

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Ε. ΚΑΝΑΒΑΚΗΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ

«ΕΡΕΥΝΑ ΣΤΗ ΓΥΝΑΙΚΕΙΑ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ»

ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ INSL3, HOXD13, HOXA10 ΓΙΑ ΠΙΘΑΝΗ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ
ΤΗΝ ΕΜΦΑΝΙΣΗ ΤΗΣ ΜΕΜΟΝΩΜΕΝΗΣ ΚΡΥΨΟΡΧΙΑΣ ΣΤΟΝ ΕΛΛΑΔΙΚΟ ΧΩΡΟ

ΒΑΠΠΑ ΣΟΦΙΑ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΑΘΗΝΑ

ΙΟΥΝΙΟΣ 2013



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΟΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΑΘΗΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

&



ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΑΘΗΝΑΣ ΤΜΗΜΑ ΜΑΙΕΥΤΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΕΡΕΥΝΑ ΣΤΗ ΓΥΝΑΙΚΕΙΑ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ»

ΤΙΤΛΟΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ INSL3, HOXD13, HOXA10 ΓΙΑ ΠΙΘΑΝΗ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΤΗΝ
ΕΜΦΑΝΙΣΗ ΤΗΣ ΜΕΜΟΝΩΜΕΝΗΣ ΚΡΥΨΟΡΧΙΑΣ ΣΤΟΝ ΕΛΛΑΔΙΚΟ ΧΩΡΟ

Όνομα μεταπτυχιακού/ής φοιτητή/φοιτήτριας: Βάππα Σοφία

Ιδιότητα: Βιολόγος

ΑΜ: 20110250

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

1. Χριστίνα Κανακά-Gantenbein,

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παιδιατρικής Ενδοκρινολογίας και Νεανικού Διαβήτη

Επιβλέπουσα

2. Καναβάκης Εμμανούηλ

Καθηγητής Ιατρικής ΕΚΠΑ

3. Χρισταλένα Σοφοκλέους

Μοριακή Βιολόγος

Ευχαριστίες

Η παρούσα μελέτη χαρακτηρίζεται ως κλινική μη παρεμβατική και πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής του Πανεπιστημίου Αθηνών στο Χωρέμιο Ερευνητικό Κέντρο. Στην υλοποίηση της παρούσας μελέτης συντέλεσε μια πλειάδα ατόμων που θα ήταν παράλειψή μου να μην αναφέρω και να μην ευχαριστήσω.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμότατα την Δρ. Χριστίνα Κανακά-Gantenbein, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ενδοκρινολογίας και Νεανικού Διαβήτη του Πανεπιστημίου Αθηνών για την συμβολή της στην υλοποίηση της παρούσας μελέτης και για την στήριξή της καθ' όλη τη διάρκεια της συνεργασίας μας. Την ευχαριστώ πολύ για το γεγονός ότι πίστεψε σε εμένα, με εμπιστεύθηκε και ήταν πρόθυμη να συζητήσει μαζί μου όποια επιθυμία μου για την βέλτιστη υλοποίηση της μελέτης.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερος τον Καθηγητή και Διευθυντή του Εργαστηρίου Ιατρικής Γενετικής, κο Καναβάκη Εμμανούηλ για την εξίσου στήριξή του στην διεκπεραίωση της μελέτης τόσο ηθικά όσο και υλικά αλλά και για την καθοδήγησή του ώστε να ξεπεραστούν οι δυσκολίες που παρουσιάστηκαν.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω θερμά την Δρ. Σοφοκλέους Χρισταλένα, υπεύθυνη του εργαστηρίου Γενετικής όπου διεκπεραιώθηκε η μελέτη για την στήριξή της και την καθοδήγησή της στη διεκπεραίωση του εργαστηριακού μέρους της μελέτης που χωρίς εκείνη θα ήταν δύσκολο να ολοκληρωθεί αλλά και για την βοήθειά της στην κατανόηση εννοιών και διαδικασιών που μου ήταν άγνωστες.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την Ομότιμη Καθηγήτρια κα Μαύρου για την παραχώρηση του χώρου του εργαστηρίου που διευθύνει αλλά και την βοήθειά της στην ολοκλήρωση ενός μέρους της πειραματικής διαδικασίας.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τις Χειρουργικές Κλινικές των δύο νοσοκομείων Παίδων «Αγία Σοφία» και Παίδων «Αγλαΐα Κυριακού» για την δυνατότητα που μου παρείχαν να επικοινωνώ και να συλλέγω δείγματα από τους ασθενείς καθώς και τον κο Νίκα για την καθοδήγησή του στο κλινικό μέρος της μελέτης. Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης την κα Συνοδινού για τα δείγματα που μας εξασφάλισε για την ομάδα ελέγχου.

Οπωσδήποτε δεν θα μπορούσα να παραλείψω να ευχαριστήσω το προσωπικό και τους μεταπτυχιακούς και διδακτορικούς φοιτητές του εργαστηρίου. Ιδιαίτερα δε θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κο Πετηχάκη για την βοήθειά του στην κατανόηση και την διεκπεραίωση εργαστηριακών τεχνικών καθώς και τον Σπύρο, την Έφη, την Γιάννα, την Ανθή που συντέλεσαν στην πιο άμεση και καθολική υλοποίηση της μελέτης.

Περιεχόμενα	
1. Περίληψη στα αγγλικά και στα ελληνικά	1
1. A. Abstract	1
1. B. Περίληψη	2
Γενικό Μέρος	4
2. A Ορισμός	4
2. B. Διαφοροποίηση του φύλου	4
2. Γ. Εμβρυολογία της καθόδου των όρχεων	5
3. Ταξινόμηση	9
3. A. Ταξινόμηση ανάλογα με την εντόπιση	9
3. B. Ταξινόμηση ανάλογα με τις μορφές κρυπορχίας	10
3B.1 Συνδρομική Κρυπορχία	11
3B.2 Μεμονωμένη κρυπορχία	12
4. Συχνότητα εμφάνισης	13
5. Αίτια	16
5. 5. A Γενετικά Αίτια	17
5. A. 1 INSL3 και Υποδοχέας του INSL3	17
5. A. 2A Ανδρογόνα και κρυπορχία	22
5.A. 2B Ανδρογονικός υποδοχέας	22
5.A. 3 Οιστρογόνα και κρυπορχία	23
5.A.4 SF-1	25
5.A.5 Γονίδια HOX	26
5.A.5A Hoxa10 and Hoxa11	26
5.A.5B. HoxD13	27
5.A.6 Αλληλεπιδράσεις γονιδίων στην κρυπορχία	28
5.A.7 Χρωμοσωμικές ανωμαλίες	28
5.A.8 Υ χρωμόσωμα	29
5.B Περιβαλλοντικά Αίτια/ Ενδοκρινικοί διαταράκτες και κρυπορχία	30
6. Παράγοντες κινδύνου	34
7. Επιπτώσεις της κρυπορχίας	36
7.A. Υπογονιμότητα	36
7.B. Καρκίνος των όρχεων	41
7.Γ. Ψυχολογική επιβάρυνση	44
8. Διάγνωση	44

8.A. Κλινική εξέταση	44
8.B. Εργαστηριακή Διερεύνηση	47
8.Γ. Αδυναμίες δημοσιευμένων μελετών	49
9. Θεραπεία	50
9.A. Χειρουργική Θεραπεία	50
9.B. Ορμονική Θεραπεία	52
9. Γ. Συνδυασμός Χειρουργικής και Ορμονικής Θεραπείας	52
Ειδικό μέρος	54
1. Σκοπός της μελέτης	54
2. Ασθενείς και Μάρτυρες	54
3. Υλικό και μέθοδοι	55
3. Α. Απομόνωση γενωμικού DNA από δείγμα ολικού αίματος	55
3. Β. Ποσοτικός προσδιορισμός και έλεγχος της καθαρότητας του ολικού DNA	55
3. Γ. Επιλογή των γονιδίων INSL3, HOXD13 και HOXA10	56
3. Δ. Σχεδιασμός εκκινητών	57
3. Ε. Ποιοτικός προσδιορισμός εξωνίων INSL3, HOXD13, HOXA10 με κλασική PCR	60
3. Ζ. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης	62
3. ΣΤ. Ανίχνευση μεταλλάξεων μέσω πρωτοκόλλου ECMA	64
3. Ζ. Ανάλυση ακολουθίας /Άμεσος προσδιορισμός πρωτοταγούς δομής DNA	66
3.Z.1 Ενζυμικός καθαρισμός του PCR προϊόντος	68
3. Ζ. 2 Αντίδραση Sequencing	69
3.Z.3 Καθαρισμός της αντίδρασης αλληλούχισης με αιθανόλη	69
4. Αποτελέσματα	71
5. Συμπεράσματα – Συζήτηση	82
6. Βιβλιογραφία	86
7. Παραρτήματα	89
7.A. Επεξηγηματικός πίνακας συντμήσεων	89
7.B. Έντυπο Συγκατάθεσης	93
7.Γ. Φυλλάδιο καταγραφής ιστορικού	94

1. Περίληψη στα αγγλικά και στα ελληνικά

1. A. Abstract

Cryptorchidism is defined as the failure of at least one testis to descend into the scrotum. It has an estimated prevalence of 2–4% even though there has been an increase in its prevalence during the last decades. Cryptorchidism is often associated with future reduced fertility or testicular cancer. Cryptorchidism can occur as an isolated anomaly or may be associated with other congenital disorders in the context of a defined syndrome. Factors that may predispose to cryptorchidism include prematurity, low birth weight, small size for gestational age (SGA), twin pregnancy and maternal diabetes. There is evidence that endocrine disruptors, androgen, estrogen and few genes are responsible for cryptorchidism while last studies confirm that the interactions among genes play a critical role in the incidence of cryptorchidism.

In the present study the correlation between genes such as INSL3, HOXD13 and HOXA10 with the pathogenesis of isolated cryptorchidism in Greece was evaluated. Although a low prevalence of mutations or polymorphisms in the investigation of cryptorchidism cases has been reported in the literature, nevertheless a genetic analysis of cases of cryptorchidism in Greece could elucidate the possible role of genetic factors in Greece, since cryptorchidism depends from the geographic area. A total of 43 patients with mean age 3 years were tested. Concerning the INSL3 gene a new variant in the 5' untranslated region, * -109 T>A was observed. Furthermore the presence of two synonymous polymorphisms 27G>A and 126A>G and a missense polymorphism of the 178A>G both in heterozygous and homozygous condition were found.

Concerning the HOXD13 gene an unknown variant in the 3' untranslated region the reversal *528*529 was revealed, as well as a synonymous polymorphism 204G>A, two polymorphisms *311C> T and *360A> T in the 3' untranslated region and was also observed in a patient an insertion * 359_*360insT in the 3' untranslated region. In some patients we have observed an expansion of the polymorphic microsatellite sequence CA in an intronic region. As a consequence of the two so far unpublished findings in the literature we have also tested 20 males of

reproductive age as control group of the general population. In the control group, a large number of individuals carried the polymorphisms 27G> A, 126A> G and 178A> G, but none of them showed the variant * -109 T>A. Moreover, some of our patients demonstrated a combination of polymorphic alleles, affecting both the INSL3 and the HOXD13 genes, probably suggesting an interaction between these two genes in the pathogenesis of cryptorchidism.

1.B Περίληψη

Ως κρυφορχία ορίζεται η αποτυχία του ενός ή και των δύο όρχεων να κατέλθουν μέσα στο όσχεο και εμφανίζεται με μια συχνότητα της τάξης του 2-4%, ενώ τα τελευταία χρόνια η συχνότητα της κρυφορχίας έχει αυξηθεί. Η κρυφορχία μπορεί να συνοδεύεται από εμφάνιση καρκίνου των όρχεων και μειωμένη γονιμότητα. Η κρυφορχία κατηγοριοποιείται σε μεμονωμένη και συνδρομική. Η προωρότητα, το χαμηλό βάρος γέννησης, η υπολειπόμενη ενδομήτρια ανάπτυξη, η δίδυμη κύηση, ο διαβήτης της μητέρας αποτελούν παράγοντες κινδύνου ενώ σαν αίτια εμφάνισης της κρυφορχίας έχουν περιγραφεί οι ενδοκρινικοί διαταράκτες, τα ανδρογόνα, τα οιστρογόνα αλλά και αρκετά γονίδια. Τελευταίες μελέτες δείχνουν ότι καθοριστικό ρόλο παίζουν και οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των γονιδίων.

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η σχέση των γονιδίων INSL3, HOXD13 και HOXA10 με την αιτιοπαθογένεια της μεμονωμένης κρυφορχίας στον ελλαδικό χώρο. Ακόμα και χαμηλή συχνότητα μεταλλάξεων ή πολυμορφισμών να έχει αναφερθεί για αυτά τα γονίδια θα άξιζε να πραγματοποιηθεί ένας έλεγχος στον ελλαδικό χώρο δεδομένου ότι η κρυφορχία έχει αναφερθεί ότι εξαρτάται από το γεωγραφικό χώρο.

Συνολικά ελέγχθηκαν 43 ασθενείς με μέσο όρο ηλικίας τα 3 έτη. Στο γονίδιο INSL3 παρατηρήθηκε μια νέα αλλαγή στην 5' αμετάφραστη περιοχή η * -109 T>A. Διαπιστώθηκε η παρουσία δύο συνώνυμων πολυμορφισμών των 27G>A και 126A>G, καθώς και ενός παρανοηματικού πολυμορφισμού, του 178A>G τόσο σε ετεροζυγωτία όσο και ομοζυγωτία.

Στο γονίδιο HOXD13 αποκαλύφθηκε μια νέα άγνωστη αλλαγή στην 3'

αμετάφραστη περιοχή, η αναστροφή *528*529inversion, ο συνώνυμος πολυμορφισμός, 204G>A, δύο πολυμορφισμοί οι *311C>T και *360A>T στην 3' αμετάφραστη περιοχή, ενώ σε έναν ασθενή παρατηρήθηκε μια ένθεση η *359_*360insT στην 3' αμετάφραστη περιοχή. Σε μερικούς ασθενείς παρατηρήθηκε επέκταση της πολυμορφικής μικροδορυφορικής αλληλουχίας CA σε εσωνική περιοχή του γονιδίου.

Για την περεταίρω διερεύνηση των δύο αδημοσίευτων στην βιβλιογραφία ευρημάτων ελέγχθηκαν και 20 άρρενες μάρτυρες αναπαραγωγικής ηλικίας του γενικού πληθυσμού. Στην ομάδα ελέγχου, μεγάλος αριθμός ατόμων εμφάνισε της πολυμορφισμούς 27G>A, 126A>G και 178A>G. Ωστόσο κανένας μάρτυρας δεν εμφάνισε την αλλαγή *-109 T>A. Επιπλέον, αρκετοί ασθενείς (n=15) παρουσίαζαν συνδυασμό πολυμορφισμών τόσο στο γονίδιο INSL3 όσο και στο γονίδιο HOXD13, υποδηλώνοντας ότι ο συνδυασμός πολυμορφισμών διαφορετικών γονιδίων μπορεί να εμπλέκεται στην αιτιοπαθογένεια της κρυφορχίας. Σαφώς περαιτέρω μελέτες σε μεγαλύτερο αριθμό αγοριών με επιβεβαιωμένη κρυφορχία και αντίστοιχο αριθμό αγοριών χωρίς ιστορικό κρυφορχίας είναι απαραίτητες για την πλήρη διερεύνηση του ρόλου των διαπιστωθέντων πολυμορφισμών.

2. Γενικό μέρος

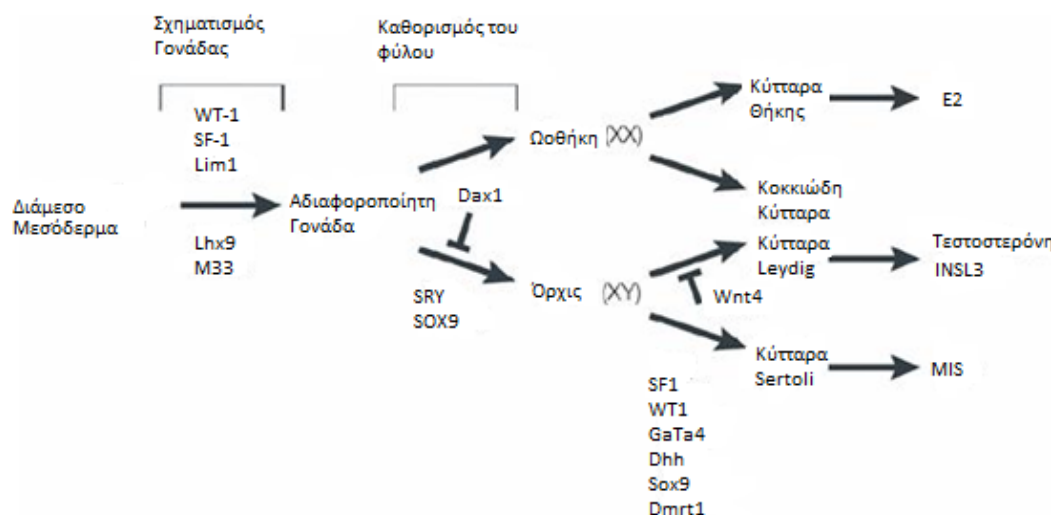
2. Α Ορισμός

Ο όρος κρυφορχία προέρχεται από της ελληνικές λέξεις «κρυπτός» και «όρχις» (1). Ως κρυφορχία ορίζεται η απουσία τουλάχιστον του της εκ των δύο όρχεων από το όσχεο (2). Ο μη κατελθών όρχις μπορεί να βρίσκεται κατά μήκος της φυσιολογικής διαδρομής της καθόδου των όρχεων ή σε έκτοπη θέση (3). Η αληθής κρυφορχία είναι μια κατάσταση όπου ο όρχις ενώ θα έπρεπε φυσιολογικά να είναι στη βάση του οσχέου βρίσκεται στην κοιλιακή κοιλότητα (1). Η κρυφορχία είναι μια από της πιο συχνές συγγενείς ανωμαλίες του ουροποιογεννητικού συστήματος στα άρρενα νεογνά. Ο όρος μη κατελθών όρχις περιλαμβάνει τόσο της μη ψηλαφητούς όσο και της ψηλαφητούς άνωθεν του οσχέου όρχεις που δεν μπορούν να κατέλθουν στο όσχεο ή δεν μπορούν να παραμείνουν στο όσχεο μέχρι και τον έκτο μήνα ζωής των νεογνών (4). Επιπλέον, η παλινδρόμηση των όρχεων σε ψηλότερη θέση μετά τη γέννηση μπορεί να οδηγήσει σε επίκτητη κρυφορχία (5). Η κρυφορχία μπορεί είτε να αποκατασταθεί αυτόματα είτε όχι καθώς και να εμφανιστεί για πρώτη φορά κατά την παιδική ηλικία (6).

2. Β. Διαφοροποίηση του φύλου

Κατά την 7^η εβδομάδα κύησης ξεκινά η διαφοροποίηση των αδιαφοροποίητων δομών του φύλου προς έσω και έξω γεννητικά όργανα. Οι αδιαφοροποίητες δομές είναι η γεννητική ακρολοφία, τα αρχέγονα γεννητικά κύτταρα, το σύστημα των γεννητικών πόρων του Wolff και του Muller και τα αδιαφοροποίητα έξω γεννητικά όργανα. Η φυσιολογική διαφοροποίηση του φύλου στο άρρεν πραγματοποιείται σε δύο στάδια. Στο πρώτο στάδιο καθοριστικό ρόλο παίζουν τα γονίδια SF-1, WT-1, SRY, SOX9 για την διαφοροποίηση της αρχέγονης γονάδας σε όρχι (καθορισμός του φύλου=sex determination). Στη συνέχεια υπό την επίδραση ορμονών που παράγονται από τον όρχι ακολουθεί η διαφοροποίηση των έσω και έξω γεννητικών οργάνων (sex differentiation). Κατά την έβδομη εβδομάδα κύησης αρχίζει η παραγωγή της αντιμυλλεριακής ορμόνης (AMH or MIS) από τα

κύτταρα Sertoli η οποία συντελεί στην υποστροφή των πόρων του Mueller. Κατά την 8^η εβδομάδα κύησης αρχίζει η έκκριση τεστοστερόνης από τα κύτταρα Leydig με αποτέλεσμα την διαφοροποίηση των πόρων του Wolff σε έσω γεννητικά όργανα αρρενος και την διαφοροποίηση των έξω γεννητικών οργάνων σε φυσιολογικό αρρενα φαινότυπο.



Εικόνα 1. Παράγοντες που επιδρούν στην διαφοροποίηση του φύλου

2. Γ. Εμβρυολογία της καθόδου των όρχεων

Η διαφοροποίηση των γεννητικών οργάνων του αρρενος είναι μια πολύπλοκη διαδικασία που περιλαμβάνει μια σειρά γεγονότων συμπεριλαμβανομένης μιας μοναδικής διαδικασίας της καθόδου των όρχεων που πραγματοποιείται σχετικά αργά στην ενδομήτρια ζωή (7). Στα θηλυκά, η διαφοροποιημένη ωοθήκη παραμένει σε μια υψηλή κοιλιακή θέση. Εν αντιθέσει, η διαφοροποίηση προς αρρεν, που προκαλείται από το SRY γονίδιο που βρίσκεται στο χρωμόσωμα Y, οδηγεί σε διαφοροποίηση των όρχεων που ακολουθείται αργότερα από μετανάστευση των όρχεων μέσα στο όσχεο. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται κάθοδος των όρχεων (8). Η διμορφική θέση των γονάδων ανάλογα με το φύλο στα θηλαστικά εξαρτάται από την διαφορική ανάπτυξη δύο συνδέσμων κατά τη διάρκεια της ενδομήτριας ζωής: του ουραίου βουβωνικού συνδέσμου ή οίακα και

του κρανιακού ανασταλτικού συνδέσμου ή κρεμαστήρα μυ (7). Η συζήτηση σχετικά με την οντογένεση της καθόδου των όρχεων ξεκινά γύρω στο 1762, με την περιγραφή του Hunter για τον οίακα ως ινώδους συνδέσμου που είναι προσκολλημένος στον όρχι και κοντά στην επιδιδυμίδα και για το ουραίο άκρο που είναι στερεοποιημένο στους μύες της βουβωνικής χώρας (9).

Η θέση των όρχεων είναι αρκετά μεταβλητή στα θηλαστικά και παρατηρούνται τρεις ανατομικές καταστάσεις της καθόδου των όρχεων: 1) όρχεις στην οδό της καθόδου και οσχεϊκοί 2) όρχεις στην οδό της καθόδου αλλά μη οσχεϊκοί και 3) όρχεις που δεν βρίσκονται στην οδό της καθόδου (όρχεις ενδοκοιλιακά). Η εξέλιξη ξεκίνησε από μια αρχικά οσχεϊκή κατάσταση σε μια σταδιακά μη οσχεϊκή κατάσταση και όρχεις που έχουν κατέβει και βρίσκονται στο όσχεο αποτελούν την πρωτόγονη κατάσταση για όλα τα θηλαστικά. Εξελικτικά μιλώντας η κάθοδος των όρχεων είναι μια πολυδάπανη διαδικασία για τον οργανισμό και δυσκολίες τόσο αναπτυξιακές όσο και φυσιολογικές μπορεί να προκύψουν κατά τη διάρκεια αυτή της διαδικασίας. Η κάθοδος λοιπόν των όρχεων είναι μια πολύπλοκη, αποτελούμενη από πολλά στάδια διαδικασία που απαιτεί την αλληλεπίδραση ανατομικών και ορμονικών παραγόντων (10).

Διχογνωμίες υπάρχουν σχετικά με τον ακριβή καθορισμό συγκεκριμένων φάσεων της καθόδου των όρχεων. Ιστορικά, δύο κρίσιμα στάδια έχουν προταθεί, το πρώτο οριοθετείται μεταξύ 12^{ης} και 16^{ης} εβδομάδας κύησης (κάθοδος των όρχεων στον έσω βουβωνικό δακτύλιο) ενώ το δεύτερο ονομαζόμενο και ως «επανακάθοδος» οριοθετείται μεταξύ 16^{ης} και 28^{ης} εβδομάδας κύησης εξαιτίας μιας αύξησης στο μήκος και στο πάχος του οίακα (1). Σήμερα είναι ευρέως αποδεκτό ότι η κάθοδος των όρχεων αποτελεί ένα διφασικό μοντέλο με διαφορετική ανατομική και ορμονική ρύθμιση (9). Αυτή η διαδικασία των δύο σταδίων κατευθύνεται από δύο συνδέσμους του μεσεντέριου, τον κρανιακό ανασταλτικό σύνδεσμο και τον ουραίο οσχεϊκό σύνδεσμο. Αρχικά οι αδιαφοροποίητες γονάδες πρόσκεινται στο κοιλιακό τοίχωμα σε μια θέση κοντά στο νεφρό. Το κρανιακό ανασταλτικό νεύρο πρόσκειται της γονάδας στο οπίσθιο κοιλιακό τοίχωμα, όπου ο οίακας συνδέει τον όρχι μέσω της επιδιδυμίδας στον μελλοντικό ενδοκοιλιακό έσω δακτύλιο του βουβωνικού πόρου (8). Συγκεκριμένα, πριν αρχίσει η μετανάστευση των όρχεων που πραγματοποιείται στη διακοιλιακή

φάση, οι όρχεις αρχικά συγκρατούνται ψηλά στη κοιλιακή κοιλότητα εξαιτίας δύο αντίθετων δυνάμεων οι οποίες ασκούνται από τους δύο συνδέσμους του μεσεντέριου. Ο κρανιακός ανασταλτικός σύνδεσμος (κρεμαστήρας μυς) συγκρατεί της όρχεις κρανιακά και το οίακας τους συγκρατεί στην ουραία περιοχή (9).

Κατά την διακοιλιακή φάση μεταξύ 10^{ης} και 23^{ης} εβδομάδας κύησης στα ανθρώπινα έμβρυα οι όρχεις σταδιακά μετακινούνται από την αρχική της θέση στην ουρογεννητική ακρολοφία στην βουβωνική περιοχή. Η διαδικασία της διακοιλιακής καθόδου των όρχεων πραγματοποιείται παράλληλα με την μείωση του μήκους της χορδής του οίακα και τη διαφοροποίηση και την αναστροφή του κρεμαστήρα μυ (10). Κατά τους ερευνητές πιστεύεται ότι λαμβάνει χώρα από την 8^η ως την 15^η εβδομάδα κύησης (9) και ο όρχις είναι προσκολλημένος στον έσω βουβωνικό δακτύλιο εξαιτίας της διεύρυνσης του ουραίου συνδέσμου. Αυτή η προσκόλληση-στερεοποίηση αποτρέπει τον όρχι από το να κατέλθει καθώς το έμβρυο αναπτύσσεται (5). Η απόφυση του οίακα και η παλινδρόμηση του κρανιακού ανασταλτικού συνδέσμου οδηγεί στην διακοιλιακή μετανάστευση των όρχεων στην βουβωνική χώρα (7). Ο οίακας (οσχεϊκός σύνδεσμος) αρχικά μεγεθύνεται και πιθανά προκαλεί τη διεύρυνση του βουβωνικού καναλιού (5). Κάτω από την επίδραση των ορμονών, ο κρανιακός ανασταλτικός σύνδεσμος υποχωρεί ενώ ο οίακας αναπτύσσει το ουραίο τμήμα του στο λεγόμενο βολβό του οίακα, μια αντίδραση που λέγεται «αντίδραση εξοίδησης» και προεξέχει στον σχηματιζόμενο οσχεϊκό σάκο. Η «αντίδραση εξοίδησης» (swelling reaction) συνοδεύεται από κυτταρικό πολλαπλασιασμό και ουσιαστικά αυτό συντελεί στην στερεοποίηση του όρχι κοντά στο μελλοντικό έσω βουβωνικό δακτύλιο καθώς το έμβρυο αναπτύσσεται. Στη συνέχεια και μέχρι το τέλος της πρώτης φάσης η υποχώρηση του ανασταλτικού κρανιακού συνδέσμου επιτρέπει την σχετική κίνηση του όρχι προς τον έξω βουβωνικό δακτύλιο (9). Η αντίδραση εξοίδησης διατηρεί τους όρχεις πολύ κοντά στο μελλοντικό έσω βουβωνικό δακτύλιο και αυτό προκαλεί τη διακοιλιακή μετανάστευση των όρχεων στη βουβωνική χώρα. Για τον λόγο αυτό η διακοιλιακή φάση της καθόδου των όρχεων είναι το αποτέλεσμα της συνολικής έλξης του φορέα από τον κρανιακό ανασταλτικό σύνδεσμο και τον οίακα (10). Λόγω της αντίδρασης οιδήματος, ο οίακας μετατρέπεται σε μια συνδεσμική δομή που προσκολλά τον αναπτυσσόμενο όρχι κοντά στην βουβωνική χώρα κατά την

εμβρυική ανάπτυξη. Στο άρρεν έμβρυο, η διόγκωση του οίακα σχετίζεται με την εξαρτώμενη από τα ανδρογόνα παλινδρόμηση του κρανιακού ανασταλτικού συνδέσμου (7).

Στην δεύτερη φάση της καθόδου των όρχεων οι όρχεις μεταναστεύουν από την έσω βουβωνική χώρα στο όσχεο. Στον άνθρωπο, αυτή η φάση συνήθως έχει ολοκληρωθεί μέχρι τη στιγμή της γέννησης (5). Η κάθοδος των όρχεων στο όσχεο λαμβάνει χώρα λόγω συστολής της χορδής μεσεγχυματικού ιστού και της έκφυσης του βολβού του οίακα (7). Ουσιαστικά, η μεταγενέστερη συρρίκνωση του οίακα και η ενδοκοιλιακή πίεση είναι η αιτία που οι όρχεις αναγκάζονται να περάσουν μέσα από το βουβωνικό πόρο (5). Συγκεκριμένα, η δεύτερη (βουβωνοοσχική) φάση της καθόδου των όρχεων ξεκινά περίπου την 26^η εβδομάδα κύησης όταν ο οίακας ξεκινά να διογκώνεται μέσα στο βουβωνικό πόρο. Ο οίακας φτάνει στο όσχεο μέχρι την 35^η εβδομάδα κύησης και έλκει της όρχεις στην πορεία που ακολουθεί πριν ο οίακας συρρικνωθεί σε ένα ινώδες υπόλειμμα (7). Κατά άλλους πάλι ερευνητές, στο ανθρώπινο έμβρυο, η δεύτερη φάση της καθόδου των όρχεων πραγματοποιείται πριν τη γέννηση μεταξύ της 24^{ης} και 34^{ης} εβδομάδας κύησης και χαρακτηρίζεται από επέκταση του ουραίου τμήματος του οίακα, υποστρόφη του και προεκβολή του στον οσχείο σάκο, διαστολή του βουβωνικού πόρου από τον βολβό του οίακα, και ενδοκοιλιακή πίεση με αποτέλεσμα να αναγκάσει της όρχεις να περάσουν μέσα από τον πόρο (10). Η ιστολογία του ανθρώπινου οίακα αφορά μια ενυδατωμένη δομή και φτωχά διαφοροποιημένων ινοβλαστών σε μια ουσιαστικά ινώδη δομή πλούσια σε κολλαγόνο και ελαστικές ίνες (10). Η διαδικασία αυτή έχει αναφερθεί ότι πραγματοποιείται μέχρι τον έβδομο μήνα κύησης στα περισσότερα αγόρια (5).

Σημαντικό ρόλο στην κάθοδο των όρχεων παίζουν οι ορμόνες και ιδιαίτερα η τεστοστερόνη, η αντιμυλλέριος ορμόνη (AMH) και ο παράγοντας INSL3. Σχηματικά, η τεστοστερόνη δρα στον κρανιακό ανασταλτικό σύνδεσμο και διεγείρει την διαφοροποίηση των παραγώγων του πόρου του Wolff, η AMH προκαλεί υποστρόφη των πόρων του Muller και το INSL3 ελέγχει τη διαφοροποίηση του οίακα. Οι δύο φάσεις της καθόδου των όρχεων ρυθμίζονται με διαφορετικό τρόπο και η πρώτη διακοιλιακή φάση είναι ουσιαστικά εξαρτώμενη από το INSL3 ενώ η δεύτερη βουβωνοοσχική φάση είναι ουσιαστικά εξαρτώμενη από τα ανδρογόνα (10).

Νεότερα δεδομένα υποδεικνύουν ότι τουλάχιστον 3 στάδια της καθόδου

των όρχεων υπάρχουν στον άνθρωπο ενώ Πολωνοί συγγραφείς προτείνουν ότι υπάρχουν ακόμα και 4-5 στάδια. Ενδεικτικά αναφέρουμε την αρχή των 3 σταδίων: 1/ νεφρική μετανάστευση των όρχεων που ολοκληρώνεται με τον εκφυλισμό του μεσόνεφρου (βδομάδες κύησης: 7^η – 8^η), 2/ διακοιλιακό πέρασμα που περιλαμβάνει μετακίνηση των όρχεων από τον μεσόνεφρο της τον έσω βουβωνικό δακτύλιο (ολοκληρώνεται μέχρι την 21^η εβδομάδα), 3/ ενδοκαναλοοσχική-βουβωνική διέλευση ή διαφορετικά αληθής κάθοδος που περιλαμβάνει μετακίνηση των όρχεων από την περιτοναϊκή κοιλότητα στον αυλό (28^η εβδομάδα). Αξίζει να σημειωθεί ότι υπάρχει ποικιλία παραγόντων συμπεριλαμβανομένων ανατομικών, γενετικών ενδοκρινικών και περιβαλλοντικών που σχετίζονται με την κάθοδο των όρχεων (1).

3. Ταξινόμηση

3Α. Ταξινόμηση ανάλογα με την εντόπιση

Ποικίλες περιγραφές έχουν δοθεί για τον κρυφορχικούς όρχεις: α) Όρχις ο οποίος μπορεί να κατέλθει μέσα στο όσχεο μετά από χειρισμό αλλά δεν μπορεί να παραμείνει εκεί μόλις απελευθερωθεί (Gliding testis), β) Όρχις που βρίσκεται εκτός οσχέου λόγω της έλξης από τον κρεμαστήρα μυ (Retractile testis), γ) Έκτοπος όρχις δηλαδή της πραγματικά κρυφορχικός όρχις προσκείμενος της εξω-οσχεϊκές δομές από τον ουρογεννητικό σωλήνα δ) Ο όρχις που προηγούμενα περιγράφηκε σαν ενδοοσχεϊκός αλλά που κείτεται μόνιμα έξω από το όσχεο είτε πρωτοπαθώς (μη φυσιολογική περιτονεοκολπική διαδικασία) είτε δευτεροπαθώς (μετεγχειρητικά) (Ascending testis) (2).

Οι κρυφορχικοί όρχεις ταξινομούνται ανάλογα με τη θέση της κατά μήκος της φυσιολογικής οδού καθόδου των όρχεων σαν υψηλά/χαμηλά κοιλιακοί, βουβωνικοί, υπεροσχεϊκοί, υψηλά οσχεϊκοί ή σαν έκτοποι. Ωστόσο κατά την κλινική εξέταση είναι αρκετή η διάκριση σε ψηλαφητούς ή μη καθώς και η διάκριση σε μονόπλευρη ή αμφοτερόπλευρη κρυφορχία. Υπάρχει βέβαια και η περίπτωση της πλήρους απουσίας του της ή και των δύο όρχεων που χαρακτηρίζεται σαν ανορχία (10). Η κρυφορχία μπορεί να οφείλεται είτε σε απουσία της γονάδας είτε σε

αποτυχία του όρχι να κατέλθει από την εμβρυική οπισθοπεριτοναϊκή θέση μέσα στο όσχεο (11). Η αποτυχία των όρχεων να κατέλθουν φυσιολογικά στο όσχεο λαμβάνει χώρα αμφοτερόπλευρα στο 1/3 των περιπτώσεων και μονόπλευρα στα 2/3 των περιπτώσεων (10).

3B. Ταξινόμηση ανάλογα με της μορφές κρυφορχίας

Η κρυφορχία μπορεί να εμφανιστεί είτε ως μεμονωμένη ανωμαλία ή στα πλαίσια διαταραγμένης διαφοροποίησης του φύλου του άρρενος ή σαν συγγενής δυσπλασία στα πλαίσια της συνδρόμου (12). Λαμβάνοντας υπόψη ότι η κρυφορχία αποτελεί της και μια πολύ καλά αναγνωρισμένη εκδήλωση χρωμοσωμικών ανωμαλιών αλλά και σύμπτωμα περισσοτέρων από 50 συνδρόμων που προκαλούν συγγενείς ανωμαλίες, για παράδειγμα στην OMIM υπάρχουν πάνω από 250 συγγενείς ανωμαλίες που σχετίζονται με κρυφορχία, αξίζει να αναφερθεί ότι η πλειοψηφία των περιπτώσεων κρυφορχίας είναι μη συνδρομικές και αγνώστου αιτιολογίας (13).

Η οικογενής προδιάθεση και η μετάδοση από τον άντρα με κρυφορχία στον γιό του θεωρούνται σύνηθες φαινόμενο. Ασθενείς με μη συνδρομική κρυφορχία (μεμονωμένη) είναι τρεις φορές πιο πιθανό από ότι ο γενικός πληθυσμός να αναφέρουν άρρεν άτομο πρώτου βαθμού συγγένειας (πατέρας ή αδερφός) που να εμφανίζει και το ίδιο κρυφορχία. Η κληρονομικότητα της κρυφορχίας σε συγγενείς πρώτου βαθμού μεταξύ 452 ατόμων με κρυφορχία υπολογίζεται περίπου στο 0,67. Η συχνότητα της σποραδικής και της οικογενούς κρυφορχίας υποδηλώνει ότι εμπλέκονται γενετικοί παράγοντες στην εμφάνιση της (13).

Προοπτικές μελέτες έχουν δείξει ότι η αυτόματη αποκατάσταση της συγγενούς κρυφορχίας μπορεί να αναιρεθεί από νέα άνοδο των όρχεων με αποτέλεσμα να χρειαστεί να γίνει χειρουργική αποκατάσταση της εκ νέου κρυφορχίας. Παράλληλα, όρχεις που βρίσκονταν στο όσχεο κατά τη γέννηση μπορεί να ανέλθουν μετά από κάποιο ερέθισμα. Η υπόθεση εμφάνισης μη συγγενούς κρυφορχίας ενισχύεται από την παρατήρηση ότι πραγματοποιούνται ορχεοπηξίες σε σημαντικό αριθμό παιδιών μεγαλύτερης από την συστηνόμενη ηλικία

αποκατάστασης της βλάβης. Συμπερασματικά λοιπόν, η κρυψορχία μπορεί να μην είναι μόνο συγγενής (και να εμφανίζεται εκ γενετής) αλλά να αποκτάται και αργότερα (επίκτητη κρυψορχία). Σε μια μελέτη παρατηρήθηκε ότι το ποσοστό εμφάνισης επίκτητης κρυψορχίας είναι τρεις φορές υψηλότερο από αυτό της συγγενούς κρυψορχίας (να γράψω την αναφορά). Σε μια άλλη πρόσφατη μελέτη φάνηκε ότι η επίκτητη κρυψορχία έφτανε το 2,2% μεταξύ των αγοριών 6 ως 13 ετών. Εν κατακλείδι, πολλοί παράγοντες θα πρέπει να ληφθούν υπόψη όταν γίνεται η αξιολόγηση αποτελεσμάτων διαφορετικών μελετών. Αυτοί περιλαμβάνουν τον ορισμό της κρυψορχίας, τον τύπο της μελέτης (κλινική μελέτη/μελέτη καταγεγραμμένων περιστατικών-αρχείο), ηλικία ασθενών και πιθανή καταγραφή περιστατικών επίκτητης κρυψορχίας (5).

3B.1 Συνδρομική Κρυψορχία

Η κρυψορχία μπορεί να εκδηλωθεί στα πλαίσια του Συνδρόμου Δυσγενεσίας των Όρχεων (TDS). Οι εκδηλώσεις του TDS ταξινομούνται ανάλογα με τη σοβαρότητα σε TGCC> υποσπαδίας > κρυψορχία > υπογονιμότητα (14). Το TDS περιλαμβάνει καταστάσεις της ο υποσπαδίας, η μειωμένη ποιότητα σπερματοζωαρίων και ο καρκίνος των όρχεων (1). Το σύνδρομο δυσγενεσίας των όρχεων ίσως είναι αποτέλεσμα γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων και προκαλεί διαταραγμένη ανάπτυξη όρχεων και γενικότερα ατελή ή διαταραγμένη ανάπτυξη του γεννητικού συστήματος (15). Ένα άτομο που εμφανίζει το σύνδρομο αυτό έχει περισσότερες πιθανότητες να εμφανίσει μία ή παραπάνω διαταραχές που χαρακτηρίζουν το σύνδρομο.

Το σύνδρομο μειωμένης ευαισθησίας στα ανδρογόνα (AIS) είναι μια συνδεόμενη με το X χρωμόσωμα κληρονομούμενη διαταραχή που προκαλείται από μεταλλάξεις του υποδοχέα των ανδρογόνων (AR, Androgen Receptor). Η μερική μη ευαισθησία στα ανδρογόνα είναι μια διαταραχή που περιλαμβάνει ποικιλόμορφη ανάπτυξη των παραγώγων των πόρων του Wolf, κρυψορχία και υποσπαδία. Για το λόγο αυτό οι μεταλλάξεις του υποδοχέα AR δεν αποτελούν συχνή αιτία στην μεμονωμένη κρυψορχία (16). Η κρυψορχία μπορεί να συσχετιστεί με τα επίπεδα της

τεστοστερόνης ορού αν και συχνά συνυπάρχει με υπογοναδοτροφικό υπογοναδισμό, στοιχείο που υποστηρίζει την πιθανότητα να εμπλέκονται και οι ορμόνες της υπόφυσης στην κατάσταση αυτή (1). Η κρυψορχία ως κλινική εκδήλωση του υπογοναδοτροφικού υπογοναδισμού μπορεί να προκληθεί από μεταλλάξεις σε διαφορετικά γονίδια με κύριο εκπρόσωπο το KAL1 που βρίσκεται στο X χρωμόσωμα και είναι υπεύθυνο για το σύνδρομο Kallman. Το FGFR1 (KAL2) είναι υπεύθυνο για τον αυτοσωμικό κυρίαρχο τύπο του υπογοναδοτροφικού υπογοναδισμού και ευθύνεται για το 10% των περιπτώσεων εμφάνισης συνδρόμου Kallman (10). Ο υπογοναδοτροφικός υπογοναδισμός χαρακτηρίζεται από μειωμένα επίπεδα ανδρογόνων. Κατά τη διάρκεια της ενδομήτριας ζωής η αυξημένη χοριακή γοναδοτροπίνη που κυκλοφορεί στον πλακούντα ίσως αντικαθιστά τα μειωμένα επίπεδα της LH, δεδομένου ότι προσδένονται στον ίδιο υποδοχέα στοιχείο που θα μπορούσε να εξηγήσει γιατί όλα τα αγόρια με υπογοναδοτροφικό υπογοναδισμό δεν εμφανίζουν κρυψορχία (1).

Η κρυψορχία αρκετές φορές αποτελεί μια μόνο από της εκδηλώσεις κάποιων συνδρόμων της συμβαίνει για παράδειγμα στην καμπτομελική δυσπλασία ή στον όγκο του Wilms (1). Ωστόσο πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν ότι υπάρχει αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης κρυψορχίας κατά τη γέννηση σε σύνδρομα που εμφανίζουν μεγάλη συχνότητα στο γενικό πληθυσμό της το Klinefelter, το σύνδρομο FG, το σύνδρομο Noonan, το σύνδρομο Down (10).

3B.2 Μεμονωμένη κρυψορχία

Η μεμονωμένη κρυψορχία πιστεύεται ότι έχει διαφορετικό γενετικό υπόβαθρο από την κρυψορχία που εκδηλώνεται στα πλαίσια της συνδρόμου. Τα HomeboxA10 (HOXA10) γονίδια, αλλά και τα γονίδια INSL3 και LGR8/GREAT του υποδοχέα του INSL3 έχουν προταθεί σαν πιθανοί ρυθμιστές της καθόδου των όρχεων και ως υπεύθυνα για την μεμονωμένη κρυψορχία (10). Μεταλλάξεις στα ανθρώπινα γονίδια INSL3, LGR8, HOXA10, ZNF214, ZNF215 έχουν αναγνωριστεί περιστασιακά αλλά δεν φαίνεται να αποτελούν μια συχνή αιτία της κρυψορχίας (12). Από την άλλη πλευρά, κοινοί πολυμορφισμοί σε αυτά τα γονίδια έχουν

πρόσφατα διερευνηθεί ως συνεισφέροντες παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση ιδιοπαθούς μεμονωμένης (μη συνδρομικής) κρυψορχίας (12). Τέλος, της οι δημοσιευμένες μεταλλάξεις της μόνο γονιδίου που σχετίζονται με την εμφάνιση κρυψορχίας και έχουν ταυτοποιηθεί στον άνθρωπο αφορούν τα εξής γονίδια: *Sos1*, *Hoxd13*, *Raf1*, *Spata12*, *Sox2*, *Nr5a1*, *Znf215*, *Znf214*, *Ptprn11*, *Cyp19a1*, *Hoxa10*, *Fgfr1*, *Pwcr*, *Esr1*, *Insl3*, *Prokr2*, *Kal1*, *Arx*, *Ar* (17).

4. Συχνότητα εμφάνισης

Η κρυψορχία είναι η πιο συχνή διαταραχή της ουροποιογεννητικής οδού της άρρενες (18). Τα τελευταία χρόνια κατά τον Virtanen και της η κρυψορχία εμφανίζεται με μια συχνότητα της τάξης του 2-8% στα τελειόμηνα νεογνά εμφανίζοντας μια αυξητική τάση (19). Η συγγενής κρυψορχία μπορεί να διορθωθεί αυτόματα και η κάθοδος αυτή των όρχεων πραγματοποιείται κυρίως της πρώτους μήνες της ζωής όταν η ενδογενής έκκριση τεστοστερόνης αυξάνει. Σαν αποτέλεσμα ένα χαμηλότερο ποσοστό εμφάνισης κρυψορχίας της τάξης του 1-2% παρατηρείται της 3 με 12 μήνες ζωής (20). Κατά της μελέτες η συχνότητα εμφάνισης κρυψορχίας είναι 3% στα τελειόμηνα νεογνά ενώ μπορεί να φτάσει και ποσοστά της τάξης του 33% στα πρόωρα νεογνά και στη συγκεκριμένη περίπτωση χωρίς πιθανότητα αυτόματης διόρθωσης(21). Άλλοι ερευνητές υποστηρίζουν ότι η συχνότητα εμφάνισης της κρυψορχίας είναι 18.1% στα πρόωρα νεογνά (22). Η αμφοτερόπλευρη κρυψορχία εμφανίζει μια συχνότητα της τάξης του 10-15% των περιπτώσεων κρυψορχίας (21). Ο δεξιός όρχις επηρεάζεται στο 45% των περιπτώσεων, ο αριστερός όρχις στο 30% ενώ και οι δύο όρχεις σε ποσοστό 25% (22). Έχουν περιγραφεί οικογενείς περιπτώσεις κρυψορχίας και το οικογενειακό ιστορικό κρυψορχίας αποτελεί παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση κρυψορχίας. Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι το 22.7% των ασθενών με κρυψορχία είχαν οικογενειακό ιστορικό κρυψορχίας έναντι του 7.5% που εμφάνιζαν οι ομάδες ελέγχου, με παράγοντα κινδύνου κρυψορχίας στα άρρενα νεογνά 6.9 υψηλότερο αν υπήρχε στην οικογένεια αδερφός με κρυψορχία και 4.6 αν υπήρχε πατέρας με κρυψορχία (10).

Η αναφερόμενη συχνότητα της κρυφορχίας από προοπτικές μελέτες τελειόμηνων και φυσιολογικού βάρους νεογνών κατά τη γέννηση εμφανίζει γεωγραφικές διαφορές. Ωστόσο τα στοιχεία αυτά δεν είναι άμεσα συγκρίσιμα με τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τα αρχεία καταγραφής (registry) είτε από της μελέτες των ορχεοπηξιών (20). Καθώς, οι ορχεοπηξίες περιλαμβάνουν τόσο συγγενείς όσο και επίκτητες μορφές κρυφορχίας όσο και ανελκόμενους όρχεις δεν μπορούν να συγκριθούν πλήρως με τη συχνότητα της συγγενούς κρυφορχίας που εμφανίζεται στο γενικό πληθυσμό (3). Για παράδειγμα, μια υψηλή συχνότητα εμφάνισης κρυφορχίας (9%) παρατηρήθηκε στην Δανία όπου χρησιμοποιούνται τα κριτήρια του Scorettou 1964 που περιλαμβάνουν όρχεις σε υψηλά οσχεϊκή θέση (7% όλων των περιπτώσεων) μεταξύ των κρυφορχικών αγοριών. Εν αντιθέσει, μια πιο πρόσφατη μελέτη από μια άλλη ομάδα από τη Δανία ανέφερε συχνότητα της τάξης του 2.4% χρησιμοποιώντας την ταξινόμηση της ομάδας του John Radcliffe η οποία περιλαμβάνει όρχεις σε υψηλά οσχεϊκή θέση μεταξύ των φυσιολογικά κατελθόντων όρχεων(5).

Τέλος, αξίζει να αναφερθεί ότι, ενώ κάποιες μελέτες ανέφεραν υψηλά ποσοστά κρυφορχίας μεταξύ μαθητών στον επανέλεγχο που πραγματοποιήθηκε σε μαθητές φάνηκε ότι το 75% των περιπτώσεων είχε εμφανίσει αυτόματη κάθοδο των όρχεων κατά την εφηβεία. Αδιευκρίνιστο βέβαια παραμένει κατά πόσο επρόκειτο για ανασπώμενους όρχεις και φυσιολογική παραλλαγή και όχι αληθινά κρυφορχικούς ασθενείς. Ιδιαίτερα μάλιστα οι μαθητές που εμφάνιζαν επίκτητη κρυφορχία ήταν εκείνοι που είχαν υψηλότερα ποσοστά αυτόματης καθόδου των όρχεων κατά την εφηβεία. Αυτό ενδεχομένως εξηγεί και γιατί παλιότερες μελέτες που πραγματοποιούνταν σε φαντάρους είχαν διαπιστώσει την συχνότητα της κρυφορχίας να κυμαίνεται γύρω στο 1%. Η συχνότητα εμφάνισης λοιπόν της κρυφορχίας εξαρτάται από την ηλικία στην οποία επιλέγουμε να την εξετάσουμε την οποία θα πρέπει να λαμβάνουμε υπόψη όταν συγκρίνουμε αποτελέσματα διαφορετικών μελετών (5).

Σε προοπτικές μελέτες που χρησιμοποίησαν όμοια και αυστηρώς καθορισμένα κριτήρια για την κρυφορχία, η συχνότητα εμφάνισης κρυφορχίας κατά τη γέννηση ποικίλει μεταξύ 1.6 και 9%. Επιπλέον έχει φανεί ότι τα πρόωρα άρρενα νεογνά εμφανίζουν μεγαλύτερα ποσοστά εμφάνισης κρυφορχίας και όταν

σε αυτά συμπεριληφθούν μόνο αγόρια με βάρος γέννησης 2500g το ποσοστό συγγενούς κρυφορχίας κυμαίνεται μεταξύ 1.8 και 8.4%. Χαμηλό βάρος γέννησης, προωρότητα και υπολειπόμενη ανάπτυξη σχετίζονται με την αυξημένη συχνότητα εμφάνισης της κρυφορχίας που μπορεί να φτάσει το 20-25% στα νεογνά με βάρος γέννησης λιγότερο από 2.5 kg. (10). Σύγκριση μελετών που πραγματοποιήθηκαν κατά της τελευταίες δύο δεκαετίες προτείνει ότι υπάρχουν γεωγραφικές διαφορές στα ποσοστά εμφάνισης κρυφορχίας κατά τη γέννηση που ποικίλουν μεταξύ 1.8 και 8.4% σε αγόρια με βάρος γέννησης τουλάχιστον 2.5 κιλών. Προοπτικές μελέτες σε άρρενα νεογνά και/ή με βάρος γέννησης τουλάχιστον 2.5 κιλά έδειξαν μια αύξηση στη συχνότητα της κρυφορχίας στην Αγγλία μεταξύ του 1950 και 1980 και στη Δανία μεταξύ του 1960 και 2000. Ωστόσο η αυξημένη συχνότητα που παρατηρήθηκε στην Δανία πρέπει να ληφθεί προσεχτικά υπόψη επειδή της αναφορές από την ίδια χώρα δεν έδειξαν διαφορές από το 1950 (5). Σε μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί τα τελευταία χρόνια έχει παρατηρηθεί ότι υπάρχουν διαφορές στα ποσοστά εμφάνισης συγγενούς κρυφορχίας που εξαρτώνται από την γεωγραφική κατανομή. Επιπλέον, τελευταίες μελέτες δείχνουν ότι υπάρχει μια αύξηση στα ποσοστά εμφάνισης συγγενούς κρυφορχίας. Η συγγενής κρυφορχία συχνά ακολουθείται από αυτόματη κάθοδο των όρχεων και κατ' επέκταση χαμηλότερα ποσοστά κρυφορχίας σε ηλικία 3 μηνών για παράδειγμα 0.9 με 1.8% μεταξύ αγοριών με βάρος γέννησης 2.500g (5).

Παρόλα αυτά η αυξημένη συχνότητα εμφάνισης υποσπαδία, ανδρικής υπογονιμότητας και καρκίνου των όρχεων που παρατηρήθηκε της Δυτικές χώρες υποδηλώνει ότι πιθανά εμπλέκονται και περιβαλλοντικοί παράγοντες οι οποίοι φαίνεται να δρουν σαν ενδοκρινικοί διαταράκτες της καθόδου των όρχεων και οδηγεί στη θεωρία του συνδρόμου της δυσγενεσίας των όρχεων (10). Επιπλέον αρκετές αλλά όχι της οι μελέτες υποστηρίζουν ότι η αύξηση της συχνότητας εμφάνισης παρατηρείται ιδιαίτερα σε συγκεκριμένους πληθυσμούς. Οι τελευταίες μελέτες έχουν καταλήξει στο συμπέρασμα ότι η αδυναμία εφαρμογής κοινής μεθοδολογίας /διαγνωστικών κριτηρίων για τα άτομα με κρυφορχία αποτρέπει τον ακριβή καθορισμό της συχνότητας της κρυφορχίας. Ωστόσο οι διαφορές στη συχνότητα των εμφάνισης της κρυφορχίας μεταξύ διαφορετικών πληθυσμών – όταν

πραγματικά – υπάρχει αποδίδονται τόσο σε γενετικούς όσο και σε περιβαλλοντικούς παράγοντες (6).

5. Αίτια

Η ορμονική ρύθμιση της καθόδου των όρχεων που περιλαμβάνει το INSL-3 πεπτίδιο, τα ανδρογόνα, την AMH, το CGRP. Πιθανές αιτίες εμφάνισης της κρυψορχίας προτείνονται μεταλλάξεις και πολυμορφισμοί που στο γονίδιο INSL-3 και του υποδοχέα του INSL-3, στα γονίδια του υποδοχέα των ανδρογόνων και των οιστρογόνων, άλλα και σε άλλα γονίδια. Επιπλέον, οι χρωμοσωμικές αλλαγές καθώς και διάφοροι ενδοκρινικοί παράγοντες φαίνεται να συνδέονται με την εμφάνιση της κρυψορχίας (10).

Ένας τρόπος ταξινόμησης των παραγόντων που ευθύνονται για την εμφάνιση της κρυψορχίας είναι ανάλογα με την φάση της καθόδου των όρχεων την οποία ρυθμίζουν. Κύριο ρόλο στη διακοιλιακή κάθοδο των όρχεων φαίνεται να παίζουν το INSL3, ο LGR8 (GREAT ή RSFB2) και τα οιστρογόνα. Εν αντιθέσει, τα ανδρογόνα, το γονίδιο του ανδρογονικού υποδοχέα, οι γοναδοτροφίνες, το μηριαίο νεύρο του γεννητικού συστήματος (GFN) και το πεπτίδιο που σχετίζεται με την καλσιτονίνη (CGRP) επηρεάζουν την ενδοκαναλοσχική φάση της καθόδου των όρχεων. Παράλληλα σαν πιθανοί παράγοντες έχουν προταθεί το γονίδιο Hoxa10, η ορμόνη AMH και ο υποδοχέας του γονιδίου της AMH (1).

Σε πρόσφατη μελέτη ο Ferlin και οι συνεργάτες εκτίμησαν τη συχνότητα των γενετικών αλλαγών της οι ανωμαλίες στον καρυότυπο και οι μεταλλάξεις στα γονίδια INSL3, LGR8/GREAT και στο γονίδιο του υποδοχέα των ανδρογόνων σε ασθενείς με κρυψορχία. Οι ερευνητές ανέφεραν ότι η συχνότητα εμφάνισης των γενετικών αλλαγών ήταν σημαντικά υψηλότερη στα αγόρια με κρυψορχία (5.3%) από ότι στα δείγματα ελέγχου (0.3%). Σαν αποτέλεσμα ο σχετικός κίνδυνος συσχέτισης κρυψορχίας με γενετικές αλλαγές ήταν 16.7 (16).

5. Α Γενετικά Αίτια

5. Α. 1 INSL3 και Υποδοχέας του INSL3

Το INSL3 εκφράζεται στα κύτταρα Leydig του όρχι και στα κύτταρα της θήκης της ωοθήκης. Το πεπτίδιο αυτό ρυθμίζει την κάθοδο των όρχεων δρώντας στον οσχεϊκό σύνδεσμο μέσω του LGR8/GREAT υποδοχέα (16). Ο ρόλος του INSL3 στην κάθοδο των όρχεων συνδέεται κυρίως με την επίδρασή του στην διαφοροποίηση του οίακα κατά τη διάρκεια της διακουλιακής φάσης (10). Η παραγωγή του INSL3 σχετίζεται με την παραγωγή της LH και μειωμένα επίπεδα LH επηρεάζουν αρνητικά τη δράση του (16). Η συγκέντρωση του INSL3 αυξάνει νωρίς μετά τη γέννηση και πιθανώς διεγείρεται από την παροδική μεταγεννητική αιχμή έκκρισης της LH. Ελαττώνεται μέχρι την εφηβεία, όπου παράγεται και πάλι υπό την επίδραση της έκκρισης της LH. Οι συγκεντρώσεις του διατηρούνται κατά τη διάρκεια της ενήλικης ζωής και εν τέλει μειώνονται σε προχωρημένη ηλικία (10).

Στον άνθρωπο, εκτός από της μεταλλάξεις στο INSL3 και τον RXFP2 που εντοπίζονται στα αγόρια και τους άντρες με κρυφορχία περαιτέρω στοιχεία για τον ρόλο του INSL3 στην κάθοδο των όρχεων προκύπτουν από το γεγονός ότι η συγκέντρωση του INSL3 στο αίμα του ομφαλίου λώρου είναι μειωμένη στα αγόρια με κρυφορχία. Το INSL3 παράγεται από τους αναπτυσσόμενους όρχεις κάτω από την επιρροή της μητρικής hCG και/ή της εμβρυικής LH για να ελέγξει την πρώτη φάση της καθόδου των όρχεων (10).

Συμπερασματικά λοιπόν, αυτά τα δεδομένα υποδηλώνουν ότι οι περιβαλλοντικοί παράγοντες δρουν ως ενδοκρινικοί διαταράκτες που μιμούνται την οιστρογονική δράση και η έκθεση σε οιστρογόνα κατά την ενδομήτρια ζωή μπορεί να προκαλέσει κρυφορχία μέσω της καταστολής της παραγωγής του INSL3 (10). Ο φαινότυπος των ατόμων με κρυφορχία και μεταλλάξεις στο INSL3 και το RXFP2 ποικίλει όχι μόνο ανάλογα με την σοβαρότητα της κρυφορχίας αλλά και αναλόγως της ορχικής βλάβης κατά την ενήλικη ζωή, προτείνοντας ότι άλλοι γενετικοί, ενδοκρινικοί και/ή περιβαλλοντικοί παράγοντες μπορεί να επηρεάζουν την βαρύτητα του φαινοτύπου της κρυφορχίας (10). Οι φαινότυποι των ανδρών με μεταλλάξεις στο INSL3 και το RXFP2 που έχουν παρατηρηθεί χαρακτηρίζονται από αμφοτερόπλευρη κρυφορχία, μονόπλευρη κρυφορχία ως και αποτυχία της

καθόδου των όρχεων μέσα στο όσχεο κατά την γέννηση που συνοδεύεται από αυτόματη κάθοδο κατά τα πρώτα χρόνια της ζωής (10).

Παρόλο που αρκετές εκατοντάδες ασθενών έχουν εξεταστεί για μεταλλάξεις στο INSL3 ή στον LGR8 μόνο σε λίγους ασθενείς έχουν περιγραφεί μεταλλάξεις αυτών των γονιδίων και αυτές ήταν σε ετερόζυγη κατάσταση. Η χαμηλή συχνότητα των μεταλλάξεων στο INSL3 και το LGR8 της κρυπορχικούς ασθενείς μπορεί να συνδέεται με το γεγονός ότι στον άνθρωπο η πρώτη φάση της καθόδου των όρχεων σπάνια διακόπτεται, ενώ η ενδοκαναλοοσχεϊκή φάση είναι αυτή που κυρίως επηρεάζεται (5). Οι φαινότυποι συμφωνούσαν με ανωμαλίες στην ανάπτυξη του οσχεϊκού συνδέσμου, οι ανωμαλίες αυτές που ανιχνεύθηκαν σε άντρες ήταν λιγότερο σοβαρές από ότι στα μεταλλαγμένα ποντίκια (10). Επιπλέον, το INSL3 ίσως να παίζει κάποιο ρόλο και στη δεύτερη φάση της καθόδου των όρχεων (1).

Οι περισσότερες λοιπόν μελέτες έχουν αναγνωρίσει αρκετές παραλλαγές αλληλομόρφων στο INSL3 συμπεριλαμβανομένων των C-19G, V18N, A24G, V43L, P49S, A60T, W69R, R73X, P93L, R102C, R102H, N105 και N110K καθώς και στον υποδοχέα του LGR8/GREAT συμπεριλαμβανομένων των T222P, R223K, και I604V που έχουν κατηγορηθεί ότι σχετίζονται με την εμφάνιση κρυπορχίας, αν και τελικά η σχέση των μεταλλάξεων αυτών με την κρυπορχία είναι πολύ μικρή (1.5%-2.0%). Καμία συσχέτιση δεν υπήρξε μεταξύ των μεταλλάξεων και της βαρύτητας της κρυπορχίας και οι περισσότερες από αυτές της μεταλλάξεις ήταν ετερόζυγες (16). Οι υποθέσεις γύρω από το πώς αυτές οι ετερόζυγες μεταλλάξεις μπορεί να ευθύνονται για την πρόκληση της κρυπορχίας ποικίλουν. Πιθανότατα η παρουσία μιας μη αναγνωρισμένης μετάλλαξης κάπου αλλού μέσα στο γονίδιο να ευθύνεται για την εμφάνιση της κρυπορχίας(10).

Μια μελέτη που πραγματοποιήθηκε πρόσφατα σε άνδρες με κρυπορχία που προέρχονταν από της Η.Π.Α και την Ευρώπη διαπίστωσε και αυτή αρκετές παρανοηματικές μεταλλάξεις τόσο στο INSL3 όσο και στο γονίδιο του υποδοχέα του, RXFP2 αλλά και μια νέα μετάλλαξη την V39G στο INSL3η οποία βρέθηκε σε έναν μόνο ασθενή με κρυπορχία. Ωστόσο η λειτουργική μελέτη του μεταλλαγμένου πεπτιδίου δεν αποκάλυψε κάποια σημαντική αλλαγή στη λειτουργία του (8).

Όσον αφορά στη μετάλλαξη T222P που είναι και η κυρίαρχη μετάλλαξη που εντοπίζεται στο RXFP2 , οι ασθενείς με την μετάλλαξη αυτή εμφανίζουν διάφορους

φαινοτύπους, που ποικίλουν από αμφοτερόπλευρη κρυπορχία ως μονόπλευρο ανελκόμενο όρχι. Συνεπώς είναι πιθανό ότι και άλλοι παράγοντες τόσο γενετικοί όσο και αναπτυξιακοί μπορεί να επηρεάζουν τον φαινότυπο κάθε ετεροζυγώτη (11). Αξίζει να αναφερθεί ότι σε περισσότερους από 2000 ασθενείς και δείγματα ελέγχου που έχουν αναλυθεί μέχρι σήμερα η μη νοηματική μετάλλαξη T222P του RXFP2 είναι η μόνη που έχει συσχετιστεί ισχυρά την εμφάνιση της κρυπορχίας (8). Συγκεκριμένα ο Bogatcheva και άλλοι έδειξαν ότι η μετάλλαξη T222PLGR8/GREAT, που ανευρέθη μόνο σε ασθενείς με κρυπορχία και που προκαλεί δομικές αλλαγές στο τμήμα πρόσδεσης του LGR8/GREAT υποδοχέα, οδηγεί στην ανικανότητα του υποδοχέα να εκφραστεί στην επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης και έτσι γίνεται υπεύθυνος για τον φαινότυπο των κρυπορχικών ασθενών (16). Η Thr222Pro έχει φανεί ότι ελαττώνει αρκετά την παραγωγή cAMP (23). Έχει αναφερθεί μάλιστα ότι η μετάλλαξη αυτή δεν περιορίζεται στην περιοχή της Μεσογείου αλλά έχει παρατηρηθεί της και στην Κεντρική Ευρώπη (23). Ωστόσο υπήρξε και μια μετέπειτα μελέτη από τον Nuti και της το 2008 που έδειξε ότι υπήρχαν αρκετά άτομα με φυσιολογικό κλινικό φαινότυπο που εμφάνιζαν την μετάλλαξη. Συγκεκριμένα, η μελέτη αυτή διεξήχθη στην Ισπανία και περιελάμβανε μικρό αριθμό ασθενών και μαρτύρων (77 ασθενείς και 48 μάρτυρες) (23). Ωστόσο είναι σημαντικό να συγκριθεί η συχνότητα των μεταλλάξεων σε συγκεκριμένους πληθυσμούς (8).

Όσον αφορά στον τρόπο κληρονομής, σε περιπτώσεις που εξετάστηκαν οι γονείς το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο για την T222P μετάλλαξη είχε προκύψει από την μητέρα (8). Από την άλλη πλευρά όσον αφορά στη γεωγραφική κατανομή, συνολικά φαίνεται ότι θα πρέπει να υπάρχει μια αρχική κύρια επίδραση στην οποία οφείλονται οι περιορισμοί ανά γεωγραφική περιοχή αυτού του πολυμορφισμού/μετάλλαξης και πιθανώς και οι Ιταλοί και οι Ισπανοί που εξετάστηκαν σε μια μελέτη να προέρχονται από έναν κοινό πρόγονο (founder effect). Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης υποστηρίζουν την ύπαρξη σχετικά υψηλής συχνότητας της T222P μετάλλαξης στις δύο αυτές Μεσογειακές χώρες. Ωστόσο παρόλο που στην Ισπανία η συχνότητα εμφάνισης της μετάλλαξης είναι όμοια τόσο σε ασθενείς όσο και σε μάρτυρες, στην Ιταλία η μετάλλαξη T222P φαίνεται να αποτελεί ήπιο παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση κρυπορχίας το οποίο έρχεται σε αντίθεση με τα συμπεράσματα του Nuti και πιθανώς οφείλεται στον μεγαλύτερο αριθμό

δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκε (23).

Επίσης, δείχθηκε ότι τόσο στην Κεντρική όσο και στην Βόρεια Ιταλία η παραλλαγή μεταφέρθηκε μέσω της μητέρας. Ωστόσο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι σε μελέτη που διεξήχθη στο Μαρόκο υπήρξε έλλειψη συσχέτισης μεταξύ μετάλλαξης και κρυπορχίας και εκεί στις δύο από τις τρεις οικογένειες που εξετάστηκαν υπήρχε πατρική μετάδοση της μετάλλαξης ενώ όλοι οι πατέρες φορείς εμφάνιζαν φυσιολογική θέση όρχεων (23). Αξίζει να αναφερθεί ότι οι παρατηρούμενες γεωγραφικές διαφορές κάνουν δύσκολο τον συνδυασμό δεδομένων από διάφορες γεωγραφικές περιοχές. Ακόμα και σε μετα-αναλύσεις μελετών που πραγματοποιήθηκαν στην Ιταλία παρουσιάστηκαν σφάλματα καθώς η T222P δεν εντοπίστηκε σε 850 δείγματα ελέγχου, παρόλο που στην Κεντρική Ιταλία η συχνότητα έφτανε το 1,4% (23).

Ο Nuti και οι άλλοι ανέφεραν ότι όσον αφορά στη συχνότητα της μετάλλαξης Thr222Pro δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ 359 ασθενών με κρυπορχία έναντι 463 μαρτύρων. Η μετάλλαξη Arg223Lys βρέθηκε μόνο σε μια περίπτωση αμφοτερόπλευρης κρυπορχίας στην οποία παρατηρήθηκε αυτόματη κάθοδος των όρχεων μεταγεννητικά και η οποία φάνηκε να έχει μικρή επίδραση στον υποδοχέα σε *in vitro* μελέτες που πραγματοποιήθηκαν. Παράλληλα, σε υπογόνιμους ασθενείς εντοπίστηκε ο πολυμορφισμός G178AG/A που προκαλεί την αλλαγή της Ala σε Thr (κωδικόνιο 60) η οποία μπορεί να είναι αρκετή για να αλλάξει την δομή της πρωτεΐνης. Ωστόσο, ο πολυμορφισμός αυτός αποτελεί έναν από τους πιο μικρής σημασίας γενετικούς παράγοντες που σχετίζονται με την εμφάνιση της κρυπορχίας καθώς ανιχνεύεται μόνο σε συγκεκριμένους πληθυσμούς ασθενών που πιθανότατα οφείλεται στο συγκεκριμένο γενετικό υπόβαθρο και το περιβάλλον. Αυτή η κατάσταση μοιάζει με αυτήν των CAG επαναλήψεων, πολυμορφισμό που εντοπίζεται στο γονίδιο του ανδρογονικού υποδοχέα(12).

Προηγούμενες μελέτες μάλιστα πρότειναν ότι όλοι εκτός από τρεις φορείς μοιράζονταν έναν κοινό απλότυπο: C-C-G-A-13. Αυτά τα ευρήματα οδήγησαν στην υπόθεση ότι υπάρχει ένας κοινός πρόγονος με τον απλότυπο C-C-G-A-13 στην περιοχή της Μεσογείου. Η ανάλυση απλοτύπων επιβεβαίωσε την παρουσία αυτού του απλοτύπου σε όλους της Ισπανούς και σε όλους της Ιταλούς φορείς για αυτήν την μετάλλαξη. Πιο ειδικά η ανάλυση δύο ισπανικών τριπλετών (μητέρα, πατέρα

και κρυψορχικός γιος) και μητέρα/γιος υποστήριξε την υπόθεση ότι υπάρχει μια σύνδεση μεταξύ T222P και απλοτύπου C-C-G-A-13 σε αυτές της περιπτώσεις(23). Στην μια περίπτωση η αλλαγή βρισκόταν πάνω στον απλότυπο C-C-G-A-13. Παράλληλα έχει παρατηρηθεί και ο απλότυπος C-C-G-A-12 ο οποίος θα μπορούσε να προέλθει από τον C-C-G-A-13 μέσω συρρίκνωσης της αλυσίδας των πολυαδενινών, καθώς η συρρίκνωση και η επέκταση των επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών είναι ένα κοινό φαινόμενο (23). Συμπερασματικά, έχει φανεί ότι η μετάλλαξη T222P δεν έχει καμία παθογενετική επίδραση στην κρυψορχία στον ισπανικό πληθυσμό. Παρόλο που στην Ιταλία η μετάλλαξη T222P φαίνεται να αποτελεί ήπιο κίνδυνο για την εμφάνιση της κρυψορχίας, ο διαγνωστικός έλεγχος για αυτήν δεν ενδείκνυται λόγω της υψηλής συχνότητας των φορέων – μαρτύρων (1,4% των Ιταλών ανδρών χωρίς ιστορικό κρυψορχίας) (23).

Η περιοχή του INSL3 με τους περισσότερους πολυμορφισμούς είναι το C πεπτίδιο, όπου 6 στις 10 μεταλλάξεις εντοπίζονται εκεί. Όσον αφορά στο ρόλο που παίζουν αυτές οι μεταλλάξεις, υπάρχουν στοιχεία ότι οι παρανοηματικές μεταλλάξεις (missence) V18M και P49S οδηγούν σε ανικανότητα ή μειωμένη ικανότητα του μεταλλαγμένου πεπτιδίου να ενεργοποιήσει τον LGR8 υποδοχέα. Η μη νοηματική (nonsense) R73X ευθύνεται για τη λήξη της μετάφρασης. Φυσιολογική ενεργοποίηση του υποδοχέα παρατηρείται παρουσία των W69R, P93L, R102H, R105H και N110K μεταλλάξεων (12). Η R223K παρατηρήθηκε μόνο σε μια περίπτωση ενώ λίγα στοιχεία υπάρχουν για την R102C. Η καινούργια υποκατάσταση της C-19G στην περιοχή του εκκινητή θα μπορούσε να έχει ενδιαφέρον ωστόσο η ανάλυση έκφρασης της δραστηριότητας του υποδοχέα δεν αποκάλυψε κάποια διαφορά σε σχέση με το άγριου τύπου (wildtype) αλληλόμορφο του INSL3 (10). Αξίζει να αναφερθεί ότι οι περισσότερες δημοσιευμένες μελέτες περιλαμβάνουν ασθενείς με σποραδική κρυψορχία. Ο Feng και συν. πρότειναν ότι αξιοσημείωτες μεταλλάξεις απώλειας λειτουργίας είτε στον αρχικό εκκινητή ή στις κωδικοποιούσες περιοχές του INSL3 είναι πιθανό να εμφανίζονται σε λιγότερο από το 11% των οικογενών περιπτώσεων κρυψορχίας (12). Στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί ότι έλεγχος για μεταλλάξεις στο INSL3 και τον υποδοχέα του GREAT/LGR8 που πραγματοποιήθηκε σε 13 οικογενείς περιπτώσεις κρυψορχίας σε ασθενείς διαφορετικής εθνικής καταγωγής δεν ανίχνευσε καμία μετάλλαξη στους ασθενείς

αποδεικνύοντας ότι οι μεταλλάξεις που εμπλέκουν τα δύο αυτά γονίδια δεν αντιπροσωπεύουν μια κοινή αιτιολογία της ασθένειας. Μέχρι σήμερα καμία οικογενής περίπτωση μεταλλαγμένου αλληλόμορφου δεν έχει συσχετιστεί με ανωμαλίες των όρχεων στον άνθρωπο (11).

Εν κατακλείδι, οι πιο πρόσφατες μελέτες προτείνουν ότι οι αλλαγές A24G, V43L, και A60T στο INSL3 και η I604V στο RXFP2 αντιπροσωπεύουν κοινούς πολυμορφισμούς ενώ 12 μεταλλάξεις και συγκεκριμένα οι C-19G, V18M, P49S, W69R, R73X, P93L, R102C, R102H, R105H, και N110K στο INSL3 καθώς και οι T222P και R223K στο RXFP2 εμφανίζονται αποκλειστικά σε κρυφορχικά αγόρια ή σε ενήλικες με ιστορικό κρυφορχίας (10).

5. A.2A Ανδρογόνα και κρυφορχία

Πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η αρρενοποίηση ρυθμίζεται από την δράση των ανδρογόνων σε πρώιμο στάδιο της εμβρυικής ζωής πριν από την μορφολογική διαφοροποίηση και ελλιπής δράση ανδρογόνων έστω και μόνο σε αυτό το πρώιμο στάδιο ανάπτυξης θα μπορούσε να προκαλέσει κρυφορχία. Παρόλα αυτά ο μηχανισμός που θα μπορούσε να οδηγήσει σε «μεμονωμένη» κρυφορχία δεν έχει ακόμα αποσαφηνιστεί. Γεγονότα ανεξάρτητα από τα ανδρογόνα μπορεί να συμβάλλουν στην κάθοδο των όρχεων (16). Έχει δειχθεί ότι τα επίπεδα τεστοστερόνης πλάσματος μπορεί να εμφανίζονται κοντά στις τιμές αναφοράς σε ασθενείς με κρυφορχία. Ωστόσο μετά από την εφαρμογή διέγερσης με χοριακή γοναδοτροπίνη τα επίπεδα τεστοστερόνης δεν αυξάνονται ικανοποιητικά συγκριτικά με αυτά των φυσιολογικών ατόμων, σε ένα ποσοστό της τάξης του 30% των κρυφορχικών ασθενών (1).

5. A. 2B Ανδρογονικόςυποδοχέας

Είναι ευρέως αποδεκτό ότι τα ανδρογόνα δρουν τόσο στον οίακα όσο και στον κρανιακό ανασταλτικό σύνδεσμο (CSL) και είναι οι κύριοι μεσολαβητές της ενδοκαναλοοσχεικής φάσης της καθόδου των όρχεων. Κατά την διακοιλιακή φάση

της καθόδου των όρχεων, τα ανδρογόνα συνεισφέρουν στην υποστροφή του κρανιακού ανασταλτικού συνδέσμου. Παρόλα αυτά η ανάπτυξη του οίακα σε αυτήν τη φάση φαίνεται να είναι ανεξάρτητη των ανδρογόνων (10).

Επειδή τα ανδρογόνα έχουν ρόλο κλειδί στην κάθοδο των όρχεων αλλά και στην σεξουαλική διαφοροποίηση, οι μεταλλάξεις στον υποδοχέα των ανδρογόνων οδηγούν σε αξιοσημείωτες αλλαγές τόσο στα έσω όσο και στα έξω γεννητικά όργανα στον άνθρωπο. Το σύνδρομο αντίστασης στα ανδρογόνα προκαλείται από μεταλλάξεις του ανδρογονικού υποδοχέα. Αποτελεί μια διαταραχή που περιλαμβάνει ποικιλόμορφη ανάπτυξη των παραγώγων των πόρων του Wolff, κρυψορχία και υποσπαδία και ενδεχομένως και μικροπεϊσμό γι' αυτό οι μεταλλάξεις του υποδοχέα AR δεν είναι συχνή αιτία της μεμονωμένης κρυψορχίας. Το γονίδιο αυτό έχει δύο πολυμορφικές περιοχές που χαρακτηρίζονται από διαφορετικού αριθμού επαναλήψεις CAG και GGN. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει μια συσχέτιση μεταξύ του επαναλαμβανόμενου πολυμορφισμού CAG/GGN και κρυψορχίας (16).

Συμπερασματικά λοιπόν, περισσότερες από 300 διαφορετικές μεταλλάξεις έχουν εντοπιστεί στο γονίδιο του υποδοχέα των ανδρογόνων και προκαλούν ποικίλου βαθμού εκδηλώσεις του συνδρόμου αντίστασης στα ανδρογόνα. Σε αυτές της περιπτώσεις η κρυψορχία αντιπροσωπεύει ένα σύμπτωμα ενός πιο πολύπλοκου συνδρόμου και συνήθως σχετίζεται με την αποτυχία της ενδοκαναλοοσχικής φάσης καθόδου. Συγκεκριμένα, η πιο σοβαρή αντίσταση στα ανδρογόνα σχετίζεται με ενδοκοιλιακούς όρχεις ενώ οι όρχεις εντοπίζονται στην βουβωνική χώρα σε ηπιότερες μορφές του συνδρόμου. Από την άλλη πλευρά, έλεγχος για μεταλλάξεις στο γονίδιο του υποδοχέα των ανδρογόνων σε ασθενείς με μεμονωμένη κρυψορχία απέτυχε στο να εντοπίσει κάποια ανωμαλία (10).

5.A.3 Οιστρογόνα και κρυψορχία

Ο ρόλος των οιστρογόνων στην κάθοδο όρχεων είναι ασαφής αλλά ο προσδιορισμός περιβαλλοντικών παραγόντων με οιστρογονική δραστηριότητα ικανών να επηρεάσουν την ανάπτυξη του ανδρικού ουρογεννητικού συστήματος,

οδήγησε σε αυξημένο ενδιαφέρον για την πιθανή συμμετοχή της στην κρυφορχία στον άνθρωπο (10). Αυτό αποδεικνύεται και από μελέτες που διαπίστωσαν αυξημένα επίπεδα οιστραδιόλης στον πλακούντα μητέρων κρυφορικών αρρένων-νεογνών. Τα οιστρογόνα δρουν μέσω των οιστρογονουποδοχών ESR1 και ESR2 οι οποίοι είναι πιθανοί υποψήφιοι για μια τέτοια ρυθμιστική δράση, επειδή η οιστρογονική επίδραση των περιβαλλοντικών ενδοκρινικών διαταρακτών ασκείται μέσω των οιστρογονουποδοχών. Ωστόσο, ο ESR1 έχει λάβει μεγαλύτερη προσοχή, διότι ο ESR1 φαίνεται να παίζει κάποιο ρόλο στο ανδρικό γεννητικό σύστημα και την αναπαραγωγική υγεία, ενώ ο ESR2 έχει λιγότερο εμφανή δράση (10). Η κρυφορχία θα μπορούσε να συσχετιστεί με έναν συγκεκριμένο απλότυπο του γονιδίου του υποδοχέα των οιστρογόνων α (ESR1). Έχει προταθεί ότι η ύπαρξη ομοζυγωτίας για αυτόν τον απλότυπο θα μπορούσε να αυξήσει την ευαισθησία της επιδράσεις των ενδοκρινικών διαταρακτών οιστρογονικής φύσης (EEDs) (1). Συμπερασματικά λοιπόν, οι επιδράσεις των EEDs στην κάθοδο των όρχεων εξαρτώνται από την ευαισθησία του μοναδικού γενετικού υποστρώματος του καθενός ασθενούς.

Ωστόσο, της πιθανός μηχανισμός που θα μπορούσε να εξηγήσει την εμφάνιση της κρυφορχίας είναι η καταστολή της παραγωγής ή της δράσης των ανδρογόνων από τα οιστρογόνα (15). Κατ' επέκταση τα οιστρογόνα αναστέλλουν την παραγωγή INSL3 και γι' αυτό διαταράσσουν την κάθοδο των όρχεων (7). Ο Wang και οι άλλοι ανέφεραν ότι το SNP12 (RS 6932902) στην 3 – τερματική περιοχή του ESR1 και οι 4 εκτιμώμενοι απλότυποι στην περιοχή 3 του γονιδίου ESR1 δεν συνδέθηκαν με την εμφάνιση της κρυφορχίας, αλλά ο απλότυπος AGATC συνδέθηκε με τη βαρύτητα της κρυφορχίας (16). Ο μοναδικός άνδρας που περιγράφηκε με μια ομόζυγη μετάλλαξη του ESR1 έχει όρχεις σε φυσιολογική θέση στο όσχεο. Μόνο δύο μελέτες ανέλυσαν την πιθανή συμμετοχή πολυμορφισμών στο ESR1 γονίδιο στην εμφάνιση της κρυφορχίας. Σε μια μελέτη από την Ιαπωνία 5 πολυμορφισμοί ενός νουκλεοτιδίου στην 3' περιοχή του γονιδίου (το αλληλόμορφο AGATA) εντοπίστηκαν σε μεγάλο βαθμό σε ασθενείς με κρυφορχία σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (34,0 έναντι 21,3%) και η ομοζυγωτία για αυτό το αλληλόμορφο βρέθηκε μόνο μεταξύ ασθενών με κρυφορχία. Σε αντίθεση, στην μελέτη που πραγματοποιήθηκε στην Ιταλία, ο απλότυπος AGATA βρέθηκε να σχετίζεται με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης της κρυφορχίας. Οι παρατηρούμενες διαφορές θα

μπορούσαν να οφείλονται στο διαφορετικό γενετικό υπόβαθρο των δύο πληθυσμών ή στο μικρό αριθμό περιπτώσεων που μελετήθηκαν (63 στην ιαπωνική μελέτη και 118 στην ιταλική) (10).

5.A.4 SF-1

Ο στερεοϊδογενετικός παράγοντας-1 (SF-1) παίζει ρόλο κλειδί στον καθορισμό του φύλου και την διαφοροποίηση των γονάδων (20) και είναι σημαντικός για τη διατήρηση της στεροειδογένεσης στους όρχεις στον άνθρωπο (16). Πολυμορφισμοί στο SF-1 μπορεί να εντοπιστούν σε συνδυασμό με μια ποικιλία φαινοτύπων σε σχέση με το αναπαραγωγικό σύστημα όπως ο υποσπαδίας, η ανορχία, ο ανδρικός παράγοντας υπογονιμότητας. Ετερόζυγες αλλαγές στον NR5A1 θεωρούνται ένα σχετικά συχνό εύρημα σε ασθενείς με διαταραχές της διαφοροποίησης του φύλου (46,XYDSD) χωρίς να συνοδεύονται από ανεπάρκεια των επινεφριδίων (24).

Γονοτυπική ανάλυση που διεξήχθη για τον πολυμορφισμό G146A στο γονίδιο Ad4BP/SF-1, έδειξε ότι το αλληλόμορφο Ala του γονοτύπου Ala / Gly και η συχνότητα εμφάνισης των γονοτύπων Ala / Ala συν Ala / Gly ήταν σημαντικά υψηλότερες της ασθενείς με κρυφορχία σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (16). Ο κοινός μη συνώνυμος πολυμορφισμός στο NR5A1 (p.G146A) έχει δειχθεί ότι μπορεί να προκαλεί ήπια μεταβολή στη λειτουργική δραστηριότητα σε μια σειρά μελετών. Σε δύο πληθυσμιακές μελέτες έχει προταθεί η συσχέτιση του συγκεκριμένου πολυμορφισμού με τον μικροπεΐσμό ή την κρυφορχία (20).

Υπερέκφραση του SF-1 θα μπορούσε να προκύψει από διπλασιασμούς της χρωμοσωμικούς τόπους του NR5A1 με αποτέλεσμα να οδηγήσει σε σημαντικούς πολυμορφισμούς (CNV) ή σε ενίσχυση της μεταγραφής του NR5A1 λόγω της αυξημένης ενίσχυσης της δραστηριότητας ή λόγω της ακόλουθης μειωμένης επαγωγής της μεθυλίωσης (24). Δεδομένης της δοσοεξαρτώμενης επίδρασης του SF-1, θα μπορούσε να προβλεφθεί ότι ηπιότερες λειτουργικές αλλαγές θα μπορούσαν να σχετίζονται με λιγότερο σοβαρούς παθολογικούς φαινοτύπους. Σε μια πρόσφατη μελέτη 24 ασθενών με αμφοτερόπλευρη ανορχία με ή χωρίς

μικροπεϊσμό, εντοπίστηκε μια ετερόζυγη μετάλλαξη η p.V355M στο NR5A1 σε δύο διζυγωτικά δίδυμα. Η μετάλλαξη p.V355M δεν φάνηκε να επηρεάζει σημαντικά την έκφραση της πρωτεΐνης, ωστόσο μείωσε στο μισό την ενεργοποίηση της μεταγραφής(20).

Τα πρότυπα που κληρονομούνται και σχετίζονται με αλλαγές στο NR5A1 μπορεί να είναι de novo αυτοσωμικά επικρατή, φυλοσύνδετα επικρατή ή αυτοσωμικά υπολειπόμενα (24). Έχει παρατηρηθεί ότι παρόλο που από τις ετερόζυγες αλλαγές που εντοπίζονται στον SF-1 περίπου το 1/3 αυτών είναι de novo γεγονότα (ή ακόμα και μωσαϊκά), έχει βρεθεί ότι κληρονομούνται από την μητέρα με φυλοσύνδετο επικρατή τρόπο (20).

5.A.5 Γονίδια HOX

Τα Hox γονίδια που είναι εξελικτικά σχετιζόμενα με τα ομοιοτικά γονίδια της Δροσόφιλας παίζουν καθοριστικό ρόλο στην μορφογένεση της τμηματικής δομής κατά μήκος του πρώιμου σωματικού άξονα, της οι βραγχιακές αψίδες, οι σπόνδυλοι, τα κρανιακά νεύρα, και τα γάγγλια (16). Τα γονίδια HOX κωδικοποιούν μια υψηλά συντηρημένη οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων που παίζουν έναν καθοριστικής σημασίας ρόλο στην πρώιμη μορφογένεση του εμβρύου (13). Τα γονίδια αυτά εκφράζονται σε πολλούς τύπους κυττάρων συμπεριλαμβανομένων και εκείνων του ουροποιογεννητικού συστήματος (νεφρά, γονάδες και γεννητικό φύμα) και ενεργούν ως κύριοι ρυθμιστικοί διακόπτες ή παράγοντες μεταγραφής που προσδιορίζουν την αξονική ταυτότητα (specify axial identity) και ελέγχουν την ανάπτυξη και την διαφοροποίηση των κυττάρων. Αξίζει να αναφερθεί ότι εμφανίζουν αξιοσημείωτη συντήρηση κατά την εξέλιξη καθώς έχουν σχεδόν την ίδια αλληλουχία σε ποντικούς και σε ανθρώπους (12).

A. Hoxa10 and Hoxa11

In situ υβριδισμός για τα μετάγραφα του HOXA10 σε αγρίου τύπου ποντίκια έχει δείξει ότι εκφράζονται κυρίως στον οίακα και στο νεφρό, αλλά όχι σε άλλα

όργανα και ιστούς του ανδρικού αναπαραγωγικού συστήματος. Συνεπώς αν και δεν έχουμε καμία πληροφορία σχετικά με το ρόλο αυτού του μεταγραφικού παράγοντα σε άλλα είδη εκτός από το ποντίκι αποτελεί αναμφισβήτητα ένα υποψήφιο γονίδιο που αξίζει να μελετηθεί στα πλαίσια της εμφάνισης της κρυφορχίας (12).

Τα HoxA10 και Hoxa11 πιστεύεται ότι παίζουν καθοριστικό ρόλο στην διακοιλιακή φάση καθόδου των όρχεων και μάλιστα ο Satokata και συν. ανέφεραν ότι τα Hoxa10 knockout ποντίκια εμφάνισαν αμφοτερόπλευρους ενδοκοιλιακούς όρχεις. Παράλληλα τα Hoxa11 knockout ποντίκια εμφάνισαν ανεπαρκή κάθοδο των όρχεων με τους όρχεις να μην καταφέρνουν να κατέλθουν στον οσχεικό σάκο εκδηλώνοντας ποικίλου βαθμού κρυφορχία με κάποια ποντίκια να εμφανίζουν ως και ενδοκοιλιακούς όρχεις. Ωστόσο, δεν υπάρχουν στοιχεία που να αποδεικνύουν ότι υπάρχει κάποια σχέση μεταξύ HOXA10 αλληλομόρφων και κρυφορχίας στον άνθρωπο (16).

Μάλιστα αντιφατικά είναι τα στοιχεία που προέκυψαν από δύο μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στον άνθρωπο από τον Kolon και τον Bertini. Ο Kolon και οι συνεργάτες ανέφεραν ότι ανευρέθηκαν αλλαγές (11%) (πολυμορφισμοί) στο οξέδιο 1 του γονιδίου Hoxa10 σε 45 παιδιά με κρυφορχία ενώ καμία δεν εντοπίστηκε στα 16 δείγματα ελέγχου. Συγκεκριμένα, εντοπίστηκαν 5 μη συνώνυμες μεταλλάξεις/πολυμορφισμοί και μια έλλειψη/διαγραφή (13). Ωστόσο, σε μια άλλη μελέτη ο Bertini ανέφερε την ύπαρξη πολυμορφισμών στο HOXA10 που ανιχνεύθηκαν της με την ίδια συχνότητα τόσο σε δείγματα ελέγχου (28 άτομα) όσο και σε κρυφορχικούς ασθενείς (18 άτομα), συγκεκριμένα ανέφερε έναν σιωπηλό πολυμορφισμό τόσο στους κρυφορχικούς ασθενείς όσο και στα δείγματα ελέγχου σε ένα ποσοστό της τάξης του 10% (16). Εν κατακλείδι, πολυμορφισμοί έχουν βρεθεί στο εξώνιο 1 του Hoxa-10 γονιδίου αλλά δεν έχουν αναγνωριστεί αιτιολογικές μεταλλάξεις στον άνθρωπο (7), ενώ στο εξώνιο 2 του Hoxa10 δεν έχει αναφερθεί κάποια μετάλλαξη ή πολυμορφισμός μέχρι στιγμής (12).

B. HoxD13

Μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε 44 κρυφορχικούς ασθενείς που εμφάνιζαν μεμονωμένη κρυφορχία και όχι στα πλαίσια κάποιου συνδρόμου έναντι 46 φυσιολογικών δειγμάτων διαπίστωσε ότι το αλληλόμορφο 180A>G (A60A) στο

HOXD13 αποτελεί παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση κρυφορχίας και ότι ένα δυναμικό ισοδύναμο των γονιδίων στο παράλογο 13 του HOX εμπλέκεται στην παθογένεση της κρυφορχίας (13). Η συνώνυμη αυτή μετάλλαξη/πολυμορφισμός δεν οδηγεί σε αλλαγή/υποκατάσταση αμινοξέος, ωστόσο θα μπορούσε να οδηγήσει σε πρόβλημα κατά το μάτισμα και συνεπώς στο στάδιο της μετάφρασης. Αυτή η αλλαγή του νουκλεοτιδίου που σχετίστηκε με την κρυφορχία εντοπίζεται στο αμινοτελικό άκρο της περιοχής της πολυαλανίνης που έχει αναφερθεί ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του ουροποιογεννητικού συστήματος.

5.A.6 Αλληλεπιδράσεις γονιδίων και κρυφορχία

Ανωμαλίες του οίακα στα knockout Hoxa10 ποντίκια προτείνουν ότι υπάρχει μια πιθανή συσχέτιση μεταξύ ρυθμιστικών οδών του HOXA10 και του INSL3 που επάγουν την διαφοροποίηση του οίακα. Δύο μεταγραφικοί παράγοντες φαίνεται να επηρεάζουν την έκφραση του INSL3 in vitro, ο στερεοειδικός παράγοντας SF-1 και ο πυρηνικός υποδοχέας DAX-1. Πρόσφατα δείχθηκε ότι ο SF-1 επηρεάζει την μεταγραφή του ανθρώπινου γονιδίου του GREAT/LGR8 in vitro, παρόλο που η επίδραση του SF-1 στον εκκινητή GREAT/LGR8 είναι πιο έμμεση. Τελευταία αποδείχθηκε ότι το SOX9, που είναι ένας από τους κυριότερους παράγοντες που συμμετέχουν στον καθορισμό του φύλου αυτορυθμίζει την έκφραση του SF-1 in vitro συνδέοντας έτσι τον καθορισμό του φύλου στα αρρενα με την κάθοδο των όρχεων.

5.A.7 Χρωμοσωμικές ανωμαλίες

Οι επιδημιολογικές μελέτες αναφέρουν ότι η συχνότητα των χρωμοσωμικών ανωμαλιών σε ασθενείς με κρυφορχία εμφανίζεται σε ποσοστό της τάξης του 3-4% (10). Συγκεκριμένα, η συχνότητα χρωμοσωμικών ανωμαλιών που παρατηρήθηκε σε περισσότερους από 1000 ασθενείς με μεμονωμένη κρυφορχία έφτανε το 2.4%, ενώ όταν εξετάστηκαν 400 ασθενείς που εμφάνιζαν κρυφορχία μαζί με ανωμαλίες όπως ο υποσπαδίας, το ποσοστό αυξήθηκε στο 7.6% (10). Αξίζει να σημειωθεί το γεγονός ότι η αμφοτερόπλευρη κρυφορχία σχετίζεται συχνότερα με χρωμοσωμικές αλλαγές

(5%) από ότι η μονόπλευρη κρυφορχία (3%) (10). Σε πρόσφατες μελέτες έχουν επιβεβαιωθεί de novo διπλασιασμοί και ελλείμματα στις περιοχές 10p14 και Xq28 σε ασθενείς με κρυφορχία (17).

Παράλληλα, αλλαγές στους 2q22 και Xq28 τόπους βρέθηκαν σε ασθενείς με κρυφορχία και υποσπαδία. Αυτές οι περιοχές του γονιδιώματος ενδέχεται να περιλαμβάνουν υποψήφια γονίδια που ρυθμίζουν τόσο την κάθοδο των όρχεων όσο και το σχηματισμό της ανδρικής ουρήθρας. Σε έναν από τους ασθενείς το έλλειμμα που διαπιστώθηκε στην περιοχή 2q22 συνοδευόταν από κρυφορχία και υποσπαδία και ήταν στην περιοχή που σχετίζεται με το σύνδρομο Mowat-Wilson (17). Κληρονομούμενες από τη μητέρα αλλαγές των αντιγράφων θεωρήθηκαν σαν αδιευκρίνιστης κλινικής σημασίας αν και αναγνωρίστηκαν διπλασιασμοί στην 5p15.2 περιοχή και στην περιοχή του ανδρογονικού υποδοχέα Xq12 που σχετίστηκαν με την εμφάνιση της κρυφορχίας (17). Εν κατακλείδι, η κρυφορχία είναι ένα σύνηθες χαρακτηριστικό πολλών συνδρόμων που σχετίζονται με χρωμοσωμικές ανωμαλίες αλλά καμία χρωμοσωμική ανωμαλία δεν έχει συσχετιστεί με την μεμονωμένη κρυφορχία. Οι πιο συχνές χρωμοσωμικές ανωμαλίες ή μωσαϊκισμοί που συνδέονται με την κρυφορχία είναι εκείνοι που αφορούν τα φυλετικά χρωμοσώματα (12).

5.A.8 Υ χρωμόσωμα

Τα οικογενενή περιστατικά κρυφορχίας που περιγράφονται σε κάποιες μελέτες ίσως συνηγορούν στην συμμετοχή του Υ χρωμοσώματος στην παθογένεση της κρυφορχίας (10). Μελέτες έδειξαν ελλείμματα μόνο σε άντρες με αμφοτερόπλευρη ορχική βλάβη και απουσία ελλειμμάτων σε άνδρες με φυσιολογικά λειτουργικό μονόπλευρο όρχι (10). Η συχνότητα των μικροελλείψεων του Υq δεν διέφερε από αυτή των σοβαρών ιδιοπαθών ορχεοπαθειών. Συμπεράναμε λοιπόν ότι τέτοιου είδους ελλείμματα ήταν πιθανότατα υπεύθυνα για αμφοτερόπλευρη ορχική βλάβη και σαν συνέπεια αυτής θα μπορούσε να προκύψει η κρυφορχία αντί να υπάρχει ρόλος του Υ χρωμοσώματος στην κάθοδο των όρχεων (16).

Συγκρίσεις άλλωστε που έγιναν μεταξύ αντρών με και χωρίς μικροελλείψεις στην Υq περιοχή έδειξαν ότι η συχνότητα εμφάνισης της κρυπορχίας ήταν όμοια και στις δύο ομάδες και ότι δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά στη συχνότητα εμφάνισης μεταξύ ανδρών με σοβαρή ιδιοπαθή υπογονιμότητα και σε άνδρες με μη ιδιοπαθή υπογονιμότητα που σχετίστηκε με κρυπορχία (10). Μερική έλλειψη της περιοχής AZFc δεν φαίνεται να παίζει κάποιο ρόλο στην παθογένεση της κρυπορχίας (10). Στην ίδια μελέτη οι ερευνητές έδειξαν ότι δεν βρέθηκαν ελλείμματα στο γονίδιο DAZ σε υπογόνιμους άνδρες με ιστορικό κρυπορχίας (10). Ωστόσο, ο Foresta και οι συνεργάτες αναφέρουν ότι υπάρχουν μικροελλείψεις στην AZF περιοχή του Υq σε ποσοστό 27.5% στα άρρενα άτομα με κρυπορχία. Το στοιχείο αυτό θα πρέπει να επιβεβαιωθεί και από μελέτες που θα πραγματοποιηθούν σε άλλους πληθυσμούς (7). Η παρουσία μικροελλειμάτων στο Υq σε αγόρια με κρυπορχία θα μπορούσε ενδεχομένως να χρησιμοποιηθεί και σαν δείκτης πιθανής μελλοντικής βλάβης στην σπερματογένεση κατά την ενηλικίωση (10).

5.B Περιβαλλοντικά Αίτια/ Ενδοκρινικοί διαταράκτες και κρυπορχία

Η συχνότητα εμφάνισης της κρυπορχίας έχει αυξηθεί τα τελευταία χρόνια σε μερικές χώρες. Το γεγονός ότι παρατηρείται γεωγραφική ποικιλομορφία συνηγορεί στο ότι περιβαλλοντικοί παράγοντες είναι υπεύθυνοι για αυτό. Τα αποτελέσματα υποστηρίζουν την υπόθεση ότι το περιβάλλον παίζει ρόλο στην διαφοροποίηση του φύλου στον άνδρα (22). Οι περιβαλλοντικοί παράγοντες λειτουργούν σαν ενδοκρινικοί διαταράκτες της καθόδου των όρχεων. Ως ενδοκρινικοί διαταράκτες ορίζονται εξωγενείς ουσίες με την ικανότητα να διαταράσσουν την φυσιολογική ομοιόσταση του οργανισμού και την αναπαραγωγή και σε αυτούς περιλαμβάνονται τα ξενοοιστρογόνα (χημικά της βιομηχανίας), οι συνθετικές και φυσικές ορμόνες, τα φυτο- και μυκοοιστρογόνα καθώς και ουσίες που επηρεάζουν την ενδοκρινική σηματοδότηση. Αναμφισβήτητα, η αλληλεπίδραση των περιβαλλοντικών και γενετικών παραγόντων είναι καθοριστικής σημασίας ενώ έχει παρατηρηθεί ότι κάποια άτομα μπορεί να είναι πιο ευαίσθητα ή πιο ανθεκτικά στους ενδοκρινικούς διαταράκτες από κάποια άλλα. Οι περιβαλλοντικές ενώσεις που πιστεύεται ότι παίζουν κάποιο ρόλο στην εμφάνιση της κρυπορχίας μιμούνται

τη δράση ορμονών που εμπλέκονται στην κάθοδο των όρχεων και δρουν κυρίως σαν αντιανδρογόνα. Μεταξύ ενδοκρινικών διαταρακτών συμπεριλαμβάνονται οι ρύποι οργανοφαινόλες, που συσσωρεύονται στην τροφική αλυσίδα και υπεισέρχονται στον άνθρωπο μέσω των τροφών ζωικής προέλευσης καθώς και οι φθαλικές ενώσεις που χρησιμοποιούνται στα βιομηχανικά προϊόντα και είναι πολύ συχνά παρατηρούμενοι περιβαλλοντικοί ρύποι. Υποψήφιοι ενδοκρινικοί διαταράκτες αποτελούν τα διάφορα ζιζανιοκτόνα, μυκητοκτόνα και άλλα βιομηχανικά χημικά όπως η δισφαινόλη Α (10).

Οι φθαλικοί εστέρες έχειδειχθεί ότι προκαλούν τοξικότητα στην αναπαραγωγική λειτουργία στα αρσενικά τρωκτικά και οδηγούν σε ένα σύνδρομο που προκαλεί ανωμαλίες στο αναπαραγωγικό σύστημα συμπεριλαμβανομένης της κρυπορχίας. Παρόλο που οι μεταλλάξεις αρκετών γονιδίων εξηγούν έναν πολύ μικρό αριθμό των περιπτώσεων της κρυπορχίας αξιοσημείωτη είναι η πρόοδος που γίνεται στην έρευνα πάνω στους πολυμορφισμούς που ενδεχομένως επηρεάζουν την προδιάθεση των ατόμων στους ενδοκρινικούς διαταράκτες. Για παράδειγμα, η κρυπορχία μπορεί να σχετίζεται με έναν συγκεκριμένο απλότυπο του ESR1 γονιδίου που παίζει ρόλο στις οιστρογονικές επιδράσεις που θα προκαλέσουν οι ενδοκρινικοί διαταράκτες. Συγκεκριμένα μια ομάδα από 15 SNPs, στην περιοχή του γονιδίου ESR1, προτείνει ότι η ομοζυγωτία για έναν συγκεκριμένο απλότυπο “AGATA” μπορεί να αυξάνει την προδιάθεση για εμφάνιση κρυπορχίας ενισχύοντας την οιστρογονική επίδραση των ενδοκρινικών διαταρακτών (16).

Δεδομένου ότι η κάθοδος των όρχεων είναι γνωστό ότι εξαρτάται από μια ισορροπημένη αναλογία στεροειδών του φύλου (ανδρογόνων/οιστρογόνων) είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη στα εξωγενή οιστρογόνα. Η ανισορροπία αυτή που θα μπορούσε να προκληθεί από τα ξενοοιστρογόνα οδηγεί σε ανεπαρκή ωρίμανση των κυττάρων Sertolikai των κυττάρων Leydig. Ωστόσο κάποιοι συγγραφείς δεν βρήκαν κάποια συσχέτιση μεταξύ κρυπορχίας και έκθεσης της μητέρας στα ξενοοιστρογόνα (ή φυτοφάρμακα) κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Έχει φανεί ότι υπάρχει αυξημένη συχνότητα εμφάνισης της κρυπορχίας σε γεννήσεις την Άνοιξη και γι’ αυτό έχει προταθεί ότι οι περιβαλλοντικοί παράγοντες επηρεάζουν την κάθοδο των όρχεων. Σε φυσιολογικούς άνδρες αυξημένη έκκριση ωχρινotropου ορμόνης, θυλακιοτρόπου ορμόνης, τεστοστερόνης και ανασταλτίνης έχει

παρατηρηθεί τους μήνες Μάιο και Ιούνιο φτάνοντας στο ναδίρ τον μήνα Αύγουστο και η οποία πιθανότατα θα μπορούσε να συσχετιστεί με τις διακυμάνσεις της έντασης του φωτός καθώς και άλλους παράγοντες (22).

Ωστόσο άλλοι ερευνητές υποστήριξαν ότι η κρυφορχία εμφανίζεται σε μεγάλο βαθμό στα πλαίσια του συνδρόμου δυσγενεσίας των όρχεων. Σύμφωνα με το σύνδρομο δυσγενεσίας των όρχεων (TDS=testicular dysgenesis syndrome) δυσμενείς μεταβολές στην λειτουργία του ανδρικού γεννητικού συστήματος οφείλονται στους ίδιους παράγοντες κινδύνου. Υπάρχουν ενδείξεις ότι όχι μόνο η κρυφορχία και ο υποσπαδίας, αλλά και ο καρκίνος των όρχεων και η ανδρική στειρότητα έχουν εμβρυϊκή προέλευση (7). Τόσο γενετικοί όσο και περιβαλλοντικοί παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων των χημικών ουσιών που προκαλούν ενδοκρινικές διαταραχές, μπορεί να συμβάλουν στην ανάπτυξη του συνδρόμου δυσγενεσίας των όρχεων. Συγκεκριμένα, σε μελέτες που έγιναν σε ζώα φάνηκε ότι η έκθεση σε χημικά με οιστρογονικές ή αντιοιστρογονικές επιδράσεις προκαλεί συνδεόμενες με το TDS διαταραχές εκτός από καρκίνο των γεννητικών κυττάρων.

Ο Skakkebaek και οι συνεργάτες του ήταν εκείνοι που αρχικά πρότειναν την ύπαρξη του συνδρόμου TDS, του συνδρόμου που σχετίζεται με ανωμαλίες του αναπαραγωγικού συστήματος του άρρενος και είναι πιθανώς αποτέλεσμα της έκθεσης σε χημικές ουσίες. Οι φθαλικές ενώσεις μπορεί να αλλάξουν την λειτουργία των κυττάρων του Leydig, επηρεάζοντας τόσο την έκφραση του *InsI3* και την βιοσύνθεση των ανδρογόνων με αποτέλεσμα να προκαλούν κρυφορχία όταν δοθούν σε υψηλές δόσεις σε αρουραίους. Άλλες κατηγορίες περιβαλλοντικών χημικών ουσιών όπως τα φυτοφάρμακα, τα ζιζανιοκτόνα και οι πολυβρωμοδιφαινυλαιθέρες (PBDEs) είναι αντιανδρογόνα, τα οποία εντοπίζονται τόσο στο μητρικό γάλα όσο και στον πλακούντα. Ωστόσο τα τυπικά επίπεδα έκθεσης σε περιβαλλοντικά χημικά, είναι πολύ χαμηλότερα στον άνθρωπο από ότι στα ζώα και παραμένει αβέβαιο στο κατά πόσο συμβάλουν ακόμα και σε συνδυασμό στην εμφάνιση της κρυφορχίας ή σε άλλες ανωμαλίες του αναπαραγωγικού συστήματος στον άνθρωπο. Σε αντίθεση με τον άνθρωπο η αυθόρμητη κάθοδος των όρχεων είναι σπάνιο φαινόμενο στα πειραματικά μοντέλα αρουραίων. Στοιχεία για αυξημένη έκθεση σε ειδικά περιβαλλοντικά χημικά στα αγόρια με κρυφορχία είναι περιορισμένα. Πρόσφατα, ο Carbone και άλλοι

απέτυχαν να αναγνωρίσουν στατιστικά σημαντική διαφορά στους παράγοντες κινδύνου για κρυφορχία που σχετίζονται με την πιθανή έκθεση σε φυτοφάρμακα σε μια μελέτη ασθενών-μαρτύρων. Σε μια άλλη μελέτη που αφορούσε έκθεση σε φθαλικά, ο Swan και οι συνεργάτες ανέλυσαν τους μεταβολίτες του φθαλικού που βρέθηκαν στα ούρα των μητέρων, την θέση των όρχεων και τον δείκτη AGI (ano-genital-index) δηλαδή την απόσταση μεταξύ του πρωκτού και του πρόσθιου τμήματος του πέους σε σχέση με το βάρος σε αγόρια-μάρτυρες 2-36 μηνών (6). Σημειωτέον ότι ο AGI είναι τόσο μεγαλύτερος όσο υψηλότερα επίπεδα ανδρογόνων κυκλοφορούν στο έμβρυο. Ανέφεραν μια εκπληκτικά υψηλή συχνότητα «ατελούς καθόδου των όρχεων» στο 20% 9,5% και 5,9% των αγοριών με μικρό, μέσο και μεγάλο AGI, αντίστοιχα, και το μικρό AGI συσχετίστηκε με υψηλά επίπεδα μεταβολιτών του φθαλικού. Ωστόσο η σημασία αυτών των παρατηρήσεων δεν είναι πλήρως διευκρινισμένη.

Συμπερασματικά λοιπόν, περαιτέρω μελέτες θα ήταν χρήσιμες προκειμένου να αποδειχθεί μια ισχυρή συσχέτιση μεταξύ των περιβαλλοντικών χημικών ουσιών και του κινδύνου εμφάνισης κρυφορχίας η οποία θα απαιτούσε την ανάλυση της έκθεσης σε πολλαπλές χημικές ενώσεις κατά τη διάρκεια κρίσιμων περιόδων της ενδομήτριας ζωής, την αποσαφήνιση των πολύπλοκων γενετικών κινδύνων και την αξιολόγηση του ρόλου της αλληλεπίδρασης περιβάλλοντος και γονιδίων στην έκφραση της νόσου. Η υλοποίηση προοπτικών μελετών απαιτείται προκειμένου να μειωθεί η πιθανότητα λάθους και να εντοπιστούν οι περιπτώσεις κρυφορχίας που λαμβάνουν χώρα κατά την παιδική ηλικία και εκδηλώνονται λίγο μετά από την πρώιμη εξωμήτρια ζωή (6).

Εν κατακλείδι, η έκθεση σε περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως το κάπνισμα, οι φθαλικοί μονοεστέρες, τα οργανικά χλώρια, τα εντομοκτόνα και γενικώς τα χημικά αναστέλλουν την φυσιολογική ανάπτυξη του αναπαραγωγικού συστήματος των αρρένων παιδιών (1). Κάθε λοιπόν εξωτερικός παράγοντας που επηρεάζει το έμβρυο κατά τη διάρκεια των κρίσιμων σταδίων της ανάπτυξης του οίκα και της καθόδου των όρχεων μπορεί να αυξήσει τον κίνδυνο για εμφάνιση κρυφορχίας σε άτομα που εμφανίζουν γενετική προδιάθεση. Τέτοιοι παράγοντες θα μπορούσαν να σχετίζονται με το περιβάλλον του εμβρύου, τα χαρακτηριστικά της μητέρας ή την έκθεση σε άλλες ουσίες (6). Χαρακτηριστικό παράδειγμα

αποτελεί η έκθεση σε διμεθυλοσιλβεστρόλη (1). Η έκθεση σε ξενο-οιστρογόνα θα μπορούσε να προκαλέσει μια μεταβολή στην αναλογία ανδρογόνων/οιστρογόνων που παίζει καθοριστικό ρόλο στην κάθοδο των όρχεων αλλά και στην ωρίμανση των κυττάρων Sertoli και των κυττάρων Leydig. Ωστόσο κάποιοι άλλοι ερευνητές δεν έχουν βρει να υπάρχει κάποια συσχέτιση (1). Η εμφάνιση κρυπορχίας στο οικογενειακό περιβάλλον καθώς και το επάγγελμα των γονιών, σε περίπτωση που εμπλέκει έκθεση σε EDCS, αποτελούν σημαντικούς παράγοντες κινδύνου.

6. Παράγοντες κινδύνου

Η προωρότητα, το χαμηλό βάρος γέννησης, η υπολειπόμενη ενδομήτρια ανάπτυξη, η δίδυμη κύηση, ο διαβήτης της μητέρας και η έκθεση σε οιστρογόνα κατά τη διάρκεια του πρώτου τριμήνου θεωρούνται παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση της κρυπορχίας (22). Επιδημιολογικές μελέτες προτείνουν ότι παράγοντες όπως το κάπνισμα, η κατανάλωση αλκοόλ αλλά και η έκθεση σε περιβαλλοντικούς παράγοντες μπορεί να αυξήσουν ή να συμβάλλουν στον κίνδυνο εμφάνισης της κρυπορχίας (6). Το χαμηλό βάρος (< 2.5 κιλά) γέννησης σε σχέση με την ηλικία κύησης (SGA) φαίνεται να υπερισχύει όλων των άλλων παραγόντων (7). Επιπλέον, ο Preiksa και συν. παρατήρησαν ότι υπάρχει μεγαλύτερη συχνότητα αμφοτερόπλευρης κρυπορχίας σε αγόρια με βάρος γέννησης < 2.500 γραμμαρίων έναντι αγοριών βάρους γέννησης > 2.500 γραμμαρίων με αναλογία πιθανοτήτων 3.8 (95% διάστημα εμπιστοσύνης των 1.04 και 15.80) (22).

Το χαμηλό βάρος γέννησης δηλώνει μια πιθανή συσχέτιση με την κακή λειτουργία του πλακούντα (7). Συγκεκριμένα, η ανεπάρκεια του πλακούντα με μειωμένη έκκριση HCG ίσως είναι το υποκείμενο αίτιο όπως και τα χαμηλά επίπεδα οιστρογόνων της μητέρας. Επίσης, η ενδομήτρια ανάπτυξη παίζει ρόλο κλειδί για της διαταραχές της ανδρικής αναπαραγωγικής ικανότητας. Παράλληλα, έκθεση σε περιβαλλοντικούς παράγοντες, για παράδειγμα τα ανθεκτικά οργανικά χλωρίδια, οι φθαλικοί μονοεστέρες και το κάπνισμα, έχουν πρόσφατα συνδεθεί με αρνητικές επιπτώσεις στην αναπαραγωγική ανάπτυξη του νεογνού(3). Μια άλλη μελέτη διαπίστωσε ότι το συστηματικό κάπνισμα της μητέρας αυξάνει τον κίνδυνο για

αμφοτερόπλευρη κρυφορχία (22). Τέλος, ο διαβήτης της μητέρας, συμπεριλαμβανομένου του διαβήτη κύησης, εμφανίζονται σαν παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση κρυφορχίας (3).

Με βάση άλλες μελέτες η γενετική προδιάθεση θεωρείται ένας ακόμη παράγοντας κινδύνου για την εμφάνιση της κρυφορχίας (2). Επιπλέον, ο κίνδυνος εμφάνισης κρυφορχίας έχει περιγραφεί ότι αυξάνει όσο μειώνεται η ηλικία κύησης που είναι σύμφωνο με τον ανωτέρω περιγραφόμενο χρόνο της καθόδου των όρχεων. Η κρυφορχία επίσης, έχει συσχετιστεί με μια αυξημένη συχνότητα άλλων γεννητικών ανωμαλιών όπως ο υποσπαδίας. Αυτή η παρατήρηση υποστηρίζει τη θεωρία δυσλειτουργίας του πλακούντα και την μετέπειτα διαταραγμένη εμβρυική παραγωγή ανδρογόνων σαν αιτιολογικούς παράγοντες της κρυφορχίας όπως άλλωστε έχει προταθεί σε επιδημιολογικές μελέτες.

Οι επιπλοκές κατά την εγκυμοσύνη όπως για παράδειγμα η προεκλαμψία και ο διαβήτης κύησης έχουν συσχετιστεί με την κρυφορχία σε αρκετές μελέτες. Ο μηχανισμός συσχέτισης μεταξύ κρυφορχίας και διαβήτη κύησης είναι άγνωστος. Παρόλα αυτά θεωρητικά, ο διαβήτης κύησης μπορεί να σχετίζεται με μια ανισορροπία μεταξύ δράσης εμβρυικών ανδρογόνων και οιστρογόνων, δεδομένου ότι έχει συσχετιστεί με μειωμένα επίπεδα δεσμευτικής σφαιρίνης των ορμονών του φύλου της μητέρας (SHBG) και εμβρυική υπερινσουλιναίμια που με τη σειρά της μπορεί να μειώσει τα επίπεδα SHBG (5).

Άλλα μητρικά χαρακτηριστικά που σχετίζονται με την κρυφορχία είναι το κάπνισμα κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης από την μητέρα, το ολιγοάμνιο, οι ανωμαλίες του πλακούντα και η υπέρταση που εκδηλώνεται κατά την εγκυμοσύνη (22). Τέλος, κατά κάποιους ερευνητές η καισαρική τομή θεωρήθηκε σαν παράγοντας κινδύνου εμφάνισης κρυφορχίας ωστόσο μελέτες έδειξαν ότι δεν μπορεί να θεωρηθεί ανεξάρτητος παράγοντας που οδηγεί στην εμφάνιση της κρυφορχίας. Αυτό ίσως δηλώνει ότι η καισαρική τομή αντανακλά άλλους παράγοντες κινδύνου όπως το χαμηλό βάρος γέννησης ή η προωρότητα. Επιπλέον, η καισαρική τομή σε πολλά ιδρύματα αποτελεί πάγια προτίμηση των γυναικολόγων με αποτέλεσμα να μην αποτελεί μια ενδεικτική παράμετρο προς συσχέτιση (22).

7. Επιπτώσεις της κρυφορχίας

7.Α. Υπογονιμότητα

Η κρυφορχία αυξάνει τον κίνδυνο για μειωμένη σπερματογένεση και υπογονιμότητα. Η συχνότητα εμφάνισης της υπογονιμότητας μεταξύ των ασθενών με μονόπλευρη κρυφορχία μπορεί να φτάσει το 32% ενώ μεταξύ των ασθενών με αμφοτερόπλευρη κρυφορχία μπορεί να πλησιάσει το 59%, παρά την χειρουργική αποκατάσταση. Αξίζει να σημειωθεί ότι το 8% των ανδρών στα υπογόνιμα ζευγάρια εμφανίζει ιστορικό κρυφορχίας. Παρόλα αυτά δεν έχει αποσαφηνιστεί ο μηχανισμός που προκαλεί την μειωμένη σπερματογένεση. Η έλλειψη συσχέτισης μεταξύ της ηλικίας διεκπεραίωσης της ορχεοπηξίας και της γονιμότητας υποδηλώνει ότι μπορεί να είναι παρούσα μια εγγενής ανωμαλία των όρχεων. Ανωμαλίες στην ανάπτυξη του σπερματικού επιθηλίου μπορεί να είναι αποτέλεσμα μιας γενετικής ανωμαλίας που να παρατηρείται κυρίως σε ασθενείς με υπογονιμότητα (21).

Η υπογονιμότητα μπορεί να αναγνωστεί σαν συνέπεια της κρυφορχίας, αλλά η ακριβής παθοφυσιολογία της κατάστασης είναι ελάχιστα κατανοητή. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, είναι πιθανό ότι διακριτοί γενετικοί τύποι ή περιβαλλοντικοί παράγοντες επηρεάζουν την κάθοδο όρχεων και τη σπερματογένεση. Περίπου το 25-30% των ασθενών με ιστορικό μονόπλευρης κρυφορχίας και έως το 50% των ασθενών με ιστορικό αμφοτερόπλευρης κρυφορχίας βρέθηκαν να εμφανίζουν ολιγοσπερμία. Μειωμένη σπερματογένεση έχει αποδειχθεί ότι εμφανίζεται στον ετερόπλευρο φυσιολογικά κατελθόντα όρχι σε άνδρες με μονόπλευρη κρυφορχία, γεγονός που υποδηλώνει γενετική ανωμαλία που επηρεάζει τόσο την κάθοδο των όρχεων όσο και την σπερματογένεση. Ωστόσο, δεν έχει ακόμα αποσαφηνιστεί το αν ο γενετικός παράγοντας που ελέγχει την κάθοδο των όρχεων ελέγχει και την σπερματογένεση (21). Μια μείωση στον αριθμό των σπερματογονίων ανά σπερματικό σωληνάριο μπορεί να παρατηρηθεί στα άτομα με κρυφορχία ήδη από την ηλικία του ενός έτους. Αν και έχει υποτεθεί ότι η ανώμαλη ορχική τοποθέτηση οδηγεί σε μειωμένη παραγωγή σπέρματος, ο συγκεκριμένος μηχανισμός παραμένει ασαφής (25).

Η κρυψορχία είναι μια ετερογενής διαταραχή και η λειτουργία των όρχεων στην ενήλικη ζωή μπορεί να έχει υποστεί ποικίλου βαθμού μεταβολή με την ποιότητα του σπέρματος να κυμαίνεται μεταξύ φυσιολογικού αριθμού σπερματοζωαρίων έως αζωοσπερμία. Άνδρες με ιστορικό κρυψορχίας είναι συχνά υπογόνιμοι λόγω διαταραχής στην σπερματογένεση. Πιο σοβαρή βλάβη παρατηρείται συνήθως στην αμφοτερόπλευρη κρυψορχία ακόμα και αν σε ορισμένες περιπτώσεις μονόπλευρης κρυψορχίας ο φυσιολογικά κατελθών όρχις μπορεί να έχει υποστεί βλάβη. Αποτελεί σύνηθες φαινόμενο άνδρες που θεραπεύτηκαν χειρουργικά για την κρυψορχία να παρουσιάζουν μειωμένη συγκέντρωση σπερματοζωαρίων, αυξημένη FSH και μειωμένα επίπεδα ανασταλτίνης Β στο πλάσμα που συσχετίζονται με μειωμένο όγκο όρχεων, υποδεικνύοντας μειωμένο δυναμικό γονιμότητας. Μη φυσιολογικός αριθμός σπερματοζωαρίων συναντάται στο 50% των μονόπλευρων και περίπου στο 80% των ετερόπλευρων κρυψορχικών ανδρών με διορθωμένη κρυψορχία. Στην πρώτη ομάδα, όταν ο ετερόπλευρος όρχις έχει κατέλθει αυτόματα, όσο μικρότερα σε ηλικία είναι τα άτομα που υποβάλλονται σε ορχεοπηξία τόσο μεγαλύτερο αριθμό σπερματοζωαρίων έχουν. Για την ακρίβεια, η κρυψορχία είναι μία από της πιο κοινές αιτίες αζωοσπερμίας και είναι υπεύθυνη για το 20% του συνόλου των αζωοσπερμικών ασθενών. Είναι ευρέως αποδεκτό ότι η μη φυσιολογική κάθοδος των όρχεων οδηγεί σε προοδευτική ιστολογική βλάβη των όρχεων (10).

Για το λόγο αυτό η ηλικία χειρουργικής αποκατάστασης της κρυψορχίας έχει μειωθεί και σήμερα συστήνεται να πραγματοποιείται μέχρι την ηλικία των 2 ετών. Ωστόσο, παρά τη χειρουργική επέμβαση για την αποκατάσταση της κρυψορχίας, έχει αναφερθεί ότι υπογονιμότητα εμφανίζεται στο ένα τρίτο των ασθενών. Ο Hadziselimonic και ο Herzog ανέφεραν ότι το 89% των ασθενών με αμφοτερόπλευρη κρυψορχία που παρέμειναν χωρίς θεραπεία βρέθηκαν αζωοσπερμικοί, ενώ αζωοσπερμία εκδηλώθηκε μόνο στο 32% των ασθενών που ανταποκρίθηκαν με επιτυχία στην χορήγηση hCG και στο 46% των ασθενών που υπέστησαν ορχεοπηξία. Εν αντιθέσει, στην μονόπλευρη κρυψορχία η συχνότητα εμφάνισης αζωοσπερμίας φαίνεται ανεξάρτητη από την μέθοδο θεραπείας και οι ίδιοι συγγραφείς ανέφεραν μια συχνότητα της τάξης του 13%. Επίσης, το ποσοστό τεκνοποίησης είναι διαφορετικό κατά τη σύγκριση μονόπλευρης και αμφοτερόπλευρης κρυψορχίας.

Στην πραγματικότητα, ανεξάρτητα από την ηλικία που πραγματοποιείται η ορχεοπηξία, διακυβεύεται η δυνατότητα τεκνοποίησης στην αμφοτερόπλευρη κρυφορχία σε σύγκριση με τον γενικό πληθυσμό και αυτό φαίνεται να ισχύει εξίσου και στις περιπτώσεις μονόπλευρης κρυφορχίας. Στις τελευταίες μάλιστα περιπτώσεις, αιτίες πέραν της μη φυσιολογικής θέσης των όρχεων πιθανώς να εμπλέκονται στην πρόκληση ορχικής βλάβης, συμπεριλαμβανομένων εγγενών (εκ γενετής) και εξωγενών (ανατομικών) παραγόντων. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, μια ποικιλία συγγενών συνδρόμων, που οφείλονται είτε σε χρωμοσωμικές ανωμαλίες είτε σε μονογονιδιακά νοσήματα, μπορεί να εκδηλώνονται με κρυφορχία (10).

Για παράδειγμα, σε περιπτώσεις μη φυσιολογικού καρυοτύπου ή μικροελλείψεων του χρωμοσώματος Y, η δυσλειτουργία του σπερματικού σωληναρίου είναι συγγενής και εμφανίζεται εκ γενετής. Έτσι ακόμα και πρώιμη χειρουργική επέμβαση θα είχε πολύ μικρή επίδραση στη γονιμότητα. Μια άλλη πιθανή παθογένεση της βλάβης του σπερματικού σωληναρίου της κρυφορχικούς όρχεις θα μπορούσε να σχετίζεται με την έλλειψη γοναδοτροπίνης και τεστοστερόνης κατά το πρώτο μεταγεννητικό στάδιο ωρίμανσης. Έχει αποδειχθεί ότι μετά τον 5^ο μήνα, η αύξηση των γοναδοτροπινών και της τεστοστερόνης είναι απαραίτητη για το μετασχηματισμό-διαφοροποίηση των γεννητικών κυττάρων. Σε αυτές της περιπτώσεις η έγκαιρη χειρουργική επέμβαση μάλλον θα είχε μικρή επίδραση στην σπερματογένεση. Επιπλέον, αυτή η υπόθεση θα μπορούσε να εξηγήσει το αναφερόμενο όφελος της χαμηλής δόσολογίας αναλόγων LHRH για τη διατήρηση της γονιμότητας στα αγόρια με κρυφορχία. Από την άλλη πλευρά, υπάρχουν συγγενείς ανωμαλίες που οδηγούν σε αποτυχία των όρχεων να κατέλθουν φυσιολογικά στο όσχεο κατά την περίοδο της εμβρυϊκής ανάπτυξης εξαιτίας μεταλλάξεων στα γονίδια INSL3 και RXFP2. Σε αυτές της περιπτώσεις η πρώιμη ορχεοπηξία θα μπορούσε να αποτρέψει την εμφάνιση του συνδρόμου Sertoli cell – only και έτσι οι χειρουργικά αποκατεστημένοι όρχεις να έχουν τελικά φυσιολογική σπερματογένεση. Επιπλέον, μεταλλάξεις στα γονίδια αυτά μπορεί να εμπλέκονται στην κάθοδο των όρχεων αλλά να μην επηρεάζουν την σπερματογένεση και την ενδοκρινική λειτουργία του όρχι (10).

Οι περισσότερες μελέτες σχετικά με την ποιότητα του σπέρματος έχουν

χρησιμοποιήσει τα κριτήρια του WHO όπου τα 20×10^6 σπερματοζωάρια / ml ορίζονται ως η χαμηλότερη φυσιολογική συγκέντρωση σπερματοζωαρίων. Οι ενήλικες άνδρες με επιμένουσα αμφοτερόπλευρη κρυπορχία εμφανίζουν συνήθως αζωοσπερμία, ενώ το 28% των ανδρών μετά την χειρουργική αποκατάσταση είχαν φυσιολογικό αριθμό σπερματοζωαρίων. Περίπου το 49% των ανδρών με επίμονη μονόπλευρη κρυπορχία είχαν φυσιολογική συγκέντρωση σπερματοζωαρίων σε σύγκριση με το 71% των ανδρών που υποβλήθηκαν σε ορχεοπηξία. Χαμηλά ποσοστά πατρότητας έχουν σημειωθεί μετά τη θεραπεία αμφοτερόπλευρης κρυπορχίας. Μελέτες έδειξαν ότι η χειρουργική αποκατάσταση όταν πραγματοποιήθηκε μεταξύ 10 μηνών και 4 ετών στην αμφοτερόπλευρη κρυπορχία οδήγησε στην αποκατάσταση του αριθμού των σπερματοζωαρίων μέσα της τιμές αναφοράς στο 76% των περιπτώσεων, σε σύγκριση με το 26%, όταν η χειρουργική επέμβαση πραγματοποιήθηκε μεταξύ 4 και 14 ετών. Εν αντιθέσει, στην μονόπλευρη κρυπορχία η επίδραση του χρόνου δεν ήταν τόσο προφανής καθώς εμφανίστηκαν ποσοστά της τάξης του 75% στην πρώτη ομάδα (10 μηνών – 6 ετών) έναντι του 71% στην δεύτερη ομάδα (9 – 12 ετών) (3).

Η διαφοροποίηση των γονοκυττάρων σε σπερματογόνια είναι ορμονοεξαρτώμενη. Στα αγόρια με κρυπορχία ωστόσο, ο αριθμός των γονοκυττάρων μειώνεται με αποτέλεσμα να μην είναι σαφές αν η αποτυχία διαφοροποίησης λαμβάνει χώρα κατά την διαδικασία ανάπτυξης των γεννητικών κυττάρων. Δυσανάλογη μείωση των σπερματογονίων Ad (dark) αποτελεί την ουσιαστική ανωμαλία στην ανάπτυξη των γεννητικών κυττάρων σε αγόρια με κρυπορχία. Η διαφοροποίηση των γονοκυττάρων σε σπερματογόνια Ad εξαρτάται από την τεστοστερόνη. Τα δημοσιευμένα στοιχεία δείχνουν ότι σε ασθενείς με κρυπορχία τα επίπεδα της τεστοστερόνης και των γοναδοτροπινών είναι χαμηλά, ενώ η αύξηση της τεστοστερόνης στο πλάσμα μπορεί να αναστείλει την παραγωγή IgM και IgG από τα B-κύτταρα και είναι ένας αρνητικός ρυθμιστής της λεμφοποίησης των B-κυττάρων. Μπορεί να θεωρηθεί ότι η μείωση των επιπέδων της τεστοστερόνης, FSH και της LH μπορεί να εξηγήσει την έναρξη της παραγωγής αντισπερματικών αντισωμάτων (1).

Η ωρίμανση των γεννητικών κυττάρων ξεκινά με την διαφοροποίηση των γονοκυττάρων σε σπερματογόνια και ολοκληρώνεται συνήθως μέχρι την ηλικία των

6 μηνών. Στην ηλικία των 3 μηνών, τα σπερματογόνια (Ad) αρχίζουν να εμφανίζονται και αυξάνονται σταθερά σε αριθμό. Ο αριθμός της μειώνεται της κρυφορχικούς όρχεις, στοιχείο που δείχνει ότι υπάρχει μια αποτυχία στη διαδικασία ωρίμανσης των γαμετοκυττάρων. Αυτή η μείωση των σπερματογονίων είναι πιο σοβαρή από τη μείωση του συνολικού αριθμού των γεννητικών κυττάρων. Βλάβη των σπερματοζωαρίων παρατηρείται σε μεγάλο βαθμό σε άνδρες με ιδιοπαθή ολιγοσπερμία με ιστορικό κρυφορχίας. Η εύρεση αυξημένων επιπέδων ενεργών ριζών οξυγόνου σε υπογόνιμα άτομα μπορεί να υποδεικνύει ότι το οξειδωτικό στρες ενέχεται στην παθογένεση της βλάβης του DNA των σπερματοζωαρίων σε αυτά τα άτομα. Υψηλά επίπεδα ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS) διαταράσσουν τις εσωτερικές και εξωτερικές μιτοχονδριακές μεμβράνες, προκαλώντας την απελευθέρωση της πρωτεΐνης του κυτοχρώματος-c και ενεργοποιώντας την απόπτωση. Ο αριθμός των σπερματοζωαρίων μεταβάλλεται τόσο στα άτομα με μονόπλευρη όσο και στα άτομα με αμφοτερόπλευρη κρυφορχία. Ωστόσο, όσο σημαντική και αν είναι η μορφολογία του σπέρματος, η πυκνότητα και η κινητικότητα, η ικανότητα τεκνοποίησης με φυσικό τρόπο αποτελεί τον χρυσό κανόνα για την αξιολόγηση της γονιμότητας των ανδρών με κρυφορχία. Έτσι, έχει αποδειχθεί ότι τα άτομα με αμφοτερόπλευρη κρυφορχία έχουν σημαντική καθυστέρηση στη σύλληψη, σε αντίθεση με τα άτομα με μονόπλευρη κρυφορχία που αποδίδουν σχεδόν όπως και η ομάδα ελέγχου (1).

Ασθενείς με μη αποκατεστημένη αμφοτερόπλευρη κρυφορχία έχουν πολύ υψηλό κίνδυνο εκδήλωσης στειρότητας (μη φυσιολογικός αριθμός σπερματοζωαρίων σε ποσοστό της τάξης του 100%). Εάν η κρυφορχία διορθωθεί ο κίνδυνος πέφτει στο 38% στις μελέτες τεκνοποίησης. Η θέση του όρχεως πριν από τη θεραπεία δεν έχει καμία επίδραση στη γονιμότητα. Οι πιθανότητες τεκνοποίησης σε άνδρες με αποκατεστημένη μονόπλευρη κρυφορχία είναι σχεδόν όμοιες με αυτές των φυσιολογικών ατόμων. Υπογονιμότητα διαπιστώθηκε στο 10% αυτών των ασθενών έναντι του 6% που παρατηρείται στην ομάδα ελέγχου. Η μονόπλευρη απουσία όρχι ή η μονόπλευρη ορχεκτομή δεν αλλάζει τα ποσοστά τεκνοποίησης. Όσο μικρότερη είναι η ηλικία που πραγματοποιείται η χειρουργική επέμβαση τόσο αυτή συσχετίζεται με ευνοϊκότερες τιμές FSH και ανασταλτίνης αργότερα. Εάν αυτό έχει επίδραση στη γονιμότητα δεν είναι γνωστό. Ωστόσο, ιστολογικές αλλαγές

εμφανίζονται ήδη από της 9 μήνες, συστήνοντας έτσι την έγκαιρη παρέμβαση για την αποκατάσταση της κρυφορχίας, προκειμένου να αποφευχθούν περαιτέρω βλάβες ή ακόμα και να διορθωθούν οι ήδη υπάρχουσες. Η ανάπτυξη των όρχεων φαίνεται να εξελίσσεται καλύτερα αν η χειρουργική επέμβαση πραγματοποιείται της 9 μήνες από όταν πραγματοποιηθεί σε ηλικία 3 ετών (2).

7.B. Καρκίνος των όρχεων

Αν και η αιτία εμφάνισης καρκίνου των όρχεων δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί είναι ευρέως αποδεκτό ότι υπάρχει μια ισχυρή συσχέτιση μεταξύ καρκίνου των όρχεων και κρυφορχίας. Στην πραγματικότητα, τα αγόρια με κρυφορχία διατρέχουν υψηλό κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου των όρχεων, και συγκεκριμένα ο κίνδυνος εμφάνισης νεοπλασίας κυμαίνεται μεταξύ 2-3%, το οποίο είναι περίπου τέσσερις φορές υψηλότερο από ότι στον γενικό πληθυσμό. Έχει επίσης αναφερθεί ότι ο κίνδυνος για καρκίνο των όρχεων μειώνεται μετά από την αντιμετώπιση της κρυφορχίας με ορχεοπηξία ενώ έχει παρατηρηθεί αυξημένος κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου περίπου 32 φορές αυξημένος μεταξύ ανδρών που η κρυφορχία παρέμεινε και μετά την ηλικία των 11 ετών (10). Ουσιαστικά 10% όλων των κακοηθειών των όρχεων συνδέονται με την κρυφορχία. Εάν η κρυφορχία αντιμετωπιστεί πριν την ηλικία των 10 ετών αυτός ο κίνδυνος μπορεί να μειωθεί σχεδόν στο φυσιολογικό ή τουλάχιστον να μειωθεί φτάνοντας το διπλάσιο από ότι εμφανίζεται στο γενικό πληθυσμό. Ωστόσο, το σεμίνωμα που είναι μακράν ο πιο κοινός τύπος καρκίνου στην κρυφορχία, έχει σήμερα ένα ποσοστό επιβίωσης περίπου 100%, έτσι ώστε η προηγούμενη θεραπεία της κρυφορχίας να μην έχει καμία επιρροή στην επιβίωση αυτών των ασθενών (2). Η κρυφορχία λοιπόν αποτελεί έναν ευρέως αποδεκτό παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη νεοπλασίας των όρχεων, αλλά το ποσοστό καρκίνου των όρχεων που εν τέλει αποδίδεται στην κρυφορχία φτάνει μόνο περίπου το 5%. Μάλιστα σε μια πρόσφατη μετα-ανάλυση 21 μελετών ασθενών-μαρτύρων σχετικά με την επιδημιολογία των όγκων των γεννητικών κυττάρων, διαπιστώθηκε αυξημένος σχετικός κίνδυνος για τον καρκίνο των όρχεων σε ασθενείς με ιστορικό κρυφορχίας που κυμαίνονταν μεταξύ 3,5 και

17,1. Ο συνολικός σχετικός κίνδυνος ήταν της τάξης του 4,8 (4,0 – 5,7) (3).

Ωστόσο, ο μηχανισμός με τον οποίο συμβάλλει στην καρκινογένεση η κρυψορχία σε μεγάλο βαθμό παραμένει άγνωστος. Αν και πολλά στοιχεία υποδηλώνουν ότι το γενετικό υπόβαθρο είναι υπεύθυνο τόσο για τον καρκίνο των όρχεων όσο και για την κρυψορχία δεν έχει αναφερθεί μέχρι στιγμής κάποια γενετική συσχέτιση μεταξύ τους. Τα τελευταία χρόνια, δύο θεωρίες έχουν προταθεί προκειμένου να εξηγήσουν τη σχέση μεταξύ μη κατελθόντων όρχεων και καρκίνου των όρχεων. Η πιο ευρέως αποδεκτή είναι η υπόθεση του συνδρόμου δυσγενεσίας των όρχεων που περιγράφει τη σχέση μεταξύ γενετικών παραγόντων, ενδοκρινικών διαταρακτών και την επακόλουθη ανάπτυξη κρυψορχίας, υπογονιμότητας, υποσπαδία και καρκίνου των όρχεων (10). Το σύνδρομο δυσγενεσίας των όρχεων περιλαμβάνει την εμφάνιση υποσπαδία, χαμηλή ποιότητα σπέρματος και καρκίνο των όρχεων. Αυτές οι καταστάσεις πιστεύεται ότι έχουν κοινή προέλευση λόγω ενδομήτριας κακής ανάπτυξης του όρχεως που επηρεάζει τόσο τα κύτταρα του Sertoli όσο και τα κύτταρα του Leydig αλλά και την διαφοροποίηση των γεννητικών κυττάρων. Ο σκοπός της διεκπεραίωσης μιας πρώιμης ορχεοπηξίας είναι να αποτρέψει τις πιθανές συνέπειες στην σπερματογένεση κατά την ενήλικη ζωή ενώ η επίδρασή της στον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου των όρχεων δεν είναι ξεκάθαρη (4).

Άλλοι συγγραφείς προτείνουν μια σχέση αιτίας – αποτελέσματος μεταξύ των δύο αυτών καταστάσεων. Σε αυτήν την περίπτωση η ύπαρξη των όρχεων σε μια θέση που δεν είναι η φυσιολογική θα μπορούσε να οδηγήσει στην ανάπτυξη καρκίνου των όρχεων, προτείνοντας έτσι ότι η κρυψορχία είναι ένας πιθανός παράγοντας που εμπλέκεται στην καρκινογένεση. Αυτή η υπόθεση ενισχύεται από το γεγονός ότι η χειρουργική αποκατάσταση της κρυψορχίας μειώνει τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου των όρχεων. Ωστόσο αν και η ορχεοπηξία δίνει και τη δυνατότητα για πρώιμη ανίχνευση του καρκίνου, δεν εξαλείφει πλήρως τον κίνδυνο. Επιπλέον, ακόμα και όταν ο ετερόπλευρος όρχις σε περιπτώσεις μονόπλευρης κρυψορχίας έχει κατέλθει φυσιολογικά, ο κίνδυνος καρκίνου στον εν λόγω όρχι είναι υψηλότερος σε σύγκριση με τον γενικό πληθυσμό. Εν κατακλείδι, φαίνεται ότι η καρκινογένεση της όρχεως ίσως είναι η τελική επίδραση μιας πλειάδας παραγόντων που περιλαμβάνουν ενδοκρινικούς διαταράκτες που επιδρούν στους γενετικά μη φυσιολογικούς όρχεις και προδιαθέτουν έτσι για

κρυφορχία και καρκίνο. Παρόλο που η σχέση μεταξύ καρκίνου των όρχεων και κρυφορχίας είναι πολύπλοκη η πρόωπη χειρουργική αποκατάσταση της κρυφορχίας κρίνεται απαραίτητη καθώς η ορχεοπηξία που πραγματοποιείται πριν την εφηβεία πιστεύεται ότι μειώνει τον κίνδυνο για εμφάνιση καρκίνου των όρχεων (10).

Επιδημιολογικές μελέτες έχουν επίσης συνδέσει την πλειοψηφία των παραγόντων κινδύνου με την ενδομήτρια και την περιγεννητική ανάπτυξη των όρχεων, και αρκετοί από αυτούς τους παράγοντες έχουν συσχετιστεί με την εμφάνιση της κρυφορχίας. Ο καρκίνος των γεννητικών κυττάρων των όρχεων προέρχεται από μια προ-επεμβατική βλάβη, το καρκίνωμα *in situ* (CIS), που είναι γνωστή και ως «μη ταξινομημένη ενδο-σωληνοειδή νεοπλασία των γεννητικών κυττάρων». Η ανάπτυξη των όγκων γίνεται εμφανής συνήθως σε νεαρούς ενήλικες, καθώς τα κύτταρα CIS αρχίζουν να πολλαπλασιάζονται ταχέως μετά την έναρξη της εφηβείας. Σε μια μελέτη 300 ανδρών, που είχαν υποβληθεί σε ορχεοπηξία, βιοψία όρχεων στην ενήλικη ζωή διαπίστωσε CIS στο 1,7% των ατόμων (95% CIS = διάστημα: 0,5 – 3,9%) ενώ δύο άνδρες είχαν διαγνωστεί με καρκίνο των όρχεων πριν από τη μελέτη. Εκτιμήθηκε ότι οι ενήλικες άνδρες με ιστορικό κρυφορχίας εμφάνιζαν CIS σε ποσοστό περίπου 2.9% (1.8 – 4.1). Γενικότερα, η βιοψία των όρχεων στην παιδική ηλικία προς διερεύνηση του CIS δεν συστήνεται. Ωστόσο, εάν η κρυφορχία συνδυάζεται με διαταραχές της φυλετικής διαφοροποίησης ή μη φυσιολογικό καρυότυπο, για παράδειγμα δυσγενεσία των γονάδων, συζητείται η πραγματοποίηση βιοψίας κατά τη διάρκεια της ορχεοπηξίας στην παιδική ηλικία, καθώς υπάρχει αυξημένος κίνδυνος νεοπλασίας. Άτομα με αμφοτερόπλευρη κρυφορχία αντιμετωπίζουν μεγαλύτερο κίνδυνο κακοήθειας από άτομα με μονόπλευρη κρυφορχία. Στη μονόπλευρη κρυφορχία οι περισσότεροι όγκοι εμφανίζονται στους κρυφορχικούς όρχεις, αλλά σε ένα ποσοστό της τάξης του 8-15% των περιπτώσεων εμφανίζονται στον ετερόπλευρο μη κρυφορχικό όρχι. Επιπλέον ο κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου των όρχεων είναι μεγαλύτερος εάν ο όρχις βρίσκεται ενδοκοιλιακά. Σε μια πρόσφατη μελέτη, το 40% των μη ψηλαφητών όρχεων ενήλικων ανδρών είχαν αναπτύξει όγκους των γεννητικών κυττάρων. Παρόλα αυτά τον χαμηλότερο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου των όρχεων τον εμφανίζουν τα άτομα με το σύνδρομο πλήρους αντίστασης στα ανδρογόνα, το οποίο ωστόσο συχνά συνοδεύεται από ενδοκοιλιακούς όρχεις. Αξίζει να αναφερθεί

ότι με βάση τα μέχρι στιγμής δεδομένα, καμία περίπτωση καρκίνου των όρχεων δεν έχει αναφερθεί σε άνδρες που εμφάνιζαν υπογοναδοτροπικό υπογοναδισμό, ο οποίος σχετιζόταν και με την εμφάνιση ενδοκοιλιακών όρχεων. Είναι ευρέως λοιπόν αποδεκτό ότι υπάρχει μια συσχέτιση μεταξύ κρυφορχίας και καρκίνου των όρχεων, αν και μόνο ένα μικρό ποσοστό των ασθενών αναπτύσσουν και τις δύο αυτές διαταραχές κατά τη διάρκεια της ζωής (3).

7.Γ. Ψυχολογική επιβάρυνση

Πολλοί ερευνητές υποστηρίζουν ότι οι κρυφορχικοί όρχεις μπορεί να επηρεάσουν την ψυχοσεξουαλική κατάσταση του άρρενος. Η παραγωγή σπέρματος εμφανίζεται αργότερα στα αγόρια με κρυφορχία αλλά η σεξουαλική δραστηριότητα, το μέγεθος του πέους, τα επίπεδα τεστοστερόνης, τα προβλήματα ανικανότητας και η απόκτηση της ανδρικής ταυτότητας είναι όμοια με εκείνα που εμφανίζονται στον γενικό πληθυσμό (2).

8. Διάγνωση

8.Α. Κλινική εξέταση /Απεικονιστικός έλεγχος

Η διάγνωση της κρυφορχίας θα πρέπει να πραγματοποιείται από έναν έμπειρο εξεταστή σε ένα ήσυχο και ζεστό περιβάλλον για να ελαττώνονται οι πιθανότητες επίδρασης του αντανακλαστικού του κρεμαστήρα μυ (4). Η κλινική εξέταση περιλαμβάνει οπτική περιγραφή του οσχέου και ψηλάφηση όταν το άτομο βρίσκεται σε ύπτια θέση, σε βατραχοειδή στάση και αν είναι δυνατόν σε όρθια στάση. Ασύμμετρο ή υποπλαστικό όσχεο υποδηλώνει μονόπλευρη και ετερόπλευρη κρυφορχία αντίστοιχα (1). Ένας μονόπλευρος μη ψηλαφητός όρχις και ένας μεγενθυμένος ετερόπλευρος όρχις, ειδικά μετά την έναρξη της εφηβείας, ίσως υποκρύπτουν απουσία όρχι ή ατροφία. Ωστόσο αυτά τα ευρήματα δεν αποκλείουν την ανάγκη για χειρουργική διερεύνηση.

Ο εξεταστής θα πρέπει να παρεμποδίζει το αντανακλαστικό του κρεμαστήρα

μυ με την πίεση του ενός χεριού του πάνω από το ηβικό οστό στην βουβωνική χώρα πριν αγγίξει ή πριν φέρει τον όρχι με το άλλο χέρι στο όσχεο. Ασκήι πίεση στη βουβωνική χώρα προς το όσχεο στην προσπάθεια να κατέλθει ο κρυφορχικός όρχις σε αυτό. Αυτός ο χειρισμός επιτρέπει την διαφοροποίηση μεταξύ ενός όρχι που βρίσκεται σε ενδοκαναλοοσχέϊκή θέση (βουβωνική χώρα) και ενός πεπλατυσμένου λεμφαδένα. Θα πρέπει να δοθεί προσοχή στην μηριαία, πεικκή και περινεϊκή περιοχή σε περίπτωση μη ψηλαφητού όρχεος για να αποκλειστεί ο έκτοπος όρχις (3).

Αυτόματη κάθοδος των όρχεων αναμένεται μόνο πριν τους 6 μήνες. Οι ανασπώμενοι όρχις ακολουθούν εντελώς διαφορετική κλινική διερεύνηση και είναι ο κύριος παράγοντας που πρέπει να ληφθεί υπόψη στη διαφορική διάγνωση της αληθούς κρυφορχίας. Στους ανελκώμενους όρχις (ascending) οφείλεται σε ένα μεγάλο βαθμό η καθυστερημένη διάγνωση της κρυφορχίας. Η θέση του όρχεως θα πρέπει να καταγράφεται στον φάκελο του ασθενούς προκειμένου να εντοπιστεί η εκ νέου άνοδος του όρχι.

Αμφοτερόπλευροι μη ψηλαφητοί όρχις ή μονόπλευρη κρυφορχία σχετίζονται με την εμφάνιση υποσπαδία και ελλοχεύουν την ύπαρξη διαταραχής της φυλετικής διαφοροποίησης και για τα άτομα αυτά συστήνεται απαραίτητως ενδοκρινικός και γενετικός έλεγχος. Μέχρι σήμερα καμία απεικονιστική μέθοδος για μη ψηλαφητούς όρχις δεν έχει αποδειχθεί καλύτερη της λαπαροσκόπησης που επιτρέπει την αντιμετώπιση αν υπάρχει όρχις. Το μέγεθος του ετερόπλευρου όρχι δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν προγνωστικός δείκτης μονορχίας. Η απεικόνιση με μαγνητική τομογραφία υπερτερεί μεταξύ των απεικονιστικών μεθόδων καθώς εμφανίζει ακρίβεια περίπου 100%. Ωστόσο, η απεικόνιση θα είχε νόημα μόνο στην περίπτωση απόκλισης παρουσίας ορχικού ιστού με πιθανότητα κακοήθους εκφυλισμού που δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί μέχρι στιγμής (2). Η κρυφορχία θα πρέπει να διαφοροποιείται από τους ανασπώμενους όρχις, μια κατάσταση όπου ο όρχις είναι ψηλαφητός στο άνω τμήμα του οσχέου αλλά μόλις τραβηχτεί στο όσχεο παραμένει εκεί μετά την εξάντληση της δραστηριότητας του κρεμαστήρα μυ. Σε αυτήν την περίπτωση ο ανασπώμενος όρχις δεν πρέπει να θεραπεύεται. Η διαφορική διάγνωση μεταξύ της πραγματικά ανασπώμενου όρχι και του άνω του οσχέου μη κατελθόντος όρχι (κρυφορχία) δεν είναι πάντα εύκολη. Τα δεδομένα

που πρέπει να καταγράφονται κατά την εξέταση περιλαμβάνουν: ηλικία διάγνωσης, κλινικό τύπο σύμφωνα με τους παραπάνω ορισμούς (μη ψηλαφητούς μη κατελθόντες όρχεις, ψηλαφητούς άνω οσχεικούς μη κατελθόντες όρχεις, ανελκόμενους όρχεις), παρουσία μιας σημαντικής κλινικά συνυπάρχουσας νόσου, χρήση ορμονικής θεραπείας, ηλικία ορχεοπηξίας (4).

Σε κλινικό επίπεδο μια διαφοροδιάγνωση ψηλαφητού και μη ψηλαφητού όρχι και μονόπλευρης ή αμφοτερόπλευρης κρυφορχίας φαίνεται να είναι ο πιο πρακτικός τρόπος στον καθορισμό του ποιος θα θεραπευτεί. Θα ήταν ορθό να εφαρμοστεί ένα πιο λεπτομερές σύστημα ταξινόμησης. Κατά προτίμηση ένα τέτοιο σύστημα θα περιέγραφε την ακριβή θέση του όρχεος [υψηλά/χαμηλά κοιλιακά, ενδοκαναλοοσχεικά (βουβωνική χώρα) άνω οσχεικά, υψηλά οσχεικά και έκτοπος] η θέση του κατά τη διάρκεια μεταξύ νηπιακής και παιδικής ηλικίας (αυτόματη κάθοδος, αυτόματη άνοδος) καθώς και κάθε γνωστός αιτιολογικός παράγοντας όπως η προηγούμενη χειρουργική επέμβαση στη βουβωνική χώρα (ιατρογενής κρυφορχία). Λίγοι ερευνητές χρησιμοποιούν την απόσταση μεταξύ της κορυφής της ηβικής περιοχής (λοφίο) και το μέσο του όρχι όταν είναι < 4 εκατοστά στα τελειόμηνα αγόρια (<2.5 εκατοστά στα πρόωρα) σαν μια ένδειξη κρυφορχίας. Ο ανασπώμενος όρχις αντιπροσωπεύει μια φυσιολογική παραλλαγή της θέσης του όρχεος. Ένας τέτοιου τύπου όρχις δεν βρίσκεται αρχικά στο κατώτερο μέρος του οσχέου, αλλά μετά από χειρισμό χωρίς πρόκληση πόνου κατέρχεται σε μια θέση χαμηλά στο όσχεο και μπορεί να παραμείνει εκεί. Η διάγνωση της κρυφορχίας δεν είναι πάντοτε εύκολο να τεθεί και εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την εμπειρία του ερευνητή και τον τύπο της εξέτασης.

Η φυσική εξέταση είναι η μόνη μέθοδος για το διαχωρισμό των ψηλαφητών από τους μη ψηλαφητούς όρχεις. Δεν υπάρχει κανένα όφελος από τη χρήση αξονικής τομογραφίας, μαγνητικής τομογραφίας ή αγγειογραφίας. Αντίθετα, η υπερηχογραφική διερεύνηση επιτρέπει τόσο τον ακριβέστερο εντοπισμό των μη ψηλαφητών όρχεων, καθώς και τον καλύτερο προσδιορισμό του μεγέθους, της υφής των, καθώς και της αιμάτωσής των. Επιπλέον, η διαγνωστική λαπαροσκόπηση είναι η μόνη αξιόπιστη μέθοδος για να επιβεβαιωθεί ή να αποκλειστεί η παρουσία ενδοκοιλιακού ή ενδοβουβωνικού όρχι ή απουσία όρχι. Πριν την λαπαροσκόπηση συνιστάται η φυσική εξέταση υπό γενική αναισθησία λόγω του ότι είναι πιθανό

ορισμένοι μη ψηλαφητοί όρχεις να είναι ψηλαφητοί υπό γενική αναισθησία (26).

Εν κατακλείδι, αξίζει να σημειωθεί ότι η αναφερόμενη συχνότητα εμφάνισης της κρυφορχίας εξαρτάται από την ικανότητα εξέτασης του εξεταστή, τα συστήματα ταξινόμησης, την επιλογή του πληθυσμού μελέτης και την ηλικία εξέτασης του παιδιού. Σε ένα φαινοτυπικά άρρεν νεογνό με αμφοτερόπλευρους μη ψηλαφητούς όρχεις, είναι σημαντικό να αποκλειστεί η διαταραχή διαφοροποίησης του φύλου όπως συμβαίνει στην συγγενή υπερπλασία επινεφριδίων, την πλακουντιακή ανεπάρκεια αρωματάσης ή την υπερανδρογοναιμία της μητέρας (3).

8.B. Εργαστηριακή Διερεύνηση

Οι διαταραχές διαφοροποίησης του ουροποιογεννητικού συστήματος εμφανίζονται με μια συχνότητα της τάξης του 1 στα 2000 με 4500 νεογνά. Παρά τη συχνότητά της, η μοριακή βάση της παθολογίας των συγγενών ανωμαλιών του ουροποιογεννητικού συστήματος είναι ελάχιστα κατανοητή. Η έκθεση του εμβρύου σε περιβαλλοντικές τοξικές ουσίες καθώς και οι σημειακές μεταλλάξεις σε μια μικρή ομάδα γονιδίων μπορεί να επηρεάσουν την ανάπτυξη της ουροποιογεννητικής οδού αλλά οι γνωστές μέχρι σήμερα αιτίες δεν αντιπροσωπεύουν όλες τις ανωμαλίες του ουροποιογεννητικού συστήματος. Ενδιαφέρον έχει το γεγονός ότι, όπως αναφέρεται στην βάση δεδομένων OMIM, ένας συγκεκριμένος αριθμός αυτών των εγγενών λαθών που σχετίζονται με την ανάπτυξη του ουροποιογεννητικού συστήματος συνδέονται με σημαντικές συγγενείς ανωμαλίες ή πολλαπλές μικρές ανωμαλίες γνώρισμα που υποδηλώνει σε μεγάλο βαθμό αιτιολογικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες. Παρόλα αυτά οι μέθοδοι ρουτίνας κυτταρογενετικής ανάλυσης οδήγησαν σε προηγούμενες αναφορές σε χαμηλά ποσοστά δομικών ανωμαλιών που σχετίζονται με ανωμαλίες της διαφοροποίησης του φύλου (17). Ανευρεθείσες χρωμοσωμικές ανακατατάξεις εμπλέκονται στην αιτιολογία των διαταραχών της ανθρώπινης αναπαραγωγής δεδομένου ότι οι μικροελλείψεις του χρωμοσώματος Y σχετίζονται με την ανδρική υπογονιμότητα. Βάση αυτού ελέγχθηκε η υπόθεση ότι υποмикροσκοπικές χρωμοσωμικές αλλαγές, πολύ μικρές για να ανιχνευθούν με τον κλασικό κυτταρογενετικό έλεγχο ίσως εμφανίζονται σε ασθενείς με διαταραχές της διαφοροποίησης του φύλου.

Μελετήθηκαν ακόμα άτομα με υποσπαδία, κρυφορχία και αμφίβολα γεννητικά όργανα, που είναι οι πιο κοινές ανωμαλίες του ουροποιογεννητικού συστήματος στις ουρολογικές παιδιατρικές κλινικές. Συγκρίθηκαν τέτοιου τύπου ανωμαλίες μέσω χρωμοσωμικού ελέγχου μικροσυστοιχιών και μέσω της χρήσης του απλού καρυοτύπου. Αναλύθηκαν περαιτέρω η συμβολή αυτών των δομικών ανωμαλιών στους ήδη παρατηρημένους φαινοτύπους με ανωμαλίες του ουροποιογεννητικού συστήματος μελετώντας την σχέση με την γεννητική οδό, καθώς και τον τύπο κληρονομικότητας αλλά και την επαναληψιμότητά της. Για πρώτη φορά τα ευρήματα αποκάλυψαν την παρουσία συχνών μικροελλείψεων και μικροδιπλασιασμών στο γονιδίωμα παιδιών που γεννήθηκαν με ανωμαλίες του ουροποιογεννητικού και καθιέρωσαν της *de novo* ανακατατάξεις κυττάρων γεννητικής σειράς σαν σημαντικό παράγοντα της εμφάνισης αυτών.

Ωστόσο, ο «χρυσός κανόνας» για την γενετική διάγνωση παραμένει η ανάλυση καρυοτύπου και το ενδοκρινικό προφίλ αλλά ευρήματα σε περιπτώσεις διαταραχής διαφοροποίησης του φύλου δεν είναι πάντοτε πληροφοριακά και κατατοπιστικά. Πράγματι ένα μόνο μικρό μέρος αυτών των αναπτυξιακών ανωμαλιών μπορεί να αποδοθεί σε ανωμαλίες στη σύνθεση της τεστοστερόνης ή στη σύνθεση των επινεφριδιακών στεροειδών ορμονών, αλλαγές του υποδοχέα των ανδρογόνων, εξωγενείς τροποποιητές, προφανείς αριθμητικές και δομικές χρωμοσωμικές αλλαγές της το σύνδρομο Klinefelter. Οι βαθύτερες αιτίες της πλειοψηφίας των ιδιοπαθών περιπτώσεων παραμένουν άγνωστες. Σε αυτήν την μελέτη η χρήση χρωμοσωμικής ανάλυσης μικροσυστοιχιών αποκάλυψε την ύπαρξη κρυπτικών ανισορροπιών που συνδέονται ισχυρά με ανωμαλίες στην ανάπτυξη του ουροποιογεννητικού ή που έχουν βρεθεί περιοδικά σε ασθενείς με διαταραχές του φύλου. Το μεγαλύτερο ποσοστό αυτών των χρωμοσωμικών ανωμαλιών ήταν πολύ μικρές για να ανιχνευθούν από τον κλασικό – απλό καρυότυπο ο οποίος έχει περιορισμένη ανάλυση της τάξης των 5-10 Mb ανάλογα με την ποιότητα των χρωμοσωμάτων των παρασκευασμάτων. Πολλές από αυτές τις ανωμαλίες του γονιδιώματος παρέμεναν μη ανιχνεύσιμες επειδή βρίσκονταν σε υποτελομεριδιακούς τόπους που είναι δύσκολο να χαρακτηριστούν-ανιχνευτούν από χρώση ζωνών G. Επιπλέον, ήπιες ή μεμονωμένες περιπτώσεις υποσπαδία και ασθενών με κρυφορχία συνήθως δεν παραπέμπονται για γενετικό έλεγχο ενώ αυτή

η μελέτη απέδειξε ότι αυτή η ομάδα ασθενών φέρει δομική ποικιλομορφία που μπορεί να υποδεικνύει ανωμαλίες στην ουροποιογεννητική οδό (17).

Η ανάλυση πολυμορφισμών, αλλαγών μιας βάσης, προκειμένου να συσχετιστεί η εμφάνιση μιας ασθένειας που σχετίζεται με ένα γονίδιο με ποικίλες κλινικές ανωμαλίες αποτελεί τη μέθοδο εκλογής τα τελευταία χρόνια. Η ιδέα αυτή βασίζεται στον προσδιορισμό της ανισορροπίας σύνδεσης της μετάλλαξης που είναι υπεύθυνη για την ανωμαλία αυτή και του πολυμορφικού γονιδιωματικού δείκτη του DNA. Οι πολυμορφισμοί είναι οι πλέον κατάλληλοι για αυτήν την ανάλυση. Εξαιτίας του μεγάλου βαθμού γενετικής ποικιλομορφίας που ανιχνεύεται κάθε 200-300 βάσεις στο γονιδιωματικό DNA και της διαθεσιμότητας των μεθόδων υψηλής απόδοσης ανίχνευσης πολυμορφισμών. Ακόμη πιο σημαντικό είναι το γεγονός ότι η δύναμη της ανάλυσης αυξάνεται όταν πολλαπλοί πολυμορφισμοί χρησιμοποιούνται για να καθορίσουν τον απλότυπο που συνδέεται με την ασθένεια (12).

8.Γ. Αδυναμίες δημοσιευμένων μελετών

Η αιτιολογία της κρυφορχίας παραμένει στο μεγαλύτερο μέρος της άγνωστη και η κρυφορχία η ίδια θεωρείται μια πολύπλοκη κατάσταση. Από αυτήν την άποψη αξίζει να σημειωθεί ότι η διάγνωση της κρυφορχίας αποτελεί πρόκληση και γι' αυτό άλλωστε οι μελέτες πάνω στην κρυφορχία παρουσιάζουν κάποιες εγγενείς δυσκολίες. Συγκεκριμένα οφείλεται στο γεγονός ότι πρώτον, η κάθοδος των όρχεων κατά την παιδική ηλικία δεν έχει καταγραφεί επακριβώς. Δεύτερον, η διαφορά μεταξύ κρυφορχίας και ανελκόμενου όρχι δεν είναι πάντοτε σαφής και παλιότερα η ορχεοπηξία πραγματοποιούνταν για να διορθώσει και τις δύο αυτές καταστάσεις. Τρίτον, παρόλο που η κρυφορχία συνοδεύεται από ανωμαλίες των γεννητικών οργάνων αλλά και άλλου τύπου ανωμαλίες συχνά προκύπτει λόγω αλλαγών ενός γονιδίου και συγκεκριμένα σαν μεμονωμένη κρυφορχία σε ποσοστό 10% των περιπτώσεων, κάτι που μπορεί να οδηγήσει σε καθυστερημένη προσφυγή στον ειδικό γιατρό εάν δεν έχει παρατηρηθεί κατά τη γέννηση.

Η μεταβλητότητα στην αναφερόμενη συχνότητα εμφάνισης της κρυφορχίας μπορεί να εξηγηθεί λόγω του ότι ο καθορισμός της κρυφορχίας δεν

πραγματοποιείται από όλους τους γιατρούς με κοινά διαγνωστικά κριτήρια και αυτό μπορεί να έχει επηρεάσει και τα αποτελέσματα των επιδημιολογικών μελετών. Για παράδειγμα, ένα υψηλό ποσοστό κρυφορχίας (9%) που έχει αναφερθεί από τον Boisen και άλλους χρησιμοποιώντας τα κριτήρια του Score του 1964, που περιλαμβάνουν όρχεις σε υψηλά οσχεϊκή θέση μεταξύ των κρυφορχικών όρχεων. Εν αντιθέσει, ο Cortes και οι άλλοι ανέφεραν μια συχνότητα της τάξης του 2,4% χρησιμοποιώντας την ταξινόμηση της ομάδας του John Radcliffe που περιλαμβάνει υψηλά οσχεϊκούς όρχεις μεταξύ των φυσιολογικά κατελθόντων όρχεων (22).

9. Θεραπεία

9.Α. Χειρουργική Θεραπεία

Η βέλτιστη θεραπευτική αγωγή για την κρυφορχία παραμένει άγνωστη. Η χειρουργική επέμβαση συνιστάται επί του παρόντος για την αντιμετώπιση της συγγενούς κρυφορχίας στην πρώιμη βρεφική ηλικία προκειμένου να αποφευχθεί δευτερογενής εκφυλισμός των όρχεων, που πιστεύεται ότι προκαλείται από την αυξημένη θερμοκρασία των όρχεων όταν δεν βρίσκονται εντός του οσχεϊκού σάκου (1).

Κατά άλλους ερευνητές προτείνονται τα εξής: α) Δεν συστήνεται πλέον ορμονική θεραπεία β) οι ορχεοπηξίες θα πρέπει να πραγματοποιούνται μεταξύ 6 και 12 μηνών, ή μετά τη διάγνωση εάν αυτή πραγματοποιείται αργότερα, γ) οι ορχεοπηξίες θα πρέπει να γίνονται σε κέντρα όπου υπάρχουν και παιδοχειρουργοί και ουρολόγοι αλλά και παιδιατρικοί αναισθησιολόγοι. Ο ανασπώμενος όρχις (retractile) μπορεί να είναι πιο δύσκολο να διαγνωστεί και ο ανασπώμενος όρχις δεν πρέπει να χειρουργηθεί αλλά θα πρέπει να γίνεται επανέλεγχος μια φορά το χρόνο μήπως παραμείνει σε υψηλή θέση (ascending testicle) (4).

Η πρώιμη αντιμετώπιση της κρυφορχίας συστήνεται καθώς το ανοσοποιητικό σύστημα των ασθενών σε μικρή ηλικία της τάξης των 0-1 και 1-4 ετών εμφανίζει πολύ μικρή αυτό-αντιδραστικότητα, χωρίς της και πάλι να μπορεί να αποκλειστεί η πιθανότητα εκδήλωσης υπογονιμότητας (1).

Η διόρθωση της κρυφορχίας πριν τα 10 έτη θεωρείται ότι μειώνει τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου σε όμοια επίπεδα με αυτά των φυσιολογικών ατόμων. Η χειρουργική αποκατάσταση της κρυφορχίας το δεύτερο εξάμηνο της ζωής στοχεύει στο να αποτρέψει ιστολογικές αλλοιώσεις των όρχεων. Ωστόσο δεν έχει αποδειχθεί καλύτερη επίδραση στη γονιμότητα σε σχέση με μελέτες που τα άτομα υποβλήθηκαν σε χειρουργείο σε ηλικία ως 2 ετών. Σε μια μελέτη, δείχθηκε ότι τα άτομα με μονόπλευρη κρυφορχία που χειρουργήθηκαν πριν της 9 μήνες είχαν καλύτερη ανάπτυξη των όρχεων σε σχέση με τα μη χειρουργημένα άτομα της ομάδας ελέγχου αλλά και τα άτομα που είχαν χειρουργηθεί σε ηλικία 3 ετών (2).

Η συνιστώμενη ηλικία ορχεοπηξίας έχει μειωθεί σταθερά κατά τη διάρκεια των δεκαετιών λόγω της κατανόηση της διαδικασίας της σπερματογένεσης και τη βελτίωση των χειρουργικών τεχνικών. Είναι γενικά αποδεκτό ότι η αυτόματη κάθοδος των όρχεων παρουσιάζεται σπάνια μετά της 6 μήνες. Σε αντίθεση με της προηγούμενους ερευνητές, οι Ludwig και Rotempa ήδη από το 1975 έδειξαν ότι τα άτομα που χειρουργήθηκαν τα δύο πρώτα χρόνια της ζωής της διατήρησαν κατά 90% τη γονιμότητά της σε αντίθεση με εκείνα που χειρουργήθηκαν μεταξύ 9και 12ετών που διατήρησαν το 50% της γονιμότητάς της. Επιπλέον, εάν η χειρουργική επέμβαση καθυστερούσε πέραν των 12ετών, σημειώθηκε σημαντική μείωση στη γονιμότητα. Δεν υπάρχει καμία ένδειξη ότι η έγκαιρη χειρουργική επέμβαση (για κρυφορχία) μειώνει τη συχνότητα εμφάνισης του καρκίνου των όρχεων. Η ορχεοπηξία για αμφοτερόπλευρη κρυφορχία οδήγησε σε μεγαλύτερο αριθμό σπερματοζωαρίων όταν πραγματοποιήθηκε πριν τα 3 έτη ζωής σε σχέση με εκείνες που πραγματοποιήθηκαν μετά τα 4 έτη (1).

Κάθε λοιπόν μη κατελθών όρχις μετά την ηλικία των 6 μηνών θα πρέπει να παραπέμπεται για ορχεοπηξία (1). Η χειρουργική προσέγγιση διαφέρει για της ψηλαφητούς και της αψηλάφητους όρχεις. Η λύση των συμφύσεων και η ορχεοπηξία με βουβωνική προσέγγιση χρησιμοποιείται για της ψηλαφητούς όρχεις (ποσοστό επιτυχίας 92%). Σε περίπτωση μη ψηλαφητών όρχεων πρέπει να γίνεται χειρουργική διερεύνηση βουβωνικά ενώ στη σπάνια περίπτωση απουσίας αγγείων ή σπερματικού πόρου, η κοιλία πρέπει να ελέγχεται λαπαροσκοπικά. Λαπαροσκοπικά μπορεί να γίνει και η λύση των συμφύσεων, η ορχεοπηξία ή η αφαίρεση του όρχεως. Σε αγόρια άνω των δέκα ετών με ενδοκοιλιακό όρχι και

φυσιολογικό ετερόπλευρο όρχι, πρέπει να γίνεται αφαίρεση του ενδοκοιλιακού όρχι. Σε αγόρια κάτω των δέκα ετών με αμφοτερόπλευρους ενδοκοιλιακούς όρχεις μπορεί να χρησιμοποιηθεί η ενός ή δύο σταδίων διαδικασία Fowler-Stephens. Η μικροχειρουργική αυτομεταμεταμόσχευση έχει πολύ καλά αποτελέσματα αλλά απαιτεί μεγάλη εμπειρία και εξαιρετική τεχνική (26). Επανελέγχος των ασθενών θα πρέπει να πραγματοποιείται στους 1, 6 και 12 μήνες μετά το χειρουργείο (2).

9.B. Ορμονική Θεραπεία

Παρόλο που η θεραπεία που ακολουθείται είναι ως επί το πλείστον η χειρουργική, υπάρχουν αναφορές σε αρκετές περιπτώσεις μετανάστευσης των όρχεων (καθόδου των όρχεων) μετά από ορμονική θεραπεία με χορήγηση hCG ή GnRH. Μια υπόθεση που θα μπορούσε να εξηγήσει την κάθοδο του όρχι μετά την χορήγηση hCG θα ήταν η αύξηση των επιπέδων τεστοστερόνης λόγω της δράσης της hCG στον υποδοχέα hCG/CH (1).

9. Γ. Συνδυασμός Χειρουργικής και Ορμονικής Θεραπείας

Σύμφωνα με της σκανδιναβικές κατευθυντήριες οδηγίες για την αντιμετώπιση της κρυφορχίας η ορμονική υποκατάσταση δεν συστήνεται επισήμως. Ωστόσο έχουν αναφερθεί ποσοστά επιτυχίας καθόδου των όρχεων μετά τη χρήση ορμονών της τάξης του 15-20% σε σύγκριση με το 95% που έχει αναφερθεί για τη χειρουργική θεραπεία. Οι επιφυλάξεις των Σκανδιναβών σχετικά με τη χρήση των ορμονών οφείλονται στο γεγονός ότι κατά κάποιους ερευνητές η hCG έχει συσχετιστεί όχι μόνο με τον αυξημένο κίνδυνο ορχικής βλάβης και κατ' επέκταση μειωμένης σπερματογένεσης που αποδίδεται σε αυξημένη απόπτωση των γεννητικών κυττάρων, αλλά και σε συστηματικές επιδράσεις, όπως η κοιλιακή υπερτροφία.

Γι' αυτό και η Ευρωπαϊκή Εταιρεία Παιδιάτρων Ουρολόγων τάσσεται υπέρ της χρήσης αναλόγων GnRH προκειμένου να βελτιωθεί η γονιμότητα στα αγόρια με κρυφορχία και ειδικά σε εκείνα που εμφανίζουν αμφοτερόπλευρη κρυφορχία. Παρόλο που ο αριθμός των μελετών αλλά και των ασθενών που συμμετέχουν σε

αυτές είναι σχετικά μικρός τα ανάλογα GnRH (σε ορισμένες μελέτες και σε συνδυασμό με hCG) φαίνεται να εμφανίζουν στατιστικά σημαντική ευεργετική διαφορά στην γονιμότητα τόσο όταν χορηγούνται πριν όσο και όταν χορηγούνται μετά την ορχεοπηξία. Ωστόσο περαιτέρω τυχαιοποιημένες ελεγχόμενες μελέτες θα πρέπει να πραγματοποιηθούν για να επιβεβαιωθεί η ευεργετική της δράση (4). Η έγκαιρη ορχεοπηξία μπορεί να μειώσει τον κίνδυνο εμφάνισης κακοήθειας και γι' αυτό πρέπει να πραγματοποιείται σε ηλικία 12-18 μηνών. Ανοιχτό παραμένει το κατά πόσο η ορμονική θεραπεία μπορεί να ωφελήσει τη γονιμότητα (26).

Ειδικό μέρος

1. Σκοπός μελέτης

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση των γονιδίων INSL3, HoxD13 και HoxA10 προκειμένου να διαπιστωθεί η πιθανή συσχέτισή τους με την εμφάνιση της μεμονωμένης κρυφορχίας στον ελλαδικό χώρο. Τελικός στόχος είναι η συσχέτιση γονοτύπου που μπορεί να αφορά γνωστές ή άγνωστες μεταλλάξεις, γνωστούς ή άγνωστους πολυμορφισμούς με τον φαινότυπο.

2. Ασθενείς και Μάρτυρες

Ως ασθενείς ορίστηκαν άτομα παιδικής ηλικίας που εμφάνιζαν μεμονωμένη κρυφορχία και ως μάρτυρες ορίστηκαν άρρενα άτομα αναπαραγωγικής ηλικίας γενικού πληθυσμού. Οι ασθενείς παιδικής ηλικίας προέρχονταν από την Α' και από την Β' Χειρουργική Κλινική του Νοσοκομείου Παιδών «Η Αγία Σοφία» καθώς και από την Α' και Β' Χειρουργική Κλινική του Νοσοκομείου Παιδών «Αγλαΐα Κυριακού». Η μελέτη υποβλήθηκε και εγκρίθηκε από την Επιτροπή Ηθικής και Δεοντολογίας του Επιστημονικού Συμβουλίου του Νοσοκομείου Παιδών «Η Αγία Σοφία» και από την Επιτροπή Ηθικής και Δεοντολογίας του Επιστημονικού Συμβουλίου του Νοσοκομείου Παιδών «Αγλαΐα Κυριακού». Οι μάρτυρες ήταν άτομα που προσήλθαν στο Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής στη Μονάδα Μεσογειακής Αναιμίας για προληπτικό έλεγχο για πιθανή φορεία. Συνολικά ελέγχθηκαν 43 ασθενείς, αριθμός αντιπροσωπευτικός, για τον ελλαδικό χώρο, ενώ ελέγχθηκαν και 20 μάρτυρες. Η μελέτη ξεκίνησε τον Οκτώβριο του 2012 και ολοκληρώθηκε τον Ιούνιο του 2013. Στους γονείς/κηδεμόνες των ασθενών χορηγήθηκε έγγραφο πληροφορημένης συγκατάθεσης για τη συμμετοχή τους στη μελέτη και πραγματοποιήθηκε καταγραφή ιστορικού από τον ερευνητή. Το βιολογικό υλικό (δείγμα περιφερικού αίματος) που συλλέχθηκε χρησιμοποιήθηκε αποκλειστικά για την συγκεκριμένη μελέτη. Οι ασθενείς συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη μόνο εφόσον υπήρχε η σύμφωνη γνώμη των γονέων/κηδεμόνων τους και ανά πάσα στιγμή μπορούσαν να διακόψουν τη συμμετοχή τους στη μελέτη.

Πίνακας 1. Συλλογή δειγμάτων

Ασθενείς με κρυφορχία που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη	43
Ασθενείς της οποίους δεν έγινε λήψη αίματος λόγω αναβολής χειρουργείου ή ανεύρεση ανασπώμενου όρχι	13
Μη κρυφορχεικτομή ασθενείς ή ασθενείς με άλλου τύπου κρυφορχία	9
Αμφιλεγόμενα περιστατικά	8
Συνολικά: Συγκαταθέσεις + Ερωτηματολόγια	73

3. Υλικό και μέθοδοι

3. Α. Απομόνωση γενωμικού DNA από δείγμα ολικού αίματος

Η απομόνωση DNA πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του αυτόματου αναλυτή MagAttract DNA Blood Biorobot M48 της QIAGEN και του συστήματος MagAttract DNA Blood Midi M48 Kit (Cat No 951356, QIAGEN, USA) με βάση το πρωτόκολλο που αναφέρεται στο εγχειρίδιο που διατίθεται από την κατασκευάστρια εταιρεία.

Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος απομόνωσης που εφαρμόζεται με το MagAttract βασίζεται στην πρωτεολυτική δράση της πρωτεάσης K η οποία προκαλεί λύση των ερυθροκυττάρων. Ακολουθεί εξαλάτωση των κυτταρικών πρωτεϊνών με αφυδάτωση και χρήση χαοτροπικών αλάτων κατά την πρόσδεση του DNA στα μαγνητικά σφαιρίδια παρουσία ρυθμιστικού διαλύματος δέσμησης (27).

Το DNA που δεσμεύεται στα μαγνητικά σφαιρίδια στην συνέχεια ξεπλένεται με διάφορα διαλύματα ενώ ακολουθεί και ταχεία έκπλυση με απεσταγμένο νερό το οποίο βελτιώνει την καθαρότητα του DNA. Η απόδοση της καθαρότητας του DNA εξαρτάται από τον τύπο του δείγματος, τον τρόπο αποθήκευσης και την περιεκτικότητα του δείγματος σε λευκοκύτταρα (27).

3. Β. Ποσοτικός προσδιορισμός και έλεγχος της καθαρότητας του ολικού DNA

Υπάρχουν διάφοροι τρόποι για να πραγματοποιηθεί ο ποιοτικός προσδιορισμός των διαλυμάτων των νουκλεϊκών οξέων. Εάν το διάλυμα έχει καθαριστεί/απομονωθεί μπορεί να χρησιμοποιηθεί το φασματοφωτόμετρο το οποίο μετρά την ποσότητα της υπεριώδους ακτινοβολίας που απορροφάται από της

βάσεις (28).

Εάν υπάρχει επιμόλυνση των διαλυμάτων των νουκλεϊκών οξέων αυτό καθιστά τη μέτρηση με το φασματοφωτόμετρο ανακριβή. Συγκεκριμένα, για τον προσδιορισμό της καθαρότητας των νουκλεϊκών οξέων υπολογίζεται ο λόγος OD260/OD280. Σαν καθαρό DNA θεωρείται αυτό με λόγο OD260/OD280~1.8. Καθαρό RNA εμφανίζει λόγο OD260/OD280~2.0. Χαμηλοί λόγοι μπορεί να προκύψουν από προσμίξεις πρωτεϊνών ή φαινολών (28).

Αξίζει να σημειωθεί ότι με βάση το εγχειρίδιο του MagAttract DNA Blood M48 της Qiagen, καθαρό DNA θεωρείται ένα δείγμα με λόγο απορροφήσεων A260/A280 μεταξύ 1.7-1.9 (28). Ο ποσοτικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης του DNA πραγματοποιήθηκε από το φασματοφωτόμετρο Nanodrop-1000 Spectrophotometer και το όριο ανίχνευσης είναι 2ng/μl. Η διαδικασία απαιτεί 1 μl δείγματος.

3. Γ. Επιλογή των γονιδίων INSL3, HOXD13 και HOXA10

Τα γονίδια INSL3, HOXD13 και HOXA10 επιλέχτηκαν προς διερεύνηση μετά από συστηματική ανασκόπηση της βιβλιογραφίας σχετικά με την αιτιοπαθογένεια της μεμονωμένης κρυφορχίας και αξιολόγηση της πιθανότητας εύρεσης μεταλλάξεων ή πολυμορφισμών σε αυτά. Παράλληλα εκτιμήθηκε το κόστος της διερεύνησης καθώς γονίδια μεγάλου μεγέθους ή γονίδια με μεγάλο αριθμό εξωνίων κρίθηκαν απαγορευτικά προς διερεύνηση. Στον πίνακα 2 παρατίθενται τα τρία αυτά γονίδια και αναγράφεται ο αριθμός των εξωνίων τους ανά μετάγραφο και το μέγεθός τους με βάση τα στοιχεία που παρατίθενται στη βάση δεδομένων του NCBI/Ensemble.

Πίνακας 2.Γονίδια σχετιζόμενα με την εμφάνιση της κρυφορχίας (ΠηγήEnsemble)

Γονίδια: Εξώνια/Εσώνια	Αρχή	Τέλος	Μέγεθος εξωνίων/εσωνίων (bp)
INSL3(INSL3-002 ENST00000379695)			
Εξώνιο 1	17,932,383	17,932,126	258
Εσώνιο 1-2	17,932,125	17,931,300	826
Εξώνιο 2	17,931,299	17,931,205	95
Εσώνιο 2-3	17,931,204	17,927,869	3,336
Εξώνιο 3	17,927,868	17,927,323	546
HOXD13(HOXD13-001 ENST00000392539)			
Εξώνιο 1	176,957,619	176,958,399	781
Εσώνιο 1-2	176,958,400	176,959,207	808
Εξώνιο 2	176,959,208	176,960,666	1,459
HOXA10(HOXA10-001 ENST00000283921)			
Εξώνιο 1	27,213,925	27,212,968	958
Εσώνιο 1-2	27,212,967	27,211,793	1,175
Εξώνιο 2	27,211,792	27,210,210	1,583

3. Δ. Σχεδιασμός εκκινητών

Το μέγεθος των εκκινητών κυμαίνεται μεταξύ 15 και 30 νουκλεοτιδίων που λειτουργούν αποτελεσματικότερα όταν η περιεκτικότητά σε βάσεις G και C φτάνει περίπου στο 50%. Τα ζεύγη των εκκινητών δεν θα πρέπει να περιέχουν μεγάλες εκτάσεις με G-C περιοχές ή περιοχές που εμφανίζουν ομολογία μεταξύ της. Εάν παράλληλα με την ενίσχυση της μήτρας του DNA πραγματοποιείται και ενίσχυση μη ειδικών περιοχών του DNA, αυτό θα μπορούσε να αποφευχθεί ή να ελαττωθεί με την χρήση εκκινητών με αλληλουχίες μετατοπισμένες μερικά νουκλεοτίδια προς τα αριστερά ή προς τα δεξιά κατά μήκος της μήτρας του DNA (29).

Για την επιλογή των εκκινητών εφαρμόζονται κάποιοι κανόνες που αφορούν το μέγεθος, τη συγκέντρωση σε A, T, C και G, τη συμπληρωματικότητα μεταξύ τους κλπ. Τα μοτίβα αλληλουχίας που ενδεχομένως ενθαρρύνουν την δημιουργία δευτεροταγούς δομής θα πρέπει να αποφεύγονται όπως και οι συμπληρωματικές βάσεις στα 3' άκρα του ζεύγους των εκκινητών καθώς θα οδηγήσουν στον υβριδισμό και στην επέκταση των εκκινητών μεταξύ τους (primer-dimer/εκκινητής-

διμερές). Τα ολιγονουκλεοτίδια με μεγάλο ποσοστό GC απαιτούν υψηλότερες θερμοκρασίες υβριδισμού και επέκτασης. Σε περίπτωση αναποτελεσματικότητας των εκκινητών ακολουθεί αλλαγή της διάρκειας των κύκλων, της θερμοκρασίας υβριδισμού ή της συγκέντρωσης του μαγνησίου. Ωστόσο σε περίπτωση που οι εκκινητές δεν φέρνουν το επιθυμητό αποτέλεσμα συστήνεται να αντικατασταθούν από νέο ζεύγος εκκινητών (30).

Κριτήρια σχεδιασμού εκκινητών

Κατά τον σχεδιασμό των εκκινητών στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η εφαρμογή In Silico PCR του UCSC. Τα κριτήρια για τον σχεδιασμό των εκκινητών που λήφθηκαν υπόψη ήταν:

1. Το μήκος των εκκινητών θα πρέπει να είναι ίσο με 18 ως 30 βάσεις.
2. Το Tm θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 55 και 72°C.
3. Τα Tm μεταξύ της δεν πρέπει να απέχουν πάνω από 5 βαθμούς.
4. Η συγκέντρωση σε G/C πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 40 και 60%.
5. Οι εκκινητές δεν πρέπει να έχουν μια βάση που να επαναλαμβάνεται 4 φορές και πάνω στη σειρά.
6. Δεν πρέπει να έχουν περισσότερες από δυο G ή C βάσεις μέσα στις τελευταίες 5 βάσεις του 3' άκρου.

Πειραματική Πορεία

Με βάση τα παραπάνω κριτήρια επιλέχθηκαν οι εκκινητές στα άκρα της περιοχής που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί. Στη συνέχεια, οι επιλεγμένοι εκκινητές εισήχθησαν στην εφαρμογή in silico PCR για την επιβεβαίωση της παραγωγής του ζητούμενου προϊόντος. Ωστόσο η εφαρμογή των κριτηρίων αυτών δεν κατέστη δυνατό να εφαρμοστεί σε όλα τα ζεύγη εκκινητών. Όπου ανευρέθηκαν ζεύγη εκκινητών στην βιβλιογραφία που να πολλαπλασιάζουν την επιθυμητή περιοχή της ακολουθίας προτιμήθηκαν από το σχεδιασμό νέων εκκινητών (Πίνακας).

Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν με σκοπό τον πολλαπλασιασμό των εξωνίων των γονιδίων *INSL3*, *HOXD13* και *HOXA10*. Ωστόσο καλύπτουν και πολύ μικρή περιοχή των εσωνίων καθώς χρησιμοποιήθηκε σαν αρχή η προσθήκη τουλάχιστον 15 βάσεων πριν το 5' άκρο και μετά το 3' άκρο προκειμένου να εξασφαλιστεί ότι θα ελεγχθούν πλήρως οι κωδικοποιούσες περιοχές των γονιδίων.

Επιπλέον, κατά τον σχεδιασμό έγινε προσπάθεια δημιουργίας εκκινητών που ο πρόσθιος εκκινητής του επόμενου τμήματος της αλληλουχίας να βρίσκεται πριν τον ανάστροφο εκκινητή του προηγούμενου έτσι ώστε να ελαττωθεί η πιθανότητα μη ανάγνωσης βάσεων της αλληλουχίας κατά την ανάλυση της πρωτοταγούς δομής του DNA. Παράλληλα τα προϊόντα της PCR έγινε προσπάθεια να μην ξεπερνούν κατά πολύ τις 500 βάσεις προκειμένου να βελτιστοποιηθεί η ανάλυση της πρωτοταγούς δομής του DNA.

Πίνακας 3: Εκκινητές

Γονίδιο/ Εξώνιο	Πρόσθιος Εκκινητής (5' → 3')	Ανάστροφος Εκκινητής (5' → 3')	Προϊόν PCR (bp)	Tm (°C)
<i>INSL3(INSL3-002 ENST00000379695)</i>				
Εξώνιο 1	ctcgttgcccagtgctccc	catgcaaacctgcccacc	491	62
Εξώνιο 2	ggattcgtgcacatgcagc	ggggacaagcccaca	686	65
<i>HoxD13(HOXD13-001 ENST00000392539)</i>				
Εξώνιο 1	cgcgccatggtgtcct	gcatgacttgagcgatt	522	58
	cagcgctgggctacggctaccact	caagtagggcgcatactctta g	501	58
Εξώνιο 2	aagaccaaacagcatggcatt	ggccttttgagacaaccgaat g	453	58
	tggccacagacagcttaga	gcaagtgaacacccaaagt	636	58
	ggattgtatcaatattgaaatg	aaataagaatcggttcaagaag	684	55
<i>HoxA10(HOXA10-001 ENST00000283921)</i>				
Εξώνιο 1	ggggattgctaactgtatt	ttgtccgagtcgtagag	566	58
	ttcgcgagaacatcaaa	agttcacaaggtcagcctgc	621	58

Σημείωση:

Όλοι οι πρόσθιοι εκκινητές έχουν σημανθεί με την αλληλουχία M13: gtaaaacgacggccagt.

Το Tm αποτελεί τη θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών στην αλυσιδωτή αντίδρασης πολυμεράσης κατά τον πολλαπλασιασμό των προϊόντων PCR.

Πίνακας 4. Προέλευση εκκινητών

Γονίδια/Εξώνια	Πρόσθιος εκκινητής	Ανάστροφος εκκινητής	Πρόσθιος και ανάστροφος εκκινητής
INSL3			
Εξώνιο 1			Ferlinetal.
Εξώνιο 2	Ferlin et al.	καινούργιος	
HOXD13			
Εξώνιο 1 (περιοχή 1)			καινούργιοι
(περιοχή 2)			Kosaki et al.
Εξώνιο 2 (περιοχή 1)	καινούργιος	Kosaki et al.	
(περιοχή 2)			καινούργιοι
(περιοχή 3)			καινούργιοι
HOXA10			
Εξώνιο 1 (περιοχή 1)	καινούργιος	Fleischman et al.	
Εξώνιο 1 (περιοχή 2)	καινούργιος	Fleischman et al.	

3. Ε. Ποιοτικός προσδιορισμός εξωνίων INSL3, HOXD13, HOXA10 με κλασική PCR

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης είναι μια τεχνική που «ενισχύει» συγκεκριμένες αλληλουχίες με αξιοσημείωτη ακρίβεια και αποτελεσματικότητα. Δύο συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια κατασκευάζονται το καθένα συμπληρωματικό στα άκρα 5 και 3' της αλληλουχίας του DNA που θέλουμε να πολλαπλασιάσουμε. Το DNA αποδιατάσσεται σε υψηλή θερμοκρασία (95°C), τα ολιγονουκλεοτίδια

προσανατολίζονται με τα 3' άκρα της, υβριδοποιούνται με την συμπληρωματική αλληλουχία στόχο και πραγματοποιείται η ενζυματική επέκταση των εκκινητών κατά μήκος της αλυσίδας μήτρας του DNA παρουσία των τεσσάρων τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων, με τη βοήθεια ενός θερμικά σταθερού ενζύμου, της Taq πολυμεράσης (30).

Η Taq πολυμεράση δεν έχει δραστικότητα εξωνουκλεάσης και αντιγράφει αλληλουχίες μόνο με κατεύθυνση 5' της 3'. Το τελικό προϊόν αποδιατάσσεται και πάλι για άλλον ένα κύκλο. Αυτό οδηγεί στην επιλεκτική ενίσχυση της συγκεκριμένης αλληλουχίας του DNA (30). Περίπου 25-30 κύκλοι μπορούν να αυξήσουν την αλληλουχία στόχου κατά 10^5 έως 10^6 φορές (29).

Τα δύο βασικά χαρακτηριστικά της PCR είναι η αυξημένη ευαισθησία και η αυξημένη ειδικότητα καθώς μπορεί να ανιχνεύσει ένα κύτταρο από ένα μόνο αντίγραφο της αλληλουχίας. Σαν συνέπεια κάθε ζεύγος εκκινητών έχει τη δική του θερμοκρασία υβριδισμού και τα δικά του κριτήρια επέκτασης που βασίζονται στην θερμοκρασία, τη διάρκεια του κύκλου, την συγκέντρωση των εκκινητών, τη συγκέντρωση Mg^{2+} , την ποσότητα του ενζύμου και την ποσότητα του DNA (34). Η θερμοκρασία και ο χρόνος που απαιτείται για τον υβριδισμό των εκκινητών εξαρτάται από την σύσταση των βάσεων, το μήκος και την συγκέντρωση των ενισχυμένων εκκινητών. Γενικά η κατάλληλη θερμοκρασία υβριδισμού θεωρείται ότι είναι 5 βαθμούς κάτω από το σημείο τήξης των εκκινητών. Η συγκέντρωση των εκκινητών πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 0.1 και 0.5 pM. Μεγαλύτερη συγκέντρωση μπορεί να έχει σαν αποτέλεσμα συσσώρευση μη ειδικών προϊόντων αλλά και σχηματισμό διμερούς-εκκινητή που ανταγωνίζεται την ενίσχυση του επιθυμητού προϊόντος και το οποίο μπορεί να προκύψει και λόγω συμπληρωματικότητας των 3' άκρων αλλά και λόγω μεγάλου αριθμού G ή C στα 3' άκρα. Λανθασμένη ενσωμάτωση μπορεί να προκύψει είτε εξαιτίας χαμηλής συγκέντρωσης dNTPs είτε εξαιτίας ασύμμετρης συγκέντρωσης dNTPs. Η ικανότητα της PCR να παράγει μεγάλο αριθμό αντιγράφων από πολύ μικρές ποσότητες DNA οδηγεί σε αυξημένη πιθανότητα για ψευδώς θετικά προϊόντα. Γι' αυτό δεν πρέπει να παραλείπεται η χρήση θετικών και αρνητικών δειγμάτων ελέγχου (control) προκειμένου να εξασφαλιστεί η αξιοπιστία των ενισχυμένων προϊόντων αλλά και η απουσία επιμόλυνσης (35).

Οργανολογία συμβατικής PCR

Για την εκτέλεση των αντιδράσεων χρησιμοποιήθηκαν οι θερμοκυκλοποιητές Biometra T3000 Thermocycler και Techne TC 412.

Πίνακας 5: Συστατικά Συμβατικής PCR

Διάλυμα Q (5x)	2 μ l
Multiplex PCR Master Mix (2x)	10 μ l
DNA	2 μ l
Πρόσθιος εκκινητής (10 μ M)	0.5 μ l
Ανάστροφος εκκινητής (10 μ M)	0.5 μ l
RNAse-Free H ₂ O	3 μ l
Συνολικός όγκος	20 μ l

Πίνακας 6: Συστατικά Συμβατικής PCR

Hotstart	10 μ l
DNA	2 μ l
Πρόσθιος εκκινητής (10 μ M)	0.5 μ l
Ανάστροφος εκκινητής (10 μ M)	0.5 μ l
H ₂ O	7 μ l
Συνολικός όγκος	20 μ l

Σημείωση: Κατά τον πολλαπλασιασμό κάποιων εκ των προϊόντων PCR προστέθηκαν είτε 2 μ l DMSO ή/και 2 μ l μαγνησίου. Ενώ οι PCR αντιδράσεις σχεδιάστηκαν βάση των αναφορών 36 και 37.

3. Ζ. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζη

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό των τμημάτων DNA μεγέθους 0.1/0.5 έως 25 kb. Το πρωτόκολλο που ακολουθείται μπορεί να διαιρεθεί σε τρία στάδια: Πρώτον, ένα πήγμα παρασκευάζεται με συγκέντρωση αγαρόζης κατάλληλη για το μέγεθος των θραυσμάτων DNA που πρόκειται να διαχωριστούν (38). Κατά τη διάρκεια της παρασκευής του πηκτώματος τα πολυμερή της αγαρόζης συνδέονται με μη ομοιοπολικούς δεσμούς και σχηματίζουν ένα δίκτυο πόρων που το μέγεθός τους καθορίζει της ιδιότητες διαχωρισμού του πηκτώματος καθώς όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση της αγαρόζης τόσο μικρότερο είναι το μέγεθος των πόρων (39).

Δεύτερον, τα δείγματα DNA φορτώνονται στα πηγαδάκια και στο πήκτωμα εφαρμόζεται τάση ρεύματος για μια χρονική περίοδο που θα επιτύχει το βέλτιστο διαχωρισμό (38). Το DNA είναι αρνητικά φορτισμένο με αποτέλεσμα όταν τοποθετηθεί σε ηλεκτρικό πεδίο τα θραύσματα του DNA να μεταναστεύσουν προς τον θετικά φορτισμένο πόλο. Επειδή το DNA έχει μία ομοιόμορφη αναλογία

μάζας/φορτίου, τα μόρια του DNA διαχωρίζονται ανάλογα με το μέγεθος μέσα στο πηκτώμα αγαρόζης σε ένα μοτίβο, έτσι ώστε η απόσταση που διανύεται να είναι αντιστρόφως ανάλογη της το λογάριθμο του μοριακού βάρους (39).

Τρίτον, η έκθεση σε υπεριώδες φως ενεργοποιεί τα ηλεκτρόνια από τον αρωματικό δακτύλιο του μορίου του αιθιδίου, το οποίο με τη σειρά του οδηγεί στην εκπομπή φωτός. Το βρωμιούχο αιθίδιο επιτρέπει την εκτίμηση της ποσότητας του DNA βάση την έντασή της (39). Συμπερασματικά, ο ρυθμός μετανάστευσης της μορίου DNA μέσω της πηκτώματος καθορίζεται από τα ακόλουθα: 1) το μέγεθος του μορίου του DNA, 2) τη συγκέντρωση της αγαρόζης, 3) την διαμόρφωση του DNA, 4) την εφαρμοζόμενη τάση, 5) την παρουσία του βρωμιούχου αιθιδίου, 6) τον τύπο της αγαρόζης και 7) το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (39).

Τέλος, όσον αφορά της χρωστικές φόρτωσης αυτές εξυπηρετούν της εξής τρεις σκοπούς: 1) Καθιστούν το δείγμα πιο βαρύ ώστε να βυθιστεί πιο εύκολα στο πηγαδάκι/γέλη 2) Δίνουν χρώμα με αποτέλεσμα να διευκολύνουν την διαδικασία της φόρτωσης 3) Επιτρέπουν την εκτίμηση της απόστασης που τα θραύσματα DNA έχουν διανύσει. Απαραίτητη είναι η χρήση του δείκτη μοριακών βαρών που αποτελεί ένα πρότυπο μεγέθους DNA και αποτελείται από ένα μίγμα θραυσμάτων DNA με προκαθορισμένα μεγέθη που μπορούν να συγκριθούν με τα άγνωστα δείγματα DNA (39).

Όργανα- αντιδραστήρια

- Certified Molecular Biology Agarose Cat No 161-3102 (Bio-Rad Laboratories)
- Ρυθμιστικό διάλυμα TBE pH 8.0. Παρασκευάζεται με αραιώση 1/20 του διαλύματος παρακαταθήκης (20X TBE) (περιέχει 242gr Tris, 125,4 Boric Acid, 14,88 g EDTA)
- Βρωμιούχο αιθίδιο (10mg/ml)
- Έγχρωμο διάλυμα πλήρωσης (gel-loadingbuffer). Περιέχει 3 g φικόλη, 0,01 g bromophenol και 20mlH₂O.
- Δείκτεςμοριακώνβαρών: 1kbDNA ladder 0,1 μg/μl, CatNo 65711 και Φx 174 DNA Hae III Digest 1.000μg/ml, Cat No N30265

- Συσκευή ηλεκτροφόρησης Thermo Scientific EC Classic και E-C105 Apparatus Corporation
- Πηγή UV φωτός
- Κάμερα

Πειραματική Πορεία

Για τον ποιοτικό προσδιορισμό των προϊόντων της PCR παρασκευάζεται πήκτωμα αγαρόζης 2% w/v με τη χρήση ρυθμιστικού διαλύματος TBE 1% και προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε ρυθμιστικό διάλυμα 1% TBE στα 134V για 15-30 λεπτά, ενώ για το φόρτωμα χρησιμοποιείται έγχρωμο διάλυμα πλήρωσης.

3. ΣΤ. Ανίχνευση μεταλλάξεων μέσω πρωτοκόλλου ECMA

Η μελέτη των ασθενειών που προκαλούνται από μικρές αλλαγές στην αλληλουχία του DNA (ενθέσεις, αντικαταστάσεις, μικρές διαγραφές/ελλείψεις και διπλασιασμούς) είναι μια επίπονη διαδικασία λόγω του μεγάλου μεγέθους της υπό μελέτη αλληλουχίας, της περιεκτικότητας σε GC και του κόστους.

Μερικές από τις τεχνικές που έχουν αναφερθεί στην διεθνή βιβλιογραφία σχετικά με την ανίχνευση μικρών αλλαγών της αλληλουχίας του DNA, είναι η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα ακρυλαμίδης παρουσία αποδιατακτικού παράγοντα (DGGE) και η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (DHPLC), οι οποίες της απαιτούν πρωτύπωση για κάθε διαφορετικό προϊόν PCR και ενδεχομένως να μην καταφέρουν να εντοπίσουν την μετάλλαξη. Μία ακόμη τεχνική είναι η μέθοδος ανίχνευσης πολυμορφισμού διαμόρφωσης μονόκλωνης αλυσίδας (SSCP) που εφαρμόζεται για προϊόντα PCR < 600 bp και δεν δίνει πληροφορίες για τη θέση της μετάλλαξης. Τέλος, η δοκιμασία πρόωρου τερματισμού της πρωτεϊνοσύνθεσης (PTT) απαιτεί δείγματα RNA και είναι αποτελεσματική μόνο για μεταλλάξεις που προκαλούν βλάβη στην πρωτεϊνοσύνθεση, ενώ εφαρμόζονται και μέθοδοι χημικής διάσπασης ετεροδιμερών (40). Ωστόσο οι περισσότερες από αυτές έχουν εγκαταλειφθεί τα τελευταία χρόνια.

Το ECMA είναι μια γρήγορη, αποτελεσματική, ασφαλής, αξιόπιστη και απλή μέθοδος που μπορεί οδηγήσει στην ανίχνευση αυτών των αλλαγών. Δεν απαιτεί ειδικό εργαστηριακό εξοπλισμό, ειδική σήμανση ή πρωτύπωση ή τυποποίηση για κάθε προϊόν PCR δεδομένου ότι οι συνθήκες για το σχηματισμό ετεροδιμερών και η πέψη είναι κοινές για όλα τα προϊόντα PCR. Το ECMA αποδεικνύει ότι οι σημειακές μεταλλάξεις μπορούν να ανιχνευθούν σε οποιοδήποτε συμβατικό εργαστήριο (40).

Αρχή της μεθόδου

Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στη δυνατότητα μιας ενδονουκλεάσης να ανιχνεύει και να διασπά ετεροδιμερή (mismatch). Η πρώτη ενδονουκλεάση που ανακαλύφθηκε με μεγάλη ευαισθησία της μεθόδους πέψης μιας κακοσυζευμένης βάσης ήταν η CEL 1. Στη συγκεκριμένη ενζυματική μέθοδο διάσπασης ετεροδιμερών (ECMA) σαν ενδονουκλεάση χρησιμοποιείται το ένζυμο Surveyor που ανήκει και αυτό στην οικογένεια της CEL 1. Το Surveyor κόβει και της δύο αλυσίδες του DNA στο σημείο που εντοπίζεται απουσία ομολογίας και τα προϊόντα αυτά γίνονται ορατά σε πήκτωμα αгарόζης (41).

Όργανα-Αντιδραστήρια

- Surveyor Mutation Detection Kit, Cat No 706020
- Bovine Serum Albumin (BSA) 10% (v/v). Παρασκευάζεται από διάλυμα παρακαταθήκης Bovine Serum Albumin Acetylated 10mg/ml, Cat No R3961
- Πηκτή αгарόζης 2% (w/v)
- Χρωστική Orange G 6X. Orange Loading Dye Solution, Cat No R0631
- Δείκτης μοριακών βαρών 1 kb DNA ladder 0,1 μg/μl, Cat No 65711
- Δείγματα DNA (προϊόντα PCR)

Εφαρμογή Πρωτοκόλλου ECMA

Αρχικά πραγματοποιείται θερμική αποδιάταξη των αλυσίδων στον θερμικό κυκλοποιητή TECHNE (Πίνακας 7). Για την αποδιάταξη χρησιμοποιούνται 10μl προϊόντος PCR για κάθε δείγμα με εξαίρεση της περιπτώσεις όπου εξετάζονται φυλοσύνδετα νοσήματα, όπου απαιτείται ανάμειξη 5μl από το προϊόν της PCR

άρρενος ασθενή με 5μl από προϊόν PCR φυσιολογικού άρρενος ατόμου. Στη συνέχεια πραγματοποιείται η πέψη με τη χρήση του ενζύμου Surveyor. Η όλη διαδικασία της πέψης πραγματοποιείται σε θερμοκρασία 0 °C στον πάγο. Ακολουθεί φυγοκέντρηση και ανάδευση και έπειτα τα δείγματα τοποθετούνται και πάλι στον θερμικό κυκλοποιητή TECHNE στο πρόγραμμα ECMA όπου πραγματοποιείται επώαση στους 46°C για περίπου 35 λεπτά. Στη συνέχεια πραγματοποιείται ανάδευση των δειγμάτων με 1 μl χρωστικής Orange και φορτώνονται 7 μl προϊόντος από κάθε δείγμα σε πηκτή αγαρόζης 2%.

Πίνακας 7: Συνθήκες για αποδιάταξη και σχηματισμό ετεροδιμερών

Στάδιο	Συνθήκες	
Διαχωρισμός αλυσίδων	95°C/ 2 min 85°C/ 1 min	2 κύκλοι
Δημιουργία ετεροδιμερών	50°C/ 1 min	

Πίνακας 8: Συστατικά που χρησιμοποιούνται για την πέψη με το ένζυμο Surveyor™ (42)

Surveyor Nuclease W	0.5 μl
SurveyorNuclease Enhancer	0.5 μl
BSA 10% (v/v)	0.5 μl
Προϊόν PCR	10 μl
Συνολικός όγκος	11.5μl

3. Ζ. Ανάλυση ακολουθίας /Άμεσος προσδιορισμός πρωτοταγούς δομής DNA

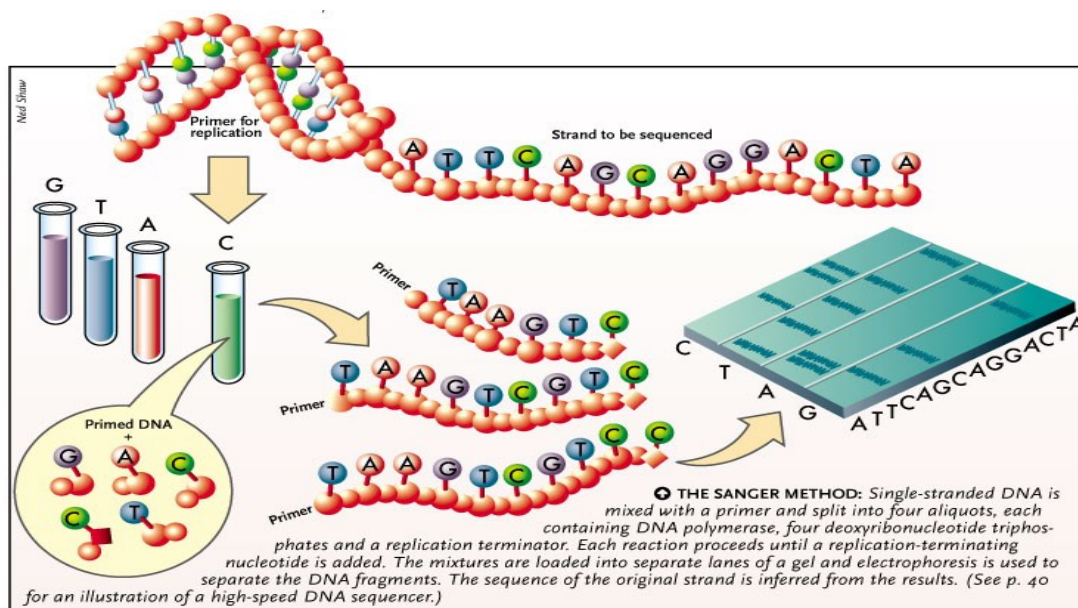
Με τον όρο ανάλυση ακολουθίας ορίζεται η γραμμική καταγραφή των μεμονωμένων ζευγών αζωτούχων βάσεων κατά μήκος του τμήματος DNA. Για την ανάλυση ακολουθίας απαιτούνται: 1) προϊόν PCR, 2) εκκινητές, 3) DNA πολυμεράση 4) διδεοξυνουκλεοτιδια 5) δεοξυνουκλεοτίδια 6) ραδιοσημασμένες ή σημασμένες με φθορίζουσα χρωστική βάσεις και 7) συσκευή διαχωρισμού του DNA.

Η πρώτη αυτοματοποιημένη μέθοδος ανάλυσης της πρωτοταγούς δομής του DNA διατυπώθηκε από τον Sanger και τον Coulson το 1975 και αρχικά έγινε γνωστή

με την ονομασία μέθοδος τερματισμού της αλυσίδας ή ως μέθοδος των διδεοξυνουκλεοτιδίων (43). Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιεί την DNA πολυμεράση I και την DNA πολυμεράση που απομονώνεται από τον φάγο T4 μαζί με διαφορετικά περιοριστικά τριφωσφορικά νουκλεοτίδια.

Παρουσία των DNA πολυμερασών λαμβάνει χώρα πολυμερισμός των τριφωσφορικών δεοξυνουκλεοτιδίων (dNTP) στο DNA. Ο πολυμερισμός συνεχίζεται μέχρι το ένζυμο να ενσωματώσει στην αναπτυσσόμενη αλυσίδα ένα από τα τροποποιημένα νουκλεοτίδια (διδεοξυνουκλεοτίδιο τερματισμού ή τριφωσφορικό διδεοξυνουκλεοτίδιο). Η διαδικασία πραγματοποιείται σε 4 διαφορετικά σωληνάρια που το καθένα περιέχει την κατάλληλη ποσότητα του ενός εκ των τεσσάρων διδεοξυνουκλεοτιδίων τερματισμού. Όλα τα τμήματα DNA που προκύπτουν έχουν το ίδιο 5' άκρο ενώ το κατάλοιπο του 3' άκρου καθορίζεται από το διδεοξυνουκλεοτίδιο που χρησιμοποιείται στην αντίδραση. Αφού ολοκληρωθούν και οι 4 αντιδράσεις, το μίγμα των διαφορετικού μεγέθους τμημάτων DNA αναλύεται μέσω ηλεκτροφόρησης σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης σε 4 παράλληλες σειρές. Το μοτίβο/πρότυπο των ζωνών δείχνει την κατανομή των διδεοξυνουκλεοτιδίων τερματισμού στην συντιθέμενη αλυσίδα του DNA και η άγνωστη αλληλουχία μπορεί να αναγνωστεί (Εικόνα 1).

Εικόνα 1: Ανάλυση Πρωτοταγούς Δομής DNA κατά Sanger



Πειραματική πορεία

3.2.1 Ενζυμικός καθαρισμός του PCR προϊόντος

Ο ενζυμικός καθαρισμός πραγματοποιείται με σκοπό την αποικοδόμηση τυχόν περίσσειας των εκκινητών και την αποφωσφορυλίωση των dNTPs.

Όργανα αντιδραστήρια

- ExoSAP-ITPCRClean-Urkitπου περιέχει ανασυνδυασμένη εξωνουκλεάση I/αλκαλική φωσφατάση γαρίδας
- Θερμικός κυκλοποιητής Techne TC-142

Για τον ενζυμικό καθαρισμό του προϊόντος PCR χρησιμοποιούνται 2,5μl προϊόντος από κάθε δείγμα και τα ένζυμα ExoI και Fastap. Οι αντιδράσεις πραγματοποιούνται στον πάγο. Αρχικά προστίθεται το μείγμα των ενζύμων και έπειτα το προϊόν της PCR. Ακολουθεί φυγοκέντρηση και τα δείγματα τοποθετούνται στον θερμικό κυκλοποιητή TECHNE στο πρόγραμμα EXOSAP. Οι συνθήκες αντίδρασης περιγράφονται στον πίνακα 10. Αφού ολοκληρωθεί η αντίδραση ενζυμικού καθαρισμού τα δείγματα τοποθετούνται στον πάγο ακολουθεί φυγοκέντρηση και η αντίδραση αλληλούχισης.

Πίνακας 9: Ενζυμικός καθαρισμός προϊόντος PCR

EnzymeMix	
ExoI (20u/μl)	0.25 μl
FASTAP (1u/μl)	0.50 μl
Συνολικός όγκος	0.75 μl
Προϊόν PCR	2.5 μl

Πίνακας 10: Συνθήκες αντίδρασης ενζυμικού καθαρισμού (EXOSAP)

37 °C	15 min
85 °C	15 min
4°C	Stop

3. Z. 2 Αντίδραση Sequencing

Παρατήρηση: Σαν πρόσθιοι εκκινητές χρησιμοποιούνται οι εκκινητές με την επιπρόσθετη αλληλουχία M13. Σαν ανάστροφοι εκκινητές χρησιμοποιούνται οι αρχικοί εκκινητές.

Πίνακας 11: Συστατικά αντίδρασης αλληλούχισης (44)

Sequencing reaction's mix	
BigDye Term Buffer (5x)	1,75 μ l
BigDye Term (enz) (2.5x)	0,25 μ l
Primer F/R (5 μ M)	0,40 μ l
H ₂ O	6,6 μ l
Συνολικός όγκος	9 μ l
Προϊόν PCR ενζυμικού καθαρισμού	1 μ l

Πίνακας 12: Συνθήκες αντίδρασης αλληλούχισης

96°C	1 min
96°C	10 sec
55 °C	5 sec 25 κύκλοι
60 °C	4min
4°C	stop

Για την αντίδραση Sequencing το plate τοποθετείται στον θερμοκυκλοποιητή ABI.

Μετά την αντίδραση το plate φυλάσσεται στο ψυγείο μέχρι να πραγματοποιηθεί ο καθαρισμός Sequencing.

3.Z.3 Καθαρισμός της αντίδρασης αλληλούχισης με αιθανόλη

Όργανα – αντιδραστήρια

- EtOH 100%
- Οξικό αμμώνιο NH₄Ac (7.5M)
- Φορμαμίδιο 10%
- Σωληνάριο universalτων 15ml
- Σωληνάριο universalτων 50ml

- Δοχείο δεξαμενή για πολυκάναλες πιπέτες
- Πιπέτα ρυθμιζόμενου όγκου των 1000μl και ρύγχη
- Πιπέτα ρυθμιζόμενου όγκου των 200μl και ρύγχη
- 8κάναλη πιπέτα ρυθμιζόμενου όγκου των 200μl και ρύγχη
- 8κάναλη πιπέτα ρυθμιζόμενου όγκου των 50μl και ρύγχη
- Πλαστικό κάλυμμα
- Χειροπετσέτες
- Δοχείο απορριμμάτων

Πραγματοποιείται καθαρισμός της αντίδρασης που περιλαμβάνει προσθήκη αιθανόλης και οξικού αμμωνίου, διαδοχικές φυγοκεντρήσεις σε ψυχόμενη φυγόκεντρο και πλύσεις με αιθανόλη. Το plate αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου να στεγνώσει και ακολουθεί προσθήκη 10μl HiDi στο βάθος των πηγαδιών και καλή ανάδευση. Τα δείγματα είναι έτοιμα για να τρέξουν στον αυτόματη αναλυτή.

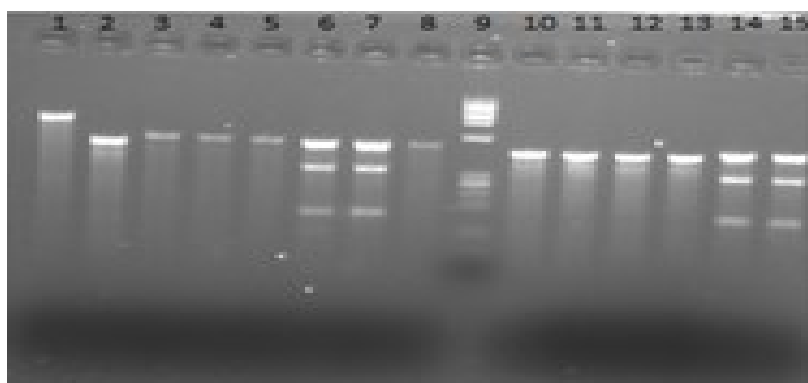
Οργανολογία

Ο αναλυτής που χρησιμοποιείται στη συγκεκριμένη μελέτη είναι ο ABI 3500. Ο διαχωρισμός των πολυνουκλεοτιδικών μορίων επιτυγχάνεται μέσω τριχοειδικής ηλεκτροφόρησης. Η ανάγνωση της αλληλουχίας γίνεται μέσω της μέτρησης της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας φθορισμού που εκπέμπουν τα σημασμένα προϊόντα PCR.

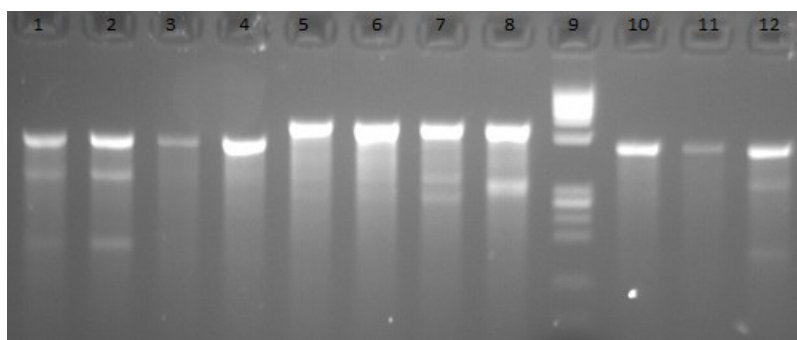
4. Αποτελέσματα

Συνολικά ελέγχθηκαν 43 ασθενείς με μεμονωμένη κρυφορχία. Ο μέσος όρος ηλικίας των ασθενών ήταν τα 3 έτη. Στους 11 από αυτούς πραγματοποιήθηκε επιπλέον της μοριακής ανάλυσης χρωμοσωμικός έλεγχος ενώ παράλληλα 3 από της ασθενείς είχαν ήδη προβεί σε ανάλυση καρυστύπου. Στους 19 από τους 43 πραγματοποιήθηκε και έλεγχος για μικροελλείψεις στο Υ χρωμόσωμα. Κανένας από της επιπλέον ελέγχους δεν αποκάλυψε κάποιο παθολογικό εύρημα.

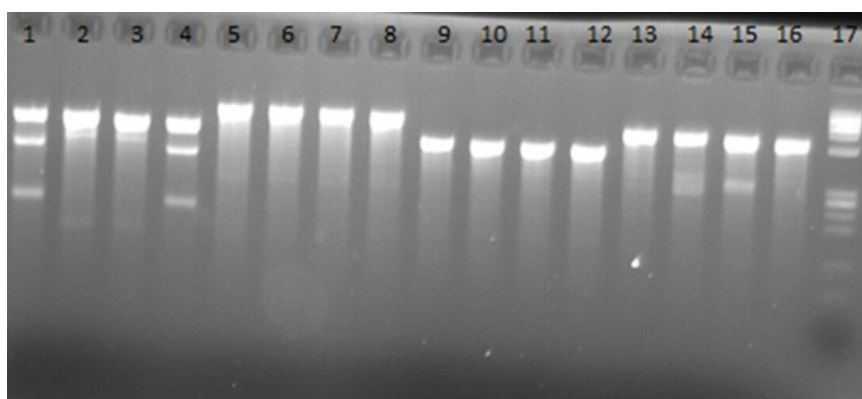
Ο έλεγχος που πραγματοποιήθηκε σε όλα τα δείγματα περιελάμβανε αλυσιδωτή αντίδρασης πολυμεράσης για τον πολλαπλασιασμό της επιθυμητής αλληλουχίας, ECMA για πιθανή εύρεση ετερόζυγης αλλαγής – μετάλλαξης/πολυμορφισμού και ανάλυση της πρωτοταγούς δομής του DNA σε όσα δείγματα παρουσιάστηκε κάποια ένδειξη στο ECMA (Εικόνα 2,3,4).



Εικόνα 2: Τα δείγματα 2, 6,7,10,11 12, 13 δίνουν θετικό ECMA ενώ 14,15 είναι τα control. Το πρότυπο του 2, 10,11,12,13 αποτελεί ένδειξη για ανάλυση αλληλουχίας για το γονίδιο HOXD13 ενώ το πρότυπο 6,7 για το INSL3.



Εικόνα 3: Τα δείγματα 1, 2, 7, 8 δίνουν θετικό ECMA ενώ 12 είναι το control. Το πρότυπο του 1, 2, αποτελεί ένδειξη για ανάλυση αλληλουχίας για το γονίδιο INSL3 ενώ το πρότυπο 7, 8 για το HOXD13.



Εικόνα 4: Τα δείγματα 1, 2, 3, 4, 14, 15 δίνουν θετικό ECMA. Το πρότυπο του 1, 2, 3, 4 αποτελεί ένδειξη για ανάλυση αλληλουχίας για το γονίδιο INSL3 ενώ το πρότυπο 14,15 για το HOXD13.

Από τον έλεγχο που πραγματοποιήθηκε στα 43 παθολογικά δείγματα, 14 δείγματα δεν εμφάνισαν καμία αλλαγή της συγκεκριμένες περιοχές των γονιδίων που ελέγχθηκαν ενώ τα συνολικά ευρήματα παρουσιάζονται στον πίνακα 1.

Πίνακας 13: Αλλαγές που διαπιστώθηκαν ανά ασθενή

Δείγματα	INSL3-1		HOXD13-1α	HOXD13-2α	HOXD13-2β	
1	178A>G (ομόζυγη)					
2	178A>G (ομόζυγη)					
3					*311C>T	
4	178A>G (ομόζυγη)					
5	*-109 T>A		204G>A			
6	178A>G (ομόζυγη)					
7	178A>G (ομόζυγη)					
8	178A>G (ομόζυγη)					
9	27G>A		204G>A	elongation CA	*311C>T	
10	178A>G (ομόζυγη)			elongation CA		
11			204G>A	elongation CA		
12	126A>G	178A>G (ομόζυγη)				
13	27G>A	178A>G (ομόζυγη)		elongation CA		
14	178A>G (ομόζυγη)					
15					*311C>T	
16	178A>G (ομόζυγη)		204G>A			
17	178A>G (ομόζυγη)					
18	178A>G (ομόζυγη)					
19	126A>G	178A>G (ομόζυγη)				
20	178A>G (ομόζυγη)		204G>A			
21	178A>G (ετερόζυγη)				*311C>T	*360A>T
22					*311C>T	
23	178A>G (ομόζυγη)					
24	126A>G	178A>G (ομόζυγη)				
25	126A>G	178A>G (ομόζυγη)				
26	178A>G (ομόζυγη)					
27	126A>G	178A>G (ομόζυγη)				
28	178A>G (ομόζυγη)					
29	178A>G (ομόζυγη)					
30	178A>G (ομόζυγη)		204G>A			
31	178A>G (ομόζυγη)					
32					*528 *529inversion	
33				elongation CA		
34				elongation CA	*359_*360insT	

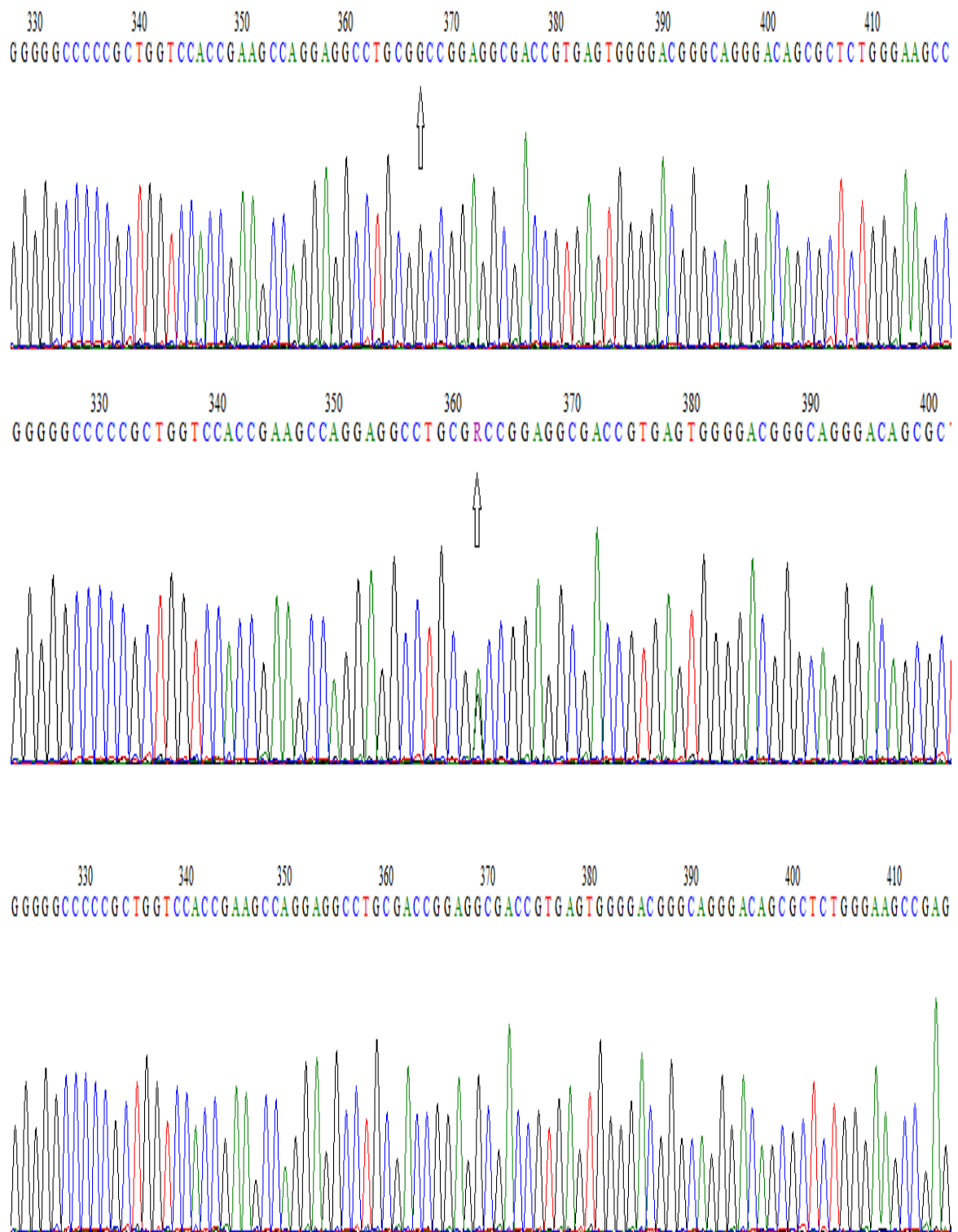
Πίνακας 14: Συχνότητα εμφάνισης αλλαγών

Variants	Αριθμός Ασθενών	Συχνότητα
INSL3		
178A>G ή Thr60Ala	24 (ομόζυγη) / 1 (ετερόζυγη)	58%
27G>A ή Ala9=	2	4,65%
126A>G ή Leu42=	5	11,63%
*1-109T>A (novel)	1	2,32%
HOXD13		
204G>A ή Ala68=	6	13,95%
Elongation CA	6	13,95%
*311C>T	5	11,63%
*360A>T	1	2,32%
*359_ *360insIT	1	2,32%
*528 *529 inversion(novel)	1	2,32%

Πίνακας 15: Ασθενείς που εμφάνισαν περισσότερες από μια αλλαγές

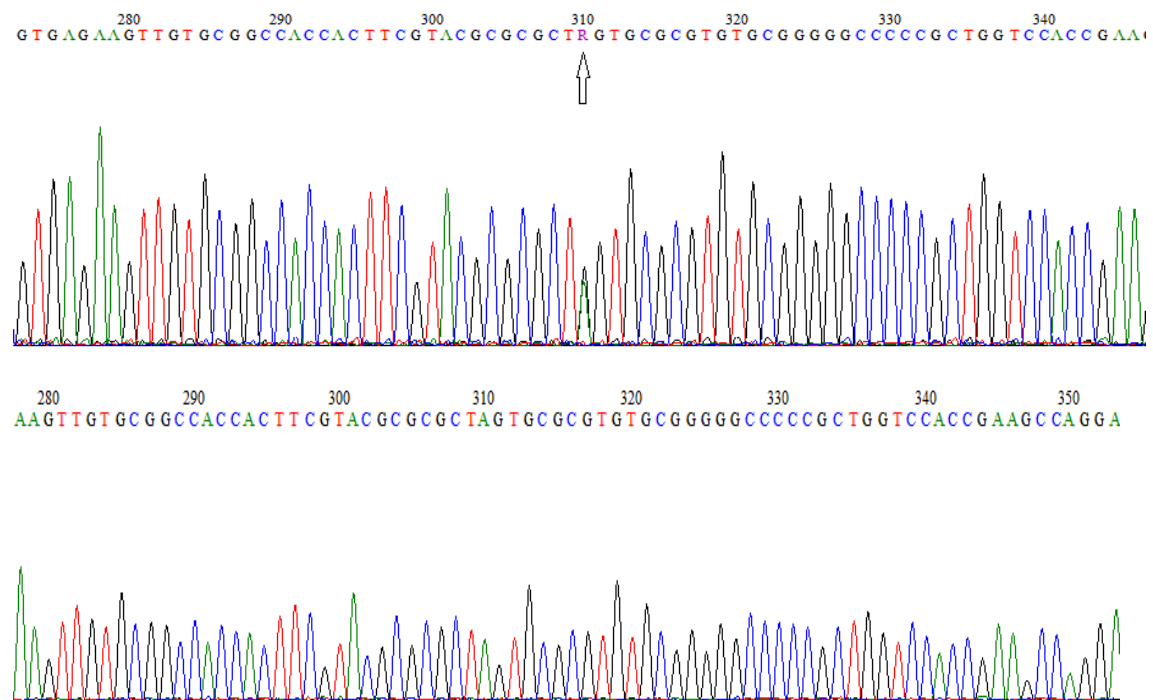
Κωδικός Ασθενούς	Variants			
5	*1-109 T>A (INSL3/5'UTR)	204G>A (HOXD13/εξώνιο1)		
9	27G>A (INSL3/εξώνιο1)	204G>A (HOXD13/εξώνιο1)	*311C>T (HOXD13/3'UTR)	Elongation CA
12,19,24,25, 27	178A>G (INSL3/εξώνιο1)	126A>G (INSL3/εξώνιο1)		
13	178A>G (INSL3/εξώνιο1)	27G>A (INSL3/εξώνιο1)	Elongation CA	
16,20,30	178A>G (INSL3/εξώνιο1)	204G>A (HOXD13/εξώνιο1)		
21	178A>G (INSL3/εξώνιο1)	*311C>T (HOXD13/3'UTR)	360*A>T (HOXD13/3'UTR)	
10	178A>G (INSL3/εξώνιο1)	Elongation CA		
11	204G>A (HOXD13/εξώνιο1)	Elongation CA		
34	*359_ *360insIT	Elongation CA		

178A>G



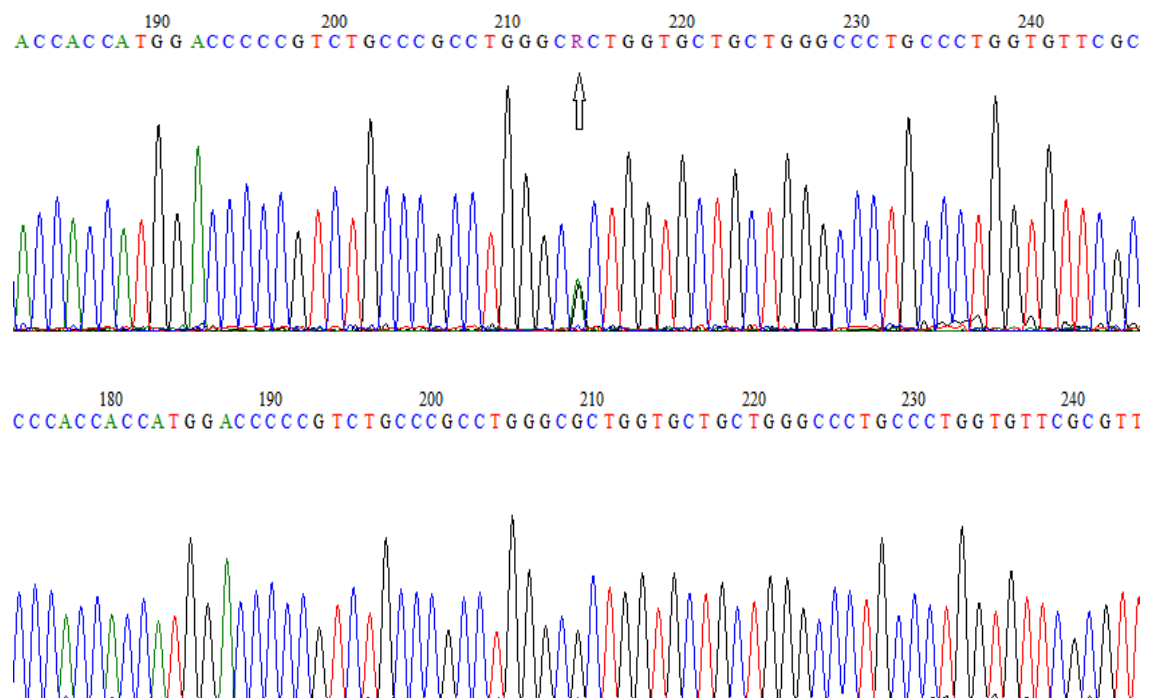
Εικόνα 5: Ανάλυση πρωτοταγούς δομής DNA σε ασθενή με ομοζυγωτία, ετεροζυγωτία και σε φυσιολογικό άτομο για τον πολυμορφισμό 178A>G.

126A>G



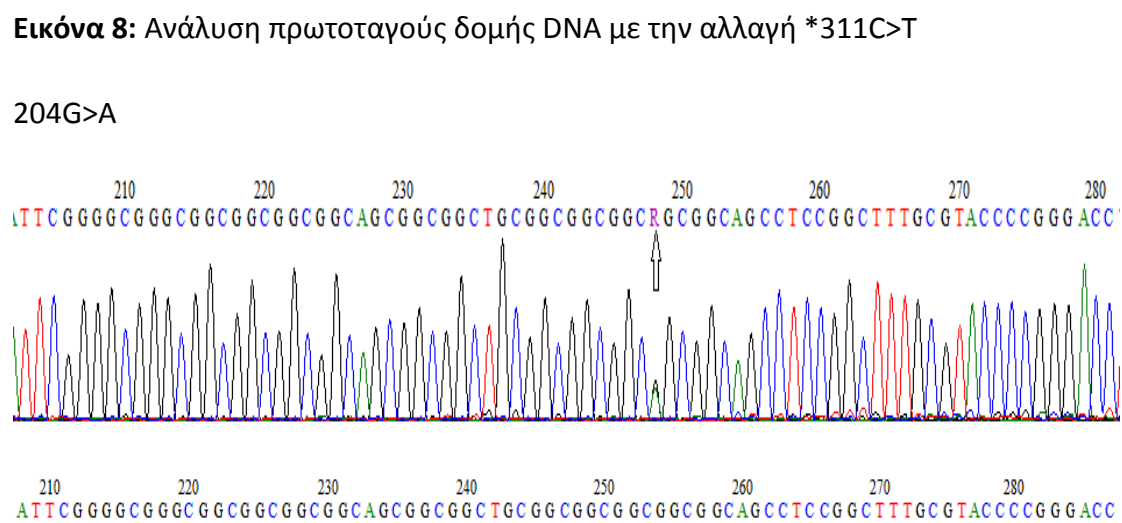
Εικόνα 6: Ανάλυση πρωτοταγούς δομής DNA με τον πολυμορφισμό 126A>G

27G>A

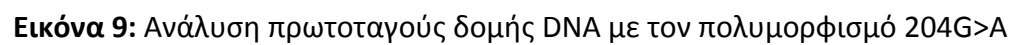


Εικόνα 7: Ανάλυση πρωτοταγούς δομής DNA με τον πολυμορφισμό 27G>A

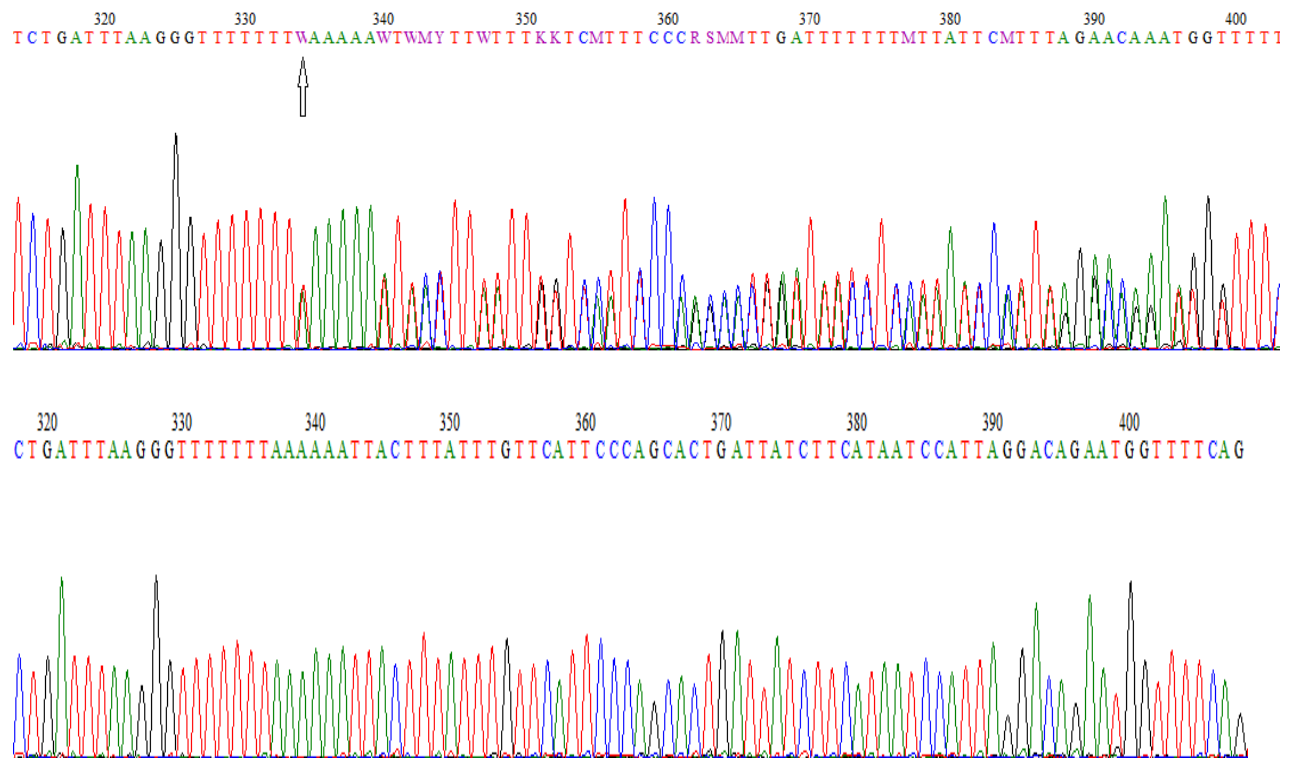
*311C>T



204G>A

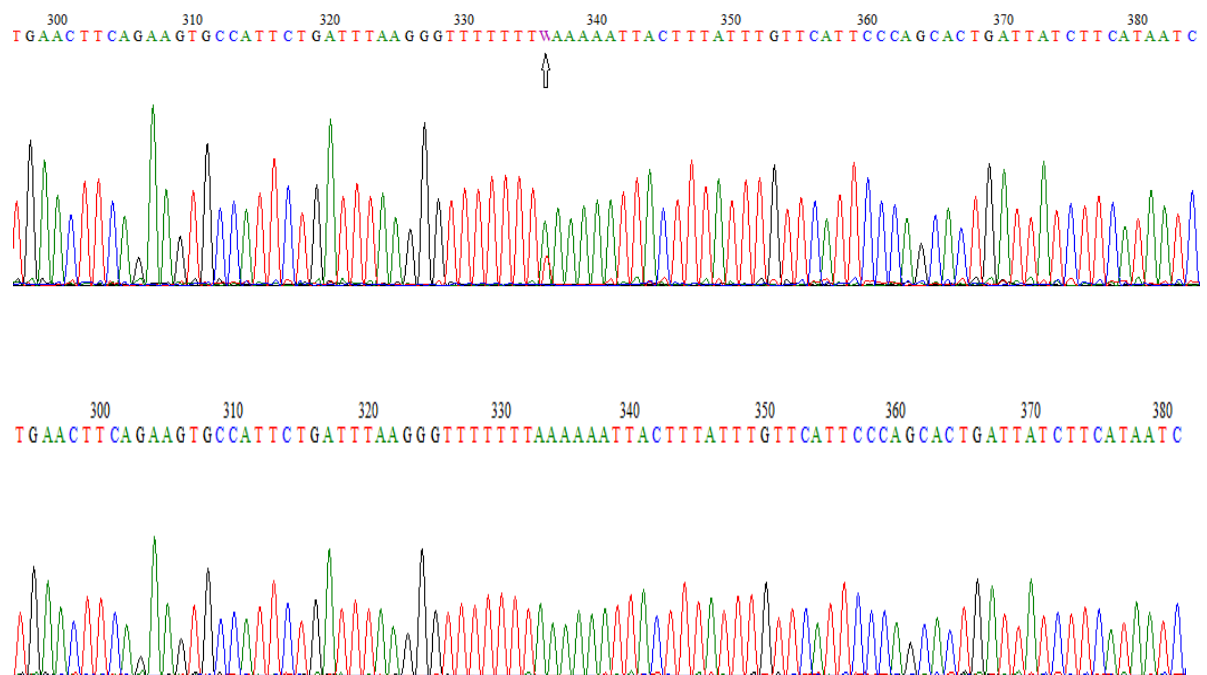


*359_*360insT



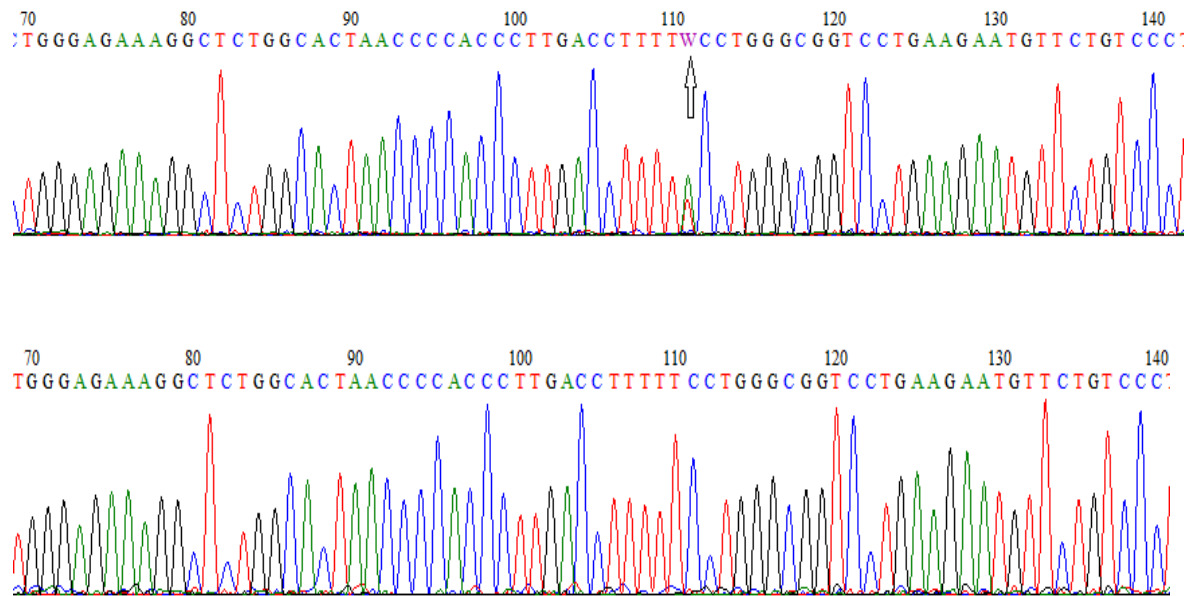
Εικόνα 10: Ανάλυση πρωτοταγούς δομής DNA με την αλλαγή *359_*360insT

*360A>T



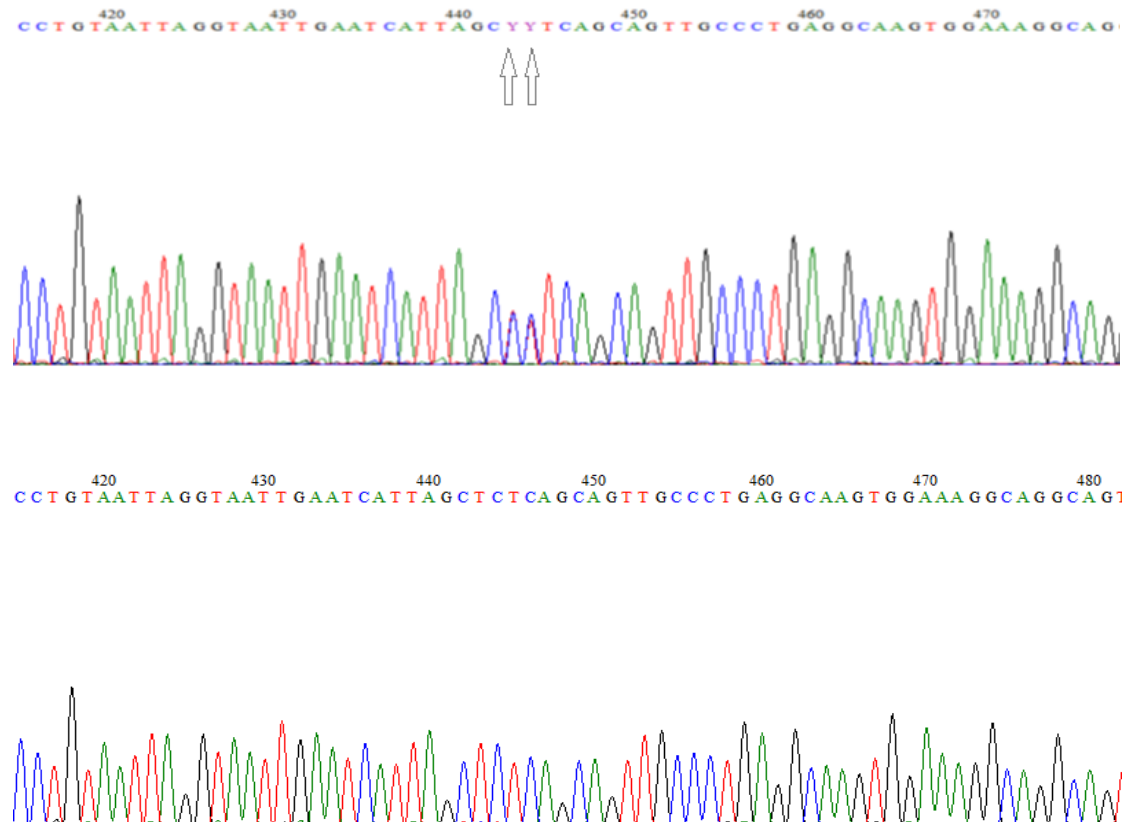
Εικόνα 11: Ανάλυση πρωτοταγούς δομής DNA με την αλλαγή *360A>T

***-109T>A**



Εικόνα 12: Ανάλυση πρωτοταγούς δομής DNA με την αλλαγή *-109T>A

***528 *529inversion**



Εικόνα 13: Ανάλυση πρωτοταγούς δομής DNA με την αλλαγή *528 *529inversion

Στο INSL3 παρατηρήθηκε μια πιθανά νέα αλλαγή στην 5' αμετάφραστη περιοχή η *1-109 T>A. Παράλληλα διαπιστώθηκε η παρουσία δύο συνώνυμων πολυμορφισμών (27G>A ή Ala9= και 126A>G ή Leu42=) ενώ διαπιστώθηκε και ένας παρανοηματικός πολυμορφισμός, ο 178A>G. Αξίζει να αναφερθεί ότι ο παρανοηματικός αυτός πολυμορφισμός εμφανίζεται τόσο σε ετεροζυγωτία όσο και σε ομοζυγωτία ενώ δεν προκαλεί κάποιον αναγνωρισμένο παθολογικό κλινικό φαινότυπο. Για το λόγο αυτό μετά το εύρημα αυτό πραγματοποιήθηκε ανάλυση ακολουθίας για το της εξώνιο 1 του INSL3 σε όλα τα δείγματα.

Στο γονίδιο HOXD13 αποκαλύφθηκε μια νέα άγνωστη αλλαγή στην 3' αμετάφραστη περιοχή η αναστροφή *528 *529inversion ενώ παράλληλα διαπιστώθηκαν ένας συνώνυμος πολυμορφισμός ο 204G>A, ένας πολυμορφισμός ο *311C>T στην 3' αμετάφραστη περιοχή και μια μετάλλαξη η *360A>T στην 3' αμετάφραστη περιοχή ενώ σε έναν ασθενή παρατηρήθηκε μια ένθεση η *359_*360insT στην 3' αμετάφραστη περιοχή. Σε αριθμό ασθενών παρατηρήθηκε επέκταση της πολυμορφικής μικροδορυφορικής αλληλουχίας CA σε εσωνική περιοχή στο γονίδιο HOXD13.

Τα χαρακτηριστικά των αλλαγών που παρατηρήθηκαν περιγράφονται συνοπτικά και στον πίνακα 16. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι σαν συχνότητα εμφάνισης 1 (MAF) ορίζεται η συχνότητα εμφάνισης ανά 1000 άτομα γενικού πληθυσμού που αναφέρεται στην βάση δεδομένων NCBI/Ensemble. Ως συχνότητα εμφάνισης 2 ορίζεται η συχνότητα εμφάνισης ανά 20 άτομα γενικού πληθυσμού στην παρούσα μελέτη.

Πίνακας 16: Χαρακτηριστικά των παρατηρούμενων αλλαγών
(Πηγή NCBI/Ensemble)

Variants	Περιοχή	Χαρακτηρισμός αλλαγής	Συχνότητα Εμφάνισης 1 (MAF)	Συχνότητα εμφάνισης 2
INSL3				
*-109T>A (novel)	5'Αμετάφραση περιοχή			0/0
27G>A	Εξώνιο 1	Συνώνυμη	0.126/275	0.15/3
126A>G	Εξώνιο 1	Συνώνυμη	0.280/612	0.35/7
178A>G	Εξώνιο 1	Παρανοηματική	0.312/681	0.6/12
HOXD13				
elongation CA	Εσώνιο 1-2			0.1/2
204G>A	Της 1	Συνώνυμη	0.386/846	
*311C>T	3'Αμετάφραστη περιοχή		0.026/56	
*360A>T	3'Αμετάφραστη περιοχή		0.004/8	
*359_*360insIT	3'Αμετάφραστη περιοχή	Ένθεση		
*528*529inversion	3'Αμετάφραστη περιοχή			

Ωστόσο στο σημείο αυτό θα πρέπει να αναφέρουμε ότι για τον συνώνυμο πολυμορφισμό 204G>A που παρατηρήθηκε στο HOXD13 τα ποσοστά εμφάνισης στον πληθυσμό δεν μπορούν να εκτιμηθούν πλήρως όπως για τα προηγούμενα ευρήματα καθώς υπήρξε αδυναμία ελέγχου όλων των δειγμάτων λόγω παραγωγής προϊόντος PCR μόνο σε μικρό αριθμό από αυτά. Αντίστοιχη κατάσταση προέκυψε και κατά τη μελέτη του εξωνίου 1 του HOXA10. Ωστόσο ο έλεγχος που

πραγματοποιήθηκε στον μικρό αριθμό δειγμάτων που ελέγχθηκαν δεν αποκάλυψε κάποιο παθολογικό εύρημα.

Για την περαιτέρω διερεύνηση των δύο αδημοσίευτων στην βιβλιογραφία ευρημάτων (βάσεις δεδομένων NCBI και Ensemble) ελέγχθηκαν και 20 μάρτυρες αναπαραγωγικής ηλικίας που αποτελούσαν τον γενικό πληθυσμό. Από την ομάδα ελέγχου του γενικού πληθυσμού, μεγάλος αριθμός ατόμων εμφάνισε τους πολυμορφισμούς 27G>A, 126A>G, 178A>G. Ωστόσο κανένα δείγμα δεν εμφάνισε την αλλαγή *-109 T>A. Πρέπει να αναφερθεί ότι η συχνότητα εμφάνισης στα 20 άτομα γενικού πληθυσμού της παρούσας μελέτης δεν είναι αντιπροσωπευτική καθώς υπήρξε δυσκολία ανάγνωσης της αλληλουχίας. Επιπλέον, η επέκταση της μικροδορυφορικής αλληλουχίας CA αναφέρεται στην βιβλιογραφία ωστόσο δεν κατέσται δυνατός ο ακριβής χαρακτηρισμός της αλλαγής γι' αυτό και δεν παρέχονται περαιτέρω στοιχεία σχετικά με την συχνότητα της αλλαγής της.

Στο σημείο αυτό θα πρέπει να αναφερθεί ότι δεν έδωσαν όλα τα ζεύγη εκκινητών τα επιθυμητά αποτελέσματα με συνέπεια αυτό να επηρεάσει τα αποτελέσματα της μελέτης. Συγκεκριμένα, για το ζεύγος εκκινητών του τμήματος 1 του εξωνίου 1 του HOXD13 επιτεύχθηκε πολλαπλασιασμός του επιθυμητού προϊόντος σε μερικό αριθμό δειγμάτων. Παράλληλα για το τμήμα 2 του εξωνίου 2 του INSL3 και τα τμήματα 1 και 2 του εξωνίου HOXA10 ενδεχομένως η καλύτερη λύση να ήταν ο σχεδιασμός καινούργιων εκκινητών, αν και μερικά δείγματα έδωσαν προϊόν σωστού μεγέθους στο HOXA10. Τέλος, στο ζεύγος εκκινητών του τμήματος 1 του εξωνίου 1 του HOXD13 δεν επετεύχθη η ιδανική απόδοση μετά από πολλαπλές προσπάθειες τυποποίησης.

5. Συμπεράσματα – Συζήτηση

Η κρυφορχία είναι μια από της πιο συχνές συγγενείς διαταραχές στα άρρενα νεογνά με μια συχνότητα της τάξης του 2-4%. Τα τελευταία χρόνια η εμφάνιση της κρυφορχίας έχει αυξηθεί, ενώ έχει διαπιστωθεί ότι η συχνότητά της εξαρτάται και από γεωγραφικούς παράγοντες. Αρκετά είναι τα γονίδια που έχουν συσχετιστεί με την εμφάνιση της κρυφορχίας. Ακόμα και χαμηλή συχνότητα

μεταλλάξεων ή πολυμορφισμών να έχει αναφερθεί για αυτά τα γονίδια θα άξιζε να πραγματοποιηθεί ένας έλεγχος στον ελλαδικό χώρο δεδομένου ότι η εμφάνιση της κρυπορχίας έχει αναφερθεί ότι εξαρτάται από το γεωγραφικό χώρο.

Στην παρούσα μελέτη θελήσαμε να εξετάσουμε την αιτιοπαθογένεια της μεμονωμένης κρυπορχίας δηλαδή της κρυπορχίας που δεν εμφανίζεται στα πλαίσια κάποιου συνδρόμου. Κατά τη διάρκεια της μελέτης πραγματοποιήθηκε καταγραφή ιστορικού από τους γονείς των ασθενών, κλινική εξέταση από τους παιδοχειρουργούς και καταγραφή των ευρημάτων κατά την χειρουργική επέμβαση. Σαν συμπληρωματικός έλεγχος πραγματοποιήθηκε χρωμοσωμική ανάλυση, παρόλο που ο φαινότυπος δεν συνηγορούσε στην πιθανότητα ύπαρξης συνδρομικής κρυπορχίας που σε αυτήν την περίπτωση σε μεγάλο βαθμό διαγιγνώσκεται μέσω του καρυοτύπου αλλά και έλεγχος μικροελλείψεων για πιθανά ευρήματα που θα μπορούσαν να συσχετιστούν σε κάποιο βαθμό με το φαινότυπο.

Στην μελέτη συμπεριλήφθησαν 43 ασθενείς παιδικής ηλικίας με ποικίλου βαθμού βαρύτητας μεμονωμένης κρυπορχίας. Όπως είναι γνωστό η πιθανή παρουσία μεταλλάξεων δεν φαίνεται να συσχετίζεται με την βαρύτητα της κρυπορχίας. Όσον αφορά στα ευρήματα της παρούσας μελέτης αναφορικά με το γονίδιο INSL3 αξίζει να αναφερθεί η παρουσία του παρανοηματικού πολυμορφισμού 178A>G ο οποίος προκαλεί αλλαγή της τυροσίνης σε αλανίνη στην αμινοξική ακολουθία και εμφανίζεται στη διεθνή βιβλιογραφία (βάσεις δεδομένων NCBI και Ensemble) με μια συχνότητα της τάξης του 0.312 σε 1000 άτομα γενικού πληθυσμού που ελέγχθηκαν και δεν έχει κάποιο χαρακτηρισμένο κλινικό φαινότυπο. Η παρούσα μελέτη αποκάλυψε την πολύ μεγάλη συχνότητα αυτού του πολυμορφισμού στον ελλαδικό χώρο και μάλιστα σε ομόζυγη κατάσταση. Χαρακτηριστικό είναι ότι τον συγκεκριμένο πολυμορφισμό τον εμφανίζουν εξίσου και τα δείγματα ελέγχου. Όσον αφορά τους πολυμορφισμούς 27G>A, 126A>G, 178A>G εμφανίζονται και εκείνοι σχετικά συχνά στα δείγματα ελέγχου ενώ αξίζει να σημειωθεί ότι στους μάρτυρες εμφανίστηκε ο συνώνυμος πολυμορφισμός 126A>G σε ομοζυγωτία, κάτι που δεν παρατηρήθηκε στους ασθενείς. Αξίζει να σημειωθεί ότι στο INSL3 παρατηρήθηκε και μια νέα αλλαγή στην 5' αμετάφραστη περιοχή του εξωνίου 1 η *-109 T>A, η οποία δεν παρατηρήθηκε σε κάποιο από τα δείγματα της ομάδας ελέγχου.

Στο γονίδιο HOXD13 αποκαλύφθηκε μια νέα άγνωστη αλλαγή στην 3' αμετάφραστη περιοχή, η αναστροφή *528 *529, ένας συνώνυμος πολυμορφισμός, ο 204G>A, δύο πολυμορφισμοί οι *311C>T και *360A>T στην 3' αμετάφραστη περιοχή, ενώ σε έναν ασθενή παρατηρήθηκε μια ένθεση η *359_*360insT στην 3' αμετάφραστη περιοχή. Σε αριθμό ασθενών παρατηρήθηκε επέκταση της πολυμορφικής μικροδορυφορικής αλληλουχίας CA σε εσωνική περιοχή του γονιδίου. Ωστόσο ο αντίστοιχος έλεγχος που πραγματοποιήθηκε στον γενικό αποκάλυψε την επέκταση της αλληλουχίας CA σε και στα δείγματα ελέγχου.

Αξίζει επίσης να παρατηρήσουμε ότι υπήρξαν 15 ασθενείς που εμφάνισαν περισσότερες από μια αλλαγές σε περιοχές εξωνίου ή αμετάφραστες περιοχές στο ίδιο ή και σε διαφορετικά γονίδια. Οι αλλαγές που παρατηρούνται στην εσωνική περιοχή του HOXD13 δεν μπορούν να αξιολογηθούν πλήρως δεδομένου ότι υπάρχει δυσκολία εντόπισης της ακριβούς θέσης της αλλαγής ενώ παρατηρήθηκε και δυσκολία ανάγνωσης μετά την ανάλυση της ακολουθίας. Ωστόσο θα πρέπει να αναφερθεί ότι συνδυασμός περισσότερων από μια αλλαγών εντοπίστηκε και στα δείγματα ελέγχου για την περιοχή του εξωνίου 1 του INSL3 ενώ κάποιος αντίστοιχος έλεγχος δεν πραγματοποιήθηκε για της περιοχές εύρεσης αλλαγών του HOXD13. Ενδεχομένως ο συνδυασμός αλλαγών στα διαφορετικά γονίδια να παίζει κάποιο παθογενετικό ρόλο καθώς είναι γνωστό και επιβεβαιώνεται και από τις τελευταίες *in vitro* μελέτες ότι αλληλεπιδράσεις μεταξύ γονιδίων μπορεί να σχετίζονται με την εμφάνιση της κρυφορχίας. Θα πρέπει να αναφερθεί επιπλέον το γεγονός ότι οι πολυμορφισμοί ή οι μεταλλάξεις που ανιχνεύθηκαν θα μπορούσαν ενδεχομένως να παίζουν κάποιο ρόλο στην εμφάνιση παθολογικού φαινοτύπου σε συνδυασμό με την παρουσία κάποιας άλλης μη ανιχνεύσιμης αλλαγής σε κάποια άλλη περιοχή των γονιδίων δεδομένου ότι δεν ελέγχθηκε το σύνολο της αλληλουχίας του γονιδίου INSL3 λόγω αδυναμίας ελέγχου του εξωνίου 2 ενώ και στα δύο γονίδια δόθηκε προτεραιότητα στην ανάλυση περιοχών εξωνίων και αμετάφραστων περιοχών έναντι εσωνικών περιοχών.

Όσον αφορά στην αξιοπιστία της μεθόδου ECMA στις περισσότερες περιπτώσεις πλην ελαχίστων εξαιρέσεων τα ευρήματά της επιβεβαιώθηκαν από την ανάλυση πρωτοταγούς δομής του DNA και εκεί που δεν συνέβη αυτό ενδεχομένως οφείλεται σε αδυναμία ανάγνωσης του συνόλου του προϊόντος PCR.

Εν κατακλείδι, το σύνολο των παρατηρούμενων αλλαγών διαπιστώθηκε είτε σε εξώνια είτε σε αμετάφραστες περιοχές, με εξαίρεση την επέκταση της πολυμορφικής αλληλουχίας CA που παρατηρήθηκε στο εσώνιο του HOXD13. Σημαντικά ήταν τα ευρήματα σχετικά με την αποκάλυψη των δύο νέων αλλαγών, της *-109T>A στην 5' αμετάφραστη περιοχή του INSL3 αλλά και της *528*529inversion στην 3' αμετάφραστη περιοχή του HOXD13. Για το λόγο αυτό θα πρέπει να πραγματοποιηθούν περαιτέρω μελέτες με μεγαλύτερο αριθμό ασθενών και μαρτύρων, αλλά και με τη χρήση ομάδας ελέγχου που επιβεβαιωμένα δεν παρουσιάζει κρυπτορχία προκειμένου να ενισχυθούν τα ευρήματά της αλλά και να χαρακτηριστούν οι δύο μη καταγεγραμμένες αλλαγές στην βιβλιογραφία σαν μεταλλάξεις ή πολυμορφισμοί. Ο έλεγχος δεν θα πρέπει να περιοριστεί μόνο στις περιοχές των γονιδίων που ευρέθησαν οι νέες αλλαγές αλλά στο σύνολο των περιοχών που παρατηρήθηκαν αλλαγές ακόμα και χαρακτηρισμένες, καθώς η συχνότητα εμφάνισής τους στον ελληνικό χώρο μπορεί να διαφέρει σε σχέση με την αναγραφόμενη στην βιβλιογραφία και όπως είναι γνωστό η κρυπτορχία φαίνεται να εξαρτάται από τον γεωγραφικό χώρο.

6. Βιβλιογραφία

1. Kurpisz, M., et al., *Cryptorchidism and long-term consequences*. Reprod Biol, 2010. 10(1): p. 19-35.
2. Gapany, C., et al., *Management of cryptorchidism in children: guidelines*. Swiss Med Wkly, 2008. 138(33-34): p. 492-8.
3. Virtanen, H.E., et al., *Cryptorchidism: classification, prevalence and long-term consequences*. Acta Paediatr, 2007. 96(5): p. 611-6.
4. Marchetti, F., et al., *Management of cryptorchidism: a survey of clinical practice in Italy*. BMC Pediatr, 2012. 12: p. 4.
5. Virtanen, H.E. and J. Toppari, *Epidemiology and pathogenesis of cryptorchidism*. Hum Reprod Update, 2008. 14(1): p. 49-58.
6. Barthold, J.S., *Undescended testis: current theories of etiology*. Curr Opin Urol, 2008. 18(4): p. 395-400.
7. Kaleva, M. and J. Toppari, *Genetics and hormones in testicular descent*. Hormones (Athens), 2003. 2(4): p. 211-6.
8. Feng, S., et al., *INSL3/RXFP2 signaling in testicular descent*. Ann N Y Acad Sci, 2009. 1160: p. 197-204.
9. Lie, G. and J.M. Hutson, *The role of cremaster muscle in testicular descent in humans and animal models*. Pediatr Surg Int, 2011. 27(12): p. 1255-65.
10. Foresta, C., et al., *Role of hormones, genes, and environment in human cryptorchidism*. Endocr Rev, 2008. 29(5): p. 560-80.
11. Adham, I.M. and A.I. AgoulNIK, *Insulin-like 3 signalling in testicular descent*. Int J Androl, 2004. 27(5): p. 257-65.
12. Massart, F. and G. Saggese, *Morphogenetic targets and genetics of undescended testis*. Sex Dev, 2010. 4(6): p. 326-35.
13. Wang, Y., et al., *Allelic variants in HOX genes in cryptorchidism*. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol, 2007. 79(4): p. 269-75.
14. Dalgaard, M.D., et al., *A genome-wide association study of men with symptoms of testicular dysgenesis syndrome and its network biology interpretation*. J Med Genet, 2012. 49(1): p. 58-65.
15. Giwercman, A., et al., *Ethnic differences in occurrence of TDS-genetics and/or environment?* Int J Androl, 2006. 29(1): p. 291-7; discussion 304-6.

16. Kojima, Y., et al., *Advances in molecular genetics of cryptorchidism*. Urology, 2009. 74(3): p. 571-8.
17. Tannour-Louet, M., et al., *Identification of de novo copy number variants associated with human disorders of sexual development*. PloS One, 2010. 5(10): p. e15392.
18. Hadziselimovic, N.O., et al., *Decreased expression of FGFR1, SOS1, RAF1 genes in cryptorchidism*. Urol Int, 2010. 84(3): p. 353-61.
19. Laitinen, E.M., et al., *Isolated cryptorchidism: no evidence for involvement of genes underlying isolated hypogonadotropic hypogonadism*. Mol Cell Endocrinol, 2011
20. Lin, L. and J.C. Achermann, *Steroidogenic factor-1 (SF-1, Ad4BP, NR5A1) and disorders of testis development*. Sex Dev, 2008. 2(4-5): p. 200-9.
21. Gurbuz, N., et al., *Do microdeletions in the AZF region of the Y chromosome accompany cryptorchidism in Turkish children?* Int Urol Nephrol, 2008. 40(3): p. 577-81.
22. Zakaria, M., et al., *Cryptorchidism in Egyptian neonates*. J Pediatr Urol, 2012.
23. Ars E et al., *Further insights into the role of T222P variant of RXFP2 in non-syndromic cryptorchidism in two Mediterranean populations*. Int J Androl, 2011. 34(4): p333-8.
24. Ferraz-de-Souza, B., L. Lin, and J.C. Achermann, *Steroidogenic factor-1 (SF-1, NR5A1) and human disease*. Mol Cell Endocrinol, 2011. 336(1-2): p. 198-205.
25. Fagerli, J., et al., *Absence of microdeletions in the Y chromosome in patients with a history of cryptorchidism and azoospermia or oligospermia*. Fertil Steril, 1999. 71(4): p. 697-700.
26. Paediatric Urology pocket 2011
27. MagAttract® DNA Blood M48 Handbook, April 2010
28. Barbas, C.F., 3rd, et al., *Quantitation of DNA and RNA*. CSH Protoc, 2007: p. pdb ip47.
29. Jean M. DeMarchi, *The Polymerase Chain Reaction*. Clinical Microbiology Newsletter, 1990. 12 (11) p: 81-84
30. Bell, J., *The polymerase chain reaction*. Immunol Today, 1989. 10(10): p. 351-5.

31. Ferlin, A., et al., *The INSL3-LGR8/GREAT ligand-receptor pair in human cryptorchidism*. J Clin Endocrinol Metab, 2003. 88(9): p. 4273-9.
32. Kosaki, K., et al., *Complete mutation analysis panel of the 39 human HOX genes*. Teratology, 2002. 65(2): p. 50-62.
33. Fleischman, R.A., et al., *Absence of mutations in the HoxA10, HoxA11 and HoxD11 nucleotide coding sequences in thrombocytopenia with absent radius syndrome*. Br J Haematol, 2002. 116(2): p. 367-75.
34. Lynch, J.R. and J.M. Brown, *The polymerase chain reaction: current and future clinical applications*. J Med Genet, 1990. 27(1): p. 2-7.
35. Towbin, J.A., *Polymerase chain reaction and its uses as a diagnostic tool for cardiovascular disease*. Trends Cardiovasc Med, 1995. 5(5): p. 175-85.
36. QIAGEN® Multiplex PCR Handbook, October 2010
37. HotStarTaq™ PCR Handbook, March 2002
38. Voytas, D., *Agarose gel electrophoresis*. Curr Protoc Immunol, 2001. Chapter 10: p. Uni10 4.
39. Lee, P.Y., et al., *Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments*. J Vis Exp, 2012(62)
40. Vogiatzakis, N., et al., *Screening human genes for small alterations performing an enzymatic cleavage mismatched analysis (ECMA) protocol*. Mol Biotechnol, 2007. 37(3): p. 212-9
41. Voskarides, K. and C. Deltas, *Screening for mutations in kidney-related genes using SURVEYOR nuclease for cleavage at heteroduplex mismatches*. J Mol Diagn, 2009. 11(4): p. 311-8.
42. User Guide for the Transgenomic SURVEYOR® Mutation Detection Kit for Standard Gel Electrophoresis
43. Franca, L.T., E. Carrilho, and T.B. Kist, *A review of DNA sequencing techniques*. Q Rev Biophys, 2002. 35(2): p. 169-200.
44. BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, Printed in USA, 09/2010

7. Παραρτήματα

7.Α. Επεξηγηματικός πίνακας συντμήσεων

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ	ΠΛΗΡΗΣ ΑΓΓΛΙΚΟΣ ΟΡΟΣ	ΕΛΛΗΝΙΚΟΣ ΟΡΟΣ
Ad	Type A dark spermatogonia	Τύπος σπερματογονίων «σκοτεινά»
Ad4BP	Adrenal 4 binding protein	Πρωτεΐνη δέσμευσης στην επινεφριδιακή περιοχή 4
AGI	Ano-genital-index	Δείκτης απόστασης πρωκτού γεννητικών οργάνων
AIS	Androgen insensitivity syndrome	Σύνδρομο αντίστασης στα ανδρογόνα
AR	Androgen Receptor	Υποδοχέας των ανδρογόνων
Arx	Aristaless related homeobox	Πεπτίδιο C σχετιζόμενο με την ομοιοακολουθία
AMH	Anti-mullerianhormone	Αντιμυλλέριος ορμόνη
AZF	Azoospermia factor	Αζωοσπερμικός παράγοντας
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate	Κυκλάση της μονοφωσφορικής αδενοσίνης
CGRP	Calcitonin gene-related peptide	Πεπτίδιο σχετιζόμενο με την καλσιτονίνη
CIS	Carcinoma in situ	Καρκίνωμα in situ
CNV	Copy-number variant	Παραλλαγή του αριθμού αντιγράφων
CSL	Cranial suspensory ligament	Κρανιακός ανασταλτικός σύνδεσμος
Cyp19a1	Cytochrome P450, family 19, subfamily A, polypeptide 1	Κυτόχρωμα P450, οικογένεια 19, υποοικογένεια A, πολυπεπτίδιο 1
DAX-1	Dosage-sensitive sex reversal, adrenal hypoplasia critical region, on chromosome X, gene 1	Δοσοεξαρτώμενη αναστροφή του φύλου, σε κρίσιμη περιοχή για την υποπλασία των επινεφριδίων στο χρωμόσωμα X, γονίδιο 1
DAZ	Deleted in azoospermia	Διαγραφόμενο στην αζωοσπερμία
DGGE	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis	Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα ακρυλαμίδης παρουσία αποδιατακτικού παράγοντα
DHPLC	Denaturing High Pressure Liquid Chromatography	Αποδιατακτική υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης
DNA	Deoxyribonucleic acid	Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate	Τριφωσφορική δεοξυριβόζη

DSD	Disorders of sexual development	Διαταραχές της διαφοροποίησης του φύλου
ECMA	Enzymatic cleavage mismatch analysis	Ενζυματική μέθοδος διάσπασης ετεροδιμερών
EDCS	Endocrine disruptors	Ενδοκρινικοί διαταράκτες
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid	Αιθυλενοδιάμινο Τετραοξικό οξύ
EEDs	Estrogenicendocrine disruptors	Διαταράκτες οιστρογονικής φύσης
ESR1	Estrogen receptor 1	Υποδοχέας α των οιστρογόνων
ESR2	Estrogen receptor 2 (ER beta)	Υποδοχέας β των οιστρογόνων
FG	Represents the surname initials of the first family diagnosed with the disorder. It is a rare genetic syndrome. Its major clinical features include retardation, hyperactivity, hypotonia and macrocephaly	Τα αρχικά της πρώτης οικογένειας στην οποία διαγνώστηκε το σύνδρομο. Σπάνιο σύνδρομο με κύρια κλινικά χαρακτηριστικά την νοητική υστέρηση, την υπερδραστηριότητα, την υποτονία και την μακροκεφαλία
FGFR1	Fibroblast growth factor receptor1	Υποδοχέας του αυξητικού παράγοντα των ινοβλαστών
FSH	Follicle-stimulating hormone	Θυλακιοτρόπος ορμόνη
GnRH	Gonadotropin-releasing hormone	Εκλυτική ορμόνη των γοναδοτροπινών
GNRHR	Gonadotropin-releasing hormone receptor	Υποδοχέας της εκλυτικής ορμόνης των γοναδοτροπινών
hCG	Human chorionic gonadotropin	Ανθρώπινη χοριακή γοναδοτροπίνη
HOX	Homeobox	Ομοιοτικάγονίδια
HOXA10	Homeo box A10	Ομοιοτικό γονίδιο A10
Hoxa11	Homeobox A11	Ομοιοτικό A11 γονίδιο
Hoxd13	Homeobox D13	Ομοιοτικό D13
INSL3	Insulin-like factor 3	Ομοιοειδής της ινσουλίνης αυξητικός παράγοντας 3
IgG	Immunoglobulin G	Ανοσοσφαιρίνη G
IgM	Immunoglobulin M	Ανοσοσφαιρίνη M
KAL1	Kallmann's syndrome gene 1	Το γονίδιο 1 για το σύνδρομο Kallman
KAL2	Kallmann's syndrome gene 2	Το γονίδιο 2 για το σύνδρομο Kallman
LGR8/GREAT	Leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptor 8	Υποδοχέας 8 της λευκίνης που είναι πλούσια περιοχή σε επαναλήψεις G/Υποδοχέας του INSL3
LH	Luteinizing hormone	Ωχρινοτρόπος ορμόνη

NCBI	National Center for Biotechnology Information	Εθνικό Κέντρο Πληροφοριών για τη Βιοτεχνολογία
Noonan Syndrome	It is a relatively common autosomal dominant congenital disorder .The principal features include congenital heart defect, short stature, learning problems, impaired blood clotting.	Είναι μια σχετικά κοινή συγγενής διαταραχή. Τα κύρια χαρακτηριστικά της είναι συγγενείς ανωμαλίες της καρδιάς, κοντό ανάστημα, μαθησιακές δυσκολίες, διαταραχή της πήκτικότητας του αίματος,.
Nr5a1	Nuclear receptor subfamily 5, group A, member 1	Πυρηνικός υποδοχέας της υποοικογένειας 5, ομάδα A,μέλος 1
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man	Βάση δεδομένων για τα γενετικά σύνδρομα σε πλήρη περιγραφή
PBDEs	Polybrominated diphenyl ethers	Πολυβρωμοδιφαινυλαιθέρες
PCR	Polymerase chain reaction	Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης
Prokr2	Prokineticin receptor 2	Υποδοχέας της προκινετισίνης 2
Ptpn11	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11	Πρωτεϊνική φωσφατάση της τυροσίνης, μη ειδικός υποδοχέας τύπου 11
PTT	Protein truncation test	Δοκιμασία πρόωρου τερματισμού της πρωτεϊνοσύνθεσης
Pwcr	Prader-Willi Syndrome region	Υπεύθυνη περιοχή για το σύνδρομο Prader-Willi
Raf1	v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1	Ομόλογο του ιικού ογκογονιδίου v-raf του ποντικού
RNA	Ribonucleic acid	Ριβονουκλεϊκό οξύ
ROS	Reactive oxygen species	Ελεύθερες ρίζες οξυγόνου
RXFP2	Relaxin/insulin-like familypeptide receptor 2	Ρελαξίνη/Υποδοχέαςομοιοειδής του πεπτιδίου της ινσουλίνης
SF-1	Steroidogenic factor 1	Στεροεοειδικός παράγοντας 1
SNP	Single-nucleotide polymorphism	Πολυμορφισμοί που αφορούν αλλαγή μιας βάσης
Sos1	Salt Overly Sensitive 1	
Sox2	Sex determining region Y-box 2	Σχετιζόμενη με την περιοχή του SRY, (περιοχή καθορισμού του φύλου), περιοχή 2
SOX9	Sex determining region Y-box 9	Ομοιοτική περιοχή με αυτήν του καθορισμού του φύλου στο Y, μοτίβο 9

Spata12	Spermatogenesis associated 12	Γονίδιο 12 σχετιζόμενο με την σπερματογένεση
SSCP	Single-strand conformation polymorphism	Ανάλυση με βάση των πολυμορφισμό μονόκλωνου DNA
TDS	Testicular Dysgenesis Syndrome	Σύνδρομο δυσγενεσίας των όρχεων
TGCC	Testicular germ cell cancer	Καρκίνος των όρχεων
UCSC	University of California Santa Cruz	Πανεπιστήμιο της Σάντα Κρουζ στην Καλιφόρνια
ZNF214	Zinc finger protein 214	Πρωτεΐνη δακτύλου ψευδαργύρου 214
ZNF215	Zinc finger protein 215	Πρωτεΐνη δακτύλου ψευδαργύρου 215

7.Β. Έντυπο Συγκατάθεσης

Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής
Διευθυντής Καθηγητής: Ε. Καναβάκης
Χωρέμειο Ερευνητικό Κέντρο

Μονάδα Ενδοκρινολογίας και Διαβήτη
Α' Παιδιατρική Κλινική του Νοσοκομείου
Παίδων «Η Αγία Σοφία»
(Αναπλ. Καθηγήτρια Δρ. Χριστίνα Κανακά-
Gantenbein)

ΕΝΤΥΠΟ ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΜΕΝΗΣ ΣΥΓΚΑΤΑΘΕΣΗΣ

ΕΓΩ, Ο/Η.....

ΚΑΤΟΙΚΟΣ

ΜΕ ΤΟ ΠΑΡΟΝ ΕΓΓΡΑΦΟ ΑΝΑΓΝΩΡΙΖΩ ΚΑΙ ΠΙΣΤΟΠΟΙΩ ΤΑ ΑΚΟΛΟΥΘΑ:

Δηλώνω τη συγκατάθεσή μου για τη συμμετοχή του παιδιού μου, στην ερευνητική μελέτη με τίτλο: «Διερεύνηση των γονιδίων HoxA10, HoxD13, Sox9 και INSL3 για πιθανή συσχέτιση με την αιτιοπαθογένεια της μεμονωμένης κρυφορχίας στον ελληνικό πληθυσμό» με επιστημονικό υπεύθυνο την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παιδιατρικής Ενδοκρινολογίας και Νεανικού Διαβήτη Δρ. Χριστίνα Κανακά-Gantenbein του τμήματος Ενδοκρινολογίας και Διαβήτη της Α' Παιδιατρικής Κλινικής του Νοσοκομείου Παίδων «Η Αγία Σοφία» σε συνεργασία με το εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής του ΕΚΠΑ και με την Α' και Β' Χειρουργική Κλινική του Νοσοκομείου Παίδων «Η Αγία Σοφία» και την Α' και Β' Χειρουργική Κλινική του Νοσοκομείου Παίδων «Αγλαΐα Κυριακού» .

Συγκεκριμένα:

1. Κατανοώ ότι πριν αρχίσει η συμμετοχή του παιδιού μου στη μελέτη θα ενημερωθώ επαρκώς για τη φύση και το σκοπό τη μελέτης.
2. Αντιλαμβάνομαι πως δεν υπάρχει κανένας κίνδυνος από τη συμμετοχή του παιδιού μου στη μελέτη.
3. Κατανοώ ότι η μελέτη περιλαμβάνει λήψη ιατρικού και οικογενειακού ιστορικού, κλινική εξέταση, απεικονιστικό/υπερηχογραφικό έλεγχο και αιμοληψία για ορμονολογικές εξετάσεις και γενετικές αναλύσεις.
4. Οποιαδήποτε πληροφορία που αφορά στο παιδί μου (αποτελέσματα εξετάσεων που θα προκύψουν κατά τη διάρκεια της μελέτης) θα παραμείνει απόρρητη.
5. Οποιαδήποτε ερωτήματά μου σχετικά με την μελέτη θα απαντηθούν πλήρως από τους επιστημονικούς υπεύθυνους /συνεργάτες.
6. Δυνητικό όφελος της μελέτης θα είναι η εύρεση της αιτιοπαθογένειας της μεμονωμένης κρυφορχίας.
7. Κατανοώ ότι το παιδί μου θα συμπεριληφθεί στη μελέτη μόνο εάν το επιθυμώ.
8. Διατηρώ το δικαίωμα να διακόψω ανά πάσα στιγμή τη συμμετοχή του παιδιού μου στη μελέτη, χωρίς καμία επίπτωση στην ιατρική του φροντίδα.

Εγώ, ο/η υπογράφων/ουσα κατανοώ τις παραπάνω εξηγήσεις και επιθυμώ το παιδί μου,, με ημερομηνία γέννησης/...../....., να συμμετέχει στην εν λόγω μελέτη.

Δηλώνω ότι υπογράφω αυτό το έντυπο πληροφόρησης με ελεύθερη βούληση.

Ημερομηνία:/...../..

Ο κηδεμόνας

Ο ερευνητής

(όνομα και υπογραφή)

(όνομα και υπογραφή)

7.Γ. Φυλλάδιο καταγραφής ιστορικού

Κωδικός		Όνομα		Επώνυμο		Ημερομηνία	
Επάγγελμα Πατέρα		Επάγγελμα Μητέρας		Τόπος Κατοικίας			
				Τόπος Καταγωγής			
Ηλικία Τεκνοποίησης Πατέρα		Ηλικία Τεκνοποίησης Μητέρας		Καπνιστής/καπνίστρια			
Οικογενειακό Ιστορικό				Γενεαλογικό Δένδρο			
Ιστορικό κρυψορχίας							
Ιστορικό Εγκυμοσύνης							
Φυσιολογική κύηση/Εξωσωματική	Διάρκεια κύησης	Αγωγή	Φάρμακα κατά την εγκυμοσύνη	Παθήσεις μητέρας πριν και κατά την διάρκεια της εγκυμοσύνης			
Ιστορικό							
Ηλικία παιδιού		Ημερομηνία Γέννησης		Πρωωρότητα			
Βάρος γέννησης		Μήκος γέννησης		SGA			
Αντικειμενική εξέταση							
1η επέμβαση / 2 ^η επέμβαση		κρυψορχία: αμφοτερόπλευρη / ετερόπλευρη ετερόπλευρη: δεξιά / αριστερά θέση όρχεως: κοιλιακά / στο όσχεο				βαρύτητα: υψηλή/χαμηλή	
Χρονολογική ηλικία ορχεοπηξίας			Συνοδές ανωμαλίες του ουρογεννητικού				
Ορμονολογικός έλεγχος							
LH:				T3:			
FSH:				T4:			
TESTO:				TSH:			
AMH:				DHT:			
Παρατηρήσεις:							