη φυλοσύνδετη υπολειπόμενη. Συγχρόνως, άλλοι μελετητές προσπάθησαν να προσδιορίσουν τον τρόπο κληρονόμησης χαρακτηριστικών που παρουσιάζουν μεταβίβαση από τον πατέρα στο γιο, ενώ άλλες μελέτες των ανθρώπινων κυττάρων με τη βοήθεια μικροσκοπίου παρείχαν ενδείξεις για την ύπαρξη ενός χρωμοσώματος που εμφανιζόταν μόνο στους άνδρες (Painter, 1921). Ως το 1950, οι μελέτες της ανθρώπινης γενεαλογίας ανέδειξαν τουλάχιστον 17 χαρακτηριστικά που σχετίζονται με το Y χρωμόσωμα (Stern, 1957).

Κατά τη δεκαετία του 1950, η μελέτη του Jacobs για το σύνδρομο Klinefelter (XXY) (Jacobs & Strong, 1959) στους άνδρες και η έρευνα του Ford για το σύνδρομο Turner (X0) σε γυναίκες (Ford et al., 1959) παρουσίασαν πως το Y χρωμόσωμα φέρει ένα σημαντικό γονίδιο που σχετίζεται με το φυλοκαθορισμό. Κατά τη δεκαετία του 1960, ο Ohno πρότεινε πως τα χρωμοσώματα X και Y των θηλαστικών είχαν προκύψει από ένα κοινό ζεύγος αυτοσωμικών χρωμοσωμάτων (Ohno, 1967). Επιπροσθέτως, διατύπωσε μία υπόθεση, κατά την οποία το X χρωμόσωμα είχε διατηρήσει το γονιδιακό του περιεχόμενο, ενώ το Y είχε χάσει την πλειοψηφία των γονιδίων του εκτός από αυτά που σχετίζονταν με τον καθορισμό του φύλου. Έτσι προέκυψε η πεποίθηση ότι το Y χρωμόσωμα είναι ένα εκφυλισμένο X.

Τέλος, έρευνες ανασυνδυασμένου DNA και η εφαρμογή της αλληλούχισης στο Y χρωμόσωμα, οδήγησαν σε συμπεράσματα αναφορικά με τα γονίδια του. Η γνώση των βιολογικών διεργασιών που σχετίζονται με το Y χρωμόσωμα προκύπτει από μελέτες του γονιδιώματος σε άτομα που δεν έχουν ολόκληρο το Y χρωμόσωμα, άτομα που πάσχουν από το σύνδρομο Turner και άτομα που δεν παράγουν σπερματοζωάρια (Vogt et al., 1997). Γενετικές μελέτες ανέδειξαν ότι το Y χρωμόσωμα περιέχει μια περιοχή, η οποία καλύπτει το 95% του συνολικού του μήκους και δεν συμβαίνει ανασυνδυασμός μεταξύ των X και Y. Αυτή η περιοχή έγινε γνωστή αρχικά ως η μη ανασυνδυαζόμενη περιοχή (NRY), όμως τελικώς ονομάστηκε male-specific region (MSY) (Rozen et al., 2003). Εκατέρωθεν της περιοχής αυτής εντοπίζονται ψευδοαυτοσωμικές περιοχές όπου ο ανασυνδυασμός μεταξύ των X και Y είναι ένα σύνηθες φαινόμενο κατά τη μείωση (Skaletsky et al., 2003).

1.3 ΧΑΡΤΟΓΡΑΦΗΣΗ ΤΟΥ Y ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΟΣ

Μελέτες στο γονιδίωμα έδειξαν πως το χρωμόσωμα Y περιέχει μια περιοχή, που αποτελεί περί το 95% του συνολικού μήκους του, στην οποία δεν γίνεται ανασυνδυασμός μεταξύ των χρωμοσωμάτων X-Y. Η μη ανασυνδυαζόμενη αυτή περιοχή ονομάστηκε MSY (male-specific region). Η περιοχή MSY περιβάλλεται και από τις δύο πλευρές από ψευδοαυτοσωμικές περιοχές, όπου ο ανασυνδυασμός ανάμεσα στα χρωμοσώματα X και Y είναι ένα συχνό και φυσιολογικό γεγονός κατά τη μείωση στους άνδρες (Skaletsky et al, 2003). Η ευχρωματινική περιοχή της MSY καλύπτει στο σύνολο περίπου 23 Mb, 8 Mb στο βραχύ βραχίονα Yp και 14.5 Mb στο μακρό βραχίονα του Yq.



Εικόνα 1 Η αρρενο-ειδική περιοχή του χρωμοσώματος Y: A) Σχηματική απεικόνιση ολόκληρου του χρωμοσώματος Y, περιλαμβανομένης και της ψευδοαυτοσωμικής και ετεροχρωματικής περιοχής, B) Μεγέθυνση της περιοχής μήκους 24Mb της MSY όπου απεικονίζονται και οι τρεις τάξεις ευχρωματινικών αλληλουχιών, όπως επίσης και οι ετεροχρωματικές περιοχές (Skaletsky et al, 2003) [Cen: κεντρομερίδιο].

Η MSY περιοχή περιλαμβάνει τουλάχιστον 156 μεταγραφικές μονάδες, οι μισές από τις οποίες πιθανότατα κωδικοποιούν πρωτεΐνες. Όλες αυτές οι μεταγραφικές μονάδες που αναγνωρίστηκαν εντοπίζονται σε περιοχές ευχρωματίνης. Από τις 78 αλληλουχίες που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, περίπου οι 60 ανήκουν σε 9 διαφορετικές MSY-ειδικές οικογένειες γονιδίων. Τα γονίδια της κάθε μιας από τις οικογένειες παρουσιάζουν >98% ομοιότητα στην νουκλεοτιδική τους αλληλουχία. Για τα υπόλοιπα 18 γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, εντοπίζεται ένα αντίγραφο τους στην MSY περιοχή. Κατά συνέπεια, η περιοχή αυτή φαίνεται να κωδικοποιεί τουλάχιστον 27 διαφορετικές πρωτεΐνες. Αξίζει να αναφερθεί πως οι περιοχές ετεροχρωματίνης δεν παρουσιάζουν ενδείξεις για πιθανή μεταγραφική δραστηριότητα (Skaletzky et al, 2003).

1.4 Η ΔΟΜΗ ΤΟΥ Y ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΟΣ

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, το Y χρωμόσωμα εντοπίζεται μόνο στον άνδρα και είναι το μικρότερο από τα χρωμοσώματα του. Το Y χρωμόσωμα (60Mb) αποτελεί το 2%-3% του απλοειδούς γονιδιώματος. Πρόκειται για ένα ακροκεντρικό χρωμόσωμα που αποτελείται από τον μικρό (p) βραχίονα, τον μεγάλο (q) βραχίονα και την ενδιάμεση των δύο, περιοχή του κεντομερούς. Πιο συγκεκριμένα, με τη βοήθεια κυτταρογενετικών μελετών έχουν προσδιοριστεί οι παρακάτω περιοχές στο Y χρωμόσωμα:

1. Ψευδοαυτοσωμικές περιοχές (Pseudoautosomal region – PAR1, PAR2). Οι περιοχές αυτές εντοπίζονται στα άκρα των δυο βραχιόνων του Y χρωμοσώματος και καταλαμβάνουν μια έκταση 2,6Mb και 320bp, αντίστοιχα (Zheng Li et al.,2008). Αυτές οι περιοχές παρουσιάζουν ομολογία με τα άκρα του X χρωμοσώματος και συμβάλουν στο σχηματισμό συνάψεων μεταξύ των X και Y χρωμοσωμάτων, όπως επίσης και στον ανασυνδυασμό τους κατά την μείωση. Μία πιθανή απώλεια της περιοχής PAR1 οδηγεί σε στειρότητα, εξαιτίας της απουσίας σύναψης των φυλετικών χρωμοσωμάτων (Mangs et al., 2007).

2. Μη ανασυνδιαζόμενη περιοχή του Y χρωμοσώματος (Non-recombining region/ NRY ή Male Specific Y/MSY). Η περιοχή αυτή αποτελεί το τμήμα του Y χρωμοσώματος που περιλαμβάνεται μεταξύ των δυο ψευδοαυτοσωμικών περιοχών και καλύπτει το 95% του συνολικού μήκους του Y χρωμοσώματος. Καταλαμβάνει μια έκταση 63Mb, εκ των οποίων οι 23Mb περιλαμβάνουν γονίδια που μεταγράφονται (Krausz et al., 2006). Η περιοχή αυτή περιέχει αλληλουχίες, που μπορεί να έχουν ομόλογες στο X χρωμόσωμα ή να είναι ειδικές του Y χρωμοσώματος. Η NRY περιοχή υποδιαιρείται στα παρακάτω επιμέρους τμήματα:

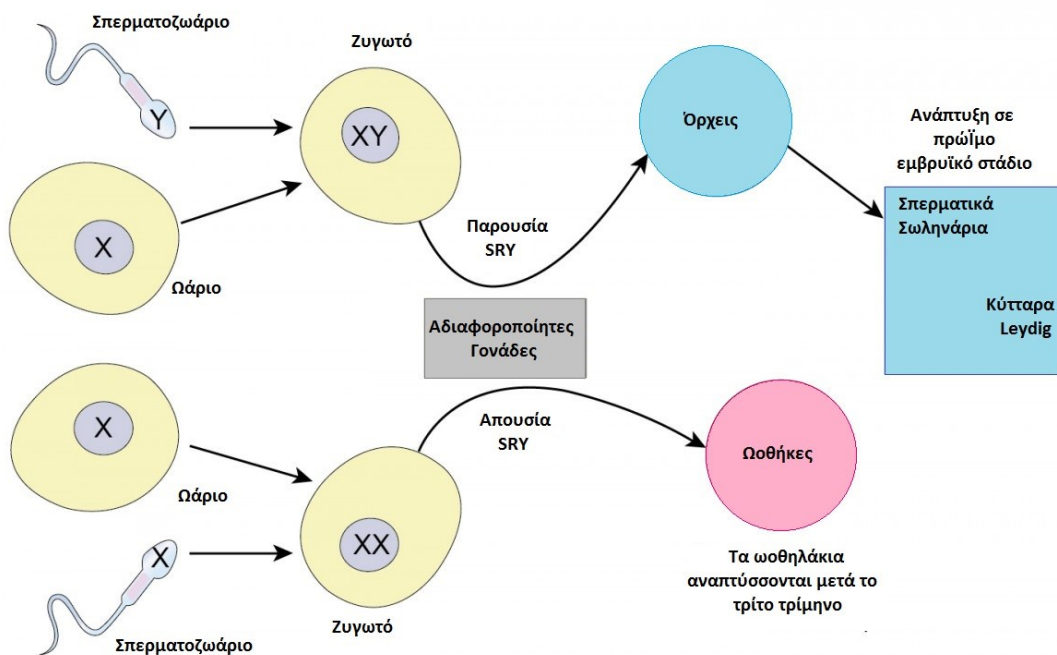
- i. Το μικρό βραχίονα του Y χρωμοσώματος (ευχρωματινική περιοχή)
- ii. Την περιοχή του κεντρομέρους
- iii. Την κεντρική περιοχή του μεγάλου βραχίονα του Y χρωμοσώματος (ευχρωματινική περιοχή)
- iv. Την περιοχή ετεροχρωματίνης, η οποία καταλαμβάνει την απομακρυσμένη Yq περιοχή. Η περιοχή αυτή παρουσιάζει ποικιλομορφία όσο αφορά το μήκος μεταξύ των ανδρών που ανήκουν σε διαφορετικές πληθυσμιακές ομάδες και μπορεί να αποτελέσει το $\frac{1}{2}$ - $\frac{2}{3}$ του μεγέθους της περιοχής Yq. Θεωρείται ότι είναι γενετικά ανενεργή και συγκροτείται από δύο διαφορετικές ομάδες επαναλαμβανόμενων τμημάτων, τις DYZ1 και DYZ2, κάθε μια εκ των οποίων διαθέτει από 5000-2000 αντίγραφα, αντίστοιχα.

Τα περισσότερα από τα γονίδια που συναντώνται στην NRY/MSY περιοχή του Y χρωμοσώματος συμμετέχουν τόσο στον καθορισμό και τη διαφοροποίηση του φύλου (SRY) όσο και στην διαδικασία της σπερματογένεσης (γονίδια των AZF περιοχών) (Krausz et al., 1999; Foresta et al., 2001; Krausz et al., 2006; Zheng Li et al., 2008).

1.5 ΚΑΘΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΦΥΛΟΥ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ

Εξαιτίας της μεγάλης κλινικής και βιολογικής σημασίας του, η αναγνώριση του μηχανισμού που συμβάλει στον καθορισμό του φύλου με την ανάπτυξη των όρχεων ή των ωοθηκών συνεχίζει να έλκει το ενδιαφέρον των ερευνητών.

Δύο μεγάλες ανακαλύψεις που οδήγησαν στην κατανόηση του καθορισμού του φύλου στα θηλαστικά. Η πρώτη είναι το 1959, ταυτοποίηση των συνδρόμων Turner (XO θηλυκά άτομα) και Klinefelter (XXY αρσενικά άτομα). Αποδείχθηκε πως το χρωμόσωμα Y φέρει ένα γονίδιο το οποίο ορίζει το ανδρικό φύλο. Η δεύτερη ανακάλυψη, το 1989, αφορά την εύρεση του γονιδίου SRY (sex-determining region on the chromosome Y). Το ανθρώπινο γονίδιο SRY ανακαλύφθηκε ψάχνοντας για συντηρημένες αλληλουχίες σε τμήματα του Y χρωμοσώματος, οι οποίες μεταφέρθηκαν στο χρωμόσωμα X με ομόλογο ανασυνδυασμό. Μεταξύ αυτών των αλληλουχιών εντοπίζεται και το γονίδιο SRY, το οποίο εντοπίστηκε σε άτομα τα οποία φαινοτυπικά ήταν άνδρες αλλά καρυοτυπικά είχαν ένα ζεύγος XX φυλετικών χρωμοσωμάτων (ασθενείς με σύνδρομο de la Chapelle).



Εικόνα 2. Ο ρόλος του γονιδίου SRY στον καθορισμό του φύλου στα θηλαστικά.

Μετά την 6^η εβδομάδα κύησης λαμβάνει χώρα η διαφοροποίηση του φύλου, δηλαδή ο σχηματισμός και η διαφοροποίηση των έσω και έξω γεννητικών οργάνων, τα οποία πλέον θα είναι διαφορετικά στο αρσενικό και στο θηλυκό άτομο (Κανακά-Gantenbein et al., 2007, Warne et al., 1998, Rey et al., 1998, McElreavey et al., 1999, Federman et al., 2004, McElreavey et al., 1997, Ahmed et al., 2002, Josso et al., 1996, Hughes et al., 2001). Πιο συγκεκριμένα, κατά τις πρώτες έξι εβδομάδες της εμβρυϊκής ανάπτυξης, αναγνωρίζονται οι αδιαφοροποίητες δομές, οι οποίες είναι όμοιες και αμφιδύναμες τόσο στα 46, XX όσο και στα 46, XY έμβρυα (Κανακά-Gantenbein et al., 2007, Josso et al., 1996, Hughes et al., 2001, Keith et al., 1978, MacLaughlin 2004, Tohonen et al., 2003, Barsoum et al., 2006). Οι δομές αυτές είναι:

- Α) γεννητική ακρολοφία (gonadal ridge), τμήμα του μεσοδέρματος του εμβρύου των σπονδυλωτών από το οποίο αναπτύσσονται οι γονάδες
- Β) τα αρχέγονα γεννητικά κύτταρα (germ cells), κύτταρα της αναπαραγωγικής σειράς στα στάδια που προηγούνται της διαφοροποίησής τους σε ωογόνια και σπερματογόνια
- Γ) το σύστημα των εσωτερικών πόρων (internal ducts), οι οποίοι είναι δύο αρχικά σε κάθε έμβρυο, ο αγωγός Wolff ή μεσονεφρικός και ο αγωγός του Müller ή παραμεσονεφρικός
- Δ) τα έξω γεννητικά όργανα

Κατά την διαφοροποίηση του φύλου η γοναδική ακρολοφία θα διαφοροποιηθεί σε όρχεις ή ωοθήκες, τα γεννητικά κύτταρα θα διαφοροποιηθούν σε σπερματοκύτταρα ή ωοκύτταρα, το ένα ζευγάρι των εσωτερικών πόρων θα υποστραφεί ενώ το άλλο θα αναπτυχθεί, και τέλος, τα έξω γεννητικά όργανα θα αρρενοποιηθούν ή θα διαμορφωθούν προς θήλυ.

Η διδύναμη γοναδική ακρολοφία στο έμβρυο των 5 εβδομάδων βρίσκεται στη μέση γραμμή των ουρογεννητικών ακρολοφιών. Τα αρχέγονα γεννητικά κύτταρα προέρχονται από το ενδόδερμα και στη συνέχεια μεταναστεύουν προς τη γοναδική ακρολοφία. Στις 4 εβδομάδες τα αρχέγονα γεννητικά κύτταρα ανιχνεύονται στα τοιχώματα του λεκιθικού ασκού και μία

εβδομάδα αργότερα, δηλαδή κατά την 5^η εβδομάδα εμβρυικής ανάπτυξης 700-1300 κύτταρα μεταναστεύουν προς τους γεννητικούς αδένες. Τα γεννητικά κύτταρα τα οποία δεν φθάνουν στους γεννητικούς αδένες κατά κανόνα εκφυλίζονται, ενώ παραμονή τους σε εξωγοναδικές θέσεις οδηγεί σε εμφάνιση νεοπλασίας. Αξίζει να σημειωθεί ότι στο άρρεν η εγκατάσταση των αρχέγονων γενετικών κυττάρων είναι απαραίτητη για τη γονιμότητα. Αντίθετα, στο θήλυ αν δεν επιτελεσθεί η εγκατάσταση των αρχέγονων γεννητικών κυττάρων στις ωοθήκες δεν διαφοροποιούνται και δημιουργούνται ταινιοειδείς γονάδες (streak gonads) (McElreavey et al., 1999, Federman et al., 2004, Ahmed et al., 2002, Ross et al., 2005). Κάθε γονάδα για να είναι λειτουργική πρέπει να περιέχει τόσο γα μετοκύτταρα, που θα δώσουν γένεση σε γαμέτες, όσο και σωματικά κύτταρα, τα οποία θα αποτελέσουν το υπόστρωμα που θα περιβάλλει τους γαμέτες (Tohonen et al., 2003) και θα εκκρίνουν ορμόνες, οι οποίες είναι απαραίτητες για την περαιτέρω διαφοροποίηση του φύλου και την αναπαραγωγική ικανότητα. Η αδιαφοροποίητη γονάδα περιλαμβάνει συνήθως τέσσερις κυτταρικές σειρές, τα κύτταρα του στρώματος, τα στεροειδοπαραγωγά, τα κύτταρα του συνδετικού ιστού και τα γαμετοκύτταρα. Τα κύτταρα του στρώματος, θα δώσουν γένεση στα κύτταρα Sertoli, που θα περιβάλουν τα γαμετοκύτταρα και θα δημιουργήσουν ένα περιβάλλον κατάλληλο για την αύξηση και διαφοροποίησή τους ενώ τα στεροειδοπαραγωγά κύτταρα θα είναι τα κύτταρα Leydig. Η φυσιολογική διαφοροποίηση του φύλου στο άρρεν επιτελείται σε δύο στάδια. Αρχικά μέσω της δράσης γονιδίων που κωδικοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες, όπως οι SF-1, WT-1, θα σχηματιστεί η διδύναμη γονάδα από το ενδιάμεσο μεσόδερμα και στη συνέχεια η συνδυασμένη δράση άλλων γονιδίων, με κύριους εκπροσώπους το καθοριστικό γονίδιο του φύλου SRY, που εδράζεται στο χρωμόσωμα Y και το SOX9, θα επιτρέψει την πρόοδο της διαδικασίας φυλοκαθορισμού. Αυτό θα προσδιορίσει την περαιτέρω πορεία των γονάδων, δηλαδή στο άρρεν τη μετατροπή της αδιαφοροποίητης γονάδας σε όρχι, ενώ στη δεύτερη φάση οι εκκρινόμενες από τον όρχι πλέον ορμόνες, όπως η τεστοστερόνη, θα οδηγήσουν σε διαφοροποίηση των έσω και έξω γεννητικών οργάνων προς τον φυσιολογικό άρρενα φαινότυπο (Κανακά-Gantenbein et al., 2007, Warne et al., 1998, Rey et al., 1998, McElreavey et al., 1999, Federman et al., 2004, McElreavey et al., 1997, Tohonen et al., 2006, Barsoum et al., 2006).

Η βάση του φυλετικού διμορφισμού στα θηλαστικά προήλθε από την εξέλιξη των φυλετικών χρωμοσωμάτων. Τα φυλετικά χρωμοσώματα X και Y έχουν προέλθει από αυτοσωμικούς προγόνους που υπήρχαν τουλάχιστον 300 εκατομμύρια χρόνια πριν. Τότε, ένας ανεπιτυχής συνδυασμός ομολόγων δημιούργησε μια περιοχή που δεν ήταν όμοια στα 2 χρωμοσώματα. Ανάλογα με την παρουσία ή την έλλειψη αυτής προέκυψε ένα διαφορετικό μοντέλο ανάπτυξης και δράσης των ανδρογόνων, έτσι ώστε να αποδοθεί σε αυτήν ένας φυλοκαθοριστικός ρόλος. Σε όλα τα θηλαστικά η περιοχή αυτή παίζει ρυθμιστικό ρόλο και ονομάζεται «περιοχή που καθορίζει το φύλο στο χρωμόσωμα Y» (Sex-determining Region of the Y chromosome - SRY gene). Τα αρσενικά φέρουν ένα χρωμόσωμα Y το οποίο αποτελείται, σχεδόν αποκλειστικά (95%) από μη συνδυαζόμενες αλληλουχίες έτσι ο ανασυνδυασμός με το X χρωμόσωμα συμβαίνει μόνο στις ψευδοαυτοσωματικές περιοχές PAR1 και PAR2. Η μη συνδυαζόμενη περιοχή εντοπίζεται γύρω από το γονίδιο SRY και περιέχει γονίδια και ρυθμιστικά στοιχεία. Ακριβώς γι αυτό η συγκεκριμένη περιοχή ονομάζεται και ειδική του άρρενος (Male-Specific region of the Y chromosome).

Στα θηλυκά, τα φυλετικά χαρακτηριστικά οφείλονται στο μεγαλύτερο βαθμό στην παρουσία δύο XX χρωμοσωμάτων. Λόγω του φαινομένου διαφυγής της αδρανοποίησης ορισμένα γονίδια είναι παρόντα «εις διπλούν» γεγονός που τους προσδίδει χαρακτηριστικά

ειδικά του θήλεος, σε σχέση με την παρουσία του ενός αντιγράφου στο αρσενικό. Ωστόσο, δεν έχει βρεθεί κάποιος ρόλος στον έλεγχο των λειτουργιών του φύλου για όλα τα γονίδια και για αυτό έχει προταθεί ότι, στη δημιουργία του θηλυκού φυλετικού προτύπου, συμμετέχουν και περιοχές των αυτοσωμάτων. Τέλος, υπέρ του σπουδαίου ρόλου των φυλετικών χρωμοσωμάτων στο διμορφισμό μεταξύ θηλυκών και αρσενικών συνηγορούν οι φαινοτυπικές διαταραχές που απορρέουν από κυτταρογενετικές ανωμαλίες. Παρά τα διαφορετικά συμπτώματα, οι ανευπλοειδισμοί των γονοσωμάτων, όπως τα σύνδρομα Klinefelter και Turner, χαρακτηρίζονται πάντοτε από γοναδική δυσγενεσία και υπογονιμότητα.

1.6 ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΩΝ ΓΟΝΑΔΩΝ

Οι αρσενικές και οι θηλυκές γονάδες διαφέρουν μεταξύ τους και η ανάπτυξη τους συνδέεται στενά με τον καθορισμό του φύλου. Οι γονάδες αναπτύσσονται από το ενδιάμεσο μεσόδερμα σε μικρή απόσταση από τους νεφρούς. Το πλευρικό τμήμα του ενδιάμεσου μεσοδέρματος σχηματίζει τους μεσονεφρούς και το μέσο τμήμα τη γονάδα. Η γεννητική ακρολοφία εμφανίζεται σε κάθε πλευρά του κορμού, προβάλλοντας ελαφρά μέσα στο κοιλώμα. Οι γεννητικές ακρολοφίες εκφράζουν το μεταγραφικό παράγοντα ομοιοπλαισίου και επικρατειών LIM, τον Lhx9, ο οποίος παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξή τους. Λίγο μετά την εμφάνιση της γεννητικής ακρολοφίας, ομάδες κυττάρων (χορδές) από το επιθήλιο που επενδύει το κοιλώμα αρχίζουν να αναπτύσσονται μέσα στο υποκείμενο μεσέγχυμα. Κατά την περίοδο αυτή εμφανίζονται οι δύο αγωγοί οι οποίοι αποτελούν σημαντικά στοιχεία για το σχηματισμό των αναπαραγωγικών οργάνων. Ο νεφρικός αγωγός (αγωγός Wolf) αφού αρχίσει η ανάπτυξη των μετανεφρών, δεν έχει πλέον εκκριτική λειτουργία, αλλά παραμένει σχηματίζοντας τελικά το σπερματικό πόρο στο αρσενικό άτομο. Ο αγωγός του Muller (παραμεσονεφρικός αγωγός) εμφανίζεται δίπλα στον αγωγό του Wolf και τελικά θα σχηματίσει τον ωαγωγό, τη μήτρα και τον κεντρικό κόλπο του θηλυκού. Μέχρι το σημείο αυτό δεν υπάρχει διαφορά ως προς την ορατή διαφοροποίηση των δύο φύλων.

Στο αρσενικό άτομο, από τις χορδές του επιθηλίου του κοιλώματος οι οποίες αναπτύσσονται προς τη γεννητική ακρολοφία σχηματίζεται ένα πολύπλοκο σύστημα σπερματοφόρων σωληναρίων, που αποτελούνται από κύτταρα Sertoli. Τα κύτταρα της αναπαραγωγικής σειράς ενσωματώνονται στα σπερματοφόρα σωληνάκια. Τα κύτταρα που είναι υπεύθυνα για την έκκριση της τεστοστερόνης ονομάζονται κύτταρα Leydig και διαφοροποιούνται από το μεσέγχυμα που εντοπίζεται ανάμεσα στα σωληνάκια. Τα σωληνάκια συνδέονται με τον αγωγό του Wolf και η αναπτυσσόμενη γονάδα βραχύνεται και ενθυλακώνεται σχηματίζοντας τον όρχι. Στο μεταξύ ο αγωγός του Muller υποχωρεί. Τα σωληνάκια του όρχι παραμένουν συμπαγή μέχρι και μετά τη γέννηση, οπότε αρχίζει η αυλοποίηση τους και εμφανίζονται τα σπερματογόνια, που προέρχονται από τα γαμετικά κύτταρα. Κατά τη σπερματογένεση λαμβάνει χώρα

συνεχής παραγωγή σπερματοζωαρίων από σπερματογόνια τύπου A, που είναι προσαρτημένα στη βασική μεμβράνη του σωληναρίου, μέσω μιτωτικών σπερματογονίων τύπου B, που κινούνται προς τον αυλό και υπόκεινται στη μείωση, κατά την οποία καθένα από αυτά παράγει τέσσερα σπερματοζωάρια (Slack, 2007).

1.7 ΤΑ ΓΟΝΙΔΙΑ ΤΟΥ Υ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΟΣ

Σε σύγκριση με τα αυτοσωμικά χρωμοσώματα, το Υ χρωμόσωμα διαθέτει τον μικρότερο αριθμό γονιδίων αλλά τον μεγαλύτερο αριθμό επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών. Ειδικότερα έχουν προσδιοριστεί 220 γονίδια, εκ των οποίων τα 104 κωδικοποιούν πρωτεϊνικά μόρια, τα 111 είναι ψευδογονίδια και τα υπόλοιπα 5 δεν έχουν κατηγοριοποιηθεί. Μεταξύ αυτών, 16 πρωτεΐνες κωδικοποιούνται από γονίδια που εδράζονται στις AZF περιοχές και εμπλέκονται στη διαδικασία της σπερματογένεσης (Zheng Li et al., 2008).

Τα γονίδια ταξινομούνται σε τρεις ομάδες με βάση τη θέση τους στο Υ χρωμόσωμα, τον αριθμό των αντιγράφων τους και το πρότυπο έκφρασής τους (Yen H., 1999):

1. Ψευδοαυτοσωμικά γονίδια (όπως ASMTL, MIC2 και IL9R) των οποίων η αλληλουχία είναι όμοια στο Χ και το Υ χρωμόσωμα και με ορισμένες εξαιρέσεις, εκφράζονται σε διαφορετικούς ιστούς.
2. Γονίδια τα οποία εδράζονται στην NRY περιοχή (USP9Y, BY, UTY). Αυτά τα γονίδια έχουν ομόλογα στο Χ χρωμόσωμα, κωδικοποιώντας πρωτεϊνικά μόρια με υψηλό βαθμό ταυτοσημίας. Επίσης, τα γονίδια αυτά εκφράζονται σε όλους τους ιστούς ενώ ορισμένα εκφράζονται ιστοειδικά στους όρχεις.
3. Οικογένειες γονιδίων ειδικών για το Υ χρωμόσωμα (Υ specific) (όπως DAZ, CDY και TSPY). Αποτελούν γονίδια τα οποία απαντώνται σε πολλαπλά αντίγραφα, τα οποία μπορεί να είναι είτε διασπαρμένα είτε ομαδοποιημένα στο Υ χρωμόσωμα και εκφράζονται αποκλειστικά στους όρχεις. Εξαιρέση στην παραπάνω ομαδοποίηση αποτελεί το γονίδιο SRY το οποίο είναι απαραίτητο για την ανάπτυξη των όρχεων, βρίσκεται μόνο σε ένα αντίγραφο και παρουσιάζει διαφορετικό πρότυπο έκφρασης εκφράζεται στα κύτταρα της γενετικής ακρολοφίας, στα κύτταρα Sertoli του ενήλικα και στα προγονικά κύτταρα των γονάδων (Jeske et al., 1995; Koopman et al., 1999; Salas-Cortes et al., 1999).

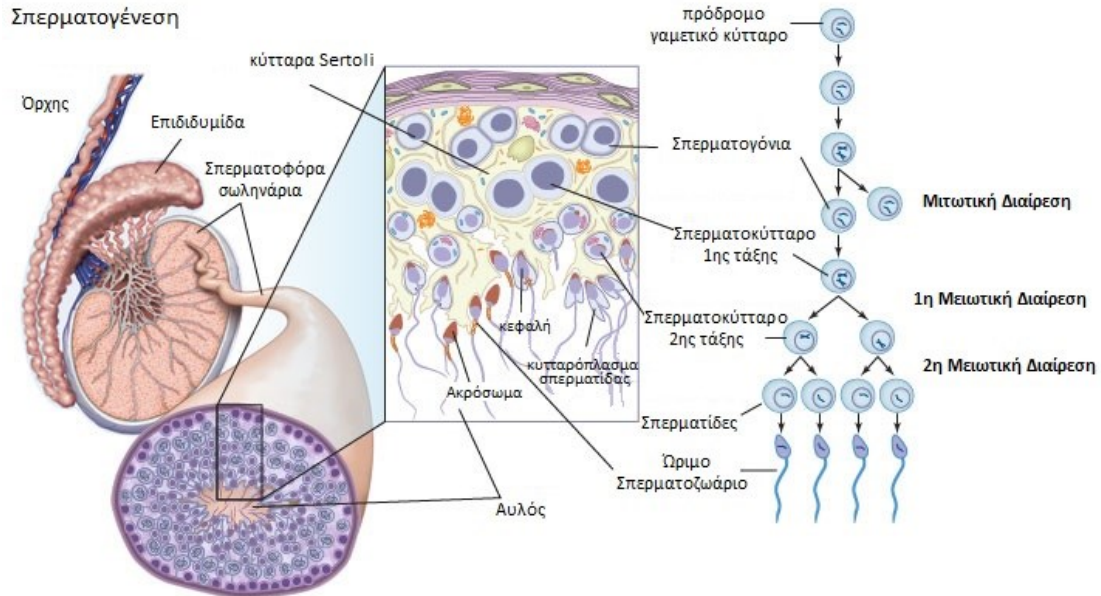
1.8 ΣΠΕΡΜΑΤΟΓΕΝΕΣΗ

Η σπερματογένεση είναι μια διαδικασία πολλαπλασιασμού και κυτταρικής διαφοροποίησης, κατά την οποία τα πρόδρομα γεννητικά κύτταρα μετατρέπονται σταδιακά στα σπερματοζωάρια (αρσενικοί γαμέτες). Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται στα σπερματοφόρα σωληνάρια του όρχι και ολοκληρώνεται στην επιδιδυμίδα με την ωρίμανση των σπερματοζωαρίων. (O'Donnell et al. 2001, Bedford et al. 1979) Στον άνθρωπο παράγονται καθημερινά περίπου 200 εκατομμύρια πλήρως διαφοροποιημένα σπερματοζωάρια. (De Jonge and Barratt, 2006) Χρονικά, το διάστημα που είναι απαραίτητο για να επιτευχθεί εξέλιξη ενός

πρόδρομοι γαμετικού κυττάρου σε ώριμο σπερματοζώαριο συνιστά ένα κύκλο σπερματογένεσης, η διάρκεια του οποίου εμφανίζει διαφορές ανάλογα με τον οργανισμό που μελετάται, για τον άνθρωπο είναι περίπου 70 μέρες. (Vander, 2011)

Η σπερματογένεση διαχωρίζεται σε τρεις φάσεις, οι οποίες παρουσιάζουν τοπική και χρονική εξειδίκευση. (Vander, 2011) Η διαδικασία αρχίζει με μία φάση μιτωτικών διαιρέσεων. Τα σπερματογόνια κύτταρα (βλαστικά κύτταρα), τα οποία συναντώνται στα σπερματικά σωληνάκια του όρχι κοντά στη βασική μεμβράνη, μεταξύ των κυττάρων Sertoli, θα δώσουν τα τύπου Α και τύπου Β σπερματογόνια. Η διαφορά είναι ότι τα σπερματογόνια τύπου Α διατηρούν τα χαρακτηριστικά των αδιαφοροποίητων βλαστικών κυττάρων, ενώ τα σπερματογόνια τύπου Β προορίζονται για περαιτέρω διαφοροποίηση. (O'Donnell et al. 2001) Στη συνέχεια, πραγματοποιείται μιτωτική διαίρεση των Α σπερματογόνιων και παράγονται νέα σπερματογόνια τύπου Α και τύπου Β. Τα δεύτερα με μιτωτική διαίρεση δίνουν τα πρωτογενή σπερματοκύτταρα (πρώτης τάξης), τα οποία αυξάνονται σε μέγεθος και διπλασιάζουν το γενετικό τους υλικό πριν πραγματοποιηθεί η πρώτη μειωτική διαίρεση. (Clermont, 1972) Κατά το στάδιο μειωτικών διαιρέσεων, κάθε ένα από τα πρωτογενή σπερματοκύτταρα σχηματίζει με μείωση δύο δευτερογενή σπερματοκύτταρα (δεύτερης τάξης). Τα κύτταρα αυτά έχουν το μισό αριθμό χρωμοσωμάτων των πρωτογενών σπερματοκυττάρων, δηλαδή τον απλοειδή αριθμό χρωμοσωμάτων (23 χρωμοσώματα με δύο αδελφές χρωματίδες το κάθε ένα). Στη συνέχεια, κάθε σπερματοκύτταρο δεύτερης τάξης, υποβάλλεται στη δεύτερη μειωτική διαίρεση ώστε να παραχθούν τέσσερα απλοειδή κύτταρα, οι σπερματίδες (Slack, 2007). Στο σημείο αυτό οι σπερματίδες βρίσκονται κλεισμένες σε κοιλώματα που διαμορφώνονται από εγκοπώματα της μεμβράνης των κυττάρων Sertoli. Ταυτόχρονα με την εξέλιξη της διαδικασίας της σπερματογένεσης, παρατηρείται πολλαπλασιασμός και διαφοροποίηση των πρόδρομων γαμετικών κυττάρων, ενώ ταυτόχρονα μετακινούνται προς το επάνω μέρος των σωληναρίων, κοντά στον αυλό (Vander, 2011). Τέλος, σε μία τρίτη φάση, πραγματοποιείται η μετατροπή των σφαιρικών σπερματιδίων σε ώριμες, επιμηκυμένες σπερματίδες μέσα από μία διαδικασία που ονομάζεται σπερμιογένεση. Η σπερμιογένεση ορίζεται ως μία μορφολογική μετατροπή των σπερματιδίων μέχρι το σχηματισμό των σπερματοζωαρίων, μέσα από μια διαδικασία 19 σταδίων διαφοροποίησης. Στο στάδιο αυτό παρουσιάζεται ένα πρωτοφανές παράδειγμα κυτταρικής διαφοροποίησης, στην οποία συμπεριλαμβάνονται η συμπύκνωση χρωματίνης, ο μετασχηματισμός και η επιμήκυνση του πυρήνα, η σταδιακή απώλεια του κυτταροπλάσματος, η βιογένεση του μαστιγίου και ο σχηματισμός του ακροσώματος. (Leblond and Clermont, 1952, Russell et al. 1990, Chocu et al. 2012) Όταν οι σπερματίδες φτάσουν σε ένα ωριμάσουν απελευθερώνονται από τα κύτταρα Sertoli στον αυλό του σπερματοφόρου σωληναρίου μέσω της διαδικασίας της σπερμίας (Russell, 1993 (a), O'Donnell et al., 2011). Σε ένα τελευταίο στάδιο τα σπερματοζώαρια μέσω του ορχικού δικτύου μεταφέρονται στην επιδιδυμίδα όπου και ολοκληρώνεται η ωρίμανση τους, αποκτούν την τελική τους μορφή, γίνονται ικανά για γονιμοποίηση και αποθηκεύονται (Bedford, 1979, Smokovitis, 2007, Chocu et al., 2012). Κατά τη σπερματογένεση, τα ώριμα κύτταρα Sertoli διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ομαλή διεκπεραίωση της σπερματογένεσης. Τα κύτταρα Sertoli υφίστανται μία μετατροπή ωρίμανσης, η οποία περιλαμβάνει το σχηματισμό ενός κυτταρικού φραγμού μεταξύ αίματος και όρχι, ώστε να παρεμποδιστεί η μεταφορά χημικών ουσιών από το αίμα στον αυλό και να εξασφαλιστούν οι κατάλληλες συνθήκες ανάπτυξης των γαμετικών κυττάρων. Συγχρόνως, είναι υπεύθυνα για την διοχέτευση θρεπτικών ουσιών, αυξητικών παραγόντων και διαλυτών πρωτεϊνών, που είναι αναγκαία για την ομαλή αύξηση και διαφοροποίηση των σπερματογόνιων. Επίσης, τα κύτταρα

Sertoli πραγματοποιούν και την φαγοκυττάρωση απομακρύνοντας τα ελαττωματικά σπερματοζώαρια. Τα γαμετικά κύτταρα και τα κύτταρα Sertoli επικοινωνούν με τη βοήθεια της παρακρινούς οδού κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης, πράγμα που δείχνει το πόσο ικανά είναι τα κύτταρα Sertoli στο να προσαρμόζονται στις υψηλές εναλλασσόμενες ανάγκες των γαμετικών κυττάρων (Russell, 1993 (b), Parvinen, 1982, O'Donnell et al., 2011, Hai et al., 2014).



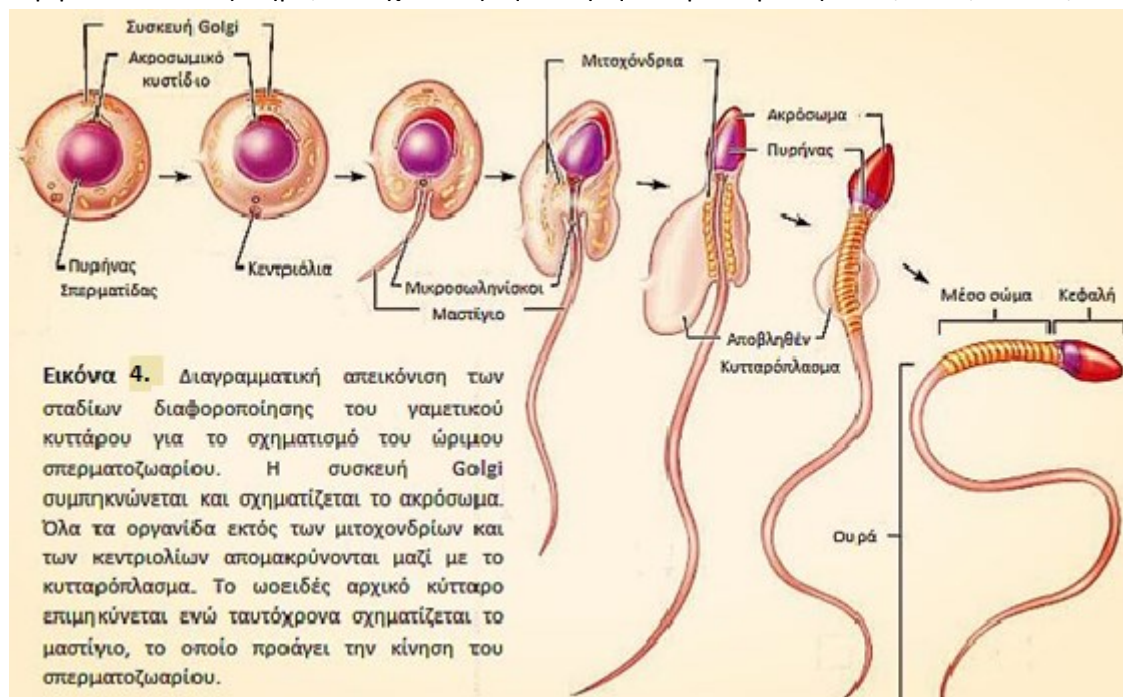
Πηγή: Εγκυκλοπαίδεια Britannica, 2010

Εικόνα 3. Απεικόνιση της διαδικασίας της σπερματογένεσης. Εμφανίζονται τα στάδια της σπερματογένεσης όπως λαμβάνουν χώρα στον όρχι και τα στάδια διαφοροποίησης των γαμετικών κυττάρων ώστε να μετατραπούν σε ώριμα σπερματοζώαρια.

1.9 ΔΟΜΗ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΟΥ

Το ώριμο σπερματοζώαριο, που σχηματίζεται στο τέλος της σπερματογένεσης, αποτελεί ένα απλό, αλλά πλήρως διαφοροποιημένο κύτταρο με συγκεκριμένο ρόλο. (Ramalho-Santos et al. 2007) Το μέγεθος των ανθρώπινων σπερματοζωαρίων είναι 60μm και αποτελούνται κυρίως από τρεις περιοχές με διαφορετική μορφολογία και λειτουργία: την ουρά, το μέσο σώμα και την κεφαλή (Ramalho-Santos et al. 2007, Eddy and O'Brien, 1994, Yanagimachi, 1994). Μορφολογικά, η κεφαλή του φυσιολογικού σπερματοζωαρίου έχει σχήμα ωοειδές, μήκος 3,0-5,0 μm, πλάτος 2,0-3,0 μm και πάχος 1,5 μm. Αποτελείται από τον πυρήνα και το ακρόσωμα, τα οποία καλύπτει η πλασματική μεμβράνη (Ramalho-Santos et al. 2007, Buffone et al. 2012). Η κεφαλή του σπερματοζωαρίου περιέχει τον πυρήνα, στον οποίο εντοπίζονται σε μεγαλύτερο βαθμό (γιατί υπάρχουν και οι ιστόνες) οι προταμίνες: πρωτεΐνες που συνδέονται στο DNA και αντικαθιστούν τις ιστόνες. Η παρουσία των προταμινών επιτρέπει το πακετάρισμα του DNA και τη συσπείρωσή του στο μέγιστο βαθμό, ώστε να επιτευχθεί ο εγκλεισμός του στην κεφαλή του σπερματοζωαρίου. Συμπερασματικά, οι προταμίνες σε συνδυασμό με την απώλεια υποκυττάρων οργανιδίων και κυτταροπλάσματος επιτρέπουν σε ένα μεγάλο βαθμό τη μείωση του όγκου του σπερματοκυττάρου και επιτρέπουν το αεροδυναμικό σχήμα (Jodar & Oliva, 2014). Στο μπροστινό μέρος του πυρήνα εντοπίζεται το ακρόσωμα, ένα εκκριτικό κυστίδιο το οποίο προκύπτει από τη συσκευή Golgi κατά την

σπερμιογένεση. (Abou-Haila, 2000). Στο ακρόσωμα περιέχονται υδρολυτικά ένζυμα και πρωτεΐνες, που συμβάλλουν στο σχηματισμό των συγκεκριμένων δομών, οι οποίες με τη σειρά τους θα βοηθήσουν κατά τη διείσδυση στο ωάριο (Slack, 2007, Abou-Haila, 2000). Η κεφαλή συνδέεται με το υπόλοιπο σώμα του σπερματοζωαρίου μέσω του αυχένα. Ο αυχένας περιλαμβάνει το κεντριόλιο, από το οποίο θα προκύψει το αξόνημα της ουράς (Chemes et al. 1999). Ακολουθεί το μέσο σώμα, το οποίο έχει μήκος 5,0-7,0 μm και πλάτος 1μm (Menkveld et al. 2011). Όπως προκύπτει και από το όνομά του, το μέσο σώμα βρίσκεται στο μέσο του σπερματοζωαρίου και διαθέτει μεγάλο αριθμό μιτοχονδρίων που είναι διατεταγμένα σε μορφή σπειράματος γύρω από το αξόνημα. Η υψηλή συσσώρευση των μιτοχονδρίων στο σημείο αυτό διασφαλίζει τη σύνθεση ATP ώστε να είναι δυνατή η κίνηση και η επιβίωση των σπερματοζωαρίων. (Oko and Clermont, 1990) Τέλος, η δομή του σπερματοζωαρίου ολοκληρώνεται με την παρουσία της ουράς, η οποία έχει μήκος περίπου 45μm (Menkveld et al. 2011). Η ουρά είναι ένα ενισχυμένο μαστίγιο με χαρακτηριστική οργάνωση από δέσμες μικροσωληνίσκων, εννέα ζεύγη ινιδίων διατάσσονται περιφερικά του αξονήματος και ένα ζεύγος βρίσκεται στο κέντρο. Επιπλέον πρωτεϊνικές δομές όπως οι βραχίονες δυνείνης περιβάλλουν το αξόνημα, ενισχύοντας την κίνηση του μαστιγίου (Inaba, 2003, Turner, 2003).



1.10 ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΟΥ-ΩΟΚΥΤΤΑΡΟΥ

Ενεργοποίηση

Στα περισσότερα θηλαστικά τα σπερματοζωάρια που απελευθερώνονται κατά τη σύζευξη δεν είναι ικανά για γονιμοποίηση. Προκειμένου να αποκτήσουν αυτή την ικανότητα, παραμένουν για ένα χρονικό διάστημα στην αναπαραγωγική οδό του θηλυκού όπου υφίστανται ενεργοποίηση (Chang, 1951, Austin, 1951). Αυτή η διαδικασία ενεργοποίησης αφορά μια σειρά βιοχημικών, μοριακών και δομικών αλλαγών. (Gadella et al. 2006). Αναφορικά, ένα από τα γεγονότα που συμβαίνουν, είναι η απώλεια της χοληστερόλης από την

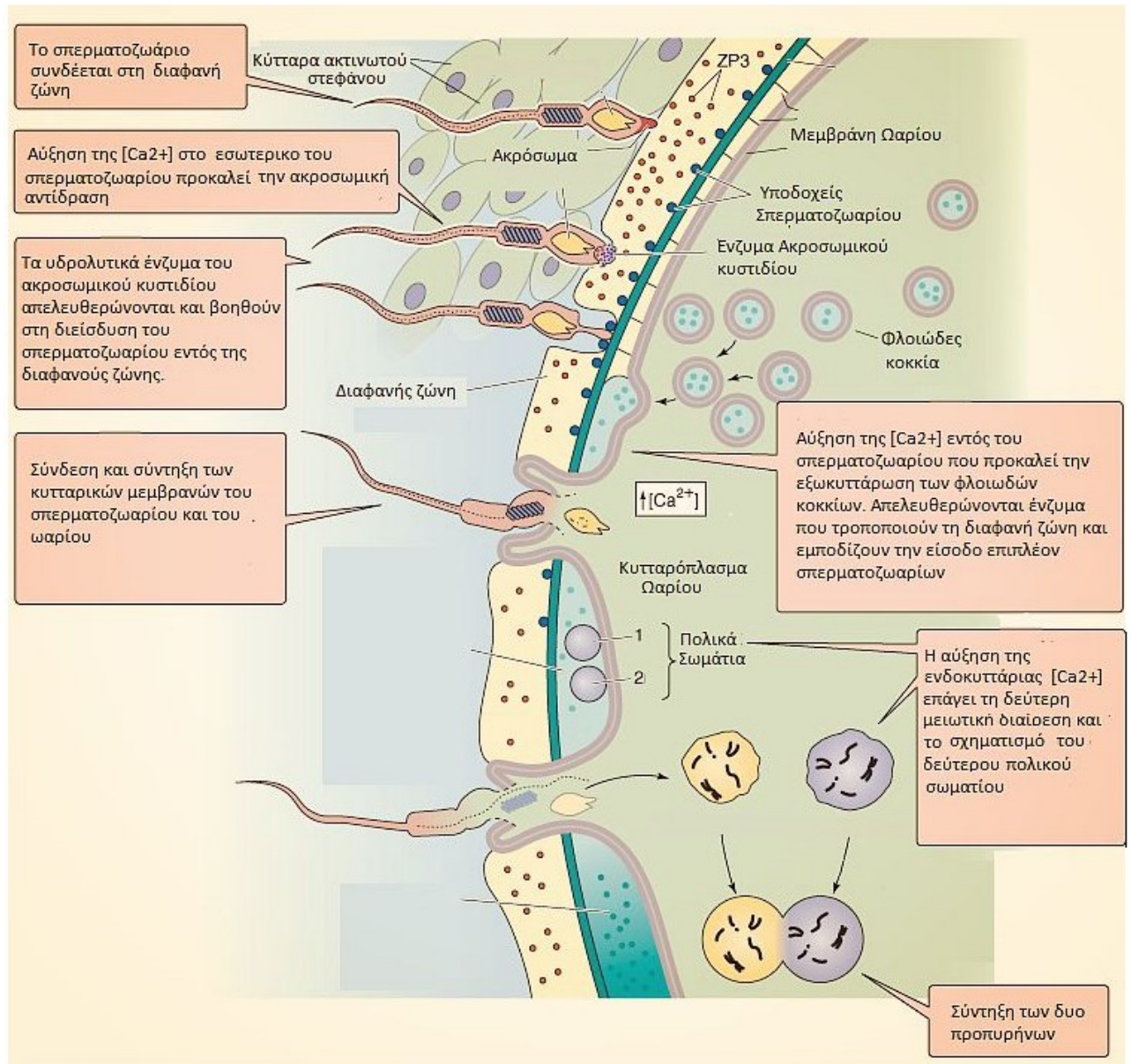
πλασματική μεμβράνη του σπερματοζωαρίου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της διαπερατότητας και ρευστότητας της μεμβράνης, με συνέπεια την αύξηση της μεταφοράς ιόντων Ca^{2+} και HCO_3^- προς στο εσωτερικό του κυττάρου (Ickowicz et al. 2012). Με την αύξηση της εισροής ιόντων πυροδοτείται το μονοπάτι μεταγωγής σήματος της αδενυλικής κυκλάσης (Garbers et al. 1982). Η ενεργοποιημένη αδενυλική κυκλάση προκαλεί αύξηση των επιπέδων cAMP και κατ' επέκταση σε ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης pKA, η οποία φωσφορυλιώνει πρωτεϊνικά υποστρώματα (Visconti et al. 1998). Κατά κύριο λόγο, οι πρωτεΐνες που υφίστανται φωσφορυλίωση στη φάση της ενεργοποίησης εντοπίζονται στην ουρά του σπερματοζωαρίου και σε σαφώς μικρότερο ποσοστό στην κεφαλή (Petrunkina et al. 2001). Η φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών της ουράς, συνδυάζεται με την υπερκινητικότητα των σπερματοζωαρίων (hyperactivation), που τους προσδίδει την ικανότητα να διασχίσουν την τραχηλική βλέννα ώστε να προσδεθούν στη διαφανή ζώνη του ωαρίου (Rajesh et al. 2004). Επίσης, κατά τη διάρκεια της ενεργοποίησης διευκολύνεται το άνοιγμα των διαύλων Ca εξαιτίας της μεταβολής του δυναμικού της μεμβράνης (υπερπόλωση) που παρατηρείται. Η παροδική αύξηση του ενδοκυτταρικού ασβεστίου προετοιμάζει το σπερματοζωάριο για την ακροσωμική αντίδραση (Zeng et al. 1995).

1.11 ΑΚΡΟΣΩΜΙΚΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ

Στα θηλαστικά, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου, το ωοκύτταρο που απελευθερώνεται από την ωοθήκη περιβάλλεται από τα ωοθηλακικά κύτταρα (κύτταρα ακτινωτού στεφάνου) και από μια διαφανή στιβάδα εξωκυττάρου υλικού η οποία ονομάζεται διαφανής ζώνη (Keisuke et al. 2004). Η διαφανής ζώνη περιβάλλεται από τα κύτταρα του ακτινωτού στεφάνου, τα οποία είναι βυθισμένα σε εξωκυττάριο στρώμα πλούσιο σε υαλουρονικό οξύ (Slack, 2007). Για να υπάρξει επιτυχής γονιμοποίηση του ωαρίου, το ενεργοποιημένο σπερματοζωάριο θα πρέπει πρώτα να διεισδύσει στο εξωκυττάριο στρώμα και έπειτα να προσδεθεί στη διαφανή ζώνη. Για το λόγο αυτό τα σπερματοζωάρια φέρουν στη μεμβράνη τους ένα ένζυμο με ενεργότητα υαλουρονιδάσης η οποία βοηθά το πέρασμά τους από την στιβάδα των κυττάρων του ακτινωτού στεφάνου (Ying Lin et al. 1994). Ακολούθως, πραγματοποιείται η σύνδεση του σπερματοζωαρίου στη διαφανή ζώνη, στάδιο κατά το οποίο εξασφαλίζεται η ειδο-ειδικότητα της γονιμοποίησης (Ganguly et al. 2010). Η διαφανής ζώνη αποτελείται από τέσσερεις γλυκοπρωτεΐνες που ονομάζονται ZP1, ZP2, ZP3, ZP4 και φέρουν στο καρβοξυτελικό τους άκρο, ένα κοινό μοτίβο πεπτιδικής αλληλουχίας "ZP" (Hughes and Barratt, 1999, Lefievre et al. 2004). Το ενεργοποιημένο σπερματοζωάριο συνδέεται στις γλυκοπρωτεΐνες ZP1, ZP3 και ZP4 και επάγεται η ακροσωμική αντίδραση, ενώ η ZP2 φαίνεται να έχει δευτερεύοντα ρόλο (Gurta et al. 2012). Κατά την ακροσωμική αντίδραση παρατηρείται ταχεία εξωκυττάρωση του ακροσωμικού κυστιδίου, κάτι το οποίο συνδυάζεται με την απελευθέρωση υδρολυτικών ενζύμων όπως οι σερίνο-πρωτεάσες και η ακροσίνη που βοηθούν στην διείσδυση του σπερματοζωαρίου στη διαφανή ζώνη (Abou-Haila & Tulsiani, 2000).

1.12 ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗ & ΣΥΝΤΗΞΗ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΟΥ-ΩΟΚΥΤΤΑΡΟΥ

Το πρώτο στάδιο της σύντηξης των κυτταρικών μεμβρανών είναι η πρόσδεση του σπερματοζωαρίου στο ωάριο και πραγματοποιείται στην περιοχή του ωαρίου που εφάπτεται στην πλευρική επιφάνεια της κεφαλής του σπερματοζωαρίου (Slack, 2007). Τα δύο κύτταρα αλληλεπιδρούν μεταξύ τους μέσω της σύνδεσης των ιντεγκρινών του ωαρίου και των πρωτεϊνών της οικογένειας ADAM (φερτιλίνη α,β, κυριτεστίνη) του σπερματοζωαρίου (Keisuke et al. 2004). Το ζεύγος ADAM/ιντεργκρίνη αββ1 θεωρείται ότι παίζει σημαντικό ρόλο σε αυτή τη σύνδεση μεταξύ σπερματοζωαρίου και ωαρίου (Barraud-Lange and Boucheix, 2013). Ωστόσο, για την σύντηξη των δύο κυτταρικών μεμβρανών είναι απαραίτητη μια πρωτεΐνη του ωαρίου η οποία καλείται τετρασπανίνη, CD9 καθώς και η πρωτεΐνη Izumo που εντοπίζεται στην κεφαλή του σπερματοζωαρίου μετά την ακροσωμική αντίδραση (Inoue et al. 2005). Τη σύντηξη των δυο γαμετών ακολουθεί η αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης ασβεστίου (Lawrence et al. 1997). Ακολούθως, η αύξηση αυτή ενεργοποιεί την εξωκυττάρωση των φλοιωδών κοκκίων, την ολοκλήρωση της δεύτερης μειωτικής διαίρεσης και το σχηματισμό του δεύτερου πολικού σωματίου (Alberio et al. 2001). Τα φλοιώδη κοκκία περιέχουν ένζυμα όπως πρωτεάσες και γλυκοσιδάσες, οι οποίες τροποποιούν τους υποδοχείς της διαφανούς ζώνης, παρεμποδίζοντας την είσοδο επιπλέον σπερματοζωαρίων (Stein et al. 2004). Ο πυρήνας του σπερματοζωαρίου υφίσταται αποσυμπύκνωση μέσω της μείωσης των δισουλφιδικών δεσμών των πρωταμινών, ενώ τα μιτοχόνδρια εκφυλίζονται και δε συμμετέχουν στη μετέπειτα ανάπτυξη (Slack, 2007). Το κεντριόλιο που αρχικά αποτελεί το κέντρο οργάνωσης μικροσωληνίσκων του σπερματικού αστέρα διαιρείται προκειμένου να σχηματιστεί στο ζυγωτό η πρώτη αυλακωτική άτρακτος (Slack, 2007). Τέλος, οι δυο προπυρήνες μεταναστεύουν αργά ο ένας προς τον άλλο, ενώ παράλληλα λαμβάνει χώρα η αντιγραφή του DNA. Οι προπυρηνικοί φάκελοι αποσυγκροτούνται κατά τη συνάντησή τους και τα χρωμοσώματα ευθυγραμμίζονται με τη μιτωτική άτρακτο, έτοιμα για την πρώτη αυλάκωση (Slack, 2007).



Εικόνα 5. Διαγραμματική απεικόνιση των σταδίων αλληλεπίδρασης ωοκυττάρου -σπερματοζωαρίου.

1.13 ΑΝΔΡΙΚΗ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑ

Αναμφίβολα, ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα που ενδέχεται να αντιμετωπίζουν τα σύγχρονα ζευγάρια, τα οποία ετοιμάζονται να ξεκινήσουν τη δική τους οικογένεια, είναι αυτό της υπογονιμότητας. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας ο κλινικός ορισμός της υπογονιμότητας ορίζεται ως «μία ασθένεια του αναπαραγωγικού συστήματος που χαρακτηρίζεται από αδυναμία επίτευξης εγκυμοσύνης για χρονικό διάστημα μεγαλύτερο των 12 μηνών, κατά τους οποίους πραγματοποιούνται τακτικές σεξουαλικές επαφές χωρίς να γίνεται χρήση αντισυλληπτικών μεθόδων» (WHO, 2007).

Για να πραγματοποιηθεί σωστή διάγνωση και, εν συνεχεία, η σωστή θεραπεία της υπογονιμότητας, θα πρέπει να ληφθεί υπ' όψη ότι 15-20% των ζευγαριών αντιμετωπίζουν

πρόβλημα τεκνοποίησης, ενώ σε ένα 40% των περιπτώσεων το πρόβλημα εντοπίζεται στον άνδρα, σε 40% στη γυναίκα, ενώ σε ένα ποσοστό περίπου 20% είναι μικτής αιτιολογίας. Φυσικά, υπάρχει και ένα ποσοστό όπου δεν είναι εύκολο να προσδιορίσουμε τα αίτια της υπογονιμότητας. (Turek et al., 2008) Συνεπώς, είναι αντιληπτό ότι παρ' όλο που σε πολλά ζευγάρια η υπογονιμότητα οφείλεται σε προφανή και εύκολα αναγνωρίσιμα αίτια, υπάρχουν και περιπτώσεις που τα αίτια γίνονται δύσκολα γνωστά. (Grace et al., 2014) Στις περιπτώσεις αυτές είναι αναγκαίο να πραγματοποιηθούν οι σωστές ενέργειες διάγνωσης ώστε να εξακριβωθούν τα αίτια και να επιλεγθεί η κατάλληλη αντιμετώπιση του προβλήματος.

1.14 ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑΣ

1.14.1 ΑΝΑΛΥΣΗ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ

Το σπέρμα αποτελείται από σπερματοζωάρια και σπερματικό υγρό. Τα σπερματοζωάρια παράγονται στους όρχεις και αποτελούν το 3-5% του όγκου του σπέρματος, ενώ το σπερματικό υγρό, προέρχεται από την ανάμιξη των εκκρίσεων των επικουρικών γεννητικών αδένων και αποτελεί το 95-97% (Polakoski et al. 1976). Ο έλεγχος του σπέρματος είναι ο ακρογωνιαίος λίθος της εργαστηριακής αξιολόγησης της ανδρικής υπογονιμότητας (Poongothai et al 2009). Για το λόγο αυτό η ανάλυση του σπέρματος βασίζεται σε λεπτομερή εργαστηριακά πρωτόκολλα που έχει δημοσιεύσει ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO).

Στον έλεγχο του σπέρματος πρέπει να περιλαμβάνεται η εκτίμηση των κύριων παραμέτρων του σπέρματος και ανάλογα με την περίπτωση, η ανοσολογική, η βιοχημική και η μικροβιολογική εξέταση. Οι κύριες παράμετροι που αξιολογούνται είναι ο αριθμός, η κινητικότητα, και η μορφολογία των σπερματοζωαρίων (WHO, 1999). Ακόμη, γίνεται αξιολόγηση ενός ακόμα παράγοντα: του pH, το οποίο σε φυσιολογικές συνθήκες θα πρέπει να είναι ελαφρώς αλκαλικό. Στην περίπτωση που η τιμή του pH είναι μικρότερη από 7 και ο αριθμός των σπερματοζωαρίων είναι περιορισμένος τότε αυτό υποδηλώνει την απόφραξη της εκσπερματικής οδού (de la Taille et al. 1998). Τα επίπεδα του κιτρικού οξέος και της φρουκτόζης μπορούν να προσδιορίσουν την εκκριτική ικανότητα των επικουρικών αδένων, καθώς τυχόν χαμηλές συγκεντρώσεις μπορεί να είναι ενδεικτικές της ύπαρξης φλεγμονής (Cooper et al. 1990). Τέλος, η υψηλή συγκέντρωση λευκοκυττάρων στο δείγμα μειώνει τη γονιμοποιητική ικανότητα του σπέρματος και αποτελεί ένδειξη βλάβης του αναπαραγωγικού συστήματος (WHO, 2010) (Πίνακας 3.)

Σε περίπτωση που οι παράμετροι που μελετώνται, εμφανίζουν διαφορές από τα φυσιολογικά όρια τότε το δείγμα χαρακτηρίζεται ως παθολογικό. Συνεπώς, τα δείγματα που παρουσιάζουν χαμηλή συγκέντρωση σπερματοζωαρίων χαρακτηρίζονται ως ολιγοζωοσπερμικά, ενώ τα δείγματα στα οποία δεν εντοπίζονται καθόλου σπερματοζωάρια χαρακτηρίζονται ως αζωοσπερμικά. Δείγματα στα οποία περισσότερα από το 40% των σπερματοζωαρίων έχουν παθολογική μορφολογία χαρακτηρίζονται ως τερατοζωοσπερμικά (Εικόνα 9.), ενώ δείγματα στα οποία η πλειοψηφία των σπερματοζωαρίων εμφανίζουν μειωμένη κινητικότητα χαρακτηρίζονται ως ασθενοζωοσπερμικά (WHO, 2010) (Πίνακας 4.).

1.14.2 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ

Επειδή η διάγνωση της υπογονιμότητας με συμβατική ανάλυση των παραμέτρων του σπέρματος δεν επαρκεί, είναι αναγκαία η εκτέλεση περισσότερων λειτουργικών δοκιμών. Οι δοκιμές αυτές έχουν σαν στόχο την ανίχνευση διαταραχών στην επιβίωση των σπερματοζωαρίων, τη μετακίνηση τους εντός του θήλεος γεννητικού συστήματος και στα επιμέρους βήματα της γονιμοποίησης. (Aitken, 2006) Η ικανότητα γονιμοποίησης των σπερματοζωαρίων μπορεί να αξιολογηθεί με: τη δοκιμασία διείσδυσης των σπερματοζωαρίων στην τραχηλική βλέννα (Aitken, 1985), τη δοκιμασία "ενεργοποίησης" των σπερματοζωαρίων (Sukcharoen et al 1995), τη δοκιμασία σύνδεσης σπερματοζωαρίου-διαφανούς ζώνης (Oehninger et al., 1992), τη δοκιμασία ακρωσωμικής αντίδρασης (Aitken, 1993) και τη δοκιμασία εισόδου των σπερματοζωαρίων σε ωάρια χάμστερ (Aitken, 2006).

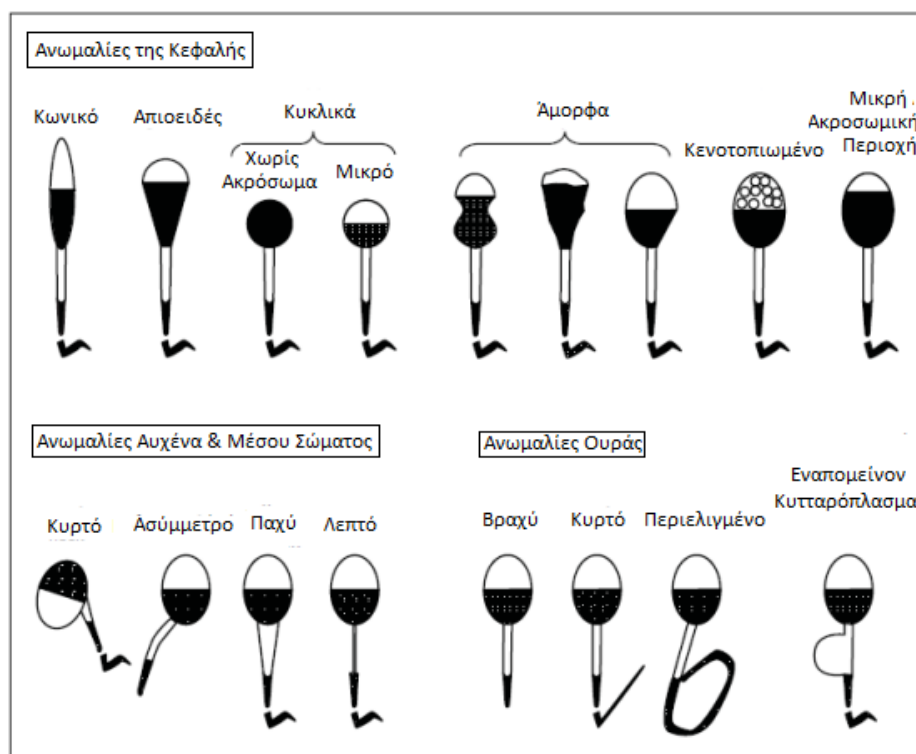
Πίνακας 1. Παράμετροι που μελετώνται κατά την ανάλυσή του σπέρματος και οι κατώτερες τιμές που μπορούν να λάβουν (WHO, 2010).

Παράμετρος	Κατώτερες τιμές αναφοράς
Όγκος (ml)	1,5 (1,4-1,7)
Ολικός αριθμός σπερματοζωαρίων (10 ⁶ ανά εκσπερμάτιση)	39 (33-46)
Συγκέντρωση σπέρματος (10 ⁶ ανά ml)	15 (12-16)
Συνολική κινητικότητα (προοδευτική & μη προοδευτική, %)	40 (38-42)
Προοδευτική κινητικότητα	32 (31-34)
Βιωσιμότητα (ζωντανά σπερματοζωάρια %)	58 (55-63)
Μορφολογία (φυσιολογικές μορφές %)	4 (3,0-4,0)
pH	>7,2
Περοξιδάση-θετικά λευκοκύτταρα (10 ⁶ per ml)	<1,0
Ψευδάργυρος σπέρματος (μmol/εκσπερμάτιση)	>2,4
Φρουκτόζη σπέρματος (μmol/εκσπερμάτιση)	>13
Ουδέτερη γλυκοσιδάση (mU/εκσπερμάτιση)	>20

MAR test (κινητά σπερματοζωάρια με δεσμευμένα σωματίδια, %)	<50
Immunobead test (κινητά σπερματοζωάρια με δεσμευμένα σφαιρίδια %)	<50

Πίνακας 2. Κατηγορίες διαταραχών του σπέρματος σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO, 2010).

Ιατρική ονομασία	Χαρακτηριστικά
Αζωοσπερμία	Απουσία σπερματοζωαρίων στο σπέρμα
Ασπερμία	Πλήρης έλλειψη σπέρματος κατά την εκσπερμάτωση
Ολιγοζωοσπερμία	< 10 εκατομμύρια σπερματοζωάρια/ml σπέρματος
Ασθενοζωοσπερμία	> 40% των σπερματοζωαρίων με μειωμένη κινητικότητα
Τερατοζωοσπερμία	> 40% των σπερματοζωαρίων με ανώμαλη μορφολογία
Νεκροσπερμία	Μη βιώσιμα/ νεκρά σπερματοζωάρια
Ολιγοασθενοζωοσπερμία	Μειωμένη κινητικότητα & συγκέντρωση σπερματοζωαρίων, λιγότερο από 8 εκατομμύρια/ml σπέρματος
Ολιγοασθενοζωοτερατοσπερμία	Μειωμένη κινητικότητα, συγκέντρωση και ανώμαλη μορφολογία σπερματοζωαρίων
Αιματοσπερμία	Παρουσία ερυθροκυττάρων στο σπέρμα
Πυοσπερμία	Παρουσία λευκοκυττάρων στο σπέρμα
Πολυζωοσπερμία	Υπερβολικά υψηλή συγκέντρωση σπερματοζωαρίων στο σπέρμα



Εικόνα 6. Διαγραμματική απεικόνιση ανώμαλων διαμορφώσεων των σπερματοζωαρίων (Kruger et al. 1993)

1.15 ΑΙΤΙΑ ΑΝΔΡΙΚΗΣ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑΣ

Η ανδρική υπογονιμότητα είναι μια πολύπλοκη διαταραχή η οποία οφείλεται τόσο σε γενετικούς όσο και σε μη γενετικούς παράγοντες. Οι κυριότεροι από αυτούς συνοψίζονται παρακάτω (WHO 2000):

- Γενετικές ανωμαλίες
- Συγγενείς ή επίκτητες ανωμαλίες του ουρογεννητικού συστήματος
- Μολύνσεις ουρογεννητικού συστήματος
- Αυξημένη θερμοκρασία του όσχεου
- Ενδοκρινολογικές διαταραχές
- Ανοσοβιολογικοί παράγοντες

1.15.1 ΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Υπολογίζεται ότι οι γενετικές ανωμαλίες αποτελούν τον σημαντικότερο αιτιολογικό παράγοντα της ανδρικής υπογονιμότητας, συμβάλλοντας σε ένα ποσοστό 15-30% (Ferlin et al. 2007). Το γενετικό υπόβαθρο της υπογονιμότητας αφορά κυρίως χρωμοσωμικές ανωμαλίες, μικροελλείμματα στο Υ χρωμόσωμα και γονιδιακές μεταλλάξεις, που μπορούν να επηρεάσουν ένα εύρος φυσιολογικών διαδικασιών όπως η ορμονική ομοιόσταση, η σπερματογένεση και η ποιότητα του σπέρματος (Poongothai et al. 2009, Ferlin et al. 2007).

1.15.2 ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΕΣ ΑΝΩΜΑΛΙΕΣ

Όσον αφορά τις χρωμοσωμικές ανωμαλίες, μπορεί να πρόκειται για κάποια ανευπλοειδία όπως το σύνδρομο Klinefelter (47, ΧΧΥ) ή για κάποια δομική ανωμαλία όπως είναι η μετάθεση κατά Robertson. Το σύνδρομο Klinefelter προκαλεί υπογοναδισμό και υπογονιμότητα με αποτέλεσμα το 75-90% των ανδρών που πάσχουν να εμφανίζουν αζωοσπερμία (Selice et al. 2010, Wisser et al. 2012). Ακόμα, άτομα που φέρουν ένα επιπλέον Υ χρωμόσωμα (47, ΧΥΥ) μπορεί να εμφανίσουν ανωμαλίες στη σπερματογένεση (Shefi and Turek, 2006). Από την άλλη πλευρά, η μετάθεση κατά Robertson μπορεί να οδηγήσει σε μια ποικιλία φαινοτύπων, από φυσιολογική σπερματογένεση μέχρι αδυναμία παραγωγής σπερματογόνιων. Χαρακτηριστικά, μόνο το 0,8% των υπογόνιμων ανδρών φέρουν αυτή τη χρωμοσωμική ανωμαλία (O'Flynn O'Brien et al. 2010).

1.15.3 ΜΙΚΡΟΕΛΛΕΙΜΜΑΤΑ ΣΤΟ Υ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΧΕΣ AZF

Η πρώτη ένδειξη πως υπάρχει μια συσχέτιση μεταξύ των μικροελλειμμάτων στο μακρύ βραχίονα του Υ χρωμοσώματος και της υπογονιμότητας στον άνδρα ήρθε το 1976 από τους Zuffardi και Tierolo. Για την ακρίβεια, υποστήριξαν ότι στο βραχίονα q του Υ χρωμοσώματος εντοπίζεται ένα γονίδιο που κωδικοποιεί για ένα παράγοντα, ο οποίος συνδέεται με τη διαδικασία της σπερματογένεσης. Ο παράγοντας αυτός ονομάστηκε AZF (azospermia factor) καθώς βρέθηκε ότι λείπει σε άνδρες που έπασχαν από αζωοσπερμία (Tierolo and Zuffardi, 1976).

Λόγω της πολύπλοκης διαμόρφωσης του χρωμοσώματος Υ, χρειάστηκαν περίπου 30 χρόνια ερευνών για να υπάρξει μια καλύτερη εικόνα σχετικά με τις AZF περιοχές. Οι έρευνες αυτές ανέδειξαν ότι δεν πρόκειται για ένα γονίδιο αλλά για μια ευρύτερη AZF περιοχή, η οποία διακρίνεται σε τρεις μη επικαλυπτόμενες υποπεριοχές τις AZFa, AZFb, AZFc. Εντός αυτών των χρωμοσωμικών τμημάτων εδράζονται 12 γονίδια/οικογένειες γονιδίων που είναι απαραίτητα για τη φυσιολογική διεξαγωγή της σπερματογένεσης (Vogt et al. 1996).

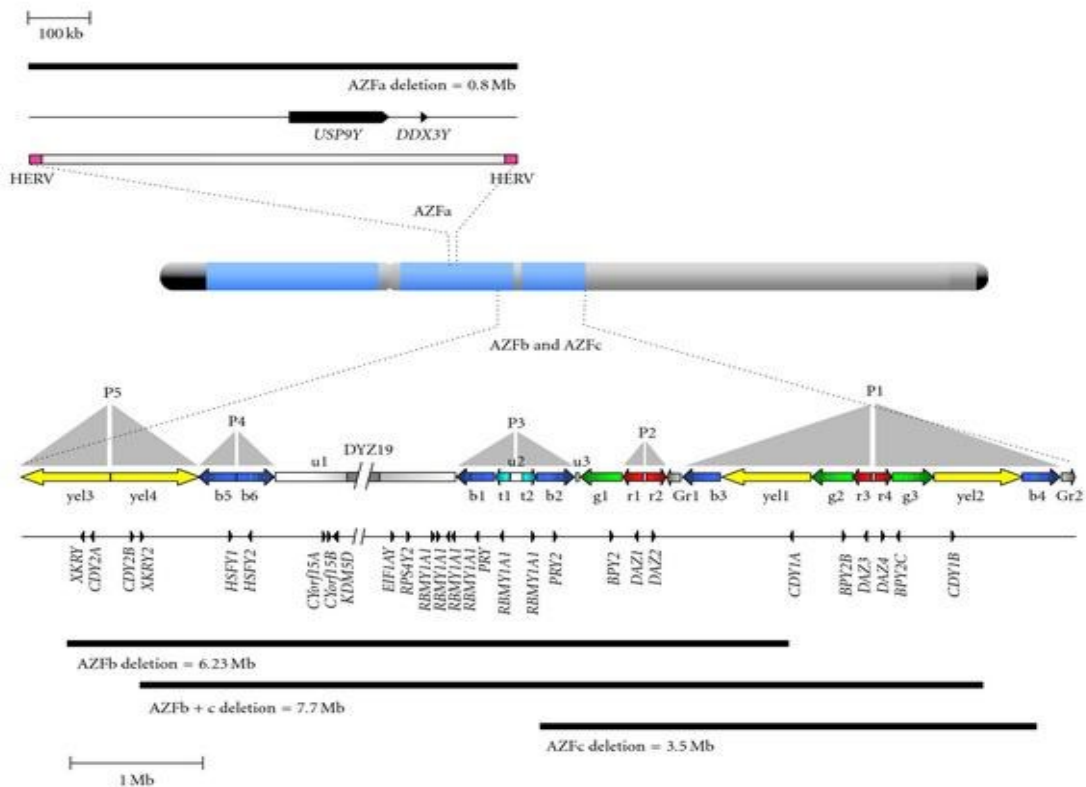
Όσο αφορά την κάθε περιοχή ξεχωριστά, η AZFa έχει μέγεθος 792kb. Κωδικοποιεί για 2 γονίδια, το USP9Y, μια πρωτεάση εξειδικευμένη για ουβικιτίνη (αφαιρεί ουβικιτίνες από ουβικιτινυλιωμένες πρωτεΐνες), μέλος της οικογένειας πρωτεασών C19. Η έκφραση της συγκεκριμένης πρωτεΐνης παρατηρείται στο στάδιο της σπερματίδας, ωστόσο ελλείμματα σε αυτήν είναι συμβατά με την παραγωγή σπερματοζωαρίων. Η δεύτερη πρωτεΐνη που κωδικοποιείται είναι η DDX3, της οποίας ο μοριακός ρόλος παραμένει άγνωστος, ωστόσο έχει τα στοιχεία μιας ATP-εξαρτώμενης RNA ελικάσης που ανήκει στην οικογένεια πρωτεϊνών με DEAD box (Navarro-Costa et al., 2010).

Η AZFb περιοχή εκτείνεται σε 6,23Mb και κωδικοποιεί 12 γονίδια, 5 μονά και 7 σε πολλαπλά αντίγραφα. Μεταξύ αυτών τα EIF1AY, KDM5D, RPS4Y2, HSFY και RBMY1A1 εκφράζουν έναν παράγοντα έναρξης της μετάφρασης, μια απομεθυλάση της τέταρτης λυσίνης της ιστόνης 3 (H3K4), μια πρωτεϊνική υπομονάδα του ριβοσώματος απαραίτητη για την πρόσδεση του mRNA, έναν μεταγραφικό ενεργοποιητή της οικογένειας πρωτεϊνών θερμικού

σοκ και μια πρωτεΐνη που συνδέεται στο mRNA και ενέχεται στη μεταφορά και αποθήκευση του, αντίστοιχα (Navarro-Costa et al., 2010).

Η AZFc περιοχή έχει μέγεθος περίπου 3,5Mb και περιέχει 3 οικογένειες γονιδίων, τα BPY2, CDY και DAZ. Το γονίδιο BPY2 κωδικοποιεί για μια έντονα φορτισμένη πρωτεΐνη που σχετίζεται με τη ρύθμιση του κυτταροσκελετού κατά την σπερματογένεση. Η CDY υποπεριοχή κωδικοποιεί για δυο πρωτεΐνες, τις CDY1 & 2, οι οποίες ενέχονται στην μετα-μειωτική αναμόρφωση του πυρήνα καθώς και δρουν ως μεταγραφικοί παράγοντες. Η DAZ υποπεριοχή κωδικοποιεί για τρεις πρωτεΐνες με ικανότητα σύνδεσης σε mRNA και παίζουν ρόλο στη διαμόρφωση της ανδρικής γαμετικής σειράς (Navarro-Costa et al., 2010).

Μικροελλείμματα στις περιοχές AZF του Y χρωμοσώματος έχουν εντοπισθεί στο 5-15% των ανδρών που παρουσιάζουν μειωμένη γονιμότητα. Ο φαινότυπος των υπογονίμων ανδρών ποικίλει ανάλογα με την περιοχή AZF που απουσιάζει και μπορεί να κυμαίνεται από ήπια ολιγοσπερμία μέχρι πλήρη απουσία γαμετικών κυττάρων (Huynh et al., 2002, Kent-First et al., 1999, Kuroda-Kawaguchi et al. 2001, Pryor et al. 1997, Reijo et al. 1996). Αναλυτικότερα, ελλείψεις σε κάθε περιοχή έχουν και διαφορετικό φαινότυπο και πιο συγκεκριμένα στην AZFa περιοχή οδηγούν στην πλήρη απουσία γαμετικών κυττάρων στα σπερματικά σωληνάρια, στην AFZb περιοχή σε αναστολή της ωρίμανσης στο στάδιο του σπερματοκυττάρου. Αντίθετα, ελλείμματα στην AZFc περιοχή ήταν συμβατά με την παραγωγή σπερματοζωαρίων αλλά επηρέαζαν το αριθμό (ολιγοζωοσπερμία) κι έτσι μπορούσαν να μεταβιβαστούν στους απογόνους. Ο σχετικά καλύτερος φαινότυπος (ολιγο- αντι για αζωοσπερμία) που παρατηρείται για ελλείμματα της τρίτης περιοχής πιθανώς οφείλεται στη «διάσωση» από σωματικά ομόλογα των εκάστοτε γονιδίων που χάνονται (Navarro-Costa et al., 2010).



Εικόνα 7. Σχηματική απεικόνιση της γονιδιακής αρχιτεκτονικής των περιοχών AZFa,b & c του χρωμοσώματος Y.

Πίνακας 3. Χαρακτηρισμός των μικροελλειμμάτων του Υ χρωμοσώματος

AZF περιοχή	Γονίδια	Μήκος Περιοχής	Συχνότητα Ελλείμματος	Φαινότυπος
AZFa	USP9Y, DBY, UTY, TB4Y	1–3 Mb	4,90%	Sertoli only cells syndrome, μερική ή πλήρης απουσία γαμετικών κυττάρων
AZFb	HSFY, eIF-1Y, CDY SMCY, BPY2, DAZ, RBMY, PRY	6.–7.7 Mb	16,00%	Αδυναμία ωρίμανσης των γαμετικών κυττάρων, αζωοσπερμία
AZFc	DAZ, CDY1, BPY2, PRY, TTY2	3.5 Mb	60,00%	Ήπια έως σοβαρή ολιγοσπερμία

1.15.4 ΓΟΝΙΔΙΑΚΕΣ ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ

Ελλείμματα, πολυμορφισμοί και μεταλλάξεις που έχουν ταυτοποιηθεί σε αυτοσωμικά και φυλετικά γονίδια, μελετώνται για την ενδεχόμενη συμβολή τους στην εκδήλωση της υπογονιμότητας στον άνδρα. Συγκεκριμένα, σημειακές μεταλλάξεις στο γονίδιο CFTR (Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator), το οποίο ανιχνεύεται στο χρωμόσωμα 7, έχουν εντοπισθεί στο 60-90% των ασθενών με συγγενή απουσία σπερματικών πόρων (Radpour et al. 2007). Συγχρόνως, πιθανή είναι η συμβολή του γονιδίου SHBG (sex hormone-binding globulin), το οποίο εδράζεται στο χρωμόσωμα 17 και κατά κύριο λόγο σχετίζεται με τη ρύθμιση των επιπέδων των ανδρογόνων στους όρχεις. Τα ανδρογόνα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη σπερματογένεση και τη φυλογένεση, ενώ μια ενδεχόμενη διατάραξη των επιπέδων τους μπορεί να επηρεάσει τη γονιμότητα (Lazaros et al. 2008). Ένα ακόμη υποψήφιο γονίδιο είναι το FSHR (FSH receptor). Το γονίδιο αυτό, κωδικοποιεί για τον υποδοχέα της ωθηλακιοτρόπου ορμόνης (FSH), η οποία έχει σημαντικό ρόλο στη φυσιολογική λειτουργία των γονάδων. Ελλείμματα στην αλληλουχία του γονιδίου αυτού έχουν σχετιστεί με ελαττωματική σπερματογένεση (Tapanainen et al. 1997). Τέλος, το γονίδιο USP26 εντοπίζεται στο μακρύ βραχίονα του X χρωμοσώματος και εκφράζεται στους όρχεις στα πρώιμα στάδια της σπερματογένεσης (Stouffs et al. 2005). Σύμφωνα με έρευνες, πολυμορφισμοί του γονιδίου σχετίζονται με μειωμένη γονιμότητα. Οι παραπάνω αναφορές αποτελούν μόνο ένα μικρό

μέρος από το σύνολο των γονιδίων τα οποία θεωρούνται υποψήφια για την ανδρική υπογονιμότητα.

1.15.5 ΣΥΓΓΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΕΠΙΚΤΗΤΕΣ ΑΝΩΜΑΛΙΕΣ

Οι συγγενείς και επίκτητες ανωμαλίες οι οποίες οδηγούν στην εκδήλωση της ανδρικής υπογονιμότητας συγκεντρώνονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 6) (WHO, 2000).

Πίνακας 4. Συγγενείς και επίκτητες ανωμαλίες που σχετίζονται με την ανδρική υπογονιμότητα.

Συγγενείς ανωμαλίες	Ανορχία
	Δυσγενεσία όρχεων
	Κρυσορχία
	Απουσία σπερματικού πόρου
	Απλασία των γαμετικών κυττάρων (Sertoli cell only syndrome)
	Αδυναμία ωρίμανσης σπερματογονίων
Επίκτητες ανωμαλίες	Τραύμα
	Συστροφία όρχεως
	Καρκίνος των όρχεων
	Συστημικές διαταραχές (κίρρωση του ήπατος)
	Κιρσοκήλη
	Εξωγενείς παράγοντες (φαρμακευτική αγωγή, κυτταροτοξικοί παράγοντες, ακτινοβολία)

1.15.6 ΜΟΛΥΝΣΕΙΣ ΟΥΡΟΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ

Οι λοιμώξεις της ανδρικής ουρογεννητικής οδού μπορούν να προκαλέσουν μείωση της γονιμότητας αν και είναι δυνητικά ιάσιμες (Weidner et al. 1999, Purvis et al. 1993). Κατά κύριο λόγο πρόκειται για λοιμώξεις των επικουρικών γεννητικών αδένων όπως είναι η προστατίτιδα, η ουρηθρίτιδα, η επιδιδυμίτιδα και η ορχίτιδα (WHO 2000). Υπάρχουν ενδείξεις ότι τα βακτήρια, *Ureoplasma urelyticum*, *Chlamydia trachomatis* και *Neisseria gonorrhoea* μπορούν να προκαλέσουν μολύνσεις αυτού του είδους (Schiefer, 1998).

1.15.7 ΕΝΔΟΚΡΙΝΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ

Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα ορμονικής διαταραχής που μπορεί να οδηγήσει σε υπογονιμότητα είναι ο υπογοναδοτροφικός υπογοναδισμός. Στην περίπτωση αυτή, ο υπογοναδισμός οφείλεται σε έλλειψη γοναδοτροπινών, χωρίς να εντοπίζεται φανερά ανατομική βλάβη στην περιοχή της υπόφυσης. Τα επίπεδα γοναδοτροπινών είναι συνήθως ελαττωμένα όπως και η έκκριση της απελευθερωτικής ορμόνης των γοναδοτρόπων ορμονών (GnRH). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αδυναμία ανάπτυξης γονάδων, την ελαττωμένη παραγωγή ανδρογόνων και την ελαττωματική σπερματογένεση (Seminar et al. 2000). Ακόμα, ο υπογοναδοτροφικός υπογοναδισμός μπορεί να είναι αποτέλεσμα συγγενών ανωμαλιών όπως το σύνδρομο Kallmann (Fechner et al. 2008), επίκτητων ανωμαλιών όπως οι επίκτητες υποθαλαμικές/υπόφυσης ασθένειες (υπερπρολακτιναιμία) και εξωγενών παραγόντων όπως η χρήση φαρμάκων (αναβολικά στεροειδή) (Wiser et al. 2012).

1.15.8 ΥΠΕΡΘΕΡΜΙΑ ΟΣΧΕΟΥ

Γενικά θεωρείται ότι, μια θερμοκρασία μεταξύ 33-36°C είναι ιδανική για την ωρίμανση των σπερματοζωαρίων και την παραγωγή φυσιολογικού σπέρματος (Hjollund et al. 2002). Αντίθετα, η υπερβολική αύξηση της θερμοκρασίας μπορεί να οδηγήσει σε οξειδωτικό στρες το οποίο προκαλεί βλάβες στο γενετικό υλικό των γαμετικών κυττάρων και έχει ως αποτέλεσμα τη μειωμένη παραγωγή σπέρματος (Ivell, 2007). Το εργασιακό περιβάλλον και ο τρόπος ζωής είναι δύο ακόμα παράγοντες που μπορούν να συμβάλλουν στην αύξηση της θερμοκρασίας του όσχεου (Jung et al. 2007). Επίσης η κρυσορχία και η κισσοκήλη αποτελούν χαρακτηριστικές περιπτώσεις υπογονιμότητας που συνδέονται με την περίπτωση της υπερθερμίας (Zorngiotti et al. 1973, Mieusset et al. 1995).

1.15.9 ΑΝΟΣΟΒΙΟΛΟΓΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Ο αιματο-ορχικός φραγμός εμποδίζει τις πρωτεΐνες του σπέρματος να αλληλεπιδράσουν με το ανοσοποιητικό σύστημα και έτσι αποτρέπεται η ανάπτυξη ανοσολογικής απόκρισης κατά αυτών. Ένας τραυματισμός, μια μόλυνση ή μια φλεγμονή μπορούν να προκαλέσουν ρήξη του προστατευτικού φραγμού, οδηγώντας στην δημιουργία αντισωμάτων έναντι των σπερματοζωαρίων (Wiser et al 2012). Τα αντισώματα αυτά παρουσιάζουν ετερογένεια και μπορεί να αναγνωρίζουν πρωτεΐνες της κεφαλής των σπερματοζωαρίων, επηρεάζοντας έτσι την ικανότητα σύνδεσής τους με το ωάριο ή πρωτεΐνες στην ουρά του σπερματοζωαρίου, με αποτέλεσμα να προκαλούν μειωμένη κινητικότητα (Walsh et al. 2009).

1.16 ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΗΣ ΑΝΔΡΙΚΗΣ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑΣ

1.16.1 ΕΞΩΣΩΜΑΙΚΗ ΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ (IVF)

Το πρώτο “παιδί του σωλήνα”, γεννήθηκε το 1978 γεγονός που αποτέλεσε ορόσημο στο πεδίο της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Η μέθοδος της εξωσωματικής γονιμοποίησης εφαρμόστηκε για πρώτη φορά από τους Steptoe και Edwards και ακολουθείται όταν το σπέρμα δεν παρουσιάζει σοβαρά προβλήματα. Πριν την εφαρμογή της IVF προκαλείται διέγερση των ωοθηκών με ορμονική θεραπεία με σκοπό την παραγωγή περισσότερων του ενός ωαρίων. Όταν η διαδικασία παρακολούθησης της ωρίμανσης των ωαρίων δείξει ότι τα ωάρια έχουν ωριμάσει παραλαμβάνονται από τις ωοθήκες και μεταφέρονται σε ειδικό καλλιεργητικό μέσο. Το σπέρμα υφίσταται επεξεργασία και συλλέγονται τα καλύτερα σπερματοζωάρια, τα οποία τοποθετούνται μαζί με τα ωάρια για να επιτευχθεί γονιμοποίηση των ωαρίων *in vitro* (Edwards and Broody, 1995). Ωστόσο, η μέθοδος αυτή δεν ενδείκνυται σε περιπτώσεις όπου τα σπερματοζωάρια παρουσιάζουν μικρό αριθμό και κινητικότητα.

1.16.2 ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ ΕΓΧΥΣΗ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΩΝ (ICSI)

Η εισαγωγή της ενδοκυτταροπλασματικής έγχυσης σπερματοζωαρίων (ICSI) από τους Palermo et al, το 1992 αποτέλεσε καθοριστικό βήμα για τη θεραπευτική αντιμετώπιση μεγάλου αριθμού υπογόνιμων ζευγαριών με σοβαρό ανδρικό παράγοντα υπογονιμότητας. Η θεραπευτική αυτή προσέγγιση ενδείκνυται στην περίπτωση ατόμων που πάσχουν από ολιγοζοασθενότερα σπερμιά και εφαρμόζεται όταν η μέθοδος της εξωσωματικής γονιμοποίησης δεν είναι αποτελεσματική. Κατά την ICSI, ένα και μόνο υγιές σπερματοζωάριο εισάγεται μέσα στο ώριμο ωάριο μέσω της διαδικασίας της μικροέγχυσης επιτυγχάνοντας τη γονιμοποίησή του (Palermo et al. 1992) (Εικόνα 10.).



Εικόνα 8. Ενδοκυτταροπλασματική έγχυση σπέρματος (ICSI). Με τη βοήθεια ειδικού μικροσκοπίου και ειδικών διατάξεων γίνεται έγχυση ενός επιλεγμένου σπερματοζωαρίου μέσα στο ωάριο

ΣΚΟΠΟΣ

Κατά τις τελευταίες δεκαετίες έχει αυξηθεί σημαντικά το ενδιαφέρον για την αποτελεσματική και έγκαιρη πρόληψη, διάγνωση και θεραπεία της ανδρικής υπογονιμότητας. Για το λόγο αυτό ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η μελέτη της συμβολής του ανδρικού παράγοντα και πιο συγκεκριμένα η διερεύνηση των ελλειμάτων του χρωμοσώματος Y.

Δεδομένου ότι τα γονίδια των περιοχών AZF του χρωμοσώματος Y σχετίζονται με διαδικασίες αύξησης, πολλαπλασιασμού και ανάπτυξης όπως η σπερματογένεση, θεωρείται πιθανό οι βλάβες και τα ελλείματα στις περιοχές αυτές να σχετίζονται με την υπογονιμότητα. Συγχρόνως, έχει γίνει γνωστό από έρευνες ελλειμμάτων στην AZFc περιοχή, ότι τα ελλείματα σε αυτή την περιοχή ήταν συμβατά με την παραγωγή σπερματοζωαρίων (αν και σε μειωμένο αριθμό) κι έτσι μπορούσαν να μεταβιβαστούν στους απογόνους. Συνεπώς, φαίνεται ότι είναι πολύ σημαντικός ο έλεγχος των μικροελλειμμάτων πριν εφαρμοσθεί ICSI καθώς τα ελλείματα αυτά μπορούν να μεταβιβαστούν στον αρσενικό απόγονο.

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση ορισμένων ελλειμμάτων του Y χρωμοσώματος όσον αφορά την επίδρασή τους στην ποιότητα και γονιμοποιητική ικανότητα του σπέρματος. Η πλήρης και ολοκληρωμένη γνώση σχετικά με τους παράγοντες που μπορεί να οδηγήσουν σε προβλήματα γονιμότητας, δύναται να οδηγήσουν στη στοχευμένη διερεύνηση, διάγνωση και αποτελεσματική αντιμετώπιση των διαταραχών με στόχο να αυξηθεί η πιθανότητα της αναπαραγωγικής επιτυχίας. Στη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δείγματα αίματος και σπέρματος τόσο υπογόνιμων όσο και γόνιμων ανδρών με προβλήματα τεκνοποίησης, οι οποίοι είχαν καταφύγει στη λύση της εξωσωματικής γονιμοποίησης.

ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

Στη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκε γενετικό υλικό που απομονώθηκε από βιολογικό δείγμα σπέρματος τόσο από υπογόνιμους, όσο και από φυσιολογικούς, γονιμους άνδρες. Τα δείγματα συλλέχθηκαν στο κέντρο εξωσωματικής γονιμοποίησης "EMBRYOLAB". Μέχρι τώρα έχουν παραλειφθεί και αναλυθεί συνολικά 33 δείγματα με 18 φυσιολογικούς και 15 με διάφορους μη φυσιολογικούς φαινοτύπους σπέρματος. Τα δείγματα σπέρματος μετά τη συλλογή τους αναλύθηκαν και κατατάχθηκαν σύμφωνα με τα κριτήρια του WHO (Πίνακας 1). Συγχρόνως, παρέχονται πληροφορίες σχετικές με τον τρόπο της θεραπείας που έχει ακολουθηθεί μέχρι τώρα καθώς και των επιπέδων της β-χοριακής γοναδοτροπίνης (B-HCG), τα οποία μπορεί να είναι ενδεικτικά μιας πιθανής κύησης. Αξίζει να αναφερθεί ότι, σύμφωνα με τον κώδικα δεοντολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, η έρευνα στο ανθρώπινο βιολογικό υλικό δεσμεύεται από τις αρχές της συναίνεσης ύστερα από πληροφόρηση του δότη, και της προστασίας των ευαίσθητων προσωπικών δεδομένων που συλλέγονται και υπόκεινται σε επεξεργασία.

Πίνακας 5. Κατηγοριοποίηση των δειγμάτων σπέρματος βάσει των κριτηρίων του WHO

Δείγμα	Ηλικία	Αριθμός	Κινητικότητα	Μορφολογία	Θεραπεία	B-HCG
1	39	Ολιγοζωοσπερμία	Ασθενοζωοσπερμία	Τερατοζωοσπερμία	IVF	Αρνητική
2	43	Φυσιολογικός	Φυσιολογική	Φυσιολογική	IVF	Αρνητική
3	42	Ολιγοσπερμία	Φυσιολογική	Φυσιολογική	IVF	Θετική
4	40	Ολιγοσπερμία	Φυσιολογική	Φυσιολογικός	IVF	Θετική
5	37	Ολιγοσπερμία	Φυσιολογική	Φυσιολογικός	IVF	Θετική
6	45	Φυσιολογικός	Φυσιολογική	Φυσιολογική		
7	44	Ολιγοζωοσπερμία	Φυσιολογική	Φυσιολογική	IVF	Θετική
8	40	Φυσιολογική	Φυσιολογική	Φυσιολογική	IVF	Θετική
9	36	Φυσιολογική	Φυσιολογική	Φυσιολογική	IVF	Θετική
10	42	Φυσιολογική	Φυσιολογική	Φυσιολογική	IVF	Αρνητική
11	36	Φυσιολογική	Φυσιολογική	Φυσιολογική	IVF	Θετική
12	35	Φυσιολογική	Φυσιολογική	Φυσιολογική	IVF	Θετική
13	30	Φυσιολογική	Φυσιολογική	Φυσιολογική	IVF	Θετική
14	31	Φυσιολογική	Φυσιολογική	Φυσιολογική	IVF	Θετική
15	43	Ολιγοζωοσπερμία	Ασθενοζωοσπερμία	Τερατοζωοσπερμία	IVF	Αρνητική
16	37	Φυσιολογική	Φυσιολογική	Φυσιολογική	IVF	
17	46	Φυσιολογική	Φυσιολογική	Τερατοσπερμία	IVF	Αρνητική
18	40	Φυσιολογική	Φυσιολογική	Φυσιολογική	IVF	Αρνητική
19	36	Φυσιολογική	Φυσιολογική	Φυσιολογική	IVF	
20	38	Ολιγοζωοσπερμία	Ασθενοζωοσπερμία	Τερατοζωοσπερμία	IVF	Θετική
21	39	Φυσιολογική	Φυσιολογική	Φυσιολογική	IVF	Θετική
22	47	Φυσιολογική	Φυσιολογική	Φυσιολογική	IVF	
23	39	Ολιγοζωοσπερμία	Φυσιολογική	Φυσιολογική	IVF	Θετική
24	35	Ολιγοζωοσπερμία	Ασθενοζωοσπερμία	Τερατοζωοσπερμία	IVF	Αρνητική

25	37	Φυσιολογική	Φυσιολογική	Φυσιολογική	IVF	Θετική
26	38	Φυσιολογική	Φυσιολογική	Φυσιολογική	IVF	Αρνητική
27	37	Φυσιολογική	Φυσιολογική	Φυσιολογική	IVF	Αρνητική
28	41	Ολιγοζωοσπερμία	Ασθενοζωοσπερμία	Τερατοζωοσπερμία	IVF	Θετική
29	31	Ολιγοζωοσπερμία	Φυσιολογική	Τερατοζωοσπερμία	IVF	Θετική
30	41	Ολιγοζωοσπερμία	Ασθενοζωοσπερμία	Τερατοζωοσπερμία	IVF	
31	35	Φυσιολογική	Ασθενοζωοσπερμία	Φυσιολογική	IVF	Θετική
32	37	Ολιγοζωοσπερμία	Φυσιολογική	Τερατοζωοσπερμία	IVF	Αρνητική
33	40	Φυσιολογική	Φυσιολογική	Φυσιολογική	IVF	Αρνητική

2.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΟΥ DNA

2.2.1. Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από σπέρμα

Υλικά

- Αιθανόλη 70%
- Lysis Buffer: 10Mm Tris-HCl pH 8.0, 100Mm NaCl, 10Mm EDTA, 0,5% SDS
- Triton-X100 (0,5%)
- DTT 0,1M
- Πρωτεΐνάση K 100mg/ml

Μεθοδολογία

Για την πραγματοποίηση της απομόνωσης του DNA χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο "Preparation of Genomic DNA from Mammalian Sperm" (Weyrich, 2012). Σκοπός της διαδικασίας είναι η απομόνωση γενετικού υλικού από σπέρμα. Το ανθρώπινο σπέρμα αποτελείται από σπερματικό υγρό και σπερματοζωάρια. Το σπερματικό υγρό περιλαμβάνει πρωτεϊνικά και μη πρωτεϊνικά συστατικά όπως είναι η φρουκτόζη, τα οποία μπορούν να μειώσουν την ποιότητα και την καθαρότητα του DNA. Για το λόγο αυτό συνίσταται η χρήση αιθανόλης για απομάκρυνση του σπερματικού υγρού. Από την άλλη πλευρά, τα σπερματοζωάρια περιβάλλονται από μια λιπιδική μεμβράνη πλούσια σε δισουλφιδικούς δεσμούς. Η δομή της μεμβράνης εμποδίζει τη λύση των κυττάρων και δυσχεραίνει την απομόνωση του γενετικού υλικού. Για να γίνει παράκαμψη του εμποδίου αυτού χρησιμοποιείται ένας ισχυρός αντιοξειδωτικός παράγοντας, το DDT. Επιπλέον, η σύσταση του διαλύματος ομογενοποίησης (Lysis Buffer) επιτρέπει την ρήξη των κυτταρικών /πυρηνικών μεμβρανών και την απελευθέρωση του DNA. Ακόμα, το διάλυμα ομογενοποίησης (Lysis Buffer) περιέχει EDTA έναν χηλικό υποκαταστάτη, που έχει την ικανότητα να δεσμεύει μεταλλικά ιόντα. Τα μεταλλικά ιόντα αποτελούν συμπράγοντα για τη δράση των δεσοξυριβονουκλεασών, οπότε η δέσμευσή τους προστατεύει το DNA από την αποικοδόμηση. Επίσης, η παρουσία του ρυθμιστικού διαλύματος, Tris, διατηρεί το pH σε ουδέτερη περιοχή.

Τέλος, το SDS χρησιμοποιείται ως ανιονικό απορρυπαντικό για τη διάσπαση των κυτταρικών τοιχωμάτων και την αποδιάταξη των πρωτεϊνών. Αντίστοιχη δράση παρουσιάζει και η πρωτεϊνάση K, η οποία προκαλεί την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών. Όμως, η πλήρης απομάκρυνση των πρωτεϊνών και των κυτταρικών υπολειμμάτων πραγματοποιείται μέσω εκχύλισης με φαινόλη / χλωροφόρμιο, ενώ το DNA ανακτάται μετά από κατακρήμνιση με αιθανόλη.

1. Πλύση 100 μl σπέρματος με προσθήκη 500 μl αιθανόλης (70%)
2. Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 13.000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπερκείμενο απομακρύνεται.
3. Τα στάδια (1),(2) επαναλαμβάνονται και συλλέγεται το ίζημα.
4. Προσθήκη 500 μl διαλύματος ομογενοποίησης, Lysis Buffer.
5. Προσθήκη 2,5 μl Triton-X100 (0,5%), 200 μl DTT (0,1M) και 40 μl πρωτεϊνάσης K (10mg/ml).
6. Ανάδευση του μίγματος και επώαση για 2-3 ώρες στους 50°C (υπό ανάδευση).
7. Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 13.000 rpm. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο σωλήνα τύπου erpendorf.

2.2.2 Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από αίμα

Η απομόνωση του γονιδιωματικού DNA από δείγματα αίματος πραγματοποιήθηκε με τη χρήση κατάλληλου kit (PureLink Genomic DNA Mini Kit, Invitrogen).

2.3 ΧΕΙΡΙΣΜΟΙ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

2.3.1. Εκχύλιση με φαινόλη/χλωροφόρμιο

Μεθοδολογία

Η εκχύλιση των νουκλεϊκών οξέων με φαινόλη /χλωροφόρμιο πραγματοποιείται για την απομάκρυνση των λιπιδίων και των πρωτεϊνών ώστε το DNA να είναι υψηλής καθαρότητας. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιείται φαινόλη για τον διαχωρισμό του DNA από τα λιπίδια και τις πρωτεΐνες με τη δημιουργία δυο διακριτών φάσεων, της υδατικής φάσης που βρίσκονται τα νουκλεϊκά οξέα και της οργανικής φάσης που βρίσκονται τα λιπίδια και οι πρωτεΐνες. Η παρουσία του χλωροφορμίου έχει ως αποτέλεσμα τον καλύτερο διαχωρισμό των δύο φάσεων, προσδίδοντας μεγαλύτερη πυκνότητα στην οργανική φάση.

1. Σε διάλυμα DNA όγκου V προστίθεται ίσος όγκος διαλύματος φαινόλης /χλωροφορμίου και ακολουθεί ανάδευση μέχρι να σχηματιστεί ένα ομοιογενές γαλάκτωμα.
2. Στη συνέχεια πραγματοποιείται φυγοκέντρηση σε 13,000 rpm για 10 λεπτά στους 4°C ώστε να γίνει διαχωρισμός της οργανικής από την υδατική φάση.
3. Η υδατική φάση, στην οποία βρίσκονται τα νουκλεϊκά οξέα, μεταφέρεται σε νέο σωληνάκι και προστίθεται ίσος όγκος διαλύματος χλωροφορμίου (1 ml), αφού προηγηθεί ανάδευση, φυγοκεντρείται σε 13,000 rpm για 5 λεπτά στους 4°C.

4. Στη συνέχεια η υδατική φάση μεταφέρεται σε νέο σωληνάκι τύπου erpendorf.
5. Έπειτα, το DNA επανακτάται με κατακρήμνιση με αιθανόλη.

2.3.2. Κατακρήμνιση νουκλεϊκών οξέων με αιθανόλη

Υλικά

- CH₃COONa (3M)
- Αιθανόλη
- TE-buffer

Μεθοδολογία

Η κατακρήμνιση με αιθανόλη χρησιμοποιείται για τη συμπύκνωση, αφαλάτωση και επανάκτηση των νουκλεϊκών οξέων και πραγματοποιείται παρουσία συγκεκριμένων συγκεντρώσεων μονοσθενών κατιόντων. Η αιθανόλη αφαιρεί το ενυδατωμένο περίβλημα των νουκλεϊκών οξέων και εκθέτει τις αρνητικά φορτισμένες φωσφορικές ομάδες στα μονοσθενή κατιόντα όπως τα Na⁺, τα οποία συνδέονται με αυτές. Με αυτό τον τρόπο μειώνονται οι απωθητικές δυνάμεις μεταξύ των πολυνουκλεοτιδικών αλυσίδων σε τέτοιο βαθμό ώστε να σχηματίζεται ίζημα. Η κατακρήμνιση μπορεί να επιτευχθεί μόνο παρουσία επαρκούς ποσότητας κατιόντων ώστε να εξουδετερωθεί το αρνητικό φορτίο των φωσφορικών ομάδων.

1. Σε διάλυμα DNA όγκου V προστίθεται διάλυμα οξικού νατρίου (CH₃COONa), όγκου V/10, συγκέντρωσης 3M και αιθανόλη όγκου 2V.
2. Το μείγμα ύστερα από σχετικά ήπια ανάδευση τοποθετείται -80°C για 1-2 ώρες και έπειτα φυγοκεντρείται στις 13,000 rpm για 20 λεπτά στους 4°C.
3. Στη συνέχεια απομακρύνεται προσεκτικά το υπερκείμενο υγρό και προστίθενται 500μl αιθανόλης 75%
4. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13,000 στροφές για 5 λεπτά και απομάκρυνση του υπερκειμένου.
5. Το ίζημα ξεραίνεται σε θερμοκρασία δωματίου και επαναδιαλύεται σε TE-buffer ή υδατικό διάλυμα.

2.4 ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ DNA

2.4.1 Με χρήση φασματοφωτόμετρου

Η ποσοτικοποίηση των νουκλεϊκών οξέων μέσω φωτομέτρησης βασίζεται στο γεγονός ότι το DNA και το RNA απορροφούν εκλεκτικά στα 260nm του φάσματος της υπεριώδους ακτινοβολίας (UV). Η τιμή της οπτικής απορρόφησης 1 (OD₂₆₀ = 1) αντιστοιχεί σε συγκέντρωση

50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ δίκλωνου DNA, 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ μονόκλωνου DNA ή και $\sim 20\mu\text{g}/\text{ml}$ για μονόκλιωνα ολιγονουκλεοτίδια. Ο λόγος των τιμών OD στα 260nm και 280nm παρέχει μια εκτίμηση της καθαρότητας του DNA, δηλαδή κατά πόσο αυτό είναι απαλλαγμένο από πρωτεΐνες. Για καθαρά διαλύματα DNA και RNA ο λόγος $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ κυμαίνεται μεταξύ 1.8-2.0.

2.4.2 Με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Ο ποσοτικός προσδιορισμός του DNA μέσω ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης ενδείκνυται σε περιπτώσεις χαμηλής συγκέντρωσης ή καθαρότητας των προς εξέταση δειγμάτων. Η ποσοτικοποίηση βασίζεται στην ιδιότητα του δίκλωνου DNA να συνδέεται με την ένωση βρωμιούχο αιθίδιο, με τα μόρια της οποίας φωσφορίζουν κάτω από το υπεριώδες φως. Η σύνδεση αυτή και η ένταση φθορισμού είναι ανάλογη της ποσότητας DNA. Η εκτίμηση της συγκέντρωσης γίνεται συγκρίνοντας το φθορισμό που εκπέμπεται από το προς ανάλυση DNA με το φθορισμό γνωστής συγκέντρωσης και μήκους DNA (μάρτυρας-ladder). Η διακριτική δυνατότητα του πηκτώματος αγαρόζης 1% είναι περίπου 10 ng DNA.

2.5 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ PCR

Αρχή της μεθόδου

Η τεχνική της PCR ή Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης εφαρμόστηκε για πρώτη από την ομάδα των ερευνητών Mullis, Faloona και Saiki της εταιρείας Cetus και αποτελεί αναμφίβολα επανάσταση στην βιοϊατρική έρευνα με ευρύτατο φάσμα εφαρμογών. Το 1993 απονεμήθει στον Δρ Κ.Mullis το βραβείο Νόμπελ Χημείας για την καθοριστική του συμβολή στην ανακάλυψη και ανάπτυξη της τεχνικής PCR.

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR αποτελεί μια γρήγορη και εύκολη διαδικασία που επιτρέπει τον ενζυμικό πολλαπλασιασμό *in vitro* επιλεγμένων αλληλουχιών DNA. Η μέθοδος βασίζεται σε συνεχείς κύκλους πολυμερισμού της επιλεγμένης αλληλουχίας με τη βοήθεια μίας DNA πολυμεράσης και δύο ειδικών μονόκλωνων ολιγονουκλεοτιδίων.

Στάδια της αντίδρασης

Κάθε κύκλος πολυμερισμού αποτελείται από τα εξής βήματα:

1. Την αποδιάταξη του DNA που πραγματοποιείται συνήθως σε θερμοκρασία 94°C για 30 δευτερόλεπτα.
2. Την υβριδοποίηση των αλυσίδων του DNA με τους αντίστοιχους συμπληρωματικούς εκκινητές. Η θερμοκρασία και ο χρόνος που χρειάζεται για να γίνει η υβριδοποίηση των εκκινητών εξαρτάται από τη συγκέντρωση τους στην αντίδραση, το μήκος και την αλληλουχία των βάσεων τους. Η θερμοκρασία της αντίδρασης για την υβριδοποίηση (T_a) ρυθμίζεται περίπου 5°C χαμηλότερα από το σημείο τήξης (T_m).
3. Την επιμήκυνση από κάθε εκκινητή μιας συμπληρωματικής αλυσίδας. Ο χρόνος για την επιμήκυνση εξαρτάται από το μήκος κι τη συγκέντρωση της αλληλουχίας του στόχου και από τη θερμοκρασία της αντίδρασης. Συνήθως, η επιμήκυνση πραγματοποιείται σε

θερμοκρασία 72°C, στην οποία η Taq πολυμεράση προσθέτει 35-100 νουκλεοτίδια ανά δευτερόλεπτο.

Συστατικά της αντίδρασης

Μια αντίδραση PCR πρέπει να περιέχει τα εξής συστατικά:

1. Τον στόχο (μήτρα) DNA, η ποσότητα του οποίου εξαρτάται από τον αριθμό των αντιγράφων του. Στις βέλτιστες συνθήκες, η τεχνική PCR μπορεί θεωρητικά να ενισχύσει την αλληλουχία στόχο από ένα μόνο αντίγραφο DNA. Ωστόσο για την κάθε αντίδραση απαιτείται συγκεκριμένης ποσότητας και ποιότητας DNA.
2. Την Taq DNA πολυμεράση, η οποία έχει απομονωθεί από το θερμοανθεκτικό βακτήριο *Thermus aquaticus* (Saiki et al. 1988) και επιτρέπει τη χρήση υψηλών θερμοκρασιών στα βήματα υβριδισμού και επιμήκυνσης.
3. Ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) της Taq πολυμεράσης, ώστε να διατηρούνται σταθερά το pH και η ιονική ισχύς του περιβάλλοντος της αντίδρασης, τα οποία παρέχονται από την παρουσία Tris-HCl και NaCl ή KCl, αντίστοιχα.
4. Κατάλληλη συγκέντρωση διαλύματος $MgCl_2$. Η παρουσία των ιόντων Mg^{+2} είναι απαραίτητη για τη δράση της πολυμεράσης. Τα ιόντα σχηματίζουν διαλυτά σύμπλοκα με τα dNTPs ώστε να δημιουργήσουν το πραγματικό υπόστρωμα που αναγνωρίζει η πολυμεράση.
5. Κατάλληλο διάλυμα ελεύθερων 5' τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs: dATP, dTTP, dCTP, dGTP) σε συγκέντρωση 0,2mM το καθένα, ώστε να περιοριστεί η πιθανότητα εισαγωγής λανθασμένου νουκλεοτιδίου.
6. Ένα ζεύγος συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων, τα οποία αποκαλούνται εκκινητές και καθορίζουν τα όρια του τμήματος DNA που θα ενισχυθεί. Τα ολιγονουκλεοτίδια πρέπει να είναι αντιπαράλληλου προσανατολισμού και καθένα συμπληρωματικό προς τη μία αλυσίδα του υπό μελέτη DNA.

2.6 ΧΡΗΣΕΙΣ ΔΕΙΚΤΩΝ STS (MARKERS)

Τα STS (Sequence-Tagged Sites) είναι αλληλουχίες σχετικά μικρού μήκους (200-500 bp) που μπορούν να ενισχυθούν με τη μέθοδο της PCR. Η ακολουθία ενός STS μπορεί να περιέχει ακολουθίες που εντοπίζονται και σε άλλες περιοχές του γονιδιώματος, για το λόγο αυτό χρησιμοποιούνται σε ζεύγη για να αυξηθεί η αξιοπιστία και επιτρέπεται η ανίχνευση μιας περιοχής ενδιαφέροντος.

Λόγω της συνήθως μικρής έκτασης τους, τα ελλείμματα δεν δύναται να προσδιοριστούν κυτταρογενετικά, αντιθέτως γίνεται χρήση συνδυασμού STS για τον εντοπισμό ελλειμμάτων. Γενικά έχουν ελεγχθεί πάνω από 131 STS, ωστόσο στην παρούσα μελέτη έγινε έλεγχος μόνο σε 7. Από αυτά τα 6 ήταν χωρισμένα σε 3 ζεύγη που εντοπίζονταν στα όρια των τριών AZF περιοχών, ενώ το έβδομο STS αφορούσε το γονίδιο SRY χρησιμεύοντας σαν ένα εσωτερικό control. Τα τρία διαφορετικά ζεύγη συνδέονται με τις τρεις διαφορετικές περιοχές AZF: a (sY_84

και sY_86), b (sY_127 και sY_134) και c (sY_254 και sY_255) και αναλύθηκαν με στόχο την εξασφάλιση μεγαλύτερης αξιοπιστίας των αποτελεσμάτων. Κάθε STS αντιπροσωπεύει μία μη πολυμορφική περιοχή και πιθανή απουσία ενίσχυσης του έπειτα από αντίδραση PCR υποδηλώνει την απουσία της αντίστοιχης περιοχής ενδιαφέροντος AZF στο χρωμόσωμα Y. Η ύπαρξη ή μη του εκάστοτε STS αναλύθηκε με τη χρήση της μεθόδου PCR και τα αποτελέσματα οπτικοποιήθηκαν με τη βοήθεια ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης.

Για τις αντιδράσεις PCR χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές που παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 6. Οι εκκινητές που αναγράφονται στον παραπάνω πίνακα χρησιμοποιούνται για την ενίσχυση των STS: SY_14, SY_84, SY_86, SY_127, SY_134, SY_254, SY_255.

Εκκινητές	Αλληλουχία (5'→3')	Μέγεθος PCR προϊόντος	Θερμοκρασία αποδιάταξης (Tm)	GC%
SY84_F	AGAAGGGTCTGAAAGCAGGT	326	57,3	50
SY84_R	GCCTACTACCTGGAGGCTTC		61,4	60
SY86_F	GTGACACACAGACTATGCTTC	320	57,9	47,6
SY86_R	ACACACAGAGGGACAACCCT		59,4	55
SY127_F	GGCTCACAAACGAAAAGAAA	274	53,2	40
SY127_R	CTGCAGGCAGTAATAAGGGA		57,3	50
SY134_F	GTCTGCCTCACCATAAAACG	301	57,3	50
SY134_R	ACCACTGCCAAAACCTTTCAA		53,2	40
SY254_F	GGGTGTTACCAGAAGGCAAAA	380	57,3	50
SY254_R	GAACCGTATCTACCAAAGCAGC		60,3	50
SY255_F	GTTACAGGATTCGGCGTGAT	123	57,3	50
SY255_R	CTCGTCATGTGCAGCCAC		58,2	61,1
SY14_F	GAATATTCCTCCGCTCTCCGGA	470	59	55
SY14_R	GCTGGGCTCCACTTGAG		59,9	55

Το πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε για τις αντιδράσεις PCR παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 7. Πρωτόκολλο αντίδρασης PCR

	Ποσότητες	Αρχική Συγκέντρωση	Τελική Συγκέντρωση
DNA*	0,5 μL DNA από σπέρμα		
Buffer	5 μL	10X (Mg ²⁺ 15mM)	1X (Mg ²⁺ 1.5mM)
MgCl ₂	1 μL	25 mM	0.5 mM

dNTPs	1 μ L	40 mM	0.8 mM
Εκκινητής Fw	1 μ L	50 pmol/ μ L	1 pmol/ μ L
Εκκινητής Rv	1 μ L	50 pmol/ μ L	1 pmol/ μ L
KAPA Taq	0.2 μ L	5 U/ μ L	0.02 U/ μ L
ddH₂O	Έως τα 50 μ L	-	-

- Το πρωτόκολλο αυτό χρειάστηκε να τροποποιηθεί όσον αφορά την ποσότητα του DNA που χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να παραχθεί το επιθυμητό προϊόν.

Το πρόγραμμα της PCR που ακολουθήθηκε , με τις θερμοκρασίες και τα αντίστοιχα χρονικά διαστήματα παρουσιάζονται παρακάτω. Αξίζει να αναφερθεί ότι σε κάποιες περιπτώσεις χρειάστηκε να τροποποιήσουμε τη θερμοκρασία υβριδοποίησης στους 53°C ώστε να παραχθεί το επιθυμητό προϊόν.

Πίνακας 8. Το πρόγραμμα της PCR που εφαρμόστηκε

Πρόγραμμα PCR	
Initial denaturation	95°C, 4min
Denaturation	94°C, 40 sec
Primer annealing	54 °C, 40 sec
Extension	72°C, 40 sec
Final extension	72°C, 10 min

36 κύκλοι

2.7 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Η Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης είναι μια μέθοδος που χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό, την αναγνώριση και τον καθορισμό κομματιών DNA. Βασίζεται στην αρχή της μετανάστευσης φορτισμένων μορίων κάτω από την επίδραση ενός εξωτερικού εφαρμοζόμενου ηλεκτρικού πεδίου. Η ηλεκτροστατική δύναμη που αναπτύσσεται κατευθύνει τα αρνητικά φορτισμένα μόρια του DNA προς την άνοδο. Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA στα πηκτώματα αγαρόζης εξαρτάται από τους εξής παράγοντες:

- Το μέγεθος του DNA. Γραμμικά δίκλινα DNA κινούνται σε ρυθμό αντιστρόφως ανάλογο του log του μοριακού βάρους.
- Την συγκέντρωση της αγαρόζης. Η κινητικότητα ενός κομματιού DNA διαφέρει σε πήκτωμα διαφορετικής συγκέντρωσης αγαρόζης. Χρησιμοποιώντας πηκτώματα διαφορετικών συγκεντρώσεων μπορούμε να διαχωρίσουμε ένα μεγάλο εύρος μεγεθών DNA.

- Τη στερεοδιάταξη του DNA. Η κλειστή (υπερελικωμένη) κυκλική μορφή (μορφή I), η ανοιχτή κυκλική μορφή (μορφή II) και το γραμμικό DNA (μορφή III) του ίδιου μοριακού βάρους έχουν διαφορετική κινητικότητα σε πηκτώματα αγαρόζης. Οι σχετικές κινητικότητες των τριών μορφών εξαρτώνται κυρίως από τη συγκέντρωση αγαρόζης στο πήκτωμα, αλλά επηρεάζονται επίσης από την ένταση του ρεύματος, την ιονική ισχύ του ρυθμιστικού διαλύματος και τον βαθμό υπερελίκωσης της μορφής I του DNA. Κάτω από ορισμένες συνθήκες, η μορφή I κινείται γρηγορότερα από την III. Κάτω από άλλες συνθήκες συμβαίνει το αντίστροφο.
- Την ένταση του ρεύματος. Σε χαμηλή τάση η κινητικότητα των γραμμικών κομματιών DNA είναι ανάλογη με τα volts που χρησιμοποιούνται. Σε υψηλότερη ένταση η κινητικότητα κομματιών DNA μεγάλου μοριακού βάρους αυξάνεται με διαφορετικό συντελεστή σε κάθε κομμάτι DNA.
- Την παρουσία χρωστικών. Όταν αυξάνεται η συγκέντρωση βρωμιούχου αιθιδίου, περισσότερη χρωστική δεσμεύεται στο DNA. Έτσι, αναιρούνται προοδευτικά οι αρνητικές στροφές υπερέλικας της μορφής I και η κινητικότητά της. Στο σημείο συγκέντρωσης ελεύθερου βρωμιούχου αιθιδίου, όταν δεν υπάρχουν πλέον στροφές υπερέλικας, η μορφή I αποκτά την ελάχιστη κινητικότητά της. Αν αυξηθεί ακόμα περισσότερο η συγκέντρωση βρωμιούχου αιθιδίου, δημιουργούνται θετικές στροφές υπερέλικας και η κινητικότητα της μορφής I αυξάνεται γρήγορα. Οι κινητικότητες των μορφών II και III μειώνονται με διαφορετικό βαθμό η καθεμία.
- Τη σύσταση και την ιοντική ισχύς του διαλύματος ηλεκτροφόρησης. Απουσία ιόντων η ηλεκτρική αγωγιμότητα είναι ελάχιστη και το DNA μετακινείται με πολύ αργό ρυθμό ή καθόλου. Διαλύματα με υψηλό βαθμό ιοντισμού δημιουργούν υψηλή ηλεκτρική αγωγιμότητα που σαν αποτέλεσμα έχει την ανάπτυξη θερμότητας στη συσκευή. Στη χειρότερη περίπτωση, το πήκτωμα λειώνει και το DNA αποδιατάσσεται.

Υλικά

- Loading Buffer
- TAE 0,5X
- Αγαρόζη
- Βρωμιούχο αιθίδιο
- Ladder

Μεθοδολογία

1. Ζυγίζεται η επιθυμητή ποσότητα αγαρόζης η οποία αναμιγνύεται με συγκεκριμένο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης συνήθως 0,5 x TAE. Η αγαρόζη διαλύεται με τη βοήθεια βρασμού ώπου το διάλυμα να γίνει τελείως διαυγές.
2. Στη συνέχεια προστίθεται διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου σε τελική συγκέντρωση 0.1 $\mu\text{g/ml}$.
3. Πριν τη στερεοποίηση του πηκτώματος, το διάλυμα εισάγεται σε ένα γυάλινο καλούπι συγκεκριμένων διαστάσεων (μήτρα πολυμερισμού ηλεκτροφορητικής συσκευής). Οι θέσεις των δειγμάτων DNA (πηγαδάκια) σχηματίζονται με τη βοήθεια ειδικής μήτρας που τοποθετείται στη συσκευή (χτενάκια) πριν τον πολυμερισμό του πηκτώματος.

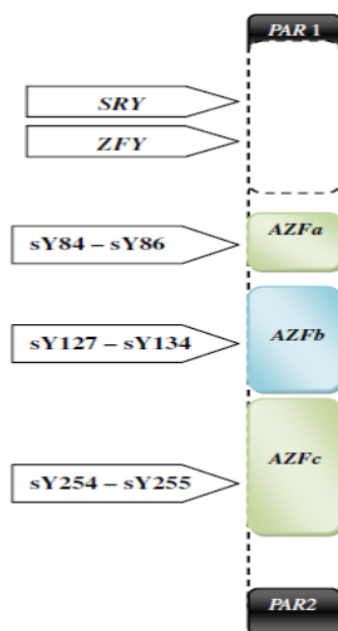
4. Στα δείγματα DNA που πρόκειται να αναλυθούν προστίθεται διάλυμα χρωστικής Loading buffer.
5. Όταν στερεοποιηθεί το διάλυμα τοποθετείται στην ηλεκτροφορητική συσκευή η οποία είναι πληρωμένη με διάλυμα ηλεκτροφόρησης (αντίστοιχο με αυτό που έχει κατασκευαστεί το πήκτωμα) τόσο ώστε να επικαλύπτει το πήκτωμα.
6. Τα δείγματα τοποθετούνται στα πηγαδάκια και αναλύονται σε οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης.
7. Προκειμένου να είναι δυνατή η εκτίμηση του μεγέθους των τμημάτων DNA που αναλύονται, ηλεκτροφορείται μαζί με τα δείγματα και ο μάρτυρας μοριακών βαρών (ladder).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 PCR ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΤΩΝ ΥΠΟ ΜΕΛΕΤΗ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΤΟΠΩΝ

Το πρώτο στάδιο της συγκεκριμένης εργασίας περιελάμβανε την ενίσχυση συγκεκριμένων γενετικών τόπων του χρωμοσώματος Y με τη βοήθεια της τεχνικής PCR. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν τα κατάλληλα ζεύγη εκκινητών (Πίνακας 5.1) και πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το κατάλληλο πρωτόκολλο (Πίνακας 5.2) και πρόγραμμα (Πίνακας 5.3).

Τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1,5% παράλληλα με μάρτυρα τμημάτων γνωστών μοριακών μεγεθών (ladder), για τον έλεγχο της ενίσχυσης του επιθυμητού γονιδιακού τμήματος και την εκτίμηση του μεγέθους του προϊόντος PCR. Στις παρακάτω εικόνες παρουσιάζονται τα διάφορα γονιδιακά τμήματα που ενισχύθηκαν τόσο από δείγματα αίματος όσο και σπέρματος.

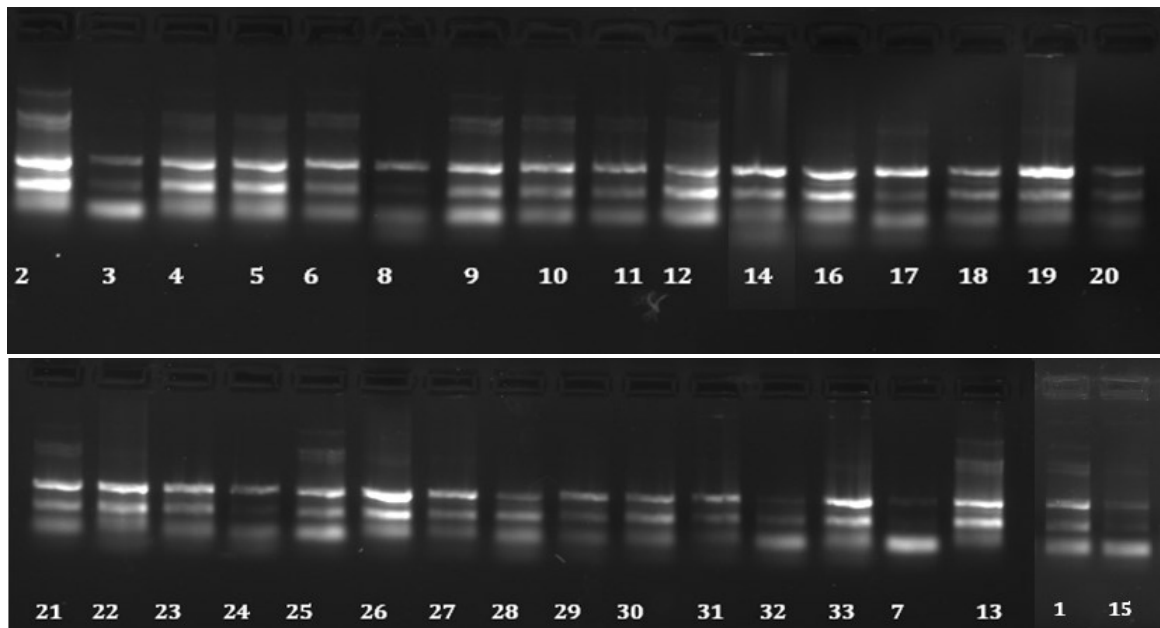


Εικόνα 9. Σχηματική απεικόνιση του Y χρωμοσώματος. Παρουσιάζονται οι AZF περιοχές καθώς και τα γονίδια που περιλαμβάνονται σε αυτές.

3.2 ΓΟΝΙΔΙΑ ΤΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ AZFa

i. SY_84

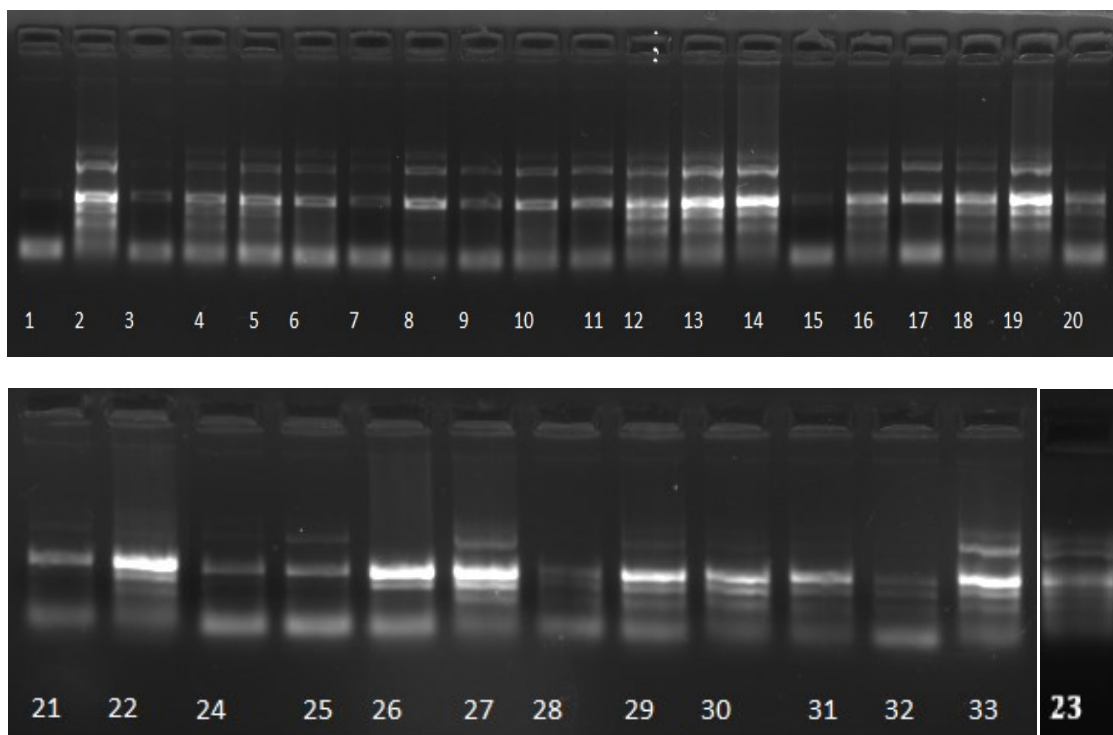
Χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινητών SY84_F & SY84_R σύμφωνα με τον πίνακα 6 και τα αποτελέσματα της ενίσχυσης φαίνονται στις παρακάτω εικόνες.



Εικόνα 10. Σύμφωνα με την πηκτή αγαρόζης παρατηρήθηκε ενίσχυση του γονιδίου SY_84 σε όλα τα υπό εξέταση δείγματα.

i. SY_86

Χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινητών SY86_F & SY86_R σύμφωνα με τον πίνακα 6 και τα αποτελέσματα της ενίσχυσης φαίνονται στις παρακάτω εικόνες.

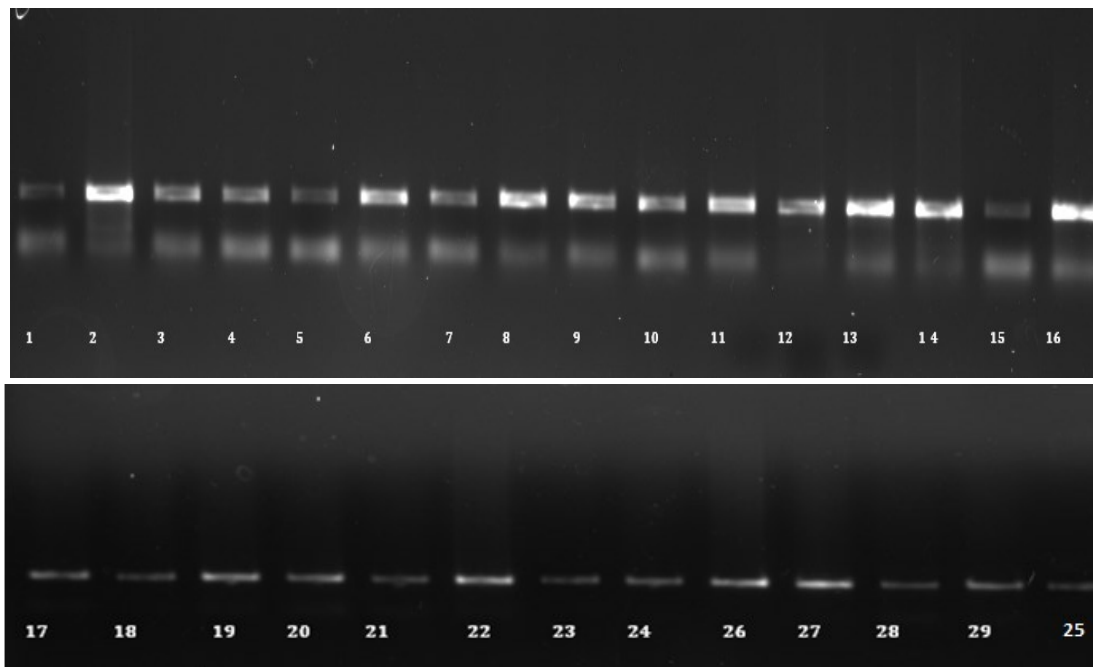


Εικόνα 11. Ομοίως, σε αυτή την περίπτωση παρατηρείται ενίσχυση του γονιδίου SY_86 σε όλα τα δείγματα που μελετήθηκαν.

3.3 ΓΟΝΙΔΙΑ ΤΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ AZFb

i. SY_127

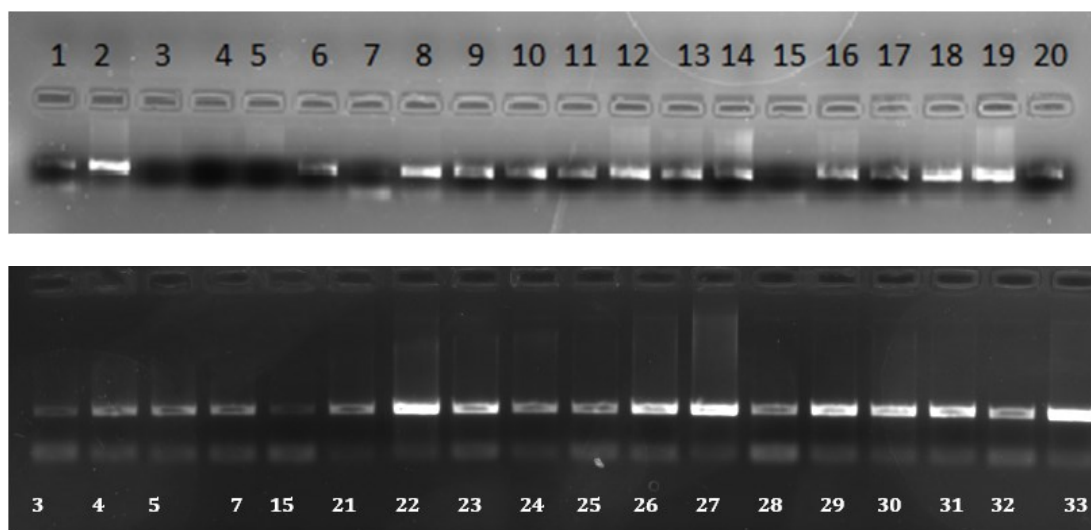
Χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινητών SY127_F & SY127_R σύμφωνα με τον πίνακα 6 και τα αποτελέσματα της ενίσχυσης φαίνονται στις παρακάτω εικόνες.



Εικόνα 12. Και σε αυτή την περίπτωση παρατηρήθηκε η ενίσχυση του γονιδίου SY_127 στα δείγματα που αναλύθηκαν.

II. SY_134

Ομοίως κι εδώ χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινητών SY134_F & SY134_R σύμφωνα με τον πίνακα 6 και τα αποτελέσματα της ενίσχυσης φαίνονται στις παρακάτω εικόνες.

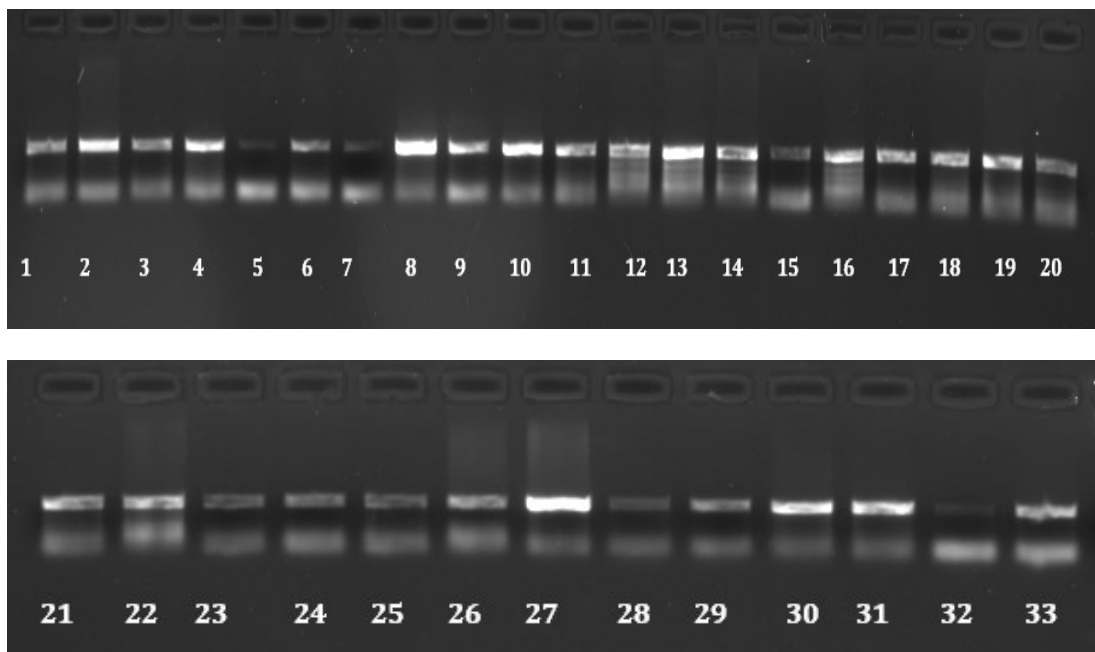


Εικόνα 13. Η παρουσία του γονιδίου SY_134 επιβεβαιώθηκε σε όλα τα δείγματα που αναλύθηκαν.

3.4 ΠΕΡΙΟΧΗ AZFc

i. SY_254

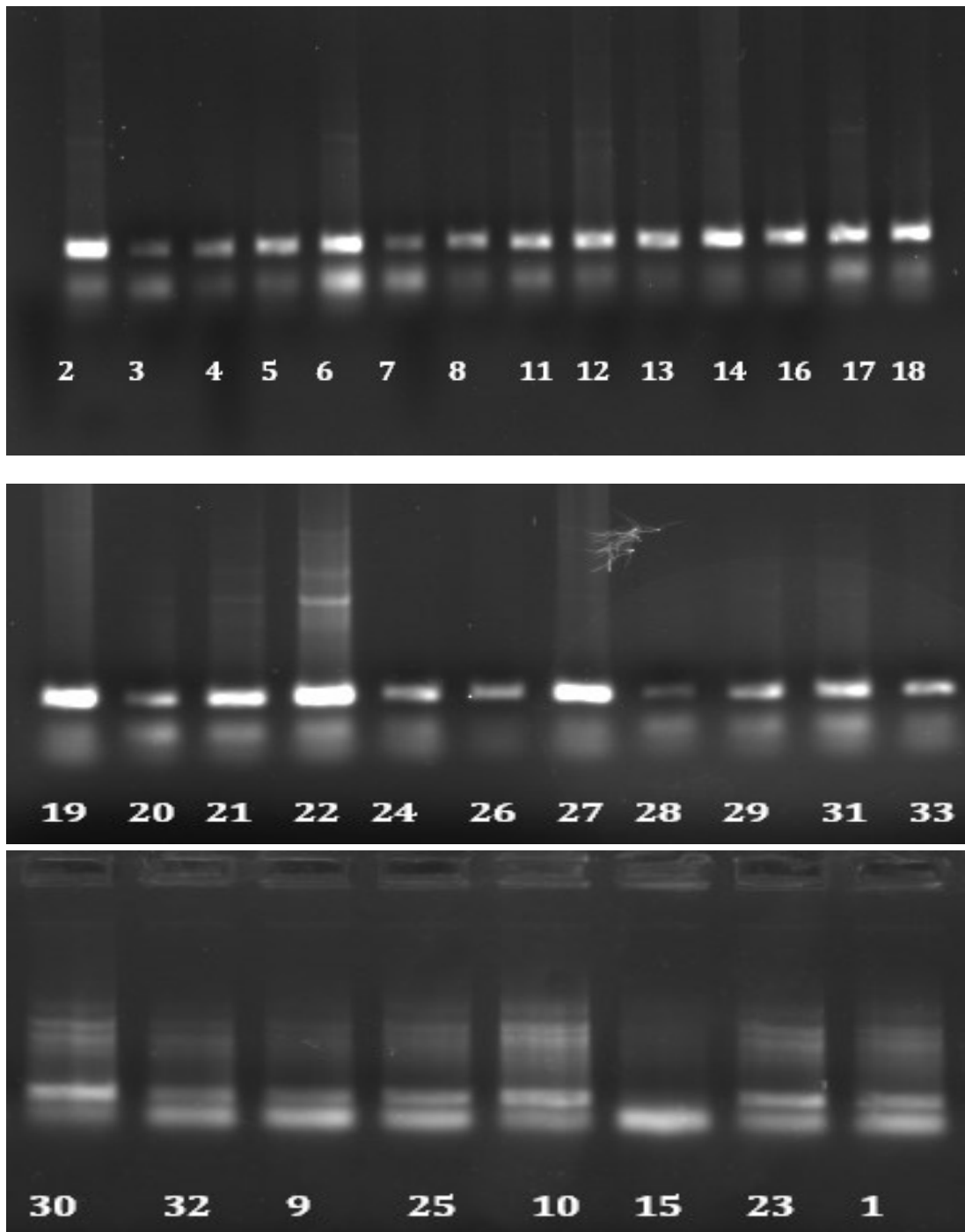
Χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινητών SY254_F & SY255_R σύμφωνα με τον πίνακα 6 και τα αποτελέσματα της ενίσχυσης φαίνονται στις παρακάτω εικόνες.



Εικόνα 14. Σύμφωνα με τις πηκτές αγαρόζης η ενίσχυση του marker SY_254 είναι εμφανής σε όλα τα προς ανάλυση δείγματα.

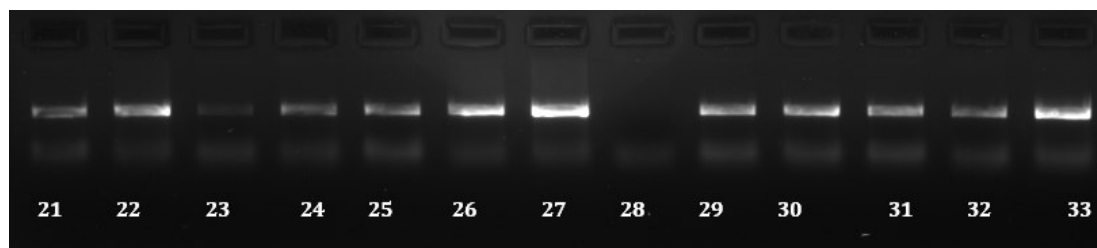
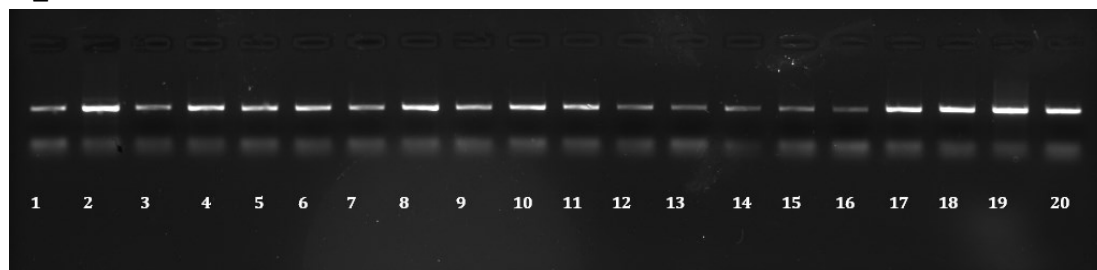
ii. SY_255

Χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινητών SY254_F & SY255_R σύμφωνα με τον πίνακα 6 και τα αποτελέσματα της ενίσχυσης φαίνονται στις παρακάτω εικόνες.



Εικόνα 15. Ομοίως, σε αυτή την περίπτωση παρατηρείται ενίσχυση του STS SY_255 σε όλα τα δείγματα που μελετήθηκαν.

SY_14



Εικόνα 16. Σύμφωνα με την πηκτή αγαρόζης παρατηρήθηκε ενίσχυση του γονιδίου SY_14 σε όλα τα υπό εξέταση δείγματα.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η ανδρική υπογονιμότητα αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα που ενδέχεται να αντιμετωπίζουν τα σύγχρονα ζευγάρια, τα οποία ετοιμάζονται να ξεκινήσουν τη δική τους οικογένεια. Ένα ποσοστό 15-20% των ζευγαριών αντιμετωπίζουν πρόβλημα υπογονιμότητας, όπου στο 40% των περιπτώσεων το πρόβλημα εντοπίζεται στον άνδρα, σε ένα ποσοστό 40% εντοπίζεται στη γυναίκα και σε ένα 20% είναι μικτής αιτιολογίας. Στη συγκεκριμένη εργασία μελετήθηκε ο ανδρικός παράγοντας και μάλιστα το κατά πόσο μπορούν ορισμένα ελλείμματα στο χρωμόσωμα Y να σχετιστούν με την υπογονιμότητα στον άνδρα. Η υπογονιμότητα που οφείλεται στο Y χρωμόσωμα προκαλείται από ελλείμματα σε περιοχές του Y χρωμοσώματος, τις ονομαζόμενες περιοχές AZFa, b, c. Πιστεύεται, ότι στα γονίδια στις περιοχές αυτές εμπεριέχονται πληροφορίες σχετικά με την κωδικοποίηση πρωτεϊνών που διαδραματίζουν κάποιο ρόλο στην ανάπτυξη του σπερματοζωαρίου όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή. Γίνεται αντιληπτό, ότι απουσία γενετικού υλικού μπορεί να αποτρέψει την παραγωγή πρωτεϊνών που είναι απαραίτητες στη φυσιολογική ανάπτυξη των κυττάρων, οδηγώντας έτσι σε εμφάνιση αζωοσπερμίας ή ολιγοσπερμίας.

Λόγω της συνήθως μικρής έκτασης τους, τα ελλείμματα δεν δύναται να προσδιοριστούν κυτταρογενετικά, αντιθέτως γίνεται χρήση συνδυασμού STS για τον εντοπισμό ελλειμμάτων. Γενικά έχουν ελεγχθεί πάνω από 131 STS, ωστόσο στην παρούσα μελέτη έγινε έλεγχος μόνο σε 7. Από αυτά τα 6 ήταν χωρισμένα σε 3 ζεύγη που εντοπίζονταν στα όρια των τριών AZF περιοχών, ενώ το έβδομο STS αφορούσε το γονίδιο SRY χρησιμεύοντας σαν ένα εσωτερικό control. Τα τρία διαφορετικά ζεύγη συνδέονται με τις τρεις διαφορετικές περιοχές AZF: a (sY_84 και sY_86), b (sY_127 και sY_134) και c (sY_254 και sY_255) και αναλύθηκαν με στόχο την εξασφάλιση μεγαλύτερης αξιοπιστίας των αποτελεσμάτων. Κάθε STS αντιπροσωπεύει μία μη πολυμορφική περιοχή και πιθανή απουσία ενίσχυσής του έπειτα από αντίδραση PCR υποδηλώνει την απουσία της αντίστοιχης περιοχής ενδιαφέροντος AZF στο χρωμόσωμα Y. Η ύπαρξη ή μη του εκάστοτε STS αναλύθηκε με τη χρήση της μεθόδου PCR και τα αποτελέσματα οπτικοποιήθηκαν με τη βοήθεια ηλεκτροφόρησης σε πηκτική αγαρόζη. Συνολικά πραγματοποιήθηκε ανάλυση 33 ατόμων στα οποία περιλαμβάνονται άτομα με φυσιολογικό και παθολογικό φαινότυπο σπέρματος.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε ανάλυση της ύπαρξης του STS sY_84 με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης. Τα τελικά αποτελέσματα αυτής έδειξαν ότι το συγκεκριμένο STS εντοπίζεται σε όλα τα άτομα, παρά το γεγονός ότι χρειάστηκε σε ορισμένα δείγματα να αυξηθεί η ποσότητα του DNA ή να μειωθεί η θερμοκρασία υβριδοποίησης - κατά ένα βαθμό - στους 53°C. Το ίδιο μοτίβο αποτελεσμάτων ανιχνεύθηκε και για το STS του sY_86, του sY_127 και του sY_134, τα οποία εντοπίστηκαν σε όλα τα άτομα. Ομοίως και για τα STS της περιοχής AZFc (sY_254 και sY_255) τα οποία ταυτοποιήθηκαν σε όλα τα άτομα που μελετήθηκαν. Τέλος, ένα STS του γονιδίου SRY χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας και η παρουσία του επιβεβαιώθηκε σε όλα τα δείγματα όπως ήταν αναμενόμενο. Με βάση τα αποτελέσματα καταλήγουμε στο συμπέρασμα πως κανένα από τα υπό μελέτη άτομα δεν εμφάνιζε ελλείμματα στις συγκεκριμένες περιοχές, γεγονός που υποδηλώνει ότι η παθολογία που εμφάνιζαν ως

προς τον αριθμό, την κινητικότητα και τη μορφολογία των σπερματοζωαρίων τους ίσως να μην οφείλεται σε ελλείμματα των συγκεκριμένων περιοχών.

Η ύπαρξη τέτοιων μικροελλειμμάτων στο Υ χρωμόσωμα αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 1976 από τους Tierolo & Zuffardi και έκτοτε έχει επιβεβαιωθεί από μια σειρά μελετών, μεταξύ των οποίων και σε μία έρευνα των Dada et al. (2004), όπου επιβεβαιώθηκε η παρουσία μικροελλειμμάτων και στις τρεις AZF περιοχές του χρωμοσώματος για το 6,01% (8 στους 133 άνδρες) του υπό μελέτη πληθυσμού. Επίσης, μία μελέτη σε ένα βραζιλιάνικο πληθυσμό έδειξε ότι το 6,7% των ατόμων παρουσίαζαν ελλείμματα σε κάποια από τις τρεις περιοχές AZF (SãoPedro et al., 2003). Σε έναν αντίστοιχο πληθυσμό στην Κίνα το 8,02% εμφάνιζε ελλείμματα στις προαναφερθείσες περιοχές (Zhang et al., 2013). Μια ακόμα εργασία, αυτή τη φορά σε Τούρκικο πληθυσμό, έδειξε ότι εντοπίστηκαν μικροελλείμματα στην περιοχή AZFc στο 5,3% των περιπτώσεων (8/150) (Ozdemir et al., 2007). Το μικρό μέγεθος του πληθυσμού των ατόμων με παθολογικό φαινότυπο σπέρματος που αναλύθηκαν δεν επέτρεψε την εύρεση μικροελλειμμάτων στο Υ χρωμόσωμα. Το επόμενο βήμα είναι η ανάλυση μεγαλύτερου όγκου δειγμάτων για τα ίδια STS ή και για περισσότερα από αυτά, η βελτιστοποίηση των συνθηκών της αντίδρασης ώστε να βγουν σαφή συμπεράσματα για τη χρησιμότητα αυτών των δεικτών. Ακόμα, θα πρέπει να επιβεβαιωθεί ή ειδικότητα των εξεταζόμενων STS μόνο για το χρωμόσωμα Υ, καθώς σε αντίθετη περίπτωση μπορεί να προκύψουν ψευδώς αρνητικά ως προς την ύπαρξη μικροελλείμματος αποτελέσματα. Συνεπώς, η διερεύνηση των ελλειμμάτων του Υ χρωμοσώματος σε μεγαλύτερη κλίμακα τόσο σε επίπεδο δειγμάτων αλλά και σε επίπεδο εξεταζόμενων STS παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον και μπορεί να εξελιχθεί σε ένα διαγνωστικό εργαλείο κυρίως στην περίπτωση της ιδιοπαθούς υπογονιμότητας και να οδηγήσει στην αποτελεσματική της θεραπεία.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Abou-Haila A. and Tulsiani R. (2000). Mammalian sperm acrosome: formation, contents, and function. *Biochemistry and Biophysics*. 379: 173–182.
2. Aitken R. J. (2006). Sperm function tests and fertility. *International journal of andrology*. 29: 69–75.
3. Aitken R. J., Buckingham D.W. and Fang H.G. (1993). Analysis of the responses of human spermatozoa to A23187 employing a novel technique for assessing the acrosome reaction. *J A. 14*: 132–141
4. Aitken R. J., Sutton M., Warner P. & Richardson D.W. (1985). Relationship between the movement characteristics of human spermatozoa and their ability to penetrate cervical mucus and zona-free hamster oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility*. 73: 441–449.
5. Alberio R., Zakhartchenko V., Motlik J. and Wolf E. (2001). Mammalian oocyte activation: lessons from the sperm and implications for nuclear transfer. *Int. J. Dev. Biol.* 45: 797 – 809
6. Alberts B, Dennis Bray, Karen Hopkin, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter. (2006) Βασικές Αρχές Κυτταρικής Βιολογίας Δομή ευκαρυωτικών χρωμοσωμάτων p. 210-211
7. Assumpção JG, Benedetti CE, Maciel-Guerra AT, Guerra G Jr, Baptista MT, Scolfaro MR, de Mello MP. (2002) Novel mutations affecting SRY DNA-binding activity: the HMG box N65H associated with 46,XY pure gonadal dysgenesis and the familial non-HMG box R30I associated with variable phenotypes. *J Mol Med (Berl)*. 2002 Dec;80(12):782-90.
8. Austin C.R. (1951). Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg. *Aust J Sci Res B*. 4: 581-596.
9. Aziz, N. The importance of semen analysis in the context of azoospermia. *Clinics (Sao Paulo)*, v. 68 Suppl 1, p. 35-8, 2013. ISSN 1807-5932.
10. Bedford J.M. (1979). Evolution of sperm maturation and sperm storage functions of the epidymis. *The spermatozoon*. Inc.7-21.
11. Barratt C., Kay V. and Oxenham S. (2007). The human spermatozoon – a stripped down but refined machine. *J.B.* 8:63
12. Barraud-Lange, V. et al. (2011) Seminal leukocytes are Good Samaritans for spermatozoa. *Fertil Steril*, v. 96, n. 6, p. 1315-9, Dec 2011. ISSN 0015-0282.
13. Barraud-Lange V., Boucheix C. (2013). The Role of Tetraspanin Complexes in Egg-Sperm Fusion. *Tetraspanins*. 9: 203-231
14. Bruce Alberts, Dennis Bray, Karen Hopkin, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter. 2006. Βασικές Αρχές Κυτταρικής Βιολογίας Δομή ευκαρυωτικών χρωμοσωμάτων p. 210-211
15. Buffone G.M., Ijiri W.T., Cao W., Merdiushev T., Aghajanian K. H., Gerton L. G. (2012). Heads or Tails? Structural events and molecular mechanisms that promote mammalian sperm acrosomal exocytosis and motility. *Mol Reprod Dev*. 79: 4–18.
16. Clermont Y. (1972). Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol Rev*. 52: 198–236
17. Chang M.C. (1951). Fertilizing capacity of spermatozoa desposited into the fallopian tubes. *Nature* 168: 697-698.
18. Chemes H.E., Puigdomenech E.T., Carizza C., Brugo O.S., Zanchetti F., et al.(1999). Acephalic spermatozoa and abnormal development of the head–neck attachment. A human

- syndrome of genetic origin. *Hum Reprod.* 14: 1811–8
19. Chocu S, Calvel P, Rolland AD & Pineau C. (2012) Spermatogenesis in mammals: proteomic insights. *Syst Biol Reprod Med* 58, 179–190.
 20. Cooper, T. G.; Weidner, W.; Nieschlag, E. (1990) The influence of inflammation of the human male genital tract on secretion of the seminal markers alpha-glucosidase, glycerophosphocholine, carnitine, fructose and citric acid. *Int J Androl*, v. 13, n. 5, p. 329–36.
 21. Dada, R., Gupta, N. P., & Kucheria, K. (2004). Yq Microdeletions—Azoospermia Factor Candidate Genes and Spermatogenic Arrest. *Journal of Biomolecular Techniques : JBT*, 15(3), 176–183.
 22. De Jonge J.C. and Barratt C. (2006). *The sperm cell (Production, Maturation, Fertilization, Regeneration)*. Cambridge University Press.
 23. de la Taille, A. et al. (1998) Correlation of genitourinary abnormalities, spermogram and CFTR genotype in patients with bilateral agenesis of the vas deferens. *Prog Urol*, v. 8, n. 3, p. 370–6.
 24. Eddy E.M., O'Brien D. (1994). *Mammalian fertilization. The physiology of reproduction*. 2nd ed. New York, USA: Raven Press p.29–78.
 25. Edwards R.G. and Broody S.A. (1995). *Principles and Practice of Assisted Human Reproduction*
 26. Fechner A., Fong S., McGovern P.A. (2008). Review of Kallmann syndrome: genetics, pathophysiology, and clinical management. *Obstet Gynecol Surv.* 63(3):189–94.
 27. Ferlin A., Raicu F., Gatta V., Zuccarello D., Palka G., Foresta C. (2007). Male infertility: role of genetic background. *Reprod Biomed* 14(6):734–45.
 28. Ford, C. E., Miller, O. J., Polani, P. E., de Almeida, J. C. & Briggs, J. H. (1959) A sex-chromosome anomaly in a case of gonadal dysgenesis (Turner's syndrome). *Lancet* 1, 711–713
 29. Foresta et al., (2001), Y chromosome microdeletions and alterations of spermatogenesis, *Endocrine Reviews*, 22 (2):226–239.
 30. Gadella B.M., Visconti A. (2006). Regulation of capacitation. *The Sperm Cell*. Cambridge. 134–69.
 31. Ganguly A., Bukovsky A., Sharma K. R., Bansal P., Bhandari B. and Gupta K. S. (2010). In humans, zona pellucida glycoprotein-1 binds to spermatozoa and induces acrosomal exocytosis. *Human Reproduction*. 25: 1643–1656.
 32. Garbers D.L., Tubb D.J. and Hyne R.V. (1982) A requirement of bicarbonate for Ca²⁺-induced elevations of cyclic AMP in guinea pig spermatozoa. *J Biol Chem.* 257: 8980–8984.
 33. Gimelli G, Gimelli S, Dimasi N, Bocciardi R, Di Battista E, Pramparo T, Zuffardi O. (2007) Identification and molecular modelling of a novel familial mutation in the SRY gene implicated in the pure gonadal dysgenesis. *Eur J Hum Genet.* 2007 Jan;15(1):76–80.
 34. Grace M. Centola (2014). *Semen Assessment, Urologic Clinics of North America Volume 41 Issue 1, February 2014, Pages 163–167.*
 35. Gupta K. S., Bhandari B., Shrestha A., Biswal K.B., Palaniappan C., Malhotra S.S., Gupta N. (2012). Mammalian zona pellucida glycoproteins: structure and function during fertilization. *Cell and Tissue Research.* 349: 665–678
 36. Hai, Y., J. Hou, Y. Liu, H. Yang, Z. Li, and Z. He, (2014), The roles and regulation of Sertoli cells in fate determinations of spermatogonial stem cells and spermatogenesis: *Semin Cell Dev Biol.*

37. Harraway, C., Berger, N. G., Dubin, N. H., (2000) Semen pH in patients with normal versus abnormal sperm characteristics. *Am J Obstet Gynecol*, v. 182, n. 5, p. 1045-7.
38. Haugen, T. B.; Grotmol, T. (1998) pH of human semen. *Int J Androl*, v. 21, n. 2, p. 105-8.
39. Hjollund N.H., Storgaard L., Ernst E., et al. (2002). The relation between daily activities and scrotal temperature. *Reprod Toxicol*. 16: 209–14.
40. Hughes D.C., Barratt C.L. (1999). Identification of the true human orthologue of the mouse Zp1 gene: evidence for greater complexity in the mammalian zona pellucida? *Biochim Biophys Acta*. 1447: 303-306.
41. Huynh, T., Mollard, R., Trounson, A. (2002). Selected genetic factors associated with male infertility. *Hum. Reprod*. 8: 183–198.
42. Ickowicz D., Finkelstein M., and Breitbart H. (2012). Mechanism of sperm capacitation and the acrosome reaction: role of protein kinases. *Asian J Androl*. 14: 816–821.
43. Inaba K. (2003.) Molecular Architecture of the Sperm Flagella: Molecules for Motility and Signaling. *Z.S.J.* 20: 1043–1056
44. Inoue N., Ikawa M., Isotani A., Okabe M. (2005). The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature*. 10: 434: 234-8.
45. Ivell R. (2007). Lifestyle impact and the biology of the human scrotum. *Reprod Biol Endocrinol*. 5: 15.
46. Jacobs, P. A. & Strong, J. A. (1959) A case of human intersexuality having a possible XXY sex determining mechanism. *Nature* **183**, 302-303
47. Jeske et al., (1995), Expression of a linear Sry transcript in the mouse genital ridge. *Nat Genet*, 10:480–482
48. Jodar, M., and R. Oliva, (2014), Protamine alterations in human spermatozoa: *Adv Exp Med Biol*, v. 791, p. 83-102.
49. Jung A., Schuppe H.C. (2007) Influence of genital heat stress on semen quality in humans. *Andrologia*. 39: 203–15
50. Keisuke K. and Akira K. (2004). The mechanism of sperm–oocyte fusion in mammals. *Reproduction*. 127: 423–429
51. Kellermayer R, Halvax L, Czakó M, Shahid M, Dhillon VS, Husain SA, Süle N, Gömöri E, Mammel M, Kosztolányi G. (2005) A novel frame shift mutation in the HMG box of the SRY gene in a patient with complete 46,XY pure gonadal dysgenesis. *Diagn Mol Pathol*. 2005 Sep;14(3):159-63.
52. Kent-First M., Muallem A., S., Pryor, J., Roberts K., Nolten W., et al. (1999). Defining regions of the Y-chromosome responsible for male infertility and identification of a fourth AZF region (AZFd) by Y-chromosome microdeletion detection. *Mol. Reprod. Dev*. 53: 27–41.
53. King TF, Conway GS. (2014) Swyer syndrome. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2014 Dec;21(6):504-10.
54. Koopman P., (1999), Sry and Sox9: mammalian testis-determining genes. *Cell Mol Life Sci*, 55:839–856
55. Krausz et al., (1999), Y chromosome and male infertility, *Frontiers in Bioscience*, 4:1-8
56. Krausz et al., (2006), Y chromosome and male infertility: Update 2006, *Frontiers in Bioscience*, 11: 3049-3061
57. Kruger T.F., et al. (1993). The self teaching programme for strict sperm morphology. Bellville, South Africa. MQ Medical.
58. Kuroda-Kawaguchi T., Skaletsky H., Brown L.G., Minx P.J., Cordum H.S., Waterston R.H., et al. (2001). The AZFc region of the Y chromosome features massive palindromes and uniform recurrent deletions in infertile men. *Nat. Genet*. 29: 279–286.

59. Lahn, B. T.; Page, D. C. (1999) Four evolutionary strata on the human X chromosome. In: (Ed.). Science. United States, v.286, 1999. p.964-7.
60. Lawrence Y., Whitaker M. and Swann K. (2007). Sperm-egg fusion is the prelude to the initial Ca²⁺ increase at fertilization in the mouse. *Development*. 124: 233-241.
61. Lazaros L., Xita N., Kaponis A., Zikopoulos K., Sofikitis N., Georgiou I. (2008). Evidence for association of sex hormone-binding globulin and androgen receptor genes with semen quality. *Andrologia*. 40: 186–191.
62. Leblond C.P., Clermont Y. (1952). Spermiogenesis of rat, mouse and guinea pig as revealed by the 'periodic acid-fuchsin sulfuric acid' technique. *Am J Anat*. 90: 167–206
63. Lefievre L., Conner S.J., Salpekar A., Olufowobi O., Ashton P., Pavlovic B., Lenton W., Afnan M., Brewis I.A., Monk M., Hughes D.C., Barratt C.L. (2004). Four zona pellucida glycoproteins are expressed in the human. *Hum Reprod*.19: 1580-1586
64. Mangs H. et al., (2007), The human Pseudoautosomal Region (PAR): Origin,Function and Future, *Current Genomics*, 8(2):129-136
65. Menkveld R., Holleboom A.G., Rhemrev J. (2011). Measurement and significance of sperm morphology. *A J A*.13: 59–68.
66. Meinhardt A., Wilhelm B., Seitz J. (1999). New aspect of spermatogenesis. Expression of mitochondrial marker proteins during spermatogenesis. *Hum Reprod*. 5 : 108-19.
67. Navarro-Costa, P., Gonçalves, J., & Plancha, C. E. (2010). Genetic Dissection of the AZF Regions of the Human Y Chromosome: Thriller or Filler for Male (In)fertility?. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* vol. 2010 Article ID 936569, 18 pages.
68. Navarro-Costa, P., Gonçalves, J., & Plancha, C. E. (2010). The AZFc region of the Y chromosome: at the crossroads between genetic diversity and male infertility. *Human Reproduction Update*, 16(5), 525–542.
69. O'Donnell L., Nicholls K. P., O'Bryan K. M., McLachlan I., Stanton G. (2001). The process of sperm release. *Spermatogenesis*. 1:14-35
70. O'Flynn O'Brien L. K., Varghese C. A., Agarwal A. (2010). The genetic causes of male factor infertility: A review. *Fertil Steril*. 93: 1–12
71. Oehninger S., Franken D., Alexander N. & Hodgen G. D. (1992) Hemizona assay and its impact on the identification and treatment of human sperm dysfunctions. *Andrologi*. 24: 307–321.
72. Ohno, S. (1967) *Sex Chromosomes and Sex-linked Genes* (Springer, Berlin, 1967)
73. Oko R. and Clermont Y. (1990). Mammalian spermatozoa: structure and assembly of the tail: *Biol Clin Asp*. 3-28.
74. Ozdemir O1, Gul E, Kilicarslan H, Gokce G, Beyaztas FY, Ayan S, Sezgin I, (2007). SRY and AZF gene variation in male infertility: a cytogenetic and molecular approach. *Int Urol Nephrol.*; 39(4):1183-9.
75. Painter, T. S. (1921) The Y-chromosome in mammals. *Science* **53**, 503-504
76. Palermo G., Joris H., Devroe P., van Sterteghem A.C. (1992). Pregnancies after intracytoplasmic injection of a single spermatozoon into an oocyte. *Lancet*. 340: 17-18
77. Parvinen M. (1982). Regulation of the seminiferous epithelium. *Endocr Rev*. 3: 404–417
78. Petrunkina A.M., Friedrich J., Drommer W., Bicker G., Waberski D., Topfer-Petersen E. (2001). Kinetic characterization of the changes in protein tyrosine phosphorylation of membranes, cytosolic Ca²⁺ concentration and viability in boar sperm populations selected by binding to oviductal epithelial cells. *Reproduction*. 122: 469-480
79. Phillips NB, Jancso-Radek A, Ittah V, Singh R, Chan G, Haas E, Weiss MA. (2006) SRY and human sex determination: the basic tail of the HMG box functions as a kinetic clamp to augment DNA bending. *J Mol Biol*. 2006 Apr 21;358(1):172-92.

80. Polakoski K.L., Syner F.N., Zaneveld L.D. (1976). Biochemistry of human seminal plasma. Human semen and fertility regulation in man. St Louis The Mosby Co. 133-1334
81. Poongothai J., Gopenath T.S., Manonayaki S. (2009). Genetics of human male infertility. Singapore Med J. 50: 336
82. Pryor J.L., Kent-First M., Muallem A., Van Bergen A.H., Nolten W.E., Meisner L., et al. (1997). Microdeletions in the Y chromosome of infertile men. N. Engl. J. Med. 336: 534–539.
83. Purvis K., Christiansen E. (1993). Infection in the male reproductive tract. Impact, diagnosis and treatment in relation to male infertility. Int J Androl. 16: 1-13
84. Racca JD, Chen YS, Maloy JD, Wickramasinghe N, Phillips NB, Weiss MA. (2014) Structure-function relationships in human testis-determining factor SRY: an aromatic buttress underlies the specific DNA-bending surface of a high mobility group (HMG) box. J Biol Chem. 2014 Nov 21;289(47):32410-29.
85. Radpour R., Gourabi H., Gilani M.A., Dizaj A.V. (2007). Molecular study of (TG) m(T)n polymorphisms in Iranian males with congenital bilateral absence of the vas deferens. J Androl. 28: 541–547
86. Rajesh K. N. and Preeti B.R. (2004). Role of tyrosine phosphorylation in sperm capacitation / acrosome reaction. Reproductive Biology and Endocrinology. 2:75
87. Ramalho-Santos J., Amaral A., Paula S.A., Rodrigues A. S., Martins L., Baptista M., Mota C. P., Tavares R., Amaral S. and Gamboa S. (2007). Probing the Structure and Function of Mammalian Sperm using Optical and Fluorescence Microscopy. Modern Research and Educational Topics in Microscopy.
88. Reijo R., Alagappan R.K., Patrizio P., Page D.C. (1996). Severe oligozoospermia resulting from deletions of azoospermia factor gene on Y chromosome. Lancet. 347: 1290–1293.
89. Rizvi AA. 46, XX man with SRY gene translocation: cytogenetic characteristics, clinical features and management. Am J Med Sci. 2008 Apr;335(4):307-9.
90. Rozen, S., Skaletsky H., Marszalek J., Minx P., Cordum H., Waterston R., Wilson R., Page D. (2003) Abundant gene conversion between arms of palindromes in human and ape Y chromosomes. Nature 423, 873-876
91. Russell L.D. (1993). Role in spermiation. In: Russell LD, Griswold MD. The Sertoli Cell. Cache River Press, Clearwater, Florida: 269–304 (a)
92. Russell L.D. (1993). "The Sertoli Cell," eds. by Russell L. D., Griswold M.D., Cache River Press, Clearwater, pp. 365—390 (b)
93. Saiki, R.K. et al. (1988). The polymerase chain reaction can synthesize millions of copies of a specific DNA sequence in a brief in vitro reaction. (Thermostable DNA polymerase from *Thermus aquaticus* improves the technique.) Science. 230: 1350-4.
94. Salas-Cortes et al., (1999), The human SRY protein is present in fetal and adult Sertoli cells and germ cells. Int J Dev Biol, 43:135–140
95. SãoPedro, S.L., Fraietta, R., Spaine, D., Porto, C.S., Srougi, M., Cedenho, A.P., & Avellar, M.C.W.. (2003). Prevalence of Y chromosome deletions in a Brazilian population of nonobstructive azoospermic and severely oligozoospermic men. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 36(6), 787-793.
96. Schiefer H.G. (1998). Microbiology of male urethroadnexitis: diagnostic procedures and criteria for aetiologic classification. Andrologia. 30: 7-13.
97. Selice R., Di Mambro A., Garolla A., Ficarra V., Iafrate M., Ferlin A., Foresta C. Spermatogenesis in Klinefelter syndrome. J Endocrinol Invest. 33: 789-93
98. Seminara S.B, Oliveira L.M.B, Beranova M., Hayes F.J., Crowley W.F. (2000). Genetics of

- hypogonadotropic hypogonadism, *Journal of endocrinological investigation*, vol.23,pp.560-565
99. Shefi S. and Turek J. P. (2006). Sex chromosome abnormalities and male infertility: a clinical perspective: In *The sperm cell (Production, Maturation, Fertilization, Regeneration)*. Cambridge University Press.
 100. Skaletsky H, Kuroda-Kawaguchi T, Minx PJ, Cordum HS, Hillier L, Brown LG et al. The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature* 2003; 423:825-837.
 101. Slack J.M.W. (2007). Βασικές Αρχές Βιολογίας Ανάπτυξης. Δεύτερη ελληνική έκδοση. Ακαδημαϊκές Εκδόσεις Ι. Μπάσδρα και ΣΙΑ Ο.Ε.
 102. Sophie Chocu, Pierre Calvel, Antoine D. Rolland and Charles Pineau. (2012)Spermatogenesis in mammals: proteomic insights. *Special Issue Systems Biology in Reproductive Medicine*, 58: 179–190: Focus on Proteomics and Reproduction.
 103. Stein KK, Primakoff P and Myles D (2004) Sperm-egg fusion: events at the plasma membrane. *J Cell Sci*. 117: 6269-6274.
 104. Stern, C. (1957) The problem of complete Y-linkage in men. *Am. J. Hum. Genet.* 9, 147-166
 105. Stouffs K., Lissens W., Tournaye H., Van Steirteghem A., Liebaers I. (2005). Possible role of USP26 in patients with severely impaired spermatogenesis. *Eur J Hum Genet.* 13: 336–340
 106. Sukcharoen N., Keith J., Irvine D. S. & Aitken R. J. (1995). Definition of the optimal criteria for identifying hyperactivated spermatozoa at 25 Hz using in vitro fertilization as a functional end-point. *Human Reproduction.* 10: 2928–2937.
 107. Tapanainen J.S., Aittomaki K., Min J., Vaskivuo T., Huhtaniemi I.T. (1997). Men homozygous for an inactivating mutation of the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor gene present variable suppression of spermatogenesis and fertility. *Nat Genet*, 15 pp. 205–206
 108. Tiepolo L, Zuffardi O (1976) Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm. *Hum Genetics* 34:119–124
 109. Turek P. Male ifertility. In: Tanagho P, McAninch J, eds. *Smith’s General Urology* McGraw-Hill Companies Inc: New York, 2008, pp. 684.
 110. Turner M. R. (2003). Tales from the tail: What do we really know review about sperm motility? *J Androl.* 24: 790-803.
 111. Vander A. (2011). Φυσιολογία του ανθρώπου. Όγδοη ελληνική έκδοση. Ακαδημαϊκές Εκδόσεις Π.Χ Πασχαλίδης.
 112. Visconti E. P. and. Kopf S. G. (1998). Regulation of Protein Phosphorylation during Sperm Capacitation. *BOR.* 59: 1–6.
 113. Vogt PH, Affara N, Davey P, Hammer M, Jobling MA, Lan YF, Mitchell M, Schempp W, Tyler-Smith C, Williams G, Yen P, Rappold GA. (1997) Report of the Third International Workshop on Y Chromosome Mapping 1997. *Cytogenet Cell Genet* 1997; 79:1-20.
 114. Vogt P.H., Edelmann A., Kirsch S., Henegariu O., Hirschmann P., Kiesewetter F., et al. (1996). Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11. *Hum. Mol. Genet.* 5: 933–943.
 115. Walsh T., Turek P. (2009). *Immunologic infertility. Infertility in the male.* 4th ed. New York City, NY: Cambridge University.
 116. Waters PD, Wallis MC, Marshall Graves JA. Mammalian sex--Origin and evolution of the Y chromosome and SRY. *Semin Cell Dev Biol.* 2007 Jun;18(3):389-400. Epub 2007 Feb 24.
 117. Weidner W., Krause W., Ludwig M. (1999). Relevance of male accessory gland infection for subsequent fertility with special focus on prostatitis. *Hum Reprod Update.* 5:421-32.
 118. Weyrich A. (2012). Preparation of genomic DNA from mammalian sperm. *Curr Protoc Mol*

Biol. 98:2.13.1–2.13.3.

119. Wisner H.J., Sandlow J., and Köhler Tobias S. (2012). Causes of Male Infertility. *Male Infertil.* 3-14
120. World Health Organization (2006) Reproductive health indicators for global monitoring: guidelines for their generation, interpretation and analysis for global monitoring. Geneva: World Health Organization. 63 p.
121. Yanagimachi, R. (1994). Mammalian fertilization. *The physiology of reproduction*. 2nd edition. New York, USA: Raven Press. 189–317.
122. Yen et al., (1990), Frequent deletions of the human X chromosome distal short arm result from recombination between low copy repetitive elements. *Cell*. 61, 603-610.
123. Yen PH.,(1999), Advances in Y chromosome mapping, *Curr Opin Obstet Gynecol*, 11:275–281
124. Ying L., Kimberly M., William E.L., Diana G. M., and Primakoff P. (1994). A Hyaluronidase Activity of the Sperm Plasma Membrane Protein PH-20 Enables Sperm to Penetrate the Cumulus Cell Layer Surrounding the Egg. *JBC*. 125: 1157-1163.
125. Zhang, Y.-S., Dai, R.-L., Wang, R.-X., Zhang, Z.-H., Fadlalla, E. and Liu, R.-Z. (2014), Azoospermia factor microdeletions: occurrence in infertile men with azoospermia and severe oligozoospermia from China. *Andrologia*, 46: 535–540
126. Zheng Li et al., (2008), "Micro-deletions" of the human Y chromosome and their relationship with male infertility, *J.Genet.Genomics*, 35:193-199
127. Zeng Y., Clark N.E., Florman M.H. (1995). Sperm Membrane Potential: Hyperpolarization during Capacitation Regulates Zona Pellucida-Dependent Acrosomal Secretion. *Develop. Biology*. 171: 554–563.
128. Zoragniotti A.W., MacLeod J. (1973). Studies in temperature, human semen quality, and varicocele. *Fertil Steril*. 24: 854–63.

