



Ελληνική Ανδρολογική Εταιρεία
Τμήμα Ενδοκρινολογίας, Διαβήτου και Μεταβολισμού
Νοσοκομείο «Έλενα Βενιζέλου»
Εκπαίδευση στην Ανδρολογία
9ος κύκλος, 2η συνάντηση



Το Εργαστήριο στην Ανδρολογία

Γενετικός - Μοριακός έλεγχος

Χρήστος Π. Τσαμέτης

Ενδοκρινολόγος, Κλινικός Ανδrolόγος (ΕΑΑ cert.)
Διδάκτωρ Ιατρικής Α.Π.Θ.



Μονάδα Ενδοκρινολογίας Αναπαραγωγής
Α' Μαιευτική και Γυναικολογική Κλινική Α.Π.Θ.
ΓΠΝΘ "Παπαγεωργίου"



Δήλωση σύγκρουσης συμφερόντων

Δεν έχω λάβει τιμητική αμοιβή για την ομιλία μου, η οποία δεν ενέχει καμία σύγκρουση συμφερόντων.

Δομή της παρουσίασης

- Εισαγωγή, μέθοδοι γενετικού-μοριακού ελέγχου.
- Γενετικός έλεγχος στη καθημερινή κλινική πράξη
- Μελλοντικές προοπτικές

Δομή της παρουσίασης

- Εισαγωγή, μέθοδοι γενετικού-μοριακού ελέγχου.
- Γενετικός έλεγχος στη καθημερινή κλινική πράξη.
- Μελλοντικές προοπτικές.

Κλινική σημασία του γενετικού ελέγχου

- Αιτιολογική διάγνωση
 - 15-20% των ανδρών με υπογονιμότητα
- Αποφυγή διενέργειας άσκοπων διαγνωστικών και θεραπευτικών παρεμβάσεων
- Γενετική συμβουλευτική και καθοδήγηση

Οργάνωση του γενετικού υλικού

- Πυρηνικό DNA

- Σωματικά κύτταρα, σπερματογόνια/ωογόνια
 - 23 ζεύγη χρωμοσωμάτων ($2n=46$)
 - 22 ζεύγη αυτοσωματικών και 1 ζεύγος φυλετικών χρωμοσωμάτων (XX ή XY)
- Γεννητικά κύτταρα
 - 23 χρωμοσώματα ($n=23$)
- 3×10^9 ζεύγη βάσεων (απλοειδής αριθμός), 25000-30000 γονίδια

- Μιτοχονδριακό DNA

- 16569 ζεύγη βάσεων, 37 γονίδια
- Κληρονομείται μόνο από τη μητέρα

Πυρηνικό DNA

- Απλές αλληλουχίες νουκλεοτιδίων
 - Αλληλουχίες κωδικοποίησης (1%)
 - Ρυθμιστικές αλληλουχίες
 - Spacer DNA
- Επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες
 - DNA ρετροϊών
 - Τρανσποζόνια (μεταφερόμενα τμήματα DNA)
 - Δορυφορικό DNA (διαδοχικά επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες ολιγονουκλεοτιδίων)

Ποικιλομορφία του ανθρώπινου γονιδιώματος

- Απλοί πολυμορφισμοί νουκλεοτιδίων (Single Nucleotide Polymorphisms, SNP)
- Ποικιλία στον αριθμό των επαναλήψεων αλληλουχιών ολιγονουκλεοτιδίων (Variable Number of Tandem Repeats, VNTR)
- Ποικιλία στον αριθμό αντιγράφων γονιδίων (Copy Number Variants, CNV)

Μέθοδοι γενετικού ελέγχου

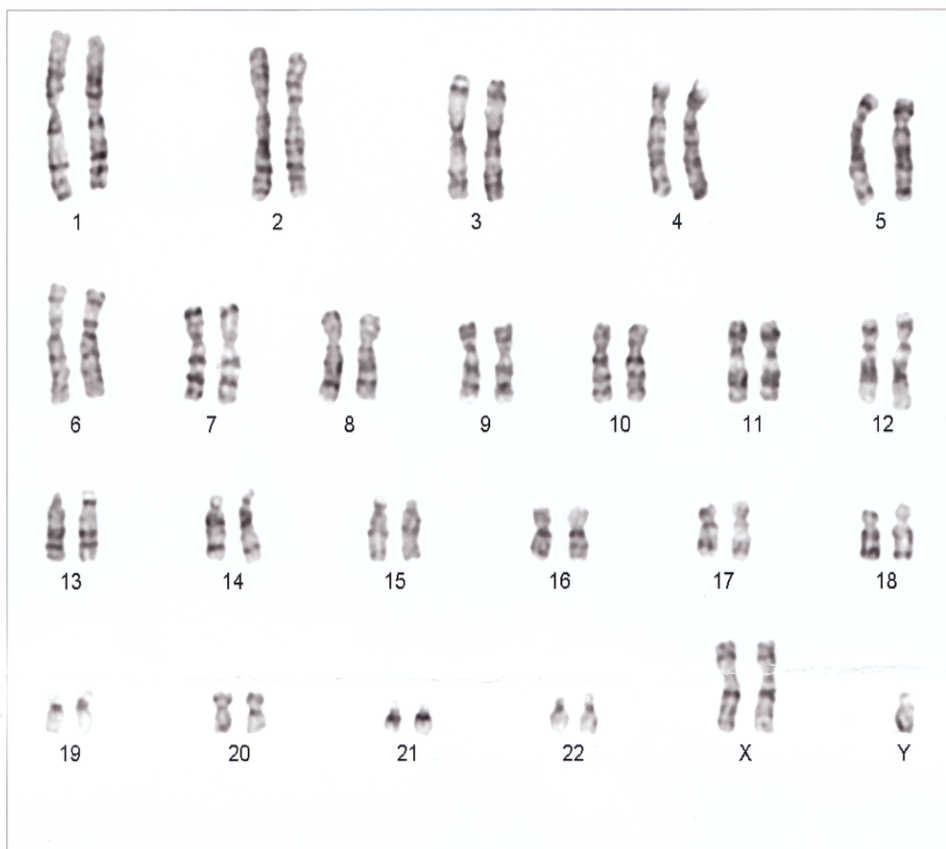
- Κυτταρογενετική ανάλυση
 - Καρυότυπος
 - Φθορίζων in-situ υβριδισμός (Fluorescent in-situ Hybridization, FISH)
 - Συγκριτικός γενομικός υβριδισμός (Comparative Genomic Hybridization, CGH)
 - σε μικροσυστοιχίες (array-CGH)
- Μοριακή γενετική ανάλυση
 - αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)
 - Αλληλούχιση (sequencing) επιλεγμένων γονιδίων (μέθοδος Sanger, dye-terminator sequencing)

Χρωμοσωμικές ανωμαλίες

- **Αριθμητικές**
- **Δομικές**
 - Ισοζυγισμένες
 - Αναστροφές
 - Μεταθέσεις (αμοιβαίες, κατά Robertson, ενθέσεις)
 - Μη ισοζυγισμένες
 - Ελλείψεις
 - Διπλασιασμοί
 - Δακτυλιοειδή χρωμοσώματα
 - Χρωμοσώματα δείκτες
 - Ισοχρωμοσώματα
 - Δικεντρικά χρωμοσώματα

Καρυότυπος

- Η ταξινόμηση των χρωμοσωμάτων ανά ζεύγη ανάλογα με το μέγεθός τους, τη θέση του κεντρομερούς και το μοτίβο ζωνοποίησης τους.
- Λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος→ επώαση με μιτογόνα για 72h→ προσθήκη κολχικίνης→ επώαση με υποτονικό διάλυμα και καθήλωση με οξικό οξύ και μεθανόλη→χρώση (GTG) για ζωνοποίηση→μικροσκόπηση (X1000)
- Το αποτέλεσμα του καρυοτύπου δίνεται με βάση διεθνείς κανόνες (ISCN, 2005): αριθμός χρωμοσωμάτων, φυλετικά χρωμοσώματα, τυχόν ανωμαλίες



核型 : 47, XXY

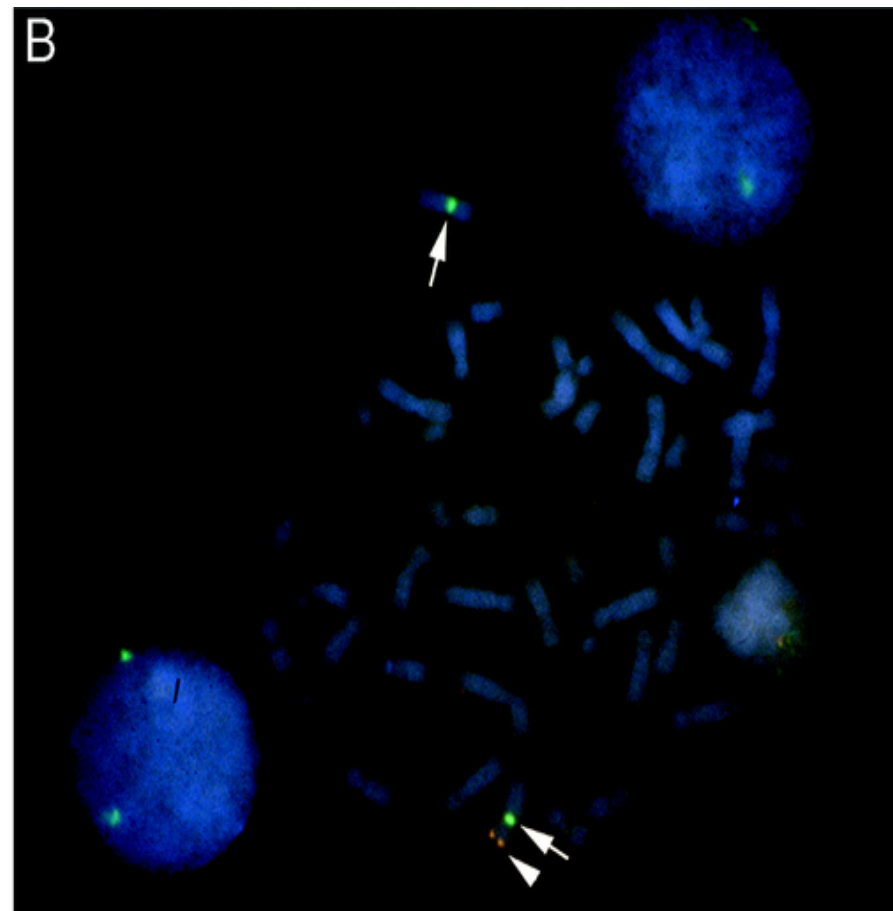
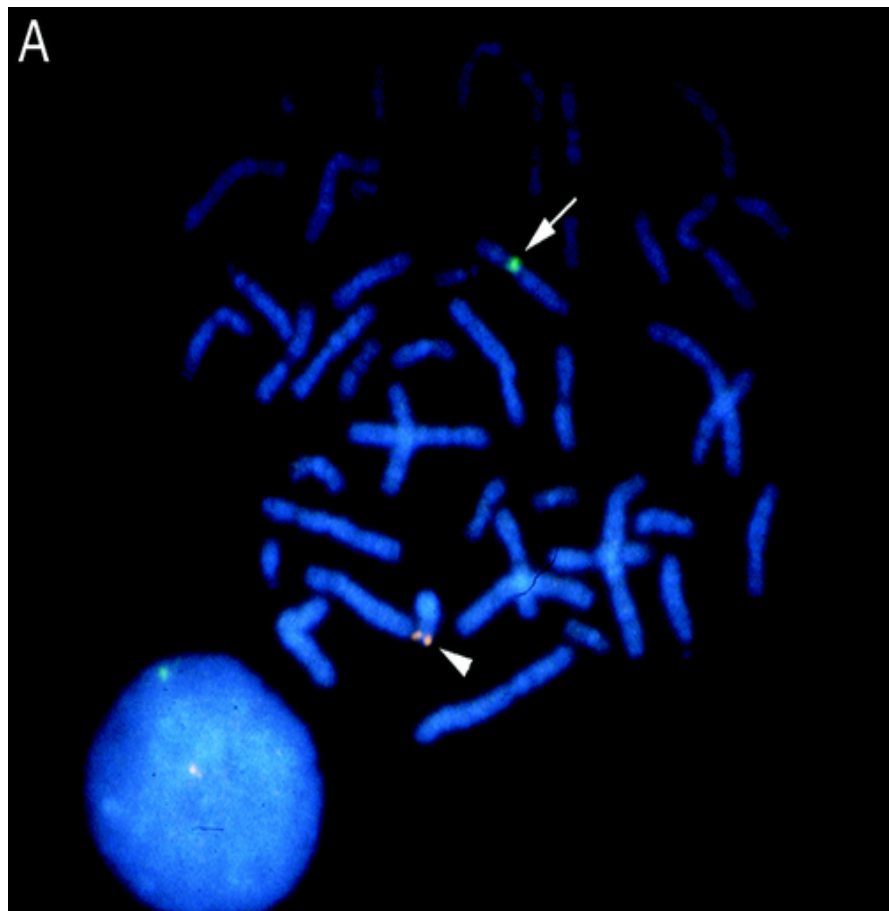
Cell No. : 003



FISH

- Συνδυασμός κλασσικού κυτταρογενετικού ελέγχου με τεχνικές μοριακής γενετικής.
- Βασίζεται στη δυνατότητα σεσημασμένων με φθορίζοντα παράγοντα αλληλουχιών DNA μονής αλύσου (Probes) να συνδέονται με τις αντίστοιχες χρωμοσωμικές περιοχές βάσει της συμπληρωματικότητας των βάσεων.
- Δεν απαιτεί κυτταροκαλλιέργεια (μπορεί να γίνει στη μεσόφαση).
- Μπορεί να ανιχνευθεί έλλειψη ή διπλασιασμός ολόκληρου χρωμοσώματος, σκέλους ή οποιασδήποτε περιοχής του.
- Παραλλαγές (χρώση όλων των χρωμοσωμάτων)
 - Multiplex FISH (M-FISH)
 - Φασματικός καρυότυπος (spectral karyotyping FISH, SKY)

FISH (46 XX άρρεν)



CGH, array-CGH

- Σύγκριση του γονιδιώματος ενός ασθενούς με εκείνο φυσιολογικού ατόμου για την ανίχνευση μη ισοζυγισμένων χρωμοσωμικών ανωμαλιών.
- Χρώση με φθορίζοντες παράγοντες διαφορετικού χρώματος και ταυτόχρονος υβριδισμός με γονιδίωμα σε μετάφαση φυσιολογικού ατόμου.
- Array-CGH (a-CGH)
 - Υβριδισμός των δύο δειγμάτων με προκαθορισμένα τμήματα μονόκλωνου DNA καθηλωμένα σε μικροσυστοιχίες
- Ταυτόχρονος έλεγχος των 46 χρωμοσωμάτων
- Δεν απαιτεί κυτταροκαλλιέργεια
- Η a-CGH είναι η πιο ευαίσθητη κυτταρογενετική μέθοδος

Ευαισθησία των μεθόδων κυτταρογενετικού ελέγχου

• Conventional chromosome analysis	6 –10 Mb
• Conventional CGH	2 Mb
• Metaphase-FISH	100 Kb
• Interphase-FISH	20 Kb
• Array-CGH	up to < 1 Kb*

Simoni, M. & Wieacker, P. (2010). Cytogenetic and molecular genetic investigations.
In Nieschlag, E. et al (eds), *Andrology*, (pp 119-124), Berlin,Haidelberg: Springer-Verlag

Δομή της παρουσίασης

- Εισαγωγή, μέθοδοι γενετικού-μοριακού ελέγχου
- Γενετικός έλεγχος στη καθημερινή κλινική πράξη
- Μελλοντικές προοπτικές

Γενετικός/μοριακός έλεγχος στην Ανδρολογία

- Κυτταρογενετικός έλεγχος (καρυότυπος)
- Έλεγχος για μικροελλείψεις Υq
- Ανίχνευση μεταλλάξεων του γονιδίου της κυστικής ίνωσης (CFTR)
- Ανίχνευση μεταλλάξεων των γονιδίων που εμπλέκονται στην εμφάνιση υπογοναδοτροφικού υπογοναδισμού
- Ανίχνευση μεταλλάξεων του υποδοχέα των ανδρογόνων (AR)
- Έλεγχος του βαθμού κατάτμησης του DNA και FISH σπερματοζωαρίων
- Άλλες

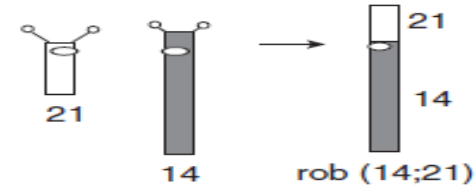
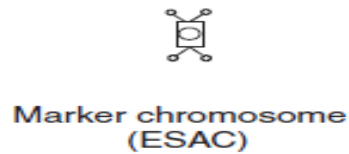
Ενδείξεις κυτταρογενετικού ελέγχου

- Διαταραχές διαφοροποίησης του φύλου (αμφίβολα γεννητικά όργανα)
- Υπογονιμότητα (μη αποφρακτική αζωοσπερμία ή ολιγοσπερμία $< 10 \times 10^6/\text{ml}$)
- Καθ' έξιν αποβολές
- Οικογενειακό ιστορικό καθ' έξιν αποβολών, γνωστής χρωμοσωμικής διαταραχής, δυσμορφιών ή νοητικής υστέρησης

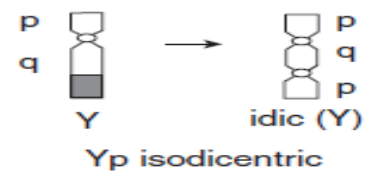
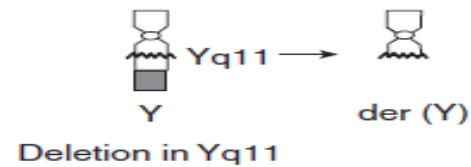
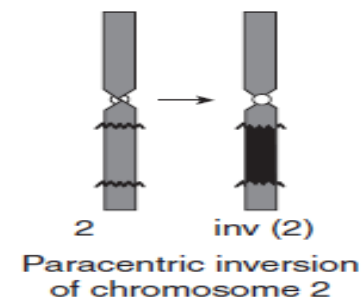
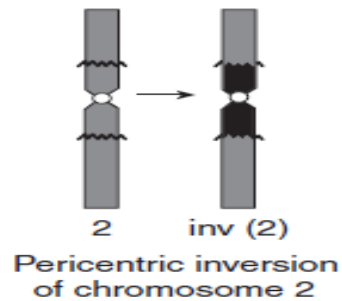
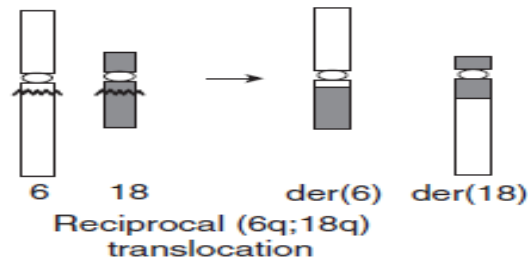
Χρωμοσωμικές διαταραχές στην ανδρική υπογονιμότητα

- Συχνότητα ανίχνευσης: 5,8% (φυλετικά χρωμοσώματα:4,2%)
- Πιο συχνές σε άνδρες με σοβαρότερες διαταραχές στη σπερματογένεση
 - Μη αποφρακτική αζωοσπερμία: 15-16%
 - Ολιγοσπερμία<5 εκατομ/ml: 4%
- Η πιο συχνή διαταραχή των φυλετικών χρωμοσωμάτων είναι το σύνδρομο Klinefelter
 - 47,XXY (80-90%)
 - 46,XY/47,XXY, 48,XXX, δομικές αλλαγές στο X
- Πιο συχνές διαταραχές των αυτοσωμικών είναι:
 - Μεταθέσεις κατά Robertson, αμοιβαίες μεταθέσεις, παρακεντρικές αναστροφές, χρωμοσώματα δείκτες

Δομικές χρωσωμικές ανωμαλίες



Robertsonian translocation involving a chromosome 14 and 21 each



Ενδείξεις για FISH περιφερικού αίματος

- Δομικές ανωμαλίες φυλετικών χρωμοσωμάτων
 - 46, XX άρρεν
 - Εντοπισμός SRY
 - Ελλείψεις, αναστροφές και διπλασιασμοί Y
- Επιβεβαίωση ύπαρξης μωσαϊκισμού
 - Μωσαϊκισμός 47,XXY/46,XY
 - <10% των κυττάρων σε καρυότυπο

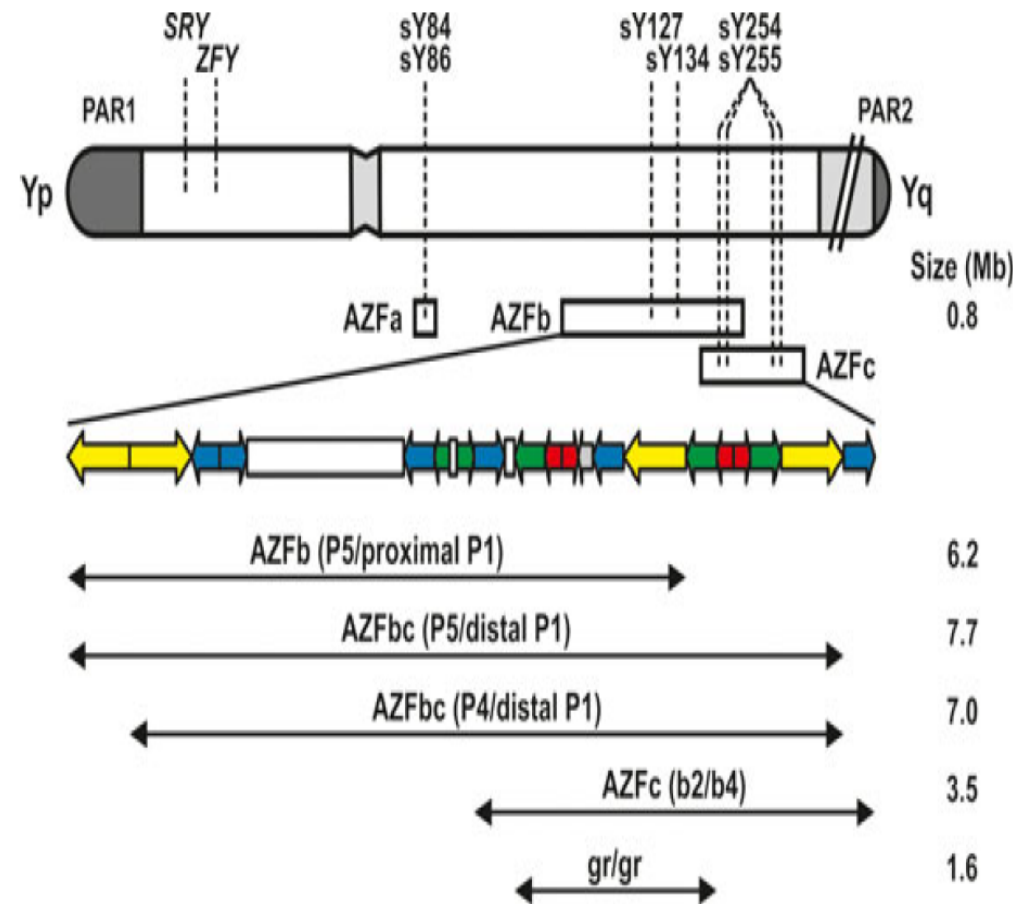
Γενετικοί κίνδυνοι/συμβουλευτική

- Αυξημένος κίνδυνος ανευπλοειδιών στο σπέρμα ασθενών με σύνδρομο Klinefelter.
 - Φυλετικά (0,9-7% σε μωσαικισμό, 1,4-25% σε 47,XYY)
 - Δισωμίες 13, 18, 21
- Αυξημένος κίνδυνος εμφάνισης ανευπλοειδιών ή μη ισοζυγισμένων δομικών ανωμαλιών στους απογόνους ανδρών με δομικές αυτοσωμικές ανωμαλίες.
- Προεμφυτευτική γενετική διάγνωση (PGD) ή προγεννητικός κυτταρογενετικός έλεγχος (αμνιοπαρακέντηση) σε εφαρμογή ICSI.

Υq μικροελλείψεις

- Η δεύτερη συχνότερη γενετική αιτία ανδρικής υπογονιμότητας.
- Γενικός πληθυσμός: 1:4000
- Υπογόνιμοι άνδρες: 0,7-10%
- Τύποι μικροελλείψεων με κλινική σημασία:

- **AZFa** (0,5-4%)
- **AZFb** (1-5%)
- **AZFbc** (1-3%)
- **AZFc** (~80%)
- gr/gr



Συχνότητα Υγ μικροελλείψεων

Τύπος μικροέλλειψης Υγ	Συχνότητα		
	Ασθενείς	Φυσιολογικό σπέρμα	
	Αζωσπερμία	Ολιγοσπερμία *	
Ελλείψεις AZF	5-12%	2-7% *	0
gr/gr	3-5%		0,9%

* Εξαιρετικά σπάνιες σε συγκεντρώσεις > 5×10^6 /ml: **0,7%**

Krausz, C & Chianese, C. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes 2014, 21:244–250,
Jungwirth, A et al. EAU guidelines on male infertility. Update March 2014

Μικροελλείψεις Υγ σε άνδρες με γνωστά αίτια υπογονιμότητας

- Συχνότητα ανίχνευσης: 7-25%
 - Κρυπορχία
 - Κιρσοκήλη
 - Όγκοι όρχεων
 - Χ/Θ ή Α/Θ
 - Λοιμώξεις
 - Τραυματισμός
 - Αποφρακτική αζωοσπερμία

Σχέση γονότυπου – φαινότυπου σε άνδρες με μικροελλείψεις Yq

- **Πλήρης έλλειψη AZFa**
 - Αζωοσπερμία, σύνδρομο απλασίας σπερματικού επιθηλίου (SCOS πλήρες)
 - Μηδενική πιθανότητα ανεύρεσης σπερματοζωαρίων σε TESE
- **Πλήρης έλλειψη AZFb και AZFbc**
 - Αζωοσπερμία, SCOS ή αναστολή σπερματογένεσης
 - Σχεδόν μηδενική πιθανότητα ανεύρεσης σπερματοζωαρίων σε TESE
- Οι κλασσικές (πλήρεις) ελλείψεις AZF δεν σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης κρυπορχίας ή καρκίνου των όρχεων.

Σχέση γονότυπου – φαινότυπου σε άνδρες με μικροελλείψεις Υq (2)

- **Πλήρης έλλειψη AZFc, μερικές ελλείψεις AZF**
 - Ποικίλος φαινότυπος (ολιγοσπερμία, αζωοσπερμία)
 - ~50% (9-80%) πιθανότητα ανεύρεσης σπερματοζωαρίων σε TESE (υψηλότερα ποσοστά σε micro-TESE)
- **gr/gr**
 - Ποικίλος φαινότυπος (φυσιολογικό σπέρμα έως αζωοσπερμία)
 - Παράγων κινδύνου για διαταραχή σπερματογένεσης (X 2,0-2,5) και πιθανόν για καρκίνο των όρχεων

Κατευθυντήριες οδηγίες για τον έλεγχο των Yq μικροελλείψεων

ANDROLOGY



ISSN: 2047-2919

ANDROLOGY

REVIEW ARTICLE

Correspondence:

Csilla Krausz, Andrology Unit, Department of
Experimental and Clinical Biomedical Sciences,
Viale Pieraccini 6, Florence 50139, Italy.
E-mail: c.krausz@dfc.unifi.it;
Frank Tüttelmann, Institute of Human Genetics,
University of Münster, Vesaliusweg 12-14, Münster
48149, Germany.
E-mail: frank.tuettelmann@ukmuenster.de

Keywords:

AZF, azoospermia, genetics, gr/gr deletion, male
infertility, oligozoospermia, quality control,
spermatogenesis, Y chromosome microdeletion

Received: 3-Nov-2013

Revised: 17-Nov-2013

Accepted: 18-Nov-2013

doi: 10.1111/j.2047-2927.2013.00173.x

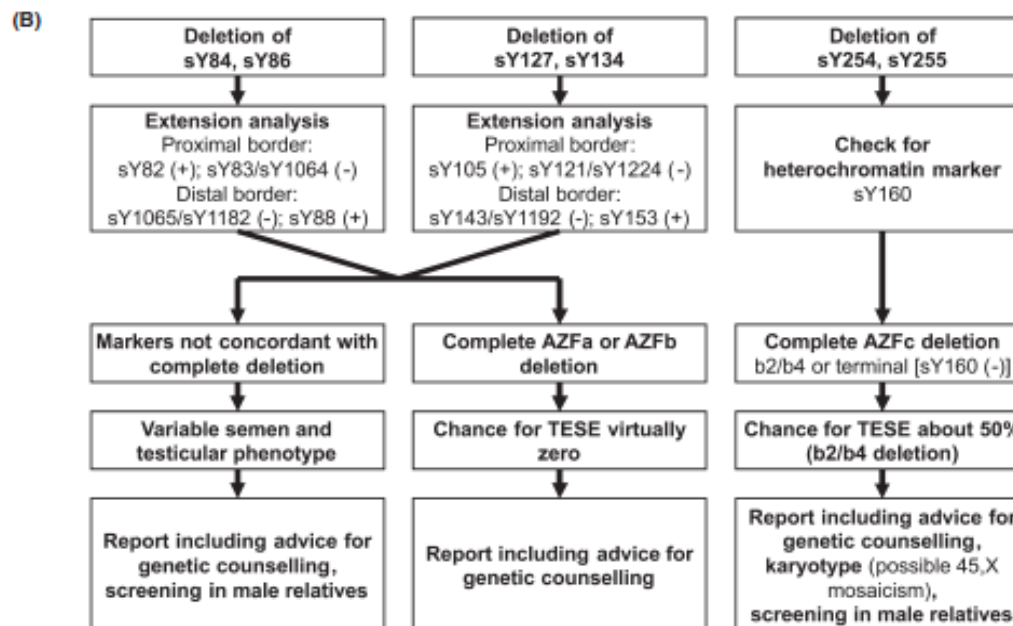
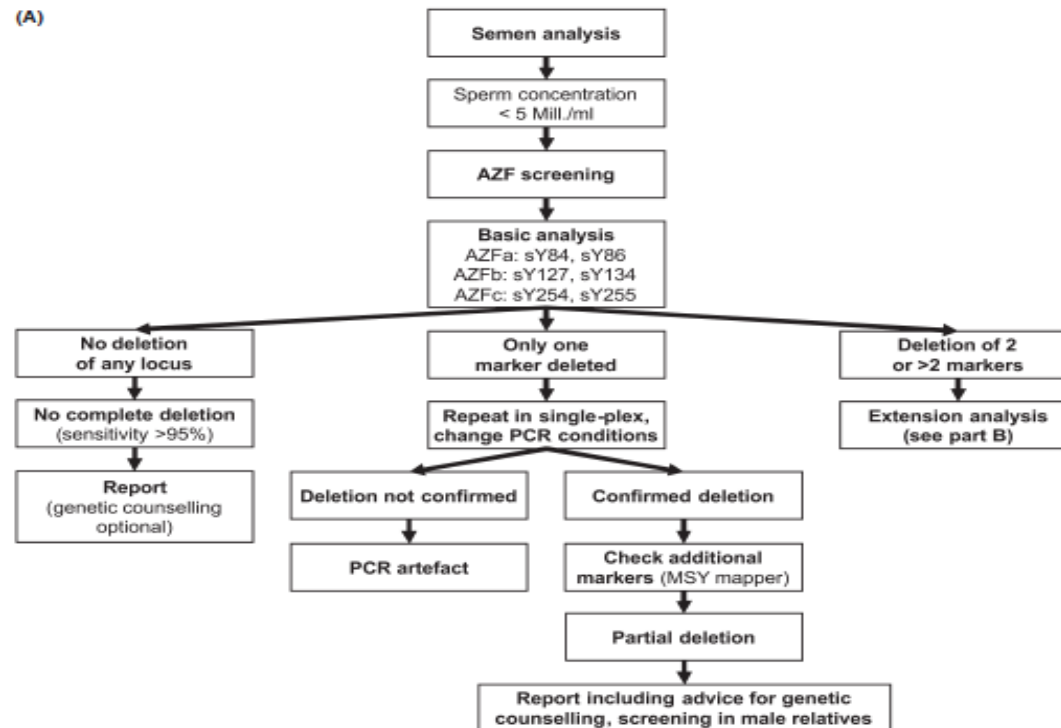
EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions: state-of-the-art 2013

¹C. Krausz, ²L. Hoefsloot, ^{3,4}M. Simoni and ⁵F. Tüttelmann

¹Andrology Unit, Department of Experimental and Clinical Biomedical Sciences, University of
Florence, Florence, Italy, ²Department of Human Genetics, Radboud University Nijmegen Medical
Centre, Nijmegen, The Netherlands, ³Department of Biomedicine, Metabolism and Neural Sciences,
University of Modena and Reggio Emilia, ⁴Azienda USL di Modena, NOCSAE, Modena, Italy, and
⁵Institute of Human Genetics, University of Münster, Münster, Germany

Ενδείξεις γενετικού ελέγχου για Υq μικροελλείψεις

- Αζωοσπερμία και βαρεία ολιγοσπερμία/OTA ($< 5 \times 10^6$ /ml).
 - Προοπτική αντιμετώπισης με TESE/ICSI
- Δεν συστήνονται σε:
 - Χρωμοσωμικές ανωμαλίες (εκτός 46,XY/45,X)
 - Αποφρακτική αζωοσπερμία με φυσιολογική FSH
 - Υπογοναδοτροπικό υπογοναδισμό
- Ολιγοσπερμία ($< 15 \times 10^6$ /ml)
 - AZFc (gr/gr)
- Καθορισμός της έκτασης έλλειψης (πλήρης/μερική) της περιοχής AZF



Κλινική σημασία ανεύρεσης Υq μικροελλείψεων

- Τεκμηρίωση της αιτιολογικής διάγνωσης της ανδρικής υπογονιμότητας.
- Προγνωστική αξία: αποφυγή διενέργειας αναποτελεσματικών διαγνωστικών και θεραπευτικών παρεμβάσεων.
 - Όχι TESE/ICSI σε πλήρη έλλειψη AZFa, AZFb, AZFbc
 - Όχι χειρουργική διόρθωση συνυπάρχουσας κισσοκήλης
- Γενετική συμβουλευτική/καθοδήγηση του ζευγαριού.

Γενετική συμβουλευτική (1)

- Υποχρεωτική μεταβίβαση της μικροέλλειψης στον άρρενα απόγονο.
 - Δεν μπορεί να προβλεφθεί ο ακριβής φαινότυπος του απογόνου
 - Μερική έλλειψη AZFc (πατέρας) → πλήρης έλλειψη (γιός)
- Πιθανώς αυξημένος κίνδυνος μωσαϊκού 46,XY/45,X ή συνδρόμου Turner.
- Αποτελέσματα ICSI συγκριτικά με άνδρες που δεν έχουν Υq μικροελλείψεις:
 - Ίδια ποσοστά γονιμοποίησης και κύησης
 - Μειωμένο ποσοστό σχηματισμού βλαστοκύστης και χαμηλότερη ποιότητα εμβρύων

Γενετική συμβουλευτική (2)

- Διενέργεια καρυοτύπου για αποκλεισμό μωσαϊκού 46,XY/45,X
 - Έλλειψη AZFc ή AZFa+b+c
- Προσυμπτωματικός γενετικός έλεγχος (screening) σε άνδρες συγγενείς
 - Έλλειψη AZFc ή μερική έλλειψη AZFa ή AZFb

Έλεγχος του γονιδίου CFTR

- Αποφρακτική αζωοσπερμία λόγω συγγενούς αμφοτερόπλευρης αγενεσίας των σπερματικών πόρων (CBAVD).
 - Πρωτοπαθής υπογονιμότητα, μέγεθος όρχεων > 15 ml, αψηλάφητοι σπερματικοί πόροι
 - φυσιολογική FSH
 - Όγκος σπέρματος < 1.5 ml, pH σπέρματος < 7.2, ελαττωμένη φρουκτόζη ή/και α-γλυκοσιδάση
- Ετερόπλευρη αγενεσία και απουσία νεφρικών ανωμαλιών.
- 85% έχουν μεταλλάξεις του CFTR (7p)
 - ~1500 μεταλλάξεις (F508, R117H and W1282X, 5T)
- Υποχρεωτικός έλεγχος και της συζύγου
 - 4% οι φορείς στο γενικό πληθυσμό

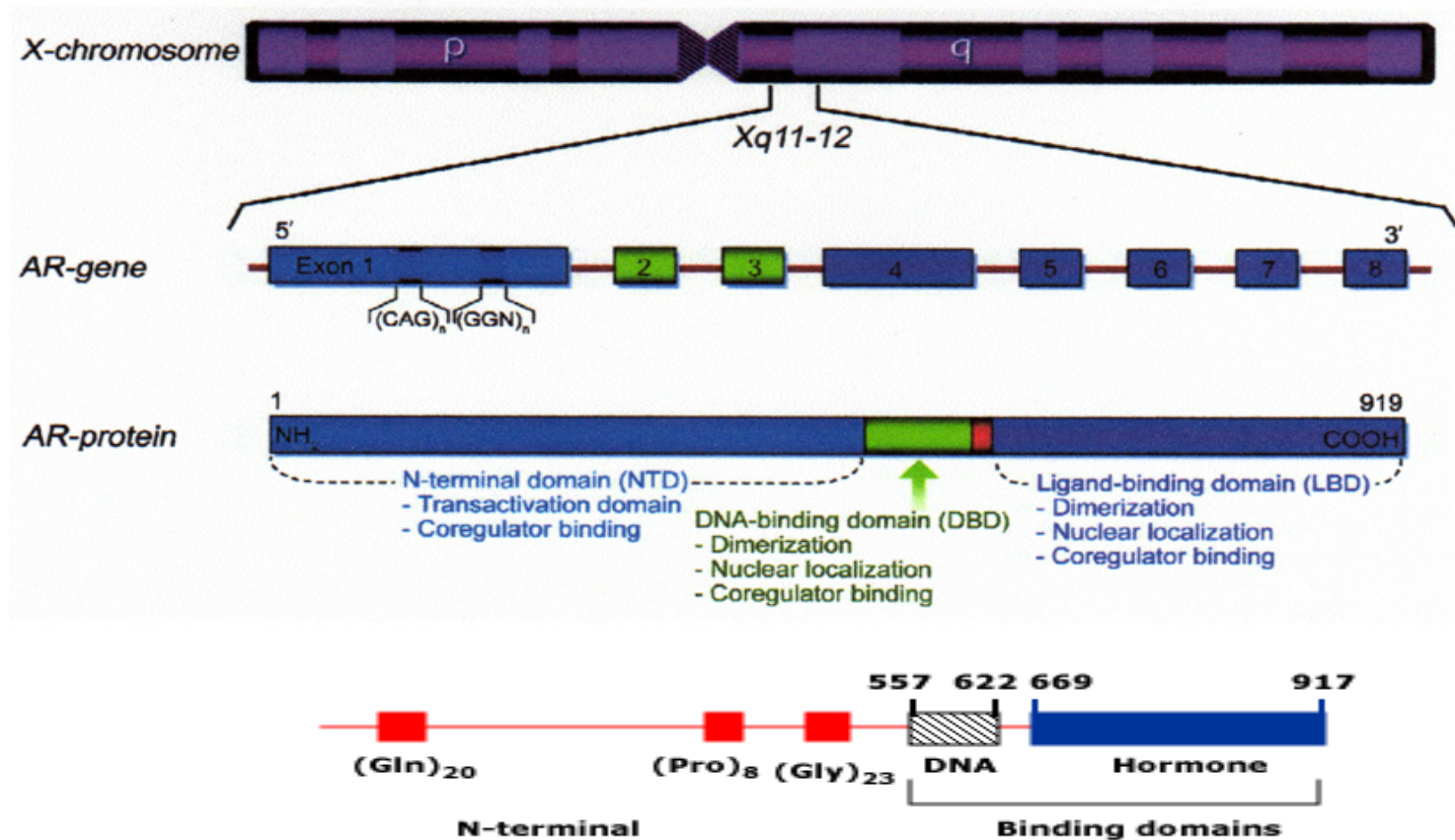
Γενετικός έλεγχος σε συγγενή υπογοναδοτροπικό υπογοναδισμό (ΥΥ)

- Σύνδρομο Kallmann
 - ΥΥ
 - υποσμία/ανοσμία
 - συγγενείς ανωμαλίες
- Μεμονωμένος ΥΥ (χωρίς υποσμία/ανοσμία)
- Μεμονωμένη ανεπάρκεια FSH ή LH
 - Ανίχνευση μεταλλάξεων στα γονίδια *FSHβ* ή *LHβ*

Γονίδια που σχετίζονται με συγγενή ανεπάρκεια GnRH

- **KAL1**
 - Xp22.3 (σ. Kallmann)
- **FGFR1** (KAL-2)
 - Αυτοσωματικό επικρατές
- **FGF8**
- **PROK2** (KAL3), **PROKR2** (KAL4)
- **KISS1R** (GPR54)
 - 19p13.3
- **KISS1**
- **GnRH1**
- **GnRHR**
 - Όψιμης έναρξης ΥΥ
- **TAC3, TAC3R**
 - Αναστρέψιμος ΥΥ
- **CHD7**
 - Σύνδρομο GHARGE
- **SEMA3A**
- **NELF, FGF17, IL17RD**
- **SOX10, DUSP6, SPRY4, FLRT3**

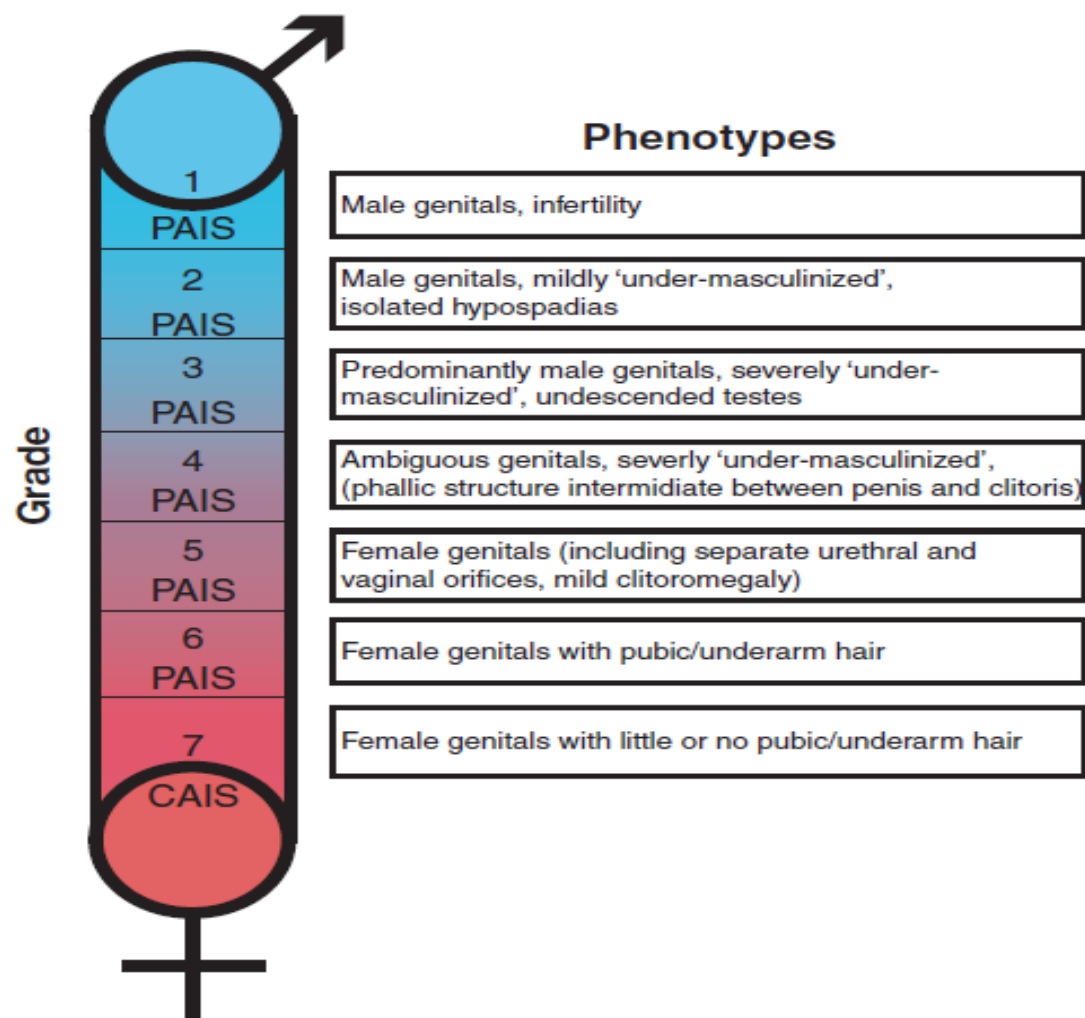
Υποδοχέας των ανδρογόνων (AR)



Ενδείξεις ελέγχου του γονιδίου του AR

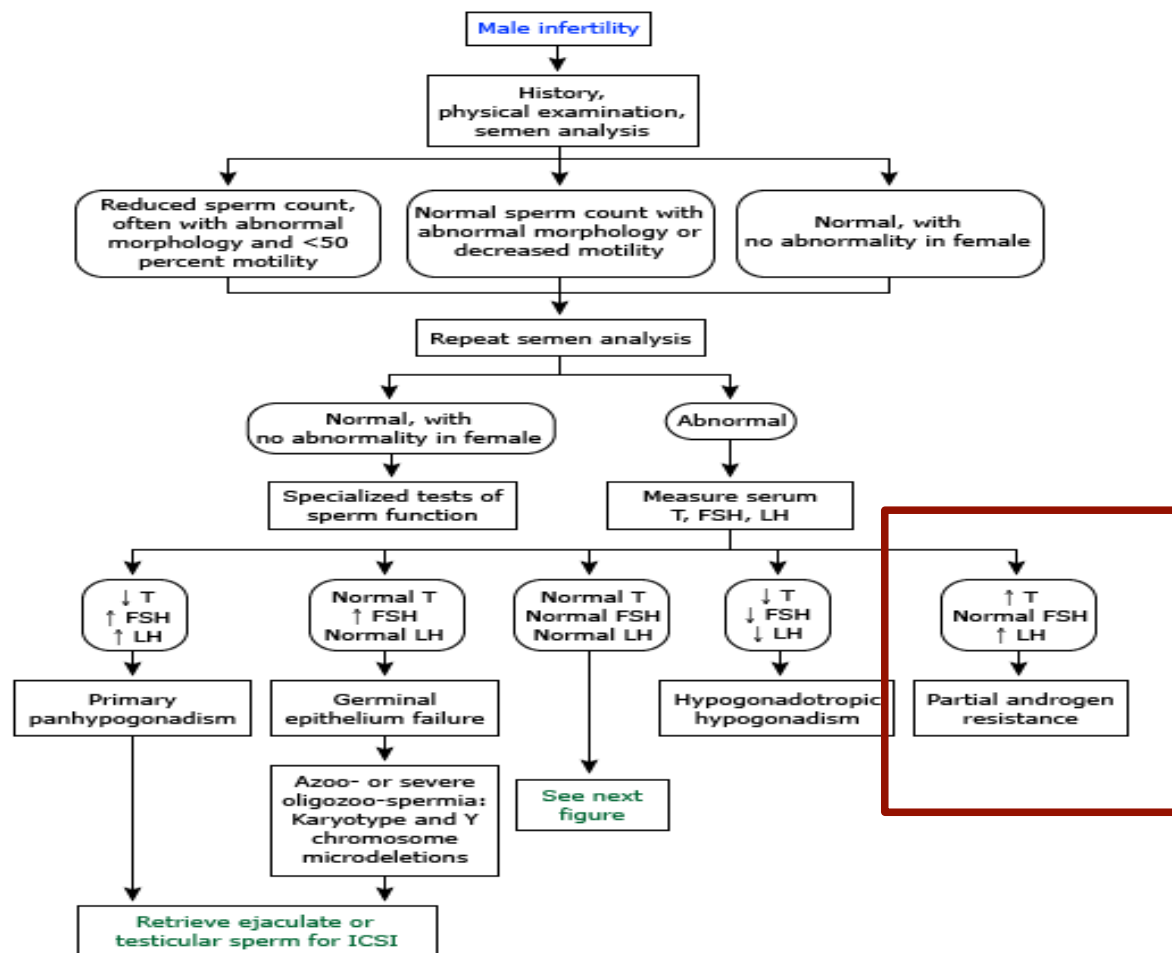
- **Σύνδρομο αντίστασης στα ανδρογόνα (AIS)**
 - Πλήρης (CAIS), μερική (PAIS), ήπια μορφή (MAIS)
 - Σημειακές μεταλλάξεις (85%)
 - μικροελλείψεις ή ενθέσεις (5%)
 - πλήρης ή μερική έλλειψη (6%)
- **Σύνδρομο Kennedy (X-linked spinal and bulbar muscular atrophy)**
 - Κεντρομελική μυική αδυναμία, δυσαρθρία, δυσφαγία
 - Γυναικομαστία, oligo-/αζωοσπερμία
 - Αύξηση του αριθμού των επαναλήψεων του τρινουκλεοτιδίου CAG (>38)

Φαινοτυπικό φάσμα του AIS



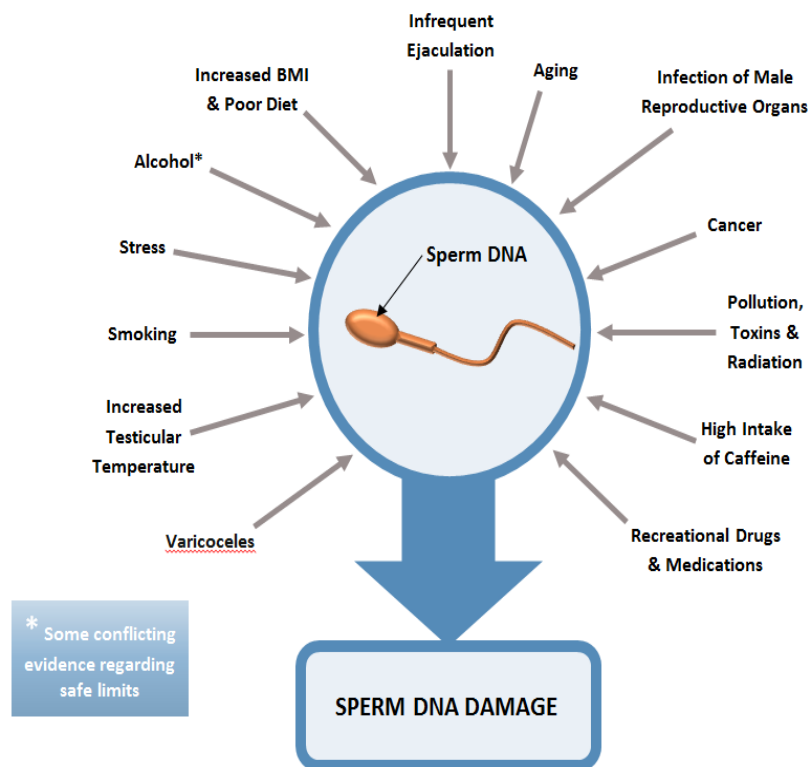
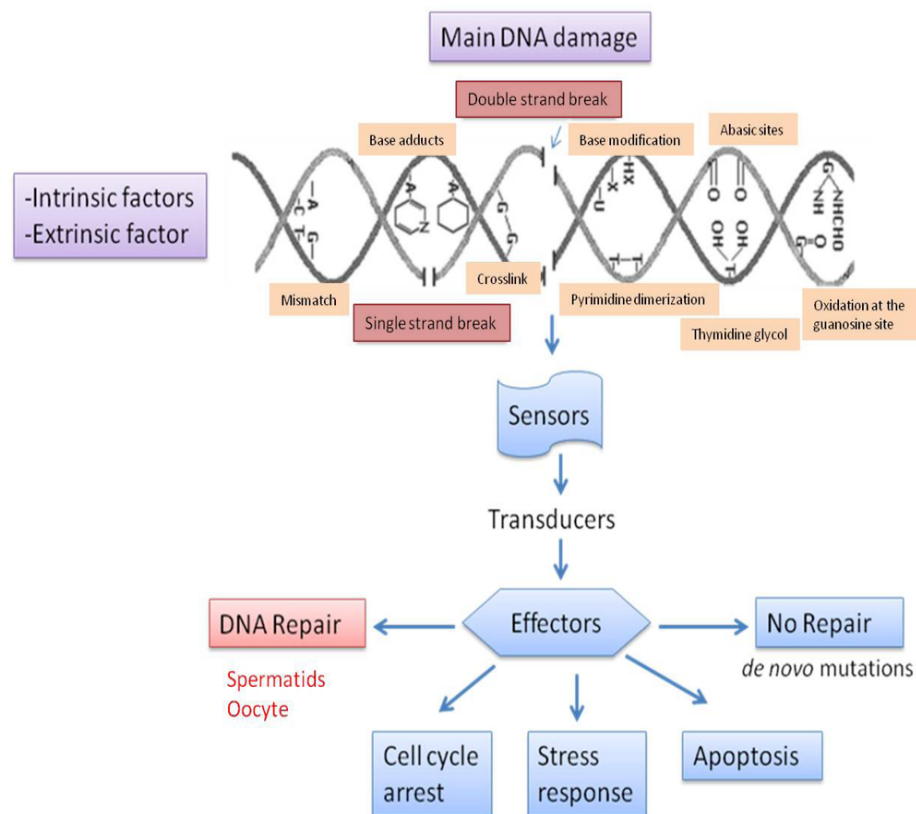
Έλεγχος για AIS σε υπογόνιμους άνδρες

Approach to diagnosis of male infertility



T: testosterone; FSH: follicle-stimulating hormone; LH: luteinizing hormone; ICSI: intracytoplasmic sperm injection.

Κατακερματισμός DNA σπερματοζωαρίων (DNA fragmentation)



Μέθοδοι εκτίμησης της ακεραιότητας του DNA

- Μέθοδος **COMET**
- Sperm Chromatin Structure Assay (**SCSA**)
- Terminal transferase dUTP nick end labeling (**TUNEL**) assay
- Sperm Chromatin Dispersion (**SCD** or Halo) test
- Το αποτέλεσμα δίνεται ως: DNA fragmentation index (**DFI**)
 - Η φυσιολογική τιμή εξαρτάται από τη μέθοδο
 - SCSA: <15-40%
 - TUNEL: <10-20%
 - SCD: <18-25%
 - COMET: <25%

Κλινική σημασία αυξημένου DFI

- Ανδρική υπογονιμότητα
- Μειωμένη πιθανότητα γονιμοποίησης (in vivo/in vitro)
- Προεμφυτευτική αναστολή εμβρυικής ανάπτυξης
- Μειωμένη πιθανότητα εμφύτευσης
- Αποτυχία κύκλων σπερματέγχυσης (IUI) και IVF
- Αυτόματες αποβολές
- Κίνδυνος εμφάνισης συγγενών ανωμαλιών στους απογόνους

Ενδείξεις εκτίμησης του DFI

- Δεν συστήνεται ως έλεγχος ρουτίνας
- Πιθανές ενδείξεις:
 - Αδιευκρίνιστης αιτιολογίας υπογονιμότητα
 - Άνδρες με φυσιολογικό σπερμοδιάγραμμα προ IVF
 - Επανειλημμένες αποτυχίες IUI/IVF
 - Καθ' ἑξιν αποβολές

Lewis SEM. 2013

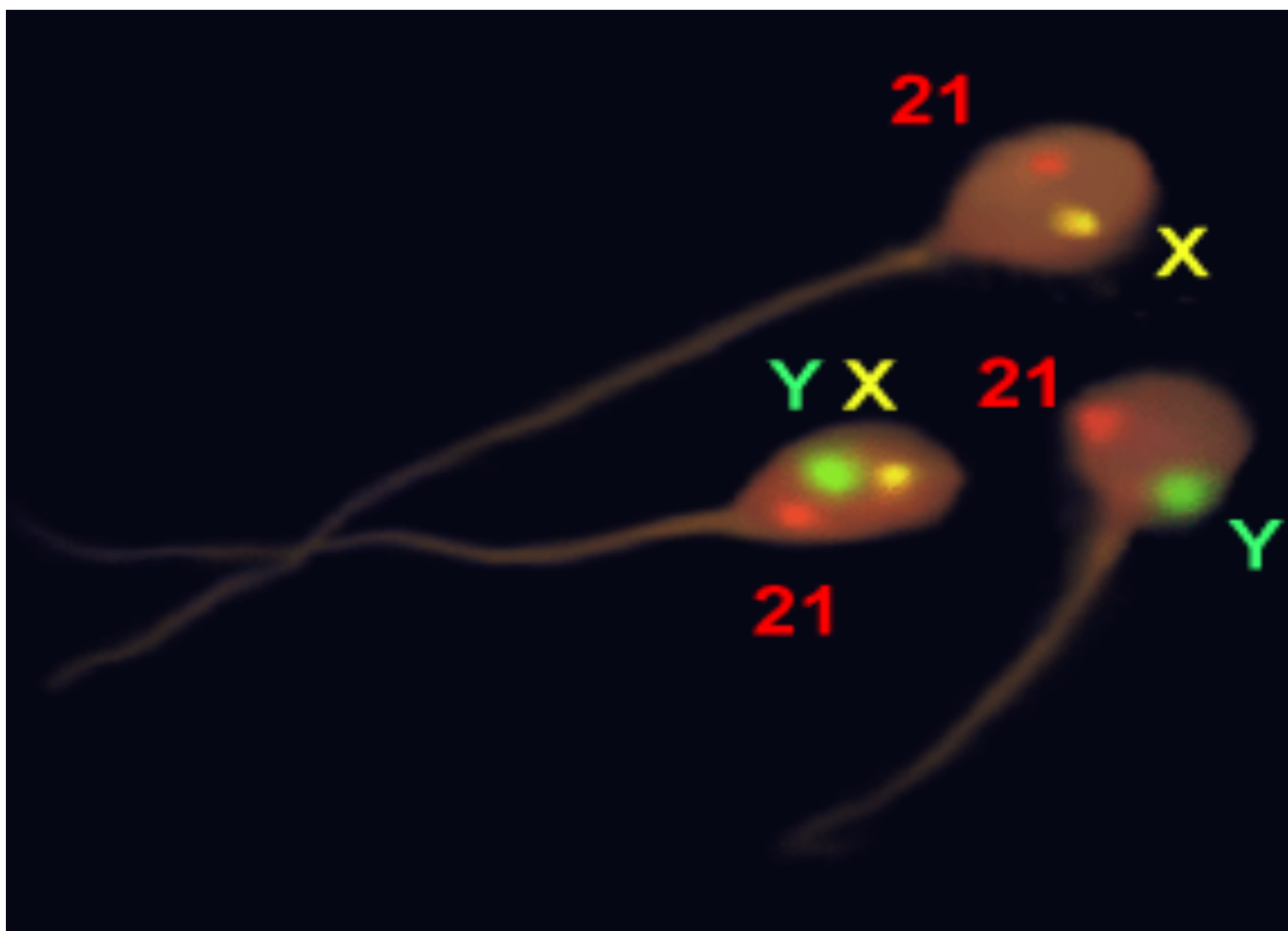
The Practice Committee of the ASRM.

The clinical utility of sperm DNA integrity testing: a guideline. Fertil Steril 2013;99:673-7

FISH σπερματοζωαρίων

- Εκτίμηση του βαθμού ανευπλοειδίας φυλετικών και αυτοσωμικών χρωμοσωμάτων των σπερματοζωαρίων
- Ελέγχονται τα χρωμοσώματα **X, Y, 13, 18** και **21**
- Χρήσεις
 - Ανδρική υπογονιμότητα
 - Μελέτη της επίδρασης γοναδοτοξινών στο σπέρμα

FISH σπερματοζωαρίων



Ενδείξεις για FISH σπερματοζωαρίων

Indication	Study
Recurrent pregnancy loss	Bernardini <i>et al.</i> [2004]
Repeated <i>in vitro</i> fertilization failure	Petit <i>et al.</i> [2005]
Oligospermia	Martin [2007]
Low motility <30% (asthenospermia)	Collodel <i>et al.</i> [2007a]
Nonobstructive azoospermia (testicular sperm)	Palermo <i>et al.</i> [2002]
Obstructive azoospermia (epididymal sperm)	Sukcharoen <i>et al.</i> [2003]
Teratozoospermia	
Tail agenesis	Carrell <i>et al.</i> [2004]
Multiflagellar sperm	Devillard <i>et al.</i> [2002]
Macrocephalic sperm	Devillard <i>et al.</i> [2002]
Round head-only syndrome (globozoospermia)	Morel <i>et al.</i> [2004]
Necrozoospermia	Moretti <i>et al.</i> [2007]
Double-head or multinucleated sperm	Lewis-Jones <i>et al.</i> [2003]
Other severe morphologic defects	Carrell [2008]
Genetic abnormalities	
Robertsonian translocations	Sarrate <i>et al.</i> [2005]
Reciprocal translocations	Sarrate <i>et al.</i> [2005]
Chromosome inversions	Sarrate <i>et al.</i> [2005]
Ring chromosome	Arnedo <i>et al.</i> [2005]
Klinefelter's syndrome (mosaic and nonmosaic)	Kruse <i>et al.</i> [1998]
	Lim <i>et al.</i> [1999]
	Rives <i>et al.</i> [2000]
Y-chromosome microdeletions	Minor <i>et al.</i> [2007]

Επίδραση γοναδοτοξινών και θεραπευτικών ουσιών στο βαθμό ανευπλοειδίας του σπέρματος

Chemical	Sex chromosome disomy	Autosome disomy	Diploidy	Study
Lifestyle factors				
Caffeine	Increased	Increased	Increased	Robbins <i>et al.</i> [1997]
Alcohol	No change	No change	Increased	Robbins <i>et al.</i> [1997]
Smoking	Increased	Increased	No change	Robbins <i>et al.</i> [1997], Rubes <i>et al.</i> [1998]
Pharmaceuticals				
Diazepam	Increased	Increased	No change	Baumgartner <i>et al.</i> [2001]
Finasteride	Increased	No change	Increased	Colodel <i>et al.</i> [2007b]
FSH	Decreased	No change	Decreased	Piomboni <i>et al.</i> [2009]
Vitamins and minerals				
Folate	Decreased	Decreased	Decreased	Young <i>et al.</i> [2008]
Zinc	No change	No change	No change	Young <i>et al.</i> [2008]
Vitamin C	No change	No change	No change	Young <i>et al.</i> [2008]
Vitamin E	No change	No change	No change	Young <i>et al.</i> [2008]
β-carotene	No change	No change	No change	Young <i>et al.</i> [2008]
Antioxidant composite	No change	No change	No change	Young <i>et al.</i> [2008]
Chemotherapy				
NOVP	Increased	Increased	Increased	Frias <i>et al.</i> [2003]
MACOP-B	No change	No change	No change	Martin and Rademaker [1995]
ABVD	Increased	Increased	Increased	Tempest <i>et al.</i> [2008]
BEP	Increased	Increased	Increased	Martin <i>et al.</i> [1999], De Mas <i>et al.</i> [2001]
Occupational exposures				
Organophosphates	Increased	No change	No change	Padungtod <i>et al.</i> [1999]
Miscellaneous pesticides	No change	No change	No change	Smith <i>et al.</i> [2004]
Styrene	No change	No change	No change	Naccarati <i>et al.</i> [2003]
Acrylonitrile	Increased	Increased	NA	Xu <i>et al.</i> [2003]

FSH, follicle-stimulating hormone; NOVP, novantrone, oncovin, velban, and prednisone; MACOP-B, methotrexate, doxorubicin, cyclophosphamide, vincristine, bleomycin and prednisone; ABVD, bleomycin, doxorubicin, vincristine, and dacarbazine; BEP, bleomycin, etoposide, and cisplatin; NA, not applicable.

Σπάνιες γενετικές παθήσεις στην Ανδρολογία

- Σύνδρομο Noonan
 - Μεταλλάξεις γονιδίων PTPN11, KRAS, SOS1 και RAF1
- Σύνδρομο Prader-Willi
 - Έλλειψη 15q11-13 του πατρικού χρωμοσώματος
- Σύνδρομο Bardet-Biedl
- Συγγενής υποπλασία επινεφριδίων με ΥΥ
 - Μετάλλαξη DAX-1
- Μυοτονική δυστροφία
 - VNTR γονιδίων DMPK και ZNF-9
- Ανεπάρκεια 5α-αναγωγάσης
- Ενζυμικές διαταραχές βιοσύνθεσης τεστοστερόνης
- Μεταλλάξεις των υποδοχέων FSH και LH

Δομή της παρουσίασης

- Εισαγωγή, μέθοδοι γενετικού-μοριακού ελέγχου
- Γενετικός έλεγχος στη καθημερινή κλινική πράξη
- Μελλοντικές προοπτικές

Πολυμορφισμοί των γονιδίων FSHβ και FSHR Φαρμακογενετική

- FSHB -221 G>T (rs10835638)
 - Καθοριστικός παράγων της συγκέντρωσης FSH
 - Το T αλληλόμορφο σχετίζεται με ελαττωμένη FSH και ολιγοσπερμία
- FSHR 2039 A>G (rs6166)
 - Το G αλληλόμορφο σχετίζεται με μικρότερο μέγεθος όρχεων
- Φαρμακογενετικά εργαλεία επιλογής ανδρών με ιδιοπαθή υπογονιμότητα που θα απαντήσουν στη θεραπεία με FSH
 - Η παρουσία του T αλληλόμορφου σχετίζεται με μεγαλύτερη πιθανότητα απάντησης στην αγωγή
 - Η συνδυασμένη ανάλυση FSHB -221 G>T και FSHR 2039 A>G υπόσχεται καλύτερα αποτελέσματα

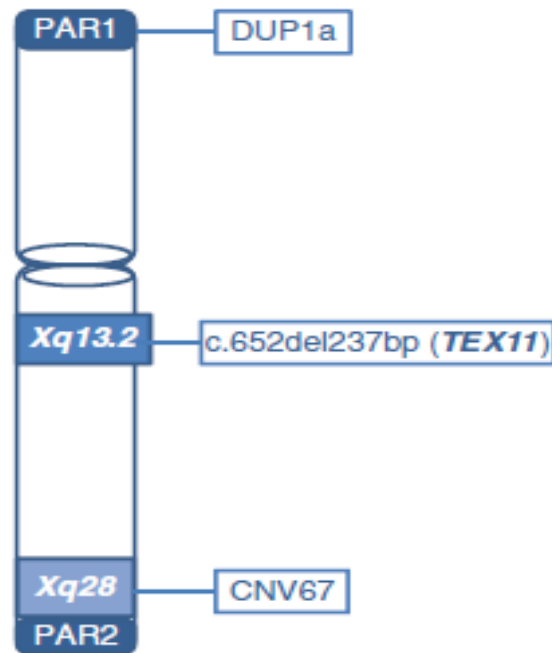
Αυτοσωματικά γονίδια

- Τεχνικές αλληλούχισης επόμενης γενιάς (next generation sequencing)
- Μελέτη ολόκληρου του γονιδιώματος (whole genome study)
 - CGH σε μικροσυστοιχίες
 - Αυξημένο ποσοστό ελλείψεων σε αυτοσωμικά χρωμοσώματα σε υπογόνιμους
- Συσχέτιση με υπογονιμότητα
 - Deleted in AZoospermia Like (**DAZL**, χρωμόσωμα 3)
 - **SOX5** (χρωμόσωμα 12)
 - Aurora Kinase C (**AURKC**) [μακροκεφαλία]
 - DPY-19-like 2 (**DPY19L2**) [μικροστρογγυλοκεφαλία]

Χρωμόσωμα X

- Πολυμορφισμοί (VNTR) του **AR**
 - CAG επαναλήψεις: 6-39 [διάμεση τιμή: 19-23]
 - Μεγαλύτερος ή μικρότερος αριθμός επαναλήψεων σχετίζεται με διαταραχές σπερματογένεσης
- Μεταλλάξεις του γονιδίου Testis Expressed X-linked 11 (**TEX11**, Xq13.2)
 - διακοπή σπερματογένεσης και αζωοσπερμία (2,4%)
- Copy Number Variants (CNV)
 - Μικροελλείψεις **CNV67, 64, 69** σε ολιγοσπερμία
 - Μικροδιπλασιασμοί (**DUP1A**)

CNV's του χρωμοσώματος X

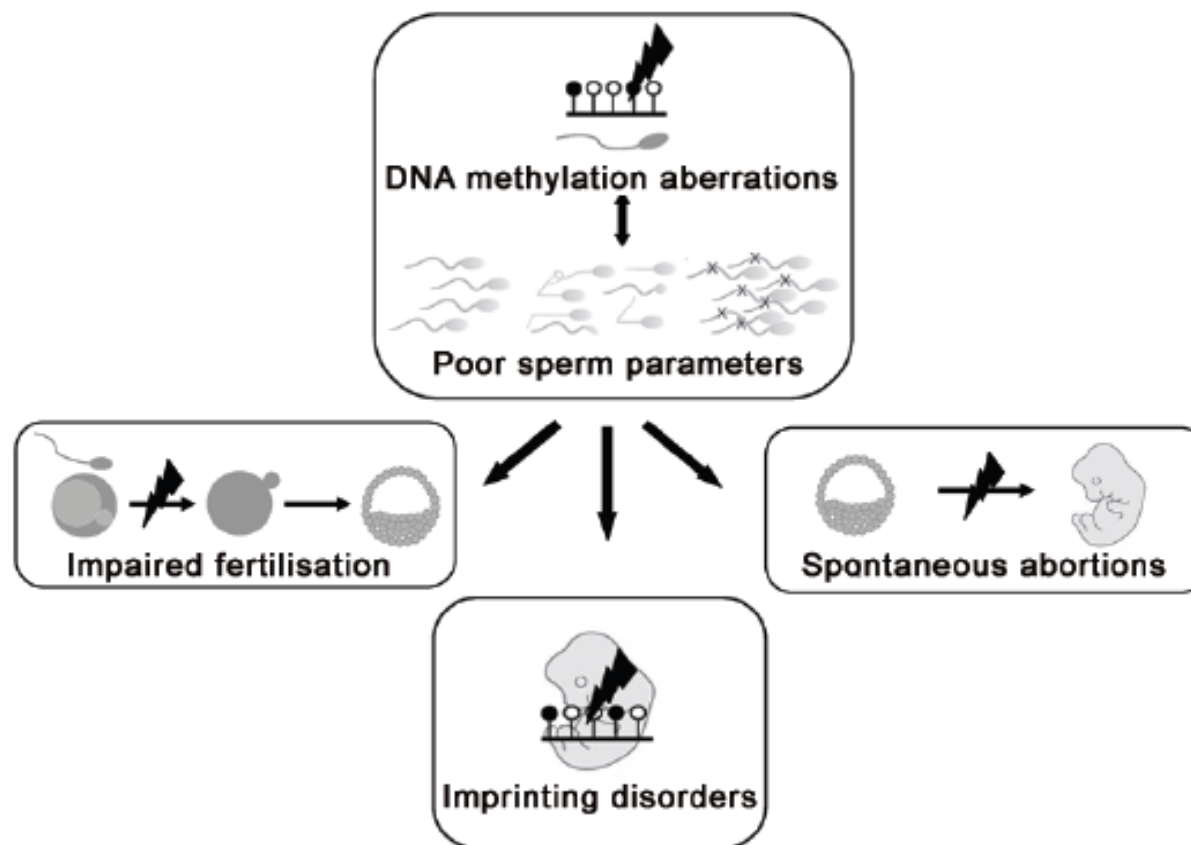


CNV	CNV type	Frequency	
		Patients (%)	Controls (%)
DUP1a	Duplication	1.4	0
c.652del237bp	Deletion	0.7	0
CNV67	Deletion	1.1	0

Επιγενετική

- Μελέτη των κληρονομήσιμων μεταβολών στην έκφραση γονιδίων που δεν οφείλονται σε αλλαγές στη πρωτοταγή δομή του DNA.
- Τύποι επιγενετικών μεταβολών
 - Μεθυλίωση DNA
 - τροποποίηση ιστονών
 - Non-coding RNAs
 - MicroRNAs
 - long non-coding RNAs
 - SRNAs
- Έχουν συσχετιστεί με ιδιοπαθή ανδρική υπογονιμότητα και διαταραγμένη εμβρυογένεση

Διαταραχές μεθυλίωσης DNA



Μέθοδοι εκτίμησης του βαθμού μεθυλίωσης του DNA

Global	High-performance liquid chromatography	- Highly quantitative and reproducible - Requires large amounts of high-quality genomic DNA	Gene-specific	Bisulfite sequencing of specific genes ('gold standard')	- Requires very little DNA - Quantitative, if a sufficient number of clones is sequenced - Information on allele-specific methylation possible - Labor-intensive
	Bisulfite sequencing of repetitive elements	- Requires very little DNA - Quantitative, if a sufficient number of clones is sequenced - Labor-intensive		Pyrosequencing	- Internal control (control dispensations) and accurate quantification of multiple CpG methylation sites in the same reaction - Time-effective - Only analysis of short to medium-length DNA sequences
Genome-wide	5-mC antibody staining	- Easy to perform - Less sensitive - Not very quantitative		Methylation sensitive PCR	- Rapid and very sensitive technique - Requires low quantity and quality of DNA - Not quantitative (in case of MethyLight: quantitative by real-time PCR)
	Whole-genome bisulfite sequencing	- Comprehensive genomic coverage - High quantitative accuracy - High costs		Bisulfite PCR followed by restriction analysis (COBRA)	- Requires low quantity of DNA - Quantitative - Provides data only for specific restriction enzyme cutting sites
	Genome-wide DNA methylation arrays	- Enable to measure DNA methylation levels of preselected cytosines throughout the genome - Lower per-sample cost compared with whole-genome bisulfite sequencing - Limited genomic coverage - High setup cost for designing customized microarrays			
	Restriction landmark genome scanning	- Simultaneous DNA methylation analysis of thousands of loci - Dependent of specific restriction enzyme cutting sites - Limited genome coverage and sensitivity		COBRA: combined bisulfite-PCR restriction analysis	
	Methylated DNA immunoprecipitation	- Can be followed by DNA microarrays or next-generation sequencing - Requires large amounts of genomic DNA and antibody			

Συμπεράσματα

- Ο γενετικός/μοριακός έλεγχος αποτελεί αναπόσπαστο τμήμα της εργαστηριακής διερεύνησης ανδρολογικών παθήσεων και ιδιαίτερα της υπογονιμότητας.
- Συμβάλλει σημαντικά στην τεκμηρίωση της αιτιολογικής διάγνωσης, στην επιλογή των κατάλληλων θεραπευτικών παρεμβάσεων και την ορθή γενετική καθοδήγηση.
- Οι κύριες γενετικές εξετάσεις που διενεργούνται στη καθημερινή κλινική πράξη είναι ο κυτταρογενετικός έλεγχος, η ανίχνευση μικροελλείψεων του Υq και η ανίχνευση μεταλλάξεων συγκεκριμένων γονιδίων (CFTR, γονίδια που προκαλούν ΣΥΥ).
- Μελλοντικά, η ευρεία εφαρμογή νέων τεχνολογιών ελέγχου γενετικών και επιγενετικών αλλοιώσεων, όπως η NGS, θα αλλάξει ριζικά το διαγνωστικό οπλοστάσιο της Ανδρολογίας.