



Σχολή Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας
Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών



Εργαστήριο Χημείας, Βιοχημείας, Κοσμητολογίας

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Γονιδιακή Θεραπεία για την Ανδρική Υπογονιμότητα

GRADUATE THESIS

Gene Therapy for Male Infertility



ΟΝΟΜΑ ΦΟΙΤΗΤΗ/ NAME OF STUDENT

Ενκέλα Μπούσι
Enkela Bushi

ΟΝΟΜΑ ΕΙΣΗΓΗΤΗ/NAME OF THE SUPERVISOR

Πέτρος Καρκαλούσος
Petros Karkalousos

ΑΙΓΑΛΕΩ/ΑΙΓΑΛΕΟ 2022



Faculty of Health and Caring Professions
Department of Biomedical Sciences



Laboratory of Chemistry, Biochemistry, Cosmetology

GRADUATE THESIS
Gene Therapy for Male Infertility

Enkela Bushi
18678123
bisc18678123@uniwa.gr

FIRST SUPERVISOR
Petros Karkalousos

SECOND SUPERVISOR
Maria Trapali

THIRD SUPERVISOR
Christina Fountzoula

AIGALEO 2022

Επιτροπή εξέτασης

Ημερομηνία εξέτασης: 7 Οκτωβρίου 2022

	Ονόματα εξεταστών	Υπογραφή
1 ^{ος} Εξεταστής	Καρκαλούσος Πέτρος	
2 ^{ος} Εξεταστής	Τράπαλη Μαρία	
3 ^{ος} Εξεταστής	Φούντζουλα Χριστίνα	

Δήλωση συγγραφέα προπτυχιακής διπλωματικής εργασίας

Η κάτωθι υπογεγραμμένη ΜΠΟΥΣΙ ΕΝΚΕΛΑ του ΛΟΥΛΕΖΙΜ, με αριθμό μητρώου 18678123 φοιτήτρια του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών της Σχολής Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, δηλώνω ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της πτυχιακής/διπλωματικής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος. Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Υπογραφή φοιτητή

Ευχαριστίες

Αρχικά, θέλω να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα μου, Δρ. Πέτρο Καρκαλούσο, Επίκουρο Καθηγητή Κλινικής Χημείας, για την ευκαιρία υλοποίησης της παρούσας διπλωματικής εργασίας αλλά και για τα εποικοδομητικά σχόλια και την πολύτιμη βοήθεια του. Η καθοδήγηση και οι συμβουλές του υπήρξαν στοχευμένες και καθοριστικές για το τελικό αποτέλεσμα.

Επίσης, θέλω να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στη Δρ. Μαρία Τράπαλη, Λέκτορα Βιοχημείας και Κλινικής Χημείας και στη Δρ. Χριστίνα Φούντζουλα, Επίκουρη Καθηγήτρια Χημείας, για τις παρατηρήσεις τους και την αξιολόγηση της διπλωματικής εργασίας.

Τέλος, επιθυμώ να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου προς την οικογένεια μου, τον σύντροφο μου και τις φίλες μου για την κατανόηση και τη συνεχή στήριξη τους καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας εργασίας.

Περίληψη

Η υπογονιμότητα συνιστά ένα συχνό παγκόσμιο πρόβλημα, με τον ανδρικό παράγοντα να εντοπίζεται περίπου στο ήμισυ των περιπτώσεων. Ο όρος αφορά την αποτυχία σύλληψης έπειτα από 12 μήνες σεξουαλικής επαφής δίχως αντισύλληψη. Η ανδρική υπογονιμότητα συνήθως χαρακτηρίζεται από τις διαταραχές της λειτουργίας των γεννητικών οργάνων και τις ανώμαλες παραμέτρους του σπέρματος, που προκύπτουν σε προ-ορχικό, ορχικό και μετα-ορχικό επίπεδο. Σε αυτές τις κατηγορίες εντάσσονται τα ενδοκρινολογικά και ανοσολογικά αίτια, οι λοιμώξεις, οι εξωγενείς παράγοντες και η σεξουαλική δυσλειτουργία. Οι γενετικοί παράγοντες εντοπίζονται στο 15% των περιπτώσεων και περιλαμβάνουν τις χρωμοσωμικές ανωμαλίες, τις μεταλλάξεις γονιδίων αλλά και τους πολυμορφισμούς. Η διάγνωση και ταυτοποίηση των παραπάνω αιτιών είναι καθοριστική για την αποτελεσματική αντιμετώπιση της υπογονιμότητας.

Οι κύριες διαθέσιμες θεραπευτικές επιλογές αφορούν την υποβοηθούμενη αναπαραγωγή, χωρίς να εστιάζουν στη αντιμετώπιση των αιτιολογικών παραγόντων. Επομένως, η γονιδιακή θεραπεία καθίσταται χρήσιμη για τη μόνιμη διόρθωση των γενετικών βλαβών, υπεύθυνων για την ανδρική υπογονιμότητα. Οι χρησιμοποιούμενοι μέθοδοι περιλαμβάνουν τη προσθήκη λειτουργικών γονιδίων, τη καταστολή μεταλλαγμένων αλληλομόρφων, τη θανάτωση παθολογικών κυττάρων και τη επεξεργασία του γονιδιώματος. Ενώ, για τη μεταφορά των απαραίτητων γονιδίων εφαρμόζονται φυσικές και χημικές τεχνικές ή ιικοί φορείς. Οι ιικοί φορείς αποτελούν ένα ισχυρό εργαλείο για την *in vivo* αλλά και την *ex vivo* μεταφορά του γενετικού υλικού και μία από τις βασικές στρατηγικές για τη γονιδιακή θεραπεία στα κύτταρα Sertoli και Leydig. Τα κύτταρα-στόχοι της γονιδιακής θεραπείας έναντι της ανδρικής υπογονιμότητας αφορούν τα γεννητικά και τα σωματικά κύτταρα του όρχεως, με τα δεύτερα να αποδεικνύονται πιο ασφαλή και με μεγαλύτερες προοπτικές σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες σε ζωικά μοντέλα. Επιπλέον, μολονότι η γενετική διόρθωση των σπερματογόνιων βλαστοκυττάρων με τη χρήση του συστήματος CRISPR/Cas9 θεωρείται δυνητικά σπουδαία για την αντιμετώπιση των αναπαραγωγικών διαταραχών, απαγορεύεται από τη νομοθεσία, λόγω των ηθικών προβληματισμών και των πιθανών δυσμενών επιπτώσεων στους απογόνους.

Συμπερασματικά, οι διαθέσιμες γενετικές τεχνικές καθιστούν εφικτή την εφαρμογή της γονιδιακής θεραπείας για τις κλινικά διαδεδομένες και προσδιορισμένες κατα-

στάσεις ανδρικής υπογονιμότητας, που οφείλονται σε μεταλλαγμένα γονίδια των ορικών σωματικών κυττάρων. Ωστόσο, πριν την κλινική εφαρμογή της είναι αναγκαία η περαιτέρω μελέτη της σε ζωικά μοντέλα και η επίλυση των προβλημάτων που σχετίζονται με την ασφάλεια και τα ηθικά ζητήματα της γονιδιακής θεραπείας.

Λέξεις κλειδιά: γονιδιακή θεραπεία, ανδρική υπογονιμότητα, σπερματοζώαριο, γενετική επεξεργασία, γεννητικά κύτταρα, σωματικά κύτταρα, ανθρώπινη αναπαραγωγή, ιικοί φορείς.

Abstract

Infertility is a common health problem worldwide, with the male factor being assigned as the underlying cause in about half of all cases. The term refers to the inability to conceive after 12 months of unprotected intercourse. Male infertility is usually characterized by the disorders of reproductive tract function and abnormal sperm parameters, arising at the pre-testicular, testicular, and post-testicular level. These categories include endocrinopathies, immunological and lifestyle factors, infections and sexual dysfunction. Genetic factors account for 15% of cases and include chromosomal abnormalities, gene mutations and polymorphisms. The effective treatment of male infertility depends on the diagnosis and identification of the above disorders.

The mainly available therapeutic options are associated with assisted reproduction, instead of the treatment of etiological factors. Therefore, gene therapy is considered useful for the permanent correction of the genetic defects, responsible for male infertility. The available techniques include gene augmentation, inhibition of mutant alleles, causing cell death, and genome editing. Whereas, the available gene transfer systems consist of physical and chemical tools or viral vectors. Viral vectors are considered a powerful tool for *in vivo* and *ex vivo* gene and constitute one of the main strategies used for gene therapy in Sertoli and Leydig cells. The target cell type of testis is subdivided into germline and somatic cells for the purpose of gene therapy, with the latter proven to be safer and more promising in previous animal studies. Although genetic modification of spermatogonial stem cells using the CRISPR/Cas9 system would potentially treat underlying reproductive disorders, it is prohibited by the law at the present due to ethical concerns and possible adverse effects upon resulting progeny.

In conclusion, currently available genetic techniques allow the application of gene therapy for clinically prevalent and defined conditions of male infertility, induced by mutated genes of the testicular somatic cells. However, further research on animal models as well as overcoming safety and ethical issues are required before its clinical application on infertile humans.

Key words: gene therapy, male infertility, sperm, gene editing, stem cells, somatic cells, human reproduction, viral vectors.

Πίνακας περιεχομένων

Δήλωση συγγραφέα προπτυχιακής διπλωματικής εργασίας	iv
Ευχαριστίες.....	v
Περίληψη.....	vi
Abstract	ix
Συνοτομογραφίες	xii
Πρόλογος.....	1
Κεφάλαιο 1 : Εισαγωγή	3
1.1. Ανδρικό Αναπαραγωγικό Σύστημα	3
1.1.1. Ανατομία.....	3
1.1.2. Φυσιολογία.....	10
1.2. Σπερματογένεση.....	18
1.3. Σπερματοζώαριο.....	21
Κεφάλαιο 2 : Ανδρική Υπογονιμότητα	24
2.1. Αίτια υπογονιμότητας	24
2.1.1. Προορχικά.....	24
2.1.2. Ορχικά.....	29
2.1.3 Μετα-ορχικά	36
2.1.4. Γενετικοί παράγοντες	41
2.2. Διάγνωση υπογονιμότητας.....	46
2.2.1. Ιστορικό	46
2.2.2. Κλινική εξέταση	48
2.2.3. Εργαστηριακός έλεγχος.....	49
Κεφάλαιο 3 : Γονιδιακή Θεραπεία.....	56
3.1. Ιστορική αναδρομή.....	56
3.2. Τεχνικές γονιδιακής θεραπείας.....	57
3.2.1. Προϋποθέσεις εφαρμογής.....	59
3.2.2. Κύτταρα-στόχοι	60
3.2.3. In vivo μεταφορά έναντι ex vivo	60
3.3. Συστήματα μεταφοράς γενετικού υλικού	62
3.3.1. Νουκλεϊκά οξέα	63
3.3.2. Χημικοί φορείς	64
3.3.3. Φυσικοί φορείς.....	67
3.3.4. Ιικοί φορείς.....	69

3.4. Εργαλεία επεξεργασίας γονιδίων.....	74
Κεφάλαιο 4 : Γονιδιακή θεραπεία σε υπογόνιμους άνδρες.....	79
4.1. Πιθανά υποψήφια γονίδια	79
4.1.1. Μεταλλάξεις γονιδίων που προκαλούν μη αποφρακτική αζωοσπερμία.....	80
4.1.2. Χρωμόσωμα Χ.....	81
4.1.3. Χρωμόσωμα Υ.....	82
4.1.4. Αυτοσωμικά χρωμοσώματα.....	83
4.2. Υποψήφια κύτταρα.....	84
4.2.1. Σπερματογόνια βλαστοκύτταρα.....	84
4.2.2. Εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα	85
4.2.3. Κύτταρα Sertoli.....	87
4.2.4. Κύτταρα Leydig.....	88
4.3. Μεταφορά γονιδίων στους όρχεις	89
4.3.1. In Vivo	89
4.3.2. Ex Vivo.....	90
4.4. Φορείς γενετικού υλικού	90
4.4.1. Ιικοί φορείς.....	90
4.4.2. Μη ιικοί φορείς	97
4.5. Σύγχρονες τεχνικές	101
4.5.1. Επεξεργασία γονιδίων	101
4.5.2. Εφαρμογές σε ζωικά μοντέλα	104
Κεφάλαιο 5 : Συζήτηση.....	107
5.1. Προκλήσεις γονιδιακής θεραπείας	107
5.2. Ηθικά προβλήματα	109
5.3. Μελλοντικές προοπτικές	111
Κεφάλαιο 6 : Συμπεράσματα.....	113
Αναφορές	116
Πηγές Εικόνων	156
Πηγές Πινάκων.....	158

Συντομογραφίες

	Αγγλική ορολογία	Ελληνική ορολογία
ABP	Androgen-binding protein	Πρωτεΐνη δέσμευσης ανδρογόνων
ADA-SCID	Adenosine deaminase deficient severe combined immunodeficiency	Σοβαρή συνδυασμένη ανοσοανεπάρκεια της απομινάσης της αδενοσίνης
AIS	Androgen Insensitivity Syndrome	Σύνδρομο μη απόκρισης σε ανδρογόνα
AR	Androgen Receptor	Ανδρογονικός υποδοχέας
ATP	Adenosine triphosphate	Τριφωσφορική αδενοσίνη
AVV	Adeno-associated virus	Αδενο-σχετιζόμενος ιός
AZF	Azoospermic factor	Παράγοντας αζωοσπερμίας
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate	Αδενυλική κυκλάση της μονοφωσφορικής αδενοσίνης
Cas9	CRISPR-associated protein 9	Πρωτεΐνη 9 που σχετίζεται με το σύστημα CRISPR
CBAVD	Congenital absence of the vas deferens	Συγγενής αμφοτερόπλευρη απόφραξη του σπερματικού πόρου
CFTR	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator	Ρυθμιστής διαμεμβρανικής αγωγιμότητας κυστικής ίνωσης
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats	Συστάδες τακτικά διατεταγμένων βραχέων παλινδρομικών επαναληπτικών αλληλουχιών
DHEA	Dehydroepiandrosterone	Δεϋδροεπιανδροστερόνη
DHT	Dihydrotestosterone	Διυδροτεστοστερόνη
DSB	Double Strand Breaks	Δίκλωνες θραύσεις
ES	Embryonic stem cells	Εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα

FI	Fertility Index	Δείκτης γονιμότητας
FSH	Follicle-stimulating hormone	Ωθυλακιοτρόπος ορμόνη
GnRH	Gonadotropin-releasing hormone	Γοναδοτροπική εκλυτική ορμόνη
hCG	Human chorionic gonadotropin	Χοριακή γοναδοτροπίνη
HH	Hypogonadotropic Hypogonadism	Υπογοναδοτρόπος Υπογοναδισμός
HPG	Hypothalamic-pituitary-gonadal	Υποθάλαμος-υπόφυση-γονάδες
HSPC	hematopoietic stem and progenitor cells	Αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα
ICSI	Intracytoplasmic Sperm Injection	Ενδοκυτταροπλασματική έγχυση σπέρματος
IHH	Idiopathic hypogonadotropic hypogonadism	Ιδιοπαθής Υπογοναδοτρόπος Υπογοναδισμός
INSL3	Insulin like factor 3	Ινσουλινόμορφος παράγοντας 3
IVF	In Vitro Fertilization	Εξωσωματική Γονιμοποίηση
LH	Luteinizing Hormone	Ωχρινοτρόπος ορμόνη
LOF	Loss-of-function	Απώλεια λειτουργίας
MAIS	Mild androgen insensitivity syndrome	Ήπια μη απόκριση στα ανδρογόνα
MESA	Microsurgical epididymal sperm aspiration	Μικροχειρουργική επιδιδυμική αναρρόφηση σπέρματος
MIS	Müllerian-inhibiting substance	Αντιμυλλέριος ουσία
NHEJ	Non-Homologous End Joining	Μη ομόλογη σύνδεση των ελεύθερων άκρων
NOA	Nonobstructive azoospermia	Μη Αποφρακτική Αζωοσπερμία
PAIS	Partial androgen insensitivity syndrome	Μερική μη απόκριση στα ανδρογόνα

PAP	Prostatic acid phosphatase	Προστατική όξινη φωσφατάση
PESA	Percutaneous Epididymal Sperm Aspiration	Διαδερμική ανάκτηση σπέρματος από την επιδιδυμίδα
PRL	Prolactin	Προλακτίνη
PSA	Prostate-Specific Antigen	Ειδικό προστατικό αντιγόνο
RNAi	RNA interference	Παρεμβατικά RNA
ROS	Reactive oxygen species	Δραστικά είδη οξυγόνου
RT	Reverse transcriptase	Αντίστροφη μεταγραφάση
SCID	Severe combined immunodeficiency	Σοβαρή συνδυαστική ανοσοανεπάρκεια
SCID-X1	X-linked severe combined immunodeficiency	X-φυλοσύνδετη συνδυασμένη ανοσοανεπάρκεια
SHBG	Sex hormone binding globulin	Δεσμευτική σφαιρίνη των φυλετικών ορμονών
siRNA	Small interfering RNA	Μικρά παρεμβατικά RNA
SRY	Sex-determining region of Y chromosome	Περιοχή που καθορίζει το φύλο στο Y χρωμόσωμα
SSCs	Spermatogonial stem cells	Σπερματογόνια βλαστοκύτταρα
TALENS	Transcription activator-like effector nucleases	Νουκλεάσες που μοιάζουν με μεταγραφικούς ενεργοποιητές
TESE	Testicular Sperm Extraction	Εκχύλιση ορχικού σπέρματος
WT	Wild type	Άγριου τύπου
ZFN	Zinc finger nucleases	Νουκλεάσες δακτύλων ψευδαργύρου

Πρόλογος

Η υπογονιμότητα είναι ένα κλινικά διαδεδομένη κατάσταση με κοινωνικοοικονομική αλλά και ψυχολογική επιβάρυνση που επηρεάζει 48 εκατομμύρια ζευγάρια και 186 εκατομμύρια ανθρώπους παγκοσμίως (Mascarenhas, et al., 2012; Slade, et al., 2007). Ο όρος αναφέρεται στην αποτυχία σύλληψης μετά από 12 μήνες σεξουαλικής επαφής δίχως αντισύλληψη και διακρίνεται στην πρωτοπαθή και δευτεροπαθή υπογονιμότητα (Zegers-Hochschild, et al., 2017). Η πρωτοπαθής υπογονιμότητα σχετίζεται με την αδυναμία σύλληψης, χωρίς την ύπαρξη προηγηθείσας εγκυμοσύνης, ενώ η δευτεροπαθής υπογονιμότητα αναφέρεται στην αποτυχία σύλληψης έπειτα από προηγούμενη εγκυμοσύνη (Leaver, 2016). Ο ανδρικός παράγοντας ευθύνεται για το 20-30% των υπογόνιμων ζευγαριών (Agarwal, et al., 2015), με μελέτες να εντοπίζουν μεγάλη ελάττωση (50-60%) των φυσιολογικών παραμέτρων του σπέρματος τις τελευταίες δεκαετίες (Carlsen, et al., 1992; Levine, et al., 2017). Τα αίτια της ανδρικής υπογονιμότητας είναι πολυάριθμα και περιλαμβάνουν τις ενδοκρινοπάθειες, γενετικές ανωμαλίες, διαταραχές της σπερματογένεσης και περιβαλλοντικούς παράγοντες (Borghet & Wyns, 2018). Αυτές οι διαταραχές επηρεάζουν την ποιότητα του σπέρματος και τη λειτουργία των σπερματοζωαρίων και συνεπώς ενεργούν κατασταλτικά για την γονιμότητα (Nieschlag, et al., 2010).

Σήμερα, η κύρια διαθέσιμη θεραπεία για την ανδρική υπογονιμότητα είναι η υποβοηθούμενη αναπαραγωγή, στην οποία εφαρμόζονται τεχνικές όπως η εξωσωματική γονιμοποίηση (In Vitro Fertilization, IVF) και πιο συγκεκριμένα η ενδοκυτταροπλασματική έγχυση σπέρματος (Intracytoplasmic Sperm Injection, ICSI) και η εκχύλιση ορχικού σπέρματος (Testicular Sperm Extraction, TESE) (Palermo, et al., 1996). Παρόλη την χρησιμότητα αυτών των μεθόδων, καμία τεχνική δεν έχει αποδειχθεί αποτελεσματική για ασθενείς με μη αποφρακτική αζωοσπερμία, η οποία χαρακτηρίζεται από απουσία ώριμων σπερματοζωαρίων στους όρχεις (Miyamoto, et al., 2012). Η επεμβατική φύση αυτών των τεχνικών, σε συνδυασμό με την έλλειψη πληροφοριών για τις μακροπρόθεσμες επιπτώσεις και την επικινδυνότητα έγχυσης σπερματοζωαρίων με πιθανά κατακερματισμένο DNA, δεν μπορούν να παραληφθούν (Agarwal, et al., 2016; Staessen, et al., 1999). Εξίσου ανησυχητική είναι η πιθανότητα κληρονόμησης γενετικών ανωμαλιών, σχετιζόμενες με τη διαταραγμένη σπερματογένεση και άλλες νόσους, στους απογόνους. Συνεπώς, είναι ση-

μαντική η ανάπτυξη νέας θεραπείας για την αντιμετώπιση των αιτιών της ανδρικής υπογονιμότητας, συμβάλλοντας στη φυσιολογική αναπαραγωγή.

Η γονιδιακή θεραπεία θα μπορούσε να αποτελέσει μια εναλλακτική επιλογή για την αντιμετώπιση της ανδρικής υπογονιμότητας. Ενώ, δεν συνιστά καινούρια έννοια, η συνεχής εργαστηριακή έρευνα έχει αποφέρει σπουδαία πρόοδο και ανακαλύψεις (Anguela & High, 2019). Συγκεκριμένα, η ολοκλήρωση χαρτογράφησης και αποκωδικοποίησης του πλήρους ανθρώπινου γονιδιώματος (Mayeux, 2005), η αξιοποίηση της τεχνολογίας αλληλούχισης νέας γενιάς (Next Generation Sequencing – NGS) και των διαγονιδιακών ζώων συνέβαλαν στην μεγαλύτερη κατανόηση των γενετικών και επιγενετικών αιτιών της ανδρικής υπογονιμότητας και στην αύξηση της δυνατότητας αξιοποίησής τους για θεραπευτική χρήση (Carrell, et al., 2006). Η επιταχυνόμενη πρόοδος στα συστήματα παράδοσης γονιδίων σε συνδυασμό με εκμετάλλευση του νέου συστήματος CRISPR/Cas9 έχουν ενισχύσει τις προοπτικές επεξεργασίας των γονιδίων και προσφέρουν την ανάπτυξη και την εφαρμογή νέας, εξατομικευμένης γονιδιακής θεραπείας για τη διάγνωση και την αποκατάσταση κοινών αναπαραγωγικών διαταραχών στους άνδρες (Savić & Schwank, 2016). Έτσι, ενώ αρχικά η συγκεκριμένη θεραπεία χρησιμοποιούταν μόνο σε κληρονομικές μονογονιδιακές παθήσεις, πλέον υπάρχει η δυνατότητα εφαρμογής σε πολλούς ιστούς και για μη κληρονομικές πολλαπλές διαταραχές (Dunbar, et al., 2018).

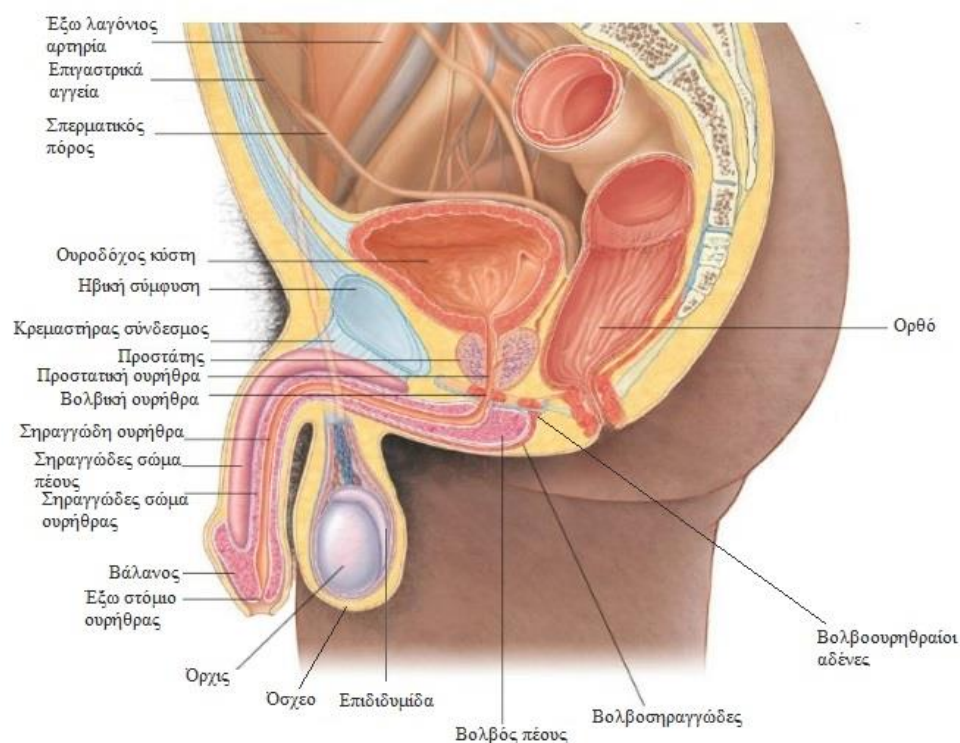
Η παρούσα διπλωματική εργασία έχει στόχο να διερευνήσει τους λόγους που συντελούν στην υπογονιμότητα των ανδρών καθώς και τις γενετικές και μοριακές μεθόδους που μπορούν να εφαρμοστούν για τη πιθανή αντιμετώπιση της. Οι ραγδαίες εξελίξεις σε αυτό το επιστημονικό πεδίο καθώς και το διαχρονικό πρόβλημα των υπογόνιμων ζευγαριών, αποτέλεσαν κίνητρο για την πραγματοποίηση αυτής της βιβλιογραφικής ανασκόπησης.

Κεφάλαιο 1 : Εισαγωγή

1.1. Ανδρικό Αναπαραγωγικό Σύστημα

1.1.1. Ανατομία

Το ανδρικό αναπαραγωγικό σύστημα αποτελείται από τα έσω και έξω γεννητικά όργανα. Τα έσω γεννητικά όργανα περιλαμβάνουν ένα ζεύγος γεννητικών αδένων, δηλαδή τους όρχεις και την αποχετευτική οδό, την οποία συνιστούν δύο επιδιδυμίδες, δύο σπερματικοί πόροι και η ουρήθρα (Βλ. Εικ.1.1.) (Hansen & Lambert, 2011). Σε αυτά ανήκουν, επίσης, οι ουρηθραίοι και βολβοουρηθραίοι αδένες, οι σπερματοδόχες κύστεις και ο προστάτης (παραγεννητικοί αδένες). Ο ρόλος τους είναι η παραγωγή, ωρίμανση, αποθήκευση και μεταφορά των σπερματοζωαρίων καθώς και η σύνθεση ορμονών (Hall, 2016; Nieschlag, et al., 2010). Ενώ τα έξω γεννητικά όργανα αποτελούνται από πέος, το οποίο είναι απαραίτητο για την συνουσία, και το όσχεο (Rogers, 2011).

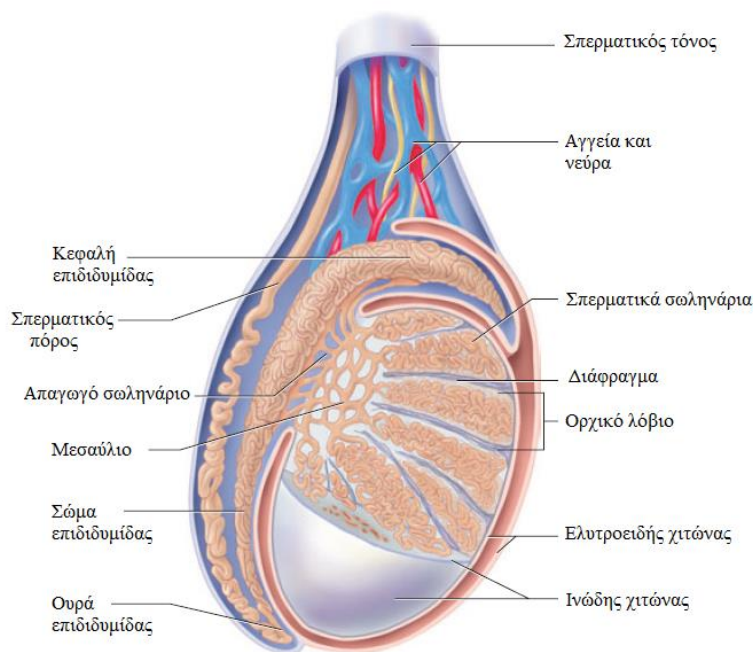


Εικόνα 1.1. Αναπαράσταση ουρογεννητικού συστήματος ανδρός (Ramírez-González & Sansone, 2022).

Όρχεις

Οι όρχεις είναι ωοειδείς δομές, μήκους περίπου 5 cm, διαμέτρου 3 cm, με το βάρος τους να κυμαίνεται από 10,5 έως 14 g (Begley, et al., 1980). Βρίσκονται μέσα στη δερματική πτυχή του όσχεου, το οποίο αποτελείται από υποδόριο ιστό και περιβάλλονται από έξω προς τα έσω, από το δαρτό χιτώνα, τον ελυτροειδή και ινώδη χιτώνα (Gartner, 2017). Ο δαρτός χιτώνας αποτελείται από επιπολής μεμβρανώδη περιτονία που βρίσκεται σε συνέχεια με την εν τω βάθει μεμβρανώδη στοιβάδα του υποδόριου ιστού της κοιλιάς (Nieschlag, et al., 2010). Δημιουργεί προς τα μέσα ένα διάφραγμα, το οποίο χωρίζει τον όσχεο θύλακα σε δύο κοιλότητες για τους όρχεις και εκτείνεται μεταξύ της ραφής και της κάτω επιφάνειας του πέους, μέχρι τη ρίζα του (Hansen & Lambert, 2011; Gray, 1918). Ο ινώδης χιτώνας πρόκειται για πυκνό συνδετικό ιστό που περιβάλλει τον κάθε όρχι και παχύνεται στο οπίσθιο χείλος, σχηματίζοντας το μεσαύλιο. Ενώ, ο ελυτροειδής χιτώνας αποτελεί μια περιτοναϊκή κατάδυση που συμπαρασύρθηκε στη φάση της καθόδου των όρχεων και επιτρέπει την ελευθερία κίνησης στους όρχεις μέσα στο όσχεο (Κατρίτση, 1983).

Το μεσαύλιο διεισδύει ακτινωτά μέσα στον όρχι, χωρίζοντας τον σε 200-300 ορχικά λόβια, κωνικού σχήματος (βλ. Εικ. 1.2.) (Standring, 2020). Κάθε λόβιο, βρίσκεται στα διαστήματα μεταξύ των ινώδων διαφραγμάτων που εκτείνονται μεταξύ του μεσαύλιου και του ινώδη χιτώνα και αποτελείται από 1-4 σπερματικά σωληνάρια, τα οποία αναστο-



Εικόνα 1.2. Ανατομία όρχεως, επιδιδυμίδα και σπερματικός πόρος (Kenneth, 2003).

μώνονται μεταξύ τους και σχηματίζουν το ορχικό δίκτυο (δίκτυο Haller) (Agur & Dalley, 2005). Ενώ ανάμεσα στα σωληνάκια βρίσκεται η διάμεσος ουσία του όρχεως, μεσεγγυματογενούς προελεύσεως, αποτελούμενη από συνδετικό ιστό και τα διάμεσα κύτταρα Leydig, που παράγουν τα ανδρογόνα (Αποστολάκη, 1948). Καθένα από τα σπερματικά σωληνάκια αποτελείται από ένα βασικό υμένα, συνδετικού ιστού, που περιέχει πολυάριθμες ελαστικές ίνες, και καλύπτεται εξωτερικά από ένα στρώμα πεπλατυσμένων επιθηλιακών κυττάρων (Agur & Dalley, 2005) (Gartner, 2017). Το σπερματικό επιθήλιο συνίσταται από 2 είδη κυττάρων, τα σπερματογόνια σε διαφορετικά στάδια ανάπτυξης και τα κύτταρα Sertoli, που συμβάλλουν στην ωρίμανση και θρέψη των σπερματοζωαρίων (Costanzo, 2018). Επιπλέον, στο τοίχωμα των ώριμων σπερματικών σωληναρίων εντοπίζονται τα μυοειδή κύτταρα, υπεύθυνα για την συσταλτικότητα και το σχηματισμό, μαζί με τα κύτταρα Sertoli, του αιματοορχικού φραγμού (Καλλιπολίτης, 2002).

Κάθε όρχις τροφοδοτείται με αίμα από την ορχική αρτηρία, η οποία κατέρχεται μαζί με τον όρχι στο όσχεο και προέρχεται από το μπροστινό μέρος της αορτής ακριβώς κάτω από την αρχή των νεφρικών αρτηριών (Begley, et al., 1980). Κάθε αρτηρία διασχίζει το οπίσθιο κοιλιακό τοίχωμα, συνοδεύει τον σπερματικό πόρο, διέρχεται από τον βουβωνικό πόρο και εισέρχεται στο οπίσθιο άνω άκρο κάθε όρχι (Heffner & Schust, 2014). Οι φλέβες που βγαίνουν από τον όρχι και την επιδιδυμίδα σχηματίζουν το ελικοειδές φλεβικό πλέγμα (Gartner, 2017), το οποίο ανέρχεται προς τον σπερματικό πόρο. Από τον σπερματικό πόρο περνούν, επίσης, τα λεμφαγγεία και παροχετεύονται στους πλάγιους και προαορτικούς λεμφαδένες. Τα αγγεία συνοδεύονται από τις νευρικές ίνες, περνώντας από τα νεφρικά και αορτικά νευρικά δίκτυα (Rogers, 2011). Τα αγγεία, τα νεύρα, οι μυϊκές ίνες του κρεμαστήρος μύος και ο σπερματικός πόρος σχηματίζουν το σπερματικό τόνο (Καλλιπολίτης, 2002).

Επιδιδυμίδα

Η επιδιδυμίδα είναι μια επιμήκης δομή στην οπίσθια άνω επιφάνεια του όρχεως, η οποία συνίσταται σε ένα περιελιγμένο πόρο, μήκους 5-6 m και μεταπίπτει στον σπερματικό πόρο (Hansen & Lambert, 2011). Επίσης, διαιρείται σε 3 μέρη, την κεφαλή, το σώμα και την ουρά (βλ. Εικ. 1.2.) (Agur & Dalley, 2005). Η κεφαλή είναι το ανώτερο και μεγαλύτερο τμήμα και συνίσταται κυρίως από τα απαγωγά σωληνάκια, τα οποία αποτελούν τη συνέχεια του ορχικού ή Αλληρείου δικτύου (Καλλιπολίτης, 2002). Το σώμα είναι προ-

σκολλημένο προς την πρωκτική πλευρά του όρχεως και εκτείνεται σε όλο το μήκος του αδένου. Ενώ, η ουρά είναι το μικρότερο τμήμα και ξεκινά από το σημείο διαχωρισμού της επιδιδυμίδας από τον όρχη (Molina, 2013). Τα σπερματοζωάρια ωριμάζουν κυρίως στη κεφαλή και το σώμα της επιδιδυμίδας και αποθηκεύονται στην ουρά (Rogers, 2011). Η επιδιδυμίδα λαμβάνει σπερματοζωάρια από τα σωληνάκια στο μεσαύλιο. Από το μεσαύλιο προς την κεφαλή της επιδιδυμίδας υπάρχουν 15-20 μικρά, σφιχτά περιελιγμένα απαγωγέα σωληνάκια, τα οποία περικλείονται από τον ινώδη χιτώνα και ενώνονται μεταξύ τους για τον σχηματισμό του πόρου της επιδιδυμίδας (Heffner & Schust, 2014). Ο αυλός των απαγωγών σωληναρίων παρουσιάζει σταδιακή στένωση από το κέντρο προς την περιφέρεια και αποτελείται από κροσσωτά κυλινδρικά κύτταρα και μη κροσσωτά κυβοειδή κύτταρα (Gartner, 2017). Η λειτουργία τους είναι απορροφητική στο περιφερικό τμήμα και εκκρινική στο κεντρικό (Καλλιπολίτης, 2002).

Σπερματικός πόρος

Ο σπερματικός πόρος είναι ένας μυϊκός σωλήνας, μήκους 40-45 cm, και αποτελεί συνέχεια της ουράς της επιδιδυμίδας που εκτείνεται μέχρι τη βάση του προστάτη (Hansen & Lambert, 2011). Σε αυτό το σημείο στενεύει αρκετά και αναστομώνεται με τον πόρο της σπερματοδόχου κύστης για να σχηματίσει τον εκσπερματικό πόρο, ο οποίος διασχίζει τον προστάτη πίσω από τον μεσαίο λοβό του και ανοίγει στο προστατικό τμήμα της ουρήθρας, κοντά στο στόμιο του προστατικού κόλπου (Gray, 1918). Με βάση την πορεία όπισθεν του όρχεως έως τη ουροδόχο κύστη διακρίνεται σε 5 τμήματα: το τονικό, το ορχικό, το βουβωνικό, το πυελικό και το κυστικό (Καλλιπολίτης, 2002). Ο ρόλος του σπερματικού πόρου είναι η μεταφορά των σπερματοζωαρίων, που έχουν αποθηκευτεί στην επιδιδυμίδα, στην ουρήθρα, όπου προστίθενται επιπλέον εκκρίσεις για την παραγωγή του σπέρματος. Ο παχύς ινώδης χιτώνας που περιβάλλει τον σπερματικό πόρο, νευρώνεται από το συμπαθητικό νευρικό σύστημα και, όταν διεγείρεται, συστέλλεται για την παροχή ταχείας προώθησης του σπέρματος κατά μήκος της οδού κατά την εκσπερμάτιση (Creasy & Chapin, 2013).

Βολβοουρηθραίοι αδένες

Οι βολβοουρηθραίοι αδένες ή αδένες του Cowper, έχουν διάμετρο περίπου 3-5 mm και εντοπίζονται στο ουρογεννητικό διάφραγμα, όπισθεν και πλευρικά του μεμβρανώδους

τιμήματος της ουρήθρας, ανάμεσα στα 2 στρώματα της περιτονίας του ουρογεννητικού διαγράμματος (Βλ. Εικ.1.1.) (Mescher, 2013). Βρίσκονται πάνω από τον βολβό της ουρήθρας και περιβάλλονται από τις εγκάρσιες ίνες της μεμβράνης του σφιγκτήρα της (Gray, 1918). Ο εκφορητικός πόρος κάθε αδένου, μήκους περίπου 3-5 cm, περνά κάτω από τη βλεννώδη μεμβράνη και εκβάλλει στο κάτω τοίχωμα της σηραγγώδους ουρήθρας (Καλλιπολίτης, 2002). Κάθε αδένου συνίσταται από πολλούς λοβούς, που συγκρατούνται μεταξύ τους με μια ινώδη επένδυση. Κάθε λοβός αποτελείται από έναν αριθμό σωληνοκυψελωειδών εκκριτικών αδενοκυψέλων, με επένδυση μονόστιβων κυλινδρικών επιθηλιακών κυττάρων, που καταλήγουν σε έναν πόρο, ο οποίος ενώνεται με τους πόρους άλλων λοβών έξω από τον αδένου για να σχηματίσει τον ενιαίο εκφορητικό πόρο (Mescher, 2013; Standring, 2020). Τη λειτουργία των βολβοουρηθραίων αδένων συνιστά η έκκριση αλκαλικού και βλεννώδους διαλύματος γλυκοπρωτεϊνών για την εξουδετέρωση της οξύτητας και λίπανση του αυλού της ουρήθρας πριν την εκσπερμάτιση (Nieschlag, et al., 2010).

Σπερματοδόχοι κύστες

Οι σπερματοδόχοι κύστες έχουν απιοειδές σχήμα, μήκος 5-7cm και ανευρίσκονται πάνω από τη βάση του προστάτη και μεταξύ της ουροδόχου κύστεως και της σπερματικής ληκύθου (Καλλιπολίτης, 2002). Κάθε κύστη αποτελείται από έναν πολυέλικτο πόρο με πολλά εκκολπώματα που εκτείνονται από τον κύριο πόρο, ενώ το σύνολο συγκρατείται από κάψα πυκνού συνδετικού ιστού (Mescher, 2013). Στο κάτω άκρο του ο πόρος συσφίγγεται για να σχηματίσει έναν ευθύ πόρο που ενώνεται με τον αντίστοιχο σπερματικό πόρο για να δημιουργήσει τον εκσπερματικό πόρο. Οι κύστες βρίσκονται κοντά μεταξύ τους στα κατώτερα μέρη τους, αλλά διαχωρίζονται στο ανώτερο μέρος, πλησίον του σπερματικού πόρου (Gray, 1918) (Rogers, 2011). Οι σπερματοδόχοι κύστες έχουν διαμήκειες και κυκλικές στοιβάδες λείων μυών και οι κοιλότητες τους είναι επενδεδυμένες με βλεννογόνο, που είναι η πηγή των εκκρίσεων τους, που απεκκρίνονται από μυϊκές συσπάσεις κατά την εκσπερμάτιση (Hossler, 2014). Ο βλεννογόνος είναι έντονα πολυέλικτος και σχηματίζει λαβυρινθώδεις εκκοπλώσεις, οι οποίες εκβάλλουν στον κεντρικό αυλό (Gartner, 2017). Η δραστηριότητα των κύστεων εξαρτάται από την παραγωγή ανδρογόνων από τους όρχεις (Rogers, 2011). Το έκκριμα είναι παχύρρευστο, κολλώδες, κιτρινωπό

ελαφρώς αλκαλικό, περιέχει φρουκτόζη και συνιστά το μεγαλύτερο ποσοστό του σπερματικού υγρού (Begley, et al., 1980).

Προστάτης αδένας

Ο προστάτης είναι ένα συμπαγές, αδενώδες και μυώδες όργανο, το οποίο βρίσκεται στην πυελική κοιλότητα, κάτω από την ηβική σύμφυση, πάνω από την άνω περιτονία του ουρογεννητικού διαφράγματος και μπροστά από το ορθό, μέσω του οποίου μπορεί να γίνει ευδιάκριτα αισθητός, ειδικά όταν είναι διευρυμένος (Gray, 1918). Έχει μέγεθος κάστανου, κωνικό σχήμα και χωρίζεται ανατομικά σε 3 ζώνες: τη κεντρική, τη μεταβατική και τη περιφερική. Η κεντρική ζώνη περιέχει τους περιουρηθρικούς υποβλεννογόνιους αδένες, περιβάλλει τους εκσπερματικούς πόρους και προεκβάλλει κάτω από τη βάση της ουροδόχου κύστεως (Mescher, 2013) (Papaner, 2010). Ενώ η μεταβατική ζώνη, περιβάλλει την προστατική ουρήθρα κοντά στους εκσπερματικούς πόρους και περιέχει τους περιουρηθρικούς αδένες (Papaner, 2010). Η περιφερική ζώνη αποτελεί το μεγαλύτερο μέρος της κορυφαίας, οπίσθιας και πλάγιας όψης του προστάτη και περιέχει τους κύριους αδένες (Verze, et al., 2016). Επίσης, ο προστάτης περιβάλλεται από μια λεπτή αλλά σταθερή ινώδη κάψα, η οποία προσκολλάται σταθερά σε αυτόν και είναι δομικά συνεχής με το στρώμα του αδένα, που αποτελείται από τους ίδιους ιστούς, δηλαδή από μη γραμμωτό μυ και ινώδη ιστό (Standring, 2020).

Ο προστάτης είναι ένα σύμπλεγμα 30 έως 50 ανεξάρτητων και σύνθετων σωληνοκυψελοειδών αδένων που εκβάλλουν με αρκετούς ελάσσονες και 3 μείζονες εκφορητικούς πόρους στην προστατική μοίρα της ουρήθρας (Καλλιπολίτης, 2002). Οι εκφορητικοί πόροι και οι αδένες είναι επενδυμένοι με μια βλενώδη μεμβράνη και από μονόστιβο ή ψευδοπολύστιβο κυλινδρικό επιθήλιο (Gartner, 2017). Οι πτυχώσεις επιτρέπουν τη διαστολή του ιστού κατά την αποθήκευση υγρών (Rogers, 2011). Κάτω από αυτό το στρώμα εντοπίζεται συνδετικός ιστός που αποτελείται από ένα παχύ δίκτυο ελαστικών ινών και αιμοφόρα αγγεία (Gray, 1918). Ο ιστός που περιβάλλει το εκφορητικούς πόρους και αδένες, δηλαδή ο διάμεσος ιστός, περιέχει μυϊκές ίνες, ελαστικές ίνες και ίνες κολλαγόνου που δίνουν στήριξη και σταθερότητα στον προστάτη αδένα (Rogers, 2011).

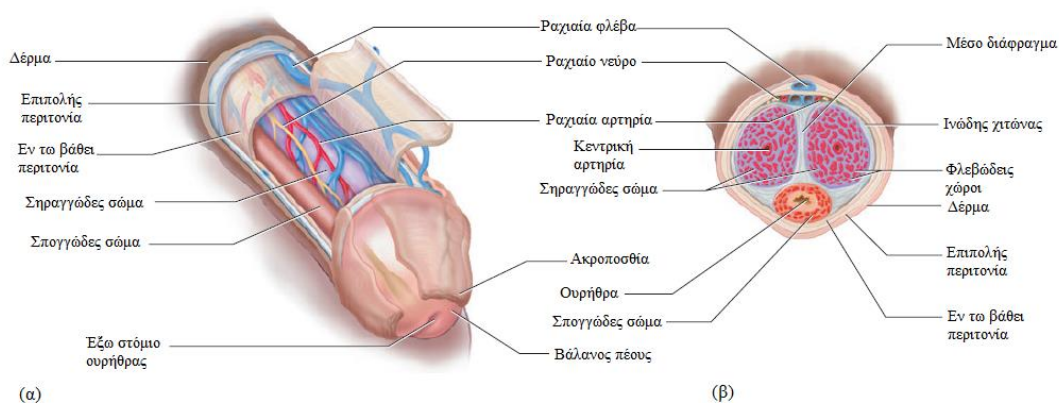
Οι αρτηρίες που τροφοδοτούν τον προστάτη προέρχονται από την έσω αιδοϊκή, την κάτω κυστική και τη μέση αιμορροϊδική. Οι φλέβες του σχηματίζουν ένα πλέγμα γύρω από τις πλευρές και τη βάση του αδένα, διέρχονται μπροστά τη ραχιαία φλέβα του

πέους, και καταλήγουν στις υπογαστρικές φλέβες. Ενώ, τα νεύρα προέρχονται από το πυελικό πλέγμα (Gray, 1918).

Το επιθηλιακό διαμέρισμα του προστάτη συνιστά την κύρια αδενική λειτουργία καθώς εκκρίνει το προστατικό υγρό που αποτελεί περίπου το 20-30% του όγκου ολόκληρης της εκσπερμάτισης (Gilany, et al., 2015) (Rey, et al., 2013). Το προστατικό υγρό, όπως και οι άλλες εκκρίσεις των ανδρικών βοηθητικών αδένων, συμβάλλει ουσιαστικά στην ανδρική γονιμότητα, καθώς περιέχει έναν αριθμό παραγόντων που ελέγχουν τη διαδικασία της εκσπερμάτισης και ρυθμίζουν πρωτεΐνες που ενεργοποιούν την ωρίμανση του σπέρματος (Gilany, et al., 2015). Αποτελείται από διάφορα ένζυμα διάσπασης πρωτεϊνών όπως η ινολυσίνη, το κιτρικό οξύ και όξινη φωσφατάση, η οποία συμβάλλει στην αύξηση της οξύτητας, και άλλα συστατικά, συμπεριλαμβανομένων ιόντων και ενώσεων νατρίου, ψευδάργυρο, ασβέστιο και κάλιο (Rogers, 2011). Αυτοί οι παράγοντες είναι απαραίτητοι για τη ρευστοποίηση του σπέρματος, τον κύκλο πήξης και την κινητικότητα των σπερματοζωαρίων (Verze, et al., 2016).

Πέος

Το πέος είναι το όργανο σύζευξης και διακρίνεται σε τρία τμήματα, τη ρίζα, το σώμα και τη βάλανο. Η ρίζα αποτελεί το εσωτερικό τμήμα και συνδέεται με τα όρια της ηβικής σύμφυσης (Rogers, 2011). Το σώμα βρίσκεται εξωτερικά, είναι ελεύθερο, κρεμαστό και καλύπτεται με ελαστικό δέρμα, τη πόσθη (Hossler, 2014). Η βάλανος έχει κωνοειδές σχήμα και διαχωρίζεται από το σώμα με ένα προεξέχον κυκλικό χείλος, τη στεφάνη καθώς και τη στεφανιαία αύλακα (Gray, 1918). Στην άκρη της βαλάνου βρίσκεται το έξω



Εικόνα 1.3. Σχηματική απεικόνιση ανατομίας πέους. (α) Πλάγια διατομή. (β) Εγκάρσια διατομή (Kenneth, 2003).

στόμιο της ουρήθρας. Επίσης, διαθέτει αισθητικές νευρικές απολήξεις και είναι η κύρια ερωτογενής ζώνη στον άνδρα. Σε κατάσταση ηρεμίας καλύπτεται από δέρμα, την ακροποσθία, η οποία κανονικά αποσύρεται στη στύση ή κατά τη διάρκεια της συνουσίας (Standring, 2020).

Τα κύρια δομικά χαρακτηριστικά του πέους καθορίζονται από τις τρεις μάζες στυτικού ιστού, τα δύο σηραγγώδη σώματα του πέος και το σπογγώδες σώμα ή σηραγγώδες σώμα της ουρήθρας (Gartner, 2017; Gray, 1918). Τα σηραγγώδη σώματα του πέος αποτελούνται από το σώμα και τη κορυφή, τα οποία ενώνονται, και τα σκέλη, τα οποία χωρίζονται όπισθεν (Standring, 2020). Ενώ το σηραγγώδες σώμα της ουρήθρας αποτελείται από τον βολβό, το σώμα και τη βάλανο. Ο βολβός διέρχεται από την τελική βάλανο του πέους, η οποία σχηματίζεται από την επέκταση του σηραγγώδους σώματος της ουρήθρας (Rogers, 2011). Τα σηραγγώδη σώματα σχηματίζουν τον στυτικό ιστό του πέους και αποτελούνται από συνδετικό ιστό μέσω του οποίου διακλαδίζονται πολλά αγγεία (Begley, et al., 1980). Όταν οι σηραγγώδεις κόλποι γεμίζουν με αίμα, δημιουργείται σημαντική υδροστατική πίεση που προκαλεί τη στύση του πέους (Mescher, 2013).

Τα σηραγγώδη σώματα συνίστανται από αγγειακές κοιλότητες, περιβαλλόμενες από νευρικές απολήξεις του αυτόνομου νευρικού συστήματος (Βλ. Εικ.1.3.). Η παροχή αίματος στο πέος πραγματοποιείται από ένα ραχιαίο επιφανειακό και σηραγγώδες αρτηριακό σύστημα, που προέρχεται από την έσω αιδοϊκή αρτηρία. Οι βαθιές αρτηρίες του πέους εισέρχονται στα σκέλη των σηραγγωδών σωμάτων και ρέουν και στις δύο πλευρές κεντρικά μέσα σε αυτά (Niederberger, 2011). Οι φλέβες διακρίνονται στις επιπολείς, που αποχετεύουν αίμα από τα περιβλήματα του πέους και τις εν τω βάθει, που αποχετεύουν αίμα από τα σηραγγώδη σώματα (Gray, 1918).

1.1.2. Φυσιολογία

Λειτουργία όρχεων

Οι όρχεις αποτελούνται από δύο λειτουργικά τμήματα, το διάμεσο ιστό και τα σπερματικά σωληνάκια, η λειτουργία των οποίων εξαρτάται από την έκκριση γοναδοτροπινών από την υπόφυση (Sokol, 2009). Στον διάμεσο ιστό συναντάται ο συνδετικός ιστός και τα διάμεσα κύτταρα ή κύτταρα Leydig, ενώ στα σπερματικά σωληνάκια συνίστανται από τα πολυδύναμα γεννητικά κύτταρα και τα επιθηλιακά κύτταρα του Sertoli (Barrett, et al., 2019). Η ενδοκρινής τους μοίρα είναι υπεύθυνη για την σύνθεση των ανδρογόνων, της

συνδεδεμένης των ανδρογόνων πρωτεΐνης (ABP) και της ινχιμπίνης, ενώ η εξωκρινής για την παραγωγή των σπερματοζωαρίων στα σπερματικά σωληνάκια. Στα ανδρογόνα συμπεριλαμβάνονται η τεστοστερόνη, η ανδροστενδιόνη και η δεϋδροεπιανδροστερόνη (DHEA) (Marshall & Bangert, 2008). Αυτές οι δύο λειτουργίες των όρχεων συνδέονται σε μεγάλο βαθμό επειδή η παραγωγή ανδρογόνων είναι απαραίτητη για την παραγωγή σπέρματος και η επιτυχής ανδρική αναπαραγωγή απαιτεί φυσιολογική σεξουαλική συμπεριφορά και ανάπτυξη δευτερογενών σεξουαλικών χαρακτηριστικών, τα οποία εξαρτώνται επίσης από τα ανδρογόνα (Overstreet & Blazak, 1983).

Τα κύτταρα Sertoli που επενδύουν τα σπερματικά σωληνάκια έχουν τέσσερις σημαντικές λειτουργίες που υποστηρίζουν τη σπερματογένεση (Mescher, 2013). Αρχικά, σχηματίζουν σφιχτές αποφρακτικές συνδέσεις μεταξύ των πλαγιοβασικών μεμβρανών, δημιουργώντας ένα φράγμα μεταξύ των όρχεων και της κυκλοφορίας του αίματος που ονομάζεται αιματοορχικός φραγμός (Costanzo, 2018). Ο φραγμός προσδίδει μια επιλεκτική διαπερατότητα, επιτρέποντας τη διέλευση ουσιών όπως η τεστοστερόνη, αλλά απαγορεύοντας τις επιβλαβείς ουσίες για το αναπτυσσόμενο σπερματοζωάριο (Barrett, et al., 2019). Επιπλέον, παρέχουν θρεπτικά συστατικά, όπως η τρανσφερίνη, και προστασία στα αναπτυσσόμενα σπερματογόνια τα οποία είναι απομονωμένα από τις θρεπτικές ουσίες του πλάσματος και τα κυκλοφορούντα ανοσοστοιχεία λόγω το αιματοορχικού φραγμού (Mescher, 2013). Τα κύτταρα Sertoli εκκρίνουν, επίσης, ένα υδατικό υγρό και μια πρωτεΐνη που δεσμεύει τα ανδρογόνα (ABP) στον αυλό των σπερματικών σωληναρίων. Το πρώτο βοηθά στη μεταφορά του σπέρματος μέσω των σωληναρίων στην επιδιδυμίδα, ενώ η πρωτεΐνη (ABP) συμβάλει στη διατήρηση των υψηλών τοπικών επιπέδων τεστοστερόνης (Costanzo, 2018). Ως ενδοκρινή κύτταρα εκκρίνουν, επίσης, μια γλυκοπρωτεΐνη 39 kDa, την ινχιμπίνη, και την αντιμυλλέριο ουσία (MIS). Η ινχιμπίνη έχει παλίνδρομη δράση στην έκκριση της FSH από την υπόφυση και η αντιμυλλέριο ουσία προκαλεί την υποστροφή των εμβρυϊκών πόρων (Mescher, 2013). Τέλος, τα λυσοσώματα των κυττάρων Sertoli φαγοκυτταρώνουν τα υπολειμματικά σωματίδια της σπερμιογένεσης, αποτρέποντας την διαπέραση από τον αιματοορχικό φραγμό.

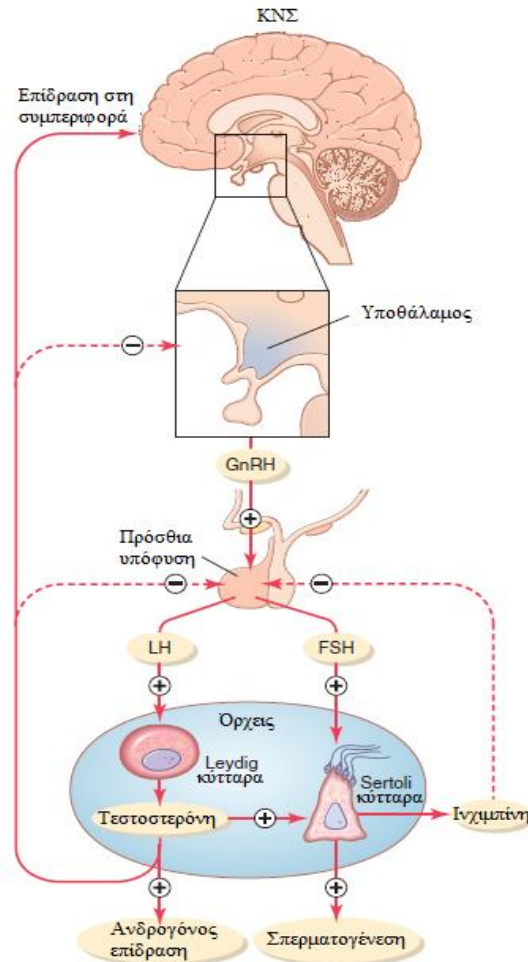
Τα κύτταρα Leydig συνθέτουν στεροειδείς ορμόνες, με σημαντικότερη τη τεστοστερόνη, υπό την επίδραση της ωχρινοτρόπου ορμόνης LH (Hall, 2016). Σε αυτά πραγματοποιούνται τα δύο πρώτα στάδια της στεροειδογένεσης μετατρέποντας τη χοληστερόλη, το υπόστρωμα για όλες τις στεροειδείς ορμόνες, σε πρεγνενολόνη και έπειτα σε

προγεστερόνη (Burstein & Gut, 1976). Στη συνέχεια, με τις καταλυτικές δραστηριότητες διάφορων ενζύμων, προκύπτει το τελικό προϊόν, η τεστοστερόνη (Payne, et al., 1976). Τα κύτταρα Leydig μπορούν επίσης να μετατρέψουν την τεστοστερόνη σε οιστρογόνα, με την επίδραση μιας αρωματάσης, τα οποία στη συνέχεια συνδέονται με τους οιστρογονικούς υποδοχείς και αναστέλλουν τη σύνθεση της τεστοστερόνης (Payne, et al., 1976). Υπάρχουν επιπλέον υποδοχείς για την προλακτίνη και την ινχιμπίνη, οι οποίες συμβάλλουν στη διεγερτική δραστηριότητα της LH για την παραγωγή της τεστοστερόνης (Heffner & Schust, 2014).

Ορμονικός έλεγχος

Η ενδοκρινική λειτουργία των όρχεων στηρίζεται στον υποθάλαμο-υποφυσιακό-ορχικό άξονα, ο οποίος ρυθμίζεται από μηχανισμούς αλληλορύθμισης του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ), του υποθάλαμου, της υπόφυσης και των δύο λειτουργικών τμημάτων του όρχεως (βλ. Εικ. 1.4.) (Καλλιπολίτης, 2002). Στο ΚΝΣ, η νορ-επινεφρίνη και η ντοπαμίνη ελέγχουν τη σύνθεση της εκλυτικής ορμόνης των γοναδοτροπινών (GnRH) στον υποθάλαμο και τη σφυγμική έκκριση της κάθε 90 λεπτά. Η GnRH καταλήγει στην πρόσθια υπόφυση μέσω των υποθαλαμο-υποφυσιακών πυλαίων αγγείων και διεγείρει την έκκριση των γοναδοτρόπων ορμονών, δηλαδή την ωχρινοτρόπο ορμόνη (LH) και την ωοθυλακιοτρόπο ορμόνη (FSH) (Widmaier, et al., 2016). Η παλμική απελευθέρωση της GnRH έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση LH και FSH με παρόμοιο τρόπο στη συστηματική κυκλοφορία. Στους υγιείς άνδρες παρατηρούνται περίπου 2 έως 4 παλμοί LH και FSH κατά τη διάρκεια μιας περιόδου 6 έως 8 ωρών (Newsholme & Leech, 1983). Οι δύο ορμόνες συνδέονται με συγκεκριμένους υποδοχείς στις μεμβράνες των αντίστοιχων κυττάρων-στόχων τους και διεγείρουν τον κυτταρικό μεταβολισμό μέσω της αύξησης της δραστηριότητας της αδενυλικής κυκλάσης, της κυκλικής μονοφωσφορικής αδενοσίνης (cAMP) και της πρωτεϊνικής (Steinberger, et al., 1977). Η LH συνδέεται σε ειδικούς υποδοχείς στα διάμεσα κύτταρα του Leydig και διεγείρει τη έκκριση στεροειδών (Molina, 2013). Το κύριο προϊόν είναι το ανδρογόνο τεστοστερόνη και συντίθενται σε μικρότερες ποσότητες οιστραδιόλη και 17α-υδροξυπρογεστερόνη (Steinberger, et al., 1977). Ενώ, η FSH δρα στα κύτταρα Sertoli, προκαλώντας την έκκριση παρακρινών παραγόντων, οι οποίοι με τη σειρά τους διεγείρουν τη σπερματογένεση (Εικ. 1.4.) (Costanzo, 2018). Επιπροσθέτως, η

προλακτίνη (PRL), ορμόνη της πρόσθιας υπόφυσης, σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις δρα ενισχύοντας τη δράση της LH στα κύτταρα Leydig (Bardin, 1978).



Εικόνα 1.4. Σύνοψη ορμονικού ελέγχου του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-όρχεων στους άνδρες. Οι διεγερτικές επιδράσεις φαίνονται με πρόσημα συν, και οι ανασταλτικές επιδράσεις αρνητικής ανάδρασης με πρόσημα μείον. Η ινχιμίνη αναστέλλει την έκκριση της FSH και η τεστοστερόνη αναστέλλει την έκκριση της LH. Η τοπική δράση της τεστοστερόνης στα κύτταρα Sertoli διεγείρει την σπερματογένεση (Hall, 2016).

Ο άξονας υποθαλάμου-υπόφυσης ελέγχεται, επίσης, από αρνητική ανάδραση των ορικών ορμονών, η οποία έχει δύο διαδρομές (Costanzo, 2018). Στην πρώτη, η τεστοστερόνη αναστέλλει την έκκριση της LH δρώντας στην πρόσθια υπόφυση καθώς και στον υποθάλαμο για την μείωση της έκκρισης GnRH (Widmaier, et al., 2016). Στη δεύτερη διαδρομή, τα κύτταρα Sertoli εκκρίνουν την ινχιμίνη, η οποία δρα στην πρόσθια υπόφυση μειώνοντας την έκκριση της FSH. Έτσι τα κύτταρα Sertoli συνθέτουν τον δικό

τους αναστολέα ανάδρασης που χρησιμεύει ως δείκτης της σπερματογενετικής δραστηριότητας των όρχεων (Newsholme & Leech, 1983).

Ανδρογόνα

Τα ανδρογόνα ανήκουν στη κατηγορία των C-19 στεροειδών και εκκρίνονται κυρίως από τους όρχεις αλλά και τον φλοιό των επινεφριδίων (Roy & Chatterjee, 1995). Σε αυτά περιλαμβάνονται η τεστοστερόνη (T), η Δ4-ανδροστενδιόνη, η ανδροστερόνη, η 17α-υδροξυπρογεστερόνη, η πρεγνολόλη, η προγεστερόνη και η δεϋδροεπιανδροστερόνη (DHEA). Τα ανδρογόνα στηρίζουν τις αναπαραγωγικές και αναβολικές λειτουργίες (Mooradian, et al., 1987). Είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη και τη λειτουργία των όρχεων, την ωρίμανση των δευτερογενών σεξουαλικών χαρακτηριστικών, τη λίμπιντο, την αρρενοποίηση του οστικού-μυϊκού μηχανισμού και τη διέγερση της σπερματογένεσης. Οι φυσιολογικές επιδράσεις των ανδρογόνων εξαρτώνται από διαφορετικούς παράγοντες όπως η κατανομή των ανδρογόνων και των μεταβολιτών τους μέσα στο κύτταρο, ο αριθμός των μορίων ανδρογόνων, ο αριθμός πολυγλουταμίνης της αλληλουχίας αμινοξέων στον υποδοχέα ανδρογόνου, η αλληλεπίδραση με τους υποδοχείς και η ενεργοποίηση τους (Palazzolo, et al., 2008). Επίσης, οι συγκεντρώσεις ανδρογόνων στο αίμα εξαρτώνται από τον ρυθμό σύνθεσης, που εξισορροπείται από τη μεταβολική μετατροπή και απέκκριση.

Ο ρόλος της ανδροστερόνης, της προγεστερόνης και της 17α υδροξυπρογεστερόνης στον όρχι είναι άγνωστος αλλά έχουν βρεθεί υποδοχείς προγεστερόνης σε ορισμένα περισωληναριακά κύτταρα και στα σπερματοζώαρια (Modi, et al., 2007). Χρησιμοποιώντας ένα παράγωγο της προγεστερόνης, την ενανθική νορεθιστερόνη, δεν βρέθηκαν άμεσες επιδράσεις στη λειτουργία των όρχεων και των επιδιδυμίδων (Junaidi, et al., 2005).

Το πιο σημαντικό και άφθονο ανδρογόνο στην κυκλοφορία του αίματος είναι η τεστοστερόνη (Nieschlag, et al., 2010). Καθημερινά παράγονται συνολικά 6 -7 mg τεστοστερόνης, από τα οποία το 95% συντίθεται στους όρχεις από τα κύτταρα του Leydig και το υπόλοιπο ποσοστό στα επινεφρίδια, στον ορό του αίματος και στο ήπαρ (Lei, et al., 2001). Το μεγαλύτερο μέρος της τεστοστερόνης, περίπου το 97%, κυκλοφορεί στο αίμα συνδεδεμένο με πρωτεΐνες-φορείς (Johnson & Everitt, 1984). Η κύρια πρωτεΐνη φορέας είναι η δεσμευτική σφαιρίνη των φυλετικών ορμονών (SHBG), που δεσμεύει περίπου το

44% της κυκλοφορούσας τεστοστερόνης (Williams, 1974). Η λευκωματίνη και ορισμένες άλλες πρωτεΐνες του πλάσματος μπορούν επίσης να δεσμεύσουν το 54% της ορμόνης αλλά με πολύ χαμηλότερη συγγένεια δέσμευσης. Το υπόλοιπο 2% μη δεσμευμένο τμήμα της ορμόνης θεωρείται «ελεύθερη τεστοστερόνη» και αντιπροσωπεύει τη βιολογικά ενεργή μορφή της ορμόνης (Newsholme & Leech, 1983).

Η τεστοστερόνη δρα, ανάλογα με τον ιστό στόχο, με τρεις διαφορετικές μορφές. Η απευθείας δράση της εντοπίζεται στα κύτταρα Sertoli, διεγείροντας τη σπερματογένεση, καθώς και στον υποθάλαμο και την υπόφυση, αναστέλλοντας την έκκριση της GnRH και της LH, αντίστοιχα. Σε ορισμένα κύτταρα, όπως του προστάτη, η τεστοστερόνη μετατρέπεται σε διυδροτεστοστερόνη (DHT), μέσω της 5 α -αναγωγής (Marshall & Bangert, 2008). Στα κύτταρα Leydig πραγματοποιείται μετατροπή σε οιστρογόνα, μέσω του ενζύμου αρωματάση, τα οποία έχουν ανασταλτική δράση (Widmaier, et al., 2016). Επιπλέον, η τεστοστερόνη συμβάλλει στην εμβρυϊκή διαφοροποίηση της εσωτερικής ανδρικής γεννητικής οδού. Κατά την εφηβεία, έχει ανδρογόνο και αναβολική δράση, προάγοντας την αύξηση της μυϊκής μάζας, την εφηβική ανάπτυξη και το κλείσιμο των επιφυσιικών πλακών (Begley, et al., 1980). Συμμετέχει στην ωρίμανση των ανδρικών γεννητικών αδένων και εξωτερικών οργάνων, την εμβάθυνση της φωνής, τη σπερματογένεση και τη ανάπτυξη σεξουαλικής συμπεριφοράς (Begley, et al., 1980) (Costanzo, 2018).

Λειτουργία επιδιδυμίδας

Η επιδιδυμίδα είναι κυρίως υπεύθυνη για την κινητικότητα, την ωρίμανση, την αποθήκευση των σπερματοζωαρίων και την σύνθεση του επιδιδυμικού πλάσματος (Cosentino & Cockett, 1986). Τα σπερματοζωάρια στους όρχεις θεωρούνται ακίνητα (James, et al., 2020). Ενώ δύνανται να συσπαστούν, δεν είναι σε θέση να ολοκληρώσουν οποιαδήποτε προοδευτική κίνηση. Στον επιδιδυμικό αυλό πραγματοποιούνται μορφολογικές και δομικές αλλαγές στο σπερματοζωάριο, που ενισχύουν την κινητικότητα (Robaire, et al., 2006). Έτσι, όταν φτάσουν στην ουρά της επιδιδυμίδας, η πλειονότητα των σπερματοζωαρίων είναι ικανά για προοδευτική κινητικότητα. Μια άλλη βασική διαδικασία που απαιτείται για τη φυσιολογική ανδρική γονιμότητα είναι η ωρίμανση των σπερματοζωαρίων, που συμβαίνει κατά τη διάρκεια της επιδιδυμικής διέλευσης. Τα σπερματοζωάρια υφίστανται πολλές αλλαγές κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου, αλλά κυρίως αποκτούν κινητικότητα και παράγοντες απαραίτητους για την επιτυχή γονιμοποίηση ενός ωοκυτ-

τάρου (James, et al., 2020). Η διαδικασία ωρίμανσης λαμβάνει χώρα μέσω της άμεσης επαφής του σπέρματος με το περιεχόμενο του επιδιδυμικού αυλού (Robaire, et al., 2006). Καθώς τα σπερματοζωάρια προχωρούν μέσω της επιδιδυμίδας, υφίστανται αλλαγές στην συμπύκνωση του πυρήνα, στη σύσταση της πλασματικής μεμβράνης, στην κυτταροσκελετική δομή και την πρωτεϊνική σύσταση (Cornwall, 2009; Sullivan & Mieusset, 2016). Εκτός από την ωρίμανση, στην επιδιδυμίδα συμβαίνει η φαγοκυττάρωση των γηρασμένων και φθαρμένων σπερματοζωαρίων (James, et al., 2020).

Μια πρόσθετη λειτουργία της επιδιδυμίδας είναι η προστασία των σπερματοζωαρίων από βλάβες που προκαλούνται από το εξωτερικό περιβάλλον (Hinton, et al., 1996). Τα επιθηλιακά κύτταρα της έχουν υψηλή μεταβολική δραστηριότητα, με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενεργών μορφών οξυγόνου, που είναι επιβλαβή για τα σπερματοζωάρια (James, et al., 2020). Για την αντιμετώπιση αυτού του προβλήματος, τα επιθηλιακά κύτταρα εκκρίνουν διάφορα αντιοξειδωτικά ένζυμα στον αυλό της επιδιδυμίδας, συμπεριλαμβανομένης της υπεροξειδικής δισμουτάσης, για να εξουδετερώσουν τα αντιδραστικά είδη οξυγόνου (O'Flaherty, 2019). Επιπλέον, ένας φραγμός αίματος-επιδιδυμίδας λειτουργεί για να προστατεύει τα ώριμα σπερματοζωάρια από το ανοσοποιητικό σύστημα και από επιβλαβείς ουσίες που μπορεί να υπάρχουν στην κυκλοφορία του αίματος (Robaire, et al., 2006).

Η ουρά της επιδιδυμίδας λειτουργεί ως χώρος αποθήκευσης για τα λειτουργικά ώριμα σπερματοζωάρια πριν από την εκσπερμάτιση (Cornwall, 2009). Πιο συγκεκριμένα, τα επιθηλιακά κύτταρα της ουράς εκκρίνουν παράγοντες που βοηθούν στη διατήρηση των σπερματοζωαρίων σε κατάσταση ηρεμίας κατά την αποθήκευση (James, et al., 2020). Ενώ πολλοί παράγοντες που σχετίζονται με αυτήν την κατάσταση ηρεμίας είναι ακόμα άγνωστοι, καθοριστική θεωρείται η ρύθμιση του pH του αυλού και η παρουσία ειδικών πρωτεϊνών και ενζύμων (Robaire, et al., 2006). Μετά την εκσπερμάτιση, τα σπερματοζωάρια εγκαταλείπουν αυτή την κατάσταση ηρεμίας και η μεταβολική δραστηριότητα αυξάνεται 3-5 φορές σε σύγκριση με τη δραστηριότητα στην ουρά της επιδιδυμίδας (Jones, 1999).

Τέλος, στην επιδιδυμίδα πραγματοποιείται η μεταφορά του σπέρματος από τους όρχεις προς τους σπερματικούς σπόρους. Ο συνολικός χρόνος διέλευσης μέσω της επιδιδυμίδας διαρκεί περίπου 10-15 μέρες (Robaire, et al., 2006). Η μεταφορά επιτυγχάνεται κυρίως με ρυθμικές συσπάσεις των λείων μυϊκών στοιβάδων που περιβάλλουν την

επιδιδυμίδα. Ενώ οι συσπάσεις συμβαίνουν συχνότερα στη κεφαλή, ενισχύονται περισσότερο στην ουρά (James, et al., 2020).

Λειτουργία σπερματοδόχων κύστεων

Οι σπερματοδόχοι κύστες παράγουν περίπου το 60% του σπερματικού υγρού, το οποίο περιέχει άφθονη φρουκτόζη, κιτρικό οξύ και άλλες θρεπτικές ουσίες, καθώς και μεγάλες ποσότητες προσταγλανδινών και ινωδογόνου (Creasy & Charin, 2013). Κατά τη διάρκεια της εκσπερμάτισης, οι σπερματοδόχες κύστες εκκρίνουν το κιτρινωπό και ιξώδες υγρό και το σπέρμα μεταφέρεται από τον σπερματικό πόρο προς τον εκσπερματικό πόρο (Mescher, 2013). Με αυτόν το τρόπο αυξάνεται ο όγκος του σπέρματος και παρέχονται θρεπτικά συστατικά για το σπερματοζωάριο, μέχρι τη γονιμοποίηση του ωαρίου (Hall, 2016). Η φρουκτόζη αποτελεί σημαντική πηγή ενέργειας για το σπερματοζωάριο, ενώ το ινωδογόνο επιτρέπει τη πήξη του σπέρματος μετά την εκσπερμάτιση (Mescher, 2013).

Οι προσταγλανδίνες συμβάλλουν στην γονιμοποίηση του ωαρίου, αντιδρώντας με την τραχηλική βλέννη ώστε να διευκολυνθεί η κινητικότητα των σπερματοζωαρίων (Costanzo). Επίσης, προκαλούν περισταλτικές συσπάσεις στη μήτρα και στις σάλπιγγες προκειμένου να μεταφέρουν το σπέρμα προς τις ωοθήκες (Costanzo, 2018) (Hall, 2016). Αποτελούν, ακόμη, μαζί με τη φρουκτόζη, δείκτες για τη λειτουργία των σπερματοδόχων κύστεων λόγω της αποκλειστικής έκκρισης τους από αυτές (Καλλιπολίτης, 2002).

Λειτουργία προστάτη

Ο προστάτης αδένας έχει διάφορες χρήσιμες λειτουργίες. Αρχικά συμμετέχει στον έλεγχο της εξόδου ούρων από την ουροδόχο κύστη και στη μεταφορά του σπερματικού υγρού κατά την εκσπερμάτιση (Williams & Chisholm, 1976). Ως εξωκρινής αδένας, συνεισφέρει στο σπερματικό πλάσμα ένα φάσμα μικρών μορίων, όπως ο ψευδάργυρος και το μαγνήσιο, κιτρικό οξύ και ένζυμα όπως η όξινη φωσφατάση, ινωδολυσίνη και η κοαγκουλάση, που διευκολύνουν τη γονιμότητα και εμπλέκονται στην πήξη (Πίνακας 1) (Walsh, et al., 1992). Η προστατική όξινη φωσφατάση (PAP), με την υδρόλυση της φωσφορυλοχολίνης σε χολίνη, εμπλέκεται άμεσα στη θρέψη των σπερματοζωαρίων (Walsh, et al., 1992). Ενώ, το υψηλό επίπεδο ψευδαργύρου στο σπερματικό υγρό, που προέρχε-

ται κυρίως από την έκκριση του προστάτη, δρα ως αντιβακτηριδιακός παράγοντας (Fair & Wehner, 1976).

Πίνακας 1. Εκκρίσεις προστατικού αδένα	
Όξινη φωσφατάση	Ινωδολυτικά ένζυμα
Λευκωματίνη	Ινοσιτόλη
α-Αμυλάση	Μαγνήσιο, Ψευδάργυρος, Νάτριο
β-Γλυκουρονιδάση	Ενεργοποιητής του πλασμινογόνου
Κεφαλίνη	Φωσφολιπίδια
Χοληστερόλη	Ειδικό προστατικό αντιγόνο (PSA)
Χολίνη	Πρωτεολυτικά ένζυμα
Κιτρικό οξύ	Σπερμίνη
Θευική δερματάνη	Σπερμιδίνη

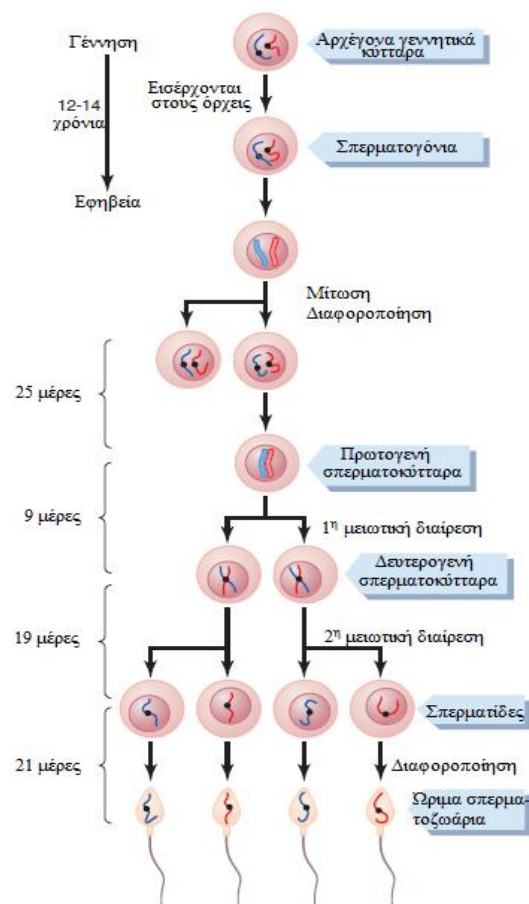
Το προστατικό υγρό προστατεύει τη ζωτικότητα των σπερματοζωαρίων μειώνοντας την οξύτητα της ουρήθρας (Hall, 2016). Ο προστάτης, επίσης, διευκολύνει και ενισχύει την κινητικότητα τους μέσω της έκκρισης λευκωματίνης στο σπερματικό υγρό (Walsh, et al., 1992). Ως ενδοκρινής αδένας, συμβάλλει στον άμεσο μεταβολισμό της τεστοστερόνης σε πιο ισχυρό ανδρογόνο, τη διυδροτεστοστερόνη (DHT), και έτσι επηρεάζει τις λειτουργίες τόσο του υποθαλάμου όσο και της υπόφυσης (Williams & Chisholm, 1976).

1.2. Σπερματογένεση

Η σπερματογένεση είναι μια πολύπλοκη βιολογική διαδικασία κυτταρικού μετασχηματισμού που παράγει αρσενικά απλοειδή γαμετικά κύτταρα από διπλοειδή αρχέγονα και προγονικά κύτταρα, τα σπερματογόνια (Cheng, 2008). Ξεκινάει στην εφηβεία μετά από μια μακρά περίοδο «προσπερματογένεσης» στο έμβρυο και το βρέφος (Holstein, et al., 2003). Κατά τον σχηματισμό του εμβρύου, τα αρχέγονα γαμετικά κύτταρα μεταναστεύουν στους όρχεις και γίνονται ανώριμα γαμετικά κύτταρα που ονομάζονται σπερματογόνια, τα οποία βρίσκονται στο βασικό τμήμα του επιθηλίου των σπερματικών σωληναρίων (Hall, 2016). Αυτή η διαδικασία έχει απλοποιηθεί μορφολογικά, με τη διάκριση τριών

σταδίων, τη σπερματογονιογένεση, την ωρίμανση των σπερματοκυττάρων και την σπερμιογένεση (Heffner & Schust, 2014), τα οποία συνοψίζονται στην Εικόνα 1.5.

Αρχικά, πραγματοποιείται η μίτωση των σπερματογόνιων και τα θυγατρικά που προκύπτουν επαναδιαίρονται μέχρις ότου να δημιουργηθεί ένας κλώνος από το κάθε πρότυπο σπερματογόνο (Widmaier, et al., 2016). Ακολουθούν διαφοροποιήσεις των κυττάρων αυτών και μετατροπή από σπερματογόνα τύπου A σε σπερματογόνα τύπου B (Mescher, 2013). Τα τελευταία υφίστανται μια τελική μιτωτική διαίρεση και παράγονται δύο κύτταρα, τα οποία αυξάνονται σε μέγεθος και μετατρέπονται σε πρωτογενή σπερματοκύτταρα (Kretser, et al., 1998). Τα κύτταρα αυτά είναι επίσης διπλοειδή με 46 χρωμοσώματα και υπόκεινται στην πρώτη μειωτική διαίρεση (Hall, 2016). Έτσι, σχηματίζονται δύο δευτερογενή σπερματοκύτταρα, τα οποία περιέχουν 23 χρωμοσώματα και από δύο χρωματίδες. Στη συνέχεια, μια δεύτερη μειωτική διαίρεση μετατρέπει τα δευτερο-



Εικόνα 1.5. Σύνοψη διαδικασίας σπερματογένεσης. Κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη, τα αρχέγονα γεννητικά κύτταρα μεταναστεύουν στον όρχι, όπου γίνονται σπερματογόνα. Στην εφηβεία, τα σπερματογόνα πολλαπλασιάζονται γρήγορα με μίτωση. Μερικά αρχίζουν τη μείωση για να γίνουν πρωτογενή σπερματοκύτταρα και συνεχίζουν μέσω της 1^{ης} μειωτικής διαίρεσης ώστε να γίνουν δευτερογενή σπερματοκύτταρα. Μετά την ολοκλήρωση της 2^{ης} μειωτικής διαίρεσης, τα δευτερογενή σπερματοκύτταρα παράγουν τις σπερματίδες, οι οποίες διαφοροποιούνται για να σχηματίσουν τα ώριμα σπερματοζωάρια (Hall, 2016).

γενή σπερματοκύτταρα σε σπερματίδες, κάθε μια από τις οποίες είναι απλοειδής και περιέχει 23 χρωμοσώματα (Widmaier, et al., 2016).

Το τελικό στάδιο είναι η σπερμιογένεση, κατά την οποία οι σπερματίδες διαφοροποιούνται σε σπερματοζωάρια. Η σπερμιογένεση είναι ευαίσθητη στη θερμοκρασία και υποβοηθείται από τα κύτταρα Sertoli. Περιλαμβάνει την πύκνωση και επιμήκυνση του πυρήνα, τον σχηματισμό του ακροσώματος και του μαστιγίου και την απώλεια της περίσσειας του κυτταροπλάσματος (Mescher, 2013). Η διαδικασία της σπερμιογένεσης μπορεί να χωριστεί σε τέσσερις φάσεις, τη φάση Golgi, τη φάση καλύπτρας, την ακροσωμική και την φάση ωρίμανσης (Nieschlag, et al., 2010).

Κατά τη διάρκεια της φάσης Golgi, τα ακροσωμικά κυστίδια ενώνονται ώστε να δημιουργήσουν, στο ένα άκρο του πυρήνα, την ακροσωμική καλύπτρα (Kretser, et al., 1998). Τα κεντριόλια απομακρύνονται από την ακροσωμική καλύπτρα και λειτουργούν ως βασικό σωματίο, σχηματίζοντας το αξόνημα της ουράς (Mescher, 2013). Στη φάση της καλύπτρας, η ακροσωμική καλύπτρα επιμηκύνεται για να καλύψει το πρόσθιο ήμισυ του συμπυκνωμένου πυρήνα (Cheng, 2008). Το ακρόσωμα απελευθερώνει υδρολυτικά ένζυμα, όπως η υαλουρονιδάση και η ακροσίνη, τα οποία διευκολύνουν την είσοδο των σπερματοζωαρίων στο ωάριο κατά τη γονιμοποίηση (Kretser, et al., 1998). Εν συνεχεία, στην ακροσωμική φάση ο πυρήνας επιμηκύνεται περαιτέρω και γίνεται πιο πυκνός, με τις ιστόνες των νουκλεοσωμάτων να αντικαθίστανται από τις πρωταμίνες (Nieschlag, et al., 2010). Σχηματίζεται, επιπλέον, το μέσο τμήμα από τη συσσώρευση της ουράς και των μιτοχονδρίων γύρω από την εγγύς περιοχή (Begley, et al., 1980). Εκεί πραγματοποιείται η παραγωγή ATP, για την κίνηση του μαστιγίου. Στη φάση της ωρίμανσης, το περιττό κυτταρόπλασμα αποβάλλεται ως υπολειμματικό σωματίο και απομακρύνονται οι ενδοκυττάρια γέφυρες (Mescher, 2013). Έτσι, προκύπτουν ώριμα αλλά μη λειτουργικά και ακίνητα σπερματοζωάρια (Gartner, 2017).

Η συνολική διαδικασία της σπερματογένεσης, από τα πρωτογενή σπερματοκύτταρα μέχρι τη δημιουργία των σπερματοζωαρίων, διαρκεί περίπου 64 μέρες (Costanzo, 2018). Οπότε προκύπτει το ώριμο σπερματοζωάριο, το οποίο απελευθερώνεται από την επιφάνεια του κυττάρου Sertoli μέσα στον αυλό του σπερματικού σωληνάριου (σπερμίωση) και φτάνουν παθητικά στην επιδιδυμίδα μέσω του Αλληρείου δικτύου (Widmaier, et al., 2016). Φυσιολογικά, ένας άνδρας παράγει περίπου 30 εκατομμύρια σπερματοζωάρια ημερησίως (Mescher, 2013). Τα αποτελέσματα της σπερματογένεσης είναι ο κυττα-

ρικός πολλαπλασιασμός και διατήρηση ενός αποθεματικού πληθυσμού γαμετικών κυττάρων, η μείωση του αριθμού των χρωμοσωμάτων και της γενετικής διαφοροποίησης, μέσω της μειωτικής διαίρεσης, και η παραγωγή σπερματοζωαρίων (Molina, 2013).

Ρύθμιση σπερματογένεσης

Η ρύθμιση της σπερματογένεσης περιλαμβάνει τόσο ενδοκρινικούς όσο και παρακρινικούς μηχανισμούς (Kretser, et al., 1998). Η ενδοκρινική διέγερση της σπερματογένεσης περιλαμβάνει τη FSH και τη LH, η οποία δρα μέσω της τεστοστερόνης, που παράγεται από τα κύτταρα Leydig στον όρχι (Hall, 2016). Δεδομένου ότι τα γαμετικά κύτταρα δεν διαθέτουν υποδοχείς για τη FSH και την τεστοστερόνη, τα ορμονικά σήματα μεταδίδονται μέσω των κυττάρων Sertoli και των περισωληνιακών κυττάρων, με την παραγωγή μη καθορισμένων σημάτων (Heffner & Schust, 2014). Έτσι τα κύτταρα Sertoli διεγείρονται και εκκρίνουν διάφορες σπερματογόνες ουσίες. Ταυτόχρονα, η διυδροτεστοστερόνη και η τεστοστερόνη, που διαχέεται στα σπερματικά σωληνάκια από τα κύτταρα Leydig, είναι απαραίτητες για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των γαμετικών κυττάρων (Nieschlag, et al., 2010).

Επίσης, ένα πλήθος αυξητικών παραγόντων (IGF1, TGFβ, NGF) και κυτταροκινών εμπλέκονται σε μηχανισμούς τοπικού ελέγχου που επηρεάζουν την μιτωτική διαίρεση των γαμετικών κυττάρων και την διαδικασία των δύο μειωτικών διαιρέσεων (Nieschlag, et al., 2010). Ενώ, η τελική μετατροπή των στρογγυλών κυττάρων στις σύνθετες δομές των σπερματοζωαρίων είναι καλά καθορισμένη σε δομικό επίπεδο, δεν έχουν διευκρινιστεί ακόμη τα συστήματα ελέγχου που ρυθμίζουν αυτή τη διαδικασία (Kretser, et al., 1998).

1.3. Σπερματοζωάριο

Τα ώριμα σπερματοζωάρια που προκύπτουν από την σπερματογένεση αποτελούν επιμήκη κύτταρα, μήκους περίπου 65 μm, και απαρτίζονται από την κεφαλή και την ουρά. Η κεφαλή περιέχει τον πυρήνα, ο οποίος έχει 23 ζεύγη χρωμοσωμάτων, και περιβάλλεται από λεπτή κυτταροπλασματική μεμβράνη. Εμφανίζει αποπλατυσμένο σχήμα, μήκος περίπου 5 μm και το 40-70% καταλαμβάνεται από το ακρόσωμα (Menkveld, et al., 2001). Το ακρόσωμα περιβάλλει την πρόσθια όψη του πυρήνα και έρχεται σε επαφή με την

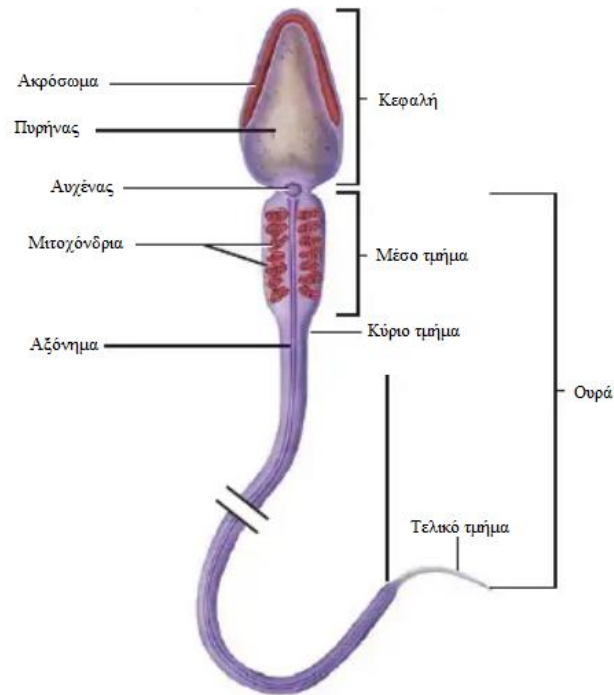
κυτταρική μεμβράνη. Περιέχει διάφορες πρωτεΐνες και τα υδρολυτικά ένζυμα νευραμινιδάση, όξινη φωσφατάση, ακροσίνη, αρυλική σουλφατάση και υαλουρονιδάση (Gartner, 2017). Επίσης, η ακροσωμική περιοχή περιέχει συνήθως μέχρι δύο μικρά κενοτόπια (World Health Organization, 2010).

Η ουρά του σπερματοζωαρίου διακρίνεται σε τέσσερα τμήμα, τον αυχένα, το μέσο τμήμα, το κύριο τμήμα και το τελικό τμήμα (Εικ. 1.6.) (Gartner, 2017). Ο αυχέννας, συνδέει την κεφαλή με το υπόλοιπο μέρος της ουράς και αποτελείται από τις εννέα στήλες του συνδετικού τμήματος που περιβάλλει τα δύο κεντριόλια (Gartner, 2017). Τα κεντριόλια συμμετέχουν στις μιτωτικές και μειωτικές διαιρέσεις κατά τη σπερματογένεση, στο σχηματισμό της ουράς και στη σύνδεση της κεφαλής με την ουρά. Επιπλέον, ελέγχουν τη κίνηση του σπερματοζωαρίου και οργανώνουν το κυτταροπλασματικό δίκτυο του ζυγωτού (Avidor-Reiss, 2018).

Το μέσο τμήμα της ουράς βρίσκεται μεταξύ του αυχένα και του κύριου τμήματος και καταλήγει στον δακτύλιο, μια δομή στην οποία προσφύεται η κυτταρική μεμβράνη. Περιλαμβάνει το μιτοχονδριακό έλυτρο, το οποίο περιβάλλει το αξόνημα και τις εξωτερικές πυκνές ίνες (Nieschlag, et al., 2010). Το κύριο τμήμα έχει μήκος 45 μm και εκτείνεται από τον δακτύλιο έως το τελικό τμήμα. Περιέχει το ινώδες έλυτρο, το οποίο περιβάλλει την συνέχεια του αξονήματος και επτά εξωτερικές πυκνές ίνες (Begley, et al., 1980). Το τελικό τμήμα συνίσταται από το κεντρικό αξόνημα, στο οποίο διακρίνονται 20 τυχαία διατεταγμένοι μικροσωληνίσκοι (Gartner, 2017).

Η κινητικότητα των σπερματοζωαρίων εξαρτάται κυρίως από την φυσιολογική ανάπτυξη των δομών του αξονήματος, το μιτοχονδριακό περίβλημα και τη λειτουργία των κεντριολίων στη σύνδεση της κεφαλής με την ουρά (Holstein, et al., 2003). Επίσης, περιλαμβάνει πολυάριθμες μεταβολικές οδούς και ρυθμιστικούς μηχανισμούς, όπως την οδό ασβεστίου (Ca^{2+}) και το μονοπάτι cAMP-εξαρτώμενης πρωτεϊνικής κινάσης (Pereira, et al., 2017). Με την παρατήρηση των σπερματοζωαρίων σε τρισδιάστατα (3D) μικροσκοπία, διαπιστώθηκε ότι κάθε σπερματοζωάριο κινείται περιστρέφοντας γύρω από τον δικό του αλλά και από έναν μεσαίο άξονα (Hermes, et al., 2020). Κατά τη διάρκεια αυτής της κίνησης, παράγει ένα ασύμμετρο κύμα που οδηγεί σε ένα μονόπλευρο παλμό και ένα παλμικό κύμα εκτός επιπέδου που προκαλεί την κίνηση της ουράς, η οποία εμφανίζεται ως ίσος χτύπος της ουράς σε όλες τις πλευρές σε τρισδιάστατη μικροσκοπία (Kumar & Singh, 2021). Αυτή η κυλιόμενη κίνηση της ουράς του σπερματοζωαρίου κρύβει τους

ασύμμετρους παλμούς στο δισδιάστατο μικροσκόπιο και δίνει την εντύπωση ότι η ουρά του σπέρματος κινείται συμμετρικά από τη μία πλευρά στην άλλη. Ωστόσο, με προηγμένη τρισδιάστατη μικροσκοπία, αποδείχθηκε ότι το σπερματοζωάριο χρησιμοποιεί την ασυμμετρία για να δημιουργήσει συμμετρία (Hermes, et al., 2020).



Εικόνα 1.6. Σχηματική απεικόνιση ώριμου σπερματοζωαρίου (Saladin, 2003).

Κεφάλαιο 2 : Ανδρική Υπογονιμότητα

2.1. Αίτια υπογονιμότητας

2.1.1. Προορχικά

Υπογοναδισμός

Ο υπογοναδισμός είναι μια πάθηση που μπορεί να επηρεάσει τη σπερματογένεση, λόγω ελαττωμένης παραγωγής τεστοστερόνης (Leaver, 2016). Η έλλειψη αυτή μπορεί να οφείλεται είτε στην ανεπάρκεια των όρχεων (πρωτοπαθής υπογοναδισμός), είτε σε υποφυσιακή ή υποθαλαμική βλάβη (δευτεροπαθής υπογοναδισμός) (Marshall & Bangert, 2008). Ο πρωτοπαθής υπογοναδισμός αναφέρεται και ως υπεργοναδοτροπικός εξαιτίας της αυξημένης έκκρισης γοναδοτροπίνης που προκαλεί η μειωμένη ανατροφοδότηση (Molina, 2013). Ενώ, ο δευτεροπαθής υπογοναδισμός συναντάται και ως υπογοναδοτροπικός λόγω της ελαττωμένης έκκρισης των γοναδοτροπινών, που προκύπτει από την διαταραχή του υποθαλάμου ή της υπόφυσης (Widmaier, et al., 2016). Τα αίτια του υπογοναδισμού συνοψίζονται στον Πίνακα 2.1.

Ο υπεργοναδοτροπικός υπογοναδισμός είναι αποτέλεσμα ελαττωματικής λειτουργίας των κυττάρων Leydig ή των σπερματικών σωληναρίων, που προκύπτουν από συγγενή ή επίκτητα αίτια (Marshall & Bangert, 2008). Ορισμένες από τους συγγενείς παράγοντες είναι η ορχική αγενεσία, η μη θεραπεύσιμη κρυφορχία, η διαταραχή της 5α-αναγωγάσης και άλλων ενζύμων και το σύνδρομο Klinefelter (Molina, 2013). Στα επίκτητα αίτια περιλαμβάνονται η αμφίπλευρη ιογενής ορχίτιδα, η αμφίπλευρη συστροφή των όρχεων, η χημειοθεραπεία, η λήψη κυτταροτοξικών φαρμάκων καθώς και η έκθεση σε ακτινοβολία (Sobel & Imperato-McGinley, 2004). Συνεπώς, η ανεπαρκής λειτουργία των κυττάρων Leydig επιφέρει διαταραχές της σπερματογένεσης και άλλων λειτουργιών που εξαρτώνται από την τεστοστερόνη (Harris, et al., 2011). Οι παθήσεις των σπερματικών σωληναρίων έχουν ως συνέπεια την μειωμένη παραγωγή σπερματοζωαρίων και επομένως μπορεί να οδηγήσουν στη στειρότητα, ενώ διατηρούνται τα δευτερεύοντα χαρακτηριστικά του φύλου (Marshall & Bangert, 2008).

Ο υπογοναδοτροπικός υπογοναδισμός (ΗΗ) οφείλεται στην απουσία ή την χαμηλή γοναδοτροπική διέγερση και απαντάται είτε ως συγγενής είτε ως επίκτητος (Fraietta, et al., 2013). Η συγγενής μορφή του διακρίνεται στο σύνδρομο Kallmann και

τον ιδιοπαθή υπογοναδοτροπικό υπογοναδισμό (IHH) (Jungwirth, et al., 2012). Ενώ, ο επίκτητος τύπος μπορεί να προκληθεί από διαταραχές τη υπόφυσης ή του υποθάλαμου, τραυματισμό της κεφαλής, υπερπρολακτιναιμία, λοιμώξεις, φάρμακα και συστηματικές ασθένειες, όπως η αιμοχρωμάτωση και η σαρκοείδωση (Darby & Anawalt, 2005).

Οι συγγενείς παθήσεις συνήθως συνδέονται με καθυστερημένη εφηβεία και συνεπώς αραιές ή σχεδόν απύσες τρίχες σώματος, γυναικομαστία και πολύ χαμηλό όγκο όρχεων (Krausz, 2011). Ωστόσο, σε ορισμένες περιπτώσεις η μειωμένη σπερματογένεση και η ήπια έλλειψη ανδρογόνων μπορεί να είναι τα μόνα συμπτώματα και έτσι διάγνωση μπορεί να καθυστερήσει μέχρι την ενηλικίωση (Huhtaniemi & Alevizaki, 2007). Οι επίκτητες μορφές συνήθως εκδηλώνονται στους ενήλικους με λίγα συμπτώματα, όπως η μείωση του όγκου της εκσπερμάτισης, η μειωμένη λίμπιντο και αδυναμία (Hall, 2016).

Πίνακας 2.1. Αίτια υπογοναδισμού	
Πρωτοπαθής υπογοναδισμός	Δευτεροπαθής υπογοναδισμός
Σύνδρομο Klinefelter 47 XXY	Σύνδρομο Kallman
Ανορχία, κρυφορχία, εκτοπία όρχεως	Υπερπρολακτιναιμία, αδένωμα υπόφυσης
Ακτινοβολία, τραύμα όρχεως	Ακτινοβολία, τραύμα, ισχαιμία
Ορχίτιδα	Αιμοχρωμάτωση
Όγκος όρχεως	Δευτεροπαθείς διαταραχές της GnRH
Φάρμακα, τοξίνες, ναρκωτικά, συστηματικές παθήσεις	Σύνδρομο Prader-Willi
Χημειοθεραπεία	Φάρμακα, ναρκωτικά

Σύνδρομο Kallmann και Ιδιοπαθής Υπογοναδοτροπικός υπογοναδισμός

Ο ιδιοπαθής υπογοναδοτροπικός υπογοναδισμός (IYY) και το σύνδρομο Kallmann είναι στενά σχετιζόμενες παθήσεις που αφορούν κυρίως τη διαταραγμένη υποθαλαμική έκκριση ή δράση της GnRH (Nieschlag, et al., 2010). Ο ιδιοπαθής υπογοναδοτροπικός υπογοναδισμός έχει ως κύρια κλινική εκδήλωση το υπογοναδισμό, που προκύπτει από την ελάττωση της GnRH (Seminara, et al., 1998). Οι ασθενείς με σύνδρομο Kallmann παρουσιάζουν ανοσμία και περιστασιακά κάποιες άλλες σωματικές ανωμαλίες (Quinton, et al.,

2001). Η αιτιογένεση είναι πιθανώς γενετική, με πολλά γονίδια να έχουν αναγνωριστεί ως υπεύθυνα, συμπεριλαμβανομένου του KAL1 (Hardelin & Dode, 2008).

Η ανεπάρκεια της υποθαλαμικής GnRH ή της λειτουργίας της, εξαιτίας της μετάλλαξης του υποδοχέα της, αποτελούν τη βασική ενδοκρινική ανωμαλία τόσο στο σύνδρομο IYY όσο και στο σύνδρομο Kallmann (Adamowicz, et al., 2014). Ο παθογενετικός μηχανισμός συνιστά τη παρεμβολή της μετανάστευσης των νευρώνων της GnRH στον υποθάλαμο, όπου ολοκληρώνεται η διαφοροποίησή τους και αρχίζει η έκκριση της ορμόνης (Wiser, et al., 2012). Εξίσου επιβλαβής είναι η μη ενεργοποίηση των ήδη εντοπισμένων νευρώνων της GnRH στον υποθάλαμο (Nieschlag, et al., 2010). Στην πρώτη περίπτωση, ο IYY μπορεί να συνοδεύεται από ανοσμία και άλλες γενετικές ανωμαλίες (σύνδρομο Kallmann). Ενώ, στη δεύτερη περίπτωση ο IYY αποτελεί τη μοναδική κλινική εκδήλωση.

Το κύριο κλινικό χαρακτηριστικό του συνδρόμου Kallmann και του ιδιοπαθούς υπογοναδοτρόπου υπογοναδισμού είναι η απύσα ή ατελής ηβική ανάπτυξη, με τη παρουσία σοβαρού υπογοναδισμού (Nishio, et al., 2012). Οι ασθενείς παρουσιάζουν συχνά μονόπλευρη ή αμφοτερόπλευρη κρυφορχία, χαμηλό όγκο όρχεων και υποπλαστικό όσχεο (Harris, et al., 2011). Άλλες ενδείξεις του υπογοναδισμού περιλαμβάνουν την υπανάπτυξη του προστάτη και του πέους, την απύσα ή αραιή ηβική, μασχαλιαία και σωματική τριχοφυΐα, την έλλειψη γενειάδας, τις ευνουχοειδείς αναλογίες σώματος και το γυναικείο μοτίβο κατανομής του λιπώδους ιστού (Nieschlag, et al., 2010). Ενώ, η γυναικομαστία είναι ένα σπάνιο εύρημα. Οι άνδρες με IHH και το σύνδρομο Kallmann που δεν έχουν λάβει θεραπεία είναι υπογόνιμοι λόγω της ασπερμίας ή της αζωοσπερμίας (Nachtigall, et al., 1997). Χωρίς την ενδοκρινική υποκατάσταση αυτοί οι ασθενείς έχουν μειωμένες ή καθόλου σεξουαλικές δραστηριότητες.

Υπερπρολακτιναιμία

Η προλακτίνη είναι ορμόνη που παράγεται στον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης, χωρίς να έχει κάποια γνωστή φυσιολογική λειτουργία στον ενήλικο άνδρα. Τα αίτια της αύξησης της είναι πολλαπλά και μπορεί ακόμη να προκληθεί λόγω σωματικού ή ψυχολογικού στρες (Nieschlag, et al., 2010).

Η πιο συχνή αιτία της υπερπρολακτιναιμίας είναι τα αδενώματα της υπόφυσης που εκκρίνουν προλακτίνη και διακρίνονται σε μικροπρολακτινώματα και μακροπρολα-

κτινώματα. Τα μακροπρολακτινώματα είναι μεγάλοι, ταχέως πολλαπλασιαζόμενοι όγκοι που μπορούν να οδηγήσουν στην καταστροφή των γύρω δομών, ιδιαίτερα των οπτικών νεύρων (Carter, et al., 1978). Επιπλέον, οι βλάβες του υποθαλάμου ή του υποφυσιακού μίσχου εμποδίζουν την έκκριση της ντοπαμίνης, που δρα κατασταλτικά στην έκκριση της προλακτίνης, προκαλώντας την αύξηση της (Melmed, 2008). Οι όγκοι της υπόφυσης που δεν εκκρίνουν προλακτίνη, όπως τα κраниοφαρυγγιώματα μπορούν επίσης να προκαλέσουν υπερπρολακτιναιμία (Sokol, 2009). Η αύξηση της προλακτίνης μπορεί να σχετίζεται με παθήσεις, όπως η νεφρική ανεπάρκεια, ο υποθυρεοειδισμός και η κίρρωση (Singh, et al., 2011). Ορισμένες συστηματικές ασθένειες όπως ο συστηματικός ερυθρεματώδης λύκος, η ρευματοειδής αρθρίτιδα, η κοιλιοκάκη και η συστηματική σκλήρυνση, συμβάλλουν επίσης στην εμφάνιση υπερπρολακτιναιμίας (Wiser, et al., 2012).

Η υπερπρολακτιναιμία ανευρίσκεται στο 11% των ολιγοζωοσπερμικών ανδρών και στο 16% των ανδρών με μειωμένη στυτική λειτουργία (De Rosa, et al., 2003). Μπορεί να επηρεάσει την παλμική απελευθέρωση της GnRH και συνεπώς την εμφάνιση δευτεροπαθούς υπογοναδισμού, τη μείωση των επιπέδων της τεστοστερόνης και τη καταστολή της σπερματογένεσης (Jarow, 2007). Επίσης, η μετατόπιση και καταστροφή των γοναδοτρόπων κυττάρων της υπόφυσης από τα μακροπρολακτινώματα επάγει καταστολή των επιπέδων LH και FSH και συνεπώς την διαταραχή της λειτουργίας των όρχεων (Nieschlag, et al., 2010). Έτσι, οι άνδρες με υπερπρολακτιναιμία χαρακτηρίζονται από υπογοναδισμό, υπογονιμότητα, διαταραχές της σεξουαλικής επιθυμίας και σπάνια γυναικομαστία και γαλακτόρροια (Buvat, 2003).

Παθήσεις θυρεοειδούς

Η νόσος του θυρεοειδούς επηρεάζει την αναπαραγωγική λειτουργία των ανδρών, μέσω των μεταβολών στα επίπεδα SHBG στην κυκλοφορία και της παροδικής βλάβης της σπερματογένεσης από τη θεραπεία του καρκίνου του θυρεοειδούς με ραδιενεργό ιώδιο (Pacini, et al., 1994). Οι ορμόνες του θυρεοειδούς διεγείρουν τη σύνθεση της ηπατικής SHBG οπότε, ο υπερθυρεοειδισμός αυξάνει τα επίπεδα SHBG στην κυκλοφορία και ο υποθυρεοειδισμός προκαλεί τη μείωση τους (Trokoudes, et al., 2006). Η αύξηση της SHBG μειώνει τον ρυθμό κάθαρσης της τεστοστερόνης, με αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων της ολικής τεστοστερόνης, της οιστραδιόλης και των γοναδοτροπινών (Ridgway, et

al., 1982). Ωστόσο, αυτές οι αλλαγές είναι αναστρέψιμες με την ομαλοποίηση των επιπέδων θυρεοειδικών ορμονών (Kumar, et al., 1990).

Ο υποθυρεοειδισμός σχετίζεται με την ελαττωμένη σεξουαλική επιθυμία, τη στυτική δυσλειτουργία και την καθυστερημένη εκσπερμάτιση (Carani, et al., 2005). Όμως, οι επιπτώσεις του υποθυρεοειδισμού στη σπερματογένεση και τη γονιμότητα του ανθρώπου δεν είναι γνωστές, καθώς υπάρχουν σπάνιες αναφορές (Krassas & Pontikides, 2004). Οι ασθενείς με υπερθυρεοειδισμό έχουν σημαντικά μειωμένες παραμέτρους του σπέρματος, συμπεριλαμβανομένης της χαμηλής συγκέντρωσης σπέρματος, του χαμηλού όγκου εκσπερμάτισης, της χαμηλής κινητικότητας και της ανώμαλης μορφολογίας των σπερματοζωαρίων (Βλ. Πίνακα 2.2) (Carani, et al., 2005).

Αυτά τα συμπτώματα υποχωρούν όταν ανακτηθεί ο υπερθυρεοειδισμός. Από την άλλη, η σπερματογένεση καταστέλλεται στη θυρεοτοξίκωση (O'Brien, et al., 1982) και στον μακροχρόνιο υποθυρεοειδισμό προεφηβικής έναρξης, αλλά επηρεάζεται ελάχιστα από τον μεταεφηβικό υποθυρεοειδισμό (Nieschlag, et al., 2010). Η κινητικότητα του σπέρματος είναι η κύρια παράμετρος γονιμότητας που επηρεάζεται από τον υπερθυρεοειδισμό και βελτιώνεται κατά τη θεραπεία (Krassas, et al., 2008).

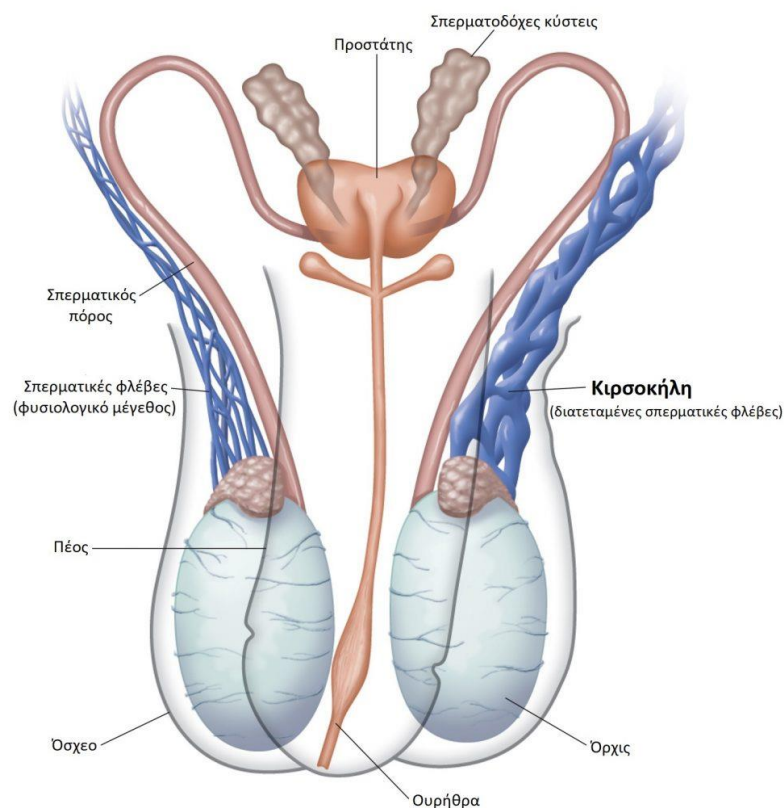
Πίνακας 2.2. Επιδράσεις υπο- και υπερθυρεοειδισμού στη λειτουργία του ανδρικού αναπαραγωγικού συστήματος		
	Υποθυρεοειδισμός	Υπερθυρεοειδισμός
Προεφηβικός όγκος και λειτουργία όρχεως	↑ Πρώιμη έναρξη σπερματογένεσης	↓
Αριθμός σπερματοζωαρίων	κ.φ. ή ↓	↓
Αριθμός γεννητικών κυττάρων όρχεως	↓	↓
Κινητικότητα σπερματοζωαρίων	↓	↓
Σεξουαλική λειτουργία	Διαταραγμένη	Διαταραγμένη, πρώιμη εκσπερμάτιση
Στυτική λειτουργία	↓	↓
Ελεύθερη τεστοστερόνη	↓	↓
LH και FSH	↓	↑ και SHBG
E2	↓	↑

2.1.2. Ορχικά

Κιρσοκήλη

Η κιρσοκήλη ορίζεται ως ελικοειδής διάταση των φλεβών του όρχεως (Βλ. Εικόνα 2.1) και εμφανίζεται στο 15% του φυσιολογικού ανδρικού πληθυσμού και στο περίπου 35-44% των ανδρών που παρουσιάζουν υπογονιμότητα (Gorelick & Goldstein, 1993; Nagler, et al., 1997). Οι πιο δημοφιλείς θεωρίες για την εμφάνιση κιρσοκήλης αφορούν τις ανατομικές διαφορές στη φλεβική παροχέτευση μεταξύ της αριστερής και της δεξιάς εσωτερικής σπερματικής φλέβας και την ανεπάρκεια ή την έλλειψη των φλεβικών βαλβίδων, που οδηγούν σε παλινδρόμηση του φλεβικού αίματος και αυξημένη υδροστατική πίεση (Jensen, et al., 2017). Στην πρώτη περίπτωση, η έσω αριστερή σπερματική φλέβα εκβάλλεται κάθετα στην αριστερή νεφρική φλέβα, δικαιολογώντας την συχνότερη εμφάνιση της κιρσοκήλης στην αριστερή πλευρά (Braedel, et al., 1994). Επίσης, η περίπτωση συμπίεσης της έσω σπερματικής φλέβας από κάποιο νεόπλασμα, τότε αποτελεί δευτεροπαθή κιρσοκήλη (Nieschlag, et al., 2010).

Η κιρσοκήλη μπορεί να επηρεάσει πολλαπλές παραμέτρους του σπέρματος, συμπεριλαμβανομένου του συνολικού αριθμού, της κινητικότητας και της μορφολογίας



Εικόνα 2.1. Σχηματική απεικόνιση κιρσοκήλης στον αριστερό όρχη.

των σπερματοζωαρίων (Paduch & Niedzielski, 1996). Στο σπερμοδιάγραμμα των υπογόνιμων ανδρών, εμφανίζεται ολιγοζωοσπερμία, ασθενοζωοσπερμία ή τερατοζωοσπερμία ή συνδυασμός αυτών, χωρίς να υπάρχει απαραίτητα αιτιώδης σύνδεση μεταξύ αυτών των καταστάσεων και της κισσοκήλης (Nieschlag, et al., 2010). Η κισσοκήλη μπορεί επίσης να βρεθεί σε αζωοσπερμικούς ασθενείς. Ωστόσο, οι μειωμένες παράμετροι του σπέρματος και η υπογονιμότητα δεν εκδηλώνονται σε όλους τους άνδρες με κισσοκήλη (Pasqualotto, et al., 2011). Επιπλέον, οι άνδρες με κισσοκήλη εμφανίζουν αυξημένα αντιδραστικά είδη οξυγόνου και μειωμένη αντιοξειδωτική ικανότητα, η οποία μπορεί να επηρεάσει το DNA και την ωρίμανση του σπερματοζωαρίου (Esteves & Agarwal, 2016)

Υπάρχουν πολλές θεωρίες σχετικά με την παθοφυσιολογία τη κισσοκήλης, συμπεριλαμβανομένης της επίδρασης της θερμοκρασίας, των νεφρικών μεταβολιτών και των ορμονικών ανωμαλιών (Eisenberg & Lipshultz, 2011). Η φλεβική παλινδρόμηση και η αύξηση της θερμοκρασίας των όρχεων φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στην επαγόμενη από κισσοκήλη δυσλειτουργία των όρχεων, αν και οι ακριβείς παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί που εμπλέκονται δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητοί (Wiser, et al., 2012). Η εμφάνιση της κισσοκήλης ενδεχομένως επηρεάζεται ακόμη και από τον τρόπο ζωής των ασθενών και απο γενετικούς παράγοντες (Raman, et al., 2005).

Κρυψορχία

Η κρυψορχία ή ο μη κατελθών όρχις, είναι μια παθολογική κατάσταση, όπου ο ένας ή οι δύο όρχις δεν έχουν κατέλθει στο όσχεο και παραμένουν στην κοιλιακή κοιλότητα (Virtanen, et al., 2007). Είναι μια από τις πιο συχνές συγγενείς παθήσεις στον παιδιατρικό πληθυσμό, με συχνότητα εμφάνισης σχεδόν 1% στο τέλος της βρεφικής ηλικίας (Jungwirth, et al., 2016). Η αιτιογένεση είναι πολυπαραγοντική και μπορεί να εμπλέκονται τόσο η διαταραγμένη ενδοκρινική ρύθμιση όσο και οι γονιδιακές ανωμαλίες (Hutson, et al., 2010). Το αποτέλεσμα της κρυψορχίας είναι η βλάβη της ωρίμανσης των γεννητικών κυττάρων και η επακόλουθη υπογονιμότητα στην ενήλικη ζωή (Virtanen, et al., 2007). Αποτελεί, επίσης τον πιο κοινό αιτιολογικό παράγοντα αζωοσπερμίας στους ενήλικες, με τη συχνότητα εμφάνισης 13% στη μονόπλευρη κρυψορχία και 89% στην αμφοτερόπλευρη κρυψορχία, που δεν έχει θεραπευθεί (Hadziselimovic & Herzog, 2001)

Η εκδήλωση υπογονιμότητας σε ασθενείς με κρυψορχία μπορεί να οφείλεται στην μειωμένη σπερματογένεση εξαιτίας της ανατομικής θέσης του όρχεως έξω από το

όσχεο. Οι όρχεις αυτοί, αποτελούνται απο μικρότερα σπερματικά σωληνάκια, μειωμένο αριθμό σπερματογόνιων και πυκνότερες βασικές μεμβράνες μέχρι την ηλικία του 1,5 έτους (Cooper, 1929). Εάν αφεθούν σε αυτή τη θέση, το 69,2% των όρχεων εμφανίζουν απλασία του σπερματικού επιθηλίου κατά την ιστολογική εξέταση (Rogers, et al., 1998). Οι άνδρες με κρυφορχία έχουν ελαττωμένη απόκριση στη διέγερση της GnRH και χαμηλότερα επίπεδα LH και τεστοστερόνης (Brugh & Lipshultz, 2004). Όσοι υποβάλλονται σε ορχεοπηξία πριν από την εφηβεία, το 62% με μονόπλευρη και το 30% αμφοτερόπλευρη κρυφορχία, έχουν βελτιωμένες παραμέτρους σπέρματος (Lipshultz, 1976).

Ορχίτιδα

Ο όρος ορχίτιδα περιγράφει μια φλεγμονώδη βλάβη του όρχεως, η οποία σχετίζεται με ένα λευκοκυτταρικό εξίδρωμα μέσα και έξω από τα σπερματικά σωληνάκια, με αποτέ

Πίνακας 2.3. Ταξινόμηση ορχίτιδας	
Μορφές	Αιτιολογία
Μη ειδική επιδιδυμοορχίτιδα	<i>Escherichia coli</i> <i>Enterobacteriaceae</i> <i>Chlamydia trachomatis</i> <i>Neisseria gonorrhoeae</i> <i>Ureaplasma urealyticum</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Proteus mirabilis</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Staphylococci spp.</i> <i>Streptococci spp.</i>
Μη ειδική βακτηριακή ορχίτιδα σε παιδιά	<i>Pneumococci</i> <i>Salmonella spp.</i> <i>Klebsiella spp.</i> <i>Haemophilus influenzae</i>
Μη ειδική οκκιωματώδης ορχίτιδα ενηλίκων	Ιδιοπαθής (Αυτοάνοση)
Ειδική κοκκιωματώδης ορχίτιδα	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> <i>Treponema pallidum</i> <i>Brucella spp.</i>
Ιογενής ορχίτιδα	Παρωτίτιδα Εμβόλια παρωτίτιδας Ιός Κοξάκι Μονοπυρήνωση Ανεμοβλογιά (VZV) Ηχοϊός Λεμφοκυτταρική Χοριομηνιγγίτιδα

λεσμα τη σωληναριακή βλάβη (Weidner, et al., 2004). Η πάθηση μπορεί να προκαλέσει καταστολή της σπερματογένεσης, ατροφία των όρχεων και συνεπώς χαμηλή συγκέντρω-

ση και ποιότητα σπέρματος (Diemer & Desjardins, 1999). Η οξεία λοιμώδης ορχίτιδα χαρακτηρίζεται από απότομη έναρξη έντονου πόνου με ορατό οίδημα του προσβεβλημένου όρχεως καθώς και των βουβωνικών λεμφαδένων και μπορεί να συνοδεύεται από αιματοουρία και αίμα στην εκσπερμάτιση (Henkel, 2012). Επίσης, η ορχίτιδα μπορεί να οδηγήσει σε ενδοορχική απόφραξη, μια κατάσταση που συμβαίνει στο 15% των περιπτώσεων της αποφρακτικής αζωοσπερμίας (Weidner & Anderson, 2008). Αντιθέτως, οι υποξείες και χρόνιες φλεγμονώδεις καταστάσεις παραμένουν συχνά ασυμπτωματικές (Schurpe, et al., 2008).

Η αιτιολογία της πρωτοπαθούς και δευτεροπαθούς ορχίτιδας μπορεί να ταξινομηθεί σε μη ειδική, ειδική και ιογενή ορχίτιδα (Πίνακας 2.3). Η ιογενής ορχίτιδα, ο πιο κοινός τύπος πρωτοπαθούς αιματογενούς ορχίτιδας, προκαλείται συνήθως από τον ιό της παρωτίτιδας. και εμφανίζεται στο 20-30% των ανδρών μετά την εφηβεία (Lambert, 1951). Η δευτεροπαθής ορχίτιδα είναι συνήθως βακτηριακής προέλευσης και συναντάται σε συνδυασμό με την επιδιδυμοορχίτιδα (Schurpe, et al., 2008). Σε αυτή τη περίπτωση προκαλείται ολιγοζωοσπερμία, ασθενοζωοσπερμία, τερατοζωοσπερμία ή αζωοσπερμία στο 8-27% των ασθενών (Osegbe, 1991).

Τα πιο κοινά παθογόνα σε άνδρες ηλικίας ≤ 35 ετών είναι οι σεξουαλικά μεταδιδόμενες λοιμώξεις από *Chlamydia trachomatis* ή *Neisseria gonorrhoeae* (Schurpe, et al., 2008). Ενώ, σε αγόρια κάτω των 14 ετών και σε άνδρες άνω των 35 ετών, η μόλυνση προκαλείται γενικά από κοινά παθογόνα του ουροποιητικού, όπως το *Escherichia coli* και άλλα κολοβακτηρίδια, και συχνά σχετίζεται με δυσπλασίες του ουρογεννητικού συστήματος και απόφραξη της εξόδου της ουροδόχου κύστης (Kedia, 2014).

Καρκίνος των όρχεων

Ο καρκίνος των όρχεων είναι η πιο κοινή κακοήθεια σε άνδρες 15-35 ετών (Masterson & Beck, 2011), αντιπροσωπεύοντας ωστόσο, μόνο το 1-2% όλων των νεοπλασμάτων στους άνδρες (Huyshe, et al., 2003). Το 95 % αυτών αφορούν όγκους των γεννητικών κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των σεμινωμάτων και των μη σεμινωματοδών όγκων. Ενώ, οι όγκοι των κυττάρων Leydig και Sertoli, ευθύνονται για <5% των καρκίνων του όρχεως (Stephenson & Gilligan, 2011). Οι ασθενείς που παρουσιάζουν πρωτοπαθή όγκο των όρχεων έχουν συχνά μειωμένη ποιότητα σπέρματος και μειωμένη γονιμότητα (Edey & Sidhu, 2008). Επιπλέον, στο 5% έως 8% των ανδρών με όγκους γεννητικών κυττάρων των

όρχεων προϋπάρχει η αζωοσπερμία πριν από οποιαδήποτε θεραπεία του καρκίνου (Petersen, et al., 1999). Οι παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση καρκίνου των όρχεων είναι η κρυφορχία, το ατομικό ή οικογενειακό ιστορικό καρκίνου όρχεος και η ενδοσωληνιακή νεοπλασία γεννητικών κυττάρων (Ostrowski & Walsh, 2015).

Τα αίτια της ελαττωμένης ποιότητας του σπέρματος σε ασθενείς με καρκίνο δεν είναι επαρκώς κατανοητά και πιθανώς εμπλέκονται πολλοί παράγοντες (Williams, et al., 2009). Μερικοί από αυτούς τους παράγοντες αποτελούν τα προϋπάρχοντα ελαττώματα στα γεννητικά κύτταρα, τοπικές επιδράσεις του όγκου, ενδοκρινικές διαταραχές και αυτοάνοσες και συστηματικές επιδράσεις του καρκίνου (Agarwal & Allamaneni, 2005). Οποιαδήποτε διαδικασία που εκθέτει το σπέρμα στο ανοσοποιητικό σύστημα μπορεί να οδηγήσει στο σχηματισμό αντισπερματικών αντισωμάτων (Carter, 1993). Ωστόσο, η αρνητική επίδραση των αντισωμάτων μπορεί να μην αντανακλάται από τη μείωση του αριθμού ή της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων (Foster, et al., 1999). Επίσης, ο αριθμός των σπερματοζωαρίων επηρεάζεται περαιτέρω από την ορχεκτομή και τα αποτελέσματα της ακτινοβολίας και της χημειοθεραπείας (Hendry, et al., 1983).

Εξωγενείς παράγοντες

Η ανδρική γονιμότητα επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων των περιβαλλοντικών και επαγγελματικών αιτιών μαζί με πρακτικές τρόπου ζωής, που συμβάλλουν στην υποβάθμιση της ποιότητας του σπέρματος (Sharma, et al., 2013). Ο δυτικός τρόπος ζωής (καθιστική εργασία, παχυσαρκία) είναι επίσης δυνητικά επιβλαβής για την παραγωγή σπέρματος (Skakkebaek, et al., 2001) όπως και άλλοι παράγοντες (στρες, ύπνος, διατροφή) (Gollenberg, et al., 2010). Σύμφωνα με σύγχρονες μελέτες, οι δυσμενείς συμπεριφορές για την υγεία όπως, η υπερβολική πρόσληψη αλκοόλ (Anderson, et al., 1983), το κάπνισμα (Evans, et al., 1981) και η κατάχρηση ναρκωτικών (Close, et al., 1990) σχετίζονται με μειωμένη γονιμότητα στους άνδρες.

Το κάπνισμα συνεπάγεται με τη ελαττωμένη κινητικότητα και την ανώμαλη μορφολογία των σπερματοζωαρίων καθώς και τη χαμηλότερη συγκέντρωση σπέρματος και δείκτη γονιμότητας (FI) σε βαρείς καπνιστές σε σύγκριση με ήπιους ή μη καπνιστές (Mitra, et al., 2012). Οι μηχανισμοί πρόκλησης της ανδρικής υπογονιμότητας από το κάπνισμα αποτελούν την αύξηση των δραστικών ειδών οξυγόνου (ROS), που οδηγεί σε οξειδωτικό στρες και μειωμένη ποιότητα σπέρματος (Harlev, et al., 2015). Έτσι, η γενική

επίδραση του καπνίσματος μπορεί να προκύψει από τους συνδυασμένους ρόλους του αυξημένου οξειδωτικού στρες (Saleh, et al., 2002), της βλάβης του DNA και της κυτταρικής απόπτωσης, που θα μπορούσαν να εξηγήσουν την ελαττωμένη ποιότητας και ωρίμανση του σπέρματος, αλλά και την εξασθενημένη σπερματογένεση (Βλ. Εικόνα 2.2.) (Vine, et al., 1996).

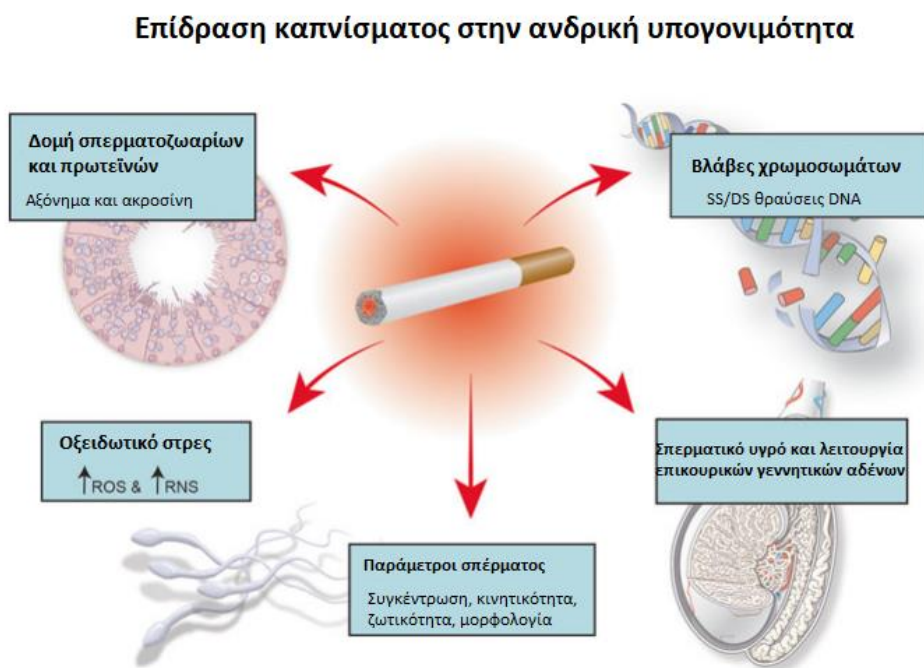
Η επίδραση του αλκοόλ στο ανδρικό αναπαραγωγικό σύστημα αφορά όλα τα επίπεδα του άξονα υποθάλαμος-υπόφυση-γονάδες (HPG) (Dugairajanayagam, 2018). Το αλκοόλ παρεμβαίνει στην παραγωγή GnRH, FSH, LH και τεστοστερόνης και βλάπτει τις λειτουργίες των κυττάρων Leydig και Sertoli. Ως εκ τούτου, μπορεί να επηρεαστεί η παραγωγή, η μορφολογική ανάπτυξη και η ωρίμανση των σπερματοζωαρίων (Emanuele & Emanuele, 1998). Η σπερματογένεση μειώνεται σταδιακά όσο αυξάνονται τα επίπεδα πρόσληψης αλκοόλ (Pajarinen & Karhunen, 1994). Στους καταναλωτές αλκοόλ παρατηρείται συχνά μερική ή πλήρης αναστολή της σπερματογένεσης και ενδοσωληνιακή νεοπλασία των γεννητικών κυττάρων (Pajarinen & Karhunen, 1994).

Η χρήση ναρκωτικών, όπως η κάνναβη, τα ανδρογόνα και τα οπιοειδή, συσχετίζεται με τις μειωμένες παραμέτρους σπέρματος (Bracken, et al., 1990), τον υψηλό κατακερματισμό του DNA των σπερματοζωαρίων και τη μειωμένη γονιμότητα (Safarinejad, et al., 2013). Επίσης, τα ανδρογόνα μπορεί να προκαλέσουν υπογοναδοτροπικό υπογοναδισμό λόγω της αρνητικής ανάδρασης στον άξονα HPT (Dohle, et al., 2003).

Η παχυσαρκία αναστέλλει την ενδοκρινική λειτουργία των όρχεων και έχει επίσης αρνητικές επιπτώσεις στη σπερματογένεση και τη γονιμότητα (Machen & Sandlow, 2012). Στα παχύσαρκα αγόρια παρουσιάζεται καθυστερημένη εφηβική ανάπτυξη, με μειωμένα επίπεδα τεστοστερόνης, αλλά φυσιολογική ανάπτυξη των όρχεων (Denzer, et al., 2007). Οι μειώσεις στα επίπεδα τεστοστερόνης και SHBG στο αίμα είναι ανάλογες με τον βαθμό του υπέρβαρου, ενώ τα επίπεδα οιστραδιόλης στο αίμα είναι αυξημένα, πιθανώς λόγω της αυξημένης εξαρτώμενης από την αρωματάση περιφερειακής μετατροπής της τεστοστερόνης σε οιστραδιόλη (Nieschlag, et al., 2010). Ο κύριος παθογενετικός μηχανισμός της μείωσης των επιπέδων τεστοστερόνης στο αίμα μπορεί να περιλαμβάνει τον λειτουργικό υποσωματοτροπισμό ή/και την αντίσταση στην ινσουλίνη, που προκαλεί η ελάττωση της ηπατικής έκκρισης της SHBG (Karishma, et al., 2014).

Το θερμικό στρες των γεννητικών οργάνων που προκύπτει από την υπερθερμία του οσχέου είναι ένας σημαντικός παράγοντας κινδύνου για την ανδρική υπογονιμότητα.

Η έκθεση σε ακτινοβολούμενη θερμότητα, οι παρατεταμένες ώρες καθίσματος, η κρισοκήλη και η κρυφορχία μπορούν να οδηγήσουν σε θερμικό στρες των όρχεων (Durairajanayagam, et al., 2014). Οι αυξημένες θερμοκρασίες του οσχέου προκαλούν την αναστολή της σπερματογένεσης, την απόπτωση των γεννητικών κυττάρων, το οξειδωτικό στρες και τη βλάβη του DNA των σπερματοζωαρίων (Durairajanayagam, et al., 2015). Επιπροσθέτως, η επαγγελματική έκθεση σε θερμότητα, όπως στη περίπτωση των συγκολλητών, έχει αποδειχθεί ότι μειώνει την ποιότητα του σπέρματος (Durairajanayagam, et al., 2014). Η καθιστική στάση, τα θερμαινόμενα καθίσματα αυτοκινήτου και η χρήση ατμόλουτρου και υδρομασάζ, αυξάνουν επίσης τη θερμοκρασία του οσχέου και μπορεί να συμβάλλουν σε μείωση της γονιμότητας (Jung & Schuppe, 2007).



Εικόνα 2.2. Σύνοψη επιδράσεων καπνίσματος στην ανδρική υπογονιμότητα. Τα συστατικά του καπνού οδηγούν σε μονόκλωνες και δίκλωνες θραύσεις του DNA, μειωμένη ποιότητα σπερματικού υγρού, ελαττωμένη δράση των επικουρικών αδένων, διαταραγμένες παραμέτρους του σπέρματος, αύξηση των δραστικών ειδών οξυγόνου και ανώμαλη μορφολογία του αξονήματος (Haq, et al., 2014).

Οι πολυάριθμες εξωτερικές αιτίες της υπογονιμότητας περιλαμβάνουν την έκθεση σε ουσίες που σχετίζονται με την εργασία, σε εξαιρετικά θερμές περιοχές και την επαφή με τοξικές ουσίες όπως, τα φυτοφάρμακα (Mínguez-Alarcón, et al., 2014). Επιπλέον, ουσίες όπως τα μέταλλα, οι πτητικές οργανικές ενώσεις, ενώσεις ενδοκρινικού διαταράκτη, όπως ορισμένα πολυχλωριωμένα διφαινύλια (PCBs) ή οι φθαλικοί εστέρες

(PEs) (Duty, et al., 2003), αρκετά βαρέα μέταλλα όπως ο μόλυβδος και το κάδμιο και αρκετοί ατμοσφαιρικοί ρύποι, αλλοιώνουν την αναπαραγωγική λειτουργία (Mendiola, et al., 2009). Οι αλλοιώσεις αφορούν την ενδοκρινική διαταραχή των γονάδων, την ελαττωμένη ποιότητα σπέρματος, τη βλάβη του DNA των σπερματοζωαρίων και αριθμητικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες (Skakkebaek, et al., 2016).

2.1.3 Μετα-ορχικά

Αυτή η αιτιολογική κατηγορία περιλαμβάνει όλες τις αποφρακτικές βλάβες του σπερματικού σωληναρίου, τις λοιμώξεις και φλεγμονώδεις παθήσεις των επικουρικών αδένων, την αυτοάνοση υπογονιμότητα και τις σεξουαλικές διαταραχές (Krausz, 2011). Στη περίπτωση της αμφοτερόπλευρης απόφραξης, προκύπτει αζωοσπερμία, ενώ στις άλλες μεταορχικές καταστάσεις μπορεί να παρατηρηθεί διαφορετικός βαθμός βλάβης των τριών κύριων παραμέτρων του σπέρματος (αριθμός σπερματοζωαρίων, κινητικότητα και μορφολογία) (Machen & Sandlow, 2012). Οι ασθένειες που επηρεάζουν τους επικουρικούς αδένες συνδέονται συνήθως με χαμηλό όγκο εκσπερμάτισης, δεδομένου ότι το 90% της εκσπερμάτισης προέρχεται από τις σπερματοδόχες κύστεις και τον προστάτη (Nieschlag, et al., 2010). Ο χαμηλός όγκος του σπέρματος, με υψηλό pH και ιξώδες είναι χαρακτηριστικό της προστατίτιδας ή της απόφραξης του εκσπερματικού πόρου λόγω ύπαρξης προστατικής κύστης (Lipshultz, et al., 2009). Ενώ, η παρουσία λευκοκυττάρων άνω του 1 εκατομμυρίου/ml είναι χαρακτηριστική για τη φλεγμονή των επικουρικών αδένων. Τα πιο κοινά παθογόνα που προκαλούν λοιμώξεις του ουρογεννητικού συστήματος είναι τα *Ureaplasma urealyticum*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia Coli* και συνήθως σχετίζονται με τυπικά συμπτώματα ερεθισμού του ουροποιητικού συστήματος και προστατοδυνία (Weidner & Anderson, 2008). Η παρουσία μικροοργανισμών ή και λευκοκυττάρων στο σπερματικό υγρό μπορεί να επηρεάσει την κινητικότητα και τη γονιμοποιητική ικανότητα των σπερματοζωαρίων λόγω της παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου από τα ενεργοποιημένα λευκοκύτταρα (Krausz, et al., 1994). Επιπλέον, η αυτοάνοση αντίδραση έναντι των σπερματοζωαρίων ως μεμονωμένη ανωμαλία παρατηρείται στο <5% των υπογόνιμων ανδρών (Walsh & Turek, 2009). Τα αντισπερματικά αντισώματα μπορεί να προέρχονται από προηγούμενες λοιμώξεις ή φλεγμονή του όρχεως ή της επιδιδυμίδας και είναι ικανά να διαταράξουν τον αιματοορχικό φραγμό (Turek & Lipshultz, 1994).

Συγγενείς αποφράξεις αποχετευτικών οδών

Οι συγγενείς αποφράξεις των αποχετευτικών οδών αφορούν αποφράξεις του σπερματικού πόρου, της επιδιδυμίδας, του εκσπερματικού πόρου και της σπερματοδόχου κύστης, καταστάσεις που οδηγούν στην υπογονιμότητα. Η συγγενής αμφοτερόπλευρη απόφραξη του σπερματικού πόρου (CBAVD) μπορεί να επηρεάσει ένα ή και τους δύο σπερματικούς πόρους και συνήθως σχετίζεται με αγενεσία των σπερματοδόχων κύστεων και δυσπλασίες της επιδιδυμίδας (Krausz, 2011). Η CBAVD είναι η πιο συχνά απαντώμενη απόφραξη του εξωόρχιου πόρου, επηρεάζοντας το 1% έως 2% των υπογόνιμων ανδρών (Quinzii & Castellani, 2000). Τα χαρακτηριστικά των ανδρών με CBAVD περιλαμβάνουν την απουσία του σπερματικού πόρου, μη λειτουργικές σπερματοδόχες κύστεις και εκσπερματικούς πόρους και επιδιδυμικά υπολείμματα (Daudin, et al., 2000). Επίσης, ως πρωτοπαθής διαταραχή, χαρακτηρίζεται από αζωοσπερμία, χαμηλό όγκο σπέρματος και επακόλουθη υπογονιμότητα (Harnisch & Oates, 2012).

Η συγγενής μονόπλευρη απόφραξη του σπερματικού πόρου (CUAVD) μπορεί να συνυπάρξει με την φυσική γονιμότητα. Έτσι, παραμένει στις περισσότερες περιπτώσεις αδιάγνωστη (Dimitriadis, et al., 2017). Η CUAVD σχετίζεται επίσης με μεταλλάξεις του *CFTR* (Mickle, et al., 1995) και αποδίδεται στην ελαττωματική ανάπτυξη των αγωγών Wolffian (Shapiro, et al., 2003). Η νεφρική αγενεσία είναι επίσης ένα κοινό κλινικό χαρακτηριστικό (Avellino & Oates, 2018). Η αμφοτερόπλευρη ή μονόπλευρη απόφραξη του πόρου μπορεί να προκαλέσει αποφρακτική αζωοσπερμία και χαμηλό όγκο σπέρματος (von Eckardstein, et al., 2000). Ένα μεγάλο ποσοστό ανδρών με CUAVD παρουσιάζει ανωμαλίες στους ετερόπλευρους εκσπερματικούς πόρους ή και στις σπερματοδόχες κύστεις (Raviv, et al., 2006).

Το σύνδρομο Young είναι μια σπάνια διαταραχή που εμφανίζεται κλινικά ως αποφρακτική αζωοσπερμία και χρόνιες πνευμονικές λοιμώξεις (Handelsman, et al., 1984). Στο σύνδρομο Young δεν υπάρχουν δομικές ανωμαλίες των σπερματικών πόρων και της επιδιδυμίδας αλλά η απόφραξη είναι το αποτέλεσμα της παρουσίας μιας άμορφης μάζας εντός του επιδιδυμικού αυλού (Handelsman, et al., 1984). Παρατηρείται φυσιολογική σπερματογένεση και η αποφρακτική αζωοσπερμία οφείλεται σε συμπυκνωμένες εκκρίσεις στον σπερματικό πόρο (Dimitriadis, et al., 2017).

Η επιδιδυμική απόφραξη είναι η πιο συχνή αιτία της αποφρακτικής αζωοσπερμίας και επηρεάζει το 30-67% των ανδρών που εμφανίζουν αζωοσπερμία (Dohle, et al.,

2005). Επιπλέον, η ιδιοπαθής επιδιδυμική απόφραξη είναι μια σχετικά ασυνήθιστη παθολογία που εντοπίζεται σε άνδρες χωρίς άλλα εμφανή προβλήματα υγείας. Ενώ, πρόσφατες μελέτες συνδέουν αυτή την πάθηση με την κυστική ίνωση (Dimitriadis, et al., 2017). Τα αίτια μπορεί να είναι ιατρογενή, ιδιοπαθή ή να σχετίζονται με λοιμώξεις, τραύματα και τη βαζεκτομή (Chan, et al., 2008).

Τέλος, η απόφραξη του εκσπερματικού πόρου είναι μια κοινή αιτιολογία της ανδρικής υπογονιμότητας, που εμφανίζεται στο 1%-5% των υπογόνιμων ανδρών (Smith, et al., 2008). Η παθογένεση αφορά τη κυστική ίνωση, τις κύστες προερχόμενες από τα Wolffian ή Mullerian, τη φυματίωση και λοιμώξεις του γαστρεντερικού σωλήνα και του ουροποιητικού συστήματος (Paick, et al., 2000). Τα κλινικά χαρακτηριστικά είναι η αζωοσπερμία, ο χαμηλός όγκος σπέρματος, με φυσιολογικά δευτερεύοντα χαρακτηριστικά του φύλου και ορμονικά επίπεδα (Nieschlag, et al., 2010). Ωστόσο, παρατηρείται υποφυσιολογικό pH και μειωμένη περιεκτικότητα φρουκτόζης κατά την εκσπερμάτιση (Hopps, et al., 2002). Επιπλέον, στη μακροχρόνια απόφραξη, οι σπερματοδόχες κύστες μπορεί να χάσουν τη συσταλτικότητα, χωρίς να επέρχεται βελτίωση ο πιθανή επίλυση της ανατομικής απόφραξης (Machen & Sandlow, 2012).

Επίκτητες αποφράξεις αποχετευτικών οδών

Οι επίκτητες αποφράξεις των εκφορητικών οδών είναι συνήθως αποτέλεσμα φλεγμονών ή εκτομής λόγω τραυματισμού. Οι αποφράξεις των σπερματικών σωληναρίων αφορούν την επιδιδυμίδα, τον σπερματικό και εκσπερματικό πόρο (Wilschanski, et al., 1996). Η απόφραξη μπορεί να είναι αποτέλεσμα οξείας ή χρόνιας επιδιδυμίτιδας και φλεγμονών των σπερματοδόχων κύστεων και του προστάτη (Nieschlag, et al., 2010).

Η επιδιδυμίτιδα μπορεί να προκαλέσει έντονη φλεγμονώδη αντίδραση, που οδηγεί σε δευτερογενείς ουλές και απόφραξη της επιδιδυμίδας (Dimitriadis, et al., 2017). Τυπικά, ο όγκος του σπέρματος είναι φυσιολογικός. Επίσης, η φυματίωση μπορεί να σχετίζεται με οζώδη και διευρυμένο σπερματικό πόρο και μειωμένο όγκο εκσπερμάτισης (Baker & Sabanegh, 2013). Η χρόνια επιδιδυμίτιδα με διηθήσεις, οι οποία εμφανίζεται στο περίπου 15% των ασθενών, μπορεί τελικά να οδηγήσει σε απόφραξη (Nieschlag, et al., 2010). Επιπλέον, οι λοιμώξεις μπορούν να προκαλέσουν μονόπλευρες ή αμφοτερόπλευρες αποφράξεις των σπερματικών σωληναρίων, καθώς και δυσλειτουργία της εκσπερμάτισης (Purvis & Christiansen, 1993).

Η ιατρογενής απόφραξη μπορεί να είναι μια επιπλοκή που προκύπτει από αφαίρεση βουβωνοκήλης, σκωληκοειδεκτομή, μεταμόσχευση νεφρού και από επεμβάσεις στην περιοχή των εκσπερματικών πόρων (Ridgway, et al., 2002). Η διαδερμική ανάκτηση σπέρματος από την επιδιδυμίδα (PESA), η μικροχειρουργική επιδιδυμική αναρρόφηση σπέρματος (MESA) ή βιοψίες της επιδιδυμίδας οδηγούν, στις περισσότερες περιπτώσεις, σε απόφραξη. Η αμφοτερόπλευρη απολίνωση του σπερματικού πόρου, που πραγματοποιείται ως αντισυλληπτικό μέτρο, είναι η πιο κοινή αιτία απόφραξης του (Costabile & Sprevak, 2001).

Ανοσολογικά αίτια

Τα ανοσολογικά αίτια της υπογονιμότητας αποτελούν τα αντισώματα τα οποία συνδέονται με αντιγόνα των σπερματοζωαρίων μειώνοντας την αλληλεπίδραση μεταξύ σπέρματος και ωοκυττάρου (Gilbert, et al., 1990). Τα αντισπερματικά αντισώματα (ASA) είναι πολύ κοινά, με το 8%-17% των ανδρών να είναι θετικά για ASA ορού (Collins, et al., 1993). Η έκφραση των αντισπερματικών αντισωμάτων σχετίζεται με ορισμένες τάξεις HLA (Omu, et al., 1999), υποδηλώνοντας μια αυτοάνοση διαταραχή. Οι ανωμαλίες στην ανάπτυξη του αιματοορχικού φραγμού μπορεί να οδηγήσουν στο σχηματισμό αντισπερματικών αντισωμάτων (Bohring & Krause, 2003). Οι παράγοντες κινδύνου για το σχηματισμό τους είναι ο τραυματισμός του ιστού των όρχεων (δηλαδή συστροφή των όρχεων, χειρουργική επέμβαση ή τραύμα) και η επιδιδυμίτιδα (Heidenreich, et al., 1994), αν και η ακριβής αιτία είναι συχνά ασαφής. Τα αντισπερματικά αντισώματα προκαλούν τη συγκόλληση των σπερματοζωαρίων, εμποδίζοντας την κινητικότητά τους (Clarke, et al., 1985). Η διείσδυση του σπέρματος στην τραχηλική βλέννη είναι επίσης μειωμένη (Barratt, et al., 1992). Το σπέρμα με τα αντισπερματικά αντισώματα εκδηλώνει ελαττωμένες αλληλεπιδράσεις σπερματοζωαρίου-ωαρίου. Ενώ, η ακροσωμική αντίδραση και η σύνδεση της διαφανούς ζώνης μπορεί επίσης να επηρεαστεί, γεγονός που με τη σειρά του οδηγεί σε μειωμένη γονιμότητα (Liu, et al., 1991; Bando, et al., 1992).

Σεξουαλικές διαταραχές

Οι σεξουαλικές διαταραχές συνδράμουν στην υπογονιμότητα όταν παρεμβαίνουν στην εναπόθεση του σπέρματος στον κόλπο. Οι συγγενείς ή επίκτητες ανατομικές ανωμαλίες του πέους μπορεί να επηρεάσουν την εκσπερμάτιση (Machen & Sandlow, 2012). Αυτές οι

συγγενείς ανατομικές παραλλαγές περιλαμβάνουν ιδιαίτερα τη μη φυσιολογική θέση του ουρηθρικού πόρου (υποσπαδίες ή επισπαδίες), αλλά και η στροφή ή κάμψη του πέους κατά τη σύση λόγω σχηματισμού ινώδους πλάκας στον ινώδη χιτώνα (Νόσος Peyronie), που αντιπροσωπεύει ένα πολύ συχνό κλινικό πρόβλημα (Nieschlag, et al., 2010).

Οι ανωμαλίες της εκσπερμάτισης μπορεί να οδηγήσουν σε απουσία έκκρισης και παλίνδρομη εκσπερμάτιση, που οφείλονται σε νευρολογικές, ανατομικές και ψυχολογικές καταστάσεις (Lipshultz, et al., 2009). Η παλίνδρομη εκσπερμάτιση προκαλείται από ατελές κλείσιμο του αυχένα της ουροδόχου κύστης (McMahon, et al., 2004). Επιπλέον, ο σακχαρώδης διαβήτης προκαλεί τραυματισμό του περιφερικού νευρικού συστήματος με αποτέλεσμα πιθανή παλίνδρομη εκσπερμάτιση ή απουσία της (Barazani, et al., 2012). Η αποτυχία εκσπερμάτισης μπορεί επίσης να προκληθεί από διαταραχές των πυελικών νεύρων κατά τη οπισθοπεριτοναϊκή λεμφαδενεκτομή ή άλλη οπισθοπεριτοναϊκή, κοιλιακή ή πυελική χειρουργική επέμβαση (Tarin, et al., 2015). Τέλος, ορισμένα φάρμακα επηρεάζουν την εκσπερμάτιση, όπως οι α -αναστολείς, τα αντικαταθλιπτικά, τα αντιψυχωτικά και ορισμένα αντιυπερτασικά (Brugh & Lipshultz, 2004).

Η πρόωρη εκσπερμάτιση είναι η πιο συχνή σεξουαλική διαταραχή στον άνδρα και ορίζεται ως η κορύφωση και η εκσπερμάτιση νωρίτερα, χωρίς τη θέληση του (Shindel, et al., 2008). Όμως, για να θεωρηθεί δυσλειτουργία, πρέπει να προκαλεί δυσφορία. Η πρόωρη εκσπερμάτιση είναι πιθανώς το πιο κοινό σεξουαλικό παράπονο, επηρεάζοντας το 31% των ανδρών ηλικίας 18 έως 59 ετών (Laumann, et al., 1999).

Η καθυστερημένη εκσπερμάτιση ή η αδυναμία εκσπερμάτισης εμφανίζονται σε αποτυχία κορύφωσης. Μπορεί να είναι χρόνια ή επίκτητη και αποτελείται από πολλούς οργανικούς και ψυχογενείς αιτιολογικούς παράγοντες (Lipshultz, et al., 2009). Η αδυναμία επίτευξης κορύφωσης παρατηρείται στο 8% των ανδρών ηλικίας 18-59 ετών (Laumann, et al., 1999). Αυτή η κατάσταση μπορεί να είναι πιο συχνή με τη γήρανση και πρόσφατα στοιχεία έχουν δείξει ότι το πρότυπο αυνανισμού μπορεί να επηρεάσει την ικανότητα κορύφωσης κατά τη σεξουαλική δραστηριότητα (Perelman, et al., 2006). Έχει, επίσης, σημαντικό αντίκτυπο στη σεξουαλική ικανοποίηση του ζευγαριού με αποτέλεσμα τη στειρότητα (Lue, 2016).

Η στυτική δυσλειτουργία ορίζεται ως η επίμονη αδυναμία επίτευξης και διατήρησης επαρκούς σύσης για να πραγματοποιηθεί ικανοποιητική σεξουαλική απόδοση

(Lue, et al., 2004). Σχετίζεται με την ηλικία και αυξάνεται έως και 70% σε ασθενείς ηλικίας 70 ετών (Feldman, et al., 1994). Όμως, επηρεάζει και νεότερους άνδρες, 40 ετών, με το 5 % εξ αυτών να έχουν πλήρη και το 17 % μέτρια στυτική δυσλειτουργία (Braun, et al., 2000). Οι παράγοντες κινδύνου είναι η έλλειψη άσκησης, η παχυσαρκία, το κάπνισμα, η υπερχοληστερολαιμία και το μεταβολικό σύνδρομο (Gurta, et al., 2011). Ξεχωριστά ή σε μεταβλητούς συνδυασμούς οι ψυχογενείς, αγγειακές, νευρογενείς, ενδοκρινικές ή μυογενείς διαταραχές καθώς και τα φάρμακα μπορεί να αποτελέσουν αίτια της στυτικής δυσλειτουργίας (Bongers & Kedia, 2014).

2.1.4. Γενετικοί παράγοντες

Η υπογονιμότητα επηρεάζει περίπου το 7% του ανδρικού πληθυσμού, εκ των οποίων το 15% σχετίζεται με γενετικές διαταραχές, συμπεριλαμβανομένων τόσο των χρωμοσωμικών όσο και των μονογονιδιακών αλλοιώσεων (Krausz, 2011). Τα γενετικά αίτια μπορούν να ανιχνευθούν σε όλες τις κύριες αιτιολογικές κατηγορίες της ανδρικής υπογονιμότητας (προορχικά, ορχικά και μετα-ορχικά). Η υπογονιμότητα μπορεί να προκληθεί από γενετικές ανωμαλίες που προκύπτουν καθ' όλη τη διάρκεια του κύκλου ζωής, από τα γενετικά χαρακτηριστικά που μεταφέρονται από το σπερματοζωάριο, έως τις γονιδιωματικές αλλαγές κατά ή μετά τη γονιμοποίηση, από επακόλουθες αναπτυξιακές αλλαγές στο έμβρυο (Hotaling, 2014). Οι γενετικοί παράγοντες που εμπλέκονται στην ανδρική υπογονιμότητα βρίσκονται σε κάθε επίπεδο γενετικής πληροφορίας, από τα χρωμοσώματα έως τα γονίδια και τα νουκλεοτίδια (Plaseska-Karanfilska, et al., 2012). Οι μεταλλάξεις μπορεί να περιλαμβάνουν δομικές ανωμαλίες των χρωμοσωμάτων, όπως μεταθέσεις, μικροελλείψεις του Y χρωμοσώματος και θραύσματα του DNA (Esteves & Agarwal, 2011). Επίσης, συνήθεις είναι οι αριθμητικές ανωμαλίες των χρωμοσωμάτων, όπως το σύνδρομο Klinefelter ή η ανευπλοειδής των σπερματοζωαρίων (Ferlin, et al., 2006). Οι γονιδιακές μεταλλάξεις και οι πολυμορφισμοί μπορούν να επηρεάσουν οποιαδήποτε από τις περίπου 2000 πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη σπερματογένεση αλλά και οι επιγενετικές αλλοιώσεις μπορεί να επηρεάσουν την έκφραση και τη δραστηριότητα των πρωτεϊνών (Krausz, et al., 2015).

Χρωμοσωμικές ανωμαλίες

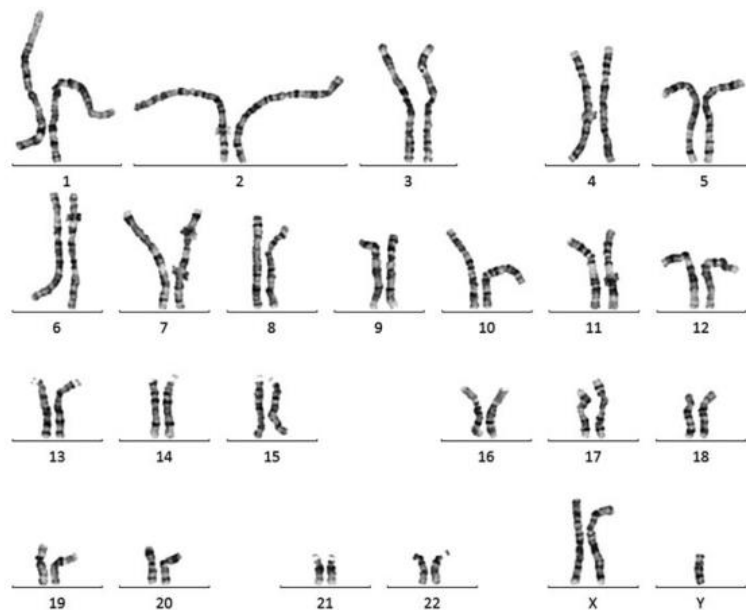
Οι ανωμαλίες του καρυότυπου εμφανίζονται στο 0,4% του γενικού πληθυσμού και μπορούν να επηρεάσουν τον αριθμό ή τη δομή των χρωμοσωμάτων (Krausz, 2011). Η πλειονότητα των χρωμοσωμικών ανωμαλιών δημιουργείται κατά τη διάρκεια της μείωσης (Martin, 2008). Η υψηλή συχνότητα των αριθμητικών και δομικών μεταλλάξεων έχει ως αποτέλεσμα την εξασθένηση της σπερματογένεσης (Vincent, et al., 2011). Η συνολική συχνότητα εμφάνισης ενός χρωμοσωμικού παράγοντα στους υπογόνιμους άνδρες κυμαίνεται μεταξύ 2% και 8%, με μέση τιμή το 5%. Αυτή η τιμή αυξάνεται σε περίπου 15% στους αζωοσπερμικούς άνδρες και αυτούς με ανευπλοειδία 47,XXY Klinefelter (Ferlin, 2007).

Το σύνδρομο Klinefelter (47, XXY) αποτελεί την πιο συχνή γονιδιωματική μετάλλαξη, που ανευρίσκεται στην αζωοσπερμία και τη σοβαρή ανδρική υπογονιμότητα. Ενώ, ακολουθούν οι μικροελλείψεις του χρωμοσώματος Y (Yq-) και οι δομικές αυτοσωμικές ανωμαλίες (Kamischke, et al., 2003). Στο 80% περίπου των περιπτώσεων η νόσος οφείλεται στη συγγενή αριθμητική χρωμοσωμική ανωμαλία 47,XXY (Βλ. Εικ. 2.2) (Nieschlag, et al., 2010). Το άλλο 20% αποτελείται είτε από μωσαϊκά 46,XY/47,XXY, ένα ή περισσότερα επιπλέον χρωμοσώματα Y (π.χ. 48,XXYY), χρωμοσωμικές ανευπλοειδίες (48,XXX; 49,XXXXY) είτε δομικές ανωμαλίες πρόσθετου χρωμοσώματος X (Groth, et al., 2013). Ο κλασικός φαινότυπος των ανδρών με σύνδρομο Klinefelter χαρακτηρίζεται από μικρούς και σκληρούς όρχεις, μικρό πέος, γυναικομαστία, γλωσσικές δυσκολίες, χαμηλά επίπεδα τεστοστερόνης, στειρότητα και ήπια έως μέτρια γνωστικά ελλείμματα (Paduch, et al., 2009). Το σύνδρομο Klinefelter επηρεάζει τη γονιμότητα μέσω δύο μηχανισμών, επιδρώντας άμεσα στη σπερματογένεση ή έμμεσα μέσω των ορμονών (Kamischke, et al., 2003). Οι περισσότεροι άνδρες με μη μωσαϊκό σύνδρομο έχουν αζωοσπερμία και αυξημένη FSH ως απόκριση στη ανώμαλη σπερματογένεση (Bojesen & Gravholt, 2007).

Η δεύτερη πιο συχνή γενετική ανευπλοειδία που σχετίζεται με την ανδρική υπογονιμότητα είναι το σύνδρομο 47,XY, το οποίο έχει συχνότητα εμφάνισης 1:1000 γεννήσεις (Martin, 2008). Οι άνδρες με αυτό το σύνδρομο έχουν φυσιολογικό φαινότυπο, αν και έχουν σημειωθεί αναφορές για αυξημένο ύψος και προβλήματα συμπεριφοράς (Tüttelmann & Röhrke, 2017). Επίσης, είναι δυνατό να εμφανίσουν ολιγοζωοσπερμία ή ακόμα και αζωοσπερμία που σχετίζεται με τη διακοπή ωρίμανσης ή την απλασία του σπερματικού επιθηλίου (Shi & Martin, 2000). Ωστόσο, η πλειονότητα των ανδρών έχει

φυσιολογική σπερματογένεση, με το επιπλέον χρωμόσωμα Y να χάνεται κατά τη μείωση καθώς λιγότερο από το 1% των σπερματοζωαρίων είναι 24,XY ή 24,YY (Shi & Martin, 2000).

Το σύνδρομο XX-ανδρών (ή de la Chapelle) χαρακτηρίζεται από το συνδυασμό ανδρικών εξωτερικών γεννητικών οργάνων, τη διαφοροποίηση γονάδων σε όρχεις και 46,XX καρυότυπο (Nieschlag, et al., 2010). Αυτή η ανευπλοειδία του φυλετικού χρωμοσώματος είναι πολύ πιο σπάνια από το Klinefelter, με επιπολασμό 1:9000 έως 1:20.000. Στο 80% περίπου των ανδρών XX, η περιοχή που καθορίζει το φύλο (SRY) του χρωμοσώματος Y συνήθως μετατοπίζεται σε ένα χρωμόσωμα X (Tüttelmann & Rörke, 2017). Ωστόσο, κατά τη μετατόπιση άλλα βασικά γονίδια που είναι υπεύθυνα για την επαγωγή της σπερματογένεσης, όπως η περιοχή AZF, χάνονται και έτσι τα αρσενικά XX είναι στείρα. Εκτός από τους θετικούς σε SRY XX άνδρες, υπάρχει επίσης μια πιο σπάνια παραλλαγή αρνητικής σε SRY (Mau-Holzmann, 2005). Αυτοί οι ασθενείς εμφανίζουν δυσπλασίες των γεννητικών οργάνων όπως κακοήθεις όρχεις, δισχιδές όσχεο ή υποσπαδία (Vorona, et al., 2007).



Εικόνα 2.3. Τυπικός καρυότυπος άνδρα με σύνδρομο Klinefelter 47(XXY) (Tüttelmann & Rörke, 2017).

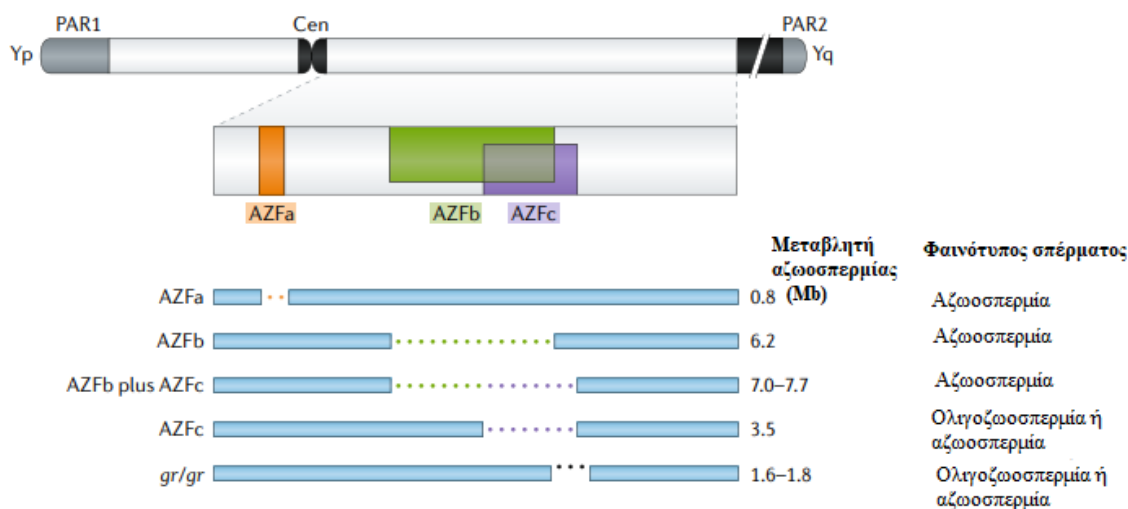
Οι μεταθέσεις χρωμοσωμάτων κατά Robertson είναι οι πιο συχνές δομικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες στον άνθρωπο και μπορούν να επηρεάσουν τη γονιμότητα, με διάφορους βαθμούς αλλοιώσεων του σπέρματος. Οι μεταθέσεις συμβαίνουν όταν τα ά-

κρα δύο ακροκεντρικών χρωμοσωμάτων (13-15, 21, 22) συγχωνεύονται (Ferlin, et al., 2006). Οι φορείς του συνδρόμου έχουν γενικά φυσιολογικούς φαινοτύπους (De Braekeleer & Dao, 1991). Ενώ, ανωμαλίες παρατηρούνται σπάνια σε αζωοσπερμικούς άνδρες, αλλά συχνά εντοπίζονται σε ολιγοζωοσπερμικούς και σε νορμοζωοσπερμικούς άνδρες (Chandley, et al., 1975). Παρόλα αυτά, η μετάθεση μπορεί να επηρεάσει τη γονιμότητα ή και την έκβαση της εγκυμοσύνης λόγω της πιθανώς διαταραγμένης σπερματογένεσης ή παραγωγής γαμετών με μη ισορροπημένο συνδυασμό χρωμοσωμάτων (Spinner, et al., 2013).

Μικροελλείψεις Y χρωμοσώματος

Οι μικροελλείψεις του Y χρωμοσώματος είναι η δεύτερη πιο κοινή γενετική αιτία ανδρικής υπογονιμότητας (Krausz, 2017). Οι ολοκληρωτικές μικροελλείψεις στο μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος Y (Yq) παρατηρούνται με επικράτηση 10-15% στη μη αποφρακτική αζωοσπερμία και 5-10% στη σοβαρή ολιγοζωοσπερμία (Foresta, et al., 2001). Ο μακρύς βραχίονας του χρωμοσώματος περιέχει τον παράγοντα αζωοσπερμίας (Azospermia Factor, AZF), ο οποίος διακρίνεται σε τρεις περιοχές: AZFa, AZFb και AZFc (βλ. Εικόνα 2.3). Στην περιοχή AZFa έχουν χαρτογραφηθεί τα γονίδια *USPY9* και *DBY* (Foresta, et al., 2000), στην περιοχή AZFb το γονίδιο *RBMY1* και στην AZFc το γονίδιο *DAZ* (Reijo, et al., 1995). Οι ελλείψεις της πλήρους περιοχής AZFc ανιχνεύονται συχνότερα (69%), ακολουθούν οι ελλείψεις της περιοχής AZFb (14%) και της περιοχής AZFa (6%). Οι μικροελλείψεις που καλύπτουν ολόκληρη την περιοχή AZFa έχουν ως αποτέλεσμα την απλασία του σπερματικού επιθηλίου (Hopps, et al., 2003). Ενώ, οι ελλείψεις εντός της AZFb συνήθως οδηγούν σε αζωοσπερμία (Pan, et al., 2019). Τέλος, οι ελλείψεις της περιοχής AZFc μπορούν να προκαλέσουν αζωοσπερμία, απλασία του σπερματικού επιθηλίου και ολιγοζωοσπερμία (Blagosklonova, et al., 2006).

Οι μερικές ελλείψεις εντός της περιοχής AZFc (gr/gr και b2/b3) που αφαιρούν μικρότερα τμήματα της περιοχής AZFc είναι επίσης πολύ πιο συχνές (Vogt, et al., 1996). Ενώ η πλήρης έλλειψη της AZFc είναι συσχετισμένη και καλά τεκμηριωμένη με την ανεπαρκή σπερματογένεση, η επίδραση των μερικών ελλείψεων στη σπερματογένεση και την ανδρική υπογονιμότητα παραμένει αμφιλεγόμενος (Hucklenbroich, et al., 2005).



Εικόνα 2.4. Παραλλαγές αριθμού αντιγράφων που συνδέονται με το χρωμόσωμα Υ. Οι πλήρεις μικροελλείψεις του παράγοντα αζωοσπερμίας (AZF) αποτελούν άμεση αιτία διαταραχής της σπερματογένεσης, και η διαγραφή gr/gr είναι παράγοντας κινδύνου για σπερματογενετική βλάβη (Krausz, et al., 2015).

Μεταλλάξεις γονιδίων

Πολλά γονίδια είναι απαραίτητα για τη φυσιολογική σεξουαλική ανάπτυξη, τη λειτουργία και την κάθοδο των όρχεων και τη σπερματογένεση. Ωστόσο, μόνο μερικά έχουν κλινική σημασία ρουτίνας. Αυτά περιλαμβάνουν το γονίδιο *CFTR* (ρυθμιστής διαμεμβρανικής αγωγιμότητας της κυστικής ίνωσης), του οποίου οι μεταλλάξεις προκαλούν κυστική ίνωση και συγγενή απόφραξη του σπερματικού πόρου (CBAVD) (Schulz, et al., 2006). Οι μεταλλάξεις του γονιδίου του υποδοχέα ανδρογόνων (AR) προκαλούν το σύνδρομο μη απόκρισης στα ανδρογόνα (AIS) και βλάβες τις σπερματογένεσης (Rajender, et al., 2007). Εξίσου σημαντικά είναι τα γονίδια *INSL3* (Ινσουλινομορφος αυξητικός παράγοντας 3) και *LGR8*, των οποίων οι μεταλλάξεις έχουν συσχετιστεί με την κρυψορχία (Ferlin, 2007). Το 60-70% των ασθενών με συγγενή αμφοτερόπλευρη απόφραξη του σπερματικού πόρου (CBAVD) εμφανίζουν μεταλλάξεις στο γονίδιο *CFTR*, χωρίς άλλα κλινικά συμπτώματα κυστικής ίνωσης (Foresta, et al., 2005). Ενώ, σχεδόν όλοι οι άνδρες με πλήρη κλινική κυστική ίνωση επηρεάζονται επίσης από τη CBAVD και, ως εκ τούτου, είναι υπογόνιμοι, εκδηλώνοντας αποφρακτική αζωοσπερμία (Singh, et al., 2012).

Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο του υποδοχέα ανδρογόνου (AR) που συνδέεται με το Χ χρωμόσωμα, προκαλούν ένα ευρύ φάσμα συνδρόμων μη απόκρισης στα ανδρογόνα (AIS) (Hughes, et al., 2012). Ανάλογα με τον λειτουργικό αντίκτυπο στον υποδοχέα, οι με-

ταλλάξεις μπορεί να οδηγήσουν σε πλήρη μη απόκριση στα ανδρογόνα (CAIS), με γυναικείο φαινότυπο σε άτομα με ανδρικό καρυότυπο. Επίσης, ενδέχεται να προκύψει μερική μη απόκριση στα ανδρογόνα (PAIS) σε ασθενείς με διφορούμενα γεννητικά όργανα ή ήπια μη απόκριση στα ανδρογόνα (MAIS) σε άνδρες με υποσπαδία, γυναικομαστία και σπερματογενετική βλάβη (Ferlin, et al., 2006). Ωστόσο, οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *AR* φαίνεται ότι δεν αποτελούν αιτιολογικό παράγοντα στη μεμονωμένη ανδρική υπογονιμότητα, αλλά μόνο σε ασθενείς με πρόσθετα συμπτώματα, όπως σοβαρό υποσπαδία (Singh, et al., 2012).

Πολυμορφισμοί

Οι γενετικοί πολυμορφισμοί μπορεί επίσης να αυξήσουν την ευπάθεια σε ορισμένες μορφές της ανδρικής υπογονιμότητας. Οι πολυμορφισμοί των γονιδίων *MEI1*, *URB2*, *PRDM9* αποτελούν παράγοντες κινδύνου για τους ασθενείς με αζωοσπερμία λόγω αναστολής της μείωσης (Sato, et al., 2006). Ενώ, οι πολυμορφισμοί του γονιδίου *SEPTIN12* σχετίζονται με την απλασία του σπερματικού επιθηλίου (Miyakawa, et al., 2012). Ορισμένα γονίδια που έχουν εντοπιστεί ότι σχετίζονται με την ανδρική υπογονιμότητα τα τελευταία χρόνια περιλαμβάνουν τα *MTHFR*, *CYP19A1*, *GSTM1*, *SHBG*, *ESR1*, *TNP1*, *GSTT1*, *TS2*, *MSK6* και *MLH3* (Gu, et al., 2010). Παρόλα αυτά, οι μηχανισμοί της σπερματογένεσης και η συσχέτιση αυτών των γονιδίων μεταξύ τους δεν έχουν προσδιοριστεί πλήρως (Miyamoto, et al., 2012).

2.2. Διάγνωση υπογονιμότητας

2.2.1. Ιστορικό

Η επιτυχής διάγνωση της ανδρικής υπογονιμότητας μπορεί να είναι δύσκολη, καθώς η διαδικασία της σύλληψης περιλαμβάνει πολλαπλά όργανα και απαιτεί την αξιολόγηση δύο ατόμων (Ghuman & Ramalingam, 2018). Αρχικά, για την διάγνωση της απαιτείται η λήψη λεπτομερούς ιστορικού. Η υπογονιμότητα μπορεί να ταξινομηθεί είτε ως πρωτοπαθής είτε ως δευτεροπαθής (Zegers-Hochschild, et al., 2017). Αν και αυτή η διάκριση μπορεί να περιορίσει τη διαφορική διάγνωση, οι άνδρες που ταξινομούνται με πρωτοπαθή ή δευτεροπαθή υπογονιμότητα θα πρέπει να αξιολογούνται με τον ίδιο τρόπο (Jarow, et al., 2011).

Η αρχική λήψη ιστορικού θα πρέπει να περιλαμβάνει πληροφορίες σχετικά με το οικογενειακό ιστορικό στειρότητας, τις επαναλαμβανόμενες αποβολές, τις δυσπλασίες, τη διάρκεια της υπογονιμότητας και πιθανή προηγούμενη γονιμότητα (Leaver, 2016). Επίσης, θα πρέπει να περιλαμβάνονται η συχνότητα, η διάρκεια και τυχόν προβλήματα της σεξουαλικής επαφής, καθώς και οι παιδιατρικές διαταραχές και οι παρούσες ιατρικές καταστάσεις (Pandiyam & Khan, 2017). Επίσης, θα πρέπει να αναφερθούν πιθανές σοβαρές ασθένειες όπως ο διαβήτης, φάρμακα και τυχόν αλλεργίες, αλλά και παράγοντες του τρόπου ζωής που μπορεί να έχουν αντίκτυπο στην παραγωγή και την ποιότητα του σπέρματος (Ricci, et al., 2017).

Όσον αφορά το ιστορικό της αναπαραγωγής, θα πρέπει να αναφέρονται η διάρκεια και η συχνότητα της σεξουαλικής επαφής χωρίς προστασία, τυχόν προηγούμενη σύλληψη, η χρήση αντισύλληψης, οι αποβολές και οι θεραπείες γονιμότητας (Majzoub & Sabanegh, 2016). Επίσης, σημαντική είναι η αναφορά της χρησιμοποίησης κολπικών λιπαντικών καθώς πολλά από αυτά είναι σπερματοκτόνα (Mowat, et al., 2014). Οι ερωτήσεις που αξιολογούν τη στύση και την εκσπερμάτιση είναι κρίσιμες καθώς αντικατοπτρίζουν τη νευροενδοκρινική κατάσταση του ασθενή, η οποία μπορεί να είναι η μοναδική αιτία της υπογονιμότητας του (McMahon, et al., 2004). Η κατανόηση του εμμηνορροϊκού κύκλου από τον ασθενή είναι επίσης σημαντική, με ιδιαίτερη έμφαση στο χρονικό πλαίσιο της ωορρηξίας και τη βιωσιμότητα του σπέρματος (Agarwal, et al., 2021).

Επιπλέον ο βαθμός αρρενωπότητας του ασθενούς θα πρέπει να αξιολογείται με βάση τη σεξουαλική ανάπτυξη και την ηλικία έναρξης της εφηβείας (Majzoub & Sabanegh, 2016). Η ηλικία αυτή υποδεικνύει τι προκαλεί το πρόβλημα, για παράδειγμα, η πρόωμη εφηβεία, η οποία εμφανίζεται πριν από την ηλικία των 9 ετών ή η καθυστερημένη εφηβεία, στην οποία διακρίνεται απουσία ανάπτυξης των όρχεων μέχρι την ηλικία των 14 ετών (Pitteloud, 2012). Επίσης, διάφορες παιδικές παθήσεις (π.χ. κρυσορχία, ορχίτιδα από παρωτίτιδα μετά την εφηβεία και συστροφή ή τραύμα των όρχεων) μπορεί να οδηγήσουν σε ατροφία των όρχεων ή μειωμένη ποιότητα του σπέρματος (Lewis & Karlan, 2009). Επομένως, είναι απαραίτητο να καταγράφονται λοιμώξεις του ανδρικού ουρογεννητικού συστήματος, μιας και μπορούν να συμβάλουν στην ανδρική υπογονιμότητα (Kasturi, et al., 2009).

Το ιστορικό χειρουργικής επέμβασης του ασθενή θα πρέπει επίσης να αξιολογηθεί για καταστάσεις όπως η αποκατάσταση βουβωνοκήλης, η βαζεκτομή, η υδροκελε-

κτομή, η ορχεοπηξία καθώς και για άλλες ουρολογικές επεμβάσεις, ειδικά στον προστάτη και την ουρήθρα, που μπορεί να επηρεάσουν την εκσπερμάτιση (Majzoub & Sabanegh, 2016). Ο καρκίνος ή η θεραπεία για τον καρκίνο μπορούν επίσης να επηρεάσουν τη γονιμότητα, ιδιαίτερα ο καρκίνος των όρχεων, αφού υπάρχει μεγαλύτερη πιθανότητα δημιουργίας προβλημάτων στη σπερματογένεση (Agarwal, et al., 2021).

2.2.2. Κλινική εξέταση

Η κλινική αξιολόγηση ενός υπογόνιμου άνδρα είναι ιδιαίτερα σημαντική και εστιάζει στα δευτερεύοντα χαρακτηριστικά του φύλου, συμπεριλαμβανομένης της εξωτερικής εμφάνισης (σωματικό λίπος, μυϊκή μάζα), του στήθους (γυναικομαστία), της τριχοφυΐας (ηβική, μασχαλιαία και προσώπου), του δέρματος (παραγωγή σμήγματος, ακμή, ωχρότητα, ρυτίδες) και των εξωτερικών γεννητικών οργάνων (μέγεθος πέους, όγκος όρχεων, επιδιδυμίδα, σπερματικός πόρος) (Kedia, 2014). Ιδιαίτερη έμφαση θα πρέπει να δοθεί στα γεννητικά όργανα, με εξέταση του πέους, της θέσης του ουρηθρικού πόρου και η μέτρηση του όγκου των όρχεων με ορχιδόμετρο Prader (Krausz, 2011). Με τη μέτρηση του μεγέθους των όρχεων εκτιμάται και ο όγκος τους, οποίος συσχετίζεται με την παραγωγή του σπέρματος (Johnson, et al., 1980). Επίσης, πρέπει να πραγματοποιείται ψηλάφηση του οσχέου για κισσοκήλη και ψηφιακή ορθική εξέταση (Pandiyan & Khan, 2017). Σημασία πρέπει να δίνεται στη παρουσία μικρών όρχεων, πέους και προστάτη, λιγοστές ηβικές και μασχαλιαίες τρίχες και δυσανάλογα μακριά χέρια και καθώς υποδηλώνουν σύνδρομο Klinefelter (Kamischke, et al., 2003). Τέλος, η μειωμένη μυϊκή διάπλαση, η γυναικομαστία και η ψηλή φωνή υποδηλώνουν παρουσία προεφηβικού υπογοναδισμού (Krausz, 2011).

Κατά την εξέταση του οσχέου αναζητούνται τυχόν μάζες, ουλές προηγούμενων χειρουργικών επεμβάσεων, κισσοκήλη και παρουσία ψηλαφητής επιδιδυμίδας (Ghuman & Ramalingam, 2018). Η παρουσία κισσοκήλης πρέπει να επιβεβαιώνεται με σε όρθια στάση, με τη δοκιμασία κατά Valsava (Brugh & Lipshultz, 2004). Η εξέταση θα πρέπει επίσης να αναζητήσει την ενδείξεις για σεξουαλικά μεταδιδόμενα νοσήματα και περαιτέρω διερεύνηση σε περίπτωση ανεύρεσης τους (Bhasin, 2007).

Το υπερηχογράφημα των όρχεων βελτιώνει την ανίχνευση παθολογικών καταστάσεων όπως, υδροκήλη, όγκους όρχεων και επιδιδυμικών διαταραχών (Leaver, 2016). Το μέγεθος της επιδιδυμικής κεφαλής μεγαλύτερο από 7,5 mm σε διάμετρο παρέχει α-

ντικειμενική ένδειξη για απόφραξη (Ghuman & Ramalingam, 2018). Επιπρόσθετα, σε περιπτώσεις απόφραξης πραγματοποιείται υπερηχογράφημα του ορθού για παθολογίες του προστάτη και του σπερματικών σωληναρίων (Jarow, 2007).

2.2.3. Εργαστηριακός έλεγχος

Σπερμοδιάγραμμα

Η ανάλυση του σπέρματος έχει πρωταρχική σημασία για τη διάγνωση και τον καθορισμό της σοβαρότητας του ανδρικού παράγοντα της υπογονιμότητας. Η ανάλυση παρέχει πληροφορίες για τη φυσιολογική λειτουργία των όρχεων, την επάρκεια του ενδοκρινικού συστήματος και την υγεία των επικουρικών οργάνων που παράγουν το υγρό του σπέρματος (Eliasson, 2010). Ωστόσο, οι φυσιολογικές παράμετροι του σπέρματος δεν αποκλείουν την πιθανότητα ύπαρξης άλλων, βλαπτικών για την υπογονιμότητα, λειτουργικών ανωμαλιών (Roch & Sigman, 2010). Από την άλλη, οι σοβαρές διαταραχές των παραμέτρων του σπέρματος μπορεί να μην επηρεάσουν την γονιμότητα του ζευγαριού, καθώς μια εξαιρετικά γόνιμη γυναίκα σύντροφος μπορεί να αντισταθμίσει την ανδρική υπογονιμότητα (Majzoub & Sabanegh, 2016).

Πίνακας 2.4. Διαταραχές σπέρματος (World Health Organization, 2010)	
Νορμοζωοσπερμία	Ο συνολικός αριθμός των σπερματοζωαρίων, η κινητικότητα και η μορφολογία τους είναι εντός των ορίων αναφοράς.
Ολιγοζωοσπερμία	Ο συνολικός αριθμός των σπερματοζωαρίων είναι $<15 \times 10^6/\text{mL}$ και η συγκέντρωση $<39 \times 10^6$ /εκσπερμάτιση.
Ασθενοζωοσπερμία	Η προωθητική κινητικότητα των σπερματοζωαρίων είναι $<32\%$.
Τερατοζωοσπερμία	Τα μορφολογικά φυσιολογικά σπερματοζωάρια είναι $<4\%$
Ολιγοτερατοασθενοσπερμία	Ο συνολικός αριθμός των σπερματοζωαρίων, η κινητικότητα και η μορφολογία τους είναι κάτω από τα κατώτερα όρια αναφοράς.
Αζωοσπερμία	Πλήρης απουσία σπερματοζωαρίων από το σπερματικό υγρό.
Ασπερμία	Πλήρης έλλειψη σπέρματος κατά την εκσπερμάτιση.
Κρυπτοζωοσπερμία	Απουσία των σπερματοζωαρίων στα νωπά δείγματα αλλά ανίχνευση στο ίζημα της φυγοκέντρωσης.
Αιματοσπερμία	Ανίχνευση ερυθροκυττάρων κατά την εκσπερμάτιση.
Λευκοκυτταροσπερμία	Παρουσία $>10^6$ λευκοκυττάρων ανά εκσπερμάτιση.

Η ανάλυση του σπέρματος θα πρέπει να πραγματοποιείται σύμφωνα με τις οδηγίες του εγχειριδίου του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (World Health Organization, 2021). Η ανάλυση περιλαμβάνει το σπερμοδιάγραμμα, τα αντισπερματικά αντισώματα και πιο ειδικές εξετάσεις όπως ο βιοχημικός έλεγχος, η καλλιέργεια και η ακροσωμική

αντίδραση του σπέρματος (Krausz, 2011). Σε περίπτωση που διαπιστωθούν μη φυσιολογικές παράμετροι σπέρματος, η ανάλυση θα πρέπει να επαναληφθεί. Η ονοματολογία που χρησιμοποιείται σε περίπτωση παθολογικών ευρημάτων αναφέρεται στον Πίνακα 2.4.

Συλλογή

Ο ΠΟΥ συνιστά την συλλογή του δείγματος σπέρματος μετά από 2-7 ημέρες αποχής από κάθε σεξουαλική δραστηριότητα (World Health Organization, 2021), με το βέλτιστο διάστημα αποχής να ορίζεται στις 2-4 μέρες, καθώς τότε παρατηρείται σχετική βελτίωση στη συνολική συγκέντρωση και την κινητικότητα των σπερματοζωαρίων (Agarwal, et al., 2016). Ενώ, το μεγαλύτερο διάστημα αποχής έχει συσχετιστεί με αυξημένη βλάβη του DNA του σπερματοζωαρίου (Levitas, et al., 2005). Επίσης, σε περίπτωση πυρετώδους ασθένειας ή έντονου στρες, συνίσταται η συλλογή του σπέρματος μετά από τουλάχιστον 3 μήνες. Ιδανικά, το δείγμα θα πρέπει να λαμβάνεται σε ένα αποστειρωμένο κύπελλο μέσω αυνανισμού, είτε στο σπίτι είτε στο εργαστήριο (Baskaran, et al., 2020). Μπορεί ακόμη να ληφθεί με σεξουαλική επαφή χρησιμοποιώντας ειδικό προφυλακτικό συλλογής, που δεν είναι επιζήμιο για το σπέρμα και δεν περιέχει σπερματοκτόνα. Τα λιπαντικά πρέπει να αποφεύγονται αφού επηρεάζουν την κινητικότητα του σπέρματος (Niederberger, 2016).

Ανάλυση

Αμέσως μετά την ρευστοποίηση του σπέρματος, συνήθως εντός 20-60 min, διενεργείται η μακροσκοπική αξιολόγηση του, η οποία περιλαμβάνει την όψη, τη χροιά, την οσμή, τον όγκο, το pH και τη γλοιότητα (World Health Organization, 2021). Ακολουθεί η μικροσκοπική ανάλυση και ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης, της μορφολογίας, της κινητικότητας, των πυοσφαιρίων αλλά και της φρουκτόζης σε περίπτωση απουσίας των σπερματοζωαρίων (Πίνακας 2.5) (Esteves, 2014). Η μικροσκόπηση πραγματοποιείται είτε σε νωπά δείγματα, για την εκτίμηση της κινητικότητας και των συγκολλήσεων των σπερματοζωαρίων, είτε σε αραιωμένα παρασκευάσματα για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των σπερματοζωαρίων και του αριθμού των στρογγυλών κυττάρων (World Health Organization, 2021). Επίσης, σε μονιμοποιημένο δείγμα με χρώσεις Παπανικολάου, Leucoscreen και η Ηωσίνης-Νιγκροσίνης, προσδιορίζονται η μορφολογία, τα πυοσφαίρια και

η ζωτικότητα των σπερματοζωαρίων, αντίστοιχα (Majzoub & Sabanegh, 2016). Η κινητικότητα των σπερματοζωαρίων μπορεί να είναι ζωηρή ή νωθρή προωθητική, μη προωθητική ή να είναι ακίνητα (Πίνακας 2.6.) (World Health Organization, 2021).

Πίνακας 2.5. Τιμές αναφοράς αναλύσεων σπέρματος. (World Health Organization, 2021)	
Παράμετρος	Τιμές αναφοράς
Όψη	Ημιδιαφανής
Χροιά	Φαίον ιριδίζον
Οσμή	Ιδιάζουσα
Όγκος	> 1,5 mL
pH	> 7,2
Γλοιότητα	Μηδενική
Ρευστοποίηση	20-60 min
Συγκέντρωση σπερματοζωαρίων	$\geq 15 \times 10^6$ / mL
Συνολικός αριθμός σπερματοζωαρίων	$\geq 39 \times 10^6$ / εκσπερμάτιση
Προωθητική κινητικότητα	$\geq 32\%$
Ζωτικότητα	$\geq 58\%$ ζωντανά σπερματοζωάρια
Μορφολογία	$\geq 4\%$ φυσιολογικές μορφές
Πυοσφαίρια	$< 5 \times 10^6$ / mL
Στρογγυλά κύτταρα	$< 10^6$ / mL

Πίνακας 2.6. Κινητικότητα σπερματοζωαρίων. (World Health Organization, 2021)	
Ζωηρή προωθητική	≥ 25 $\mu\text{m/s}$ ταχύτητα και κίνηση γραμμική ή σε μεγάλο κύκλο.
Νωθρή προωθητική	5-25 $\mu\text{m/s}$ ταχύτητα και κίνηση γραμμική ή σε μεγάλο κύκλο.
Μη προωθητική	< 5 $\mu\text{m/s}$ ταχύτητα και επιτόπια κίνηση της ουράς, χωρίς μετατόπιση.
Ακίνητα	Καμία ενεργή κίνηση της ουράς.

Πρόσθετες εξετάσεις

Σε περιπτώσεις έλλειψης παθολογικών στοιχείων στη βασική ανάλυση του σπέρματος, συνίσταται η διεξαγωγή εξειδικευμένων εξετάσεων ώστε να γίνει άρτια αξιολόγηση και διαχείριση του ασθενή (Centola, 2011). Μια κοινή εξέταση στο ανδρολογικό εργαστήριο είναι η ανίχνευση αντισπερματικών αντισωμάτων (World Health Organization, 2010). Τα αντισπερματικά αντισώματα, τύπου IgG και IgA, μπορεί να βρίσκονται στα σπερματοζωάρια, στο σπερματικό υγρό, στην τραχηλική βλέννη, στο ωοθυλακικό υγρό και στον ορό (Walsh & Turek, 2009). Τα αντισώματα αυτά μπορούν να προκαλέσουν τη συσσώρευση ή τη συγκόλληση των σπερματοζωαρίων, τη μείωση της κινητικότητας, καθώς και να παρέμβουν στη σύνδεση σπερματοζωαρίου-ωαρίου (Cui, et al., 2015).

Οι πρόσθετες εξετάσεις αφορούν τη δοκιμασία σύνδεσης του σπερματοζωαρίου με τη διαφανή ζώνη του ωαρίου, τη διείσδυση του σπερματοζωαρίου σε ετερόλογο ωάριο και την ακροσωμική αντίδραση (Alukal & Lamb, 2010). Οι κυτταρικοί δείκτες ή οι δεί-

κτες γονιμότητας περιλαμβάνουν επίσης τη χημική επαγωγή της ακροσωμικής αντίδρασης, την υποωσμωτική διόγκωση της κυτταρικής μεμβράνης του σπερματοζωαρίου και την εκτίμηση της βλάβης του DNA του σπερματοζωαρίου (World Health Organization, 2021). Τα επίπεδα αυτών των δεικτών μπορεί να έχουν άμεση ή έμμεση σχέση με τις απαραίτητες λειτουργίες του σπέρματος και η απουσία τέτοιων δεικτών ή χαρακτηριστικών θα απέκλειε την κανονική γονιμοποίηση (Desai, et al., 2009).

Επιπλέον, η μέτρηση των δραστικών ειδών οξυγόνου (ROS) είναι σημαντική βοηθητική δοκιμή, δεδομένου ότι οι ελεύθερες ρίζες επάγουν τη βλάβη των σπερματοζωαρίων και οξειδωτικό στρες των σπερματοζωαρίων (Lipshultz, et al., 2009). Τα ROS προέρχονται από τα ανώριμα σπερματοκύτταρα και τα λευκοκύτταρα (Agarwal, et al., 2006). Όμως, η μέτρηση του οξειδωτικού στρες και των επιπέδων ROS δεν αποτελούν συμβατικές εξετάσεις λειτουργίας του σπέρματος και δεν συναντώνται σε γενικό εργαστήριο ανδρολογίας (Lipshultz, et al., 2009).

Γενετικός έλεγχος

Ο γενετικός έλεγχος είναι σημαντικός για την κατάλληλη και αξιόπιστη αξιολόγηση της ανδρικής υπογονιμότητας. Παρέχει τις απαραίτητες πληροφορίες για τον προσδιορισμό των αιτιών της υπογονιμότητας, τον εντοπισμό κλινικά σημαντικών παθήσεων και την αξιολόγηση της πιθανότητας επιτυχίας ορισμένων επιλογών θεραπείας για την υπογονιμότητα (Krausz, 2017). Οι ενδείξεις για τους διαφορετικούς τύπους γενετικών εξετάσεων ποικίλλουν ανάλογα με τον φαινότυπο του ασθενούς (Πίνακας 2.7). Σε ασθενείς με σοβαρή ολιγοζωοσπερμία (<5 εκατομμύρια/ml) ή μη αποφρακτική αζωοσπερμία ενδείκνυται η αξιολόγηση του καρυότυπου και των μικροελλείψεων του Y χρωμοσώματος (Sabanegh, 2011). Η πιο κοινή ανωμαλία είναι το σύνδρομο Klinefelter (47, XXY), το οποίο ευθύνεται για περίπου τα δύο τρίτα των ανωμαλιών στους υπογόνιμους άνδρες (Hotaling & Carrell, 2014). Οι απόγονοι των ασθενών με το σύνδρομο Klinefelter σπάνια κληρονομούν τη μετάλλαξη στους απογόνους τους. Ωστόσο, συνιστάται η γενετική συμβουλευτική για το ζευγάρι. Επίσης, μια μεγάλη καρυοτυπική ανωμαλία σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο αποβολής και απόκτησης απογόνων με χρωμοσωμική και συγγενή ανωμαλία (Krausz, 2017).

Πίνακας 2.7. Γενετικές εξετάσεις για διαφορετικούς φαινοτύπους.		
Γενετική εξέταση	Ένδειξη για ανάλυση	Μέθοδος
Χρωμοσωμικές ανωμαλίες		
Καρυότυπος	Αζωοσπερμία (<10 × 10 ⁶ / mL)	Κυτταρογενετική ανάλυση
Έλεγχος για μικροελλείψεις AZF	Αζωοσπερμία (<5 × 10 ⁶ / mL)	PCR
Έλεγχος για μικροελλείψεις gr/gr	Ολιγοζωοσπερμία (<15 × 10 ⁶ /mL)	PCR
Μεταλλάξεις		
cHH υποψήφια γονίδια	Σύνδρομο Kallmann ή συγγενής Υπογοναδοτρόπος υπογοναδισμός	Αλληλούχιση Νέας Γενιάς (NGS)
Υποδοχέας Ανδρογόνων (AR)	Υπογονιμότητα λόγω έλλειψης ανδρογόνων	Αλληλούχιση κατά Sanger
<i>CFTR</i>	Συγγενής απόφραξη σπερματικού πόρου Ιδιοπαθής απόφραξη επιδιδυμίδας	Πάνελ γονιδιακών μεταλλάξεων
<i>TEX11</i>	Αζωοσπερμία	Αλληλούχιση κατά Sanger ή συγκριτική γονιδιωματική υβριδοποίηση (CGH)
<i>DPY19L2</i>	Γλομποζωοσπερμία (απουσία ακροσώματος)	Αλληλούχιση κατά Sanger και qPCR
<i>AURKC</i>	Μακροζωοσπερμία (μεγάλη κεφαλή)	Αλληλούχιση κατά Sanger

Ο γενετικός έλεγχος για τις μικροελλείψεις στην περιοχή του παράγοντα αζωοσπερμίας (AZF) στο μακρύ σκέλος του χρωμοσώματος Y ενδείκνυται σε ασθενείς με σοβαρή ολιγοζωοσπερμία (<5 εκατομμύρια/mL) και αζωοσπερμία, καθώς εντοπίζονται στο 16% αυτών των ατόμων (Yu, et al., 2005). Οι μικροελλείψεις μπορούν κιόλας να ταξινομηθούν περαιτέρω ανάλογα με τη συγκεκριμένη περιοχή όπου εμφανίζονται, AZFa, AZFb και AZFc (Hoops, et al., 2003). Αυτή η τοποθεσία παρέχει σημαντικές προγνωστικές πληροφορίες που βοηθούν στην άμεση περαιτέρω διαχείριση.

Ο έλεγχος του γονιδίου *CFTR* πραγματοποιείται σε ασθενείς με μονόπλευρη ή αμφοτερόπλευρη απόφραξη του σπερματικού πόρου (Ghuman & Ramalingam, 2018). Σε περίπτωση ύπαρξης της μετάλλαξης του *CFTR* στον ένα σύντροφο, ενδείκνυται ο έλεγχος και άλλου συντρόφου, για τον αποκλεισμό της πιθανότητας κληρονόμησης της στους απογόνους. Επίσης, στους ασθενείς με απόφραξη του σπερματικού πόρου συνίσταται η διενέργεια υπερηχογραφήματος κοιλίας, καθώς συνήθως συνυπάρχουν άλλες ανωμαλίες του ουρογεννητικού συστήματος (Pandiyani & Khan, 2017).

Ενδοκρινικός έλεγχος

Οι ορμονικές διαταραχές οφείλονται για το 3% των υπογόνιμων ανδρών (Sigman & Boekelheide, 2008). Στις διαταραχές της ανδρικής αναπαραγωγής πραγματοποιείται αξιολόγηση των ορμονών που ρυθμίζουν τον άξονα υπόφυσης-όρχεως και αυτών που μεταβάλλονται ως απάντηση στη λειτουργία αυτού του άξονα. Οι εξετάσεις μπορούν να πραγματοποιηθούν με τη μέτρηση των αρχικών συγκεντρώσεων των ορμονών ή μετά από διεγέρση της παραγωγής τους (Pagotto, et al., 2017).

Ο ορμονικός έλεγχος είναι αναπόσπαστο κομμάτι της ανδρολογικής εξέτασης και πρέπει να γίνεται όταν δύο αναλύσεις σπέρματος δείχνουν σοβαρή ολιγοζωοσπερμία ή αζωοσπερμία, μειωμένη σεξουαλική λειτουργία ή κλινικά ευρήματα μικρού όρχεως και αλλοιωμένων αρσενικών χαρακτηριστικών (Agarwal, et al., 2021). Ο έλεγχος του ορού για FSH, LH και τεστοστερόνη συμβάλλει στη διαφοροποίηση του υπεργοναδοτροπικού υπογοναδισμού (πρωτοπαθής ανεπάρκεια των όρχεων) από τον υπογοναδοτροπικό υπογοναδισμό (ανεπάρκεια υποθαλάμου-υπόφυσης) (Ghuman & Ramalingam, 2018). Ενώ τα φυσιολογικά επίπεδα της FSH στον ορό δεν εγγυώνται ενεργή σπερματογένεση, ένα αυξημένο ή υψηλό φυσιολογικό επίπεδο FSH είναι ενδεικτικό μιας ανωμαλίας στη σπερματογένεση, όπως ο υπεργοναδοτροπικός υπογοναδισμός (βλ. Πίνακα 2.8.) (Leaver, 2016). Η πολύ χαμηλή FSH και LH μπορεί να οφείλονται σε παθολογία της υπόφυσης ή στο σύνδρομο Kallmann και απαιτεί έγκαιρη παρέμβαση (Pandiyam & Khan, 2017). Για τον ορμονικό έλεγχο συνιστάται η πρωινή συλλογή αίματος λόγω της φυσιολογικής μείωσης των επιπέδων τεστοστερόνης κατά τη διάρκεια της ημέρας (Katz, et al., 2017). Εάν το επίπεδο της τεστοστερόνης είναι χαμηλό, τότε θα πρέπει να επαναληφθεί η μέτρηση της ολικής και της ελεύθερης τεστοστερόνης.

Πίνακας 2.8. Επίδραση ορμονολογικών διαταραχών στην ανδρική υπογονιμότητα.				
Κλινική κατάσταση	FSH	LH	Τεστοστερόνη	Προλακτίνη
Υπογοναδοτροπικός υπογοναδισμός	↓	↓	↓	κ.φ.
Διαταραγμένη σπερματογένεση	↑/ κ.φ.	κ.φ.	κ.φ.	κ.φ.
Πλήρης ανεπάρκεια όρχεων/ Υπεργοναδοτροπικός υπογοναδισμός	↑	↑	κ.φ. /↓	κ.φ.
Υποφυσιακός όγκος που εκκρίνει PRL	κ.φ. /↓	κ.φ. /↓	↓	↑

Επιπλέον ορμόνες που μπορούν να προσδιοριστούν είναι η προλακτίνη (PRL) όταν η αναπαραγωγική διαταραχή περιλαμβάνει χαμηλή ερωτική διέγερση, η οιστραδιόλη όταν συνυπάρχει ηπατική ανεπάρκεια ή γυναικομαστία και η οιστραδιόλη μαζί με ανθρώπινη χοριακή γοναδοτροπίνη (hCG) όταν υπάρχει υποψία όγκου όρχεως (Casapueva, et al., 2006). Η αξιολόγηση των οιστρογόνων θα πρέπει επίσης να πραγματοποιείται σε παχύσαρκους υπογόνιμους άνδρες ή σε αυτούς με συμπτώματα που υποδηλώνουν υπεριοιστρογονισμό (Swerdlhoff, et al., 1991). Οι παχύσαρκοι άνδρες έχουν αυξημένη δραστηριότητα της αρωματάσης, ενός ενζύμου που βρίσκεται στο λιπώδη ιστό και μετατρέπει την τεστοστερόνη σε οιστρογόνα (Agarwal, et al, 2021).

Κεφάλαιο 3 : Γονιδιακή Θεραπεία

3.1. Ιστορική αναδρομή

Η έννοια της επεξεργασίας των γονιδίων έχει διερευνηθεί πριν από πολύ καιρό, με το πρώτο παράδειγμα γονιδιακής τροποποίησης να αναδεικνύεται από τον μετασχηματισμό βακτηρίων τη δεκαετία του 1970 (Cohen, et al., 1973). Έπειτα, ακολούθησε η επιτυχής μεταφορά γονιδίων σε άλλους οργανισμούς, συμπεριλαμβανομένων των θηλαστικών. Η πρώτη πραγματοποιήθηκε το 1974, σε ένα πείραμα που απέδειξε την ενσωμάτωση και την παραμονή του DNA του πολυόμα ιού SV40 στο DNA υγιούς ενήλικου ποντικού μετά από μικροέγχυση στην βλαστοκύστη (Jaenisch & Mintz, 1974). Η εισαγωγή τεχνολογιών γενετικής τροποποίησης, όπως η εξάλειψη γονιδίων (knock out) με ομόλογο ανασυνδυασμό σε εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα (Embryonic Stem Cells, ES) και η ανάπτυξη του συστήματος τοπειδικού ανασυνδυασμού Cre/Lox επέτρεψε την πειραματική διερεύνηση της λειτουργίας χιλιάδων γονιδίων (Sauer, 1987; Sauer & Henderson, 1988). Αυτές οι προσεγγίσεις επέτρεψαν τον χειρισμό των γονιδίων με πολλούς διαφορετικούς τρόπους, σε συγκεκριμένα ή πολλαπλά συστήματα οργάνων καθ' όλη τη διάρκεια ζωής των οργανισμών.

Η γονιδιακή θεραπεία είναι μια από τις νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις που αναδύθηκε από αυτήν την επανάσταση της μοριακής βιολογίας και της βιοτεχνολογίας (Anderson, et al., 1998). Το 1990 ξεκίνησε η πρώτη γονιδιακή θεραπεία σε παιδί που έπασχε από σοβαρή συνδυασμένη ανοσοανεπάρκεια της απομινάσης αδενοσίνης (ADA-SCID) και ολοκληρώθηκε επιτυχώς το 1995 (Blaese, et al., 1995). Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε η επεξεργασία των αυτόλογων T-λεμφοκυττάρων *ex vivo* και η ενσωμάτωση του γονιδίου ADA με τη χρήση ρετροϊού και έπειτα μεταγγίσθηκαν ξανά στον οργανισμό (Blaese, et al., 1995).

Η πρώτη σαφής επιτυχία δημοσιεύτηκε το 2000, περιγράφοντας τη θεραπεία ασθενών με X-φυλοσύνδετη συνδυασμένη ανοσοανεπάρκεια (SCID-X1) μέσω τροποποίησης των αυτόλογων αιμοποιητικών κυττάρων (HSPC), με τη χρήση παρόμοιας τεχνολογίας ρετροϊών (Cavazzana-Calvo, et al., 2000). Οι προσπάθειες για την ανάπτυξη θεραπειών με ενσωματωμένους φορείς στέφθηκαν τελικά με επιτυχία το 2016, όταν το φάρμακο Strimvelis εγκρίθηκε στην Ευρώπη για τη θεραπεία ασθενών με ADA-SCID, για τους

οποίους δεν υπήρχε διαθέσιμος κατάλληλος δότης βλαστοκυττάρων (South, et al., 2019). Συνεπώς, ήταν η πρώτη αυτόλογη ex vivo γονιδιακή θεραπεία βλαστοκυττάρων (Athanasopoulos, et al., 2017).

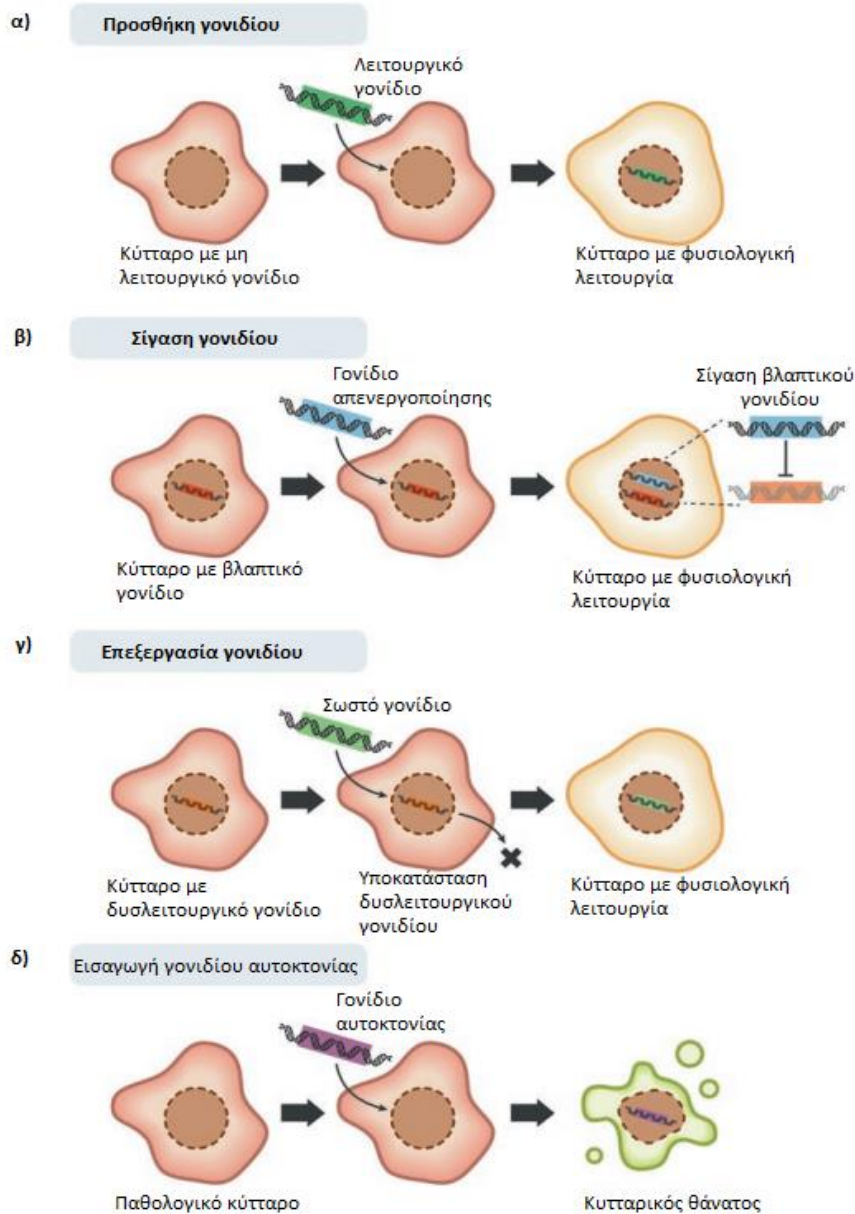
3.2. Τεχνικές γονιδιακής θεραπείας

Η γονιδιακή θεραπεία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία ασθενειών που προκαλούνται από μεταλλάξεις στο DNA, σε κληρονομικές διαταραχές, καρκίνο, καθώς και για μολυσματικές ασθένειες (Gurta, et al., 2017). Τυπικά περιλαμβάνει την εισαγωγή ενός λειτουργικού γονιδίου στα κύτταρα για τη διόρθωση μιας κυτταρικής δυσλειτουργίας ή για την παροχή μιας νέας κυτταρικής λειτουργίας (Culver, 1994). Η αρχή της γονιδιακής θεραπείας αφορά την επιλεκτική θεραπεία προσβεβλημένων κυττάρων και ιστών και τη μακροχρόνια δράση μετά την πρώτη εφαρμογή (Gurta, et al., 2017).

Η πιο απλή μορφή της αφορά την μακροπρόθεσμη έκφραση του φυσιολογικού αντιγράφου ενός μεταλλαγμένου γονιδίου που θα μπορούσε να αναστρέψει τον φαινότυπο της νόσου και επομένως το μόνο υλικό προς μεταφορά είναι το φυσιολογικό γονίδιο. Αυτή η προσέγγιση ονομάζεται γονιδιακή θεραπεία ενίσχυσης και θεωρείται ιδανική για τη θεραπεία ασθενειών προκαλούμενων από μονογονιδιακή μετάλλαξη, που οδηγεί σε δυσλειτουργία ή ανεπάρκεια της προκύπτουσας πρωτεΐνης (Kaufmann, et al., 2013). Ωστόσο, από μια πιο πρακτική άποψη, η επιτυχία εξαρτάται από τουλάχιστον δύο παράγοντες, (i) τα επίπεδα της φυσιολογικής πρωτεΐνης που παράγεται από το εισαγόμενο γονίδιο, καθώς πρέπει να είναι επαρκή και φυσιολογικά, και (ii) αν η πάθηση είναι ακόμη σε αναστρέψιμη κατάσταση (Nóbrega, et al., 2020). Αυτός ο τύπος γονιδιακής θεραπείας χρησιμοποιήθηκε στην πρώτη κλινική δοκιμή γονιδιακής θεραπείας για την ADA-SCID, αλλά θα μπορούσε επίσης να είναι αποτελεσματική για τύπους σοβαρής συνδυασμένης ανοσοανεπάρκειας ή για την κυστική ίνωση (Nóbrega, et al., 2020).

Από την άλλη, για μερικές ασθένειες η αποκατάσταση της φυσιολογικής πρωτεϊνικής λειτουργίας δεν είναι αρκετή για την επιδιόρθωση του μεταλλαγμένου φαινοτύπου και θα πρέπει να ανασταλεί η έκφραση του μεταλλαγμένου αλληλομόρφου (Dunbar, et al., 2018). Αυτή η μέθοδος, ονομάζεται επίσης θεραπεία γονιδιακής σίγασης ή απενεργοποίησης και θα ήταν κατάλληλη για επικρατείς νόσους, ορισμένους τύπους καρκίνου ή ορισμένες μολυσματικές ασθένειες (Βλ. Εικόνα 3.1.) (Nussbaum, et al., 2007). Στην

περίπτωση των επικρατών νόσων, η εισαγωγή ενός γονιδίου θα μπορούσε να αναστείλει την έκφραση του μεταλλαγμένου γονιδίου ή να παρεμποδίσει τη δραστηριότητα της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης. Αυτή η προσέγγιση έγινε εφικτή με την ανακάλυψη των μικρών παρεμβαλλόμενων μορίων RNA (RNAi) (Fire, et al., 1998). Τα RNAi ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων μέσω μικρών δίκλωνων παρεμβατικών μορίων RNA (small interfering RNA,



Εικόνα 3.1. Μέθοδοι γονιδιακής θεραπείας. (α) Προσθήκη λειτουργικού γονιδίου για την αντιστάθμιση μετάλλαξης. (β) Σίγαση έκφρασης μεταλλαγμένου γονιδίου. (γ) Επεξεργασία γονιδιώματος και διόρθωση γονιδίου. (δ) Εισαγωγή τοξικού γονιδίου για τη θανάτωση του παθολογικού κυττάρου (Nóbrega, et al., 2020).

siRNA) που είναι συμπληρωματικά με το mRNA (Renneberg, et al., 2020). Η ανακάλυψη των RNAi πρόσφερε την ευκαιρία να χρησιμοποιηθεί ο ενδογενής κυτταρικός μηχανισμός για τον έλεγχο της έκφρασης μη φυσιολογικών γονιδίων (Chakraborty, et al., 2017). Επίσης δυνατή είναι η χρήση τεχνικών επεξεργασίας του γονιδιώματος για τη διόρθωση ενός μεταλλαγμένου γονιδίου στην ακριβή του θέση μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού, μαζί με πρότυπο DNA του δότη ή μέσω επεξεργασίας της αλληλουχίας των βάσεων (Komor, et al., 2016).

Οι υπάρχουσες τεχνολογίες γενετικής επεξεργασίας χρησιμοποιούν νουκλεάσες για να κόψουν τους κλώνους του DNA, να διεγείρουν τις οδούς επιδιόρθωσης του και για να πραγματοποιήσουν τις επιθυμητές αλλαγές της αλληλουχίας (Anzalone, et al., 2020). Ενώ οι κλινικές δοκιμασίες αυτών των τεχνολογιών ξεκίνησα πρόσφατα, ήδη αναπτύσσονται επιπλέον νέες τεχνολογίες επόμενης γενιάς, οι οποίες βελτιώνουν την ειδικότητα, την ακρίβεια και την αποτελεσματικότητα για περισσότερες κατηγορίες ασθενειών (Pickar-Oliver & Gersbach, 2019). Για παράδειγμα, οι εφευρέσεις της επεξεργασίας αζωτούχων βάσεων (base editing) και της πρωτεύουσας επεξεργασίας (prime editing) επέτρεψαν την ακριβή αλλαγή των αλληλουχιών, δίχως θραύσεις του DNA και χωρίς την εξάρτηση από τη δραστηριότητα των ενδογενών οδών επιδιόρθωσης του DNA (Bulaklak & Gersbach, 2020).

Οι τεχνικές που αναφέρονται παραπάνω (βλ. Εικόνα 3.1.) στοχεύουν στην αποκατάσταση της κυτταρικής ομοιόστασης, αναστρέφοντας τις γενετικές ανωμαλίες. Ωστόσο, σε ορισμένους τύπους ασθενειών όπως ο καρκίνος, ο στόχος είναι η θανάτωση των ελαττωματικών κυττάρων (Nóbrega, et al., 2020). Η γονιδιακή θεραπεία μπορεί επίσης να εφαρμοστεί σε αυτό το πλαίσιο, χρησιμοποιώντας ένα διαγονίδιο που κωδικοποιεί μια εξαιρετικά τοξική πρωτεΐνη για τα παθολογικά κύτταρα ή μια πρωτεΐνη που επισημαίνει το κύτταρο ως στόχο για το ανοσοποιητικό σύστημα (Bonini, et al., 2007). Αυτός ο τύπος γονιδιακής θεραπείας πραγματοποιείται με την εισαγωγή γονιδίου αυτοκτονίας (suicide gene therapy) (Bonini, et al., 2007).

3.2.1. Προϋποθέσεις εφαρμογής

Η αναγνώριση των γονιδίων που ευθύνονται για μια γενετική ασθένεια είναι σημαντική και μπορεί να γίνει με τον εντοπισμό των γενετικών τόπων στο ανθρώπινο γονιδίωμα και πραγματοποιείται με ανάλυση σύνδεσης (linkage analysis) ή κλωνοποίηση θέσης (positi-

onal cloning) (Dunbar, et al., 2018). Εξίσου σημαντική είναι η γνώση του παθοφυσιολογικού μηχανισμού για την επακόλουθη διαδικασία διόρθωσης της βλάβης αλλά και την αξιολόγηση της δυνατότητας θεραπείας της φαινοτυπικής ανωμαλίας (Nussbaum, et al., 2007). Η επιλογή του κυττάρου-στόχου αφορά τον χρόνο ημιζωής του, το καλό δυναμικό πολλαπλασιασμού και τη δυνατότητα *ex vivo* καλλιέργειας (Nussbaum, et al., 2007). Επίσης απαραίτητα είναι η εύρεση κατάλληλων συστημάτων παράδοσης γονιδίων (υικοί και μη υικοί φορείς), η απόδειξη της αρχής της αποτελεσματικότητας και της ασφάλειας σε προκλινικά μοντέλα και η εξασφάλιση κατάλληλων διαδικασιών παραγωγής και ανάλυσης, για την παροχή καλά καθορισμένων προϊόντων γονιδιακής θεραπείας για κλινικές έρευνες (Rubanyí, 2001).

3.2.2. Κύτταρα-στόχοι

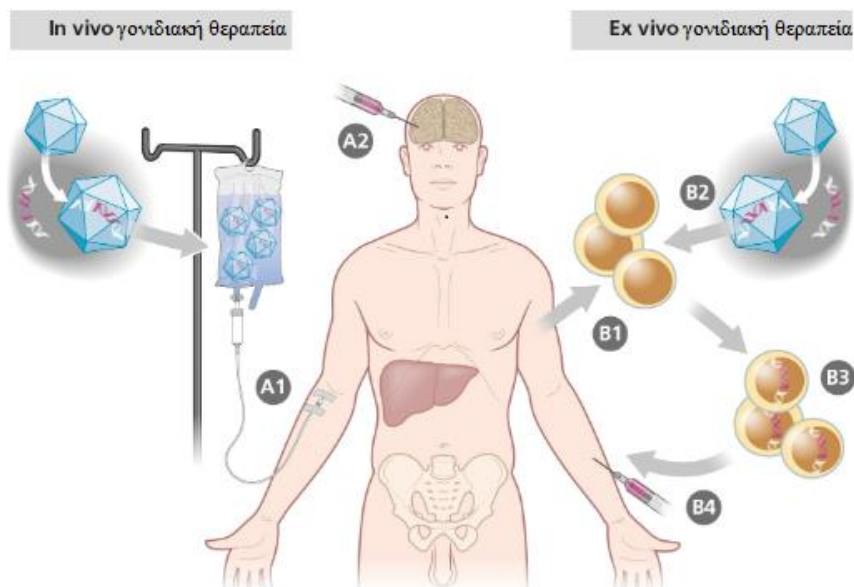
Η γονιδιακή θεραπεία μπορεί να εφαρμοστεί σε διαφορετικά κύτταρα-στόχους, τα οποία ανήκουν σε δύο μεγάλες κατηγορίες, τα γεννητικά και τα σωματικά (Gonçalves & Paiva, 2017). Στα γεννητικά κύτταρα ανήκουν το σπερματοζώαριο, τα σπερματογόνια και το ωάριο, τα οποία τροποποιούνται με την εισαγωγή λειτουργικών γονιδίων, που ακολούθως ενσωματώνονται στο γονιδίωμα (Mathews & Curiel, 2007). Ως εκ τούτου, οι αλλαγές που πραγματοποιούνται σε αυτά τα κύτταρα είναι κληρονομικές και μεταφέρονται στις επόμενες γενιές. Αυτή η προσέγγιση μπορεί να είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική στη θεραπεία γενετικών και κληρονομικών διαταραχών, όμως, γενικά δεν εφαρμόζεται για λόγους ασφάλειας, ηθικής και τεχνικών απαιτήσεων (Rohini, 2014).

Αντιθέτως, η γονιδιακή θεραπεία των σωματικών κυττάρων περιλαμβάνει την εισαγωγή ενός πλήρως λειτουργικού και εκφραζόμενου γονιδίου για τη διόρθωση της γενετικής νόσου (Gurta, et al., 2017). Οποιαδήποτε τροποποίηση και επίπτωση της θεραπείας των σωματικών κυττάρων περιορίζεται στον εκάστοτε ασθενή και δεν μεταβιβάζεται στους απογόνους ή σε επόμενες γενιές (Bank, 1996).

3.2.3. *In vivo* μεταφορά έναντι *ex vivo*

Η ενδοσωματική (*in vivo*) γονιδιακή θεραπεία λαμβάνει χώρα απευθείας στον παθολογικό ιστό του οργανισμού. Αφού ενσωματωθεί σε κάποιον φορέα, το γονίδιο εγχέεται στον προσβεβλημένο ιστό, όργανο ή στην κυκλοφορία του αίματος (Βλ. Εικόνα 3.2.) (Rohini, 2014). Στην *in vivo* εφαρμογή, απαιτείται ο φορέας να εντοπίσει και να συνδεθεί στα κα-

τάλληλα παθολογικά κύτταρα χωρίς αυτό, ωστόσο, να επιτυγχάνεται συχνά. Οι ενδοσωματικές προσεγγίσεις εξαρτώνται από τη προσβασιμότητα του ιστού ή του κυττάρου (Bosch, 2016). Αρκετοί ιστοί είναι δύσκολο να προσεγγιστούν ή να μετασχηματιστούν in vivo σε σημαντικό βαθμό. Για παράδειγμα, είναι δύσκολο να επιτευχθεί ευρεία μεταφορά γονιδίων στον εγκέφαλο, στους χόνδρους, στον συνδετικό ιστό ή στα οστά. Σε αυτές τις περιπτώσεις, η γονιδιακή θεραπεία περιορίζεται αναγκαστικά στη χορήγηση του θεραπευτικού γονιδίου μόνο σε συγκεκριμένες περιοχές (Giacca, 2010). Μετά την χορήγηση in vivo, το γονίδιο μπορεί να εισέλθει σε κύτταρα διαφορετικά από τους επιθυμητούς στόχους, προκαλώντας έτσι ανεπιθύμητα αποτελέσματα (Dunbar, et al., 2018). Επίσης, σε περίπτωση χρήσης φορέα για την παράδοση του γονιδίου, ενδέχεται να υποβληθεί σε αδρανοποίηση ή να προκαλέσει την ανοσοαπόκριση του οργανισμού (Gupta, et al., 2017). Τα περισσότερα κύτταρα στο σώμα μας, συμπεριλαμβανομένων των καρδιακών, των νευρώνων, των ενδοθηλιακών και των ηπατοκυττάρων, είναι μετα-μιτωτικά ή σε φάση ηρεμίας (Giacca, 2010). Συνεπώς, περιορίζεται η επιλογή ορισμένων φορέων, όπως εκείνων που βασίζονται σε γαμμαρετροϊούς, οι οποίοι απαιτούν από τα κύτταρα-στόχους να βρίσκονται σε φάση αντιγραφής (Keeler, et al., 2017).



Εικόνα 3.2. In vivo και ex vivo γονιδιακή θεραπεία. A1: ο ιικός φορέας μεταφέρεται στο κυκλοφορικό σύστημα (ενδοφλέβια). A2: ενδοπαρεγχυματική μεταφορά. B1: απομόνωση κυττάρων ασθενή. B2: χρήση ιικών φορέων, B3: ενσωμάτωση του θεραπευτικού γονιδίου στους φορείς. B4: Μεταφορά των διαμολυσμένων κυττάρων πίσω στον οργανισμό του ασθενή (Herzog & Popplewell, 2020).

Στην εξωσωματική (ex vivo) εφαρμογή της γονιδιακής θεραπείας, η βιοψία του ασθενούς υποβάλλεται σε γενετική επεξεργασία έξω από το σώμα και στη συνέχεια τα κύτταρα επαναχορηγούνται στον οργανισμό (Bosch, 2016). Σημαντικό πλεονέκτημα αυτής της διαδικασίας είναι ότι μόνο τα κύτταρα της βιοψίας έρχονται σε επαφή με τον φορέα μεταφοράς (Βλ. Εικόνα 3.2.). Επιπλέον, οι συνθήκες της κυτταροκαλλιέργειας ευνοούν την πιο αποτελεσματική μεταφορά των γονιδίων, συγκριτικά με αυτή in vivo (Nóbrega, et al., 2020). Σε ορισμένες περιπτώσεις είναι δυνατό να επεκταθούν τα κύτταρα στη βιοψία και να δημιουργηθεί μια δεξαμενή γενετικά τροποποιημένων κυττάρων, τα οποία μπορούν να εφαρμοστούν εκ νέου στον ασθενή όποτε χρειαστεί (Bosch, 2016). Οι τύποι κυττάρων που μπορούν να αξιοποιηθούν για την ex vivo γονιδιακή επεξεργασία, έχουν αυξηθεί τα τελευταία χρόνια και περιλαμβάνουν, εκτός από λεμφοκύτταρα και αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα, βλαστοκύτταρα διαφορετικής προέλευσης, κερατινοκύτταρα, δορυφόρα κύτταρα και ηπατοκύτταρα (Giacca, 2010).

Τα κύρια μειονεκτήματα της ex vivo προσέγγισης είναι η πολυπλοκότητα, το μεγάλο κόστος και χρονική απαίτηση. Από την άλλη, ελαχιστοποιείται η πιθανότητα ανοσοαπόκρισης έναντι του φορέα, που μπορεί να εξουδετερώσει το ξένο γονίδιο (Giacca, 2010). Όμως, η διαδικασία είναι σημαντικά πιο επίπονη και δαπανηρή από τη μεταφορά γονιδίων in vivo και πρέπει να εξατομικεύεται για κάθε ασθενή (Kaufmann, et al., 2013).

3.3. Συστήματα μεταφοράς γενετικού υλικού

Η μεταφορά εξωγενούς γενετικού υλικού σε ένα κύτταρο ή ιστό δεν είναι μια απλή ή εύκολη διαδικασία, καθώς οι οργανισμοί έχουν διάφορες στρατηγικές και φραγμούς για να την αποτρέψουν (Gonçalves & Paiva, 2017). Έτσι, ένα από τα κύρια ζητήματα που πρέπει να ληφθούν υπόψη σε μια μέθοδο γονιδιακής θεραπείας είναι ο τρόπος χορήγησης της θεραπευτικής αλληλουχίας, δηλαδή η επιλογή του καταλληλότερο φορέα παράδοσης (Rohini, 2014). Τα συστήματα παράδοσης διακρίνονται στα ιικά και τα μη ιικά (Nóbrega, et al., 2020). Τα ιικά συστήματα επωφελούνται από την ευρεία ποικιλία των ιών και την έμφυτη ικανότητά τους να μολύνουν τα κύτταρα. Το βασικό πλεονέκτημα αυτών των συστημάτων είναι η υψηλή τους απόδοση, ενώ το κύριο μειονέκτημα είναι η αμφίβολη ασφάλεια χορήγησης τροποποιημένων ιών (Lundstrom & Boulikas, 2003). Από την άλλη

πλευρά, τα μη ιικά συστήματα περιλαμβάνουν διάφορες χημικές ή φυσικές μεθόδους, οι οποίες είναι πιο ασφαλείς αλλά έχουν χαμηλότερη απόδοση (Jiao, et al., 2020). Η επιλογή του σωστού ή ιδανικού συστήματος παράδοσης για δεδομένη γονιδιακή θεραπεία εξαρτάται από διάφορες μεταβλητές, όπως το μέγεθος του γονιδίου, το αναμενόμενο αποτέλεσμα και την ενδεχόμενη τοξικότητα (Gardlík, et al., 2005).

Εκτός από την επιλογή του συστήματος παράδοσης, αναγκαία είναι η επιλογή του κατάλληλου θεραπευτικού γονιδίου. Υπάρχει ένα μεγάλο φάσμα νουκλεϊκών οξέων με θεραπευτική λειτουργία, το οποίο περιλαμβάνει γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες ή cDNA και μια ευρεία σειρά μικρών, μη κωδικοποιητικών νουκλεϊκών οξέων, μεταξύ των οποίων είναι τα συμπληρωματικά ολιγονουκλεοτίδια, τα ριβοένζυμα, τα siRNAs, το RNA και τα απταμερή (Giacca, 2010).

Μια εναλλακτική επιλογή θεραπευτικού γονιδίου είναι το mRNA (Yin, et al., 2014). Αν και το mRNA είναι λιγότερο σταθερό από το DNA, έχει μειωμένη ανοσογονικότητα (Ginn, et al., 2013). Επιπλέον, δεν υπάρχει πιθανότητα μεταλλαξιγένεσης, που προκύπτει από τη γονιδιωματική ενσωμάτωση, και το mRNA δεν απαιτεί την ενσωμάτωση στον πυρήνα για να εκφραστεί (Kay, 2011).

Τα συνθετικά siRNA είναι χημικά συντιθέμενα δίκλινα RNA με δομές που μιμούνται τα προϊόντα διάσπασης του ενζύμου Dicer (Yin, et al., 2014). Κατά την εισαγωγή στο κυτταρόπλασμα, τα συνθετικά siRNA ενσωματώνονται στον μηχανισμό των παρεμβατικών RNA (RNAi) με τον ίδιο τρόπο όπως τα ενδογενή μικρά RNA (Whitehead, et al., 2009). Το μεγάλο θεραπευτικό δυναμικό του siRNA είναι αποτέλεσμα της ικανότητάς σίγασης σχεδόν οποιουδήποτε στοχευόμενου γονιδίου μετά την εισαγωγή του στα κύτταρα (Whitehead, et al., 2009). Όμως, το μεγαλύτερο εμπόδιο για τη θεραπευτική χρήση του siRNA είναι η αποκλειστική παράδοση in vivo (Kanasty, et al., 2012).

3.3.1. Νουκλεϊκά οξέα

Το γυμνό DNA ή σπανιότερα το RNA, είναι ένας κοινός μη ικός φορέας λόγω της εγγενούς απλότητάς του, καθώς μπορεί να αναπτυχθεί εύκολα σε βακτήρια και ο χειρισμός του απαιτεί τυπικές τεχνικές ανασυνδυασμένου DNA. Εμφανίζει πολύ μικρή διασπορά και επιμόλυνση μετά τον μετάδοση και μπορεί να επαναχορηγηθεί πολλές φορές, χωρίς να προκαλέσει ανοσολογική απόκριση εναντίον του, δηλαδή δεν δημιουργούνται αντισώματα αντι-DNA (Li & Huang, 2006). Για την παράδοση των νουκλεϊκών οξέων χρησιμο-

ποιείται συζνά η υδροδυναμική έγχυση λόγω της απλότητας και της υψηλής απόδοσης της. Με τη χρήση αυτής της μεθόδου, το DNA εξαναγκάζεται στην κυκλοφορία του αίματος και στη συνέχεια στα εσωτερικά όργανα, αν και είναι πιο αποτελεσματικό για το ήπαρ (Niidome & Huang, 2002).

Ωστόσο, η ταχεία αποικοδόμηση από τις νουκλεάσες και η κάθαρση από το σύστημα μονοπύρηνων φαγοκυττάρων μειώνουν την αναποτελεσματικότητα της *in vivo* έγχυσης του γυμνού DNA (Dubensky & , 2003). Για να ξεπεραστεί αυτό, ένας αριθμός φορέων έχουν αναπτυχθεί και τροποποιηθεί για να διευκολύνουν τη μεταφορά γονιδίων στα κύτταρα-στόχους μειώνοντας την αποικοδόμηση τους από τις νουκλεάσες (Ye, et al., 2008).

3.3.2. Χημικοί φορείς

Οι χημικοί φορείς ταξινομούνται στα ανόργανα, τα λιπιδικά, τα βασισμένα σε πολυμερή και τα πεπτιδικά σωματίδια. Γενικά κατηγοριοποιούνται σε φορείς που σχηματίζουν πυκνό σύμπλοκο με θεραπευτικό γονίδιο για την προστασία τους από νουκλεάσες και άλλα συστατικά του αίματος και σε φορείς που έχουν σχεδιαστεί για να στοχεύουν συγκεκριμένα κύτταρα και το κυτταρόπλασμα ή πυρήνα (Jin, et al., 2014). Επίσης, μερικοί έχουν σχεδιαστεί για την αποσπώνται από DNA/RNA στα λυσοσώματα και μερικοί είναι υπεύθυνοι για την παρατεταμένη ή την ελεγχόμενη απελευθέρωση του θεραπευτικού γονιδίου στον ιστό.

Ανόργανα σωματίδια

Είναι γενικά νανοσωματίδια που μπορούν να κατασκευαστούν σε ποικίλα μεγέθη και σχήματα προκειμένου να διαφύγουν από το δικτυοενδοθηλιακό σύστημα ή να προστατεύσουν ένα παγιδευμένο μόριο από την αποικοδόμηση (Al Dosari & Gao, 2009). Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν το θεικό ασβέστιο, το πυρίτιο, ο χρυσός, οι μαγνητικές ενώσεις, οι κβαντικές κουκκίδες, οι νανοσωλήνες άνθρακα και τα φουλερένια (Buck, et al., 2012).

Λιπιδικά Συστήματα

Υπάρχουν τρεις κύριοι φορείς που βασίζονται σε λιπίδια και χρησιμοποιούνται για τη γονιδιακή θεραπεία. Αυτοί περιλαμβάνουν τα λιποσώματα, τα συστήματα μίμησης λιποπρωτεϊνών υψηλής πυκνότητας (HDL) και τα μικροκυστίδια, τα οποία απαρτίζονται

από τα εξωσώματα (Ramamoorth & Narvekar, 2015). Η φαρμακολογική επίδραση των νουκλεϊκών οξέων που μεταφέρονται σε αυτά τα συστήματα εξαρτάται από τη φαρμακοκινητική, τη βιοκατανομή και χαρακτηριστικά απελευθέρωσης αυτών των φορέων (Jones, et al., 2013).

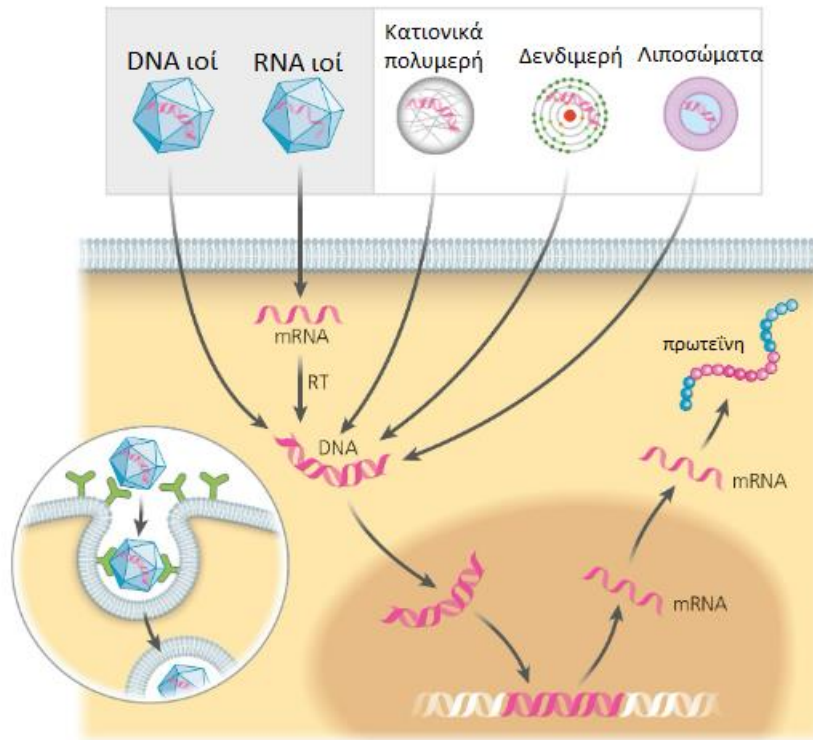
Τα λιποσώματα είναι μικρο- ή νανοσωματίδια που αποτελούνται από μία ή περισσότερες λιπιδικές διπλοστοιβάδες και περιέχουν υδατικό πυρήνα. Αρχικά, στη δεκαετία του 1970, αυτά τα συστήματα μεταφοράς εισήχθησαν ως παράγοντες απελευθέρωσης φαρμάκων και πλέον έχουν προσαρμοστεί για μεταφορά νουκλεϊκών οξέων (Lasic, 1998). Η απόδοσή τους ως φορείς μεταφοράς εξαρτάται από τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά, όπως η λιπιδική σύνθεση, το μέγεθος και το καθαρό φορτίο, τη δυνατότητα φόρτωσης και τη σταθερότητα (Drummond, et al., 2008). Υπάρχουν διάφοροι τύποι λιποσωμάτων, με διαφορετικά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά και κατά συνέπεια διαφορετική καταλληλότητα για κάθε χρήση. Μερικά παραδείγματα είναι τα κατιονικά λιποσώματα και τα λιποσώματα «Δούρειου ίππου» (Nóbrega, et al., 2020).

Τα κατιονικά λιποσώματα είναι θετικά φορτισμένα και έτσι συνδέονται αυθόρμητα με τα αρνητικά φορτισμένα νουκλεϊκά οξέα μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων (Ramamoorth & Narvekar, 2015). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την παγίδευση των μεγάλων μορίων νουκλεϊκού οξέος σε μικρότερα λιποσυμπλέγματα (lipoplex), τα οποία αποτελούν σύμπλοκα λιποσώματος και νουκλεϊκών οξέων (Morille, et al., 2008). Τα κατιονικά λιποσώματα μεσολαβούν επιτυχώς στην παράδοση των νουκλεϊκών οξέων *in vitro* καθώς διαμορφώνονται έτσι ώστε να παρουσιάζουν ένα καθαρό θετικό φορτίο, το οποίο πυροδοτεί τη ένωση τους με τις αρνητικά φορτισμένες κυτταρικές μεμβράνες (βλ. Εικόνα 3.3) (Al Dosari & Gao, 2009).

Τα λιποσώματα μακράς κυκλοφορίας ονομάζονται συχνά λιποσώματα «Δούρειου ίππου», δεδομένης της ικανότητάς τους να αποφεύγουν το ανοσοποιητικό σύστημα και να παραμένουν στην κυκλοφορία του αίματος για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Συχνά, πραγματοποιείται τροποποίηση της επιφάνειάς τους εισάγοντας υδρόφιλα πολυμερή, όπως το PEG, προκειμένου να αυξηθεί περαιτέρω η παραμονή τους στο κυκλοφορικό σύστημα (Nóbrega, et al., 2020).

Επιπρόσθετα, τα HDL είναι ενδογενή σωματίδια, βιοδιασπώμενα, δεν προκαλούν ανοσολογική απόκριση και δεν απομακρύνονται από την κυκλοφορία μέσω του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος, χαρακτηριστικά που τα καθιστούν σημαντικούς και χρή-

σιμους φορείς (Rensen, et al., 2001). Τα HDL μπορούν να τροποποιηθούν προκειμένου να μεταφέρουν αποτελεσματικά τα νουκλεϊκά οξέα σε συγκεκριμένο κυτταρικό πληθυσμό αποφεύγοντας το ανοσοποιητικό σύστημα (Damiano, et al., 2013).



Εικόνα 3.3. Φορείς παράδοσης DNA. Τα μη ιικά συστήματα μεταφοράς περιλαμβάνουν την ενσωμάτωση του DNA π.χ. σε λιποσώματα, κατιονικά πολυμερή και δένδριμια, τα οποία επιτρέπουν την ενδοκυττάρωση του αρνητικά φορτισμένου DNA μέσω της αρνητικά φορτισμένης κυτταρικής μεμβράνης. Ανάλογα με τον μηχανισμό εισόδου, ο μη ιικός φορέας μπορεί να μεταφερθεί σε ενδοσώματα, πριν την πρόσληψη του DNA από τον πυρήνα, και έπειτα να αποικοδομηθεί από τις νουκλεάσες του λυσοσώματος. Μόλις εισέλθει στον πυρήνα, το DNA μεταγράφεται για την τελική έκφραση της πρωτεΐνης. Ενώ η παράδοση μέσω ικών φορέων είναι παρόμοια, η ενδοκυττάρωση προκαλείται από υποδοχείς του κυττάρου. Στην περίπτωση των ρετροϊικών ή λεντιϊκών φορέων, το RNA απελευθερώνεται και μεταγράφεται αντίστροφα στο κυτταρόπλασμα χρησιμοποιώντας την ιική αντίστροφη μεταγραφάση (RT), για τη δημιουργία διανοϊδικού DNA (Herzog & Porplewell, 2020).

Τα μικροκυστίδια ή εξωσώματα παράγονται από σχεδόν όλους τους κυτταρικούς τύπους και απελευθερώνονται στον εξωκυτταρικό χώρο με σκοπό να δράσουν ως φορείς διακυτταρικής επικοινωνίας. Έτσι, προάγουν τη μεταφορά διάφορων μορίων μεταξύ διαφορετικών κυττάρων, σε μεγάλες αποστάσεις (Nóbrega, et al., 2020). Εφόσον το μέγεθός τους επιτρέπει μια λογική μεταφορά φορτίου μεταξύ των κυττάρων, επακόλουθη είναι η διερεύνηση αυτών των κυστιδίων ως παράγοντες χορήγησης φαρμάκων και νουκλεϊκών οξέων (Ferguson & Nguyen, 2016).

Πολυμερή

Τα πολυμερή είναι ουσίες των οποίων οι μοριακές δομές αποτελούνται από μεγάλο αριθμό επαναλαμβανόμενων μονάδων συνδεδεμένων μεταξύ τους. Τα συστήματα πολυμερών μπορούν να υποδιαιρεθούν σε δύο ομάδες, (α) τα φυσικά πολυμερή, όπως ο πολυσακχαρίτης χιτοζάνη, οι πρωτεΐνες και τα πεπτίδια, και (β) τα συνθετικά πολυμερή, όπως κυκλοδεξτρίνες και η πολυαιθυλενιμίνη (Mendonca, et al., 2012). Τα συνθετικά κατιονικά πολυμερή χρησιμοποιούνται συχνότερα στη γονιδιακή θεραπεία, λόγω της αλληλεπίδρασής τους με τα αρνητικά φορτισμένα νουκλεϊκά οξέα, που προέρχονται από τα πολυσυμπλέγματα (polyplex) (Nóbrega, et al., 2020). Με αυτό τον τρόπο, είναι ικανά να προστατεύουν το φορτίο και επιτρέπουν την ενδοκυτταρική παράδοση του (Thomas & Klibanov, 2003). Άλλα φυσικά και συνθετικά πολυμερή που χρησιμοποιούνται στην παράδοση γονιδίων είναι η β-κυκλοδεξτρίνη, η δεξτράνη και τα δενδριμερή (El-Say & El-Sawy, 2017).

Πεπτιδικής βάσης

Οι φορείς που βασίζονται σε πεπτίδια θεωρούνται πλεονεκτικοί έναντι άλλων μη ικών φορέων λόγω του ισχυρού δεσμού που προστατεύει το DNA, του ειδικού υποδοχέα για το κύτταρο-στόχο και της δυνατότητας διαταραχή της ενδοσωματικής μεμβράνης για την παράδοση γενετικού φορτίου στον πυρήνα (Ramamoorth & Narvekar, 2015). Τα κατιονικά πεπτίδια είναι πλούσια σε βασικά κατάλοιπα όπως η λυσίνη και η αργινίνη (Al Dosari & Gao, 2009). Η σύνδεση των πεπτιδίων στα πολυσυμπλέγματα ή τα λιποσυμπλέγματα επιτρέπει στον φορέα να προσδεθεί στον συγκεκριμένο στόχο. Για τη μεταφορά του γονιδίου στον πυρήνα, λαμβάνεται μια μικρή πεπτιδική αλληλουχία από ική πρωτεΐνη ώστε να παρέχει σήμα πυρηνικού εντοπισμού (Jones, et al., 2013) Δεδομένων αυτών των πλεονεκτημάτων, τα πεπτίδια χρησιμοποιούνται συχνά για την ενίσχυση της λειτουργικότητας των κατιονικών λιποσυμπλεγμάτων ή πολυσυμπλεγμάτων (Al Dosari & Gao, 2009).

3.3.3. Φυσικοί φορείς

Ηλεκτροδιάτρηση

Η μέθοδος αποτελείται από την εφαρμογή μιας σειράς ηλεκτρικών παλμών προκειμένου να προκληθεί προσωρινή και αναστρέψιμη αύξηση της διαπερατότητας της μεμβρά-

νης και έτσι να επιτραπεί η είσοδος μεγάλων, φορτισμένων μακρομορίων, συμπεριλαμβανομένου του πλασμιδικού DNA (Shirley, et al., 2013). Για την εκκένωση του ηλεκτρικού παλμού, δύο ηλεκτρόδια τοποθετούνται πλευρικά της θέσης εμβολιασμού του διαλύματος που περιέχει τα νουκλεϊκά οξέα (Wells, 2004). Ο ηλεκτρικός παλμός προκαλεί το σχηματισμό υδρόφιλων πόρων στην κυτταρική μεμβράνη και την επακόλουθη παθητική διέλευση του DNA μέσω αυτών των πόρων χάρη σε ένα τοπικό ηλεκτροφορητικό αποτέλεσμα (Shirley, et al., 2013). Στο τέλος του ερεθίσματος, η μεμβράνη αποκτά ξανά τις κανονικές της ιδιότητες. Οι κύριοι περιορισμοί αυτής της τεχνικής είναι η σημαντική κυτταρική βλάβη και η επακόλουθη κυτταροτοξικότητα που προκαλείται, καθώς και η περιορισμένη *in vivo* εφαρμογή σε τοπικές περιοχές (Lambrecht, et al., 2016).

Μικροέγχυση

Η μικροέγχυση συνιστά την άμεση μεταφορά του γενετικού υλικού στο εσωτερικό του κυττάρου. Γενικά, το διάλυμα με το γενετικό υλικό τοποθετείται σε ένα γυάλινο μικροσιφώνιο με ρύγχος διαμέτρου λιγότερο από 0,5 μm προγεμίζεται και έπειτα εισάγεται στο κύτταρο στόχο, υπό παρατήρηση στο μικροσκόπιο (Nóbrega, et al., 2020).

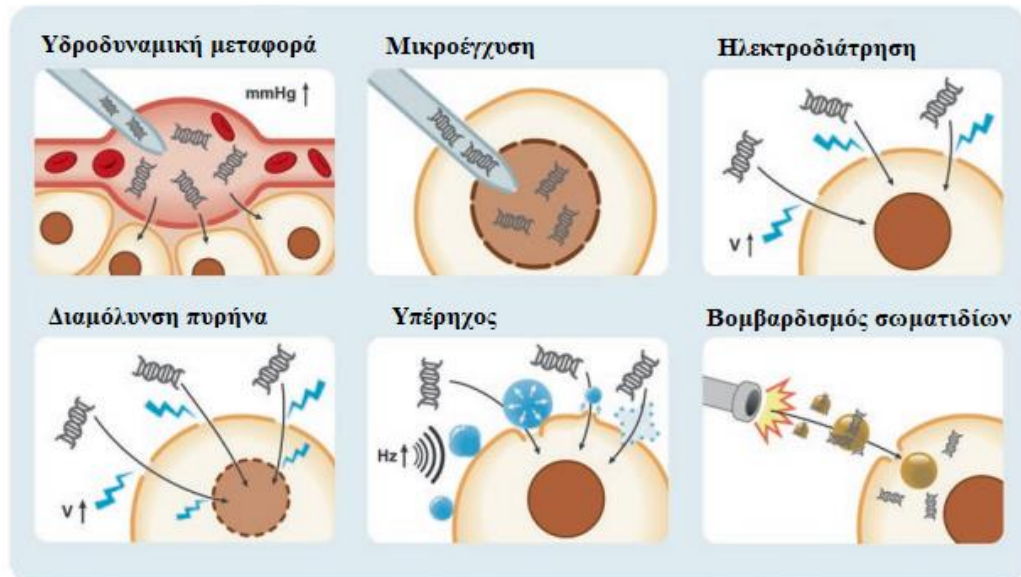
Γονιδιακό πιστόλι

Ο βομβαρδισμός σωματιδίων ή αλλιώς το «γονιδιακό πιστόλι» (gene gun) είναι μέθοδος μεταφοράς γενετικού υλικού που εφαρμόστηκε αρχικά σε φυτά (Ramamoorth & Narvekar, 2015). Η μέθοδος βασίζεται στην αρχή της μεταφοράς DNA, επικαλυμμένο με σωματίδια βαρέων μετάλλων, προς τον ιστό-στόχο με μια ορισμένη ταχύτητα ΙΒλ. Εικόνα 3.4.) (Al Dosari & Gao, 2009). Το κύριο πλεονέκτημα της είναι η ακριβής μεταφορά των απαιτούμενων δόσεων DNA. Χρησιμοποιείται πιο συχνά στην έρευνα της γονιδιακής θεραπείας για τον καρκίνο των ωοθηκών (Li & Huang, 2006).

Υδροδυναμική

Η τεχνική της υδροδυναμικής διαμόλυνσης βασίζεται στην ενίσχυση της πίεσης που ασκείται σε έναν ιστό προκειμένου να αυξηθεί η διαπερατότητα του (Huang, et al., 2017). Γενικά, αυτό πραγματοποιείται μέσω της ταχείας μεταφοράς μεγάλου όγκου διαλύματος DNA στην κυκλοφορία του αίματος (Βλ. Εικόνα 3.3.) (Herweiger & Wolff, 2006). Αυτή η άμεση αύξηση του όγκου του αίματος οδηγεί στην επίσης ταχεία αύξηση της φλεβικής ή

αρτηριακής πίεσης. Αυτή η αύξηση της υδροστατικής πίεσης προκαλεί παροδικό σχηματισμό πόρων στα αιμοφόρα αγγεία και ως εκ τούτου ενισχύει τη διαπερατότητα του ιστού (Huang, et al., 2017).



Εικόνα 3.4. Φυσικές μέθοδοι μεταφοράς γενετικού υλικού. Διατίθενται διάφορες φυσικές μέθοδοι, συγκεκριμένα, (i) υδροδυναμική μεταφορά που χρησιμοποιεί υδροστατική ενίσχυση της πίεσης για μεγέθυνση των πόρων και κατά συνέπεια τη διαπερατότητα του ιστού. (ii) Μικροέγχυση, άμεση μεταφορά γενετικού υλικού στο εσωτερικό του κυττάρου. (iii) Ηλεκτροδιάτρηση και διαμόλυνση πυρήνα, η μεταφορά γενετικού υλικού διευκολύνεται από ηλεκτρικούς παλμούς που προκαλούν παροδικούς πόρους στην κυτταρική μεμβράνη και/ή στον πυρηνικό φάκελο. (iv) Υπέρηχος, σχηματισμός παροδικών πόρων κυτταρικής μεμβράνης. (v) Βομβαρδισμός με επιταχυνόμενο νουκλειϊκό οξύ, επικαλυπτόμενο με μεταλλικά νανοσωματίδια (Nóbrega, et al., 2020).

Υπέρηχος (Sonoporation)

Είναι μια μη επεμβατική τεχνική διαμόλυνσης που χρησιμοποιεί υπερηχητικά κύματα για την προσωρινή διάτρηση της κυτταρικής μεμβράνης ώστε να επιτρέψει την κυτταρική πρόσληψη του DNA (Newman & Bettinger, 2007). Το γενετικό υλικό ενσωματώνεται σε μικροφουσαλίδες και χορηγείται στη συστηματική κυκλοφορία. Ακολουθεί εξωτερική εφαρμογή υπερήχων. Το υπερηχητικό κύμα δημιουργεί πόρους στη μικροφουσαλίδα μέσα στη μικροκυκλοφορία του ιστού στόχου, που έχουν ως αποτέλεσμα την στοχευμένη εναπόθεση του θεραπευτικού γονιδίου (Delalande, et al., 2012).

3.3.4. Ιικοί φορείς

Οι ιικοί φορείς είναι γενετικά τροποποιημένοι ιοί που έχουν μειωμένη παθογένεια αλλά διατηρούν την ικανότητα να μολύνουν κύτταρα (Nóbrega, et al., 2020). Συνήθως αποτελούνται από ένα τροποποιημένο ιικό γονιδίωμα, με ελάχιστη ποσότητα γενετικού υλικού

από τον άγριου τύπου (wild type, wt) ιό, εντός κάψας (Choi & Samulski, 2010). Οι ιικοί φορείς τυπικά περιέχουν ισχυρούς υποκινητές για την υποστήριξη υψηλού επιπέδου έκφρασης διαγονιδίων. Οι φορείς DNA μπορούν επίσης να περιλαμβάνουν ειδικούς για τους ιστούς υποκινητές ώστε να αποκλείσουν την έκφραση σε μη ειδικά κύτταρα (Chen, et al., 2018). Επίσης, υπάρχει η δυνατότητα εισαγωγής ειδικών αλληλουχιών αναγνώρισης στις επιφανειακές δομές του περιβλήματος του ιού για να καταστεί δυνατή η μόλυνση συγκεκριμένων κυττάρων ή ιστών (Lundstrom & Boulikas, 2003).

Πέντε κατηγορίες ιικών φορέων βρίσκονται επί του παρόντος σε προχωρημένο στάδιο κλινικών δοκιμών για ανθρώπινη γονιδιακή θεραπεία. Αυτές περιλαμβάνουν ιούς που προέρχονται από την οικογένεια Retroviridae (ρετροϊοί και λεντιοί), αδενοϊούς, αδενο-σχετιζόμενους ιούς (adeno-associated viruses, AAVs) και ερπητοϊούς (Lundstrom & Boulikas, 2003). Άλλοι ιοί, όπως αυτοί της δαμαλίτιδας, οι ιοί που ανήκουν στα γένη spumavirus και alpharetrovirus της οικογένειας Retroviridae, και ιοί RNA όπως ο ιός του δάσους Semliki θεωρούνται επίσης δυνητικά αποδοτικοί για τη θεραπευτική μεταφορά γονιδίων, ωστόσο η χρήση τους περιορίζεται για τα εμβόλια ή χρειάζονται ακόμη τεράστια προκλινική ανάπτυξη και επικύρωση (Giacca, 2010).

Ωστόσο, τα ζητήματα ασφάλειας αποτελούν σημαντικό παράγοντα στην ανάπτυξη και χρήση ιικών φορέων. Για αυτό, αναπτύχθηκαν διάφορες τεχνικές για τη βελτίωση της ασφάλειας των ιικών φορέων, χωρίς να διακυβεύεται η αποτελεσματικότητά τους. Αυτές αφορούν την αποφυγή της αναπαραγωγής τους, την αδρανοποίηση τους και την ελαχιστοποίηση της φυσικής τους τοξικότητας (Nóbrega, et al., 2020). Τα πλεονεκτήματα των ιικών φορέων αποτελούν η αποτελεσματικότητά τους και το ευρύ φάσμα των υπαρχόντων ιών, οι οποίοι έχουν διαφορετικά χαρακτηριστικά, όπως ο τύπος γενετικού υλικού, ο φυσικός τροπισμός και το μέγεθος, που παρέχουν μια τεράστια ποικιλία συστημάτων για τη μεταφορά γονιδίων (Gardlík, et al., 2005). Από την άλλη πλευρά, εκτός από τις ανησυχίες περί της ασφάλειας τους στη γονιδιακή θεραπεία, οι ιικοί φορείς έχουν και άλλα μειονεκτήματα, όπως η περιορισμένη ικανότητα κλωνοποίησης (Rohini, 2014).

Αδενοϊοί

Οι αδενοϊοί ήταν από τους πρώτους ιούς που μελετήθηκαν διεξοδικά και προτάθηκαν για χρήση στη γονιδιακή θεραπεία πριν από περισσότερα από 20 χρόνια (Quantin, et al.,

1992). Οι αδενοϊοί είναι ιοί χωρίς περίβλημα, με γονιδίωμα δίκλωνου DNA περίπου 35 kb. Μολύνουν την αναπνευστική οδό στο φυσιολογικό πληθυσμό και προκαλούν τη λοίμωξη του ανώτερου αναπνευστικού, αλλά τα αποτελέσματά τους είναι αυτοπεριοριζόμενα (Khan, 2016). Για να χρησιμοποιηθούν ως φορείς για τη γονιδιακή θεραπεία, οι αδενοϊοί εξασθενούνται με την έλλειψη ενός θραύσματος γονιδιώματος που κωδικοποιεί πρώιμες πρωτεΐνες (Lukashev & Zamiatnin, 2016) .

Οι αδενοϊκοί φορείς θεωρούνται οι πιο ευέλικτοι και εύκολα χειραγωγήσιμοι ιικοί φορείς για την μεταφορά γονιδίων (Khan, 2016). Αρχικά, δεν προκαλούν ογκογένεση, είναι σχετικά εύκολοι στην καλλιέργεια και μπορούν να αναπτυχθούν σε μεγάλες ποσότητες (Giacca, 2010). Επίσης, ο κύκλος ζωής, η βιολογία και οι λειτουργίες τους είναι καλά κατανοητές. Πραγματοποιούν μια εξαιρετικά αποτελεσματική μεταφορά μεγάλων ενθεμάτων, μεγέθους έως 30-35 kb (Rohini, 2014).

Οι περισσότεροι ιστοί που υποβάλλονται σε γονιδιακή θεραπεία με αδενοϊκό φορέα, εμφανίζουν παροδική διαγονιδιακή έκφραση. Επομένως, δεν θα ήταν κατάλληλος για τη θεραπεία μόνιμων γενετικών διαταραχών, ωστόσο, η παροδική έκφραση είναι ευνοϊκή για τη θεραπεία καταστάσεων όπως ο καρκίνος και δυσλειτουργικών γεννητικών κυττάρων (Darbey & Smith, 2018). Για τη γονιδιακή θεραπεία του καρκίνου με χρήση αδενοϊών έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορα πρωτόκολλα, τα οποία περιλαμβάνουν την ανοσοθεραπεία, τη χρήση προφαρμάκων και τη γονιδιακή αντικατάσταση (Gardlík, et al., 2005). Αυτές οι διαδικασίες χρησιμοποιούνται συχνά σε συνδυασμό με την χημειοθεραπεία (Khan, 2016).

Ωστόσο, το κύριο μειονέκτημα του αδενοϊκού φορέα είναι η πρόκληση ειδικής και φυσικής ανοσολογικής απόκρισης λόγω της συστημικής απελευθέρωσής του, δημιουργώντας έτσι βλάβη στον ιστό και την απομάκρυνση των μολυσμένων κυττάρων από μακροφάγα (Gilgenkrantz, et al., 1995). Αυτό απαγορεύει τη χρήση του φορέα για την καθιέρωση μακροπρόθεσμης διαγονιδιακής έκφρασης για μακροχρόνια θεραπεία (Choi & Samulski, 2010).

Αδενο-σχετιζόμενοι ιοί

Οι αδενο-σχετιζόμενοι ιοί (AVVs) χρησιμοποιούνται όλο και περισσότερο για την κλινική μεταφορά γονιδίων και έχουν αξιοσημείωτα αποτελέσματα. Οι AAV είναι παρβοϊοί με μικρά (5 kb), γραμμικά μονόκλινα μόρια DNA που κωδικοποιούν μόνο δύο γονιδιακά

προϊόντα (Rohini, 2014). Η ονομασία του ιού σχετίζεται με την απαραίτητη συνμόλυνση των κυττάρων με τον αδενοϊό (Khan, 2016).

Οι AAVs δεν σχετίζονται με κάποια ανθρώπινη ασθένεια και ο μολυσμένος ξενιστής δεν παράγει αντισώματα ή φλεγμονώδη απόκριση εναντίον του (Khan, 2016). Προσβάλλουν, όμως, ένα ευρύ φάσμα ζώων, εφόσον υπάρχει ο κατάλληλος βοηθητικός ιός, επομένως μπορεί να καλλιεργηθεί σε πολλούς τύπους ζωικών κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων αυτών των ποντικών ή των πιθήκων (Rohini, 2014). Επίσης, μπορεί να εισέλθει σε διαιρούμενα και μη διαιρούμενα κύτταρα πολλών διαφορετικών ιστών, σε αντίθεση με τον αδενοϊό (Gardlík, et al., 2005). Το ασυνήθιστα μικρό μέγεθος του ιού επιτρέπει την αποτελεσματική διείσδυση σε πολλά κύτταρα του σώματος (Chen, et al., 2018). Ο AAV ενσωματώνει το DNA του σε μια συγκεκριμένη θέση στο γονιδίωμα των ζωικών κυττάρων (AAV S1 του χρωμοσώματος 19 στους ανθρώπους) και έτσι ευνοείται η μόνιμη ενσωμάτωση του θεραπευτικού γονιδίου (Rohini, 2014).

Τα μειονεκτήματά του περιλαμβάνουν την περιορισμένη χωρητικότητα διαγονιδίου, καθώς δεν μπορούν να φέρουν ενθέματα > 5kb και χρειάζονται δύο φορείς ταυτόχρονα για την κατάλληλη έκφραση του διαγονιδίου (Hirsch, et al., 2016). Επιπλέον, ο μικρός κύκλος ζωής του ιού συνεπάγεται με την σταδιακή ελάττωση του αριθμού του γονιδιώματος του που υπάρχει στα διαιρούμενα κύτταρα του ξενιστή και συνεπώς τη μείωση των επιπέδων των διαγονιδίων (Lukashev & Zamyatnin, 2016). Για το λόγο αυτό, οι AAVs προτιμώνται για την επιμόλυνση βραδέως διαιρούμενων κυττάρων, όπως τα μυοκύτταρα και τα καρδιομυοκύτταρα (Giacca, 2010).

Ρετροϊοί

Ο ρετροϊός αποτελείται από γονιδίωμα μονόκλωνου RNA, μαζί με ένα γονίδιο για την ανάστροφη μεταγραφάση, περιβάλλεται από φάκελο (Choi & Samulski, 2010) και υπήρξε μεταξύ των πρώτων κατασκευασμένων φορέων ανθρώπινης γονιδιακής θεραπείας (Boris-Lawrie & Temin, 1994). Οι ρετροϊοί μπορούν να μεταγράψουν το δικό τους ιικό γενετικό υλικό σε δίκλωνο DNA κατά τη μόλυνση ενός κυττάρου ξενιστή έπειτα από τη σύντηξη της μεμβράνης, μέσω ιικών πρωτεϊνών προσκόλλησης (Gardlík, et al., 2005). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μη αναστρέψιμη σύνδεση του ιού με το κύτταρο ξενιστή (Rohini, 2014). Μετά την παράδοση του ιικού γονιδιώματος στο κύτταρο ξενιστή, το ιικό

DNA ενσωματώνεται στο DNA του ξενιστή, επιτρέποντας στον μηχανισμό του κυττάρου ξενιστή να παράγει οποιοδήποτε συστατικό, απαραίτητο για αντιγραφή (Mali, 2013).

Ο ρετροϊός μολύνει μόνο τα διαιρούμενα κύτταρα, και επομένως χρησιμοποιούνται λιγότερο στη γονιδιακή θεραπεία συγκριτικά με τον λεντιό (Maetzig, et al., 2011). Επίσης, μπορεί να ενσωματώσει το γονιδίωμα του στα χρωμοσώματα του ξενιστή, οδηγώντας στη μακροπρόθεσμη γονιδιακή έκφραση (Gardlík, et al., 2005). Συνεπώς, εμφανίζει πλεονέκτημα στη θεραπεία κληρονομικών και χρόνιων ασθενειών, αλλά από την άλλη ο μηχανισμός ενσωμάτωσης μπορεί να προκαλέσει μεταλλαξιγένεση (Li & Huang, 2006; Scott-Taylor, et al., 1998).

Λεντιοί

Οι λεντιοί είναι RNA ιοί, που ανήκουν στην οικογένεια Retroviridae και χαρακτηρίζονται από τη χρήση της ιικής αντίστροφης μεταγραφάσης (RT) και την ικανότητα να εισάγουν τις γενετικές τους πληροφορίες στο γονιδίωμα του ξενιστή μέσω της δράσης της ιικής ιντεγκράσης (IN) (Sakuma, et al., 2012). Το όνομα του ιού προέρχεται από τη μακρά περίοδο που μεσολαβεί μεταξύ της μόλυνσης και της εμφάνισης της νόσου (Lundstrom & Boulikas, 2003). Σε αντίθεση με άλλους ρετροϊούς, ο λεντιός μπορεί επίσης να αναπαράχθει σε μη διαιρούμενα κύτταρα (Nóbrega, et al., 2020). Πολλοί από τους λεντιικούς φορείς που χρησιμοποιούνται για τη γονιδιακή θεραπεία βασίζονται στους ιούς ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV), ιούς ανοσοανεπάρκειας πιθήκου (SIV) ή ιούς ανοσοανεπάρκειας αιλουροειδών (FIV) (Vigna & Naldini, 2000).

Τα συστήματα μεταφοράς μέσω των λεντιών εξασφαλίζουν τη μακροχρόνια έκφραση και την αποτελεσματική μεταφορά χωρίς εμφάνιση φλεγμονωδών αποκρίσεων (Quinonez & Sutton, 2002). Οι φορείς αυτοί έχουν αποδειχθεί αποτελεσματικοί για την μόλυνση κυττάρων του λεμφικού, του αιμοποιητικού και του νευρικού συστήματος (Kafri, et al., 1997). Ωστόσο, παρά την υψηλή ασφάλεια, οι λεντιικοί φορείς δεν μπορούν να αποκλείσουν την πιθανότητα ογκογένεσης (Lukashev & Zamyatnin, 2016).

Ιός του απλού έρπητα-1 (HSV-1)

Ο ιός του απλού έρπητα-1 (HSV-1) είναι ένας ανθρώπινος νευροτρόπος φορέας που διαθέτει δίκλωνο DNA, αντιγράφεται στον πυρήνα των μολυσμένων κυττάρων και μπορεί να μολύνει τόσο διαιρούμενα όσο και μη διαιρούμενα κύτταρα (Khan, 2016). Ο ιός χρησι-

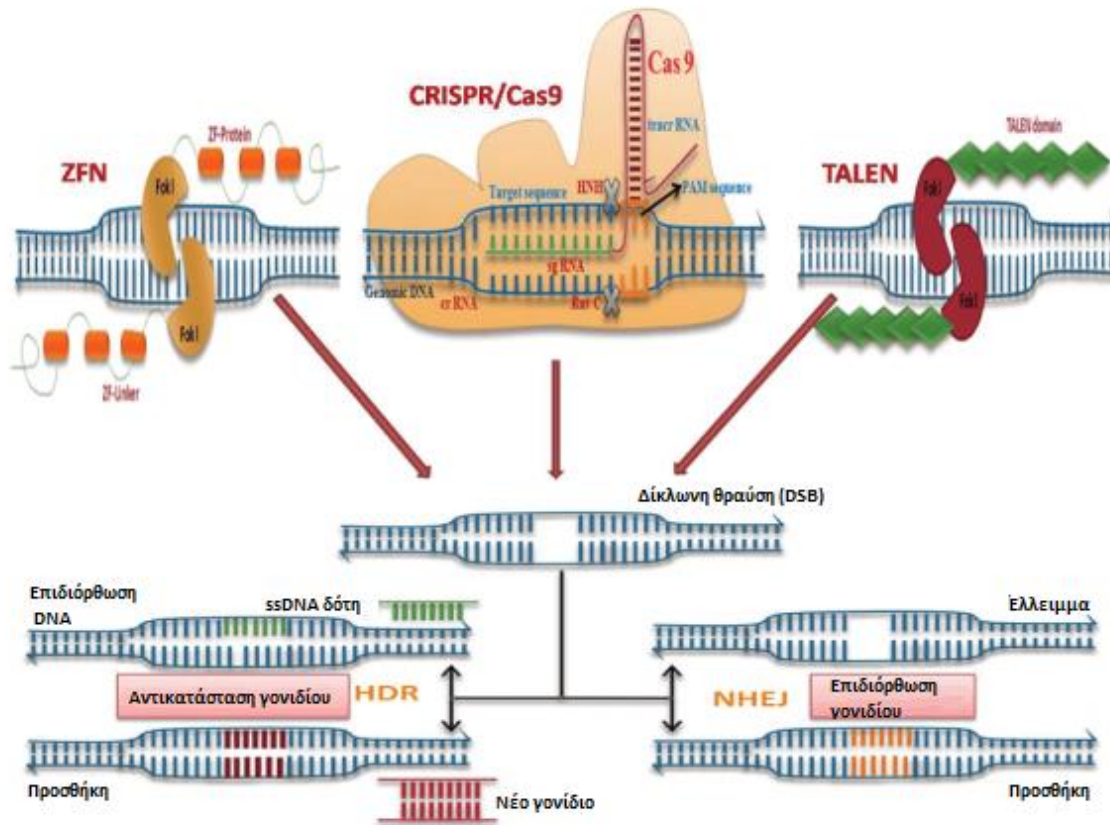
μπορείται συχνά ως φορέας για τη μεταφορά γονιδίων στο νευρικό σύστημα, καθώς μολύνει νευρώνες και μπορεί να εισέλθει σε έναν λυτικό κύκλο ζωής ή σε μια λανθάνουσα κατάσταση. (Khan, 2016). Άλλα πλεονεκτήματα περιλαμβάνουν τη μεγάλη ικανότητα κλωνοποίησης και τον μειωμένο κίνδυνο μεταλλαξιγένεσης, καθώς ο HSV δεν ενσωματώνεται στο γονιδίωμα του ξενιστή (Nóbrega, et al., 2020).

Το γονιδίωμα του ιού μπορεί να εισαχθεί με μια μεγάλη αλληλουχία DNA με ομόλογο ανασυνδυασμό. Ωστόσο, αυτός ο ιικός φορέας έχει αρκετά μειονεκτήματα, αρχικά, είναι δύσκολο να ληφθούν παρασκευάσματα που είναι εντελώς ελαττωματικά στην αντιγραφή και ο τροποποιημένος φορέας δημιουργεί ανοσοαπόκριση και αντισώματα ειδικά για τον HSV-1 (Khan, 2016). Συνεπώς, η υψηλή κυτταροτοξικότητα που σχετίζεται με τον HSV και η διέγερση μιας ισχυρής ανοσολογικής απόκρισης είναι σημαντικά μειονεκτήματα για τη χρήση του στη γονιδιακή θεραπεία (Nóbrega, et al., 2020). Παρόλα αυτά, ο φορέας HSV θεωρείται ότι είναι ένας από τους πιο αποτελεσματικούς φορείς για τη γονιδιακή θεραπεία του καρκίνου (Carter, 2005).

3.4. Εργαλεία επεξεργασίας γονιδίων

Παράλληλα με την ανάπτυξη ενός ευρέος φάσματος φορέων για την παράδοση DNA, έχουν σημειωθεί βασικές εξελίξεις στην τεχνολογία επεξεργασίας γονιδίων καθιστώντας την ως πιθανή μέθοδο γονιδιακής θεραπείας (Bulaklak & Gersbach, 2020). Οι τρεις πιο κοινές νουκλεάσες που χρησιμοποιούνται για την επεξεργασία γονιδίων είναι οι νουκλεάσες δακτύλων ψευδαργύρου (zinc finger nucleases, **ZFN**), οι νουκλεάσες που μοιάζουν με μεταγραφικούς ενεργοποιητές (transcription activator-like effector nucleases, **TALEN**) και οι συστάδες τακτικά διατεταγμένων βραχέων παλινδρομικών επαναληπτικών αλληλουχιών (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR) που σχετίζονται με τη νουκλεάση Cas9 (**CRISPR/Cas9**) (Maeder & Gersbach, 2016). Όλες αυτές αποτελούνται από επεξεργασμένες περιοχές δέσμευσης DNA και είναι ικανές να προκαλέσουν δίκλωνες θραύσεις (Double Strand Breaks, DSB) στο DNA στόχο (Maeder & Gersbach, 2016). Σε αντίθεση με τους ιικούς φορείς, οι οποίοι μπορούν να πραγματοποιήσουν μόνο έναν τύπο γονιδιακής τροποποίησης, τη προσθήκη γονιδίων, οι νέες τεχνολογίες επεξεργασίας του γονιδιώματος μπορούν να μεσολαβήσουν στην προσθήκη, την αφαίρεση και τη διόρθωση γονιδίων και άλλες εξαιρετικά στοχευμένες τροποποιήσεις

του γονιδιώματος στα κύτταρα (Βλ. Εικόνα 3.5.) (Cox, et al., 2015). Η επεξεργασία του γονιδιώματος μπορεί να πραγματοποιηθεί σε κύτταρα *ex vivo* ή ο μηχανισμός επεξεργασίας μπορεί να παραδοθεί *in vivo* για να πραγματοποιηθεί *in situ* επεξεργασία γονιδιώματος (Dunbar, et al., 2018).



Εικόνα 3.5. Επεξεργασία γονιδιώματος μέσω των νουκλεασών ZFN, CRISPR/Cas9 και TALEN. Η δίκλωνη θραύση (DSB) που προκύπτει από τη δράση των ZFN-fok1, TALEN, Cas9-sg RNA μπορεί να επιδιορθωθεί είτε με ομόλογο ανασυνδυασμό (HDR) είτε με την σύνδεση μη ομόλογων άκρων (NHEJ). Η NHEJ είναι αποτελεσματική αλλά επιρρεπής σε σφάλματα, όπως μικρές προσθήκες ή ελλείψεις στο σημείο της θραύσης. Ενώ, η HDR απαιτεί ομόλογο πρότυπο του DNA-δότη για τη διόρθωση μετάλλαξης στη θέση της διάσπασης (Pandey, et al., 2017).

Διάφορες στρατηγικές είναι διαθέσιμες για θεραπευτική γονιδιακή επεξεργασία, οι οποίες περιλαμβάνουν την εξουδετέρωση γονιδίων μέσω σύνδεσης μη ομόλογων ελεύθερων άκρων NHEJ (Non-Homologous End Joining), τη στοχευμένη προσθήκη θεραπευτικών γονιδίων στην κατάλληλη θέση του ανθρώπινου γονιδιώματος για την *in vivo* θεραπεία αντικατάστασης των πρωτεϊνών (In Vivo Protein Replacement Therapy, IVPRT) και τέλος, τη διόρθωση μεταλλάξεων στα γονίδια που προκαλούν τη νόσο (Chandrasegaran, 2017).

Μια στοχευμένη αλλαγή του DNA ξεκινά με τη δημιουργία μιας δίκλωνης θραύσης από την νουκλεάση, η οποία διεγείρει τον εξαιρετικά αποτελεσματικό ανασυνδυασμό των κυττάρων (Rouet, et al., 1994). Η επιδιόρθωση με τη διαμεσολάβηση της NHEJ έχει ως αποτέλεσμα την πρόκληση μεταλλάξεων λόγω των μικρών και τυχαίων ενθέσεων ή ελλείψεων (indels) στη θέση του DSB, η οποία γενικά απενεργοποιεί τη γονιδιακή λειτουργία (Dunbar, et al., 2018).

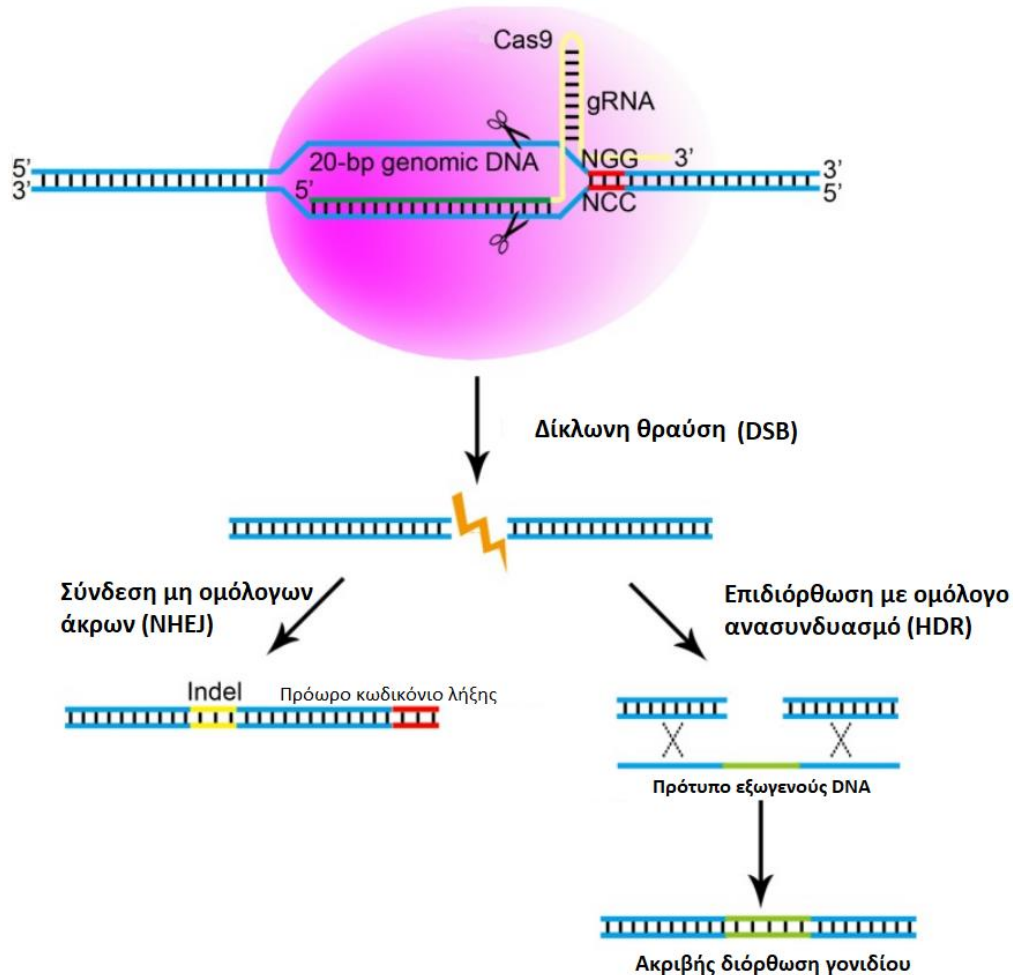
Οι πρώιμες μελέτες σχετικά με την επεξεργασία του γονιδιώματος βασίστηκαν στη χρήση των ZFNs (Urnov, et al., 2010) ή των μεγανουκλεασών (Silva, et al., 2011) για κάθε μεμονωμένο στόχο DNA προκειμένου να επάγουν τις απαιτούμενες DSB. Οι ZFNs μπορούν να απελευθερωθούν από έναν φορέα γονιδιακής θεραπείας για τη διόρθωση κάποιου μεταλλαγμένου γονιδίου του χρωμοσώματος και τελικώς την έκφραση της θεραπευτικής πρωτεΐνης από τα κύτταρα του ξενιστή (Choi & Samulski, 2010). Ωστόσο, αυτές οι νουκλεάσες δεν εμφανίζουν υψηλή εξειδίκευση πρόσδεσης στις αλληλουχίες-στόχους, οπότε απαιτούνται ειδικοί συνδυασμοί των περιοχών δακτύλων ψευδαργύρου, γεγονός που περιορίσει την ευρύτερη χρήση και εφαρμογή τους λόγω της περίπλοκης και δαπανηρής διαδικασίας (Dunbar, et al., 2018).

Η ανακάλυψη των βακτηριακών τελεστών TALEs για τη δέσμευση και αλλοίωση του ξένου DNA, συνέβαλε στη δημιουργία των νουκλεασών που μοιάζουν με μεταγραφικούς ενεργοποιητές (TALENs) (Moscou & Bogdanove, 2009). Αυτά τα ένζυμα μπορούν να διασπάσουν αποτελεσματικά οποιαδήποτε επιθυμητή αλληλουχία DNA (Reyon, et al., 2012). Το απεριόριστο εύρος στόχευσής του και η ευκολία κατασκευής νέων πρωτεϊνών, καθιστούν τις TALEN ελκυστικό εργαλείο για τη στοχευμένη επεξεργασία γονιδίων. Ωστόσο, οι προσεγγίσεις TALEN εξακολουθούν να απαιτούν σχεδιασμό ενός συγκεκριμένου ζεύγους νουκλεασών για κάθε νέο στόχο DNA. (Dunbar, et al., 2018)

Σύστημα CRISPR/Cas9

Το σύστημα CRISPR και οι σχετιζόμενες πρωτεΐνες Cas, προερχόμενα από το προσαρμοστικό ανοσοποιητικό σύστημα των προκαρυωτών, πρωταγωνιστούν από το 2012 ως ένα από τα κύρια βιοτεχνολογικά εργαλεία για την επεξεργασία του γονιδιώματος (Gonçalves & Paiva, 2017). Ο μηχανισμός αναγνωρίζει το ξένο γενετικό υλικό, το διασπά σε μικρά θραύσματα και το ενσωματώνει στο δικό του DNA. Σε μια δεύτερη μόλυνση από τον ίδιο παράγοντα, εμφανίζεται η ακόλουθη διαδικασία· η μεταγραφή της αλλη-

λουχίας σχετιζόμενη με το CRISPR, επεξεργασία του RNAm και δημιουργία μικρών θραυσμάτων RNA (crRNAs) που σχηματίζουν σύμπλοκα με τις πρωτεΐνες Cas, και αυτά αναγνωρίζουν τα ξένα νουκλεϊκά οξέα και τελικά τα καταστρέφουν (Marraffini & Sontheimer, 2010).



Εικόνα 3.6. Σχηματική απεικόνιση δράσης του συστήματος CRISPR-Cas9. Το σύστημα βασίζεται σε ένα RNA-οδηγό (gRNA) που περιέχει ειδική αλληλουχία 20 bp για να καθοδηγήσει την ενδονουκλεάση Cas9 σε μια συμπληρωματική αλληλουχία DNA-στόχου, όπου προκαλεί δίκλωνη θραύση του DNA (DSB). Η αλληλουχία του γονιδιωματικού DNA-στόχου 20 bp πρέπει να αντιπαράλληλη προς μια συγκεκριμένη αλληλουχία (5'-NGG, όπου το N αντιπροσωπεύει ένα τυχαίο νουκλεοτίδιο). Το επαγόμενο από τη Cas9 DSB είναι αντιπαράλληλο του 5'-NGG και επιδιορθώνεται είτε με την σύνδεση των μη ομόλογων άκρων (NHEJ) είτε μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού (HDR). Οι εισαγωγές/ελλείψεις (indels) που προκύπτουν από σφάλματα της NHEJ γύρω από το σημείο DSB, μπορεί να προκαλέσουν απώλεια της γονιδιακής λειτουργίας (knockout), μέσω του σχηματισμού πρόωμου κωδικόνιου λήξης. Από την άλλη, η HDR χρησιμοποιεί πρότυπη αλληλουχία DNA για την ακριβή επιδιόρθωση της DSB (Mulder, et al., 2016).

Με βάση αυτόν τον φυσικό μηχανισμό, αναπτύχθηκε η τεχνική CRISPR που επιτρέπει την επεξεργασία συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA του γονιδιώματος οποιουδήποτε οργανισμού μέσω τριών μορίων, της νουκλεάσης (Cas9), υπεύθυνη για τη διάσπαση του διπλώνου μορίου DNA, ένα οδηγό RNA (gRNA), το οποίο οδηγεί το σύμπλεγμα στον στόχο (βλ. Εικόνα 3.6.) (Jinek, et al., 2012). Λόγω της απλότητας και της ακρίβειάς του σε σύγκριση με τις υπόλοιπες τεχνικές, το σύστημα CRISPR εμφανίζεται ως ένα ευέλικτο εργαλείο που προωθεί τη γενετική επεξεργασία μέσω της αδρανοποίησης (knock-out) των γονιδίων, της ενσωμάτωσης εξωγενών αλληλουχιών (knock-in), και της υποκατάστασης των αλληλομόρφων (Gori, et al., 2015). Η ταχεία πρόοδος αυτής της νέας τεχνολογίας επέτρεψε τη διεξαγωγή δοκιμών σε ανθρώπινα σωματικά κύτταρα, χρησιμοποιώντας το CRISPR για τη γονιδιακή επεξεργασία (Gonçalves & Paiva, 2017).

Αν και οι θεραπείες μέσω του CRISPR/Cas9 βρίσκονται ακόμη σε πρώιμη ανάπτυξη, ορισμένες θεραπευτικές προσεγγίσεις έχουν ήδη προσδιοριστεί για γενετικές ασθένειες και για τη μυϊκή δυστροφία Duchenne (Nelson, et al., 2016). Μία από τις κύριες προκλήσεις είναι η παράδοση των στοιχείων, απαραίτητων για την ολοκλήρωση της διαδικασίας επεξεργασίας. Για αυτό τον σκοπό, έχουν προταθεί ιικοί φορείς όπως ο AAV, αλλά η μακροχρόνια έκφραση του ιικού φορέα αποτελεί μειονέκτημα για την επεξεργασία γονιδιώματος με το σύστημα CRISPR/Cas9, στην οποία είναι απαραίτητη η βραχυπρόθεσμη έκφραση (Keeler, et al., 2017). Αντίθετα, φορείς όπως ο αδενοϊός, οι οποίοι έχουν ισχυρή έκφραση αν και βραχυπρόθεσμα, θα ήταν ιδανικοί σε μη ισχυρές ανοσολογικές αποκρίσεις του ξενιστή (Savić & Schwank, 2016).

Κεφάλαιο 4 : Γονιδιακή Θεραπεία σε υπογόνιμους άνδρες

4.1. Πιθανά υποψήφια γονίδια

Ο αριθμός των μεταλλάξεων που έχουν αποδειχθεί ότι εμπλέκονται στην ανδρική υπογονιμότητα είναι μικρός, ωστόσο παρουσιάζει συνεχή αύξηση με την εφαρμογή της αλληλούχισης νέας γενιάς (Krausz, et al., 2015). Δεδομένης της τρέχουσας προσέγγισης και των γνώσεων σχετικά με τη γονιδιακή θεραπεία, ο αριθμός των πιθανών γονιδίων-στόχων είναι σχετικά περιορισμένος. Παρόλα αυτά, η καλύτερη κατανόηση της γενετικής βάσης για την ανδρική υπογονιμότητα και τα σύγχρονα εργαλεία γονιδιακής θεραπείας συμβάλουν στην συνεχή και ταχεία εξέλιξη (Miyamoto, et al., 2015). Οι πρώιμες δοκιμές γονιδιακής θεραπείας πιθανότατα θα στοχεύουν μεταλλάξεις που ευθύνονται για την μη αποφρακτική αζωοσπερμία (Nonobstructive azoospermia, NOA), καθώς δεν υπάρχουν επί του παρόντος διαθέσιμες επιλογές αναπαραγωγής για τους άνδρες με NOA που επιθυμούν να χρησιμοποιήσουν δικούς τους γαμέτες (Carell, et al., 2020). Επιπλέον, οι διαθέσιμες προσεγγίσεις έχουν περιορισμένη ικανότητά τροποποίησης μεγάλων περιοχών, επομένως οι σημειακές μεταλλάξεις ή οι μικροελλείψεις αποτελούν τους πιο κατάλληλους στόχους. Οι μεταλλάξεις στο Χ ή Υ χρωμόσωμα ή οι σύνθετες ετερόζυγες μεταλλάξεις με υπολειπόμενο χαρακτήρα, θα μπορούσαν να αποτελέσουν πρώιμους υποψήφιους στόχους, καθώς η διόρθωση θα απαιτούσε την τροποποίηση μόνο μιας γονιδιακής θέσης (Carell, et al., 2020).

Ιδανικά, οι επαναλαμβανόμενες μεταλλάξεις θα ήταν πιο αποτελεσματικοί στόχοι, καθώς επιτρέπουν την εφαρμογή θεραπείας σε περισσότερες από μία καταστάσεις. Τέλος, η στόχευση γονιδίων που εκφράζονται μόνο στον όρχι ελαττώνει σε κάποιο βαθμό τον κίνδυνο των απροσδόκητων συνεπειών (Kojima, et al., 2010). Δεδομένων αυτών των απαιτήσεων, δεν υπάρχει ακόμα ιδανικό υποψήφιο γονίδιο για αρχικές μελέτες αλλά μερικά από τα κατάλληλα πρώιμα υποψήφια γονίδια περιλαμβάνουν τα *TEX11*, *SUN5* και *AURKC*, λόγω της συμβολής τους στην ανδρική υπογονιμότητα, της φύσης των μεταλλάξεων τους και της ειδικής έκφρασης τους στους όρχεις (Miyamoto, et al., 2015).

4.1.1. Μεταλλάξεις γονιδίων που προκαλούν μη αποφρακτική αζωοσπερμία

Η μη αποφρακτική αζωοσπερμία αποτελεί μια πολυπαραγοντική γενετική κατάσταση με υποφαινοτύπους, που προκύπτει από πολλαπλές παθολογικές διεργασίες (Krausz & Riera-Escamilla, 2018). Οι μονογονιδιακές μεταλλάξεις, υπεύθυνες για την NOA, αποτελούνται από υψηλή ετερογένεια, δεδομένου του μεγάλου αριθμού γονιδίων που εμπλέκονται στη σπερματογένεση και τη λειτουργία των όρχεων (Βλ. Πίνακα 4.1.) (Soraggi, et al., 2020). Η NOA σχετίζεται με τις κοινές παραλλαγές των γονιδίων *PRMT6*, *PEX10* και *SOX5* (Hu, et al., 2012), τις διαλληλικές υπολειπόμενες παραλλαγές απώλειας λειτουργίας του *FANCM* (Kasak, et al., 2018) και τη παρερμηνευτική μετάλλαξη του *WT1* (Hastie, et al., 2013). Επιπρόσθετες μεταλλάξεις που προκαλούν NOA αφορούν τα γονίδια *TEX11* (Yatsenko, et al., 2015), *DMRT1* (Lopes, et al., 2013), *SRA1* (Kotan, et al., 2016), *SPINK2* (Kherraf, et al., 2017), *MAGEB4* (Okutman, et al., 2017), *TDRD9* (Arafat, et al., 2017), *WNK3*, *NANOS2*, *SPO11* (Fakhro, et al., 2018), *MEIOB*, *DNAH6* και *TEX14* (Gershoni, et al., 2017). Μερικές από τις πιο υποσχόμενες μεταλλάξεις υπεύθυνες για την NOA και την ολιγοζωοσπερμία, για τις οποίες έχουν πραγματοποιηθεί λειτουργικές μελέτες, έχουν εντοπιστεί στα γονίδια *SOHLH1*, *HSF2* (Choi, et al., 2010; Mou, et al., 2013), *NR5A1* και *NANOS1* (Bashamboo, et al., 2010; Kusz-Zamelczyk, et al., 2013).

<i>PRMT6</i>	<i>SRA1</i>	<i>MEIOB</i>
<i>PEX10</i>	<i>SPINK2</i>	<i>DNAH6</i>
<i>SOX5</i>	<i>MAGEB4</i>	<i>TEX14</i>
<i>FANCM</i>	<i>TDRD9</i>	<i>NR5A1</i>
<i>WT1</i>	<i>WNK3</i>	<i>NANOS1</i>
<i>TEX11</i>	<i>NANOS2</i>	<i>NPAS2</i>
<i>DMRT1</i>	<i>SPO11</i>	<i>SYCE1</i>
<i>TEX15</i>	<i>MCM8</i>	<i>SOHLH1</i>

Το γονίδιο *TEX11* είναι το πρώτο και, μέχρι στιγμής, το μοναδικό γονίδιο, του οποίου οι μεταλλάξεις που προκαλούν NOA έχουν επικυρωθεί με την ανακάλυψη διακριτών μεταλλάξεων απώλειας λειτουργίας (loss-of-function, LOF) σε μη συγγενικούς άνδρες (Mitchell, et al., 2017). Το γονίδιο αυτό εδράζεται στο Χ χρωμόσωμα, εκφράζεται στους όρχεις και είναι ζωτικής σημασίας για τη σύναψη των χρωμοσωμάτων και το σχη-

ματισμό διασταυρώσεων κατά τη διάρκεια της μείωσης. Οι υπολειπόμενες μεταλλάξεις σε αυτό το γονίδιο οδηγούν σε μη αποφρακτική αζωοσπερμία (NOA) λόγω διακοπής της ωρίμανσης (Maturation arrest, MA) (Yatsenko, et al., 2015) και οδηγούν σε σχεδόν μηδενική πιθανότητα εύρεσης ώριμων σπερματοζωαρίων στους όρχεις (Krausz & Ciorri, 2021).

Πρόσφατα, η μελέτη συγγενικών οικογενειών αποκάλυψε παραλλαγές, που μπορεί επίσης να οφείλονται για την αυτοσωμική υπολειπόμενη NOA, στα γονίδια *NPAS2* (Ramasamy, et al., 2015), *TEX15* (Okutman, et al., 2015), *SYCE1* (Maor-Sagie, et al., 2015) και *MCM8* (Tenenbaum-Rakover, et al., 2015). Εκ των οποίων, τα τρία τελευταία εκφράζονται κυρίως στον όρχι και η σπάνια ομόζυγη μετάλλαξη LOF, που εντοπίστηκε σε κάθε γονίδιο, είναι μια ισχυρή ένδειξη απενεργοποίησης του γονιδίου σε υπογόνιμους άνδρες (Mitchell, et al., 2017).

4.1.2. Χρωμόσωμα Χ

Πολλά από τα γονίδια που εδράζονται στο Χ χρωμόσωμα αποτελούν υποψήφια αίτια της ανδρικής υπογονιμότητας λόγω της έκφρασης τους στους όρχεις και της αναμενόμενης εμπλοκής τους στη σπερματογένεση (Vockel, et al., 2021). Ο υποδοχέας των ανδρογόνων (AR) συνιστά το καλύτερα μελετημένο Χ-συνδεδεμένο γονίδιο, υπεύθυνο για την ανδρική υπογονιμότητα. Ο AR είναι σημαντικός για διάφορες αναπτυξιακές διεργασίες και γενικά λειτουργεί ως μεταγραφικός παράγοντας που δεσμεύει το DNA (Ferlin, et al., 2006). Τα μεγαλύτερα μήκη επανάληψης των αλληλουχιών CAG μπορεί να είναι παράγοντας κινδύνου για την ανδρική υπογονιμότητα (Davis-Dao, et al., 2007), με μελέτες να υποστηρίζουν την ισχυρή συσχέτιση τους με την ιδιοπαθή ανδρική υπογονιμότητα (Xiao, et al., 2016).

Εκτός από τον AR, επιπρόσθετα Χ-συνδεδεμένα γονίδια πιθανώς σχετίζονται με την ανδρική υπογονιμότητα, συμπεριλαμβανομένων των *ADGRG2* (Yang, et al., 2017), *RHOX* (Borgmann, et al., 2016), *MAGEB4*, *USP26* (Ma, et al., 2016), *TAF7L* (Stouffs, et al., 2006) και *PIH1D3* (Olcese, et al., 2017). Το γονίδιο *USP26* είναι απαραίτητο για τη φυσιολογική μορφογένεση του σπερματοζωαρίου και οι ημιζυγωτικές μεταλλάξεις του μπορούν να προκαλέσουν ασθενοτερατοζωοσπερμία (Liu, et al., 2021). Οι μεταλλάξεις του γονιδίου έχουν εντοπιστεί σε παθήσεις όπως η απλασία του σπερματικού επιθηλίου και η διακοπή της ωρίμανσης (Stouffs, et al., 2006). Οι γενετικοί πολυμορφισμοί επαλήθευ-

σαν περαιτέρω τη συσχέτιση του *USP26* με την ανώμαλη σπερματογένεση, την μη αποφρακτική αζωοσπερμία και την ασθενερατοζωοσπερμία (Paduch, et al., 2005).

Επιπλέον, οι μεταλλάξεις του X-συνδεδεμένου γονιδίου *KAL-1*, συνήθως ενδογονιδιακές ελλείψεις και οι σημειακές μεταλλάξεις, προκαλούν την πάθηση του συνδρόμου Kallmann που τυπικά ορίζεται ως συσχέτιση μεταξύ υπογοναδοτροφικού υπογοναδισμού και ανοσμίας (Hardelin & Dode, 2008). Οι μεταλλάξεις στο *Dax1*, ένα άλλο γονίδιο του χρωμοσώματος X, προκαλούν τον υπογοναδοτροφικό υπογοναδισμό σε συνδυασμό με συγγενή υποπλασία των επινεφριδίων (Maduro & Dolores, 2002). Το *Dax1* κωδικοποιεί έναν μοναδικό υποδοχέα πυρηνικής ορμόνης που έχει κρίσιμο ρόλο στην ανάπτυξη του υποθαλάμου, της υπόφυσης, των επινεφριδίων και των γονάδων (Burris, et al., 1996). Επομένως, συμβάλλει στη διατήρηση της ακεραιότητας του επιθηλίου των όρχεων και της σπερματογένεσης.

Τέλος, οι ημιζυγωτικές μεταλλάξεις πρόωρου τερματισμού (stop-gain) του X-συνδεδεμένου *TENT5D* είναι μια νέα γενετική αιτία της ολιγοασθενερατοζωοσπερμίας (oligoasthenoteratozoospermia, OAT) και παρέχουν πληροφορίες για τον μοριακό μηχανισμό με τον οποίο το γονίδιο λειτουργεί στη διαδικασία της σπερματογένεσης (Cong, et al., 2022). Αν και η ανεπάρκεια του *TENT5D* μπορεί να ευθύνεται για ένα μικρό κλάσμα των περιπτώσεων OAT, τα ευρήματα συνάδουν με την υψηλή γενετική ετερογένεια της ανδρικής υπογονιμότητας (Cong, et al., 2022).

4.1.3. Χρωμόσωμα Y

Είναι πλέον αποδεδειγμένο ότι ο μακρύν βραχίονας του χρωμοσώματος Y απαιτείται για τη σπερματογένεση. Ο μακρύν βραχίονας του χρωμοσώματος περιλαμβάνει τον παράγοντα αζωοσπερμίας και διακρίνεται στις περιοχές AZFa, AZFb και AZFc (Vogt, 2005). Αυτές οι περιοχές περιέχουν πολλαπλά γονίδια που απαιτούνται για διαφορετικά στάδια σπερματογένεσης (Maduro & Dolores, 2002). Στην περιοχή AZFa βρίσκονται τα *USP9Y* και *DBY*, στην AZFb το *RBMY*, ενώ στην AZFc εντοπίζεται το γονίδιο *DAZ* (Reijo, et al., 1995). Η έλλειψη αυτών των περιοχών σχετίζεται με αζωοσπερμία και τη σοβαρή ολιγοζωοσπερμία, που συνήθως εξαρτάται από την διαγραφή του γονιδίου *DAZ* (Maduro & Dolores, 2002). Το γονίδιο *DAZ* είναι απαραίτητο για την ολοκλήρωση της φυσιολογικής σπερματογένεσης και η μετάλλαξη του είναι η πρώτη προσδιοριζόμενη γενετική αιτία για την αζωοσπερμία (Reijo, et al., 1995).

4.1.4. Αυτοσωμικά χρωμοσώματα

Ένα αξιοσημείωτο υποψήφιο γονίδιο, το *MTHFR*, έχει σοβαρή συσχέτιση με την ανδρική στειρότητα καθώς οι μεταλλάξεις του οδηγούν σε ολιγοζωοσπερμία και ολιγοασθενοτερατοζωοσπερμία (Tüttelmann, et al., 2007). Το *MTHFR* βρίσκεται στο χρωμόσωμα 1p.36.22, κωδικοποιεί ένα ένζυμο που παράγει το 5-μεθυλοτετραϋδροφολικό και εμπλέκεται στο μεταβολισμό του φυλλικού οξέος (Krausz, et al., 2015). Το φυλλικό οξύ είναι απαραίτητο για τη διατήρηση της ακεραιότητας του γονιδιώματος λόγω του ρόλου του στη σύνθεση και επιδιόρθωση του DNA και την μεθυλίωση, και η έλλειψη του ενδέχεται να οδηγήσει επίσης σε ανδρική υπογονιμότητα (Krausz, et al., 2015).

Εξίσου σημαντικός είναι ο ινσουλινόμορφος παράγοντας 3 (*INSL3*), γνωστός και ως RLF, μέλος της οικογένειας ορμονών που μοιάζουν με τη ρελαξίνη και παράγεται από τα κύτταρα Leydig (Ferlin, et al., 2006). Οι μεταλλάξεις του *INSL3* και *LGR8* σχετίζονται με την κρυπορχία και οδηγούν σε υποκατάσταση αμινοξέων. Η επικράτηση των μεταλλάξεων συναντάται στο 4-5% των ανδρών με κρυπορχία ή πρώην κρυπορχία (Ferlin & Foresta, 2005). Εκτός από το ρόλο στην κάθοδο των όρχεων και την κρυπορχία, ο *INSL3* έχει πιθανώς σημαντικές αλλά μη αναγνωρισμένες ενδοκρινικές και παρακρινικές δράσεις σε ενήλικες και η ανεπάρκεια αυτής της ορμόνης μπορεί να αντιπροσωπεύει ένα σημαντικό σημάδι λειτουργικού υπογοναδισμού (Ferlin & Foresta, 2005).

Επίσης, το αυτοσωμικό γονίδιο *CFTR*, το οποίο βρίσκεται στο χρωμόσωμα 7, ανευρίσκεται μεταλλαγμένο στο 60-90% των ανδρών με CBAVD (Ferlin, 2007). Οι άνδρες με αυτό το είδος ανωμαλίας μπορεί να έχουν είτε δύο ήπιες μεταλλάξεις στο γονίδιο *CFTR* είτε έναν συνδυασμό ήπιων και σοβαρών μεταλλάξεων (Georgiou, et al., 2006). Το F50del θεωρείται η πιο σοβαρή μετάλλαξη του *CFTR* και εμφανίζεται στο 60-70% των ανδρών με CBAVD (Georgiou, et al., 2006).

Ένα άλλο αυτοσωμικό γονίδιο, το *SUN5* εκφράζεται αποκλειστικά στον όρχι, βρίσκεται στον εσωτερικό πυρηνικό φάκελο του σπερματοζωαρίου και είναι υπεύθυνο για την σύνδεση της κεφαλής του σπέρματος με την ουρά (Zhu, et al., 2016). Μέχρι τώρα, έχουν αναφερθεί σε μελέτες δέκα τύποι μετάλλαξης στο *SUN5* (Sha, et al., 2018). Οι μεταλλάξεις αυτές είναι η κύρια αιτία του συνδρόμου ακέφαλου σπερματοζωαρίου, μιας σπάνιας και σοβαρής μορφής τερατοζωοσπερμίας που χαρακτηρίζεται από την επικράτηση ακέφαλων σπερματοζωαρίων στην εκσπερμάτιση (Xiang, et al., 2022).

Το γονίδιο *AURKC* εκφράζεται επίσης σε μεγάλο βαθμό στον όρχι και πιθανώς εμπλέκεται στην κυτταροκίνηση, τη μίτωση και τη μείωση (Tang, et al., 2006). Μια απλή διαγραφή ενός νουκλεοτιδίου (c.144delC) στην κωδικοποιητική περιοχή *AURKC* οδηγεί σε πρόωρο τερματισμό της μετάφρασης, αποδίδοντας μια πρωτεΐνη χωρίς την περιοχή της κινάσης και επομένως δίχως λειτουργικότητα (Dieterich, et al., 2007; Miyamoto, et al., 2015). Η ομόζυγη μετάλλαξη του *AURKC* αποφέρει έτσι τετραπλοειδή σπερματοζώαρια με μεγάλη κεφαλή, ακατάλληλα για γονιμοποίηση (Khelifa, et al., 2011). Επιπλέον, άλλες αναφερόμενες μεταλλάξεις *AURKC* προκαλούν μακροζωοσπερμία (Khelifa, et al., 2011).

4.2. Υποψήφια κύτταρα

4.2.1. Σπερματογόνια βλαστοκύτταρα

Τα σπερματογόνια βλαστοκύτταρα (Spermatogonial stem cells, SSCs) αποτελούν τα ανώριμα γεννητικά κύτταρα του όρχεως και διαδραματίζουν ουσιαστικό ρόλο στη διατήρηση της παραγωγικής σπερματογένεσης, μέσω της αυτοανανέωσης και της συνεχούς δημιουργίας θυγατρικών σπερματογόνιων, που διαφοροποιούνται σε σπερματοζώαρια, μεταφέροντας γενετικές πληροφορίες στην επόμενη γενιά (Kubota & Brinster, 2006). Επίσης, ως μέρος της βλαστικής σειράς, υπόκεινται σε γρήγορες και άμεσες μεταγραφικές και επιγενετικές αλλαγές κατά την πρώιμη ανάπτυξη του εμβρύου (Hammoud, et al., 2014). Έτσι, τα SSC χρησιμεύουν ως ένα εξαιρετικό ερευνητικό μοντέλο για τη μελέτη του τρόπου με τον οποίο αναπτύσσονται τα βλαστοκύτταρα, αλλά συμβάλλουν επίσης στην καλύτερη κατανόηση και τη θεραπεία της ανδρικής υπογονιμότητας (Carell, et al., 2020).

Η διόρθωση των γενετικών ανωμαλιών στα γεννητικά κύτταρα καθίστανται περίπλοκη, καθώς η διαδικασία της σπερματογένεσης ξεκινά από τα βλαστοκύτταρα. Η επεξεργασία των σπερματογόνιων και η ενσωμάτωση του διαγονιδίου στο γονιδίωμα του ασθενούς, θα προσέφερε μια πιο μόνιμη λύση για την υπογονιμότητα (Boekelheide & Sigman, 2008). Συνεπώς, όλα τα επόμενα σπερματοζώαρια θα έφεραν το διαγονίδιο. Αντιθέτως, η επεξεργασία των σπερματοκυττάρων θα επηρέαζε μόνο την επόμενη γενιά σπερματοζωαρίων, δίχως να ενσωματώνεται το διαγονίδιο στα επόμενα σπερματοζώαρια που προέρχονται από διαφορετικά σπερματοκύτταρα (Boekelheide & Sigman, 2008).

Εάν το διαγονίδιο υπήρχε στα σπερματοκύτταρα, χωρίς την ενσωμάτωση στο γονιδίωμα, δεν μεταφέρεται στους απογόνους.

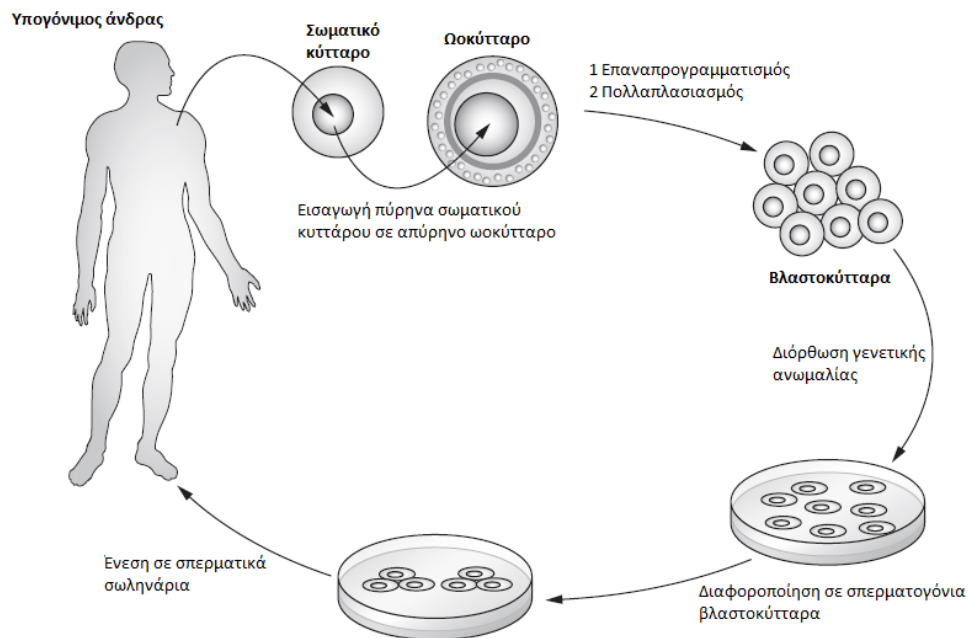
Τα SSC μπορούν να καλλιεργηθούν και να υποβληθούν σε γενετική τροποποίηση για τη διόρθωση των μεταλλαγμένων γονιδίων. Αφού μεταμοσχευθούν ξανά, τα διορθωμένα SSC θα πρέπει να μπορούν να παράγουν φυσιολογικά και λειτουργικά σπερματοζωάρια (Carell, et al., 2020). Η γονιδιακή θεραπεία σε καλλιεργημένα SSCs μπορεί δυνητικά να παρέχει την ευκαιρία σε ασθενείς με NOA, με αναγνωρισμένη σημειακή μετάλλαξη να αποκτήσουν απόγονο χωρίς ανεπιθύμητες γονιδιωματικές αλλαγές (Wang, et al., 2021). Ωστόσο, δεν έχει διερευνηθεί ακόμη η δυνατότητα επίτευξης της συνδυασμένης εφαρμογής της *in vitro* επέκτασης των SSCs με τη γονιδιακή θεραπεία για την αντιμετώπιση της ανδρικής υπογονιμότητας (Wang, et al., 2021). Υπάρχει επίσης η επιλογή της *in vivo* επεξεργασίας αλλά χωρίς τα πλεονεκτήματα της *in vitro* επεξεργασίας, που περιλαμβάνουν την ευελιξία εφαρμογής πολλαπλών τεχνικών και κύκλων, καθώς και την μεγαλύτερη ασφάλεια για τον ασθενή.

Η γονιδιακή θεραπεία σε γεννητικά κύτταρα προς το παρόν απαγορεύεται σύμφωνα με τον νόμο, λόγω ανησυχιών σχετικά με την ασφάλεια και την ηθική μιας τέτοιας προσέγγισης (Porteus & Dann, 2015). Η εφαρμογή της ως μέσο χειρισμού της γονιδιακής έκφρασης στα γεννητικά κύτταρα θα απαιτούσε ένα πολύ διαφορετικό νομικό πλαίσιο από το τρέχον, λαμβάνοντας υπόψη την αποτελεσματικότητα της μεταφοράς γονιδίων, τις πιθανές αλλαγές στην παθολογία των όρχεων που μπορεί να προκληθούν με τη θεραπευτική παρέμβαση, καθώς και τη πιθανή επίδραση της γονιδιακής θεραπείας στους απογόνους (Coward, et al., 2007).

4.2.2. Εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα

Μια εναλλακτική προσέγγιση για τη θεραπεία της υπογονιμότητας αφορά τη χρήση εμβρυϊκών βλαστοκυττάρων και την μεταμόσχευση τους στους όρχεις (Daley, 2007). Θεωρητικά, είναι δυνατή η δημιουργία πολυδύναμων εμβρυϊκών βλαστοκυττάρων από ενήλικα κύτταρα, μεταφέροντας τον πυρήνα των σωματικών κυττάρων του ασθενούς σε απύρηνο ωκύτταρο (βλ. Εικόνα 4.1.) (Xu, et al., 2013). Μετά τον «επαναπρογραμματισμό» του πυρήνα, ακολουθεί η διέγερση και η διαίρεση του ωαρίου ώστε να σχηματιστεί η βλαστοκύστη (Daley, 2007). Τα εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα που λαμβάνονται από τη βλαστοκύστη περιέχουν το γενετικό υλικό του ασθενούς, το οποίο μπορεί να υποβληθεί

σε διόρθωση των γενετικών ανωμαλιών με τη χρήση ικών, φυσικών, χημικών φορέων ή εργαλείων επεξεργασίας του γονιδιώματος (Xu, et al., 2013).



Εικόνα 4.1. Γονιδιακή θεραπεία σε εμβρυικά βλαστοκύτταρα. Ο πυρήνας του σωματικού κυττάρου του υπογόνιμου άνδρα μεταφέρεται σε άπύρηνο ωκύτταρο και ακολουθεί ο επιγενετικός επαναπρογραμματισμός του ώστε να σχηματιστεί το βλαστοκύτταρο. Έπειτα πραγματοποιείται η διόρθωση της γενετικής βλάβης, τα προκύπτοντα εμβρυικά βλαστοκύτταρα καλλιεργούνται και στη συνέχεια διαφοροποιούνται σε σπερματογόνια βλαστοκύτταρα. Τα γενετικά τροποποιημένα σπερματογόνια βλαστοκύτταρα μεταφέρονται στα σπερματικά σωληνάρια για να επάγουν τη σπερματογένεση (Boekelheide & Sigman, 2008).

Μετά τη γενετική διόρθωση, αυτά τα κύτταρα μπορούν να διεγερθούν στη καλλιέργεια για να διαφοροποιηθούν σε μια σειρά γεννητικών κυττάρων (Nayernia, et al., 2006). Τα πρώιμα γεννητικά κύτταρα που παράγονται από αυτή τη διαδικασία μπορούν να μεταμοσχευθούν πίσω στα σπερματικά σωληνάρια του ίδιου του ασθενούς, εάν τα σωματικά στοιχεία είναι ικανά να υποστηρίξουν τη σπερματογένεση (Boekelheide & Sigman, 2008). Εναλλακτικά, είναι δυνατή η περαιτέρω διαφοροποίηση των γεννητικών κυττάρων *in vitro* και έπειτα η απομόνωση των απλοειδών γαμετικών κυττάρων, που περιέχουν το γενετικό υλικό του ασθενούς, για τη ICSI (Hou, et al., 2014). Αυτή η προσέγγιση θα ήταν ιδιαίτερα χρήσιμη για τη θεραπεία των γενετικών ανωμαλιών που επηρεάζουν τα γεννητικά κύτταρα.

4.2.3. Κύτταρα Sertoli

Μια εναλλακτική επιλογή κυττάρων για την αποφυγή των προβλημάτων που σχετίζονται με την εισαγωγή μεταλλαξιογένεσης στα γεννητικά κύτταρα, αποτελούν τα κύτταρα Sertoli ή άλλα σωματικά κύτταρα. Η ενσωμάτωση διαγονιδίων σε κύτταρα Sertoli δεν επηρεάζει το γονιδίωμα των γεννητικών κυττάρων και έτσι αποφεύγεται και η μετάδοση των γενετικών αλλαγών (Boekelheide & Sigman, 2008). Μελέτες σε ποντίκια με ανεπάρκεια του διαμεμβρανικού μορίου των βλαστικών κυττάρων (σύμπλοκο c-kit) δείχνουν ότι τα κύτταρα Sertoli μπορούν να επιμολυνθούν *in vivo* χωρίς μετάδοση γενετικού υλικού στα γεννητικά κύτταρα (Kojima, et al., 2008).

Η γονιδιακή θεραπεία με τα κύτταρα Sertoli ως κύτταρα-στόχους μπορεί να είναι χρήσιμη για τη θεραπεία της ανδρικής υπογονιμότητας στο μέλλον, ειδικά για τους άνδρες που δεν έχουν καθόλου σπερματοζώαρια στους όρχεις τους, όπως στην απλασία του σπερματικού επιθηλίου (Sertoli cells only syndrome) ή MA (Gassei & Orwig, 2016). Τα κύτταρα Sertoli θεωρούνται τα πιο κατάλληλα κύτταρα-στόχοι, επειδή εκτελούν κρίσιμες λειτουργίες για την έναρξη, προαγωγή και διατήρηση της σπερματογένεσης απευθείας στα σπερματικά σωληνάκια (Kojima, et al., 2010).

Η ιδιοπαθής ανδρική υπογονιμότητα, συμπεριλαμβανομένης της παθολογικής διακοπής της ωρίμανσης και η απλασία του σπερματικού επιθηλίου, μπορεί να οδηγήσουν σε ανώμαλη λειτουργία των κυττάρων Sertoli και συνεπώς στη διατάραξη της φυσιολογικής εξέλιξης της σπερματογένεσης (Sharpe, et al., 2003). Μερικά από τα γονιδιακοί δείκτες της ωριμότητας και ανωριμότητας των κυττάρων Sertoli περιλαμβάνουν τα *AMH*, *GATA1*, *βιμεντίνη*, *αρωματάση*, *θειική γλυκοπρωτεΐνη 2*, *κυτοκερατίνη-18*, *λαμινίνη α5*, *αντιγόνο M2A*, *ανασταλτίνη α*, *AR* και *WT-1* (Brehm & Steger, 2005). Επιπλέον, αλλαγές στη ρύθμιση της μεταγραφής στον όρχι μπορεί να προκαλέσουν ιδιοπαθή ανδρική υπογονιμότητα (Maclean & Wilkinson, 2005). Οι μεταγραφικοί παράγοντες περιλαμβάνουν τους *CREB* (Hummler, et al., 1994), *Sox3* (Weiss, et al., 2003), *Pem* (*Rhox5*) (Maclean, et al., 2005) και *DAX1* (Kojima, et al., 2006), οι οποίοι είναι απαραίτητοι για τη σπερματογένεση και εκφράζονται στα κύτταρα Sertoli. Η αποσαφήνιση του ρόλου αυτών των παραγόντων στη σπερματογένεση μπορεί να ενισχύσει την κλινική εφαρμογή της γονιδιακής θεραπείας για ασθενείς με ανδρική υπογονιμότητα.

Για την εφαρμογή της γονιδιακής θεραπείας στα κύτταρα Sertoli είναι απαραίτητη η μελέτη της ασφάλειας και της εφαρμοσιμότητας της σε ανθρώπινα κύτταρα κα-

θώς και η επιβεβαίωση της έλλειψης κινδύνου μόλυνσης των γεννητικών κυττάρων με την προσεκτική χαρτογράφηση της γονιδιωματικής ενσωμάτωσης του θεραπευτικού διαγονιδίου (Gassei & Orwig, 2016). Οι κίνδυνοι πρόκλησης μεταλλαξιογένεσης μπορεί να μειωθούν χρησιμοποιώντας αδενοϊικούς ή λεντιικούς φορείς που δεν ενσωματώνονται στο γονιδίωμα (Hu, et al., 2015; Stephen, et al., 2010). Συνεπώς, οι μελέτες ασφάλειας θα είναι ιδιαίτερα σημαντικές για τον τομέα της ανθρώπινης γονιδιακής θεραπείας που έχει ήδη υποστεί σοβαρές αποτυχίες λόγω απροσδόκητων δυσμενών εκβάσεων σε προηγούμενες δοκιμές (Wilson, 2009).

4.2.4. Κύτταρα Leydig

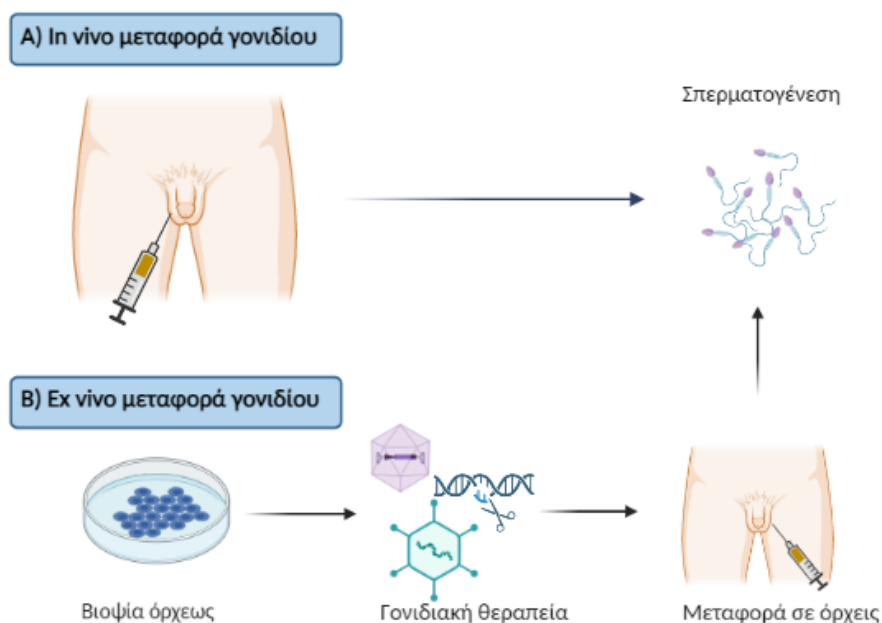
Από την άλλη πλευρά, τα κύτταρα Leydig μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθούν ως κύτταρα-στόχοι για τη γονιδιακή θεραπεία. Ενδείξεις αποτελούν η ανεπάρκεια των κυττάρων Leydig και η διαταραγμένη ρύθμιση της απόπτωσης τους, που εντοπίζεται στο σύνδρομο Klinefelter (Aksklaede, et al., 2006). Επίσης, υπάρχουν ενδείξεις διαταραχής των κυττάρων Leydig σε ένα ποσοστό ανδρών που έλαβαν κυτταροτοξική χημειοθεραπεία για κακοήγη νόσο (Howell & Shalet, 2001). Οι ενδοκρινικοί αναστολείς μπορούν να διαταράξουν τη σπερματογένεση αλλά και τη φυσιολογική ενδοκρινική λειτουργία των κυττάρων Leydig, δρώντας απευθείας σε αυτά για να μειώσουν την παραγωγή τεστοστερόνης, παρεμποδίζοντας την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων στο μονοπάτι της στεροειδογένεσης (Skakkebaek, et al., 2001).

Γονίδια δείκτες, όπως τα *P450 (CYP)*, *3β-HSD* (Morohashi & Omura, 1994), *AR* (Xu, et al., 2007), *LHR* (Weiss, et al., 1992) και *Ad4BP/SF-1* (Kojima, et al., 2006) εκφράζονται στα κύτταρα Leydig και μπορούν να αποτελέσουν υποψήφια γονίδια για γονιδιακή θεραπεία. Σε μελέτη ζωικών μοντέλων με έλλειψη του γονιδίου *Lhcgr*, έχει εντοπιστεί η ανάκτηση της παραγωγής τεστοστερόνης και της ωρίμανσης των κυττάρων Leydig έπειτα από την εφαρμογή γονιδιακής θεραπείας με AAV φορείς (Xia, et al., 2021). Επιπλέον, αποδείχθηκε η αποτελεσματική μεταγωγή των προγονικών κυττάρων Leydig χωρίς κάποια επίδραση στα γεννητικά κύτταρα ή κύτταρα Sertoli (Xia, et al., 2021).

4.3. Μεταφορά γονιδίων στους όρχεις

4.3.1. In Vivo

Η μεταφορά του γενετικού υλικού στους όρχεις μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε *in vivo* είτε *ex vivo*, με την επεξεργασία της βιοψίας του όρχι. Η *in vivo* μεταφορά γονιδίου στον όρχι θεωρείται ευκολότερη, πιο αποτελεσματική και πρακτική μέθοδος για κλινική εφαρμογή. Εάν τα κύτταρα-στόχοι είναι τα γεννητικά ή κύτταρα Sertoli, η ενδοσωληναριακή ένεση μπορεί να είναι καλύτερη, ενώ εάν πρόκειται για κύτταρα Leydig προτιμάται η ενδοορχική ένεση (Kojima, et al., 2008). Η ενδοσωληναριακή ένεση είναι μια χρήσιμη τεχνική για την εισαγωγή γονιδίων στα κύτταρα Sertoli καθώς βρίσκονται στα σπερματικά σωληνάκια, ενώ η ενδοορχική ένεση ενδείκνυται για τα κύτταρα Leydig καθώς βρίσκονται στο διάμεσο ιστό (Barrett, et al., 2019).



Εικόνα 4.2. Σχηματική απεικόνιση *in vivo* και *ex vivo* μεταφοράς γονιδίων στους όρχεις. Α: έγχυση φορέα με το θεραπευτικό γονίδιο απευθείας στους όρχεις. Β: Επεξεργασία κυττάρων από τη βιοψία όρχεως, ενσωμάτωση λειτουργικού γονιδίου ή διόρθωση γενετικής ανωμαλίας και μεταφορά πίσω στους όρχεις.

Για την ενδοσωληναριακή ένεση, είναι διαθέσιμες δύο τεχνικές ένεσης, η ορθόδρομη και η παλίνδρομη (Kojima, et al., 2010). Ο όρχις τραβιέται έξω και εκτίθεται κάτω από ανατομικό μικροσκόπιο και στις δύο τεχνικές. Για την ορθόδρομη προσέγγιση, γίνεται μια μικρή τομή στον χιτώνα και στη συνέχεια το διάλυμα με το γενετικό υλικό εγχύεται απευθείας στα σπερματικά σωληνάκια χρησιμοποιώντας μια μικροπιπέττα έγχυσης από γυαλί (Kojima, et al., 2008). Η ένεση γίνεται συνήθως σε πολλά σημεία του όρχεως

(Kojima, et al., 2003). Για την παλίνδρομη έγχυση, η μικροπιπέττα εισάγεται στον όρχι μέσω του απαγωγού πόρου για να επιτραπεί η άμεση έγχυση στα σπερματικά σωληνάκια (Kurokawa, et al., 2005). Αυτή η τεχνική επιτρέπει την πιο ενδεδειγμένη εξάπλωση του γενετικού υλικού σε ολόκληρο το σπερματικό σωληνάριο.

Η ενδοορχική ένεση αποτελεί πιο απλή μέθοδο, όπου το γενετικό υλικό εγχύεται απευθείας στον όρχι μέσω του όσχεου, χρησιμοποιώντας μια βελόνα και σύριγγα (Βλ. Εικόνα 4.2.). Αυτή η τεχνική επιτρέπει την εξάπλωση του γενετικού υλικού σε ολόκληρο τον διάμεσο χώρο του όρχεως, αλλά όχι στα σπερματικά σωληνάκια (Kojima, et al., 2008).

4.3.2. Ex Vivo

Η ex vivo μεταφορά γονιδίων στον όρχι είναι μια άλλη πιθανή μέθοδος γονιδιακής θεραπείας για την ανδρική υπογονιμότητα (Βλ. Εικόνα 4.2.). Αύτη η διαδικασία εφαρμόζεται κυρίως στα σπερματογόνια βλαστοκύτταρα, τα οποία παρέχουν πρόσβαση στην επεξεργασία των γεννητικών κυττάρων in vitro και έπειτα την μεταφορά των διορθωμένων κυττάρων στους όρχεις (Brinster & Avarbock, 1994). Η μεταμόσχευση τροποποιημένων κυττάρων των όρχεων μετά τη μεταφορά γονιδίου, παρέχει μεγάλες δυνατότητες για το ex vivo σύστημα παροχής θεραπευτικών γονιδίων στους όρχεις, με σκοπό τη θεραπεία της ανδρικής υπογονιμότητας (Kojima, et al., 2008). Όμως, είναι σημαντική η δημιουργία ενός πιο αποτελεσματικού ex vivo συστήματος μεταφοράς γονιδίων στα κύτταρα Sertoli και κύτταρα Leydig για την κλινική εφαρμογή.

4.4. Φορείς γενετικού υλικού

4.4.1. Ιικοί φορείς

Οι ιοί είναι σημαντικοί και κοινοί φορείς για τη μεταφορά γονιδίων, καθώς χρησιμοποιούνται εξελιγμένα και αποτελεσματικά μέσα εισόδου στα ανθρώπινα κύτταρα, για την έκφραση των γονιδίων τους (Lamb, 2008). Για τη χρήση τους στην γονιδιακή θεραπεία πραγματοποιείται γενετική τροποποίηση ώστε να εξαλείψουν την ικανότητά τους να αναπαράγονται και να προκαλούν ασθένειες και οι αφαιρεθείσες κωδικοποιητικές αλληλουχίες των ιών μπορούν να αντικατασταθούν με εξωγενή θεραπευτικά γονίδια (Kojima, et al., 2010). Τέτοιοι γενετικά τροποποιημένοι ιοί θεωρητικά διατηρούν τον ιικό τροπι-

σμό άγριου τύπου σε κυτταρικό επίπεδο και εξασφαλίζουν την έκφραση των διαγονιδίων στα κύτταρα-στόχους, χωρίς να προκαλούν διαρκή μόλυνση. Έχουν γίνει κιάλας προσπάθειες αλλαγής των φυσικών τροπισμών των ιών μέσω του χειρισμού των ιικών συστατικών που μεσολαβούν στη δέσμευση και την ενσωμάτωση των κυττάρων, δημιουργώντας ένα μέσο ανακατεύθυνσης των ιών προς ειδικά επιλεγμένα κύτταρα στόχους (Krasnykh, et al., 1996). Επομένως, οι ιοί είναι ένα ισχυρό εργαλείο για τη μεταφορά γενετικού υλικού από ένα κύτταρο σε άλλο και αποτελούν μία από τις βασικές στρατηγικές για τη γονιδιακή θεραπεία σε σωματικά κύτταρα (Mancheno-Corvo & Martin-Duque, 2006). Οι ιικοί φορείς μπορούν να ταξινομηθούν ως προς ικανότητα έκφρασης ξένων γονιδίων και τη δυνατότητα αποτελεσματικής μεταφοράς γενετικού υλικού (Coward, et al., 2007).

Ωστόσο, η ασφάλεια της γονιδιακής θεραπείας για την ανδρική υπογονιμότητα είναι ένα σημαντικό ζήτημα και ο φορέας που χρησιμοποιείται είναι υψίστης σημασίας. Ο ιδανικός φορέας θα πρέπει να είναι ανοσολογικά αδρανής, να στοχεύει μόνο τους κυτταρικούς τύπους με την ανεπάρκεια και να είναι ικανός να μεταφέρει μεγάλα κομμάτια γενετικού υλικού (Somia & Verma, 2000). Επίσης, ιδανικά πρέπει να ενσωματώνεται σε μια ακριβή θέση του χρωμοσώματος ή να λειτουργεί ως επίσωμα, να έχει μηχανισμό περιορισμού της λειτουργίας εάν είναι απαραίτητο, και να μολύνει διαιρούμενα αλλά και μη διαιρούμενα κύτταρα (Somia & Verma, 2000).

Αδενοϊός

Οι αδενοϊοί είναι οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι φορείς, με το DNA τους να στερείται την ικανότητα ενσωμάτωσης στο γονιδίωμα του ξενιστή, το οποίο καθίσταται σημαντικό από την άποψη της βιοασφάλειας (Parrington, et al., 2011). Οι αδενοϊοί μπορούν να μολύνουν τα κύτταρα Sertoli και Leydig και να εκφράζουν νέα γονίδια, αλλά δεν μπορούν να μολύνουν τα γεννητικά κύτταρα (Blanchard & Boekelheide, 1997; Peters, et al., 2001). Όσον αφορά τη χορήγηση γονιδιακής θεραπείας στον όρχι, αυτό μπορεί να θεωρηθεί ως θετικός παράγοντας που υποδεικνύει ότι αυτή η μέθοδος θα μπορούσε να αξιοποιηθεί, μετά από κάποια βελτιστοποίηση, για τη θεραπεία των ανδρικών αναπαραγωγικών διαταραχών σχετιζόμενα με δυσλειτουργίες των σωματικών κυττάρων. Η μεταφορά γονιδίων σε σωματικά κύτταρα των όρχεων με χρήση αδενοϊού έχει ήδη αποδειχθεί, *ex vivo* (Qamar, et al., 2009), *in vitro* για τη μελέτη του καρκίνου των γεννητικών κυττάρων των όρχεων (Tanimoto, et al., 2007) και *in vivo* (Gordon, 2003). Εντούτοις, μια μελέτη που

διερεύνησε την *in vivo* χρήση αδενοϊκών φορέων στον όρχι σημείωσε διαταραχές εντός του σπερματικού επιθηλίου, που πιθανώς οφείλονται σε διαταραχή των σφιχτών αποφρακτικών συνδέσεων, μέρος του αιματοορχικού φραγμού, ως αποτέλεσμα της δέσμησης του αδενοϊκού φορέα στον υποδοχέα του ιού (Hookey, et al., 2009).

Επίσης, η αποτελεσματικότητα της μεταγωγής των αδενοϊκών φορέων *in vivo* θα μπορούσε να επηρεαστεί από τα επίπεδα λιπιδίων και τις λιποπρωτεΐνες του οργανισμού του ξενιστή, σύμφωνα με μελέτη σε ζωικά μοντέλα (Kivela, 2017). Αυτό αποδόθηκε σε συγκεκριμένες λιποπρωτεΐνες που ανταγωνίζονται την πρόσληψη ιικού φορέα μέσω υποδοχέων λιποπρωτεϊνών, υποδεικνύοντας ότι η γονιδιακή θεραπεία με αδενοϊκό φορέα μπορεί να είναι λιγότερο αποτελεσματική σε ασθενείς με υψηλά επίπεδα χοληστερόλης (Darbey & Smith, 2018). Ωστόσο, δεν έχουν καθοριστεί ακόμη οι πιθανές επιπτώσεις της γονιδιακής θεραπείας με αδενοϊκό φορέα στον όρχι, στον οποίο τόσο οι λιποπρωτεΐνες όσο και η χοληστερόλη είναι απαραίτητες για τη στεροειδογένεση.

Η υψηλή έκθεση των ανθρώπων σε αδενοϊούς με τη μορφή κοινού κρουολογήματος, αναπνευστικών ασθενειών όπως η πνευμονία, η γαστρεντερίτιδα και η επιπεφυκίτιδα, η έχει συμβάλει στη δημιουργία αντισωμάτων κατά του ιού στην πλειονότητα των ενηλίκων. Τα αντισώματα μπορεί να περιορίσουν την αποτελεσματικότητα της γονιδιακής θεραπείας με αδενοϊκό φορέα, ιδιαίτερα σε θεραπείες που μπορεί να απαιτούν δεύτερη δόση (Darbey & Smith, 2018). Ακόμη, η μεταγωγή του φορέα στους όρχεις μπορεί να προκαλέσει απόπτωση σε ορισμένα σπερματοκύτταρα και ελαφριά ανοσολογική απόκριση για σύντομο χρονικό διάστημα (Kojima, et al., 2003). Όμως, σύμφωνα με μελέτες, δεν έχει παρατηρηθεί ατροφία του όρχεως ή σοβαρή φθορά των σπερματικών σωληναρίων, ούτε ανωμαλίες των σπερματοζωαρίων (Kojima, et al., 2003). Συνεπώς, η επιμόλυνση από αδενοϊκό φορέα δεν θεωρείται ότι έχει δυσμενή επίδραση στη σπερματογενετική λειτουργία. Τέλος, πρόσθετες μελέτες που διερευνούν τη δυνατότητα δημιουργίας οροτύπων αδενοϊού με χημική τροποποίηση του ιικού καψιδίου και τροποποίηση του γονιδιώματος τους, θα μπορούσαν να επιτρέψουν τη δημιουργία εξατομικευμένων αδενοϊκών φορέων με διακριτά χαρακτηριστικά, ειδικά για γονιδιακή θεραπεία (Muck-Hausl, et al., 2015).

Αδενο-σχετιζόμενος ιός

Οι αδενο-σχετιζόμενοι ιοί (AAVs) είναι διαδεδομένοι φορείς για τη γονιδιακή θεραπεία λόγω της χαμηλής παθογονικότητας και της ελαττωματικής αναπαραγωγής τους (Giacca, 2010). Μολύνουν τα μη διαιρούμενα κύτταρα και ενσωματώνονται σταθερά στο γονιδίωμα του ξενιστή (Βλ. Πίνακα 4.1.), καθιστώντας τους AAVs πιο μόνιμη στρατηγική για την καταπολέμηση των γενετικών διαταραχών (Rohini, 2014). Όμως, είναι λιγότερο σημαντικό στη γονιδιακή θεραπεία του καρκίνου, στην οποία μπορεί να είναι επαρκής η παροδική διαγονιδιακή έκφραση (Harrington, et al., 2001).

Οι AAV φορείς έχουν χρησιμοποιηθεί στη διερεύνηση της αυτοανοσίας των όρχεων. Σε αυτή τη μελέτη, ο AAV που κωδικοποιεί την ανθρώπινη IL-10 χορηγήθηκε μέσω ενδομυϊκής ένεσης σε ανοσοποιημένα ποντίκια από μονόπλευρη βλάβη των όρχεων (Watanabe, et al., 2005). Ύστερα, παρατηρήθηκε καταστολή της επίπτωσης της ορχίτιδας και της διαταραχής της σπερματογένεσης, ρυθμίζοντας την κυτταρομεσολαβούμενη ανοσία (Watanabe, et al., 2005). Τα επίπεδα έκφρασης της ανθρώπινης IL-10 κορυφώθηκαν 3 εβδομάδες μετά την ένεση, τετραπλασιάζοντας το αρχικό επίπεδο έκφρασης.

Όπως και με τους προηγούμενους φορείς, έχουν γίνει προσπάθειες στόχευσης των γεννητικών κυττάρων χρησιμοποιώντας AAV με αντικρουόμενα αποτελέσματα. Σε μια μελέτη, παρά την ανίχνευση του διαγονιδίου που απελευθερώθηκε από τον AAV στις γονάδες ορισμένων ζώων στα οποία έγινε ένεση, δεν εντοπίστηκε η μετάδοση του διαγονιδίου στα γεννητικά κύτταρα (Jakob, et al., 2005). Αντίθετα, σε μια μεταγενέστερη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν γεννητικά κύτταρα δότη ποντικού και φορείς AAV, που μετέφεραν το γονίδιο GFP, διαπιστώθηκε η ενσωμάτωση το γονιδίου στα γεννητικά κύτταρα του όρχι του λήπτη (Honaramooz, et al., 2008). Σε αυτή τη περίπτωση η πρόσληψη του ιού από τα κύτταρα Sertoli όταν εισήχθη στον όρχι *in vivo* ευνόησε τη μεταγωγή των γεννητικών κυττάρων *in vitro*, όπως έχει αναφερθεί και σε μελέτες που χρησιμοποιούν φορείς ρετροϊών και αδενοϊών (Honaramooz, et al., 2008).

Ένα μειονέκτημα της χρήσης των AAV φορέων είναι ο περιορισμός του μεγέθους του διαγονιδίου που μπορούν να δεχτούν (Khan, 2016). Έχουν γίνει προσπάθειες να ξεπεραστεί αυτό το εμπόδιο με τη χρήση πολλαπλών φορέων AAV που εκφράζουν επικαλυπτόμενα γονιδιακά θραύσματα προσδοκώντας την ανασύσταση τους κατά τη μεταγωγή του κυττάρου ξενιστή (Halbert, et al., 2002). Παρόλα τα θετικά αποτελέσματα, παραμένει άγνωστο εάν αυτή η προσέγγιση μπορεί να είναι εξίσου αποτελεσματική σε

άλλους ιστούς και να παρέχει άλλα γονίδια. Πράγματι, μια πρόσφατη ανασκόπηση κατέληξε στο συμπέρασμα ότι η χρήση συστημάτων διπλού φορέα μπορεί να μην είναι αποτελεσματική για όλους του ιστούς, οι οποίοι ενδέχεται να επηρεάσουν δραστικά την επιτυχία της χρήσης τους (Chamberlain, et al., 2016).

Πίνακας 4.1. Χαρακτηριστικά ιικών φορέων.		
Φορέας	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
Αδενοϊκός	<ul style="list-style-type: none"> ◦ Μεταφορά σε διαιρούμενα και μη διαιρούμενα κύτταρα. ◦ Στόχευση σωματικών κυττάρων. ◦ Υψηλή έκφραση γονιδίων. ◦ Δεν επηρεάζει την σπερματογένεση. ◦ Μεταφορά μεγάλων ενθεμάτων. 	<ul style="list-style-type: none"> ◦ Πιθανή φλεγμονώδης αντίδραση ξενιστή. ◦ Υψηλή ανοσολογική απόκριση οργανισμού. ◦ Μικρή διάρκεια έκφρασης γονιδίου.
Αδενο-σχετιζόμενος	<ul style="list-style-type: none"> ◦ Μεταφορά σε διαιρούμενα και μη διαιρούμενα κύτταρα. ◦ Σταθερή έκφραση γονιδίων. ◦ Μη ανοσολογική απόκριση οργανισμού. ◦ Μειωμένη παθογονικότητα. 	<ul style="list-style-type: none"> ◦ Μικρό μέγεθος ενθέματος. ◦ Παροδική μεταγωγή κυττάρων.
Ρετροϊκός	<ul style="list-style-type: none"> ◦ Σταθερή έκφραση γονιδίου. ◦ Υψηλή αποδοτικότητα μεταγωγής. ◦ Ελαττωμένη ανοσογονικότητα. 	<ul style="list-style-type: none"> ◦ Δράση μόνο σε διαιρούμενα κύτταρα. ◦ Μικρό μέγεθος ενθέματος. ◦ Πιθανή ογκογένεση.
Λεντιϊκός	<ul style="list-style-type: none"> ◦ Μεταφορά σε διαιρούμενα και μη διαιρούμενα κύτταρα. ◦ Μακροπρόθεσμη έκφραση γονιδίων. ◦ Μειωμένη ανοσογονικότητα. ◦ Ειδική μεταφορά σε γεννητικά ή σωματικά κύτταρα. 	<ul style="list-style-type: none"> ◦ Πιθανή μεταλλαξιογένεση. ◦ Μικρό μέγεθος ενθέματος.

Ρετροϊός

Οι ρετροϊοί χρησιμοποιούνται ευρέως για τη σταθερή μεταφορά γονιδίων λόγω της αποτελεσματικότητάς τους και της ακριβής ενσωμάτωσής τους (Bushman, 2007). Παρόλο που αυτοί οι ιοί μολύνουν μόνο τα διαιρούμενα κύτταρα (βλ. Πίνακα 4.1.), περιορίζοντας έτσι τη χρησιμότητά τους, είναι πολύ αποδοτικοί στην ενσωμάτωση διαγονιδίων στο γονιδίωμα (Gardlík, et al., 2005). Έτσι, όμως, αυξάνεται η πιθανότητα μεταφοράς των διαγονιδίων που μεταφέρουν οι ρετροϊκοί φορείς και στα θυγατρικά κύτταρα, ενισχύοντας την αποτελεσματικότητά τους για γονιδιακή θεραπεία αλλά συνάμα δημιουργώντας πιθανά προβλήματα βιοασφάλειας, καθώς το ενσωματωμένο ιικό DNA μπορεί να διαταράξει την έκφραση των ενδογενών γονιδίων στο γονιδίωμα (Parrington, et al., 2011). Ω-

στόσο, τα ενσωματωμένα διαγονίδια που μεταφέρονται από τους ρετροϊούς ενδέχεται να αποσιωπηθούν από τους προστατευτικούς μηχανισμούς του γονιδιώματος του ξενιστή, περιορίζοντας έτσι την δραστηριότητά τους.

Σε έρευνα όπου έγινε ένεση με ρετροϊικό φορέα στα σπερματικά σωληνάκια του όρχι, δεν βρέθηκαν κύτταρα που να εκφράζουν το ξένο γονίδιο (Ikawa, et al., 2002). Εντούτοις, άλλες έρευνες ανέφεραν τη *in vitro* μεταφορά εξωγενών γονιδίων μέσω ρετροϊικών φορέων στη γεννητική κυτταρική σειρά και τα σπερματογόνια, παρέχοντας σημαντικές πληροφορίες σχετικά με τους παράγοντες που θα μπορούσαν να επηρεάσουν τη μεταγωγή των ρετροϊών (De Miguel & Donovan, 2003). Αυτοί περιλαμβάνουν την ικανότητα πολλαπλασιασμού του μολυσμένου κυττάρου, τον τύπο του ιικού φακέλου, τον τύπο της μακράς τερματικής επανάληψης του ρετροϊού και φυσικά τη μέθοδο της ιικής ενσωμάτωσης των ρετροϊών (De Miguel & Donovan, 2003). Επιπλέον, η *in vitro* παράδοση γονιδίου με τη μεσολάβηση ρετροϊού σε σπερματογόνια βλαστοκύτταρα είχε ως αποτέλεσμα σταθερή ενσωμάτωση και έκφραση ενός διαγονιδίου (Nagano, et al., 2000).

Λεντιός

Ο λεντιός χρησιμοποιείται ως φορέας όλο και περισσότερο στη βασική και εφαρμοσμένη έρευνα. Επί του παρόντος βρίσκονται σε εξέλιξη κλινικές δοκιμές ανθρώπινης γονιδιακής θεραπείας με χρήση λεντιικών φορέων για ένα φάσμα ασθενειών (Escors & Breckpot, 2010). Η ευρεία χρήση του οφείλεται στην ικανότητα αποτελεσματικής μεταγωγής διαιρούμενων και μη κυττάρων και στη δυνατότητα μεταφοράς μεγάλων γενετικών φορτίων και διατήρησης σταθερής μακροπρόθεσμης έκφρασης των διαγονιδίων (βλ. Πίνακα 4.1.) (Cockrell & Kafri, 2007). Αν και οι λεντιοί διαθέτουν περιορισμένη ικανότητα εισαγωγής, το διαγονίδιο που παρέχεται από αυτήν την κατηγορία ιικού φορέα είναι πιο ικανό να αποφύγει τη σίγαση του και να εμφανίσει σταθερή έκφραση *in vivo*, συγκριτικά με άλλους τύπους ρετροϊών (Sakuma, et al., 2012).

Έχει αποδειχθεί επίσης ότι οι λεντιοί μολύνουν *in vitro* τα αρσενικά γεννητικά κύτταρα και συγκεκριμένα τα σπερματογόνια βλαστοκύτταρα (Nagano, et al., 2002). Η μεταγωγή των γεννητικών κυττάρων με χρήση λεντιού έχει επιχειρηθεί και *in vivo* με διάφορους βαθμούς επιτυχίας (Darbey & Smith, 2018). Στην πρώτη μελέτη σχετικά με την *in vivo* μεταφορά στον όρχι παρατηρήθηκε η μεταγωγή των σπερματογόνιων καθώς και των κυττάρων Sertoli και Leydig (Darbey & Smith, 2018). Παρόμοια αποτελέσματα

αναδείχθηκαν σε *in vivo* ένεση του φορέα στον διάμεσο ιστό και τα σπερματικά σωληνάρια, όπου πραγματοποιήθηκε η μεταγωγή των σπερματογόνιων βλαστοκυττάρων για τη παραγωγή διαγονιδιακών απογόνων (Sehgal, et al., 2014). Ωστόσο, η έκφραση του διαγονιδίου στους απογόνους φαινόταν να ποικίλλει ανάλογα με τον υποκινητή του γονιδίου του λεντιικού φορέα (Qin, et al., 2015).

Επιπλέον, ένας αριθμός μελετών έχουν διεξαχθεί στοχεύοντας τα σωματικά κύτταρα του όρχεως για τη γονιδιακή θεραπεία, αποφεύγοντας τη μεταγωγή των γεννητικών κυττάρων, με χρήση *in vivo* έγχυσης λεντιικών φορέων. Σε μια πρώιμη μελέτη, αποκαταστάθηκε η σπερματογένεση των υπογόνιμων ποντικών με έγχυση ενός λεντιικού φορέα που εκφράζει τη διαμεμβρανική μορφή του συμπλόκου c-kit, με στόχο τα κύτταρα Sertoli (Ikawa, et al., 2002). Αν και τα αποτελέσματα αποδείχθηκαν αισιόδοξα για την γονιδιακή θεραπεία της ανδρικής υπογονιμότητας με τη χρήση του συγκεκριμένου φορέα, παραμελήθηκε η διερεύνηση της μεταγωγής των παρόντων σπερματογόνιων βλαστοκυττάρων του όρχεως τη στιγμή της ένεσης (Ikawa, et al., 2002). Η μεταγωγή αυτών των κυττάρων θα μπορούσε ενδεχομένως να οδηγήσει σε ώριμα σπερματοζωάρια που φέρουν το νέο γονίδιο, υποδεικνύοντας τη πιθανότητα μεταγωγής των γεννητικών κυττάρων χρησιμοποιώντας αυτή την τεχνική (Darbey & Smith, 2018).

Επιπρόσθετα, η στόχευση των κυττάρων Sertoli χρησιμοποιώντας λεντιικούς φορείς είναι δυνατόν να πραγματοποιηθεί τόσο *ex vivo* (Wang, et al., 2008) όσο και *in vivo* (Willems, et al., 2015). Οι παραπάνω μελέτες έδειξαν την τελεσφόρα μεταγωγή αυτών των κυττάρων έπειτα από ένεση του λεντιικού φορέα στα σπερματικά σωληνάρια, δίχως τη πρόσληψη του από τα γεννητικά κύτταρα. Σε επόμενη μελέτη παρατηρήθηκε επίσης η μεταγωγή των κυττάρων Leydig *in vivo* χρησιμοποιώντας λεντιικούς φορείς (Park, et al., 2013). Επομένως, οι λεντιικοί φορείς φαίνεται να έχουν αισιόδοξες προοπτικές για τη χρήση στη γονιδιακή θεραπεία ανδρικών αναπαραγωγικών διαταραχών, έπειτα από περαιτέρω διερεύνηση για τον αποκλεισμό της πιθανότητας μετάδοσης τους στα γεννητικά κύτταρα

Βακουλοϊός

Οι βακουλοϊοί έχουν μελετηθεί εκτενώς ως πιθανοί φορείς τόσο για *in vitro* όσο και για *in vivo* γονιδιακή θεραπεία, ύστερα από την ανακάλυψη της αποτελεσματικής μεταγωγής των κυττάρων θηλαστικών (Hu, 2008). Η μεταφορά γονιδίου με το βακουλοϊό ως φο-

ρέα είναι απλή στην εκτέλεση, δεν παρουσιάζει εμφανή κυτταρική τοξικότητα και είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για επαναλαμβανόμενες ή μέτριας απόδοσης διαδικασίες (Merrihew, et al., 2004). Σε ενδοσωληναριακή μεταφορά γονιδίου στον όρχι, με τη χρήση του φορέα, παρατηρήθηκε γονιδιακή έκφραση στα κύτταρα Sertoli αλλά όχι στα σπερματοκύτταρα ή στα σπερματοζωάρια (Tani, et al., 2003). Επίσης, σε έρευνα αποδείχθηκε ότι η ένεση με βακουλοϊού, που φέρει το γονίδιο *GFP*, στον ινώδη χιτώνα των όρχεων ποντικίου οδήγησε σε υψηλό επίπεδο έκφρασης του στους διάμεσους ιστούς (Park, et al., 2009). Επιπλέον, σε παρόμοια δοκιμή με τον βακουλοϊό να φέρει το γονίδιο που κωδικοποιεί την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη που δεσμεύει τον ινσουλινόμορφο αυξητικό παράγοντα (*IGFBP*)-5 οδήγησε σε αύξηση της στους όρχεις και το σπέρμα (Park, et al., 2009).

4.4.2. Μη ικοί φορείς

Οι μη ικοί φορείς περιλαμβάνουν τους φυσικούς και χημικούς φορείς μεταφοράς όπως η ηλεκτροδιάτρηση, η υδροδυναμική, τα κατιονικά πολυμερή, τα λιπιδικά συστήματα, τα ανόργανα σωματίδια και το γυμνό DNA, που μπορεί να παρέχουν μια ασφαλέστερη και πιο ευέλικτη προσέγγιση από τους ικούς φορείς (Bergen, 2008). Αυτοί οι φορείς δεν είναι μολυσματικοί, αλλά παρέχουν πλασμίδια, ολιγονουκλεοτίδια ή siRNA στα κύτταρα (Lamb, 2008). Συνήθως, εμποδίζουν ή αποσιωπούν την έκφραση ελαττωματικών γονιδίων αντί να τα αντικαθιστούν.

Ωστόσο, όπως και οι ιοί, ορισμένοι μη ικοί φορείς προκαλούν ταχεία ανοσολογική απόκριση, δημιουργώντας υψηλά επίπεδα προφλεγμονωδών κυτοκινών, τα οποία μπορεί να είναι επιζήμια για τη λειτουργία των σπερματοζωαρίων (Li & Huang, 2006). Η τοξικότητα των μη ικών φορέων δεν είναι πλήρως κατανοητή, ιδιαίτερα αυτή των νανοσωματιδίων, και ενδέχεται να δημιουργηθούν ελεύθερες ρίζες, προκαλώντας φλεγμονώδεις αντιδράσεις, με τα νανοσωματίδια να συσσωρεύονται σε διάφορα όργανα (Sanvicens & Marco, 2008). Οι ελεύθερες ρίζες επηρεάζουν επίσης δυσμενώς το σπερματοζωάριο, προκαλώντας γονοτοξικότητα, φλεγμονή, βλάβη στον πυρήνα και το DNA, μιτοχονδριακή διαταραχή, μετουσίωση των πρωτεϊνών και απόπτωση των κυττάρων (Lamb, 2008). Επιπλέον, οι κυτταροτοξικές ανεπιθύμητες ενέργειες ποικίλλουν ανάλογα με το μέγεθος και τη συγκέντρωση των νανοσωματιδίων, καθώς και τη σύσταση, τη διαλυτότητα και τη γεωμετρία τους (Sanvicens & Marco, 2008).

Ένα άλλο ζήτημα με τους μη ικούς φορείς είναι η παράδοση τους καθώς οι ε-ξωκυτταρικοί φραγμοί μπορούν να αποτρέψουν τη μεταφορά τους ή η μέθοδος χορήγησης τους θα μπορούσε να διαταράξει τον αιματοορχικό φραγμό (Lamb, 2008). Επίσης, η αποτελεσματικότητα των μη ικών φορέων είναι χαμηλότερη συγκριτικά με αυτή των ικών, αν και οι μη ικοί φορείς είναι κατάλληλοι για τη διόρθωση γενετικών διαταραχών που απαιτούν χαμηλό επίπεδο έκφρασης. Τέλος, ένα κοινό πρόβλημα με όλες τις μεθόδους γονιδιακής θεραπείας είναι η ποικιλόμορφη αποτελεσματικότητα της μεταφοράς των γονιδίων, με συνέπεια την μερική επιδιόρθωση τις γενετικής ανωμαλίας (Rohini, 2014).

Γυμνό DNA

Το γυμνό DNA ή RNA θεωρείται ως ένα από τα απλούστερα συστήματα γονιδιακής θεραπείας και χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά *in vivo* το 1990 (Wolff, et al., 1990). Η εισαγωγή γυμνού DNA στο κύτταρο στόχο έχει αποδειχθεί δύσκολη λόγω της υδρόφιλης φύσης του DNA και του αρνητικού φορτίου τόσο του DNA όσο και των μεμβρανών του κυττάρου και του πυρήνα. Οπότε για να ξεπεραστεί αυτό, έχουν χρησιμοποιηθεί φυσικές μέθοδοι, όπως η έγχυση με βελόνα, το πιστόλι γονιδίων με χρήση πίεσης, οι υδροδυναμικές ενέσεις γονιδίων και η ηλεκτροδιάτρηση, οι οποίες «εξαναγκάζουν» τα μόρια να εισέλθουν στο κυτταρόπλασμα μέσω της μεμβράνης (Nóbrega, et al., 2020).

Η πρόσληψη εξωγενούς DNA από σπερματοζωάρια ποντικών έχει αναλυθεί από μια μελέτη χρησιμοποιώντας *in vivo* μεθόδους (Huguet & Esponda, 1998). Το DNA εγχύθηκε στον σπερματικό πόρο, έπειτα τα σπερματοζωάρια ανακτήθηκαν 6 ώρες αργότερα και η πρόσληψη του εξωγενούς DNA ανευρέθηκε στο 60-70% εξ αυτών (Huguet & Esponda, 1998). Ωστόσο, ένα σημαντικό μειονέκτημα της χρήσης γυμνών μορίων DNA για γονιδιακή θεραπεία είναι η ευαισθησία τους στην αποικοδόμηση από τις νουκλεάσες κατά την είσοδο στην κυκλοφορία του αίματος και στο κύτταρο, μειώνοντας την αποτελεσματικότητα της μεθόδου (Darbey & Smith, 2018). Για να ξεπεραστεί αυτό, ένας αριθμός φορέων έχουν αναπτυχθεί και τροποποιηθεί για να διευκολύνουν τη μεταφορά γονιδίων στα κύτταρα στόχους μειώνοντας την αποικοδόμηση που προκαλείται από τις νουκλεάσες (Ye, et al., 2008).

Υδροδυναμική

Η υδροδυναμική έγχυση αποτελεί τη μεγάλη όγκου και υψηλής ταχύτητας προσθήκη αλατούχου ορού που περιέχει το νουκλειικό οξύ στο κύτταρο, προκαλώντας τοπική πίεση και έτσι αυξάνεται η πρόσληψη του γενετικού υλικού (Huang, et al., 2017). Μετά την παράδοση του DNA χρησιμοποιώντας υδροδυναμική έγχυση, η έκφραση διαγονιδίων έχει ανιχνευθεί σε επαρκή αριθμό μεγάλων εσωτερικών οργάνων (Liu, et al., 1999). Επίσης, η κατεύθυνση της παροχής της υδροδυναμικής ένεσης προς το αγγείο του οργάνου-στόχου, μπορεί να επιτύχει υψηλότερη έκφραση διαγονιδίου (Darbey & Smith, 2018). Όμως, ένας αριθμός μελετών υποδηλώνουν ότι η υδροδυναμική έγχυση γυμνού DNA στα αγγεία του όρχεως μπορεί να προκαλέσει βλάβη στα σπερματικά σωληνάρια και στη σπερματογένεση (Peng, et al., 2011).

Ηλεκτροδιάτρηση

Η μεταφορά γονιδίων από μη ικούς φορείς ενισχύεται σημαντικά με την εφαρμογή της ηλεκτροδιάτρησης *in vivo*, καθώς αυτό το σύστημα παρέχει εξωγενές DNA σε οποιοδήποτε τύπο κυττάρου και έχει σημαντικά υψηλότερη απόδοση συγκριτικά με άλλα μη ικά συστήματα μεταφοράς (Coward, et al., 2007). Η *in vivo* ηλεκτροδιάτρηση περιλαμβάνει την έγχυση του συμπλόκου που περιέχει το γενετικό υλικό στον όρχι με την εφαρμογή μιας σειράς ηλεκτρικών παλμών που διαταράσσουν τις κυτταρικές μεμβράνες επιτρέποντας έτσι στο DNA να εισέλθει (Coward, et al., 2007).

Αυτή η τεχνική έχει αξιοποιηθεί για την έκφραση διαγονιδίων στα κύτταρα Sertoli και ως εκ τούτου την ενίσχυση της σπερματογένεσης, αλλά και για την μεταφορά γονιδίων στα κύτταρα Leydig και τα σπερματοκύτταρα (Dobashi, et al., 2005; Umemoto, et al., 2005). Επίσης, πιο πρόσφατα, χρησιμοποιήθηκε για την *in vivo* γονιδιακή επιμόλυνση όρχεως ποντικού με στόχο την ενσωμάτωση του DNA στα γεννητικά κύτταρα και τη μετάδοση στους απογόνους (Michaelis, et al., 2014). Ωστόσο, η ηλεκτροδιάτρηση θεωρείται λιγότερο αξιόπιστη για μεταφορά γονιδίων στους όρχεις μεγαλύτερων ζώων λόγω των διακυμάνσεων στο μέγεθος του όρχεως και στο πάχος του οσχέου (Usmani, et al., 2016). Επιπρόσθετα, οι ηλεκτρικοί παλμοί μπορεί να προκαλέσουν βλάβη στους όρχεις, αύξηση της απόπτωση των κυττάρων και διαταραχή της σπερματογένεσης (Umemoto, et al., 2005). Συνεπώς, είναι απαραίτητη η περαιτέρω διερεύνηση των επιπτώσεων της ηλεκτροδιάτρησης στη λειτουργία των όρχεων πριν τη χρήση της για τη γονιδιακή θεραπεία

των ανδρών με προϋπάρχουσες αναπαραγωγικές διαταραχές. Είναι κιάλας σημαντικό να ληφθεί υπόψη η πιθανότητα μετάδοσης του γονιδίου στα γεννητικά κύτταρα του όρχεως (Darbey & Smith, 2018). Είτε πρόκειται για σκόπιμη είτε τυχαία, η τροποποίηση της ανθρώπινης γεννητικής σειράς προς το παρών απαγορεύεται στις περισσότερες χώρες, καθιστώντας τη χρήση της τεχνικής για ανθρώπινη γονιδιακή θεραπεία στους όρχεις ανήθι-κη αλλά και μη πρακτική (Araki & Ishii, 2014).

Λιποσώματα

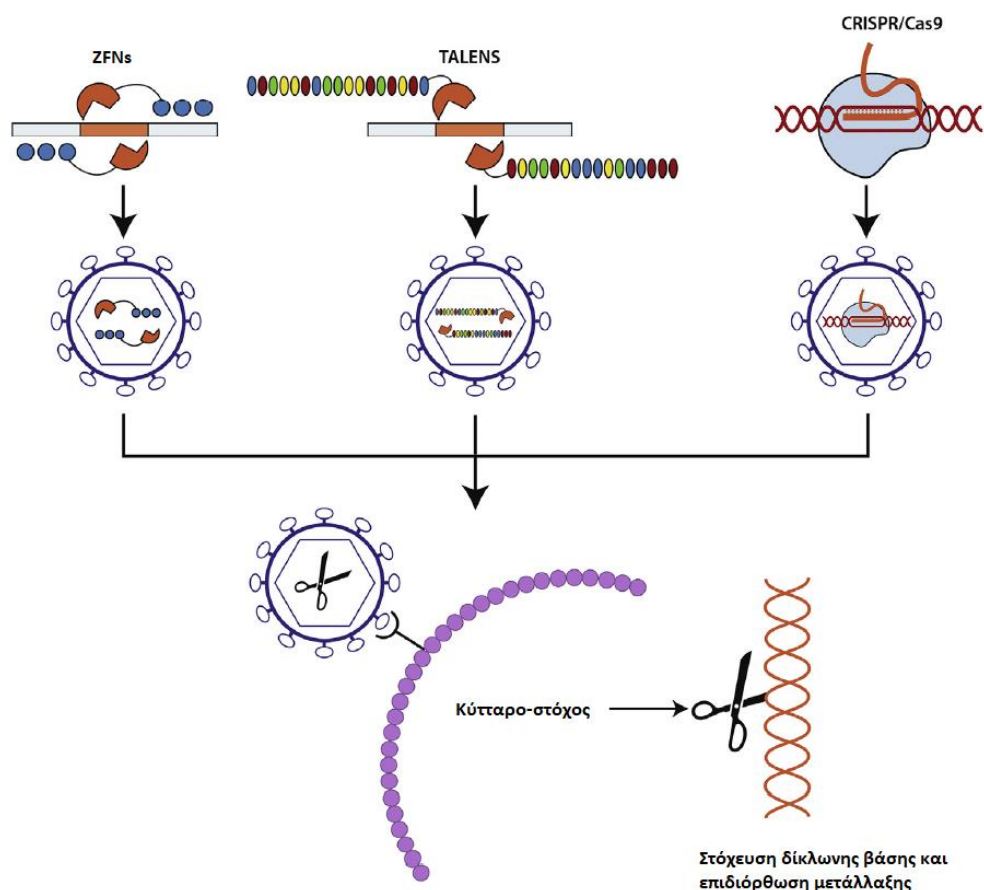
Τα λιποσώματα αποτελούν συχνά χρησιμοποιούμενους μη ιικούς φορείς, που συμβάλ-λουν στην παράδοση του εξωγενούς γενετικού υλικού στο κύτταρο-στόχο και εν συνε-χεία στη τροποποίηση των μονοπατιών σηματοδότησης του κυττάρου (Darbey & Smith, 2018). Αυτοί οι φορείς έχουν χαμηλή ανοσογονικότητα, υψηλή ικανότητα φόρτωσης γε-νετικού υλικού και είναι σχετικά εύκολο να παραχθούν. Τα κατιονικά λιπίδια αλληλεπι-δρούν με τα αρνητικά φορτισμένα μόρια του νουκλεϊκού οξέος σχηματίζοντας σύμπλοκα νουκλεϊκού οξέος, επικαλυμμένα από λιπίδια (Felgner, et al., 1987). Η θετικά φορτισμένη εξωτερική επιφάνεια του συμπλόκου μπορεί να αλληλεπιδράσει με την αρνητικά φορτι-σμένη κυτταρική μεμβράνη, επιτρέποντας την εσωτερίκευση του νουκλεϊκού οξέος. Σε αυτή την τεχνική, το DNA αναμιγνύεται με κατιονικό λιπίδιο λίγο πριν την προσθήκη αυ-τού του συμπλόκου στον όρχι (Kojima, et al., 2010).

Με τη χρήση αυτής της τεχνικής έχει παρατηρηθεί η γονιδιακή έκφραση σε ανώριμα και διαφοροποιημένα γεννητικά κύτταρα έπειτα από έγχυση σε σπερματικά σω-ληνάρια (Celebi, et al., 2002). Τα λιποσώματα έχουν την ικανότητα μεταφοράς γονιδίων στον όρχι, με στόχο τα σπερματογόνια βλαστοκύτταρα, δημιουργώντας διαγονιδιακούς απογόνους σε ζωικά μοντέλα (Miao & Zhang, 2011). Όμως, καμία από αυτές τις μελέτες δεν έδειξε υψηλή ενσωμάτωση του εξωγενούς DNA στο γονιδίωμα των ζώων στα οποία χορηγήθηκε. Αν και επιτυχείς, οι δύο μελέτες επιδεικνύουν μειωμένη αποτελεσματικό-τητα της *in vivo* λιποσωμικής επιμόλυνσης και την πιθανότητα ελλιπούς ενσωμάτωσης στο γονιδίωμα των γεννητικών κυττάρων (Celebi, et al., 2002; Miao & Zhang, 2011). Πα-ρόλα αυτά, για τους σκοπούς της γονιδιακής θεραπείας, είναι επιθυμητή η μη ενσωμά-τωση του συστήματος και η απόκτηση μη διαγονιδιακών απογόνων. Σε μια τέτοια κατά-σταση, αναμένεται η προσωρινή αποκατάσταση της λειτουργίας και η ενδεχόμενη ανα-γκαιότητα για επαναλαμβανόμενες θεραπείες.

4.5. Σύγχρονες τεχνικές

4.5.1. Επεξεργασία γονιδίων

Η επεξεργασία του γονιδιώματος αποτελεί μια εναλλακτική και σύγχρονη προσέγγιση γονιδιακής θεραπείας, που θα μπορούσε να εφαρμοστεί για την αποκατάσταση της ανδρικής γονιμότητας και της φυσιολογικής σπερματογένεσης. Η τεχνική αυτή προσφέρει τη δυνατότητα εισαγωγής, αφαίρεσης ή αντικατάστασης ενός ή περισσότερων συγκεκριμένων νουκλεοτιδίων στο γονιδίωμα ενός οργανισμού (Cox, et al., 2015). Η σύγχρονη τεχνολογία επεξεργασίας γονιδιώματος χρησιμοποιεί νουκλεάσες, όπως η CRISPR/Cas9, καθοδηγούμενες από RNA για τη πραγματοποίηση δίκλωνων θραύσεων στο γονιδίωμα, με σκοπό την αδρανοποίηση γονιδίων, την τροποποίηση μεταλλάξεων ή την εισαγωγή αυτούσιων γονιδίων (Corrigan-Curay, et al., 2015).



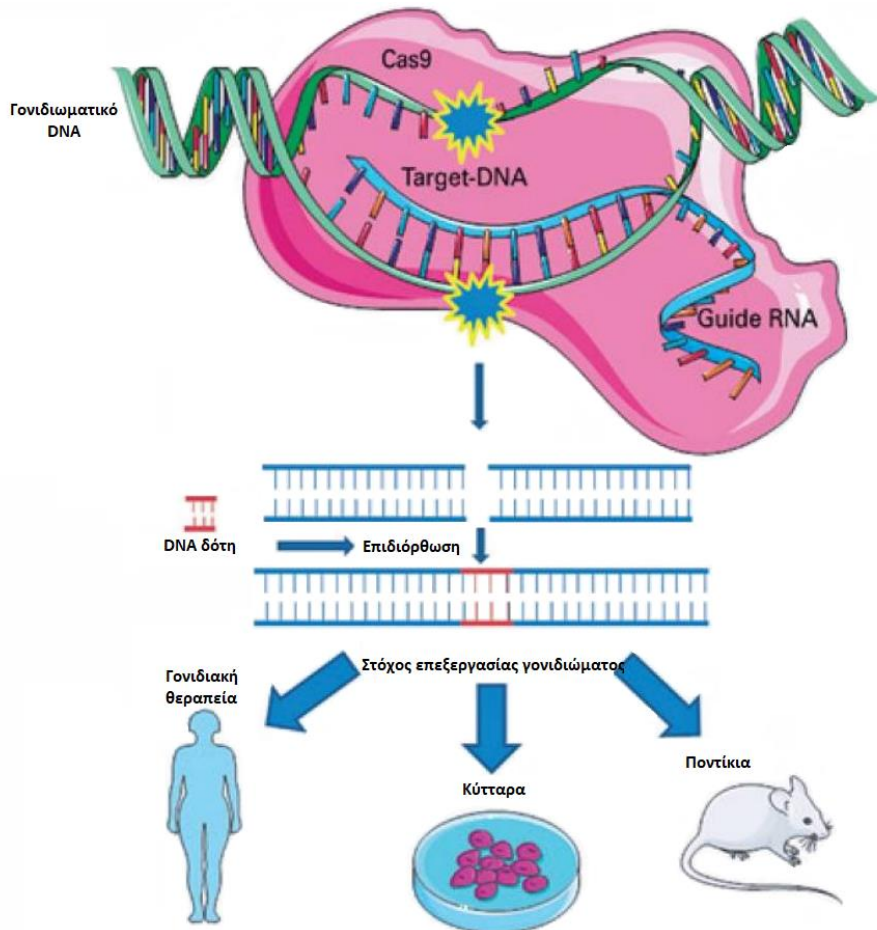
Εικόνα 4.3. Σχηματική απεικόνιση σύγχρονων τεχνικών γονιδιακής θεραπείας. Αυτές αποτελούνται από τις νουκλεάσες ZFN, TALEN, CRISPR/Cas9 και τη μεταφορά τους με ιικούς φορείς, όπως οι ρετροϊικοί. Με τη χρήση τους επιτρέπεται η επιδιόρθωση γενετικών ανωμαλιών στα κύτταρα-στόχους (Darbey & Smith, 2018).

Οι κύριες νουκλεάσες που χρησιμοποιούνται για την επεξεργασία των γονιδίων είναι οι ZFNs, TALENs και CRISPR/Cas9 (βλ. Εικόνα 4.3), οι οποίες έχουν εφαρμοστεί επίσης σε μελέτες γενετικής τροποποίησης των σπερματογόνιων βλαστοκυττάρων, παρέχοντας μοντέλα για τη μελέτη της σπερματογένεσης, για τη δημιουργία στοχευμένων μεταλλάξεων των γεννητικών κυττάρων και πιθανώς για την διόρθωση γενετικών διαταραχών (Fanslow, et al., 2014; Sato, et al., 2015; Wu, et al., 2015). Όμως, είναι σημαντική η περαιτέρω διερεύνηση της εφαρμοσιμότητας της τεχνικής στη κλινική γονιδιακή θεραπεία, δεδομένων των διαφωνιών σχετικά με την επεξεργασία των ανθρώπινων γεννητικών κυττάρων (Mathews & Curiel, 2007). Επί του παρόντος, δεν υπάρχουν αναφορές για την εφαρμογή της συγκεκριμένης τεχνολογίας σε σωματικά κύτταρα του όρχεως. Η χρήση αυτών των τεχνολογιών για τον προσδιορισμό των παραγόντων που επηρεάζουν τη λειτουργία και τη γονιμότητα των όρχεων είναι πρωταρχικής σημασίας για περαιτέρω κατανόηση και συνακολούθως, την εφαρμογή των γνώσεων προς όφελος των ανδρών με αναπαραγωγικές διαταραχές (Darbey & Smith, 2018).

Το σύστημα CRISPR/Cas9 παρέχει την ταχεία ανάπτυξη θεραπειών γονιδιακής επεξεργασίας λόγω της απλότητας της διαδικασίας παρασκευής του και αποτελεί το πλέον πιο κοινό εργαλείο επεξεργασίας γονιδίων (Shim, et al., 2017). Πιο συγκεκριμένα, είναι μια τεχνολογία κατευθυνόμενης τροποποίησης των αλληλουχιών-στόχων, χρησιμοποιώντας ειδικό για την αλληλουχία μικρό οδηγό RNA (sgRNA) σχεδιασμένο να συνδέεται με το DNA, αντί της διαδικασίας σύντηξης πρωτεϊνών (βλ. Εικόνα 4.4) (Liu, et al., 2022). Επομένως, το CRISPR/Cas, γνωστό ως τεχνολογία επεξεργασίας γονιδίων τρίτης γενιάς, είναι πιο αποτελεσματικό, απλό, προσβάσιμο και ευρέως χρησιμοποιούμενο σε σύγκριση με το ZFN και το TALEN (Liu, et al., 2022).

Τα πλεονεκτήματα των συστημάτων γονιδιακής επεξεργασίας CRISPR/Cas και η δυνατότητα θεραπείας σοβαρών ασθενειών, συμβάλλουν στην μελλοντική ευρεία χρήση της τεχνολογίας. Επιπλέον, η επεξεργασία της γεννητικής κυτταρικής σειράς προσφέρει αρκετά πλεονεκτήματα και ευκαιρίες. Η διαδεδομένη χρήση των ορχικών βιοψιών για τη λήψη σπερματοζωαρίων για τη ICSI και η απομόνωση των σπερματογόνιων βλαστοκυττάρων για την IVF, παρέχουν ήδη τις απαραίτητες τεχνικές για την *in vitro* γενετική επεξεργασία των SSCs (Sadri-Ardekani, et al., 2016). Επίσης, η μεταφορά των SSCs πίσω στον όρχι είναι μια αρκετά συνηθισμένη διαδικασία στα ζωικά μοντέλα (Mulder, et al., 2016). Όσον αφορά την *in vivo* γονιδιακή επεξεργασία, ενδέχεται ο αιματοορχικός φραγμός α-

ποτελέσει εμπόδιο για την αποτελεσματική εφαρμογή της (Carrell, et al., 2020). Ωστόσο, οι πειραματικές μελέτες σε ζωικά μοντέλα μπορούν να ενισχύσουν την αποτελεσματικότητα των ex vivo εφαρμογών της επεξεργασίας γονιδιώματος και την εύρεση εναλλακτικών τεχνικών για την in vivo τροποποίηση.



Εικόνα 4.4. Σύστημα CRISPR Cas-9. Η τεχνική περιλαμβάνει μια νουκλεάση (άγριου τύπου Cas-9) του, ένα οδηγό RNA (gRNA) και τον DNA στόχο (Gonçalves & Paiva, 2017).

Ένας από τους κινδύνους της χρήσης οποιασδήποτε από αυτές τις νουκλεάσες για γονιδιακή επεξεργασία είναι ότι, με ένα πρωτόκολλο συστηματικής γονιδιακής θεραπείας πολλά όργανα θα μπορούσαν να στοχευθούν με την ίδια τεχνολογία επεξεργασίας γονιδίων. Όμως, η χρήση φορέων που δρουν σε συγκεκριμένα κύτταρα θα μπορούσε να ενισχύσει την στοχευμένη δράση των νουκλεασών και των συστατικών τους (Choi, et al., 2016). Η επιλογή του φορέα παράδοσης οφείλει να είναι προσεκτική λόγω των τυχών επιδράσεων εκτός του οργάνου-στόχου και εξαρτάται κιάλας από τις απαιτήσεις

μιας συγκεκριμένης γονιδιακής θεραπείας (Darbey & Smith, 2018). Ως εκ τούτου, οι μελλοντικές εφαρμογές των τεχνολογιών επεξεργασίας γονιδίων, όπως το CRISPR/Cas9, αλλά και των φορέων παράδοσης θα πρέπει να προσαρμόσουν τη στρατηγική που χρησιμοποιείται, δίνοντας ιδιαίτερη προσοχή στην πιθανότητα πρόκλησης τοξικότητας σε άλλους ιστούς.

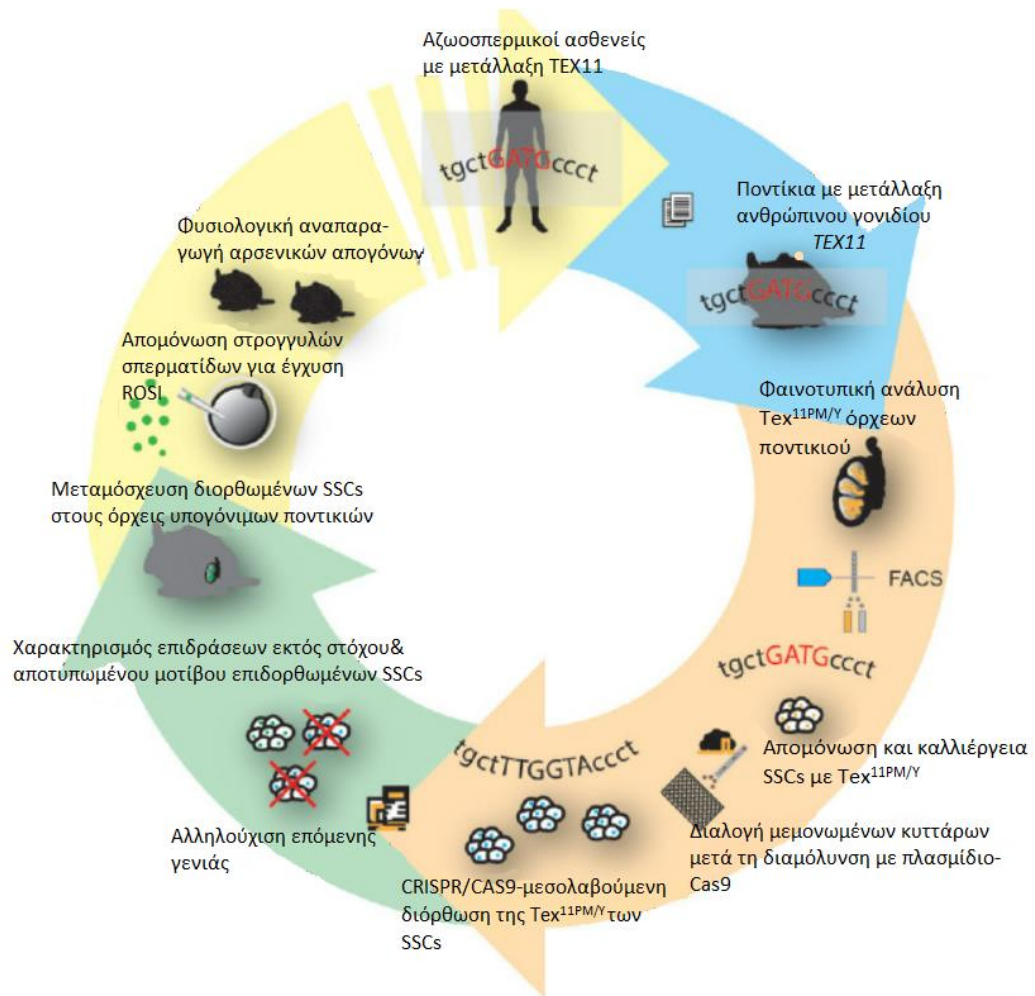
4.5.2. Εφαρμογές σε ζωικά μοντέλα

Η πρώτη εφαρμογή του συστήματος CRISPR/Cas9 πραγματοποιήθηκε το 2013 για τη επιδιόρθωση γενετικών βλαβών (Wu, et al., 2013). Έπειτα, χρησιμοποιήθηκε για την επεξεργασία του γονιδίου *Crygc* στα σπερματογόνια βλαστοκύτταρα ποντικών, επιδιορθώνοντας επιτυχώς τις γενετικές ανωμαλίες (Wu, et al., 2015). Η επεξεργασία των γονιδίων των SSCs παρέχει μια νέα θεραπευτική προσέγγιση για την ανδρική υπογονιμότητα που προκαλείται από γενετικά ελαττώματα των γεννητικών κυττάρων. Πρόσφατα, εκτελέστηκε κίολας η in vitro διόρθωση της σημειακής μετάλλαξης *Kit^w/Kit^{wv}* στα SSCs ποντικών με μη αποφρακτική αζωοσπερμία, με τη χρήση των CRISPR/Cas9 (Li, et al., 2019). Αφού μεταμοσχεύθηκαν ξανά στον όρχι, τα επιδιορθωμένα SSCs αποκατέστησαν με επιτυχία τη φυσική γονιμότητα των ποντικών (Li, et al., 2019).

Μια άλλη πειραματική μελέτη, απέδειξε την in vivo επιδιόρθωση του μεταλλαγμένου γονιδίου *Msh5* που προκαλεί μη αποφρακτική αζωοσπερμία (Chen, et al., 2022). Το σύστημα CRISPR/Cas9, sgRNA και το μονόκλωνο εκμαγείο DNA που εκφράζει το άγριου τύπου *Msh5* χορηγήθηκαν στα σπερματικά σωληνάκια του ποντικίου και εν συνεχεία εφαρμόστηκε ηλεκτροδιάτρηση, για την πιο αποτελεσματική διαμόλυνση. Μετά από πέντε εβδομάδες παρατηρήθηκαν ώριμα και φυσιολογικά σπερματοζωάρια στα σπερματικά σωληνάκια που περιείχαν το επιδιορθωμένο γονίδιο (Chen, et al., 2022).

Επίσης, σε πρόσφατη μελέτη αποδείχθηκε ότι η συνδυασμένη εφαρμογή της in vitro επέκτασης των SSCs και της γονιδιακής θεραπείας με τη μεσολάβηση των CRISPR-Cas9 μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αποτελεσματική θεραπεία της υπογονιμότητας σε ποντίκια, θέτοντας τη βάση για τη θεραπεία της ανθρώπινης αζωοσπερμίας, προκαλούμενη από μονογονιδιακές μεταλλάξεις (Wang, et al., 2021). Τα SSCs απομονώθηκαν από τους όρχεις ποντικών που είχαν διαμολυνθεί με το μεταλλαγμένο γονίδιο *Tex11^{PM/Y}*, προερχόμενο από ασθενή, επεκτάθηκαν in vitro και έπειτα μεσολάβησε η επεξεργασία του γονιδίου από το σύστημα CRISPR/Cas9 (βλ. Εικόνα 4.5.). Τα επιδιορθωμένα SSCs με-

ταφέρθηκαν πίσω στους όρχεις για την αποκατάσταση της σπερματογένεσης (Wang, et al., 2021).



Εικόνα 4.5. Ζωικό μοντέλο διόρθωσης μετάλλαξης TEX11 που προέρχεται από ασθενή με μη αποφρακτική αζωοσπερμία. Για την επικύρωση των παθογόνων ρόλων της μετάλλαξης $Tex11^{PM/Y}$, ενσωματώθηκε σε μοντέλο ποντικών και εν συνεχεία εμφάνισαν διακοπή της μείωσης. Τα SSCs που απομονώθηκαν από τον όρχι των ποντικών επεκτάθηκαν in vitro και πραγματοποιήθηκε διόρθωση γονιδίου με τη μεσολάβηση του CRISPR-Cas9. Ακολούθησε, η απομόνωση και η επέκταση των διορθωμένων SSCs καθώς και η αλληλούχιση του γονιδιώματος για τον αποκλεισμό των επιδράσεων εκτός στόχου. Τελικά, τα διορθωμένα SSCs μεταφέρθηκαν στους όρχεις των υπογόνιμων ποντικών και αποκατέστησαν την σπερματογένεση (Wang, et al., 2021).

Λαμβάνοντας υπόψη τις επιτυχημένες εφαρμογές τις γονιδιακής θεραπείας για την διόρθωση των αναπαραγωγικών διαταραχών των ζωικών μοντέλων, ενδεχομένως είναι εφικτή η εφαρμογή παρόμοιων τεχνικών γενετικής επεξεργασίας και σε ανθρώπινα κύτταρα (Wu, et al., 2015). Εξάλλου, τα ανθρώπινα SSCs έχουν επίσης διατηρηθεί in vitro για μεγάλα χρονικά διαστήματα (He, et al., 2010). Οπότε, η γονιδιακή θεραπεία στα SSCs θα μπορούσε να αξιοποιηθεί για τη ανδρική υπογονιμότητα που προκαλείται από γενε-

τικές ανωμαλίες και ασθένειες που συνδέονται με τα φυλετικά χρωμοσώματα (Singh, et al., 2011).

Ωστόσο, εξακολουθούν να υπάρχουν ηθικά προβλήματα και ζητήματα ασφάλειας σχετικά με τη χρήση των τεχνολογιών επεξεργασίας του γονιδιώματος στα SSCs, συμπεριλαμβανομένων του κινδύνου της μη στοχευμένης δράσης και της ανοσογονικότητας (Carrell, et al., 2020). Είναι, συνεπώς, επιτακτική η ενίσχυση της ασφάλειας της μεθόδου. Παρόλα αυτά, είναι σαφές ότι οι πρόοδοι που έχουν ήδη γίνει υποστηρίζουν τις δυνατότητες εξέλιξης της τεχνικής στην κλινική εφαρμογή, συμπεριλαμβανομένης της θεραπείας της ανδρικής υπογονιμότητας.

Κεφάλαιο 5 : Συζήτηση

5.1. Προκλήσεις γονιδιακής θεραπείας

Η γονιδιακή θεραπεία για την ανδρική υπογονιμότητα έχει αποδειχθεί επιτυχής σε ζωικά μοντέλα, με αποτέλεσμα την απόκτηση υγιών απογόνων, ωστόσο, παραμένει ακόμη μη εφαρμόσιμη στην κλινική πρακτική στους υπογόνιμους ασθενείς. Κυρίαρχο παράγοντα αποτελεί η έλλειψη πλήρους κατανόησης της γενετικής βάσης της υπογονιμότητας και της ταυτοποίησης όλων των παραλλαγών που οδηγούν σε αυτή (Carell, et al., 2020). Τα τελευταία χρόνια, έχουν γίνει σημαντικά βήματα προς τον εντοπισμό των αιτιολογικών μεταλλάξεων, δεδομένης κιάλας της αυξανόμενης πρόσβασης στην ανάλυση ολόκληρου του γονιδιώματος αλλά η υποκείμενη γενετική αιτία δεν έχει ανακαλυφθεί για όλες τις περιπτώσεις ανδρικής υπογονιμότητας (Krausz, et al., 2015; Mitchell, et al., 2017). Εξάλλου, πολλοί υπογόνιμοι άνδρες δεν έχουν αναγνωρίσιμα γενετικά ελαττώματα, καθιστώντας αδύνατη τη γονιδιακή θεραπεία για αυτούς, με εξαίρεση την ιδιοπαθή υπογονιμότητα, που πιθανώς οφείλεται σε γενετικά αίτια (Boekelheide & Sigman, 2008).

Η περαιτέρω εξέλιξη απαιτεί τεχνικές προόδους και τον εντοπισμό περισσότερων μεμονωμένων γονιδιακών ελαττωμάτων που ευθύνονται για την υπογονιμότητα καθώς και τους κυτταρικούς τύπους που εμπλέκονται. Υπάρχουν, όμως, μερικά εμπόδια σχετικά με την πλήρη κατανόηση της γενετικής βάσης της ανδρικής υπογονιμότητας. Αυτά περιλαμβάνουν τη μοριακή πολυπλοκότητα της σπερματογένεσης, τη σημαντική ετερογένεια των νόσων και τις προκλήσεις στην ταξινόμηση των φαινοτύπων της ανδρικής υπογονιμότητας (Aston & Conrad, 2013). Καθοριστική είναι επίσης η έλλειψη εργαλείων για τη λειτουργική επικύρωση των εντοπισμένων παραλλαγών, οι περιορισμένες πηγές δειγμάτων και η ανεπάρκεια χρηματοδοτήσεων σε σχέση με το μέγεθος των πειραμάτων που απαιτούνται για σημειωθεί πρόοδος σε αυτόν τον τομέα (Aston & Conrad, 2013; Carrell, et al., 2020). Επιπλέον, για τη θεραπεία των γνωστών κοινών γενετικών αιτιών της ανδρικής υπογονιμότητας, είναι σημαντική η ανάπτυξη τεχνολογίας που επιτρέπει τον χειρισμό μεγάλων τμημάτων DNA, συμπεριλαμβανομένων ολόκληρων χρωμοσωμάτων (Boekelheide & Sigman, 2008).

Μια άλλη πρόκληση για τη γονιδιακή θεραπεία της ανδρικής υπογονιμότητας είναι η συμβολή τόσο των σωματικών όσο των γεννητικών κυττάρων σε αυτή. Η επιτυχής

σπερματογένεση απαιτεί τη στενή παρακρινική αλληλεπίδραση μεταξύ των γεννητικών κυττάρων και πολλαπλών σωματικών κυττάρων, όπως τα κύτταρα Sertoli και Leydig, οπότε ένα ελάττωμα σε οποιοδήποτε από αυτά τα κύτταρα μπορεί να προκαλέσει στειρότητα (Hall, 2016). Επομένως, είναι σημαντική η γνώση του τύπου κυττάρου που δυσλειτουργεί για την κατεύθυνση της γονιδιακής θεραπείας προς αυτό (Brugh, et al., 2003). Όμως, αν και η γονιδιακή θεραπεία με στόχο τα γεννητικά κύτταρα και συγκεκριμένα τα σπερματογόνια βλαστοκύτταρα μπορεί να καταστεί σπουδαία για την αντιμετώπιση της υπογονιμότητας, είναι απαγορευμένη σύμφωνα με τη νομοθεσία, εν μέρει λόγω των πιθανών δυσμενών επιπτώσεων στις επόμενες γενιές, αλλά και επειδή μια τέτοια προσέγγιση εγείρει σοβαρά ηθικά ερωτήματα (Ishii, 2015). Από την άλλη, η μεταφορά ή επεξεργασία γονιδίων στα σωματικά κύτταρα του όρχεως μπορεί να αποκαταστήσει τη φυσιολογική σπερματογένεση, αν και υπάρχουν ανησυχίες σχετικά με την ασφάλεια, την αξιοπιστία και την ηθική της μεθόδου, που πρέπει να αντιμετωπιστούν (Ikawa, et al., 2002; Kanatsu-Shinohara, et al., 2002).

Οι σημαντικότερες προκλήσεις για τη γονιδιακή θεραπεία με στόχο τα σωματικά κύτταρα αφορούν την εύρεση ασφαλών τρόπων μεταφοράς των διαγονιδίων σε αυτά και η επακόλουθη συντήρηση και έκφραση τους. Για δεκαετίες, οι επιστήμονες αναζητούν φορείς μετάδοσης των γονιδίων με ειδική δράση στα κύτταρα ενδιαφέροντος, που να αποφεύγουν την ανοσολογική απόκριση, να μολύνουν τόσο διαιρούμενα όσο και μη διαιρούμενα κύτταρα και να παραμένουν επισωματικά ή διαφορετικά να εισάγουν το γενετικό υλικό στο γονιδίωμα χωρίς τον κίνδυνο πρόκλησης μεταλλαξιογένεσης. Σημαντική είναι επίσης η αποτελεσματική και μακροπρόθεσμη έκφραση των διαγονιδίων (Askou & Corydon, 2015).

Οι ιικοί όσο και οι μη ιικοί φορείς μπορούν να προκαλέσουν την ανοσολογική απόκριση του ξενιστή και επομένως τη πιθανή εξάλειψη τους αλλά και των διαμολυσμένων κυττάρων, μειώνοντας έτσι την αποτελεσματικότητα της θεραπείας. Η παραγωγή προφλεγμονωδών κυτοκινών και χημειοκινών έχει επίσης επιβλαβή επίδραση στον οργανισμό (Arruda, et al., 2009). Οι παράγοντες που επηρεάζουν την ανοσολογική απόκριση σε έναν φορέα αφορούν την οδό χορήγησης, τη δόση του φορέα, παράγοντες που σχετίζονται με τον ασθενή, όπως η ηλικία, η ανοσοποιητική κατάσταση και η λήψη φαρμάκων, τον τύπο των προαγωγών ή ενισχυτών που χρησιμοποιούνται και τις αλλαγές

που έγιναν στην αλληλουχία και/ή τη δομή του γονιδιώματος του φορέα (Nóbrega, et al., 2020).

Επιπρόσθετα, η επεξεργασία του γονιδιώματος θέτει επίσης προκλήσεις που σχετίζονται με την πιθανότητα δράσης εκτός στόχου, όπου οι νουκλεάσες προκαλούν θραύσεις σε ανεπιθύμητες θέσεις του γονιδιώματος, συνεχίζουν την δράση τους μετά την τροποποίηση του στόχου ή το gRNA συνδέεται με αλληλουχίες εκτός στόχου (Carrell, et al., 2020). Οι εισαγωγές, οι διαγραφές ή οι μετατοπίσεις μπορούν να ενεργοποιήσουν ή να απενεργοποιήσουν κρίσιμες αλληλουχίες στο γονιδίωμα, οι οποίες θα μπορούσαν να ενεργοποιήσουν ογκογονίδια ή να προκαλέσουν απροσδόκητο αποτέλεσμα όπως η προχωρημένη γήρανση (Cox, et al., 2015). Ακόμη και οι μικρές προσθήκες ή ελλείψεις μπορούν να έχουν ουσιαστικές επιπτώσεις στη γονιδιακή έκφραση και στην επακόλουθη υγεία του ασθενούς.

Τέλος, η ασφάλεια της γονιδιακής θεραπείας για την ανδρική υπογονιμότητα θα πρέπει να αξιολογείται σε σύγκριση με την ασφάλεια των τωρινών διαθέσιμων θεραπειών. Για παράδειγμα, η ICSI είναι μια θεραπεία διαθέσιμη σε ορισμένους υπογόνιμους άνδρες, αλλά τα παιδιά που συλλαμβάνονται με αυτόν τον τρόπο έχουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης χρωμοσωμικών ανωμαλιών, ορμονικής δυσλειτουργίας και επιγενετικών διαταραχών (Lamb, 2008). Σε περίπτωση ανάπτυξης ενός ιδανικού φορέα, οι γενετικές ανωμαλίες που σχετίζονται με την ανδρική υπογονιμότητα θα μπορούσαν να επιλυθούν και η γονιδιακή θεραπεία θα μπορούσε να θεωρηθεί ασφαλέστερη από την ICSI.

5.2. Ηθικά προβλήματα

Η τροποποίηση του ανθρώπινου γονιδιώματος στα πλαίσια της γονιδιακής θεραπείας υπόκειται σε ορισμένους ηθικούς περιορισμούς. Η ηθική έννοια και η αρχή αυτής της θεραπείας διαφέρουν από χώρα σε χώρα και η βασική κοινή συναίνεση αφορά την εφαρμογή της σε σωματικά κύτταρα, για ένα ευρύ φάσμα διαταραχών, συμπεριλαμβανομένων των κληρονομικών ασθενειών και του καρκίνου (Smith, 2003). Τα ηθικά ζητήματα σχετικά με τη σωματική γονιδιακή θεραπεία είναι κυρίως αυτά που σχετίζονται με τον κίνδυνο αυτής της διαδικασίας, όπως η τοξικότητα του φορέα και η ογκογένεση (Kojima, et al., 2006). Οπότε, υπάρχουν οι προοπτικές καθιέρωσης της γονιδιακής θεραπείας στα

σωματικά κύτταρα των όρχεων, εφόσον αντιμετωπιστούν οι ανησυχίες σχετικά με την ασφάλεια, την αξιοπιστία και την ηθική (Coward, et al., 2007).

Από την άλλη, ενώ η γονιδιακή θεραπεία των γεννητικών κυττάρων είναι θεωρητικά δυνατή, απαγορεύεται από το νόμο, εν μέρει λόγω των πιθανών δυσμενών επιπτώσεων στις επόμενες γενιές, χωρίς την κατανόηση του ακριβή μηχανισμού και του ελέγχου της γονιδιακής έκφρασης, αλλά και επειδή μια τέτοια προσέγγιση εγείρει σοβαρά ηθικά ερωτήματα (Sprink, 2004). Η υιοθέτηση της γονιδιακής θεραπείας ως μέσου χειρισμού της γονιδιακής έκφρασης στη γεννητική κυτταρική σειρά θα απαιτούσε ένα πολύ διαφορετικό νομικό πλαίσιο από το τρέχον, λαμβάνοντας υπόψη την αποτελεσματικότητα της μεταφοράς των γονιδίων, τις πιθανές αλλαγές στην παθολογία των όρχεων μετά τη θεραπευτική παρέμβαση, καθώς και την ενδεχόμενη επίδραση της στους προκύπτοντες απογόνους (Coward, et al., 2007). Όμως, πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι έχει ήδη επιτραπεί η θεραπευτική μεταφορά ολόκληρων μιτοχονδρίων, ακόμη και αν το μιτοχονδριακό DNA πιθανότατα μεταδίδεται στη γεννητική κυτταρική σειρά (Keeler, et al., 2017). Επιπλέον, σε αντίθεση με τα ανθρώπινα ηθικά ζητήματα, η βελτιστοποίηση της τεχνικής και η αξιολόγηση των δυσμενών επιπτώσεων μπορούν να δοκιμαστούν ενδελεχώς σε ζωικά μοντέλα.

Είναι επίσης σημαντικό να γίνει διάκριση μεταξύ της γενετικής επεξεργασίας που οδηγεί στη μεταγωγή της γεννητικής κυτταρικής σειράς και της επεξεργασίας των σωματικών κυττάρων ή των βλαστοκυττάρων (όπως τα SSCs και τα εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα) από τα οποία μπορούν να δημιουργηθούν γεννητικά κύτταρα ύστερα από κατάλληλη τροποποίηση (Magnusdottir & Surani, 2014). Συνεπώς, η γονιδιακή θεραπεία στα σωματικά κύτταρα ή τα βλαστοκύτταρα είναι ασφαλέστερη και είναι σημαντικό η επιστημονική κοινότητα να υποστηρίξει την δυνατότητα έρευνας και καθιέρωσης αυτής της πρακτικής (Porteus & Dann, 2015). Εξάλλου, μια καθαρά θεραπευτική προσέγγιση, που αποσκοπεί στη θεραπεία μιας ασθένειας και όχι στη βελτίωση, θα μπορούσε να ενισχύσει την πιθανότητα να επιτραπεί η γονιδιακή θεραπεία για την ανδρική υπογονιμότητα στο μέλλον, εφόσον αντιμετωπιστούν τα προβλήματα σχετιζόμενα με την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα.

5.3. Μελλοντικές προοπτικές

Η αξιοσημείωτη πρόοδος στις γενετικές τεχνολογίες τις τελευταίες δύο δεκαετίες έχουν συμβάλει στην ταυτοποίηση περαιτέρω αιτιών της ανδρικής υπογονιμότητας, οδηγώντας δυνητικά σε νέες θεραπείες όχι μόνο για την καλύτερη αντιμετώπιση των αναπαραγωγικών διαταραχών αλλά και για την επίλυση της υποκείμενης γενετικής μετάλλαξης με νέες τεχνικές γονιδιακής θεραπείας (Jenkins, et al., 2017). Επίσης, οι πρόσφατες εξελίξεις στις τεχνικές επεξεργασίας γονιδίων και των φορέων παράδοσης των γονιδίων ενισχύουν την δυνατότητα εφαρμογής τους για την θεραπεία της υπογονιμότητας στο άμεσο μέλλον. Έτσι, η πιθανότητα ανάπτυξης θεραπειών για ένα μεγάλο εύρος γενετικών διαταραχών συνίσταται όλο και πιο εφικτή δεδομένων κιόλας των διαθέσιμων οχημάτων μεταφοράς του γενετικού υλικού (Gardlík, et al., 2005). Παράλληλα, η ταχεία επέκταση των τεχνολογιών επεξεργασίας γονιδίων όπως το CRISPR/Cas9 καθιστά τον χειρισμό των γονιδίων *in vivo* πιο προσιτή στους ερευνητές, τόσο για την περαιτέρω μελέτη των βιολογικών συστημάτων όσο και για την ανακάλυψη νέων θεραπευτικών οδών (Shim, et al., 2017).

Η χρήση αυτών των τεχνολογιών για τη γονιδιακή θεραπεία έχει ήδη γίνει πραγματικότητα για ορισμένες διαταραχές, για τις οποίες οι επιτυχημένες κλινικές δοκιμές βρίσκονται υπό αξιολόγηση (Ginn, et al., 2018). Τα συστήματα μεταφοράς DNA καθώς και οι τεχνολογίες επεξεργασίας γονιδίων έχουν επίσης αξιοποιηθεί και μελετηθεί σε ζωικά μοντέλα για την μεταγωγή των όρχεων με ποικίλα ποσοστά επιτυχίας (Chen, et al., 2022; Ikawa, et al., 2002; Li, et al., 2019). Επομένως, αναμένεται η κλινική εφαρμογή και σε υπογόνιμους άνδρες στο άμεσο μέλλον.

Ορισμένες μελέτες έχουν στοχεύσει τα σωματικά κύτταρα των όρχεων, τα οποία είναι υπεύθυνα τόσο για την παραγωγή τεστοστερόνης όσο και για την υποστήριξη της σπερματογένεσης (Darbey & Smith, 2018). Με σύνθετους συνδυασμούς αυτών των διαθέσιμων εργαλείων, οι ερευνητές θα μπορούσαν να εντοπίσουν μια λύση για τη θεραπεία των κλινικά διαδεδομένων διαταραχών της σπερματογένεσης και της γονιμότητας, που πιθανώς προέρχονται από τα σωματικά κύτταρα του όρχεως. Υπάρχει, επιπλέον, η δυνατότητα στόχευσης της γεννητικής κυτταρικής σειράς αλλά η χρήση αυτών των εργαλείων στους ανθρώπινους όρχεις παραμένει αμφιλεγόμενη (Porteus & Dann, 2015). Ο-

πότε, είναι σημαντική η περαιτέρω διερεύνηση αυτών των τεχνικών για τον πλήρη προσδιορισμό της αποδοτικότητας και της ασφάλειας χρήσης τους σε αυτά τα κύτταρα.

Τέλος, η μεταφορά και επεξεργασία των γονιδίων στον όρχι απαιτεί προσεκτικές διαδικασίες σε σύγκριση με άλλα όργανα για βιολογικούς και ηθικούς λόγους (Kimmelman, 2008). Αν και απαιτούνται περισσότερες έρευνες σχετικά με μηχανισμό της σπερματογένεσης και την ανδρική υπογονιμότητα καθώς και η καθιέρωση ασφαλέστερων και πιο αποδοτικών τεχνικών μεταφοράς γονιδίων για την κλινική εφαρμογή, η γονιδιακή θεραπεία θα αποδειχθεί σπουδαία για την θεραπεία των αναπαραγωγικών διαταραχών, με πολλαπλά οφέλη για τους υπογόνιμους άνδρες.

Κεφάλαιο 6 : Συμπεράσματα

Η αξιοσημείωτη πρόοδος στις γενετικές τεχνολογίες και η ανακάλυψη νέων μεθόδων μεταφοράς και επεξεργασίας των γονιδίων έχει αποτελέσει τη βάση για την διερεύνηση των αιτιών της ανδρικής υπογονιμότητας αλλά και για την αντιμετώπιση των υποκείμενων γενετικών διαταραχών της. Δεδομένων των διαθέσιμων εναλλακτικών προσεγγίσεων που εστιάζουν κυρίως στην υποβοηθούμενη αναπαραγωγή, παραλείποντας την θεραπεία των αιτιολογικών παραγόντων της, η γονιδιακή θεραπεία καθίστανται καθοριστικής σημασίας.

Για την αποκατάσταση της φυσιολογικής λειτουργίας του ανδρικού αναπαραγωγικού συστήματος είναι αρχικά απαραίτητη ο εντοπισμός των υποκείμενων παθολογικών αιτιών με τον συνδυασμό της κλινικής εξέτασης και της εργαστηριακής διερεύνησης. Η γονιμότητα εξαρτάται από την φυσιολογική σπερματογένεση, την επιτυχή επιδιδυμική ωρίμανση, την ομαλή λειτουργία των επικουρικών αδένων καθώς και την επιτυχή σεξουαλική επαφή. Σε περιπτώσεις μη εκπλήρωσης αυτών των προϋποθέσεων προκύπτει η υπογονιμότητα, η οποία μπορεί να κατηγοριοποιηθεί σε προορχικά, ορχικά, μετα-ορχικά και γενετικά αίτια. Σε αυτά περιλαμβάνονται ο υπογοναδισμός και άλλες ορμονικές διαταραχές, οι ανωμαλίες και οι λοιμώξεις των όρχεων, όπως η κισσοκήλη και η ορχίτιδα, καθώς και οι αποφρακτικές βλάβες, η αυτοάνοση υπογονιμότητα και οι σεξουαλικές διαταραχές. Ενώ, οι γενετικοί παράγοντες αφορούν τις χρωμοσωμικές ανωμαλίες, τις μικροελλείψεις του Y χρωμοσώματος, τις μεταλλάξεις γονιδίων και τους πολυμορφισμούς. Ο προσδιορισμός των υπεύθυνων γονιδίων της υπογονιμότητας είναι καταλυτικός για την επιλογή των κατάλληλων κυττάρων-στόχων και την εφαρμογή της γονιδιακής θεραπείας.

Τα τελευταία χρόνια, έχουν γίνει σημαντικά βήματα προς τον εντοπισμό των αιτιολογικών μεταλλάξεων, δεδομένης κιάλας της αυξανόμενης πρόσβασης στην ανάλυση ολόκληρου του γονιδιώματος και της χρήσης knock-out ποντικών. Παρόλα αυτά η υποκείμενη γενετική αιτία δεν έχει ανακαλυφθεί για όλες τις περιπτώσεις ανδρικής υπογονιμότητας. Οι πρώιμες δοκιμές γονιδιακής θεραπείας θα μπορούσαν να στοχεύσουν γνωστά γονίδια των οποίων οι μεταλλάξεις ευθύνονται για την μη αποφρακτική αζωοσπερμία, καθώς δεν υπάρχει άλλη διαθέσιμη θεραπεία για αυτή τη πάθηση (Carrell, et al., 2020). Εξίσου κατάλληλους στόχους αποτελούν οι σημειακές μεταλλάξεις και οι μι-

κροελλείψεις των φυλετικών και των σωματικών χρωμοσωμάτων, δεδομένου ότι οι διαθέσιμες προσεγγίσεις έχουν περιορισμένη ικανότητα τροποποίησης μεγάλων περιοχών. Λαμβάνοντας υπόψη αυτές τις απαιτήσεις, δεν υπάρχει ακόμα ιδανικό υποψήφιο γονίδιο για τις αρχικές μελέτες αλλά μερικά από τα κατάλληλα πρώιμα υποψήφια γονίδια περιλαμβάνουν τα *TEX11*, *AURCK* και *SUN5* λόγω της φύσης των μεταλλάξεων τους, της συμβολής τους στην ανδρική υπογονιμότητα και της ειδικής έκφρασης τους στους όρχεις. Ειδικότερα, η επιτυχής *ex vivo* γονιδιακή θεραπεία στα SSCs ποντικών με αποφρακτική αζωοσπερμία, λόγω της μετάλλαξης του γονιδίου *TEX11*, ενισχύει την δυνατότητα αξιοποίησης του συγκεκριμένου γονιδίου για την θεραπεία της ανδρικής υπογονιμότητας (Wang, et al., 2021).

Η βελτίωση και η ανακάλυψη νέων φορέων παράδοσης των γονιδίων, έχουν επίσης ενισχύσει τις προοπτικές για την εκτέλεση της γονιδιακής θεραπείας στην κλινική πρακτική. Με το φάσμα των διαθέσιμων συστημάτων μεταφοράς, όπως οι χημικοί, οι φυσικοί και ιικοί φορείς, και τις αλληλεπικαλυπτόμενες ικανότητες τους, καθίσταται πιο εφικτή η ανάπτυξη θεραπειών για ένα μεγάλο εύρος γενετικών διαταραχών. Παράλληλα, η ταχεία επέκταση των τεχνολογιών επεξεργασίας γονιδίων όπως το σύστημα CRISPR-Cas9 συμβάλει στον πιο εύκολο *in vivo* χειρισμό των γονιδίων, για την περαιτέρω μελέτη των μεταλλάξεων αλλά και την ανακάλυψη νέων μεθόδων γονιδιακής θεραπείας. Παρόλα αυτά, κρίνεται σημαντική η προσεκτική επιλογή των συστημάτων μεταφοράς ανάλογα με το κύτταρο-στόχο, εξαιτίας των διαφορετικών χαρακτηριστικών και δράσεων τους.

Αυτοί οι φορείς αλλά και οι τεχνολογίες επεξεργασίας γονιδίων έχουν μελετηθεί στα γεννητικά και σωματικά κύτταρα των όρχεων ζωικών μοντέλων, με διάφορα και αισιόδοξα ποσοστά επιτυχίας. Η στόχευση των ανθρώπινων σπερματογόνιων βλαστοκυττάρων, αν και θα μπορούσε να αποδειχθεί σπουδαία για την αντιμετώπιση της υπογονιμότητας, παραμένει αμφιλεγόμενη λόγω ηθικών προβληματισμών. Από την άλλη, η μεταφορά ή επεξεργασία γονιδίων στα σωματικά κύτταρα του όρχεως, υπεύθυνα για την σπερματογένεση και τη παραγωγή τεστοστερόνης, θα μπορούσε να αποκαταστήσει τη φυσιολογική σπερματογένεση.

Επί του παρόντος, με τον συνδυασμό των διαθέσιμων τεχνικών, θεωρείται εφικτή η εφαρμογή της γονιδιακής θεραπείας για τις κλινικά διαδεδομένες και εντοπισμένες καταστάσεις ανδρικής υπογονιμότητας, που οφείλονται σε γενετικές ανωμαλίες των σωματικών κυττάρων. Ωστόσο, πριν την κλινική εφαρμογή είναι αναγκαία η διενέργεια πε-

ρισσότερων μελετών σε ζωικά μοντέλα και η επίλυση των προβλημάτων που σχετίζονται με την ασφάλεια και τα ηθικά ζητήματα της γονιδιακής θεραπείας. Τέλος, η ασφάλεια της γονιδιακής θεραπείας για την ανδρική υπογονιμότητα θα πρέπει επίσης να αξιολογείται σε σύγκριση με τους κινδύνους των ήδη διαθέσιμων θεραπειών.

Αναφορές

- Adamowicz, J., Aboumarzouk, O. M., Chłosta, P. L. & Drewa, T., 2014. Hypogonadotropic Hypogonadism. In: *Urology at a Glance*. Berlin: Springer, pp. 257-262.
- Agarwal, A. & Allamaneni, S. S., 2005. Disruption of spermatogenesis by the cancer disease process. *J Natl Cancer Inst Monogr*, Volume 34, p. 9.
- Agarwal, A. et al., 2021. Male infertility. *The Lancet*, 397(10271), pp. 319-333.
- Agarwal, A., Cho, C. & Esteves, S., 2016. Should we evaluate and treat sperm DNA fragmentation?. *Curr Opin Obstet Gynecol*, Volume 28, p. 164–171.
- Agarwal, A. et al., 2016. Abstinence time and its impact on basic and advanced semen parametrs. *Urology*, Volume 94, p. 102–110.
- Agarwal, A., Mulgund, A., Hamada, A. & Chyatte, M., 2015. A unique view on male infertility around the globe. *Reprod Biol Endocrinol*, 13(1), p. 37.
- Agarwal, A. et al., 2006. Reactive oxygen species as an independent marker of male factor infertility. *Fertil Steril*, 86(4), p. 878–885.
- Agur, A. M. & Dalley, A. F., 2005. *Grant's Anatomy*. 11 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Aks glaede, L., Wikström, A., Rajpert-De Meyts, E. & Dunkel, L., 2006. Natural history of seminiferous tubule degeneration in Klinefelter syndrome. *Hum Reprod Update*, Volume 12, pp. 39-48.
- Al Dosari, M. S. & Gao, X., 2009. Non viral gene delivery: Principle, limitations and recent progress. *AAPS J*, 11(4), pp. 671-681.
- Alukal, J. P. & Lamb, D. J., 2010. Advanced tests of sperm function. In: D. T. Carrell & C. M. Peterson, eds. *Reproductive Endocrinology and Infertility: Integrating Modern Clinical and Laboratory Practice*. New York: Springer, pp. 423-429.
- Anderson, R., Willis, B., Oswald, C. & Zaneveld, L., 1983. Male reproductive tract sensitivity to ethanol: a critical overview. *Pharmacol Biochem Behav*, Volume 18, pp. 305-310.
- Anguela, X. M. & High, K. A., 2019. Entering the Modern Era of Gene Therapy. *Annual review of medicine*, Volume 70, pp. 273-288.

- Anzalone, A. V., Koblan, L. W. & Liu, D. R., 2020. Genome editing with CRISPR-Cas nucleases, base editors, transposases and prime editors. *Nat. Biotechnol.*, Volume 38, p. 824–844.
- Arafat, M., Har-Vardi, I., Harlev, A. & Levitas, O., 2017. Mutation in TDRD9 causes non-obstructive azoospermia in infertile men. *J Med Genet*, 54(9), pp. 633-639.
- Araki, M. & Ishii, T., 2014. International regulatory landscape and integration of corrective genome editing into in vitro fertilization. *Reprod Biol Endocrinol*, Volume 12, p. 108.
- Arruda, V., Favaro, P. & Finn, J., 2009. Strategies to modulate immune responses: a new frontier for gene therapy. *Mol Ther*, Volume 17, p. 1492–1503.
- Askou, A. L. & Corydon, T. J., 2015. Somatic Gene Therapy Using Viral Vectors: Theoretical and Clinical Implications in Relation to Treatment of Genetic Conditions in Humans. In: X. Q. Li, D. Donnelly & T. G. Jensen, eds. *Somatic Genome Manipulation : Advances, Methods, and Applications*. New York: Springer.
- Aston, K. & Conrad, D., 2013. A review of genome-wide approaches to study the genetic basis for spermatogenic defects. *Methods Mol Biol*, Volume 927, p. 397–410.
- Athanasopoulos, T., Munye, M. M. & Yáñez-Muñoz, R., 2017. Nonintegrating Gene Therapy Vectors. 31(5), pp. 753-770.
- Avellino, G. & Oates, R. D., 2018. Congenital Bilateral Absence of the vas Deferens. *Elsevier*, pp. 263-265.
- Avidor-Reiss, T., 2018. Rapid Evolution of Sperm Produces Diverse Centriole Structures that Reveal the Most Rudimentary Structure Needed for Function. *Cells*, p. 67.
- Baker, K. & Sabanegh, J. E., 2013. Obstructive azoospermia: reconstructive techniques and results. *Clinics (Sao Paolo)*, p. 61–73.
- Bandoh, R. et al., 1992. Effect of sperm-immobilizing antibodies on the acrosome reaction of human spermatozoa. *Fertil Steril*, Volume 57, p. 387–392.
- Bank, A., 1996. Human somatic cell gene therapy. *Bioessays*, 18(12), pp. 999-1007.
- Barazani, Y., Stahl, P. J., Nagler, H. M. & Stember, D. S., 2012. Management of ejaculatory disorders in infertile men. *Asian J. Androl*, Volume 14, p. 525–529.
- Bardin, C. W., 1978. Pituitary-testicular axis. In: S. C. Yen & R. B. Jaffe, eds. *Reproductive Endocrinology: Physiology, Pathophysiology and Clinical Management*. Toronto: W. B. Saunders, pp. 110-125.

Barratt, C., Dunphy, B., McLeod, I. & Cooke, I., 1992. The poor prognostic value of low to moderate levels of sperm surface-bound antibodies. *Hum Reprod*, Volume 7, p. 95–98.

Barrett, K. E., Barman, S. M., Brooks, H. L. & Yuan, J. X., 2019. *Ganong's Review of Medical Physiology*. 26 ed. s.l.:McGraw-Hill Education.

Bashamboo, A. et al., 2010. Human male infertility associated with mutations in NR5A1 encoding steroidogenic factor 1. *American Journal of Human Genetics*, Volume 8, pp. 505-512.

Baskaran, S., Finelli, R., Agarwal, A. & Henkel, R., 2020. Diagnostic value of routine semen analysis in clinical andrology. *Andrologia*, pp. 1-12.

Begley, D., Firth, J. & Hoult, J., 1980. *Human Reproduction and Developmental*. London: The Macmillan Press.

Bergen, J., 2008. Nonviral approaches for neuronal delivery of nucleic acids. *Pharm Res*, Volume 25, pp. 983-998.

Bhasin, S., 2007. Approach to the Infertile Man. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 92(6), p. 1995–2004.

Blaese, R. M. et al., 1995. T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: initial trial results after 4 years. *Science*, Volume 270, p. 475–480.

Blagosklonova, O. et al., 2006. AZFa deletions in Sertoli cell-only syndrome: a retrospective study. *Mol Hum Reprod*, 6(9), pp. 795-799.

Blanchard, K. & Boekelheide, K., 1997. Adenovirus-mediated gene transfer to rat testis in vivo. *Biol Reprod*, Volume 56, p. 495–500.

Boekelheide, K. & Sigman, M., 2008. Is gene therapy for the treatment of male infertility feasible?. *Nature clinical practice Urology*, 5(11), pp. 590-593.

Bohring, C. & Krause, W., 2003. Immune infertility: towards a better understanding of sperm (auto)-immunity. The value of proteomic analysis. *Hum Reprod*, 18(5).

Bojesen, A. & Gravholt, C., 2007. Klinefelter syndrome in clinical practice. *Nat Clin Pract Urol*, Volume 4, p. 192–204.

Bongers, R. & Kedia, G., 2014. Erectile Dysfunction . In: A. S. Merseburger, M. A. Kuczyk & J. D. Moul, eds. *Urology at a Glance*. Berlin: Springer, pp. 263-267.

Bonini, C., Bondanza, A., Perna, S. K. & Kaneko, S., 2007. The Suicide Gene Therapy Challenge: How to Improve a Successful Gene Therapy Approach. *Molecular Therapy*, 15(7), pp. 1248-1252.

- Borgh, M. V. & Wyns, C., 2018. Fertility and infertility: Definition and epidemiology. *Clinical biochemistry*, Volume 62, pp. 2-10.
- Borgmann, J. et al., 2016. The human RHOX gene cluster: target genes and functional analysis of gene variants in infertile men. *Hum Mol Genet*, Volume 25, pp. 4898-4910.
- Boris-Lawrie, K. & Temin, H. M., 1994. The retroviral vector. Replication cycle and safety considerations for retrovirus-mediated gene therapy. *Ann N Y Acad Sci*, Volume 716, p. 59–70.
- Bosch, V., 2016. Gene Therapy. In: M. Schwab, ed. *Encyclopedia of Cancer*. Berlin: Springer.
- Bracken, M. et al., 1990. Association of cocaine use with sperm concentration, motility, and morphology. *Fertil Steril.*, 53(2).
- Braedel, H. et al., 1994. A possible ontogenic etiology for idiopathic left varicocele. *J Urol*, Volume 151, pp. 62-65.
- Braun, M. και συν., 2000. Epidemiology of erectile dysfunction: results of the 'Cologne Male Survey'. *Int J Impot Res*, 12(6), pp. 305-311.
- Brehm, R. & Steger, K., 2005. Regulation of Sertoli cell and germ cell differentiation. *Adv Anat Embryol Cell Biol*, Volume 181, pp. 1-93.
- Brinster, R. & Avarbock, M., 1994. Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA*, Volume 91, pp. 11303-11307.
- Brugh, V. M. 3., Maduro, M. R. & Lamb, D. J., 2003. Genetic disorders and infertility. *The Urologic clinics of North America*, 30(1), pp. 143-152.
- Brugh, V. M. & Lipshultz, L. I., 2004. Male factor infertility: Evaluation and management. *Medical Clinics of North America*, 88(2), pp. 367-385.
- Buck, L. G. et al., 2012. Heavy metals and couple fecundity, the LIFE Study. *Chemosphere* , p. 1201–1207.
- Bulaklak, K. & Gersbach, C., 2020. The once and future gene therapy. *Nat Commun*, Volume 11, p. 5820.
- Burris, T., Guo, W. & McCabe, E., 1996. The gene responsible for adrenal hypoplasia congenita, DAX-1, encodes a nuclear hormone receptor that defines a new class within the superfamily. *Recent Prog Horm Res*, Volume 51, p. 241.
- Burstein, S. & Gut, M., 1976. Intermediates in the conversion of cholesterol to pregnenolone: kinetics and mechanism. *Steroids*, Issue 28, p. 115–131.

- Bushman, F. D., 2007. Retroviral integration and human gene therapy. *J Clin Invest*, Volume 117, pp. 2083-2086.
- Buvat, J., 2003. Hyperprolactinemia and sexual function in men: a short review. *Int J Impot Res*, pp. 373-377.
- Carani, C. et al., 2005. Multicenter study on the prevalence of sexual symptoms in male hypo- and hyperthyroid patients. *J Clin Endocrinol Metab*, 90(12), p. 6472–6479.
- Carrell, D. T., Guo, J. & Aston, K., 2020. The Potential of CRISPR/Cas Gene Editing to Correct Male Infertility. In: M. Arafa, H. Elbardisi, A. Majzoub & A. Agarwal, eds. *Genetics of Male Infertility*. Cham: Springer, pp. 347-367.
- Carlsen, E., Giwercman, A., Keiding, N. & Skakkebaek, N. E., 1992. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *British medical journal*, 305(6854), pp. 609-613.
- Carrell, D. T., De Jonge, C. & Lamb, D. J., 2006. The Genetics Of Male Infertility: A Field of study whose time is now. *Archives of Andrology*, 52(4), pp. 269-274.
- Carrell, D. T., Guo, J. & Aston, K., 2020. The Potential of CRISPR/Cas Gene Editing to Correct Male Infertility. In: M. Arafa, H. Elbardisi, A. Majzoub & A. Agarwal, eds. *Genetics of Male Infertility*. Cham: Springer, pp. 347-367.
- Carter, B., 2005. Adeno-associated virus vectors in clinical trials. *Hum Gen Ther*, Volume 16, p. 541–550.
- Carter, J. N. et al., 1978. Prolactin-screening tumors and hypogonadism in 22 men. *N Engl J Med.*, pp. 847-852.
- Carter, M., 1993. Fertility in the testicular cancer patient. *World J Urol*, Volume 11, pp. 70-75.
- Casanueva, F. F. et al., 2006. Guidelines of the pituitary society for the diagnosis and management of prolactinomas. *Clin Endocrinol*, Volume 65, pp. 265-273.
- Cavazzana-Calvo, M. et al., 2000. Gene therapy for human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science*, Volume 288, p. 669–672.
- Celebi, C. et al., 2002. Transient transmission of a transgene in mouse offspring following in vivo transfection of male germ cells. *Mol Reprod Dev*, Volume 62, pp. 477-482.
- Centola, G., 2011. Semen: analysis and processing. In: C. Niederberger, ed. *An Introduction to Male Reproductive Medicine*. s.l.:Cambridge University Press, pp. 121-131.
- Chakraborty, C. et al., 2017. Therapeutic miRNA and siRNA: moving from bench to clinic as next generation medicine. *Mol Ther Nucleic Acids*, Volume 8, pp. 132-143.

- Chamberlain, K., Riyad, J. M. & Weber, T., 2016. Expressing Transgenes That Exceed the Packaging Capacity of Adeno-Associated Virus Capsids. *Human Gene Therapy Methods*, 27(1), pp. 1-12.
- Chandley, A. et al., 1975. . Cytogenetics and infertility in man. I. Karyotype and seminal analysis: results of a fiveyear survey of men attending a subfertility clinic. *Ann Hum Genet.*, Volume 39, pp. 231-254.
- Chandrasegaran, S., 2017. Recent advances in the use of ZFN-mediated gene editing for human gene therapy. *Cell & gene therapy insights*, 3(1), p. 33–41.
- Chan, P., Lee, R. & Li, P., 2008. Six years of experience with microsurgical longitudinal intussusception vasoepididymostomy (LIVE): a prospective analysis. *J Urol*, Volume 179, p. 591.
- Cheng, Y. C., 2008. *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis*. Austin: Landes Bioscience and Springer Science+Business Media.
- Chen, M., Yao, C. & Qin, Y., 2022. Mutations of MSH5 in nonobstructive azoospermia (NOA) and rescued via in vivo gene editing. *Sig Transduct Target Ther*, 7(1).
- Chen, Y. H., Keiser, M. S. & Davidson, B. L., 2018. Viral Vectors for Gene Transfer. *Current protocols in mouse biology*, 8(4), p. 58.
- Choi, J. et al., 2016. Lentivirus pre-packed with Cas9 protein for safer gene editing. *Gene Ther*, Volume 23, p. 627–633 .
- Choi, V. W. & Samulski, R. J., 2010. Gene Therapy. In: M. R. Speicher, et al. eds. *Vogel and Motulsky's Human Genetics: Problems and Approaches*. Berlin: Springer, pp. 867-874.
- Choi, Y. et al., 2010. Mutations in SOHLH1 gene associate with nonobstructive azoospermia. *Human Mutation*, Volume 31, p. 788–793.
- Clarke, G., Elliott, P. & Smaila, C., 1985. Detection of sperm antibodies in semen using the immunobead test: a survey of 813 consecutive patients. *Am J Reprod Immunol Microbiol*, Volume 7, p. 118–123.
- Close, C., Roberts, P. & Berger, R., 1990. Cigarettes, alcohol and marijuana are related to pyospermia in infertile men. *J Urol*, 144(4), p. 900–903.
- Cockrell, A. & Kafri, T., 2007. Gene delivery by lentivirus vectors. *Mol Biotechnol*, Volume 36, pp. 184-204.

Cohen, S. N., Chang, A. C., Boyer, H. & Helling, R., 1973. Construction of Biologically Functional Bacterial Plasmids In Vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 70(11), pp. 3240-3244.

Collins, J., Burrows, E., Yeo, J. & YoungLai, E., 1993. Frequency and predictive value of antisperm antibodies among infertile couples. *Hum Reprod*, Volume 8, pp. 592-598.

Cong, J., Yang, Y. & Wang, X., 2022. Deficiency of X-linked TENT5D causes male infertility by disrupting the mRNA stability during spermatogenesis. *Cell Discov*, 8(23).

Cooper, E., 1929. The histology of the retained testis in the human subject at different ages and its comparison with the testis. *J Anat*, Volume 64, pp. 5-10.

Cornwall, G., 2009. New insights into epididymal biology and function. *Hum. Reprod. Update.*, Volume 15, p. 213–227.

Cornwall, G., 2009. New insights into epididymal biology and function.. *Hum. Reprod. Update*, Volume 15, p. 213–227.

Corrigan-Curay, J. et al., 2015. Genome Editing Technologies: Defining a Path to the Clinic. *Molecular Therapy*, 23(5), pp. 796-806.

Cosentino, M. J. & Cockett, A. T. K., 1986. Review Article: Structure and Function of the Epididymis. *Urological Research*, 14(5).

Costabile, R. & Spevak, M., 2001. Characterization of patients presenting with male factor infertility in an equal access, no cost medical system. *Urology*, 58(6), p. 1021–1024.

Costanzo, L. S., 2018. *Physiology*. 16 ed. Philadelphia: Elsevier.

Coward, K., Kubota, H. & Parrington, J., 2007. In vivo Gene Transfer into Testis and Sperm: Developments and Future Application. *Archives of Andrology*, 53(4), pp. 187-197.

Cox, D., Platt, R. & Zhang, F., 2015. Therapeutic genome editing: prospects and challenges. *Nat Med*, Volume 21, p. 121–131.

Creasy, D. M. & Chapin, R. E., 2013. Male Reproductive System. In: M. W. Haschek, C. G. Rousseaux & M. A. Walling, eds. *Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology*. 3 ed. s.l.:Academic Press, pp. 2493-2598.

Cui, D. et al., 2015. Antisperm antibodies in infertile men and their effect on semen parameters: a systematic review and meta-analysis. *Clin Chim Acta*, Volume 444, p. 29.

Culver, K., 1994. Gene Therapy. In: *A Handbook for Physicians*. New York: Mary Ann Liebert.

- Daley, G. Q., 2007. Gametes from embryonic stem cells: a cup half empty or half full?. *Science*, Volume 316, pp. 409-410.
- Damiano, M. G., Mutharasan, R. & Tripathy, S., 2013. Templated high density lipoprotein nanoparticles as potential therapies and for molecular deliver. *Adv Drug Deliv Rev*, 65(5), pp. 649-662.
- Darbey, A. & Smith, L. B., 2018. Deliverable transgenics & gene therapy possibilities for the testes. *Molecular and Cellular Endocrinology*, Volume 468, pp. 81-94.
- Darby, E. & Anawalt, B., 2005. Male hypogonadism : an update on diagnosis and treatment. *Treat Endocrinol*, 4(5), p. 293–309.
- Daudin, M. et al., 2000. Congenital bilateral absence of the vas deferens: clinical characteristics, biological parameters, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations, and implications for genetic counseling. *Fertil Steril*, Volume 74.
- Davis-Dao, C. A., Tuazon, E., Sokol, R. & Cortessis, V., 2007. Male Infertility and Variation in CAG Repeat Length in the Androgen Receptor Gene: A Meta-analysis. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 92(11), p. 4319–4326.
- De Braekeleer, M. & Dao, T. N., 1991. Cytogenetic studies in male infertility: a review. *Hum Reprod*, pp. 245-250.
- De Miguel, M. & Donovan, P., 2003. Determinants of retroviral-mediated gene delivery to mouse spermatogonia. *Biol Reprod*, Volume 68, pp. 860-866.
- De Rosa, M., Zarrilli, S. & Di Sarno, A., 2003. Hyperprolactinemia in men. Clinical and biochemical features and response to treatment. *Endocrine*, pp. 75-82.
- Delalande, A. et al., 2012. Ultrasound and microbubble-assisted gene delivery: recent advances and ongoing challenges. *Ther Deliv*, 3(10), pp. 1199-1215.
- Denzer, C. et al., 2007. Pubertal development in obese children and adolescents. *Int J Obes*, Volume 31, pp. 1509-1519.
- Desai, N. et al., 2009. Physiologic and pathologic levels of reactive oxygen species in neat semen of infertile men. *Fertil Steril*, 92(5), p. 1626–1631.
- Diemer, T. & Desjardins, C., 1999. *Disorders of spermatogenesis*. San Diego: Academic.
- Dieterich, K. et al., 2007. Homozygous mutation of AURKC yields large-headed polyploid spermatozoa and causes male infertility. *Nat Genet* , Volume 39, pp. 661-665.

- Dimitriadis, F. et al., 2017. Pre-Testicular, Testicular, and Post-Testicular Causes of Male Infertility. In: M. Simoni & I. Huhtaniemi, eds. *Endocrinology of the Testis and Male Reproduction. Endocrinology*. Cham: Springer, pp. 981-1027.
- Dobashi, M., Goda, K., Maruyama, H. & Fujisawa, M., 2005. Erythropoietin gene transfer into rat testes by in vivo electroporation may reduce the risk of germ cell loss caused by cryptorchidism. *Asian J Androl*, Volume 7, p. 369–373.
- Dohle, G. et al., 2005. EAU guidelines on male infertility. *Eur Uro*, Volume 5, pp. 703-711.
- Dohle, G., Smit, M. & Weber, R., 2003. Androgens and male fertility. *World J Urol*, 21(5), pp. 341-345.
- Drummond, D., Noble, C., Hayes, M. & Park, J., 2008. Pharmacokinetics and in vivo drug release rates in liposomal nanocarrier development. *J Pharm Sci*, 97(11), p. 4696–4740.
- Dubensky, T. W. & S. S., 2003. Generation of retroviral packaging and producer cell lines for large-scale vector production with improved safety and titer. *Methods Mol Med*, Volume 76, pp. 309-330.
- Dunbar, C., High, K., Joung, J. K. & Kohn, D., 2018. Gene therapy comes of age. *Science*, Volume 359, pp. 1-10.
- Durairajanayagam, D., 2018. Lifestyle causes of male infertility. *Arab Journal of Urology*, 16(1), pp. 10-20.
- Durairajanayagam, D., Agarwal, A. & Ong, C., 2015. Causes, effects and molecular mechanisms of testicular heat stress. *Reprod Biomed Online*, Volume 30, pp. 14-27.
- Durairajanayagam, D., Sharma, R., Du Plessis, S. & Agarwal, A., 2014. Testicular heat stress and sperm quality. In: S. Du Plessis, ed. *Male infertility: a complete guide to lifestyle and environmental factors*. N.Y: Springer Science + Business Media.
- Duty, S. M. et al., 2003. Phthalate exposure and human semen parameters. *Epidemiology*, 14(3), pp. 269-277.
- Edey, A. & Sidhu, P., 2008. Male infertility: role of imaging in the diagnosis and management. *Imaging*, Volume 20, pp. 139-146.
- Eisenberg, M. L. & Lipshultz, L. I., 2011. Varicocele-induced infertility: Newer insights into its pathophysiology. *Indian journal of urology*, 27(1), p. 58–64.
- Eliasson, R., 2010. Semen analysis with regard to sperm number, sperm morphology and functional aspects. *Asian J Androl*, Volume 12, pp. 26-32.

El-Say, K. & El-Sawy, H., 2017. Polymeric nanoparticles: promising platform for drug delivery. *Int J Pharm*, 528(1), pp. 675-691.

Emanuele, M. A. & Emanuele, N., 1998. Alcohol's effects on male reproduction. *Alcohol Health Res World*, pp. 195-201.

Escors, D. & Breckpot, K., 2010. Lentiviral vectors in gene therapy: their current status and future potential. *Arch Immunol Ther Exp*, 58(2), pp. 107-119.

Esteves, S. & Agarwal, A., 2016. Afterword to varicocele and male infertility: current concepts and future perspectives. *Asian J Androl*, Volume 18, pp. 319-322.

Esteves, S. C., 2014. Clinical relevance of routine semen analysis and controversies surrounding the 2010 World Health Organization criteria for semen examination. *International braz j urol* , 40(4), pp. 433-453.

Esteves, S. C. & Agarwal, A., 2011. Novel Concepts in Male Infertility. *Int Braz J Urol*, Volume 37, pp. 5-15.

Evans, H., Fletcher, J., Torrance, M. & Hargreave, T., 1981. Sperm abnormalities and cigarette smoking. *Lancet*, pp. 627-629.

Fainberg, J. & Kashanian, J. A., 2019. Recent advances in understanding and managing male infertility. *F1000Research*, Volume 8.

Fair, W. R. & Wehner, N., 1976. The prostatic antibacterial factor, identity and significance. *Prog. Clin. Biol. Res*, Volume 6, p. 383.

Fakhro, K. et al., 2018. Point-of-care whole-exome sequencing of idiopathic male infertility. *Genet Med.*, 20(11), p. 1365–1373.

Fanslow, D. et al., 2014. Genome Editing in Mouse Spermatogonial Stem/Progenitor Cells Using Engineered Nucleases. *PLOS ONE*, 9(11).

Feldman, H., Goldstein, I. & Hatzichristou, D., 1994. Impotence and its medical and psychosocial correlates: results of the Massachusetts Male Aging Study. *J Urol*, 151(1), p. 54–61.

Felgner, P., Gadek, T. & Holm, M., 1987. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci USA*, Volume 84, pp. 7413-7417.

Ferguson, S. & Nguyen, J., 2016. Exosomes as therapeutics: the implications of molecular composition and exosomal heterogeneity. *J Control Release*, Volume 228, pp. 179-190.

Ferlin, A., 2007. Male infertility: role of genetic background. *Reproductive BioMedicine Online*, pp. 1-12.

- Ferlin, A., Arredi, B. & Foresta, C., 2006. Genetic causes of male infertility. *Reproductive Toxicology*, 22(2), pp. 133-141.
- Ferlin, A. & Foresta, C., 2005. The INSL3-LGR8 hormonal system in humans: testicular descent, cryptorchidism and testicular functions. *Curr Med Chem*, Volume 5, pp. 421-430.
- Ferlin, A. et al., 2006. Male infertility and androgen receptor gene mutations: clinical features and identification of seven novel mutations. *Clinical Endocrinology*, Volume 65, pp. 606-610.
- Fire, A. et al., 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, Volume 391, pp. 806-811.
- Foresta, C., Ferlin, A. & Moro, E., 2000. Deletion and expression analysis of AZFa-genes on the human Y chromosome revealed a major role for DBY in male infertility. *Hum Mol Genet*, Volume 9, p. 1161–1169.
- Foresta, C. et al., 2005. Genetic abnormalities among severely oligospermic men who are candidates for intracytoplasmic sperm injection. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 90(1), pp. 152-156.
- Foresta, C., Moro, E. & Ferlin, A., 2001. Y chromosome microdeletions and alterations of spermatogenesis. *Endocrine Reviews*, Volume 22, pp. 226-329.
- Foster, R. et al., 1999. Detection of antisperm-antibodies in patients with primary testicular cancer. *Int J Androl*, Volume 14, pp. 179-185.
- Fraietta, R., Zylberstejn, D. S. & Esteves, S. C., 2013. Hypogonadotropic Hypogonadism Revisited. *Clinics*, pp. 81-88.
- Gardlík, R. et al., 2005. Vectors and delivery systems in gene therapy. *Med Sci Monit*, 11(4), pp. 110-121.
- Gartner, L. P., 2017. *Textbook of Histology*. 4 ed. Philadelphia: Elsevier.
- Gassei, K. & Orwig, K. E., 2016. Experimental methods to preserve male fertility and treat male factor infertility. *Fertility and Sterility*, 105(2), pp. 256-266.
- Georgiou, I. et al., 2006. Genetic and epigenetic risks of intracytoplasmic sperm injection method. *Asian J Androl*, 8(6), p. 643–673.
- Gershoni, M. et al., 2017. A familial study of azoospermic men identifies three novel causative mutations in three new human azoospermia genes. 19(9), pp. 998-1006.
- Ghuman, N. & Ramalingam, M., 2018. Male infertility. *Obstetrics, Gynaecology & Reproductive Medicine*, 28(1), pp. 7-14.

- Giacca, M., 2010. Introduction to Gene Therapy. In: *Gene Therapy*. Verlag: Springer, pp. 1-7.
- Gilany, K. et al., 2015. Exploring the human seminal plasma proteome: an unexplored gold mine of biomarker for male infertility and male reproduction disorder. *J. Reprod. Infertil.*, pp. 61-71.
- Gilbert, B., Witkin, S. & Goldstein, M., 1990. Immunology of male infertility. *AUA Update Series*, p. 590.
- Gilgenkrantz, H., Duboc, D. & Juillard, V., 1995. Transient expression of genes transferred in vivo into heart using first generation adenoviral vectors: role of the immune response. *Hum Gen Ther*, Volume 6, p. 1265–1274.
- Ginn, S. et al., 2018. Gene therapy clinical trials worldwide to 2017: An update. *J Gene Med*, Volume 20.
- Ginn, S. L. et al., 2013. Gene therapy clinical trials worldwide to 2012 — an update. *J. Gene Med.*, Volume 15, pp. 65-75.
- Gollenberg, A. et al., 2010. Semen quality in fertile men in relation to psychosocial stress. *Fertil Steril*, Volume 93, p. 1104–1111.
- Gonçalves, G. & Paiva, R., 2017. Gene therapy: advances, challenges and perspectives. *Einstein (Sao Paulo, Brazil)*, 15(3), p. 369–375.
- Gordon, J., 2003. Seminiferous tubule cannulation (STC): a new, sensitive technique for detecting gene transfer in developing sperm. *Gene Ther*, Volume 10, p. 43–50.
- Gorelick, J. I. & Goldstein, M., 1993. Loss of fertility in men with varicocele. *Fertil. Steril*, Volume 59, p. 613–616.
- Gori, J. et al., 2015. Delivery and Specificity of CRISPR/Cas9 Genome Editing Technologies for Human Gene Therapy. *Hum Gen Ther*, 26(7), pp. 443-451.
- Gray, H., 1918. *Anatomy of the Human Body*. 20 ed. Philadelphia: Lea & Febiger.
- Groth, K. et al., 2013. Klinefelter syndrome—a clinical update. *J Clin Endocrinol Metab*, 98(1), pp. 20-30.
- Gu, A. et al., 2010. Polymorphisms of nucleotide-excision repair genes may contribute to sperm DNA fragmentation and male infertility. *Reproductive biomedicine online*, 21(5), pp. 602-609.

- Gupta, B. P., Murad, M. H. & Clifton, M. M., 2011. The effect of lifestyle modification and cardiovascular risk factor reduction on erectile dysfunction: a systematic review and meta-analysis. *Arch Intern Med*, 171(20), p. 1797–1803.
- Gupta, V., Sengupta, M., Prakash, J. & Tripathy, B., 2017. Gene Therapy. In: *Basic and Applied Aspects of Biotechnology*. Signapore: Springer Science+Business Media, pp. 351-372.
- Hackney, A. C., 1996. The male reproductive system and endurance exercise. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 28(2), pp. 180-189.
- Hadziselimovic, F. & Herzog, B., 2001. The importance of both and early orchidopexy and germ cell maturation for fertility. *Lancet*, Volume 358, p. 1156–1157.
- Halbert, C., Allen, J. & Miller, A., 2002. Efficient mouse airway transduction following recombination between AAV vectors carrying parts of a larger gene. *Nat. Biotechnol*, 20(7), pp. 697-701.
- Hall, J. E., 2016. *Guyton and Hall textbook of Medical Physiology*. 13 ed. Philadelphia: Elsevier.
- Hammoud, S. et al., 2014. Chromatin and transcription transitions of mammalian adult germline stem cells and spermatogenesis. *Cell Stem Cell*, 15(2), p. 239–253.
- Handelsman, D., Conway, A., Boylan, L. & Turtle, J., 1984. Young's syndrome. Obstructive azoospermia and chronic sinopulmonary infections. *N Engl J Med*, Volume 310, pp. 3-9.
- Hansen, J. T. & Lambert, D. R., 2011. *Netter's Ανατομία Ι: Βασική Κλινική Ανατομία*. Αθήνα: Π.Χ. ΠΑΣΧΑΛΙΔΗΣ.
- Haque, O., Vitale, J., Agarwal, A. & du Plessis, S., 2014. The Effect of Smoking on Male Infertility. In: S. du Plessis, A. Agarwal & E. Sabanegh Jr, eds. *Male Infertility: A Complete Guide to Lifestyle and Environmental Factors*. New York: Springer Science+Business Media, pp. 19-30.
- Hardelin, J. & Dode, C., 2008. The complex genetics of Kallmann syndrome: KAL1, FGFR1, FGF8, PROKR2, PROK2, et al. *Sex Dev*, Volume 2, pp. 181-193.
- Hargreave, T. B., 2000. Genetic basis of male fertility. *British medical bulletin*, 56(3), pp. 650-671.
- Harlev, A. et al., 2015. Smoking and male infertility: an evidence-based review. *World J Mens Health*, Volume 33, pp. 143-160.

- Harnisch, B. & Oates, R., 2012. Genetic disorders related to male factor infertility and their adverse consequences. *Seminars in Reproductive Medicine*, 30(2), pp. 105-115.
- Harrington, K. J., Spitzweg, C. & Bateman, A. R., 2001. Gene therapy for Prostate cancer: current status and future prospects. *The Journal of Urology*, 166(4).
- Harris, S. E., Kandil, H. M. S. & Niederberger, C. S., 2011. Endocrinopathies in Male Infertility. In: *Male Infertility, Problems and Solutions*. London: Springer.
- Hastie, N. et al., 2013. The Wilms Tumor Gene, Wt1, Is Critical for Mouse Spermatogenesis via Regulation of Sertoli Cell Polarity and Is Associated with Non-Obstructive Azoospermia in Humans. *PLoS Genet*.
- Heffner, L. J. & Schust, D. J., 2014. *The Reproductive System at a Glance*. 4 ed. Chichester: John Wiley & Sons.
- Heidenreich, A. et al., 1994. Risk factors for antisperm antibodies in infertile men. *Am J Reprod Immunol*, Volume 31, p. 69–76.
- Hendry, W., Stedronska, C. & Jones, C., 1983. Semen analysis in testicular cancer and Hodgkin's disease: pre- and post-treatment findings and implications for cryopreservation. *Br J Urol*, Volume 55, pp. 769-773.
- Henkel, R., 2012. Infection In Infertility. In: S. Parekattil & A. Agarwal, eds. *Male Infertility, Contemporary Clinical Approaches, Andrology, ART & Antioxidants*. NY: Springer, pp. 261-272.
- Henkel, R. et al., 2007. Age-related changes in seminal polymorphonuclear elastase in men with asymptomatic inflammation of the genital tract. *Asian J Androl*, Volume 9, pp. 299-304.
- Hermes, G. et al., 2020. Human sperm uses asymmetric and anisotropic flagellar controls to regulate swimming symmetry and cell steering. *Science Advances*, 6(31).
- Herweiger, H. & Wolff, J., 2006. Progress and prospects: Hydrodynamic gene delivery. *Gen Ther*, Volume 14, pp. 99-107.
- Herzog, R. & Popplewell, L., 2020. *Fast Facts: Gene Therapy*. Oxford: S. Karger Publishers.
- He, Z. et al., 2010. Isolation, characterization, and culture of human spermatogonia. *Biol Reprod*, Volume 82, pp. 363-372.
- Hinton, B. et al., 1996. The role of the epididymis in the protection of spermatozoa. *Curr. Top. Dev. Biol.*, pp. 61-102.

Hirsch, M. L., Wolf, S. J. & Samulski, R. J., 2016. Delivering transgenic DNA exceeding the carrying capacity of AAV vectors. *Methods in Molecular Biology*, Volume 1382, pp. 21-39.

Holstein, A., Schulze, W. & Davidoff, M., 2003. Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. *Reprod Biol Endocrinol*.

Honaramooz, A. et al., 2008. Adeno-associated virus (AAV)-mediated transduction of male germ line stem cells results in transgene transmission after germ cell transplantation. Volume 22, pp. 374-382.

Hooley, R. P. et al., 2009. Intra-testicular injection of adenoviral constructs results in Sertoli cell-specific gene expression and disruption of the seminiferous epithelium. 138(2), pp. 361-370.

Hopps, C., Goldstein, M. & Schlegel, P., 2002. The diagnosis and treatment of the azoospermic patient in the age of intracytoplasmic sperm injection.. *Urol Clin North Am*, 29(4), p. 895–911.

Hopps, C. et al., 2003. Detection of sperm in men with Y chromosome microdeletions of the AZFa, AZFb and AZFc regions. *Human Reproduction*, 18(8), p. 1660–1665.

Hossler, F., 2014. *Ultrastructure Atlas of Human Tissues*. 1 ed. s.l.:John Wiley & Sons.

Hotaling, J. & Carrell, D., 2014. Clinical genetic testing for male factor infertility: Current applications and future directions. *Andrology*, 2(3), p. 339–350.

Hotaling, J. M., 2014. Genetics of Male Infertility. *Urologic Clinics of North America*, 41(1), pp. 1-17.

Hou, J., Yang, S. & Yang, H., 2014. Generation of male differentiated germ cells from various types of stem cells. *Reproduction*, Volume 147, p. 179–188.

Howell, S. & Shalet, S., 2001. Testicular function following chemotherapy. *Hum Reprod Update*, Volume 7, pp. 363-369.

Huang, M., Sun, R., Huang, Q. & Tian, Z., 2017. Technical improvement and application of hydrodynamic gene delivery in study of liver diseases. *Front Pharmacol* , Volume 8, p. 591.

Hucklenbroich, K. et al., 2005. Partial deletion in the AZFc region of the Y chromosome occur in men with impaired as well as normal spermatogenesis. *Hum Reprod*., Volume 20, pp. 191-197.

Hughes, I. A., Werner, R., Bunch, T. & Hiort, O., 2012. Androgen insensitivity syndrome. *Semin. Reprod. Med*, Volume 30, p. 432–442 .

Huguet, E. & Esponda, P., 1998. Foreign DNA introduced into the vas deferens is gained by mammalian spermatozoa. *Mol Reprod Dev*, Volume 51, pp. 42-52.

Huhtaniemi, I. & Alevizaki, M., 2007. Mutations along the hypothalamic-pituitary-gonadal axis affecting male reproduction. *Reprod Biomed Online*, Volume 15, pp. 622-632.

Hull, M. G., Glazener, C. M. & Kelly, N. J., 1985. Population study of causes, treatment, and outcome of infertility. *Br Med J (Clin Res Ed)*, Volume 291, p. 1693–1697.

Hummler, E. et al., 1994. Targeted mutation of the CREB gene: compensation within the CREB/ATF family of transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Volume 91, pp. 5647-5651.

Hu, P. et al., 2015. Generation of a stable packaging cell line producing high-titer PPT-deleted integration-deficient lentiviral vectors. *Molecular Therapy-Methods & Clinical Development*, Volume 2, p. 15025.

Hutson, J., Balic, A., Nation, T. & Southwell, B., 2010. Cryptorchidism. *Semin Pediatr Surg*, 19(3), pp. 215-224.

Hu, Y., 2008. Baculoviral vectors for gene delivery: a review. *Curr Gene Ther*, Volume 8, pp. 54-65.

Huyghe, E., Matsuda, T. & Thonneau, P., 2003. Increasing incidence of testicular cancer worldwide: a review. *J Urol*, 170(1), p. 5–11.

Hu, Z. et al., 2012. A genome-wide association study in Chinese men identifies three risk loci for non-obstructive azoospermia. *Nat. Genet.*, Volume 44, p. 183–186.

Ikawa, M. et al., 2002. Restoration of spermatogenesis by lentiviral gene transfer: offspring from infertile mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, Volume 99, pp. 7524-7529.

Ishii, T., 2015. Germline genome-editing research and its socioethical implications. *Trends in Molecular Medicine*, 21(8), pp. 473-481.

Ittmann, M., 2018. Anatomy and Histology of the Human and Murine Prostate. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 8(5).

Jaenisch, R. & Mintz, B., 1974. Simian virus 40 DNA sequences in DNA of healthy adult mice derived from preimplantation blastocysts injected with viral DNA. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 70(4), pp. 1250-1254.

Jakob, M. et al., 2005. No evidence for germ-line transmission following prenatal and early postnatal AAV-mediated gene delivery. *J. Gene Med*, Volume 7, pp. 630-637.

- James, E. R. et al., 2020. The Role of the Epididymis and the Contribution of Epididymosomes to Mammalian Reproduction. *International journal of molecular sciences*, 21(15).
- Jarow, J. P., 2007. Diagnostic approach to the infertile male patient. *Endocrinol Metab Clin North Am*, Volume 36, pp. 297-311.
- Jarow, J. et al., 2011. The optimal evaluation of the infertile male: AUA best practice statement. *AUA Best Pract Statement*,, pp. 5-7.
- Jenkins, T., Aston, K., James, E. & Carrell, D., 2017. Sperm epigenetics in the study of male fertility, offspring health, and potential clinical applications. *Syst Biol Reprod Med*, 63(2), p. 69–76.
- Jensen, C. et al., 2017. Varicocele and male infertility. *Nature Reviews Urology*, Volume 14, pp. 523-533.
- Jiao, Y. et al., 2020. Research Progress of nucleic acid delivery vectors for gene therapy. *Biomed Microdevices*, 22(16).
- Jinek, M. et al., 2012. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial. *Science*, Volume 337, pp. 816-821.
- Jin, L. et al., 2014. Current progress in gene delivery technology based on chemical methods and nano carriers. *Theranostics*, 4(3), pp. 240-255.
- Johnson, L., Petty, C. S. & Neaves, W. B., 1980. The relationship of biopsy evaluations and testicular measurements to over-all daily sperm production in human testes. *Fertil Steril*, 34(1), p. 36–40.
- Johnson, M. & Everitt, B., 1984. *Essential Reproduction*. London: Blackwell Scientific.
- Jones, C. et al., 2013. Overcoming non viral gene delivery barriers: perspective and future. *Mol Pharm.*, 10(11), p. 4082–4098.
- Jones, R., 1999. To store or mature spermatozoa? The primary role of the epididymis. *Int. J. Androl.*, pp. 57-67.
- Junaidi, A. et al., 2005. Norethisterone enanthate has neither a direct effect on the testis nor on the epididymis: A study in adult male cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Eur J Endocrinol*, Issue 152, pp. 655-661.
- Jung, A. & Schuppe, H., 2007. Influence of genital heat stress on semen quality in humans. *Andrologia*, Τόμος 39, pp. 203-215.

- Jungwirth, A. et al., 2012. European Association of Urology Guidelines on Male Infertility: The 2012 Update. *European Association of Urology*, pp. 324-332.
- Jungwirth, A. et al., 2012. European Association of Urology Working Group on Male Infertility. European Association of Urology guidelines on Male Infertility: the 2012 update. *European Urology*, 62(2), pp. 324-332.
- Kafri, T., Blomer, U. & Peterson, D., 1997. Sustained expression of genes delivered directly into liver and muscle by lentiviral vectors. *Nat Genet*, Volume 17, p. 314–317.
- Kamischke, A., Baumgardt, A., Horst, J. & Nieschlag, 2003. Clinical and diagnostic features of patients with suspected Klinefelter syndrome. *Journal of Andrology*, Volume 24, pp. 41-48.
- Kanasty, R. L., Whitehead, K. A., Vegas, A. J. & Anderson, D. G., 2012. Action and reaction: the biological response to siRNA and its delivery vehicles. *Mol. Ther.* , Volume 20, pp. 513-524.
- Kanatsu-Shinohara, M. et al., 2002. Adenovirus-mediated gene delivery and in vitro microinsemination produce offspring from infertile male mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, Volume 99, pp. 1383-1388.
- Karishma, K., Agarwal, A. & du Plessis, S. S., 2014. BMI and Obesity . In: *Male Infertility, A Complete Guide to Lifestyle and Environmental factors*. s.l.:Springer, pp. 31-45.
- Kasak, L. et al., 2018. Bi-allelic Recessive Loss-of-Function Variants in FANCM Cause Non-obstructive Azoospermia. *Am. J. Hum. Genet*, Volume 103, pp. 200-212.
- Kasturi, S. S., Osterberg, C., Tannir, j. & Brannigan, R. E., 2009. The effect of genital tract infection and inflammation on male infertility. In: L. I. Lipshultz, S. S. Howards & N. C. S, eds. *Infertility in the male*. 4 ed. New York: Cambridge University Press, pp. 295-329.
- Kaufmann, K. et al., 2013. Gene therapy on the move. *EMBO Mol Med*, Volume 5, p. 1642–1661.
- Kay, M., 2011. State-of-the-art gene-based therapies: the road ahead. *Nature Rev. Genet.*, Volume 12, pp. 316-328.
- Kedia, G., 2014. Male Infertility. In: A. S. Merseburger, M. A. Kuczyk & J. D. Moul, eds. *Urology at a Glance*. Berlin: Springer, pp. 13-18.
- Keeler, A. M., El Mallah, M. K. & Flotte, T. R., 2017. Gene Therapy 2017: Progress and Future Directions. *Clin Transl Sci*, Volume 10, pp. 242-248.

Kenneth, S., 2003. *Anatomy & Physiology The Unity of Form and Function*. 2 ed. s.l.:McGraw Hill Science Engineering Math.

Khan, M., 2016. Gene Therapy. In: *Immunopharmacology*. Cham: Springer, pp. 363-376.

Khelifa, B. et al., 2011. A new AURKC mutation causing macrozoospermia: implications for human spermatogenesis and clinical diagnosis. *Molecular human reproduction*, 17(12), pp. 762-768.

Kherraf, Z. et al., 2017. SPINK2 deficiency causes infertility by inducing sperm defects in heterozygotes and azoospermia in homozygotes. *EMBO Mol Med*, 9(8), p. 132–149.

Kimmelman, J., 2008. The ethics of human gene transfer. *Nat Rev Genet*, Volume 9, p. 239–244.

Kivela, A. M., 2017. High plasma lipid levels reduce efficacy of adenovirusmediated gene therapy. 7(1), p. 386.

Kojima, Y. et al., 2008. Gene Transfer to Sperm and Testis: Future Prospects of Gene Therapy for male infertility. *Current Gene Therapy*, 8(2), pp. 121-134.

Kojima, Y. et al., 2010. Therapeutic Potential of Gene Transfer to Testis; Myth or Reality?. In: C. Kand, ed. *Gene Therapy Applications*. London: IntechOpen.

Kojima, Y. et al., 2008. No evidence of germ-line transmission by adenovirus-mediated gene transfer to mouse testes. *Fertil Steril*, Volume 89, p. 1448–1454.

Kojima, Y. et al., 2006. Role of transcription factors Ad4BP/SF-1 and DAX-1 in steroidogenesis and spermatogenesis in human testicular development and idiopathic azoospermia. *Int J Urol*, Volume 13, pp. 785-793.

Kojima, Y., Sasaki, S. & Kohri, K., 2006. Current Research and Future Prospects for Gene Therapy in Andrology. In: W. Schill, F. Comhaire & T. B. Hargreave, eds. *Andrology for the Clinician*. Berlin: Springer, pp. 592-598.

Kojima, Y. et al., 2003. Effects of adenovirus mediated gene transfer to mouse testis in vivo on spermatogenesis and next generation. *J Urol*, Volume 170, pp. 2109-2114.

Komor, A. C. et al., 2016. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature*, Volume 533, pp. 420-424.

Kotan, L. et al., 2016. Idiopathic hypogonadotropic hypogonadism caused by inactivating mutations in SRA1. *Clin Res Pediatr Endocrinol*, 8(2), pp. 125-134.

Krasnykh, V. et al., 1996. Generation of recombinant adenovirus vectors with modified fibers for altering viral tropism. *J Virol*, Volume 70, p. 6839.

- Krassas, G. & Pontikides, N., 2004. Male reproductive function in relation with thyroid alterations. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, Τόμος 18, p. 183–195.
- Krassas, G. et al., 2008. Erectile dysfunction in patients with hyper- and hypothyroidism: how common and should we treat?. *J Clin Endocrinol Metab*, Volume 93, p. 1815–1819.
- Krausz, C., 2011. Male infertility: Pathogenesis and clinical diagnosis. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 25(2), pp. 271-285.
- Krausz, C., 2017. Genetic Analysis in Male Infertility. In: M. Simoni & I. T. Huhtaniemi, eds. *Endocrinology of the Testis and Male Reproduction*. Cham: Springer International Publishing, pp. 517-530.
- Krausz, C. & Cioppi, F., 2021. Genetic Factors of Non-Obstructive Azoospermia: Consequences on Patients' and Offspring Health. *J. Clin. Med*, Volume 10, p. 4009.
- Krausz, C., Escamilla, A. R. & Chianese, C., 2015. Genetics of male infertility: from research to clinic. *Reproduction*, 150(5), pp. 159-174.
- Krausz, C., Escamilla, A. R. & Chianese, C., 2015. Genetics of male infertility: from research to clinic. *Reproduction*, 150(5), pp. 159-174.
- Krausz, C. et al., 1994. Stimulation of oxidant generation by human sperm suspensions using phorbol esters and formyl peptides: relationships with motility and fertilization in vitro. *Fertility and Sterility*, 62(3), pp. 599-605.
- Krausz, C. & Riera-Escamilla, A., 2018. Genetics of male infertility. *Nat Rev Urol* , Volume 15, pp. 369-384.
- Kretser, D. M., Loveland, K. L., Meinhardt, A. & D, S., 1998. Spermatogenesis. *Human Reproduction*, Volume 13, pp. 1-8.
- Kubota, H. & Brinster, R., 2006. Technology insight: In vitro culture of spermatogonial stem cells and their potential therapeutic uses. *Nat Clin Pract Endocrino Metab* , Volume 12, pp. 99-108.
- Kumar, B. et al., 1990. Reproductive endocrine functions in men with primary hypothyroidism: effect of thyroxine replacement. *Horm Res*, Volume 34, p. 215–218.
- Kumar, N. & Singh, A. K., 2021. The anatomy, movement, and functions of human sperm tail: an evolving mystery. *Biology of Reproduction*, 104(3), p. 508–520.
- Kurokawa, S. et al., 2005. Effect of epidermal growth factor on spermatogenesis in the cryptorchid rat. *J Urol*, Volume 174, pp. 2415-2419.

Kusz-Zamelczyk, et al., 2013. Mutations of NANOS1, a human homologue of the *Drosophila* morphogen, are associated with a lack of germ cells in testes or severe oligo-astheno-teratozoospermia. *Journal of Medical Genetics*, Volume 50, p. 187–193.

Lamb, D. J., 2008. Would gene therapy for the treatment of male infertility be safe?. *Nature clinical practice. Urology*, 5(11), pp. 594-595.

Lambert, B., 1951. The frequency of mumps and mumps orchitis. *Acta Genet Stat Med*, p. 166.

Lambricht, L. et al., 2016. Clinical potential of electroporation for gene therapy and DNA vaccine delivery. *Expert Opin Drug Deliv*, 13(2), pp. 295-310.

Lasic, D., 1998. Novel applications of liposomes. *Trends Biotechnol*, 16(7), pp. 307-321.

Laumann, E., Paik, A. & Rosen, R., 1999. Sexual dysfunction in the United States: prevalence and predictors. *JAMA*, Volume 281, pp. 537-544.

Leaver, R. B., 2016. Male infertility: an overview of causes and treatment options. *British Journal of Nursing*, Volume 25, pp. 35-40.

Lei, Z. et al., 2001. Targeted disruption of luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptor gene. *Mol Endocrinol*, Issue 5, pp. 184-200.

Levine, H. et al., 2017. Temporal trends in sperm count: a systematic review and meta-regression analysis. *Human reproduction update*, 23(6), pp. 646-659.

Levitas, E., Lunenfeld, E. & Weiss, N., 2005. Relationship between the duration of sexual abstinence and semen quality: analysis of 9489 semen samples. *Fertil Steril*, Volume 83, p. 1680.

Lewis, J. M. & Kaplan, W. E., 2009. Anatomy and embryology of the male reproductive tract and gonadal development. In: L. Lipshultz, S. Howards & N. C. S, eds. *Infertility in the male*. 4 ed. New York: Cambridge University Press, pp. 1-13.

Lipshultz, L., Howards, S. & Niederberger, C., 2009. *Infertility in the Male*. 4 ed. Cambridge: Cambridge University Press.

Lipshultz, L. I., 1976. Cryptorchidism in the subfertile male. *Fertil Steril*, Volume 27, p. 609–620.

Li, S. & Huang, L., 2000. Nonviral gene therapy: Promises and challenges. *Gen Ther*, Volume 7, pp. 31-34.

Li, S. & Huang, L., 2006. Gene therapy progress and prospects: non-viral gene therapy by systemic delivery. *Gene Ther*, Volume 13, p. 1313–1319.

- Li, S. & Huang, S., 2006. Gene therapy progress and prospects; Decade strategy. *Gen Ther*, Volume 13, p. 1313–1319.
- Liu, C. et al., 2021. Novel Mutations in X-Linked, USP26-Induced Asthenoteratozoospermia and Male Infertility. *Cells*, Volume 10, p. 1594.
- Liu, D., Clarke, G. & Baker, H., 1991. Inhibition of human sperm-zona pellucida and spermolemma binding by antisperm antibodies. *Fertil Steril*, Volume 55, pp. 440-442.
- Liu, F., Song, Y. & Liu, D., 1999. Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA. *Gene Ther*, Volume 6, p. 1258–1266.
- Liu, G., Lin, Q., Jin, S. & Gao, C., 2022. The CRISPR-Cas toolbox and gene editing technologies. *Mol. Cell*, Volume 82, p. 333–347.
- Li, X. et al., 2019. Restore natural fertility of Kit(w)/Kit(wv) mouse with nonobstructive azoospermia through gene editing on SSCs mediated by CRISPR-Cas9. *Stem. Cell Res. Ther.*, Volume 10, p. 271.
- Li, Z., Dullmann, J. & Schiedlmeier, B., 2002. Murine leukemia induced by retroviral gene marking. *Science*, Volume 296, p. 497.
- Lopes, A. et al., 2013. Human spermatogenic failure purges deleterious mutation load from the autosomes and both sex chromosomes, including the gene DMRT1. *PLoS Genet*, 9(3).
- Lue, T., 2016. Physiology of penile erection and pathophysiology of erectile dysfunction. In: A. Wein, L. Kavoussi, A. Partin & C. Peters, eds. *Campbell-Walsh urology*. Philadelphia: Elsevier, pp. 612-642.
- Lue, T., Giuliano, F. & Montorsi, F., 2004. Summary of the recommendations on sexual dysfunctions in men. *J Sex Med*, Volume 1, pp. 6-23.
- Lukashev, A. & Zamyatnin, A., 2016. Viral vectors for gene therapy: Current state and clinical perspectives. *Biochemistry Moscow*, Volume 81, pp. 700-708.
- Lundstrom, K. & Boulikas, T., 2003. Viral and Non-viral Vectors in Gene Therapy: Technology Development and Clinical Trials. *Technology in Cancer Research & Treatment*, 2(5), pp. 471-785.
- Machen, G. L. & Sandlow, J. I., 2012. Causes of Male Infertility. In: *Male Infertility, Contemporary Clinical Approaches, Andrology, ART & Antioxidants*. N.Y: Springer, pp. 2-14.
- Macleay, J., Chen, M. & Wayne, C., 2005. RhoX: a new homeobox gene cluster. *Cell*, Volume 120, pp. 369-382.

- Maclean, J. & Wilkinson, M., 2005. Gene regulation in spermatogenesis. *Curr Top Dev Biol*, Volume 71, pp. 131-197.
- Maduro, R. & Dolores, J., 2002. Understanding New Genetics of Male Infertility. *The Journal of Urology*, 168(5), pp. 2197-2205.
- Maeder, M. L. & Gersbach, C. A., 2016. Genome-editing Technologies for Gene and Cell Therapy. *Molecular Therapy*, 24(3), pp. 430-446.
- Maetzig, T., Galla, M., Baum, C. & Schambach, A., 2011. Gammaretroviral vectors: biology, technology and applications. *Viruses*, Volume 3, p. 677–713.
- Magnusdottir, E. & Surani, M., 2014. How to make a primordial germ cell. *Development*, Volume 141, pp. 245-252.
- Majzoub, A. & Sabanegh, E., 2016. Diagnostic Tests in the Evaluation of Male Infertility . In: A. Agarwal, S. Gupta & S. R, eds. *Andrological Evaluation of Male Infertility, A Laboratory Guide*. s.l.: Springer International Publishing, pp. 1-10.
- Mali, S., 2013. Delivery systems for gene therapy. *Indian J. Hum. Genet*, 19(1), pp. 3-8.
- Mancheno-Corvo, P. & Martin-Duque, P., 2006. Viral gene therapy. *Clin Transl Onco*, Volume 8, pp. 858-867.
- Maor-Sagie, E., Cinnamon, Y. & Yaacov, B., 2015. Deleterious mutation in SYCE1 is associated with non-obstructive azoospermia. *J Assist Reprod Genet*, 32(6), p. 887– 891.
- Ma, Q. et al., 2016. A novel missense mutation in USP26 gene is associated with nonobstructive azoospermia. *Reprod Sci*, Volume 23, p. 1434–1441.
- Marraffini, L. & Sontheimer, E., 2010. CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea. *Nat Rev Genet*, 11(3), pp. 181-190.
- Marshall, W. L. & Bangert, S. K., 2008. The Gonads. In: *Clinical Chemistry*. 6 ed. London: Elsevier science, pp. 191-205.
- Martin, R., 2008. Cytogenetic determinants of male fertility. *Hum Reprod Update*, 14(4), pp. 379-390.
- Martin, R. H., 2008. Meiotic errors in human oogenesis and spermatogenesis. *Reproductive Biomedicine Online*, Volume 16, pp. 523-531.
- Mascarenhas, M. et al., 2012. National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys. *PLoS Med*, 9(12).

- Masterson, T. A. & Beck, S. D., 2011. Testicular cancer: clinical signs and symptoms. In: P. Scardino, W. Linehan, M. Zelefsky & N. Vogelzang, eds. *Comprehensive textbook of genitourinary oncology*. Philadelphia: Wolters Kluwer, pp. 505-508.
- Mathews, Q. L. & Curiel, D. T., 2007. Gene therapy: human germline genetics modifications-assessing the scientific, socioethical, and religious issues. *South Med J*, 100(1), pp. 98-100.
- Mau-Holzmann, U. A., 2005. Somatic chromosomal abnormalities in infertile men and women. *Cytogenet Genome Res*, Volume 111, pp. 317-336.
- Mayeux, R., 2005. Mapping the new frontier: complex genetic disorders. *J Clin Invest*, Volume 115, p. 1404–1407.
- McMahon, C. G. et al., 2004. Disorders of orgasm and ejaculation in men. *The journal of sexual medicine*, 1(1), pp. 58-65.
- Melmed, S., 2008. Update in pituitary disease. *J Clin Endocrinol*, Volume 93, pp. 331-338.
- Mendiola, J., Torres-Cantero, A. M. & Agarwal, A., 2009. Invited review Lifestyle factors and male infertility: an evidence-based review. *Archives of Medical Science Special Issues*, p. 12.
- Mendonca, L., de Lima, M. & Simoes, S., 2012. Targeted lipid-based systems for siRNA delivery. *Drug Deliv Sci Technol*, 22(1), pp. 65-73.
- Menkveld, R. et al., 2001. Semen parameters, including WHO and strict criteria morphology, in a fertile and subfertile population: an effort towards standardization of in-vivo thresholds. *Human reproduction*, 16(6), p. 1165–1171.
- Merrihew, R., TA, K. & Condreay, J., 2004. Baculovirus-mediated gene delivery into mammalian cells. *Methods. Mol Biol*, Volume 246, pp. 355-365.
- Mescher, A. L., 2013. *Janqueira's Basic Histology*. 13 ed. s.l.:McGraw-Hill Medical.
- Miao, X. & Zhang, X., 2011. Production of transgenic mice carrying the Thanatin gene by intratesticular injection. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 415(3), pp. 429-433.
- Michaelis, M., Sobczak, A. & Weitzel, J., 2014. In vivo microinjection and electroporation of mouse testis. *J. Vis. Exp.*, 23(90).
- Mickle, J., Milunsky, A., Amos, J. & Oates, R., 1995. Congenital unilateral absence of the vas deferens: a heterogeneous disorder with two distinct subpopulations based upon aetiology and mutational status of the cystic fibrosis gene. *Hum Reprod.*, 10(7), p. 1728–1735.

- Mínguez-Alarcón, L., Mendiola, J. & Torres-Cantero, A. M., 2014. Pesticides and Heavy Metal Toxicity. In: S. Du Plessis, A. Agarwal & E. S. . Sabanegh, eds. *Male Infertility, A Complete Guide to Lifestyle and Environmental Factors* . N.Y.: Springer.
- Mitchell, M. et al., 2017. Single gene defects leading to sperm quantitative anomalies. *Clin Genet*, Volume 91, pp. 208-216.
- Mitra, A., Chakraborty, B., Mukhopadhyay, D. & al, e., 2012. Effect of smoking on semen quality, FSH, testosterone level, and CAG repeat length in androgen receptor gene of infertile men in an Indian city. *Syst Biol Reprod Med*, 58(5), p. 255–262.
- Miyakawa, H. et al., 2012. Single-nucleotide polymorphisms in the SEPTIN12 gene may be a genetic risk factor for Japanese patients with sertoli cell-only syndrome. *Journal of andrology*, 33(3), pp. 483-487.
- Miyamoto, T. et al., 2015. Male infertility and its genetic causes. *J. Obstet. Gynaecol. Res.*
- Miyamoto, T. et al., 2012. Male infertility and its causes in human. *Advances in urology*.
- Modi, D., Shah, C. & CP, P., 2007. Non-genomic membrane progesterone receptors on human spermatozoa. *Soc Reprod Fertil*, pp. 515-529.
- Molina, P., 2013. Male Reproductive System. In: *Endocrine Physiology*. 4 ed. s.l.:McGraw-Hill Companies, pp. 187-211.
- Mooradian, A. D., Morley, J. E. & Korenman, S. G., 1987. Biological actions of androgens. *Endocrine Reviews*, Issue 8, pp. 1-28.
- Morille, M., Passirani, C., Vonarbourg, A. & Clavreul, A., 2008. Progress in developing cationic vectors for non-viral systemic gene therapy against cancer. *Biomaterials*, Volume 29, p. 3477–3496.
- Morohashi, K. & Omura, T., 1994. Ad4BP/SF-1, a transcription factor essential for the transcription of steroidogenic cytochrome P450 genes and for the establishment of the reproductive function. *FASEB J*, Volume 10, pp. 1569-1577.
- Moscou, M. J. & Bogdanove, A. J., 2009. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science*, Volume 326, p. 1501.
- Mou, L. et al., 2013. A dominant-negative mutation of HSF2 associated with idiopathic azoospermia. *Human Genetics*, Volume 132, p. 159–165.
- Mowat, A. et al., 2014. The effects of vaginal lubricants on sperm function: an in vitro analysis. *J Assist Reprod Genet*, Volume 31, pp. 333-339.

- Muck-Hausl, M. et al., 2015. Ad 2.0: a novel recombineering platform for highthroughput generation of tailored adenoviruses. *Nucleic Acids Res*, 43(8), p. 50.
- Mulder, C. L. et al., 2016. Spermatogonial stem cell autotransplantation and germline genomic editing: a future cure for spermatogenic failure and prevention of transmission of genomic diseases. *Human reproduction update*, 22(5), pp. 561-573.
- Nachtigall, L. B., Boepple, P. A., Pralong, F. P. & Crowley, W. J., 1997. Adult-onset idiopathic hypogonadotropic hypogonadism—a treatable form of male infertility. *N Engl J Med.*, Volume 336, pp. 410-415.
- Nagano, M. et al., 2001. Transgenic mice produced by retroviral transduction of male germ-line stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, Volume 98, pp. 13090-13095.
- Nagano, M., Shinohara, T., Avarbock, M. & Brinster, R., 2000. Retrovirus mediated gene delivery into male germ line stem cells. *FEBS Lett*, Volume 475, pp. 7-10.
- Nagano, M. et al., 2002. Lentiviral vector transduction of male germ line stem cells in mice. *FEBS Lett*, Volume 524, p. 111–115.
- Nagler, H. M., Luntz, R. K. & Martinis, F. G., 1997. Varicocele. In: L. I. Lipshultz & S. S. Howards, eds. *Infertility in the male*. St. Louis: Mosby Year Book, pp. 336-359.
- Nayernia, K. et al., 2006. In vitro-differentiated embryonic stem cells give rise to male gametes that can generate offspring mice. *Dev Cell*, Volume 11, pp. 125-132.
- Nelson, C. et al., 2016. In vivo genome editing improves muscle function in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Science*, Volume 351, p. 403– 407.
- Newman, C. & Bettinger, T., 2007. Gene therapy progress and prospects: Ultrasound for gene transfer. *Gen Ther*, 14(6), p. 465–475.
- Newsholme, E. A. & Leech, A. R., 1983. *Biochemistry for the Medical Sciences*. New York: John Wiley & Sons.
- Niederberger, C., ed., 2011. *An Introduction to Male Reproductive Medicine*. 1 ed. Cambridge: Cambridge University Press.
- Niederberger, C. S., 2016. Male Infertility. Στο: A. Wein, L. R. Kavoussi, A. Partin & C. A. Peters, επιμ. *Campbell-Walsh urology*. 11 επιμ. s.l.:Elsevier, pp. 556-579.
- Nieschlag, E., Behre, H. & Nieschlag, S. eds., 2010. *Andrology: Male Reproductive Health and Dysfunction*. 3 ed. Berlin: Springer.
- Niidome, T. & Huang, L., 2002. Gene therapy progress and prospects: nonviral vectors. *Gen Ther*, Volume 9, pp. 1674-1652.

- Nishio, H. et al., 2012. Clinical features and testicular morphology in patients with Kallmann syndrome. *Urology*, Volume 79, pp. 684-686.
- Nóbrega, C., Mendonça, L. & Matos, C. A., 2020. *A Handbook of Gene and Cell Therapy*. Cham: Springer Nature Switzerland.
- Nussbaum, R., McLnnes, R., Willard, H. & Hamosh, A., 2007. *Thompson & Thompson: Genetics in Medicine*. 7 ed. Philadelphia: Elsevier.
- O'Brien, I., Lewin, I., O'Hare, J. & Corral, R., 1982. Reversible male subfertility due to hyperthyroidism. *BMJ*, Volume 285, p. 691.
- O'Flaherty, C., 2019. Orchestrating the antioxidant defenses in the epididymis. *Andrology*, Volume 7, pp. 662-668.
- Okutman, O. et al., 2017. A non-stop mutation in MAGEB4 is a possible cause of rare X-linked azoospermia and oligozoospermia in a consanguineous Turkish family. *J Assist Reprod Genet*, pp. 683-694.
- Okutman, O. et al., 2015. Exome sequencing reveals a nonsense mutation in TEX15 causing spermatogenic failure in a Turkish family. *Hum Mol Genet*, 24(19), p. 5581– 5588.
- Olcese, C. et al., 2017. X-linked primary ciliary dyskinesia due to mutations in the cytoplasmic axonemal dynein assembly factor PIH1D3. *Nat Commun*, Volume 8.
- Omu, A. et al., 1999. Relationship between unexplained infertility and human leukocyte antigens and expression of circulating autogeneic and allogeneic antisperm antibodies. *Clin Exp Obstet Gynecol*, Volume 26, p. 199–202.
- Osegbe, D., 1991. Testicular function after unilateral bacterial epididymo-orchitis. *Eur Urol*, Volume 19, pp. 204-208.
- Ostrowski, K. A. & Walsh, T. J., 2015. Infertility with Testicular Cancer. *Urologic Clinics of North America*, 42(3), pp. 409-420.
- Overstreet, J. W. & Blazak, W. F., 1983. The Biology of Human Male Reproduction: An overview. *American Journal of Industrial Medicine*.
- Pacini, F. et al., 1994. Testicular function in patients with differentiated thyroid carcinoma treated with radioiodine. *J Nucl Med*, Volume 35, p. 1418–1422.
- Paduch, D., Bolyakov, A., Cohen, P. & Travis, A., 2009. A Reproduction in men with Klinefelter syndrome: the past, the present, and the future. *Seminars in Reproductive Medicine*, Volume 27, pp. 137-148.

- Paduch, D., Mielnik, A. & Schlegel, P., 2005. Novel mutations in testis-specific ubiquitin protease 26 gene may cause male infertility and hypogonadism. *Reprod. Biomed. Online*, Volume 10, p. 747–754.
- Paduch, D. & Niedzielski, J., 1996. Semen analysis in young men with varicocele: preliminary study. *J Urol*, Volume 156, p. 788–790.
- Pagotto, U., Fanelli, F. & Granata, A., 2017. Endocrinology of the Testis and Male Reproduction. In: M. Simoni & I. Huhtaniemi, eds. *Hormonal Laboratory Examination*. Cham: Springer .
- Paick, J., Kim, S. & Kim, S., 2000. Ejaculatory duct obstruction in infertile men. *BJU Int.*, Volume 85, pp. 720-724.
- Pajarinen, J. et al., 1996. Moderate alcohol consumption and disorders of human spermatogenesis. *Alcohol Clin Exp Res*, pp. 332-337.
- Pajarinen, J. T. & Karhunen, P. J., 1994. Spermatogenic arrest and 'Sertoli cell-only' syndrome—common alcohol-induced disorders of the human testis. *Int J Androl*, Volume 17, pp. 292-299.
- Palazzolo, I. et al., 2008. The role of the polyglutamine tract in androgen receptor. *J Steroid Biochem Mol*, Issue 108, pp. 245-253.
- Palermo, G., Cohen, J. & Rosenwaks, Z., 1996. Intracytoplasmic sperm injection: powerful tool to overcome fertilization failure. *Fertil Steril*, Volume 65, pp. 899-908.
- Pandey, V. K. et al., 2017. Application of CRISPR/Cas9 Genome Editing in Genetic Disorders: A Systematic Review Up to Date. *Genet Syndr Gene Ther*, 8(2), pp. 1-10.
- Pandiyani, N. & Khan, S. D., 2017. A Clinical Approach to Male Infertility. In: K. Gunasekaran & N. Pandiyani, eds. *Male Infertility*. N. Delhi: Springer, pp. 41-54.
- Paner, G., 2010. Prostate gland and seminal vesicle. In: M. Amin, ed. *Diagnostic pathology: Genitourinary*. 2 ed. Salt Lake City: Elsevier, pp. 4-156.
- Pan, S., Bearely, P. & Oates, R., 2019. Fertility in men with Klinefelter syndrome and Y chromosome microdeletions: an update. *Curr Opin Endocr Metab Res*, Volume 6, pp. 21-28.
- Park, H. et al., 2009. Interstitial tissue-specific gene expression in mouse testis by intratunica albuginea injection of recombinant baculovirus. *Asian J Androl*, Volume 1, pp. 340-350.

- Park, S. et al., 2013. hCG-induced endoplasmic reticulum stress triggers apoptosis and reduces steroidogenic enzyme expression through activating transcription factor 6 in Leydig cells of the testis. *Journal of Molecular Endocrinology*, 50(2), pp. 151-166.
- Parrington, J., Coward, K. & Gadea, J., 2011. Sperm and testis mediated DNA transfer as a means of gene therapy. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, pp. 35-42.
- Pasqualotto, F. F. et al., 2011. Varicocele: To Fix or Not to Fix. In: E. S. Sabanegh, ed. *Current Clinical Urology: Male Infertility: Problems and Solution*. N. York: Springer Science+Business Media, pp. 66-75.
- Payne, A., Kelch, R., Musich, S. & Halpern, M., 1976. Intratesticular site of aromatization in the human. *J Clin Endocrinol Metab*, p. 1081–1087.
- Peng, B. et al., 2011. Comparison of spermatogenic damage induced at 6 months after ligation of the vas deferens at proximal and distal locations in the rabbit. *Andrologia*, Volume 43, pp. 129-138.
- Pereira, R., Sá, R., Barros, A. & Sousa, M., 2017. Major regulatory mechanisms involved in sperm motility. *Asian J Androl*, Volume 19, pp. 5-14.
- Perelman, M. A. & Rowland, D. L., 2006. Retarded ejaculation. *World J Urol*, Volume 24, pp. 645-652.
- Petersen, P. et al., 1999. Semen quality and reproductive hormones before orchiectomy in men with testicular cancer. *J Clin Oncol.*, 17(3), p. 941–947.
- Peters, H. A. et al., 2001. Absence of Germline Infection in Male Mice Following Intraventricular Injection of Adenovirus. *Molecular Therapy*, 4(6), pp. 603-613.
- Pickar-Oliver, A. & Gersbach, C. A., 2019. The next generation of CRISPR-Cas technologies and applications. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, Volume 20, p. 490–507.
- Pitteloud, N., 2012. Managing delayed or altered puberty in boys. *BMJ*, Volume 345, p. 7913–7913.
- Plaseska-Karanfilska, D. et al., 2012. Genetic causes of male infertility. *Balkan J Med Genet*, pp. 31-34.
- Poch, M. A. & Sigman, M., 2010. Clinical evaluation and treatment of male factor infertility. In: D. Carrell & C. Peterson, eds. *Reproductive Endocrinology and Infertility: Integrating Modern Clinical and Laboratory Practice*. New York: Springer, p. 367–378.
- Porteus, M. & Dann, C., 2015. Genome editing of the germline: Broadening the discussion. *Mol Ther*, Volume 23, p. 980–982.

Purvis, K. & Christiansen, E., 1993. Infection in the male reproductive tract. Impact, diagnosis and treatment in relation to male infertility. *Int J Androl*, Volume 16, pp. 1-13.

Qamar, I. et al., 2009. ARR19 (Androgen Receptor Corepressor of 19 kDa), an Antisteroidogenic Factor, Is Regulated by GATA-1 in Testicular Leydig Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 284(27), pp. 18021-18032.

Qatar, I. et al., 2009. ARR19 (Androgen Receptor Corepressor of 19 kDa), an Antisteroidogenic Factor, Is Regulated by GATA-1 in Testicular Leydig Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 284(27), pp. 18021-18032.

Qin, J. et al., 2015. An efficient strategy for generation of transgenic mice by lentiviral transduction of male germline stem cells in vivo. *Journal of animal science and biotechnology*, Volume 6, p. 59.

Quantin, B., Perricaudet, L. D., Tajbakhsh, S. & Mandel, L., 1992. Adenovirus as an expression vector in muscle cells in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Volume 89, pp. 2581-2584.

Quinonez, R. & Sutton, R. E., 2002. Lentiviral vectors for gene delivery into cells. *DNA Cell Biol*, Volume 21, pp. 937-951.

Quinton, R., Duke, V. & Robertson, A., 2001. Idiopathic gonadotrophin deficiency: genetic questions addressed through phenotypic characterization. *Clin Endocrinol*, Volume 55, pp. 163-174.

Quinzii, C. & Castellani, C., 2000. The cystic fibrosis transmembrane regulator gene and male infertility. *J Endocrinol Invest*, Volume 23, pp. 684-689.

Rajender, S., Singh, L. & Thangaraj, K., 2007. Phenotypic heterogeneity of mutations in androgen receptor gene. *Asian Journal of Andrology*, Volume 9, pp. 147-179.

Ramamoorth, M. & Narvekar, A., 2015. Non viral vectors in gene therapy- an overview. *Journal of clinical and diagnostic research*, 9(1).

Raman, J., Walmsley, K. & Goldstein, M., 2005. Inheritance of varicoceles. *Urology*, Volume 65, p. 1186–1189.

Ramasamy, R. et al., 2015. Whole-exome sequencing identifies novel homozygous mutation in NPAS2 in family with nonobstructive azoospermia. *Fertil Steril*, 104(2), p. 286– 291.

- Ramírez-González, J. A. & Sansone, A., 2022. Chapter 2 - Male reproductive system. In: D. Vaamonde, A. C. Hackney & J. Garcia-Manso, eds. *Fertility, Pregnancy, and Wellness*. s.l.:Elsevier, pp. 23-36.
- Raviv, G. et al., 2006. Role of transrectal ultrasonography in the evaluation of azoospermic men with low-volume ejaculate. *J Ultrasound Med*, 25(7), pp. 825-829.
- Reijo, R. et al., 1995. Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene. *Nat Genet*, Volume 14, p. 292–299.
- Renneberg, R. και συν., 2020. *Βιοτεχνολογία, Βασικές Αρχές και Εφαρμογές*. 7 επιμ. Λευκωσία: Broken Hill Publishers LTD.
- Rensen, P., de Vruh, R., Kuiper, J. & Bijsterbosch, M., 2001. Recombinant lipoproteins: lipoprotein-like lipid particles for drug targeting. *Adv Drug Deliv Rev*, 47(3), p. 251–276.
- Reyon, D. et al., 2012. FLASH assembly of TALENs for high throughput genome editing. *Nat. Biotechnol*, Volume 30, pp. 460-465.
- Rey, R. A. et al., 2013. Male hypogonadism: an extended classification based on a developmental, endocrine physiology-based approach. *Andrology*, 1(1), pp. 3-16.
- Ricci, E. et al., 2017. Semen quality and alcohol intake: a systematic review and meta-analysis. *Reproductive biomedicine online*, 34(1), pp. 38-47.
- Ridgway, E., Maloof, F. & Longcope, C., 1982. Androgen and oestrogen dynamics in hyperthyroidism. *J. Endocrinol.*, Volume 95, pp. 105-115.
- Ridgway, P., Shah, J. & Darzi, A., 2002. Male genital tract injuries after contemporary inguinal hernia repair. *BJU Int.*, 90(3), p. 272–276.
- Robaire, B., Hinton, B. T. & Orgebin, C. M., 2006. The Epididymis. In: K. Neill , ed. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. 3 ed. NY: cademic Press; Cambridge.
- Rogers, E. et al., 1998. The role of orchiectomy in the management of postpubertal cryptorchidism. *J Urol*, Volume 159, p. 851–854.
- Rogers, K., 2011. *The reproductive system*. 1 ed. New York: Britannica Educational Publishing.
- Rohini, K., 2014. Gene Therapy. In: I. Ravi, et al. eds. *Advances in Biotechnology*. New Delhi: Springer, pp. 41-54.

Rouet, P., Smih, F. & Jasin, M., 1994. Expression of a site-specific endonuclease stimulates homologous recombination in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, Volume 91, pp. 6064-6068.

Roy, A. K. & Chatterjee, B., 1995. Androgen Action. *Crit. Rev. Eukaryotic Gene Expression*, Issue 5, pp. 157-176.

Rubanyi, G. M., 2001. The future of human gene therapy. *Molecular Aspects of Medicine*, 22(3), pp. 113-142.

Sabanegh, E. S., 2011. *Male Infertility, Problems and Solutions*. London: Springer.

Sadri-Ardekani, H. et al., 2016. Experimental testicular tissue banking to generate spermatogenesis in the future: a multidisciplinary team approach. *Methods*, Volume 99, pp. 120-127.

Safarinejad, M. R. et al., 2013. The effects of opiate consumption on serum reproductive hormone levels, sperm parameters, seminal plasma antioxidant capacity and sperm DNA integrity. *Reproductive toxicology*, pp. 18-23.

Sakuma, T., Barry, M. & Ikeda, Y., 2012. Lentiviral vectors: basic to translational. *Biochem J*, Volume 443, p. 603–618.

Saladin, K., 2003. *Anatomy & Physiology: The Unity of Form and Function*. 4 ed. New York: McGraw-Hill.

Saleh, R. et al., 2002. Effect of cigarette smoking on levels of seminal oxidative stress in infertile men: a prospective study. *Fertil Steril*, Volume 78, pp. 491-499.

Sanvicens, N. & Marco, M., 2008. Multifunctional nanoparticles—properties and prospects for their use in human medicine. *Trends Biotechnol*, Volume 26, p. 425–433.

Sato, H., Miyamoto, T. & Yogev, L., 2006. Polymorphic alleles of the human MEI1 gene are associated with human azoospermia by meiotic arrest,. *Journal of Human Genetics*, 51(6), pp. 533-540.

Sato, T. et al., 2015. Genome Editing in Mouse Spermatogonial Stem Cell Lines Using TALEN and Double-Nicking CRISPR/Cas9. *Stem Cell Reports*, 5(1), pp. 75-82.

Sauer, B., 1987. Functional expression of the cre-lox site-specific recombination. *Mol. Cell Biol*, 7(6), pp. 2087-2096.

Sauer, B. & Henderson, N., 1988. Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 85(14), pp. 5166-5170.

- Savić, N. & Schwank, G., 2016. Advances in therapeutic CRISPR/Cas9 genome editing. *Translational Research*, Volume 168, pp. 15-21.
- Schulz, S. et al., 2006. Increased frequency of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations in infertile males. *Fertil Steril*, Volume 85, pp. 135-138.
- Schuppe, H. & Meinhardt, A., 2006. *Immunology of the testis and the excurrent ducts*. 292-300 ed. Heidelberg: Springer.
- Schuppe, H. et al., 2008. Chronic orchitis: a neglected cause of male infertility?. *Andrologia*, Volume 40, pp. 84-91.
- Scott-Taylor, T., Gallardo, H. & Gansbacher, B., 1998. Adenovirus facilitated infection of human cells with ecotropic retrovirus. *Gene Ther*, Volume 5, p. 621–629.
- Sehgal, L., Usmani, A., Dalal, S. & Majumdar, S., 2014. Generation of Transgenic Mice by Exploiting Spermatogonial Stem Cells In Vivo. In: S. Singh & V. Coppola, eds. *Mouse Genetics. Methods in Molecular Biology*. New York: Humana Press.
- Seminara, S. B., Hayes, F. J. & Crowley Jr, W. F., 1998. Gonadotropin-releasing hormone deficiency in the human (idiopathic hypogonadotropic hypogonadism and Kallmann's syndrome): pathophysiological and genetic considerations. *Endocrine reviews*, 19(5), pp. 521-539.
- Shapiro, E., Goldfarb, D. & Ritchey, M., 2003. The congenital and acquired solitary kidney. *Rev Urol*, Volume 5, pp. 2-8.
- Sharma, R., Biedenharn, K. R., Fedor, J. M. & Agarwal, A., 2013. Lifestyle factors and reproductive health: taking control of your fertility. *Reprod Biol Endocrinol*, Volume 11, p. 66.
- Sharpe, R., McKinnell, C., Kivlin, C. & Fisher, J., 2003. Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction*, Volume 125, pp. 769-784.
- Sha, Y. et al., 2018. Genetic contribution of SUN5 mutations to acephalic spermatozoa in Fujian China. *Gene*, Volume 647, p. 221–225.
- Shim, G., Kim, D. & Park, G., 2017. Therapeutic gene editing: delivery and regulatory perspectives. *Acta Pharmacol Sin*, Volume 38, pp. 738-753.
- Shindel, A. W., Nelson, C. J., Naughton, C. K. & Mulhall, J. P., 2008. Premature Ejaculation in Infertile Couples: Prevalence and Correlates. *J Sex Med*, Volume 5, p. 485–491.

Shi, Q. & Martin, R., 2000. Multicolor fluorescence in situ hybridization analysis of meiotic chromosome segregation in a 47,XYY male and a review of the literature. *Am J Med Genet*, Volume 93, pp. 40-46.

Shirley, S., Heller, R. & Heller, L., 2013. Electroporation gene therapy. In: E. Iatime & S. Gerson, eds. *Gene therapy of cancer*. 3 ed. Sandiego: Elsevier, pp. 93-106.

Sigman, M. & Boekelheide, K., 2008. Is gene therapy for the treatment of male infertility feasible?. *Nature Clinical Practice Urology*, Volume 5, pp. 590-593.

Sigman, M. & Jarow, J. P., 1997. Ipsilateral testicular hypotrophy is associated with decreased sperm counts in infertile men with varicoceles. *J Urol*, Volume 158, p. 605–607.

Silva, G. et al., 2011. Meganucleases and other tools for targeted genome engineering: Perspectives and challenges for gene. *Curr. Gene Ther*, Volume 11, pp. 11-27.

Singh, P., Singh, M., Cugati, G. & Singh, A., 2011. Hyperprolactinemia: An often missed cause of male infertility. 4(2), pp. 102-103.

Singh, R., Hamada, A., Bukavina, L. & Agarwal, A., 2012. Physical deformities relevant to male infertility. *Nat Rev Urol*, 9(3), pp. 156-174.

Singh, S., Burnicka-Turek, O., Chauhan, C. & Hou, S., 2011. Spermatogonial stem cells, infertility and testicular cancer. *J Cell Mol Med*, Volume 15, pp. 468-483.

Skakkebaek, N. et al., 2016. Male Reproductive Disorders and Fertility Trends: Influences of Environment and Genetic Susceptibility. *Physiol Rev.*, 96(1), pp. 55-97.

Skakkebaek, N., Rajpert-De Meyts, E. & Main, K., 2001. Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Hum Reprod*, Volume 16, pp. 972-978.

Slade, P., O'Neill, C., Simpson, A. & Lashen, H., 2007. The relationship between perceived stigma, disclosure patterns, support and distress in new attendees at an infertility clinic. *Hum Reprod*, Volume 22, pp. 2309-2317.

Smith, J., Walsh, T. & Turek, P., 2008. Ejaculatory duct obstruction. *Urol Clin North Am*, Volume 35, pp. 221-227.

Smith, K. R., 2003. Gene therapy: theoretical and bioethical concepts. *Arch Med Res*, Volume 34, pp. 247-268.

Sobel, V. & Imperato-McGinley, J., 2004. *Hypergonadotropic Hypogonadism*. s.l.:Elsevier.

Sokol, R., 2009. Endocrinology of Male Infertility: Evaluation and Treatment. *Semin Reprod Med*, pp. 149-158.

Somia, N. & Verma, I., 2000. Gene therapy: trials and tribulations. Volume 1, pp. 91-99.

Soraggi, S. et al., 2020. Evaluating genetic causes of azoospermia: What can we learn from a complex cellular structure and single-cell transcriptomics of the human testis. *Hum Genet.*

South, E., Cox, E. & Meader, N., 2019. Strimvelis® for Treating Severe Combined Immunodeficiency Caused by Adenosine Deaminase Deficiency: An Evidence Review Group Perspective of a NICE Highly Specialised Technology Evaluation. *PharmacoEconomics Open*, Volume 3, p. 151–161.

Spink, J., 2004. Gene therapy progress and prospects: bringing gene therapy into medical practice: the evolution of international ethics and the regulatory environment. *Gene Ther*, Volume 11, p. 1611–1616.

Spinner, N., Conlin, L., Mulchandani, S. & Emanuel, B., 2013. Deletions and Other Structural Abnormalities of the Autosomes. Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics. *Academic Press*, Volume 3, pp. 1-37.

Staessen, C. et al., 1999. Conventional in-vitro fertilization versus intracytoplasmic sperm injection in sibling oocytes from couples with tubal infertility and normozoospermic semen. Volume 14, pp. 2474-2479.

Standring, S., ed., 2020. *Gray's Anatomy : The anatomical basis of Clinical Practice*. s.l.:Elsevier.

Steinberger, E., Swerdloff, R. & R, H., 1977. The control of testicular function. In: R. Greep & M. A. Koblinsky, eds. *Frontiers in Reproduction and Fertility Control*. Cambridge: MIT press, pp. 264-292.

Stephen, S. L. et al., 2010. Chromosomal integration of adenoviral vector DNA in vivo. *Journal of virology*, 84(19), pp. 9987-9994.

Stephenson, A. & Gilligan, T., 2011. Neoplasms of the testis. In: A. Wein, et al. eds. *Campbell-Walsh urology*. 10 ed. Philadelphia: Elsevier, pp. 837-870.

Stouffs, K. et al., 2006. Alterations of the USP26 gene in Caucasian men. *Int. J. Androl.*, Volume 29, p. 614–617.

Stouffs, K., Willems, A., Lissens, W. & P, L., 2006. The role of the testis-specific gene hTAF7L in the aetiology of male infertility. *Mol Hum Reprod*, Volume 12, pp. 263-267.

Sullivan, R. & Mieusset, R., 2016. The human epididymis: its function in sperm maturation. *Human Reproduction Update*, pp. 574-587.

Swerdloff, R. S., Wang, C. & Sokol, R. Z., 1991. Endocrine evaluation of the infertile man. In: I. Lipshultz & S. S. Howards, eds. *Infertility In Male*. St. Louis: Mosby Year Book.

Tang, C., Lin, C. & Tang, T., 2006. Dynamic localization and functional implications of Aurora-C kinase during male mouse meiosis. *Dev Biol*, Volume 290, pp. 398-410.

Tani, H., Limn, C. & Yap, C., 2003. In vitro and in vivo gene delivery by recombinant baculoviruses. *J Virol*, Volume 77, pp. 9799-9808.

Tanimoto, R. et al., 2007. REIC/Dkk-3 as a potential gene therapeutic agent against human testicular cancer. *Int. J. Mol. Med.*, 19(3), pp. 363-368.

Tarín, J. J., García-Pérez, M. A., Hamatani, T. & Cano, A., 2015. A. Infertility etiologies are genetically and clinically linked with other diseases in single metadiseases. *Reproductive Biology Endocrinol*, Volume 31, p. 31.

Tenenbaum-Rakover, Y., Weinberg-Shukron, A. & Renbaum, P., 2015. Minichromosome maintenance complex component 8 (MCM8) gene mutations result in primary gonadal failure. *Med Genet*, 52(6), p. 391– 399.

Thomas, M. & Klibanov, A., 2003. Non-viral gene therapy: polycation-mediated DNA delivery. *Appl Microbiol Biotechnol*, 62(1), pp. 27-34.

Trokoudes, K. M., Skordis, N. & Picos, M. K., 2006. Infertility and thyroid disorders. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, 18(4), pp. 446-451.

Turchi, P., 2015. Prevalence, definition, and classification of infertility. In: G. Cavallini & G. Beretta, eds. *Clinical Management of Male Infertility*. s.l.:Springer, p. 5–11.

Turek, P. & Lipshultz, L., 1994. Immunologic infertility. *Urol Clin North Am*, Volume 21, pp. 447-468.

Tüttelmann, F., Rajpert-DeMeyts, E., Nieschlag, E. & Simoni, M., 2007. Gene polymorphisms and male infertility – a meta-analysis and literature review. *Reproductive Biomedicine Online*, Volume 15, p. 643–658.

Tüttelmann, F. & Röpke, A., 2017. Genetics of Male Infertility. In: A. Lenzi & E. Jannini, eds. *Endocrinology of the Testis and Male reproduction*. Cham: Springer International Publishing, pp. 1029-1049.

Umemoto, Y. et al., 2005. Gene transfer to mouse testes by electroporation and its influence on spermatogenesis. *J Androl*, Volume 26, pp. 264-271.

Urnov, F., Rebar, E. & Holmes, M., 2010. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nat Rev Genet*, p. 636–646.

- Usmani, A. et al., 2016. Robust generation of transgenic mice by simple hypotonic solution mediated delivery of transgene in testicular germ cells. *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development*, Volume 3, p. 16076.
- Verze, P., Cai, T. & Lorenzetti, S., 2016. The role of the prostate in male fertility, health and disease. *Nature Reviews Urology*, p. 379–386.
- Vigna, E. & Naldini, L., 2000. Lentiviral Vectors: Excellent Tools for Experimental Gene Transfer and Promising Candidates for Gene Therapy. *J. Gene Med*, Volume 2, pp. 308-316.
- Vincent, M. C., Daudin, M. & Massat, G., 2011. Cytogenetic investigations of infertile men with low sperm counts: a 25-year experience. *Journal of Andrology*, Volume 23, pp. 18-22.
- Vine, M., Tse, C., Hu, P. & Truong, K., 1996. Cigarette smoking and semen quality. *Fertil Steril*, Volume 65, pp. 835-842.
- Virtanen, H. E. et al., 2007. Cryptorchidism: classification, prevalence and long-term consequences. *Acta Paediatrica*, Volume 96, pp. 611-616.
- Vockel, M. et al., 2021. The X chromosome and male infertility. *Hum Genet*, Volume 140, p. 203–215.
- Vogt, P., Edelmann, A., Kirsch, S. & Henegariu, O., 1996. Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11. *Human Molecular Genetics*, Volume 5, pp. 933-943.
- Vogt, P. H., 2005. AZF deletions and Y chromosomal haplogroups: history and update based on sequence. *Hum Reprod Update*, 11(4), pp. 319-336.
- von Eckardstein, S. et al., 2000. Seminal plasma characteristics as indicators of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene mutations in men with obstructive azoospermia. *Fertil Steril*, Volume 73, pp. 1226-1231.
- Vorona, E. και συν., 2007. Clinical, endocrinological, and epigenetic features of the 46,XX male syndrome, compared with 47,XXY. *Klinefelter patients. J Clin Endocrinol Metab*, Τόμος 92, p. 3458–3465.
- Walsh, P. C., Retik, A. B., Stamey, T. A. & Vaughan, E. D. J., 1992. *Campbell's Urology*. Philadelphia: W. B. Saunders Co.
- Walsh, T. J. & Turek, P. J., 2009. Immunologic infertility. In: L. I. Lipshultz, S. S. Howards & C. S. Niederberger, eds. *Infertility in the Male*. 4 ed. New York: Cambridge University Press, pp. 274-294.

- Wang, Y. H. et al., 2021. Rescue of male infertility through correcting a genetic mutation causing meiotic arrest in spermatogonial stem cells. *Asian journal of andrology*, 23(6), p. 590–599.
- Wang, Z. et al., 2008. The microtubule plus end-binding protein EB1 is involved in Sertoli cell plasticity in testicular seminiferous tubules. *Experimental Cell Research*, 314(1), pp. 213-226.
- Watanabe, M., Kashiwakura, Y. & Kusumi, N., 2005. Adeno-associated virus-mediated human IL-10 gene transfer suppresses the development of experimental autoimmune orchitis. *Gene Ther*, Volume 12, p. 1126–1132.
- Weidner, W. & Anderson, R. U., 2008. Evaluation of acute and chronic bacterial prostatitis and diagnostic management of chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome with special reference to infection/inflammation. *International Journal of Antimicrobial Agents*, Volume 31, pp. 91-95.
- Weidner, W. et al., 2004. EAU guidelines on male infertility. *European urology*, 42(4), pp. 313-322.
- Weiss, J. et al., 1992. Hypogonadism caused by a single amino acid substitution in the beta subunit of luteinizing hormone. *N Engl J Med*, Volume 326, pp. 179-183.
- Weiss, J. et al., 2003. Sox3 is required for gonadal function, but not sex determination, in males and females. *Mol Cell Biol*, Volume 23, pp. 8084-8091.
- Wells, D. J., 2004. Gene therapy progress and prospects: electroporation and other physical methods. *Gene Ther*, 11(18), pp. 1363-1369.
- Whitehead, K. A., Langer, R. & Anderson, D. G., 2009. Knocking down barriers: advances in siRNA delivery. *Nature Rev. Drug Discov*, Volume 8, pp. 129-138.
- Widmaier, E. P., Hershel, R. & Strang, K. T., 2016. Αναπαραγωγή. Στο: Ν. Γελαδάς, επιμ. *Vander's Φυσιολογία του Ανθρώπου : Οι Μηχανισμοί του σώματος*. 2 επιμ. Λευκωσία: Broken Hills Publishers LTD, pp. 714-724.
- Willems, A. et al., 2015. Sertoli cell androgen receptor signalling in adulthood is essential for post-meiotic germ cell development. *Mol. Reprod. Dev*, Volume 82, pp. 626-627.
- Williams, D. H., Karpman, E., Sander, J. & Philippe, E., 2009. Pretreatment Semen Parameters in Men With Cancer. *The Journal of Urology*, 181(2), pp. 736-740.
- Williams, D. I. & Chisholm, G. D., 1976. *Scientific Foundations of Urology*. London: William Heinemann Medical Book Ltd.

Williams, R. H., 1974. *Textbook of Endocrinology*. 8 ed. Philadelphia: W. B. Saunders.

Wilschanski, M. et al., 1996. Diversity of reproductive tract abnormalities in men with cystic fibrosis. *JAMA*, Volume 276, p. 607–608.

Wilson, J. M., 2009. A history lesson for stem cells. *Science*, Volume 324, pp. 727-728.

Wiser, H. J., Sandlow, J. & Köhler, T. S., 2012. Causes of Male Infertility. In: *Male Infertility: Contemporary Clinical Approaches, Andrology, ART & Antioxidants*. New York: Springer Science+Business Media, pp. 3-13.

Wolff, J. et al., 1990. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science*, Volume 247, pp. 1465-1468.

World Health Organization, 2010. *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen*. 5 ed. Geneva: World Health Organization.

World Health Organization, 2021. *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen*. 6 ed. Geneva: World Health Organization.

Wu, Y. et al., 2013. Correction of a genetic disease in mouse via use of CRISPR-Cas9. *Cell Stem. Cell*, Volume 13, p. 659–662.

Wu, Y. et al., 2015. Correction of a genetic disease by CRISPR-Cas9-mediated gene editing in mouse spermatogonial stem cells. *Cell Res*, Volume 25, pp. 67-79.

Xia, K. et al., 2021. AAV-mediated gene therapy produces fertile offspring in the Lhcgr-deficient mouse model of Leydig cell failure. *bioRxiv*, pp. 1-45.

Xiang, M. et al., 2022. Novel Mutation and Deletion in SUN5 Cause Male Infertility with Acephalic Spermatozoa Syndrome. *Reprod. Sci.*, Volume 29, pp. 646-651.

Xiao, F. et al., 2016. Impact of CAG repeat length in the androgen receptor gene on male infertility—a meta-analysis. Volume 33, pp. 39-49.

Xu, Q. et al., 2007. Infertility with defective spermatogenesis and steroidogenesis in male mice lacking androgen receptor in Leydig cells. *Endocrine*, Volume 32, pp. 96-106.

Xu, X. L. et al., 2013. Progress and prospects in stem cell therapy. *Acta pharmacologica Sinica*, 34(6), p. 741–746.

Yang, B. et al., 2017. Pathogenic role of ADGRG2 in CBAVD patients replicated in Chinese population. *Andrology*, Volume 5, p. 954–957.

Yatsenko, A. et al., 2015. X-Linked TEX11 mutations, meiotic arrest, and azoospermia in infertile men. *N Engl J Med*, 372(22), pp. 2097-2107.

- Ye, J. et al., 2008. Anionic solid lipid nanoparticles supported on protamine/DNA complexes. *Nanotechnology*, 19(8).
- Yin, H. et al., 2014. Non-viral vectors for gene-based therapy. *NATURE REVIEW*, Volume 15, pp. 541-55.
- Yu, X. et al., 2005. Y chromosome azoospermia factor region microdeletions and transmission characteristics in azoospermic and severe oligozoospermic patients. *Int J Clin Exp Med*, 8(9), p. 4634–4646.
- Zegers-Hochschild, F. et al., 2017. The international glossary on infertility and fertility care, 2017. *Human Reproduction*, 32(9), pp. 1786-1801.
- Zhu, F. et al., 2016. Biallelic SUN5 mutations cause autosomal-recessive acephalic spermatozoa syndrome. *Am J Hum Genet*, 99(4), pp. 942-949.
- Αποστολάκη, Γ., 1948. *Ανατομική του Ανθρώπου*. Αθήνα: Τύποις Χ. Συνοδινού.
- Καλλιπολίτης, Γ., 2002. Ανατομική και Φυσιολογία Ανδρικού Γεννητικού Συστήματος. Στο: *Υπογονιμότητα - Στείρωση, Προβλήματα αναπαραγωγής*. Αθήνα: Π.Χ. Πασχαλίδης, pp. 130-137.
- Κατρίτση, Ε., 1983. *Μαθήματα Ανατομικής του Ανθρώπου*. Αθήνα: Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας.

Πηγές Εικόνων

- Εικόνα 1.1.** Ramírez-González, J. A. & Sansone, A., 2022. Chapter 2 - Male reproductive system. In: D. Vaamonde, A. C. Hackney & J. Garcia-Manso, eds. *Fertility, Pregnancy, and Wellness*. s.l.:Elsevier, pp. 23-36.
- Εικόνα 1.2.** Kenneth, S., 2003. *Anatomy & Physiology The Unity of Form and Function*. 2 ed. s.l.:McGraw Hill Science Engineering Math.
- Εικόνα 1.3.** Kenneth, S., 2003. *Anatomy & Physiology The Unity of Form and Function*. 2 ed. s.l.:McGraw Hill Science Engineering Math.
- Εικόνα 1.4.** Hall, J. E., 2016. *Guyton and Hall textbook of Medical Physiology*. 13 ed. Philadelphia: Elsevier.
- Εικόνα 1.5.** Hall, J. E., 2016. *Guyton and Hall textbook of Medical Physiology*. 13 ed. Philadelphia: Elsevier.
- Εικόνα 1.6.** Saladin, K., 2003. *Anatomy & Physiology: The Unity of Form and Function*. 4 ed. New York: McGraw-Hill.
- Εικόνα 2.1.** <https://www.britannica.com/science/varicocele>
- Εικόνα 2.2.** Haque, O., Vitale, J., Agarwal, A. & du Plessis, S., 2014. The Effect of Smoking on Male Infertility. In: S. du Plessis, A. Agarwal & E. Sabanegh Jr, eds. *Male Infertility: A Complete Guide to Lifestyle and Environmental Factors*. New York: Springer Science+Business Media, pp. 19-30.
- Εικόνα 2.3.** Tüttelmann, F. & Röpke, A., 2017. Genetics of Male Infertility. In: A. Lenzi & E. Jannini, eds. *Endocrinology of the Testis and Male reproduction*. Cham: Springer International Publishing, pp. 1029-1049
- Εικόνα 2.4.** Krausz, C., Escamilla, A. R. & Chianese, C., 2015. Genetics of male infertility: from research to clinic. *Reproduction*, 150(5), pp. 159-174.
- Εικόνα 3.1.** Nóbrega, C., Mendonça, L. & Matos, C. A., 2020. *A Handbook of Gene and Cell Therapy*. Cham: Springer Nature Switzerland.
- Εικόνα 3.2.** Herzog, R. & Popplewell, L., 2020. *Fast Facts: Gene Therapy*. Oxford: S. Karger Publishers.
- Εικόνα 3.3.** Herzog, R. & Popplewell, L., 2020. *Fast Facts: Gene Therapy*. Oxford: S. Karger Publishers.
- Εικόνα 3.4.** Nóbrega, C., Mendonça, L. & Matos, C. A., 2020. *A Handbook of Gene and Cell Therapy*. Cham: Springer Nature Switzerland.

- Εικόνα 3.5.** Pandey, V. K. et al., 2017. Application of CRISPR/Cas9 Genome Editing in Genetic Disorders: A Systematic Review Up to Date. *Genet Syndr Gene Ther*, 8(2), pp. 1-10.
- Εικόνα 3.6.** Mulder, C. L. et al., 2016. Spermatogonial stem cell autotransplantation and germline genomic editing: a future cure for spermatogenic failure and prevention of transmission of genomic diseases. *Human reproduction update*, 22(5), pp. 561-573.
- Εικόνα 4.1.** Boekelheide, K. & Sigman, M., 2008. Is gene therapy for the treatment of male infertility feasible?. *Nature clinical practice Urology*, 5(11), pp. 590-593.
- Εικόνα 4.3.** Darbey, A. & Smith, L. B., 2018. Deliverable transgenics & gene therapy possibilities for the testes. *Molecular and Cellular Endocrinology*, Volume 468, pp. 81-94.
- Εικόνα 4.4.** Gonçalves, G. & Paiva, R., 2017. Gene therapy: advances, challenges and perspectives. *Einstein (Sao Paulo, Brazil)*, 15(3), p. 369–375.
- Εικόνα 4.5.** Wang, Z. et al., 2008. The microtubule plus end-binding protein EB1 is involved in Sertoli cell plasticity in testicular seminiferous tubules. *Experimental Cell Research*, 314(1), pp. 213-226.

Πηγές Πινάκων

- Πίνακας 1.** Kumar, V. L. & Majumder, P. K., 1995. Prostate gland: structure, functions and regulation. *International urology and nephrology*, 27(3).
- Πίνακας 2.1.** Dohle, G. et al., 2005. EAU guidelines on male infertility. *Eur Uro*, Volume 5, pp. 703-711.
- Πίνακας 2.2.** Sengupta, P., Dutta, S., Karkada, I. R., & Chinni, S. V. (2021). Endocrinopathies and Male Infertility. *Life*, 12(1), p. 10.
- Πίνακας 2.3.** Kedia, G., 2014. Male Infertility. In: A. S. Merseburger, M. A. Kuczyk & J. D. Moul, Ed. *Urology at a Glance*. Berlin: Springer, pp. 13-18.
- Πίνακας 2.4.** World Health Organization, 2010. *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen*. 5 ed. Geneva: World Health Organization.
- Πίνακας 2.5.** World Health Organization, 2021. *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen*. 6 ed. Geneva: World Health Organization.
- Πίνακας 2.6.** World Health Organization, 2021. *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen*. 6 ed. Geneva: World Health Organization.
- Πίνακας 2.7.** Krausz, C., 2017. Genetic Analysis in Male Infertility. In: M. Simoni & I. T. Huhtaniemi, eds. *Endocrinology of the Testis and Male Reproduction*. Cham: Springer International Publishing, pp. 517-530.
- Πίνακας 2.8.** Jarow, J. et al., 2011. The optimal evaluation of the infertile male: AUA best practice statement. *AUA Best Pract Statement*, pp. 5-7.
- Πίνακας 4.1.** Giacca, M., 2010. Introduction to Gene Therapy. In: *Gene Therapy*. Verlag: Springer, pp. 1-7.