



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΤΟΜΕΑΣ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΟΣ

ΟΥΡΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Ν. ΣΟΦΙΚΙΤΗΣ

ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Ε. ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΪΔΗΣ

**ΣΠΕΡΜΑΤΟΛΟΓΙΚΕΣ ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ ΚΑΙ
ΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΣΤΗΝ ΚΡΥΨΟΡΧΙΑ**

ΧΑΡΑΛΑΜΠΟΣ Κ. ΜΑΜΟΥΛΑΚΗΣ

ΟΥΡΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2008



«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα. Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)».



Ημερομηνία αίτησης του κ. Μαμουλάκη Χαράλαμπου: 10-12-2001

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 458^α/22-1-2002

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων:

Σοφικίτης Νικόλαος Καθηγητής Ουρολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη:

Γιαννακόπουλος Ξενοφών Επίκουρος Καθηγητής Ουρολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων -

Γεωργίου Ιωάννης Επίκουρος Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας με γνώσεις Κλινικής Γενετικής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 24-1-2002

«Σπερματολογικές μεταβολές και γενετικοί παράγοντες στην κρυπορχία»

ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ: 619^α/30-10-2007

Ασημακόπουλος Δημήτριος	Καθηγητής	Ωτορινολαρυγγολογίας	Ιατρικής	Σχολής	Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Γεωργάτος Γεώργιος	Καθηγητής	Βιολογίας	Ιατρικής	Σχολής	Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Παπαδόπουλος Γεώργιος	Καθηγητής	Αναισθησιολογίας	Ιατρικής	Σχολής	Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Παρασκευαΐδης Ευάγγελος	Καθηγητής	Μαιευτικής-Γυναικολογίας	Ιατρικής	Σχολής	Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Σοφικίτης Νικόλαος	Καθηγητής	Ουρολογίας	Ιατρικής	Σχολής	Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Γεωργίου Ιωάννης	Αναπληρωτής	Καθηγητής	Ιατρικής	Γενετικής	και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Μαιευτικής-Γυναικολογίας
Γιαννακόπουλος Ξενοφών	Επίκουρος	Καθηγητής	Ουρολογίας	Ιατρικής	Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 24-1-2008

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

Ιωάννης Γουδέβενος

Καθηγητής Παθολογίας-Καρδιολογίας

Η Γραμματέας της Σχολής



ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ ΤΣΑΓΓΑΛΑ

Στον πατέρα μου



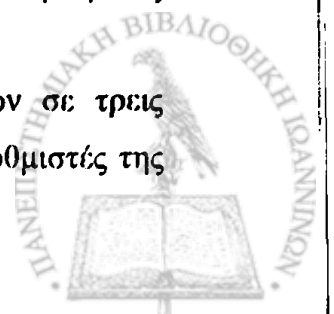
Πρόλογος

Ο καθορισμός του φύλου στον άνθρωπο και γενικότερα στα θηλαστικά, αποτελεί μια ενεργό διαδικασία που περιλαμβάνει αλληλεπιδράσεις μεταξύ διαφόρων γονιδίων. Το τελευταίο βήμα της φυλετικής διαφοροποίησης είναι η κάθοδος των όρχεων στο όσχεο. Πρόκειται για μια πολύπλοκη και πολυσταδιακή διεργασία, η οποία για να ολοκληρωθεί απαιτείται εύρυθμη αλληλεπίδραση διαφόρων ανατομικών δομών, ορμονών, περιβαλλοντικών και γενετικών παραγόντων. Η ορχική κάθοδος αποτελεί αποκλειστικό «προνόμιο» αλλά όχι καθολικό φαινόμενο στα θηλαστικά. Φαίνεται ότι η εξελικτικά και ενεργειακά δαπανηρή αυτή διαδικασία στοχεύει στην εξασφάλιση χαμηλότερης ορχικής θερμοκρασίας από αυτή της κοιλιακής κοιλότητας, ώστε να εξασφαλίζεται φυσιολογική παραγωγή και αποθήκευση σπερματοζωαρίων.

Ένα διφασικό μοντέλο ορμονικού ελέγχου έχει προταθεί για να ερμηνευθεί η ορχική κάθοδος στους φυσιολογικούς άρρενες. Αδρά, σύμφωνα με αυτό, η πρώτη (διακοιλιακή) φάση συμβαίνει κατά τη διάρκεια του πρώτου τριμήνου της κύησης, οπότε οι όρχεις κατέρχονται από την ενδοκοιλιακή τους θέση στην περιοχή του μελλοντικού έσω βουβωνικού στομίου και θεωρείται μη ανδρογονο-εξαρτώμενη. Η δεύτερη (βουβωνο-οσχεική) φάση θεωρείται ανδρογονο-εξαρτώμενη και επιτελείται κατά τη διάρκεια του τρίτου τριμήνου της κύησης, οπότε οι όρχεις κατέρχονται μέσω του βουβωνικού πόρου στον οσχεικό σάκο. Ωστόσο, οι ακριβείς μοριακοί μηχανισμοί που ρυθμίζουν την ορχική κάθοδο παραμένουν σε μεγάλο βαθμό αδιευκρίνιστοι.

Η κρυψορχία είναι αποτέλεσμα διαταραχής της ορχικής καθόδου. Ο όρχις δεν ψηλαφάται στο όσχεο αλλά βρίσκεται σε κάποιο σημείο της φυσιολογικής καθόδου, από το επίπεδο του εμβρυϊκού μεσονέφρου όπου αρχικά διαπλάσσεται (γεννητικές ταινίες) έως λίγο πριν το σύστοιχο ημιόσχεο ή ακόμη και σε τελείως απρόβλεπτη θέση (εκτοπία). Αποτελεί τη συχνότερη συγγενή ανωμαλία των έξω γεννητικών οργάνων του ανθρώπου. Η συχνότητά της σε συνδυασμό με τη στενή συσχέτισή της με την υπογονομότητα και τον καρκίνο των όρχεων, την καθιστούν μια κλινικά πολύ σημαντική παθολογική οντότητα. Η ακριβής αιτιολογία της παραμένει μέχρι σήμερα σε μεγάλο βαθμό αδιευκρίνιστη, φαίνεται ωστόσο ότι είναι πολυπαραγοντική, ενώ αρκετές ενδείξεις υποστηρίζουν την ύπαρξη κάποιας γενετικής βάσης σε ορισμένες τουλάχιστον περιπτώσεις.

Η παρούσα μελέτη έχει ως σκοπό την αναζήτηση μεταβολών σε τρεις γενετικούς τύπους, οι οποίοι αποτελούν ενδεχόμενους και δυνητικούς ρυθμιστές της

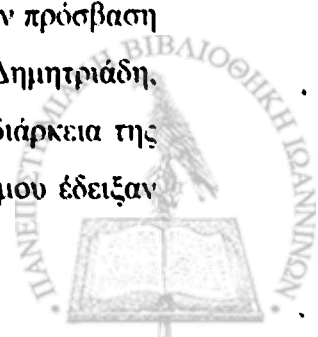


φυσιολογικής ορχικής καθόδου, σε μια προσπάθεια διευκρίνισης της πολύπλοκης αιτιολογίας της κρυπορχίας. Συγκεκριμένα ελέγχθηκαν η ευχρωματική περιοχή του μακρού σκέλους του χρωμοσώματος Υ, το γονίδιο κωδικοποίησης της ορμόνης τύπου-ινσουλίνης 3 καθώς και η πεντανουκλεοτιδική πολυμορφική θέση (ΤΑΑΑΑ)π του εγγύς προαγωγέα του γονιδίου κωδικοποίησης της φυλοδεσμευτικής πρωτεΐνης του ορού. Αποτελεί μέχρι σήμερα την πρώτη μοριακή μελέτη της κρυπορχίας στην Ελλάδα και διεθνώς τη μεγαλύτερη διεξαχθείσα σε παιδιά, περιλαμβάνοντας άτομα με όλες τις δυνατές φαινοτυπικές εκφράσεις της συγγενούς αυτής ανωμαλίας, καθώς και μέλη (πάσχοντα και μη) των οικογενειών αυτών των παιδιών. Όλοι οι ασθενείς παρακολουθούνταν στην Α΄ Παιδοχειρουργική Κλινική του Νοσοκομείου Παίδων «Η Αγία Σοφία» στην Αθήνα ή στην Ουρολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων. Όλα τα πειράματα μοριακής βιολογίας έγιναν στη Μονάδα Γενετικής της Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να εκφράσω τις ιδιαίτερες ευχαριστίες μου στον επικεφαλής της τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, Διευθυντή της Ουρολογικής Κλινικής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, Καθηγητή κ. Νικόλαο Σοφικίτη που με τίμησε με την ανάθεση του θέματος αυτής της μελέτης. Οι πολύτιμες υποδείξεις και εξειδικευμένες επισημάνσεις του, βασισμένες επάνω στη σε βάθος επιστημονική του γνώση και εμπειρία, σε συνδυασμό με την αμέριστη διάθεση για βοήθεια και πατρική καθοδήγηση του σε όλα τα στάδια της παρούσας έρευνας, συνέβαλαν αποφασιστικά στη διεξαγωγή και ολοκλήρωσή του έργου μου.

Ευχαριστώ επίσης θερμά τον Διευθυντή της Μονάδας Γενετικής της Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Ιωάννη Γεωργίου, μέλος της τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, ο οποίος στάθηκε με την πλατιά του κατάρτιση στο αντικείμενο, την ειλικρινή και φιλική του διάθεση, ακούραστος αρωγός δίπλα μου στηρίζοντας ουσιαστικά την προσπάθειά μου.

Επίσης αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω θερμά τους ιατρούς της Α΄ Παιδοχειρουργικής Κλινικής του Νοσοκομείου Παίδων «Η Αγία Σοφία». Ιδιαίτερα τον κ. Θεόδωρο Ντόλατζα, Διευθυντή της κλινικής, που μου επέτρεψε την πρόσβαση στο υλικό της μελέτης καθώς και τους κ. Αντύπα Σπύρο και Δημήτρη Δημητριάδη, Αναπληρωτές Διευθυντές που μου συμπαραστάθηκαν ηθικά σε όλη τη διάρκεια της εκπόνησης του έργου μου. Η ειλικρινής αγάπη και η εμπιστοσύνη που μου έδειξαν



από την αρχή της ειδίκευσής μου, οι πολύτιμες συμβουλές και χρήσιμες οδηγίες τους, θα αποτελούν για μένα ανεκτίμητα εφόδια για τη μετέπειτα πορεία μου.

Ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στη σύζυγο και σύντροφο της ζωής μου Αμαλία Σταματιάδου, ιατρό Βιοπαθολόγο, της οποίας η συμβολή ήταν πραγματικά ουσιαστική και καθοριστική για την ολοκλήρωση του έργου μου. Η βοήθειά της σε πρακτικό επίπεδο κατά την πρώτη φάση της μελέτης, ήταν ιδιαίτερα σημαντική αφού ανέλαβε πλήρως τη διαδικασία των αιμοληψιών και τη διαχείριση των δειγμάτων αίματος ως ειδικευόμενη στο Νοσοκομείο Παιδών «Η Αγία Σοφία». Πέραν όμως από αυτό, θεωρώ τη συνδρομή της σε συναισθηματικό επίπεδο ανεκτίμητη. Η κατανόηση της ανάγκης περάτωσης της μελέτης, η καρτερική αντιμετώπιση των οικογενειακών δυσχερειών που αυτή συνεπάγεται και η αφοσίωση στην οικογένειά μας, αποτέλεσαν σημαντικότερα εφόδια ψυχικής ενδυνάμωσης και κινητήρια δύναμη κατά τη διάρκεια της πολυετούς προσπάθειάς μου.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα τη φίλη, δεσποινίδα Ανθή Χατζηκυριακίδου, καθώς και την κα Ιωάννα Μπούμπα, Βιολόγους της Μονάδας Γενετικής της Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων, οι οποίες με εξαιρετική επιστημονική κατάρτιση, εργατικότητα και υπομονή με μύησαν στις απαραίτητες-ιδιαίτερες τεχνικές της μοριακής βιολογίας, συμβάλλοντας τα μέγιστα στην ολοκλήρωση των πειραμάτων μου.

Τέλος ευχαριστώ πολύ την κα. Καλλιόπη Γιαννακάκη, Φιλολόγο-Καθηγήτρια Μέσης Εκπαίδευσης, για τη γλωσσική επιμέλεια του κειμένου και την δεσποινίδα Ελένη Μαμουλάκη, Αρχιτέκτονα ΕΜΠ, για την καλλιτεχνική επιμέλεια των εικόνων.



ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Α. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Εισαγωγή	21
2. Το γεννητικό σύστημα του άνδρα	25
2.1. Στοιχεία ανατομίας	26
2.2. Στοιχεία φυσιολογίας	33
2.2.1. Ο άξονας υποθάλαμος-υπόφυση-όρχεις	33
2.2.2. Σπερματογένεση	36
2.2.3. Το σπερματοζώαριο	43
2.2.4. Ωρίμανση, μεταφορά και αποθήκευση του σπέρματος	43
2.2.5. Διαδικασία της στύσης και της εκσπερμάτισης	45
2.2.6. Το σπέρμα	46
3. Εμβρυολογική ανάπτυξη του ανδρικού γεννητικού συστήματος	49
3.1. Καθορισμός του φύλου-σεξουαλική διαφοροποίηση του άρρενος	49
3.1.1. Το γεννητικό σύστημα πριν από το φυλετικό καθορισμό	51
3.1.2. Σχηματισμός των γεννητικών ταινιών	52
3.1.3. Μοριακή βάση του ανδρικού φυλετικού καθορισμού	53
3.1.4. Δομική οργάνωση όρχι-ορμονοπαραγωγή-διαφοροποίηση άρρενος	59
3.1.5. Ανάπτυξη των έξω γεννητικών οργάνων	63
4. Κάθοδος των όρχεων στα διάφορα θηλαστικά είδη	69
4.1. Εξέλιξη της ορχικής καθόδου στα διάφορα είδη θηλαστικών	70
4.1.1. Είδη θηλαστικών με όρχεις σε αληθή ενδοκοιλιακή θέση	70
4.1.2. Είδη θηλαστικών με μερική κάθοδο των όρχεων	72
4.1.3. Είδη θηλαστικών με όρχεις εντός αληθούς οσχέου	72
4.1.4. Εξελκτικές υποθέσεις για την ερμηνεία της ορχικής καθόδου και της ανάπτυξης του οσχέου στα θηλαστικά	74
4.2. Φυσιολογία της ορχικής καθόδου-παθοφυσιολογία της διαταραχής της ορχικής καθόδου (κρυφορχίας) στα οσχεοφόρα θηλαστικά	79
4.2.1. Εμβρυολογία της ορχικής καθόδου	82
4.2.2. Διακοιλιακή φάση της ορχικής καθόδου	85
4.2.2.1. Παλινδρόμηση του κρανιακού κρεμαστήριου συνδέσμου υπό την επίδραση των ανδρογόνων	85
4.2.2.2. Η «αντίδραση εξοίδησης» του ορχικού οίακα	87



4.2.2.2.1.	Ενδείξεις εναντίον του ανδρογονικού ελέγχου	88
4.2.2.2.2.	Ενδείξεις εναντίον του ρόλου της MIS	89
4.2.2.2.3.	Η πρωτεΐνη INSL3 και ο ρόλος της στην ορχική κάθοδο	91
4.2.3.	Βουβωνο-οσχείκη φάση της ορχικής καθόδου	115
4.2.3.1.	Ο ρόλος της ενδοκοιλιακής πίεσης και του ορχικού οίακα	115
4.2.3.2.	Ο ρόλος των ανδρογόνων	116
4.2.3.3.	Η υπόθεση του αιδοιομηρικού νεύρου	117
4.2.2.2.4.	Ο ρόλος των γονιδίων Hox	122
5.	Επιδημιολογία της κρυφορχίας	129
5.1.	Επίπτωση της κρυφορχίας σε διάφορα θηλαστικά είδη	129
5.2.	Τοποχρονικές τάσεις της επίπτωσης της κρυφορχίας	130
5.3.	Παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση κρυφορχίας	133
6.	Κρυφορχία στα πλαίσια γενετικών συνδρόμων	135
7.	Επιπτώσεις της κρυφορχίας	145
7.1.	Κρυφορχία και υπογονιμότητα	145
7.1.1.	Επιδημιολογία της υπογονιμότητας	145
7.1.2.	Παθογένεια της υπογονιμότητας	146
7.1.2.1.	Ανωμαλίες της επιδιδυμίδας	146
7.1.2.2.	Διαταραχή της ιστολογίας των όρχεων	147
7.1.2.3.	Δυσλειτουργία του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-όρχεων	149
7.1.2.4.	Ο ρόλος της απόπτωσης	150
7.2.	Καρκίνος των όρχεων και κρυφορχία	156

B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.	Υλικό και Μέθοδοι	161
2.	Αποτελέσματα	169
3.	Συζήτηση	177
4.	Συμπεράσματα	199
	Περίληψη στην Ελληνική	201
	Περίληψη στην Αγγλική	205
	Παραρτήματα	209
	Βιβλιογραφία	231

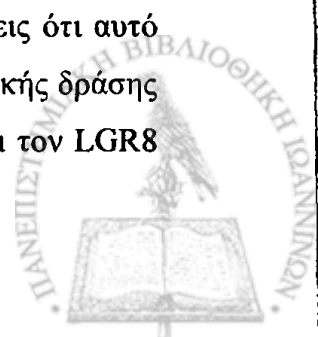


1. Εισαγωγή

Η κρυφορχία αποτελεί μια από τις συχνότερες συγγενείς ανωμαλίες του ανθρώπου και την πιο συχνή μεταξύ αυτών που αφορούν στα έξω γεννητικά όργανα. Η επίπτωση της υπερβαίνει το 3,5% στον πληθυσμό των τελειόμηνων αρρένων νεογέννητων. Αυτόματη ορχική κάθοδος είναι δυνατόν να συμβεί κατά τη διάρκεια των πρώτων εβδομάδων μετά τη γέννηση, με αποτέλεσμα η επίπτωση να μειώνεται σε $\approx 0,7-1\%$ κατά το τέλος της βρεφικής ηλικίας παραμένοντας σταθερή έκτοτε. Αν και συχνά θεωρείται ελάσσονα συγγενής ανωμαλία, η συχνότητά της σε συνδυασμό με τη συσχέτιση της με την υπογονομότητα και τον καρκίνο των όρχεων την καθιστούν μια κλινικά πολύ σημαντική παθολογική οντότητα.

Η ορχική κάθοδος φαίνεται ότι αποτελεί μια πολύπλοκη και πολυσταδιακή διαδικασία, για την ολοκλήρωση της οποίας απαιτείται η εύρυθμη αλληλεπίδραση διαφόρων ανατομικών δομών, ορμονών, περιβαλλοντικών και γενετικών παραγόντων.^{1,2} Υπάρχουν ενδείξεις που υποστηρίζουν την ύπαρξη γενετικής βάσης σε κάποιες τουλάχιστον περιπτώσεις.^{3,4} Ένα διφασικό μοντέλο ορμονικού ελέγχου έχει προταθεί προκειμένου να ερμηνευθεί η ορχική κάθοδος στους φυσιολογικούς άρρενες.⁵ Σύμφωνα με αυτό, η πρώτη (διακοιλιακή) φάση συμβαίνει κατά τη διάρκεια του πρώτου τριμήνου της κύησης, οπότε οι όρχεις κατέρχονται από την ενδοκοιλιακή τους θέση στη περιοχή ανάπτυξης του μελλοντικού έσω βουβωνικού στομίου και θεωρείται ανδρογονο-ανεξάρτητη. Η δεύτερη (βουβωνο-οσχεϊκή) φάση θεωρείται ανδρογονο-εξαρτώμενη και επιτελείται κατά τη διάρκεια του τρίτου τριμήνου της κύησης, οπότε οι όρχεις κατέρχονται δια του βουβωνικού πόρου στον οσχεϊκό σάκο.

Πρόσφατα δεδομένα από μελέτες πειραματοζώων υποδηλώνουν ότι η ορμόνη τύπου-ινσουλίνης 3 (Insulin-like 3/INSL3) που προέρχεται από τα διάμεσα ορχικά κύτταρα του Leydig, διαδραματίζει θεμελιώδη ρόλο κατά τη διακοιλιακή φάση της ορχικής καθόδου ασκώντας έλεγχο επί της διαφοροποίησης του ορχικού οίακα.^{6,7} Η δράση αυτή μεσολαβείται από ένα μοναδικό και ειδικό υποδοχέα γνωστό ως LGR8 (Leucine-rich repeat-containing G protein-coupled Receptor 8) ή GREAT (G protein-coupled REceptor Affecting Testis descent).⁸⁻¹¹ Υπάρχουν επίσης ενδείξεις ότι αυτό το ορμονικό σύστημα επηρεάζει την ανδρική γονιμότητα μέσω παρακρινικής δράσης στον όρχι. Αδρά, η βιοσύνθεση της INSL3 στα κύτταρα Leydig διεγείρει τον LGR8

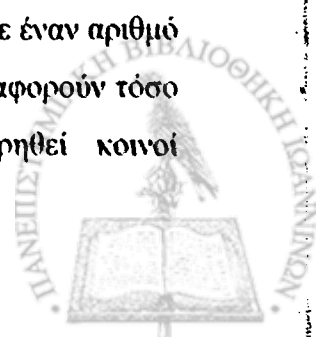


που εκφράζεται στα μειωτικά σπερματογόνια με αποτέλεσμα την καταστολή της απόπτωσης των βλαστικών κυττάρων.¹² Ωστόσο, η ακριβής αιτιολογία της κρυφορχίας καθώς και η παθογένεια της σχετιζόμενης με αυτήν υπογονιμότητας στον άνθρωπο παραμένει σε μεγάλο βαθμό αδιευκρίνιστη λόγω ατελούς γνώσης των ακριβών μοριακών μηχανισμών που ελέγχουν την ορχική κάθοδο.

Ο φυσιολογικός έλεγχος της σπερματογένεσης πραγματοποιείται από γονίδια που εντοπίζονται στην ευχρωματική περιοχή του μακρού σκέλους του χρωμοσώματος Υ (Yq11). Είναι πλέον σαφές ότι οι μικροαπαλοιφές της περιοχής αυτής αποτελούν την πιο συχνή γενετική αιτία σοβαρής ορχεοπάθειας με συνολική επίπτωση γύρω στο 8% σε πληθυσμούς υπογόνιμων ανδρών.¹³ Μικροαπαλοιφές της περιοχής Yq11 έχουν sporadικά ανακοινωθεί σε μεμονωμένους ασθενείς με ιστορικό κρυφορχίας (case report studies),¹⁴⁻¹⁸ καθώς επίσης και σε ανάλογους ασθενείς στα πλαίσια μελετών υπογόνιμων πληθυσμών.¹⁹⁻²⁸ Ωστόσο, αρκετές ανάλογες μελέτες απέτυχαν να εντοπίσουν τέτοια γενετικά ελλείμματα στους συμπεριλαμβανόμενους κρυφορχικούς ασθενείς.²⁹⁻³⁵

Η σχέση μεταξύ μικροαπαλοιφών της περιοχής Yq11 ειδικά με την κρυφορχία και την σχετιζόμενη με αυτήν υπογονιμότητα έχει ερευνηθεί σε έναν περιορισμένο σχετικά αριθμό μελετών με αμφίβολα μέχρι στιγμής τελικά συμπεράσματα.^{18,36-47} Έχει προταθεί η ύπαρξη μιας έμμεσης αιτιολογικής σχέσης, με την έννοια ότι οι μικροαπαλοιφές αυτές προκαλώντας σοβαρή ορχεοπάθεια καθιστούν τον όρχι ανίκανο να ανταποκριθεί στα φυσιολογικά ερεθίσματα που ρυθμίζουν την κάθοδό στο όσχεο.³⁸ Η άποψη αυτή έχει υιοθετηθεί από κάποιους ερευνητές,^{17,18,26,41} ωστόσο άλλοι είναι αντίθετοι.^{36,37,39,40,43}

Ένας ικανός αριθμός μελετών έχει πραγματοποιηθεί με βάση τα αρχικά μοντέλα πειραματοζώων, με σκοπό την αναζήτηση φυσικών μεταλλάξεων στα ανθρώπινα ομόλογα γονίδια INSL3 και LGR8 σε κρυφορχικούς ασθενείς. Μέχρι σήμερα έχουν ελεγχθεί περίπου 2000 ασθενείς και μάρτυρες συνολικά, για την πιθανή παρουσία μεταλλάξεων του γονιδίου INSL3 και η αθροιστική επίπτωση αυτών έχει υπολογιστεί γύρω στο 1,6-2,2%.⁴⁸⁻⁵⁰ Αυτό υποδηλώνει ότι η παρουσία μεταλλάξεων αυτού του γονιδίου ευθύνεται για ένα μικρό μόνο ποσοστό εμφάνισης της συγγενούς αυτής ανωμαλίας στον άνθρωπο.⁵¹ Από τη μια πλευρά, σε έναν αριθμό μελετών^{50,52-66} έχουν ανιχνευτεί γενετικές μεταβολές του γονιδίου που αφορούν τόσο σε ασθενείς όσο και σε μάρτυρες και επομένως έχουν θεωρηθεί κοινοί



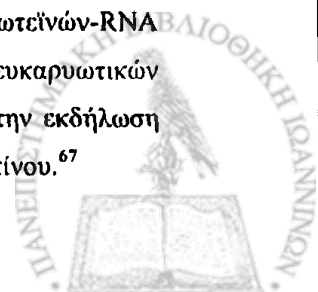
πολυμορφισμοί.⁽¹⁾ Από την άλλη πλευρά, σε κάποιες μελέτες, έχουν ανιχνευτεί γενετικές μεταβολές του γονιδίου αποκλειστικά σε πάσχοντες (όχι σε φυσιολογικούς μάρτυρες) και επομένως έχουν θεωρηθεί πραγματικές μεταλλάξεις.^{50,54-57,60-62,66} Παρόλα αυτά, η ύπαρξη μιας αιτιολογικής σχέσης δεν έχει μέχρι σήμερα τελεσίδικα αποδειχθεί.⁵⁰

Η ανθρώπινη φυλοδεσμευτική σφαιρίνη του ορού (sex hormone-binding globulin, SHBG) επηρεάζει τη βιοδιαθεσιμότητα των στεροειδών ορμονών, δεσμεύοντας τις με ειδικό τρόπο, ελέγχοντας έτσι την πρόσβασή τους στα κύτταρα στόχους.⁶⁸ Πρόσφατα περιγράφηκε ένας πεντανουκλεοτιδικός επαναληπτικός πολυμορφισμός (TAAAA)_n που εντοπίζεται στο 5' άκρο εντός της αλληλουχίας *alu*⁽²⁾ του εγγύς προαγωγέα του γονιδίου SHBG, ο οποίος επηρεάζει τη μεταγραφική του δραστηριότητα *in vitro*.⁶⁹ Ο πολυμορφισμός αυτός έχει βρεθεί ότι στον άνθρωπο συσχετίζεται με το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών, την ηλικία εμμηναρχής και ίσως συμβάλλει στη παρατηρούμενη διακύμανση των επιπέδων της SHBG στο πλάσμα μεταξύ των διαφόρων ατόμων.⁷⁰⁻⁷⁴ Λαμβάνοντας υπόψη ότι η δεύτερη φάση της ορχικής καθόδου είναι ανδρογονο-εξαρτώμενη,⁵ και ότι τα επίπεδα της SHBG μπορεί να είναι αυξημένα σε ασθενείς με κρυπορχία,⁷⁵ ερευνήθηκε για πρώτη φορά διεθνώς στην παρούσα μελέτη η πιθανότητα ύπαρξης συσχέτισης/γενετικής ζεύξης αυτού του πολυμορφισμού με τον κρυπορχικό φαινότυπο.

Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε σε έναν ευρύ παιδιατρικό πληθυσμό, ο οποίος εμφανίζει όλες τις δυνατές φαινοτυπικές εκφράσεις της κρυπορχίας. Σκοπός

⁽¹⁾ Πολυμορφισμός σύμφωνα με τον ορισμό του Βρετανού οικολόγου γενετιστή E.B Ford (1940) είναι «η εμφάνιση δύο ή περισσότερων μορφών ενός γενετικού στίγματος στο ίδιο φυσικό περιβάλλον, με τέτοιες συχνότητες που η συντήρηση της σπανιότερης μορφής δεν μπορεί να δικαιολογηθεί από την επανάληψη μιας μετάλλαξης αποκλειστικά». Ένας πολυμορφισμός μπορεί να επηρεάζει ή όχι το φαινότυπο ενός οργανισμού. Οι πολυμορφισμοί που δεν επηρεάζουν το φαινότυπο καλούνται συχνά «ουδέτεροι».⁶⁷

⁽²⁾ Πρόκειται για βραχείες αλληλουχίες ($\cong 300\text{bp}$) DNA που αναγνωρίζονται από το περιοριστικό ένζυμο *Alu* (*Arthrobacter luteus*). Αποτελούν τα αφρονότερα ($>10^6$) κινητά στοιχεία του ανθρώπινου γενώματος ($\cong 10\%$ του ανθρώπινου γενώματος αποτελείται από τέτοιες αλληλουχίες). Ωστόσο, $<0,5\%$ είναι πολυμορφικές. Προέρχονται από το μικρό κυτοπλασματικό 7SL RNA που αποτελεί συστατικό του «μορίου αναγνώρισης σημάτων» (signal recognition particle), ένα σύμπλεγμα πρωτεϊνών-RNA που αναγνωρίζει και μεταφέρει ειδικές πρωτεΐνες στο ενδοπλασματικό δίκτυο των ευκαρυωτικών κυττάρων. Οι παρεμβολές (insertions) αυτών των αλληλουχιών έχουν συσχετιστεί με την εκδήλωση διαφόρων κληρονομικών νοσημάτων συμπεριλαμβανομένων και διαφόρων μορφών καρκίνου.⁶⁷



της μελέτης ήταν να αξιολογηθεί η πιθανότητα κατά πόσο: α) συγκεκριμένοι γενετικοί τόποι της περιοχής Yq11 που ως γνωστό σχετίζονται με τη ρύθμιση της σπερματογένεσης (παράγοντας αζωοσπερμίας a, b, c; AZoospermia Factor a, b, c; AZFa, AZFb, AZFc) παίζουν ρόλο στην σύνθεση παραγόντων που προάγουν ή παρακωλύουν τη ορχική κάθοδο, δηλαδή εάν οι μικροαπαλοιφές της περιοχής Yq11 εμπλέκονται στην παθογένεια ή συμβάλλουν στην εμφάνιση κάποιου συγκεκριμένου κρυσορχικού φαινοτύπου (διερεύνηση της πιθανότητας άμεσης συσχέτισης μεταξύ αυτών των μικροαπαλοιφών και κρυσορχίας), β) γενετικές μεταβολές του γονιδίου INSL3 συσχετίζονται με την κρυσορχία, και γ) ο αριθμός των επαναλήψεων (n) της πολυμορφικής επαναληπτικής αλληλουχίας (TAAAA)_n του εγγύς προαγωγέα του γονιδίου SHBG συσχετίζεται με την εμφάνιση κρυσορχίας.



2. Το γεννητικό σύστημα του άνδρα: ανατομία-φυσιολογία

Το γεννητικό σύστημα του άνδρα αποτελείται από τους κύριους γεννητικούς αδένες (όρχεις ή δίδυμοι), την εκφορητική οδό του σπέρματος, τους επικουρικούς γεννητικούς αδένες και από το πέος. Επιγραμματικά επομένως το ανδρικό γεννητικό σύστημα συγκροτείται από τις εξής ανατομικές δομές (Εικόνα 1):

I. Κύριοι γεννητικοί αδένες – ανδρικές γονάδες (όρχεις)

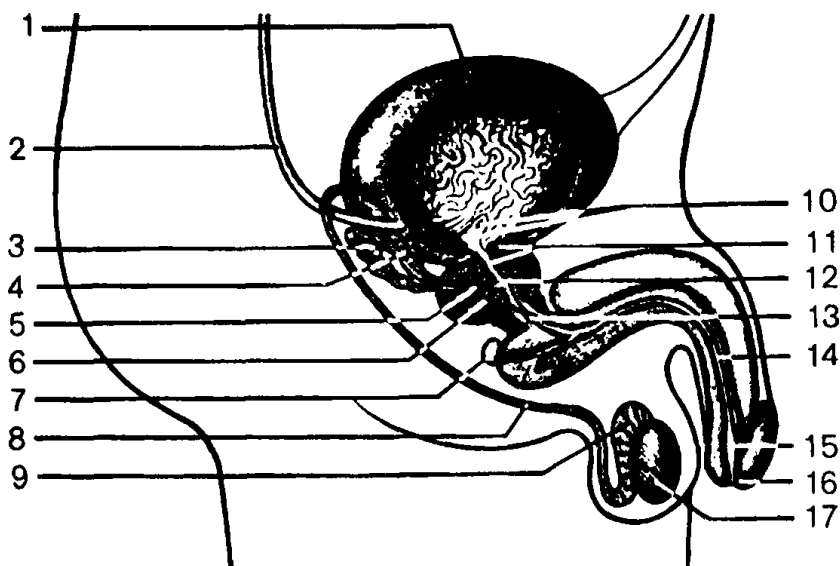
II. Εκφορητική οδός του σπέρματος

1. Επιδιδυμίδες
2. Σπερματικοί πόροι
3. Εκσπερματιστικοί πόροι

III. Επικουρικοί γεννητικοί αδένες

1. Σπερματοδόχες κύστεις
2. Προστάτης
3. Βολβουρηθραίοι αδένες ή αδένες του Cowper
4. Αδένες του Littre

IV. Πέος

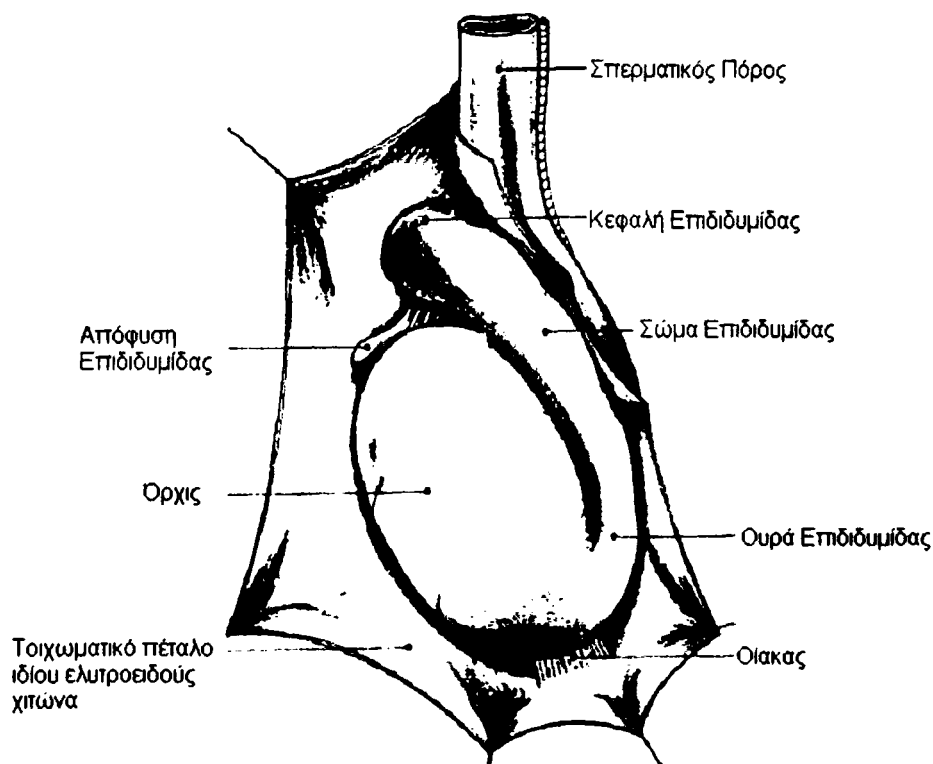


Εικόνα 1. Το ανδρικό γεννητικό σύστημα σε σχέση με το κατώτερο ουροποιητικό σύστημα. 1=Ουροδόχος κύστη, 2=Ουρητήρας, 3=Σπερματοδόχος κύστη, 4=Σπερματική λήκυθος, 5= Εκσπερματιστικός πόρος, 6=Προστάτης, 7=Βολβουρηθραίος αδένας, 8= Σπερματικός πόρος, 9= Επιδιδυμίδα, 10=Κυστικό τρίγωνο, 11=Κυστικός αυχένας και προστατική ουρήθρα, 12= Σπερματικό λοφίδιο, 13=Υμενώδης ουρήθρα, 14=Πείκη ουρήθρα, 15=Σκαφοειδής βόθρος, 16=Έξω στόμιο ουρήθρας, 17=Όρχις (τροποποιημένη από αναφορά 76).



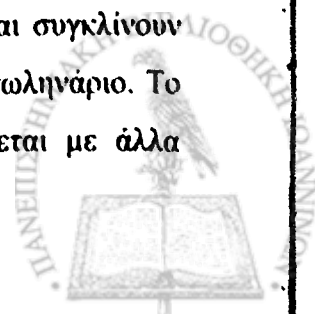
2.1. Στοιχεία ανατομίας

Ο κάθε όρχις έχει σχήμα ελλειψοειδές και είναι αποπλατυσμένος στα πλάγια. Το μήκος του είναι περίπου 4-5 cm, το πλάτος του 2,5-3,5 cm, το βάρος του 10-14 gr και ο όγκος του 15-25 ml. Το πρόσθιο χείλος του είναι ελεύθερο, ενώ το οπίσθιο έχει προς τα πάνω τις πύλες, μέσω των οποίων εισέρχονται τα αγγεία και τα νεύρα. Κατά μήκος του οπίσθιου χείλους κατέρχεται η επιδιδυμίδα και ανέρχεται ο σπερματικός πόρος. Στον άνω πόλο εντοπίζεται η κεφαλή της επιδιδυμίδας, ο κάτω πόλος συμφύεται με το όσχεο μέσω ενός συνδέσμου που ονομάζεται οίακας (Εικόνα 2).

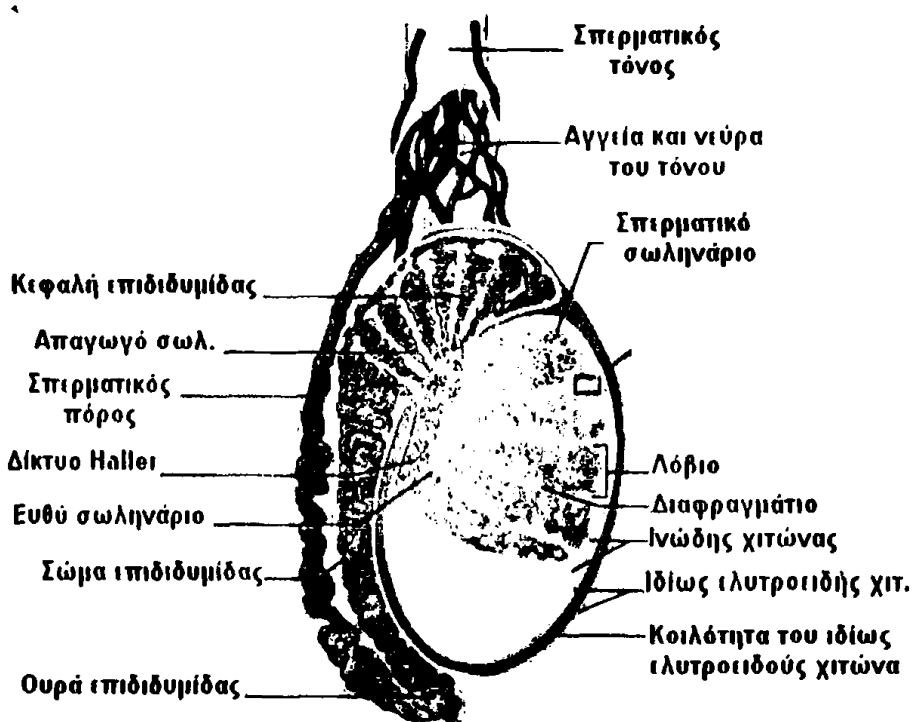


Εικόνα 2. Σχηματική παράσταση της ανατομίας του όρχεως.⁷⁷

Ο όρχις αποτελείται από τον ινώδη χιτώνα, τα σπερματικά σωληνάκια, τη διάμεση ουσία, τα αγγεία και τα νεύρα. Ο ινώδης χιτώνας περιβάλλει εξωτερικά τον όρχι και σχηματίζει στο άνω τριτημόριο του οπίσθιου χείλους του μια πάχυνση που ονομάζεται μεσαύλιο ή σώμα του Higmore (rete testis). Από το μεσαύλιο εκπορεύονται ινώδη διαφραγμάτια που χωρίζουν το ορχικό παρέγχυμα σε 250-300 ορχικά λόβια. Τα σπερματικά σωληνάκια αρχίζουν με τυφλό άκρο κάτω από τον ινώδη χιτώνα (3-4 σε κάθε ορχικό λόβιο), πορεύονται σπειροειδώς και συγκλίνουν προς το μεσαύλιο όπου ενώνονται και σχηματίζουν ένα βραχύ κοινό σωληνάριο. Το κοινό αυτό σωληνάριο εισέρχεται μέσα στο μεσαύλιο, αναστομώνεται με άλλα



παρόμοια σωληνάρια και δημιουργεί το δίκτυο του Haller. Το δίκτυο αυτό αποτελείται από 6-12 εκφορητικά σωληνάρια που εκβάλλουν στην κεφαλή της επιδιδυμίδας. Κάθε σπερματικό σωληνάριο εμφανίζει δυο μοίρες, την εσπειραμένη, στην οποία παράγονται τα σπερματοζωάρια και την ευθεία, από την οποία αποχετεύονται (Εικόνα 3).



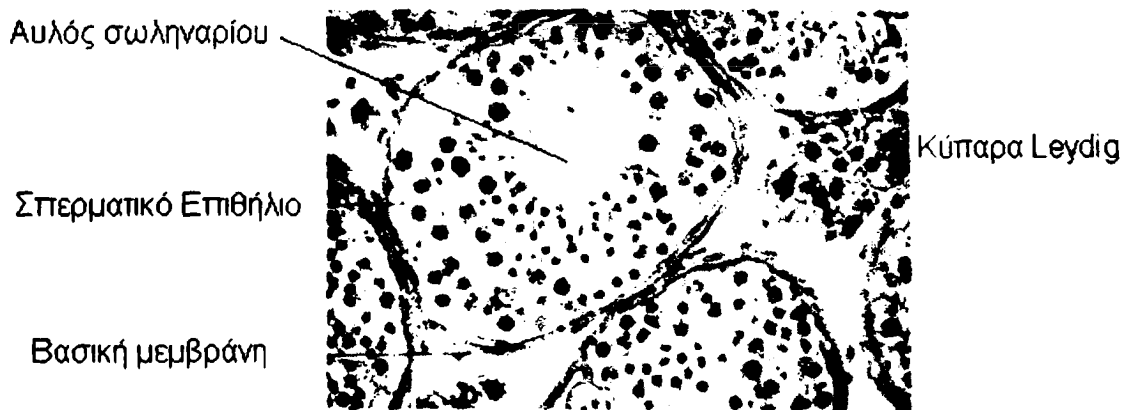
Εικόνα 3. Όρχις και η εσωτερική ανατομία του.⁷⁷

Το τοίχωμα του εσπειραμένου σωληναρίου αποτελείται από τη βασική μεμβράνη και από το επιθήλιο (Εικόνα 4). Το επιθήλιο αποτελείται από δυο είδη κυττάρων, τα στηρικτικά κύτταρα του Sertoli που διατάσσονται κατά μήκος της βασικής μεμβράνης και τα σπερματογόνα κύτταρα σε διάφορα στάδια ανάπτυξης. Στην έξω επιφάνεια των σωληναρίων βρίσκονται τα μυοειδή κύτταρα που έχουν την ικανότητα να συσπώνται και να συμβάλλουν, μαζί με άλλους παράγοντες, στην προώθηση των ακίνητων σπερματοζωαρίων προς την επιδιδυμίδα. Τα σπερματικά σωληνάρια αποτελούν το 85% του συνολικού όγκου των όρχεων. Η διάμεση ουσία αποτελείται από συνδετικό ιστό, ο οποίος παρεμβάλλεται μεταξύ των εσπειραμένων σωληναρίων και από τα διάμεσα κύτταρα του Leydig (Εικόνα 4).

Η αγγείωση του όρχεως γίνεται μέσω της έσω σπερματικής αρτηρίας (κλάδου της κοιλιακής αορτής), της εκφορητικής αρτηρίας ή αρτηρίας του σπερματικού πόρου

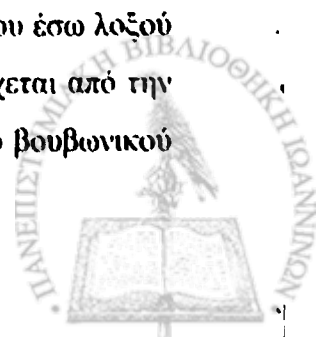


(κλάδου της έσω λαγόνιας αρτηρίας) και της έξω σπερματικής ή κρεμαστήριας (κλάδου της κάτω επιγάστριας αρτηρίας). Η φλεβική αποχέτευση γίνεται από το εν τω βάθει και το επιπολής φλεβικό δίκτυο. Το εν τω βάθει δίκτυο αποτελείται από την έσω σπερματική φλέβα που αριστερά εκβάλλει στην αριστερή νεφρική φλέβα και δεξιά στην κάτω κοίλη φλέβα, την εκφορητική που εκβάλλει στο προστατικό πλέγμα, την φλέβα του σπερματικού τόνου που εκβάλλει στην κάτω επιγάστρια και την κρεμαστήρια που εκβάλλει στην έσω σαφηνή. Το επιπολής φλεβικό δίκτυο σχηματίζεται από τις οσχεϊκές που εκβάλλουν στις έξω αιδοϊκές και από τις επιπολής περινεϊκές που εκβάλλουν στις έσω αιδοϊκές. Η νεύρωση του όρχεως γίνεται από ίνες που ξεκινούν από το ορχικό πλέγμα. Το πλέγμα αυτό είναι προέκταση του κοιλιακού πλέγματος και σχηματίζεται από ίνες του συμπαθητικού και παρασυμπαθητικού.

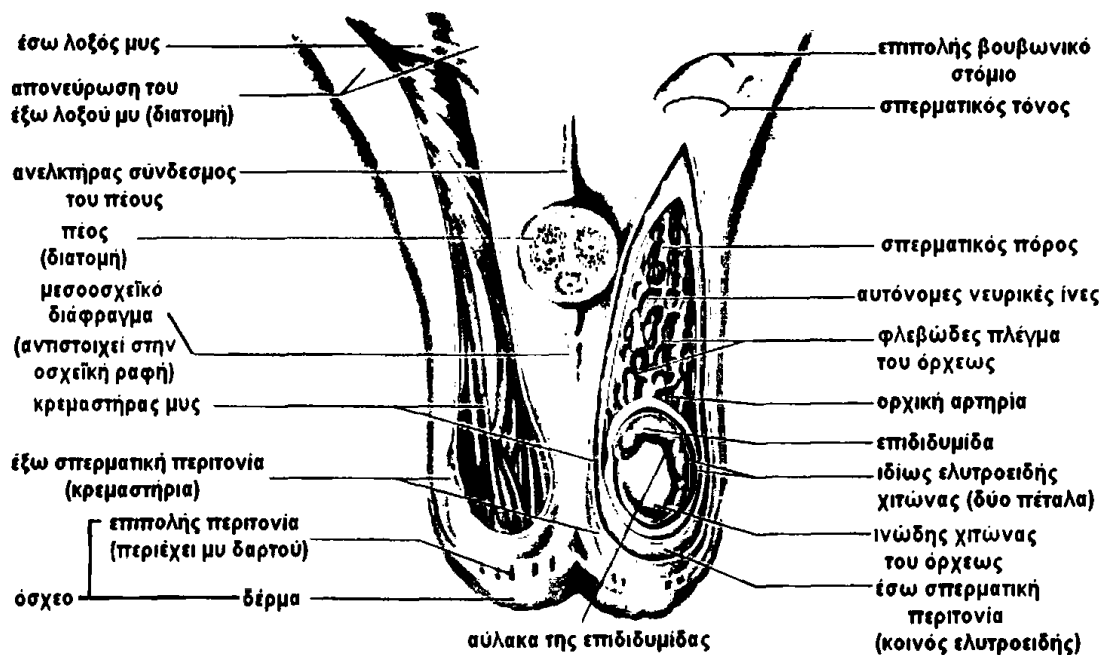


Εικόνα 4. Φυσιολογικά σπερματικά σωληνάκια.⁷⁷

Οι όρχεις περιβάλλονται από πολλούς χιτώνες που είναι προσεκβολές των διαφόρων στιβάδων του πρόσθιου κοιλιακού τοιχώματος. Αυτοί, από τα έξω προς τα μέσα είναι: το όσχεο, ο δαρτός, η κρεμαστήρια περιτονία, ο έξω κρεμαστήρας μυς, ο κοινός ελυτροειδής χιτώνας και ο ίδιος ελυτροειδής χιτώνας (Εικόνα 5). Ειδικότερα, το όσχεο είναι το δερματικό περίβλημα του όρχεως. Ο δαρτός είναι ένα λεπτό, ινομυώδες πέταλο που συνάπτεται στενά με το δέρμα. Στον τόνο των λείων μυϊκών ινών του οφείλεται η ρυτίδωση του όσχεου. Η κρεμαστήρια περιτονία αποτελεί την συνέχεια της επιπολής κοιλιακής περιτονίας και συνδέεται με την απονεύρωση του έξω λοξού μυ. Ο έξω κρεμαστήρας μυς είναι η προσεκβολή των ινών του έσω λοξού και του εγκάρσιου κοιλιακού μυ. Ο κοινός ελυτροειδής χιτώνας προέρχεται από την εγκάρσια περιτονία, η οποία καταδύεται μέσα στο κοιλιακό στόμιο του βουβωνικού



πόρου, επαλείφει τα τοιχώματα του πόρου και περιβάλλει τον όρχι μαζί με την επιδιδυμίδα. Ο ίδιος ελυτροειδής χιτώνας είναι ο ορογόνος χιτώνας του όρχεως και προέρχεται από το περίτονο. Εμφανίζει δύο πέταλα, το περισπλάχνιο που περιβάλλει τον όρχι και την επιδιδυμίδα και το περίτονο που επαλείφει τον κοινό ελυτροειδή χιτώνα. Τα δύο αυτά πέταλα ανακάμπτουν το ένα στο άλλο, κατά μήκος του οπίσθιου χείλους του όρχεως, και έτσι σχηματίζεται μια μικρή πτυχή, το μεσόρχιο. Ανάμεσα στα δύο πέταλα του ίδιου ελυτροειδούς χιτώνα σχηματίζεται μια κοιλότητα, η οποία όταν γεμίζει από ποσότητα ορώδους υγρού σχηματίζει την υδροκλήλη.



Εικόνα 5. Το όσχεο και τα περιβλήματά του.⁷⁷

Η εκφορητική οδός του σπέρματος ξεκινά από την ευθεία μοίρα των σπερματικών σωληναρίων του όρχεως και το δίκτυο του Haller και συνεχίζεται κατά σειρά με τη σύστοιχη επιδιδυμίδα, τον σπερματικό πόρο και τον εκσπερματιστικό πόρο.

Η επιδιδυμίδα βρίσκεται στον άνω πόλο και στο οπίσθιο χείλος του όρχεως και έχει μήκος 5-6cm. Αποτελείται από τρία μέρη, την κεφαλή, το σώμα και την ουρά. Η κεφαλή βρίσκεται στον άνω πόλο του όρχεως, με τον οποίο συνδέεται με τα εκφορητικά σωληνάρια. Το σώμα φέρεται στο οπίσθιο χείλος και χωρίζεται από την έξω επιφάνεια του όρχεως με τον κόλπο της επιδιδυμίδας. Ο τελευταίος αποτελεί μια



αύλακα που σχηματίζεται από την κατάδυση του περισπλάχνιου πετάλου του ιδίως ελυτροειδούς, που από κοινού περιβάλλει τον όρχι και την επιδιδυμίδα, μεταξύ των δύο αυτών οργάνων. Η ουρά, τέλος, φθάνει ως τον κάτω πόλο του όρχεως, όπου ανακάμπτει προς τα πάνω και μεταπίπτει στο σπερματικό πόρο. Η αιμάτωση της επιδιδυμίδας προέρχεται από την έσω σπερματική αρτηρία και την αρτηρία του σπερματικού πόρου. Η επιδιδυμίδα καλύπτεται από ορογόνο. Το τοίχωμα της περιέχει αραιές μυϊκές ίνες και επενδύεται από δίστοιβο κυλινδρικό επιθήλιο. Το pH στην επιδιδυμίδα είναι αλκαλικό και προφυλάσσει τα σπερματοζώαρια επιτρέποντας την ωρίμανσή τους.

Ο σπερματικός πόρος αρχίζει από τον κάτω πόλο του όρχεως, ως συνέχεια της ουράς της επιδιδυμίδας, και φθάνει μέχρι τη βάση του προστάτη, όπου αναστομώνεται με τη σπερματοδόχο κύστη σχηματίζοντας τον εκσπερματιστικό πόρο. Έχει μήκος 40-45cm. Στην αρχή πορεύεται ελικοειδώς κατά μήκος του οπίσθιου χείλους του όρχεως και επί τα εντός της επιδιδυμίδας (ορχική μοίρα) και ύστερα φέρεται προς τα πάνω μέχρι το υποδερμάτιο στόμιο του βουβωνικού πόρου (τονική μοίρα). Η μοίρα αυτή πορεύεται στο πίσω μέρος του σπερματικού τόνου, όπου μπορεί να ψηλαφηθεί. Στην πορεία του στον βουβωνικό πόρο, τον συνοδεύουν: η έσω και έξω σπερματική αρτηρία, η αρτηρία του πόρου, το φλεβικό δίκτυο που θα σχηματίσει πιο πάνω τις σπερματικές φλέβες, λεμφαγγεία και νεύρα, ενώ περιλαμβάνονται και ίνες του κρέμαστήρα μυ. Όλα τα παραπάνω περικλείονται σε λεπτό στρώμα περιτονίας και συναποτελούν τον σπερματικό τόνο. Στη συνέχεια περνά το βουβωνικό πόρο και φθάνει στο κοιλιακό του στόμιο (βουβωνική μοίρα), όπου αποχωρίζεται από το σπερματικό τόνο και περνά στην κοιλιακή κοιλότητα. Στο σημείο αυτό, αφού χιαστεί με τα κάτω επιγάστρια και τα έξω λαγόνια αγγεία, πορεύεται στο πλάγιο πυελικό τοίχωμα (πυελική μοίρα), χιάζεται στη συνέχεια με τον ουρητήρα και πορεύεται πίσω από την ουροδόχο κύστη και επί τα εντός της σπερματοδόχου κύστης μέχρι τη βάση του προστάτη (κυστική μοίρα). Η τελευταία αυτή μοίρα είναι διευρυμένη και λέγεται σπερματική λήκυθος. Ο σπερματικός πόρος έχει λεπτό αυλό και παχύ τοίχωμα που αποτελείται από βλεννογόνο (κυλινδρικό δίστοιβο επιθήλιο), υποβλεννογόνιο και ισχυρό μυϊκό χιτώνα στον οποίο διακρίνονται τρία στρώματα μυϊκών ινών.

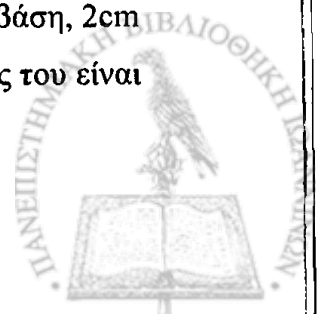
Οι σπερματοδόχες κύστεις βρίσκονται πάνω από τη βάση του προστάτη ανάμεσα στον πυθμένα της ουροδόχου κύστης και στο απευθυσμένο. Η κάθε μια από



αυτές εμφανίζει σχήμα σακοειδές-απιοειδές, αποπλατυσμένο από εμπρός προς τα πίσω και παρουσιάζει δύο επιφάνειες (πρόσθια και οπίσθια), δύο χείλη (έσω και έξω) και δύο άκρα (το έξω και το έσω). Η πρόσθια επιφάνεια της σπερματοδόχου κύστης συνάπτεται προς τα πίσω με τον πυθμένα της ουροδόχου κύστης και προς τα εμπρός με τον προστάτη. Η οπίσθια επιφάνεια έρχεται σε σχέση με το απευθυσμένο, από το οποίο μπορεί να ψηλαφηθεί. Το έσω χείλος ακουμπά στη σπερματική λήκυθο. Το έξω χείλος έρχεται σε επαφή με τον προστάτη. Το έξω άκρο είναι σε στενή σχέση με τον ουρητήρα, ενώ, τέλος, το έσω άκρο είναι στενό και αναστομώνεται με το σύστοιχο πόρο, αντίστοιχα προς τη βάση του προστάτη για να σχηματιστεί ο εκσπερματιστικός πόρος, ο οποίος και διασχίζει την κεντρική ζώνη του τελευταίου. Στην σπερματοδόχο κύστη διακρίνεται ο βλεννογόνος (που είναι πτυχωτός), το υποβλεννογόνο στρώμα (που αποτελείται από πυκνό συνδετικό ιστό καλυμμένο από λεπτό στρώμα μυϊκών ινών) και την κάψα (από συνδετικό ιστό επίσης). Η αιμάτωση των σπερματοδόχων κύστεων είναι η ίδια με εκείνη του προστάτη.

Ο εκσπερματιστικός πόρος (μήκους 2cm) σχηματίζεται, πάνω από τη βάση του προστάτη, από τη συνένωση της σπερματικής ληκύθου με τον αυχένα της σπερματοδόχου κύστης. Στη συνέχεια φέρεται λοξά μέσα στον αδένα (κεντρική ζώνη), από τα άνω και πίσω προς τα κάτω και εμπρός και εκβάλλει στην προστατική μοίρα της ουρήθρας, στα πλάγια του σπερματικού λοφιδίου.

Ο προστάτης είναι ένα όργανο μικτής ιστολογίας, αποτελούμενο από αδενικό (που καταλαμβάνει το 70% του αδένα) και ινομυώδες στρώμα (καταλαμβάνει το υπόλοιπο 30% του αδένα). Τοπογραφικά βρίσκεται αμέσως κάτω από τον αυχένα της κύστης και περιβάλλει την αρχή της ουρήθρας, πίσω από την ηβική σύμφυση, και πάνω από τα ουρογεννητικό διάφραγμα (που αποτελείται κυρίως από τον ανεγκτήρα μυ του πρωκτού), έμπροσθεν από το ορθό (από το οποίο χωρίζεται με την ισχυρή περιτονία του Denovillier και την ευθυκυστική πτυχή του περιτοναίου που διαμορφώνει το Δουγλάσειο χώρο). Έχει μέγεθος και σχήμα κάστανου και μακροσκοπικά (σε οβελιαία διατομή) παρουσιάζει μια βάση (επιφάνεια επαφής με την ουροδόχο κύστη), μια κορυφή (περιφερικό άκρο σε επαφή με την μεμβρανώδη ουρήθρα), δύο πλάγιες επιφάνειες, καθώς και τη πρόσθια και οπίσθια επιφάνεια. Οι εξωτερικές διαστάσεις του προστάτη είναι: 4cm η εγκάρσια διάμετρος στη βάση, 2cm η προσθοπίσθια διάμετρος και 2,5-3cm η επιμήκης διάμετρος, ενώ το βάρος του είναι περίπου 20gr.



Η αρτηριακή αγγείωση του προστάτη προέρχεται από την κάτω κυστική αρτηρία (κλάδος της έσω λαγόνιας αρτηρίας), κύριοι κλάδοι της οποίας είναι οι ουρηθραίες αρτηρίες και οι αρτηρίες της κάψας. Αρτηριακή παροχή προς τον προστάτη φέρουν επίσης οι έσω αιδοϊκές και οι μέσες αιμορροϊδικές αρτηρίες. Η φλεβική αποχέτευση επιτυγχάνεται μέσω του πλούσιου περιπροστατικού φλεβικού πλέγματος που συνδέεται με την εν τω βάθει ραχιαία φλέβα του πέους και τις έσω λαγόνιες φλέβες, ενώ η λεμφική αποχέτευση γίνεται κυρίως προς τους έσω λαγόνιους και θυρεοειδείς λεμφαδένες. Ο προστάτης λαμβάνει αυτόνομη (συμπαθητική και παρασυμπαθητική) νεύρωση μέσω του πυελικού πλέγματος και σωματική νεύρωση μέσω του αιδοϊκού νεύρου. Οι αυτόνομες ίνες του πυελικού πλέγματος σχηματίζουν το προστατικό πλέγμα λίγο πριν την είσοδό τους στον αδένα, ενώ ένα μεγάλο μέρος τους σχηματίζει μέρος από τα αγγειονευρώδη δεμάτια. Τα τελευταία πορεύονται στα οπισθοπλάγια του αδένα και καταλήγουν στα σηραγγώδη νεύρα, ίνες των οποίων είναι υπεύθυνες για την έναρξη της διαδικασίας της στύσης.

Το πέος αποτελεί το όργανο της συνουσίας. Μορφολογικά παρουσιάζει τρία τμήματα, τη ρίζα, το σώμα και τη βάλανο. Η ρίζα του πέους προσφύεται ισχυρά στην επιφάνεια του ουρογεννητικού διαφράγματος και στα οστά της πυέλου. Το σώμα του πέους είναι κινητό και ελεύθερο και καταλήγει στη βάλανο του πέους, από την οποία χωρίζεται με τη στεφανιαία αύλακα. Η βάλανος φέρει το έξω στόμιο της ουρήθρας.

Το σώμα του πέους αποτελείται από τα δύο σηραγγώδη σώματα του πέους (ραχιαία) και το σπογγιώδες σώμα του πέους ή σηραγγώδες σώμα της ουρήθρας (κοιλιακά). Στο τελευταίο πορεύεται η σηραγγώδης μοίρα της ανδρικής ουρήθρας. Το σπογγιώδες σώμα του πέους θα καταλήξει στο άκρο του σώματος του πέους όπου διευρύνεται σχηματίζοντας τη βάλανο που καλύπτει τα άκρα των δύο σηραγγωδών σωμάτων. Το κάθε σηραγγώδες σώμα αποτελείται από πολύπλοκο δίκτυο δοκίδων (κολλαγόνες, ελαστικές και λείες μυϊκές ίνες που επενδύονται από ενδοθήλιο) που δημιουργεί τους σηραγγώδεις κόλπους στο εσωτερικό των σηραγγωδών σωμάτων. Η πλήρωση των σηραγγωδών σωμάτων με αίμα προκαλεί τη στύση.

Τέλος, εκτός από τις παραπάνω λειτουργικές ανατομικές δομές στο ανδρικό γεννητικό σύστημα συχνά απαντούν και ορισμένα μη λειτουργικά υπολειμματικά εμβρυϊκά όργανα τα συνηθέστερα από τα οποία είναι:

1. Η απόφυση του όρχεως ή (ορχική) υδατίδα κύστη του Morgani
2. Η απόφυση της επιδιδυμίδας



3. Η παραδιδυμίδα ή όργανο του Giraldes
4. Οι πλανητικοί πόροι (σωληνάρια ή σωματία)

2.2. Στοιχεία φυσιολογίας

2.2.1. Ο άξονας υποθάλαμος-υπόφυση-όρχεις

Η ανάπτυξη των δευτερογενών ανδρικών χαρακτηριστικών και η ανδρική σεξουαλική συμπεριφορά σχετίζονται άμεσα με τη λειτουργία των όρχεων. Τα στεροειδή και κυρίως η τεστοστερόνη διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην έκφραση του ανδρικού φαινοτύπου, στην ανάπτυξη και λειτουργία των γεννητικών οργάνων, καθώς επίσης και στη σεξουαλική λειτουργία και την ικανότητα προς γονιμοποίηση.

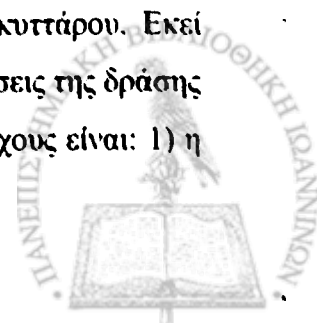
Ο υποθάλαμος, η υπόφυση, ο φλοιός των επινεφριδίων και οι όρχεις αποτελούν το ορμονικό γεννητικό σύστημα του άνδρα, το οποίο δρα σαν άξονας, δηλαδή το ένα όργανο επηρεάζει τη λειτουργία του άλλου. Ο άξονας «υποθάλαμος-υπόφυση-όρχεις» λειτουργεί αμφίδρομα. Ο υποθάλαμος δέχεται ερεθίσματα από το περιβάλλον, το Κεντρικό Νευρικό Σύστημα και από τον όρχι και απελευθερώνει κατά ώσεις μια ορμόνη που λέγεται εκλυτική των γοναδοτροπινών ορμόνη (Gonadotropin Releasing Hormone, GnRH). Η GnRH είναι ένα δεκαπεπτίδιο που εκκρίνεται από τον τοξοειδή πυρήνα του υποθαλάμου προς το πυλαίο αγγειακό σύστημα υποθαλάμου-υπόφυσης. Στη συνέχεια μεταφέρεται προς τον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης, όπου διεγείρει την έκκριση της θυλακιοτρόπου ορμόνης (Follicle Stimulating Hormone, FSH) και της ωχρινοτρόπου ορμόνης (Luteinising Hormone, LH).

Συγκεκριμένα, η FSH είναι μια γλυκοπρωτεΐνη που παράγεται και απελευθερώνεται κατά κύματα από τα γοναδοτρόπα κύτταρα του πρόσθιου λοβού της υπόφυσης. Ασκεί τη δράση της στα κύτταρα Sertoli, όπου συνδέεται με ειδικούς μεμβρανικούς υποδοχείς προάγοντας τη σύνθεση και έκκριση ειδικών πρωτεϊνών που συνδέονται με τα ανδρογόνα και τα μεταφέρουν στα όργανα-στόχους. Η έκκριση της αναστέλλεται κυρίως από τις ανασταλτίνες (inhibins) (η κύρια ισομορφή στον ορό των ανδρών είναι η ινχιμπίνη β). Σε βαριές βλάβες του σπερματικού επιθηλίου η παραγωγή των ανασταλτινών, από τα κύτταρα Sertoli, μειώνεται ή/και αναστέλλεται με αποτέλεσμα η έκκριση της FSH να αυξάνεται σημαντικά. Τα αυξημένα επίπεδα της αποτελούν ισχυρό δείκτη μη επανορθώσιμης βλάβης του σπερματικού επιθηλίου.



Η LH είναι μια γλυκοπρωτεΐνη που παράγεται επίσης από τα κύτταρα του πρόσθιου λοβού της υπόφυσης. Η έκκρισή της στη συστηματική κυκλοφορία γίνεται κατά εκκριτικά κύματα, η συχνότητα των οποίων είναι χαρακτηριστική για κάθε είδος ζώου. Στον άνθρωπο είναι 1 κύμα/90-120min. Η συχνότητα αυτή αντανακλά και τη συχνότητα έκκρισης της GnRH. Η κύρια δράση της αφορά στα κύτταρα Leydig, όπου συνδέεται με τους ειδικούς υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης και ενεργοποιεί το μηχανισμό σύνθεσης των στεροειδικών ορμονών με κύριο εκπρόσωπο την τεστοστερόνη. Η έκκριση της LH καταστέλλεται κυρίως από τη τεστοστερόνη (αλλά και από τους μεταβολίτες της, όπως η διδροτεστοστερόνη) και τα οιστρογόνα. Φαίνεται, ότι τα ανδρογόνα ασκούν την ανασταλτική τους δράση στον υποθάλαμο, ενώ τα οιστρογόνα (οιστραδιόλη) στην υπόφυση.

Η τεστοστερόνη είναι το ισχυρότερο ανδρογόνο του πλάσματος. Η σύνθεση της γίνεται στα μιτοχόνδρια και στο ενδοπλασματικό δίκτυο των κυττάρων Leydig. Τα επινεφρίδια, εκκρίνουν μεγάλες ποσότητες ανδρογόνων, (διδροεπιανδροστερόνη (Dehydroepiandrosterone, DHEA), θειική διδροεπιανδροστερόνη (DHEA-S) και ανδροστενεδιόνη), προδρόμων της τεστοστερόνης, ωστόσο παράγουν μόνο το 5% της συνολικής ορμόνης. Στους φυσιολογικούς άνδρες, το 2-3% της ορμόνης κυκλοφορεί ελεύθερο και αποτελεί το βιολογικά δραστικό κλάσμα, το 40-50% είναι στερεά συνδεδεμένο με την SHBG, ενώ το υπόλοιπο συνδέεται χαλαρά με τις λευκωματίνες. Το κλάσμα αυτό έχει τη δυνατότητα να αποδεσμεύεται εύκολα από τις λευκωματίνες και να εισέρχεται ταχύτατα στα κύτταρα στόχους. Η ορθή εκτίμηση της βιολογικά δραστικής (βιοδιαθέσιμης) τεστοστερόνης πρέπει να περιλαμβάνει, εκτός από την ελεύθερη, και τη συνδεδεμένη με λευκωματίνες ορμόνη. Η ενδοορμική συγκέντρωση της ορμόνης είναι 50-100 φορές υψηλότερη από ότι στο αίμα. Στον αυλό των σπερματικών σωληναρίων η τεστοστερόνη βρίσκεται συνδεδεμένη με τη δεσμεύουσα τα ανδρογόνα πρωτεΐνη (Androgen Binding Protein, ABP), η οποία αποτελεί τον ενδοσωληναριακό μεταφορέα της. Η δράση της ασκείται στους ανδρογονικούς υποδοχείς των κυττάρων Sertoli και μέσω των κυττάρων αυτών επιδρά στη σπερματογένεση. Η FSH ενισχύει τη δράση της. Στο κύτταρο, η τεστοστερόνη μπορεί να μετατραπεί από την 5-α-αναγωγή σε διδροτεστοστερόνη και με τις δύο μορφές της συνδέεται με τον υποδοχέα που την οδηγεί στον πυρήνα του κυττάρου. Εκεί παράγεται mRNA που προκαλεί σύνθεση πρωτεϊνών και άλλες εκφράσεις της δράσης των ανδρογόνων. Οι κύριες δράσεις των τελευταίων στα κύτταρα-στόχους είναι: 1) η



ρύθμιση της έκκρισης γοναδοτροπινών με τον άξονα «υποθαλάμου-υπόφυσης», 2) η έναρξη και διατήρηση της σπερματογένεσης, 3) η διαφοροποίηση του γεννητικού συστήματος του άνδρα κατά την εμβρυϊκή ζωή και 4) η προαγωγή της σεξουαλικής ωρίμανσης κατά την ήβη.

Η αύξηση των επιπέδων της τεστοστερόνης στο αίμα ξεκινά μια ανάδρομη διαδικασία (feed-back) που αναστέλλει την απελευθέρωση της GnRH στον υποθάλαμο, με αποτέλεσμα την αναστολή της παραγωγής των γοναδοτροπινών από την υπόφυση και τον περιορισμό της παραγωγής τεστοστερόνης μέχρι τα επίπεδά της στο αίμα επανέλθουν στα φυσιολογικά όρια. Θα πρέπει να σημειωθεί, ότι και τα παραγόμενα από τους όρχεις οιστρογόνα επίσης αναστέλλουν την έκκριση τόσο της LH όσο και της FSH.

Τα κύτταρα Leydig αποτελούν το σημαντικότερο ενδοκρινικό σύστημα του όρχεως. Βρίσκονται σε ομάδες μεταξύ των σπερματικών σωληναρίων, κατά μήκος των αγγείων και των λεμφαγγείων, όπου περιβάλλονται από μακροφάγα και κύτταρα του συνδετικού ιστού. Αποτελούν το 5%-12% του συνολικού όγκου του αδένου. Η βιοσύνθεση και έκκριση των στεροειδών ορμονών διεγείρεται από την LH διαμέσου των ειδικών υποδοχέων της κυτταρικής μεμβράνης (είναι τα μοναδικά κύτταρα του όρχεως που έχουν LH υποδοχείς). Επιπλέον, η LH σε συνδυασμό με άλλους παράγοντες που εκκρίνονται από τα άλλα κύτταρα του όρχεως (Sertoli, μακροφάγα, μυοειδή) ασκεί τροφική δράση στα κύτταρα Leydig.

Τα κύτταρα Sertoli είναι ευμεγέθη, επιμήκη κύτταρα που διατάσσονται στη βασική μεμβράνη των σπερματικών σωληναρίων και εκτείνονται έως τον αυλό τους. Το περίγραμμα τους είναι ανώμαλο με πολλές διακλαδιζόμενες κυτταροπλασματικές προεκβολές που εφάπτονται με αυτές των γειτονικών κυττάρων και εγκοιλώνουν τα εξελισσόμενα σπερματογόνια. Αποτελούν πολύπλοκο σύστημα που διαδραματίζει πρωτεύοντα ρόλο στη σπερματογένεση και ιδιαίτερα στη διαφοροποίηση των σπερματικών κυττάρων.

Η κύρια λειτουργία τους είναι εκκριτική. Υπό την επίδραση της FSH εκκρίνουν περισσότερες από 100 πρωτεΐνες (ABP, ανασταλτίνες, ακτιβίνη, τρανσφερίνη, σερουλοπλασμίνη, MIS (ανασταλτική ουσία των Μυλλερείων πόρων, Müllerian Inhibiting Substance), αυξητικούς παράγοντες (TGFβ-3, IGF), κυτοκίνες, μόρια προσκόλλησης (ιντεγκρίνες, καντερίνες) κ.λ.π.).



Επίσης, τα κύτταρα Sertoli με τις ισχυρές διακυττάρειες συνδέσεις τους (zonula occludens complexes) σχηματίζουν ένα μη διαπερατό φραγμό, τον αιματο-ορχικό που εμποδίζει την είσοδο των λεμφοκυττάρων και των αντισωμάτων στον αυλό των σπερματικών σωληναρίων, όπως και την είσοδο των σπερματοζωαρίων στη λεμφική και στη συστηματική κυκλοφορία. Έτσι, τα γεννητικά κύτταρα απομονώνονται από το ανοσοποιητικό σύστημα και δεν εκτίθενται σε αυτοάνοση αντίδραση. Επιπλέον, εμποδίζει την ελεύθερη διακίνηση ουσιών από το αίμα προς τα σωληνάρια, δημιουργώντας ένα προστατευμένο μικροπεριβάλλον για τη σπερματογένεση.

Συνοπτικά, οι κυριότερες λειτουργίες των υποστηρικτικών κυττάρων Sertoli είναι: 1) η εξασφάλιση της θρέψης και εξέλιξης των κυττάρων του σπερματικού επιθηλίου, 2) η συμμετοχή στη δημιουργία του αιματο-ορχικού φραγμού, 3) η παραγωγή της ABP που μεταφέρει την τεστοστερόνη στα σπερματικά σωληνάρια και στην κεφαλή της επιδιδυμίδας, 4) η παραγωγή της ινχιμπίνης που αναστέλλει εκλεκτικά την έκκριση της FSH από την υπόφυση και 5) η παραγωγή, κατά την εμβρυϊκή ζωή, της MIS.

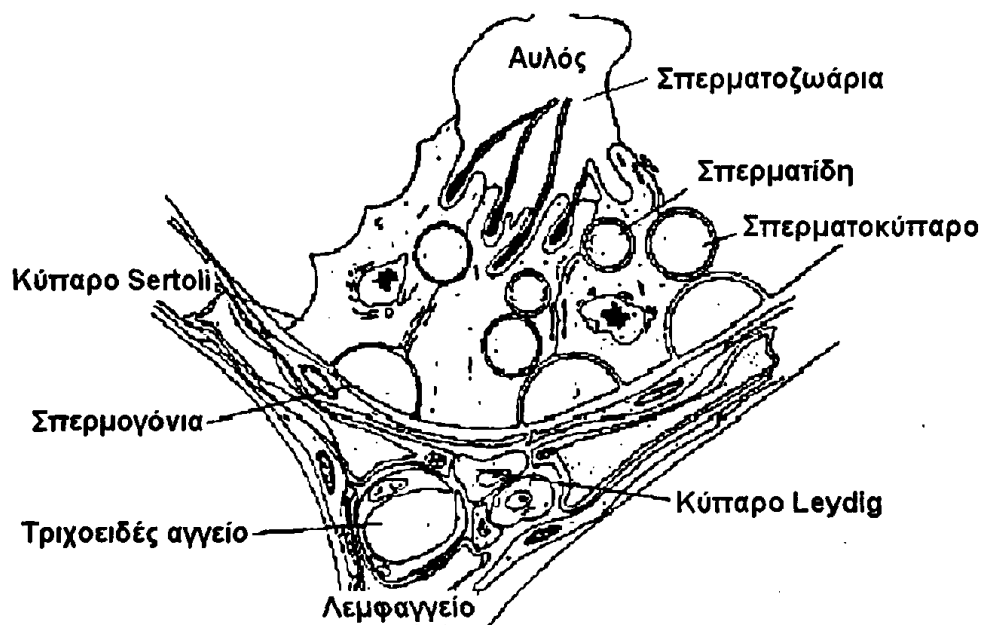
2.2.2. Σπερματογένεση

Η αναπαραγωγή του ανθρώπου γίνεται, με αμφιγονία, δηλαδή με συνένωση δύο ετερόφυλων γεννητικών κυττάρων (γαμετών). Οι γαμέτες, παράγονται μέσα στους γεννητικούς αδένες από άωρα γεννητικά κύτταρα με μια εξελικτική διαδικασία που ονομάζεται γαμετογένεση. Στον άνδρα, οι γεννητικοί αδένες είναι οι όρχεις, οι γαμέτες τα σπερματοζωάρια, ενώ η γαμετογένεση καλείται σπερματογένεση.

Σπερματογένεση είναι η διαδικασία σχηματισμού των σπερματοζωαρίων από άωρα γεννητικά κύτταρα (σπερματογόνια) μέσω ενός συνδυασμού κυτταρικών διαιρέσεων (μειωτικών και μιτωτικών) και διαφοροποιήσεων. Τα σπερματοζωάρια που προκύπτουν δεν είναι γενετικά πανομοιότυπα, εξαιτίας των μειωτικών χιασμάτων που εξασφαλίζουν αυτή την ετερογένεια. Στον άνδρα, ο χρόνος για την ολοκλήρωση της σπερματογένεσης είναι 64 ημέρες. Αν συνυπολογισθεί και ο χρόνος διάβασης των σπερματοζωαρίων μέσω της επιδιδυμίδας (2-11 ημέρες), τότε για να σχηματιστεί το σπερματοζωάριο και να εμφανιστεί στο σπέρμα, απαιτούνται περίπου 75 ημέρες. Πρέπει να σημειωθεί, ότι τα σπερματογόνια δεν εξελίσσονται όλα συγχρόνως, αλλά βρίσκονται σε ανόμοια στάδια διαφοροποίησης. Έτσι εξηγείται γιατί στον άνδρα, σε αντίθεση με τη γυναίκα, έχουμε συνεχή παραγωγή ώριμων γεννητικών κυττάρων.

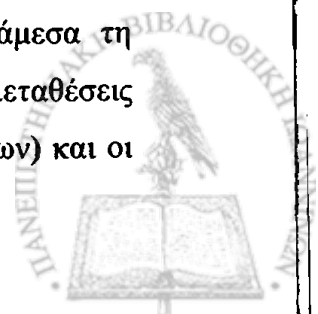


Η διαδικασία της σπερματογένεσης μπορεί να διακριθεί σε δύο φάσεις. Η πρώτη χαρακτηρίζεται από μιτωτικές διαιρέσεις των σπερματογονίων, οι οποίες ανανεώνουν και κατανέμουν το γενετικό υλικό σε όσο το δυνατό περισσότερα κύτταρα. Από τα σπερματογόνια δημιουργούνται τα σπερματοκύτταρα πρώτης τάξης, τα οποία με μειωτικές διαιρέσεις ελαττώνουν τον αριθμό των χρωμοσωμάτων από 46 σε 23 και δίνουν γένεση στα σπερματοκύτταρα δεύτερης τάξης. Από αυτά, με μιτωτική πάλι διαίρεση και ωρίμανση δημιουργούνται οι σπερματίδες. Στη δεύτερη φάση, οι σπερματίδες, χωρίς να υποστούν άλλη διαίρεση, ωριμάζουν και μετατρέπονται σε σπερματοζώαρια. Από ορισμένους συγγραφείς η πρώτη φάση ονομάζεται σπερματογένεση, ενώ η δεύτερη σπερμιόγνεση. Όλα τα παραπάνω κύτταρα διατάσσονται σε στιβάδες με τα πιο άωρα προς την βασική μεμβράνη και τα πιο ώριμα προς τις ανώτερες στιβάδες και τον αυλό των σπερματικών σωληναρίων. Τα ώριμα σπερματοζώαρια πέφτουν ελεύθερα στον αυλό των σωληναρίων μέσω των οποίων μεταφέρονται και αποθηκεύονται στις επιδιδυμίδες (Εικόνα 6).



Εικόνα 6. Σχηματική παράσταση της σπερματογένεσης. Διακρίνονται τα κύτταρα Sertoli που εγκολπώνουν τα σπερματικά κύτταρα στις διάφορες φάσεις ανάπτυξής τους.⁷⁷

Η φυσιολογική σπερματογένεση προϋποθέτει παρουσία ενός φυσιολογικού χρωμοσώματος Y. Ανωμαλίες του χρωμοσώματος αυτού επηρεάζουν άμεσα τη φυσιολογική φυλετική διαφοροποίηση και τη γονιμότητα. Οι μεταθέσεις (συνηθέστερα μεταξύ χρωμοσώματος Y και αυτοσωματικών χρωμοσωμάτων) και οι



μικροαπαλοιφές είναι οι συχνότερα παρατηρούμενες δομικές ανωμαλίες και ασκούν επιβλαβή επίδραση στη σπερματογένεση.

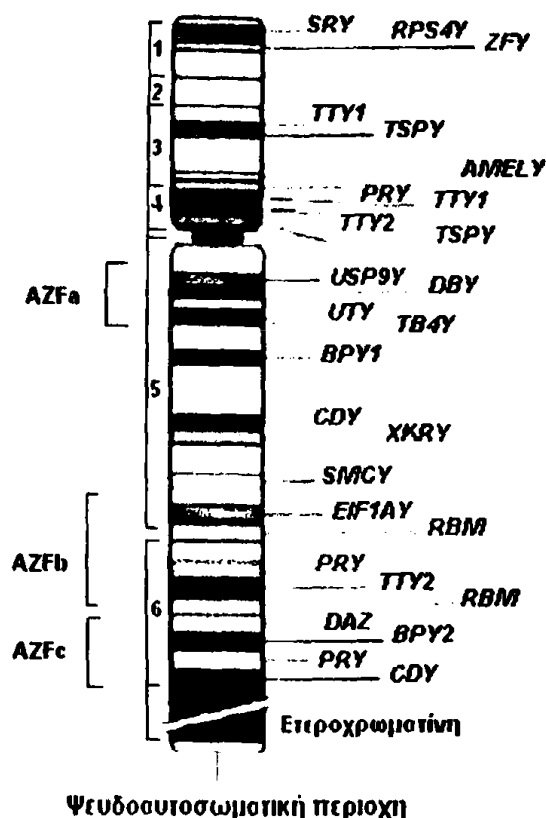
Το χρωμόσωμα Y είναι αρκετά πολύπλοκο και περιλαμβάνει ετεροχρωματίνη που εντοπίζεται μεταξύ επαναλαμβανόμενων γονιδίων, γονιδιακών οικογενειών και παλινδρομικών προτύπων (palindromic motifs). Η μη ανασυνδυαζόμενη περιοχή του χρωμοσώματος Y περιλαμβάνει τρεις τάξεις ευχρωματικών αλληλουχιών: α) εκείνων που έχουν προκύψει από μετάθεση από το χρωμόσωμα X κατά την εξέλιξη του χρωμοσώματος Y (X transposed), β) εκείνων που ομοιάζουν με αλληλουχίες του χρωμοσώματος X (X degenerate) και γ) εκείνων που επαναλαμβάνονται κατά μήκος του εγγύς τμήματος του βραχέως σκέλους (Yp) καθώς και κατά μήκος της μεγαλύτερης έκτασης του μακρού σκέλους (Yq).

Στην θέση του ανθρώπινου χρωμοσώματος Y όπου βρίσκεται η περιοχή AZF (Yq11.21-23), εντοπίζονται τρεις τόποι που σχετίζονται με την σπερματογένεση (AZFa, AZFb, και AZFc). Αυτοί οι τόποι συναθροίζονται και εδράζουν δυνητικά ή υποψήφια γονίδια, των οποίων η απουσία (μικροαπαλοιφή-microdeletion) επηρεάζει δραματικά την σπερματογένεση. Τέτοια γονίδια είναι τα DFFRY, USP9Y, DBY (AZFa), καθώς και τα συχνότερα υφιστάμενα απαλοιφή γονίδια των AZFb και AZFc περιοχών: EIF1AY, RBM, TTY2 (AZFb), DAZ, PRY και CDY1 (AZFc) (Εικόνα 7). Ειδικά στην AZFc περιοχή εδράζονται συνολικά οκτώ οικογένειες γονιδίων: BPY2, CDY1, DAZ, TTY3.1, TTY4.1, TTY17.1, CSPG4LY και GOLGA2LY.

Οι πιο συχνές μικροαπαλοιφές της περιοχής Yq11 συμβαίνουν στις περιοχές AZFc και AZFb. Δεν υπάρχει καθαρή συσχέτιση μεταξύ του μήκους της απαλοιφής και της προκύπτουσας ποιότητας σπέρματος ή ορχικής ιστολογίας. Ο φαινότυπος ποικίλλει από ολιγοσπερμία μέχρι αζωοσπερμία με ή χωρίς παρουσία εστιών ολοκληρωμένης σπερματογένεσης (μέχρι το στάδιο του σπερματοζωαρίου) στον όρχι. Ωστόσο όλοι οι ασθενείς με πλήρη απαλοιφή (complete deletion) της περιοχής AZFa ή της AZFb είναι αζωοσπερμικοί χωρίς ορχικές εστίες σπερματοζωαρίων και παρατηρείται ισχυρή γονοτυπική-φαινοτυπική συσχέτιση σε αυτές τις περιπτώσεις. Έτσι οι περιπτώσεις πλήρους απαλοιφής των περιοχών AZFa και AZFb συσχετίζονται με εμφάνιση απλασίας του σπερματικού επιθηλίου (Sertoli-cell-only syndrome-SCOS) ή αναστολή της σπερματογένεσης (arrest) στο στάδιο του πρωτογενούς σπερματοκυττάρου, αντίστοιχα. Ωστόσο, έχει αναφερθεί λήψη



σπερματοζωαρίων χειρουργικά από την επιδιδυμίδα ασθενούς με μερική απαλοιφή (partial deletion) της περιοχής AZFb.



Εικόνα 7. Γονίδια στο ανθρώπινο χρωμόσωμα Y (τροποποιημένη από αναφορά.⁷⁸

Από την άλλη πλευρά, η απαλοιφή της περιοχής της AZFc (πλήρης (b2-b4) ή μερική) συσχετίζεται με ετερογενή φαινοτυπική έκφραση μεταξύ των διαφόρων ατόμων που κυμαίνεται από SCOS έως σοβαρή μείωση του αριθμού, της κινητικότητας και της μορφολογίας των σπερματοζωαρίων στο εκσπέρμασμα. Αυτό υποδηλώνει ότι αν και η έναρξη της σπερματογένεσης ενδεχομένως δεν εξαρτάται από τα AZFc γονίδια, η παρουσία τους ωστόσο είναι κρίσιμη για την επίτευξη φυσιολογικής ποσοτικά και ποιοτικά σπερματογένεσης. Αντίθετα φαίνεται ότι τα γονίδια της περιοχής AZFb ρυθμίζουν τη μείωση και τα γονίδια της περιοχής AZFa πιθανότατα εμπλέκονται στη διαδικασία διαφοροποίησης των προμειωτικών μορφών βλαστικών κυττάρων και στη μίτωση. Μια μερική απαλοιφή της περιοχής AZFc (gr/gr), η οποία συνίσταται σε απουσία του μισού περιεχομένου της περιοχής, έχει περιγραφεί σε ασθενείς με ποικίλους βαθμούς διαταραχής της σπερματογένεσης και θεωρείται παράγοντας κινδύνου διαταραχής της σπερματογένεσης και καρκίνου των

όρχεων. Η δεύτερη σε συχνότητα μερική απαλοιφή της περιοχής AZFc (b2/b3), παρά το γεγονός ότι και αυτή συνίσταται σε απουσία ανάλογου αριθμού γονιδίων (το μισό περίπου γονιδιακό περιεχόμενο της περιοχής AZFc επίσης), φαίνεται ότι δεν ασκεί κάποια επίδραση στη σπερματογένεση και στη γονιμότητα. Η κλινική σημασία των μικροαπαλοιφών της περιοχής Yq11 συνοψίζεται στο **Παράρτημα 1 (Πίνακας 1)**.

Σπερματοζωάρια από τους όρχεις ασθενών με απαλοιφές των περιοχών AZFc (πλήρεις ή μερικές) και AZFb (μερικές), αναμένεται να γονιμοποιήσουν ωάρια επιτυχώς και να οδηγήσουν σε απογόνους με την ίδια συχνότητα όπως εκείνα υπογόνιμων ασθενών που δεν εμφανίζουν απαλοιφές. Επιπλέον, ένας υποπληθυσμός ασθενών με απαλοιφές της περιοχής AZFc εμφανίζει κάποιο βαθμό олиγοσπερμίας και χρειάζεται ενδοκυτταροπλασματική μικρογονιμοποίηση (Intracytoplasmic sperm injection, ICSI) Ο παθογενετικός ρόλος των μικροαπαλοιφών της περιοχής Yq11 στην ανδρική υπογονιμότητα έχει αμφισβητηθεί από αναφορές που περιγράφουν μικροαπαλοιφές σε αποδεδειγμένα γόνιμους άνδρες. Ωστόσο, η ανδρική γονιμότητα δεν είναι συνώνυμη με την νορμοζωοσπερμία. Η παθογενετική σημασία των μικροαπαλοιφών της περιοχής Yq11 συνίσταται σε ανεπάρκεια της σπερματογένεσης (spermatogenic failure) και όχι σε υπογονιμότητα. Σε σπάνιες περιπτώσεις, έχει επίσης αναφερθεί μεταβίβαση απαλοιφής της περιοχής AZFc μετά από φυσιολογική σύλληψη από υπογόνιμο πατέρα σε υπογόνιμο γιο. Επίσης, έχει αναφερθεί φυσική μεταβίβαση μερικής απαλοιφής της περιοχής AZFb σε τρεις γενιές. Είναι προφανές ακόμη, ότι η μεταβίβαση από τον πάσχοντα πατέρα είναι σχεδόν βέβαιη σε άρρενες απογόνους μετά από ICSI.

Σημαντική είναι ακόμη η παρατήρηση ότι σε μερικούς υπογόνιμους ασθενείς με μικροαπαλοιφές της περιοχής AZFc, έχουμε προοδευτική με το χρόνο μείωση της ορχικής σπερματογενετικής δραστηριότητας. Έτσι, σε τέτοιους ασθενείς όπως και σε άρρενες απογόνους τους πρέπει να προτείνεται κρυοσυντήρηση (cryopreservation) σπερματοζωαρίων που λαμβάνονται από το εκσπερμάτισμα ή μετά από ορχική βιοψία ανάλογα.

Έχει επίσης ανακοινωθεί ότι υπάρχει ενδεχόμενος κίνδυνος χρωμοσωματικής εμφάνισης ανευπλοειδίας (45,X0/46,XY και 45,X0) σε άρρενες απογόνους πατέρων-φορέων μικροαπαλοιφών της περιοχής Yq11. Αυτό αποδίδεται σε πιθανή πρόκληση χρωμοσωματικής αστάθειας λόγω της παρουσίας μεγάλων μικροαπαλοιφών στο άκρο του χρωμοσώματος Y. Με βάση αυτήν την πιθανότητα, συστήνεται προεμφυτευτική

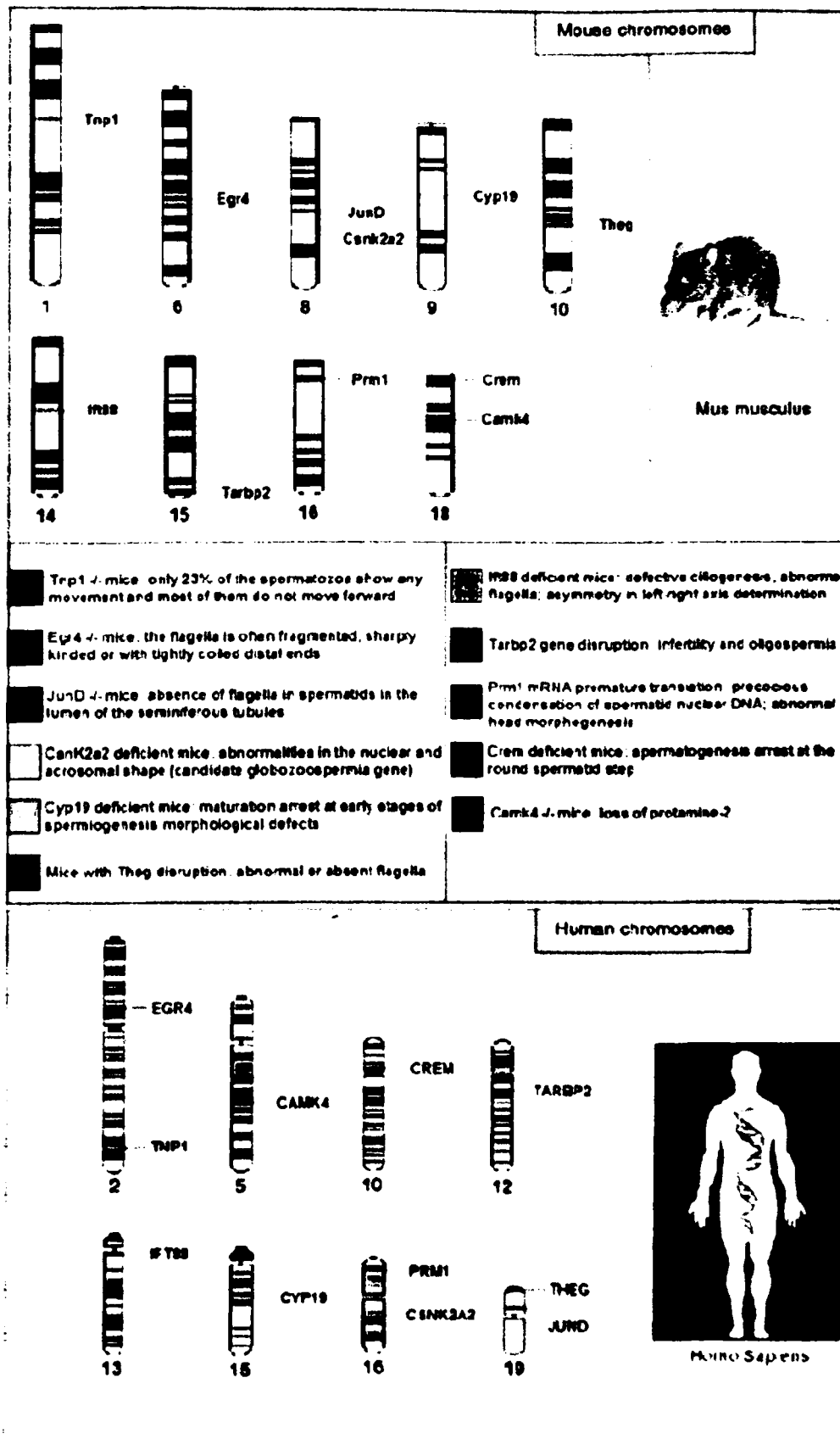


γενετική διάγνωση (preimplantation genetic diagnosis) σε περιπτώσεις μετά από ICSI σε ασθενείς με μικροαπαλοιφές της περιοχής Υq11 ώστε να αποτραπεί η μεταφορά εμβρύων 45,X0 (σύνδρομο Turner) ή 46,XXY (σύνδρομο Klinefelter).

Εκτός από τα προαναφερθέντα γονίδια, υπάρχουν και ορισμένα άλλα που εδράζονται σε αυτοσωματικά χρωμοσώματα και συμβάλουν στη φυσιολογική ρύθμιση της σπερμιόγερσης. Γενετικές μεταβολές που αφορούν σε αυτά τα γονίδια προκαλούν στον ποντικό πλήρη ή μερική αποτυχία της σπερμιόγερσης. Μερικά από αυτά τα γονίδια έχουν διατηρηθεί κατά την εξέλιξη και στον άνθρωπο (Εικόνα 8).

Η σπερμιόγερση είναι πολύ ευαίσθητη διαδικασία σε γενετικές μεταβολές. Μεταβολές στην έκφραση μοριακών παραγόντων στον όρχι εξαιτίας ελλειμμάτων έκφρασης αντιστοιχών υπεύθυνων γονιδίων μπορεί να οδηγήσουν σε διαταραχή της ολοκλήρωσης συγκεκριμένων σταδίων της σπερμιόγερσης, προκαλώντας αναστολή σε επίπεδο στρογγυλής σπερματίδας ή παραγωγή σπερματοζωαρίων με ανατομικά ή λειτουργικά ελλείμματα. Αν και τέτοιοι ασθενείς δεν είναι γόνιμοι *in vivo*, η εφαρμογή τεχνικών υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (ICSI), με χρήση σπερματίδων που προκύπτουν *in vivo* ή *in vitro*, μπορεί να τους προσφέρει τη δυνατότητα να αποκτήσουν απογόνους. Ωστόσο, η παράκαμψη των βιολογικών φραγμών που σχετίζονται με ελλείμματα της σπερμιόγερσης μέσω καλλιέργειας βλαστικών γενετικών κυττάρων και ακόλουθης τεχνολογίας υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, συνοδεύεται από κινδύνους μεταβίβασης γονιδιακών ελλειμμάτων στους απογόνους. Η προκύπτουσα φαινοτυπική έκφραση στους απογόνους (συνέπεια ελλειμματικής σπερμιόγερσης) εξαρτάται από τη χρωμοσωματική εντόπιση, τον τρόπο της μεταβίβασης του αντίστοιχου υπεύθυνου γονιδίου καθώς και/ή την παρουσία οποιασδήποτε μετάλλαξης γενετικής διαταραχής αυτού του γονιδίου στο γονότυπο της μητέρας.





Εικόνα 8. Γονίδια που ρυθμίζουν τη σπερμιογένεση: στα χρωμοσώματα του ανθρώπου και του ποντικού και αντίστοιχοι φαινότυποι, στο ανθρώπινο χρωμόσωμα.⁷⁹



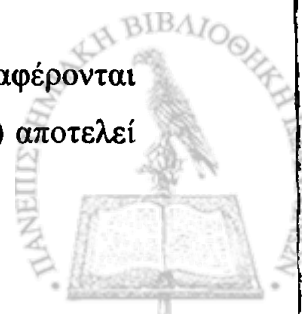
Για τη φυσιολογική εξέλιξη της σπερματογένεσης είναι απαραίτητη η συνεχής παρουσία τεστοστερόνης, FSH, καθώς και άλλων παραγόντων που στο μεγαλύτερο μέρος τους παραμένουν άγνωστοι. Η τεστοστερόνη συμμετέχει στη διαφοροποίηση των γεννητικών κυττάρων, την ωρίμανση των σπερματίδων και την απελευθέρωση των ώριμων σπερματοζωαρίων. Αποτελεί, επίσης, σημαντικό παράγοντα επιβίωσης για τα κύτταρα Sertoli που συνιστούν τα κύτταρα-κλειδιά στη διαδικασία ωρίμανσης του σπέρματος. Στον άνθρωπο η FSH ενισχύει τη δράση της τεστοστερόνης. Όταν η ενδο-ορχική στάθμη της FSH είναι ανεπαρκής, τα αρχέγονα σπερματογόνια δεν εξελίσσονται περαιτέρω και παραμένουν αδρανή στη βασική μεμβράνη των σπερματικών σωληναρίων, ενώ όταν τα αντίστοιχα επίπεδα της τεστοστερόνης είναι χαμηλά, τότε η σπερματογένεση αναστέλλεται στο επίπεδο των σπερματογονίων και των στρογγυλών σπερματίδων.

2.2.3. Το σπερματοζωάριο

Το φυσιολογικό σπερματοζωάριο αποτελείται από την κεφαλή, το σώμα και την ουρά. Η κεφαλή έχει μήκος 3-5 μm και πλάτος 1,5-3 μm , ενώ ο όγκος της υπολογίζεται μεταξύ 15 και 29 μm^3 . Καλύπτεται από το ακρόσωμα (40%-70% της κεφαλής), μια περιοχή πλούσια σε φωσφολιπίδια, γλυκοπρωτεΐνες και λυτικά ένζυμα με κυριότερο μια πρωτεάση, την ακρωσίνη, η οποία είναι απαραίτητη για τη διείσδυση του σπερματοζωαρίου στο ωάριο. Ο πυρήνας του είναι αποπλατυσμένος και περιέχει συμπυκνωμένη χρωματίνη. Το σώμα του σπερματοζωαρίου αποτελείται από τον αυχένα και το μέσο τμήμα. Ο αυχένας έχει μήκος περίπου 1 μm , ενώ το μέσο τμήμα έχει μήκος 5-7 μm και πλάτος 1 μm . Η ουρά του σπερματοζωαρίου αποτελείται από το κύριο μέρος με μήκος περίπου 45 μm και το τελικό τμήμα με μήκος 5-7 μm και είναι υπεύθυνη για τη κίνηση του σπερματοζωαρίου. Στο κέντρο της ουράς βρίσκεται το αξόνημα που περιέχει δύο κεντρικά και εννέα περιφερικά μικρονημάτια, στα οποία βασίζεται η κινητικότητα των σπερματοζωαρίων. Το αξόνημα περιβάλλεται από μιτοχόνδρια που παράγουν την ενέργεια για την κίνηση των σπερματοζωαρίων.

2.2.4. Ωρίμανση, μεταφορά και αποθήκευση του σπέρματος

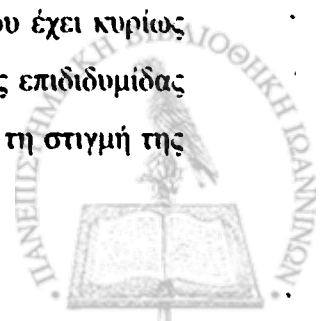
Με την εκφορητική οδό του σπέρματος τα σπερματοζωάρια μεταφέρονται από τη θέση παραγωγής τους προς τα έξω. Επιπλέον, η επιδιδυμίδα (ουρά) αποτελεί



όργανο αποθήκευσης σπερματοζωαρίων, ενώ συμβάλλει ουσιαστικά στην ωρίμανση (κινητικότητα, γονιμοποιητική ικανότητα), ιδιαίτερα κατά τη διέλευσή τους από τα απώτερα τμήματά της.⁸⁰⁻⁸² Οι μηχανισμοί με τους οποίους επιτελούνται οι λειτουργίες αυτές δεν είναι απόλυτα γνωστοί, ωστόσο φαίνεται ότι εξαρτώνται από τη σύσταση των εκκρίσεων της επιδιδυμίδας.⁸³ Η γλυκερυλ-φωσφορυλ-χολίνη, η καρνιτίνη, το σιαλικό οξύ καθώς και διάφορες ειδικές πρωτεΐνες αποτελούν ιδιαίτερα συστατικά του επιδιδυμικού υγρού.

Τα ώριμα σπερματοζωάρια απελευθερώνονται στον αυλό των εσπειραμένων σπερματικών σωληναρίων και προωθούνται προς τα ευθέα σωληνάκια. Μέχρις αυτό το σημείο δεν έχουν καμία κινητικότητα και δεν είναι σε θέση να γονιμοποιήσουν το ωάριο. Τις ικανότητες αυτές τις αποκτούν μόνο όταν περάσουν από το αποχετευτικό σύστημα του όρχεως και, κυρίως, την επιδιδυμίδα. Η ουρά της επιδιδυμίδας είναι το σημαντικότερο στοιχείο για την απόκτηση της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων. Στην κεφαλή της επιδιδυμίδας αρχίζουν οι εξεργασίες για την απόκτηση της ικανότητας των σπερματοζωαρίων για γονιμοποίηση. Εκεί υπάρχει μεγάλη ποσότητα τεστοστερόνης που φτάνει από τον όρχι συνδεδεμένη με την ABP. Η ελάττωση της τεστοστερόνης στην κεφαλή της επιδιδυμίδας έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση ή και την πλήρη εξαφάνιση της γονιμότητας και της βιωσιμότητας των σπερματοζωαρίων. Οι εξεργασίες αυτές συνεχίζονται στο σώμα και την ουρά, όπου ολοκληρώνεται η γονιμοποιητική ικανότητα του σπέρματος. Στην ουρά της επιδιδυμίδας γίνεται η αποθήκευση μεγάλου μέρους των σπερματοζωαρίων έως την εκσπερμάτιση. Εκτός από την τεστοστερόνη, στο επιδιδυμικό υγρό υπάρχουν και άλλες ουσίες, όπως πρωτεΐνες, ηλεκτρολύτες, λιπαρά οξέα, σιαλικό οξύ, υδατάνθρακες και δυο ειδικές ουσίες, η καρνιτίνη και η γλυκερυλ-φωσφορυλ-χολίνη. Μέχρι σήμερα δεν έχει αποδειχθεί η σημασία της καθεμίας από αυτές. Μια από τις πιο σημαντικές βλάβες της επιδιδυμίδας με επιπτώσεις στη γονιμότητα είναι η απόφραξη (π.χ. μετά από φλεγμονή) που όταν είναι αμφοτερόπλευρη οδηγεί σε αζωοσπερμία. Η απουσία της καρνιτίνης στο σπέρμα βοηθά στη διάγνωση.

Όσον αφορά στο σπερματικό πόρο, η κύρια αποστολή του είναι η μεταφορά των σπερματοζωαρίων από την ουρά της επιδιδυμίδας στο τελικό διευρυμένο άκρο του, τη σπερματοδόχο λήκυθο. Η περίσταση του τοιχώματος του (που έχει κυρίως συμπαθητική νεύρωση) συμμετέχει μαζί με τη σύσπαση της ουράς της επιδιδυμίδας και των σπερματοδόχων κύστεων στην προώθηση του σπέρματος κατά τη στιγμή της



εκσπερμάτισης. Τέλος, έχει προταθεί ότι ο ανθρώπινος σπερματικός πόρος πιθανόν επιτελεί απορροφητικές και απεκκριτικές λειτουργία).^{84,85}

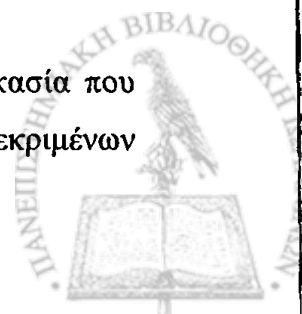
Ένα μεγάλο μέρος των σπερματοζωαρίων αποθηκεύεται στις ληκύθους (και στην ουρά της επιδιδυμίδας), το υγρό των οποίων αποτελεί ένα ελάχιστο μέρος του συνολικού όγκου του εκσπερματίσματος. Τα περιφερικά άκρα των σπερματοδόχων ληκύθων ενώνονται με τους αντίστοιχους πόρους των σπερματοδόχων κύστεων, σχηματίζοντας τον εκσπερματιστικό πόρο που εκβάλλει στο σπερματικό λοφίδιο της προστατικής ουρήθρας.

Οι επικουρικοί γεννητικοί αδένες πιστεύεται ότι επιτελούν σημαντικό αλλά εν πολλοίς άγνωστο ρόλο στην αναπαραγωγή. Παρατηρείται εξαιρετική διαφοροποίηση στην εξέλιξη αυτών των αδένων που εκφράζεται με την παρουσία εκσεσημασμένων ανατομικών, βιολογικών και λειτουργικών διαφορών μεταξύ των διαφόρων ειδών. Οι αδένες αυτοί είναι οι βασικοί υπεύθυνοι για την παραγωγή του σπερματικού υγρού, το οποίο αποτελεί το κύριο συστατικό του σπέρματος (>99%), ενώ το υπόλοιπο αποτελείται από σπερματοζωάρια (<1%).

Οι επικουρικοί γεννητικοί αδένες του ανθρώπου παράγουν και εκκρίνουν στο σπερματικό υγρό σε εξαιρετικά υψηλές συγκεντρώσεις πολλές και ισχυρές βιολογικές ουσίες, όπως φρουκτόζη (2mg/ml, κύριο εκκριτικό προϊόν των σπερματοδόχων κύστεων), κιτρικό οξύ (4mg/ml, κυρίως από τον προστάτη), σπερμίνη (3mg/ml), προσταγλανδίνες (200μg/ml), ψευδάργυρο (150μg/ml), πρωτεΐνες (40mg/ml) και ειδικά ένζυμα όπως ανοσοσφαιρίνες, πρωτεάσες, εστεράσες και φωσφατάσες. Ο φυσιολογικός ρόλος των ουσιών αυτών παραμένει σε μεγάλο βαθμό άγνωστος, με εξαίρεση τη δραστηριότητα ειδικών ενζύμων που συμβάλουν στην πήξη και ρευστοποίηση σπέρματος. Αν και στο σπερματικό υγρό δεν περιέχονται ενδεχομένως παράγοντες απολύτως απαραίτητοι για τη γονιμοποίηση, ωστόσο οι εκκρίσεις αυτές πιθανόν βελτιστοποιούν τις συνθήκες γονιμοποίησης ασκώντας ρυθμιστική δράση, αυξάνοντας την κινητικότητα και την βιωσιμότητα των σπερματοζωαρίων ή υποβοηθώντας τη μεταφορά τους μέσα στον ανδρικό και τον γυναικείο αναπαραγωγικό σωλήνα.

2.2.5. Διαδικασία της στύσης και της εκσπερμάτισης

Τα γεγονότα που οδηγούν στη στύση είναι μια πολύπλοκη διαδικασία που φυσιολογικά ξεκινά από το σεξουαλικό ερέθισμα, το οποίο μέσω συγκεκριμένων



διαβιβαστών (κεντρικό ρόλο έχει το μονοξείδιο του αζώτου –NO- αλλά και άλλοι) προκαλεί αύξηση της αρτηριακής παροχής αίματος προς τα σπυραγγώδη σώματα, με αποτέλεσμα η φλεβική παροχέτευση να ελαττώνεται καθώς οι εκφορητικές και οι υπό τον επιπολής χιτώνα κύριες φλέβες συμπιέζονται. Η διατήρηση της σύσπασης κατά τη φάση ηρεμίας οφείλεται στο συμπαθητικό, ενώ το παρασυμπαθητικό προκαλεί την αλυσίδα της έκλυσης των διαβιβαστών εκείνων που οδηγούν τελικά στην στύση.

Κατά τη στιγμή της εκσπερμάτισης γίνονται διαδοχικές συσπάσεις του τοιχώματος όλου του αποχετευτικού συστήματος του σπέρματος. Η διαδοχικότητα των συσπάσεων έχει ως αποτέλεσμα το σπέρμα που βγαίνει από το έξω στόμιο της ουρήθρας να μην έχει την ίδια σύσταση από την αρχή μέχρι το τέλος της εκσπερμάτισης. Αρχικά βγαίνουν οι εκκρίσεις των αδένων του Cooper που εκβάλλουν στον αυλό της ουρήθρας, το έκκριμα του προστάτη και το περιεχόμενο της σπερματικής ληκύθου. Στο αρχικό αυτό τμήμα του σπέρματος περιέχονται τα περισσότερα σπερματοζωάρια. Τελευταίο βγαίνει το περιεχόμενο των σπερματοδόχων κύστεων που είναι φτωχό σε σπερματοζωάρια και αναμιγνύεται με το υπόλοιπο σπέρμα αμέσως μετά την εκσπερμάτιση.

Ελάχιστα πριν την έναρξη της εκσπερμάτισης κλείνει ο αυχένος της ουροδόχου κύστης και συσπάται ο σπερματικός πόρος υπό την επίδραση του συμπαθητικού κεντρικού νευρικού συστήματος. Κατά τη διάρκεια της εκσπερμάτισης χαλαρώνει ο γραμμωτός σφιγκτήρας της ουρήθρας που νευρώνεται από το αιδοϊκό νεύρο και διευκολύνεται η έξοδος του σπέρματος προς την ουρήθρα, ενώ με την σύσπαση του κυστικού αυχένα, εμποδίζεται η παλινδρόμησή του προς την ουροδόχο κύστη.

2.2.6. Το σπέρμα

Το σπέρμα είναι η ρευστή μάζα, η οποία εκτοξεύεται από την ουρήθρα κατά την εκσπερμάτιση. Πρόκειται για ένα εναιώρημα σπερματοζωαρίων μέσα στο σπερματικό πλάσμα που προέρχεται από τη μείξη των εκκριμάτων του όρχεως, της επιδιδυμίδας και των επικουρικών αδένων του γεννητικού συστήματος.

Ο μέσος όγκος του σπέρματος ανά εκσπερμάτιση στον άνθρωπο ισούται περίπου με 3ml (2-6ml). Οι σπερματοδόχες κύστεις έχουν τη μέγιστη συμμετοχή στον όγκο του σπερματικού υγρού ($\cong 1,5-2\text{ml}$, $\cong 60\%$), ο προστάτης συμβάλλει περίπου



κατά 30% (0,5ml) ενώ οι αδένες του Cowper και Littre συμβάλλουν μόλις κατά περίπου 5% (0,1-0,2ml) όσο δηλαδή και οι κύριοι γεννητικοί αδένες ($\cong 5\%$).

Φυσιολογικά, το σπερματικό επιθήλιο παράγει καθημερινά $100-300 \times 10^6$ σπερματοζωάρια. Από αυτά το 70% είναι ζωντανά, το 50% εμφανίζουν ζωηρή κίνηση, ενώ ανωμαλίες μορφολογίας εμφανίζονται σε ποσοστό μέχρι και 70%. Ο αριθμός των σπερματοζωαρίων ελαττώνεται προοδευτικά μετά από επανειλημμένες εκσπερματίσεις, ενώ μειώνεται συγχρόνως και ο όγκος του σπέρματος. Αποχή μακράς διάρκειας προκαλεί επίσης μείωση του αριθμού των σπερματοζωαρίων, καθώς και την αύξηση του αριθμού των ανώμαλων μορφών.

Εκτός από τα ώριμα σπερματοζωάρια, στο σπέρμα βρίσκονται και άωρα κύτταρα, όπως οι σπερματίδες και σπάνια κάποιες άλλες πρόδρομες μορφές τους. Σε παθολογικές καταστάσεις (φλεγμονές, νεοπλασίες κ.α.) είναι συχνή η ανίχνευση επιθηλιακών κυττάρων, λευκοκυττάρων, ερυθρών αιμοσφαιρίων και νεοπλασματικών κυττάρων.



3. Εμβρυολογική ανάπτυξη του ανδρικού γεννητικού συστήματος

3.1. Καθορισμός του φύλου-σεξουαλική διαφοροποίηση του άρρενος

Κατά την εμβρυογένεση των θηλαστικών κάθε άτομο ανεξάρτητα του φυλετικού χρωμοσωμικού γονότυπού του, δύναται να αναπτύξει τόσο ανδρικό όσο και θηλυκό αναπαραγωγικό σύστημα. Προκειμένου να αναπτυχθεί ένα φυσιολογικό θήλυ ή άρρεν άτομο απαιτείται κάποιος μηχανισμός επιλογής που να εξασφαλίζει την ανάπτυξη του ενός μόνο από τα δύο γεννητικά συστήματα με ταυτόχρονη υποστροφή του άλλου.

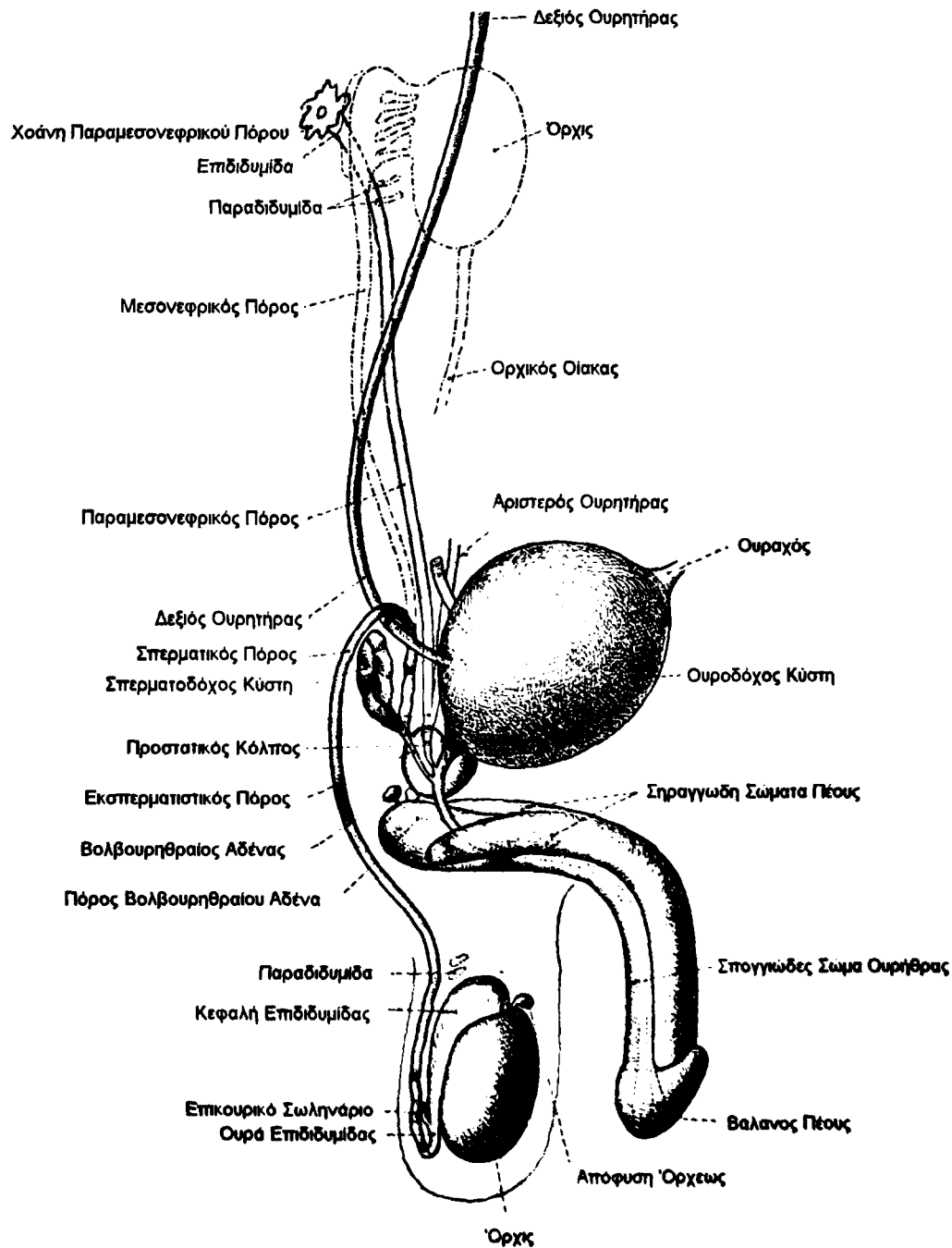
Η ανάπτυξη του ανδρικού φαινοτύπου εξαρτάται από την παρουσία του χρωμοσώματος Y στο γονιδίωμα που κληροδοτείται από τον πατέρα κατά την στιγμή της γονιμοποίησης. Το γενετικό φύλο δηλαδή καθορίζεται τη στιγμή της συνένωσης των γαμετών στα έμβρυα των θηλαστικών. Η ανάπτυξη του φυλετικού φαινοτύπου επιτελείται σε δύο διακριτά στάδια: α) στάδιο του φυλετικού καθορισμού και β) στάδιο της φυλετικής διαφοροποίησης. Ο φυλετικός καθορισμός επιτελείται κατά την περίοδο της οργανογένεσης οπότε σχηματίζονται οι γονάδες (όρχεις-ωοθήκες). Η φυλετική διαφοροποίηση αποτελεί επακόλουθη διαδικασία που εξαρτάται από την παρουσία ή απουσία των ορμονών που παράγουν οι γονάδες κατά την περίοδο της εμβρυϊκής ανάπτυξης, με τελικό αποτέλεσμα την εμφάνιση φυσιολογικά είτε του ανδρικού είτε θηλυκού φαινοτύπου.

Τα πρωτοποριακά πειράματα του Jost διερεύνησαν το ρόλο των εμβρυϊκών ορμονών κατά την διάρκεια της ανάπτυξης.^{86,87} Ο Jost ήταν ο πρώτος που πρότεινε ένα μοντέλο σύμφωνα με το οποίο, δύο εμβρυϊκές ορχικές ορμόνες ρυθμίζουν την διαφοροποίηση του φύλου στα πλακουντοφόρα θηλαστικά. Η μία διεγείρει τη διαφοροποίηση των πόρων του Wolf και την αρρενοποίηση των έξω γεννητικών οργάνων και η άλλη αναστέλλει την ανάπτυξη των πόρων του Müller.

Συνεπώς, η τεστοστερόνη αφού μετατραπεί σε διυδροτεστοστερόνη από το ένζυμο 5α-ρεδουκτάση στους ιστούς στόχους, επάγει τη διαφοροποίηση των μεσονεφρικών πόρων σε σπερματικούς πόρους, επιιδυμίδες, σπερματοδόχες κύστεις, εκσπερματιστικούς πόρους. Από την άλλη η αντιμυλλέριος ορμόνη (anti-Müllerian hormone-AMH ή MIS) που ανιχνεύεται στα κύτταρα Sertoli και εκκρίνεται από αυτά από την 7^η και μετά την 8^η εβδομάδα της κύησης, αντίστοιχα, προκαλεί ενεργητική υποστροφή των παραμεσονεφρικών πόρων πιθανόν μέσω αλληλεπιδράσεων με

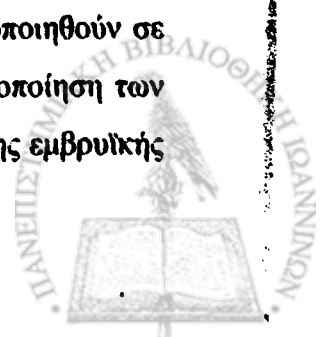


μεμβρανικούς υποδοχείς κινάσης της σερίνης/θρεονίνης σε μεσεγχυματικά κύτταρα που περιβάλλουν τους παραμεσoneφρικούς πόρους⁸⁸⁻⁹⁰ (Εικόνα 9).



Εικόνα 9. Εμβρυολογική ανάπτυξη του ανδρικού γεννητικού συστήματος (τροποποιημένη από αναφορά 91)

Οι αδιαφοροποίητες γονάδες γενετικώς ΧΧ ατόμων θα διαφοροποιηθούν σε ωοθήκες, οι οποίες δημιουργούν επιτρεπτικό περιβάλλον για τη διαφοροποίηση των παραμεσoneφρικών πόρων καθώς δεν παράγουν MIS κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής



ανάπτυξης. Η απουσία τεστοστερόνης οδηγεί σε παθητική υποστροφή του συστήματος των μεσονεφρικών πόρων. Έτσι, η παραγωγή της MIS και της τεστοστερόνης από τους εμβρυϊκούς όρχεις επιβάλλει ένα αρρενοποιητικό πρότυπο πάνω σε ένα εγγενώς κληροδοτημένο θηλυκό μοντέλο ανάπτυξης.

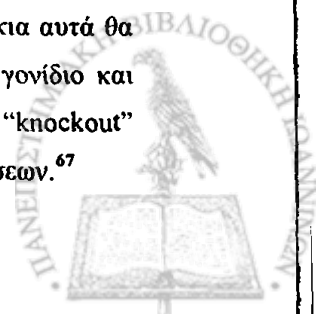
3.1.1. Το γεννητικό σύστημα πριν από το φυλετικό καθορισμό

Πριν από το φυλετικό καθορισμό, η γοναδική καταβολή των θηλαστικών εμφανίζεται ως ένα αμφιδύναμο αρχέγονο όργανο που προέρχεται από το διάμεσο μεσόδερμα. Το αρχέγονο αυτό όργανο ως αμφιδύναμο, έχει τη δυνατότητα δηλαδή να διαφοροποιηθεί είτε σε όρχι, είτε σε ωθήκη ανάλογα με την παρουσία ή απουσία, αντίστοιχα, του γονιδίου Sry, (περιοχή καθορισμού του φύλου του χρωμοσώματος Y κοντά στην ψευδοαυτοσωματική περιοχή στο βραχύ σκέλος-sex-determining region of the Y chromosome). Αποτελέσματα πειραμάτων σε ποντίκια «knockout»⁽¹⁾ έχουν ενοχοποιήσει τα εξής πέντε γονίδια ως υπεύθυνα για το σχηματισμό ή την επιβίωση της αρχέγονης γονάδας: Wt1, Sfl, Lhx1 (Lim1), Lhx9 και Emx2.⁹²

Κατά τη διάρκεια του αρχικού αδιαφοροποίητου ή αμφιδύναμου σταδίου φυλετικής ανάπτυξης (4^η-6^η εβδομάδα της κύησης στον άνθρωπο), τόσο τα γενετικά XX όσο και τα XY έμβρυα αναπτύσσουν δύο ζεύγη γεννητικών πόρων. Αρχικά εμφανίζονται οι ανδρικοί ή μεσονεφρικοί πόροι ή πόροι του Wolf, οι οποίοι διαθέτουν το δυναμικό μεταγενέστερης διαφοροποίησης σε σπερματικούς πόρους, επιδιδυμίδες, σπερματοδόχες κύστεις και εκσπερματιστικούς πόρους. Αργότερα εμφανίζονται οι θηλυκοί ή παραμεσονεφρικοί πόροι ή πόροι του Müller, οι οποίοι διαθέτουν το δυναμικό μεταγενέστερης διαφοροποίησης σε ωαγωγούς, μήτρα και άνω τριτημόριο του κόλπου.

Το διάμεσο μεσόδερμα βρίσκεται σε κάθε πλευρά του εμβρύου πληρώνοντας το μεγαλύτερο μέρος του σπλαχνικού κοιλώματος. Καθώς το έμβρυο αναπτύσσεται, από το διάμεσο μεσόδερμα σχηματίζονται τρεις δομές προσθιοπισθίως κατά μήκος

⁽¹⁾ Knockout καλείται το ποντίκι του οποίου το γένωμα περιλαμβάνει ένα γονίδιο που έχει καταστεί μη λειτουργικό («knocked-out»). Η αδρανοποίηση του γονιδίου επιτυγχάνεται συνήθως με μεθόδους ανασυνδυασμένου DNA. Κύτταρα τα οποία φέρουν αυτό το αδρανοποιημένο γονίδιο ενίονται στη συνέχεια σε έμβρυα ποντικού και έτσι δημιουργούνται χμαιρικά ποντίκια. Από τα ποντίκια αυτά θα προέλθουν στελέχη τα οποία όλα τους τα κύτταρα περιλαμβάνουν το αδρανοποιημένο γονίδιο και επομένως στερούνται πλήρως του αντίστοιχου ενεργού γονιδιακού προϊόντος. Τα ποντίκια “knockout” χρησιμοποιούνται ως πειραματικά μοντέλα για τη μελέτη διαφόρων παθολογικών καταστάσεων.⁶⁷



των μεσονεφρικών πόρων: ο πρόνεφρος, ο μεσόνεφρος και ο μετάνεφρος. Ο πρόνεφρος είναι υποτυπώδης στα θηλαστικά, αλλά ο μεσόνεφρος μπορεί να χρησιμεύσει ως αρχέγονος νεφρός κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης σε μερικά είδη. Ο μόνιμος νεφρός είναι το αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης μεταξύ του μετανεφρικού μεσεγγύματος στο οπίσθιο τμήμα του ουρογεννητικού συστήματος και του ουρητηρικού βλαστήματος που εκφύεται από το μεσονεφρικό πόρο.

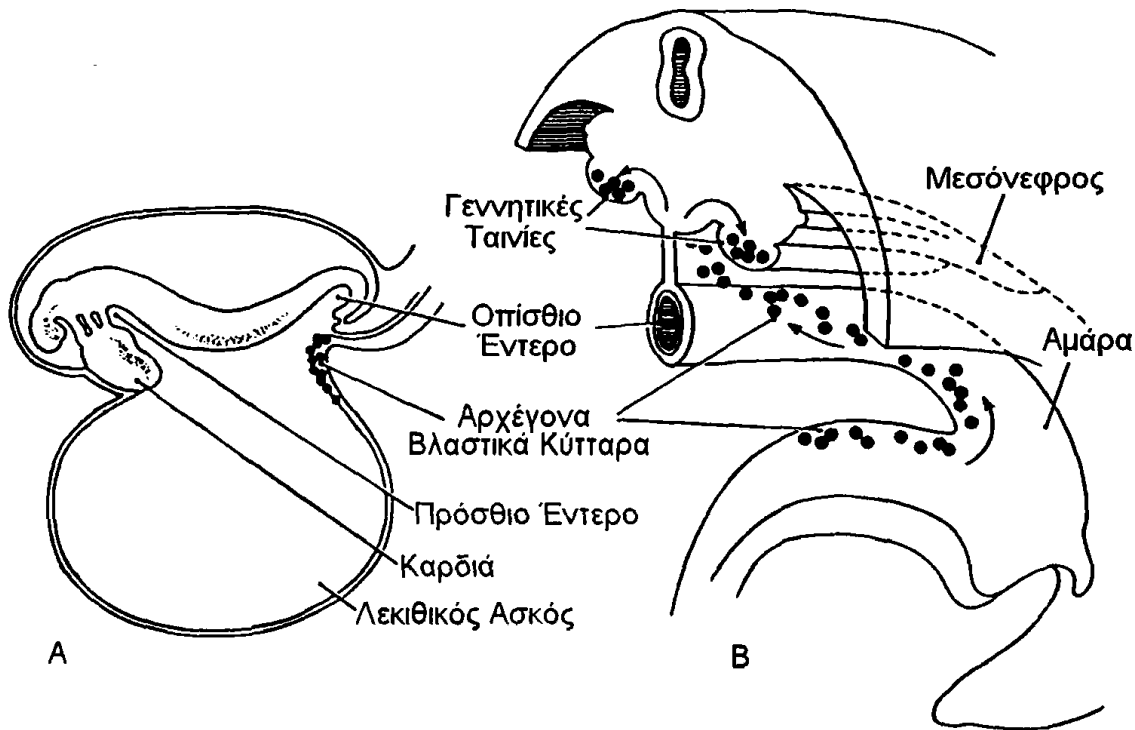
Εγκόλπωση του επιθηλίου του σπλαγχνικού κοιλώματος μέσα σε κάθε μεσόνεφρο καταλήγει στο σχηματισμό των παραμεσονεφρικών πόρων. Κάθε παραμεσονεφρικός πόρος πορεύεται παράλληλα με τον αντίστοιχο μεσονεφρικό πόρο μέχρι το οπίσθιο πέρας του σύστοιχου μεσονέφρου για να στραφεί στη συνέχεια προς τη μέση γραμμή και να συγχωνευτεί με τον αντίθετο πόρο. Ο κάθε μεσονεφρικός πόρος παρέχει διακλαδιζόμενα σωληνάκια που εκτείνονται διαμέσου του σύστοιχου μεσονέφρου προς το επιθήλιο του σπλαγχνικού κοιλώματος. Τα επιθηλιακά κύτταρα του σπλαγχνικού κοιλώματος υπερπλάσσονται, διατάσσονται σε στιβάδες και εκτείνονται μέχρι τον κυτταρικό πληθυσμό των μελλοντικών γονάδων συναθροιζόμενα στην επιφάνεια του μεσονέφρου.

3.1.2. Σχηματισμός των γεννητικών ταινιών

Κατά τη διάρκεια της 5ης εμβρυϊκής εβδομάδας, αρχέγονα βλαστικά κύτταρα που προέρχονται από το εξωεμβρυϊκό μεσόδερμα στη βάση της αλλαντοΐδας (ουραίο τοίχωμα του λεκιθικού ασκού) αρχίζουν να μεταναστεύουν κατά μήκος του ραχιαίου μεσεντερίου και εγκαθίστανται στο μεσέγγυμα του οπισθίου σωματικού τοιχώματος κοντά στο 10^ο θωρακικό επίπεδο αποικίζοντας την περιοχή των μελλοντικών γονάδων (Εικόνα 10). Η άφιξη των αρχέγονων βλαστικών κυττάρων στην περιοχή αυτή πυροδοτεί τον πολλαπλασιασμό των μεσονεφρικών και επιθηλιακών κυττάρων του γειτονικού σπλαγχνικού κοιλώματος προς σχηματισμό ενός ζεύγους γεννητικών ταινιών αμέσως επί τα εντός των αναπτυσσόμενων μεσονέφρων που εμφανίζονται ως παχύνσεις της κοιλιο-(εξω)-πλάγιας επιφάνειας κάθε μεσονέφρου (Εικόνα 11). Η διαδικασία αυτή προκαλεί τη διόγκωση του μεσονέφρου και το σχηματισμό των γεννητικών ταινιών, οι οποίες αποτελούνται επομένως από σωματικά μεσονεφρικά κύτταρα και αρχέγονα βλαστικά κύτταρα που έχουν μεταναστεύσει και αποικίσει την αδιαφοροποίητη γονάδα.⁹⁵



Κατά την 6^η εμβρυϊκή εβδομάδα, τα κύτταρα της γεννητικής ταινίας εισβάλλουν στο μεσέγχυμα της περιοχής των μελλοντικών γονάδων σχηματίζοντας συναθροίσεις στηρικτικών κυττάρων που καλούνται αρχέγονες γεννητικές δοκίδες. Οι αρχέγονες γεννητικές δοκίδες ακολούθως περιβάλλουν τα βλαστικά κύτταρα και υποστηρίζουν την ανάπτυξή τους. Το μεσέγχυμα των γεννητικών ταινιών που περιέχει τις αρχέγονες γεννητικές δοκίδες διαιρείται σε φλοιώδη και μυελώδη μοίρα.

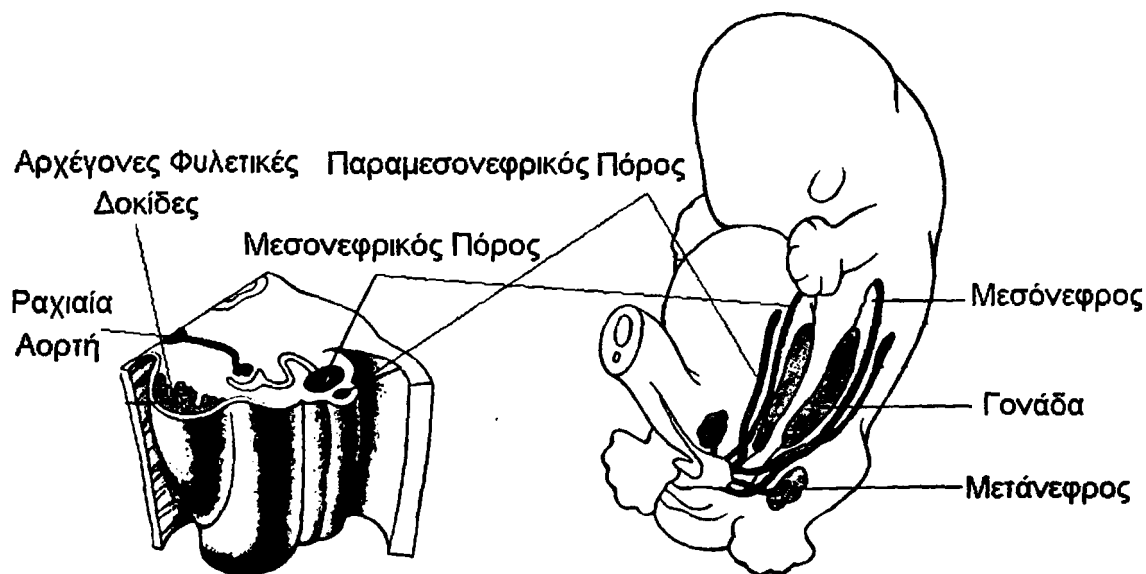


Εικόνα 10. Α, Περιοχή της προέλευσης των αρχέγονων βλαστικών κυττάρων στο τοίχωμα του λεκιθικού ασκού σε έμβρυο ηλικίας 3 εβδομάδων. Β, Μεταναστευτική οδός των αρχέγονων βλαστικών κυττάρων κατά μήκος του τοιχώματος του λεκιθικού ασκού και του ραχιαίου μεσεντερίου προς σχηματισμό των γεννητικών ταινιών (τροποποιημένη από αναφορά 93).

3.1.3. Μοριακή βάση του ανδρικού φυλετικού καθορισμού

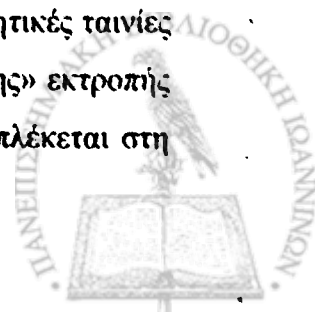
Οι γονάδες αναπτύσσονται αρχικά με τρόπο μη ειδικό και είναι μορφολογικά ταυτόσημες μεταξύ XX και XY εμβρύων θηλαστικών μέχρι και τη 12η ημέρα μετά την συνουσία ή την 7η εβδομάδα της κύησης στον ποντικό και στον άνθρωπο, αντίστοιχα. Στα φυσιολογικά XY έμβρυα ποντικού, η έκφραση του γονιδίου Sry στα σωματικά (προ-Sertoli) κύτταρα των γεννητικών ταινιών αρχίζει κατά τη στιγμή του ανδρικού φυλετικού καθορισμού (10,5^η-11^η ημέρα μετά τη συνουσία) σαν ένα κύμα με προσθιοπίσθια κατεύθυνση που διαρκεί για μια πολύ μικρή χρονική περίοδο (1,5

ημέρα).^{96,97} Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την έναρξη της διαφοροποίησης, εκτρέποντας την εξέλιξη των κυττάρων αυτών προς την κατεύθυνση Sertoli αντί της διαφορετικά προδιαγεγραμμένης σε θυλακιοκύτταρα.^{98,99} Έτσι, καθορίζεται τελικά η τύχη της εξέλιξης της αδιαφοροποίητης γονάδας σε όρχι αντί ωοθήκης.¹⁰⁰⁻¹⁰²



Εικόνα 11. Σχηματισμός των γεννητικών ταινιών. Κατά τη διάρκεια της 5ης και 6ης εμβρυϊκής εβδομάδας, οι γεννητικές ταινίες σχηματίζονται στο οπίσθιο κοιλιακό τοίχωμα αμέσως επί τα εντός των αναπτυσσόμενων μεσονέφρων. Τα αρχέγονα βλαστικά κύτταρα επάγουν την υπερπλασία των επιθηλιακών κυττάρων του σπλαγχνικού κοιλώματος που επενδύουν την περιτοναϊκή κοιλότητα καθώς και των μεσονεφρικών κυττάρων, με αποτέλεσμα το σχηματισμό των αρχέγονων γεννητικών δοκίδων (τροποποιημένη από αναφορά 94).

Το ανθρώπινο γονίδιο SRY κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που διαθέτει μια δεσμευτική για το DNA κεντρική περιοχή (DNA-binding motif) που καλείται ομάδα υψηλής κινητικότητας (high mobility group-HMG). Το τμήμα αυτό της πρωτεΐνης είναι σχετικά συντηρητικό μεταξύ των διαφόρων ειδών των θηλαστικών σε αντίθεση με το υπόλοιπο μόριο.^{103,104} Έχουν ταυτοποιηθεί περισσότερα από 100 γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, οι οποίες περιλαμβάνουν αυτήν την περιοχή στο μόριό τους και καλούνται συνολικά γένος HMG (HMG box).¹⁰⁵ Εκείνα τα γονίδια δε με τη μεγαλύτερη ομολογία (>60%) με το SRY καλούνται συνολικά SOX γονίδια (SRY-type HMG box genes). Η παροδική έκφραση του γονιδίου Sry στις γεννητικές ταινίες του ποντικού υποδηλώνει ότι το γονίδιο αυτό δρα μάλλον ως «διακόπτης» εκτροπής της εξέλιξης προς την κατεύθυνση των κυττάρων Sertoli παρά ότι εμπλέκεται στη

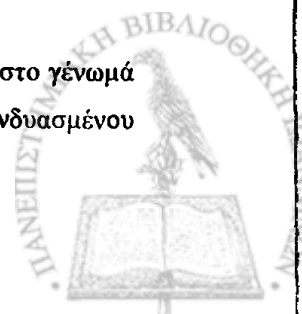


διατήρηση της ταυτότητας και λειτουργίας των εν λόγω κυττάρων. Επομένως, η πρωτεΐνη SRY πρέπει με κάποιον τρόπο να δρα πάνω σε άλλα γονίδια, τα οποία εμπλέκονται στον καθορισμό και διατήρηση της ταυτότητας των κυττάρων Sertoli. Πολλά γονίδια έχουν θεωρηθεί ως πιθανοί υποψήφιοι συμπεριλαμβανομένου των Sf-1, DMT-1, Gata-4, Desert hedgehog (Dhh), testatin κ.λ.π.^{98,99,106}

Το αυτοσωματικό γονίδιο Sox9 αποτελεί επίσης ισχυρό υποψήφιο γονιδιακό στόχο.⁹⁹ Το γονίδιο Sox9 αρχικά εκφράζεται σε χαμηλά επίπεδα τόσο στις αρσενικές όσο και στις θηλυκές γεννητικές ταινίες. Αμέσως μετά την έκφραση του Sry¹⁰⁷ (από την 11,5^η ημέρα μετά τη συνουσία στον ποντικό) η έκφρασή του Sox9 ενισχύεται στα κύτταρα Sertoli και ανιχνεύεται καθόλη τη διάρκεια της ζωής, ενώ καταπαύει και παραμένει μη ανιχνεύσιμη στην θηλυκή γονάδα.^{108,109}

Η σημασία των πρωτεϊνών SRY και SOX9 στον καθορισμό του φύλου στηρίζεται από πειραματικά δεδομένα σε τρανσγενετικά ποντίκια (transgenic mice),^{(1)110,111} όπως και από αναλύσεις αναζήτησης μεταλλάξεων τόσο σε ποντίκια όσο και ανθρώπους με αναστροφή φύλου.¹¹²⁻¹¹⁵ Σχεδόν όλες οι μεταλλάξεις του γονιδίου SRY στον άνθρωπο που είναι υπεύθυνες για την 46, XY αναστροφή φύλου, συναθροίζονται στην περιοχή HMG,¹¹⁶ η οποία αποτελεί επομένως το πιο κρίσιμο τμήμα της αντίστοιχης πρωτεΐνης. Το Sry απαιτείται για την υπερπλασία του επιθηλίου του σπλαγγνικού κοιλώματος (πρόδρομοι των κυττάρων Sertoli)¹¹⁷ και της κυτταρικής μετανάστευσης από τον μεσόνεφρο εντός της αναπτυσσόμενης γονάδας (περισωληναριακά μυοειδή και αγγειακά κύτταρα),¹¹⁸ δύο διεργασίες που είναι κρίσιμες για την ανάπτυξη του όρχεως. Η πρωτεΐνη SRY ενδεχομένως κατευθύνει κυτταρικές μεταβολές στην αναπτυσσόμενη γονάδα μέσω ενεργοποίησης ενός ενδοκυττάριου μορίου επικοινωνίας που καλείται ινοβλαστικός αυξητικός παράγοντας 9 (fibroblast growth factor 9-Fgf9).¹¹⁹ Από την άλλη πλευρά, η πρωτεΐνη SOX9 φαίνεται να είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση του γονιδίου της MIS σε συνδυασμό με άλλες πρωτεΐνες όπως ο παράγοντας στεροειδογένεσης 1 (SF1) η (-KTS) ισομορφή της WT1 (βλέπε παρακάτω), η GATA4 και η πρωτεΐνη θερμικής καταπληξίας 70 (Heat Shock Protein 70-HSP70).^{98,120,121}

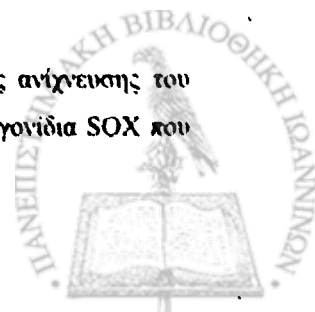
(1) Τρανσγενετικό ζώο είναι αυτό που φέρει ένα ξένο γονίδιο που έχει σκοπίμως εισαχθεί στο γένομά του. Το ξένο αυτό γονίδιο κατασκευάζεται στο εργαστήριο με την τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA και καλείται τρανσγενετικό γονίδιο (transgenic gene).⁶⁷



Έτσι, οι πρωτεΐνες SRY και SOX9 είναι τόσο ικανές όσο και αναγκαίες για τον καθορισμό του αρσενικού φύλου στον ποντικό και στον άνθρωπο. Ωστόσο, η λειτουργική τους σημασία και επομένως η αναγκαιότητα της ύπαρξής τους ίσως να μην έχει διατηρηθεί σε όλα τα είδη των θηλαστικών.^{122,123} Το γονίδιο SRY ανευρίσκεται αποκλειστικά στα θηλαστικά.¹²¹ Όλες οι τάξεις (orders) των κατώτερων κατηγοριών (infraclasses) των δύο υποκατηγοριών (subclasses) της κατηγορίας των θηλαστικών (Mammalian class) της ταξινόμησης του Simpson,¹²⁴ κατέχουν ομόλογα γονίδια του Sry:^{100,101,121,125} α) τα Πρωτοθήρια (Prototheria),⁽¹⁾ δηλαδή τα Μονοτρήματα (Monotremata) όπως ο νησσόραμφος πλατύπους (*Ornithorhynchus anatinus*) και ο ακανθώδης μυρμηγκοφάγος ή έχιδνα και β) τα Θήρια (Theria), όπου ανήκουν 1) τα Μεταθήρια (Metatheria), δηλαδή τα Μαρσιποφόρα (Marsupialia) όπως το οπόσσον (opossum), το καγκουρό κ.λ.π. και 2) τα Ευθήρια (Eutheria) ή πλακουντοφόρα θηλαστικά. Ωστόσο, ομόλογα γονίδια του SRY απουσιάζουν από δύο είδη της οικογένειας Cricetidae (vole) και από μέλη της οικογένειας Echimyidae (spiny rat), οι οποίες ανήκουν στην τάξη των Τρωκτικών (Rodentia).^{127,128}

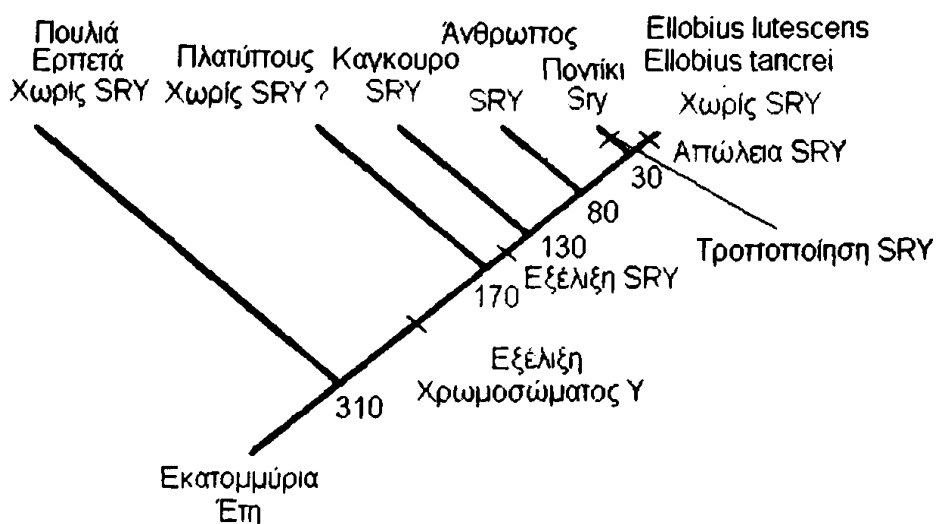
Είναι γνωστό ότι πολλά γονίδια του χρωμοσώματος Y εξαφανίστηκαν κατά τη διάρκεια της πρόσφατης εξελικτικής ιστορίας. Ολόκληρο το χρωμόσωμα Y (και το γονίδιο Sry) εξαφανίστηκε σταδιακά στα είδη Τρωκτικών *Ellobius lutescens* και *Ellobius tancrei*.¹²⁶ Στο πρόγονικό χρωμόσωμα Y αυτών των τρωκτικών διατηρήθηκαν αρκετά γονίδια κρίσιμα για τον καθορισμό του αρσενικού φύλου όπως το Sry, Rbmy and Ubely, καθώς και αλληλόμορφα των αντιστοιχών τους γονιδίων στο χρωμόσωμα X. Όλα αυτά τα γονίδια εξαφανίστηκαν στη συνέχεια με αυθαίρετη σειρά και τις λειτουργίες τους ανέλαβαν άλλα γονίδια που εδρεύουν σε αυτοσώματα ή στο χρωμόσωμα X. Η απώλεια καθενός γονιδίου είχε ως αποτέλεσμα την περαιτέρω αποσταθεροποίηση του χρωμοσώματος Y, καθιστώντας την επόμενη απώλεια ακόμη πιθανότερη. Σταδιακά, το χρωμόσωμα Y κατέστη περιττό και εξαφανίστηκε πλήρως. Επομένως, το Sry δεν φαίνεται να είναι το πρωταρχικό φυλοκαθοριστικό γονίδιο που χαρακτηρίζει το χρωμόσωμα Y στα θηλαστικά και άρα μπορεί να αντικατασταθεί ως υπεύθυνο της πυροδότησης των διεργασιών καθορισμού του φύλου από κάποιο άλλο γονίδιο και να εξαφανιστεί

⁽¹⁾ Εδώ ανήκουν τα μόνα θηλαστικά είδη που γενούν αυγά. Όλες οι προσπάθειες ανίχνευσης του γονιδίου SRY στα Μονοτρήματα έχουν αποτύχει μέχρι στιγμής και τα δύο σχετικά γονίδια SOX που ταυτοποιήθηκαν αποδείχθηκε ότι είναι αυτοσωματικά.¹²⁶



μελλοντικά.^{126,129} Το χρονοδιάγραμμα εξέλιξης του χρωμοσώματος Y και του γονιδίου SRY στα θηλαστικά παρουσιάζεται στην **εικόνα 12**.

Αν και τα γονίδια Sry και Sox9 φαίνεται να είναι κυρίως υπεύθυνα για τον καθορισμό του αρσενικού φύλου στα θηλαστικά, η ρύθμιση της έκφρασής τους και ο τρόπος λειτουργίας τους παραμένουν ακόμη αδιευκρίνιστα. Η έκφραση του SRY στη γονάδα ακολουθείται από μια σειρά πολύπλοκων αλληλεπιδράσεων, οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση άλλων «αρρενοποιητικών» γονιδίων, την καταστολή «αντιαρρενοποιητικών» γονιδίων, την κυτταρική μετανάστευση και την κυτταρική υπερπλασία στην αναπτυσσόμενη αρσενική γονάδα.¹²¹ Έχει προταθεί ότι το ογκοκατασταλτικό γονίδιο Wt1 (11p13) πρέπει να παίζει ρόλο στην ενεργοποίηση ή τη μεταγραφική σταθερότητα του Sry.¹³⁰ Η πρωτεΐνη WT1 υφίσταται σε δύο διαφορετικές ισομορφές, την (+KTS) και την (-KTS), ο σχηματισμός των οποίων είναι αποτέλεσμα εναλλακτικής πρωτεϊνικής συναρμολόγησης (splicing) που οδηγεί σε ενσωμάτωση ή αποκλεισμό αντίστοιχα, τριών αμινοξέων (λυσίνης, θρεονίνης, σερίνης) μεταξύ των δακτυλίων ψευδαργύρου στις θέσεις 3 και 4.^{131,132} Ο σχηματισμός της αρσενικής γονάδας απαιτεί την παρουσία ειδικά της ισομορφής (+KTS), η οποία συμβάλλει στην παρουσία αφθονίας αντιγράφων της πρωτεΐνης SRY, ενώ η (-KTS) ισομορφή αν και απαιτείται επίσης για την ανάπτυξη τόσο της αρσενικής όσο και της θηλυκής γονάδας, δεν είναι αναγκαία για τον καθορισμό του αρσενικού φύλου.¹³³



Εικόνα 12. Χρονοδιάγραμμα της εξέλιξης του χρωμοσώματος Y και του γονιδίου SRY στα θηλαστικά (τροποποιημένο από αναφορά 128).



Μεταλλάξεις στο γονίδιο WT1 απαντούν στο 15% περίπου των περιπτώσεων ασθενών με όγκο του Wilms και σχετίζονται με τα εξής σύνδρομα: α) σύνδρομο WAGR (όγκοι Wilms, ανιριδία, δυσπλασία ουρογεννητικού συστήματος, διανοητική καθυστέρηση), β) σύνδρομο Denys Drash (όγκοι Wilms, ψευδοερμαφροδιτισμός, νεφροπάθεια), γ) σύνδρομο Frasier (εστιακή σπειραματοσκλήρυνση, όψιμη νεφρική ανεπάρκεια, γοναδική δυσγενεσία που οφείλεται σε διαταραχή της σύνθεσης της (+KTS) ισομορφής) και δ) σύνδρομο Perlman (αυτοσωματικό υπολειπόμενο: όγκοι Wilms, νεφρική δυσπλασία, νεφρομεγαλία, μακρογλωσσία, κρυσορχία, ανωμαλίες προσώπου, πολυδράμνιο, υπογλυκαιμία). Οι μεταλλάξεις στο WT1 σπάνια απαντούν σε ασθενείς με υποσπαδία και κρυσορχία χωρίς άλλα σημεία των προαναφερθέντων συνδρόμων.¹³⁴⁻¹³⁷

Έχει προταθεί ότι η πρωτεΐνη SRY δρώντας ως μεταφραστικός παράγοντας ανταγωνίζεται τη λειτουργία διαφόρων κατασταλατών της αρρενογένεσης (αντι-ορχικά γονίδια) όπως το Wnt4 και το Dax1.^{138,139} Το γονίδιο Wnt4 διαδραματίζει θεμελιώδη ρόλο στην φυλετική διαφοροποίηση του θήλεος ρυθμίζοντας την στεροειδογένεση στα πρώιμα στάδια της γοναδικής ανάπτυξης,¹⁴⁰ αν και παραμένει αδιευκρίνιστο ποια γονίδια αποτελούν άμεσο στόχο των σημάτων του. Είναι πιθανόν ότι η μεταγραφή του γονιδίου Dax1 προάγεται από το Wnt4.¹⁴¹ Η έκφραση του Dax1 προάγεται από τον SF1.^{141,142}

Ελλείμματα του γονιδίου DAX1, έχουν ταυτοποιηθεί σε πολλούς ασθενείς με φυλοσύνδετη συγγενή υποπλασία των επινεφριδίων (ΣΥΕ ή AHC-adrenal hypoplasia congenital). Η πάθηση αυτή μπορεί να παρουσιαστεί α) στα πλαίσια ενός «Χρ21 όμορου γονιδιακού συνδρόμου» που προκαλείται από απαλοιφή που περιλαμβάνει μεμονωμένα το γονίδιο DAX1 ή συμπεριλαμβάνει τα γειτονικά γονίδια της γλυκερολικής κινάσης και της μυϊκής δυστροφίας του Duchenne ή β) ως μεμονωμένη διαταραχή λόγω διαφόρων σημειακών μεταλλάξεων στην περιοχή κωδικοποίησης του DAX1, η οποία φαίνεται ότι είναι ικανή να προκαλέσει ΣΥΕ και συνοδό μεμονωμένο υπογοναδοτροφικό υπογοναδισμό.¹⁴³⁻¹⁴⁵ Ασθενείς με μεταλλάξεις στο DAX1 εμφανίζονται ως φυσιολογικοί άνδρες χωρίς σημαντικές διαταραχές στα γεννητικά όργανα εκτός από κρυσορχία.¹⁴⁶ Εμφάνιση κρυσορχίας έχει επίσης ανακοινωθεί στα πλαίσια Χρ21 όμορου γονιδιακού συνδρόμου-ΣΥΕ,¹⁴⁴ καθώς επίσης



και σε περιπτώσεις με ΣΥΕ χωρίς ενδείξεις σημειακής μετάλλαξης⁽¹⁾ ή απαλοιφής του DAX1 (συνδυασμός IMAGe-IMAGe association: ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης-Intrauterine growth retardation, μεταφυσιακή δυσπλασία-Metaphyseal dysplasia, ΣΥΕ-AHC, ανωμαλίες γεννητικών οργάνων-Genital anomalies, AHC).¹⁴⁷

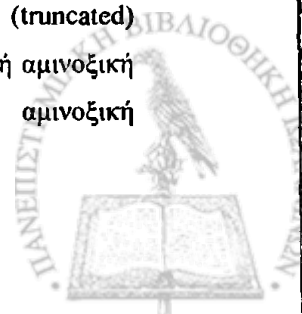
Ο υποδοχέας της πρωτεΐνης DAX1 μπορεί να ανταγωνίζεται τη λειτουργία της πρωτεΐνης SRY με πολλούς τρόπους:¹²¹ α) έμμεση αναστολή της δράσης της αναστέλλοντας τη μεταγραφική δραστηριότητα του πυρηνικού υποδοχέα SF1 μέσω άμεσης πρωτεΐνο-πρωτεϊνικής αλληλεπίδρασης,^{141,148} ο οποίος εμπλέκεται στην ενεργοποίηση «αρρενοποιητικών» γονιδίων όπως το γονίδιο της MIS,^{120,149} β) άμεσος ανταγωνισμός για παρόμοιες περιοχές του DNA που εμπλέκονται στη ρύθμιση της έκφρασης «αρρενοποιητικών» γονιδίων (αναστολή της SRY επαγόμενης ενεργοποίησης του γονιδίου SOX9), γ) ανταγωνισμός της λειτουργίας της (+KTS) ισομορφής της πρωτεΐνης WT1.

3.1.4. Δομική οργάνωση όρχι-ορμονοπαραγωγή-διαφοροποίηση άρρενος

Υπό την επίδραση του SRY τα κύτταρα της μυελώδους μοίρας των αρχέγονων γεννητικών δοκίδων αρχίζουν να διαφοροποιούνται σε κύτταρα Sertoli, ενώ τα κύτταρα της φλοιώδους μοίρας υποστρέφουν. Η τύχη της γονάδας έχει αποφασιστεί, ένα πλήθος γονιδίων που σχετίζονται με τη λειτουργία των κυττάρων Sertoli αρχίζουν να ενεργοποιούνται (π.χ. τα Dhh και Mis ενεργοποιούνται 11,5 και 12 ημέρες μετά τη συνουσία στον ποντικό)^{150,151} και διάφορα γεγονότα ακολουθούν, οδηγώντας στη δομική και λειτουργική οργάνωση του όρχεως και τελικά στη φυλετική διαφοροποίηση προς την κατεύθυνση του άρρενος.⁹⁸

Κατά την 7η εμβρυϊκή εβδομάδα ο όρχις αρχίζει να οργανώνεται σε δύο διακριτά διαμερίσματα: α) τις ορχικές δοκίδες (αποτελούν προγονικές δομές που σωληνοποιούνται στην εφηβεία και διαφοροποιούνται σε σύστημα σπερματικών σωληναρίων) και β) τη διάμεση περιοχή. Οι ορχικές δοκίδες σχηματίζονται από την

⁽¹⁾ Σημειακή μετάλλαξη (point mutation) ή υποκατάσταση (substitution) καλείται η μετάλλαξη που προκύπτει από την μεμονωμένη αντικατάσταση μιας νουκλεοτιδικής βάσης από άλλη. Οι σημειακές μεταλλάξεις μπορεί να διακριθούν σε: α) nonsense mutations: κωδικοποιούν μια τριπλέτα λήξης της πρωτεϊνοσύνθεσης οπότε προκύπτει μια μη φυσιολογικής αλληλουχίας περικοκομμένη (truncated) πρωτεΐνη, β) missense mutations: κωδικοποιούν ένα διαφορετικό αμινοξύ στην πρωτεϊνική αμινοξική αλληλουχία, γ) silent mutations: κωδικοποιούν το ίδιο αμινοξύ στην πρωτεϊνική αμινοξική αλληλουχία.⁶⁷



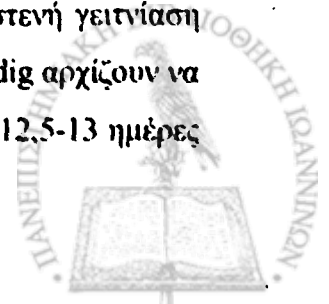
οργάνωση των κυττάρων Sertoli. Τα κύτταρα αυτά αρχικά σχηματίζουν συναθροίσεις γύρω από τα βλαστικά κύτταρα που διαφοροποιούνται σε γονοκύτταρα κατά την είσοδό τους στις ορχικές δοκίδες (βλέπε παρακάτω), για να γίνουν εμβρυϊκά σπερματογόνια από την 15^η εβδομάδα της κύησης. Η άμεση επαφή μεταξύ αναπτυσσόμενων κυττάρων Sertoli και αρχέγονων βλαστικών κυττάρων θεωρείται ότι παίζει αποφασιστικό ρόλο στην ορθή ανάπτυξη των ανδρικών γαμετών. Αυτή η αλληλεπίδραση συμβαίνει αμέσως μετά την άφιξη των αρχέγονων βλαστικών κυττάρων στην περιοχή της σχηματιζόμενης γεννητικής ταινίας.

Τα κύτταρα Sertoli παράγουν άγνωστα μέχρι σήμερα σήματα που προάγουν την μετανάστευση κυττάρων από το μεσόνεφρο προς την αναπτυσσόμενη γονάδα. Τα κύτταρα αυτά μετατρέπονται σε ενδοθηλιακά και περισωληναριακά μυοειδή που περιβάλλουν αυτές τις συναθροίσεις γύρω από τα βλαστικά κύτταρα (σχηματισμός δοκίδων).¹⁵²⁻¹⁵³ Τα περισωληναριακά μυοειδή κύτταρα συμβάλλουν στην εναπόθεση μιας βασικής μεμβράνης σε συνεργασία με τα κύτταρα Sertoli, η οποία παγιδεύει τα βλαστικά κύτταρα μέσα στις ορχικές δοκίδες και τα καθλώνει στο στάδιο της μιτωτικής δραστηριότητας πιθανόν μέσω ενός DHH-επαγόμενου σήματος.¹⁵⁰ Έτσι, παρεμποδίζεται η είσοδος των βλαστικών κυττάρων στη διαδικασία της μείωσης, η οποία πιστεύεται ότι προάγει την ωοθηκική και αναχαιτίζει την ορχική εξέλιξη.¹⁵⁵

Καθώς τα κύτταρα Sertoli διαφοροποιούνται υπό την επίδραση του SRY, αρχίζουν να εκκρίνουν την γλυκοπρωτεϊνική ορμόνη MIS. Η MIS προκαλεί ταχεία υποστροφή των παραμεσонеφρικών πόρων μεταξύ 8^{ης}-10^{ης} εμβρυϊκής εβδομάδας. Μικρά υπολείμματα των παραμεσонеφρικών πόρων μπορεί να ανιχνευτούν (απόφυση του όρχεως, προστατικός κόλπος).

Κατά την 9^η-10^η εμβρυϊκή εβδομάδα υπό την επίδραση της πρωτεΐνης SRY αρχίζουν να διαφοροποιούνται τα κύτταρα του Leydig από μεσεγχυματικά κύτταρα των γεννητικών ταινιών. Τα ενδοκρινικά αυτά κύτταρα παράγουν τεστοστερόνη. Στα αρχικά στάδια της ανάπτυξης η έκκριση της τεστοστερόνης ρυθμίζεται από την πλακουντιακή χορειακή γοναδοτροφίνη (β-hCG), ωστόσο σταδιακά οι υποφυσιακές γοναδοτροφίνες αναλαμβάνουν τον έλεγχο της ανδρογονικής παραγωγής.

Τα ανδρογονοπαραγωγά κύτταρα του Leydig αποκλείονται εκτός δοκίδων και παραμένουν στο διάμεσο χώρο (διάμεσα κύτταρα) ευρισκόμενα σε στενή γειτνίαση με το αρτηριακό και λεμφικό αγγειακό σύστημα. Τα κύτταρα του Leydig αρχίζουν να παράγουν τεστοστερόνη μόλις έχουν σχηματιστεί οι ορχικές δοκίδες (12,5-13 ημέρες

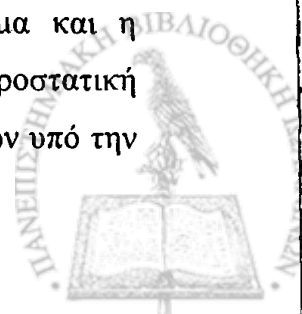


μετά τη συνουσία στον ποντικό, 8^η εβδομάδα της κύησης στον άνθρωπο). Έχει προταθεί ότι το Sry καταστέλλει το Wnt4 που με τη σειρά του αναστέλλει την παραγωγή τεστοστερόνης. Το τελικό αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας είναι η προαγωγή της στεροειδογένεσης από το γονίδιο Sry.¹⁴⁰

Μεταξύ 8^{ης}-12^{ης} εμβρυϊκής εβδομάδας, η έκκριση της τεστοστερόνης από τα κύτταρα Leydig διεγείρει την μετατροπή των μεσонеφρικών πόρων σε σπερματικούς πόρους. Τα κρανιακά τμήματα των πρώτων υποστρέφουν καταλείποντας μια μικρή υπολειμματική προβολή που καλείται απόφυση της επιδιδυμίδας. Η περιοχή των μεσонеφρικών πόρων που συνέχεται με τον αναπτυσσόμενο όρχι διαφοροποιείται σε επιδιδυμίδα. Οι ορχικές δοκίδες σωληνοποιούνται αντίστοιχα προς το πέρας των μελλοντικών σπερματικών σωληναρίων και διαφοροποιούνται σε λεπτοτοιχωματικό σύστημα πόρων, το ορχικό ή Αλλήρειο δίκτυο ή δίκτυο του Haller (rete testis).

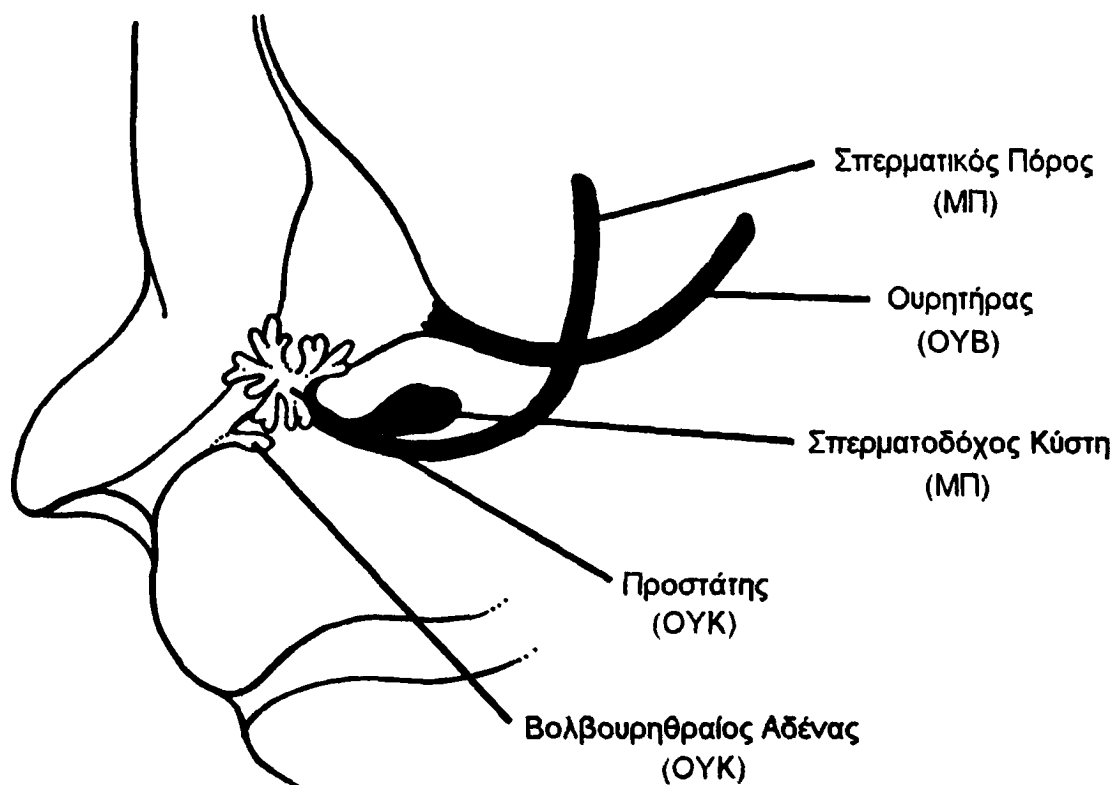
Κατά την 9^η εμβρυϊκή εβδομάδα, 5-12 υπολειμματικά σωληνάκια από τους μεσонеφρικούς πόρους αμέσως επί τα εντός της αναπτυσσόμενης γονάδας στην περιοχή της επιδιδυμίδας, έρχονται σε επαφή με τις γεννητικές δοκίδες του μελλοντικού Αλληρείου δικτύου. Ωστόσο, τα σωληνάκια αυτά δεν επικοινωνούν ουσιαστικά με το Αλλήρειο δίκτυο ως απαγωγά σωληνάκια μέχρι τον 3^ο εμβρυϊκό μήνα. Παράλληλα, οι μεσонеφρικοί πόροι υποστρέφουν κοντά στον κάτω πόλο του αναπτυσσόμενου όρχεως καταλείποντας μερικές φορές υπολειμματικό ιστό την παραδιδυμίδα. Την ίδια περίοδο, ο όρχις αρχίζει να μικραίνει σε πλέον συμπαγές όργανο μειώνοντας την επιφάνεια επαφής του με τον περιβάλλοντα μεσόνεφρο. Καθώς ο όρχις εξακολουθεί να αναπτύσσεται, η υποστρέφουσα φλοιώδης μοίρα των γεννητικών δοκίδων διαχωρίζεται από το επιθήλιο του σπλαγχνικού κοιλώματος από μια παρεμβαίνουσα στιβάδα συνδετικού ιστού που καλείται ινώδης χιτώνας.

Οι σπερματοδόχες κύστεις εκβλαστάνουν κατά τη διάρκεια της 10^{ης} εμβρυϊκής εβδομάδας από τους μεσонеφρικούς πόρους κοντά στην εκβολή των τελευταίων στην πυελική ουρήθρα. Το τμήμα του μεσонеφρικού πόρου πέρα από την αναπτυσσόμενη σπερματοδόχο κύστη καλείται εκσπερματιστικός πόρος. Ο προστάτης αδένας αρχίζει να αναπτύσσεται επίσης κατά τη ίδια χρονική περίοδο υπό τη μορφή συνάθροισης ενδοδερμικών προβολών που εκβλαστάνουν από την πυελική ουρήθρα. Η προστατική έκφυση επάγεται από το γειτονικό μεσέγχυμα και η διεργασία αυτή εξαρτάται από τη διυδροτεστοστερόνη. Συγκεκριμένα η προστατική ανάπτυξη είναι αποτέλεσμα μεσεγχυματικών-επιθηλιακών αλληλεπιδράσεων υπό την

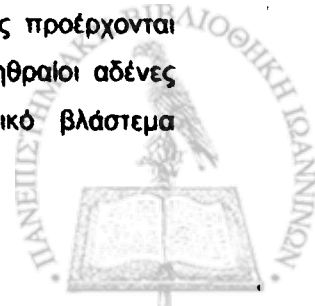


επίδραση των ανδρογόνων.^{156,157} Έχει διατυπωθεί επίσης η υπόθεση ότι παρακρινικοί παράγοντες που παράγονται από το μεσέγχυμα υπό την επίδραση των ανδρογόνων μπορεί να ρυθμίζουν την ανάπτυξη του ανδρικού αναπαραγωγικού συστήματος.

Ο προστάτης αρχικά εκφύεται υπό τη μορφή πέντε ανεξάρτητων ομάδων συμπαγών δοκίδων. Από την 11^η εμβρυϊκή εβδομάδα, οι δοκίδες αυτές αποκτούν αυλό και αδενικές κυψέλες, ενώ από την 13^η εμβρυϊκή εβδομάδα που συμπίπτει με την αύξηση των επιπέδων τεστοστερόνης, αρχίζει η εκκριτική δραστηριότητα του αδένου. Το μεσέγχυμα που περιβάλλει τα ενδοδερμικής προέλευσης προστατικά λόβια, διαφοροποιείται σε λείες μυϊκές ίνες και συνδετικό ιστό. Παράλληλα, οι βολβουρηθραίοι αδένες εκβλαστάνουν από την ουρήθρα αμέσως κάτω από τον αναπτυσσόμενο προστάτη (Εικόνα 13).



Εικόνα 13. Ανάπτυξη των επικουρικών γεννητικών αδένων του άνδρα. Κατά τη διάρκεια της 10^{ης} εμβρυϊκής εβδομάδας, οι σπερματοδόχες κύστεις εκβλαστάνουν από τα απώτερα τμήματα των μεσонеφρικών πόρων υπό την επίδραση της τεστοστερόνης, ενώ ο προστάτης και οι βολβουρηθραίοι αδένες αναπτύσσονται από την ουρήθρα υπό την επίδραση της διυδροτεστοστερόνης. Ο σπερματικός πόρος και οι σπερματοδόχες κύστεις προέρχονται από τους μεσонеφρικούς πόρους (ΜΠ), ενώ ο προστάτης και οι βολβουρηθραίοι αδένες αναπτύσσονται από τον ουρογεννητικό κόλπο (ΟΥΚ). ΟΥΒ, ουρητηρικό βλάστημα (τροποποιημένη από αναφορά 94).



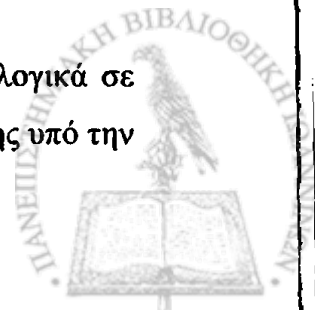
3.1.5. Ανάπτυξη των έξω γεννητικών οργάνων

Κατά την 4^η εμβρυϊκή εβδομάδα, με την εμβρυϊκή κάμψη, το ραχιαίο μέρος του λεκιθικού ασκού ενσωματώνεται στο έμβρυο σχηματίζοντας τον πρωτογενή πεπτικό σωλήνα. Στο τέλος της 4^{ης} εμβρυϊκής εβδομάδος το οπίσθιο έντερο και το μελλοντικό ουρογεννητικό σύστημα προσεγγίζουν την κοιλιακή επιφάνεια του εμβρύου στην αμαρική μεμβράνη, η οποία αποτελείται από εμβρυϊκό ενδόδερμα και εξώδερμα, χωρίς να παρεμβάλλεται μεσόδερμα. Το οπίσθιο έντερο εκτείνεται από το μέσο έντερο μέχρι την αμαρική μεμβράνη. Συγκεκριμένα, η τελική μοίρα του οπισθίου εντέρου διευρυνόμενη σχηματίζει την αμάρα, όπου καταλήγει η αλλαντοΐδα κοιλιακά και οι μεσονεφρικοί πόροι (πόροι του Wolf) ραχιαία (Εικόνα 14α).¹⁵⁸

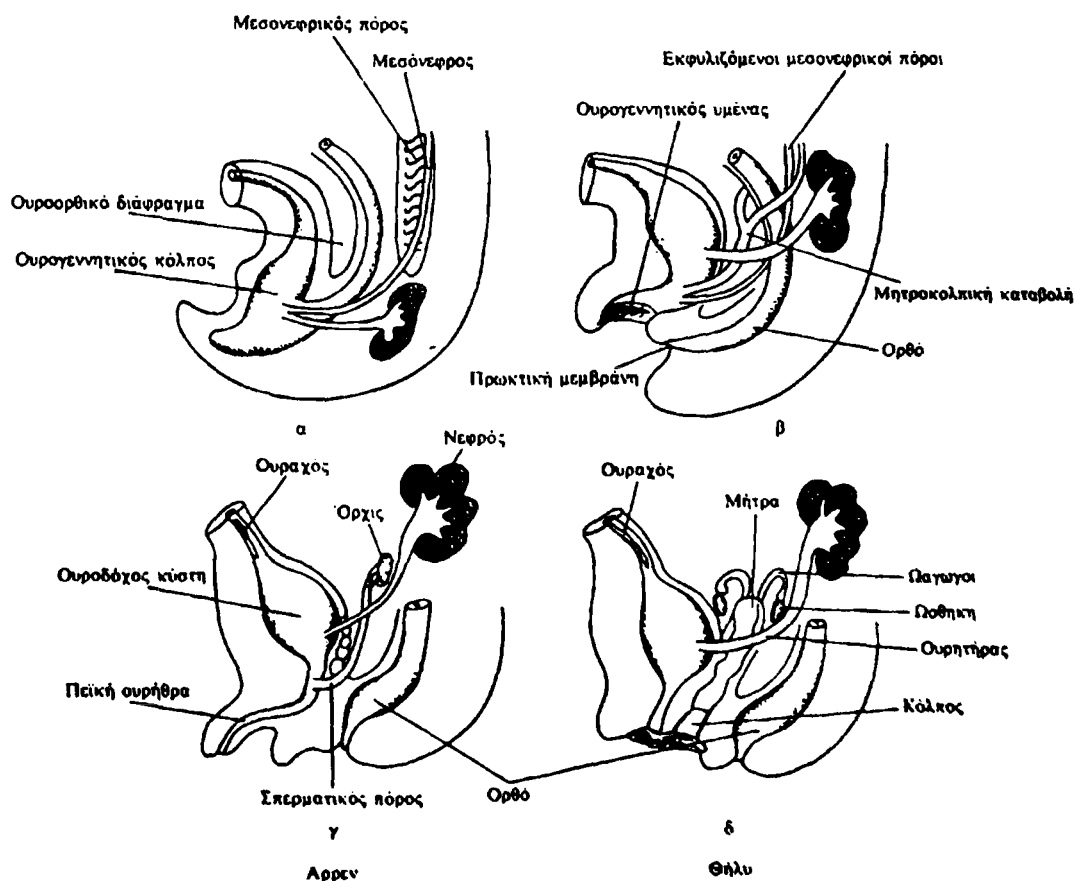
Μεταξύ της 4^{ης}-7^{ης} εμβρυϊκής εβδομάδας η αμάρα διαιρείται από ένα μεσεγχυματικής προέλευσης διάφραγμα που βρίσκεται μεταξύ αλλαντοΐδας και οπισθίου εντέρου (ουρο-ορθικό διάφραγμα) σε δύο χώρους: τον οπίσθιο ή ορθοπρωκτικό σωλήνα και τον πρόσθιο ή αρχέγονο ουρογεννητικό κόλπο. Η αμαρική μεμβράνη διαιρείται επίσης σε ουρογεννητική (πρόσθια) και πρωκτική (οπίσθια) μεμβράνη (Εικόνα 14β,γ).¹⁵⁸ Η ουρογεννητική μεμβράνη θα ραγεί πρώτη την 6^η-7^η εμβρυϊκή εβδομάδα και η πρωκτική αργότερα την 9^η εβδομάδα. Ο ουρογεννητικός κόλπος χωρίζεται σε τρεις διαφορετικές μοίρες: α) την ανώτερη και πιο διευρυμένη από την οποία θα προέλθει η ουροδόχος κύστη, β) τη μέση εστενωμένη από όπου στον άνδρα θα προέλθει η προστατική και μέρος της υμενώδους μοίρας της ουρήθρας και γ) τον τελικό ουρογεννητικό κόλπο (φαλλικό τμήμα). Η ανάπτυξη του τελικού ουρογεννητικού κόλπου διαφέρει σημαντικά στα δύο φύλα (Εικόνα 14γ, δ).¹⁵⁸

Η θέση των έξω γεννητικών οργάνων καθορίζεται περίπου την 5^η εμβρυϊκή εβδομάδα με την εμφάνιση ενός απλού αρχέγονου οργάνου, ενώ την 6^η εβδομάδα της κύησης τα έξω γεννητικά όργανα του άρρενος και του θήλεος εμβρύου είναι όμοια (Εικόνα 15).¹⁵⁹ Τρία επάρματα διακρίνονται γύρω από την ουρογεννητική μεμβράνη. Το πιο κεφαλικά ευρισκόμενο καλείται γεννητικό φύμα. Τα άλλα δύο επάρματα βρίσκονται εκατέρωθεν της ουρογεννητικής μεμβράνης και καλούνται ουρογεννητικές πτυχές. Επί τα εκτός των ουρογεννητικών πτυχών βρίσκονται άλλα δύο επάρματα, τα χειλεοσχεϊκά.¹⁶⁰ Μέχρι και την 7^η εμβρυϊκή εβδομάδα τα έξω γεννητικά όργανα παραμένουν αδιαφοροποίητα.

Η ανάπτυξη της ανθρώπινης ανδρικής ουρήθρας συμβαίνει φυσιολογικά σε ένα γενετικώς άρρεν έμβρυο (46, XY) μεταξύ 8^{ης}-16^{ης} εβδομάδας της κύησης υπό την



επίδραση των ανδρογόνων (τεστοστερόνη-διυδροτεστοστερόνη). Προέρχεται από την ουρηθρική πλάκα, η οποία εκφύεται από τα τοιχώματα της αμάρας και του ουρογεννητικού κόλπου.¹⁶¹ Σύμφωνα με μια άλλη θεώρηση, η ανάπτυξη της ουρήθρας αρχίζει ήδη από την 4^η περίπου εμβρυϊκή εβδομάδα όταν η ουρηθρική πλάκα αναγνωρίζεται ως πάχυνση του προσθίου τοιχώματος του ενδοδέρματος της αμαρικής μεμβράνης.^{161,162} Μια πρωτογενής ουρηθρική αύλακα δημιουργείται από την ανάπτυξη των ουρηθραίων πτυχών στην κοιλιακή επιφάνεια του φαλλικού τμήματος του ουρογεννητικού κόλπου εκατέρωθεν της ουρηθρικής πλάκας.¹⁶¹ Μια δευτερογενής ουρηθρική αύλακα αναπτύσσεται στη συνέχεια περί την 8^η εμβρυϊκή εβδομάδα ως αποτέλεσμα αποσύνθεσης της οροφής της πρωτογενούς ουρηθρικής αύλακας.¹⁶² Η διαδικασία αυτή συνεχίζεται για να δημιουργηθεί τελικά η μόνιμη ουρηθρική αύλακα.



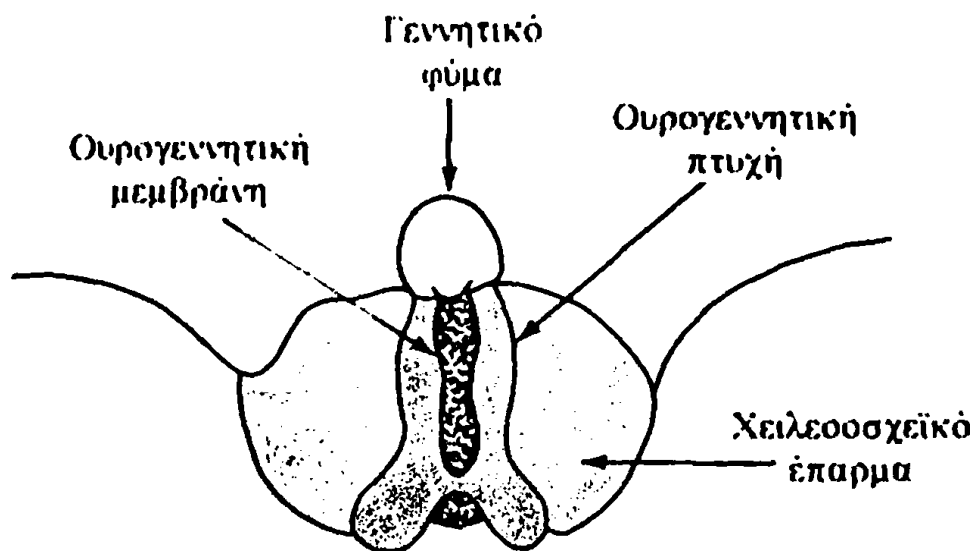
Εικόνα 14. Σχηματική απεικόνιση της διαίρεσης της αμάρας σε ουρογεννητικό κόλπο και ορθοπρωκτικό σωλήνα καθώς και της ανάπτυξης της ουροδόχου κύστης, της ουρήθρας και του ουραχού στα δύο φύλα.¹⁶⁸

Κατά την 8^η εβδομάδα της εμβρυϊκής ζωής τα εμβρυϊκά ορχικά κύτταρα του



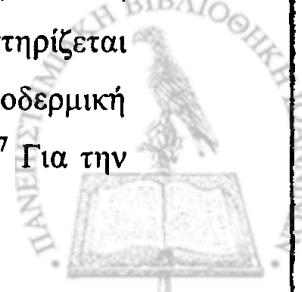
Leydig αρχίζουν να παράγουν υπό την επίδραση της β -hCG τεστοστερόνη, που συνεχίζει να εκκρίνεται και φθάνει στη μέγιστη τιμή της κατά τη 12^η εβδομάδα περίπου.¹⁶³⁻¹⁶⁵ Η ισχυρότερη ανδρογονικά διυδροτεστοστερόνη προέρχεται από μετατροπή της τεστοστερόνης υπό την επίδραση του ενζύμου 5 α -ρεδουκτάση (κωδικοποιείται από το γονίδιο SRD5A2 που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 2) που εκφράζεται στην αρχέγονη καταβολή των ανδρικών γεννητικών οργάνων.¹⁶⁶

Σύμφωνα με τον ιστορικά παραδεκτό μηχανισμό ανάπτυξης της πείκης ουρήθρας, περί την 11^η εμβρυϊκή εβδομάδα τα κύτταρα του Leydig αυξάνουν σε αριθμό, μέγεθος και ρυθμό λειτουργίας και οι ουρηθραίες πτυχές αρχίζουν να συγχωνεύονται κατά μήκος της μέσης γραμμής της κοιλιακής επιφάνειας του πείκου κορμού με φυγόκεντρο κατεύθυνση υπεγείροντας την ουρηθρική πλάκα προκειμένου να σχηματιστεί η ουρήθρα.¹⁶¹ Η συγχώνευση των ουρηθραίων πτυχών έχει ολοκληρωθεί μέχρι τη 12^η εβδομάδα της κύησης και η στεφανιαία αύλακα διαχωρίζει τη βάλανο από το σώμα του πέους.



Εικόνα 15. Απεικόνιση της καταβολής των έξω γεννητικών οργάνων σε έμβρυο 6 εβδομάδων (τροποποιημένο από αναφορά 159).

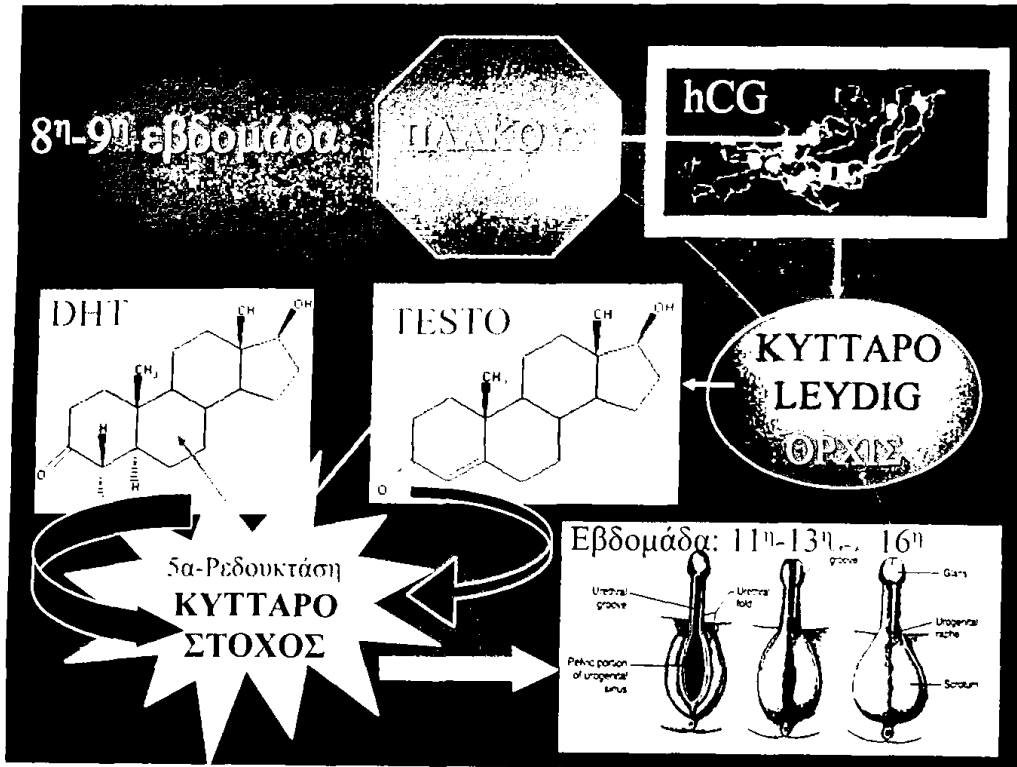
Κατά τη διάρκεια της 16^{ης} εμβρυϊκής εβδομάδας εμφανίζεται η βαλανική ουρήθρα. Ο ακριβής μηχανισμός ανάπτυξης παραμένει αντιφατικός. Υποστηρίζεται ότι το εγγύς τμήμα της προέρχεται από την ουρηθρική πλάκα (ενδοδερμική προέλευση) με μηχανισμό ανάλογο του σχηματισμού της πείκης μοίρας.¹⁶⁷ Για την



ερμηνεία της ανάπτυξης του άπω τμήματος της βαλανικής ουρήθρας έχουν αναπτυχθεί δύο θεωρίες. Σύμφωνα με την κλασσική θεωρία της εξωδερμικής προέλευσης η βάλανος αρχίζει να σωληνοποιείται από το περιφερικό άκρο της και τείνει να συναντήσει κεντρικά την πείκη ουρήθρα. Συγκεκριμένα, το άπω τμήμα της βαλανικής ουρήθρας σχηματίζεται από πεταλιώδη διείσδυση του επιφανειακού επιθηλίου της βάλανου (ectodermal intrusion theory or ectodermal in-growth theory), το οποίο επεκτείνεται προς το απώτερο άκρο της ουρηθρικής πλάκας για να μετατραπεί τελικά σε πολύστιβο πλακώδες επιθήλιο. Πρόσφατα η παραπάνω θεωρία έχει αμφισβητηθεί και έχει προταθεί η θεωρία της ενδοδερμικής διαφοροποίησης (endodermal differentiation theory).¹⁶⁸ Σύμφωνα με αυτή, η ουρηθρική πλάκα εκτείνεται μέχρι την κορυφή του φαλλού και διατηρεί τη βατότητα και τη συνέχεια της ουρήθρας καθ' όλη τη διάρκεια της ουρηθρικής ανάπτυξης. Επομένως, το επιθήλιο της ουρήθρας καθ' όλο το μήκος της προέρχεται από τον ουρογεννητικό κόλπο (ενδοδερμική προέλευση). Υπάρχουν ενδείξεις σύμφωνα με τις οποίες, ο επιθηλιακός ιστός ενδοδερμικής προέλευσης (ουρηθρική πλάκα) κάτω από κατάλληλες συνθήκες διακυτταρικής επικοινωνίας (cellular signaling) διαφοροποιείται σε πολύστιβο πλακώδες επιθήλιο που απαντά στην πλήρως αναπτυγμένη βαλανική ουρήθρα.¹⁶⁸

Κατά την 8^η εμβρυϊκή εβδομάδα περίπου, εμφανίζονται χαμηλά σε κάθε πλευρά του πείκου κορμού ακροποσθιακές πτυχές. Αυτές συναντιόνται ραχιαία για να σχηματίσουν μια επίπεδη ζάρα στο εγγύς άκρο της στεφανιαίας αύλακας, η οποία δεν περιβρογχίζει τη βάλανο γιατί διακόπτεται κοιλιακά λόγω της ατελούς ανάπτυξης της βαλανικής ουρήθρας μέχρι εκείνη τη χρονική στιγμή. Επομένως, η ακροποσθιακή πτυχή μετακινείται περιφερικότερα με ενεργητική αύξηση του μεσεγγύματος μεταξύ αυτής και της βάλανου. Η διαδικασία συνεχίζεται μέχρι να καλυφθεί ολόκληρη η βάλανος περί την 20^η εμβρυϊκή εβδομάδα.¹⁶² Σχηματικά η εμβρυολογική ανάπτυξη της ανδρικής ουρήθρας παριστάνεται στην εικόνα 16.





Εικόνα 16. Εμβρυολογική ανάπτυξη της ανδρικής ουρήθρας. hCG = ανθρώπινη χορειακή γοναδοτροφίνη DHT = Διυδροτεστοστερόνη, TESTO = Τεστοστερόνη.¹⁶⁹

4. Κάθοδος των όρχεων στα διάφορα θηλαστικά είδη

Η ορχική κάθοδος και η εξέλιξη του οσχέου επιτελείται αποκλειστικά αλλά όχι καθολικά στα θηλαστικά. Αν και παραμένει αμφισβητήσιμο, θεωρείται ότι η εξελικτικά δαπανηρή αυτή διεργασία, αποσκοπεί αν μη τι άλλο στην εξασφάλιση χαμηλότερης θερμοκρασίας στους όρχεις από αυτή του πυρήνα του σώματος, γεγονός απαραίτητο για την παραγωγή και διατήρηση βιώσιμου σπέρματος.

Η κάθοδος των όρχεων στα οσχεοφόρα θηλαστικά αποτελεί μια διεργασία, η οποία επιτελείται σε περισσότερα από ένα στάδια και προϋποθέτει αλληλεπιδράσεις μεταξύ πολλών ανατομικών δομών και ορμονικών παραγόντων. Φαίνεται ότι ο οσχείκος σύνδεσμος (οίακας) του όρχεως (gubernaculum) κατέχει θέση κλειδί ιδίως κατά την φάση της διακοιλιακής ορχικής καθόδου. Τα ανδρογόνα και η MIS φαίνεται να παίζουν μάλλον δευτερεύοντα ρόλο κατά την διακοιλιακή ορχική κάθοδο, η οποία φαίνεται ότι ρυθμίζεται από την ορμόνη INSL3 που εκκρίνεται από τα διάμεσα ορχικά κύτταρα του Leydig, δρώντας άμεσα επί του οίακα (βλέπε παρακάτω). Η βουβωνοσχεϊκή φάση της ορχικής καθόδου επιτυγχάνεται δια μεσολαβήσεως των ανδρογόνων, τα οποία δρουν πιθανότατα έμμεσα επί του οίακα, σε συνδυασμό με την επίδραση μηχανικών παραγόντων (ενδοκοιλιακή πίεση), ενώ γονίδια που συμβάλουν στη μορφογένεση (homeobox-Hox) φαίνεται να παίζουν κάποιον ανεξάρτητο ρόλο στη φάση αυτή και χρίζουν περαιτέρω ελέγχου (βλέπε παρακάτω).

Οι αναφορές σχετικά με τις διαχρονικές τάσεις διακύμανσης της επίπτωσης της κρυσορχίας είναι αντιφατικές. Ωστόσο, υπάρχει γενικά ομοφωνία σχετικά με την εποχικότητα της επίπτωσης της συγγενούς αυτής ανωμαλίας τουλάχιστον όσον αφορά στο βόρειο ημισφαίριο.

Οι δυσπλασίες της επιδιδυμίδας, η επηρεασμένη ορχική ιστολογία λόγω ενδογενών ορχικών ελλειμμάτων, η ήπια υπογοναδική κατάσταση και ο αυξημένος ρυθμός απόπτωσης των βλαστικών γεννητικών κυττάρων κυρίως λόγω της αυξημένης ορχικής θερμοκρασίας, αποτελούν παράγοντες στους οποίους αποδίδεται η υπογονιμότητα που συχνά συνοδεύει την κρυσορχία. Η θεωρία της ενδογενούς ορχικής παθολογίας μπορεί να ερμηνεύσει εύσχημα το συσχετισμό της κρυσορχία με τον καρκίνο των όρχεων.

Η αντιμετώπιση της κρυσορχίας στον άνθρωπο αποσκοπεί στη διατήρηση της μελλοντικής γονιμότητας του ασθενούς. Ο μόνος αποτελεσματικός θεραπευτικός



τρόπος επί του παρόντος είναι η χειρουργική τοποθέτηση του όρχεως στο όσχεο. Πρέπει να λαμβάνει χώρα πριν την ηλικία του ενός έτους. Οι ορμονικοί χειρισμοί μπορεί ενδεχομένως να θεωρηθεί ότι αποτελούν επικουρική θεραπεία υπό προϋποθέσεις, η οποία διεγείρει την ωρίμανση των βλαστικών γεννητικών κυττάρων και βελτιώνει μακροχρονίως τα αποτελέσματα.

4.1. Εξέλιξη της ορχικής καθόδου στα διάφορα είδη θηλαστικών

Η κάθοδος των όρχεων από την αρχική τους θέση (περιοχή των γεννητικών ταινιών), η οποία στις περισσότερες περιπτώσεις αντιστοιχεί στη φυσιολογική θέση των ωοθηκών, συμβαίνει αποκλειστικά στα θηλαστικά (Θήρια).¹⁷⁰ Ωστόσο, ο βαθμός ορχικής καθόδου ποικίλλει πολύ και οι όρχεις ανευρίσκονται σε ενδοκοιλιακή θέση σε μια μεγάλη ποικιλία και αριθμό τάξεων. Επιπλέον, συχνά παρατηρείται μεταβλητότητα της θέσης των όρχεων ανάμεσα στα διάφορα γένη των θηλαστικών.¹⁷¹⁻¹⁷³ Έξι τάξεις θηλαστικών περιλαμβάνουν είδη που φέρουν τους όρχεις εσωτερικά καθώς και είδη που φέρουν τους όρχεις σε εξωτερική θέση (Μαρσιποφόρα: καγκουρό κ.α., Χειρόπτερα: νυχτερίδες, Τρωκτικά: αρουραίοι, ποντικοί, ακανθόχοιροι, κυνόμυς, τσιντσιλά κ.α., Περισσοδάκτυλα: άλογο, ρινόκερος κ.α., Αρτιοδάκτυλα: χοίρος, ιπποπόταμος, καμήλα, τάρανδος, αγελάδα κ.α. και Σαρκοφάγα¹⁷⁴⁻¹⁷⁵).

Η θέση των όρχεων στα θηλαστικά μπορεί γενικά να ταξινομηθεί σε ενδοκοιλιακή και βουβωνοσχεϊκή.¹⁷⁶ Κάθε θέση μπορεί να υποδιαιρεθεί σχηματικά περαιτέρω σε δύο και τέσσερις υποκατηγορίες, αντίστοιχα: εμβρυϊκή, δηλαδή καμία κάθοδος από την αρχική θέση της γεννητικής ταινίας (θέση 1), ενδιάμεση, δηλαδή μερική κάθοδος σε ενδοκοιλιακή θέση (θέση 2), βουβωνική, δηλαδή εντός βουβωνικού πόρου (θέση 3), αναδυόμενη, δηλαδή κάποιο τμήμα του όρχεως προσπίπτει εκτός βουβωνικού πόρου δια του έξω βουβωνικού στομίου (θέση 4), πέραν του έξω βουβωνικού στομίου αλλά όχι εντός ενός πραγματικού οσχέου (θέση 5), οσχεϊκή, δηλαδή εντός ενός πραγματικού οσχέου (θέση 6).^{171,176} Σε μη θηλαστικά είδη όπως τα ψάρια, τα πουλιά, οι χελώνες, οι κροκόδειλοι, οι όρχεις εντοπίζονται στη θέση 1.^{176,177}

4.1.1. Είδη θηλαστικών με όρχεις σε αληθή ενδοκοιλιακή θέση

Υπάρχει ένας αριθμός θηλαστικών ειδών των οποίων οι όρχεις δεν



κατέρχονται καθόλου (θέση 1), όπως συμβαίνει στα μη θηλαστικά σπονδυλωτά. Τα ζώα αυτά λέγονται τεστίκοντα (*testiconda*) και το φαινόμενο τεστικόντια (*testicondia*).¹⁷⁸ Εδώ ταξινομούνται τα Πρωτοθήρια¹⁷⁹ καθώς και μερικά Ευθήρια είδη. Στα τεστίκοντα Ευθήρια είδη ανήκουν: α) τα Υρακοειδή (*Hyracoidea*): ύραξ των βράχων (*Heterohyrax, Procavia*), ένα μικρό φυτοφάγο ζώο που ζει στα βραχώδη εδάφη της Αφρικής,^{178,180} β) τα Προβοσκιδοφόρα (*Proboscidea*): τα δύο είδη ελέφαντα που διασώζονται (Ασιατικός και Αφρικανικός (*Elephas maximus* και *Loxodonta Africana*, αντίστοιχα))¹⁸¹⁻¹⁸³ και γ) τα Σειρήνια (*Sirenia*): το θαλάσσιο κήτος *Dugong dugon*.¹⁸⁴

Τα θαλάσσια θηλαστικά κήτη της τάξης *Catacea*, δηλαδή το γουρουνόψαρο, το δελφίνι και η φάλαινα διαθέτουν μερικώς κατεβασμένους όρχεις (θέση 2).¹⁸⁵ Ωστόσο, η θέση των όρχεων ποικίλει στις διάφορες οικογένειες. Οι όρχεις στο κοινό γουρουνόψαρο (*Phocaena phocaena*) εντοπίζονται επί τα εκτός και ουραία των νεφρών,¹⁸⁶ ενώ στην πτερυγιοφόρο φάλαινα (*Balaenoptera physalus*) εντοπίζονται λίγο πιο κάτω από τους νεφρούς και η κρνιακή μοίρα των σπερματικών πόρων είναι καθηλωμένη στη βουβωνική περιοχή από μια γεννητική δοκίδα.¹⁸⁷ Στη αρκτική χαυλιοδοντοφόρο φάλαινα (*Monodon monoceros*), οι όρχεις βρίσκονται σε πυελική θέση κοντά στον αυχένα της κύστης εντός του βουβωνικού πόρου (θέση 3).¹⁸⁵

Τα θαλάσσια θηλαστικά κήτη της τάξης *Catacea* θεωρείται ότι εξελικτικά αποτελούν απογόνους των χερσαίων (οπληφόρων) θηλαστικών που προσαρμόστηκαν στη θαλάσσια ζωή πριν από περίπου 50 εκατομμύρια χρόνια. Εφόσον οι πρόγονοί τους εμφάνιζαν ορχική κάθοδο, τα μέλη τη τάξης αυτής θηλαστικών διαφοροποιούνται επομένως από τα προαναφερθέντα (πρωτογενή) τεστίκοντα ((primary) *testiconda*) και θεωρούνται δευτερογενή τεστίκοντα (*secondary testiconda*).¹⁸⁸ Υποτίθεται ότι τα ζώα αυτά είχαν όρχεις σε οσχείκη θέση σε προηγούμενη εποχή, αλλά έχασαν αυτό το χαρακτηριστικό κατά τις επόμενες χιλιετίες¹⁸⁵ προκειμένου να προστατευτούν οι γονάδες τους από υπερβολική ψύξη, δεδομένου ότι ακόμη και βραχεία περίοδος υπερβολικής ψύξης των όρχεων μπορεί να καταστήσει το ζώο μόνιμα στείρο.¹⁸⁹ Έχει προταθεί ότι η απουσία της πυελικής ζώνης σε συνδυασμό με την ανάπτυξη δομών εντός και πέραν της ουραίας κοιλιακής περιοχής, κυρίως του ουραίου προσπονδυλικού μυϊκού συστήματος αποκλείει την ουραία επέκταση κοίλων οργάνων από την κοιλιακή κοιλότητα, όπως η ελυτροπεριτοναϊκή πτυχή.¹⁸⁸



4.1.2. Είδη θηλαστικών με μερική κάθοδο των όρχεων

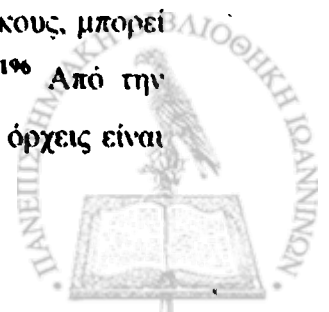
Οι όρχεις στα σκιουρόμορφα τρωκτικά του γένους *Cynomys* (prairie dog) παραμένουν σε παρόμοια θέση με αυτή που βρίσκονται στην αρκτική χαυλιοδοντοφόρο φάλαινα *Monodon monoceros*.¹⁹⁰ Το ίδιο ισχύει και στα περισσότερα θηλαστικά της τάξης των Εντομοφάγων, δηλαδή στις οικογένειες Erinaceidae: εχίνος, Talpidae: ασπάλακας Soricidae: μυγαλή και στην τάξη Macroscelididea, (elephant shrew) με τη διαφορά ότι αυτά τα μη οσχεοφώρα θηλαστικά είδη παρουσιάζουν εποχικές μεταβολές της θέσης και του μεγέθους των γονάδων τους. Έτσι, οι όρχεις στα ζώα αυτά κατά την άνοιξη που αποτελεί περίοδο της αναπαραγωγής τους, αυξάνονται σε μέγεθος και προσπίπτουν εντός σακοειδών προβολών που εντοπίζονται κοντά στη βάση της ουράς.^{191,192} Οι όρχεις των *armadillos* και του βραδύποδα (πρώην τάξη Edentata) που σήμερα ταξινομούνται στις τάξεις Cingulata και Pilosa αντίστοιχα, εντοπίζονται ανάμεσα στην ουροδόχο κύστη και στο ορθό.¹⁹³

Τα τρωκτικό τσιντσιλά αποτελεί αντιπροσωπευτικό παράδειγμα θηλαστικού με αναστολή της ορχικής καθόδου αμέσως επί τα εκτός του βουβωνικού πόρου (θέση 4). Αντί για αληθές όσχεο, αυτά τα ζώα διαθέτουν ένα λεπτοτοιχωματικό εκκόλπωμα επί τα εκτός και ουραία του πέους. Αν και οι όρχεις βρίσκονται εντός βουβωνικών πόρων, η ουρά της επιδιδυμίδας προβάλλει μέσα στο εκκόλπωμα.¹⁹⁴

Ο θαλάσσιος ελέφαντας του νοτίου ημισφαιρίου (*Mirounga leonina*) που ανήκει στην τάξη των Σαρκοφάγων αποτελεί ένα τυπικό παράδειγμα θηλαστικού με τους όρχεις στη θέση 5. Εδώ, οι όρχεις βρίσκονται εκτός κοιλιακού κύτους, μέσα σε βουβωνικές «θήκες» αντί σε μονήρες αληθές όσχεο, ενώ απουσιάζει ο δαρτός και οι κρεμαστήρες μύες είναι υποτυπωδώς ανεπτυγμένοι.¹⁹⁵

4.1.3. Είδη θηλαστικών με όρχεις εντός αληθούς οσχέου

Ακόμη και στις περιπτώσεις θηλαστικών στις οποίες παρατηρείται ορχική κάθοδος μέσα σε αληθές όσχεο (θέση 6), η ακριβής θέση του οσχεικού σάκου καθώς και ο βαθμός ανάπτυξης του μπορεί να ποικίλλει αρκετά μεταξύ των διαφόρων ειδών. Οι όρχεις για παράδειγμα της ύαινας, η οποία ανήκει στα Σαρκοφάγα, ολοκληρώνουν συνήθως την κάθοδό τους μέσα σε δύο οπίσθιους αβαθείς οσχεικούς σάκους, μπορεί ωστόσο περιστασιακά να εξαφανίζονται υποδόρια μέσα στο περίνεο.¹⁹⁶ Από την άλλη, στο καγκουρό, όπως και στην πλειοψηφία των μαρσιποφόρων οι όρχεις είναι



μόνιμα κατεβασμένοι σε ένα μεγάλο αιωρούμενο όσχεο που βρίσκεται μπροστά από το πέος^{197,198} σε αντίθεση με τα περισσότερα θηλαστικά με μόνιμα κατεβασμένους όρχεις, των οποίων το όσχεο αναπτύσσεται οπισθοπεϊκά.¹⁹⁹

Η θέση των όρχεων σε σχέση με το όσχεο είναι δυνατόν να ποικίλλει επίσης ανάλογα με την εποχή (περίοδο αναπαραγωγής) και/ή τη σεξουαλική ωριμότητα του ζώου. Τέτοιες παραλλαγές παρατηρούνται σε μερικά σαρκοφάγα, τρωκτικά και σε τρία είδη της τάξης των Πρωτεύοντων θηλαστικών (Primates) (βλέπε παρακάτω).^{200,201}

Τα Σαρκοφάγα θηλαστικά αλεπού, κουνάβι, νυφίτσα, ερμίνα, γάτα και σκύλος καθώς επίσης τα Τρωκτικά ποντικός και αρουραίος (Muridae) έχουν ενιαίο όσχεο μεταξύ βουβωνικής περιοχής και πρωκτού και παρουσιάζουν μόνιμη κάθοδο των όρχεων, ανεξαρτήτως από το αν βρίσκονται ή όχι σε αναπαραγωγική περίοδο.^{202,203} Αντίθετα, η αρκούδα που ανήκει επίσης στα Σαρκοφάγα, διαθέτει όρχεις σε θέση οσχέϊκή ήδη από την νηπιακή ηλικία οι οποίοι διατηρούνται κοντά στο σώμα εκτός από την περίοδο αναπαραγωγής στο ενήλικο ζώο, οπότε συμβαίνει χάλαση του οσχέου και οι όρχεις απομακρύνονται από το σώμα και αιωρούνται.²⁰⁴

Ομοίως, το είδος του Τρωκτικού *Marmota Monax*, εμφανίζει εποχική κάθοδο των όρχεων σε σάκους που εντοπίζονται παρά την ουρά,²⁰⁵ ενώ οι όρχεις του Τρωκτικού κάστωρ των ορέων (*Aplodontia rufa*) βρίσκονται σε ημιοσχέϊκή θέση κατά την αναπαραγωγική περίοδο.¹⁷⁴ Στους νεαρούς σκίουρους που επίσης ανήκουν στα τρωκτικά (Squiridae), οι όρχεις μπορεί να εντοπίζονται σε οσχέϊκή ή βουβωνική θέση, αλλά μετά τη σεξουαλική τους ωρίμανση δεν ανέλκονται πια παρά μόνο περιστασιακά.²⁰⁶

Σε όλα τα διασωζόμενα Πρωτεύοντα θηλαστικά οι όρχεις κατέρχονται σε οσχέϊκό σάκο και δεν επανέρχονται πια εντός του κοιλιακού κύτους.²⁰⁷ Ωστόσο, είναι αξιοσημείωτο ότι στα γένη *Loris* και *Perodicticus* (*Lorisidae*) παρατηρείται εποχική εξάρτηση της ορχικής καθόδου στο όσχεο.²⁰¹ Επίσης, ο πίθηκος των Ινδιών Μακάκος ο ρήσος (*Macaca rhesus*) παρουσιάζει κάθοδο των όρχεων πριν τη γέννηση όπως ο άνθρωπος με τη διαφορά ότι στον πίθηκο οι όρχεις επανέρχονται μέσα στο βουβωνικό πόρο μετά τη γέννηση και επανέρχονται στο όσχεο τελικά κατά την εφηβεία.²⁰⁰



4.1.4. Εξελικτικές υποθέσεις για την ερμηνεία της ορχικής καθόδου και της ανάπτυξης του οσχέου στα θηλαστικά

Σημαντική είναι η διαμάχη μεταξύ των διαφόρων μελετητών των θηλαστικών, φυσιολόγων της αναπαραγωγής, αναπτυξιολόγων και εξελικτικών βιολόγων σχετικά με τους λόγους που οδηγούν στην ανάπτυξη των όρχεων και της επιδιδυμίδας καθώς και στην τελική θέση που αυτά καταλαμβάνουν στο σώμα. Η ορχική κάθοδος αποτελεί δαπανηρή διεργασία από πλευράς φυσιολογίας, εξέλιξης και ανάπτυξης,²⁰⁸ άρα τα οφέλη που προκύπτουν από αυτήν πρέπει να υπερτερούν των δαπανών. Έτσι, το ποια μπορεί να είναι τα πλεονεκτήματα που προκύπτουν από την ορχική κάθοδο είναι δύσκολο να γίνει αντιληπτό και το ερώτημα μόλις μερικώς αλληλεπικαλύπτει αυτό περί προσαρμοστικής αξίας του οσχέου, καθώς η ανάπτυξη του οσχέου δεν αποτελεί προϋπόθεση της ορχικής καθόδου. Αρκετές υποθέσεις έχουν αναπτυχθεί προκειμένου να ερμηνευτεί η λόγος της ορχικής καθόδου και της εξέλιξης του οσχέου. Οι πιο σημαντικές από αυτές είναι: α) η υπόθεση της εξάρτησης της σπερματογένεσης από τη θερμοκρασία,²⁰⁹ β) η υπόθεση του ρυθμού μεταλλάξεων,²¹⁰ γ) η υπόθεση της επίδειξης,²¹¹ δ) η υπόθεση της ψυχρής εναποθήκευσης²¹² και ε) η υπόθεση της εκπαίδευσης.¹⁷⁷

Η παλαιότερη και πιο κλασσική υπόθεση που επιχειρεί να ερμηνεύσει την ορχική κάθοδο και την εξέλιξη του οσχέου προέρχεται από τον Moore.²⁰⁹ Σύμφωνα με αυτή, οι όρχεις κατέρχονται σε ιδιαίτερα εξειδικευμένο περιβάλλον χαμηλής θερμοκρασίας, το όσχεο, επειδή ένα τέτοιο περιβάλλον είναι απαραίτητο για την παραγωγή βιώσιμου σπέρματος. Είναι γνωστό ότι η φυσιολογική σπερματογένεση και αποθήκευση του σπέρματος στην επιδιδυμίδα πολλών ειδών θηλαστικών, προϋποθέτει θερμοκρασίες χαμηλότερες από την κεντρική θερμοκρασία του σώματος.^{171,213-218} Η σπερματογένεση μπορεί να παρακωλύεται σε θερμοκρασίες μεταξύ 35-38°C,^{213,217} ενώ οι θερμοκρασίες που αναπτύσσονται εντός κοιλιακού κύτους δρουν καταστροφικά στη αποθήκευση των σπερματοζωαρίων στις επιδιδυμίδες πολλών ειδών σε μακροχρόνια βάση.²¹² Τα περισσότερα θηλαστικά, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου, έχουν αποκτήσει ένα μεγάλο αριθμό εξεζητημένων και περίπλοκων ανατομικών και φυσιολογικών προσαρμοστικών μηχανισμών του οσχέου (Παράρτημα 1, Πίνακας 2),^{170,173,176,177,212,215,219,220} έτσι ώστε η επιδιδυμίδα και οι όρχεις να διατηρούνται κατά 3-5°C περίπου χαμηλότερα από την κεντρική θερμοκρασία του σώματος.



Η υπόθεση αυτή έχει επικριθεί σοβαρά από πολλούς συγγραφείς^{171,177,212,221} κυρίως πάνω στη βάση της σχέσης μεταξύ ορχικής-κεντρικής θερμοκρασίας σώματος στα οσχεοφόρα συγκριτικά με τα μη οσχεοφόρα θηλαστικά είδη, όπως επίσης και λόγω του ότι αδυνατεί να ερμηνεύσει την παρατηρούμενη μεταβλητότητα του βαθμού ορχικής καθόδου μεταξύ των διαφόρων ειδών θηλαστικών. Ωστόσο, η υπόθεση ενισχύεται από τα μέχρι τώρα συσσωρευμένα δεδομένα που υποστηρίζουν ότι η μεγάλη πλειοψηφία των περίπου 1500 διασωζόμενων μη οσχεοφόρων θηλαστικών ειδών δεν αναπτύσσει τελικά υψηλότερες ορχικές θερμοκρασίες συγκριτικά με τα οσχεοφόρα είδη.²²²

Είναι γνωστό ότι υπάρχουν ειδικοί μηχανισμοί με τους οποίους επιτυγχάνεται ψύξη των όρχεων σε ένα πλήθος μη οσχεοφόρων θηλαστικών όπως συμβαίνει για παράδειγμα σε μέλη της οικογένειας Phocidae της τάξης των Σαρκοφάγων και συγκεκριμένα στο θαλάσσιο ελέφαντα του νοτίου ημισφαιρίου (*Mirounga leonina*) και άλλες «αληθείς φώκιες»,^{223,224} καθώς επίσης και στα θαλάσσια θηλαστικά κήτη της τάξης Catacea.^{225,226} Στα είδη αυτά η ψύξη των όρχεων επιτυγχάνεται με ανταλλαγή θερμότητας με το μηχανισμό αντιρρεύματος στα αιμοφόρα αγγεία δηλαδή φλεβικά πλέγματα φέρουν ψυχρό αίμα προς τα αρτηριακά στελέχη που τροφοδοτούν τον όρχι.

Αντιθέτως, άλλα μη οσχεοφόρα θηλαστικά είδη όπως για παράδειγμα ο εχίνος¹⁶³ και τα Πρωτοθήρια πρωτογενή τεστίκοντα δηλαδή τα Μονοτρήματα²²⁷ δεν χρειάζονται τέτοιους μηχανισμούς επειδή η κεντρική θερμοκρασία του σώματός τους είναι χαμηλή πιθανώς ως συνέπεια εξελικτικής προσαρμογής στην ανοσχεϊκή τους κατάσταση.

Από την άλλη πλευρά, τα Ευθήρια πρωτογενή τεστίκοντα όπως τα Υρακοειδή και τα Προβοσκιδοφόρα αποτελούν εξαίρεση του γενικού μοντέλου των πρωτογενών τεστικόντων, που χαρακτηρίζεται από χαμηλή κεντρική θερμοκρασία σώματος.²²⁸ Οι ύρακες χαρακτηρίζονται από περιορισμένη δυνατότητα εσωτερικής θερμορύθμισης και ο έλεγχος της θερμοκρασίας του σώματός τους επιτυγχάνεται κυρίως με διάφορες μεθόδους συμπεριφοράς.²²⁷ Λόγω του μικρού τους μεγέθους, της εποχικής αναπαραγωγικής δραστηριότητάς τους και της θέσης των όρχεων κοντά στο ραχιαίο τοίχωμα του σώματός τους, είναι σχετικά εύκολο για τα ζώα αυτά να ρυθμίζουν κατάλληλα την θερμοκρασία των όρχεών τους σε επίπεδα ικανά για τη διατήρηση φυσιολογικής σπερματογένεσης τροποποιώντας τη συμπεριφορά τους.¹⁸⁰

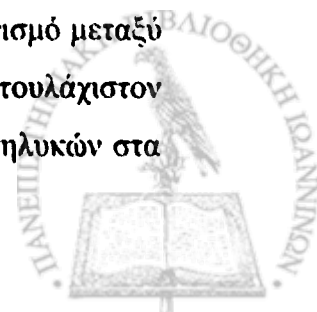


Οι ελέφαντες έχουν θερμοκρασία όρχεων ίση με την κεντρική θερμοκρασία του σώματός τους ($>36^{\circ}\text{C}$)¹⁷¹ και οι ορχικές φλέβες εκβάλλουν κατευθείαν στην κάτω κοίλη χωρίς να σχηματίζονται εμφανή ελικοειδή πλέγματα που θα μπορούσαν να συμβάλλουν στην ψύξη των όρχεων.¹⁸¹ Τα ζώα αυτά θεωρούνται «άνοσα» στις επιδράσεις των υψηλών θερμοκρασιών στη βιωσιμότητα του σπέρματος.²²⁸ Ωστόσο, ένα εύρος θερμοκρασιών της τάξης των $36-38^{\circ}\text{C}$ δεν είναι τόσο υψηλό για να προκαλέσει ασπερμία, αν και θερμοκρασίες μεγαλύτερες από 38°C φαίνεται ότι έχουν τέτοια επίδραση.²¹⁸ Συνεπώς, το γεγονός ότι οι ελέφαντες ανήκουν στα πρωτογενή τεστίκοντα δεν αρκεί από μόνο του να απορρίψει την υπόθεση της εξάρτησης της σπερματογένεσης από τη θερμοκρασία προκειμένου να ερμηνευτεί ο λόγος για τον οποίο οι όρχεις κατέρχονται και το όσχεο εξελίσσεται.²²²

Η υπόθεση του Moore υποστηρίζεται και από τη φυλογενετική προσέγγιση,²²² η οποία παρέχει ισχυρή απόδειξη της επιλεκτικής μετάβασης εξελικτικά από την παρουσία οσχέου στην εξαφάνισή του. Έτσι, η διακύμανση της ορχικής θέσης στα διάφορα είδη θηλαστικών θα μπορούσε να θεωρηθεί ως το αποτέλεσμα των αναπτυξιακών και φυσιολογικών δυσχερειών που συναντιούνται κατά την εξελικτική πίεση προς την κατάργηση του οσχέου και της καθόδου των όρχεων.

Μια τροποποίηση της παραπάνω υπόθεσης προτάθηκε σχετικά πρόσφατα από τον Short.²¹⁰ Σύμφωνα με αυτή τη θεωρία, η ορχική κάθοδος και η εξέλιξη του οσχέου στοχεύει να διατηρήσει το ρυθμό των μεταλλάξεων στα βλαστικά γεννητικά κύτταρα του άρρενος υπό έλεγχο παρά να εξασφαλίσει αυτή καθαυτή μια φυσιολογική σπερματογένεση. Ο ρυθμός των μεταλλάξεων στον άνθρωπο είναι υψηλότερος στους άνδρες παρά στις γυναίκες.^{229,230} Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με το ότι οι αυξημένες θερμοκρασίες συσχετίζονται με αύξηση των ρυθμών εμφάνισης μεταλλάξεων, οδηγεί στην υπόθεση ότι η διατήρηση των όρχεων σε χαμηλότερες θερμοκρασίες βοηθά στη διατήρηση των ρυθμών εμφάνισης μεταλλάξεων στην ανδρική βλαστική γεννητική σειρά σε αποδεκτά επίπεδα.^{214,231}

Η θεωρία της «επίδειξης» προτάθηκε από τον Portman.²¹¹ Βασίζεται στην υπόθεση ότι οι όρχεις κατέρχονται και εξωτερικεύονται στο όσχεο, εξ' αιτίας της σημασίας που έχουν στον κοινωνικό ανταγωνισμό, είτε προσελκύοντας τα θηλυκά να επιλέξουν ταίρι είτε ενέχοντας θέση συμβόλου κυριαρχίας στον ανταγωνισμό μεταξύ των αρσενικών. Σε μερικές τάξεις θηλαστικών το όσχεο είναι ζωνρά ή τουλάχιστον χαρακτηριστικά χρωματισμένο, ώστε να προσελκύει την προσοχή των θηλυκών στα



σεξουαλικά όργανα της αντίστοιχης τάξης. Αυτό ισχύει στα Πρωτεύοντα θηλαστικά για παράδειγμα, όπου η παρουσία κεχρωσμένου οσχέου σχετίζεται με πολυγυνή ή έκδοτα αναπαραγωγικά είδη, τα οποία χαρακτηρίζονται από έντονο ανταγωνισμό ανάμεσα στα αρσενικά.¹⁷⁷

Αν και υπάρχει ένας αριθμός παρατηρήσεων συμβατών με τη συγκεκριμένη υπόθεση, η αδυναμία της να ερμηνεύσει τη μεταβλητότητα της θέσης των όρχεων μεταξύ των διαφόρων μη οσχεοφόρων θηλαστικών ειδών, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι τα κεχρωσμένα όσχεα δεν είναι πάντοτε άμεσα εκτεθειμένα (οι κάτοχοι μπορεί να είναι νυκτόβια ζώα, συχνά καλύπτονται από τρίχωμα) αποδυναμώνει την ερμηνευτική της ισχύ.¹⁷⁷ Είναι πιθανότερο ότι το όσχεο είχε εξελιχθεί αρχικά ως όργανο επιτέλεσης άλλης λειτουργίας και ακολούθως διατηρήθηκε και επιπλέον, υιοθετήθηκε από μερικά είδη και ιδιαίτερα από τα Πρωτεύοντα θηλαστικά, ως συσκευή εκπομπής σημάτων λόγω των ιδιαίτερων συστημάτων της σεξουαλικής τους συμπεριφοράς.¹⁷² Με αυτόν τον τρόπο, η κοινωνική συμπεριφορά μπορεί να δρα μάλλον ως περιορισμός ενάντια στις προσαρμοστικές πιέσεις προς την κατεύθυνση της απώλειας του οσχέου παρά ως ένας εξελικτικός μηχανισμός προς την κατεύθυνση της ανάπτυξης του.²²²

Η υπόθεση της «ψυχρής εναποθήκευσης» προέρχεται από τον Bedford.²¹² Σύμφωνα με αυτήν η ορχική κάθοδος είναι ένα δευτερεύον φαινόμενο απότοκο της καθόδου των επιδιδυμίδων, η οποία αποτελεί τον «κύριο υποκινητή» για την εξέλιξη του οσχέου. Υποτίθεται δηλαδή ότι η ορχική κάθοδος στο όσχεο αποτελεί μηχανισμό που εξυπηρετεί δομικά την στήριξη των επιδιδυμίδων σε μερικά είδη, ενώ ο κύριος ρόλος του οσχέου είναι η συγκέντρωση του σπέρματος σε ψυχρό περιβάλλον.

Με βάση τη θεωρία αυτή, το όργανο εναποθήκευσης του σπέρματος στα θηλαστικά (συνήθως οι επιδιδυμίδες, αλλά κάποτε και οι σπερματοδόχες κύστες ή ο σπερματικός πόρος) προηγείται πάντοτε των όρχεων στην κάθοδο, κατερχόμενο σε μια θήκη του σωματικού τοιχώματος ή σε μια εξωτερική-δίκην οσχέου θήκη στα περισσότερα είδη με ενδοκοιλιακούς όρχεις.^{180,221,232,233} Ακόμη και σε μη θηλαστικά είδη όπως για παράδειγμα στα πτηνά της τάξης Passeriformes το σπέρμα εναποθηκεύεται σε μια αμαρική προεκβολή με χαμηλότερη κατά αρκετούς βαθμούς θερμοκρασία από την κεντρική του σώματος.²³⁴

Ωστόσο, το κύριο μειονέκτημα αυτής της υπόθεσης είναι η μη συμβατότητα της με το γεγονός ότι σε μερικές ανοσχεϊκές τάξεις, οι επιδιδυμίδες εντοπίζονται



υποδώρα ή ενδοκοιλιακά (π.χ. στις ύρακες,¹⁸⁰ στο elephant shrew²³⁵). Από φυλογενετικής άποψης²²² (βλέπε παραπάνω) η υπόθεση του Bedford δεν ευσταθεί αν και ερμηνεύει το γιατί σε μερικές τάξεις η επιδιδυμίδα παραμένει σε χαμηλή θέση, ενώ οι όρχεις ανέρχονται μεταναστεύοντας εκτός οσχέου κατά την διαδικασία οσχεϊκής απώλειας.

Η υπόθεση της «εκπαίδευσης» διατυπώθηκε από τον Zahavi.¹⁷⁷ Αποκλίνει ριζοσπαστικά από τις άλλες υποθέσεις που παρουσιάστηκαν παραπάνω, αφού θεωρεί το όσχεο ένα σκόπιμα εχθρικό παρά ευνοϊκό περιβάλλον ωρίμανσης του σπέρματος. Η βασική ιδέα είναι ότι, η κάθοδος των όρχεων σε όσχεο επιτελείται προκειμένου να «εκπαιδευτούν» τα σπερματοζώαρια ώστε να καταστούν ικανά να ανταπεξέλθουν στο μελλοντικό τους αγώνα μέσα στο φυσιολογικά τραχύ περιβάλλον του αναπαραγωγικού σωλήνα του θηλυκού.

Η υπόθεση στηρίζεται στη φυσιολογική βάση ότι η αιμάτωση των όρχεων που βρίσκονται εντός οσχέου είναι πολύ πτωχή για δύο κυρίως λόγους. Πρώτον, η πίεση του αίματος στις ορχικές αρτηρίες των οσχεοφόρων θηλαστικών είναι χαμηλότερη συγκριτικά με αυτή των μη οσχεοφόρων. Αυτό ισχύει διότι τα οσχεοφόρα θηλαστικά διαθέτουν ορχικές αρτηρίες που είναι εσπειραμένες, το μήκος τους είναι υπερβολικά μεγάλο και έχουν πολύ μικρή διάμετρο σε σχέση με το μήκος τους. Αντιθέτως τα μη οσχεοφόρα θηλαστικά διαθέτουν ευθείες και κοντές ορχικές αρτηρίες.^{219,236} Δεύτερον, η αιμοσφαιρίνη έχει πιο μεγάλη χημική συγγένεια προς το οξυγόνο σε θερμοκρασίες χαμηλότερες από τη θερμοκρασία του πυρήνα του σώματος, δηλαδή στη θερμοκρασία που βρίσκονται οι όρχεις μέσα στο όσχεο.²³⁷ Επομένως, ο βαθμός υποξυγοναιμίας και η ένταση της οξειδωτικής πίεσης στην οποία υποβάλλονται τα σπερματοζώαρια καθώς ωριμάζουν είναι ευθέως ανάλογος με το βαθμό της ορχικής καθόδου.

Άμεση συνέπεια της επιτέλεσης της σπερματογένεσης κάτω από συνθήκες υποξυγοναιμίας και οξειδωτικής πίεσης, είναι η αύξηση του μεγέθους, του αριθμού και της ικανότητας των μιτοχονδρίων των ωριμαζόντων σπερματοκυττάρων, όπως συμβαίνει και στις γραμμωτές μυϊκές ίνες κατά τη διάρκεια της αναερόβιας άσκησης. Εάν τα μιτοχόνδρια έχουν ασκηθεί πιο αποτελεσματικά σε όρχεις που έχουν κατέλθει εντός οσχέου και ανταποκρίνονται αποδοτικότερα κατά την ενεργό μεταφορά του σπέρματος μέσα στο γυναικείο αναπαραγωγικό σωλήνα (προσφέρουν δηλαδή στα σπερματοζώαρια την ενεργειακή δυνατότητα να κολυμπούν καλύτερα και/ή να



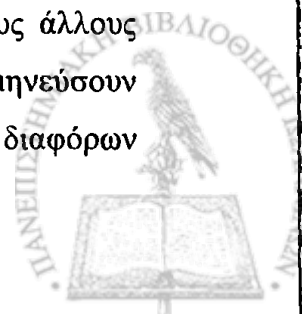
επιβιώνουν για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα), τότε η ορχικής κάθοδος καθιστά ικανό ένα αρσενικό να παράγει από άποψη φυσιολογίας, σπέρμα ανώτερης ποιότητας και άρα του προσφέρει πλεονέκτημα στον «εκσπερματιστικό ανταγωνισμό» που χαρακτηρίζει το σύστημα ζευγαρώματος πολλών θηλαστικών ειδών.²³⁸

Το πιο δυνατό σημείο της υπόθεσης είναι ότι μπορεί να ερμηνεύσει ολόκληρο το φάσμα της διακύμανσης της θέσης των όρχεων μεταξύ των διαφόρων θηλαστικών ειδών προσφέροντας μια εξήγηση για τις στρατηγικές παραγωγής σπέρματος τόσο στα οσχεοφόρα όσο και στα μη οσχεοφόρα θηλαστικά: οι όρχεις που έχουν κατέλθει σε όσχεο παράγουν μικρότερη ποσότητα, υψηλότερης ωστόσο ποιότητας σπέρματος, ενώ οι όρχεις που βρίσκονται σε μη οσχεϊκή θέση παράγουν μεγαλύτερη ποσότητα, πτωχότερης όμως ποιότητας σπέρματος. Η υπόθεση του Zahavi έχει επικριθεί κυρίως με τη λογική ότι η παροχή αίματος στους όρχεις θα μπορούσε να τροποποιηθεί χωρίς να υπάρχει ανάγκη της προσφυγής στην ανάπτυξη μιας τόσο πολύπλοκης, περίτεχνης και δαπανηρής διαδικασίας, όπως η ορχική κάθοδος και η ανάπτυξη του οσχέου.²²²

4.2. Φυσιολογία της ορχικής καθόδου-παθοφυσιολογία της διαταραχής της ορχικής καθόδου (κρυψορχίας) στα οσχεοφόρα θηλαστικά

Είναι γνωστό από μελέτες σε διάφορα θηλαστικά ζώα, ήδη από τα πολύ παλιά χρόνια, ότι οι όρχεις κατέρχονται από την κοιλιακή κοιλότητα στο όσχεο κατά τη διάρκεια της κύησης. Ωστόσο, μόλις τον 17^ο αιώνα έγινε η παρατήρηση σε ανθρώπινο έμβρυο.²³⁹ Η μελέτη της ορχικής καθόδου θεμελιώνεται πραγματικά και για πρώτη φορά στον άνθρωπο από τον John Hunter, έναν Άγγλο ανατόμο, ο οποίος δημοσίευσε την πρώτη σημαντική και ιδιαίτερος ακριβή περιγραφή της διαδικασίας αυτής σε ανθρώπινο έμβρυο. Το 1762 και 1786, περιέγραψε τον εμβρυϊκό όρχι και την επιδιδυμίδα εντός της κοιλιακής κοιλότητας και ήταν ο πρώτος που εισήγαγε τον λατινικής προέλευσης όρο «gubernaculum» που σημαίνει πηδάλιο, για να περιγράψει μια μοναδική, προσαρτημένη δομή στον όρχι (τον ουραίο ή οσχεϊκό σύνδεσμο του όρχεως ή οίακα), ο οποίος πίστευε πως ήταν υπεύθυνος για την καθοδήγηση της ανδρικής γονάδας εντός του οσχέου.^{240,241}

Από τότε που περιγράφηκε για πρώτη φορά ο ορχικός οίακας από τον Hunter, η ανατομική αυτή δομή έχει περιγραφεί πολλές φορές και από διάφορους άλλους ερευνητές, ενώ ένας μεγάλος αριθμός θεωριών έχουν αναπτυχθεί για να ερμηνεύσουν το σκοπό και το μηχανισμό της ορχικής καθόδου.^{242,243} Μεταξύ των διαφόρων



θεωριών, ο ρόλος του ορχικού οίακα καταλαμβάνει αναμφισβήτητα την κεντρική θέση. Αν και δεν είναι καθολικά παραδεκτό ότι ο ορχικός οίακας «κρατά το κλειδί του μυστηρίου της ορχικής καθόδου», το γεγονός ότι παριστά μια δομή μοναδική του άρρενος εμβρύου, προσφέρει την πιο προφανή εξήγηση του γιατί ο εμβρυϊκός όρχις κατέρχεται σε αντίθεση με την ωοθήκη. Επιπλέον, υπάρχουν ισχυρές αποδείξεις προερχόμενες από την εξελικτική ιστορία των θηλαστικών, που υποδηλώνουν ότι ο ορχικός οίακας παίζει ουσιώδη ρόλο στην ορχική κάθοδο. Από τη μία πλευρά, τα ερπετά, καθώς και τα πρωτογενή τεστικόντα θηλαστικά, όπως τα Μονοτρήματα, τα Υρακοειδή,¹⁷⁸ και τα Προβοσκιδοφόρα,¹⁸¹ είτε δεν εμφανίζουν ίχνος σχηματισμού ορχικού οίακα σε οποιοδήποτε στάδιο της ανάπτυξής τους, είτε εμφανίζουν μερικό μόλις σχηματισμό αυτού (π.χ. η *Hyrax capensis* αναπτύσσει μόνο τη χορδή και όχι το βολβό του ορχικού οίακα).¹⁷⁸ Από την άλλη πλευρά, τα δευτερογενή τεστικόντα της τάξης *Catacea* όπως το κοινό δελφίνι (*Delphinus delphis*), το γουρουνόψαρο των λιμανιών της Μαύρης Θάλασσας (*Phocoena phocoena*), η γκριζα φάλαινα του ανατολικού Ειρηνικού (*Eschrichtius robustus*), η σπερμοφόρος φάλαινα (*Physeter catodon* ή *Physeter macrocephalus*) παρουσιάζουν αρχέγονες καταβολές ορχικού οίακα από την έναρξη της σεξουαλικής τους διαφοροποίησης.¹⁸⁸ Στα θηλαστικά αυτά, οι ορχικοί οίακες αναπτύσσονται περαιτέρω σε μεγάλες μάζες πυκνού συνδετικού ιστού στην κοιλιο-ουραία περιοχή του κοιλιακού κύτους στο σημείο εισόδου του μεσονεφρικού βουβωνικού συνδέσμου. Αυτό αποτελεί σημαντική απόδειξη ότι τα θηλαστικά αυτά είναι εξελικτικά απόγονοι χερσαίων (οπληφόρων) θηλαστικών που παρουσίαζαν ορχική κάθοδο (βλέπε παραπάνω).

Παρά την εκτεταμένη δουλειά πάνω στη μελέτη της ορχικής καθόδου κατά τη διάρκεια των τελευταίων αιώνων, το θέμα εξακολουθεί να παραμένει αμφισβητούμενο καθώς δεν έχει αναπτυχθεί ακόμη μια ενιαία υπόθεση που να την ερμηνεύει ικανοποιητικά. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε πολλούς, παράγοντες όπως: α) τη στήριξη των διαφόρων αναπτυσσόμενων θεωριών σε εσφαλμένες ή ανακριβείς παρατηρήσεις, β) το είδος υλικού που χρησιμοποιείται στη μελέτη (για παράδειγμα, οι ιστοανατομικές μελέτες σε νεκροτομικό υλικό δεν μπορούν να καθορίσουν τις δυνάμεις που είναι υπεύθυνες και εμπλέκονται στην ορχική κάθοδο) και κυρίως γ) το είδος πειραματοζώου που χρησιμοποιείται και η χωρίς διάκριση γενίκευση των ευρημάτων μεταξύ των διαφόρων ειδών.²⁴² Στην πραγματικότητα, δεν υπάρχει ένα πλήρως ικανοποιητικό πειραματόζωο-μοντέλο για τη μελέτη της ορχικής καθόδου.

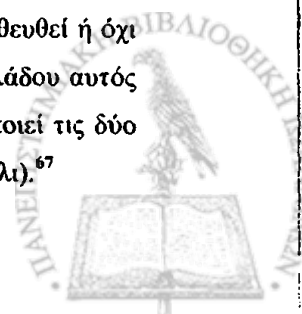


Επομένως, σύγχυση έχει προκύψει από τη σύγκριση της ορχικής καθόδου μεταξύ διαφόρων ειδών, λόγω εκσεσημασμένων μορφολογικών και τοπογραφικών διαφορών ανάμεσα στις διάφορες εμπλεκόμενες δομές.²⁴⁴ Είχε επισημανθεί ήδη από το 1856 ότι η ορχική κάθοδος πρέπει να μελετάται κυρίως στον άνθρωπο έτσι ώστε να αποφεύγονται οι εσφαλμένες αναλογίες που συνάγονται από τη μελέτη των πειραματοζώων.²⁴⁵ Ωστόσο, οι δυσκολίες και οι περιορισμοί της μελέτης εμβρυϊκών διεργασιών στον άνθρωπο αλλά και στα μεγάλα θηλαστικά όπως το γουρούνι που προσφέρεται ως ένα από τα καλύτερα πειραματόζωα-μοντέλα λόγω ιστοανατομικής εγγύτητας που παρουσιάζουν τόσο ο ορχικός οίακας, όσο και οι γύρω σχετικές δομές με τις αντίστοιχες του ανθρώπου, ερμηνεύουν την ευρεία χρήση του κλάδου Glires⁽¹⁾ ως πειραματικά μοντέλα για τη μελέτη της ορχικής καθόδου.^{242,244}

Η ορχική κάθοδος αποτελεί ένα εμβριθές παράδειγμα φυλετικού διμορφισμού. Είναι μια πολύπλοκη διαδικασία που φαίνεται να επιτελείται σε περισσότερα από ένα στάδια εμπλέκοντας την αλληλεπίδραση διαφόρων ανατομικών δομών και ορμονικών παραγόντων. Ήδη από το 1932 έχει γίνει αποδεκτό ότι η ορχική κάθοδος τελεί υπό ορμονικό έλεγχο, όταν καταδείχθηκε από τον Engle²⁴⁶ ότι ούρα εγκύων ή εκχυλίσματα από τον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης προκαλούσαν πρόωρη ορχική κάθοδο σε πιθήκους προεφηβικής ηλικίας. Ωστόσο, η σχέση αυτής της επίδρασης με την φυσιολογική κάθοδο των όρχων στον άνθρωπο δεν έχει διευκρινισθεί, καθώς οι πίθηκοι δεν εμφανίζουν πλήρη ορχική κάθοδο πριν την εφηβεία.¹⁷³

Η ακριβής αιτιολογία της κρυσορχίας δεν είναι γνωστή αλλά η ακεραιότητα του υποθαλαμο-υποφυσιακού άξονα αποτελεί συνήθως προϋπόθεση της φυσιολογικής ορχικής καθόδου.²⁴⁷ Η ανώμαλη φυλετική διαφοροποίηση σχετίζεται με την παθολογική ορχική κάθοδο. Αν και οι ορμόνες εμπλέκονται στην ορχική κάθοδο, οι διάφορες ορμονικές ανεπάρκειες δε φαίνεται να αποτελούν συχνά αίτια κρυσορχίας. Όπου εμπλέκονται αληθείς ορμονικές ελλείψεις (δηλαδή ανωμαλίες του υποθαλαμο-υποφυσιακού άξονα, ανώμαλη έκκριση της MIS) οι όρχεις συχνά δεν έχουν κατέλθει στο όσχεο. Ωστόσο, οι κρυσορχείς στα πλαίσια συγκεκριμένων

⁽¹⁾ Υπό τον όρο «κλάδος» εννοούμε μια μονοφυλετική ομάδα οργανισμών που αποτελείται από έναν πρόγονο και όλους τους απογόνους αυτού. Ο κλάδος αποτελεί επομένως μια επιστημονική υπόθεση για τις εξελικτικές σχέσεων μεταξύ διαφόρων οργανισμών και επομένως μπορεί να επαληθευθεί ή όχι η ορθότητα του με αντίστοιχη κλαδική ανάλυση. Εφόσον επαληθευθεί η ορθότητα του κλάδου αυτός μετατρέπεται σε ταξονομική μονάδα (taxon). Ο κλάδος Glires ή αλλιώς Myochonta ενοποιεί τις δύο τάξεις Rodentia (π.χ. αρουραίος, ποντικός) και Lagomorpha (Λαγόμορφα: π.χ. λαγός κουνέλι).⁶⁷

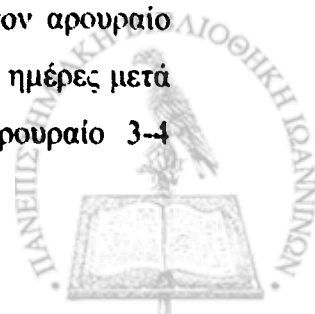


ορμονικών συνδρόμων αποτελούν ένα πολύ μικρό υποπληθυσμό του συνολικού αριθμού των κρυφορχικών ατόμων, καθώς στην πλειοψηφία των περιπτώσεων δεν εμφανίζονται ενδοκρινικές ανωμαλίες μετά τη γέννηση.²⁴⁷

4.2.1. Εμβρυολογία της ορχικής καθόδου

Η πολυσταδιακή ορχική κάθοδος προτάθηκε για πρώτη φορά το 1969 από τους Gier & Marion.²⁴⁸ Σύμφωνα με τους συγγραφείς, η ορχική κάθοδος στο ανθρώπινο έμβρυο πραγματοποιείται σε τρεις φάσεις: α) αρχικά εκτοπίζονται οι γονάδες προς τα κάτω λόγω της αποδιοργάνωσης του μεσονέφρου και της ανάπτυξης του μετανέφρου κατά την 7^η-8^η εβδομάδα της κύησης, στη συνέχεια β) οι όρχεις μετακινούνται διακοιλιακά από τον μετάνεφρο προς το βουβώνα από την 21^η εβδομάδα της κύησης και τέλος γ) διέρχονται δια του βουβωνικού πόρου από την περιτοναϊκή κοιλότητα στο όσχεο κατά μήκος της ελυτροπεριτοναϊκής πτυχής την 28^η εβδομάδα της κύησης. Το γεγονός ότι το πρώτο στάδιο της ορχικής καθόδου με βάση αυτό το μοντέλο ολοκληρώνεται πολύ νωρίς κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης, αποκλείει την πιθανότητα να παίζει αυτό το στάδιο μείζονα ρόλο στο φυλετικό διμορφισμό.¹

Αργότερα προτάθηκε ένα διφασικό μοντέλο από τον Hutson για να ερμηνεύσει την κάθοδο των όρχεων στους φυσιολογικούς άρρενες.⁵ Το μοντέλο αυτό συνιστάται από δύο μορφολογικά και ορμονικά διακριτές φάσεις: α) την πρώτη ή διακοιλιακή φάση, δηλαδή την σχετική συγκριτικά με την ωθητική μετακίνηση του όρχεως από την αρχική οπίσθια κοιλιακή του θέση κοντά στο νεφρό μέχρι το έσω βουβωνικό στόμιο που αρχίζει να πραγματοποιείται από την 8^η εβδομάδα της κύησης και β) τη δεύτερη ή βουβωνοσχεϊκή φάση, δηλαδή τη ορχική κάθοδο από το έσω βουβωνικό στόμιο στο όσχεο.⁵ Η βουβωνοσχεϊκή φάση της ορχικής καθόδου αρχίζει από την 26^η εβδομάδα της κύησης.^{249,250} Μεταξύ 26^{ης}-28^{ης} εβδομάδας της κύησης, ο όρχις κατέρχεται γρήγορα δια του βουβωνικού πόρου για να μετακινηθεί στη συνέχεια αργά προς το όσχεο, όπου φθάνει την 35^η-40^η εβδομάδα της κύησης.²⁴⁹ Στον άνθρωπο η μετανάστευση οίακα και όρχεως πραγματοποιείται ταυτόχρονα, ενώ στα τρωκτικά η μετανάστευση του ορχικού οίακα προηγείται της ορχικής καθόδου. Συγκεκριμένα η βουβωνοσχεϊκή μετανάστευση του ορχικού οίακα στον αρουραίο συμβαίνει στις 3-5 ημέρες μετά τη γέννηση και στον ποντικό περίπου 7 ημέρες μετά τη γέννηση, ενώ η αντίστοιχη ορχική κάθοδος επιτελείται στο αρουραίο 3-4

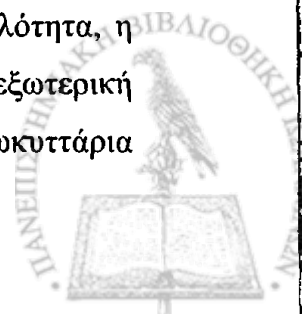


εβδομάδες μετά τη γέννηση και στον ποντικό στις 2 περίπου εβδομάδες μετά τη γέννηση.^{244,251}

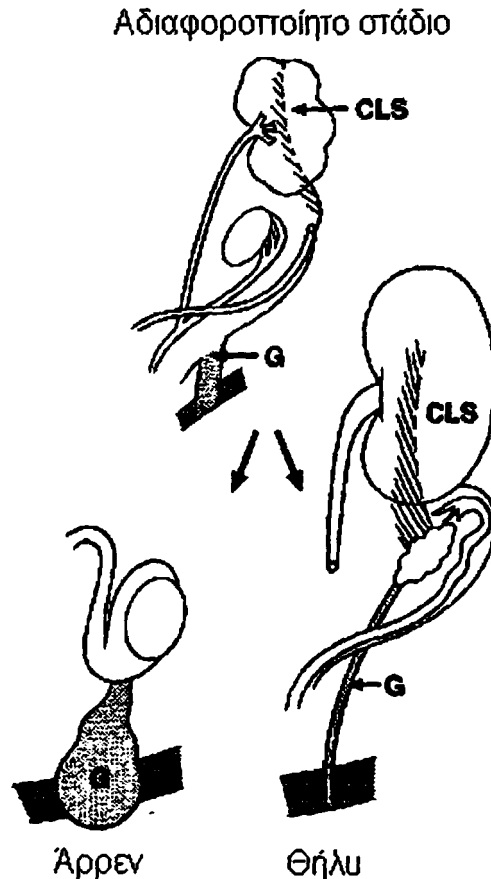
Μεταξύ 10^{ης}-15^{ης} εβδομάδας της κύησης, ο κρανιακός κρεμαστήριος σύνδεσμος (cranial suspensory ligament) που συγκρατεί τον ουρογεννητικό σωλήνα κοντά στο αναπτυσσόμενο διάφραγμα παλινδρομεί, ενώ ταυτόχρονα μεταξύ 8^{ης}-15^{ης} εβδομάδα της κύησης, ο ορχικός οίακας που εμφανίστηκε την 7^η εβδομάδα της κύησης²⁵² μεγεθύνεται ουραία.¹ Το ουραία μεγεθυνόμενο τμήμα του ορχικού οίακα (βολβός του ορχικού οίακα) διατηρεί τον όρχι «αγκυροβολημένο» κοντά στην μελλοντική βουβωνική περιοχή δια εφαρμοζόμενης έλξης μέσω του χορδής του ορχικού οίακα, η οποία βραχύνεται καθώς ενσωματώνεται στο βολβό.^{253,254} Το καθαρό τελικό αποτέλεσμα αυτών των διεργασιών είναι να καθηλωθεί ο όρχις κοντά στο βουβώνα και να επιτραπεί η σχετική κάθοδός του ενώ ο νεφρός μεταναστεύει κρανιακά καθώς μεγαλώνει η κοιλιακή κοιλότητα (Εικόνα 17).¹ Σύμφωνα με την υπόθεση του Hutson, η πρώτη φάση της ορχικής καθόδου είναι μη ανδρογονοεξαρτώμενη, δηλαδή ελέγχεται από ένα μη-ανδρογονικό παράγοντα-ορμόνη και προτάθηκε ως πιθανός ο ρόλος της MIS (βλέπε παρακάτω), ενώ η δεύτερη φάση βρίσκεται υπό ανδρογονικό έλεγχο και θεωρείται επομένως ανδρογονοεξαρτώμενη.⁵

Η διακοιλιακή ορχική κάθοδος επιτελείται μεταξύ 15.5-17.5 και 16-20^{ης} ημέρας μετά τη συνουσία στον ποντικό²⁵⁵ και στον αρουραίο,²⁵⁶ αντίστοιχα. Η βουβωνοσχεική φάση της ορχικής καθόδου απαιτεί προηγουμένως ανάπτυξη της ελυτροπεριτοναϊκής πτυχής, διαστολή του βουβωνικού πόρου από το βολβό του ορχικού οίακα και άσκηση κάποιας ενδοκοιλιακής πίεσης που θα ωθήσει τον όρχι προς τα κάτω διαμέσου του βουβωνικού πόρου.¹

Έχει αποδειχθεί πειραματικά ότι η περιφερική πρόσφυση του ορχικού οίακα έχει σημασία για τη φυσιολογική ανάπτυξη της ελυτροπεριτοναϊκής πτυχής.²⁵⁷ Η ανάπτυξη του βουβωνικού πόρου αρχίζει κατά τη διάρκεια της 8^{ης} εβδομάδας της κύησης ως μια ουραία εκκολπωμάτωση του κοιλιακού τοιχώματος, ενώ η ελυτροπεριτοναϊκή πτυχή αναπτύσσεται ως μια περιτοναϊκή κηλική προπέτεια δια του έσω βουβωνικού στομίου και της πρόσθιας όψης του ορχικού οίακα και επιμηκύνεται ουραία.²⁵² Η επιμήκυνση αυτού του περιτοναϊκού εκκολπώματος επιτελείται μέσα στον ορχικό οίακα και σχηματίζει μια δακτυλιοειδή κοιλότητα, η οποία τον διαιρεί σε μια κεντρική μεσεγχυματική στήλη και μια εξωτερική τοιχωματική στιβάδα. Μετά την ολοκλήρωση της ορχικής καθόδου, η εξωκυττάρια



θεμέλια ουσία του ορχικού οίακα αποσυντίθεται με αποτέλεσμα την εκφύλιση της κεντρικής του στήλης και την παραμονή τελικά μιας ινώδους οσχεο-ορχικής πρόσφυσης.¹⁷⁰



Εικόνα 17. Σχηματική απεικόνιση του κρανιακού κρεμαστήριου συνδέσμου (CLS) και του ορχικού οίακα (G) κατά τη διάρκεια της σεξουαλικής διαφοροποίησης των τρωκτικών. Αμφότεροι οι σύνδεσμοι είναι παρόντες κατά το στάδιο της αδιαφοροποίητης γονάδας. Στα αρσενικά ζώα ο κρανιακός κρεμαστήριος σύνδεσμος υποστρέφεται, ενώ ο ορχικός οίακας μεγαθύνεται. Αντίθετα, στα θηλυκά ζώα, ο κρανιακός κρεμαστήριος σύνδεσμος διατηρείται όπως και ο οίακας, ο οποίος όμως είναι λεπτός και επιμηκυμένος (τροποποιημένο από αναφορά 1).

Ο κρεμαστήρας μυς αναπτύσσεται μέσα στην εξωτερική τοιχωματική στιβάδα του ορχικού οίακα σχηματίζοντας ένα δίστιβο σάκο στα Τρωκτικά και μια μυϊκή λωρίδα στα Οπληφόρα και Πρωτεύοντα θηλαστικά.²⁵⁸ Η πρόσφυση του κρεμαστήρα μυ στο βουβωνικό κοιλιακό τοίχωμα ποικίλλει από είδος σε είδος.²⁴⁴ Ο ορχικός οίακας νευρώνεται από τον αιδουικό κλάδο του αιδιομηρικού νεύρου.^{259,260} Το περιφερικό άκρο του ορχικού οίακα, τόσο στον χοίρο όσο και στον άνθρωπο είναι

ελεύθερο χωρίς στερεά οσχεϊκή πρόσφυση.^{249,261} Αυτό αποτελεί ισχυρή απόδειξη εναντίον της άποψης ότι ο όρχις «έλκεται» από τον οίακά του προς τα κάτω εντός του οσχέου.^{249,250} Η δύναμη της κίνησης προέρχεται πιθανόν από την ενδοκοιλιακή πίεση.^{242,248,251,262-265} που μεταδίδεται άμεσα ή έμμεσα στον όρχι διαμέσου του αυλού της ελυτροπεριτοναϊκής πτυχής και της χορδής του ορχικού οίακα, αντίστοιχα.²⁶⁶

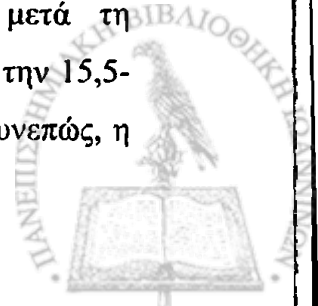
4.2.2. Διακοιλιακή φάση της ορχικής καθόδου

4.2.2.1. Παλινδρόμηση του κρανιακού κρεμαστήριου συνδέσμου υπό την επίδραση των ανδρογόνων

Ο κρανιακός κρεμαστήριος σύνδεσμος είναι μια μυϊκή δομή υπό μορφή χορδής που προέρχεται από το μεσονεφρικό μεσέγγυμα. Οριοθετεί το μεσονεφρικό μεσεντέριο κρανιακά, προσαρτώντας την ωθήκη και το γεννητικό σωλήνα στην κρανιακή-έξω επιφάνεια του ραχιαίου κοιλιακού τοιχώματος κοντά στην κοιλιακή επιφάνεια της τελευταίας πλευράς. Η αρχέγονη καταβολή του είναι παρούσα και στα δύο φύλα των διαφόρων θηλαστικών ειδών όπως για παράδειγμα στο αρουραίο, το χοίρο, τον σκύλο, τα βοοειδή και τον άνθρωπο.^{267,268}

Τα ανδρογόνα παρεμποδίζουν την ανάπτυξη του συνδέσμου στα αρσενικά τρωκτικά. Έτσι, η ενδομήτρια έκθεση θηλυκών εμβρύων σε ανδρογόνα οδηγεί σε αναστολή της ανάπτυξης του συνδέσμου, ενώ αντίθετα, η έκθεση αρρένων εμβρύων σε αντιανδρογόνα κατά την αντίστοιχη εμβρυϊκή περίοδο έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη θηλυκόμορφου συνδέσμου.²⁶⁹⁻²⁷² Το ίδιο συμβαίνει και σε άλλα θηλαστικά όπως ο χοίρος, τα βοοειδή και ο άνθρωπος, αφού ασθενείς με το σύνδρομο μερικής ή ολικής απευαισθητοποίησης στα ανδρογόνα διατηρούν επίσης τον κρανιακό κρεμαστήριο σύνδεσμο τους.^{268,273,274} Ωστόσο, η ανδρογονική εξάρτηση του συνδέσμου έχει αμφισβητηθεί στον σκύλο.²⁶⁷

Η «περίοδος παραθύρου» κατά τη διάρκεια της οποίας τα ανδρογόνα μπορούν να καταργήσουν την ανάπτυξη του συνδέσμου ολοκληρώνεται περίπου την 17^η-18^η ημέρα μετά τη σύλληψη στον αρσενικό αρουραίο²⁶⁸ και φαίνεται να συσχετίζεται με τον ακριβή χρόνο της επίδρασης των ανδρογόνων στη διαδικασία της ορχικής καθόδου, αφού η μέγιστη διαταραχή που προκαλεί στην κάθοδο η χορήγηση του αντιανδρογόνου φλουταμίδη παρατηρείται μεταξύ 15,5-17^η ημέρας μετά τη σύλληψη.^{275,276} Η ορχική παραγωγή τεστοστερόνης στον αρουραίο αρχίζει την 15,5-16,5 ημέρα μετά τη σύλληψη²⁷⁷ φθάνοντας στο μέγιστο την 18,5 ημέρα. Συνεπώς, η



αρνητική επίδραση των ανδρογόνων στην ανάπτυξη του συνδέσμου αποτελεί πρώιμο φαινόμενο κατά τη διάρκεια της φυλετικής διαφοροποίησης του άρρενος, με έναρξη αρκετά πριν τη στιγμή μέγιστης παραγωγής τεστοστερόνης από τους εμβρυϊκούς όρχεις.²⁷⁸

Επιπλέον, ο ανδρογονικός υποδοχέας εκφράζεται στα αρχέγονα κύτταρα της καταβολής του συνδέσμου και στα δύο φύλα κατά τη διάρκεια της κρίσιμης περιόδου κατά την οποία τα ανδρογόνα δρουν κατασταλτικά επί της ανάπτυξης του συνδέσμου.²⁷⁹ Ωστόσο, μετά τη 18^η ημέρα από τη σύλληψη, ο υποδοχέας εξακολουθεί να εκφράζεται ισχυρά μόνο στη αρχέγονη καταβολή του κρανιακού κρεμαστήριου συνδέσμου του άρρενος εμβρύου παρά την απώλεια της ευαισθησίας του στα ανδρογόνα από τη 17^η ημέρα μετά τη σύλληψη. Επομένως, τα μεσεγχυματικά κύτταρα του συνδέσμου μπορεί να θεωρηθούν άμεσοι στόχοι των εμβρυϊκών ορχικών ανδρογόνων, τα οποία όμως έχουν μια αυστηρά χρονοεξαρτώμενη μορφογενετική επίδραση επάνω στον σύνδεσμο.²⁷⁹

Στον αρουραίο, για παράδειγμα, ο σύνδεσμος του άρρενος συγκριτικά με το θήλυ έμβρυο χαρακτηρίζεται από σχετική απουσία λείων μυϊκών κυττάρων, κάτι που υποδηλώνει ότι τα ανδρογόνα ασκούν αρνητική επίδραση στη διαφοροποίηση των λείων μυϊκών κυττάρων πιθανόν εμπλεκόμενα σε πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις μεταξύ διαφόρων μακρομορίων της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας όπως κολλαγόνο, φιβρονεκτίνη, λαμινίνη και πεπτιδικών αυξητικών παραγόντων όπως ο TGFβ.²⁷⁹

Το εάν ή όχι η παλινδρόμηση του κρανιακού κρεμαστήριου συνδέσμου αποτελεί τον κεντρικό παράγοντα στη διαδικασία ορχικής καθόδου αμφισβητείται. Πιθανόν είναι μια προαπαιτούμενη διεργασία.²⁷⁹ Ωστόσο, έχει αποδειχθεί ότι η παλινδρόμηση αυτή καθαυτή δεν αρκεί για να προκληθεί κάθοδος της γονάδας, αφού 46,XX άτομα που εκτέθηκαν κατά την ενδομήτρια ζωή σε ανδρογόνα διατήρησαν τις ωθήκες τους σε φυσιολογική θέση.²⁸⁰ Η διακοιλιακή φάση της ορχικής καθόδου δεν φαίνεται να παρακωλύεται στις περιπτώσεις όπου διατηρείται ο κρανιακός κρεμαστήριος σύνδεσμος. Έτσι, για παράδειγμα σε ποντίκια με ορχική θηλεοποίηση (Tfm), οι όρχεις κατέρχονται μέχρι το ύψος του έσω βουβωνικού στομίου, ενώ σε πάσχοντες με σύνδρομο πλήρους και μερικής έλλειψης ανδρογονικής ευαισθησίας (Complete Androgen Insensitivity Syndrome/Partial Androgen Insensitivity Syndrome, CAIS/PAIS), οι όρχεις κατέρχονται επίσης στο ίδιο ύψος ή και παραπέρα.²⁷⁴ Ωστόσο, αμφοτερόπλευρη ενδοκοιλιακή θέση των όρχεων

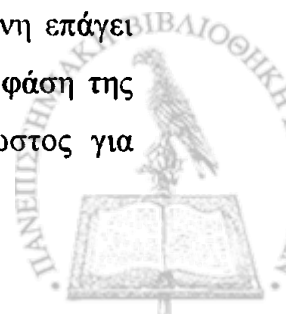


συσχετιζόμενη με αμφοτερόπλευρη διατήρηση των κρανιακών κρεμαστήριων συνδέσμων έχει περιγραφεί στον σκύλο.²⁶⁷ Επιπλέον, ο σύνδεσμος διατηρείται σε αρουραίους με ορχική θηλεοποίηση και τα πειραματόζωα εμφανίζουν όρχεις σε ενδοκοιλιακή, βουβωνική και οσχεϊκή θέση σε ποσοστό 20%, 67% και 13%, αντίστοιχα, κάτι που υποδηλώνει ότι η διατήρηση του συνδέσμου πιθανόν παίζει κάποιο ρόλο στη διακοιλιακή ορχική κάθοδο στον αρουραίο.²⁶⁹ Ωστόσο, οι περισσότεροι συγγραφείς γενικά συμφωνούν ότι ο ρόλος του κρανιακού κρεμαστήριου συνδέσμου στην κάθοδο των όρχεων περιορίζεται μόλις σε κάποια είδη.^{266,269,281}

4.2.2.2. Η «αντίδραση εξοίδησης» του ορχικού οίακα

Η ουραία μεγέθυνση του ορχικού οίακα κατά τη διάρκεια της σχετικής διακοιλιακής ορχικής καθόδου είναι γνωστή ως «αντίδραση εξοίδησης του ορχικού οίακα».¹ Η αντίδραση αυτή προκαλείται από ταχεία υπερπλασία των κυττάρων και εναπόθεση σημαντικής ποσότητας εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας. Η εξωκυττάρια θεμέλια ουσία αποτελείται κυρίως από υδρόφιλα μόρια όπως γλυκοζαμινογλυκάνες και υαλουρονικό οξύ. Αυτά είναι πιθανόν υπεύθυνα για την αύξηση της ποσότητας νερού μέσα στη θεμέλια ουσία που καθιστά το τελικό τμήμα του ορχικού οίακα ογκώδες και ζελατινώδες παρόμοιο με τη ζελατινώδη ουσία του Wharton που ανευρίσκεται στον ομφάλιο λώρο.^{249,282-284} Η αντίδραση εξοίδησης με ταυτόχρονη βράχυνση του ορχικού οίακα έχει συνδεθεί στενά με τη διακοιλιακή φάση της ορχικής καθόδου.²⁴⁶ Ο (ορμονικός) έλεγχος της αντίδρασης και επομένως της πρώτης φάσης της ορχικής καθόδου παρέμενε ωστόσο μέχρι πρόσφατα ακόμη αντιφατικός.

Η ανάπτυξη ενός αρσενικόμορφου ορχικού οίακα με συνεπακόλουθη μερική ωθητική κάθοδο τόσο σε α) βόειο (ατελές) θηλυκό έμβρυο που προέκυψε εξαιτίας έκθεσης σε ορμονική επίδραση των όρχεων ενός άρρενος διδύμου λόγω συγχώνευσης των δύο χοριονικών κυκλοφοριών αίματος νωρίς μετά την εμφύτευση (freemartin),^{285,286} όσο και σε β) θηλυκά έμβρυα κουνελιού που είχαν λάβει εμβρυϊκό ορχικό μόσχευμα²⁸⁷ κατέδειξε τη συμμετοχή ενός εμβρυϊκού ορχικού παράγοντα στην ανάπτυξη του ορχικού οίακα και την επιτέλεση της ορχικής καθόδου. Ωστόσο, δεν ήταν μέχρι πρόσφατα σαφές ποιος ακριβώς ορχικός παράγοντας/ορμόνη επάγει την αντίδραση εξοίδησης του ορχικού οίακα και ελέγχει την διακοιλιακή φάση της ορχικής καθόδου. Ο ορχικός αυτός παράγοντας/ορμόνη παρέμενε άγνωστος για



δεκαετίες και είχε λάβει ονομασίες όπως «παράγοντας Χ»²⁸⁸ και «τρίτη ορμόνη».²⁸⁶

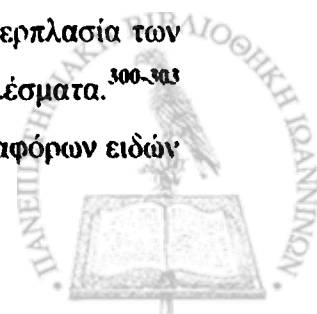
4.2.2.2.1. Ενδείξεις εναντίον του ανδρογονικού ελέγχου

Υπάρχουν ισχυρές αποδείξεις ότι τόσο η αντίδραση εξοίδησης του ορχικού οίακα όσο και η διακοιλιακή φάση της ορχικής καθόδου δεν τελούν υπό ανδρογονικό έλεγχο σε ένα μεγάλο αριθμό θηλαστικών ειδών. Έχουν ταυτοποιηθεί κύτταρα που εκφράζουν τον ανδρογονικό υποδοχέα στο μεσεγχυματικό πυρήνα του ορχικού οίακα τόσο του αρουραίου^{289,290} όσο και του χοίρου.²⁹¹ Ωστόσο, στον αρουραίο, η έκφραση του ανδρογονικού υποδοχέα στον ορχικό οίακα μειώνεται δραματικά από την εμβρυϊκή προς την μετά τη γέννηση περίοδο,²⁹⁹ ενώ μεγιστοποιείται μεταξύ 18^{ης}-21^{ης} ημέρας μετά τη συνουσία²⁹⁰ δηλαδή σχεδόν μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης εξοίδησης του ορχικού οίακα σε αυτό το ζώο. Από την άλλη πλευρά, η χημική συγγένεια και η δεσμευτική ικανότητα των ανδρογονικών υποδοχέων του ορχικού οίακα είναι μικρότερη συγκριτικά με αυτή που παρατηρείται σε άλλους ανδρογονο-εξαρτώμενους ιστούς (π.χ. προστάτης) στο χοίρο.²⁹¹

Κλινική απόδειξη κατά του ανδρογονικού ελέγχου της αντίδρασης εξοίδησης του ορχικού οίακα και της διακοιλιακής φάσης ορχικής καθόδου είναι οι πάσχοντες από CAIS/PAIS με αμφοτερόπλευρη κρυπορχία, στην πλειοψηφία των οποίων οι όρχεις ψηλαφιούνται αμφοτερόπλευρα στις χειλεοσχεϊκές πτυχές ή στις βουβωνικές περιοχές.^{274,292}

Επιπλέον, η άποψη αυτή στηρίζεται από τα αποτελέσματα μεγάλου αριθμού πειραματικών μελετών. Έτσι, η αντίδραση εξοίδησης του ορχικού οίακα όπως και η διακοιλιακή φάση ορχικής καθόδου τελείται φυσιολογικά σε έμβρυα χοίρου, ρακούν, σκύλου καθώς και ποντικού με ορχική θηλεοποίηση.^{274,293,294} Επίσης τελούνται φυσιολογικά παρά την έκθεση πιθήκων, αρουραίων, ποντικών και κουνελιών ενδομήτρια ή σκύλων μετά τη γέννηση σε στεροειδή ή μη αντιανδρογόνα.^{271,295-297} Επιπλέον, η χορήγηση ανδρογόνων σε θηλυκά έμβρυα αρουραίου ή χοίρου δεν κινητοποιεί την αντίδραση εξοίδησης του ορχικού οίακα,²⁵⁴ ενώ η ανδρογονική υποκατάσταση μετά ορχεκτομή δεν αποτρέπει την ατροφία του ορχικού οίακα σε έμβρυα σκύλου.^{298,299}

Ωστόσο, μελέτες της επίδρασης των ανδρογόνων πάνω στην υπερπλασία των κυττάρων του ορχικού οίακα *in vitro*, καταλήγουν σε αντιφατικά αποτελέσματα.³⁰⁰⁻³⁰³ Αυτό πιθανόν οφείλεται σε ανατομικές/δομικές διαφορές μεταξύ των διαφόρων ειδών



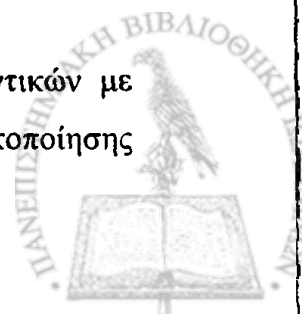
πειραματοζώνων. Έτσι, για παράδειγμα ο ορχικός οίακας του χοίρου αποτελείται από μεσεγχυματικά κύτταρα αποκλειστικά, σε αντίθεση με αυτόν του αρουραίου, ο οποίος διαθέτει μια μυϊκή εξωτερική στιβάδα που είναι το ανατομικό ισοδύναμο του κρεμαστήρα μυός του χοίρου.²⁴⁵

4.2.2.2. Ενδείξεις εναντίον του ρόλου της MIS

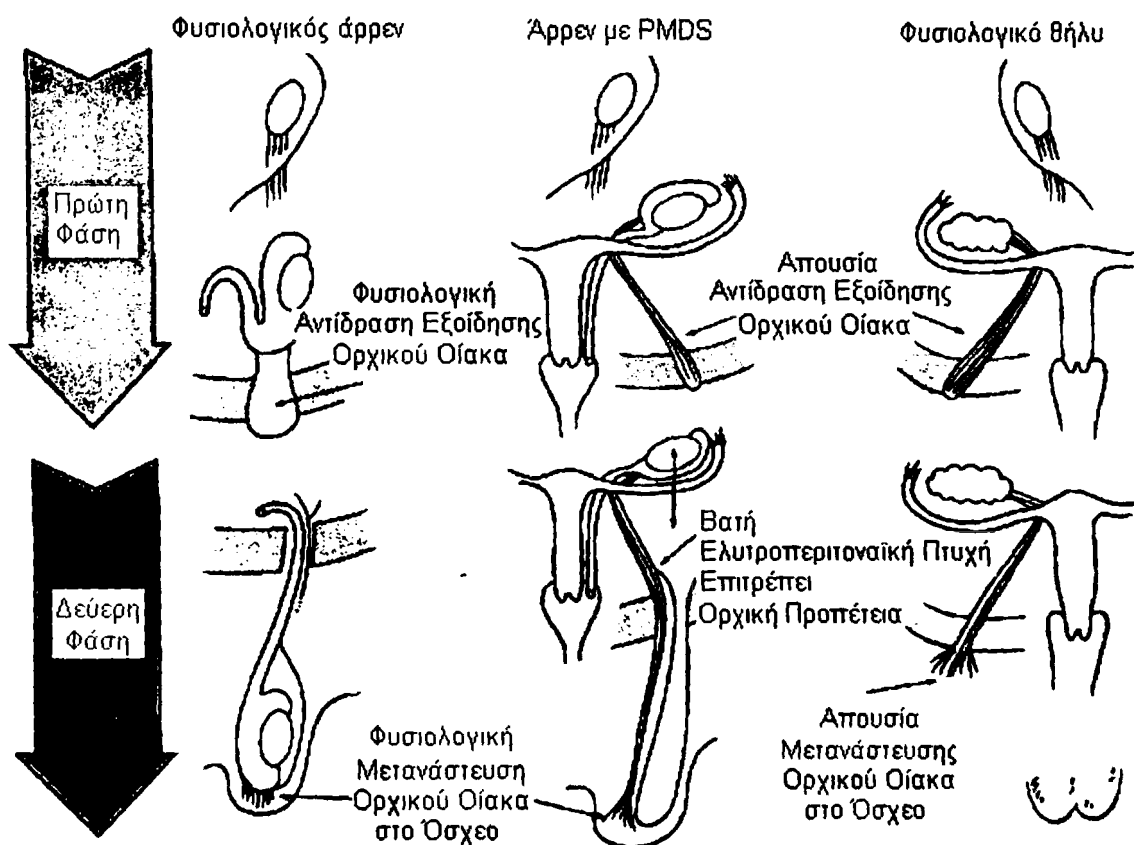
Σύμφωνα με το διφασικό μοντέλο ορχικής καθόδου που προτάθηκε από τον Hutson, μια μη ανδρογονικής φύσεως ορμόνη, πιθανόν η MIS, είναι υπεύθυνη για την επαγωγή της αντίδρασης εξοίδησης του ορχικού οίακα και τη ρύθμιση επομένως της διακοιλιακής φάσης της ορχικής καθόδου.⁵ Η ιδέα βασίστηκε σε πειράματα που δείχνουν ότι η χορήγηση εξωγενών οιστρογόνων σε έμβρυα ποντικού οδηγεί σε διατήρηση των πόρων του Müller,³⁰⁴ παρεμπόδιση της αντίδρασης εξοίδησης του ορχικού οίακα^{305,306} και πλήρη διακοπή της διακοιλιακής φάσης της ορχικής καθόδου,³⁰⁷ παθολογία που δεν αναστρέφεται με την ταυτόχρονη εξωγενή χορήγηση ανδρογόνων.³⁰⁸ Τα αποτελέσματα αυτά οδήγησαν στην υπόθεση ότι τα οιστρογόνα ασκούν πρωτεύουσα ανασταλτική επίδραση στη διαδικασία υποστροφής των πόρων του Müller καθώς και στην αντίδραση εξοίδησης του ορχικού οίακα διακόπτοντας τη φάση της διακοιλιακής ορχικής καθόδου όχι δια καταστολής της ανδρογονικής έκκρισης όπως είχε θεωρηθεί παλαιότερα^{251,309} αλλά με αναστολή μιας πιθανής επίδρασης της MIS επί του ορχικού οίακα.^{307,308,310}

Ο ρόλος της MIS ως παράγοντας ελέγχου της διακοιλιακής φάσης της ορχικής καθόδου διερευνήθηκε περισσότερο εξαιτίας της παρατήρησης ότι στους ασθενείς με το σύνδρομο διατήρησης των πόρων του Müller (persistent Müllerian duct syndrome-PMDS) και οι δύο όρχεις εντοπίζονται σε ωθητική θέση στο 60-70% περίπου των περιπτώσεων,³⁰⁷ ενώ ο ορχικός οίακας είναι θηλυκόμορφος δηλαδή λεπτός και επιμηκυμένος³¹¹ (Εικόνα 18). Το σύνδρομο PMDS αποτελεί μια κληρονομική κατά τον αυτοσωματικό υπολειπόμενο χαρακτήρα διαταραχή που οφείλεται σε μεταλλάξεις στο γονίδιο που κωδικοποιεί το μόριο της MIS ή/και το μόριο του υποδοχέα II της MIS.³¹³ Ωστόσο, σε ομόζυγα και ετερόζυγα μοντέλα knock-out ποντικών με απαλοιφή των γονιδίων MIS³¹⁴ και MISRII,³¹⁵ οι όρχεις παρουσιάζουν φυσιολογική κάθοδο και ανάπτυξη του οίακα.

Παρόλα αυτά, πρέπει να επισημανθεί ότι αρσενικά στελέχη ποντικών με ορχική θηλεοποίηση και ταυτόχρονα ομόζυγη απαλοιφή του γονιδίου κωδικοποίησης

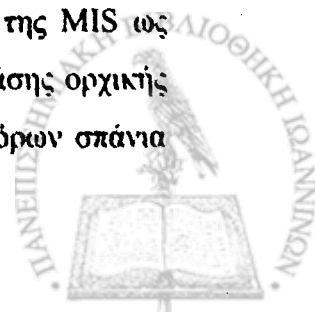


της MIS ($Tfm+MIS^{-/-}$) εμφανίζονται ως ψευδοερμαφρόδιτα με σοβαρά επηρεασμένη τη διακοιλιακή φάση ορχικής καθόδου αν και τα στελέχη που φέρουν μεμονωμένα καθεμία από τις γενετικές αυτές ανωμαλίες δεν εμφανίζουν διαταραχή της διακοιλιακής καθόδου των όρχεων.³¹⁴ Το γεγονός αυτό μπορεί να υποδηλώνει ότι υπάρχει ένας άγνωστος μέχρι τώρα μηχανισμός μέσω του οποίου τα ανδρογόνα μπορεί να ρυθμίζουν την επίδραση της MIS επί του ορχικού οίακα³¹⁶ ή το ανάποδο, ώστε να καθοδηγηθεί η κάθοδος των όρχεων διακοιλιακά.



Εικόνα 18. Σχηματική απεικόνιση των δύο φάσεων της ορχικής καθόδου σε φυσιολογικά αρσενικά και θηλυκά άτομα καθώς και σε πάσχοντες από το σύνδρομο παραμονής των πόρων του Müller (PMDS). Στους ασθενείς αυτούς, η φυσιολογική ανάπτυξη της ελυτροπεριτοναϊκής πτυχής κατά τη δεύτερη φάση της ορχικής καθόδου, σε συνδυασμό με την υπερκινητικότητα των όρχεων λόγω λείπυνσης του ορχικού οίακα, επιτρέπει την προπέτεια του όρχι (± πόρων) στο βουβώνα (τροποποιημένο από αναφορά 312).

Ένα επιπρόσθετο επιχείρημα εναντίον του προταθέντος ρόλου της MIS ως ρυθμιστή της αντίδρασης εξοίδησης του ορχικού οίακα-διακοιλιακής φάσης ορχικής καθόδου αποτελεί το γεγονός ότι παραμονή των παραμεσονεφρικών πόρων σπάνια



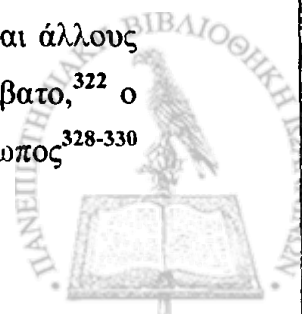
παρατηρείται σε ασθενείς με ενδοκοιλιακή κρυφορχία.³⁰⁴ Η παρουσία των όρχεων σε ενδοκοιλιακή θέση σε ασθενείς με PMDS έχει προταθεί ότι οφείλεται μάλλον σε ανατομική σύνδεση των γονάδων με τους παραμείναντες πόρους του Müller, με αποτέλεσμα την εμπλοκή της μετακίνησης τους²⁸¹ παρά σε αναστολή της αντίδρασης εξοίδησης του ορχικού οίακα.^{274,317,318}

4.2.2.2.3. Η πρωτεΐνη INSL3 και ο ρόλος της στην ορχική κάθοδο

Σε μια μελέτη *in vitro* πάνω στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του ορχικού οίακα του εμβρύου του χοίρου,³⁰¹ βρέθηκε ότι το εκχύλισμα εμβρυϊκών όρχεων κατά την ενδοκοιλιακή φάση καθόδου περιείχε ένα κλάσμα χαμηλού μοριακού βάρους (<3,5kD), στο οποίο τα κύτταρα του ορχικού οίακα παρουσίαζαν ανταπόκριση. Έτσι πιθανολογήθηκε ότι αυτό το βιολογικά ενεργό κλάσμα περιλάμβανε τον παράγοντα ή τους παράγοντες που προάγουν την κάθοδο των όρχεων. Κατά τον έλεγχο ενός πλήθους πολυπεπτιδικών αυξητικών παραγόντων (επιδερμικός, ινοβλαστικός, αιμοπεταλιακός αυξητικός παράγοντας, TGFβ, ινσουλίνη) καθώς και διαφόρων ορχικών ορμονών (ινχιμπίνη, ανδρογόνα, MIS), κανένας δε βρέθηκε να ασκεί παρά υποτυπώδη διεγερτική επίδραση πάνω στα κύτταρα του ορχικού οίακα και επομένως αποκλείστηκαν διαδοχικά ως δυνητικοί ρυθμιστές της διακοιλιακής φάσης ορχικής καθόδου. Αυτός ο άγνωστος παράγοντας ονομάστηκε «αντισεντίνη» («descendin») και αργότερα προτάθηκε³⁰³ ότι παριστά ένα νέο ορμονικό πεπτίδιο (\cong 26kD) εκκρινόμενο από τα εμβρυϊκά ορχικά κύτταρα και ονομάστηκε «γκουμπερνακιουλοτροπίνη» («gubernaculotropin»).

Πρόσφατα βρέθηκε σε γονιδιακές μελέτες ποντικών «knockout»^{6,7} ότι μια ορμόνη που είχε αρχικά περιγραφεί σε χοίρους ως ειδική ορμόνη του όρχι και είχε ονομαστεί ορμόνη των κυττάρων Leydig τύπου-ινσουλίνης (Leydig cell insulin-like (Ley I-L) hormone)³¹⁹ κατέχει δραστηριότητα τύπου «γκουμπερνακιουλοτροπίνης»/ «αντισεντίνης». Ονομάζεται επίσης και παράγοντας τύπου ριλαξίνης (relaxin-like factor (RLF)) ενώ σήμερα έχει επικρατήσει ο όρος πεπτιδική ορμόνη τύπου-ινσουλίνης 3 και φαίνεται ότι παριστά τον επί μακρό χρονικό διάστημα αναζητούμενο παράγοντα «αντισεντίνη» ή «γκουμπερνακιουλοτροπίνη».

Το πεπτίδιο αυτό στη συνέχεια χαρακτηρίστηκε από τους όρχεις και άλλους ιστούς ευρείας γκάμας θηλαστικών όπως το ποντίκι,³²⁰ το βόδι,³²¹ το πρόβατο,³²² ο πίθηκος,³²³ ο αρουραίος,³²⁴ η κατσίκα,³²⁵ το ελάφι,³²⁶ ο σκύλος,³²⁷ ο άνθρωπος³²⁸⁻³³⁰

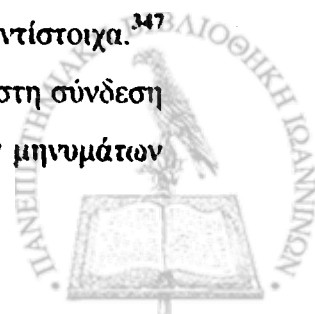


και άλλα πρωτεύοντα είδη.³³¹

Το πεπτιδίο INSL3 αποτελεί μέλος της οικογένειας των πεπτιδίων ινσουλίνης/ριλαξίνης των θηλαστικών που περιλαμβάνει άλλα εννέα γνωστά μέλη στον άνθρωπο^{319,332-341} και είναι ορμόνη που κυκλοφορεί φυσιολογικά σε μετρήσιμα επίπεδα στο αίμα των ενηλίκων ανδρών (1μg/ml).³⁴² Τα πεπτιδία της οικογένειας αυτής εμπλέκονται στη ρύθμιση αρκετών βιολογικών λειτουργιών όπως την κυτταρική αύξηση, την κυτταρική διαφοροποίηση και τη ρύθμιση της ενεργειακής ισορροπίας. Εδώ ανήκουν η ινσουλίνη (INSL), ο αυξητικός παράγοντας τύπου ινσουλίνης I (IGF1) και II (IGF2), η ριλαξίνη H1 (RLX1), H2 (RLX2) και H3 (INSL 7 ή RLX3), το πρώιμο πλακουντιακό πεπτιδίο τύπου ινσουλίνης (INSL4 ή EPIL), η ορμόνη τύπου-ινσουλίνης 5 (INSL5 ή RIF-2) και η ορμόνη τύπου-ινσουλίνης 6 (INSL6 ή RIF-1) που εκφράζεται ισχυρά στα σπερματοκύτταρα και στρογγυλές σπερματίδες αρουραίου και ανθρώπου). Ο εντοπισμός των γονιδίων της οικογένειας πεπτιδίων ινσουλίνης/ριλαξίνης στο ανθρώπινο γένωμα φαίνεται στην εικόνα 19.

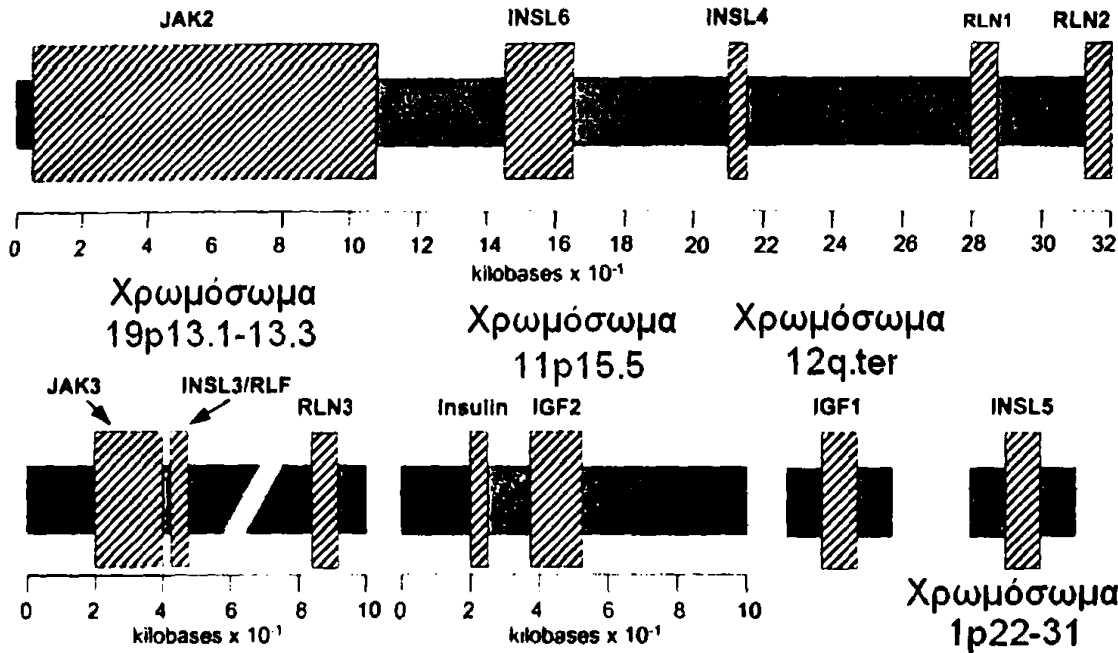
Το μόριο της ορμόνης INSL3, όπως και η ινσουλίνη, συντίθεται αρχικά ως προ-προ-ορμόνη που περιλαμβάνει ένα αρχικό πεπτιδίο συνδεδεμένο με τα τμήματα B-C-A. Στη συνέχεια ακολουθεί η διαδικασία της ωρίμανσης κατά την οποία αποσπώνται το αρχικό πεπτιδίο καθώς και το ενδιάμεσο πεπτιδίο C για να προκύψει τελικά το ώριμο ετεροδιμερές που αποτελείται από μία A και μία B αλυσίδας που συνδέονται με δισουλφιδικούς δεσμούς.^{319,328} Η αλυσίδα B περιέχει τα απαραίτητα αμινοξικά κατάλοιπα για τη σύνδεση με τον υποδοχέα της ορμόνης.^{344,345} Αυτά είναι η αργινίνη και η βαλίνη στις θέσεις B16 και B19 αντίστοιχα, ενώ τα κατάλοιπα ιστιδίνη και αργινίνη στις θέσεις B12 και B20 αντίστοιχα παίζουν δευτερεύοντα ρόλο.³⁴⁶ Τα παραπάνω μαζί με το επίσης κρίσιμο αμινοξικό κατάλοιπο τρυπτοφάνη στη θέση B27³⁴⁴ συνδυάζονται σχηματίζοντας μία ενιαία επιφάνεια σύνδεσης.³⁴⁶

Συγκεκριμένα, φαίνεται ότι τα κατάλοιπα αυτά συμπλησιάζουν και σχηματίζουν μια ενιαία εκτεταμένη περιοχή σύνδεσης στο κέντρο της αλυσίδας B, ιδιαίτερα εάν το καρβοξυτελικό άκρο της αλυσίδας αυτής είναι σε θέση να αναδιπλωθεί ελεύθερα και αντίθετα από την κεντρική περιοχή της, μια κίνηση που εξαρτάται από το σωστό προσανατολισμό της τρυπτοφάνης B27 και ελέγχεται από τα αμινοξικά κατάλοιπα γλυκίνη-γλυκίνη-προλίνη των θέσεων B23-B25, αντίστοιχα.³⁴⁷ Αντίθετα αμινοτελικό τμήμα της αλυσίδας A δε φαίνεται να συμμετέχει στη σύνδεση με τον αγωνιστή αλλά είναι υπεύθυνο για τη διαμεμβρανική αγωγή των μηνυμάτων



του ενεργοποιημένου υποδοχέα.³⁴⁸ Η διαλυτή δομή και η επιφάνεια σύνδεσης του πεπτιδίου με τον υποδοχέα του έχουν πρόσφατα χαρακτηριστεί.³⁴⁶ Η δυνητική κύρια περιοχή δέσμευσης του πεπτιδίου INSL3 στον υποδοχέα του (βλέπε παρακάτω) και η επιφάνεια δέσμευσης φαίνονται στις εικόνες 20 και 21, αντίστοιχα.

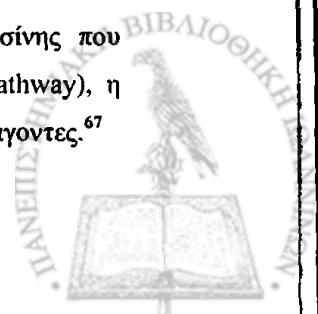
Χρωμόσωμα 9p23-24.3



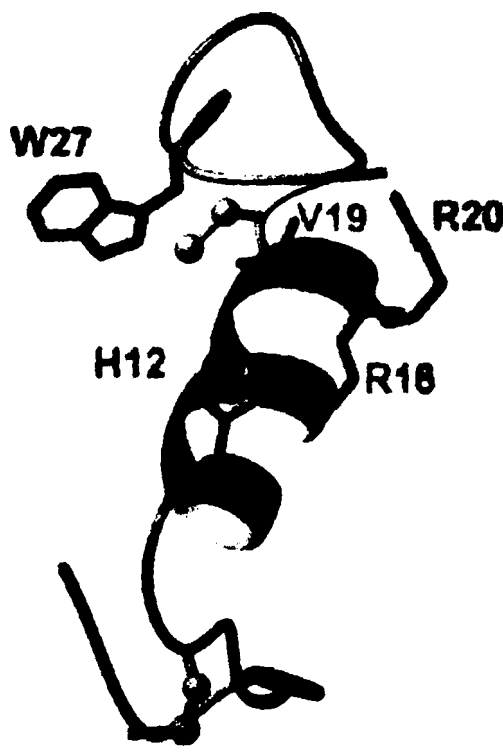
Εικόνα 19. Εντόπιση των γονιδίων της υπεροικογένειας της ινσουλίνης στο ανθρώπινο γένωμα. JAK = κινάση Janus⁽¹⁾ (τροποποιημένο από αναφορά 343).

Το γονίδιο INSL3 είναι ένα «μοντέρνο» γονίδιο στην εξέλιξη των ειδών, η εμφάνιση του οποίου όπως προκύπτει από τη φυλογενετική ανάλυση είναι αποτέλεσμα φυσικής επιλογής.³⁴⁹ Στα ασπόνδυλα δεν έχει ανακαλυφθεί μέχρι σήμερα πρωτεϊνική αλληλουχία τύπου ριλαξίνης.³⁴⁹ Από την ενδελεχή φυλογενετική ανάλυση³⁴⁹ προκύπτει ότι τα σπονδυλωτά αρχικά διέθεταν ένα μοναδικό αρχέγονο γονίδιο σχετιζόμενο με τη ριλαξίνη, που πιθανόν αντιστοιχεί στο πρόσφατα ανακαλυφθέν RLN3 των θηλαστικών,³⁴¹ με νευροφυσιολογικό αρχικά ρόλο. Το γονίδιο κωδικοποίησης της αρχέγονης αυτής ριλαξίνης και ο νέος ρόλος του στην

⁽¹⁾ Οι κινάσες Janus συγκροτούν μια οικογένεια ενδοκυττάρων κινασών της τυροσίνης που εμπλέκονται στην οδό διακυτταρικής επικοινωνίας JAK-STAT (JAK-STAT signaling pathway), η οποία συμμετέχει στη ρύθμιση της κυτταρικής απάντησης σε κυτοκίνες και αυξητικούς παράγοντες.⁶⁷



αναπαραγωγή πιστεύεται ότι εμφανίστηκε πριν το διαχωρισμό των Τελεοστέων,⁽¹⁾ αφού τα προγενέστερα κατώτερα σπονδυλωτά όπως τα Ελασμοβράγχια⁽²⁾ και οι βάτραχοι το εκφράζουν τόσο στους όρχεις όσο και στις ωοθήκες,³⁵⁰⁻³⁵⁴ αλλά όχι στον εγκέφαλο τους.³⁵⁴

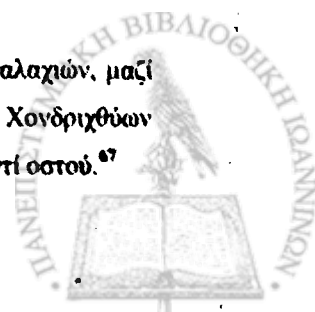


Εικόνα 20. Δυνητική κύρια θέση σύνδεσης της πρωτεΐνης INSL3 του ανθρώπου (B αλυσίδα) με τον υποδοχέα της. Απεικονίζονται τα κρίσιμα αμινοξικά κατάλοιπα που είναι υπεύθυνα για την αλληλεπίδραση με τον υποδοχέα και ο αριθμός του αντίστοιχου κωδικονίου στην αλληλουχία της πρωτεΐνης. W27=Τρυπτοφάνη^(B27), V19=Βαλίνη^(B19), R20=Αργινίνη^(B20), H12=Ιστιδίνη^(B12), R16=Αργινίνη^(B16) (η αρίθμηση ξεκινά από το πρώτο κωδικόνιο της B αλυσίδας του ώριμου μορίου) (από αναφορά 346).

Με την εμφάνιση των μοντέρνων θηλαστικών προέκυψαν δύο ξεχωριστά γονίδια: ένα για την ριλαξίνη και ένα και για την ορμόνη INSL3. Το πρώτο

⁽¹⁾ Τα Τελεόστεα (Teleostei) είναι συνομοταξία ψαριών που χαρακτηρίζονται από την παρουσία οστέινου σκελετού. Εμφανίστηκαν κατά την έναρξη του Μεσοζωικού Αιώνα (Τριαδική γεωλογική περίοδος: πριν από 251-200 εκατομμύρια χρόνια).⁶⁷

⁽²⁾ Τα Ελασμοβράγχια (Elastobranchii) όπου ανήκουν τα διάφορα είδη καρχαρία και σαλαχιών, μαζί με τα Χολοκέφα (Holocephali) δηλαδή τις χίμαιρες, είναι οι δύο υποτάξεις της τάξης των Χονδριχθύων (Chondrichthyes) όπου ανήκουν ψάρια των οποίων ο σκελετός συνίσταται από χόνδρο αντί οστού.⁶⁷



εκφράζεται έντονα στις ωοθήκες και λιγότερο στο ενδομήτριο, τον πλακούντα και τον προστάτη. Το δεύτερο εκφράζεται έντονα στα κύτταρα Leydig του όρχεως και της έσω θήκης της ωοθήκης (βλέπε παρακάτω). Αυτό σημαίνει ότι από το μοναδικό αρχικά ορμονικό σύστημα των κατώτερων θηλαστικών, με δύο διαδοχικές αντιγραφές του αρχέγονου γονιδίου, προέκυψαν ορμόνες αρχικά με εξειδίκευση γενικά επί του αναπαραγωγικού συστήματος και στη συνέχεια με επιπλέον υπερεξειδίκευση ξεχωριστά επί του ανδρικού (INSL3) και του γυναικείου (ριλαξίνη) αναπαραγωγικού συστήματος.³⁵⁵ Η εμφάνιση δε του πεπτιδίου INSL3 σχετίζεται με την εξωτερίκευση των γονάδων και την ανάπτυξη του οσχέου. Πειραματικά μοντέλα τρανσγενετικών ποντικών που υπερεκφράζουν το γονίδιο *Insl3* παρουσιάζουν βουβωνοκήλες αμφοτερόπλευρα^{356,357} πράγμα που σημαίνει ότι η εξέλιξη του οσχέου είναι πιθανή συνέπεια φυσικής επιλογής εξαιτίας κάποιου πλεονεκτήματος που προκύπτει από την παρουσία αυτών των κηλών στα αρσενικά.



Εικόνα 21. Η πιθανή επιφάνεια σύνδεσης της πρωτεΐνης INSL3 του ανθρώπου με τον υποδοχέα της. (A) Τμήματα των κρίσιμων αμινοξέων καλύπτονται από το καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης. (B) Άποψη της ίδιας επιφάνειας της Β αλυσίδας μετά από απομάκρυνση του καρβοξυτελικού άκρου Β23-Β31. W27=Τρυπτοφάνη^(B27), V19=Βαλίνη^(B19), R20=Αργινίνη^(B20), H12=Ιστιδίνη^(B12), R16=Αργινίνη^(B16) (η αρίθμηση ξεκινά από το πρώτο κωδικόνιο της Β αλυσίδας του ώριμου μορίου) (από αναφορά 346)

Η νουκλεοτιδική αλληλουχία του αντίστοιχου γονιδίου έχει καθοριστεί στον άνθρωπο,³⁵⁸ το χοίρο,³⁵⁸ το ποντίκι,^{359,360} τον αρουραίο³²⁴ το βόδι³⁴³ και το σκύλο.³⁶¹



Το ανθρώπινο γονίδιο INSL3 βρίσκεται στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 19 (19p13.2-p12) και αποτελείται από δύο εξώνια⁽¹⁾ και ένα εσώνιο που διακόπτει την περιοχή κωδικοποίησης του πεπτιδίου C.³⁵⁸ Το εξώνιο 1 κωδικοποιεί μια αρχική πεπτιδική αλληλουχία που απαντά στην προ-πρωτεΐνη (signal peptide), την αλυσίδα B και τα οκτώ πρώτα αμινοξέα του πεπτιδίου C, ενώ το εξώνιο 2 κωδικοποιεί το υπόλοιπο πεπτίδιο C και την αλυσίδα A (Εικόνα 22).³⁵⁸ Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι στα τρωκτικά ο προαγωγέας του γονιδίου εντοπίζεται μέσα στο 23^ο (τελικό) εσώνιο του γονιδίου Jak3 που είναι υπεύθυνο για την κωδικοποίηση της αντίστοιχης κινάσης Janus, ενώ στον άνθρωπο και στην αγελάδα βρίσκεται εκτός αλλά πολύ κοντά στο τελικό άκρο του εσωνίου^{324,359} (Εικόνα 19).

Η μεταγραφή του γονιδίου INSL3 δε φαίνεται να υπόκειται σε άμεσο ορμονικό έλεγχο και άρα η ρύθμιση της έκκρισης της αντίστοιχης ορμόνης από τα κύτταρα Leydig είναι ιδιοσυγκρασιακή (constitutive).³⁶²⁻³⁶⁴ Δύο μεταγραφικοί παράγοντες έχει φανεί ότι επηρεάζουν την έκφραση του γονιδίου στα κύτταρα Leydig και στα κύτταρα της θήκης του ποντικού *in vitro*: ο SF1 (NR5A1) και ο πυρηνικός υποδοχέας DAX1.^{362,363} Ο SF1 από μόνος του δεν αρκεί για να ενεργοποιήσει τον προαγωγέα του γονιδίου *Insl3* και προς τούτο απαιτούνται επιπλέον παράγοντες ειδικοί των κυττάρων Leydig.³⁶⁴ Αυτό προκύπτει από πειράματα *in vivo* σε ποντίκια «knockout», τα οποία στερούνται τον SF1.³⁶⁵ Έτσι, τα ποντίκια με αδρανοποίηση του γονιδίου *Sf1* ειδικά στα κύτταρα Leydig παρουσιάζουν επηρεασμένη αλλά όχι πλήρη όπως τα *Insl3*^{-/-} αναστολή της ορχικής καθόδου.³⁶⁵ Συγκεκριμένα, οι όρχεις παρουσιάζουν μερική ορχική κάθοδο στο επίπεδο της ουροδόχου κύστης, γεγονός που δείχνει ότι τα ζώα διατηρούν την ικανότητα έκφρασης του *Insl3* αλλά σε μικρότερο βαθμό.³⁶⁵ Έτσι πολύ πρόσφατα βρέθηκε ότι ένας ακόμη ορφανός πυρηνικός υποδοχέας, ο NR4A1 συμμετέχει στη ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου στα κύτταρα Leydig του ποντικού.³⁶⁶

Ο SF1 αυξάνει την έκφραση του γονιδίου *Insl3* συνδεόμενος άμεσα σε ειδικές θέσεις του προαγωγέα.^{362,363} Συγκεκριμένα, ο προαγωγέας διαθέτει στην εγγύς περιοχή του τρεις θέσεις σύνδεσης για τον SF1^{324,362,363} που δεν είναι ισοδύναμες

⁽¹⁾ Εξώνιο (exon) είναι τμήμα του γονιδίου που μεταγράφεται και διατηρείται στο τελικό μόριο του αγγελιαφόρου RNA (mRNA) για να μεταφραστεί σε πεπτίδιο. Εσώνιο (intron) είναι παρεμβαλλόμενη αλληλουχία νουκλεοτιδίων μεταξύ δύο εξωνίων που μεταγράφεται σε πρόδρομο mRNA αλλά τελικά απομακρύνεται κατά την ωρίμανσή του μορίου και επομένως δε μεταφράζεται.⁶⁷



μεταξύ τους αλλά ούτε και μεταξύ των διαφόρων θηλαστικών.³⁶⁴ Η σύγκριση του προαγωγέα του γονιδίου *Ins13* του ποντικού με αυτούς των αντιστοίχων γονιδίων του ανθρώπου, του αρουραίου, του χοίρου και του σκύλου δείχνει ότι μία μόνο από τις θέσεις σύνδεσης για τον SF1 διατηρείται και στα πέντε αυτά είδη.^{361,367} Στον αρουραίο τη μεγαλύτερη συνάφεια με τον SF1 εμφανίζει η απώτερη περιοχή σε αντίθεση με τον ποντικό, στον οποίο την πιο ισχυρή δεσμευτική ικανότητα εμφανίζει η εγγύτερη περιοχή.³⁶⁴

Ο DAX1 με τη σειρά του παρεμποδίζει τη μεταγραφική δραστηριότητα του *Ins13* αναστέλλοντας πλήρως την ενεργοποίηση του προαγωγέα από τον SF1.³⁶³ Αντίθετα, το γονίδιο *Sox9* που αποτελεί έναν από τους κύριους ρυθμιστές της σεξουαλικής διαφοροποίησης,⁹⁹ ενισχύει την έκφραση του *Sf1* *in vitro*³⁶⁸ συνδέοντας τα γεγονότα της σεξουαλικής διαφοροποίησης με την ορχική κάθοδο. Είναι ενδιαφέρον δε ότι η έκφραση του γονιδίου *Sf1* συμπίπτει χρονικά με την έκφραση του *Ins13* και την ορχική κάθοδο κατά την περίοδο ανάπτυξης του ανδρικού αναπαραγωγικού συστήματος. Συγκεκριμένα, κατά την εμβρυογένεση του ποντικού, το γονίδιο *Sf1* εκφράζεται στο αναπτυσσόμενο ουρογεννητικό σύστημα και των δύο φύλων μέχρι περίπου την 9^η ημέρα μετά τη συνουσία.³⁶⁹ Από την 12,5 ημέρα το γονίδιο εξακολουθεί να εκφράζεται στα κύτταρα Sertoli και Leydig της αρσενικής γονάδας, ενώ η έκφρασή του μειώνεται από την ημέρα 13,5 στη θηλυκή γονάδα. Ακριβώς εκείνη τη στιγμή αρχίζει η διακοιλιακή φάση της ορχικής καθόδου στον ποντικό και αρχίζουν να ανιχνεύονται αντίγραφα του *Ins13* στον εμβρυϊκό όρχι³⁶⁰ (βλέπε παρακάτω).

Η λειτουργία του προαγωγέα του γονιδίου *INS13* ελέγχεται σε μεγάλο βαθμό από τον SF1 *in vitro* και σε άλλα θηλαστικά συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου.^{361,367,370} Ωστόσο, ένας άλλος ορφανός πυρηνικός υποδοχέας φαίνεται ότι παίζει ρόλο και ενεργοποιεί τον προαγωγέα ακόμη ισχυρότερα στον άνθρωπο. Πρόκειται για τον Nur77.³⁶⁷ Ο Nur77 (ή αλλιώς NGF-B, TR3, NR4A1) εκφράζεται μεταξύ άλλων στα κύτταρα Leydig σε χαμηλά επίπεδα, η δε έκφρασή του επάγεται σταθερά και ισχυρά από την LH και ανάλογα του cAMP.^{371,372} Έχει παρατηρηθεί ότι ενεργοποιεί προαγωγείς αρκετών γονιδίων στα κύτταρα Leydig τόσο του ανθρώπου (*HSD3B2*), όσο και των τρωκτικών (*Cyp17* του αρουραίου, *HSD3B1* και *StAR* του ποντικού), τα οποία εμπλέκονται στη στεροειδογένεση.^{371,373,374}

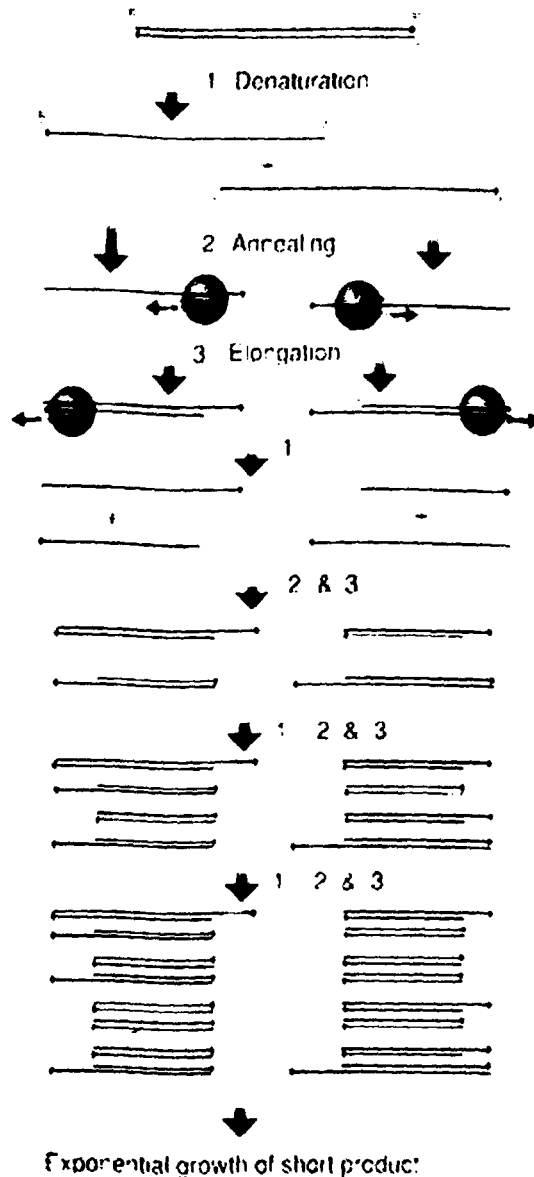


Το γονίδιο *Insl3* εκφράζεται σε μέγιστο βαθμό στα εμβρυϊκά και στα ώριμα του ενήλικα κύτταρα Leydig που αντικαθιστούν τα εμβρυϊκά μεταξύ 5^{ης}-15^{ης} ημέρας μετά τη γέννηση. Αντίθετα, εκφράζεται ασθενέστατα στα προεφηβικά ανώριμα κύτταρα Leydig και στην ωοθήκη. Μόνη εξαίρεση της τελευταίας περίπτωσης μέχρι τώρα γνωστή αποτελεί η ωοθήκη των μηρυκαστικών όπου εκφράζεται επίσης σε υψηλό βαθμό.^{330,360}

Αντίγραφα του *Insl3* ανευρίσκονται αποκλειστικά στα κύτταρα Leydig των αναπτυσσόμενων όρχεων³¹⁹ αλλά όχι στον ορχικό οίακα ή σε άλλους γειτονικούς ιστούς.⁵ Μόνο με τη βοήθεια της τεχνικής RT-PCR⁽¹⁾ έχουν ανιχνευτεί αντίγραφα σε εξω-ορχικούς ιστούς όπως για παράδειγμα στην επιδιδυμίδα, στον προστάτη στον υποθάλαμο και στον θυρεοειδή.^{320,232,360,375,376} Στον ποντικό, τα αντίγραφα ανιχνεύονται για πρώτη φορά την 13,5 ημέρα μετά τη συνουσία αποκλειστικά στα κύτταρα Leydig του όρχεως.³⁶⁰ Η έκφραση τους παραμένει σταθερή κατά τη διάρκεια της 3^{ης} εβδομάδας μετά τη γέννηση, οπότε παρατηρείται αύξηση που συμπίπτει με τη σπερμιόγένεση που υφίσταται το πρώτο κύμα στρογγυλών σπερματίδων, ενώ τελικά η μέγιστη έκφραση επιτυγχάνεται στους όρχεις του ενήλικα.³⁶⁰ Στον αρουραίο ωστόσο, τα αποτελέσματα είναι αντιφατικά αφού αντίγραφα στα κύτταρα Leydig αναφέρεται ότι ανιχνεύονται για πρώτη φορά μετά την 25^η ημέρα από τη γέννηση,²⁶⁴ ενώ σε άλλη μελέτη η ανίχνευσή τους πιστοποιείται και κατά την ενδομήτρια ζωή.³⁷⁷ Η ανίχνευση των αντιγράφων κατά την ενδομήτρια ζωή παρατηρείται από την ημέρα 15,5, με ιδιαίτερη ένταση μάλιστα τις ημέρες 17,5 και 19,5 ενώ στη συνέχεια ακολουθεί μεγάλη μείωση από την ημέρα 21,5.³⁷⁷ Το εύρημα αυτό είναι συμβατό με το ρόλο του πεπτιδίου *INSL3* στην ανάπτυξη του ορχικού οίακα και τη διακοιλιακή φάση της ορχικής καθόδου, η οποία λαμβάνει χώρα κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου.²⁵⁹

(1) Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) αποτελεί βιοχημική-μοριακή τεχνική με την οποία γίνεται εκθετική, εκλεκτική ενίσχυση (amplification) γενετικού υλικού (DNA), *in vitro*, με τη βοήθεια ενζυματικών επαναλήψεων. Ανακαλύφθηκε το 1983 από τον Kary Mullis. Συνήθως συγκροτείται από μια σειρά 20-35 κύκλων και κατά κανόνα πραγματοποιείται σε τρία διαδοχικά βήματα (Εικόνα 23). Η τροποποιημένη τεχνική της PCR αντίστροφης μεταγραφής (Reverse Transcription PCR, RT-PCR) αποτελεί μέθοδο ενίσχυσης και απομόνωσης ή ανίχνευσης μιας γνωστής νουκλεοτιδικής αλληλουχίας από ένα κυτταρικό ή ιστικό μόριο RNA. Της αντίδραση PCR προηγείται μια αντίδραση, η οποία χρησιμοποιεί το ένζυμο ανάστροφη μεταγραφή (reverse transcriptase) που μεταγράφει το RNA σε cDNA.⁶⁷





Εικόνα 23. Σχηματική αναπαράσταση του κύκλου της PCR.⁶⁷

Στα θηλυκά ποντίκια, τα αντίγραφα του γονιδίου παρουσιάζουν ευρύτερη κατανομή. Η ωθήκη είναι η κύρια πηγή του πεπτιδίου όπου αντίγραφα ανιχνεύονται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις στα κύτταρα της θήκης των ωοθυλακίων του άντρου, και σε μικρότερες στα κύτταρα του ωχρού σωματίου και του στρώματος σε μηρυκαστικά,^{321,322,378} στον πίθηκο³²³ και στον άνθρωπο,³⁷⁹ αλλά και εκτός ωοθήκης όπως στο μαστό, στον πλακούντα και στο θυρεοειδή αδένι.^{375,380,381} Στον ποντικό ανιχνεύονται για πρώτη φορά την 6^η ημέρα μετά τη γέννηση στα κύτταρα της θήκης των μικρών ωοθυλακίων του άντρου και η έκφραση συσχετίζεται με την επιλογή των ωοθυλακίων που θα γίνουν προωορρηκτικά,^{360,382} ενώ ανιχνεύονται σε μικρότερο

βαθμό στα κύτταρα του ωχρού σωματίου της ωοθήκης.³⁶⁰

Επομένως η μεταγραφή του γονιδίου στους κύριους ιστούς έκφρασής του (κύτταρα Leydig και θήκης) εξαρτάται από το βαθμό διαφοροποίησης των κυττάρων καθιστώντας την ορμόνη INSL3 ή το αντίστοιχο mRNA ιδανικό δείκτη του ώριμου φαινοτύπου. Όταν τα κύτταρα αυτά είναι ανώριμα ή δυσλειτουργούν όπως για παράδειγμα τα προεφηβικά κύτταρα Leydig,³⁸³ τα καρκινικά, κύτταρα Leydig,^{384,385} τα κύτταρα Leydig των θηλαστικών με εποχική διακύμανση της αναπαραγωγή τους κατά τη μη αναπαραγωγική περίοδο,³⁸⁶ τα κύτταρα Leydig ατόμων υπό κατασταλτικές δόσεις αντισυλληπτικών στεροειδών,³⁸⁷ τότε η γονιδιακή έκφραση ελαχιστοποιείται ή εξαλείφεται.

Πρόσφατα μάλιστα, κατέστη δυνατή η μέτρηση των επιπέδων του πεπτιδίου στον ορό και μελετήθηκε η συγκέντρωση του σε φυσιολογικούς ανθρώπους και σε ασθενείς με διάφορες παθήσεις των όρχεων.^{387,388-390} Οι μελέτες αυτές έδειξαν ότι α) η κυκλοφορούσα ορμόνη INSL3 είναι αποκλειστικά ορχικής προέλευσης, β) φυσιολογικά αυξάνεται προοδευτικά κατά τη διάρκεια της εφηβείας υπό την επίδραση της ωχρινότροπου ορμόνης (LH) επί των κυττάρων Leydig επιτυγχάνοντας μέγιστη έκκριση σε φυσιολογικά επίπεδα LH κατά την ενηλικίωση, γ) η συγκέντρωσή της στο πλάσμα αντικατοπτρίζει το βαθμό ωριμότητας και τη λειτουργική κατάσταση αυτών των κυττάρων δ) τα επίπεδά της στον ορό είναι σημαντικά χαμηλότερα σε ενήλικες με παθήσεις των όρχεων όπως στο σύνδρομο Klinefelter και ε) αποτελεί πιο ευαίσθητο δείκτη βλάβης του κυττάρου Leydig από την τεστοστερόνη.

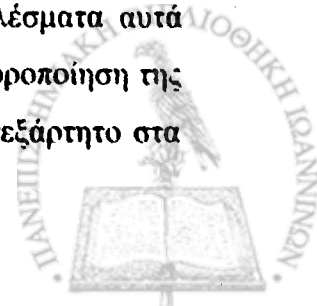
Στα ανώριμα κύτταρα Leydig μπορεί μερικές φορές να επαχθεί η έκφραση του γονιδίου υποβάλλοντάς τα σε ένα κατάλληλο χρονικά διαφοροποιητικό ερέθισμα. Η ακόλουθη ενεργοποίηση του γονιδίου πιθανόν οφείλεται σε άλλους παράγοντες που σχετίζονται με την αυξημένη κατάσταση διαφοροποίησης των κυττάρων και όχι με την άμεση επίδραση κάποιας συγκεκριμένης ορμόνης επί του προαγωγέα. Έτσι για παράδειγμα στο μοντέλο Hrg του ποντικού, το οποίο στερείται ενεργού υποθαλαμο-υποφυσιακού άξονα, παρατηρείται έκφραση του *Insl3* γονιδίου τόσο στα εμβρυϊκά κύτταρα Leydig όσο και στα κύτταρα Leydig του ενήλικα που έχουν όμως πρώτα υποστεί διαφοροποίηση μετά από καθημερινή χορήγηση hCG και έχουν προχωρήσει από την προεφηβική κατάσταση στην οποία αρχικά βρίσκονται σε φαινότυπο ενήλικα.³⁸³ Επίσης σε ασθενείς με υπογοναδοτροφικό υπογοναδισμό, η μακροχρόνια



χορήγηση (για ένα μήνα) της hCG οδηγεί σε αύξηση των περιφερικών επιπέδων του INSL3 πιθανόν λόγω επαγωγής της διαφοροποίησης των κυττάρων Leydig σε φαινότυπο ενήλικα.³⁸⁷

Από τα παραπάνω προκύπτει ότι τα εμβρυϊκά κύτταρα Leydig εκφράζουν το γονίδιο με τρόπο ανεξάρτητο από τη δράση των LH και hCG, ενώ οι γοναδοτροφίνες είναι απαραίτητες για τη φυσιολογική συνεχή επαγωγή της γονιδιακής έκφρασης στα κύτταρα Leydig του ενήλικα.³⁸³ Πρόσφατα έχει προταθεί μάλιστα η χρήση της ορμόνης INSL3 ως νέος δείκτης έναρξης και προόδου της ήβης στα αγόρια.^{390,391} Τέλος αξίζει να σημειωθεί ότι αν και η παραγωγή τόσο της τεστοστερόνης όσο και της ορμόνης INSL3 εξαρτάται από την LH, η ρύθμιση της παραγωγής αυτών των δύο ορμονών των κυττάρων Leydig είναι διαφορετική αφού η βραχεία χορήγηση (για 3-4 ημέρες) hCG σε ασθενείς με υπογοναδοτροφικό υπογοναδισμό δεν αυξάνει τα περιφερικά επίπεδα του INSL3 σε αντίθεση με αυτά της τεστοστερόνης.³⁸⁸ Συγκεκριμένα, φαίνεται ότι η παραγωγή της INSL3 εξαρτάται από τη μακροχρόνια τροφική επίδραση της LH επί των κυττάρων Leydig και είναι ανεξάρτητη από την οξεία στεροειδογενετική επίδρασή της στα ίδια κύτταρα.³⁸⁸

Έχει παρατηρηθεί ότι τα αρσενικά ποντίκια με ομόζυγη απαλοιφή του γονιδίου *Insl3* (*Insl3^{-/-}*) είναι βιώσιμα αλλά στείρα και εμφανίζουν όρχεις αμφοτερόπλευρα σε ενδοκοιλιακή θέση λόγω αναπτυξιακής ανωμαλίας των ορχικών τους οιακών.^{6,7} Συγκεκριμένα, ο κρυπορχικός φαινότυπος στο μοντέλο *Insl3^{-/-}* είναι άμεση συνέπεια της ελλειμματικής ανάπτυξης του ορχικού οίακα λόγω απουσίας της πρωτεΐνης INSL3 κατά τη διάρκεια μιας συγκεκριμένης κρίσιμης πρώιμης φάσης της ανάπτυξης.³⁹² Ο ορχικός οίακας στα πειραματόζωα αυτά μοιάζει με εκείνο των φυσιολογικών θηλυκών ποντικών που χαρακτηρίζεται από την παρουσία α) επίπεδου και λεπτού βολβού, β) επιμηκυμένης λεπτής χορδής και γ) υποτυπώδους περιφερικής μυϊκής ανάπτυξης—απουσία μεσεγχυματικού κεντρικού πυρήνα, δηλαδή απουσιάζει η χαρακτηριστική δομική οργάνωση με εξωτερική στιβάδα από μυοβλάστες και εσωτερική στιβάδα από μεσέγχυμα.^{6,7} Πέρα από τη δομή του ορχικού οίακα και τη θέση των όρχεων, η ανάπτυξη του υπόλοιπου γεννητικού σωλήνα, η παλινδρόμηση του κρανιακού κρεμαστήριου συνδέσμου, η σεξουαλική συμπεριφορά και τα επίπεδα τεστοστερόνης στον ορό φαίνονται να είναι φυσιολογικά. Τα αποτελέσματα αυτά καταδεικνύουν ότι η πρωτεΐνη INSL3 διεγείρει την ανάπτυξη και διαφοροποίηση της αρχέγονης καταβολής του ορχικού οίακα με μηχανισμό ανδρογονο-ανεξάρτητο στα



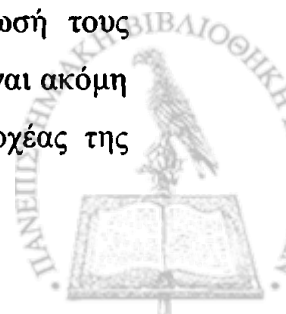
ποντίκια, ενώ η ανδρογονο-εξαρτώμενη παλινδρόμηση του κρανιακού κρεμαστήριου συνδέσμου επιτελείται ανεξάρτητα από τη δράση του INSL3.⁷

Το ετερόζυγο μοντέλο (Insl3^{+/-}) αρσενικού ποντικού είναι γόνιμο και μπορεί να εμφανίζει ετερόπλευρη ή αμφοτερόπλευρη ατελή κάθοδο των όρχεων. Ο ορχικός οίακας είναι ανεπτυγμένος αλλά όχι ενσφηνωμένος στο κοιλιακό τοίχωμα με αποτέλεσμα να επιτυγχάνεται μεν αλλά καθυστερημένα (κατά την ενήλικη ζωή) η ορχική κάθοδος (δοσολογική εξάρτηση της ορχικής καθόδου από η πρωτεΐνη INSL3.⁶

Αντιθέτως, παρατηρείται μια ήπια φαινοτυπική διαταραχή στο μοντέλο Insl3^{-/-} θηλυκού ποντικού. Το μοντέλο αυτό δεν εμφανίζει μορφολογικές ανωμαλίες αλλά επηρεασμένη γονιμότητα που εκφράζεται ως δυσκολία σύλληψης και ολοκλήρωσης κύησης λόγω επιμήκυνσης του αναπαραγωγικού κύκλου⁶ και αύξησης του ρυθμού απόπτωσης των ωοθηκικών κυττάρων που αφορά κυρίως στα ωοθυλάκια και ωχρά σωμάτια.³⁹³ Τα δεδομένα στηρίζουν το ρόλο του πεπτιδίου INSL3 στη ρύθμιση του κύκλου και πιθανόν στην ανάπτυξη των ωοθυλακίων.⁶ Ωστόσο, τα θηλυκά ποντίκια με απαλοιφή του γονιδίου του υποδοχέα του INSL3 (βλέπε παρακάτω) είναι γόνιμα.³⁹⁴ Το γεγονός αυτό υποδηλώνει την ύπαρξη επιπρόσθετων ενδο-ωοθηκικών οδών που συμμετέχουν στη ρύθμιση των ωοκυττάρων.³⁹⁵

Αν και η έκφραση του γονιδίου Insl3 αυξάνεται δραματικά κατά την περίοδο της εφηβείας,³⁶⁰ πράγμα που υποδηλώνει έναν επιπρόσθετο ρόλο του πεπτιδίου στη γονιμότητα, η ιστολογία των ενδοκοιλιακών όρχεων στο νεογέννητο ποντίκι Insl3^{-/-} είναι αρχικά φυσιολογική. Ωστόσο η παραμονή τους στη θέση αυτή μέχρι την ενηλικίωση, οδηγεί σε επιδείνωση της ιστολογικής εικόνας με κατάληξη σε SCOS και στειρότητα στο 100% των πειραματοζώων.^{6,7} Πρόσφατα έχει καταδειχθεί ότι η ορχεοπηξία στο όσχεο μπορεί να διασώσει την γονιμότητα στο μοντέλο.³⁹⁶ Επομένως, η υπογονιμότητα που παρατηρείται μπορεί να αποδοθεί στην αυξημένη θερμοκρασία των όρχεων λόγω της μη φυσιολογικής θέσης τους.^{6,7}

Ωστόσο, έχει πρόσφατα παρατηρηθεί στον αρουραίο ότι τόσο στις θηλυκές όσο και στις αρσενικές γονάδες η ορμόνη INSL3 και ο υποδοχέας της (βλέπε παρακάτω) αποτελούν ένα σημαντικό παρακρινικό σύστημα για την επαγωγή της μείωσης στην ωοθήκη (ωοκυτταρική ωρίμανση) και την επιβίωση των ανδρικών βλαστικών γεννητικών κυττάρων στον όρχι αναστέλλοντας την απόπτωσή τους (Εικόνα 24).¹² Αν και ο ειδικός ρόλος της ορμόνης αυτής στον άνθρωπο είναι ακόμη άγνωστος, το σημαντικό αυτό εύρημα δείχνει ότι η INSL3 και ο υποδοχέας της

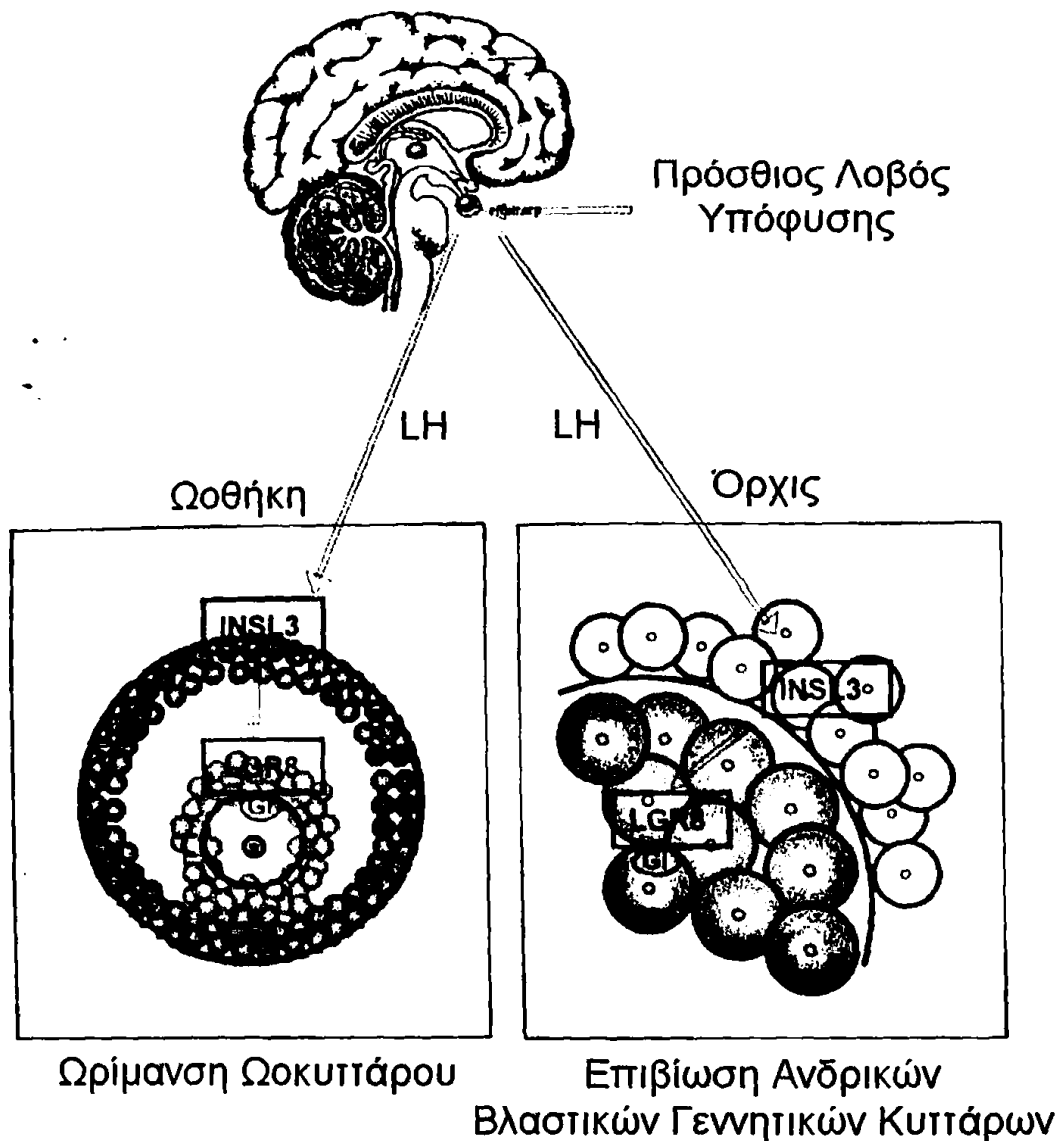


αποτελούν ειδικούς ρυθμιστές της γονιμότητας με δυναμικές κλινικές εφαρμογές στο πεδίο της αντισύλληψης, αφού μεμονωμένες Β αλυσίδες της INSL3 ανταγωνίζονται τη δράση της ορμόνης και η χορήγησή τους οδηγεί σε μείωση του βάρους των όρχεων του αρουραίου πιθανόν λόγω αναστολής της επιβίωσης των βλαστικών γεννητικών κυττάρων.³⁴⁵ Το γεγονός ότι παράλογα γονίδια⁽¹⁾ εκφράζονται στον όρχι τόσο για το INSL3 όσο και για το γονίδιο του υποδοχέα του (βλέπε παρακάτω) μπορεί να σημαίνει ότι η επιβίωση των ανδρικών βλαστικών γεννητικών κυττάρων ρυθμίζεται από υπεράριθμα συστήματα^{9,398} και έτσι ίσως ερμηνεύεται η φυσιολογική αρχικά ιστολογική εικόνα των ενδοκοιλιακών όρχεων στο ποντίκι *Insl3*^{-/-}.

Μελέτες *in vitro* καταλήγουν στο ότι τόσο η πρωτεΐνη INSL3 όσο και τα ανδρογόνα απαιτούνται για την επαγωγή της ανάπτυξης και διαφοροποίησης του ορχικού οίακα.^{300,302} Ωστόσο, υπάρχουν ισχυρές αποδείξεις ότι η επίδραση *in vivo* του INSL3 πάνω στον ορχικό οίακα είναι άμεση³⁹⁹ και ανδρογονοανεξάρτητη.³⁵⁶ Το συμπέρασμα αυτό υποστηρίζεται από τα αποτελέσματα πειραμάτων σε αρσενικά και θηλυκά τρανσγενετικά ποντίκια που υπερεκφράζουν δραστικό γονίδιο *Insl3* στο πάγκρεας (*Tg(Insl2-Insl3)*). Η έκφραση του αλληλίου στο τρανσγενετικό μοντέλο *Insl3*^{-/-} αρσενικού ποντικού εξασφαλίζει την ορχική κάθοδο. Από την άλλη πλευρά, όλα τα θηλυκά τρανσγενετικά ποντίκια εμφανίζουν μειωμένη γονιμότητα λόγω εμβρυϊκής θνητότητας κατά το μέσον της κύησης, αμφοτερόπλευρα βουβωνοκήλη και κάθοδο των ωοθηκών σε θέση πάνω από την ουροδόχο κύστη. Οι ωοθήκες είναι προσαρτημένες στο κοιλιακό τοίχωμα μέσω ενός καλά αναπτυγμένου κρανιακού κρεμαστήριου συνδέσμου και ορχικού οίακα. Η ανάπτυξη του ορχικού οίακα στα θηλυκά αυτά τρανσγενετικά ποντίκια αποδίδεται στην έκφραση του *Insl3*, η οποία οδηγεί σε βράχυνση της χορδής - μεγέθυνση του βολβού και διαφοροποίηση αυτού με δημιουργία μεσεγχυματικού κέντρου και ανάπτυξη μυοβλαστικών στιβάδων στην περιφέρεια. Η χορήγηση διυδροτεστοστερόνης κατά τη διάρκεια της ενδομήτριας ανάπτυξης αναστέλλει το σχηματισμό του κρανιακού κρεμαστήριου συνδέσμου επιτρέποντας περαιτέρω κάθοδο των ωοθηκών εντός της ελυτροπεριτοναϊκής πτυχής.

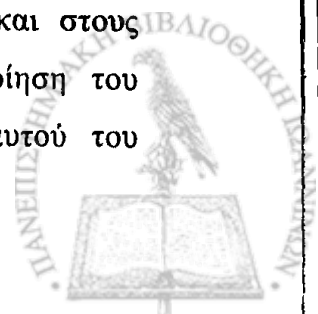
⁽¹⁾ Παράλογα (*paralogous*) καλούνται τα ομόλογα γονίδια του ίδιου είδους. Ορθόλογα (*orthologous*) καλούνται τα ομόλογα γονίδια διαφορετικών ειδών.⁶⁷





Εικόνα 24. Η γοναδοτροπική διέγερση της ωοκυτταρικής ωρίμανσης και της επιβίωσης των ανδρικών βλαστικών γεννητικών κυττάρων διενεργείται μέσω ενός παρακρινικού συστήματος που συνίσταται από την ορμόνη INSL3 και τον υποδοχέα του LGR8 (βλέπε παρακάτω). Η υποφυσιακή ωχρινότροπος ορμόνη (LH) διεγείρει τα κύτταρα της θήκης του ωοθυλακίου ή τα κύτταρα Leydig του όρχεως προς παραγωγή INSL3 που στη συνέχεια ενεργοποιεί τους τοπικούς LGR8 υποδοχείς και μέσω την ανασταλτική πρωτεΐνη G_i αναστέλλει τη δραστηριότητα της αδενυλικής κυκλάσης στα μεν ωκύτταρα προς επαγωγή της μειωτικής τους ωρίμανσης, στα δε βλαστικά γεννητικά κύτταρα στον όρχι προς καταστολή της απόπτωσης του πληθυσμού τους (τροποποιημένο από αναφορά 397).

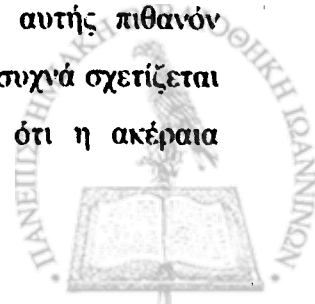
Ένα κρίσιμο στοιχείο αναφορικά στη λειτουργία του INSL3 και στους υποκείμενους μοριακούς μηχανισμούς που καθορίζουν τη διαφοροποίηση του ορχικού οίακα είναι η ταυτοποίηση ενός φυσιολογικού υποδοχέα αυτού του



πεπτιδίου. Πρόσφατα, δημιουργήθηκε ένα τρανσγενετικό στέλεχος ποντικού με φαινότυπο πολύ παρόμοιο με αυτών που φέρουν μετάλλαξη στο γονίδιο *Ins13*. Το στέλεχος είναι γνωστό ως *crsp* (cryptorchidism with white spotting) από τα αρχικά των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών του, δηλαδή κρυσορχία με λευκά στίγματα.⁷ Η τρανσγενετική προσθήκη εντοπίζεται στο περιφερικό άκρο του χρωμοσώματος 5.

Οι ομοζυγώτες (*crsp*^{+/+}) και των δύο φύλων εμφανίζουν νωρίς μετά τη γέννησή τους, μειωμένη βιωσιμότητα, χαμηλότερο σωματικό βάρος και λευκά στίγματα που πρωτοεμφανίζονται 3-5 ημέρες μετά τη γέννησή ως μία ποικίλου μεγέθους λευκή λωρίδα στη ράχη κατά τη μεσότητα του κορμού και ένα λευκό εμβάλωμα στην κοιλιακή χώρα. Τα ομοζυγωτικά αρσενικά ζώα παρουσιάζουν στειρότητα με πλήρη αναστολή της σπερματογένεσης, όρχεις μικρούς σε υψηλή ενδοκοιλιακή θέση αμφοτερόπλευρα και εκτεταμένο μη διαφοροποιημένο ορχικό οίακα. Ωστόσο, το υπόλοιπο γεννητικό σύστημα εμφανίζεται φυσιολογικό και τα επίπεδα τεστοστερόνης στο περιφερικό αίμα βρίσκονται επίσης εντός φυσιολογικών ορίων. Αντιθέτως, τα ετεροζυγωτικά (*crsp*^{+/-}) αρσενικά ζώα, όπως επίσης τα θηλυκά *crsp*^{+/+} και *crsp*^{+/-} εμφανίζουν φαινότυπο *crsp*^{-/-} (wild type). Χειρουργική καθήλωση των όρχεων σε οσχεϊκή θέση στο μοντέλο *crsp*^{+/+} οδηγεί σε αποκατάσταση της σπερματογένεσης στο φυσιολογικό, γεγονός που καταδεικνύει ότι η μετάλλαξη δεν επηρεάζει την ανάπτυξη και διαφοροποίηση των ανδρικών βλαστικών γεννητικών κυττάρων άμεσα, αλλά είναι μια γενετική αλλοίωση που επηρεάζει ειδικά την ορχική κάθοδο. Η πλήρης αναστολή της σπερματογένεσης που παρατηρείται αποδίδεται σε αυξημένη περιβαλλοντική θερμοκρασία των όρχεων λόγω της ενδοκοιλιακής θέσης.

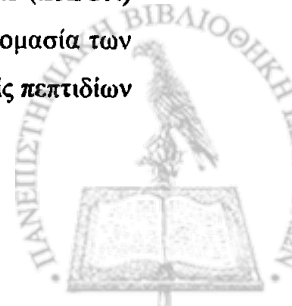
Αξίζει επίσης να σημειωθούν δύο ενδιαφέροντα σημεία σχετικά με τη μετάλλαξη *crsp*. Πρώτον, κρυσορχία έχει αναφερθεί σε μερικούς ασθενείς με το σύνδρομο Rieger τύπου II (κληρονομικό γλαύκωμα). Ένα γονίδιο υπεύθυνο για το σύνδρομο αυτό έχει χαρτογραφηθεί κοντά στο γονίδιο *BRCA2*.⁴⁰⁰ Το κατά πόσο το γονίδιο αυτό σχετίζεται με τη μετάλλαξη *crsp* παραμένει αδιευκρίνιστο. Δεύτερον, μπορεί να υπάρχει σχέση μεταξύ του *crsp*-επαγόμενου φαινοτύπου των λευκών στιγμάτων και αδρανοποίησης ενός γονιδίου υπεύθυνου για την εμφάνιση κρυσορχίας. Οι μελανοβλάστες και τα σωματικά νεύρα προέρχονται από τη νευρική ακρολοφία κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, ενώ τα παράγωγα αυτής πιθανόν εμπλέκονται στην ορχική κάθοδο αφού η κρυσορχία στον άνθρωπο συχνά σχετίζεται με ελλείμματα του νευρικού σωλήνα.²⁹⁶ Ακόμη, έχει προταθεί ότι η ακέραια

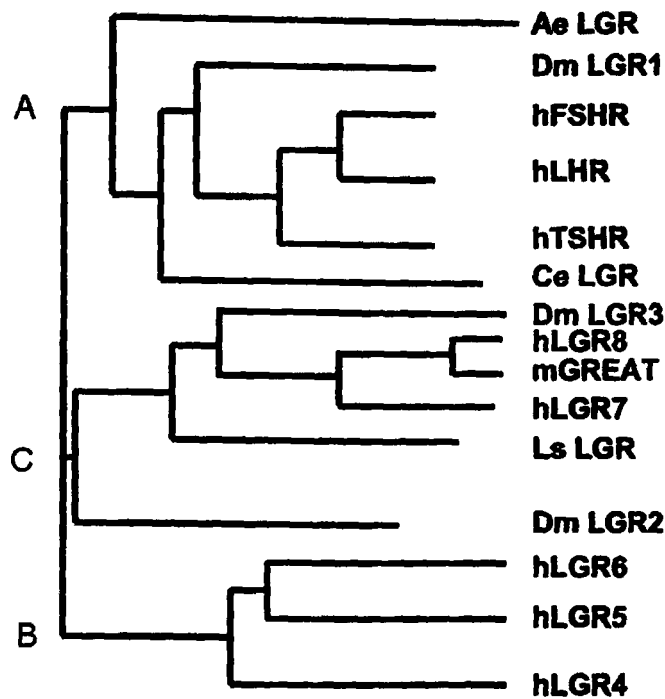


νεύρωσης του κρεμαστήρα μύος και του ορχικού οίακα είναι απαραίτητη για τη φυσιολογική ορχική κάθοδο.¹ Επιπλέον, υπάρχει τουλάχιστον ένα ακόμη παράδειγμα συσχέτισης μεταξύ κρυσορχίας, λευκών στιγμάτων και διαταραχών συμπεριφοράς, που υποδηλώνει υποκείμενη ανωμαλία του νευρικού συστήματος. Αυτή η συσχέτιση έχει περιγραφεί σε αλεπούδες ομόζυγες για μια ημι-επικρατητική μετάλλαξη του γονιδίου STAR.⁴⁰¹ Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα παραπάνω, θα μπορούσε να υποθετηθεί ότι η μετάλλαξη *crsp* ίσως διαταράσσει με κάποιον τρόπο την ορθή λειτουργία των εμβρυικών κυττάρων της νευρικής ακρολοφίας με τελικό αποτέλεσμα την ταυτόχρονη εμφάνιση κρυσορχίας και λευκών στιγμάτων.

Η τρανσγενετική ενσωμάτωση της μετάλλαξης *crsp* και η ολοκλήρωση του πειραματικού μοντέλου συνοδεύεται από απαλοιφή μιας περιοχής μεγέθους περίπου 550 kb στο άκρο του χρωμοσώματος 5 κοντά στο γονίδιο *Brcal*, το οποίο αντιστοιχεί στην περιοχή 13q12-13 του ανθρώπινου γενώματος.⁴⁰² Η ταυτοποίηση της αλληλουχίας της προσβεβλημένης περιοχής (sequencing), οδήγησε στην ανίχνευση ενός νέου γονιδίου. Το γονίδιο αυτό ονομάστηκε *Great*, αποτελείται από 18 εξώνια και κωδικοποιεί ένα συζευγμένο με μια πρωτεΐνη G υποδοχέα που σχετίζεται με την ορχική κάθοδο και ονομάζεται mGREAT⁽¹⁾ (mouse GREAT).⁸ Η έκφραση του γονιδίου *Great* περιορίζεται στον όρχι, τον εγκέφαλο και τους σκελετικούς μύες, αλλά τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης παρατηρούνται στον ορχικό οίακα.⁸ Απαλοιφή αυτού του γονιδίου οδηγεί σε αναστολή της διακοιλιακής φάσης της ορχικής καθόδου στον ποντικό ταυτόσημη με αυτή που παρατηρείται στο μοντέλο *Ins13^{-/-}*,⁴⁰⁸ ενώ μεταλλάξεις του είναι υπεύθυνες για την υψηλή ενδοκοιλιακή θέση των όρχεων στο τρανσγενετικό στέλεχος *crsp^{+/+}* συνεπεία της αποτυχημένης διαφοροποίησης των ορχικών οιάκων.³⁹⁵

⁽¹⁾ Η mGREAT είναι ένας υποδοχέας συζευγμένος με μια πρωτεΐνη G πλούσιος σε επαναλήψεις λευκίνης (Leucine-rich repeat (LRRs)-containing G protein-coupled Receptor-LGR). Οι LGRs χαρακτηρίζονται από την παρουσία επτά διαμεμβρανικών τμημάτων και ενός σχετικά μεγάλου εξωκυττάρου τμήματος (ectodomain) στο οποίο εντοπίζονται οι LRRs οι οποίες σχηματίζουν μια πεταλοειδή δομή που θεωρείται σημαντική για τη δέσμευση γλυκοπρωτεϊνικών ορμονών.⁴⁰³⁻⁴⁰⁵ Η mGREAT ανήκει στην ίδια υποομάδα των LGRs με έναν αντίστοιχο της μύγας των φρούτων *Drosophila melanogaster* (DmLGR3), έναν του σαλιγκαριού των λιμνών *Lymnaea stagnalis* (LsLGR) και δύο του ανθρώπου (LGR7 και LGR8)⁹ (Εικόνα 25). Πρόσφατα έχει προταθεί η μετονομασία των LGR7 και LGR8 σε RXFP 1 και 2 αντίστοιχα (Relaxin Family Peptide Receptors-Υποδοχείς πεπτιδίων οικογένειας της ριλαξίνης).⁴⁰⁷

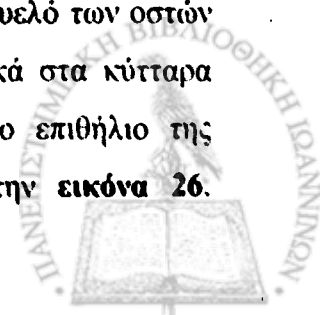




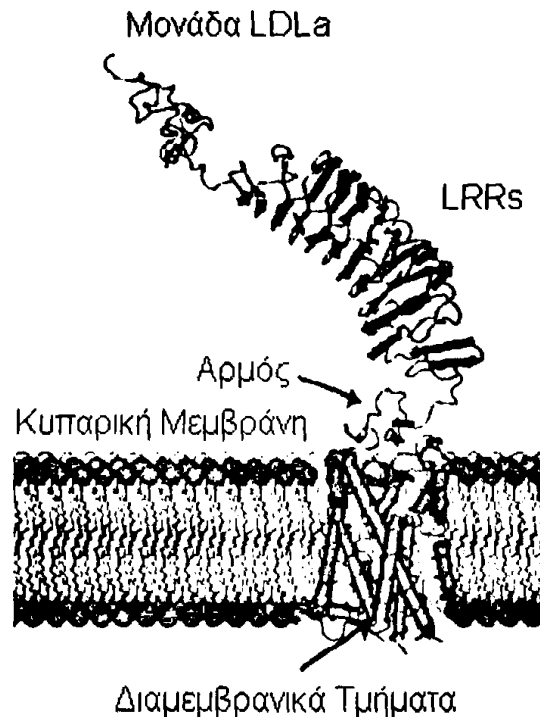
Εικόνα 25. Φυλογενετική σχέση των LGRs θηλαστικών και ασπονδύλων. Μελέτες διαφόρων ειδών καταλήγουν στο ότι τρεις τύποι LGRs (A, B και C) εμφανίστηκαν κατά τη διάρκεια της πρώιμης εξέλιξης των μεταζώων, πριν την εμφάνιση των σπονδυλωτών και των νηματωδών.³⁹⁵ Οι τρεις αυτοί τύποι παρουσιάζουν διαφορές στα χαρακτηριστικά του εξωκυτταρίου τμήματός και του τμήματος δίκην αρμού (βλέπε παρακάτω) που συνδέει το εξωκυτταριο τμήμα με τις LRRs. LH, FSH, TSH: γοναδοτροφίνες και θυρεοτροφίνη του ανθρώπου, LGR4-8 υποδοχείς στον άνθρωπο, Ae: θαλάσσια ανεμώνη *Anthopleura elegantissima*, Dm: μύγα των φρούτων *Drosophila melanogaster*, Ce: νηματώδης σκώληκας *Caenorhabditis elegans*, Ls: σαλιγκάρι των λιμνών *Lymnaea stagnalis*, mGREAT υποδοχέας στον ποντικό (τροποποιημένο από αναφορά 9).

Ο υποδοχέας του πεπτιδίου INSL3 έχει χαρακτηριστεί και σε άλλα θηλαστικά όπως ο αρουραίος,⁴⁰⁹ ο σκύλος⁴¹⁰ και ο άνθρωπος.^{9,10} Το ανθρώπινο ορθόλογο γονίδιο του Great είναι ο LGR8 με 82% συνολική ταύτιση σε επίπεδο νουκλεοτιδίων και αμινοξέων και ίδια δομή εξωνίων-εσωνίων.^{9,394} Η μεταγραφή του γονιδίου LGR8 επηρεάζεται *in vitro* από τον SF1, η επίδραση του οποίου ωστόσο είναι ηπιότερη από αυτήν επί του προαγωγέα του INSL3 και πιθανότατα έμμεση.³⁷⁰

Η έκφραση του LGR8 στον άνθρωπο έχει ανιχνευτεί σε διάφορους ιστούς όπως: μήτρα, εγκέφαλο, νεφρό, θυρεοειδή, μύες, περιφερικό αίμα, μυελό των οστών και όρχι.⁹ Στον όρχι, ο υποδοχέας έχει ανιχνευτεί ανοσοϊστοχημικά στα κύτταρα Leydig, σπερματοκύτταρα και σπεματίδες καθώς επίσης και στο επιθήλιο της επιδιδυμίδας.⁴⁰⁷ Η δομή του υποδοχέα LGR8 παρουσιάζεται στην εικόνα 26.

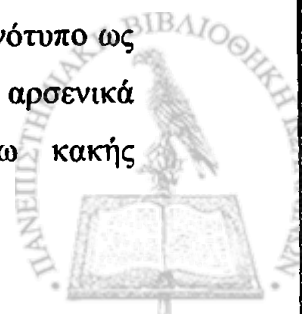


Πρόσφατα έχει αποδειχθεί ότι η πρωτεΐνη INSL3 ενεργοποιεί *in vitro* ειδικά τους υποδοχείς GREAT/LGR8 στο ορχικό οίακα μέσω της οδού αδενυλικής κυκλάσης επάγοντας υπερπλασία των κυττάρων του.¹⁰



Εικόνα 26. Σχηματική αναπαράσταση της δυναμικής δομής των υποδοχέων LGR7 και LGR8 (LGR C). Τα κύρια στοιχεία της δομής τους είναι α) τα επτά πτυσσόμενα διαμεμβρανικά τμήματα, β) η περιοχή δίκην αρμού, γ) το εξωκυττάριο τμήμα με τις 10 πλούσιες σε λευκίνη αλληλουχίες (Leucine-rich repeat (LRRs)) και δ) η μονάδα χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης τύπου A (LDLa) στο αμινοτελικό άκρο. Οι τύποι LGR A και B περιέχουν 9 και 17 LRRs αντίστοιχα. Η ιδιαίτερη διάταξη της περιοχής δίκην αρμού, το πλήθος των LRRs, καθώς και η παρουσία της LDLa χαρακτηρίζει τους LGRs τύπου C από τους τύπους A και B. Η LDLa είναι κρίσιμη για την αγωγή των σημάτων του υποδοχέα (receptor signaling) μετά την ενεργοποίηση του από τον αγωνιστή⁴¹¹ και όχι με αυτή καθαυτή τη σύνδεση του με τον αγωνιστή, ενώ φέρει ένα ιόν Ca^{2+} που είναι απαραίτητο για την ορθότητα και σταθερότητα της δομής της⁴¹² (τροποποιημένο από αναφορά 407).

Αξίζει να σημειωθεί ότι ο LGR8 είναι ο μοναδικός υποδοχέας της πρωτεΐνης INSL3 *in vivo* όπως αποδείχθηκε πρόσφατα αφού σε τρανσγενετικά ποντίκια Tg(Insl2-Insl3) η απαλοιφή του γονιδίου Great οδηγεί σε φυσιολογικό φαινότυπο ως προς τη θέση των ωοθηκών και τη γονιμότητα στα θηλυκά, ενώ στα αρσενικά προκαλείται υψηλή ενδοκοιλιακή κρυπορχία αμφοτερόπλευρα λόγω κακής



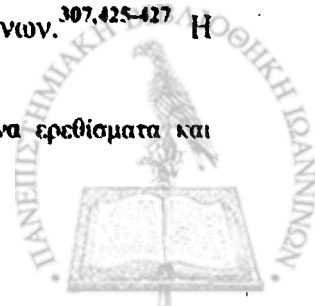
διαφοροποίησης του ορχικού οίακα.¹¹ Ο υποδοχέας συνδέεται ασθενέστερα με τις ριλαξίνες H1 και H2 και πολύ λιγότερο με την H3,⁴⁰⁷ ενώ όταν ενεργοποιείται χρησιμοποιεί διαφορετικές οδούς από τον LGR7 για τη μεταβίβαση των σημάτων⁴¹³ και συγκεκριμένα φαίνεται ότι εκτός από την οδό της αδενυλικής κυκλάσης (cAMP-PKA) χρησιμοποιεί και την οδό p38/JNK.⁽¹⁾⁴¹⁴

Ο υποδοχέας LGR8 διαθέτει δύο περιοχές δέσμησης, μία περιοχή υψηλής συνάφειας που εντοπίζεται στο εξωκυττάριο τμήμα του πιθανόν εντός της περιοχής των LRRs και μία χαμηλότερης συνάφειας στο διαμεμβρανικό του τμήμα⁴¹⁵ (Εικόνα 27). Είχε αρχικά προταθεί ένα μοντέλο διφασικής ενεργοποίησης του υποδοχέα, σύμφωνα με το οποίο, η σύνδεση του αγωνιστή με την περιοχή υψηλής συνάφειας του υποδοχέα προκαλεί αλλαγή της διαμόρφωσης του μορίου, καθιστώντας δυνατή την επακόλουθη αλληλεπίδραση του αγωνιστή με την περιοχή χαμηλής συνάφειας με αποτέλεσμα την πλήρη ενεργοποίηση και σταθεροποίηση του υποδοχέα.⁴¹⁶ Πρόσφατα ωστόσο, προτάθηκε η προσθήκη στο παραπάνω μοντέλο και ενός τρίτου σταδίου κατά το οποίο η LDLa διαβιβάζει τα μηνύματα του πλήρως ενεργοποιημένου υποδοχέα μέσω ενός άγνωστου μηχανισμού (μοντέλο τριφασικής ενεργοποίησης)⁴¹¹ (Εικόνα 28).

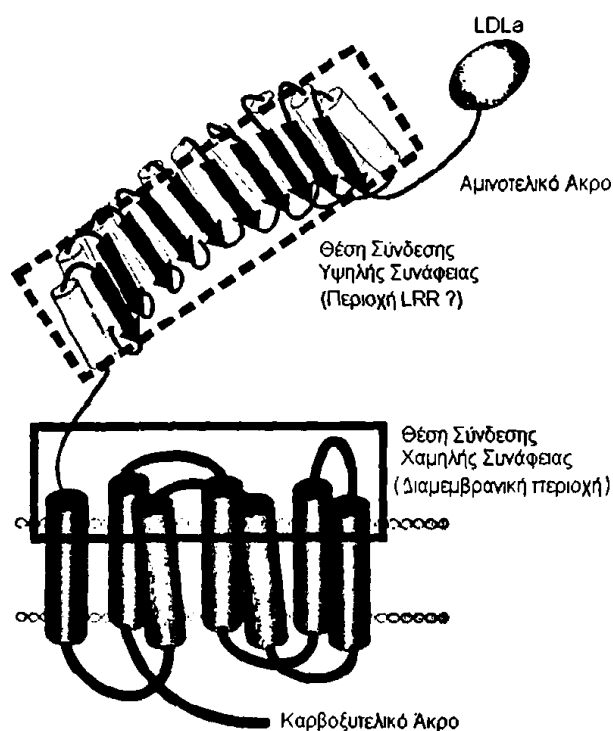
Οι παρατηρήσεις ότι α) η ενδομήτρια έκθεση τρωκτικών και ανθρώπων σε εξωγενή οιστρογόνα^{305,306,417-421} και η έλλειψη της ορμόνης INSL3 στους ποντικούς^{6,7,422} επάγουν την εμφάνιση ενδοκοιλιακής κρυπορχίας αμφοτερόπλευρα καθώς επίσης ότι β) τα επίπεδα ελεύθερης οιστραδιόλης είναι υψηλότερα στο αίμα μητέρων κρυπορχικών αγοριών⁴²³ και γ) τα επίπεδα έκφρασης οιστραδιόλης είναι αυξημένα στον πλακούντα κρυπορχικών αγοριών συγκριτικά με τα αντίστοιχα παιδιών με φυσιολογικά τα έξω γεννητικά όργανα,⁴²⁴ οδήγησε στη διερεύνηση του ενδεχομένου ύπαρξης πιθανής σχέσης μεταξύ INSL3 και οιστρογόνων.

Η εμφάνιση κρυπορχίας μετά από ενδομήτρια έκθεση στο μη στεροειδές συνθετικό οιστρογόνο διαιθυλστυλβεστρόλη (DES) έχει προταθεί ότι οφείλεται σε αναστολή της ανάπτυξης του ορχικού οίακα,^{305,306} αλλά ο ακριβής μηχανισμός δεν είναι καλά κατανοητός. Έχει αποδειχθεί ότι τα οιστρογόνα αναστέλλουν την ανάπτυξη των εμβρυϊκών κυττάρων Leydig³⁰⁹ με μηχανισμό ανεξάρτητο από τη λειτουργία της εμβρυϊκής υπόφυσης και τη δράση των ανδρογόνων.^{307,425-427} Η

(1) Η οδός p38/JNK (c-Jun N-terminal kinases) ενεργοποιείται από στρεσογόνα ερεθίσματα και εμπλέκεται στην κυτταρική διαφοροποίηση και απόπτωση.⁴⁷



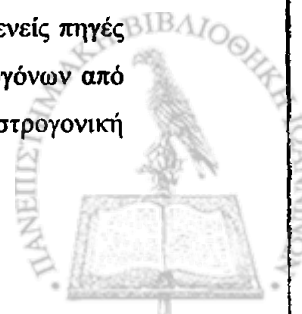
ενδομήτρια έκθεση σε οιστρογόνα αναστέλλει επίσης τη μεταγραφή του γονιδίου *Ins13* στα εμβρυϊκά κύτταρα Leydig^{420,428} και με αυτόν τον μηχανισμό ερμηνεύεται η απουσία αντίδρασης εξοίδησης του ορχικού οίακα και η εμφάνιση κρυσορχίας.⁽¹⁾ Συγκεκριμένα, η ενδομήτρια έκθεση εμβρύων ποντικού σε 17β-οιστραδιόλη κατά την εμβρυϊκή ημέρα 13,5 (ενδομήτρια ηλικία κατά την οποία επιτελείται η διαφοροποίηση των γονάδων που ακόμη βρίσκονται παρά τους νεφρούς) οδηγεί σε αναστολή της ενδοκοιλιακής φάσης της ορχικής καθόδου και ο ορχικός οίακας εμφανίζει θηλεοποίηση (μικρός μη ανεπτυγμένος κώνος, επιμηκυμένη χορδή).



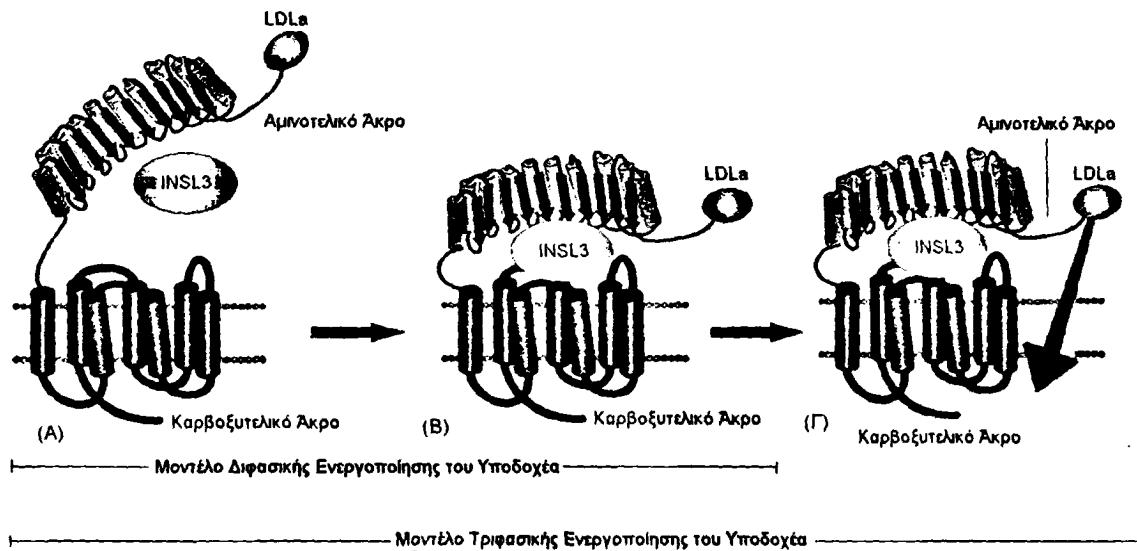
Εικόνα 27. Προτεινόμενες θέσεις σύνδεσης του υποδοχέα LGR8 (τροποποιημένο από αναφορά 416).

Η ανασταλτική επίδραση των οιστρογόνων στη μεταγραφή του γονιδίου *Ins13* πρέπει να είναι έμμεση. Φαίνεται ότι ασκείται δια του μεταγραφικού ελέγχου μέσω

⁽¹⁾ Τα παθολογικά υψηλά επίπεδα οιστρογόνων μπορούν να εξαντλήσουν τους φυσιολογικούς εμβρυϊκούς ρυθμιστικούς μηχανισμούς που ελέγχουν τη συγκέντρωση της ελεύθερης οιστραδιόλης, η οποία είτε παράγεται τοπικά από τα κύτταρα Sertoli,^{429,430} είτε συγκεντρώνεται από εξωγενείς πηγές στα κύτταρα Leydig.⁴³¹ Τέτοιοι μηχανισμοί είναι η αποτελεσματική δέσμευση των οιστρογόνων από την α-φετοπρωτεΐνη του ορού^{432,433} και η προαγωγή του καταβολισμού τους από την οιστρογονική θεική τρανσφεράση στα κύτταρα Leydig.^{434,435}



οιστρογονικών υποδοχέων, άλλων γονιδίων, τα οποία με τη σειρά τους ρυθμίζουν τη μεταγραφή του *Insl3*.⁴³⁶ Αυτό προκύπτει από το γεγονός ότι ο προαγωγέας του γονιδίου *Insl3* δεν εμφανίζει αλληλουχίες που να σχετίζονται εμφανώς με οιστρογόνο-αποκριτικά στοιχεία,³⁶² ενώ η επίδραση αυτή δεν φαίνεται να ασκείται μέσω του SF1.^{420,428} Προς το παρόν δεν είναι γνωστό ποιοι ακριβώς μεταγραφικοί παράγοντες και οδοί επηρεάζονται από τα διάφορα οιστρογόνα προς μείωση της γονιδιακής έκφρασης.⁴³⁷



Εικόνα 28. Μοντέλο διφασικής και τριφασικής ενεργοποίησης του υποδοχέα LGR8 από την ορμόνη INSL3. Α. Το πεπτιδίο αρχικά συνδέεται με την κύρια θέση δέσμευσης στην περιοχή των LRRs του εξωκυττάριου τμήματος του υποδοχέα. Β) Οι αλλαγές στη διαμόρφωση του υποδοχέα που επάγονται από το στάδιο Α επιτρέπουν την αλληλεπίδραση μεταξύ αγωνιστή και εξωκυττάριων αγκυλών των διαμεμβρανικών περιοχών (θέση χαμηλής συνάφειας) οπότε και ενεργοποιείται πλήρως ο υποδοχέας. Γ) Τα προηγούμενα γεγονότα οδηγούν σε τέτοια διαμόρφωση του υποδοχέα, η οποία επιτρέπει στην LDLa να διαβιβάσει το μήνυμα της ενεργοποίησης του υποδοχέα επάγοντας την ενδοκυττάρια συσσώρευση cAMP με άγνωστο μηχανισμό (τροποποιημένο από αναφορές 411 και 416).

Ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός ότι το γονίδιο *Insl3* επανεκφράζεται μέσα στην πρώτη εβδομάδα μετά τη γέννηση, πράγμα που σημαίνει ότι η μεταγραφή του έχει ανασταλεί μόνιμα στον πληθυσμό των εμβρυϊκών κυττάρων Leydig. Αντίθετα, η έκθεση ενηλίκων αρσενικών ζώων σε οιστρογόνα δεν αναστέλλει την έκφραση του γονιδίου.⁴²⁰ Αυτό δείχνει ότι η ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου διαφέρει μεταξύ εμβρυϊκού και ενηλίκου πληθυσμού των κυττάρων Leydig. Στα εμβρυϊκά κύτταρα

Leydig η έκφραση του γονιδίου είναι οισρογονο-ευαίσθητη και ανεξάρτητη από τις γοναδοτροφίνες, ενώ αντίθετα στα αντίστοιχα κύτταρα του ενήλικα η έκφραση δεν είναι οισρογονο-ευαίσθητη αλλά εξαρτάται από τις γοναδοτροφίνες.³⁸²

Εκτός όμως από τη DES, η μητρική έκθεση σε ορισμένους φθαλικούς εστέρες⁽¹⁾ κατά την κρίσιμη ενδομήτρια περίοδο της σεξουαλικής διαφοροποίησης οδηγεί εκτός των άλλων σε ανώμαλη ανάπτυξη του ορχικού οίακα⁴³⁸ και κρυπορχία.⁴³⁹⁻⁴⁴² Αν και το κύτταρο Leydig φαίνεται ότι αποτελεί το κύριο στόχο κατά την ενδομήτρια έκθεση στις χημικές αυτές ουσίες, το κύτταρο Sertoli μπορεί επίσης να αποτελεί έναν άμεσο ή έμμεσο στόχο.⁴⁴³ Σχηματικά, η επίδραση του δι-π-βουτυλ-φθαλικού εστέρα (DBP) στο αναπτυσσόμενο ανδρικό αναπαραγωγικό σύστημα φαίνεται στην εικόνα 29 (σύνδρομο φθαλικών εστέρων). Το σύνδρομο αυτό έχει παραλληλιστεί με το «σύνδρομο ορχικής δυσγενεσίας» (testicular dysgenesis syndrome-TDS)⁽²⁾ αν και δεν έχει τεκμηριωθεί ακόμη αιτιολογική σχέση μετά από έκθεση σε φθαλικούς εστέρες στον άνθρωπο.⁴⁴⁵

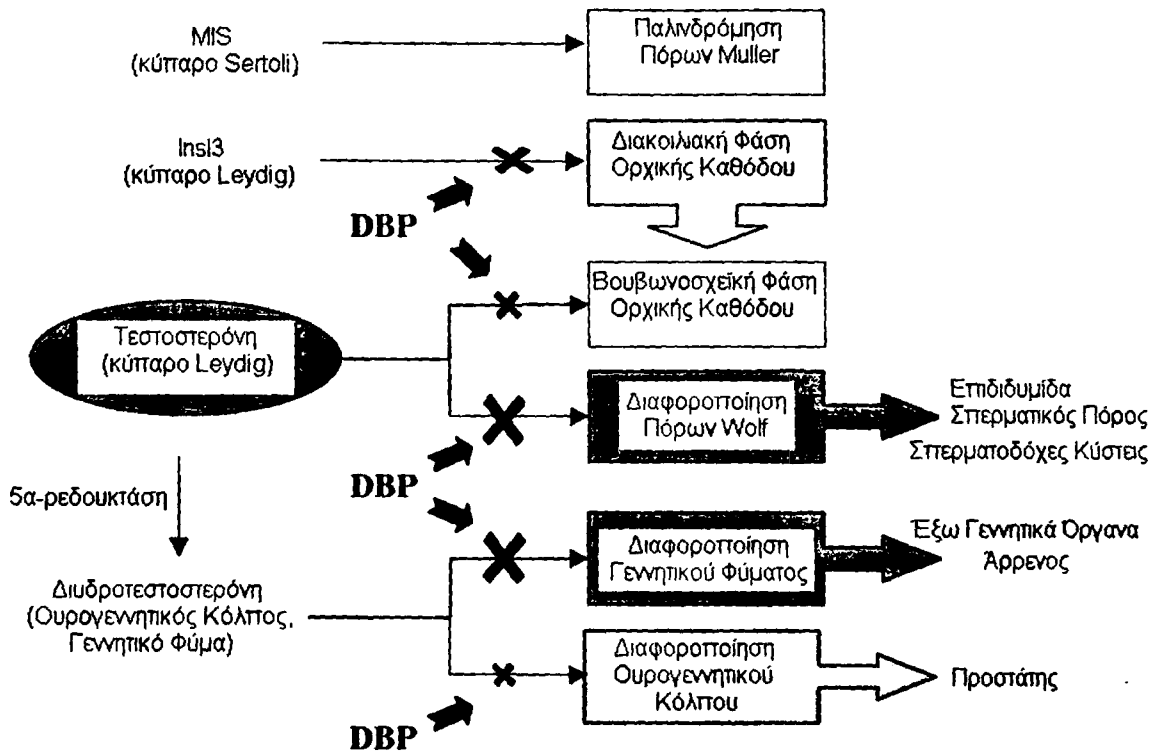
Έχει παρατηρηθεί ότι οι φθαλικοί μονο-εστέρες δεν δρουν μέσω οιστρογονικών υποδοχέων *in vivo*.⁴⁴⁶ Η αντι-ανδρογονική τους δράση είναι αποτέλεσμα διαταραχής της σύνθεσης τεστοστερόνης λόγω μείωσης της έκφρασης μεγάλου αριθμού εμπλεκόμενων γονιδίων⁴⁴⁷ όχι όμως λόγω άμεσης ανταγωνιστικής δράσης επί του ανδρογονικού υποδοχέα.^{448,449} Οι φθαλικοί εστέρες είναι οι μόνες ουσίες με αντι-ανδρογονική δράση που διαταράσσουν την ανάπτυξη και διαφοροποίηση του ορχικού οίακα προκαλώντας αγενεσία, η οποία σχετίζεται με μειωμένη έκφραση του γονιδίου *Ins13*.^{377,438} Έχει προταθεί ότι η διπλή αυτή βλαπτική επίδραση είναι αποτέλεσμα διαταραχής του παρακρινικού περιβάλλοντος του όρχεως

⁽¹⁾ Οι φθαλικοί εστέρες (phthalate esters) αποτελούν μια μεγάλη κατηγορία περιβαλλοντικών συνθετικών χημικών ουσιών με ευρεία παραγωγή και χρήση. Χρησιμοποιούνται ως προσθετικές ουσίες για την αύξηση της πλαστικότητας και ανθεκτικότητας διαφόρων σκληρών πλαστικών (plasticizers) όπως το πολυ-βινυλο-χλωρίδιο, καθώς και ως διαλύτες, στερεοποιητικές ουσίες, απορρυπαντικά και λιπαντικά.⁶⁷

⁽²⁾ Το σύνδρομο ορχικής δυσγενεσίας, δηλαδή η μη φυσιολογική ενδομήτρια ανάπτυξη των όρχεων λόγω δυσμενούς επίδρασης περιβαλλοντικών παραγόντων πιθανόν πάνω σε ένα γενετικά βεβαρημένο υπόστρωμα, έχει προταθεί ως υπόθεση για να ερμηνεύσει τη διαχρονική αύξηση της συχνότητας της υπογονιμότητας (πτωχή ποιότητα σπέρματος), της κρυπορχίας, του υποσπαδία και του καρκίνου των όρχεων από βλαστικά κύτταρα. Οι παθήσεις αυτές αποτελούν τις τέσσερις συνιστώσες του συνδρόμου, οι οποίες μπορεί να εμφανίζονται μεμονωμένα ή σε διάφορους συνδυασμούς.⁴⁴⁴



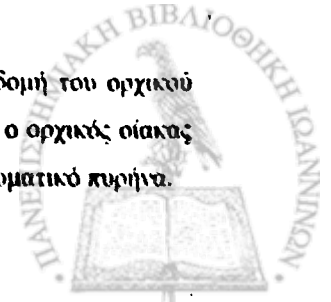
που επιτρέπει μεν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων Leydig (υπερπλασία) αλλά οδηγεί σε καθυστέρηση της ωρίμανσης τους με αποτέλεσμα την αδυναμία των κυττάρων να συνθέτουν τόσο στεροειδή όσο και πεπτιδικές ορμόνες.⁴³⁸



Εικόνα 29. Διαγραμματική αναπαράσταση της επίδρασης του δι-*n*-βουτυλ-φθαλικού εστέρα (DBP) στο αναπτυσσόμενο ανδρικό αναπαραγωγικό σύστημα μετά από την ενδομήτρια έκθεση στον αρουραίο, που οδηγεί στην εμφάνιση ενός συνόλου συγγενών ανωμαλιών στους απογόνους, που συνιστούν το «σύνδρομο φθαλικών εστέρων» (τροποποιημένο από αναφορές 411 και 416).

Με βάση όλα τα παραπάνω, ο έλεγχος της ανάπτυξης και διαφοροποίησης του ορχικού οίακα και επομένως η διακοιλιακή φάση της ορχικής καθόδου φαίνεται ότι καθοδηγείται από τη συνδυασμένη δράση της ορμόνης INSL3 επί του υποδοχέα της GREAT/LGR8 και επομένως βρίσκεται υπό τον έλεγχο των δύο αυτών γονιδίων. Καθώς το γονίδιο αυτό φαίνεται να είναι απαραίτητο για την ανάπτυξη του μεσεγχυματικού στοιχείου του ορχικού οίακα⁽¹⁾ και όχι του κρεμαστήρα μύος, το

⁽¹⁾ Το μεσεγχυματικό στοιχείο αποτελεί την προέχουσα (βλεννοπολυσακχαριδική) δομή του ορχικού οίακα στον άνθρωπο, το σκύλο και το χίτρο, σε αντίθεση με τα τρωκτικά στα οποία ο ορχικός οίακας αποτελείται πρωτίστως από κρεμαστήριες μυϊκές ίνες και δευτερευόντως από μεσεγχυματικό πυρήνα.



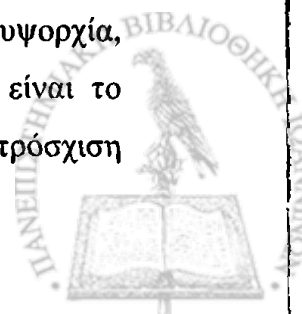
πάχος του οποίου φαίνεται να εξαρτάται από τη δράση της MIS και των οιστρογόνων,^{450,451} είναι λογικό να υποθετηθεί ότι η πρωτεΐνη INSL3 εμπλέκεται στην διακοιλιακή φάση της ορχικής καθόδου και στον άνθρωπο. Επιπλέον, η κρυπορχία που παρατηρείται στο αρσενικό *Ins13^{+/-}* ποντίκι θυμίζει πολλές περιπτώσεις κρυπορχίας στον άνθρωπο όπου η μερική κάθοδος του όρχι κατά τη γέννηση συχνά αυτοδιορθώνεται αργότερα.⁶

Το ερώτημα που εξακολουθεί να παραμένει αναπάντητο είναι εάν και κατά πόσο το σύστημα αυτής της ορμόνης-υποδοχέα παίζει κάποιο ρόλο στη δεύτερη (βουβωνο-οσχεϊκή) φάση της ορχικής καθόδου.⁴⁵² Η πιθανότητα αυτή δεν έχει αποκλειστεί καθώς υποστηρίζεται από διάφορα δεδομένα όπως: α) Ποντίκια *Ins13^{+/-}* παρουσιάζουν καθυστέρηση στην ορχική κάθοδο⁶ που υποδηλώνει ότι μετά τη συμπλήρωση της διακοιλιακής φάσης της ορχικής καθόδου, η ορμόνη INSL3 ίσως εξακολουθεί να παίζει κάποιο ρόλο, β) Ασθενείς που φέρουν τις ίδιες μεταλλάξεις στο γονίδιο *LGR8* παρουσιάζουν μεταβλητότητα ως προς τη θέση των όρχεων, η οποία ποικίλει από ετερόπλευρη φυσιολογική (ανασπώμενοι όρχεις) έως και αμφοτερόπλευρη ενδοκοιλιακή (βλέπε παρακάτω).⁵¹ Έτσι λοιπόν, παρόλο που τα δεδομένα από μελέτες σε ποντίκια «knockout» υποστηρίζουν ισχυρά το ρόλο «κλειδί» της πρωτεΐνης INSL3 στην ορχική κάθοδο, οριστική απόδειξη δεν υπάρχει ακόμη και επομένως η σημασία της στην παθοφυσιολογία της κρυπορχίας χρήζει περαιτέρω έρευνας.

4.2.3. Βουβωνο-οσχεϊκή φάση της ορχικής καθόδου

4.2.3.1. Ο ρόλος της ενδοκοιλιακής πίεσης και του ορχικού οίακα

Η δεύτερη φάση της ορχικής καθόδου, δηλαδή η βουβωνο-οσχεϊκή φάση, θεωρείται σήμερα ότι ρυθμίζεται από ένα συνδυασμό μηχανικών και ορμονικών παραγόντων. Υποτίθεται ότι η ενδοκοιλιακή πίεση που προέρχεται από την ανάπτυξη των σπλάγγων,²⁶³⁻²⁶⁵ σε συνδυασμό με δυναμικές μεταβολές στη μορφολογία και σύσταση του ορχικού οίακα συμβάλλουν στην ώθηση των όρχεων προς τα κάτω δια του βουβωνικού καναλιού.¹ Η ενδοκοιλιακή πίεση ίσως παίζει κάποιο βοηθητικό ρόλο στη διακοιλιακή φάση της ορχικής καθόδου επίσης, αλλά στη συνέχεια ο ρόλος της φαίνεται να είναι πιο ουσιαστικός.^{265,453} Καταστάσεις που οδηγούν σε κρυπορχία, και υποθετικά σχετίζονται αιτιολογικά με μειωμένη ενδοκοιλιακή πίεση είναι το σύνδρομο «prune-belly», η αμαρική εκτροφία, η ομφαλοκήλη, η γαστροσχισση

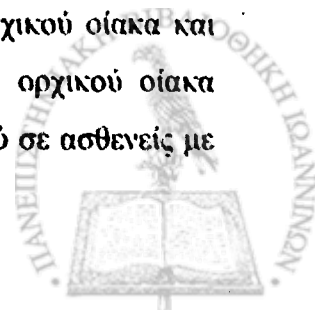


καθώς και ένας αριθμός άλλων συνδρόμων που περιλαμβάνουν μεταξύ άλλων κρυπορχία σε συνδυασμό με αγενεσία ή συγγενή ελλείμματα του μυϊκού κοιλιακού τοιχώματος.^{454,455} Ωστόσο, έχει αποδειχθεί πειραματικά ότι ένα ορχικό ένθεμα σιλικόνης κατέρχεται σπανιότερα στο όσχεο υπό την επίδραση της ενδοκοιλιακής πίεση επί απουσίας ανδρογόνων.²⁶³ Η ενδοκοιλιακή πίεση από μόνη της δε φαίνεται να επαρκεί για την ολοκλήρωση αυτής της φάσης.

Ο ρόλος του ορχικού οίακα στη βουβωνο-οσχεική φάση της ορχικής καθόδου παραμένει αντιφατικός. Η παλινδρόμηση του ογκώδους βολβού θεωρείται από κάποιους ικανή για να επιτρέψει στον όρχι να προσεγγίσει το όσχεο.^{244,253,254} Ωστόσο, τόσο στον άνθρωπο²⁵⁰ όσο και στα τρωκτικά,⁴⁵⁶ έχει παρατηρηθεί μια σημαντική ενεργός μεταναστευτική φάση του ορχικού οίακα, η οποία ωστόσο έχει αμφισβητηθεί από ερευνητές που υποστηρίζουν τη θεωρία της παλινδρόμησης και αναστροφής του κώνου του οίακα.^{251,262,457} Πρόσφατα προτάθηκε ότι τα κύτταρα του βολβού του ορχικού οίακα υπερπλάσσονται ενεργά στα τρωκτικά μετά τη γέννηση τους και πιθανόν διαφοροποιούνται προς νέα μυοκύτταρα κρεμαστήρα.⁴⁵⁸ Αντίθετα στον άνθρωπο φαίνεται ότι ο συνδετικός ιστός του ορχικού οίακα υφίσταται εκτεταμένη ανακατασκευή κατά τη διάρκεια της ορχικής καθόδου που οδηγεί τελικά σε μετατροπή του οίακα σε μια κατά βάση ινώδη δομή, πλούσια σε κολλαγόνο και ελαστικές ίνες.⁴⁵⁹ Τέτοιου είδους μεταβολές οδηγούν σε μείωση του μεγέθους του οίακα και επομένως πιθανόν συμβάλλουν μαζί με άλλες δυνάμεις στην κίνηση του όρχι προς το όσχεο. Η ενεργός σύσπαση του οίακα φαίνεται λιγότερο πιθανή στον άνθρωπο λόγω της έλλειψης και της περιορισμένης παρουσίας λείων και γραμμωτών μυϊκών ινών αντίστοιχα.

4.2.3.2. Ο ρόλος των ανδρογόνων

Υπάρχει γενικά ομοφωνία ως προς το ότι η βουβωνο-οσχεική φάση της ορχικής καθόδου είναι ανδρογονοεξαρτώμενη.^{170,252,304} Μετανάστευση του ορχικού οίακα πέραν της βουβωνικής περιοχής απουσιάζει σε ποντίκια με έλλειψη γοναδοτροφινών⁴²⁶ ή ορχική θηλεοποίηση καθώς και σε ασθενείς με CAIS.²⁷⁴ Επιπλέον, το 50% περίπου των πειραματοζώων που υποβάλλονται ενδομήτρια σε φλουταμίδη εμφανίζουν αποδιοργάνωση της μετανάστευσης του ορχικού οίακα και όψιμη υποστροφή του.^{275,276,460-462} Η υποστροφή του βολβού του ορχικού οίακα φαίνεται ότι είναι συνέπεια της απουσίας ανδρογονικής δράσης αφού σε ασθενείς με

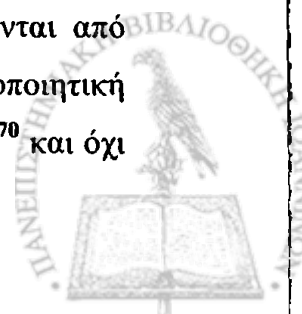


CAIS ο ορχικός οίακας παραμένει επιμηκυμένος ενώ αποτυγχάνει η προσρόφηση εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας.^{310,457}

Η δράση των ανδρογόνων επί του ορχικού οίακα μπορεί να είναι άμεση ή έμμεση αλλά ο ακριβής μηχανισμός παραμένει αντιφατικός. Ωστόσο, αρκετά δεδομένα συνηγορούν υπέρ μιας έμμεσης μάλλον δράσης προκειμένου να διεξαχθεί η βουβωνο-οσχεική φάση της ορχικής καθόδου. Τα δεδομένα αυτά συνοψίζονται ως ακολούθως: α) Ανδρογονικοί υποδοχείς έχουν ανιχνευτεί στον κρεμαστήρα μυ αλλά όχι στον ορχικό οίακα του ανθρώπου.⁴⁶³ Ωστόσο, οι μελέτες αυτές δεν αφορούν σε εμβρυικούς ιστούς και επομένως δεν είναι γνωστό επί του παρόντος εάν ο ανδρογονικός υποδοχέας εκφράζεται στον ορχικό οίακα ή στον κρεμαστήρα μυ κατά την εμβρυϊκή περίοδο πραγματοποίησης της βουβωνο-οσχεικής φάσης της ορχικής καθόδου. β) Ανδρογονικοί υποδοχείς έχουν ανιχνευτεί σε καλλιέργειες ινοβλαστών ορχικού οίακα χοίρου,⁴⁶⁴ ωστόσο η συνολική συγκέντρωση καθώς και η δεσμευτική συνάφεια και ικανότητα τους έχει βρεθεί ότι είναι σημαντικά χαμηλότερη αυτής που ανιχνεύεται σε αναγνωρισμένους ιστούς-στόχους ανδρογόνων όπως ο προστάτης και η ουρήθρα, ενώ είναι συγκρίσιμη με αυτή των γραμμωτών μυών άρρενος και θήλεως.^{291,465} γ) Η δραστηριότητα του ενζύμου 5α-ρεδουκτάση αναφέρεται ότι παραμένει σταθερή καθόλη τη διάρκεια της κύησης στον ορχικό οίακα του χοίρου, σε επίπεδα χαμηλότερα από αυτά που ανιχνεύονται στον προστάτη ή στην ουρήθρα.⁴⁶⁶ δ) Τα επίπεδα έκφρασης των ανδρογονικών υποδοχέων στο μεσεγχυματικό πυρήνα του ορχικού οίακα του αρουραίου μειώνονται προοδευτικά κατά τη διάρκεια της βουβωνο-οσχεικής φάσης της ορχικής καθόδου.²⁹⁰ ε) Τέλος αναφέρεται επίσης ότι η συνολική ποσότητα ανδρογόνων που δεσμεύονται στον νεογνικό ορχικό οίακα του αρουραίου αποτελεί το 20% της αντίστοιχης μετρούμενης ποσότητας στον ουρογεννητικό κόλπο.⁴⁶⁷

4.2.3.3. Η υπόθεση του αιδοιομηρικού νεύρου

Σύμφωνα με την υπόθεση αυτή, η μετανάστευση του ορχικού οίακα στο όσχεο κατά τη βουβωνο-οσχεική φάση της ορχικής καθόδου επιτυγχάνεται δια της έμμεσης κυρίως μεσολάβησης των ανδρογόνων μέσω του αιδοιομηρικού νεύρου.^{456,468,469} Συγκεκριμένα τα κυκλοφορόντα ανδρογόνα που εκκρίνονται από τους όρχεις δεν δρουν άμεσα επί του ορχικού οίακα αλλά ασκούν αρρενοποιητική επίδραση επί του αισθητικού πυρήνα του νεύρου (O1-O2 νωτιαία γάγγλια)⁴⁷⁰ και όχι



επί του κινητικού πυρήνα όπως είχε αρχικά προταθεί.⁴⁶⁹ Η ειδική αναζήτηση του υποδοχέα των ανδρογόνων στην οσφυϊκή μοίρα του νωτιαίου μυελού σε έμβρυα αρουραίου καταδεικνύει ανδρογονική δέσμευση ήδη από την 15^η ημέρα της κύησης⁴⁷¹ ενισχύοντας την άποψη περί ανδρογονικής επαγωγής της διαφοροποίησης του αιδοιομηρικού νεύρου και του πυρήνα του. Ως αποτέλεσμα αυτής της ανδρογονικά επαγόμενης διαφοροποίησης, οι τελικές αισθητικές απολήξεις του νεύρου συνθέτουν και απελευθερώνουν ένα ειδικό νευρομεταβιβαστή, το σχετιζόμενο με το γονίδιο της καλσιτονίνης πεπτίδιο (calcitonin gene-related peptide (CGRP)).⁴⁷²⁻⁴⁷⁴ Έχει προταθεί ότι το πεπτίδιο αυτό δράντας ως δεύτερος αγγελιαφόρος (second messenger) διαβιβάζει το μήνυμα της ανδρογονικής διέγερσης επί του οίακα και επάγοντας την ανάπτυξη και τη χημειοτακτική μετανάστευσή του από τη βουβωνική περιοχή στο όσχεο καθοδηγεί τη βουβωνο-οσχεϊκή φάση της ορχικής καθόδου.⁴⁶⁹

Η παραπάνω υπόθεση προέρχεται αρχικά από τον Lewis,⁴⁶⁸ ο οποίος κατάφερε να αναστείλει την ορχική κάθοδο σε νεογέννητους αρουραίους διατέμνοντας το αιδοιομηρικό νεύρο στα πλαίσια ελέγχου της «θεωρίας της έλξης».⁽¹⁾ Η βασική ιδέα πίσω από την υπόθεση είναι η εξής: εφόσον ο κρεμαστήρας μυς νευρώνεται από το αιδοιομηρικό νεύρο διατομή του νεύρου θα οδηγήσει σε παράλυση του μυός με αποτέλεσμα την αναστολή της ορχικής καθόδου. Ωστόσο, αρκετοί ερευνητές έχουν επικρίνει τα συγκεκριμένα πειραματικά δεδομένα και συμπεράσματα με τη λογική ότι η σύσπαση του κρεμαστήρα έλκει τον όρχι προς τη βουβωνική περιοχή παρά προς το όσχεο. Παρόλα αυτά είναι αξιοπερίεργο ότι η απονεύρωση του συγκεκριμένου μυ μπλοκάρει μια ανδρογόνο-εξαρτώμενη διαδικασία και έτσι δημιουργήθηκε η υπόθεση ότι τα ανδρογόνα δρουν μέσω του αιδοιομηρικού νεύρου.⁴⁶⁹ Τα ανδρογόνα θα πρέπει να ασκούν επίδραση (αρρενοποίηση) επί του αιδοιομηρικού νεύρου κατά τη διάρκεια της ενδομήτριας ζωής⁴⁶⁹ αφού ακόμη και σε είδη που εμφανίζουν μετανάστευση του ορχικού οίακα μετά τη γέννηση, το νευρικό σύστημα θα πρέπει να έχει προηγουμένως κατάλληλα τροποποιηθεί. Αν και η βουβωνο-οσχεϊκή φάση της ορχικής καθόδου επιτελείται μετά τη γέννηση στα τρωκτικά, αναστολή αυτής μπορεί να προκληθεί μόνο μετά από προγεννητική έκθεση σε αντιανδρογόνα.^{271,275,276,460,461}

Η υπόθεση του αιδοιομηρικού νεύρου είναι συμβατή με τα αποτελέσματα της περιφερικής διατομής του ορχικού οίακα σε νεογέννητους αρουραίους που οδηγεί σε

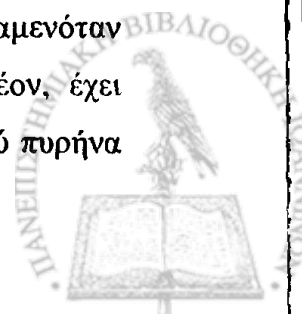
⁽¹⁾ Σύμφωνα με τη θεωρία αυτή, η κάθοδος του όρχεως στο όσχεο είναι συνέπεια της έλξης που ασκεί επί του όρχι ο κρεμαστήρας μυς.



αναστολή της μετανάστευσης του συνδέσμου και της βουβωνο-οσχεϊκής φάσης της ορχικής καθόδου μετά τη γέννηση λόγω κατάργησης της νεύρωσης του οίακα. Αντίθετα, η κεντρική διατομή του οίακα δεν παρεμποδίζει την ολοκλήρωση της βουβωνο-οσχεϊκής κάθοδου^{475,476} λόγω διατήρησης τη νεύρωση αφού οι ίνες του αιδοιομηρικού νεύρου εισέρχονται και εφοδιάζουν το σύνδεσμο από την οπισθοουραία επιφάνεια του.^{260,477} Επιπλέον, σύμφωνα με την υπόθεση αυτή, οι διάφορες ανωμαλίες του νευρικού συστήματος που επηρεάζουν τον πυρήνα του αιδοιομηρικού νεύρου συσχετίζονται με την κρυσορχία. Αυτό ισχύει πράγματι στις περιπτώσεις με δισχιδή ράχη, ιδίως όταν η μνηιγομυελοκήλη εντοπίζεται ψηλά στην οσφυϊκή περιοχή δηλαδή άνωθεν του Ο4 όπου εδρεύει ο πυρήνας του αιδοιομηρικού νεύρου.⁴⁷⁸ Παρόμοια αποτελέσματα προκύπτουν σε νεογέννητους αρουραίους μετά από διατομή του νωτιαίου μυελού στο επίπεδο της χαμηλής θωρακικής-υψηλής οσφυϊκής περιοχής, οπότε παρατηρείται κρυσορχία σε ποσοστό 75%.⁴⁷⁸

Ο ρόλος του αιδοιομηρικού νεύρου και του νευρομεταβιβαστή του CGRP έχει πλέον καλά τεκμηριωθεί.^{468,472-476,479-484} Ωστόσο, ο ακριβής μηχανισμός μέσω του οποίου τα κυκλοφορόντα ανδρογόνα δρουν επί του νεύρου δεν είναι ακόμη απόλυτα γνωστός. Η φλουταμίδη φαίνεται ότι αναστέλλει την αρρενοποίηση του νεύρου όταν χορηγηθεί σε μια κρίσιμη περίοδο της ανάπτυξης στον αρουραίο (16^η-19^η ημέρα της κύησης).⁴⁶⁰ Επιπλέον, στα ίδια πειραματόζωα έχει καταδειχθεί σημαντική μείωση της νευρωνικής διαμέτρου και του αριθμού των εμμύελων νευραξόνων του νεύρου ομόπλευρα προς την κρυσορχία.⁴⁸⁵

Προηγούμενες μελέτες εστίαστηκαν στον κινητικό πυρήνα του αιδοιομηρικού νεύρου (Ο1-Ο2) ως πρωτεύοντα στόχο των κυκλοφορόντων ανδρογόνων.^{269,460,486-488} Ωστόσο υπάρχουν πολλές ενδείξεις υπέρ της προέλευσης του CGRP από τον αισθητικό πυρήνα του νεύρου. Έχει αποδειχθεί ότι ο κινητικός πυρήνας παρουσιάζει φυλετική διμορφία στους αρουραίους,⁴⁸⁹ ωστόσο αν και η προγεννητική έκθεση σε αντι-ανδρογόνα μειώνει τον αριθμό των κυτταρικών σωμάτων στα αρσενικά ζώα, η μείωση αυτή δεν είναι τέτοια ώστε να προσεγγίζονται τελικά οι αριθμοί των θηλυκών ζώων.⁴⁸⁶ Η φυλετική διμορφία του κινητικού πυρήνα εξαφανίζεται στο νεογέννητο αρουραίο μετά από προγεννητική χορήγηση φλουταμίδης, όχι όμως εξαιτίας σημαντικής μείωσης των κυτταρικών σωμάτων στα αρσενικά ζώα όπως αναμενόταν αλλά λόγω αύξησης του αριθμού στα θηλυκά πειραματόζωα.⁴⁶⁰ Επιπλέον, έχει υποστηριχτεί ότι τα ανδρογόνα δεν έχουν καμία επίδραση επί του κινητικού πυρήνα

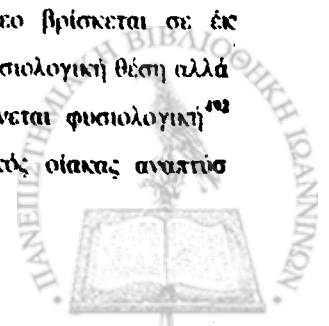


του νεύρου αφού τόσο στους αρουραίους²⁶⁹ όσο και στους ποντικούς⁴⁸⁸ με ορχική θηλεοποίηση, ο αριθμός των κινητικών πυρήνων δε διαφέρει σημαντικά από τα αντίστοιχα φυσιολογικά πειραματόζωα, ενώ επιπλέον έχει βρεθεί ότι οι κινητικοί πυρήνες στον αρουραίο στερούνται ανοσοδραστικότητας CGRP.^{269,490,491}

Ο αισθητικός πυρήνας του αιδοιομηρικού νεύρου (γάγγλια των O1-O2 οπισθίων ριζών) παρουσιάζει φυλετική διμορφία.⁴⁷⁰ Στον αισθητικό πυρήνα του αιδοιομηρικού νεύρου ομόπλευρα προς την κρυσορχία στο «υπεροσχεϊκό» στέλεχος αρουραίου⁽¹⁾ ανιχνεύεται αυξημένη συγκέντρωση CGRP συγκριτικά με τον ετερόπλευρο πυρήνα⁴⁹⁴ ενώ αντίθετα στον ορχικό οίακα του ίδιου στελέχους ο αριθμός των υποδοχέων του πεπτιδίου είναι ελαττωμένος και δεν παρατηρούνται πρακτικά ρυθμικές συσπάσεις μετά από εξωγενή χορήγηση CGRP.^{474,483} Ωστόσο, μετά από διατομή του αιδοιομηρικού νεύρου ή μετά από εκλεκτική αισθητική απονεύρωση με καψαΐσίνη, η οποία εξαντλεί τα αποθέματα CGRP από τις νευρικές απολήξεις, αποκαθίσταται η συσπαστικότητα του οίακα στην εξωγενή χορήγηση του πεπτιδίου σε καλλιέργειες οργάνων.^{480,483} Αυτό οφείλεται στην αύξηση του αριθμού των αντίστοιχων υποδοχέων στο ορχικό σύνδεσμο εξαιτίας της διακοπής ενδογενούς τροφοδοσίας CGRP (secondary up-regulation).¹

Υπάρχουν πολλά δεδομένα που υποστηρίζουν το ρόλο του CGRP στη διέγερση και μετανάστευση του αναπτυσσόμενου ορχικού οίακα. Καταρχήν έχουν ταυτοποιηθεί υποδοχείς υψηλής συνάφειας του πεπτιδίου στον αναπτυσσόμενο ορχικό οίακα τρωκτικών.^{484,495} Το πεπτίδιο επίσης επάγει την αύξηση και διαφοροποίηση σε μυογενείς κυτταροκαλλιέργειες.^{496,497} Οι ορχικοί οίακες νεογέννητων αρουραίων εμφανίζουν σε καλλιέργειες οργάνων δόσο-εξαρτώμενη απόκριση στην εξωγενή χορήγηση CGRP υπό μορφή ρυθμικών συσπάσεων, οι οποίες μπορεί να παίζουν σημαντικό ρόλο στη διαδικασία μετανάστευσης του οίακα νινο.⁴⁷²⁻⁴⁷⁴ Προηγηθείσα διατομή του αιδοιομηρικού νεύρου οδηγεί ευαισθητοποίηση του ορχικού οίακα στην εξωγενή χορήγηση CGRP,⁴⁸¹ η οποία είναι συμβατή με αντίστοιχη ευαισθητοποίηση (up-regulation) των υποδοχέων¹

⁽¹⁾ Το μεταλλαγμένο αυτό στέλεχος αποτελεί φυσικό συγγενές μοντέλο κρυσορχίας. Φέρει το όνομα του (trans-scrotal rat, TS) από την αρχική εντύπωση ότι το ημίσχεο βρίσκεται σε έκτακτη υπερβουβωνική θέση.⁴⁹² Αργότερα αποδείχθηκε ότι το ημίσχεο είναι σε φυσιολογική θέση αλλά και υποπλαστικό.⁴⁹³ Στο στέλεχος αυτό, η ανδρογονική λειτουργία φαίνεται φυσιολογική⁴⁹² παρατηρείται ετερόπλευρη βουβωνική κρυσορχία στο 85%.⁴⁹³ Ο ορχικός οίακας αναπτύσσεται φυσιολογικά αλλά μεταναστεύει προς εσφαλμένη κατεύθυνση.



πεπτιδίου.⁴⁸⁴ Η χορήγηση φλουταμίδης ενδομητρίως αυξάνει την πυκνότητα των υποδοχέων στον οίακα.⁴⁸² Οι υποδοχείς αυτοί είναι αφθονότεροι κατά την περίοδο της μετανάστευσης του οίακα στο όσχεο.⁴⁷³

Έχει περιγραφεί η παρουσία πυκνών, κισσοειδών ινών που εμφανίζουν ανοσοδραστικότητα CGRP στους αρσενικού αρουραίους, οι οποίες περιβάλλουν τους κινητικούς νευρώνες του αιδοιομηρικού νεύρου και απουσιάζουν στο θηλυκά πειραματόζωα.⁴⁹⁰ Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι η φλουταμίδα μειώνει τον αριθμό των κυττάρων των αισθητικών πυρήνων του νεύρου τόσο στους αρσενικούς όσο και στους θηλυκούς αρουραίους, αλλά σημαντική μείωση των κυττάρων με ανοσοδραστικότητα CGRP ανιχνεύεται μόνο στα αρσενικά πειραματόζωα.⁴⁷⁰ Ακόμη, έχει αποδειχθεί ότι σε στελέχη TS αρουραίου ο αισθητικός πυρήνας του νεύρου ομόπλευρα προς την κρυσορχία διαθέτει σημαντικά μεγαλύτερο αριθμό κυττάρων με ανοσοδραστικότητα CGRP συγκριτικά με την πλευρά του φυσιολογικού όρχι.⁴⁹⁴ Έχει υποτεθεί ότι η παθολογική ορχική κάθοδος σε αυτό το στέλεχος μπορεί να οφείλεται σε πρωτοπαθές έλλειμμα των υποδοχέων του πεπτιδίου CGRP και ο αυξημένος αριθμός των ινών που εκκρίνουν το πεπτίδιο παριστά έναν μη επαρκή αντιρροπιστικό μηχανισμό.

Με βάση τα παραπάνω, η αρχική υπόθεση του αιδοιομηρικού νεύρου έχει τροποποιηθεί θέτοντας ως πιθανή την επίδραση των κυκλοφορόντων ανδρογόνων επί του αισθητικού παρά επί του κινητικού πυρήνα του νεύρου.⁴⁷⁰ Ωστόσο, παρά την ευρεία έρευνα, η υπόθεση ακόμη τελεί υπό αμφισβήτηση αφού το CGRP δε φαίνεται να επάγει την ορχική κάθοδο σε ποντίκια.⁴⁹⁸ Επιπλέον, το CGRP αποτελεί νευρομεταβιβαστή, ο οποίος έχει αποδειχθεί ότι δρα επί του μυϊκού στοιχείου του αναπτυσσόμενου ορχικού οίακα των τρωκτικών δηλαδή τον κρεμαστήρα μυ.²⁸¹ Ο ορχικός οίακας του ανθρώπου αποτελείται κυρίως από βλεννοπολυσακχαρίτες και ελάχιστο μυϊκό στοιχείο (στόχος του πεπτιδίου).^{284,459} Επιπλέον, προσφάτως, η αναζήτηση μεταλλάξεων στα γονίδια CGRP και CGRPR (υποδοχέα) σε 90 κρυσορχικούς ασθενείς χωρίς οικογενειακό ιστορικό, ήταν αρνητική.⁴⁹⁹ Το γεγονός αυτό θέτει πιθανόν σε αμφισβήτηση τη σημαντικότητα του νευρομεταβιβαστή ως ρυθμιστή της βουβωνο-οσχεϊκής φάσης της ορχικής καθόδου στον άνθρωπο.

Εναλλακτικά, έχει προταθεί ως σημαντικός ο ρόλος του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (epidermal growth factor, EGF) ως διαμεσολαβητή της ανδρογονικής δράσης.⁵⁰⁰ Ο EGF σε μεγάλες δόσεις μπορεί να μειώσει την επίπτωση



της επαγόμενης από την ενδομήτρια χορήγηση φλουταμίδης κρυσορχίας στα τρωκτικά και αντίστροφα, χαμηλές συγκεντρώσεις EGF στον ορό οδηγεί σε σημαντικά αυξημένη επίπτωση κρυσορχίας και επιδιδυμικών ανωμαλιών στους απογόνους.⁵⁰¹ Ο EGF ρυθμίζει την λειτουργία του πλακούντα διεγείροντας την έκκριση γοναδοτροφινών.⁵⁰⁰ Ωστόσο, μέχρι σήμερα δεν υπάρχουν δεδομένα σχετικά με το ρόλο του EGF στην κάθοδο του όρχεως στον άνθρωπο.

4.2.3.4. Ο ρόλος των γονιδίων Hox

Μία άλλη κατηγορία γονιδίων των οποίων η ορθή λειτουργία φαίνεται ότι είναι απαραίτητη για τη φυσιολογική ορχική κάθοδο είναι τα γονίδια Hox. Τα γονίδια Hox αποτελούν ιδιαίτερη υποκατηγορία των λεγόμενων γονιδίων «homeobox», τα οποία συγκροτούν μια οικογένεια γονιδίων που συμμετέχουν στη μορφογένεση και χαρακτηρίζονται από την παρουσία μιας κοινής ιδιαίτερα συντηρητικής αλληλουχίας DNA μήκους 183 ζευγών νουκλεοτιδικών βάσεων που καλείται «homeobox». Η αλληλουχία αυτή κωδικοποιεί μια περιοχή 61 αμινοξικών καταλοίπων που ονομάζεται «homeodomain», η οποία μπορεί να συνδέεται με ειδικό τρόπο με το DNA.⁵⁰² Επειδή τα γονίδια Hox κωδικοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες, το αποτέλεσμα τέτοιου είδους συνδέσεων είναι η ενεργοποίηση ή καταστολή των αντίστοιχων γονιδίων-στόχων. Με αυτόν τον τρόπο επομένως, ρυθμίζουν τη λειτουργία άλλων γονιδίων, όπως για παράδειγμα όλων εκείνων που εμπλέκονται στην κατασκευή ενός σκέλους.

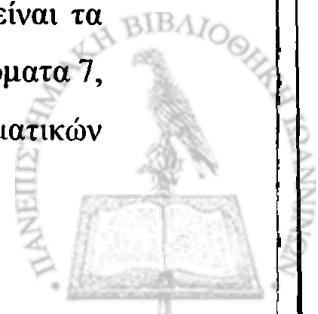
Τα γονίδια «homeobox» εντοπίστηκαν αρχικά στη μύγα των φρούτων *Drosophila melanogaster*, η οποία διαθέτει οκτώ τέτοια γονίδια συναθροισμένα σε μια περιοχή που καλείται ομοιοτικό σύμπλεγμα (Homeotic Complex-HomC) και παρέχουν την αναπτυξιακή ταυτότητα όλων των τμημάτων του εντόμου.⁵⁰³ Ακολούθως ταυτοποιήθηκαν σε πολλά άλλα είδη, από φυτά και μύκητες έως έντομα, ερπετά και θηλαστικά. Τα αντίστοιχα γονίδια των σπονδυλωτών είναι τουλάχιστον 39 συναθροίζονται επίσης σε ομάδες που καλούνται συμπλέγματα Hox (Hox clusters ή complexes) ή HOX εφόσον πρόκειται για τα αντίστοιχα γονίδια του ανθρώπου, και ο ρόλος τους αφορά στη συμβολή της ορθής πλαισίωσης του αξονικού σκελετού από τα διάφορα μέλη. Η ταυτότητα κάθε σωματικού τμήματος καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό από το συνδυασμό των αντίστοιχων γονιδίων Hox/HOX που εκφράζονται. Έτσι συνδυαζόμενα μεταξύ τους αποδίδουν συγκεκριμένη ταυτότητα στις διάφορες



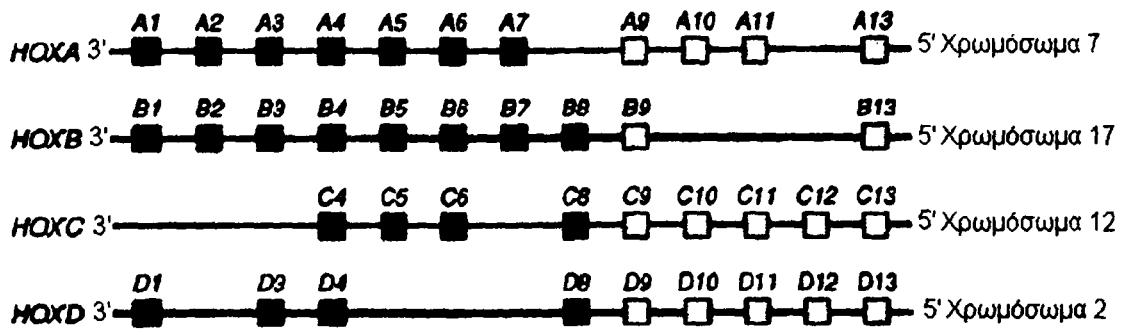
περιοχές του σώματος καθορίζουν τη θέση όπου θα σχηματιστούν τα μέλη και τα διάφορα άλλα τμήματα του σώματος στο αναπτυσσόμενο έμβρυο ή προνύμφη. Ο ειδικός για κάθε τμήμα του σώματος συνδυασμός γονιδίων καλείται κώδικας *Hox/HOX* και αποτελεί τη γενετική βάση που καθορίζει το φαινότυπο των αναπτυσσόμενων ιστών.

Όταν ένα γονίδιο «homeobox» μεταλλαχθεί, το τμήμα του σώματος όπου φυσιολογικά εκφράζεται, τυπικά αναπτύσσει χαρακτηριστικά του αμέσως μπροστινού του τμήματος ένα φαινόμενο γνωστό ως «πρόσθια μετατροπή» ή «μεταμόρφωση» (anterior transformation), ενώ σπανιότερα επικρατεί ο φαινότυπος του αμέσως οπίσθια ευρισκόμενου τμήματος (οπίσθια μετατροπή). Τα φαινόμενα αυτά ερμηνεύονται από τον τρόπο έκφρασης των γονιδίων κατά μήκος του προσθοπισθίου άξονα του σώματος (Εικόνα 30). Σε αντίθεση με τη *Drosophila melanogaster*, όπου η μετάλλαξη ενός και μόνο γονιδίου οδηγεί σε δραματικές φαινοτυπικές μετατροπές, στα σπονδυλωτά οι μεταλλάξεις μεμονωμένων γονιδίων συνήθως προκαλούν ελάχιστες πρόσθιες μετατροπές.⁵⁰⁴ Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι στα θηλαστικά υπάρχει λειτουργική γονιδιακή περίσσεια λόγω παρουσίας παράλογων γονιδίων καθώς και αλληλεπικαλυπτόμενης έκφρασης μεταξύ γειτονικών γονιδίων.⁵⁰⁶

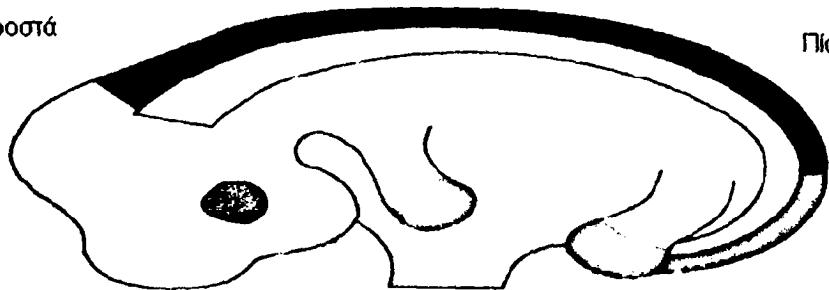
Στο γένωμα του ποντικού και του ανθρώπου υπάρχουν τέσσερα συμπλέγματα των 9-13 γονιδίων *Hox/HOX* (A, B, C και D) και εντοπίζονται σε τέσσερα διαφορετικά χρωμοσώματα.⁵⁰⁷ Τα γονίδια κάθε συμπλέγματος αριθμούνται κατά αύξουσα σειρά με βάση την 3'-5' χρωμοσωμιακή τους διάταξη, η οποία με τη σειρά της αντικατοπτρίζει τη χωροχρονική τους έκφραση κατά μήκος του προσθοπισθίου σωματικού άξονα κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης. Έτσι, γονίδια που εντοπίζονται πιο κοντά στο άκρο 3' του συμπλέγματος εκφράζονται νωρίτερα κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης και αφορούν σε πιο πρόσθια τμήματα του σώματος συγκριτικά με γονίδια που εντοπίζονται πιο κοντά στο άκρο 5', τα οποία εκφράζονται αργότερα και ελέγχουν πλέον οπίσθια τμήματα. Τα γονίδια αυτά είναι αξιοσημείωτα συντηρητικά κατά τη διάρκεια της εξέλιξης των ειδών επιδεικνύοντας σχεδόν την ίδια αλληλουχία στο ποντίκι και στον άνθρωπο.⁵⁰⁸ Έτσι, τα γονίδια *Hox* A, B, C, D του ποντικού που εντοπίζονται στα χρωμοσώματα 6, 11, 15 και 2 αντίστοιχα, είναι τα ομόλογα *HOXA*, B, C, D του ανθρώπου, τα οποία εντοπίζονται στα χρωμοσώματα 7, 17, 12 και 2 αντίστοιχα.⁵⁰⁸ Κατέχουν κεντρική θέση στη μορφογένεση τμηματικών



δομών κατά μήκος του κύριου προσθοπισθίου σωματικού άξονα, όπως βραγχιακών τόξων, σπονδύλων, κρανιακών νεύρων, και γαγγλίων.^{504,509} Εκφράζονται σε πολλούς τύπους κυττάρων δρώντας ως κύριοι καθοριστικοί παράγοντες της ταυτότητας του σωματικού άξονα και ρυθμίζουν την αύξηση και διαφοροποίηση των κυττάρων σε σχέση με τη θέση τους.⁵⁰⁹ Η σχηματική αναπαράσταση της οργάνωσης των συμπλεγμάτων HOX στο ανθρώπινο γένωμα παρουσιάζεται στην εικόνα 30.



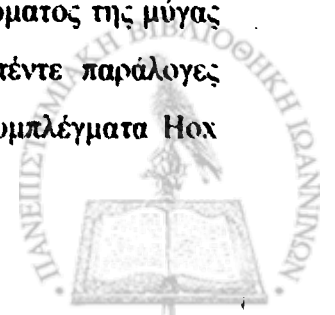
Μπροστά



Πίσω

Εικόνα 30. Αναπαράσταση της οργάνωσης των γονιδιακών συμπλεγμάτων HOX στο ανθρώπινο γένωμα και του προτύπου εμβρυϊκής έκφρασής τους. Στο αναπτυσσόμενο έμβρυο, η έκφραση των γονιδίων κατά μήκος του προσθοπισθίου σωματικού άξονα παραλληλίζεται με την χρωμοσωμιακή 3'-5' διάταξή τους.⁵⁰⁴ Τα έγχρωμα πεδία αναπαριστούν τα χαρακτηριστικά, σαφώς καθορισμένα, πλέον πρόσθια όρια της έκφρασης των συμπλεγμάτων. Στην οπίσθια περιοχή κάθε συμπλέγματος, το επίπεδο της γονιδιακής έκφρασης εξασθενίζει σταδιακά, έτσι ώστε τα οπίσθια όρια έκφρασης κάθε συμπλέγματος αλληλεπικαλύπτονται ουραία με τα πρόσθια όρια έκφρασης του αμέσως ακόλουθου συμπλέγματος (τροποποιημένο από αναφορά 505).

Το μοναδικό γονίδιο *AbdB* (Abdominal B) που εντοπίζεται στο 5' άκρο του *HomC* και καθορίζει την ταυτότητα των οπισθίων τμημάτων του σώματος της μύγας των φρούτων *Drosophila melanogaster* αντιπροσωπεύεται από πέντε παράλογες ομάδες (16 γονίδια συνολικά) που εντοπίζονται στα αντίστοιχα συμπλέγματα *HoX*



των θηλαστικών.⁵⁰⁴ Τα σχετιζόμενα με το AbdB γονίδια των θηλαστικών, συνιστούν μια διακριτή υποοικογένεια γονιδίων HOX που εκφράζεται στα οπίσθια τμήματα του σώματος^{504,510} συμπεριλαμβανομένου και του αναπτυσσόμενου ουροποιογεννητικού συστήματος των σπονδυλωτών.^{511,512} Ειδικά το σχετιζόμενο με το AbdB Hoxa10 γονίδιο εκφράζεται στα οπίσθια τμήματα του αναπτυσσόμενου εμβρύου του ποντικού συμπεριλαμβανομένου του ενδιάμεσου μεσοδέρματος από το οποίο προέρχεται ο ουρογεννητικός σωλήνας και οι γονάδες.⁵¹³

Ο ρόλος των γονιδίων HOX στο σύστημα αναπαραγωγής υπογραμμίζεται από τους φαινοτύπους ποντικών με έλλειψη των ουραία εκφραζομένων γονιδίων Hoxa10 ή Hoxa11.^{452,514-516} Μοντέλα αρσενικών ποντικών «knockout» με έλλειψη του γονιδίου Hoxa10^{452,514,515} είναι πλήρως βιώσιμα αλλά εμφανίζουν ετερόπλευρη ή αμφοτερόπλευρη ενδοκοιλιακή κρυσορχία σε υψηλό ποσοστό, ανώμαλη ανάπτυξη του ορχικού οίακα και του αιδοιομηρικού νεύρου, διαταραχή στη σπερματογένεση και στειρότητα. Η θέση των όρχεων συνήθως είναι χαμηλή στο επίπεδο της ουροδόχου κύστης. Επίσης, ο ανδρικός αναπαραγωγικός σωλήνας υφίσταται πρόσθια μετατροπή που εκδηλώνεται ως «κρανιοποίηση» του σώματος της επιδιδυμίδας και του εγγύς τμήματος του σπερματικού πόρου, δηλαδή το σώμα της επιδιδυμίδας και το εγγύς τμήμα του σπερματικού πόρου φαινοτυπικά προσομοιάζουν περισσότερο με κεφαλή και ουρά επιδιδυμίδας αντίστοιχα.⁵¹⁷ Ωστόσο η αρρενοποίηση, η ανάπτυξη του προστάτη και των άλλων ανδρογόνου-εξαρτώμενων ιστών είναι φυσιολογική⁵¹⁷ σε αντιδιαστολή με τα μοντέλα Tfm⁵¹⁸ ή έλλειψης της GnRH,⁵¹⁹ γεγονός που σημαίνει φυσιολογική παραγωγή και δράση των ανδρογόνων. Επιπλέον, στο μοντέλο αυτό παρατηρείται παραγωγή Ins13 και ο ορχικός οίακας εκφράζει τον υποδοχέα Lgr8.⁴⁵² Επομένως, φαίνεται ότι η κρυσορχία οφείλεται σε διαταραχή της διαφοροποίησης του ορχικού οίακα, η οποία ωστόσο δεν οφείλεται στην πρόκληση κάποιας ορμονικής διαταραχής.^{452,514,515}

Μελέτες επιτόπιου υβριδισμού (in situ hybridization) αποδεικνύουν ότι τόσο η χορδή όσο και ο βολβός του ορχικού οίακα αποτελούν θέσεις ισχυρής έκφρασης του γονιδίου Hoxa10 από τη 15,5 ημέρα μετά τη συνουσία στο άρρεν έμβρυο του ποντικού αλλά και μετά τη γέννηση.⁵¹⁴ Επιπλέον, ανάλυση του ορχικού οίακα στο μοντέλο Hoxa10^{-/-} αποδεικνύει ότι έχει αποτύχει η διαδικασία βράχυνσης της χορδής και ανάπτυξης του βολβού.⁵¹⁴ Τα μυϊκά κύτταρα του κρεμαστήρα είναι παρόντα αλλά ο αριθμός τους είναι μειωμένος και η διάταξή τους είναι αποδιοργανωμένη.⁵¹⁴ Από



την άλλη πλευρά, το γονίδιο Hoxa10 εκφράζεται επίσης από την 13,5-14,5 ημέρα μετά τη συνουσία στον ποντικό και μετά κατά μήκος της έσω-κοιλιακής περιοχής του αναπτυσσόμενου κοιλιακού τοιχώματος προτού λάβουν χώρα τα μορφογενετικά γεγονότα που οδηγούν στο σχηματισμό του βουβωνικού καναλιού και του οσχεϊκού σάκου.⁵¹⁵ Έτσι πιθανόν ερμηνεύεται η διαταραχή στην ανάπτυξη δομών όπως η ελυτροπεριτοναϊκή πτυχή, το βουβωνικό κανάλι και το όσχεο, τα οποία στο μοντέλο Hoxa10^{-/-} είτε απουσιάζουν εντελώς είτε έχουν σχηματιστεί μερικώς.⁵¹⁵

Θηλυκά και αρσενικά τρανσγενετικά ποντίκια Hoxa10^{-/-} που υπερεκφράζουν το γονίδιο Insl3 παρουσιάζουν αντίστοιχα κάθοδο των ωθηκών κοντά στην κύστη και παρόμοιο φαινότυπο ως προς την ορχική κάθοδο και τη διαφοροποίηση του ορχικού οίακα (ολοκλήρωση της διακοιλιακής φάσης της ορχικής καθόδου και εντόπιση των όρχεων στο επίπεδο της κύστης). Τα πειράματα αυτά καταδεικνύουν ότι η ορμόνη Insl3 είναι ικανή από μόνη της για την ολοκλήρωση της διακοιλιακής φάσης της ορχικής καθόδου ενώ η υπερέκφρασή της δεν δύναται να διορθώσει τον κρυψορχικό φαινότυπο που προκαλείται από την απουσία λειτουργίας του γονιδίου Hoxa10. Φαίνεται ότι η ορθή έκφραση του γονιδίου Hoxa10 είναι απαραίτητη για τη βουβωνο-οσχεϊκή φάση της ορχικής καθόδου. Όλα τα παραπάνω ευρήματα σε συνδυασμό με την εμφάνιση μιας πρόσθιας μορφολογικής μετατροπής των οσφυϊκών σπονδύλων⁽¹⁾ καθώς και των αντίστοιχων νωτιαίων νεύρων⁽²⁾^{514,515} οδήγησε στην υπόθεση ότι η κρυψορχία που εκδηλώνεται στο μοντέλο αυτό θα μπορούσε να οφείλεται σε εσφαλμένη εξειδίκευση των κινητικών ινών του αιδοιομηρικού νεύρου με τελικό αποτέλεσμα την ανώμαλη νεύρωση των οργάνων στόχων.⁽³⁾⁵¹⁵

Μεταλλάξεις του γονιδίου Hoxa11, το οποίο εκφράζεται επίσης στο παραμεσονεφρικό μεσέγχυμα, επηρεάζουν με τρόπο παρόμοιο την ανάπτυξη του ανδρικού αναπαραγωγικού συστήματος. Συγκεκριμένα, ο αναπαραγωγικός σωλήνας υφίσταται παρόμοια πρόσθια μετατροπή με αυτή του μοντέλου Hoxa10^{-/-}.⁵¹⁶ Η άμεση επίσης σύγκριση των ελλειμμάτων των ορχικών οιάκων μεταξύ των δύο μοντέλων δεν καταδεικνύει εμφανείς διαφορές αφού και εδώ ο ορχικός οίακας είναι ανώμαλα

(1) Ο πρώτος οσφυϊκός σπόνδυλος μετατρέπεται σε έκτοπο δηλαδή 13^ο θωρακικό σπόνδυλο.

(2) Το τελευταίο θωρακικό και τα πέντε οσφυϊκά νεύρα αποκτούν ταυτότητα μεσοπλευρίου, τελευταίου θωρακικού και πρώτου έως τετάρτου οσφυϊκού νεύρου, αντίστοιχα.

(3) Το αιδοιομηρικό νεύρο προέρχεται από το πρώτο και δεύτερο οσφυϊκό νευροτόμιο και νευρώνει τον κρεμαστήρα μυ και τον ορχικό οίακα.

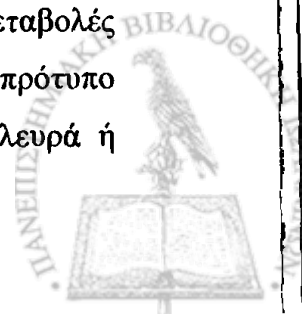


λεπτός και επιμηκυμένος με εμφανή αποτυχία σχηματισμού της χορδής και του βολβού.⁵⁰⁷ Παρομοίως, τα ετερόζυγα μεμονωμένα μοντέλα (Hoxa10^{+/-}, Hoxa11^{+/-}) εμφανίζουν ανάλογα ελλείμματα του ανδρικού αναπαραγωγικού σωλήνα. Ωστόσο, τα μοντέλα αυτά εμφανίζουν φυσιολογική κάθοδο των όρχεων και ανάπτυξη του ορχικού οίακα.⁵⁰⁷ Αντίθετα, στο συνδυασμένο μοντέλο Hoxa10^{+/-}/Hoxa11^{+/-} παρατηρείται επιπλέον ετερόπλευρη και αμφοτερόπλευρη κρυσορχία και μάλιστα σε μεγαλύτερο ποσοστό συγκριτικά με τα αντίστοιχα μεμονωμένα ομόζυγα μοντέλα όσον αφορά στην ετερόπλευρη κρυσορχία.⁵⁰⁷ Έτσι, τα γονίδια Hoxa10 και 11 φαίνεται ότι εμφανίζουν ρυθμιστικές αλληλεπιδράσεις και λειτουργική περίσσεια όσον αφορά στην ανάπτυξη του ανδρικού αναπαραγωγικού συστήματος, τέτοια ώστε η ποσοτική απώλεια οποιουδήποτε συνδυασμού ζεύγους από τα τέσσερα συνολικά αλληλία των δύο αυτών γονιδίων οδηγεί σε σοβαρές παρόμοιες ανωμαλίες.⁵⁰⁷

Η πιθανή παρουσία μεταλλάξεων των γονιδίων HOX σε κρυσορχικούς ασθενείς έχει ελεγχθεί μέχρι σήμερα σε τρεις κλινικές μελέτες.⁵²⁰⁻⁵²² Οι δύο πρώτες αφορούν αποκλειστικά το γονίδιο HOXA10^{520,521}. Από τις μελέτες αυτές, μόνο η πρώτη κατέδειξε γενετικές μεταβολές.⁵²⁰ Η πιο πρόσφατη μελέτη αφορά στο σύνολο των 16 οπίσθιων γονιδίων HOX (A-D)9-13.⁵²²

Το γονίδιο HOXA10 εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 7 του ανθρώπου και αποτελείται από 2 εξώνια. Το πρώτο εξώνιο περιλαμβάνει δύο περιοχές: α) την περιοχή 1 που εντοπίζεται στο τελικό άκρο 5' του γονιδίου, η οποία περιλαμβάνει το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης και β) την περιοχή 2 που εντοπίζεται στο τελικό άκρο 3' του γονιδίου, η οποία βρίσκεται μεταξύ της θέσης ενεργοποίησης της μεταγραφής και του εξωνίου 2 που περιλαμβάνει την περιοχή σύνδεσης με το DNA.⁵²⁰

Αρκετές νουκλεοτιδικές μεταβολές αυτού του γονιδίου έχουν ανακοινωθεί, όλες σε μία και μοναδική μελέτη ασθενών-μαρτύρων.⁵²⁰ Η μελέτη περιέλαβε 45 ασθενείς με ετερόπλευρη ή αμφοτερόπλευρη κρυσορχία και 16 υγιείς μάρτυρες.⁵²⁰ Βρέθηκε ότι οι ασθενείς, και κυρίως οι οικογενείς περιπτώσεις, εμφανίζουν στατιστικά συχνότερα νουκλεοτιδικές μεταβολές στην αλληλουχία του γονιδίου συγκριτικά με τους υγιείς μάρτυρες. Συνολικά ανιχνεύτηκαν νουκλεοτιδικές μεταβολές σε 30 ασθενείς και 2 υγιείς μάρτυρες. Όλες οι νουκλεοτιδικές μεταβολές αφορούσαν στο εξώνιο 1. Δεν ανιχνεύτηκε κάποιο συγκεκριμένο πρότυπο νουκλεοτιδικής μεταβολής που να σχετίζεται με κάποια συγκεκριμένη πλευρά ή



ακριβή εντόπιση κρυπορχίας, ωστόσο οι περισσότερες περιπτώσεις ήταν βουβωνικές.

Πιο συγκεκριμένα, μεταβολές στην αλληλουχία του γονιδίου στους ασθενείς εντοπίστηκαν αποκλειστικά στην περιοχή 1 σε 6 άτομα, αποκλειστικά στην περιοχή 2 σε 10 άτομα καθώς και ταυτόχρονα και στις δύο περιοχές του εξωνίου 1 σε 14 άτομα. Αντίθετα, στους δύο υγιείς μάρτυρες νουκλεοτιδικές μεταβολές εντοπίστηκαν αποκλειστικά στην περιοχή 1. Από τους δέκα ασθενείς με οικογενειακό ιστορικό κρυπορχίας νουκλεοτιδικές μεταβολές ανιχνεύτηκαν στους οκτώ και αφορούσαν τόσο μεμονωμένα όσο και σε συνδυασμό και στις δύο περιοχές του εξωνίου 1. Η ανάλυση αλληλουχίας αποκάλυψε αρκετές νουκλεοτιδικές μεταβολές στο εξώνιο 1 τόσο στους ασθενείς όσο και στους υγιείς μάρτυρες που πιθανότατα παριστούν πολυμορφισμούς. Αντίθετα νουκλεοτιδικές μεταβολές εντοπίστηκαν αποκλειστικά σε ασθενείς, πέντε συνολικά, και έχουν ως αποτέλεσμα την αμινοξική αντικατάσταση στην κωδικοποιημένη πρωτεΐνη. Ένας εκ των ασθενών παρουσίασε μια απαλοιφή 24 νουκλεοτιδίων στην περιοχή 1. Οι νουκλεοτιδικές αυτές μεταβολές που πιθανότατα αποτελούν σημειακές μεταλλάξεις είναι οι εξής: α) περιοχή 1: Arg(127)-Lys, Arg(128)-Gln, Gly(129)-Ser, Arg(136)-Arg(143) απαλοιφή, Gln(162)-His και β) περιοχή 2: Ser(396)-Ile. Ωστόσο, δεν έχει γίνει ακόμη λειτουργική ανάλυση αυτών των νουκλεοτιδικών μεταβολών ώστε να επιβεβαιωθεί αν και κατά πόσο συσχετίζονται τελικά με τον κρυπορχικό φαινότυπο. Επιπλέον εκκρεμεί ο έλεγχος μεταλλάξεων των παραλόγων γονιδίων του HOXA10 (HOXB10, HOXC10, HOXD10) καθώς και των ορθολόγων γονιδίων του HOXA10 (HOXA9, HOXA11), προκειμένου να διευκρινιστεί γενικά ο ρόλος των γονιδίων HOX στη φυσιολογική και παθολογική ορχική κάθοδο.

Η μελέτη του συνόλου των οπίσθιων HOX γονιδίων συμπεριέλαβε 152 άτομα με μη συνδρομική κρυπορχία και 160 μάρτυρες.⁵²² Συνολικά ταυτοποιήθηκαν 57 γενετικές μεταβολές από τις οποίες μόνο η HOXD13 180A>G (A60A) βρέθηκε να διαφέρει σε βαθμό στατιστικά σημαντικό μεταξύ ασθενών-μαρτύρων και θεωρήθηκε παράγοντας κινδύνου για την εμφάνιση κρυπορχίας.

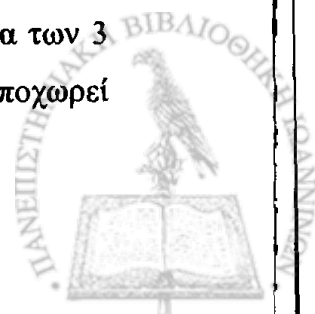


5. Επιδημιολογία της κρυφορχίας

5.1. Επίπτωση της κρυφορχίας σε διάφορα θηλαστικά είδη

Η κρυφορχία αποτελεί τη συχνότερη συγγενή ανωμαλία των γεννητικών οργάνων του ανθρώπου καθώς και άλλων θηλαστικών ειδών (π.χ. στον σκύλο η επίπτωση εκτιμάται ~1,2-5%⁵²³) και γενικά μια από τις πλέον συχνές συγγενείς ανωμαλίες γενικά στον άνθρωπο αφορώντας >3,5% των αρρένων νεογεννήτων.⁵²⁴⁻⁵²⁹ Η ετερόπλευρη κρυφορχία είναι πιο συχνή από την αμφοτερόπλευρη στα θηλαστικά (η επίπτωση της αμφοτερόπλευρης εκτιμάται ~1,6-1,9% των περιπτώσεων στον άνθρωπο,²⁵⁴ \cong 10-16% στο άλογο⁵³⁰ και \cong 20,2% στον σκύλο⁵²⁹). Στις περισσότερες περιπτώσεις στον άνθρωπο, οι όρχεις έχουν κατέλθει στο ύψος ή και πιο κάτω από το έσω βουβωνικό στόμιο. Οι όρχεις βρίσκονται σε ενδοκοιλιακή θέση σε μικρό ποσοστό ασθενών (\cong 5-10%). Το ίδιο ισχύει και στον σκύλο, στον οποίο ενδοκοιλιακή κρυφορχία απαντά \cong 18% των περιπτώσεων,^{523,531} σε αντίθεση για παράδειγμα με το άλογο,⁵³⁰ όπου δυο φορές συχνότερα απαντά η ενδοκοιλιακή και «ατελής» ενδοκοιλιακή κρυφορχία δηλαδή ο όρχις εντός του κοιλιακού κήτους-η επιδιδυμίδα και ο σπερματικός πόρος εντός του βουβωνικού καναλιού.

Διαφορές μεταξύ φυλών και εθνοτήτων έχουν ανακοινωθεί με υπεροχή στους Καυκάσιους συγκριτικά με τους Αφρο-αμερικανούς⁵³² και τους Ασιάτες.⁵³³ Υπάρχουν ωστόσο μελέτες, οι οποίες δεν έχουν καταδείξει τέτοιου είδους διαφορές.⁵²⁴ Στα άλογα η κρυφορχία απαντά συχνότερα στα ρονιές,⁵³⁰ ενώ στον σκύλο ~2,7 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο διατρέχουν οι μικρόσωμες ράτσες (<9,1Kg, π.χ. Chihuahua, Yorkshire terrier κ.λ.π.).^{523,531} Υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι η επίπτωση στον άνθρωπο είναι έως και 10 φορές υψηλότερη στα πρόωρα (<37 εβδομάδων κύησης, σωματικό βάρος < 2,5Kg) από ότι στα τελειόμηνα μωρά.⁵²⁴⁻⁵²⁹ Εφόσον τελικά οι όρχεις κατέρχονται υπό φυσιολογικές συνθήκες αργά κατά τη διάρκεια της κύησης, η κρυφορχία μπορεί να θεωρηθεί ως φυσιολογικό φαινόμενο στα πρόωρα βρέφη και επομένως μπορεί να αναμένεται αυτόματη κάθοδος. Η ολοκλήρωση της ορχικής καθόδου συνήθως επιτελείται κατά τη διάρκεια των πρώτων εβδομάδων μετά τη γέννηση αφού στο \cong 70%-77% των περιπτώσεων επισέρχεται αυτόματη κάθοδος των όρχεων νωρίς, συνήθως μέχρι την ηλικία των 3 μηνών. Έτσι, η επίπτωση της κρυφορχίας στο τέλος της βρεφικής ηλικίας υποχωρεί στο \cong 0,7-1% για να παραμείνει σταθερή έκτοτε.^{252,526}



Προγνωστικοί παράγοντες της πλήρους και πρόωμης ορχικής καθόδου μετά τη γέννηση αποτελούν η αμφοτερόπλευρη εντόπιση, η φυσιολογική ανατομία του οσχέου και η απουσία εκτοπίας, σε αντίθεση με την παρουσία μικρού, κακώς ανεπτυγμένου οσχέου και υποσπαδία.⁵²⁷ Από την άλλη πλευρά, προγνωστικοί παράγοντες καθυστερημένης πέραν του έτους αυτόματης ορχικής καθόδου αποτελούν η εθνικότητα (μαύροι, ισπανόφωνοι), το θετικό οικογενειακό ιστορικό, η κατανάλωση κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης ποτών που περιέχουν κόλα, το χαμηλό βάρος γέννησης, και ο πρόωρος τοκετός.⁵³³

5.2. Τοποχρονικές τάσεις της επίπτωσης της κρυσορχίας

Η χρονική ανάλυση (temporal analysis) της επίπτωσης της κρυσορχίας δηλαδή η διερεύνηση των διαχρονικών (secular) και κυκλικών τάσεων (cyclic trends) έχει ευρέως χρησιμοποιηθεί ως μέσον για την διευκρίνιση της αιτιολογίας διαφόρων νοσημάτων. Η διερεύνηση της εποχικότητας, η οποία αποτελεί τον πιο σημαντικό τύπο κυκλικής διακύμανσης, χρησιμοποιείται ειδικά στη βασική διευκρίνιση των αιτιών των συγγενών ανωμαλιών. Με βάση τα δεδομένα των χρονικών αναλύσεων, προκύπτει ότι η επίπτωση της κρυσορχίας ακολουθεί μια διαχρονική τάση αύξησης κατά τις τελευταίες δεκαετίες σε μερικές χώρες.^{524,527,528} Ωστόσο εξακολουθούν να υπάρχουν και αντίθετες αναφορές.^{525,534} Επιπλέον, έχουν ανακοινωθεί σημαντικές διαφορές μεταξύ γειτονικών κρατών (π.χ. στη Φινλανδία η επίπτωση είναι σαφώς χαμηλότερη από τη Δανία).^{534,535}

Είναι σαφές ότι απαιτούνται περισσότερες επιδημιολογικές μελέτες, χρησιμοποιώντας προτυποποιημένα διαγνωστικά κριτήρια και τεχνικές ώστε να αποκρυσταλλωθεί μια πιο ξεκάθαρη άποψη σχετικά με τις τοποχρονικές τάσεις της επίπτωσης της κρυσορχίας προκειμένου να ανιχνευτούν πιθανές περιβαλλοντικές επιδράσεις.⁵³⁶ Από την άλλη πλευρά, υπάρχει γενική ομοφωνία σχετικά με την εποχικότητα της κρυσορχίας, με την άνοιξη (Μάρτιος) και το φθινόπωρο (Σεπτέμβριος) να είναι οι εποχές με τη στατιστικά υψηλότερη και χαμηλότερη επίπτωση, αντίστοιχα.^{3,537-539} Οι περισσότεροι ερευνητές της εποχικότητας της κρυσορχίας, έχουν αποδώσει το φαινόμενο αυτό σε ανάλογες εποχικές διακυμάνσεις των φυλετικών ορμονών. Έχει εκφραστεί η άποψη ότι η διακύμανση της διάρκειας του ημερήσιου φωτός (daylight length) επηρεάζει τη λειτουργία του μητρικού κωναρίου μεταβαλλόντας την έκκριση μελατονίνης, η οποία με τη σειρά της

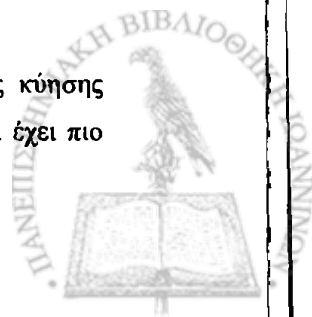
επηρεάζει τη ορμονική δραστηριότητα της μητρικής υπόφυσης και των ωοθηκών οδηγώντας σε μεταβολή της ορμονικής ισορροπίας στη μητέρα με τελικό αποτέλεσμα τη μεταβολή της ορμονικής δραστηριότητας των εμβρυϊκών όρχεων. Η μεταβολή αυτή μπορεί να ευθύνεται για τη διαταραχή της ορχικής καθόδου (θεωρία του φωτός).

Ωστόσο, με την αυστηρή εφαρμογή στατιστικών μεθόδων σχεδιασμένων ειδικά για τη διερεύνηση της εποχικότητας των συγγενών ανωμαλιών, πρόσφατα καταδείχτηκε ότι η μηνιαία επίπτωση των κρυσορχικών γεννήσεων στην Ελλάδα ακολουθεί ένα τεκμηριωμένο κυκλικό πρότυπο απλού αρμονικού τύπου με αιχμή το Μάρτιο/Μάιο και ναδίρ το Σεπτέμβριο.^{540,541} Παρόμοιο πρότυπο έχει παρατηρηθεί και στη Βόρεια Ευρώπη σε άλλες μελέτες.^{538,539} Η ανίχνευση ωστόσο αυτού του προτύπου σε μία χώρα όπως η Ελλάδα όπου δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές στη διάρκεια του ημερήσιου φωτός μεταξύ των διαφόρων εποχών, αποτελεί ισχυρή ένδειξη εναντίον της θεωρίας του φωτός.⁵⁴¹

Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί ότι τα επίπεδα της μητρικής hCG στον ορό είναι σημαντικά χαμηλότερα το χειμώνα από ότι το καλοκαίρι κατά την 26^η εβδομάδα της κύησης (έναρξη της βουβωνο-οσχεϊκής φάσης της ορχικής καθόδου).⁵⁴¹ Δεδομένο ότι παρατηρείται αυξημένη επίπτωση κρυσορχικών γεννήσεων κατά τους μήνες Μάρτιο/Μάιο φαίνεται ότι η έναρξη της βουβωνο-οσχεϊκής φάσης καθόδου των όρχεων κατά τους μήνες Δεκέμβριο/Ιανουάριο ή Φεβρουάριο/Μάρτιο, αντίστοιχα συνοδεύεται από αυξημένη επίπτωση κρυσορχίας. Επομένως, οι χαμηλές περιβαλλοντικές θερμοκρασίες κατά την έναρξη της βουβωνο-οσχεϊκής καθόδου των όρχεων, ίσως σχετίζονται με μια αυξημένη πιθανότητα αποτυχίας της έναρξης ή ολοκλήρωσης της φάσης αυτής. Εφόσον, η δεύτερη φάση της ορχικής καθόδου είναι ανδρογονο-εξαρτώμενη, φαίνεται ότι χαμηλές περιβαλλοντικές θερμοκρασίες κατά την 26^η εβδομάδα της κύησης συνοδεύονται από μια μείωση των επιπέδων της μητρικής hCG στον ορό και παραβιάζουν έτσι την εκκριτική λειτουργία των εμβρυϊκών κυττάρων Leydig και επομένως την ανδρογονική παραγωγή από τους εμβρυϊκούς όρχεις,⁽¹⁾ οδηγώντας στην εμφάνιση κρυσορχίας.

Η επίπτωση της 26^{ης} εβδομάδας της κύησης κατά τους μήνες Ιούνιο-Ιούλιο συνοδεύεται από χαμηλότερη επίπτωση κρυσορχίας.^{540,541} Με βάση αυτό

(1) Η παραγωγή ανδρογόνων από τους εμβρυϊκούς όρχεις κατά την όσιμη περίοδο της κύησης επηρεάζεται όχι μόνο από την εμβρυϊκή LH, αλλά και από τη μητρική hCG, η οποία είναι έχει πιο ισχυρή γοναδοτροφική δραστηριότητα από την LH.⁵⁴²

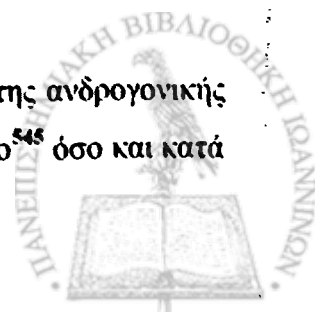


δημιουργήθηκε η υπόθεση ότι σχετικά υψηλότερες περιβαλλοντικές θερμοκρασίες κατά τη χρονική αυτή περίοδο της κύησης δεν επιδρούν αρνητικά (ως προς την ορχική κάθοδο) στα εμβρυομητρικά ορμονικά επίπεδα/ισορροπία με αποτέλεσμα τελικά να μην παρατηρείται διαταραχή στην έναρξη/ολοκλήρωση της δεύτερης φάσης της ορχικής καθόδου.⁵⁴¹ Η υπόθεση αυτή θα μπορούσε να ερμηνεύσει τα αποτελέσματα των εποχικών διακυμάνσεων της κρυσορχίας όχι μόνο στην Ελλάδα, αλλά και στη Βόρεια Ευρώπη (Ουγγαρία, Μεγάλη Βρετανία και Σουηδία).^{3,538,539} Αντιθέτως, η θεωρία του φωτός, δεν μπορεί να ερμηνεύσει εύκολα την εποχική κατανομή των κρυσορχικών γεννήσεων στην Ελλάδα, αλλά ούτε και το παρόμοιο εποχικό πρότυπο που έχει παρατηρηθεί μεταξύ βόρειας και νότιας Σουηδίας παρά τις μεγάλες διαφορές στη διάρκεια του ημερήσιου φωτός.⁵³⁸

Σε δύο άλλες μελέτες^{169,543} αξιολογήθηκε η επιδημιολογική σχέση της εποχικότητας με βάση το μήνα γέννησης μεταξύ κρυσορχίας και υποσπαδία που ως γνωστό συχνά συνδυάζονται στο ίδιο άτομο.^{527,538,544} Αποδείχθηκε ότι η μηνιαία επίπτωση των υποσπαδιακών γεννήσεων στην Ελλάδα ακολουθεί ένα στατιστικά τεκμηριωμένο πρότυπο απλής αρμονικής ταλάντωσης με το Φθινόπωρο να είναι η εποχή της επικρατούσας επίπτωσης (αιχμή τον Οκτώβριο) και την Άνοιξη να είναι η εποχή με τη χαμηλότερη επίπτωση (ναδίρ τον Απρίλιο).

Λαμβάνοντας υπόψη ότι αυξημένη επίπτωση των υποσπαδιακών γεννήσεων παρατηρείται τον Οκτώβριο, φαίνεται ότι η έναρξη (8^η εβδομάδα της κύησης) της κρίσιμης περιόδου για τη φυσιολογική διαφοροποίηση των ανδρικών έξω γεννητικών οργάνων (8^η-16^η εβδομάδα της κύησης) λαμβάνει χώρα συχνότερα σε αυτούς τους ασθενείς το χειμώνα. Εφόσον η κρίσιμη εμβρυϊκή περίοδος τόσο για την τελική κάθοδο του όρχι στο όσχεο, όσο και για την διαφοροποίηση-ανάπτυξη της ανδρικής ουρήθρας θεωρούνται ανδρογονο-εξαρτώμενες, αναμένεται ως πιθανή η ύπαρξη ενός διεγέρτη της ανδρογονικής παραγωγής που ακολουθεί ένα κυκλικό πρότυπο διακύμανσης με ναδίρ επιπέδων του το χειμώνα (μειωμένη ανδρογονική παραγωγή από τους εμβρυϊκούς όρχεις). Με βάση αυτά, θα μπορούσε να υποτεθεί ότι η σύμπτωση της 8^{ης} ή 26^{ης} εβδομάδας μιας δυνητικώς γενετικά επιβαρυνμένης κύησης με την χειμερινή περίοδο θα μπορούσε να οδηγήσει σε φαινοτυπική έκφραση υποσπαδία ή κρυσορχίας, αντίστοιχα.

Η hCG αποτελεί πιθανό παράδειγμα ενός τέτοιου διεγέρτη της ανδρογονικής παραγωγής αφού εμφανίζει εποχική διακύμανση τόσο κατά το πρώτο⁵⁴⁵ όσο και κατά

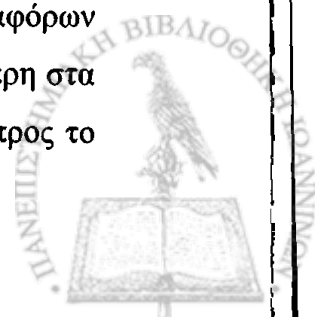


το τελευταίο τρίμηνο της κύησης⁵⁴¹ με χαμηλότερα επίπεδα κατά τη χειμερινή περίοδο. Εφόσον δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές στη διάρκεια του ημερησίου φωτός μεταξύ των εποχών στην Ελλάδα, η ανίχνευση τέτοιων προτύπων αποτελεί ισχυρή ένδειξη εναντίον της θεωρίας του φωτός. Ή εποχική μεταβολή της περιβαλλοντικής θερμοκρασίας μπορεί να θεωρηθεί ως πιθανό παράδειγμα μιας εναλλακτικής αιτίας που θα μπορούσε να συμβάλλει μέσω του παραπάνω μηχανισμού στην εμφάνιση των παρατηρούμενων εποχικών προτύπων επίπτωσης της κρυσορχίας και του υποσπαδία.

Πρόσφατα έχει προταθεί ότι τουλάχιστον κάποιες περιπτώσεις του TDS θα μπορούσαν να ερμηνευτούν με τον εξής μηχανισμό:¹⁶⁹ Η επίδραση σχετικά χαμηλότερων επιπέδων πλακουντιακής hCG (κατά τη διάρκεια των χειμερινών μηνών) επί ενός όρχι, ο οποίος είναι ήδη δυσγενετικός από τη φύση του (με οριακή εκκριτική λειτουργία κυττάρων Leydig) πιθανόν οδηγεί στην παραγωγή δυσανάλογα χαμηλών επιπέδων ανδρογόνων. Αν αυτά τα σχετικά χαμηλότερα επίπεδα πλακουντιακής hCG παρατηρηθούν κατά το πρώτο ή τρίτο τρίμηνο της εγκυμοσύνης (8^η-9^η ή 26^η εβδομάδα) τα συμπτώματα θα είναι υποσπαδίας ή κρυσορχία, αντίστοιχα. Η εμφάνιση των συμπτωμάτων του TDS μπορεί να ποικίλλει ανάλογα με τη σοβαρότητα της υποκείμενης ορχικής δυσγενεσίας. Στις ήπιες μορφές η άποκατάσταση των επιπέδων της hCG κατά τη διάρκεια των θερμότερων μηνών εξασφαλίζει την διαμόρφωση ενός φυσιολογικού πέους ή την φυσιολογική ορχική κάθοδο. Από την άλλη πλευρά, στις σοβαρές μορφές (σοβαρά πάσχον κύτταρο Leydig) η χαμηλή παραγωγή ανδρογόνων είναι ανεξάρτητη από τα χαμηλά ή υψηλά επίπεδα πλακουντιακής hCG με τελικό αποτέλεσμα πιθανόν το συνδυασμό συμπτωμάτων (π.χ. υποσπαδίας-κρυσορχία). Η παραπάνω υπόθεση συνοψίζεται στην εικόνα 31.

5.3. Παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση κρυσορχίας

Ο καθορισμός επιδημιολογικών παραγόντων κινδύνου εμφάνισης κρυσορχίας είναι δύσκολος εξαιτίας της ύπαρξης πολύπλοκων αλληλεπιδράσεων μεταξύ διαφόρων ανατομικών, κληρονομικών, ορμονικών και κοινωνικοοικονομικών ή περιβαλλοντικών συνθηκών και δεν υπάρχει πάντα ομοφωνία μεταξύ των διαφόρων συγγραφέων. Όπως έχει ήδη αναφερθεί παραπάνω, η κρυσορχία είναι συχνότερη στα πρόωρα και λιποβαρή άρρενα νεογέννητα. Ωστόσο, μετά από διόρθωση ως προς το



γέννησης φάνηκε ότι η ηλικία κύησης δεν αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα υ. Από την άλλη πλευρά, η επίδραση του βάρους γέννησης δεν επηρεάζεται από διόρθωση ως προς την ηλικία κύησης. Επομένως, το χαμηλό βάρος της είναι ο κύριος παράγοντας κινδύνου για την εμφάνιση κρυφορχίας κατά το έτος της ζωής ανεξάρτητα από τη διάρκεια της κύησης.^{538,544,546,547}

Άλλοι παράγοντες κινδύνου που έχουν κατά καιρούς προταθεί είναι οι εξής: υείς ανωμαλίες όπως υποσπαδίας, άλλες ανωμαλίες του ουροποιογεννητικού υ πεπτικού συστήματος και εξάρθρημα/υπεξάρθρημα του ισχίου,^{527,538,544,547} κές της κύησης όπως τοξιναιμία, ολιγοϋδράμνιο, υπέρταση της κύησης, λαμπσία, υπερέμεση,^{538,544-546} καισαρική επέμβαση,⁵³⁸ δίδυμη κύηση,⁵²⁷ οπίσθια λή,^{546,548} κάπνισμα⁵⁴⁸ ή χρήση αναλγητικών κατά τη διάρκεια της οσύνης,⁵³³ ομάδα αίματος της μητέρας (A Rh⁺ και B Rh⁺),⁵²⁵ πρωτοτοκία,^{547,548} ή παχυσαρκία,^{543,538} οικογενειακό ιστορικό κρυφορχίας.⁵³³



να 31. Μηχανισμός ερμηνείας της εμφάνισης κρυφορχίας και υποσπαδία στα πλαίσια με βάση την hCG. A', B', Γ': πρώτο, δεύτερο, τρίτο τρίμηνο κύησης. TESTO: οστερόνη, LC: Leydig Cell, A, K, Φ, X: Άνοιξη, Καλοκαίρι, Φθινόπωρο, Χειμώνας.^{16*}

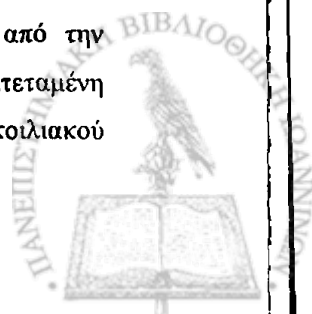


6. Κρυψορχία στα πλαίσια γενετικών συνδρόμων

Η διαταραχή της ορχικής καθόδου απαντά συνήθως ως μεμονωμένη φαινοτυπική έκφραση. Ωστόσο, μπορεί επίσης να συνυπάρχει με άλλες συγγενείς ανωμαλίες του ουροποιογεννητικού συστήματος, ιδιαίτερα με υποσπαδία^{527,538,544} σε ποσοστό $\cong 10\%$ των περιπτώσεων.³ Υπάρχει μια πλειάδα αναγνωρισμένων σποραδικών ή κληρονομούμενων (Μενδελιανών ή χρωμοσωμικών) συνδρόμων, στα οποία η επίπτωση της κρυψορχίας είναι σημαντικά υψηλότερη από εκείνη του γενικού πληθυσμού. Μεταξύ αυτών περιλαμβάνονται διάφορα ορμονικά σύνδρομα (βλέπε παρακάτω), το σύνδρομο Eagle-Barrett (prune-belly),⁽¹⁾ αμαρική εκτροφία, ομφαλοκήλη, εξόμφαλος, γαστρόσχιση, βαλβίδες οπίσθιας ουρήθρας, δισχιδής ράχη και εγκεφαλική παράλυση.¹

Η αναφερόμενη επίπτωση χρωμοσωμικών ανωμαλιών σε ασθενείς με κρυψορχία ποικίλλει στη διεθνή βιβλιογραφία από 0 έως 6,52%.⁵⁴⁹⁻⁵⁵⁶ Ωστόσο, οι περισσότερες αναφορές προέρχονται από μικρές σειρές και επομένως τα αποτελέσματα μπορεί να μην είναι ακριβή. Πρόσφατα, στη μεγαλύτερη σειρά 916 ασθενών με μεμονωμένη και συνοδό κρυψορχία,⁵⁵⁷ η αναφερόμενη επίπτωση χρωμοσωμικών ανωμαλιών υπολογίστηκε 1,84% και 6,67%, αντίστοιχα. Πιο συχνές ήταν οι φυλετικές (66,67%) από τις αυτοσωματικές χρωμοσωμιακές διαταραχές, με τη μεγαλύτερη επίπτωση σε ασθενείς με μεμονωμένη κρυψορχία. Οι φυλετικές χρωμοσωμιακές εκτροπές που απαντούν στο σύνδρομο Klinefelter (πλήρες και μωσαϊκό) ήταν οι συχνότερα παρατηρούμενες (12/916), ακολουθούμενες από διάφορες αυτοσωματικές (10/916) και άλλου τύπου φυλετικές χρωμοσωμιακές διαταραχές (5/916). Η διαφορά στην επίπτωση των χρωμοσωμικών ανωμαλιών δεν ήταν σημαντική μεταξύ του πληθυσμού ασθενών με ετερόπλευρη ή αμφοτερόπλευρη κρυψορχία. Χρωμοσωμιακές ανωμαλίες που έχουν συσχετιστεί με την κρυψορχία περιλαμβάνουν:²⁵² απαλοιφές (4p, 5p, 9p, 11q, 13q, 18q), διπλασιασμούς (3q, 4p, 10q, 15p), τριπλοειδίες και τρισωμίες (9, 13, 18).

⁽¹⁾ Η αμφοτερόπλευρη ενδοκοιλιακή κρυψορχία αποτελεί σταθερό εύρημα που αποδίδεται είτε σε παρακώλυση της πρόσβασης των κατερχόμενων όρχεων στα έσω βουβωνικά στόμια από την διατεταμένη ουροδόχο κύστη, είτε σε αποδιοργάνωση του ορχικού οίακα από τη διατεταμένη ουροδόχο κύστη είτε σε χαμηλή ενδοκοιλιακή πίεση λόγω των ελλειμμάτων του κοιλιακού τοιχώματος.¹⁷⁰



Διαταραχή της ορχικής καθόδου συνοδευόμενη από άλλες φαινοτυπικές ανωμαλίες έχει περιγραφεί σε περιπτώσεις με ιδιοπαθή υπογοναδοτροφικό υπογοναδισμό (idiopathic hypogonadal hypogonadism, ΙΗΗ) που οφείλεται σε μεταλλάξεις του γονιδίου KAL (Χρ 22.3: σχετίζεται με το φυλοσύνδετο σύνδρομο, KS),⁵⁵⁸ του γονιδίου DAX1 (Χρ21: σχετίζεται με το φυλοσύνδετο τύπο ΑΗC)¹⁴⁶ και το γονίδιο που κωδικοποιεί τον υποδοχέα της GnRH (4q21.2: σχετίζεται με τον αυτοσωματικό υπολειπόμενο νορμοσμικό (normosmic ΙΗΗ, nΙΗΗ)).⁵⁵⁹ Η συνολική επίπτωση της κρυσορχίας είναι έως και 30% στον ΙΗΗ, αλλά η ακριβής επίπτωση ποικίλλει μεταξύ των διαφόρων μορφών αυτής της ετερογενούς κλινικής οντότητας (50-70% στο KS με αμφοτερόπλευρη κρυσορχία στο 75%, έως και 80% στο φυλοσύνδετο KS, 23% στο nΙΗΗ με αμφοτερόπλευρη κρυσορχία στο 44%, χαμηλή επίπτωση παρόμοια με αυτή του γενικού πληθυσμού σε nΙΗΗ με κάποιες ενδείξεις ενήβωσης).^{560,559} Η παρατήρηση ότι η επίπτωση της κρυσορχίας είναι περίπου τρεις φορές μεγαλύτερη στο KS από ότι στον nΙΗΗ παρά το ότι οι όγκοι των όρχεων είναι συγκρίσιμοι, είναι ενδεικτική μιας πρωτοπαθούς διαταραχής της ορχικής καθόδου στο KS που είναι ανεξάρτητη δηλαδή από την έλλειψη των γοναδοτροφινών.⁵⁵⁹

Τα σύνδρομα Prader-Willi και Borjeson-Forsman-Lehmann είναι σπάνια σύνδρομα που χαρακτηρίζονται από την εμφάνιση μεταξύ άλλων, πρωτοπαθούς δυσλειτουργία του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-γονάδων και ετερόπλευρη ή αμφοτερόπλευρη κρυσορχία σε ποσοστό έως και 80-100%.^{252,562,563} Το σύνδρομο Prader-Willi είναι μια κλασσική διαταραχή γενωμικής αποτύπωσης (genomic imprinting).⁵⁶⁴ Μια απαλοιφή τμήματος του πατρικής προέλευσης χρωμοσώματος 15 (15q11-q13) παρατηρείται σε ποσοστό 70% των περιπτώσεων, ενώ οι υπόλοιπες περιπτώσεις εμφανίζουν μητρική μονογονεϊκή δισωμία της ίδιας χρωμοσωμιακής περιοχής.⁵⁶⁵⁻⁵⁶⁷ Το σύνδρομο Borjeson-Forsman-Lehmann αποτελεί συνδρομική φυλοσύνδετη μορφή διανοητικής καθυστέρησης με ελάχιστες συνοδές σωματικές ανωμαλίες, η οποία σχετίζεται με ένα γενετικό τόπο 17Mb στην περιοχή Χq26-q27.⁵⁶⁸ Προσφάτως, ο τόπος αυτός περιορίστηκε αδρά σε 9Mb, όπου περιλαμβάνεται ένας αριθμός γονιδίων, μεταξύ των οποίων και ένα νέο γονίδιο, το PHF6, στο οποίο ταυτοποιήθηκαν μεταλλάξεις τόσο σε οικογενείς όσο και σε σποραδικές περιπτώσεις του συνδρόμου.⁵⁶⁹

Ένα άλλο σπάνιο σύνδρομο στο οποίο μπορεί να συνυπάρχει διαταραχή της

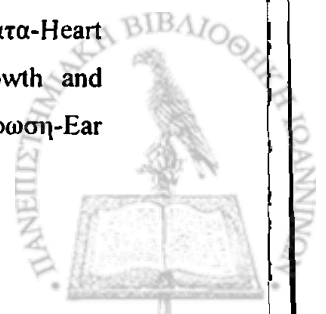


ορχικής καθόδου είναι η συσχέτιση CHARGE.⁽¹⁾ Διάφοροι γενετικοί μηχανισμοί έχουν προταθεί για να ερμηνεύσουν αυτή τη συσχέτιση, ωστόσο η αιτιολογία παραμένει αδιευκρίνιστη.⁵⁷⁰⁻⁵⁷²

Ανωμαλίες της LH ή του υποδοχέα της (LH receptor, LHR) μπορεί θεωρητικά να επηρεάζουν την ορχική κάθοδο. Μια μετάλλαξη του γονιδίου που κωδικοποιεί την αλυσίδα β της LH έχει ανακοινωθεί ότι προκαλεί διαταραχή της δεσμευτικής ικανότητας του μορίου στον υποδοχέα του, οδηγώντας σε διαταραχή της στεροειδογένεσης και υπογονιμότητα στους ετεροζυγώτες με επακόλουθη καθυστέρηση της ήβης, ολιγοσπερμία και υποπλασία των κυττάρων Leydig.⁵⁷³ Έχει ανακοινωθεί ότι η διαταραχή της ορχικής καθόδου σχετίζεται με την υποπλασία των κυττάρων Leydig, μια αυτοσωματική υπολειπόμενη διαταραχή που χαρακτηρίζεται από ανώμαλη διαφοροποίηση αυτών των κυττάρων που οφείλεται σε λειτουργικές μεταλλάξεις του γονιδίου που κωδικοποιεί τον LHR.⁵⁷⁴⁻⁵⁷⁶

Ελλείμματα στη βιοσύνθεση ή δράση της τεστοστερόνης επηρεάζουν την ανδρική φαινοτυπική ανάπτυξη και οδηγούν σε άρρεν ψευδο-ερμαφροδιτισμό. Το πιο συχνό αίτιο άρρενος ψευδο-ερμαφροδιτισμού είναι η ελλειμματική ανδρογονική δραστηριότητα συνέπεια μεταλλάξεων στο γονίδιο που κωδικοποιεί τον ανδρογονικό υποδοχέα (androgen receptor, AR) (Xq11-12) καθώς και στο γονίδιο που κωδικοποιεί το ένζυμο 5α-ρεδουκτάση 2 (SRD5A2) (2p23).⁵⁷⁷ Έχει εκφραστεί η υπόθεση ότι η διαταραχή της ορχικής καθόδου ίσως παριστά μορφή ερμαφροδιτισμού ακόμη και εάν είναι μεμονωμένη.¹⁶⁵ Ωστόσο, γενετικές μεταβολές όπως σημειακές μεταλλάξεις των γονιδίων SRD5A2 ή AR, καθώς και επαναληπτικές πολυμορφικές (CAG)_n τρινουκλεοτιδικές αλληλουχίες του εξωνίου 1 του γονιδίου AR, οι οποίες σχετίζονται άμεσα με την εμφάνιση μεμονωμένης ανδρικής υπογονιμότητας και μέτριου έως σοβαρού βαθμού υπο-αρρενοποίηση των γεννητικών οργάνων, φαίνεται ότι αποτελούν πολύ σπάνια αίτια μεμονωμένης κρυπορχίας στον άνθρωπο.^{292,578-582} Ωστόσο, έχει ανακοινωθεί ότι ασθενείς με αμφοτερόπλευρη ή ετερόπλευρη κρυπορχία διαθέτουν μεγαλύτερες αλυσίδες CAG επαναλήψεων στο γονίδιο του AR συγκριτικά με φυσιολογικούς μάρτυρες, πράγμα που υποδηλώνει ότι η διακύμανση

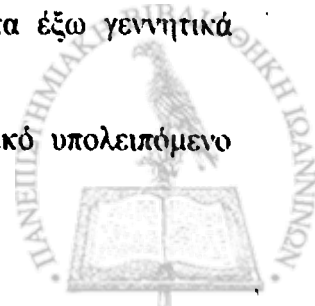
⁽¹⁾ CHARGE association: οφθαλμικό κολόβωμα-Coloboma of the eye, καρδιακά ελλείμματα-Heart defect, ατρησία χοάνης-Atresia of the choana, καθυστερημένη ανάπτυξη-Retarded growth and development, υποπλασία γεννητικών οργάνων-Genital hypoplasia, ανωμαλίες ώτων ή κώφωση-Ear anomalies or deafness)



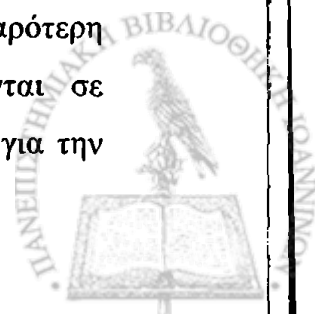
των επαναλήψεων αυτών ίσως επηρεάζει την ορχική κάθοδο.⁵⁸³

Έχουν επίσης περιγραφεί μεταλλάξεις που κληρονομούνται κατά τον αυτοσωματικό υπολειπόμενο τύπο και σχετίζονται με την κρυπορχία στα πλαίσια άρρενος ψευδο-ερμαφροδιτισμού. Οι μεταλλάξεις αυτές επηρεάζουν ειδικές ενζυμικές αντιδράσεις που εμπλέκονται στη μετατροπή της χοληστερόλης σε τεστοστερόνη. Τέτοιο παράδειγμα αποτελεί η σπάνια έλλειψη της 17α-υδροξυλάσης/17,20-λυάσης που οδηγεί σε συγγενή υπερπλασία των επινεφριδίων. Η υπέρταση λόγω της υπερπαραγωγής προδρόμων των αλατοκορτικοειδών και οι φυλετικές ανωμαλίες λόγω της διαταραχής της βιοσύνθεσης της τεστοστερόνης, αποτελούν τα κύρια χαρακτηριστικά του συνδρόμου. Τα γενετικώς άρρενα, πάσχοντα άτομα, εμφανίζουν όρχεις σε ενδοκοιλιακή θέση ή αμφίβολα έξω γεννητικά όργανα με διαταραχή της ορχικής καθόδου. Ένα απλό πολυπεπτίδιο, το κυτόχρωμα P450c17 (CYP17), το οποίο κωδικοποιείται από το γονίδιο CYP17 που εντοπίζεται στην χρωμοσωματική περιοχή 10q24-q25, ευθύνεται για τη δραστηριότητα τόσο της 17α-υδροξυλάσης, όσο και της 17,20-λυάσης. Μεταλλάξεις του CYP17 προκαλούν το σύνδρομο.^{584,585} Επίσης, η έλλειψη της 3β-υδροξυστεροειδο-δεϋδρογενάσης τύπου 2 (HSD3B2) οφείλεται σε μεταλλάξεις του γονιδίου HSD3B2 (1p13.1) και οδηγεί σπάνια σε συγγενή υπερπλασία των επινεφριδίων που κληρονομείται κατά τον αυτοσωματικό υπολειπόμενο τύπο. Τα γενετικώς άρρενα, πάσχοντα άτομα, εμφανίζουν συγγενή υπερπλασία των επινεφριδίων με ή χωρίς απώλεια άλατος και υποαρρενοποίηση των έξω γεννητικών οργάνων (υποσπαδία σε συνδυασμό με παθολογική ποικίλη θέση των όρχεων).⁵⁸⁶⁻⁵⁸⁹ Η έλλειψη της 17β-υδροξυστεροειδο-δεϋδρογενάσης τύπου 3, οφείλεται σε μεταλλάξεις του γονιδίου 17βHSD3 (9q22) που φαίνεται να εκφράζεται κυρίως ή αποκλειστικά στους όρχεις, με αποτέλεσμα την ελλειμματική μετατροπή της εμβρυϊκής ορχικής ανδροστενεδιόνης σε τεστοστερόνη και αποτελεί σπάνια αιτία άρρενος ψευδο-ερμαφροδιτισμού που κληρονομείται κατά τον αυτοσωματικό υπολειπόμενο τύπο.⁵⁹⁰ Τα γενετικώς άρρενα, πάσχοντα άτομα, τυπικά εμφανίζουν φαινότυπο θήλεος (αλλά με όρχεις που εντοπίζονται εντός των βουβωνικών πόρων ή στα μεγάλα χείλη του αιδοίου) κατά τη γέννηση, αλλά υφίστανται σημαντικού βαθμού αρρενοποίηση κατά την περίοδο της αναμενόμενης εφηβείας, ενώ σπανιότερα μπορεί να γεννηθούν με αμφίβολα τα έξω γεννητικά όργανα.⁵⁹¹

Σπάνια σύνδρομα κληρονομούμενα κατά τον αυτοσωματικό υπολειπόμενο



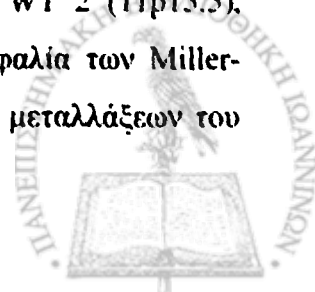
τύπο, στα οποία η διαταραχή της ορχικής καθόδου μπορεί να αποτελεί ένα από τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά σε συνδυασμό με άλλες ουρογεννητικές ανωμαλίες περιλαμβάνουν: 1) το σύνδρομο Dubowitz,⁵⁹² 2) το σύνδρομο πολλαπλών πτερυγίων τύπου Escobar,⁵⁹³ 3) την πανκυτταροπενία του Fanconi,²⁵² 4) το σύνδρομο Fraser,⁵⁹⁴ 5) το σύνδρομο Fryns,²⁵² 6) το σύνδρομο Johanson-Blizzard,²⁵² 7) το σύνδρομο (Laurence-Moon)-Bardet-Biedl που αποτελεί μια γενετικώς ετερογενή διαταραχή που αφορά σε γονίδια τα οποία εντοπίζονται σε τουλάχιστον έξι γνωστούς τόπους: 11q13 (BBS1), 16q21 (BBS2), 3p13p12 (BBS3), 15q22.3q23 (BBS4), 2q31 (BBS5), 20p12 (BBS6-MKKS: ο τύπος διαταραχής που οφείλεται σε μεταλλάξεις αυτού του γονιδίου είναι αλληλικός με το αλληλεπικαλυπτόμενο σύνδρομο McKusic-Kaufman syndrome),⁵⁹⁵⁻⁵⁹⁷ 8) το σύνδρομο Meckel-Gruber που αποτελεί την πιο κοινή μονογονική αιτία ελλειμμάτων του νευρικού σωλήνα. Τρία υπεύθυνα γονίδια έχουν αναγνωριστεί MKS1, 2 και 3 που εντοπίζονται στις περιοχές 17q21-24, 11q13 και 8q24, αντίστοιχα,^{598,599} 9) η τριγωνοκεφαλία του Opitz, σύνδρομο (C): σχεδόν όλοι οι ασθενείς αποτελούν σποραδικές περιπτώσεις, αν και έχει προταθεί επίσης ως πιθανός ο αυτοσωματικός υπολειπόμενος τύπος κληρονομικότητας,^{600,601} 10) Peter-plus syndrome,²⁵² 11) το σύνδρομο Robinow: έχει επίσης περιγραφεί μια μορφή του συνδρόμου που κληρονομείται κατά τον αυτοσωματικό επικρατητικό τύπο, αν και είναι άγνωστο επί του παρόντος εάν ο συγκεκριμένος τύπος οφείλεται σε μεταλλάξεις του γονιδίου ROR2 (9q22) που είναι υπεύθυνο για τον κλασικό τύπο του συνδρόμου,^{602,603} 11) τη φωκομέλια Roberts-SC: εδώ έχουν αναγνωριστεί χρωμοσωματικά ελλείμματα στις μισές περίπου περιπτώσεις, ενώ έχει ενοχοποιηθεί ο πρόωρος διαχωρισμός της ετεροχρωματίνης από πολλά χρωμοσώματα καθώς και ανωμαλίες του κυτταρικού κύκλου διαίρεσης,^{604,605} 12) το σύνδρομο RSH/Smith-Lemli-Opitz: αποτελεί τη συχνότερη εγγενή διαταραχή βιοσύνθεσης της χοληστερόλης, η οποία οφείλεται σε ελλειμματική δραστηριότητα του ενζύμου 7-δεϋδρο-χολεστερολ-ρεδουκτάση (7-DHCR), εξαιτίας μεταλλάξεων του γονιδίου DHCR7 (11q13),⁶⁰⁶⁻⁶⁰⁹ 13) τον οστεοδυσπλαστικό «νανισμό» του Seckel: δύο υπεύθυνοι γενετικοί τόποι έχουν μέχρι τώρα εντοπιστεί (3q22.1-q24 και 18p11.31-q11.2),⁶¹⁰⁻⁶¹² 14) το σύνδρομο Varadi-Papp,⁶¹³ 15) γεννητο-επιγονατιδικό σύνδρομο,⁶¹⁴ 16) το εγκεφαλοπατονεφρικό (Zellweger) σύνδρομο: η σοβαρότερη από τις «διαταραχές βιογένεσης των περοξυσωμάτων» που οφείλονται σε μεταλλάξεις των γονιδίων PEX, τα οποία κωδικοποιούν πεπτίδια αναγκαία για την



είσοδο πρωτεϊνών εντός των αυλών των περοξυσωμάτων. Πάνω από 50% των ασθενών με αυτό το σύνδρομο φέρουν μεταλλάξεις του γονιδίου PEX1.^{615,616}

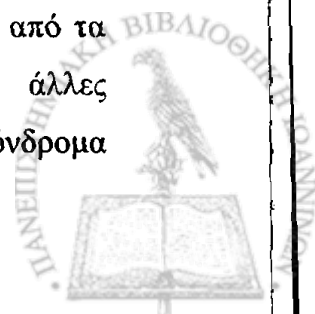
Σπάνια σύνδρομα κληρονομούμενα κατά τον αυτοσωματικό υπολειπόμενο τύπο, στα οποία η διαταραχή της ορχικής καθόδου μπορεί να αποτελεί ένα από τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά συνήθως χωρίς να συνδυάζεται με άλλες ουρογεννητικές ανωμαλίες περιλαμβάνουν: 1) το σύνδρομο Schinzel (acrocallosal syndrome),⁶¹⁷ 2) το σύνδρομο Carpenter (ακροκεφαλοπολυσυνδακτυλία τύπου 2,⁶¹⁸ 3) το σύνδρομο Donohue (leprechaunism): η πιο σοβαρή μορφή υπερβολικής αντίστασης στην ινσουλίνη που οφείλεται σε μεταλλάξεις του γονιδίου που κωδικοποιεί τον υποδοχέα της ορμόνης,^{619,620} 4) το σύνδρομο Pena-Shokeir (fetal akinesia deformation sequence): μια ετερογενής ομάδα διαταραχών, στην οποία η παρατεταμένη μείωση ή απουσία εμβρυϊκών κινήσεων οδηγεί σε μια σειρά από ανωμαλίες. Υπάρχουν ενδείξεις ότι τουλάχιστον κάποιες περιπτώσεις ακολουθούν τον αυτοσωματικό υπολειπόμενο τύπο κληρονομικότητας,^{621,622} 5) το θανατηφόρο σύνδρομο πολλαπλών πτερυγίων: αναφέρεται επίσης φυλοσύνδετη κληρονομικότητα,²⁵² 6) τη φωκομέλια του Schnitzel,⁶²³ 7) το σύνδρομο Martsolf,^{624,625} 8) το σύνδρομο McDonough,⁶²⁶ 9) το σύνδρομο (ούς-επιγονατίδα-βραχύ ανάστημα ear-patella-short stature) Meier-Gorlin,^{627,628} 10) το σύνδρομο πτώσης βλεφάρων-διάστασης ορθών κοιλιακών μυών-δυσπλασίας ισχίων,⁶²⁹ 11) το σύνδρομο Nevo,⁶³⁰ 12) το ωτο-προσωπο-οστικό-γεννητικό σύνδρομο (Oto-facio-osseous-gonadal syndrome).⁶³¹

Σπάνια σύνδρομα κληρονομούμενα κατά τον αυτοσωματικό επικρατητικό τύπο, στα οποία η διαταραχή της ορχικής καθόδου μπορεί να αποτελεί ένα από τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά σε συνδυασμό με άλλες ουρογεννητικές ανωμαλίες περιλαμβάνουν: 1) το σύνδρομο Aert: πρόκειται για κρानιοσυνόστωση που οφείλεται σε μεταλλάξεις του γονιδίου που κωδικοποιεί τον ινοβλαστικό αυξητικό παράγοντα 2 (FGFR2) (10q25-26). Σποραδικές περιπτώσεις του συνδρόμου σχετίζονται επίσης συχνά με προχωρημένη γονική ηλικία.^{632,633} 2) το σύνδρομο Beckwith-Wiedemann: συνήθως απαντά σε άτομα με φυσιολογικό καρύοτυπο και αρνητικό οικογενειακό ιστορικό, ωστόσο, έχει αναφερθεί και κληρονομικότητα κατά τον αυτοσωματικό επικρατητικό τύπο: ανωμαλίες του γονιδίου WT 2 (11p15.5), μονογονεϊκή πατρική δισωμία του 11p15.5,^{644,634} 3) τη λυσεγκεφαλία των Miller-Dieker (τύπου I): σχετίζεται με την παρουσία μικροαπαλοιφών ή μεταλλάξεων του



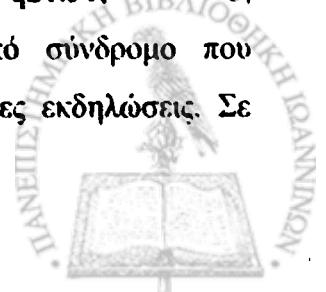
γονιδίου LIS1 (17p13.3), το οποίο κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που είναι υπεύθυνη για την ορθή νευρωνική μετανάστευση^{252,635} 4) το σύνδρομο Oritz G/BBB: πρόκειται για μια γενετικώς ετερογενή διαταραχή που οφείλεται σε μεταλλάξεις είτε ενός αυτοσωματικού (22q11.2), είτε ενός φυλοσύνδετου γονιδίου (MID1, Xp22.3),^{636,637} 5) το σύνδρομο Pallister (ωλενιο-μαζικό): οφείλεται σε μεταλλάξεις του γονιδίου TBX3 (12q23-q24.1),^{638,639} 6) το σύνδρομο popliteal pterygium: συνήθως τα άτομα αυτά εμφανίζουν ορχική εκτοπία. Οφείλεται σε μεταλλάξεις του γονιδίου που κωδικοποιεί τον ρυθμιστικό παράγοντα ιντερφερόνης 6 που εντοπίζεται στην κρίσιμη γενετική περιοχή του συνδρόμου Van der Woude (1q32-q41) γεγονός που υποδηλώνει ότι οι δύο αυτές οντότητες είναι αλληλικές,⁶⁴⁰⁻⁶⁴² 7) τον υπερτελορισμό Teebi,^{643,644} 8) το σύνδρομο Leopard.⁶⁴⁵ εδώ παρατηρούνται αρκετά κλινικά χαρακτηριστικά κοινά με το σύνδρομο Noonan (NS), μια ετερογενή γενετικά και φαινοτυπικά διαταραχή που κληρονομείται κατά τον αυτοσωματικό επικρατητικό τύπο, η οποία πολύ συχνά σχετίζεται με διαταραχή της ορχικής καθόδου συνήθως χωρίς συνύπαρξη άλλων ουρογεννητικών ανωμαλιών. Πρόσφατα βρέθηκε ότι μεταλλάξεις του γονιδίου PTPN11 (12q24.1) που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη φωσφατάση της τυροσίνης SHP-2, είναι υπεύθυνες για τις μισές περίπου περιπτώσεις του NS.^{646,647} Με βάση το γεγονός ότι άλλες μεταλλάξεις του ίδιου γονιδίου έχουν πρόσφατα ανιχνευτεί σε περιπτώσεις συνδρόμου Leopard, έχει προταθεί ότι αυτές οι δύο οντότητες παριστούν αλληλικές γενετικές διαταραχές.⁶⁴⁸ Υποτίθεται ότι κάποιες μεταλλάξεις του γονιδίου PTPN11 σχετίζονται με τον τυπικό φαινότυπο NS, ενώ άλλες σχετίζονται με τον φαινότυπο NS σε συνδυασμό με την εμφάνιση δερματικών βλαβών (καφεγαλακτόχρωες κηλίδες κ.λ.π) του συνδρόμου Leopard.⁶⁴⁹ 9) τον νανισμό των Silver-Russell, ο οποίος αποτελεί μια άλλη γενετικώς ετερογενή διαταραχή στην οποία εμπλέκονται διάφορα χρωμοσώματα. Διαταραχή της ορχικής καθόδου απαντά σε ποσοστό ~40-50% των περιπτώσεων.^{650,651} Σε ένα ποσοστό ~10% έχει ανιχνευτεί μητρική μονογονεϊκή δισωμία που αφορά στο χρωμόσωμα 7.⁶⁵² Ο μητρικός γενετικός τόπος 7p11.2-p13 (που περιέχει το γονίδιο GRB10) θεωρείται ως υποψήφιος-υπεύθυνος, αφού διπλασιασμός αυτού έχει συσχετιστεί με το σύνδρομο.^{652,653}

Σπάνια σύνδρομα κληρονομούμενα κατά τον αυτοσωματικό επικρατητικό τύπο, στα οποία η διαταραχή της ορχικής καθόδου μπορεί να αποτελεί ένα από τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά συνήθως χωρίς να συνδυάζεται με άλλες ουρογεννητικές ανωμαλίες περιλαμβάνουν: 1) την ακροδυσόστωση,²⁵² 2) σύνδρομα

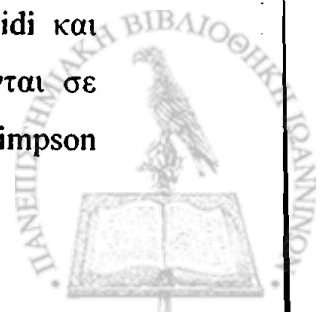


κρανιοσυνόστωσης όπως τα σύνδρομα Pfeiffer και Saethre-Chotzen, τα οποία σχετίζονται με μεταλλάξεις των γονιδίων FGFR 1, 2, 3 και TWIST (8p12, 10q25, 4p16 και 7p21, αντίστοιχα),⁶⁵⁴⁻⁶⁵⁸ 3) το σύνδρομο Ehlers-Danlos: υπολειπόμενος τύπος κληρονομικότητας έχει επίσης τεκμηριωθεί σε άτομα με έλλειψη τεναςκίνης X (tenascin-X),^{659,660} 4) τα σύνδρομα Freeman-Sheldon και Gordon που αποτελούν μορφές αρθρογρύπωσης. Αυτοσωματικός υπολειπόμενος τύπος κληρονομικότητας έχει επίσης αναφερθεί σε περιπτώσεις του πρώτου συνδρόμου,^{252,661,662} 5) το σύνδρομο Rubinstein-Taybi μπορεί να οφείλεται σε χρωμοσωμιακές αναδιατάξεις (μετακινήσεις, αναστροφές, μικροαπαλοιφές) αλλά στη συντριπτική πλειοψηφία των περιπτώσεων οφείλεται σε σημειακές μεταλλάξεις. Συγκεκριμένα, συνήθως είναι το αποτέλεσμα ανωμαλίας της περιοχής HAT του ενός αλληλίου του γονιδίου που κωδικοποιεί την συνδετική πρωτεΐνη CREB (16p13.3), η οποία είναι απαραίτητος μεταγραφικός συνπαράγοντας εμπλεκόμενος στη ρύθμιση της μεταγραφής, της ανακατασκευής της χρωματίνης και στην ολοκλήρωση αρκετών οδών διαβίβασης σημάτων (signal transduction pathways).⁶⁶³⁻⁶⁶⁵

Φυλοσύνδετα κληρονομικά σύνδρομα και σύνδρομα που κληρονομούνται με άγνωστο τρόπο, τα οποία μπορεί να σχετίζονται με διαταραχή της ορχικής καθόδου περιλαμβάνουν: 1) το ανοφθαλμο-οισοφαγο-γεννητικό σύνδρομο (άγνωστος τύπος κληρονομικότητας),⁶⁶⁶ 2) τη συσχέτιση BRESHECK (Διανοητική καθυστέρηση-Brain Retardation, Εξωδερμική δυσπλασία-Ectodermal dysplasia, Σκελετικές ανωμαλίες-Skeletal deformities, νόσος Hirschsprung, οφθαλμικές/ωτικές ανωμαλίες-Ear/Eye anomalies, Υπερωιοσχιστία/κρυσορχία-Cleft palate/ Cryptorchidism και νεφρική δυσπλασία/υποπλασία-Kidney dysplasia/hypoplasia): Πιθανή θεωρείται η φυλοσύνδετη κληρονομικότητα,⁶⁶⁷ 3) την προσωπο-γεννητική δυσπλασία (σύνδρομο Aarskog) που αποτελεί φυλοσύνδετη υπολειπόμενη διαταραχή και χαρακτηρίζεται από την παρουσία αβαθούς οσχέου και κήλης. Οφείλεται σε μεταλλάξεις του γονιδίου FGD1 (Xp11.21),^{668,669} 4) το μηριαίο-προσωπικό σύνδρομο που είναι άγνωστης αιτιολογίας, πιθανόν ιδιοπαθές, σποραδικό σχετιζόμενο με το μητρικό διαβήτη, αν και έχει υποστηριχτεί αυτοσωματικός επικρατητικός τύπος κληρονομικότητας.^{670,671} 5) το σύνδρομο FG που αποτελεί φυλοσύνδετη υπολειπόμενη διαταραχή. Πρόσφατα έχει ενοχοποιηθεί ένα γονίδιο που εντοπίζεται στην περιοχή Xq12-q21.31,^{252,672,673} 6) το σύνδρομο Gorlin-Cohen²⁵² και το ωτο-υπερωιο-δακτυλικό σύνδρομο που αποτελούν δύο φυλοσύνδετες σκελετικές δυσπλασίες με ποικίλες εκδηλώσεις. Σε



περιπτώσεις του τελευταίου συνδρόμου έχει ανακοινωθεί γενετική ζεύξη με έναν τόπο που εντοπίζεται στην περιοχή Χq28.^{674,675} Πρόσφατα έχει προταθεί ότι τα δύο αυτά σύνδρομα αποτελούν μια ενιαία οντότητα,⁶⁷⁶ 7) το σύνδρομο King-Denborough (θεωρείται πιθανός ο αυτοσωματικός επικρατητικός τύπος κληρονομικότητας),^{677,678} 8) το σύνδρομο πλάγιας μηνιγγοκήλης (άγνωστος τύπος κληρονομικότητας),⁶⁷⁹ 9) τον υπεροστοτικό νανισμό Lenz-Majewski (άγνωστος τύπος κληρονομικότητας, έχουν ανακοινωθεί και σποραδικές περιπτώσεις),⁶⁸⁰ 10) τη μικροφθαλμία του Lenz που αποτελεί φυλοσύνδετη υπολειπόμενη διαταραχή σχετιζόμενη με ουρογεννητικές ανωμαλίες. Σχετίζεται με τους τόπους Χq27-q28 καθώς και Χp11.4-p21.2),^{681,682} 11) το σύνδρομο Lowe που αποτελεί φυλοσύνδετη υπολειπόμενη διαταραχή. Οφείλεται σε μεταλλάξεις του γονιδίου OCRL1 (Χq25-q26), το οποίο κωδικοποιεί μια φωσφατιδυλο-ινοσιτολ-4, 5 διφωσφορική φωσφατάση που εντοπίζεται στη συσκευή Golgi, η οποία φαίνεται ότι παίζει ρόλο στη διακίνηση των κυστιδίων,^{252,683} 12) τη νόσο Norrie-Warburg που οφείλεται σε μεταλλάξεις του γονιδίου NDP (Χp11.3),⁶⁸⁴⁻⁶⁸⁶ 13) το σύνδρομο βλεφαρόπτωσης του Ohdo (άγνωστος τύπος κληρονομικότητας, πιθανή θεωρείται η αυτοσωματική υπολειπόμενη, αυτοσωματική επικρατητική, φυλοσύνδετη επικρατητική καθώς και η μιτοχονδριακή κληρονομικότητα),^{687,688} 14) το σύνδρομο Simpson-Golabi-Behmel που αποτελεί φυλοσύνδετη υπολειπόμενη διαταραχή. Μεταξύ των άλλων παρατηρούνται ανωμαλίες των νεφρών και αυξημένος κίνδυνος για εμβρυϊκού τύπου καρκίνους. Απαλοιφές και μετακινήσεις των γονιδίων GPC3 και GPC4 (Χq26) έχουν θεωρηθεί υπεύθυνες για την παθογένεια του συνδρόμου,^{689,690} 15) το σύνδρομο τηλέκανθου-υποσπαδία (πιθανώς φυλοσύνδετο), 16) το σύνδρομο von Voss-Cherstvoy που περιλαμβάνει μεγάλο αριθμό ουρογεννητικών ανωμαλιών. Η αιτιολογία είναι άγνωστη αλλά έχει προταθεί ότι κληρονομείται κατά τον αυτοσωματικό υπολειπόμενο τύπο τουλάχιστον σε κάποιες περιπτώσεις. Φαίνεται επίσης ότι κάποιες περιπτώσεις είναι μωσαϊκά για del(13)(q12),^{691,692} 17) τη φυλοσύνδετη ιχθύωση που αποτελεί υπολειπόμενη διαταραχή οφειλόμενη σε μεγάλες απαλοιφές του γονιδίου STS (Χp22.3) στη συντριπτική πλειοψηφία των περιπτώσεων. Ωστόσο, κάποιες περιπτώσεις οφείλονται σε σημειακές μεταλλάξεις ή μερικές απαλοιφές του γονιδίου,^{693,694} 18) τα σύνδρομα φυλοσύνδετης διανοητικής καθυστέρησης όπως τα σύνδρομα Juberg-Marisidi και Smith-Fineman-Myers. Αποτελούν υπολειπόμενες διαταραχές που οφείλονται σε μεταλλάξεις του γονιδίου XNP (Χp13),⁶⁹⁵⁻⁶⁹⁷ 19) το σύνδρομο Young-Simpson



7. Επιπτώσεις της κρυπορχίας

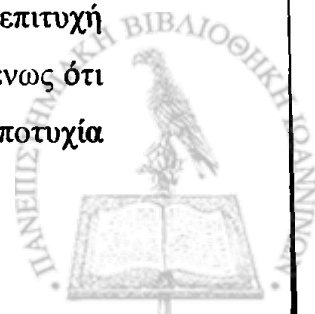
Αν και η κρυπορχία συχνά θεωρείται μια ελάσσονα συγγενής ανωμαλία, η στενή συσχέτιση της με την υπογονιμότητα⁷⁰⁰⁻⁷⁰³ και τον καρκίνο των όρχεων,⁷⁰⁴⁻⁷¹¹ καταδεικνύουν την κλινική της σημασία.

7.1. Κρυπορχία και υπογονιμότητα

7.1.1. Επιδημιολογία της υπογονιμότητας

Η ανάλυση σπέρματος και η εκτίμηση της πατρότητας με βάση το κλινικό ιστορικό, αποτελούν τους συχνότερα χρησιμοποιούμενους δείκτες ανδρικής γονιμότητας. Η κρυπορχία είναι ο πιο κοινός αιτιολογικός παράγοντας αζωοσπερμίας.⁷¹² Η επίπτωση της αζωοσπερμίας στο γενικό πληθυσμό εκτιμάται γύρω στο 0,4-0,5%.⁷¹³ Ωστόσο, το 89% περίπου των ασθενών με αμφοτερόπλευρη κρυπορχία που δεν έχουν υποβληθεί σε θεραπεία εμφανίζουν αζωοσπερμία (σχεδόν όλοι είναι υπογόνιμοι), σε αντιδιαστολή με εκείνους που έχουν υποβληθεί σε φαρμακευτική ή χειρουργική αντιμετώπιση, οι οποίοι εμφανίζουν αζωοσπερμία σε ποσοστό 32% και 46%, αντίστοιχα.⁷¹³⁻⁷¹⁵ Από τους ασθενείς με μη αντιμετωπισθείσα ετερόπλευρη κρυπορχία, το 50-70% εμφανίζουν αζωοσπερμία ή ολιγοσπερμία.⁷¹⁵ Ωστόσο, η επίπτωση της αζωοσπερμίας στην ετερόπλευρη κρυπορχία κυμαίνεται γύρω στο 13% ανεξάρτητα από το αν ο ασθενής έχει ή όχι αντιμετωπιστεί.⁷¹⁴

Η πατρότητα θεωρείται καλύτερος δείκτης εκτίμησης της ανδρικής γονιμότητας από την ανάλυση σπέρματος⁷¹⁶ αφού είναι γνωστό ότι ασθενείς με αριθμό σπερματοζωαρίων κάτω του φυσιολογικού είναι δυνατόν να γονιμοποιήσουν.⁷¹⁷ Υπάρχουν δεδομένα που δείχνουν ότι η πατρότητα είναι σημαντικά μειωμένη σε ασθενείς με ιστορικό αμφοτερόπλευρης κρυπορχίας (61,5-65,3%), πράγμα που δεν ισχύει όμως, σε αντίθεση με παλαιότερες αντιλήψεις, για τους ασθενείς με ιστορικό ετερόπλευρης κρυπορχίας, στους οποίους το αντίστοιχο ποσοστό είναι συγκρίσιμο με εκείνο του γενικού ανδρικού πληθυσμού (89,7% και 93,2-94,6%, αντίστοιχα).⁷¹⁸⁻⁷²¹ Επιπλέον, άνδρες με έναν όρχι, ανεξαρτήτως της αιτίας απώλειας (συγγενής ετερόπλευρη ανορχία, ατροφία επί εδάφους κρυπορχίας), εμφανίζουν ποσοστά πατρότητας παρόμοια με ασθενείς που υποβλήθηκαν σε επιτυχή αντιμετώπιση ετερόπλευρης κρυπορχίας ή υγιείς μάρτυρες.⁷²¹ Φαίνεται επομένως ότι η ανδρική υπογονιμότητα (επί εδάφους κρυπορχίας) οριζόμενη ως αποτυχία



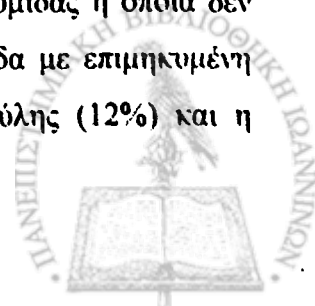
γονιμοποίησης εντός χρονικού διαστήματος 12 μηνών τακτικών και ελεύθερων σεξουαλικών επαφών, αφορά μόνο σε ασθενείς με αμφοτερόπλευρη διαταραχή της ορχικής καθόδου.^{718,719} Η θέση ανεύρεσης⁷²² καθώς και το μέγεθος του όρχι κατά την ορχεοπηξία⁷²³ δεν φαίνεται να καθορίζει σημαντικά τη μελλοντική γονιμότητα των ασθενών με ιστορικό ετερόπλευρης κρυπορχίας. Αντίθετα, τα υψηλά επίπεδα FSH, ο χαμηλός αριθμός σπερματοζωαρίων και η τοποθέτηση διαπαρεγχυματικών ραφών, αποτελούν παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση υπογονιμότητας στο μέλλον.^{724,725}

7.1.2. Παθογένεια της υπογονιμότητας

Οι ακριβείς υπεύθυνοι κυτταρικοί και μοριακοί μηχανισμοί που ευθύνονται για την παθογένεια της υπογονιμότητας που παρατηρείται σε ασθενείς με κρυπορχία δεν έχουν ακόμη πλήρως διευκρινιστεί. Διάφοροι παράγοντες έχουν κατά καιρούς θεωρηθεί υπεύθυνοι μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται: συνοδές ανωμαλίες της επιδιδυμίδας, μειωμένος αριθμός σπερματικών σωληναρίων, μειωμένος αριθμός σπερματογονίων ανά σπερματικό σωληνάριο, ήπια συνοδός υπογοναδική κατάσταση, επαγωγή αντισπερματικών αντισωμάτων, αυξημένος ρυθμός απόπτωσης των βλαστικών γεννητικών κυττάρων, μικροαπαλοιφές της περιοχής Yq11.

7.1.2.1. Ανωμαλίες της επιδιδυμίδας

Ανωμαλίες της επιδιδυμίδας απαντούν σε ποσοστό 36-43% των περιπτώσεων διαταραχής της ορχικής καθόδου.⁷²⁶⁻⁷²⁸ Αυτές υποδιαιρούνται σε δύο ομάδες: α) ανωμαλίες συνένωσης των πόρων (anomalies of ductal fusion) και β) ανωμαλίες ανάρτησης των πόρων (anomalies of ductal suspension). Οι ανωμαλίες συνένωσης των πόρων συνήθως απαντούν σε περιπτώσεις με ενδοκοιλιακή ή υψηλή βουβωνική θέση των όρχεων.^{726,728} Συνίστανται σε απώλεια της συνέχειας μεταξύ όρχι και επιδιδυμίδας ή σε απουσία/στένωση τμήματος της επιδιδυμίδας ή του σπερματικού πόρου. Η πιο συχνή ανωμαλία αυτού του τύπου είναι η σαθρή πρόσφυση της κεφαλής της επιδιδυμίδας στον σύστοιχο όρχι (50%), ενώ πλήρης διαχωρισμός ή ατρησία της επιδιδυμίδας ή του σπερματικού πόρου απαντά σε ποσοστό 5-21%. Οι ανωμαλίες ανάρτησης των πόρων εμφανίζονται συχνότερα σε περιπτώσεις με όρχεις σε χαμηλότερη εντόπιση.^{726,728} Εδώ ανήκουν η γωνίωση της επιδιδυμίδας η οποία δεν εφάπτεται στον όρχι (80%), η μερικώς αποχωρισμένη επιδιδυμίδα με επιμηκυμένη ουρά που συνδυάζεται με μακρύ σπερματικό πόρο δίκτην αγκύλης (12%) και η



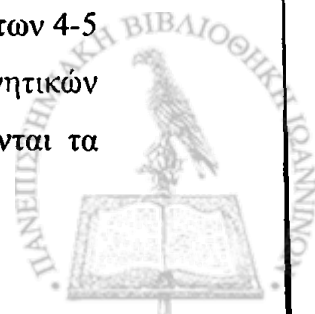
φυσιολογικώς προσαρτημένη επιδιδυμίδα με επιμηκυμένη ουρά που συνδυάζεται με μακρύ σπερματικό πόρο δίκην αγκύλης (8%). Ωστόσο πρέπει να σημειωθεί ότι οι παραπάνω ανωμαλίες είναι δυνατόν να συνδυάζονται και με φυσιολογική ορχική ιστολογία και η παρουσία τους ίσως ερμηνεύει την υπογονιμότητα που παρατηρείται σε κάποιους ασθενείς με διαταραχή της ορχικής καθόδου.

7.1.2.2. Διαταραχή της ιστολογίας των όρχεων

Η επηρεασμένη γονιμότητα που παρατηρείται επί εδάφους κρυψορχίας έχει συσχετιστεί με το μειωμένο αριθμό βλαστικών γεννητικών κυττάρων των όρχεων, επειδή οι ασθενείς με τους συνολικά χαμηλότερους αριθμούς τέτοιων κυττάρων εμφανίζουν τα πιο επηρεασμένα σπερμοδιαγράμματα κατά την ενήλικη ζωή.⁷²⁹ Η λεπτή ισορροπία μεταξύ πολλαπλασιασμού, διαφοροποίησης και απόπτωσης των βλαστικών γεννητικών κυττάρων είναι κρίσιμη για την εξασφάλιση φυσιολογικής σπερματογένεσης. Η απορρύθμιση οποιασδήποτε από αυτές τις ευαίσθητες διεργασίες μπορεί να οδηγήσει σε υπογονιμότητα.

Φυσιολογικά, τα βλαστικά γεννητικά κύτταρα των όρχεων, προέρχονται από τα αρχέγονα γονοκύτταρα (εμβρυϊκή παρακαταθήκη πολυδύναμων κυττάρων-fetal stem cell pool) που εμφανίζονται κατά την 8^η εβδομάδα της κύησης,⁷³⁰ μέσω μιας σειράς διαδοχικών σταδίων που περιλαμβάνουν αρχικά την εμφάνιση των εμβρυϊκών σπερματογονίων (fetal spermatogonia) κατά τη 15^η εβδομάδα της κύησης και των βαθυχρωματικών σπερματογονίων του ενήλικα (adult dark spermatogonia-Ad: παρακαταθήκη πολυδύναμων κυττάρων ενήλικα-adult stem cell pool⁷³¹) κατά τον 3 μήνα της ζωής⁷³² από τα οποία προέρχονται τα σπερματοκύτταρα πρώτης τάξης (πρώτη μειωτική διαίρεση) κατά το 3-4 έτος της ζωής.⁷³²

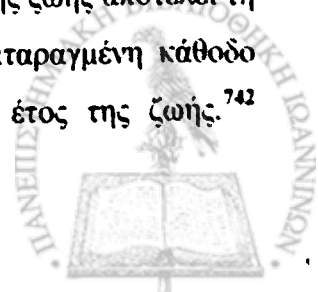
Κατά τη διάρκεια της προεφηβικής ηλικίας συμβαίνουν αδρά, δύο στάδια ιστολογικής ωρίμανσης στον όρχι, τα οποία έχουν μείζονα σημασία για την εξασφάλιση της μελλοντικής γονιμότητας: α) στην ηλικία των 2-3 μηνών, εγκαθιδρύεται η παρακαταθήκη των Ad σπερματογονίων αντικαθιστώντας την αντίστοιχη εμβρυϊκή, δηλαδή εξαφανίζονται τα αρχέγονα γονοκύτταρα, εμφανίζονται τα Ad σπερματογόνια, ενώ μειώνεται δραματικά ο συνολικός αριθμός των βλαστικών γεννητικών κυττάρων ανά σπερματικό σωληνάριο^{255,733-735} και β) στην ηλικία των 4-5 ετών, αυξάνει ο ρυθμός ωρίμανσης και πολλαπλασιασμού των βλαστικών γεννητικών κυττάρων και επέρχεται η πρώτη μειωτική διαίρεση, δηλαδή δημιουργούνται τα



σπερματοκύτταρα πρώτης τάξης από τα Ad σπερματογόνια. Η πρόφαση της πρώτης μειωτικής διαίρεσης συνοδεύεται από αύξηση του συνολικού αριθμού τόσο των βλαστικών γεννητικών κυττάρων όσο και των Ad σπερματογονίων.^{733,735-739}

Οι χαρακτηριστικές ιστολογικές αλλοιώσεις των όρχεων επί εδάφους κρυπορχίας είναι ήδη εμφανείς από το 1^ο-2^ο έτος της ζωής και περιλαμβάνουν: 1) υποπλασία των κυττάρων Leydig που αποτελεί μάλιστα το πιο πρώιμο παθολογικό εύρημα,⁷³⁴ 2) μείωση του αριθμού των κυττάρων Leydig,^{255,733,735} 3) διάμεση (περισωληναριακή) ίνωση,⁷⁴⁰ 4) ένα ιδιαίτερο πρότυπο εκφύλισης των κυττάρων Sertoli που εξαρτάται από τη θέση του όρχι, ενώ είναι ανεξάρτητο από την ηλικία του ασθενούς και χαρακτηρίζεται από κενοδοπιώδη εκφύλιση του κυτοπλάσματος, διάταση του αδρού ενδοπλασματικού δικτύου, μιτοχονδριακές αλλοιώσεις (αύξηση της ηλεκτρονικής πυκνότητας της μιτοχονδριακής θεμέλιας ουσίας, εξάλειψη των μιτοχονδριακών ακρολοφιών), επιμήκυνση των πυρήνων και ανώμαλη εμφάνιση των πυρηνικών μεμβρανών,⁷⁴¹ 5) καθυστέρηση της εξαφάνισης των γονοκυττάρων, 6) καθυστέρηση της εμφάνισης των Ad σπερματογονίων, 7) αποτυχία ανάπτυξης των σπερματοκυττάρων πρώτης τάξης και 7) μείωση του συνολικού αριθμού των βλαστικών γεννητικών κυττάρων.^{733-735,742} Η ελάττωση του αριθμού των βλαστικών γεννητικών κυττάρων έχει συσχετιστεί με ελλείμματα των δύο φυσιολογικών σταδίων σπερματικής ωρίμανσης κατά τη διάρκεια της προεφηβικής περιόδου της ζωής,^{733-735,742} καθώς και με το χαρακτηριστικό πρότυπο εκφύλισης των κυττάρων Sertoli.⁷²⁷ Επομένως οι κρυπόρχεις γέννιουνται με βλαστικά γεννητικά κύτταρα αλλά ο αριθμός τους στην πορεία είναι δυνατόν να μειωθεί.^{729,743-745}

Η μείωση των βλαστικών γεννητικών κυττάρων δεν είναι εμφανής πριν τον 7^ο μήνα της ζωής.⁷³⁴ Συγκεκριμένα, μέχρι τον 7^ο μήνα της ζωής, ο αριθμός των γονοκυττάρων είναι παρόμοιος σε όρχεις με διαταραχή της καθόδου και φυσιολογικούς όρχεις λόγω της ανώμαλη παραμονή των γονοκυττάρων εξαιτίας αδυναμίας μετατροπής τους σε σπερματογόνια Ad. Στη συνέχεια όμως, η δευτεροπαθής αποδόμηση των μη διαφοροποιημένων γονοκυττάρων επιφέρει τελικά μείωση του συνολικού αριθμού των βλαστικών γεννητικών κυττάρων στους όρχεις με διαταραχή της καθόδου. Η παρατήρηση ότι ο συνολικός αριθμός των βλαστικών γεννητικών κυττάρων παραμένει υψηλός κατά τον πρώτο χρόνο της ζωής αποτελεί τη βάση της παραδοσιακής άποψης ότι ο όρχις που εμφανίζει διαταραγμένη κάθοδο είναι φυσιολογικός από ιστολογική άποψη μέχρι το δεύτερο έτος της ζωής.⁷⁴²



Ωστόσο, μια μείωση του αριθμού των σπερματογονίων φαίνεται να αρχίζει ήδη από τον 6^ο μήνα της ζωής σε όρχεις με ενδοκοιλιακή θέση.⁷⁴⁶ Έχει επίσης παρατηρηθεί από αξιολόγηση βιοψιών με βάση των σπερματικό δείκτη, ότι τόσο οι ενδοκοιλιακοί όσο και οι βουβωνικοί όρχεις εμφανίζουν το ίδιο δυναμικό γονιμοποίησης,^{729,747,748} ωστόσο μια απότομη μείωση του σπερματικού δείκτη παρατηρείται μέσα στους πρώτους 20 μήνες της ζωής, ο οποίος αγγίζει ένα κρίσιμο χαμηλό όριο ήδη μέσα στους πρώτους 8-9 μήνες.⁷⁴⁸

7.1.2.3. Δυσλειτουργία του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-όρχεων

Αρκετές παρατηρήσεις συνηγορούν υπέρ της άποψης ότι η διαφοροποίηση και ωρίμανση των βλαστικών γεννητικών κυττάρων των όρχεων είναι διαδικασίες που εξαρτώνται από την τεστοστερόνη. Οι ασθενείς με CAIS εμφανίζουν SCOS και απουσία σπερματογονίων Ad κατά το 1^ο έτος της ζωής, απουσία σπερματοκυττάρων πρώτης τάξης και υπερπλασία των κυττάρων Leydig,⁷⁴⁹ γεγονός που υποδηλώνει ότι τόσο η διαφοροποίηση των γονοκυττάρων σε σπερματογόνια Ad, όσο και η ανάπτυξη των σπερματοκυττάρων πρώτης τάξης είναι ανδρογono-εξαρτώμενες διεργασίες. Επιπλέον, στον φυσιολογικό άνδρα, το πρώτο στάδιο σπερματικής ωρίμανσης συνοδεύεται από μια παροδική αιχμή των επιπέδων της FSH, LH και τεστοστερόνης του ορού καθώς και μια μικρή αύξηση του βάρους και του όγκου των όρχεων.⁷⁵⁰⁻⁷⁵² Αυτό υποδηλώνει ότι μια αιχμή των επιπέδων της LHRH προκαλεί απότομη απελευθέρωση της LH διεγείρει την παραγωγή τεστοστερόνης από τα κύτταρα Leydig, η οποία με τη σειρά της πυροδοτεί την ωρίμανση των βλαστικών γεννητικών κυττάρων.

Επιπλέον, η υποπλασία των κυττάρων Leydig που παρατηρείται σε όρχεις με διαταραχή της καθόδου, αποτελεί προεξέχον, πρώιμο εύρημα που καταδεικνύει πιθανό έλλειμμα της γοναδοτροφινικής έκκρισης.^{255,734,753} Έχει παρατηρηθεί ότι η φυσιολογική αιχμή της LH και τεστοστερόνης κατά τον 2-3 μήνα της ζωής είναι αμβλύτερη στα κρυπορχικά παιδιά.⁷⁵⁴ Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν ότι σε βρέφη με κρυπορχία, τα κύτταρα Leydig υφίστανται μειωμένου βαθμού διέγερση εξαιτίας ενός ελλειμματικού άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης, με αποτέλεσμα να μη δημιουργείται ικανή αιχμή τεστοστερόνης για να πυροδοτηθεί η φυσιολογική έναρξη ωρίμανσης των βλαστικών γεννητικών κυττάρων και να δημιουργηθεί ικανή παρακαταθήκη πολυδύναμων κυττάρων ενήλικα.



Το τι προκαλεί την φυσιολογική έναρξη της μειωτικής διαίρεσης στην ηλικία των 4-5 ετών, αποτελεί αντικείμενο συνεχιζόμενης μελέτης. Η παρατηρούμενη αύξηση των επιπέδων της LH στα ούρα²⁵⁵ και η προέξαρση του πληθυσμού των κυττάρων Leydig των όρχεων ταυτόχρονα με την εμφάνιση των σπερματοκυττάρων πρώτης τάξης στους όρχεις των φυσιολογικών αγοριών προεφηβικά, υποδηλώνει ότι η είσοδος στη μείωση ίσως οφείλεται σε μια ήπια αύξηση της δραστηριότητας του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης.

Ωστόσο, η αιτία της ελλειμματικής έναρξης της μείωσης στους ασθενείς με κρυπορχία αποτελεί επίσης αντικείμενο διαφωνιών. Τα χαμηλά επίπεδα LH και FSH στα ούρα,⁷⁵⁵ η επηρεασμένη ανταπόκριση της υπόφυσης με έκκριση LH και FSH μετά από διέγερση από την LHRH,⁷⁵⁶ η επηρεασμένη ορχική ανταπόκριση με έκκριση τεστοστερόνης μετά από διέγερση από την hCG⁷⁵⁷ και η υποπλασία των κυττάρων Leydig στα κρυπορχικά αγόρια αυτής της ηλικίας συνηγορούν υπέρ μιας ελλειμματικής δραστηριότητας του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης. Ωστόσο, υπάρχουν και αντίθετες αναφορές σύμφωνα με τις οποίες η γοναδοτροφινική έκκριση είναι φυσιολογική σε βρέφη με κρυπορχία.⁷⁵⁸⁻⁷⁶⁰

Το γεγονός ότι παρόμοιες αλλά λιγότερο σοβαρές, οψιμότερης έναρξης και λιγότερο προοδευτικές αλλοιώσεις παρατηρούνται και στον όρχι που βρίσκεται σε φυσιολογική οσχεϊκή θέση σε περιπτώσεις ετερόπλευρης κρυπορχίας, πιθανόν υποστηρίζουν την άποψη ότι ο υπογοναδοτροφικός υπογοναδισμός είναι η αιτία της αυξημένης επίπτωσης της υπογονιμότητας σε ασθενείς με ετερόπλευρη κρυπορχία.^{255,731,734,735,742,747} Ωστόσο, το θέμα αυτό παραμένει αντιφατικό⁷⁰² αφού υπάρχουν αναφορές που υποστηρίζουν ότι ο όρχις που βρίσκεται σε φυσιολογική θέση είναι δυνατόν να υφίσταται επίσης βλαπτική θερμική επίδραση, δεδομένου ότι έχει παρατηρηθεί αύξηση της θερμοκρασίας του που έχει αποδοθεί σε αύξηση της αιματικής τους ροής⁷⁶¹ καθώς επίσης και ότι υπάρχει μια εγγενής (intrinsic) βλάβη σε αμφότερους τους όρχεις σε περιπτώσεις ετερόπλευρης κρυπορχίας.⁴⁴⁴

7.1.2.4. Ο ρόλος της απόπτωσης

Έχει προταθεί ότι η εκφύλιση των ορχικών βλαστικών γεννητικών κυττάρων που παρατηρείται στην κρυπορχία είναι αποτέλεσμα επαγωγής μιας αυξημένης αποπτωτικής δραστηριότητας.⁷⁶²⁻⁷⁷⁵ Αντίθετα, η κρυπορχία δε φαίνεται να επάγει την απόπτωση στα κύτταρα Sertoli και Leydig.⁷⁶⁸

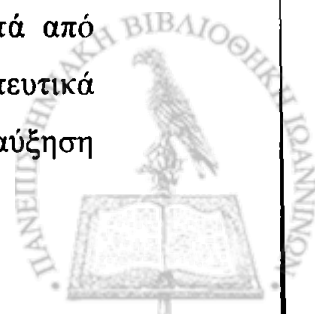


Ο φυσιολογικός κυτταρικός κύκλος περιλαμβάνει την αύξηση, διαφοροποίηση και τελικά τον κυτταρικό θάνατο. Ο κυτταρικός θάνατος μπορεί να προκληθεί με δύο διαφορετικούς μηχανισμούς, τη νέκρωση και την απόπτωση.⁷⁷⁶ Σε αντίθεση με τη νέκρωση που είναι αποτέλεσμα ενός οξέος κυτταρικού τραυματισμού, η απόπτωση αποτελεί ένα διακριτό τύπο προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, ο οποίος χαρακτηρίζεται από ιδιαίτερα βιοχημικά γεγονότα που οδηγούν σε χαρακτηριστικές μορφολογικές κυτταρικές αλλοιώσεις οδηγώντας σε αποτελεσματική εξάλειψη των κυττάρων από έναν ιστό χωρίς να επάγεται φλεγμονώδης αντίδραση και προσφέρει πλεονεκτήματα κατά τη διάρκεια της ζωής ενός οργανισμού.^{777,778} Η απόπτωση μπορεί να πυροδοτηθεί από εξωγενείς βλαπτικούς παράγοντες, αλλά σε αντίθεση με τη νέκρωση, μπορεί να προκληθεί και αυτόματα ή μετά από ένα φυσιολογικό ερέθισμα όπως για παράδειγμα τη μείωση ή την αύξηση των επιπέδων μιας ορμόνης.⁷⁷⁹

Το χαρακτηριστικό της απόπτωσης είναι ο ταχύς ενδονουκλεοσωμιακός κατακερματισμός του κυτταρικού DNA από ειδικά ένζυμα τις πυρηνικές ενδονουκλεάσες σε πολυμερή 180-200bp.^{780,781} Οι χαρακτηριστικές μορφολογικές κυτταρικές μεταβολές που παρατηρούνται περιλαμβάνουν τη συμπύκνωση και περιθωριοποίηση της πυρηνικής χρωματίνης, την κυτταροπλασματική συμπύκνωση, την ανάπτυξη εκβλαστήσεων της κυτταρικής μεμβράνης, τη συρρίκνωση και κατακερματισμό του κυττάρου στα λεγόμενα «αποπτωτικά σωματίδια» τα οποία περικλείονται από εξωτερική μεμβράνη και υφίστανται ταχεία φαγοκυττάρωση από τα μακροφάγα και άλλα γειτονικά κύτταρα.^{777,782}

Η απομάκρυνση των βλαστικών γεννητικών κυττάρων με τη διαδικασία της απόπτωσης συμβαίνει φυσιολογικά στους όρχεις των ενηλίκων⁷⁸³⁻⁷⁸⁵ καθώς και προεφηβικά.⁷⁶³ Πρόσφατα έχει αναγνωριστεί δε ότι η απόπτωση αποτελεί σημαντικό φυσιολογικό μηχανισμό που περιορίζει τον πληθυσμό των βλαστικών γεννητικών κυττάρων σε αριθμό τέτοιο ώστε να είναι δυνατόν να υποστηριχτεί από τα υπάρχοντα κύτταρα Sertoli.⁷⁸³⁻⁷⁸⁶

Εκτός όμως από τη φυσιολογική απόπτωση των βλαστικών γεννητικών κυττάρων, παρατηρείται επίσης και μια μαζική απόπτωση των κυττάρων αυτών μετά από επίδραση διαφόρων βλαπτικών παραγόντων όπως για παράδειγμα μετά από έκθεση σε τοξικές ουσίες,⁷⁸⁷⁻⁷⁹⁰ ακτινοβολία,^{791,792} θεραπεία με χημειοθεραπευτικά παράγωγα,⁷⁹² μεταβολές των ορμονικών υποστρωμάτων^{779,785,786,793-795} και αύξηση

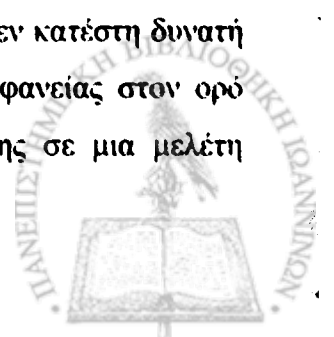


της θερμοκρασία των όρχεων.^{774,775,796} Το γεγονός αυτό δηλώνει ότι κάποιες ειδικές οδοί ενεργοποιούνται οδηγώντας τα κύτταρα σε απόπτωση όταν το περιβάλλον των όρχεων είναι εχθρικό και δεν επιτρέπει τη σπερματογένεση.

Η αιτία του αυξημένου ρυθμού της απόπτωσης των βλαστικών γεννητικών κυττάρων των όρχεων που παρατηρείται επί εδάφους κρυσορχίας παραμένει αδιευκρίνιστη. Δύο δυνητικά βλαπτικοί ορχικοί παράγοντες έχουν προταθεί ως υπεύθυνοι πυροδότησης της αποπτωτικής διεργασίας:⁷⁷² α) το ελλειμματικό ορμονικό υπόβαθρο που οφείλεται στην επηρεασμένη δραστηριότητα του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης και β) η υπερθερμία λόγω της μη φυσιολογικής θέσης του όρχι εκτός οσχέου. Οι παράγοντες αυτοί δρουν είτε συγχρόνως είτε ανεξάρτητα μέσω μοριακών μηχανισμών που εξακολουθούν να μην έχουν πλήρως διευκρινιστεί.

Αντιφατικές είναι οι απόψεις σχετικά με το επίπεδο της απόπτωσης στον φυσιολογικής θέσης όρχι σε περιπτώσεις με ετερόπλευρη κρυσορχία. Από τη μια πλευρά υπάρχουν αναφορές που υποστηρίζουν ότι ο όρχις που βρίσκεται σε φυσιολογική θέση εμφανίζει μια επίσης αυξημένη αποπτωτική δραστηριότητα,⁷⁷² αλλά από την άλλη πλευρά αναφέρεται ότι είτε δεν παρατηρείται αυξημένη αποπτωτική δραστηριότητα^{772,773,797} ή ακόμη και ότι η αποπτωτική δραστηριότητα των βλαστικών γεννητικών κυττάρων στον φυσιολογικό όρχι είναι μειωμένη συγκριτικά με τον παθολογικό στο ίδιο άτομο.⁷⁶³

Εφόσον η άμεσα βλαπτική επίδραση της αυξημένης θερμοκρασίας στον όρχι που βρίσκεται σε φυσιολογική θέση δεν είναι προφανής, έχει υποστηριχτεί ότι ο αυξημένος ρυθμός απόπτωσης στο όργανο αυτό θα μπορούσε οφείλεται σε έμμεση έκλυση ανοσολογικής αντίδρασης (επαγωγή αυτό-αντισωμάτων εναντίον των αναπτυσσόμενων ορχικών δομών) από την επίδραση της αυξημένης θερμότητας στον όρχι που εμφανίζει διαταραχή της καθόδου.⁷⁹⁸ Υψηλοί τίτλοι αντισπερματικών αντισωμάτων έχουν μετρηθεί σε παιδιά με κρυσορχία ανεξάρτητα από τη θέση των όρχεων ή την προηγηθείσα ή μη ορχεοπηξία και έχει υποθετηθεί ότι η διαταραχή της ορχικής καθόδου μπορεί να πυροδοτήσει μια αυτοάνοση αντίδραση εναντίον σπερματικών αντιγόνων επιφανείας προ και κατά τη διάρκεια τη εφηβείας πιθανόν λόγω διαταραχής του αιματο-ορχικού φραγμού από την αυξημένη θερμοκρασία.⁷⁹⁹ Ωστόσο, υπάρχουν και αντίθετες αναφορές.^{800,801} Συγκεκριμένα, δεν κατέστη δυνατή η ανίχνευση ικανών τίτλων αντισπερματικών αντισωμάτων επιφανείας στον ορδ παιδιών με ετερόπλευρη κρυσορχία προεφηβικά⁸⁰⁰ καθώς επίσης σε μια μελέτη



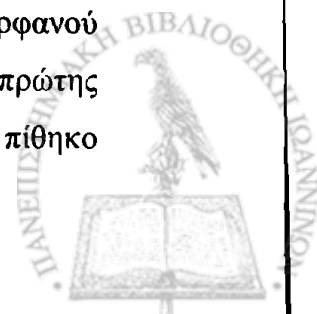
παρακολούθησης ασθενών-μαρτύρων που συμπεριέλαβε 61 ασθενείς στην εφηβεία, οι οποίοι είχαν υποβληθεί σε χειρουργική αποκατάσταση της κρυπορχίας προεφηβικά, δεν κατέστη δυνατόν να ανιχνευτεί αυτοάνοση αντίδραση εναντίον αντιγόνων της σπερματικής επιφάνειας.⁸⁰¹

Συνοπτικά, τρία διακριτά συστήματα-οδοί επικοινωνίας έχουν μέχρι σήμερα ενοχοποιηθεί στη ρύθμιση της απόπτωσης στον όρχι προκειμένου να εξασφαλιστεί η φυσιολογική σπερματογένεση. Εδώ ανήκουν τα συστήματα επικοινωνίας p53, Fas και Bcl-2.⁸⁰² Διαταραχή-εκτροπή οποιουδήποτε από αυτά λόγω ορμονικής διαταραχής και/ή αυξημένης ορχικής θερμοκρασίας επί εδάφους κρυπορχίας οδηγεί σε αυξημένη απόπτωση των βλαστικών γεννητικών κυττάρων στον όρχι οδηγώντας σε υπογονιμότητα.

Η ογκοκατασταλτική φωσφοπρωτεΐνη p53 αποτελεί έναν ευρέως περιγραφέντα ρυθμιστή της κυτταρικής υπερπλασίας⁸⁰³ και της απόπτωσης.⁸⁰⁴ Έχει ενοχοποιηθεί για την επαγωγή αυτόματης αλλά και μετά κυτταρικό τραυματισμό απόπτωσης σε επίπεδο μιτωτικά δραστήριων σπερματογόνιων και ενδεχομένως σε επίπεδο μειωτικών και μετα-μειωτικών ορχικών βλαστικών γεννητικών κυττάρων.^{775,791,805} Έχει προταθεί ότι η p53 είναι ο κύριος επαγωγέας της αυξημένης απόπτωσης συνέπεια αύξησης της ορχικής θερμοκρασίας επί εδάφους κρυπορχίας στον ποντικό.⁷⁷⁰ Ωστόσο, η οδός της p53 ευθύνεται μόνο για την αρχική (πρώτη) φάση (ανδρογόνου-ανεξάρτητη⁷⁶⁸) της απόπτωσης και είναι ανεξάρτητη από το σύστημα Fas/FasL,⁷⁹⁷ ενώ η περαιτέρω αποπτωτική διαδικασία είναι αποτέλεσμα μιας p53-ανεξάρτητης οδού⁷⁷⁵ που μεσολαβείται από το σύστημα Fas/FasL.⁷⁹⁷

Έχει υποθετηθεί ότι η διαμεσολαβούμενη από την p53 απόπτωση θα μπορούσε να αποτελεί έναν προστατευτικό μηχανισμό στον άνθρωπο και σε άλλα είδη, προκειμένου να αποφευχθεί η μεταβίβαση γενετικού υλικού που έχει υποστεί βλάβη από την υψηλή θερμοκρασία και δεν κατέστη δυνατόν να επιδιορθωθεί.⁷⁷⁵ Ένα άλλο ενδιαφέρον σημείο είναι ότι η p53 δεν φαίνεται να παίζει ρόλο στην απόπτωση που παρατηρείται στην επιδιδυμίδα του κρυπτοεπιδιδυμικού μοντέλου ποντικού.⁷⁶⁵

Ο ακριβής μοριακός μηχανισμός, μέσω του οποίου η p53 προάγει την εκ της υψηλής θερμοκρασίας επαγομένη απόπτωση των βλαστικών γεννητικών κυττάρων στην κρυπορχία, δεν είναι σαφής. Έχει παρατηρηθεί ότι η δράση του ορφανού ορχικού υποδοχέα TR2 που εκφράζεται στα παχυταινικά σπερματοκύτταρα πρώτης τάξης⁸⁰⁶ καταστέλλεται από μια p53-εξαρτώμενη οδό σημάτων στον πίθηκο



Rhesus.⁸⁰⁷ Ο TR2 αποτελεί κύριο ρυθμιστή που ελέγχει πολλές οδούς σημάτων και είναι πιθανόν ότι παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της σπερματογένεσης.⁸⁰⁷ Έχει υποθετηθεί ότι οι υψηλές ορχικές θερμοκρασίες μπορεί να αυξήσουν την p53 με αποτέλεσμα την καταστολή του TR2, η οποία με τη σειρά της επηρεάζει αρνητικά την σπερματογένεση στο επίπεδο των σπερματοκυττάρων πρώτης τάξης, εξασφαλίζοντας με αυτόν τον τρόπο την αποφυγή της μεταβίβασης γενετικού υλικού που έχει υποστεί βλάβη.⁸⁰⁷

Η οδός σημάτων Fas αποτελείται από τις αλληλοεπιδρούσες πρωτεΐνες Fas (CD95/APO-1) και and Fas ligand (FasL, CD95L/APO-1L).⁸⁰⁸ Η πρωτεΐνη Fas είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη τύπου I που ανήκει στην υπερουκογένεια των παραγόντων νέκρωσης όγκου (tumor necrosis factor, TNF)/ παραγόντων νευρικής αύξησης (nerve growth factor, NGF), η οποία διαθέτει μια «περιοχή θανάτου» («death domain») και είναι ικανή να ξεκινήσει τη διαδικασία της απόπτωσης όταν διεγερθεί μετά από δέσμευση από την FasL (μια TNF σχετιζόμενη διαμεμβρανική πρωτεΐνη τύπου II).⁸⁰⁸ Η αλληλεπίδραση των FasL-Fas πυροδοτεί τη θανάτωση των κυττάρων που εκφράζουν την Fas.⁸⁰⁸ Η Fas εκφράζεται σε όλους τους ιστούς αλλά ιδιαίτερα στο θύμο, σπλήνα, και μη λεμφογενείς ιστούς, ενώ η έκφραση της FasL γενικώς περιορίζεται σε λεμφικά όργανα, ενώ είναι άφθονη στον όρχι με ιδιαίτερη εντόπιση στη κύτταρα Sertoli.⁸⁰⁹

Εκτός από το ρόλο του συστήματος Fas στην εξασφάλιση του προνομίου της άνοσης κατάστασης του όρχι,⁸¹⁰ η ανίχνευση της FasL (κύτταρα Sertoli) και της Fas (σε ορισμένα βλαστικά γεννητικά κύτταρα) στους όρχεις των τρωκτικών και του ανθρώπου εμπλέκει το σύστημα αυτό στη ρύθμιση της αυτόματης απόπτωσης των βλαστικών γεννητικών κυττάρων και υπαινίσσεται ένα κεντρικό ρόλο του κυττάρου Sertoli ως παρακρινικού ρυθμιστή της σπερματογένεσης.^{811,812}

Το σύστημα σημάτων Fas εμπλέκεται επίσης στη διαδικασία της απόπτωσης που επάγεται μετά από κάποια εξωτερική βλαπτική επίδραση επί των όρχεων (έκθεση σε τοξικές ουσίες, ακτινοβολία, υπερθερμία).^{789,812} Ειδικά μετά από ορχική υπερθερμία, παρατηρείται εκλεκτική, μεμονωμένη αύξηση της έκφρασης της Fas (και όχι της FasL), πράγμα που δεν παρατηρείται μετά από τοξική έκθεση.⁷⁸⁹ Αυτό υποδηλώνει ότι η υπερθερμία προσβάλλει εκλεκτικά τα βλαστικά γεννητικά κύτταρα, τα οποία εξαλείφονται λόγω αύξησης της έκφρασης της Fas, ενώ η ποσοτηρική ικανότητα των κυττάρων Sertoli δε μεταβάλλεται αφού τα κύτταρα αυτά δεν



επιηρεάζονται εμφανώς εφόσον δεν αυξάνει η έκφραση της FasL.⁷⁸⁹ Πρόσφατα έχει παρατηρηθεί ότι η οδός της Fas ευθύνεται για τη δεύτερη (p53-ανεξάρτητη) φάση της απόπτωσης στα πλαίσια κρυσορχίας.⁷⁹⁷ Η επίδραση των ανδρογόνων επί της οδού μεταβίβασης σημάτων της Fas, είναι αντιφατική αφού έχει παρατηρηθεί τόσο αύξηση⁷⁶⁶ όσο και ελάττωση⁷⁹⁵ της γονιδιακής έκφρασης Fas της στον όρχι σε συνδυασμό με απόπτωση βλαστικών γεννητικών κυττάρων μετά από ανδρογονική στέρηση. Εκτός από τις δύο αυτές προφανώς αλληλοεπηρεαζόμενες αλλά ανεξάρτητες οδούς απόπτωσης που ενεργοποιούνται από την αυξημένη θερμοκρασία των όρχεων επί εδάφους κρυσορχίας (p-53 και Fas), φαίνεται ότι λειτουργεί και μια τρίτη, άγνωστη μέχρι στιγμής, επακόλουθη αποπτωτική οδός.⁷⁹⁷

Η οικογένεια πρωτεϊνών Bcl-2 αποτελεί μία ευρέως αναγνωρισμένη ομάδα ρυθμιστών της απόπτωσης.^{813,814} Οι πρωτεΐνες αυτές διακρίνονται σε αντι-αποπτωτικές (π.χ. Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w) και προ-αποπτωτικές (π.χ. Bax).⁸¹⁵ Η αναλογία αυτών των μορίων καθορίζει εν μέρει τη δεκτικότητα-ευπάθεια των κυττάρων σε ένα θανατηφόρο μήνυμα.⁸¹⁶ Υπάρχουν ενδείξεις που υποστηρίζουν ότι ορισμένα μέλη της οικογένειας Bcl-2 καθώς και η ρύθμιση της έκφρασή τους παίζουν κριτικό ρόλο στη φυσιολογική λειτουργία της σπερματογένεσης.

Αρσενικά ποντίκια που παρουσιάζουν έλλειψη της πρωτεΐνης Bax εμφανίζουν απρόσφορη συσσώρευση προμειωτικών βλαστικών γεννητικών κυττάρων καθώς και αυξημένο ρυθμό απόπτωσης των ώριμων βλαστικών γεννητικών κυττάρων με τελικό αποτέλεσμα την πλήρη παύση της παραγωγής σπέρματος και υπογονιμότητα.⁸¹⁷ Αρσενικά ποντίκια που παρουσιάζουν έλλειψη της πρωτεΐνης Bcl-w είναι επίσης υπογόνιμα.⁸¹⁸ Τρανσγενετικά ποντίκια με παθολογική έκφραση της Bcl-2 στα σπερματογόνια εμφανίζουν συσσώρευση αυτών των κυττάρων προεφηβικά, αλλά κατά την ενήλικη ζωή επέρχεται απώλεια των βλαστικών γεννητικών κυττάρων στην πλειοψηφία των σπερματικών σωληναρίων οδηγώντας σε υπογονιμότητα.⁸¹⁹ Τρανσγενετικά ποντίκια που υπερεκφράζουν την Bcl-2 ή την Bcl-xL είναι επίσης υπογόνιμα και εμφανίζουν αποδιοργάνωση του σπερματικού επιθηλίου.⁸²⁰ Τόσο η πρωτεΐνη Bax όσο και η Bcl-2 έχουν φαίνεται να εμπλέκονται στην απόπτωσης των ορχικών βλαστικών κυττάρων που επάγεται μετά από έκθεση σε υπερθερμία⁸²¹ ή ανδρογονική στέρηση.⁷⁹⁵ Επίσης, οι πρωτεΐνες αυτές πιθανόν παίζουν σημαντικό ρόλο στην επαγωγή της απόπτωσης των βλαστικών γεννητικών κυττάρων που παρατηρείται μετά από πειραματική πρόκληση ετερόπλευρης κρυσορχίας⁸²² όπως



επίσης και σε κρυπτο-επιδιδυμικά μοντέλα ποντικών.⁷⁶⁵

7.2. Καρκίνος των όρχεων και κρυπορχία

Αν και έχουν προταθεί αρκετοί παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση καρκίνου των όρχεων στον άνθρωπο, το ιστορικό κρυπορχίας αποτελεί τον μόνο καλά τεκμηριωμένο.^{823,824} Η κρυπορχία σχετίζεται με την ορχική νεοπλασία όχι μόνο στον άνθρωπο, αλλά και σε άλλα θηλαστικά είδη όπως τα άλογα και τα σκυλιά.^{523,530,531} Το μέγεθος του σχετικού κινδύνου αποτελεί αντικείμενο διαφωνιών μεταξύ των διαφόρων ερευνητών. Έτσι, αναφέρεται ότι άτομα με ιστορικό κρυπορχίας έχουν 5-50 και 9,2-13,6 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου των όρχεων συγκριτικά με το γενικό πληθυσμό στον άνθρωπο και στον σκύλο, αντίστοιχα.^{531,824-828} Άτομα με αυτόματη καθυστερημένη κάθοδο των όρχεων δεν εμφανίζουν αυξημένο κίνδυνο ορχικού καρκίνου.⁸²⁹

Η σχετική συχνότητα ετερόπλευρης και αμφοτερόπλευρης κρυπορχίας σε ασθενείς με όγκους των όρχεων είναι 15 και 33 φορές μεγαλύτερη από αυτή του γενικού πληθυσμού.⁸³⁰ Η εντόπιση του όρχεος επίσης επηρεάζει το σχετικό κίνδυνο ανάπτυξης ορχικού καρκίνου, με την έννοια ότι όσο υψηλότερη σε σχέση με το όσχεο είναι η εντόπιση, τόσο μεγαλύτερος ο κίνδυνος μελλοντικής εμφάνισης κακοήθειας.^{831,832} Οι όρχεις που βρίσκονται σε ενδοκοιλιακή θέση διατρέχουν 6 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο συγκριτικά με εκείνους που εντοπίζονται σε βουβωνική θέση⁸³⁰ αφού σχεδόν οι μισοί ορχικοί καρκίνοι επί εδάφους κρυπορχίας, εμφανίζονται σε όρχεις που εντοπίζονται σε ενδοκοιλιακή θέση.⁸³³

Ο πιο συχνός τύπος ορχικού καρκίνου επί εδάφους κρυπορχίας στον άνθρωπο είναι το σεμίνωμα,^{839-831,834-836} ενώ στον σκύλο, η επίπτωση του σεμινώματος και του όγκου από κύτταρα Sertoli είναι σχεδόν η ίδια.⁵³¹ Άλλοι σπανιότεροι ιστολογικοί τύποι ορχικού καρκίνου που απαντούν σε ασθενείς με ιστορικό κρυπορχίας είναι το εμβρυϊκό καρκίνωμα, το τερατοκαρκίνωμα και το χωριοκαρκίνωμα.⁸³⁵ Ο καρκίνος των όρχεων εμφανίζεται συνήθως μετά την εφηβεία, αν και έχουν αναφερθεί σποραδικές περιπτώσεις εμφάνισης πριν από την ηλικία των 10 ετών.⁸³⁷ Στην παιδική ηλικία, το σεμίνωμα δεν είναι τόσο συχνό.⁸³⁸ Αν και γενικά σπάνιος, ο πιο συχνός τύπος καρκίνου των όρχεων που απαντά στην παιδική ηλικία επί εδάφους συνήθως ενδοκοιλιακής κρυπορχίας είναι το ώριμο τεράτωμα.⁸³⁷

Η ενδοσωληναριακή νεοπλασία από βλαστικά γεννητικά κύτταρα (καρκίνος



in situ, CIS) θεωρείται η πρόδρομος αλλοίωση όλων των όγκων από βλαστικά γεννητικά κύτταρα με εξαίρεση του σπερματοκυτταρικού σεμινώματος.⁸³⁹ Η αλλοίωση αυτή στα πρώιμα στάδια συνίσταται στην εμφάνιση άτυπων κυττάρων που ομοιάζουν με τα αρχέγονα (stem) γεννητικά κύτταρα και τα κύτταρα του σεμινώματος. Τα κύτταρα αυτά θεωρείται ότι είναι κακοήθη γονοκύτταρα, τα οποία προέρχονται από αρχέγονα βλαστικά γεννητικά κύτταρα που παρεκτράπηκαν από τη φυσιολογική διαφοροποίηση ενδομητρίως και εντοπίζονται μέσα στα σπερματικά σωληνάρια, συνήθως σε μία σειρά κατά μήκος της βασικής μεμβράνης. Αργότερα, τα άτυπα αυτά κύτταρα αντικαθιστούν τα φυσιολογικά κύτταρα των σωληναρίων, ενώ στα προχωρημένα στάδια (διηθητικός όγκος) παρατηρείται διήθηση της βασικής μεμβράνης και επέκταση στο διάμεσο ιστό.

Η συχνότητα του CIS είναι υψηλότερη σε άτομα με υπογονιμότητα, κρυπορχία, διαταραχές της διαφοροποίησης του φύλου και εξωγοναδικούς όγκους από γεννητικά κύτταρα. Η επίπτωση του CIS εκτιμάται γύρω στο 1,7% σε ασθενείς με ιστορικό κρυπορχίας.⁸⁴⁰ Το CIS απαντά συχνότερα σε όρχεις με ενδοκοιλιακή θέση.⁸⁴¹ Περίπου 50% των ασθενών με CIS θα εμφανίσουν όγκο από βλαστικά γεννητικά κύτταρα μέσα σε πέντε χρόνια από τη διάγνωση.⁸⁴²

Το χρονικό διάστημα μεταξύ της διάγνωσης του CIS και της ανάπτυξης του σεμινώματος σε έναν όρχι με διαταραχή της καθόδου μπορεί να υπερβαίνει τη δεκαετία, ενώ αυτόματη υποστροφή του CIS δεν έχει ποτέ παρατηρηθεί.⁸⁴³ Από την άλλη πλευρά, το CIS αποτελεί εξαιρετικά σπάνιο εύρημα πριν την ενηλικίωση.⁸²⁵ Σε μια μεγάλη μελέτη ορχικών βιοψιών που ελήφθησαν κατά τη χειρουργική επέμβαση (πρό της ενηλικίωσης) από 1335 ασθενείς με κρυπορχία, CIS ανιχνεύτηκε μόλις σε έξι ασθενείς (δύο με ενδοκοιλιακή εντόπιση των όρχεων, τρεις με κρυπορχία σε συνδυασμό με ανωμαλία των έξω γεννητικών οργάνων και ένας με συνοδό ανώμαλο καρυότυπο (45,X0/46,XY)).⁸²⁵

Η αιτία του αυξημένου κινδύνου κακοήθους εξαλλαγής του όρχεος επί εδάφους κρυπορχίας δεν είναι γνωστή. Οι πιθανοί παράγοντες που έχουν αναφερθεί ότι οδηγούν στην ανάπτυξη όγκου στον κρυπόρχη είναι: α) η ανωμαλία στη μορφολογία των κυττάρων της γεννητικής σειράς, β) η αυξημένη θερμοκρασία, γ) οι ενδοκρινικές διαταραχές και δ) η δυσγενεσία των γονάδων.

Έχει διατυπωθεί η υπόθεση ότι οι ορχικοί καρκίνοι μπορεί να δημιουργούνται εξαιτίας μιας προϋπάρχουσας εγγενούς διαταραχής του όρχεος, στην οποία οφείλεται



επίσης η αρχική εμφάνιση της διαταραχής της ορχικής καθόδου και ότι η εξαλλαγή δεν είναι δευτεροπαθές αποτέλεσμα συνέπεια της αυξημένης ορχικής θερμοκρασίας.⁸⁴⁴ Αν και δεν μπορεί να αποκλειστεί το ενδεχόμενο της δευτερογενούς επίδρασης, η θεωρία της εγγενούς παθολογικής διεργασίας που αφορά σε αμφοτέρους τους όρχεις φαίνεται πιο εύλογη. Στο γεγονός αυτό συνηγορεί η παρατήρηση ότι επί ετερόπλευρης κρυπορχίας, ο όρχις που βρίσκεται σε φυσιολογική θέση εντός οσχέου διατρέχει κατά περίπου 3,5 φορές αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου (περίπου 15-20% όλων των περιπτώσεων καρκίνου αφορούν στον ετερόπλευρο όρχι που βρίσκεται σε φυσιολογική θέση).^{170,831,835,845,846} Επιπλέον, γύρω στο 15% των ετερόπλευρων όρχεων εμφανίζουν όγκους σε ασθενείς με αμφοτερόπλευρη κρυπορχία όταν ο ένας όρχις έχει ήδη προσβληθεί από καρκίνο.²⁵²

Τα τελευταία χρόνια, σύμφωνα με επιδημιολογικές μελέτες, υπάρχει μία μείωση της ποιότητας του σπέρματος σε συνδυασμό με συνυπάρχουσα αύξηση της επίπτωσης ουροποιογεννητικών ανωμαλιών, όπως η κρυπορχία, ο υποσπαδίας και οι διαταραχές διαφοροποίησης του φύλου. Η αύξηση της συχνότητας του καρκίνου των όρχεων σε ασθενείς με υπογονιμότητα, κρυπορχία και γοναδική δυσγενεσία υποδηλώνει μια κοινή αιτιολογική συσχέτιση μεταξύ των γεννητικών αυτών διαταραχών και του ορχικού καρκίνου. Θεωρείται ότι η επίδραση παραγόντων με οιστρογονική ή αντι-ανδρογονική δράση στην ενδομήτρια ζωή, ιδιαίτερα σε άτομα με γενετική προδιάθεση, προκαλεί ενδοκρινική δυσλειτουργία των όρχεων και προαγωγή της καρκινογένεσης.



ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η παρούσα μελέτη, βασισμένη σε πρώτο χρονογράφο, είναι η πρώτη που διεξήχθη στην Ελλάδα με σκοπό την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας των προγραμμάτων εκπαίδευσης των εκπαιδευτικών. Η μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε στο πλαίσιο του προγράμματος "Εκπαίδευση και Ανάπτυξη" της Ευρωπαϊκής Ένωσης, στο πλαίσιο του οποίου υλοποιήθηκαν διάφορα προγράμματα εκπαίδευσης των εκπαιδευτικών. Η μελέτη αυτή έχει ως στόχο να προσφέρει πληροφορίες σχετικά με την αποτελεσματικότητα των προγραμμάτων εκπαίδευσης των εκπαιδευτικών, καθώς και να βοηθήσει στην βελτίωση της ποιότητας της εκπαίδευσης.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Το ειδικό μέρος της μελέτης περιλαμβάνει την ανάλυση των αποτελεσμάτων της έρευνας, καθώς και την παρουσίαση των προτάσεων για την βελτίωση της εκπαίδευσης των εκπαιδευτικών. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων της έρευνας πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια των στατιστικών μεθόδων, οι οποίες επέτρεψαν να προσδιοριστούν οι διαφορές μεταξύ των ομάδων που συμμετείχαν στα προγράμματα εκπαίδευσης και των ομάδων που δεν συμμετείχαν. Τα αποτελέσματα της έρευνας δείχνουν ότι τα προγράμματα εκπαίδευσης των εκπαιδευτικών έχουν θετική επίδραση στην αποτελεσματικότητα της εκπαίδευσης, καθώς και στην ικανότητα των εκπαιδευτικών να εφαρμόζουν καινοτόμες μεθόδους διδασκαλίας. Ωστόσο, υπάρχουν και κάποιες προκλήσεις που πρέπει να αντιμετωπιστούν, όπως η έλλειψη πόρων και η ανεπάρκεια της υποδομής.

Βασισμένοι στα αποτελέσματα της έρευνας, προτείνεται η υλοποίηση περισσότερων προγραμμάτων εκπαίδευσης των εκπαιδευτικών, καθώς και η βελτίωση της ποιότητας της εκπαίδευσης των εκπαιδευτικών. Επιπλέον, προτείνεται η υλοποίηση προγραμμάτων που στοχεύουν στην ανάπτυξη των δεξιοτήτων των εκπαιδευτικών, καθώς και στην εφαρμογή καινοτόμων μεθόδων διδασκαλίας. Η υλοποίηση των προτάσεων αυτών θα βοηθήσει στην βελτίωση της ποιότητας της εκπαίδευσης, καθώς και στην ανάπτυξη των δεξιοτήτων των εκπαιδευτικών.



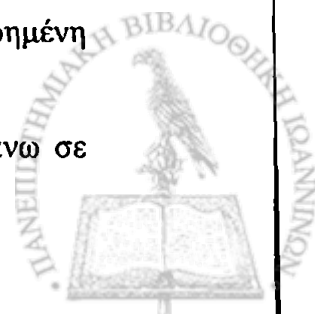
1. Υλικό και Μέθοδοι

Η παρούσα μελέτη βασίστηκε σε υλικό οικογενειών (family-based study). Συνολικά ελέγχθηκαν 590 άτομα και αποτέλεσαν τον πληθυσμό της μελέτης (study population). Ο πληθυσμός αυτός είχε την εξής σύνθεση: α) 180 κρυπορχικά παιδιά ηλικίας 1-13 ετών (διάμεση ηλικία τα 2,3 έτη) κατά τον χρόνο της ορχεοπηξίας (ομάδες Α και Β: πληθυσμός ασθενών), β) 307 γονείς: 156 μητέρες-151 πατέρες εκ των οποίων εννέα έπασχαν από κρυπορχία (ομάδα Ρ: γονικός πληθυσμός) γ) τρεις διαθέσιμοι, ανεξάρτητοι μεταξύ τους πάσχοντες συγγενείς δευτέρου βαθμού (ομάδα R: θείοι, ένας πατρικής και δύο μητρικής προέλευσης) και δ) 100 φυσιολογικοί μάρτυρες (ομάδα C: πληθυσμός ελέγχου).

Η συλλογή του πληθυσμού της μελέτης έγινε προοπτικά και αναδρομικά από δύο διαφορετικές πηγές: α) όλα τα παιδιά που προσήλθαν στην Α΄ Παιδοχειρουργική Κλινική του Νοσοκομείου Παιδών «Η Αγία Σοφία» στην Αθήνα καθώς και στην Ουρολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων για χειρουργική αποκατάσταση κρυπορχίας κατά τη χρονική περίοδο Δεκέμβριος 1999-Ιούλιος 2002 (ομάδα Α: ομάδα προοπτικής συλλογής, n=109) και β) πρώην κρυπορχικά παιδιά που επιλέχθηκαν τυχαία από τη λίστα χειρουργημένων ασθενών της Α΄ Παιδοχειρουργική Κλινική του Νοσοκομείου Παιδών «Η Αγία Σοφία» κατά τη δεκαετία 1990-2000, των οποίων οι γονείς ανταποκρίθηκαν στην κλήση για συμμετοχή στην παρούσα μελέτη (ομάδα Β: ομάδα αναδρομικής συλλογής, n=71). Μεταξύ των παραπάνω ασθενών, ταυτοποιήθηκαν έξι ζεύγη πασχόντων αδελφών και επομένως συμπεριελήφθησαν ασθενείς από 174 διακριτές οικογένειες συνολικά. Στον πληθυσμό ελέγχου περιλήφθηκαν άτομα με φυσιολογικά έξω γεννητικά όργανα που δεν είχαν συγγενική σχέση μεταξύ τους ή με οποιοδήποτε άτομο από τον πληθυσμό της μελέτης, αντίστοιχων ηλικιών, προερχόμενα μετά από τυχαία δειγματοληψία από το γενικό παιδικό πληθυσμό.

Η παρούσα μελέτη εγκρίθηκε από τα τοπικά Επιστημονικά Συμβούλια των αντιστοιχών ιδρυμάτων. Οι οικογένειες κλήθηκαν τηλεφωνικά και ενημερώθηκαν πλήρως για τη διαδικασία και τους σκοπούς της μελέτης. Η συμμετοχή τόσο των ασθενών όσο και των μαρτύρων ήταν εκούσια και έγινε μετά από πληροφορημένη συναίνεση των γονέων τους.

Μετά από τη λεπτομερή λήψη ιατρικού ιστορικού που βασίστηκε πάνω σε



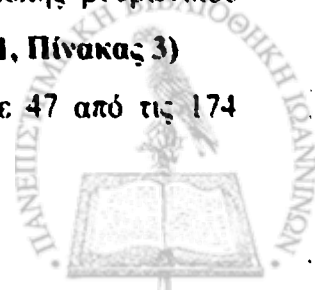
προσχεδιασμένη φόρμα ερωτηματολογίου ιδιαίτερα εστιασμένου στο οικογενειακό ιστορικό κρυψορχίας και στη γονιμότητα των γονέων, κάθε ασθενής της ομάδας Α εξετάστηκε ενδεδειχώς προκειμένου να εκτιμηθεί η ακριβής θέση, το μέγεθος και η υφή των όρχεων. Σε όσους χειρουργήθηκαν, έγινε λεπτομερής καταγραφή των διεγχειρητικών ευρημάτων. Ανάλογη φυσική εξέταση έγινε σε όλους τους ασθενείς της ομάδας Β καθώς και ανασκόπηση των ιατρικών τους φακέλων με ιδιαίτερη έμφαση στα διεγχειρητικά ευρήματα από τα αντίστοιχα βιβλία χειρουργείων. Έλεγχος με υπερηχογράφημα οσχέου, αξονική, μαγνητική τομογραφία ή καρυότυπο δεν έγινε ως ρουτίνα.

Κάθε άτομο του πληθυσμού της μελέτης υποβλήθηκε σε μία αιμοληψία από περιφερική φλέβα που πραγματοποιήθηκε αμέσως μετά τη φυσική εξέταση. Η συλλογή των δειγμάτων ολικού αίματος (5ml) έγινε σε κοινά σωληνάρια γενικής εξέτασης αίματος (μιας χρήσης, κλειστά σωληνάρια με αντιπηκτικό EDTA). Η αποθήκευση των δειγμάτων γινόταν άμεσα μετά την αιμοληψία στους -30°C μέχρι τη στιγμή εξαγωγής του DNA.

Προκειμένου να εξασφαλιστεί η τυφλή διενέργεια της μοριακής ανάλυσης, κάθε άτομο του πληθυσμού της μελέτης κωδικοποιήθηκε με δύο τρόπους. Συγκεκριμένα, το κάθε άτομο κατά την είσοδό του στη μελέτη (αιμοληψία) έλαβε έναν μοναδικό κωδικό καθώς και έναν δεύτερο μοναδικό οικογενειακό κωδικό. Έτσι για παράδειγμα εάν κατά την αιμοληψία της 5^{ης} οικογένειας η σειρά λήψης του αίματος (τυχαία) ήταν: κρυψορχικό παιδί, πατέρας, μητέρα και είχαν ήδη εισαχθεί άλλα 13 άτομα στη μελέτη τότε το κρυψορχικό παιδί, ο πατέρας του και η μητέρα του έλαβαν τους κωδικούς 14-5, 15-5 και 16-5, αντίστοιχα.

Τα 180 παιδιά που εξετάστηκαν βρέθηκε να φέρουν 230 όρχεις συνολικά σε παθολογική θέση εκτός οσχέου. Κάποιοι ασθενείς δεν υποβλήθηκαν σε χειρουργική επέμβαση (ανασπώμενοι όρχεις). Αμφοτερόπλευρη και ετερόπλευρη κρυψορχία διαγνώστηκε σε 100/230 (43,5%) και σε 130/230 (56,5%) όρχεις αντίστοιχα, με μικρή υπεροχή στη δεξιά πλευρά. Ανορχία/πλήρης ατροφία ανιχνεύτηκε σε 13/230 όρχεις (5,6%), ενδοκοιλιακή εντόπιση (πάνω από το έσω βουβωνικό στόμιο) σε 37/230 όρχεις (16,1%), βουβωνική/υψηλή οσχέϊκή θέση σε 131/230 όρχεις (57%), ανάσπαση σε 30/230 όρχεις (13%) και εκτοπία (εντός του επιπολής βουβωνικού θύλακα του Denis-Browne) σε 19/230 (8,3%) όρχεις (Παράρτημα 1, Πίνακας 3)

Θετικό οικογενειακό ιστορικό κρυψορχίας αναφέρθηκε σε 47 από τις 174



οικογένειες (27,0%). Σε 27/174 (15,5%), 13/174 (7,5%), 2/174 (1,1%) και 5/174 (2,9%) των οικογενειών η προέλευση ήταν πατρική, μητρική, μεικτή και μεμονωμένη μεταξύ των αδελφών (απουσία αναφερόμενης πατρική ή μητρική προέλευσης), αντίστοιχα. Ωστόσο, θετικό οικογενειακό ιστορικό τεκμηριώθηκε μόλις σε 17 από τις 174 οικογένειες (9,8%) (παρόντα συγγενικά πάσχοντα άτομα στον πληθυσμό της μελέτης: οκτώ πατέρες, ένας πατέρας-αδελφός, πέντε αδελφοί και τρεις μη σχετιζόμενοι μεταξύ τους θείοι): σε 9/174 (5,2%) και 6/174 (3,4%) οικογένειες ταυτοποιήθηκε πάσχον πατέρας ή αδελφός αντίστοιχα.

Ο μωριακός έλεγχος πραγματοποιήθηκε στη Μονάδα Γενετικής του Τμήματος Μαιευτικής και Γυναικολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, τυφλά ως προς τα κλινικά δεδομένα.

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη (εταιρεία προέλευσης και αριθμός καταλόγου) παρατίθενται συνολικά στο **Παράρτημα 2**. Η εξαγωγή του γενωμικού DNA έγινε από μεμονωμένους κυτταρικούς πυρήνες περιφερικού αίματος (λεμφοκύτταρα) με χρήση διαλυμάτων αλάτων σύμφωνα με τυποποιημένο πρωτόκολλο (**Παράρτημα 3**).

α) Αναζήτηση μικροαπαλοιφών της περιοχής Yq11

Στην ανάλυση αυτή χρησιμοποιήθηκε γενωμικό DNA από όλα τα άτομα των ομάδων A, B, R και C (n=283). Το σύνολο των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών που αναγνωρίζουν τα σημεία έναρξης της ενίσχυσης (primers-προαγωγείς)⁽¹⁾ των σεσημασμένων θέσεων αλληλουχίας (Sequence Tagged Site, STS) και οι συνθήκες ενίσχυσης (amplification conditions) των αλυσιδωτών αντιδράσεων πολυμεράσης (Polymerase Chain Reactions) επιλέχθηκαν σύμφωνα με τις τρέχουσες εργαστηριακές οδηγίες μοριακής διάγνωσης των μικροαπαλοιφών της περιοχής Yq11 (laboratory guidelines for molecular diagnosis of Yq11 microdeletions) της Ευρωπαϊκής Ακαδημίας Ανδρολογίας (European Academy of Andrology) και του Ευρωπαϊκού Δικτύου Ποιότητας Μοριακής Γενετικής (European Molecular Genetics Quality Network).^{847,848} Το προτεινόμενο αυτό βασικό σύνολο των προαγωγέων STS είναι ικανό να εντοπίσει όλες σχεδόν τις κλινικά σημαντικές μικροαπαλοιφές (>95% των μικροαπαλοιφών των περιοχών AZFa, AZFb και AZFc) και αποτελεί επαρκές

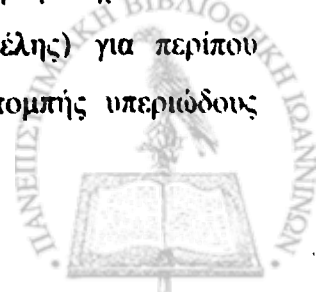
⁽¹⁾ Συμπληρωματικές νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των περιοχών του DNA στο 5' και 3' άκρο της περιοχής του DNA που πρόκειται να ενισχυθεί.⁶⁷



διαγνωστικό εργαλείο ρουτίνας που ελαχιστοποιεί τις ανάγκες προτυποποίησης και τη μεταβλητότητα των αποτελεσμάτων μεταξύ των διαφορετικών εργαστηρίων, επιτρέποντας την καλύτερη σύγκριση των αποτελεσμάτων.^{847,848} Αυστηροί κανόνες καλής εργαστηριακής πρακτικής και βασικές αρχές ελέγχου ποιότητας (quality control) εφαρμόστηκαν προσεκτικά όπως ορίζεται και απαιτείται κατά τη διαγνωστική διαδικασία των μικροαπαλοιφών της περιοχής Yq11.⁸⁴⁹

Δύο πολυπλεγματικές αντιδράσεις (multiplex reactions) σχεδιάστηκαν για την ανίχνευση απαλοιφών στις τρεις περιοχές AZF (Multiplex A: sY86, sY127, sY254 έλεγχος της AZFa, AZFb και AZFc περιοχής, αντίστοιχα και Multiplex B: sY84, sY134, sY255 έλεγχος της AZFa, AZFb και AZFc περιοχής, αντίστοιχα). Οι προαγωγείς για τον έλεγχο της ακεραιότητας των περιοχών ZFY (sY238) και SRY (sY14) συμπεριλήφθηκαν σε κάθε πολυπλεγματική αντίδραση A και B, αντίστοιχα, για να εξασφαλιστεί εσωτερικός έλεγχος (internal controls) της ενίσχυσης (επιβεβαίωση της καλής ποιότητας του χρησιμοποιούμενου DNA). Θετικοί και αρνητικοί εξωτερικοί μάρτυρες (external controls), δείγματα δηλαδή DNA από έναν γόνιμο άνδρα με φυσιολογικά έξω γεννητικά όργανα και από μία γυναίκα, αντίστοιχα) έτρεξαν παράλληλα σε κάθε αντίδραση για να εξασφαλιστεί ο έλεγχος ευαισθησίας/ ειδικότητας και ειδικότητας/πιθανής μόλυνσης, αντίστοιχα. Επιπλέον, ένα δείγμα ύδατος (blank) που περιείχε όλα τα αντιδραστήρια αλλά νερό αντί για DNA, έτρεξε παράλληλα σε κάθε αντίδραση προκειμένου να εξασφαλιστεί ο έλεγχος πιθανής μόλυνσης των αντιδραστηρίων από εξωγενές DNA.

Η κάθε PCR εκτελέστηκε σε τελικό αντιδραστηριακό όγκο μίγματος 25μl. Το μίγμα περιλάμβανε τα εξής συστατικά: 1μl διαλύματος γενωμικού DNA (σε 1xTE: 10mM Tris base, pH: 8,0, 1mM EDTA), 0,04U Taq DNA πολυμεράση, 1,6mM MgCl₂ 200μM από το κάθε τριφωσφορικό δεοξυριβονουκλεοτίδιο (dNTP), 0,5μl από τον κάθε προαγωγέα STS (4μl συνολικά), 2,5μl 10x ρυθμιστικού διαλύματος PCR (baffer: 200mM Tris HCl, pH: 8,4, 500mM KCl). Οι αλληλουχίες των προαγωγέων STS και οι συνθήκες ενίσχυσης της PCR παρατίθενται στο **Παράρτημα 1 (Πίνακας 4)**. Τα ενισχυμένα προϊόντα υποβλήθηκαν σε ηλεκτροφόρηση επί γέλης αγαρόζης 2% σε 1xTBE, pH 8.0 (Tris base:10,778g/l (0,089M), Boric acid: 0,744g/l (0,002M), EDTA: 5,50g/L (0,089M)) εμποτισμένης με διάλυμα χρωστικής βρωμιούχου αιθιδίου (5,25mg/ml διαλύματος: προσθήκη 5μl/100ml διαλύματος γέλης) για περίπου 80Vhrs και στη συνέχεια διαβάστηκαν κάτω από λυχνία εκπομπής υπεριώδους



φωτός. Σε κάθε περίπτωση αμφίβολου αποτελέσματος ακολουθούσε επανάληψη της αντίδρασης, μεμονωμένα (simplex PCR), μέχρι το τελικό αποτέλεσμα να είναι σαφές, ευδιάκριτο και αναπαραγώγιμο. Η κάθε ελεγχόμενη STS αλληλουχία οριζόταν ως απύσα μετά από τρεις αποτυχημένες προσπάθειες ενίσχυσής της επί ταυτόχρονης επιτυχούς ενίσχυσης των αλληλουχιών των εσωτερικών μαρτύρων (sY14 ή sY238).

β) Αναζήτηση γενετικών μεταβολών στο γονίδιο *INSL3*

Στην ανάλυση αυτή διερευνήθηκαν 170 μη σχετιζόμενα άτομα από τις ομάδες Α και Β, συμπεριλαμβανομένων όλων των περιπτώσεων με τεκμηριωμένο οικογενειακό ιστορικό κρυφορχίας καθώς και 50 άτομα της ομάδας C. Ενισχύθηκαν και τα δύο εξώνια του γονιδίου χρησιμοποιώντας προαγωγείς από την διεθνή βιβλιογραφία.⁵⁴ Η αναζήτηση των ενδεχόμενων γενετικών παραλλαγών του γονιδίου έγινε με τη μέθοδο PCR-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP).⁽¹⁾ Εκτελέστηκαν ανεξάρτητες αντιδράσεις για κάθε τμήμα της περιοχής κωδικοποίησης του γονιδίου. Η κάθε PCR εκτελέστηκε σε τελικό αντιδραστηριακό όγκο μίγματος 25μl. Το μίγμα περιλάμβανε τα εξής συστατικά: 1μL διαλύματος γενωμικού DNA (σε 1xTE), 0,1U Taq DNA πολυμεράση, 1mM MgCl₂, 200μM από κάθε dNTP, 50pmol πρόσθιου (forward) προαγωγέα, 50pmol ανάστροφου (reverse) προαγωγέα, 2,5μL 10x ρυθμιστικού διαλύματος PCR (buffer: 200mM Tris HCl, pH: 8,4, 500mM KCl). Οι αλληλουχίες των χρησιμοποιηθέντων προαγωγέων και οι συνθήκες ενίσχυσης της

⁽¹⁾ Η μέθοδος αυτή επιτρέπει το διαχωρισμό μετά από ηλεκτροφόρηση επί γέλης διαφορετικών μονόκλωνων μορίων (single stranded) DNA, ταυτόσημου μήκους, κάτω από συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες. Μια μεμονωμένη νουκλεοτιδική μεταβολή κάποιας δεδομένης αλληλουχίας δεν μπορεί να διαχωριστεί με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης από τη μη μεταλλαγμένη (wild type) όταν το DNA βρίσκεται σε δίκλωνη κατάσταση (double stranded), αφού οι φυσικές ιδιότητες του δίκλωνου μορίου είναι σχεδόν ταυτόσημες για τα δύο αλλήλια. Αντιθέτως, μετά από μετουσίωση (denaturation), τα μονόκλινα μόρια υφίστανται τρισδιάστατες μεταβολές (3-dimensional folding) και μπορεί να προσλάβουν διαφορετικές προσαρμοστικές μορφές (conformational states) ανάλογα με τις διαφορετικές τους αλληλουχίες. Έτσι αποκτούν διαφορετικές φυσικές ιδιότητες και μπορεί να τρέχουν ταχύτερα ή βραδύτερα κατά την ηλεκτροφόρηση παρά το γεγονός ότι διαθέτουν ίσο αριθμό νουκλεοτιδίων. Αυτό υποδηλώνει ότι η μέθοδος υπόκειται σε περιορισμούς που διέπονται από τις πειραματικές συνθήκες κάτω από τις οποίες εκτελείται, αφού κάθε νέα προσαρμογή των μορίων στο χώρο εξαρτάται από αυτές. Η μέθοδος χρησιμοποιείται αφεαυτής για την ανίχνευση νέων πολυμορφισμών ή μπορεί να συμπληρωθεί με τεχνικές προσδιορισμού νουκλεοτιδικών αλληλουχιών (sequencing) για αύξηση της εγκυρότητας.⁶⁷



PCR παρατίθενται στο **Παράρτημα 1 (Πίνακας 5)**. 5μl από κάθε δείγμα ενισχυμένου προϊόντος αναμιχθηκαν με 5μL ειδικού διαλύματος μετουσίωσης (95% απιονισμένη φορμαμίδη, 0,05% κυανού της βρωμοφαινόλης, 0,05% κυανολ-ξυλένιο και 20mM EDTA). Τα μίγματα θερμάνθηκαν στους 95°C για πέντε λεπτά και μετά ψύχθηκαν σε πάγο. Ακολούθησε στρώση σε γέλη μη μετουσιωμένης πολυακρυλαμίδης 8%. Κάθε γέλη υποβλήθηκε σε συνθήκες ηλεκτροφόρησης 7V/cm για 18-20 ώρες. Προκειμένου να αυξηθεί η ευαισθησία και εγκυρότητα της μεθόδου SSCP, όλα τα ενισχυμένα προϊόντα υποβλήθηκαν σε ηλεκτροφόρηση υπό τέσσερις διαφορετικές συνθήκες: σε θερμοκρασία δωματίου και στους 4°C παρουσία και απουσία γλυκερόλης 5% στη γέλη πολυακρυλαμίδης. Το τελικό διάβασμα των αποτελεσμάτων έγινε μετά από χρώση αργύρου. Κάθε διαφορετικό πρότυπο SSCP υποβλήθηκε σε προσδιορισμό αλληλουχίας με χρήση αυτόματου αναλυτή (ABI 3700 DNA Automated Sequencer).

Για ταχύ έλεγχο και επιβεβαίωση της ανίχνευσης κάποιας φαινοτυπικά εκφραζόμενης γενετικής μεταβολής, χρησιμοποιήθηκε μια περιοριστική μέθοδος (restriction assay) βασισμένη στη δράση της περιοριστικής ενδονουκλεάσης⁽¹⁾ Eag I. Το ένζυμο αυτό αναγνωρίζει το φυσικό γονότυπο G/G στη θέση 178 στο εξώνιο 1 του γονιδίου. Τα προϊόντα των PCR μετά την επίδραση του ενζύμου (restriction patterns) αναλύθηκαν σε γέλη αγαρόζης 2% και ελέγχθηκαν μετά από χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο.

Η αξιολόγηση των διαφορών των γονοτυπικών και αλληλικών κατανομών των γενετικών μεταβολών μεταξύ α) ασθενών-μαρτύρων, β) οικογενών-σποραδικών περιπτώσεων, γ) αμφοτερόπλευρων-ετερόπλευρων περιπτώσεων και δ) βουβωνικών-ενδοκοιλιακών περιπτώσεων έγινε με την εφαρμογή του χ^2 κατά Pearson ή Fisher

⁽¹⁾ Τα ένζυμα αυτά (restriction endonucleases), αναγνωρίζοντας συγκεκριμένες θέσεις αλληλουχίας του DNA (μήκους 4-6 ζεύγη βάσεων) που διαφέρουν μεταξύ των διαφόρων ενδονουκλεασών και καλούνται αλληλουχίες αναγνώρισης ή θέσεις περιορισμού (recognition sequences or restriction sites), αποκόπτουν τη διπλή έλικα σε αυτές τις θέσεις. Η αποκοπή αφορά σε σακχαρο-φωσφορικούς δεσμούς χωρίς να παραβλάπτονται οι βάσεις. Έτσι προκύπτουν απομονωμένες αλληλουχίες DNA, οι οποίες καλούνται τμήματα περιορισμού (restriction fragments). Τα τμήματα περιορισμού μπορούν κατόπιν να διαχωριστούν με ηλεκτροφόρηση. Με την τεχνική αυτή που είναι γνωστή ως Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) είναι δυνατόν να συγκριθούν μόρια DNA με ηλεκτροφόρηση και να ταυτοποιηθούν πολυμορφισμοί. Οι ενδονουκλεάσες ανακαλύφθηκαν από τους Werner Arber, Daniel Nathans και Hamilton Smith (Βραβείο Nobel, 1978), οδηγώντας στην ανάπτυξη της τεχνολογίας του ανασυνδυσασμένου DNA. Ο όρος «περιοριστική» προέρχεται από το γεγονός ότι ανακαλύφθηκαν σε στελέχη E. coli που εμφάνιζαν περιορισμό (αντοχή) σε προσβολή από ορισμένους βακτηριοφάγους.⁶⁷

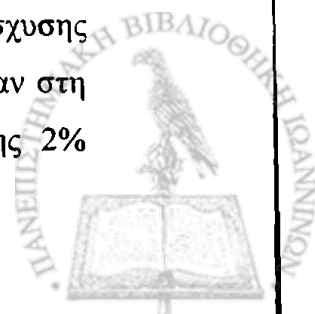
κατά περίπτωση, λαμβάνοντας ως όριο στατιστικής σημαντικότητας την πιθανότητα $P=0.05$ (διπλής κατεύθυνσης). Η συγκεκριμένη ανάλυση έγινε με τη βοήθεια του στατιστικού πακέτου STATA/SE 8.0 for Windows.

γ) Ανάλυση της (TAAAA)_n πολυμορφικής αλληλουχίας του γονιδίου SHBG

Στην ανάλυση αυτή χρησιμοποιήθηκε γενωμικό DNA από το σύνολο των ατόμων των ομάδων A, B και P ($n=487$). Αφού εξαιρέθηκαν οι αμφίβολες οικογενειακές τριάδες (παιδί-γονείς) και η πλειοψηφία των περιπτώσεων με ελλειείς γονικούς γνότυπους, περιελήφθησαν τελικά στην στατιστική ανάλυση 138 πλήρεις πυρηνικές οικογένειες (nuclear families) πέντε από τις οποίες διέθεταν και δεύτερο πάσχον παιδί, καθώς και πέντε ζεύγη πάσχοντος παιδιού-γονέα (απουσία ενός γονικού γνότυπου).⁸⁵⁰ Μεταξύ των παραπάνω 429 ατόμων περιλήφθησαν οκτώ πατέρες με ιστορικό κρυπορχίας. Συνολικά επομένως αναλύθηκαν 148 περιπτώσεις κρυπορχικών παιδιών (156 περιπτώσεις κρυπορχίας συνολικά). Από τις 148 αυτές περιπτώσεις κρυπορχικών παιδιών, 157 όρχεις βρίσκονταν σε παθολογική θέση. Αμφοτερόπλευρη και ετερόπλευρη πάθηση αναγνωρίστηκε σε 72 (45,9%) και 85 όρχεις (54,1%), αντίστοιχα με μια ελαφρά δεξιά υπεροχή. Ανορχία/πλήρης ατροφία ανιχνεύτηκε σε 11/157 όρχεις (7,0%), ενδοκοιλιακή εντόπιση σε 24/157 όρχεις (15,3%), βουβωνική/υψηλή οσχεϊκή θέση σε 82/157 όρχεις (52,2%), ανάσπαση σε 25/157 (15,9%) και εκτοπία σε 15/157 (9,6%) όρχεις.

Η επαναλαμβανόμενη πεντανουκλεοτιδική περιοχή (TAAAA)_n εντός της αλληλουχίας *alu* του εγγύς προαγωγέα του γονιδίου SHBG ενισχύθηκε με κοινή PCR χρησιμοποιώντας προαγωγείς από τη διεθνή βιβλιογραφία.⁷¹ Επιπλέον, ένα δείγμα ύδατος (blank) που περιείχε όλα τα αντιδραστήρια αλλά νερό αντί για DNA, έτρεξε παράλληλα σε κάθε αντίδραση προκειμένου να εξασφαλιστεί ο έλεγχος πιθανής μόλυνσης των αντιδραστηρίων από εξωγενές DNA.

Η κάθε PCR εκτελέστηκε σε τελικό αντιδραστηριακό όγκο μίγματος 25μl. Το μίγμα περιλάμβανε τα εξής συστατικά: 1μl διαλύματος γενωμικού DNA (σε 1xTE), 0,05U Taq DNA πολυμεράση, 1mM MgCl₂, 200μM από κάθε dNTP, 50pmol από κάθε προαγωγέα, 2,5μl 10x ρυθμιστικού διαλύματος PCR (buffer: 200mM Tris HCl, pH: 8,4, 500mM KCl). Οι αλληλουχίες των προαγωγέων και οι συνθήκες ενίσχυσης παρατίθενται στο Παράρτημα 1 (Πίνακας 6). Τα προϊόντα PCR υποβλήθηκαν στη συνέχεια σε έλεγχο της ενίσχυσης με ηλεκτροφόρηση επί γέλης αгарόζης 2%



εμποτισμένης με διάλυμα χρωστικής βρωμιούχου αιθιδίου σε 1xTBE για περίπου 80Vhrs και στη συνέχεια διαβάστηκαν κάτω από λυχνία εκπομπής υπεριώδους φωτός. Μετά από τον παραπάνω έλεγχο, τα ενισχυμένα προϊόντα υποβλήθηκαν σε ηλεκτροφόρηση επί γέλης μη μετουσιωμένης πολυακρυλαμίδης 10% και κατόπιν ακολούθησε χρώση των πολυακρυλαμιδικών γελών με άργυρο σύμφωνα με την παρακάτω τεχνική:

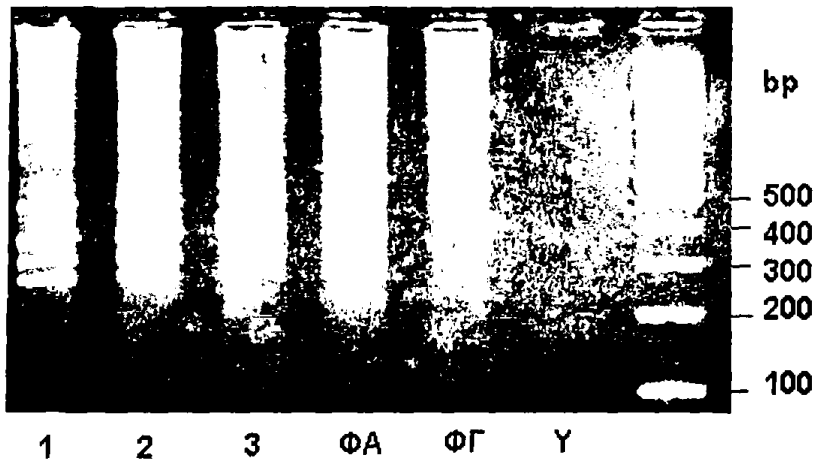
Βήμα πρώτο (3min): μονιμοποίηση σε διάλυμα όγκου 200ml αποτελούμενο από 350ml απεσταγμένο νερό, 40ml αιθανόλη και 2ml οξικού οξέος. Βήμα δεύτερο (10min): χρώση σε 200ml AgNO_3 και μετά ξέπλυμα με απεσταγμένο νερό. Βήμα τρίτο ($\cong 20\text{min}$): εμφύσηση σε διάλυμα όγκου 200ml αποτελούμενο από 200ml απεσταγμένο νερό, 4g NaOH, 2ml φορμαλδεΐδη. Μετά τη χρώση, προσδιορίστηκε ο αριθμός των διαφορετικών αλληλίων με βάση τον αριθμό των TAAA επαναλήψεων τους. Ο αριθμός των TAAA επαναλήψεων σε κάθε αλληλίο προσδιορίστηκε με αντιπαραβολή των ενισχυμένων προϊόντων με προϊόντα PCR από δείγματα γνωστού αριθμού επαναλήψεων (μετά από προσδιορισμό της αλληλουχίας-sequencing) ύστερα από τυχαία δειγματοληψία από το γενικό πληθυσμό (μάρτυρες).

Τα δεδομένα αναλύθηκαν τόσο για το σύνολο των γονέων-πασχόντων απογόνων, όσο και ξεχωριστά για τα υποσύνολα α) γονέων-πασχόντων απογόνων με βουβωνική κρυπορχία και β) γονέων-πασχόντων απογόνων με ενδοκοιλιακή κρυπορχία. Έγινε χρήση δύο διαφορετικών στατιστικών μεθόδων, ειδικών για ανάλυση γενετικών δεδομένων από οικογένειες (family-based): α) Affected Family-Based Control (AFBAC) method⁸⁵¹ και β) Logistic regression-based extension of the transmission disequilibrium test (TDT) for multi-allelic loci (ETDT).⁸⁵² Η ανάλυση έγινε με τα στατιστικά πακέτα AFBAC 1.13 for MS-DOS⁸⁵³ και ETDT for MS-DOS.⁸⁵⁴ Η πιθανότητα $P < 0,05$ (διπλής κατεύθυνσης) θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική.

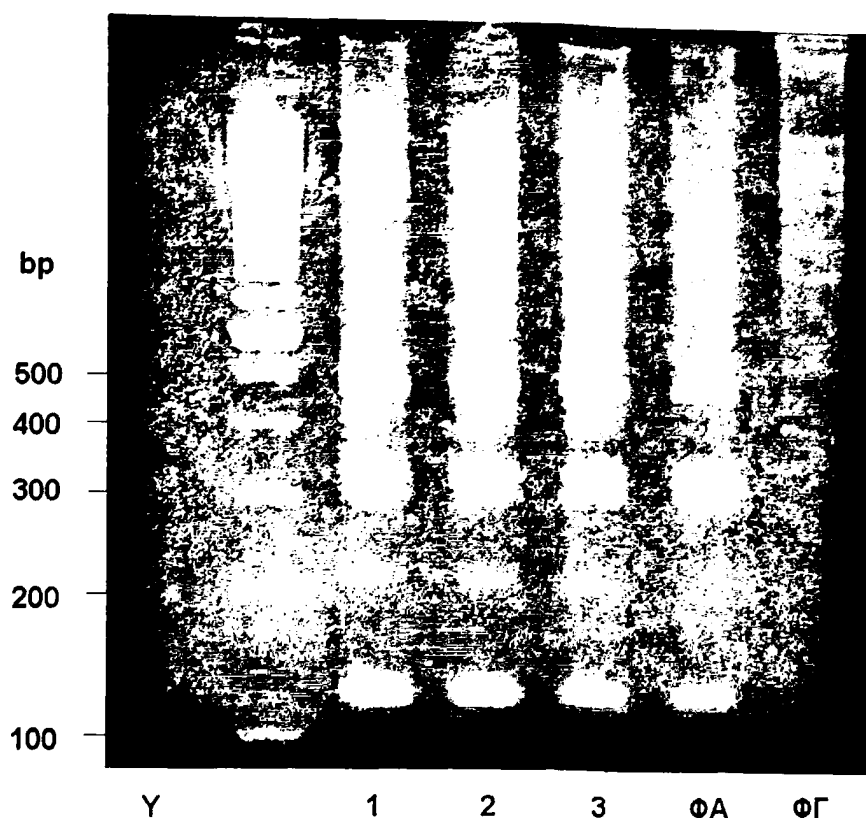


2. Αποτελέσματα

Σε καμία από τις φαινοτυπικές υποομάδες κρυφορχίας ή σε μάρτυρες δεν ανιχνεύτηκαν μικροαπαλοιφές της περιοχής Yq11. Τα αναμενόμενα ενισχυμένα προϊόντα των PCR αντιδράσεων ήταν παρόντα σε όλα τα άτομα που ελέγχθηκαν. Ενδεικτικά παρατίθενται κάποια αποτελέσματα (Εικόνες 32, 33, 34).



Εικόνα 32. Πολυπλεγματική αντίδραση (multiplex reaction) Α. Ενισχυμένα προϊόντα PCR μετά από ηλεκτροφόρηση επί γέλης αгарόζης 2% εμποτισμένης με διάλυμα χρωστικής βρωμιούχου αιθιδίου σε 1xTBE όπως φαίνονται στο υπεριώδες φως. Οι διάδρομοι 1, 2, 3 αντιστοιχούν σε δείγματα DNA από τρεις κρυφορχικούς ασθενείς. Οι διάδρομοι ΦΑ, ΦΓ αντιστοιχούν στο θετικό και αρνητικό εξωτερικό μάρτυρα (external controls) δηλαδή σε δείγματα DNA από έναν γόνιμο άνδρα με φυσιολογικά έξω γεννητικά όργανα και από μία γυναίκα, αντίστοιχα). Ο διάδρομος Υ αντιστοιχεί σε δείγμα ύδατος (blank). Οι ελεγχόμενοι ασθενείς συμπεριφέρονται όπως ο φυσιολογικός αρσενικός μάρτυρας (ΦΑ) εμφανίζοντας και τις τρεις αναμενόμενες ενισχυμένες ζώνες (από κάτω προς τα πάνω) που αντιστοιχούν στα STSs SY127 (274bp), SY86 (320bp), SY254 (400bp), υποδηλώνοντας απουσία μικροαπαλοιφών στις αντίστοιχες περιοχές Yq11 (AZFb, AZFa, AZFc, αντίστοιχα). Όλα τα δείγματα DNA είναι καλής ποιότητας όπως προκύπτει από την εμφάνιση της ζώνης SY238 (ZFY:495bp) (τέταρτη ζώνη από κάτω προς τα πάνω) ενώ η γυναίκα (ΦΓ) εμφανίζει μόνο την τελευταία αυτή ζώνη της πολυπλεγματικής αντίδρασης αφού στερείται το χρωμόσωμα Y. Το δείγμα ύδατος (Υ) δεν εμφανίζει ενίσχυση υποδηλώνοντας απουσία μόλυνσης των αντιδραστηρίων από εξωγενές DNA.

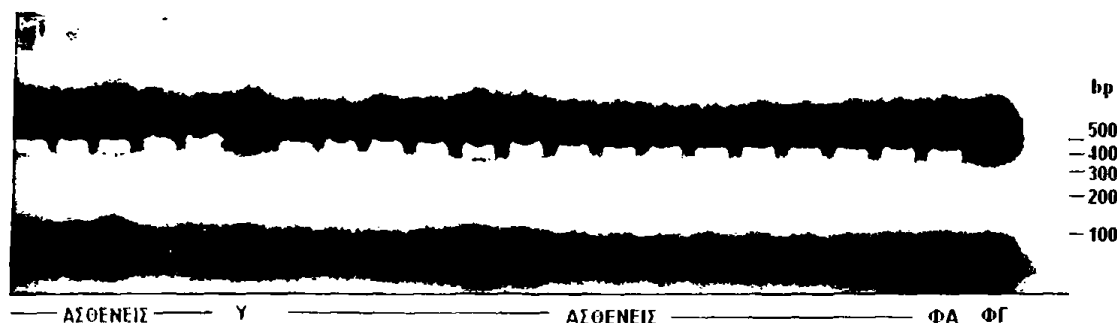


Εικόνα 33. Πολυπλεγματική αντίδραση (multiplex reaction) B. Ενισχυμένα προϊόντα PCR μετά ηλεκτροφόρηση επί γέλης αγαρόζης 2% εμποτισμένης με διάλυμα χρωστικής βρωμιούχου αιθιδίου σε 1xTBE όπως φαίνονται στο υπεριώδες φως. Οι διάδρομοι 1, 2, 3 αντιστοιχούν σε δείγματα DNA από τρεις κρυπορχεικούς ασθενείς. Οι διάδρομοι ΦΑ, ΦΓ αντιστοιχούν στο θετικό και -αρνητικό εξωτερικό μάρτυρα (external controls) δηλαδή σε δείγματα DNA από έναν γόνιμο άνδρα με φυσιολογικά έξω γεννητικά όργανα και από μία γυναίκα, αντίστοιχα). Ο διάδρομος Γ αντιστοιχεί σε δείγμα ύδατος (blank). Οι ελεγχόμενοι ασθενείς συμπεριφέρονται όπως ο φυσιολογικός αρσενικός μάρτυρας (ΦΑ) εμφανίζοντας και τις τρεις αναμενόμενες ενισχυμένες ζώνες (από κάτω προς τα πάνω) που αντιστοιχούν στα STSs SY255 (126bp), SY134 (301bp), SY84 (326bp), δηλώνοντας απουσία μικροαπαλοιφών στις αντίστοιχες περιοχές Yq11 (AZFc, AZFb, AZFa, αντίστοιχα). Όλα τα δείγματα DNA είναι καλής ποιότητας όπως προκύπτει από την εμφάνιση της ζώνης SY14 (SRY:472bp) (τέταρτη ζώνη από κάτω προς τα πάνω) ενώ η γυναίκα (ΦΓ) δεν εμφανίζει καμία ζώνη αφού στερείται το χρωμόσωμα Y. Το δείγμα ύδατος (Γ) δεν εμφανίζει ενίσχυση υποδηλώνοντας απουσία μόλυνσης των αντιδραστηρίων από εξωγενές DNA.

Επίσης, δεν ανιχνεύτηκε καμία μετάλλαξη στο γονίδιο INSL3. Ωστόσο, ταυτοποιήθηκαν τρεις πολυμορφισμοί μονήρους νουκλεοτιδίου (single-nucleotide



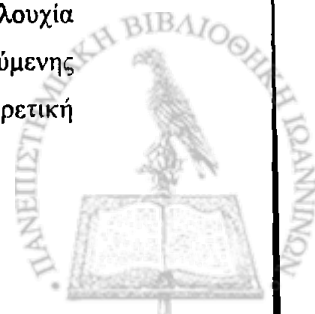
polymorphisms-SNPs)⁽¹⁾ στο εξώνιο 1 που έχουν ήδη περιγραφεί σε προηγούμενες μελέτες (βλέπε συζήτηση). Πρόκειται για τους συνώνυμους SNPs (synonymous SNPs, sSNPs) 27G>A (A9A) και 126G>A (L42L) καθώς και τον μη συνώνυμο SNP (non-sSNP) 178G>A (A60T) (Εικόνα 35A, 35B, 35Γ, 36), ο οποίος συνίσταται σε μεταβολή της αλανίνης σε θρεονίνη στο κωδικόνιο 60. Όλες αυτές οι γενετικές μεταβολές ανιχνεύτηκαν επίσης στην ομάδα ελέγχου.



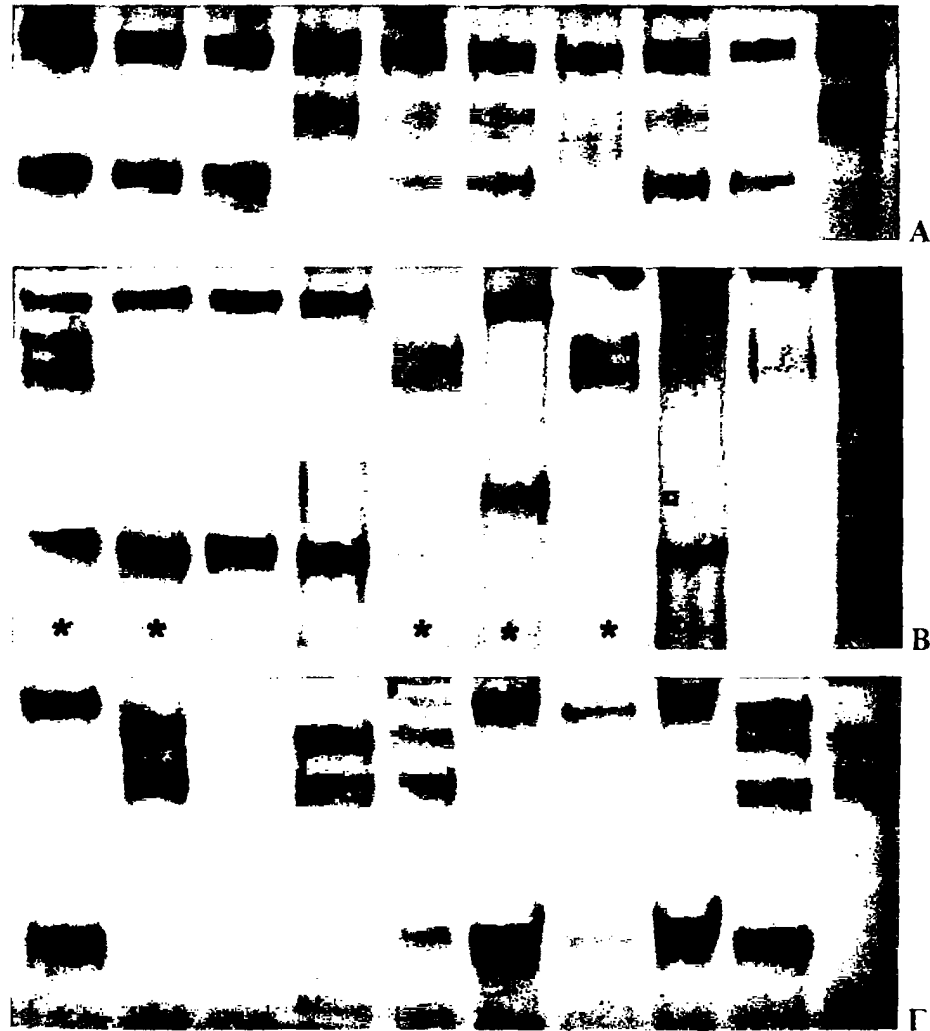
Εικόνα 34. Μονοπλεγματική αντίδραση (simplex reaction SY254). Ενισχυμένα προϊόντα PCR μετά ηλεκτροφόρηση επί γέλης αгарόζης 2% εμποτισμένης με διάλυμα χρωστικής βρωμιούχου αιθιδίου σε 1xTBE όπως φαίνονται στο υπεριώδες φως. Οι διάδρομοι ΦΑ, ΦΓ αντιστοιχούν στο θετικό και αρνητικό εξωτερικό μάρτυρα (external controls) δηλαδή σε δείγματα DNA από έναν γόνιμο άνδρα με φυσιολογικά έξω γεννητικά όργανα και από μία γυναίκα, αντίστοιχα). Ο διάδρομος Υ αντιστοιχεί σε δείγμα ύδατος (blank). Όλοι οι επανελεγχόμενοι κρυφορχικοί ασθενείς εμφανίζουν την ζώνη SY254 (400bp). Τα συγκεκριμένα δείγματα επανελέγχονται με μονοπλεγματική αντίδραση λόγω απουσίας ικανοποιητικής εμφάνισης ενίσχυσης της συγκεκριμένης ζώνης στα πλαίσια της πολυπλεγματικής αντίδρασης A προτού αυτή αποδοθεί σε μικροαπαλοιφή της περιοχής AZFc. Η γυναίκα (ΦΓ) δεν εμφανίζει την ελεγχόμενη ζώνη αφού στερείται το χρωμόσωμα Υ. Το δείγμα ύδατος (Υ) δεν εμφανίζει ενίσχυση υποδηλώνοντας απουσία μόλυνσης των αντιδραστηρίων από εξωγενές DNA.

Εντοπίστηκαν 119/170 (70%) κρυφορχικά άτομα και 39/50 μάρτυρες (78%) φορείς γενετικής μεταβολής γενικά ($P=0,269$). Επίσης εντοπίστηκαν 13/17 (76,5%) άτομα με τεκμηριωμένο οικογενειακό ιστορικό κρυφορχίας και 76/123 (47,6%) άτομα με σποραδική κρυφορχία φορείς γενετικής μεταβολής γενικά ($P=0,238$).

⁽¹⁾ Πολυμορφισμοί που προκύπτουν από αντικατάσταση ενός και μόνο νουκλεοτιδίου στην αλληλουχία του DNA. Ένας SNP που δε συνεπάγεται μεταβολή στην αμινοξική αλληλουχία της κωδικοποιούμενης πρωτεΐνης καλείται συνώνυμος (synonymous), ενώ αντίθετα εάν προκύπτει πρωτεΐνη με διαφορετική αμινοξική αλληλουχία, τότε ο υπεύθυνος SNP καλείται μη συνώνυμος (non-synonymous).⁶⁷



Προκειμένου να διερευνηθεί εάν ο πολυμορφισμός 178G>A σχετίζεται με την χημία, υπολογίστηκε η συχνότητά του στους ασθενείς και στους μάρτυρες μετά FLP ανάλυση. Το φυσικό νουκλεοτίδιο (wild type, 178G) ανιχνεύτηκε στο των αλληλίων των ασθενών. Το αντίστοιχο ποσοστό στην ομάδα ελέγχου ήταν πομένως, αυτή η αμινοξική αντικατάσταση παριστά κοινό πολυμορφισμό που νεται να σχετίζεται με τον κρυσορχικό φαινότυπο ($P=0,876$).

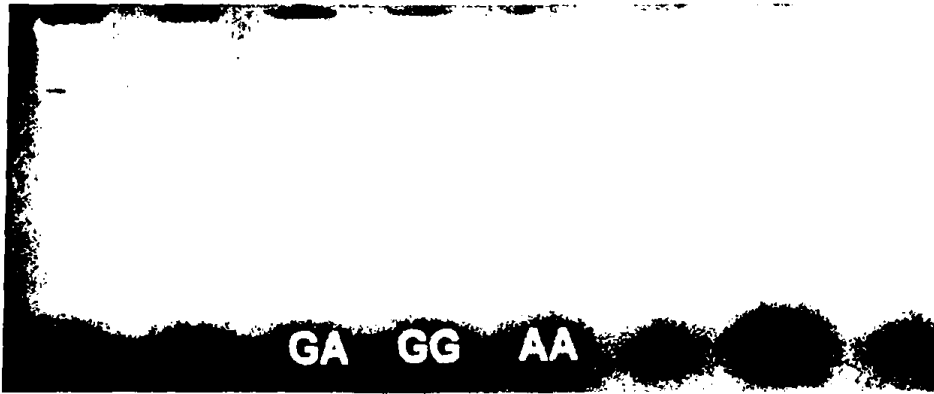


15. Διάφορα ηλεκτροφορητικά πρότυπα που βρέθηκαν μετά την επεξεργασία με τηνθοδο ανάλυσης στο εξώνιο 1 του γονιδίου INSL3. Καθένα από αυτά αντιστοιχεί σεμένο γονοτυπικό συνδυασμό των τριών πολυμορφισμών (A60T, A9A, L42L) πουιστήκε μετά από sequencing. Οι ασερίσκοι στις εικόνες επισημαίνουν διαφορετικάSSCP μέσα σε κάθε υπο-εικόνα.

Επιπλέον, μετά την εξαίρεση των περιπτώσεων με αναφερόμενο αλλά μηωμένο οικογενειακό ιστορικό (n = 30), το μεταλλαγμένο νουκλεοτίδιο 178A



(non-wild type) ανιχνεύτηκε στο 52,9% και 42,3% των αλληλίων των ασθενών με επιβεβαιωμένο οικογενειακό ιστορικό (n=17) και σποραδική κρυπορχία (n=123), αντίστοιχα. (P=0,240). Τέλος, δεν ανιχνεύτηκε συσχέτιση με την πλευρά της βλάβης (αμφοτερόπλευρα-ετερόπλευρα: P=0,695) ή με την παθολογική θέση των όρχεων ενδοκοιλιακή-βουβωνική εντόπιση (P=0,330). Τα αποτελέσματα της γονοτυπικής και αλληλικής ανάλυσης φαίνονται αναλυτικά στο Παράρτημα 1 (Πίνακας 7).

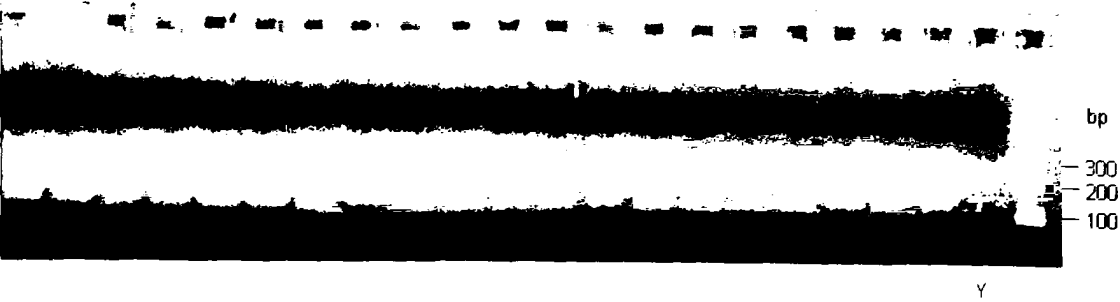


Εικόνα 36. Προσδιορισμός των γονοτύπων της πολυμορφικής θέσης 178G>A μετά από πέψη των δειγμάτων με την περιοριστική ενδονουκλεάση EagI.

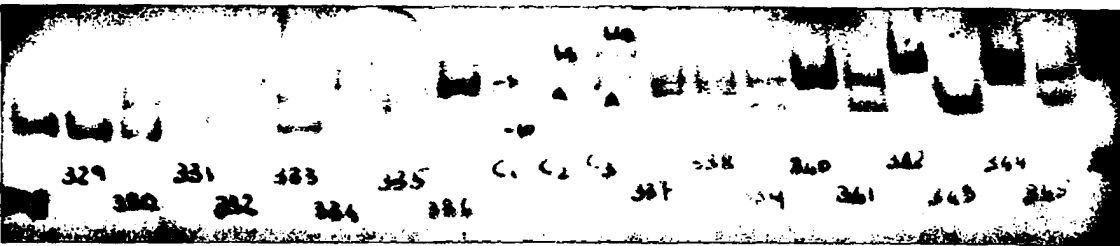
• Η ανάλυση που αφορά στον (TAAAA)_n πολυμορφισμό του εγγύς προαγωγέα του γονιδίου SHBG αποκάλυψε την παρουσία έξι διαφορετικών αλληλίων ως προς τον αριθμό των επαναλήψεων (n=5-10) στα 429 άτομα που ελέγχθηκαν (πέντε διαφορετικά αλλήλια (n=6-10) στους 148 πάσχοντες απογόνους). Ενδεικτικά παρατίθενται κάποια αποτελέσματα (Εικόνες 37, 38, 39). Η κατανομή των αλληλίων και των γονοτύπων στον πληθυσμό ασθενών-γονέων που περιλήφθηκε στη συγκεκριμένη ανάλυση παρουσιάζεται στο Παράρτημα 1 (Πίνακες 8 και 9).

Τόσο η μέθοδος AFBAC (γονικά, πατρικά, μητρικά μεταβιβαζόμενα αλλήλια προς μη μεταβιβαζόμενα στους αντίστοιχους πάσχοντες απογόνους: P=0,921, P=0,979 και P=0,745, αντίστοιχα-πατρικά προς μητρικά μεταβιβαζόμενα και πατρικά προς μητρικά μη μεταβιβαζόμενα αλλήλια: P=0,690, P=0,877, αντίστοιχα), όσο και η μέθοδος ETDT (αλληλική και γονοτυπική ανάλυση: P=0,883, P=0,615, αντίστοιχα) στο σύνολο των πασχόντων, απέτυχαν να ανιχνεύσουν κάποια συσχέτιση/γενετική ζεύξη μεταξύ αριθμού επαναλήψεων TAAAA και κρυπορχικού φαινότυπου.





Εικόνα 37. Ενισχυμένα προϊόντα PCR της επαναλαμβανόμενης πεντανουκλεοτιδική περιοχή TAAAA εντός της αλληλουχίας *alu* του εγγύς προαγωγέα του γονιδίου SHBG μετά ηλεκτροφόρηση επί γέλης αραρόζης 2% εμποτισμένης με διάλυμα χρωστικής βρωμιούχου αιθιδίου σε 1xTBE όπως φαίνονται στο υπεριώδες φως. Το δείγμα ύδατος (Y) δεν εμφανίζει ενίσχυση υποδηλώνοντας απουσία μόλυνσης των αντιδραστηρίων από εξωγενές DNA.

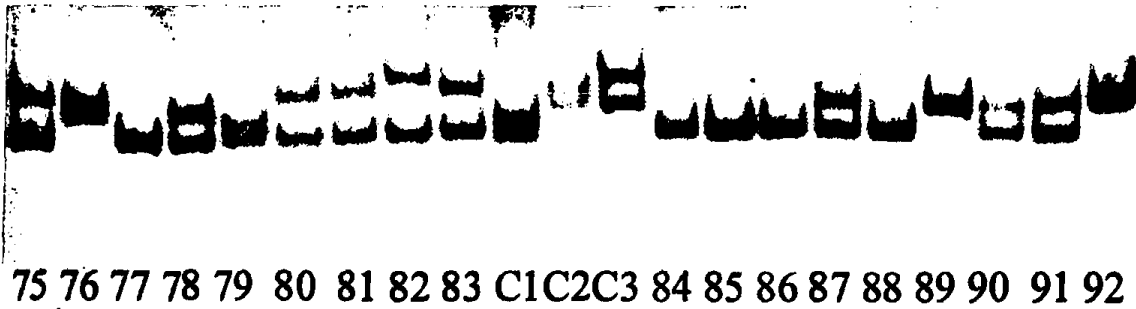


Εικόνα 38. Ενισχυμένα προϊόντα PCR της επαναλαμβανόμενης πεντανουκλεοτιδικής περιοχή $(TAAAA)_n$ εντός της αλληλουχίας *alu* του εγγύς προαγωγέα του γονιδίου SHBG μετά ηλεκτροφόρηση επί γέλης μη μετουσιωμένης πολυακρυλαμίδης 10% (χρώση αργύρου). Διακρίνεται ο διαχωρισμός των αλληλίων σε κάθε περίπτωση ανάλογα με τον αριθμό των επαναλήψεων που διαθέτουν. Στο κέντρο διακρίνονται οι μάρτυρες (C_1 , C_2 , C_3), δηλαδή δείγματα από τυχαία άτομα του γενικού πληθυσμού, με γνωστό αριθμό επαναλήψεων TAAAA, μετά από προσδιορισμό της αλληλουχίας τους (sequencing). Η κωδικοποίηση έχει ως εξής: A=8 επαναλήψεις ($n=8$), -10=A-2 επαναλήψεις (TAAAA πεντανουκλεοτίδια) ($n=6$), -5=A-1 επανάληψη ($n=7$), +5=A+1 επανάληψη ($n=9$), +10=A+2 επαναλήψεις ($n=10$). Έτσι δηλαδή, οι γονότυποι των C_1 , C_2 , C_3 είναι οι εξής: $(TAAAA)_6/(TAAAA)_7$, $(TAAAA)_6/(TAAAA)_9$ και $(TAAAA)_8/(TAAAA)_{10}$, αντίστοιχα. Ο αριθμός των επαναλήψεων κάθε αλληλίου στα άτομα του πληθυσμού της μελέτης προσδιορίστηκε με αντιπαραβολή των αντίστοιχων ενισχυμένων προϊόντων με εκείνα των μαρτύρων. Έτσι για παράδειγμα στην προκειμένη περίπτωση για τα άτομα 328, 330, 331, 332, 336, διαβάζουμε: $(TAAAA)_8/(TAAAA)_6$, $(TAAAA)_6/(TAAAA)_8$, $(TAAAA)_6/(TAAAA)_7$, $(TAAAA)_8/(TAAAA)_9$, $(TAAAA)_8/(TAAAA)_8$, αντίστοιχα. Η ανάγνωση της κάθε γέλης πραγματοποιήθηκε τυφλά από δύο ανεξάρτητους ερευνητές για να αυξηθεί η γκυρότητα και επί διαφωνίας ακολουθούσε σε κάθε περίπτωση επανάληψη της ηλεκτροφόρησης του αμφισβητούμενου δείγματος.

Η εφαρμογή των ίδιων μεθόδων ξεχωριστά στις περιπτώσεις με βουβωνική



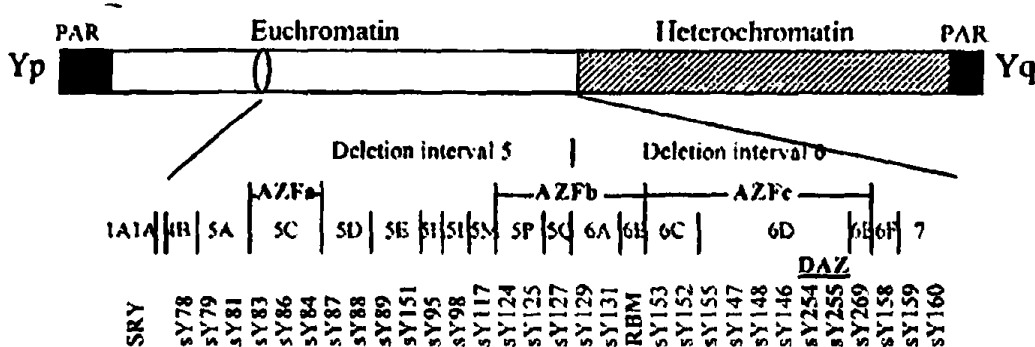
και ενδοκοιλιακή κρυφορχία δεν κατέληξε σε στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα:
 α) Βουβωνική κρυφορχία: AFBAC (γονικά, πατρικά, μητρικά μεταβιβαζόμενα αλληλία προς μη μεταβιβαζόμενα στους αντίστοιχους πάσχοντες απογόνους: $P=0,956$, $P=0,446$ και $P=0,709$, αντίστοιχα-πατρικά προς μητρικά μεταβιβαζόμενα/μη μεταβιβαζόμενα αλληλία: $P=0,542$, $P=0,136$, αντίστοιχα), ETDΤ (αλληλική και γονοτυπική ανάλυση: $P=0,956$, $P=0,795$, αντίστοιχα) και β) ενδοκοιλιακή κρυφορχία: AFBAC (γονικά, πατρικά, μητρικά μεταβιβαζόμενα αλληλία προς μη μεταβιβαζόμενα στους αντίστοιχους πάσχοντες απογόνους: $P=0,543$, $P=0,784$ και $P=0,308$, αντίστοιχα-πατρικά προς μητρικά μεταβιβαζόμενα/μη μεταβιβαζόμενα αλληλία: $P=0,215$, $P=0,665$, αντίστοιχα), ETDΤ (αλληλική και γονοτυπική ανάλυση: $P=0,421$, $P=0,229$, αντίστοιχα).



Εικόνα 39. Ομοίως, για τα άτομα 79, 80, 82, 85, 90 και 92 για παράδειγμα διαβάζουμε $(TAAAA)_6/(TAAAA)_7$, $(TAAAA)_6/(TAAAA)_9$, $(TAAAA)_6/(TAAAA)_{10}$, $(TAAAA)_6/(TAAAA)_6$, $(TAAAA)_6/(TAAAA)_8$, $(TAAAA)_6/(TAAAA)_8$, αντίστοιχα.

3. Συζήτηση

Η ειδική για το ανδρικό φύλο περιοχή (male-specific part) του χρωμοσώματος Y αποτελεί το 95% αυτού και συμπληρώνεται από ψευδοαυτοσωματικούς τόπους.⁸⁵⁵ Το ειδικό αυτό τμήμα, το οποίο προσβάλλεται από μικροαπαλοιφές, έχει κλασσικά υποδιαιρεθεί σε τρεις επιμέρους περιοχές (εγγύς προς άπω: AZFa, AZFb, AZFc) (Εικόνα 40).⁸⁵⁶

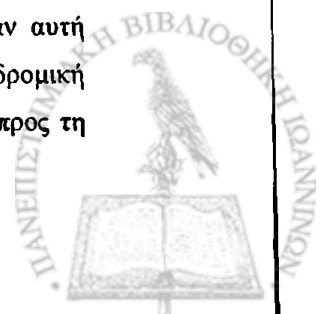


Εικόνα 40. Σχηματική απεικόνιση του χρωμοσώματος Y. Κλασσική υποδιαίρεση της περιοχής Yq11 στις τρεις περιοχές AZFa, AZFb, AZFc. Διακρίνονται οι αντίστοιχες STSs της κάθε περιοχής.

Ωστόσο, η πρόσφατη ολοκλήρωση της αποκωδικοποίησης της αλληλουχίας του χρωμοσώματος Y στο σύνολό της⁸⁵⁵ αποκάλυψε ότι οι περισσότερες μικροαπαλοιφές των περιοχών AZF δημιουργούνται από ενδοχρωμοσωματικούς ομόλογους ανασυνδυασμούς μεταξύ επαναλαμβανόμενων, σχεδόν ταυτόσημων αλληλουχιών (amplicons)⁽¹⁾, οι οποίες οργανώνονται σε παλινδρομικές δομές που ονομάζονται μαζικά παλίνδρομα (massive palindromes, P).^{(2)857,858} Έτσι, με βάση τα νέα δεδομένα, η αρχική κατάταξη των μικροαπαλοιφών της περιοχής Yq11 σε τρεις

⁽¹⁾ Τμήματα DNA που έχουν προκύψει μετά από ενίσχυση (amplification)-προϊόντα αντιδράσεων PCR.⁶⁷

⁽²⁾ Μια μονόκλωνη αλληλουχία DNA καλείται παλίνδρομη εφόσον ισοδυναμεί με τη διαβαζόμενη αντίστροφα συμπληρωματική της αλληλουχία. Για παράδειγμα, η αλληλουχία ACCTAGGT είναι παλινδρομική διότι η συμπληρωματική αυτής (TGGATCCA) ισοδυναμεί με την πρώτη εάν αυτή διαβαστεί αντίστροφα. Είναι γνωστό ότι πολλές βάσεις στο χρωμόσωμα Y έχουν παλινδρομική διάταξη. Αυτή η δομή επιτρέπει στο χρωμόσωμα Y να «αυτοεπισκευάζεται» με κάμψη ως προς τη μέση γραμμή σε περίπτωση που υποστεί βλάβη η μία πλευρά.⁶⁷

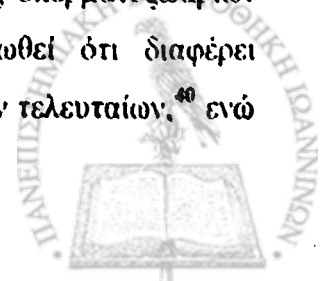


περιοχές (AZFa, AZFb, AZFc) έχει τροποποιηθεί, ανάλογα με το μηχανισμό απαλοιφής και σήμερα ισχύει το εξής κλινικό μοντέλο: AZFa, AZFb (P5/εγγύς P1), AZFbc (P5/άπω P1 ή P4/άπω P1) και AZFc (b2/b4).⁸⁵⁸ Οι απαλοιφές της περιοχής AZFc είναι οι συχνότερες ακολουθούμενες κατά σειρά από τις απαλοιφές των περιοχών AZFb, AZFbc, AZFa, AZFb και πλήρης AZFabc (XX άρρεν).²⁸

Επιπλέον, πρόσφατα δεδομένα καταδεικνύουν ότι μερικές απαλοιφές (partial deletions) των περιοχών AZF απαντούν επίσης σχετικά συχνά και μπορεί να αποτελούν παράγοντα κινδύνου για ανδρική υπογονιμότητα.^{28,859-861} Ωστόσο, η κλινική σημασία των μερικών απαλοιφών του χρωμοσώματος Y δεν έχει επί του παρόντος αναλυθεί διεξοδικά και επομένως, η αναζήτησή τους εξακολουθεί να θεωρείται πειραματική χωρίς να έχει ακόμη ενσωματωθεί στην καθημερινή κλινική εξέταση ρουτίνας.⁸⁴⁸

Οι μικροαπαλοιφές της περιοχής Yq11 γενικά απαντούν σχετικά συχνά σε υπογόνιμους άνδρες ($\cong 8\%$), και αποτελούν το συχνότερο αίτιο σε μοριακό επίπεδο σοβαρής ανδρικής υπογονιμότητας, προκαλώντας γενετικώς επαγόμενη σοβαρή ορχική βλάβη, καθώς επίσης και το δεύτερο σε συχνότητα γενετικό αίτιο διαταραχής της σπερματογένεσης μετά το σύνδρομο Klinefelter.^{13,848,862,863} Οι πάσχοντες από μη αποφρακτική αζωοσπερμία εμφανίζουν υψηλότερη επίπτωση μικροαπαλοιφών (8,3%) συγκριτικά με τους πάσχοντες από σοβαρή олиγοσπερμία (3,4%), ενώ μικροαπαλοιφές της περιοχής Yq11 δεν έχουν ποτέ ανιχνευτεί σε περιπτώσεις με αριθμό σπερματοζωαρίων $>5 \times 10^6/\text{ml}$.²⁸ Ωστόσο, ο συνολικός επιπολασμός μπορεί να διακυμαίνεται σημαντικά από 2-10% ή και περισσότερο ανάλογα με τη σύνθεση των πληθυσμών των διαφόρων μελετών και τα διαγνωστικά πρωτόκολλα που χρησιμοποιούνται από τα διάφορα εργαστήρια, γεγονός που καθιστά αναγκαία την προτυποποίηση και τον ποιοτικό έλεγχο κατά την αναζήτησή τους.^{847,848}

Με βάση τα δεδομένα μιας μετα-ανάλυσης, στους υπογόνιμους ασθενείς με ιστορικό κρυπορχίας, η επίπτωση είναι 4,9%.⁴⁰ Ωστόσο, τα εξατομικευμένα κλινικά ή ορμονολογικά δεδομένα δε φαίνεται να επαρκούν για τον εκ προοιμίου εντοπισμό των ασθενών με αυξημένο κίνδυνο να είναι φορείς, ενώ η επίπτωση δε δείχνει να διαφέρει σημαντικά μεταξύ περιπτώσεων ιδιοπαθούς και μη (ιστορικό κρυπορχίας, κισσοκίλης κ.λ.π.) βαριάς υπογονιμότητας (αζωοσπερμία/αριθμός σπερματοζωαρίων $<2 \times 10^6/\text{ml}$).^{28,42} Η επίπτωση της κρυπορχίας έχει ανακοινωθεί ότι διαφέρει σημαντικά μεταξύ υπογόνιμων ασθενών-φορέων και μη, υπέρ των τελευταίων,⁴⁰ ενώ



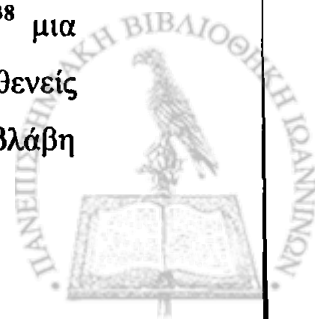
σε μια πρόσφατη μελέτη δεν εντοπίστηκε τέτοια διαφορά.²⁸

Ο πρώτος σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να ελεγχθεί η υπόθεση κατά πόσο ειδικοί γενετικοί τόποι στο χρωμόσωμα Υ που ρυθμίζουν την σπερματογένεση σχετίζονται με την έκφραση παραγόντων που επάγουν ή αναχαιτίζουν την ορχική καθόδο. Προκειμένου να απαντηθεί αυτό το ερώτημα, ελέγχθηκε ένας ευρύς πληθυσμός παιδιών με όλες τις πιθανές φαινοτυπικές εκφράσεις κρυσορχίας και συγκρίθηκε με ομάδα παιδιών με φυσιολογικά έξω γεννητικά όργανα. Εάν οι γενετικοί αυτοί τόποι εμπλέκονταν άμεσα στον έλεγχο της ορχικής καθόδου ή εάν υπήρχε συσχέτιση μεταξύ μικροαπαλοιφών της περιοχής Υq11 ειδικά με κάποιο κρυσορχικό φαινότυπο, εξαιτίας πρόκλησης διαταραχής σε κάποια φάση της ορχικής καθόδου, θα αναμενόταν να ανιχνευτεί κάτω από αυτές τις συνθήκες μια στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς την επίπτωση των γενετικών αυτών μεταβολών μεταξύ ασθενών-μαρτύρων. Η παρούσα μελέτη είναι διεθνώς η μεγαλύτερη διεξαχθείσα, αποκλειστικά σε παιδικό πληθυσμό. Αυτό το χαρακτηριστικό προσδίδει τη δυνατότητα οριστικής απάντησης στο κατά πόσο οι μικροαπαλοιφές της περιοχής Υq11 συμβάλλουν άμεσα στην εμφάνιση της κρυσορχίας.

Το απολύτως αρνητικό αποτέλεσμα της έρευνας, βασισμένο σε δείγμα ικανού μεγέθους, αποτελεί ισχυρή ένδειξη απουσίας τέτοιας συσχέτισης και δεδομένης της απουσίας αυτής είναι σχετικά αναμενόμενο με βάση την αδρά υπολογιζόμενη μελλοντική γονιμοποιητική ικανότητα του δείγματος. Έτσι εάν για παράδειγμα θεωρήσουμε ότι η επίπτωση των μικροαπαλοιφών της περιοχής Υq11 είναι περίπου 4,9% στον υπογόνιμο κρυσορχικό πληθυσμό⁴⁰ και η επίπτωση της υπογονιμότητας σε ασθενείς με ιστορικό ετερόπλευρης και αμφοτερόπλευρης κρυσορχίας είναι περίπου 10% και 37%, αντίστοιχα,⁷¹⁸⁻⁷²¹ θα αναμενόταν να εντοπιστούν ένας με δύο ασθενείς φορείς μικροαπαλοιφών της περιοχής Υq11 στο δείγμα.

Μικρός σχετικά αριθμός μελετών έχει εστιασθεί στην αναζήτηση μικροαπαλοιφών της περιοχής Υq11 ειδικά σε κρυσορχικούς ασθενείς.^{18,36-47} Η ανασκόπηση της σχετικής βιβλιογραφίας παρουσιάζεται στο **Παράρτημα 1 (Πίνακες 10Α, 10Β, 10Γ)**.

Το 1999 ανακοινώθηκε για πρώτη φορά από τους Foresta και συν.³⁸ μια ιδιαίτερα υψηλή επίπτωση (27,5%) μικροαπαλοιφών της περιοχής Υq11 σε ασθενείς με ιστορικό ετερόπλευρης κρυσορχίας και σοβαρή αμφοτερόπλευρη ορχική βλάβη



(αζωοσπερμία, σοβαρή ολιγοσπερμία). Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν 31 προαγωγείς STS (συμπεριλαμβανομένου αυτών της παρούσας μελέτης), προκειμένου να ελεγχθούν οι τρεις περιοχές AZF. Οι ασθενείς με ετερόπλευρη κρυπορχία και μετρίου βαθμού ολιγοσπερμία ήταν αρνητικοί για τέτοιου είδους γενετικές βλάβες. Με βάση αυτά τα ευρήματα, προτάθηκε η ύπαρξη μιας έμμεσης συσχέτισης μεταξύ μικροαπαλοιφών της περιοχής Yq11 και κρυπορχίας με την έννοια ότι αυτές οι γενετικές μεταβολές προκαλώντας σοβαρή ορχική βλάβη, πιθανόν καθιστούν τον όρχι αδρανή προς τα φυσιολογικά ερεθίσματα που ρυθμίζουν την κάθοδό του στο όσχεο και επομένως οδηγούν σε φαινοτυπική εκδήλωση κρυπορχίας. Θα πρέπει να επισημανθεί ωστόσο, ότι στην ίδια μελέτη ανιχνεύθηκαν ανάλογες γενετικές μεταβολές σε συγκρίσιμο ποσοστό μη κρυπορχικών ασθενών (25,4%) με αζωοσπερμία-σοβαρή ολιγοσπερμία και ιδιοπαθή (πρωτοπαθή) σοβαρή ορχική βλάβη. Το γεγονός αυτό δεν συνηγορεί υπέρ της άμεσης εμπλοκής των μικροαπαλοιφών στην παθογένεια της κρυπορχίας. Καθώς δε γνωρίζουμε τη μελλοντική κατάσταση γονιμότητας των ασθενών που ελέγχθηκαν στην παρούσα μελέτη δεδομένης της απουσίας σπερματολογικών παραμέτρων, η πιθανότητα μιας έμμεσης συσχέτισης δεν μπορεί εύκολα να αποκλειστεί. Ωστόσο, τα απολύτως αρνητικά μας αποτελέσματα πιθανότατα υποδηλώνουν ότι οι γενετικές αυτές μεταβολές δε φαίνεται να αποτελούν σημαντικό αιτιολογικό παράγοντα υπογονιμότητας στα πλαίσια κρυπορχίας.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης είναι συμβατά με εκείνα ανάλογων, προηγούμενων μελετών πάνω σε κρυπορχικούς ασθενείς υπογόνιμους ή μη. Στη μελέτη των Cortes και συν.,³⁶ έξι υπογόνιμοι ασθενείς με ιστορικό κρυπορχίας ελέγχθηκαν και κανένας δε βρέθηκε φορέας κάποιας μικροαπαλοιφής της περιοχής AZFc. Οι περιοχές AZFa και AZFb δεν ελέγχθηκαν. Ομοίως, η μελέτη των Fagerli και συν.³⁷ που συμπεριέλαβε 42 ενήλικες με ιστορικό κρυπορχίας και φυσιολογικό έως σοβαρά επηρεασμένο αριθμό σπερματοζωαρίων, κατέληξε σε αρνητικά αποτελέσματα. Ωστόσο, πρέπει να αναφερθεί ότι η συγκεκριμένη μελέτη δεν είναι άμεσα συγκρίσιμη με την παρούσα ως προς τους προαγωγείς STS που χρησιμοποιήθηκαν. Επιπλέον, σε μια μικρή μελέτη, 10 επιλεγμένοι ασθενείς με κρυπορχία στα πλαίσια του συνδρόμου Prader-Willi ελέγχθηκαν προκειμένου να απαντηθεί το ερώτημα κατά πόσο οι μικροαπαλοιφές της περιοχής Yq11 σχετίζονται με την κρυπορχία στο συγκεκριμένο σύνδρομο.³⁹ Στη μελέτη συμπεριλήφθηκαν και

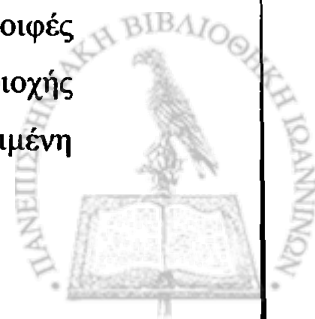


παιδιά (επτά από τους 10 ασθενείς ήταν ηλικίας 3-14 ετών). Χρησιμοποιήθηκαν 51 προαγωγείς STS, συμπεριλαμβανομένων και αυτών της παρούσας μελέτης, για τον έλεγχο των τριών AZF περιοχών. Οι ερευνητές κατέληξαν στο ότι οι μικροαπαλοιφές δεν σχετίζονται με την εμφάνιση του κρυσορχικού φαινοτύπου στο συγκεκριμένο σύνδρομο. Ομοίως, οι Bor και συν.,⁴³ έλεγξαν 64 Δανούς ασθενείς με κρυσορχία και φυσιολογικό έως σοβαρά επηρεασμένο σπερμοδιάγραμμα. Κανένας ασθενής δε βρέθηκε φορέας κάποιας μικροαπαλοιφής και οι ερευνητές κατέληξαν σε απουσία συσχέτισης των γενετικών αυτών μεταβολών με τον κρυσορχικό φαινότυπο.

Οι Kunej και συν.⁴⁰ διερεύνησαν την πιθανότητα ύπαρξης συσχέτισης σε μια μελέτη 90 ασθενών με ιστορικό κρυσορχίας. Ανίχνευσαν δύο περιπτώσεις φορέων σε πάσχοντες από αζωοσπερμία σε σύνολο 71 ασθενών με επηρεασμένο αριθμό σπερματοζωαρίων. Στη μία περίπτωση η μικροαπαλοιφή αφορούσε αποκλειστικά στην περιοχή AZFc ενώ στην άλλη και στις τρεις περιοχές. Οι ίδιοι ερευνητές διεξήγαγαν μια μετα-ανάλυση βασισμένη σε μια λεπτομερή ανασκόπηση της διεθνούς βιβλιογραφίας. Οι υπογόνιμοι κρυσορχικοί ασθενείς βρέθηκε να φέρουν μικροαπαλοιφές σπανιότερα συγκριτικά με το γενικό υπογόνιμο ανδρικό πληθυσμό, αν και η διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Επιπλέον, η συχνότητα της κρυσορχίας βρέθηκε σημαντικά υψηλότερη στους υπογόνιμους μη φορείς συγκριτικά με τους υπογόνιμους φορείς μικροαπαλοιφών. Με βάση τα αποτελέσματα αυτά, οι ερευνητές κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι οι μικροαπαλοιφές της περιοχής Yq11 δεν σχετίζονται αιτιολογικά με την κρυσορχία, σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης.

Οι Song και συν.,⁴² διεξήγαγαν μια μελέτη σε Κινέζους ασθενείς με σοβαρή ιδιοπαθή και μη ιδιοπαθή (ιστορικό κρυσορχίας και κισσοκήλης) υπογονιμότητα. Πέντε από τους 36 ασθενείς με ιστορικό ετερόπλευρης κρυσορχίας και αμφοτερόπλευρη ορχική βλάβη βρέθηκαν φορείς μικροαπαλοιφών στην περιοχή AZFc. Η μελέτη αυτή είναι συγκρίσιμη με την παρούσα από μεθοδολογικής απόψεως. Οι συγγραφείς αμφισβητούν τελικά κατά πόσο ο γενετικός παράγοντας που ελέγχει την ορχική κάθοδο ελέγχει επίσης και τη σπερματογένεση αλλά δέχονται την πιθανή έμμεση αιτιολογική συσχέτιση.

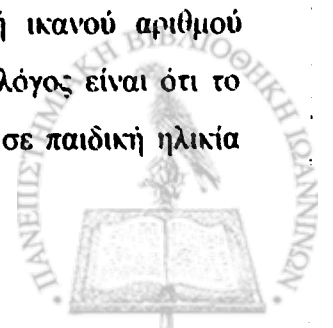
Οι Ferlin και συν.,⁴¹ διερεύνησαν την πιθανότητα οι μερικές απαλοιφές (partial deletions) της περιοχής AZFc και συγκεκριμένα της γονιδιακής περιοχής DAZ (Deleted in Azoospermia) να σχετίζονται με την κρυσορχία. Στη συγκεκριμένη



μελέτη ελέγχθηκαν 95 ασθενείς με σοβαρή υπογονιμότητα και ιστορικό κρυπορχίας τόσο για την παρουσία πλήρων μικροαπαλοιφών των περιοχών AZF όσο και για την παρουσία μερικών απαλοιφών της γονιδιακής περιοχής DAZ. Ανιχνεύτηκαν 11 φορείς πλήρων μικροαπαλοιφών (11,6%), πιο συχνές οι περιπτώσεις με ετερόπλευρη παρά με αμφοτερόπλευρη κρυπορχία. Η επίπτωση αυτή δε διέφερε σημαντικά από εκείνη των ασθενών με ιδιοπαθή υπογονιμότητα (13/98:13,3%). Κανένας κρυπορχικός ασθενής δεν έφερε μερική απαλοιφή της γονιδιακής περιοχής DAZ σε αντίθεση με τους μη κρυπορχικούς ασθενείς (6/85:7,1%). Με βάση τα αποτελέσματα αυτά, οι ερευνητές υιοθέτησαν την άποψη των Foresta και συν.³⁸ ότι δηλαδή οι πλήρεις μικροαπαλοιφές της περιοχής Yq11 εμπλέκονται έμμεσα στην αιτιοπαθογένεια της κρυπορχίας. Όσο δε για τις μερικές απαλοιφές της γονιδιακής περιοχής AZFc, σύμφωνα με τους συγγραφείς, δε φαίνεται να είναι επαρκείς για να οδηγήσουν σε διαταραχή της ορχικής καθόδου συμπέρασμα που επιβεβαιώνεται και σε μια πολύ πρόσφατη μελέτη.⁴⁶

Οι συντριπτική πλειοψηφία των παραπάνω μελετών αναφέρεται σε κρυπορχικούς υπογόνιμους ασθενείς. Ελάχιστες είναι οι μελέτες που έχουν περιλάβει νορμοσπερμικούς ασθενείς στο δείγμα τους^{36,39,42,45} ή έστω παιδιά.^{38,44,47} Ωστόσο, πρέπει να τονιστεί ότι προκειμένου να διερευνηθεί η πιθανότητα παρουσίας μιας άμεσης αιτιολογικής σχέσης μεταξύ μικροαπαλοιφών της περιοχής Yq11 και κρυπορχίας, ιδανικά θα έπρεπε να σχεδιαστεί μια μελέτη που θα περιλάμβανε δύο ομάδες: α) κρυπορχικούς νορμοσπερμικούς ασθενείς και β) μη κρυπορχικούς νορμοσπερμικούς μάρτυρες. Η ανεύρεση μικροαπαλοιφών της περιοχής Yq11 σε στατιστικά μεγαλύτερο ποσοστό ασθενών της πρώτης ομάδας θα επιβεβαίωνε μια πιθανή συσχέτιση με τον κρυπορχικό φαινότυπο.

Δεδομένου ότι οι μικροαπαλοιφές της περιοχής Yq11 συσχετίζονται πολύ ισχυρά με τη πρόκληση σοβαρής ορχικής βλάβης (διαταραχή της σπερματογένεσης) και η κρυπορχία μπορεί να είναι αποτέλεσμα της τελευταίας, η παρουσία υπογονιμότητας στον πληθυσμό ελέγχου είναι δυνατόν να δρα ως συγχυτικός παράγοντας (confounder) στη διερεύνηση της άμεσης αιτιολογικής σχέσης μεταξύ μικροαπαλοιφών της περιοχής Yq11-κρυπορχίας. Ο συγχυτικός παράγοντας πρέπει επομένως να εξουδετερωθεί. Από την άλλη όμως, η συλλογή ικανού αριθμού κρυπορχικών νορμοσπερμικών ασθενών είναι πολύ δύσκολη. Ο λόγος είναι ότι το μεγαλύτερο ποσοστό αυτών των ασθενών πλέον αντιμετωπίζονται σε παιδική ηλικία

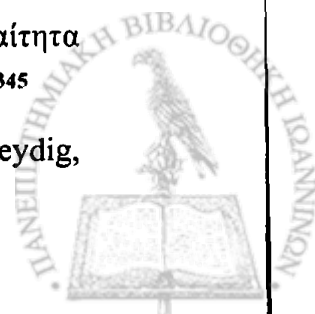


για να επανεμφανιστούν ως ενήλικες, προκειμένου να ζητήσουν επίλυση του προβλήματος υπογονιμότητας που κάποιοι από αυτούς θα διαπιστώσουν μελλοντικά ότι έχουν. Έτσι, μια τέτοια μελέτη μπορεί πολύ πιο εύκολα να βασιστεί σε δείγμα από παιδικό πληθυσμό όπου τα περιστατικά αυθονούν. Φυσικά η ακριβής μελλοντική γονιμοποιητική ικανότητα σε ένα τέτοιο δείγμα δεν μπορεί να είναι γνωστή δεδομένου ότι απουσιάζουν τα σπερματολογικά δεδομένα. Μπορεί ωστόσο να εκτιμηθεί με σχετικά ικανοποιητική προσέγγιση όπως εξηγήθηκε παραπάνω.

Ένα μεγάλο πλεονέκτημα της παρούσας μελέτης είναι ότι βασίστηκε σε ευρύ παιδιατρικό πληθυσμό και μπορεί να απαντήσει πιο έγκυρα στο ζητούμενο ερώτημα σε σύγκριση με τις μελέτες που βασίζονται σε υπογόνιμους κρυψορχικούς ασθενείς, αφού θεωρείται ότι ο συγχυτικός παράγοντας «υπογονιμότητα» μπορεί να ελεγχθεί σε μεγάλο βαθμό. Η επίδραση του συγχυτικού παράγοντα είναι πρακτικά αμελητέα αφού ο αριθμός κρυψορχικών ασθενών που αναμένεται να εμφανίσουν μελλοντικά υπογονιμότητα υπολογίζεται αδρά ότι είναι 32 άτομα ($\cong 17\%$) και από αυτούς ένα με δύο άτομα ότι είναι φορείς μικροαπαλοιφών (βλέπε παραπάνω). Η μόνη μελέτη που βασίστηκε σε αμιγώς παιδιατρικό πληθυσμό προέρχεται από την Τουρκία, είναι πολύ πρόσφατη, καταλήγει στο ίδιο συμπέρασμα με την παρούσα αλλά περιλαμβάνει μόλις 64 άτομα.⁴⁷

Ο παράγοντας INSL3 αποτελεί μέλος της υπεροικογένειας των ορμονών τύπου ινσουλίνης, εκκρίνεται από τα κύτταρα Leydig και φαίνεται να καθοδηγεί την πρώτη φάση της ορχικής καθόδου ελέγχοντας τη διαφοροποίηση του ορχικού οίακα μέσω του υποδοχέα του LGR8.³⁵⁵ Πιο συγκεκριμένα, στα ποντίκια «Insl3-knockout» αποτυγχάνει η ανάπτυξη του ορχικού οίακα, ενώ η ανδρογONO-εξαρτώμενη υποστροφή του κρανιακού κρεμαστήριου συνδέσμου επιτελείται φυσιολογικά.^{6,7, 864} Το μόριο αυτό όπως και η ινσουλίνη, συντίθεται αρχικά ως προ-προ-ορμόνη, η οποία περιλαμβάνει μια εναρκτήρια αμινοξική αλληλουχία (signal peptide, SP) συνδεδεμένη με μια ακόλουθη B-C-A αλυσίδα. Αργότερα, κατά τη διάρκεια της διαδικασίας ωρίμανσης, το εναρκτήριο πεπτίδιο καθώς και η ενδιάμεση συνδετική αμινοξική αλληλουχία (C peptide) απομακρύνονται ώστε τελικά το ώριμο μόριο προκύπτει ως ετεροδιμερές αποτελούμενο από μία A και μία B αλυσίδα συνδεόμενες με δισουλφιδικούς δεσμούς.^{319,328} Η αλυσίδα B περιλαμβάνει τα απαραίτητα αμινοξέα για την αλληλεπίδραση και τη σύνδεση με τον ορμονικό υποδοχέα.^{344,345}

Το γονίδιο Insl3 του ποντικού εκφράζεται ειδικά στα ορχικά κύτταρα Leydig,



τόσο κατά την εμβρυϊκή περίοδο όσο και μετά τη γέννηση, καθώς επίσης και στα ωθηκικά κύτταρα της θήκης μετά τη γέννηση.³⁶⁰ Το αντίστοιχο γονίδιο INSL3 στον άνθρωπο εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 19 (19p13.2-p12) και αποτελείται από δύο μικρά εξώνια και ένα εσώνιο που διακόπτει την περιοχή κωδικοποίησης του ενδιάμεσου πεπτιδίου C.³⁵⁸ Το εξώνιο 1 είναι υπεύθυνο για την κωδικοποίηση του εναρκτηρίου πεπτιδίου, της αλυσίδας B και των οκτώ πρώτων αμινοξέων του πεπτιδίου C, ενώ το υπόλοιπο πεπτίδιο C και η αλυσίδα A κωδικοποιούνται από το εξώνιο 2.³⁵⁸

Ο δεύτερος σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να ελεγχθεί η υπόθεση κατά πόσο γενετικές μεταβολές του γονιδίου INSL3 σχετίζονται με την εμφάνιση κρυπορχίας. Αρκετές μελέτες έχουν διεξαχθεί μέχρι σήμερα διεθνώς, οι οποίες περιλαμβάνουν συνολικά περισσότερους από 1000 ασθενείς και αρκετές εκατοντάδες φυσιολογικών μαρτύρων προκειμένου να διερευνηθεί η συγκεκριμένη υπόθεση^{50,52-63,65} και ένας ικανός αριθμός γεντικών μεταβολών του γονιδίου έχει ταυτοποιηθεί (Εικόνα 41). Η αθροιστική επίπτωση των μεταλλάξεων αυτού του γονιδίου στους κρυπορχικούς ασθενείς είναι σχετικά χαμηλή (1,6-2,2%), αλλά διαφέρει σημαντικά σε σύγκριση με τους φυσιολογικούς μάρτυρες.^{48,49,862} Η επίπτωση δε φαίνεται να διαφέρει σημαντικά μεταξύ περιπτώσεων αμφο- και ετερόπλευρης κρυπορχίας.⁵⁰ Επί του παρόντος, ο αιτιολογικός ρόλος για πολλές από αυτές τις μεταλλάξεις εξακολουθεί να μην έχει οριστικά αποδειχθεί *in vitro*, ωστόσο είναι σαφές ότι αποτελούν την πρώτη περιγραφή γενετικών μεταβολών στον άνθρωπο που σχετίζονται ειδικά με τον κρυπορχικό φαινότυπο.⁵⁰

Εννέα συνολικά διαφορετικές μεταβολές στη νουκλεοτιδική αλληλουχία του γονιδίου INSL3 έχουν ανιχνευθεί μέχρι σήμερα σε κρυπορχικούς ασθενείς και/ή φυσιολογικούς άρρενες μάρτυρες και ως εκ τούτου έχουν θεωρηθεί πολυμορφισμοί. Πρόκειται για ουδέτερους SNPs (sSNPs και non-sSNPs) που απαντούν μεμονωμένα ή σε συνδυασμό, σε ετερόζυγη ή ομόζυγη κατάσταση, κάποιοι δε από αυτούς είναι αρκετά συχνοί και αφορούν στην συντριπτική πλειοψηφία τους στο εξώνιο 1.^{50,52-66} Ο μοναδικός SNP που έχει μέχρι σήμερα περιγραφεί εκτός εξωνίου 1 εντοπίζεται στο εσώνιο και αφορά σε συνώνυμη αντικατάσταση της βάσης κυτοσίνης (C) από θυμίνη (T) στο νουκλεοτίδιο 1259 και περιγράφηκε σε έναν Αφρο-αμερικανό ασθενή.⁵⁴





Εικόνα 41. Νουκλεοτιδική αλληλουχία του ανθρώπινου γονιδίου INSL3 (19p13.2-p12). Οι αλληλουχίες των εξωνίων απεικονίζονται με κεφαλαίους χαρακτήρες ενώ του εσωνίου και των πλευρικών 3' και 5' τμημάτων με μικρούς χαρακτήρες. Διακρίνεται επίσης το αρχικό τμήμα του προαγωγέα του γονιδίου (200bp) με μικρούς χαρακτήρες στο άνω τμήμα της εικόνας. Η αρίθμηση των αμινοξέων είναι σύμφωνα με τα δεδομένα της κωδικοποίησης της αντίστοιχης πρωτεΐνης.³¹⁹ Οι θέσεις διαχωρισμού σε Α αλυσίδα, C πεπτίδιο και Β αλυσίδα καθορίζονται με κάθετες γραμμές. Το αρχικό αγγελιαφόρο πεπτίδιο (signal peptide) είναι υπογραμμισμένο. Τα νουκλεοτίδια αριθμούνται από την υποτιθέμενη θέση έναρξης της μετάφρασης (τροποποιημένη από αναφορά 358). Διακρίνουμε όλες τις γενετικές μεταβολές του γονιδίου που έχουν περιγραφεί μέχρι σήμερα. Τα τετράγωνα παριστούν γενετικές μεταβολές εντός της περιοχής κωδικοποίησης του γονιδίου, ενώ τα τρίγωνα εκτός αυτής (πρωαγωγές και εσώνιο). Οι συνώνυμοι πολυμορφισμοί καταδεικνύονται με κίτρινο, οι μη συνώνυμοι πολυμορφισμοί με πράσινο και οι μεταλλάξεις με κόκκινο χρώμα. Σημειώνονται επίσης ο τύπος και η ακριβής θέση των νουκλεοτιδικών αλλαγών καθώς και τα νέα προκύπτοντα αμινοξέα. Τα κωδικώνια 24 και 102 σημειώνονται επιπλέον εκτός θέσεως για να φανεί η δεύτερη γενετική αλλαγή που έχει περιγραφεί σε αυτά.

Παράδειγμα sSNP αποτελεί η αντικατάσταση της βάσης γουανίνη (G) από τη

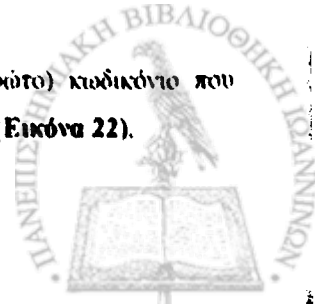


βάση αδενίνη (A) στο νουκλεοτίδιο 126 του γονιδίου (κωδικόνιο 42),⁽¹⁾ (126G>A) στο εξώνιο 1. Ο συγκεκριμένος sSNP ανιχνεύτηκε και στην παρούσα μελέτη (L42L). Τόσο το φυσικό-wild type (CTG) όσο και το νέο κωδικόνιο (CTA) οδηγούν στην προσθήκη του ίδιου αμινοξέος (λευκίνη, L) στην 42^η αμινοξική θέση του προ-προ-πρωτεϊνικού μορίου (18^ο αμινοξύ της αλυσίδας B). Παράδειγμα non-sSNP αποτελεί ο κοινός μεταξύ πολλών εθνοτήτων πολυμορφισμός A60T που ανιχνεύτηκε επίσης στην παρούσα μελέτη. Προκύπτει από αντικατάσταση μιας βάσης G από A στο νουκλεοτίδιο 178 του γονιδίου (178G>A) και οδηγεί σε συντηρητική μεταβολή του αμινοξικού καταλοίπου αλανίνη (A, κωδικόνιο GCC) σε θρεονίνη (T, κωδικόνιο ACC) στο κωδικόνιο 60 που βρίσκεται εντός της υπεύθυνης περιοχής κωδικοποίησης του ενδιάμεσου πεπτιδίου C (60^ο αμινοξύ του προ-προ-πρωτεϊνικού μορίου, 5^ο αμινοξύ του πεπτιδίου C). Η ανασκόπηση της διεθνούς βιβλιογραφίας που αφορά στους SNPs του γονιδίου INSL3 που έχουν μέχρι σήμερα περιγραφεί παρουσιάζεται συνοπτικά στο **Παράρτημα 1 (Πίνακες 11 και 12)**.

Δέκα συνολικά διαφορετικές μεταβολές στη νουκλεοτιδική αλληλουχία του γονιδίου INSL3 έχουν βρεθεί μέχρι σήμερα (όλες σε ετερόζυγη κατάσταση) αποκλειστικά σε κρυσορχικούς ασθενείς (όχι σε υγιείς άρρενες μάρτυρες), και επομένως έχουν θεωρηθεί μεταλλάξεις.^{45,49-52,55-57,66} Πρόκειται για σημειακές μεταλλάξεις που αφορούν στο εξώνιο 2 εκτός από δύο που εντοπίζονται στο εξώνιο 1^{50,66} και μία που εντοπίζεται στον προαγωγέα του γονιδίου.⁶⁶ Μία από αυτές είναι nonsense mutation ενώ οι υπόλοιπες είναι missense mutations (**Παράρτημα 1, Πίνακας 13**) και συνοψίζονται παρακάτω:

1) Η μετάλλαξη R73X⁵⁴ (nonsense mutation). Προκύπτει από αντικατάσταση της βάσης κυτοσίνης (C) από θυμίνη (T) στη νουκλεοτιδική θέση 217 (κωδικόνιο 49) και οδηγεί σε αλλαγή του αμινοξέος αργινίνη (R) σε τριπλέτα τερματισμού της πρωτεϊνοσύνθεσης (X) στη 73^η αμινοξική θέση του προ-προ-πρωτεϊνικού μορίου (18^ο αμινοξύ πεπτιδίου C). Η επίδραση είναι βλαπτική διότι οδηγεί τελικά στη σύνθεση μιας περικομμένης πρωτεΐνης που στερείται την αλυσίδα A. Ανιχνεύτηκε σε έναν Αφρο-αμερικανό ασθενή που βρέθηκε ότι έπασχε από δεξιά κρυσορχία όταν εμφανίστηκε σε ηλικία 6 εβδομάδων με δεξιά περισφιγμένη βουβωνοκήλη και στη συνέχεια υποβλήθηκε σε διόρθωση της κήλης και ταυτόχρονη ορχεοπηξία. Ο

⁽¹⁾ Η αρίθμηση των νουκλεοτιδίων και των κωδικονίων αρχίζει από το (πρώτο) κωδικόνιο που κωδικοποιεί το πρώτο αμινοξύ (μεθειονίνη, M) στο μόριο της προ-προ-πρωτεΐνης (**Εικόνα 22**).



ασθενής, η μητέρα του και ο πατέρας της (αρνητικό ιστορικό κρυπορχίας), ήταν ετερόζυγοι φορείς.

2) Η μετάλλαξη P93L^{50,54,61,62} προκύπτει από αντικατάσταση της βάσης C από T στη νουκλεοτιδική θέση 278 και οδηγεί σε αλλαγή του αμινοξέος προλίνη (P) σε L στην 93^η αμινοξική θέση του προ-προ-πρωτεϊνικού μορίου (38^ο αμινοξύ πεπτιδίου C). Ανιχνεύτηκε σε δύο ανεξάρτητες μελέτες.^{50,54} Η πρώτη περίπτωση που ανακοινώθηκε,⁵⁴ ήταν ένα βρέφος ηλικίας 8 μηνών-ετερόζυγος φορέας, με δεξιά ενδοκοιλιακή κρυπορχία. Αργότερα, ανακοινώθηκαν τέσσερις επιπλέον ασθενείς-φορείς (δύο με αριστερή, ένας με δεξιά και ένας με αμφοτερόπλευρη κρυπορχία), δύο από τους οποίους ήταν υπογόνιμοι.⁵⁰ Σε δύο ασθενείς η μετάδοση προερχόταν από τις φαινοτυπικά φυσιολογικές μητέρες τους. Η επίδραση θεωρείται πιθανόν βλαπτική αφού οδηγεί σε μη συντηρητική αλλαγή ενός ιδιαίτερα συντηρητικού αμινοξέος και απαντά σε ποσοστό <1% του πληθυσμού.⁵⁴

3) Η μετάλλαξη P49S⁵⁵ προκύπτει από αντικατάσταση της βάσης C από T στη νουκλεοτιδική θέση 147 και οδηγεί σε αλλαγή του αμινοξέος P σε σερίνη (S) στην 49^η αμινοξική θέση του προ-προ-πρωτεϊνικού μορίου (25^ο αμινοξύ αλυσίδας B). Ανιχνεύτηκε σε άνδρα με αμφοτερόπλευρη ενδοκοιλιακή κρυπορχία, έξω γεννητικά όργανα θήλεος, απουσία μήτρας και φυσιολογικούς επικουρικούς γεννητικούς αδένες.

4) Η μετάλλαξη R102C^{50,57,61,62} προκύπτει από αντικατάσταση της βάσης C από T στη νουκλεοτιδική θέση 304 και οδηγεί σε αλλαγή του αμινοξέος R σε κυστεΐνη (C) στην 102^η αμινοξική θέση του προ-προ-πρωτεϊνικού μορίου (47^ο αμινοξύ πεπτιδίου C). Ανιχνεύτηκε σε έναν ασθενή με ιστορικό ετερόπλευρης κρυπορχίας και σοβαρή υπογονιμότητα, ο οποίος έχει ανακοινωθεί σε τέσσερις μελέτες.^{50,57,61,62}

5) Η μετάλλαξη N110K⁶⁰ προκύπτει από αντικατάσταση της βάσης C από G στη νουκλεοτιδική θέση 330 και οδηγεί σε αλλαγή του αμινοξέος ασπαραγίνης (N) σε λυσίνη (K) στην 110^η αμινοξική θέση του προ-προ-πρωτεϊνικού μορίου (5^ο αμινοξύ αλυσίδας A). Ανιχνεύτηκε σε ασθενή ηλικίας 3,5 ετών, ημι-αυτόχθονα ιθαγενή Μεξικανική καταγωγής, με δεξιά βουβωνική κρυπορχία και αρνητικό οικογενειακό ιστορικό. Τόσο ο ασθενής όσο και η μητέρα του ήταν ετεροζυγώτες-φορείς.

6) Η μετάλλαξη W69R⁵⁰ προκύπτει από αντικατάσταση της βάσης T από C στη νουκλεοτιδική θέση 205 και οδηγεί σε αλλαγή του αμινοξέος τρυπτοφάνη (W) σε



R στην 69^η αμινοξική θέση του προ-προ-πρωτεϊνικού μορίου (14^ο αμινοξύ πεπτιδίου C). Ανιχνεύτηκε σε δύο Καυκάσιους πάσχοντες από σοβαρή υπογονιμότητα., ο ένας με ιστορικό αμφοτερόπλευρης και ο άλλος ετερόπλευρης κρυσορχίας και ομόπλευρου σεμινώματος.

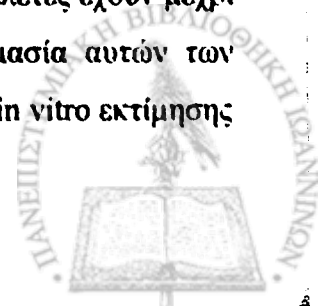
7) Η μετάλλαξη R102H^{50,61,62} προκύπτει από αντικατάσταση της βάσης G από A στη νουκλεοτιδική θέση 304 και οδηγεί σε αλλαγή του αμινοξέος R σε ιστιδίνη (H) στην 102^η αμινοξική θέση του προ-προ-πρωτεϊνικού μορίου (47^ο αμινοξύ πεπτιδίου C). Ανιχνεύτηκε σε πέντε υπογόνιμους Καυκάσιους ασθενείς με ιστορικό κρυσορχίας (ετερόπλευρη στους τρεις,^{50,62} αμφοτερόπλευρη στους δύο⁶¹). Η συγκεκριμένη γενετική μεταβολή είχε ανιχνευτεί για πρώτη φορά αποκλειστικά σε θηλυκό φυσιολογικό μάρτυρα σε μια προηγούμενη μελέτη⁵⁵ και είχε θεωρηθεί ως non-sSNP.

8) Η μετάλλαξη R105H⁶⁶ προκύπτει από αντικατάσταση της βάσης G από A στη νουκλεοτιδική θέση 314 και οδηγεί σε αλλαγή του αμινοξέος R σε H στην 105^η αμινοξική θέση του προ-προ-πρωτεϊνικού μορίου (50^ο αμινοξύ πεπτιδίου C). Ανιχνεύτηκε σε ένα αγόρι Μαροκινής καταγωγής με αμφοτερόπλευρη κρυσορχία χωρίς οικογενειακό ιστορικό.

9) Η μετάλλαξη V18M⁶⁶ προκύπτει από αντικατάσταση της βάσης G από A στη νουκλεοτιδική θέση 52 και οδηγεί σε αλλαγή του αμινοξέος V σε M στην 18^η αμινοξική θέση του προ-προ-πρωτεϊνικού μορίου (18^ο αμινοξύ του SP). Ανιχνεύτηκε σε ένα αγόρι Μαροκινής καταγωγής με ετερόπλευρη κρυσορχία χωρίς οικογενειακό ιστορικό. Ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι ο πατέρας του συγκεκριμένου ασθενούς ήταν επίσης ετεροζυγώτης για τη μετάλλαξη αλλά δεν εμφάνιζε κρυσορχικό φαινότυπο.

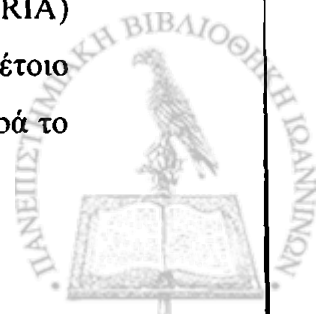
10) Η μετάλλαξη C-19G⁶⁶ προκύπτει από αντικατάσταση της βάσης C από G στη νουκλεοτιδική θέση -19, εντός δηλαδή του προαγωγέα του γονιδίου (200bp τμήμα αμέσως πριν το εναρκτήριο κωδικόνιο της πρωτεϊνοσύνθεσης). Ανιχνεύτηκε σε αγόρι Μαροκινής καταγωγής με ετερόπλευρη κρυσορχία χωρίς οικογενειακό ιστορικό και παθολογικά μικρό πέος (micropenis).

Με εξαίρεση τη μετάλλαξη R73X (nonsense), η οποία προφανώς προκαλεί σύνθεση ελλειμματικού πεπτιδίου, η λειτουργική σημασία των υπολοίπων σημειακών μεταλλάξεων (missense) δεν είναι προφανής. Τρεις λειτουργικές μελέτες έχουν μέχρι σήμερα διεξαχθεί προκειμένου να εκτιμηθεί η φυσιολογική σημασία αυτών των μεταλλάξεων.^{10,45,66} Οι μελέτες αυτές στηρίχθηκαν σε πρωτόκολλα in vitro εκτίμησης

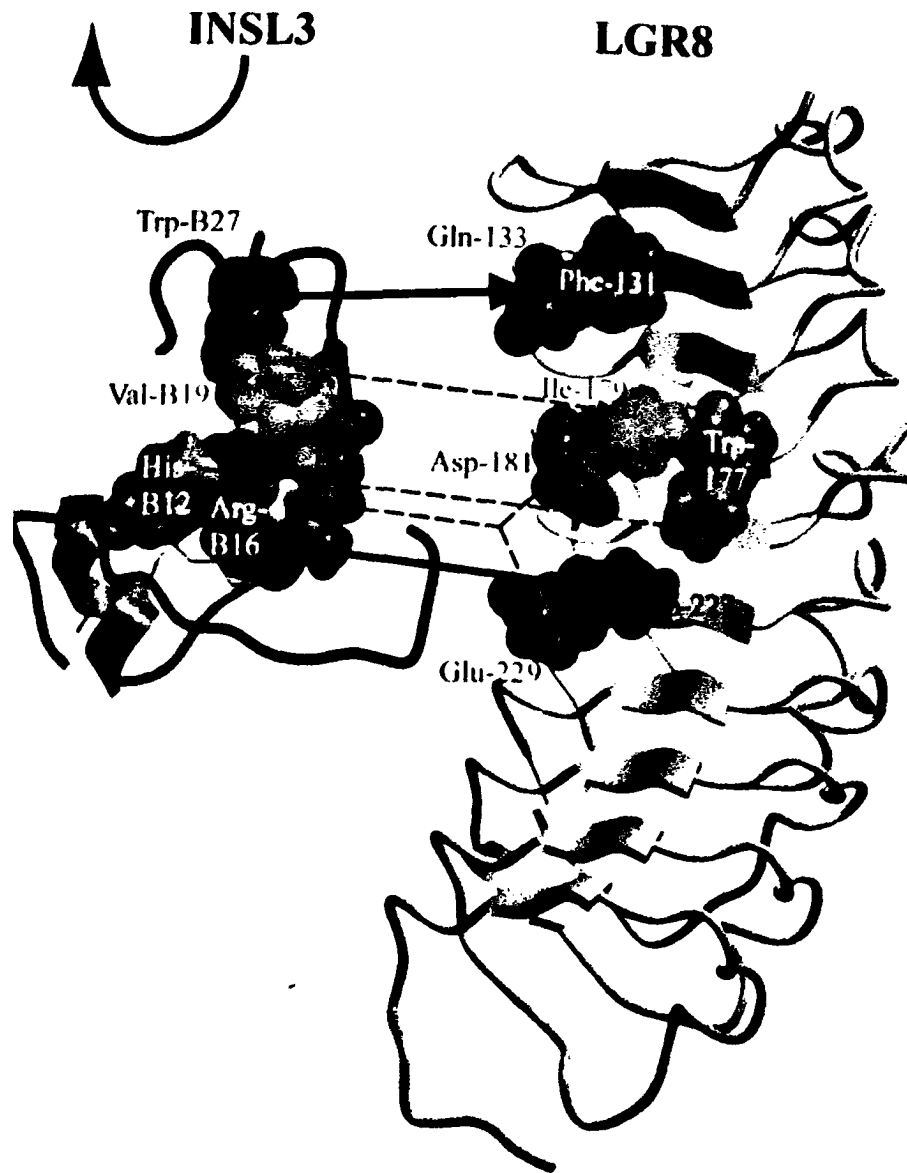


της ικανότητας των αντίστοιχων «τροποποιημένων» πεπτιδίων να ενεργοποιούν τον υποδοχέα LGR8, πράγμα που εκτιμάται από την επαγόμενη αύξηση της συγκέντρωσης του cAMP σε κύτταρα που εκφράζουν τον υποδοχέα.^{10,45} Με βάση τα αποτελέσματα αυτών των μελετών, μόνο οι μεταλλάξεις R102C, P49S και V18M φαίνεται να επηρεάζουν αρνητικά τη φυσιολογική λειτουργία της πρωτεΐνης INSL3.^{10,45,66} Ωστόσο, δεν μπορεί να αποκλειστεί το ενδεχόμενο ότι και οι υπόλοιπες νουκλεοτιδικές μεταβολές οδηγούν στον παθολογικό φαινότυπο με κάποιο διαφορετικό, άγνωστο μηχανισμό *in vivo*. Μέχρι τώρα δεν έχουν γίνει λειτουργικές μελέτες που να εστιάζουν σε άλλες λειτουργίες όπως η ικανότητα μεταγραφής και μετάφρασης των «τροποποιημένων» γονιδίων ή ωρίμανσης των «τροποποιημένων» πεπτιδίων.⁴⁵

Όσο αφορά στις τρεις αυτές λειτουργικές μεταλλάξεις, φαίνεται ότι η R102C μειώνει ελαφρά τη φυσιολογική λειτουργικότητα της πρωτεΐνης (ικανότητα ενεργοποίησης του υποδοχέα LGR8),^{11,50} σε αντιδιαστολή με την P49S¹¹ και την V18M⁶⁶ που την επηρεάζει σημαντικά. Η μετάλλαξη P49S είναι ουσιαστικά η μόνη μέχρι σήμερα περιγραφείσα γενετική μεταβολή του γονιδίου που θα μπορούσε όπως φαίνεται να θεωρηθεί υπεύθυνη για την πρόκληση κρυπορχικού φαινοτύπου.¹¹ Αυτό μπορεί να δικαιολογηθεί από το γεγονός ότι όλα τα πεπτίδια INSL3 που έχουν απομονωθεί μέχρι σήμερα από τα διάφορα είδη θηλαστικών διαθέτουν σταθερά το αμινοξύ προλίνη στην αντίστοιχη αμινοξική θέση της πρωτεΐνης INSL3 του ανθρώπου, δηλαδή στην 49^η.^{320-327,331} Πιστεύεται ότι η παρουσία του αμινοξέος αυτού στη συγκεκριμένη θέση είναι κρίσιμη για την επίτευξη του σωστού προσανατολισμού της τρυπτοφάνης στη γειτονική θέση 51,³⁴⁴ ο οποίος με τη σειρά του είναι κρίσιμος για τη δέσμευση του αγωνιστή στον υποδοχέα (Εικόνες 20, 21, 42).^{344,346} Από την άλλη πλευρά, επί του παρόντος ελάχιστα είναι γνωστά σχετικά με τη διαδικασία συγκρότησης (processing) της προ-προ-ορμόνης INSL3 και ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο αλλαγή στο SP θα μπορούσε να οδηγήσει σε εμφάνιση κρυπορχίας παραμένει αδιευκρίνιστος. Είναι πιθανόν ότι το μεταλλαγμένο πεπτίδιο δεν συγκροτείται φυσιολογικά με αποτέλεσμα να μην απομακρύνεται τελικά το SP από το τελικό μόριο με αποτέλεσμα μειωμένη ικανότητα ενεργοποίησης του υποδοχέα. Η τεχνική ανίχνευσης του πεπτιδίου στον ορό με ειδικό αντίσωμα (RIA) εντοπίζει μόρια ώριμα που φέρουν τις αλυσίδες A και B. Επομένως ένα τέτοιο ανώμαλο πεπτίδιο εξακολουθεί πιθανόν να είναι ανιχνεύσιμο και μετρήσιμο παρά το

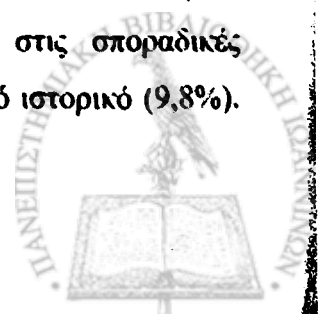


γεγονός ότι είναι δυσλειτουργικό.



Εικόνα 42. Μοντέλο σύνδεσης της πρωτεΐνης INSL3 του ανθρώπου με τον υποδοχέα της LGR8. Οι επιβεβαιωμένες αλληλεπιδράσεις της INSL3 Arg-B16 με την LGR8 Asp-227 και της INSL3 Trp-B27 με την LGR8 Phe-131 και Gln-133 καταδεικνύονται με τονισμένα βέλη. Λιγότερο επιβεβαιωμένες (συμπεριαινόμενες) αλληλεπιδράσεις δείχνονται με διακεκομμένα βέλη. (από αναφορά 865)

Η παρούσα μελέτη αναζήτησης γενετικών μεταβολών στο γονίδιο INSL3 αποτελεί μέχρι σήμερα διεθνώς τη μεγαλύτερη που έχει διεξαχθεί σε παιδιατρικό κρυφορχικό πληθυσμό. Μεταλλάξεις δεν ανιχνεύτηκαν ούτε στις σποραδικές περιπτώσεις, ούτε στις περιπτώσεις με τεκμηριωμένο οικογενειακό ιστορικό (9,8%).



Τρεις γενετικές μεταβολές (A9A, L42L, A60T) ταυτοποιήθηκαν τόσο σε ασθενείς όσο και σε φυσιολογικούς μάρτυρες. Αποτελούν κοινούς SNPs με παγκόσμια κατανομή που έχουν ανακοινωθεί και στο παρελθόν.^{50,52-56-64} Θετική συσχέτιση μεταξύ κρυπορχίας και του non-SNP A60T έχει ανακοινωθεί σε μία μελέτη, οδηγώντας στην άποψη ότι ο πολυμορφισμός αυτός θα μπορούσε να παριστά έναν γενετικό παράγοντα σχετικά ήσσονος ωστόσο σημασίας στην ανάπτυξη κρυπορχίας.⁶⁰ Στην παρούσα μελέτη, σε συμφωνία με προηγούμενες,^{50,52-55,58-61,64} δεν ανιχνεύτηκε τέτοια συσχέτιση. Επιπλέον, στην παρούσα μελέτη, η κατανομή του συγκεκριμένου non-SNP δε βρέθηκε να διαφέρει σε βαθμό στατιστικά σημαντικό μεταξύ του πληθυσμού με σποραδική κρυπορχία και εκείνου με τεκμηριωμένο οικογενειακό ιστορικό Av και η πιθανότητα παρουσίας μεταλλάξεων σε κάποια μη ελεγχθείσα περιοχή του γονιδίου όπως ο προαγωγέας ή το εσώνιο δεν μπορεί να αποκλειστεί, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης συμφωνώντας με εκείνα προγενέστερων μελετών, υποδηλώνουν ότι οι μεταλλάξεις του γονιδίου INSL3 σπάνια αποτελούν αίτιο κρυπορχίας στον άνθρωπο.

Όσον αφορά στο γονίδιο LGR8, πάνω από 1000 ασθενείς και ανάλογος αριθμός υγιών μαρτύρων έχουν μέχρι σήμερα ελεγχθεί σε οκτώ μελέτες^{61-63,65,394,866-868} Οκτώ μεταβολές της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας ανιχνεύτηκαν σε πάσχοντες και σε φυσιολογικούς μάρτυρες (πολυμορφισμοί). Οι πολυμορφισμοί αυτοί είναι συνοπτικά οι εξής:

α) Δύο συνώνυμες αντικαταστάσεις βάσης G από A στις νουκλεοτιδικές θέσεις⁽¹⁾ 261 (A87A) και 957 (E319E)⁽²⁾ στα εξώνια 3 και 12, αντίστοιχα, β) δύο συνώνυμες αντικαταστάσεις βάσης A από G στις νουκλεοτιδικές θέσεις 993 (L331L)⁽³⁾ του εξωνίου 12 και 176 της μη μεταφραζόμενης περιοχής στο άκρο 3' (Utr 3') στο εξώνιο 18, γ) μια μη συνώνυμη αλλαγή στη νουκλεοτιδική θέση 1810 (εξώνιο 17), η οποία οδηγεί στη συντηρητική αμινοξική αντικατάσταση μιας ισολευκίνης (I) από βαλίνη (V) (I604V) στο πέμπτο διαμεμβρανικό τμήμα του υποδοχέα, δ) δύο αντικαταστάσεις βάσης C και T από T και A, αντίστοιχα στις θέσεις 15 και -17, αντίστοιχα των εσωνίων 2 και 4, αντίστοιχα (INV2(+15)C-T) και (INV4(-17)T-A) και ε) μια πολυμορφική αδενινική έκταση 9-13 βάσεων στο εσώνιο 12 (INV12(-2)A₉-

⁽¹⁾ Η αριθμηση των νουκλεοτιδίων ξεκινά από την πρώτη αδενίνη του εναρκτήριου κωδικονίου.

⁽²⁾ Η αλανίνη και το γλουταμικό οξύ διατηρούνται στις θέσεις 87 και 319 της πρωτεΐνης αντίστοιχα.

⁽³⁾ Η λευκίνη διατηρείται στη θέση 331 της πρωτεϊνικής αλληλουχίας.



A₁₃).

Επιπλέον, βρέθηκαν και δύο σημειακές μεταλλάξεις (missense) στο εξόνιο 8 (αποκλειστικά σε πάσχοντες, όχι σε φυσιολογικούς άρρνες μάρτυρες) σε τρεις ανεξάρτητες μελέτες.^{56,383,867} Οι ασθενείς που ανακοινώθηκαν στη δεύτερη μελέτη⁶¹ επανεμφανίζονται στη βιβλιογραφία σε μία επόμενη μελέτη.⁶² Στην πρώτη μελέτη,³⁹⁴ μετάλλαξη ανιχνεύτηκε σε έναν ασθενή Ευρωπαϊκής καταγωγής με αμφοτερόπλευρη, βουβωνική κρυπορχία. Ο ασθενής ήταν ετεροζυγώτης για μια νουκλεοτιδική αλλαγή A σε C στη θέση 664 που οδηγεί σε αντικατάσταση μιας T από P στην αμινοξική θέση 222 (T222P) στην τέταρτη LRR του εξωκυττάριου τμήματος του υποδοχέα (συχνότητα αλληλίου 0,8%).³⁹⁴ Στη δεύτερη μελέτη,⁶¹ η ίδια μετάλλαξη ανιχνεύτηκε σε τέσσερις κρυπορικούς ασθενείς (δύο ασθενείς με ιστορικό ετερόπλευρης, δύο με ιστορικό αμφοτερόπλευρης και αυτόματη κάθοδος των όρχεων στον ένα ασθενή-αμφοτερόπλευροι ανελκόμενοι όρχεις τελικά) και φυσιολογική έως σοβαρά επηρεασμένη γονιμότητα. Οι ασθενείς ήταν ετεροζυγώτες για τη μετάλλαξη (συχνότητα αλληλίου 2,3%). Η λειτουργική ανάλυση in vitro, έδειξε ότι η συγκεκριμένη μετάλλαξη είναι βλαπτική και υπεύθυνη για την πρόκληση λειτουργικού ελλείμματος στο μόριο του υποδοχέα.^{63,394} Με βάση αυτό το εύρημα δημιουργήθηκε η υπόθεση ότι μετάλλαξη σε περιοχή LRR μπορεί να επηρεάσει είτε τη δεσμευτική ικανότητα, είτε την ικανότητα μεταβίβασης σημάτων από τον υποδοχέα (receptor signaling).³⁸³ Τέλος στην τρίτη μελέτη⁸⁶⁸ η μετάλλαξη ανακοινώθηκε σε 18 ασθενείς (έξι με αμφοτερόπλευρη και 12 με ετερόπλευρη κρυπορχία), σε όλους δε τους ασθενείς που υπήρχε διαθέσιμο γονικό DNA (εννέα άτομα) το αλληλίο βρέθηκε μητρικής προέλευσης. Επιπλέον ανακοινώθηκε μια νέα μετάλλαξη (R223K: 223G>A) σε ασθενή με αμφοτερόπλευρη κρυπορχία και αυτόματη ορχική κάθοδο σε ηλικία 2-3 ετών. Στην λειτουργική ανάλυση που ακολούθησε φάνηκε ότι η μόνο η (T222P) είχε βλαπτική επίδραση που αποδόθηκε σε πρόκληση μειωμένης μεμβρανικής έκφρασης του υποδοχέα. Ωστόσο, σε μια πολύ πρόσφατη πολυεθνική μελέτη που συμπεριέλαβε 822 ασθενείς (359 κρυπορικούς και 463 μάρτυρες) από τέσσερα συμμετέχοντα κράτη (Ιταλία, Ισπανία Ουγγαρία και Αίγυπτο) έδειξε ότι η T222P δεν μπορεί να θεωρηθεί ύποπτη και δεν σχετίζεται αιτιολογικά με την κρυπορχία, αφού ανιχνεύτηκε σε μάρτυρες και μάλιστα η διαφορά της επίπτωσης δεν ήταν στατιστικά σημαντική (κρυπορικοί ασθενείς: 3,6%-μάρτυρες: 1,7%).⁸⁶⁸



Για τη ειδική συσχέτιση των γενετικών μεταβολών των γονιδίων INSL3-LGR8 με τη κρυπορχία δεν υπάρχουν επί του παρόντος οριστικά δεδομένα. Ο δε επιπολασμός των μεταλλάξεων που έχουν εντοπιστεί ποικίλει πολύ μεταξύ των διαφόρων μελετών πιθανόν ως αποτέλεσμα εθνολογικών διαφορών ή διαφορών στα κριτήρια επιλογής των ασθενών. Ο φαινότυπος των ασθενών που έχουν περιγραφεί με τέτοιου είδους μεταλλάξεις δεν είναι ομοιογενής αλλά ποικίλει πολύ, από αμφοτερόπλευρη ενδοκοιλιακή μέχρι ετερόπλευρη βουβωνική κρυπορχία με μεταγενέστερη αυτόματη ορχική κάθοδο-ανελκόμενοι όρχεις.^{50,61} Όλοι αυτοί οι διαφορετικοί φαινότυποι είναι συμβατοί με την ύπαρξη αναπτυξιακών ελλειμμάτων του ορχικού οίακα.

Από την άλλη πλευρά, η σπερματογένεση και η ενδοκρινική λειτουργία του όρχεος δεν φαίνεται να παραβλάπτεται άμεσα από τέτοιου είδους μεταλλάξεις.^{50,61} Η διαταραχή της σπερματογένεσης είναι ίσως αποτέλεσμα της παθολογικής θέσης των όρχεων και της προχωρημένης ηλικίας κατά την οποία οι ασθενείς υποβλήθηκαν τελικά σε ορχεοπηξία.^{50,61} Ωστόσο, λίγες μελέτες έχουν αναλύσει δεδομένα σπερματολογικών μεταβολών και καρκινογένεσης σε ασθενείς με τέτοιες μεταλλάξεις, αν και η πρωτεΐνη INSL3 έχει ανιχνευτεί σε καρκινικούς ιστούς άλλων οργάνων.^{355,376,380,869}

Αξίζει να σημειωθεί ότι η επίπτωση των μεταλλάξεων του γονιδίου INSL3 γενικά στο σύνδρομο της ορχικής δυσγενεσίας είναι περίπου 1,9% και δε διαφέρει σημαντικά μεταξύ των επιμέρους συνιστωσών του συνδρόμου και των διαφόρων συνδυασμών τους (διακύμανση επίπτωσης από περιπτώσεις μεμονωμένης κρυπορχίας έως μεμονωμένου σεμινώματος: 1,5-3,1%, αντίστοιχα).⁵⁰ Σε ασθενείς με τις δύο από τις τέσσερις συνιστώσες (πλην κρυπορχίας και υποσπαδία), μεμονωμένα ή σε συνδυασμό, έχουν εντοπιστεί δύο μεταβολές στη νουκλεοτιδική αλληλουχία του γονιδίου που δεν έχουν προηγουμένως περιγραφεί σε ασθενείς με κρυπορχία⁵⁰ και δύο που έχουν ήδη περιγραφεί (P93L και W69R).^{50,54} Καμία από αυτές δεν ανιχνεύτηκε σε φυσιολογικούς μάρτυρες. Οι δύο νέες αυτές μεταλλάξεις missense δεν προκαλούν μεταβολή στην ικανότητα του πρωτεϊνικού μορίου να ενεργοποιεί τον υποδοχέα LGR8 *in vitro*. Οι σημειακές αυτές μεταλλάξεις είναι οι εξής:

1) Η μετάλλαξη R4H⁵⁰ προκύπτει από αντικατάσταση της βάσης G από A στη νουκλεοτιδική θέση 11 και οδηγεί σε αλλαγή του αμινοξέος R σε ιστιδίνη H στην περιοχή κωδικοποίησης του αρχικού αγγελιαφόρου πεπτιδίου (κωδικόνιο 4, εξώνιο



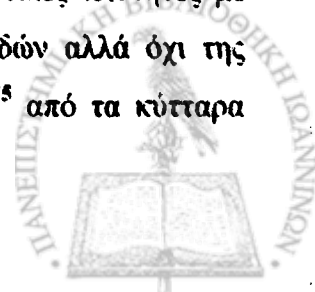
1). Η μετάλλαξη ανιχνεύτηκε σε υπογόνιμο Καυκάσιο ασθενή (χωρίς ιστορικό κρυσορχίας) λόγω μικροαπαλοιφής στην περιοχή Yq11.

2) Η μετάλλαξη R72K⁵⁰ προκύπτει από αντικατάσταση της βάσης G από A στη νουκλεοτιδική θέση 215 και οδηγεί σε αλλαγή του αμινοξέος R σε K στην περιοχή κωδικοποίησης ενδιάμεσου πεπτιδίου C (κωδικόνιο 72, εξώνιο 2). Η μετάλλαξη ανιχνεύτηκε σε τρεις Καυκάσιους με μεμονωμένη υπογονιμότητα, μεμονωμένο σεμίνωμα και συνδυασμό αυτών, αντίστοιχα.

Αν και τα μέχρι τώρα αποτελέσματα δείχνουν ότι οι μεταλλάξεις των γονιδίων INSL3 και/ή LGR8 δεν αποτελούν συχνές αιτίες σποραδικής⁵²⁻⁶¹ ή οικογενούς κρυσορχίας,^{63,866} ανορχίας⁶⁴ ή γενικότερα συνδρόμου ορχικής δυσγενεσίας στον άνθρωπο,⁵⁰ είναι δύσκολο να κατανοηθεί η ακριβής φαινοτυπική τους επίδραση και είναι μεγάλη η ανάγκη αφενός για περαιτέρω γενετικές αναλύσεις και αφετέρου για λειτουργικές μελέτες ώστε να διευκρινιστεί η δυναμική τους επίπτωση στην ορχική κάθοδο.

Τα μέχρι τώρα αποθαρρυντικά αποτελέσματα της γενετικής ανάλυσης των εν λόγω γονιδίων σε συνδυασμό με κάποια άλλα ευρήματα, έχουν οδηγήσει ορισμένους συγγραφείς ακόμη και σε αμφισβήτηση του ρόλου της πρωτεΐνης INSL3 στην ορχική κάθοδο σε θηλαστικά πλην του ποντικού,²⁵³ παρόλο που αυτό δεν θεωρείται αρκετά πιθανό. Τέτοιοι υπαιγιμοί προκύπτουν από μελέτες ανοσοϊστοχημείας σε κύτταρα Leydig όρχεων α) αρουραίου 1 και 5 ημέρες μετά τη γέννηση²⁶¹ και β) εμβρύων ανθρώπου δευτέρου και τρίτου τριμήνου της κύησης (Ivell, Balvers, Jerek, μη δημοσιευμένα αποτελέσματα²⁶¹) που απέτυχαν να ανιχνεύσουν, πρωτεϊνικά αντίγραφα INSL3. Επίσης τα πρόδρομα αποτελέσματα των μετρήσεων των επιπέδων της πρωτεΐνης INSL3 σε ορό κρυσορχικών νεογέννητων (αίμα από ομφάλιο λώρο) και βρεφών ηλικίας 3 μηνών δεν δείχνουν συσχέτιση με την παθολογία.⁸⁷⁰

Η SHBG είναι μια ομοδιμερική γλυκοπρωτεΐνη που αποτελείται από 373 αμινοξέα και ο ρόλος της είναι να μεταφέρει τις στεροειδικές φυλετικές ορμόνες στο αίμα ρυθμίζοντας την πρόσβασή τους στους ιστούς-στόχους.⁸⁷¹ Η συνάφεια είναι μέγιστη για την διυδροτεστοστερόνη, ελαφρώς μικρότερη για την τεστοστερόνη και την οιστραδιόλη και πολύ χαμηλή για άλλα βιολογικά δραστικά στεροειδή.⁸⁷² Η ορχική ABP έχει παρόμοιες φυσικοχημικές και στεροειδοδεσμευτικές ιδιότητες με την SHBG.^{873,874} Υπό την επίδραση της FSH και των ρετινοειδών αλλά όχι της τεστοστερόνης, απεκκρίνεται μέσα στα σπερματικά σωληνάρια⁸⁷⁵ από τα κύτταρα



Sertoli στον αρουραίο και μεταναστεύει στην κεφαλή της επιδιδυμίδας.⁸⁷⁶ Εμφανίζει επίσης ισχυρή συνάφεια προς τα ανδρογόνα, τα οποία και δεσμεύει⁸⁷⁷ για να τα μεταφέρει στην επιδιδυμίδα.⁸⁷³ Εκεί το σύμπλεγμα εισέρχεται στα επιθηλιακά κύτταρα⁸⁷⁸ και έτσι ρυθμίζεται η τοπική ανδρογονική δραστηριότητα εντός του ανδρικού αναπαραγωγικού σωλήνα και επηρεάζονται οι ανδρογόνο-εξαρτώμενοι μηχανισμοί ωρίμανσης των σπερματοζωαρίων.⁸⁷⁹ Έχει δειχθεί ότι η ορχική ABP και η SHBG του πλάσματος είναι προϊόντα της ίδιας μεταγραφικής μονάδας στα τρωκτικά αλλά όχι στον άνθρωπο.⁸⁸⁰ Το μοναδικό ανθρώπινο γονίδιο που κωδικοποιεί την SHBG/ABP εντοπίζεται στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 17 (17p13-p12)⁸⁸¹ έχει μέγεθος 4 kb και διαθέτει 9 εξώνια (E1-E8) καθώς και το «εναλλακτικό» εξώνιο 1 (Alt E1).⁸⁸²

Οι κύριες πηγές προέλευσης της SHBG και ABP στον άνθρωπο είναι το ήπαρ⁸⁸³ και οι όρχεις,⁸⁸⁰ αντίστοιχα όπου συντίθενται τόσο κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ζωής όσο και μετά τη γέννηση.^{872,884} Το γονίδιο SHBG/ABP στον άνθρωπο, φαίνεται ότι περιλαμβάνει τουλάχιστον δύο μεταγραφικές μονάδες.⁸⁸² Η πρώτη (E1-E8) έχει μέγεθος 4,3 kb και κωδικοποιεί το πρόδρομο πολυπεπτιδίο που στη συνέχεια υφίσταται ωρίμανση και εκκρίνεται από τα ηπατοκύτταρα ως SHBG του πλάσματος υπό τον έλεγχο ενός εγγύς προαγωγέα που διαθέτει 5 διακριτές περιοχές τις FP1-FP5 (DNase I footprinted assay.⁽¹⁾ Η περιοχή FP4 τόσο στον άνθρωπο όσο και στον χιμπατζή περιλαμβάνει μια αλληλουχία δέσμευσης-στόχο (CTTGTGA) μεταγραφικών παραγόντων (upstream stimulatory factors) που καταπιέζουν τη δραστηριότητα αυτής της μονάδας στα κύτταρα Sertoli.⁸⁸⁵ Σε άλλα θηλαστικά (τρωκτικά) ωστόσο, η μεταγραφική αυτή μονάδα λειτουργεί επιπλέον και στα κύτταρα Sertoli, αφού η αντίστοιχη αλληλουχία του προαγωγέα στα είδη αυτά

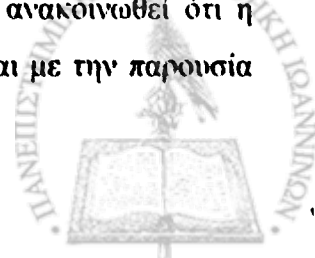
(¹) Η μοριακή αυτή τεχνική δίνει τη δυνατότητα ανίχνευσης αλληλεπιδράσεων μεταξύ DNA-πρωτεϊνών (DNA-binding proteins) π.χ. μεταγραφικούς παράγοντες (transcription factors) που ρυθμίζουν τη διαδικασία της μεταγραφής. Στηρίζεται στην αρχή ότι μια πρωτεΐνη που συνδέεται στο DNA, συχνά το προστατεύει από την ενζυματική διάσπαση των δεοξυριβονουκλεασών (DNases), οι οποίες καταλύουν την υδρολυτική διάσπαση των φωσφοδιεστερικών δεσμών. Το μόριο DNA του ενδιαφέροντος, ραδιοσημένεται με PCR ενίσχυση, χρησιμοποιώντας ³²P 5'-σεσημασμένο προαγωγέα και ακολούθως το πρότυπο ενζυματικής αποκοπής ανιχνεύεται με ηλεκτροφόρηση επί γέλης. Εάν η πρωτεΐνη δεσμεύει το DNA, η θέση της δέσμευσης στο μόριο προστατεύεται από την ενζυματική διάσπαση. Αυτό οδηγεί στην εμφάνιση μιας «καθαρής» περιοχής στη γέλη γνωστή ως «ίχνος» («footprint»).⁶⁷



απουσιάζει. Αν και το γονίδιο SHBG δεν εκφράζεται στα κύτταρα Sertoli του ανθρώπου, προϊόντα μεταγραφής του, τα οποία περιλαμβάνουν αλληλουχίες που αντιστοιχούν σε ένα «εναλλακτικό» εξώνιο 1^{880,886} ακολουθούμενο από τα εξώνια 2-8 (Alt E1, E2-E8) ανευρίσκονται στα ορχικά βλαστικά κύτταρα.⁸⁸² Αυτά είναι προϊόντα μιας δεύτερης μεταγραφικής μονάδας του γονιδίου SHBG, μεγέθους περίπου 8kb, που φαίνεται ότι κωδικοποιεί μια ισομορφή της SHBG, η οποία είναι 4-5kDa μικρότερη από την SHBG του πλάσματος και παριστά την ορχική ABP. Η μεταγραφική αυτή μονάδα λειτουργεί υπό τον έλεγχο ενός εναλλακτικού προαγωγέα που λειτουργεί αποκλειστικά στα ορχικά βλαστικά κύτταρα.⁸⁸⁷ Αυτή η ισομορφή συσσωρεύεται μεταξύ του εξωτερικού ακροσώματος και της πλασματικής μεμβράνης του σπερματοζωαρίου και απελευθερώνεται κατά τη διάρκεια της τελικής φάσης ωρίμανσης των κυττάρων αυτών κατά την οποία καθίστανται ικανά να γονιμοποιήσουν το ωάριο (capacitation reaction).⁸⁸⁷ Στον αρουραίο, σε αντιδιαστολή με τον άνθρωπο, υπάρχει μία και μοναδική μεταγραφική μονάδα μεγέθους 5,5kb, η οποία χρησιμοποιεί την ίδια αλληλουχία εξονίων (E1-E8) με την 4,3kb που λειτουργεί στο ανθρώπινο ηπατοκύτταρο.⁸⁸²

Μεταξύ των ατόμων παρατηρείται σημαντική διακύμανση της συγκέντρωσης της SHBG του ορού, η οποία εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως η ορμονική, μεταβολική και διατροφική κατάσταση.⁸⁸⁸ Ωστόσο, η συγκέντρωση της SHBG στον ορό παραμένει σχετικά σταθερή σε κάθε άτομο κατά τη διάρκεια της ενηλίκου ζωής, παρουσιάζοντας κάποια διακύμανση ανάλογα με την ηλικία που σχετίζεται κυρίως με τη μεταβολική του κατάσταση.⁸⁸⁹ Έχει ανακοινωθεί επίσης ότι υπάρχει γενετική επίδραση επάνω στα επίπεδα της SHBG του ορού, που ευθύνεται για >60% της διακύμανσης της συγκέντρωσης της μεταξύ των ατόμων. Επομένως πολυμορφισμοί του αντίστοιχου γονιδίου ίσως ευθύνονται για μεταβολή είτε του ρυθμού παραγωγής είτε του μεταβολισμού της πρωτεΐνης, συμβάλλοντας στην παρατηρούμενη μεταβλητότητα της συγκέντρωσης μεταξύ των διαφόρων ατόμων.⁸⁹⁰⁻⁸⁹³

Πρόσφατα περιγράφηκε μια πολυμορφική επαναληπτική πεντανουκλεοτιδική αλληλουχία (TAAA)_n, (n=6-10 στο γενικό πληθυσμό), η οποία εντοπίζεται στο 5' άκρο (upstream) εντός της αλληλουχίας *ah1* του εγγύς προαγωγέα του γονιδίου SHBG (μεταξύ των περιοχών FP16-FP17), που φαίνεται να επηρεάζει τη μεταγραφική δραστηριότητα του γονιδίου *in vitro*.⁶⁹ Πιο συγκεκριμένα, έχει ανακοινωθεί ότι η μείωση της μεταγραφικής δραστηριότητας του γονιδίου σχετίζεται με την παρουσία



βραχύτερων επαναλήψεων (αλλήλιο (TAAA)₆).⁶⁹ Το γεγονός αυτό αποδίδεται σε μια μεγαλύτερη τάση δέσμευσης ενός 46kDa ηπατικού πυρηνικού παράγοντα στην ολιγονουκλεοτιδική αλληλουχία έξι επαναλήψεων συγκριτικά με τις αλληλουχίες μεγαλύτερων (7-10) επαναλήψεων.⁶⁹ Φαίνεται ότι ο πολυμορφισμός αυτός ίσως συμβάλλει στη παρατηρούμενη διακύμανση των επιπέδων της SHBG στο πλάσμα μεταξύ των διαφόρων ατόμων επηρεάζοντας ενδεχομένως την πρόσβαση των φυλετιών στεροειδικών ορμονών στους ιστούς-στόχους τους.⁶⁹⁻⁷⁴

Η παραπάνω περιγραφείσα παρατήρηση είναι συμβατή με τα ευρήματα α) μιας πολυεθνικής μελέτης κοορτής υγιών μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών που κατέληξε στο συμπέρασμα ότι το αλλήλιο (TAAA)₆ συσχετίζεται με χαμηλότερα επίπεδα κυκλοφορούσας SHBG στον ορό⁸⁹⁴ και β) μιας μελέτη επάνω σε νέες υγιείς γυναίκες, όπου η παρουσία βραχύτερων επαναλήψεων (TAAA)₆ συσχετίζεται με την εμφάνιση πρώιμης εμμηναρχής.⁷¹ Από την άλλη πλευρά ωστόσο, έχει βρεθεί ότι νεαροί ενήλικες καθώς και ηλικιωμένοι, τυχαία επιλεγμένοι από το γενικό πληθυσμό⁷² όπως επίσης προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες με σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών⁷⁰ και υπερτρίχωση⁷¹ με γονότυπους βραχύτερων επαναλήψεων, εμφανίζουν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα SHBG στον ορό.

Εφόσον οι διακυμάνσεις των επιπέδων της SHBG στον ορό επηρεάζουν το ελεύθερο κλάσμα των στεροειδικών ορμονών του φύλου, είναι κρίσιμο να καθοριστεί εάν οι γενετικές αυτές παραλλαγές του γονιδίου σχετίζονται με παθήσεις όπως η κρυπορχία που συνδέονται με απρόσφορη έκθεση στις ορμόνες αυτές. Λαμβάνοντας υπόψη ότι η δεύτερη φάση της ορχικής καθόδου είναι ανδρογονο-εξαρτώμενη,⁵ και ότι τα επίπεδα της SHBG στον ορό μπορεί να είναι αυξημένα σε ασθενείς με κρυπορχία,⁷⁵ διερευνήθηκε στην παρούσα μελέτη η πιθανότητα ύπαρξης συσχέτισης/γενετικής ζεύξης αυτού του πολυμορφισμού με τον κρυπορχικό φαινότυπο. Η παρούσα έρευνα είναι η πρώτη διεθνώς, στην οποία μελετήθηκε σε γενετικό υλικό ολόκληρων οικογενειών (family-based study) η πιθανότητα συσχέτισης του συγκεκριμένου πολυμορφισμού με την κρυπορχία.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης βασίστηκαν σε πλήρεις «πυρηνικές» οικογένειες (completely typed nuclear families) αποτελούμενες από δύο γονείς και ένα ή περισσότερα κρυπορχικά παιδιά. Τα γονικά αλλήλια που δεν μεταβιβάστηκαν στον πάσχοντα απόγονο απετέλεσαν τον λεγόμενο πληθυσμό μαρτύρων βασισμένων σε πάσχουσες οικογένειες (affected family based controls (AFBAC)). Δεν βρέθηκε



κάποιο συγκεκριμένο αλληλίο που να έχει την τάση να μεταβιβάζεται συχνότερα στους πάσχοντες απογόνους. Επίσης, δεν καταδείχτηκε στατιστική υπεροχή κάποιου συγκεκριμένου γονοτύπου στους πάσχοντες. Επομένως τα αποτελέσματα αδυνατούν να στηρίζουν την ύπαρξη συσχέτισης/γενετικής ζεύξης του πολυμορφισμού με τον κρυφορχικό φαινότυπο.

Αφού ο πολυμορφισμός θεωρείται λειτουργικός, θα αναμενόταν προνομιακή γονική μεταβίβαση κάποιου ή κάποιων αλληλίων που θα έτεινε να οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων της SHBG στον ορό και μείωση της ανδρογονικής βιοδραστικότητας στους κρυφορχικούς απογόνους. Το γεγονός αυτό, δεδομένο ότι το γονίδιο της SHBG εκφράζεται κατά την ενδομήτρια ζωή, θα μπορούσε να οδηγήσει σε διαταραχή της ανδρογόνου-εξαρτώμενης βουβωνο-οσχεϊκής φάσης της ορχικής καθόδου. Εφόσον το γονίδιο εξακολουθεί να εκφράζεται μετά τη γέννηση στον άνθρωπο, σε αντίθεση με τα τρωκτικά, θα αναμενόταν επίσης διατήρηση αυξημένων των επιπέδων της SHBG στον ορό των κρυφορχικών παιδιών. Ωστόσο, η οφειλόμενη σε μη γενετικά αίτια σημαντική μεταβλητότητα της συγκέντρωσης της SHBG στον ορό θεωρητικά μπορεί να καλύψει ένα τέτοιο εύρημα προκαλώντας σύγχυση με την πάροδο των ετών.

Τα αποτελέσματα σχετικά με τα επίπεδα της SHBG στον ορό ατόμων που πάσχουν από κρυφορχία, καθώς επίσης και σχετικά με τα επίπεδα των ανδρογόνων και της βιοδραστικότητας αυτών είναι αντιφατικά. Αυξημένα επίπεδα SHBG στον ορό έχουν ανιχνευτεί σε ασθενείς με ιστορικό κρυφορχίας που υποβλήθηκαν σε χειρουργική αποκατάσταση, αρκετά έτη μετά την ορχεοκαθίλωση.⁷⁵ Από την άλλη πλευρά υπάρχουν δεδομένα που δείχνουν ότι τα επίπεδα της SHBG δεν διαφέρουν σε βαθμό στατιστικά σημαντικό μεταξύ κρυφορχικών παιδιών και μαρτύρων κατά την περίοδο φυσιολογικής ενεργοποίησης του υποθαλαμο-υποφυσιακού άξονα (2^{ος}-3^{ος} μήνας της ζωής: αιχμή ορμονών της αναπαραγωγής).⁸⁹⁵ Αναφέρεται επίσης μείωση της ανδρογονικής βιοδραστικότητας σε κρυφορχικά βρέφη κατά την ίδια περίοδο.⁸⁹⁶ Το γεγονός όμως αυτό συσχετίζεται θετικά τόσο με τα επίπεδα της τεστοστερόνης στον ορό, όσο και με τον ελεύθερο ανδρογονικό δείκτη (free androgen index) πράγμα που σημαίνει ότι δεν υπάρχει σημαντική ανακολουθία μεταξύ συγκέντρωσης της τεστοστερόνης στον ορό και της ανδρογονικής βιοδραστικότητας στην κρυφορχία.⁸⁹⁶



4. Συμπεράσματα

Συμπερασματικά, η παρούσα μελέτη αξιολόγησε τις εξής τρεις υποθέσεις:

α) κατά πόσο συγκεκριμένοι γενετικοί τόποι της περιοχής Yq11 που ως γνωστό σχετίζονται με τη ρύθμιση της σπερματογένεσης (παράγοντας αζωοσπερμίας a, b, c; AZoospermia Factor a, b, c; AZFa, AZFb, AZFc) παίζουν ρόλο στην σύνθεση παραγόντων που προάγουν ή παρακωλύουν τη ορχική κάθοδο, δηλαδή εάν οι μικροαπαλοιφές της περιοχής Yq11 εμπλέκονται στην παθογένεια ή συμβάλλουν στην εμφάνιση κάποιου συγκεκριμένου κρυσορχικού φαινοτύπου (διερεύνηση της πιθανότητας ύπαρξης άμεσης συσχέτισης μεταξύ μικροαπαλοιφών Yq11 και κρυσορχίας),

β) κατά πόσο γενετικές μεταβολές του γονιδίου INSL3 συσχετίζονται με την εμφάνιση κρυσορχίας και

γ) κατά πόσο ο αριθμός των επαναλήψεων (n) της πολυμορφικής επαναληπτικής αλληλουχίας (TAAAA)_n του εγγύς προαγωγέα του γονιδίου SHBG συσχετίζεται με την εμφάνιση κρυσορχίας

Με βάση τα αποτελέσματα, τα συμπεράσματα που εξάγονται είναι τα εξής:

α) Ο άμεσος ρόλος των μικροαπαλοιφών της περιοχής Yq11 στην εμφάνιση της κρυσορχίας τίθεται υπό ισχυρή αμφισβήτηση και επομένως ο συστηματικός έλεγχος για μικροαπαλοιφές της περιοχής Yq11 σε παιδιά με παθολογική ορχική κάθοδο δεν συστήνεται ως ρουτίνα στα πλαίσια του προεγχειρητικού ελέγχου ή κατά την μετεγχειρητική τους παρακολούθηση.

β) Οι γενετικές μεταβολές του γονιδίου INSL3 δεν φαίνεται να αποτελούν συχνό αίτιο κρυσορχίας στον άνθρωπο.

γ) Η πολυμορφική πεντανουκελεοτιδική αλληλουχίας (TAAAA)_n του εγγύς προαγωγέα του γονιδίου SHBG δεν εμφανίζει συσχέτιση/γενετική ζεύξη με την κρυσορχία αφού ο αριθμός των επαναλήψεων (n) δεν συσχετίζεται με κάποιο παθολογικό φαινότυπο.

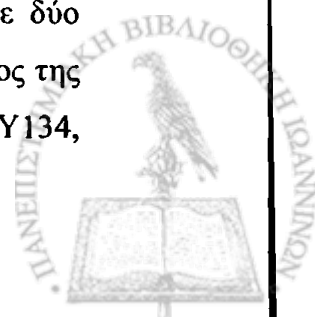
δ) Το είδος της πιθανής γενετικής προδιάθεσης που φαίνεται να υπάρχει σε κάποιον τουλάχιστον κρυσορχικό υποπληθυσμό θα μπορούσε να αποσαφηνιστεί από τη μελέτη άλλων υποψηφίων-αιτιολογικά σχετιζόμενων γενετικών παραγόντων.



Περίληψη

Σκοπός: Να αξιολογηθεί η υπόθεση κατά πόσο: α) οι μικροαπαλοιφές της περιοχής Yq11 εμπλέκονται άμεσα στην παθογένεια της κρυσορχίας, β) γενετικές μεταβολές του γονιδίου INSL3 συσχετίζονται με την εμφάνιση κρυσορχίας, και γ) ο αριθμός των επαναλήψεων της πολυμορφικής αλληλουχίας (TAAA)_n του εγγύς προαγωγέα του γονιδίου SHBG συσχετίζεται με την εμφάνιση κρυσορχίας.

Υλικό και Μέθοδοι: Συνολικά συμμετείχαν 590 άτομα στη μελέτη: α) 180 κρυσορχικά παιδιά, ηλικίας 1-13 ετών (διάμεση ηλικία τα 2,3 έτη) κατά τον χρόνο της ορχεοπηξίας από 174 διακριτές οικογένειες (ομάδες A και B: πληθυσμός ασθενών), β) 307 γονείς: 156 μητέρες-151 πατέρες εκ των οποίων εννέα ήταν πάσχοντες (ομάδα P: γονικός πληθυσμός), γ) τρεις ανεξάρτητοι μεταξύ τους πάσχοντες συγγενείς δευτέρου βαθμού (ομάδα R: θείοι, ένας πατρικής και δύο μητρικής προέλευσης) και δ) 100 φυσιολογικοί μάρτυρες (ομάδα C: πληθυσμός ελέγχου). Η συλλογή των ασθενών έγινε προοπτικά και αναδρομικά από δύο διαφορετικές πηγές: α) όλα τα παιδιά που προσήλθαν στην Α΄ Παιδοχειρουργική Κλινική του Νοσοκομείου Παιδών «Η Αγία Σοφία» Αθηνών καθώς και στην Ουρολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων για χειρουργική αποκατάσταση κρυσορχίας κατά την χρονική περίοδο Δεκέμβριος 1999–Ιούλιος 2002 (ομάδα A: προοπτικής συλλογής, n=109) και β) πρώην κρυσορχικά παιδιά που επιλέχθηκαν τυχαία από τη λίστα χειρουργημένων της Α΄ Παιδοχειρουργικής Κλινικής του Νοσοκομείου Παιδών «Η Αγία Σοφία» κατά τη δεκαετία 1990-2000 (ομάδα B: αναδρομικής συλλογής, n=71). Στον πληθυσμό ελέγχου περιλήφθηκαν μη συγγενικά άρρενα άτομα με φυσιολογικά έξω γεννητικά όργανα, αντίστοιχων ηλικιών, μετά από τυχαία δειγματοληψία από το γενικό παιδικό πληθυσμό. Κάθε άτομο υποβλήθηκε σε μία αιμοληψία από περιφερική φλέβα. Ο μοριακός έλεγχος πραγματοποιήθηκε στη Μονάδα Γενετικής της Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Η εξαγωγή του γενωμικού DNA έγινε από το δείγμα αίματος με χρήση διαλυμάτων αλάτων σύμφωνα με τυποποιημένο πρωτόκολλο. Η αναζήτηση μικροαπαλοιφών Yq11 έγινε με PCR σε γενωμικό DNA από όλα τα άτομα των ομάδων A, B, R και C (n=283) με δύο πολυπλεγματικές αντιδράσεις (Multiplex A: sY86, sY127, sY254 sY238 έλεγχος της AZFa, AZFb, AZFc και ZFY περιοχής, αντίστοιχα, Multiplex B: sY14, sY84, sY134,



sY255 έλεγχος της SRY, AZFa, AZFb και AZFc περιοχής, αντίστοιχα). Τα ενισχυμένα προϊόντα υποβλήθηκαν σε ηλεκτροφόρηση επί γέλης αγαρόζης 2% εμποτισμένης με βρωμιούχο αιθίδιο και διαβάστηκαν κάτω από υπεριώδες φως. Η αναζήτηση γενετικών μεταβολών στο γονίδιο INSL3 έγινε σε γενωμικό DNA από 170 μη σχετιζόμενα άτομα των ομάδων A και B συμπεριλαμβανομένων όλων των περιπτώσεων με τεκμηριωμένο οικογενειακό ιστορικό κρυπορχίας (n=17) καθώς και από 50 άτομα της ομάδας C. Ο έλεγχος έγινε με PCR-SSCP ενίσχυση και των δύο εξωνίων του γονιδίου. Τα ενισχυμένα προϊόντα μετά από επεξεργασία υποβλήθηκαν σε ηλεκτροφόρηση επί γέλης μη μετουσιωμένης πολυακρυλαμίδης 8% κάτω από τέσσερεις διαφορετικές συνθήκες και διαβάστηκαν μετά από χρώση αργύρου. Κάθε ασυνήθιστο πρότυπο SSCP υποβλήθηκε περαιτέρω σε προσδιορισμό αλληλουχίας. Επιπλέον χρησιμοποιήθηκε η περιοριστική ενδονουκλεάση Eag I που αναγνωρίζει το φυσικό γονότυπο G/G στη θέση 178 στο εξόνιο 1. Τα προϊόντα των PCR μετά την επίδραση του παραπάνω ενζύμου αναλύθηκαν σε γέλη αγαρόζης 2% εμποτισμένης με βρωμιούχο αιθίδιο και διαβάστηκαν κάτω από υπεριώδες φως. Η αξιολόγηση των διαφορών των γονοτυπικών και αλληλικών κατανομών των γενετικών μεταβολών μεταξύ α) ασθενών-μαρτύρων, β) οικογενών-σποραδικών, γ) αμφοτερόπλευρων-ετερόπλευρων και δ) βουβωνικών-ενδοκοιλιακών περιπτώσεων έγινε με εφαρμογή χ^2 κατά Pearson ή Fisher. Η ανάλυση της πολυμορφικής αλληλουχίας (TAAA)n του εγγύς προαγωγέα του γονιδίου SHBG έγινε σε γενωμικό DNA από το σύνολο των ατόμων των ομάδων A, B και P (n=487). Μετά από ενίσχυση της περιοχής τα προϊόντα υποβλήθηκαν σε ηλεκτροφόρηση επί γέλης μη μετουσιωμένης πολυακρυλαμίδης 10% και χρώση αργύρου. Ο αριθμός των επαναλήψεων (n) κάθε αλληλίου προσδιορίστηκε με αντιπαραβολή των ενισχυμένων προϊόντων με δείγματα γνωστού αριθμού επαναλήψεων που συλλέχθηκαν με τυχαία δειγματοληψία από το γενικό πληθυσμό. Τα δεδομένα αναλύθηκαν τόσο στο σύνολο γονέων-πασχόντων απογόνων, όσο και ξεχωριστά στα υποσύνολα α) γονέων-πασχόντων απογόνων με βουβωνική και β) γονέων-πασχόντων απογόνων με ενδοκοιλιακή κρυπορχία. Στην στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν τελικά τα δεδομένα από 138 πλήρεις πυρηνικές οικογένειες, (πέντε από αυτές διέθεταν και δεύτερο πάσχον παιδί, οκτώ από αυτές διέθεταν πατέρες με ιστορικό κρυπορχίας) καθώς και πέντε ζεύγη πάσχοντος παιδιού-γονέα (429 άτομα συνολικά: 148 περιπτώσεις κρυπορχικών



παιδιών, 156 περιπτώσεις κρυπορχίας συνολικά). Η στατιστική ανάλυση έγινε με τις μεθόδους AFBAC και ETDT.

Αποτελέσματα: Σε κανέναν ασθενή ή μάρτυρα δεν ανιχνεύθηκαν μικροαπαλοιφές της περιοχής Yq11. Γενετικές μεταβολές στο γονίδιο INSL3 δεν εντοπίστηκαν αποκλειστικά σε ασθενείς. Ωστόσο, ταυτοποιήθηκαν τρεις γενετικές μεταβολές στο εξώνιο 1 του γονιδίου INSL3 σε ασθενείς και μάρτυρες (πολυμορφισμοί μονήρους νουκλεοτιδίου): 27G>A (A9A), 126G>A (L42L) και 178G>A (A60T). Η συχνότητά τους δεν διέφερε σημαντικά μεταξύ α) ασθενών-μαρτύρων β) σποραδικών-μη σποραδικών περιπτώσεων κρυπορχίας. Για τον μη συνώνυμο πολυμορφισμό 178G>A, το φυσικό νουκλεοτίδιο ανιχνεύτηκε στο 55,9% και 55% των αλληλίων των ασθενών και μαρτύρων, αντίστοιχα (P=0,917). Το μεταλλαγμένο νουκλεοτίδιο 178A ανιχνεύτηκε στο 52,9% και 42,3% των αλληλίων των ασθενών με επιβεβαιωμένο οικογενειακό ιστορικό και σποραδική κρυπορχία, αντίστοιχα (P=0,240). Τέλος, δεν ανιχνεύτηκε συσχέτιση με την πλευρά της βλάβης (αμφοτερόπλευρα-ετερόπλευρα: P=0,695) ή με την παθολογική θέση των όρχεων (ενδοκοιλιακή-βουβωνική εντόπιση: P=0,330). Πέντε διαφορετικά αλληλία ως προς τον αριθμό επαναλήψεων (n=6-10) της αλληλουχίας TAAAA του εγγύς προαγωγέα του γονιδίου SHBG ανιχνεύτηκαν στους πάσχοντες απογόνους. Τόσο η μέθοδος AFBAC (γονικά, πατρικά, μητρικά μεταβιβαζόμενα αλληλία προς μη μεταβιβαζόμενα στους αντίστοιχους πάσχοντες απογόνους: P=0,921, P=0,979 και P=0,745, αντίστοιχα-πατρικά, μητρικά μεταβιβαζόμενα προς μη μεταβιβαζόμενα αλληλία: P=0,690, P=0,877, αντίστοιχα), όσο και η μέθοδος ETDT (αλληλική και γονοτυπική ανάλυση: P=0,883, P=0,615, αντίστοιχα) απέτυχαν να καταδείξουν συσχέτιση/γενετική ζεύξη μεταξύ αριθμού επαναλήψεων και κρυπορχίας. Η ανάλυση ξεχωριστά στις περιπτώσεις με βουβωνική και ενδοκοιλιακή κρυπορχία δεν κατέληξε επίσης σε στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα.

Συμπεράσματα: α) Ο άμεσος ρόλος των μικροαπαλοιφών της περιοχής Yq11 στην εμφάνιση της κρυπορχίας τίθεται υπό ισχυρή αμφισβήτηση και επομένως η συστηματική αναζήτησή τους σε παιδιά με παθολογική ορχική κάθοδο δεν συστήνεται ως ρουτίνα στα πλαίσια του προεγχειρητικού ελέγχου ή κατά την μετεγχειρητική παρακολούθηση. β) Οι γενετικές μεταβολές του γονιδίου INSL3 δεν φαίνεται να αποτελούν συχνό αίτιο κρυπορχίας στον άνθρωπο. γ) Η πολυμορφική πεντανουκλεοτιδική αλληλουχία (TAAAA)η του εγγύς προαγωγέα του γονιδίου



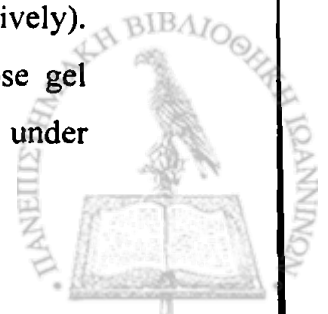
SHBG δεν εμφανίζει συσχέτιση/γενετική ζεύξη με την κρυπορχία αφού ο αριθμός των επαναλήψεων (n) δεν συσχετίζεται με κάποιο παθολογικό φαινότυπο. Η γενετική προδιάθεση που φαίνεται να υπάρχει τουλάχιστον σε κάποιο κρυπορχικό υποπληθυσμό θα μπορούσε να αποσαφηνιστεί από τη μελέτη άλλων υποψηφίων-αιτιολογικά σχετιζόμενων γενετικών παραγόντων.



Summary

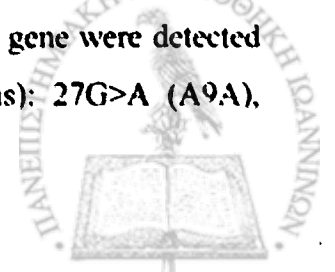
Objective: To investigate the hypothesis whether: a) Yq11 microdeletions are directly implicated in the pathogenesis of cryptorchidism, b) genetic alterations of the INSL3 gene are associated with cryptorchidism and c) the number of TAAAA repeats within the SHBG gene proximal promoter is associated with cryptorchidism.

Material and Methods: A total of 590 subjects participated in this family-based study: a) 180 cryptorchid children aged between 1-13 years (median age: 2.3 years) at the time of orchidopexy from 174 index families (groups A and B: patient population), b) 307 parents: 156 mothers-151 fathers, nine of whom were also cryptorchid (group P: parental population), c) three unrelated affected second degree relatives (group R: uncles: one father-sided, two mother-sided), and d) 100 normal controls (group C: control group). Patients were prospectively and retrospectively recruited from two different sources: a) all children that were admitted to the 1st Paediatric Surgery Clinic, "Aghia Sophia" Childrens' Hospital, Athens, Greece as well as to the Department of Urology, University Hospital of Ioannina, Ioannina, Greece for surgical correction of cryptorchidism during the period December 1999-July 2002 (group A: prospective recruitment; n=109) and b) ex-cryptorchid children operated on, during the decade 1990-2000, at the 1st Paediatric Surgery Clinic, "Aghia Sophia" Childrens' Hospital, who were randomly selected from the archive (group B: retrospective recruitment; n=71). The control group consisted of unrelated males with normal external genitalia of respective age, recruited randomly from the general children population. Each individual was submitted to one blood sampling from a peripheral vein. Molecular analysis was performed at the Genetics Unit, Department of Obstetrics and Gynaecology, Medical School, Ioannina University, Ioannina, Greece. Genomic DNA was extracted from blood samples using standard salting out procedures. Yq11 microdeletion analysis was based on routine PCR amplification of genomic DNA from all individuals of groups A, B, R and C (n=283) with the use of two multiplex reactions (Multiplex A: sY86, sY127, sY254 sY238 to screen AZFa, AZFb, AZFc and ZFY regions, respectively; Multiplex B: sY14, sY84, sY134, sY255 to screen SRY, AZFa, AZFb and AZFc regions, respectively). Amplified reaction products were submitted to electrophoresis on 2% agarose gel containing ethidium bromide as intercalating DNA stain and visualized under



ultraviolet light. INSL3 gene genetic alteration analysis was based on PCR-SSCP method. Genomic DNA from 170 unrelated individuals of groups A and B, including all cases with a documented family history (n=17), as well as from 50 individuals from group C was used. PCR-SSCP was used to examine both exons of the gene. Amplified reaction products were further processed and submitted to electrophoresis on 8% non-denaturing polyacrylamide gel under four different conditions. Bands were detected by silver staining. All different SSCP patterns were sequenced. Restriction assay was further employed using the restriction endonuclease Eag I, which recognizes the wild type G/G genotype at position 178 in exon 1 of the gene. Digested PCR products were analyzed on 2% agarose gel containing ethidium bromide and restriction patterns were visualized under ultraviolet light. Pearson's/Fisher's chi square test was performed to evaluate differences in the distribution of the alleles/genotypes for the detected genetic changes among: a) patients and controls b) familial and sporadic, c) bilateral and unilateral, and d) inguinal and intra-abdominal cryptorchid cases. TAAA polymorphism genotype analysis was performed on genomic DNA of the total population of groups A, B and P (n=487). PCR products were electrophorized on 10% non-denaturing polyacrylamide gel and silver stained. The number of repeats (n) of each allele was detected by comparing the amplified products with samples of known number of repeats after sequencing, derived randomly from the general population. Data were separately analyzed for the whole population of parents-affected children as well as for the subpopulations of a) parents-affected children with inguinal and b) parents-affected children with intra-abdominal cryptorchidism. Finally, the statistical analysis included data from 138 completely typed nuclear families (five of them included a second affected child, eight of them included cryptorchid fathers) as well as from five couples with one missing parent (429 subjects in total: 148 cryptorchid children, 156 cryptorchid cases in total). Statistical analysis was based on a) affected family-based control (AFBAC) method and b) logistic regression-based extension of the transmission disequilibrium test for multi-allelic loci (ETDT).

Results: No Yq11 microdeletions were detected in patients or controls. No genetic alterations of the INSL3 gene were detected exclusively in patients (mutations). However, three genetic alterations affecting exon 1 of the INSL3 gene were detected both in patients and controls (single nucleotide polymorphisms): 27G>A (A9A),



126G>A (L42L), 178G>A (A60T). Their frequency did not differ significantly between either a) patients and controls or b) sporadic and familial cases of cryptorchidism. As far as the non-synonymous polymorphism 178G>A is concerned, the wild type nucleotide was found in 55.9% and 55% of patient and control alleles, respectively ($P=0.917$). The non-wild type nucleotide 178A was detected in 52.9% and 42.3% of patient alleles with and without documented history of familial cryptorchidism, respectively ($P=0.123$). Finally, no association was detected with laterality (bilaterally-unilaterally: $P=0.695$) or with the testicular pathologic position (inguinal-intra-abdominal location: $P=0.330$). TAAAA polymorphism genotype analysis revealed five different alleles based on the number of their TAAAA repeats ($n=6-10$) in cryptorchid children. Both the AFBAC method (parental, paternal, maternal alleles transmitted vs. not transmitted to an affected child: $P=0.921$, $P=0.979$, and $P=0.745$, respectively; paternal vs. maternal alleles transmitted/not transmitted: $P=0.690$, $P=0.877$, respectively) and the ETDT (allele-wise and genotype analysis: $P=0.883$, $P=0.615$, respectively) failed to detect an association/genetic linkage between the number of repeats and cryptorchidism. Subgroup analysis in inguinal and intra-abdominal cases resulted in insignificant results as well.

Conclusions: The direct role of the Yq11 microdeletions in the pathogenesis of cryptorchidism is set under severe dispute and therefore their routine screening in children with testicular maldescent is not warranted in terms of preoperative evaluation or during the postoperative follow up. b) Genetic alterations of the INSL3 gene do not seem to be a common cause of cryptorchidism in the human. c) The polymorphic sequence (TAAAA) n within the SHBG gene proximal promoter is not associated/genetically linked with cryptorchidism. Genetic predisposition that seems to affect a cryptorchid subpopulation should be further evaluated by investigating other candidate-possibly etiologically related genetic factors.



ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ



Παράρτημα 1. Πίνακες

Πίνακας 1. Κλινική σημασία των μικροσπαλοιφών της περιοχής Υq11

Περιοχή μικροσπαλοφής	Τύπος σπαλοφής	Ορχικός φαινότυπος	Κλινική σημασία
AZFa	Πλήρης	SCOS	Ορχική βιοψία περιπτή
AZFb	Πλήρης	Αναστολή σπερματογένεσης (στάδιο σπερματοκυττάρου I)	Ορχική βιοψία περιπτή
AZFc	Πλήρης	Υποσπερματογένεση έως SCOS	Ορχική βιοψία μπορεί να γίνει Επί παρουσίας σπερματοζωαρίων: κρυσσυνήθηση Επί γονιμοποίησης και εμβρυϊκής ανάπτυξης μετά από ICSI: σύσταση για προεμφυτευτική γενετική διάγνωση προς αποφυγή μεταφοράς εμβρύων 45,X0/46,XXY
AZFa	Μερική	Υποσπερματογένεση έως SCOS	Ορχική βιοψία μπορεί να γίνει
AZFb	Μερική	Υποσπερματογένεση έως SCOS	Ορχική βιοψία μπορεί να γίνει
AZFc	Μερική	Υποσπερματογένεση έως SCOS	Ορχική βιοψία μπορεί να γίνει Επί παρουσίας σπερματοζωαρίων στο σπέρμα ή στον ορχικό ιστό: κρυσσυνήθηση Επί γονιμοποίησης και εμβρυϊκής ανάπτυξης μετά από ICSI: σύσταση για προεμφυτευτική γενετική διάγνωση προς αποφυγή μεταφοράς εμβρύων 45,X0/46,XXY

SCOS=Senoli Cell Only Syndrome (Ατλασία σπερματικού επιθήλιου), ICSI=Intracytoplasmic sperm injection (ενδοκυτταροπλασματική μικρογονιμοποίηση)



Πίνακας 2. Το όσχεο ως περιβάλλον χαμηλής θερμοκρασίας: θερμορύθμιση σε επίπεδο όρχεων-επιδιδυμίδων

Ανατομικό χαρακτηριστικό	Φυσιολογικός ρόλος
Εξέλεψη ελγτροπερτοναϊκής πιυχής (π.χ. χιμπανζής, γορίλλας, άνθρωπος)	Διατήρηση όρχεως εκτός κοιλιακής κοιλότητας
Αμφούμενο όσχεο (π.χ. άλογο, ταύρος)	Φυσικός διαχωρισμός από τον πυρήνα το σώματος
Μεγάλη επιφάνεια οσχέου	Μετάδοση/εκπομπή θερμότητας
Λεπτό και κεχωρισμένο δέρμα οσχέου	Μετάδοση/εκπομπή θερμότητας
Απουσία τριχώματος (π.χ. αρουραίος)	Απώλεια θερμότητας
Απουσία υποδορκου λίπους	Μετάδοση θερμότητας
Δαρτός μύς	Ρύθμιση της έκτασης του οσχέου ανάλογα με την εξωτερική θερμοκρασία
Κρεμοστήρας μύς	Ρύθμιση της έκτασης του όρχεως ανάλογα με την εξωτερική θερμοκρασία
Ελκμοειδές πλέγμα σπερματικών φλεβών πέριξ της σπερματικής αρτηρίας	Ψύξη εισερχόμενου αίματος (μηχανισμός αντιρρεύματος στον σπερματικό τόνο)
Οσχεϊκές δερματικές φλέβες	Μετάδοση θερμότητας
Περίελη αρχηκής αρτηρίας γύρω από τον όρχι (π.χ. κριάρι)	Απώλεια θερμότητας πριν διακλαδιστεί η αρτηρία και τροφοδοτήσει τον όρχι
Απώδης επίστρωση βουβωνικού καναλιού (π.χ. αρουραίος)	Απομόνωση όρχεως από την κοιλιακή κοιλότητα
Απώδης ένθεμα μεταξύ όρχεως και επιδιδυμίδας	Απομόνωση ουράς της επιδιδυμίδας από τον όρχι



Πίνακας 3. Φαινοτυπική έκφραση της κρυπορχίας στους 180 ασθενείς που ελέγχθηκαν για μικροσπαλοειφές της περιοχής Υq11

Αριστερός όρχις	Εντόπιση όρχι	Δεξιός όρχις										Σύνολο όρχεων με διαταραχή καθόδου
		Όσχεο		Ανασπώμενος Έκτοπος		Αληθής κρυπορχία				Απίων/ Ατροφικός		
		0	4	4	5	Βουβωνικός/Υψηλά οσχεικός	47	1	13	Ενδοκοιλιακός	7	
Όσχεο		1	9	1	1	4	4	1	1	0	0	16
Ανασπώμενος Έκτοπος		4	0	4	4	0	0	0	0	0	0	8
Αληθής κρυπορχία	Βουβωνικός/Υψηλά οσχεικός Ενδοκοιλιακός	41	1	1	1	18	0	0	0	0	0	61
Απίων/Ατροφικός		7	0	0	0	0	0	8	0	0	0	15
Σύνολο όρχεων με διαταραχή καθόδου		1	0	0	0	1	1	0	0	2	2	4
			14	11	11	70	22	9	9	230		



Πίνακας 4. Έλεγχος μικροπαλαοφών της περιοχής Υq11: STS primers και συνθήκες εκτέλεσης PCR

Τόπος	STS	Μέγεθος προϊόντος (bp)	Primers	Αλληλουχίες των Primers	Συνθήκες ενίσχυσης	
Multiplex A	ZFY	495	ZFY-F ZFY-R	5'-ACC RCT GTA CTG ACT GTG ATT ACA C-3' 5'-GCA CYT CTT TGG TAT CYG AGA AAG T-3'	1. Προβέρνηση για 5 λεπτά στους 94°C 2. Μετουσίωση (Denaturation) για 1 λεπτό στους 94°C 3. Δέσμευση των primers (Annealing) για 1 λεπτό στους 55°C 4. Επμήκυνση (Elongation) για 4 λεπτά στους 72°C (27 επανάληψεις (κύκλοι) των βημάτων 2-3) 5. Τελική επμήκυνση για 5 λεπτά στους 72°C	
	AZFa	320	sY86-F sY86-R	5'-GTG ACA CAG AGA CTA TGC TTC-3' 5'-ACA CAC AGA GGG ACA ACC CT-3'		
	AZFb	274	sY127-F sY127-R	5'-GGC TCA CAA ACG AAA AGA AA-3' 5'-CTG CAG GCA GTA ATA AGG GA-3'		
	AZFc	400	sY254-F sY254-R	5'-GGG TGT TAC CAG AAG GCA AA-3' 5'-GAC CGT ATC TAC CAA AGC AGC A-3'		
Multiplex B	SRY	472	SRY-F SRY-R	5'-GAA TAT TCC CGC TCT CCG GA-3' 5'-GCT GGT GCT CCA TTC TTG AG-3'	1. Προβέρνηση για 5 λεπτά στους 94°C 2. Μετουσίωση (Denaturation) για 1 λεπτό στους 94°C 3. Δέσμευση των primers (Annealing) για 1 λεπτό στους 57°C 4. Επμήκυνση (Elongation) για 4 λεπτά στους 72°C (35 επανάληψεις (κύκλοι) των βημάτων 2-3) 5. Τελική επμήκυνση για 5 λεπτά στους 72°C	
	AZFa	326	sY84-F sY84-R	5'-AGA AGG GTC TGA AAG CAG GT-3' 5'-GCC TAC TAC CTG GAG GCT TC-3'		
	AZFb	301	sY134-F sY134-R	5'-GTC TGC CTC ACC ATA AAA CG-3' 5'-ACC ACT GCC AAA ACT TTC AA-3'		
	AZFc	sY255-F	126	sY255-F		5'-GTT ACA GGA TTC GGC GTG AT-3'
		sY255-R		sY255-R		5'-CTC GTC ATG TGC AGC CAC-3'



Πίνακας 5. Έλεγχος γενετικών μεταβολών του γονιδίου INSL3: primers και συνθήκες εκτέλεσης PCR

Μέγεθος προϊόντος (bp)	Primers	Αλληλουχίες των Primers	Συνθήκες ενίσχυσης
Εξώτιο 1 400	INSL3F1	5'-TGG GAG AAA GGC TCT GGC AC-3'	1. Προθέρμανση για 5 λεπτά στους 94°C 2. Μετουσίωση (Denaturation) για 30 δευτερόλεπτα στους 94°C 3. Δέσμευση των primers (Annealing) 30 δευτερόλεπτα στους 60°C 4. Επιμήκυνση (Elongation) για 90 δευτερόλεπτα στους 72°C (30 επανάληψεις (κύκλοι) των βημάτων 2-3) 5. Τελική επιμήκυνση για 5 λεπτά στους 72°C
	INSL3R1	5'-CTG GGC TCA TGC ATG CAA AC-3'	
Εξώτιο 2 300	INSL3F2	5'-TGC ATG CAT GAG TGT TTG GTG GG-3'	
	INSL3R2	5'-ATC AGT AGG GAC AGA GGG TC-3'	



Πίνακας 6. Ανάλυση της (TAAAA)n πολυμορφικής αλληλουχίας του γονιδίου SHBG: primers και συνθήκες εκτέλεσης PCR

Μέγεθος προϊόντος (bp)	Primers	Αλληλουχίες των Primers	Συνθήκες ενίσχυσης
170	SHBGF	5'-GCT TGA ACT CGA AGA GGC AG-3'	<ol style="list-style-type: none"> 1. Προθέρμανση για 5 λεπτά στους 94°C 2. Μετουσίωση (Denaturation) για 30 δευτερόλεπτα στους 94°C 3. Δέσμευση των primers (Annealing) 30 δευτερόλεπτα στους 59°C 4. Επimerkungση (Elongation) για 90 δευτερόλεπτα στους 72°C (30 επανάληψεις (κύκλοι) των βημάτων 2-3) 5. Τελική επιμήκυνση για 5 λεπτά στους 72°C
	SHBGR	5'-CAG GGC CTA AAC AGT CTA GCA GT-3'	



Πίνακας 7. Γενετικές μεταβολές του γονιδίου INSL3 που ανιχνεύθηκαν στην παρούσα μελέτη

	Ασθενείς													
	Οικογενειακό Ιστορικό (n=17)						Ασθενείς (n=170)						Μάρτυρες (n=50)	
	Ε	Ο	Συχνότητα (%)	Πολυμορφισμοί Αλληλίου (%)	Συχνότητα (%)	Σποραδικές Περιπτώσεις (n=123)	Συχνότητα (%)	Πολυμορφισμοί Αλληλίου (%)	Συχνότητα (%)	Συχνότητα (%)	Πολυμορφισμοί Αλληλίου (%)	Συχνότητα (%)	Ε	Ο
A9A	2	0	11,8	5,9	2,4	3	0	1,2	6	0	3,5	1,8	3	0
L42L	5	8	76,5	61,8	60,2	34	40	46,3	48	59	62,9	48,8	10	27
A60T	8	5	76,5	52,9	57,7	38	33	42,3	56	47	60,6	44,1	27	9

Ε=Ετεροζυγώτες, Ο=Ομοζυγώτες

	Γονοτυπική Ανάλυση	Αλληλική Ανάλυση
A9A:	Κρυφορχικοί-Μάρτυρες: P=0,141	Κρυφορχικοί-Μάρτυρες: P=0,438
	Οικογενείς-Σποραδικές: P=0,139	Οικογενείς-Σποραδικές: P=0,113
L42L:	Κρυφορχικοί-Μάρτυρες: P=0,148	Κρυφορχικοί-Μάρτυρες: P=0,008
	Οικογενείς-Σποραδικές: P=0,194	Οικογενείς-Σποραδικές: P=0,092
A60T:	Κρυφορχικοί-Μάρτυρες: P=0,141	Κρυφορχικοί-Μάρτυρες: P=0,876
	Οικογενείς-Σποραδικές: P=0,139	Οικογενείς-Σποραδικές: P=0,240



Πίνακας 8. Κατανομή αλληλίων με βάση τον αριθμό ΤΑΑΑΑ επαναλήψεων στους πληθυσμούς γονέων και ασθενών

Αλληλίο	n	Πατέρες	Μητέρες	Πάσχοινα Παιδιά
1	10	23	16	20
2	9	63	65	65
3	8	98	98	105
4	7	14	15	15
5	6	80	89	91
6	5	0	1	0
Σύνολο αλληλίων		278	284	296



Πίνακας 9. Κατανομή γονοτύπων με βάση τον αριθμό επαναλήψεων TAAAA στους πληθυσμούς γονέων και ασθενών

Γονότυπος	Πατέρες	Μητέρες	Πάσχοντα Παιδιά
1/1	2	0	1
1/2	8	5	5
1/3	5	3	6
1/4	1	0	0
1/5	5	8	7
1/6	0	0	0
2/2	5	4	6
2/3	23	26	31
2/4	4	4	4
2/5	18	20	13
2/6	0	1	0
3/3	20	18	16
3/4	2	3	5
3/5	28	31	31
3/6	0	0	0
4/4	0	2	2
4/5	7	3	2
4/6	0	0	0
5/5	11	14	19
5/6	0	0	0
6/6	0	0	0
Σύνολο γονοτύπων	139	142	148

Αλλήλια 1, 2, 3, 4, 5, 6: n=10, 9, 8, 7, 6, 5 επαναλήψεις TAAAA αντίστοιχα



Πίνακας 10Α. Μικροσπαλοειφές της περιοχής Υq11 σε κρυπορχικούς ασθενείς: ανασκόπηση της διεθνούς βιβλιογραφίας

Αναφορά ^a	Αριθμός κρυπορχικών ασθενών				Κρυπορχικοί ασθενείς-φορείς μικροσπαλοειφών					
	Σύνολο	Ανάλυση σπέρματος		Φορείς	Πάσχυσα Πλευρά	Ανάλυση Σπέρματος	Ιστολογία πασχοντος όρχεος	Προσβεβλημένη περιοχή AZF ^b		
		Αζωοσπερμικοί	Ολιγοσπερμικοί					AZFa	AZFb	AZFc
14	1	*	*	1	*	*	*	-	-	-
29	22	1	21	0				X		
30	6	4	2	0				X		
36	6	1	5	0				X		
20	7	*	*	1	*	A	SCOS	+		
31	7	7	0	0						
37	42 ^c	4	10	0						
34	11	*	*	0						
32	15	9	6	0						
33	16	*	*	0						
38	60	40 ^d	20 ^e	11	ETEPO	A	SCOS	+	+	-
					ETEPO	A	SCOS	+	+	-
					ETEPO	O	SH	+	+	-
					ETEPO	A	SCOS	+	+	-
					ETEPO	O	SH	+	+	-
					ETEPO	O	SH	-	-	+
					ETEPO	A	SCOS	-	-	+
					ETEPO	A	SCOS	-	-	+
					ETEPO	O	SH	+	+	+
					ETEPO	O	SH	+	+	+
					ETEPO	O	SH	+	+	+

^a=Απουσία πληροφορίας, X= Μη ελεγχθείσα περιοχή, ETEPO=ετερόπλευρη κρυφορχία, A=Αζωοσπερμία, O=Ολιγοσπερμία
SCOS = Sertoli Cell Only Syndrome (Απλασία σπερματικού επιθηλίου), SH = Severe Hypospermatogenesis (Σοβαρή υποσπερματογένεση).

^bΚατάταξη με βάση το χρόνο δημοσίευσης της μελέτης

^cΗ παρουσία μικροσπαλοειφής καταδεικνύεται με (-)

^dΠαραλαμβάνονται 24 νορμοσπερμικοί άνδρες με ιστορικό κρυπορχίας και τέσσερις κρυπορχικοί ασθενείς χωρίς στοιχεία από το σπερμοδιάγραμμα

^eΑσθενείς με αζωοσπερμία και σοβαρή ολιγοσπερμία (αριθμός σπερματοζωαρίων < 5x10⁶/mL) με αμφοτερόπλευρη ορχική ιστοπαθολογία (SCOS ή SH)

^fΑσθενείς με μέτριο βαθμού ολιγοσπερμία (αριθμός σπερματοζωαρίων < 10-20x10⁶/mL)



Πίνακας 10B. Μικροσπαλοειφές της περιοχής Υq11 σε κρυφορχικούς ασθενείς: ανασκόπηση της διεθνούς βιβλιογραφίας

Αναφορά ^a	Αριθμός κρυφορχικών ασθενών				Κρυφορχικοί ασθενείς-φορείς μικροσπαλοειφών					
	Ανάλυση σπέρματος		Φορείς		Ανάλυση ιστολογία		Προσβεβλημένη περιοχή AZF ^b			
	Σύνολο	Αζωοσπερμικοί	Ολιγοσπερμικοί	Πάσχουσα Πλευρά	Σπέρματος	Πασχόντος όρχεος	AZFa	AZFb	AZFc	
35	54	25	29	0						
15	1	*	*	1	ΕΤΕΡΟ	*	*	*	*	-
22 ^c	*	*	*	4	*	A	*	+	*	-
					*	A	SCOS	+	+	-
					*	A	SCOS	+	-	-
					*	A	*	+	+	-
21	*	*	*	2	ΕΤΕΡΟ	O	*	+	+	-
					ΕΤΕΡΟ	A	SCOS ^d	+	+	-
16	1	*	*	1	ΑΜΦΟ	-	SCOS ^e	+	-	-
23	23	*	*	1	*	A	*	+	+	-
39	10	Παιδιά με Prader Willi	*	0						
17 ^f	2	2	0	2	ΑΜΦΟ	A	*	+	+	-
					ΑΜΦΟ	A	SH	+	-	+
24	*	*	*	1	ΕΤΕΡΟ	A	SCOS	X	X	-
27	5	2	3	1	*	A	*	X	-	-
40 ^g	90 ^h	36	35	2	ΑΜΦΟ	A	SCOS	-	-	-
					ΕΤΕΡΟ	A	MA	+	+	-

^a=Άποια πληροφορίας, X= Μη ελεγχθείσα περιοχή, ΕΤΕΡΟ=ετερόπλευρη κρυφορχία, ΑΜΦΟ=Αμφοτερόπλευρη κρυφορχία, Α=Αζωοσπερμία, Ο=Ολιγοσπερμία
SCOS = Sertoli Cell Only Syndrome (Απλασία σπερματικού επιθηλίου), SH = Severe Hypospermatogenesis (Σοβαρή υποσπερματογένεση), MA = Αναστολή ωρίμανσης

^bΚατάσχη με βάση το χρόνο δημιουργίας της μελέτης

^cΗ παρουσία μικροσπαλοειφής καταδεικνύεται με (-)

^dΟι ασθενείς από τη μελέτη των Simoni et al., 1997 (αναφορά 19) συμπεριλαμβάνονται στη μελέτη

^eΣπερματοκυτταρική αναστολή (Spermatocytic arrest) στον αντίθετο όρχι

^fΑμφοτερόπλευρα, με εστιακή σπερματογένεση σε επίπεδο σπερματογονίων

^gΟι ασθενείς αυτοί συμπεριλαμβάνονται επίσης στις μελέτες των Dada et al, 2002 (αναφορά 18) and Dada et al, 2003 (αναφορά 26)

^hΣυμπεριλαμβάνονται 19 νορμωσπερμικοί άνδρες με ιστορικό κρυφορχίας



Πίνακας 10Γ. Μικροαπαλοιφές της περιοχής Υq11 σε κρυπορχικούς ασθενείς: ανασκόπηση της διεθνούς βιβλιογραφίας

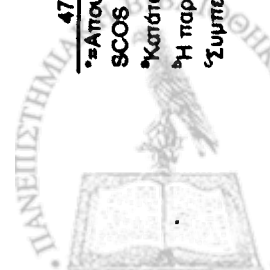
Αναφορά ^a	Αριθμός κρυπορχικών ασθενών				Κρυπορχικοί ασθενείς-φορείς μικροαπαλοιφών					
	Σύνολο	Ανάλυση σπέρματος		Φορείς	Πάχουσα Πλευρά	Ανάλυση Σπέρματος	Ιστολογία	Προσβεβλημένη περιοχή AZF ^b		
		Αζωοσπερμικοί	Ολιγοσπερμικοί					AZFa	AZFb	AZFc
41	95	37	58	11	AMΦO	O	SH	*	*	*
					ETEPO	O	SH	*	*	*
					ETEPO	O	SH	*	*	*
					ETEPO	O	SH	*	*	*
					ETEPO	O	SH	*	*	*
					AMΦO	A	SCOS	*	*	*
					AMΦO	A	SCOS	*	*	*
					AMΦO	A	SCOS	*	*	*
					ETEPO	A	SCOS	*	*	*
					ETEPO	A	SCOS	*	*	*
					ETEPO	A	SCOS	*	*	*
44	20	Παιδιά με κρυπορχία & υποσπαδία		0						
42	36	*	*	5	ETEPO	O	SH	+	+	-
					ETEPO	A	SCOS	+	+	-
					ETEPO	O	SCOS	+	+	-
					ETEPO	A	SCOS	+	+	-
					ETEPO	A	SCOS	+	+	-
43	64 ^c	2	3	0	ETEPO	O	X	X	X	CDY1a-DAZ 1/2
45	42	7	35	0	AMΦO	A	X	X	X	CDY1a-DAZ 1/2
					AMΦO	O	X	X	X	CDY1b-DAZ 1/2
					ETEPO	O	X	X	X	CDY1a-DAZ 1/2
					AMΦO	O	X	X	X	CDY1a-DAZ 3/4
					ETEPO	*	X	X	X	CDY1a-DAZ 3/4
47	64	Παιδιά με κρυπορχία		0						

^a=Απουσία πληροφορίας, X= Μη ελεγχθείσα περιοχή, ETEPO=ετερόπλευρη κρυπορχία, AMΦO=Αμφοτερόπλευρη κρυπορχία, A=Αζωοσπερμία, O=Ολιγοσπερμία
SCOS = Sertoli Cell Only Syndrome (Απίλασια σπερματικού επιθηλίου), SH = Severe Hypospermatogenesis (Σοβαρή υποσπερματογένεση), MA = Αναστολή ωρίμανσης

^bΚατάταξη με βάση το χρόνο δημοσίευσης της μελέτης

^cΗ παρουσία μικροαπαλοιφής καταδεικνύεται με (-)

^dΣυμπεριλαμβάνονται 7 νορμωσπερμικοί άνδρες με ιστορικό κρυπορχίας



Πίνακας 11. Μη συνώνυμοι πολυμορφισμοί του γονιδίου INSL3 σε κρυφορχικούς ασθενείς: ανασκότηση της διεθνούς βιβλιογραφίας

Αναφορά ^a	Φαινότυπος	Οικογενειακό Ιστορικό			Ασθενείς			Μάρτυρες			Νουκλεοτιδική ^b Μεταβολή	Κωδικόνιο ^b & Εξώνιο Μεταβολή Αμινοξέος	Εξώνιο Εντόπιση					
		Σ	E	O	Αριθμός	Συχνότητα	Αλληλίου (%)	Σ	E	O				Αριθμός	Συχνότητα	Αλληλίου (%)		
																	Σ	E
52	K	7	4	0	30	15	4	63,3	38,3	89	35	9	49,4	29,8	178G>A*	A60T	1	CP
53	EK	-	-	-	13	5	1	46,2	26,9	9	3	2	55,6	38,9	178G>A	A60T	1	CP
	AK	-	-	-	18	10	0	55,6	27,8									
54	-	-	-	-	145	57	19	52,4	32,8	36	13	4	47,2	29,2	178G>A	A60T	1	CP
	K	-	-	-	28	8	8	57,1	42,9									
55	E/K-K ^c	-	-	-	24	9	3	50,0	31,3	126	43	26	54,8	37,7	178G>A	A60T	1	CP
	BK ²	-	-	-	33	10	8	54,5	39,4									
	OO ^d	-	-	-	0	0	0	0	0									
	GM ^d	-	-	-	0	0	0	0	0									
58	E/K-K	0	0	0	5	3	0	60,0	30,0	70	28	4	45,7	25,7	178G>A	A60T	1	CP
	K	-	-	-	118	7	20	22,9	19,9									
59	K	-	-	-	150	-	-	-	-	50	-	-	-	-	178G>A	A60T	1	CP
60	K	27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	178G>A	A60T	1	CP
56	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	178G>A	A60T	1	CP
57	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	178G>A	A60T	1	CP
61	K	-	-	-	540	-	-	-	-	150	-	-	-	-	178G>A	A60T	1	CP
49	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	178G>A	A60T	1	CP
63	K	13	3	5	13	3	5	61,5	50,0	-	-	-	-	-	178G>A	A60T	1	CP
64	ANO	-	-	-	14	8	2	71,4	42,9	-	-	-	-	-	178G>A	A60T	1	CP
65	EK/AK	-	-	-	62	20	17	59,7	43,5	60	23	4	45	25,8	178G>A	A60T	1	CP
66	EK/AK	-	-	-	109	39	19	53,2	35,3	270	-	-	-	-	178G>A	A60T	1	CP

Σ=Συνολικός αριθμός, E=Ετεροζυγώτες, O=Ομοζυγώτες, K=Κρυφορχία, EK=Ετερόπλευρη Κρυφορχία, AK=Αμφοτερόπλευρη Κρυφορχία, Ε/Κ-Κ=Ενδοκοιλιακή Κρυφορχία, ΒΚ=Βουβωνική Κρυφορχία, ANO=Ανορχία G=Γουσανίη/Γλυκίνη, T=Θυμίνη/Θρεονίνη, A=Αδενίνη/Αλανίνη, V=Βαλίνη, R=Αργίνη, C=Κυτοσίνη, L=Λευκίνη

SP=Signal Peptide (Αγγειοφόρο πεπτιδίο), B=Αλουσίδα Β, CP=Ενδιάμεσο πεπτιδίο C

^a Κατάταξη με βάση το χρόνο δημοσίευσης της μελέτης

^b Η αριθμηση ξεκινά από το πρώτο νουκλεοτίδιο του (πρώτου) κωδικονίου που κωδικοποιεί το πρώτο αμινοξύ (Μεθιονίνη) στο μόριο της προ-προ-πρωτεΐνης (sp-B-C-A). Στην αριθμηση δεν περιλαμβάνονται τα νουκλεοτίδια του εσωνίου.

^c Με συνοδό υποαρρενοποίηση έξω γεννητικών οργάνων

^d Μάρτυρας με όρχεις σε σχετική θέση (OO) και υποαρρενοποίηση έξω γεννητικών οργάνων. GM=Θηλικός μάρτυρας



Πίνακας 12. Συνώνυμοι πολυμορφισμοί του γονιδίου INSL3 σε κρυμφορικούς ασθενείς: ανασκόπηση της διεθνούς βιβλιογραφίας

Αναφορά ^a	Φαινότυπος	Οικογενειακό Ιστορικό			Αριθμός Ατόμων			Συχνότητα Πολυμορφισμού		Συχνότητα Αλληλίου		Νουκλεοτιδική Μεταβολή ^b		Κωδικόνιο & Εξώνιο Εντόπιση Μεταβολής Αμινοξέος ^b	
		Σ	E	O	Σ	E	O	(%)	(%)	(%)	(%)				
52	K	-	-	-	4	0	0	13,3	6,7	27G>A	A9A	1	SP		
		-	-	-	16	9	9	83,3	56,7	126G>A	L42L	1	B		
53	EK/AK	-	-	-	-	-	-	-	-	27G>A	A9A	1	SP		
		-	-	-	-	-	-	-	-	126G>A	L42L	1	B		
54	-	-	-	-	-	-	-	-	-	126G>A	L42L	1	B		
		-	-	-	1	0	0	0,7	0,3	1259C>T ²	-	-	Εσώνιο		
55	BK ^c Ooc	-	-	-	-	-	-	-	-	126G>A	L42L	1	B		
		-	-	-	-	-	-	-	-	27G>A	A9A	1	SP		
		-	-	-	1	0	0	1,2	0,6	138C>T	C46C	1	C		
56	K	-	-	-	-	-	-	-	-	126G>A	L42L	1	B		
		-	-	-	-	-	-	-	-	27G>A	A9A	1	SP		
		-	-	-	-	-	-	-	-	96G>A	K32K	1	B		
58	AK	0	0	0	2	0	0	40,0	20	27G>A	A9A	1	SP		
		0	0	0	0	5	5	100	100	126G>A	L42L	1	B		
60	K	27	-	-	-	-	-	-	-	27G>A	A9A	1	SP		
		-	-	-	-	-	-	-	-	126G>A	L42L	1	B		
61	K	-	-	-	-	-	-	-	-	27G>A	A9A	1	SP		
63	K	4	0	0	4	0	0	30,7	15,4	27G>A	A9A	1	SP		
		13	6	5	6	5	5	84,6	61,5	126G>A	L42L	1	B		
65	EK/AK	-	-	-	62	1	0	1,6	0,8	72G>A	A24A	1	SP		
		-	-	-	9	38	38	43,1	39	72G>A	A24A	1	SP		
66	EK/AK	-	-	-	109	1	57	53,2	52,8	126G>A	L42L	1	B		

Σ=Συνολικός αριθμός, E=Ετεροζυγώτες, O=Ομοζυγώτες, K=Κρυμφορξία, EK=Ετερόζυγη Κρυμφορξία, AK=Αμοτερόζυγη Κρυμφορξία

BK=Βουβωνική Κρυμφορξία, OO=Μάρτυρας με άρχεις σε οσχική θέση,

G=Γουανίνη, A=Αδενην/Αλανίνη, L=Λευκίνη, T=Θυμίνη, C=Κυτοσίνη/Κυστεΐνη, K=Λυσίνη,

SP=Signal Peptide (Αγγελιοφόρο πεπτιδίο), B=Αλυσίδα Β, CP=Ενδιάμεσο πεπτιδίο C

^aΚατάταξη με βάση το χρόνο δημοσίευσης της μελέτης

^bΗ αριθμηση ξεκινά από το πρώτο νουκλεοτίδιο του (πρώτου) κωδικονίου που κωδικοποιεί το πρώτο αμινοξύ (Μεθιονίνη) στο μόριο της προ-προ-πρωτεΐνης (pp-B-C-A). Στην αριθμηση δεν περιλαμβάνονται τα νουκλεοτίδια του εσωνίου.

^cΤα νουκλεοτίδια αριθμούνται από την υποτιθέμενη θέση έναρξης της μετάφρασης

^dΜε συνοδό μέτρηση υποαρενατοποίηση έξω γεννητικών οργάνων



Πίνακας 13. Μεταλλάξεις του γονιδίου INSL3 σε κρυφορικούς ασθενείς: ανασκόπηση της διεθνούς βιβλιογραφίας

Αναφορά	Φαινότυπος	Οικογενειακό ιστορικό			Ασθενείς			Μάρτυρες			Νουκλεοτιδική ^b Μεταβολή	Κωδικόνιο ^b & Εξώνιο Εντόπιση Μεταβολή Αμινοξέος						
		Σ	Ε	Ο	Αριθμός	Συχνότητα (%)	Μεταλλάξης Αλληλίου (%)	Σ	Ε	Ο			Αριθμός	Συχνότητα (%)	Μεταλλάξης Αλληλίου (%)			
																Σ	Ε	Ο
54	B-EK	0	0	0	1	0	0	145	0,7	0,3	90	0	0	0	Σ17C>T	R73X	2	CP
	E/K-EK	-	-	-	1	0	0	105	0,7	0,3	105	0	0	0	278C>T	P93L	2	CP
55	E/K-AK ^c	-	-	-	85	1	0	85	1,2	0,6	126	0	0	0	146C>T	P49S	1	B
60	B-EK	27	0	0	150	1	0	150	0,7	0,3	50	0	0	0	330C>G	N110K	2	A
56					2	0	0	2	0,4	0,2	0	0	0	0	205T>C	W69R	2	CP
57	K	-	-	-	5	0	0	540	0,9	0,5	150	0	0	0	305G>A	R102H	2	CP
61					4	0	0	4	0,7	0,4	0	0	0	0	278C>T	P93L	2	CP
50	EK	0	0	0	1	0	0	1	0,2	0,1	0	0	0	0	304C>T	R102C	2	CP
66	Akd	0	0	0	109	1	0	109	0,9	0,5	270	0	0	0	52G>A	V18M	1	SP
	Eke	0	0	0	1	0	0	1	0,9	0,5	0	0	0	0	G319>A	R105H	2	CP
					1	0	0	1	0,9	0,5	0	0	0	0	C-19>G	-	2	Προσαγωγέας

Σ=Συνολικός αριθμός, Ε=Ετεροζυγώτες, Ο=Ομοζυγώτες.

K=Κρυφορμία, EK=Ετερόλευρη Κρυφορμία, AK=Ενδοκοιλιακή Αμφοτερόλευρη Κρυφορμία, B-EK=Βουβωνική Ετερόλευρη Κρυφορμία,

E/K-EK=Ενδοκοιλιακή Ετερόλευρη Κρυφορμία, E/K-AK=Ενδοκοιλιακή Αμφοτερόλευρη Κρυφορμία

C= Κυτταρίνη/Κυστίτη, T=Θυμίνη, G=Γουανίνη, A=Αδεσίνη, R=Αργίνη, L=Λευκίνη, P=Προλίνη, S=Σερίνη, N=Ασπαράγινη, K=Λυσίνη, W=Τρυπτοφάνη, H=Ιστιδίνη,

X=Κωδικόνιο λήξης πρωτεϊνοσύνθεσης, CP=Ενδιάμεσο πεπτικό C, B=Αλυσίδα Β, A=Αλυσίδα Α

^aΚατάταξη με βάση το χρόνο δημοσίευσης της μελέτης

^bΗ αρίθμηση ξεκινά από το πρώτο νουκλεοτίδιο του (πρώτου) κωδικονίου που κωδικοποιεί το πρώτο αμινοξύ (Μεθιονίνη) στο μόριο της προ-προ-πρωτεΐνης (sp-B-C-A).

Στην αρίθμηση δεν περιλαμβάνονται τα νουκλεοτίδια του εσωνίου.

^cΜε συννοσή υποαρρενοποίηση έξω γεννητικών οργάνων

^dΟ πατέρας του συγκεκριμένου ασθενή επίσης ετεροζυγώτης για τη μετάλλαξη αλλά χωρίς να εμφανίζει κρυφορμία

^eΟ συγκεκριμένος ασθενής εμφάνιζε επίσης παθολογικά μικρό πέος (micropenis)



Παράρτημα 2.

Κατάλογος των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν στην μελέτη:

Δίδεται η εταιρεία προέλευσής τους και ο αριθμός καταλόγου τους.

Αντιδραστήριο	Εταιρεία	Αρ. Καταλόγου
Ammonium persulfate	GIBCOBRL	15703-010
EDTA (Ethylenediaminetetracetic Acid, Disodium Salt, Dihydrate- Na_2 EDTA \cdot $2\text{H}_2\text{O}$)	GIBCOBRL	15576-028
Agarose	Invitrogen	15510-027
dNTPs (100mM dNTP Set PCR Grade)	Invitrogen	10297-018
Ethidium Bromide solution	Invitrogen	15585-011
Taq DNA Polymerase Recombinant	Invitrogen	10342-020
Tris	Invitrogen	15504-020
10xBlue Juice Gel Loading Buffer	Invitrogen	10816-015
100bp DNA Ladder	Invitrogen	15628-050
Formamide	INTERGEN	54117
Rapid PCR Purification System	Marligen Bioscience Inc.	11458-015
Ethanol absolute, extra pure	MERCK	100986
Formaldehyde solution	MERCK	159174
MgCl_2 (Magnesium chloride)	MERCK	814733
KCl (Potassium chloride)	MERCK	105001
AgNO_3 (Silver nitrate)	MERCK	101510
NaBH_4 (Sodium borohydride)	MERCK	818873
NaCl (Sodium chloride)	MERCK	101540
TEMED (N', N', N', N'-Tetramethylenediamine)	MERCK	110732
Bromphenol blue	SIGMA	B-8026
(Octylphenoxy)polyethoxyethanol	SIGMA	I-3021
SDS (Sodium Dodecyl Sulphate)	SIGMA	L-6026
Xylen cyanol FF	SIGMA	X-4126
Acrylamide	SCHARLAU	AC3345
Acetic acid glacial	SCHARLAU	AC0342
bis-acrylamide (N', N'-Methylene-bis-acrylamide)	SCHARLAU	BI0091
Boric acid	SCHARLAU	AC0577
Glycerol	SCHARLAU	GL0027
NaOH (Sodium hydroxide, pellets)	SCHARLAU	SO0420
Primers	Invitrogen	-
Eag I	New England Biolaps	RO505



Παράρτημα 3.

Πρωτόκολλο εξαγωγής DNA από περιφερικό αίμα

Σε σωληνάριο όγκου 1,5ml τοποθετούνται 750μl αίματος, 700μl TKM-σουκρόζης (Tris HCl, με 25mM KCl, 5mM MgCl₂, 0,25mM σουκρόζης: pH=7,5) και δύο σταγόνες IGEPAL[®] CA 630 (μη ιονικό, επιφανειοδραστικό φαινολικό παράγωγο αιθοξυλίου⁽¹⁾). Ακολουθεί ανάδευση και φυγοκέντρηση για ένα λεπτό στις 10.000 στροφές. Στη συνέχεια απορρίπτεται το υπερκείμενο και στο ίζημα (περιέχει τους απομονωμένους λεμφοκυτταρικούς πυρήνες) προστίθενται 500μl TKM. Ακολούθως, γίνεται σθεναρή ανάδευση μέχρι να διαλυθεί το ίζημα και κατόπιν φυγοκέντρηση για 1 δευτερόλεπτο σε 10.000 στροφές. Η παραπάνω διαδικασία επαναλαμβάνεται μέχρι το ίζημα να γίνει λευκό. Συνήθως αυτό γίνεται μετά από 3-4 κύκλους (πλυσίματα) συνολικά. Αφού το ίζημα χάσει το κόκκινο χρώμα του, απορρίπτεται το υπερκείμενο και προστίθενται 200μl TKM. Ακολουθεί νέα σθεναρή ανάδευση μέχρι να διαλυθεί το ίζημα. Στη συνέχεια προστίθενται 15μl SDS⁽²⁾ 10% και μετά από νέα ανάδευση γίνεται επώαση στο υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 55°C για τουλάχιστον 5 λεπτά. Ακολουθεί προσθήκη 85 μl διαλύματος NaCl 6M, καλή ανάδευση και φυγοκέντρηση στις 12.000 στροφές για 3 λεπτά. Γίνεται προσεκτική αφαίρεση του υπερκειμένου (χωρίς να ληφθεί ίχνος ιζήματος) και μεταφέρεται σε νέο σωληνάριο όπου προστίθενται 750 μl απόλυτης αιθυλικής αλκοόλης (-20°C), γίνεται ανάδευση και στη συνέχεια αλίευση του DNA, το οποίο αφού τοποθετηθεί σε νέο φιαλίδιο που περιέχει 50μl 1xTE (10 mM Tris base, pH: 8,0, 1mM EDTA), φυλάσσεται σε θερμοκρασία 4°C μέχρι να χρησιμοποιηθεί σε αντιδράσεις PCR.

Χρησιμοποιούμενα διαλύματα:

Διάλυμα NaCl 6M: Παρασκευάζεται με προσθήκη NaCl σε απεσταγμένο H₂O μέχρι κορεσμού.

SDS 10%: Σε 10 ml απεσταγμένο H₂O διαλύεται 1gr SDS

⁽¹⁾ Η χημική διεργασία κατά την οποία το αιθυλενοξειδίο (1,2 εποξυαιθάνη) προστίθεται στα λιπαρά οξέα αυξάνοντας τη διαλυτότητά τους στο νερό.⁶⁷

⁽²⁾ Νατριούχο δωδεκυλ-σουλφικό οξύ (Sodium dodecyl sulphate: C₁₂H₂₅NaO₄S): ιονικός επιφανειοδραστικός παράγοντας (απορρυπαντικό).⁶⁷



Παράρτημα 4.

Ανακοινώσεις σε διεθνή συνέδρια από την παρούσα μελέτη

- Screening for Y chromosome microdeletions in childhood: lack of evidence for a direct aetiological relationship with testicular maldescent. Mamoulakis Ch, Sofikitis N, Chatzikiyriakidou A, Bouba I, Giannakopoulos X, Georgiou I. XIVth Annual Congress of the European Society of Paediatric Urology. March 12-15, 2003, Madrid, Spain. **BJU Int 2003;91 (s1):79.**
- Evidence against a contribution of (TAAAA)n repeat polymorphism within the human sex hormone-binding globulin (SHBG) gene promoter region to testicular maldescent (TMD) phenotype: absence of association/genetic linkage in a family-based study. Mamoulakis Ch, Sofikitis N, Baltogiannis D, Giannakis D, Chatzikiyriakidou A, Georgiou I. XIXth Congress of the European Association of Urology. 24-27 March 2004, Vienna, Austria. **Eur Urol Suppl 2004;3(2):183.**
- No evidence for a correlation of genetic variants of the insulin-like factor with the development of cryptorchidism. Hatzikiyriakidou A, Mamoulakis Ch, Baltogiannis D, Sofikitis N, Georgiou I. XXth Congress of the European Association of Urology. 16-19 March 2005, Istanbul, Turkey. **Eur Urol Suppl 2005;4(3):100.**

Άρθρα προς δημοσίευση σε διεθνή περιοδικά από την παρούσα μελέτη

- Mechanisms regulating testicular descent and consequences of testicular maldescent in the human and mammals.
- Analysis of three genetic factors possibly involved in testicular descent in a Greek paediatric cohort with cryptorchidism: lack of evidence for a direct association with testicular maldescent.

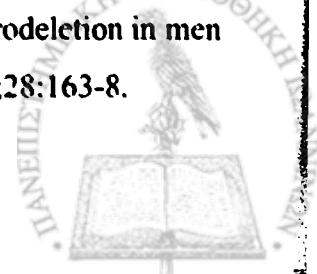


Βιβλιογραφία

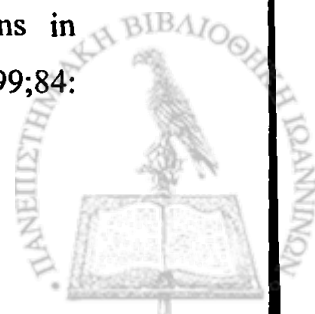
1. Hutson JM, Hasthorpe S, Heyns CF. Anatomical and functional aspects of testicular descent and cryptorchidism. *Endocr Rev.* 1997; 18:259-80.
2. Ivell R, Hartung S. The molecular basis of cryptorchidism. *Mol Hum Reprod.* 2003; 9:175-81.
3. Czeizel A, Eredi E, Toth J. An epidemiological study on undescended testis. *J Urol.* 1981;126:524-7.
4. Elert A, Jahn K, Heidenreich A, et al. The familial undescended testis. *Klin Padiatr.* 2003;215:40-5.
5. Hutson JM. A biphasic model for the hormonal control of testicular descent. *Lancet.* 1985;2:419-21.
6. Nef S, Parada LF. Cryptorchidism in mice mutant for *Ins13*. *Nat Genet.* 1999;22: 295-9.
7. Zimmermann S, Steding G, Emmen JM, et al. Targeted disruption of the *Ins13* gene causes bilateral cryptorchidism. *Mol Endocrinol.* 1999;13:681-91.
8. Overbeek PA, Gorlov IP, Sutherland RW, et al. A transgenic insertion causing cryptorchidism in mice. *Genesis.* 2001;30:26-35.
9. Hsu SY, Nakabayashi K, Nishi S, et al. Activation of orphan receptors by the hormone relaxin. *Science.* 2002;295: 637-8.
10. Kumagai J, Hsu SY, Matsumi H, et al. *INSL3/Leydig* insulin-like peptide activates the *LGR8* receptor important in testis descent. *J Biol Chem.* 2002;277:31283-6.
11. Bogatcheva NV, Truong A, Feng S, et al. *GREAT/LGR8* is the only receptor for insulin-like 3 peptide. *Mol Endocrinol.* 2003;17:2639-46.
12. Kawamura K, Kumagai J, Sudo S, et al. Paracrine regulation of mammalian oocyte maturation and male germ cell survival. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004;101:7323-8.
13. Foresta C, Moro E, Ferlin A. Y chromosome microdeletions and alterations of spermatogenesis. *Endocr Rev.* 2001;22:226-39.
14. Salo P, Ignatius J, Simola KO, et al. Clinical features of nine males with molecularly defined deletions of the Y chromosome long arm. *J Med Genet.* 1995;32:711-5.



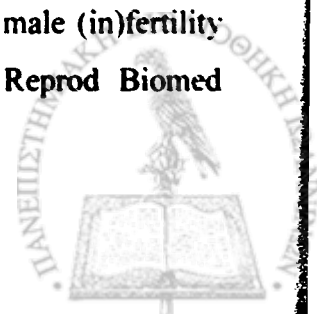
15. Botella-Carretero JI, Valero MA, Valcorba I, et al. Deletion of the long arm of the Y chromosome in an adolescent with short stature and hypogonadism. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2001;14:103-6.
16. Papadimas J, Goulis DG, Giannouli C, et al. Ambiguous genitalia, 45,X/46,XY mosaic karyotype, and Y chromosome microdeletions in a 17-year-old man. *Fertil Steril.* 2001;76:1261-3.
17. Dada R, Gupta NP, Kucheria K. Case report: Cryptorchidism and AZF microdeletion. *Asian J Androl.* 2002;4:148.
18. Dada R, Gupta NP, Kucheria K. AZF microdeletions associated with idiopathic and non idiopathic cases with cryptorchidism and varicocele. *Asian J Androl.* 2002;4:259-63.
19. Simoni M, Gromoll J, Dworniczak B, et al. Screening for deletions of the Y chromosome involving the DAZ (Deleted in AZoospermia) gene in azoospermia and severe oligozoospermia. *Fertil Steril.* 1997;67:542-7.
20. Grimaldi P, Scarponi C, Rossi P, et al. Analysis of Yq microdeletions in infertile males by PCR and DNA hybridization techniques. *Mol Hum Reprod.* 1998;4:1116-21.
21. Krausz C, Rajpert-de Meyts E, Frydelund-Larsen L, et al. Double blind Y chromosome microdeletion analysis in men with known sperm parameters and reproductive hormone profiles: Microdeletions are specific for spermatogenic failure. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86:2638-42.
22. Maurer B, Gromoll J, Simoni M, et al. Prevalence of Y chromosome microdeletions in infertile men who consulted a tertiary care medical centre: the Munster experience. *Andrologia.* 2001;33:27-33.
23. Dohle GR, Halley DJ, Van Hemel JO, et al. Genetic risk factors in infertile men with severe oligozoospermia and azoospermia. *Hum Reprod.* 2002;17:13-6.
24. Oates RD, Silber S, Brown LG, et al. Clinical characterization of 42 oligospermic or azospermic men with microdeletion of the AZFc region of the Y chromosome, and of 18 children conceived via ICSI. *Hum Reprod.* 2002;17:2813-24.
25. Peterlin B, Kuncj T, Sinkovec J, et al. Screening for Y chromosome microdeletions in 226 Slovenian subfertile men. *Hum Reprod.* 2002; 17:17-24.
26. Dada R, Gupta NP, Kucheria K. Molecular screening for Yq microdeletion in men with idiopathic oligozoospermia and azoospermia. *J Biosci.* 2003;28:163-8.



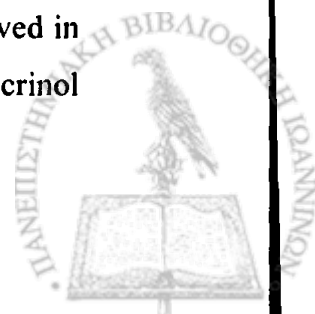
27. Quilter CR, Svennevik EC, Serhal P, et al. Cytogenetic and Y chromosome microdeletion screening of a random group of infertile males. *Fertil Steril.* 2003;79:301-7.
28. Ferlin A, Arredi B, Speltra E, et al. Molecular and clinical characterization of Y chromosome microdeletions in infertile men: a ten year experience in Italy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92: 762-70.
29. Kremer JA, Tuerlings JH, Meuleman EJ, et al. Microdeletions of the Y chromosome and intracytoplasmic sperm injection: from gene to clinic. *Hum Reprod.* 1997;12:687-91.
30. Stuppia L, Gatta V, Calabrese G, et al. A quarter of men with idiopathic oligozoospermia display chromosomal abnormalities and microdeletions of different types in interval 6 of Yq11. *Hum Genet.* 1998;102: 566-70.
31. Kleiman SE, Yogev L, Gamzu R, et al. Genetic evaluation of infertile men. *Hum Reprod.* 1999;14:33-8.
32. Krausz C, Quintana Murci L, Barbaux S, et al. A High frequency of Y chromosome deletions in males with nonidiopathic infertility. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84:3606-12.
33. Krausz C, Bussani-Mastellone C, Granchi S, et al. Screening for microdeletions of Y chromosome genes in patients undergoing intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 1999;14:1717-21.
34. Seifer I, Amat S, Delgado-Viscogliosi P, et al. Screening for microdeletions on the long arm of chromosome Y in 53 infertile men. *Int J Androl.* 1999;22:148-54.
35. Van Landuyt L, Lissens W, Stouffs K, et al. Validation of a simple Yq deletion screening programme in an ICSI candidate population. *Mol Hum Reprod.* 2000;6:291-7.
36. Cortes D, Thorup JM, Visfeldt J, et al. Is infertility after surgery for cryptorchidism congenital or acquired? *Pediatr Surg Int.* 1998;14:6-8.
37. Fagerli J, Schneck FX, Lee PA, et al. Absence of microdeletions in the Y chromosome in patients with a history of cryptorchidism and azoospermia or oligospermia. *Fertil Steril.* 1999;71:697-700.
38. Foresta C, Moro E, Garolla A, et al. Y Chromosome microdeletions in cryptorchidism and idiopathic infertility. *J Clin Endocrinol Metabol.* 1999;84: 3660-5.



39. Suzuki Y, Sasagawa T, Tateno H, et al. Absence of microdeletions in the Y chromosome in patients with Prader-Willi syndrome with cryptorchidism. *Int J Androl*. 2002;25:1-5.
40. Kunej T, Zorn B, Peterlin B. Y chromosome microdeletions in infertile men with cryptorchidism. *Fertil Steril*. 2003;79 Suppl 3:41-7.
41. Ferlin A, Battella A, Tessari A, et al. Analysis of the DAZ gene family in cryptorchidism and idiopathic male infertility. *Fertil Steril*. 2004;81:1013-8.
42. Song NH, Wu HF, Zhang W, et al. Screening for Y chromosome microdeletions in idiopathic and nonidiopathic infertile men with varicocele and cryptorchidism. *Chin Med J (Engl)*. 2005;118: 1462-7.
43. Bor P, Hindkjaer J, Kolvraa S, et al. Screening for Y microdeletions in men with testicular cancer and undescended testis. *J Assist Reprod Genet*. 2006;23:41-5.
44. Castro A, Codner E, Kaune H, et al. Absence of Y chromosome microdeletions in patients with cryptorchidism and hypospadias. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2004;17:143-8.
45. Moretti E, Di Cairano G, Capitani S, et al. Cryptorchidism and semen quality: a TEM and molecular study. *J Androl*. 2007;28:194-9.
46. Giachini C, Nuti F, Marinari E, et al. Partial AZFc deletions in infertile men with cryptorchidism. *Hum Reprod*. 2007;22:2398-403.
47. Gurbuz N, Ozbay B, Aras B, et al. Do microdeletions in the AZF region of the Y chromosome accompany cryptorchidism in Turkish children? *Int Urol Nephrol*. 2007 Dec 13 [Epub ahead of print]
48. Ferlin A, Foresta C. The INSL3-LGR8 hormonal system in humans: testicular descent, cryptorchidism and testicular functions. *Curr Med Chem Immun Endoc & Metab Agents*. 2005;5:421-9.
49. Ferlin A, Arredi B, Zuccarello D, et al. Paracrine and endocrine roles of insulin-like factor 3. *J Endocrinol Invest*. 2006;29:657-64.
50. Ferlin A, Bogatcheva NV, Giancesello L, et al. Insulin-like factor 3 gene mutations in testicular dysgenesis syndrome: clinical and functional characterization. *Mol Hum Reprod*. 2006;12:401-6.
51. Bogatcheva NV, AgoulNIK AI. Symposium: Genetic aspects of male (in)fertility: INSL3/LGR8 role in testicular descent and cryptorchidism. *Reprod Biomed Online*. 2005;10:49-54.



52. Koskimies P, Virtanen H, Lindstrom M, et al. A common polymorphism in the human relaxin-like factor (RLF) gene: no relationship with cryptorchidism. *Pediatr Res.* 2000;47:538-41.
53. Krausz C, Quintana Murci L, Fellous M, et al. Absence of mutations involving the INSL3 gene in human idiopathic cryptorchidism. *Mol Hum Reprod.* 2000;6:298-302.
54. Tomboç M, Lee PA, Mitwally MF, et al. Insulin-like 3/relaxin-like factor gene mutations are associated with cryptorchidism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85:4013-8.
55. Lim HN, Raipert de Meyts E, Skakkebaek NE, et al. Genetic analysis of the INSL3 gene in patients with maldescent of the testis. *Eur J Endocrinol.* 2001;144:129-37.
56. Marin P, Ferlin A, Moro E, et al. Different insulin-like 3 (INSL3) gene mutations not associated with human cryptorchidism. *J Endocrinol Invest.* 2001;24:RC13-15.
57. Marin P, Ferlin A, Moro E, et al. Novel insulin-like 3 (INSL3) gene mutation associated with human cryptorchidism. *Am J Med Genet.* 2001;103:348-9.
58. Takahashi I, Takahashi T, Komatsu M, et al. Ala/Thr60 variant of the Leydig insulin-like hormone is not associated with cryptorchidism in the Japanese population. *Pediatr Int.* 2001;43:256-8.
59. Baker LA, Nef S, Nguyen MT, et al. The insulin-3 gene: lack of a genetic basis for human cryptorchidism. *J Urol.* 2002;167:2534-7.
60. Canto P, Escudero I, Soderlund D, et al. A novel mutation of the insulin-like 3 gene in patients with cryptorchidism. *J Hum Genet.* 2003;48:86-90.
61. Ferlin A, Simonato M, Bartoloni L, et al. The INSL3-LGR8/GREAT ligand-receptor pair in human cryptorchidism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88:4273-9.
62. Foresta C, Ferlin A. Role of INSL3 and LGR8 in cryptorchidism and testicular functions. *Reprod Biomed Online.* 2004;9:294-8.
63. Feng S, Cortessis VK, Hwang A, et al. Mutation analysis of INSL3 and GREAT/LGR8 genes in familial cryptorchidism. *Urology.* 2004;64:1032-6.
64. Vinci G, Anjot MN, Trivin C, et al. An analysis of the genetic factors involved in testicular descent in a cohort of 14 male patients with anorchia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89:6282-5.



65. Yamazawa K, Wada Y, Sasagawa I, et al. Mutation and polymorphism analyses of INSL3 and LGR8/GREAT in 62 Japanese patients with cryptorchidism. *Horm Res.* 2007;67:73-6.
66. El Houate B, Rouba H, Sibai H, et al. Novel mutations involving the INSL3 gene associated with cryptorchidism. *J Urol.* 2007;177:1947-51.
67. <http://en.wikipedia.org>
68. Siiteri PK, Murai JT, Hammond GL, et al. The serum transport of steroid hormones. *Recent Prog Horm Res.* 1982;38:457-510.
69. Hogeveen KN, Talikka M, Hammond GL. Human sex hormone-binding globulin promoter activity is influenced by a (TAAAA)_n repeat element within an Alu sequence. *J Biol Chem.* 2001;276:36383-90.
70. Xita N, Tsatsoulis A, Chatzikiyriakidou A, et al. Association of the (TAAAA)_n repeat polymorphism in the sex hormone-binding globulin (SHBG) gene with polycystic ovary syndrome and relation to SHBG serum levels. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88:5976-80.
71. Cousin P, Calemard-Michel L, Lejeune H, et al. Influence of SHBG gene pentanucleotide TAAAA repeat and D327N polymorphism on serum sex hormone-binding globulin concentration in hirsute women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89:917-24.
72. Xita N, Tsatsoulis A, Stavrou I, et al. Association of SHBG gene polymorphism with menarche. *Mol Hum Reprod.* 2005;11:459-62.
73. Eriksson AL, Lorentzon M, Mellstrom D, et al. SHBG gene promoter polymorphisms in men are associated with serum sex hormone-binding globulin, androgen and androgen metabolite levels, and hip bone mineral density. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006; 91:5029-37.
74. Ferik P, Teran N, Gersak K. The (TAAAA)_n microsatellite polymorphism in the SHBG gene influences serum SHBG levels in women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod.* 2007;22:1031-6.
75. Bollerslev J, Rohl H, Krag Sorensen E, et al. Gonadotropin and androgen levels in patients operated upon for cryptorchidism. *Dan Med Bull.* 1986;33:336-8.
76. Rohen JW, Yokochi C. In: *Human Anatomy. Photographic atlas of systemic and Regional Anatomy.* Stuttgart-New York, Schattauer, 1988.
77. Μελέκος ΜΔ. Σύγχρονη ουρολογία. 1η έκδοση, Πασχαλίδης, Αθήνα, 2005.



78. Georgiou I, Syrou M, Pardalidis N, et al. Genetic and epigenetic risks of intracytoplasmic sperm injection method. *Asian J Androl.* 2006;8:643-73.
79. Georgiou I, Pardalidis N, Giannakis D, et al. In vitro spermatogenesis as a method to bypass pre-meiotic or post-meiotic barriers blocking the spermatogenic process: genetic and epigenetic implications in assisted reproductive technology. *Andrologia.* 2007;39:159-76.
80. Bedford JM, Calvin HI, Cooper GW. The maturation of spermatozoa in the human epididymis. *J Reprod Fertil Suppl.* 1973;33:19-29.
81. Hinrichsen MJ, Blaquier JA. Evidence supporting the existence of sperm maturation in the human epididymis. *J Reprod Fertil.* 1980;60:291-4.
82. Moore HD, Hartman TD, Pryor JP. Development of the oocyte-penetrating capacity of spermatozoa in the human epididymis. *Int J Androl.* 1983;6:310-8.
83. Cooper TG. *The Epididymis, Sperm Maturation and Fertilization.* Berlin, Springer-Verlag, 1986.
84. Hoffer AP. The ultrastructure of the ductus deferens in man. *Biol Reprod.* 1976; 14:425-43.
85. Paniagua R, Regader J, Nistal M, et al. Histological, histochemical and ultrastructural variations along the length of the human vas deferens before and after puberty. *Acta Anat (Basel).* 1982;111:190-203.
86. Jost A. Recherches sur la differenciation sexuelle de l' embryon de lapin. *Arch Anat Microsci Morphol Exp.* 1947;36:271-315.
87. Jost A. Problems of fetal endocrinology. The gonadal and hypophysial hormones. *Recent Prog Horm Res.* 1953;8:379-413.
88. Baarends WM, van Helmond MJ, Post M, et al. A novel member of the transmembrane serine/threonine kinase receptor family is specifically expressed in the gonads and in mesenchymal cells adjacent to the mullerian duct. *Development.* 1994;120:189-97.
89. di Clemente N, Wilson C, Faure E, et al. Cloning, expression, and alternative splicing of the receptor for anti-Mullerian hormone. *Mol Endocrinol.* 1994;8: 1006-20.
90. Lee MM, Donahoe PK. Mullerian inhibiting substance: a gonadal hormone with multiple functions. *Endocr Rev.* 1993;14:152-64.



91. Sobotta J. In: Sobotta Atlas der Anatomie des Menschen. München-Wien-Baltimore, Urban & Schwarzenberg, 1982
92. Koopman P. The genetics and biology of vertebrate sex determination. *Cell*. 2001; 105:843-7.
93. Sadler TW. Langman's Medical Embryology. Baltimore, Williams & Wilkins, 1985.
94. Larsen WJ. Human Embryology. New York, Churchill Livingstone, 1997
95. Ginsburg M, Snow MH, McLaren A. Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. *Development*. 1990;110:521-8.
96. Hacker A, Capel B, Goodfellow P, et al. Expression of Sry, the mouse sex determining gene. *Development*. 1995;121:1603-14.
97. Jeske YW, Bowles J, Greenfield A, et al. Expression of a linear Sry transcript in the mouse genital ridge. *Nat Genet*. 1995;10:480-2.
98. Swain A, Lovell Badge R. Mammalian sex determination: a molecular drama. *Genes Dev*. 1999;13:755-67.
99. Lovell Badge R, Canning C, Sekido R. Sex-determining genes in mice: building pathways. *Novartis Found Symp*. 2002;244:4-18.
100. Gubbay J, Collignon J, Koopman P, et al. A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature*. 1990;346:245-50.
101. Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, et al. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature*. 1990;346:240-4.
102. Palmer SJ, Burgoyne PS. In situ analysis of fetal, prepuberal and adult XX-XY chimaeric mouse testes: Sertoli cells are predominantly, but not exclusively, XY. *Development*. 1991;112:265-8.
103. Tucker PK, Lundrigan BL. Rapid evolution of the sex determining locus in Old World mice and rats. *Nature*. 1993;364:715-7.
104. Whitfield LS, Lovell Badge R, Goodfellow PN. Rapid sequence evolution of the mammalian sex-determining gene SRY. *Nature*. 1993;364:713-5.
105. Bianchi ME. The HMG-box domain. In: DNA-protein: structural interactions. DMJ Lilley (ed), Oxford University Press, pp. 177-200, 1995.



106. Roberts LM, Shen J, Ingraham HA. New solutions to an ancient riddle: defining the differences between Adam and Eve. *Am J Hum Genet.* 1999;65:933-42.
107. de Santa Barbara P, Moniot B, et al. Expression and subcellular localization of SF-1, SOX9, WT1, and AMH proteins during early human testicular development. *Dev Dyn.* 2000;217:293-8.
108. Kent J, Wheatley SC, Andrews JE, et al. A male-specific role for SOX9 in vertebrate sex determination. *Development.* 1996;122:2813-22
109. Morais da Silva S, Hacker A, Harley V, et al. Sox9 expression during gonadal development implies a conserved role for the gene in testis differentiation in mammals and birds. *Nat Genet.* 1996;14:62-8.
110. Koopman P, Gubbay J, Vivian N, et al. Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature.* 1991;351: 117-21.
111. Vidal VP, Chaboissier MC, de Rooij DG, et al. Sox9 induces testis development in XX transgenic mice. *Nat Genet.* 2001;28:216-7.
112. Foster JW, Dominguez Steglich MA, Guioli S, et al. Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. *Nature.* 1994;372:525-30.
113. Gubbay J, Vivian N, Economou A, et al. Inverted repeat structure of the Sry locus in mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992;89:7953-7.
114. Hawkins JR, Taylor A, Goodfellow PN, et al. Evidence for increased prevalence of SRY mutations in XY females with complete rather than partial gonadal dysgenesis. *Am J Hum Genet.* 1992;51:979-84.
115. Wagner T, Wirth J, Meyer J, et al. Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene SOX9. *Cell.* 1994;79:1111-20.
116. Harley VR, Jackson DI, Hextall PJ, et al. DNA binding activity of recombinant SRY from normal males and XY females. *Science.* 1992;255:453-6.
117. Schmahl J, Eicher EM, Washburn LL, et al. Sry induces cell proliferation in the mouse gonad. *Development.* 2000;127:65-73.
118. Capel B, Albrecht KH, Washburn LL, et al. Migration of mesonephric cells into the mammalian gonad depends on Sry. *Mech Dev.* 1999;84:127-31.



119. Colvin JS, Green RP, Schmahl J, et al. Male-to-female sex reversal in mice lacking fibroblast growth factor 9. *Cell*. 2001;104:875-89.
120. Arango NA, Lovell Badge R, Behringer RR. Targeted mutagenesis of the endogenous mouse *Mis* gene promoter: in vivo definition of genetic pathways of vertebrate sexual development. *Cell*. 1999;99:409-19.
121. Clarkson MJ, Harley VR. Sex with two SOX on: SRY and SOX9 in testis development. *Trends Endocrinol Metab*. 2002;13:106-11.
122. Bowles J, Schepers G, Koopman P. Phylogeny of the SOX family of developmental transcription factors based on sequence and structural indicators. *Dev Biol*. 2000;227: 239-55.
123. Nagai K. Molecular evolution of Sry and Sox gene. *Gene*. 2001;270:161-9.
124. Novacek MJ. Mammalian phylogeny: shaking the tree. *Nature* 1992;356:121-5.
125. Foster JW, Brennan FE, Hampikian GK, et al. Evolution of sex determination and the Y chromosome: SRY-related sequences in marsupials. *Nature*. 1992;359:531-3.
126. Marshall Graves JA. The rise and fall of SRY. *Trends Genet*. 2002;18:259-64.
127. Just W, Rau W, Vogel W, et al. Absence of Sry in species of the vole *Ellobius*. *Nat Genet*. 1995;11:117-8.
128. Soullier S, Hanni C, Catzeflis F, et al. Male sex determination in the spiny rat *Tokudaia osimensis* (Rodentia: Muridae) is not Sry dependent. *Mamm Genome*. 1998;9:590-2.
129. Marshall Graves JA. Evolution of the testis-determining gene-the rise and fall of SRY. *Novartis Found Symp*. 2002;244:86-97.
130. Guo JK, Hammes A, Chaboissier MC, et al. Early gonadal development: exploring *Wt1* and *Sox9* function. *Novartis Found Symp*. 2002;244:23-31.
131. Hastie ND. Life, sex, and WT1 isoforms--three amino acids can make all the difference. *Cell*. 2001;106:391-4.
132. Little M, Holmes G, Walsh P. WT1: what has the last decade told us? *Bioessays*. 1999;21:191-202.
133. Hammes A, Guo JK, Lutsch G, et al. Two splice variants of the Wilms' tumor 1 gene have distinct functions during sex determination and nephron formation. *Cell*. 2001;106:319-29.



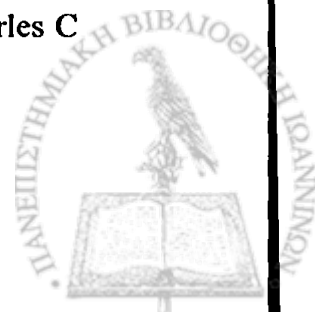
134. Henneveld HT, van Lingen RA, Hamel BC, et al. Perlman syndrome: four additional cases and review. *Am J Med Genet.* 1999;86:439-46.
135. Klamt B, Koziell A, Poulat F, et al. Frasier syndrome is caused by defective alternative splicing of WT1 leading to an altered ratio of WT1 +/-KTS splice isoforms. *Hum Mol Genet.* 1998;7:709-14.
136. Kohler B, Schumacher V, Schulte-Overberg U, et al. Bilateral Wilms tumor in a boy with severe hypospadias and cryptorchidism due to a heterozygous mutation in the WT1 gene. *Pediatr Res.* 1999;45:187-90.
137. Little M, Wells C. A clinical overview of WT1 gene mutations. *Hum Mutat* 1997; 9:209-25.
138. Jordan BK, Mohammed M, Ching ST, et al. Up-regulation of WNT-4 signaling and dosage-sensitive sex reversal in humans. *Am J Hum Genet.* 2001;68:1102-9.
139. Swain A, Narvaez V, Burgoyne P, et al. Dax1 antagonizes Sry action in mammalian sex determination. *Nature.* 1998;391:761-7.
140. Vainio S, Heikkila M, Kispert A, et al. Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature.* 1999;397:405-9.
141. Suzuki T, Mizusaki H, Kawabe K, et al. Concerted regulation of gonad differentiation by transcription factors and growth factors. *Novartis Found Symp.* 2002;244:68-77.
142. Hoyle C, Narvaez V, Alldus G, et al. Dax1 expression is dependent on steroidogenic factor 1 in the developing gonad. *Mol Endocrinol.* 2002;16:747-56.
143. Muscatelli F, Strom TM, Walker AP, et al. Mutations in the DAX-1 gene give rise to both X-linked adrenal hypoplasia congenita and hypogonadotropic hypogonadism. *Nature.* 1994;372:672-6.
144. Peter M, Viemann M, Partsch CJ, et al. Congenital adrenal hypoplasia: clinical spectrum, experience with hormonal diagnosis, and report on new point mutations of the DAX-1 gene. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83:2666-74.
145. Zanaria E, Muscatelli F, Bardoni B, et al. An unusual member of the nuclear hormone receptor superfamily responsible for X-linked adrenal hypoplasia congenita. *Nature.* 1994; 372:635-41.
146. Yu RN, Acherman JC, Ito M, et al. The role of DAX-1 in reproduction *Trends Endocrinol Metabol.* 1998;9:169-75.



147. Vilain E, Le Merrer M, Lecointre C, et al. IMAGE, a new clinical association of intrauterine growth retardation, metaphyseal dysplasia, adrenal hypoplasia congenita, and genital anomalies. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84:4335-40.
148. Ito M, Yu R, Jameson JL. DAX-1 inhibits SF-1-mediated transactivation via a carboxy-terminal domain that is deleted in adrenal hypoplasia congenita. *Mol Cell Biol.* 1997;17:1476-83.
149. de Santa Barbara P, Bonneaud N, Boizet B, et al. Direct interaction of SRY-related protein SOX9 and steroidogenic factor 1 regulates transcription of the human anti-Mullerian hormone gene. *Mol Cell Biol.* 1998;18:6653-65.
150. Bitgood MJ, Shen L, McMahon AP. Sertoli cell signaling by Desert hedgehog regulates the male germline. *Curr Biol.* 1996;6:298-304.
151. Munsterberg A, Lovell Badge R. Expression of the mouse anti-mullerian hormone gene suggests a role in both male and female sexual differentiation. *Development.* 1991;113:613-24.
152. Buehr M, Gu S, McLaren A. Mesonephric contribution to testis differentiation in the fetal mouse. *Development.* 1993;117:273-81.
153. Martineau J, Nordqvist K, Tilmann C, et al. Male-specific cell migration into the developing gonad. *Curr Biol.* 1997;7:958-68.
154. Merchant Larios H, Moreno Mendoza N, Buehr M. The role of the mesonephros in cell differentiation and morphogenesis of the mouse fetal testis. *Int J Dev Biol.* 1993;37:407-15.
155. Yao HH, Tilmann C, Zhao GQ, et al. The battle of the sexes: opposing pathways in sex determination. *Novartis Found Symp.* 2002;244:187-98.
156. Cunha GR, Chung LW. Stromal-epithelial interactions: I. Induction of prostatic phenotype in urothelium of testicular feminized (Tfm/y) mice. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1981;14:1317-24.
157. Chung LW, Cunha GR. Stromal-epithelial interactions: II. Regulation of prostatic growth by embryonic urogenital sinus mesenchyme. *Prostate.* 1983;4:503-11.
158. Φαρή-Κωστοπούλου Ε. Εμβρυολογία του ουροποιητικού συστήματος. Στο: Παιδιατρική ουρολογία Ανδρουλακάκη ΦΑ. Αθήνα: Εκδόσεις ΒΗΤΑ, 1-21,1993.
159. Ransley PG, Μιχαήλ Β. Ανδρουλακάκης ΦΑ. Ανωμαλίες της ουροδόχου κύστης και της ουρήθρας. Στο: Παιδιατρική ουρολογία Ανδρουλακάκη ΦΑ. Αθήνα: Εκδόσεις ΒΗΤΑ, 1-21,1993.



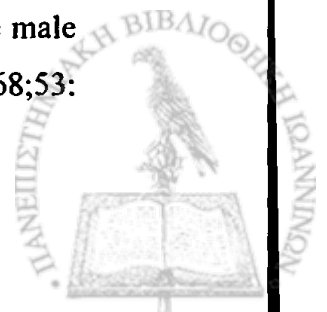
160. Bellinger MF. Embryology of the male external genitalia. *Urol Clin North Am.* 1981;8:375-82.
161. Glenister TW. The origin and fate of the urethral plate in man. *J Anat.* 1954; 88: 413-24. -
162. Stephens FD, Smith ED, Hutson JM. Embryogenesis of hypospadias. In: *Congenital anomalies of the urinary and genital tracts.* Stephens FD (Ed). Oxford, UK: Isis Medical Media Ltd, pp 80-90,1996.
163. Baskin LS. Hypospadias and urethral development. *J Urol.* 2000;163:951-6.
164. Siiteri PK, Wilson JD. Testosterone formation and metabolism during male sexual differentiation in the human embryo. *J Clin Endocrinol Metab.* 1974;38:113-25.
165. Sultan C, Paris F, Terouanne B, et al. Disorders linked to insufficient androgen action in male children. *Hum Reprod Update.* 2001;7:314-22.
166. Silver RI, Russel DW. 5-alpha reductase type 2 mutations are present in some boys with isolated hypospadias. *J Urol.* 1999;162:1142-5.
167. Retik AB, Borer G. Hypospadias. In: *Campbell's Urology.* Walsh PC, Retik AB, Vaughan ED, Jr, et al (Eds). Philadelphia: WB Saunders, pp 2284-333, 2002.
168. Kurzrock EA, Baskin LS, Cunha GR. Ontogeny of the male urethra: theory of endodermal differentiation. *Differentiation.* 1999;64:115-22.
169. Μαμουλάκης Χ. Υποσπαδίας: Εποχική διακύμανση στον ελληνικό πληθυσμό. Διπλωματική εργασία. ΠΜΣ Βιοστατιστικής, Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, (Ιατρική Σχολή-Τμήμα Μαθηματικών) & Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, (Τμήμα Μαθηματικών), 2005
170. Hutson JM, Beasley SW. *Descent of the Testis.* London, Edward Arnold,1992.
171. Carrick FN, Setchell BP. The evolution of the scrotum. In: *Reproduction and evolution.* JH Calaby & T Tyndale-Biscoe (eds), Cambera, Australian Academy of Science, pp. 165-170,1977.
172. Harrison RM, Lewis RW. The male reproductive tract and its fluids. In: *Comparative Primate Biology.* WR Dukelow, J Ervin (eds), New York, Alan R Liss, pp 101-48 (vol 3),1986.
173. Kinzey WG. Male reproductive system and spermatogenesis. In: *Comparative Reproduction of Nonhuman Primates.* Hafez ESE (ed), Springfield IL, Charles C Tomas, pp 85-114,1971.



174. Pfeifer EW. The male reproductive tract of a primitive rodent *Aplodontia rufa*. *Anat Rec.* 1956;124:629-37.
175. Weir BJ. Reproductive characteristics of hystericomorph rodents. *Symp Zool Soc Lond* 34:265-301,1974.
176. Williams MP, Hutson JM. The phylogeny of testicular descent. *Pediatr Surg Int.* 1991;6:162-6.
177. Freeman S. The evolution of the scrotum: a new hypothesis. *J Theor Biol.* 1990; 145:429-45.
178. van der Schoot P. Foetal genital development in *Hyrax capensis*, a species with primary testicondia: proposal for the evolution of Hunter's gubernaculum. *Anat Rec.* 1996;244:386-401.
179. Grant T. *The Platypus*. Sydney, NSW University Press, 1984.
180. Glover TD, Sale JB. The reproductive system of male rock hyrax (*Procavia* and *Heterohyrax*). *J Zool Lond.* 1968;156: 351-362.
181. Gaeth AP, Short RV, Renfree MB. The developing renal, reproductive, and respiratory systems of the African elephant suggest an aquatic ancestry. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:5555-8.
182. Short RV, Mann T, Hay MF. Male reproductive organs of the African elephant, *Loxodonta africana*. *J Reprod Fertil.* 1967;13:517-36.
183. Short RV. Reproductive patterns. In: *Reproduction in mammals*. CR Austin & RV Short (eds), Cambridge, Cambridge University Press, pp 1-33 (vol 4),1972
184. Marsh H, Heinsohn GE, Glover TD. Changes in the male reproductive organs of the dugong, *Dugong dugon* (Sirenia: Dugongidae) with age and reproductive activity. *Aust J Zool.* 1984;32:721-42.
185. Meek A. The reproductive organs of catacea. *J Anat.* 1918;52:186-210.
186. Ping C. On the testis and its accessory structures in the porpoise. *Anat Rec.* 1926; 34:113-7.
187. Ommaney RD. The urogenital system of the fin whale (*Balaenopter physalus*). *Dis Rep.* 1932;5:363-466.
188. van der Schoot P. Studies on the fetal development of the gubernaculum in cetacea. *Anat Rec.* 1995;243:449-60.
189. Young GP, Goldstein M, Phillips DM, et al. Sertoli cell-only syndrome produced by cold testicular ischemia. *Endocrinology.* 1988;122:1074-82.



190. Anthony A. Seasonal reproductive cycle in the normal and experimentally treated male prairie dog, *Cynomys ludovicianus*. *J Morph.* 1953;93:331-69.
191. Marshall FH. The male generative cycle in the hedgehog; with experiments on the functional correlation between the essential and accessory sexual organs. *J Physiol.* 1911;43:247-60.
192. Pearson OP. Reproduction in the shrew (*Blarina brevicauda*). *Am J Anat.* 1944;75:39-48.
193. Wislocki GB. Observations on the gross and microscopic anatomy of the sloths (*Bradypus griseus* Gray and *Choloepus hoffmanni* Peters). *J Morph.* 1928;46:317-28.
194. Roos TB, Schackelford RM. Some observations on the gross anatomy of the genital system and two endocrine organs and body weights in the chinchilla. *Anat Rec.* 1955; 123:301-11.
195. Bryden MM. Testicular temperature in the Southern elephant seal, *Mirounga leonina* (Linn). *J Reprod Fertil.* 1967;13:583-4.
196. Mathews LH. Reproduction in the spotted hyaena *Crocuta crocuta* (Ernleben). *Phil Trans B*:230,1941.
197. Chase EB. The reproductive system of the male opossum, *Didelphis virginiana kerr*, and its experimental modification. *J Morphol.* 1939 ;65:215-27.
198. Renfree MB. Ontogeny, genetic control and phylogeny of female reproduction in monotreme and therian mammals. In: *Mammalian Phylogeny*. FS Szalay, MJ Novacek, MC McKenna (eds), New York, Springer Verlag, pp. 315-56,1992.
199. Le Gros Clark WE. *The antecedents of man*. Edimburgh, Edimburgh University Press,1962.
200. Miller RA. The inguinal canal of the primates. *Am J Anat.* 1918 ;52:186-210.
201. Rau AS, Hiriyannaiya. The urogenital system of *Loris lydekkerianus*. *J Mysore Univ.* 1930;4:149.
202. Hill M. The reproductive cycle of the male weasel (*Mustela nivalis*). *Proc Zool Soc Lond.* 1939;109(B):481-512.
203. Sisson S. *The anatomy of domestic animals*. London, Philadelphia,1940
204. Erickson AW, Mossman HW, Hensel RT, et al. The breeding biology of the male brown bear (*Ursus arctos*). *Zoologica* (New York Zoological Society). 1968;53:85-106.



205. Rasmussen AT. Seasonal changes in the interstitial cells of the testis of the woodchuck (*Marmota monax*). *Am J Anat.* 1917;22:475-515.
206. Mossman HW, Lawalsh JW, Bradley JA. The male reproductive tract of the *Sciuridae*. *Am J Anat.* 1932;51:89-94.
207. Martin RD. The evolution of reproductive mechanisms in primates. *J Reprod Fertil Suppl.* 1969;6:49-66.
208. Moore KL, Persaud TV. *Clinically oriented Embryology.* Philadelphia, WB Saunders Co,1993.
209. Moore CR. The biology of the mammalian testis and scrotum. *Q Rev Biol.* 1926; 1:4-50.
210. Short RV. The testis: the witness of the mating system, the site of mutation and the engine of desire. *Acta Paed.* 1997;Suppl 422:3-7.
211. Portman A. *Animal forms and Patterns.* New York, Schocken,1952.
212. Bedford JM. Evolution of the scrotum: the epididymis as the prime mover? In: *Reproduction and evolution.* JG Calaby & HD Tyndale-Biscoe (eds), Cambera, Australian Academy of Science, pp. 171-82,1977.
213. Cowles RB. The evolutionary significance of the scrotum. *Evolution* 1958;12: 417-8.
214. Cowles RB. Hyperthermia, aspermia, mutation rates and evolution. *Q Rev Biol.* 1965;40:341-67.
215. Jameson EW. *Vertebrate reproduction.* New York, John Wiley and Sons,1988.
216. Setchell BP. The Parkes Lecture. Heat and the testis. *J Reprod Fertil.* 1998;114: 179-94.
217. VanDemark NL, Free MJ. Temperature effects. In: *The Testis.* AD Johnson, WR Gomes, NL VanDemark (eds), New York, Academic Press, pp. 233-312 (vol 3). 1970.
218. Waites GM. Temperature regulation and the testis. In: *The Testis.* AD Johnson, WR Gomes, VanDemark NL (eds), New York, Academic Press, pp. 241-279 (vol 1),1970.
219. Setchell BP. *The mammalin testis.* Ithaca, N.Y, Cornell University Press,1978.
220. Waites GM, Moule GR. Relation of vascular heat exchange to temperature regulation in the testis of the ram. *J Reprod Fertil.* 1961;2:213-24.



221. Bedford JM. Anatomical evidence for the epididymis as the prime mover in the evolution of the scrotum. *Am J Anat.* 1978;152:483-507.
222. Werdelin L, Nilsson A. The evolution of the scrotum and testicular descent in mammals: a phylogenetic view. *J Theor Biol.* 1999;196:61-72.
223. Blix AS, Fay FH, Ronald K. On testicular cooling in phocid seals. *Polar Res.* 1983;1:231-3.
224. Rommel SA, Early GA, Matassa KA, et al. Venous structures associated with thermoregulation of phocid seal reproductive organs. *Anat Rec.* 1995; 243:390-402.
225. Pabst DA, Rommel SA, McLellan WA, et al. Thermoregulation of the intra-abdominal testes of the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) during exercise. *J Exp Biol.* 1995;198:221-6.
226. Rommel SA, Pabst DA, McLellan WA, et al. Anatomical evidence for a countercurrent heat exchanger associated with dolphin testes. *Anat Rec.* 1992;232:150-6.
227. Macdonald D. The encyclopedia of mammals. London, Unwin Hyman, 1984.
228. Hanks J. Comparative aspects of reproduction in the male hyrax and elephant. In: *Reproduction and evolution.* JG Calaby, HD Tyndale-Biscoe (eds), Canberra, Australian Academy of Science, pp. 155-164, 1977.
229. Shimmin LC, Chang BH, Li WH. Male-driven evolution of DNA sequences. *Nature.* 1993;362:745-7.
230. Shimmin LC, Chang BH, Li WH. Contrasting rates of nucleotide substitution in the X-linked and Y-linked zinc finger genes. *J Mol Evol.* 1994;39:569-78.
231. Ehrenberg L, Ehrenstein GV, Hedgran A. Gonadal temperatures and spontaneous mutation rates in man. *Nature.* 1957;180:1433-4.
232. Glover TD. Aspects of sperm production in some East African mammals. *J Reprod Fertil.* 1973;35:45-53.
233. Harrison RJ. Reproduction and reproductive organs. In: *The biology of marine mammals.* HT Anderson (ed), London, Academic Press, pp. 253-348, 1969.
234. Wolfson A. Sperm storage at lower-than-body temperature outside the body cavity of some passerine birds. *Science.* 1954;120:68-71.
235. Woodal PF. The male reproductive system and the phylogeny of elephant-shrews. *Mammal Rev.* 1995;25:87-93.



236. Waites GM, Sethell BP. Some physiological aspects of the function of the testis. In: The gonads. KW Meckerns (ed), New York, Appleton-Century-Crofts, pp. 649-714, 1969.
237. Eckert R, Randall D. Animal physiology. New York, Freeman, 1983.
238. Ginsberg JR, Huck UW. Sperm competition in mammals. Trends Ecol Evol. 1989;4:74-9.
239. Weil C. Über den Descensus testiculorum, nebst Bemerkungen über die Entwicklung der Scheidenhauete und des Skrotums. Z. Heilk. 1885;5:225-35.
240. Hunter J. Observation on the state of the testis, and on hernia congenita. In: Medical Commentaries, pp 75-90, 1762
241. Hunter J. A description of the situation of the testis in the foetus, with its descent into the scrotum. In: Observations on certain parts of the animal oeconomy. London, 13 Castle St, pp 1-26, 1786.
242. Heyns CF, Hutson JM. Historical review of theories on testicular descent. J Urol. 1995;153:754-67.
243. Williams MP, Hutson JM. The history of ideas about testicular descent. Pediatr Surg Int. 1991;6:180-4.
244. Wensing CJ. Testicular descent in the rat and a comparison of this process in the rat with that in the pig. Anat Rec. 1986;214:154-60.
245. Cleland J. The mechanism of the gubernaculum testis, with an introductory sketch of the development of the testes, and an appendix on the purpose of their descent from the abdomen. Edinburgh, Maclachan and Stewart, 1856.
246. Engle ET. Experimentally induced descent of the testis in the macacus monkey by hormones from the anterior pituitary and pregnant urine. Endocrinology. 1932;15: 513-20.
247. Toppari J, Kaleva M. Maldescendus testis. Horm Res. 1999;6:261-9.
248. Gier HT, Marion GB. Development of mammalian testes and genital ducts. Biol Reprod. 1969;Suppl:1-23.
249. Backhouse KM. Embryology of testicular descent and maldescent. Urol Clin North Am. 1982;9:315-25.
250. Heyns CF. The gubernaculum during testicular descent in the human fetus. J Anat. 1987;153:93-112.



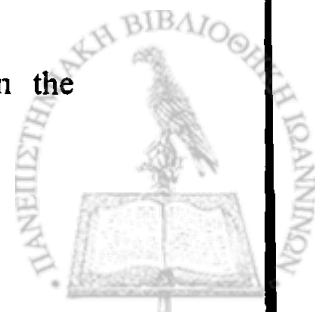
251. Hadziselimovic F, Herzog B, Kruslin E. Morphological background of estrogen-induced cryptorchidism in the mouse. *Pediatr Adolesc Endocrinol.* 1979;6:79-87.
252. Schneck FX, Bellinger MF. Abnormalities of the testes and scrotum and their surgical management. In: *Campbells Urology.* CP Walsh, AB Retik, et al (eds), Philadelphia, Saunders, pp. 2353-77,2002.
253. Wensing CJ. Testicular descent in some domestic mammals 1. Anatomical aspects of testicular descent. *Proc K Ned Akad Wet C.* 1968;71:423-4.
254. Wensing CJ. Testicular descent in some domestic mammals 2. The nature of the gubernacular change during the process of testicular descent in the pig. *Proc K Ned Akad Wet C.* 1973;76:190-5.
255. Hadziselimovic F, Thommen L, Girard J, et al. The significance of postnatal gonadotropin surge for testicular development in normal and cryptorchid testes. *J Urol.* 1986;136:274-6.
256. van der Schoot P. Doubts about the 'first phase of testis descent' in the rat as a valid concept. *Anat Embryol (Berl).* 1993;187:203-8.
257. Clarnette TD, Hutson JM, Beasley SW. Factors affecting the development of the processus vaginalis in the rat. *J Urol.* 1996;156:1463-6.
258. Wensing CJ, Colenbrander B, van Straaten HW. Normal and abnormal testicular descent in some mammals. In: *Clinics in Andrology: Descended and Cryptorchid Testis.* ESE Hafez (ed), The Hague, Martinus Nijhoff, pp. 125-137 (vol 3),1980.
259. Hodson N. The Nerves of the Testis, Epididymis and Scrotum. In: *The Testis.* AD Johnson, WR Gomes, NL Vandemark (eds), New York, Academic Press, pp. 47-99 (vol 1),1970.
260. Tayakkanonta K. The gubernaculum testis and its nerve supply. *Aust NZ J Surg.* 1963;33:61-7.
261. Heyns CF. The gubernaculum during testicular descent and maldescent. *Urol Clin N Am.* 1982;9:315-25.
262. Elder JS, Isaacs JT, Walsh PC. Androgenic sensitivity of the gubernaculum testis: evidence for hormonal/mechanical interactions in testicular descent. *J Urol.* 1982;127: 170-6.
263. Frey HL, Peng S, Rajfer J. Synergy of abdominal pressure and androgens in testicular descent. *Biol Reprod.* 1983;29:1233-9.



264. Frey HL, Rajfer J. Role of the gubernaculum and intraabdominal pressure in the process of testicular descent. *J Urol*. 1984;131:574-9.
265. Quinlan DM, Gearhart JP, Jeffs RD. Abdominal wall defects and cryptorchidism: an animal model. *J Urol*. 1988;140:1141-4.
266. Hutson JM, Terada M, Zhou B, et al. Normal testicular descent and the aetiology of cryptorchidism. *Adv Anat Embryol Cell Biol*. 1995;132:1-56.
267. Kersten W, Molenaar GJ, Emmen JM, et al. Bilateral cryptorchidism in a dog with persistent cranial testis suspensory ligaments and inverted gubernacula: report of a case with implications for understanding normal and aberrant testis descent. *J Anat*. 1996;189:171-6.
268. van der Schoot P, Emmen JM. Development, structure and function of the cranial suspensory ligaments of the mammalian gonads in a cross-species perspective; their possible role in effecting disturbed testicular descent. *Hum Reprod Update*. 1996;2:399-418.
269. Barthold JS, Mahler HR, Newton BW. Lack of feminization of the cremaster nucleus in cryptorchid androgen insensitive rats. *J Urol*. 1994;152:2280-6.
270. Cain MP, Kramer SA, Tindall DJ, et al. Flutamide-induced cryptorchidism in the rat is associated with altered gubernacular morphology. *Urology*. 1995;46:553-8.
271. Shono T, Ramm Anderson S, Goh DW, et al. The effect of flutamide on testicular descent in rats examined by scanning electron microscopy. *J Pediatr Surg*. 1994;29: 839-44.
272. van der Schoot P, Elger W. Androgen-induced prevention of the outgrowth of cranial gonadal suspensory ligaments in fetal rats. *J Androl*. 1992;13:534-42.
273. Clarnette TD, Sugita Y, Hutson JM. Genital anomalies in human and animal models reveal the mechanisms and hormones governing testicular descent. *Br J Urol*. 1997;79:99-112.
274. Hutson JM. Testicular feminization: a model for testicular descent in mice and men. *J Pediatr Surg*. 1986;21:195-8.
275. Husmann DA, McPhaul MJ. Time-specific androgen blockade with flutamide inhibits testicular descent in the rat. *Endocrinology*. 1991;129:1409-16.
276. Spencer JR, Torrado T, Sanchez RS, et al. Effects of flutamide and finasteride on rat testicular descent. *Endocrinology* 1991;129: 741-8.



277. Warren DW, Haltmeyer GC, Eik Nes KB. The effect of gonadotrophins on the fetal and neonatal rat testis. *Endocrinology*. 1975;96:1226-9.
278. Habert R, Picon R. Testosterone, dihydrotestosterone and estradiol-17 beta levels in maternal and fetal plasma and in fetal testes in the rat. *J Steroid Biochem*. 1984; 21:193-8.
279. Emmen JM, McLuskey A, Grootegoed JA, et al. Androgen action during male sex differentiation includes suppression of cranial suspensory ligament development. *Hum Reprod*. 1998;13:1272-80.
280. Scott JE. The Hutson hypothesis. A clinical study. *Br J Urol*. 1987;60:74-6.
281. Husmann DA, Levy JB. Current concepts in the pathophysiology of testicular undescend. *Urology*. 1995;46:267-76.
282. Backhouse KM, Butler H. The gubernaculum testis of the pig (*sus scropha*). *J Anat*. 1960;94:107-21.
283. Heyns CF, Human HJ, De Klerk DP. Hyperplasia and hypertrophy of the gubernaculum during testicular descent in the fetus. *J Urol*. 1986;135:1043-7.
284. Heyns CF, Human HJ, Werely CJ, et al. The glycosaminoglycans of the gubernaculum during testicular descent in the fetus. *J Urol*. 1990;143:612-7.
285. Lillie FR. The freemartin: a study of the action of sex hormones in the foetal life of a cattle. *J Exp Zool*. 1917;23:371-452.
286. van der Schoot P, Vigier B, Prepin J, Perchellet JP, Gittenberger de Groot A. Development of the gubernaculum and processus vaginalis in freemartinism: further evidence in support of a specific fetal testis hormone governing male-specific gubernacular development. *Anat Rec*. 1995;241:211-24.
287. van der Schoot P. Foetal testes control the prenatal growth and differentiation of the gubernacular cones in rabbits--a tribute to the late Professor Alfred Jost. *Development*. 1993;118:1327-34.
288. Habenicht UF, Neumann F. Hormonal regulation of testicular descent. *Adv Anat Embryol Cell Biol*. 1983;81:1-54.
289. Bentvelsen FM, George FW. The fetal rat gubernaculum contains higher levels of androgen receptor than does the postnatal gubernaculum. *J Urol*. 1993;150:1564-6.
290. Husmann DA, McPhaul MJ. Localization of the androgen receptor in the developing rat gubernaculum. *Endocrinology*. 1991;128:383-7.



291. Heyns CF, Pape VC. Presence of a low capacity androgen receptor in the gubernaculum of the pig fetus. *J Urol*. 1991;45:161-7.
292. Ahmed SF, Cheng A, Dovey L, et al. Phenotypic features, androgen receptor binding, and mutational analysis in 278 clinical cases reported as androgen insensitivity syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85:658-65.
293. Fentener van Vlissingen JM, Colenbrander B, Verbruggen A, et al. Testicular feminized males (TFM) in *Nyctereutes procyonoides* (Raccoon, dog). In: *Recent Progress in Cellular Endocrinology of the Testis*. INSERM Symposium, Amsterdam, Elsevier, pp. 335-40 (No 123), 1984.
294. Wensing CJ, Colenbrander B, Bosma AA. Testicular feminisation syndrome and gubernacular development in a pig. *Proc K Ned Akad Wet C*. 1975;78:402-5.
295. Elger W, Richter J, Korte R. Failure to detect androgen dependence of the descensus testicularum in foetal rabbits, mice and monkeys. In: *Maldescensus testis*. JR Bierich, K Rager, MB Ranke (eds), Baltimore, Urban & Schwarzenberg, pp. 187-91, 1977.
296. Hutson JM, Beasley SW. Embryological controversies in testicular descent. *Semin Urol*. 1988;6:68-73.
297. Wensing CJ. Testicular descent in some domestic mammals. 3. Search for the factors that regulate the gubernacular reaction. *Proc K Ned Akad Wet C*. 1973;76: 196-202.
298. Baumans V, Dijkstra G, Wensing CJ. The effect of orchidectomy on gubernacular outgrowth and regression in the dog. *Int J Androl*. 1982;5:387-400.
299. Baumans V, Dijkstra G, Wensing CJ. The role of a non-androgenic testicular factor in the process of testicular descent in the dog. *Int J Androl*. 1983;6:541-52.
300. Emmen JM, McLuskey A, Adham IM, et al. Hormonal control of gubernaculum development during testis descent: gubernaculum outgrowth in vitro requires both insulin-like factor and androgen. *Endocrinology*. 2000;141:4720-7.
301. Fentener van Vlissingen JM, van Zoelen EJ, Ursem PJ, et al. In vitro model of the first phase of testicular descent: identification of a low molecular weight factor from fetal testis involved in proliferation of gubernaculum testis cells and distinct from specified polypeptide growth factors and fetal gonadal hormones. *Endocrinology*. 1988;123:2868-77.



302. Kubota Y, Temelcos C, Bathgate RA, et al. The role of insulin 3, testosterone, Mullerian inhibiting substance and relaxin in rat gubernacular growth. *Mol Hum Reprod.* 2002;8:900-5.
303. Visser JH, Heyns CF. Proliferation of gubernaculum cells induced by a substance of low molecular mass obtained from fetal pig testes. *J Urol.* 1995;153:516-20.
304. Hadziselimovic F. Embryology of Testicular Descent and Maldescent. In: *Cryptorchidism. Management and Implications.* Hadziselimovic F (ed), Berlin, Springer-Verlag, pp. 11-34,1983.
305. Raynaud A. Inhibition, sous l'effect d'une hormone oestrogène, du développement du gubernaculum du foetus mâle de souris. *CR Acad Sc Paris.* 1958;246:176-9.
306. Shono T, Hutson JM, Watts L, et al. Scanning electron microscopy shows inhibited gubernacular development in relation to undescended testes in oestrogen-treated mice. *Int J Androl.* 1996;19:263-70.
307. Hutson JM. Exogenous oestrogens prevent transabdominal testicular descent in mice with complete androgen resistance (testicular feminization). *Pediatr Surg Int.* 1987;2: 242-6.
308. Hutson JM, Watts LM. Both gonadotropin and testosterone fail to reverse estrogen-induced cryptorchidism in fetal mice: further evidence for nonandrogenic control of testicular descent in the fetus. *Pediatr Surg Int.* 1990;5: 13-8.
309. Hadziselimovic F, Herzog B, Kruslin E. Estrogen induced cryptorchidism in animals. *Clin Androl.* 1980;3:166-74.
310. Hutson JM, Donahoe PK. The hormonal control of testicular descent. *Endocr Rev.* 1986;7:270-83.
311. Hutson JM, Davidson PM, Reece LA, et al. Failure of gubernacular development in the persistent Müllerian duct syndrome allows herniation of the testes. *Pediatr Surg Int.* 1994;9:544-6.
312. Hutson JM, Baker ML. A hypothesis to explain abnormal gonadal descent in persistent Mullerian duct syndrome. *Pediatr Surg Int.* 1994;9:542-3.
313. Imbeaud S, Josso N, Belville C, et al. Molecular biology of the persistent Mullerian duct syndrome. *Contracept Fertil Sex.* 1996;24: 613-6.



314. Behringer RR, Finegold MJ, Cate RL. Mullerian-inhibiting substance function during mammalian sexual development. *Cell*. 1994;79:415-25.
315. Bartlett JE, Lee SM, Mishina Y, et al. Gubernacular development in Müllerian inhibiting substance receptor-deficient mice. *BJU Int*. 2002;89:113-8.
316. Catlin EA, MacLaughlin DT, Donahoe PK. Mullerian inhibiting substance: new perspectives and future directions. *Microsc Res Tech*. 1993;25:121-33.
317. Guerrier D, Tran D, Vanderwinden JM, et al. The persistent Mullerian duct syndrome: a molecular approach. *J Clin Endocrinol Metab*. 1989;68:46-52.
318. Josso N, Picard JY, Imbeaud S, et al. Clinical aspects and molecular genetics of the persistent mullerian duct syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1997;47:137-44.
319. Adham IM, Burkhardt E, Benahmed M, et al. Cloning of a cDNA for a novel insulin-like peptide of the testicular Leydig cells. 1993; *J Biol Chem*. 268: 26668-72.
320. Pusch W, Balvers M, Ivell R. Molecular cloning and expression of the relaxin-like factor from the mouse testis. *Endocrinology*. 1996;137:3009-13.
321. Bathgate R, Balvers M, Hunt N, et al. Relaxin-like factor gene is highly expressed in the bovine ovary of the cycle and pregnancy: sequence and messenger ribonucleic acid analysis. *Biol Reprod*. 1996;55:1452-7.
322. Roche PJ, Butkus A, Wintour EM, et al. Structure and expression of Leydig insulin-like peptide mRNA in the sheep. *Mol Cell Endocrinol*. 1996;121:171-7.
323. Zarreh-Hoshyari-Khah MR, Einspanier A, Ivell R. Differential splicing and expression of the relaxin-like factor gene in reproductive tissues of the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*). *Biol Reprod*. 1999;60:445-53.
324. Spiess AN, Balvers M, Tena-Sempere M, et al. Structure and expression of the rat relaxin-like factor (RLF) gene. *Mol Reprod Dev*. 1999;54:319-25.
325. Hombach-Klonisch S, Tetens F, Kauffold J, et al. Molecular cloning and localization of caprine relaxin-like factor (RLF) mRNA within the goat testis. *Mol Reprod Dev*. 1999;53:135-41.
326. Hombach-Klonisch S, Kauffold J, Rautenberg T, et al. Relaxin-like factor (RLF) mRNA expression in the fallow deer. *Mol Cell Endocrinol*. 2000;159:147-58.
327. Klonisch T, Kauffold J, Steger K, et al. Canine relaxin-like factor: unique molecular structure and differential expression within reproductive tissues of the dog. *Biol Reprod*. 2001;64:442-50.



328. Burkhardt E, Adham IM, Hobohm U, et al. A human cDNA coding for the Leydig insulin-like peptide (Ley I-L). *Hum Genet.* 1994;94: 91-4.
329. Tashima LS, Hieber AD, Greenwood FC, et al. The human Leydig insulin-like (hLEY I-L) gene is expressed in the corpus luteum and trophoblast. *J Clin Endocrinol Metab.* 1995;2:707-10.
330. Ivell R, Balvers M, Domagalski R, et al. Relaxin-like factor: a highly specific and constitutive new marker for Leydig cells in the human testis. *Mol Hum Reprod.* 1997;3:459-66.
331. Klonisch T, Froehlich C, Tetens F, et al. Molecular remodeling of members of the relaxin family during primate evolution. *Mol Biol Evol.* 2001;18:393-403.
332. Rinderknecht E, Humbel RE. The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. *J Biol Chem.* 1978; 253:2769-76.
333. Bell GI, Pictet RL, Rutter WJ, et al. Sequence of the human insulin gene. *Nature.* 1980;284:26-32.
334. Bell GI, Merryweather JP, Sanchez-Pescador R, et al. Sequence of a cDNA clone encoding human preproinsulin-like growth factor II. *Nature.* 1984;310:775-7.
335. Hudson P, Haley J, John M, et al. Structure of a genomic clone encoding biologically active human relaxin. *Nature.* 1983;301:628-31.
336. Hudson P, John M, Crawford R, et al. Relaxin gene expression in human ovaries and the predicted structure of a human preprorelaxin by analysis of cDNA clones. *EMBO J.* 1984;3: 2333-9.
337. Bullesbach EE, Schwabe C. A novel Leydig cell cDNA-derived protein is a relaxin-like factor. *J Biol Chem.* 1995;270:16011-5.
338. Chassin D, Laurent A, Janneau JL, et al. Cloning of a new member of the insulin gene superfamily (INSL4) expressed in human placenta. *Genomics.* 1995;29:465-70.
339. Conklin D, Lofton Day CE, Haldeman BA, et al. Identification of INSL5, a new member of the insulin superfamily. *Genomics.* 1999;60:50-6.
340. Lok S, Johnston DS, Conklin D, et al. Identification of INSL6, a new member of the insulin family that is expressed in the testis of the human and rat. *Biol Reprod.* 2000;62:1593-9.



341. Bathgate RA, Samuel CS, Burazin TC, et al. Human relaxin gene 3 (H3) and the equivalent mouse relaxin (M3) gene. Novel members of the relaxin peptide family. *J Biol Chem.* 2002;277:1148-57.
342. Bullesbach EE, Rhodes R, Rembiesa B, et al. The relaxin-like factor is a hormone. *Endocrine.* 1999;10:167-9.
343. Ivell R, Bathgate RA. Reproductive Biology of the Relaxin-Like Factor (RLF/INSL3). *Biol Reprod.* 2002,67:699-705.
344. Bullesbach EE, Schwabe C. Tryptophan B27 in the relaxin-like factor (RLF) is crucial for RLF receptor-binding. *Biochemistry.* 1999;38:3073-8.
345. Del Borgo MP, Hughes RA, Bathgate RA, et al. Analogs of insulin-like peptide 3 (INSL3) B-chain are LGR8 antagonists in vitro and in vivo. *J Biol Chem.* 2006;281:13068-74.
346. Rosengren KJ, Zhang S, Lin F, et al. Solution Structure and Characterization of the LGR8 Receptor Binding Surface of Insulin-like Peptide 3. *J Biol Chem.* 2006,281:28287-95.
347. Bullesbach EE, Schwabe C. The mode of interaction of the relaxin-like factor (RLF) with the leucine-rich repeat G protein-activated receptor 8. *J Biol Chem.* 2006;281:26136-43.
348. Bullesbach EE, Schwabe C. LGR8 signal activation by the relaxin-like factor. *Biol Chem.* 2005;280:14586-90.
349. Wilkinson TN, Speed TP, Tregear GW, et al. Evolution of the relaxin-like peptide family: from neuropeptide to reproduction. *Ann N Y Acad Sci.* 2005;1041:530-3.
350. Reinig JW, Daniel LN, Schwabe C, et al. Isolation and characterization of relaxin from the sand tiger shark (*Odontaspis taurus*). *Endocrinology.* 1981;109:537-43.
351. Bullesbach EE, Schwabe C, Callard IP. Relaxin from an oviparous species, the skate (*Raja erinacea*). *Biochem Biophys Res Commun.* 1987;143:273-80.
352. Bullesbach EE, Schwabe C, Lacy ER. Identification of a glycosylated relaxin-like molecule from the male atlantic stingray, *Dasyatis sabina*. *Biochemistry.* 1997;36:10735-41.
353. Steinetz BG, Schwabe C, Callard IP, et al. Dogfish shark (*Squalus acanthias*) testes contain a relaxin. *J Androl.* 1998;19:110-5.



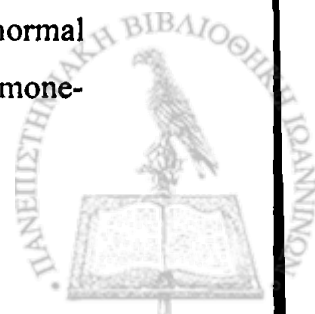
354. de Rienzo G, Aniello F, Branno M, et al. Isolation and characterization of a novel member of the relaxin/insulin family from the testis of the frog *Rana esculenta*. *Endocrinology*. 2001;142:3231-8.
355. Ivell R, Hartung S, Anand-Ivell R. Insulin-like factor 3: where are we now? *Ann N Y Acad Sci*. 2005;1041:486-96.
356. Adham IM, Steding G, Thamm T, et al. The overexpression of the *insl3* in female mice causes descent of the ovaries. *Mol Endocrinol*. 2002;16:244-52.
357. Koskimies P, Suvanto M, Nokkala E, et al. Female mice carrying a ubiquitin promoter-*Ins13* transgene have descended ovaries and inguinal hernias but normal fertility. *Mol Cell Endocrinol*. 2003;206:159-66.
358. Burkhardt E, Adham IM, Brosig B, et al. Structural organization of the porcine and human genes coding for a Leydig cell-specific insulin-like peptide (LEY I-L) and chromosomal localization of the human gene (*INSL3*). *Genomics*. 1994;20:13-9.
359. Koskimies P, Spiess AN, Lathi P, et al. The mouse relaxin-like factor gene and its promoter are located within the 3' region of the *JAK3* genomic sequence. *FEBS Lett*. 1997;419:186-90.
360. Zimmermann S, Schottler P, Engel W, et al. Mouse Leydig insulin-like (Ley I-L) gene: structure and expression during testis and ovary development. *Mol Reprod Dev*. 1997;47:30-8.
361. Truong A, Bogatcheva NV, Schelling C, et al. Isolation and expression analysis of the canine insulin-like factor 3 gene. *Biol Reprod*. 2003;69: 1658-64.
362. Zimmermann S, Schwarzler A, Buth S, et al. Transcription of the Leydig insulin-like gene is mediated by steroidogenic factor-1. *Mol Endocrinol*. 1998; 12:706-13.
363. Koskimies P, Lavallet J, Sipila P, et al. Murine relaxin-like factor promoter: functional characterization and regulation by transcription factors steroidogenic factor 1 and DAX-1. *Endocrinology*. 2002;43:909-19.
364. Sadeghian H, Anand-Ivell R, Balvers M, et al. Constitutive regulation of the *Ins13* gene in rat Leydig cells. *Mol Cell Endocrinol*. 2005, 241:10-20.
365. Jeyasuria P, Ikeda Y, Jamin SP, et al. Cell-specific knockout of steroidogenic factor 1 reveals its essential roles in gonadal function. *Mol Endocrinol*. 2004;18:1610-9.



366. Robert NM, Martin LJ, Tremblay JJ. The orphan nuclear receptor NR4A1 regulates insulin-like 3 gene transcription in Leydig cells. *Biol Reprod.* 2006;74:322-30.
367. Tremblay JJ, Robert NM. Role of nuclear receptors in INSL3 gene transcription in Leydig cells. *Ann N Y Acad Sci.* 2005;1061:183-9.
368. Shen JH, Ingraham HA. Regulation of the orphan nuclear receptor factor 1 by sox proteins. *Mol Endocrinol.* 2002;16:529-40.
369. Ikeda Y, Shen WH, Ingraham HA, et al. Developmental expression of mouse steroidogenic factor-1, an essential regulator of the steroid hydroxylases. *Mol Endocrinol.* 1994;8:654-62.
370. Adham IM, Agoulnik AI. Insulin-like 3 signalling in testicular descent. *Int J Androl.* 2004;27:257-65.
371. Martin LJ, Tremblay. The human 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/Delta5-Delta4 isomerase type 2 promoter is a novel target for the immediate early orphan nuclear receptor Nur77 in steroidogenic cells. *Endocrinology.* 2005;146:861-9.
372. Song KH, Park JJ, Lee MO, et al. LH induces orphan nuclear receptor Nur77 gene expression in testicular Leydig cells. *Endocrinology.* 2001;142:5116-23.
373. Hong CY, Park JH, Ahn RS, et al. Molecular mechanism of suppression of testicular steroidogenesis by proinflammatory cytokine tumor necrosis factor alpha. *Mol Cell Biol.* 2004;24:2593-604.
374. Zhang P, Mellon SH. Multiple orphan nuclear receptors converge to regulate rat P450c17 gene transcription: novel mechanisms for orphan nuclear receptor action. *Mol Endocrinol.* 1997;11:891-904.
375. Hombach-Klonisch S, Hoang-Vu C, Kehlen A, et al. INSL-3 is expressed in human hyperplastic and neoplastic thyrocytes. *Int J Oncol.* 2003;22:993-1001.
376. Klonisch T, Müller-Huesmann H, Riedel M, et al. INSL3 in the benign hyperplastic and neoplastic human prostate gland. *Int J Oncol.* 2005;27:307-15.
377. McKinnell C, Sharpe RM, Mahood K, et al. Expression of insulin-like factor 3 protein in the rat testis during fetal and postnatal development and in relation to cryptorchidism induced by in utero exposure to di (n-Butyl) phthalate. *Endocrinology.* 2005;146:4536-44.



378. Nichols N, Binta H, Fields PA, et al. Immunohistochemical localization of relaxin-like factor/insulin-like peptide-3 in the bovine corpus luteum. *Ann N Y Acad Sci.* 2005;1041:506-9.
379. Bamberger AM, Ivell R, Balvers M, et al. Relaxin-like factor (RLF): a new specific marker for Leydig cells in the ovary. *Int J Gynecol Pathol.* 1999;18:163-8.
380. Hombach-Klonisch S, Buchmann J, Sarun S, et al. Relaxin-like factor (RLF) is differentially expressed in the normal and neoplastic human mammary gland. *Cancer.* 2000;89:2161-8.
381. Hombach-Klonisch S, Seeger S, Tscheudschilsuren G, et al. Cellular localization of human relaxin-like factor in the cyclic endometrium and placenta. *Mol Hum Reprod.* 2001;7:349-56.
382. Irving Rodgers HF, Bathgate RA, Ivell R, et al. Dynamic changes in the expression of relaxin-like factor (INSL3), cholesterol side-chain cleavage cytochrome p450, and 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase in bovine ovarian follicles during growth and atresia. *Biol Reprod.* 2002;66:934-43.
383. Balvers M, Spiess AN, Domagalski R, et al. Relaxin-like factor expression as a marker of differentiation in the mouse testis and ovary. *Endocrinology.* 1998;139:2960-70.
384. Klonisch T, Ivell R, Balvers M, et al. Expression of relaxin-like factor is down-regulated in human testicular Leydig cell neoplasia. *Mol Hum Reprod.* 1999;5:104-8.
385. Klonisch T, Hombach-Klonisch S, Buchmann J, et al. Relaxin-like factor expression in a human ovarian Sertoli-Leydig cell tumor. *Fertil Steril.* 1999;72:546-8.
386. Hombach-Klonisch S, Schon J, Kehlen A, et al. Seasonal expression of INSL3 and Lgr8/Insl3 receptor transcripts indicates variable differentiation of Leydig cells in the roe deer testis. *Biol Reprod.* 2004;71:1079-87.
387. Foresta C, Battela A, Vinanzi C, et al. Insulin-like factor 3: A novel circulating hormone of testis origin in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89:5952-8.
388. Bay K, Hartung S, Ivell R, et al. Insulin-like factor 3 serum levels in 135 normal men and 85 men with testicular disorders: relationship to the luteinizing hormone-testosterone axis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90:3410-8.



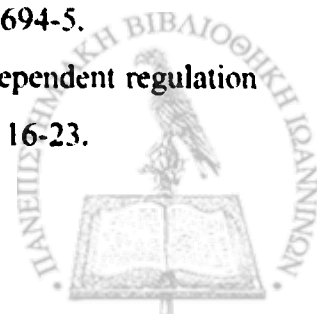
389. Bay K, Matthiesson KL, McLachlan RI, et al. The effects of gonadotropin suppression and selective replacement on insulin-like factor 3 secretion in normal adult men. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91:1108-11.
390. Ferlin A, Garolla A, Rigon F, et al. Changes in serum insulin-like factor 3 during normal male puberty. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91:3426-31.
391. Wikstrom AM, Bay K, Hero M, et al. Serum insulin-like factor 3 levels during puberty in healthy boys and boys with Klinefelter syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91:4705-8.
392. Boockfor FR, Fullbright G, Büllesbach EE, et al. Relaxin-like factor (RLF) serum concentrations and gubernaculum RLF receptor display in relation to pre- and neonatal development of rats. *Reproduction.* 2001;122: 899-906.
393. Spanel Borowski K, Schafer I, Zimmermann S, et al. Increase in final stages of follicular atresia and premature decay of corpora lutea in *Insl3*-deficient mice. *Mol Reprod Dev.* 2001;58:281-6.
394. Gorlov IP, Kamat A, Bogatcheva NV, et al. Mutations of the GREAT gene cause cryptorchidism. *Hum Mol Genet.* 11:2002;2309-18.
395. Park JY, Su YQ, Ariga M, et al. *Science.* 2004;303:682-4.
396. Nguyen MT, Showalter PR, Timmons CF, et al. Effects of orchiopexy on congenitally cryptorchid insulin-3 knockout mice. *J Urol.* 2002;168: 1779-83.
397. Kawamura K, Sudo S, Kumagai J, et al. Relaxin research in the postgenomic era. *Ann N Y Acad Sci.* 2005;1041: 1-7.
398. Hsu SY. Cloning of two novel mammalian paralogs of relaxin/insulin family proteins and their expression in testis and kidney. *Mol Endocrinol.* 1999;13:2163-74.
399. Smith KJ, Wade JD, Claasz AA, et al. Chemical synthesis and biological activity of rat INSL3. *J Pept Sci.* 2001;7:495-501.
400. Phillips JC, del Bono EA, Haines JL, et al. A second locus for Rieger syndrome maps to chromosome 13q14. *Am J Hum Genet.* 1996;59:613-9.
401. Belyaev DK, Ruvinsky AO, Trut LN. Inherited activation-inactivation of the star gene in foxes: its bearing on the problem of domestication. *J Hered.* 1981;72:267-74.



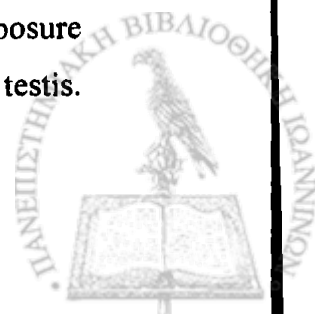
402. Couch FJ, Rommens JM, Neuhausen SL, et al. Generation of an integrated transcription map of the BRCA2 region on chromosome 13q12-q13. *Genomics*. 1996;36:86-99.
403. Hearn MD, Gomme PT. Molecular architecture and biorecognition processes of the cystine knot protein superfamily: part I. The glycoprotein hormones. *J Mol Recognit*. 2000;13:223-78.
404. Jiang X, Dreano M, Buckler DR, et al. Structural predictions for the ligand-binding region of glycoprotein hormone receptors and the nature of hormone-receptor interactions. *Structure*. 1995;3:1341-53.
405. Song YS, Beauchamp J, Isaacs NW, et al. Hormone interactions to Leu-rich repeats in the gonadotropin receptors. I. Analysis of Leu-rich repeats of human luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor and follicle-stimulating hormone receptor. *J Biol Chem*. 2001;276:3426-35.
406. Hsu SY, Kudo M, Chen T, et al. The three subfamilies of leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptors (LGR): identification of LGR6 and LGR7 and the signaling mechanism for LGR7. *Mol Endocrinol*. 2000;14:1257-71.
407. Bathgate RA, Ivell R, Sanborn BM, et al. International Union of Pharmacology LVII: recommendations for the nomenclature of receptors for relaxin family peptides. *Pharmacol Rev*. 2006;58:7-31.
408. Tomiyama H, Hutson JM, Truong A, et al. Transabdominal testicular descent is disrupted in mice with deletion of insulinlike factor 3 receptor. *J Pediatr Surg*. 2003;38:1793-8.
409. Scott DJ, Fu P, Shen PJ, et al. Characterization of the rat INSL3 receptor. *Ann N Y Acad Sci*. 2005;1041:13-6.
410. Klonisch T, Steger K, Kehlen A, et al. INSL3 ligand-receptor system in the equine testis. *Biol Reprod*. 2003;68:1975-81.
411. Scott DJ, Layfield S, Yan Y, et al. Characterization of novel splice variants of LGR7 and LGR8 reveals that receptor signaling is mediated by their unique LDLa modules. *J Biol Chem*. 2006;281:34942-54.
412. Hopkins EJ, Bathagte RA, Gooley PR. The human LGR7 low-density lipoprotein class A module requires calcium for structure. *Ann N Y Acad Sci*. 2005;1041:27-34.



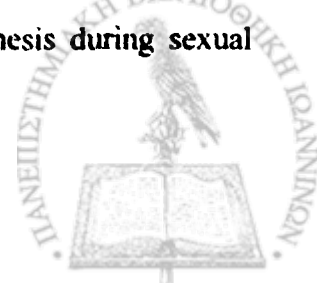
413. Feng S, Bogatcheva NV, Kamat AA, et al. Genetic targeting of relaxin and insl3 signaling in mice. *Ann N Y Acad Sci.* 2005;1041:82-90.
414. Halls ML, Bathgate RA, Roche PJ, et al. Signaling pathways of the LGR7 and LGR8 receptors determined by reporter genes. *Ann N Y Acad Sci.* 2005a;1041:292-5.
415. Halls ML, Bathgate RA, Sudo S, et al. Identification of binding sites with differing affinity and potency for relaxin analogues on LGR7 and LGR8 receptors. *Ann N Y Acad Sci.* 2005b;1041:17-21.
416. Halls ML, Bond CP, Sudo S, et al. Multiple binding sites revealed by interaction of relaxin family peptides with native and chimeric relaxin family peptide receptors 1 and 2 (LGR7 and LGR8). *J Pharmacol Exp Ther.* 2005c;313:677-87.
417. Gill WB, Schumacher GF, Bibbo M, et al. Association of diethylstilbestrol exposure in utero with cryptorchidism, testicular hypoplasia and semen abnormalities. *J Urol.* 1979;122:36-9.
418. Greene RR, Burrell NW, Ivy AC. Experimental intersexuality: The effects of estrogens on the antenatal sexual development of the rat. *Am J Anat.* 1942;67:305-45.
419. Hutson JM, Chow DW, Ng WD. Persistent Mullerian duct syndrome with transverse testicular ectopia. An experiment of the nature with clues for understanding testicular descent. *Pediatr Surg Int.* 1987;2:191-4.
420. Nef S, Shipman T, Parada LF. A molecular basis for estrogen-induced cryptorchidism. *Dev Biol.* 2000;224:354-61.
421. Vidaeff AC, Sever LE. In utero exposure to environmental estrogens and male reproductive health: a systematic review of biological and epidemiologic evidence. *Reprod Toxicol.* 2005;20:5-20.
422. Kubota Y, Nef S, Farmer PJ, et al. Leydig insulin-like hormone, gubernacular development and testicular descent. *J Urol.* 2001;165:1673-5.
423. Bernstein L, Pike MC, Depue RH, et al. Maternal hormone levels in early gestation of cryptorchid males: a case-control study. *Br J Cancer.* 1988;58:379-81.
424. Hadziselimovic F, Geneto R, Emmons LR. Elevated placental estradiol: a possible etiological factor of human cryptorchidism. *J Urol.* 2000;164:1694-5.
425. El Gehani F, Zhang FP, Pakarinen P, et al. Gonadotropin-independent regulation of steroidogenesis in the fetal rat testis. *Biol Reprod.* 1998;58:116-23.



426. Grocock CA, Charlton HM, Pike MC. Role of the fetal pituitary in cryptorchidism induced by exogenous maternal oestrogen during pregnancy in mice. *J Reprod Fertil.* 1988;83:295-300.
427. O Shaughnessy PJ, Baker P, Sohnius U, et al. Fetal development of Leydig cell activity in the mouse is independent of pituitary gonadotroph function. *Endocrinology.* 1998;139:1141-6.
428. Emmen JM, McLuskey A, Adham IM, et al. Involvement of insulin-like factor 3 (Insl3) in diethylstilbestrol-induced cryptorchidism. *Endocrinology.* 2000;141:846-9.
429. Dorrington JH, Armstrong DT. Follicle-stimulating hormone stimulates estradiol-17beta synthesis in cultured Sertoli cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1975;72:2677-81.
430. Pomerantz DK. Developmental changes in the ability of follicle stimulating hormone to stimulate estrogen synthesis in vivo by the testis of the rat. *Biol Reprod.* 1980;23: 948-54.
431. Kelch RP, Jenner MR, Weinstein R, et al. Estradiol and testosterone secretion by human, simian, and canine testes, in males with hypogonadism and in male pseudohermaphrodites with the feminizing testes syndrome. *J Clin Invest.* 1972; 51:824-30.
432. Keel BA, Abney TO. The kinetics of estrogen binding to rat alpha-fetoprotein. *Experientia.* 1984;40:503-5.
433. Nunez E, Vallette G, Benassayag C, et al. Comparative study on the binding of estrogens by human and rat serum proteins in development. *Biochem Biophys Res Commun.* 1974;57:126-33.
434. Hobkirk R, Glasier MA. Estrogen sulfotransferase distribution in tissues of mouse and guinea pig: steroidal inhibition of the guinea pig enzyme. *Biochem Cell Biol.* 1992;70:712-5.
435. Song WC, Moore R, McLachlan JA, et al. Molecular characterization of a testis-specific estrogen sulfotransferase and aberrant liver expression in obese and diabetogenic C57BL/KsJ-db/db mice. *Endocrinology.* 1995;136:2477-84.
436. Majdic G, Sharpe RM, Saunders PT. Maternal oestrogen/xenoestrogen exposure alters expression of steroidogenic factor-1 (SF-1/Ad4BP) in the fetal rat testis. *Mol Cell Endocrinol.* 1997;127:91-8.



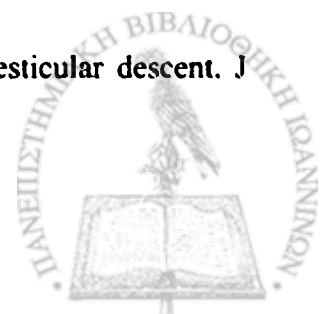
437. Verma-Kurvari S, Nef S, Parada LF. Hormonal regulation of male reproductive tract development. *Ann N Y Acad Sci.* 2005;1061:1-8.
438. Wilson VS, Lambright C, Furr J, et al. Phthalate ester-induced gubernacular lesions are associated with reduced *insl3* gene expression in the fetal rat testis. *Toxicol Lett.* 2004;146:207-15.
439. Mylchreest E, Sar M, Cattley RC, et al. Disruption of androgen-regulated male reproductive development by di(n-butyl) phthalate during late gestation in rats is different from flutamide. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1999;156:81-95.
440. Ema M, Miyawaki E, Kawashima K. Critical period for adverse effects on development of reproductive system in male offspring of rats given di (n-butyl) phthalate during late pregnancy. *Toxicol Lett.* 2000;111:271-8.
441. Gray LE Jr, Ostby J, Furr J, et al. The plasticizer diethylhexyl phthalate induces malformations by decreasing fetal testosterone synthesis during sexual differentiation in the male rat. *Toxicol Sci.* 2000;58:339-49.
442. Fisher JS, Macpherson S, Marchetti N, et al. Human "testicular dysgenesis syndrome": a possible model using in utero exposure of the rat to dibutyl phthalate. *Hum Reprod.* 2003;18:1-13.
443. David RM. Proposed mode of action for in utero effects of some phthalate esters on the developing male reproductive tract. *Toxicol Pathol.* 2006;34:209-19.
444. Skakkebaek NE, Rajpert De Meyts E, Main KM. Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Hum Reprod.* 2001;16:972-8.
445. Foster P. Disruption of reproductive development in male rat offspring following in utero exposure to phthalate esters. *Int J Androl* 2006;29:140-7.
446. Zacharewski TR, Meek MD, Clemons JH, et al. Examination of the in vitro and in vivo estrogenic activities of eight commercial phthalate esters. *Toxicol Sci.* 1998; 46:282-93.
447. Liu K, Lehman KP, Sar M, et al. Gene expression profiling following in utero exposure to phthalate esters reveals new gene targets in the etiology of testicular dysgenesis. *Biol Reprod.* 2005;73:180-92.
448. Parks LG, Ostby JS, Lambright CR, et al. The plasticizer diethylhexyl phthalate induces malformations by decreasing fetal testosterone synthesis during sexual differentiation in the male rat. *Toxicol Sci.* 2000;58:339-349.



449. Shultz VD, Phillips S, Sar M, et al. Altered gene profiles in fetal rat testes after in utero exposure to di(n-butyl) phthalate. *Toxicol Sci* 2001; 64:233-42.
450. Bartlett JE, Lee SM, Mishina Y, et al. Gubernacular development in Mullerian inhibiting substance receptor-deficient mice. *BJU Int.* 2002;89:113-8.
451. Donaldson KM, Tong SY, Washburn T, et al. Morphometric study of the gubernaculum in male estrogen receptor mutant mice. *J Androl.* 1996;17:91-5.
452. Feng S, Bogatcheva NV, Truong A, et al. Over expression of Insulin-like 3 does not prevent cryptorchidism in GNRH or HOXA 10 deficient mice. *J Urol.* 2006;176:399-404.
453. Attah AA, Hutson JM. The role of intra-abdominal pressure in cryptorchidism. *J Urol.* 1993;150:994-6.
454. Kaplan LM, Koyle MA, Kaplan GW, et al. Association between abdominal wall defects and cryptorchidism. *J Urol.* 1986;136:645-7.
455. Koivusalo A, Taskinen S, Rintala RJ. Cryptorchidism in boys with congenital abdominal wall defects. *Pediatr Surg Int.* 1998;13:143-5.
456. Fallat ME, Williams MPL, Farmer PJ, et al. Histologic evaluation of inguinoscrotal migration of the gubernaculum in rodents during testicular descent and its relationship to the genitofemoral nerve. *Pediatr Surg Int.* 1992;7:265-70.
457. Radhakrishnan J, Donahoe PK. The Gubernaculum and Testicular Descent. In: *The Undescended Testis.* EW Fonkalsrud, W Mengel (eds), Chicago, Year Book Medical Publishers, pp. 30-41,1981.
458. Hrabovszky Z, Di Pilla N, Yap T, et al. Role of the gubernacular bulb in cremaster muscle development of the rat. *Anat Rec* 2002;267:159-65.
459. Costa WS, Sampaio FJ, Favorito LA, et al. Testicular migration: remodeling of connective tissue and muscle cells in human gubernaculum testis. *J Urol.* 2002; 167:2171-6.
460. Goh DW, Middlesworth W, Farmer PJ, et al. Prenatal androgen blockade with flutamide inhibits masculinization of the genitofemoral nerve and testicular descent. *J Pediatr Surg.* 1994;29:836-8.
461. Husmann DA, McPhaul MJ. Reversal of flutamide-induced cryptorchidism by prenatal time-specific androgens. *Endocrinology.* 1992;131:1711-5.



462. McMahon DR, Kramer SA, Husmann DA. Antiandrogen induced cryptorchidism in the pig is associated with failed gubernacular regression and epididymal malformations. *J Urol.* 1995;154:553-7.
463. Johansen TE, Klein H. Evidence of androgen receptivity in the pathway of testicular descent in humans. A postnatal study. *Eur Urol.* 1993;23:466-8.
464. Oprins AC, Fentener van Vlissingen JM, Blankenstein MA. Testicular descent: androgen receptors in cultured porcine gubernaculum cells. *J Steroid Biochem.* 1988; 31:387-91.
465. Heyns CF, Pape VC, DeKlerk DP. Demonstration of a cytosolic androgen receptor in the gubernaculum of the pig fetus. *J Urol.* 1988;139:236.
466. Heyns CF, Tate R, Sargent NS, et al. Absence of 5 alpha-reductase activity in the gubernaculum during descent of the fetal pig testis. *J Urol.* 1993;150:510-3.
467. George FW, Peterson KG. Partial characterization of the androgen receptor of the newborn rat gubernaculum. *Biol Reprod.* 1988;39:536-9.
468. Lewis LG. Cryptorchidism. *J Urol.* 1948;60:345-6.
469. Hutson JM, Beasley SW. The mechanisms of testicular descent. *Aust Paediatr J.* 1987;23:215-6.
470. Hrabovszky Z, Farmer PJ, Hutson JM. Does the sensory nucleus of the genitofemoral nerve have a role in testicular descent? *J Pediatr Surg.* 2000;35:96-100.
471. Cain MP, Kramer SA, Tindall DJ, et al. Expression of androgen receptor protein within the lumbar spinal cord during ontologic development and following antiandrogen induced cryptorchidism. *J Urol.* 1994;152:766-9.
472. Park WH, Hutson JM. The gubernaculum shows rhythmic contractility and active movement during testicular descent. *J Pediatr Surg.* 1991;26:615-7.
473. Momose Y, Griffiths AL, Hutson JM. Testicular descent. III. The neonatal mouse gubernaculum shows rhythmic contraction in organ culture in response to calcitonin gene-related peptide. *Endocrinology.* 1992;131:2881-4.
474. Goh DW, Momose Y, Middlesworth W, et al. The relationship among calcitonin gene-related peptide, androgens and gubernacular development in 3 animal models of cryptorchidism. *J Urol.* 1993;150:574-6.
475. Beasley SW, Hutson JM. The role of the gubernaculum in testicular descent. *J Urol* 1988;140:1191-3.



476. Bergh A, Helander HF, Wahlquist L. Studies on factors governing testicular descent in the rat-particularly the role of gubernaculum testis. *Int J Androl.* 1978;1: 342-56.
477. Larkins SL, Hutson JM. Fluorescent anterograde labelling of the genitofemoral nerve shows that it supplies the scrotal region before migration of the gubernaculum. *Pediatr Surg Int.* 1991;6:167-71.
478. Hutson JM, Beasley SW, Bryan AD. Cryptorchidism in spina bifida and spinal cord transection: a clue to the mechanism of transinguinal descent of the testis. *J Pediatr Surg.* 1988;23:275-7.
479. Beasley SW, Hutson JM. Effect of division of the genitofemoral nerve on testicular descent in the rat. *Aust N Z J Surg.* 1987;57:49-51.
480. Hrabovszky Z, Hutson JM. Capsaicin restores gubernacular contractility in TS rats. *J Pediatr Surg* 1999;34:1769-72.
481. Shono T, Goh DW, Momose Y, et al. Physiological effects in vitro of calcitonin gene-related peptide on gubernacular contractility with or without denervation. *J Pediatr Surg.* 1995;30:591-5.
482. Terada M, Goh DW, Farmer PJ, et al. Calcitonin gene-related peptide receptors in the gubernaculum of normal rat and 2 models of cryptorchidism. *J Urol.* 1994; 152:759-62.
483. Terada M, Hutson JM, Farmer PJ, et al. The role of the genitofemoral nerve and calcitonin gene-related peptide in congenitally cryptorchid mutant TS rats. *J Urol.* 1995;154:734-7.
484. Yamanaka J, Metcalfe SA, Hutson JM, et al. Testicular descent. II. Ontogeny and response to denervation of calcitonin gene-related peptide receptors in neonatal rat gubernaculum. *Endocrinology.* 1993;132:280-4.
485. Husmann DA, Boone TB, McPhaul MJ. Flutamide-induced testicular undescend in the rat is associated with alterations in genitofemoral nerve morphology. *J Urol.* 1994; 151:509-13.
486. Barthold JS, Mahler HR, Sziszak TJ, et al. Lack of feminization of the cremaster nucleus by prenatal flutamide administration in the rat and pig. *J Urol.* 1996;156: 767-71.



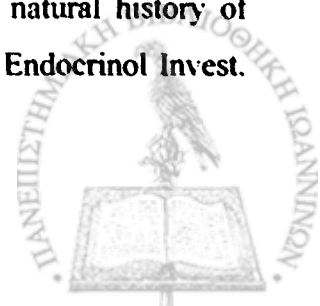
487. Goh DW, Farmer PJ, Hutson JM. Absence of normal sexual dimorphism of the genitofemoral nerve spinal nucleus in the mutant cryptorchid (TS) rat. *J Reprod Fertil.* 1994;102:195-9.
488. Larkins SL, Williams MPL, Hutson JM. Localization of calcitonin gene-related peptide within the spinal nucleus of the genitofemoral nerve. *Pediatr Surg Int.* 1991; 6:176-9.
489. Kojima M, Sano Y. Sexual differences in the topographical distribution of serotonergic fibers in the anterior column of rat lumbar spinal cord. *Anat Embryol (Berl).* 1984;170:117-21.
490. Newton BW, Unger J, Hamill RW. Calcitonin gene-related peptide and somatostatin immunoreactivities in the rat lumbar spinal cord: sexually dimorphic aspects. *Neuroscience.* 1990;37:471-89.
491. Schwindt B, Farmer PJ, Watts LM, et al. Localization of calcitonin gene-related peptide within the genitofemoral nerve in immature rats. *J Pediatr Surg.* 1999;34: 986-91.
492. Ikadai H, Ajisawa C, Taya K, et al. Suprainguinal ectopic scrotum of TS inbred rats. *J Reprod Fertil.* 1988;84:701-7.
493. Park WH, Hutson JM. A new inbred rat strain (TS) with suprainguinal ectopic testes is a model for human cryptorchidism. *Pediatr Surg Int* 1991;6:172- 5.
494. Hrabovszky Z, Farmer PJ, Hutson JM. Undescended testis is accompanied by calcitonin gene related peptide accumulation within the sensory nucleus of the genitofemoral nerve in trans-scrotal rats. *J Urol.* 2001;165:1015-8.
495. Yamanaka J, Metcalfe SA, Hutson JM. Demonstration of calcitonin gene-related peptide receptors in the gubernaculum by computerized densitometry. *J Pediatr Surg.* 1992;27:876 -8.
496. Noble BS, McMillan DN, Maltin CA. Calcitonin gene-related peptide stimulates differentiation of neonatal rat myogenic cultures. *Growth Regul.* 1993;3:245-8.
497. Okazaki S, Kawai H, Arii Y, et al. Effects of calcitonin gene-related peptide and interleukin 6 on myoblast differentiation. *Cell Prolif.* 1996;29:173-82.
498. Houle AM, Gagne D. Human chorionic gonadotropin but not the calcitonin gene-related peptide induces postnatal testicular descent in mice. *J Androl.* 1995;16: 143-7.



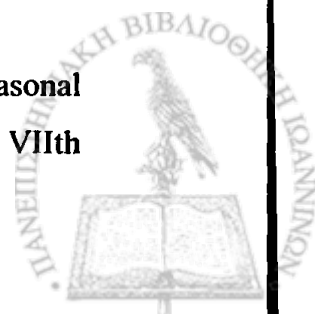
499. Zuccarello D, Morini E, Douzgou S, et al. Preliminary data suggest that mutations in the CgRP pathway are not involved in human sporadic cryptorchidism. *J Endocrinol Invest.* 2004;27:760-4.
500. Levy JB; Husmann DA. The hormonal control of testicular descent. *J Androl.* 1995;16:459-63.
501. Cain MP, Kramer SA, Tindall DJ, et al. Alterations in maternal epidermal growth factor (EGF) effect testicular descent and epididymal development. *Urology.* 1994;43:375-8.
502. Kissinger CR, Liu BS, Martin Blanco E, et al. Crystal structure of an engrailed homeodomain-DNA complex at 2.8 Å resolution: a framework for understanding homeodomain-DNA interactions. *Cell.* 1990;63:579-90.
503. Akam M. Hox and HOM: homologous gene clusters in insects and vertebrates. *Cell.* 1989;57:347-9.
504. Krumlauf R. Hox genes in vertebrate development. *Cell.* 1994;78:191-201.
505. Daftary GS, Taylor HS. Endocrine regulation of HOX genes. *Endocr Rev.* 2006;27: 331-55.
506. Favier B, Dolle P. Developmental functions of mammalian Hox genes. *Mol Hum Reprod.* 1997;3:115-31.
507. Branford WW, Benson GV, Ma L, et al. Characterization of Hoxa-10/Hoxa-11 transheterozygotes reveals functional redundancy and regulatory interactions. *Dev Biol.* 2000;224:373-87.
508. Duboule D, Dolle P. The structural and functional organization of the murine HOX gene family resembles that of *Drosophila* homeotic genes. *EMBO J.* 1989; 8:1497-505.
509. Botas J. Control of morphogenesis and differentiation by HOM/Hox genes. *Curr Opin Cell Biol.* 1993;5:1015-22.
510. Izpisua Belmonte JC, Falkenstein H, et al. Murine genes related to the *Drosophila* AbdB homeotic genes are sequentially expressed during development of the posterior part of the body. *EMBO J.* 1991;10:2279-89.
511. Celniker SE, Lewis EB. Transabdominal, a dominant mutant of the Bithorax Complex, produces a sexually dimorphic segmental transformation in *Drosophila*. *Genes Dev.* 1987;1:111-23.



512. Dolle P, Izpisua Belmonte JC, Brown JM, et al. HOX-4 genes and the morphogenesis of mammalian genitalia. *Genes Dev.* 1991;5:1767-77.
513. Benson GV, Nguyen TH, Maas RL. The expression pattern of the murine Hoxa-10 gene and the sequence recognition of its homeodomain reveal specific properties of Abdominal B-like genes. *Mol Cell Biol.* 1995;15:1591-601.
514. Satokata I, Benson G, Maas R. Sexually dimorphic sterility phenotypes in Hoxa10-deficient mice. *Nature.* 1995;374:460-3.
515. Rijli FM, Matyas R, Pellegrini M, et al. Cryptorchidism and homeotic transformations of spinal nerves and vertebrae in Hoxa-10 mutant mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995;92:8185-9.
516. Hsieh-Li HM, Witte DP, Weinstein M, et al. Hoxa 11 structure, extensive antisense transcription, and function in male and female fertility. *Development.* 1995;121:1373-85.
517. Benson GV, Lim H, Paria BC, et al. Mechanisms of reduced fertility in Hoxa-10 mutant mice: uterine homeosis and loss of maternal Hoxa-10 expression. *Development.* 1996;122:2687-96.
518. Lyon MF, Hawkes SG. X-linked gene for testicular feminization in the mouse. *Nature.* 1970;227:1217-19.
519. Radovick S, Wray S, Lee E, et al. Migratory arrest of gonadotropin-releasing hormone neurons in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991;88:3402-6.
520. Kolon TF, Wiener JS, Lewitton M, et al. Analysis of homeobox gene HOXA10 mutations in cryptorchidism. *J Urol.* 1999;161:275-80.
521. Bertini V, Bertelloni S, Valetto A, et al. Homeobox HOXA10 gene analysis in cryptorchidism. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2004;17:41-5.
522. Wang Y, Barthold J, Kanetsky PA, et al. Allelic variants in HOX genes in cryptorchidism. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2007;79:269-75.
523. Boothe HW. Testes and Epididymides. In: *Textbook of Small Animal Surgery.* D Slatter (ed), Philadelphia, WB Saunders Co, pp. 1325-36, 1993.
524. Berkowitz GS, Lapinski RH, Dolgin SE, et al. Prevalence and natural history of cryptorchidism. *Pediatrics.* 1993;92:44-9.
525. Ghirri P, Ciulli C, Vuerich M, et al. Incidence at birth and natural history of cryptorchidism: a study of 10,730 consecutive male infants. *J Endocrinol Invest.* 2002;25:709-15.

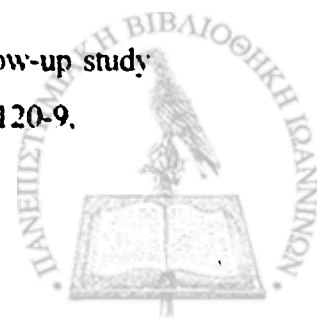


526. James EG, Jean DW. Disorders of the testes and the male reproductive tract. In: Williams Textbook of endocrinology. DW Jean, WF Daniel, MKP Henry, L Reed (eds), pp. 839-41,1998
527. John Radcliffe Hospital cryptorchidism study group. Cryptorchidism: a prospective study of 7500 consecutive male births, 1984-1988. Arch Dis Child. 1992; 67:892-9.
528. Scorer CG. The descent of the testis. Arch Dis Child. 1964;39:605-9.
529. Thong M, Lim C, Fatimah H. Undescended testes: incidence in 1,002 consecutive male infants and outcome at 1 year of age. Pediatr Surg Int. 1998;13:37-41.
530. Wintzer HJ. Equine diseases. Berlin, Verlag Paul Parey,1986
531. Johnston SD, Root Kustitz MV, Olson PN. Canine & Feline Theriogenology. Philadelphia, WB Saunders Co, 2001
532. Heinonen OP, Slonc D, Shapiro S. Birth defects and drugs in pregnancy. Littleton, Publishing Science Group,1997.
533. Berkowitz GS, Lapinski RH. Risk factors for cryptorchidism: a nested case-control study. Paediatr Perinat Epidemiol. 1996;10:39-51.
534. Kaleva M, Virtanen H, Haavisto AM, et al. Incidence of cryptorchidism in Finnish boys. Horm Res. 2001;55:54.
535. Kaleva M, Haavisto AM, Schmidt IM. Higher incidence of cryptorchidism in Denmark than in Finland In: Proceedings of the 11th International Congress of Endocrinology, Sydney, October 29-November 03, 2000. Australia, p.149,2001.
536. Toppari J, Kaleva M, Virtanen HE. Trends in the incidence of cryptorchidism and hypospadias, and methodological limitations of registry-based data. Hum Reprod Update. 2001;7:282-6.
537. Berkowitz GS, Lapinski RH, Godbold JH, et al. Maternal and neonatal risk factors for cryptorchidism. Epidemiology. 1995;6:127-31.
538. Hjertkvist M, Damber JE, Bergh A. Cryptorchidism: a registry based study in Sweden on some factors of possible aetiological importance. J Epidemiol Community Health. 1989;43:324-9.
539. Jackson MB, Swerdlow AJ. Seasonal variations in cryptorchidism. J Epidemiol Community Health. 1986;40:210-3.
540. Mamoulakis Ch, Antypas S, Stamatiadou A, et al. Cryptorchidism: seasonal variations in Greece. In: Andrology in the 21st Century, Proceedings of the VIIIth

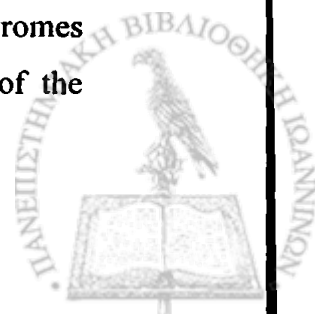


International Congress of Andrology, Montréal, Québec, June 15-19, 2001
 Medimond Publishing Company, Inc., B Robaire, H Chemes, CR Morales
 p. 427,2001.

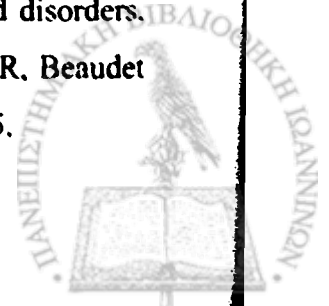
- 51
 51
 5
 541. Mamoulakis Ch, Antypas S, Stamatiadou A, et al. Cryptorchidism: sex variations in Greece do not support the theory of light. *Andrologia*. 2002;34:203.
542. Clements JA, Reyes FI, Winter JS, et al. Studies on human sexual development III. Fetal pituitary and serum, and amniotic fluid concentrations of LH, CG, FSH. *J Clin Endocrinol Metab*. 1976;42:9-19.
543. Mamoulakis Ch, Demetriadis D, Antypas S, et al. Seasonality of cryptorchidism and hypospadias in Greece: Epidemiological relationships. *J Androl* 2002;May-April Suppl: 37.
544. Weidner IS, Moller H, Jensen TK, et al. Risk factors for cryptorchidism and hypospadias. *J Urol*. 1999;61:1606-9.
545. Kiely EA, Chapman RS, Bajoria SK, et al. Maternal serum human chorionic gonadotrophin during early pregnancy resulting in boys with hypospadias and cryptorchidism. *Br J Urol*. 1995;76:389-92.
546. Jones ME, Swerdlow AJ, Griffith M, et al. Prenatal risk factors for cryptorchidism: a record linkage study. *Paediatr Perinat Epidemiol*. 1998;12:383-96.
547. Mayr JM, Lawrenz K, Berghold A. Undescended testicles: an epidemiological review. *Acta Paediatr*. 1999;88:1089-93.
548. Biggs ML, Baer A, Critchlow CW. Maternal, delivery, and perinatal characteristics associated with cryptorchidism: a population-based case-control study among births in Washington State. *Epidemiology*. 2002;13:197-204.
549. Bartone FF, Schmidt MA. Cryptorchidism: incidence of chromosomal anomalies in 50 cases. *J Urol*. 1982;127:1105-6.
550. Dewald GW, Kelalis PP, Gordon H. Chromosomal studies in cryptorchidism. *J Urol*. 1977;117:110-2.
551. Dougall AJ, Maclean N, Wilkinson AW. Histology of the maldescended testis at operation. *Lancet*. 1974;1:771-4.
552. Hortling H, Chapelle A, Johansson CJ, et al. An endocrinologic follow-up study of operated cases of cryptorchidism. *J Clin Endocrinol Metab*. 1967;27: 120-9.



553. Klugo R, Van Dyke DL, Weiss L. Cytogenic studies of cryptorchid testes. *Urology*. 1978;11:255-6.
554. Sasagawa I, Nakada T, Ishigooka M, et al. Cryptorchidism and marker chromosomes: identification of marker chromosomes by fluorescence in situ hybridization. *Urol Int*. 1995;55:25-8.
555. Sasagawa I, Nakada T, Ishigooka M, et al. Chromosomal anomalies in cryptorchidism. *Int Urol Nephrol*. 1996;28:99-102.
556. Yamaguchi T, Kitada S, Osada Y. Chromosomal anomalies in cryptorchidism and hypospadias. *Urol Int*. 1991;47:60-3.
557. Moreno-Garcia M, Miranda EB. Chromosomal anomalies in cryptorchidism and hypospadias. *J Urol*. 2002;168:2170-2.
558. Oliveira LM, Seminara SB, Beranova M, et al. The importance of autosomal genes in Kallmann syndrome: genotype-phenotype correlations and neuroendocrine characteristics. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86:1532-8.
559. Kottler ML, Counis R, Bouchard P. Mutations of the GnRH receptor gene: a new cause of autosomal-recessive hypogonadotropic hypogonadism. *Arch Med Res*. 1999; 30:481-5.
560. Pitteloud N, Hayes FJ, Boepple PA, et al. The role of prior pubertal development, biochemical markers of testicular maturation, and genetics in elucidating the phenotypic heterogeneity of idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87:152-60.
561. Quinton R, Duke VM, Robertson A, et al. Idiopathic gonadotrophin deficiency: genetic questions addressed through phenotypic characterization. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2001;55:163-74.
562. Muller J. Hypogonadism and endocrine metabolic disorders in Prader-Willi syndrome. *Acta paediatr*. 1977;423 (suppl):53-9.
563. Weber FT, Frias JL, Julius RL, et al. Primary hypogonadism in the Borjeson-Forsman-Lehmann syndrome. *J Med Genet*. 1978;15:63-6.
564. Butler MG. Imprinting disorders: non-Mendelian mechanisms affecting growth. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2002;Suppl 5:1279-88.
565. Knoll JH, Nicholls RD, Magenis RE, et al. Angelman and Prader-Willi syndromes share a common chromosome 15 deletion but differ in parental origin of the deletion. *Am J Med Genet*. 1989;32:285-90.



566. Mascari MJ, Gottlieb W, Rogan PK, et al. The frequency of uniparental disomy in Prader-Willi syndrome. Implications for molecular diagnosis. *N Engl J Med.* 1992;326:1599-607.
567. Robinson WP, Bottani A, Xie YG, et al. Molecular, cytogenetic, and clinical investigations of Prader-Willi syndrome patients. *Am J Hum Genet.* 1991;49:1219-34.
568. Turner G, Gedeon A, Mulley J, et al. Borjeson-Forssman-Lehmann syndrome: clinical manifestations and gene localization to Xq26-27. *Am J Med Genet.* 1989;34:463-9.
569. Lower KM, Turner G, Kerr BA, et al. Mutations in PHF6 are associated with Börjeson-Forssman-Lehmann syndrome. *Nat Genet.* 2002;32:661-5.
570. Ragan DC, Casale AJ, Rink RC, et al. Genitourinary anomalies in the CHARGE association. *J Urol.* 1999;161:622-5.
571. Sanlaville D, Romana SP, Lapierre JM, et al. A CGH study of 27 patients with CHARGE association. *Clin Genet.* 2002;61:135-8.
572. Wheeler PG, Quigley CA, Sadeghi Nejad A, Weaver DD. Hypogonadism and CHARGE association. *Am J Med Genet.* 2000;94:228-31.
573. Weiss J, Axelrod L, Whitcomb RW, et al. Hypogonadism caused by a single amino acid substitution in the beta subunit of luteinizing hormone. *N Engl J Med.* 1992;326:179-83.
574. Kremer H, Kraaij R, Toledo SP, et al. Male pseudohermaphroditism due to a homozygous missense mutation of the luteinizing hormone receptor gene. *Nat Genet.* 1995;9:160-4.
575. Martinez Mora J, Saez JM, Toran N, et al. Male pseudohermaphroditism due to Leydig cell agenesis and absence of testicular LH receptors. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1991;34:485-91.
576. Wu SM, Hallermeier KM, Laue L, et al. Inactivation of the luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor by an insertional mutation in Leydig cell hypoplasia. *Mol Endocrinol.* 1998;12:1651-60.
577. Griffin JE, McPhaul MJ, Russell DW, et al. The androgen resistance syndromes: steroid 5 α -reductase 2 deficiency, testicular feminization, and related disorders. In: *The metabolic and molecular bases of inherited disease.* Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds), New York: McGraw-Hill, pp 2967-98, 1995.



578. Lim HN, Nixon RM, Chen H, et al. Evidence that longer androgen receptor polyglutamine repeats are a causal factor for genital abnormalities. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86:3207-10.
579. Sasagawa I, Suzuki Y, et al. CAG repeat length of the androgen receptor gene in Japanese males with cryptorchidism. *Mol Hum Reprod.* 2000;6:973-5.
580. Suzuki Y, Sasagawa I, Ashida J, et al. Screening for mutations of the androgen receptor gene in patients with isolated cryptorchidism. *Fertil Steril.* 2001;76:834-6.
581. Suzuki Y, Sasagawa I, Itoh K, et al. 5Alpha-reductase type 2 genes in Japanese males do not appear to be associated with cryptorchidism. *Fertil Steril.* 2002;78:330-4.
582. Wiener JS, Marcelli M, Gonzales ET, et al. Androgen receptor gene alterations are not associated with isolated cryptorchidism. *J Urol.* 1998;160:863-5.
583. Silva Ramos M, Oliveira JM, Cabeda JM, et al. The CAG repeat within the androgen receptor and its relationship to cryptorchidism. *BJU Int.* 2003;91 (s1):76-7.
584. Biason A, Mantero F, Scaroni C, et al. Deletion within the CYP17 gene together with insertion of foreign DNA is the cause of combined complete 17 alpha-hydroxylase/17,20-lyase deficiency in an Italian patient. *Mol Endocrinol.* 1991;5:2037-45.
585. Lin D, Harikrishna JA, Moore CC, et al. Missense mutation serine106-proline causes 17 alpha-hydroxylase deficiency. *J Biol Chem.* 1991;266: 15992-8.
586. Chang YT, Kappy MS, Iwamoto K, et al. Mutations in the type II 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase gene in a patient with classic salt-wasting 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase deficiency congenital adrenal hyperplasia. *Pediatr Res.* 1993;34:698-700.
587. Simard J, Rheume E, Sanchez R, et al. Molecular basis of congenital adrenal hyperplasia due to 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase deficiency. *Mol Endocrinol.* 1993;7:716-28.
588. Simard J, Rheume E, Leblanc JF, et al. Congenital adrenal hyperplasia caused by a novel homozygous frameshift mutation 273 delta AA in type II 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase gene (HSD3B2) in three male patients of Afghan/Pakistani origin. *Hum Mol Genet.* 1994;3:327-30.



589. Rheaume E, Sanchez R, Simard J, et al. Molecular basis of congenital adrenal hyperplasia in two siblings with classical nonsalt-losing 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;79:1012-8.
590. Geissler WM, Davis DL, Wu L, et al. Male pseudohermaphroditism caused by mutations of testicular 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase 3. *Nat Genet.* 1994; 7:34-9.
591. Andersson S, Geissler WM, Wu L, et al. Molecular genetics and pathophysiology of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase 3 deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996;81:130-6.
592. Wilroy RS, Tipton RE, Summitt RL. The Dubowitz syndrome. *Am J Med Genet.* 1978;2:275-84.
593. Fryns JP, Volcke P, van den Berghe H. Multiple pterygium syndrome type Escobar in two brothers. Follow-up data from childhood to adulthood. *Eur J Pediatr.* 1988;147: 550-2.
594. Slavotinek AM, Tiffit CJ. Fraser syndrome and cryptophthalmos: review of the diagnostic criteria and evidence for phenotypic modules in complex malformation syndromes. *J Med Genet.* 2002;39:623-33.
595. McLoughlin TG, Shanklin DR. Pathology of Laurence-Moon-Bardet-Biedl syndrome. *J Pathol Bacteriol.* 1967;93:65-79.
596. Mykytyn K, Nishimura DY, Searby CC, et al. Identification of the gene (BBS1) most commonly involved in Bardet-Biedl syndrome, a complex human obesity syndrome. *Nat Genet.* 2002;31:435-438.
597. Vince JD, Martin NJ. McKusick-Kaufman syndrome: report of an instructive family. *Am J Med Genet.* 1989;32:174-7.
598. Morgan NV, Gissen P, Sharif SM, et al. A novel locus for Meckel-Gruber syndrome, MKS3, maps to chromosome 8q24. *Hum Genet.* 2002;111:456-61.
599. Rapola J, Salonen R. Visceral anomalies in the Meckel syndrome. *Teratology.* 1985; 31:193-201.
600. Antley RM, Hwang DS, Theopold W, et al. Further delineation of the C (trigonocephaly) syndrome. *Am J Med Genet.* 1981;9:147-63.
601. Schaap C, Schrandt-Stumpel CT, Fryns JP. Opitz-C syndrome: on the nosology of mental retardation and trigonocephaly. *Genet Couns.* 1992;3:209-15.



602. Fabbro MA, D'Agostino S, Costa L, et al. Cryptorchidism with didymo-epididymal dissociation and Robinow's syndrome: 2 case reports *Pediatr Med Chir.* 1997;19:121-4.
603. Patton MA, Afzal AR. Robinow syndrome. *J Med Genet* 2002;39:305-310.
604. Bates AW. Autopsy on a case of Roberts syndrome reported in 1672: The earliest description? *Am J Med Genet.* 2003;117A:92-6.
605. Maheshwari A, Kumar P, Dutta S, et al. Roberts-SC phocomelia syndrome. *Indian J Pediatr.* 2001;68:557-9.
606. Dallaire L. Syndrome of retardation with urogenital and skeletal anomalies (Smith-Lemli-Opitz syndrome): clinical features and mode of inheritance. *J Med Genet.* 1969;6:113-20.
607. Opitz JM, Gilbert-Barness E, Ackerman J, et al. Cholesterol and development: the RSH ("Smith-Lemli-Opitz") syndrome and related conditions. *Pediatr Pathol Mol Med.* 2002;21:153-81.
608. Shefer S, Salen G, Batta AK, et al. Markedly inhibited 7-dehydrocholesterol-delta 7-reductase activity in liver microsomes from Smith-Lemli-Opitz homozygotes. *J Clin Invest.* 1995;96:1779-85.
609. Waterham HR, Wijburg FA, Hennekam RC, et al. Smith-Lemli-Opitz syndrome is caused by mutations in the 7-dehydrocholesterol reductase gene. *Am J Hum Genet.* 1998;63:329-38.
610. Borglum AD, Balslev T, Haagerup A, et al. A new locus for Seckel syndrome on chromosome 18p11.31-q11.2. *Eur J Hum Genet.* 2001;9:753-7.
611. Goodship J, Gill H, Carter J, et al. Autozygosity mapping of a seckel syndrome locus to chromosome 3q22. 1-q24. *Am J Hum Genet.* 2000;67:498-503.
612. Faivre L, Le Merrer M, Lyonnet S, et al. Clinical and genetic heterogeneity of Seckel syndrome. *Am J Med Genet.* 2002;112:379-83.
613. Varadi V, Szabo L, Papp Z. Syndrome of polydactyly, cleft lip/palate or lingual lump, and psychomotor retardation in endogamic gypsies. *J Med Genet.* 1980;17:119-22.
614. Cormier Daire V, Chauvet ML, Lyonnet S, et al. Genitopatellar syndrome: a new condition comprising absent patellae, scrotal hypoplasia, renal anomalies, facial dysmorphism, and mental retardation. *J Med Genet.* 2000;37:520-4.



615. Maxwell MA, Nelson PV, Chin SJ, et al. A common PEX1 frameshift mutation in patients with disorders of peroxisome biogenesis correlates with the severe Zellweger syndrome phenotype. *Hum Genet.* 1999;105:38-44.
616. Wilson GN, Holmes RG, Custer J, et al. Zellweger syndrome: diagnostic assays, syndrome delineation, and potential therapy. *Am J Med Genet.* 1986;24:69-82.
617. Schinzel A. The acrocallosal syndrome in first cousins: widening of the spectrum of clinical features and further support for autosomal recessive inheritance. *J Med Genet.* 1988;25:332-6.
618. Islek I, Kucukoduk S, Incesu L, et al. Carpenter syndrome: report of two siblings. *Clin Dysmorphol.* 1998;7:185-9.
619. Longo N, Wang Y, Smith SA, et al. Genotype-phenotype correlation in inherited severe insulin resistance. *Hum Mol Genet.* 2002;11:1465-75.
620. Yamaguchi T, Osada Y. A case of leprechaunism with cryptorchidism. *Hinyokika Kiyō.* 1987;33:1913-6.
621. Ohlsson A, Fong KW, Rose TH, et al. Prenatal sonographic diagnosis of Pena-Shokeir syndrome type I, or fetal akinesia deformation sequence. *Am J Med Genet.* 1988;29:59-65.
622. Pena SD, Shokeir MH. Syndrome of camptodactyly, multiple ankyloses, facial anomalies and pulmonary hypoplasia--further delineation and evidence for autosomal recessive inheritance. *Birth Defects Orig Artic Ser.* 1976;12:201-8.
623. Olney RS, Hoyme HE, Roche F, et al. Limb/pelvis hypoplasia/aplasia with skull defect (Schinzel phocomelia): distinctive features and prenatal detection. *Am J Med Genet.* 2001;103:295-301.
624. Hennekam RC, van de Meeberg AG, van Doorne JM, et al. Martsolf syndrome in a brother and sister: clinical features and pattern of inheritance. *Eur J Pediatr.* 1988;47:539-43.
625. Strisciuglio P, Costabile M, Esposito M, et al. Martsolf's syndrome in a non-Jewish boy. *J Med Genet.* 1988;25:267-9.
626. Garcia-Sagredo JM, Lozano C, Ferrando P, et al. Mentally retarded siblings with congenital heart defect, peculiar facies and cryptorchidism in the male: possible McDonough syndrome with coincidental (X; 20) translocation. *Clin Genet.* 1984;26:117-24.



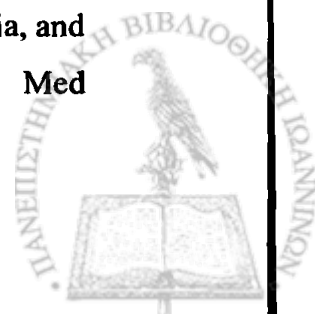
627. Bongers EM, Opitz JM, Fryer A, et al. Meier-Gorlin syndrome: report of eight additional cases and review. *Am J Med Genet.* 2001;102:115-24.
628. Lacombe D, Toutain A, Gorlin RJ, et al. Clinical identification of a human equivalent to the short ear (se) murine phenotype. *Ann Genet.* 1994;37:184-91.
629. Carnevale F, Krajewska G, Fischetto R, et al. Ptosis of eyelids, strabismus, diastasis recti, hip defect, cryptorchidism, and developmental delay in two sibs. *Am J Med Genet.* 1989;33:186-9.
630. Dunic M, Vukelic D, Plavsic V, et al. Nevo syndrome. *Am J Med Genet.* 1998;76:67-70.
631. da-Silva EO, Duarte AR, Lins TS. Oto-facio-osseous-gonadal syndrome: a new form of syndromic deafness? *Clin Genet.* 1997;52:51-5.
632. Cohen MM, Kreiborg S. Visceral anomalies in the Apert syndrome. *Am J Med Genet.* 1993;45:758-60.
633. Wilkie AO, Slaney SF, Oldridge M, et al. Apert syndrome results from localized mutations of FGFR2 and is allelic with Crouzon syndrome. *Nat Genet.* 1995;9:165-72.
634. Weksberg R, Squire JA. Molecular biology of Beckwith-Wiedemann syndrome. *Med Pediatr Oncol.* 1996;27:462-9.
635. Golden JA. Cell migration and cerebral cortical development. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2001;27:22-8.
636. Quaderi NA, Schweiger S, Gaudenz K, et al. Opitz G/BBB syndrome, a defect of midline development, is due to mutations in a new RING finger gene on Xp22. *Nat Genet.* 1997;17:285-91.
637. Robin NH, Feldman GJ, Aronson AL, et al. Opitz syndrome is genetically heterogeneous, with one locus on Xp22, and a second locus on 22q11.2. *Nat Genet.* 1995;11:459-61.
638. Bamshad M, Root S, Carey JC. Clinical analysis of large kindred with the Pallister ulnar-mammary syndrome. *Am J Med Genet.* 1996;65:325-31.
639. Sasaki G, Ogata T, Ishii T, et al. Novel mutation of TBX3 in a Japanese family with ulnar-mammary syndrome: implication for impaired sex development. *Am J Med Genet.* 2002;110:365-9.
640. Cunningham LN, Keating MA, Snyder HM, et al. Urological manifestations of the popliteal pterygium syndrome. *J Urol.* 1989;141:910-2.



641. Gorlin RJ, Sedano HO, Cervenka J. Popliteal pterygium syndrome. A syndrome comprising cleft lip-palate, popliteal and intercrural pterygia, digital and genital anomalies. *Pediatrics*. 1968;41:503-9.
642. Kondo S, Schutte BC, Richardson RJ, et al. Mutations in IRF6 cause Van der Woude and popliteal pterygium syndromes. *Nat Genet*. 2002;32:285-9.
643. Nakagawa M, Kondo M, Matsui A. Teebi hypertelorism syndrome with tetralogy of Fallot. *Am J Med Genet*. 1998;77:345-7.
644. Tsai AC, Robertson JR, Teebi AS. Teebi hypertelorism syndrome: Report of a family with previously unrecognized findings. *Am J Med Genet*. 2002;113:302-6.
645. Gorlin RJ, Anderson RC, Moller JH. The Leopard (multiple lentigines) syndrome revisited. *Birth Defects Orig Artic Ser*. 1971;7:110-5.
646. Tartaglia M, Mehler EL, Goldberg R, et al. Mutations in PTPN11, encoding the protein tyrosine phosphatase SHP-2, cause Noonan syndrome. *Nat Genet*. 2001;29:465-8.
647. Tartaglia M, Kalidas K, Shaw A, et al. PTPN11 mutations in Noonan syndrome: molecular spectrum, genotype-phenotype correlation, and phenotypic heterogeneity. *Am J Hum Genet*. 2002;70:1555-63.
648. Digilio MC, Conti E, Sarkozy A, et al. Grouping of multiple-lentigines/LEOPARD and Noonan syndromes on the PTPN11 gene. *Am J Hum Genet*. 2002;71:389-94.
649. Legius E, Schrandt-Stumpel C, Schollen E, et al. PTPN11 mutations in LEOPARD syndrome. *J Med Genet*. 2002;39: 571-4.
650. Weiss GR, Garnick MB. Testicular cancer in a Russell-Silver dwarf. *J Urol*. 1981;126:836-7.
651. Angehrn V, Zachmann M, Prader A. Silver-Russell syndrome. Observations in 20 patients. *Helv Paediatr Acta*. 1979;34:297-308.
652. Monk D, Bentley L, Hitchins M, et al. Chromosome 7p disruptions in Silver Russell syndrome: delineating an imprinted candidate gene region. *Hum Genet*. 2002;111:376-87.
653. Hitchins MP, Bentley L, Monk D, et al. DDC and COBL, flanking the imprinted GRB10 gene on 7p12, are biallelically expressed. *Mamm Genome*. 2002;13:686-91.



654. Bellus GA, Gaudenz K, Zackai EH, et al. Identical mutations in three different fibroblast growth factor receptor genes in autosomal dominant craniosynostosis syndromes. *Nat Genet.* 1996;14:174-6.
655. Goldfischer ER, Cromie WJ. Bilateral suprarenal cryptorchidism in a patient with the Pfeiffer syndrome. *J Urol.* 1997;158:597-8.
656. Kopysc Z, Stanska M, Ryzko J, et al. The Saethre-Chotzen syndrome with partial bifid of the distal phalanges of the great toes. Observations of three cases in one family. *Hum Genet.* 1980;56:195-204.
657. Paznekas WA, Cunningham ML, Howard TD, et al. Genetic heterogeneity of Saethre-Chotzen syndrome, due to TWIST and FGFR mutations. *Am J Hum Genet.* 1998;62:1370-80.
658. Schell U, Hehr A, Feldman GJ, et al. Mutations in FGFR1 and FGFR2 cause familial and sporadic Pfeiffer syndrome. *Hum Mol Genet.* 1995;4:323-8.
659. Hoeffgen B, Milbradt R. Ehlers-Danlos syndrome and cryptorchism. *Hautarzt.* 1970; 21:229-30.
660. Schalkwijk J, Zweers MC, Steijlen PM, et al. A recessive form of the Ehlers-Danlos syndrome caused by tenascin-X deficiency. *N Engl J Med.* 2001;345:1167-675.
661. Courtens W, Perlmutter N, Dan B, et al. New syndrome or severe expression of Gordon syndrome? A case report. *Clin Dysmorphol.* 1997;6:39-44.
662. Ioan DM, Belengeanu V, Maximilian C, et al. Distal arthrogryposis with autosomal dominant inheritance and reduced penetrance in females: the Gordon syndrome. *Clin Genet.* 1993;43:300-2.
663. Kalkhoven E, Roelfsema JH, Teunissen H, et al. Loss of CBP acetyltransferase activity by PHD finger mutations in Rubinstein-Taybi syndrome. *Hum Mol Genet.* 2003;12:441-50.
664. Petrij F, Giles RH, Dauwerse HG, et al. Rubinstein-Taybi syndrome caused by mutations in the transcriptional co-activator CBP. *Nature.* 1995;376:348-51.
665. Rubinstein JH. Broad thumb-hallux (Rubinstein-Taybi) syndrome 1957-1988. *Am J Med Genet.* 1990;6 (Suppl):3-16.
666. Shah D, Jones R, Porter H, et al. Bilateral microphthalmia, esophageal atresia, and cryptorchidism: the anophthalmia-esophageal-genital syndrome. *Am J Med Genet.* 1997;70:171-3.



667. Reish O, Gorlin RJ, Hordinsky M, et al. Brain anomalies, retardation of mentality and growth, ectodermal dysplasia, skeletal malformations, Hirschsprung disease, ear deformity and deafness, eye hypoplasia, cleft palate, cryptorchidism, and kidney dysplasia/hypoplasia (BRESEK/BRESHECK): new X-linked syndrome? *Am J Med Genet.* 1997;68:386-90.
668. Aarskog D. A familial syndrome of short stature associated with facial dysplasia and genital anomalies. *Birth Defects Orig Artic Ser.* 1971;7:235-9.
669. Schwartz CE, Gillessen-Kaesbach G, May M, et al. Two novel mutations confirm FGD1 is responsible for the Aarskog syndrome. *Eur J Hum Genet.* 2000;8:869-74.
670. Robinow M, Sonek J, Buttino L, et al. Femoral-facial syndrome--prenatal diagnosis--autosomal dominant inheritance. *Am J Med Genet.* 1995;57:397-9.
671. Sabry MA, Obenbergerova D, Al Sawan R, et al. Femoral hypoplasia-unusual facies syndrome with bifid hallux, absent tibia, and macrophallus: a report of a Bedouin baby. *J Med Genet.* 1996;33:165-7.
672. Briault S, Hill R, Shrimpton A, et al. A gene for FG syndrome maps in the Xq12-q21.31 region. *Am J Med Genet.* 1997;73:87-90.
673. Opitz JM, Kaveggia EG. Studies of malformation syndromes of man 33: the FG syndrome. An X-linked recessive syndrome of multiple congenital anomalies and mental retardation. *Z Kinderheilkd.* 1974;117:1-18.
674. Biancalana V, Le Marec B, Odent S, et al. Oto-palato-digital syndrome type I: further evidence for assignment of the locus to Xq28. *Hum Genet.* 1991;88:228-30.
675. Farhud DD, Walizadeh GR, Farhud I. Oto-palato-digital syndrome in an Iranian infant. *Monatsschr Kinderheilkd.* 1989;137:681-3.
676. Verloes A, Lesenfants S, Barr M, et al. Fronto-otopalatodigital osteodysplasia: clinical evidence for a single entity encompassing Melnick-Needles syndrome, otopalatodigital syndrome types 1 and 2, and frontometaphyseal dysplasia. *Am J Med Genet.* 2000;90:407-22.
677. Graham GE, Silver K, Arlet V, et al. King syndrome: further clinical variability and review of the literature. *Am J Med Genet.* 1998;78:254-69.
678. McPherson EW, Taylor CA. The King syndrome: malignant hyperthermia, myopathy, and multiple anomalies. *Am J Med Genet.* 1981;8:159-65.



679. Gripp KW, Scott CI, Hughes HE, et al. Lateral meningocele syndrome: three new patients and review of the literature. *Am J Med Genet.* 1997;70:229-39.
680. Gorlin RJ, Whitley CB. Lenz-Majewski syndrome. *Radiology* 1983;149:129-31.
681. Ng D, Hadley DW, Tiffit CJ, et al. Genetic heterogeneity of syndromic X-linked recessive microphthalmia-anophthalmia: is Lenz microphthalmia a single disorder? *Am J Med Genet.* 2002;110:308-14.
682. Ozkinay FF, Ozkinay C, Yuksel H, et al. A case of Lenz microphthalmia syndrome. *J Med Genet.* 1997;34:604-6.
683. Suchy SF, Nussbaum RL. The deficiency of PIP2 5-phosphatase in Lowe syndrome affects actin polymerization. *Am J Hum Genet.* 2002;71:1420-7.
684. Moreira-Filho CA, Neustein I. A presumptive new variant of Norrie's disease. *J Med Genet.* 1979;16:125-8.
685. Schuback DE, Chen ZY, Craig IW, et al. Mutations in the Norrie disease gene. *Hum Mutat.* 1995;5:285-92.
686. Stevens CA, Wilroy RS. The telecanthus-hypospadias syndrome. *J Med Genet.* 1988; 25:536-42.
687. Maat Kievit A, Brunner HG, Maaswinkel Mooij P. Two additional cases of the Ohdo blepharophimosis syndrome. *Am J Med Genet.* 1993;47:901-6.
688. Mhanni AA, Dawson AJ, Chudley AE. Vertical transmission of the Ohdo blepharophimosis syndrome. *Am J Med Genet.* 1998;77:144-8.
689. Hughes Benzie RM, Hunter AG, Allanson JE, et al. Simpson-Golabi-Behmel syndrome associated with renal dysplasia and embryonal tumor: localization of the gene to Xqcen-q21. *Am J Med Genet.* 1992;43:428-35.
690. Veugelers M, Cat BD, Muyldermans SY, et al. Mutational analysis of the GPC3/GPC4 glypican gene cluster on Xq26 in patients with Simpson-Golabi-Behmel syndrome: identification of loss-of-function mutations in the GPC3 gene. *Hum Mol Genet.* 2000;9:1321-18.
691. Managoli S, Chaturvedi P, Vilhekar KY, et al. Von Voss-Cherstvoy syndrome. *Indian Pediatr.* 2002;39:967-9.
692. Urioste M, Paisan L, Martinez Frias ML. DK-phocomelia syndrome in a child with a long follow-up. *Am J Med Genet.* 1994;52:269-71.
693. Al Jasmi F, Al Khenazian S. X-linked ichthyosis and undescended testes. *Int J Dermatol.* 2002;41:614-6.



694. Hernandez Martin A, Gonzalez Sarmiento R, De Unamuno P. X-linked ichthyosis: an update. *Br J Dermatol.* 1999;141:617-27.
695. Ades LC, Kerr B, Turner G, et al. Smith-Fineman-Myers syndrome in two brothers. *Am J Med Genet.* 1991;40:467-70.
696. Gibbons RJ, Higgs DR. Molecular-clinical spectrum of the ATR-X syndrome. *Am J Med Genet.* 2000;97:204-12.
697. Juberg RC, Marsidi I. A new form of X-linked mental retardation with growth retardation, deafness, and microgenitalism. *Am J Hum Genet.* 1980;32:714-22.
698. Bonthron DT, Barlow KM, Burt AM, et al. Parental consanguinity in the blepharophimosis, heart defect, hypothyroidism, mental retardation syndrome (Young-Simpson syndrome). *J Med Genet.* 1993;30:255-6.
699. Masuno M, Imaizumi K, Okada T, et al. Young-Simpson syndrome: further delineation of a distinct syndrome with congenital hypothyroidism, congenital heart defects, facial dysmorphism, and mental retardation. *Am J Med Genet.* 1999;84:8-11.
700. Chilvers C, Pike MC. Epidemiology of Undescended Testis. In: *Urological and Genital Cancer.* RTD Oliver, JP Blandy, F Hope-Stone (eds), Oxford, Blackwell Scientific Publications, pp. 306-21, 1989.
701. Hadziselimovic F, Herzog B, Girard J. Cryptorchidism: Histology, fertility and treatment. *Prog Reprod Biol Med.* 1984;10:1-15.
702. Leissner J, Filipas D, Wolf HK, et al. The undescended testis: considerations and impact on fertility. *BJU Int.* 1999;83:885-91.
703. Rozanski TA, Bloom DA. The undescended testis. Theory and management. *Urol Clin North Am.* 1995, 22:107-18.
704. Chilvers C, Dudley NE, Gough MH, et al. Undescended testis: the effect of treatment on subsequent risk of subfertility and malignancy. *J Pediatr Surg.* 1986; 21:691-6.
705. Depue RH, Pike MC, Henderson BE. Estrogen exposure during gestation and risk of testicular cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1983;71:1151-5.
706. Henderson BE, Benton B, Jing J, et al. Risk factors for cancer of the testis in young men. *Int J Cancer.* 1979;23:598-602.
707. Krabbe S, Skakkeback NE, Berthelsen JG, et al. High incidence of undetected neoplasia in maldescended testes. *Lancet.* 1979;1:999-1000.



708. Morrison AS. Cryptorchidism, hernia, and cancer of the testis. *J Natl Cancer Inst.* 1976;56:731-3.
709. Moss AR, Osmond D, Bacchetti P, et al. Hormonal risk factors in testicular cancer. A case-control study. *Am J Epidemiol.* 1986;124:39-52.
710. Pottern LM, Brown LM, Hoover RN, et al. Testicular cancer risk among young men: role of cryptorchidism and inguinal hernia. *J Natl Cancer Inst.* 1985;74:377-81.
711. Schottenfeld D, Warshauer ME, Sherlock S, et al. The epidemiology of testicular cancer in young adults. *Am J Epidemiol.* 1980;112:232-46.
712. David G, Bisson JP, Martin-Boyce A, et al. Sperm Characteristics and Fertility in Previously Cryptorchid Adults. In: *Cryptorchidism, Diagnosis, and Treatment. Ped Adolesc Endocr. JCL Job (ed), Basel: Karger, pp. 187-94 (vol 6), 1979.*
713. Hadziselimovic F, Herzog B. Importance of early postnatal germ cell maturation for fertility of cryptorchid males. *Horm Res.* 2001;55:6-10.
714. Hadziselimovic F. Cryptorchidism, its impact on male fertility. *Eur Urology.* 2002; 41:121-3.
715. Weidner W, Colpi GM, Hargreave TB, et al, Pomerol JM. EAU guidelines on male infertility. *Eur Urol.* 2002;42:313-22.
716. Lee PA. Fertility in cryptorchidism. Does treatment make a difference? *Endocrinol Metab Clin North Am.* 1993;22:479-90.
717. Barfield A, Melo J, Coutinho E, et al. Pregnancies associated with sperm concentrations below 10 million/ml in clinical studies of a potential male contraceptive method, monthly depot medroxyprogesterone acetate and testosterone esters. *Contraception* 1979;20:121-7.
718. Lee PA, O Leary LA, Songer NJ, et al. Paternity after unilateral cryptorchidism: a controlled study. *Pediatrics.* 1996;98:676-9.
719. Lee PA, O Leary LA, Songer NJ, et al. Paternity after bilateral cryptorchidism. A controlled study. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 1997;151:260-3.
720. Lee PA, Coughlin MT. Fertility after bilateral cryptorchidism. Evaluation by paternity, hormone, and semen data. *Horm Res.* 2001;55:28-32.
721. Lee PA, Coughlin MT. The single testis: paternity after presentation as unilateral cryptorchidism. *J Urol.* 2002;168:1680-2.



722. Lee PA, Coughlin MT, Bellinger MF. Paternity and hormone levels after unilateral cryptorchidism: association with pretreatment testicular location. *J Urol.* 2000;164: 1697-701.
723. Lee PA, Coughlin MT, Bellinger MF. No relationship of testicular size at orchiopexy with fertility in men who previously had unilateral cryptorchidism. *J Urol.* 2001;166:236-9.
724. Coughlin MT, Bellinger MF, LaPorte RE, et al. Testicular suture: a significant risk factor for infertility among formerly cryptorchid men. *J Pediatr Surg.* 1998; 33:1790-3.
725. Lee PA, Bellinger MF, Coughlin MT. Correlations among hormone levels, sperm parameters and paternity in formerly unilaterally cryptorchid men. *J Urol.* 1998; 160:1155-7.
726. Gill B, Kogan S, Starr S, et al. Significance of epididymal and ductal anomalies associated with testicular maldescent. *J Urol.* 1989;142:556-8.
727. Koff WJ, Scaletsky R. Malformations of the epididymis in undescended testis. *J Urol.* 1990;143:340-3.
728. Mollaeian M, Mehrabi V, Elahi B. Significance of epididymal and ductal anomalies associated with undescended testis: study in 652 cases. *Urology.* 1994; 43:857-60.
729. Hadziselimovic F, Herzog B, Hocht B, et al. Screening for cryptorchid boys risking sterility and results of long-term buserelin treatment after successful orchiopexy. *Eur J Pediatr.* 1987;146 Suppl 2:S59-62.
730. Holstein AF, Wartenberg H, Vossmeier J. Zur Zytologie der prenatalen Gonadenentwicklung beim Menschen. Teil III. *Z Anat Entwickl Gesch.* 1971;135: 43-66.
731. Clermont Y. Spermatogenesis in man. A study of the spermatogonial population. *Fertil Steril.* 1966;17:705-21.
732. Seguchi H, Hadziselimovic F. Ultramikroskopische Untersuchungen am Tubulus seminiferus bei Kindern von der Geburt bis zur Pubertät. I. Spermatogonienentwicklung. *Anat Anz.* 1974;68:133-48.
733. Huff DS, Hadziselimovic F, Snyder HM, et al. Postnatal testicular maldevelopment in unilateral cryptorchidism. *J Urol.* 1989;142:546-8.



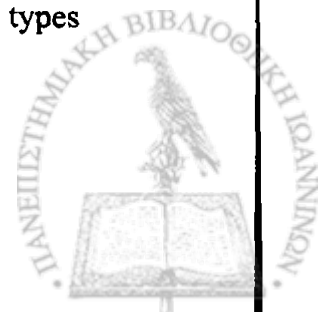
734. Huff DS, Hadziselimovic F, Snyder HM, et al. Early postnatal testicular maldevelopment in cryptorchidism. *J Urol*. 1991;146:624-6.
735. Huff DS, Hadziselimovic F, Snyder HM, et al. Histologic maldevelopment of unilaterally cryptorchid testes and their descended partners. *Eur J Pediatr*. 1993; 152 Suppl 2:S11-4.
736. Hedinger E. Histopathology of undescended testes. *Eur J Pediatr* 1982;139:266-71.
737. Nistal M, Paniagua R. Occurrence of primary spermatocytes in the infant and child testis. *Andrologia*. 1984;16:532-6.
738. Schindler AM, Diaz P, Cuendet A, et al. Cryptorchidism: a morphological study of 670 biopsies. *Helv Paediatr Acta*. 1987;42:145-58.
739. Scorer CG, Farrington GH. Congenital deformities of the testis and epididymis. London, Butterworth, 1971.
740. Elder JS. The undescended testis. Hormonal and surgical management. *Surg Clin North Am*. 1988;68:983-1005.
741. Rune GM, Mayr J, Neugebauer H, et al. Pattern of Sertoli cell degeneration in cryptorchid prepubertal testes. *Int J Androl*. 1992;15:19-31.
742. Huff DS, Fenig DM, Canning DA, et al. Abnormal germ cell development in cryptorchidism. *Horm Res*. 2001;55:11-17.
743. Cortes D. Cryptorchidism: aspects of pathogenesis, histology and treatment. *Scand J Urol Nephrol*. 1999;32 (suppl 196):1-54.
744. Hadziselimovic F. Cryptorchidism. *Adv Anat Embryol Cell Biol*. 1977;53:7-72.
745. Hedinger C. The moment of the earliest recognizable changes of the testicles in cryptorchidism of infants. *Verh Dtsch Ges Path*. 1971;55:172-5.
746. Hadziselimovic F, Herzog B, Busser M. Development of cryptorchid testes. *Eur J Pediatr*. 1987;146 (suppl 2):S8.
747. McAleer IM, Packer MG, Kaplan GW, et al. Fertility index analysis in cryptorchidism. *J Urol*. 1995;153:1255-8.
748. Wilkerson ML, Bartone FF, Fox L, et al. Fertility potential: a comparison of intra-abdominal and intracanalicular testes by age groups in children. *Horm Res*. 2001; 55:18-20.
749. Hadziselimovic F, Snyder HM, Huff D. Impaired gonocyte transformation due to androgen receptor defect. *Pediatrics*. 1999;104:843-4.



750. Cassorla FG, Golden SM, Johnsonbaugh RE, et al. Testicular volume during early infancy. *J Pediatr*. 1981;99:742-3.
751. Forest MG, Sizonenko PC, Cathland AM, et al. Hypophyseo-gonadal function in humans during the first year of life. *J Clin Invest*. 1974;53:819-28.
752. Siebert JR. Testicular weight in infancy (letter). *J Pediatr*. 1982;100:835-6.
753. Hadziselimovic F, Herzog B. The meaning of the Leydig cell in relation to the etiology of cryptorchidism: An experimental electron-microscopic study. *J Pediatr Surg*. 1976;11:1-8.
754. Gendrel D, Roger M, Job JC. Plasma gonadotropin and testosterone values in infants with cryptorchidism. *J Pediatr*. 1980;97:217-20.
755. Hadziselimovic F. Cryptorchidism. In: *International perspectives in Urology*. A Retick & J Cukier (eds), Baltimore, Williams & Williams, pp. 271-81, 1987.
756. Canlorbe P, Toubanc JE, Roger M, et al. Etude de la fonction endocrine dans 125 cas de cryptorchides. *Ann Med Interne*. 1974;125:365-9.
757. Forest MG. Pattern of the response to HCG stimulation in prepubertal cryptorchid boys. In: *Cryptorchidism*. JC Job (ed), *Pediatr Adolesc Endocrinol*, Basel, Karger, pp. 108-20 (vol 6), 1979.
758. Bartolini E, Galli P, Del Genevise A, et al. Pituitary response to constant infusion of LHRH in cryptorchid boys. In: *Cryptorchidism*. J Bierich & A Giariola (eds), London, Academic Press, pp. 351-7, 1979.
759. Cacciari, Cicognani A, Pirazzoli P, et al. Hypophyso-gonadal function in the cryptorchid child: differences between unilateral and bilateral cryptorchids. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1976;83:182-9.
760. De Muinck Keizer-Schrama SM, Hazebroek FW. Hormonal treatment of cryptorchidism: role of pituitary gonadal axis. *Semin Urol*. 1988;6:84-95.
761. Ono K, Sofikitis N. A novel mechanism to explain the detrimental effects of left cryptorchidism on right testicular function. *Yon Acta Med*. 1997;40:79-89.
762. Guo CX, Ma J, Zhou XC, et al. Expression of HSP70-2 gene during germ cell apoptosis in rat unilateral cryptorchid testes. *Arch Androl*. 2001;46:109-15
763. Heiskanen P, Billig H, Toppari J, et al. Apoptotic cell death in the normal and cryptorchid human testis: the effect of human chorionic gonadotropin on testicular cell survival. *Pediatr Res*. 1996;40: 351-6.



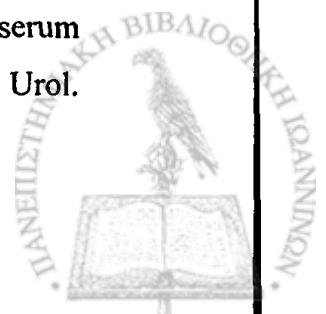
764. Henriksen K, Hakovirta H, Parvinen M. In-situ quantification of stage-specific apoptosis in the rat seminiferous epithelium: effects of short-term experimental cryptorchidism. *Int J Androl.* 1995;18:256-62.
765. Jara M, Esponda P, Carballada R. Abdominal temperature induces region-specific p53-independent apoptosis in the cauda epididymis of the mouse. *Biol Reprod.* 2002;67:1189-96.
766. Nandi S, Bunerjee PP, Zirkin BR. Germ cell apoptosis in the testes of Sprague Dawley rats following testosterone withdrawal by ethane 1,2-dimethanesulfonate administration: relationship to Fas? *Biol Reprod.* 1999;61:70-5.
767. Ogi S, Tanji N, Yokoyama M, et al. Involvement of Fas in the apoptosis of mouse germ cells induced by experimental cryptorchidism. *Urol Res.* 1998;26:17-21.
768. Ohta Y, Nishikawa A, Fukazawa Y, et al. Apoptosis in adult mouse testis induced by experimental cryptorchidism. *Acta Anat (Basel).* 1996;157:195-204.
769. Shikone T, Billing H, Hsueh AJ. Experimentally induced cryptorchidism increases apoptosis in rat testis. *Biol Reprod.* 1994;51:865-72.
770. Socher SA, Yin Y, Dewolf WC, et al. Temperature-mediated germ cell loss in the testis is associated with altered expression of the cell-cycle regulator p53. *J Urol.* 1997;157:1986-9.
771. Tomomasa H, Adachi Y, Oshio S, et al. Germ cell apoptosis in undescended testis: the origin of its impaired spermatogenesis in the TS inbred rat. *J Urol.* 2002;168:343-7.
772. Wang ZQ, Todani T, Watanabe Y, et al. Germ-cell degeneration in experimental unilateral cryptorchidism: role of apoptosis. *Pediatr Surg Int.* 1998;14:9-13.
773. Watts LM, Hasthorpe S, Farmer PJ, et al. Apoptotic cell death and fertility in three unilateral cryptorchid rat models. *Urol Res.* 2000;28:332-7.
774. Yin Y, Hawkins KL, Dewolf WC, et al. Heat stress cause testicular germ cell apoptosis in adult mice. *J Androl.* 1997;18:159-65.
775. Yin Y, DeWolf W, Morgentaler A. Experimental cryptorchidism induces testicular germ cell apoptosis by p53-dependent and -independent pathways in mice. *Biol Reprod.* 1998;58:492-6.
776. Buja LM, Eigenbrodt ML, Eigenbrodt EH. Apoptosis and necrosis: basic types and mechanisms of cell death. *Arch Pathol Lab Med.* 1993;117:1208-14.



777. Kerr J, Wyllie A, Curie A. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972;26:239-57.
778. Wyllie A, Kerr J, Curie A. Cell death the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol*. 1980;68: 251-306.
779. Tapanainen J, Tilly JL, Vihko K, et al. Hormonal control of apoptotic cell death in the testis: gonadotropins and androgens as testicular cell survival factors. *Mol Endocrinol*. 1993;7:643-50.
780. Schwartz LM, Osborne BA. Programmed cell death, apoptosis and killer genes. *Immunol Today*. 1993;14:582-90.
781. Schwartzman RA, Cidlowski JA. Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocr Rev*. 1993,14:133-51.
782. Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol*. 1995;146:3-15.
783. Allan D, Harnon B, Roberts S. Spermatogonial apoptosis has three morphologically recognizable phases and shows no circadian rhythm during normal spermatogenesis in the rat. *Cell Prolif*. 1992;25:241-50.
784. Bartke A. Apoptosis of male germ cells, a generalized or cell type-specific phenomenon. *Endocrinology*. 1995;136:3-4.
785. Billig H, Furuta I, Rivier C, et al. Apoptosis in testis germ cells: developmental changes in gonadotropin dependence and localization to selective tubule stages. *Endocrinology*. 1995;136:5-12.
786. Sinha Hikim AP, Wang C, Leung A, et al. Involvement of apoptosis in the induction of germ cell degeneration in adult rats after gonadotropin-releasing hormone antagonist treatment. *Endocrinology*. 1995;136:2770-75.
787. Blanchard K, Allard E, Boekelheide K. Fate of germ cells in 2,5-hexanedione-induced testicular injury. *Toxicol Appl Pharmacol* 1996;137:141-8.
788. Brinkworth M, Weinbauer G, Schlatt S, et al. Identification of male germ cells undergoing apoptosis in adult rats. *J Reprod Fertile*. 1995;105:25-33.
789. Lec J, Richburg J, Shipp EB, et al. The Fas system, a regulator of germ cell apoptosis, is differentially upregulated in Sertoli cell versus germ cell injury of the testis. *Endocrinology*. 1999;140:852-8.



790. Richburg J, Boekelheide K. Mono-(2-ethylhexyl) phthalate rapidly alters both Sertoli cell vimentin filaments and germ cell apoptosis in young rat testes. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1996;137:42-50.
791. Hasegawa M, Zhang Y, Niibe H, et al. Resistance of differentiating spermatogonia to radiation-induced apoptosis and loss in p53 deficient mice. *Radiat Res.* 1998;149:263-70.
792. Meistrich ML. Effects of chemotherapy and radiotherapy on spermatogenesis. *Eur Urol.* 1993;23:136-41.
793. Henriksen K, Hakovirta H, Parvinen M. Testosterone inhibits and induces apoptosis in rat seminiferous tubules in a stage-specific manner: in situ quantification in squash preparations after administration of ethane dimethane sulfonate. *Endocrinology.* 1995;136:3285-91.
794. Troiano L, Faustini M, Lovato E, et al. Apoptosis and spermatogenesis: evidence from an in vitro model of testosterone withdrawal in the adult rat. *Biochem Biophys Res Comm.* 1994;202:1315-21.
795. Woolveridge I, de Boer-Brower M, Taylor MF, et al. Apoptosis in the rat spermatogenic epithelium following androgen withdrawal: changes in apoptosis-related genes. *Biol Reprod.* 1999;60:461-70.
796. Lue Y, Sinha Hikim AP, Swerdloff RS, et al. Single exposure to heat induces stage-specific germ cell apoptosis in rats: role of intratesticular testosterone on stage specificity. *Endocrinology* 1999;140:1709-17.
797. Yin Y, Stahl BC, Dewolf WC, et al. p53 and Fas are sequential mechanisms of testicular germ cell apoptosis. *J Androl.* 2002;23:64-70.
798. Rapaport FT, Sampath A, Kano K, et al. Immunologic effects of thermal injury. I. Inhibition of spermatogenesis in guinea pig. *J Exp Med.* 1969;130:1411-22.
799. Sinisi AA, Pasquali D, Papparella A, et al. Antisperm antibodies in cryptorchidism before and after surgery. *J Urol.* 1998;160:1834-7.
800. Mirilas P, De Almeida M. Absence of antisperm surface antibodies in prepubertal boys with cryptorchidism and other anomalies of the inguinoscrotal region before and after surgery. *J Urol.* 1999;162:177-81.
801. Mirilas P, Mamoulakis Ch, De Almeida M. Puberty does not induce serum antisperm surface antibodies in previously operated chryptorchids. *J Urol.* 2003;170: 2432-5.



802. Richburg J. The relevance of spontaneous- and chemically-induced alterations in testicular germ cell apoptosis to toxicology. *Toxicol letters*. 2000;112-113:79-86.
803. Tsukuda T, Tomooka Y, Takai S. Enhanced proliferative potential in culture of cells from p53-deficient mice. *Oncogene*. 1993;8:3313-22.
804. Skeikh MS, Fornace AJ. Role of p53 family members in apoptosis. *J Cell Physiol*. 2000;182:171-81.
805. Beumer TL, Roepers-Gajadien HL, Gademan IS, et al. The role of the tumor suppressor p53 in spermatogenesis. *Cell Death Differ*. 1998;5:669-77.
806. Lee CH, Chang L, Wei LN. Molecular cloning and characterization of a mouse nuclear orphan receptor expressed in embryos and testes. *Mol Reprod Dev*. 1996;44: 305-14.
807. Mu X, Liu Y, Collins LL, et al. The p53/retinoblastoma-mediated repression of testicular orphan receptor-2 in the rhesus monkey with cryptorchidism. *J Biol Chem*. 2000;275:23877-83.
808. Nagata S, Goldstein P. The Fas death factor. *Science*. 1995;267:1449-56.
809. French LE, Hahne M, Viard I, et al. Fas and Fas ligand in embryos and adult mice: ligand expression in several immune-privileged tissues and coexpression in adult tissues characterized by apoptotic cell turnover. *J Cell Biol*. 1996;133:335-43.
810. Bellgrau D, Gold D, Selawry H, et al. A role for CD95 ligand in preventing graft rejection. *Nature*. 1995;377:630-2.
811. Pentikainen V, Erkkila K, Dunkel L. Fas regulates germ cell apoptosis in the human testis in vitro. *Am J Physiol*. 1999;276:E310-E316.
812. Lee J, Richburg J, Younkin SC, et al. The Fas system is a key regulator of germ cell apoptosis in the testis. *Endocrinology*. 1997;138:2081-8.
813. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science*. 1998;281:1322-6.
814. Korsmeyer SJ. BCL-2 gene family and the regulation of programmed cell death. *Cancer Res*. 1999;59 Suppl:1693s-1700s.
815. Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev*. 1999;13:1899-911.



816. Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*. 1993;74:609-19.
817. Knudson CM, Tung KS, Tourtellotte WG, et al. Bax-deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death. *Science*. 1995; 270:96-9.
818. Print CG, Loveland KL, Gibson L, et al. Apoptosis regulator bcl-w is essential for spermatogenesis but appears otherwise redundant. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95:12424-31.
819. Furuchi T, Masuko K, Nishimune Y, et al. Inhibition of testicular germ cell apoptosis and differentiation in mice misexpressing Bcl-2 in spermatogonia. *Development*. 1996;122:1703-9.
820. Rodriguez I, Ody C, Araki K, et al. An early and massive wave of germinal cell apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis. *EMBO J*. 1997;16:2262-70.
821. Yamamoto CM, Sinha Hikim AP, Huynh PN, et al. Redistribution of Bax is an early step in an apoptotic pathway leading to germ cell death in rats, triggered by mild testicular hyperthermia. *Biol Reprod*. 2000;63:1683-90.
822. Xu J, Xu Z, Jiang Y, et al. Cryptorchidism induces mouse testicular germ cell apoptosis and changes in bcl-2 and bax protein expression. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*. 2000;19:25-33.
823. UK Testicular Cancer Study Group. Social, behavioural and medical factors in the aetiology of testicular cancer: results from the UK study. *Br J Cancer*. 1994;70: 513-20.
824. UK Testicular Cancer Study Group. Aetiology of testicular cancer: association with congenital abnormalities, age at puberty, infertility, and exercise. *BMJ*. 1994; 308:1393-9.
825. Cortes D, Thorup JM, Visfeldt J. Cryptorchidism: aspects of fertility and neoplasms. *Horm Res*. 2001;55:21-7.
826. Farrer JH, Walker AH, Rajfer J. Management of the postpubertal cryptorchid testis: a statistical review. *J Urol*. 1985;134:1071-6.
827. Whitaker RH. Neoplasia in cryptorchid men. *Semin Urol*. 1988;6:107-9.
828. Woodhouse CJ. Undescended testes. In: Long-Term Paediatric Urology. Woodhouse CJR (ed), Oxford, Blackwell Scientific, pp. 167-175,1991.



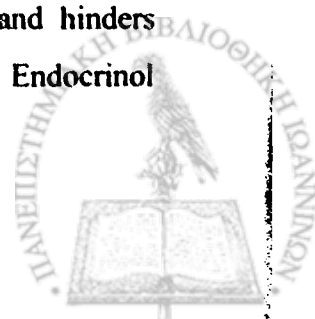
829. Moller H, Prener A, Skakkebaek NE. Testicular cancer, cryptorchidism, inguinal hernia, testicular atrophy, and genital malformations: case-control studies in Denmark. *Cancer Causes Control*. 1996;7:264-74.
830. Stone JM, Cruickshank DG, Sandeman TF, et al. Laterality, maldescent, trauma and other clinical factors in the epidemiology of testis cancer in Victoria, Australia. *Br J Cancer*. 1991;64:132-8.
831. Martin DC. Malignancy in the cryptorchid testis. *Urol Clin North Am*. 1982;9:371-6.
832. Martin DC, Menck HR. The undescended testis: management after puberty. *J Urol*. 1975;114:77-9.
833. Campbell HE. Incidence of the malignant growth of the undescended testicle. A critical and statistical study. *Arch Surg*. 1942 ;44:353-69.
834. Abratt RP, Reddi VB, Sarembock LA. Testicular cancer and cryptorchidism. *Br J Urol*. 1992;70:656-9.
835. Batata MA, Whitmore WF, Chu FC, et al. Cryptorchidism and testicular cancer. *J Urol*. 1980;124:382-7.
836. Martin DC. Germinal cell tumors of the testis after orchiopexy. *J Urol*. 1979;121:422-4.
837. Doi O, Itoh F, Aoyama K. Mature teratoma arising in intraabdominal undescended testis in an infant with previous inguinal exploration: case report and review of intraabdominal testicular tumors in children. *J Pediatr Surg*. 2002;37:1236-8.
838. Miller FH, Whitney WS, Fitzgerald SW, et al. Seminomas complicating undescended intraabdominal testes in patients with prior negative findings from surgical exploration. *AJR Am J Roentgenol*. 1999;172:425-8.
839. Skakkebaek NE, Berthelsen JG, Giwercman A, et al. Carcinoma-in-situ of the testis: possible origin from gonocytes and precursor of all types of germ cell tumours except spermatocytoma. *Int J Androl*. 1987;10:19-28.
840. Giwercman A, Bruun E, Frimodt Moller C, et al. Prevalence of carcinoma in situ and other histopathological abnormalities in testes of men with a history of cryptorchidism. *J Urol*. 1989;142:998-1002.
841. Ford TF, Parkinson MC, Pryor JP. The undescended testis in adult life. *Br J Urol*. 1985;57:181-4.



842. Von der Maase H, Rorth M, Walbom-Jørgensen S, et al. Carcinoma in situ of contralateral testis in patients with testicular germ cell cancer: study of 27 cases in 500 patients. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1986;293:1398-401.
843. Sigg C, Hedinger C. Zur Bedeutung der sogenannten atypischen Keimzellen des Hodens. *Zentralbl Haut*. 1983;148:1027-33.
844. Giwercman A, Muller J, Skakkebaek NE. Cryptorchidism and testicular neoplasia. *Horm Res*. 1988;30:157-63.
845. Johnson DE, Woodhead DM, Pohl DR, et al. Cryptorchism and testicular tumorigenesis. *Surgery*. 1968;63:919-22.
846. Prener A, Engholm G, Jensen OM. Genital anomalies and risk for testicular cancer in Danish men. *Epidemiology*. 1996;7:14-9.
847. Simoni M, Bakker E, Eurlings MC, et al. Laboratory guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions. *Int J Androl*. 1999;22:292-9.
848. Simoni M, Bakker E, Krausz C. EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of y-chromosomal microdeletions. State of the art 2004. *Int J Androl*. 2004; 27:240-9.
849. Neumaier M, Braun A, Wagener C. Fundamentals of quality assessment of molecular amplification methods in clinical diagnostics. International Federation of Clinical Chemistry Scientific Division Committee on Molecular Biology Techniques. *Clin Chem*. 1998;44:12-26.
850. Curtis D, Sham PC. A note on the application of the transmission disequilibrium test when a parent is missing. *Am J Hum Genet*. 1995;56:811-2.
851. Thomson G. Mapping disease genes: family-based association studies. *Am J Hum Genet*. 1995;57:487-98.
852. Sham PC, Curtis D. An extended transmission/disequilibrium test (TDT) for multi-allele marker loci. *Ann Hum Genet*. 1995;59:323-36.
853. <http://allelelab.biol.berkeley.edu/~mprn/afbac.html>.
854. <http://www.smd.qmul.ac.uk/statgen/dcurtis/software.html>.
855. Skaletsky H, Kuroda-Kawaguchi T, Minx PJ, et al. The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature*. 2003; 423:825-37.



856. Vogt PH, Edelmann A, Kirsch S, et al. Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11. *Hum Mol Genet.* 1996;5: 933-43.
857. Kuroda-Kawaguchi T, Skaletsky H, Brown LG, et al. The AZFc region of the Y chromosome features massive palindromes and uniform recurrent deletions in infertile men. *Nat Genet.* 2001;29: 279-86.
858. Repping S, Skaletsky H, Lange J, et al. Recombination between palindromes P5 and P1 on the human Y chromosome causes massive deletions and spermatogenic failure. *Am J Hum Genet.* 2002;71:906-22.
859. Repping S, Skaletsky H, Brown L, et al. Polymorphism for a 1.6-Mb deletion of the human Y chromosome persists through balance between recurrent mutation and haploid selection. *Nat Genet.* 2003;35:247-51.
860. Vogt PH, Fernandes S. Polymorphic DAZ gene family in polymorphic structure of AZFc locus: Artwork or functional for human spermatogenesis? *APMIS.* 2003;111: 115-27.
861. Ferlin A, Tessari A, Ganz F, et al. Association of partial AZFc region deletions with spermatogenic impairment and male infertility. *J Med Genet.* 2005;42:209-13.
862. Ferlin A, Arredi B, Foresta C. Genetic causes of male infertility. *Reprod Toxicol.* 2006;22:133-41.
863. Krausz C, Degl'Innocenti S. Y chromosome and male infertility: update, 2006. *Front Biosci.* 2006;11:3049-61.
864. Adham IM, Emmen JM, Engel W. The role of the testicular factor INSL3 in establishing the gonadal position. *Mol Cell Endocrinol.* 2000;160:11-6.
865. Scott DJ, Wilkinson TN, Zhang S, et al. Defining the LGR8 residues involved in binding insulin-like peptide 3. *Mol Endocrinol.* 2007;21:1699-712.
866. Roh J, Virtanen H, Kumagai J, et al. Lack of LGR8 gene mutation in Finish patients with a family history of cryptorchidism. *Reprod Biomed Online.* 2003; 7:400-6.
867. Bogatcheva NV, Ferlin A, Feng S, et al. T222P mutation of the insulin-like 3 hormone receptor LGR8 is associated with testicular maldescent and hinders receptor expression on the cell surface membrane. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007;292:E138-44.



868. Nuti F, Marinari E, Erdei E, et al. The LGR8 gene T222P mutation does not cause cryptorchidism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007 Dec 11 [Epub ahead of print]
869. Klonisch T, Hoang-Vu C, Hombach-Klonisch S. Relaxine-like peptides in neoplastic lesions. *Curr Med Chem: Immunol Endocr Metab Agents* 2005;5:431-8.
870. Bay K, Schumacher M, Hartung S, et al. Relaxin-like factor (RLF)/ Insulin -like hormone 3 (INSL3) measured in newborn and 3-month-old normal and cryptorchid boys. *Horm. Res.* 2004;62 (Suppl 2):P2-434.
871. Hammond GL. Potential functions of plasma steroid-binding proteins *Trends Endocrinol. Metab.* 1995;6:298-304.
872. Munell F, Suarez-Quian CA, Selva DM, et al. Androgen-binding protein and reproduction: where do we stand? *J Androl.* 2002;23:598-609.
873. French FS, Ritzen EM. A high-affinity androgen-binding protein (ABP) in rat testis: evidence for secretion into efferent duct fluid and absorption by epididymis. *Endocrinology.* 1973;93:88-95.
874. Danzo BJ, Eller BC, Orgebin-Crist MC. Studies on the site of origin of the androgen binding protein present in epididymal cytosol from mature intact rabbits. *Steroids.* 1974;24:107-22.
875. Gunsalus GL, Musto NA, Bardin W. Immunoassay of androgen binding protein in blood: a new approach for study of the seminiferous tubule. *Science.* 1978;200:65-6.
876. Hagenas L, Ritzen EM, Plooen L, et al. Sertoli cell origin of testicular androgen-binding protein (ABP). *Mol Cell Endocrinol.* 1975;2:339-50.
877. Westphal U. Steroid-protein interactions II. *Monogr Endocrinol.* 1986;27:1-603.
878. Pelliniemi LJ, Dym M, Gunsalus GL, et al. Immunocytochemical localization of androgen-binding protein in the male rat reproductive tract. *Endocrinology.* 1981;108:925-31.
879. Joseph DR. Structure, function, and regulation of androgen-binding protein/sex hormone-binding globulin. *Vitam Horm.* 1994;49:197-280.
880. Hammond GL, Underhill DA, Rykx HM, et al. The human sex hormone-binding globulin gene contains exons for androgen-binding protein and two other testicular messenger RNAs. *Mol Endocrinol.* 1989;3:1869-76.



881. Berube D, Seralini GE, Gagne R, et al. Localization of the human sex hormone-binding globulin gene (SHBG) to the short arm of chromosome 17 (17p12-p13). *Cytogenet Cell Genet.* 1990;54:65-7.
882. Selva DM, Hammond GL. Human sex hormone-binding globulin is expressed in testicular germ cells and not in sertoli cells. *Horm Metab Res.* 2006;38:230-5.
883. Khan MS, Knowles BB, Aden DP, et al. Secretion of testosterone-estradiol-binding globulin by a human hepatoma-derived cell line. *J Clin Endocrinol Metab.* 1981;53:448-9.
884. Janne M, Hogeveen KN, Deol HK, et al. Expression and regulation of human sex hormone-binding globulin transgenes in mice during development. *Endocrinology.* 1999 Sep;140(9):4166-74.
885. Selva DM, Hogeveen KN, Hammond GL. Repression of the human sex hormone-binding globulin gene in Sertoli cells by upstream stimulatory transcription factors. *J Biol Chem.* 2005;280:4462-8.
886. Gershagen S, Lundwall A, Fernlund P. Characterization of the human sex hormone binding globulin (SHBG) gene and demonstration of two transcripts in both liver and testis. *Nucleic Acids Res.* 1989;17:9245-58.
887. Selva DM, Hogeveen KN, Seguchi K, et al. A human sex hormone-binding globulin isoform accumulates in the acrosome during spermatogenesis. *J Biol Chem.* 2002;277:45291-8.
888. Von Schoultz B, Carlstrom K. On the regulation of sex-hormone-binding globulin--a challenge of an old dogma and outlines of an alternative mechanism. *J Steroid Biochem.* 1989;32:327-34.
889. Longcope C, Feldman HA, McKinlay JB, et al. Diet and sex hormone-binding globulin. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85:293-6.
890. Meikle AW, Stanish WM, Taylor N, et al. Familial effects on plasma sex-steroid content in man: testosterone, estradiol and Sex-hormone-binding globulin. *Metabolism.* 1982;31:6-9.
891. Jaquish CE, Blangero J, Haffner SM, et al. Quantitative genetics of serum sex hormone-binding globulin levels in participants in the San Antonio Family Heart Study. *Metabolism.* 1997;46:988-91.



892. An P, Rice T, Gagnon J, et al. A genetic study of sex hormone-Binding globulin measured before and after a 20-week endurance exercise training program: The HERITAGE Family Study. *Metabolism*. 2000;49:1014-20.
893. Ring HZ, Lessov CN, Reed T, et al. Heritability of plasma sex hormones and hormone binding globulin in adult male twins. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90:3653-8.
894. Haiman CA, Riley SE, Freedman ML, et al. Common genetic variation in the sex steroid hormone-binding globulin (SHBG) gene and circulating shbg levels among postmenopausal women: the Multiethnic Cohort. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90:2198-204.
- 895. Barthold JS, Manson J, Regan V, Si X, Hassink SG, Coughlin MT, Lee PA. Reproductive hormone levels in infants with cryptorchidism during postnatal activation of the pituitary-testicular axis. *J Urol*. 2004;172:1736-41.
896. Raivio T, Toppari J, Kaleva M, et al. Serum androgen bioactivity in cryptorchid and noncryptorchid boys during the postnatal reproductive hormone surge. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88:2597-9.

