



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΝΙΚΟΛΕΤΑ ΤΟΡΟΦΙΑ

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ

ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2020

**Ανάλυση πολυμορφισμών σε μόρια κυτοκινών και
συσχέτισή τους με την ανδρική υπογονιμότητα.**

**Single nucleotide polymorphism analysis in
cytokines and correlation with male infertility.**

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΜΑΜΟΥΡΗΣ ΖΗΣΗΣ

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

ΣΑΡΑΦΙΔΟΥ ΘΕΟΛΟΓΙΑ

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

ΣΤΑΜΑΤΗΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ

Διδάκτορας - Μέλος του Εργαστηριακού Διδακτικού Προσωπικού (Ε.Δι.Π.) του τμήματος Βιοχημείας - Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

“Ποτέ δεν κάνει να εγκαταλείψουμε το όνειρο μας!
Τα όνειρα τρέφουν την ψυχή μας, όπως ακριβώς η τροφή τρέφει το σώμα μας.
Όσες φορές κι αν χρειαστεί να γευτούμε πίκρες στη ζωή μας
και να βλέπουμε τις ελπίδες μας να ναυαγούν,
εμείς πρέπει να συνεχίσουμε παρ’ όλα αυτά να ονειρευόμαστε.”

Paulo Coelho

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με την ολοκλήρωση της διπλωματικής μου εργασίας θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλλαν στην υλοποίησή της και με βοήθησαν ο καθένας με τον δικό τους τρόπο.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Ζήση Μαμούρη που μου ανέθεσε το συγκεκριμένο θέμα. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα Θεολογία Σαραφίδου και τον κ. Κωνσταντίνο Σταμάτη για τη συμμετοχή τους στην τριμελή επιτροπή.

Ιδιαίτερως, θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Μαρία Μαρκαντώνη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε από την αρχή ώστε να συνεργαστούμε για την εκπόνηση της συγκεκριμένης διπλωματικής. Θα ήθελα να την ευχαριστήσω για την καθοδήγησή της, την υπομονή της και το χρόνο που διέθεσε προκειμένου να ολοκληρωθεί η εργασία μου.

Επιπρόσθετα, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας που από την πρώτη στιγμή με έκαναν να αισθανθώ πολύ άνετα, με συμβούλευσαν και μου πρόσφεραν την πολύτιμη βοήθειά τους, όπου και όταν την χρειαζόμουν.

Επίσης, θα ήθελα να απευθύνω τι ευχαριστίες μου στην οικογένειά μου, τον άντρα μου και τα παιδιά μου, για την αγάπη τους και τη στήριξή τους από την αρχή μέχρι και την ολοκλήρωση της διπλωματικής μου. Απόλυτα καθοριστική και ανεκτίμητη υπήρξε η ηθική συμπαράσταση της μητέρας μου, που στέκεται βράχος δίπλα μου σε κάθε μου απόφαση και δύσκολη στιγμή. Ευχαριστώ πολύ τον πατέρα μου, που αν και δεν είναι στη ζωή, με προίκισε με όλα τα απαραίτητα εφόδια ώστε να μάθω να ανταπεξέρχομαι στις απαιτήσεις της ζωής, μου έμαθε να κυνηγάω τα όνειρά μου, να θέτω στόχους και να τους υλοποιώ. Τέλος ένα τεράστιο ευχαριστώ στον αδερφό μου και την αδελφή μου για την συμπαράσταση και ενθάρρυνσή τους.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα τελευταία χρόνια η υπογονιμότητα είναι ένα κοινό πρόβλημα που επηρεάζει ένα στα έξι ζευγάρια και το 50% αποδίδεται στον ανδρικό παράγοντα. Πολλές αρσενικές περιπτώσεις στειρότητας δεν έχουν εμφανή αιτία και χαρακτηρίζονται ως ιδιοπαθή. Όλο και περισσότερες μελέτες επικεντρώνονται στις κυτοκίνες, ρυθμιστικές πρωτεΐνες που παράγονται τόσο φυσιολογικά, όσο και παθολογικά στους όρχεις (ανοσολογική απόκριση) από πολλούς διαφορετικούς κυτταρικούς πληθυσμούς, κυρίως από τα σωματικά κύτταρα Sertoli και Leydig, καθώς και το μικροπεριβάλλον αυτών. Υπάρχουν ενδείξεις ότι ένα γενετικό υπόβαθρο, όπως οι πολυμορφισμοί σε γονίδια που εκφράζουν τις κυτοκίνες, σχετίζεται με τα τροποποιημένα επίπεδα της παραγωγής τους και κατά συνέπεια συμβάλουν στην αρσενική στειρότητα. Στη συγκεκριμένη διπλωματική θα επικεντρωθούμε στις γονιδιακές μεταλλάξεις και θα ερευνήσουμε μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς (single nucleotide polymorphism: SNPs) στα αυτοσωμικά γονίδια που εκφράζουν λειτουργικά τις κυτοκίνες IL1, IFN γ , TNF- α και IL8. Χρησιμοποιήθηκαν δείγματα σπέρματος από νορμοσπερμικούς και μη νορμοσπερμικούς άνδρες του Ελληνικού πληθυσμού από όπου έγινε η απομόνωση DNA, ακολούθησε ποσοτικός προσδιορισμός του απομονωμένου γενετικού υλικού, γονοτύπηση των δειγμάτων DNA και βιοπληροφορική ανάλυση αποτελεσμάτων με Plink. Εντοπίστηκαν πολυμορφισμοί στα μόρια των κυτοκινών, ωστόσο δεν παρουσιάζουν σημαντικές στατιστικές διαφορές μεταξύ των νορμοσπερμικών και μη νορμοσπερμικών δειγμάτων. Τέλος, η διερεύνηση πολυμορφισμών στις κυτοκίνες μπορεί να οδηγήσει στην έγκυρη διάγνωση, στην αποτελεσματική θεραπεία και την αποκατάσταση της ανδρικής υπογονιμότητας.

Λέξεις – κλειδιά: Ανδρική υπογονιμότητα, σπέρμα, κυτοκίνες, πολυμορφισμός, SNPs, Plink.

ABSTRACT

In recent years, infertility has been a common problem affecting one in six couples, with 50% of cases attributed to the male partner. Many cases of male infertility are idiopathic since they have no apparent cause. An increasing number of studies have been focusing on cytokines, a group of regulatory proteins produced either naturally or pathologically in the testes (immune response) by many and varied cell populations and, in particular, the Sertoli and Leydig cells, as well as in the microenvironment of the testes or the cells. There are indications that the genetic background, e.g., polymorphisms of the genes responsible for cytokine production, is causing altered levels of cytokine production, thus contributing to male infertility. In this thesis, we are focusing on gene mutations and examine single nucleotide polymorphisms (SNPs) in autosomal genes that functionally express IL1, IFN γ , TNF- α and IL8 cytokines. We used sperm samples from normospermic and non-normospermic men from the Greek population: after their DNA was isolated, quantitative determination of their genetic material ensued and followed by genotyping of DNA samples and bioinformatic analysis via Plink. Polymorphisms were detected in cytokines, but no statistically significant differences were found between normospermic and non-normospermic samples. Finally, the examination of polymorphisms in cytokines may lead to sound diagnosis, effective treatment and restored male fertility.

Keywords: Male infertility, sperm, cytokines, polymorphism, SNPs, Plink.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη.....	5
Abstract.....	6
A. Εισαγωγή.....	9
1. Ανδρικό αναπαραγωγικό σύστημα.....	9
1.1. Γενικά.....	9
1.2. Σπερματογένεση.....	10
1.3. Κύτταρα Sertoli.....	12
1.4. Κύτταρα Leydig.....	14
1.5. Διαδικασία σπερματογένεσης.....	15
1.6. Σπερματοζώαριο (spermatozoon).....	16
1.7. Σπέρμα (sperm).....	17
2. Ανδρική υπογονιμότητα.....	18
2.1. Ορισμός.....	18
2.2. Στατιστικά στοιχεία.....	18
2.3. Αίτια ανδρικής υπογονιμότητας.....	18
2.4. Κυτοκίνες.....	19
2.5. Γενετικές ανωμαλίες.....	23
2.6. Διάγνωση ανδρικής υπογονιμότητας.....	24
B. Σκοπός.....	29
Γ. Υλικά και μέθοδοι.....	30
1. Βιολογικό Υλικό.....	30
2. Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από σπέρμα.....	30
3. Χειρισμοί νουκλεϊκών οξέων.....	32
3.1. Εκχύλιση με φαινόλη/χλωροφόρμιο.....	32
3.2. Κατακρήμιση νουκλεϊκών οξέων με αιθανόλη.....	32
4. Ποσοτικός προσδιορισμός του DNA.....	33
4.1. Με χρήση φασματοφωτόμετρου.....	33
4.2. Με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.....	33
5. Γονοτύπηση δειγμάτων DNA.....	35
6. Ανάλυση αποτελεσμάτων αλληλούχισης με PLINK.....	36
6.1. Δημιουργία αρχείου ανάλυσης – ένωση αρχείων αλληλούχισης.....	37
6.2. Quality control (QC).....	38
6.3. Ανάλυση συσχέτισης - Association analysis.....	40
6.4. Εύρεση πολυμορφισμών SNPs.....	41

Δ. Αποτελέσματα- Συζήτηση.....	44
1. Ποσοτικός προσδιορισμός του DNA.....	44
2. Γονοτύπηση δειγμάτων DNA.....	44
3. Ανάλυση αποτελεσμάτων αλληλούχισης με PLINK	44
3.1. Δημιουργία αρχείου ανάλυσης – ένωση αρχείων αλληλούχισης.....	44
3.2. Quality control (QC).....	44
3.3. Ανάλυση συσχέτισης – Association Analysis.....	45
3.4. Εύρεση πολυμορφισμών SNPs.....	46
3.5. Αποτελέσματα συσχέτισης.....	46
Ε. Συμπεράσματα.....	47
Βιβλιογραφία.....	50
Περιεχόμενα για τους πίνακες	
Πίνακας 1.....	26
Πίνακας 2.....	45
Πίνακας 3.....	46
Πίνακας 4.....	46
Πίνακας 5.....	46
Πίνακας 6.....	46
Πίνακας 7.....	46
Περιεχόμενα για τις εικόνες	
Εικόνα 1.....	10
Εικόνα 2.....	11
Εικόνα 3.....	11
Εικόνα 4.....	12
Εικόνα 5.....	14
Εικόνα 6.....	15
Εικόνα 7.....	17
Εικόνα 8.....	35
Εικόνα 9.....	37
Εικόνα 10.....	37
Εικόνα 11.....	40
Εικόνα 12.....	42
Εικόνα 13.....	43
Εικόνα 14.....	44

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

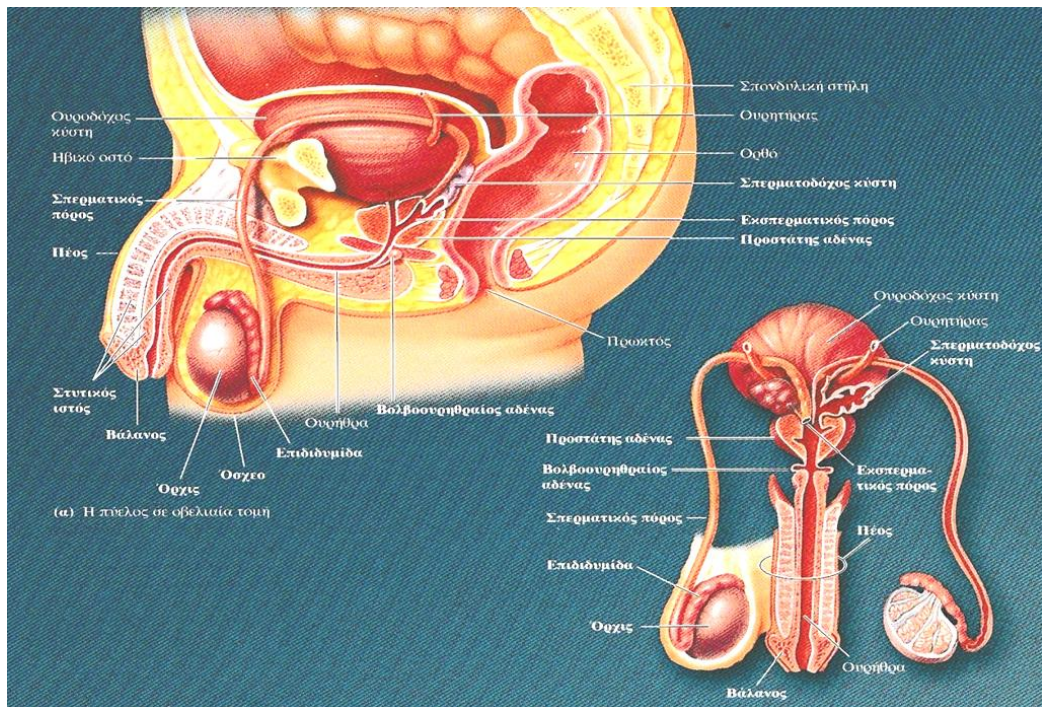
1. Ανδρικό αναπαραγωγικό σύστημα

1.1. Γενικά

Το ανδρικό αναπαραγωγικό σύστημα στον άνδρα αποτελείται από πολλά επιμέρους όργανα τους δύο όρχεις, την επιδιδυμίδα, τον σπερματικό πόρο, τη σπερματοδόχο κύστη, τον εκσπερματικό πόρο, το πέος, την ουρήθρα, τον προστάτη και τους βολβοουρηθραίους αδένες, (Εικόνα 1).

Οι όρχεις αποτελούν τα κύρια ή πρωτογενή αναπαραγωγικά όργανα του άνδρα (primary reproductive organs) ή γονάδες (gonads). Βρίσκονται μέσα στο όσχεο (ένα εκκόλπωμα από δέρμα ανάμεσα στο ανώτερο τμήμα των μηρών). Η λειτουργία του όσχεου είναι να προστατεύει τους όρχεις και να διατηρεί την φυσιολογική θερμοκρασία τους (1-8°C χαμηλότερη από την θερμοκρασία του σώματος). Οι όρχεις επιτελούν αναπαραγωγική, αλλά και ορμονική λειτουργία. Η αναπαραγωγική λειτουργία αποσκοπεί στη δημιουργία των γεννητικών κυττάρων, δηλαδή των σπερματοζωαρίων. Η ορμονική λειτουργία γίνεται από τα κύτταρα Leydig (LC), παράγοντας την τεστοστερόνη. Η τεστοστερόνη συμβάλει στην παραγωγή σπέρματος, καθώς επίσης προσδίδει και τα δευτερογενή ανδρικά χαρακτηριστικά στο άτομο κατά το ξεκίνημα της εφηβείας. Στο αρσενικό έμβρυο, οι όρχεις αναπτύσσονται κοντά στους νεφρούς, ύστερα κατέρχονται στο όσχεο λίγο πριν την γέννηση του βρέφους. Κάθε όρχις έχει περίπου 3 cm μήκος και 2,5 cm πλάτος, (Τζαλλά-Ρέγκα Αικατερίνη, 2014).

Το ανδρικό αναπαραγωγικό σύστημα είναι σχεδιασμένο να μεταφέρει τα σπερματοζωάρια στο γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα με το σπέρμα, ένα υγρό που μεταφέρει σπερματοζωάρια και συμβάλλει στην επιβίωσή τους. Οι κύριοι ανδρικοί επικουρικοί φυλετικοί αδένες, οι οποίοι εκκρίνουν τον μεγαλύτερο όγκο του υγρού του σπέρματος, είναι οι σπερματοδόχες κύστες, ο προστάτης και οι βολβοουρηθραίοι αδένες. Το πέος είναι το όργανο που χρησιμοποιείται για την μεταφορά και εναπόθεση του σπέρματος στη γυναίκα κατά τη συνουσία. Το σπέρμα εξέρχεται από κάθε όρχι μέσω της γεννητικής οδούς του ανδρικού αναπαραγωγικού συστήματος, η οποία μερικές φορές ονομάζεται και εκφορητική οδός του σπέρματος. Η ανδρική γεννητική οδός αποτελείται σε κάθε πλευρά από την επιδιδυμίδα, τον σπερματικό πόρο και τον εκσπερματικό πόρο. Οι εκφορητικές οδοί από τους δυο όρχεις εκβάλλουν στη μονήρη ουρήθρα, τον αγωγό που διατρέχει το πέος σε όλο το μήκος του και παροχετεύει τα ούρα και το σπέρμα στο εξωτερικό περιβάλλον, (Lauralee Sherwood, 2016) (Εικόνα 1).

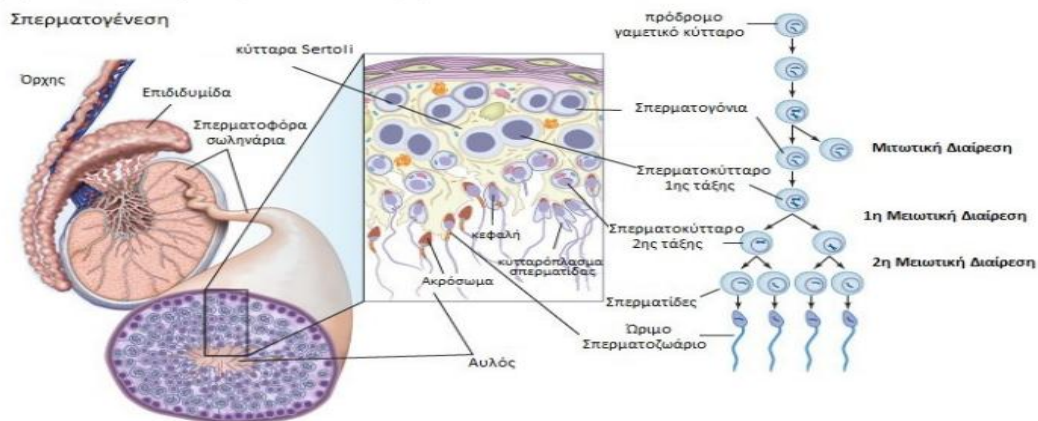


Εικόνα 1: Το ανδρικό αναπαραγωγικό σύστημα. Επάνω αριστερά: Η πύελος σε οβελιαία τομή και κάτω δεξιά: Οπίσθια άποψη των αναπαραγωγικών οργάνων, (Lauralee Sherwood, 2016).

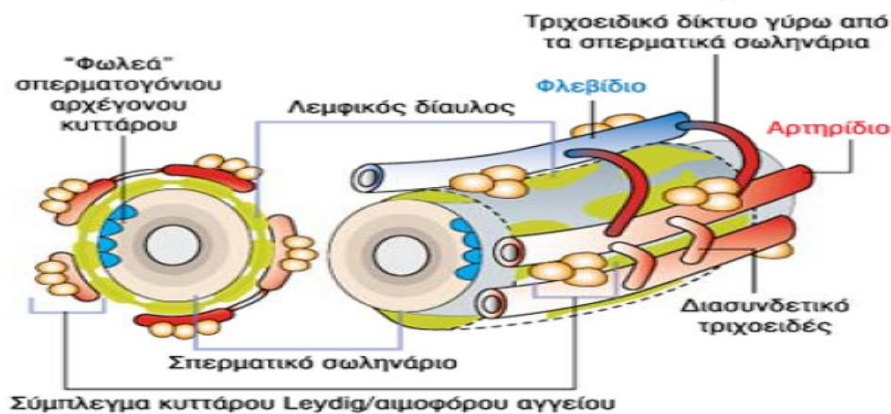
1.2. ΣΠΕΡΜΑΤΟΓΕΝΕΣΗ

Η σπερματογένεση είναι η περίπλοκη διαδικασία πολλαπλασιασμού των σχετικά αδιαφοροποίητων προγονικών ή αρχέγονων γεννητικών κυττάρων, των σπερματογονίων, τα οποία είναι διπλοειδή κύτταρα με 46 χρωμοσώματα και τη μετατροπή τους στα εξαιρετικά εξειδικευμένα, κινητά σπερματοζωάρια που φέρουν έναν τυχαίο συνδυασμό 23 χρωμοσωμάτων (απλοειδή κύτταρα), (Lauralee Sherwood, 2016).

Η σπερματογένεση πραγματοποιείται στους όρχεις και συγκεκριμένα σε όλα τα επίπεδα των σπερματοφόρων σωληναρίων (ΣΣ). Τα σπερματοφόρα σωληνάκια συγκεντρώνονται σε έναν αγωγό εκκένωσης του σπέρματος, που συνήθως καταλήγει σε μια διασταλμένη δομή, τη σπερματική κύστη. Τα σπερματοφόρα σωληνάκια περιβάλλονται από ινώδη χιτώνα και πολύστιχη κυτταρική στιβάδα που ονομάζεται σπερματικό επιθήλιο. Μέσα στο σπερματικό επιθήλιο, υπάρχουν τα σπερματογόνια κύτταρα, από τα οποία με διαφοροποίηση θα παραχθούν τα σπερματοζωάρια, καθώς και τα κύτταρα Sertoli (SC) (Εικόνα 2). Μεταξύ των σπερματοφόρων σωληναρίων υπάρχει ο διάμεσος ιστός του όρχι που αποτελείται από χαλαρό συνδετικό ιστό, αιμοφόρα αγγεία, λεμφικά αγγεία και τα ενδοκρινή κύτταρα που παράγουν τεστοστερόνη και ονομάζονται κύτταρα Leyding (LC) ή διάμεσα κύτταρα (Εικόνα 3) (Καρκαλούσος Πέτρος, 2009). Τα αιμοφόρα αγγεία και τα λεμφικά αγγεία χρησιμεύουν ως αγωγοί για ορμονικά σήματα που ρυθμίζουν τις λειτουργίες των όρχεων. Επίσης στο διάμεσο ιστό, σε στενή θέση στην περίμετρο του σπερματικού σωληναρίου υπάρχουν τα ανοσοκύτταρα, ειδικά ένα υποσύνολο μακροφάγων και μερικά διάσπαρτα ιστιοκύτταρα, (Loveland et al., 2017).



Εικόνα 2: 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 σπερματοζωάρια, (Νικηφορίδης Νικηφόρος, 2015).



Εικόνα 3: Διάμεσος ιστός σπερματικών σωληναρίων. Διακρίνονται ο χαλαρός ινοκολλαγονώδης ιστός, τα αιμοφόρα αγγεία: αρτηρίδια, φλεβίδια, τριχοειδή, τα λεμφικά αγγεία και οι αθροίσεις των κυττάρων Leydig (παραγωγή ανδρογόνων), (Χαβάκη Σοφία, 2016).

Ο υποθάλαμος, η υπόφυση, ο φλοιός των επινεφριδίων και οι όρχεις αποτελούν το ορμονικό γεννητικό σύστημα του άνδρα, το οποίο δρα σαν άξονας, δηλαδή το ένα όργανο επηρεάζει τη λειτουργία του άλλου. Ο άξονας «υποθάλαμος-υπόφυση-όρχεις» λειτουργεί αμφίδρομα. Ο υποθάλαμος δέχεται ερεθίσματα από το περιβάλλον, το Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (Κ.Ν.Σ.) και από τον όρχι και απελευθερώνει κατά ώσεις μια ορμόνη που λέγεται εκλυτική των γοναδοτροπινών ορμόνη (Gonadotropin Releasing Hormone, GnRH). Στη συνέχεια μεταφέρεται προς τον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης, όπου διεγείρει την έκκριση της θυλακιοτρόπου ορμόνης (Follicle Stimulating Hormone, FSH) και της ωχρινοτρόπου ορμόνης (Luteinising Hormone, LH).

Η FSH είναι μια γλυκοπρωτεΐνη που παράγεται και απελευθερώνεται κατά κύματα από τα κύτταρα του πρόσθιου λοβού της υπόφυσης. Ασκεί τη δράση της στα κύτταρα Sertoli. Τα αυξημένα επίπεδα της FSH αποτελούν ισχυρό δείκτη μη επανορθώσιμης βλάβης του σπερματικού επιθηλίου.

Η LH είναι επίσης μια γλυκοπρωτεΐνη που παράγεται από τα κύτταρα του πρόσθιου λοβού της υπόφυσης μαζί με την FSH. Η έκκρισή της στη συστηματική κυκλοφορία γίνεται κατά εκκριτικά κύματα. Η κύρια δράση της αφορά τα κύτταρα του Leydig. Η έκκριση της LH καταστέλλεται κυρίως από τη τεστοστερόνη (αλλά και από τους μεταβολίτες της, όπως η διϋδροτεστοστερόνη) και τα οιστρογόνα.

1.3. Κύτταρα Sertoli

Τα επιθηλιακά κύτταρα Sertoli διατάσσονται το ένα δίπλα στο άλλο δημιουργώντας ένα δακτύλιο γύρω από τον αυλό των σωληναρίων και κάθε κύτταρο Sertoli εκτείνεται σχεδόν από την εξωτερική επιφάνεια μέχρι τον αυλό του σωληναρίου, (Εικόνα 2). Μέχρι την εφηβεία αποτελεί τον κυρίαρχο τύπο του ΣΣ, μετά την εφηβεία το 10% των κυττάρων του ΣΣ και σε ηλικιωμένους άντρες αποτελεί έναν σημαντικό κυτταρικό πληθυσμό του ΣΣ, (Χαβάκη Σοφία, 2016). Επιτελούν τις παρακάτω βασικές λειτουργίες κατά τη σπερματογένεση.

1. Οι στενές συνδέσεις μεταξύ γειτονικών κυττάρων Sertoli σχηματίζουν το αιματορχικό φραγμό των όρχεων κατά την εφηβεία (Εικόνα 4), ο οποίος παρεμποδίζει την είσοδο των ουσιών από το αίμα στον αυλό των σπερματικών σωληναρίων. Μόνο επιλεγμένα μόρια περνάνε από τον αιματορχικό φραγμό μέσα από τα κύτταρα Sertoli (διακυτταρική μεταφορά) και φτάνουν στον αυλό των σπερματικών σωληναρίων.



Εικόνα 4: α) Κάθετη τομή του όρχεος, όπου διακρίνονται τα σπερματικά σωληνάρια, κύτταρα Sertoli και τα κύτταρα Leydig, β) Πορεία ωρίμανσης των σπερματικών κυττάρων, (Κατσαντώνη Δέσποινα, 2016).

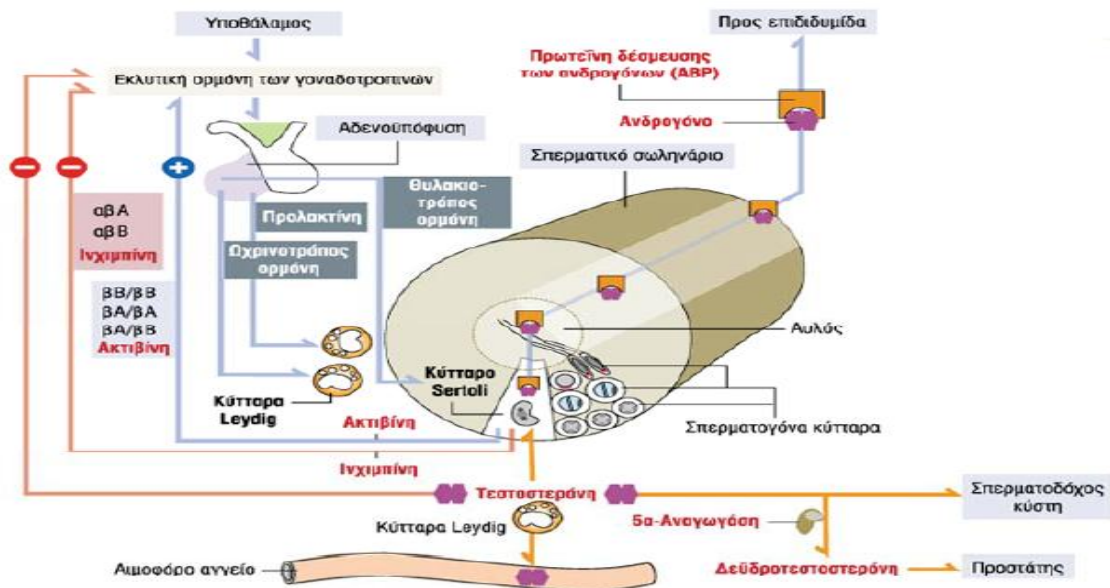
2. Επειδή τα αναπτυσσόμενα σπερματικά κύτταρα είναι απομονωμένα από την κυκλοφορία του αίματος και δεν έχουν άμεση πρόσβαση στα θρεπτικά συστατικά του αίματος τα κύτταρα Sertoli είναι τα βασικά τροφικά κύτταρα που τους παρέχουν θρέψη. Τα αναπτυσσόμενα σπερματικά κύτταρα δεν μπορούν να χρησιμοποιήσουν σε επαρκή βαθμό τη γλυκόζη ως θρεπτικό συστατικό. Τα κύτταρα Sertoli προσλαμβάνουν τη γλυκόζη μέσω του μεταφορέα GLUT-1 και τη μεταβολίζουν σε γαλακτικό οξύ, το οποίο στη συνέχεια προωθούν στα σπερματικά κύτταρα, που το χρησιμοποιούν ως πηγή ενέργειας.

3. Δρουν επίσης ως φαγοκύτταρα και η λειτουργία τους αυτή είναι ιδιαίτερη σημαντική. Εγκολπώνουν και απομακρύνουν το κυτταρόπλασμα που αποβάλλεται από τις σπερματίδες κατά τη διαφοροποίησή τους σε ώριμα σπερματοζώαρια και καταστρέφουν τα ελαττωματικά γεννητικά κύτταρα που αποτυγχάνουν να ολοκληρώσουν επιτυχώς όλα τα στάδια της σπερματογένεσης και έχουν σημαντική ανοσορυθμιστική λειτουργία. Λόγω της φαγοκυτταρικής τους ιδιότητας παράγουν και εκκρίνουν τις κυτοκίνες.

4. Παράγουν και εκκρίνουν το υγρό των σπερματικών σωληναρίων, το οποίο παρασύρει τα απελευθερωμένα σπερματοζώαρια στον αυλό των σωληναρίων προς την επιδιδυμίδα για αποθήκευση και περαιτέρω επεξεργασία.

5. Τα κύτταρα Sertoli αποτελούν τα κύτταρα στόχους της τεστοστερόνης και της ωοθυλακιοτρόπου ορμόνης (FSH) κατά τον έλεγχο της σπερματογένεσης. Τα κύτταρα Sertoli φέρουν διαφορετικούς υποδοχείς για τις δυο αυτές ορμόνες: ενδοκυτταρικούς υποδοχείς για την τεστοστερόνη και υποδοχείς στην κυτταρική μεμβράνη για την FSH, (Lauralee Sherwood, 2016).

6. Ορμονική ρύθμιση της λειτουργίας των όρχεων. Τα εμβρυικά κύτταρα Sertoli εκκρίνουν την αντιμυλλέριος ορμόνη (AMH). Από την εφηβεία και μετά ο υποθάλαμος εκκρίνει την εκλυτική των γοναδοτροπινών ορμόνη (GnRH) η οποία με τη σειρά της διεγείρει την αδενούπόφυση και εκκρίνεται η FSH η οποία δεσμεύεται από τους υποδοχείς των κυττάρων Sertoli. Στην συνέχεια επάγεται η έκκριση της πρωτεΐνης δέσμησης των ανδρογόνων (ABP), δεσμεύεται η τεστοστερόνη που εκκρίνεται από τα κύτταρα Leydig γεγονός που συντελεί στην ωρίμανση των σπερματογόνων κυττάρων και τη μεταφορά τους στην επιδιδυμίδα. Τέλος, σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της σπερματογένεσης παίζουν και δυο ακόμη ορμόνες που εκκρίνονται από τα κύτταρα Sertoli όπως η ινχιμπίνη, η οποία καταστέλλει, μέσω αρνητικής αντίδρασης την έκκριση της FSH και η ακτιβίνη που συμβάλει θετικά στην έκκριση της FSH, (Εικόνα 5).



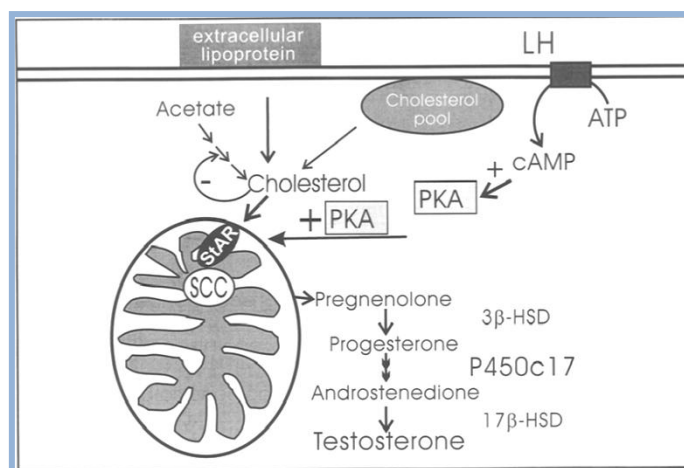
Εικόνα 5: Κύτταρα Sertoli – Leydig: Ορμονική ρύθμιση της λειτουργίας των όρχεων, (Χαβάκη Σοφία, 2016).

1.4. Κύτταρα Leydig

Τα κύτταρα Leydig βρίσκονται στο διάμεσο χώρο σχηματίζοντας σύμπλεγμα με τα αιμοφόρα αγγεία που βρίσκονται εκεί, (Εικόνα 3). Πολύ κοντά τους υπάρχουν τα μακροφάγα κύτταρα δημιουργώντας μια λειτουργική αλληλεπίδραση μεταξύ τους (ανοσοενδροκινική αλληλεπίδραση), (Hales et al., 1999). Διεγείρονται από την προλακτίνη που εκκρίνεται από την αδενούποφυση, έτσι αυξάνεται η έκφραση των υποδοχέων τους για τη δέσμευση της LH που εκκρίνεται επίσης από την αδενούποφυση. Η LH διεγείρει με τη σειρά της τα κύτταρα Leydig για την παραγωγή της τεστοστερόνης που είναι ένα από τα πιο βασικά βήματα της στεροειδογένεσης, (Εικόνα 5).

Βιοσύνθεση τεστοστερόνης

Η LH ενεργοποιεί την αδενική κυκλάση που καταλύει τη μετατροπή του ATP σε cAMP. Με την παραγωγή του cAMP ενεργοποιείται η δράση της πρωτεϊνικής κινάσης (PKA). Η PKA ενεργοποιεί την μετακίνηση της χοληστερόλης στο εσωτερικό των κυττάρων Leydig. Το πρώτο βήμα στη σύνθεση της τεστοστερόνης είναι η μετατροπή της χοληστερόλης (πρόδρομη ουσία στεροειδίων ορμονών) σε προγνενολόνη που λαμβάνει χώρα στα μιτοχόνδρια των κυττάρων Leydig με τη βοήθεια της οξείας ρυθμιστικής πρωτεΐνης (Steroidogenic acute regulatory protein: STAR), η οποία ρυθμίζει τη μεταφορά της χοληστερόλης στο εσωτερικό μιτοχονδριακό χώρο. Στη συνέχεια η προγνενολόνη διαχέεται στο λείο ενδοπλασματικό δίκτυο όπου μετατρέπεται σε προγεστερόνη και καταλήγει σε τεστοστερόνη, (Εικόνα 6).



Εικόνα 6: Βιοσυνθετικό μονοπάτι τεστοστερόνης στα κύτταρα Leydig, (Hales et al., 1999).

Στη συνέχεια η τεστοστερόνη δεσμεύεται από τους υποδοχείς των κυττάρων Sertoli, καθώς και από άλλους ιστούς όπου απαιτείται, όπως προστάτη, σπερματοδόχο κύστη. Στα κύτταρα Sertoli η τεστοστερόνη επιτελεί δυο βασικές λειτουργίες: συντελεί στη διαμόρφωση στέρεων συνδέσεων μεταξύ των κυττάρων Sertoli και αιματορχικού φραγμού και στην απελευθέρωση των ώριμων σπερματοζωαρίων από τα κύτταρα Sertoli στον αυλό των ΣΣ, (Hales et al., 1999).

1.5. Διαδικασία σπερματογένεσης

Η ανδρική γονιμότητα εξαρτάται από τις διαδικασίες παραγωγής και μεταφοράς του σπέρματος, τις διαδικασίες δηλαδή της σπερματογένεσης, οι οποίες είναι ιδιαίτερα πολύπλοκες και εμπλέκουν το νευρικό, το ενδοκρινικό αλλά και το ανοσοποιητικό σύστημα, (Katz et al., 2017)

Η διαδικασία της σπερματογένεσης από το σπερματογόνο μέχρι το ώριμο σπερματοζώαριο γίνεται για πρώτη φορά στην εφηβική ηλικία περίπου 13 ετών και διαρκεί περίπου 70 ημέρες. Σε κάθε χρονική στιγμή, διαφορετικά σπερματοφόρα σωληνάρια βρίσκονται σε διαφορετικά στάδια σπερματογένεσης. Καθημερινά ωριμάζουν έως και πολλές εκατοντάδες εκατομμύρια σπερματοζώαρια, (Lauralee Sherwood, 2016).

Η διαδικασία της σπερματογένεσης ξεκινά από τα πρόδρομα γεννητικά κύτταρα που βρίσκονται στην εξωτερική στιβάδα των σπερματοφόρων σωληναρίων, είναι περιορισμένος ο αριθμός τους και πολλαπλασιάζονται μιτωτικά. Μερικά από αυτά παραμένουν ως πρόδρομα γεννητικά κύτταρα, διατηρώντας ένα σταθερό απόθεμα, μια δεξαμενή σπερματογονίων, ενώ άλλα διαφοροποιούνται σε σπερματογόνια.

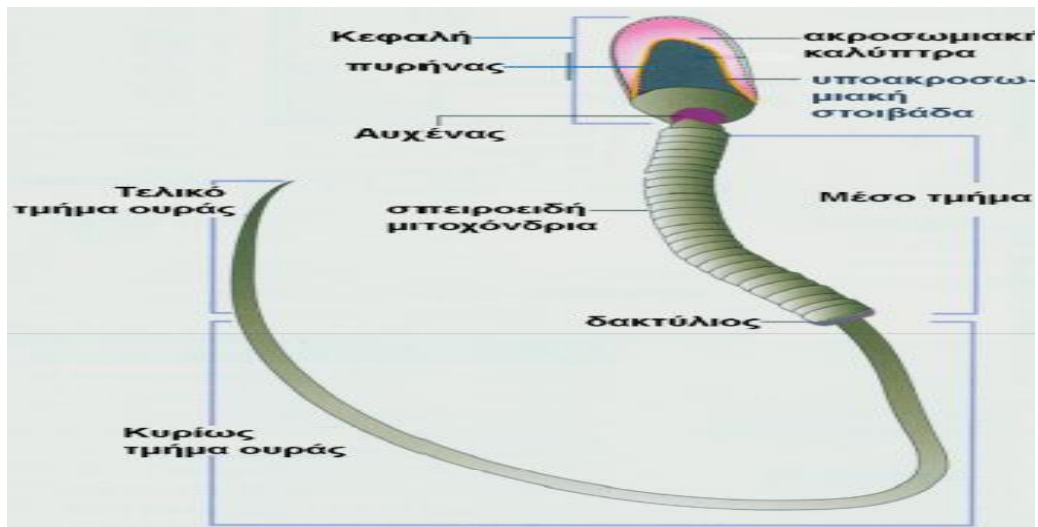
Στη ζώνη ανάπτυξης των σπερματοφόρων σωληναρίων τα διπλοειδή σπερματογόνια αρχίζουν τη μείωση κι έτσι κατά την πρόφαση I προκύπτουν τα σπερματοκύτταρα 1ης τάξεως, τα οποία είναι επίσης διπλοειδή (2n). Με την ολοκλήρωση της μείωσης για κάθε σπερματοκύτταρο 1ης τάξεως, στη ζώνη ωρίμανσης, προκύπτουν δύο σπερματοκύτταρα 2ης τάξεως, τα οποία είναι απλοειδή (n). Καθένα από αυτά

εισέρχεται σε μια ακόμη διαδικασία μείωσης (μείωση II) και τελικά προκύπτουν δύο απλοειδείς σπερματίδες (n) από κάθε σπερματοκύτταρο 2ης τάξεως. Στην ζώνη σπερματογένεσης, καθένα από τα τέσσερα σπερματίδια διαφοροποιείται σε λειτουργικό σπερματοζώαριο που απελευθερώνεται τελικά στον αυλό του σωληναρίου (Εικόνα 2 και 4), (Ζίφα et al., 2008).

Η παραγωγή των υψηλά εξειδικευμένων, κινητών σπερματοζωαρίων από τις σπερματίδες απαιτεί εκτεταμένη αναδιαμόρφωση ή πακετάρισμα, των κυτταρικών δομών των σπερματίδων μια διαδικασία που είναι γνωστή ως σπερμιογένεση. Τα σπερματοζωάρια είναι κύτταρα από τα οποία έχει σχεδόν απομακρυνθεί πλήρως το κυτταρόπλασμα, καθώς και οποιοδήποτε οργανίδιο που δεν είναι απολύτως αναγκαίο για την μεταφορά της γενετικής πληροφορίας του σπερματοζωαρίου στο ωάριο, (Lauralee Sherwood, 2016).

1.6. Σπερματοζώαριο (spermatozoon)

Τα ανθρώπινα σπερματοζωάρια είναι μικρά κύτταρα μήκους 65 μm (συμπεριλαμβανομένου και του μαστιγίου). Κάθε σπερματοζώαριο αποτελείται από τρία διακριτικά μέρη (Εικόνα 7): την κεφαλή που καλύπτεται από το ακρόσωμα, τον αυχένα, ένα μεσαίο τμήμα και την ουρά. Η κεφαλή αποτελείται κυρίως από τον πυρήνα, ο οποίος περιέχει το γενετικό υλικό του σπερματοζωαρίου. Το ακρόσωμα, ένα κυστίδιο γεμάτο με ένζυμα που καλύπτει την κορυφή της κεφαλής, λειτουργεί κυριολεκτικά ως ένα «ενζυμικό τρυπάνι» για τη διείσδυση του σπερματοζωαρίου στο ωάριο. Το ακρόσωμα είναι ένα τροποποιημένο λυσόσωμα και σχηματίζεται από τη σύνταξη κυστιδίων που παράγονται από το σύμπλεγμα ενδοπλασματικού δικτύου – συστήματος Golgi. Το ενδοπλασματικό δίκτυο - σύστημα Golgi των σπερματοζωαρίων αποβάλλονται μετά τον σχηματισμό του ακροσώματος. Τα ένζυμα του ακροσώματος παραμένουν ανενεργά μέχρι το σπερματοζώαριο να έρθει σε επαφή με το ωάριο, οπότε απελευθερώνονται. Το σπερματοζώαριο κινείται χάρη στην επιμήκη ουρά του που μοιάζει με μαστίγιο, η κίνηση της οποίας τροφοδοτείται ενεργειακά από τα μιτοχόνδρια του μεσαίου τμήματος του σπερματοζωαρίου, (Lauralee Sherwood, 2016).



Εικόνα 7: Σπερματογένεση - Ωριμο σπερματοζώαριο, (Σοφία Χαβάκη, 2016)

Τα σπερματοζώαρια μένουν στα σπερματοφόρα σωληνάκια με την κεφαλή τους καθηλωμένα στα κύτταρα Sertoli μέχρι να απελευθερωθούν στον αυλό των σωληναρίων και να φτάσουν στην επιδιδυμίδα, ένα σωλήνα που είναι εξαιρετικά περιελιγμένος και προκύπτει από τη συνένωση των σπερματοφόρων σωληναρίων. Εκεί, τα σπερματοζώαρια ολοκληρώνουν την ωρίμανσή τους και αποθηκεύονται. Τέλος, διατρέχοντας τον σπερματικό πόρο, φτάνουν στον προστάτη που είναι ένας σημαντικός αρσενικός αδένας, και εμπλουτίζονται με το προστατικό υγρό ώστε να σχηματιστεί το σπέρμα. Η προώθηση του σπέρματος γίνεται μέσω της σύσσης και της εκσπερμάτωσης, (Ζίφα et al., 2008).

1.7. Σπέρμα (sperm)

Το σπέρμα είναι λευκωπό, γλοιώδες, παχύρρευστο υγρό, μέσα στο οποίο βρίσκονται φυσιολογικά 50-120 εκατομμύρια σπερματοζώαρια για κάθε ml (Ζίφα et al., 2008). Έχει χαρακτηριστική οσμή και pH γύρω στο 7,8. Τα σπερματοζώαρια περιλαμβάνουν μόλις το 2% του συνολικού όγκου του σπέρματος, ενώ το υπόλοιπο 98% αποτελείται από το σπερματικό υγρό.

Σε αντίθεση με τα σπερματοζώαρια που παράγονται εξ' ολοκλήρου στους όρχεις το σπερματικό υγρό παράγεται κυρίως από τις σπερματοδόχες κύστες (60%) και τον προστάτη (20%). Το υπόλοιπο 20% προέρχεται από τους σπερματικούς πόρους, τους βολβουρηθραίους αδένες, τους ουρηθρικούς αδένες, την επιδιδυμίδα και τους όρχεις.

Το σπερματικό υγρό περιέχει πλήθος ουσιών για την επιβίωση των σπερματοζωαρίων: φρουκτόζη και άλλους υδατάνθρακες όπως σορβιτόλη, ινοσιτόλη, γλυκόζη, ριβόζη, λιπαρά οξέα αλλά και διάφορα οργανικά οξέα όπως ασκορβικό οξύ και γαλακτικό οξύ, διάφορα ένζυμα, οργανικές ουσίες όπως φλαβίνη (προσδίδει κίτρινη απόχρωση και φθορισμό), κιτρικό οξύ (προσδίδει όξινη αντίδραση), χολίνη, σπερμίνη κ.α., (Καρκαλούσος Πέτρος, 2009).

2. Ανδρική υπογονιμότητα

2.1. Ορισμός

Η υπογονιμότητα, σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (ΠΟΥ), ορίζεται κλινικά ως η αδυναμία σύλληψης από ένα ζευγάρι, έπειτα από τουλάχιστον ένα χρόνο τακτικής σεξουαλικής επαφής χωρίς προφυλάξεις.

Η υπογονιμότητα διακρίνεται σε δύο κατηγορίες: την πρωτοπαθή και την δευτεροπαθή.

Πρωτοπαθής υπογονιμότητα χαρακτηρίζεται η υπογονιμότητα κατά την οποία δεν αναφέρεται ιατρικό σύλληψης παρά τις, χωρίς αντισύλληψη, συχνές επαφές του ζευγαριού.

Δευτεροπαθής υπογονιμότητα ορίζεται η υπογονιμότητα κατά την οποία προηγήθηκε σύλληψη στο παρελθόν, αλλά δεν προέκυψε νέα κύηση παρά την από διαιτίας προσπάθεια του ζευγαριού.

2.2. Στατιστικά στοιχεία

Στην Ελλάδα υπολογίζεται ότι ποσοστό 10-15% των ζευγαριών, που βρίσκονται σε αναπαραγωγική ηλικία, αντιμετωπίζουν πρόβλημα γονιμότητας, (Καρκαλούσος Πέτρος, 2009).

Η συνεισφορά του ανδρικού παράγοντα αγγίζει το 50% των περιπτώσεων. Συγκεκριμένα, το 30% των περιπτώσεων οφείλεται αποκλειστικά στον ανδρικό παράγοντα ενώ το 20% οφείλεται σε συνδυασμό ανδρικού και γυναικείου παράγοντα, (Katz et al., 2017).

Η Στατιστική Υπηρεσία της Ευρωπαϊκής Επιτροπής “Eurostat” έδωσε στοιχεία για τον δείκτη γονιμότητας στην Ευρωπαϊκή Ένωση για το έτος 2017. Η Ελλάδα βρίσκεται στις τελευταίες θέσεις, ενώ οι Ελληνίδες τείνουν να τεκνοποιούν σε αρκετά μεγάλη ηλικία. Σύμφωνα με την Eurostat, ο λεγόμενος δείκτης γονιμότητας ήταν το 2017 στην Ελλάδα 1,35 (με 42.267 γεννήσεις) έναντι 1,38 το 2016, όταν στην Ευρωπαϊκή Ένωση το αντίστοιχο ποσοστό ήταν 1,59 σε σχέση με 1,60 το 2016, (Efsyn, 2019).

2.3. Αίτια ανδρικής υπογονιμότητας

Σε περισσότερους από τους υπογόνιμους άντρες, η αιτία της υπογονιμότητάς τους είναι άγνωστη (ιδιοπαθή) και μπορεί να είναι συγγενής ή επίκτητη, (Poongothai et al, 2009). Η ανδρική υπογονιμότητα είναι μια πολύπλοκη διαταραχή η οποία οφείλεται τόσο σε γενετικούς, όσο και σε μη γενετικούς παράγοντες, (ΠΟΥ 2010). Οι κυριότεροι από αυτούς συνοψίζονται παρακάτω:

- Γενετικές ανωμαλίες
- Συγγενείς ή επίκτητες ανωμαλίες του ουρογεννητικού συστήματος (Κρυπορχία)
- Ενδοκρινολογικές διαταραχές (Υποθάλαμο-υποφυσιακή ανεπάρκεια/δυσλειτουργία, Υπερθυρεοειδισμό, Υποθυρεοειδισμό, Πρωτοπαθής υπογοναδισμό, Σακχαρώδη διαβήτη, Υπερπρολακτιναιμία)
- Ανοσοβιολογικοί παράγοντες
- Όγκοι όρχεων
- Μολύνσεις ουρογεννητικού συστήματος (Male Accessory Gland Infections: MAGI)
- Φλεγμονές (Ορχίτιδα) - Λοιμώξεις αναπαραγωγικών οργάνων (Βακτηριακή λοίμωξη π.χ. από *Chlamydia trachomatis*, Gram αρνητικά μικρόβια: *E.coli*. Ιογενής λοίμωξη π.χ. από τους ιούς *Coxsackie*, *Epstein-Barr*, γρίπης), (Loveland et al., 2017).

Στην ανδρική υπογονιμότητα επιδρούν και ποικίλοι περιβαλλοντικοί παράγοντες, ο ρόλος των οποίων, όσο αυξάνουν τα χρόνια όλο και μεγαλώνει. Αυτοί μπορεί να είναι: φυσικοί (ακτινοβολία, μικροκύματα), χημικοί (μόλυβδος, υδράργυρος, εντομοκτόνα), φάρμακα, παχυσαρκία, ψυχολογικοί λόγοι, (Καρκαλούσος Πέτρος, 2009).

Αξίζει να αναφερθεί πως αρκετές από τις παραπάνω βασικές αιτίες όπως φλεγμονές, λοιμώξεις, κρυπορχία, MAGI ρυθμίζονται από φλεγμονώδεις κυτοκίνες που φαίνεται να έχουν βασικό ρόλο στη ρύθμιση της σπερματογένεσης.

Οι κυτοκίνες αυτές, που θα μας απασχολήσουν ιδιαίτερα και θα μελετήσουμε παρακάτω, παράγονται στους όρχεις και από τα σωματικά κύτταρα των Leydig και Sertoli, που συνδέονται με τη διακλαδιστική επικοινωνία χάσματος στο φράγμα αίματος-όρχεως. Επιπλέον, ρυθμίζουν την σπερματογένεση και επηρεάζουν την παραγωγή τεστοστερόνης, ενεργώντας σε πολλά επίπεδα του γοναδικού άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων (ΥΥΕ). Οποιαδήποτε ανισορροπία στην παραγωγή τους μπορεί να οδηγήσει σε υπογονιμότητα, (Syriou et al. 2018).

2.4. Κυτοκίνες

Οι κυτοκίνες ή κυτταροκίνες (cytokines) είναι μια οικογένεια με περισσότερες από 200 πρωτεΐνες (διαλυτές ή γλυκοπρωτεΐνες) μικρού μοριακού βάρους (μεταξύ 5 και 20 kDa), (Syriou et al., 2018).

Οι κυτοκίνες είναι ρυθμιστικές πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην αιμοποίηση, την ανάπτυξη ανοσοκυττάρων, τη φλεγμονή και τις ανοσολογικές αντιδράσεις, (Fraczek et al, 2015).

Όταν ανακαλύφθηκαν, υπήρχε η εντύπωση ότι παράγονται και εκκρίνονται μόνο από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, σε απόκριση της εισβολής από

κάποιους παθογόνους μικροοργανισμούς ή κάποιο σοβαρό τραυματισμό. Σήμερα, είναι γνωστό ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στη φλεγμονώδη απόκριση, ρυθμίζοντας τη φύση, την ένταση και τη διάρκειά της, και διαμορφώνοντας την επικοινωνία μεταξύ των διαφόρων κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος. Η ανεξέλεγκτη παραγωγή κυτοκινών οδηγεί σε σοβαρές παθολογικές καταστάσεις. Ωστόσο, οι κυτοκίνες δεν παράγονται αποκλειστικά από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Οι ινοβλάστες, τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα λιποκύτταρα και κύτταρα άλλων ιστών, όπως η ωοθήκη, οι όρχεις παράγουν κυτοκίνες.

Υπάρχουν δύο σημαντικοί ρόλοι που παίζουν οι κυτοκίνες στους όρχεις: ο πρώτος είναι ως μεσολαβητές παθοφυσιολογικών αποτελεσμάτων ανοσο-ενδοκρινικών αλληλεπιδράσεων κατά τη διάρκεια φλεγμονώδους νόσου και ο δεύτερος είναι ως παράγοντες ανάπτυξης και διαφοροποίησης που βοηθούν στην ενορχήστρωση κυτταρικών αλληλεπιδράσεων κατά τη διάρκεια φυσιολογικών λειτουργιών, (Hales et al., 1999).

Ο όρχις θεωρείται ανοσοποιητικό όργανο (ανοσολογικό προνόμιο) και έτσι είναι απαραίτητος για την υποστήριξη της ανάπτυξης της σπερματογένεσης προστατεύοντας τα γεννητικά κύτταρα από την καταστροφή. Ωστόσο, οι όρχεις είναι συνήθως εκτεθειμένοι σε παθογόνους παράγοντες που προέρχονται από αίμα, τραύμα ή μέσω του ουροποιογεννητικού συστήματος. Για να προστατευτεί από όλα αυτά τα παθογόνα, ο όρχις αναπτύσσει τοπική ανοσία (φλεγμονώδης αντίδραση), (Syriou et al., 2018)

Η εγγενής (φυσική) ανοσία διαμεσολαβείται από την παρουσία λευκοκυττάρων στους όρχεις, που βρίσκονται στο διάμεσο χώρο. Έτσι, οι κυτοκίνες παράγονται τόσο φυσιολογικά, όσο και παθολογικά στους όρχεις από πολλούς διαφορετικούς κυτταρικούς πληθυσμούς και μπορούν να βρεθούν στο σπερματικό πλάσμα, (Syriou et al., 2018). Απελευθερώνονται από τα μακροφάγα κύτταρα που είναι ο κύριος και πιο άφθονος υποπληθυσμός λευκοκυττάρων (επικουρικά κύτταρα που συμμετέχουν στην ανοσολογική απάντηση). Μπορούν να προωθήσουν τη φλεγμονώδη διαδικασία εκκρίνοντας προφλεγμονώδεις κυτοκίνες: την ιντερλευκίνη-1 (IL-1) και τον συντελεστή νέκρωσης όγκων-α (TNF-α). Επίσης, σημαντικές ποσότητες κυτοκινών εκκρίνονται από τα Τ λεμφοκύτταρα, τα δενδριτικά κύτταρα (Dendritic cells: DCs) και τα μαστοκύτταρα, (Fraczek et al., 2015).

Πολλές από τις κυτοκίνες παράγονται επίσης από τα κύτταρα SC και LC, σε απόκριση της διέγερσης από γοναδοτροπίνες (FSH και LH). Η παραγωγή των κοινών κυτοκινών εξηγεί την αμοιβαία αλληλεπίδραση μεταξύ των μακροφάγων, LC και SC: τα λευκοκύτταρα ασκούν τροφικά αποτελέσματα σε LC και SC και προκαλούν στεροειδογένεση, ενώ οι πληθυσμοί των λευκοκυττάρων επηρεάζονται κυρίως από το LC και το SC. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις, τόσο άμεσες όσο και έμμεσες, τονίζει το δυναμικό των μακροφάγων είτε για φλεγμονώδεις είτε για

ομοιοστατικές λειτουργίες, ανάλογα με τις περιβαλλοντικές επιρροές στις οποίες υποβάλλονται, (Syriou et al., 2018).

Ο χρόνος ημίσειας ζωής των κυτοκινών σε κυκλοφορία είναι σχετικά σύντομος. Μόλις κυκλοφορήσουν, δεσμεύονται από συγκεκριμένους υποδοχείς που βρίσκονται στην κυτταρική μεμβράνη.

Οι κυτοκίνες ταξινομούνται ως εξής:

Με βάση τα κύτταρα παραγωγής, οι κυτοκίνες διακρίνονται σε λεμφοκίνες (παράγονται από τα λεμφοκύτταρα), μονοκίνες (παράγονται από τα μακροφάγα/μονοκύτταρα), χημειοκίνες (εμπλέκονται ειδικά στις διαδικασίες έναρξης της φλεγμονής) και ιντερλευκίνες (παράγονται κυρίως από τα Τ-λεμφοκύτταρα και ασκούν τη δράση τους σε άλλα λεμφοκύτταρα).

Με βάση τη δομή τους, οι κυτοκίνες μπορούν να χωριστούν σε πέντε οικογένειες. Εκείνες που ανιχνεύονται στο ανθρώπινο σπέρμα και θα μελετήσουμε ιδιαίτερα είναι:

Ιντερλευκίνες (interleukins, ILs). Μέχρι σήμερα έχουν αναγνωρισθεί 18 ιντερλευκίνες. Από αυτές εκείνες που θα μελετήσουμε είναι η προφλεγμονώδης IL-1 που φυσιολογικά στους όρχεις ρυθμίζει τη σπερματογένεση και αυξάνεται σε περιπτώσεις δυσπερμίας (σιωπηλή στειρότητα). Παράγεται και εκκρίνεται, φυσιολογικά, από τα κύτταρα Sertoli, ώστε να διατηρηθούν τα φυσιολογικά επίπεδα στα διάμεσα υγρά των όρχεων, αλλά και σε απόκριση της φλεγμονώδης αντίδρασης λόγω της φαγγοκυτταρικής τους ιδιότητας, (Hales et al., 1999). Επίσης, παράγεται και από τα μακροφάγα κύτταρα του μικροπεριβάλλοντος των κυττάρων Leydig. Η αυξημένη έκκριση της IL-1 εμποδίζει την μετατροπή της προγεστερόνης σε τεστοστερόνη που γίνεται στα κύτταρα Leydig και κατά συνέπεια εμποδίζεται η σπερματογένεση, (Hedger et al., 2002).

Στο εγγύς μέλλον, οι ιντερλευκίνες μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες παρακολούθησης για θεραπείες. Αυτό υποστηρίζεται από το γεγονός ότι η χρήση της επανασυνδυασμένης FSH σε άνδρες με μη αποφρακτική αζωοσπερμία είχε θετική επίδραση στο προφίλ ανδρικής υπογονιμότητας, τροποποιώντας ευνοϊκά την έκφραση των κυτοκινών, (Syriou, et al. 2018).

Ιντερφερόνες (interferons, IFNs). Οι ιντερφερόνες (IFN) είναι μια πολύ μεγάλη οικογένεια κυτοκινών με ισχυρές αντιϊκές δράσεις, οι οποίες ταξινομούνται ως τύπου I (IFN α ή IFN β) ή τύπου II (IFN γ). Η IFN γ , που θα μελετήσουμε, παράγεται κανονικά από Τ-λεμφοκύτταρα και διαδραματίζει έναν ανοσορυθμιστικό ρόλο. Τόσο οι ιντερφερόνες τύπου I όσο και οι ιντερφερόνες τύπου II έχουν βρεθεί στους όρχεις, ιδιαίτερα στα σωματικά κύτταρα Sertoli και Leydig. Συμβάλουν στην προστασία των όρχεων από τις ιογενείς λοιμώξεις και έχει αποδειχθεί ότι, *in vitro*, αναστέλλουν την στεροειδογένεση των κυττάρων Leydig, μέσω αναστολής της έκφρασης της οξείας ρυθμιστικής πρωτεΐνης (Star). Μελέτες έχουν δείξει ότι η IFN γ ευθύνεται παθολογικά

για την αυτοάνοση ορχίτιδα και είναι αυξημένη σε ανεξήγητες περιπτώσεις στειρότητας, (Hales et al., 1999, Hedger et al, 2002).

Παράγοντες νέκρωσης όγκων (tumor necrosis factor, TNF). Τα σημαντικότερα μέλη της οικογένειας αυτής είναι ο παράγοντας νέκρωσης όγκων-α (TNF-α) και ο παράγοντας νέκρωσης όγκων-β (TNF-β) ή λεμφοτοξίνη (lymfotoxin, LT).

Ο TNF-α, που θα μελετήσουμε συμβάλλει στη ρύθμιση της λειτουργίας του αιματορρικού φραγμού και κατά συνέπεια παίζει σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο στην ανάπτυξη και την κανονική λειτουργία των όρχεων. Εκκρίνεται από βλαστικά κύτταρα κυρίως σπερματοκύτταρα παχυτενίου και σπερματίδες, καθώς και από τα κύτταρα Sertoli, ενώ οι υποδοχείς του περιορίζονται στα κύτταρα Sertoli, (Drożdżik et al, 2015). Επίσης, εκκρίνεται από μονοκύτταρα, μακροφάγα κύτταρα και δενδριτικά κύτταρα του μικροπεριβάλλοντος των κυττάρων Leydig. Είναι μια πλειοτροπική κυτοκίνη που έχει εμπλακεί σε πολλές δραστηριότητες κυτταρικού συστήματος. Επιπλέον, σε μια λοίμωξη παρέχει ταχεία άμυνα έναντι του ξενιστή, ωστόσο είναι μια κυτταροτοξική πρωτεΐνη που μέσω υποδοχέων οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο, (Tronchon et al., 2018). Σε υψηλές συγκεντρώσεις αναστέλλει την παραγωγή της τεστοστερόνης στα LC. Μελέτες έχουν δείξει ότι παθολογικά ευθύνεται για την αυτοάνοση ορχίτιδα, (Hedger et al., 2002).

Χημειοκίνες. Διευκολύνουν τις φλεγμονώδεις αντιδράσεις προκαλώντας την έλξη των λευκοκυττάρων στο σημείο της φλεγμονής/λοίμωξης. Από τις χημειοκίνες εκείνη που θα μελετήσουμε ιδιαίτερα είναι η προφλεγμονώδης IL8 η οποία πιστεύεται ότι θα μπορούσε να είναι ένας από τους πιο αξιόπιστους και προγνωστικούς δείκτες, σπερματικού πλάσματος, της προστατίτιδας (Fraczek et al, 2015). Σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Ένωση Ουρολογίας (European Association of Urology: EAU) και την Ευρωπαϊκή Κοινωνία της Ανδρολογικής Ουρολογίας (European Society of Andrological Urology: ESAU), η IL-8 αναφέρεται ως ένας από τους ευαίσθητους δείκτες «αθόρυβης υπογονιμότητας», (Syriou et al. 2018).

Παράγοντες διεγερτικοί αποικιών (colony stimulating factors, CSFs), (Syriou et al, 2018).

Ο τρόπος δράσης των κυτοκινών διακρίνεται σε αυτοκρινή (προσδένεται σε υποδοχείς του ίδιου του κυττάρου που την εκκρίνει), σε παρακρινή (προσδένεται σε υποδοχείς κυττάρων στόχων που βρίσκονται κοντά στο κύτταρο που την εκκρίνει), καθώς και σε ενδοκρινή (προσδένεται σε υποδοχείς κυττάρων που βρίσκονται σε απομακρυσμένα μέρη, από το κύτταρο έκκρισης της). Μια κυτοκίνη μπορεί να έχει διαφορετικές δράσεις σε διαφορετικά κύτταρα και ιστούς γι' αυτό ονομάζεται και πλειοτροπική. Στην περίπτωση που το ίδιο το αποτέλεσμα μπορεί να επιτυγχάνεται από τη δράση διαφορετικών κυτοκινών, το φαινόμενο αυτό ονομάζεται πλεονασμός.

Στη περίπτωση που δυο κυτοκίνες ασκούν την ίδια δράση στο κύτταρο στόχο, τότε ασκούν συνεργική δράση, ενώ όταν μια κυτοκίνη εμποδίζει τη δράση μιας άλλης τότε οι δυο κυτοκίνες έχουν ανταγωνιστική δράση. Μερικές κυτοκίνες μπορεί να παράγονται κατά τη διέγερση διαφόρων κυττάρων από άλλες κυτοκίνες. Αυτό το δίκτυο αλληλεπιδράσεων μεταξύ των κυτοκινών αναφέρεται σαν «δίκτυο κυτοκινών», (Medical mate, 2010).

Σε υγιείς ιστούς όρχεων, η φυσιολογική ανάπτυξη των γεννητικών κυττάρων δεν επηρεάζεται από την παρουσία των ανοσοκυττάρων και των κυτοκινών τους. Αντίθετα, μια αλλαγή της ανοσοποιητικής ομοιόστασης, που σχετίζεται με λοίμωξη και φλεγμονή, μπορεί να οδηγήσει σε ανδρική υπογονιμότητα. Στη νεοπλασία των βλαστικών κυττάρων των όρχεων, υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι το περιβάλλον των ανοσοκυττάρων διαταράσσεται σοβαρά (Loveland et al., 2017). Η ορχίτιδα είναι γενικά αποδεκτή ως αιτία για την ανδρική στειρότητα. Η χρόνια ορχίτιδα, παρά το γεγονός ότι είναι ασυμπτωματική, μπορεί να είναι αιτία υπογονιμότητας, μέσω της απορρύθμισης του μικροπεριβάλλοντος των όρχεων, (Syriou et al., 2018).

Υπάρχουν ενδείξεις ότι ένα γενετικό υπόβαθρο, όπως οι πολυμορφισμοί σε γονίδια που εκφράζουν τις κυτοκίνες, σχετίζεται με τα τροποποιημένα επίπεδα της παραγωγής τους και κατά συνέπεια συμβάλουν στην αρσενική υπογονιμότητα, (Fraczek et al., 2015).

2.5. Γενετικές ανωμαλίες

Οι γενετικές ανωμαλίες αποτελούν έναν από τους σημαντικότερους αιτιολογικούς παράγοντες της ανδρικής υπογονιμότητας σε ποσοστό 15-30%.

Είναι πολύ σημαντικό να γίνει διερεύνηση της γενετικής βάσης της ανδρικής υπογονιμότητας καθώς μέθοδοι υποβοηθούμενης αναπαραγωγής χρησιμοποιούνται όλο και πιο συχνά, όπως η εξωσωματική γονιμοποίηση (IVF) και η ενδοκυτταροπλασματική σπερματέγχυση (ICSI), επιτρέποντας πολλές φορές την κληρονόμηση μεταλλάξεων στους απογόνους. Επομένως, στόχος είναι η κάθε περίπτωση ανδρικής υπογονιμότητας να αντιμετωπίζεται ξεχωριστά με βάση τη γενετική βάση, ώστε να προτείνεται η καλύτερη λύση με τη μικρότερη δυνατή επίδραση στην επόμενη γενιά.

Οι πιο συχνές γενετικές ανωμαλίες σε άνδρες με υπογονιμότητα είναι οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες, τα μικροελλείματα στο Y χρωμόσωμα και οι γονιδιακές μεταλλάξεις. Όλες οι παραπάνω μπορούν να επηρεάσουν ένα εύρος φυσιολογικών διαδικασιών όπως την ορμονική ομοιόσταση, τη σπερματογένεση και την ποιότητα του σπέρματος, (O'Flynn O' Brien et al., 2010).

Στη συγκεκριμένη διπλωματική θα επικεντρωθούμε στις γονιδιακές μεταλλάξεις και θα ερευνήσουμε μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς (single nucleotide polymorphism: SNPs) που αφορούν την αλλαγή σε ένα μόνο ζεύγος βάσεων σε μια

θέση του γονιδιώματος και συγκεκριμένα στα αυτοσωμικά γονίδια που εκφράζουν τις κυτοκίνες IL1, IFN γ , TNF- α και IL8.

Ο πολυμορφισμός ενός νουκλεοτιδίου (SNP) είναι η απλούστερη μορφή παραλλαγής DNA μεταξύ ατόμων. Δημιουργούνται από αυθόρμητες μεταλλαγές κατά την αντιγραφή. Εμφανίζονται σε όλο το γονιδίωμα με συχνότητα περίπου 1 στα 1.000 bp και ευθύνονται για το 90-95% της ποικιλομορφίας του ανθρώπινου γονιδιώματος. Μπορεί να είναι υπεύθυνοι για την ποικιλομορφία μεταξύ των ατόμων, την εξέλιξη του γονιδιώματος, τα πιο συνηθισμένα οικογενειακά χαρακτηριστικά, όπως τα σγουρά μαλλιά, τις διαφορές στην ανταπόκριση στα φάρμακα και τις σύνθετες και κοινές ασθένειες, όπως ο διαβήτης, η παχυσαρκία, η υπέρταση και οι ψυχιατρικές διαταραχές.

Τα SNPs μπορεί να αλλάξουν τα κωδικοποιημένα αμινοξέα (μη συνώνυμα) ή να είναι σιωπηλά (συνώνυμα) και επομένως δεν αλλάζουν την πρωτεϊνική ακολουθία ή απλά να εμφανιστούν στις περιοχές που δεν κωδικοποιούν αμινοξέα, όπως συμβαίνει στις αμετάφραστες περιοχές ενός γονιδίου και σε κάποιες περιπτώσεις ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση (ιντρόνια, υποκινητή, 5'UTR και 3'UTR περιοχές). Επομένως, ο εντοπισμός πολλών παραλλαγών στα γονίδια και η ανάλυση των επιπτώσεών τους μπορεί να οδηγήσει σε καλύτερη κατανόηση του αντικτύπου τους στη γονιδιακή λειτουργία και την υγεία ενός ατόμου, (Shastry B.S., 2009).

2.6. Διάγνωση ανδρικής υπογονιμότητας

Λήψη Ατομικού Ιστορικού

Η διερεύνηση της ανδρικής υπογονιμότητας ξεκινά με ένα λεπτομερές ιστορικό, που περιλαμβάνει πιθανές ιατρικές, χειρουργικές, γενετικές, συγγενής και περιβαλλοντικές αιτίες. Περιλαμβάνει επίσης λεπτομέρειες σχετικά με τον τρόπο ζωής και το ιατρικό οικογενειακό ιστορικό, (Katz et al., 2017).

Κλινική εξέταση

Η κλινική εξέταση μπορεί να αποκαλύψει σημαντικά στοιχεία για την κατάσταση του ανδρικού ουρογεννητικού συστήματος.

Με την κλινική εξέταση ο ιατρός σχηματίζει μια γενική άποψη για τα σωματικά χαρακτηριστικά του εξεταζόμενου (αναλογίες σώματος, ύψος, μήκος άκρων, δείκτης σωματικής μάζας), με έμφαση στα γεννητικά όργανα και τους δευτερογενείς χαρακτήρες του φύλλου (τριχοφυΐα, μυϊκή μάζα, διαμόρφωση στήθους), (Τζαλλά-Ρέγκα Αικατερίνη, 2014).

Εργαστηριακός έλεγχος

Ορμονολογικές Εξετάσεις

Στο πλαίσιο του ελέγχου της υπογονιμότητας ενός άντρα, είναι απαραίτητο να μετρηθούν τα επίπεδα κάποιων ορμονών, με τη λήψη περιφερικού φλεβικού αίματος, που μπορούν άμεσα ή έμμεσα να επηρεάσουν την παραγωγή σπερματοζωαρίων. Οι

κυριότερες ορμόνες που πρέπει να διερευνηθούν είναι η ωοθυλακιοτρόπος ορμόνη (Follicle Stimulating Hormone: FSH), η ωχρινοτρόπος ορμόνη (Lutenizing Hormone: LH), η τεστοστερόνη (Testosterone: T) και η προλακτίνη (Prolactin: PRL), καθώς και ο έλεγχος της θυρεοειδικής λειτουργίας με προσδιορισμό της θυρεοτρόπου ορμόνης (Thyroid-Stimulating Hormone: TSH) και της ελεύθερης θυροξίνης (fT4).

Βιοχημικές εξετάσεις

Οι βιοχημικές εξετάσεις του σπέρματος δίνουν πληροφορίες για την λειτουργία των επικουρικών αδένων. Πιο συγκεκριμένα, για την λειτουργία του προστάτη (όξινη φωσφατάση, κιτρικό οξύ, ο ψευδάργυρος και το μαγνήσιο), για την λειτουργία των σπερματικών πόρων (φρουκτόζη και οι προσταλαγανίδες), για την επιδιδυμίδα (η ουδέτερη α-γλυκοσιδάση, η καρνιτίνη και η γλυκερυλ-φωσφωρυλ-χολίνη).

Ανοσολογικός έλεγχος

Υπάρχουν περιπτώσεις που η υπογονιμότητα του άνδρα οφείλεται σε αυτοάνοσα αίτια. Τέτοια είναι τα αντισπερματικά αντισώματα που παράγονται στον άνδρα και δρουν εναντίον των σπερματοζωαρίων τα οποία αναγνωρίζουν ως ξένες ουσίες, δηλαδή ως αντιγόνα. Πρόκειται για αντιγόνα της τάξεως IgA και IgG. Τα αντισώματα αυτά προσκολλώνται στην κεφαλή ή τον αυχένα των σπερματοζωαρίων και προκαλούν την συγκόλλησή τους με γειτονικά σπερματοζωάρια.

Τα αντισώματα κατά του σπέρματος μπορούν να σχηματιστούν όταν υπάρχει διαταραχή στον φραγμό αίματος-όρχεως. Αυτό μπορεί να συμβεί μετά από αγγειεκτομή, τραύμα, βιοψία, ορχίτιδα, συστροφή ή καρκίνο των όρχεων. Τα αντισώματα κατά του σπέρματος μπορούν να ποσοτικοποιηθούν στον ορό, στο σπερματικό υγρό ή απευθείας στο σπέρμα. Τα αντισώματα που συνδέονται με το σπέρμα μπορούν να μειώσουν την κινητικότητα, να εμποδίσουν τη διείσδυση της αυχενικής βλέννας και να αποτρέψουν τη γονιμοποίηση, (Katz et al., 2017).

Ανάλυση Σπέρματος

Η ανάλυση σπέρματος είναι η πιο σημαντική δοκιμασία στην αξιολόγηση ενός υπογόνιμου άνδρα. Για τη συλλογή του δείγματος συνίσταται σεξουαλική αποχή από δύο έως τρεις ημέρες. Οι μικρότερες περιόδους αποχής μπορεί να έχουν αρνητικό αντίκτυπο στον αριθμό των σπερματοζωαρίων, ενώ τα μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα μπορούν να επηρεάσουν την κινητικότητά τους. Η επαρκής συλλογή δείγματος σπέρματος είναι πρωταρχικής σημασίας για την επίτευξη αντιπροσωπευτικού αποτελέσματος και πρέπει να γίνει απευθείας σε αποστειρωμένο δοχείο. Το σωστό είναι η λήψη να πραγματοποιηθεί στο εργαστήριο μετά από σαφείς οδηγίες. Αν τα δείγματα συλλέγονται στο σπίτι, πρέπει να διατηρούνται στη θερμοκρασία του σώματος κατά τη μεταφορά τους στο εργαστήριο και πρέπει να αναλύονται εντός μίας ώρας.

Η ανάλυση σπέρματος περιλαμβάνει:

1. Τον προσδιορισμό φυσικών χαρακτηριστικών του σπέρματος, όπως η αντίδραση pH, η οσμή, η όψη, η χροιά, η γλοιότητα (ιξώδες) και η ρευστοποίηση.
2. Την μικροσκοπική παρατήρηση νωπού, αραιωμένου και ξηρού παρασκευάσματος σπέρματος.

Στο νωπό παρασκεύασμα μελετάται η κινητικότητα των σπερματοζωαρίων, η παρουσία μικροοργανισμών, η παρουσία επιθηλιακών κυττάρων, πιθανές συγκολλησεις-συσσωρεύσεις και η παρουσία στρογγυλών κυττάρων.

Στο αραιωμένο παρασκεύασμα γίνεται ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των σπερματοζωαρίων, καθώς επίσης και η μέτρηση των κυττάρων (ερυθρά αιμοσφαίρια, στρόγγυλα κύτταρα, μικροοργανισμοί, επιθηλιακά κύτταρα). Η μέτρησή τους γίνεται σε κυτταρομετρική πλάκα (Neubauer).

Τα ξηρά βαμμένα παρασκευάσματα χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση της ενδεχόμενης παρουσίας παθογόνων μικροοργανισμών.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός σπέρματος (συνολικός αριθμός σπερματοζωαρίων και ο όγκος σπέρματος), ο ποιοτικός προσδιορισμός σπέρματος (μορφολογία σπερματοζωαρίων και η κινητικότητα των σπερματοζωαρίων) και οι παράμετροι: συγκολλησεις σπερματοζωαρίων, η παρουσία λευκών αιμοσφαιρίων, συντελούν στη δημιουργία του σπερμοδιαγράμματος που είναι η πρώτη και ίσως η σημαντικότερη εξέταση για τη διερεύνηση της αναπαραγωγικής ικανότητας ενός άνδρα (Πίνακας 1).

Πίνακας 1: Τιμές αναφοράς για τα χαρακτηριστικά του σπέρματος της Παγκόσμιας Οργάνωσης Υγείας (ΠΟΥ) 2010, (Amena et al, 2018).

Όγκος	≥2 mL
pH	7.0-8.0
Συγκέντρωση σπέρματος	≥15 εκατομμύρια / mL
Συνολικός αριθμός σπερματοζωαρίων	≥39 εκατομμύρια
Συνολική κινητικότητα	≥40%
Προοδευτική κινητικότητα	≥32%
Ζωτικότητα	≥58%
Κανονική μορφολογία	≥4%
Λευκοκύτταρα	<1,0 χ 10⁶ / mL
Μικτή αντίδραση αντιγλοβουλίνης	Λιγότερο από 50% σπερματοζωάρια με προσκολλημένα

Τα σπερμοδιαγράμματα υπογόνιμων ανδρών μπορούν να αποκαλύψουν διάφορες ανωμαλίες, όπως:

Αζωοσπερμία είναι η παντελής απουσία σπερματοζωαρίων στο σπερματικό υγρό.

Ασπερμία είναι η παντελής έλλειψη σπέρματος κατά την εκσπερμάτιση.

Ολιγοσπερμία είναι η μείωση του αριθμού των σπερματοζωαρίων κάτω από 15 εκατομμύρια/ml.

Ασθενοζωοσπερμία είναι όταν παρατηρείται χαμηλή κινητικότητα των σπερματοζωαρίων σε ποσοστό πάνω από 40%.

Τερατοσπερμία είναι η αύξηση του ποσοστού των σπερματοζωαρίων με μη φυσιολογική μορφολογία πάνω από το 40%.

Νεκροσπερμία είναι η παρουσία στο δείγμα μόνο νεκρών σπερματοζωαρίων.

Ολιγοασθενοσπερμία είναι όταν παρατηρείται χαμηλός αριθμός σπερματοζωαρίων, μειωμένη κινητικότητα, αύξηση του αριθμού των ανώμαλων μορφών, αλλαγή του όγκου και παρουσία αντισπερμικών αντισωμάτων στο δείγμα.

Η τρέχουσα εκτίμηση είναι ότι περίπου το 30% των ανδρών που αναζητούν βοήθεια στην κλινική υπογονιμότητας έχουν ολιγοζωοσπερμία ή αζωοσπερμία άγνωστης αιτιολογίας. Ως εκ τούτου, υπάρχει ανάγκη να βρεθεί η αιτία της στειρότητας (Poongothai J et al, 2009).

Άλλες εξετάσεις

Κατακερματισμός του DNA (DNA Fragmentation Test):

Το γενετικό υλικό (DNA) βρίσκεται στο εσωτερικό των σπερματοζωαρίων και των ωαρίων και είναι υπεύθυνο για τη μεταβίβαση των γενετικών χαρακτηριστικών των γονιών στην επόμενη γενεά. Έχει τη μορφή διπλής έλικας η οποία σταθεροποιείται με χημικούς δεσμούς. Αν οι δεσμοί αυτοί σπάσουν τότε η έλικα γίνεται ασταθής. Η αστάθεια αυτή στο DNA των σπερματοζωαρίων λέγεται κατάτμηση ή κατακερματισμός και δεν αντιπροσωπεύεται από το συμβατικό σπερμοδιάγραμμα. Η γενετική ακεραιότητα των σπερματοζωαρίων θεωρείται απαραίτητη για το σχηματισμό και τη φυσιολογική ανάπτυξη ενός εμβρύου. Υψηλό ποσοστό κατακερματισμού του DNA στα σπερματικά κύτταρα, πάνω από 30%, υποδηλώνει μέτρια ως κακή γονιμότητα και μπορεί να ευθύνεται για ανδρική υπογονιμότητα στις καταστάσεις εκείνες που οι συμβατικές παράμετροι σπέρματος που αναφέρονται παραπάνω είναι φυσιολογικές, (Μπιλάλης Δημήτριος et al, 2014).

Κυτταρογενετική μελέτη

Σε περιπτώσεις αζωοσπερμίας ή σοβαρού βαθμού ολιγο-ασθενο-τερατοσπερμίας και όταν η κλινική εικόνα και ο υπόλοιπος εργαστηριακός έλεγχος συνηγορούν υπέρ της ύπαρξης κάποιου γενετικού αίτιου υπογονιμότητας, είναι απαραίτητο να προσδιοριστεί ο καρυότυπος του ασθενούς. Για την εξέταση απαιτείται, συνήθως, η λήψη δείγματος περιφερικού αίματος, καθώς ο καρυότυπος προσδιορίζεται στα λεμφοκύτταρα. Με τον προσδιορισμό του καρυότυπου ελέγχεται η παρουσία χρωμοσωμικών ανωμαλιών αυτοσωματικού ή φυλοσύνδετου τύπου. Χρωμοσωμικές

ανωμαλίες παρουσιάζει το 6%, περίπου, των υπογόνιμων ανδρών. Όσο βαρύτερη είναι η εικόνα του σπέρματος, τόσο αυξάνεται η πιθανότητα χρωμοσωμικής βλάβης. Έτσι, στους αζωοσπερμικούς άνδρες το ποσοστό φθάνει στο 15%. Η επίπτωση των χρωμοσωμικών ανωμαλιών μειώνεται σε 4% έως 5% στους ολιγοσπερμικούς ασθενείς και σε 1% στους άνδρες των οποίων το σπέρμα δεν έχει επηρεασμένες παραμέτρους. Οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες μπορεί να αφορούν στον αριθμό των χρωμοσωμάτων ή στη δομή τους (π.χ. μετάθεση γενετικού υλικού).

Βιοψία όρχεων

Η βιοψία των όρχεων είναι σημαντική εξέταση και διενεργείται επί αρκετών ενδείξεων και όχι μόνο για τη διερεύνηση της πιθανότητας κακοήθειας. Μπορεί να διενεργηθεί ως ανοικτή βιοψία (Testicular Sperm Extraction - TESE), η οποία είναι μέθοδος ιδιαίτερα τραυματική και απαιτεί γενική αναισθησία ή ως αναρρόφηση υλικού δια λεπτής βελόνης (Fine Needle Aspiration - FNA). Η εξέταση αυτή μπορεί να παρέχει σημαντικές πληροφορίες, προκειμένου να τεθεί η διάγνωση του αιτίου της υπογονιμότητας. Επιπλέον, μπορεί να παίξει σημαντικό ρόλο στη θεραπευτική αντιμετώπιση, εφόσον μπορούν να απομονωθούν σπερματοζώαρια για να χρησιμοποιηθούν στη συνέχεια για μικρογονιμοποίηση ωαρίων (ICSI).

Έλεγχος με απεικονιστικές εξετάσεις

Ο απεικονιστικός έλεγχος του υπογόνιμου άνδρα περιλαμβάνει τον υπερηχογραφικό έλεγχο των γεννητικών οργάνων και τον έλεγχο με Doppler υπερηχογράφημα των σπερματικών αγγείων, (Κανταρτζή Περσεφόνη – Δήμητρα, 2012).

B. ΣΚΟΠΟΣ

Στη σύγχρονη εποχή η υπογονιμότητα αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα, με συνεχώς αυξανόμενα ποσοστά και πολύ σημαντικές κοινωνικοοικονομικές συνέπειες. Στο 50% των περιπτώσεων, η αιτία είναι διαταραχές στη γονιμότητα των ανδρών και η πλειοψηφία των ζευγαριών καταφεύγει σε διαδικασίες υποβοηθούμενης αναπαραγωγής προκειμένου να αποκτήσει τον δικό του βιολογικό απόγονο. Η συμβατική ανάλυση σπέρματος θεωρείται ως το πρώτο βήμα για τη διερεύνηση της ποιότητας του σπέρματος και της υπογονιμότητας του ανδρικού παράγοντα. Ωστόσο απαιτείται έγκυρη, γρήγορη και μη επεμβατική διάγνωση της ανδρικής υπογονιμότητας, βασισμένη στο ότι οι διαταραχές της ανδρικής υπογονιμότητας διαθέτουν ένα γενετικό υπόβαθρο.

Όλο και περισσότερες μελέτες συσχετίζουν την ύπαρξη κυτοκινών με την ανδρική υπογονιμότητα. Οι κυτοκίνες παράγονται από ένα ολόκληρο φάσμα κυττάρων σε διάφορα διαμερίσματα του ανδρικού γεννητικού συστήματος και έτσι μπορούν να εμπλακούν σε μια ποικιλία ανδρολογικών διαταραχών. Η παρακολούθηση των κυτοκινών στο σπερματικό πλάσμα μπορεί να προσφέρει την ευκαιρία να κατανοήσουμε καλύτερα τους μηχανισμούς που οδηγούν σε υπογονιμότητα.

Σκοπός της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας είναι η διερεύνηση, καταγραφή και ανάδειξη πολυμορφισμών και συγκεκριμένα μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (SNPs) σε γονιδιακές περιοχές που εκφράζουν λειτουργικά τις κυτοκίνες και πιθανόν να εμπλέκονται στην ανδρική υπογονιμότητα. Χρησιμοποιήθηκαν δείγματα σπέρματος από νορμοσπερμικούς και μη νορμοσπερμικούς άνδρες του Ελληνικού πληθυσμού και μετά τη γονοτύπηση των δειγμάτων DNA ακολούθησε βιοπληροφορική ανάλυση, η οποία κερδίζει συνεχώς έδαφος στη μελέτη γονιδίων έναντι των χρονοβόρων και ακριβών πειραματικών διαδικασιών αποσκοπώντας στην βελτίωση της αξιολόγησης και της θεραπείας της ανδρικής υπογονιμότητας.

Γ. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Βιολογικό Υλικό

Στη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκε γενετικό υλικό DNA που απομονώθηκε συνολικά από 288 βιολογικά δείγματα σπέρματος τόσο από νορμοσπερμικούς (154 δείγματα), όσο και από μη νορμοσπερμικούς άνδρες (134 δείγματα), εθελοντές ελληνικής καταγωγής και ηλικίας 18–40 ετών. Η λήψη των βιολογικών δειγμάτων έγινε στην Μονάδα Ιατρικώς Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής «Embryolab» στα πλαίσια του ερευνητικού προγράμματος Spermatogene. Το κάθε δείγμα συνοδεύεται με κωδικό (barcode) που αντιστοιχεί στον κάθε ασθενή.

Αξίζει να αναφερθεί ότι, καθ' όλη τη διάρκεια του προγράμματος, σύμφωνα με τον κώδικα δεοντολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας αλλά και του εργαστηρίου, η έρευνα στο ανθρώπινο βιολογικό υλικό δεσμεύεται από την αρχή της συναίνεσης ύστερα από πληροφόρηση του δότη και από την αρχή της προστασίας των ευαίσθητων προσωπικών δεδομένων που συλλέγονται και υπόκεινται σε επεξεργασία.

2. 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

Στο DNA βρίσκονται κωδικοποιημένες όλες οι πληροφορίες που καθορίζουν την ανάπτυξη του κάθε οργανισμού. Η μελέτη του μας δίνει πληροφορίες για κληρονομούμενα χαρακτηριστικά και περιέχει τον κώδικα που καθορίζει τη σύνθεση των πρωτεϊνών. Το DNA μπορεί να απομονωθεί από οποιοδήποτε εμπύρηνο κύτταρο. Για την πραγματοποίηση της απομόνωσης του DNA χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο 'Preparation of Genomic DNA from Mammalian Sperm' (Weyrich A., 2012). Σκοπός της διαδικασίας είναι η απομόνωση γενετικού υλικού DNA από το σπέρμα.

Το ανθρώπινο σπέρμα αποτελείται από σπερματικό υγρό και σπερματοζωάρια. Η βασική διαφορά επίσης από άλλους ιστούς είναι ότι πλήθος δισουλφιδικών δεσμών συναντώνται στην κεφαλή των σπερματοζωαρίων περικυκλώνοντας το γενετικό υλικό.

Το σπερματικό υγρό επίσης, περιλαμβάνει πρωτεϊνικά και μη πρωτεϊνικά συστατικά, όπως είναι η φρουκτόζη, τα οποία μπορούν να μειώσουν την ποιότητα και την καθαρότητα του DNA. Επομένως, συνίσταται η χρήση αιθανόλης για απομάκρυνση του σπερματικού υγρού. Ακόμη, οι δισουλφιδικοί δεσμοί της λιπιδικής μεμβράνης εμποδίζουν τη λύση των κυττάρων και δυσκολεύουν την απομόνωση του γενετικού υλικού. Για να γίνει παράκαμψη του εμποδίου αυτού, χρησιμοποιείται ένας ισχυρός αντιοξειδωτικός παράγοντας, το DTT. Επιπλέον, η σύσταση του διαλύματος ομογενοποίησης (Lysis Buffer) επιτρέπει τη ρήξη των κυτταρικών / πυρηνικών μεμβρανών και την απελευθέρωση του DNA. Επίσης, το διάλυμα ομογενοποίησης (Lysis Buffer) περιέχει αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (Ethylenediaminetetraacetic acid: EDTA), δηλαδή έναν χηλικό υποκαταστάτη που έχει την ικανότητα να δεσμεύει και να απομακρύνει τα μεταλλικά ιόντα. Τα μεταλλικά ιόντα αποτελούν συμπαράγοντα για τη δράση των δεσοξυριβονουκλεασών, οπότε η δέσμευσή τους προστατεύει το DNA από την αποικοδόμηση. Επιπρόσθετα, η παρουσία του ρυθμιστικού διαλύματος, Tris, διατηρεί το pH σε ουδέτερη περιοχή. Τέλος, η λύση των κυτταρικών μεμβρανών επιτυγχάνεται με χρήση διαλυμάτων που περιέχουν απορρυπαντικά, το πιο κοινό εκ των οποίων είναι το δωδεκυλοθειικό νάτριο (Sodium Dodecyl Sulphate: SDS). Το SDS απομακρύνει τις ιστόνες από τα μόρια του DNA και επίσης δρα ως αποδιατακτικός παράγοντας, διαταράσσοντας τους δεσμούς μεταξύ των πρωτεϊνών. Αντίστοιχη δράση παρουσιάζει το πρωτεολυτικό ένζυμο πρωτεϊνάση K, η οποία προκαλεί την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών και συγκεκριμένα απενεργοποιεί αμέσως τις ενδογενείς νουκλεάσες (DNAσες) του κυττάρου, που μπορεί να κατακερματίσουν το DNA κατά τη διαδικασία απομόνωσης. Ένα πλεονέκτημα της πρωτεϊνάσης K είναι ότι παραμένει δραστική ακόμη και παρουσία SDS και χηλικών παραγόντων όπως το EDTA.

Στάδια

1. Πλύση 100 μl σπέρματος με προσθήκη 500 μl αιθανόλης (70%).
2. Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 13.000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου. Απορρίπτεται το υπερκείμενο.
3. Επαναλαμβάνονται τα στάδια (1), (2) και συλλέγεται το ίζημα μετά το πέρας της φυγοκέντρησης.
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.

Παρόλα αυτά, η πλήρης απομάκρυνση των πρωτεϊνών και των κυτταρικών υπολειμμάτων πραγματοποιείται μέσω εκχύλισης με φαινόλη / χλωροφόρμιο ενώ το DNA ανακτάται μετά από κατακρήμνιση με αιθανόλη.

3. Χειρισμοί νουκλεϊκών οξέων

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 το διαχωρισμό του DNA από τα λιπίδια και τις πρωτεΐνες με τη δημιουργία δύο διακριτών φάσεων: της υδατικής φάσης, όπου βρίσκονται τα νουκλεϊκά οξέα και της οργανικής φάσης, όπου 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.

Στάδια

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 επανακάθεται με κατακρήμνιση με αιθανόλη.

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. Συγκεκριμένα, 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.

Στάδια

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 στους -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 φυγοκέντρωση 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.

4. Ποσοτικός προσδιορισμός του DNA

4.1. Με χρήση φασματοφωτόμετρου

Η ποσοτικοποίηση των νουκλεϊκών οξέων μέσω της φωτομέτρησης βασίζεται στο γεγονός ότι το DNA και το RNA απορροφούν εκλεκτικά στα 260nm του φάσματος της υπεριώδους ακτινοβολίας (UV). Η τιμή οπτικής απορρόφησης 1 (OD₂₆₀ = 1) αντιστοιχεί σε συγκέντρωση 50 μg/ml δίκλωνου DNA, 40 μg/ml μονόκλωνου DNA ή και ~20 μg/ml για μονόκλινα ολιγονουκλεοτίδια.

Ακόμη, ο λόγος των τιμών OD στα 260nm και 280nm παρέχει μια εκτίμηση της καθαρότητας του DNA, δηλαδή δείχνει κατά πόσο αυτό είναι απαλλαγμένο από πρωτεΐνες. Για καθαρά διαλύματα DNA και RNA ο λόγος OD 260/OD 280 κυμαίνεται μεταξύ 1.8-2.0.

Για τη φωτομέτρηση των δειγμάτων DNA έγινε αραίωση 2 μl διαλύματος DNA σε 98 μl ddH₂O κι έπειτα, οι τιμές της απορρόφησης στα 260 nm ανάχθηκαν σε συγκέντρωση DNA.

4.2. Με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Υλικά

TAE 1x

Agarose Loading buffer 1%

Xpert green Stain

Μεθοδολογία

Μία από τις κύριες μεθόδους ποσοτικοποίησης δειγμάτων DNA είναι η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης με κυμαινόμενη συγκέντρωση, ανάλογα με το μέγεθος του ηλεκτροφορούμενου DNA. Πρόκειται για μια τεχνική διαχωρισμού φορτισμένων μορίων και συγκεκριμένα του DNA στο πείραμα αυτό. Το DNA είναι ένα αρνητικά φορτισμένο μόριο το οποίο κινείται διαμέσου της πηκτής της αγαρόζης από τον αρνητικό πόλο προς τον θετικό πόλο στη συσκευής ηλεκτροφόρησης. Η τεχνική βασίζεται στην κινητικότητα των μορίων αναλόγως του μεγέθους τους καθώς αυτά

κινούνται μέσα σε πήκτωμα αγαρόζης 1% w/v κι ενώ εφαρμόζεται στα άκρα του ένα ηλεκτρικό πεδίο μέσω ηλεκτροδίων (Εικόνα 8). Στηρίζεται στην αρχή της κίνησης φορισμένων σωματιδίων κάτω από την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Μέσα στο ηλεκτρικό πεδίο τα φορισμένα σωματίδια κινούνται προς τον ένα ή τον άλλο πόλο με ταχύτητες διαφορετικές, ανάλογα με το φορτίο τους και αντιστρόφως ανάλογα με το μέγεθός τους. Τα θετικά φορισμένα ιόντα (κατιόντα) θα προχωρήσουν προς τον αρνητικό πόλο (κάθοδο), ενώ τα αρνητικά φορισμένα ιόντα (ανιόντα) προς τον θετικό πόλο (άνοδο). Συγκεκριμένα, όταν το πήκτωμα βρίσκεται σε ηλεκτρικό πεδίο τα νουκλεϊκά οξέα, τα οποία είναι φορισμένα αρνητικά σε ουδέτερο pH λόγω των φωσφορικών ομάδων που βρίσκονται στον φωσφοδιεστερικό σκελετό, κινούνται προς την άνοδο με ταχύτητα αντιστρόφως ανάλογη προς το μέγεθός τους. Έτσι, τα περισσότερα φορισμένα και μικρότερα μόρια απομακρύνονται περισσότερο από το αρχικό σημείο, ενώ τα και λιγότερα φορισμένα μόρια απομακρύνονται λιγότερο, οπότε επέρχεται διαχωρισμός, (Γιαννακούρης Νικόλαος et al, 2015).

Η ποσοτικοποίηση βασίζεται στην ιδιότητα του δίκλωνου DNA να συνδέεται με την κατάλληλη χρωστική Xpert green, τα μόρια της οποίας φωσφορίζουν κάτω από το υπεριώδες φως (UV). Η σύνδεση αυτή, κι επομένως 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).

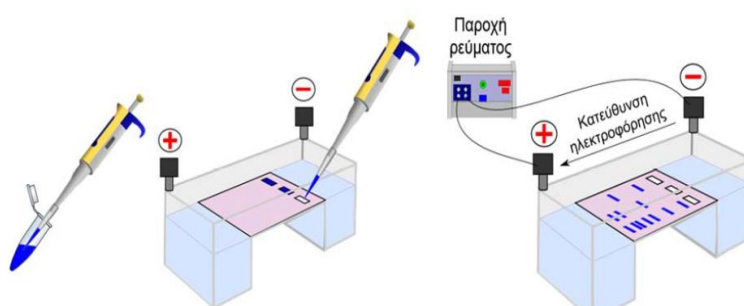
Εκτός από τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του DNA, η συγκεκριμένη μέθοδος δίνει πληροφορίες και για τη φυσική κατάσταση του DNA, δηλαδή αν είναι ακέραιο (μακρομοριακό) ή κατακερματισμένο. Ενδείκνυται ακόμη σε περιπτώσεις χαμηλής καθαρότητας των προς εξέταση δειγμάτων. Τέλος, η διακριτική δυνατότητα του πηκτώματος αγαρόζης 1% w/v είναι περίπου 10 ng DNA.

Για την προετοιμασία του πηκτώματος χρησιμοποιείται αγαρόζη 1% που αποτελεί έναν ευθύγραμμο πολυσακχαρίτη ο οποίος εκχυλίζεται σε μεγάλες ποσότητες από αρκετά είδη ερυθροφύκων και σχηματίζει πήκτωμα με πόρους που κυμαίνονται από 100 έως 300 nm διάμετρο. Το μέγεθος των πόρων εξαρτάται από τη συγκέντρωση της αγαρόζης στο πήκτωμα. Η συγκέντρωση της αγαρόζης καθορίζει συνεπώς το εύρος των τμημάτων DNA που μπορούν να διαχωριστούν. Τέλος, η χρωστική Xpert green αποτελεί μια πιο ασφαλή εναλλακτική έναντι της χρήσης βρωμιούχου αιθιδίου. Συγκεκριμένα, προσδένεται σε DNA και RNA προκαλώντας την εμφάνιση φθορισμού και είναι εξίσου ευαίσθητη με το βρωμιούχο αιθίδιο, αλλά είναι μη καρκινογόνος και σύμφωνα με το τεστ AMES προκαλεί πολύ λιγότερες μεταλλάξεις.

Στάδια

1. Για τη δημιουργία του πηκτώματος αγαρόζης 1% w/v αναμειγνύεται αγαρόζη σε σκόνη (0,3 γρ.) με 45 ml ρυθμιστικού διαλύματος TAE 1x και το μίγμα θερμαίνεται μέχρι να γίνει διαυγές και να διαλυθεί η αγαρόζη.
2. Γίνεται προσθήκη 4 ml χρωστικής Xpert green και ακολουθεί ήπια ανάδευση.

3. Το μίγμα προστίθεται σε κατάλληλο οριζόντιο εκμαγείο και προστίθενται ειδικά εξαρτήματα που ονομάζονται «χτενάκια». Το κάθε «χτενάκι» αποτελείται από έναν οριζόντιο άξονα κατά μήκος του οποίου ξεκινούν 12 κάθετοι άξονες -θέσεις και χρησιμοποιείται για την δημιουργία θέσεων («πηγαδάκια») στις οποίες θα τοποθετηθούν τα δείγματα DNA.
4. Το μίγμα αφήνεται να κρυώσει ώστε να δημιουργηθεί το πήκτωμα (πολυμερισμός) αгарόζης και έπειτα αφαιρούνται τα χτενάκια φροντίζοντας να παραμείνουν ανέπαφα τα πηγαδάκια.
5. Το πήκτωμα αгарόζης τοποθετείται σε κατάλληλη συσκευή ηλεκτροφόρησης και προστίθεται σε αυτή TAE buffer 1x μέχρι να καλυφθεί το εκμαγείο με το πήκτωμα αгарόζης.
6. Σε πλαστικά σωληνάρια τύπου erpendorf αναμείχθηκε ποσότητα δείγματος DNA 5 μl με 3μl Agarose Loading buffer. Το Agarose Loading buffer βοηθάει στην παρατήρηση της φόρτωσης και μετακίνησης των δειγμάτων κατά την ηλεκτροφόρηση. Με τη βοήθεια αυτόματης πιπέτας γίνεται η φόρτωση των δειγμάτων στα αντίστοιχα πηγαδάκια του πηκτώματος.
7. Ακολουθεί εφαρμογή σταθερής ηλεκτρικής τάσης 100 Volt και ηλεκτροφόρηση για περίπου 15-20 λεπτά.
8. Τέλος, πραγματοποιείται παρατήρηση του πηκτώματος σε λάμπα υπεριώδους φωτός.



Εικόνα 8: Φόρτωση δειγμάτων και ηλεκτροφόρηση, (Γιαννακούρης Νικόλαος et al, 2015)

5. Γονοτύπηση δειγμάτων DNA

Η αλληλούχιση των δειγμάτων DNA έγινε μέσω γονοτύπησης και πραγματοποιήθηκε από το κέντρο HuGeF στην Ολλανδία. Πιο συγκεκριμένα, η γονοτύπηση των δειγμάτων έγινε με τη χρήση του chip της Illumina: Infinium® Global Screening Array. Το συγκεκριμένο chip προσφέρει πληροφορίες για 642.824 δείκτες στο ανθρώπινο γονιδίωμα (SNPs), και ως εκ τούτου προσφέρει μια αρκετά μεγάλη κάλυψη του γονιδιώματος και ιδιαίτερως των περιοχών των ιντρονίων, καθώς οι 256.673 δείκτες ανήκουν σε αυτές τις περιοχές. Έτσι, αναδεικνύεται πιο αντιπροσωπευτικά ο πολυμορφισμός των non- coding περιοχών.

Η γονοτύπηση με τέτοια chips βασίζεται στη χρήση ολιγονουκλεοτιδίων ειδικών για μια συγκεκριμένη περιοχή, περίπου 50 bp γύρω από τα SNPs, τα οποία είναι ακινητοποιημένα πάνω σε γυάλινη πλάκα. Αρχικά, γίνεται πολλαπλασιασμός και

προετοιμασία του DNA-στόχου και ακολουθεί υβριδοποίηση και επιμήκυνση με νουκλεοτιδικές βάσεις οι οποίες είναι σημασμένες με διαφορετικές φθορίζουσες. Έπειτα από διαδοχικά στάδια πλύσης πραγματοποιείται ανίχνευση των φθορίζόντων προϊόντων που προκύπτουν με ειδικό laser. Διαφορετικά χρώματα φθορισμού οδηγούν στην ανάγνωση των αποτελεσμάτων της γονοτύπησης.

Αξίζει να αναφερθεί ότι αρχικά, η συγκέντρωση των δειγμάτων σπέρματος αλλά και η γονοτύπηση τους έγινε στα πλαίσια της διδακτορικής διατριβής της Μαρίας Μαρκαντώνη, η οποία μελετά μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς (SNPs) που εμπλέκονται στην εμφάνιση ανδρικής υπογονιμότητας και συμβάλλουν στην εμφάνιση παθολογικού φαινοτύπου. Επομένως, στη συνέχεια, τα δείγματα που είχαν ήδη συγκεντρωθεί αλλά και τα αποτελέσματα γονοτύπησης που προέκυψαν χρησιμοποιήθηκαν και για την πραγματοποίηση της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας (Μαρία Μαρκαντώνη, διδακτορική διατριβή σε εξέλιξη).

6. Ανάλυση αποτελεσμάτων αλληλούχισης με PLINK

Για να πραγματοποιηθεί η επεξεργασία και η ανάλυση των αποτελεσμάτων της αλληλούχισης χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα PLINK. Το PLINK είναι ένα εργαλείο Βιοπληροφορικής, γενετικής ανάλυσης, που χρησιμοποιείται για αναλύσεις συσχέτισης ολόκληρου γονιδιώματος (Whole-genome association studies: WGAS) και εκτελείται τόσο σε UNIX όσο και σε Windows λειτουργικά συστήματα. Το PLINK είναι ένα φιλικό προς το χρήστη εργαλείο που δίνει τη δυνατότητα επεξεργασίας δεδομένων για τον εντοπισμό συσχετίσεων μεταξύ μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (SNPs) και φαινοτυπικών χαρακτηριστικών, (Purcell et al., 2007).

Πρόκειται για ένα πρόγραμμα με γραμμή εντολών γραμμένο σε κώδικες C/C++, επομένως όλες οι εντολές έχουν την εξής δομή:

```
plink - - (αρχεία που θα χρησιμοποιηθούν στην ανάλυση) - - (μέθοδοι-εντολές που θα χρησιμοποιηθούν στην ανάλυση).
```

Επίσης, το πρόγραμμα PLINK αναγνωρίζει διαφορετικές μορφές αρχείων. Μπορεί να διαβάσει αρχεία μορφής κειμένου ή δυαδικά αρχεία, καθένα από τα οποία έχει διαφορετικές ιδιότητες αλλά και περιεχόμενο. Οι βασικές μορφές αρχείων που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση είναι δυο αρχεία μορφής κειμένου:

- Αρχείο MAP (*.map). Πρόκειται για ένα αρχείο που περιλαμβάνει μια λίστα των μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (SNP) που έχουν αλληλουχηθεί. Κάθε γραμμή του αρχείου αντιστοιχεί σε ένα SNP. Το αρχείο αποτελείται από τουλάχιστον 4 στήλες. Η πρώτη στήλη αντιστοιχεί στο χρωμόσωμα (Chr) που ανήκει το κάθε SNP, η δεύτερη στήλη αντιστοιχεί στο rs (reference) ή σε κάποιον άλλο κωδικό που αποτελεί το SNP identifier, η τρίτη στήλη αντιστοιχεί στη γενετική απόσταση (genetic distance: GD), (μέτρηση σε

morgans), και η τέταρτη στήλη αντιστοιχεί στη θέση του ζεύγους βάσεων (μέτρηση σε bp units), (Εικόνα 9).

*.map

Chr	SNP	GD	BPP
1	rs1	0	870000
1	rs2	0	880000
1	rs3	0	890000

Εικόνα 9: Παράδειγμα μορφής αρχείου MAP.

- Αρχείο PED (*.ped). Πρόκειται για ένα αρχείο που περιλαμβάνει τους γονοτύπους κάθε ατόμου αλλά και πρόσθετες πληροφορίες. Κάθε γραμμή του αρχείου αντιστοιχεί σε ένα άτομο. Το αρχείο περιλαμβάνει τουλάχιστον 9 στήλες. Η πρώτη στήλη συνήθως είναι ένας κωδικός που αντιστοιχεί στην οικογένεια (Family ID) και η δεύτερη στήλη είναι συνήθως ένας κωδικός που αντιστοιχεί στο άτομο (Individual ID). Η τρίτη στήλη αντιστοιχεί στον κωδικό του πατέρα (Paternal ID), η τέταρτη στον κωδικό της μητέρας (Maternal ID), η πέμπτη στήλη δείχνει το φύλο του ατόμου και η έκτη στήλη το φαινότυπο (Phenotype: P). Τέλος οι στήλες 7,8 και 9 αντιστοιχούν στους γονοτύπους, (Εικόνα 10), (Marees et al., 2018).

*.ped

FID	IID	PID	MID	Sex	P	rs1	rs2	rs3
1	1	0	0	2	1	CT	AG	AA
2	2	0	0	1	0	CC	AA	AC
3	3	0	0	1	1	CC	AA	AC

Εικόνα 10: Παράδειγμα μορφής αρχείου PED.

Στα αρχεία που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση ωστόσο, η πρώτη στήλη αντιστοιχεί σε έναν αύξοντα αριθμό για την αρίθμηση των δειγμάτων ενώ η δεύτερη στήλη αντιστοιχεί σε έναν αύξοντα αριθμό που δείχνει τη σειρά αλληλούχισης των δειγμάτων.

6.1. Δημιουργία αρχείου ανάλυσης –ένωση αρχείων αλληλούχισης

Για να πραγματοποιηθεί η ανάλυση φαινοτύπων και γονοτύπων απαιτείται η δημιουργία ενός αρχείου που προκύπτει από την ένωση των τριών επιμέρους αρχείων που αντιστοιχούν σε αποτελέσματα αλληλούχισης τριών διαφορετικών plates. Όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των δειγμάτων που θα χρησιμοποιηθούν στην ανάλυση τόσο μεγαλύτερη είναι η στατιστική δύναμη των αποτελεσμάτων καθώς μελέτες που γίνονται σε μικρό αριθμό δειγμάτων μπορεί να δώσουν ψευδώς θετικά αποτελέσματα και λανθασμένες συσχετίσεις.

Τα αποτελέσματα από το 1^ο plate ονομάζονται GSA1pheno και ουσιαστικά πρόκειται για δύο αρχεία (GSA1pheno.map, GSA1pheno.ped), από το 2^ο plate ονομάζονται GSA2pheno και πρόκειται επίσης για δύο αρχεία (GSA2pheno.map, GSA2pheno.ped) και τέλος από το 3^ο plate GSA3pheno και πρόκειται επίσης για δύο αρχεία (GSA3pheno.map, GSA3pheno.ped).

Το PLINK προσφέρει τη δυνατότητα χειρισμού γενετικών δεδομένων μέσω μια σειράς εντολών με τις οποίες ο χρήστης μπορεί να αναδιατάξει, αποκωδικοποιήσει και συγχωνεύσει δεδομένα. Στη συγκεκριμένη περίπτωση η εντολή που χρησιμοποιήθηκε είναι:

```
plink - - file GSA1pheno - -merge GSA2pheno.ped GSA2pheno.map - - recode - -  
out GSAmmerged.
```

Με τη συγκεκριμένη εντολή το πρόγραμμα χρησιμοποιεί τα δεδομένα του αρχείου GSA1pheno (.map, .ped) και τα ενώνει (- - merge) με τα δεδομένα των αρχείων GSA2pheno (.map, .ped) και τα δεδομένα των αρχείων GSA3pheno (.map, .ped). Η εντολή - - recode - - out απαιτείται ώστε το αποτέλεσμα που προκύπτει από την εντολή merge να κωδικοποιηθεί σε ένα νέο αρχείο, το GSAmmerged (.map, .ped). Αξίζει να αναφερθεί πως το αρχείο της ένωσης περιέχει όλες τις πληροφορίες για τους πολυμορφισμούς SNPs των γονιδίων που εκφράζουν τις κυτοκίνες που μελετάμε.

6.2. Quality control (QC)

Ο στόχος των αναλύσεων συσχέτισης ολόκληρου γονιδιώματος, όπως τονίστηκε και στην εισαγωγή, είναι να ταυτοποιηθούν SNPs που συνεισφέρουν στην εμφάνιση ενός συγκεκριμένου φαινοτύπου. Ένας καθοριστικός παράγοντας όμως, που μπορεί να επηρεάσει τα αποτελέσματα, είναι η ποιότητα των δεδομένων. Προκειμένου τα αποτελέσματα να είναι αξιόπιστα και να μην προκύψουν ψευδώς θετικές ή ψευδώς αρνητικές συσχετίσεις, είναι απαραίτητο πριν την ανάλυση να πραγματοποιηθεί το στάδιο του quality control ώστε να απομακρυνθούν μη αξιόπιστα δείγματα και SNPs. Κακή ποιότητα δεδομένων μπορεί να οφείλεται σε κακή ποιότητα των δειγμάτων DNA, λάθη κατά το χειρισμό των δειγμάτων, λάθη κατά την αλληλούχιση πιθανόν λόγω μη σωστής υβριδοποίησης κ.α.

Το πρώτο στάδιο του quality control αφορά την απομάκρυνση των SNPs τα οποία δεν έχουν αλληλουχηθεί σωστά στα περισσότερα δείγματα καθώς δεν αποτελούν αξιόπιστους δείκτες για την ανάλυση. Προκειμένου να χρησιμοποιηθούν τα SNPs στην περαιτέρω ανάλυση θα πρέπει να υπάρχουν αποτελέσματα γονοτύπησης για αυτά σε όσο το δυνατόν περισσότερα δείγματα. Η εντολή που χρησιμοποιείται σε αυτή την περίπτωση είναι η:

```
plink - - geno 0.01
```

Η συγκεκριμένη εντολή κρατάει μόνο τα SNPs με 99% genotyping rate, δηλαδή αυτά τα οποία έχουν αλληλουχηθεί στο 99% των δειγμάτων. Τα SNPs που δεν πληρούν αυτό το κριτήριο αφαιρούνται. Η μη αλληλούχιση των SNPs μπορεί να οφείλεται σε αστοχία της πλατφόρμας αλληλούχισης, όπως είναι η μη σωστή υβριδοποίηση του DNA ή άλλες βλάβες που σχετίζονται με τον εξοπλισμό. Ο αριθμός 0.01 είναι το κατώφλι (threshold).

Στο επόμενο στάδιο του quality control χρησιμοποιείται η εντολή:

```
plink - - mind 0.01
```

Αυτή η εντολή αφαιρεί δείγματα τα οποία εμφανίζουν χαμηλό ποσοστό επιτυχίας της αλληλούχισης. Συγκεκριμένα, αφαιρεί δείγματα για τα οποία λείπει ποσοστό μεγαλύτερο του 1% του συνόλου των SNPs που έχουν αλληλουχηθεί. Η μη αλληλούχιση μπορεί να οφείλεται σε κακή ποιότητα δείγματος DNA ή λάθη κατά το χειρισμό του δείγματος. Ο αριθμός 0.01 είναι επίσης το threshold.

Τέλος, χρησιμοποιείται η εντολή:

```
plink - - maf 0.05
```

Η συγκεκριμένη εντολή διατηρεί στην ανάλυση μόνο SNPs με minor allele frequency, δηλαδή συχνότητα σπάνιου αλληλομόρφου, ≥ 0.05 . Ουσιαστικά με αυτή την εντολή αφαιρούνται τα πολύ σπάνια αλληλόμορφα για τα οποία η στατιστική δύναμη είναι πολύ χαμηλή και απαιτείται τεράστιος αριθμός δειγμάτων για να γίνει σωστή συσχέτισή τους. Επομένως μελέτες με πολύ μεγάλο αριθμό δειγμάτων μπορούν να χρησιμοποιήσουν χαμηλότερο maf threshold. Εφόσον όμως ο αριθμός δειγμάτων στην ανάλυση είναι μικρός, επιλέγεται το τυπικό threshold 0.05. Ακόμη, είναι σημαντικό να αφαιρεθούν τα σπάνια αλληλόμορφα επειδή είναι ιδιαίτερα επιρρεπή σε λάθη αλληλούχισης, ιδιαίτερα αν δεν υπάρχει μεγάλος αριθμός δειγμάτων ώστε να γίνει επαλήθευση, (Marees et al., 2018).

Στη συγκεκριμένη περίπτωση, προκειμένου να πραγματοποιηθεί quality control στα δεδομένα, χρησιμοποιήθηκε η εξής εντολή:

```
plink - - file GSAmerged - -geno 0.01 - - mind 0.01 - - maf 0.05 - -tab - -recode - -out GSAQC.
```

Πρόκειται ουσιαστικά για παράθεση των εντολών που αναφέρθηκαν παραπάνω σε μία και μόνο εντολή για εξοικονόμηση χρόνου και πιο εύκολη διαχείριση των αποτελεσμάτων, ώστε να μην απαιτείται και πάλι ένωση των αρχείων που θα προέκυπταν από κάθε στάδιο του quality control. Ως αρχείο ανάλυσης ορίστηκε το GSAmerged και τα αποτελέσματα της ανάλυσης κωδικοποιήθηκαν στο αρχείο

GSAQC. Τα thresholds που χρησιμοποιήθηκαν σε όλες τις εντολές είναι αρκετά αυστηρά καθώς ο αριθμός δειγμάτων που χρησιμοποιούνται στην ανάλυση δεν είναι ιδιαίτερα μεγάλος άρα απαιτείται όσο το δυνατόν μεγαλύτερη αυστηρότητα προκειμένου να μην προκύψουν λανθασμένες συσχετίσεις.

6.3. Ανάλυση συσχέτισης - Association analysis

Αμέσως μετά το στάδιο του quality control, τα δεδομένα είναι έτοιμα για να χρησιμοποιηθούν σε μια ανάλυση συσχέτισης ώστε να εντοπιστούν SNPs με διαφορετικές συχνότητες αλληλομόρφων ανάμεσα σε cases και controls. Προκειμένου να γίνει αυτό, χρησιμοποιούνται συγκεκριμένα στατιστικά τεστ ανάλογα με τον τύπο της ασθένειας που μελετάται κάθε φορά, δηλαδή αν τα χαρακτηριστικά που επηρεάζονται από την ασθένεια είναι ποιοτικά ή ποσοτικά (Marees et al., 2018). Το PLINK προσφέρει τη δυνατότητα πραγματοποίησης ανάλυσης συσχέτισης με την εξής εντολή:

```
plink - - assoc
```

Η συγκεκριμένη εντολή χρησιμοποιεί τη δοκιμασία χ^2 για να συγκρίνει τις συχνότητες των αλληλομόρφων ανάμεσα σε control και cases για κάθε SNP. SNPs που συνεισφέρουν στην εμφάνιση του φαινοτύπου αναμένεται να εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά στις συχνότητες αλληλομόρφων ανάμεσα σε controls και cases. Το αρχείο που προκύπτει από την ανάλυση δίνει τις συχνότητες εμφάνισης των αλληλομόρφων για κάθε SNP σε controls και cases, την τιμή του χ^2 αλλά και τις τιμές p-value και odds ratio, (Εικόνα 11).

CHR	SNP	BP	A1	F_A	F_U	A2	CHISQ	P	OR
10	rs10762485	73619428	C	0.25	0.4701	T	25.64	4,11E-04	0.3757
20	rs1080026	43413198	G	0.25	0.4515	T	21.74	3,13E-03	0.405
9	GSA-rs4842168	137691346	T	0.3596	0.5672	C	21.29	3,95E-03	0.4286
20	GSA-rs11086940	43406138	A	0.2018	0.3918	C	21.01	4,57E-03	0.3924
7	GSA-rs12705960	114015707	C	0.4912	0.2948	A	20.08	7,43E-03	2.31
1	GSA-rs1934620	210898263	G	0.08333	0.2313	A	19.75	8,82E-03	0.3021
17	rs11650066	32287449	A	0.4298	0.2463	G	18.75	1,49E-02	2.307
9	GSA-rs929673	128816587	G	0.307	0.1455	A	18.74	1,50E-02	2.601
1	rs12035663	238650133	T	0.1316	0.291	C	18.39	1,80E-02	0.3691
7	rs1852470	114027269	T	0.4737	0.291	G	17.53	2,82E-02	2.192

Εικόνα 11: Παράδειγμα αρχείου αποτελεσμάτων που προκύπτει με την εντολή - -assoc. Οι στήλες αντιστοιχούν (1) στο χρωμόσωμα όπου βρίσκεται το SNP, (2) στο rs# του SNP, (3) στη θέση του ζεύγους βάσεων, (4) το πρώτο από το ζεύγος των αλληλομόρφων, (5) στη συχνότητα εμφάνισης των αλληλομόρφων γονιδίων στα δείγματα cases (frequency affected: F_A), (6) στη συχνότητα εμφάνισης των αλληλομόρφων γονιδίων στα δείγματα controls (frequency unaffected: F_U), (7) το δεύτερο από το ζεύγος των αλληλομόρφων, (8) στην τιμή του χ^2 , (9) στην τιμή του p-value (P) και (10) στο odds ratio (OR).

Η τιμή p-value (Observed level of significance ή probability value) χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της στατιστικής σημαντικότητας των αποτελεσμάτων και η τιμή του δηλώνει πόσο πιθανό είναι η συσχέτιση ενός αλληλομόρφου με την ασθένεια να οφείλεται στην τύχη. Όσο μικρότερη είναι η τιμή του τόσο λιγότερο πιθανό είναι η συσχέτιση να οφείλεται στην τύχη.

Η τιμή odds ratio ή λόγος σχετικών πιθανοτήτων δείχνει πόσο πιθανό είναι να ανήκει κανείς στην ομάδα cases αν φέρει το αλληλόμορφο που συσχετίζεται με τη νόσο (risk allele). Αποτελεί ουσιαστικά ένα μέτρο της δύναμης της συσχέτισης. Ακόμη, τιμές odds ratio ίσες με τη μονάδα δηλώνουν ότι οι πιθανότητες εμφάνισης και μη εμφάνισης της νόσου είναι ίσες, δηλαδή δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ γονοτύπου και εμφάνισης της ασθένειας, ενώ τιμές μεγαλύτερες από τη μονάδα δηλώνουν ότι οι πιθανότητες εμφάνισης είναι μεγαλύτερες από τις πιθανότητες μη εμφάνισης. Τέλος τιμές odds ratio μικρότερες από τη μονάδα δηλώνουν ότι οι πιθανότητες εμφάνισης της νόσου είναι μικρότερες από τις πιθανότητες μη εμφάνισης.

Η εντολή που χρησιμοποιήθηκε στην ανάλυση είναι:

```
plink - - file GSAQC - -assoc
```

η οποία με βάση τα δεδομένα του αρχείου GSAQC παράγει ένα νέο αρχείο που περιέχει τις πληροφορίες που αναφέρονται παραπάνω και ονομάζεται GSAQC.assoc. Από το συγκεκριμένο αρχείο επιλέχθηκαν τα SNPs με $p\text{-value} \leq 0.05$ και odds ratio >1 . Η συγκεκριμένη τιμή $p\text{-value}$ δηλώνει ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στη συχνότητα των αλληλομόρφων η οποία δεν μπορεί να εξηγηθεί από την τύχη και η τιμή odds ratio μεγαλύτερης της μονάδας δηλώνει ότι τα άτομα που φέρουν το αλληλόμορφο έχουν μεγαλύτερες πιθανότητες εμφάνισης του χαρακτήρα που μελετάται, δηλαδή της ανδρικής υπογονιμότητας. Οι τιμές αυτές επίσης επιλέχθηκαν ώστε ο αριθμός των αποτελεσμάτων να μην είναι εξαιρετικά μεγάλος αλλά να έχει μέγεθος που επιτρέπει την περαιτέρω ανάλυση στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Αξίζει να σημειωθεί ότι μετά το στάδιο του Quality Control τα SNPs που διατηρήθηκαν είχαν $p\text{-value}$ της τάξης του 10^{-4} .

6.4. Εύρεση πολυμορφισμών SNPs

Ο αριθμός των βάσεων δεδομένων όσον αφορά το πεδίο της Μοριακής Βιολογίας έχει αυξηθεί ραγδαία τα τελευταία χρόνια. Υπάρχουν χιλιάδες διαφορετικές βάσεις δεδομένων όπου η κάθε μια παρέχει δωρεάν διαδικτυακές πληροφορίες σε διαφορετική μορφή.

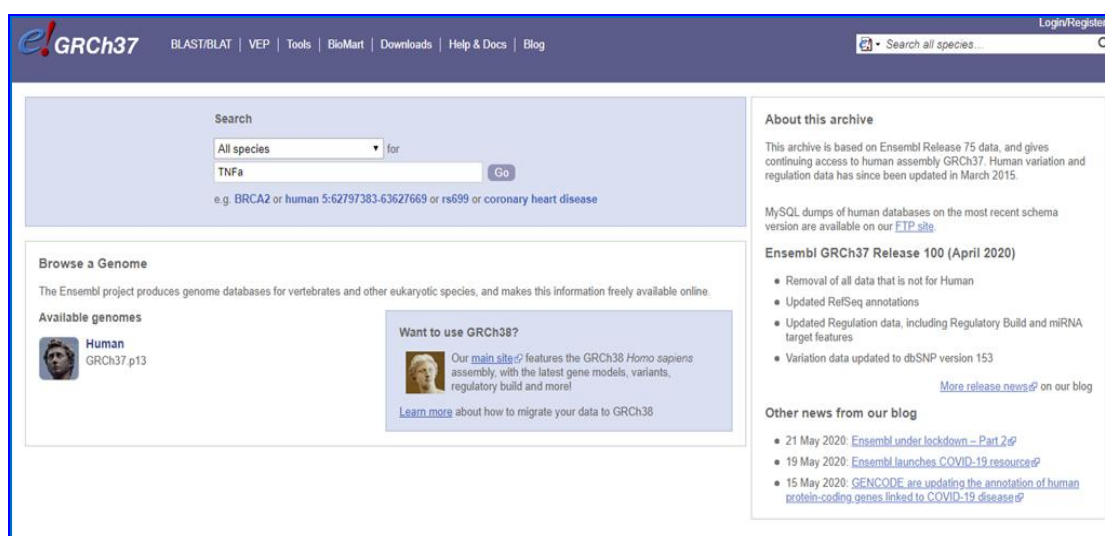
Η Ensembl Genome Browser (<http://www.ensembl.org>) αποτελεί μια βάση δεδομένων που ξεκίνησε το 1999, λίγα χρόνια πριν ολοκληρωθεί η αποκρυπτογράφιση ολόκληρου του ανθρώπινου γονιδιώματος. Έχει την έδρα της στο Ευρωπαϊκό Ινστιτούτο Βιοπληροφορικής του Ευρωπαϊκού Εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας (European Molecular Biology Laboratory's European Bioinformatics Institute: EMBL-EBI). Σκοπός του project ήταν η μελέτη ολόκληρου του ανθρώπινου γονιδιώματος (3 δισεκατομμυρίων ζευγών βάσεων) και η δημοσιοποίηση αυτής της μελέτης, ενώ από τον Ιούλιο του 2000 και μετά, πληθώρα γονιδιωμάτων διαφορετικών ειδών προστέθηκαν στη βάση αυτή. Η Ensembl Genome Browser περιλαμβάνει δεδομένα για πάνω από 30 είδη, η πλειονότητα των

οποίων είναι σπονδυλωτά, συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπου, του ποντικού, του αρουραίου, του zebrafish, καθώς και μια μεγάλη γκάμα οργανισμών που χρησιμοποιούνται ευρέως σε ερευνητικές μελέτες (π.χ. η *Drosophila Melanogaster* και ο *Caenorhabditis elegans*).

Η Ensembl Genome Browser διαθέτει πολλούς ιστότοπους και αρχεία από όπου μπορεί να γίνει η αναζήτηση διάφορων δεδομένων. Ο Ensembl GRCh37 (γνωστός επίσης και ως hg19) είναι ένας από τους ιστότοπους όπου παρέχει δεδομένα σχετικά με το ανθρώπινο γονιδίωμα. Μεταξύ των δεδομένων που μπορούν να αναζητηθούν είναι και αυτά των πολυμορφισμών και πιο συγκεκριμένα των SNPs ενός γονιδίου.

Στη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκε ο Ensembl GRCh37 (<https://grch37.ensembl.org/index.html>) για να γίνει εντοπισμός των SNPs που βρίσκονται σε γονιδιακές περιοχές των γονιδίων που κωδικοποιούν τις κυτοκίνες IL1, IFNg, TNF-α και IL8. Ο συγκεκριμένος ιστότοπος (GRCh37/hg19) επιλέχθηκε επειδή τα plates γονοτυπήθηκαν σε αυτό το assembly της Ensembl.

Στην αρχική σελίδα του Ensembl GRCh37 (Εικόνα 12) δηλώνεται η επιλογή για όλα τα είδη (all species) και για το γονίδιο που θέλουμε π.χ. TNFa. Η επόμενη σελίδα οδηγεί στα αποτελέσματα του γονιδίου που δηλώσαμε (Εικόνα 13). Η σελίδα όπου φαίνεται το γονίδιο δίνει διάφορες πληροφορίες σχετικά με αυτό όπως, το Ensembl Gene ID, περιγραφή, συνώνυμα, μετάγραφα, την τοποθεσία στο χρωμόσωμα κτλ. Από όλες τις παραπάνω πληροφορίες επιλέγεται η τοποθεσία του γονιδίου στο χρωμόσωμα η οποία δηλώνεται στη γραμμή εντολών του προγράμματος PLINK και έπειτα το PLINK στέλνει ένα αρχείο txt με τα SNPs list για το γονίδιο της επιλογής μας.



The screenshot shows the Ensembl GRCh37 homepage. At the top, there is a navigation menu with links like BLAST/BLAT, VEP, Tools, BioMart, Downloads, Help & Docs, and Blog. A search bar is present with the text 'Search all species...'. Below the search bar, there is a search form with a dropdown menu set to 'All species' and a text input field containing 'TNFa'. A 'Go' button is next to the input field. Below the search form, there is a 'Browse a Genome' section with the text 'The Ensembl project produces genome databases for vertebrates and other eukaryotic species, and makes this information freely available online.' Underneath, there is a list of 'Available genomes' with 'Human' selected. To the right of the 'Available genomes' section, there is a 'Want to use GRCh38?' section with a small image of a person and text about the main site featuring the GRCh38 Homo sapiens assembly. The right sidebar contains 'About this archive' information, 'Ensembl GRCh37 Release 100 (April 2020)' details, and 'Other news from our blog'.

Εικόνα 12: Αρχική σελίδα του Ensembl GRCh37 για την αναζήτηση ενός γονιδίου.

Location: HSCHR6_MHC_APD:31,555,632-31,557,434 Gene: TNF Transcript: TNF-001

Gene-based displays

- Summary
 - Splice variants
 - Transcript comparison
 - Gene alleles
- Sequence
 - Secondary Structure
 - Comparative Genomics
 - Paralogues
 - Genomic alignments
 - Gene tree
 - Gene gain/loss tree
 - Orthologies
 - Ontologies
 - GO: Cellular component
 - GO: Biological process
 - GO: Molecular function
 - Phenotypes
 - Genetic Variation
 - Variant table
 - Variant image
 - Structural variants
 - Gene expression
 - Pathway
 - Regulation
 - External references
 - Supporting evidence
 - ID History
 - Gene history

Gene: TNF ENSG00000228978

Description: tumor necrosis factor [Source:HGNC Symbol;Acc:11822]

Gene Synonyms: DIF, TNF-alpha, TNFA, TNFSF2

Location: [Chromosome HSCHR6_MHC_APD_31,555,632-31,557,434](#) forward strand.
GRCh37: GL000250.1
View this gene on the [primary assembly](#).

About this gene: This gene has 1 transcript ([splice variant](#)), 1 gene allele and is associated with [3 phenotypes](#).

Transcripts: [Hide transcript table](#)

Name	Transcript ID	bp	Protein	Biotype	CCDS	UniProt	Flags
TNF-001	ENST00000445232.2	1315	171aa	Protein coding	-	B5DUQ6	CDS 5' incomplete GENCODE basic

Summary

Name: [TNF](#) (HGNC Symbol)

Ensembl version: ENSG00000228978.2

Other assemblies: This gene maps to [31,643,520-31,645,322](#) in GRCh38 coordinates.

Gene type: Protein coding

Annotation method: Manual annotation (determined on a case-by-case basis) from the [Havana](#) project.

Alternative genes: This gene corresponds to the following database identifiers:
Havana gene: [Q1THUMG00000148782](#) (version 2)

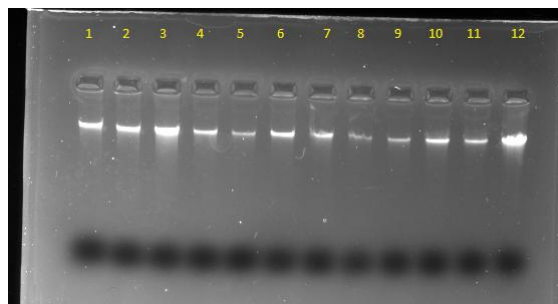
[Go to Region in Detail](#) for more tracks and navigation options (e.g. zooming)

Εικόνα 13: Παράδειγμα εμφάνισης αποτελεσμάτων στη βάση δεδομένων Ensembl GRCh37.

Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

1. Ποσοτικός προσδιορισμός του DNA

Μετά την απομόνωση του DNA ακολούθησε ποσοτικός και ποιοτικός προσδιορισμός με φωτομέτρηση και με ηλεκτροφόρηση προκειμένου να προσδιοριστεί η ποσότητα και η καθαρότητα του απομονωμένου DNA. Τα προϊόντα της απομόνωσης ελέγχθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης φαίνονται στην εικόνα 14 και είναι πολύ ικανοποιητικά.



Εικόνα 14: Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης. Μπορούμε να διακρίνουμε την επαρκή ποσότητα DNA που απομονώθηκε.

2. Γονοτύπηση δειγμάτων DNA

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η γονοτύπηση των δειγμάτων έγινε χρησιμοποιώντας chip της Illumina. Συγκεκριμένα, έγιναν γονοτυπήσεις σε τρία plates κι έτσι προέκυψαν τρία διαφορετικά αρχεία με τα αποτελέσματα γονοτύπησης αντίστοιχα για κάθε plate, όπου περιέχουν τις πληροφορίες που θέλουμε σχετικά με τους πολυμορφισμούς των γονιδίων που μελετάμε. Το κάθε plate περιέχει από 96 βιολογικά δείγματα σπέρματος. Έτσι προέκυψαν τα αρχεία GSA1rpheno, GSA2rpheno και GSA3rpheno.

3. Ανάλυση αποτελεσμάτων αλληλούχισης με PLINK

Για να γίνει η ανάλυση των αποτελεσμάτων των τριών παραπάνω αρχείων, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα PLINK που με κατάλληλες εντολές επεξεργάζεται αρχεία MAP και PED, εξάγει τα επιθυμητά αποτελέσματα και πραγματοποιεί αναλύσεις.

3.1. Δημιουργία αρχείου ανάλυσης –ένωση αρχείων αλληλούχισης

Προκειμένου να γίνει πιο εύκολη η ανάλυση, έγινε ένωση των δεδομένων των τριών αρχείων (GSA1rpheno, GSA2rpheno) σε ένα ενιαίο αρχείο που ονομάστηκε GSAMerged με χρήση της εντολής - -plink - -merge.

3.2. Quality control (QC)

Ο στόχος μιας ανάλυσης συσχέτισης ολόκληρου γονιδιώματος είναι να διαπιστωθούν οι διαφορές στις συχνότητες των αλληλομόρφων ανάμεσα σε cases και controls, ώστε να εντοπιστούν SNPs που συνεισφέρουν στο φαινότυπο. Προκειμένου να

εξασφαλιστεί η ποιότητα των δεδομένων, προηγείται η ανάλυση με το στάδιο του quality control (QC), ώστε να απομακρυνθούν μη αξιόπιστα δείγματα και SNPs.

Συγκεκριμένα, με χρήση των κατάλληλων εντολών του PLINK αφαιρέθηκαν τα δείγματα για τα οποία έλειπε ποσοστό μεγαλύτερο του 1% των γονοτύπων από το σύνολο των SNPs που γονοτυπήθηκαν, αφαιρέθηκαν τα πολύ σπάνια αλληλόμορφα που απαιτούν τεράστιο αριθμό δειγμάτων για να προκύψουν σωστές συσχετίσεις και αφαιρέθηκαν SNPs που γονοτυπήθηκαν σε λιγότερο από 99% των δειγμάτων.

Έτσι, προέκυψε το αρχείο GSA_QC με αποτελέσματα γονοτύπησης για 282 δείγματα και πιο συγκεκριμένα, 151 cases και 131 controls και 305.777 SNPs.

3.3. Ανάλυση συσχέτισης – Association Analysis

Μετά από το στάδιο του Quality Control, ακολούθησε η συσχέτιση ανάλυσης που βασίζεται στη δοκιμασία χ^2 για να συγκρίνει τις συχνότητες των αλληλομόρφων ανάμεσα σε control και cases για κάθε SNP.

Το αρχείο που προέκυψε από την ανάλυση είναι το GS2019assoc.assoc και μας δίνει τις συχνότητες εμφάνισης των αλληλομόρφων για κάθε SNP σε controls και cases, την τιμή του χ^2 αλλά και τις τιμές p-value και odd ratio. Από το συγκεκριμένο αρχείο επιλέχθηκαν SNPs με p-value ≤ 0.05 και odd ratio >1 . Το p-value αποτελεί δείκτη στατιστικής σημαντικότητας και το odd ratio μέτρο της δύναμης της συσχέτισης, (Πίνακας 2).

Πίνακας 2: Τμήμα αρχείου GS2019assoc.assoc αποτελεσμάτων που προκύπτει με την εντολή - -assoc. Οι στήλες αντιστοιχούν (1) στο χρωμόσωμα όπου βρίσκεται το SNP, (2) στο rs# του SNP, (3) στη θέση του ζεύγους βάσεων, (4) το πρώτο από το ζεύγος των αλληλόμορφων, (5) στη συχνότητα εμφάνισης των αλληλόμορφων γονιδίων στα δείγματα cases (frequency affected: F_A), (6) στη συχνότητα εμφάνισης των αλληλόμορφων γονιδίων στα δείγματα controls (frequency unaffected: F_U), (7) το δεύτερο από το ζεύγος των αλληλόμορφων, (8) στην τιμή του χ^2 , (9) στην τιμή του p-value (P) και (10) στο odds ratio (OR).

CHR	SNP	BP	A1	F_A	F_U	A2	CHISQ	P	OR
15	GSA-rs67310386	42205772	A	0.2237	0.3993	G	17.49	2,88E-02	0.4335
20	rs17404096	43391186	C	0.2368	0.4142	T	17.45	2,95E-02	0.439
7	rs179892	106023839	C	0.136	0.291	A	17.28	3,23E-02	0.3833
2	rs10168498	99382537	T	0.1667	0.05224	C	17.19	3,39E-02	3.629
13	GSA-rs9532899	42167055	T	0.008772	0.09328	C	17.09	3,56E-02	0.08602
3	rs6763869	115582838	A	0.05263	0.1716	G	16.9	3,95E-02	0.2681
4	GSA-rs7658585	77252196	T	0.2237	0.09328	C	16.15	5,87E-02	2.801
7	rs10280299	8750204	C	0.1447	0.2948	T	15.86	6,81E-02	0.4049
9	GSA-rs13289947	22551240	A	0.2061	0.3694	G	15.81	7,01E-02	0.4433
6	GSA-rs72867511	43020925	C	0.1009	0.01866	T	15.64	7,68E-02	5.901

3.4. Εύρεση πολυμορφισμών SNPs

Με την βοήθεια της βάσης δεδομένων Ensembl GRCh37 (<https://grch37.ensembl.org/index.html>) έγινε εντοπισμός των SNPs που βρίσκονται στις γονιδιακές περιοχές των γονιδίων που κωδικοποιούν τις κυτοκίνες, IFN γ , IL1, IL8 και TNF- α . Στην συνέχεια με τη συμβολή του προγράμματος PLINK δημιουργήθηκαν αρχεία txt με λίστες των SNPs. Η κάθε λίστα περιλαμβάνει τα SNPs των γονιδίων αντίστοιχα, όπως φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 3: Στην οριζόντια γραμμή του πίνακα αναφέρονται τα γονίδια που εκφράζουν τις κυτοκίνες που μελετάμε (IFN γ , IL1, IL8, TNF- α) και αντίστοιχα στην κάθετη στήλη του πίνακα τα SNPs με τον κωδικό rs# (reference SNP ID).

IFN γ	IL1	IL8	TNF α
rs2430561	rs36093393	rs1126647	rs1800610
	rs1800587		rs3093662
			rs3093664
			rs3093665

3.5. Αποτελέσματα συσχέτισης

Με βάση τον πίνακα 3, και τα SNPs από το κάθε γονίδιο, εντοπίστηκαν οι συχνότητες ανάμεσα στα δείγματα cases και στα controls (F_A, F_U) από το αρχείο GS2019assoc.assoc. Συνοπτικά τα αποτελέσματα συσχέτισης φαίνονται στους παρακάτω πίνακες.

Πίνακας 4: Αποτέλεσμα συσχέτισης για το γονίδιο που κωδικοποιεί την IFN γ .

CHR	SNP	BP	A1	F_A	F_U	A2	CHISQ	P	OR
12	rs2430561	68552522	T	0.5	0.4811	A	0.1739	0.6766	1.079

Πίνακας 5: Αποτέλεσμα συσχέτισης για το γονίδιο που κωδικοποιεί την IL1.

CHR	SNP	BP	A1	F_A	F_U	A2	CHISQ	P	OR
2	rs36093393	113520129	A	0.1096	0.1082	G	0.002634	0.9591	1.015
2	rs1800587	113542960	T	0.3026	0.3134	C	0.06738	0.7952	0.9506

Πίνακας 6: Αποτέλεσμα συσχέτισης για το γονίδιο που κωδικοποιεί την IL8.

CHR	SNP	BP	A1	F_A	F_U	A2	CHISQ	P	OR
4	rs1126647	74609045	T	0.4009	0.3798	A	0.2179	0.6407	1.093

Πίνακας 7: Αποτέλεσμα συσχέτισης για το γονίδιο που κωδικοποιεί τον TNF- α .

CHR	SNP	BP	A1	F_A	F_U	A2	CHISQ	P	OR
6	rs1800610	31543827	T	0.1667	0.2276	C	2.864	0.09057	0.6787
6	rs3093662	31544189	G	0.06579	0.07463	A	0.1467	0.7017	0.8732
6	rs3093664	31544642	G	0.0614	0.06716	A	0.06774	0.7947	0.9086
6	rs3093665	31545391	C	0.05263	0.04851	A	0.04378	0.8343	1.09

Από τους παραπάνω πίνακες διαπιστώνεται ότι οι πολυμορφισμοί στα μόρια των κυτοκινών δεν παρουσιάζουν σημαντικές στατιστικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων cases και controls.

E. Συμπεράσματα

Τα τελευταία χρόνια η υπογονιμότητα είναι ένα κοινό πρόβλημα που επηρεάζει ένα στα έξι ζευγάρια και το 50% αποδίδεται στον ανδρικό παράγοντα. Συγκεκριμένα, το 30% των περιπτώσεων οφείλεται αποκλειστικά στον ανδρικό παράγοντα, ενώ το 20% οφείλεται σε συνδυασμό ανδρικού και γυναικείου παράγοντα. Η υπογονιμότητα του ανδρικού παράγοντα είναι μια πολύπλοκη διαταραχή που επηρεάζει μεγάλο τμήμα του πληθυσμού. Στην Ελλάδα υπολογίζεται ότι ποσοστό 10-15% των ζευγαριών, που βρίσκονται σε αναπαραγωγική ηλικία, αντιμετωπίζουν πρόβλημα γονιμότητας. Πολλές αρσενικές περιπτώσεις στειρότητας δεν έχουν εμφανή αιτία και χαρακτηρίζονται ως ιδιοπαθή.

Η ανδρική υπογονιμότητα μπορεί να οφείλεται τόσο σε γενετικούς, όσο και σε μη γενετικούς παράγοντες. Η διερεύνηση των αιτιών της υπογονιμότητας οδήγησε στην μελέτη των κυτοκινών. Πρόκειται για ρυθμιστικές πρωτεΐνες που παράγονται τόσο φυσιολογικά, όσο και παθολογικά στους όρχεις (ανοσολογική απόκριση) από πολλούς διαφορετικούς κυτταρικούς πληθυσμούς, κυρίως από τα σωματικά κύτταρα Sertoli και Leydig καθώς και το μικροπεριβάλλον αυτών, και μπορούν να βρεθούν στο σπερματικό πλάσμα. Τα σωματικά κύτταρα των Leydig και Sertoli, εμπλέκονται σε διάφορες λειτουργίες τον όρχεων, κυρίως ρυθμίζουν την σπερματογένεση και επηρεάζουν την παραγωγή τεστοστερόνης, ενεργώντας σε πολλά επίπεδα του γοναδικού άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων (ΥΥΕ). Οποιαδήποτε ανισορροπία στην παραγωγή τους μπορεί να οδηγήσει σε στειρότητα.

Αξίζει να αναφερθεί ότι οι γενετικές ανωμαλίες αποτελούν έναν από τους σημαντικότερους αιτιολογικούς παράγοντες της ανδρικής υπογονιμότητας σε ποσοστό 15-30%. Στη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία μελετήθηκαν ιδιαίτερα οι γονιδιακές μεταλλάξεις και ειδικότερα οι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (single nucleotide polymorphism: SNPs) που αφορούν την αλλαγή σε ένα μόνο ζεύγος βάσεων σε μια θέση του γονιδιώματος, συγκεκριμένα στα αυτοσωμικά γονίδια που εκφράζουν τις κυτοκίνες IL1, IFN γ , TNF- α και IL8 και ιδιαίτερος στις αμετάφραστες περιοχές αυτών (ιντρόνια, υποκινητή, 5'UTR και 3'UTR περιοχές). Οι αμετάφραστες περιοχές φαίνεται ότι κρύβουν λειτουργικούς πολυμορφισμούς που μπορούν να επηρεάσουν την έκφραση των γονιδίων που τους φιλοξενούν, συμβάλλουν στην εμφάνιση του παθολογικού φαινοτύπου και κατά συνέπεια στην εμφάνιση ανδρικής υπογονιμότητας.

Χρησιμοποιήθηκαν 288 δείγματα σπέρματος από νορμοσπερμικούς (154 controls) και μη νορμοσπερμικούς (134 cases) άνδρες του Ελληνικού πληθυσμού. Έγινε η απομόνωση γενετικού υλικού DNA και ακολούθησε ποσοτικός προσδιορισμός με φωτομέτρηση και ηλεκτροφόρηση προκειμένου να προσδιοριστεί η ποσότητα και η καθαρότητα του απομονωμένου DNA. Εφόσον, η ποσότητα και ποιότητα του απομονωμένου DNA ήταν ικανοποιητική ακολούθησε η γονοτύπηση των δειγμάτων χρησιμοποιώντας chip της Illumina. Το συγκεκριμένο chip μας προσφέρει πληροφορίες για 642.824 δείκτες στο ανθρώπινο γονιδίωμα (SNPs), και ως εκ τούτου προσφέρει μια αρκετά μεγάλη κάλυψη του γονιδιώματος και ιδιαιτέρως των περιοχών των ιντρονίων, καθώς οι 256.673 δείκτες ανήκουν σε αυτές τις περιοχές. Έτσι, αναδεικνύεται πιο αντιπροσωπευτικά ο πολυμορφισμός των αμετάφραστων περιοχών. Έγιναν γονοτυπήσεις σε τρία plates κι έτσι προέκυψαν τρία διαφορετικά αρχεία, όπου περιέχουν τις πληροφορίες που θέλουμε σχετικά με τους πολυμορφισμούς των γονιδίων που μελετάμε.

Σημαντική ήταν η συμβολή της βιοπληροφορικής ανάλυσης η οποία κερδίζει συνεχώς έδαφος στις μελέτες και αναλύσεις συσχέτισης ολόκληρου γονιδιώματος έναντι των χρονοβόρων και ακριβών πειραματικών διαδικασιών. Για την επεξεργασία και την ανάλυση των αποτελεσμάτων της αλληλούχισης χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Plink με τη βοήθεια του οποίου έγινε αναδιάταξη, αποκωδικοποίηση και συγχώνευση όλων των γενετικών δεδομένων σε ένα αρχείο. Έτσι μας δόθηκε η δυνατότητα επεξεργασίας των δεδομένων για τον εντοπισμό συσχετίσεων μεταξύ μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (SNPs) και φαινοτυπικών χαρακτηριστικών υπογόνιμων ανδρών. Μέσω της βιοπληροφορικής ανάλυσης, δεν αναδείχθηκαν στατιστικά σημαντικοί πολυμορφισμοί στα μόρια κυτοκινών υπό εξέταση αλλά παρόλα αυτά υπήρχαν πολυμορφισμοί με διαφορές στις συχνότητες τους μεταξύ ασθενών και υγιών ατόμων. Απαιτούνται μελέτες οι οποίες θα μπορέσουν να συμπεριλάβουν την εξέταση περισσότερων πολυμορφισμών στα μόρια των κυτοκινών, σε κωδικές και μη περιοχές, αλλά και σε περισσότερα μόρια κυτοκινών για την πλήρη διερεύνηση του ανοσολογικού τοπίου του όρχι.

Επιπρόσθετα, πέρα από την αύξηση του αριθμού των δειγμάτων η οποία θα προσδώσει μια πιο δυναμική βάση για τη στατιστική σημαντικότητα, θα μπορούσαν να δείγματα να ομαδοποιηθούν ανά φαινοτυπική ομάδα και να αναλυθούν ξανά για συσχετίσεις μεταξύ ασθενών και υγιών ατόμων. Ένα σημαντικό επίσης βήμα στην ανάλυση αυτών των μορίων θα είναι η μέτρηση και ανάλυση της έκφρασης τους. Η εκτίμηση της υπερέκφρασης ή της υποέκφρασης των μορίων των κυτοκινών θα μπορέσει να ρίξει φως και στον λειτουργικό ρόλο των πολυμορφισμών.

Συμπερασματικά, στην παρούσα διπλωματική εργασία έχει καταστεί σαφής ο ρόλος των κυτοκινών στην λειτουργία των όρχεων, στη ρύθμιση της σπερματογένεσης και της δημιουργίας ενός προστατευμένου ανοσολογικά προφίλ στον όρχι, αλλά και πως μπορεί να οδηγήσουν στην ανδρική υπογονιμότητα όταν υπάρχουν πολυμορφισμοί. Επίσης, δόθηκε ιδιαίτερη έμφαση στην ανεύρεση πολυμορφισμών και την ανάλυση

συσχέτισης των αποτελεσμάτων μέσω στατιστικών δοκιμασιών. Έχουν γίνει πρόοδοι στον χαρακτηρισμό των ρόλων συγκεκριμένων γονιδίων. Ωστόσο, απαιτείται περαιτέρω μελέτη στο γενετικό υπόβαθρο του άντρα. Η διερεύνηση των κυτοκινών και οι πολυμορφισμοί σε μεγαλύτερη κλίμακα και σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων με τη χρήση κατάλληλων τεχνικών θα μπορούσε να δώσει στατιστικά μεγαλύτερη διαφορά συχνοτήτων μεταξύ των δειγμάτων. Η ανάλυση των γενετικών παραγόντων που επηρεάζουν τη γονιμότητα των ανδρών θα συμβάλλει στον προσδιορισμό των αιτίων της ιδιοπαθούς αρσενικής υπογονιμότητας, θα παράσχει πολύτιμες πληροφορίες για τη δημιουργία στοχευμένων θεραπειών και έτσι θα δώσει αποτελεσματικές λύσεις για τα προβλήματα των υπογόνιμων ζευγαριών.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Γιαννακούρης Νικόλαος, Νικολιουδάκης Νικόλαος, Κοκκορόγιαννης Θεόδωρος, (2015), Ηλεκτροφόρηση Μακρομορίων, Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας - Διατροφής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο, Εκδόσεις Κάλλιπος.

Ζίφα Α., Μαμούρης Ζ., Μούτου Α., (2008), Βιολογία, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Θεσσαλίας, Βόλος, σελ. 785 – 790.

Κανταρτζή Περσεφόνη – Δήμητρα, (2012), Η εκτίμηση του Κατακερματισμού του DNA των σπερματοζωαρίων στους υπογόνιμους άνδρες, Διδακτορική διατριβή, Ιατρική Σχολή Αριστοτέλειου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης.

Καρκαλέτση Μαργαρίτα, (2017), Ο ρόλος των μικρών μη κωδικών μορίων RNA (microRNA) στην υπογονιμότητα, Διπλωματική εργασία, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Ιατρικής Λάρισας.

Καρκαλούσος Πέτρος, (2009), Το ανδρικό αναπαραγωγικό σύστημα και η εργαστηριακή διάγνωση της ανδρικής υπογονιμότητας, Πτυχιακή εργασία, Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Αθήνας, Σχολή Επαγγελματιών Υγείας Και Πρόνοιας, Τμήμα Ιατρικών Εργαστηρίων.

Κατσαντώνη Δέσποινα, (2016), Νέα Δεδομένα στις Νοσηλευτικές Διεργασίες του Καρκίνου των Όρχεων, , Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Ηπείρου, Σχολή Επαγγελματιών Υγείας και Πρόνοιας, Τμήμα Νοσηλευτικής.

Λεμονιά Παρασκευή, (2018), Διερεύνηση και ανάλυση μικροελλειμμάτων στο χρωμόσωμα Υ υπογόνιμων ανδρών, Διπλωματική εργασία, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Λάρισας.

Μαρκαντώνη Μαρία (σε εξέλιξη). Γονιδιωματική: Μελέτη των αιτιών της ανδρικής υπογονιμότητας, Διδακτορική Διατριβή, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Νικηφορίδης Νικηφόρος, (2015), Διερεύνηση μεταλλάξεων στο χρωμόσωμα Υ που σχετίζονται με την υπογονιμότητα στον άνδρα, Διπλωματική εργασία, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας Σχολή Επιστημών Υγείας Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Λάρισας.

Τζαλλά-Ρέγκα Αικατερίνη, (2014), Ορμονικοί και μοριακοί δείκτες στην ανδρική υπογονιμότητα, Πτυχιακή εργασία, Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Αθήνας, Σχολή Επαγγελματιών Υγείας Και Πρόνοιας, Τμήμα Ιατρικών Εργαστηρίων.

Χαβάκη Σοφία, (2016), Γεννητικό σύστημα άρρενος - Διάμεσος Ιστός Σπερματικών Σωληναρίων, Ορμονική ρύθμιση της λειτουργίας των όρχεων, Εργαστήριο Ιστολογίας – Εμβρυολογίας, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ.

Χαβάκη Σοφία, (2016), Σπερματογένεση, Εργαστήριο Ιστολογίας – Εμβρυολογίας, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ.

Amena Khatun, Md Saidur Rahman, Myung-Geol Pan, (2018), Clinical assessment of the male fertility, *Obstetrics & Gynecology Science* vol.61(2), p.179–191.

Drożdżik Marek, Kaczmarek Maciej, Malinowski Damian, Broś Urszula, Kazienko Anna, Kurzawa Rafał & Kurzawski Mateusz, (2015), TGFβ3 (TGFB3) polymorphism is associated with male infertility, *Scientific Reports*, vol. 5, Article number: 17151.

Fraczek Monika, Kurpisz Maciej, (2015), Cytokines in the male reproductive tract and their role in infertility disorders, *Journal of Reproductive Immunology*, vol. 108, p. 98-104.

Hales Dale Buchanan, Diemer Thorsten and Hales Karen Held, (1999), Role of cytokines in testicular function, *Endocrine*, vol.10 (3), p. 201-217.

Hedger Mark P., Meinhardt Andreas, (2002), Cytokines and the immune-testicular axis, *Journal of Reproductive Immunology*, vol. 58, p. 1-26.

Katz D. J., Teloken P. & Shoshany O., (2017), Male infertility – The other side of the equation, *Australian Fam Physician*, vol. 46(9), p. 641–646.

Lauralee Sherwood, (2016), Εισαγωγή στη Φυσιολογία του Ανθρώπου – Από τα κύτταρα στα συστήματα, Ακαδημαϊκές Εκδόσεις Ι. Μπάσδρα και ΣΙΑ Ο.Ε, σελ. 927-942.

Loveland Kate L. ,Pueschl Dana, Indumathy Sivanjah, Bergmann Martin, Loveland Bruce E., Hedger Mark P., Schuppe Hans-Christian, (2017), Cytokines in Male Fertility and Reproductive Pathologies: Immunoregulation and Beyond, *Molecular and Structural Endocrinology*, a section of the journal *Frontiers in Endocrinology*, vol. 8, article 307.

Marees A.T., de Kluiver H., Stringer S., Vorspan F., Curis E., Marie-Claire C., Derks E.M., (2018), A tutorial on conducting genome-wide association studies: Quality control and statistical analysis, *International journal of methods in psychiatric research*, vol. 27(2), e1608.

O' Flynn O'Brien K.L., Varghese A.C, Agarwal A., (2010), The genetic causes of male factor infertility: A review, *Fertility and Sterility*, vol.93(1), p.1-12.

Poongothai J., Gopenath T. S., Manonayaki S., (2009), Genetics of human male infertility, Singapore Medical journal, vol.50(4), p. 336-47.

Purcell S., Neale B., Todd-Brown K., Thomas L., Ferreira M.A., Bender D., Maller J., de Bakker P.I., Daly M.J., Sham P.C., (2007), PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses, American journal of human genetics, 81(3), 559–575.

Shastri Barkur S., (2009), SNPs: Impact on Gene Function and Phenotype, Single Nucleotide Polymorphisms, Methods in Molecular Biology 578, Chapter 1, vol. 578, p. 3-22.

Syriou Vassiliki, Papanikolaou Dimitrios, Kozyraki Ariadni, Goulis Dimitrios G., (2018), Cytokines and male infertility, European Cytokine Network, vol. 29(3), p. 73-82.

Tronchon V., Vialard F., Sirkasi M. El, Dechaud H., Rollet J., Albert M., Bailly M., Roy P., Mauduit C., Fenichel P., Selva J., Benahmed M., (2008), Tumor necrosis factor-alpha -308 polymorphism in infertile men with altered sperm production or motility, Human Reproduction, Vol. 23 (12), p. 2858–2866.

Weyrich A., (2012), Preparation of Genomic DNA from Mammalian Sperm, Current Protocols in Molecular Biology, vol. 98: 2.13.1-2.13.3.

ΔΙΚΤΥΑΚΟΙ ΤΟΠΟΙ

Δημήτριος Α. Μπιλάλης, Χαρούλα Μαθιοπούλου Μπιλάλη, (2014), Υπογονιμότητα: Τι να ψάξω και ποιες εξετάσεις να κάνω, διαθέσιμο on line:

<https://www.iatronet.gr/ygeia/maieftiki-egkymosyni/article/26892/ypogonimotita-ti-na-psaxw-kai-poies-exetaseis-na-kanw.html>

Efsyn, (2019), Ουραγός στον δείκτη γονιμότητας η Ελλάδα στην Ε.Ε., Η Εφημερίδα των συντακτών, διαθέσιμο on line:

<https://www.efsyn.gr/node/186844>

Embryolab Fertility Clinic, (2018), Spermogene: Διάγνωση της Ανδρικής Υπογονιμότητας, διαθέσιμο on line:

<https://embryolab.eu/spermogene-διάγνωση-της-αντρικής-υπογονιμότη/>

Medical mate, (2010), Κυτταροκίνες, διαθέσιμο on line:

<http://medicalmate.gr/content/8-diafora>