

# RECAPITULATION

CHAPTER I. THE STATE OF THE UNION  
CHAPTER II. THE STATE OF THE UNION  
CHAPTER III. THE STATE OF THE UNION  
CHAPTER IV. THE STATE OF THE UNION

ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



026000200222



A

Αρ. εισ.:..... 200...4.

354



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**  
**ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ**  
**ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**  
**ΔΙΟΥΝΤΗΣ - ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΕΥΑΓΓΕΛΟΣ ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΪΔΗΣ**

**ΜΕΛΕΤΗ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗΣ ΤΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ**  
**ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΤΩΝ ΑΝΔΡΟΓΟΝΩΝ ΚΑΙ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΤΩΝ**  
**ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ**  
**ΜΕ ΤΗΝ ΑΝΔΡΙΚΗ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑ**

**ΑΣΠΑΣΙΑ ΤΣΙΡΚΑ**  
**ΜΑΙΕΥΤΗΡΑΣ - ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2004**



Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος.)



**Ημερομηνία αιτήσεως 08/11/1999**

**Ημερομηνία ορισμού τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής : 3999/29/02/2000**

**Μέλη τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:**

Επιβλέπων

Δημήτριος Λώλης Καθηγητής Μαιευτικής Γυναικολογίας  
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Μέλη

Γεωργίου Ιωάννης Επίκουρος Καθηγητής Μαιευτικής Γυναικολογίας  
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Κων/νος Ζηκόπουλος Επίκουρος καθηγητής Μαιευτικής Γυναικολογίας

**Ημερομηνία ορισμού θέματος: 09/03/2000**

**Ημερομηνία καταθέσεως διδακτορικής διατριβής: 30/03/2004**

**Πρόεδρος Ιατρικής σχολής: Επαμεινώνδας Τσιάνος, Καθηγητής Παθολογίας**

**Μέλη Επταμελούς εξεταστικής επιτροπής:**

Λώλης Δημήτριος, Καθηγητής Μαιευτικής Γυναικολογίας  
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Παρασκευαΐδης Ευάγγελος, Καθηγητής Μαιευτικής Γυναικολογίας  
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Γεωργίου Ιωάννης, Αναπληρωτής Καθηγητής Γενετικής  
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Ζηκόπουλος Κων/νος, Επίκουρος Καθηγητής Μαιευτικής Γυναικολογίας  
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Σοφικίτης Νικόλαος, Καθηγητής Ουρολογίας  
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Δαλκαλίτσης Νικόλαος, Αναπληρωτής Καθηγητής Μαιευτικής γυναικολογίας  
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Πασχόπουλος Μινάς, Επίκουρος Καθηγητής Μαιευτικής Γυναικολογίας  
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

**Βαθμός διατριβής: Άριστα**

Η Γραμματέας

Ε. Ζαβερδινού - Τσαγγαλά



## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η διδακτορική διατριβή πραγματοποιήθηκε στην Μαιευτική και Γυναικολογική κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Δ. Ε. Λώλη, κατά το διάστημα 2000-2003.

Το θέμα αφορά την σχέση μεταξύ ανδρικής υπογονιμότητας και των πολυμορφισμών των γονιδίων του υποδοχέα των ανδρογόνων και των οιστρογόνων. Ο πληθυσμός που μελετήθηκε προέρχεται από το πρόγραμμα υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, στο κέντρο εξωσωματικής γονιμοποίησης του Νοσοκομείου.

Ευχαριστώ θερμά:

Τον επιβλέποντα Καθηγητή μου Δημήτριο Λώλη, που μου παρήχε την δυνατότητα και τα μέσα για την εκπόνηση αυτής της διατριβής.

Τον αναπληρωτή Καθηγητή Ιωάννη Γεωργίου, μέλος της τριμελούς επιτροπής, ο οποίος μου ανέθεσε το θέμα και μου παρείχε την απαραίτητη προσοχή και καθοδήγηση, τόσο κατά την διεκπεραίωση του εργαστηριακού μέρους, όσο και κατά τη διεξαγωγή των συμπερασμάτων της μελέτης. Επίσης για την καθοριστική συμβολή του στην διαμόρφωση του άρθρου :

"Association of oestrogen receptor a polymorphisms and androgen receptor CAG trinucleotid repeats with male infertility: a study of 109 Greek infertile men. " που δημοσιεύτηκε στο International journal of andrology.

Τον επίκουρο καθηγητή Κ. Ζηκόπουλο, μέλος της τριμελούς επιτροπής, για τη συμβολή του στο κλινικό μέρος της μελέτης.

Επίσης ευχαριστώ τους φίλους βιολόγους Βασίλη Κρανά και Ιωάννα Μπούμπα για την πολύτιμη βοήθειά τους κατά τη διεξαγωγή του εργαστηριακού μέρους και την Αφροδίτη Κατσαράκη για την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων.

ΙΔΙΑΙΤΕΡΩΣ ευχαριστώ την ομάδα του πληθυσμού της μελέτης για την πρόθυμη συνεργασία τους.



# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΓΕΝΙΚΑ ΠΕΡΙ ΑΝΔΡΙΚΗΣ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑΣ (ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ)
2. ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΤΩΝ ΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ ΟΡΜΟΝΩΝ ΣΤΟ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ
3. ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ (α και β )
  - Α) ΕΚΦΡΑΣΗ ΣΤΟΥΣ ΙΣΤΟΥΣ ΟΡΓΑΝΑ (α και β )
  - Β) ΓΟΝΙΔΙΑ ER α ER β. οργανωση, ομολογια,
  - Γ) ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ
  - Δ) ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ
4. ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ ΑΝΔΡΟΓΟΝΩΝ
  - Α) ΕΚΦΡΑΣΗ
  - Β) ΓΟΝΙΔΙΟ ΚΑΙ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΤΟΥ
  - Γ) ΣΧΕΣΗ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΥ ΚΑΙ ΓΟΝΟΤΥΠΟΥ (CAG)<sub>n</sub>
  - Δ) ANDOGEN SENSITIVITY INDEX
5. ΟΡΙΣΜΟΣ WHO – ΣΠΕΡΜΟΔΙΑΓΡΑΜΜΑ
6. ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΟΜΑΔΕΣ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΟ ΣΠΕΡΜΟΔΙΑΓΡΑΜΜΑ (ΟΛΙΓΟ ΤΕΡΑΤΟ ΑΣΘΕΝΟ ΣΠΕΡΜΙΑ, ΑΖΩΟΣΠΕΡΜΙΑ – ΑΠΟΦΡΑΚΤΙΚΗ, ΜΗ ΑΠΟΦΡΑΚΤΙΚΗ )
7. ΕΠΙΚΤΗΤΑ ΑΙΤΙΑ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑΣ
8. ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΑ ΑΙΤΙΑ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑΣ

### ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

#### Α ΣΚΟΠΟΣ

#### Β ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

1. ΕΙΔΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ



2. ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΑΣΘΕΝΩΝ – ΕΠΙΛΟΓΗ
3. ΕΠΙΛΟΓΗ ΤΗΣ ΟΜΑΔΑΣ ΕΛΕΓΧΟΥ
4. ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΕΙΣΟΔΟΥ Η ΑΠΟΚΛΕΙΣΜΟΥ ΣΤΗ ΜΕΛΕΤΗ
5. ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ
6. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟ ΜΕΡΟΣ
  - A) ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ
  - B) ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΡΜΟΝΩΝ
7. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.

## **Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

1. ΣΥΓΚΡΙΣΕΙΣ
2. ΓΡΑΦΗΜΑΤΑ
3. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ ΣΗΜΑΝΤΙΚΕΣ ΔΙΑΦΟΡΕΣ
4. ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ

## **Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

## **Ε. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ**

## **ΣΤ. ΠΕΡΙΛΗΨΗ**

## **Z. SUMMARY**

## **Η. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**





## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Με βάση την διεθνή βιβλιογραφία αυξημένος αριθμός (CAG)n επαναλήψεων στο γονίδιο του υποδοχέα των ανδρογόνων οδηγεί σε σοβαρή βλάβη της σπερματογένεσης, όπως έχει φανεί από μελέτες σε διαφορετικούς πληθυσμούς. Από την άλλη πλευρά ο ρόλος του υποδοχέα των οιστρογόνων, όσον αφορά την σπερματογένεση στον άνθρωπο, δεν έχει ουσιαστικά διευρευνηθεί. Υπάρχουν μόνο τρία case reports ανθρώπων με αντοχή στα οιστρογόνα και πειράματα σε ποντίκια (ERKO, ArKO) όπου φαίνεται να υπάρχει διαταραχή της σπερματογένεσης. Με την παρούσα μελέτη γίνεται ορατό ότι στον συγκεκριμένο πληθυσμό (Ελληνικό), αυξημένος αριθμός επαναλήψεων (CAG)n στο γονίδιο του AR συνδιάζεται με διαταραχή της σπερματογένεσης. Όσον αφορά τον ER αποδεικνύεται για πρώτη φορά σε ανθρωπινό πληθυσμό ότι οι πολυμορφισμοί του Era σχετίζονται με διαταραχή της σπερματογένεσης και υπογονιμότητα. Πιθανόν συνδυασμός αυτών των δύο παραγόντων να παρουσιάζει συνέργεια στην βλάβη της σπερματογένεσης.



### ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

(ΑΠΟ ΚΙΝΗΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ) ΤΙΤΛΟΣ: ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΟ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ

Φύλο: Μικρό και μεγάλα παιδιά (1991)

με την πρόοδο των χρόνων (1991)

Ο πρόοδος των χρόνων και η πρόοδος των γνώσεων και των δεξιοτήτων των μαθητών είναι ο στόχος του προγράμματος. Η πρόοδος των χρόνων και η πρόοδος των γνώσεων και των δεξιοτήτων των μαθητών είναι ο στόχος του προγράμματος. Η πρόοδος των χρόνων και η πρόοδος των γνώσεων και των δεξιοτήτων των μαθητών είναι ο στόχος του προγράμματος.

Η πρόοδος των χρόνων και η πρόοδος των γνώσεων και των δεξιοτήτων των μαθητών είναι ο στόχος του προγράμματος. Η πρόοδος των χρόνων και η πρόοδος των γνώσεων και των δεξιοτήτων των μαθητών είναι ο στόχος του προγράμματος. Η πρόοδος των χρόνων και η πρόοδος των γνώσεων και των δεξιοτήτων των μαθητών είναι ο στόχος του προγράμματος.

Η πρόοδος των χρόνων και η πρόοδος των γνώσεων και των δεξιοτήτων των μαθητών είναι ο στόχος του προγράμματος. Η πρόοδος των χρόνων και η πρόοδος των γνώσεων και των δεξιοτήτων των μαθητών είναι ο στόχος του προγράμματος. Η πρόοδος των χρόνων και η πρόοδος των γνώσεων και των δεξιοτήτων των μαθητών είναι ο στόχος του προγράμματος.

Η πρόοδος των χρόνων και η πρόοδος των γνώσεων και των δεξιοτήτων των μαθητών είναι ο στόχος του προγράμματος. Η πρόοδος των χρόνων και η πρόοδος των γνώσεων και των δεξιοτήτων των μαθητών είναι ο στόχος του προγράμματος. Η πρόοδος των χρόνων και η πρόοδος των γνώσεων και των δεξιοτήτων των μαθητών είναι ο στόχος του προγράμματος.

Κατάλογος περιεχομένων

Το πρόγραμμα περιλαμβάνει:

- Εισαγωγή
- Προγράμματα μαθημάτων
- Προγράμματα δραστηριοτήτων
- Προγράμματα αξιολόγησης

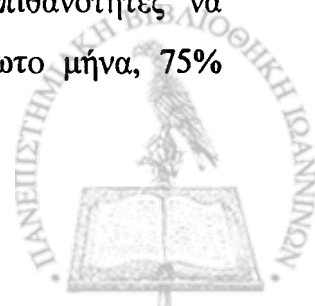


## 1. ΓΕΝΙΚΑ ΠΕΡΙ ΑΝΔΡΙΚΗΣ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑΣ (ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ)

Ο τομέας της υπογονιμότητας υπέστη και συνεχίζει να υπόκειται σε συνεχείς εξελίξεις. Μέχρι το 1970 η αντιμετώπιση του υπογόνιμου ζευγαριού εστιάζονταν κυρίως στον γυναικείο παράγοντα. Από το 1980 και κυρίως με την ανάπτυξη των μεθόδων υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (IVF), άρχισε να δίνεται έμφαση και στον ανδρικό παράγοντα. Από το 1990 τεχνικές όπως η μικρογονιμοποίηση ICSI, η βιοψία εμβρύου και άλλα έκαναν την εμφάνισή τους. Μετά την επιτυχία των παραπάνω τεχνικών οι οποίες απαιτούν ακριβή τεχνολογία πολλές φορές η διερεύνηση της ανδρικής υπογονιμότητας παρακάμπτεται θεωρούμενη ως αναποτελεσματική. Με αυτήν την τακτική αγνοείται το γεγονός ότι ο ανδρικός παράγοντας εκτός από τις εύκολα αντιμετωπίσιμες περιπτώσεις (όπως κοιρσοκήλη, αποφράξεις των αποχετευτικών οδών ή λοιμώξεις), μπορεί να οφείλεται σε καρκίνο των όρχεων, όγκους της υπόφυσης, νευρολογικά νοσήματα ή γενετικά νοσήματα.

Στην Ευρώπη ένα στα έξι ζευγάρια αντιμετωπίζει πρόβλημα υπογονιμότητας και στην Μεγάλη Βρετανία φαίνεται ότι ένας στους τέσσερις ασθενείς παρουσιάζεται με διαταραχές στο σπερμοδιάγραμμα. Η πιο συχνή διαταραχή είναι αυτή της ποιότητας του σπέρματος. Υπάρχουν ενδείξεις ότι η ποιότητα του σπέρματος χειροτερεύει στο γενικό πληθυσμό, πιθανόν σαν αποτέλεσμα περιβαλλοντικών παραγόντων που επιδρούν πολύ νωρίς κατά την ανάπτυξη του εμβρύου. Αυτές οι παρατηρήσεις υπογραμμίζουν την αναγκαιότητα κατανόησης της μοριακής βιολογίας που σχετίζεται με τα σπερματοζωάρια και να διευκρινιστεί σε μοριακό επίπεδο ποιες είναι οι διαταραχές που οδηγούν σε απώλεια της γονιμοποιητικής ικανότητας.

Όσον αφορά περαιτέρω επιδημιολογικά δεδομένα, οι πιθανότητες να συλλάβει ένα φυσιολογικό ζευγάρι είναι περίπου 25% τον πρώτο μήνα, 75%



στους έξι μήνες και 90% στον ένα χρόνο (Spira 1986). Επίσης τα ποσοστά γονιμότητας βρίσκονται στο maximum στην ηλικία των 24 ετών και για τα δύο φύλα. Μετά από αυτή την ηλικία τα ποσοστά γονιμότητας αρχίζουν να μειώνονται με την πάροδο του χρόνου (vanNcord – Zaadstra 1991).

Παρόλο που στα περισσότερα ζευγάρια συμβαίνει σύλληψη στον πρώτο χρόνο, περίπου στο 10% έως 15% δεν συμβαίνει (Greenhall 1990). Περίπου 20% από τις περιπτώσεις υπογονιμότητας σχετίζονται με τον ανδρικό παράγοντα και περίπου ένα 30% σχετίζονται με μικτό παράγοντα που αφορά και τα δύο φύλα (Mosher 1991). Έτσι περίπου στο 50% των περιπτώσεων υπογονιμότητας ευθύνεται ο ανδρικός παράγοντας. Από τα υπογόνιμα ζευγάρια χωρίς θεραπεία, 25-35% θα συλλάβουν κάποια στιγμή (Collins 1983). Μέσα στα δύο πρώτα χρόνια 23% θα συλλάβει, ενώ ένα επιπλέον 10% θα συλλάβει μετά από άλλα δύο χρόνια (Aafjes 1978). Αυτός ο ρυθμός που συμβαίνει μια κύηση πρέπει να λαμβάνεται υπόψη όταν γίνεται η εκτίμηση των αποτελεσμάτων της θεραπείας υπογονιμότητας. Όσο προχωρά η ηλικία των υπογόνιμων ζευγαριών δεν συνιστάται έλεγχος μέχρι να συμπληρωθεί ένας χρόνος. Μετά από αυτόν τον χρόνο ένας βασικός έλεγχος επιβάλλεται να γίνει. Αυτός περιλαμβάνει ιατρικό ιστορικό, φυσική εξέταση και κάποιες απλές εργαστηριακές εξετάσεις (π.χ. σπερμοδιάγραμμα, ορμονικός έλεγχος). Μετά την αξιολόγηση αυτών των παραμέτρων και εφόσον δεν έχει τεθεί διάγνωση μπορεί να προχωρήσει κανείς σε περαιτέρω έλεγχο.

Το ιδανικό είναι η διερεύνηση της ανδρικής υπογονιμότητας να οδηγήσει σε κάποιον συγκεκριμένο παράγοντα. Παρ'όλα αυτά πολλές φορές υπάρχει μη φυσιολογικό σπερμοδιάγραμμα και δεν ανευρίσκεται κάποια αιτία γι' αυτό. Όμως τόσο οι εμπειρικές θεραπείες όσο και οι τεχνικές υποβοηθούμενες αναπαραγωγής θα μπορούσαν να έχουν θέση όταν δεν ανευρίσκεται συγκεκριμένος αιτιολογικός παράγοντας.



## 2. ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΤΩΝ ΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ ΣΤΟ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

Οι υποδοχές των στεροειδών ορμονών ανήκουν στην υπεροικογένεια των υποδοχέων των θυροειδικών και στεροειδικών ορμονών. Από το 1900 έως σήμερα συνεχώς αυξάνονται οι γνώσεις για το μηχανισμό δράσης των ορμονών αυτών. Όσον αφορά τις στεροειδείς ορμόνες, έχουν περιγραφεί τρεις μεγάλες κατηγορίες με βάση τη βιολογική τους δράση: η πρώτη αφορά την κορτιζόλη και την αλδοστερόνη (adrenal steroids), η δεύτερη αφορά τα στεροειδή του φύλου (προγεστερόνη, οιστρογόνα και τεστοστερόνη) και η τρίτη τη βιταμίνη D<sub>3</sub><sup>(7)</sup>. Αυτά τα μόρια έχει αποδειχθεί να είναι καθοριστικά για την ανάπτυξη των σπονδυλωτών και τη φυσιολογία τους. Τα στεροειδή των επινεφριδίων επηρεάζουν τη φυσιολογία του οργανισμού, ελέγχοντας τον μεταβολισμό του γλυκογόνου και των μετάλλων καθώς επίσης και την απόκριση στο stress. Έχουν επίδραση στο ανοσοποιητικό σύστημα και στο νευρικό και επηρεάζουν την ανάπτυξη και διαφοροποίηση κυττάρων που βρίσκονται σε κυτταροκαλλιέργειες.

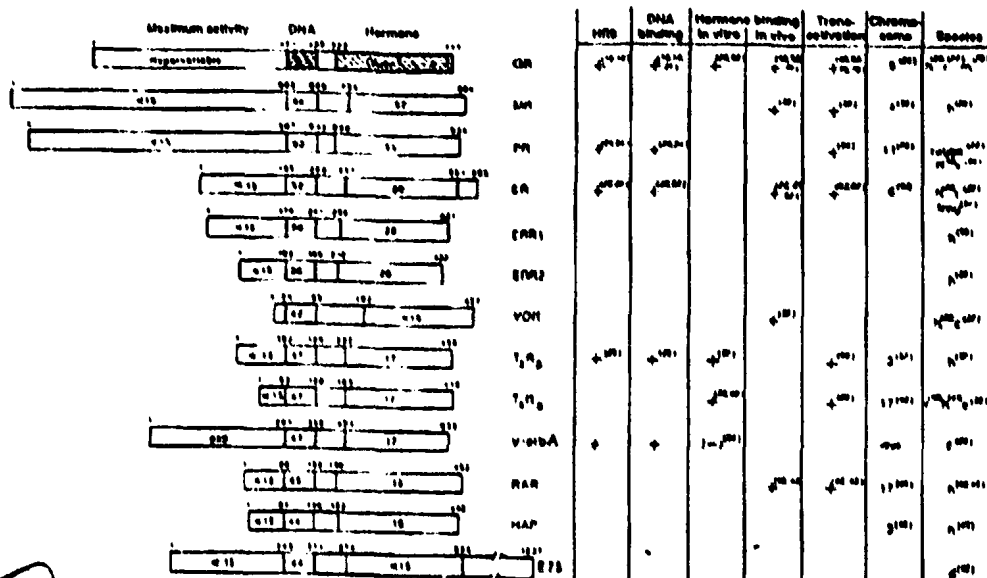
Τα στεροειδή του φύλου προκαλούν την αναπτυξη και τον καθορισμό του εμβρυονικού αναπαραγωγικού συστήματος, προκαλούν αρρενοποίηση ή θυλεοποίηση του εγκεφάλου κατά τη γέννηση, ελέγχουν την αναπαραγωγή και την αναπαραγωγική συμπεριφορά στους ενήλικες και επίσης ελέγχουν την ανάπτυξη των δευτερογενών χαρακτηριστικών του φύλου.

Η βιταμίνη D είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη και ομοιοστασία των οστών, ελέγχοντας το μεταβολισμό του ασβεστίου.

Παρόλο που τόσο οι στεροειδικές όσο και οι θυροειδικές ορμόνες δεν μοιάζουν ούτε δομικά ούτε βιοσυνθετικά, η ύπαρξη μιας κοινής δομής για τους υποδοχείς τους, στηρίζει την υπόθεση ότι υπάρχει μια υπεροικογένεια γονιδίων των οποίων τα προϊόντα είναι ligand-responsive transactivation factors.



Στην παρακάτω εικόνα φαίνονται τα μέλη της οικογένειας των υποδοχέων των στεροειδικών και των θυρεοειδικών ορμονών, με βάση την ομολογία που παρουσιάζουν.



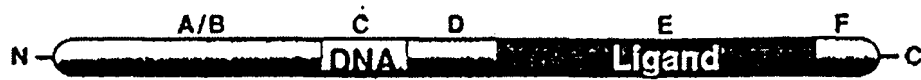
Τα μέλη της οικογένειας των στεροειδικών ορμονών.

Το κλασικό μοντέλο δράσης των στεροειδικών ορμονών σχετίζεται με το ότι οι υποδοχές των ορμονικών αυτών είναι ligand-responsive transactivation factors. Από τη στιγμή που η ορμόνη συνδεθεί με τον υποδοχέα προκαλεί αλλοστερική αλλαγή, η οποία επιτρέπει στο σύμπλεγμα ορμόνης-υποδοχέα να ενωθεί με την κατάλληλη περιοχή του DNA (δηλαδή με το DNA response element) η οποία βρίσκεται στην περιοχή προαγωγής (promoter region) του γονιδίου στόχου. Μετά από αυτή την ένωση ακολουθεί η έκφραση του συγκεκριμένου γονιδίου.

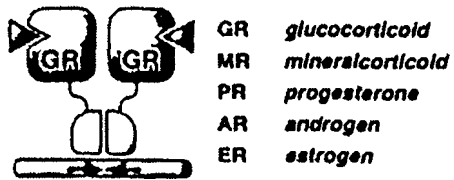
Οι υποδοχές των στεροειδικών ορμονών αποτελούνται από: 1) ένα αμινοτελικό άκρο το οποίο παρουσιάζει μεγάλη μεταβλητότητα (hypervariable N terminus) και συμμετέχει στη λειτουργία της ενεργοποίησης (transactivation). 2) Από μια καλά προστατευμένη περιοχή σύνδεσης στο DNA, η οποία είναι:



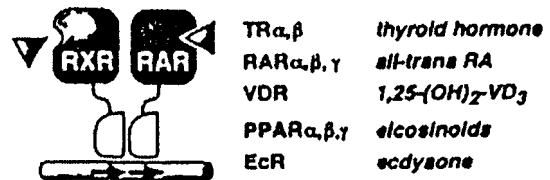
υπεύθυνη για την υψηλή εκειδίκευση σύνδεσης με το DNA και το διμερισμό. 3) Από ένα C- τελικό άκρο όπου δεσμεύεται η ορμόνη .



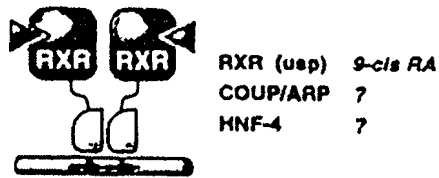
#### Steroid Receptors



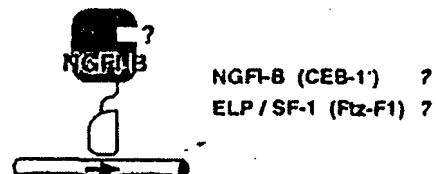
#### RXR Heterodimers



#### Dimeric Orphan Receptors



#### Monomeric Orphan Receptors



Υποδοχείς των στεροειδικών ορμονών μοιράζονται κοινούς δομικούς και λειτουργικούς τομείς.

Όσον αφορά τη δράση και τη δομή καθενός από τους υποδοχείς των οιστρογόνων και των ανδρογόνων, περιγράφονται στα επιμέρους κεφάλαια.

### 3. ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ

#### α) Έκφραση στους ιστούς όργανα

Ο υποδοχέας των οιστρογόνων εκφράζεται σε πολλούς ιστούς στο ανθρώπινο σώμα, όπως ο εγκέφαλος, υποθάλαμος, υπόφυση, μαστό, ουρογεννητικό σύστημα, οστά, καρδιαγγειακό, πνεύμονας.

Βλαστοκύστες και έμβρυα στο στάδιο των δύο κυττάρων εκφράζουν ER mRNA, πράγμα το οποίο υποστηρίζει την πιθανότητα ότι τα οιστρογόνα παίζουν ρόλο νωρίς στην ανάπτυξη.

Όσον αφορά το άρρεν αναπαραγωγικό σύστημα, πειράματα σε ποντίκια έδειξαν ότι ο ERα εκφράζεται ισχυρά στα απαγωγά σωληνάρια στον όρχι, και μάλιστα πολύ πριν αρχίσει η σπερματογένεση και η ροή στα σπερματικά σωληνάρια. Αυτό οδηγεί στην υπόθεση ότι τα οιστρογόνα παίζουν ρόλο στην δομή και λειτουργία των απαγωγών σωληναρίων (efferent ductules).

Προς το τέλος της εμβρυϊκής ζωής στα ποντίκια ο ERα εκφράζεται στα κύτταρα που περιβάλλουν τα μεσονεφρικά σωληνάρια και μετά τη γέννηση εκφράζεται στο επιθήλιο του αρχικό δίκτυο και στα απαγωγά σωληνάρια. Αυτά τα ευρήματα δηλώνουν ότι οι κύριες δράσεις των οιστρογόνων στο αναπαραγωγικό σύστημα των αρσενικών ποντικών που εξαρτώνται από τον ERα, αφορούν την ανάπτυξη και λειτουργία των απαγωγών σωληναρίων και των κυττάρων Leyding. Έχει επίσης υποθεθεί ότι ο ERα πιθανόν να εκφράζεται και στα κύτταρα Sertoli για μικρή περίοδο της νεογνικής ζωής.

Συμπερασματικά μπορούμε να πούμε ότι ο ERα εκφράζεται κυρίως στα απαγωγά σωληνάρια στην επιδιδυμίδα και στα κύτταρα Leyding στα ποντίκια και στο ανθρώπινο σπέρμα. Απαιτούνται όμως επιπλέον μελέτες για να καθοριστούν οι μοριακοί και βιοχημικοί μηχανισμοί με τους οποίους δρουν τα Ε στις παραπάνω θέσεις.

Ο ERb στα ποντίκια εκφράζεται στα κύτταρα Sertoli, Leyding, περισωληναριακά, σπερματογόνια, σπερματοκύτταρα, σπερματίδες, στον





προστάτη και στην επιδιδυμίδα και στα απαγωγά σωληνάρια (επίσης στον πνεύμονα, ωοθήκη, υποθάλαμο).

Η αρωματάση P450 εκφράζεται στα στελεχιαία κύτταρα, στις στρογγυλές και επιμήκεις σπερματίδες, στα στρογγυλά σπερματοκύτταρα, στα κύτταρα Sertoli και Leyding.

Η αρωματάση εκφράζεται κυρίως στις σπερματίδες πράγμα το οποίο συμφωνεί με το εύρημα ότι τα ποντίκια με ανεπάρκεια της αρωματάσης έχουν έλλειψη στρογγυλών και επιμήκων σπερματίδων.

Όσον αφορά τα germ cells, τα E που παράγονται σ'αυτά μπορεί να επηρεάζουν την παραγωγή A από τα κύτταρα Leyding, την γονιδιακή έκφραση στα σπερματογόνα ή την δομή στα επιθηλιακά κύτταρα στην επιδιδυμίδα. (Αυτό υποδηλώνει ότι αλλαγές στην κινητικότητα και συγκέντρωση σπέρματος της επιδιδυμίδας στα ERKO θα μπορούσε να είναι εξαιτίας της έλλειψης της δράσης των E στα κύτταρα Sertoli και στα germ cells).

Στον άνθρωπο η αρωματάση εκφράζεται στους όρχεις, ήπαρ, εγκέφαλος, ινοβλάστες, κ.α.

## β) Γονίδια ERa – ERb οργάνωση ομολογία

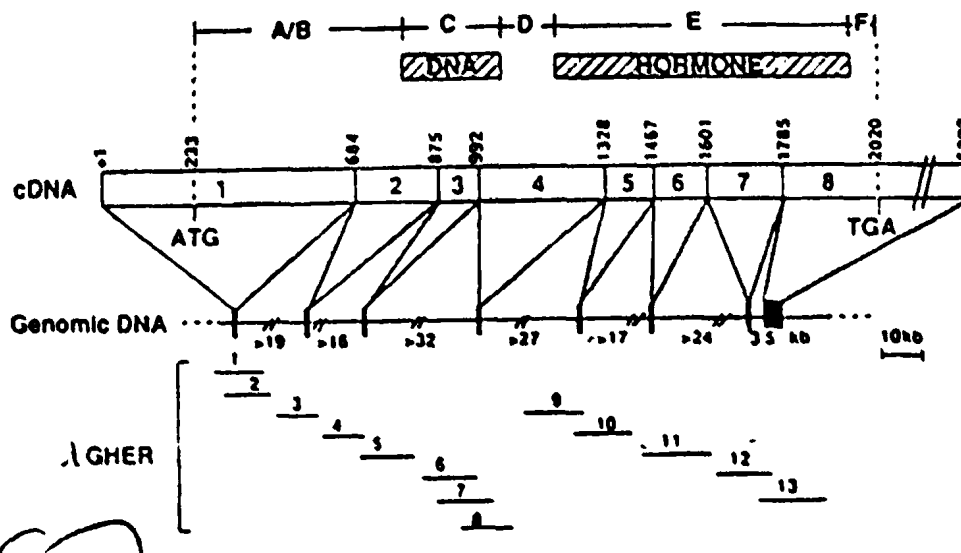
Τα E επιτελούν τη δράση τους πάνω στα διάφορα κύτταρα του οργανισμού όχι άμεσα, αλλά μέσω ειδικών υποδοχέων υψηλής δεσμευτικής συγγένειας. Οι υποδοχείς αυτοί (ER) δεσμεύουν τα E με ενεργό τρόπο και αφού μετατραπούν σε ένα ενεργοποιημένο σύμπλοκο, επιδρούν στο κύτταρο στόχο προάγοντας την παραγωγή της πρωτεΐνης που ζητείται. Μόλις ολοκληρωθεί η δράση των οιστρογόνων το σύμπλοκο αποσυνδέεται.

Υποδοχείς των οιστρογόνων έχουν εντοπιστεί παντού στο ουροποιητικό, στις σάλπιγγες, ενδομήτριο, στο σώμα της μήτρας, στον τράχηλο, στο μαστό, στον υποθάλαμο, υπόφυση και αλλού.

Το γονίδιο του ESRa στον άνθρωπο βρίσκεται στο 6q25.1 χρωμόσωμα και του ERSb στο 14q22-24. Η περιοχή του γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη



αποτελείται από 8 εξώνια: Το εξώνιο 1 κωδικοποιεί τον τομέα ενεργοποίησης της μεταγραφής (transcription activation domain). Τα εξώνια 2 και 3 κωδικοποιούν τον τομέα σύνδεσης με το DNA (DNA binding domain) και τα εξώνια 4 έως 8 κωδικοποιούν την περιοχή σύνδεσης με την ορμόνη.



Η δομή του γονιδίου του υποδοχέα των οιστρογόνων.

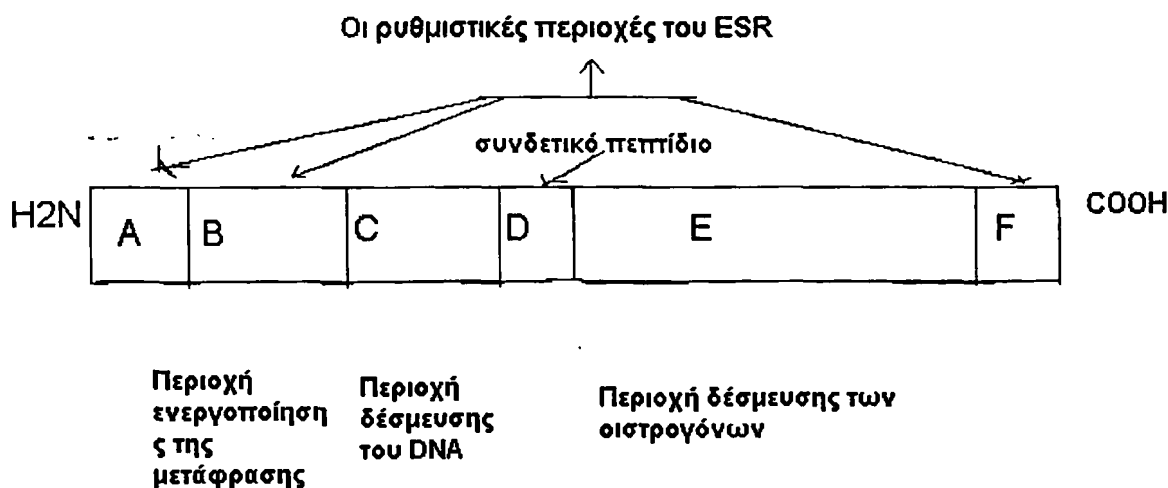
Το γονίδιο του ER εκτείνεται σε παραπάνω από 140kb και το CDNA του ορίζει μια αλληλουχία από 6322 νουκλεοτίδια που κωδικοποιούν μια πρωτεΐνη από 595 αμινοξέα, με προβλεπόμενο μοριακό βάρος 66·182.

Η δομή του υποδοχέα συνίσταται από έξι τμήματα: τα A,B,C,D,E και F. Οι περιοχές A και B είναι οι λιγότερο προστατευμένες και παρουσιάζουν μια δομική λειτουργία ενεργοποίησης της μετάφρασης των οιστρογονοεξαρτώμενων γονιδίων. Είναι υπεύθυνες για το μοριακό βάρος του υποδοχέα και μαζί με την F περιοχή αποτελούν τα ρυθμιστικά τμήματα του υποδοχέα. Η C περιοχή είναι πολύ καλά προστατευμένη και αποτελεί το τμήμα με το οποίο έρχεται σε επαφή ο υποδοχέας με το DNA του πυρήνα (DNA binding region), δίνοντας το έναυσμα για την έναρξη της μεταγραφής των ειδικών γονιδίων. Συγκεκριμένα, το τμήμα αυτό είναι υπεύθυνο για τη σύνδεση του συμπλόκου ορμόνης-υποδοχέα με μια



αλληλουχία ρυθμιστικού DNA από το DNA του κυττάρου στόχου, που καλείται στοιχείο απόκρισης στα οιστρογόνα (Estrogen Response Element, ERE) και αυτή η σύνδεση παρουσιάζει υψηλή εξειδίκευση καθώς κάθε υποδοχέας αναγνωρίζει τα δικά του ERE. Αυτή η υψηλή εξειδίκευση εξασφαλίζει ακρίβεια δράσης ώστε τα σήματα των εξωκυτταρικών ορμονών να μεταφέρονται με τους υποδοχείς στα συγκεκριμένα γονίδια στόχους. Επίσης στην άκρη της C περιοχής, εντοπίζεται και μια αλληλουχία εντοπισμού του πυρήνα από τον υποδοχέα. Η D περιοχή αποτελεί το συνδετικό πεπτίδιο μεταξύ των περιοχών C και E, που αποτελούν τις περιοχές σύνδεσης με το DNA και την ορμόνη αντίστοιχα. Ο ρόλος της περιοχής αυτής δεν είναι καλά γνωστός. Τέλος η E περιοχή είναι το τμήμα του υποδοχέα που συνδέεται με την ορμόνη (ligand binding region) και συμβάλλει στη σταθερότητα του διμερισμού της ορμόνης με τον υποδοχέα.

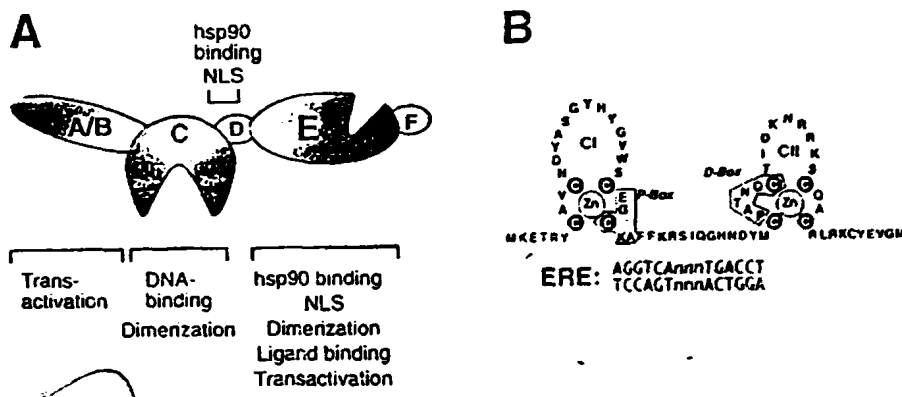
#### ΣΧΗΜΑΤΙΚΗ ΠΑΡΑΣΤΑΣΗ ΤΗΣ ΔΟΜΗΣ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΤΩΝ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ ESR



Συμπληρωματικά υπάρχει μια λειτουργία ενεργοποίησης της μετάφρασης που επάγεται από τα οιστρογόνα και που συνεργάζεται με την A/B περιοχή. Η περιοχή αυτή σχηματίζει έναν υδρόφοβο φάκελο, η δομή του οποίου



εξασφαλίζεται από τα κοινά αμινοξέα των υποδοχέων, ενώ τα διαφορετικά αμινοξέα είναι υπεύθυνα για την ειδική σύνδεση του κάθε υποδοχέα με την αντίστοιχη ορμόνη. Ακόμη, μια σειρά άλλων λειτουργιών όπως ο διμερισμός του υποδοχέα και η αλληλεπίδραση με τις heat-shock proteins αποδίδονται στην περιοχή αυτή.



Δομή των υποδοχέων των στεροειδικών ορμονών A= σχηματική παράσταση των δομικών και λειτουργικών περιοχών, των υποδοχέων του πυρήνα, B= Παρουσίαση της περιοχής σύνδεσης με το DNA του υποδοχέα των οιστρογόνων και το ERE. C1 και C2 παρουσιάζουν τους δύο δακτυλίους ψευδαργύρου στο DBD.

Όσον αφορά τον τρόπο δράσης του υποδοχέα, συγκριτική ανάλυση και πειράματα πάνω στις μεταλλάξεις του υποδοχέα έχουν οδηγήσει στην ταυτοποίηση τριών λειτουργικών περιοχών: την  $-COOH$  τελική περιοχή όπου δεσμεύεται η ορμόνη, την μεσαία περιοχή όπου δεσμεύεται το DNA και την  $-NH_2$  τελική περιοχή όπου εντοπίζεται η ενεργοποίηση της μετάφρασης. Η αλληλεπίδραση των τριών περιοχών μεταξύ τους είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση της μετάφρασης των οιστρογονοεξαρτώμενων γονιδίων.

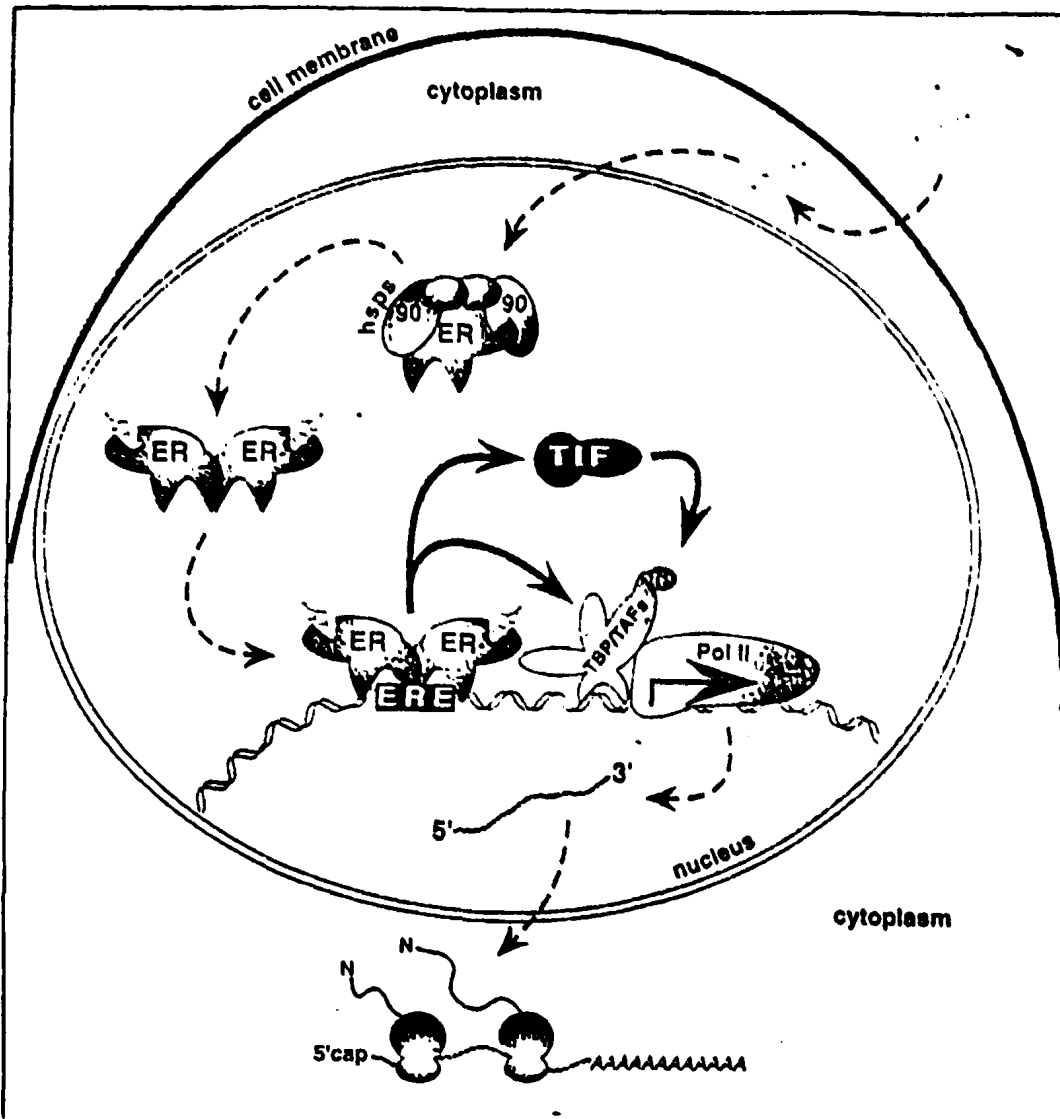


Μετά την σύνδεση των E με τον υποδοχέα, το σύμπλοκο ορμόνης-υποδοχέα συνδέεται με το DNA του κυττάρου στόχου. Η σύνδεση στο DNA γίνεται σε χρωμοσωμικές πρωτεΐνες-υποδοχείς που δεν ανήκουν στην τάξη των ιστονών.

Το γεγονός της δέσμευσης του συμπλέγματος στο DNA οδηγεί στην επαγωγή ή καταστολή ενός περιορισμένου αριθμού γονιδίων (περίπου 50-100 σε κάθε κύτταρο) των οποίων η επιλογή επιτυγχάνεται χάριν της διαφοροποίησης των κυττάρων, επειδή η δομή της χρωματίνης σε κάθε τύπο κυττάρου είναι μοναδικά οργανωμένη, διαφορετικές ομάδες γονιδίων θα είναι προσιτές στο σύμπλεγμα σε κάθε περίπτωση. Οι παραγόμενες πρωτεΐνες (π.χ. υποδοχείς οιστρογόνων, EGR, κ.λ.π.) επιδρούν στη βιολογία των κυττάρων προκαλώντας αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού.

Η διαδικασία έχει ως εξής: Αρχικά τα E μετά την έκκρισή τους κυκλοφορούν για λίγα λεπτά στο αίμα, είτε ελεύθερα, είτε συνδεδεμένα με ειδικές πρωτεΐνες. Όταν φθάσει στο κύτταρο στόχο διέρχονται παθητικά από την κυτταρική μεμβράνη και αφού ενωθούν με τους υποδοχείς τους μπαίνουν στον πυρήνα. Η ένωση της ορμόνης με τον υποδοχέα γίνεται στην ορμονοδεσμευόμενη περιοχή και προάγει τη μορφοποίηση ενός σταθερού ομοδιμερούς. Στο δεύτερο βήμα το διμερές το ενεργοποιημένο από την ορμόνη, αντιδρά με μια αλληλουχία ρυθμιστικού DNA από το DNA του κυττάρου στόχου, το ERE, και αυτή η σύνδεση προάγει τη μεταγραφή των γονιδίων των εξαρτώμενων από το E σε mRNA. Τέλος το σύμπλεγμα του διμερούς με το ERE προάγει τη διαμόρφωση του συμπλέγματος έναρξης της μετάφρασης των γονιδίων αυτών στα ριβοσώματα, κυρίως συλλέγοντας μεταφραστικούς παράγοντες και/ή σταθεροποιώντας την αντίδραση των παραγόντων αυτών με τον επαγωγέα των οιστρογονοεξαρτώμενων γονιδίων. Μόλις η ορμόνη επιτελέσει τον σκοπό της, το διμερές αποσυνδέεται. Ο χρόνος διαχωρισμού είναι σταθερός για κάθε ορμόνη.

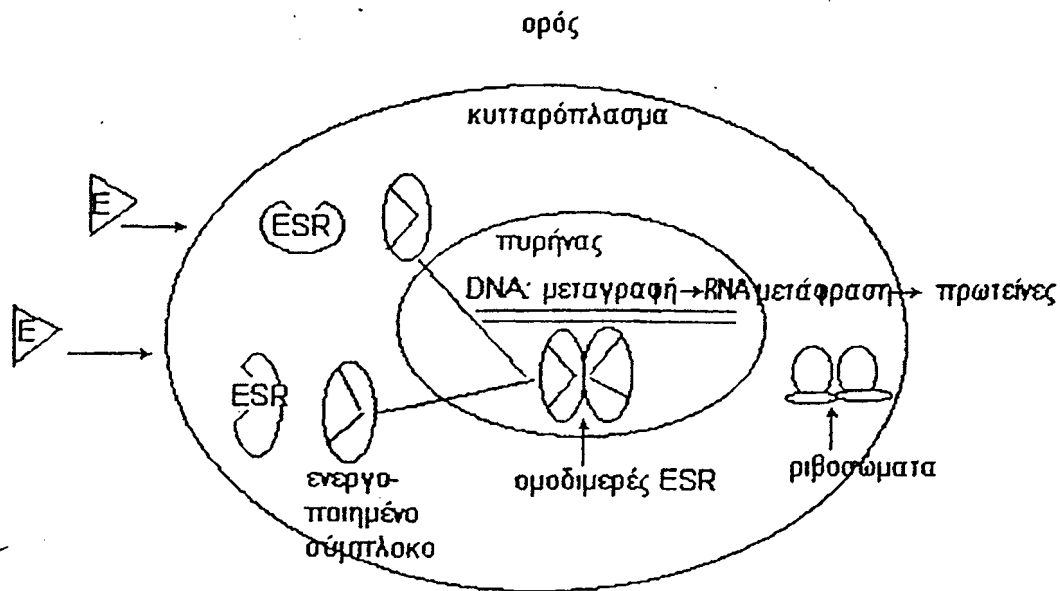




**ΣΧΗΜΑΤΙΚΗ ΠΑΡΑΣΤΑΣΗ ΤΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ER**

Παράγοντες που επηρεάζουν την μετατόπιση του συμπλέγματος στον πυρήνα εκτός από της θερμοκρασία, φαίνεται πως είναι η ιονική ισχύς και η ενζυμική ενεργοποίηση.





Το ενεργοποιημένο σύμπλοκο της ορμόνης (E) και του υποδοχέα (ER) σχηματίζει ομοδιμερές και προάγει τη μεταγραφή του ορμονοεξαρτούμενου γονιδίου σε mRNA το οποίο θα μεταγραφεί σε πρωτεΐνη.

;

Όπως προαναφέρθηκε το γονίδιο του ERb βρίσκεται στο 14q22-24 χρωμόσωμα. Το CDNA του κλώνου 29 όπως ονομάστηκε, απομονώθηκε από προστάτη ποντικού (Kuiper et al) και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη από 485 αμινοξέα με υπολογιζόμενο βάρος 54,2kd.

Η πρωτεΐνη αυτή παρουσιάζει ομολογία με την πρωτεΐνη του ERa στην περιοχή σύνδεσης με το DNA (DNA binding domain – DBD) κατά 95% και με την C-τελική περιοχή (LBD) κατά 55%.

Η βιολογική σημασία της ύπαρξης δύο διαφορετικών ER είναι αυτή τη στιγμή αδιευκρίνιστη. Θα μπορούσαν να υπάρχουν διαφορές στην περιοχή σύνδεσης (ligand-binding properties) ή /και στη λειτουργία της μεταγραφής σε συγκεκριμένα γονίδια στόχους.

Η αλληλουχία του clone 29c DNA φαίνεται στο παρακάτω σχήμα.







γ) **Κλινικές συσχετίσεις – έκφραση ER a+b**

Στα ζώα ο ρόλος των οιστρογόνων στη λειτουργία των όρχεων μελετήθηκε μετά τη δημιουργία των ποντικών aERKO (τα ποντίκια αυτά προκύπτουν μετά από μετάλλαξη του γονιδίου του Era).

Τα ενήλικα αρσενικά ποντίκια aERKO είναι στείρα. Η ιστολογία των όρχεων έδειξε ατροφία και αποδιοργάνωση του σπερματικού επιθηλίου σε συνδυασμό με διογκωμένα σωληνάκια και διευρυσμένο ορχικό δίκτυο.

Η διακοπή της σπερματογένεσης φαίνεται να είναι προοδευτική. Η ιστολογία των όρχεων ήταν φυσιολογική στις 10 ημέρες και άρχισε να αποδιοργανώνεται στις 20 ημέρες. Έγινε προφανής στις 40-60 ημέρες όταν τα σωληνάκια ήταν εντελώς διατεταμένα και το σπερματικό επιθήλιο ατροφικό (Couse and Korach 1999).

Μια σημαντική διαταραχή στην επαναρρόφηση των υγρών στα σωληνάκια φάνηκε να είναι η αιτία της υπογονιμότητας στα aERKO. Το αποτέλεσμα αυτό φαίνεται να αναπαράγεται μερικώς μετά από έκθεση φυσιολογικών ποντικών σε αντιοιστρογόνα (Hess).

Στο αναπαραγωγικό σύστημα η μεγαλύτερη συγκέντρωση ERa βρίσκεται στα απαγωγά σωληνάκια (Hess) και η επαναρρόφηση των υγρών σ' αυτό το σημείο ρυθμίζεται με την δράση των οιστρογόνων μέσω του ERa.

Στα aERKO η έλλειψη της επαναρρόφησης υγρών και η διεύρυνση των σωληναρίων έχουν σαν αποτέλεσμα οίδημα των σπερματικών σωληναρίων. Η βλάβη των σωληναρίων και του σπερματικού επιθηλίου οφείλεται πιθανόν στην αυξημένη πίεση του υγρού που οδηγεί σε ατροφία των όρχεων και βλάβη της σπερματογένεσης (Hess).

Η δημιουργία των ArKo (προκύπτουν μετά από μετάλλαξη του γονιδίου της αρωματάσης cyp19) και bERKO (προκύπτουν μετά από μετάλλαξη του γονιδίου του Erb) ποντικών, υποστηρίζει την άποψη ότι στα πειραματόζωα αυτά η δράση των οιστρογόνων στο αναπαραγωγικό σύστημα των αρσενικών είναι πιο περίπλοκη. Έτσι τα ARKO είναι γόνιμα (Fisher) αλλά η γονιμότητά τους



επηρεάζεται αρνητικά όσο προχωρά η ηλικία τους (Roberts 1999) ενώ τα BERKO είναι γόνιμα και φαινοτυπικά φυσιολογικά (Krege 1998).

Από την ηλικία των 7 μηνών τα αρσενικά ARKO δεν είναι ικανά να παράγουν απογονούς. Η ιστολογία των όρχεων σε ηλικία ενός έτους στα ARKO έδειξε διακοπή της σπερματογένεσης σε πρώιμα στάδια όπως και υπερπλάσια των κυττάρων Leyding, χωρίς σημαντικές αλλαγές στον όγκο των σπερματικών σωληναρίων (Robertson 1999).

Ο μηχανισμός που οδηγεί σε υπογονιμότητα τα ARKO προφανώς σχετίζεται με αδυναμία διαφοροποίησης των germ cells όπως φαίνεται από τη διακοπή της σπερματογένεσης σε πρώιμα στάδια. Η αδυναμία αυτή της διαφοροποίησης μάλλον οφείλεται στην έλλειψη οιστρογόνων στον όρχι.

Αυτά τα ευρήματα σε συνδυασμό με την παρατήρηση ότι τα BERKO αρσενικά ποντίκια είναι γόνιμα (Krege 1998) οδηγούν στην υπόθεση ότι η δράση των οιστρογόνων στο αναπαραγωγικό σύστημα των αρσενικών περιεπατοζώων εξαρτάται από τον τύπο του υποδοχέα και τη θέση δράσης τους. Είναι προφανές ότι χρειάζονται περαιτέρω μελέτες για να γίνει κατανοητός ο ρόλος του κάθε υποδοχέα στην ανδρική υπογονιμότητα καθώς και η ενδοκρινής ή παρακρινής δράση των οιστρογόνων στον όρχι.

## ARKO

Τα ARKO ποντίκια δεν εκφράζουν την αρωματάση μετά από μετάλλαξη του γονιδίου Cyp 19. έτσι δεν μετατρέπουν τα A σε E. Βρέθηκε ότι αυτά τα πειραματόζωα ήταν αρχικά γόνιμα, αλλά προοδευτικά ανέπτυξαν υπογονιμότητα. Η σπερματογένεση αρχικά σταμάτησε σε πρώιμα στάδια και συγκεκριμένα παρουσιάστηκε αυξημένη απόπτωση των germ cells και κύτταρα με πολλούς πυρήνες, σημαντική μείωση σε στρογγυλές και επιμήκων σπερματίδων ανωμαλίες στην ανάπτυξη του ακροσώματος και στην ικανότητα αναπαραγωγής. Δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές στα Sertoli κύτταρα και σε πιο πρώιμες μορφές των



germ cells. Αντίθετα παρατηρήθηκε υπερπλασία και υπερτροφία των Leyding προφανώς λόγω αυξημένης LH.

Η διαταραχή της σπερματογένεσης παρατηρήθηκε μεταξύ 4-5 μηνών και ενός έτους, ενώ δεν παρατηρήθηκε πτώση των γεναδοτροφινών ή των ανδρογόνων.

Παρόμοια αποτελέσματα παρουσιάζουν μελέτες όπου πίθηκοι και ποντίκια εκτέθηκαν σε αναστολείς της αρωματάσης. Και σ' αυτές τις περιπτώσεις υπήρξε σημαντική μείωση σε στρογγυλές και elongated σπερματίδες αλλά όχι πιο πρώιμες μορφές germ cells.

Άλλοι συγγραφείς υπέθεσαν ότι τα E μπορεί να συντίθενται από τα germ cells και ότι μπορεί να δρουν με παρακρινη τρόπο στα κύτταρα Sertoli, τα οποία με τη σειρά τους εκκρίνουν παράγοντες που καθορίζουν την ανάπτυξη των germ cells. Το ίδιο θα μπορούσε να συμβαίνει στα Leyding cells (δράση της αρωματάσης – ανάπτυξη germ cells).

Η εναλλακτικά τα E θα μπορούσαν να συντίθενται από τα germ cells και να δρουν με ενδοκρινή τρόπο, αποτελώντας μια τοπική πηγή E, τα οποία ελέγχουν την σπερματογένεση.

Επειδή η αρωματάση συνυπάρχει με τον ERb στο σπερματικό επιθήλιο, υποθέτουμε ότι οι δράσεις των E στην ανάπτυξη των germ cells είναι αποτέλεσμα παρακρινούς και ενδοκρινούς δράσης.

Τα ευρήματα από τη μελέτη στα ARKO δείχνουν ότι η τοπική έκφραση της αρωματάσης είναι βασική για τη σπερματογένεση και δηλώνουν μια απευθείας δράση των E στην ανάπτυξη των germ cells και φυσικά στη γονιμότητα.

Πιστεύεται ότι τα E παίζουν καθοριστικό ρόλο κατά την εμβρυϊκή ζωή στην ανάπτυξη των δευτερογενών χαρακτηριστικών του φύλλου στις γυναίκες και καθορίζουν επίσης τον αναπαραγωγικό κύκλο, τη γονιμότητα και τη διατήρηση της κύησης – αποβολή. Εκτός από το αναπαραγωγικό σύστημα των θηλέων τα E συσχετίζονται με τον καρκίνο του μαστού και κατά την περίοδο της εμμηνόπαυσης συσχετίζονται με την οστεοπόρωση και καρδιαγγειακά νοσήματα.



Αυτές οι δράσεις όμως δεν έχουν κατανοηθεί πλήρως, λόγω έλλειψης ενός μοντέλου για να μελετηθεί η αντίστοιχη φυσιολογία.

Πολυμορφισμοί του ER έχει βρεθεί ότι σχετίζονται με την ανταπόκριση των ωοθηκών στην πρόκληση ωορρηξίας κατά την IVF (κυήσεις από IVF ήταν στατιστικά λιγότερες σε ασθενείς που ήταν ομόζυγες για τον πολυμορφισμό Pvu II (Georgiou et al 1997).

Όσον αφορά το αναπαραγωγικό σύστημα στον άνθρωπο, στην βιβλιογραφία υπάρχουν τα παρακατω δεδομενα

#### Φαινότυπος ανδρών με συγγενή ανεπάρκεια των E

Σε ενήλικες άνδρες δύο περιπτώσεις έχουν τεκμηριωθεί στη βιβλιογραφία με μετάλλαξη στο γονίδιο της αρωματάσης (Morishima 1995 – Carani 1997 και μία περίπτωση ασθενούς με συγγενή ανεπάρκεια οιστρογόνων που οφείλονταν σε μετάλλαξη του γονιδίου του Era που οδηγεί σε αναστολή της ενεργοποίησής του .

#### Περίληπτικά τα κλινικά ευρήματα

1) Άνδρας 28 ετών με μετάλλαξη στο ERa γονίδιο.

Υπήρχαν όλα τα ευρήματα της αντίστασης στα οιστρογόνα. Το ορμονικό profile ήταν: αυξημένες οιστραδιόλη, οιστρόνη, FSH και LH, τεστοστερόνη φυσιολογική.

Τα έξω γεννητικά όργανα ήταν φυσιολογικά και ο όγκος των όρχεων και ο προστάτης επίσης φυσιολογικά.

Σπερμοδιάγραμμα: μειωμένη κινητικότητα σπέρματος (viability 18%) και φυσιολογικός αριθμός σπερματοζωαρίων.

Acanthosis nigricans οστεοπόρωση μη σύγκλιση των επιφύσεων υπερινσουλιαιμία – ανοχή στη γλυκόζη.

Η μετάλλαξη ήταν στο εξώνιο 2. αντικατάσταση της κυτοσίνης από θυμίνη στο κωδικόνιο 157 και στα δύο αλληλόμορφα (οι γονείς ήταν ετεροζυγώτες και συγγενείς μεταξύ τους). Αυτό οδήγησε σε premature stop codon. Δεν υπήρχε ανταπόκριση στη θεραπεία με E. Άρα μη έκφραση



(disruption) του ER στους ανθρώπους δεν είναι θανατηφόρος. Τα E είναι εξίσου σημαντικά για την ομοιόσταση των οστών και στα δύο φύλα.

- 2) (1995 Morishima) Διαγνώστηκε ανεπάρκεια στις αρωματάσης σε έναν ενήλικα άνδρα. Οι LH, FSH και τεστοστερόνη ήταν αυξημένες. Τα E δεν ήταν ανιχνεύσιμα. Τα έξω γεννητικά όργανα ήταν φυσιολογικά και ο όγκος των όρχεων αυξημένος. Υπήρχε οστεοπενία και υπερινσουλιαιμία.

Σπερμοδιάγραμμα δεν υπάρχει διαθεσιμότητα για τον συγκεκριμένο ασθενή.

- 3) Το 1997, ταυτοποιήθηκε μια μετάλλαξη του γονιδίου της αρωματάσης P450 σε ομόζυγη κατάσταση (Carani et al).

Ορμονικό profile: οιστραδιόλη ελαττωμένη, FSH, LH αυξημένη, τεστοστερόνη: φυσιολογική. Ο όγκος των όρχεων 8ml λοιπά γεννητικά όργανα: φυσιολογικά.

Σπερμοδιάγραμμα:  $(1 \cdot 10^3)$  σπερματοζώαρια και ακίνητα).

Ο καρυότυπος ήταν 46XY η ταυτότητα του φύλου, ο ψυχοσεξουαλικός προσανατολισμός και η libido φυσιολογικά.

Χοληστερόλη και τριγλυκερίδια ήταν αυξημένα, η HDL ελαττωμένη. Υπήρχαν ανοικτές υποφύσεις.

Βιοψία όρχεων: υποσπερματογένεση και germ cell arrest κυρίως στο στάδιο των πρωτογενών σπερματοκυττάρων.

Μετάλλαξη: G→A στο ζεύγος βάσεων (bp)1094 στο εξόνιο 9 του γονιδίου της αρωματάσης P450.

Μετά θεραπεία με οιστρογόνα όλες οι παράμετροι βελτιώθηκαν εκτός από τον όγκο των όρχεων και το σπέρμα.

Στους ενήλικες άνδρες η αρωματάση εντοπίζεται στα κύτταρα Leyding, αλλά η δομή της δεν είναι γνωστή. Η αποτυχία της θεραπείας με οιστρογόνα στη



βελτίωση του σπέρματος αντιτίθεται στην υπόθεση του να οφείλεται η βλάβη (της σπερματογένεσης) στα οιστρογόνα.

Μεταξύ των δύο ανδρών με ανεπάρκεια της αρωματάσης ο ένας είχε αυξημένο όγκο όρχεων και  $\uparrow$ LH και τεστοστερόνη, ενώ ο άλλος φυσιολογικό προς ελαττωμένο όγκο όρχεων, σοβαρή ολιγοσπερμία και υπογονιμότητα. Οι LH και τεστοστερόνη ήταν φυσιολογικές ή λίγο αυξημένες.

Άλλες περιπτώσεις γυναικών

Ένα άλλο case report περιέγραψε μια γυναίκα (XX) με ψευδερμαφροδιτισμό ο οποίος οφειλόταν σε null mutation στο γονίδιο της αρωματάσης P450.

Στην ήβη παρουσίασε προοδευτικό ερμαφροδιτισμό χωρίς ανάπτυξη των μαστών ή επιτάχυνση της ανάπτυξης. Η θεραπεία με οιστρογόνα είχε σαν αποτέλεσμα φυσιολογική ανάπτυξη των μαστών και εμμηναρχή.

Μια δεύτερη περίπτωση γυναίκας με ψευδερμαφροδιτισμό που οφείλονταν σε ανεπάρκεια της αρωματάσης του πλακούντα.

Η περίπτωση αυτή δηλώνει ότι από το πρώτο τρίμηνο της κύησης, η παρουσία των ανδρογόνων σε συνδυασμό με χαμηλά ή απόντα οιστρογόνα στο θήλυ έμβρυο είναι συμβατά με τη ζωή.

#### δ) Πολυμορφισμοί των γονιδίων

Όπως προαναφέρθηκε, η καλή κατάσταση του υποδοχέα είναι ένας παράγοντας καθοριστικός για την αποτελεσματικότητα της δράσης της ορμόνης. Οι πολυμορφισμοί και οι μεταλλάξεις επηρεάζουν την σταθερότητα και την έκφραση του γονιδίου κωδικοποιούν, μέσω της δράσης τους στην πρωτεΐνη που παράγεται.

Στον ERα έχουν εντοπιστεί πολυμορφισμοί στο εξώνιο 1 (codon 10 και codon 87), στο εξώνιο 1 ο PVUII, στο εξώνιο 3 (codon 243) ο xbaI (στα εξώνια 2 και 5), στο εξώνιο 4 (codon 325) και στο εξώνιο 8 (codon 594).



Οι πολυμορφισμοί του υποδοχέα είναι ένα σχετικά καινούριο πεδίο έρευνας και δεν υπάρχουν πολλές αναφορές στη διεθνή βιβλιογραφία που να συσχετίζουν πολυμορφισμούς με νοσήματα.

Έχει βρεθεί σχέση του πολυμορφισμού στο εξώνιο 4 (codon325 ) με οικογενειακό ιστορικό καρκίνου του μαστού (1). Από την άλλη πλευρά η συχνότητα του πολυμορφισμού αυτού σε σποραδικό καρκίνο μαστού ήταν αυξημένη σε σχέση με την ομάδα σύγκρισης. Επίσης έχει δημοσιευθεί και η απουσία σχέσης του πολυμορφισμού αυτού με ανάπτυξη καρκίνου του μαστού.

Στην IVF έχει βρεθεί ότι η επίτευξη κυήσεων ήταν ελαττωμένη σημαντικά σε ασθενείς που ήταν ομοζυγώτες για τον πολυμορφισμό PVUII (Georgiou et al ). Οι ίδιοι συγγραφείς έδειξαν σχέση μεταξύ της ενδομητρίωσης και του πολυμορφισμού PVUII και του (TA)n.

Άλλοι συσχετισμοί είναι: η σιωπηλή μετάλλαξη BstUI που μελετήθηκε σε σχέση με τον καρκίνο του μαστού και με τις καθ'εξήν εκτρώσεις, η επαναλαμβανόμενη αλληλουχία (TA) η με την οστεοπόρωση.

Πρόσφατα δημοσιεύτηκε συσχετισμός μεταξύ ιδιοπαθούς αζωοσπερμίας και του πολυμορφισμού στο εξώνιο 4 (codan 325) (Fertility- Ster 2002).

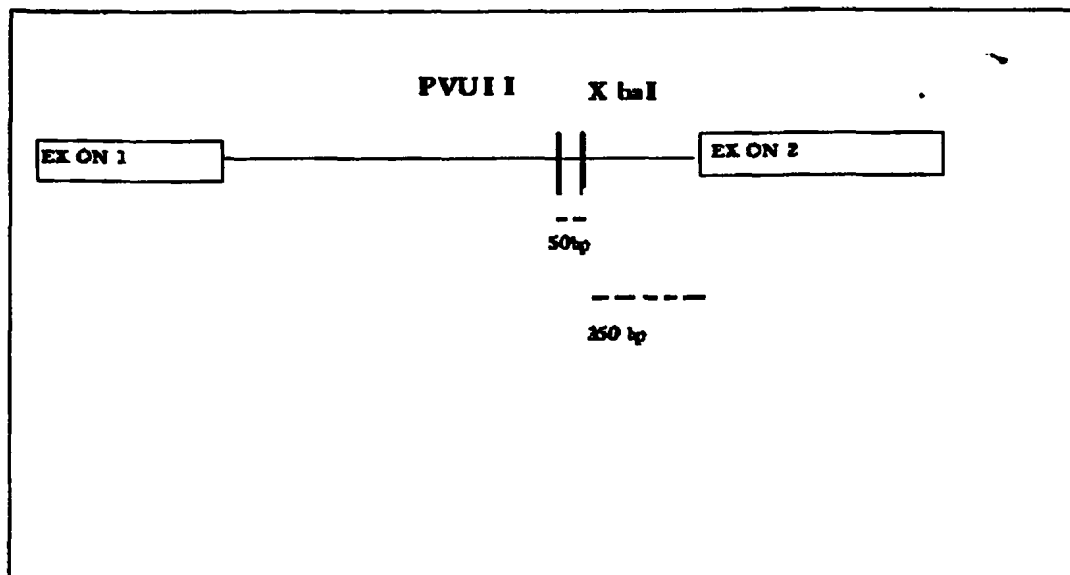
Ο πολυμορφισμός PVUII

Ο πολυμορφισμός αυτός μελετήθηκε από τους Anderson et al 1997 και Yaich et all 1992, στον καρκίνο του μαστού.

Βρίσκεται στο εσώνιο 1, στις 0,4 kb πάνω από το εξώνιο 2 και είναι μια γονιδιακή μετάλλαξη T→C στην 5<sup>η</sup> θέση της αλληλουχίας CAGCTG (restriction site). Η θέση του στο εσώνιο περιορίζει την επίδρασή του στην έκφραση του ESR, αλλά δεν μπορούμε να αγνοήσουμε την πιθανότητα να συνδέεται με άλλες μεταλλάξεις του γονιδίου οι οποίες έχουν επίδραση στον υποδοχέα. Ο πολυμορφισμός αυτός έχει μελετηθεί στον καρκίνο του μαστού. Η συχνότητά του στον πληθυσμό είναι μεγάλη.

Ο πολυμορφισμός XbaI.





Ο πολυμορφισμός Xba I βρίσκεται περίπου 50 ζεύγη βάσεων μακριά από τον πολυμορφισμό Pvu II και περίπου 400 ζεύγη βάσεων πριν το εξώνιο 2 στο γονίδιο του υποδοχέα των οιστρογόνων. Υπάρχει μια σημειακή μετάλλαξη (A-G) στη θέση (TCTAGA) η οποία γίνεται (TCTGGA). Έχει ενοχοποιηθεί για πρόκληση οστεοπόρωσης και αντίσταση στην θεραπεία υποκατάστασης.



#### 4. ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ ΑΝΔΡΟΓΟΝΩΝ

##### α) Έκφραση του ER στου ιστού όργανα

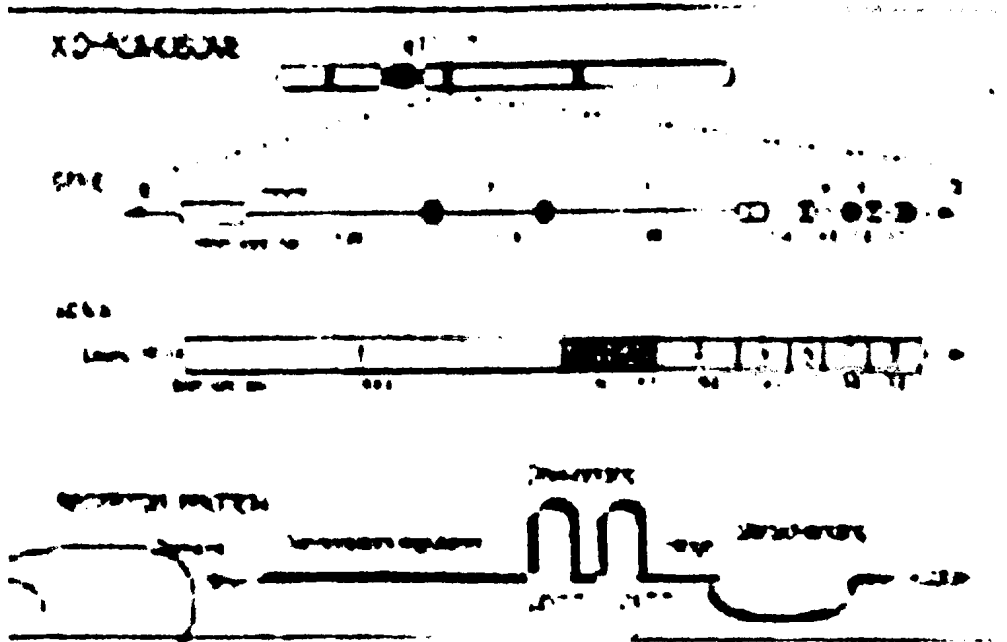
Ο AR εντοπίζεται σε όλους τους ιστούς και όργανα πράγμα το οποίο οδηγεί στο συμπέρασμα ότι τα ανδρογόνα παίζουν ρυθμιστικό ρόλο σε όλα τα οργανικά συστήματα. Στο γεννητικό σύστημα του άρρενος τα ανδρογόνα μέσω του AR ρυθμίζουν τη σπερματογένεση, αφού όμως προηγηθεί η διαφοροποίηση του όρχεος από τον παράγοντα που κωδικοποιείται από το γονίδιο SRY, που βρίσκεται στο Y χρωμόσωμα.

Μετά τον καθορισμό του φύλου, έχουμε την υποστροφή των πόρων του Muller μέσω ενός παράγοντα που ανήκει στην οικογένεια των TGF- $\beta$  και που εκκρίνεται από τα κύτταρα Sertoli. Στη συνέχεια έχουμε τη διαφοροποίηση των πόρων του Wolff μέσω της δράσης των ανδρογόνων που εκκρίνονται από τα κύτταρα Leyding. Η διαφοροποίηση αυτή οδηγεί στο σχηματισμό της επιδιδυμίδας, του σπερματικού πόρου και των σπερματοδόχων κύστεων. Αργότερα η διϋδροτεστοστερόνη είναι υπεύθυνη για την ανάπτυξη του προστάτη της προστατικής ουρήθρας, του πέους, της πείκης ουρήθρας και του οσχέου. Όσον αφορά τα υπόλοιπα συστήματα αναφέρεται η αναβολική δράση των A στο μυοσκελετικό και το ήπαρ, η επίδραση στη διαφοροποίηση του νευρικού ιστού, στο ανοσολογικό σύστημα, στο δέρμα και στην τριχοφυΐα.

##### β) Γονίδιο και πολυμορφισμοί του

Η δομή του AR





Ο AR ανήκει στην υπεροικογένεια των στεροειδικών και των θυρεοειδικών ορμονών, της βιταμίνης D, του ρεινοϊκού οξέως και μιας μεγάλης κατηγορίας άλλων ρυθμιστικών μορίων.

Ο υποδοχέας έχει μοριακό βάρος 110-114Kda, και στο μόριό του αναγνωρίζονται οι εξής περιοχές: 1) η περιοχή πρόσδεσης της ορμόνης. Η συγγένεια πρόσδεσης είναι μεγαλύτερη για την διϋδροτερτοστερόνη, μετά για την τεστοστερόνη και ακόμη λιγότερη για την δεϋδροεπιανδροστερόνη και την ανδροστενδιόνη. Η περιοχή αυτή βρίσκεται στο C- άκρο του μορίου, κωδικοποιείται από τα εξώνια 5-8 και εκτείνεται στα αμινοξέα: 670-916. 2) Η περιοχή πρόσδεσης στο DNA, η οποία βρίσκεται στο μέσο του μορίου εκτείνεται στα αμινοξέα 538-627 και κωδικοποιείται από τα εξώνια 2 και 3. Χαρακτηρίζεται από την παρουσία δύο δακτυλίων Zn, καθένας από τους οποίους φέρει τέσσερις κυστεΐνες συνδεδεμένες με ένα άτομο Zn. Ο πρώτος δακτύλιος συμμετέχει στην αναγνώριση των ορμονοανταποκρινόμενων στοιχείων του DNA, ενώ ο άλλος συμβάλλει στη σταθεροποίηση του δεσμού υποδοχέα-DNA και στο διμερισμό. 3) Η περιοχή του μεταγραφικού ελέγχου, η οποία εντοπίζεται στο αμινοτελικό άκρο του υποδοχέα που κωδικοποιείται από το εξώνιο 1.



Στο μόριο του AR υπάρχουν, εκτός από τις παραπάνω περιοχές, και περιοχές υπεύθυνες για το διμερισμό του υποδοχέα, για τη φωσφορυλίωσή του και για την πυρηνική μετατόπιση.

#### Το γονίδιο του AR

Το γονίδιο του AR βρίσκεται στο X χρωμόσωμα στο q 11-12. Αυτό έχει σαν συνέπεια να γίνονται εύκολα ορατές οι μεταλλάξεις του. Το γονίδιο εκτείνεται σε μήκος 75-90kb ενώ η κωδική περιοχή του αποτελείται από περίπου 2757 βάσεις. Περιέχει 8 εξόνια. Στην αρχή του πρώτου εξωνίου βρίσκεται μια επαναλαμβανόμενη τριπλέτα CAG η οποία είναι έντονα πολυμορφική. Το γονίδιο αυτό περιέχει δύο περιοχές έναρξης της μεταγραφής (promoters), μια κύρια που ξεκινά τη μετάφραση, και μια άλλη.

Έχουν βρεθεί και αλληλουχίες που θα μπορούσαν να παίζουν ρόλο ως ορμονοεξαρτώμενα στοιχεία, με πιθανό ρόλο στην ορμονική ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου του AR.

#### Τρόπος δράσης του υποδοχέα

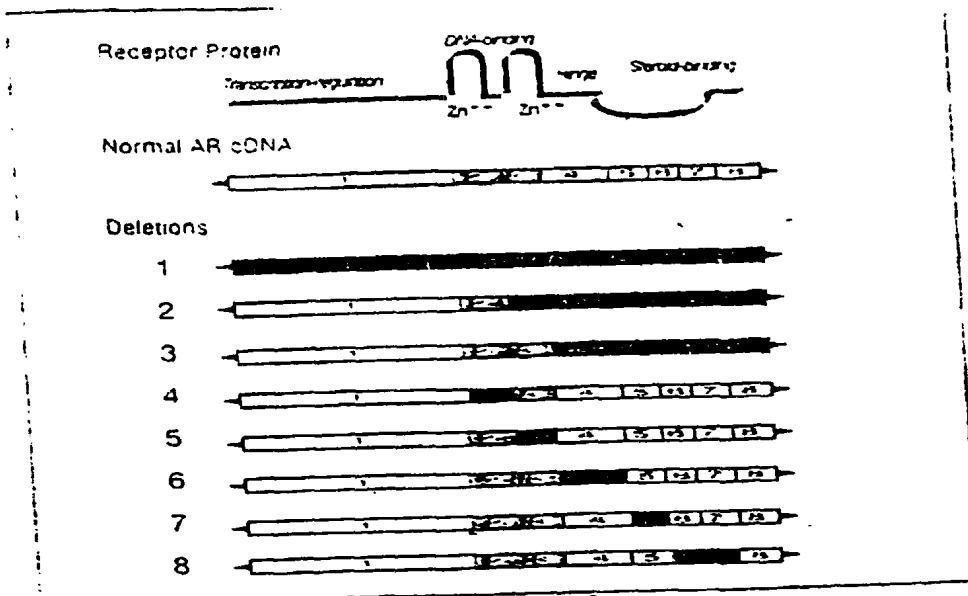
Ο τρόπος δράσης είναι ίδιος με αυτόν των υπολοίπων στεροειδικών ορμονών: Όταν δεν είναι συνδεδεμένος με την ορμόνη, βρίσκεται σε μορφή ανενεργού συμπλόκου με άλλες πρωτεΐνες, όπως είναι οι πρωτεΐνες του θερμικού shock. Όταν προσδεθεί η ορμόνη στον υποδοχέα το σύμπλοκο ενεργοποιείται. Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει τη διάσπαση του συμπλόκου, την απελευθέρωσή του, το σχηματισμό διμερούς με ένα άλλο ενεργοποιημένο μόριο υποδοχέα και την πρόσδεση του διμερούς αυτού σε ειδικές θέσεις του DNA, στα ορμονοανταποκρινόμενα στοιχεία. Τα στοιχεία αυτά είναι (στον AR) AGNACA<sub>n</sub>nnn TGTNCT, τα οποία αναγνωρίζονται επίσης από τους υποδοχείς των άλατο και γλυκο κορτικοειδών και της προγεστερόνης. Το φαινόμενο αυτό εξηγεί τη συνεργική δράση των ορμονών αυτών σχετικά με τη ρύθμιση συγκεκριμένων γονιδίων, καθώς επίσης τονίζει τη σημασία ιστοειδικών και άλλων ειδικών μεταγραφικών παραγόντων στη διαφορική ορμονοεξαρτώμενη διέγερση γονιδίων που φέρουν τέτοια ορμονοανταποκρινόμενα στοιχεία. Η σύνδεση του



υποδοχέα στο DNA οδηγεί σε ενεργοποίηση ή καταστολή συγκεκριμένων γονιδίων, στην παραγωγή mRNA και πρωτεϊνών, από τις οποίες εκδηλώνεται η δράση της ορμόνης.

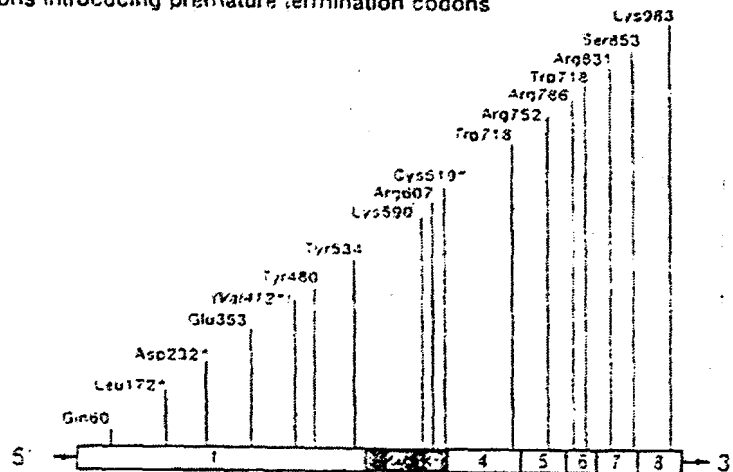
### Πολυμορφισμοί του γονιδίου του AR

Πολλών ειδών μοριακές αλλαγές έχουν περιγραφεί στο γονίδιο του AR, όπως απαλείψεις τμημάτων και προσθέσεις μικρών τμημάτων και σκελετικές μεταλλάξεις (που αφορούν το 90% των περιπτώσεων)

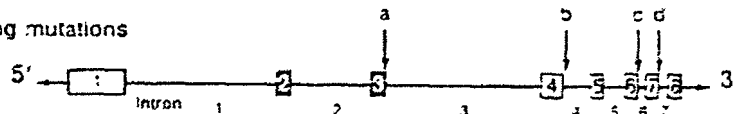


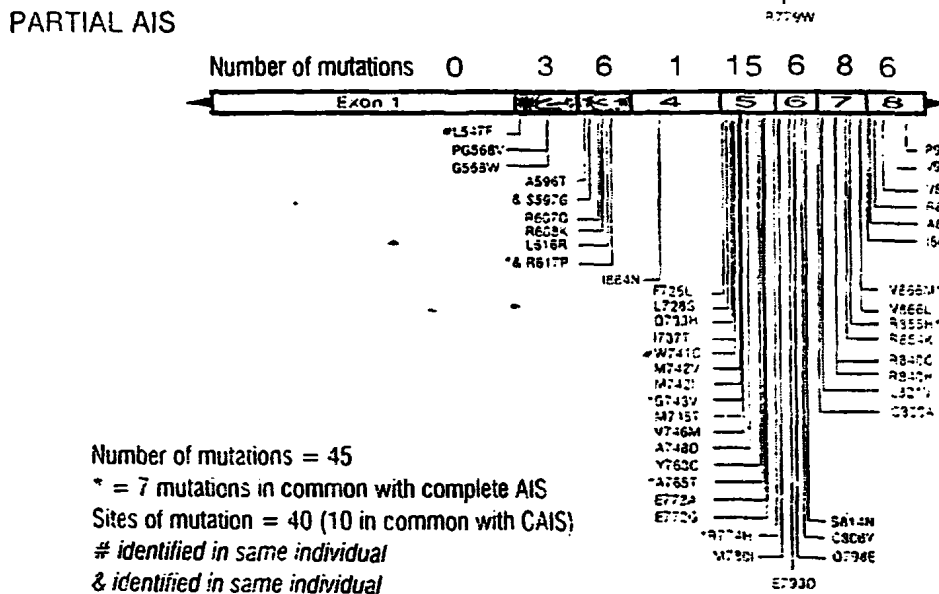
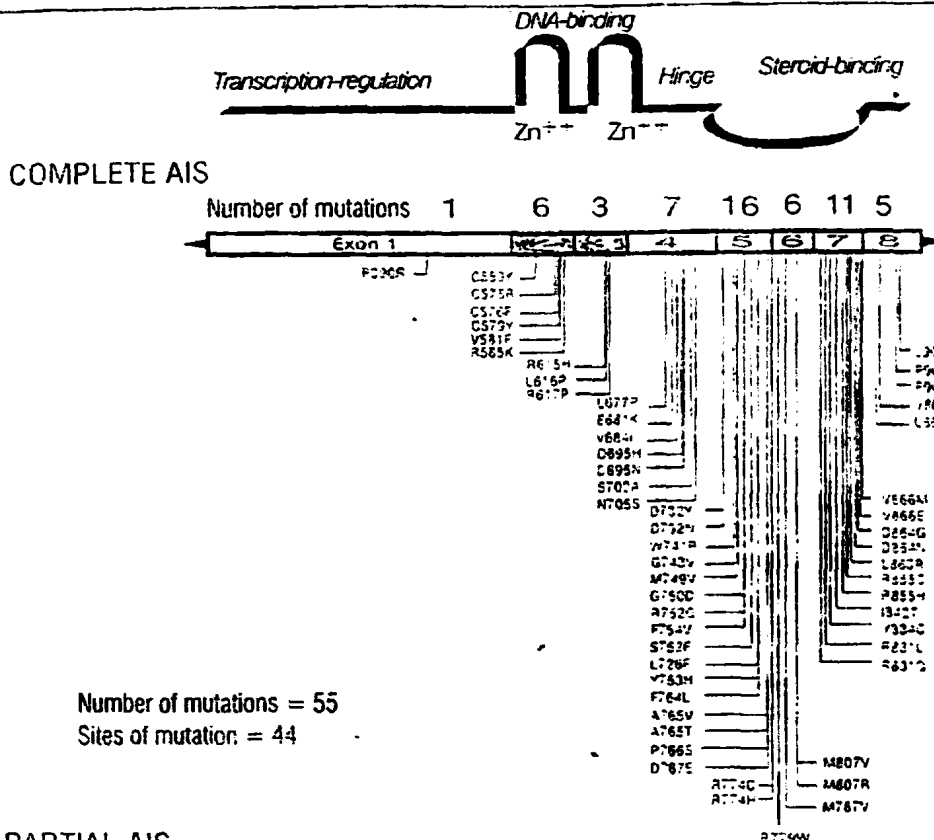
Το γονίδιο του υποδοχέα των ανδρογόνων και οι θέσεις μεταλλάξεων αυτού

Locations of mutations introducing premature termination codons



Locations of splicing mutations





θέσεις μεταλλάξεων στο σύνδρομο πλήρους έλλειψης ευαισθησίας στα ανδρογόνα

Οι συνέπειες της μοριακής αλλαγής στην λειτουργικότητα του υποδοχέα εξαρτώνται από την έκταση της αλλαγής, το σημείο στο οποίο συμβαίνει και στην



περίπτωση των σημειακών μεταλλάξεων, που οδηγούν σε αλλαγή κωδικωνίου, στην φύση του υποκατάστατου αμινοξέος.

Μικρές απαλείψεις ή προσθήσεις ή αντικατάσταση αμινοξέων από άλλα με όμοιες ιδιότητες, μπορεί να μην έχουν αρνητικό αποτέλεσμα στη λειτουργικότητα του AR ή να την επηρεάζουν λίγο π.χ. μικρή μεταβολή της σταθεράς συνδέσεως ή της θερμοευαισθησίας του μορίου. Υπάρχουν τα λεγόμενα «θερμά σημεία» όπου οι μεταλλάξεις δείχνουν προτίμηση, όπως στα κωδικόνια 774 (Arg, στο εξώνιο 6) και 840, 855 και 866 (Arg, Arg, Val αντίστοιχα στο εξώνιο 7), οι οποίες αποτελούν το 25% περίπου του συνόλου των missense μεταλλάξεων.

Σημαντικές είναι οι μεταλλάξεις που οδηγούν σε κωδικόνιο τερματισμού οπότε παράγεται τμήμα μόνο της πολυπεπτιδικής αλυσίδας ή οι μεταλλάξεις σε περιοχές σημαντικές για τη δημιουργία του προδρόμου mRNA σε mRNA, κυρίως στην περιοχή συνενώσεως εξωνίων-εσωνίων. Τέτοιες μεταλλάξεις οδηγούν σε AR με έλλειψη εξωνίων και βλάβη στη λειτουργικότητά του.

Στη νόσο του Kennedy, η οποία εμφανίζεται με νευρολογική σημειολογία, γυναικομαστία, αζωοσπερμία και ατροφία όρχεων και η ηλικία στην οποία πρωτοεμφανίζεται είναι η μέση. Στη νόσο αυτή υπάρχουν περισσότερες επαναλήψεις CAG (>40) ενώ φυσιολογικά ο αριθμός επαναλήψεων αυτής της τριπλέτας είναι 20. η πολυγλουταμινική αυτή αλυσίδα βρίσκεται στο N-τελικό άκρο του μορίου.

Μεταλλάξεις του AR συμβαίνουν στον καρκίνο του προστάτη. Η σημασία των σωματικών αυτών μεταλλάξεων στην αντίσταση στην ορμονοθεραπεία του καρκίνου είναι σημαντική, γιατί οι μεταλλάξεις αυτές μεταβάλλουν την εξειδίκευση του AR προς την ορμόνη. Έχει βρεθεί μετάλλαξη του AR στον καρκίνο του προστάτη, ο οποίος ενεργοποιείται από τα ανδρογόνα, τεστοστερόνη και διϋδροτεστοστερόνη, αλλά και από την προγεστερόνη, δεϋδροεπιανδροστερόνη και την ανδροστενδιόνη.

Σε μερικές περιπτώσεις του καρκίνου του προστάτη έχει παρατηρηθεί μεταβολή του αριθμού των επαναλήψεων του CAG στο N-τελικό άκρο του



υποδοχέα και έχει γίνει συσχέτιση του αριθμού των επαναλήψεων με την πρόγνωση της νόσου.

### γ) χέ ση γονοτύπου φαινοτύπου (CAG)n

Πολλές επαναλήψεις του τρινουκλεοτιδίου (CAG)n έχουν παρατηρηθεί σε αρκετά γονίδια στον άνθρωπο και έχουν συσχετιστεί με διάφορα νοσήματα του νευρικού συστήματος όπως: νόσος του Kennedy, νόσος Huntington νωτιαιοπαρεγκεφαλιδική αταξία τύπου 1 και 3 ή Machado-Joseph νόσος, νωτιαιοπαρεγκεφαλιδική αταξία τύπου 6 και 7, dentatorubral pallidoluysian atrophy ή (DRPLA) νόσος. Σε κάθε μία από τις παραπάνω νόσους οι επαναλήψεις του τρινουκλεοτιδίου (CAG)n, έχουν το χαρακτηριστικό ότι στις επόμενες γενιές η ηλικία εμφάνισης της νόσου ελαττώνεται όλο και περισσότερο (anticipation). Αυτό το φαινόμενο εξηγείται από το γεγονός ότι οι πολλές επαναλήψεις του τρινουκλεοτιδίου χαρακτηρίζονται από αστάθεια, η οποία τις οδηγεί στην περαιτέρω αύξηση των επαναλήψεων. Αυτές οι μεταλλάξεις κληρονομούνται τότε στις επόμενες γενιές. Παρολαυτά οι επαναλήψεις του (CAG)n μπορεί να παραμένουν σταθερές στα ίδια γονίδια με διαφορετικά νούμερα στο κάθε αντίγραφο του γονιδίου.

Επίσης η επαναλαμβανόμενη τριπλέτα (CAG)n είναι πιθανό να λειτουργεί σαν polar zipper (π.χ. ενώνει ειδικούς παράγοντες μεταγραφής που πρόσκεινται σε ξεχωριστές έλικες του DNA) ή ρυθμίζει την ενεργοποίηση της μεταγραφής μιας ομάδας γονιδίων.

Για λόγους οι οποίοι δεν είναι γνωστοί ο αριθμός των επαναλήψεων του (CAG)n μερικές φορές αυξάνει σε ένα επίπεδο πριν από αυτό της μετάλλαξης και κληρονομείται από τη μία γενιά στις επόμενες. Με αυτό τον αριθμό των επαναλήψεων χάνεται η μειωτική σταθερότητα, παρατηρείται μεγαλύτερος αριθμός επαναλήψεων στην επόμενη γενιά και αυτό συνδέεται με την εμφάνιση του εκφυλιστικού νευρολογικού νοσήματος.





Όσον αφορά το γονίδιο που κωδικοποιεί τον υποδοχέα των ανδρογόνων αύξηση του αριθμού των επαναλήψεων του (CAG)<sub>n</sub> στο εξώνιο 1 συνδέεται με ολιγοσπερμία ή αζωοσπερμία. (Dawsing et all The Lancet).

Σε φυσιολογικούς άνδρες και γυναίκες ο αριθμός των επαναλήψεων του (CAG)<sub>n</sub> στο εξώνιο 1 του γονιδίου του AR κυμαίνεται μεταξύ 9 και 36. οι λόγοι ύπαρξης αυτού του πολυμορφισμού είναι άγνωστοι.

Μελέτη της *in vitro* έκφρασης έδειξε ότι βαθμιαία αύξηση των επαναλήψεων του (CAG)<sub>n</sub> συνεπάγεται βαθμιαία ελάττωση του δυναμικού ενεργοποίησης του AR.

Έτσι συμπεραίνουμε ότι ο AR χρησιμοποιεί το δυναμικό ενεργοποίησης (transactivation potential) μέσω της αμινοτελικής πολυγλουταμονικής οδού.

Στη νόσο του Kennedy ο μικρότερος αριθμός επαναλήψεων είναι 41 και κυμαίνεται από 38 έως 62. Έτσι το επίπεδο ενεργοποίησης (anticipation) είναι μεταξύ 38 και 41. Η συχνότητα εμφάνισης αυτής της νόσου είναι 1/50.000 ανθρώπους.

Παρόλο που οι επαναλήψεις του (CAG)<sub>n</sub> στη νόσο του Kennedy είναι πολύ περισσότερες απ' ότι στους υπογόνιμους άνδρες, στους άνδρες που πάσχουν από τη νόσο του Kennedy παρατηρείται πρόβλημα στη σπερματογένεση όταν αυτοί είναι από 40 έως 50 ετών. Με άλλα λόγια οι πιο πολλοί άνδρες με τη νόσο αυτή είναι γόνιμοι.

Αυτό το εύρημα οδηγεί σε ερωτηματικά όσον αφορά μια απευθείας σχέση μεταξύ των επαναλήψεων του (CAG)<sub>n</sub> και την εμφάνιση σοβαρής ολιγοσπερμίας και αζωοσπερμίας. Όμως, όπως δείχνουν οι *in vitro* μελέτες, μια ελαφρά μείωση του δυναμικού ενεργοποίησης του AR θα μπορούσε να έχει σαν αποτέλεσμα μεταλλάξεις σε άλλα άγνωστα γονίδια που σχετίζονται με τη σπερματογένεση και σχετίζονται λειτουργικά με τον AR.

Απαντήσεις σ'αυτά τα ερωτηματικά θα μπορούσαν να είχαν δοθεί αν είχε εξεταστεί ο αριθμός των επαναλήψεων των (CAG)<sub>n</sub> στις μητέρες και στα αδέρφια των υπογόνιμων ανδρών για να ταυτοποιηθεί το πρώτο βήμα στην αύξηση των



επαναλήψεων και για να αποδειχθεί η απουσία αυτών των επαναλήψεων στους γόνιμους συγγενείς.

Όσον αφορά τον κίνδυνο υπογονιμότητας στους γιούς ή τις κόρες που προκύπτουν μετά από ICSI όπου χρησιμοποιήθηκε σπέρμα από άνδρες με μικρό αριθμό επαναλήψεων (CAG)<sub>n</sub> (από n=20 έως n=23 στη μελέτη των Dowsing και από n=21 μέχρι n>28 στη μελέτη των Tut<sup>2</sup>), δεν είναι πιθανόν ο κίνδυνος αυτός να είναι μεγαλύτερος από την περίπτωση όπου χρησιμοποιήθηκε σπέρμα από φυσιολογικούς άνδρες με αριθμό επαναλήψεων από 9 έως 36.

Οι Dowsing et al συμπεραίνουν ότι αν ο ελαφρά αυξημένος αριθμός επαναλήψεων του (CAG)<sub>n</sub> στους υπογόνιμους άνδρες, είχε μεγαλύτερες πιθανότητες να οδηγήσει σε περαιτέρω αυξήσεις των επαναλήψεων (απ' ότι συμβαίνει όταν n<20) τότε θα υπήρχε αυξημένος κίνδυνος για εμφάνιση της νόσου του Kennedy στους απογόνους που θα προέκυπταν από ICSI από σπέρμα τέτοιων ασθενών.

Οι Misfud et al σε ένα μεγάλο δείγμα υπογόνιμων ανδρών βρήκαν ότι 33-46% των ασθενών με αυξημένο αριθμό επαναλήψεων (CAG)<sub>n</sub> ήταν αζωοσπερμικοί, αλλά σπερματοζώαρια βρίσκονταν στα σπερματικά σωληνάρια στους περισσότερους από αυτούς. Αυτό δηλώνει ότι η βασική λειτουργία της σπερματογένεσης υπάρχει σ' αυτούς τους ασθενείς και ότι αυξημένα επίπεδα ανδρογόνων στον όρχι αυτών θα μπορούσαν να βελτιώσουν τη σπερματογένεση.

Οι ίδιοι συγγραφείς προτείνουν ότι μια εξήγηση στο φαινόμενο ότι αύξηση των επαναλήψεων (CAG)<sub>n</sub> στον AR οδηγεί σε αύξηση των πολυγλουταμινικών οδών και σε μείωση της ενδογενούς δραστηριότητας του AR, είναι η εξής:

Ένας πιθανός μηχανισμός σχετίζεται με την ταυτοποίηση μιας καινούριας πρωτεΐνης του πυρήνα (G protein) Ras-related protein / ARA24 η οποία δρα σαν συνενεργοποιητής μαζί με τον AR και μπορεί να ενώνεται με διαφορετικό τρόπο με τα διάφορα μήκη των πολυγλουταμινικών του AR. Η αντίδραση μεταξύ των (CAG)<sub>n</sub> του AR και της ARA24 γίνονται πιο ισχυρή



όταν ο αριθμός των πολυγλουταμινών μειώνεται και έτσι αυξάνεται η συνέργεια και η δυνατότητα για ενεργοποίηση του AR.

Μικρές αλλαγές του αριθμού του (CAG)<sub>n</sub> μπορεί να έχουν παθολογική σημασία με την πάροδο του χρόνου.

Προφανώς οι επαναλήψεις παίζουν ρόλο στη λειτουργικότητα του AR ελέγχοντας την ισορροπία μεταξύ της αυξημένης και ανεπαρκούς λειτουργικότητας του υποδοχέα.

Η πολυμορφική φύση των πολυγλουταμινών επαναλήψεων θα μπορούσαν να δηλώνουν, μια διαβάθμιση της λειτουργικότητας του AR μεταξύ διαφορετικών ατόμων και πιθανόν επιτρέπει σε αλληλόμορφα, με πλεονέκτημα όσον αφορά την εξέλιξη, να μπορούν να επιλεγούν γρήγορα και να κληρονομηθούν σε επόμενες γενιές.

Όσον αφορά άλλα νοσήματα, οι Cheang et al πρότειναν ότι ο αριθμός επαναλήψεων του (CAG)<sub>n</sub> θα μπορούσε να συνδέεται με ελάττωση του mRNA και της έκφρασης σε πρωτεΐνες.

Σε γυναίκες με ιδιοπαθή υπερτρίχωση και φυσιολογική συγκέντρωση τεστοστερόνης βρέθηκε αντίστροφη σχέση μεταξύ (CAG)<sub>n</sub> επαναλήψεων και βαθμού υπερτρίχωσης. Το ίδιο ισχύει μεταξύ (CAG)<sub>n</sub> επαναλήψεων και την ανάπτυξη του καρκίνου του προστάτη.

Έτσι φαίνεται ότι σε αύξηση των επαναλήψεων ελαττώνεται η ενεργοποίηση (transactivation) του AR οδηγώντας σε αποδιοργάνωση της σπερματογένεσης. Σε ελάττωση των επαναλήψεων έχουμε αύξηση της ενεργοποίησης του AR που οδηγεί σε καρκίνο του προστάτη.

#### δ) ANDROGEN SENSITIVITY INDEX (ASI)



Δείκτης ευαισθησίας στα ανδρογόνα ASI είναι το γινόμενο της τιμής του LH και της τεστοστερόνης (LHxT). Όταν οι τιμές της LH και τεστοστερόνης είναι αυξημένες το γινόμενο αυτό έχει μεγαλύτερη τιμή. Αυτό συμβαίνει όταν υπάρχει διαταραχή στο μηχανισμό παλλίνδρομης ρύθμισης στον άξονα υποθάλαμος-υπόφυση-ανδρογόνα.

Έτσι η LH και η τεστοστερόνη είναι αυξημένες σαν αποτέλεσμα διαταραχής του αρνητικού feed-back στον άξονα υποθάλαμος-υπόφυση-όρχεις. Σ'αυτή την περίπτωση το ASI είναι αυξημένο και έχει προταθεί σαν δείκτης αντοχής στα ανδρογόνα.

Έχει βρεθεί σε διάφορες μελέτες ότι ασθενείς με μεταλλάξεις στο γονίδιο του υποδοχέα των ανδρογόνων έχουν υψηλές τιμές στον ASI, και οι συγγραφείς αυτοί προτείνουν ότι ο προσδιορισμός του ASI μπορεί να είναι χρήσιμος στο να ταυτοποιούνται ασθενείς σε κίνδυνο για αντοχή στα ανδρογόνα, η οποία οφείλεται σε μετάλλαξη του AR.

Επειδή ο δείκτης αυτός στερείται ειδικότητας, έχει νόημα να χρησιμοποιείται μόνο με την έννοια, ότι ασθενείς που δεν έχουν αυξημένο ASI δεν είναι πιθανό να έχουν μεταλλάξεις στο γονίδιο του AR.

Η χαμηλή ειδικότητα έχει σχέση με το γεγονός ότι και στην ανεπάρκεια οιστρογόνων η LH και η τεστοστερόνη είναι αυξημένες, σαν αποτέλεσμα διαταραχής του feed-back στις γοναδοτροφίνες.



## 5. ΟΡΙΣΜΟΣ WHO – ΣΠΕΡΜΟΔΙΑΓΡΑΜΜΑ

Επειδή το σπερμοδιάγραμμα παραμένει ο βασικότερος τρόπος αξιολόγησης του σπέρματος ενός υπογόνιμου άνδρα, ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO) έχει εκδώσει ένα εγχειρίδιο που αφορά την εργαστηριακή εξέταση του σπέρματος το 1980 (Laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction). Από τότε έχουν γίνει δύο επανεκδόσεις η πρόσφατη από τις οποίες είναι το 1992.

Ο WHO λοιπόν αναφέρει περιγραφικά δεδομένα που αφορούν τον αριθμό των σπερματοζωαρίων, την κινητικότητα και τη μορφολογία.

- Συλλογή του σπέρματος και μεταφορά

Το σπέρμα πρέπει να συλλεγεί μετά από αποχή τουλάχιστον 48 ωρών και όχι περισσότερο από 7 ημέρες. Πρέπει να εξεταστεί το σπέρμα τουλάχιστον δύο φορές οι οποίες να απέχουν χρονικά από 7 ημέρες μέχρι 3 μήνες, γιατί πρέπει να ληφθούν υπόψη τα αποτελέσματα της μεταβλητότητας που παρατηρείται μεταξύ δύο εκσπερματίσεων. Το δείγμα λαμβάνεται μετά από αυνανισμό σε ένα καθαρό πλαστικό ή γυάλινο δοχείο με αρκετά μεγάλο στόμιο και μεταφέρεται στο εργαστήριο μέχρι μία ώρα μετά τη συλλογή του, εφόσον η λήψη του δεν έγινε στο εργαστήριο. Εάν δεν πρόκειται να γίνει εξέταση της λειτουργικότητας του σπέρματος είναι βασικό να ξεχωρίζονται τα σπερματοζωάρια από το πλάσμα μέσα σε μία ώρα μετά την εκσπερμάτωση.

- Κινητικότητα

Εκατό σπερματοζωάρια εξετάζονται σε μεγέθυνση X400 μέχρι X600 κατά προτίμηση με phase-contrast οπτικό σύστημα και σε θερμοκρασία όσο το δυνατό προς τους 37°C. Η κινητικότητα εξετάζεται και αξιολογείται υποκειμενικά στις εξής διαβαθμίσεις:

Βαθμός Α: γρήγορη κίνηση προς τα εμπρός



Βαθμός B: πιο αργή ή ελικοειδής κίνηση

Βαθμός C: μη προωθητική κίνηση

Βαθμός D: ακίνητα

Στη συνέχεια ανευρίσκεται το ποσοστό των σπερματοζωαρίων που ανήκει στην κάθε κατηγορία. Επειδή ο τρόπος αξιολόγησης της κινητικότητας είναι καθαρά υποκειμενικός, υπάρχει σημαντική διακύμανση μεταξύ παρατηρητών.

- Κυτταρικά στοιχεία, άλλα εκτός από τα σπερματοζωάρια

Επιθηλιακά κύτταρα, κύτταρα σπερματογένεσης και λευκά αιμοσφαίρια είναι τα πιο συνηθισμένα. Η παρουσία λευκοκυττάρων στο σπέρμα μπορεί να δηλώνει λοίμωξη. Η λευκοκυτταροσπερμία μπορεί να συνδυάζεται με ελάττωση του όγκου του σπέρματος, με ολιγοσπερμία, ασθενοσπερμία και ελάττωση της λειτουργικότητας του σπέρματος εξαιτίας του οξειδωτικού stress. Ο WHO προτείνει ότι φυσιολογικά στο σπέρμα μπορεί να υπάρχουν μέχρι  $5 \times 10^6$  από τα παραπάνω κύτταρα (αυτά αναφέρονται στη βιβλιογραφία ως round cells) και από αυτά μέχρι  $1 \times 10^6/\text{ml}$  μπορεί να είναι λευκοκύτταρα. Τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την αναγνώριση των λευκοκυττάρων περιλαμβάνουν αυτές που στηρίζονται στην διακυτταρική περοξειδάση και σε ειδικά αντισώματα εναντίων των λευκοκυττάρων.

- Συγκέντρωση του σπέρματος

Η συγκέντρωση του σπέρματος μελετάται αφού διαλυθεί ένα μέρος του σπέρματος με κάποιο διαλύτη που ακινητοποιεί τα σπερματοζωάρια. Έπειτα τοποθετείται αυτό το δείγμα σε Neubauer haemocytometer. Ένας άλλος είναι οι κοιλότητες Makler ή Microcell αλλά υπάρχουν αμφιβολίες όσον αφορά την αξιοπιστία της μεθόδου.

- Μορφολογία των σπερματοζωαρίων

Η αξιολόγηση της μορφολογίας των σπερματοζωαρίων είναι αντικείμενο συζήτησης γιατί η αναθεώρηση που έκανε ο WHO είναι διαφορετική από αυτά που ίσχυαν στην προηγούμενη έκδοση. Στην τελευταία έκδοση η μορφολογία αξιολογείται με μια κλίμακα τερατοσπερμίας ("teratozoospermia index"), όπου



σχολιάζει τον αριθμό των ανωμαλιών ανά κύτταρο, παρά το ποσοστό των κυττάρων που είναι φυσιολογικά. Ένας εναλλακτικός τρόπος για την αξιολόγηση της μορφολογίας προτάθηκε από τους Kruger et al, και χρησιμοποιεί κριτήρια με βάση τα οποία 14% φυσιολογικών μορφών θεωρείται το κατώτερο όριο για να θεωρηθεί η μορφολογία φυσιολογική. Στο πίνακα που ακολουθεί το ποσοστό αυτό είναι 30%. Ποιο από τα δύο συστήματα είναι πιο αξιόπιστο παραμένει ακόμη ανοικτό σαν ερώτημα.

- Φυσιολογικές τιμές

Ο WHO καθόρισε τις φυσιολογικές τιμές (Πίνακας 1) οι οποίες είναι και αποδεκτές με βάση τα κριτήρια που συζητήθηκαν παραπάνω. Όμως είναι σκόπιμο κάθε εργαστήριο να θεσπίζει τις δικές του τιμές με βάση τα χαρακτηριστικά του τοπικού πληθυσμού (περίπου 2000 δείγματα σπέρματος από άνδρες αποδεδειγμένης γονιμότητας).

Δεδομένου ότι οι μεταβλητές του σπέρματος δεν κατανέμονται φυσιολογικά, πάρθηκαν η 5<sup>η</sup> και 95<sup>η</sup> εκατοστιαία θέση σαν τιμές αναφοράς για τον φυσιολογικό πληθυσμό όπως φαίνεται στον πίνακα 2. τα περιγραφικά κριτήρια που χρησιμοποιούνται για τις διάφορες διαταραχές της ποιότητας του σπέρματος φαίνονται στον πίνακα 3.



Πίνακας 1. ΣΠΕΡΜΟΔΙΑΓΡΑΜΜΑ: ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ, ΣΥΝΗΘΩΣ, ΓΙΑ ΤΟΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟ ΤΟΥ ΩΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟ

ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΣ	ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ ΤΙΜΗ
ΟΓΚΟ	2.0ml ή περισσότερα
pH	7.2-7.8
ΥΓΓΕΝΤΡ Ω Η ΠΕΡΜΑΤΟ	20 x 10 <sup>6</sup> σπερματοζώαρια/ml ή περισσότερα
ΥΝΟΛ ΙΚΟ ΑΡΙΘΜΟ ΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΩΝ	40 10 <sup>6</sup> σπερματοζώαρια ή περισσότερα
κινητικότητα	50% ή περισσότερα με προς τα εμπρός κίνηση(a+b) ή 25% ή περισσότερα με γρήγορη ευθεία προώθηση (a)
μορφολογία	30% ή περισσότερα με φυσιολογική μορφολογία
βιοσιμότητα	75% ή περισσότερα βίσιμα
λευκά αιμοσφαίρια	Λιγότερα απο 1 x 10 <sup>6</sup> /ml
Zinc (συνολικά)	2.4 μmol ή περισσότερα κατά εκσπερμάτιση
Κιτρικό οξύ(συνολικά)	52 μmol ή περισσότερα κατά εκσπερμάτιση
φρουκτόζη(συνολικά)	13 μmol ή περισσότερα κατά εκσπερμάτιση
α-γλυκοσιδάση	20 mU or ή περισσότερα κατά εκσπερμάτιση
όξινη φωσφατάση (total)	200 U ή περισσότερο κατά εκσπερμάτιση
Μικτή εξέταση αντίδρασης αντισφαιρίνης	Λιγότερα από 10% σπερματοζώαρια με συγκόλληση
Δοκιμασία ανοσοσυγκόλλησης	Λιγότερα από 10% σπερματοζώαρια με συγκόλληση





Πίνακας 2. ΣΠΕΡΜΟΔΙΑΓΡΑΜΜΑ, ΤΙΜΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΣ	Απόκλιση αναφοράς		Approximation
ΟΓΚΟΣ (ml)	1.3	6.2	>1.0ml
ΣΥΓΓΕΝΤΡΩΣΗ	20	256	>20
ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ (x 10 <sup>6</sup> /ml)			
ΟΛΙΚΗ	33	78	>40
ΚΙΝΗΤΙΚΟΤΗΤΑ (%)			
ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ	46	88	>40
ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ (%)			

Ορίζονται ως 5η και 95<sup>η</sup> εκατοστιαία θέση από 1920 δείγματα σπέρματος ανδρών αποδεδειγμένης γονιμότητας.

**ΣΠΕΡΜΟΔΙΑΓΡΑΜΜΑ, ΟΡΟΙ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ ΓΙΑ ΝΑ ΠΕΡΙΓΡΑΨΟΥΝ ΤΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟ ΣΠΕΡΜΑ.**

ΒΛΑΒΗ	ΠΕΡΙΓΡΑΦΙΚΟΣ ΟΡΟΣ
Φυσιολογική ποιότητα σπέρματος	Νορμοσπερμία
Απουσία σπέρματος	Ασπερμία
Απουσία σπερματοζωαρίων στο σπέρμα	Αζωοσπερμία
Χαμηλή συγγέντωση σπερματοζωαρίων	Ολιγοσπερμία
Χαμηλή κινητικότητα σπερματοζωαρίων	Ασθενοσπερμία
Προβληματική μορφολογία	Τερατοσπερμία



## 6. ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΟΜΑΔΕΣ (ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΟ ΣΠΕΡΜΟΔΙΑΓΡΑΜΜΑ) ΟΛΙΓΟ / ΑΣΘΕΝΟ / ΤΕΡΑΤΟ-ΣΠΕΡΜΑ / ΑΖΩΟΣΠΕΡΜΙΑ

### ΟΛΙΓΟΣΠΕΡΜΙΑ

Σ' αυτή την περίπτωση το σπέρμα περιέχει λιγότερα από  $20 \cdot 10^6$  σπερματοζωάρια ανά ml ή μια συνολική ποσότητα κάτω από  $50 \cdot 10^6$  σπερματοζωάρια. Μεμονωμένη ολιγοσπερμία με φυσιολογική κινητικότητα και μορφολογία των σπερματοζωαρίων, είναι ασύνηθες φαινόμενο. Στην περίπτωση της σοβαρής ολιγοσπερμίας ( $< 5 \cdot 10 \cdot 10^6$  σπερματοζωάρια/ml), χρειάζεται ορμονικός έλεγχος, κυρίως προσδιορισμός της LH, FSH και τεστοστερόνης. Αν αυτές δεν είναι φυσιολογικές τότε πρέπει να γίνει πλήρης ορμονικός έλεγχος και ανάλογη θεραπεία. Ασθενείς με φυσιολογικό ορμονικό έλεγχο και μεμονωμένη ολιγοσπερμία, είναι υποψήφιοι για εμπειρική θεραπεία.

### ΑΣΘΕΝΟΣΠΕΡΜΙΑ

Πρόκειται για διαταραχές στην κινητικότητα των σπερματοζωαρίων και αφορά είτε ελαττωμένη κινητικότητα ή ελαττωμένη κίνηση προς τα εμπρός ή και τα δύο. Η αιτιολογία σ' αυτές τις περιπτώσεις μπορεί να είναι δομικές βλάβες των σπερματοζωαρίων, λοιμώξεις, αντισπερματικά αντισώματα, μερική απόφραξη των αποχετευτικών οδών, ιδιοπαθής ή μεγάλης περιόδου αποχής. Η ασθενοσπερμία αυξάνει την πιθανότητα για υπογονιμότητα ανοσολογικής αιτιολογίας και χρειάζεται έλεγχος του ασθενούς προς αυτή την κατεύθυνση.

Επίσης ο ορμονικός έλεγχος θα αποκλείσει σ' αυτή την περίπτωση τα ορμονικά αίτια, αν και τα συγκεκριμένα αίτια ανευρίσκονται σπάνια σ' αυτή την ομάδα.



Οι φλεγμονές θα μπορούσαν να συμμετέχουν στη διάγνωση της Ασθενοσπερμίας, αν στο σπερμοδιάγραμμα βρίσκονται αυξημένοι αριθμοί στρογγυλών κυττάρων (round cells).

Η κισσοκήλη ευθύνεται συχνά για βλάβες της κινητικότητας του σπέρματος, του αριθμού των σπερματοζωαρίων και του σχήματός τους. Η αιτία αυτή αντιμετωπίζεται εύκολα χειρουργικά.

Μερική απόφραξη του αποχετευτικού συστήματος μπορεί να είναι αιτία ασθενοσπερμίας, ειδικά στην περίπτωση που υπάρχει οριακά ελαττωμένος όγκος σπέρματος και πολύ φτωχή κινητικότητα προς τα εμπρός.

Αν υπάρχει απουσία κινητικότητας ή περιπτώσεις με κινητικότητα <5% τότε πρέπει να γίνει δοκιμασία βιοσιμότητας (viability assay). Η ανεύρεση μεγάλου ποσοστού βιώσιμων σπερματοζωαρίων σε συνδυασμό με ελαττωμένη κινητικότητα υποδηλώνει δομική βλάβη, όπως συμβαίνει στο σύνδρομο Kartagener και στο σύνδρομο με τους ακίνητους κροσσούς.

Κάποιες φορές ιδιαίτερα μεγάλες περίοδοι αποχής, μπορεί να οδηγήσουν σε ελάττωση της της κινητικότητας.

### **ΤΕΡΑΤΟΣΠΕΡΜΙΑ**

Εδώ υπάρχουν διαταραχές στη μορφολογία. Παροδικές διαταραχές της σπερματογένεσης και κηρσοκήλης μπορεί να αποτελούν αιτιολογικούς παράγοντες.

### **ΠΟΛΛΑΠΛΕΣ ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ ΣΤΙΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ ΤΟΥ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ**

Διαταραχές στη συγκέντρωση, στην κινητικότητα και τη μορφολογία του σπέρματος, οφείλονται συχνά σε κισσοκήλη (κισσοκήλη η οποία είναι κλινικά ορατή).

Το ίδιο αποτέλεσμα στο σπερμοδιάγραμμα φαίνεται σε μερική απόφραξη της αποχετευτικής οδού του σπέρματος.



Άλλες περιπτώσεις με πολλαπλές διαταραχές σπέρματος είναι η κρυπορχία, παροδικές διαταραχές της σπερματογένεσης όπως: θερμοκρασία (πυρετός ή εξωγενώς) ή τοξίνες του περιβάλλοντος.

### ΑΖΩΟΣΠΕΡΜΙΑ (Αποφρακτική – Μη αποφρακτική)

Η εκτίμηση της αζωοσπερμίας πρέπει να γίνεται προς την κατεύθυνση του αν η αζωοσπερμία οφείλεται σε έλλειψη σπερματογένεσης ή οφείλεται σε φυσική ή ανατομική απόφραξη των πόρων. Το βασικό βήμα είναι η φυγοκέντριση του σπέρματος. Η ύπαρξη σπερματοζωαρίων, έστω και ελάχιστων, εξαιρεί την αμφοτερόπλευρη απόφραξη των πόρων, οπότε ο ασθενής ερευνάται σαν να ήταν ολιγοσπερμικός. Απόφραξη μπορεί να συμβεί σε οποιοδήποτε σημείο του αποχετευτικού συστήματος. Η απόφραξη μπορεί να είναι συγγενής (π.χ. συγγενής έλλειψη σπερματικών σωληναρίων (CBAVD) ή επίκτητη π.χ. απολίνωση του σπερματικού πόρου.

Σε αζωοσπερματικούς ασθενείς με ψηλαφητούς σπερματοδόχους πόρους (vas deferens), ο ορμονικός έλεγχος δίνει επιπλέον πληροφορίες. Όταν οι ασθενείς έχουν φυσιολογικό ορμονικό έλεγχο, τότε θα πρέπει να γίνει βιοψία όρχεος. Η παρουσία σπερματογένεσης στη βιοψία, δηλώνει απόφραξη.

Σε ασθενείς με μικρό όγκο όρχεων και FSH >2 ή 3 φορές του φυσιολογικού, προφανής διάγνωση είναι η σοβαρή διαταραχή (ανεπάρκεια) των germ cells και η πρόγνωση είναι φτωχή. Σ' αυτές τις περιπτώσεις μπορεί να βρεθεί στα σπερματικά σωληνάκια, ώριμο σπέρμα περιστασιακά. Έτσι οι βιοψίες όρχεος μπορεί να ενδείκνυνται θεραπευτικά και όχι διαγνωστικά σ' αυτούς τους ασθενείς.

Ασθενείς με αζωοσπερμία και μικρό όγκο όρχεων δικαιούνται καρυότυπο για να τακτοποιηθούν πιθανές χρωμοσωμικές ανωμαλίες.

Το εύρημα χαμηλής LH και FSH ή συνδυασμός χαμηλής τεστοστερόνης με απόσφορη τιμή LH, δηλώνει υπογοναδοτροφικό υπογοναδισμό.



Η εκτίμηση μιας ομάδας αζωοσπερμικών ασθενών έδειξε ότι 41% έχουν φυσιολογική σπερματογένεση. Sertoli all only syndrome ταυτοποιήθηκε στο 38% των ασθενών, σταμάτημα της ωρίμανσης (maturation arrest) στο 20% και τοπικές ουλές στο 2%.

Η αιτιολογία της αζωοσπερμίας φαίνεται στον παρακάτω πίνακα .

## I. Αζωοσπερμία

1. Σκλήρυνση των σπερματικών σωληναρίων
  - a. Σύνδρομο Klinefelter's
  - b. Σύνδρομο Klinefelter με αρνητική χρωματίνη
2. Απλασία των Germ κυττάρων
  - a. Ιδιοπαθής
  - b. Φάρμακα/ακτινοβολία
  - c. Σύνδρομο Klinefelter με μωσαικισμό
  - d. Σύνδρομο XYY
3. Διακοπή της ωρίμανσης
  - a. Ιδιοπαθής
  - b. Σύνδρομο XYY
  - c. Κιρσοκήλη
4. Απόφραξη των πόρων
5. Ενδοκρινοπάθειες



Υπάρχουν άλλες δύο κλινικές ομάδες που σχετίζονται με το σπερμοδιάγραμμα.

A) Ελαττωμένος όγκος σπέρματος ή παντελής έλλειψή του

Αυτή η κατάσταση μπορεί να οφείλεται σε παλίνδρομη εκσπερμάτιση ή σε έλλειψη έκκρισης σπέρματος από τα σπερματικά σωληνάκια στην οπίσθια ουρήθρα νευρολογικά νοσήματα, χειρουργική του αυχένα της ουρήθρας, φάρμακα, ανεπάρκεια ανδρογόνων ή χειρουργικές επεμβάσεις στον οπισθοπεριταναϊκό χώρο μπορεί να έχουν σαν αποτέλεσμα απουσία ή παλίνδρομη εκσπερμάτιση. Επίσης ψυχογενείς καταστάσεις που συνοδεύονται από αδυναμία οργασμού παρουσιάζονται με αυτά τα ευρήματα.

Αν υπάρχει αποκλεισμός της παλίνδρομης εκσπερμάτισης, ελαττωμένος όγκος σπέρματος υποδηλώνει την έλλειψη συμμετοχής των σπερματικών πορών. Έτσι ο ασθενής αυτός πρέπει να ελεγχθεί για το αν υπάρχουν οι σπερματικοί ποροι (vas deferens), γιατί μπορεί να υπάρχει αγένεση των σπερματικών αγγείων. Επίσης πλήρης ή μερική απόφραξη της αποχετευτικής οδού, έχει σαν αποτέλεσμα ελάττωση του όγκου σπέρματος.

B) Φυσιολογικό σπερμοδιάγραμμα

Φυσιολογικό σπερμοδιάγραμμα και υπογονιμότητα σημαίνει 1) είτε γυναικείο παράγοντα, 2) είτε ανοσολογικά αίτια, 3) είτε προβληματική σεξουαλική επαφή. Σ'αυτές τις περιπτώσεις μπορεί να γίνει δοκιμασία μετά από επαφή (PCT).

Στην περίπτωση της ανεξήγητης στειρώσεως και οι δύο σύζυγοι πρέπει να ελεγχθούν για την παρουσία αντισπερματικών αντισωμάτων. (direct για τους άνδρες, indirect για τις γυναίκες).

Επίσης γίνεται έλεγχος για τους γυναικείους παράγοντες υπογονιμότητας. Αν δεν υπάρχει πρόβλημα τότε γίνεται έλεγχος της λειτουργικότητας του



σπέρματος, όπως δοκιμασία διείσδυσης των σπερματοζωαρίων (sperm penetration assay) ή δοκιμασία πρόκλησης ακροσωματικής αντίδρασης (inducibility of the acrosome reaction).

## ΟΡΜΟΝΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

Επειδή στα διάφορα κεφάλαια αναφέρεται συχνά ο ορμονικός έλεγχος του υπογόνιμου άνδρα, είναι σκόπιμο να αναφερθούμε σ' αυτή τη διαγνωστική προσέγγιση.

Το ποσοστό των υπογόνιμων ανδρών που έχουν πρωτοπαθή ενδοκρινική βλάβη είναι λιγότερο από 3%. Τέτοια νοσήματα είναι εξαιρετικά σπάνια σε ασθενείς με συγκέντρωση σπέρματος  $>5 \cdot 10^6$  σπερματοζωάρια/ml (Baker et al 1986).

Αν υπάρχει φυσιολογική σπερματογένεση η FSH ρυθμίζεται από το αρνητικό feed-back της ανασταλίνης. Σε πρωτοπαθή αρχική ανεπάρκεια έχουμε απρόσφορη υπερλειτουργία των κυττάρων Leyding και sertoli με αποτέλεσμα αυξημένες γοναδοτροπίνες και φυσιολογικά ή ελαττωμένα επίπεδα τεστοστερόνης (πινακας ).

Υποθαλαμική ή υποφυσιακή δυσλειτουργία, οδηγεί σε μη φυσιολογική έκκριση γοναδοτροπινών και ελαττωμένα επίπεδα τεστοστερόνης με αποτέλεσμα απουσία σπερματογένεσης.

Ξέρουμε ότι ο υποθάλαμος εκκρίνει τη GnRH σε ώσεις. Έτσι οι γοναδοτροπίνες εκκρίνονται επεισοδικά και εμφανίζουν διακυμάνσεις των επιπέδων τους στο αίμα, κυρίως η LH.

Έχει προταθεί ότι ο σκριβής προσδιορισμός τους μπορεί να γίνει όταν παίρνεται ένα δείγμα αίματος ανά 15min.

Αυτό όμως είναι υπερβολικό γιατί πολύ σπάνια μια τυχαία μέτρηση των ορμονών αυτών είναι ανακριβής και η παραπάνω τεχνική συνιστάται μόνο στις



περιπτώσεις που υπάρχει απόκλιση μεταξύ ορμονικού προσδιορισμού και κλινικής εικόνας (Bain et al 1988).

Προτείνεται συνήθως να γίνεται ορμονικός έλεγχος σε άνδρες που υπάρχει ένδειξη στο ιστορικό, στην κλινική εξέταση ή έχουν στο σπερμοδιάγραμμα λιγότερα από 5 έως  $10 \cdot 10^6$  σπερματοζώαρια/ml. Ο έλεγχος αυτός είναι προσδιορισμός των LH, FSH και τεστοστερόνης.

Αν η τεστοστερόνη είναι ελαττωμένη ή οριακή και η LH δεν είναι αυξημένη, τότε είναι καλό να μετρηθεί η testo και η free testo το πρωί, γιατί τότε έχουν υψηλότερα επίπεδα. Αν η testo παραμένει χαμηλή τότε γίνεται μέτρηση της PRL και CT εγκεφάλου (Διαταραχή των οπτικών πεδίων ή πονοκέφαλοι οδηγούν σε όγκο του ΚΝΣ).

Πολλές φορές όμως σε όγκους της υπόφυσης η PRL είναι φυσιολογική. Πολλοί ασθενείς με όγκους που εκκρίνουν PRL έχουν μακροαδενώματα (>1cm), και η PRL είναι >200ng/ml.

Αυτοί οι ασθενείς έχουν υπογοναδοτροφισμό σε συνδυασμό με χαμηλά ανδρογόνα. Παρ'όλα αυτά μικρή αύξηση της PRL είναι πιο συχνή στους υπογόνιμους άνδρες, και δεν ανευρίσκεται τίποτε σε αυτούς όταν ελέγχεται το ΚΝΣ. Αυτοί οι άνδρες με ιδιοπαθή υπερπρολακτιναιμία έχουν φυσιολογικά επίπεδα LH, FSH και testo. Θεραπεία αυτών των ασθενών δεν οδηγεί σε βελτίωση της σπερματογένεσης. Παρ'όλα αυτά πρέπει να αποκλείεται σ'αυτούς όγκος της υπόφυσης.

Ανδρική υπογονιμότητα που να οφείλεται σε συγγενή υπερπλασία των επινεφριδίων είναι σπάνια και συνοδεύεται από ιστορικό (οικογενειακό ιστορικό, κοντός σκελετός, πρόωμη ήβη, μεγάλοι όρχεις). Η 17 (OH) προγεστερόνη είναι αυξημένη σ'αυτούς. Η όψιμη εμφάνιση του συνδρόμου επίσης πρέπει να λαμβάνεται υπόψη.

Αυξημένα οιστρογόνα μπορεί να είναι ενδογενή ή εξωγενή. (Γυναικομαστία, ατροφικοί όρχεις είναι τα κλινικά σημεία). Σ'αυτές τις περιπτώσεις FSH, LH και testo, είναι φυσιολογικά.





Εκτίμηση του θυροειδούς και GnRH test δεν είναι απαραίτητο να γίνονται, εκτός αν υπάρχει κλινική ένδειξη για τον θυροειδή.

#### ΟΡΜΟΝΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΤΗΝ ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΡΑΞΗ

ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ	FSH (mIU/ml)	LH (mIU/ml)	Τεστοστερόνη (ng/100ml)
Φυσιολογικοί άνδρες	φυσιολογική	φυσιολογική	φυσιολογική
Απλασία των Germ κυττάρων	↑	φυσιολογική	φυσιολογική
Ορχική ανεπάρκεια	↑	↑	Φυσιολογική ή ↓
Υπογοναδοτροφικός υπογοναδισμός	↓	↓	↓

FSH, folic-stimulating hormone. LH, luteinizing hormone.



## 7. ΕΠΙΚΤΗΤΑ ΑΙΤΙΑ

### A) Ενδοκρινικά ή προορχικά αίτια

#### α) Νοσήματα της υπόφυσης

Η λειτουργία της υπόφυσης παραβλάπεται σε περιπτώσεις όπως μετεγχειρητικά, σε όγκους, έμφρακτα, λοιμώξεις ή μετά ακτινοβολία. Ασθενείς με εμφάνιση υποφυσιακής ανεπάρκειας πριν την ήβη συνήθως αντιμετωπίζονται για άλλους λόγους και όχι για υπογονιμότητα (π.χ. προβλήματα με το θυρεοειδή ή τα επινεφρίδια). Συνήθως τα δευτερεύοντα χαρακτηριστικά του φύλου είναι φυσιολογικά (εκτός από την περίπτωση της ανεπάρκειας των επινεφριδίων). Οι όρχεις μπορεί να είναι μικροί και μαλακοί εκτός από τις περιπτώσεις που υπάρχει πρωτοπαθής βλάβη των όρχεων όπου αυτοί είναι μικροί και σκληροί. Η τεστοστερόνη είναι χαμηλή και οι γεναδοτροπίνες χαμηλές ή φυσιολογικές.

#### β) Υπογοναδοτροφικός Υπογοναδισμός

Υπάρχουν ορισμένες καταστάσεις όπως το σ. Kallmann, όπου υπάρχει υπογοναδοτροφικός υπογοναδισμός και ανοσμία (μπορεί να είναι σποραδικός ή ογκογενής) ή ιδιοπαθής υπογοναδοτροφικός υπογοναδισμός.

#### γ) Σύνδρομο του γόνιμου ευνούχου (Fertile Eunuch Syndrome)

Σε κάποιες σπάνιες περιπτώσεις υπάρχει μεμονωμένη ανεπάρκεια της LH ενώ η FSH είναι φυσιολογική. Ασθενείς αυτής της κατηγορίας παρουσιάζουν ευνουχοειδή συμπεριφορά, μεγάλους όρχεις και χαμηλό όγκο σπέρματος με λίγα σπερματοζωάρια.

Η τεστοστερόνη και η LH είναι χαμηλές αλλά η FSH φυσιολογική. Στην βιοψία όρχεων τα κύτταρα Leyding μπορεί να μην υπάρχουν εξαιτίας της



έλλειψης LH. Καμιά φορά ανεπαρκή ανδρογόνα στην περιφέρεια οδηγούν σε έλλειψη virilization. Η θεραπεία είναι hCG.

δ) Μεμονωμένη ανεπάρκεια FSH

Σ' αυτή την περίπτωση έχουμε φυσιολογική ενήβωση, φυσιολογικά επίπεδα LH και τεστοστερόνης και φυσιολογικό όγκο όρχεων. Υπάρχει ολιγοσπερμία ή αζωοσπερμία. Θεραπεία με HMG βελτιώνει τη σπερματογένεση. Πιο ειδική θεραπεία είναι η καθαρή FSH.

ε) Έκθεση σε ανδρογόνα

Τα ανδρογόνα, εξωγενή (π.χ. αναβολικά σε αθλητές) ή ενδογενή (π.χ. όγκοι) προκαλούν υπογοναδισμό μέσω του αρνητικού feed - back στον υποθάλαμο και την υπόφυση.

Τα σπερματικά σωληνάρια εκτίθενται σε υψηλά επίπεδα τεστοστερόνης με αποτέλεσμα ελάττωση της LH, ελάττωση της ενεργόποίησης των κυττάρων Leyding και ελάττωση των ανδρογόνων στο περιβάλλον του όρχι. Επίσης τα περιφερικά ανδρογόνα καταστέλλουν την έκκριση FSH ή οποία επηρεάζει αρνητικά τη σπερματογένεση.

στ) Έκθεση σε οιστρογόνα

Η υποθαλαμική υποφυσική έκκριση γοναδοτροπινών καταστέλλεται από τα περιφερικά οιστρογόνα. Αυτό συμβαίνει όταν οιστρογόνα εκκρίνονται από όγκους των επινεφριδίων ή των κυττάρων Sertoli ή των διαμέσων κυττάρων του όρχι. Επίσης αυξημένα οιστρογόνα υπάρχουν σε ηπατική δυσλειτουργία.

Στις περιπτώσεις αυτές υπάρχει γυναικομαστία και ατροφία όρχεων. Ο ορμονικός έλεγχος δείχνει αυξημένα οιστρογόνα και ελαττωμένη LH, FSH και τεστοστερόνη.



ζ) Αυξημένη PRL

Σε ασθενείς με μικρά αδενώματα της υπόφυσης, οι γοναδοτροφίνες όπως και η τεστοστερόνη είναι ελαττωμένες, αλλά σε μικροαδενώματα αυτές μπορεί να είναι φυσιολογικές. Γίνεται έλεγχος με CT ή MRI και η θεραπεία είναι βρωμοκρυπτίνη (ή χειρ/κή).

η) Νόσοι του θυροειδούς

Ο υπερθυροειδισμός έχει συσχετιστεί με υπογονιμότητα. Σ' αυτή την περίπτωση υπάρχουν διαταραχές στον όρχι και την υπόφυση, όπως επίσης αυξημένα οιστρογόνα. Στη βιοψία όρχεως ανευρίσκεται σταμάτημα της ωρίμανσης των σπερματοζωαρίων.

θ) Έκθεση σε γλυκοκορτικοειδή

Οι ορμόνες αυτές καταστέλλουν την έκκριση LH με αποτέλεσμα ανεπάρκεια ανδρογόνων και βλάβη των όρχεων. Αύξηση των γλυκοκορτικοειδών έχουμε στο σ. Cushing ή σε εξωγενή χορήγησή τους. Στη βιοψία όρχεως υπάρχει υποσπερματογένεση και διακοπή της ωρίμανσης της σπερματογένεσης.

Β) ΑΙΤΙΑ ΠΟΥ ΑΦΟΡΟΥΝ ΤΟΝ ΟΡΧΙ

α) Κρυψορχία

Η κρυψορχία παρουσιάζεται σε ποσοστό 3-4% των τελειόμηνων αρρένων νεογνών. Στο 50% των ασθενών ο αριθμός των σπερματοζωαρίων στο σπεροδιάγραμμα είναι  $12-20 \cdot 10^6 / \text{ml}$ , σε αυτούς με αμφοτερόπλευρη κρυψορχία και σε 25-30% των ασθενών με ετερόπλευρη. Η βιοψία όρχεων δείχνει ελαττωμένο αριθμό κυττάρων Leyding. Γενικά όσο πιο υψηλά είναι ο όρχις τόσο πιο σοβαρή είναι η βλάβη που προκαλείται σε αυτόν.



Η αιτιολογία σ' αυτή την κατάσταση είναι είτε ορμονική ή μηχανική. Μετά από θεραπεία (η οποία γίνεται στον πρώτο έως δεύτερο χρόνο το αργότερο) τα ποσοστά γονιμότητας είναι από 78 έως 92%.

β) Κιρσοκήλη

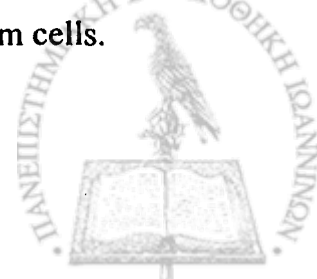
Η κιρσοκήλη είναι διεύρυνση των φλεβών μέσα στον σπερματικό πόρο. Η συχνότητα εμφάνισης είναι περίπου 30% στους υπογόνιμους άνδρες και είναι η πιο συχνή χειρουργικά διορθώσιμη αιτία ανδρικής υπογονιμότητας.

Οι κιρσοκήλες εντοπίζονται συνήθως αριστερά (90%) λόγω του ότι η αριστερή έσω σπερματική φλέβα εκβάλλει στην αριστερή νεφρική (ενώ η δεξιά στην κάτω κοίλη) και είναι πιο πιθανό να μην υπάρχουν βαλβίδες.

Πολλοί μηχανισμοί έχουν προταθεί για να εξηγήσουν την δυσλειτουργία του όρχι σ' αυτή την περίπτωση. Αυξημένη θερμοκρασία κατά  $0,6^{\circ}\text{C}$  έχει βρεθεί σε ολιγοσπερμικούς σε σχέση με ασθενείς χωρίς κιρσοκήλη. Όμως δεν συμφωνούν όλοι οι ερευνητές ότι η αιτία της βλάβης της σπερματογένεσης οφείλεται στην αυξημένη θερμοκρασία.

Παλιδρόμηση μεταβολιτών από τους νεφρούς και τα επινεφρίδια, ελαττωμένη παροχή αίματος και υποξία επίσης έχουν ενοχοποιηθεί. Φαίνεται όμως ότι πολλοί παράγοντες συμμετέχουν στη διαταραχή της σπερματογένεσης. Επίσης πειράματα σε ζώα έχουν δείξει ότι αν προκληθεί κιρσοκήλη ετερόπλευρα έχουμε αμφοτερόπλευρα αύξηση της θερμοκρασίας και διαταραχή της σπερματογένεσης. Χειρουργική αποκατάσταση οδηγεί σε αποκατάσταση της αιματικής ροής και της θερμοκρασίας. Οι βλάβες που παρατηρούνται στο σπερμοδιάγραμμα είναι ελαττωμένη κινητικότητα σε ποσοστό 90%. Λιγότερα από  $20 \cdot 10^6$  σπερματοζώαρια/ml σε 65% των ασθενών. Επίσης μορφολογικές ανωμαλίες είναι συνήθεις.

Επίσης έχει περιγραφεί παλαιότερα ένα μοντέλο όπου ανευρίσκεται αυξημένο ποσοστό αμόρφων κυττάρων και ανώριμων germ cells.



Η διάγνωση της κισσοκήλης γίνεται με υποκειμενικά κριτήρια (κλινική εξέταση) και υπάρχει επίσης ένας αριθμός υποκλινικών περιπτώσεων.

Έχει προταθεί να γίνεται αποκάτασταση της κισσοκήλης σε ενήλικες με κισσοκήλη βαθμού II ή III . Είναι προφανές ότι οι κισσοκήλες επηρεάζουν αρνητικά την ποιότητα του σπέρματος. Από την άλλη πλευρά όμως οι πλειοψηφία των ανδρών με κισσοκήλη είναι γόνιμοι.

Μετά από χειρουργική θεραπεία στο 70% των ασθενών παρουσιάζει βελτίωση στο σπερμοδιάγραμμα. Περισσότερο εμφανής είναι η βελτίωση στην κινητικότητα (70%) και ακολουθεί η συγκέντρωση σπερματοζωαρίων (51%) και η μορφολογία (44%). Παρόλ'αυτά τα ποσοστά σύλληψης είναι περίπου 40-50%.

Υπάρχουν ελάχιστες μελέτες που να εξετάζουν την θεραπεία της κισσοκήλης σε σχέση με τις με τις παραμέτρους του σπέρματος. Κάποιες δείχνουν ότι δεν υπάρχει βελτίωση ενώ κάποιες άλλες υποστηρίζουν το αντίθετο.

Συμπερασματικά μπορούμε να πούμε ότι χρειάζεται χειρουργική θεραπεία η κισσοκήλη που είναι κλινικά ψηλαφητή, συνοδεύεται από προβληματικό σπερμοδιάγραμμα και το ζευγάρι είναι υπογόνιμο (εφόσον έχει ελεγχθεί και ο γυναικείος παράγοντας υπογονιμότητας).

#### γ) Σύνδρομο Sertoli cell only

Η αιτιολογία του συνδρόμου είναι άγνωστη και προφανώς πολυπαραγοντική. Οι ασθενείς παρουσιάζονται με μικρούς ή φυσιολογικούς όρχεις και αζωοσπερμία. Στην βιοψία όρχεος υπάρχουν κύτταρα Sertoli και απουσιάζουν τα germ cells.

#### δ) Γοναδοτοξικοί παράγοντες

Πολλοί παράγοντες φυσικοί ή χημικοί βλάπτουν το σπερματικό επιθήλιο. παράγοντες οι οποίοι επηρεάζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό



βλάπτουν την σπερματογένεση. Ακόμα επειδή η σπερματογένεση είναι ανδρογονοεξαρτώμενη φάρμακα τα οποία επηρεάζουν την παραγωγή ή την δράση των ανδρογόνων επιρεάζουν αρνητικά την γονιμότητα. Εκτός από τις παραπάνω κατηγορίες υπάρχουν πολλοί περιβαλλοντικοί παράγοντες των οποίων οι αρνητικές συνέπειες στην γονιμότητα δεν είναι πλήρως γνωστές.

ε) Χημειοθεραπεία

Η σπερματογένεση βλάπτεται με αντιστρεπτό τρόπο από τα περισσότερα χημειοθεραπευτικά. Τα κύτταρα που επηρεάζονται περισσότερο είναι τα σπερματογόνια και τα σπερματοκύτταρα.

στ) Έκθεση στην ακτινοβολία

Τα germ cells είναι πολύ ακτινοευαίσθητα γιατί πολλαπλασιάζονται εύκολα. Οι σπερματίδες είναι πιο ανθεκτικές από τα σπερματογόνια και τα σπερματοκύτταρα. Τα κύτταρα Leyding είναι ανθεκτικά. Με δόσεις μικρότερες από 18 rads χρειάζονται 12 μήνες για να ανάνηψη. Αζωοσπερμία συμβαίνει σε δόσεις μεγαλύτερες από 50 rads. Με δόσεις 400-600 rad χρειάζονται περίπου 5 χρόνια για ανάνηψη. Μετά από χημειοθεραπεία ή ακτινοβολία αντενδείκνυται σύλληψη για δύο χρόνια. Μετά δεν υπάρχει ένδειξη για αύξηση του κινδύνου για συγγενείς ανωμαλίες.

ζ) Ουσίες των οποίων γίνεται χρήση πολύ συχνά

Αλκοόλ: Ατροφία όρχεων συμβαίνει σε χρόνιους αλκοολικούς. Η ιστολογική δείχνει περισωληνιαριακή ινώση και ελάττωση του αριθμού των germ cells.



Πολλές μελέτες δεν απέδειξαν σχέση μεταξύ κατανάλωσης οινόπνευματος και κινητικότητας ή αριθμού σπερματοζωαρίων σε ομάδες υπογόνιμων ανδρών.

**Κάπνισμα:** Υπάρχουν μελέτες όπου δεν φαίνεται σχέση μεταξύ καπνίσματος και υπογονιμότητας ενώ άλλες έχουν δείξει ελάττωση του όγκου σπέρματος, ανώμαλη μορφολογία σπερματοζωαρίων και πυοσπερμία.

**Καφεΐνη:** Δεν έχει αποδειχθεί αρνητική σχέση μεταξύ υπογονιμότητας και κατανάλωσης καφέ.

**Άλλες ουσίες:** Μαριχουάνα, κοκαΐνη, διαπυλοστιλβεστρόλη, νιτροφουραντοΐνη και άλλες ουσίες βλάπτουν με πολλούς μηχανισμούς την γονιμότητα.

#### η) Φλεγμονές

Παρωτίτιδα σε ενήλικες προκαλεί ορχίτιδα σε περίπου 30% των ασθενών. Στο 30% των περιπτώσεων η λοίμωξη είναι αμφοτερόπλευρη. Μετά τη λοίμωξη μπορεί να συμβεί ατροφία όρχεων, μέσα σε διάστημα μηνών ή και ετών. Στην ιστολογική φαίνεται ατροφία των σπερματικών σωληναρίων.

Η σύφιλη προσβάλλει τους όρχεις και τις επιδιδυμίδες και η γονόρροια επίσης προκαλεί ορχίτιδα.

#### θ) Ανοσολογικά αίτια

Υπάρχουν δύο τρόποι προσέγγισης αυτών των ασθενών:

Στην πρώτη γίνεται προσπάθεια καταστολής της παραγωγής αντισωμάτων.

Στην δεύτερη γίνεται προσπάθεια για απομάκρυνση των αντισωμάτων από





το σπέρμα ή για επιλογή εκείνων των σπερματοζωαρίων που δεν φέρουν αντισπερματικά αντισώματα.

Συνήθως παρουσιάζεται στους ασθενείς αυτούς η περίπτωση για θεραπεία με στεροειδή, αλλά επίσης πρέπει να ενθαρρύνονται αυτοί να διαλέξουν IVI ή IVF αν το σπέρμα έχει την κατάλληλη ποιότητα.

ι) **Ιδιοπαθής υπογονιμότητα**

Παρόλο την ανάπτυξη των διαγνωστικών μεθόδων, περίπου το 25% των ασθενών έχουν παθολογικό σπερμοδιάγραμμα, χωρίς να βρίσκεται συγκεκριμένη αιτιολογία. Αυτή η κατάσταση λέγεται ιδιοπαθής ανδρική υπογονιμότητα και σχετίζεται με πολλούς αιτιολογικούς παράγοντες.

Στο 39% υπάρχουν βλάβες όλων των παραμέτρων του σπέρματος. Βλάβες στην κινητικότητα και βιοσιμότητα βρίσκονται στο 24% των ασθενών, ενώ προβληματική μορφολογία βρίσκεται στο 10%.

Η κλινική εξέταση, το ιστορικό και ο ορμονικός έλεγχος συνήθως δεν αποκαλύπτουν κάτι το παθολογικό.

Επίσης κανένα θεραπευτικό σχήμα δεν έχει αποδειχθεί αποτελεσματικό σ' αυτή την κατηγορία ασθενών.

Γ) **ΜΕΤΑΟΡΧΙΚΑ ΑΙΤΙΑ**

α) **Απόφραξη της αποχετευτικής οδού**

Η συχνότητα εμφάνισης αυτής της κατηγορίας είναι περίπου 7%. Οποιοδήποτε σημείο της αποχετευτικής οδού, από τα σπερματικά σωληνάκια μέχρι τον σπερματικό πόρο, μπορεί να προσβληθεί.

Η απόφραξη μπορεί να είναι συγγενής ή επίκτητη όπως συμβαίνει σε φλεγμονές ή απόλινωση του σπερματικού πόρου ή στενωση.

Σ' αυτή την περίπτωση υπάρχει ελαττωμένος όγκος σπέρματος και αζωοσπερμία. Στην βιοψία υπάρχει σπερματογένεση. Χειρουργική



αντιμετώπιση οδηγεί σε ποσοστά κυησης μέχρι 4%, γι'αυτό και δεν συνιστάται.

Αυτή τη στιγμή η καλύτερη θεραπεία είναι αναρρόφηση σπέρματος από την επιδιδυμίδα και ICSI. Αν δεν υπάρχει σπέρμα στην επιδιδυμίδα τότε γίνεται βιοψία όρχεων και ICSI.

β) Προβλήματα εκσπερμάτισης

Οτιδήποτε επηρεάζει τη νεύρωση του αυχένα της κύστης και των σπερματικών πορών μπορεί να οδηγήσει σε έλλειψη εκσπερμάτισης ή σε παλίνδρομη εκσπερμάτιση. Αυτό το πρόβλημα τίθεται στη διαφορετική διάγνωση όταν υπάρχει ελαττωμένος όγκος σπέρματος ή καθόλου.

Μετά από διουρηθρική αφαίρεση προστάτη, χειρουργική του αυχένα της κύστης ή λεμφαδενεκτομή στον οπισθοπεριτοναϊκό χώρο έχουμε την παραπάνω κατάσταση. Επίσης ο Σακχαρώδης διαβήτης, η σκλήρυνση κατά πλάκας και τα φάρμακα που δρουν στο συμπαθητικό επηρεάζουν την εκσπερμάτιση.



## 8. ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΑ ΑΙΤΙΑ

### 1. Γενετική των διαταραχών της σπερματογένεσης

Την τελευταία δεκαετία έχει αυξηθεί θεαματικά η ταυτοποίηση γονιδίων που σχετίζονται με τη σπερματογένεση και τη φυλετική διαφοροποίηση. Υπολογίζεται ότι περισσότερα από 1000 γονίδια σε σύνολο 20.000 έως 100.000 περίπου του ανθρώπινου γονιδιώματος, σχετίζονται με τη γονιμότητα. Ιδιαίτερα σημαντική είναι η προσπάθεια που έχει επικεντρωθεί στα γοίδια του χρωμοσώματος Y καθώς και σε ομόλογες περιοχές του X. Έχουν επίσης αναγνωριστεί και μελετηθεί τα γονίδια που ευθύνονται για γενετικά σύνδρομα που εκδηλώνονται με υπογονιμότητα και υπολειπόμενη σπερματογένεση. Η ανάλυση των χρωμοσωμάτων και των γονιδίων σε υπογόνιμους άνδρες συμβάλλει αποφασιστικά στην κατανόηση των σύνθετων μοριακών μηχανισμών της ανθρώπινης σπερματογένεσης. Όμως η βελτίωση των γνώσεών μας όσον αφορά την ανδρική υπογονιμότητα προβάλλει και ηθικά ζητήματα για τη χρήση της μικρογονιμοποίησης και για τους κινδύνους συγγενών ανωμαλιών, χρωμοσωματικών ανωμαλιών και άλλων γενετικών βλαβών που ενδεχομένως θα προκληθούν ή θα μεταβιβαστούν από τη χρήση της μεθόδου.

Σήμερα οι διαταραχές της σπερματογένεσης μπορούν σε μεγάλο βαθμό να μελετηθούν και να ταξινομηθούν με βάση γενετικά κριτήρια, ενώ το 30% από αυτές θεωρείται ότι έχει γενετική βάση (Meschede and Horst 1997, Diemer and Desjardins 1999, Kupker et al. 1999). Η κλινική ταξινόμηση από μόνη της είναι δύσκολο να συσχετίσει τα κλινικά ευρήματα με μια συγκεκριμένη γενετική βλάβη. Εκτός από τις περιπτώσεις γενετικών συνδρόμων με υπογονιμότητα όπου



η κλινική εικόνα είναι χαρακτηριστική, στις υπόλοιπες περιπτώσεις η κλινική εικόνα δεν αντιστοιχεί σε κάποια σταθερά γενετικά ευρήματα.

Οι περισσότερες περιπτώσεις ανδρικής υπογονιμότητας είναι ιδιοπαθείς. Για το λόγο αυτό ολόένα και περισσότεροι ειδικοί προτείνουν τη συστηματική μελέτη των συχνών γενετικών αιτιών της υπογονιμότητας πριν από την εφαρμογή της μικρογονιμοποίησης. Όμως πριν από την καθιέρωση του συστηματικού γενετικού ελέγχου θα πρέπει να συστηματοποιήσουμε τις γνώσεις μας για τις γενετικές διαταραχές στις περιπτώσεις που έχουν θεραπευτική ένδειξη για IC'SI. Επίσης θα πρέπει να εξετάσουμε σε ποιο βαθμό οι γενετικές διαταραχές συνδέονται με τον κλινικό φαινότυπο και κατά πόσο μπορούν να προκαλέσουν γενετικές βλάβες στους απογόνους.

#### A. Μονογονιδιακές γενετικές βλάβες

Οι γενετικές βλάβες που οφείλονται σε συγκεκριμένα γονίδια είναι περισσότερες από 5000 και έχουν καταγραφεί συστηματικά στη βάση δεδομένων MIM (Mendelian Inheritance in Man). Ορισμένες από αυτές τις βλάβες έχουν χαρακτήρα συνδρόμου με πολλαπλές κλινικές εκδηλώσεις, ενώ άλλες έχουν μεμονωμένες εκδηλώσεις. Εδώ θα αναφερθούμε στις μονογονιδιακές βλάβες στις οποίες η υπογονιμότητα είναι το σταθερό και κύριο κλινικό χαρακτηριστικό.

1. Η συγγενής αμφοτερόπλευρη απουσία του σπερματικού πόρου (ΣΛΑΣΠ) είναι μια σημαντική αιτία αποφρακτικής αζωοσπερμίας σε υγιείς κατά τα άλλα άρρενες. Και αποτελεί μια από τις εκδηλώσεις της αυτοσωματικής υπολειπόμενης ινοκυστικής νόσου (IN). Η ινοκυστική νόσος, οι περισσότερες περιπτώσεις ΣΛΑΣΠ (60-90%) και ορισμένες περιπτώσεις ετερόπλευρης απουσίας του σπερματικού πόρου οφείλονται σε μεταλλάξεις του γονιδίου CFTR (Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator). Οι δύο τελευταίες θεωρούνται οι ηπιότερες εκδηλώσεις της IN και περιορίζονται μόνο στο αναπαραγωγικό σύστημα. Οι μεταλλάξεις του γονιδίου ταξινομούνται σε ήπιες και βαρείς, όμως η συσχέτιση μεταξύ του γονότυπου και του φαινοτύπου είναι σύνθετη. Γενικώς οι



ήπιες μεταλλάξεις προκαλούν ήπιες εκδηλώσεις της νόσου η οποία χαρακτηρίζεται από προιούσα πνευμονική νόσο και παγκρεατική ανεπάρκεια ή μόνο αποφρακτική αζωοσπερμία. Περισσότερες από 500 μεταλλάξεις του υπεύθυνου γονιδίου, το οποίο έχει μέγεθος 230kb έχουν μέχρι σήμερα περιγραφεί και πολλές από αυτές περιορίζονται μόνο σε ένα ασθενή ή μία οικογένεια (De Braekeleer and Ferec).

Η συχνότητα φορέων της IN στο γενικό πληθυσμό είναι υψηλή στους Καυκάσιους (Λευκή φυλή) ενώ αποτελεί το συχνότερο γενετικό νόσημα στην Δυτική Ευρώπη και στην Ελλάδα είναι δεύτερη μετά την Μεσογειακή αναιμία. Στις περιπτώσεις αυτές συνιστάται ο μοριακός γενετικός έλεγχος του υπογόνιμου ζεύγους τουλάχιστον για τις συχνότερες μεταλλάξεις της IN και η κατάλληλη γενετική καθοδήγηση.

## 2. Πρωτοπαθής ακινησία των μαστιγίων (σύνδρομο Kartagener)

Η πρωτοπαθής ακινησία ή δυσκινησία των μαστιγίων, είναι ένας συγκεντρωτικός όρος που περιλαμβάνει τις διαταραχές που οφείλονται σε διαταραχές της κινητικότητας και της δομής των μαστιγίων κυρίως των αεραγωγών και της ουράς των σπερματοζωαρίων. Οι προσβεβλημένοι παρουσιάζουν χρόνια νοσήματα των αεραγωγών ενώ οι άρρενες είναι συνήθως υπογόνιμοι λόγω ακινησίας των σπερματοζωαρίων τους η οποία μπορεί να οφείλεται σε ανωμαλίες της δομής των υπεύθυνων πρωτεϊνών με συχνότερη την απουσία των συνδετικών βραχιόνων της δυνείνης του αξωνήματος. Η ταυτόχρονη παρουσία βρογχιεκτασίας, ιγμορίτιδα, ακινησίας σπερματοζωαρίων και αναστροφής των σπλάγγων ονομάζεται σύνδρομο Kartagener. Παράλληλα εδώ θα πρέπει να αναφερθεί και η ύπαρξη σημαντικού αριθμού μονομοριακών διαταραχών των σπερματοζωαρίων με γενετική προέλευση όπως για παράδειγμα η σφαιροζωοσπερμία (Meschede and Horst 1997).

Οι συνήθεις τρόποι κληρονομίησης αυτών των διαταραχών είναι ο αυτοσωματικός υπολειπόμενος και ο φυλοσύνδετος. Επειδή η κατηγορία αυτή των



νοσημάτων είναι ετερογενής η γενετική διάγνωση βασίζεται στην κλινική εξέταση και τη λήψη ιστορικού με κατάλληλη γενετική καθοδήγηση.

### 3. Σύνδρομο Kallman

Το σύνδρομο αυτό ευθύνεται για το 5% των υπογόνιμων ανδρών με υπογοναδοτροφικό υπογοναδισμό και οφείλεται σε ελλείμματα του Χρ22 ή μεταλλάξεις του γονιδίου *Kal-1* το οποίο εδράζεται σε αυτή την περιοχή του χρωμοσώματος Χ. Ο φαινότυπος του συνδρόμου ποικίλει από τους νορμογοναδοτροφικούς γόνιμους ασθενείς, έως την απόλυτη έλλειψη FSH και LH ανάλογη με την ανεπάρκεια της GnRH. Ο πλήρης φαινότυπος του συνδρόμου εμφανίζεται με ανοσμία γιατί το ίδιο γονίδιο κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη συγκόλλησης η οποία είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη και των υποθαλαμικών νευρώνων που παράγουν GnRH και των οσφρητικών. Εάν οι συγκεντρώσεις της τεστοστερόνης, σε πάσχοντες από το σύνδρομο, είναι επαρκείς για να στηρίξουν τη σεξουαλική διαφοροποίηση κατά τη διάρκεια της οργανογένεσης τότε ο φαινότυπος του άρρενος είναι φυσιολογικός (Behre et al. 1997).

### 4. Συγγενής υποπλασία των επινεφριδίων και των όρχεων

Η συνήθης φιλοσύνδετη μορφή του νοσήματος που αποτελεί τα 2/3 των περιπτώσεων οφείλεται στο γονίδιο *DAX-1* και συνδέεται με σοβαρές βλάβες που ποικίλουν από νεογνικό θάνατο μέχρι υπογοναδοτροφικό υπογοναδισμό. Η σπερματογένεση σε αυτή την ομάδα είναι μειωμένη ή απολύτως ανενεργής και δεν υφίσταται ζήτημα γονιμότητας με τη χρήση σύγχρονων τεχνικών. Όμως η αυτοσωματική υπολειπόμενη μορφή της νόσου οφειλόμενη στα γονίδια *FTZ1* και *S11* παρουσιάζει ήπια ανεπάρκεια της στεροειδογένεσης (Behre et al. 1997).

### 5. Σύνδρομο αντίστασης στα ανδρογόνα και νόσος του Kennedy

Το γονίδιο του υποδοχέα των ανδρογόνων που βρίσκεται στο μακρό σκέλος του χρωμοσώματος Χ (*Xq11-12*) είναι υπεύθυνο για μια σειρά νοσημάτων και



φαινοτυπικών εκδηλώσεων. Στο σύνδρομο αντίστασης στα ανδρογόνα, ο υποδοχέας εμφανίζει μεταλλάξεις ποικίλης κλινικής βαρύτητας και μοριακής ετερογένειας. Οι σημειακές μεταλλάξεις είναι συχνότερες από τα ελλείμματα και υπάρχει μια περιορισμένη συσχέτιση μεταξύ του γονοτύπου και του φαινοτύπου. Δύο μορφές του συνδρόμου, η θηλεοποίηση των όρχεων και το σύνδρομο Reifenstein χαρακτηρίζονται από αναστροφή του φύλου και αμφίβολα έξω γεννητικά όργανα (Maclean et al. 1995). Όμως μια άλλη μορφή του συνδρόμου συνδυάζεται με ποσοστική μείωση της σπερματογένεσης.

Μια ειδική μετάλλαξη του υποδοχέα των ανδρογόνων που προκαλεί τη νόσο του Kennedy, παρουσιάζει πολύ μικρή κλινική ομοιότητα με την αντίσταση στα ανδρογόνα. Η εκδήλωσή της αρχίζει μετά από την ηλικία των 20 ετών και ακολουθεί κυρίως βραδεία εξέλιξη. Τα άτομα που πάσχουν από το σύνδρομο εμφανίζουν δευτεροπαθή ατροφία των όρχεων, γυναικομαστία και υπογονιμότητα, ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις εμφανίζεται μείωση των επιπέδων τεστοστερόνης του ορού. Αν δεν τεκνοποιήσουν πριν από την εμφάνισή των συμπτωμάτων της νόσου είναι δυνατόν να ζητήσουνε τη συνδρομή των τεχνικών της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Η νόσος του Kennedy ή φυλοσύνδετη νωτιαία μυϊκή ατροφία ανήκει σε μια ομάδα γενετικών νοσημάτων που οφείλονται στην αύξηση των επαναλήψεων της αλληλουχίας τρινουκλεοτιδίων και αναφέρονται και ως δυναμικές μεταλλάξεις. Η δυναμική αυτή μετάλλαξη βρίσκεται στο 1<sup>ο</sup> εξόνιο του γονιδίου και εμφανίζει επέκταση (συχνότερα) ή συρρίκνωση (σπανιότερα) κατά τη διάρκεια της μείωσης (Willems 1997).

Η μυοτονική δυστροφία και το σύνδρομο εύθραυστου X συμπληρώνουν τον κατάλογο των νοσημάτων με δυναμικές μεταλλάξεις και υπογονιμότητα. Σε περιπτώσεις μυοτονικής δυστροφίας ενδιάμεσης κλινικής βαρύτητας ζητείται η εφαρμογή της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής και η θεραπευτική αντιμετώπιση του υπογοναδισμού (Meschede and Horst). Τέλος το σύνδρομο εύθραυστου X παρουσιάζει ήπια έως σοβαρή διανοητική καθυστέρηση και διαταραχές στη σπερματογένεση λόγω του ότι το υπεύθυνο γονίδιο εκφράζεται στους όρχεις. Σε



αυτά τα νοσήματα όπως και σε άλλα φυλοσύνδετα το πάσχον χρωμόσωμα X μεταβιβάζεται στις κόρες των πασχόντων αποκλειστικά. Υπάρχει επίσης ο κίνδυνος της περαιτέρω επέκτασης της βλάβης.

## **B. Χρωμοσωματικές ανωμαλίες (Mendelian cytogenetics database)**

Οι χρωμοσωματικές ανωμαλίες σε υπογόνιμους άρρενες διακρίνονται σε αριθμητικές και δομικές. Στην υπογονιμότητα ενδιαφέρουν κυρίως οι αριθμητικές ανωμαλίες των φυλετικών χρωμοσωμάτων. Τα υπεράριθμα φυλετικά χρωμοσώματα έχουν περιορισμένες συνέπειες στο φαινότυπο σε σχέση με τα υπεράριθμα αυτοσωματικά χρωμοσώματα. Όμως η απώλεια ενός χρωμοσώματος X προκαλεί πολλαπλές σωματικές βλάβες και σοβαρές διαταραχές της φυλετικής διαφοροποίησης των θηλέων.

### **1. Το σύνδρομο Klinefelter : 47 ,XXY**

Το σύνδρομο Klinefelter είναι η συχνότερη αριθμητική χρωμοσωματική ανωμαλία που προκαλεί υπογοναδισμό και υπογονιμότητα, με ήπιες ως σοβαρές διαταραχές στη σπερματογένεση. Τα σπερματογόνια αυτών των ασθενών δεν διαφοροποιούνται πέρα από το πρωτογενές σπερματοκύτταρο, όμως σε ορισμένες περιοχές του επιθηλίου η σπερματογένεση μπορεί να ολοκληρωθεί. Ο καρυότυπος των σπερματοζωαρίων αυτών των ασθενών δείχνει ότι το 2-20% των σπερματοζωαρίων τους έχει ανευπλοειδία των φυλετικών χρωμοσωμάτων (Foresta 1998). Όμως τα σπερματοζωάρια στο σύνδρομο Klinefelter έχουν μεγαλύτερη συχνότητα υπεράριθμων χρωμοσωμάτων X, καθώς και υψηλότερη συχνότητα μεταβίβασης του συνδρόμου στους απογόνους.

### **2. Σύνδρομοι XYY: 47 ,XYY**

Για το σύνδρομο αυτό ευθύνεται ο πατρικός μη αποχωρισμός του χρωμοσώματος Y. Τα δευτερογενή χαρακτηριστικά του φύλου και η σπερματογένεση δεν προσβάλλονται, ενώ το υπεράριθμο χρωμόσωμα Y απομακρύνεται κατά τη μείωση. Όμως τα άτομα αυτά παράγουν σπερματοζωάρια με δισωμίες και υπεραπλοειδείς καρυοτύπους, όπως 24,XY ή 24,YY σε





μεγαλύτερο ποσοστό από ότι τα άτομα με καρυότυπο 46,XY. Όπως και στο σύνδρομο 47,XXY ο κίνδυνος μεταβίβασης τρισωμίας των φυλετικών χρωμοσωμάτων υπολογίζεται από το ποσοστό των υπεραπλοειδών σπερματοζωαρίων (Blanco et al. 1997).

### 3. Δομικές ανωμαλίες του χρωμοσώματος X

Οι δομικές ανωμαλίες του χρωμοσώματος X όπως μικρά ελλείμματα ή μεταθέσεις προκαλούν υπογονιμότητα. Τα μεγαλύτερα ελλείμματα και ιδιαίτερα αυτά που προσβάλουν το μεγαλύτερο μέρος του χρωμοσώματος X είναι ασύμβατα με την ανάπτυξη άρρενος εμβρύου.

Η μετάθεση του χρωμοσώματος X σε αυτοσωματικά χρωμοσώματα ή στο χρωμόσωμα Y παρά το ότι δεν αποτελεί μια συνήθη αιτία υπογονιμότητας, είναι κληρονομική και οι συνέπειες της στους απογόνους είναι απρόβλεπτες. Η φυσιολογική σπερματογένεση εξαρτάται από την απενεργοποίηση του X η οποία κατευθύνεται από ένα φυλοσύνδετο γονίδιο που δρα κατά τη διάρκεια του σταδίου των σπερματοκυττάρων. Η απενεργοποίηση του X αποτρέπει τον ανασυνδυασμό μεταξύ του X και του Y. Οι μεταθέσεις ενός τμήματος του X έχουν ισχυρή επίδραση στη σπερματογένεση με αποτέλεσμα τα περισσότερα σπερματοκύτταρα να μη μπορούν να εισέλθουν στα επόμενα στάδια της μείωσης. Σε ορισμένες περιπτώσεις η σπερματογένεση ολοκληρώνεται μέχρι το στάδιο των επιμήκων σπερματίδων, αλλά η διαδικασία αυτή είναι εξαιρετικά ανεπαρκής και παράγονται λίγα σπερματοζωάρια (Diemer and Desjardins).

### 4. Ανωμαλίες των αυτοσωματικών χρωμοσωμάτων



Στους υπογόνιμους άνδρες οι μεταθέσεις των αυτοσωματικών χρωμοσωμάτων είναι 4-10 φορές συχνότερες από ότι στους γόνιμους (Elliott and Cook 1997). Οι συχνότερες ανωμαλίες είναι οι περικεντρικές αναστροφές των χρωμοσωμάτων 1, 3, 5, 6, 9, 10 ή 21. περισσότερες από 700 μεταθέσεις έχουν αναφερθεί ότι σχετίζονται με υπογονιμότητα (Mendelian Cytogenetics Database) ενώ τα γονίδια που εμπλέκονται είναι στην πλειοψηφία τους άγνωστα.

Σχεδόν όλα τα αυτοσωματικά χρωμοσώματα που εμπλέκονται σε αμοιβαίες ή μη μεταθέσεις συσχετίζονται με υπογονιμότητα. Οι μεταθέσεις των αυτοσωματικών χρωμοσωμάτων δεν επιτρέπουν το κατάλληλο ζευγάρωμα των ομόλογων ζευγών των χρωμοσωμάτων κατά τη μείωση και παρακωλύουν το ζευγάρωμα των φυλετικών χρωμοσωμάτων. Αυτό είναι δυνατό να οδηγήσει σε επανεργοποίηση του X, του οποίου η έκφραση των γονιδίων κατά τη μείωση παρεμποδίζει τη σπερματογένεση (Handel and Hunt 1992). Ο βαθμός της διαταραχής της σπερματογένεσης εξαρτάται από το βαθμό της αλληλεπίδρασης των παράγωγων χρωμοσωμάτων με τα φυλετικά χρωμοσώματα κατά τη μείωση.

Οι μεταθέσεις μεταξύ ακροκεντρικών χρωμοσωμάτων (Robertsonian) είναι από τις συχνότερες στον άνθρωπο, όμως η επίδρασή τους στη σπερματογένεση ποικίλει από βαρεία απώλεια των σπερματογονίων έως μικρές ή καθόλου αλλαγές στο σπερματικό επιθήλιο.

Οι περι-και παρακεντρικές αναστροφές των χρωμοσωμάτων δεν είναι συχνές μεταξύ των υπογόνιμων ανδρών, όμως αυτές οι χρωμοσωματικές ανωμαλίες επιδρούν στη σπερματογένεση. Οι αναστροφές προκαλούν από στάση της σπερματογένεσης στο στάδιο των σπερματοκυττάρων μέχρι ολιγοσπερμά, αλλά δεν διαταράσσουν τη φυλετική διαφοροποίηση ή τους σωματικούς ιστούς.

### Γ. Ανωμαλίες του χρωμοσώματος Y

Ειδικά το χρωμόσωμα Y εμπλέκεται σε δομικές ανωμαλίες διακριτές στο μοριακό ή στο κυτταρογενετικό επίπεδο που αφορούν αποκλειστικά τη γονιμότητα και τη φυλετική διαφοροποίηση. Οι μεταθέσεις μεταξύ του Y και των αυτοσωματικών χρωμοσωμάτων αφορούν συνήθως τα χρωμοσώματα 1, 3 και 11



και έχουν βλαπτική επίδραση στη σπερματογένεση λόγω της ατελούς απενεργοποίησης του χρωμοσώματος X (Chandley 1994). Άλλες αδρές ανωμαλίες του Y όπως το δακτυλιοειδές Y και το δικεντρικό βραχύ σκέλος του Y παρεμποδίζουν τη σπερματογένεση με αποτέλεσμα την έλλειψη διαφοροποίησης των σπερματογονίων.

Τα ελλείμματα του μακρού σκέλους του χρωμοσώματος Y ανευρέθησαν αρχικά με τεχνικές ανάλυσης των χρωμοσωμάτων, ενώ αργότερα με μοριακές τεχνικές ταυτοποιήθηκαν μικροελλείμματα της ίδιας περιοχής η οποία ονομάζεται AZF (Azoospermia Factor). Πρόσφατα αναγνωρίστηκε ότι τα μικροελλείμματα χαρτογραφούνται σε τρεις διαφορετικές περιοχές του Yq11.21-23, οι οποίες πλέον ονομάζονται AZFa, AZFb, AZFc. Τα μικροελλείμματα εμφανίζονται σαν *de novo* μεταλλάξεις και συνήθως απουσιάζουν από τους γονείς. Ελλείμματα της περιοχής AZFa προκαλούν πλήρη έλλειψη των γεννητικών κυττάρων τυπική του συνδρόμου παρουσίας μόνο των κυττάρων Sertoli (Sertoli-cell only syndrome). Στην περιοχή AZFb έχουν προταθεί 4 υποψήφια γονίδια με συμμετοχή στη σπερματογένεση. Τα ελλείμματα της περιοχής αυτής προκαλούν κυρίως αζωοσπερμία αλλά και ολιγοσπερμία. Η Τρίτη περιοχή AZFc περιέχει πολύ σημαντικά γονίδια για τη σπερματογένεση όπως τα DAZ και SPGY τα οποία εμφανίζονται ως ανεξάρτητα γονίδια της ίδιας οικογένειας. Τα ελλείμματα της περιοχής αυτής προκαλούν ποσοστική μείωση της σπερματογένεσης ή στάση της σπερματογένεσης στο στάδιο των σπερματίδων (Vogt, 1998).

## 2. Μιτοχονδριακή κληρονομικότητα

Ανωμαλίες της μιτοχονδριακής λειτουργίας φαίνεται ότι προκαλούν υπογονιμότητα στους άρρενες (St John et al. 1997). Από την εφαρμογή της ICSI και την εισαγωγή ώριμων ή ανώριμων μορφών σπερματοζωαρίων στο ωάριο είναι λογικό να υποθέσει κανείς ότι υπάρχει κίνδυνος πατρικής μεταβίβασης μεταλλαγμένου μιτοχονδριακού DNA.





## Α. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να διερευνηθεί η σχέση μεταξύ των γενετικών πολυμορφισμών του γονιδίου του υποδοχέα των οιστρογόνων και του υποδοχέα των ανδρογόνων σε συνδυασμό με την σπερματογένεση και την ανδρική υπογονιμότητα.

Συγκεκριμένα θα μελετηθεί η γενετική ποικιλομορφία των γονιδίων με ανάλυση σημειακών πολυμορφισμών στον πληθυσμό των υπογόνιμων ανδρών καθώς και στην ομάδα ελέγχου. Επίσης θα διερευνηθεί η ύπαρξη γενετικής σύνδεσης μεταξύ των πολυμορφισμών και θα μελετηθεί η ύπαρξη τους σαν διαγνωστικός παράγοντας της γενετικής προδιάθεσης για υπογονιμότητα.

Γενικότερα βέβαια σκοπός της μελέτης είναι η κατανόηση του τρόπου λειτουργίας του υποδοχέα τόσο των ανδρογόνων αλλά κυρίως και των οιστρογόνων στην σπερματογένεση. Είναι γνωστό ότι είναι απαραίτητα τα ανδρογόνα για την διαφοροποίηση του φύλλου και τη σπερματογένεση και υπάρχουν δημοσιεύσεις, όπου αφορούν διαφορετικούς πληθυσμούς, όπου φαίνεται η σχέση μεταξύ πολυμορφισμών του υποδοχέα των ανδρογόνων και υπογονιμότητας. Όσον αφορά τον υποδοχέα των οιστρογόνων όμως, υπάρχουν δεδομένα από πειράματα σε ζώα όπου ο μη λειτουργικός υποδοχέας οιστρογόνων και (Era) συνδέεται με υπογονιμότητα. Δεν υπάρχουν δεδομένα σχετικά με τον άνθρωπο ούτε έχει μελετηθεί η συνέργια μεταξύ και των δυο υποδοχέων ER & AR στην ανδρική υπογονιμότητα.



## B. ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

### 1. ΕΙΔΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Αναδρομική Case Control μελέτη μεταξύ των τριών ομάδων των υπογόνιμων ανδρών και της ομάδας ελέγχου.

### 2.. ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΑΣΘΕΝΩΝ – ΕΠΙΛΟΓΗ

Στην μελέτη περιλαμβάνονται τρεις κατηγορίες ασθενών: 1). Ασθενείς με ιδιοπαθή μέτρια oligo-terato-spermiā (η=24), - αριθμός σπερματοζωαρίων  $10-20 \times 10^6$ . 2). Ασθενείς με ιδιοπαθή βαριά OTA ή αζωοσπερμία (η=42)- αριθμός σπερματοζωαρίων  $< 10 \times 10^6$ . 3). Ασθενείς με βαριά OTA ή αζωοσπερμία που οφείλεται σε διάφορα γνωστά αίτια (η=38) (όπως λοιμώξεις, κισσοκήλες κ.λ.π.). Οι ηλικίες των ασθενών ήταν από 30 έως 34 ετών. Στην ομάδα 1 (ασθενείς με ιδιοπαθή βαριά OTA ή αζωοσπερμία) περιλαμβάνονται ασθενείς οι οποίοι είναι ευγοναδικοί, χωρίς κλινικά ή εργαστηριακά ευρήματα υπογονιδιασμού οι οποίοι παρουσιάζουν διαταραχές στην ποιότητα του σπέρματος που σχετίζονται με τον αριθμό ( $\leq 10 \cdot 10^6$  Inl σπέρμα) την κινητικότητα ή & τη μορφολογία των σπερματοζωαρίων. Η διάγνωση σ' αυτή την περίπτωση έχει τεθεί εξ αποκλεισμού, αφού εξαιρέθηκαν γνωστά αίτια ανδρικής υπογονιμότητας όπως οι φλεγμονές των επικουρικών γεννητικών αδένων, ο υπογοναδισμός, οι κισσοκήλες, η κρυπορχία, η απόφραξη των εκφορητικών οδών, ενδοκρινικά αίτια, τα ανασολογικά και οι σεξουαλικές διαταραχές. Επίσης εξαιρούνται ασθενείς με κυστική ίνωση SCOS και μικροελλείματα στο Y χρωμόσωμα. Σε όλους έγινε καρνότυπος και ταυτοποιήθηκε η ύπαρξη του SRY.

Στην ομάδα 2 τα κριτήρια για τη διάγνωση είναι τα ίδια όπως στην ομάδα 1 αλλά ο αριθμός των σπερματοζωαρίων είναι  $10-20 \times 10^6$  σπερματοζωάρια / ml.



Στη ομάδα 3 ανήκουν ασθενείς με βαριά ΟΤΑ ή αζωοσπερμία οι οποίες οφείλονται σε διάφορα γνωστά αίτια όπως κισσοκήλες χημειοθεραπεία, φλεγμονές, κρυσορχία, έλλειψη επιδιδυμίας, απλασία σπερματοδόχων κύστεων και απόφραξη.

Σε όλες τις περιπτώσεις το σπεροδιάγραμμα εξετάστηκε με βάση κανόνες του WHO (1999) και η εξέταση έγινε τουλάχιστον δύο φορές.

Οι ασθενείς των παραπάνω ομάδων προέρχονται από το τμήμα υποβοηθούμενης αναπαραγωγής του ΠΠΓΝΙ και όλοι υποβοήθησαν σε κλινική εξέταση και εργαστηριακό έλεγχο όπως αναφέρεται στις επόμενες παραγράφους.

### **3. ΕΠΙΛΟΓΗ ΤΗΣ ΟΜΑΔΑΣ ΕΛΕΓΧΟΥ**

Στην ομάδα αυτή ανήκουν 45 άνδρες ηλικίας από 29 έως 36 ετών σε καλή γενική κατάσταση υγείας. Η προϋπόθεση ήταν να έχουν τουλάχιστον ένα παιδί σαν επιβεβαίωση της γονιμότητάς τους.

Όλοι οι πληθυσμοί προέρχονται από την περιοχή της βορειοδυτικής Ελλάδας, για τη διατήρηση της ομοιογένειας στις ομάδες μελέτης, η οποία αφορά την κληρονομικότητα του γενετικού υλικού και για την εξασφάλιση συγκρισιμότητας στα αποτελέσματα.

### **4. ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΕΙΣΟΔΟΥ Η ΑΠΟ ΚΛΕΙΣΜΟΥ ΣΤΗ ΜΕΛΕΤΗ.**

Όλοι οι ασθενείς ήταν ευγοναδικοί με φυσιολογικό όγκο όρχεων. Σε όλους έγινε καρύοτυπος (ανεύρεση του SRY) και έλεγχος για μικρόελλείμματα στο Y χρωμόσωμα.

Επίσης ασθενείς με φλεγμονές των επικουρικών αδένων του γεννητικού συστήματος, με κισσοκήλες, κρυσορχία, υπογοναδισμό, απόφραξη των εκφορητικών οδών, ενδοκρινικά ή ανοσολογικά αίτια και σεξουαλικές διαταραχές εξαιρέθηκαν από τη μελέτη.



### 5. ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ – ΛΗΨΗ ΙΣΤΟΡΙΚΟΥ

Η κλινική εξέταση περιελάμβανε την εξέταση κατά συστήματα & την εξέταση του γεννητικού συστήματος.

Ο βαθμός ανδρογενετισμού (virilization) εξετάστηκε.

Κατά την εξέταση του γεννητικού συστήματος, εξεταστηκε η παρουσία υποσπαδία ή χορδής, η οποία υποδηλώνει πρόβλημα στην εναπόθεση του σπέρματος στον τράχηλο.

Με την ψηλάφηση των όρχεων εξετάστηκε η υφή τους και το μέγεθος. Επειδή ο όγκος των όρχεων συνιστάται κυρίως από τα σπερματικά σωληνάρια και τα στοιχεία των germ cells ελάττωση του αριθμού των κυττάρων εκδηλώνεται ως ατροφία όρχεως. Ο φυσιολογικός όγκος όρχεως είναι  $\geq 20$  ml και το μήκος  $\geq 40$ mm.

Επίσης έγινε ψηλάφηση της επιδερμίδας στην κεφαλή, το σώμα και την ουρά. Εάν υπάρχει απόφραξη στην επιδερμίδα μπορεί να ψηλαφηθεί σε αυτήν κυστική αλλαγή.

Η ψηλάφηση των σπερματικών πόρων επίσης έγινε για να επιβεβαιωθεί η ύπαρξή τους και να αποκλειστούν περιοχές ατροφίας.

Στην ψηλάφηση συμπεριλαμβάνεται και ο έλεγχος για κισσοκήλες.

### ΙΣΤΟΡΙΚΟ

Κατά τη λήψη του ιστορικού διευκρινίστηκε η διάρκεια της υπογονιμότητας αν ήταν πρωτοπαθής ή δευτεροπαθής, αναζητήθηκαν στοιχεία όσον αφορά προηγούμενες εγκυμοσύνες (σε περίπτωση που η υπογονιμότητα ήταν δευτεροπαθής), οι μέθοδοι αντισύλληψης που χρησιμοποιήθηκαν στο παρελθόν, και η συχνότητα των επαφών και η χρήση lubricants (λιπαντικών μέσων) (μερικές φορές είναι σπερματοκτόνα).





Όσον αφορά το ατομικό αναμνηστικό διευκρινίστηκε αν υπήρξε κρυφορχία (ετερόπλευρη ή αμφοτερόπλευρη) αν υπήρξαν προβλήματα κατά την ήβη, γιατί ιστορικό καθυστερημένης ενήβωσης μπορεί να συνδυάζεται με ενδοκρिनοπάθεια ή πρόβλημα στον υποδοχέα των ανδρογόνων. Η ύπαρξη γυναικομαστίας επίσης εξεταστηκε γιατί μπορεί να σχετίζεται με υπερπρολακτιναιμία η με υπεροιστογοναιμία.

Διάφορες επεμβάσεις στην πυελό ή στον αυχένα της κύστης ή στον οπισθυπεριτοναϊκό χώρο επηρεάζουν την ικανότητα στήσης και εκσπερμάτωσης. Επίσης εξακρίβωθηκε αν υπήρξαν στο παρελθόν λοιμώξεις του ουροποιητικού ή σεξουαλικά μεταδιδόμενα νοσήματα, παρόλο ότι δεν είναι αποδεδειγμένο ότι αυτές οι καταστάσεις οδηγούν όντως σε υπογονιμότητα. Άλλα στοιχεία που ζητηθηκαν από το ιστορικό (ιδιαίτερα σε περιπτώσεις όπου υπάρχει απουσία σπέρματος ή ελάτωση του όγκου του) ήταν παλινδρόμη εκσπερμάτιση απόφραξη των αποχετευτικών οδών ή υποπλασία ή συγγενής έλλειψη των εκφορητικών οδών, διαβήτη, νεφρική ανεπάρκεια ή σκλήρυνση κατά πλάκας, καρκίνο των όρχεων ή λέμφωμα.

Διάφορα φάρμακα και η χημειοθεραπεία επηρεάζουν, όπως είναι γνωστό την γονιμότητα. Σε περιπτώσεις όπου ο ασθενής παρουσιάζει δεξιοκαρδία και συνεχές λοιμώξεις αναπνευστικού, υποπτεύεται κανείς το σύνδρομο Kartayener. Σε αζωοσπερμικούς ασθενείς εξεταστηκε το ενδεχομένο της κυστικής ίνωσης η οποία είναι αυτοσωμικό υπολειπόμενο νόσημα.

Στο οικογενειακό ιστορικό αναζητηθηκαν και άλλα μέλη της οικογένειας με προβλήματα υπογονιμότητας.

Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται τα στοιχεία από το ιστορικό που ενδιαφέρουν σε περίπτωση υπογονιμότητας.

#### I. Ιστορικό σεξουαλικών επαφών.

Διάρκεια σεξουαλικών σχέσεων με ή χωρίς αντισύλληψη.



## Μέθοδοι αντισύλληψης

Συχνότητα επαφών

Χρήση λιπαντικών μέσων

II Ατομικό αναμνηστικό

A) ανάπτυξη: κρυπορχία, ηλικία έναρξης της ήβης, γυναικομαστία, συγγενείς ανωμαλίες του ουροποιητικού ή του ΚΝΣ.

B) επεμβάσεις: χειρουργία στην πνέλο ή στον οισθοπεριτοναϊκό χώρο, συμπαθεκτομή, σύστροφή όρχεως, ορχεοπηξία, vasectomy.

B) άλλες παθήσεις: λοιμώξεις ουροποιητικού, σεξουαλικά μεταδιδόμενα νοσήματα, νόσοι των νεφρών, διαβήτης, ακτινοθεραπεία, επιδιδυμιτιδα, TB, ανοσμία, χρόνιες παθήσεις.

Γ) φάρμακα, κάπνισμα και αλκοόλ

Δ) ασχολίες και συνήθειες: έκθεση σε χημικά, υψηλές θερμοκρασίες, ακτινοβολία

E) Ιστορικό προηγούμενων κυήσεων ή αποβολών

Στ) προηγούμενος έλεγχος για υπογονιμότητα και θεραπείες.

III οικογενειακό ιστορικό

Ατροφία όρχεων

Υπογοναδισμός

Κρυπορχία

Συγγενείς midline defects

IV ιστορικό της συζύγου



## 6. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟ ΜΕΡΟΣ

### **A) Μοριακές μέθοδοι**

Δείγματα περιφερικού αίματος, λαμβάνονται από όλους τους ασθενείς του πληθυσμού μελέτης καθώς και από εκείνους του πληθυσμού ελέγχου, για εξαγωγή DNA από τα λευκά αιμοσφαίρια.

Τα τμήματα του γονιδίου που περιέχουν τους υπό μελέτη πολυμορφισμούς PvuII, και Xba 1, πολλαπλασιάζονται με την μέθοδο αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR amplification) σύμφωνα με τα πρωτόκολλα των Yaich et al. (1992).

Το προϊόν πολλαπλασιασμού των πολυμορφισμών PvuII και Xba1, πέπτεται με περιοριστικά ένζυμα για τον εντοπισμό των πολυμορφισμών στα πολυμερισμένα τμήματα του DNA. Η πέψη γίνεται σύμφωνα με τις οδηγίες των κατασκευαστών των περιοριστικών ενζύμων για την επίτευξη της πλήρους δράσης τους, η οποία εξαρτάται από την θερμοκρασία, το pH και την τελική σύσταση του διαλύματος όπου γίνεται η αντίδραση.

Οι πολυμορφισμοί ανιχνεύονται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Το προϊόν της ηλεκτροφόρησης συγκρίνεται με γνωστό δείκτη (marker), υπολογίζοντας τα Μοριακά Βάρη ανάλογα με την κινητικότητα τους στο πήγμα, και γίνεται η διάγνωση της πέψης του ενζύμου (κατά προέκταση, της παρουσίας, ή μη, του πολυμορφισμού) όσον αφορά τους πολυμορφισμούς PvuII και Xba1. Τα δείγματα κατατάσσονται σε ομάδες για τις στατιστικές συγκρίσεις.



## A.ΕΞΑΓΩΓΗ DNA

Το προς μελέτη γενετικό υλικό λαμβάνεται από περιφερικό αίμα (2,5 ml-αίμα σε αντυπηκτικό EDTA), για την απομόνωση του DNA από τα λευκά αιμοσφαίρια.

### Πειραματική διαδικασία

Από κάθε δείγμα λαμβάνεται 1 ml αίματος σε ειδικά σωληνάρια (erpendorf) των 2 ml, και προστίθεται διάλυμα TKM, και απορρυπαντικό NP-40, για την λύση και απομάκρυνση των ερυθρών αιμοσφαιρίων.

Ακολουθούν πλύσεις του δείγματος με TKM, μέχρι της πλήρους απομάκρυνσης των ερυθρών αιμοσφαιρίων από το ίζημα.

Στο ίζημα προστίθενται TKM και SDS, για να γίνει η λύση των μεμβρανών των λευκών αιμοσφαιρίων με επώαση στους 55 °C για πέντε λεπτά, και στη συνέχεια, κεκορεσμένο διάλυμα NaCl για να κατακρημνισθούν οι πρωτεΐνες.

Ακολουθεί φυγοκέντρηση.

Το ίζημα απομακρύνεται και στο υπερκείμενο προστίθεται απόλυτη αιθυλική αλκοόλη (EtOH) θερμοκρασίας -20°C, για να απομακρυνθούν τα μόρια του νερού από το μόριο του DNA.

Το καθαρό πλέον DNA διαλύεται σε TE, ώστε η τελική συγκέντρωση του να είναι 200-400 ng/μl.

Αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 24 ώρες ώστε να γίνει πλήρης και ομοιόμορφη διάλυση του DNA στο TE.

Φυλάσσεται στους 4°C.

### ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

TKM: 10mM Tris-HCl (pH 7.6), 10mM KCl, 2 mM EDTA και 4 mM MgCl<sub>2</sub>.

NP-40: Nonylphenoxy Polyethoxy Ethanol (Sigma).

SDS: Sodium dodecyl sulfate, 10% (Sigma).

TE: 10 mM Tris-HCl (pH 7.8) και 1 mM EDTA (pH 8.0).



**ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ  
ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ  
(PCR AMPLIFICATION)**

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης είναι η τεχνική με την οποία μπορούμε να αποκτήσουμε πολλά αντίγραφα τμήματος του μορίου του DNA χρησιμοποιώντας πολύ μικρή ποσότητα υποστρώματος. Η αντίδραση στηρίζεται στην χρήση της θερμοανθεκτικής DNA πολυμεράσης (Taq DNA polymerase), που απομονώθηκε από το θερμόφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus*, και που επιτρέπει τη χρήση υψηλών θερμοκρασιών χωρίς να μετουσιώνεται.

Η αντίδραση γίνεται σε βήματα. Αρχικά οριοθετείται το τμήμα που θέλουμε να πολλαπλασιαστεί με την χρήση ειδικών εκκινητών (primers). Οι εκκινητές είναι συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια (συνήθως 15-30 βάσεων) με αλληλουχία συμπληρωματική με την μία από τις δύο αλυσίδες του DNA. Ακολουθεί κυκλική επανάληψη τριών διαδοχικών φάσεων όπου αποδιατάσσεται το DNA στην υψηλή θερμοκρασία (ανοίγουν οι κλώνοι του), γίνεται η σύνδεση των εκκινητών με τις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στις μονόκλωνες αλυσίδες του DNA και τέλος, με εκμαγείο τις μονές αλυσίδες του DNA και υλικό τα δεοξυριβονουκλεοτίδια που υπάρχουν στο διάλυμα της αντίδρασης, συντίθεται το τμήμα του DNA που ζητείται, βασιζόμενο στην επιμήκυνση των υβριδισμένων εκκινητών. Το προϊόν που προκύπτει από τον κύκλο αυτόν είναι ένα δίκλωνο, μικρό τμήμα DNA, που τα άκρα του καθορίζονται από τα 5' άκρα των εκκινητών. Η επανάληψη αυτού του κύκλου αυξάνει την συγκέντρωση των νέων μορίων εκθετικά. Στο τέλος της αντίδρασης, η περιεκτικότητα του τμήματος αυτού στο διάλυμα είναι πολύ μεγάλη.



Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε στον αυτόματο θερμικό κυκλοποιητή QUATRO TC-40 (QUATRO BIOSYSTEM Ltd, UK).

### Πειραματική διαδικασία

Για τη διεξαγωγή της αντίδρασης γίνεται ένα μείγμα που αποτελείται από τα εξής:

1) Ρυθμιστικό διάλυμα (buffer). Παρέχεται από την προμηθευτική εταιρία μαζί με την DNA πολυμεράση.

2) Ιόντα μαγνησίου, σε συγκεκριμένη ποσότητα, για την αποτελεσματικότερη δράση του ενζύμου. Η βέλτιστη ποσότητα των ιόντων στο μείγμα, βρίσκεται με τιτλοποίηση.

3) Τους δυο εκκινητές (primers) για την οριοθέτηση του τμήματος που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί.

4) Δεοξυριβονουκλεοτίδια (d ATP, d TTP, d CTP, d GTP), για υλικό δόμησης των νέων τμημάτων του DNA (PROMEGA).

5) DNA πολυμεράση (Taq DNA polymerase) σαν ένζυμο πολυμερισμού (Gibco BRL).

6) Το προς ανάλυση γενομικό DNA.

7) Δισαπεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό.

8) Στο μείγμα προστίθεται παραφινέλαιο (mineral oil) σαν επικάλυψη, για την προστασία του προϊόντος από την εξάτμιση, καθώς αυτό εκτίθεται σε υψηλές θερμοκρασίες.



Όλη η διαδικασία προετοιμασίας του διαλύματος της αντίδρασης γίνεται με γάντια στους 0°C, μέσα σε ειδικές θήκες με πάγο, και τα υλικά που χρησιμοποιούνται είναι αποστειρωμένα. Τα προϊόντα PCR διατηρούνται σε θερμοκρασία -20 °C.

**Πρωτόκολλο πολυμερισμού  
του τμήματος του γενομικού  
DNA που περιέχει  
τον πολυμορφισμό  
PvuII και Xba I  
με τη μέθοδο PCR.**

Σύνθεση της αντίδρασης και τελικές συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων:

buffer : 20 mM Tris HCl (pH 8.4), 50 mM KCl  
d NTP s : 0.2 mM από κάθε d NTP.  
Mg<sup>2+</sup> : 4 mM  
primer P<sub>1</sub> : 30 pmol  
Primer P<sub>2</sub>: 30 pmol  
Taq : 1.5 μονάδες  
H<sub>2</sub>O : Μέχρι τελικού όγκου 50 μl.  
DNA : 200-400 ng Προσθέτουμε  
δύο σταγόνες λάδι.

Αλληλουχία των

P<sub>1</sub> : 5'- CTG CCA CCC TAT CTG TAT CTT TTC CTA TTC TCC -  
3' P<sub>2</sub> : 5'-TCT TTC TCT GCC ACC CTG GCG TCG ATT ATC



TGA-3' Το τμήμα του DNA που αντιγράφουν περιλαμβάνει 1300 βάσεις.

### Πρόγραμμα

Αρχική αποδιάταξη 94 °C για 2 λεπτά.

Ακολουθεί:

Αποδιάταξη (denaturation) 94 °C για 1 λεπτό

Επανασύνδεση (annealing) 62 °C για 1 λεπτό

Επέκταση (extension) 72 °C για 1.5 λεπτό

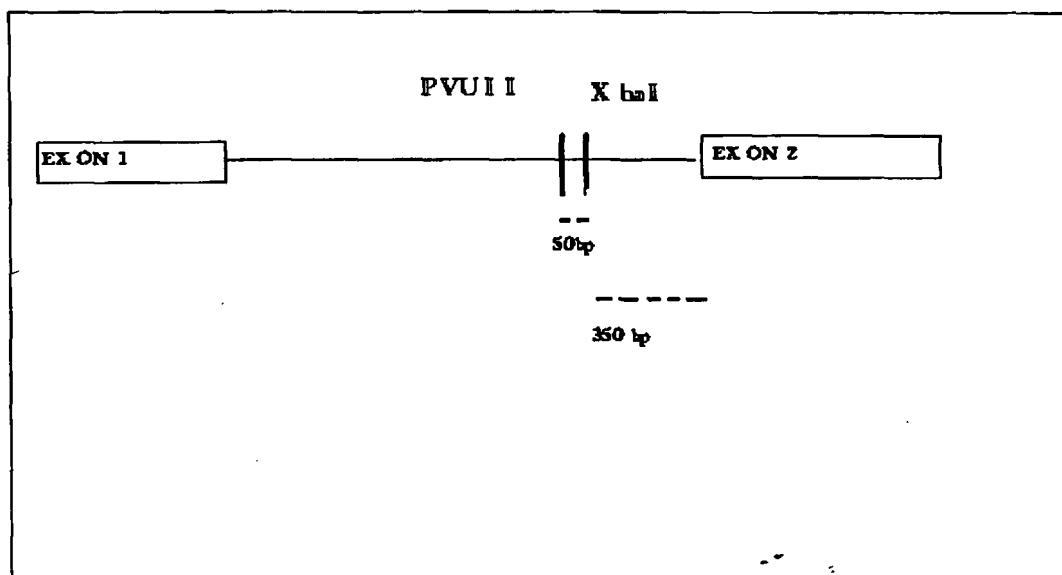
Η αποδιάταξη, επανασύνδεση και επέκταση επαναλαμβάνονται για 33 κύκλους και η διαδικασία ολοκληρώνεται με το τελικό στάδιο επέκτασης που είναι στους 72 °C για 10 λεπτά.





Σχηματική παράσταση των πολυμορφισμών στο γονίδιο του ER3\

Απεικονίζεται η θέση των πολυμορφισμών PvuII και Xba I πάνω στο γονίδιο του υποδοχέα ESR, καθώς και των τμημάτων DNA που αντιγράφονται με την τεχνική PCR για την περαιτέρω ανάλυση των εν λόγω πολυμορφισμών.



### ΠΕΨΗ ΤΟΥ DNA ΜΕ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΑ ΕΝΖΥΜΑ

Το προϊόν της αντίδρασης PCR πέπτεται με περιοριστικό ένζυμο, σύμφωνα με τις ειδικές συνθήκες που χρειάζεται για την πλήρη δράση του. Τα περιοριστικά ένζυμα είναι ενδονουκλεάσες που διασπών τους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς ανάμεσα σε δύο γειτονικές βάσεις των αλυσίδων του DNA, σε συγκεκριμένες θέσεις που τις αναγνωρίζουν λόγω της μεγάλης εξειδίκευσης που παρουσιάζουν.

Στη διάρκεια της πέψης, το ένζυμο θα κόψει το DNA εκεί όπου υπάρχει ο πολυμορφισμός, και αυτό μας δίνει τη δυνατότητα να διακρίνουμε (μέσω ηλεκτροφόρησης), αν το τμήμα του DNA φέρει ή όχι τον πολυμορφισμό. Αν



το δείγμα είναι αρνητικό, θα διακρίνουμε ένα κλάσμα ενώ αν είναι θετικό, τουλάχιστον δύο. Έτσι:

- το ένζυμο *RvuII* κόβει το τμήμα του DNA που αντιγράφηκε με τους εκκινητές  $P_1$  και  $P_2$  και που περιλαμβάνει 1300 βάσεις, σε δύο κλάσματα με 850 και 450 βάσεις. Τα κλάσματα αυτά ανιχνεύονται εύκολα σε πηκτή αγαρόζης 2%.

#### Πειραματική διαδικασία

Για την πέψη του DNA, γίνεται ένα διάλυμα που περιλαμβάνει τα εξής: Ρυθμιστικό διάλυμα (buffer). Παρέχεται από την προμηθευτική εταιρία μαζί με το ένζυμο.

Ένζυμο. Η ποσότητα του ενζύμου πρέπει να είναι η κατάλληλη, σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευαστικής εταιρίας. Το ένζυμο διατηρείται στους  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  καθώς είναι πολύ ευαίσθητο στην θερμοκρασία, γι' αυτό και η μεταφορά του στο μείγμα της αντίδρασης πρέπει να γίνεται στον ελάχιστο χρόνο ώστε να μη μειωθεί η δραστηριότητά του. (N.E. Biolabs, USA).

Το προϊόν PCR που παρασκευάστηκε για την πέψη από το αντίστοιχο ένζυμο.

Δισαπεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό.

**Πρωτόκολλο πέψης του τμήματος του γενωμικού DNA που περιέχει τον πολυμορφισμό *RvuII* με το αντίστοιχο περιοριστικό ένζυμο.**

#### Σύνθεση της αντίδρασης:

buffer : 50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM dithiothreitol  
(pH 7.9)  
*RvuII* : 3 μονάδες  
Προϊόν PCR : 10 μl  
H<sub>2</sub>O : μέχρι τελικού όγκου 20 μl



Η πέψη γίνεται στους 37 °C για 2 ώρες.

Θέση αναγνώρισης του περιοριστικού ενζύμου PvuII πάνω στην αλληλουχία του τμήματος του DNA;

5'...CAG<sup>A</sup>CTG...3'

3'...GTC<sup>A</sup>GAC...5'

Πρωτόκολο πέψης του γενωμικού DNA που περιχει τον πολυμορφισμό Xba I με το αντιστοιχο περιοριστικο ενζυμο.

Συνθεση της αντιδρασης

Buffer του αντιστοιχου ενζυμου 2μl, προιον PCR 10 μl, H<sub>2</sub>O 7 μl, και Xba I 1 μοναδα

Η πέψη γίνεται στους 37 βαθμους C για 12 ωρες

Θεση αναγνωρισης του περιοριστικου ενζυμου Xba I πανω στην αλληλουχια του DNA

5'-CCCTGAGTGTGGTCTGGAGTTGGGATGAGC-3'

#### ΙΑΧΩ ΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΚΛΑΣΜΑΤΩΝ

Ο διαχωρισμος των κλασματων του DNA για τους πολυμορφισμους Pvu II και XbaI αναλογα με το μοριακο τους βαρος, μετα την πέψη με τα περιοριστικα ενζυμα, εγινε με ηλεκτροφορηση σε πηκτη αγαροζης.

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης είναι μια μέθοδος εντοπισμού, διαχωρισμού και προσδιορισμού τμημάτων DNA. Πραγματοποιείται σε οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης, και βασίζεται στην αρχή ότι το μόριο του DNA παρουσιάζει αρνητικό φορτίο (φωσφορικές ρίζες), επομένως, όταν βρεθεί σε ηλεκτρικό πεδίο, μετακινείται προς τον θετικό πόλο.

Παρασκευή πηκτής αγαρόζης



Αρχικά, παρασκευάζεται διάλυμα αγαρόζης σε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης TBE, (είναι το ίδιο με το ρυθμιστικό διάλυμα που θα γίνει η ηλεκτροφόρηση), και σε συγκεκριμένη πυκνότητα, (ανάλογα με τον πολυμορφισμό που θα αναλυθεί) και θερμαίνεται μέχρι βρασμού. Το εκμαγείο της πηκτής τοποθετείται στο ψυγείο, αφού προσαρμοστεί το ειδικό κτένι για την δημιουργία των φρεατίων.

Μετά τον βρασμό, προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr) σε περιεκτικότητα 10%, και αφήνεται να κρυώσει μέχρι την θερμοκρασία των 60°C. Η διαλυμένη αγαρόζη εκχύνεται στο εκμαγείο και αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για να πήξει. Στη συνέχεια, τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, όπου αφαιρείται το κτένι και απελευθερώνονται τα φρεάτια στα οποία θα προστεθούν τα προϊόντα πέψης των ενζύμων.

Τα δείγματα προετοιμάζονται με προσθήκη διαλύματος φόρτωσης (Blue/Orange, PROMEGA), και φορτώνονται στα φρεάτια. Παράλληλα, φορτώνεται και το δείγμα του δείκτη (marker) και η ηλεκτροφόρηση αρχίζει με εφαρμογή σταθερής τάσης 80 Volt.

Όταν οι χρωστικές προχωρήσουν αρκετά, το πήγμα εκτίθεται σε συσκευή υπεριώδους ακτινοβολίας για να διαβαστούν οι ζώνες του DNA που, λόγω φθορισμού των χρωστικών είναι ευδιάκριτες, και φωτογραφίζεται.

Διάλυμα TSE (Tris-Borate): 89 mM Tris-HCL, 89 mM Βορικό οξύ, 2.5 mM EDTA pH 8.0.

Χρωστική Blue/Orange (Loading Dye 6x): 10% Ficoll 400, 0.25% Bromophenol Blue, 0.25% Xylene Cyanol FF, 0.4% Orange G, 10mM Tris HCl pH 7.5, 50mM EDTA.

**ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΩΝ ΤΜΗΜΑΤΩΝ  
DNA ΠΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ  
ΤΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ PvuII και XbaI.**



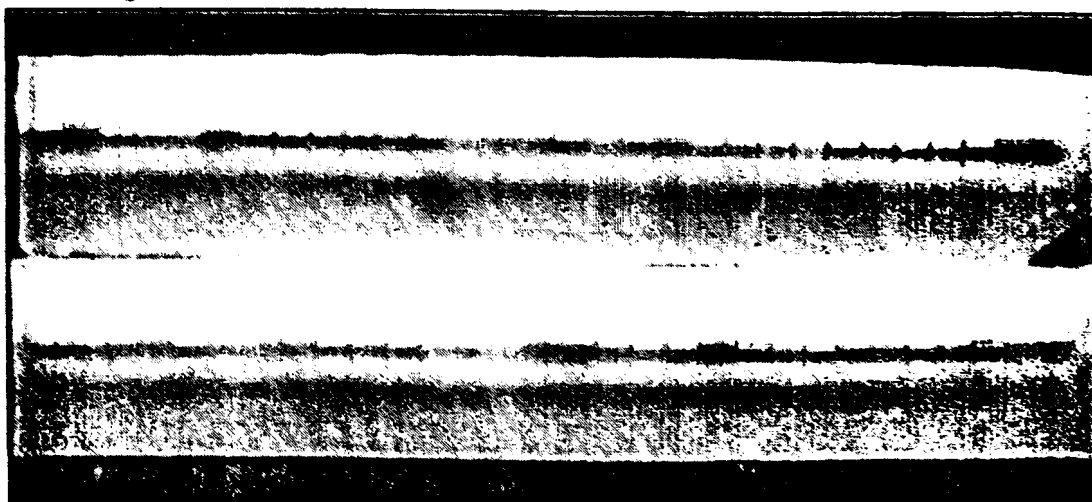
Τα τμήματα χωρίζονται ανάλογα με το μοριακό τους βάρος καθώς κινούνται μέσα στην πηκτή παράλληλα προς την κίνηση του ρεύματος. Η συγκέντρωση της αгарόζης είναι 2%. (MetaPhor TM, FMC, USA).

Δείκτης για τον εντοπισμό των μοριακών βαρών ήταν το πλασμίδιο ΦΧ 174/ Hae III. Η παρατήρηση των ζωνών έγινε εύκολα λόγω της χρώσης της πηκτής με το βρωμιούχο αιθίδιο, το οποίο ενώνεται με τα τμήματα του DNA και δίνει φωτεινό σήμα όταν εκτεθεί σε υπεριώδες φως.

### Ηλεκτροφόρηση του πολυμορφισμού Xba I

Kodak Digital Science 1D™

P000145

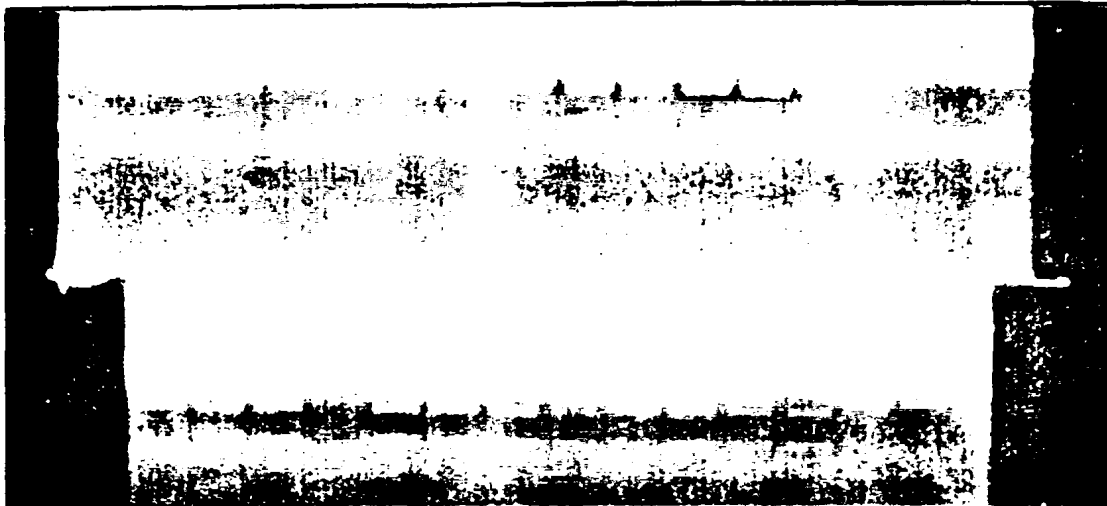


### Ηλεκτροφόρηση του πολυμορφισμού Xba I



Kodak Digital Science 1D™

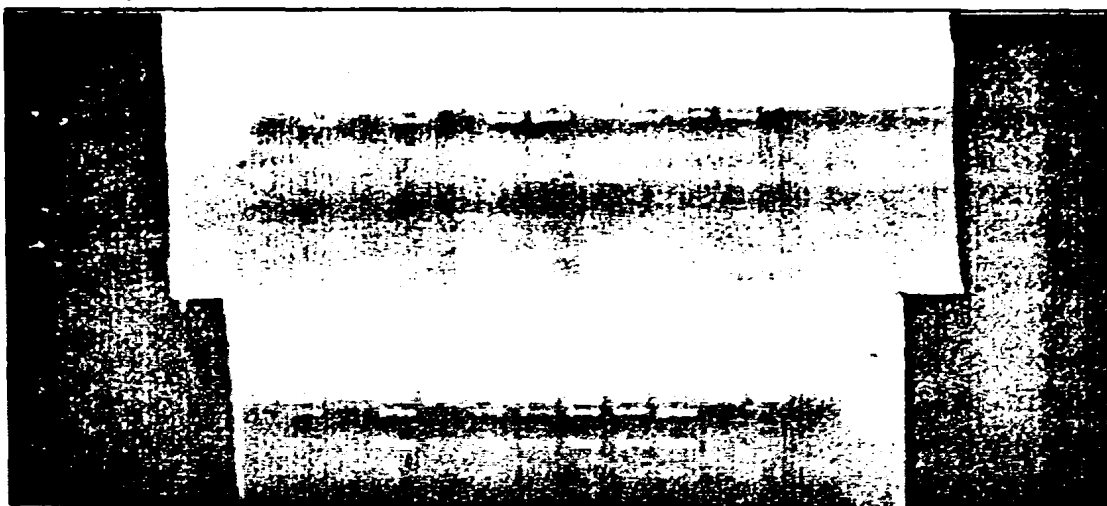
P000147



Ηλεκτροφόρηση του πολυμορφισμού PVU II

Kodak Digital Science 1D™

P000148

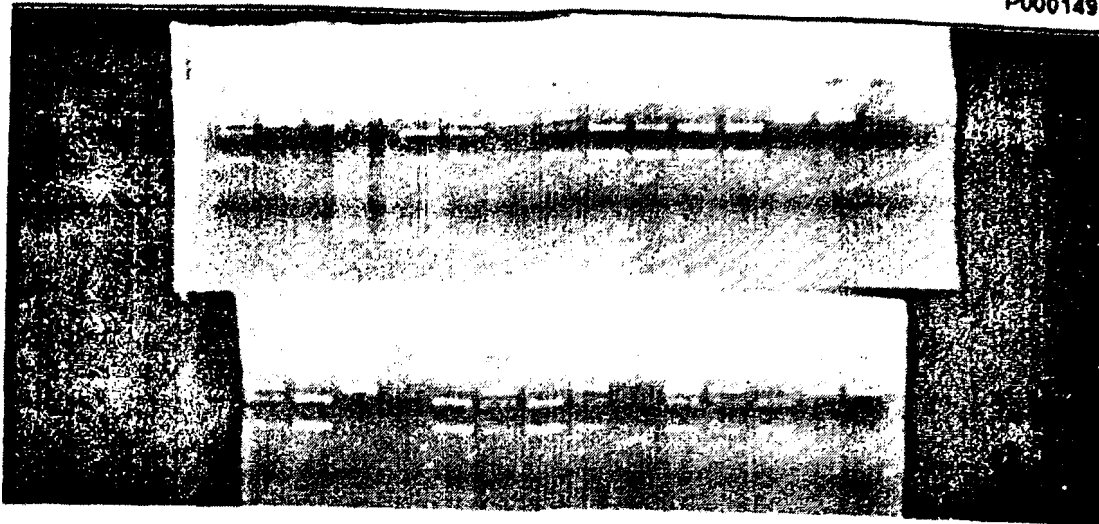


Ηλεκτροφόρηση του πολυμορφισμού PVU II



Kodak Digital Science 1D™

P000149



## Ανάλυση του πολυμορφισμού (CAG)<sub>n</sub> του υποδοχέα των ανδρογόνων

Το μήκος των επαναλήψεων (CAG)<sub>n</sub> προσδιορίστηκε όπως περιγράφεται από τους La Spada et al 1991.

Μίγμα για την αντίδραση PCR

250 ng γενομικού DNA 12.5 pmol primer 95-  
 TCCAGAATCTGTTCCAGAGCGTTGC-3 και (5-  
 GCTGTGAAGGTTGCTGTTCCCTCAT-3), 4 U AmpliTag, buffer και νουκλεοτίδια  
 μέχρι τελικού όγκου 25 μl και 2.5 μCi [α-32P]dATP.

Ακολούθησαν 25 κύκλοι στους 95 βαθμούς C για 1 λεπτό και στους 72 βαθμούς για 1 λεπτό. Οι χρόνοι αρχικής αποδιάταξης και τελικής επιμήκυνσης του DNA διήρκεσαν 5 και 8 λεπτά αντίστοιχα. Μετά από προσθήκη 15 μl stop solution (0.05% bromophenol blue, 95% formamide 20 mM EDTA, 0.05% xylene cyanol FF) τα δείγματα επώαστηκαν στους 75 βαθμούς για 3 λεπτά και ηλεκτοφορήθηκαν σε gel polyacrylamide/ 8 M urea για 3 ώρες σε 38 W. Τα gels ηλεκτοφορήθηκαν σε Kodak X-Omat film για 12 ώρες στους 70 βαθμούς C.

### B) Ορμονικός προσδιορισμός

Ο προσδιορισμός των ορμονών LH, FSH, τεστοστερόνης και προλακτίνης, έγινε με ανοσολογική μικροσωματιδιακή χημειοφωταύγεια (CHEMICOMINESCENCE MICROPARTICAL IMMUNOASSAY (CMIA), ABBOT ARCHITECT).



## 7. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η στατιστική ανάλυση έγινε αυτό των Statistical Package και το  $\chi^2$  Test κατά τις συγκρίσεις μεταξύ των ομάδων της μελέτης. Ως στατιστικά σημαντικές θεωρήθηκαν οι σχέσεις με P-Values < 0,05. Επίσης χρησιμοποιήθηκε το Hardy-Weinberg equilibrium test.





## Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Συγγρίθησαν οι συχνότητες των αλληλομόρφων των πολυμορφισμών PVUII & XbaI του γονιδίου του Era μεταξύ των υποομάδων των υπογόνιμων ανδρών και της ομάδας ελέγχου. Οι ομάδες της μελέτης είναι:

ΟΜΑΔΑ Α, ομάδα ελέγχου

ΟΜΑΔΑ Β, ασθενείς με ιδιοπαθή μέτρια oligo-ασθenoσπερμία (αριθμός σπερματοζωαρίων  $10-20 \times 10^6/\text{mL}$ )

ΟΜΑΔΑ Γ, ασθενείς με ιδιοπαθή σοβαρή oligo-ασθenoσπερμία ή αζωοσπερμία (αριθμός σπερματοζωαρίων  $10 \times 10^6/\text{mL}$ )

ΟΜΑΔΑ Δ, ασθενείς με σοβαρή oligo-ασθenoσπερμία ή αζωοσπερμία από διάφορα γνωστά αίτια (κοιρσοκήλες, φλεγμονές, κ.α.).

Οι ασθενείς χωρίστηκαν σε ομάδες ανάλογα με τους γονοτύπους τους:

RR, ομόζυγοι θετικοί ως προς τον πολυμορφισμό PVUII

Rr, ετερόζυγοι

rr, ομόζυγοι αρνητικοί

XX, ομόζυγοι αρνητικοί ως προς τον πολυμορφισμό XbaI :

Xx, ετερόζυγοι

xx, ομόζυγοι θετικοί.

Στους παρακάτω πίνακες (II – III) φαίνεται η κατανομή των γονοτύπων και οι συχνότητες των αλληλομόρφων για τους δύο πολυμορφισμούς PVUII & XbaI του γονιδίου του Era, καθώς και τα δημογραφικά & ορμονικά δεδομένα των ομάδων της μελέτης.

Οι συχνότητες των PVUII θετικών (P) και αρνητικών (p) αλληλομόρφων δεν διέφεραν σημαντικά ανάμεσα στην ομάδα ελέγχου και στις ομάδες των



ασθενών. Το ίδιο συνέβη και με τις συχνότητες των XbaI θετικών (X) και αρνητικών (χ) αλληλομόρφων. Το ότι οι πολυμορφισμοί αυτοί δεν βρέθηκαν σε υψηλότερη συχνότητα στις ομάδες των ασθενών, σημαίνει ενδεχομένως ότι από μόνοι τους δεν είναι σε θέση να προκαλέσουν υπογονιμότητα.

Μεταξύ της ομάδας ελέγχου και της ομάδας με ιδιοπαθή σοβαρή ολιγοτερατοασθενοσπερμία ή αζωοσπερμία (ομάδα Γ) ο γονότυπος (χχ) (ομοζυγώτες θετικοί) για τον πολυμορφισμό XbaI ήταν λιγότερο συχνός στην ομάδα αυτή (Γ). ( $p < 0,04$ ).

Ο γονότυπος XX (ομοζυγώτες αρνητικοί) για τον ίδιο πολυμορφισμό ήταν πιο συχνός στην ομάδα (Γ).

Αυτές οι διαφορές που είναι στατιστικά σημαντικές δηλώνουν ότι υπάρχει σχέση μεταξύ ιδιοπαθούς σοβαρής ΟΤΑ ή αζωοσπερμίας με τον Era.

Στις υπόλοιπες συγγρίσεις που σχετίζονται με τον πολυμορφισμό PVUII δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές. Αυτό πιθανόν συνέβη λόγω της διαφοράς συχνοτήτων των δύο πολυμορφισμών του Era στην ομάδα ελέγχου.

Ενας άλλος συσχετισμός που έγινε στη μελέτη είναι τα ορμονικά δεδομένα των ασθενών και της ομάδας ελέγχου. (πίνακας 1). Βρέθηκε ότι στην ομάδα (Γ) η τεστοστερόνη ήταν φυσιολογική, ενώ οι LH & FSH ήταν ελαφρώς αυξημένες. Αυτό φαίνεται και σε άλλες μελέτες. Η αυξημένη FSH μπορεί να αποτελεί συνέπεια της αδυναμίας σπερματογένεσης, ενώ η αυξημένη LH μπορεί να οφείλεται στην απευαισθητοποίηση της υπόφυσης στην τεστοστερόνη.

Όσον αφορά τον υποδοχέα των ανδρογόνων, μελετήθηκε η συχνότητα των επαναλήψεων (CAG) του γονιδίου του AR στις διάφορες ομάδες της μελέτης. Επίσης προσδιορίστηκε η συχνότητα των ασθενών που είχαν πάνω από 30 επαναλήψεις CAG στην κάθε ομάδα.

Στον πίνακα IV φαίνονται τα παραπάνω στοιχεία.

Δεν υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις συχνότητες και στο μέσο όρο του αριθμού των επαναλήψεων (CAG). Όμως η συχνότητα του μεγαλύτερου αριθμού επαναλήψεων ( $n > 30$ ) CAG του γονιδίου του AR ήταν 4 φορές



μεγαλύτερη στην ομάδα Β (ιδιοπαθής μέτρια ΟΤΑ) και 4-5 φορές υψηλότερη στην ομάδα Γ (ιδιοπαθής σοβαρή ΟΤΑ ή αζωοσπερμία) και 2 φορές υψηλότερη στην ομάδα Δ (αζωοσπερμία ή σοβαρή ΟΤΑ από γνωστά αίτια).

Τα στοιχεία αυτά δείχνουν ότι ο μεγαλύτερος αριθμός επαναλήψεων (CAG) αυξάνει την πιθανότητα για διαταραχή της σπερματογένεσης.

## Πίνακες

Πίνακας Ι. Δημογραφικά και ορμονικά δεδομένα των ομάδων της μελέτης

	Ομάδα Α	Ομάδα Β	Ομάδα Γ	Ομάδα Δ
ηλικία(έτη)	31 ± 1.0	31.4 ± 1.2	33.9 ± 1.1	32.1 ± 1.1
FSH (mIU/mL)	4.7 ± 0.2	5.2 ± 1.4	21.9 ± 2.1	9.0 ± 2.1
LH (mIU/mL)	4.1 ± 0.2	4.6 ± 1.1	11 ± 1.8	6.1 ± 1.1
Testosterone (ng/dL)	766 ± 35	758 ± 26	360 ± 15	405 ± 52
Συγγέντρωση σπέρματος (x10 <sup>6</sup> /mL)	57.9 ± 3.8	19.2 ± 3.0	1.0 ± 0.2	6.4 ± 1.3
Φυσιολογικές τιμές: FSH = 1.6-17.8 mIU/mL, LH = 1.4-11.1 mIU/mL, testosterone = 270-1100 ng/dL				



# ALIO TIEA ZWA

SA NOMHIRONDIYIC

SA NOMHIRONDIYIC



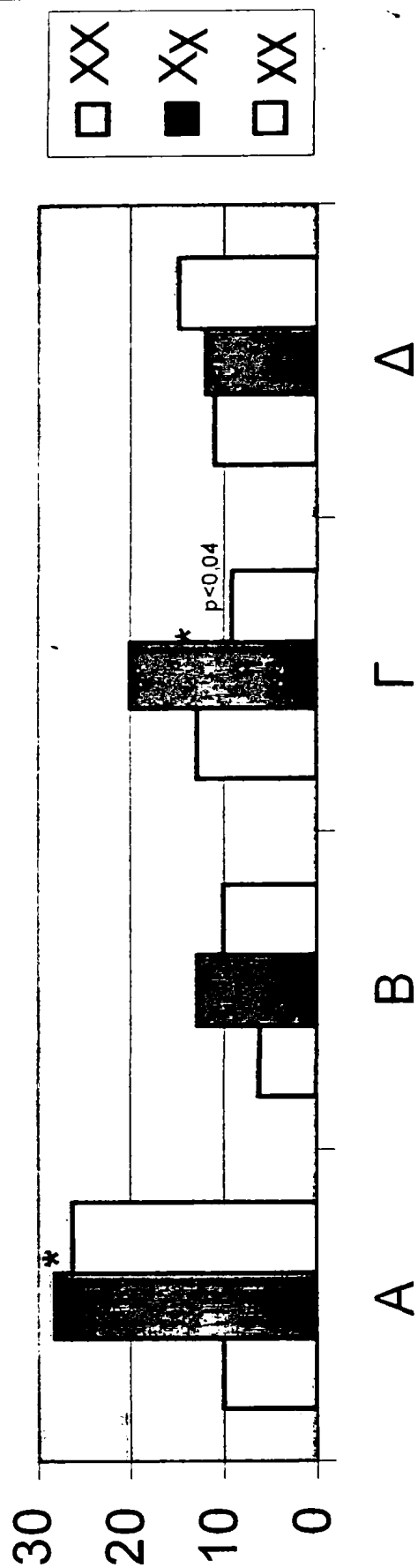
NOJIKI IDANNOM

Πίνακας II. Κατανομή των γονοτύπων και της συχνότητας των αλληλομόρφων για τον πολυμορφισμό RvuII του γονιδίου του ERa

Ομάδα	RvuII γονότυποι (%)			αλληλόμορφα	
	PP	Pp	pp	P	p
A (n=64)	18 (28.2)	25 (39)	21 (32.8)	0.48	0.52
B (n=29)	9 (31)	9 (31)	11 (38)	0.47	0.53
Γ (n=42)	17 (40.5)	13 (30.9)	12 (28.6)	0.55	0.45
Δ (n=38)	12 (31.6)	16 (42.1)	10 (26.3)	0.53	0.47



# ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΓΟΝΟΤΥΠΩΝ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟ Xba1

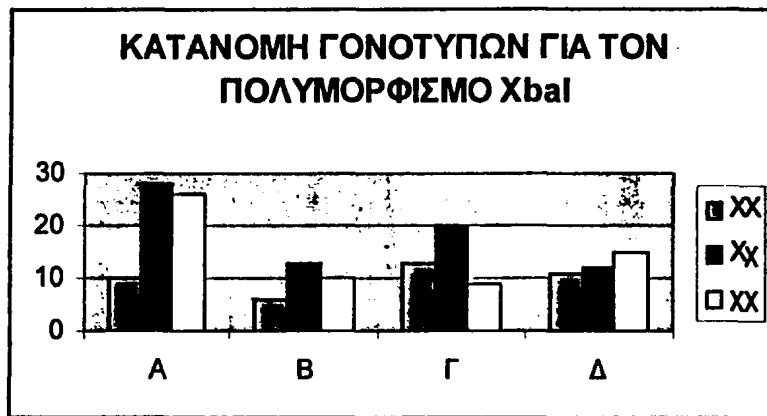


Πίνακας III. Κατανομή των γονοτύπων και της συχνότητας των αλληλομόρφων για τον πολυμορφισμό XbaI του γονιδίου του ERa

Ομάδα	XbaI γονότυποι			αλληλόμορφα	
	XX	Xx	xx	X	x
A (n=64)*	10 (15.6)	28 (43.7)	26 (40.6)	0.37	0.63
B (n=29)	6 (20.7)	13 (44.8)	10 (34.5)	0.43	0.57
Γ (n=42)*	13 (31)	20 (47.6)	9 (21.4)	0.55	0.45
Δ (n=38)	11 (28.9)	12 (31.6)	15 (39.5)	0.44	0.56

\*Μεταξύ των ομάδων Α και Γ ο γονότυπος XbaI xx (ομοζυγώτες θετικοί) ήταν λιγότερο συχνός στην ομάδα Γ ( $p < 0.04$ ).







Πίνακας IV. Συχνότητα >30 των επαναλήψεων CAG του γονιδίου του AR. Φυσιολογικός αριθμός επαναλήψεων μεταξύ 13 και 30 (CAG)n

Ομάδα	n	Διακύμανση	Μέσος όρος	>30 CAG AR
A	64	14-31	21	1 : 64
B	29	19-32	22	2 : 29
Γ	42	17-33	21	3 : 42
Δ	38	15-31	22	1 : 38



## Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Μέχρι σήμερα, η γνώση για την σχέση μεταξύ των οιστρογόνων και του υποδοχέα τους (ER) και την λειτουργία της σπερματογένεσης δεν έχει διευκρινιστεί. Ένα μοντέλο που χρησιμοποιήθηκε είναι ποντίκια ομοζυγώτες για μια μετάλλαξη στον ER (ERKnoock-out, ERKO).

Οι Eddy et al έδειξαν ότι το αναπαραγωγικό σύστημα των αρσενικών ERKO είναι φυσιολογικό όσον αφορά την ανατομία. Όμως αυτά τα ποντίκια είναι στείρα, πράγμα το οποίο υποδηλώνει ότι ο ER παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στη λειτουργία του αναπαραγωγικού συστήματος. Συγκεκριμένα αυτή η λειτουργία επηρεάζεται σε τρία επίπεδα. 1) Ο αριθμός των σπερματοζωαρίων στην επιδυιδίδα ήταν ελαττωμένος στα ERKO σε σχέση με τα φυσιολογικά ποντίκια. 2) Η λειτουργικότητα των σπερματοζωαρίων των ERKO ήταν προβληματική. Η κινητικότητα ήταν ελαττωμένη στην ηλικία των 8 – 10 εβδομάδων. Επίσης από την ηλικία από 8 έως 16 εβδομάδες το σπέρμα από τα ERKO δεν μπορούσε να γονιμοποιήσει ωάρια με τη μέθοδο της IVF. Αυτό σημαίνει ότι η μετάλλαξη του γονιδίου του ER επηρεάζει αρνητικά τόσο την παραγωγή όσο και τη λειτουργικότητα των σπερματοζωαρίων. 3) Τα ERKO είχαν μικρότερο αριθμό σεξουαλικών επαφών σε σχέση με τα φυσιολογικά ποντίκια ή με ετεροζυγώτες, όταν ήρθαν σε επαφή με θηλυκά πειραματόζωα. Αυτό σημαίνει ότι η αναπαραγωγική συμπεριφορά επίσης επηρεάζεται αρνητικά στα ERKO.

Όσον αφορά το ορμονικό προφίλ, η LH και η FSH δεν διέφερε μεταξύ των ERKO των ετεροζυγωτών και των φυσιολογικών ποντικιών.

Αυτό σημαίνει ότι τα οιστρογόνα δεν είναι σημαντικά στο να ρυθμίζουν τις γοναδοτροφίνες στα ενήλικα αρρένα ποντίκια. Η τεστοστερόνη ήταν υψηλότερη στα ERKO. Από την άλλη πλευρά όταν ποντίκια ενήλικα εκτεθούν σε χαμηλές δόσεις ταμοξιφαίνης (αντιοιστρογόνο), παρουσιάζουν ελάττωση της τεστοστερόνης και της LH, ατροφία των επικουρικών γεννητικών αδένων και προβληματική σπερματογένεση. Αυτό συνέβη εξαιτίας, μάλλον, της καταστολής



της έκκρισης LH αν και υπάρχουν *in vitro* μελέτες που δείχνουν απευθείας ελάττωση της έκκρισης τεστοστερόνης από τα κύτταρα Leyding. Τα ERKO είναι ένα καλό μοντέλο για να μελετηθεί ο ρόλος των οιστρογόνων στο ενδοκρινικό σύστημα των αρρένων.

Εμφανείς μορφολογικές διαφορές υπήρξαν στα σπερματικά σωληνάρια και στο ορχικό δίκτυο, όπου παρουσιάστηκε εξοίδηση στα ERKO. Αυτό συνέπεσε με την περίοδο (10-20 ημέρες μετά τη γέννηση) όπου γίνεται η συνένωση των Sertoli κυττάρων (Sertoli-Sertoli tight junction), η παραγωγή υγρών και η δημιουργία του αυλού στα σπερματικά σωληνάρια.

Ένας πιθανός μηχανισμός που θα μπορούσε να εξηγεί το οίδημα των σπερματικών σωληναρίων είναι η υπερπαραγωγή υγρού από τα κύτταρα Sertoli. Τα οιστρογόνα ρυθμίζουν την έκφραση της N-cadherin. Στα ERKO η έλλειψη του ER τροποποιεί την έκφραση της N-cadherin και κατ'επέκταση τις συνδέσεις μεταξύ κυττάρων, οι οποίες ρυθμίζουν την ομοιόσταση των υγρών στον όρχι. Επίσης το υγρό των σπερματικών σωληναρίων περιέχει μεγάλες συγκεντρώσεις σε Na και τα οιστρογόνα ρυθμίζουν κανάλια τα οποία ενεργοποιούνται με διαφορά δυναμικού στις λείες μυϊκές ίνες μέσω CGMP. Το οίδημα στα ERKO μπορεί να οφείλεται στην έλλειψη ER ο οποίος ρυθμίζει την παραγωγή υγρών μέσω ενός τέτοιου μηχανισμού στα κύτταρα Sertoli.

Το οίδημα αυτό επίσης θα μπορούσε να οφείλεται σε ελαττωμένη απορρόφιση υγρών στα απαγωγά σωληνάρια (efferent ductules).

Είναι γνωστό ότι στα σπερματικά σωληνάρια γίνεται επαναρρόφιση υγρών, ότι απολίνωση αυτών προκαλεί εξοίδηση, ότι σ'αυτό το επιθήλιο υπάρχουν αντλίες K-Na και ότι σ'αυτή την περιοχή υπάρχουν αυξημένα επίπεδα του ER. Αν ο μηχανισμός επαναρρόφησης υγρών στα σπερματικά σωληνάρια επηρεάζεται από τα οιστρογόνα, τότε η διαταραχή της σπερματογένεσης στα ERKO οφείλεται στην βλάβη του ER.

Ένα άλλο χαρακτηριστικό είναι ότι η διαταραχή της σπερματογένεσης στα ERKO παρουσιάζει χειροτέρευση από την ουρά προς την κεφαλή της



επιδιδυμίδας. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στο ότι η αγγείωση στα ποντίκια είναι πιο πλούσια στην κεφαλή της επιδιδυμίδας. Έτσι πρώτα επηρεάζεται η ουρά της επιδιδυμίδας που έχει λιγότερο καλή αγγείωση.

Η κινητικότητα του σπέρματος και η συγκέντρωση επίσης ήταν ελαττωμένες στα ERKO. Είναι γνωστό ότι ο ER βρίσκεται στα κύτταρα Sertoli και στα επιθηλιακά κύτταρα των σπερματικών σωληναρίων. Τα germ cells επίσης έχουν την αρωματάση P450 που μετατρέπει τα Ανδρογόνα σε οιστρογόνα. Έχει υποτεθεί ότι τα οιστρογόνα που παράγονται στα germ cells θα μπορούσαν να επηρεάζουν την παραγωγή ανδρογόνων από τα κύτταρα Leyding, την έκφραση γονιδίων στα σπερμογόνα κύτταρα και την λειτουργικότητα των επιθηλιακών κυττάρων στην επιδιδυμίδα. Αυτό σημαίνει ότι οι αλλαγές στην κινητικότητα του σπέρματος και στην συγκέντρωση στα ERKO θα μπορούσε να οφείλεται στην απώλεια της δράσης των οιστρογόνων στα κύτταρα Sertoli και στα germ cells.

Επίσης τα οιστρογόνα επηρεάζουν την μεταφορά του σπέρματος και την ωρίμανση στην επιδιδυμίδα παράγοντες που είναι σημαντικοί για το να αποκτήσουν τα σπερματοζώαρια κινητικότητα και ικανότητα για γονιμοποίηση.

Οι Hess et al απέδειξαν ότι τα οιστρογόνα ρυθμίζουν την επαναρρόφηση υγρών στην κεφαλή της επιδιδυμίδας. Διαταραχή αυτής της λειτουργίας έχει σαν αποτέλεσμα να εισέρχεται το σπέρμα σε μεγάλη διάλυση (αντί να είναι συμπυκνωμένο) στην επιδιδυμίδα, και έτσι οδηγούμαστε σε υπογονιμότητα. Είναι γνωστό και στον άνθρωπο ότι η ενεργοποίηση των σπερματοζωαρίων (capacitation) εξαρτάται από το pH του σπερματικού υγρού. Τα απαγωγά σωληνάκια στον όρχι εκφράζουν τον ERA. Επίσης περιέχουν κροσσωτά κύτταρα τα οποία είναι υπεύθυνα για ανταλλαγή υγρών, αλλά και μη κροσσωτά κύτταρα τα οποία μοιάζουν με τα εγκύς σωληναριακά κύτταρα (proximal tubule cells) του νεφρού. Αυτά τα κύτταρα έχουν επαναρροφητική λειτουργία η οποία σχετίζεται με επαναρρόφηση νερού, ιόντων και πρωτεϊνών. Αυτή η μέθοδος αύξησης της συγκέντρωσης του σπέρματος εξασφαλίζει την επιβίωση και την ωρίμανση κατά την διάρκεια της στάσης του σπέρματος στην επιδιδυμίδα.



Η υπόθεση που διατύπωσαν ήταν ότι εφόσον τα απαγωγά σωληνάρια περιέχουν μεγάλες συγκεντρώσεις ER, τότε τα E συμμετέχουν στην επαναρρόφηση υγρών στον όρχι. Χρησιμοποίησαν τα ERKO ποντίκια στα οποία οι όρχεις είναι φυσιολογικοί μέχρι την ήβη, οπότε αρχίζουν να αποδιοργανώνονται και στην ηλικία των 150 ημερών είναι ατροφικοί. Η συγκέντρωση του σπέρματος στην επιδιδυμίδα είναι πολύ ελαττωμένη. Στα πειραματόζωα αυτό ο ορχικό δίκτυο έχει οίδημα καθώς και τα σπερματικά σωληνάρια. Από αυτό φαίνεται ότι τα υγρά δεν επαναροφώνται από το επιθήλιο των σωληναρίων ή ότι υπάρχει υπερέκκριση υγρών.

Τα επιθηλιακά κύτταρα των φυσιολογικών ποντικίων περιέχουν ενδοκυττάρια αγγεία και PAS και λυσοσωματικά οργανύλια, τα οποία τα συναντάμε συχνά σε κύτταρα ενεργά στην επαναρρόφηση υγρών. Αυτά τα οργανύλια είναι ελαττωμένα ή λείπουν από το επιθήλιο των ERKO. Με βάση αυτά τα δεδομένα υπέθεσαν οι Hess et al ότι η αύξηση του βάρους του όρχι αντιστοιχεί στις εκκρίσεις των σπερματικών σωληναρίων. Η αύξηση του βάρους του όρχι παρατηρείται μεταξύ 32 και 81 ημερών και μετά ελαττώνεται από τις 185 ημέρες, υποδηλώνοντας ότι η ατροφία που συμβαίνει τελικά οφείλεται στην αύξηση της πίεσης από τα υγρά των σωληναρίων (luminal fluids).

Οι ίδιοι συγγραφείς υπέθεσαν ότι αν τα σπερματικά σωληνάρια στα ERKO ήταν δυσλειτουργικά, τότε απολίνωση της επιδιδυμίδας κοντά στα σωληνάρια θα είχε σαν αποτέλεσμα τα υγρά να συσσωρεύονται πιο γρήγορα στα ERKO παρά στα φυσιολογικά ποντίκια. Το αποτέλεσμα ήταν οι όρχεις από τα ERKO ζύγιζαν 30% περισσότερο από τους όρχεις των φυσιολογικών ποντικίων. Παρολαυτά αυτά τα δεδομένα δεν αποκλείουν την πιθανότητα η αύξηση του βάρους να οφείλεται σε αυξημένη έκκριση υγρών από το σπερματικό επιθήλιο των ERKO.

Επίσης απολίνωσαν ετερόπλευρα τον ορχικό δίκτυο σε μια ομάδα από ERKO και φυσιολογικά ποντίκια. Παρατήρησαν ότι μετά 24 ώρες το επιθήλιο στα ERKO εκκρίνει σημαντικά λιγότερα υγρά. Επίσης στα ERKO τα απαγωγά σωληνάρια δεν φαίνονταν ικανά να επαναροφηθούν υγρά που προέρχονταν από



τον όρχι. Έτσι προκύπτει ότι τα οιστρογόνα θα μπορούσαν να είναι υπεύθυνα για τη ρύθμιση της μεταφοράς υγρών, με αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης του σπέρματος πριν αυτό εισέλθει στην επιδιδυμίδα.

Ένα άλλο πείραμα που πραγματοποίησαν για να εκτιμήσουν την λειτουργία των οιστρογόνων ήταν η χορήγηση αντιοιστρογόνων σε φυσιολογικά ποντίκια (το συγκεκριμένο 101182,780 αποκλείει και το ERa και τον ERb). Στο τέλος συνέκριναν την λειτουργία των σωληναρίων μεταξύ φυσιολογικών ERKO και ποντικών που είχαν εκτεθεί στο αντιοιστρογόνο.

Στα φυσιολογικά ποντίκια το επιθήλιο επανααρροφά αμέσως τα υγρά και το τοίχωμα των σωληναρίων συμπίπτει 24 ώρες μετά από απολίνωση τα σωληνάρια των φυσιολογικών ποντικιών επαναρρόφησαν το 82% των υγρών. Αντίθετα στα ERKO αυξήθηκαν τα υγρά κατά 46% και τα σωληνάρια απ'τα ποντίκια που εκτέθηκαν στο αντιοιστρογόνο μείωσαν τα υγρά κατά 14%. Έτσι τα απαγωγά σωληνάρια από τα ERKO δεν επαναρροφούν υγρά ενώ η έκθεση σε αντιοιστρογόνο εμποδίζει αρκετά την επαναρρόφηση υγρών.

Φαίνεται λοιπόν ότι ο ERa είναι πολύ σημαντικός για την φυσιολογική ανάπτυξη του όρχι κατά τη λειτουργία των απαγωγών σωληναρίων. Το γεγονός ότι τα σωληνάρια των ποντικιών που εκτέθηκαν στο αντιοιστρογόνο δεν είχαν την ίδια εξοίδηση με τα ERKO δείχνουν ότι ο μηχανισμός δράσης των οιστρογόνων δεν είναι πλήρως γνωστός. Για παράδειγμα δεν είναι γνωστό αν ο ρόλος του ERb είναι ίδιος με αυτόν του ERa. Πρόσφατες μελέτες σε HeLa κύτταρα έδειξαν ότι τα αντιοιστρογόνα και η 17-b-οιστραδιόλη προκαλούν αντίθετα αποτελέσματα στον ERb, ανάλογα στον τύπο του συμπλέγματος απόκρισης που γίνεται.

Όπως προαναφέρθηκε, τα οιστρογόνα ρυθμίζουν την έκφραση της N-cadherin στον όρχι των ποντικιών. Η έλλειψη του ER στα ERKO μπορεί να επηρεάζει την έκφραση της N-cadherin και τις συνδέσεις μεταξύ κυττάρων και κατ'επέκταση την επαναρρόφηση υγρών. Επίσης τα υγρά στο σπερματικό επιθήλιο έχουν αυξημένη συγκέντρωση Na και τα οιστρογόνα είναι γνωστό ότι ρυθμίζουν κανάλια που ενεργοποιούνται με διαφορά δυναμικού στις λείες μυϊκές ίνες με



μηχανισμό που εξαρτάται από το CGMP. Η έλλειψη έκφρασης του ER στα ERKO μπορεί να έχει σαν αποτέλεσμα διαταραχή στην επαναρρόφηση υγρών στο σπερματικό επιθήλιο, μέσω ενός τέτοιου μηχανισμού στα κύτταρα Sertoli. Αν μπορούσε λοιπόν να διευκρινιστεί πού γίνεται η ανταλλαγή υγρών στο σπερματικό επιθήλιο, θα βοηθούσε πολύ στην κατανόηση του μηχανισμού δράσης των οιστρογόνων στη λειτουργία του όρχι.

Οι Mahato et al απέδειξαν ότι τα σπερματογόνα κύτταρα (spermatogenic cells) δεν χρειάζονται τον ERα για την ανάπτυξη ή τη λειτουργία τους. Συγκεκριμένα, για να ελέγξουν αν τα germ cells ή τα σωματικά κύτταρα χρειάζονται τον ERα έκαναν το εξής πείραμα: πήραν germ cells από ποντίκια ομοζυγώτες για την μετάλλαξη στον ERα (ERα<sup>-/-</sup>) (δότες) και τα μεταμόσχευσαν σε όρχεις φυσιολογικών ποντικίων (ERα<sup>+/+</sup>) (δέκτες). Οι δέκτες είχαν εκτεθεί σε busulfan και είχαν καταστραφεί τα δικά τους germ cells. Οι δέκτες χρησιμοποιήθηκαν δηλαδή σαν «δανεικοί» πατέρες για λογαριασμό των υπογόνιμων ERα<sup>-/-</sup> ποντικίων. Όταν οι δέκτες διασταυρώθηκαν με φυσιολογικά ποντίκια θηλυκά έδωσαν απογόνους ετεροζυγώτες για τη μετάλλαξη ERα<sup>+/-</sup>. Αυτό δείχνει ότι η υπογονιμότητα στα ERα<sup>-/-</sup> οφείλεται σε διαταραχή της δράσης των οιστρογόνων στα σωματικά κύτταρα του αναπαραγωγικού συστήματος.

Οι Fisher et al βρήκαν ότι ο ERα εκφράζεται στα εμβρυικά κύτταρα Leyding, την περίοδο που ο AR δεν ανιχνεύεται, πράγμα που υποδηλώνει ότι τα οιστρογόνα περισσότερο από τα ανδρογόνα καθορίζουν την ανάπτυξη και τη λειτουργία των κυττάρων Leyding κατά τη φάση της αρρενοποίησης.

Επίσης η παρατήρηση ότι ο ERα εκφράζεται στα απαγωγά σωληνάρια σε όλες τις ηλικίες, μαζί και στην περιγεννητική, υποδηλώνει ότι τα οιστρογόνα παίζουν ρόλο στη μορφολογική και λειτουργική ανάπτυξη των σωληναρίων στον όρχι.

Οι Krege et al περιέγραψαν μια γενιά ποντικίων στα οποία δεν εκφράζεται ο ERβ (ERβ<sup>-/-</sup>). Αυτά τα ποντίκια αναπτύχθηκαν φυσιολογικά και δεν διέφεραν αδρά και ιστολογικά από τους γονείς τους. Όταν διασταυρώθηκαν τα θηλυκά



ποντίκια με αρσενικά (και τα δύο ERb<sup>-1</sup>) φάνηκε ότι είναι γόνιμα με φυσιολογική σεξουαλική συμπεριφορά, αλλά δίνουν μικρότερο αριθμό απογόνων. Πειράματα με πρόκληση ωορρηξίας έδειξαν ότι η επηρεασμένη γονιμότητα είναι αποτέλεσμα της μειωμένης επάρκειας της ωοθήκης. Τα αρσενικά δεν δείχνουν προβλήματα και αναπαράγονται φυσιολογικά, όταν όμως προχωρά η ηλικία τους αναπτύσσουν υπερπλασία του προστάτη και της κύστης. Έτσι φαίνεται ότι ο ERb είναι σημαντικός για την ωορρηξία, αλλά όχι για τη διαφοροποίηση των φύλων, τη γονιμότητα και το θηλασμό. Χρειάζονται μελέτες για να καθοριστεί ο ρόλος του στην ομοιόσταση των οστών και του καρδιαγγειακού.

Οι Rubertsan et al εξέτασαν την σπερματογένεση σε ποντίκια στα οποία δεν υπάρχει αρωματάση, εξαιτίας μετάλλαξης στο γονίδιο *cyp19*. Τα ποντίκια αυτά ARKO ήταν αρχικά γόνιμα, αλλά προοδευτικά ανέπτυξαν υπογονιμότητα μεταξύ 4,5 και 12 μηνών χωρίς ορμονικές διαταραχές. Η σπερματογένεση είχε σταματήσει σε πρώιμα στάδια με σημαντική μείωση των στρογγυλών και επιμήκων σπερματιδίων. Επίσης παρατηρήθηκε υπερπλασία και υπερτροφία των κυττάρων Leyding, προφανώς λόγω αύξησης της LH. Τα δεδομένα αυτά δείχνουν έναν απευθείας ρόλο των οιστρογόνων στην ανάπτυξη των germ cells. Επίσης στα ARKO ποντίκια παρατηρήθηκε προβληματική ανάπτυξη του ακροσώματος. Τα κύτταρα Leyding παρουσίασαν υπερπλασία και έτσι μπορούμε να υποθέσουμε ότι αυτά εκφράζουν υπερβολικά ή λίγο παράγοντες που επηρεάζουν την σπερματογένεση. Δεν είναι σαφές εδώ το γιατί η προβληματική σπερματογένεση αργεί να εκδηλωθεί, είναι προοδευτική.

Στα ποντίκια ARKO υπήρξε προβληματική ανάπτυξη του ακροσώματος. Η αρωματάση εκφράζεται ισχυρά στις πρώιμες στρογγυλές σπερματίδες και ιδιαίτερα στο σύστημα Golgi. Φαίνεται από αυτά τα στοιχεία ότι η τυπική έκφραση της αρωματάσης είναι σημαντική για την δομή του ακροσώματος. Αυτό είναι ένα ερώτημα-υπόθεση που θα πρέπει να εξεταστεί.





Έχει βρεθεί ότι η αρωματάση P450 και ο ERb συνυπάρχουν στο σπερματικό επιθήλιο. Θα ήταν πιθανό, οι δράσεις των οιστρογόνων στην ανάπτυξη των germ cells να είναι αποτέλεσμα παρακρινούς ή και ενδοκρινούς δράσης τους. Τα ευρήματα στα ARKO ποντίκια και η ανεπάρκεια της αρωματάσης στον άνθρωπο που έχει σαν συνέπεια έναν συγκεκριμένο φαινότυπο στα οστά, υποδηλώνει έναν ρόλο των οιστρογόνων σαν τοπικά δρώσα ορμόνη, πράγμα το οποίο επίσης πρέπει να διευκρινιστεί.

Ένας άλλος φαινότυπος ARKO έχει περιγραφεί όπου απουσιάζουν τα εξώνια 1 και 2. αυτά τα ποντίκια ήταν υπογόνιμα με προβληματική σεξουαλική συμπεριφορά, παρόλο που υπήρχε σπέρμα στις επιδιδυμίδες.

Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι μειωτικά και μεταμειωτικά germ cells εκφράζουν την αρωματάση, η οποία παραμένει ενεργός στα σπερματοζώαρια καθώς αυτά πηγαίνουν στην επιδιδυμίδα. Αυτό αυξάνει την πιθανότητα ότι τα σπερματοζώαρια ρυθμίζουν οιστρογονοεξαρτώμενες λειτουργίες στα απαγωγά σωληνάκια, όπως την επαναρρόφηση υγρών. Αναφορές ότι η συγκέντρωση των οιστρογόνων στα υγρά του ορχικό δίκτυο και στην κεφαλή της επιδιδυμίδας του ποντικίου συμβάλλουν σ' αυτή την υπόθεση.

Μια άλλη απόδειξη ότι τα οιστρογόνα παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανδρική γονιμότητα, είναι το γεγονός ότι αυξημένη έκθεση σε εξωγενή οιστρογόνα κατά την περιγεννητική περίοδο προκαλεί βλάβη στη δομή του αναπαραγωγικού συστήματος και οδηγεί στη δημιουργία όγκων στα σωματικά κύτταρα στα ποντίκια και στους ανθρώπους. Επίσης φαρμακολογικές δόσεις οιστρογόνων που δόθηκαν σε ποντίκια, ελαττώνουν το βάρος των επικουρικών αδένων και τον αριθμό των σπερματίδων και το σπέρμα. Πιθανόν τα οιστρογόνα του περιβάλλοντος να ευθύνονται για τη μείωση του σπέρματος, την αύξηση των προβλημάτων στην ανάπτυξη του αναπαραγωγικού συστήματος και την μεγαλύτερη συχνότητα των όγκων των όρχεων τις τελευταίες πέντε δεκαετίες.



Στον άνθρωπο υπάρχει μια αναφορά σε μετάλλαξη στον ERα και μια άλλη με μετάλλαξη στην αρωματάση P450. Στην πρώτη περίπτωση (Smith *et al*) ο ασθενής παρουσίαζε ατελή σύγκλιση των επιφύσεων, φυσιολογική ενήβωση και μελανοειδή ακάνθωση. Η συγκέντρωση της οιστραδιόλης και της οιστρονής ήταν αυξημένες, της τεστοστερόνης φυσιολογική και της FSH και LH αυξημένες. Επίσης παρουσίαζε παθολογική ανοχή στη γλυκόζη και μειωμένη οστική πυκνότητα. Η θεραπεία με οιστρογόνα δεν απέδωσε. Η μετάλλαξη βρισκονταν στο εξώνιο 2 C→T στο κωδικόνιο 157 και στα δύο αλληλία που οδήγησε σε stop codon. Οι γονείς ήταν ετεροζυγώτες και συγγενείς μεταξύ τους. Το συμπέρασμα είναι ότι διαταραχή του ER στον άνθρωπο δεν είναι θανατηφόρα και ότι τα οιστρογόνα είναι σημαντικά για την ομοιοστασία των οστών.

Στην δεύτερη περίπτωση (carani *et al*) ο ασθενής ήταν ομοζυγώτης για μια μετάλλαξη που απενεργοποιούσε την έκφραση του γονιδίου της αρωματάσης P450. Ο όγκος όρχεων ήταν μικρότερος του φυσιολογικού και στην ηλικία των 28 ετών είχε μη σύγκλιση των επιφύσεων και οστεοπενία. Επίσης είχε ολιγοσπερμία και ασθενοσπερμία. Η θεραπεία με γοναδοτροφίνες δεν βελτίωσε το σπέρμα. Ο όγκος όρχεων ήταν ελαττωμένος, χωρίς άλλα παθολογικά ευρήματα όσον αφορά την ανατομία του γεννητικού συστήματος. Η τεστοστερόνη ήταν φυσιολογική, η FSH και LH ελαφρά αυξημένες.

Η βιοψία όρχεος έδειξε υποσπερματογένεση και germ cell arrest. Θεραπεία με οιστρογόνα βελτίωσε την κλινική εικόνα αλλά όχι τον όγκο των όρχεων και σπερμοδιάγραμμα.

Η αποτυχία της θεραπείας με οιστρογόνα μάλλον σημαίνει ότι η διαταραχή της σπερματογένεσης δεν είναι οιστρογόνοεξαρτώμενη.

Μια άλλη περίπτωση ασθενών με ανεπάρκεια της αρωματάσης περιγράφηκε από τον Morishima. Ο ασθενής αυτός είχε αυξημένες LH και FSH και τεστοστερόνη ενώ τα οιστρογόνα ήταν χαμηλά. Τα εξω γεννητικά όργανα ήταν φυσιολογικά αλλά ο όγκος όρχεων αυξημένες. Σπερμοδιάγραμμα δεν έγινε.



Όσον αφορά τη μελέτη των πολυμορφισμών του γονιδίου του ERa ελάχιστα έχουν δημοσιευτεί. Ο Yashuro et al ανέλυσε τους πολυμορφισμούς στο εξώνιο 4 του ERa σε ασθενείς με ιδιοπαθή αζωοσπερμία και βρήκε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική σχέση.

Σχέση μεταξύ συγκεκριμένων πολυμορφισμών του γονιδίου του ERa με γυναικεία υπογονιμότητα έχει βρεθεί σε δύο ανεξάρτητες μελέτες σε ασθενείς που υποβλήθηκαν σε IVF από την Ελλάδα (Georgiou et al) και η Σιγκαπούρη (Sundarrayan et al).

Στην παρούσα μελέτη φαίνεται ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των πολυμορφισμών του γονιδίου του ERa και της ανδρικής υπογονιμότητας. Όσον αφορά τον πολυμορφισμό PVUII δεν βρέθηκε συσχέτιση πιθανόν λόγω της διαφοράς της συχνότητας των δύο πολυμορφισμών του ERa στην ομάδα ελέγχου. Όσον αφορά τον πολυμορφισμό xba1, η συχνότητα του γονότυπου xx (φυσιολογικού) ήταν σημαντικά χαμηλότερη στην ομάδα των αζωοσπερμικών (ομάδα Γ) σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.

Είναι γνωστό ότι για την εκτίμηση της γενετικής προδιάθεσης σε νοσήματα μονογονιδιακά είναι σχετικά εύκολη. Δεν συμβαίνει το ίδιο για νοσήματα ή χαρακτήρες που είναι πολυπαραγοντικά. (επηρεάζονται δηλαδή από περισσότερα του ενός γονίδια).

Σε αυτές τις περιπτώσεις τα γονίδια που συμβάλλουν στην έκφραση ενός νοσήματος δεν είναι καθοριστικά από μόνα τους αλλά συμβάλλουν έμμεσα στη γενετική προδιάθεση σε συνεργασία με άλλους παράγοντες (π.χ. περιβαλλοντικούς).

Τα αποτελέσματα τόσο αυτά που αφορούν τους πολυμορφισμούς του AR όσο και του ER δείχνουν ότι αυτοί σχετίζονται με την ανδρική υπογονιμότητα και ότι θα μπορούσαν να παρουσιάζουν συνέργεια στην εξέλιξη της διαταραχής αυτής.

Ένα ερώτημα λοιπόν που προκύπτει είναι κατά πόσο ο ERa είναι υποψήφιο γονίδιο για υπογονιμότητα από μόνο του ή σε συνδιασμό με άλλα γονίδια ή και παράγοντες που δεν έχουν ακόμα μελετηθεί.



Ο μηχανισμός δράσης των οιστρογόνων στον όρχι δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί. Παρόλο που μόνο ένας άνδρας με ανεπάρκεια του Ega έχει βρεθεί, από μελέτες των Hess et al, φαίνεται ότι τα οιστρογόνα έχουν καθοριστικό ρόλο στη σπερματογένεση. Έτσι θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη ο παράγοντας αυτός στην εκτίμηση της ανδρικής υπογονιμότητας. Επίσης το εύρημα αυτό είναι ενδιαφέρον για έρευνα μιας πιθανής σχέσης μεταξύ της έκπτωσης της αναπαραγωγικής ικανότητας των ανδρών και της έκθεσης στα οιστρογόνα του περιβάλλοντος.

Μέχρι σήμερα υπάρχουν αρκετές μελέτες, σχετικά με τους πολυμορφισμούς του υποδοχέα των ανδρογόνων, που αναφέρονται σε διαφορετικούς πληθυσμούς. Οι Misfud et al αναφέρονται σε μια ομάδα υπογόνιμων ανδρών από τις ΗΠΑ και μια δεύτερη από την Σιγκαπούρη. Από αυτές φαίνεται ότι οι African Americans έχουν λιγότερες επαναλήψεις από τους υπόλοιπους Αμερικανούς. Επίσης οι Ασιατικοί πληθυσμοί έχουν μεγαλύτερο μήκος CAG επαναλήψεων.

Οι Tut et al χρησιμοποιώντας πληθυσμό από την Κίνα έδειξαν ότι  $\geq 28$  επαναλήψεις GLU στον AR βρίσκονταν στατιστικά πιο συχνά στον πληθυσμό των υπογόνιμων (odds ratio 4.02). το αντίθετο φαινόμενο παρατηρήθηκε για επαναλήψεις  $\leq 23$ .

Οι Giwrcman et al (5-5) χρησιμοποιώντας πληθυσμό από τη Σουηδία δεν βρήκαν σχέση μεταξύ CAG επαναλήψεων και υπογονιμότητας. Αυτό δικαιολογείται είτε από το γεγονός ότι στον συγκεκριμένο πληθυσμό ο αριθμός των επαναλήψεων ήταν γενικά μικρότερος είτε γιατί ο αριθμός των ασθενών ήταν πολύ μικρός.

Οι Legius et al χρησιμοποιώντας πληθυσμό από το Βέλγιο βρήκαν ότι οι περισσότεροι άνδρες με προβλήματα σπερματογένεσης είχαν μεγαλύτερο μήκος επαναλήψεων CAG σε σχέση με τον πληθυσμό ελέγχου, και οδηγήθηκαν στην υπόθεση ότι αυξημένος αλλά φυσιολογικός αριθμός επαναλήψεων πιθανόν να



είναι σημαντικός παράγοντας αν και άλλοι παράγοντες επηρεάζουν αρνητικά την σπερματογένεση. Αυτό επίσης δηλώνει ότι η διαταραχή της σπερματογένεσης είναι πολυπαραγοντική.

Επίσης σε όλους τους παραπάνω πληθυσμούς βρέθηκε ότι ο μεγάλος αριθμός επαναλήψεων του τρινουκλεοτιδίου CAG σχετίζονταν με υπογονιμότητα, πράγμα το οποίο σημαίνει ότι αυτός ο συσχετισμός δεν επηρεάζεται από την εθνικότητα.

Όσο αναφορά την δική μας μελέτη δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά στην συχνότητα και τον μέσο όρο των CAG επαναλήψεων. Η συχνότητα των μεγαλύτερων επαναλήψεων (>30) του CAG στον AR ήταν μεγαλύτερη στην ομάδα της ιδιοπαθούς σοβαρής ολογοσπερμίας και στην ομάδα της άζωοσπερμίας. Αυτό δείχνει ότι όσο μεγαλύτερο είναι το μήκος αυτών των επαναλήψεων τόσο περισσότερο αυξάνεται ο κίνδυνος για την διαταραχή της σπερματογένεσης.

Δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στο μέσο όρο και στην κατανομή των επαναλήψεων CAG, αλλά η συχνότητα των μεγαλύτερων μήκους επαναλήψεων  $n > 30$  CAG βρέθηκε στην ομάδα των ασθενών με προβληματική σπερματογένεση. Αυτό αποτελεί ένδειξη ότι ο αυξημένος αριθμός επαναλήψεων σχετίζεται με υπογονιμότητα.

Όσον αφορά τον φαινότυπο των ασθενών αυτών δεν υπήρχε τίποτε συγκεκριμένο. Ο όγκος όρχεων, η κατανομή της τριχοφυΐας και τα επίπεδα της FSH δεν διέφεραν από την ομάδα ελέγχου. Το ίδιο αναφέρεται και σε άλλες μελέτες.

Βρέθηκε στην ομάδα της ιδιοπαθούς άζωοσπερμίας ότι οι LH και FSH ήταν οριακά αυξημένες ενώ η T ήταν φυσιολογική. Αυτό δηλώνει πιο πολύ μειωμένη λειτουργικότητα των κυττάρων Leyding σε αντίθεση με υψηλή LH και T που συμβαίνει σε ασθενείς με ανοχή στα ανδρογόνα η οποία οφείλεται σε σημειακές μεταλλάξεις στο γονίδιο του AR.



Ασθενείς με μικρό αριθμό επαναλήψεων CAG έχουν μικρότερο κίνδυνο για υπογονιμότητα. Άνδρες με  $\leq 19$  επαναλήψεις είχαν μόνο το 1/10 του κινδύνου για υπογονιμότητα που είχαν άνδρες με  $\geq 26$  επαναλήψεις.

Είναι όμως γνωστό ότι μήκος 22 CAG επαναλήψεων είναι το σημείο όπου αυξάνεται ο κίνδυνος για καρκίνο προστάτη (3-17). Ο καρκίνος του προστάτη είναι ανδρογονοεξαρτώμενος και η θεραπεία του είναι συνήθως αναστολή των ανδρογόνων. Έτσι φαίνεται ότι ο καρκίνος του προστάτη και η υπογονιμότητα αντιπροσωπεύουν τα δύο αντίθετα άκρα της δραστηριότητας του υποδοχέα των ανδρογόνων.

Ασθενείς με μεταλλάξεις στον AR οι οποίες οδηγούν σε ελάττωση της λειτουργικότητάς του επίσης παρουσιάζουν βλάβες στην σπερματογένεση (3:18-20).

Οι Hiart et al έδειξαν ότι ασθενείς με μεταλλάξεις στο AR είχαν ολιγοτεροσπερμία. Επίσης Tesarik et al έδειξαν ότι η T ενισχύει τα αποτελέσματα της FSH, προλαμβάνοντας την απόπτωση των κυττάρων Sertoli. Από την άλλη πλευρά η FSH καθορίζει την έκφραση του AR στα κύτταρα Sertoli. Έτσι διακυμάνσεις στην έκφραση του AR επηρεάζουν την ωρίμανση του σπέρματος παρά οδηγούν σε απουσία σπερματογένεσης.

Αν λάβουμε υπόψη όλα αυτά τα δεδομένα βλέπουμε ότι οι πολυμορφισμοί που αφορούν στο μήκος των επαναλήψεων του CAG καθορίζουν αντιστρόφως την λειτουργία του AR. Όσο μικρότερος είναι ο κίνδυνος για υπογονιμότητα, τόσο αυξάνεται η πιθανότητα για μικρότερη ηλικία εμφάνισης του καρκίνου του προστάτη και χειρότερη κλινική εικόνα.

Σ' αυτό χρειάζονται προοπτικές μελέτες.

Έχει δειχθεί σε προηγούμενη μελέτη ότι περίπου 40% των ασθενών με πολλές επαναλήψεις του CAG ήταν αζωοσπερμικοί, αλλά στην ιστολογική ανευρίσκονταν σπερματοζωάρια στο σπερματικό επιθήλιο. Αυτό σημαίνει ότι η βασική λειτουργία της σπερματογένεσης υπάρχει. Θα μπορούσε να διερευνηθεί αν



ενδοορχικά επίπεδα ανδρογόνων θα μπορούσαν να βελτιώσουν την σπερματογένεση σ' αυτούς τους ασθενείς.

In vitro πειράματα έδειξαν ότι όσο μεγαλύτερος ο αριθμός επαναλήψεων του CAG τόσο μικρότερη η μεταγραφική δραστηριότητα του AR.

Οι Choong et al υπέθεσαν ότι ο αυξημένος αριθμός CAG θα μπορούσε να συνδυάζεται με ελάττωση του mRNA και παραγωγής πρωτεΐνης. Γυναίκες με ιδιοπαθή υπερτρίχωση αλλά φυσιολογική τεστοστερόνη παρουσιάζουν αντίστροφη σχέση μεταξύ του βαθμού υπερτρίχωσης και του αριθμού επαναλήψεων CAG. Αντίστοιχα και στον καρκίνο του προστάτη, όσο μικρότερος ο αριθμός των επαναλήψεων τόσο πιο μικρή η ηλικία έναρξης της νόσου και τόσο χειρότερη είναι η κλινική εικόνα. Αυτές οι παρατηρήσεις υποδηλώνουν ότι οι πολλές επαναλήψεις μπορεί να ελαττώνουν την μεταγραφική ικανότητα του AR οδηγώντας σε υπογονιμότητα ενώ οι λίγες την αυξάνουν οδηγώντας σε καρκίνο προστάτη

Αριθμός επαναλήψεων ακόμη μεγαλύτερος  $n > 41$  ( $n = 38-62$ ) οδηγεί στη νόσο του Kennedy. Έτσι φαίνεται ότι αριθμός επαναλήψεων  $31 < n < 40$  επηρεάζει την λειτουργικότητα του AR  $n \geq 40$  έχει σαν αποτέλεσμα και νευροτοξικότητα.

Στους ασθενείς με νόσο Kennedy επίσης παρουσιάζονται βλάβες στην σπερματογένεση αλλά μεταξύ 40 και 50 ετών. Δηλαδή οι πιο πολλοί από αυτούς τους ασθενείς είναι γόνιμοι. Αυτό το εύρημα θέτει ερωτηματικά για το κατά πόσο είναι αιτιολογική η σχέση μεταξύ αυξημένου αριθμού επαναλήψεων CAG και διαταραχή της σπερματογένεσης. Όμως όπως έχει δειχθεί και στις in vitro μελέτες, η μικρή ελάττωση της μεταγραφικής ικανότητας του AR μπορεί να συνδυάζεται με μεταλλάξεις σε άλλα άγνωστα γονίδια που συμμετέχουν στη σπερματογένεση και συνδέονται λειτουργικά με τον AR.

Αφού υπάρχει ένδειξη ότι υπάρχει γονίδιο που σχετίζεται με τη σπερματογένεση το οποίο εκφράζεται κάτω από τον έλεγχο του AR θα πρέπει να διερευνηθεί η αιτιολογική σχέση μεταξύ της μεταβολής της δραστηριότητας του AR και της σοβαρής υπογονιμότητας.



Επίσης θα πρέπει να μελετηθεί ο αριθμός των επαναλήψεων CAG του AR στις οικογένειες (μητέρες και απογόνους) των υπογόνιμων ανδρών, για να βρεθεί ποιος είναι ο πρώτος αριθμός επαναλήψεων CAG στο οικογενειακό δέντρο και για να αποδειχθεί η απουσία σε γόνιμους συγγενείς. Οι μελέτες αυτές σε οικογένειες με μεγαλύτερο αριθμό επαναλήψεων CAG χρειάζεται για να αποδειχθεί αν υπάρχει anticipation όπως έχει βρεθεί σε άλλα νοσήματα με αυξημένο αριθμό τρινουκλεοτιδίων .

Ελάχιστα δεδομένα υπάρχουν για τον ρυθμό αύξησης των επαναλήψεων CAG όταν αυτός ο αριθμός είναι μικρότερος από αυτόν που συναντάμε στη νόσο του Kennedy. Έτσι χρειάζονται μελέτες που να εξετάζουν τη συχνότητα και την μεταδοτικότητα σε επόμενες γενιές των επαναλήψεων CAG που σχετίζονται με τη σπερματογένεση. Με αυτόν τον τρόπο μπορεί να διερευνηθεί ο ρόλος των μεταλλάξεων και πολυμορφισμών του γονιδίου του AR σε σχέση με τη σπερματογένεση, και επίσης μπορεί να καθοριστεί η βάση για γενετική συμβουλή υπογόνιμων ανδρών που καταφεύγουν σε ICSI σχετικά με την ασφάλεια αυτής της μεθόδου.

Σύμφωνα με τους Dowsing et al απόγονοι ασθενών που προκύπτουν μετά από ICSI, όταν ο αριθμός επαναλήψεων είναι στατιστικά αυξημένος αλλά οριακός (από  $n=20-23$  κατά Dowsing και  $n=21-28$  κατά Tut) ο κίνδυνος για υπογονιμότητα είναι ο ίδιος με αυτόν όταν  $n=9-36$  (δηλαδή φυσιολογικό).

Όσον αφορά τη νόσο Kennedy, ο αριθμός των επαναλήψεων CAG σε γόνιμους άνδρες χωρίς σημεία νευρολογικού νοσήματος είναι 9 έως 36. Έτσι δεν είναι λογικό να περιμένουμε αύξηση των επαναλήψεων όταν  $n < 36$ . Στους υπογόνιμους άνδρες κατά Dowsing  $n < 23$ . Όπως φαίνεται δεν είναι πιθανό να συμβεί αύξηση των επαναλήψεων όταν ο αριθμός  $n < 36$  και δεν υπάρχει κίνδυνος για νόσο Kennedy σε απογόνους υπογόνιμων ανδρών που προέκυψαν από ICSI.

Όπως φαίνεται αυξημένος αριθμός επαναλήψεων CAG στο N τελικό άκρο του γονιδίου του AR σχετίζεται με μειωμένη λειτουργικότητα του AR. Ένας πιθανός μηχανισμός έχει σχέση με την ταυτοποίηση μιας πυρηνικής G πρωτεΐνης,





Ras-εξαρτώμενη πρωτεΐνη του πυρήνα/ARA24, η οποία δρα σαν συν-ενεργοποιητής με τον AR και μπορεί να συνδέεται διαφορετικά με διάφορα μήκη CAG στον AR. Η αλληλεπίδραση μεταξύ CAG επαναλήψεων του AR και ARA24 γίνεται ισχυρότερη όταν ο αριθμός CAG ελαττώνεται, ενώ αυξάνεται η ενεργοποίηση και η μεταγραφική ικανότητα του AR. Παρόλο που αύξηση της ενεργοποίησης του AR, με κάθε μείωση των επαναλήψεων CAG, είναι μικρή, αυτά τα φαινόμενα είναι γενετικά καθορισμένα και καθορίζουν το αποτέλεσμα κατά τη διάρκεια της ζωής. Μικρές αλλαγές μπορεί να έχουν σημαντικά παθολογικά αποτελέσματα με την πάροδο του χρόνου. Φαίνεται ότι η επανάληψη CAG παίζει ρόλο στη λειτουργικότητα του AR ρυθμίζοντας την ισορροπία ανάμεσα σε πολύ αυξημένη ή ανεπαρκή λειτουργία του. Η πολυμορφική φύση αυτών των επαναλήψεων αντιπροσωπεύει μια ποικιλομορφία του AR μεταξύ ατόμων, οδηγώντας πιθανόν αλληλόμορφους με εξελικτικά πλεονεκτήματα να επιλεγούν γρήγορα και να κληρονομηθούν στις επόμενες γενιές.

Λαμβανοντας υποψη τα υπαρχοντα δεδομενα για το ρολο του AR και του ER στην ανδρικη υπογονιμοτητα, είναι προφανες ότι οι πολυμορφισμοι των γονοδιων και των δυο υποδοχεων είναι υπευθυνοι για την υπογονιμοτητα και ότι μια πιθανη συνεργεια ενδεχομενωσ συμμετεχει στην εξελιξη αυτης της διαταραχης.



## Ε. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Με την παρούσα μελέτη έγινε προσπάθεια για κατανόηση της λειτουργίας του υποδοχέα των ανδρογόνων και των οιστρογόνων ώστε να φανεί από την πλευρά της γενετικής η συμμετοχή των πολυμορφισμών των γονιδίων των παραπάνω υποδοχέων στην ανδρική υπογονιμότητα.

Απ'ο τα αποτελέσματα προκύπτει ότι καταλήγουμε στα εξής συμπεράσματα

1) Αυξημένος αριθμός επαναλήψεων (CAG)<sub>n</sub> στο γονίδιο του υποδοχέα των ανδρογόνων, συνδιάζεται με υπογονιμότητα (ολιγοασθενοσπερμία ή αζωοσπερμία), και στον ελληνικό πληθυσμό όπως έχει αποδειχθεί και σε άλλες μελέτες που αφορούν διαφορετικούς πληθυσμούς.

Ο πολυμορφισμός που αφορά το μήκος των επαναλήψεων (CAG)<sub>n</sub> καθορίζει αντιστρόφως ανάλογα τη λειτουργικότητα του AR.

2) Το γεγονός ότι ο αυξημένος αριθμός επαναλήψεων (CAG)<sub>n</sub> του γονιδίου του AR βρέθηκε σε μεγαλύτερη συχνότητα στις ομάδες ασθενών με ολιγοτεροασθενοσπερμία ή αζωοσπερμία, δείχνει ότι πιθανόν να είναι αυτός σημαντικός παράγοντας υπογονιμότητας όταν και άλλοι παράγοντες επηρεάζουν αρνητικά τη σπερματογένεση δείχνοντας ότι η σχέση μεταξύ αυξημένου αριθμού επαναλήψεων (CAG)<sub>n</sub> και υπογονιμότητας μπορεί να μην είναι αιτιολογική. Αυτό δηλώνει ότι η διαταραχή της σπερματογενεσης είναι πολυπαραγοντική.

3) Στην ομάδα ασθενών της δικής μας μελέτης δεν υπήρχε αριθμός επαναλήψεων (CAG)<sub>n</sub> μεγαλύτερος του 40, ούτε σημεία νευροτοξικότητας στους ασθενείς. Ο αριθμός των επαναλήψεων ήταν  $30 < n < 40$  στις ομάδες των υπογόνιμων ανδρών,



υποδηλώνοντας ότι ο αυξημένος αυτός αριθμός μπορεί να ελαττώνει τη μεταγραφική ικανότητα του υποδοχέα οδηγώντας σε υπογονιμότητα.

4) Στην παρούσα μελέτη φαίνεται συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού Xba I του γονιδίου του υποδοχέα των οιστρογόνων και ανδρικής υπογονιμότητας ( για πρώτη φορά σε ανθρώπινο πληθυσμό).

5) Τα αποτελέσματα που αφορούν τόσο τον AR όσο και τον ER οδηγούν στο συμπέρασμα ότι οι παραπάνω πολυμορφισμοί συμμετέχουν στην ανδρική υπογονιμότητα. Πιθανόν να παρουσιάζουν συνέργεια μεταξύ τους, όσον αφορά την εξέλιξη του φαινομένου της ανδρικής υπογονιμότητας, αλλά κάτι τέτοιο στην παρούσα μελέτη δεν μπορεί να δειχθεί, λόγω του μικρού αριθμού των ασθενών.



## ΣΤ. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η μελέτη αυτή σκοπό έχει να εξετάσει την σχέση μεταξύ ανδρικής υπογονιμότητας και πολυμορφισμών των γονιδίων του υποδοχέα των ανδρογόνων και του υποδοχέα των οιστρογόνων.

Μελετήθηκαν 173 άνδρες εκ των οποίων οι 64 ανήκαν στην ομάδα ελέγχου (ομάδα Α) (υγιείς άνδρες αποδεδειγμένης γονιμότητας). Στην ομάδα Β ανήκαν 29 άνδρες με ιδιοπαθή μέτρια oligospermia ( $10-20 \times 10^6$  σπερματοζώαρια/ml). Στην ομάδα C ανήκαν 42 άνδρες με αζωοσπερμία ή ιδιοπαθή σοβαρή oligospermia ( $<10^6$  σπερματοζώαρια/ml). Στην ομάδα D ανήκαν 38 άνδρες με αζωοσπερμία ή σοβαρή oligospermia γνωστής αιτιολογίας.

Έγινε εξαγωγή DNA από περιφερικό αίμα. Για τον ER έγινε αντίδραση PCR (κατά Yaich et al. 1992): Ακολούθησε πέψη του προϊόντος με περιοριστική ενδονουκλεάση (Xba<sub>1</sub> και Pvu II) και ηλεκτροφόρηση για διαχωρισμό των κλασμάτων (x ή p είναι τα αλληλία με την παρουσία του πολυμορφισμού και X ή P για την απουσία του).

Ο αριθμός των επαναλήψεων (CAG) ή του AR προσδιορίστηκε με τη μέθοδο που περιέγραψαν οι La Spada et al. 1991.

Η στατιστική ανάλυση έγινε με Statistica package και  $\chi^2$  test και Hardy-Weinberg equilibrium.

Τα αποτελέσματα σχετικά με τον ER, δείχνουν ότι όσον αφορά τον πολυμορφισμό PvuII δεν βρέθηκε στατιστική διαφορά μεταξύ των ομάδων.



Όσον αφορά τον πολυμορφισμό Xba1 ο γονότυπος xx ήταν στατιστικά λιγότερο συχνός στην ομάδα C (αζωοσπερμία ή ιδιοπαθής σοβαρή oligospermia). Ο γονότυπος XX (φυσιολογικός) ήταν πιο συχνός σ' αυτή την ομάδα.

Για τον AR ο αριθμός επαναλήψεων (CAG) η >30 βρέθηκε να είναι τέσσερις φορές πιο συχνός στην ομάδα B (ιδιοπαθής μέτρια oligospermia) και 4-5 φορές πιο συχνός στην ομάδα C (αζωοσπερμία ή ιδιοπαθής σοβαρή oligospermia) και 2 φορές πιο συχνός στην ομάδα D (αζωοσπερμία ή oligospermia γνωστής αιτιολογίας).

Τόσο οι υποδοχείς των ανδρογόνων λοιπόν όσο και οι υποδοχείς των οιστρογόνων παίζουν καθοριστικό ρόλο στην αδρική υπογονιμότητα. Είναι επίσης πιθανό να υπάρχει συνεργεία μεταξύ των προβληματικών γονοτύπων.



## Z. Summary

Abnormal human spermatogenesis is caused by a variety of genetic and acquired conditions. It is established that spermatogenesis is dependent on androgens and some males may have a minimal form of androgen insensitivity that does not inhibit virilization but impairs fertility.

The role of the ER in human spermatogenesis is not clear yet. Experiments in rats have shown that targeted disruption of the ER $\alpha$  causes defective spermatogenesis because of impairment of estrogen action in somatic cells of the testis; (ERKO mice). There is only one man with estrogen resistance and infertility in the literature.

We studied 173 greek men: 64 controls group A (men of proven fertility), 29 men with idiopathic moderate oligospermia (group B), 42 men with azoospermia or idiopathic severe oligospermia (group C) and 38 men with azoospermia or oligospermia of known aetiologies (group D).

All patients undergone full clinical and hormonal evaluation and they were genotyped for the (CAG) $n$  repeat length polymorphism and for two polymorphisms of the estrogen receptor alpha gene.

The frequency of the higher repeats ( $n > 30$ ) of the (CAG) $n$  repeat sequence of the AR was 4 times higher in group B, 4-5 times higher in group C and 2 times higher in group D, compared with the control group.

Regarding the PvuII polymorphism of the ER $\alpha$  gene we did not find any significant difference between the groups.

Regarding the Xba $_1$  polymorphism of the ER $\alpha$  gene we observe that the xx (homozygous positive) genotype was less frequent in group C. the genotype XX (homozygous negative) was more frequent in group C, indicating an association of the Xba $_1$  polymorphism of the ER $\alpha$  gene azoospermia or severe idiopathic oligospermia.

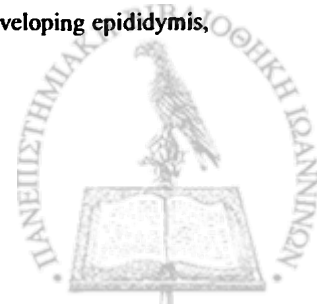


Our results are suggestive that both ER $\alpha$  and AR gene polymorphisms are associated with infertility and they also could play a synergistic role in the impairment of spermatogenesis.



## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **Aiman J, Griggin J.E, Gazar J.M. et al.** Androgen insensitivity as a cause of infertility in otherwise normal men. *N. Engl. J. Med* 1979; 300:223-27
2. **Aiman J. and Griffin JE:** The frequency of androgen receptor deficiency in infertile men. *J Clin Endocrinol Metab* 1982; 54: 725-732.
3. **Andersen T.I, Heimdal K.R, Skrede M, Tveit K, Berg K, Borresen A.L.** Oestrogen receptor (ESR) polymorphisms and breast cancer susceptibility. *Hum Genet* 1994; 94:665-70
4. **Azzouzi A.R, Cochand-Priollet B, Mangin P, Fournier G, Berthon P, Latil A, Cussenot O.** Impact of constitutional genetic variation in androgen/oestrogen-regulating genes on age-related changes in human prostate. *Eur J Endocrinol* 2002; 147:479-84
5. **Baker H.W.G, Burger H.G, de Kretser D.M, Lording D.W, Mc Gowan P. and Rennie G.C.** Factors affecting the variability of semen analysis results in infertile men. *Int J. Androl.* 1981; 4:609
6. **Balic I, Graham S.T, Troyer D.A, Higgins B.A, Pollock B.H, Johnson-Pais T.L, Thompson I.M, Leach R.J.** Androgen receptor length polymorphism associated with prostate cancer risk in Hispanic men. *J Urol* 2002; 168:2245-48
7. **Beato M, Herrlich P, Schutz G.** Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. *Cell* 1995; 83:851-57
8. **Beato M.** Gene regulation by steroid hormones. *Cell* 1989; 56:335-344
9. **Berg J.P.** Oestrogens – essential for reproduction in males, too. *European J Endocrinol* 1998; 138:497-98
10. **Berkovitz G.D, Brown T.R, Migeon C.J.** Androgen receptors. *Lancet* 1983; 344:826-827
11. **Bhatnagar A.S, Muller P, Schenkel L, Trunet P.F, Beh I, Schieweck K.** Inhibition of estrogen biosynthesis and its consequences on gonadotrophin secretion in the male. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1992; 41:437-43
12. **Blumberg B.** Identification of nuclear hormone receptor homologs by screening libraries with highly degenerate oligonucleotide probes. *Methods Mol Biol* 2001; 176:119-29
13. **Bouchard P, Wright F, Portois M.C. et al.** Androgen insensitivity in oligospermic men: A reappraisal. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1986; 63:1242-46
14. **Brake A, Krause W.** Treatment of idiopathic oligozoospermia with tamoxifen- a randomized controlled study. *Int J Androl* 1992; 15:507-8
15. **Brinkmann A.O, Faber P.W, van Rooij H.C.J, Kuiper G.G.J.M, Ris C, Klaassen P, van der Korput J.A.G.M, Voorhorst M.M, van Laar J.H, Mulder E, Trapman J.** The human androgen receptor: domain structure, genomic organization and regulation of expression. *J Steroid Biochem* 1989; 34:307-10
16. **Carani C, Qin K, Simoni M, Faustini-Fustini M, Serpente S, Boyd J. et al.** Effect of testosterone and estradiol in a man with Aromatase deficiency. *New England Journal of Medicine* 1997; 337:91-95
17. **Casella R, Maduro M.R, Misfud A, Lipshultz L.L, Yong E.L, Lamb D.J.** Androgen receptor gene polyglutamine length is associated with testicular histology in infertile patients. *J Urol* 2003; 169:224-27
18. **Chamberlain N.L, Driver E.D, and Miesfeld R.L.** The length and location of CAG trinucleotide repeats in the androgen receptor N-terminal domain affect transactivation function. *Nucleic Acids Res.* 1994; 22:3181-3186
19. **Chang B.L, Zheng S.L, Hawkins G.A, Isaacs S.D, Wiley K.E, Turner A, Carpten J.D, Bleecker E.R, Walsh P.C, Trent J.M, Meyers D.A, Isaacs W.B, Xu J.** Polymorphic GGC repeats in the androgen receptor gene are associated with hereditary and sporadic prostate cancer risk. *Hum Genet* 2002; 110:122-29
20. **Chen C, Lamharzi N, Weiss N.S, Etzioni R, Dightman D.A, Barnett M, DiTommaso D, Goodman G.** Androgen receptor polymorphisms and the incidence of prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002; 11:1033-40
21. **Comhaire F.H. et al.** Analysis of factors suspected to be related with the pathogenesis of infertility. *Male infertility: diagnosis and management.* 10-18
22. **Comhaire F.H. et al.** Objective criteria for diagnostic categories in the simplified management of male infertility. *Male infertility: diagnosis and management.* 48-53
23. **Comhaire F.H. et al.** The significance of physical characteristics and laboratory investigations for the diagnosis of male infertility. *Male infertility: diagnosis and management.* 19-33
24. **Comhaire F.H. et al.** The significance of semen analysis for the evaluation of male infertility. *Male infertility: diagnosis and management.* 34-47
25. **Comhaire F.H. et al.** Towards more objectivity in the management of male infertility. *Male infertility: diagnosis and management.* 1-9
26. **Cooke P.S, Young P, Hess R.A, and Cunha G.R.** Estrogen receptor expression in developing epididymis, efferent ductules and other male reproductive organs. *Endocrinology* 1991; 128:2874-79





27. **Couse J.F, Korach K.S.** Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? *Endocr. Rev.* 1999; 20:358-417
28. **Cram D.S, Song B, McLachlan R.I, Trounson A.O.** CAG trinucleotide repeats in the androgen receptor gene of infertile men exhibit stable inheritance in female offspring conceived after ICSI. *Mol Hum Reprod* 2000; 6:861-66
29. **Dadze S, Wieland C, Jakubiczka S, Funke K, Schroder E, Royer-Pokora B, Willers R, Wieacker P.F.** The size of the CAG repeat in exon 1 of the androgen receptor gene shows no significant relationship to impaired spermatogenesis in an infertile Caucasoid sample of German origin. *Mol Hum Reprod* 2000; 6:207-14
30. **Dahlman-Wright K, Baumann H, McEwan I.J, Almlöf T, Wright A.P, Gustafsson J-A, and Hard T.** Structural characterization of a minimal functional transactivation domain for the human glucocorticoid receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1995; 92:1699-1703
31. **DeLisle R.K, Yu S.J, Nair A.C, Welsh W.J.** Homology modeling of the estrogen receptor subtype beta (ER-beta) and calculation of ligand binding affinities. *J Mol Graph Model* 2001; 20:155-67
32. **Dowsing A.T, Yong E.L, Clark M, McLachlan R.I, de Kretser D.M, Trounson A.O.** Linkage between male infertility and trinucleotide expansion in the androgen-receptor gene. *Lancet* 1999; 354:640-43
33. **Eckardstein S.V, Schmidt A, Kamischke A, Simoni M, Gromoll J, and Nieschlag E.** CAG repeat length in the androgen receptor gene and gonadotrophin suppression influence the effectiveness of hormonal male contraception. *Clin Endocrinol.* 2002; 57:647
34. **Eckardstein S.V, Schmidt A, Kamischke A, Simoni M, Gromoll J, Nieschlag E.** Analysis of the polymorphic CAG repeat length in the androgen receptor gene and gonadotrophin suppression influence the effectiveness of hormonal male contraception. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2002; 57:647-55
35. **Eddy E.M, Washburn T.F, Bunch D.O, Goulding E.H, Gladen B.C, Lubahn D.B, Korach K.S.** Targeted disruption of the estrogen receptor gene in male mice causes alteration of spermatogenesis and infertility. *Endocrinol* 1996; 137:4796-805
36. **Elhaji Y.A, Gottlieb B, Lumbroso R, Beitel L.K, Foulkes W.D, Pinsky L, Trifiro M.A.** The polymorphic CAG repeat of the androgen receptor gene: a potential role in breast cancer in women over 40. *Breast Cancer Res Treat.* 2001; 70:109-16
37. **Ellis J.A, Wong Z.Y, Stebbing M, Harrap S.B.** Sex, genes and blood pressure. *Clin Ex Pharmacol Physiol* 2001; 28:1053-66
38. **Encio I.J, and Detera-Wadleigh S.D.** The genomic structure of the human glucocorticoid receptor. *J. Biol. Chem* 1991; 266:7182-7188
39. **Enmark E, Gustafsson J-A.** Oestrogen receptors – an overview. *J Intern Med* 1999; 246:133-38
40. **Evans R.M.** The steroid and thyroid hormone receptor super family. *Science* 1988; 240:889-95
41. **Faustini-Fustini M, Rochira V, Carani C.** Oestrogen deficiency in men: where are we today? *Eur J Endocrinol* 1999; 140:111-29
42. **Fisher C.R, Graves K.H, Parlow A.F, Simpson E.R.** Characterization of mice deficient in aromatase (ArKO) because of targeted disruption of the cyp 19 gene. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1998; 95:6965-70
43. **Fisher J.S, Millar M.R, Majdic G, Saunders P.T.K, Fraser H.M, and Sharpe R.M.** Immunolocalisation of oestrogen receptor- $\alpha$  within the testis and excurrent ducts of the rat and marmoset monkey from merinatal life to adulthood. *J Endocrinol* 1997; 153:485-95
44. **Gaston K.E, Ford III O.H, Singh S, Gregory C.W, Weyel D.E, Smith G.J, Mohler J.L.** A novel method for the analysis of the androgen receptor. *Curr Urol Rep* 2002; 3:67-74
45. **Gelmann E.P.** Molecular biology of the androgen receptor. *J Clin Oncol* 2002; 20:3001-15
46. **Georgiou I, Konstantelli M, Syrrou M, Messinis I.E, and Lolis D.E.** Oestrogen receptor gene polymorphisms and ovarian stimulation for in-vitro fertilization. *Hum Reprod.* 1997; 12:1430-1433
47. **Georgiou I, Syrrou M, Bouba I, Dalkalitsis N, Paschopoulos M, Navrazoglou I, and Lolis D.** Association of estrogen receptor gene polymorphisms with endometriosis. *Fertil Steril* 1999; 75:164-166
48. **Ghadessy F.J, Lim J, Abdullah A.A, Panet-Raymond V, Choo C.K, Lumbroso R, Tut T.G, Gottlieb B, Pinsky L, Trifiro M.A, Yong E.L.** Oligospermic infertility associated with an androgen receptor mutation that disrupts interdomain and coactivator (TIF2) interactions. *J Clin Invest* 1999; 103:1517-25
49. **Ghadessy F.J, Liow S.L, Yong E.L.** Mutations in the promoter region of the androgen receptor gene are not common in males with idiopathic infertility. *Mol Hum Reprod* 1999; 5:287-90
50. **Giwereman A, Kledal T, Schwartz M, Giwereman Y.L, Leffers H, Zazzi H, Wedell A, Skakkebaek N.E.** Preserved male fertility despite decreased androgen sensitivity caused by a mutation in the ligand-binding domain of the androgen receptor gene. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85:2253-59
51. **Giwereman Y.L, Nordenskjold A, Ritzen E.M, Nilsson K.O, Ivarsson S.A, Grandell U, Wedell A.** An androgen receptor gene mutation (E653K) in a family with congenital adrenal hyperplasia due to steroid 21-hydroxylase deficiency as well as impartial androgen insensitivity. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:2623-28
52. **Gobinet J, Poujol N, Sultan Ch.** Molecular action of androgens. *Mol Cell Endocrinol* 2002; 198:15-24
53. **Gottlieb B, Pinsky L, Beitel L.K, Trifiro M.** Androgen insensitivity. *Am J Med Genet* 1999; 29:210-17
54. **Grandien K, Berkenstam A, Gustafsson J-A.** The estrogen receptor gene: promoter organization and expression. *Int J Biochem Cell Biol* 1997; 29:1343-1369



55. Green S, Walter P, Kumar V, Krust A, Bornert J.M, Argos P, and Chambon P. Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to *v-erb-A*. *Nature* 1986; 320:134-39
56. Griffin J.E. Androgen resistance-the clinical and molecular spectrum. *N. Engl. J. Med.* 1992; 326:11-18
57. Gronemeyer H. Control of transcription activation by steroid hormone receptors. *FASEB J.* 1992; 6:2524-2529
58. Gsur A, Preyer M, Haidinger G, Zidek T, Madersbacher S, Schatzl G, Marberger M, Vutuc C, Micksehe M. Polymorphic CAG repeats in the androgen receptor gene, prostate-specific antigen polymorphism and prostate cancer risk. *Carcinogenesis* 2002; 23:1647-51
59. Gustafson D.R, Wen M.J, Koppanati B.M. Androgen receptor gene repeats and indices of obesity in older adults. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2003; 27:75-81
60. Haiman C.A, Brown M, Hankinson S.E, Spiegelman D, Colditz G.A, Willett W.C, Kantoff P.W, Hunter D.J. The androgen receptor CAG repeat polymorphism and risk of breast cancer in the Nurses' Health Study. *Cancer Res* 2002; 62:1045-49
61. Hawkins M.M., Barratt C.L.R., Sutcliffe A.G., Cooke I.D. Male infertility and increased risk of diseases in future generations. *Lancet* 1999; 354: 1906-1907
62. Hess R.A, Bunick D, Lee K.H, Bahr J, Taylor J.A, Korach K.S, Lubahn D.B. A role for estrogens in the male reproductive system. *Nature* 1997; 390:509-12
63. Hess R.A. et al. Estrogen receptor ( $\alpha$  &  $\beta$ ) expression in the excurrent ducts of the adult male rat reproductive tract. *J Androl* 1997; 18:602-11
64. Hickey T, Chandy A, Norman R.J. The androgen receptor CAG repeat polymorphism and X-chromosome inactivation in Australian Caucasian women with infertility related to polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:161-65
65. Hiort O, Holterhus P-M, Horter T, Schulze W, Kremke B, Bals-Pratsch M, Sinneker G.H.G. and Kruse K. Significance of mutations in the androgen receptor gene in males with idiopathic infertility. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85
66. Hiort O, Sinneker G.H.G, Holterhus P.M. et al. The clinical and molecular spectrum of androgen insensitivity. *Am. J. Med. Genet.* 1996; 63:218-22
67. Hughes I.A, Lim H.N, Martin H, Mongan N.P, Dovey L, Ahmed S.E, Hawkins J.R. Developmental aspects of androgen action. *Mol Cell Endocrinol* 2001; 185:33-41
68. Ilio K.Y, and Hess R.A. Structure and function of the ductuli efferentes: a review. *Microscopy Research and Technique* 1994; 29:432-67
69. Inkster S, Yue W, Brodie A. Human testicular aromatase: immunocytochemical and biochemical studies. *J. Clin Endocrinol. Metab.* 1995; 80:1941-47
70. Jacobs M.N, Lewis D.F. Steroid hormone receptors and dietary ligands: a selected review. *Proc Nutr Soc* 2002; 61:105-22
71. Jensen E.V, and Jacobson H.I. Basic guides to the mechanism of estrogen action. *Rec. Prog. Horm. Res.* 1962; 18:387-414
72. Kato S. Nuclear steroid hormone receptors as possible target molecule for endocrine disruptant. *Nippon Rinsho* 2000; 58:1535-43
73. Keaveney M, Klug J, Dawson M.T, Nestor P.V, Neilan J.G, Forde R.C, and Gannon F. Evidence for a previously unidentified upstream exon in the human oestrogen receptor gene. *J. Mol. Endocrinol.* 1991; 6:111-115
74. Keightley M.C. Steroid receptor isoforms: exception or rule? *Mol Cell Endocrinol* 1998; 137:1-5
75. Kelce W.R, Wilson E.M. Environmental antiandrogens: developmental effects, molecular mechanisms, and clinical implications. *J Mol Med* 1997; 75:198-207
76. Knoke I, Jakubuczka S, Lehnert H, Wieacker P. A new point mutation of the androgen receptor gene in a patient with partial androgen resistance and severe oligospermia. *Andrologia* 1999; 31:1999-201
77. Kobayashi S., Inone S., Hosoi T., Ouchi Y., Shiraki M. and Orimo H. Association of bone mineral density with polymorphism of estrogen receptor gene. *J Bone Miner Res* 1996; 11:306-311;
78. Koh, J.-M and others. LEPR and ER $\alpha$  genes on BMD. *European Journal of Endocrinology* (2002) 147.
79. Komori S, Kasumi H, Kanazawa R, Sakata K, Nakata Y, Kato H, Koyaman K. CAG repeat length in the androgen receptor gene of infertile Japanese males with oligozoospermia. *Mol Hum Reprod* 1999; 5:14-16
80. Korach K. S. Insights from the study of animals lacking a functional estrogen receptor. *Science* 1996; 266:1524-1527;
81. Korach K. S. Target Organ Toxicity: Endocrine System Conference, *Environ. Health Perspect.* 1981; 38, 39
82. Korach K.S, Migliaccio S, and Davis V.S. Estrogens. In *Principles of Pharmacology, Basic Concepts and Clinical Applications*, ed. P.L. Munson, pp. 809-825. Chapman and Hall, New York 1995
83. Korach K.S. Insights from the study of animals lacking functional estrogen receptor. *Science* 1994; 266:1524-27
84. Kos M, Reid G, Denger S, Gannon F. Minireview: genomic organization of the human ER $\alpha$  gene promoter region. *Mol Endocrinol* 2001; 15:2057-63
85. Krause W, Holland-Moritz Schram. Treatment of idiopathic oligozoospermia with tamoxifen-a randomized control study. *Int. J. Androl.* 1992; 15:14-18



86. **Krege J.H, Hodgin J.B, Couse J.F, Enmark E, Warner M, Mahler J.F, Saar M, Korach K.S, Gustafsson J.A, Smithies O.** Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1998; 95:15677-82.
87. **Kuiper G.G. et al.** Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 1997; 138:863-70
88. **Kuiper G.J.M, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson J-A.** Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1996; 93:5925-30
89. **Kukuvitis A, Georjov I, Bouba I, Tsirka A, Giannouli C.H, Yapijakis C, Tarlatzis B, Bontis J, Lolis D, Sofikitis N, Papadimas J.** Association of oestrogen receptor alpha polymorphisms and androgen receptor CAG trinucleotide repeats with male infertility: a study in 109 Greek infertile men. *Int J Androl* 2002; 25:149-52
90. **Kumar V, Green S, Stack G, Barry M, Jin J.R, and Chambon P.** Functional domains of the human estrogen receptor. *Cell* 1987; 51:941-951
91. **Kupker W, Schwinger E, Hiort O, Ludwig M, Nikolettos N, Schlegel P.N, Diedrich K.** Genetics of male subfertility: consequences for the clinical work-up. *Hum Reprod* 1999; 14:24-37
92. **Kurinczuk J.J., Bower C.** Birth defects in infants conceived by intracytoplasmic sperm injection: an alternative interpretation. *BMJ* 1997; 315: 1260-65
93. **L'Hermite M.** Risks of estrogens and progestogens. *Maturitas* 1990; 12:215-246
94. **LaSpada AR, Wilson EM, Lubahn DB, Harding AE, Fishbeck KH.** Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nature* 1991; 352: 77-79
95. **Le Roux M.G, Theze N, Wolff J, Le Pennec J.P.** Organization of a rainbow trout estrogen receptor gene. *Biochim Biophys Acta* 1993; 1172:226-30
96. **Legius E, Vanderschueren D, Spiessens C, D'Hooghe T, Matthijs G.** Association between CAG repeat number in the androgen receptor and male infertility in a Belgian study. *Clin Genet* 1999; 56:166-67
97. **Lehrer S.P, Schmutzler T.K, Rabin J.M, Schachter B.S.** An estrogen receptor genetic polymorphism and a history of spontaneous abortions. Correlation in women with estrogen receptor positive breast cancer but not in women with estrogen receptor negative breast cancer or in women without cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1993; 26:175-80
98. **Lephart E.D, Simpson E.R.** Assay of aromatase activity. *Methods Enzymol.* 1991; 206:477-83
99. **Levin E.R.** Cellular functions of the plasma membrane estrogen receptor. *Trends Endocrinol* 1999; 10:374-77
100. **Li C, Dsong J, Guan W.** CAG microsatellite polymorphisms of androgen receptor gene and the stage and grade of prostate cancer. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 2001; 23:217-19
101. **Lubahn D.B, Joseph D.R, Sullivan P.M, et al.** Cloning of human androgen receptor complementary DNA and localization to the X chromosome. *Science* 1988; 240: 327-30
102. **Lubahn D.B, Moyer J.S, Golding T.S, Couse J.F, Korach K.S, and Smithies O.** Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1993; 90:11162-66
103. **Mac Lean, Warne, Zajac.** Defects of AR function: from sex reversal to motor neuron disease. *Mol Cell Endocrinol* 1995; 112:133-41
104. **Mahato D, Goulding E.H, Korach K.S, Eddy E.M.** Spermatogenic cells do not require estrogen receptor-alpha for development or function. *Endocrinol* 2000; 141:1273-76
105. **Makinen S, Makela S, Weihua Z, Warner M, Rosenlund B, Salmi S, Hovatta O, Gustafsson J-A.** Localization of oestrogen receptors alpha and beta in human testis. *Mol Hum Reprod* 2001; 7:497-503
106. **Mangelsdorf D.J, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, and Evans R.** The nuclear receptor superfamily: the second decade. 1995; 83:835-839
107. **McDonnell D.P, Dana S.L, Hoener P.A, et al.** Cellular mechanisms which distinguish between hormone- and antihormone-activated estrogen receptor. *Ann N Y Acad Sci* 1995; 761:121-137
108. **McLachlan R.I, Wreford N.G., O'Donnott L, et al.** The endocrine regulation of spermatogenesis: independent roles for testosterone and FSH. *J Endocrinol* 1996; 148: 1-9
109. **McPhaul M.J, Buchanan G, Hickey T.E, Bentel J.M.** Androgen resistance caused by mutations in the androgen receptor gene. *FASEB J.* 1991; 5:2910-2915
110. **McPhaul M.J.** Molecular defects of the androgen receptor. *Recent Prog Horm Res* 2002; 57:181-94
111. **Meistrich M.L, Hughes T.J, Bruce W.R.** Alteration of epididymal sperm transport and maturation in mice by estrogen and testosterone. *Nature* 1975; 258:145-47
112. **Mifsud A, Choon A.T, Fang D, Yong E.L.** Prostate-specific antigen, testosterone, sex-hormone binding globulin and androgen receptor CAG repeat polymorphisms in subfertile and normal men. *Mol Hum Reprod* 2001; 7:1007-1013
113. **Mifsud A, Sim C.K.S., Boettger-Tong H, Moreira S, Lamb D.J., Lipshultz L.I., Yong E.L.** Trinucleotide (CAG) repeat polymorphisms in the androgen receptor gene: molecular markers of risk for male infertility. *Fertil Steril* 2001, 75
114. **Misrahi M, Venencie P.Y, Saugier-veber P, Sar S, Dessen P, and Milgrom E.** Structure of the human progesterone receptor gene. *Biochim. Biophys. Acta* 1993; 1216:289-292



115. Mizunuma H. Estrogen receptor genotypes and bone turnover. *Bone* Vol. 21, No. 5 November 1997:379-383
116. Mononen N, Ikonen T, Autio V, Rokman A, Matikainen M.P, Tammela T.L, Kallioniemi O.P, Koivisto P.A, Schleutker J. Androgen receptor CAG polymorphism and prostate cancer risk. *Hum Genet* 2002; 111:166-71
117. Morishima A, Grumbach M.M, Simpson E.R, Fisher C, Qin K. Aromatase deficiency in male and female siblings caused by a novel mutation and the physiological role of estrogens. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80:3689-98
118. Morrow A.F., Gyorki S, Warne G.I, Burger H.G, Bangah M.L, Outch K.H, Mirovics A, and Baker H.W.G. Variable androgen receptor levels in infertile men. *J Clin Endocrinol Metab* 1987; 64:1115-1120
119. Mosselman S, Polman J, and Dijkema R. ER $\beta$ : identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Letters* 1996; 392: 49-53
120. Nakahori Y, Kuroki Y, Komaki R. et al. The Y chromosome region essential for spermatogenesis. *Horm. Res.* 1996; 46:20-23
121. Nilsson S, Makela S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson G, Enmark E, Pettersson K, Warner M, Gustafsson J-A. Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev* 2001; 81:1535-65
122. O'Hardy D, Scher H, Bogenreider T, Sabbatini P, Zhang Z-F, Nanus D.M, and Catterall J.F. Androgen receptor CAG repeat lengths in prostate cancer: correlation with age of onset. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81:4400-4405
123. O'Donnell L, Robertson K.M, Jones M.E, Simpson E.R. Estrogen and spermatogenesis. *Endocr. Rev.* 2001; 22:289-318
124. O'Malley B.W. The steroid receptor superfamily: more excitement predicted for the future. *Molec Endocr* 1990; 4:363-69
125. Parker M.G, Arbuckle N, Dauvois S, et al. Structure and function of the estrogen receptor. *Ann N Y Acad Sci* 1993; 684:119-126
126. Patrizio P, Leonard D.G, Chen K.L, et al. Larger Trinucleotide (CAG) repeat size in the androgen receptor gene of infertile men with extremely severe oligozoospermia. *J. Androl.* 2001; 22:444-448
127. Ponglikitmongkol M, Green S, and Chambon P. Genomic organization of the human oestrogen receptor gene. *EMBO J.* 1988; 7:3385-3388
128. Puscheck E.E, Behzadian M.A, McDonough P.G. The first analysis of exon 1 (transactivation domain) of the androgen receptor gene in infertile men with oligospermia or azoospermia. *Fertil Steril* 1994; 62:1035-38
129. Quigley CA, De Bellis A, Marschke KB, El Awady M.K, Wilson EM, French FS. Androgen receptor defects: historical, clinical and molecular perspectives. *Endocr Rev* 1995; 16:271-21
130. Quigley CAS, De Bellis A., Marschke KB, et al: Androgen receptor defects: historical, clinical and molecular perspectives. *Endocrinol Rev* 1995; 16:271-321.
131. Rajpert-De Meyts E, Leffers H, Daugaard G, Andersen C.B, Petersen P.M, Hinrichsen J, Pedersen L.G, Skakkebaek N.E. Analysis of the polymorphic CAG repeat length in the androgen receptor gene in patients with testicular germ cell cancer. *Int J Cancer* 2002; 102:201-4
132. Rajpert-De Meyts E, Leffers H, Petersen J.H, Andersen A.G, Carlsen E, Jorgensen N, Skakkebaek N.E. CAG repeat length in androgen-receptor gene and reproductive variables in fertile and infertile men. *Lancet* 2002; 359:44-46
133. Razvi K, Chew S, Yong E.L, Kumar J, Ng S.C. The clinical management of male infertility. *Singapore Med J* 1999; 40:291-97
134. Ribeiro M.L, Santos A, Carvalho-Salles A.B, Hackel C. Allelic frequencies of six polymorphic markers for risk of prostate cancer. *Braz J Med Biol Res* 2002; 35:205-13
135. Riley D.E, Krieger J.N. Short tandem repeat polymorphism linkage to the androgen receptor gene in prostate carcinoma. *Cancer* 2001; 92:2603-8
136. Robertson K.M, O'Donnell L, Jones M.E, Meachem S.J, Boon W.C, Fisher C.R, Graves K.H, McLachlan R.I, Simpson E.R. Impairment of spermatogenesis in mice lacking a functional aromatase (cyp 19) gene. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1999; 96:7986-91
137. Rochira V, Balestrieri A, Madeo B, Baraldi E, Faustini-Fustini M, Granata A.R.M, Carani C. Congenital estrogen deficiency: in search of the estrogen role in human male reproduction. *Mol. Cell. Endocrinol* 2001; 178:107-15
138. Rosselli M, Reinhart K, Imthurn B, Keller P.J, Dubey R.K. Cellular and biochemical mechanisms by which environmental oestrogens influence reproductive function. *Hum Reprod Update* 2000; 6:332-50
139. Sand P, Luckhaus C, Schlurmann K, Gotz M, Deckert J. Untangling the human estrogen receptor gene structure. *J Neural Transm* 2002; 109:567-83
140. Santarosa M, Bidoli E, Gallo A, Steffan A, Boiocchi M, Viel A. Polymorphic CAG repeat length within the androgen receptor gene: identification of a subgroup of patients with increased risk of ovarian cancer. *Oncol Rep* 2002; 9:639-44
141. Sasagawa I, Suzuki Y, Muroya K, Ogata T. Androgen receptor gene and male genital anomaly. *Arch Androl* 2002; 48:461-66



142. Schatzl G, Madersbacher S, Gsur A, Preyer M, Haidinger G, Haitel A, Vutuc C, Micksche M, Marberger M. Association of polymorphisms within androgen receptor, 5 $\alpha$ -reductase, and PSA genes with prostate volume, clinical parameters, and endocrine status in elderly men. *Prostate* 2002; 52:130-38
143. Sharpe R, Sakkebaek N.E. Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? *The Lancet* 1993; 341:1392-95
144. Sharpe R. Do males rely on female hormones? *Nature* 1998; 390:447-47
145. Sharpe R.M. The 'oestrogen hypothesis' - where do we stand now? *Int J Androl* 2003; 26:2-15
146. Simpson E.R, Mahendroo M.S, Means G.D, Kilgore M.W, Hineshelwood M.M, Graham-Lorence S, Amarnah B, Ito Y, Fisher R, Michael M.D, Mendelson C.R, Bulun S.E. Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocrine Rev.* 1994; 15:342-55
147. Smith E.P, Boyd J, Frank G.R, Takahashi H, Cohen R.M, Specker B, Williams T.C, Lubahn D.B, and Korach K.S. Estrogen resistance caused by a mutation in the estrogen-receptor gene in a man. *N. Engl. J. Med.* 1994; 331:1056-1061
148. Soriano Guillen L, Munoz Calvo M.T, Martinez Perez J, Pozo Roman J, Martin Sobrino M.A, Gonzalez Medeiro I, Argenete Oliver J. Deletion of thymine at position 2298 in exon 5 of the androgenic receptor gene causing complete androgen insensitivity syndrome. *An Esp Pediatr.* 2002; 56:347-52
149. Sultan C, Lumbroso S, Paris F, Jeandel C, Terouane B, Belon C, Audran F, Poujol N, Georget V, Gobinet J, Jalaguier S, Auzou G, Nicolas J.C. Disorders of androgen action. *Semin Reprod Med* 2002; 20:217-228
150. Sultan Ch, Gobinet J, Terouanne B, Paris F, Belon Ch, Jalaguier S, Georget V, Poujol N, Auzou G, Lumbroso S. The androgen receptor: molecular pathology. *J Soc Biol* 2002; 196:223-40
151. Suzuki et al. Estrogen receptor alpha gene polymorphism is associated with idiopathic azoospermia. *Fertil Steril* 2002; 78: 1341-43
152. Teofili L, Martini M, Luongo M, Di Mario A, Leone G, De Stefano V, Larocca L.M. Overexpression of the polycythemia rubra vera-1 gene in essential thrombocythemia. *J Clin Oncol* 2002; 20:4249-54
153. The Writing Group for the PEPi Trial. *J Am Med Assoc* 1995; 273:199-208
154. The Writing Group for the PEPi Trial. *J Am Med Assoc* 1996; 276:1389-96
155. Tincello D.G, Saunders P.T, Hargreave T.B. Preliminary investigations on androgen receptor gene mutations in infertile men. *Mol Hum Reprod* 1997; 3:941-43
156. Touitou I, Maudelonde T. Steroid hormone receptors. *Rev Prat* 1994; 44:1294-97
157. Tut TG., Ghadessy J., Trifiro MA., Pinsky L., Yong EL. Long polyglutamine tracts in the androgen receptor are associated with reduced trans-activation, impaired sperm production, and male infertility. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 3777-3782
158. Uematsu A, Yorifuji T, Muroi J, Kawai M, Mamada M, Kaji M, Yamanaka C, Momoi T, Nakahata T. Parental origin of normal X chromosomes in Turner syndrome patients with various karyotypes: implications for the mechanism leading to generation of a 45,X karyotype. *Am J Med Genet* 2002; 111:134-39
159. Umesono K, and Evans R.M. Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors. *Cell* 1989; 57:1139-1146
160. Van Golde R, Van Houwelingen K, Kiemeny L, Kremer J, Tuerling J, Schalken J, Meuleman E. Is increased CAG repeat length in the androgen receptor gene a risk factor for male subfertility? *J Urol* 2002; 167:621-23
161. Van Pottelbergh I, Lumbroso S, Goemaere S, Sultan C, Kaufman J.M. Lack of influence of the androgen receptor gene CAG-repeat polymorphism on sex steroid status and bone metabolism in elderly men. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2001; 55:659-66
162. Wang G, Chen G, Wang X, Zhong J, Lu J. The polymorphism of (CAG) $n$  repeats within androgen receptor gene among Chinese male population. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 2001; 18:456-58
163. White R, Lees J.A, Needham M, Ham J, Parker M. Structural organization and expression of the mouse estrogen. *Mol Endocrinol* 1987; 1:735-44
164. White R, Parker M.G. Molecular mechanisms of steroid hormone action. *Endocrine-Related Cancer* 1998; 5:1-14
165. Whitfield G.K, Jurutka P.W, Haussler C.A, Haussler M.R. Steroid hormone receptors: evolution, ligands, and molecular basis of biologic function. *J Cell Biochem* 1999; Suppl 32-33:110-22
166. Wiacker P.F, Knoke I, Jakubiczka S. Clinical and molecular aspects of androgen receptor defects. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1998; 106:446-53
167. Williams G.H. Guardian of the gate: receptors, enzymes, and mineralocorticoid function. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 74:961-962
168. Williams G.H. Steroid receptor specificity with reference to the estrogen receptor. *Osteoporosis Int.* 1997; 1:S35-S39
169. Wilson J.D. The role of androgens in male gender role behavior. *Endocr. Rev.* 1999; 20:726-37
170. World Health Organization. 1999 laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. 4<sup>th</sup> ed. New York: Cambridge University Press, 1999



171. **World Health Organization.** Towards more objectivity in diagnosis and management of male infertility. *Int. J. Androl* 1987; 7(suppl):1-53
172. Xu J, Meyers D.A, Sterling D.A, Zheng S.L, Catalona W.J, Cramer S.D, Bleecker E.R, Ohar J. Association studies of serum prostate-specific antigen levels and the genetic polymorphisms at the androgen receptor and prostate specific antigen genes. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002; 11:664-69
173. Yaich L, Dupont W.D, Cavener D.R, Parl F.F. Analysis of the PvuII restriction fragment-length polymorphism and exon structure of the estrogen receptor gene in breast cancer and peripheral blood. *Cancer Res* 1992; 52:77-83
174. Yamamoto K.R. Steroid receptor regulated transcription of specific genes and gene networks. *Annu. Rev. Genet.* 1985; 19:209-252
175. Yamamoto M, Hibi H, Katsuno S., et al. Serum estradiol levels in normal men and men with idiopathic infertility. *Int J. Urol.* 1995; 2:44-46
176. Yeh S, Tsai M.Y, Xu Q, Mu X.M, Lardy H, Huang K.E, Lin H, Yeh S.D, Altuwaijri S, Zhou X, Xing L, Boyce B.F, Hung M.C, Zhang S, Gan L, Chang C. Generation and characterization of androgen receptor knockout (ARKO) mice: an in vivo model for the study of androgen functions in selective tissues. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2002; 99:13498-503
177. Yong E.L, Lim J, Qi W, Ong V, Mifsud A. Molecular basis of androgen receptor diseases. *Ann Med* 2000; 32:15-22
178. Yong E.L, Lim L.S, Wang Q, Mifsud A, Lim J, Ong Y.C, Sim K.S. Androgen receptor polymorphisms and mutations in male infertility. *J. Endocrinol Invest* 2000; 23:573-77
179. Yoshida K.I, Yano M, Chiba K, Honda M, Kitahara S. CAG repeat length in the androgen receptor gene is enhanced in patients with idiopathic azoospermia. *Urology* 1999; 54:1078-81
180. Yu B, Handelsman D.J. Pharmacogenetic polymorphisms of the AR and metabolism and susceptibility to hormone-induced azoospermia. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:4406-4411
181. Zitzmann M, Brune M, Kornmann B, Gromoll J, Junker R, Nieschlag E. The CAG repeat polymorphism in the androgen receptor gene affects bone density and bone metabolism in healthy males. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2001; 55:649-57

