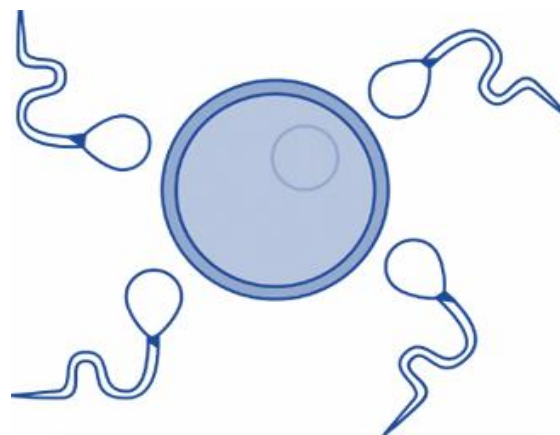




**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

Διπλωματική Εργασία

**Μελέτη του γενετικού προφίλ Ελλήνων ανδρών με
ολιγοσπερμία με τη χρήση αλληλούχησης νέας γενιάς
Study of the genetic profile of Greek oligozoospermic men
using Next-Generation Sequencing (NGS)**



Πάτσαλη Γεωργία του Θωμά

Λάρισα, 2023

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΠΡΟΦΙΛ ΕΛΛΗΝΩΝ ΑΝΔΡΩΝ
ΜΕ ΟΛΙΓΟΣΠΕΡΜΙΑ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗΣ ΝΕΑΣ ΓΕΝΙΑΣ**

**STUDY OF THE GENETIC PROFILE OF GREEK OLIGOZOOSPERMIC MEN
USING NEXT-GENERATION SEQUENCING (NGS)**

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΜΑΜΟΥΡΗΣ ΖΗΣΗΣ	Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
ΣΑΡΑΦΙΔΟΥ ΘΕΟΛΟΓΙΑ	Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
ΓΙΑΝΝΟΥΛΗΣ ΘΕΜΙΣΤΟΚΛΗΣ	Επίκουρος Καθηγητής Γονιδιωματικής, Εξέλιξης και Βιοποικιλότητας, Τμήμα Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας (ΒΙΟΖ) του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών κ. Μαμούρη Ζήση.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως τον κ. Μαμούρη Ζήση για την ανάθεση του θέματος της διπλωματικής μου εργασίας και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Επίκουρο Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών κ. Σαραφίδου Θεολογία και τον Επίκουρο Καθηγητή Γονιδιωματικής, Εξέλιξης και Βιοποικιλότητας κ. Γιαννούλη Θεμιστοκλή για την προθυμία τους να συμμετάσχουν στην τριμελή επιτροπή.

Ακόμα, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην υποψήφια Διδάκτορα Μαρία-Άννα Κυργιαφίνη για την συνεργασία, την επίβλεψη και την συνεχή καθοδήγησή της, προκειμένου να υλοποιηθεί αυτή η διπλωματική. Η βοήθεια και η στήριξη που μου προσέφερε κατά την διάρκεια εκπόνησής της, ήταν πραγματικά πολύτιμη.

Τέλος, ευχαριστώ πολύ την οικογένεια μου και τους φίλους μου για την υποστήριξή τους καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	5
A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	
1. Ανδρική υπογονιμότητα	
1.1. Ορισμός ανδρικής υπογονιμότητας.....	7
1.2. Σπερματογένεση.....	7
1.3. Διάγνωση ανδρικής υπογονιμότητας.....	10
1.4. Υπότυποι ανδρικής υπογονιμότητας.....	13
1.5. Αίτια ανδρικής υπογονιμότητας.....	16
1.5.1. Προ-ορχικά αίτια ανδρικής υπογονιμότητας	16
1.5.2. Ορχικά αίτια ανδρικής υπογονιμότητας	17
1.5.3. Μετα-ορχικά αίτια ανδρικής υπογονιμότητας.....	20
2. Ολιγοσπερμία	
2.1. Ορισμός ολιγοσπερμίας.....	21
2.2. Γονίδια που εμπλέκονται στην εμφάνιση ολιγοσπερμίας.....	21
2.2.1. <i>MHL3</i> (MutL Homolog 3 gene).....	21
2.2.2. <i>SPATA</i> (Spermatogenesis Associated gene family).....	22
2.2.3. <i>RPL10L</i> (Ribosomal Protein L10 Like gne).....	23
2.2.4. <i>RHOX</i> (X-linked Reproductive Homeobox RHOX gene cluster).....	23
2.2.5. <i>MEST</i> (Mesoderm Specific Transcript gene).....	24
3. Μεθοδολογία μελέτης της ολιγοσπερμίας.....	25
3.1 Γονιδιωματική ανάλυση.....	25
3.1.1. Αλληλούχηση νέας γενιάς (NGS: Next Generation Sequencing)	25
3.1.2. Μελέτη συσχέτισης ολόκληρου του γονιδιώματος (GWAS: Genome-Wide Association Studies)	26
3.2. Μεταγραφωμική ανάλυση.....	27
3.3. Πρωτεωμική ανάλυση.....	28
3.4. Μελέτη επιγενετικών τροποποιήσεων.....	30
B. ΣΚΟΠΟΣ.....	32
Γ. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	
1. Επιλογή βιολογικού υλικού.....	33
2. Προετοιμασία δειγμάτων και αλληλούχηση ολόκληρου του γονιδιώματος.....	33
3. Ανάλυση δεδομένων αλληλούχησης και εντοπισμός πολυμορφισμών.....	34
4. Φιλτράρισμα των μοναδικών μεταλλάξεων και εντοπισμός σημαντικών πολυμορφισμών.....	35
5. Βάσεις δεδομένων και ανάλυση του ρόλου των γονιδίων στα οποία εντοπίζονται οι πολυμορφισμοί	36
5.1. Ensembl Genome Browser.....	36
5.2. ShinyGO 0.77.....	38
5.3. STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins).....	39
Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	40
1. Ταυτοποίηση πολυμορφισμών υψηλής επίδρασης.....	40
2. Ταυτοποίηση πολυμορφισμών μέτριας επίδρασης.....	45
3. Μελέτη του ρόλου των γονιδίων στα οποία εντοπίστηκαν πολυμορφισμοί υψηλής και μέτριας επίδρασης.....	45
4. Εντοπισμός γονιδίων με πολλαπλούς πολυμορφισμούς.....	48
E. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	49
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	53
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	58

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ανδρική υπογονιμότητα είναι μια σχετικά συχνή παθολογική κατάσταση που φαίνεται να απασχολεί σημαντικό ποσοστό των ζευγαριών που βρίσκονται σε αναπαραγωγική ηλικία. Μεταξύ των διαφόρων υποτύπων της ανδρικής υπογονιμότητας, η γενετική βάση της ολιγοσπερμίας δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί. Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η διερεύνηση του γενετικού προφίλ Ελλήνων ανδρών με ολιγοσπερμία και η καταγραφή και ανάδειξη πολυμορφισμών που σχετίζονται με αυτή με την αξιοποίηση της μεθόδου αλληλούχησης νέας γενιάς (Next Generation Sequencing). Αρχικά, έγινε απομόνωση DNA από δείγματα αίματος νορμοσπερμικών και ολιγοσπερμικών ανδρών. Μετά την αλληλούχηση ολόκληρου του γονιδιώματος, ακολούθησε βιοπληροφορική ανάλυση προκειμένου να εντοπιστούν μεταλλάξεις που εντοπίζονται μόνο στους ολιγοσπερμικούς άνδρες και πιθανόν συμβάλλουν στην εμφάνιση του φαινοτύπου. Έπειτα από εφαρμογή μιας σειράς φίλτρων, επιλέχθηκαν συνολικά 215 πολυμορφισμοί σε κωδικές περιοχές (78 υψηλής επίδρασης και 137 μέτριας επίδρασης), οι οποίοι εντοπίζονται αποκλειστικά σε ολιγοσπερμικούς άνδρες. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε ανάλυση οντολογίας (Gene Ontology analysis) ώστε να διερευνηθεί ο ρόλος των γονιδίων στα οποία εντοπίζονται οι πολυμορφισμοί. Προέκυψε ότι αυτά συμμετέχουν σε σημαντικές για το κύτταρο διεργασίες, όπως η οργάνωση και ο σχηματισμός δομικών συστατικών του κυτταροσκελετού. Επηρεάζεται συγκεκριμένα η κατασκευή του αξονήματος, μιας δομής που εντοπίζεται στο εσωτερικό του μαστιγίου των σπερματοζωαρίων. Επιπλέον, μεταλλάξεις που επηρεάζουν τη δομή και τη λειτουργία των μικροσωληνίσκων μπορούν να προκαλέσουν προβλήματα στον σχηματισμό της μιτωτικής ατράκτου που απαιτείται για την διαδικασία της σπερματογένεσης. Πολλές από τις μεταλλάξεις επίσης εντοπίστηκαν σε γονίδια που έχουν συσχετιστεί στο παρελθόν με την ανδρική υπογονιμότητα ή την σπερματογένεση. Επομένως, η συγκεκριμένη μελέτη μπορεί να συμβάλει στην κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που εμπλέκονται στην εμφάνιση ολιγοσπερμίας.

ABSTRACT

Male infertility is a relatively common pathological condition that affects a significant percentage of couples of reproductive age. Among the various subtypes of male infertility, the genetic basis of oligozoospermia has not yet been fully elucidated. The present study aimed to investigate the genetic profile of Greek men with oligozoospermia and to report polymorphisms associated with oligozoospermia by using next-generation sequencing (NGS). At first, DNA was isolated from blood samples of normozoospermic and oligozoospermic men. After whole genome sequencing, bioinformatic analysis followed in order to identify mutations found only in oligozoospermic males that possibly contribute to the phenotype. After variant prioritization with a series of filters, a total of 215 coding region variants were selected (78 with high impact and 137 with moderate impact), which are found exclusively in oligozoospermic men. Additionally, a gene ontology analysis (GO) was performed to investigate the role of the genes in which the variants are mapped. The genes are involved in important cellular processes, such as the organization and formation of structural components of the cytoskeleton. The construction of the axoneme, a structure located inside the sperm flagellum, is specifically affected. Furthermore, mutations that affect the structure and function of microtubules can disrupt the formation of the mitotic spindle that is required for the process of spermatogenesis. Many of the mutations were also located in genes previously associated with male infertility or the spermatogenesis process. Therefore, this particular study may contribute to a better understanding of the molecular mechanisms involved in the pathogenesis of oligozoospermia.

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Ανδρική Υπογονιμότητα

1.1 Ορισμός ανδρικής υπογονιμότητας

Η υπογονιμότητα σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO) ορίζεται ως η αδυναμία σύλληψης ενός ζευγαριού, ύστερα από δώδεκα μήνες συχνών σεξουαλικών επαφών χωρίς προφυλάξεις. Η υπογονιμότητα διακρίνεται σε πρωτοπαθή και δευτεροπαθή. Ο όρος πρωτοπαθής χρησιμοποιείται για περιπτώσεις όπου το ζευγάρι δυσκολεύεται να συλλάβει για πρώτη φορά παρά τις τακτικές προσπάθειες. Αντιθέτως, ο όρος δευτεροπαθής αναφέρεται σε περιπτώσεις που έχει επιτευχθεί εγκυμοσύνη στο παρελθόν ανεξάρτητα της τελικής της έκβασης (Vander Borgh & Wyns, 2018).

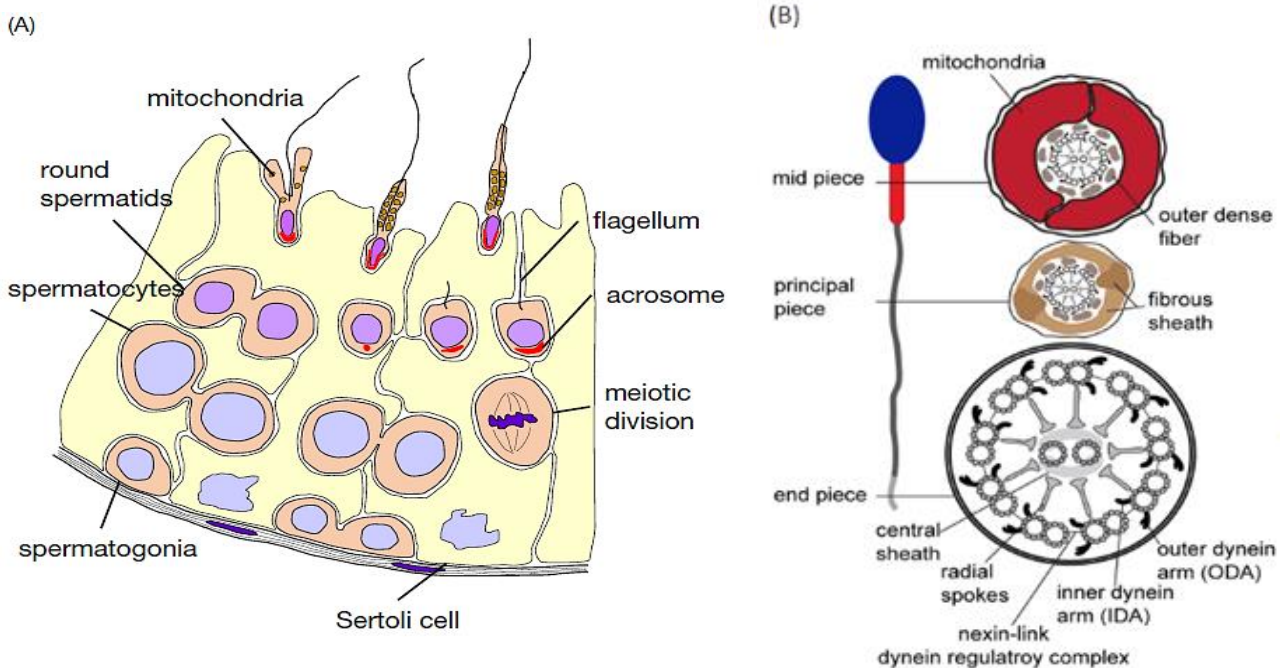
Υπολογίζεται ότι περίπου 187 εκατομμύρια άνθρωποι παγκοσμίως έρχονται αντιμέτωποι με προβλήματα υπογονιμότητας και πιο συγκεκριμένα, το φαινόμενο αυτό φαίνεται να απασχολεί το 8-12% των ζευγαριών που βρίσκονται σε αναπαραγωγική ηλικία (Agarwal et al., 2021). Είναι σημαντικό να διευκρινιστεί ότι στην εμφάνιση του φαινομένου αυτού συμβάλλουν τόσο ο ανδρικός, όσο και ο γυναικείος παράγοντας, με τον ανδρικό παράγοντα να συνεισφέρει στο 20-50% των περιπτώσεων. Ειδικότερα, η ανδρική υπογονιμότητα σχετίζεται με την αδυναμία του σπέρματος ενός άνδρα να γονιμοποιήσει το ωάριο μιας υγιούς γυναίκας και συνιστά μια παθολογική κατάσταση, η συχνότητα της οποίας έχει αυξηθεί δραματικά τις τελευταίες δεκαετίες εξαιτίας ποικίλων παραγόντων (Mehra et al., 2018).

1.2 Σπερματογένεση

Πολλές από τις περιπτώσεις ανδρικής υπογονιμότητας είναι άμεσα συνυφασμένες με διαταραχές κατά την διαδικασία της σπερματογένεσης (διαδικασία παραγωγής σπερματοζωαρίων). Η σπερματογένεση λαμβάνει χώρα στα σπερματοφόρα σωληνάκια των όρχεων και υπόκειται σε πολύπλοκη ορμονική ρύθμιση (Εικόνα 1). Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει τρεις διακριτές φάσεις (Εικόνα 1Α)(Jodar et al., 2017a):

1. Κατά την πρώτη φάση του μιτωτικού πολλαπλασιασμού, τα αδιαφοροποίητα διπλοειδή αρσενικά γεννητικά κύτταρα (αρχέγονα γεννητικά κύτταρα - PGCs: primordial germ cells) διαφοροποιούνται σε δύο διαφορετικούς τύπους σπερματογονίων, τα οποία εντοπίζονται κοντά στη βασική πλευρά των σπερματοφόρων σωληναρίων. Τα σπερματογόνια τύπου Α υπόκεινται σε αντιγραφή, ώστε να εξασφαλιστεί η διατήρηση του μελλοντικού σπερματογονικού πληθυσμού, ενώ τα σπερματογόνια τύπου Β εισέρχονται σε μείωση ώστε να διαφοροποιηθούν τελικά προς σπερματοζωάρια (Jodar et al., 2017).

2. Κατά τη δεύτερη φάση, τα σπερματογόνια τύπου B διαιρούνται μία φορά και μετατρέπονται σε πρωτογενή σπερματοκύτταρα. Κάθε πρωτογενές σπερματοκύτταρο υφίσταται την πρώτη μειωτική διαίρεση, αποδίδοντας ένα ζεύγος δευτερογενών σπερματοκυττάρων, τα οποία ολοκληρώνουν με την σειρά τους τη δεύτερη μειωτική διαίρεση. Τα απλοειδή κύτταρα που σχηματίζονται με αυτόν τον τρόπο ονομάζονται σπερματίδες. Κατά τη διάρκεια των μειωτικών διαίρεσεων, τα γαμετικά κύτταρα διαφοροποιούνται και μετατοπίζονται προς τον αυλό των σπερματοφόρων σωληναρίων (Jodar et al., 2017a).
3. Μέσω της τελικής φάσης, που ονομάζεται σπερμιογένεση (διαδικασία ωρίμανσης του σπέρματος), οι σπερματίδες υφίστανται σημαντικές πυρηνικές, μορφολογικές και κυτταροπλασματικές αλλαγές, ώστε να επιτευχθεί ο σχηματισμός των ώριμων πλέον σπερματοζωαρίων. Ακολουθεί απομάκρυνση των σπερματίδων από τον αυλό των σπερματοφόρων σωληναρίων και μεταφορά τους στην επιδιδυμίδα, όπου ολοκληρώνεται η διαδικασία της ωρίμανσης (Castañeda et al., 2018).



Εικόνα 1. (Α) Η διαδικασία της σπερματογένεσης (Castañeda et al., 2018) , (Β) Δομικά χαρακτηριστικά σπερματοζωαρίου (Aprea, Raidt, et al., 2021).

Στις τροποποιήσεις που απαιτούνται για την ωρίμανση των σπερματοζωαρίων περιλαμβάνονται οι εξής χαρακτηριστικές διαδικασίες:

- 1) Σχηματισμός ακροσώματος: Κατά τον σχηματισμό του ακροσώματος, η συσκευή Golgi σχηματίζει μια δομή που μοιάζει με καλύπτρα (το άκροσωμα), η οποία διαμορφώνεται κοντά στο εμπρόσθιο τμήμα του πυρήνα. Το ακρόσωμα περιέχει

υδρολυτικά ένζυμα και πρωτεΐνες που επιτρέπουν στο σπέρμα να διαπεράσει την εξωτερική μεμβράνη του ωαρίου κατά τα πρώιμα στάδια της γονιμοποίησης (Lin & Troyer, 2014).

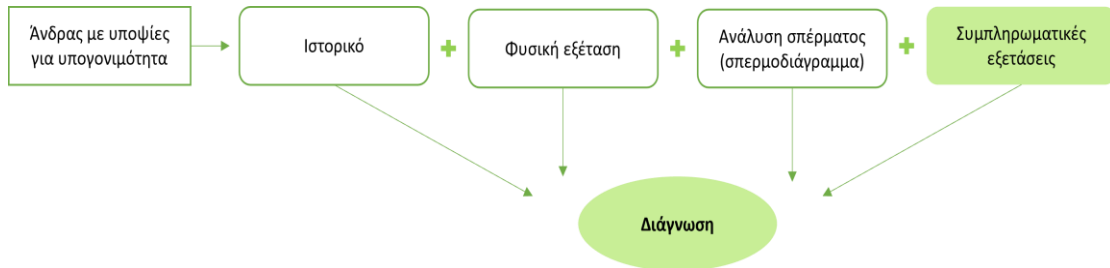
- 2) Πυρηνική συμπύκνωση: Κατά την πυρηνική συμπύκνωση, ο πυρήνας γίνεται μικρότερος και το πυρηνικό περιεχόμενο συμπυκνώνεται σε μεγάλο βαθμό. Στα μέσα της σπερμιογένεσης, οι πρωτεΐνες ιστόνης αντικαθίστανται από πρωταμίνες. Οι πρωταμίνες είναι εξαιρετικά βασικές πρωτεΐνες, γεγονός που τους επιτρέπει τη δημιουργία ισχυρότερων αλληλεπιδράσεων με τα μόρια DNA. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές προσδίδουν μια πιο συμπαγή μορφή στον πυρήνα, καθώς επίσης συμβάλλουν στην διακοπή της μεταγραφής (Lin & Troyer, 2014).
- 3) Ανάπτυξη μαστίγιου: Το μαστίγιο συνιστά το μέσο πρόωθησης του σπερματοζωαρίου και σε αυτό συναντάται το αξόνημα, μια δομή που ξεκινά να σχηματίζεται από μικροσωληνίσκους που πηγάζουν από το κεντριόλιο, στη βάση του σπερματικού πυρήνα. Το βασικό τμήμα του αξονήματος αποτελείται από εννέα ζεύγη μικροσωληνίσκων, τα οποία διατάσσονται περιφερικά και περιβάλλουν ένα κεντρικό ζεύγος μικροσωληνίσκων. Για την κάμψη και την πρόωθηση του μαστίγιου είναι αναγκαία και η συμμετοχή πρωτεϊνικών δομών, όπως για παράδειγμα πρωτεϊνών δυνείνης (Argea, Raidt, et al., 2021). Το μαστίγιο μπορεί να διαχωριστεί σε δυο βασικά τμήματα, το μέσο και το κύριο τμήμα. Το μέσο τμήμα (αυχένας) εντοπίζεται κοντά στην κεφαλή του σπερματοζωαρίου και είναι πλούσιο σε μιτοχόνδρια για παροχή ενέργειας, ενώ το κύριο τμήμα (ουρά) στερείται μιτοχονδρίων, αλλά είναι απαραίτητο, καθώς προσδίδει στο σπερματοζωάριο την χαρακτηριστική κινητικότητά του (Lin & Troyer, 2014).
- 4) Σταδιακή απώλεια κυτταροπλάσματος: Το εναπομείναν κυτταρόπλασμα (υπολειπόμενο σωματίο), το οποίο είναι περιττό σε αυτό το στάδιο, αφαιρείται μέσω φαγοκυττάρωσης από τα περιβάλλοντα κύτταρα Sertoli (Lin & Troyer, 2014). Η απώλεια του κυτταροπλάσματος χρειάζεται έτσι ώστε τα σπερματοζωάρια να αποκτήσουν την ιδανική μορφολογία που απαιτείται για την γονιμοποίηση (Castañeda et al., 2018).

Συνολικά λοιπόν, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 1A,1B, κάθε ώριμο σπερματοζωάριο απαρτίζεται από τις εξής ανατομικές δομές (Alves et al., 2020):

- την κεφαλή, η οποία αποτελείται από τον ακρόσωμα και τον πυρήνα περιβαλλόμενα από μια πλασματική μεμβράνη,
- το μέσο τμήμα (αυχένα), που συνδέει την κεφαλή με το υπόλοιπο τμήμα του σπερματοζωαρίου και σε αυτό εντοπίζεται το κεντριόλιο (σημείο σχηματισμού του μαστίγιου) και
- την ουρά (μαστίγιο).

1.3 Διάγνωση ανδρικής υπογονιμότητας

Προκειμένου να αξιολογηθεί η ανδρική γονιμότητα κρίνεται αναγκαία η πραγματοποίηση μιας σειράς εξετάσεων με τον τρόπο που παρουσιάζεται παρακάτω (Barratt et al., 2017):



Εικόνα 2. Πορεία διάγνωσης ανδρικής γονιμότητας.

Χαρακτηριστικά, σε ένα διαγνωστικό πρόγραμμα πρέπει να συμπεριλαμβάνονται: η λεπτομερής λήψη ιατρικού και σεξουαλικού ιστορικού, η φυσική εξέταση και η ανάλυση σπέρματος (σπερμοδιάγραμμα) μαζί με συμπληρωματικές εξετάσεις, εφόσον καταστεί απαραίτητο. Αναλυτικότερα:

α) Η **λήψη ιατρικού ιστορικού** επικεντρώνεται στην ταυτοποίηση πιθανών παραγόντων που θα μπορούσαν να επηρεάσουν ως ένα βαθμό την γονιμότητα ενός άνδρα, όπως για παράδειγμα τυχόν συστηματικές παθήσεις, προηγούμενες χειρουργικές επεμβάσεις, αλλεργίες, υπερβολική κατανάλωση αλκοόλ, έκθεση σε τοξικές ουσίες, λήψη φαρμάκων ή αναβολικών στεροειδών, χημειοθεραπείες-ακτινοθεραπείες. Όσον αφορά τη λήψη σεξουαλικού ιστορικού, ο ασθενής καλείται να παρέχει πληροφορίες που μπορούν να αφορούν α) τις πιθανότητες προδιάθεσης για υπογονιμότητα, β) το χρονικό διάστημα που αντιμετωπίζουν προβλήματα υπογονιμότητας με τους συντρόφους τους, γ) την σεξουαλική τους ζωή, δ) τυχόν εμφάνιση παθήσεων που σχετίζονται με τις γονάδες (π.χ. τραυματισμός όρχεων, κρυσορχία, κισσοκήλη), ε) σεξουαλικά μεταδιδόμενα νοσήματα (Barratt et al., 2017).

β) Η **φυσική εξέταση** περιλαμβάνει τον έλεγχο των γεννητικών οργάνων και την αξιολόγηση των δευτερογενών χαρακτηριστικών του ανδρικού φύλου (π.χ. κατανομή τριχοφυΐας, φωνή, αναλογίες σώματος, γυναικομαστία, κ.ά.). Ιδιαίτερη έμφαση δίνεται στην εξέταση της ανατομίας του πέους και της θέσης της ουρήθρας, στην μέτρηση του μεγέθους των όρχεων, στην ψηλάφηση των όρχεων και της επιδιδυμίδας για τυχόν κύστες και του οσχέου για κισσοκήλη. Ακόμα, ελέγχονται οι σπερματικοί πόροι σε περίπτωση που παρατηρείται μερική ή ολική απώλεια τους (Krausz, 2011).

γ) Η **ανάλυση σπέρματος (σπερμοδιάγραμμα)** θεωρείται εξαιρετικά σημαντική για την σωστή διάγνωση και εκτίμηση της συμβολής του ανδρικού παράγοντα στην αποτυχία σύλληψης ενός ζευγαριού. Εφόσον υπάρχουν υποψίες για υπογονιμότητα, δείγματα σπέρματος του άνδρα ελέγχονται για συγκεκριμένες παραμέτρους και αξιολογούνται βάσει προκαθορισμένων τιμών που έχουν οριστεί από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO,2010) όπως φαίνεται παρακάτω στον Πίνακα 1. Ανάμεσα

στις παραμέτρους αυτές περιλαμβάνονται η πυκνότητα, ο όγκος και το pH του σπέρματος, καθώς επίσης και ο συνολικός αριθμός, η κινητικότητα και η μορφολογία των σπερματοζωαρίων (Krausz, 2011). Σε περίπτωση που εντοπιστούν μη φυσιολογικές παράμετροι, συστήνεται επανάληψη της ανάλυσης.

Πίνακας 1. Πίνακας παραμέτρων σπερμοδιαγράμματος και ελάχιστα όρια αναφοράς με βάση τις οδηγίες του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (ΠΟΥ)

Παράμετροι	Ελάχιστο όριο αναφοράς
Όγκος	1,5 ml
Συγκέντρωση σπέρματος	15 ($\times 10^6$ /ml)
Συνολικός αριθμός σπερματοζωαρίων	39 ($\times 10^6$)
Προοδευτική κινητικότητα	32%
Συνολική κινητικότητα	40%
Ζωτικότητα	58%
Φυσιολογική μορφολογία	4%
pH	7.2
Λευκοκύτταρα	1 ($\times 10^6$ /ml)

Αξίζει να τονιστεί ότι η αξιοπιστία της ανάλυσης μπορεί να επηρεαστεί από παράγοντες που σχετίζονται κυρίως με την διαδικασία της δειγματοληψίας (Krausz, 2011). Για τον λόγο αυτό συνιστάται η πιστή ακολούθηση οδηγιών, σύμφωνα με τις οποίες προτείνεται:

- Αποχή από σεξουαλική δραστηριότητα 2-5 μέρες πριν την μέρα της λήψης δείγματος.
- Προσεκτική συλλογή δείγματος χωρίς απώλειες.
- Διατήρηση κατάλληλων συνθηκών κατά την μεταφορά του (διατήρηση σε θερμοκρασία περίπου 37°C).
- Αποφυγή δειγματοληψίας μετά από φαρμακευτική αγωγή ή εμπύρετα περιστατικά.

Οι **συμπληρωματικές εξετάσεις** πραγματοποιούνται με σκοπό να αποσαφηνιστούν τα αίτια του προβλήματος και επιλέγονται ειδικά βάσει κλινικής εικόνας του ασθενούς και του φαινοτύπου του δείγματος σπέρματος (Sikka & Hellstrom, 2016). Κάποιες από τις πιο σχετικές εξετάσεις που είναι πιθανόν να πραγματοποιηθούν σε δεύτερη φάση είναι:

1. Ενδροκρινικές εξετάσεις: Περιλαμβάνουν τις μετρήσεις επιπέδων ορμονών (ωοθυλακιotropου ορμόνης- FSH, ωχρινοτροπου ορμόνης- LH, ολικής τεστοστερόνης- T, προλακτίνης)
2. Γενετικός έλεγχος: Περιλαμβάνει την εφαρμογή μοριακών και γενετικών μεθόδων για τον εντοπισμό χρωμοσωμικών ανωμαλιών (π.χ. επιπλέον

χρωμόσωμα X - σύνδρομο Klinefelter, χρωμοσωμικές ελλείψεις του χρωμοσώματος Y, κ.ά), μεταλλάξεων στο γονίδιο *CFTR* (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator), το οποίο είναι αντιπροσωπευτικό της κυστικής ίνωσης, η οποία σχετίζεται με απουσία των σπερματικών πόρων κ.ά.)

3. Μικροβιολογικός έλεγχος σπέρματος για να αποκλειστεί η πιθανότητα λοίμωξης που μπορεί να επηρεάσει την σπερματογένεση και την εκκριτική ικανότητα των βοηθητικών αδένων, συμβάλλοντας έτσι στην υπογονιμότητα.

Ωστόσο, αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι παρά την πρόοδο των τεχνολογιών και των διαγνωστικών μεθόδων στον τομέα της ανδρολογίας, ένα σημαντικό ποσοστό ανδρών παραμένει να χαρακτηρίζεται από ανεξήγητη ανδρική υπογονιμότητα. Οι άνδρες αυτοί κατηγοριοποιούνται ως πάσχοντες παρά το γεγονός ότι έχουν φυσιολογική ανάλυση σπέρματος, φυσιολογικό ιστορικό και φυσική εξέταση, ενώ παράλληλα έχει αποκλειστεί το ενδεχόμενο συμβολής του γυναικείου φύλου στο παθολογικό αυτό φαινόμενο. Οι περιπτώσεις αυτές χαρακτηρίζονται ως περιπτώσεις ιδιοπαθούς ανδρικής υπογονιμότητας. Ανάμεσα στους πιθανούς παράγοντες που μπορεί να ευθύνονται για τις δυσκολίες σύλληψης σε αυτές τις περιπτώσεις, περιλαμβάνονται οι εξής: η παρουσία αντισπερμικών αντισωμάτων, ο κατακερματισμός του σπερματικού DNA και τα αυξημένα επίπεδα δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS: Reactive Oxygen Species) (Hamada et al., 2012).

Ως εκ τούτου, οφείλουμε να αναγνωρίσουμε τους περιορισμούς των παραπάνω αναλύσεων στην πρόβλεψη της υγείας και της αναπαραγωγικής ικανότητας των ανδρών, καθώς φυσιολογικές τιμές αναλύσεων δεν εγγυώνται πάντα επιτυχή γονιμοποίηση, υποδεικνύοντας την ανάγκη περαιτέρω έρευνας της ανδρικής υπογονιμότητας για την αποσαφήνιση των μηχανισμών που εμπλέκονται σε αυτή (Hamada et al., 2012).

1.4 Υπότυποι ανδρικής υπογονιμότητας

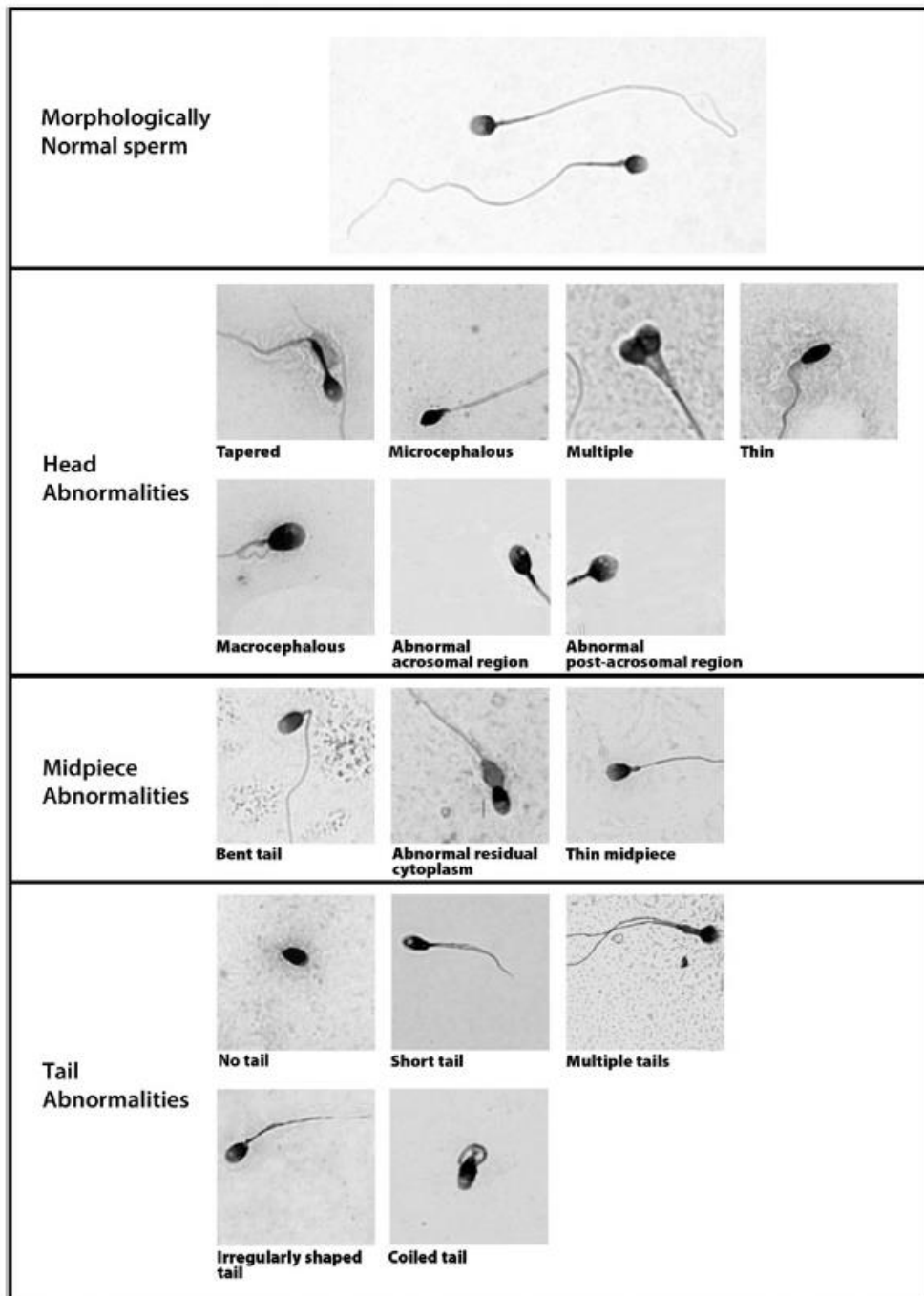
Με βάση τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (World Health Organization., 2010), σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προκύπτουν από την ανάλυση σπέρματος (σπερμοδιάγραμμα), όπως αναλύεται παραπάνω, η ανδρική υπογονιμότητα μπορεί να διακριθεί στους παρακάτω υποτύπους (Agarwal et al., 2021), όπως φαίνεται στον Πίνακα 2:

Πίνακας 2. Υπότυποι ανδρικής υπογονιμότητας (Agarwal et al., 2021)

Υπότυποι ανδρικής Υπογονιμότητας	Χαρακτηριστικά
1. Ασπερμία	Απουσία σπέρματος κατά την εκσπερμάτιση
2. Ασθενοσπερμία	Ποσοστό σπερματοζωαρίων με προσδευτική κινητικότητα, μικρότερη από το ελάχιστο όριο αναφοράς
3. Ασθενοτερατοσπερμία	Ποσοστό σπερματοζωαρίων με προσδευτική κινητικότητα και φυσιολογική μορφολογία, μικρότερες από τα ελάχιστα όρια αναφοράς
4. Αζωοσπερμία	Απουσία σπερματοζωαρίων κατά την εκσπερμάτιση
5. Κρυπτοσπερμία	Απουσία σπερματοζωαρίων από φρέσκα δείγματα σπέρματος, τα οποία ωστόσο γίνονται διακριτά ύστερα από φυγοκέντρηση των δειγμάτων
6. Αιμοσπερμία (αιματοσπερμία):	Παρουσία ερυθροκυττάρων κατά την εκσπερμάτιση
7. Λευκοσπερμία (λευκοκυτταροσπερμία, πυοσπερμία)	Παρουσία λευκοκυττάρων κατά την εκσπερμάτιση σε ποσοστά μεγαλύτερα από το φυσιολογικό όριο αναφοράς
8. Νεκροσπερμία	Χαμηλά ποσοστά ζωντανών σπερματοζωαρίων και υψηλά ποσοστά σπερματοζωαρίων χωρίς κινητικότητα κατά την εκσπερμάτιση

9. Ολιγοασθενοσπερμία	Συνολικός αριθμός ή συγκέντρωση σπερματοζωαρίων και ποσοστά σπερματοζωαρίων με προοδευτική κινητικότητα, μικρότερα από τα ελάχιστα όρια αναφοράς
10. Ολιγοασθενοτερατοσπερμία	Συνολικός αριθμός ή συγκέντρωση σπερματοζωαρίων και ποσοστά σπερματοζωαρίων με προοδευτική κινητικότητα και φυσιολογική μορφολογία, μικρότερα από τα ελάχιστα όρια αναφοράς
11. Ολιγοτερατοσπερμία	Συνολικός αριθμός ή συγκέντρωση σπερματοζωαρίων και ποσοστά σπερματοζωαρίων με φυσιολογική μορφολογία, μικρότερα από τα ελάχιστα όρια αναφοράς
12. Ολιγοσπερμία	Συνολικός αριθμός ή συγκέντρωση σπερματοζωαρίων μικρότεροι από το ελάχιστο όριο αναφοράς
13. Τερατοσπερμία	Ποσοστό σπερματοζωαρίων με φυσιολογική μορφολογία μικρότερο από το ελάχιστο όριο αναφοράς

Στην Εικόνα 3, παρουσιάζονται επίσης κάποιες χαρακτηριστικές ανωμαλίες που αφορούν την μορφολογία των σπερματοζωαρίων (Auger et al., 2016).



Εικόνα 3. Ανωμαλίες μορφολογίας των σπερματοζωαρίων (Auger et al., 2016).

Θα πρέπει ακόμα να αναφερθεί ότι στην περίπτωση που όλοι οι παράμετροι που εξετάζονται με το σπερμοδιάγραμμα έχουν τιμές μεγαλύτερες από το ελάχιστο όριο αναφοράς, όπως ορίζεται από τον ΠΟΥ, το δείγμα χαρακτηρίζεται ως νορμοσπερμικό.

1.5 Αίτια ανδρικής υπογονιμότητας

Η ανδρική υπογονιμότητα συνιστά ένα σύνθετο παθολογικό φαινόμενο, καθώς στην εκδήλωσή του συμβάλλει η αλληλεπίδραση πολλών παραγόντων, οι οποίοι μπορούν να σχετίζονται με ορμονικές ή γενετικές διαταραχές, ανατομικές ανωμαλίες, περιβαλλοντικές συνθήκες ή ακόμα και με τον τρόπο ζωής (Mann et al., 2020). Οι αιτιολογικοί αυτοί παράγοντες μπορούν να διακριθούν σε τρεις μεγάλες κατηγορίες (Olooto, 2012):

1. Προ-ορχικοί: Οι προ-ορχικοί παράγοντες αφορούν κατά κύριο λόγο διαταραχές του υποθαλάμου και της υπόφυσης.
2. Ορχικοί: Οι ορχικοί παράγοντες συνδέονται με διαταραχές της λειτουργίας των όρχεων.
3. Μετα-ορχικοί: Οι μετα-ορχικοί παράγοντες αφορούν κυρίως ανωμαλίες της εκφορητικής οδού του σπέρματος.

1.5.1 Προ-ορχικά αίτια

Ένα από τα βασικά προ-ορχικά αίτια θεωρείται ο υπογοναδοτροπικός υπογοναδισμός, ο οποίος προκαλείται εξαιτίας της απορρύθμισης του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-γονάδων. Η απορρύθμιση αυτή έχει ως αποτέλεσμα την ανεπάρκεια σε γοναδοτροπίνες (οι οποίες κρίνονται απαραίτητες για την ορθή λειτουργία του ανδρικού αναπαραγωγικού συστήματος) λόγω αδυναμίας παραγωγής της εκλυτικής ορμόνης των γοναδοτροπινών (GnRH) από τον υποθάλαμο (Rodprasert et al., 2020).

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η εκλυτική ορμόνη των γοναδοτροπινών (GnRH) ενεργοποιεί την απελευθέρωση των γοναδοτροπινών, δηλαδή της ωχρινοτρόπου ορμόνης (LH) και της θυλακιοτρόπου ορμόνης (FSH) από την υπόφυση, οι οποίες με την σειρά τους οδηγούν σε παραγωγή στεροειδών ορμονών από τις γονάδες. Πιο αναλυτικά, η LH διεγείρει τα κύτταρα Leydig στους όρχεις, ώστε να παράγουν τεστοστερόνη, η οποία χρειάζεται για την παραγωγή σπέρματος και την σωστή διαμόρφωση των χαρακτηριστικών του ανδρικού φύλου, ενώ η FSH διεγείρει τα κύτταρα Sertoli συμβάλλοντας στην έκκριση πρωτεϊνών που δεσμεύουν ανδρογόνα και στην πραγματοποίηση της σπερματογένεσης (Rodprasert et al., 2020).

Σε περιπτώσεις περιστατικών που συνδέονται με υπογοναδοτροπικό υπογοναδισμό, παρατηρείται μείωση των επιπέδων ορμονών FSH, LH και τεστοστερόνης. Η ανισορροπία αυτή οφείλεται στην δυσλειτουργία των όρχεων και κατ' επέκταση επηρεάζεται άμεσα η διαδικασία της σπερματογένεσης. Ένα από τα χαρακτηριστικά σύνδρομα που συσχετίζονται με υπογοναδοτροπικό υπογοναδισμό είναι το σύνδρομο Kallmann, το οποίο συνοδεύεται επίσης από απώλεια της αίσθησης της όσφρησης. Οι περισσότερες φαινοτυπικές ανωμαλίες που έχουν σημειωθεί σε τέτοια περιστατικά προέρχονται από αναπτυξιακές διαταραχές κατά την περίοδο της οργανογένεσης, μεταξύ της 4^{ης} και 10^{ης} εβδομάδας της εμβρυικής περιόδου (Dodé & Hardelin, 2009).

1.5.2 Ορχικά αίτια

Τα ορχικά αίτια, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, αφορούν δυσλειτουργίες των όρχεων και αναλόγως την φύση του προβλήματος μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε συγγενή και επίκτητα αίτια.

Μερικά αντιπροσωπευτικά παραδείγματα **συγγενών** διαταραχών αποτελούν τα εξής:

- Κρυφορχία: Οι άνδρες με ιστορικό κρυφορχίας, δηλαδή απουσίας του ενός ή και των δύο όρχεων από την φυσιολογική τους θέση (το όσχεο), τείνουν να έχουν δείγματα σπέρματος χαμηλότερης ποιότητας (χαμηλότερη κινητικότητα, ανώμαλη μορφολογία, χαμηλότερος αριθμός σπερματοζωαρίων) συγκριτικά με φυσιολογικούς άνδρες, ακόμα και αν έχουν υποστεί χειρουργική επέμβαση. Παρά τη διαταραχή του αριθμού των σπερματοζωαρίων και της λειτουργίας των κυττάρων Sertoli, τα επίπεδα τεστοστερόνης και η απόδοση των κυττάρων Leydig φαίνονται να μην επηρεάζονται σε μεγάλο βαθμό. Ωστόσο, όσο περισσότερο ο όρχις παραμένει μακριά από την περιοχή του οσχέου, τόσο αυξάνεται ο κίνδυνος εμφάνισης υπογονιμότητας (Leslie et al., 2023).
- Ανορχία: Ορίζεται ως η απουσία των όρχεων σε άτομο 46, XY με ανδρικό φαινότυπο. Αν και μερικοί ασθενείς με ανορχία χαρακτηρίζονται από ιδιαίτερης μορφολογίας γεννητικά όργανα, οι περισσότεροι έχουν φυσιολογικό φαινότυπο. Το γεγονός ότι η διαφοροποίηση του ανδρικού γεννητικού συστήματος εξαρτάται από ορμόνες όπως η αντιμυλλέριος ορμόνη (AMH) και η τεστοστερόνη, υποδηλώνει την ύπαρξη λειτουργικών όρχεων, οι οποίοι πιθανότατα κατακρατήθηκαν μέσα στην κοιλία ή στον βουβωνικό πόρο (Brauner et al., 2011).
- Γενετικές διαταραχές: Οι γενετικές διαταραχές ευθύνονται για το 10-15% περιπτώσεων σοβαρής υπογονιμότητας και παρουσιάζονται κυρίως με την μορφή χρωμοσωμικών ανωμαλιών, οι οποίες σχετίζονται κατά κύριο λόγο με τα φυλετικά χρωμοσώματα (Ferlin et al., 2006). Μερικά παραδείγματα τέτοιων γενετικών διαταραχών είναι τα εξής:
 - Σύνδρομο Klinefelter (47, XXY): Συνιστά το πιο συχνό φαινόμενο ανευπλοειδίας των φυλετικών χρωμοσωμάτων στους άνδρες. Σε άνδρες με σύνδρομο Klinefelter παρατηρείται υποτροφία των όρχεων και παθολογικά επίπεδα γοναδοτροπινών στο πλάσμα, κατάσταση που αντιπροσωπεύει την πιο κοινή μορφή ανδρικού υπογοναδισμού. Εξαιτίας της μειωμένης παραγωγής τεστοστερόνης, τα άτομα αυτά παρουσιάζουν γυναικομαστία, μειωμένα επίπεδα τριχοφυΐας και μυϊκής μάζας και καθυστέρηση εμφάνισης εφηβείας ή ακόμα και μη ολοκλήρωσή της. Ο πιο κοινός φαινότυπος των ατόμων με σύνδρομο Klinefelter φαίνεται να είναι η αζωοσπερμία (>90% αντιστοιχεί σε αζωοσπερμικούς άνδρες, ενώ το υπόλοιπο ποσοστό αντιστοιχεί σε

κρυπτοσπερμικούς και ολιγοσπερμικούς) (Krausz & Riera-Escamilla, 2018).

- **Σύνδρομο 46, XX ή de la Chapelle:** Παρά την παρουσία δυο φυλετικών χρωμοσωμάτων XX, στο συγκεκριμένο σύνδρομο παρατηρείται ανδρικός φαινότυπος. Οι άνδρες με σύνδρομο de la Chapelle διακρίνονται από μικρότερο ανάστημα, γυναικομαστία και υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης όρχεων με μη φυσιολογική μορφολογία, παράγοντας που οδηγεί σε αζωοσπερμία. Η μετατόπιση του γονιδίου SRY (Sex determining Region Y-gene: φυλοκαθοριστικό γονίδιο που κωδικοποιεί έναν μεταγραφικό παράγοντα απαραίτητο για την διαφοροποίηση των γονάδων σε όρχεις) είναι υπεύθυνο για το 80-90% των περιπτώσεων. Το γονίδιο SRY βρίσκεται κοντά στην ψευδοαυτοσωματική περιοχή (PAR-pseudoautosomal region) του κοντού βραχίονα του χρωμοσώματος Y και η λανθασμένη μετατόπισή του μπορεί να συμβεί κατά τη διάρκεια της μείωσης, όταν λαμβάνει χώρα ανασυνδυασμός των PAR περιοχών μεταξύ των δυο φυλετικών χρωμοσωμάτων X,Y (Ferlin et al., 2006).
- **Μικροελλείψεις χρωμοσώματος Y:** Αντιπροσωπεύουν την πιο συχνή αιτία σοβαρής υπογονιμότητας. Τρεις περιοχές, που αναφέρονται ως «παράγοντες αζωοσπερμίας» (Azoospermia factors: AZFa, b και c) έχουν οριστεί ως γενετικοί τόποι ρύθμισης της σπερματογένεσης του χρωμοσώματος Y. Η πλειονότητα των μικροελλείψεων έχει ως αποτέλεσμα την ταυτόχρονη απώλεια πολλών γονιδίων που έχουν χαρτογραφηθεί στους τόπους AZFb και AZFc. Ελλείψεις στην AZFa περιοχή οδηγούν επίσης σε σύνδρομο Sertoli-cell-only (SCO: αποκλειστική παρουσία κυττάρων Sertoli στα σπερματικά σωληνάρια), ενώ ελλείψεις στις AZFb ή συνδυαστικά στις AZFb + AZFc οδηγούν σε αζωοσπερμία συσχετιζόμενη με σύνδρομο Sertoli-cell-only (SCO) ή αναστολή της σπερματογένεσης σε προ-μειωτικά στάδια. Η πιο συνήθης έλλειψη, της AZFc περιοχής, συνδέεται άμεσα με περιστατικά αζωοσπερμίας και ολιγοσπερμίας (Krausz & Riera-Escamilla, 2018).

Όσον αφορά τα **επίκτητα** ορχικά αίτια, σε αυτά περιλαμβάνονται:

- **Κιρσοκήλη:** Πρόκειται για διάταση των φλεβών του όρχεος, η οποία μπορεί να προκαλέσει βλάβες στον σύστοιχο όρχι και την επιδιδυμίδα. Για τον λόγο αυτό τις περισσότερες φορές συνιστάται χειρουργική διόρθωση, ώστε να προληφθεί η προοδευτική μείωση της λειτουργίας των όρχεων. Η κιρσοκήλη συνιστά συχνό εύρημα στον ανδρικό πληθυσμό και ειδικότερα σε υπογόμεμους άνδρες (Cocuzza et al., 2013).
- **Καρκίνος:** Ο καρκίνος των όρχεων συνιστά μορφή κακοήθειας σε άνδρες ηλικίας 14-44 ετών. Με βάση τον τύπο κυττάρων, οι όγκοι χωρίζονται σε δυο βασικές κατηγορίες, στους όγκους γεννητικών κυττάρων (καρκίνος in situ,

σεμίνωμα, εμβρυικό καρκίνωμα, χοριοκαρκίνωμα, τεράτωμα, όγκος λεκιθικού σάκου) και στους όγκους στρώματος-γεννητικής ταινίας (κύτταρα Leydig, Sertoli) (Cheng et al., 2018).

- Συστροφή όρχεων: Η συστροφή των όρχεων αποτελεί μια οξεία ουρολογική πάθηση. Στην πάθηση αυτή, παρατηρείται συστροφή των όρχεων γύρω από τον σπερματικό τόνο εμποδίζοντας την ομαλή ροή του αίματος, γεγονός που συνεπάγεται την σταδιακή νέκρωση και ατροφία τους (Jacobsen et al., 2019).
- Τραύμα των όρχεων: Πρόκειται για κάκωση στους όρχεις έπειτα από βίαιο συνήθως τραυματισμό, ο οποίος προκαλείται από ατυχήματα, από τραυματισμούς στο εργασιακό περιβάλλον, αθλητικές δραστηριότητες κ.ά. (Starmer et al., 2018).
- Συστηματικές παθήσεις: Οι συστηματικές παθήσεις μπορούν να επηρεάσουν παραμέτρους του σπέρματος και γενικότερα την φυσιολογική σεξουαλική λειτουργία του άνδρα, καθώς μοιράζονται κοινούς παθολογικούς μηχανισμούς. Οι συστηματικές ασθένειες διαταράσσουν τον άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-γονάδων, οδηγώντας σε ανεπάρκεια τεστοστερόνης, η οποία με την σειρά της μπορεί τελικά να δημιουργήσει προβλήματα όπως η στυτική δυσλειτουργία και η καθυστερημένη εκσπερμάτιση. Μαζί με τη διαταραχή του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-γονάδων, άλλα κοινά χαρακτηριστικά των συστηματικών παθήσεων, όπως ο πυρετός, η απώλεια βάρους και ο αυξημένος καταβολισμός επιδρούν αρνητικά στην λειτουργία των όρχεων (Lotti & Maggi, 2018).
- Περιβαλλοντικοί παράγοντες: Σε αυτούς εμπεριέχονται παράγοντες όπως η ατμοσφαιρική ρύπανση, η έκθεση σε ακτινοβολία, χημικά και υψηλές θερμοκρασίες. Οι σημαντικότεροι ατμοσφαιρικοί ρύποι που επηρεάζουν την υγεία των ανδρών μπορεί να είναι αιωρούμενα σωματίδια, πτητικές οργανικές ενώσεις, όζον, οξειδία του αζώτου, διοξείδιο του θείου, μονοξείδιο του άνθρακα, πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες και ακτινοβολίες. Έχει παρατηρηθεί ότι η ατμοσφαιρική ρύπανση αυξάνει τα επίπεδα κατακερματισμού του DNA του σπέρματος, προκαλεί μορφολογικές αλλαγές και μειώνει τα επίπεδα κινητικότητας των σπερματοζωαρίων. Εκτός των παραπάνω ρύπων, η έκθεση σε ένα ευρύ φάσμα επιβλαβών χημικών (διοξίνες, δισφαινόλες, φθαλικές ενώσεις φυτοφάρμακα, ζιζανιοκτόνα, βαρέα μέταλλα) επιβαρύνει ιδιαίτερα την υγεία του αναπαραγωγικού συστήματος. Όλα αυτά λοιπόν, δρουν συνδυαστικά και προκαλούν διαταραχές κατά την σπερματογένεση οδηγώντας τελικά σε εμφάνιση ανδρικής υπογονιμότητας (Kumar & Singh, 2022).
- Τρόπος ζωής: Πολλές έρευνες έχουν δείξει ότι παράγοντες όπως το σωματικό βάρος, η διατροφή, το κάπνισμα, η καθιστική ζωή, το άγχος και η έλλειψη ύπνου έχουν αρνητικό αντίκτυπο στην ανδρική γονιμότητα. Η παχυσαρκία φαίνεται να συνδέεται με μη φυσιολογικές σπερματικές παραμέτρους συμβάλλοντας στην δημιουργία συνθηκών χρόνιας φλεγμονής και οξειδωτικού στρες (Alshahrani et al., 2016). Επιπλέον, η υιοθέτηση μια διατροφής υψηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά μπορεί να δράσει αρνητικά

στην ομαλή διαμόρφωση του ανδρικού αναπαραγωγικού συστήματος (μικρότεροι όρχεις, χαμηλότερη μάζα της επιδιδυμίδας σε σχέση με το μέγεθος του σώματος)(Du Plessis et al., 2010). Ακόμα, το κάπνισμα, ο καθιστικός τρόπος ζωής, η έλλειψη ύπνου και το άγχος έχουν σοβαρές επιπτώσεις στην μορφολογία, στην ζωτικότητα και στον αριθμό των σπερματοζωαρίων (Mann et al., 2020).

1.5.3 Μετα-ορχικά αίτια

Τα μετα-ορχικά αίτια αφορούν περιπτώσεις απόφραξης της εκφορητικής οδού του σπέρματος ή γενικότερα δυσλειτουργίες κατά την εκσπερμάτωση (Cocuzza et al., 2013). Μερικά χαρακτηριστικά παραδείγματα τέτοιων διαταραχών αποτελούν τα εξής:

- Απουσία του σπερματικού πόρου: Μπορεί να προκληθεί είτε από μεταλλάξεις του γονιδίου *CFTR* (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance regulator) της κυστικής ίνωσης, είτε από ανωμαλίες στη διαφοροποίηση του μεσονεφρικού πόρου (Cocuzza et al., 2013).
- Απόφραξη αγγείων σπερματικού πόρου: Μπορεί να προκληθεί από ακούσιους τραυματισμούς μετά από επεμβάσεις αποκατάστασης κήλης, αν και το πιο συχνό αίτιο είναι η βαζεκτομή (μικροεγχείριση που αποσκοπεί στην αποτροπή της απελευθέρωσης του σπέρματος κατά την εκσπερμάτωση), η οποία αποτελεί μια μορφή αντισύλληψης για τους άνδρες (Cocuzza et al., 2013).
- Διαταραχές κατά την εκσπερμάτωση: Στην κατηγορία αυτή συγκαταλέγονται κυρίως διαταραχές που έχουν ως αποτέλεσμα την εμφάνιση ασπερμίας, η οποία μπορεί να συμβεί, είτε λόγω αδυναμίας μεταφοράς του σπέρματος, είτε λόγω εκσπερμάτωσης σε μη φυσιολογική κατεύθυνση (παλίνδρομη εκσπερμάτωση). Η παλίνδρομη εκσπερμάτωση συγκεκριμένα οφείλεται στην ελλειμματική λειτουργία των ουρηθρικών σφιγκτήρων, οι οποίοι αδυνατούν να αποκλείσουν την διέλευση των σπερματικών υγρών στην ουρήθρα, γεγονός που μπορεί να συνδεθεί με την υπογονιμότητα, καθώς τα σπερματοζωάρια δεν είναι ικανά να απελευθερωθούν, ώστε να γονιμοποιήσουν το ωάριο (Lotti & Maggi, 2018).

2. Ολιγοσπερμία

2.1 Ορισμός ολιγοσπερμίας

Η ολιγοσπερμία, υπότυπος της ανδρικής υπογονιμότητας, αφορά περιπτώσεις ανδρών με μειωμένο αριθμό σπερματοζωαρίων σε δείγματα σπέρματος (<15 εκατομμύρια σπερματοζωάρια/mL σπέρματος), σύμφωνα με τον ΠΟΥ. Αναλόγως τον αριθμό των σπερματοζωαρίων, η ολιγοσπερμία διακρίνεται σε τρεις βασικές κατηγορίες (Castañeda et al., 2018):

- Ήπια ολιγοσπερμία: 10-15 εκατομμύρια σπερματοζωάρια/mL σπερματικού δείγματος
- Μέτρια ολιγοσπερμία: 5-10 εκατομμύρια σπερματοζωάρια/mL σπερματικού δείγματος
- Σοβαρή ολιγοσπερμία: <5 εκατομμύρια σπερματοζωάρια/mL σπερματικού δείγματος

Η ολιγοσπερμία μπορεί να θεωρηθεί ως μια λιγότερο σοβαρή μορφή αζωοσπερμίας, καθώς πολλές από τις μεταλλάξεις που συναντώνται σε ασθενείς με αζωοσπερμία, μπορεί υπό διαφορετικές συνθήκες να προκαλέσουν ολιγοσπερμία σε άλλους. Για παράδειγμα, χρωμοσωμικές ελλείψεις που εντοπίζονται σε περιοχές του χρωμοσώματος Υ, γνωστές και ως περιοχές AZF (Azoospermia Factor Regions) μπορούν να οδηγήσουν σε φαινοτύπους σοβαρής ολιγοσπερμίας σε ορισμένους ασθενείς. Ανάμεσα σε αυτές ανήκει και μια χαρακτηριστική έλλειψη της περιοχής AZFc (gr/gr deletion), η οποία επηρεάζει την έκφραση πολλαπλών γονιδίων (π.χ. *DAZ*, *CDY1*, *BPY2*) που χαρτογραφούνται εντός της περιοχής αυτής. Μεταλλάξεις μιας λίστας γονιδίων, μερικά από τα οποία θα αναλυθούν και παρακάτω, συντελούν σε σημαντική μείωση ή ακόμα και ολική αναστολή της σπερματογένεσης στους όρχεις (Matzuk & Lamb, 2008).

2.2 Γονίδια που εμπλέκονται στην εμφάνιση ολιγοσπερμίας

Έρευνες έχουν επιβεβαιώσει ότι η ολιγοσπερμία ελέγχεται από τη δράση μιας πληθώρας γονιδίων. Κάποια ενδεικτικά γονίδια που έχουν συσχετιστεί με τον συγκεκριμένο υπότυπο ανδρικής υπογονιμότητας παρατίθενται παρακάτω.

2.2.1 *MLH3* (MutL Homolog 3 gene)

Το γονίδιο *MLH3* (MutL Homolog 3) εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 14 και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη, μέλος της οικογένειας πρωτεϊνών επιδιόρθωσης αταίριαστων ζεύγων (Mismatch Repair, MMR). Το γονίδιο *MLH3* διακρίνεται από υψηλά επίπεδα έκφρασης σε ορχικούς ιστούς. Η οικογένεια γονιδίων *MMR* περιλαμβάνει δύο ομόλογα, τα MutS (*MSH4*, *MSH5*) και MutL (*MLH1*, *MLH3*, *PMS2*), και ειδικότερα η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το *MLH3* λειτουργεί ως ένα ετεροδιμερές μαζί με την *MLH1*, η δράση του οποίου κρίνεται αναγκαία κατά τον μειωτικό ανασυνδυασμό των σπερματοκυττάρων. Κατά την παραγωγή του, πολλές φορές το σπέρμα υποβάλλεται σε έκθεση ενεργών δραστικών μορφών οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS), μη φυσιολογική συμπύκνωση χρωματίνης και πιθανότατα σε

διαδικασίες απόπτωσης. Όλα τα παραπάνω προκαλούν βλάβες στο DNA, γι' αυτό και είναι χρήσιμη η δράση μηχανισμών επιδιόρθωσης, όπως το MMR, ώστε να διατηρηθεί η ακεραιότητα και η σταθερότητα του DNA των σπερματοζωαρίων (Nawaz et al., 2021).

Μια μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τον Nawaz και τους συνεργάτες του, αναφέρει μια σπάνια παραλλαγή του γονιδίου *MLH3* που φάνηκε να προκαλεί ανδρική υπογονιμότητα. Η παραλλαγή που ταυτοποιήθηκε σχετιζόταν με τη διαγραφή της περιοχής διμερισμού της MutL με αποτέλεσμα να αναιρείται η επιδιορθωτική ικανότητά της (Nawaz et al., 2021).

Προηγούμενες μελέτες σε ποντίκια κατάφεραν επίσης να αποκαλύψουν τον ρόλο που διαδραματίζει το *MLH3* στο αναπαραγωγικό σύστημα. Ομόζυγα knockout ποντίκια για το γονίδιο *MLH3* εμφάνισαν διάφορες διαταραχές, όπως μη φυσιολογική σπερματογένεση, μείωση μεγέθους όρχεων και στειρότητα, ενώ ορισμένοι πολυμορφισμοί που εντοπίστηκαν στο γονίδιο *MLH3*, συνδέθηκαν με φαινότυπους μη αποφρακτικής αζωοσπερμίας και σοβαρής ολιγοσπερμίας (Lipkin et al., 2002)

2.2.2 SPATA (Spermatogenesis Associated gene family)

Η οικογένεια γονιδίων *SPATA* (Spermatogenesis Associated family) περιλαμβάνει γονίδια, όπως τα *SPATA4*, *SPATA5*, *SPATA6*, άμεσα συνδεδεμένα με την ανδρική υπογονιμότητα (Sujit et al., 2020). Αναλυτικότερα:

- Το *SPATA4* ρυθμίζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την ανάπτυξη, τη διαφοροποίηση και την απόπτωση σε διάφορους τύπους κυττάρων.
- Το *SPATA5* αποτελεί μέλος οικογένειας γονιδίων που είναι υπεύθυνα για την κωδικοποίηση πρωτεϊνών με δράση ATPάσης. Το *SPATA5* συμμετέχει στη διαδικασία συγκέντρωσης των μιτοχονδρίων στο μέσο τμήμα (αυχένα) του σπερματοζωαρίου, τα οποία παρέχουν την απαραίτητη ενέργεια για την προωθητική κίνηση του σπερματοζωαρίου (κάμψη του μαστιγίου).
- Το *SPATA6* συμμετέχει στον σχηματισμό του ενδιάμεσου τμήματος που συνδέει τη βάση της κεφαλής με την ουρά του σπερματοζωαρίου.

Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τον Sujit και τους συνεργάτες του, έγινε ανάλυση του επιπέδου μεθυλίωσης των τριών αυτών γονιδίων της οικογένειας *SPATA* σε DNA σπερματοζωαρίων ολιγοσπερμικών και νορμοσπερμικών ανδρών. Βάσει αποτελεσμάτων, σημειώθηκε υπερμεθυλίωση στις περιοχές υποκινητών των γονιδίων *SPATA4*, *SPATA5* και *SPATA6* και κατ'επέκταση μείωση των επιπέδων έκφρασής τους, αποκλειστικά σε δείγματα που αντιστοιχούσαν σε ολιγοσπερμικούς άνδρες. Αξίζει να σημειωθεί, ότι οι υποκινητές γονιδίων των γεννητικών κύτταρων των όρχεων παρουσιάζουν σε γενικά πλαίσια, χαμηλά ποσοστά μεθυλίωσης σε σχέση με υποκινητές σωματικών κυττάρων, γεγονός που μπορεί να είναι απαραίτητο για τη φυσιολογική διεξαγωγή της σπερματογένεσης. Επομένως, η υπερμεθυλίωση των συγκεκριμένων γονιδίων μπορεί να αποτελεί πιθανή εξήγηση για τη μειωμένη ποσότητα σπερματοζωαρίων που παρατηρείται στην ολιγοσπερμία (Sujit et al., 2020).

2.2.3 RPL10L (Ribosomal Protein L10 Like gene)

Το γονίδιο *RPL10L* περιλαμβάνει μόνο ένα εξόνιο, το οποίο κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 214 αμινοξέων, παρόμοια σε αλληλουχία με την πρωτεΐνη L10 της 60S ριβοσωμικής υπομονάδας. Το *RPL10L* είναι εξαιρετικά συντηρημένο εξελικτικά στα σπονδυλωτά και το ανθρώπινο *RPL10L* μοιράζεται 95% ομοιότητα με το αντίστοιχο γονίδιο των τρωκτικών (Sugihara et al., 2010).

Η *RPL10L* συνιστά ριβοσωμικό συστατικό των σπερματικών κυττάρων του ποντικού. Συνεπώς, μεταλλάξεις στο γονίδιο αυτό διαταράσσουν τη βιογένεση των ριβοσωμάτων, η δράση των οποίων συμβάλλει στην διατήρηση σταθερών επιπέδων πρωτεϊνών που απαιτούνται για την πρόοδο της διαδικασίας της μείωσης του κυτταρικού κύκλου. Έρευνες που πραγματοποιήθηκαν σε ποντίκια έδειξαν ότι η διαγραφή του *RPL10L* οδηγούσε σε υπογονιμότητα λόγω απουσίας σπερματοκυττάρων, καθώς δεν ήταν εφικτή η μετάβαση του κυτταρικού κύκλου από την πρόφαση στην μετάφαση κατά την μειωτική διαίρεση των γαμετικών κυττάρων (Tu et al., 2020).

Ακόμη, σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τον Tu και τους συνεργάτες του, έγινε αλληλούχηση των εξονίων του γονιδιώματος (WES: Whole-exome sequencing) δύο ασθενών με σοβαρή ολιγοσπερμία σε σκοπό να ταυτοποιηθούν τυχόν μεταλλάξεις του γονιδίου *RPL10L*. Πράγματι, ύστερα από ανάλυση των αποτελεσμάτων της αλληλούχησης, η ύπαρξη πολυμορφισμού του γονιδίου αυτού επιβεβαιώθηκε. Για περαιτέρω διερεύνηση, ακολούθησε έλεγχος 414 ανδρών με ολιγοσπερμία-αζωοσπερμία και 223 φυσιολογικών γόνιμων ανδρών μέσω χρήσης μεθόδου WES. Με τον έλεγχο αυτό, εντοπίστηκαν τρεις επιπλέον πολυμορφισμοί του *RPL10L* στην ομάδα των υπογόνιμων ανδρών, σε αντίθεση με την ομάδα των φυσιολογικών ανδρών, στην οποία δεν εντοπίστηκε κανένας πολυμορφισμός. Συμπερασματικά, τα παραπάνω ευρήματα επαληθεύουν προηγούμενες πειραματικές αναφορές και καθιστούν το *RPL10L* ως υποψήφιο γονίδιο που μπορεί να συνεισφέρει στο γενετικό προφίλ ανδρών με υπογονιμότητα (Tu et al., 2020).

2.2.4 RHOX (X-linked Reproductive Homeobox RHOX gene cluster)

Το σύμπλεγμα γονιδίων (cluster) *RHOX* αποτελείται από τρία γονίδια, τα *RHOXF1*, *RHOXF2* και *RHOXF2B*, που εντοπίζονται στο χρωμόσωμα X (Xq24) και κωδικοποιεί μεταγραφικούς παράγοντες που εκφράζονται κατά βάση σε αναπαραγωγικούς ιστούς. Οι μεταγραφικοί αυτοί παράγοντες διαθέτουν μια συντηρημένη περιοχή 60 αμινοξέων για πρόσδεση και αλληλεπίδραση με το DNA. Το *RHOXF1* εκφράζεται κατά τα τελευταία στάδια ανάπτυξης των γεννητικών κυττάρων (στάδιο σχηματισμού στρογγυλών σπερματίδων), ενώ τα *RHOXF2* και *RHOXF2B* κατά τα πρώιμα στάδια (στάδια παραγωγής σπερματογονίων και πρωτογενών σπερματοκυττάρων) (Borgmann et al., 2016).

Σε πειραματική έρευνα, εξετάστηκε η συμβολή των γονιδίων *RHOX* σε περιπτώσεις υπογονιμότητας με την χρήση αλληλούχησης όλων των *RHOX* εξονίων σε μια ομάδα 250 ασθενών με σοβαρή ολιγοσπερμία. Η έρευνα αποκάλυψε δύο μεταλλάξεις στο

RHOXF1 (c.515G>A και c.522C>T) και τέσσερις στο *RHOXF2/2B* γονίδιο (-73C>G, c.202G>A, c.411C>T) και c.679G>A), εκ των οποίων μόνο η μία (c.202G>A) βρέθηκε σε ομάδα ελέγχου (control group) ανδρών με φυσιολογική συγκέντρωση σπέρματος (Borgmann et al., 2016).

Αρκετά από τα γονίδια-στόχους των *RHOX* εμπλέκονται σε διαδικασίες προστασίας των κυττάρων από συνθήκες στρες (π.χ. υψηλές θερμοκρασίες) και προαγωγής της κυτταρικής επιβίωσης, απαραίτητες για την ομαλή παραγωγή των σπερματοζωαρίων κατά την σπερματογένεση. Έτσι, μεταλλάξεις, όπως αυτές που αναφέρθηκαν παραπάνω, εμποδίζουν την φυσιολογική ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων αυτών, γεγονός που αυξάνει τις πιθανότητες εμφάνισης υπογονιμότητας στους άνδρες (Agarwal et al., 2016).

2.2.5 *MEST* (Mesoderm Specific Transcript gene)

Αρκετές μελέτες έχουν αναφέρει ότι αλλαγές στα ειδικά πρότυπα μεθυλίωσης του DNA των γεννητικών κυττάρων συσχετίζονται με ολιγοσπερμία, μειωμένη προοδευτική κινητικότητα και μη φυσιολογική μορφολογία σπέρματος (Sato et al., 2011). Τα γονίδια των σπερματοζωαρίων διακρίνονται από καθορισμένα πρότυπα επιγενετικής τροποποίησης, όπως η αντικατάσταση των ιστονών από πρωταμίνες κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης. Μια μορφή επιγενετικού μηχανισμού συνιστά και το γονιδιακό εντύπωμα, το οποίο περιγράφει διαφορές στην γονιδιακή έκφραση που οφείλονται στην κληρονόμηση αλληλομόρφων μητρικής ή πατρικής προέλευσης με διαφορετικά πρότυπα μεθυλίωσης (genomic imprinting), (Jenkins & Carrell, 2011).

Η έρευνα του Kläver και των συνεργατών του, καθώς επίσης και προηγούμενες έρευνες, φανέρωσαν ισχυρές διακυμάνσεις των επιπέδων μεθυλίωσης του DNA πολλών εντυπωμένων γονιδίων, συμπεριλαμβανομένου και του γονιδίου *MEST* σε σπερματοζωάρια υπογόνιμων ανδρών. Συγκεκριμένα, στην έρευνα αυτή πραγματοποιήθηκε επιγενετική ανάλυση του DNA σπερματοζωαρίων υπογόνιμων ανδρών. Όλοι οι 212 ασθενείς υποβλήθηκαν σε ανδρολογικό έλεγχο και από αυτούς, οι 134 χαρακτηρίστηκαν ως ολιγοσπερμικοί βάσει αποτελεσμάτων. Στην ομάδα των ολιγοσπερμικών ασθενών παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των επιπέδων μεθυλίωσης του γονιδίου *MEST* (σε σύγκριση με τους νορμοσπερμικούς), η οποία συνοδεύεται από αυξημένες τιμές των επιπέδων των ορμονών LH και FSH και μη φυσιολογικές σπερματικές παραμέτρους (Kläver et al., 2013).

Επομένως, η ανάλυση των προτύπων μεθυλίωσης του DNA συγκεκριμένων γονιδίων, σχετιζόμενων με την φυσιολογική δομή και λειτουργία των σπερματοζωαρίων, θα μπορούσε να αποτελέσει μια νέα διαγνωστική παράμετρο και προγνωστικό παράγοντα επιτυχίας στον τομέα της εξωσωματικής γονιμοποίησης (Kläver et al., 2013).

3. Μεθοδολογία μελέτης της ολιγοσπερμίας

Παρά την εξέλιξη των μεθόδων που χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση της ανδρικής υπογονιμότητας, υπάρχουν ακόμα αρκετοί περιορισμοί που δεν επιτρέπουν να τις θεωρήσει κανείς ως αποκλειστικό προγνωστικό δείκτη επιτυχίας κυήσεων, που έχουν προκύψει ύστερα από τεχνικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Το γεγονός αυτό, καθιστά αναγκαία την ανάπτυξη μοριακών βιοδεικτών, οι οποίοι θα μπορούν να διακρίνουν ακριβέστερα το ποσοστό συμβολής του ανδρικού παράγοντα σε φαινόμενα υπογονιμότητας και να προβλέπουν αντίστοιχα τις πιθανότητες επιτυχίας διάφορων θεραπευτικών μεθόδων αντιμετώπισής της (Panner Selvam & Agarwal, 2018).

Επιπλέον, αρκετές περιπτώσεις υπογονιμότητας οφείλονται σε συνδυασμό γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων. Ωστόσο, παρατηρούνται συχνά περιστατικά ασθενών, των οποίων τα αίτια που οδηγούν σε προβλήματα υπογονιμότητας συνεχίζουν να παραμένουν άγνωστα (ιδιοπαθής υπογονιμότητα). Μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί τα τελευταία χρόνια στον τομέα της ανδρικής γονιμότητας, αξιοποιούν τεχνικές υψηλής απόδοσης, όπως για παράδειγμα τεχνικές γονιδιωματικής, μεταγραφωμικής, πρωτεωμικής και επιγενετικής ανάλυσης, ως μέσο παροχής πληροφοριών για την αποσαφήνιση βασικών μοριακών μηχανισμών που συμβάλλουν στην εμφάνιση παθογένειας (Panner Selvam et al., 2021).

Στη συνέχεια παρατίθενται ορισμένες προσεγγίσεις που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανάλυση βιοδεικτών αλλά και για την αποσαφήνιση των μοριακών μηχανισμών που εμπλέκονται στην εμφάνιση ολιγοσπερμίας.

3.1 Γονιδιωματική ανάλυση

Ο τομέας της γονιδιωματικής ασχολείται με την μελέτη του γονιδιώματος των οργανισμών. Εστιάζει στην συναρμολόγηση και ανάλυση της λειτουργίας και της δομής των γονιδιωμάτων αυτών και περιλαμβάνει μια ποικιλία μεθόδων, όπως η αλληλούχηση νέας γενιάς (NGS) και η μελέτη συσχέτισης ολόκληρου του γονιδιώματος (GWAS) (Aston, 2014).

3.1.1 Αλληλούχηση νέας γενιάς (NGS: Next-Generation Sequencing)

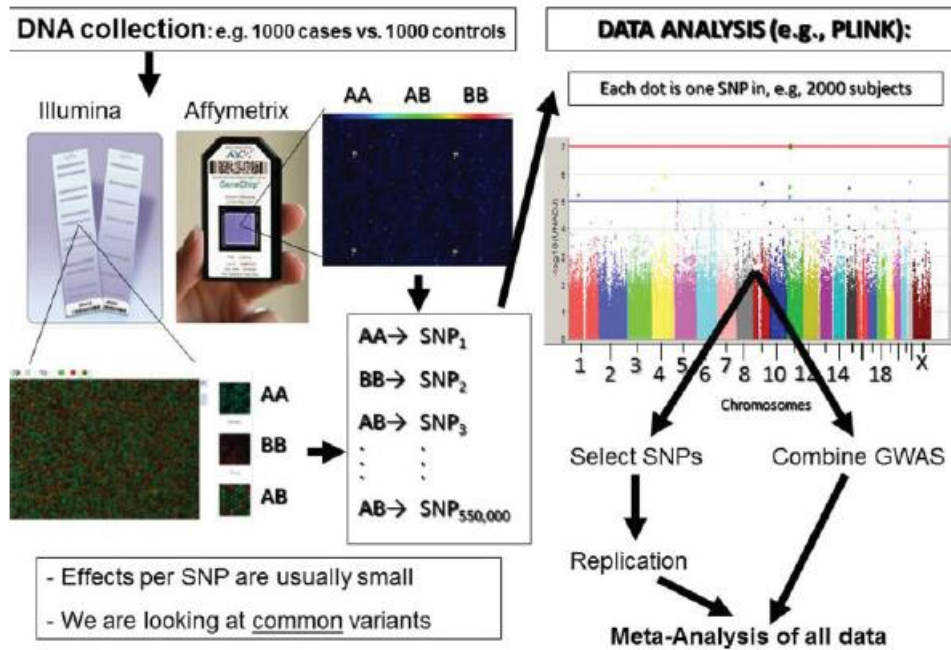
Η αλληλούχηση νέας γενιάς (NGS: Next-Generation Sequencing) συνιστά ένα νέο είδος τεχνολογίας που έχει φέρει επανάσταση στον τομέα της γονιδιωματικής έρευνας (Aston, 2014). Η μέθοδος αυτή επιτρέπει τη μαζική αλληλούχηση ενός μεγάλου αριθμού γονιδίων (είτε πρόκειται για εξόνια του γονιδιώματος, είτε για ολόκληρο το γονιδίωμα) με αποτελεσματικό και γρήγορο τρόπο. Το κόστος της αλληλούχησης νέας γενιάς έχει μειωθεί δραματικά τα τελευταία χρόνια, γι' αυτό και αποτελεί μια φθηνή και βιώσιμη προσέγγιση για τη διάγνωση και την ανακάλυψη νέων γονιδίων που σχετίζονται με ασθένειες (Xavier et al., 2021).

Η αλληλούχηση νέας γενιάς μπορεί να ταξινομηθεί σε δύο κατηγορίες: στην στοχευμένη αλληλούχηση ομάδας γονιδίων που είναι γνωστό ότι μπορεί να εμπλέκονται στην εμφάνιση μιας νόσου και στην αλληλούχηση ολόκληρου του ανθρώπινου γονιδιώματος. Μέσω αυτής της διαδικασίας προκύπτουν τεράστιοι όγκοι δεδομένων, που απαιτούν εξελιγμένα εργαλεία βιοπληροφορικής, ώστε να υποστούν κατάλληλη επεξεργασία και ανάλυση. Τα δεδομένα της αλληλούχησης συναρμολογούνται συνήθως με βάση ένα γονιδίωμα αναφοράς και στην συνέχεια αναγνωρίζονται περιοχές του γονιδιώματος που διαφέρουν από αυτό και πιθανόν να συσχετίζονται με κάποια μορφή ασθένειας (Robay et al., 2018).

Η ολιγοσπερμία έχει συσχετιστεί μέσω μελετών που αξιοποιούν αλληλούχηση νέας γενιάς με μεταλλάξεις σε μια πληθώρα γονιδίων. Πολλές μελέτες, όπως αυτή που διεξήχθη από την Canarella και τους συνεργάτες της, στοχεύουν στην αξιολόγηση της συνεισφοράς συγκεκριμένων υποψήφιων γονιδίων στην εμφάνιση ολιγοσπερμίας στους άνδρες (Cannarella et al., 2021). Η συγκεκριμένη μελέτη επικεντρώθηκε στην διερεύνηση μιας ομάδας 15 γονιδίων (*USP9Y*, *NR5A1*, *KLHL10*, *ZMYND15*, *PLK4*, *TEX15*, *TEX11*, *MEIOB*, *SOHLH1*, *HSF2*, *SYCP3*, *TAF4B*, *NANOS1*, *SYCE1*, *RHOXF2*) με τη χρήση αλληλούχησης νέας γενιάς (NGS) σε ασθενείς με ιδιοπαθή ολιγοσπερμία. Πιο συγκεκριμένα, τα γονίδια αυτά αφορούσαν διαδικασίες όπως ο πολλαπλασιασμός του σπερματογονικού πληθυσμού, οι μειωτικές διαιρέσεις των σπερματοκυττάρων και η ωρίμανση των σπερματιδίων. Μετά από προσεκτικά επιλεγμένες εξετάσεις, επιλέχθηκαν 25 ασθενείς με προβλήματα υπογονιμότητας, εκ των οποίων οι 18 χαρακτηρίζονταν από ιδιοπαθή ολιγοσπερμία. Συνολικά, εντοπίστηκαν 17 σπάνιες γενετικές παραλλαγές (πολυμορφισμοί), 13 από τις οποίες δεν είχαν αναφερθεί ποτέ στο παρελθόν και αντιστοιχούσαν κυρίως στα γονίδια *MEIOB*, *USP9Y*, *KLHL10*, *NR5A1*, και *SOHLH1* (Cannarella et al., 2021).

3.1.2 Μελέτη συσχέτισης ολόκληρου του γονιδιώματος (GWAS: Genome-Wide Association Studies)

Η μελέτη συσχέτισης ολόκληρου του γονιδιώματος (GWAS: Genome-Wide Association Studies) είναι μια ερευνητική προσέγγιση που χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό γονιδιωματικών παραλλαγών – πολυμορφισμών (π.χ. single-nucleotide polymorphisms, SNPs) που σχετίζονται με μια ασθένεια ή ένα συγκεκριμένο χαρακτηριστικό. Η μέθοδος περιλαμβάνει την συλλογή πολλών δειγμάτων DNA από άτομα που φέρουν μια συγκεκριμένη ασθένεια ή χαρακτηριστικό (cases) και αντίστοιχα από υγιή άτομα (controls), ώστε να γίνει σύγκριση των παραπάνω γονιδιωμάτων και συσχέτιση συγκεκριμένων πολυμορφισμών με το υπό μελέτη χαρακτηριστικό, έπειτα από στατιστική ανάλυση (Εικόνα 4)(Aston, 2014).



Εικόνα 4. Μεθοδολογία μελέτης συσχέτισης ολόκληρου του γονιδιώματος (GWAS: Genome-Wide Association Studies) (Uitterlinden, 2016).

Παρά την στατιστική σημαντικότητα αποτελεσμάτων ερευνών GWAS σε ολιγοσπερμικούς και νορμοσπερμικούς άνδρες, πολλά από τα αποτελέσματα που προέκυψαν στο παρελθόν δεν έχουν επιβεβαιωθεί από μεταγενέστερες στοχευμένες μελέτες. Συνολικά, λοιπόν, υποδεικνύεται ότι οι συνήθεις γονιδιωματικές παραλλαγές δεν συμβάλλουν σε μεγάλο βαθμό στην ανδρική υπογονιμότητα. Μπορούμε να υποθέσουμε ότι οι επικυρωμένοι κοινοί πολυμορφισμοί (SNPs) χαμηλού μεγέθους επίδρασης μπορούν να προκαλέσουν βλάβες κατά την σπερματογένεση, εάν παρουσιάζονται συσσωρευμένες στο ίδιο άτομο. Παρόλα αυτά, εξειδικευμένα SNPs που εμπλέκονται στον ορμονικό έλεγχο της σπερματογένεσης, έχουν πολλές προοπτικές για την ανάπτυξη εξατομικευμένων ορμονικών θεραπειών και αποτελούν στόχους φαρμακογενετικών μελετών. Σε κάθε περίπτωση, οι μέχρι τώρα μελέτες υποδεικνύουν την ανάγκη πραγματοποίησης μεγαλύτερων ερευνών GWAS με μεγάλο αριθμό υπογόνιμων ανδρών, οι οποίες πιθανόν απαιτούν την συνεργασία πολλών ερευνητικών κέντρων (Krausz & Riera-Escamilla, 2018).

3.2 Μεταγραφωμική ανάλυση

Το μεταγράφημα ορίζεται ως το σύνολο των κωδικοποιητικών και μη κωδικοποιητικών RNA εντός ενός κυτταρικού τύπου ή ιστού (Indriastuti et al., 2022). Ο ποσοτικός προσδιορισμός των μεταγράφων επιτυγχάνεται μέσω αξιοποίησης διάφορων τεχνικών, όπως το στύπωμα κατά Northern, η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR), οι μικροσυστοιχίες και η αλληλούχηση RNA (RNA Sequencing – RNA Seq)(Gunes & Mahmutoglu, 2018).

Ειδικότερα, η τεχνική RNA-Seq καθιστά δυνατή την ανάλυση ολόκληρου του μεταγραφώματος χρησιμοποιώντας τη μέθοδο αλληλούχησης νέας γενιάς, επιτρέποντας την ανίχνευση των επιπέδων έκφρασης πολλών γονιδίων ταυτόχρονα, είτε πρόκειται για φυσιολογικές βιολογικές διεργασίες, είτε για καταστάσεις παθολογείας, όπως στις περιπτώσεις ανδρικής υπογονιμότητας (Gunes & Mahmutoglu, 2018).

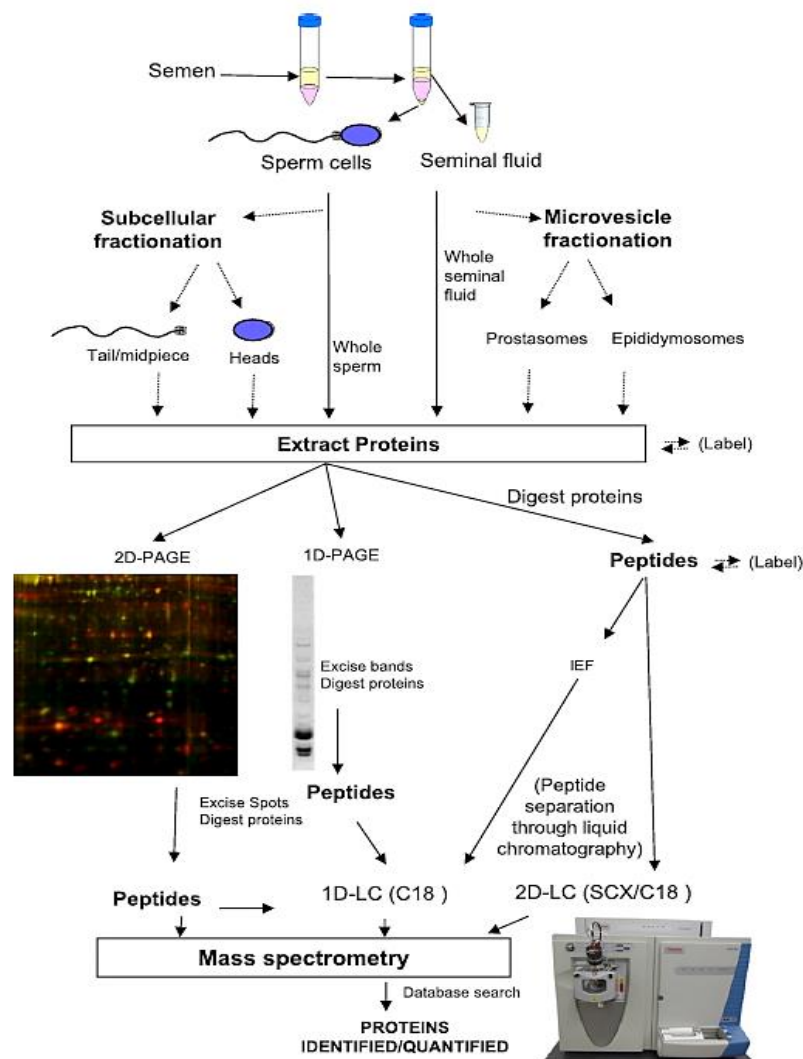
Πολλές από τις μελέτες μεταγραφωμικής στοχεύουν στην διερεύνηση του γενετικού προφίλ της ολιγοσπερμίας. Συγκεκριμένα, σε μία απ' αυτές, έγινε σύγκριση της έκφρασης των γονιδίων σε νορμοσπερμικούς και ολιγοσπερμικούς άνδρες (Montjean et al., 2012). Βάσει αποτελεσμάτων, η έκφραση των γονιδίων που συμβάλλουν στην διαδικασία της σπερματογένεσης, στην κινητικότητα των σπερματοζωαρίων και σε αντι-αποπτωτικούς μηχανισμούς των γαμετικών κυττάρων (*CREM*, *MEA-1*, *PRM2*, *SPATA-4*, *SPZ-1*), φάνηκε να έχει μειωθεί σημαντικά στους ολιγοσπερμικούς άνδρες. Στην ίδια μελέτη, παρατηρήθηκε ακόμα εντυπωσιακή πτώση στην έκφραση των γονιδίων τροποποίησης ιστονών (*DDX3X*, *JMJD1A*). Η μεθυλίωση του DNA και τα μη κωδικοποιητικά RNA είναι σημαντικοί ρυθμιστές της μεταγραφής. Επομένως, αυτοί οι ρυθμιστές είναι ικανοί να αλλάξουν τη γονιδιακή έκφραση στα αναπτυσσόμενα σπερματοζωάρια οδηγώντας σε μείωση του αριθμού τους, το οποίο συνιστά χαρακτηριστικό γνώρισμα ολιγοσπερμικών φαινοτύπων στους άνδρες (Montjean et al., 2012).

3.3 Πρωτεωμική ανάλυση

Ο όρος του πρωτεώματος αναφέρεται στο σύνολο των πρωτεϊνών ενός οργανισμού, οι οποίες αποτελούν ουσιαστικά τα δομικά και λειτουργικά συστατικά του. Οποιαδήποτε αλλαγή στη δομή, την σύνθεση και την αλληλεπίδρασή τους με άλλες πρωτεΐνες επηρεάζει άμεσα τις φυσιολογικές διεργασίες του κυττάρου. Κατ'επέκταση, απαιτείται καλύτερη κατανόηση των φυσιολογικών λειτουργιών όλων των πρωτεϊνών για να αξιολογηθεί η εμπλοκή τους σε διάφορα μοριακά μονοπάτια. Μελέτες που βασίζονται σε αναλύσεις πρωτεωμικής βιολογικών δειγμάτων σπέρματος, εστιάζουν στην περιγραφή του λειτουργικού ρόλου πρωτεϊνών σχετιζόμενων με τη γονιμότητα και των παραγόντων που επηρεάζουν τα κανονικά επίπεδα έκφρασης τους, έτσι ώστε να γίνουν διακριτοί οι μηχανισμοί που συντελούν στην διαμόρφωση του φαινοτύπου των υπογόνιμων ανδρών (Jodar et al., 2017).

Γενικότερα, έρευνες πρωτεωμικής που στοχεύουν στην διερεύνηση της ανδρικής υπογονιμότητας, στηρίζονται σε αναλύσεις πρωτεϊνών που συναντώνται στα σπερματοζωάρια και στο σπερματικό υγρό. Τα σπερματοζωάρια συνιστούν κατάλληλο μοντέλο πρωτεωμικής ανάλυσης, καθώς μπορούν να απομονωθούν εύκολα από δείγματα σπέρματος, γι' αυτό και προτιμώνται συχνότερα. Αντιθέτως, δείγματα σπερματικού υγρού αυξάνουν την πολυπλοκότητα της ανάλυσης επειδή χαρακτηρίζονται από μεγάλο βαθμό ετερογένειας, λόγω του μείγματος πρωτεϊνών που περιέχουν. Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με τις γρήγορες αλλαγές που υφίσταται το σπέρμα μετά την εκσπερμάτιση, όπως η διεργασία της πήξης – ρευστοποίησης, δυσκολεύουν ακόμα περισσότερο τις συνθήκες μελέτης, με

αποτέλεσμα να μην αποτελούν την πρώτη επιλογή δειγμάτων προς ανάλυση. Παρακάτω, στην Εικόνα 5, παρουσιάζονται πιο αναλυτικά τα βασικά μεθοδολογικά βήματα μιας πρωτεωμικής ανάλυσης σπέρματος (Agarwal et al., 2016).



Εικόνα 5. Μεθοδολογία πρωτεωμικής ανάλυσης σπέρματος (Jodar et al., 2017).

Πρωτεωμικές μελέτες έχουν δείξει ότι οι πρωτεΐνες του σπέρματος που εντοπίζονται αποκλειστικά στην κεφαλή του συσχετίζονται με διαδικασίες όπως το πακετάρισμα του DNA και το εναλλακτικό μάτισμα. Από την άλλη, πρωτεΐνες που βρίσκονται αποκλειστικά στην ουρά, συνδέονται κατά κανόνα με διαδικασίες σχετικές με την βιοσύνθεση πρόδρομων μεταβολιτών και την παραγωγή ενέργειας. Συγκεκριμένα, η διεργασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (OXPHOS: Oxidative Phosphorylation), που λαμβάνει χώρα στα μιτοχόνδρια, αποτελεί το πιο αντιπροσωπευτικό παράδειγμα, αν και άλλες διαδικασίες παραγωγής ενέργειας, όπως ο κύκλος του κιτρικού οξέος (TCA cycle: tricarboxylic acid cycle) και ο μεταβολισμός των λιπαρών οξέων, έχουν επίσης βρεθεί ότι σχετίζονται με πρωτεΐνες της ουράς των

σπερματοζωαρίων. Επιπλέον, η ανάλυση πρωτεϊνών της ουράς φανερώνει την συμβολή τους στον σχηματισμό του αξονήματος και στην δομή πρωτεϊνικών συμπλοκών (για παράδειγμα συμπλοκών δυνείνης) που απαιτούνται για την κίνηση του μαστιγίου (Agarwal et al., 2016).

Περίπου το 40-60% των υπογόνιμων ανδρών παρουσιάζουν τουλάχιστον μία μη φυσιολογική σπερματική παράμετρο. Η ολιγοσπερμία χαρακτηρίζεται από αριθμό σπερματοζωαρίων, κατώτερο του ελάχιστου ορίου αναφοράς. Ωστόσο, διαταραχές σε επιπλέον παραμέτρους μπορεί να δημιουργήσουν συνδυασμό φαινοτύπων. Για παράδειγμα, η ολιγοσπερμία συχνά συνοδεύεται από χαμηλά ποσοστά προοδευτικής κινητικότητας (ασθενοσπερμία) και μη φυσιολογική μορφολογία σπερματοζωαρίων (τερατοσπερμία). Με τη βοήθεια συγκριτικών αναλύσεων πρωτεωμικής, μπορούν να εξακριβωθούν οι πιθανοί παθολογικοί μηχανισμοί που ευθύνονται για την εμφάνιση του κάθε υποτύπου ανδρικής υπογονιμότητας, καθώς και των συνδυασμών τους (Jodar et al., 2017).

3.4 Μελέτη επιγενετικών τροποποιήσεων

Η επιγενετική έχει αναδειχθεί ως ένας από τους πολλά υποσχόμενους ερευνητικούς τομείς στην κατανόηση της ανδρικής υπογονιμότητας. Ορίζεται ως ένα είδος μελέτης κληρονομικών αλλαγών που επηρεάζουν την έκφραση γονιδίων, χωρίς ωστόσο να παρατηρείται κάποια αλλαγή στην αλληλουχία του DNA (Qin et al., 2019). Πολλές ερευνητικές μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί στο πεδίο αυτό, έχουν επιβεβαιώσει τον βασικό ρόλο που διαδραματίζουν οι επιγενετικοί μηχανισμοί στην ανθρώπινη αναπαραγωγή (Sturppia et al., 2015). Πιο συγκεκριμένα, επιγενετικές τροποποιήσεις συνδέονται με (Sturppia et al., 2015):

- 1) Διαταραχές που σχετίζονται με την ανδρική υπογονιμότητα, όπως αλλαγές στον αριθμό και στη μορφολογία των σπερματοζωαρίων.
- 2) Επιπλοκές κατά τα στάδια ανάπτυξης του εμβρύου.
- 3) Κακή έκβαση πρωτοκόλλων υποβοηθούμενης αναπαραγωγής.
- 4) Αυξημένες πιθανότητες για εμφάνιση προβλημάτων υγείας των απόγονων κατά την ενήλικη ζωή.

Οι τροποποιήσεις αυτές αναφέρονται κυρίως στη μεθυλίωση του DNA, στις τροποποιήσεις των ιστονών και στην δράση των μη κωδικοποιητικών RNA (ncRNA: non-coding RNA), με τη μεθυλίωση να αποτελεί έναν από τους πιο γνωστούς επιγενετικούς δείκτες (Gunes & Esteves, 2021).

Η διατήρηση σωστών προτύπων μεθυλίωσης είναι απαραίτητη, τόσο για τη διαδικασία της γονιμοποίησης, όσο και για την βιωσιμότητα του εμβρύου. Επομένως, η ανάλυση επιγενετικών αλλοιώσεων σε δείγματα σπέρματος καθίσταται αναγκαία για την κατανόηση αυτών των διαδικασιών, καθώς μπορεί να παρέχει πληροφορίες για τα πιθανά αίτια της ανδρικής υπογονιμότητας (Qin et al., 2019).

Τα τελευταία χρόνια, χάρη στην χρήση τεχνολογιών όπως οι μικροσυστοιχίες (microarrays), η μελέτη της μεθυλίωσης του DNA έχει καταφέρει να επεκταθεί σε ολόκληρο το γονιδίωμα. Ακόμα, μέθοδοι αλληλούχησης νέας γενιάς επιτρέπουν πλέον την κατασκευή γονιδιωματικών χαρτών μεθυλίωσης υψηλής διακριτικής ικανότητας (Genome-wide DNA methylation analysis) (Yong et al., 2016). Έτσι, πρόσφατες μελέτες ανάλυσης προτύπων μεθυλίωσης DNA σπέρματος, φανέρωσαν πως μη φυσιολογικά μοτίβα μεθυλίωσης σε γονίδια όπως τα *IGF2*, *H19*, *MEST*, *PEG*, μπορεί να οδηγήσουν στην παραγωγή κακής ποιότητας σπέρματος. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, που αφορούσαν άνδρες με ολιγοσπερμία και ασθενοσπερμία, τα μη φυσιολογικά μεθυλιωμένα γονίδια στους ολιγοσπερμικούς άνδρες φάνηκαν να συσχετίζονται κυρίως με τη διαδικασία της απόπτωσης και διάφορες πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου (Yong et al., 2016).

Προκύπτει επομένως, ότι παρά την ανάπτυξη σύγχρονων εργαλείων και μεθόδων μοριακής βιολογίας και γενετικής, δεν έχει εντοπιστεί ακόμη ο ακριβής μηχανισμός εμφάνισης της ολιγοσπερμίας ούτε και έχει χαρακτηριστεί πλήρως ο αριθμός των μεταλλάξεων που σχετίζονται με την εμφάνισή της.

Β. ΣΚΟΠΟΣ

Τα τελευταία χρόνια, ολοένα και περισσότερα ζευγάρια έρχονται αντιμέτωπα με προβλήματα υπογονιμότητας. Η πολυπαραγοντική φύση του φαινομένου αυτού καθιστά απαραίτητη την αποσαφήνιση των μηχανισμών που εμπλέκονται στην εμφάνιση παθολογικών φαινοτύπων, σχετιζόμενων με την υπογονιμότητα. Επιπλέον, το ενδιαφέρον για την ανάπτυξη αποτελεσματικών μεθόδων πρόληψης, διάγνωσης και θεραπείας της ανδρικής υπογονιμότητας φαίνεται να έχει αυξηθεί σημαντικά. Το γεγονός ότι πλέον υπάρχουν διαθέσιμες τεχνολογίες, όπως η αλληλούχηση νέας γενιάς (Next Generation Sequencing - NGS), υπόσχεται εξελίξεις στον τομέα της υπογονιμότητας και ιδιαίτερα σε κλάδους υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, δίνοντας την δυνατότητα συσχέτισης όλο και μεγαλύτερου αριθμού γονιδίων αλλά και συγκεκριμένων μεταλλάξεων με την ανδρική υπογονιμότητα, καθώς επίσης και με συγκεκριμένους υποτύπους της, όπως η ολιγοσπερμία.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, σκοπός είναι η ταυτοποίηση πολυμορφισμών που σχετίζονται με την ολιγοσπερμία στον ελληνικό πληθυσμό και η διερεύνηση του ρόλου των γονιδίων στα οποία εντοπίζονται αυτοί οι πολυμορφισμοί. Πιο συγκεκριμένα, αξιοποιώντας τη μέθοδο αλληλούχησης νέας γενιάς, θα μελετηθούν τα γενετικά προφίλ ολιγοσπερμικών ανδρών και έπειτα από σύγκριση των γονιδιωμάτων ολιγοσπερμικών και νορμοσπερμικών ανδρών, θα εντοπιστούν πολυμορφισμοί που αντιστοιχούν αποκλειστικά και μόνο σε άτομα με τον συγκεκριμένο υπότυπο ανδρικής υπογονιμότητας και πιθανόν συμβάλλουν στην εμφάνιση του φαινοτύπου. Με την χρήση κατάλληλων φίλτρων θα επιλεχθούν οι πιο σημαντικοί πολυμορφισμοί και θα διερευνηθεί ο ρόλος τους. Η ανάλυση αυτή λοιπόν, στοχεύει στην βαθύτερη κατανόηση του γενετικού υποβάθρου που χαρακτηρίζει την ολιγοσπερμία και στην ανάδειξη πιθανών γονιδίων στόχων για μελλοντικές έρευνες που αφορούν την ανδρική υπογονιμότητα.

Γ. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Επιλογή βιολογικού υλικού

Για τη διεξαγωγή της μελέτης αυτής, πραγματοποιήθηκε συλλογή δειγμάτων αίματος, καθώς επίσης και δειγμάτων σπέρματος, από εθελοντές, σε συνεργασία με το Κέντρο Εξωσωματικής Γονιμοποίησης «Embryolab», στα πλαίσια του ερευνητικού προγράμματος Spermogene. Όλοι οι εθελοντές έδωσαν γραπτή συγκατάθεση για την συμμετοχή τους στο πρόγραμμα, ενώ παράλληλα δόθηκε έγκριση για την διεξαγωγή της παρούσας έρευνας και από την Επιτροπή Ηθικής και Δεοντολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Όλοι οι εθελοντές που έλαβαν μέρος στην μελέτη, υποβλήθηκαν σε ανδρολογική εξέταση και ανάλυση σπέρματος. Η ανάλυση σπέρματος (σπερμοδιάγραμμα) πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις κατευθυντήριες γραμμές του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (5^η έκδοση, Π.Ο.Υ 2010), στις οποίες εμπεριέχονται επίσης τα κατώτερα όρια αναφοράς διαφόρων σπερματικών παραμέτρων για την αξιολόγηση της γονιμότητας του άνδρα (π.χ. όγκος, συνολικός αριθμός σπερματοζωαρίων, ποσοστό κινητικότητας, ζωτικότητας και φυσιολογικής μορφολογίας σπερματοζωαρίων). Έπειτα από αξιολόγηση αυτών των σπερματικών παραμέτρων με βάση τις τιμές αναφοράς, έγινε διαχωρισμός των εθελοντών σε συγκεκριμένες φαινοτυπικές κατηγορίες, οι οποίες αναλύονται στην Εισαγωγή (Πίνακας 2). Είναι σημαντικό να επισημανθεί, ότι τα δείγματα προς ανάλυση συλλέχθηκαν μετά από τουλάχιστον δύο έως τρεις ημέρες αποχής των εθελοντών από σεξουαλική δραστηριότητα, με σκοπό τη μεγιστοποίηση της αξιοπιστίας των αποτελεσμάτων του σπερμοδιαγράμματος. Για την συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δείγματα αίματος από 10 νορμοσπερμικούς και 5 ολιγοσπερμικούς άνδρες.

Επιπλέον, θα πρέπει να τονιστεί ότι βασικός στόχος του προγράμματος Spermogene ήταν η δημιουργία μιας βάσης δεδομένων που συγκεντρώνει όλες τις μεταλλάξεις που συσχετίζονται με την ανδρική υπογονιμότητα στον ελληνικό πληθυσμό, καθώς συχνά η εθνικότητα επηρεάζει σημαντικά το γενετικό υπόβαθρο και κατ' επέκταση την πιθανότητα εμφάνισης ανδρικής υπογονιμότητας. Επομένως, ο τόπος γέννησης ήταν ένα από τα κύρια κριτήρια στα ερωτηματολόγια που συμπληρώθηκαν από τους εθελοντές μαζί με το έντυπο συγκατάθεσης και όλοι οι εθελοντές ανήκαν στον ελληνικό πληθυσμό.

2. Προετοιμασία δειγμάτων και αλληλούχηση ολόκληρου του γονιδιώματος

Στη συνέχεια, γονιδιωματικό DNA απομονώθηκε από δείγματα αίματος των ολιγοσπερμικών και νορμοσπερμικών ανδρών μέσω χρήσης του PureLink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης και φωτομέτρηση με την συσκευή Qubit 2.0 (Qubit dsDNA BR Assay Kit) για ποιοτική και ποσοτική αξιολόγηση του DNA αντίστοιχα. Έπειτα, δημιουργήθηκαν τρία ξεχωριστά «pools» (sequencing pools) δειγμάτων. Αναλυτικότερα, το DNA των δέκα νορμοσπερμικών ανδρών

χρησιμοποιήθηκε για τα δύο «pools», τα οποία αντιστοιχούσαν σε πέντε άτομα το καθένα, ενώ το τρίτο «pool» περιείχε DNA των πέντε ολιγοσπερμικών ανδρών.

Αφού ολοκληρώθηκε η προετοιμασία των δειγμάτων DNA, αυτά στάλθηκαν στην Novogene (Cambridge, UK), όπου και αλληλουχήθηκαν με Illumina HiSeq 3000.

3. Ανάλυση δεδομένων αλληλούχησης και εντοπισμός πολυμορφισμών

Έπειτα, ακολούθησε ανάλυση των αποτελεσμάτων της αλληλούχησης. Εν συντομία, τα αποτελέσματα της αλληλούχησης αποθηκεύονται σε αρχεία FASTQ στα οποία συμπεριλαμβάνεται η αλληλουχία και ένα σκορ αλληλούχησης. Στην περίπτωση λοιπόν, που εντοπιστούν αλληλουχίες χαμηλής ποιότητας, απαιτείται φιλτράρισμα (quality trimming), ώστε αυτές να απομακρυνθούν και να χρησιμοποιηθούν για την συνέχεια της ανάλυσης μόνο αλληλουχίες υψηλής ποιότητας. Μετά τον ποιοτικό έλεγχο, οι αναγνώσεις του γονιδιώματος (reads) που προέκυψαν από την αλληλούχηση, στοιχήθηκαν στο ανθρώπινο γονιδίωμα αναφοράς (GRCh37/hg19) που ανακτήθηκε από τη βάση δεδομένων Ensembl, ώστε να προκύψει μια ενιαία αλληλουχία. Στη συνέχεια, μέσω της διαδικασίας του «variant calling», αναγνωρίστηκαν οι περιοχές που διαφέρουν μεταξύ του προς ανάλυση γονιδιώματος και του γονιδιώματος αναφοράς. Οι διαφορές αυτές οφείλονται κατά κύριο λόγο στην ύπαρξη μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (SNPs), ενθέσεων ή απαλοιφών βάσεων (indels). Έτσι, μετά την ολοκλήρωση του «variant calling» προέκυψε ένα αρχείο που περιείχε αποθηκευμένα τα παραπάνω δεδομένα (vcf: variant call format) και το οποίο αξιοποιήθηκε αργότερα για την διαδικασία του λειτουργικού χαρακτηρισμού (annotation). Ο λειτουργικός χαρακτηρισμός πραγματοποιήθηκε με το εργαλείο VEP (Variant Effect Predictor) της Ensembl. Ουσιαστικά, μέσω αυτής της διαδικασίας, οι πολυμορφισμοί που εντοπίστηκαν παραπάνω αντιστοιχήθηκαν σε γονίδια και αντλήθηκαν πληροφορίες σχετικά με την θέση τους και την πιθανή επίδραση στη λειτουργικότητα των πρωτεϊνών. Έπειτα, ακολούθησε περαιτέρω ανάλυση των δεδομένων που περιλάμβανε την σύγκριση των αλληλουχιών μεταξύ νορμοσπερμικών και ολιγοσπερμικών με σκοπό τον εντοπισμό πολυμορφισμών που αντιστοιχούν μόνο σε άνδρες με ολιγοσπερμία και πιθανότατα συμβάλλουν στην εμφάνιση του παθολογικού αυτού φαινοτύπου.

Θα πρέπει να τονιστεί ότι η παραπάνω μεθοδολογία περιγράφηκε συνοπτικά, καθώς τα παραπάνω βήματα δεν συντελέστηκαν στην παρούσα διπλωματική, αλλά αφορούν το ερευνητικό πρόγραμμα «Ανδρική γονιμότητα: γονιδιωματική, πρωτεωμική και διάγνωση - Από τον εργαστηριακό πάγκο στον ασθενή», το οποίο πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια της Ενιαίας Δράσης Κρατικών Ενισχύσεων Έρευνας, Τεχνολογικής Ανάπτυξης και Οικονομίας «ΕΡΕΥΝΩ – ΔΗΜΙΟΥΡΓΩ – ΚΑΙΝΟΤΟΜΩ» από το BIOZ – Εργαστήριο Γενετικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας σε συνεργασία με τη μονάδα υποβοηθούμενης αναπαραγωγής Embryolab. Η συνέχεια της ανάλυσης, όπως περιγράφεται παρακάτω, πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

4. Φιλτράρισμα των μοναδικών μεταλλάξεων και εντοπισμός σημαντικών πολυμορφισμών

Έπειτα από σύγκριση μεταξύ των νορμοσπερμικών και μη νορμοσπερμικών ατόμων (ολιγοσπερμικοί), εντοπιστήκαν οι πολυμορφισμοί που αντιστοιχούσαν αποκλειστικά σε ολιγοσπερμικά άτομα, οι οποίοι φιλτραρίστηκαν περαιτέρω με τον τρόπο που αναλύεται παρακάτω. Πιο συγκεκριμένα, οι κατηγορίες πολυμορφισμών και τα φίλτρα που εφαρμόστηκαν διαμορφώθηκαν ως εξής:

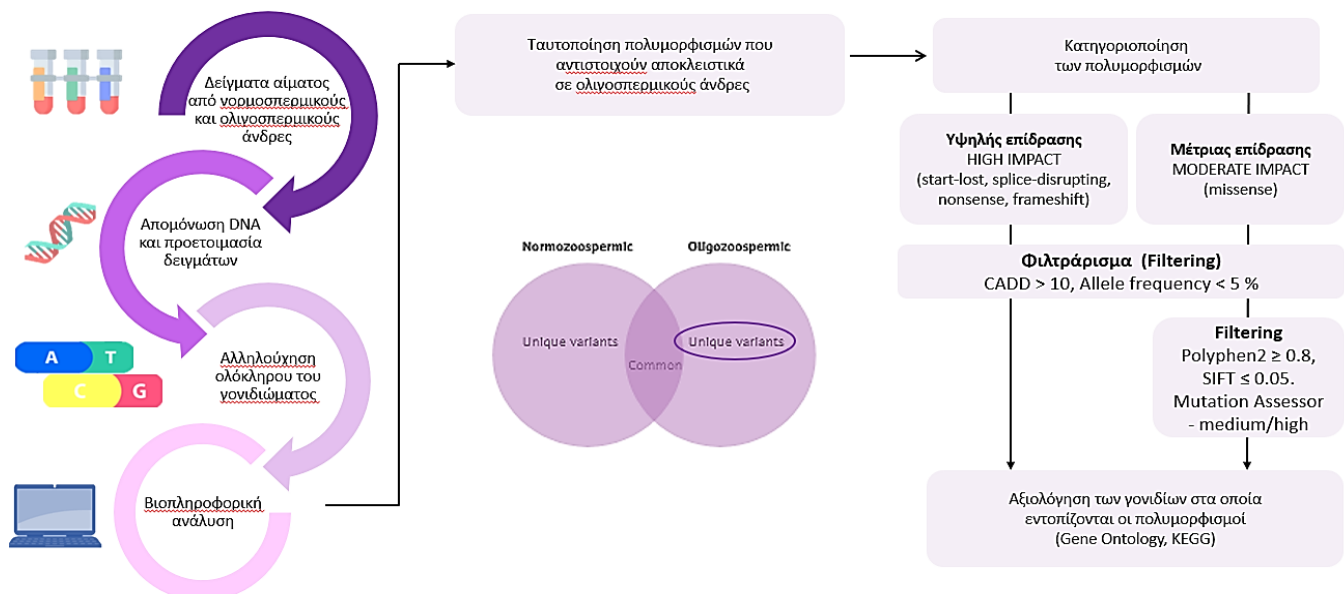
- A) **Πολυμορφισμοί υψηλής επίδρασης (High Impact variants):** Οι πολυμορφισμοί αυτοί χαρακτηρίζονται ως υψηλής επίδρασης, καθώς μπορούν να επιδράσουν σε μεγάλο βαθμό στην λειτουργικότητα της πρωτεΐνης. Πρόκειται κυρίως για πολυμορφισμούς που οδηγούν σε καταστροφή του κωδικονίου έναρξης (start - lost), σε δημιουργία πρόωρου κωδικονίου λήξης (stop - gained), σε αλλαγή του πλαισίου ανάγνωσης (frameshift) και αλλαγή του προτύπου ματίσματος (splice-disrupting). Αφού επιλέχθηκαν οι πολυμορφισμοί υψηλής επίδρασης, στη συνέχεια εφαρμόστηκε μια σειρά φίλτρων ώστε να εντοπιστούν οι σημαντικότεροι από αυτούς. Έτσι, σύμφωνα με τα δεδομένα που ανακτήθηκαν από το 1000 Genomes Project και από την βάση δεδομένων gnomAD για τον πληθυσμό της Ευρώπης, έγινε αποκλεισμός των πολυμορφισμών που αντιστοιχούσαν σε συχνότητες αλληλομόρφων (allele frequency) $\geq 0,05$. Το συγκεκριμένο φίλτρο εφαρμόστηκε επειδή η παρούσα έρευνα στοχεύει στον εντοπισμό σπάνιων παραλλαγών. Το γεγονός ότι οι υπό μελέτη πολυμορφισμοί δεν απαντώνται σε μεγάλη συχνότητα στον πληθυσμό, συνεπάγεται αυξημένες πιθανότητες συσχέτισής τους με παθολογικούς φαινοτύπους. Ακόμα, η βαθμολογία CADD score > 10 χρησιμοποιήθηκε ως ένα επιπρόσθετο φίλτρο για περαιτέρω ιεράρχηση των πολυμορφισμών. Πολυμορφισμοί με CADD score > 10 συγκαταλέγονται στο 10% των κορυφαίων υποψήφιων πολυμορφισμών με επιβλαβή επίδραση σε ολόκληρο το γονιδίωμα.
- B) **Πολυμορφισμοί μέτριας επίδρασης (Moderate Impact variants):** Επιπλέον, επιλέχθηκαν πολυμορφισμοί μέτριας επίδρασης στους οποίους περιλαμβάνονται κατά κύριο λόγο παρανοηματικές μεταλλάξεις (missense variants). Μεταλλάξεις τέτοιου τύπου που εμφανίζουν χαμηλή συχνότητα σε έναν πληθυσμό μπορεί πολλές φορές να ευθύνονται για την πρόκληση διαφόρων ασθενειών, καθώς συχνά επιδρούν στην λειτουργικότητα της παραχθείσας πρωτεΐνης. Συγκεκριμένα, προκειμένου να αξιολογηθεί η επίδραση των πολυμορφισμών στην δομή, στη λειτουργία και στο βαθμό συντήρησης των πρωτεϊνών, εκτός των δύο φίλτρων που προαναφέρθηκαν (CADD score > 10 , allele frequency $\leq 0,05$), στην κατηγορία αυτή εφαρμόστηκαν επιπλέον ως κριτήρια φιλτραρίσματος το SIFT Score, το Polyphen Score και ο βαθμός επίδρασης που αξιολογείται από το MutationAssessor. Μόνο οι πολυμορφισμοί με SIFT Score $\leq 0,05$, Polyphen

Score $\geq 0,8$ και μέτρια έως υψηλά επίπεδα επίδρασης, σύμφωνα με το MutationAssessor, συμπεριλήφθηκαν στην παρούσα ανάλυση.

Στις δύο παραπάνω κατηγορίες συμπεριλήφθηκαν επίσης πολυμορφισμοί, οι οποίοι δεν είναι καταχωρημένοι στις βάσεις δεδομένων που αξιοποιήσαμε (Ensembl, 1000 Genomes και gnomAD). Οι πολυμορφισμοί αυτοί χαρακτηρίζονται ως “novel variants” και δεν υπάρχουν ακόμη δεδομένα για την συχνότητά τους.

Με την εφαρμογή των παραπάνω φίλτρων προέκυψε μια τελική λίστα πολυμορφισμών που πιθανότατα συνδέονται με τον ολιγοσπερμικό φαινότυπο. Για να αναλυθεί βαθύτερα η συσχέτισή τους με την ανδρική υπογονιμότητα, ακολούθησε διερεύνηση του ρόλου των γονιδίων στα οποία εντοπίστηκαν οι πολυμορφισμοί αυτοί με τη βοήθεια των βάσεων δεδομένων που αναλύονται παρακάτω.

Στην Εικόνα 6, παρουσιάζεται συνοπτικά η πορεία ανάλυσης που ακολουθήθηκε:



Εικόνα 6. Σύνοψη μεθοδολογίας.

5. Βάσεις δεδομένων και ανάλυση του ρόλου των γονιδίων στα οποία εντοπίζονται οι πολυμορφισμοί

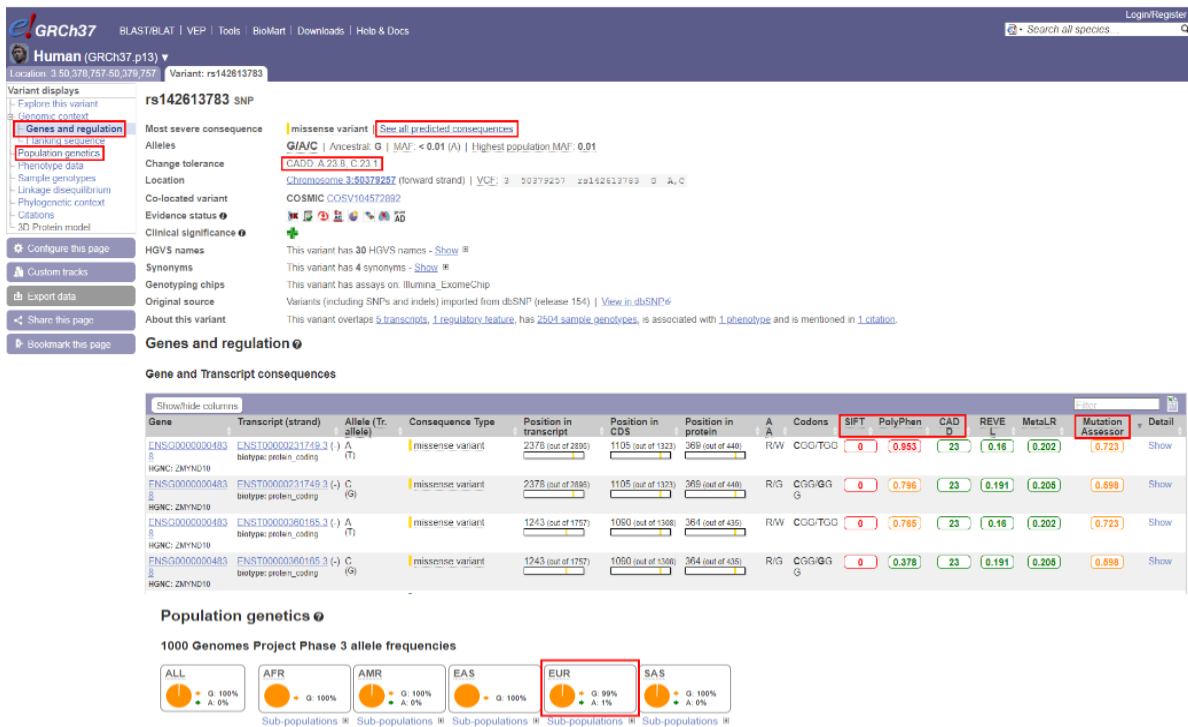
Για την διερεύνηση του ρόλου των γονιδίων στα οποία εντοπίζονται οι παραπάνω πολυμορφισμοί που απομονώθηκαν, έπειτα από την εφαρμογή των σχετικών φίλτρων, χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια διάφορες βάσεις δεδομένων από τις οποίες αντλήθηκε βιολογική πληροφορία. Αυτές αναλύονται παρακάτω.

5.1. Ensembl Genome Browser

Τα δεδομένα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική αντλήθηκαν από τη βάση δεδομένων Ensembl Genome Browser (<https://www.ensembl.org>).

Οι περιηγητές γονιδιωμάτων (genome browsers), όπως η Ensembl, συνιστούν πηγές άντλησης δεδομένων γονιδιωματικής. Τα δεδομένα αυτά μπορεί να περιλαμβάνουν γονίδια, μη κωδικοποιητικά στοιχεία που ρυθμίζουν την γονιδιακή έκφραση, γενετικές παραλλαγές και αποτελέσματα αναλύσεων συγκριτικής γονιδιωματικής (Howe et al., 2021). Πέρα από την παροχή πρόσβασης σε δεδομένα γονιδιωματικής, στην Ensembl βρίσκεται ενσωματωμένη μια σειρά από εργαλεία (π.χ. VEP, BLAST), που έχουν σχεδιαστεί για επεξεργασία και ανάλυση των δεδομένων αυτών. Για παράδειγμα, το VEP (Variant Effect Predictor) μπορεί και προβλέπει τις συνέπειες μιας σειράς μεταλλάξεων σε επίπεδο λειτουργίας των πρωτεϊνών, ενώ το BLAST επιτρέπει την στοίχιση αλληλουχιών αναζήτησης και την σύγκριση τους με αλληλουχίες που είναι διαθέσιμες σε διάφορες βάσεις δεδομένων (Newman et al., 2018).

Για την άντληση των δεδομένων της ανάλυσης επιλέχθηκε η έκδοση Human GRCh37 γονιδιώματος αναφοράς επειδή η συγκεκριμένη έχει χρησιμοποιηθεί και σε προηγούμενες αναλύσεις που αφορούν την συσχέτιση μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (SNPs) με την ανδρική υπογονιμότητα μέσω της μεθόδου GWAS (Genome-Wide Association Study) στα πλαίσια του προγράμματος Spermogene. Από την Ensembl, βρέθηκαν πληροφορίες σχετικά με την συχνότητα αλληλομόρφων (allele frequency) και διάφορα σκορ-βαθμολογίες (π.χ. CADD score, επίπεδα επίδρασης από MutationAssessor) που χρειάστηκαν για το φιλτράρισμα, όπως αναλύεται παραπάνω.



Εικόνα 7. Αναζήτηση δεδομένων μέσω της Ensembl.

5.2 ShinyGO 0.77

Οι μελέτες συσχέτισης ολόκληρου του γονιδιώματος, όπως επίσης και οι αναλύσεις με την χρήση αλληλούχησης νέας γενιάς συνεισφέρουν στην ταυτοποίηση ενός συνόλου γονιδίων. Καθώς πολύ συχνά το πλήθος των γονιδίων είναι αρκετά μεγάλο, τα γονίδια αυτά μπορούν να υποβληθούν σε ανάλυση εμπλουτισμού ή ανάλυση οντολογίας (gene ontology) για να διαπιστωθεί σε ποια μοριακά μονοπάτια ή βιολογικές διεργασίες αυτά εμπλέκονται (Xijin Ge et al., 2020).

Η ShinyGO, στηριζόμενη στην πλατφόρμα Gene Ontology (GO), δίνει τη δυνατότητα για οπτικοποίηση και στατιστική ανάλυση δεδομένων που αφορούν πλήθος γονιδίων που έχουν προκύψει από προγενέστερες αναλύσεις. Βάσει πληροφοριών που παρέχονται από τη GO, μπορεί να πραγματοποιηθεί ανάλυση οντολογίας των εκάστοτε υπό μελέτη γονιδίων, η οποία διακρίνεται σε τρεις επιμέρους οντολογίες που αφορούν:

- α) τη βιολογική διεργασία με την οποία σχετίζεται ένα γονιδιακό προϊόν (GO Biological Process),
- β) τη μοριακή λειτουργία (GO Molecular Function) και
- γ) το κυτταρικό συστατικό, στο οποίο μπορεί αυτό να εντοπίζεται (GO Cellular Component).

Επιπλέον, μέσω αξιοποίησης της ShinyGO είναι εφικτή η γραφική απεικόνιση εμπλουτισμένων μονοπατιών ή ακόμα και πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων μέσω πρόσβασης σε βάσεις όπως η KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) και η STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins), αντίστοιχα (Xijin Ge et al., 2020).

Στην παρούσα μελέτη, το σύνολο των γονιδίων στα οποία εντοπίστηκαν πολυμορφισμοί μετά το φιλτράρισμα, υποβλήθηκαν σε ανάλυση οντολογίας μέσω της ShinyGO, ώστε να εντοπιστούν οι βιολογικές διεργασίες με τις οποίες συσχετίζονται, οι μοριακές λειτουργίες τους και ο κυτταρικός εντοπισμός τους. Επιπλέον, έγινε ανάλυση μέσω της KEGG ώστε να βρεθούν τα μονοπάτια στα οποία συμμετέχουν τα παραπάνω γονίδια. Όλα τα παραπάνω αποσκοπούν στην διερεύνηση του ρόλου των γονιδίων και στη διερεύνηση των μοριακών μονοπατιών και των μηχανισμών που επηρεάζονται από τις σημαντικότερες μεταλλάξεις, οι οποίες αντιστοιχούν μόνο σε ολιγοσπερμικούς άνδρες.

5.3 STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins)

Μεγάλο ποσοστό της πολυπλοκότητας των κυττάρων προκύπτει από τις ρυθμιστικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών. Ο πυρήνας αυτών των αλληλεπιδράσεων εμπλουτίζεται ολοένα και περισσότερο, καθώς συνεχίζουν να ανακαλύπτονται νέες αλληλεπιδράσεις μέσω συναρμολόγησης πληροφοριών από βάσεις δεδομένων. Η λειτουργική σύνδεση των πρωτεϊνών μπορεί να συνεπάγεται την συσχέτιση των γονιδίων που τις κωδικοποιούν (Szkarczyk et al., 2023). Η STRING είναι μια βάση δεδομένων που συλλέγει και ενσωματώνει συστηματικά τέτοιου είδους δεδομένα, τα οποία βαθμολογούνται με ένα σκορ εμπιστοσύνης, το οποίο αντιπροσωπεύει ουσιαστικά τις πιθανότητες ισχύος κάθε πρόβλεψης πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων (Mering et al., 2003). Με αυτό τον τρόπο προκύπτουν πολύπλοκα πρωτεϊνικά δίκτυα και οι αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται μπορούν να παρέχουν πολύτιμη πληροφορία για τα μονοπάτια και τις διεργασίες που επηρεάζονται σε κάθε περίπτωση.

Έτσι, στην συγκεκριμένη μελέτη, τα γονίδια που εντοπίστηκαν παραπάνω εισήχθησαν και στην βάση δεδομένων STRING μέσω της ShinyGO ώστε να διερευνηθούν οι πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις.

Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Ταυτοποίηση πολυμορφισμών υψηλής επίδρασης (high impact)

Όπως ήδη αναφέρθηκε, οι πολυμορφισμοί που ταυτοποιήθηκαν μόνο σε ολιγοσπερμικούς άνδρες διαχωρίστηκαν αναλόγως τον βαθμό επίδρασής τους, σε πολυμορφισμούς υψηλής και μέτριας επίδρασης με βάση τον αντίκτυπο που έχουν στην λειτουργία των πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα, οι υψηλής επίδρασης πολυμορφισμοί, πέρα από την δημιουργία μιας τροποποιημένης πρωτεΐνης, μπορούν να προκαλέσουν ακόμα και την πλήρη απουσία της (π.χ. σε περιπτώσεις που λόγω μετάλλαξης καταστρέφεται το κωδικόνιο έναρξης). Στην παραπάνω κατηγορία περιλαμβάνονται πολυμορφισμοί που έχουν ως αποτέλεσμα την καταστροφή κωδικονίου έναρξης (start - lost), τη δημιουργία πρόωρου κωδικονίου λήξης (stop - gained), την αλλαγή του πλαισίου ανάγνωσης (frameshift) και την αλλαγή του προτύπου ματίσματος (splice-disrupting).

Αρχικά, οι πολυμορφισμοί υψηλής επίδρασης που ανιχνεύθηκαν σε ολιγοσπερμικούς ανέρχονταν στους 200. Ωστόσο, έπειτα από την διαδικασία φιλτραρίσματος περιορίστηκαν στους 78. Αναλυτικότερα, βάσει ομαδοποίησης προέκυψαν τα εξής αποτελέσματα:

Α) Πολυμορφισμοί που έχουν ως αποτέλεσμα την καταστροφή κωδικονίου έναρξης (start-lost) : Η αρχική λίστα περιλάμβανε 9 μεταλλάξεις “start-lost”, εκ των οποίων μόνο 3 (μεταξύ των οποίων και λιγότερο χαρακτηρισμένοι πολυμορφισμοί, που αναφέρονται ως novel variants) πληρούσαν τα κριτήρια φιλτραρίσματος (CADD score > 10, allele frequency ≤ 0,05) και επιλέχθηκαν για περαιτέρω ανάλυση. Οι συγκεκριμένοι πολυμορφισμοί που προέκυψαν μετά το φιλτράρισμα παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.

Πίνακας 3. Πολυμορφισμοί που οδηγούν σε καταστροφή κωδικονίου έναρξης (start-lost)

Πολυμορφισμοί	Γονιδωματικές Συντεταγμένες	Γονίδιο	CADD score	Συχνότητα	Τύπος Μετάλλαξης
- (novel)	17:74116482- 74116482	<i>EXOC7</i>	-	-	start_lost
- (novel)	2:228243984- 228243984	<i>TM4SF20</i>	-	-	start_lost
rs200770421	8:124440262- 124440262	<i>WDYHV1</i> (<i>NTAQ1</i>)	12,28	0,00001	start_lost

Β) Πολυμορφισμοί που έχουν ως αποτέλεσμα τη **δημιουργία πρόωρου κωδικονίου λήξης (stop-gained)** : Όσον αφορά τους συγκεκριμένους πολυμορφισμούς, η αρχική λίστα περιλάμβανε συνολικά 51 μεταλλάξεις στους ολιγοσπερμικούς άνδρες, εκ των οποίων μόνο 21 πληρούσαν τα κριτήρια φιλτραρίσματος (CADD score > 10, allele frequency ≤ 0,05) και παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.

Πίνακας 4. Πολυμορφισμοί που οδηγούν σε δημιουργία πρόωρου κωδικονίου λήξης (stop-gained)

Πολυμορφισμοί	Γονιδιωματικές Συντεταγμένες	Γονίδιο	CADD score	Συχνότητα	Τύπος Μετάλλαξης
rs146106052	10:26500881-26500881	<i>MYO3A</i>	38	0,001	stop_gained
rs138288686	11:34912059-34912059	<i>APIP</i>	42	0,001	stop_gained
rs147179561	11:47298298-47298298	<i>MADD</i>	36	0,04399	stop_gained
rs116924453	11:55110903-55110903	<i>OR4A16</i>	44	0,01	stop_gained
rs75808998	12:49724861-49724861	<i>TROAP</i>	10,84	0,002	stop_gained
rs34301344	13:50205029-50205029	<i>ARL11</i>	38	0,013	stop_gained
rs985591104	14:100762189-100762189	<i>SLC25A29</i>	12,84	0,01892	stop_gained
- (novel)	14:20012788-20012797	<i>POTEM</i>	-	-	stop_gained
rs1331040573	14:77493769-77493769	<i>IRF2BPL</i>	33	-	stop_gained
rs36102575	16:48130781-48130781	<i>ABCC12</i>	42	0,031	stop_gained
rs144163075	17:7760574-7760574	<i>LSMD1 (NAA38)</i>	38	0,014	stop_gained
rs372628445	19:12186970-12186983	<i>ZNF844</i>	-	0,008	stop_gained
rs147584129	19:43699204-43699204	<i>PSG4</i>	38	0,004	stop_gained
rs2728433	1:243328887-243328887	<i>CEP170</i>	32	0,015	stop_gained
rs142839542	1:43108238-43108238	<i>CCDC30</i>	36	0,00013	stop_gained
rs897290962	3:73111863-73111863	<i>EBLN2</i>	33	0,000194	stop_gained
rs139044238	5:78340149-78340149	<i>DMGDH</i>	41	0,002	stop_gained
rs112780453	6:158571611-158571611	<i>SERAC1</i>	26,8	0,012	stop_gained
rs151180490	7:92098171-92098171	<i>ERVW-1</i>	32	0,001	stop_gained
rs1235926839	X:106846442-106846442	<i>FRMPD3</i>	34	-	stop_gained
rs17206680	NT_167248.1:2673299- 2673299	<i>MICA</i>	-	-	stop_gained

Γ) Πολυμορφισμοί που έχουν ως αποτέλεσμα την **αλλαγή του πλαισίου ανάγνωσης (frameshift)**: Η αρχική λίστα περιλάμβανε 56 μεταλλάξεις αυτής της κατηγορίας, εκ των οποίων 26 πληρούσαν τα κριτήρια φιλτραρίσματος (CADD score > 10, allele frequency ≤ 0,05), όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 5.

Πίνακας 5. Πολυμορφισμοί που οδηγούν σε αλλαγή του πλαισίου ανάγνωσης (frameshift)

Πολυμορφισμοί	Γονιδιωματικές Συντεταγμένες	Γονίδιο	Συχνότητα	Τύπος Μετάλλαξης
rs1564899888	10:103827009- 103827025	<i>HPS6</i>	-	frameshift
rs139794951	11:4608563-4608571	<i>OR52I2</i>	0,002	frameshift
- (novel)	11:75141623-75141624	<i>KLHL35</i>	-	frameshift
rs746234865	12:117289581- 117289602	<i>RNFT2</i>	0	frameshift
rs139522193	15:42302340-42302342	<i>PLA2G4E</i>	0,003	frameshift
rs377074694	16:1823389-1823392	<i>EME2</i>	0,008	frameshift
rs150129313	16:310644-310648	<i>ITFG (FAM234A)</i>	0,009	frameshift
rs749586725	17:42089430-42089432	<i>TMEM101</i>	0	frameshift
rs200056085	18:28647999-28648002	<i>DSC2</i>	0,01	frameshift
rs148227520	19:35250690-35250694	<i>ZNF599</i>	0,01	frameshift
rs777227278	19:4529557-4529598	<i>PLIN5</i>	0	frameshift
rs550161786	19:53304139-53304148	<i>ZNF28</i>	0,009	frameshift
- (novel)	19:56125164-56125165	<i>ZNF865</i>	-	frameshift
- (novel)	1:202129795-202129802	<i>PTPN7</i>	-	frameshift
rs775667051	2:219128291-219128292	<i>GPBAR1</i>	0	frameshift
rs144166965	3:11848923-11848927	<i>TAMM41</i>	0,023	frameshift
- (novel)	3:125725266-125725271	<i>SLC41A3</i>	-	frameshift
rs200376306	4:37962608-37962610	<i>PTTG2</i>	0,019	frameshift

rs779579461	4:44692798-44692801	<i>GUF1</i>	0,001	frameshift
rs3841162	6:153019099-153019106	<i>MYCT1</i>	0,022	frameshift
rs142551217	8:10411512-10411515	<i>PRSS55</i>	0,036	frameshift
rs150536607	8:17137320-17137322	<i>VPS37A</i>	0,023	frameshift
- (novel)	8:98788168-98788183	<i>LAPTM4B</i>	-	frameshift
rs536507102	9:139304340-139304350	<i>SDCCAG3(ENTR1)</i>	0,002	frameshift
rs201673579	X:135961586-135961587	<i>RBMX</i>	0,006	frameshift
rs67523850	NT_113891.2:4498128-4498131	<i>HLA-DPB1</i>	-	frameshift

Δ) Πολυμορφισμοί που έχουν ως αποτέλεσμα την αλλαγή του προτύπου ματίσματος (splice-disrupting): Στην τελευταία υποκατηγορία των πολυμορφισμών υψηλής επίδρασης συμπεριλαμβάνονταν πολυμορφισμοί που προκαλούν αλλαγή του προτύπου ματίσματος. Συγκεκριμένα, η αρχική λίστα περιλάμβανε 84 μεταλλάξεις αυτής της κατηγορίας, εκ των οποίων 28 πληρούσαν τα κριτήρια φιλτραρίσματος (CADD score > 10, allele frequency ≤ 0,05), όπως φαίνεται στον Πίνακα 6.

Πίνακας 6. Πολυμορφισμοί που οδηγούν σε αλλαγή του προτύπου ματίσματος (splice-disrupting)

Πολυμορφισμοί	Γονιδιωματικές Συντεταγμένες	Γονίδιο	CADD score	Συχνότητα	Τύπος Μετάλλαξης
rs199906378	10:112341673-112341677	<i>SMC3</i>	-	0,042	splice_disrupting
rs957864989	11:102573851-102573851	<i>MMP27</i>	35	0	splice_disrupting
rs764610177	11:102584189-102584189	<i>MMP8</i>	33	0,0088	splice_disrupting
rs17860955	11:102649482-102649482	<i>MMP10</i>	32	0,018	splice_disrupting
rs368658841	11:126161465-126161465	<i>TIRAP</i>	10,17	0,001	splice_disrupting
rs764271518	13:49833660-49833660	<i>CDADC1</i>	34	0,03521	splice_disrupting
rs564215769	14:73731293-73731295	<i>PAPLN</i>	-	0,003	splice_disrupting
- (novel)	15:29139191-29139191	<i>APBA2</i>	-	-	splice_disrupting

rs57856942	16:81091635-81091669	<i>RP11-303E16.8</i>	-	0,001	splice_disrupting
rs1567652121	16:88780633-88780639	<i>CTU2</i>	-	-	splice_disrupting
rs546077824	17:16119398-16119410	<i>NCOR1</i>	-	0,002	splice_disrupting
rs34599426	17:56272532-56272532	<i>EPX</i>	34	0,005	splice_disrupting
rs3835397	1:101702547-101702548	<i>S1PR1</i>	-	0,049	splice_disrupting
rs201774625	1:46086193-46086200	<i>CCDC17</i>	-	0	splice_disrupting
rs1316432783	1:92979088-92979126	<i>EVI5</i>	-	0,000494	splice_disrupting
rs575093462	20:10617087-10617093	<i>SLX4IP</i>	-	0,003	splice_disrupting
- (novel)	22:37961597-37961605	<i>CDC42EP1</i>	-	-	splice_disrupting
rs7589943	2:102038936-102038936	<i>RFX8</i>	31	0,02	splice_disrupting
- (novel)	2:220505086-220505162	<i>SLC4A3</i>	-	-	splice_disrupting
- (novel)	3:130381153-130381154	<i>COL6A6</i>	-	-	splice_disrupting
rs148838820	3:157221258-157221258	<i>VEPH1</i>	14,05	0,017	splice_disrupting
rs6893323	5:111013712-111013712	<i>NREP</i>	13,51	0	splice_disrupting
rs764535782	5:147593589-147593589	<i>SPINK6</i>	33	0	splice_disrupting
- (novel)	5:79864769-79864772	<i>ANKRD34B</i>	-	-	splice_disrupting
rs58367598	6:26370833-26370833	<i>BTN3A2</i>	27,2	0,045	splice_disrupting
rs17866749	7:126890902-126890902	<i>GRM8</i>	22,6	0,031	splice_disrupting
rs530625473	7:96635363-96635411	<i>DLX6</i>	-	0,001	splice_disrupting
rs530862715	9:79075094-79075094	<i>GCNT1</i>	10,38	0,001	splice_disrupting

2. Ταυτοποίηση πολυμορφισμών μέτριας επίδρασης (moderate impact)

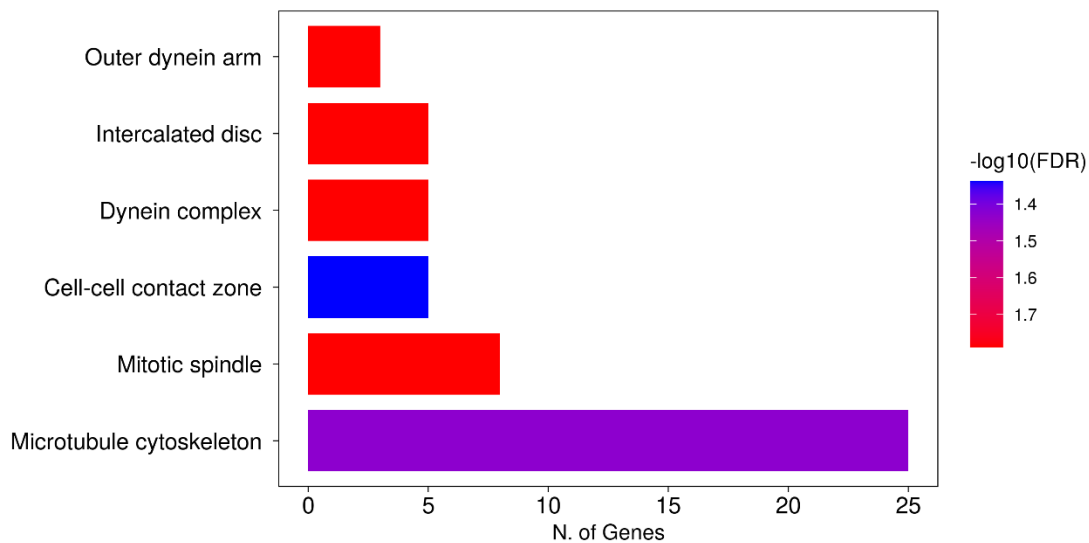
Όσον αφορά τους πολυμορφισμούς μέτριας επίδρασης, σε αυτούς περιλαμβάνονται κυρίως παρανοηματικές μεταλλάξεις (missense variants), οι οποίες είναι πιθανό να επηρεάζουν την λειτουργικότητα της πρωτεΐνης. Σε αυτήν την κατηγορία εφαρμόστηκαν επιπλέον, εκτός των CADD score >10 και allele frequency $\leq 0,05$, κριτήρια φιλτραρίσματος όπως το SIFT Score, το Polyphen Score και ο βαθμός επίδρασης που αξιολογείται από το MutationAssessor. Συγκεκριμένα, μόνο οι πολυμορφισμοί με SIFT Score $\leq 0,05$, Polyphen Score $\geq 0,8$ και μέτρια έως υψηλά επίπεδα επίδρασης σύμφωνα με το MutationAssessor συμπεριλήφθηκαν στην παρούσα ανάλυση. Έτσι, προέκυψε ένα σύνολο 137 πολυμορφισμών μέτριας επίδρασης, οι οποίοι παρουσιάζονται αναλυτικά στον Συμπληρωματικό Πίνακα 1 (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ).

3. Μελέτη του ρόλου των γονιδίων στα οποία εντοπίστηκαν πολυμορφισμοί υψηλής και μέτριας επίδρασης

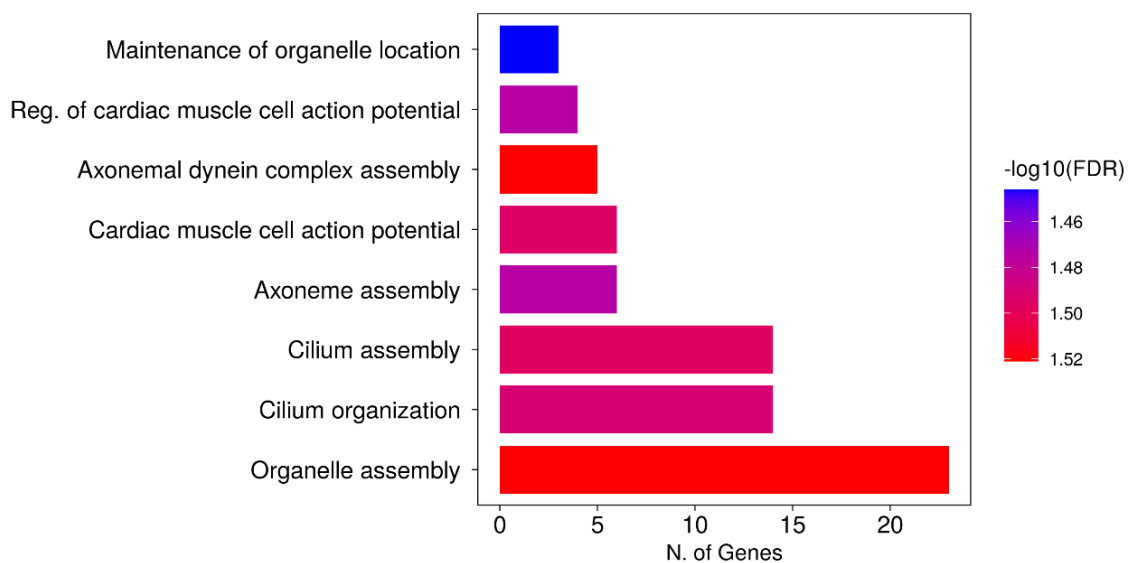
Σύμφωνα με τα παραπάνω δεδομένα, από την ανάλυση των πολυμορφισμών που βρέθηκαν αποκλειστικά σε άνδρες με ολιγοσπερμία, επιλέχθηκαν συνολικά 215 πολυμορφισμοί μετά από εφαρμογή φίλτρων, εκ των οποίων οι 78 αντιστοιχούσαν σε υψηλής επίδρασης και οι 137 σε μέτριας επίδρασης. Στη συνέχεια, προκειμένου να αξιολογηθεί ο ρόλος των γονιδίων, στα οποία εντοπίζονται οι επιλεγμένοι πολυμορφισμοί, αλλά και η πιθανή εμπλοκή τους σε διεργασίες που σχετίζονται με την αναπαραγωγή ή την ανδρική υπογονιμότητα, ακολούθησε ανάλυση οντολογίας μέσω της βάσης δεδομένων ShinyGO 0.77.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την ανάλυση οντολογίας απεικονίζονται στο Διάγραμμα 1 και Διάγραμμα 2, τα οποία παρουσιάζουν βιολογικές διεργασίες και κυτταρικές δομές με τις οποίες συνδέονται τα εμπλουτισμένα βάσει ανάλυσης γονίδια.

Όπως φαίνεται και από τα διαγράμματα, πολλά από τα γονίδια εμπλέκονται σε βιολογικές διεργασίες που σχετίζονται με τον σχηματισμό και την οργάνωση των οργανιδίων και κυτταροσκελετικών δομών, όπως το αξόνημα (κυτταροσκελετική δομή του μαστιγίου των σπερματοζωαρίων). Παρομοίως, σε κυτταρικό επίπεδο, παρατηρείται η εμπλοκή γονιδίων που κωδικοποιούν κυρίως πρωτεΐνες απαραίτητες για την οργάνωση των μικροσωληνίσκων και τη δημιουργία συμπλοκών δυνεΐνης (βασικά στοιχεία των αξονήματος), καθώς επίσης και για τον σχηματισμό της μιτωτικής ατράκτου.



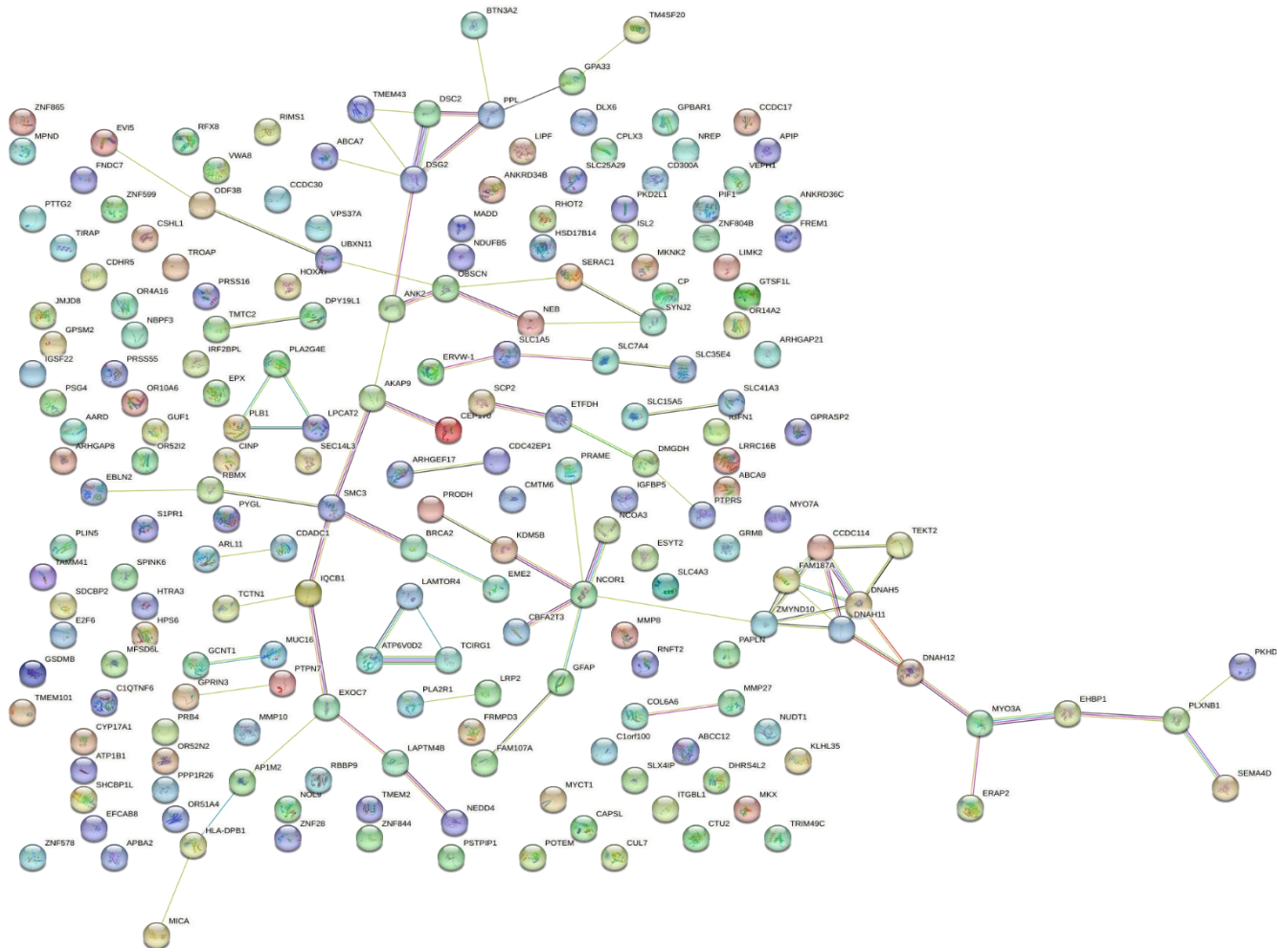
Διάγραμμα 1. Ανάλυση οντολογίας όσον αφορά τη βιολογική διεργασία (GO Biological Process).



Διάγραμμα 2. Ανάλυση οντολογίας όσον αφορά το κυτταρικό συστατικό (GO Cellular Component).

Αξίζει να σημειωθεί, ότι μέσω της εισαγωγής των παραπάνω δεδομένων ανάλυσης στην ShinyGO, δεν ήταν δυνατή η λήψη αποτελεσμάτων σχετικά με την μοριακή λειτουργία (GO Molecular Function) και τα μονοπάτια KEGG, καθώς δεν προέκυψαν στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα που να αναδεικνύουν συγκεκριμένα μοριακά μονοπάτια ή λειτουργίες που να συνδέονται με την λίστα των γονιδίων.

Ωστόσο, για να διερευνηθεί περαιτέρω ο ρόλος των γονιδίων, αξιοποιήθηκε επίσης η βάση δεδομένων STRING, μέσω της οποίας βρέθηκε το σύνολο των αλληλεπιδράσεων των πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από τα συγκεκριμένα γονίδια (Διάγραμμα 3).



Διάγραμμα 3. Δίκτυο αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών που προκύπτουν από τα επιλεγμένα γονίδια στα οποία εντοπίζονται οι πολυμορφισμοί υψηλής και μέτριας επίδρασης.

Με βάση τα δεδομένα του δικτύου, ανιχνεύθηκαν συνολικά 209 αλληλεπιδράσεις με τις σημαντικότερες από αυτές να σχετίζονται με πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη δομή και την οργάνωση του κυτταροσκελετού.

4. Εντοπισμός γονιδίων με πολλαπλούς πολυμορφισμούς

Τέλος, διερευνήθηκε αν υπάρχουν γονίδια που συγκεντρώνουν περισσότερες από μία μεταλλάξεις μέτριας ή υψηλής επίδρασης. Η συσσώρευση των πολυμορφισμών στα συγκεκριμένα γονίδια ενδεχομένως να υποδηλώνει και μεγαλύτερα ποσοστά επίδρασης στην λειτουργικότητα των πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται απ' αυτά. Παρακάτω, παρατίθεται η λίστα γονιδίων στα οποία εντοπίστηκαν περισσότεροι του ενός πολυμορφισμοί διαφόρων κατηγοριών (frameshift, splice disrupting, stop gained, missense).

Πίνακας 7. Λίστα γονιδίων στα οποία εντοπίστηκαν παραπάνω του ενός πολυμορφισμοί

Πολυμορφισμός	Γονίδιο	Τύπος Μετάλλαξης
Novel variant (8:98788168-98788183)	<i>LAPTM4B</i>	Frameshift
rs1304930066	<i>LAPTM4B</i>	Missense
Novel variant (3:130381153-130381154)	<i>COL6A6</i>	Splice disrupting
rs59021909	<i>COL6A6</i>	Missense
rs112780453	<i>SERAC1</i>	Stop gained
rs112780453	<i>SERAC1</i>	Missense

Ε. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Είναι γεγονός ότι η υπογονιμότητα συνιστά ένα από τα κύρια προβλήματα που απασχολούν σημαντικό ποσοστό των ζευγαριών που βρίσκονται σε αναπαραγωγική ηλικία. Η παθολογική αυτή κατάσταση οφείλεται σε συνδυασμό γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων, η διερεύνηση των οποίων κρίνεται αναγκαία, ώστε να αναπτυχθούν αποτελεσματικότεροι μέθοδοι πρόγνωσης, διάγνωσης και θεραπείας. Σύμφωνα με μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί, ο ανδρικός παράγοντας φαίνεται να συμβάλλει έως και στο 50% των περιπτώσεων (Mehra et al., 2018). Συνεπώς, το ενδιαφέρον για αποσαφήνιση των αιτιών της ανδρικής υπογονιμότητας έχει αυξηθεί αρκετά τα τελευταία χρόνια. Έχει αποδειχθεί ότι η αξιοποίηση τεχνολογιών, όπως η αλληλούχηση νέας γενιάς (Next Generation Sequencing), μπορούν να ενισχύσουν τις προσπάθειες προσδιορισμού της γενετικής αιτιολογίας φαινομένων υπογονιμότητας, συντελώντας έτσι στην βελτίωση των θεραπευτικών προσεγγίσεων (Nawaz et al., 2021).

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η διερεύνηση του γενετικού προφίλ Ελλήνων ανδρών με ολιγοσπερμία και ο εντοπισμός πολυμορφισμών που σχετίζονται με αυτήν μέσω της μεθόδου αλληλούχησης νέας γενιάς (Next Generation Sequencing). Η ολιγοσπερμία αποτελεί μια υποκατηγορία της ανδρικής υπογονιμότητας και αφορά περιπτώσεις ανδρών με μειωμένο αριθμό σπερματοζωαρίων σε δείγματα σπέρματος (<15 εκατομμύρια σπερματοζωάρια/mL σπέρματος) (Agarwal et al., 2021). Ωστόσο, η γενετική βάση της ολιγοσπερμίας δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως, γι' αυτό και καθίσταται απαραίτητη η ανάδειξη γονιδίων που εμπλέκονται στην εμφάνιση του συγκεκριμένου φαινοτύπου.

Έτσι, στην παρούσα μελέτη, απομονώθηκε αρχικά DNA από δείγματα αίματος νορμοσπερμικών και ολιγοσπερμικών ανδρών και ακολούθησε αλληλούχηση ολόκληρου του γονιδιώματος (Whole Genome Sequencing). Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε βιοπληροφορική ανάλυση προκειμένου να εντοπιστούν μεταλλάξεις που εντοπίζονται αποκλειστικά στους ολιγοσπερμικούς άνδρες και όχι στους νορμοσπερμικούς. Έπειτα από εφαρμογή μιας σειράς φίλτρων, επιλέχθηκαν συνολικά 215 πολυμορφισμοί (78 υψηλής επίδρασης και 137 μέτριας επίδρασης) που πιθανότατα συνδέονται με τον ολιγοσπερμικό φαινότυπο. Για να αποσαφηνιστεί η συσχέτισή τους με την ανδρική υπογονιμότητα, έγινε επιπρόσθετα διερεύνηση του ρόλου των γονιδίων στα οποία εντοπίστηκαν οι πολυμορφισμοί αυτοί.

Για την διερεύνηση του ρόλου των γονιδίων πραγματοποιήθηκε ανάλυση οντολογίας και σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν, αποδείχθηκε ότι η πλειοψηφία των γονιδίων συμμετέχουν σε διεργασίες που σχετίζονται με χαρακτηριστικές δομές του κυτταροσκελετού. Πιο συγκεκριμένα, αντλώντας δεδομένα από το Διαγράμματα 1 και Διάγραμμα 2, προκύπτει ότι πλήθος γονιδίων στα οποία εντοπίστηκαν μεταλλάξεις υψηλής και μέτριας επίδρασης κυρίως με διαδικασίες που βοηθούν στην συγκρότηση οργανιδίων του κυττάρου, στην κατασκευή και οργάνωση κυτταροσκελετικών δομών, όπως το αξόνημα, και ειδικότερα σε πρωτεΐνες που συναντώνται σε αυτό (πρωτεϊνικά σύμπλοκα δυνεΐνης). Ακόμα, βρέθηκαν γονίδια

υπεύθυνα για τη δομή και την λειτουργία των μικροσωληνίσκων, καθώς επίσης και για τον σχηματισμό της μιτωτικής ατράκτου, δυο στοιχείων απαραίτητων για τη διαδικασία της σπερματογένεσης.

Επιπλέον, από την εισαγωγή της λίστας των γονιδίων (στα οποία αντιστοιχούσαν οι επιλεγμένοι πολυμορφισμοί) στην βάση δεδομένων STRING, οι αλληλεπιδράσεις που σημειώθηκαν ήταν αρκετά περισσότερες από τις αναμενόμενες, με πιο σημαντικές αυτές που σχετίζονταν με πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού και πιο συγκεκριμένα με πρωτεΐνες, η δράση των οποίων συμβάλλει στην σωστή διαμόρφωση των κεντροσωμάτων, της μιτωτικής ατράκτου και των κροσσών ή κινητών βλεφαρίδων (cilium), οργανιδίων που αποτελούνται κυρίως από μικροσωληνίσκους και παίζουν σημαντικό ρόλο στο ανδρικό αναπαραγωγικό σύστημα. Η πληθώρα των αλληλεπιδράσεων συνιστά ενθαρρυντικό παράγοντα για περαιτέρω αναλύσεις πρωτεωμικής, ώστε να διαλευκανθεί ο τρόπος συνεισφοράς τους στην ανδρική υπογονιμότητα.

Αξίζει να επισημανθεί επίσης ότι πολλά από τα γονίδια στα οποία εντοπίστηκαν οι υπό μελέτη πολυμορφισμοί, έχουν συσχετιστεί και στο παρελθόν με φαινόμενα υπογονιμότητας στους άνδρες. Μεγάλο ποσοστό αυτών συμμετέχουν στον κατασκευή του αξονήματος, που εντοπίζεται στο εσωτερικό του μαστιγίου των σπερματοζωαρίων προσδίδοντας τους την ικανότητα προωθητικής κίνησης. Η δομή του αξονήματος περιγράφεται από ένα χαρακτηριστικό μοτίβο διάταξης "9+2", στο οποίο μια δυάδα μικροσωληνίσκων περιβάλλεται από εννέα επιπλέον ζεύγη, τα οποία βρίσκονται συνδεδεμένα με εξωτερικούς και εσωτερικούς βραχίονες δυνείνης (Εικόνα 1B). Μεταλλάξεις σε γονίδια όπως τα *DNAH5*, *DNAH11*, *DNAH12* (Dynein Axonemal Heavy chain), *ODAD1* (Outer Dynein Arm Complex Subunit 1), *TEKT2* (Tektin2) και *ZMYND10* (Zinc Finger MYND-Type containing 10) έχουν συνδεθεί με μη φυσιολογική διαμόρφωση συμπλόκων δυνείνης και χαμηλά ποσοστά κινητικότητας σπερματοζωαρίων (Braschi et al., 2022). Εκτός των παραπάνω, ανάμεσα στη λίστα των γονιδίων που εντοπίστηκαν κι έχουν συσχετιστεί στο παρελθόν με την ανδρική υπογονιμότητα, συμπεριλαμβάνονταν ακόμα γονίδια που παίζουν σημαντικό ρόλο στον σχηματισμό της μιτωτικής ατράκτου (*AKAP9*: A-Kinase Anchoring Protein 9, *GPSM2*: G-Protein Signaling Modulator 2), η οποία αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την πρόοδο των διακριτών φάσεων της σπερματογένεσης (Kanaka et al., 2022).

Επιπλέον, η συσσώρευση πολλαπλών πολυμορφισμών σε γονίδια, όπως αυτά που παρατίθενται στον Πίνακα 7, αυξάνει τις πιθανότητες παραγωγής μη λειτουργικών πρωτεϊνών. Ειδικότερα, έχει επιβεβαιωθεί στο παρελθόν ότι και τα τρία αυτά γονίδια σχετίζονται με την εμφάνιση ανδρικής υπογονιμότητας αλλά αξίζει να γίνουν περαιτέρω μελέτες για την πιθανή συσχέτισή τους αποκλειστικά με περιπτώσεις ολιγοσπερμίας. Για παράδειγμα, βρέθηκε ότι παρατεταμένη έκθεση σε τοξικές ουσίες, μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένα επίπεδα έκφρασης του *LAPTM4B* (Lysosomal Protein Transmembrane 4 Beta), το οποίο με την σειρά του ρυθμίζει αρνητικά τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, μέσω ενίσχυσης ειδικών μηχανισμών των λυσοσωμάτων, λειτουργώντας ως εμπόδιο για την ομαλή διεξαγωγή της

σπερματογένεσης (Ahn et al., 2022). Ακόμα, το *COL6A6* (Collagen Type VI Alpha 6 Chain) κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που συμμετέχει στην ρύθμιση των αλληλεπιδράσεων της φμπρονεκτίνης με άλλα συστατικά του εξωκυττάρου πλέγματος (π.χ κολλαγόνο). Μεταλλάξεις λοιπόν, στο γονίδιο αυτό, μπορούν να επιφέρουν αλλαγές που διαταράσσουν την σωστή συγκρότηση του ιστού των όρχεων (όπου παράγονται τα σπερματοζωάρια) και κατ' επέκταση να συντελέσουν σε αύξηση της απόπτωσης των γεννητικών κυττάρων εξαιτίας μορφολογικών ανωμαλιών του επιθηλίου των σπερματικών σωληναρίων (Miller et al., 2012) . Τέλος, έρευνες έχουν δείξει ότι διάφορες μεταλλάξεις στο γονίδιο *SERAC1* (Serine Active Site Containing 1), το οποίο εκφράζεται στους όρχεις, είναι ικανές να προκαλέσουν στειρότητα (Schimenti et al., 2005).

Επιπρόσθετα, από την παρούσα μελέτη προκύπτει ότι ιδιαίτερη έμφαση θα πρέπει να δοθεί στις μεταλλάξεις που επηρεάζουν γονίδια που κωδικοποιούν για το αξόνημα και τους κροσσούς ή μαστίγια (cilia). Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, το μαστίγιο των σπερματοζωαρίων συγκροτείται από μια χαρακτηριστική δομή, το αξόνημα, και προσδίδει κινητικότητα στα σπερματοζωάρια. Ωστόσο, η έννοια του αξονήματος δεν πρέπει να περιορίζεται και να συνδέεται μόνο με την κίνηση του μαστιγίου. Διάφορα ευρήματα παρουσιάζουν έναν νέο μηχανισμό που μπορεί να σχετίζεται με την ολιγοσπερμία στους άνδρες και προκαλείται από δυσλειτουργία των κινητών βλεφαρίδων (cilium) του απαγωγού πόρου, βασική δομή των οποίων συνιστά επίσης το αξόνημα (Aprea, Nöthe-Menzen, et al., 2021). Πρόσφατες μελέτες, υποδεικνύουν ότι η σύσπαση των λείων μυών του πόρου συντελούν στη μετακίνηση των σπερματοζωαρίων από τους όρχεις προς την επιδιδυμίδα, ενώ οι κινητές βλεφαρίδες δημιουργούν, με το χτύπημά τους, κίνηση του σπέρματος, κρατώντας τα σπερματοζωάρια σε εναιώρηση, αποφεύγοντας έτσι το ενδεχόμενο απόφραξης. Υποστηρίζεται λοιπόν, ότι η απώλεια αυτού του είδους κινητικότητας, είναι επαρκής για να προκληθεί ολιγοσπερμία. Ο μηχανισμός αυτός διαφοροποιείται από τις διαταραχές της κίνησης που σχετίζονται με το μαστίγιο των σπερματοζωαρίων και διευρύνει το φάσμα διαταραχών σχετιζόμενων με επιθηλιακές δομές του αναπαραγωγικού συστήματος (Yuan et al., 2019).

Ακόμα, η παρούσα μελέτη υποδεικνύει τον σημαντικό ρόλο του κυτταροσκελετού σε περιπτώσεις ανδρικής υπογονιμότητας. Ποικίλα κυτταρικά συμβάντα κατά την διάρκεια της σπερματογένεσης ευθύνονται για εκτεταμένες αλλαγές του σχήματος, του μεγέθους και της κινητικότητας των γεννητικών κυττάρων (Wang et al., 2023). Ο κυτταροσκελετός, ο οποίος αποτελείται από μικροσωληνίσκους, ινίδια ακτίνης και ενδιάμεσα ινίδια διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στις αλλαγές αυτές, καθώς συμβάλλει στην ακεραιότητα των κυτταρικών συνδέσεων και στην ικανότητα τους για δυναμικές αναδιορθώσεις. Είναι γνωστό ότι οι μικροσωληνίσκοι συμμετέχουν στη μετατόπιση των αναπτυσσόμενων σπερματίδων κατά μήκος του σπερματικού επιθηλίου κατά την διάρκεια της σπερματογένεσης, δημιουργώντας επίσης ένα δίκτυο μεταφοράς κυστιδίων, οργανιδίων και άλλων κυτταροσκελετικών συστατικών. Μια σειρά από διαταραχές του κυτταροσκελετού μπορούν να συνδεθούν με μορφολογικές ανωμαλίες των σπερματοζωαρίων, καθώς επίσης και με

επιπλοκές της μορφολογίας των όρχεων και της επιδιδυμίδας, με αποτέλεσμα την παραγωγή σπέρματος χαμηλής ποιότητας (Lie et al., 2010).

Συμπερασματικά, στην παρούσα διπλωματική εργασία διερευνήθηκε το γενετικό προφίλ ολιγοσπερμικών ανδρών μέσω αξιοποίησης της μεθόδου αλληλούχησης νέας γενιάς (NGS) και βρέθηκαν γονίδια που σχετίζονται με την εμφάνιση υπογονιμότητας, αρκετά εκ των οποίων έχουν συσχετιστεί και στο παρελθόν με την ανδρική υπογονιμότητα. Το γεγονός αυτό πιθανόν υποδεικνύει την ύπαρξη ενός κοινού γενετικού υποβάθρου, το οποίο βάσει επίδρασης περιβαλλοντικών ή άλλων παραγόντων, μπορεί να οδηγήσει πιθανότατα κάθε φορά στην εκδήλωση ενός διαφορετικού υποτύπου ανδρικής υπογονιμότητας. Θα πρέπει να σημειωθεί ωστόσο ότι ο μικρός αριθμός δειγμάτων συνιστά βασικό περιορισμό της μελέτης αυτής. Συνεπώς, προτείνονται μελλοντικές προσεγγίσεις με μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων, έτσι ώστε να μεγιστοποιηθεί η αξιοπιστία των αποτελεσμάτων που αφορούν συγκεκριμένα τον φαινότυπο της ολιγοσπερμίας. Ακόμα, η πραγματοποίηση λειτουργικών πειραμάτων θα μπορούσε να βοηθήσει στην εξακρίβωση του ρόλου επιλεγμένων γονιδίων σε παθολογικές καταστάσεις υπογονιμότητας καθώς και στην διερεύνηση της επίδρασης των πολυμορφισμών που προέκυψαν από την παρούσα μελέτη. Η συνεχής πρόοδος τεχνολογιών ανάλυσης γονιδιώματος καθιστά εφικτή την επισήμανση υποψήφιων πολυμορφισμών, παρέχοντας τη δυνατότητα ανάδειξης μελλοντικών γονιδίων στόχων για την βελτίωση θεραπευτικών προσεγγίσεων και την επίτευξη μεγαλύτερων ποσοστών επιτυχίας κυήσεων στον τομέα της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Συμπληρωματικός Πίνακας 1. Πολυμορφισμοί μέτριας επίδρασης

Πολυμορφισμοί	Γονιδιωματικές Συντεταγμένες	Γονίδιο	CADD score	Συχνότητα	Mutation Assessor	Τύπος Μετάλλαξης
rs147426900	10:102054823-102054823	<i>PKD2L1</i>	28,7	0,014	0,853	missense
rs781451590	10:104590578-104590578	<i>CYP17A1</i>	24,9	0	0,844	missense
rs142036127	10:24874111-24874111	<i>ARHGAP21</i>	22,6	0,001		missense
rs374145415	10:28024254-28024254	<i>MKX</i>	32	0,001	0,56	missense
rs141578885	10:82187167-82187167	<i>FAM213A (PRXL2A)</i>	32	0,001	-	missense
rs79058739	10:90435347-90435347	<i>LIPF</i>	29,1	0,001	0,883	missense
rs111397851	11:18735480-18735480	<i>IGSF22</i>	22,4	0,026	-	missense
rs111230950	11:4968278-4968278	<i>OR51A4</i>	23	0,028	0,913	missense
rs73394377	11:5841926-5841926	<i>OR52N2</i>	28,2	0,047	0,96	missense
rs781732884	11:617517-617517	<i>CDHR5</i>	23	-	0,554	missense
rs36027301	11:67809268-67809268	<i>TCIRG1</i>	32	0,05	0,94	missense
rs146397383	11:73078743-73078743	<i>ARHGEF17</i>	31	0,00045	0,8	missense
rs111033287	11:76914163-76914163	<i>MYO7A</i>	26,4	0	0,564	missense
rs111488559	11:7949707-7949707	<i>OR10A6</i>	23,4	0,026	0,943	missense
rs562154172	11:89806434-89806434	<i>TRIM49C</i>	19,42	0,004	-	missense
rs118096349	12:111082836-111082836	<i>TCTN1</i>	23,1	0,019	0,62	missense
rs757874200	12:11461583-11461583	<i>PRB4</i>	22,2	0		missense
rs117728539	12:16347327-16347327	<i>SLC15A5</i>	24,9	0	0,942	missense
rs573875185	12:40877451-40877451	<i>MUC19</i>	16,85	0,005	-	missense
rs766173	13:32906480-32906480	<i>BRCA2</i>	17,58	0,035	-	missense
rs9562353	13:42385446-42385446	<i>VWA8</i>	23,8	0,036	0,875	missense
rs11544426	14:102825773-102825773	<i>CINP</i>	25,9	0,032	0,831	missense
rs61732730	14:24459407-24459407	<i>DHRS4L2</i>	22,1	0,017	-	missense
rs117092113	14:24533474-24533474	<i>LRRC16B</i>	25,2	0,043	-	missense
rs61742363	14:39818076-39818076	<i>CTAGE5 (MIA2)</i>	23,1	0,015	-	missense
rs3742591	14:45433155-45433155	<i>FAM179B (TOGARAM1)</i>	22,1	0,049	-	missense
rs143759519	14:51382637-51382637	<i>PYGL</i>	29,7	0,005	0,985	missense
rs149728605	15:20192922-20192922	<i>IGHV3OR15-7</i>	22,5	0,015	-	missense
rs201295772	15:56139186-56139186	<i>NEDD4</i>	33	0	0,633	missense
rs118062397	15:65113687-65113687	<i>PIF1</i>	28,1	0,022	0,646	missense
rs780059071	15:75120382-75120382	<i>CPLX3</i>	28,7	0	0,866	missense
rs140931798	15:76633575-76633575	<i>ISL2</i>	32	-	0,806	missense
rs200771233	15:77329417-77329417	<i>PSTPIP1</i>	24	0,001	0,885	missense
rs113673618	16:11505128-11505128	<i>CTD-3088G3.8 (LOC400499)</i>	18,61	0,001	-	missense

rs143852771	16:4933576-4933576	<i>PPL</i>	32	0	0,605	missense
rs147797312	16:55613118-55613118	<i>LPCAT2</i>	29,1	0,001	0,868	missense
rs1315175843	16:718531-718531	<i>RHOT2</i>	27,3	-	0,875	missense
rs61757659	16:88951594-88951594	<i>CBFA2T3</i>	29,5	0,009	0,795	missense
rs150941805	17:38073390-38073390	<i>GSDMB</i>	23,3	0	0,603	missense
rs185409255	17:42982122-42982122	<i>FAM187A</i>	31	0	0,625	missense
rs78994946	17:42987512-42987512	<i>GFAP</i>	15,96	0,02	-	missense
rs141576938	17:61988162-61988162	<i>CSHL1</i>	20,7	0,001	0,798	missense
rs73370041	17:67012450-67012450	<i>ABCA9</i>	24,1	0,002	0,816	missense
rs1160822413	17:72469855-72469855	<i>CD300A</i>	22,4	0	0,93	missense
rs78093130	17:8700719-8700719	<i>MFSD6L</i>	27,4	0,003	0,831	missense
rs557493808	19:1048932-1048932	<i>ABCA7</i>	29,4	0,001	0,777	missense
rs34276903	19:10694295-10694295	<i>AP1M2</i>	22,9	0,003	0,899	missense
rs56158214	19:2046390-2046390	<i>MKMK2</i>	27,6	0,00006	0,671	missense
rs34522164	19:4359191-4359191	<i>MPND</i>	28,6	0,041	0,595	missense
rs148681286	19:47285695-47285695	<i>SLC1A5</i>	22,8	0,001	0,835	missense
rs16981988	19:48821757-48821757	<i>CCDC114</i>	23,8	0,025	0,753	missense
rs35299026	19:49318380-49318380	<i>HSD17B14</i>	26,9	0,043	-	missense
rs369295620	19:5214592-5214592	<i>PTPRS</i>	23,3	0,00006	0,8	missense
rs61739625	19:53014752-53014752	<i>ZNF578</i>	22,2	0,008	0,951	missense
rs1406034099	19:8997507-8997507	<i>MUC16</i>	12,6	0,005	-	missense
rs749508293	1:109276137-109276137	<i>FNDC7</i>	29,7	-	0,638	missense
rs61754640	1:109446750-109446750	<i>GPSM2</i>	31	0,036	0,688	missense
rs72689400	1:167038219-167038219	<i>GPA33</i>	21,5	0,018	0,919	missense
rs12138972	1:182873431-182873431	<i>SHCBP1L</i>	26,9	0,019	-	missense
rs11584104	1:201174215-201174215	<i>IGFN1</i>	18,81	0,043	0,873	missense
rs139757131	1:21809667-21809667	<i>NBPF3</i>	10,04	0,036	0,612	missense
rs191837710	1:228399519-228399519	<i>OBSCN</i>	24,1	0,005	0,87	missense
rs41269385	1:244541827-244541827	<i>C1orf100</i>	24	0,011	0,766	missense
rs62619787	1:247886493-247886493	<i>OR14A2</i>	19,95	0,044	-	missense
rs56039743	1:26620806-26620806	<i>UBXN11</i>	26,8	0,013	0,874	missense
rs41267269	1:36552839-36552839	<i>TEKT2</i>	23,4	0,000324	0,843	missense
rs1237869869	1:53453788-53453788	<i>SCP2</i>	27,5	0	0,85	missense
rs35367003	20:1293141-1293141	<i>SDCBP2</i>	32	0,022	0,913	missense
rs140409239	20:18471068-18471068	<i>RBBP9</i>	26,7	0,002	0,678	missense

rs117765537	20:31518229-31518229	<i>EFCAB8</i>	25,1	0,024	-	missense
rs17826038	20:42355169-42355169	<i>GTSF1L</i>	22,6	0,033	0,79	missense
rs6094752	20:46256424-46256424	<i>NCOA3</i>	25,4	0,028	0,55	missense
rs148375080	22:18912581-18912581	<i>PRODH</i>	17,4	0,008	-	missense
rs142077633	22:21384475-21384475	<i>SLC7A4</i>	24,9	0,003	0,974	missense
rs41277505	22:22892314-22892314	<i>PRAME</i>	22,6	0,002	0,683	missense
rs114566165	22:30857329-30857329	<i>SEC14L3</i>	25,7	0,001	0,941	missense
rs145308917	22:31061506-31061506	<i>SLC35E4</i>	17,64	0,033	-	missense
rs34930775	22:31658205-31658205	<i>LIMK2</i>	25,2	0,017	0,574	missense
rs17812681	22:37578388-37578388	<i>C1QTNF6</i>	31	0,018	-	missense
rs200062058	22:45255643-45255643	<i>ARHGAP8</i>	24,2	0	0,63	missense
rs139023197	22:50969647-50969647	<i>ODF3B</i>	24,5	0,044	0,57	missense
rs35625617	2:152383521-152383521	<i>NEB</i>	32	0,023	0,737	missense
rs140427239	2:160873180-160873180	<i>PLA2R1</i>	22,9	0	0,944	missense
rs34291900	2:170129547-170129547	<i>LRP2</i>	26,5	0,037	0,792	missense
rs11575194	2:217543728-217543728	<i>IGFBP5</i>	25,3	0,031	0,57	missense
rs74701215	2:28854972-28854972	<i>PLB1</i>	25	0,014	0,926	missense
rs143970378	2:63206344-63206344	<i>EHBP1</i>	32	0,001	0,59	missense
rs188178234	2:96581911-96581911	<i>ANKRD36C</i>	19,22	0,009	-	missense
rs59021909	3:130285929-130285929	<i>COL6A6</i>	24	0,2	0,74	missense
rs35028636	3:14170981-14170981	<i>TMEM43</i>	29,9	0	0,853	missense
rs61733458	3:148916215-148916215	<i>CP</i>	27,2	0,031	-	missense
rs35399127	3:179322703-179322703	<i>NDUFB5</i>	23,5	0,015	0,8	missense
rs35574803	3:32533246-32533246	<i>CMTM6</i>	23,6	0,024	0,802	missense
rs114964512	3:48463799-48463799	<i>PLXNB1</i>	25,4	0,018	0,712	missense
rs142613783	3:50379257-50379257	<i>ZMYND10</i>	23,8	0,006	0,723	missense
rs62622492	3:57431945-57431945	<i>DNAH12</i>	25,5	0,05	0,986	missense
rs1043942	3:58552997-58552997	<i>FAM107A</i>	23,1	0,048	0,661	missense
rs36210417	4:114279628-114279628	<i>ANK2</i>	25,3	0,008	0,702	missense
rs147219158	4:159606337-159606337	<i>ETFDH</i>	27,5	0,000194	0,971	missense

rs139130623	4:76489406-76489406	<i>C4orf26 (ODAPH)</i>	23,3	0,00013	-	missense
rs111620813	4:8293193-8293193	<i>HTRA3</i>	25,5	0,013	0,678	missense
rs202023170	4:90169155-90169155	<i>GPRIN3</i>	26,2	0,00006	0,644	missense
rs140782270	5:13914743-13914743	<i>DNAH5</i>	24,1	0,003	0,948	missense
rs748659530	5:35910629-35910629	<i>CAPSL</i>	26,5	0,00013	0,981	missense
rs75263594	5:96228072-96228072	<i>ERAP2</i>	23,6	0,031	0,893	missense
rs146694394	6:158492660-158492660	<i>SYNJ2</i>	29,8	0,005	0,932	missense
rs112780453	6:158571611-158571611	<i>SERAC1</i>	26,8	0,012	0,775	missense
rs5030965	6:27216699-27216699	<i>PRSS16</i>	23,8	0,031	0,595	missense
rs41274912	6:43006408-43006408	<i>CUL7</i>	24,1	0,014	0,802	missense
rs149798764	6:51609303-51609303	<i>PKHD1</i>	24,5	0,00019	0,806	missense
rs41265501	6:72984123-72984123	<i>RIMS1</i>	26,1	0,036	0,56	missense
rs139531934	7:158528253-158528253	<i>ESYT2</i>	24,8	0	-	missense
rs2003417	7:21778429-21778429	<i>DNAH11</i>	24,5	0,045	-	missense
rs4866	7:2289586-2289586	<i>NUDT1</i>	24,6	0,018	-	missense
rs1309185969	7:27194684-27194684	<i>HOXA7</i>	25,5	-	0,927	missense
rs200311128	7:34977612-34977612	<i>DPY19L1</i>	32	0,00032	0,745	missense
rs182369154	7:88965720-88965720	<i>ZNF804B</i>	23,9	0,001	0,641	missense
rs61757557	7:91631812-91631812	<i>AKAP9</i>	26,3	0	-	missense
rs200634492	7:99747131-99747131	<i>LAMTOR4</i>	21,6	0,002	-	missense
rs150345297	8:87111269-87111269	<i>ATP6V0D2</i>	29,7	0,000065	0,882	missense
rs1304930066	8:98863635-98863635	<i>LAPTM4B</i>	24,9	0,000065	-	missense
rs199947269	9:138376477-138376477	<i>PPP1R26</i>	23,1	0	0,742	missense
rs143889132	9:139008644-139008644	<i>C9orf69 (TMEM250)</i>	26	0,004	-	missense
rs7025814	9:14797516-14797516	<i>FREM1</i>	23,6	0,006	0,946	missense
rs147272925	9:74324239-74324239	<i>TMEM2</i>	28,6	0	-	missense
rs13284404	9:92017824-92017824	<i>SEMA4D</i>	22,8	0,039	0,764	missense
- (novel)	12:83455570-83455570	<i>TMTC2</i>	-	-	-	missense
- (novel)	13:102235650-102235650	<i>ITGBL1</i>	-	-	-	missense
- (novel)	16:733198-733198	<i>JMJD8</i>	-	-	-	missense
- (novel)	18:29122735-29122735	<i>DSG2</i>	-	-	-	missense
- (novel)	1:169100539-169100539	<i>ATP1B1</i>	-	-	-	missense
- (novel)	1:202724490-202724490	<i>KDM5B</i>	-	-	-	missense
- (novel)	1:6592029-6592029	<i>NOL9</i>	-	-	-	missense
- (novel)	2:11605926-11605926	<i>E2F6</i>	-	-	-	missense

- (novel)	3:121509054-121509054	<i>IQCB1</i>	-	-	-	missense
- (novel)	8:117950784-117950784	<i>AARD</i>	-	-	-	missense
- (novel)	X:101971952-101971952	<i>GPRASP2</i>	-	-	-	missense

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Agarwal, A., Baskaran, S., Parekh, N., Cho, C. L., Henkel, R., Vij, S., Arafa, M., Panner Selvam, M. K., & Shah, R. (2021). Male infertility. In *The Lancet* (Vol. 397, Issue 10271, pp. 319–333). Lancet Publishing Group. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32667-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32667-2)
- Agarwal, A., Bertolla, R. P., & Samanta, L. (2016). Sperm proteomics: Potential impact on male infertility treatment. In *Expert Review of Proteomics* (Vol. 13, Issue 3, pp. 285–296). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1586/14789450.2016.1151357>
- Ahn, J. S., Won, J. H., Kim, D. Y., Jung, S. E., Kim, B. J., Kim, J. M., & Ryu, B. Y. (2022). Transcriptome alterations in spermatogonial stem cells exposed to bisphenol A. *Animal Cells and Systems*, 26(2), 70–83. <https://doi.org/10.1080/19768354.2022.2061592>
- Alshahrani, S., Ahmed, A. F., Gabr, A. H., Abalhassan, M., & Ahmad, G. (2016). The impact of body mass index on semen parameters in infertile men. *Andrologia*, 48(10), 1125–1129. <https://doi.org/10.1111/and.12549>
- Alves, M. B. R., Celeghini, E. C. C., & Belleannée, C. (2020). From Sperm Motility to Sperm-Borne microRNA Signatures: New Approaches to Predict Male Fertility Potential. In *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (Vol. 8). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00791>
- Aprea, I., Nöthe-Menzen, T., Dougherty, G. W., Raidt, J., Loges, N. T., Kaiser, T., Wallmeier, J., Olbrich, H., Strünker, T., Kliesch, S., Pennekamp, P., & Omran, H. (2021). Motility of efferent duct cilia aids passage of sperm cells through the male reproductive system. *Molecular Human Reproduction*, 27(3). <https://doi.org/10.1093/molehr/gaab009>
- Aprea, I., Raidt, J., Höben, I. M., Loges, N. T., Nöthe-Menzen, T., Pennekamp, P., Olbrich, H., Kaiser, T., Biebach, L., Tüttelmann, F., Horvath, J., Schubert, M., Krallmann, C., Kliesch, S., & Omran, H. (2021). Defects in the cytoplasmic assembly of axonemal dynein arms cause morphological abnormalities and dysmotility in sperm cells leading to male infertility. *PLoS Genetics*, 17(2 February). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009306>
- Aston, K. I. (2014). Genetic susceptibility to male infertility: News from genome-wide association studies. In *Andrology* (Vol. 2, Issue 3, pp. 315–321). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/j.2047-2927.2014.00188.x>
- Auger, J., Jouannet, P., & Eustache, F. (2016). Another look at human sperm morphology. *Human Reproduction*, 31(1), 10–23. <https://doi.org/10.1093/humrep/dev251>
- Barratt, C. L. R., Björndahl, L., De Jonge, C. J., Lamb, D. J., Martini, F. O., McLachlan, R., Oates, R. D., van der Poel, S., John, B. S., Sigman, M., Sokol, R., & Tournaye, H. (2017). The diagnosis of male infertility: An analysis of the evidence to support the

development of global WHO guidance-challenges and future research opportunities. *Human Reproduction Update*, 23(6), 660–680.
<https://doi.org/10.1093/humupd/dmx021>

- Borgmann, J., Tüttelmann, F., Dworniczak, B., Röpke, A., Song, H. W., Kliesch, S., Wilkinson, M. F., Laurentino, S., & Gromoll, J. (2016). The human RHOX gene cluster: Target genes and functional analysis of gene variants in infertile men. *Human Molecular Genetics*, 25(22), 4898–4910.
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddw313>
- Braschi, B., Omran, H., Witman, G. B., Pazour, G. J., Pfister, K. K., Bruford, E. A., & King, S. M. (2022). Consensus nomenclature for dyneins and associated assembly factors. In *Journal of Cell Biology* (Vol. 221, Issue 2). Rockefeller University Press.
<https://doi.org/10.1083/JCB.202109014>
- Brauner, R., Neve, M., Allali, S., Trivin, C., Lottmann, H., Bashamboo, A., & McElreavey, K. (2011). Clinical, biological and genetic analysis of anorchia in 26 boys. *PLoS ONE*, 6(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023292>
- Cannarella, R., Condorelli, R., Paolacci, S., Barbagallo, F., Guerri, G., Bertelli, M., La Vignera, S., & Calogero, A. (2021). Next-generation sequencing: Toward an increase in the diagnostic yield in patients with apparently idiopathic spermatogenic failure. *Asian Journal of Andrology*, 23(1), 24–29.
https://doi.org/10.4103/aja.aja_25_20
- Castañeda, J. M., Miyata, H., Ikawa, M., & Matzuk, M. M. (2018). Sperm defects. In *Encyclopedia of Reproduction* (pp. 276–281). Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.64778-5>
- Cheng, L., Albers, P., Berney, D. M., Feldman, D. R., Daugaard, G., Gilligan, T., & Looijenga, L. H. J. (2018). Testicular cancer. In *Nature Reviews Disease Primers* (Vol. 4, Issue 1). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0029-0>
- Cocuzza, M., Alvarenga, C., & Pagani, R. (2013). The epidemiology and etiology of azoospermia. In *Clinics* (Vol. 68, Issue SUPPL. 1, pp. 15–26).
[https://doi.org/10.6061/clinics/2013\(Sup01\)03](https://doi.org/10.6061/clinics/2013(Sup01)03)
- Dodé, C., & Hardelin, J. P. (2009). Kallmann syndrome. *European Journal of Human Genetics*, 17(2), 139–146. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2008.206>
- Du Plessis, S. S., Cabler, S., McAlister, D. A., Sabanegh, E., & Agarwal, A. (2010). The effect of obesity on sperm disorders and male infertility. In *Nature Reviews Urology* (Vol. 7, Issue 3, pp. 153–161). <https://doi.org/10.1038/nrurol.2010.6>
- Ferlin, A., Arredi, B., & Foresta, C. (2006). Genetic causes of male infertility. In *Reproductive Toxicology* (Vol. 22, Issue 2, pp. 133–141).
<https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2006.04.016>
- Gunes, S., & Esteves, S. C. (2021). Role of genetics and epigenetics in male infertility. In *Andrologia* (Vol. 53, Issue 1). Blackwell Publishing Ltd.
<https://doi.org/10.1111/and.13586>

- Gunes, S., & Mahmutoglu, A. M. (2018). Transcriptomics and oxidative stress in male infertility. In *Oxidants, Antioxidants, and Impact of the Oxidative Status in Male Reproduction* (pp. 249–260). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812501-4.00023-7>
- Hamada, A., Esteves, S. C., Nizza, M., & Agarwal, A. (2012). *Unexplained Male infertility: Diagnosis and Management*.
- Howe, K. L., Achuthan, P., Allen, J., Allen, J., Alvarez-Jarreta, J., Ridwan Amode, M., Armean, I. M., Azov, A. G., Bennett, R., Bhai, J., Billis, K., Boddu, S., Charkhchi, M., Cummins, C., da Rin Fioretto, L., Davidson, C., Dodiya, K., El Houdaigui, B., Fatima, R., ... Flicek, P. (2021). Ensembl 2021. *Nucleic Acids Research*, *49*(D1), D884–D891. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa942>
- Indriastuti, R., Pardede, B. P., Gunawan, A., Ulum, M. F., Arifiantini, R. I., & Purwantara, B. (2022). Sperm Transcriptome Analysis Accurately Reveals Male Fertility Potential in Livestock. In *Animals* (Vol. 12, Issue 21). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ani12212955>
- Jacobsen, F. M., Rudlang, T. M., Fode, M., Østergren, P. B., Sønksen, J., Ohl, D. A., & Jensen, C. F. S. (2019). The impact of testicular torsion on testicular function. In *World Journal of Men's Health* (Vol. 37). Korean Society for Sexual Medicine and Andrology. <https://doi.org/10.5534/WJM.H.190037>
- Jenkins, T. G., & Carrell, D. T. (2011). The paternal epigenome and embryogenesis: Poising mechanisms for development. In *Asian Journal of Andrology* (Vol. 13, Issue 1, pp. 76–80). <https://doi.org/10.1038/aja.2010.61>
- Jodar, M., Soler-Ventura, A., & Oliva, R. (2017a). Semen proteomics and male infertility. In *Journal of Proteomics* (Vol. 162, pp. 125–134). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.08.018>
- Jodar, M., Soler-Ventura, A., & Oliva, R. (2017b). Semen proteomics and male infertility. In *Journal of Proteomics* (Vol. 162, pp. 125–134). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.08.018>
- Kanaka, V., Proikakis, S., Drakakis, P., Loutradis, D., & Tsangaris, G. T. (2022). Implementing a preimplantation proteomic approach to advance assisted reproduction technologies in the framework of predictive, preventive, and personalized medicine. In *EPMA Journal* (Vol. 13, Issue 2, pp. 237–260). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s13167-022-00282-5>
- Kläver, R., Tüttelmann, F., Bleiziffer, A., Haaf, T., Kliesch, S., & Gromoll, J. (2013). DNA methylation in spermatozoa as a prospective marker in andrology. *Andrology*, *1*(5), 731–740. <https://doi.org/10.1111/j.2047-2927.2013.00118.x>
- Krausz, C. (2011a). Male infertility: Pathogenesis and clinical diagnosis. In *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism* (Vol. 25, Issue 2, pp. 271–285). <https://doi.org/10.1016/j.beem.2010.08.006>

- Krausz, C. (2011b). Male infertility: Pathogenesis and clinical diagnosis. In *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism* (Vol. 25, Issue 2, pp. 271–285). <https://doi.org/10.1016/j.beem.2010.08.006>
- Krausz, C., & Riera-Escamilla, A. (2018a). Genetics of male infertility. *Nature Reviews Urology*. <https://doi.org/10.1038/s41585>
- Krausz, C., & Riera-Escamilla, A. (2018b). Genetics of male infertility. *Nature Reviews Urology*. <https://doi.org/10.1038/s41585>
- Kumar, N., & Singh, A. K. (2022). Impact of environmental factors on human semen quality and male fertility: a narrative review. In *Environmental Sciences Europe* (Vol. 34, Issue 1). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1186/s12302-021-00585-w>
- Leslie, S. W., Soon-Sutton, T. L., & Khan, M. A. (n.d.). *Male Infertility Continuing Education Activity*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK562258/>
- Lie, P. P. Y., Mruk, D. D., Lee, W. M., & Cheng, C. Y. (2010). Cytoskeletal dynamics and spermatogenesis. In *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* (Vol. 365, Issue 1546, pp. 1581–1592). Royal Society. <https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0261>
- Lin, J. B., & Troyer, D. (2014). Testicular Anatomy and Physiology. In *Pathobiology of Human Disease: A Dynamic Encyclopedia of Disease Mechanisms* (pp. 2464–2475). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386456-7.05102-9>
- Lipkin, S. M., Moens, P. B., Wang, V., Lenzi, M., Shanmugarajah, D., Gilgeous, A., Thomas, J., Cheng, J., Touchman, J. W., Green, E. D., Schwartzberg, P., Collins, F. S., & Cohen, P. E. (2002). Meiotic arrest and aneuploidy in MLH3-deficient mice. *Nature Genetics*, 31(4), 385–390. <https://doi.org/10.1038/ng931>
- Lotti, F., & Maggi, M. (2018). Sexual dysfunction and male infertility. In *Nature Reviews Urology* (Vol. 15, Issue 5, pp. 287–307). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2018.20>
- Mann, U., Shiff, B., & Patel, P. (2020). Reasons for worldwide decline in male fertility. In *Current opinion in urology* (Vol. 30, Issue 3, pp. 296–301). NLM (Medline). <https://doi.org/10.1097/MOU.0000000000000745>
- Matzuk, M. M., & Lamb, D. J. (2008). The biology of infertility: Research advances and clinical challenges. In *Nature Medicine* (Vol. 14, Issue 11, pp. 1197–1213). <https://doi.org/10.1038/nm.f.1895>
- Mehra, B. L., Skandhan, K. P., Prasad, B. S., Pawankumar, G., Singh, G., & Jaya, V. (2018). Male infertility rate: a retrospective study. *Urologia*, 85(1), 22–24. <https://doi.org/10.5301/uj.5000254>
- Miller, H. D., Clark, B. W., Hinton, D. E., Whitehead, A., Martin, S., Kwok, K. W., & Kullman, S. W. (2012). Anchoring Ethinylestradiol Induced Gene Expression Changes with Testicular Morphology and Reproductive Function in the Medaka. *PLoS ONE*, 7(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052479>

- Montjean, D., De La Grange, P., Gentien, D., Rapinat, A., Belloc, S., Cohen-Bacrie, P., Menezo, Y., & Benkhalifa, M. (2012). Sperm transcriptome profiling in oligozoospermia. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 29(1), 3–10. <https://doi.org/10.1007/s10815-011-9644-3>
- Nawaz, S., Ullah, M. I., Hamid, B. S., Nargis, J., Nawaz, M., Hussain, S., & Ahmad, W. (2021). A loss-of-function variant in DNA mismatch repair gene MLH3 underlies severe oligozoospermia. *Journal of Human Genetics*, 66(7), 725–730. <https://doi.org/10.1038/s10038-021-00907-z>
- Newman, V., Moore, B., Sparrow, H., & Perry, E. (2018). The ensembl genome browser: Strategies for accessing eukaryotic genome data. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1757, pp. 115–139). Humana Press Inc. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7737-6_6
- Olooto, W. E. (n.d.). *Infertility in male; risk factors, causes and management-A review SERUM CONCENTRATIONS OF GHRELIN, LEPTIN AND LIPID PROFILE IN TYPE 2 DIABETES MELLITUS View project*. <https://www.researchgate.net/publication/273322627>
- Panner Selvam, M. K., & Agarwal, A. (2018). Update on the proteomics of male infertility: A systematic review. *Arab Journal of Urology*, 16(1), 103–112. <https://doi.org/10.1016/j.aju.2017.11.016>
- Panner Selvam, M. K., Finelli, R., Agarwal, A., & Henkel, R. (2021). Proteomics and metabolomics — Current and future perspectives in clinical andrology. In *Andrologia* (Vol. 53, Issue 2). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/and.13711>
- Qin, L., Luo, X.-Q., Wei, J.-X., Wei, Y.-X., Wang, J.-L., Zhang, L.-L., Huang, H.-B., & Wei, X.-C. (2019). Genome-wide DNA methylation analysis of oligospermia and asthenozoospermia in a Chinese population. In *Int J Clin Exp Med* (Vol. 12, Issue 4). www.ijcem.com/
- Robay, A., Abbasi, S., Akil, A., El-Bardisi, H., Arafa, M., Crystal, R. G., & Fakhro, K. A. (2018). A systematic review on the genetics of male infertility in the era of next-generation sequencing. *Arab Journal of Urology*, 16(1), 53–64. <https://doi.org/10.1016/j.aju.2017.12.003>
- Rodprasert, W., Virtanen, H. E., Mäkelä, J. A., & Toppari, J. (2020). Hypogonadism and Cryptorchidism. In *Frontiers in Endocrinology* (Vol. 10). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00906>
- Sato, A., Hiura, H., Okae, H., Miyauchi, N., Abe, Y., Utsunomiya, T., Yaegashi, N., & Arima, T. (2011). Assessing loss of imprint methylation in sperm from subfertile men using novel methylation polymerase chain reaction Luminex analysis. *Fertility and Sterility*, 95(1). <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.06.076>
- Schimenti, J. C., Reynolds, J. L., & Planchart, A. (2005). *Mutations in Serac1 or Synj2 cause proximal t haplotype-mediated male mouse sterility but not transmission ratio distortion*. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0407970102

- Sikka, S. C., & Hellstrom, W. J. G. (2016). Current updates on laboratory techniques for the diagnosis of male reproductive failure. In *Asian Journal of Andrology* (Vol. 18, Issue 3, pp. 392–401). Medknow Publications. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.179161>
- Starmer, B. Z., Baird, A., & Lucky, M. A. (2018). Considerations in fertility preservation in cases of testicular trauma. *BJU International*, *121*(3), 466–471. <https://doi.org/10.1111/bju.14084>
- Stuppia, L., Franzago, M., Ballerini, P., Gatta, V., & Antonucci, I. (2015). Epigenetics and male reproduction: The consequences of paternal lifestyle on fertility, embryo development, and children lifetime health. In *Clinical Epigenetics* (Vol. 7, Issue 1). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1186/s13148-015-0155-4>
- Sugihara, Y., Honda, H., Lida, T., Morinaga, T., Hino, S., Okajima, T., Matsuda, T., & Nadano, D. (2010). Proteomic analysis of rodent ribosomes revealed heterogeneity including ribosomal proteins L10-like, L22-like 1, and L39-like. *Journal of Proteome Research*, *9*(3), 1351–1366. <https://doi.org/10.1021/pr9008964>
- Sujit, K. M., Singh, V., Trivedi, S., Singh, K., Gupta, G., & Rajender, S. (2020). Increased DNA methylation in the spermatogenesis-associated (SPATA) genes correlates with infertility. *Andrology*, *8*(3), 602–609. <https://doi.org/10.1111/andr.12742>
- Szklarczyk, D., Kirsch, R., Koutrouli, M., Nastou, K., Mehryary, F., Hachilif, R., Gable, A. L., Fang, T., Doncheva, N. T., Pyysalo, S., Bork, P., Jensen, L. J., & von Mering, C. (2023). The STRING database in 2023: protein–protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest. *Nucleic Acids Research*, *51*(D1), D638–D646. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1000>
- Tu, C., Meng, L., Nie, H., Yuan, S., Wang, W., Du, J., Lu, G., Lin, G., & Tan, Y. Q. (2020). A homozygous RPL10L missense mutation associated with male factor infertility and severe oligozoospermia. *Fertility and Sterility*, *113*(3), 561–568. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2019.10.029>
- Uitterlinden, A. G. (2016). An Introduction to Genome-Wide Association Studies: GWAS for Dummies. In *Seminars in Reproductive Medicine* (Vol. 34, Issue 4, pp. 196–204). Thieme Medical Publishers, Inc. <https://doi.org/10.1055/s-0036-1585406>
- Vander Borgh, M., & Wyns, C. (2018). Fertility and infertility: Definition and epidemiology. In *Clinical Biochemistry* (Vol. 62, pp. 2–10). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2018.03.012>
- von Mering, C., Huynen, M., Jaeggi, D., Schmidt, S., Bork, P., & Snel, B. (2003). STRING: A database of predicted functional associations between proteins. In *Nucleic Acids Research* (Vol. 31, Issue 1, pp. 258–261). <https://doi.org/10.1093/nar/gkg034>
- Wang, T., Cao, B., Cai, Y., Chen, S., Wang, B., Yuan, Y., & Zhang, Q. (2023). Plcz1 Deficiency Decreased Fertility in Male Mice Which Is Associated with Sperm Quality Decline and Abnormal Cytoskeleton in Epididymis. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(1). <https://doi.org/10.3390/ijms24010314>

- World Health Organization. (2010). *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen*. World Health Organization.
- Xavier, M. J., Salas-Huetos, A., Oud, M. S., Aston, K. I., & Veltman, J. A. (2021). Disease gene discovery in male infertility: past, present and future. In *Human Genetics* (Vol. 140, Issue 1, pp. 7–19). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s00439-020-02202-x>
- Xijin Ge, S., Jung, D., & Yao, R. (n.d.). *ShinyGO: a graphical gene-set enrichment tool for animals and plants*. <https://doi.org/10.5281/zenodo.1451847>
- Yong, W. S., Hsu, F. M., & Chen, P. Y. (2016). Profiling genome-wide DNA methylation. In *Epigenetics and Chromatin* (Vol. 9, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13072-016-0075-3>
- Yuan, S., Liu, Y., Peng, H., Tang, C., Hennig, G. W., Wang, Z., Wang, L., Yu, T., Klukovich, R., Zhang, Y., Zheng, H., Xu, C., Wu, J., Hess, R. A., & Yan, W. (2019). Motile cilia of the male reproductive system require miR-34/miR-449 for development and function to generate luminal turbulence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *116*(9), 3584–3593. <https://doi.org/10.1073/pnas.1817018116>