



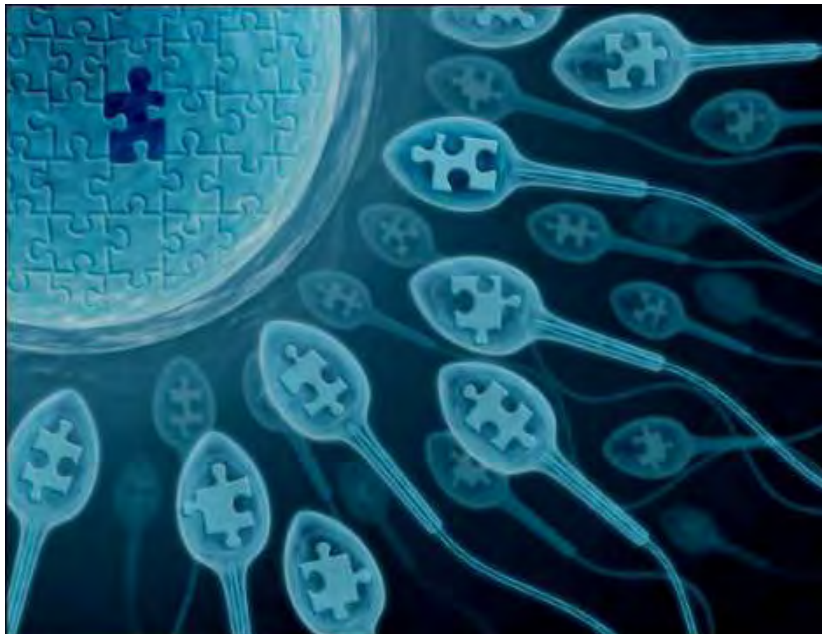
**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

Διπλωματική εργασία

**Διερεύνηση και ανάλυση μικροελλειμμάτων στο χρωμόσωμα Y  
υπογόνιμων ανδρών**

**Microdeletions in Y chromosome and their association with male  
infertility**

*ΛΕΜΟΝΙΑ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ*



Λάρισα 2018

## Τριμελής Επιτροπή

- ΜΑΜΟΥΡΗΣ ΖΗΣΗΣ

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

- ΣΑΡΑΦΙΔΟΥ ΘΕΟΛΟΓΙΑ

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

- ΣΤΑΜΑΤΗΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ

Διδάκτορας - Μέλος του Εργαστηριακού Διδακτικού Προσωπικού και Ειδικού Επιστημονικού Προσωπικού του τμήματος Βιοχημείας - Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

## Ευχαριστίες

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

Αρχικά, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον Καθηγητή κ. Μαμούρη Ζήση για την ανάθεση του θέματος, το ενδιαφέρον αλλά και τον πολύτιμο χρόνο που αφιέρωσε για την πραγματοποίηση της πτυχιακής μου εργασίας, καθώς και για όλες τις χρήσιμες συμβουλές και τη διαρκή καθοδήγηση του, που συνέβαλαν στην οργάνωση και τη διεκπεραίωση των πειραμάτων.

Ακόμη, ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στην υποψήφια διδάκτορα Μαρκαντώνη Μαρία για την υπομονή, την πολύτιμη βοήθεια, καθώς και για το χρόνο που διέθεσε για την εκπαίδευσή μου κατά την εκτέλεση του πειραματικού μέρους, αλλά και για τις συμβουλές της σχετικά με τη συγγραφή της συγκεκριμένης εργασίας.

Παράλληλα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επίκουρο Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών κα. Σαραφίδου Θεολογία και το διδάκτορα Σταμάτη Κωνσταντίνο για τη συμμετοχή τους στην τριμελή συμβουλευτική επιτροπή.

Συγχρόνως, θα ήθελα να απευθύνω τις ευχαριστίες μου στη μονάδα υποβοηθούμενης αναπαραγωγής Embryolab για την άψογη συνεργασία και την παροχή των δειγμάτων.

Επιπροσθέτως, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας.

Ένα τελευταίο ευχαριστώ στους γονείς μου για όλα όσα μου έχουν προσφέρει κατά τη διάρκεια των σπουδών μου και στον αδερφό μου, Αντώνη, για την αμέριστη υποστήριξή του σε κάθε μου επιλογή.

## Περιεχόμενα

Περίληψη.....	7
Abstract.....	8
1. Εισαγωγή .....	9
1.1 Η οργάνωση του γενετικού υλικού σε χρωμοσώματα .....	9
1.2 Η εξέλιξη του χρωμοσώματος Y .....	10
1.3 Η ιστορία και η χαρτογράφηση του χρωμοσώματος Y.....	11
1.4 Η δομή και η οργάνωση του χρωμοσώματος Y.....	12
1.5 Ο καθορισμός και η διαφοροποίηση του φύλου στον άνθρωπο .....	14
1.6 Τα γονίδια του χρωμοσώματος Y .....	15
1.7 Σπερματογένεση .....	19
1.8 Τα στάδια της σπερματογένεσης .....	20
1.9 Ο σχηματισμός και τα συστατικά του σπερματοζωαρίου .....	21
1.10 Η παραγωγή σπέρματος .....	22
1.11 Η Ακροσωμική Αντίδραση .....	22
1.12 Ανδρική υπογονιμότητα .....	23
1.12.1 Ανάλυση σπέρματος .....	24
1.12.2 Ταξινόμηση της ανδρικής υπογονιμότητας .....	27
1.13 Αίτια της ανδρικής υπογονιμότητας .....	28
1.13.1 Γενετικές ανωμαλίες .....	28
1.13.2 Χρωμόσωμα Y .....	29
1.13.3 Περιοχές AZF (azoospermia factor) .....	30
1.13.4 Περιοχή AZFa .....	30
1.13.5 Περιοχή AZFb .....	31
1.13.6 Περιοχή AZFc .....	322

1.13.7	Γονιδιακές διαταραχές - Πολυμορφισμοί .....	34
1.13.8	Συγγενείς και επίκτητες ανωμαλίες .....	35
1.14	Η αντιμετώπιση της υπογονιμότητας.....	35
1.14.1	Εξωσωματική γονιμοποίηση (IVF/ in vitro fertilization) .....	35
1.14.2	Ενδοκυτταροπλασματική Σπερματέγχυση (ICSI/ Intracytoplasmic sperm injection) .....	36
	Σκοπός:.....	37
2.	Υλικά και Μέθοδοι.....	38
2.1	Βιολογικό υλικό.....	38
2.2	Απομόνωση γονιδιωματικού DNA .....	39
2.2.1	Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από σπέρμα.....	39
2.2.2	Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από αίμα .....	40
2.3	Χειρισμοί νουκλεϊκών οξέων .....	400
2.3.1	Εκχύλιση με φαινόλη/χλωροφόρμιο .....	40
2.3.2	Κατακρήμνιση νουκλεϊκών οξέων με αιθανόλη.....	41
2.4	Ποσοτικός προσδιορισμός του DNA .....	42
2.4.1	Με χρήση φασματοφωτομέτρου.....	422
2.4.2	Με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.....	422
2.5	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR.....	43
2.5.1	Αρχή της μεθόδου .....	43
2.5.2	Στάδια της αντίδρασης.....	43
2.6	Χρήσεις δεικτών STS markers.....	45
2.7	Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης .....	47
3.	Αποτελέσματα .....	49
3.1	PCR ενίσχυση των υπό μελέτη τόπων .....	49
3.2	Γονίδια της AZFa περιοχής.....	49

3.3	Γονίδια της AZFb περιοχής.....	50
3.4	Γονίδια της AZFc περιοχής .....	51
	Συζήτηση.....	53
3		
	Βιβλιογραφία.....	57

## Περίληψη

Στις μέρες μας, η υπογονιμότητα αποτελεί ένα σοβαρό πρόβλημα της δημόσιας υγείας, που μπορεί να οδηγήσει σε ποικίλα οικονομικά, ψυχολογικά, αλλά και κοινωνικά προβλήματα. Πιο συγκεκριμένα, περίπου το 15% των ζευγαριών παρουσιάζει δυσκολία ή αδυναμία να αποκτήσει παιδιά, όπου το 30% - 50% των περιπτώσεων οφείλεται στον ανδρικό παράγοντα. Τα προβλήματα γονιμότητας μπορεί να σχετίζονται με μια σειρά σωματικών, γενετικών, περιβαλλοντικών αλλά και άλλων παραγόντων, που παραμένουν άγνωστοι μέχρι σήμερα. Οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες αποτελούν σημαντική αιτία της ανδρικής υπογονιμότητας, αλλά δεν είναι η μοναδική. Τα φυλετικά χρωμοσώματα (ΧΧ/ΧΥ) παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον σχετικά με το συγκεκριμένο πρόβλημα, καθώς τα αρσενικά άτομα (ΧΥ) έχουν ένα μοναδικό αντίγραφο και των δύο χρωμοσωμάτων. Το χρωμόσωμα Υ, ειδικότερα, μπορεί να καθορίσει την ανδρική γονιμότητα, διότι περιέχει πολλά από τα γονίδια που είναι απαραίτητα για τη σπερματογένεση και την ανάπτυξη των αρσενικών γονάδων. Μικροελλείμματα σε γονίδια των τριών περιοχών AZF (Azoospermia-Factor: AZFa, AZFb, AZFc) του χρωμοσώματος Υ θεωρούνται επίσης κοινή αιτία της ανδρικής υπογονιμότητας και έχουν συσχετιστεί με μειωμένη γονιμότητα, αδυναμία σπερματογένεσης και ωρίμανσης των γαμετικών κυττάρων. Στην παρούσα εργασία, πραγματοποιήθηκε μελέτη των μικροελλειμμάτων του Υ χρωμοσώματος σε ένα σύνολο υπογόνιμων ανδρών αλλά και ατόμων με φυσιολογικό φαινότυπο σπέρματος. Χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) , για να ενισχυθούν ορισμένα STSs (Sequence-Tagged Sites) στις τρεις περιοχές AZF του χρωμοσώματος Υ, όμως δεν ανιχνεύτηκαν μικροελλείμματα σε κανέναν από τους υπογόνιμους άνδρες. Τέλος, η διερεύνηση πιθανών μικροελλειμμάτων πέρα από το γεγονός ότι είναι άκρως σημαντική, ίσως συμβάλλει στην κατανόηση των μοριακών μηχανισμών, στους οποίους βασίζεται η ανδρική υπογονιμότητα, ενώ μπορεί να οδηγήσει σε μία έγκαιρη διάγνωση, στην κατάλληλη αντιμετώπιση και σε μια επιτυχής κύηση.

## Abstract

Nowadays, infertility is a major public health problem, which can lead to economic, social and psychological problems. Approximately, 15 % of couples have difficulty or are unable to conceive, whereas, from 30 % to 50 % of infertility cases are due to a male factor. Fertility problems may be associated with a range of physical, genetic, environmental and other factors, that still remain unknown. Chromosomal abnormalities are considered as one of the most important causes of male infertility, but not as the only ones. Sex chromosomes (XX/XY) are particularly interesting, as males (XY) have only a single copy of both chromosomes. The Y chromosome is obviously, an area of interest in the study of male-factor infertility, because it contains many of the genes that are necessary for spermatogenesis and the development of male gonads. Microdeletions in the three AZF regions (Azoospermia Factor: AZFa, AZFb, AZFc) of Y chromosome are a common cause of male infertility and they are associated with reduced fertility, aberrant sperm production and germ cell maturation. In the current thesis, a study of the Y chromosome and specifically the AZFa, b & c regional microdeletions, was carried out, in order to identify potential differences between fertile and infertile individuals. The study was performed using PCR (Polymerase Chain Reaction) in order to amplify certain STSs (Sequence-Tagged Sites) in the three AZF regions of the Y chromosome, however, no microdeletions were detected in the infertile individuals. Lastly, this study, except for being a remarkable research, indicates that the investigation of potential Y chromosome microdeletions is very important and it may contribute in the understanding of the molecular mechanisms of male infertility, leading to an early diagnosis, a proper solution and a successful pregnancy.



# 1. Εισαγωγή

## 1.1 Η οργάνωση του γενετικού υλικού σε χρωμοσώματα

Στα ευκαρυωτικά κύτταρα το μεγαλύτερο μέρος του DNA εντοπίζεται συνδεδεμένο με πρωτεΐνες μέσα στα χρωμοσώματα. Τα χρωμοσώματα είναι στοιχεία του ευκαρυωτικού κυττάρου και κατά τη διάρκεια της μεσόφασης βρίσκονται μέσα στον πυρήνα.

Το γενετικό υλικό των ευκαρυωτών είναι μοιρασμένο σε πολλά χρωμοσώματα. Οι περισσότεροι διαθέτουν δύο αντίγραφα για καθένα από τα χρωμοσώματά τους, εκ των οποίων το ένα είναι μητρικής και το άλλο πατρικής προέλευσης και για το λόγο αυτό ονομάζονται διπλοειδείς ( $2n$ ). Οι γαμέτες όλων των ευκαρυωτών, δηλαδή τα κύτταρα που παίρνουν μέρος στην αναπαραγωγή, διαθέτουν μόνο ένα αντίγραφο των χρωμοσωμάτων τους και ονομάζονται απλοειδείς ( $n$ ). Στα διπλοειδή κύτταρα τα δύο χρωμοσώματα ενός ζεύγους ονομάζονται ομόλογα (κάθε χρωμόσωμα του ζεύγους είναι ένα ομόλογο), ενώ χρωμοσώματα που ανήκουν σε διαφορετικά ζεύγη είναι μη ομόλογα.

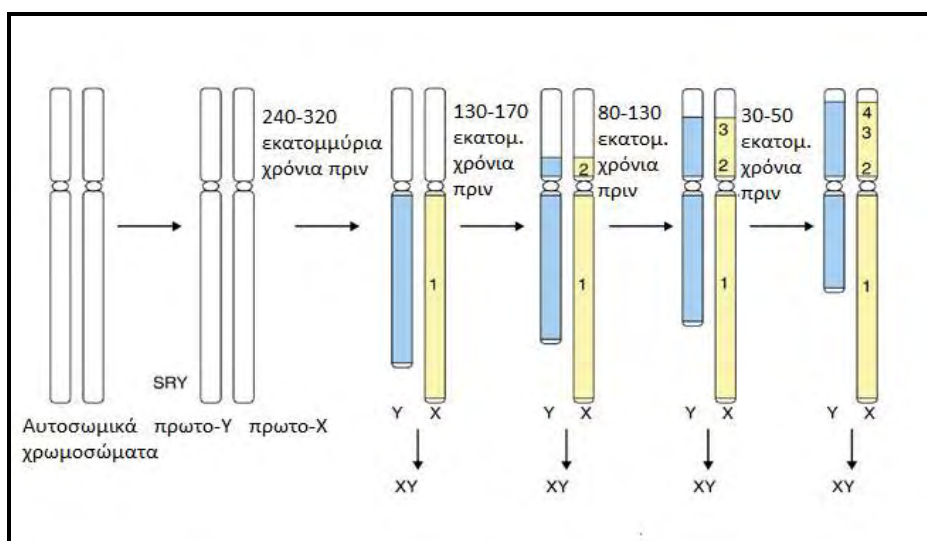
Στα κύτταρα των ευκαρυωτών ο αριθμός, το μέγεθος και το σχήμα των μεταφασικών χρωμοσωμάτων συνιστούν τον καρυότυπο, που είναι μοναδικός για κάθε είδος. Στην πλειοψηφία των ζώων ο καρυότυπος των αρσενικών διαφέρει από τον καρυότυπο των θηλυκών, εξαιτίας του ζεύγους των φυλετικών χρωμοσωμάτων XY και XX αντίστοιχα, τα οποία καθορίζουν το φύλο. Ο καρυότυπος των αυτοσωμικών χρωμοσωμάτων ή αυτοσωμάτων, δηλαδή το σύνολο των χρωμοσωμάτων εκτός των φυλετικών, δε διαφέρει σε άτομα του ίδιου είδους (εξαιρέση αποτελούν άτομα που πάσχουν από χρωμοσωμική ανωμαλία), αλλά είναι διαφορετικός μεταξύ των διαφόρων ειδών. Ο άνθρωπος έχει 46 χρωμοσώματα, οργανωμένα σε 22 ζεύγη αυτοσωμικών χρωμοσωμάτων, συν τα δύο φυλετικά χρωμοσώματα [(XX για τη γυναίκα και XY για τον άνδρα) (1)].

## 1.2 Η εξέλιξη του χρωμοσώματος Y

Το χρωμόσωμα Y στον άνθρωπο εμφανίζει μεγάλο ενδιαφέρον για τους ερευνητές, λόγω του ρόλου του στον καθορισμό του φύλου και της ασυνήθιστης εξελικτικής ιστορίας του. Το χρωμόσωμα Y έχει προέλθει από ένα αυτοσωμικό χρωμόσωμα και η εξέλιξή του χαρακτηρίζεται από μεγάλη γονιδιακή αποσύνθεση (2).

Το ανθρώπινο χρωμόσωμα Y είναι μικρό και περιλαμβάνει μικρότερο αριθμό γονιδίων σε σχέση με το χρωμόσωμα X, το οποίο περιέχει αρκετές χιλιάδες γονίδια. Τα δύο αυτά χρωμοσώματα προέρχονται από ένα ομόλογο ζεύγος αυτοσωμικών χρωμοσωμάτων .

Ωστόσο, τα χρωμοσώματα X και Y έχουν εξελιχθεί με πολύ διαφορετικό τρόπο. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι το ζεύγος αυτοσωμικών χρωμοσωμάτων που τελικά διαφοροποιήθηκε στα φυλετικά χρωμοσώματα απέκτησε το ρόλο καθορισμού του φύλου και η καταστολή του ανασυνδυασμού μεταξύ των προγονικών χρωμοσωμάτων Y και X τους επέτρεψε να εξελιχθούν ανεξάρτητα. Το χρωμόσωμα X μπορεί να ανασυνδυαστεί στις γυναίκες, αφού και τα δύο χρωμοσώματα X μπορούν να ζευγαρώσουν, κάτι το οποίο δεν μπορεί να συμβεί στο χρωμόσωμα Y. Συνεπώς, η έλλειψη ανασυνδυασμού του μεγαλύτερου μέρους του χρωμοσώματος Y δείχνει ότι η φυσική επιλογή είναι λιγότερο αποτελεσματική στην πρόληψη της συσσώρευσης επιβλαβών μεταλλάξεων, οδηγώντας στη γενετική διάβρωση του χρωμοσώματος Y . Για να εξισωθεί όμως η γονιδιακή δόση από X-συνδεδεμένους τόπους στους άνδρες και τις γυναίκες σε πολλά θηλαστικά, πραγματοποιείται η αποσιώπηση ενός από τα δύο χρωμοσώματα X στα θηλυκά άτομα (3).



Εικόνα 1: Η εξέλιξη του χρωμοσώματος Y με την πάροδο του χρόνου, λόγω της έλλειψης ανασυνδυασμού (3).

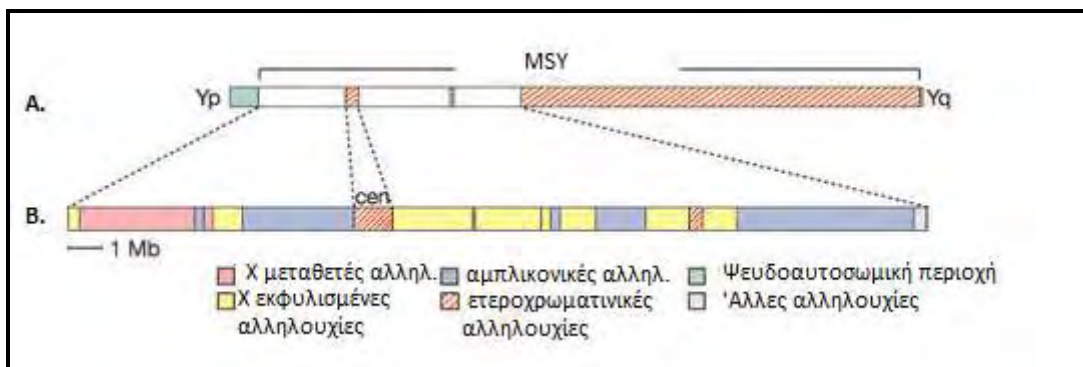
### 1.3 Η ιστορία και η χαρτογράφηση του χρωμοσώματος Y

Το ιστορικό της ανθρώπινης έρευνας του χρωμοσώματος Y μπορεί να χωριστεί σε τρεις εποχές. Η πρώτη εποχή επικεντρώθηκε στην εξέταση των ανθρώπινων γενεαλογικών δέντρων σύμφωνα με τον Mendel. Στις πρώτες δεκαετίες του εικοστού αιώνα, οι ερευνητές που υποστήριζαν τη θεωρία του Mendel παρατήρησαν τους εξής τρόπους κληρονόμησης στο ανθρώπινο είδος: αυτοσωματικό υπολειπόμενο, αυτοσωματικό επικρατή, φυλοσύνδετο επικρατή και φυλοσύνδετο υπολειπόμενο τρόπο κληρονόμησης. Ταυτόχρονα, άλλοι μελετητές επεδίωκαν να προσδιορίσουν τον τρόπο κληρονόμησης χαρακτηριστικών που μεταβιβάζονταν από τον πατέρα στο γιο, ενώ άλλες μελέτες των ανθρώπινων κυττάρων με τη βοήθεια μικροσκοπίου παρείχαν ενδείξεις για την ύπαρξη ενός χρωμοσώματος που εμφανιζόταν μόνο στους άνδρες.

Στη δεύτερη εποχή κατά τη δεκαετία του 1950, ο Stern βρήκε τις κρίσιμες ατέλειες σε κάθε μία από τις προηγούμενες γενεαλογικές μελέτες και ανακάλυψε τουλάχιστον 17 χαρακτηριστικά που σχετίζονται με το χρωμόσωμα Y. Το 1959, η μελέτη του Jacobs για τα αρσενικά άτομα με σύνδρομο Klinefelter (XXY) και η έρευνα του Ford για τις γυναίκες με σύνδρομο Turner (X0) έδειξαν ότι το χρωμόσωμα Y φέρει ένα βασικό γονίδιο που καθορίζει το φύλο (4). Στη δεκαετία του 1960, ο Ohno πρότεινε ότι τα χρωμοσώματα X και Y θηλαστικών είχαν εξελιχθεί από ένα ζεύγος αυτοσωμικών χρωμοσωμάτων. Ο Ohno θεωρούσε ότι το χρωμόσωμα X είχε διατηρήσει την περιεκτικότητα γονιδίων του προγονικού αυτοσωμικού χρωμοσώματος, ενώ το χρωμόσωμα Y είχε χάσει την πλειοψηφία των γονιδίων του, διατηρώντας όμως το γονίδιο που εμπλέκεται στον καθορισμό του φύλου. Έτσι προέκυψε η κατανόηση του ανθρώπινου χρωμοσώματος Y ως ένα εκφυλισμένο χρωμόσωμα X (5).

Το χαρακτηριστικό γνώρισμα της τρίτης εποχής ήταν η εφαρμογή του ανασυνδυασμένου DNA και των εφαρμογών αλληλούχησης στο χρωμόσωμα Y, με αποκορύφωμα τα βασισμένα σε μοριακές τεχνικές συμπεράσματα σχετικά με τα γονίδια του. Τις τελευταίες δεκαετίες, η γνώση των βιολογικών διεργασιών που σχετίζονται με το Y χρωμόσωμα προκύπτει από μελέτες του γονιδιώματος σε άτομα με μερική απώλεια τμημάτων του Y χρωμοσώματος, άτομα που πάσχουν από το σύνδρομο Turner και άτομα που δεν παράγουν σπερματοζωάρια. Οι γονιδιωματικές μελέτες οδήγησαν στο γεγονός ότι το χρωμόσωμα Y περιέχει μια περιοχή, η οποία περιλαμβάνει το 95% του μήκους της, όπου δε γίνεται ανασυνδυασμός με το χρωμόσωμα X. Αυτή η περιοχή είναι γνωστή ως μη ανασυνδυαζόμενη περιοχή ή NRY, αν και στις μέρες μας χρησιμοποιείται ευρύτατα η ονομασία MSY (male specific region). Η περιοχή MSY περιβάλλεται και από τις δύο πλευρές από ψευδοαυτοσωμικές περιοχές τις PAR1/PAR2, όπου ο ανασυνδυασμός ανάμεσα στα χρωμοσώματα X και Y είναι ένα συχνό και

φυσιολογικό γεγονός κατά τη μείωση στους άνδρες (4). Οι PAR1 και PAR2 αποτελούν το 5% του συνολικού χρωμοσώματος. Τα ολανδρικά γονίδια, δηλαδή ορισμένα γονίδια του Y χρωμοσώματος στα αρσενικά άτομα, για τα οποία δεν υπάρχουν αντίστοιχες ομόλογες θέσεις στο χρωμόσωμα X, σχετίζονται κυρίως με τον προσδιορισμό του φύλου, τη γονιμότητα και την ανάπτυξη. Η απουσία ανασυνδυασμού καθιστά αδύνατη τη γενετική χαρτογράφηση της περιοχής που αφορά την ειδική για το Y περιοχή και η πολυπλοκότητα των επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών καθιστά δύσκολη τη φυσική χαρτογράφηση της ειδικής αυτής περιοχής για το Y. Το Y-χρωμόσωμα υπάρχει σε διάφορα σχήματα και μεγέθη σε διαφορετικά είδη (6).



Εικόνα 2: Η MSY περιοχή του χρωμοσώματος Y: Α) Σχηματική απεικόνιση ολόκληρου του χρωμοσώματος Y, περιλαμβανομένης και της ψευδοαυτοσωμικής και ετεροχρωματινικής περιοχής, Β) Μεγέθυνση της περιοχής μήκους 24Mb της MSY όπου απεικονίζονται και οι τρεις τάξεις ευχρωματινικών αλληλουχιών, όπως επίσης και οι ετεροχρωματινικές περιοχές (4).

## 1.4 Η δομή και η οργάνωση του χρωμοσώματος Y

Το χρωμόσωμα Y είναι το μικρότερο χρωμόσωμα που αποτελείται από 2-3% του απλοειδούς γονιδιώματος και μπορεί να περιέχει από 70 έως και 200 είδη γονιδίων (6). Γενικά, το Y-χρωμόσωμα των θηλαστικών αποτελείται από:

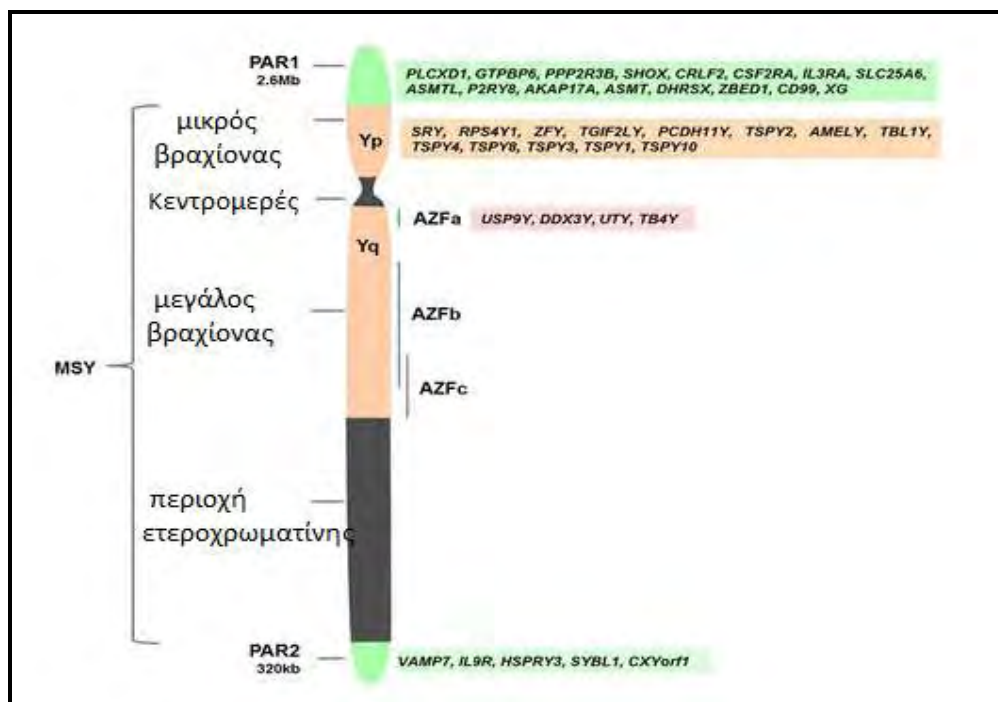
α) δύο βραχίονες (τον μικρό βραχίονα p και τον μεγάλο βραχίονα q) που περιλαμβάνουν δύο ψευδοαυτοσωματικές περιοχές (PAR1 και PAR2). Οι PAR1 και PAR2 εντοπίζονται στα άκρα των δυο βραχιόνων του Y χρωμοσώματος, καταλαμβάνουν μια έκταση 2,6Mb και 320kb, αντίστοιχα (7) και ανασυνδυάζονται με τις ομόλογες περιοχές τους που βρίσκονται στο χρωμόσωμα X (6).

β) μια περιοχή ειδική για το Y χρωμόσωμα (την MSY ή μη ανασυνδυαζόμενη περιοχή στο Y [NRY]), η οποία αποτελεί το τμήμα του Y χρωμοσώματος που περιλαμβάνεται μεταξύ των δυο ψευδοαυτοσωμικών περιοχών και καλύπτει το 95% του συνολικού μήκους του Y χρωμοσώματος. Καταλαμβάνει μια έκταση

63Mb, εκ των οποίων οι 23Mb περιλαμβάνουν γονίδια που μεταγράφονται . Δεν ανασυνδυάζεται με το Χ-χρωμόσωμα. Η NRY περιοχή υποδιαιρείται στα παρακάτω επιμέρους τμήματα:

- Το μικρό βραχίονα του Y χρωμοσώματος (ευχρωματινική περιοχή)
- Την περιοχή του κεντρομερούς
- Την κεντρική περιοχή του μεγάλου βραχίονα του Y χρωμοσώματος (ευχρωματινική περιοχή)
- Την περιοχή ετεροχρωματίνης, η οποία καταλαμβάνει την απομακρυσμένη Yq περιοχή. Η περιοχή αυτή παρουσιάζει ποικιλομορφία όσον αφορά στο μήκος μεταξύ των ανδρών που ανήκουν σε διαφορετικές πληθυσμιακές ομάδες και μπορεί να αποτελέσει το 1/2 - 2/3 του μεγέθους της περιοχής Yq. Θεωρείται ότι είναι γενετικά ανενεργή και συγκροτείται από δύο διαφορετικές ομάδες επαναλαμβανόμενων τμημάτων, τις DYZ1 και DYZ2, κάθε μια εκ των οποίων διαθέτει από 5000-2000 αντίγραφα, αντίστοιχα (8).

Τα περισσότερα από τα γονίδια που συναντώνται στην NRY/MSY περιοχή του Y χρωμοσώματος συμμετέχουν τόσο στον καθορισμό και τη διαφοροποίηση του φύλου (SRY) όσο και στην διαδικασία της σπερματογένεσης (γονίδια των AZF περιοχών) (7).



Εικόνα 3: Η δομή του χρωμοσώματος Y. Οι ψευδοαυτοσωμικές περιοχές (PAR1 και PAR2) βρίσκονται στα τελικά άκρα του χρωμοσώματος Y. Τα πράσινα πλαίσια δείχνουν τα γονίδια που κωδικοποιούνται σε αυτές τις περιοχές. Το Yp είναι ο βραχύς βραχίονας του χρωμοσώματος Y και τα γονίδια μέσα του παρουσιάζονται με πορτοκαλί χρώμα. Αποτελείται από περιοχή ευχρωματίνης. Ο μακρύς βραχίονας, Yq, αποτελείται τόσο από την ευχρωματίνη όσο και από τις γενετικά ανενεργές περιοχές της ετεροχρωματίνης. Αυτή η περιοχή περιέχει τους παράγοντες

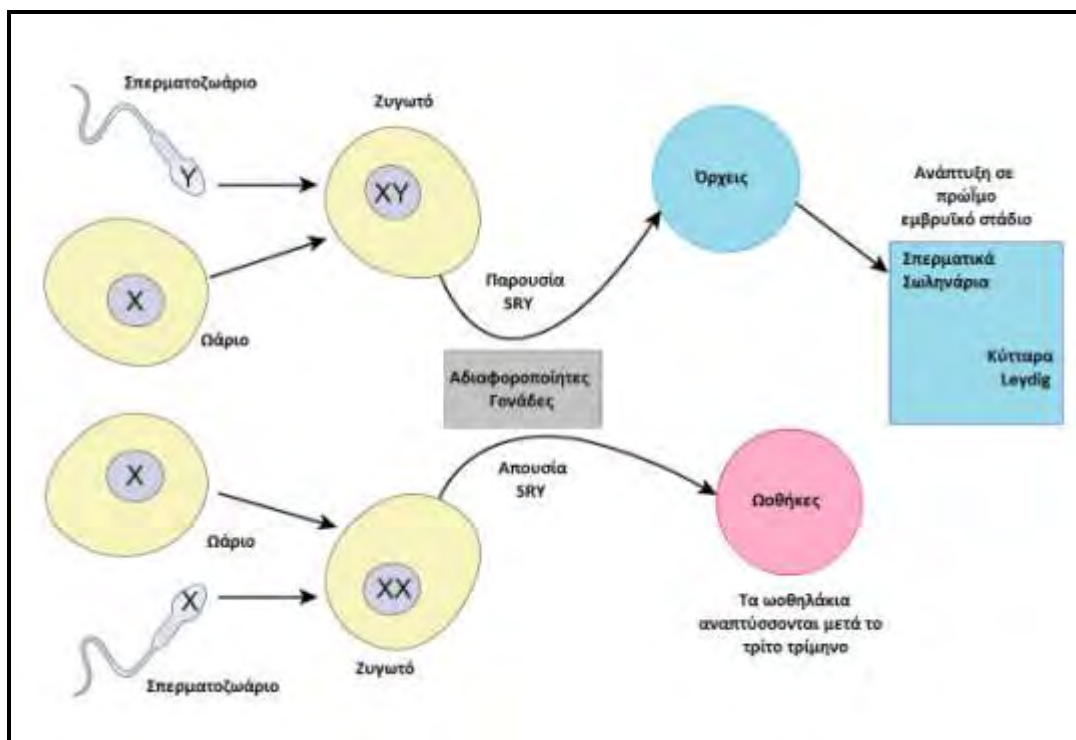
*σπερματογένεσης AZFa, AZFb και AZFc. Το ροζ πλαίσιο δείχνει τα γονίδια στην περιοχή AZFa. Η περιοχή εκτός των δύο PAR είναι η MSY (9).*

## **1.5 Ο καθορισμός και η διαφοροποίηση του φύλου στον άνθρωπο**

Στον άνθρωπο το φύλο καθορίζεται από τα φυλετικά χρωμοσώματα (XX στις γυναίκες και XY στους άνδρες). Τα χρωμοσώματα X και Y περιλαμβάνουν διαφορετικούς αριθμούς και σύνολα γονιδίων (περίπου 1.000 γονίδια στο X και μόνο μερικές δεκάδες γονίδια στο Y), τα οποία προέκυψαν από αυτοσωμικά χρωμοσώματα κατά την πρώιμη εξέλιξη των θηλαστικών. Η έλλειψη ανασυνδυασμού στο μεγαλύτερο μέρος του χρωμοσώματος Y έχει ως αποτέλεσμα τη μορφολογική διαφοροποίηση των φυλετικών χρωμοσωμάτων X και Y. Ωστόσο, η πλειονότητα των γονιδίων στα φυλετικά χρωμοσώματα δεν εμπλέκεται άμεσα στον προσδιορισμό του φύλου και η ανάπτυξη σε αρσενικό ή θηλυκό άτομο εξαρτάται από την παρουσία ενός μόνο γονιδίου προσδιορισμού του φύλου, του γονιδίου SRY, που βρίσκεται στο Y χρωμόσωμα. Η έκφραση του SRY, νωρίς στην εμβρυϊκή ανάπτυξη, ξεκινά τη διαφοροποίηση των όρχεων μέσω της ενεργοποίησης ειδικών για τους άνδρες αναπτυσσόμενων δικτύων, ενώ απουσία του αναπτύσσονται οι ωθήκες. Τα πρώτα ορατά σημάδια της διαφοροποίησης σε ωθήκες ή σε όρχεις συμβαίνουν από την έκτη εβδομάδα κύησης στον άνθρωπο και ειδικές ορμόνες προκαλούν περαιτέρω διαφοροποίηση του φύλου (10).

Η πρώτη ένδειξη ότι το χρωμόσωμα Y συμμετέχει στον προσδιορισμό του ανδρικού φύλου προήλθε από την παρατήρηση ότι τα άτομα με XY ή XYY χρωμοσώματα (σύνδρομο Klinefelter) αναπτύσσουν όρχεις, ενώ τα άτομα με χρωμοσώματα XX ή XO (σύνδρομο Turner) αναπτύσσουν ωθήκες. Αργότερα, πραγματοποιήθηκαν μελέτες σε ποντίκια που έδειξαν ότι άτομα με χρωμοσώματα XX εμφάνιζαν αρσενικό φαινότυπο, καθώς μετέφεραν ένα μικρό τμήμα του Y χρωμοσώματος. Το γεγονός αυτό οδήγησε στο συμπέρασμα ότι ένα κύριο γονίδιο που εμπλέκεται στον προσδιορισμό του ανδρικού φύλου μεταφέρθηκε από το χρωμόσωμα Y (4). Το 1990, προσδιορίστηκε τελικά το γονίδιο που είναι υπεύθυνο για τον προσδιορισμό των όρχεων και συνεπώς τον καθορισμό του αντρικού φύλου, το οποίο ονομάζεται SRY (sex determining region on chromosome Y). Αυτό το γονίδιο βρίσκεται στο βραχύ βραχίονα του χρωμοσώματος Y κοντά στην ψευδοαυτοσωματική περιοχή 1 (PAR1). Περιλαμβάνει ένα μόνο εξόνιο που κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη 204 αμινοξέων. Επιπροσθέτως, αυτό το γονίδιο κωδικοποιεί έναν παράγοντα μεταγραφής του HMG box (High Mobility Group) που είναι γνωστό ότι συνδέεται με συγκεκριμένες αλληλουχίες στόχους στο DNA και προκαλεί αλλαγές στη διάταξη χρωματίνης. Η

κάμψη του DNA φαίνεται να αποτελεί μέρος του μηχανισμού με τον οποίο το SRY επηρεάζει τη μεταγραφή των γονιδίων. Το γονίδιο SRY έχει αποδειχθεί ότι είναι απαραίτητο για την ανάπτυξη των όρχεων και τη διαφοροποίηση των γαμετών και πιο συγκεκριμένα είναι το κύριο γονίδιο καθορισμού του φύλου. Πολλά γονίδια και γενετικοί τόποι έχει βρεθεί ότι αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη που κωδικοποιεί το SRY, όπως το γονίδιο WT-1 (γονίδιο όγκου Wilm), ο παράγοντας SF-1 (Στεροειδής Παράγοντας 1) και το γονίδιο SOX-9 (κωδικοποιεί έναν μεταγραφικό παράγοντα του HMG box, επηρεάζοντας την ανάπτυξη των αρσενικών ατόμων) (11).



Εικόνα 4: Ο καθορισμός του φύλου στον άνθρωπο εξαρτάται από την έκφραση ή μη του γονιδίου SRY.

## 1.6 Τα γονίδια του χρωμοσώματος Y

Σε σχέση με τα υπόλοιπα χρωμοσώματα του ανθρώπου, το χρωμόσωμα Y αποτελείται από περιορισμένο αριθμό γονιδίων. Η μικρότερη, σε σχέση με το χρωμόσωμα X, περιεκτικότητά του σε γονίδια είναι αποτέλεσμα του εκφυλισμού του χρωμοσώματος Y κατά την εξέλιξή του με την πάροδο των ετών.

Κατά τη διάρκεια της τελευταίας δεκαετίας, έχουν εντοπιστεί διαφορετικές μονάδες μεταγραφής στην περιοχή NRY. Την προηγούμενη δεκαετία, οι Lahn και Page αναγνώρισαν 12 νέα γονίδια ή οικογένειες γονιδίων και αξιολόγησαν την έκφρασή τους σε διάφορους ανθρώπινους ιστούς (4). Τα κυριότερα γονίδια που εντοπίστηκαν τόσο στην περιοχή NRY, όσο και στις δύο ψευδοαυτοσωματικές

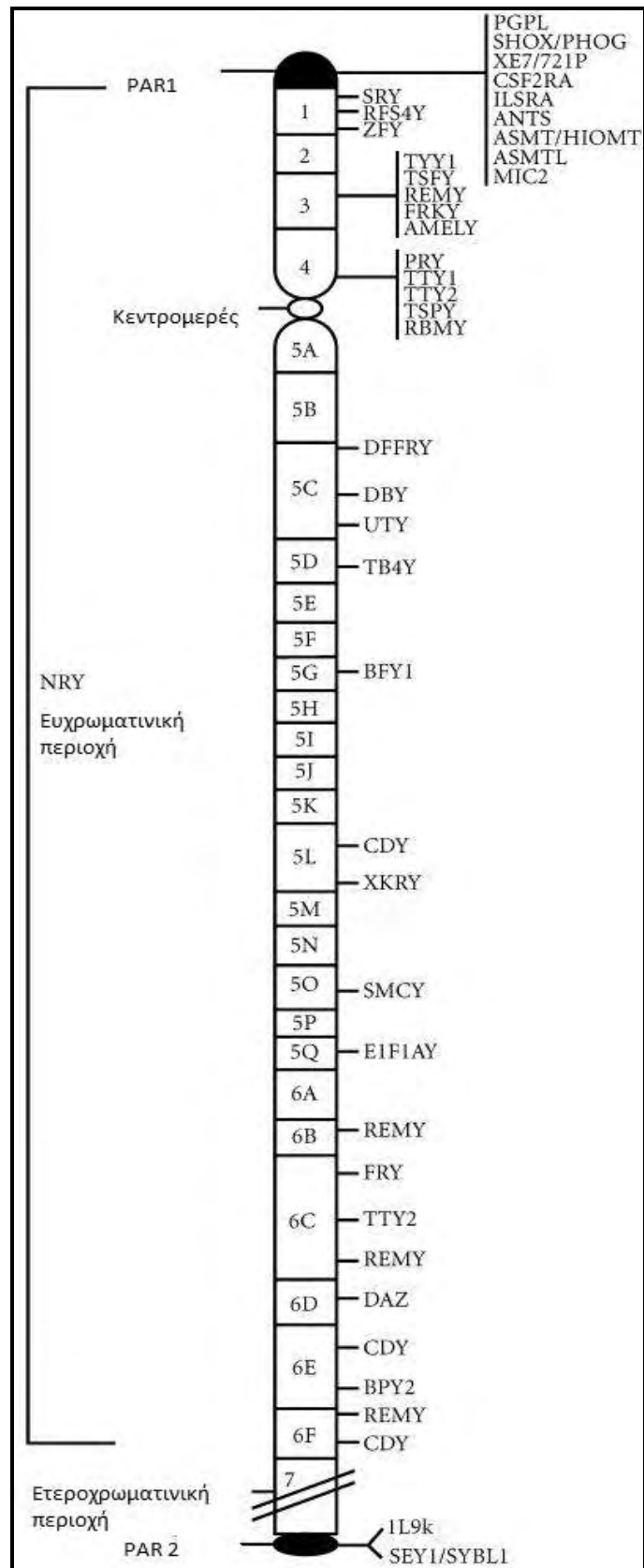
περιοχές του χρωμοσώματος Y συνοψίζονται στον Πίνακα 1 μαζί με κάποιες πληροφορίες σχετικά με τη θέση τους και την εμφάνιση ή όχι ομολογίας στο χρωμόσωμα X. Τα γονίδια της περιοχής NRY μπορούν να χωριστούν σε δύο διαφορετικές κατηγορίες. Η πρώτη περιλαμβάνει εκείνα τα γονίδια τα οποία εκφράζονται σε διάφορα τμήματα, έχουν ομόλογα στο X, εμφανίζονται σε ένα μόνο αντίγραφο στην NRY περιοχή και συμμετέχουν σε βασικές κυτταρικές λειτουργίες. Η δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνει γονίδια που εκφράζονται ειδικά στους όρχεις, υπάρχουν σε πολλαπλά αντίγραφα (με εξαίρεση το SRY) στην NRY περιοχή και κωδικοποιούν πρωτεΐνες με πιο εξειδικευμένες λειτουργίες (11).

Σύμβολο γονιδίου	Τοποθεσία	Ονομασία Γονιδίου	Ομολογία στο X
<b>CSFR2Rα</b>	PAR1	GM-CSF υποδοχέας (receptor) α υπομονάδας	+
<b>SHOX</b>	PAR1	Short stature homeobox-containing	+
<b>IL3RA</b>	PAR1	Interleukin-3 receptor α subunit	+
<b>ANT3</b>	PAR1	Adenine nucleotide translocase	+
<b>ASMTL</b>	PAR1	Acetylserotonine methyltransferase-like	+
<b>ASMT</b>	PAR1	Acetylserotonine methyltransferase	+
<b>XE7</b>	PAR1	X- escapee	+
<b>PGPL</b>	PAR1	Pseudoautosomal GTP- binding protein-like	+
<b>MIC2</b>	PAR1	MHC class I chain-related	+
<b>SRY</b>	Yp: 1A1A	Sex-determining region on Y	-
<b>RPS4Y</b>	Yp: 1A1B	Ribosomal protein S4, Y	+
<b>ZFY</b>	Yp: 1A2	Zinc-finger Y	+



<b>PRKY</b>	Yp: 3C-4A	protein kinase, Y	+
<b>TTY1</b>	Yp: 4A	testis transcript, Y1	-
<b>TSPY</b>	Yp: 3C + 5	testis-specific protein, Y	-
<b>AMELY</b>	Yp: 4A	Amelogenin, Y	+
<b>PRY</b>	Y: 4A, 6E	putative tyrosine phosphatase protein-related Y	+
<b>TTY2</b>	Y: 4A, 6C	testis transcript, Y2	-
<b>USP9Y ( DFFRY)</b>	Yq: 5C	ubiquitin-specific protease	+
<b>DBY</b>	Yq: 5C	DEAD box, Y	+
<b>UTY</b>	Yq: 5C	Ubiquitous TRY motif, Y	+
<b>TB4Y</b>	Yq: 5D	Thymosin , Y isoform	+
<b>BPY1</b>	Yq: 5G	basic protein, Y1	+
<b>CDY</b>	Yq: 5L, 6F	chromodomain, Y	-
<b>XKRY</b>	Yq: 5L	XK-related, Y	-
<b>RBM</b>	Yp + q	RNA-binding motif, Y	-
<b>SMCY</b>	Yq: 5P	Selected Mouse cDNA, Y	+
<b>EIF1AY</b>	Yq: 5Q	Translation initiation factor 1A, Y	+
<b>DAZ</b>	Yq: 6F	Deleted in azoospermia	-
<b>VCY2</b>	Yq: 6A	variably charged protein, Y2	-
<b>IL9R</b>	PAR2	Interleukin 9 receptor	+
<b>SYBL1</b>	PAR2	Synaptobrevin-like 1	+
<b>HSPRY3</b>	PAR2	Human-sprouty 3	+
<b>CXYorf1</b>	PAR2	CXYorf1	+

*Πίνακας 1: Τα γονίδια του χρωμοσώματος Y στις περιοχές PAR1, NRY και PAR2 και η εμφάνιση ομολογίας στο χρωμόσωμα X (11).*



Εικόνα 5: Σχηματική απεικόνιση της θέσης των γονιδίων του χρωμοσώματος Y (11).

## 1.7 Σπερματογένεση

Γενικά, η ανθρώπινη σπερματογένεση είναι μια περίπλοκη βιολογική διαδικασία, η οποία ξεκινά με τη μιτωτική διαίρεση από τα σπερματογόνια, ώστε να δημιουργηθούν πρωτογενή σπερματοκύτταρα τα οποία υποβάλλονται στην πρώτη μειωτική διαίρεση για να σχηματίσουν δευτερογενή σπερματοκύτταρα. Μετά από το δεύτερο μειωτικό κύκλο, αυτά τα δευτερογενή σπερματοκύτταρα παράγουν απλοειδή κύτταρα που ονομάζονται σπερματίδες, οι οποίες στη συνέχεια επιμηκύνονται και τελικά διαφοροποιούνται σε ώριμα σπερματοζωάρια (9).

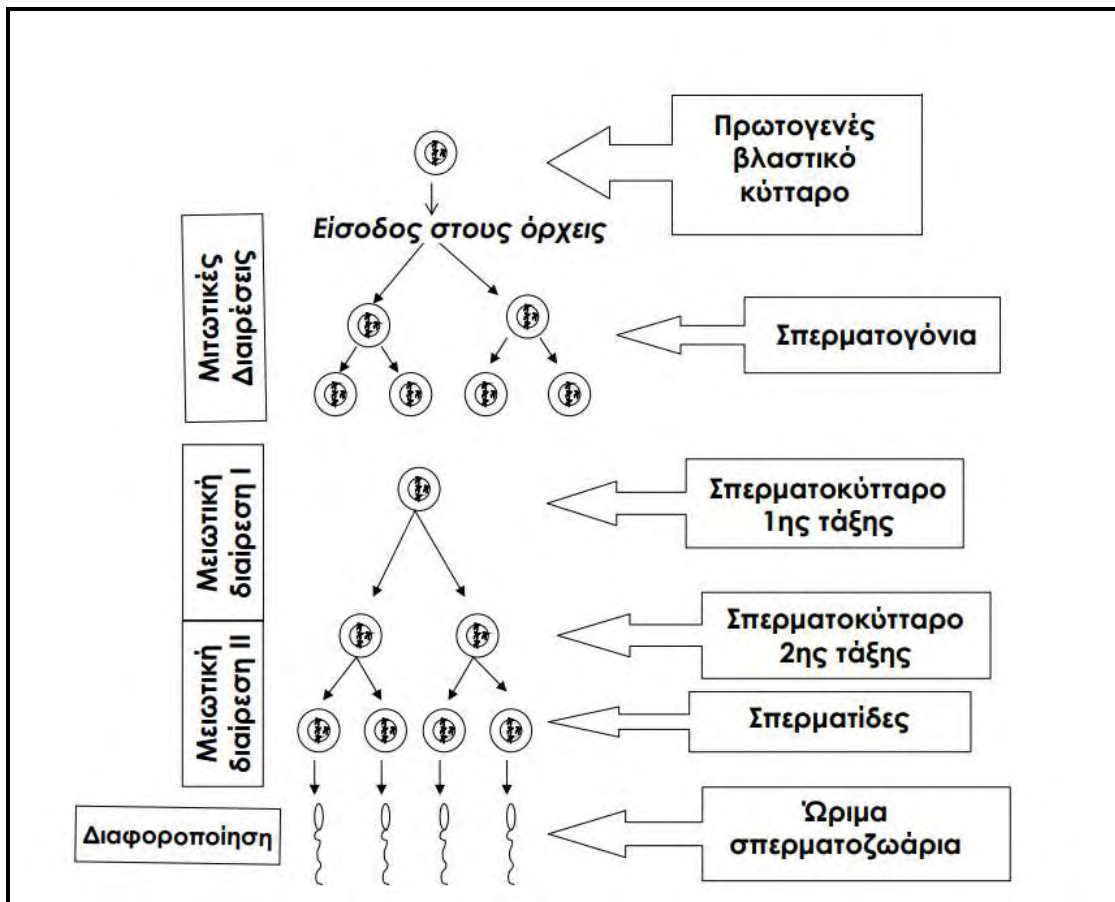
Ειδικότερα, η σπερματογένεση είναι η γαμετογένεση στα αρσενικά άτομα και εξελίσσεται στους όρχεις. Οι όρχεις, το ζεύγος γονάδων των αρσενικών ζωικών οργανισμών, αποτελούνται από πολλά σπερματοφόρα σωληνάκια, των οποίων η διευθέτηση αλλάζει ανάλογα με το είδος. Τα σπερματοφόρα σωληνάκια συγκεντρώνονται σε έναν αγωγό, από τον οποίο διέρχεται το σπέρμα, που συνήθως καταλήγει στη σπερματοδόχο κύστη. Στο εσωτερικό των συγκεκριμένων σωληναρίων των όρχεων υπάρχουν κυρίως ενδοκρινικά κύτταρα, εξειδικευμένα στην έκκριση ορμονών, τεστοστερόνης καθώς και τα κύτταρα Sertoli, των οποίων η λειτουργία είναι η ρύθμιση των ανώριμων σπερματοκυττάρων. Τα κύτταρα Sertoli υφίστανται μία μετατροπή ωρίμανσης, η οποία περιλαμβάνει το σχηματισμό ενός κυτταρικού φραγμού μεταξύ αίματος και όρχι, ώστε να παρεμποδιστεί η μεταφορά χημικών ουσιών από το αίμα στον αυλό και να εξασφαλιστούν οι κατάλληλες συνθήκες ανάπτυξης των γαμετικών κυττάρων. Συγχρόνως, είναι υπεύθυνα για την διοχέτευση θρεπτικών ουσιών, αυξητικών παραγόντων και διαλυτών πρωτεϊνών, που είναι αναγκαία για την ομαλή αύξηση και διαφοροποίηση των σπερματογονίων (1). Επίσης, τα κύτταρα Sertoli πραγματοποιούν και την φαγοκυττάρωση απομακρύνοντας τα ελαττωματικά σπερματοζωάρια. Τα γαμετικά κύτταρα και τα κύτταρα Sertoli επικοινωνούν με τη βοήθεια της παρακρινούς οδού κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης, πράγμα που δείχνει το πόσο ικανά είναι τα κύτταρα Sertoli στο να προσαρμόζονται στις υψηλές εναλλασσόμενες ανάγκες των γαμετικών κυττάρων (12,13). Τα πρόδρομα γεννητικά κύτταρα μετασχηματίζονται προοδευτικά σε αρσενικούς γαμέτες, τα σπερματοζωάρια, με μια διαδικασία που ονομάζεται σπερματογένεση. Η διαφοροποίηση αυτή επιτελείται στα τοιχώματα των σπερματοφόρων σωληναρίων και πιο συγκεκριμένα όσον αφορά στον άνθρωπο σε όλα τα επίπεδα τους. Η διαδικασία της σπερματογένεσης βασίζεται στις συντονισμένες δράσεις διαφόρων ορμονών, τοπικών εκκριτικών παραγόντων και ειδικών γονιδίων των όρχεων. Οποιαδήποτε δυσλειτουργία σε αυτούς τους παράγοντες μπορεί να οδηγήσει σε εξασθενημένη σπερματογένεση, η οποία με τη σειρά της σχετίζεται σημαντικά με την ανδρική υπογονιμότητα (1).

## 1.8 Τα στάδια της σπερματογένεσης

Το εσωτερικό των σπερματοφόρων σωληναρίων χωρίζεται σε ζώνες, οι οποίες αναλογούν στα διάφορα στάδια σχηματισμού των σπερματοζωαρίων.

- Η βλαστική ζώνη, η έξω στοιβάδα των σπερματοφόρων σωληναρίων, περιέχει τα πρόδρομα γεννητικά κύτταρα. Τα βλαστικά κύτταρα, που αρχικά σχηματίστηκαν στο έμβρυο, έχουν περιορισμένο αριθμό και γι αυτό αναπαράγονται με συνεχείς μιτώσεις. Τα μισά από τα κύτταρα που δημιουργούνται διαφοροποιούνται σε σπερματογόνια τα οποία μετατρέπονται τελικά σε σπερματοζωάρια, ενώ τα άλλα μισά παραμένουν ως πρόδρομα γεννητικά κύτταρα, δημιουργώντας ένα σταθερό απόθεμα προγονικών κυττάρων.
- Στη ζώνη ανάπτυξης, κάθε διπλοειδές σπερματογόνιο ( $2n$ ) μπορεί να αρχίσει τη μειωτική διαίρεση. Στη διάρκεια της πρόφασης I, το κύτταρο μεγαλώνει και παίρνει τη μορφή ενός  $2n$  σπερματοκυττάρου πρώτης τάξεως. Στη συνέχεια, στη ζώνη της ωρίμανσης, το σπερματοκύτταρο πρώτης τάξης ολοκληρώνει τη μείωση του και σχηματίζει δύο σπερματοκύτταρα δεύτερης τάξεως ( $n$ ), τα οποία διαιρούνται με τη σειρά τους το καθένα σε δύο απλοειδή ( $n$ ) σπερματίδια (μείωση II). Τέλος, στη ζώνη σπερματογένεσης, καθένα από τα τέσσερα σπερματίδια διαφοροποιείται σε λειτουργικό σπερματοζωάριο .

Στον άνθρωπο, ο πολλαπλασιασμός των σπερματογονίων αρχίζει στην εμβρυική περίοδο και σταματάει περίπου την εποχή της γέννησης. Η διάρκεια της σπερματικής μείωσης είναι μεγάλη, περίπου 70 ημέρες. Η παραγωγή όμως σπερματοζωαρίων στον άντρα είναι συνεχής και όχι εποχιακή, γιατί διαδοχικά κύματα σπερματογονίων αρχίζουν τη μείωση σε διαφορετικό χρόνο. Τα ανθρώπινα σπερματοζωάρια είναι μικρά κύτταρα, μήκους  $65 \mu\text{m}$  (1).



Εικόνα 6: Απεικόνιση της διαδικασίας της σπερματογένεσης. Εμφανίζονται τα στάδια της σπερματογένεσης όπως λαμβάνουν χώρα στον όρχι και τα στάδια διαφοροποίησης των γαμετικών κυττάρων ώστε να μετατραπούν σε ώριμα σπερματοζώαρια (1).

## 1.9 Ο σχηματισμός και τα συστατικά του σπερματοζωαρίου

Η ουρά του κάθε σπερματιδίου αρχίζει να αυξάνεται και να προβάλλει προς την κεντρική κοιλότητα του σπερματοφόρου σωληναρίου, ενώ ο πυρήνας συμπυκνώνεται περισσότερο. Η συσκευή Golgi δημιουργεί στο μπροστινό τμήμα το ακρόσωμα. Το ακρόσωμα είναι ένα χαρακτηριστικό οργανίδιο των σπερματοζωαρίων, που τους επιτρέπει να τρυπήσουν τον προστατευτικό φάκελο του ωαρίου τη στιγμή της γονιμοποίησης. Για το σκοπό αυτό, περιέχει όλα τα απαραίτητα ένζυμα και τις πρωτεΐνες, που συμβάλλουν στο σχηματισμό των κατάλληλων δομών, που θα χρησιμοποιηθούν για τη διείσδυση στο ωάριο. Μετά το τέλος της μείωσης, η συμπύκνωση του πυρήνα ολοκληρώνεται, κάθε γονιδιακή δραστηριότητα αναστέλλεται και το απλοειδές γονιδίωμα είναι πλέον συσκευασμένο κατάλληλα για να μεταφερθεί στο εσωτερικό του ωαρίου. Μέσω της ωρίμανσης, το σπερματοζώαριο αποκτά την τελική του μορφή, για να γονιμοποιήσει το ωάριο. Για να μπορέσει όμως το σπερματοζώαριο να φτάσει

μέχρι το ωάριο χρειάζεται να διασχίσει μια σχετικά μεγάλη απόσταση. Η μετακίνηση αυτή επιτυγχάνεται με το μαστίγιο- ουρά, που σχηματίζεται στο αντίθετο από το ακρόσωμα άκρο. Το ώριμο και ολοκληρωμένο σπερματοζωάριο παραμένει ακίνητο στο εσωτερικό των όρχεων, καθώς ενεργοποιείται μόνο μετά την έξοδό του από το σώμα (1).

### **1.10 Η παραγωγή σπέρματος**

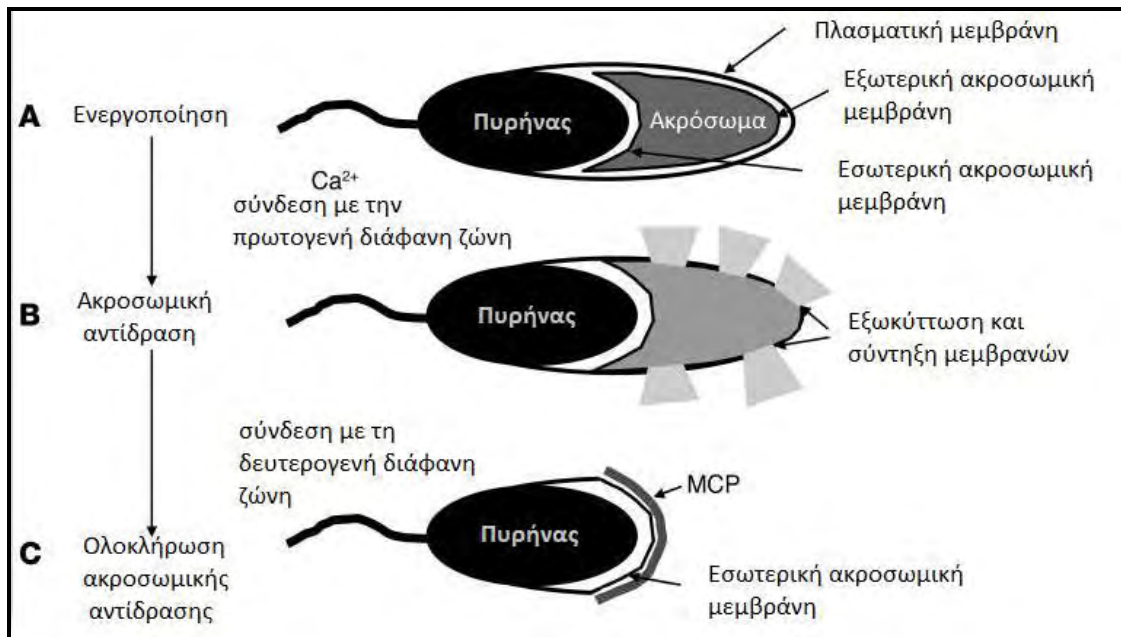
Μετά το τέλος της σπερματογένεσης, τα σπερματοζωάρια ξεκολλούν από τα κοιλώματα των σπερματοφόρων σωληναρίων και φτάνουν στην επιδιδυμίδα. Η επιδιδυμίδα είναι ένας περιελιγμένος σωλήνας που δημιουργείται από τη συνένωση των σπερματοφόρων σωληναρίων, που εξέρχονται από τους όρχεις και εκεί τα σπερματοζωάρια ολοκληρώνουν την ωρίμανσή τους και αποθηκεύονται. Στη συνέχεια, διατρέχοντας το σπερματικό πόρο φτάνουν στον προστάτη, όπου εμπλουτίζονται με το προστατικό υγρό και σχηματίζουν το σπέρμα. Αυτό είναι υπόλευκο υγρό, μέσα στο οποίο βρίσκονται φυσιολογικά 50-120 εκατομμύρια σπερματοζωάρια για κάθε ml.

Η προώθηση του σπέρματος έξω από τα γεννητικά όργανα γίνεται χάρη σε δύο μηχανισμούς, τη στύση και την εκσπερμάτωση (1).

### **1.11 Η Ακροσωμική Αντίδραση**

Μετά την επαφή του σπερματοζωαρίου με την επιφάνεια του ωαρίου, το σπερματοζωάριο χρειάζεται να υπερπηδήσει μερικά εμπόδια, πριν καταφέρει να εναποθέσει το γενετικό του υλικό στο εσωτερικό του ωαρίου. Αρχικά, πρέπει να εισχωρήσει στον προστατευτικό φάκελο του ωαρίου, ο οποίος αποτελείται από έναν ζελατινώδη κάλυκα και ένα βιτελλινικό στρώμα. Στη συνέχεια, πρέπει να περάσει μέσω της πλασματικής μεμβράνης του ωαρίου. Η πρώτη επαφή του σπερματοζωαρίου με τον προστατευτικό φάκελο, η επίδραση των συστατικών μορίων του τελευταίου και η αύξηση της συγκέντρωσης ασβεστίου στο εσωτερικό του σπερματοζωαρίου προκαλεί μια υπερβολικά γρήγορη τροποποίηση του ακροσώματος, γνωστή ως ακροσωμική αντίδραση. Η ακροσωμική αντίδραση αποτελείται από δύο φάσεις: την απελευθέρωση των αποθηκευμένων στο ακρόσωμα ενζύμων και την τροποποίηση της πλασματικής μεμβράνης του, που έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός σκληρού ακροσωμικού νηματίου, με τη βοήθεια του οποίου το σπερματοζωάριο θα διεισδύσει στο εσωτερικό του ωαρίου. Υδρολυτικά ένζυμα, που απελευθερώνονται από το ακρόσωμα ανοίγουν μια οπή στο ζελατινώδη κάλυκα, ενώ ταυτόχρονα επιμηκύνονται ινίδια ακτίνης. Αυτή η δομή προεκβάλλει από το σπερματοζωάριο, διαπερνά το ζελατινώδη κάλυκα και συνδέεται στους ειδικούς υποδοχείς της πλασματικής μεμβράνης του

ωαρίου. Ακόμη, λυτικά ένζυμα, μεταξύ των οποίων και η υαλουρονιδάση, αποικοδομούν τα συστατικά του φακέλου και οδηγούν το νημάτιο του σπερματοζωαρίου έως την πλασματική μεμβράνη του ωαρίου, μέχρι οι δύο μεμβράνες να συντηχθούν στο σημείο της επαφής, μέσω της οπής που δημιουργήθηκε στη βιτελλινική στιβάδα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, οι μεμβράνες να εκπολώνονται, καθώς προκαλείται αύξηση στη συγκέντρωση των κατιόντων ασβεστίου, που προκαλεί την εξωκυττάρωση των φλοιωδών κοκκίων, εμποδίζοντας την είσοδο άλλων σπερματοζωαρίων (1).



Εικόνα 7: Σχηματική αναπαράσταση της ακροσωμικής αντίδρασης στα ανθρώπινα σπερματοζωάρια. A: Η ακροσωμική αντίδραση σε ενεργοποιημένο σπερματοζωάριο συμβαίνει μετά τη σύνδεσή του στη διάφανη ζώνη. B: Η εξωτερική ακροσωμική μεμβράνη συντήκεται με την πλασματική, απελευθερώνοντας το περιεχόμενο του ακροσώματος. C: Έκφραση της πρωτεΐνης MCP στην εσωτερική ακροσωμική μεμβράνη. Αυτή η μεμβράνη εκτίθεται με την ολοκλήρωση της ακροσωμικής αντίδρασης, ένα γεγονός εξωκυττάρωσης το οποίο συμβαίνει κατά την επαφή με τη διάφανη ζώνη (14).

## 1.12 Ανδρική υπογονιμότητα

Η ανδρική υπογονιμότητα παρουσιάζει όλο και μεγαλύτερο ενδιαφέρον, εξαιτίας της χαμηλότερης καλής ποιότητας του σπέρματος των νέων υγιών ανδρών παγκοσμίως. Πλέον, είναι γνωστό ότι η υπογονιμότητα σε ένα ζευγάρι αφορά το 10% -15% του γενικού πληθυσμού και πιο συγκεκριμένα, το πρόβλημα εντοπίζεται στον άνδρα σε ένα 40% των περιπτώσεων, στη γυναίκα σε 40%, ενώ σε ένα ποσοστό περίπου 20% είναι μικτής αιτιολογίας (15). Μεγάλο ποσοστό υπογόνιμων ανδρών χαρακτηρίζεται, είτε από ολιγοσπερμία (μειωμένη παραγωγή

σπέρματος), είτε από αζωοσπερμία (έλλειψη σπερματοζωαρίων στην εκσπερμάτωση). Διαταραχές στην παραγωγή σπέρματος μπορεί να σχετίζονται με διαφορετικά προβλήματα των όρχεων, που κυμαίνονται από την πλήρη απουσία γεννητικών κυττάρων (σύνδρομο Sertoli cell only) έως τη μειωμένη σπερματογένεση και τη διακοπή της ωρίμανσης (16). Πολλοί παράγοντες επηρεάζουν σημαντικά την ποιότητα των σπερματοζωαρίων, συμπεριλαμβανομένου του τρόπου ζωής, του διαβήτη, της παχυσαρκίας, των ορμονικών ασθενειών, των όρχεων, της κρυφορχίας, της κισσοκήλης, των λοιμώξεων του ουροποιητικού συστήματος, των διαταραχών εκσπερμάτισης, της χημειοθεραπείας ή των χειρουργικών θεραπειών. Επιπλέον, τα γενετικά αίτια αντιπροσωπεύουν το 10% - 15% των περιπτώσεων υπογονιμότητας, συμπεριλαμβανομένων των χρωμοσωμικών ανωμαλιών και των μεταλλάξεων σε γονίδια, που επηρεάζουν σε διαφορετικά επίπεδα πολλές φυσιολογικές διεργασίες που εμπλέκονται στην αρσενική αναπαραγωγή, όπως η ορμονική ομοιοστάση, η σπερματογένεση, και η ποιότητα του σπέρματος (15). Ωστόσο, η αιτία της ανδρικής υπογονιμότητας είναι άγνωστη σε ποσοστό έως και 50% των περιπτώσεων και μέχρι πρόσφατα σχετικά μικρή έρευνα επικεντρώθηκε στις πιθανές γενετικές αιτιολογίες. Η εκρηκτική ανάπτυξη των τεχνικών υποβοηθούμενης αναπαραγωγής και, ειδικότερα, της ενδοκυτταροπλασματικής έγχυσης σπέρματος (ICSI) συνέβαλε στην ανάπτυξη μιας τέτοιας έρευνας. Η μελέτη των μικροελλειμμάτων στο χρωμόσωμα Y είναι ιδιαίτερα σημαντική λόγω της δυνατότητας μεταβίβασης των γενετικών ανωμαλιών από τον πατέρα στους απογόνους (16). Η ανάλυση του σπέρματος παίζει σημαντικό ρόλο στην αξιολόγηση της ποιότητας του σπέρματος, αν και από μόνη της δεν αρκεί για να διακρίνει τους υπογόνιμους άνδρες από τους φυσιολογικούς, διότι κατανέμει τα άτομα σε γόνιμα ή υπογόνιμα ανάλογα με τον αριθμό των σπερματοζωαρίων. Συνεπώς, υποθέτοντας ότι σε κάποιες περιπτώσεις υπάρχει γενετικό πρόβλημα είναι σημαντικό να ληφθούν υπόψη η ακεραιότητα του DNA, προβλήματα στο πακετάρισμα της χρωματίνης, η απόπτωση, το οξειδωτικό στρες, ο κατακερματισμός του DNA και η ανευπλοειδία (15).

### **1.12.1 Ανάλυση σπέρματος**

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (2010), η ανάλυση του σπέρματος είναι η βασική εξέταση για την ορθή αξιολόγηση της γονιμότητας του άνδρα. Υπάρχουν πολλές προϋποθέσεις, που απαιτείται να πληρούνται, ώστε τα αποτελέσματα να είναι αξιόπιστα και μεταξύ άλλων απαιτείται να προστατεύεται η ιδιωτικότητα του εξεταζόμενου.

Στον έλεγχο του σπέρματος χρειάζεται να περιλαμβάνεται η εκτίμηση των κύριων παραμέτρων του σπέρματος και ανάλογα με την περίπτωση, η ανοσολογική, η



βιοχημική και η μικροβιολογική εξέταση. Οι κύριες παράμετροι που αξιολογούνται είναι ο αριθμός, η κινητικότητα, και η μορφολογία των σπερματοζωαρίων.

Ο αριθμός των σπερματοζωαρίων στο δείγμα προσδιορίζει έμμεσα το επίπεδο της λειτουργίας των όρχεων του άντρα. Αν το δείγμα έχει λιγότερα από 15 εκατομμύρια/ml σπερματοζωάρια ή και συνολικό αριθμό σπερματοζωαρίων μικρότερο των  $39 \times 10^6$ , τότε θεωρείται ότι υπάρχει χαμηλός αριθμός σπερματοζωαρίων και το δείγμα χαρακτηρίζεται ως ολιγοσπερμικό. Αζωοσπερμία ονομάζεται η κατάσταση στην οποία δεν ανιχνεύονται καθόλου σπερματοζωάρια στο δείγμα. Όσον αφορά στην κινητικότητα των σπερματοζωαρίων, αυτά χαρακτηρίζονται από προωθητική κίνηση ή ακόμα και από ακινησία. Μόνο τα σπερματοζωάρια που κινούνται γρήγορα και προωθητικά είναι ικανά να φτάσουν έως το ωάριο και να το γονιμοποιήσουν. Η κινητικότητα βαθμολογείται με μία κλίμακα γρήγορης κίνησης (a), αργής κίνησης (b), μη προωθητικής κίνησης (c) και ακινησίας (d). Επιπλέον, η μορφολογία αποτελεί και αυτή μία πολύ σημαντική παράμετρο στην αξιολόγηση του δείγματος σπέρματος. Αν υπάρχουν πολλά σπερματοζωάρια με ανώμαλη μορφολογία, τότε το συγκεκριμένο δείγμα χαρακτηρίζεται από τερατοσπερμία, δηλαδή πιο συγκεκριμένα, η πλειοψηφία των σπερματοζωαρίων έχει ανωμαλίες όπως πολύ μεγάλη κεφαλή, απουσία κεφαλής ή μικρό μέγεθος κεφαλής.

Επιπρόσθετα, γίνεται αξιολόγηση μερικών ακόμα παραγόντων. Αρχικά του pH, το οποίο σε φυσιολογικές συνθήκες θα πρέπει να είναι ελαφρώς αλκαλικό. Στην περίπτωση που η τιμή του pH είναι μικρότερη από 7 και ο αριθμός των σπερματοζωαρίων είναι περιορισμένος τότε αυτό υποδηλώνει την απόφραξη της εκσπερματικής οδού, ενώ τιμές πάνω από το 8 συνδέονται με φλεγμονή των αδένων του γεννητικού συστήματος. Τα επίπεδα του κιτρικού οξέος και της φρουκτόζης μπορούν να προσδιορίσουν την εκκριτική ικανότητα των επικουρικών αδένων, καθώς τυχόν χαμηλές συγκεντρώσεις μπορεί να είναι ενδεικτικές επίσης της ύπαρξης φλεγμονής. Παράλληλα, η υψηλή συγκέντρωση λευκοκυττάρων στο δείγμα μειώνει τη γονιμοποιητική ικανότητα του σπέρματος και αποτελεί ένδειξη βλάβης του αναπαραγωγικού συστήματος. Τέλος, σημαντικός παράγοντας αποτελεί και η ποσότητα του δείγματος προς εξέταση (φυσιολογικά από 1-5 ml), αφού αυτή συνδέεται με τη σωστή λειτουργία του προστάτη και της σπερματοδόχου κύστης.

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας οι παράμετροι, που μελετώνται κατά την ανάλυση σπέρματος απεικονίζονται στον παρακάτω πίνακα.

<b>Παράμετρος</b>	<b>Κατώτερες τιμές αναφοράς</b>
Όγκος (ml)	1,5 (1,4-1,7)
Ολικός αριθμός σπερματοζωαρίων (10 <sup>6</sup> ανά εκσπερμάτιση)	39 (33-46)
Συγκέντρωση σπέρματος (10 <sup>6</sup> ανά ml)	15 (12-16)
Συνολική κινητικότητα (προοδευτική & μη προοδευτική, %)	40 (38-42)
Προοδευτική κινητικότητα	32 (31-34)
Βιωσιμότητα (ζωντανά σπερματοζωάρια %)	58 (55-63)
Μορφολογία (φυσιολογικές μορφές %)	4 (3,0-4,0)
pH	>7,2
Περοξιδάση-θετικά λευκοκύτταρα (10 <sup>6</sup> per ml)	<1,0
Ψευδάργυρος σπέρματος (μmol/εκσπερμάτιση)	>2,4
Φρουκτόζη σπέρματος (μmol/εκσπερμάτιση)	>13
Ουδέτερη γλυκοσιδάση (mU/εκσπερμάτιση)	>20
MAR test (κινητά σπερματοζωάρια με δεσμευμένα σωματίδια, %)	<50
Immunobead test (κινητά σπερματοζωάρια με δεσμευμένα σφαιρίδια %)	<50

*Πίνακας 2: Οι παράμετροι που μελετώνται κατά την ανάλυση σπέρματος και οι κατώτερες τιμές αναφοράς (WHO 2010).*

### 1.12.2 Ταξινόμηση της ανδρικής υπογονιμότητας

Η διαδικασία της σπερματογένεσης βασίζεται στις συντονισμένες δράσεις διαφόρων ορμονών, τοπικών εκκριτικών παραγόντων και ειδικών γονιδίων, που εκφράζονται στους όρχεις. Διαταραχές σε οποιονδήποτε από τους παραπάνω παράγοντες μπορούν να οδηγήσουν στη συσσώρευση λαθών, που προκαλούν δυσλειτουργίες της σπερματογένεσης, επομένως και ανδρική υπογονιμότητα. Η ανδρική υπογονιμότητα αναφέρεται στην αδυναμία του άνδρα να γονιμοποιήσει μία κλινικά φυσιολογική γυναίκα και χαρακτηρίζει σχεδόν 30 εκατομμύρια άντρες παγκοσμίως. Οι κατηγορίες της ανδρικής υπογονιμότητας διαμορφώνονται σχετικά με τις διαταραχές των σπερματοζωαρίων, οι οποίες είναι (9):

- Αζωοσπερμία: Απουσία σπερματοζωαρίων κατά την εκσπερμάτωση. Μπορεί να χαρακτηριστεί ως αποφρακτική αζωοσπερμία (απουσία σπερματοζωαρίων στην εκσπερμάτωση, λόγω προβλημάτων στην παροχή σπέρματος) ή ως μη αποφρακτική αζωοσπερμία (έλλειψη σπερματοζωαρίων στο σπέρμα λόγω της μη φυσιολογικής παραγωγής σπέρματος). Η τελευταία υποκατηγορία αποτελεί το 60% των περιπτώσεων αζωοσπερμίας.
- Ολιγοσπερμία: Λιγότερα από  $15-20 \times 10^6$  σπερματοζωάρια κατά την εκσπερμάτωση. Σε περιπτώσεις σοβαρής ολιγοσπερμίας το ποσοστό των σπερματοζωαρίων στην εκσπερμάτωση δεν ξεπερνά τα  $5 \times 10^6$
- Ασθενοσπερμία: Χαμηλά επίπεδα κινητικότητας σε ποσοστό μικρότερο από το 50% των σπερματοζωαρίων
- Τερατοσπερμία: Λιγότερα από το 30% των σπερματοζωαρίων έχουν φυσιολογική μορφολογία.
- Ασπερμία: Μη ύπαρξη σπερματοζωαρίων στο σπέρμα
- Νεκροσπερμία: Μη βιώσιμα/ νεκρά σπερματοζωάρια
- Αιματοσπερμία: Παρουσία ερυθροκυττάρων στο σπέρμα
- Πυοσπερμία: Παρουσία λευκοκυττάρων στο σπέρμα
- Πολυζωοσπερμία: Υπερβολικά υψηλή συγκέντρωση σπερματοζωαρίων στο σπέρμα

### 1.13 Αίτια της ανδρικής υπογονιμότητας

Η ανδρική υπογονιμότητα είναι μια πολύπλοκη διαταραχή η οποία οφείλεται τόσο σε γενετικούς όσο και σε μη γενετικούς παράγοντες. Οι κυριότεροι από αυτούς συνοψίζονται παρακάτω (WHO 2010):

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

Στις επόμενες παραγράφους, αναφέρονται επιγραμματικά οι συγγενείς και επίκτητες ανωμαλίες και δίνεται μεγαλύτερη έμφαση στις αιτίες, που σχετίζονται με τη γενετική της ανδρικής υπογονιμότητας, καθώς το πείραμα που πραγματοποιήθηκε αφορά πιο εξειδικευμένα στο χρωμόσωμα Y.

#### 1.13.1 Γενετικές ανωμαλίες

Υπολογίζεται ότι οι γενετικές ανωμαλίες αποτελούν έναν από τους σημαντικότερους αιτιολογικούς παράγοντες της ανδρικής υπογονιμότητας, συμβάλλοντας σε ένα ποσοστό 15-30%. Το γενετικό υπόβαθρο της υπογονιμότητας αφορά κυρίως χρωμοσωμικές ανωμαλίες, μικροελλείμματα στο Y χρωμόσωμα και γονιδιακές μεταλλάξεις, που μπορούν να επηρεάσουν ένα εύρος φυσιολογικών διαδικασιών όπως η ορμονική ομοιόσταση, η σπερματογένεση και η ποιότητα του σπέρματος.

Οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες αντιπροσωπεύουν περίπου το 5% των περιπτώσεων της ανδρικής υπογονιμότητας, ενώ ο επιπολασμός τους αυξάνεται σε ποσοστό έως και 15% σε άνδρες, που πάσχουν από αζωοσπερμία. Οι ανωμαλίες στο χρωμόσωμα Y, όπως τα μικροελλείμματα, είναι η κύρια αιτία της αζωοσπερμίας και σοβαρών περιπτώσεων ολιγοσπερμίας. Συνεπώς, τα φυλετικά χρωμοσώματα είναι μια κατάλληλη περιοχή έρευνας για τον προσδιορισμό του ρόλου της γενετικής βάσης στην ανδρική υπογονιμότητα.

Η ανευπλοειδία, δηλαδή ο λανθασμένος αριθμός χρωμοσωμάτων, είναι το πιο συνηθισμένο σφάλμα που προκύπτει από χρωμοσωμικές ανωμαλίες σε υπογόνιμους άνδρες. Οι άνδρες με αζωοσπερμία έχουν ιδιαίτερα υψηλή συχνότητα ανευπλοειδίας, ειδικά όσον αφορά στα φυλετικά χρωμοσώματα τους. Αν και το σπέρμα από άνδρες με ανευπλοειδία έχει αλλοιωμένη ποσότητα γενετικού υλικού, περιστασιακά τα σπερματοζωάρια μπορούν να γονιμοποιήσουν με επιτυχία το ωοκύτταρο και να μεταφέρουν έναν εσφαλμένο αριθμό χρωμοσωμάτων στους απογόνους τους.

Το σύνδρομο Klinefelter, η πιο συνηθισμένη χρωμοσωμική ανωμαλία που προκαλείται από ανευπλοειδία, έχει επιπολασμό 5% στους άνδρες με σοβαρή ολιγοσπερμία και 10% στους άνδρες με αζωοσπερμία. Το σύνδρομο συνήθως προκαλεί τη διακοπή της σπερματογένεσης στο στάδιο του πρώιμου σπερματοκυττάρου, αν και περιστασιακά λαμβάνουν χώρα και τα επόμενα στάδια της διαδικασίας της σπερματογένεσης. Υπάρχουν δύο μορφές του συνδρόμου Klinefelter: το μη μωσαϊκό, 47, XXY και το μωσαϊκό, 47, XXY / 46, XY. Αν και μέχρι πρόσφατα θεωρούταν ότι οι άνδρες της πρώτης κατηγορίας είναι κατά κύριο λόγο υπογόνιμοι, έχει πλέον βρεθεί ότι στο 25% των ασθενών υπάρχει ποσότητα σπέρματος κατά την εκσπερμάτωση, ενώ άτομα που ανήκουν στη δεύτερη κατηγορία χαρακτηρίζονται κυρίως από διαταραχές της σπερματογένεσης. Οι ασθενείς με σύνδρομο Klinefelter είναι δυνατόν να αποκτήσουν παιδιά, μέσω της εξωσωματικής γονιμοποίησης, αλλά με πολύ μεγάλη πιθανότητα αυτό να πάσχει από χρωμοσωμικές ανωμαλίες. Για το λόγο αυτό, συνιστάται να πραγματοποιείται προγεννητικός έλεγχος.

Οι μεταθέσεις χρωμοσωμάτων είναι μια πρόσθετη αιτία ανευπλοειδίας. Μπορούν να προκαλέσουν την απώλεια γενετικού υλικού στα σημεία θραύσης των γονιδίων και να το καταστρέψουν. Οι μεταθέσεις σε αυτοσωμικά χρωμοσώματα έχει βρεθεί να είναι 4-10 φορές πιο πιθανές σε υπογόνιμα αρσενικά άτομα σε σύγκριση με τα φυσιολογικά. Η μετάθεση κατά Robertson, που συμβαίνει όταν δύο ακροκεντρικά χρωμοσώματα συγχωνεύονται, αποτελεί τη συχνότερη χρωμοσωμική ανωμαλία στον άνθρωπο και επηρεάζει τη γονιμότητα σε έναν στους 1000 άνδρες. Αν και η μετάθεση κατά Robertson αφορά μόνο στο 0.8 % των υπογόνιμων ανδρών και πιο συγκεκριμένα αυτών που πάσχουν από αζωοσπερμία ή ολιγοσπερμία, αυτό το ποσοστό είναι 9 φορές μεγαλύτερο σε σχέση με το γενικό πληθυσμό. Γενικά, οι μεταθέσεις προκαλούν μεγάλη ποικιλία φαινοτύπων σπέρματος, που κυμαίνονται από τη φυσιολογική σπερματογένεση έως και την πλήρη αδυναμία παραγωγής σπερματοζωαρίων. Επομένως, άτομα με μετάθεση κατά Robertson μπορεί να εμφανίζουν φυσιολογικό φαινότυπο σπέρματος, αλλά να είναι υπογόνιμα, λόγω έλλειψης παραγωγής γαμετών (17).

### 1.13.2 Χρωμόσωμα Y

Το χρωμόσωμα Y αποτελεί μία περιοχή ενδιαφέροντος στη μελέτη της ανδρικής υπογονιμότητας, καθώς περιλαμβάνει απαραίτητα γονίδια, που εμπλέκονται στη σπερματογένεση και στην ανάπτυξη των αρσενικών γονάδων. Τα μικροελλείμματα σε συγκεκριμένες περιοχές του χρωμοσώματος Y είναι μια από τις κύριες αιτίες της ανδρικής υπογονιμότητας και αφορούν σε αρκετά γονίδια, αν και είναι πολύ μικρά σε μέγεθος και για το λόγο αυτό δεν είναι δυνατόν να προσδιοριστούν κυτταρογενετικά.

Τα μικροελλείμματα εμφανίζονται συχνότερα στο μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος Υ (Υq) και σχετίζονται με την αποτυχία της σπερματογένεσης. Μια ιδιαίτερη περιοχή ενδιαφέροντος για το Υq είναι η περιοχή AZF (azoospermia factor), η οποία περιέχει γονίδια που εμπλέκονται στην ανάπτυξη των σπερματοζωαρίων. Η περιοχή AZF περιλαμβάνει τρεις υπο-περιοχές, τις: AZFa, AZFb και AZFc. Επικρατέστερα, εμφανίζονται απαλοιφές γονιδίων στην περιοχή AZFb και AZFc, οι οποίες μπορούν να οδηγήσουν σε ένα ευρύ φάσμα φαινοτύπων για τους υπογόνιμους άνδρες. Γενικότερα, γίνεται κατανοητό ότι, οι ερευνητές προσπαθούν να προσδιορίσουν τα μικροελλείμματα στην περιοχή AZF του χρωμοσώματος Υ, έτσι ώστε, αυτά να μπορούν να χρησιμοποιηθούν, τόσο ως διαγνωστικό εργαλείο, όσο και στο σχεδιασμό της κατάλληλης θεραπείας των υπογόνιμων ασθενών. Στις επόμενες παραγράφους, παρουσιάζεται λεπτομερώς ο ρόλος των τριών AZF περιοχών και τα γονίδια, που εκφράζονται σε αυτές (17).

### 1.13.3 Περιοχές AZF (azoospermia factor)

#### 1.13.4 Περιοχή AZFa

Η περιοχή AZFa έχει μέγεθος 792kb και κωδικοποιεί δύο κύρια γονίδια, τα οποία είναι το USP9Y (ubiquitin-specific protease 9 on Y chromosome ή όπως ονομαζόταν παλιότερα DFFRY- Droshophila Fat Facets Related Y) και το DBY (dead box, Y ή αλλιώς DDX3Y). Τα ελλείμματα σε αυτή την περιοχή που οδηγούν στην απώλεια και των δύο αυτών γονιδίων, προκαλούν απλασία των γαμετικών κυττάρων (Sertoli cell only syndrome), μια κατάσταση, η οποία χαρακτηρίζεται από την παρουσία κυττάρων Sertoli στους όρχεις, αλλά από την έλλειψη σπερματοζωαρίων στην εκσπερμάτωση.

Το DBY, το κύριο γονίδιο που βρίσκεται στην περιοχή AZFa, έχει πιθανό ρόλο στη γονιμότητα, επειδή εντοπίζεται στους όρχεις και εμπλέκεται στην ανάπτυξη των γεννητικών κυττάρων, πριν από τη μείωση. Έπειτα, από μελέτη της μεταγραφικής δραστηριότητας αρκετών γονιδίων της περιοχής AZF, διαπιστώθηκε ότι οι άνδρες, που έπασχαν από το σύνδρομο Sertoli cell only παρουσίαζαν μειωμένα επίπεδα μεταγραφής του γονιδίου DBY, ενώ τα άλλα γονίδια, που εξετάστηκαν μεταγράφονταν κανονικά (18).

Το γονίδιο USP9Y συμμετέχει στη διαδικασία της σπερματογένεσης και ήταν το πρώτο, το οποίο εντοπίστηκε στην περιοχή AZFa. Αυτό το γονίδιο διαφέρει σημαντικά από τα άλλα γονίδια της AZF περιοχής, καθώς δεν κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη πρόσδεσης του RNA, αλλά λειτουργεί ως C-τελική υδρολάση της ουβικιτίνης. Πιο συγκεκριμένα, είναι γονίδιο, που εντοπίζεται σε ένα και μοναδικό

αντίγραφο, εμφανίζει ομολογία στο χρωμόσωμα X και εκφράζεται σε διάφορους ιστούς, καθώς δεν είναι εξειδικευμένο μόνο για την περιοχή των όρχεων (16). Ελλείμματα στην περιοχή AZFa, που οδηγούν στην απουσία του USP9Y προκαλούν αζωοσπερμία, ολιγοσπερμία ή ολιγοασθενοσπερμία (18). Αν και το γονίδιο USP9Y καταλαμβάνει λιγότερη από τη μισή περιοχή AZFa, βρέθηκε ότι λείπει στους υπογόνιμους άνδρες, αφού η πλειονότητα των ανδρών που φέρει μικροελλείμματα στην AZFa περιοχή χαρακτηρίζεται από την απουσία ολόκληρου αυτού του διαστήματος, που καταλαμβάνει το γονίδιο (16). Ωστόσο, φαίνεται ότι κατά κύριο λόγο, το παραπάνω γονίδιο εμπλέκεται στην αποτελεσματικότητα της σπερματογένεσης, καθώς μεταβιβάζεται από τον πατέρα στους απογόνους (18). Αυτά τα αποτελέσματα οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι και άλλα γονίδια σε αυτή την περιοχή μπορεί να είναι υπεύθυνα, είτε μεμονωμένα είτε σε συνδυασμό με το USP9Y, για τη δυσλειτουργία της σπερματογένεσης που παρατηρείται σε άντρες με μικροελλείμματα στην περιοχή AZFa (16).

#### 1.13.5 Περιοχή AZFb

Η AZFb περιοχή εκτείνεται σε 6,23Mb και κωδικοποιεί 12 γονίδια, 5 μονά και 7 σε πολλαπλά αντίγραφα. Μεταξύ αυτών τα EIF1AY, KDM5D, RPS4Y2, HSFY και RBMY1A1 εκφράζουν έναν παράγοντα έναρξης της μετάφρασης, μια απομεθυλάση της τέταρτης λυσίνης της ιστόνης 3 (H3K4), μια πρωτεϊνική υπομονάδα του ριβοσώματος απαραίτητη για την πρόσδεση του mRNA, έναν μεταγραφικό ενεργοποιητή της οικογένειας πρωτεϊνών θερμικού σοκ και μια πρωτεΐνη που συνδέεται στο mRNA και ενέχεται στη μεταφορά και αποθήκευση του, αντίστοιχα (19).

Μικροελλείμματα στην περιοχή AZFb προκαλούν σοβαρή δυσλειτουργία της σπερματογένεσης και πιο συγκεκριμένα στο στάδιο της πρώτης μειωτικής διαίρεσης (σπερματοκύτταρο πρώτης τάξης). Συνεπώς, η περιοχή αυτή παίζει σημαντικό ρόλο στη γονιμότητα του ατόμου. Μέχρι σήμερα, δύο κύρια γονίδια έχουν βρεθεί στη συγκεκριμένη περιοχή, το EIF1AY (translation-initiation factor 1A, Y isoform) και το RBMY (RNA binding motif on the Y).

Το κύριο γονίδιο στην περιοχή AZFb είναι το RBMY και υπάρχουν έξι αντίγραφα του γονιδίου που βρίσκεται στο χρωμόσωμα Y (18). Αποδείχθηκε ότι στην πραγματικότητα υπάρχει μια οικογένεια 20-50 γονιδίων και ψευδογονιδίων που επεκτείνεται και στους δύο βραχίονες του χρωμοσώματος Y, συμπεριλαμβανομένου ενός συμπλόκου μέσα στην περιοχή AZFb και το YRRM-σύμπλοκο αυτό μετονομάστηκε σε "οικογένεια γονιδίων RBMY". Αυτά τα αντίγραφα ανήκουν σε τουλάχιστον έξι υποοικογένειες, αλλά το RBMY-I είναι το

μόνο ενεργά μεταγραφόμενο γονίδιο και τα πιο λειτουργικά αντίγραφα εντοπίζονται στο διάστημα 6B, καθιστώντας το έτσι σημαντικό γονίδιο της AZFb. Κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη πρόσδεσης του RNA, η οποία είναι ένας, εξειδικευμένος για τους όρχεις, παράγοντας ματίσματος που εκφράζεται στους πυρήνες των σπερματογόνιων, των σπερματοκυττάρων και των σπερματιδών . Το γονίδιο EIF1AY κωδικοποιεί μία ισομορφή του eIF-1A στο Y, ο οποίος είναι ένας απαραίτητος παράγοντας που συμμετέχει στην έναρξη της μετάφρασης και έχει ομόλογο στο X. Ωστόσο, ο ακριβής ρόλος του γονιδίου στη σπερματογένεση είναι άγνωστος (16) .

Μια οικογένεια PRY γονιδίων βρίσκεται επίσης στην περιοχή AZFb του χρωμοσώματος Y. Τα γονίδια PRY συμμετέχουν στη ρύθμιση της απόπτωσης, μια σημαντική διαδικασία, κατά την οποία απομακρύνονται τα μη φυσιολογικά σπερματοζωάρια (18).

### 1.13.6 Περιοχή AZFc

Η AZFc περιοχή έχει μέγεθος περίπου 3,5Mb και περιέχει 3 οικογένειες γονιδίων, τα BPY2, CDY και DAZ. Το γονίδιο BPY2 κωδικοποιεί για μια έντονα φορτισμένη πρωτεΐνη που σχετίζεται με τη ρύθμιση του κυτταροσκελετού κατά την σπερματογένεση. Η CDY υπο-περιοχή κωδικοποιεί για δυο πρωτεΐνες, τις CDY1 & 2, οι οποίες ενέχονται στην μετα-μειωτική αναμόρφωση του πυρήνα καθώς και δρουν ως μεταγραφικοί παράγοντες. Η DAZ υπο-περιοχή κωδικοποιεί για τρεις πρωτεΐνες με ικανότητα σύνδεσης σε mRNA και παίζουν ρόλο στη διαμόρφωση της ανδρικής γαμετικής σειράς (19).

Το πιο σημαντικό γονίδιο της περιοχής AZFc είναι το DAZ (Deleted in Azoospermia). Αρχικά θεωρήθηκε ότι βρίσκεται σε ένα μοναδικό αντίγραφο, ενώ πλέον είναι γνωστό ότι αποτελεί μέλος μιας πολυγονιδιακής οικογένειας με περισσότερα από ένα αντίγραφο στο Y χρωμόσωμα, συγκεντρωμένα στην περιοχή AZFc. Ο ακριβής αριθμός των γονιδίων της οικογένειας εξακολουθεί να παραμένει άγνωστος, αν και έχουν βρεθεί τουλάχιστον τρία αντίγραφα μέσω της χαρτογράφησης περιορισμού και της τεχνικής Southern και επτά αντίγραφα, που αντιπροσωπεύουν είτε δραστικά γονίδια είτε ψευδογονίδια, μέσω του in situ υβριδισμού.

Η δομή του DAZ είναι παρόμοια με αυτή του γονιδίου RBMY. Κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη με μία μοναδική θέση πρόσδεσης του RNA στο N- τελικό άκρο και ένα C-τελικό άκρο, συμπεριλαμβανομένου μιας επαναλαμβανόμενης αλληλουχίας 24 αμινοξέων. Όπως το γονίδιο RBMY, έτσι και το DAZ μεταγράφεται και μεταφράζεται σε πρωτεΐνες μόνο στα αρσενικά γεννητικά κύτταρα (16). Το γονίδιο DAZ έχει τέσσερα αντίγραφα στο χρωμόσωμα Y . Γενικά, συμμετέχει σε



όλη τη διαδικασία της σπερματογένεσης, μιας και εκφράζεται σε όλα τα στάδια ανάπτυξης των σπερματοκυττάρων. Τα μικροελλείμματα στην περιοχή αυτού του γονιδίου μπορεί να προκαλέσουν олиγοσπερμία και αζωοσπερμία (18).

Παρόλο που δεν έχει κατασκευαστεί ακόμη ένας χάρτης για την αλληλουχία της περιοχής AZFc, αρκετά γονίδια, πέρα από το DAZ, έχουν χαρτογραφηθεί σε αυτή την περιοχή, μερικά εκ των οποίων αναφέρονται στη συνέχεια. Αυτά είναι το CDY1 (chromodomain Y1), το BPY2 (basic protein Y2), το PRY( PTA-BL related Y ) και το TTY2 (testis transcript Y2). Η λειτουργία αυτών των γονιδίων είναι άγνωστη, αλλά εμφανίζουν παρόμοια χαρακτηριστικά: βρίσκονται σε πολλαπλά αντίγραφα στο χρωμόσωμα Y, εκφράζονται μόνο στους όρχεις και είναι εξειδικευμένα για το Y χρωμόσωμα. Συγκεκριμένα, εντοπίστηκαν τρία γονίδια PRY και TTY2 στην AZFc μέσω της χαρτογράφησης περιορισμού. Ακόμη, δύο γονίδια CDY1 χαρτογραφήθηκαν στην ίδια περιοχή. Τα συγκεκριμένα επηρεάζουν τη γονιμότητα των αρσενικών ατόμων, αφού σε περιπτώσεις ασθενών που παρατηρήθηκε απουσία του γονιδίου DAZ έλειπε ένα τουλάχιστον αντίγραφο του CDY1. Για το BPY2 δεν υπάρχουν δεδομένα χαρτογράφησης (16).

<b>Γενετική ανωμαλία</b>	<b>Φαινότυπος</b>
Χρωμοσωμικές ανωμαλίες	Αζωοσπερμία - Νορμοσπερμία
Σύνδρομο Klinefelter	Αζωοσπερμία - Μερική олиγοσπερμία
Μετατόπιση κατά Robertson	Αζωοσπερμία - Νορμοσπερμία
Μικροελλείμματα στο χρωμόσωμα Y	Αζωοσπερμία - Ολιγοσπερμία
Μικροελλείμματα στην AZFa περιοχή	Αζωοσπερμία, σύνδρομο Sertoli cell-only
Μικροελλείμματα στην AZFb περιοχή	Αζωοσπερμία, δυσλειτουργία σπερματογένεσης
Μικροελλείμματα στην AZFc περιοχή	Αζωοσπερμία - Ολιγοσπερμία
Μικροελλείμματα σε μερικά τμήματα της AZFc περιοχής	Αζωοσπερμία - Νορμοσπερμία

*Πίνακας 3: Οι πιο κοινότεροι φαινότυποι στην ανδρική υπογονιμότητα, που σχετίζονται με γενετικές ανωμαλίες (17).*

### 1.13.7 Γονιδιακές διαταραχές - Πολυμορφισμοί

Πολλά αυτοσωμικά γονίδια μελετώνται για τον πιθανό ρόλο τους στην ανδρική υπογονιμότητα. Ειδικότερα, στο γονίδιο CFTR, το οποίο βρίσκεται στο χρωμόσωμα 7, έχουν βρεθεί μεταλλάξεις σε ποσοστό 60% - 90% σε άνδρες, που πάσχουν από αζωοσπερμία. Στα άτομα αυτά παρατηρούνται είτε δύο μεταλλάξεις ήπιας μορφής, είτε συνδυασμός δύο μεταλλάξεων, εκ των οποίων η μία είναι σοβαρής μορφής. Ένα επιπλέον γονίδιο είναι το SHBG, το οποίο εδράζεται στο χρωμόσωμα 17 και φαίνεται να συμμετέχει στη διαδικασία της σπερματογένεσης και ειδικότερα ελέγχει τη συγκέντρωση των ανδρογόνων στους όρχεις. Τα ανδρογόνα παίζουν σημαντικό ρόλο στη διαφοροποίηση του φύλου και στη σπερματογένεση και επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό τη γονιμότητα. Πολυμορφισμοί του γονιδίου SHBG, που οδηγούν σε αλληλόμορφα μικρότερου μεγέθους έχουν συσχετιστεί με αυξημένα επίπεδα σπερματογένεσης και υψηλότερη συγκέντρωση σπέρματος. Πρόσθετα αυτοσωμικά γονίδια, τα οποία φαίνεται να εμπλέκονται στην υπογονιμότητα είναι τα γονίδια των υποδοχέων οιστρογόνων ESR1 (χρωμόσωμα 6) και ESR2 (χρωμόσωμα 14). Μελέτες αποδεικνύουν συσχέτιση μεταξύ δυσλειτουργίας της σπερματογένεσης και ανεπάρκειας οιστρογόνων, καθώς οι πολυμορφισμοί επηρεάζουν την παραγωγή των σπερματοζωαρίων. Ένα ακόμη υποψήφιο γονίδιο είναι το FSHR (χρωμόσωμα 2). Το γονίδιο αυτό, κωδικοποιεί για τον υποδοχέα της ωοθηλακιοτρόπου ορμόνης (FSH), η οποία έχει σημαντικό ρόλο στη φυσιολογική λειτουργία των γονάδων. Ελλείμματα στην αλληλουχία του γονιδίου αυτού έχουν σχετιστεί με ελαττωματική σπερματογένεση. Επίσης, το αυτοσωμικό ομόλογο του γονιδίου DAZ, DAZL, είναι ένα άλλο γονίδιο που εξακολουθεί να μελετάται για τη συσχέτισή του με την ανδρική υπογονιμότητα. Το γονίδιο εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 3 και κωδικοποιεί τις πρωτεΐνες πρόσδεσης RNA που εμπλέκονται στη ρύθμιση της πρωτεϊνικής έκφρασης και της μείωσης. Έχουν ανακαλυφθεί δύο διαφορετικά SNPs, ένα στο εξόνιο 2 (A260G/T12A/ rs11710967) και ένα στο εξόνιο 3 (A386G/ T54A). Το SNP στο εξόνιο 3 συνδέεται με την υπογονιμότητα, σύμφωνα με πειραματικές διαδικασίες, που πραγματοποιήθηκαν στον πληθυσμό της Κίνας, ενώ παράλληλα απλότυποι στο γονίδιο DAZL σχετίζονται με τον αριθμό των σπερματοζωαρίων και την αποτυχία της σπερματογένεσης. Ταυτόχρονα, το γονίδιο USP26 εντοπίζεται στο μακρύ βραχίονα του X χρωμοσώματος και εκφράζεται στους όρχεις στα πρώιμα στάδια της σπερματογένεσης. Σύμφωνα με έρευνες, πολυμορφισμοί του γονιδίου σχετίζονται με μειωμένη γονιμότητα. Τέλος, το γονίδιο MTHFR (methylenetetrahydrofolate reductase), το οποίο βρίσκεται στο μικρό βραχίονα του χρωμοσώματος 1 κωδικοποιεί για ένα ένζυμο, που εμπλέκεται στο μεταβολισμό του φολικού οξέος, ένας απαραίτητος παράγοντας στη μεθυλίωση του DNA και στη σπερματογένεση. Η μειωμένη δραστηριότητα του MTHFR μπορεί να οδηγήσει στη δυσλειτουργία του μεταβολισμού του φολικού οξέος,

προκαλώντας σφάλματα στη μεθυλίωση του γονιδιωματικού DNA και επακόλουθες επιπτώσεις στη σπερματογένεση (17).

### 1.13.8 Συγγενείς και επίκτητες ανωμαλίες

Οι συγγενείς και επίκτητες ανωμαλίες οι οποίες οδηγούν στην εκδήλωση της ανδρικής υπογονιμότητας συγκεντρώνονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 4) (WHO, 2000).

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

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

## 1.14 Η αντιμετώπιση της υπογονιμότητας

### 1.14.1 Εξωσωματική γονιμοποίηση (IVF/ in vitro fertilization)

Το πρώτο “παιδί του σωλήνα”, γεννήθηκε το 1978 γεγονός που αποτέλεσε ορόσημο στο πεδίο της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Η μέθοδος της εξωσωματικής γονιμοποίησης εφαρμόστηκε για πρώτη φορά από τους Steptoe και Edwards και πραγματοποιείται όταν το σπέρμα δεν παρουσιάζει σοβαρά προβλήματα. Αρχικά χορηγούνται ορμόνες στη γυναίκα, ώστε να αυξηθεί η παραγωγή ωαρίων και οι ωοθήκες της παρακολουθούνται με υπερηχογράφο, για να προσδιοριστεί ο χρόνος απελευθέρωσης των ώριμων ωαρίων. Στη συνέχεια, με

χρήση τοπικού αναισθητικού ο γιατρός συλλέγει τα ωάρια με ένα ειδικό σωλήνα. Τα ωάρια διατηρούνται σε κατάλληλο θρεπτικό υλικό σε επωαστικό κλίβανο. Παράλληλα, παραλαμβάνεται σπέρμα από τον άντρα, το οποίο διαχωρίζεται με φυγοκέντρηση σε σπερματοζωάρια και σε σπερματικό υγρό. Ένα μέρος από τα σπερματοζωάρια προστίθεται στο υλικό που περιέχει τα ωάρια. Αν συμβεί γονιμοποίηση, το έμβρυο παραλαμβάνεται, διατηρείται για δύο ή περισσότερες ημέρες σε θρεπτικό υλικό, ώσπου να φτάσει στο στάδιο των τεσσάρων κυττάρων. Στη συνέχεια τοποθετείται στη μήτρα της μητέρας, όπου μπορεί να εμφυτευτεί στα τοιχώματά της. Το ποσοστό επιτυχίας αυτής της μεθόδου είναι 10% περίπου. Για να αυξηθεί η πιθανότητα επιτυχίας, συνήθως τοποθετούνται περισσότερα του ενός έμβρυα. Αυτό έχει, σε σπάνιες περιπτώσεις, ως αποτέλεσμα την πολλαπλή κύηση. Ωστόσο, η μέθοδος αυτή δεν ενδείκνυται σε περιπτώσεις όπου τα σπερματοζωάρια παρουσιάζουν μικρό αριθμό και χαμηλή κινητικότητα (20).

#### **1.14.2 Ενδοκυτταροπλασματική Σπερματέγχυση (ICSI/ Intracytoplasmic sperm injection)**

Η εισαγωγή της ενδοκυτταροπλασματικής έγχυσης σπερματοζωαρίων (ICSI) από τους Palermo et al, το 1992 αποτέλεσε πολύ σπουδαίο βήμα για τη θεραπευτική αντιμετώπιση μεγάλου αριθμού υπογόνιμων ζευγαριών με κύρια αιτία της υπογονιμότητας, τον ανδρικό παράγοντα. Η θεραπευτική αυτή προσέγγιση ενδείκνυται στην περίπτωση ατόμων που πάσχουν από ολιγοασθενοτεροσπερμία και εφαρμόζεται όταν η μέθοδος της εξωσωματικής γονιμοποίησης δεν είναι αποτελεσματική και λόγω του γεγονότος ότι είναι πιο απλής τεχνολογίας και οικονομικά πιο προσιτή. Κατά την ICSI, ένα και μόνο υγιές σπερματοζωάριο εισάγεται μέσα στο ώριμο ωάριο μέσω της διαδικασίας της μικροέγχυσης, επιτυγχάνοντας τη γονιμοποίησή του (21).

## Σκοπός:

Στις μέρες μας, έχει αυξηθεί σημαντικά το ενδιαφέρον για την αποτελεσματική και έγκαιρη πρόληψη, διάγνωση και θεραπεία της ανδρικής υπογονιμότητας. Για το λόγο αυτό, είναι απαραίτητη η μελέτη των αιτιών της και πιο συγκεκριμένα της συμβολής του ανδρικού παράγοντα, στον οποίο συμπεριλαμβάνονται και τα μικροελλείμματα του χρωμοσώματος Y.

Γενικά, το χρωμόσωμα Y μπορεί να καθορίσει την ανδρική γονιμότητα, διότι περιέχει πολλά από τα γονίδια που είναι απαραίτητα για τη σπερματογένεση και την ανάπτυξη των αρσενικών γονάδων. Μικροελλείμματα σε γονίδια των τριών περιοχών AZF (Azoospermia-Factor: AZFa, AZFb, AZFc) του χρωμοσώματος Y έχουν συσχετιστεί με μειωμένη γονιμότητα, αδυναμία σπερματογένεσης και ωρίμανσης των γαμετικών κυττάρων. Ωστόσο, τα μικροελλείμματα σε αυτές τις περιοχές είναι συμβατά με την παραγωγή σπερματοζωαρίων, σε μειωμένο ρυθμό βέβαια, και γι' αυτό το λόγο είναι δυνατόν να μεταβιβαστούν από τον πατέρα στους απογόνους. Συνεπώς, ο έλεγχος των μικροελλειμμάτων φαίνεται ότι είναι πολύ σημαντικός πριν εφαρμοσθούν οι δύο τεχνικές αντιμετώπισης της ανδρικής υπογονιμότητας.

Σκοπός της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας είναι η διερεύνηση ορισμένων μικροελλειμμάτων του χρωμοσώματος Y όσον αφορά στην επίδρασή τους στην ποιότητα και γονιμοποιητική ικανότητα του σπέρματος. Η ενδελεχής και ολοκληρωμένη γνώση σχετικά με τους παράγοντες που μπορεί να οδηγήσουν σε προβλήματα γονιμότητας, πρόκειται να συμβάλει σε μία ολοκληρωμένη άποψη σχετικά με το προφίλ του ασθενή, ώστε να προταθεί και η κατάλληλη τεχνική αντιμετώπισης, που θα οδηγήσει σε μία επιτυχή κύηση. Στη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δείγματα αίματος και σπέρματος από άνδρες με κακή ποιότητα σπέρματος, αλλά και νορμοσπερμικών ανδρών με προβλήματα τεκνοποίησης, προκειμένου να διασαφηνιστεί η αιτία της ανδρικής υπογονιμότητας.

## 2. Υλικά και Μέθοδοι

### 2.1 Βιολογικό υλικό

Στη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκε γενετικό υλικό που απομονώθηκε από βιολογικό δείγμα σπέρματος τόσο από μη νορμοσπερμικούς, όσο και από νορμοσπερμικούς άνδρες. Τα δείγματα συλλέχθηκαν στο κέντρο εξωσωματικής γονιμοποίησης “EMBRYOLAB”. Μέχρι τώρα έχουν παραληφθεί και αναλυθεί συνολικά 30 δείγματα, 12 με φυσιολογικούς και 18 με διάφορους μη φυσιολογικούς φαινοτύπους σπέρματος. Τα δείγματα σπέρματος μετά τη συλλογή τους αναλύθηκαν και κατατάχθηκαν στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 5). Αξίζει να αναφερθεί ότι, σύμφωνα με τον κώδικα δεοντολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, αλλά και του εργαστηρίου η έρευνα στο ανθρώπινο βιολογικό υλικό δεσμεύεται από τις αρχές της συναίνεσης ύστερα από πληροφόρηση του δότη, και της προστασίας των ευαίσθητων προσωπικών δεδομένων που συλλέγονται και υπόκεινται σε επεξεργασία.

Δείγμα	Αριθμός σπερματοζωαρίων	Κινητικότητα σπερματοζωαρίων	Μορφολογία σπερματοζωαρίων
1	Ολιγοσπερμία	Φυσιολογική	Τερατοσπερμία
2	Φυσιολογικός	Φυσιολογική	Φυσιολογική
3	Φυσιολογικός	Φυσιολογική	Φυσιολογική
4	Φυσιολογικός	Φυσιολογική	Φυσιολογική
5	Ολιγοσπερμία	Φυσιολογική	Φυσιολογική
6	Ολιγοσπερμία	Ασθενοσπερμία	Τερατοσπερμία
7	Ολιγοσπερμία	Φυσιολογική	Φυσιολογική
8	Ολιγοσπερμία	Φυσιολογική	Τερατοσπερμία
9	Φυσιολογικός	Φυσιολογική	Τερατοσπερμία
10	Ολιγοσπερμία	Ασθενοσπερμία	Τερατοσπερμία
11	Φυσιολογικός	Φυσιολογική	Φυσιολογική
12	Ολιγοσπερμία	Ασθενοσπερμία	Τερατοσπερμία
13	Φυσιολογικός	Φυσιολογική	Φυσιολογική
14	Ολιγοσπερμία	Φυσιολογική	Φυσιολογική
15	Ολιγοσπερμία	Φυσιολογική	Τερατοσπερμία
16	Ολιγοσπερμία	Ασθενοσπερμία	Τερατοσπερμία
17	Ολιγοσπερμία	Φυσιολογική	Τερατοσπερμία
18	Ολιγοσπερμία	Φυσιολογική	Τερατοσπερμία
19	Φυσιολογικός	Φυσιολογική	Φυσιολογική

20	Ολιγοσπερμία	Ασθενοσπερμία	Τερατοσπερμία
92	Φυσιολογικός	Φυσιολογική	Φυσιολογική
93	Φυσιολογικός	Φυσιολογική	Φυσιολογική
94	Φυσιολογικός	Φυσιολογική	Φυσιολογική
95	Ολιγοσπερμία	Φυσιολογική	Φυσιολογική
96	Φυσιολογικός	Φυσιολογική	Φυσιολογική
97	Ολιγοσπερμία	Φυσιολογική	Τερατοσπερμία
98	Φυσιολογικός	Φυσιολογική	Φυσιολογική
99	Ολιγοσπερμία	Φυσιολογική	Τερατοσπερμία
100	Ολιγοσπερμία	Φυσιολογική	Φυσιολογική
101	Φυσιολογικός	Φυσιολογική	Φυσιολογική

Πίνακας 5 : Κατηγοριοποίηση των δειγμάτων προς εξέταση

## 2.2 Απομόνωση γονιδιωματικού DNA

### 2.2.1 Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από σπέρμα

#### Υλικά

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

#### Μεθοδολογία

Για την πραγματοποίηση της απομόνωσης του DNA χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο "Preparation of Genomic DNA from Mammalian Sperm" (Weyrich, 2012). Σκοπός της διαδικασίας είναι η απομόνωση γενετικού υλικού από σπέρμα. Το ανθρώπινο σπέρμα αποτελείται από σπερματικό υγρό και σπερματοζωάρια. Το σπερματικό υγρό περιλαμβάνει πρωτεϊνικά και μη πρωτεϊνικά συστατικά όπως είναι η φρουκτόζη, τα οποία μπορούν να μειώσουν την ποιότητα και την καθαρότητα του DNA. Για το λόγο αυτό, συνίσταται η χρήση αιθανόλης για απομάκρυνση του σπερματικού υγρού. Από την άλλη πλευρά, τα σπερματοζωάρια περιβάλλονται από μια λιπιδιακή μεμβράνη πλούσια σε δισουλφιδικούς δεσμούς. Η δομή της μεμβράνης εμποδίζει τη λύση των κυττάρων και δυσκολεύει την απομόνωση του γενετικού υλικού. Για να γίνει παράκαμψη του εμποδίου αυτού, χρησιμοποιείται ένας ισχυρός αντιοξειδωτικός παράγοντας, το DTT. Επιπλέον, η σύσταση του διαλύματος ομογενοποίησης (Lysis Buffer) επιτρέπει τη ρήξη των κυτταρικών /πυρηνικών μεμβρανών και την απελευθέρωση

του DNA. Ακόμα, το διάλυμα ομογενοποίησης (Lysis Buffer) περιέχει EDTA έναν χηλικό υποκαταστάτη, που έχει την ικανότητα να δεσμεύει μεταλλικά ιόντα. Τα μεταλλικά ιόντα αποτελούν συμπαράγοντα για τη δράση των δεσοξυριβονουκλεασών, οπότε η δέσμευσή τους προστατεύει το DNA από την αποικοδόμηση. Επιπρόσθετα, η παρουσία του ρυθμιστικού διαλύματος, Tris, διατηρεί το pH σε ουδέτερη περιοχή. Τέλος, το SDS χρησιμοποιείται ως ανιονικό απορρυπαντικό για τη διάσπαση των κυτταρικών τοιχωμάτων και την αποδιάταξη των πρωτεϊνών. Αντίστοιχη δράση παρουσιάζει και η πρωτεϊνάση K, η οποία προκαλεί την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών. Όμως, η πλήρης απομάκρυνση των πρωτεϊνών και των κυτταρικών υπολειμμάτων πραγματοποιείται μέσω εκχύλισης με φαινόλη / χλωροφόρμιο, ενώ το DNA ανακτάται μετά από κατακρήμνιση με αιθανόλη.

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

### **2.2.2 Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από αίμα**

Η απομόνωση του γονιδιωματικού DNA από δείγματα αίματος πραγματοποιήθηκε επίσης με την εκχύλιση με φαινόλη / χλωροφόρμιο, αν και μπορεί να γίνει και με τη χρήση κατάλληλου kit (PureLink Genomic DNA Mini Kit, Invitrogen).

## **2.3 Χειρισμοί νουκλεϊκών οξέων**

### **2.3.1 Εκχύλιση με φαινόλη/χλωροφόρμιο**

#### Μεθοδολογία

Η εκχύλιση των νουκλεϊκών οξέων με φαινόλη / χλωροφόρμιο πραγματοποιείται για την απομάκρυνση των λιπιδίων και των πρωτεϊνών, ώστε το DNA να είναι υψηλής καθαρότητας. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιείται φαινόλη για το διαχωρισμό



του DNA από τα λιπίδια και τις πρωτεΐνες με τη δημιουργία δύο διακριτών φάσεων, της υδατικής φάσης, όπου βρίσκονται τα νουκλεϊκά οξέα και της οργανικής φάσης, που βρίσκονται τα λιπίδια και οι πρωτεΐνες. Η παρουσία του χλωροφορμίου έχει ως αποτέλεσμα τον καλύτερο διαχωρισμό των δύο φάσεων, προσδίδοντας μεγαλύτερη πυκνότητα στην οργανική φάση.

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

### 2.3.2 Κατακρήμνιση νουκλεϊκών οξέων με αιθανόλη

#### Υλικά

- CH<sub>3</sub>COONa (3M)
- Αιθανόλη
- TE-buffer

#### Μεθοδολογία

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

1. Σε διάλυμα DNA όγκου  $V$  προστίθεται διάλυμα οξικού νατρίου (CH<sub>3</sub>COONa), όγκου  $V/10$ , συγκέντρωσης 3M και αιθανόλη όγκου 2V.

2. Το μείγμα ύστερα από σχετικά ήπια ανάδευση τοποθετείται στους  $-80^{\circ}\text{C}$  για 1-2 ώρες και έπειτα φυγοκεντρείται στις 13,000 rpm για 20 λεπτά στους  $4^{\circ}\text{C}$ .
3. Στη συνέχεια, απομακρύνεται προσεκτικά το υπερκείμενο υγρό και προστίθενται 500μl αιθανόλης 75%
4. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13,000 στροφές για 5 λεπτά και απομάκρυνση του υπερκειμένου.
5. Το ίζημα ξεραίνεται σε θερμοκρασία δωματίου και επαναδιαλύεται σε TE-buffer ή υδατικό διάλυμα.

## 2.4 Ποσοτικός προσδιορισμός του DNA

### 2.4.1 Με χρήση φασματοφωτομέτρου

Η ποσοτικοποίηση των νουκλεϊκών οξέων μέσω φωτομέτρησης βασίζεται στο γεγονός ότι το DNA και το RNA απορροφούν εκλεκτικά στα 260nm του φάσματος της υπεριώδους ακτινοβολίας (UV). Η τιμή της οπτικής απορρόφησης 1 ( $\text{OD}_{260} = 1$ ) αντιστοιχεί σε συγκέντρωση 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  δίκλωνου DNA, 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  μονόκλωνου DNA ή και  $\sim 20\mu\text{g}/\text{ml}$  για μονόκλινα ολιγονουκλεοτίδια. Ο λόγος των τιμών OD στα 260nm και 280nm παρέχει μια εκτίμηση της καθαρότητας του DNA, δηλαδή κατά πόσο αυτό είναι απαλλαγμένο από πρωτεΐνες. Για καθαρά διαλύματα DNA και RNA ο λόγος  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$  κυμαίνεται μεταξύ 1.8-2.0.

### 2.4.2 Με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

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

## 2.5 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR

### 2.5.1 Αρχή της μεθόδου

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

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) αποτελεί μια γρήγορη και εύκολη διαδικασία που επιτρέπει τον επιλεκτικό ενζυμικό πολλαπλασιασμό in vitro ειδικών αλληλουχιών DNA από ένα σύνθετο μείγμα μορίων. Η μέθοδος βασίζεται σε συνεχείς κύκλους πολυμερισμού της επιλεγμένης αλληλουχίας με τη βοήθεια μίας DNA πολυμεράσης και δύο ειδικών τμημάτων μονόκλωνων ολιγονουκλεοτιδίων.

### 2.5.2 Στάδια της αντίδρασης

**Κάθε κύκλος πολυμερισμού αποτελείται από τα εξής βήματα:**

1. Την αποδιάταξη του DNA που πραγματοποιείται συνήθως σε θερμοκρασία 94°C για 30 δευτερόλεπτα.
2. Την υβριδοποίηση των αλυσίδων του DNA με τους αντίστοιχους συμπληρωματικούς εκκινητές. Η θερμοκρασία και ο χρόνος που χρειάζεται για να γίνει η υβριδοποίηση των εκκινητών εξαρτάται από τη συγκέντρωση τους στην αντίδραση, το μήκος και την αλληλουχία των βάσεων τους. Η θερμοκρασία της αντίδραση για την υβριδοποίηση (T<sub>a</sub>) ρυθμίζεται περίπου 5°C χαμηλότερα από το σημείο τήξης (T<sub>m</sub>) των εκκινητών.
3. Την επιμήκυνση μέσω των εκκινητών μιας συμπληρωματικής αλυσίδας. Ο χρόνος για την επιμήκυνση εξαρτάται από το μήκος κι τη συγκέντρωση της αλληλουχίας του στόχου και από τη θερμοκρασία της αντίδρασης. Συνήθως, η επιμήκυνση πραγματοποιείται σε θερμοκρασία 72°C, στην οποία η T<sub>aq</sub> πολυμεράση προσθέτει 35-100 νουκλεοτίδια ανά δευτερόλεπτο.

Πιο συγκεκριμένα, το πρόγραμμα της αντίδρασης PCR , που εφαρμόστηκε παρουσιάζεται στον Πίνακα.

Πρόγραμμα PCR		
Στάδιο	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος
Initial denaturation	95	4min
Denaturation	94	40 sec
Primer annealing	53-54	40 sec
Extension	72	40 sec
Final extension	72	10 min

Πίνακας 6: Το πρόγραμμα της PCR που εφαρμόστηκε.

### Συστατικά της αντίδρασης

Μια αντίδραση PCR απαιτείται να περιέχει τα εξής συστατικά:

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

Το πρωτόκολλο της αντίδρασης PCR φαίνεται στον παρακάτω πίνακα, αν και χρειάστηκε να τροποποιηθεί, καθώς προστέθηκε 1 μl DNA, αντί του 0.5 μl, ώστε να παραχθεί το επιθυμητό προϊόν.

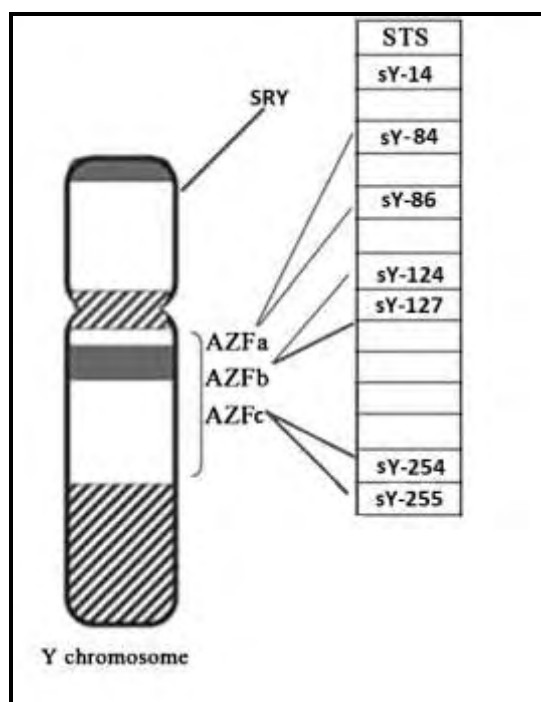
Συστατικά	Ποσότητες	Αρχική Συγκέντρωση	Τελική Συγκέντρωση
<b>DNA</b>	0.5 μL DNA από σπέρμα	-	-
<b>Buffer</b>	5 μL	10X (Mg <sup>2+</sup> 15mM)	1X (Mg <sup>2+</sup> 1.5mM)
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	1 μL	25 mM	0.5 mM
<b>dNTPs</b>	1 μL	40 mM	0.8 mM
<b>Εκκινητής Fw</b>	1 μL	50 pmol/μL	1 pmol/μL
<b>Εκκινητής Rv</b>	1 μL	50 pmol/μL	1 pmol/μL
<b>KAPA Taq</b>	0.2 μL	5 U/μL	0.02 U/μL
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	Έως τα 50 μL	-	-

Πίνακας 7: Το πρωτόκολλο της PCR που ακολουθήθηκε.

## 2.6 Χρήσεις δεικτών STS markers

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

Λόγω της συνήθως μικρής έκτασης των ελλειμμάτων γίνεται χρήση συνδυασμού STS για τον εντοπισμό τους. Γενικά έχουν ελεγχθεί πάνω από 131 STS, ωστόσο στην παρούσα μελέτη έγινε έλεγχος μόνο σε 8. Από αυτά τα 6 ήταν χωρισμένα σε 3 ζεύγη που εντοπίζονταν στα όρια των AZFa, AZFb, AZFc περιοχών, ενώ τα υπόλοιπα δύο STS αφορούσαν το γονίδιο SRY χρησιμεύοντας σαν ένα εσωτερικό control (sY\_14, SRY). Τα τρία διαφορετικά ζεύγη συνδέονται με τις τρεις διαφορετικές περιοχές AZF: a (sY\_84 και sY\_86), b (sY\_127 και sY\_134) και c (sY\_254 και sY\_255), όπως φαίνονται και στην παρακάτω εικόνα και αναλύθηκαν με στόχο την εξασφάλιση μεγαλύτερης αξιοπιστίας των αποτελεσμάτων. Κάθε STS αντιπροσωπεύει μία μη πολυμορφική περιοχή και πιθανή απουσία ενίσχυσής του έπειτα από αντίδραση PCR υποδηλώνει την απουσία της αντίστοιχης περιοχής ενδιαφέροντος AZF στο χρωμόσωμα Y. Η ύπαρξη ή μη του εκάστοτε STS αναλύθηκε με τη χρήση της μεθόδου PCR και τα αποτελέσματα οπτικοποιήθηκαν με τη βοήθεια ηλεκτροφόρησης σε πηκτική αγαρόζης.



Εικόνα 8: Τμήματα των περιοχών AZF, που ενισχύθηκαν από τα αντίστοιχα ζεύγη εκκινητών (22).

Για τις αντιδράσεις PCR, σύμφωνα με το πρωτόκολλο του Πίνακα χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές που παρουσιάζονται στον Πίνακα.

Εκκινητές	Αλληλουχία (5'→3')	Μέγεθος PCR προϊόντος	Θερμοκρασία αποδιάταξης (T <sub>m</sub> )	GC%
<b>SY84_F</b>	AGAAGGGTCTGAAAGCAGGT	326	57,3	50
<b>SY84_R</b>	GCCTACTACCTGGAGGCTTC		61,4	60
<b>SY86_F</b>	GTGACACACAGACTATGCTTC	320	57,9	47,6
<b>SY86_R</b>	ACACACAGAGGGACAACCCT		59,4	55
<b>SY127_F</b>	GGCTCACAAACGAAAAGAAA	274	53,2	40
<b>SY127_R</b>	CTGCAGGCAGTAATAAGGGA		57,3	50
<b>SY134_F</b>	GTCTGCCTCACCATAAAACG	301	57,3	50
<b>SY134_R</b>	ACCACTGCCAAAACCTTCAA		53,2	40
<b>SY254_F</b>	GGGTGTTACCAGAAGGCAAA	380	57,3	50
<b>SY254_R</b>	GAACCGTATCTACCAAAGCAGC		60,3	50
<b>SY255_F</b>	GTTACAGGATTCGGCGTGAT	123	57,3	50
<b>SY255_R</b>	CTCGTCATGTGCAGCCAC		58,2	61,1
<b>SY14_F</b>	GAATATCCCGCTCTCCGGA	470	59	55
<b>SY14_R</b>	GCTGGGCTCCACTTGAG		59,9	55

Πίνακας 8: Οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται για την ενίσχυση των STS: SY\_14, SY\_84, SY\_86, SY\_127, SY\_134, SY\_254, SY\_255.

## 2.7 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

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

- Το μέγεθος του DNA. Γραμμικά δίκλινα DNA κινούνται σε ρυθμό αντιστρόφως ανάλογο του log του μοριακού βάρους.
- Την συγκέντρωση της αγαρόζης. Η κινητικότητα ενός κομματιού DNA διαφέρει σε πήκτωμα διαφορετικής συγκέντρωσης αγαρόζης. Χρησιμοποιώντας πηκτώματα διαφορετικών συγκεντρώσεων μπορούμε να διαχωρίσουμε ένα μεγάλο εύρος μεγεθών DNA.
- Τη στερεοδιάταξη του DNA. Η κλειστή (υπερελικωμένη) κυκλική μορφή (μορφή I), η ανοιχτή κυκλική μορφή (μορφή II) και το γραμμικό DNA (μορφή III) του ίδιου μοριακού βάρους έχουν διαφορετική κινητικότητα σε πηκτώματα αγαρόζης. Οι σχετικές κινητικότητες των τριών μορφών εξαρτώνται κυρίως από τη συγκέντρωση αγαρόζης στο πήκτωμα, αλλά επηρεάζονται επίσης από την ένταση του ρεύματος, την ιονική ισχύ του ρυθμιστικού διαλύματος και τον βαθμό υπερελίκωσης της μορφής I του DNA. Κάτω από ορισμένες συνθήκες, η μορφή I κινείται γρηγορότερα από την III. Κάτω από άλλες συνθήκες συμβαίνει το αντίστροφο.

### Υλικά

- Loading Buffer
- TAE 0,5X
- Αγαρόζη
- Χρωστική Serva
- Ladder

### Μεθοδολογία

1. Ζυγίζεται η επιθυμητή ποσότητα αγαρόζης η οποία αναμιγνύεται με συγκεκριμένο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης συνήθως 0,5 x

ΤΑΕ. Η αγαρόζη διαλύεται με τη βοήθεια βρασμού ώσπου το διάλυμα να γίνει τελείως διαυγές.

2. Στη συνέχεια προστίθεται διάλυμα χρωστικής Serva σε τελική συγκέντρωση 0.1 µg/ml.
3. Πριν τη στερεοποίηση του πηκτώματος, το διάλυμα εισάγεται σε ένα γυάλινο καλούπι συγκεκριμένων διαστάσεων (μήτρα πολυμερισμού ηλεκτροφορητικής συσκευής). Οι θέσεις των δειγμάτων DNA (πηγαδάκια) σχηματίζονται με τη βοήθεια ειδικής μήτρας που τοποθετείται στη συσκευή (χτενάκια) πριν τον πολυμερισμό του πηκτώματος.
4. Στα δείγματα DNA που πρόκειται να αναλυθούν προστίθεται διάλυμα χρωστικής Loading buffer.
5. Όταν στερεοποιηθεί το διάλυμα τοποθετείται στην ηλεκτροφορητική συσκευή η οποία είναι πληρωμένη με διάλυμα ηλεκτροφόρησης (αντίστοιχο με αυτό που έχει κατασκευαστεί το πήκτωμα) τόσο ώστε να επικαλύπτει το πήκτωμα.
6. Τα δείγματα τοποθετούνται στα πηγαδάκια και αναλύονται σε οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης.
7. Προκειμένου να είναι δυνατή η εκτίμηση του μεγέθους των τμημάτων DNA που αναλύονται, ηλεκτροφορείται μαζί με τα δείγματα και ο μάρτυρας μοριακών βαρών (ladder).

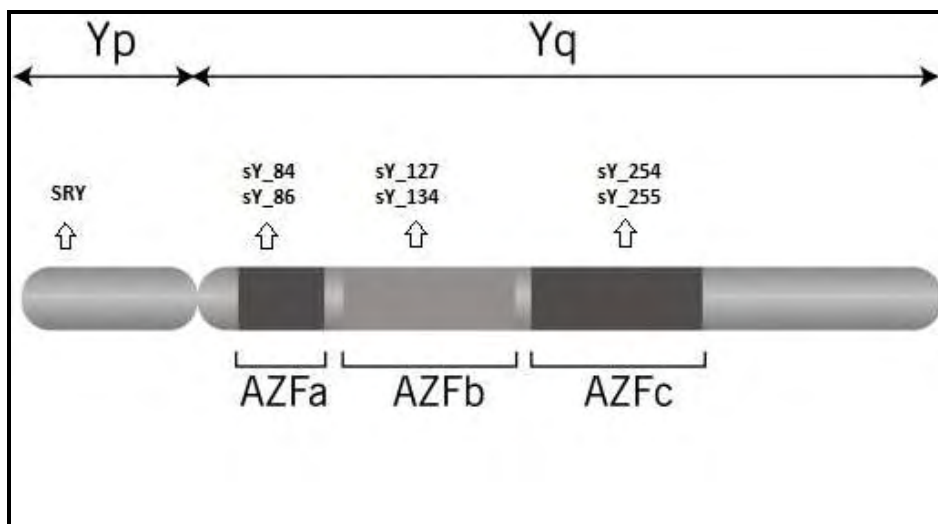


### 3. Αποτελέσματα

#### 3.1 PCR ενίσχυση των υπό μελέτη τόπων

Το πρώτο στάδιο της συγκεκριμένης εργασίας περιελάμβανε την ενίσχυση συγκεκριμένων γενετικών τόπων του χρωμοσώματος Y μέσω της τεχνικής PCR. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιήθηκαν τα κατάλληλα ζεύγη εκκινητών (Πίνακας 8). Αναλυτικά, τόσο οι συνθήκες της αντίδρασης, που ακολουθήθηκαν, όσο και το πρωτόκολλο της αντίδρασης παρουσιάζονται αντίστοιχα στον Πίνακα 6 και στον Πίνακα 7.

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

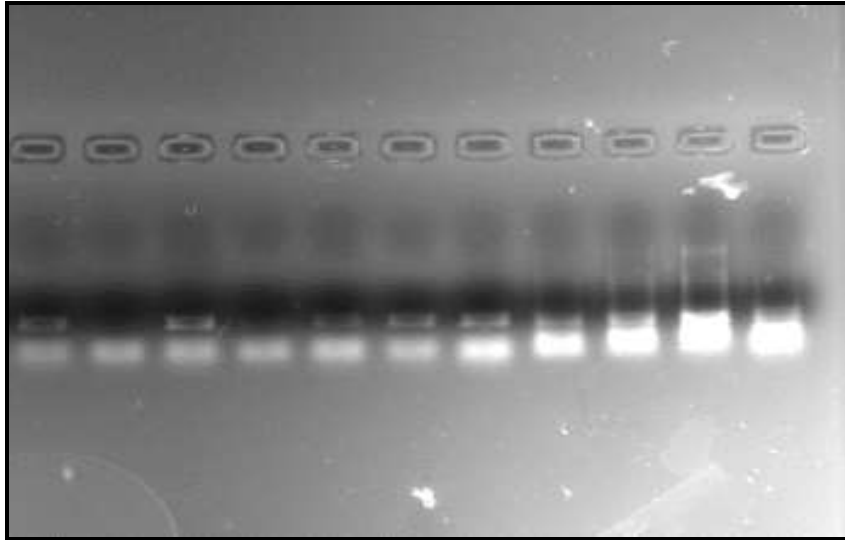


Εικόνα 9: Σχηματική απεικόνιση του χρωμοσώματος Y και των τμημάτων των AZF περιοχών, που ενισχύθηκαν.

#### 3.2 Γονίδια της AZFa περιοχής

##### i. SY\_84

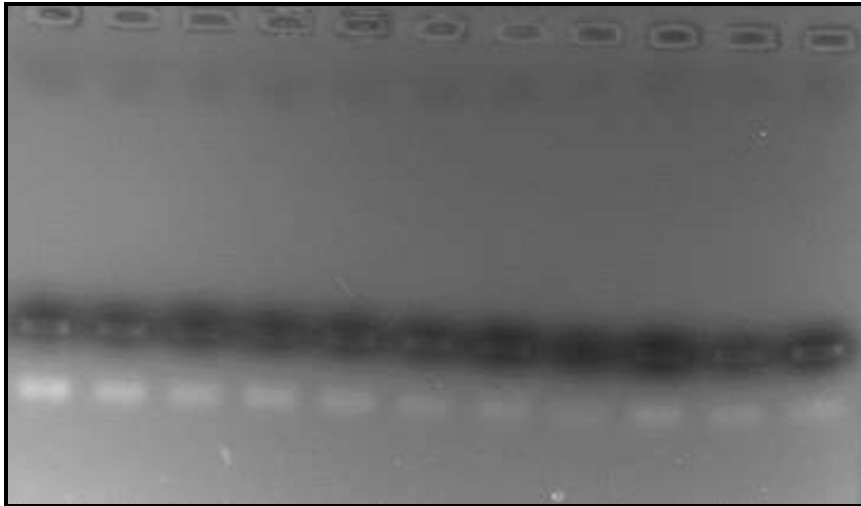
Χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινητών SY84\_F & SY84\_R σύμφωνα με τον πίνακα 8 και τα αποτελέσματα της ενίσχυσης φαίνονται στην παρακάτω εικόνα.



*Εικόνα 10: Ενδεικτική ενίσχυση του γονιδίου SY\_84 σε μερικά από τα υπό εξέταση δείγματα.*

#### **ii. SY\_86**

Χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινητών SY86\_F & SY86\_R σύμφωνα με τον πίνακα 8 και τα αποτελέσματα της ενίσχυσης φαίνονται στην παρακάτω εικόνα.

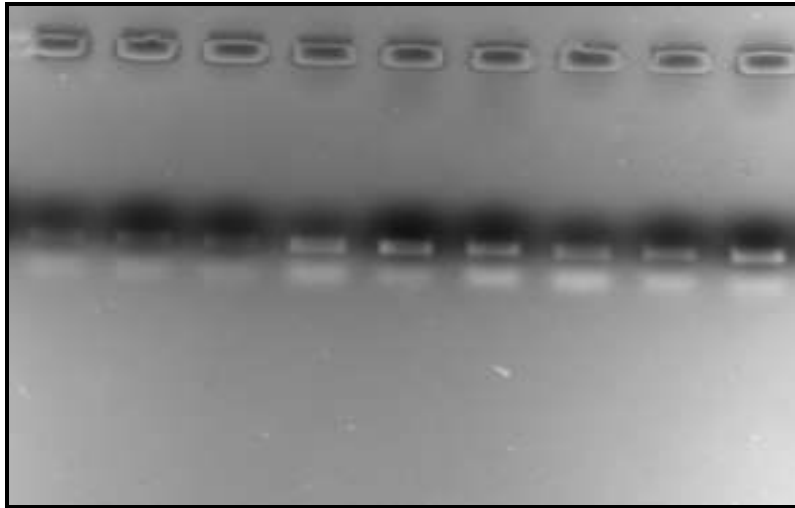


*Εικόνα 11: Ομοίως, σε αυτή την περίπτωση παρατηρείται ενίσχυση του γονιδίου SY\_86 ενδεικτικά σε κάποια από τα δείγματα που μελετήθηκαν.*

### **3.3 Γονίδια της AZFb περιοχής**

#### **i. SY\_127**

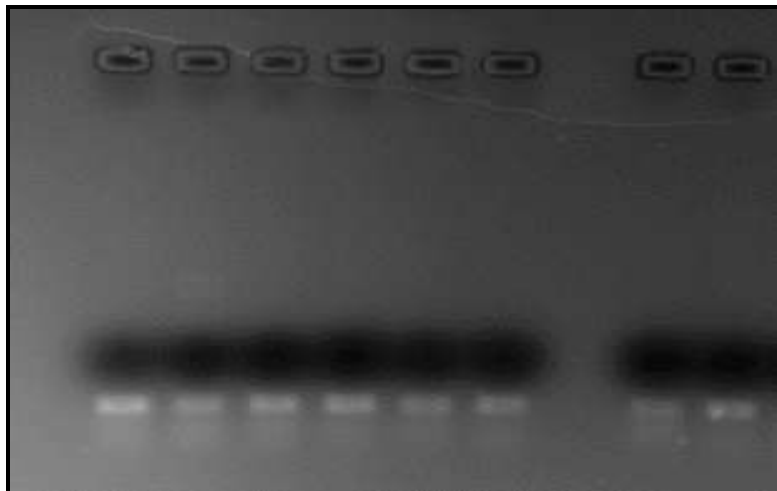
Χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινητών SY127\_F & SY127\_R σύμφωνα με τον πίνακα 8 και τα αποτελέσματα της ενίσχυσης φαίνονται στην παρακάτω εικόνα.



*Εικόνα 12. Και σε αυτή την περίπτωση παρατηρήθηκε η ενίσχυση του γονιδίου SY\_127 στα δείγματα που αναλύθηκαν.*

#### **ii. SY\_134**

Ομοίως κι εδώ χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινήτων SY134\_F & SY134\_R σύμφωνα με τον πίνακα 8, με τα αποτελέσματα της ενίσχυσης να φαίνονται στην παρακάτω εικόνα.

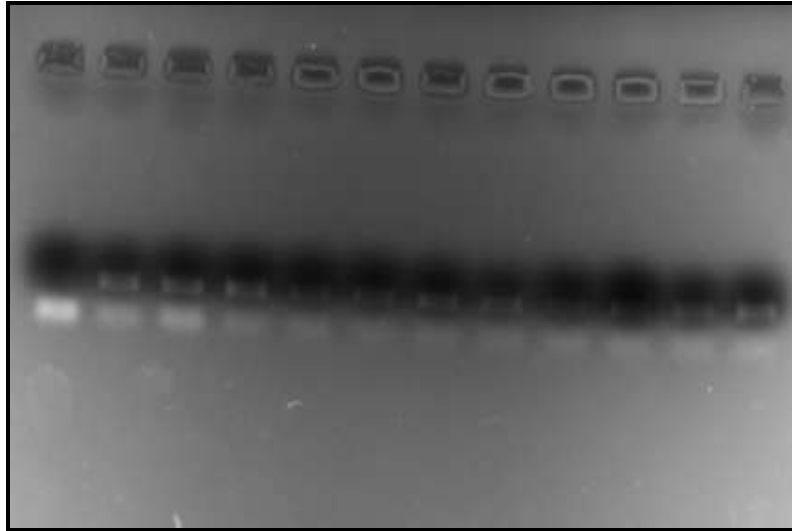


*Εικόνα 13: Η παρουσία του γονιδίου SY\_134 επιβεβαιώθηκε στα υπό μελέτη δείγματα που αναλύθηκαν παραπάνω.*

### **3.4 Γονίδια της AZFc περιοχής**

#### **i. SY\_254**

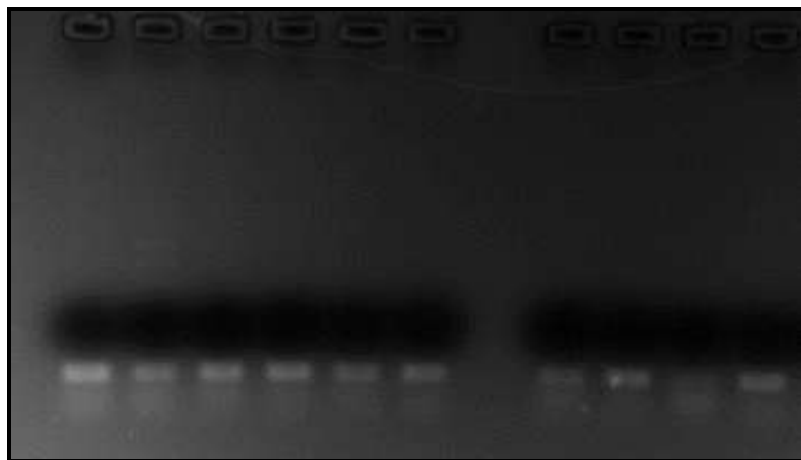
Χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινήτων SY254\_F & SY254\_R σύμφωνα με τον πίνακα 8 και τα αποτελέσματα της ενίσχυσης φαίνονται παρακάτω.



*Εικόνα 14: Σύμφωνα με την πηκτή αγαρόζης η ενίσχυση του marker SY\_254 είναι εμφανής στα παραπάνω προς ανάλυση δείγματα.*

**ii. SY\_255**

Χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινητών SY255\_F & SY255\_R σύμφωνα με τον πίνακα 8 και τα αποτελέσματα της ενίσχυσης φαίνονται παρακάτω.



*Εικόνα 15: Ομοίως, σε αυτή την περίπτωση παρατηρείται ενδεικτική ενίσχυση του STS SY\_255 στα δείγματα, που μελετήθηκαν.*

## 4. Συζήτηση

Η ανδρική υπογονιμότητα αποτελεί ένα από τα πιο σοβαρά προβλήματα που αντιμετωπίζουν τα σύγχρονα ζευγάρια, τα οποία επιθυμούν να τεκνοποιήσουν. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, ένα ποσοστό 15-20% των ζευγαριών αντιμετωπίζει πρόβλημα υπογονιμότητας, όπου το πρόβλημα εντοπίζεται στον άνδρα σε ένα ποσοστό 40% των περιπτώσεων, σε ένα άλλο 40% εντοπίζεται στη γυναίκα και σε ένα 20% είναι μικτής αιτιολογίας. Ασθενείς που πάσχουν από ολιγοσπερμία ή αζωοσπερμία είναι δυνατόν να αποκτήσουν παιδιά, με τη βοήθεια της τεχνικής της ενδοκυτταροπλασματικής σπερματέγχυσης. Ωστόσο, δεδομένου ότι οι περισσότερες περιπτώσεις της ανδρικής υπογονιμότητας οφείλονται σε γενετικά αίτια, ένα από τα οποία είναι και τα μικροελλείμματα σε περιοχές του χρωμοσώματος Y, υπάρχουν αυξημένες πιθανότητες, τέτοιου είδους μεταλλάξεις να μεταφερθούν από τον πατέρα στο γιο (23). Στη συγκεκριμένη εργασία, μελετήθηκε ο ανδρικός παράγοντας, που εμπλέκεται στην υπογονιμότητα και πιο συγκεκριμένα, κατά πόσο τα μικροελλείμματα στις περιοχές AZF του χρωμοσώματος Y σχετίζονται με την ανδρική υπογονιμότητα. Γενικότερα, ανάλογα με την περιοχή, δηλαδή την AZFa, AZFb ή AZFc έχει βρεθεί διαφορετικό ποσοστό μικροελλειμμάτων, που επηρεάζουν σε ανάλογο βαθμό τη γονιμότητα ενός άνδρα, παρά το γεγονός ότι στα υπό εξέταση δείγματα της παρούσης εργασίας δεν εντοπίστηκαν καθόλου. Πιστεύεται ότι, στα γονίδια των περιοχών αυτών εμπεριέχονται πληροφορίες σχετικά με την κωδικοποίηση πρωτεϊνών, που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη σπερματογένεση, καθώς μικροελλείμματα σε αυτές έχουν συσχετιστεί με μειωμένη γονιμότητα, αδυναμία σπερματογένεσης και ωρίμανσης των γαμετικών κυττάρων. Πιο απλά, η απουσία γενετικού υλικού μπορεί να αποτρέψει την παραγωγή πρωτεϊνών, που είναι απαραίτητες για τη φυσιολογική ανάπτυξη των κυττάρων, οδηγώντας έτσι στην εκδήλωση αζωοσπερμίας ή ολιγοσπερμίας.

Εξαιτίας της μικρής έκτασης τους, τα μικροελλείμματα είναι αδύνατο να προσδιοριστούν κυτταρογενετικά, για το σκοπό αυτό, γίνεται χρήση συνδυασμού STS (Sequence-Tagged Sites) για τον εντοπισμό τους. Γενικά, σε μια σειρά ερευνών που έχουν πραγματοποιηθεί, έχουν ελεγχθεί πάνω από 131 STS, ωστόσο στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν μόλις 8. Από αυτά, τα 6 ήταν χωρισμένα σε 3 ζεύγη που εντοπίζονταν στα όρια των τριών AZF περιοχών, ενώ τα υπόλοιπα δύο STS αποτέλεσαν εσωτερικό control (SRY, sY\_14). Τα τρία διαφορετικά ζεύγη συνδέονται με τις τρεις διαφορετικές περιοχές AZF: a (sY\_84 και sY\_86), b (sY\_127 και sY\_134) και c (sY\_254 και sY\_255) και αναλύθηκαν με στόχο την εξασφάλιση μεγαλύτερης αξιοπιστίας των αποτελεσμάτων. Κάθε STS αντιπροσωπεύει μία μη πολυμορφική περιοχή και πιθανή απουσία ενίσχυσής του, έπειτα από την αντίδραση της PCR υποδηλώνει την απουσία της αντίστοιχης περιοχής

ενδιαφέροντος AZF στο χρωμόσωμα Y και συνεπώς, ενισχύει την αρχική υπόθεση, ότι η απουσία τμήματος της περιοχής, δηλαδή γονιδίων, αποτελεί παράγοντα, που σχετίζεται με την εκδήλωση της ανδρικής υπογονιμότητας. Η ενίσχυση των υπό εξέταση περιοχών του χρωμοσώματος Y πραγματοποιήθηκε μέσω της τεχνικής της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) σε ένα σύνολο 30 δειγμάτων από Έλληνες άνδρες, τόσο με φυσιολογικό, όσο και με παθολογικό φαινότυπο σπέρματος. Το γεγονός ότι δεν εντοπίστηκαν μικροελλείμματα στις περιοχές του χρωμοσώματος Y σε κανένα δείγμα υποδηλώνει ότι η παθογένεια που εμφάνιζε το καθένα ως προς τον αριθμό, την κινητικότητα και τη μορφολογία των σπερματοζωαρίων τους ίσως να μην οφείλεται σε ελλείμματα των συγκεκριμένων περιοχών, αλλά ταυτόχρονα μπορεί να σχετίζεται με την προέλευση και την καταγωγή των ασθενών, καθώς και σε άλλες αιτίες γενετικής φύσης.

Γενικά, έχει γίνει κατανοητό ότι τα μικροελλείμματα στις περιοχές AZF του χρωμοσώματος Y σχετίζονται με διαταραχές της σπερματογένεσης επομένως, καθορίζουν την ανδρική γονιμότητα. Η συχνότητα τους εκτιμάται ότι είναι περίπου 10-18% σε ασθενείς, που πάσχουν από αζωοσπερμία και σοβαρή ολιγοσπερμία και περίπου 1,5-10,6% στο γενικό πληθυσμό. Τα κριτήρια επιλογής των ασθενών, καθώς και ο πειραματικός σχεδιασμός, αλλά και ο σχεδιασμός της έρευνας είναι οι κύριοι παράγοντες, που επηρεάζουν τη συχνότητα εμφάνισης των μικροελλειμμάτων. Σε μελέτη, που αφορά στον ελληνικό και κυπριακό πληθυσμό, άνδρες με αζωοσπερμία ή σοβαρή ολιγοσπερμία έχει βρεθεί ότι εμφανίζουν μικροελλείμματα κυρίως στην AZFbc περιοχή σε ποσοστό 3-5 %, ενώ τα μικροελλείμματα στην AZFb και AZFc είναι λιγότερα συχνά και τέλος στην AZFa δεν υπάρχουν καθόλου. Ωστόσο, ανάλογα με την περιοχή εμφάνισης των μικροελλειμμάτων, δεν παρατηρούνται αξιοσημείωτες φαινοτυπικές διαφορές στους ασθενείς (24). Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα ποσοστά εμφάνισης μικροελλειμμάτων στις περιοχές AZFbc του χρωμοσώματος Y σε άτομα, που προέρχονται από διαφορετικές χώρες, επιβεβαιώνοντας τη χαμηλή εμφάνισή τους στον ελληνικό πληθυσμό. Συνεπώς, η ύπαρξη τους ή μη σχετίζεται με τα κριτήρια επιλογής των ασθενών, τις μεθόδους, που ακολουθούνται, τη γεωγραφική, πληθυσμιακή και εθνική ταυτότητα, τους συγκεκριμένους απλοτύπους του χρωμοσώματος Y, το γενετικό υπόβαθρο και τέλος την επίδραση του περιβάλλοντος (25).

<b>Μικροελλείμματα στις AZFb / AZFc περιοχές του χρωμοσώματος Υ</b>	
<b>Χώρα</b>	<b>Συχνότητα εμφάνισης επί τοις 100 (%)</b>
Σαουδική Αραβία	3,2
Τουρκία	3,3
Κουβέιτ	2,6
Μαρόκο	3,15
Σουηδία	3
Κροατία	4,5
Ινδία	6,01
Κίνα	11,5
Νέα Ζηλανδία	20
Ελλάδα	3
Αμερική	10

*Πίνακας 9: Το ποσοστό (%) εμφάνισης των μικροελλειμμάτων στις περιοχές του χρωμοσώματος Υ ανάμεσα σε άτομα διαφορετικών χωρών (23).*

Συνοψίζοντας, σε όλη την εργασία έχει καταστεί σαφής ο ρόλος του χρωμοσώματος Υ, όσον αφορά στην ανδρική γονιμότητα και πιο συγκεκριμένα στη σωστή λειτουργία της σπερματογένεσης, στην ωρίμανση των αρσενικών γονάδων και συνεπώς στην ανάπτυξη των κατάλληλων σπερματοζωαρίων, ως προς την κινητικότητα, τον αριθμό και τη μορφολογία τους, που πρόκειται να οδηγήσουν ένα ζευγάρι στην απόκτηση του απογόνου τους. Σε μία ολοένα εξελισσόμενη εποχή, στην οποία ζούμε, είναι πλέον εφικτό να χρησιμοποιηθούν τεχνικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής και ενδοκυτταροπλασματικής σπερματέγχυσης, προκειμένου το νέο ζευγάρι να έχει τα επιθυμητά αποτελέσματα. Ωστόσο, αναφορικά με τη δεύτερη τεχνική, απαιτείται να επικεντρωθούμε ιδιαίτερα στο γενετικό υπόβαθρο του άντρα, που προορίζεται για μελλοντικός πατέρας. Οι γενετικές ανωμαλίες παρουσιάζουν σοβαρή επίδραση στη διαδικασία της σπερματογένεσης και κατ' επέκταση στην ποιότητα

του σπέρματος, για το σκοπό αυτό είναι απαραίτητη μία γενετική εξέταση κυρίως σε άντρες που πάσχουν από αζωοσπερμία και σοβαρή ολιγοσπερμία. Ειδικότερα, τα μικροελλείμματα στις περιοχές του χρωμοσώματος Y έχουν συσχετιστεί με λιγότερο καλή ποιότητα σπέρματος, πρόωρη αποβολή σε εγκύους και ποικίλες αρνητικές συνέπειες στους απογόνους. Μια έγκαιρη διάγνωση αυτών των γενετικών ανωμαλιών είναι ικανή, τόσο να συμβάλει στην εύρεση της αιτίας της ανδρικής υπογονιμότητας, όσο και να οδηγήσει και σε άλλες μεθόδους αντιμετώπισης του προβλήματος, καθώς μέσω της κρυοσυντήρησης σπέρματος σε ολιγοσπερμικούς άνδρες, το ζευγάρι θα είναι σε θέση να ενημερωθεί σχετικά με αυτές (25).

Τέλος, το γεγονός ότι δε βρέθηκαν μικροελλείμματα στους υπό εξέταση ασθενείς δεν αναιρεί τη σημασία του υπό μελέτη θέματος, καθώς το μέγεθος του πληθυσμού των ατόμων με παθολογικό φαινότυπο σπέρματος, που αναλύθηκαν ήταν αρκετά μικρό. Γι' αυτό το λόγο, το επόμενο βήμα είναι η ανάλυση μεγαλύτερου όγκου δειγμάτων για τα ίδια STS ή και για περισσότερα από αυτά και η βελτιστοποίηση των συνθηκών της αντίδρασης ώστε να προκύψουν ακριβή συμπεράσματα για τη χρησιμότητα αυτών των δεικτών. Ακόμα, χρειάζεται να επιβεβαιωθεί η εξειδίκευση των εξεταζόμενων STS μόνο για το χρωμόσωμα Y, καθώς σε αντίθετη περίπτωση μπορεί να προκύψουν ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα ως προς την ύπαρξη μικροελλείμματος. Επομένως, η διερεύνηση των μικροελλειμμάτων του χρωμοσώματος Y σε μεγαλύτερη κλίμακα, τόσο σε επίπεδο δειγμάτων, αλλά και σε επίπεδο εξεταζόμενων STS παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον και πέρα από το γεγονός ότι αποτελεί αφορμή για περαιτέρω έρευνα, μπορεί να εξελιχθεί σε ένα διαγνωστικό εργαλείο, κυρίως στην περίπτωση της ανδρικής υπογονιμότητας και να οδηγήσει στην αποτελεσματική της αντιμετώπιση.



## 5. Βιβλιογραφία

- 1: A. Ζίφα, Z. Μαμούρης, K. Μούτου (2008) : Βιολογία, 785-809
2. Yang X, Wang M, Li S (2014): The evolution of human Y chromosome
- 3: Doris Bachtrog and Brian Charlesworth (Genome Biology 2001): Towards a complete sequence of the human Y chromosome
- 4: Rozen, S., Skaletsky H., Marszalek J., Minx P., Cordum H., Waterston R., Wilson R., Page D. (2003): Abundant gene conversion between arms of palindromes in human and ape Y chromosomes. Nature 423, 873-876
- 5: Ohno, S. (Springer, Berlin, 1967) : Sex Chromosomes and Sex-linked Genes
- 6: Jasdeep Kaur Dhanoa, Chandra Sekhar Mukhopadhyay, and Jaspreet Singh Arora (2016): Y-chromosomal genes affecting male fertility: A review
- 7: Zheng Li et al., (2008):"Micro-deletions" of the human Y chromosome and their relationship with male infertility, J.Genet.Genomics, 35:193-199
- 8: Krausz et al., (2006), Y chromosome and male infertility: Update 2006, Frontiers in Bioscience, 11: 3049-3061
- 9: Stacy Colaco, Deepak Mod (2018): Genetics of the human Y chromosome and its association with male infertility
- 10: Doris Bachtrog et al (2014): Sex Determination: Why So Many Ways of Doing It?
- 11: Lluís Quintana-Murci and Marc Fellous (2001): The human Y chromosome: the biological role of a "functional wasteland".
- 12: O'Donnell L., Nicholls K. P., O'Bryan K. M., McLachlan I., Stanton G. (2001): The process of sperm release. Spermatogenesis. 1:14-35
- 13: Hai, Y., J. Hou, Y. Liu, H. Yang, Z. Li, and Z. He, (2014): The roles and regulation of Sertoli cells in fate determinations of spermatogonial stem cells and spermatogenesis: Semin Cell Dev Biol.
- 14: Rebecca C. Riley-Vargas, Susan Lanzendorf, John P. Atkinson, J Clin (2005): Targeted and restricted complement activation on acrosome-reacted spermatozoa

- 15: Damiano Pizzol, Alessandro Bertoldo, Carlo Foresta (2014): Male infertility: biomolecular aspects
- 16: Carlo Foresta, Enrico Moro, Alberto Ferlin (2001): Y Chromosome microdeletions and alterations of spermatogenesis
- 17: Katherine L. O'Flynn O'Brien, B.A., Alex C. Varghese, Ph.D., Ashok Agarwal, Ph.D (2010) : The genetic causes of male factor infertility: A review
- 18: Katherine L. O'Flynn O'Brien, Alex C. Varghese, Ashok Agarwal (2009): The genetic causes of male factor infertility: A review
- 19: Navarro-Costa, P., Gonçalves, J., & Plancha, C. E. (2010): The AZFc region of the Y chromosome: at the crossroads between genetic diversity and male infertility. *Human Reproduction Update*, 16(5), 525–542
- 20: Βιολογία Α' Γενικού Λυκείου
- 21: Palermo G., Joris H., Devroe P., van Sterteghem A.C. (1992). Pregnancies after intracytoplasmic injection of a single spermatozoon into an oocyte. *Lancet*. 340: 17-18
- 22: Hong- Yun Zheng, Yan Li, Fu-Jin Shen, Yong-Qing Tong (2014): A novel universal multiplex PCR improves detection of AZFc Y- chromosome microdeletions
- 23: D. Mantas, R. Angelopoulou, P. Msaouel, and K. Plastira, Department of Histology and Embryology, Medical School, University of Athens, Greece (2007) : Evaluation of Sperm Chromatin Quality and Screening of Y Chromosome Microdeletions in Greek Males with Severe Oligozoospermia
- 24: A. Ioulianos, C. Sismani, N. Fourouclas, T. Patroclou, C. Sergiou and P. C. Patsalis Department of Cytogenetics, Cyprus Institute of Neurology and Genetics (CING), Nicosia and Patroclou Gynecologic & Obstetric Clinic, Limassol, and Fertility Center (CFC), Nicosia, Cyprus (2002) :A nation-based population screening for azoospermia factor deletions in Greek-Cypriot patients with severe spermatogenic failure and normal fertile controls, using a specific study and experimental design
- 25: Evgeni Evangelini, Georgios Lymberopoulos, Charalambos Asvestis, Seminology Laboratory G. Lymberopoulos, Athens Greece Athenian Group for the study of Andrological Diseases, Athens Greece : Genetic aspects of azoospermia and severe oligozoospermia in Greek infertile men.



