



βιοGenetika

ΑΝΤΡΙΚΗ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑ



Αντρική Υπογονιμότητα

Στατιστικά στοιχεία

Ως υπογονιμότητα σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO, 2000) ορίζεται η αδυναμία ενός ζευγαριού, που έχει συχνές σεξουαλικές επαφές χωρίς χρήση αντισύλληψης, να πετύχει εγκυμοσύνη σε διάστημα ενός χρόνου.

Σύμφωνα με μελέτες ένα ποσοστό της τάξεως του 15% μετά από ένα χρόνο επαφών δεν έχει καταφέρει να πετύχει σύλληψη, ενώ το ποσοστό μετά από δυο χρόνια είναι της τάξεως του 10%. Η ανδρική υπογονιμότητα φαίνεται να είναι αποκλειστικά υπεύθυνη στο 30% των περιπτώσεων αυτών, ενώ σε ένα ποσοστό του 50% των υπογόνιμων ζευγαριών η αιτία είναι τόσο ο αντρικός όσο και ο γυναικείος παράγοντας.

Αιτίες

Οι βασικές αιτίες ανδρικής υπογονιμότητας συνοψίζονται παρακάτω:

- Τρόπος ζωής (έκθεση σε τοξικές ουσίες, κάπνισμα, υπερβολική κατανάλωση αλκοόλ, παρατεταμένη χρήση ναρκωτικών ουσιών και κάποιων φαρμάκων)
- συγγενείς ή επίκτητες ουρογεννητικές ανωμαλίες (παλίνδρομη εκσπερμάτωση, συστροφή των όρχεων, απόφραξη σπερματικών αγωγών)
- κακοήθειες



- λοιμώξεις του ουρογεννητικού συστήματος
- αυξημένη θερμοκρασία όσχεου λόγω κίρσοκλήλης
- ορμονικές διαταραχές (θυρεοειδής, χαμηλή τεστοστερόνη, υψηλή FSH, υψηλή προλακτίνη)
- γενετικές ανωμαλίες
- ανοσολογικοί παράγοντες

Στις πιο σοβαρές περιπτώσεις ανδρικής υπογονιμότητας, μπορεί να προκληθεί πλήρης απουσία σπερματοζωαρίων κατά την εκσπερμάτωση (αζωοσπερμία). Υπάρχουν δύο λόγοι για τους οποίους δεν ανευρίσκονται σπερματοζωάρια κατά την εκσπερμάτωση:

Η **Αποφρακτική Αζωοσπερμία** (Obstructive Azoospermia, OA), η οποία οφείλεται σε κάποια εμπλοκή στην αναπαραγωγική οδό, δηλαδή, παράγεται σπέρμα στον όρχι, αλλά παγιδεύεται μέσα σε αυτόν.

Η **Μη Αποφρακτική Αζωοσπερμία** (Non Obstructive Azoospermia, NOA), η οποία είναι το αποτέλεσμα σοβαρά εμποδιζόμενης ή ανύπαρκτης παραγωγής σπέρματος.

Εκτός από τις παραπάνω αιτίες υπάρχει και η περίπτωση της **ανεξήγητης υπογονιμότητας** η οποία αγγίζει το ποσοστό του 50%.

Διερεύνηση της ανδρικής υπογονιμότητας

- ✓ Ιατρικό ιστορικό
- ✓ Σωματική εξέταση
- ✓ Εργαστηριακές εξετάσεις

Εργαστηριακός έλεγχος υπογονιμότητας

Σπερμοδιάγραμμα

Η πρώτη βασική εξέταση που θα ζητηθεί σε περιπτώσεις υπογονιμότητας όσο αναφορά τον άντρα είναι το σπερμοδιάγραμμα. Εξετάζεται δείγμα μετά από σεξουαλική αποχή (τουλάχιστον 48 ωρών και όχι περισσότερο από 7 ημερών) με τη διαδικασία του αυνανισμού. Η βασική ανάλυση σπέρματος μας δίνει σημαντικές πληροφορίες για διαταραχές στην παραγωγή ή τη μεταφορά των σπερματοζωαρίων.

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας οι τιμές αναφοράς ώστε ένα σπέρμα να θεωρηθεί γόνιμο παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

Παράμετρος	Κατώτερο όριο αναφοράς
Όγκος (ml)	1.5 (1.4 – 1.7)
Ολικός αριθμός σπερματοζωαρίων (10^6 ανά εκσπερμάτιση)	39 (33-46)
Συγκέντρωση σπέρματος (10^6 ανά mL)	15 (12-16)
Συνολική κινητικότητα (προοδευτική κίνηση A και μη-προοδευτική κίνηση B, %)	40 (38-42)
Προοδευτική κινητικότητα (κίνηση A %)	32 (31-34)
Βιωσιμότητα (ζωντανά σπερματοζωάρια, %)	58 (55-63)
Μορφολογία (φυσιολογικές μορφές, %)	4 (3,0-4,0)
pH	> 7,2
Λευκα αιμοσφαίρια (10^6 per mL)	< 1,0
MAR test (κινητά σπερματοζωάρια με	< 50

δεσμευμένα σωματίδια, %)	
Immunobead test (κινητά σπερματοζωάρια με δεσμευμένα σφαιρίδια, %)	< 50
Ψευδάργυρος σπέρματος (μmol/εκσπερμάτιση)	> 2,4
Φρουκτόζη σπέρματος (μmol/εκσπερμάτιση)	> 13
Γλυκοσιδάση σπέρματος (mU/εκσπερμάτιση)	> 20

Σύμφωνα με τα παραπάνω τα κυριότερα αποτελέσματα ενός σπερμοδιαγράμματος είναι τα εξής:

- **Ασπερμία:** Η απουσία υλικού ύστερα από εκσπερμάτιση.
- **Αζωοσπερμία:** Η απουσία σπερματοζωαρίων στο δείγμα του σπέρματος.
- **Κρυπτοαζωοσπερμία:** Η παρουσία μερικών σπερματοζωαρίων μόνο ύστερα από φυγοκέντρηση του δείγματος.
- **Υποσπερμία:** Ο μικρός όγκος σπέρματος.
- **Ολιγοσπερμία:** Ο μικρός αριθμός σπερματοζωαρίων
- **Ασθενοσπερμία:** Μειωμένη κινητικότητα σπερματοζωαρίων
- **Τερατοσπερμία:** Αυξημένη παρουσία σπερματοζωαρίων με ανώμαλη μορφή
- **Νεκροσπερμία:** Παρουσία στο δείγμα μόνο νεκρών σπερματοζωαρίων

Κατακερματισμός DNA σπερματοζωαρίων

Ο ανδρικός παράγοντας σε περιπτώσεις υπογονιμότητας αγγίζει ένα ποσοστό της τάξεως του 45%. Μέχρι και το πρόσφατο παρελθόν ο μόνος τρόπος για να αξιολογηθεί η ανδρική γονιμότητα είχε περιοριστεί στη ανάλυση σπέρματος, η οποία μπορεί να παράσχει πληροφορίες σχετικά με 3 πτυχές: τον αριθμό των σπερματοζωαρίων, την κινητικότητα του σπέρματος και τη μορφολογία.

Ωστόσο, αυτή η δοκιμή δεν παρέχει καμία πληροφορία σχετικά με τη γενετική σύσταση του σπέρματος, η οποία είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη φυσιολογικών εμβρύων. Έτσι, ένα υψηλό επίπεδο βλάβης του DNA στα σπερματοζωάρια μπορεί να αποτελεί αιτία ανδρικής υπογονιμότητας που οι συμβατικές εξετάσεις δεν μπορούν να ανιχνεύσουν. Σε αυτές τις περιπτώσεις μιλάμε για κατάτμηση ή κατακερματισμό στο DNA του σπέρματος. Επισημαίνεται ότι τα υψηλά επίπεδα κατάτμησης του DNA στο σπέρμα:

- Ανευρίσκονται πολλές φορές και στο σπέρμα ανδρών με φυσιολογικό σπερμοδιάγραμμα.
- Είναι σημαντικά υψηλότερα στους υπογόνιμους άνδρες σε σχέση με τους γόνιμους.
- Είναι υψηλότερα στους άνδρες με κακές παραμέτρους (κινητικότητα, συγκέντρωση, μορφολογία) στο σπερμοδιάγραμμα αν και αυτό δεν αντικατοπτρίζεται πάντα.

Ο βαθμός κατακερματισμού του DNA μετράται με τον Δείκτη Κατακερματισμού DNA (DFI). Σε μια μελέτη που περιλάμβανε 700

περιπτώσεις εξωσωματικής γονιμοποίησης (IVF) με ICSI (ενδοκυτταροπλασματική έγχυση σπέρματος) το ποσοστό εγκυμοσύνης ήταν μικρότερο από 1% όταν το DFI ήταν περισσότερο από 30%.

Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι ο κατακερματισμός του DNA στο σπέρμα δε σχετίζεται τόσο με το ποσοστό γονιμοποίησης στην εξωσωματική ή με την ανάπτυξη των εμβρύων τις δυο πρώτες ημέρες της διαίρεσης τους (αυλάκωση) στο εργαστήριο. Σχετίζεται όμως με την ανάπτυξη των εμβρύων ύστερα από την έκφραση του πατρικού γονιδιώματος, η οποία πραγματοποιείται κοντά στο στάδιο της βλαστοκύστης, καθώς με αυτόματες αποβολές πρώτου τριμήνου, βιοχημικές κυήσεις και ανεπιτυχείς εμφυτεύσεις ύστερα από οποιαδήποτε μέθοδο (IUI, IVF ή ICSI) γονιμοποίησης στην υποβοηθούμενη αναπαραγωγή.

Αιτίες

Από την ανάλυση του μηχανισμού συμπύκνωσης-«πακεταρίσματος» του DNA στο σπέρμα προέκυψε ότι σημαντικοί παράγοντα για τη βλάβη του DNA του σπέρματος αποτελούν ελαττώματα στους μηχανισμούς συμπύκνωσης και επιδιόρθωσης του DNA καθώς και ανωμαλίες ρύθμισης του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (απόπτωση) που ρυθμίζει την παραγωγή σπέρματος. Ένας ακόμα σημαντικός αιτιολογικός παράγοντας είναι το οξειδωτικό στρες λόγω της υπερβολικής παραγωγής ROS. Τα αυξημένα ποσοστά DFI σχετίζονται επίσης με μια σειρά εξωτερικών παραγόντων όπως:

- ιστορικό χημειοθεραπείας/ ακτινοθεραπείας
- φλεγμονή, παρουσία υψηλού πυρετού
- κακή διατροφή (πλούσια σε λιπαρά)

- χρήση φαρμάκων και ναρκωτικών ουσιών
- αυξημένη θερμοκρασία όρχεων (πχ επαγγελματίες οδηγοί)
- κάπνισμα
- έκθεση σε τοξικές ουσίες
- ηλικία του άνδρα (σημαντική αύξηση του DFI μετά τα 46 έτη)
- κισσοκήλη
- τραυματισμοί όρχεων – καρκίνος όρχεων

Ενδείξεις

- Ανεξήγητη υπογονιμότητα μεγάλης διάρκειας
- Χαμηλά ποσοστά γονιμοποίησης ή έμβρυα κακής ποιότητας σε κύκλους IVF
- Αποτυχία εμφύτευσης μετά από IVF
- Καθ' έξιν αποβολές
- Μακροχρόνια παραμονή σε περιβάλλον με τοξικούς για την γονιμότητα παράγοντες
- Ολιγοασθενοτερατοζωοσπερμία
- Προχωρημένη ηλικία του συζύγου (> 50 χρόνια)

Εργαστηριακή Ανάλυση

Η εργαστηριακή εξέταση βασίζεται στην τεχνική SCD, κατά την οποία ακολουθείται μια ελεγχόμενη διαδικασία μετουσίωσης του DNA για να διευκολύνει την επακόλουθη απομάκρυνση των πρωτεϊνών που περιέχονται σε κάθε σπερματοζώαριο. Με αυτό τον τρόπο, τα φυσιολογικά σπερματοζώαρια δημιουργούν «φωτοστέφανα» που σχηματίζονται από βρόχους



DNA στο κεφάλι του σπέρματος, οι οποίοι δεν υπάρχουν σε εκείνους με κατεστραμμένο DNA. Η τεχνική αυτή περιλαμβάνει την ανάλυση τουλάχιστον 300 σπερματοζωαρίων σε δείγμα σπέρματος και το αποτέλεσμα δίνεται ως ποσοστό σπερματοζωαρίων με κατακερματισμένο DNA (%). Οι φυσιολογικές τιμές DFI είναι:

0 – 15 %	Εξαιρετικά καλή γονιμοποιητική ικανότητα
16 – 29 %	Καλή γονιμοποιητική ικανότητα
> 30 %	Κακή γονιμοποιητική ικανότητα

Μοριακός έλεγχος σπέρματος για μικροοργανισμούς

Οι χρόνιες φλεγμονές του γεννητικού συστήματος μπορεί να επηρεάσουν τη γονιμότητα του άνδρα, προκαλώντας αύξηση των συγκολλήσεων των σπερματοζωαρίων, δημιουργία αντισπερμικών αντισωμάτων και απόφραξη της εκφορητικής οδού. Ο έλεγχος του σπέρματος με μοριακές τεχνικές ενδείκνυται για την ανίχνευση μικροοργανισμών που επηρεάζουν την γονιμοποιητική ικανότητα μια και το ποσοστό ευαισθησίας της μεθόδου ξεπερνά το 95%. Πιο συγκεκριμένα γίνεται ανίχνευση DNA των: **Χλαμυδίων (Chlamydia trachomatis)**, **Μυκοπλάσματος (Mycoplasma hominis – Mycoplasma genitalium)**, **Ουρεοπλάσματος (Ureaplasma urealyticum – Ureaplasma parvum)**, **Ερπητοϊών 1, 2 (HSV 1,2)**.

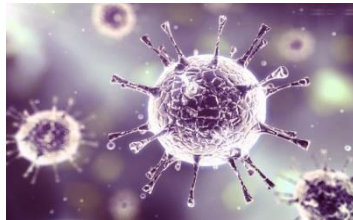
Τα χλαμύδια είναι gram αρνητικά παθογόνα βακτήρια και ο πιο συχνά μεταδιδόμενος σεξουαλικός βακτηριακός παράγοντας. Η μόλυνση από χλαμύδια είναι ο αναγνωρισμένος αιτιολογικός

8

παράγοντας περίπου 50% της μη γονοκοκκικής ουρηθρίτιδας και της συντριπτικής πλειοψηφίας της μετά-γονοκοκκικής ουρηθρίτιδας. Σχετίζεται επίσης με προστατίτιδα, επιδιδυμίτιδα και ορχίτιδα και κατά συνέπεια παίζει σημαντικό ρόλο στην ανδρική υπογονιμότητα.

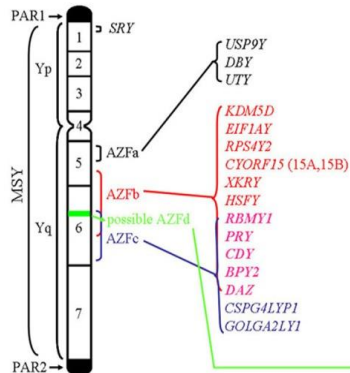
Τα μυκοπλάσματα – ουρεοπλάσματα (*U. urealyticum*, *U. parvum*, *M. hominis* and *M. genitalium*) αποτελούν τις πιο κοινές αιτίες λοίμωξης της ουρογεννητικής περιοχής των σεξουαλικά ενεργών ανδρών. Μικροβιακές μολύνσεις με τα συγκεκριμένα είδη σχετίζονται με μη γονοκοκκική ουρηθρίτιδα καθώς και –σε περίπτωση μη αντιμετώπισης- χρόνιες προστατίτιδες. Έρευνες δείχνουν συσχέτιση του *U. Urealyticum* με μειωμένη συγκέντρωση και κινητικότητα των σπερματοζωαρίων καθώς και με μειωμένα ποσοστά εμφύτευσης μετά από *in vitro* γονιμοποίηση.

Ο ιός του απλού Έρπη είναι ένας από τους συνηθέστερους ιούς στους ανθρώπινους πληθυσμούς και είναι υπεύθυνος για ένα ευρύ φάσμα ασθενειών, συμπεριλαμβανομένης της ουλίτιδας, της κερατοεπιπεφυκίτιδας, της εγκεφαλίτιδας και των νεογνικών μολύνσεων. Ο HSV περιλαμβάνει δύο ξεχωριστούς αλλά στενά συγγενείς ιούς, τον HSV-1 και τον HSV-2. Ο έρπη των γεννητικών οργάνων μπορεί να είναι ασυμπτωματικός παρ' όλα αυτά τα ποσοστά υπογονιμότητας σε ασυμπτωματικούς ασθενείς είναι αυξημένα σε σχέση με άτομα που δεν έχουν μολυνθεί από τον ιό.



Μοριακή ανίχνευση μικροελλείψεων του χρωμοσώματος Υ

Η περιοχή καθορισμού φύλου (SRY) στα αρσενικά άτομα έχει χαρτογραφηθεί στο βραχύ βραχίονα του χρωμοσώματος Υ στο Yp11 ενώ τα γονίδια που εμπλέκονται στη διαδικασία της σπερματογένεσης εντοπίζονται στο μακρύ βραχίονα του Υ (Yq11). Έρευνες έχουν



συσχετίσει αζωοσπερμικά άτομα με μικροελλείψεις του μακρού βραχίονα του Υ χρωμοσώματος και, με βάση αυτές, προτάθηκε η ύπαρξη ενός συμπλέγματος γονιδίων σπερματογένεσης που ονομάζεται "παράγοντας αζωοσπερμίας" (AZF) στο Yq. Το τμήμα Yq διαιρείται κατά κύριο λόγο στις περιοχές AZFa (περίπου 800kb), AZFb (περίπου 3.2 Mb) και AZFc (περίπου 3.5 Mb). Οι περισσότερες διαγραφές εμφανίζονται de νομο με το AZFc να είναι το πιο συχνά διαγραμμένο.

Ελλείψεις στο γονίδιο DAZ (περιοχή AZFc) είναι οι πιο συχνές σε περιπτώσεις μη αποφρακτικής ολιγοζωοσπερμίας (ήπιας ή σοβαρής) ενώ οι διαγραφές στις περιοχές AZFa και AZFb έχουν συσχετιστεί με την αζωοσπερμία. Σύμφωνα με παγκόσμιες εκτιμήσεις, περίπου το 10% των περιπτώσεων ιδιοπαθούς αζωοσπερμίας και ολιγοζωοσπερμίας εμφανίζονται λόγω μικροελλείψεων στην περιοχή AZF.

Τύπος έλλειψης	Συχνότητα ύπαρξης	Κλινική εικόνα
AZFa	0.5-4%	Αζωοσπερμία (SCOS)
AZFb	1-5%	Αζωοσπερμία
AZFbc	1-3%	Αζωοσπερμία
AZFc	~80%	Ολιγοσπερμία ή αζωοσπερμία
AZFabc	Πολύ σπάνια	Αζωοσπερμία

Ενδείξεις

- Μη αποφρακτικού τύπου αζωοσπερμία ή ολιγοσπερμία

Εργαστηριακή ανάλυση

Η ανάλυση των μικροελλείψεων στο χρωμόσωμα Y σε δείγμα αίματος γίνεται με τη χρήση Real-time PCR. Σύμφωνα με την αρχή της μεθόδου επαρκεί η ανάλυση ενός μη πολυμορφικού τόπου STS (sequence tagged site) σε κάθε περιοχή AZF ώστε να προσδιοριστεί αν υπάρχει διαγραφή STS στα AZFa, AZFb ή AZFc. Παρ' όλα αυτά για μεγαλύτερη ακρίβεια χρησιμοποιείται η ανίχνευση δυο STS τόπων για κάθε περιοχή καθώς οι διαγραφές περιλαμβάνουν καλά καθορισμένες περιοχές.

Μοριακή ανίχνευση της κυστικής ίνωσης

Η κυστική ίνωση (CF) είναι μια υπολειπόμενη γενετική ασθένεια που οδηγεί σε παραγωγή ιδρώτα με υψηλά ποσοστά ηλεκτρολυτών, πνευμονική νόσο, αρσενική στειρότητα, εντερική απόφραξη και παγκρεατική ανεπάρκεια στο 95% των ασθενών. Η συχνότητα εμφάνισης της ασθένειας διαφέρει γεωγραφικά και

πληθυσμιακά. Στην Ελλάδα εκτιμάται ότι εμφανίζεται σε 1 στις 2500 γεννήσεις, ενώ περίπου το 5% του πληθυσμού είναι φορείς..

Το γονίδιο της κυστικής ίνωσης βρίσκεται στο μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 7 και είναι υπεύθυνο για την παραγωγή μιας πρωτεΐνης (CFTR - Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator) που ελέγχει τη διέλευση του χλωρίου από τις μεμβράνες των επιθηλιακών κυττάρων διαφόρων οργάνων του σώματος, όπως των πνευμόνων, του παγκρέατος, των ιδρωτοποιών αδένων και του εντέρου. Η δυσλειτουργία του γονιδίου έχει ως συνέπεια την προβληματική παραγωγή ή λειτουργία της πρωτεΐνης, με αποτέλεσμα στα διάφορα όργανα να παράγεται από το επιθήλιο παχύρρευστη και κολλώδης βλέννη, που αποφράσσει τους πόρους των αδένων ή των αγωγών που υπάρχουν σε αυτά.

Η πλειοψηφία των ανδρών με κυστική ίνωση (CF) εμφανίζουν συγγενή ατρησία σπερματικού πόρου (CBVAD). Αυτό το συγγενές ελάττωμα έχει ως αποτέλεσμα την απουσία των ανατομικών αγωγών μέσω των οποίων τα σπερματοζωάρια περνούν από τους όρχεις στην ουρήθρα. Δεν υπάρχουν σπερματοζωάρια στο σπέρμα, μια κατάσταση που αναφέρεται ως αποφρακτική αζωοσπερμία. Η συγγενής ατρησία σπερματικού πόρου (CBAVD) αντιπροσωπεύει περίπου το 1-2% του πληθυσμού των υπογόνιμων αρσενικών και έως και 25% αυτών με αποφρακτική αζωοσπερμία. Αν και δεν έχουν όλα τα άτομα με CBAVD μεταλλάξεις στο γονίδιο CFTR, περίπου το 50% έχουν μη φυσιολογικά αλληλόμορφα CFTR. Μία ιδιαίτερη ανωμαλία αξίζει μια ειδική αναφορά - τα διάφορα αλληλόμορφα της οδού πολυθυμιδίνης στο ιντρόνιο 8 (IVS8) του γονιδίου CFTR. Από τους τρεις πολυμορφισμούς που έχουν ταυτοποιηθεί στο IVS8

(5T, 7T και 9T), το 9T αλληλόμορφο συσχετίζεται με την πιο αποτελεσματική χρήση της θέσης ματίσματος του εσωνίου 8. Η αποτελεσματικότητα αυτή μειώνεται στον πολυμορφισμό 5T και 7T και οδηγεί σε χαμηλότερο από το φυσιολογικό επίπεδο πλήρους μήκους CFTR mRNA και πιθανώς σε μείωση στην ώριμη, λειτουργική πρωτεΐνη CFTR κάτι που σχετίζεται με ήπιας μορφή CF και CBAVD.

Ενδείξεις

- μη αποφρακτικού τύπου αζωοσπερμία ή ολιγοσπερμία
- συγγενής ατρησία σπερματικού πόρου (CBAVD)

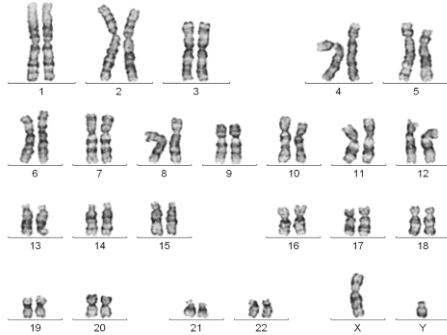
Ποσοστό ανδρών με CBAVD	Μορφές Κυστικής Ίνωσης
80%	Άτυπη μορφή κυστικής ίνωσης.
35%	Μία μετάλλαξη και ένα πολυμορφισμό 5T.
20%	Ήπια ή σοβαρή μετάλλαξη στο γονίδιο CFTR.
20%	Μία μόνο μετάλλαξη.
1-2%	Δύο 5T πολυμορφισμούς.

Εργαστηριακή ανάλυση

Η ανάλυση των μεταλλάξεων στο γονίδιο CFTR της κυστικής ίνωσης σε δείγμα αίματος γίνεται με τη χρήση PCR. Οι μεταλλάξεις που ανιχνεύονται αποτελούν το 75-88 % των μεταλλάξεων που εμφανίζονται στον ελληνικό πληθυσμό και περιλαμβάνουν τους πολυμορφισμούς στο εσώνιο 8 (5T, 7T, 9T) που είναι υπεύθυνοι για την ανδρική υπογονιμότητα.

Χρωμοσωμικός έλεγχος – καρυότυπος

Ο καρυότυπος είναι η απεικόνιση των ανθρωπίνων χρωμοσωμάτων, τα οποία φυσιολογικά είναι 46 σε αριθμό (23 ζεύγη, 22 αυτοσωμικά και 1 φυλετικό) και έχουν συγκεκριμένη



μορφολογία. Μελέτες δείχνει ότι το ποσοστό των χρωμοσωματικών ανωμαλιών σε άνδρες με κανονικές παραμέτρους σπέρματος ήταν 2,2%, σε ασθενείς με oligospermia 5,1%, με azoospermia 14,6% και με μη αποφρακτική azoospermia 20,3. Στους ασθενείς με azoospermia οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες ήταν κυρίως αριθμητικές (π.χ. σύνδρομο Klinefelter) ή δομικές ενώ στους oligospermικούς άνδρες, έχει αναφερθεί μια επικράτηση (4.6%) των αυτοσωματικών μετατοπίσεων και αναστροφών. Παρόλο που γνωρίζουμε ότι η γονιμοποίηση από σπερματοζωάρια με χρωμοσωμικές ανωμαλίες είναι δυνατή, αγνοούμε εάν το ποσοστό των ανώμαλων σπερματοζωαρίων που πετυχαίνουν γονιμοποίηση είναι το ίδιο ή μειωμένο σε σχέση με τα φυσιολογικά.

Συχνότερες χρωμοσωμικές ανωμαλίες σε υπογόνιμους άνδρες

- Το **σύνδρομο Klinefelter** - KS (47,XXY) είναι η συνηθέστερη χρωμοσωμική ανωμαλία. Οι κλινικοί γιατροί θα πρέπει να εξετάζουν το KS σε όλους τους στείρους άνδρες με αζωοσπερμία, καθώς το μη-μωσαϊκό KS αντιπροσωπεύει το 11% των περιπτώσεων, ενώ το μωσαϊκό KS (σύνολο 10%) αντιπροσωπεύει περίπου το 0,5% του σοβαρά ολιγοσπερμικού πληθυσμού.

- Τα άτομα με **47,XXY** είναι συχνά γόνιμα. Ωστόσο, έχουν αναφερθεί υψηλότερα ποσοστά φυλετικών και αυτοσωμικών ανισορροπιών σε 47,XXY άνδρες.

- Ο **46,XX αρσενικός γονότυπος** είναι σπάνιος και συνήθως συμβαίνει ως συνέπεια της μετατόπισης του τμήματος του κοντού βραχίονα του χρωμοσώματος Y που περιέχει το γονίδιο SRY σε έναν από τους βραχίονες Xp. Αυτό προκαλεί την ανάπτυξη των όρχεων, αλλά λόγω της απουσίας του μακρού βραχίονα του Y χρωμοσώματος (Yq) δεν υπάρχει σπερματογένεση.

- Οι **μετατοπίσεις κατά Robertson** χαρακτηρίζονται από κεντρική σύντηξη δύο μη ομόλογων ακροκεντρικών χρωμοσωμάτων (13, 14, 15, 21 και 22) με απώλεια του υλικού βραχέων βραχιόνων. Οι πιο συνηθισμένες μετατοπίσεις περιλαμβάνουν τα χρωμοσώματα 13, 14 και 14, 21 και βρίσκονται κυρίως σε ολιγοσπερμικούς (1,5%) και όχι σε αζωοσπερμικούς (0,2%) άνδρες οι οποίοι συνήθως έχουν έναν φυσιολογικό ανδρικό φαινότυπο.

- Οι **αμοιβαίες μετατοπίσεις** ορίζονται ως η ανταλλαγή υλικού μεταξύ των αυτοσωμικών ή μεταξύ του χρωμοσώματος X ή Y και

ενός αυτοσωμικού και εμφανίζονται σε 0,7% των σοβαρά oligo- ή αζωοσπερμικών ανδρών.

Ενδείξεις

- Πρωτοπαθής στειρότητα
- Ιστορικό αυτόματων αποβολών
- Ολιγοσπερμία
- Μη αποφρακτική αζωοσπερμία
- Παθολογικές μορφές σπερματοζωαρίων (5-16%)
- Οικογενειακό ιστορικό με συγκεκριμένη χρωμοσωμική ανωμαλία
- Προηγούμενη κύηση με χρωμοσωμικές ανωμαλίες

Εργαστηριακή ανάλυση

Η καρυοτυπική ανάλυση γίνεται σε δείγμα περιφερικού αίματος έπειτα από καλλιέργεια των λεμφοκυττάρων. Μετά από ένα διάστημα 72 ωρών τα λεμφοκύτταρα επωάζονται με κολχικίνη και ακολουθεί επεξεργασία με υπότονο διάλυμα και μονιμοποίηση. Στα μεταφασικά χρωμοσώματα γίνεται χρώση με την τεχνική G-banding. Η περιγραφή και αξιολόγηση του καρυότυπου γίνεται με βάση το International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN) 2016. Για κάθε ασθενή γίνεται έλεγχος 50 μεταφάσεων.

FISH σπέρματος για ανευπλοειδίες

Εκτός του καρυοτύπου που αποκαλύπτει τις χρωμοσωμικές ανωμαλίες στο επίπεδο των σωματικών κυττάρων στον άνθρωπο υπάρχουν και εξετάσεις που αποκαλύπτουν τις χρωμοσωμικές ανωμαλίες (ανευπλοειδία) στους γαμέτες. Συγκεκριμένα ένας άνδρας ενώ έχει φυσιολογικό καρυότυπο μπορεί να φέρει χρωμοσωμικές ανωμαλίες στα σπερματοζωάρια του ως αποτέλεσμα λαθών που προκύπτουν στη διαδικασία της μείωσης, κατά τη σπερματογένεση

- Στη μείωση I: δύο ομόλογα χρωμοσώματα καταλήγουν στον ίδιο γαμέτη αντί να διαχωριστούν

- Στη μείωση II: δεν διαχωρίζονται οι αδελφές χρωματίδες και πηγαίνουν και οι δύο στον ίδιο γαμέτη

Η FISH (fluorescent in situ hybridization) είναι μια κυτταρογενετική τεχνική που παρέχει εκτίμηση της συχνότητας των χρωμοσωμικών ανωμαλιών με μέτρηση της ανευπλοειδίας του σπέρματος. Αναμφισβήτητα, η μεγάλη πλειοψηφία των εμβρύων με οποιαδήποτε χρωμοσωμική ανευπλοειδία δεν είναι βιώσιμη. Για το λόγο αυτό οι ανευπλοειδίες που έχουν μεγάλη κλινική σημασία είναι εκείνες που μπορεί να είναι συμβατές με τη ζωή. Τέτοιες είναι οι τρισωμία 13 (σύνδρομο Patau), τρισωμία 18 (σύνδρομο Edwards), τρισωμία 21 (σύνδρομο Down) καθώς και οι ανευπλοειδίες των φυλετικών χρωμοσωμάτων (σύνδρομο Turner, σύνδρομο Klinefelter's)

Φαίνεται ότι οι άνδρες με σοβαρές μορφολογικές ανωμαλίες στο σπέρμα (πχ απουσία ουράς, διπλή κεφαλή, globozoospermia) έχουν υψηλότερα ποσοστά ανευπλοειδίας

Μελέτες δείχναν ακόμα ότι ασθενείς με ασθenoσπερμία, ειδικά με κινητικότητα σπέρματος κάτω από 30%, είχαν πολύ υψηλότερο ποσοστό δισωμιών στα σπερματοζωάρια.

Αιτίες αυξημένου ποσοστού ανευπλοειδιών

- χημειοθεραπεία – ακτινοθεραπεία
- η έκθεση σε τοξικές ουσίες
- το κάπνισμα
- η προχωρημένη ηλικία του ατόμου

Ενδείξεις

- υπογονιμότητα αγνώστου αιτιολογίας
- πολλαπλές αποτυχημένες εξωσωματικές
- ιστορικό αυτόματων αποβολών

Εργαστηριακή ανάλυση

Το σπερματικό επίχρισμα υβριδοποιείται με ανιχνευτές σημασμένους με διαφορετικού χρώματος φθορίζουσα ουσία (διαφορετικό για κάθε χρωμόσωμα που ανιχνεύεται). Στη συνέχεια το παρασκεύασμα

ελέγχεται σε μικροσκόπιο φθορισμού. Ένα φθορίζον σήμα αντιπροσωπεύει μονοσωμία του συγκεκριμένου χρωμοσώματος (φυσιολογικό), δύο δισωμία και τρία τρισωμία. Η περίπτωση κατά την οποία δεν ανιχνεύεται σήμα άρα και χρωμόσωμα στο σπερματοζωάριο που αναλύεται, ονομάζεται ασωμία. Με αυτόν



τον τρόπο πραγματοποιείται η διάγνωση του ανευπλοειδισμού συγκεκριμένων χρωμοσωμάτων. Το λιγότερο 500 σπερματοζωάρια εξετάζονται για κάθε ένα χρωμόσωμα για να καθοριστούν οι συχνότητες των αριθμητικών ανωμαλιών (ανευπλοειδίων). Τα φυσιολογικά γόνιμα άτομα παρουσιάζουν ένα ποσοστό ανευπλοειδισμού της τάξεως του 2-4% στο σπέρμα, ενώ σε σοβαρές περιπτώσεις υπογονιμότητας τα ποσοστά αυτά ξεπερνούν το 27%.

Στο Κέντρο Μοριακής Βιολογίας και Κυτταρογενετικής **βιοGenetika** χρησιμοποιούνται οι πιο σύγχρονες επιστημονικές και τεχνικές προσεγγίσεις της μοριακής βιολογίας και της κυτταρογενετικής στην διερεύνηση της αιτιολογίας της αντρικής υπογονιμότητας σε επίπεδο γενετικής και μοριακής μικροβιολογίας.

Στη **βιοGenetika** προσφέρεται μια σειρά εξετάσεων για κάθε περίπτωση:

- Σπερμοδιάγραμμα
- DNA Fragmentation (Κατακερματισμός DNA σπερματοζωαρίων)
- Φθορίζων υβριδισμός (FISH) σπέρματος για ανευπλοειδίες
- Μοριακή ανίχνευση μικροελλείψεων του χρωμοσώματος Y
- Μοριακός έλεγχος σπέρματος για μικροοργανισμούς
- Χρωμοσωμική ανάλυση ατόμου/ζεύγους
- Μοριακή ανίχνευση της κυστικής ίνωσης

Βιβλιογραφία

- Collodel G., Capitani S., Baccetti B., Pammolli A., Moretti E. Sperm aneuploidies and low progressive motility. *Hum Reprod* 22 (2007a): 1893–1898
- Egozcue J, Blanco J, Anton E, Egozcue S, Sarrate Z, Vidal F. Genetic Analysis of Sperm and Implications of Severe Male Infertility—A Review. *Placenta*. 24 (2003):S62–S5
- Gdoura, Radhouane et al. "Ureaplasma Urealyticum, Ureaplasma Parvum, Mycoplasma Hominis and Mycoplasma Genitalium infections and Semen Quality of Infertile Men." *BMC Infectious Diseases* 7 (2007): 129.
- Hopps C.V. et al. "Detection of sperm in men with Y chromosome microdeletions of the AZFa, AZFb and AZFc regions", *Human Reproduction*, 18.8 (2003): 1660–1665.
- Monavari, Seyed Hamidreza et al. "Asymptomatic Seminal Infection of Herpes Simplex Virus: Impact on Male Infertility." *Journal of Biomedical Research* 27.1 (2013): 56–61.
- Sarrate, Zaida, et al. "FISH studies of chromosome abnormalities in germ cells and its relevance in reproductive counseling." *Asian journal of andrology* 7.3 (2005): 227-236.
- Shafik, A., et al. "Sperm DNA fragmentation." *Archives of andrology* 52.3 (2006): 197-208.
- Templado C, Uroz L, Estop A. "New insights on the origin and relevance of aneuploidy in human spermatozoa." *Molecular human reproduction*. 19(2013): 634–64.
- WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, 2015
- Yu, Xiao-Wei et al. "Y Chromosome Azoospermia Factor Region Microdeletions and Transmission Characteristics in Azoospermic and Severe Oligozoospermic Patients." *International Journal of Clinical and Experimental Medicine* 8.9 (2015): 14634–14646.

