

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«ΡΟΛΟΣ ΜΙΚΡΟΕΛΛΕΙΨΕΩΝ ΤΟΥ Υ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΟΣ ΣΤΙΣ
ΠΟΛΛΑΠΛΕΣ ΑΠΟΒΟΛΕΣ ΚΑΙ ΤΗΝ ΑΝΔΡΙΚΗ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑ»

ΑΡΓΥΡΑΚΗ ΜΑΡΙΑ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΛΑΡΙΣΑ

Σεπτέμβριος 2011

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟΣ ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΙΩΑΝΝΗΣ Ε. ΜΕΣΣΗΝΗΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπων: Βαμβακόπουλος Ν.

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Νταφόπουλος Κ.

Τσέζου Α.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	3
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	4
1.1 ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑ.....	4
Ανδρική Υπογονιμότητα.....	5
1.2 ΣΠΕΡΜΑΤΟΓΕΝΕΣΗ.....	9
2. ΚΥΡΙΩΣ ΜΕΡΟΣ.....	11
2.1 ΔΟΜΗ ΤΟΥ Υ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΟΣ.....	11
Χαρτογράφηση του Υ χρωμοσώματος.....	14
Γονίδια του Υ χρωμοσώματος.....	16
AZF περιοχή.....	18
2.2 ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΡΑΣΗ Υ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΟΣ.....	24
Γονίδιο SRY και καθορισμός φύλου.....	24
Η Επίδραση στο σύνδρομο Turner	25
Ογκογενετικός ρόλος του Υ χρωμοσώματος.....	26
2.3 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΓΟΝΟΤΥΠΟΥ – ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΥ.....	27
2.4 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ Υ ΜΙΚΡΟΕΛΛΕΙΨΕΩΝ.....	29
2.5 ΣΥΓΧΡΟΝΕΣ ΑΠΟΨΕΙΣ ΓΙΑ ΤΙΣ ΜΙΚΡΟΕΛΛΕΙΨΕΙΣ ΤΟΥ Υ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΟΣ.....	32
2.6 ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΤΗΣ ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΣΕ ΑΝΔΡΕΣ ΜΕ ΜΙΚΡΟΕΛΛΕΙΨΕΙΣ ΤΟΥ Υ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΟΣ.....	35
2.7 ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΕΛΛΕΙΨΕΩΝ ΤΟΥ Υ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΟΣ ΣΤΙΣ ΠΟΛΛΑΠΛΕΣ ΑΠΟΒΟΛΕΣ.....	39
3. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	42
4. ΕΠΙΛΟΓΟΣ.....	48
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	49

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σε σύγκριση με τα υπόλοιπα χρωμοσώματα, το Y είναι φτωχό σε γονίδια, ενώ περισσότερο από το 50% της ακολουθίας του αποτελείται από επαναλαμβανόμενα στοιχεία. Επιπλέον, τα γονίδια του χρωμοσώματος Y βρίσκονται σε μια διαρκή "εξασθένηση", πιθανότατα λόγω της έλλειψης ανασυνδυασμού σε αυτό το χρωμόσωμα. Όμως την ίδια στιγμή το χρωμόσωμα Y παίζει έναν κεντρικό ρόλο στην ανθρώπινη βιολογία, καθώς η παρουσία ή η απουσία του καθορίζει φαινοτυπικά το φύλο. Συνεπώς η παρουσία Y χρωμοσώματος σε έμβρυα θηλαστικών οριοθετεί την ανάπτυξη όρχεων η δε απουσία ωοθηκών. Υπεύθυνο για τον γενετικό καθορισμό του φύλου είναι το γονίδιο SRY, το οποίο καθορίζει την ανάπτυξη των όρχεων και αποτελεί το πιο διακριτό χαρακτηριστικό του Y χρωμοσώματος. Εκτός από το SRY, έχουν αναφερθεί και άλλα γονίδια με σημαντικές λειτουργίες, με πιο σημαντικά τα γονίδια που σχετίζονται με την ανάπτυξη και τη διατήρηση των γεννητικών κυττάρων και κατ' επέκταση με την ανδρική γονιμότητα.

Μία από τις πιο σημαντικές αιτίες ανδρικής παθογένειας που σχετίζεται με την ανδρική υπογονιμότητα είναι οι μικροελλείψεις του μεγάλου βραχίονα του χρωμοσώματος Y (Yq), όπου η απώλεια συγκεκριμένων γονιδίων μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση ποικίλων φαινοτύπων, σχετιζόμενων με υπογονιμότητα. Οι μικροελλείψεις του Y χρωμοσώματος είναι η δεύτερη, μετά το σύνδρομο klinefelter, πιο συχνή γενετική αιτία αποτυχίας στη σπερματογένεση στους υπογόνιμους άνδρες. Στην παρούσα εργασία παρουσιάζεται η τρέχουσα γνώση σχετικά με το ρόλο των μικροελλείψεων του χρωμοσώματος Y στις πολλαπλές αποβολές και στην ανδρική υπογονιμότητα. Γίνεται αναφορά στον τρόπο ανίχνευσης αυτών των μικροελλείψεων, στις μεθόδους υποβοηθούμενης αναπαραγωγής που χρησιμοποιούνται προκειμένου να ξεπεραστούν τα προβλήματα ανδρικής υπογονιμότητας και στους πιθανούς κινδύνους μεταβίβασης των μικροελλείψεων στις μελλοντικές γενιές. Υπάρχουν ακόμη πολλά σημεία διαφωνίας μεταξύ των επιστημόνων και πολλά αντιφατικά δεδομένα, επομένως η περαιτέρω διερεύνηση του προβλήματος των ελλείψεων του χρωμοσώματος Y και οι προσπάθειες θεραπείας των μικροελλείψεων, κρίνεται επιτακτική.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑ

Με τον όρο υπογονιμότητα χαρακτηρίζεται η αδυναμία επίτευξης κύησης μετά από διάστημα ενός τουλάχιστον έτους ελεύθερων επαφών. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO) έχει ορίσει την υπογονιμότητα ως την περίοδο των δύο ετών χωρίς σύλληψη, αλλά πολλά ζευγάρια αναζητούν ιατρική βοήθεια μετά από ένα χρόνο αδυναμίας επίτευξης κύησης (*Poongothai et al., 2009*). Η υπογονιμότητα μπορεί να διακριθεί σε πρωτοπαθή, όταν δεν υπάρχει προηγούμενη εγκυμοσύνη (περίπου στο 67%-71% των ασθενών) και σε δευτεροπαθή, όταν έχει επιτευχθεί προηγούμενη εγκυμοσύνη, οποιοδήποτε και αν είναι το αποτέλεσμα αυτής (περίπου 29%-33% των ασθενών).

Η υπογονιμότητα αποτελεί διαφορετική κατάσταση από τη μόνιμη στειρότητα, στην οποία λόγω κάποιου φυσικού προβλήματος ή χειρουργικής επέμβασης είναι αδύνατον ο ένας από τους δύο συντρόφους να τεκνοποιήσει. Η υπογονιμότητα επηρεάζει περίπου ένα στα δέκα ζευγάρια, με τον ανδρικό παράγοντα να ευθύνεται για το 50% περίπου των περιπτώσεων. Από αυτό το ποσοστό, το 40% οφείλεται αυστηρά σε ανδρικούς παράγοντες και το 10% σε συνδυασμό ανδρικών και γυναικείων παραγόντων. Επομένως η υπογονιμότητα επηρεάζει εξίσου άνδρες και γυναίκες και γι' αυτόν το λόγο θα πρέπει και οι δύο σύντροφοι να συμμετέχουν στις διαδικασίες διάγνωσης και θεραπείας. Πιο συγκεκριμένα, ένα ποσοστό 40% των περιπτώσεων υπογονιμότητας αποδίδεται στη γυναίκα, ένα άλλο 40% στον άνδρα, 10% αφορά και τους δύο, ενώ το υπόλοιπο 10% οφείλεται σε ανεξήγητες αιτίες. Τέλος, υπολογίζεται ότι παγκοσμίως 60-80 εκατομμύρια ζευγάρια υποφέρουν από υπογονιμότητα, γεγονός που υποδηλώνει την ανάγκη δραστηκής επίλυσης του προβλήματος.

Αίτια υπογονιμότητας αποτελούν οι φλεγμονές, οι διαταραχές στη λειτουργία των σαλπίγγων, οι διαταραχές της ωοθυλακιορρηξίας, η ενδομητρίωση, οι σεξουαλικά μεταδιδόμενες ασθένειες, καθώς και γενετικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες. Η αύξηση όμως της υπογονιμότητας τα τελευταία χρόνια αποδίδεται κυρίως στον τρόπο ζωής, το άγχος, τις κακές διατροφικές συνήθειες, την κατανάλωση αλκοόλ και το κάπνισμα. Επίσης, στα αίτια συγκαταλέγονται και η προχωρημένη ηλικία εκδήλωσης

ενδιαφέροντος για τεκνοποίηση από τις γυναίκες, αλλά και από τους άνδρες, όπως και η συνεχής μείωση των παραμέτρων του σπέρματος στους άνδρες. Βέβαια παράγοντες όπως ανώμαλος κύκλος, ιστορικό κολπικών μολύνσεων ή παλαιότερα χειρουργεία, αποτελούν ενδείξεις για εξέταση νωρίτερα, ενώ ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δοθεί και στην ανδρική υπογονιμότητα, η οποία αυξάνει συνεχώς.

Ως ανεξήγητη υπογονιμότητα, χαρακτηρίζονται οι περιπτώσεις στις οποίες η έρευνα του υπογόνιμου ζευγαριού με όλες τις διαθέσιμες σήμερα διαγνωστικές μεθόδους αδυνατεί να αποκαλύψει κάποιο αιτιολογικό παράγοντα υπογονιμότητας. Μια γυναίκα θεωρείται ότι πάσχει από ανεξήγητη υπογονιμότητα όταν έχει κανονική ωοθυλακιορρηξία, διαβατές σάλπιγγες χωρίς συμφύσεις ή ενδομητρίωση, συχνές επαφές, ιδιαίτερα τις ημέρες της ωοθυλακιορρηξίας ($10^{\text{η}}$ – $14^{\text{η}}$ του κύκλου) χωρίς αποτέλεσμα όμως για έναν τουλάχιστον χρόνο, ενώ ο άνδρας έχει φυσιολογική παραγωγή σπέρματος. Σε περιπτώσεις ανεξήγητης υπογονιμότητας η υποβοηθούμενη αναπαραγωγή έχει τόσο διαγνωστικό όσο και θεραπευτικό χαρακτήρα.

Ανδρική υπογονιμότητα

Ο όρος "ανδρική υπογονιμότητα" δεν αποτελεί ένα καθορισμένο κλινικό σύνδρομο, αλλά αντίθετα αποτελεί μια συλλογή διαφορετικών καταστάσεων, οι οποίες επιδεικνύουν μια ποικιλία αιτιολογιών και διαγνώσεων. Θεωρείται δηλαδή ένα πολυπαραγοντικό σύνδρομο, με το 50% των υπογόνιμων ανδρών να εμφανίζουν υπογονιμότητα άγνωστης αιτιολογίας (ιδιοπαθής υπογονιμότητα), που μπορεί να είναι συγγενής ή επίκτητη. Περίπου το 10% της υπογονιμότητας δεν μπορεί να εξηγηθεί ιατρικά. Τέλος, στους άνδρες, η ολιγοζωοσπερμία, η ασθενοζωοσπερμία, η τερατοζωοσπερμία και η αζωοσπερμία είναι οι κύριες αιτίες της υπογονιμότητας και εμφανίζονται στο 20%-25% των περιπτώσεων. Αν και πολλές αιτίες ανδρικής υπογονιμότητας είναι γνωστές και έχουν συσχετισθεί με γενετικές και μη καταστάσεις και ταξινομηθεί σε διάφορες κατηγορίες, πολλές παραμένουν ακόμα αδιευκρίνιστες.

Αρκετές γενετικές ανωμαλίες έχουν αναγνωρισθεί σε άνδρες με ανεξήγητη ολιγοζωοσπερμία και αζωοσπερμία, συμπεριλαμβανομένων αριθμητικών και δομικών

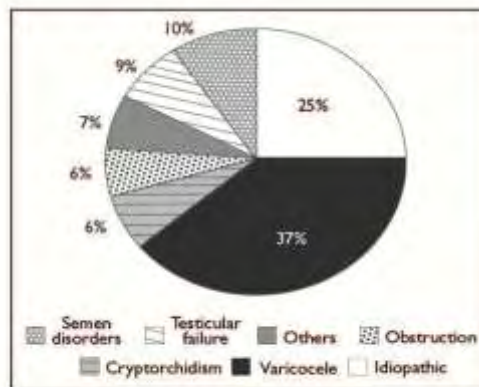
χρωμοσωμικών ανωμαλιών. Οι γονιδιακοί παράγοντες που εμπλέκονται στην ανδρική υπογονιμότητα εκδηλώνονται ως χρωμοσωμικές ανωμαλίες, μεταλλάξεις του μιτοχονδριακού DNA (mtDNA), μονογονιδιακές και πολυπαραγοντικές ασθένειες και ενδοκρινικές διαταραχές γονιδιακής αιτιολογίας. Από τις χρωμοσωμικές ανωμαλίες, το σύνδρομο Klinefelter (XXY) και ορισμένες συγκεκριμένες μεταθέσεις (αμοιβαίες, Robertson, μεταθέσεις μεταξύ φυλετικών και αυτοσωμικών) είναι γνωστοί παράγοντες ανδρικής υπογονιμότητας, ενώ με αποτυχία σπερματογένεσης σχετίζονται επίσης δύο σημαντικές αλλαγές γονιδίων: οι σημειακές μεταλλάξεις στον υποδοχέα των ανδρογόνων και στο γονίδιο ρύθμισης της διαμεμβρανικής διακίνησης ιόντων, που συνήθως σχετίζεται με συγγενείς ανωμαλίες του σπερματικού πόρου (*Poongothai et al., 2009*). Η πιο συχνή χρωμοσωμική ανωμαλία του σπέρματος υπογόνιμων ανδρών είναι η διπλοειδία, που προκαλείται είτε από μεταλλάξεις στη μείωση είτε από μη συμβατό περιβάλλον στους όρχεις.

Εκτός των παραπάνω αναφερόμενων αιτιών, ένας από τους πιο συχνούς λόγους ανδρικής υπογονιμότητας είναι οι μικροελλείψεις του μεγάλου βραχίονα του Y χρωμοσώματος (Yq). Μικροελλείψεις Y εμφανίζουν 13% των αζωοσπερμικών, 1%-7% των σοβαρά ολιγοσπερμικών και 5% των ανδρών με σοβαρή πρωτοπαθή δυσλειτουργία όρχεων και συγκέντρωση σπερματοζωαρίων κάτω από 5 εκατομμύρια/ml (*Poongothai et al., 2009*). Οι de novo μικροελλείψεις του Yq είναι οι πιο συχνά εμφανιζόμενες χρωμοσωμικές ανωμαλίες στους άνδρες και πιστεύεται ότι προκύπτουν από ανασυνδυαστικά φαινόμενα μεταξύ υψηλά επαναλαμβανόμενων DNA ακολουθιών κατά τη διάρκεια της μείωσης ή κατά την πρόιμη ανάπτυξη πριν την εμφύτευση. Επομένως, οι μικροελλείψεις του Y χρωμοσώματος συνεισφέρουν μόνο οριακά στη συνολική ανδρική υπογονιμότητα, αλλά όταν είναι παρούσες η χρήση της ICSI ως μεθόδου υποβοηθούμενης αναπαραγωγής μπορεί να επιτρέψει τη μεταβίβαση αυτών των μεταλλάξεων στην επόμενη γενιά.

Εκτός των γονιδιακών ανωμαλιών, υπάρχουν και άλλες αιτίες ανδρικής υπογονιμότητας και περιλαμβάνουν δομικές ανωμαλίες του ανδρικού γεννητικού συστήματος (απόφραξη του σπερματικού πόρου, συγκολλήσεις), υπογοναδοτροφικό υπογοναδισμό, κρυπορχία, φλεγμονές, αδυναμία εκσπερμάτισης και στύσης,

προηγούμενες εγχειρήσεις στη βουβωνική χώρα, κίρσοκήλη, χρόνιες ασθένειες, ορμονικές διαταραχές, λήψη φαρμάκων, έκθεση σε χημικά, περιβαλλοντικούς παράγοντες και ανοσολογικές αιτίες.

Όπως φαίνεται, η ανδρική υπογονιμότητα επηρεάζει μεγάλο μέρος του ανθρώπινου πληθυσμού και παλιότερα μπορούσε να διαγνωστεί μόνο μέσω της ανάλυσης σπέρματος. Χάρη όμως στην εφαρμογή των σύγχρονων μοριακών μεθόδων, υπάρχει λόγος να ελπίζουμε ότι οι γνώσεις μας, μας μεταφέρουν σε μια εποχή όπου η ανδρική υπογονιμότητα φαίνεται να είναι το αποτέλεσμα ενός εκ των πολλών αναγνωρισμένων γονιδιακών ή παθολογικών μηχανισμών. Είναι ξεκάθαρο ότι η ανδρική υπογονιμότητα οφείλεται κατά ένα μεγάλο ποσοστό σε γενετικά αίτια, παρόλα αυτά οι περισσότερες αιτίες παραμένουν ακόμα αδιευκρίνιστες. Η Εικόνα 1 και ο Πίνακας 1 συνοψίζουν γνωστές αιτίες ανδρικής υπογονιμότητας.



Εικόνα 1: Αίτια ανδρικής υπογονιμότητας

Πίνακας 1: Κυριότερες αιτίες ανδρικής υπογονιμότητας

ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΑΝΔΡΙΚΗΣ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑΣ

Τρόπος ζωής

- Αύξηση της θερμοκρασίας του σώματος
- Κατανάλωση φαρμάκων, αλκοόλ, παραισθησιογόνων ουσιών, κάπνισμα
- Έκθεση σε χημικά, ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία

Ορμονικές διαταραχές

- Θυρεοειδούς
- FSH
- Τεστοστερόνης
- Προλακτίνης
- Άξονα υποθαλάμου – υπόφυσης (ενδοκρινολογικές ανωμαλίες)

Ανοσολογικά προβλήματα

- Αυτοάνοσα προβλήματα
- Αντισπερματικά αντισώματα

Μολυσματικές ασθένειες

- Παρωτίτιδα
- Κάποια αφροδίσια νοσήματα (βλεννόρροια, γλαμύδια)
- Μολύνσεις του προστάτη

Απόφραξη του σπερματικού πόρου (διαταραχές στην εκφορητική γεννητική οδό)

Διαταραχές της λειτουργίας των όρχεων (π.χ. τραυματισμός όρχεων)

Διαταραχές της λειτουργίας των παραγεννητικών αδένων

Κιρσοκήλη

Διαταραχές της εκσπερμάτισης και στύσης (π.χ. παλίνδρομη εκσπερμάτιση)

Προηγούμενες θεραπείες για καρκίνο (χημειοθεραπεία / ακτινοβολία)

Γενετικές ανωμαλίες

- Φυλετικές ανωμαλίες (συχνότερο σύνδρομο Klinefelter)

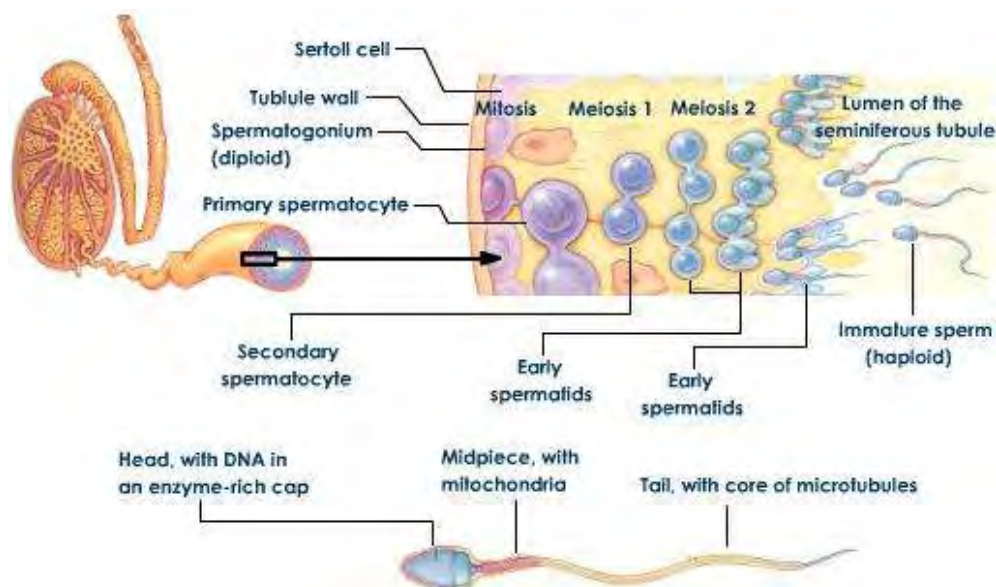
1.2 ΣΠΕΡΜΑΤΟΓΕΝΕΣΗ

Η σπερματογένεση είναι μια πολύπλοκη διαδικασία η οποία διαρκεί 70 περίπου ημέρες στον άνθρωπο και βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο των κυττάρων Leydig, οι οποίοι διαθέτουν υποδοχείς Ωχρινοτρόπου ορμόνης (LH) και των κυττάρων Sertoli με υποδοχείς Θυλακιοτρόπου ορμόνης (FSH). Στα κύτταρα Leydig η LH επάγει τη σύνθεση τεστοστερόνης και μαζί με την FSH ενεργοποιεί τα κύτταρα Sertoli να ολοκληρώσουν τη σπερματογένεση. Η σπερματογένεση αρχίζει με την πρώτη μιτωτική διαίρεση του βασικού γενετικού κυττάρου του ορχικού σωληναρίου ώστε να δημιουργηθούν δύο κύτταρα, εκ των οποίων το ένα (το μητρικό) θα αντικαταστήσει το ένα της βασικής στοιβάδας, ενώ το δεύτερο (το θυγατρικό) θα αρχίσει μια σειρά μιτωτικών και μειωτικών διαιρέσεων, έτσι ώστε μετά από 65 περίπου ημέρες να περάσουν από τον όρχι στην επιδιδυμίδα τα σπερματοζώαρια με απλοειδή αριθμό χρωμοσωμάτων. Στην επιδιδυμίδα τα σπερματοζώαρια υφίστανται μια σειρά μορφολειτουργικών αλλαγών και όλη αυτή η διαδικασία διαρκεί περίπου άλλες 12-24 ημέρες. Γι' αυτόν το λόγο στα σπερματοζώαρια της εξέτασης σπέρματος αντικατοπτρίζονται γεγονότα που ξεκίνησαν πριν από περίπου 3 μήνες.

Πιο αναλυτικά, ένα σπερματογόνιο αποτελείται από διπλοειδή αριθμό χρωμοσωμάτων, με δύο αδελφές χρωματίδες σε κάθε χρωμόσωμα και υφίσταται μια μιτωτική διαίρεση η οποία δίνει γένεση σ' ένα ενεργό και σ' ένα στατικό κύτταρο, το οποίο αποτελεί τον πρόγονο της επόμενης γενιάς σπερματοζωαρίων. Τα ενεργά κύτταρα διαιρούνται περαιτέρω για να παράγουν έναν αριθμό πρωτογενών σπερματοκυττάρων, τα οποία εισέρχονται στην πρόφαση I της μείωσης, στην οποία παραμένουν για 24 ημέρες περίπου. Οι πολύπλοκες διεργασίες του χρωμοσωμικού αναδιπλασιασμού, της σύναψης, του ανασυνδυασμού, της διαίρεσης και του αποχωρισμού, καθώς επίσης και η παραγωγή mRNA και η αντικατάσταση πρωταμινών από ιστόνες, συμπληρώνουν τη διεργασία της μείωσης. Στη συνέχεια, μέσα στο διαμέρισμα του αυλού τα θυγατρικά κύτταρα, δηλαδή τα δευτεροταγή σπερματοκύτταρα που αποτελούνται από 23 χρωμοσώματα με δύο αδελφές χρωματίδες το καθένα, διαιρούνται και πάλι. Η διαδικασία της δεύτερης μειωτικής διαίρεσης διαρκεί 8 ώρες και τα παράγωγά της ονομάζονται σπερματίδες και περιέχουν 22 αυτοσωμικά και ένα φυλετικό χρωμόσωμα (X ή Y). Σε αυτή την φάση γίνεται και ο ανασυνδυασμός μεταξύ ομόλογων χρωμοσωμάτων. Οι σπερματίδες κείνται στον αυλό του σωληναρίου και είναι συνδεδεμένες, μέσω ειδικών συνδέσμων,

με τα γειτονικά κύτταρα του Sertoli. Παραμένουν επίσης συνδεδεμένες και με τα σπερματοκύτταρα μέσω μεσοκυττάρων γεφυρών.

Οι σπερματίδες υφίστανται πυρηνική συμπύκνωση, συρρίκνωση κυτταροπλάσματος, δημιουργία ακροσώματος, σχηματισμό μιτοχονδριακού δακτυλίου, ανάπτυξη ουράς και απελευθέρωση από τους συγκυτιακούς κλώνους, διεργασία μέσω της οποίας οι σπερματίδες διαφοροποιούνται σε μαστιγοφόρα σπερματοζώαρια. Στο τέλος, από ένα σπερματογόνιο προκύπτουν 4 σπερματοζώαρια. Κατόπιν, τα σπερματοζώαρια εκβάλλονται στον αυλό του σωληναρίου και το μεγαλύτερο μέρος του κυτταροπλάσμά τους ενσωματώνεται στα κύτταρα Sertoli, όπου φαγοκυτταρώνεται και αποδομείται. Η μετακίνηση των σπερματοζωαρίων προς την επιδιδυμίδα διευκολύνεται από τα ρεύματα υγρού που δημιουργούνται από τα περιωληνιακά μυοειδή κύτταρα. Τα σπερματοζώαρια διασχίζουν την επιδιδυμίδα σε διάστημα 2 έως 4 εβδομάδων, στη διάρκεια του οποίου χάνουν και το υπόλοιπο κυτταρόπλασμά τους και αυξάνεται η κινητικότητά τους. Το σπερματοζώαριο, αφού φτάσει στο σπερματικό πόρο και τη λύκηθο, μπορεί να παραμείνει εκεί, σε βιώσιμη κατάσταση, επί μερικούς μήνες.

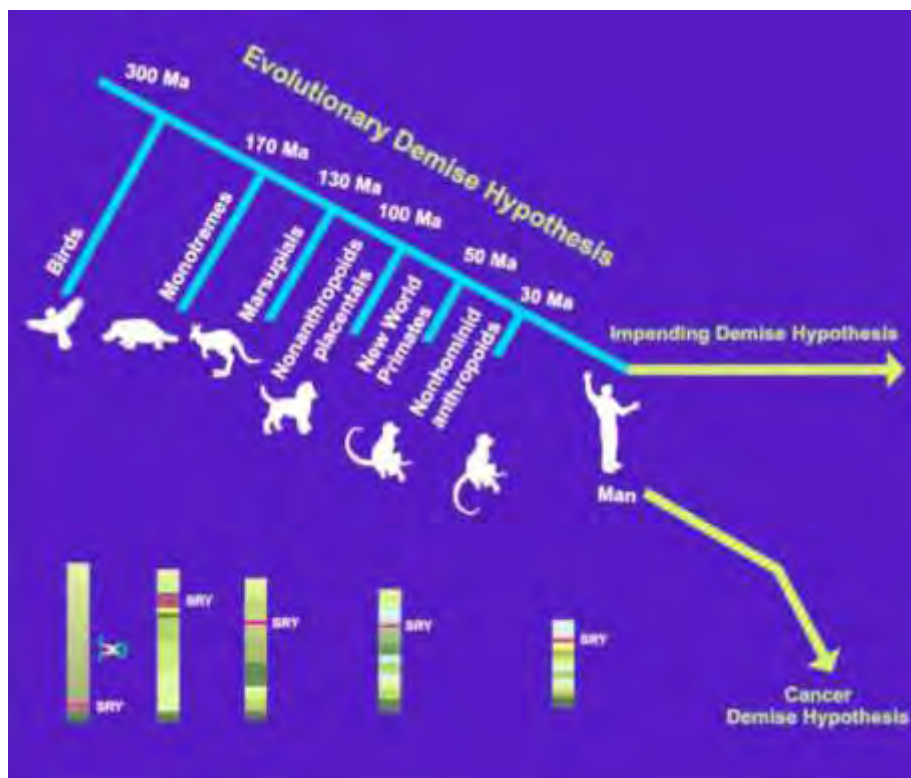


Εικόνα 2: Διαδικασία σπερματογένεσης

2. ΚΥΡΙΩΣ ΜΕΡΟΣ

2.1 ΔΟΜΗ ΤΟΥ Y ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΟΣ

Το χρωμόσωμα Y, ένα από τα μικρότερα του ανθρώπινου γονιδιώματος (~ 60 Mb), αντιπροσωπεύει περίπου το 2% - 3% του απλοειδικού γονιδιώματος, είναι πολυμορφικό και έχει μεγάλη σημασία στη σπερματογένεση (*Sadeghi-Nejad et. al., 2007, Vogt, 2005*). Κατά τη διάρκεια της ανθρώπινης εξέλιξης έχουν αναπτυχθεί πολλαπλά Y χρωμοσώματα, τα οποία διακρίνονται από μια γενεαλογική σειρά τουλάχιστον 153 απλομάδων Y χρωμοσώματος σε όλον τον κόσμο. Γενικά, από τα 60 Mb μήκος του Y χρωμοσώματος, τα 3 Mb ανήκουν στις ψευδοαυτοσωμικές περιοχές (PAR1 και PAR2) και τα 57 Mb στη μη ανασυνδυαζόμενη περιοχή, η οποία περιέχει την ευχρωματίνη (η οποία περιλαμβάνει τα περισσότερα από τα γνωστά γονίδια του Y χρωμοσώματος) και την ετεροχρωματίνη (*Quintana-Murci and Fellous, 2001*).



Εικόνα 3: Εξέλιξη του Y χρωμοσώματος και του SRY γονιδίου.

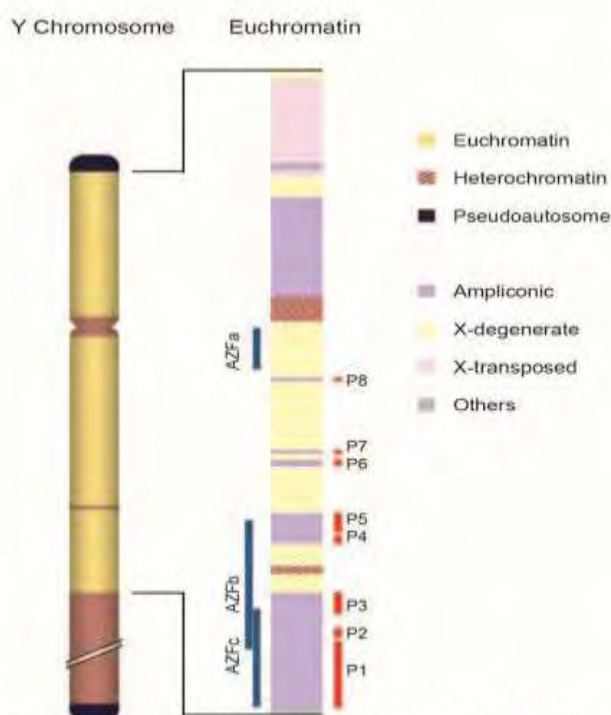
Η ψευδοαυτοσωμική περιοχή PAR1 εδράζεται στην τελική περιοχή του μικρού βραχίονα (Yp) και η PAR2 στο άκρο του μεγάλου βραχίονα (Yq) του Y

χρωμοσώματος και καλύπτουν περίπου 2600 kb και 320 kb DNA αντίστοιχα. Οι ψευδοαυτοσωμικές περιοχές και ιδιαίτερα η PAR1 (συμβαίνει υποχρεωτικός ανασυνδυασμός με το X χρωμόσωμα) βρίσκονται στο σημείο όπου το Y χρωμόσωμα ζευγαρώνει και ανταλλάσσει γενετικό υλικό με την ψευδοαυτοσωμική περιοχή του X χρωμοσώματος κατά τη διάρκεια της μείωσης. Κατά συνέπεια, τα γονίδια που εδράζονται στις PAR κληρονομούνται με τον ίδιο τρόπο με τα αυτοσωμικά γονίδια (*Quintana-Murci and Fellous, 2001*).

Ενώ οι περιοχές PAR1 και PAR2 αντιπροσωπεύουν το 5% ολόκληρου του χρωμοσώματος, η πλειονότητα του χρωμοσώματος Y (95%) αποτελείται από τη "μη-ανασυνδυαζόμενη περιοχή του Y" (NRY), το οποίο περιλαμβάνει τις ευχρωματικές και ετεροχρωματικές περιοχές του χρωμοσώματος. Η ευχρωματική περιοχή αποτελείται από την παρακεντρομερική περιοχή του μικρού και μεγάλου βραχίονα και το κεντρομέρος, ενώ έχει πολλαπλές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες και περιλαμβάνει επίσης γονίδια υπεύθυνα για σημαντικές βιολογικές λειτουργίες. Τέλος, η ετεροχρωματική περιοχή περιλαμβάνει το άνω τμήμα του Yq, που αντιστοιχεί στο Yq12. Αυτή η περιοχή θεωρείται γενετικά αδρανής και πολυμορφική σε μέγεθος σε διαφορετικούς ανδρικούς πληθυσμούς, καθώς αποτελείται κυρίως από δύο υψηλά επαναλαμβανόμενες οικογένειες αλληλουχιών, τις DYZ1 και DYZ2, με 5000 και 2000 περίπου αντίγραφα αντίστοιχα (*Quintana-Murci and Fellous, 2001*). Η ετεροχρωματίνη βρίσκεται μεταξύ επαναλαμβανόμενων γονιδίων, οικογενειών γονιδίων και παλινδρομικών μοτίβων (*Georgiou et al., 2006*). Οι ευχρωματικές DNA ακολουθίες περιλαμβάνουν περίπου 23 Mb, εκ των οποίων τα 8 Mb βρίσκονται στο μικρό βραχίονα και τα 14.5 Mb στο μακρύ βραχίονα (*Skaletsky et al., 2003*). Υπάρχουν 3 τάξεις ευχρωματικών ακολουθιών: αυτές που έχουν μεταφερθεί από το X χρωμόσωμα κατά τη διάρκεια της εξέλιξης του Y (X- μετάθεση), αυτές που είναι κάπως παρόμοιες με αλληλουχίες του X χρωμοσώματος (X-εκφυλισμένες) και αυτές που αποτελούν επαναλαμβανόμενες μονάδες κατά μήκος της κεντρικής περιοχής του Yp και του μεγαλύτερου μέρους του Yq βραχίονα (αμπλικόνια) (*Skaletsky et al., 2003*). Οι περιοχές X-μετάθεσης μήκους 3,4 Mb, είναι σχεδόν πανομοιότυπες με τις αλληλουχίες DNA της περιοχής Xq21 και είναι αποτέλεσμα μαζικής ανταλλαγής μεταξύ X και Y χρωμοσώματος που προέκυψε πριν από περίπου 3 εκατομμύρια χρόνια, μετά την απόκλιση της ανθρώπινης από τη γενεαλογική γραμμή των

χιματζήδων. Μέσα στα X-μετατοπιζόμενα τμήματα έχουν αναγνωριστεί μόνο 2 γονίδια (TGIF2LY & PCDH11Y) που κωδικοποιούν πρωτεΐνες.

Οι X-εκφυλισμένες περιοχές μήκους 8,5 Mb, περιέχουν γονίδια που απαντούν σε ένα αντίγραφο ή ψευδογονίδια που εκφράζονται σε πολλαπλά όργανα του σώματος και δεν περιορίζονται σε ένα μόνο συγκεκριμένο ιστό. Αυτά τα γονίδια είναι κατά περίπου 60% με 90% παρόμοια με τα X- συνδεδεμένα ομόλογά τους και θεωρούνται κατάλοιπα αρχέγονων αυτοσωμικών χρωμοσωμάτων από τα οποία προήλθαν τα X και Y χρωμοσώματα. Το γονίδιο καθορισμού φύλου (SRY) εδράζεται σε αυτήν την περιοχή και εκφράζει ένα μεταγραφικό παράγοντα, ο οποίος ενεργοποιεί τα γονίδια που κατευθύνουν την ανάπτυξη των ανδρικών δομών στο έμβryo. Τέλος, τα γονίδια που αναγνωρίζονται στην AZFa περιοχή (DBY και USP9Y) βρίσκονται επίσης στην X- εκφυλισμένη περιοχή.

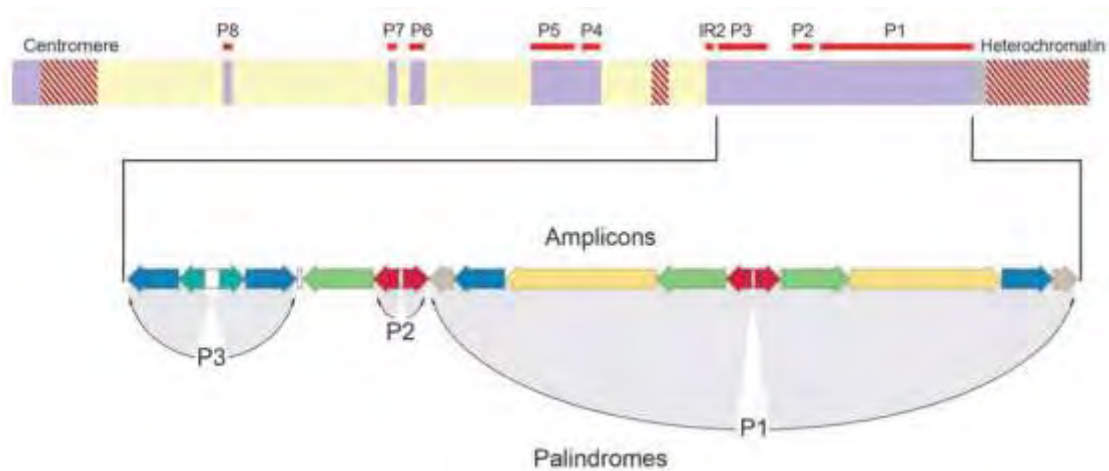


Εικόνα 4: Τρεις κατηγορίες ευχρωματίνης και η σχέση τους με την AZF περιοχή. Υπάρχουν 7 αμπλικόνια, 8 X- degenerate και 2 X- transposed περιοχές. Η AZFa βρίσκεται στην X-degenerate περιοχή. Όλα τα γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες της AZFc βρίσκονται στην περιοχή των αμπλικονίων, αλλά τα γονίδια της AZFb βρίσκονται στην X-degenerate και στην περιοχή των αμπλικονίων.

Οι πιο σύνθετες περιοχές στο Y χρωμόσωμα είναι οι μοναδικές περιοχές των αμπλικονίων, που εδράζονται στην ευχρωματική περιοχή και έχουν συνολικό μήκος 10,5 Mb. Τα αμπλικόνια είναι οικογένειες ομάδων αποτελούμενων από

νουκλεοτιδικές ακολουθίες, οι οποίες είναι αξιοσημείωτα παρόμοιες μεταξύ τους (Georgiou *et al.*, 2006). Βρίσκονται σε 7 διάσπαρτα τμήματα ευχρωματινής του μεγάλου βραχίονα και στην κεντρική περιοχή του μικρού βραχίονα του Y χρωμοσώματος. Τα αμπλικόνια περικλείουν τη μεγαλύτερη πυκνότητα των Y γονιδίων τα οποία εκφράζονται ειδικά στους όρχεις, ενώ στα αμπλικόνια περιλαμβάνονται επίσης και τα γονίδια των περιοχών AZFb και AZFc (Sadeghi-Nejad *et al.*, 2007).

Η παράταξη των αμπλικονίων σχηματίζει 8 παλίνδρομα (P1 έως P8), τα οποία αποτελούν τα πιο σημαντικά δομικά χαρακτηριστικά της περιοχής των αμπλικονίων. Κάθε παλίνδρομο αποτελείται από 2 ομάδες αμπλικονίων με όμοια αλλά ανάστροφη διάταξη. Επομένως, ένα παλίνδρομο είναι μια ακολουθία DNA, η οποία περιλαμβάνει διαφορετικά αμπλικόνια και έχει ένα πανομοιότυπο αντίγραφο κατά μήκος του Y χρωμοσώματος, το οποίο διαβάζει το ίδιο αμπλικόνιο αλλά με ανάστροφη διάταξη. Τα περισσότερα από τα αναγνωρισμένα γονίδια τα οποία λείπουν στους υπογόνιμους άνδρες βρίσκονται στις παλινδρομικές περιοχές του βραχίονα Yq.

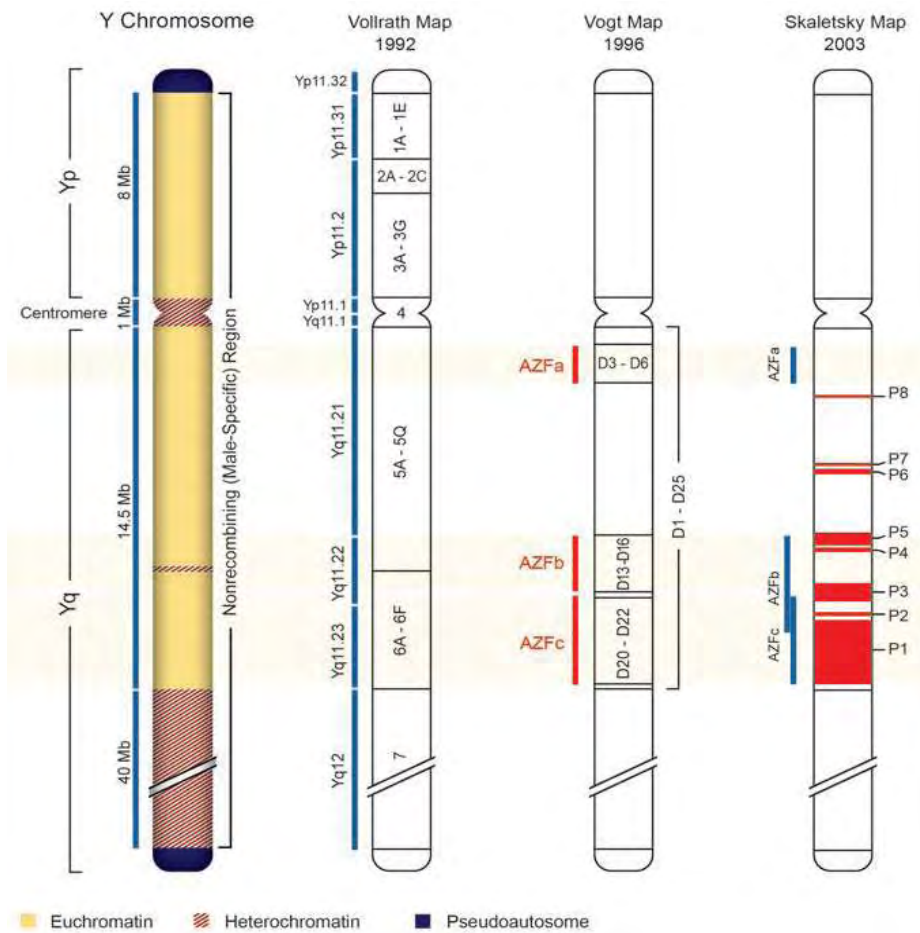


Εικόνα 5: Παλίνδρομες ακολουθίες του Y χρωμοσώματος. Κάθε παλίνδρομο αποτελείται από μια ομάδα αμπλικονίων με επαναλαμβανόμενη και αντίστροφη ακολουθία, γι' αυτό και το παλίνδρομο διαβάζει το ίδιο προς οποιαδήποτε κατεύθυνση.

✚ Χαρτογράφηση του Y χρωμοσώματος

Η δημιουργία ενός χάρτη του Y χρωμοσώματος, που να απεικονίζονται οι ελλείψεις των γονιδίων και η σειρά των θέσεων των ακολουθιών DNA, είναι πολύ

χρήσιμη όχι μόνο για τον εντοπισμό της θέσης των γονιδίων, αλλά και για τη μελέτη της δομικής ποικιλίας του Y μεταξύ των ανθρώπινων πληθυσμών και των πρωτεύοντων. Έτσι είναι δυνατή η συλλογή πληροφοριών που αφορούν την εξέλιξη του ανθρώπινου είδους κατά τη διάρκεια των αιώνων. Οι πρώτες προσπάθειες για τη χαρτογράφηση του Y χρωμοσώματος βασίστηκαν σε κυτταρογενετικά ανιχνεύσιμες ελλείψεις αυτού του χρωμοσώματος, αλλά στερούνταν ακρίβειας και ανάλυσης του προτύπου ζώνωσης του χρωμοσώματος. Παρόλα αυτά, αυτές οι πρώιμες μελέτες οδήγησαν για πρώτη φορά στην υπόθεση ότι κάποιο γονίδιο ή γονίδια που εντοπίζονται στο Yq βραχίονα σχετίζονται με αποτυχία σπερματογένεσης (*Tiepolo and Zuffardi, 1976*). Παρόμοιες μελέτες αναγνώρισαν επίσης μια περιοχή που σχετίζεται με τον καθορισμό του φύλου (*Quintana-Murci and Fellous, 2001*). Οι *Vergnaud et al.* παρουσίασαν τον πρώτο μοριακό χάρτη του Y χρωμοσώματος το 1986 (*Vergnaud et al., 1986*). Χρησιμοποιώντας διαφορετικούς ανιχνευτές, ειδικούς για το Y χρωμόσωμα, σε ασθενείς με μικροσκοπικά ανιχνεύσιμες Y ανωμαλίες, υποδιαίρεσαν το Y χρωμόσωμα σε 7 διαστήματα, αντίστοιχα με τις προκύπτουσες ελλείψεις που εμφανίστηκαν στο χρωμόσωμα. Αργότερα, ο *Vollrath* και οι συνεργάτες του υποδιαίρεσαν την περιοχή Yq11, στην οποία βρήκαν τις ελλείψεις, σε 23 διαστήματα, τα οποία ονομάστηκαν 5A έως 5Q και 6A έως 6F (*Vollrath et al., 1992*), βασιζόμενοι στην ανίχνευση 200 περίπου κοινών σημειακών πολυμορφισμών (STS). Οι *Vogt* και συν. υποδιαίρεσαν τη περιοχή Yq11 σε 25 τμήματα (D1 έως D25) και καθιέρωσαν νέο χάρτη STS (*Vogt et al., 1996*). Σήμερα, το Y χρωμόσωμα έχει χαρτογραφηθεί ολόκληρο και η αλληλουχία των γονιδίων του είναι γνωστή και διαθέσιμη σε όλους. Με την αλληλούχιση του Y χρωμοσώματος το 2003, ο *Skaletsky* και οι συνεργάτες του πρότειναν ένα νέο μοντέλο για την ανάλυση των περιοχών του Y χρωμοσώματος που εμφανίζονται μόνο σε αρσενικά άτομα (*Skaletsky et al., 2003*). Απέδειξαν ότι αυτές οι περιοχές καλύπτουν το 95% του μήκους του Y χρωμοσώματος και αποτελούν ένα μωσαϊκό ετεροχρωματικών και ευχρωματικών ακολουθιών (*Sadeghi-Nejad et al., 2007*).



Εικόνα 6: Ψευδοαυτοσωμικές και μη ανασυνδυαζόμενες περιοχές του Y χρωμοσώματος. Οι μη ανασυνδυαζόμενες έχει μήκος 57 Mb και περιλαμβάνει ευχρωματικές περιοχές, οι οποίες περικλείουν σχεδόν όλα τα γνωστά γονίδια που συμμετέχουν στη σπερματογένεση. Η ετεροχρωματίνη περιλαμβάνει 3 περιοχές: ένα μεγάλο μέρος του περιφερικού Yq, το κεντρομέρος και μια πολύ μικρή περιοχή μέσα στην ευχρωματική περιοχή του Yq.

✚ Γονίδια του Y χρωμοσώματος

Συγκρινόμενο με τα υπόλοιπα ανθρώπινα χρωμοσώματα, το Y χρωμόσωμα έχει έναν περιορισμένο αριθμό γονιδίων, φαινόμενο το οποίο είναι αποτέλεσμα της γνωστής τάσης των γονιδίων του Y χρωμοσώματος να εκφυλίζονται κατά τη διάρκεια της εξέλιξης, αποτελώντας έτσι σήμερα υπόλειμμα ενός αρχαίου κοινού προγόνου με το X χρωμόσωμα. Τόσο το X, όσο και το Y χρωμόσωμα των θηλαστικών προέρχονται από αρχέγονα αυτοσωμικά χρωμοσώματα. Οι πλέον αρχέγονες γονιδιακές λειτουργίες διατηρήθηκαν στο εκκολαπτόμενο X χρωμόσωμα, αλλά περιορίστηκαν στην NRY περιοχή του Y χρωμοσώματος, παρέχοντας έτσι στα

θηλυκά άτομα δύο αντίγραφα, αλλά στα αρσενικά ένα μόνο αντίγραφο πολλών γονιδίων (*Quintana-Murci and Fellous, 2001*).

Το χρωμόσωμα Y πιθανώς περιέχει μεταξύ 70 και 400 γονιδίων και δεν είναι απαραίτητο για τη ζωή. Μέχρι στιγμής έχουν αναγνωριστεί 122 γονίδια και 110 ψευδογονίδια στο Y χρωμόσωμα, αλλά ο ακριβής ρόλος αυτών των γονιδίων στη σπερματογένεση δεν έχει ακόμα αποσαφηνιστεί, γιατί οι μικροελλείψεις του Y χρωμοσώματος που ευθύνονται για την αποτυχία της σπερματογένεσης περιλαμβάνουν συνήθως περισσότερα από ένα γονίδια και έτσι ο ρόλος του κάθε γονιδίου που λείπει δεν μπορεί να διευκρινιστεί (*Sadeghi-Nejad et al., 2007; Krausz et al. 2006*), ενώ τα πρότυπα των ελλείψεων παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλομορφία και δεν μπορούν να συνδυαστούν εύκολα με κάποιο συγκεκριμένο φαινότυπο. Η σύνδεση των μικροελλείψεων Y με ένα συγκεκριμένο φαινότυπο σπερματογένεσης γίνεται ακόμα πιο δύσκολη λόγω της ύπαρξης μερικών μικροελλείψεων Y και της ανάπτυξης τουλάχιστον 153 απλομάδων κατά τη διάρκεια της ανθρώπινης εξέλιξης, έτσι ώστε η λειτουργική συνεισφορά της περιοχής AZF στη σπερματογένεση να ποικίλλει πολύ σε άνδρες με διαφορετικούς απλοτύπους (*Vogt, 2005*).

Μερικά γονίδια θεωρείται πως παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στη σπερματογένεση, αλλά στις περισσότερες περιπτώσεις οι αναφορές για τις ελλείψεις του σε γόνιμους ή υπογόνιμους άνδρες έχουν αμφισβητήσει τη λειτουργία τους. Μέχρι στιγμής έχει αναφερθεί μόνο μια αναγνωρισμένη μετάλλαξη σε Yq γονίδιο, η οποία οδηγεί σε αποτυχία σπερματογένεσης (*Brown et al., 1998, Sun et al., 1999*).

Εξαιτίας των παραπάνω προβλημάτων, έχει περιοριστεί η έρευνα για τις μικροελλείψεις του Y χρωμοσώματος προκειμένου να αναγνωριστούν οι περιοχές με τις ελλείψεις και η ομάδα των γονιδίων που αυτές συνήθως περικλείουν. Το πρώτο βήμα ήταν ο προσδιορισμός των AZF περιοχών. Παρόλα αυτά, τα καινούρια αναγνωρισμένα σημεία θραύσης για ελλείψεις κατά μήκος των περιοχών του Y χρωμοσώματος δεν συμφωνούν απαραίτητα με το AZF μοτίβο. Παρόλο που έχει αποδειχθεί ότι οι AZFb και AZFc περιοχές είναι επικαλυπτόμενες, οι μικροελλείψεις περιγράφονται ακόμη σε σχέση με τη θέση τους στις 3 κλασικά χαρακτηρισμένες AZF περιοχές (*Georgiou et al., 2006*).

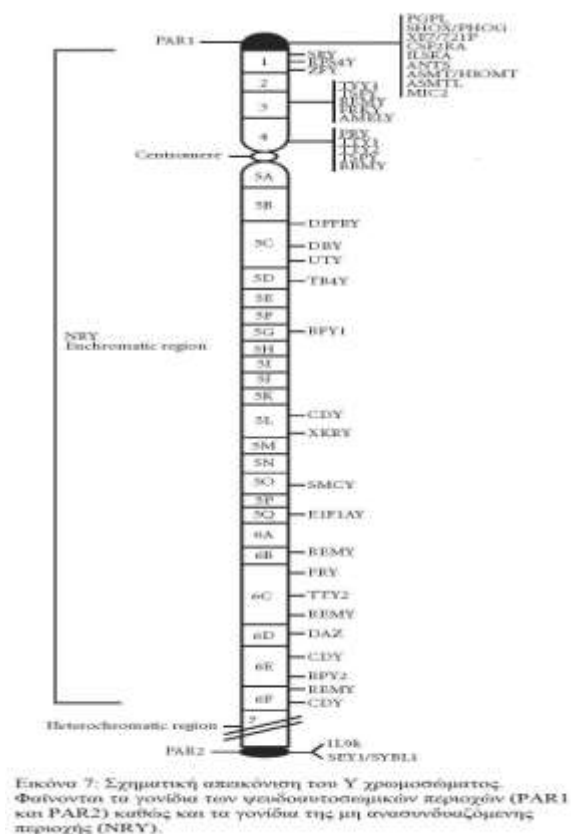
AZF περιοχή

Οι Tiepolo and Zuffardi ανέφεραν την ύπαρξη πολλών κυτταρογενετικά ανιχνεύσιμων *de novo* ελλείψεων σε έξι αζωοσπερμικά άτομα, περιγράφοντας έτσι για πρώτη φορά το ρόλο του Y χρωμοσώματος στη σπερματογένεση (Tiepolo and Zuffardi, 1976). Αυτές οι παρατηρήσεις οδήγησαν τους συγγραφείς να τεκμηριώσουν την ύπαρξη στο Yq11 μιας περιοχής, που ονομάζεται AZoospermia Factor (AZF), η οποία απαιτείται για την ολοκλήρωση της σπερματογένεσης, καθώς το σπερματικό υγρό αυτών των ασθενών που εξετάστηκαν δεν περιείχε ώριμα σπερματοζώαρια. Η παρουσία του AZF στο Yq11 επιβεβαιώθηκε επίσης από πολλές μελέτες που ακολούθησαν σε κυτταρογενετικό και μοριακό επίπεδο (Ferguson-Smith et al., 1987; Andersson et al., 1988; Bardoni, Zuffardi et al., 1991).

Το 1996, ο Vogt και οι συνεργάτες του διεξήγαγαν μια μεγάλη μελέτη και έλεγξαν 370 άνδρες με ιδιοπαθή αζωοσπερμία ή σοβαρή ολιγοσπερμία για μικροσκοπικές ελλείψεις στο Yq βραχίονα (Vogt et al., 1996). Δεκατρείς από αυτούς τους άνδρες είχαν μικροελλείψεις οι οποίες χαρτογραφήθηκαν σε 3 διαφορετικές περιοχές οι οποίες χαρακτηρίστηκαν, από την πιο κοντινή μέχρι την πιο απομακρυσμένη, ως AZFa, AZFb, and AZFc. Κάθε μια από αυτές τις περιοχές περιέχει πολλά γονίδια, τα οποία είναι υπονήφια για τη συμμετοχή τους στην ανδρική υπογονιμότητα (Quintana-Murci and Fellous, 2001). Υπάρχουν επίσης τουλάχιστον 14 οικογένειες γονιδίων στην AZF περιοχή οι οποίες κωδικοποιούν διάφορες πρωτεΐνες (Vogt et al., 2008) και πιο συγκεκριμένα δύο στην AZFa, επτά στην AZFb, τέσσερεις στην AZFc και μία στην AZFbc περιοχή. Οι ελλείψεις αυτών των γονιδίων προκύπτουν ως 6 κλασσικοί τύποι Yq ελλείψεων: AZFa, AZFb, AZFc, AZFbc, AZFabc και μερικώς AZFc. Παρόλο που είναι ευρέως αποδεκτό ότι οι ελλείψεις στις AZFa, b και c περιοχές συνεισφέρουν στην ανδρική υπογονιμότητα, η λειτουργία των γονιδίων που βρίσκονται σε αυτές τις περιοχές δεν είναι ακόμα κατανοητή (Noordam et al., 2006; Krausz et al., 1999). Υπάρχουν πολλές μελέτες οι οποίες αναφέρουν πως το πρότυπο έκφρασης πολλών γονιδίων που βρίσκονται μέσα στις AZFc/AZFb περιοχές είναι ειδικό και θεμελιώδες για τα διάφορα αναπτυξιακά στάδια της σπερματογένεσης του ανθρώπου (Kleiman et al. 2007; Lardone et al. 2007; Shinka et al. 2004; Sato et al. 2006; Stouffs et al. 2004).

Οι πιο συνηθισμένες ελλείψεις προκύπτουν στις περιοχές AZFc και AZFb. Ολοκληρωμένες και μερικές ελλείψεις AZFc απαντώνται στο 60% των μικροελλείψεων Y, ενώ η AZFb απαντάται στο 16% των ελλείψεων AZF σε υπογόνιμους άνδρες (Cram *et al.*, 2006), αλλά αυτά τα ποσοστά μπορεί να διαφέρουν σε διαφορετικούς πληθυσμούς (Simoni *et al.*, 2008). Συνολικά, το 35% των ελλείψεων είναι AZFb, AZFbc, ή AZFabc, ενώ μόνο το 2% με 5% των ελλείψεων

βρίσκονται στην περιοχή AZFa. Ο Omrani και οι συνεργάτες του στο Νοτιοδυτικό Ιράν έδειξαν ότι 24 από τους 99 ασθενείς με αζωοσπερμία ή σοβαρή ολιγοσπερμία (24.2%) εμφάνιζαν μικροελλείψεις στην περιοχή AZF, αλλά δε βρέθηκαν μικροελλείψεις σε γόνιμους άνδρες. Οι μικροελλείψεις περιλάμβαναν στο 87,5% την περιοχή AZFc και στο 29.2% την AZFb.



AZFa περιοχή

Η AZFa περιοχή βρίσκεται στο κεντρικό τμήμα του Yq11 μέσα στο πέμπτο διάστημα έλλειψης και η μοριακή του έκταση εκτιμάται ότι είναι γύρω στο 1 με 3 Mb. Πλήρης έλλειψη της AZFa σχετίζεται με αζωοσπερμία, ευδιάκριτη παθολογία όρχεων και σύνδρομο Sertoli Cells Only (SCO) (Georgiou *et al.*, 2006). Η περιοχή AZFa περιλαμβάνει 2 γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες: το USP9Y και το DBY (πρόσφατα ονομάστηκε DDX3Y), τα οποία εμπλέκονται στις ελλείψεις. Και τα δύο βρίσκονται στην X-εκφυλιζόμενη περιοχή της ευχρωματίνης και έχουν ομόλογα γονίδια στο X χρωμόσωμα (Sadeghi-Nejad *et al.*, 2007). Το γονίδιο του DBY (Dead

Box Y) κωδικοποιεί μια θεωρούμενη RNA ελικάση. Ο Foresta και οι συνεργάτες του απέδειξαν τον πολύ σημαντικό ρόλο του DBY στην σπερματογένεση (Foresta et al., 2000). Μέσω της πρωτεάσης ρύθμισης του πρωτεϊνικού μεταβολισμού που κωδικοποιεί, το γονίδιο USP9Y (Ubiquity-Specific Protease 9Y γνωστό και ως DFFRY) συμμετέχει στη γαμετογένεση. Η έλλειψή του σχετίστηκε σε 2 αναφερόμενες περιπτώσεις με σοβαρή ολιγοσπερμία και αζωοσπερμία, στις οποίες η ιστολογία ήταν ενδεικτική υποσπερματογένεσης (Sun et al. 1999; Luddi et al. 2009). Παρόλα αυτά, ο Krausz και οι συνεργάτες του το 2006 παρουσίασαν την πρώτη περίπτωση μερικής AZFa έλλειψης που περιελάμβανε το USP9Y, η οποία μεταβιβάστηκε φυσικά από τον πατέρα στο γιο: απομονωμένη έλλειψη του USP9Y βρέθηκε σε 2 γενιές 2 οικογενειών (Krausz et al., 2006). Έτσι συμπέραναν πως το USP9Y πιθανόν να έχει έναν ρυθμιστικό (παρά ένα θεμελιώδη) ρόλο, ο οποίος βελτιώνει τη λειτουργικότητα της σπερματογένεσης (Sadeghi-Nejad et al., 2007). Σε αυτήν την περιοχή έχουν αναγνωριστεί επίσης πολλά άλλα γονίδια: το Ubiquitous TPR motif Y (UTY) και η B4Y ισομορφή θυμοσίνης (TB4Y). Τα δύο αυτά γονίδια δεν έχουν κάποια εξειδικευμένη λειτουργία και φαίνεται ότι συμμετέχουν στη σωστή διατήρηση της λειτουργίας του κυττάρου (Quintana-Murci and Fellous, 2001).

AZFb περιοχή

Η AZFb περιοχή βρίσκεται μεταξύ του πέμπτου διαστήματος έλλειψης και της κεντρικής περιοχής του έκτου διαστήματος έλλειψης και το μέγεθός της έχει εκτιμηθεί ότι κυμαίνεται μεταξύ 6,2 και 7,7 Mb. Πλήρης έλλειψη της AZFb σχετίζεται με αποτυχία σπερματογένεσης, αζωοσπερμία και απουσία γεννητικών κυττάρων (SCO). Τα γνωστά γονίδια αυτής της περιοχής, τα οποία κωδικοποιούν κάποια πρωτεΐνη και σχετίζονται με τη σπερματογένεση, είναι τα EIF1AY, RPS4Y2 και SMCY, τα οποία εδράζονται στην X- εκφυλιζόμενη ευχρωματική περιοχή και τα HSFY, XKRY, PRY και RBMY, τα οποία βρίσκονται στις περιοχές των αμπλικονίων. Το πρώτο γονίδιο που θεωρήθηκε υπεύθυνο για ελλείψεις AZFb ήταν το RBMY, του οποίου η γονιδιακή οικογένεια κωδικοποιεί πρωτεΐνες σύνδεσης του RNA, ειδικές των όρχεων, οι οποίες εκφράζονται αποκλειστικά στα γεννητικά κύτταρα. Υπάρχουν 6 αντίγραφα αυτής της γονιδιακής οικογένειας στην AZFb (Skaletsky et al., 2003), αλλά δεν είναι λειτουργικά όλα τα αντίγραφα αυτού του

γονιδίου και τα περισσότερα αποτελούν ψευδογονίδια. Ο Ferlin και οι συνεργάτες του αμφισβήτησαν τον ουσιώδη ρόλο αυτού του γονιδίου στη σπερματογένεση, καθώς βρήκαν σοβαρή αποτυχία σπερματογένεσης σε άνδρες με μερική έλλειψη της AZFb, όπου έλειπαν τα SMCY, EIF1AY, RPS4Y2 και HSFY, αλλά όχι το RBMY (Ferlin et al., 2003). Το γονίδιο HSFY (Heat Shock transcription Factor, Y-linked) είναι ένα πρόσφατα μελετημένο γονίδιο που εμπλέκεται στις μικροελλείψεις Y και κωδικοποιεί πρωτεΐνη παρόμοια με αυτή που ρυθμίζει τη μεταγραφή της οικογένειας παραγόντων θερμικού σοκ. Η πρωτεΐνη HSFY εκφράζεται στα κύτταρα Sertoli και στα κύτταρα της σπερματογένεσης και έχει δείχθει ότι στους όρχεις των θηλαστικών οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ παίζουν ρόλο στη σπερματογένεση. Ο Sato και οι συνεργάτες του βρήκαν ότι η έκφραση του HSFY ήταν τροποποιημένη σε άνδρες με σύνδρομο Sertoli cell-only (SCO) και αδυναμία ωρίμανσης σπερματοζωαρίων (Sato et al., 2006).

Ένα άλλο γονίδιο στο οποίο εστιάστηκαν οι μελέτες ορισμένων ερευνητών είναι το EIF1AY, το οποίο ευρέως κωδικοποιεί ένα σημαντικό παράγοντα έναρξης της μετάφρασης (Foresta et al., 2001). Ο Kleiman και οι συνεργάτες του απέδειξαν ότι η έλλειψη έκφρασης του EIF1AY πιθανόν να συνεισφέρει στην αζωοσπερμία (Kleiman et al., 2007). Μελέτησαν επίσης την έκφραση του PRY, ενός ακόμα γονιδίου της AZFb περιοχής και βρήκαν ότι η απουσία της έκφρασής του οδηγούσε σε όρχεις χωρίς γεννητικά κύτταρα (Kleiman et al., 2007). Τέλος, τα γονίδια CDY και XKRY εκφράζονται επίσης ειδικά στους όρχεις των ενηλίκων και απουσιάζουν συχνά σε άνδρες με υπογονιμότητα.

AZFc περιοχή

Η περιοχή AZFc έχει μήκος 3,5 Mb και βρίσκεται στην ευχρωματική περιοχή, ενώ η πλήρης έλλειψή της είναι μια από τις πιο συχνές αιτίες ανδρικής υπογονιμότητας. Μερική έλλειψη της AZFc είναι ένα ακόμα συχνό πρότυπο. Η απουσία της περιοχής AZFc οδηγεί σε μεγάλη ποικιλία φαινοτύπων, από ολιγοζωοσπερμία έως πλήρη αζωοσπερμία. Πρόσφατα, ο Zhang και οι συνεργάτες του βρήκαν μερική έλλειψη AZFc σε οικογένειες με φορείς πλήρους έλλειψης AZFc και συμπέραναν ότι οι μερικές ελλείψεις της AZFc μπορούν να αυξήσουν τον κίνδυνο για πλήρη έλλειψη AZFc (Zhang et al., 2007). Ο ρόλος αυτών των ελλείψεων στην

σπερματογένεση είναι αντιφατικός. Περίπου στο 50% των ανδρών με μικροελλείψεις AZFc μπορούν να βρεθούν σπερματοζωάρια στο υλικό της εκσπερμάτισης ή στον ορχικό ιστό (*Georgiou et al., 2006*). Υπάρχουν περιπτώσεις όπου η παρουσία μερικών ελλείψεων AZFc με διαφορετικά μεγέθη δεν επηρεάζει τη γονιμότητα: έχουν αναφερθεί πολλές περιπτώσεις ανδρών που αποκτούν δικά τους παιδιά, όπου όμως στα αρσενικά άτομα έχουν μεταβιβαστεί οι μικροελλείψεις AZFc και οι γιοι έχουν φαινοτύπους όχι απαραίτητα ίδιους με αυτούς των πατέρων τους.

Η AZFc περιέχει 8 οικογένειες γονιδίων συμπεριλαμβανομένων των BPY2, CDY, DAZ, CSPG4LY, GOLGAZLY, TTY3.1, TTY4.1 και TTY7.1, εκ των οποίων οι 5 πρώτες περιέχουν γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες οι οποίες θεωρείται ότι σχετίζονται με τη σπερματογένεση (*Vogt et al., 2005*). Υπάρχουν 3 αντίγραφα του BPY2, 2 αντίγραφα του CDY1 και 4 αντίγραφα της οικογένειας DAZ, τα οποία παρουσιάζουν όλα μοναδική έκφραση στους όρχεις. Το πρώτο γονίδιο που αναγνωρίστηκε στην AZFc ήταν το DAZ, το οποίο περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1995 από τον Reijo και τους συνεργάτες του (*Reijo et al., 1995*). Το γονίδιο DAZ ανήκει σε μια οικογένεια γονιδίων που περιλαμβάνει επίσης τα αυτοσωμικά BOULE (παίζει ρόλο στη ρύθμιση της μείωσης) και DAZL (παίζει ρόλο στα αρχικά στάδια της σπερματογένεσης) γονίδια, τα οποία απαντώνται σε ένα μόνο αντίγραφο (*Georgiou et al., 2006*). Αυτό το γονίδιο κωδικοποιεί πρωτεΐνες σύνδεσης του RNA, οι οποίες εκφράζονται ειδικά στα γεννητικά κύτταρα (*Kleiman et al., 2007*). Τα αντίγραφα του DAZ στο Y χρωμόσωμα είναι σχεδόν πανομοιότυπα. Τα 2 συμπλέγματα αυτών των γονιδίων είναι ανάστροφα ζεύγη των DAZ1/DAZ2 και των DAZ3/DAZ4 (*McElreavey et al., 2006*). Έλλειψη καθενός από τα μέλη της οικογένειας DAZ έχει διαφορετικές επιπτώσεις. Ελλείψεις των DAZ2, DAZ3 και DAZ4 αντίγραφα εντοπίζονται τόσο σε γόνιμους όσο και σε υπογόνιμους άνδρες και περιγράφονται ως γνωστές παραλλαγές που κληρονομούνται από τον πατέρα στο γιο. Παρόλα αυτά, έχει αναφερθεί ότι μικροελλείψεις DAZ1/DAZ2 εμφανίζονται μόνο σε υπογόνιμους άνδρες. Η έκφραση του DAZ1 φαίνεται να είναι ουσιώδης για τη σπερματογένεση, αλλά έχει αναφερθεί πρόσφατα μια περίπτωση γόνιμου άνδρα με μικροέλλειψη DAZ1 (*Machev et al., 2004; Fernandes et al., 2006*).

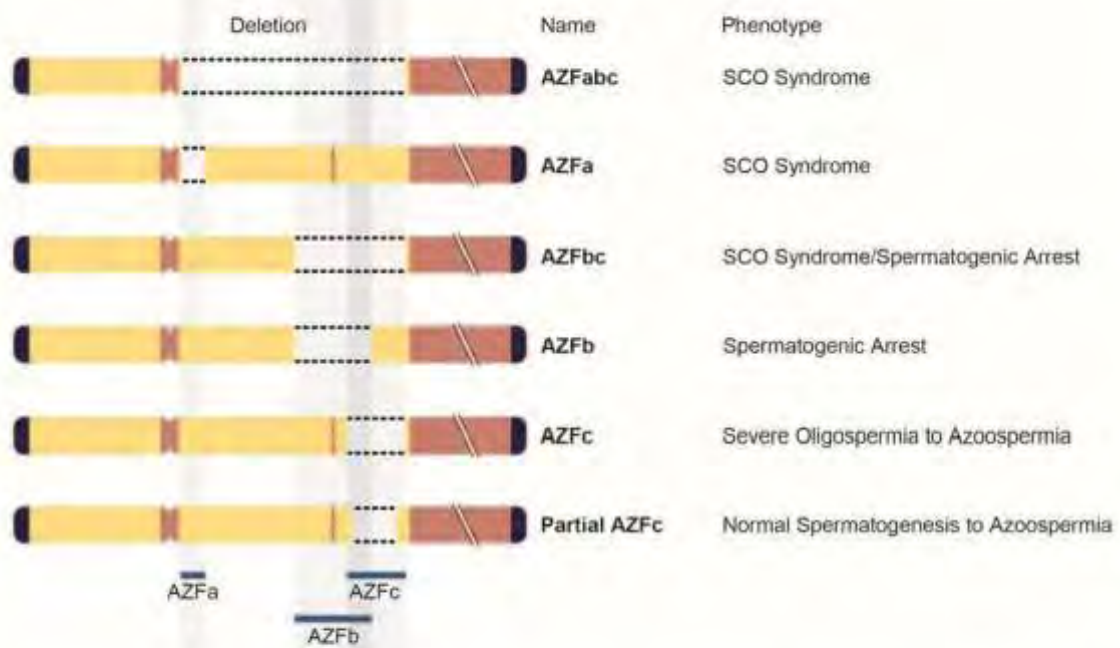
Το CDY1 γονίδιο (ChromoDomain Y) κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που εμπλέκεται στην ανακατασκευή του DNA (*Kleiman et al., 2007*). Ο Kleiman και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι τα μετάγραφα CDY1 σχετίζονται με πλήρη

σπερματογένεση (*Kleiman et al., 2001*). Στην περιοχή AZFc εδράζονται 2 αντίγραφα του CDY1 (γνωστά ως CDY1a και CDY1b): παρόλα αυτά, το ένα αντίγραφο είναι σε μια περιοχή που δε φαίνεται να επικαλύπτεται με την AZFb. Γι' αυτό οι μικροελλείψεις των AZFb και AZFbc μπορεί να απομακρύνουν μόνο ένα αντίγραφο του CDY1. Δύο άλλα αντίγραφα της γονιδιακής οικογένειας CDY (CDY2) βρίσκονται στην περιοχή AZFb.

AZFd περιοχή

Το 1999, ο Kent-First και οι συνεργάτες του περιέγραψαν μια τέταρτη περιοχή AZF μεταξύ των AZFb και AZFc, που ονομάστηκε AZFd (*Kent-First et al., 1999*) και σχετίστηκε με ήπια ολιγοσπερμία ή ανώμαλη μορφολογία σπέρματος. Αργότερα, ο Cram και οι συνεργάτες του περιέγραψαν μικροελλείψεις AZFcd σε άνδρες υποψήφιους για ICSI (*Cram et al., 2000*). Ο Muslumanoglu και οι συνεργάτες του ανέφεραν πως τα τρία τέταρτα των ελλείψεων AZF εμφάνιζαν μικροελλείψεις AZFd (*Muslumanoglu et al., 2005*). Τέλος, σε ασθενείς με SCO σύνδρομο, παρατηρήθηκαν μικροελλείψεις ενός μεμονωμένου τμήματος στην AZFd όπως επίσης και μια μικροέλλειψη AZFc. Αυτό το τμήμα (SY152) βρίσκεται κοντά στην AZFc και σ ένα αντίγραφο των DAZ.

Παρά τον αρχικό ενθουσιασμό για αυτήν την ανακάλυψη, η ύπαρξη της περιοχής AZFd αμφισβητήθηκε σοβαρά. Ο Noordam και οι συνεργάτες του πρότειναν ότι οι ελλείψεις σε αυτό το μεμονωμένο τμήμα μπορεί να αποτελούν έναν πολυμορφισμό και όχι μια έλλειψη η οποία προκαλεί ασθένεια (*Noordam et al., 2006*). Επιπλέον, σύμφωνα με νέες μελέτες, η AZFb επικαλύπτει την εγγύς AZFc και δεν υπάρχει ευκρινής περιοχή μεταξύ αυτών των δύο (*Sadeghi-Nejad et. al., 2007*). Τα STS της περιοχής AZFd βρίσκονται στην πραγματικότητα μέσα στην AZFc και απουσιάζουν σε ορισμένες περιπτώσεις μερικών ελλείψεων AZFc. Οι ειδικοί υποστηρίζουν ότι η περιοχή AZFd δεν υπάρχει και δεν αναφέρεται πλέον στη κλινική πράξη.



Εικόνα 8: Σχηματική απεικόνιση των έξι τύπων AZF μικροελλείψεων και των φαινοτύπων που προκύπτουν

2.2 ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ Υ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΟΣ

Πολλοί φαινότυποι έχουν συσχετιστεί με τη μη ανασυνδυαζόμενη περιοχή του Υ χρωμοσώματος και οι περισσότεροι από αυτούς εμφανίζονται προφανώς μόνο σε αρσενικά άτομα, καθιστώντας έτσι το Υ ένα εξειδικευμένο χρωμόσωμα κατά τη διάρκεια της ανθρώπινης εξέλιξης. Τα πιο σημαντικά χαρακτηριστικά αυτού του χρωμοσώματος αποτελούν η συμμετοχή του στον καθορισμό του φύλου και στην ανάπτυξη και διατήρηση των γεννητικών κυττάρων του άρρενα (*Quintana-Murci and Fellous, 2001*).

✚ Γονίδιο SRY και καθορισμός φύλου

Οι πρώτες ενδείξεις ότι το Υ χρωμόσωμα εμπλέκεται στον καθορισμό του αρσενικού φύλου προήλθαν από την παρατήρηση ότι τα XY ή XYY άτομα (σύνδρομο Klinefelter) αναπτύσσουν όρχεις, ενώ τα XX ή XO άτομα (σύνδρομο Turner) αναπτύσσουν ωοθήκες (*Jacobs and Strong, 1959*). Αργότερα, μελέτες σε XX

ποντίκια που παρουσίαζαν αρσενικό φαινότυπο, έδειξαν ότι περιλάμβαναν μια μικρή περιοχή του Y χρωμοσώματος, υποστηρίζοντας έτσι ότι κάποιο γονίδιο που παίζει κύριο ρόλο στον καθορισμό του φύλου υπάρχει στο Y χρωμόσωμα.

Το 1990 αναγνωρίστηκε τελικώς το υπεύθυνο γονίδιο για τον καθορισμό των όρχεων, το οποίο ονομάστηκε SRY (Sex-determining Region on the Y chromosome) (Sinclair *et al.*, 1990). Το SRY κλωνοποιήθηκε μέσω της απομόνωσης μικρών τμημάτων μετατοπισμένου Y χρωμοσώματος σε XX ασθενείς με αντιστροφή φύλου. Αυτό το γονίδιο εντοπίζεται στο μικρό βραχίονα του Y χρωμοσώματος, κοντά στο όριο με την ψευδοαυτοσωμική περιοχή και περιλαμβάνει ένα μοναδικό εξόνιο, το οποίο κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 204 αμινοξέων που παρουσιάζει τη συντηρημένη περιοχή σύνδεσης του DNA (το HMG-box: High Mobility Group), προτείνοντας έτσι ότι αυτή η πρωτεΐνη ρυθμίζει τη γονιδιακή έκφραση. Επίσης, αυτό το γονίδιο έχει δειχθεί ότι είναι πολύ σημαντικό για την έναρξη της ανάπτυξης των όρχεων και της διαφοροποίησης των αδιαφοροποίητων γονάδων προς την πλευρά των όρχεων. Επιπρόσθετα, το SRY έχει προταθεί πως αποτελεί το κύριο γονίδιο που ρυθμίζει το μονοπάτι καθορισμού των όρχεων. Παρόλο που έχει υποστηριχθεί ότι πολλά γονίδια και γονιδιακοί τόποι, όπως το WT-1 (Wilm's tumour gene), το SF-1 (Steroidogenic Factor 1) και το SOX-9, αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη SRY, παραμένει ακόμα το ερώτημα για το εάν και πώς ρυθμίζονται αυτά τα γονίδια από το SRY (Quintana-Murci and Fellous, 2001).

Η επίδραση στο σύνδρομο Turner

Το σύνδρομο Turner χαρακτηρίζεται από θηλυκό 45, X φαινότυπο ή από X μονοσωμία. Οι αρχικές εκδηλώσεις αυτού του συνδρόμου είναι οι διαταραχές ανάπτυξης, η υπογονιμότητα, οι ανατομικές ανωμαλίες και οι επιλεκτικές γνωσιακές ελλείψεις. Αυτή η ανθρώπινη γενετική δυσλειτουργία αποδίδεται σε απλοειδή ανεπάρκεια των γονιδίων του X χρωμοσώματος τα οποία είναι κοινά μεταξύ των X και Y χρωμοσωμάτων. Αυτά τα γονίδια πρέπει να μην υποστούν την απενεργοποίηση του X χρωμοσώματος, γιατί αλλιώς δε θα παρατηρηθεί καμιά διαφορά μεταξύ των 45, X και 46, XX θηλυκών. Δεύτερον, αυτά τα γονίδια σε 46, XY άτομα πρέπει να έχουν ένα αρσενικό ομόλογο στο Y, υπεύθυνο να προσομοιάζει με τα αποτελέσματα των X ομολόγων τους. Παρόλο που δεν υπάρχει σαφής αναγνώριση των γονιδίων που

εμπλέκονται στο σύνδρομο Turner, φαίνεται πως υπάρχουν διαφορετικές θέσεις στα X και Y χρωμοσώματα οι οποίες σχετίζονται με τα χαρακτηριστικά του συνδρόμου Turner, όπως οι *SHOX/PHOG* (Rao et al. 1997, Ellison et al., 1996), *ZFX/ZFY* (Page et al, 1988.), *GCY* και *TCY* (Barboux et al., 1995).

🚦 Ο ογκογενετικός ρόλος του Y χρωμοσώματος

Η συμμετοχή του Y χρωμοσώματος στην εκδήλωση του καρκίνου παραμένει ακόμα και σήμερα υποθετική (Quintana-Murci and Fellous, 2001). Η απώλεια του Y χρωμοσώματος και οι ανακατατάξεις του έχουν συσχετισθεί με διαφορετικούς τύπους καρκίνου, όπως καρκίνο της ουροδόχου κύστης, καρκίνο του πνεύμονα και οισοφαγικό καρκίνωμα. Παρόλο που οι ελλείψεις και οι ανακατατάξεις σε αυτό το χρωμόσωμα είναι σχετικά συχνές σε διάφορες μορφές καρκίνου, δεν υπάρχει άμεση απόδειξη για το ρόλο του Y χρωμοσώματος στην εξέλιξη του όγκου, καθώς δεν έχουν βρεθεί πρωτο-ογκογονίδια και ογκοκατασταλτικά ή επιδιορθωτικά γονίδια στο Y χρωμόσωμα.

Στο Y χρωμόσωμα έχει προσδιοριστεί μια περιοχή προδιάθεσης για καρκίνο, η οποία ονομάζεται GBY (gonadoblastoma locus on the Y chromosome). Το γοναδοβλάστωμα είναι μια σπάνια μορφή καρκίνου που αναπτύσσεται σε περισσότερο από το 30% των περιπτώσεων δυσγένεσης γονάδων σε θηλυκά άτομα με αντιστροφή φύλου (σύνδρομο Swyers), που διατηρούν Y χρωμοσωμικό υλικό. Αυτή η παρατήρηση οδήγησε στο συμπέρασμα ότι υπάρχει κάποια περιοχή προδιάθεσης στο Y (η GBY), η οποία συμβάλλει στο να αναπτύξουν γοναδοβλάστωμα τα άτομα με δυσγένεση γονάδων. Αυτή η περιοχή θα μπορούσε να λειτουργήσει ως ογκογονίδιο σε άτομα με δυσγένεση γονάδων, έχοντας φυσιολογική λειτουργία στους όρχεις και θα μπορούσε να προκαλέσει παθολογία όταν θα εκφραζόταν εκτός του φυσιολογικού της περιβάλλοντος (φυσιολογικοί όρχεις). Επίσης, η περιοχή αυτή μπορεί να επεκταθεί πάνω από τα 1–2Mb στο μικρό βραχίονα του Y χρωμοσώματος, ενώ πολλαπλά γονίδια έχουν θεωρηθεί ως υποψήφια για την GBY λόγω της θέσης, της λειτουργίας και του προτύπου έκφρασής τους. Μεταξύ αυτών το πιο πιθανό γονίδιο φαίνεται να είναι το TSPY. Αυτό το γονίδιο, το οποίο υπάρχει σε πολλά αντίγραφα, εδράζεται στην κρίσιμη περιοχή που χαρτογραφήθηκε το GBY και εκφράζεται στο γοναδοβλάστωμα, στα σπερματογόνια στα αρχικά στάδια της

ογκογένεσης των όρχεων, σε *in situ* καρκίνωμα των όρχεων, σε σεμίνωμα και σε καρκίνους προστάτη. Αυτές οι παρατηρήσεις προτείνουν ότι αυτό το Y- συνδεδεμένο γονίδιο μπορεί να προδιαθέτει τα γεννητικά κύτταρα και για άλλα ογκογενετικά γεγονότα στα διάφορα στάδια της διαδικασίας ογκογένεσης.

2.3 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΓΟΝΟΤΥΠΟΥ - ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΥ

Στην κλινική πράξη, οι μικροελλείψεις AZF έχουν προγνωστική αξία στα αποτελέσματα των μεθόδων υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Ο Horps και οι συνεργάτες του απέδειξαν ότι οι άνδρες με ελλείψεις AZFa, AZFb και AZFbc δεν έχουν πιθανότητες ανάκτησης σπέρματος μέσω της μεθόδου TESE, ενώ οι ελλείψεις AZFc σχετίζονται με επιτυχή TESE στο 75% των περιπτώσεων (Horps *et al.*, 2003). Σε συμφωνία με αυτά τα αποτελέσματα, ο Krausz και οι συνεργάτες του απέδειξαν ότι οι ελλείψεις AZFc σχετίζονται με επιτυχία ανάκτησης σπέρματος στο 50% των περιπτώσεων, ενώ σε πλήρεις ελλείψεις AZFa και AZFb η πιθανότητα να βρεθούν στην TESE ώριμα σπερματοζώαρια είναι πραγματικά μηδενική (Krausz *et al.*, 2001). Παρόλα αυτά, θα πρέπει να αναφερθεί ότι σε εξαιρετικά σπάνιες περιπτώσεις έχει παρατηρηθεί ότι μερικές ελλείψεις στην AZFa και AZFb έχουν μεταβιβαστεί φυσικά στο ζυγωτό (Sadeghi-Nejad *et al.*, 2007). Έτσι από πρακτική άποψη, οι πλήρεις ελλείψεις AZFa και AZFb αναφέρονται στο σύνδρομο SCO και σε σπερματογενετική αποτυχία, αντίστοιχα, ενώ οι μερικές ελλείψεις AZFb ή AZFc και οι μερικές ή πλήρεις ελλείψεις AZFc οδηγούν σε ποικίλους φαινοτύπους, που κυμαίνονται από υποσπερματογένεση μέχρι σύνδρομο SCO (Georgiou *et al.*, 2006).

Δύο πιθανές εξηγήσεις για το διαχωρισμό γονότυπου-φαινότυπου στις μικροελλείψεις Y είναι πρώτον οι δείκτες και οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται προκειμένου να αναγνωριστούν οι ελλείψεις και δεύτερον η σταδιακή αλλαγή του γεννητικού επιθηλίου των ανδρών με μικροελλείψεις λόγω ηλικίας (Sadeghi-Nejad *et al.*, 2007). Ορισμένοι συγγραφείς έχουν αναφέρει ότι οι μερικές μικροελλείψεις μπορεί να προκαλέσουν υπογονιμότητα, η οποία σταδιακά εξελίσσεται σε αζωοσπερμία (Simoni *et al.*, 1997). Παρόλα αυτά, ο Oates και οι συνεργάτες του στην επτάχρονη μελέτη τους βρήκαν παροδική διακύμανση, αλλά όχι μείωση, στη συγκέντρωση του σπέρματος 42 ανδρών με ελλείψεις AZFc (Oates *et al.*, 2002).

Επιπλέον, ένας άλλος παράγον ερμηνείας των αντικρουόμενων αποτελεσμάτων των μερικών μικροελλείψεων AZFc είναι ο απλότυπος του Y χρωμοσώματος, στον οποίο προέκυψε η έλλειψη (*McElreavey et al., 2006*). Η γενιά ή ο απλότυπος του Y χρωμοσώματος είναι μια μονοφυλετική ομάδα Y χρωμοσωμάτων που καθορίζονται από δυαδικούς δείκτες, οι οποίοι σταδιακά μεταλλάσσονται. Ορισμένοι απλότυποι περιορίζονται σε συγκεκριμένους πληθυσμούς. Για παράδειγμα, στην Ευρώπη υπάρχουν 5 ή 6 κύριες Y χρωμοσωμικές ομάδες. Γι' αυτό η επίδραση των μερικών ελλείψεων AZFc θα πρέπει να αποτιμηθεί με βάση τη φυλετική ομάδα και τα γενετικά χαρακτηριστικά του Y χρωμοσώματος (*McElreavey et al., 2006*). Οι μερικές μικροελλείψεις gr/gr και b2/b3 AZFc έχουν μελετηθεί σε πολλές ομάδες και βρέθηκε ότι παρόλο που η έλλειψη b2/b3 απομακρύνει τα γονίδια DAZ3/DAZ4 και BPY2.2/BPY2.3, δεν σχετίζεται με αποτυχία στη σπερματογένεση όπως φαίνεται σε ένα μεγάλο πληθυσμό ανδρών στη Βόρεια Ευρώπη (*Fernandes et al., 2004*). Παρομοίως, σε Ασιατικούς πληθυσμούς η έλλειψη b2/b3 δεν συσχετίστηκε με υπογονιμότητα, προτείνοντας έτσι έναν πολυμορφισμό με μειωμένη ή καθόλου επίπτωση στη γονιμότητα (*Zhang et al., 2007*), αντίθετα όμως οι μικροελλείψεις gr/gr μπορεί να έχουν μικρή επίπτωση στη γονιμότητα σε κάποιες συγκεκριμένες χρωμοσωμικές ομάδες Y. Έχει προταθεί επίσης ότι η έλλειψη gr/gr έχει προκύψει πολλές φορές κατά τη διάρκεια της ανθρώπινης εξέλιξης και ότι η κατάσταση γονιμότητας των ατόμων με έλλειψη gr/gr είναι άγνωστη (*McElreavey et al., 2006*). Ο Zhang και οι συνεργάτες του ανέφεραν ότι αυτή η έλλειψη δεν επέφερε αυξημένο κίνδυνο υπογονιμότητας (*Zhang et al., 2006*), αλλά αργότερα ανακάλυψαν μια έλλειψη gr/gr σε οικογένειες φορέων πλήρους έλλειψης AZFc και συμπέραναν ότι οι μερικές ελλείψεις της AZFc μπορούν να αυξήσουν τον κίνδυνο δημιουργίας μιας πλήρους έλλειψης AZFc (*Zhang et al., 2007*). Επίσης, σε έναν πληθυσμό της Αυστραλίας, η έλλειψη gr/gr συσχετίστηκε με την υπογονιμότητα (αλλά όχι με τη σοβαρότητα της βλάβης στη σπερματογένεση) και ήταν πιο συχνή ακόμα και από την πλήρη έλλειψη AZFc (*Sadeghi-Nejad et al., 2007*). Από την άλλη πλευρά, παρόλο που ο Giachini και οι συνεργάτες του βρήκαν μια συσχέτιση μεταξύ της έλλειψης gr/gr και της υπογονιμότητας σε Ιταλούς ασθενείς, ανέφεραν πως οι 3 από τους 7 άνδρες με αυτήν την έλλειψη παρουσίαζαν επίσης κρυπορχία και κισσοκήλη (*Giachini et al., 2005*). Ως εξήγηση των αντιφατικών αυτών αποτελεσμάτων, ένας δευτερεύων διπλασιασμός του b2/b4 βρέθηκε από τον Repping και τους συνεργάτες του στις περιπτώσεις των ελλείψεων gr/gr, ο οποίος πιθανόν να διασώζει το

φαινότυπο (*McElreavey et al., 2006*). Η γονιδιακή οικογένεια DAZ είναι η κύρια οικογένεια γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες η οποία μπορεί να διαδραματίζει ρόλο σε αυτές τις ελλείψεις. Ο Repping και οι συνεργάτες του εισήγαγαν 3 τύπους ελλείψεων gr/gr, εκ των οποίων δεν περιείχαν όλες το σύμπλεγμα DAZ1/DAZ2 ή το DAZ3/DAZ4 (*Repping et al., 2003*). Αργότερα, ο Machev και οι συνεργάτες του πρότειναν 4 τύπους ελλείψεων gr/gr και απέδειξαν ότι μόνο οι ελλείψεις που περιείχαν το DAZ3/DAZ4 μαζί με το CDY1a συνδέονταν με υπογονιμότητα (*Machev et al., 2004*).

2.4 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΤΩΝ Υ ΜΙΚΡΟΕΛΛΕΙΨΕΩΝ

Οι αρχικές προσπάθειες εντόπισης των μικροελλείψεων του Y χρωμοσώματος σε υπογόνιμους άνδρες γίνονταν μέσω της ανάλυσης καρυοτύπου, όπου μπορούσαν να παρατηρηθούν οι ελλείψεις στην περιοχή Yq11 (*Tiepolo and Zuffardi, 1976*). Όμως η γενετική πολυπλοκότητα της περιοχής AZF μπορεί να αποκαλυφθεί μόνο με την ανάπτυξη των θέσεων γνωστής ακολουθίας (STS), καθώς υπάρχουν πολλές διάμεσες υπομικροσκοπικές ελλείψεις που το μέγεθός τους είναι πολύ μικρό και έτσι δε γίνονται αντιληπτές με κυτταρογενετική/καρυοτυπική αξιολόγηση. Σε αυτές τις περιπτώσεις απαιτείται η εφαρμογή STS-PCR (και multiplex PCR) ή υβριδισμού κατά Southern. Σήμερα, η εφαρμογή της PCR (Polymerase-Chain Reaction) χρησιμοποιώντας STS έχει κάνει δυνατή την ανίχνευση των Y μικροελλείψεων, καθώς με τη χρήση αυτής της τεχνικής είναι δυνατή η ενίσχυση γνωστών STS που εκτείνονται στην περιοχή της έλλειψης και η ανίχνευση των τμημάτων του Y χρωμοσώματος που απουσιάζουν.

Ως αποτέλεσμα της χαρτογράφησης του ανθρώπινου γονιδιώματος, είναι γνωστές περισσότερες από 200 θέσεις STS και εκτείνονται σε όλο το μήκος του Y χρωμοσώματος. Πάνω από 15 μελέτες έχουν αποδείξει ότι ένας αριθμός αυτών των δεικτών απουσιάζει στο 10%-30% των υπογόνιμων ανδρών, ενώ σε γενικές γραμμές αυτοί οι δείκτες δεν απουσιάζουν σε γόνιμους άνδρες, αποδεικνύοντας έτσι ότι το Y χρωμόσωμα έχει συγκεκριμένα τμήματα ελλείψεων (*Poongothai et al., 2009*). Ο αριθμός των STS που χρησιμοποιούνται για την ανάλυση του Y χρωμοσώματος και των μικροελλείψεων ποικίλλει στις διάφορες μελέτες μεταξύ 1 και 131 (*Bor et al., 2001*), ενώ η συχνότητα ανίχνευσης των μικροελλείψεων σε υπογόνιμους άνδρες

κυμαίνεται μεταξύ 1 και 58,3% (*Foresta et al., 1998*). Παρόλο όμως που έχουν δημοσιευτεί πολλές κλινικές μελέτες όσον αφορά τη συχνότητα των μικροελλείψεων Y, οι μεθοδολογικές λεπτομέρειες σπάνια περιγράφονται.

Το πρωτόκολλο ανίχνευσης των μικροελλείψεων του Y χρωμοσώματος παρουσιάζει διάφορες παραλλαγές ανάλογα με τους παράγοντες μελέτης του κάθε εργαστηρίου και τα kit τα οποία χρησιμοποιούνται. Σε γενικές γραμμές πάντως, αυτό περιλαμβάνει αρχικά την απομόνωση DNA από λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος σύμφωνα με τις οδηγίες που περιλαμβάνονται στα kit απομόνωσης DNA. Συνήθως χρησιμοποιείται η τεχνική της φαινόλης και του χλωροφορμίου και κατόπιν επαναιωρούνται σε Tris/EDTA (pH 8) (*Aknin-Seifer et al., 2003*).

Δεύτερο βήμα στην ανίχνευση των μικροελλείψεων Y αποτελεί η ενίσχυση του γενωμικού DNA των ασθενών μέσω της μεθόδου PCR, προκειμένου να ανιχνευθούν τα σημεία έλλειψης. Μαζί με το δείγμα DNA του ασθενούς θα πρέπει να υποστεί επεξεργασία και ένα δείγμα από θηλυκό δότη, ως control για να ελεγχθεί η περίπτωση μόλυνσης του DNA κατά τη διάρκεια της όλης διαδικασίας. Κάθε σειρά αντιδράσεων PCR θα πρέπει να εκτελείται τουλάχιστον σε διπλή (duplex) ή ακόμα καλύτερα σε πολλαπλή (multiplex) PCR και αυτό γιατί έτσι (μέσω της χρήσης ενός εσωτερικού control) είναι πιο εύκολο να διακριθεί ένα αρνητικό αποτέλεσμα λόγω κάποιου τεχνικού λάθους (*Simoni et al., 2004*). Για τη διάγνωση ελλείψεων των AZF κατάλληλο εσωτερικό PCR control αποτελεί το γονίδιο ZFX/ZFY, γιατί οι εκκινητές ενισχύουν ένα μοναδικό τμήμα τόσο στο αρσενικό όσο και στο θηλυκό DNA, αντίστοιχα. Επιπλέον, εξωτερικά θετικά και αρνητικά controls θα πρέπει να τρέχουν παράλληλα με κάθε multiplex, για παράδειγμα μαζί με κάθε σειρά εκκινητών. Κατάλληλα θετικά και αρνητικά controls αποτελούν δείγματα ενός άνδρα με φυσιολογική σπερματογένεση (ελέγχει την ευαισθησία και την ειδικότητα της μεθόδου) και μιας γυναίκας (ελέγχει για ειδικότητα και επιμόλυνση) αντίστοιχα. Τέλος, μαζί με κάθε σειρά εκκινητών θα πρέπει να τρέχει και ένα δείγμα με νερό (blank), το οποίο περιέχει όλα τα αντιδρώντα συστατικά και νερό αντί για DNA (ελέγχει για επιμόλυνση των αντιδραστηρίων) (*Simoni et al., 2004*).

Σε γενικές γραμμές, η ανάλυση μιας μόνο μη πολυμορφικής θέσης STS σε κάθε περιοχή AZF είναι αρκετή προκειμένου να καθορίσει την παρουσία ή όχι STS στις ελλείψεις AZFa, AZFb ή AZFc. Παρόλα αυτά, η ανάλυση δύο STS θέσεων σε

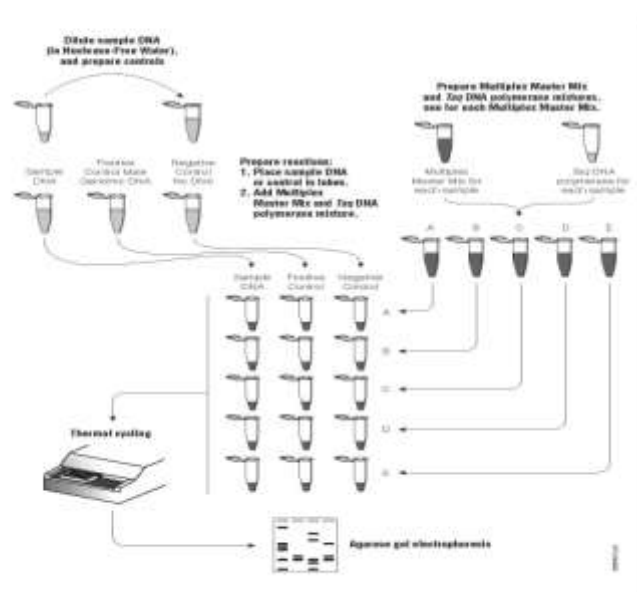
κάθε περιοχή ενισχύει την ακρίβεια της διάγνωσης, καθώς οι ελλείψεις περιλαμβάνουν καλά καθορισμένες περιοχές, συμπεριλαμβανομένων πολλών θέσεων STS. Με βάση την εμπειρία και τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τις μελέτες των περισσότερων εργαστηρίων, αλλά και τη μορφή της multiplex PCR, η πρώτη επιλογή των εκκινητών STS που συνιστώνται είναι η εξής (Simoni *et al.*, 2004) :

Για την AZFa: sY84, sY86

Για την AZFb: sY127, sY134

Για την AZFc: sY254, sY255 (και οι δύο στο DAZ γονίδιο)

Εκτός από αυτές τις θέσεις STS, θα πρέπει να περιλαμβάνονται επιπλέον στην ανάλυση και το γονίδιο SRY, ως control για τον παράγοντα καθορισμού των όρχεων στο μικρό βραχίονα του Y χρωμοσώματος και για την παρουσία συγκεκριμένων ακολουθιών Y όταν το γονίδιο ZFY λείπει (για παράδειγμα σε XX αρσενικά) (Simoni *et al.*, 2004). Επιπλέον θέσεις STS που μπορούν να ελεγχθούν είναι οι εξής (Friel *et al.*, 2001): sY138, sY139, sY143, sY153, sY152, sY150, sY155 sY147, sY149 (Vollrath *et al.*, 1992), sY220, sY245, sY242, sY262, sY257, sY272, sY273, sY269, sY243 (Reijo *et al.*, 1995), RBMY και SPGY (Vogt *et al.*, 1996).



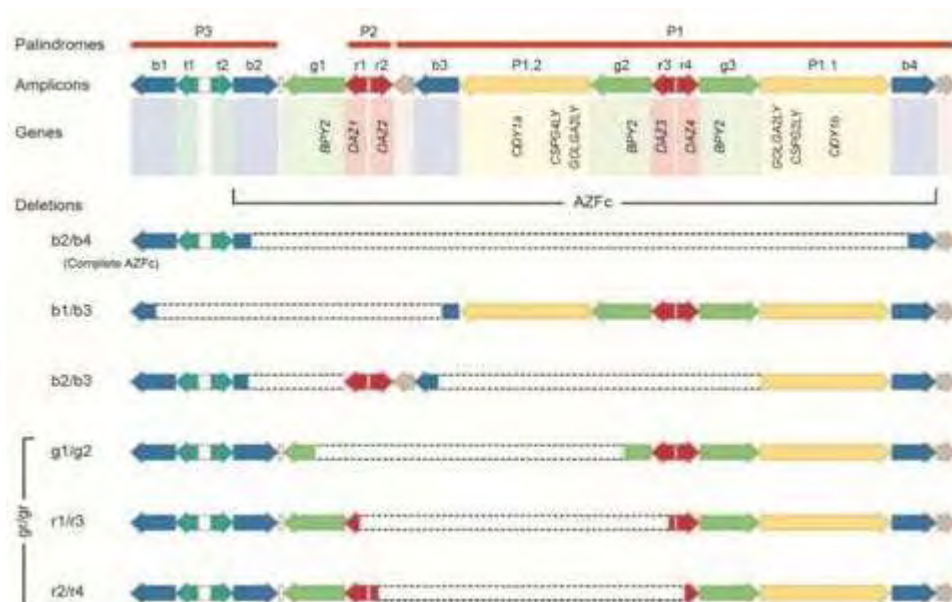
Εικόνα 9: Σχηματική απεικόνιση του πρωτοκόλλου ανίχνευσης μικροελλείψεων Y

Τέλος, πρόσφατα αναπτύχθηκαν υψηλής ανάλυσης μικροσυστοιχίες και συσκευές microchip για χρωμοσωμικό έλεγχο και ηλεκτροφόρηση αντίστοιχα, οι οποίες απαιτούν μικρή ποσότητα DNA και πολύ λίγο χρόνο για ανάλυση, ενώ όταν συνδυάζονται με multiplex PCR μπορεί να αποδειχθούν πολύ χρήσιμες για την ανίχνευση ελλείψεων στην περιοχή AZF (*Sadeghi-Nejad et al., 2007*). Στην εικόνα 9 παρουσιάζεται διαγραμματικά το πρωτόκολλο που εφαρμόζεται για την ανίχνευση των μικροελλείψεων του χρωμοσώματος Y.

2.5 ΣΥΓΧΡΟΝΕΣ ΑΠΟΨΕΙΣ ΓΙΑ ΤΙΣ ΜΙΚΡΟΕΛΛΕΙΨΕΙΣ ΤΟΥ Y ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΟΣ

Τα τελευταία χρόνια αναγνωρίστηκε ότι ο μοριακός μηχανισμός των μικροελλείψεων του Y χρωμοσώματος προέρχεται από ομόλογο ενδοχρωμοσωμικό ανασυνδυασμό μεταξύ ομάδων πανομοιότυπων ακολουθιών. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα την ανάλυση των μικροελλείψεων σύμφωνα με νέα πρότυπα, τα οποία δεν ανταποκρίνονταν πλήρως στις κλασικά καθορισμένες περιοχές AZF. Το 2001 ο Kuroda-Kawaguchi και οι συνεργάτες του προσδιόρισαν την πλήρη νουκλεοτιδική ακολουθία της AZFc και εισηγήθηκαν τη δομή 6 οικογενειών αμπλικονίων, οι οποίες αποτελούν ένα σύμπλεγμα 3 παλίνδρομων (*Kuroda-Kawaguchi et al., 2001*). Αργότερα, το 2002 ο Repping και οι συνεργάτες του ερεύνησαν περαιτέρω τις μικροελλείψεις AZFb και AZFbc και προσδιόρισαν τα σημεία θραύσης τους (*Repping et al., 2002*), ενώ η χαρτογράφηση του χρωμοσώματος Y έγινε από τον Skaletsky και τους συνεργάτες του το 2003 (*Skaletsky et al., 2003*). Αυτό είχε ως αποτέλεσμα να επικεντρωθεί η προσοχή των ερευνητών στον ομόλογο ανασυνδυασμό μεταξύ των αμπλικονίων, ειδικά στις μερικές μικροελλείψεις AZFc. Όμως η AZFa αποτελούσε εξαίρεση, καθώς εκεί εμπλεκόταν η X-εκφυλιζόμενη περιοχή της ευχρωματίνης και έτσι οι μικροελλείψεις δεν μπορούσαν να ερμηνευθούν από θραύσεις μεταξύ των αμπλικονίων. Το 2000 ο Kamp και οι συνεργάτες του υπέθεσαν πως φαινόμενα ενδοχρωμοσωμικού ανασυνδυασμού μεταξύ δύο ομάδων ομόλογων ρετροϊικών ακολουθιών στην περιοχή Yq11 αποτελούν πιθανόν τους αιτιολογικούς παράγοντες για τις περισσότερες μικροελλείψεις AZFa που παρατηρούνται σε άνδρες με σύνδρομο SCO. Το μοριακό τους μήκος εκτιμήθηκε σε μια μέση τιμή 792 kb (*Kamp et al., 2000*).

Η μελέτη της περιοχής AZFc αποτελούσε πρόκληση για την εισαγωγή των παλίνδρομων ακολουθιών του χρωμοσώματος Y (*Sadeghi-Nejad et al., 2007*). Ο Kuroda-Kawaguchi και οι συνεργάτες του αλληλούχησαν ολόκληρη την περιοχή AZFc και βρήκαν 6 ευδιάκριτες οικογένειες αμπλικονίων με μήκη που εκτείνονταν από 115 kb έως 678 kb (έχουν επίσης ονομασίες χρωμάτων: κίτρινο, πράσινο, μπλε, τρκουάζ, γκρι και κόκκινο) (*Kuroda-Kawaguchi et al., 2001*). Μέλη της κάθε οικογένειας αμπλικονίων είναι σχεδόν πανομοιότυπα και το καθένα από αυτά προκύπτει 2 έως 4 φορές κατά μήκος της ευχρωματίνης. Όλα μαζί αποτελούν το 93% της περιοχής AZFc και περιλαμβάνουν τα γονίδια RBMY, PRY, BPY2, DAZ, CDY1, CSPG4LY και GOLGA2LY (*Kuroda-Kawaguchi et al., 2001*). Έτσι η περιοχή AZFc είναι ιδιαίτερα επιρρεπής σε ελλείψεις, καθώς η δομή της αποτελείται εξ ολοκλήρου από αμπλικόνια (*Sadeghi-Nejad et al., 2007*).



Εικόνα 10: Συσχέτιση των αμπλικονίων και των παλίνδρομων ακολουθιών με τα γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες

Σύμφωνα με τις ακολουθίες των αμπλικονίων, η κλασσική πλήρης έλλειψη της περιοχής AZFc περικλείει μια αμπλικονική περιοχή μήκους 3,5 Mb μεταξύ δύο μπλε αμπλικονίων (b2 και b4), η οποία προκύπτει από ομόλογο ανασυνδυασμό (b2/b4 ανασυνδυασμό) (*Georgiou et al., 2006*). Προκειμένου να ερμηνευθούν και οι μερικές ελλείψεις της συγκεκριμένης περιοχής μελετήθηκαν και άλλοι ενδεχόμενοι συνδυασμοί. Ο Repping και οι συνεργάτες του περιέγραψαν σε υπογόνιμους άνδρες μια μερική έλλειψη της AZFc, η οποία ονομάστηκε gr/gr (ένα από τα g1/g2, r1/r2, ή

r2/r4 μοτίβα ελλείψεων που αφαιρούν τη μισή από την AZFc περιοχή) και η οποία σχετίστηκε με ποικίλου βαθμού αποτυχία σπερματογένεσης (*Repping et al., 2003*). Ο Yen υπέθεσε έναν ανασυνδυασμό b1/b3 ως πιθανό μηχανισμό μερικής έλλειψης AZFc, ο οποίος απομακρύνει το κεντρικό τμήμα της περιοχής AZFc (*Yen, 2001*), αλλά ο ρόλος του στην υπογονιμότητα δεν είναι ακόμα γνωστός, καθώς έχει βρεθεί σε ένα μικρό μόνο αριθμό γόνιμων και υπογόνιμων ανδρών (*Repping et al., 2003*). Το 2004, ο Repping και οι συνεργάτες του περιέγραψαν έναν ανασυνδυασμό b2/b3 (που καλείται επίσης g1/g3), που αποτελεί μια έλλειψη μήκους 1,8 Mb η οποία αφαιρεί τη μισή από την περιοχή AZFc συμπεριλαμβανομένων 12 μελών από 8 οικογένειες γονιδίων ειδικών για τους όρχεις (*Repping et al., 2004*). Η ίδια έλλειψη είχε προσδιοριστεί επίσης και από τον Fernandes και τους συνεργάτες του. Παρόλα αυτά, ο ρόλος των μερικών ελλείψεων AZFc (gr/gr και b2/b3) στη σπερματογένεση είναι ακόμα αντιφατικός (*Sadeghi-Nejad et al., 2007*).

Οι μικροελλείψεις AZFb και AZFbc μελετήθηκαν το 2002 από τον Repping και τους συνεργάτες του (*Repping et al., 2002*), ένα χρόνο μετά τη μελέτη του Kuroda-Kawaguchi και των συνεργατών του για τις παλινδρομικές ακολουθίες της περιοχής AZFc (*Kuroda-Kawaguchi et al., 2001*). Ο Repping και τους συνεργάτες του βρήκαν ότι οι ελλείψεις AZFb εκτείνονταν από το παλίνδρομο P5 μέχρι τον κεντρικό βραχίονα του παλίνδρομου P1, το οποίο βρίσκεται 1,5 Mb μέσα στην περιοχή AZFc (*Repping et al., 2002*), ενώ οι ελλείψεις AZFbc εκτείνονταν από το P5 μέχρι τον ακραίο βραχίονα του P1. Η έλλειψη AZFb περικλείει περίπου 6,2 Mb και απομακρύνει 32 γονίδια και μετάγραφα, ενώ η έλλειψη AZFbc περιλαμβάνει 7,7 Mb απομακρύνοντας 42 γονίδια και μετάγραφα (*Sadeghi-Nejad et al., 2007*). Αναλόγως, όλα τα γονίδια στις περιοχές AZFb και AZFc που κωδικοποιούν πρωτεΐνες και σχετίζονται με τη σπερματογένεση περιλαμβάνονται στην έλλειψη P5/ακραία P1 (AZFbc) και όλα, εκτός από τα CSPG4LY και GOLGA2LY εμπλέκονται στην έλλειψη P5/περιφερειακή P1 (πλήρης AZFb). Αυτές οι δύο ελλείψεις είναι μαζικές και προκαλούν αζωοσπερμία, απομακρύνοντας το ένα τέταρτο ή το ένα τρίτο της ευχρωματίνης.

2.6 ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΤΗΣ ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΣΕ ΑΝΔΡΕΣ ΜΕ ΜΙΚΡΟΕΛΛΕΙΨΕΙΣ ΤΟΥ Υ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΟΣ

Σε νεότερους ασθενείς που διαγνώστηκαν νωρίς στην αναπαραγωγική τους ηλικία με μικροελλείψεις του Υ χρωμοσώματος, η σταδιακή μείωση με την πάροδο του χρόνου της δραστηριότητας σπερματογένεσης των όρχεων είναι μια ένδειξη για πιθανή κρυσυντήρηση του δείγματος της εκσπερμάτισης, έτσι ώστε να αποφευχθούν στο μέλλον οι επεμβατικές τεχνικές (Georgiou *et al.*, 2006; Krausz *et al.*, 2000; Krausz *et al.*, 2003). Τα τελευταία χρόνια, η ευρεία χρήση της μικρογονιμοποίησης (ICSI) έχει φέρει επανάσταση στη θεραπεία της ανδρικής υπογονιμότητας, με όλο και μεγαλύτερο ποσοστό ανδρών με υπογονιμότητα και ελλείψεις AZF να μπορούν να τεκνοποιήσουν με τη βοήθεια της μεθόδου αυτής. Σύμφωνα με αυτήν την τεχνική, πολλοί υπογόνιμοι άνδρες μπορούν να αποκτήσουν παιδιά, αρκεί να υπάρχουν μερικά ζωντανά σπερματοζωάρια στο υλικό της εκσπερμάτισης ή ώριμες σπερματίδες στους όρχεις (Poongothai *et al.*, 2009). Οι σύγχρονες μέθοδοι ανάκτησης σπέρματος έχουν καταστήσει δυνατό άνδρες με αποφρακτική ή μη αζωοσπερμία να μπορούν να αποκτήσουν παιδιά. Ωστόσο, πρόσφατα δεδομένα υποδηλώνουν τον κίνδυνο που μπορεί να υπάρξει λόγω της κάθετης μεταβίβασης των μικροελλείψεων του Υ χρωμοσώματος του πατέρα στους αρσενικούς απογόνους του, καθώς η μέθοδος ICSI παρακάμπτει τη φυσική επιλογή και επιτρέπει την είσοδο οποιουδήποτε σπερματοζωαρίου. Έτσι, οι άνδρες που διαθέτουν μικροελλείψεις Υ μπορούν πιθανότατα να μεταβιβάσουν τόσο τις μικροελλείψεις όσο και το πρόβλημα γονιμότητας που αντιμετωπίζουν, στις επόμενες γενιές, με αποτέλεσμα να δημιουργείται έτσι οικογενής υπογονιμότητα (Page *et al.*, 1999) και να αυξάνεται το λεγόμενο γενετικό φορτίο του ανθρώπου, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε πληθυσμιακή αποσταθεροποίηση και ανισότητα. Μόνο το 2% έως 3% των υποψηφίων για ICSI περικλείει κάποιες μικροελλείψεις Υ (Georgiou *et al.*, 2006), παρόλα αυτά όμως εκτιμάται ότι εάν οι μισοί από όλους τους αζωοσπερμικούς άνδρες υποβάλλονταν σε ICSI, η περίπτωση της ανδρικής υπογονιμότητας θα διπλασιαζόταν μέσα σε εφτά γενιές, ενώ η μεγαλύτερη αναλογία αυτών θα οφείλονταν στη μεταβίβαση μικροελλείψεων Υ από τον πατέρα στο γιο. Στην κλινική πράξη, έχουν αναφερθεί πολλές περιπτώσεις μεταβίβασης ελλείψεων AZFc μέσω της ICSI (Page *et al.*, 1999; Sadeghi-Nejad *et al.*, 2007). Επίσης, ο Katagiri και οι συνεργάτες του παρατήρησαν περίπτωση ανάκτησης σπέρματος και γέννησης γιου με πανομοιότυπη

έλλειψη σε έναν άνδρα με μερική έλλειψη AZFb (*Katagiri et al., 2004*). Έχει αναφερθεί πως η ICSI καθεαυτή δεν αποτελεί παράγοντα κινδύνου για τη δημιουργία ελλείψεων Yq (*Sadeghi-Nejad et. al., 2007*). Από την άλλη πλευρά, ορισμένες αναφορές υποδηλώνουν ότι η επίπτωση των χρωμοσωμικών ανωμαλιών μετά από ICSI, συμπεριλαμβανομένων και των de novo ελλείψεων, είναι υψηλότερη σε απογόνους ανδρών με γενετικές ανωμαλίες σε σύγκριση με το γενικό ανδρικό πληθυσμό (*Sadeghi-Nejad et. al., 2007*). Για πρώτη φορά το 1999 ο Kent-First και οι συνεργάτες του αποτίμησαν άρρενα άτομα που δημιουργήθηκαν ύστερα από ICSI για μικροελλείψεις Y και βρήκαν 1 άτομο με de novo έλλειψη, ενώ ο πατέρας του δεν εμφάνιζε ελλείψεις (*Kent-First et al., 1999*). Επιπλέον, παρόλο που οι ελλείψεις φαίνεται να είναι σταθερές όταν κληρονομούνται μέσω ICSI, ο Lee και οι συνεργάτες του ανέφεραν κατακόρυφη μεταβίβαση ελλείψεων AZF σε 4 έμβρυα που δημιουργήθηκαν με τη μέθοδο της ICSI και στα 2 από αυτά η έλλειψη είχε επεκταθεί σε σχέση με αυτή των πατέρων (*Lee et al., 2006*).

Δεύτερον, παρόλο που δεν έχουν αναφερθεί άλλες ανωμαλίες σε άρρενα άτομα που έχουν συλληφθεί ύστερα από ICSI από άνδρες με ελλείψεις AZF, είναι ακόμα πολύ νωρίς ώστε να εξαχθούν σαφή συμπεράσματα. Παρόλο που τα δεδομένα υποστηρίζουν ότι δεν υπάρχουν επιπτώσεις στην υγεία που να σχετίζονται με αυτόν τον τύπο κατακόρυφης μετάδοσης, εκτός από την υπογονιμότητα, είναι πολύ σημαντικό να θυμόμαστε ότι η πρώτη γενιά των μωρών με μικροελλείψεις Y δεν έχει φτάσει ακόμα σε ωριμότητα (*Sadeghi-Nejad et. al., 2007*).

Τρίτον, οι νέες τεχνολογίες παρακάμπτουν τη φυσική επιλογή των σπερματοζωαρίων και μπορεί, τουλάχιστον θεωρητικά, να επιτρέψουν την είσοδο στο ωάριο χαμηλής ποιότητας σπέρματος κατά τη διαδικασία της αναπαραγωγής (*Sadeghi-Nejad et. al., 2007*). Ο van Golde και οι συνεργάτες του βρήκαν χαμηλότερη ποιότητα εμβρύου σε απογόνους ανδρών με ελλείψεις AZFc που υποβλήθηκαν στη διαδικασία της ICSI (*van Golde et al., 2001*). Υπέθεσαν ότι οι ελλείψεις AZFc μπορεί να προκαλέσουν βλάβη στην ποιότητα των σπερματοζωαρίων ή μπορεί να επηρεάσουν τη λειτουργία του σπέρματος κατά τη διαδικασία γονιμοποίησης. Αυτό μειώνει την πιθανότητα σύλληψης αρρένων ατόμων, όπως υποστηρίζεται από τα δεδομένα της ICSI (*van Golde et al., 2001*).

Τέλος, η σχέση των μικροελλείψεων Y και άλλων γενετικών βλαβών με την ανδρική υπογονιμότητα, εξακολουθεί να παραμένει αδιευκρίνιστη και θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψιν σε μελέτες σχετικά με τους κινδύνους της ICSI. Ο Rucker και οι συνεργάτες του απέδειξαν ότι από τους 17 υποψηφίους για TESE που εμφάνιζαν μικροελλείψεις Y, οι 5 είχαν πρόσθετες χρωμοσωμικές ανωμαλίες (Rucker *et al.*, 1998). Ο Patsalis και οι συνεργάτες του πρότειναν ότι μπορεί να υπάρχει πιθανός κίνδυνος χρωμοσωμικής ανευπλοειδίας για αρσενικούς απογόνους που προήλθαν από άνδρες με μικροελλείψεις Y (Patsalis *et al.*, 2002), ενώ ο Siffroi και οι συνεργάτες του παρατήρησαν ότι ένα σημαντικό κλάσμα σπερματοζωαρίων από άνδρες με μικροελλείψεις Y είναι μηδενασωμικό για χρωμοσώματα φύλου, υποδεικνύοντας έτσι έναν πιθανό κίνδυνο για το έμβryo να αναπτύξει 45,X σύνδρομο Turner ή άλλες ανωμαλίες (Siffroi *et al.*, 2000).

Η παντοδυναμία των TESE/ICSI έχει ελαττώσει την ανάγκη για αναζήτηση της αιτιολογίας της αποτυχίας σπερματογένεσης, ενώ η διάγνωση πριν από τη θεραπεία μπορεί να οδηγήσει στην επιλογή πιο κατάλληλης μεθόδου θεραπείας. Μακροχρόνιες follow-up μελέτες σε ζυγωτά που προέκυψαν από ICSI είναι απαραίτητες για υποψηφίους ICSI (Patsalis *et al.*, 2002). Σήμερα τα περισσότερα κέντρα υπογονιμότητας προσφέρουν ως εξέταση ρουτίνας τον έλεγχο για μικροελλείψεις του Y χρωμοσώματος σε άνδρες με προβλήματα σπερματογένεσης, ιδιαίτερος πριν από την εφαρμογή μεθόδων υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Γενικά, ο έλεγχος για μικροελλείψεις είναι σίγουρα απαραίτητος σε άνδρες με συγκέντρωση σπέρματος $1 \times 10^6/\text{mL}$ ή και λιγότερο (Land *et al.*, 2003), αλλά πολλοί επιστήμονες συνιστούν τα $5 \times 10^6/\text{mL}$ ως το προτεινόμενο όριο, καθώς το 10,5% των ασθενών με συγκέντρωση κάτω από $5 \times 10^6/\text{mL}$ μπορεί να περιλαμβάνει μικροελλείψεις. Αυτό αποτελεί επίσης το όριο και για χρωμοσωμική ανάλυση (Foresta *et al.*, 2001).

Λόγω των παραπάνω αιτίων, τα ζευγάρια που αντιμετωπίζουν προβλήματα ανδρικής υπογονιμότητας και ενδιαφέρονται να καταφύγουν σε μεθόδους υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, θα πρέπει να υποβάλλονται στη διαδικασία της γενετικής συμβουλευτικής και ενημέρωσης, ώστε να ενημερώνονται για τους πιθανούς κινδύνους που ενέχουν οι αποφάσεις που θα πάρουν. Επιπλέον, αυτά τα ζευγάρια αποτελούν μέρος ενός πληθυσμού ασθενών με έναν από τους υψηλότερα αναγνωρισμένους γενετικούς κινδύνους, γι' αυτό η συμβουλευτική είναι απαραίτητο να παρέχετε σε αυτές τις περιπτώσεις. Υπάρχουν τρεις σχετικά συνηθισμένες

διαγνώσεις, οι οποίες επιδεικνύουν σοβαρό γενετικό κίνδυνο και χρήζουν ελέγχου και ενημέρωσης: η αποφρακτική αζωοσπερμία, η μη αποφρακτική αζωοσπερμία και η ολιγοζωοσπερμία.

Η γενετική συμβουλευτική θα πρέπει να δίνεται με γνώμονα την ψυχολογική κατάσταση στην οποία βρίσκονται τα ζευγάρια λόγω του προβλήματος της υπογονιμότητας που αντιμετωπίζουν και των γενετικών πληροφοριών που τους αποκαλύπτονται. Σε πολλές περιπτώσεις και όπου αυτό κρίνεται απαραίτητο, μπορεί να εξεταστούν και τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας, ώστε να διαμορφωθεί μια πιο σφαιρική εικόνα για το πρόβλημα που υπάρχει. Επίσης, μέσω της γενετικής συμβουλευτικής προβάλλονται και οι εναλλακτικές λύσεις τις οποίες διαθέτει το ζευγάρι, όπως ο προγεννητικός έλεγχος και η προεμφυτευτική γενετική διάγνωση (PGD). Ενδιαφέρον πάντως παρουσιάζει το γεγονός ότι στις περισσότερες περιπτώσεις τα ζευγάρια με μικροελλείψεις του Y χρωμοσώματος που υποβάλλονται σε γενετική συμβουλευτική εξακολουθούν να καταφεύγουν στις μεθόδους της *in vitro* γονιμοποίησης με σπέρμα του άνδρα ή μέσω δωρεάς σπέρματος (*Poongothai et al., 2009*). Ο Giltay και οι συνεργάτες του απέδειξαν πως περισσότεροι από τους μισούς ασθενείς που βρέθηκαν θετικοί για χρωμοσωμικές ανωμαλίες αποφάσισαν να προχωρήσουν σε ICSI (*Giltay et al., 1999*). Στην τελευταία όμως περίπτωση εγείρονται πολλά ηθικά διλήμματα, καθώς υπάρχει μεγάλος κίνδυνος να δημιουργηθούν προβλήματα μεταξύ των φυσικών γονέων και του δότη και έτσι να υπάρχουν σοβαρές επιπτώσεις στα παιδιά που έρχονται στον κόσμο. Επιπλέον, δημιουργούνται πολλά ηθικά διλήμματα και κοινωνικά προβλήματα καθώς δε γνωρίζουμε κατά πόσο η κοινωνία έχει σταματήσει να αντιμετωπίζει την υπογονιμότητα ως ασθένεια, στο βωμό της οποίας θυσιάζονται τα πάντα και υπερβαίνονται όλα τα όρια προκειμένου να επιτευχθεί τεκνοποίηση. Σε ένα μικρό αριθμό περιπτώσεων, τα ζευγάρια καταφεύγουν σε PGD προκειμένου να επιλέγουν και να εμφυτευτούν μόνο τα θηλυκά έμβρυα, ούτως ώστε να αποφευχθεί η μετάδοση των γενετικών ανωμαλιών στους απογόνους. Τέλος, ορισμένα ζευγάρια καταφεύγουν στην εναλλακτική της υιοθεσίας.

Παρόλο που οι γονιδιακές αιτίες της υπογονιμότητας μπορούν να αναγνωριστούν σε ορισμένους άνδρες, είναι σίγουρο πως στο μέλλον αυτές οι αιτίες θα είναι πολύ ευκολότερα ανιχνεύσιμες σε μεγαλύτερο ποσοστό των ασθενών, ενώ θα πρέπει να αναπτυχθούν επιπλέον μέθοδοι ανίχνευσης σε σχέση με αυτές που

υπάρχουν τώρα (*Poongothai et al., 2009*). Αυτό υποδηλώνει πως στο μέλλον θα υπάρχει πολύ μεγαλύτερη επικάλυψη μεταξύ αναπαραγωγικής ιατρικής και γενετικής, μέσω της συνεργασίας των οποίων θα μπορέσουν να επιτευχθούν ακόμα υψηλότεροι στόχοι.

2.7 ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΕΛΛΕΙΨΕΩΝ ΤΟΥ Υ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΟΣ ΣΤΙΣ ΠΟΛΛΑΠΛΕΣ ΑΠΟΒΟΛΕΣ

Οι αποβολές αποτελούν μια πολύ συνηθισμένη επιπλοκή, επηρεάζοντας περίπου το 15% όλων των εγκυμοσυνών, ενώ ορισμένοι αναφέρουν πολύ μεγαλύτερο ποσοστό εάν συμπεριληφθούν και οι εγκυμοσύνες που χάνονται πριν γίνουν καν αντιληπτές. Ένα υποσύνολο αυτού του πληθυσμού θα έχει 3 ή περισσότερες συνεχείς αποβολές και οι επαναλαμβανόμενες αυτές αυτόματες αποβολές, οι οποίες ορίζονται ως ≥ 3 απώλειες κλινικής εγκυμοσύνης πριν το έμβρυο να φτάσει στη βιωσιμότητα (*Rai and Regan, 2006*), αποτελούν μια δυσάρεστη κατάσταση, η οποία επηρεάζει το 1% των ζευγαριών αναπαραγωγικής ηλικίας (*Porter and Scott, 2005*). Παρόλο που κάποιες από τις αιτίες των αυτόματων αποβολών έχουν ήδη αναγνωριστεί, ορισμένες παραμένουν ακόμα αδιευκρίνιστες. Γι' αυτόν το λόγο το 50% των ζευγαριών εξακολουθούν να αντιμετωπίζουν ανεξήγητες πολλαπλές αποβολές, καθώς δεν μπορούν να διευκρινιστούν οι υποκείμενοι μηχανισμοί (*Bellver et al., 2010*). Οι γνωστές αιτίες περιλαμβάνουν πατρικές ή de novo χρωμοσωμικές ανωμαλίες, το αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο, κάποιες κληρονομήσιμες θρομβοφιλίες (όπως τον παράγοντα V Leiden και τη μετάλλαξη γονιδίου G20210A προθρομβίνης), συγγενείς ή επίκτητες μητρικές ανωμαλίες, ενδοκρινικές και αυτοάνοσες ή αλλοάνοσες διαταραχές, ορμονικές και αιματολογικές ανωμαλίες, χρόνιες ασθένειες (ειδικά αυτές που δεν είναι εύκολα ελεγχόμενες, π.χ. διαβήτης) και ενδεχομένως τον ανθυγιεινό τρόπο ζωής (κάπνισμα, παχυσαρκία, ψυχολογικό stress). Παρόλα αυτά, οι περισσότερες από αυτές τις καταστάσεις σχετίζονται με τη γυναίκα, με τη συνεισφορά του ανδρικού παράγοντα να παραμένει ακόμα αδιευκρίνιστη (*Bellver et al., 2010*). Γι' αυτόν το λόγο οι περισσότερες εξετάσεις εστιάζονται στη γυναίκα, ενώ γενικά η ανάλυση σπέρματος δεν είναι απαραίτητη για τον έλεγχο των πολλαπλών αυτόματων αποβολών. Ωστόσο, η ακεραιότητα του σπέρματος είναι απαραίτητη για την αλληλεπίδραση σπέρματος-ωαρίου, τη γονιμοποίηση και την αρχική ανάπτυξη

του εμβρύου, ενώ σχετίζεται και με την ικανότητα του εμβρύου να φτάσει στο στάδιο της βλαστοκύστης και να επιτύχει την εμφύτευση. Επίσης, πατρικά εκφραζόμενα γονίδια συντονίζουν τον πολλαπλασιασμό και την εισβολή των τροφοβλαστικών κυττάρων, αλλά και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του πλακούντα.

Η διαφοροποίηση των παραμέτρων του σπέρματος, όπως αυτές εκτιμώνται με βάση τα κλασσικά κριτήρια (συγκέντρωση, κινητικότητα, μορφολογία, *World Health Organization, 1999*), δε σχετίζεται ξεκάθαρα με τον κίνδυνο σποραδικών ή επαναλαμβανόμενων αποβολών (*Carrell et al., 2003b; Bhattacharya, 2008*), παρόλο που ορισμένες από αυτές τις ανωμαλίες του σπέρματος θα μπορούσαν να αποτελούν την εκδήλωση κάποιες υποκείμενης αιτίας (*Bellver et al., 2010*). Αυτό ισχύει στην περίπτωση εμβρύων με χρωμοσωμικές ανωμαλίες, δημιουργώντας έτσι λάθη κατά το μειωτικό διαχωρισμό στα σπερματοζώαρια ανδρών με σοβαρή ολιγοασθενοτεροζωοσπερμία (*Bernardini et al., 2005; Pang et al., 2005*). Ορισμένοι συγγραφείς έχουν προτείνει την επιτέλεση ανάλυσης FISH (Fluorescent In Situ Hybridization) σε δείγματα σπέρματος με σημαντικά αλλαγμένες παραμέτρους, προκειμένου να ανιχνευτούν περιπτώσεις όπου ο προεμφυτευτικός γενετικός έλεγχος θα μπορούσε να φανεί χρήσιμος και να μειώσει έτσι την πιθανότητα αποβολών (*Rubio et al., 2001*). Ωστόσο, δεν υπάρχει μέχρι στιγμής ομοφωνία στη σύγχρονη ιατρική βιβλιογραφία όσον αφορά το συγκεκριμένο θέμα (*Harper et al., 2008*). Άλλωστε σε πολλές περιπτώσεις ζευγαριών με πολλαπλές αυτόματες αποβολές η εξέταση των ανδρών έχει δείξει φυσιολογικές παραμέτρους σπέρματος στο δείγμα της εκσπερμάτισης (*Al-Hassan et al., 2005*).

Σύμφωνα με τη μελέτη του Dewan, οι άνδρες των ζευγαριών με επαναλαμβανόμενες αυτόματες αποβολές έχουν περισσότερες χρωμοσωμικές ανωμαλίες και φτωχή ακεραιότητα της μεμβράνης του σπέρματος (*Dewan et al., 2006*). Σήμερα, άνδρες με πολύ μικρή συγκέντρωση σπέρματος (<1 εκατ./mL), έχουν μεγαλύτερη συχνότητα χρωμοσωμικών ανωμαλιών (0,5-2,8%) ή μικροελλείψεων Y (17%) (*Dewan et al., 2006*). Μια ακόμη μελέτη έχει επίσης αναφέρει μια σημαντικά υψηλότερη εμφάνιση χρωμοσωμικών μικροελλείψεων Y σε άνδρες ζευγαριών με επαναλαμβανόμενες αυτόματες αποβολές (*Karaer et al., 2008*), αλλά κάτι τέτοιο δεν έχει ακόμα επιβεβαιωθεί (*Kaare et al., 2008*). Τέλος, ο van Golde και οι συνεργάτες του παρατήρησαν ότι άνδρες με ελλείψεις AZFc παρουσίαζαν μικρότερο ποσοστό γονιμοποίησης και χαμηλότερη ποιότητα εμβρύων, αλλά αυτό δεν μπόρεσε σε καμία

περίπτωση να συσχετισθεί με χαμηλότερο ποσοστό κύησης ή με πολλαπλές αποβολές (*van Golde et al., 2001*).

Η μελέτη του Bellver και των συνεργατών του είχε ως στόχο να αξιολογήσει εν μέρει τη σχέση των μικροελλείψεων Y με τις αυτόματες αποβολές και να συγκρίνει τις τιμές τους μεταξύ υγείων και γόνιμων δωρητών σπέρματος (SD) με φυσιολογικές παραμέτρους σπέρματος, ασθενών με σοβαρή ολιγοζωοσπερμία (SO) και με >1 χρόνο προβλημάτων σύλληψης και ανδρών από ζευγάρια με ιδιοπαθείς επαναλαμβανόμενες αυτόματες αποβολές. Οι συγγραφείς ωστόσο δεν μπόρεσαν να ανιχνεύσουν μικροελλείψεις Y σε καμία από τις παραπάνω αναφερόμενες ομάδες δείχνοντας έτσι ότι οι μικροελλείψεις Y δε σχετίζονται με τις ιδιοπαθείς αυτόματες αποβολές (*Bellver et al., 2010*). Αυτά τα αποτελέσματα έρχονται σε πλήρη αντίθεση με αυτά που είχαν αρχικά δημοσιευτεί από τον Dewan και τους συνεργάτες του (*Dewan et al., 2006*), οι οποίοι στη μελέτη τους χρησιμοποίησαν αντίστοιχες ομάδες ανδρών με αυτές του Bellver και βρήκαν σε 14 από τους 17 άνδρες (82%) από ζευγάρια με επαναλαμβανόμενες αυτόματες αποβολές μικροελλείψεις σε ένα ή περισσότερα από τα τέσσερα τμήματα της κεντρικής περιοχής AZFc τα οποία μελέτησαν. Αντίθετα, αυτό το ποσοστό μειώθηκε στο 20% σε υπογόνιμους άνδρες με σοβαρό πρόβλημα στη σπερματογένεση, ενώ ήταν μηδενικό σε γόνιμους άνδρες. Έτσι, σύμφωνα με τον Dewan ίσως να υπάρχει πιθανή συσχέτιση μεταξύ των επαναλαμβανόμενων αποβολών και των μικροελλείψεων του κεντρικού τμήματος της περιοχής AZFc του Y χρωμοσώματος. Το υψηλότερο ποσοστό χρωμοσωμικών μικροελλείψεων Y που βρέθηκε στα άτομα με αυτόματες αποβολές σε σχέση με την ομάδα των γόνιμων ή των υπογόνιμων ανδρών υποστηρίζει τη θεωρία ότι η κεντρική περιοχή AZFc του Y χρωμοσώματος παίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της κύησης και στη δυναμική του εμβρύου. Έτσι ίσως να είναι χρήσιμη η ανάλυση για μικροελλείψεις Y σε αυτήν την περιοχή όταν δεν έχει ανιχνευθεί άλλη αιτιολογία για τις αυτόματες αποβολές (*Dewan et al., 2006*). Πρόσφατα, ο Karaer και οι συνεργάτες του ανίχνευσαν επίσης μικροελλείψεις του Y χρωμοσώματος στο 16% των ανδρών από ζευγάρια με επαναλαμβανόμενες αποβολές σε ένα ή περισσότερα από τα τέσσερα STS που καθορίστηκαν στις περιοχές AZFb και AZFd, ενώ δεν βρέθηκαν ελλείψεις σε γόνιμους άνδρες (*Karaer et al., 2008*). Παρόλα αυτά, το ποσοστό των μικροελλείψεων που ανιχνεύτηκε διέφερε σημαντικά στις δύο μελέτες (82% έναντι 16%) και οι περιοχές που μελετήθηκαν ήταν κατά βάση διαφορετικές.

Παρόμοια αποτελέσματα με αυτά του Bellver προήλθαν και από άλλες μελέτες, στις οποίες δεν ανιχνεύθηκαν μικροελλείψεις Y στους άνδρες των ζευγαριών με ιδιοπαθείς αυτόματες αποβολές. Ο Kaare και οι συνεργάτες του (*Kaare et al., 2008*) έλεγξαν 40 άνδρες από ζευγάρια με τουλάχιστον 3 αποβολές και ανέλυσαν 33 STS, καλύπτοντας ολόκληρο το Y χρωμόσωμα, καθώς επίσης και τα 4 STS που μελετήθηκαν από τον Dewan και τους συνεργάτες του (*Dewan et al., 2006*), όμως σε καμία περίπτωση δε βρέθηκαν μικροελλείψεις. Επίσης, ο Lu και οι συνεργάτες του μελέτησαν στον κινέζικο πληθυσμό 12 STS στις περιοχές AZFa, AZFb και AZFc της Yq11.2 και δεν μπόρεσε να ανιχνεύσει χρωμοσωμικές μικροελλείψεις Y σε 26 δείγματα χοριονικών λαχνών από αποβληθέντα αρσενικά έμβρυα ή σε 51 δείγματα αίματος από άνδρες ζευγαριών με επαναλαμβανόμενες αυτόματες αποβολές (*Lu et al., 2008*).

Σύμφωνα με τα παραπάνω δεδομένα γίνεται αντιληπτό πως, παρόλο που τα περισσότερα αποτελέσματα συνηγορούν υπέρ της μη συσχέτισης μεταξύ των Y μικροελλείψεων και των πολλαπλών αποβολών, δεν υπάρχει ακόμα ομοφωνία μεταξύ της επιστημονικής κοινότητας πάνω στο θέμα αυτό. Γι' αυτόν το λόγο κρίνεται απαραίτητη η περαιτέρω διερεύνηση αυτής της σχέσης, προκειμένου να εξαχθούν σαφή και αδιαμφισβήτητα συμπεράσματα.

3. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ένας στους 20 άνδρες υποφέρουν από ανδρική υπογονιμότητα και ο ανδρικός παράγοντας είναι υπεύθυνος περίπου για το ένα τρίτο όλων των περιπτώσεων υπογονιμότητας. Ένας μεγάλος αριθμός αυτών των ασθενών υποφέρουν από πρωτοπαθή αποτυχία σπερματογένεσης λόγω κάποιας γενετικής αιτίας (*Sadeghi-Nejad et. al., 2007*). Με την ανάπτυξη λεπτομερών διαγνωστικών μεθόδων και με την πρόσφατη γνώση που αποκτήθηκε λόγω της χαρτογράφησης του Y χρωμοσώματος, οι γενετικές ανωμαλίες που ευθύνονται για την υπογονιμότητα μπορούν να αναγνωριστούν ακόμα ευκολότερα. Επιπλέον, άνδρες με αζωοσπερμία ή σοβαρή олиγοσπερμία εξαιτίας κάποιας γενετικής ανωμαλίας, μπορούν να υποβληθούν σε θεραπείες αποκατάστασης ώστε να μπορέσουν να αποκτήσουν δικά τους παιδιά. Έτσι, μια διάγνωση των πιθανών αιτιών της αποτυχίας σπερματογένεσης μπορεί να καθορίσει την θεραπευτική προσέγγιση που θα ακολουθηθεί και να προβλέψει την

επιτυχία της θεραπευτικής προσπάθειας (*Sadeghi-Nejad et. al., 2007*). Από την άλλη πλευρά, καθώς η χρήση των μεθόδων TESE (TEsticular Sperm Extraction) και ICSI (IntraCytoplasmic Sperm Injection) μπορούν να παρακάμψουν τη φυσική επιλογή φυσιολογικών σπερματοζωαρίων, υπάρχουν σοβαρές ανησυχίες που αφορούν την πιθανότητα μετάδοσης γενετικών διαταραχών στο ζυγωτό (*Georgiou et al., 2006*). Αυτές οι ανησυχίες ενισχύονται ακόμα περισσότερο σε περιπτώσεις παρουσίας χρωμοσωμικών μικροελλείψεων Y (YCM). Αυτές οι δομικές γενετικές ανωμαλίες σχηματίζουν διάφορους γονοτύπους, οι οποίοι καταλήγουν σε ποικίλους μη προβλέψιμους φαινοτύπους, επιβάλλοντας έτσι περαιτέρω διευκρίνιση του ρόλου τους στην υπογονιμότητα και την επίδρασή τους στα αποτελέσματα των μεθόδων της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (ART).

Η ανάλυση για ελλείψεις του Y χρωμοσώματος θα πρέπει να αποτελεί εξέταση ρουτίνας για όλους τους άνδρες με σοβαρή ολιγοσπερμία ή αζωοσπερμία, καθώς προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα. Αρχικά, ένα θετικό αποτέλεσμα θα μπορούσε να προσφέρει μια σίγουρη διάγνωση για την αιτία της ανδρικής υπογονιμότητας, γεγονός το οποίο θα μπορούσε να απαλλάξει τα ζευγάρια με χρόνια υπογονιμότητα από το άγχος και το αίσθημα της ενοχής και της ευθύνης για τη μη απόκτηση παιδιών. Δεύτερον, η ακριβής γνώση του τύπου των μικροελλείψεων Y βοηθά το γιατρό ώστε να επιλέξει την κατάλληλη θεραπευτική μέθοδο για να επιτευχθεί το καλύτερο αποτέλεσμα. Τέλος, τα ζευγάρια θα πρέπει να γνωρίζουν την αιτία της ανδρικής υπογονιμότητας, ώστε να καταλάβουν ότι οι αρσενικοί απόγονοί τους θα είναι σχεδόν σίγουρα υπογόνιμοι και θα χρειάζονται στενή παρακολούθηση από τη στιγμή της σεξουαλικής τους ωριμότητας (*Poongothai et al., 2009*).

Οι μικροελλείψεις του Y χρωμοσώματος είναι οι πιο συχνά παρατηρούμενες δομικές ανωμαλίες σε ειδικές περιοχές του Y χρωμοσώματος των ανδρών (*Georgiou et al., 2006*), ενώ το 15% των περιπτώσεων αποτυχίας σπερματογένεσης σχετίζεται με τουλάχιστον 6 γνωστά κύρια πρότυπα χρωμοσωμικών μικροελλείψεων Y. Ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός ότι οι μικροελλείψεις έχουν βρεθεί επίσης σε άνδρες χωρίς προβλήματα υπογονιμότητας (*Sadeghi-Nejad et. al., 2007*). Οι μικροελλείψεις είναι παρούσες στο 5%-10% των υπογόνιμων ανδρών, ενώ πιο συγκεκριμένα έχει αναφερθεί η παρουσία τους στο 2%-3% των υποψηφίων για ICSI, στο 6%-16% των αζωοσπερμικών ανδρών και στο 4%-5.8% των ατόμων με σοβαρή ολιγοσπερμία, ενώ δε φαίνεται να σχετίζονται με τις πολλαπλές αυτόματες αποβολές. Σε περιορισμένο

αριθμό εργασιών που έχουν γίνει στη Μέση Ανατολή, έχει βρεθεί στη Σαουδική Αραβία ποσοστό μικροελλείψεων Y στο 3,2% των ανδρών με ιδιοπαθή αζωοσπερμία ή ολιγοσπερμία, στην Τουρκία στο 3.3% και στο Κουβέιτ στο 2,6% των ατόμων. Στο Ιράν, μελέτες σε μικρό αριθμό ασθενών έδειξαν ότι το 5% - 24,2% των υπογόνιμων ανδρών με σοβαρή ιδιοπαθή αποτυχία σπερματογένεσης εμφάνιζαν αυτές τις γενετικές ανωμαλίες.

Οι μικροελλείψεις του Y χρωμοσώματος προκύπτουν κυρίως de novo (*Foresta et al., 1998; Skaletsky et al. 2003*), καθώς η υψηλά επαναλαμβανόμενη δομή του Y χρωμοσώματος προδιαθέτει για de novo μικροελλείψεις. Παρόλα αυτά, σε αρκετές περιπτώσεις έχει παρατηρηθεί μέχρι σήμερα φυσική μεταφορά των μικροελλείψεων (*Sadeghi-Nejad et. al., 2007*). Από τότε που οι Tierpolo και Zuffardi ανέφεραν κυτταρογενετικά ανιχνεύσιμες μικροελλείψεις στην κεντρική περιοχή του μεγάλου βραχίονα (Yq) σε αζωοσπερμικούς άνδρες, ένας μεγάλος αριθμός ερευνών έχει πραγματοποιηθεί προκειμένου να ελεγχθεί ο μηχανισμός της ανάπτυξης και τα χαρακτηριστικά αυτών των ελλείψεων. Το 1996, ο Vogt και οι συνεργάτες του αναγνώρισαν 3 περιοχές στην Yq11 οι οποίες εμφάνιζαν συνεχώς ελλείψεις και οι οποίες ονομάστηκαν παράγοντας αζωοσπερμίας AZF (azoospermia factor) και πιο συγκεκριμένα AZFa, AZFb και AZFc (*Vogt et al., 1996*). Σήμερα υποθέτεται πως οι περισσότερες μικροελλείψεις AZF δημιουργούνται από ενδοχρωμοσωμικές ομόλογες αναδιατάξεις γενετικού υλικού μέσω ανασυνδυασμού που δημιουργείται μεταξύ μιας σειράς επαναλαμβανόμενων ακολουθιών, οι οποίες έχουν σχεδόν πανομοιότυπες δομές.

Παρά το μεγάλο όγκο πληροφοριών που έχει συγκεντρωθεί για το Y χρωμόσωμα την τελευταία δεκαετία, ακόμα δεν κατέστη δυνατό να αποδοθεί η σπερματογενετική λειτουργία σε συγκεκριμένα γονίδια, καθώς κάθε μια από τις ελλείψεις απομακρύνει συνήθως πολλαπλά γονίδια (*Krausz, 2006*). Συνεπώς, δεν είναι εξακριβωμένο εάν ο φαινότυπος που προκύπτει είναι αποτέλεσμα της έλλειψης όλων των γονιδίων μιας περιοχής ή της δυσλειτουργίας ενός κύριου γονιδίου, του οποίου η έκφραση από μόνη της είναι υπεύθυνη για τη σπερματογένεση. Επιπλέον, τα γνωστά πρότυπα ελλείψεων είναι ποικίλα και αποκλείουν έτσι την εύκολη ταξινόμηση των ανδρών με ένα συγκεκριμένο τύπο έλλειψης. Ασθενείς που παρουσιάζουν πανομοιότυπες μικροελλείψεις εμφανίζουν ποικιλία στο φαινότυπο, και έτσι εικάζεται η παρουσία άλλων γονιδίων (modifier genes), που έχουν την

ικανότητα να δημιουργούν διαφορετικό γενετικό υπόβαθρο το οποίο έχει τη δύναμη να ισορροπεί ή να εντείνει το αποτέλεσμα της έλλειψης των γονιδίων που βρίσκονται στην περιοχή AZF. Η αναγνώριση του ακριβή ρόλου των υποψήφιων γονιδίων AZF θα μπορούσε να αναβαθμίσει σημαντικά τις γνώσεις μας για τη βιολογία της σπερματογένεσης. Επιπλέον, η ανάλυση καινούργιων γονιδίων του Y χρωμοσώματος με πιθανό ρόλο στην ανάπτυξη αρσενικών γεννητικών κυττάρων θα μπορούσε να αποσαφηνίσει άλλα χρήσιμα και σημαντικά χαρακτηριστικά αυτού του γονιδίου και να επισημάνει εάν ο ασθενής μπορεί να υποβληθεί στη διαδικασία της ICSI. Θα πρέπει εδώ να αναφερθεί ότι δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ του μήκους της έλλειψης και της ποιότητας του σπέρματος ή της ιστολογίας των όρχεων. Παρά τις προκλήσεις αυτές, οι υπάρχουσες γνώσεις μας προσφέρουν μια χρήσιμη εικόνα των γενετικών αιτιών της αζωοσπερμίας και μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην πράξη (*Sadeghi-Nejad et. al., 2007*).

Σχετικά με τις προσπάθειες ενδεχόμενης θεραπείας των μικροελλείψεων του Y χρωμοσώματος, μέχρι στιγμής δεν έχουν υπάρξει συγκεκριμένα δεδομένα στη διεθνή βιβλιογραφία, ούτε κάποια προτεινόμενη μέθοδος θεραπείας. Οι περισσότερες μελέτες αναφέρουν πως θα πρέπει να διευκρινιστεί πρώτα ο ρόλος των γονιδίων AZF και των μικροελλείψεων στην ανδρική υπογονιμότητα και στη συνέχεια να αναζητηθούν πιθανοί τρόποι θεραπείας (*Sadeghi-Nejad et. al., 2007*).

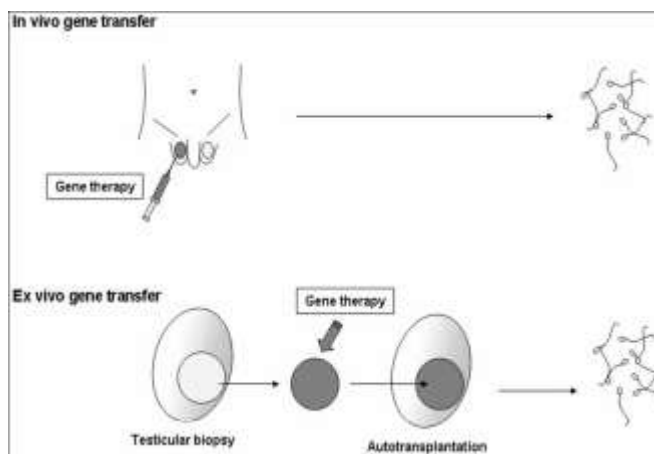
Όσον αφορά όμως γενικότερα την προσπάθεια θεραπείας της ανδρικής υπογονιμότητας, πρόσφατα αναπτύχθηκαν πολλές μελέτες που αφορούν τη μεταφορά γονιδίων στο σπέρμα και στους όρχεις, με σκοπό να αναπτυχθούν πιο απλές και αποτελεσματικές μέθοδοι, προκειμένου να δημιουργηθούν διαγονιδιακά ζώα, σε σχέση με τις παλιότερες μεθόδους που περιελάμβαναν άμεση μικροέγχυση ξένου DNA στους προπυρήνες γονιμοποιημένων ωαρίων (*Kojima et al., 2008*). Στο μέλλον, αυτή η τεχνική έχει τη δυναμική να αποτελέσει τον πιο χρήσιμο τρόπο για τη θεραπεία της ανδρικής υπογονιμότητας.

Στην κλινική πράξη, η γονιδιακή θεραπεία όρχεων μπορεί να είναι χρήσιμη για να θεραπεύσει στο μέλλον την υπογονιμότητα, γιατί θα είναι δυνατό να προωθηθεί η σπερματογένεση σε ασθενείς με υποσπερματογένεση, αδυναμία ωρίμανσης σπερματοζωαρίων και σύνδρομο SCO. Έχουν ήδη αναφερθεί μελέτες γονιδιακής θεραπείας για συγκεκριμένους καρκίνους και κληρονομήσιμες ασθένειες,

ενώ οι νέες τεχνολογίες χρησιμοποιούνται επίσης και στο πεδίο της αναπαραγωγής, με τη χρήση πειραματοζώων.

Σε σύγκριση με άλλα όργανα, η μεταφορά γονιδίων στους όρχεις απαιτεί αρκετή σκέψη και προσεκτικές κινήσεις, κυρίως λόγω βιολογικών και ηθικών αιτιών.

Στην εικόνα παρουσιάζονται οι δύο βασικοί τρόποι γονιδιακής μεταφοράς στους όρχεις. Παρόλο που απαιτούνται περισσότερες έρευνες για την κατανόηση του μηχανισμού της σπερματογένεσης και της ανδρικής υπογονιμότητας, η γονιδιακή θεραπεία θα



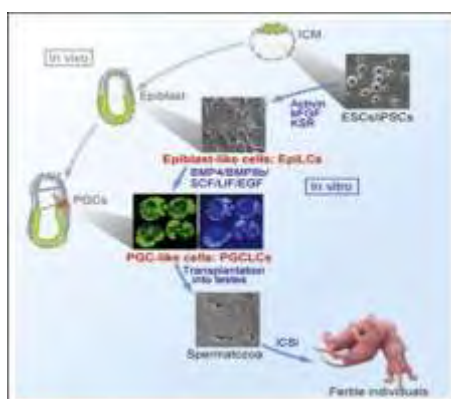
επιτρέψει να συμβούν επαναστατικές πρόοδοι στον τομέα της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής και θα προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα στους ασθενείς με υπογονιμότητα (Kojima et al., 2008).

Επίσης, πριν από λίγο καιρό είδε το φως της δημοσιότητας μια άκρως σημαντική μελέτη, η οποία δίνει ελπίδα στα χρόνια που έρχονται σε πολλά ζευγάρια με προβλήματα γονιμότητας να βιώσουν τη δυνατότητα απόκτησης απογόνων. Η μελέτη που δημοσιεύτηκε στις αρχές Αυγούστου στο επιστημονικό περιοδικό *Cell* πραγματοποιήθηκε στην Ιαπωνία και συγκεκριμένα στο εργαστήριο του καθηγητή Mitinori Saitou του Πανεπιστημίου του Κιότο, όπου επιτεύχθηκε η ανάπτυξη σπέρματος ποντικού (έως ένα στάδιο) στο εργαστήριο, το οποίο ήταν άκρως λειτουργικό και οδήγησε στη γέννηση υγιέστατων και πλήρως γόνιμων ποντικών (Katsuhiko et al., 2011).

Οι ερευνητές κατάφεραν αρχικά με τη χρήση ειδικών αυξητικών παραγόντων και άλλων χημικών της κυτταρικής ανάπτυξης και διαφοροποίησης να μετατρέψουν εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα ποντικών σε κύτταρα που έμοιαζαν με επιβλαστικά αρχέγονα γεννητικά κύτταρα. Μόλις τα επιβλαστικά κύτταρα μετατράπηκαν σε αρχέγονα σπερματοκύτταρα, τα τελευταία μεταμοσχεύτηκαν σε όρχεις ποντικών ηλικίας επτά ημερών, οι οποίοι ήταν στείροι και στη συνέχεια τα πειραματόζωα παρήγαγαν σπέρμα που φαινόταν φυσιολογικό. Αυτό το σπέρμα χρησιμοποιήθηκε για

τη γονιμοποίηση ωαρίων ποντικών στο εργαστήριο και προέκυψαν 214 έμβρυα, τα οποία εμφυτεύτηκαν σε φέρουσες μητέρες. Τελικώς γεννήθηκαν 65 υγιείς αρσενικοί και θηλυκοί απόγονοι, οι οποίοι ήταν μάλιστα και γόνιμοι. Αυτοί οι απόγονοι απέκτησαν στη συνέχεια και δικά τους μικρά τα οποία ήταν υγιή.

Δεν είναι η πρώτη φορά που οι επιστήμονες δημιουργούν σπέρμα στο εργαστήριο. Είναι όμως η πρώτη φορά που με εργαστηριακά προερχόμενο σπέρμα έρχονται στον κόσμο απόγονοι χωρίς προβλήματα υγείας, οι οποίοι είναι σε θέση να αποκτήσουν και δικά της παιδιά. Φυσικά μέχρι να φτάσει στο στάδιο να εφαρμοστεί αυτή η τεχνολογία στον άνθρωπο πρέπει να ξεπεραστούν πολλά επιστημονικά, αλλά και ηθικά και κοινωνικά εμπόδια και πιθανόν να μην καταφέρει να εφαρμοστεί ποτέ. Αλλά το μόνο σίγουρο είναι ότι η επιστήμη κάνει αργά και σταθερά βήματα, τα οποία μπορεί σύντομα να την οδηγήσουν στη θεραπεία της ανδρικής υπογονιμότητας.



Εικόνα 11: Διαδικασία ανάπτυξης σπέρματος στο εργαστήριο

Η αντιμετώπιση των καθημερινών προκλήσεων για τη βελτίωση της υγείας του ανθρώπου, θα οδηγήσει και σε θεραπεία των μικροελλείψεων του Υ χρωμοσώματος ή σε ανάπτυξη μεθόδου αποφυγής της κάθετης μετάδοσής τους στους απογόνους. Ήδη διαθέτουμε μια καλή εικόνα των γενετικών αιτιών της αζωοσπερμίας και της σοβαρής ολιγοσπερμίας, επομένως μπορεί σύντομα να διευρυνθούν αυτές οι γνώσεις ώστε να μην υπάρχει κίνδυνος δημιουργίας οικογενούς υπογονιμότητας.

4. ΕΠΙΛΟΓΟΣ

Η ανδρική υπογονιμότητα είναι πιθανότατα το αποτέλεσμα ελλείψεων και/ή μεταλλάξεων απαραίτητων γονιδίων της φυσιολογικής λειτουργίας της σπερματογένεσης. Έχει αποδειχθεί ότι οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες, που επηρεάζουν τόσο τα φυλετικά όσο και τα αυτοσωμικά χρωμοσώματα, εμφανίζονται πιο συχνά σε πληθυσμούς υπογόνιμων ανδρών σε σύγκριση με πληθυσμούς ανδρών με φυσιολογική σπερματογένεση. Από τότε που προτάθηκε ότι ο Υq βραχίονας περικλείει την περιοχή AZF, πριν από 26 χρόνια, της μεγάλος αριθμός ερευνών έχει πραγματοποιηθεί, προκειμένου να προσδιοριστούν οι υπεύθυνοι παράγοντες της ανδρικής υπογονιμότητας. Η πρόοδος των μοριακών τεχνολογιών έχει προσφέρει γνώσεις σε τομείς της γενετικής της υπογονιμότητας. Ωστόσο, παρά την απομόνωση πολλών υποψήφιων γονιδίων υπογονιμότητας, οι γνώσεις της γενετικής ρύθμισης της υπογονιμότητας παραμένουν ακόμα ελλιπείς. Συγκεκριμένα, δεν είμαστε ακόμα σε θέση να διευκρινίσουμε την ακριβή συσχέτιση γονότυπου – φαινότυπου μεταξύ συγκεκριμένων χρωμοσωμικών μικροελλείψεων Y και των διαφόρων μοτίβων ιστολογίας των όρχεων που παρατηρούνται σε υπογόνιμους άνδρες. Με την πάροδο του χρόνου και την πρόοδο της επιστήμης, είναι σίγουρο πως θα αναγνωριστούν περισσότεροι συσχετισμοί μεταξύ των γενετικών παραγόντων υπογονιμότητας και θα αναπτυχθούν νέες, σύγχρονες, ταχύτερες και πιο φθηνές μέθοδοι διάγνωσης.

Βέβαια, αυτές οι βελτιώσεις και οι πρόοδοι στη θεραπεία της ανδρικής υπογονιμότητας χρειάζονται επαγρύπνηση, τόσο από τους επιστήμονες όσο και από την πολιτεία, καθώς οι κατακτήσεις στο πεδίο της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής οφείλουν να περιφρουρούνται με σεβασμό στις αξίες της ανθρώπινης ζωής και της οικογένειας. Έτσι όλοι οι κίνδυνοι και οι πιθανές επιπτώσεις στους απογόνους θα πρέπει να λαμβάνονται σοβαρά υπόψη και να ελέγχονται σχολαστικά πριν την εφαρμογή των διαδικασιών της εξωσωματικής γονιμοποίησης, συμπεριλαμβανομένης και της αγωνίας των υποψήφιων ζευγαριών για τεκνοποίηση.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΞΕΝΗ:

- ❖ Akinin-Seifer IE, Lejeune H, Touraine RL, Levy R. (2004). Y chromosome microdeletion screening in infertile men in France: a survey of French practice based on 88 IVF centres. *Hum Reprod.* 19:788-93.
- ❖ Al-Hassan S, Hellani A, Al-Shahrani A, Al-Deery M, Jaroudi K, Coskun S. (2005). Sperm chromosomal abnormalities in patients with unexplained recurrent abortions. *Arch Androl* 51:69–76.
- ❖ Andersson M, Page DC, Pettay D, et al. (1988). Y; autosome translocations and mosaicism in the aetiology of 45, X maleness: assignment of fertility factor to distal Yq11. *Hum Genet.* 79:2–7.
- ❖ Barbaux S, Vilain E, Raoul O, et al. (1995). Proximal deletions on the long arm of the Y chromosome suggest a critical region associated with a specific subset of characteristic Turner stigmata. *Hum Mol Genet.* 4:1565–1568.
- ❖ Bardoni B, Zuffardi O, Guioli S, et al. (1991). A deletion map of the human Yq11 region: implications for the evolution of the Y chromosome and tentative mapping of a locus involved in spermatogenesis. *Genomics.* 11:443–451.
- ❖ Bellver J., Meseguer M., Muriel L., Garcia-Herrero S., Barreto M.A.M., Garda A.L, Remohi J., Pellicer A. and Garrido N. (2010). Y chromosome microdeletions, sperm DNA fragmentation and sperm oxidative stress as causes of recurrent spontaneous abortion of unknown etiology. *Human Reproduction.* 25:1713–1721.
- ❖ Bernardini LM, Calogero AE, Bottazzi C, Lanteri S, Venturini PL, N, De Palma A, Conte N, Ragni N. (2005). Low total normal motile count values are associated with increased sperm disomy and diploidy rates in infertile patients. *Int J Androl* 28:328–336.
- ❖ Bhattacharya SM. (2008). Association of various sperm parameters with unexplained repeated early pregnancy loss—which is most important? *Int Urol Nephrol* 40:391–395.
- ❖ Bor P., Hindkjaer J., Ingerslev H.J. and Kolvraar S. (2001). Multiplex PCR for Screening of Microdeletions on the Y Chromosome. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics.* 18: 291-298.

- ❖ Brown GM, Furlong RA, Sargent CA, et al. (1998). Characterisation of the coding sequence and fine mapping of the human DFFRY gene and comparative expression analysis and mapping to the Sxrb interval of the mouse Y chromosome of the Dffry gene. *Hum Mol Genet.* 7:97-107.
- ❖ Carrell DT, Wilcox AL, Lowy L, Peterson CM, Jones KP, Erickson L, Campbell B, Branch DW, Hatasaka HH. (2003b). Elevated sperm chromosome aneuploidy and apoptosis in patients with unexplained recurrent pregnancy loss. *Obstet Gynecol* 101:1229–1235.
- ❖ Cram DS, Ma K, Bhasin S, et al. (2000). Y chromosome analysis of infertile men and their sons conceived through intracytoplasmic sperm injection: vertical transmission of deletions and rarity of de novo deletions. *Fertil Steril.* 74:909-15.
- ❖ Cram DS, Osborne E, McLachlan RI. (2006). Y chromosome microdeletions: implications for assisted conception. *Med J Aust.* 185:433-4.
- ❖ Dewan S, Puscheck EE, Coulam CB, Wilcox AJ, Jeyendran RS. (2006). Y-chromosome microdeletions and recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril.* 85:441-5.
- ❖ Ellison J, Li X, Francke U, et al. (1996). Rapid evolution of pseudoautosomal genes and their mouse homologs. *Mammal Genome.* 7:250–230.
- ❖ Ferguson-Smith MA, Affara NA, Magenis RE. (1987). Ordering of Y-specific sequences by deletion mapping and analysis of X-Y interchange males and females. *Development Suppl.* 101:41–50.
- ❖ Ferlin A, Moro E, Rossi A, Dallapiccola B, Foresta C. (2003). The human Y chromosome's azoospermia factor b (AZFb) region: sequence, structure, and deletion analysis in infertile men. *J Med Genet.* 40:18-24.
- ❖ Fernandes S, Paracchini S, Meyer LH, Floridia G, Tyler-Smith C, Vogt PH. (2004). A large AZFc deletion removes DAZ3/DAZ4 and nearby genes from men in Y haplogroup N. *Am J Hum Genet.* 74:180-7.
- ❖ Fernandes AT, Fernandes S, Goncalves R, et al. (2006). DAZ gene copies: evidence of Y chromosome evolution. *Mol Hum Reprod.* 12:519-23.
- ❖ Foresta C, Ferlin A, Garolla A, et al. (1998). High frequency of well-defined Y-chromosome deletions in idiopathic Sertoli cell-only syndrome. *Hum Reprod.* 13:302-7.
- ❖ Foresta C, Ferlin A, Moro E. (2000). Deletion and expression analysis of AZFa genes on the human Y chromosome revealed a major role for DBY in male infertility. *Hum Mol Genet.* 9:1161-9.

- ❖ Foresta C, Moro E, Ferlin A. Y chromosome microdeletions and alterations of spermatogenesis. (2001). *Endocr Rev.* 22:226-39.
- ❖ Georgiou I, Syrrou M, Pardalidis N, et al. (2006). Genetic and epigenetic risks of intracytoplasmic sperm injection method. *Asian J Androl.* 8:643-73.
- ❖ Giachini C, Guarducci E, Longepied G, et al. (2005). The gr/gr deletion(s): a new genetic test in male infertility? *J Med Genet.* 42:497-502.
- ❖ Giltay JC, Kastrop PM, Tuerlings JH, et al. (1999). Subfertile men with constitutive chromosome abnormalities do not necessarily refrain from intracytoplasmic sperm injection treatment: a follow-up study on 75 Dutch patients. *Hum Reprod.* 14:318-20.
- ❖ Harper J, Sermon K, Geraedts J, Vesela K, Harton G, Thornhill A, Pehlivan T, Fiorentino F, SenGupta S, de Die-Smulders C et al. (2008). What next for preimplantation genetic screening? *Hum Reprod* 23:478–480.
- ❖ Hayashi K., Ohta H., Kurimoto K., Aramaki S. and Saitou M. (2011). Reconstitution of the mouse germ cell specification pathway in culture by pluripotent stem cells. *Cell*, 146: 519-532.
- ❖ Hopps CV, Mielnik A, Goldstein M, Palermo GD, Rosenwaks Z, Schlegel PN. (2003). Detection of sperm in men with Y chromosome microdeletions of the AZFa, AZFb and AZFc regions. *Hum Reprod.* 18:1660-5.
- ❖ Jacobs PA, Strongs JA. (1959). A case of human intersexuality having a possible XXY sex determining mechanism. *Nature.* 183:302–303.
- ❖ Kaare M, Painter JN, Ulander VM, Kaaja R, Aittomaki K. (2008). Sex chromosome characteristics and recurrent miscarriage. *Fertil Steril* 90:2328–2333.
- ❖ Kamp C, Hirschmann P, Voss H, Huellen K, Vogt PH. (2000). Two long homologous retroviral sequence blocks in proximal Yq11 cause AZFa microdeletions as a result of intrachromosomal recombination events. *Hum Mol Genet.* 9:2563-72.
- ❖ Karaer A, Karaer K, Ozaksit G, Ceylaner S, Percin EF. (2008). Y chromosome azoospermia factor region microdeletions and recurrent pregnancy loss. *Am J Obstet Gynecol* 199:662.e1–662.e5.
- ❖ Katagiri Y, Neri QV, Takeuchi T, et al. (2004). Y chromosome assessment and its implications for the development of ICSI children. *ReprodBiomedOnline.*8:307-18
- ❖ Kent-First M, Muallem A, Shultz J, et al. (1999). Defining regions of the Y-chromosome responsible for male infertility and identification of a fourth AZF region (AZFd) by Y-chromosome microdeletion detection. *Mol. Reprod Dev.* 53:27-41.

- ❖ Kleiman SE, Lagziel A, Yogev L, Botchan A, Paz G, Yavetz H. (2001). Expression of CDY1 may identify complete spermatogenesis. *Fertil Steril.* 75:166-73.
- ❖ Kleiman SE, Yogev L, Hauser R, et al. (2007). Expression profile of AZF genes in testicular biopsies of azoospermic men. *Hum Reprod.* 22:151-8.
- ❖ Kojima Y, Kurokawa S, Mizuno K, Umemoto Y, Sasaki S, Hayashi Y and Kohri K. (2008). Gene transfer to sperm and testis: Future prospects of gene therapy for male infertility. *Current Gene Therapy*, 8:121-134.
- ❖ Krausz, C. & McElreavey, K. (1999) Y chromosome and male infertility. *Frontiers in Bioscience* 4, E1–E8.
- ❖ Krausz, C., Bussani-Mastellone, C., Granchi, S., McElreavey, K., Scarselli, G. & Forti, G. (1999) Screening for microdeletions of Y chromosome genes in patients undergoing intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction* 14, 1717–21.
- ❖ Krausz C, Quintana-Murci L, McElreavey K. (2000). Prognostic value of Y deletion analysis: what is the clinical prognostic value of Y chromosome microdeletion analysis? *Hum Reprod.* 15:1431-4.
- ❖ Krausz, C., Rajpert-De Meyts, E., Larsen, L. F., Quintana-Murci, L., McElreavey, K. & Skakkebaek, N. (2001) Double blind screening for microdeletions of Y chromosome genes in infertile and fertile/normospermic Danish men. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 86, 2638–2642.
- ❖ Krausz C, Forti G, McElreavey K. (2003). The Y chromosome and male fertility and infertility. *Int J Androl.* 26:70-5.
- ❖ Krausz C, Degl'Innocenti S, Nuti F, et al. (2006). Natural transmission of USP9Y gene mutations: a new perspective on the role of AZFa genes in male fertility. *Hum Mol Genet.* 15:2673-81.
- ❖ Kuroda-Kawaguchi T, Skaletsky H, Brown LG, et al. (2001). The AZFc region of the Y chromosome features massive palindromes and uniform recurrent deletions in infertile men. *Nat Genet.* 29:279-86.
- ❖ Land JA, Evers JL. (2003). Risks and complications in assisted reproduction techniques: Report of an ESHRE consensus meeting. *Hum Reprod.* 18:455-7.
- ❖ Lardone MC, Parodi DA, Valdevenito R, Ebensperger M, Piottante A, Madariaga M, Smith R, Pommer R, Zambrano N, Castro A. (2007). Quantification of DDX3Y, RBMY1, DAZ and TSPY mRNAs in testes of patients with severe impairment of spermatogenesis. *Mol Hum Reprod* 13:705–712.

- ❖ Lee SH, Ahn SY, Lee KW, Kwack K, Jun HS, Cha KY. (2006). Intracytoplasmic sperm injection may lead to vertical transmission, expansion, and de novo occurrence of Y-chromosome microdeletions in male fetuses. *Fertil Steril.* 85:1512-5.
- ❖ Lu HY, Cui YX, Xia XY, Shi YC, Yang B, Shao Y, Ge YF, Yao B, Li XJ, Huang YF. (2008). AZF microdeletions are not related with recurrent spontaneous abortion. *Zhonghua Nan Ke Xue* 14:1099–1102.
- ❖ Luddi A, Margollicci M, Gambera L, Serafini F, Cioni M, De Leo V, Balestri P, Piomboni P. (2009). Spermatogenesis in a man with complete deletion of USP9Y. *N Engl J Med* 360:881–885.
- ❖ Machev N, Saut N, Longepied G, et al. (2004). Sequence family variant loss from the AZFc interval of the human Y chromosome, but not gene copy loss, is strongly associated with male infertility. *J Med Genet.* 41:814-25.
- ❖ McElreavey K, Ravel C, Chantot-Bastarud S, Siffroi JP. (2006). Y chromosome variants and male reproductive function. *Int J Androl.* 29:298-303.
- ❖ Muslumanoglu MH, Turgut M, Cilingir O, Can C, Ozyurek Y, Artan S. (2005). Role of the AZFd locus in spermatogenesis. *Fertil Steril.* 84:519-22.
- ❖ Noordam MJ, van der Veen F, Repping S. (2006). Techniques and reasons to remain interested in the Y chromosome. *Fertil Steril.* 86:1801-2.
- ❖ Oates RD, Silber S, Brown LG, Page DC. (2002). Clinical characterization of 42 oligospermic or azospermic men with microdeletion of the AZFc region of the Y chromosome, and of 18 children conceived via ICSI. *Hum Reprod.* 17:2813-24.
- ❖ Page DC. (1988). Is ZFY the sex-determining gene on the human Y chromosome? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 322:155–157.
- ❖ Page DC, Silber S, Brown LG. (1999). Men with infertility caused by AZFc deletion can produce sons by intracytoplasmic sperm injection, but are likely to transmit the deletion and infertility. *Hum Reprod.* 14:1722-6.
- ❖ Pang MG, Kim YJ, Lee SH, Kim CK. (2005). The high incidence of meiotic errors increases with decreased sperm count in severe male factor infertilities. *Hum Reprod* 20:1688–1694.
- ❖ Patsalis PC, Sismani C, Quintana-Murci L, Taleb- Bekkouche F, Krausz C, McElreavey K. (2002). Effects of transmission of Y chromosome AZFc deletions. *Lancet.* 360:1222-4.
- ❖ Poongothai J, Gopenath T S, Manonayaki S. (2009). Genetics of human male infertility. *Singapore Med J* 50(4) : 336.

- ❖ Porter TF, Scott JR. (2005). Evidence-based care of recurrent miscarriage. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 19:85–101.
- ❖ Quintana-Murci L. and Fellous M. (2001). The human Y chromosome: the biological role of a “functional wasteland”. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 1:18-24.
- ❖ Rai R, Regan L. (2006). Recurrent miscarriage. *Lancet* 368:601–611.
- ❖ Rao E, Weiss B, Fukami M, et al. (1997). Pseudoautosomal deletions encompassing a novel gene cause growth failure in idiopathic short stature and Turner syndrome. *Nat Genet*. 16:54–63.
- ❖ Reijo R, Lee TY, Salo P, et al. (1995). Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene. *Nat Genet*. 10:383-93.
- ❖ Repping S, Skaletsky H, Lange J, et al. (2002). Recombination between palindromes P5 and P1 on the human Y chromosome causes massive deletions and spermatogenic failure. *Am J Hum Genet*. 71: 906-22.
- ❖ Repping S, Skaletsky H, Brown L, et al. (2003). Polymorphism for a 1.6-Mb deletion of the human Y chromosome persists through balance between recurrent mutation and haploid selection. *Nat Genet*. 35:247-51.
- ❖ Repping S, van Daalen SK, Korver CM, et al. (2004). A family of human Y chromosomes has dispersed throughout northern Eurasia despite a 1.8-Mb deletion in the azoospermia factor c region. *Genomics*. 83:1046-52.
- ❖ Rubio C, Gil-Salom M, Simon C, Vidal F, Rodrigo L, Minguez Y, Remohi J, Pellicer A. (2001). Incidence of sperm chromosomal abnormalities in a risk population: relationship with sperm quality and ICSI outcome. *Hum Reprod* 16:2084–2092.
- ❖ Rucker GB, Mielnik A, King P, Goldstein M, Schlegel PN. (1998). Preoperative screening for genetic abnormalities in men with nonobstructive azoospermia before testicular sperm extraction. *J Urol*. 160:2068-71.
- ❖ Sadeghi-Nejad H and Farrokhi F. (2007). Genetics of Azoospermia: Current Knowledge, Clinical Implications, and Future Directions. Part II: Y Chromosome Microdeletions. *Urology Journal*, 4: 192-206.
- ❖ Sato Y, Yoshida K, Shinka T, Nozawa S, Nakahori Y, Iwamoto T. (2006). Altered expression pattern of heat shock transcription factor, Y chromosome (HSFY) may be related to altered differentiation of spermatogenic cells in testes with deteriorated spermatogenesis. *Fertil Steril*. 86:612-8.

- ❖ Shinka T, Sato Y, Chen G, et al. (2004). Molecular characterization of heat shock-like factor encoded on the human Y chromosome, and implications for male infertility. *Biol Reprod.* 71:297-306.
- ❖ Siffroi JP, Le Bourhis C, Krausz C, et al. (2000). Sex chromosome mosaicism in males carrying Y chromosome long arm deletions. *Hum Reprod.* 15:2559-62.
- ❖ Simoni M, Gromoll J, Dworniczak B, et al. (1997). Screening for deletions of the Y chromosome involving the DAZ (Deleted in AZoospermia) gene in azoospermia and severe oligozoospermia. *Fertil Steril.* 67:542-7.
- ❖ Simoni M., Bakker E. and Krausz C. (2004). EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of y-chromosomal microdeletions. State of the art 2004. *International Journal of Andrology*, 27:240–249.
- ❖ Simoni M, Tuttelmann F, Gromoll J, Nieschlag E (2008). Clinical consequences of microdeletions of the Y chromosome: the extended Munster experience. *Reprod Biomed Online* 16:289–303.
- ❖ Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, et al. (1990). A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature.* 346:240–244.
- ❖ Skaletsky H, Kuroda-Kawaguchi T, Minx PJ, et al. (2003). The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature.* 423:825-37.
- ❖ Stouffs K, Lissens W, Verheyen G, Van Landuyt L, Goossens A, Tournaye H, Van Steirteghem A, Liebaers I (2004) Expression pattern of the Y-linked PRY gene suggests a function in apoptosis but not in spermatogenesis. *Mol Hum Reprod* 10:15–21
- ❖ Sun C, Skaletsky H, Birren B, et al. (1999). An azoospermic man with a de novo point mutation in the Y-chromosomal gene USP9Y. *Nat Genet.* 23:429-32.
- ❖ Tiepolo L, Zuffardi O. (1976). Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm. *Hum Genet.* 34:119-24.
- ❖ van Golde RJ, Wetzels AM, de Graaf R, Tuerlings JH, Braat DD, Kremer JA. (2001). Decreased fertilization rate and embryo quality after ICSI in oligozoospermic men with microdeletions in the azoospermia factor c region of the Y chromosome. *Hum Reprod.* 16:289-92.
- ❖ Vergnaud G, Page DC, Simmler MC, et al. (1986). A deletion map of the human Y chromosome based on DNA hybridization. *Am J Hum Genet.* 38:109–124.

- ❖ Vogt PH, Edelmann A, Kirsch S, et al. (1996). Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11. *Hum Mol Genet.* 5:933-43.
- ❖ Vogt PH. AZF deletions and Y chromosomal haplogroups: history and update based on sequence. (2005). *Hum Reprod Update.* 11:319-36.
- ❖ Vogt PH., Falcao CL., Hanstein R., Zimmer J., (2008). The AZF proteins. *Int J Androl* 31:383-394.
- ❖ Vollrath D, Foote S, Hilton A, et al. The human Y chromosome: a 43-interval map based on naturally occurring deletions. (1992) *Science.* 258:52-9.
- ❖ Yen P. (2001). The fragility of fertility. *Nat Genet.* 29:243-4.
- ❖ Zhang F, Li Z, Wen B, et al. (2006). A frequent partial AZFc deletion does not render an increased risk of spermatogenic impairment in East Asians. *Ann Hum Genet.* 70:304-13.
- ❖ Zhang F, Lu C, Li Z, et al. (2007). Partial deletions are associated with an increased risk of complete deletion in AZFc: a new insight into the role of partial AZFc deletions in male infertility. *J Med Genet.* 44:437-44.

ΗΑΕΚΤΡΟΝΙΚΗ:

www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed