Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Τμήμα Ιατρικής

Π.Μ.Σ Αναπαραγωγική - Αναγεννητική Ιατρική

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Η επίδραση του Οξειδωτικού Στρες στην Ανδρική Υπογονιμότητα

Μονάδα Ιατρικώς Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής «ΒΙΟΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ»

Επιμέλεια: Φτίκα Σταυρούλα

Υπεύθυνη διπλωματικής: Δρ. Σπυροπούλου Ισαβέλλα

Τριμελής επιτροπή: Δρ. Δρακάκης Πέτρος, Δρ. Μαυρογιάννη Δέσποινα, Md Σταύρου Σοφοκλής

ΑΘΗΝΑ 2020

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στη Μονάδα Ιατρικώς Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής «ΒΙΟΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ», στα πλαίσια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών «Αναπαραγωγική - Αναγεννητική Ιατρική». Καθώς φτάνει στο τέλος της, αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω όσους βοήθησαν με κάθε τρόπο προκειμένου να πραγματοποιηθεί.

Καταρχήν, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την υπεύθυνη του εργαστηρίου και κλινική εμβρυολόγο Δρ. Σπυροπούλου Ισαβέλλα για την επίβλεψη της διπλωματικής και για τις χρήσιμες παρατηρήσεις της καθ' όλη τη διάρκεια της παραμονής μου στο εργαστήριο. Επίσης, ευχαριστώ ειλικρινά τον γυναικολόγο και διευθυντή της μονάδας κύριο Μπομπότη Μιχαήλ που μου έδωσε την ευκαιρία να ασχοληθώ στη «ΒΙΟΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ» με ένα τόσο ενδιαφέρον θέμα, συμβάλλοντας έτσι στο να ανακαλύψω τα ενδιαφέροντα μου, αποκομίζοντας πολύτιμες γνώσεις και εμπειρίες. Επιπλέον να ευχαριστήσω τον εμβρυολόγο κ. Νικόλαο Μπίλλια για την πολύτιμη βοήθεια και τη συμβολή του στο να μάθω, όσο το δυνατόν πιο ολοκληρωμένα, τις τεχνικές και την θεωρία, που χρησιμοποιήθηκαν στην εκπόνηση της πτυχιακής μου.

Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Καθηγητή Δρακάκη Πέτρο και την Δρ Μαυρογιάννη Δέσποινα που ήταν πρόθυμοι να με βοηθήσουν σε ό,τι και αν χρειάστηκα κατά την διάρκεια των μεταπτυχιακών σπουδών μου.

Τέλος να ευχαριστήσω όλο το προσωπικό της μονάδας για την βοήθεια που μου έδωσαν ο καθένας με τον τρόπο του και που συνέβαλαν στην δημιουργία ενός κλίματος φιλικού και ευχάριστου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σήμερα υπολογίζεται ότι γύρω στο 15% των ζευγαριών παγκοσμίως αντιμετωπίζουν προβλήματα τεκνοποίησης. Ο ανδρικός σύντροφος φαίνεται να εμπλέκεται στο 50% των περιπτώσεων. Πλήθος παραγόντων είναι ικανό να επηρεάσει την γονιμότητα του άνδρα. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει το γεγονός ότι αρκετές μελέτες συσχετίζουν το αυξημένο οξειδωτικό στρες με την υπογονιμότητα. Ο όρος οξειδωτικό στρες αναφέρεται σε μια κατάσταση, όπου τα επίπεδα των δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) ξεπερνούν σημαντικά την ικανότητα αντιοξειδωτικής άμυνας, με αποτέλεσμα να είναι τοξικές για ένα βιολογικό σύστημα. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, το αυξημένο οξειδωτικό στρες αυξάνει την πιθανότητα καταστροφής του DNA, προκαλεί υπεροξείδωση των λιπιδίων της μεμβράνης των σπερματοζωαρίων και επάγει την κυτταρική απόπτωση. Διάφορες παθολογικές καταστάσεις ή παράγοντες μπορεί να ενοχοποιούνται και η περαιτέρω κατανόηση της εμπλοκής του στην ανδρική υπογονιμότητα είναι αναγκαία για την έγκαιρη διάγνωση, την κατάλληλη αντιμετώπιση και την επίτευξη κύησης. Έτσι, η παρούσα μελέτη διενεργείται με σκοπό τη συσχέτιση του οξειδωτικού στρες στο σπέρμα με τον τρόπο ζωής καθώς και με γενετικές, μικροβιολογικές και ορμονικές παραμέτρους που επηρεάζουν την ανδρική υπογονιμότητα. Κατά την διεξαγωγή της, οι συμμετέχοντες κλήθηκαν να υπογράψουν ενημερωμένη συγκατάθεση συμμετοχής σε μελέτη και να συμπληρώσουν το ιατρικό τους ιστορικό. Στη συνέχεια, υποβλήθηκαν στις παρακάτω εξετάσεις με τη λήψη δείγματος: α) αίματος (Καρυότυπος, Μετάλλαξης ΔF508 Κυστικής Ίνωσης, Μέτρηση Σακχάρου, TSH, FREE T4, FSH, TESTO, προλακτίνης, ομοκυστεΐνης) και β) σπέρματος (Τεστ Οξειδωτικού Στρες, Σπερμοδιάγραμμα, PCR για Chlamydia, Ureaplasma, Mycoplasma και αερόβια/αναερόβια καλλιέργεια). Για την στατιστική επεξεργασία, ο υπό μελέτη πληθυσμός χωρίστηκε σε δύο ομάδες. Οι άνδρες με φυσιολογικό οξειδωτικό στρες αποτελούσαν την πρώτη ομάδα ενώ εκείνοι με αυξημένο την δεύτερη. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, παρατηρήθηκε στατικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα της ομοκυστεΐνης του ορού του αίματος για τις δύο ομάδες. Επιπλέον, βρέθηκε ότι σε άνδρες με υψηλότερα επίπεδα FSH παρατηρούνται υψηλότερα επίπεδα οξειδωτικού στρες. Τέλος, αποδείχτηκε ότι άτομα με μικρότερη συγκέντρωση σπέρματος και χαμηλότερη ζωηρή και συνολική προωθητική κίνηση έχουν αυξημένο οξειδωτικό στρες. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνει ότι το οξειδωτικό στρες συνδέεται με την ανδρική υπογονιμότητα και η συσχέτιση των παραπάνω παραμέτρων θα μπορούσε να διευκολύνει την βέλτιστη διαχείριση της.

ABSTRACT

Nowadays, it is estimated that around 15% of the couples worldwide face difficulties in conceiving a child. The male partner seems to be involved in 50% of the cases. A number of factors are capable of affecting male fertility. Of particular interest is the fact that more and more studies are linking increased oxidative stress to infertility. The term oxidative stress refers to a condition in which levels of reactive oxygen species (ROS) exceed the antioxidant defence capacity, making them toxic to a biological system. In the case of sperm, studies have shown that extended oxidative stress increases the possibility of sperm DNA damage, causes peroxidation of membrane lipids and induces apoptosis. Various pathological conditions or factors may be blamed for increasing oxidative stress in sperm and therefore a further understanding of its involvement in male infertility is essential for the early diagnosis, the appropriate treatment and the achievement of pregnancy. The present study is performed to correlate oxidative stress in sperm with life style, genetic, microbiological and hormonal parameters that affect male infertility. During the procedure, participants have been asked to sign an informed consent to participate in the study and complete their medical history. Then, they have undergone the following diagnostic and non-invasive tests by taking a sample of: a) blood (Karyotype, Cystic Fibrosis Mutation ΔF508, Sugar Measurement, TSH, FREE T4, FSH, TESTO, prolactin, homocysteine) and b) sperm (Oxidative Stress Analysis, Semen Analysis, PCR for Chlamydia, Ureaplasma, Mycoplasma and aerobic/anaerobic culture). For statistical analysis, the study population was divided into two groups. Men with normal oxidative stress were the first group while those with increased oxidative stress were the second one. According to our results, a statistically significant difference has been observed in the serum homocysteine levels between the two groups. In addition, FSH levels have been spotted to appear to be higher in men with oxidative stress. Finally, it has been shown that men with lower sperm concentration and fewer sperm with fast and total progressive motility have increased oxidative stress. This fact confirms that oxidative stress is associated with male infertility. Moreover, the correlation of the above parameters with oxidative stress facilitates its optimal management.

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Κεφάλαιο Ι: Ανδρική Υπογονιμότητα

Ορισμός και Επιδημιολογία

Με τον όρο Υπογονιμότητα, αναφερόμαστε στην αδυναμίας ενός σεξουαλικά ενεργού ζευγαριού, που δεν λαμβάνει μέτρα αντισύλληψης, να επιτεύξει εγκυμοσύνη εντός ενός έτους. Διακρίνεται σε Πρωτογενή και Δευτερογενή Υπογονιμότητα. Ως πρωτογενής ορίζεται η ανικανότητα είτε κύησης είτε γέννησης υγιούς παιδιού. Ως δευτερογενής ορίζεται η περίπτωση που προηγουμένως έχει υπάρξει ικανότητα κύησης και γέννησης υγιούς παιδιού (Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας, ΠΟΥ, 2000).

Υπολογίζεται ότι γύρω στο 15% των ζευγαριών παγκοσμίως είναι υπογόνιμα (Agarwal, et al., 2015). Σήμερα γνωρίζουμε ότι είναι ένα θέμα που αφορά και τα δύο φύλα. Το 30% των περιπτώσεων οφείλεται αποκλειστικά στον ανδρικό παράγοντα ενώ το 20% σε συνδυασμό ανδρικού και γυναικείου παράγοντα. Ως εκ τούτου, η ανδρική υπογονιμότητα φαίνεται να εμπλέκεται τελικά στο 50% των περιπτώσεων (Katz et al., 2017). Τέλος υπολογίζεται ότι περίπου το 7% του ανδρικού πληθυσμού είναι υπογόνιμο (Lotti and Maggi, 2015).

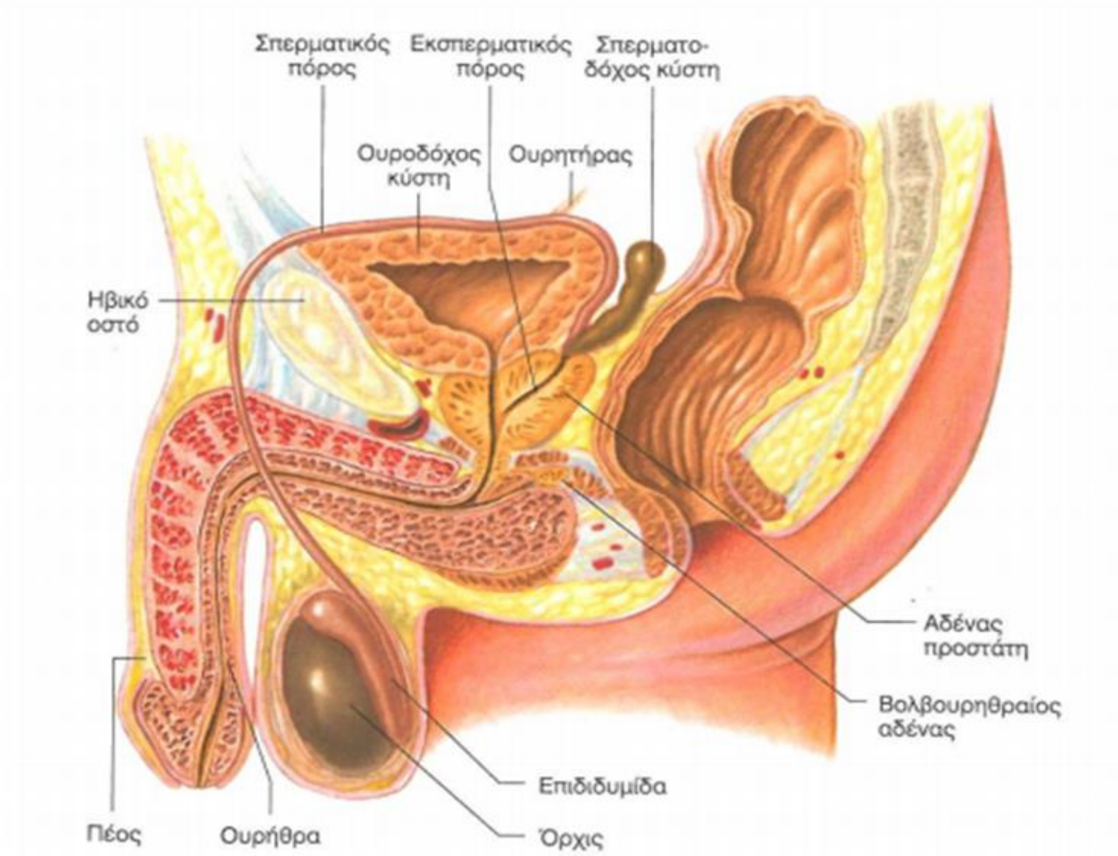
Ανδρικό Αναπαραγωγικό Σύστημα

Το αναπαραγωγικό σύστημα του άντρα περιλαμβάνει :

- το πέος, το οποίο αποτελείται από τα σηραγγώδη σώματα, την ουρήθρα και την βάλανο.
- τους γεννητικούς αδένες, που είναι οι δύο όρχεις. Κάθε όρχις εσωτερικά χωρίζεται σε λοβούς, ο καθένας από τους οποίους περιέχει 1 - 3 περιελιγμένα σπερματικά σωληνάρια. Κατά την εφηβεία, στους όρχεις γίνεται η σπερματογένεση.
- την αποχετευτική ή εκφορητική οδό, η οποία απαρτίζεται από την επιδιδυμίδα, τον σπερματικό πόρο, την σπερματοδόχο λήκυθο, τον εκσπερματικό πόρο και την ουρήθρα. Η επιδιδυμίδα είναι ένας σφικτά περιελιγμένος σωλήνας, μήκους 5 - 6 μέτρων, στο πίσω μέρος κάθε όρχεως. Εκεί ωριμάζουν και αποθηκεύονται τα σπερματοζωάρια κατά την αναπαραγωγική ηλικία του άνδρα. Ενώνεται με το σπερματικό πόρο, ο οποίος στην

συνέχεια ανεβαίνει στην κοιλιακή κοιλότητα. Εκεί καταλήγει στον εκσπερματικό πόρο, ο οποίος εκβάλλει στην ουρήθρα.

- τους παραγεννητικούς αδένες. Αποτελούνται από τον προστάτη, τους ουρηθραίους και τους βολβουρηθραίους αδένες. Ο προστάτης, οι βολβουρηθραίοι αδένες και η σπερματοδόχος κύστη εκκρίνουν ουσίες, οι οποίες μαζί με τα σπερματοζωάρια αποτελούν το σπέρμα.



Εικόνα 1.1 Αναπαραγωγικό Σύστημα Άρρενος. (Vander et al., 2011)

Άξονας Υποθάλαμος – Υπόφυση – Όρχεις

Ο άξονας Υποθάλαμος - Υπόφυση – Γονάδες στο ανδρικό αναπαραγωγικό σύστημα αποτελείται από τον υποθάλαμο, την υπόφυση και τους όρχεις. Ο υποθάλαμος εκκρίνει την εκλυτική ορμόνη των γοναδοτροπινών (GnRH) με παλμικό τρόπο όταν δέχεται ερεθίσματα από το περιβάλλον, το Κεντρικό Νευρικό Σύστημα και τον όρχι. Στην συνέχεια, η GnRH εισέρχεται στον πρόσθιο λοβό της υπόφυση διεγείροντας τον. Ως αποτέλεσμα, η υπόφυση εκκρίνει δύο σημαντικές για την αναπαραγωγή ορμόνες, την ορμόνη διέγερσης των ωοθυλακίων (FSH) και την ωχρινοτρόπο ορμόνη (LH) (Clavijo and Hsiao, 2018). Επιπλέον, εκκρίνονται αδρενοκορτικοτροπίνη, αυξητική ορμόνη, προλακτίνη και ορμόνη διέγερσης του θυρεοειδούς (TSH) (Sussman et al., 2008)

Οι LH και FSH δρουν σε κύτταρα των όρχεων, συμπεριλαμβανομένων των κυττάρων Leydig, Sertoli καθώς και των κυττάρων της γαμετικής σειράς. Τα κύτταρα Leydig είναι κύτταρα που παράγουν τεστοστερόνη στον όρχι, ενώ τα κύτταρα Sertoli παράγουν ινχιμπίνη Β. Και οι δύο ορμόνες ανατροφοδοτούν την πρόσθια υπόφυση και τον υποθάλαμο. Η τεστοστερόνη, που απελευθερώνεται στην περιφερική κυκλοφορία μπορεί να μετατραπεί σε οιστραδιόλη από το ένζυμο αρωματάση, το οποίο μπορεί να έχει επιπτώσεις στη γονιμότητα (Clavijo and Hsiao, 2018).

Η ανάπτυξη των δευτερογενών ανδρικών χαρακτηριστικών αλλά και η ανδρική σεξουαλική συμπεριφορά σχετίζονται άμεσα με τη λειτουργία των όρχεων. Τα στεροειδή και κυρίως η τεστοστερόνη παίζουν καθοριστικό ρόλο στην έκφραση του ανδρικού φαινοτύπου, στην ανάπτυξη και λειτουργία των γεννητικών οργάνων, καθώς επίσης και στη σεξουαλική λειτουργία και την ικανότητα προς γονιμοποίηση. Ταυτόχρονα, η σωστή λειτουργία του άξονα είναι απαραίτητη για τη σπερματογένεση. Ως εκ τούτου, διαταραχές σε οποιοδήποτε σημείο του μπορούν να έχουν αντίκτυπο στην ανδρική γονιμότητα (Clavijo and Hsiao, 2018).

Σπερματογένεση

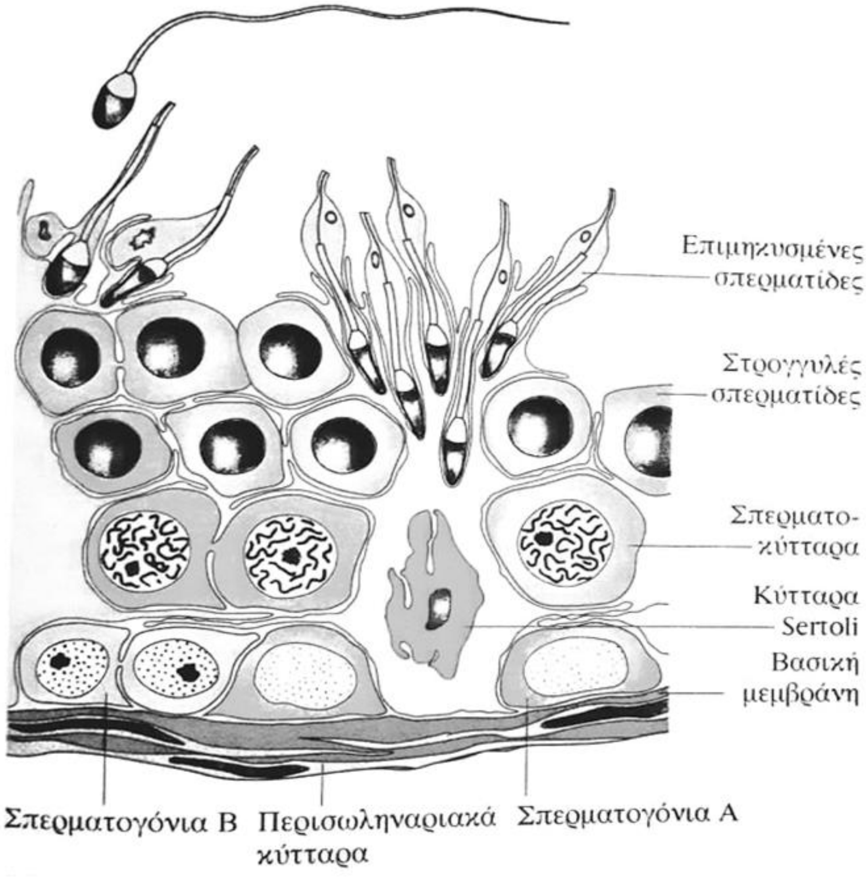
Η Σπερματογένεση είναι μία διαδικασία που ξεκινά κατά την εφηβεία. Είναι συνεχόμενη και επάγεται από την έκκριση γοναδοτροπινών (McLachlan et al., 2002). Αποτελεί τον τρόπο με τον το οποίο τα αρχέγονα γενετικά κύτταρα, που ονομάζονται σπερματογόνια, μετατρέπονται σε αρσενικούς γαμέτες, δηλαδή σπερματοζωάρια (Tenorio et al., 2016).

Κατά την εμβρυογένεση στους άνδρες, πραγματοποιείται μετανάστευση αρχέγονων γενετικών κυττάρων στους όρχεις. Εκεί τα σπερματογόνια διατάσσονται σε δύο ή τρεις στοιβάδες, στην εσωτερική επιφάνεια των σπερματικών σωληναρίων (Slack, 2013). Εκείνη την χρονική στιγμή, τα μόνα άλλα κύτταρα των σωληναρίων είναι τα κύτταρα Sertoli, τα οποία είναι σωματικά κύτταρα. Αυτά στηρίζουν τα αρχέγονα γενετικά κύτταρα και ταυτόχρονα παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο για τα γεγονότα της σπερματογένεσης (Brinster R.L, 2007).

Κατά τη διαδικασία της σπερματογένεσης διαδραματίζονται δύο γεγονότα. Ορισμένα σπερματογόνια ανανεώνονται ενώ άλλα παράγουν διαφοροποιημένα γενετικά κύτταρα. Η ισορροπία μεταξύ της ανανέωσης και της διαφοροποίησης βρίσκεται υπό τον έλεγχο γονιδίων των κυττάρων του ορχικού μικροπεριβάλλοντος (Brinster R.L, 2007) και του άξονα υποθάλαμος - υπόφυση – όρχεις. Αυτός περιλαμβάνει τόσο την FSH όσο και την LH, την τεστοστερόνη και την οιστραδιόλη-17β ως βασικούς ρυθμιστές (O'Donnell et al., 2001; McLachlan et al., 2002; Carreau et al., 2010; Sharpe et al., 1994; O'Donnell et al., 2006). Κομβικό ρόλο διαδραματίζει η μετακίνηση των σπερματογονίων από την βασική μεμβράνη προς τον αυλό των σπερματικών σωληναρίων, με τα πλέον ώριμα κύτταρα να βρίσκονται προς τον αυλό.

Η πρώτη φάση, αυτή δηλαδή του πολλαπλασιασμού των σπερματογονίων, αποτελεί τη διαίρεση τους μέσω της μίτωσης. Σκοπό αυτής αποτελεί η αντικατάσταση τους και η παραγωγή ενός αριθμού κυττάρων που στη συνέχεια θα μετατραπούν σε ώριμα σπερματοζωάρια (Brinster, 2007; Slack, 2013). Τα κύτταρα Sertoli συνδέονται μεταξύ τους και με τα γεννητικά κύτταρα με εκτεταμένες, στενές συνάψεις, οι οποίες εντοπίζονται προς τη βασική στοιβάδα του σπερματικού επιθηλίου. Μαζί με τη βασική μεμβράνη σχηματίζουν τον αιματο-ορχικό φραγμό, ο οποίος εμποδίζει την μετακίνηση ουσιών από το διάμεσο χώρο προς τον αυλό των σωληνάριων (Weber JE, et al., 1983). Τα σπερματογόνια τύπου Α παραμένουν εκτός του αιματο-ορχικού φραγμού και συνεχίζουν να ανανεώνονται μέχρι τον θάνατο, διατηρώντας μία δεξαμενή γαμετών (Clermont, 1972). Επιπλέον, στην διάρκεια της φάσης αυτής, σπερματογόνια μεταναστεύουν μεταξύ των κυττάρων Sertoli προς τον αυλό των σπερματικών σωληναρίων. Κατά την πορεία αυτή υφίστανται δομικές αλλαγές και μετατρέπονται σε σπερματοκύτταρα πρώτης τάξης. Αυτά αποτελούν τα σπερματογόνια τύπου Β, τα οποία είναι ενδιάμεσα διπλοειδή κύτταρα (Clermont, 1972; Slack, 2013).

Στην συνέχεια, τα σπερματοκύτταρα πρώτης τάξης περνούν στην πρόφαση της πρώτης μειωτικής διαίρεσης και μετατρέπονται σε απλοειδή κύτταρα, τα σπερματοκύτταρα δεύτερης τάξης. Ακολουθεί η δεύτερη μειωτική διαίρεση, όπου τα σπερματοκύτταρα δεύτερης τάξης, μέσω του διαχωρισμού των αδελφών χρωματίδων, σχηματίζουν τις στρογγυλές σπερματίδες. Από ένα σπερματοκύτταρο πρώτης τάξης προκύπτουν δύο σπερματοκύτταρα δευτέρας τάξης και τέλος από αυτά τέσσερεις σπερματίδες. Τα παραπάνω γεγονότα αποτελούν τη δεύτερη φάση της σπερματογένεσης (Slack, 2013).



Εικόνα 1.2 Σπερματογένεση (Slack Jonathan, 2013, Βασικές Αρχές Βιολογίας Ανάπτυξης)

Κατά την μετατροπή των απλοειδών σπερματίδων σε σπερματοζωάρια, οι βασικές αλλαγές που συμβαίνουν είναι ο σχηματισμός της κεφαλής, της ουράς καθώς και η απώλεια του κυτταροπλάσματος του σπερματοζωαρίου. Στην φάση Golgi, παρατηρείται σχηματισμός του ακροσωμικού κυστιδίου και συμπίκνωση της χρωματίνης. Ταυτόχρονα, μεμβράνικα παράγωγα του συμπλέγματος Golgi περιβάλλουν το πυρήνα. Ακολουθεί η φάση Cap, όπου το ακροσωμικό κυστίδιο μετακινείται προς τον πυρήνα της στρογγυλής σπερματίδας και σχηματίζεται το πρόδρομο της ουράς. Κατά την ακροσωμιακή φάση, επιτελείται η επιμήκυνση του πυρήνα της σπερματίδας και ο σχηματισμός του ακροσώματος, το οποίο περιέχει ένζυμα απαραίτητα για τη διείσδυση του σπερματοζωαρίου στο ωάριο. Τέλος στην φάση ωρίμανσης, πραγματοποιείται η μετατόπιση των μιτοχονδρίων στο μαστίγιο και η αποβολή του κυτταροπλάσματος. Τα σπερματοζώαρια ολοκληρώνουν την ωρίμανσή τους και αποθηκεύονται στην επιδιδυμίδα (O'Donnell et al., 2011).

Η διαδικασία παραγωγής σπέρματος μπορεί να διαρκέσει από 42 έως 76 μέρες και η ημερήσια παραγωγή σπέρματος ποικίλλει από 150 μέχρι και 275 εκατομμύρια σπερματοζωάρια (Tenorio et al., 2016).

Αιτιολογία Ανδρικής Υπογονιμότητας

Από διάφορες μελέτες που έχουν γίνει στο παρελθόν φαίνεται ότι υπάρχει μία σειρά παραγόντων που επηρεάζουν τη γονιμότητα σε ένα ζευγάρι. Τα αίτια της ανδρικής υπογονιμότητας ταξινομούνται σε τρεις κύριες κατηγορίες. Αρχικά, τα προ-ορχικά αίτια περιλαμβάνουν διαταραχές του άξονα υποθάλαμος – υπόφυση και ορισμένων περιφερικών οργάνων. Στη δεύτερη κατηγορία βρίσκονται τα ορχικά αίτια, που απευθύνονται στις διαταραχές της λειτουργίας των όρχεων. Τέλος, έχουμε τα μετα-ορχικά αίτια, δηλαδή τις ανωμαλίες της εκφορητικής οδού καθώς και τις διαταραχές της κινητικότητας και της ποσότητας των σπερματοζωαρίων (Dimitriadis et al.,2017.; Μέλεκος, 2005).

Α. Προ-ορχικά αίτια

Διαταραχές της υποθαλαμικής λειτουργίας

Ο υπογοναδοτροπικός υπογοναδισμός αποτελεί πάθηση που συνδέεται άμεσα με την υπογονιμότητα (Dimitriadis et al., 2017). Χαρακτηρίζεται από ανεπαρκή έκκριση των γοναδοτροπινών. Η πιο συχνή μορφή υποθαλαμικής βλάβης είναι το Σύνδρομο Kallmann. Το γενετικό αυτό σύνδρομο χαρακτηρίζεται από μεμονωμένη λειτουργική ανεπάρκεια στην υποθαλαμική παραγωγή ή έκκριση της GnRH (ιδιοπαθής υπογοναδοτροφικός υπογοναδισμός). Οι ασθενείς παρουσιάζουν χαρακτηριστική ανοσμία, καθυστερημένη εμφάνιση της ήβης, μικρούς και μαλακούς όρχεις και αζωοσπερμία. Επιπλέον παρατηρούνται λαγώχειλο, λυκόστομα και άλλες συνοδές ανωμαλίες (Dodé et Hardelin, 2010). Ο συγγενής υπογοναδοτροπικός υπογοναδισμός είναι μια πολύ σπάνια γενετική διαταραχή. Προκύπτει από την ανεπαρκή έκκριση ή δράση του GnRH και προκαλεί απουσία εφηβείας και στειρότητα (Krausz, 2011). Είναι ετερογενής και η κλινική εικόνα σχετίζεται με το βαθμό ανεπάρκειας GnRH.

Στα προ-ορχικά αίτια υπογονιμότητα επίσης εντάσσεται το Σύνδρομο του γόνιμου ευνούχου. Πρόκειται για σπάνιο σύνδρομο στο οποίο παρατηρείται διαταραχή της έκκρισης της LH και φυσιολογική παράγωγη FSH. Προκαλείται από δυσλειτουργία της υπόφυσης αλλά και του υποθαλάμου. Χαρακτηριστικό αποτελούν τα ευνουχοειδή γνωρίσματα και το μεγάλο μέγεθος των όρχεων. Είναι δυνατή η παραγωγή σπερματοζωαρίων αλλά όχι η ολοκληρωμένη ανάπτυξη των δευτερογενών χαρακτηριστικών του φύλου λόγω χαμηλών επίπεδων τεστοστερόνης (Cadman et al., 2007).

Υπογονιμότητα αντιμετωπίζουν και οι ασθενείς με μεμονωμένη ανεπάρκεια της FSH. Στο σύνδρομο αυτό, ο αρσενικός φαινότυπος είναι φυσιολογικός. Τα επίπεδα των ορμονών LH και τεστοστερόνης είναι επίσης φυσιολογικά. Ωστόσο, παρατηρείται αζωοσπερμία ή ολιγοσπερμία.

Τέλος, σε διάφορα συγγενή σύνδρομα ο υπογοναδισμός θεωρείται υποθαλαμικής αιτιολογίας. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν τα σύνδρομα Prader -Willi και Laurence – Moon – Bardet – Biedl. O (Feinberg et al., 2007).

Διαταραχές της υποφυσιακής λειτουργίας

Αίτιο υπογονιμότητας θεωρείται η υποφυσιακή ανεπάρκεια. Προκαλεί μείωση των γοναδοτροπινών που μπορεί να οφείλεται σε όγκους, εγκεφαλικά επεισόδια, χειρουργικές επεμβάσεις, ακτινοβολία ή κοκκιωματώδεις αλλοιώσεις. Εκδηλώνεται με υπογοναδισμό, ο οποίος, όταν εμφανίζεται πριν την εφηβεία, συνοδεύεται από υποθυρεοειδισμό και επινεφριδιακή ανεπάρκεια. Στην ενήλικη ζωή, τα συμπτώματα μπορεί να είναι μειωμένη libido, ανικανότητα και υπογονιμότητα, ακολουθούμενα από διαταραχές στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα και δευτεροπαθή υπογοναδισμό (Dimitriadis et al.,2017).

Επιπλέον, στην κατηγορία των διαταραχών υποφυσιακής λειτουργίας ανήκει η υπερπρολακτιναιμία. Αυξημένα επίπεδα προλακτίνης προκαλούν μείωση των γοναδοτροπινών και της τεστοστερόνης. Μπορεί να οφείλεται σε όγκους της υπόφυσης (προλακτινώματα), στο άγχος, σε ορισμένα φάρμακα ή να είναι ιδιοπαθής. Στους ασθενείς με προλακτίνωμα, η μεγάλη αύξηση συνοδεύεται από μειωμένη libido, στυτική δυσλειτουργία, γαλακτόρροια, γυναικομαστία και διαταραχές της σπερματογένεσης(Besser, 1983.; Dimitriadis et al., 2017).

Λοιπές ορμονικές διαταραχές

Ορμονικές δυσλειτουργίες είναι ικανές να έχουν αντίκτυπο στην γονιμότητα του άνδρα. Η αύξηση της παραγωγή ενδογενών οιστρογόνων συνεπάγεται την καταστολή της υποφυσιακής έκκρισης των γοναδοτροπινών. Αίτια της υπεροιστρογοναιμία μπορεί να είναι όγκοι των επινεφριδίων και των όρχεων, ηπατική δυσλειτουργία καθώς και η παχυσαρκία (Carani C et al., 1999).

Επίσης, η υπερανδρογοναιμία έχει συνδεθεί με υπογονιμότητα. Υψηλά επίπεδα εξωγενών ή ενδογενών ανδρογόνων μπορούν να προκληθούν από όγκους που εκκρίνουν ανδρογόνα καθώς και από τη λήψη στεροειδών αναβολικών (Leme de Souza and Hallak., 2011).

Μελέτες αναφέρουν την εμπλοκή υψηλών επιπέδων γλυκοκορτικοειδών στην αδυναμία επίτευξης εγκυμοσύνης. Η αύξηση των γλυκοκορτικοειδών οδηγεί σε μείωση της σπερματογένεσης, λόγω καταστολής της έκκρισης της LH από τα υψηλά επίπεδα κορτιζόνης του πλάσματος. (Winters, et al., 1999).

Στην ίδια κατηγορία περιλαμβάνονται ο υπερθυρεοειδισμός και ο υποθυρεοειδισμός. Διαταραχές του θυρεοειδούς αδένα μπορούν να επηρεάσουν τη σπερματογένεση και την ποιότητα του σπέρματος. Ιδίως ο υπερθυρεοειδισμός επηρεάζει τόσο την υποφυσιακή όσο και την ορχική λειτουργία λόγω της καταστολής της έκκρισης γοναδοτροπινών, της αυξημένης μετατροπής των ανδρογόνων σε οιστρογόνα, της αυξημένης θερμοκρασίας σώματος ή του αυξημένου στρες (La Vignera and Vita,. 2018)

Διαταραχές περιφερικών οργάνων – Συστημικές παθήσεις

Η χρόνια νεφρική ανεπάρκεια επηρεάζει τον άξονα υποθάλαμος – υπόφυση - γονάδες, τόσο κεντρικά όσο και περιφερειακά, άρα και την γονιμότητα. Συνοδεύεται από ελάττωση των επιπέδων της τεστοστερόνης και παράλληλη αύξηση των LH, FSH. Παρατηρείται στυτική δυσλειτουργία, απώλεια της libido, γυναικομαστία και διαταραχές της σπερματογένεσης (Turek 2008). Ταυτόχρονα, σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να προκληθεί και ατροφία των όρχεων.

Οι ηπατικές ασθένειες, ιδιαίτερα η κίρρωση του ήπατος, προκαλούν αναπαραγωγική δυσλειτουργία. Η ηπατική ανεπάρκεια σχετίζεται με απώλεια libido, σεξουαλική δυσλειτουργία, μειωμένη γονιμότητα. Επίσης, επιδρά στα δευτερογενή σεξουαλικά χαρακτηριστικά, προκαλώντας γυναικομαστία καθώς και ατροφία των όρχεων. Το κύριο αίτιο της παθογένειας φαίνεται να είναι η αυξημένη περιφερική μετατροπή των ανδρογόνων σε οιστρογόνα (Dimitriadis et al.,2017).

Επιπρόσθετα, βιβλιογραφία συνδέει τον διαβήτη, το μεταβολικό Σύνδρομο, την παχυσαρκία καθώς και τις αιματοπάθειες με την υπογονιμότητα. Μελέτες έχουν δείξει ότι οι τρεις πρώτες παθήσεις μπορούν να επηρεάζουν την παραγωγή τεστοστερόνης (Ding et al. 2006). Τα άτομα με παχυσαρκία χαρακτηρίζονται από υπολειτουργία του άξονα επηρεάζοντας αρνητικά την σπερματογένεση. Επιπλέον, σε ορισμένους ασθενείς με δρεπανοκυτταρική αναιμία ή β-θαλασσαιμία παρατηρείται υπογοναδισμός (Dimitriadis et al.,2017).

Λοιμώξεις του ουρογεννητικού συστήματος του άνδρα έχουν επίσης ενοχοποιηθεί. Τα παθογόνα βακτήρια στο σπερματικό πλάσμα μπορούν να μειώσουν την κινητικότητα του σπέρματος, προκαλώντας απόπτωση ή νέκρωση. Επιπλέον είναι ικανά για αλλοίωση της μορφολογίας του σπέρματος ελαττώνοντας την ποιότητα του (Dimitriadis et al.,2017). Έρευνες υποστηρίζουν ότι λοιμώξεις από βακτήρια, όπως Chlamydia trachomatis, Ureaplasma και Mycoplasma, μπορούν να επηρεάσουν την γονιμότητα. (Rybar et al., 2011).

Τέλος, τα παρατεταμένα εμπύρετα νοσήματα μπορούν να επηρεάσουν την ικανότητα γονιμοποίησης του σπέρματος. Λόγω της αύξησης της θερμοκρασίας των όρχεων, είναι πιθανό να μειωθούν προσωρινά ο αριθμός και η κινητικότητα των σπερματοζωαρίων (Carlsen et al. 2003).

Β. Ορχικά αίτια

Χρωμοσωμικές και γονιδιακές ανωμαλίες

Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, διάφορα σύνδρομα χρωμοσωμικών και γονιδιακών ανωμαλιών συνδέονται με την υπογονιμότητα. Ταυτόχρονα, έχει αναφερθεί ότι ορισμένες αλλαγές ή μεταλλάξεις σε χρωμοσώματα μπορεί να προκαλέσουν ανώμαλη παραγωγή σπέρματος ή απόφραξη στη ροή του σπέρματος.

Το Σύνδρομο Kleinefelter αποτελεί χρωμοσωμική ανωμαλία με καρυότυπο 47XXY. Η συχνότητα του αγγίζει τη 1 στις 600 - 1000 γεννήσεις αρρένων. Χαρακτηριστικά του συνδρόμου είναι η γυναικομαστία, το αυξημένο ύψος, η διανοητική καθυστέρηση (σε μερικούς ασθενείς), η καθυστέρηση στη συμπλήρωση της εφηβείας, οι μικροί όρχεις, η σκλήρυνση των σπερματικών σωληναρίων και η αζωοσπερμία. Παρουσιάζει ετερογένεια ενώ υπάρχουν και άτομα, σε πολύ μικρό ποσοστό, που έχουν σπέρμα κατά την εκσπερμάτιση (Ferlin et al., 2007; Dimitriadis et al., 2017).

Σε αυτή την κατηγορία ανήκει επίσης το Σύνδρομο του Υπεράρρενος. Τα άτομα με αυτό το σύνδρομο εμφανίζουν XYY καρυότυπο με συχνότητα 1 στους 1000 άνδρες. Χαρακτηρίζεται από υψηλό ανάστημα, ολιγοσπερμία ή αζωοσπερμία ή διακοπή της σπερματογένεσης Σε ορισμένες περιπτώσεις παρατηρείται στη βιοψία όρχεως ακόμη και πλήρη απλασία των σπερματικών σωληναρίων. (Sillo-Seidl, 1971).

Επιπλέον, υπογόνιμα θεωρούνται και τα άτομα που πάσχουν από Σύνδρομο αναστροφής του φύλου. Οι ασθενείς αυτοί μπορεί να χαρακτηριστούν ως παραλλαγές του συνδρόμου Klinefelter ενώ έχουν φυσιολογικό αριθμό χρωμοσωμάτων (46XX). Η συχνότητα εμφάνισης υπολογίζεται σε 1 ανά 25000 άνδρες. Η ανατομία των γεννητικών οργάνων είναι σαν του κανονικού άνδρα, αλλά οι όρχεις μπορεί να παρουσιάζουν τις ίδιες ιστολογικές ανωμαλίες με τα άτομα του συνδρόμου Klinefelter (Dimitriadis et al., 2017).

Το σύνδρομο Noonan επίσης ανήκει στην κατηγορία αυτή. Εμφανίζεται και σε αρσενικά και σε θηλυκά άτομα με φυσιολογικό καρυότυπο (46XY και 46XX). Μεταλλάξεις σε αρκετά γονίδια έχουν συσχετιστεί με τον φαινότυπο Noonan. Με την καθυστερημένη ανάπτυξη συνυπάρχουν καρδιακές ανωμαλίες, κρυψορχία, αζωοσπερμία και υπεργοναδοτροπικός υπογοναδισμός (Mendez and Opitz, 1985.; Dimitriadis et al. 2017).

Μικροελλείψεις χρωμοσώματος Υ ενοχοποιούνται για υπογονιμότητα. Ο μακρύς βραχίονας του χρωμοσώματος Υ περιέχει τρεις μερικώς επικαλυπτόμενες, αλλά διακριτές περιοχές, που ρυθμίζουν τη σπερματογένεση (Vogt et al., 1996). Η απώλεια μιας από αυτές τις περιοχές, που αναφέρεται ως AZF, μπορεί να οδηγήσει σε υπογονιμότητα. Άντρες με μικροελλείψεις χρωμοσώματος Υ, γενικά δεν έχουν εμφανή συμπτώματα αλλά παρουσιάζουν σοβαρή διαταραχή της σπερματογένεσης (Dimitriadis et al., 2017).

Τέλος, το Σύνδρομο των κυττάρων Sertoli αποτελεί μια διαταραχή που χαρακτηρίζεται από υπογονιμότητα. Είναι επίσης γνωστή ως απλασία γεννητικών κυττάρων. Περιγράφει μια κατάσταση των όρχεων, στην οποία υπάρχουν μόνο τα κύτταρα Sertoli στα σπερματικά σωληνάρια και μειωμένος αριθμός ή καθόλου γεννητικά κύτταρα. Οι ασθενείς με το σύνδρομο έχουν κανονικά δευτερεύοντα αρσενικά χαρακτηριστικά και κανονικούς ή μικρού μεγέθους όρχεις. (Del Castillo et al. 1947).

Κιρσοκήλη

Πρόκειται για τη παθολογική ελικοειδή – κιρσοειδή διάταξη των φλεβών του όρχεως που οφείλεται σε παλινδρόμηση του αίματος στην έσω σπερματική φλέβα. Θεωρείται υπεύθυνη για το 35% των υπογόνιμων ανδρών (Gorelick JI, et al., 1993). Στις περισσότερες περιπτώσεις, εντοπίζεται μόνο στον αριστερό όρχι, αλλά μπορεί να είναι και αμφοτερόπλευρη. Αύξηση της θερμοκρασίας των όρχεων, υπολειτουργία του άξονα υποθαλάμος – υπόφυση - όρχεις, ανώμαλη ροή μεταβολιτών των επινεφριδίων ή των νεφρών στην σπερματική φλέβα, υποξία των όρχεων και συσσώρευση καδμίου στο φλεβικό αίμα των όρχεων είναι θεωρίες που έχουν προταθεί για να εξηγήσουν την καταστροφική επίδραση της κιρσοκήλης. Μπορεί να μειώσει τον συνολικό αριθμό και την κινητικότητά των σπερματοζωαρίων. Επιπλέον, επηρεάζει αρνητικά τη μορφολογία τους και αυξάνει το ποσοστό βλαβών στο DNA του σπερματοζωαρίου (Chehval and Purcell, 1992; Dimitriadis et al., 2017).

Κρυψορχία

Η κρυψορχία είναι η συνηθέστερη συγγενής ανωμαλία των αρσενικών γεννητικών οργάνων με συχνότητα σχεδόν 1% μέχρι το τέλος της βρεφικής ηλικίας. Πρόκειται για μια παθολογική κατάσταση κατά την οποία ο ένας ή και οι δύο όρχεις δεν έχουν κατεβεί από την κοιλιά του εμβρύου στη φυσιολογική τους θέση, το όσχεο. Η κανονική κάθοδος των όρχεων αποτελεί μια σύνθετη διαδικασία που εξαρτάται από πολλά ανατομικά στοιχεία, γονίδια, ορμονικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες. Η ακριβής αιτιολογία της κρυψορχίας παραμένει άγνωστη (Hutson JM et al., 2010). Η κρυψορχία έχει ταυτιστεί με μειωμένη γονιμότητα και αυξημένο κίνδυνο για εμφάνιση καρκίνου των όρχεων. (UK_Testicular_Cancer_Study_Group 1994a, b; Dimitriadis et al., 2017).

Γοναδοτοξίνες

Στην κατηγορία αυτή ανήκουν διάφορα φάρμακα (Turek 2008), η έκθεση σε ακτινοβολία (Beretta 2015), σε εντομοκτόνα και βαρέα μέταλλα όπως ο μόλυβδος και ο υδράργυρος. Η υπερθερμία του οσχέου επηρεάζει την ποιότητα του σπέρματος. Ως εκ τούτου, το επάγγελμα μπορεί συνδέεται με την υπογονιμότητα. Επιπλέον, η χημειοθεραπεία (Turek 2008), το κάπνισμα (Vine 1996) και η αυξημένη κατανάλωση αλκοόλ έχουν ενοχοποιηθεί για διαταραχές στην σπερματογένεση (Hakim et al., 1998.; Hassa et al., 2006). Σημαντικό ρόλο στα παραπάνω γεγονότα παίζει το χρονικό διάστημα έκθεσης στον εκάστοτε παράγοντα.

Ορχίτιδα - Παρωτίτιδα

Η επιδιδυμο-ορχίτιδα προκαλείται συνήθως από βακτηριακές λοιμώξεις του ιστού του όρχεως (Turek, 2008). Η ορχίτιδα είναι μια συνηθισμένη επιπλοκή της μολυσματικής παρωτίτιδας και επηρεάζει περίπου το 20-30% των περιπτώσεων των ανδρών που νοσούν μετά την εφηβεία. Ο μηχανισμός που το παθογόνο οδηγεί σε ελάττωση της γονιμότητας δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως. Πιθανότατα η φλεγμονή των όρχεων και το επακόλουθο οίδημα να αυξάνουν την ενδοστεφανειακή πίεση που οδηγεί σε ατροφία των όρχεων (Bartak, 1973).

Αντισπερματικά Αντισώματα

Πρόκειται για αντισώματα που παράγει ο ίδιος ο οργανισμός ενάντια στα δικά του σπερματοζωάρια. Αναπτύσσονται σε καταστάσεις φλεγμονών, τραυματισμό των όρχεων, ή χειρουργικές επεμβάσεις. Τα αντισώματα αυτά προκαλούν την συγκόλληση των σπερματοζωαρίων μεταξύ τους, παρεμποδίζοντας την κινητικότητά τους επομένως και την γονιμοποίηση (Chiu and Chamley, 2004).

Μυοτονική δυστροφία

Η μυοτονική δυστροφία είναι μια αυτοσωμική επικρατής διαταραχή. Έχει βρεθεί ότι επηρεάζει πολλαπλά συστήματα. Η συχνότητα εμφάνισης της νόσους είναι περίπου 1 στις 8000. (Dalton et al.; 2006 [updated 2013]). Η προοδευτική ατροφία των όρχεων συμβαίνει περίπου στο 80% των ασθενών . Οι ιστολογικές ανωμαλίες περιλαμβάνουν πλήρη υαλίνωση, ατροφία, ίνωση των σπερματικών σωληναρίων και μειωμένο αριθμό σπερματοζωαρίων (Sarkar et al. 2004).

Καρκίνος όρχεως

Τα νεοπλάσματα γενικά μπορούν να έχουν σοβαρές αρνητικές επιπτώσεις στη σπερματογένεση (Costabile and Spevak 1998). Συγκεκριμένες κακοήθειες έχουν γοναδοτοξικές επιδράσεις ακόμη και πριν από τη χορήγηση της θεραπείας. Αυτό είναι δυνατό λόγω ενδοκρινοπάθειας, γενετικών ανωμαλιών των γεννητικών κυττάρων και παραγωγής κυτοκίνης που επηρεάζουν με επιβλαβή τρόπο τα σπερματικά σωληνάρια και τον ενδιάμεσο ορχικό ιστό (Rueffer et al. 2001).

Ιδιοπαθής Υπογονιμότητα

Ιδιοπαθής ονομάζεται η υπογονιμότητα χωρίς παρατηρήσιμα αιτία. Χαρακτηρίζεται από ολιγοσπερμία ή ασθενοσπερμία ή τερατοσπερμία. Η συχνότητας εμφάνισης της αγγίζει το 30% των περιπτώσεων ανδρών με υπογονιμότητα (Nieschlag 1997).

Γ. Μετα-ορχικά αίτια

Απόφραξη σπερματικού πόρου

Μπορεί να είναι συγγενής ή επίκτητη. Η συγγενής είναι σπάνια. Μπορεί να οφείλεται σε απουσία ή ατρησία των σπερματικών πόρων. Ταυτόχρονα μπορεί να συνοδεύεται από απουσία των σπερματοδόχων ληκύθων και κύστεων, καθώς και τμήματος της επιδιδυμίδας. Επιπλέον, πιθανή είναι η απουσία επικοινωνίας των σωληναρίων του όρχεως με την κεφαλή της επιδιδυμίδας και πλήρη ατρησία της επιδιδυμίδας. Η επίκτητη είναι πιο συχνή και μπορεί να οφείλεται φλεγμονές και ιατρικές επεμβάσεις (Jungwirth, et al., 2012).

Διαταραχές εκσπερμάτισης

Η παλίνδρομη εκσπερμάτιση αποτελεί πάθηση κατά την οποία το σπέρμα προωθείται προς την ουροδόχο κύστη και όχι προς το έξω στόμιο της ουρήθρας. Η διαταραχή αυτή μπορεί να παρατηρηθεί εξαιτίας σκλήρωσης, διαβήτη, εκτομής οπισθοπεριτονϊακών λεμφαδένων ή ακόμα και λήψης συμπαθητικολυτικών φαρμάκων.

Σεξουαλικές δυσλειτουργίες

Σε αυτές περιλαμβάνονται η στυτική δυσλειτουργία, η πρόωρη ή καθυστερημένη εκσπερμάτιση, η φίμωση, η συγγενή κάμψη του πέους, η υποσπαδία και η μειωμένη ερωτική επιθυμία (Wibowo et al. 2016).

Διάγνωση Ανδρικής Υπογονιμότητας

Η διερεύνηση του ζευγαριού είναι αναγκαία όταν το ζευγάρι δεν επιτυγχάνει εγκυμοσύνη μετά από 12 μήνες ελεύθερων σεξουαλικών επαφών. Η περίοδος αυτή μειώνεται σε έξι μήνες, εάν η γυναίκα είναι ηλικίας 35 ετών και άνω. Η αξιολόγηση μπορεί επίσης να ενεργοποιηθεί νωρίτερα, εάν υπάρχει υποψία σχετικά με τη γονιμότητα του ανδρικού συντρόφου λόγω προηγούμενου ιστορικού ή συννοσηρότητα. Στη διαγνωστική προσέγγιση του υπογόνιμου άνδρα περιλαμβάνεται το λεπτομερές ιατρικό ιστορικό, η κλινική εξέταση, η ανάλυση σπέρματος καθώς και ο ενδοκρινολογικός έλεγχος (Katz et al., 2017).

Το πρώτο βήμα που πρέπει να γίνει κατά τον έλεγχο αποτελεί η ορθή λήψη του ιστορικού. Σε αυτό συλλέγονται πληροφορίες σχετικά με το ιατρικό, χειρουργικό και οικογενειακό ιστορικό, τον τρόπος ζωής καθώς και την πιθανή έκθεση σε παράγοντες που επηρεάζουν την γονιμότητα στον άνδρα. Επίσης, συγκεντρώνονται στοιχεία για τη σεξουαλική ζωή του ατόμου και του ζευγαριού.

Εξίσου σημαντική για την διερεύνηση της υπογονιμότητας είναι η κλινική εξέταση. Αφορά τον έλεγχο του μεγέθους και της σύστασης όρχεων και επιδιδυμίδας καθώς και της ανατομίας του πέους. Επιπλέον, εξετάζονται τα δευτερογενή χαρακτηριστικά του φύλου για πιθανές ανωμαλίες.

Ο ενδοκρινολογικός έλεγχος αποτελείται από την μέτρηση κυρίως της ωοθυλακιοτρόπου ορμόνης (FSH) και της τεστοστερόνης. Ταυτόχρονα συστήνεται η μέτρηση ωχρινοτρόπου ορμόνης (LH), της προλακτίνης και της ελεύθερης τεστοστερόνης. Τα μη φυσιολογικά επίπεδα των ορμονών αυτών μπορεί να οφείλονται σε παθολογία που σχετίζεται με την υπογονιμότητα (Clavijo and Hsiao, 2018).

Η βασικότερη από τις εξετάσεις για την διάγνωση της υπογονιμότητα είναι η ανάλυση σπέρματος. Μέσω του σπερμοδιαγράμματος γίνεται αξιολόγηση του όγκου, του pH, του ιξώδους, της συγκέντρωση, της κινητικότητας, της μορφολογίας του σπέρματος καθώς και του ολικού αριθμού σπερματοζωαρίων και λευκοκυττάρων. Η μέτρηση των παραπάνω παραγόντων είναι απαραίτητη για την εκτίμηση της ποιότητας του σπέρματος και πραγματοποιείται με βάση τα κριτήρια που έχει ορίσει ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO, 2010).

Παράμετροι	Κατώτερα φυσιολογικά όρια
Όγκος σπέρματος (ml)	1,5 (1,4-1,7)
Συνολικός αριθμός σπερματοζωαρίων (10^6 / εκσπερμάτιση)	39 (33-46)
Συγκέντρωση σπερματοζωαρίων (10^6/ ml)	15 (12-15)
Συνολική Κινητικότητα (Προωθητική & Μη προωθητική κίνηση, %)	40 (38-42)
Προωθητική κινητικότητα (%)	32 (31-34)
Ζωτικότητα (ζωντανά σπερματοζωάρια, %)	58 (55-63)
Μορφολογία σπερματοζωαρίων (φυσιολογικές μορφές, %)	4 (3,0-4,0)
pH	≥7,2
Λευκοκύτταρα (10^6/ ml)	<1,0

Πίνακας 1.1 Κριτήρια φυσιολογικού σπέρματος σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO, 2010).

Επιπλέον εξετάσεις μπορεί να γίνουν όταν κριθεί απαραίτητο από τους ειδικούς. Μερικές από αυτές μπορεί να είναι ο απεικονιστικός έλεγχος, η βιοψία των όρχεων, τεστ για αντισπερματικά αντισώματα, τεστ οξειδωτικού στρες και τεστ κατάτμησης του DNA των σπερματοζωαρίων. Σε ορισμένες περιπτώσεις προτείνεται χρωμοσωμικός έλεγχος, γενετική ανάλυση για μικροελλείψεις του Y χρωμοσώματος και μεταλλάξεις γονιδίων που σχετίζονται με κυστική ίνωση.

Θεραπεία Ανδρικής Υπογονιμότητας

Η αντιμετώπιση της ανδρικής υπογονιμότητας κατευθύνεται από το αίτιο αυτής. Η θεραπευτική προσέγγιση ποικίλει ανάλογα με την περίπτωση. Σε πρώτο στάδιο, όταν η υπογονιμότητα συνδέεται με τον τρόπος ζωής, συστήνεται η αλλαγή των κακών συνηθειών. Τέτοια παραδείγματα μπορούν να είναι το υπερβολικό κάπνισμα, η κατάχρηση αλκοόλ, η χρήση στεροειδών αναβολικών, κ.α. Η διακοπή συγκεκριμένων φαρμάκων καθώς και της έκθεσης σε ορισμένους παράγοντες, όπως αυξημένη θερμοκρασία και τοξικές ουσίες, πιθανώς να έχουν θετικά αποτελέσματα στην σπερματογένεση (Dohle et al., 2005).

Καμιά μελέτη μέχρι στιγμής δεν επιβεβαίωσε ότι ορμονικές θεραπείες, όπως ανθρώπινη εμμηνοπαυσιακή γοναδοτροπίνη (HMG) ή χοριακή γοναδοτροπίνη (HCG), ανδρογόνα, αντιοιστρογόνα, αναστολείς προλακτίνης και στεροειδή, βελτίωσαν τα ποσοστά εγκυμοσύνης σε περιπτώσεις με ιδιοπαθή ανδρική υπογονιμότητα. Ωστόσο, κάποιες ορμονικές διαταραχές μπορούν να θεραπευτούν φαρμακευτικά (Liu and Handelsman, 2003). Ο υπογοναδοτροφικός υπογοναδισμός, τα χαμηλά επίπεδα τεστοστερόνης και η υπερπρολακτιναιμία είναι ορισμένες από τις περιπτώσεις αυτές. Επίσης, σε ασθενείς με αντισπερματικά αντισώματα, οι υψηλές δόσεις κορτικοστεροειδών είναι αποτελεσματικές αλλά με σοβαρές παρενέργειες (Dohle et al., 2005.; Katz et al., 2017).

Η θεραπευτική αντιμετώπιση της ανδρικής υπογονιμότητας μπορεί να είναι και χειρουργική. Μια σειρά από χειρουργικές και ακτινολογικές τεχνικές μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη θεραπεία της κιρσοκήλης (Dohle et al., 2005). Ενδείκνυται σε ασθενείς με κλινικά ανιχνεύσιμη κιρσοκήλη και μη φυσιολογική ανάλυση σπέρματος καθώς βελτιώνει τα ποσοστά εγκυμοσύνης (Kroese et al., 2012). Ασθενείς με υποκλινική κιρσοκήλη δεν φαίνεται να επωφελούνται από την επέμβαση. Επιπλέον, μικροχειρουργική-επιδιδυμοσπερματική αναστόμωση και αναστόμωση σπερματικού πόρου μπορούν να εφαρμοστούν για περιστατικά απόφραξης της εκφορητικής οδού του σπέρματος. Η μικροχειρουργική αναρρόφηση σπέρματος από την επιδιδυμίδα(MESA), σε συνδυασμό με μικρογονιμοποίηση, ενδείκνυται σε άνδρες με αποφρακτική αζωοσπερμία. Επίσης, χρησιμοποιείται η διαδερμική αναρρόφηση σπέρματος από την κεφαλή της επιδιδυμίδας (PESA). Για περιπτώσεις ανδρών με μη αποφρακτική αζωοσπερμία εφαρμόζεται βιοψία των όρχεων (TESE). Κατά τη διαδικασία αυτή, είναι δυνατή η λήψη σπερματοζωαρίων από τα σπερματικά σωληνάρια. Σε ασθενείς με μη αποφρακτική αζωοσπερμία, μπορεί να βρεθεί σπέρμα με τη χρήση TESE σε ποσοστό 40-50% (Dabaja et al., 2013). Τέλος, θεραπεία με διουρηθρική εκτομή της κύστης ή του εκσπερματιστικού πόρου μπορεί να έχει θετικά αποτελέσματα για περιστατικά με περιφερικές αποφράξεις του γεννητικού συστήματος. Αυτές συχνά προκαλούνται από φλεγμονές της προστατικής ουρήθρας και των αδένων της ή από την παρουσία κύστης στη μεσότητα του προστάτη (Schroeder-Printzen et al., 2000).

Για τις διαταραχές εκσπερμάτισης ακολουθούνται ορισμένες τεχνικές, σε συνδυασμό με μεθόδους υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, για την αντιμετώπιση της υπογονιμότητας. Για άνδρες με παλίνδρομη εκσπερμάτιση λαμβάνονται τα ούρα αμέσως μετά την εκσπερμάτιση και στην συνέχεια αλκαλοποιούνται. Η απουσία εκσπερμάτισης μπορεί να θεραπευθεί με τεχνικές ηλεκτροερεθισμού ή ηλεκτροδόνησης. Σε άλλους ασθενείς μπορεί να χρησιμοποιηθεί ηλεκτροδιέγερση μέσω ορθικού ηλεκτροδίου για την ανάκτηση σπέρματος (Katz et al., 2017).

https://www.sciencealert.com/new-smartphone-microscope-lets-men-check-the-health-of-their-own-sperm

Κεφάλαιο ΙΙ: Οξειδωτικό Στρες

Ορισμός

Τα αερόβια είδη ανέπτυξαν την ικανότητα χρήσης του οξυγόνου προκειμένου να επιτελέσουν τις βιολογικές τους διεργασίες. Ωστόσο, η διαδικασία αυτή οδήγησε στον σχηματισμό δραστικών μορφών οξυγόνου ή αλλιώς ROS (Reactive Oxygen Species), μόρια τα οποία είναι ικανά να προκαλέσουν κυτταρικές βλάβες. Η παρουσία των ROS είναι αναγκαία, σε μικρό ποσοστό, για την φυσιολογική λειτουργία των κυττάρων. Όταν όμως παράγονται σε μεγαλύτερη ή μικρότερη ποσότητα, διαταράσσεται η ισορροπία του οξειδοαναγωγικού συστήματος και είναι πλέον επιβλαβείς (Li et al., 2016; Lelli et al., 1998). Για το λόγο αυτό είναι απαραίτητο τα κύτταρα να παρεμποδίσουν το συγκεκριμένο γεγονός. Ως εκ τούτου, οι οργανισμοί εξελίχθηκαν αναπτύσσοντας μηχανισμούς που παρεμποδίζουν την τοξικότητα μέσω αντιοξειδωτικών αμυντικών μηχανισμών.

Ο όρος οξειδωτικό στρες αναφέρεται σε μια κατάσταση όπου τα επίπεδα των ROS ξεπερνούν σημαντικά την ικανότητα αντιοξειδωτικής άμυνας, με αποτέλεσμα να είναι τοξικές για ένα βιολογικό σύστημα (Lelli et al., 1998). Το οξειδωτικό στρες προκύπτει όταν τα ενζυμικά και τα μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά δεν μπορούν να ουδετεροποιήσουν πλήρως τις παραγόμενες ROS. Ως επακόλουθο, αυτές παραμένουν για αρκετό χρονικό διάστημα και επιτελούν περαιτέρω αντιδράσεις. Έτσι, όταν συμβαίνει ένα οξειδωτικό γεγονός, βιομόρια οξειδώνονται από τις ROS. Η καταστροφή εξαρτάται από την ευκολία των βιομορίων να προσδεθούν με τις ROS. Υψηλά επίπεδα ROS δεν καταλήγουν απαραίτητα σε οξειδωτικό στρες, όταν αυτό μπορεί να εξισορροπηθεί μέσω αύξησης των αμυντικών μηχανισμών. Επιπλέον, τα βιομόρια που καλύπτονται με αντιοξειδωτικά δεν είναι αναγκαστικά σε καλύτερη κατάσταση από εκείνα με χαμηλότερα επίπεδα αντιοξειδωτικών, καθώς αυτό θα εξαρτηθεί από τα επίπεδα των ROS και την κατάσταση της ανοσολογικής άμυνας. Στην πράξη, η εκτίμηση του οξειδωτικού στρες εκτιμάται μετρώντας είτε την καταστροφή είτε την παρουσία αυξημένων επιπέδων ROS (Βενετίκου, 2013).

Στον άνθρωπο το οξειδωτικό στρες φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις αλλά όχι μόνο. Σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις, οι ROS δρουν ως ειδικά σηματοδοτικά μόρια που συμμετέχουν στον έλεγχο των ανοσολογικών διαδικασιών, της κυκλοφορίας του αίματος και της ρύθμισης του ενδοκρινικού και άλλων συστημάτων (Turpaev, 2002; Paravicini et al., 2006). Όμως, σε υψηλές συγκεντρώσεις, οι ROS μπορούν να προκαλέσουν βλάβες στην κυτταρική μεμβράνη και μη αναστρέψιμες τροποποιήσεις στο

DNA. Σήμερα γνωρίζουμε ότι η οξειδωτική καταστροφή που συμβαίνει συσσωρεύεται με την ηλικία. Η συσσώρευση αυτή συνδέεται άμεσα την γήρανση (Finklet et Holbrook, 2000).

Επομένως, η μελέτη του οξειδωτικού στρες και των επιπτώσεων του στον οργανισμό αποτελεί σημείο ενδιαφέροντος για την επιστήμη. Αρκετές ερευνητικές ομάδες παγκοσμίως έχουν ασχοληθεί με το συγκεκριμένο αντικείμενο καταλήγοντας σε σημαντικά συμπεράσματα.

Δραστικές Μορφές Οξυγόνου ROS

Με τον όρο ROS αναφερόμαστε σε μικρά μόρια που έχουν βάση το οξυγόνο, τα οποία είναι ιδιαιτέρως ενεργά λόγω των μη συζευγμένων ηλεκτρονίων τους. Είναι ενδιάμεσα προϊόντα ατελούς αναγωγής του οξυγόνου και παράγονται κυρίως στα μιτοχόνδρια. Η παραγωγή τους μπορεί να οφείλεται σε εξωγενείς πηγές, όπως υπεριώδη ακτινοβολία, το κάπνισμα, το αλκοόλ ή περιβαλλοντική μόλυνση. Επιπλέον μπορεί να είναι ενδογενής, για παράδειγμα φλεγμονές, η οποία μάλιστα φαίνεται να είναι και η πιο επικίνδυνη (Balaban et al., 2005).

Μερικά από τις κυριότερες ROS είναι το υπεροξείδιο (O2−), το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H2O2), το υδροξύλιο (OH −), το οξυγόνο (O2), η ρίζα υπεροξυλίου (ROO▪), η ρίζα αλκοξυλίου (RO▪), τα οργανικά υδροπεροξείδια (ROOH), το περοξυνιτρικό οξύ (ONOO−), το υποχλωριώδες οξύ (HOCl), το όζον (O3) και άλλα (Halliwell B., 1996;).

Ένωση	Όνομα
	Ελεύθερες ρίζες
$O_2^{\cdot-}$	ανιόν σουπεροξειδίου
$HO_2^{\cdot}$	υδροϋπεροξειδική ρίζα
$^{\cdot}OH$	ρίζα υδροξυλίου
$RO^{\cdot}$	ρίζα αλκοξειδίου
$ROO^{\cdot}$	ρίζα υπεροξειδίου
$NO_2^{\cdot}$ και $NO^{\cdot}$	διοξείδιο και μονοξείδιο του αζώτου
	Μη-ελεύθερες ρίζες
H_2O_2	υπεροξείδιο του υδρογόνου
ROOH	οργανικά υδροπεροξείδια
$^1O_2$	μονήρες οξυγόνο
O_3	όζον
HOCl	υποχλωριώδες οξύ
ONOO-	περοξυνιτρικό

Πίνακας 1.2 Δραστικές Μορφές Οξυγόνου (Γάλαρης, Δ. 2015)

Οξειδωτικό στρες και χρόνιες ασθένειες

Δεν είναι λίγη η βιβλιογραφία που συνδέει το οξειδωτικό στρες με διάφορες παθήσεις. Ο μηχανισμός που φαίνεται να εμπλέκεται είναι η ενεργοποίηση φλεγμονωδών αντιδράσεων και η πρόκληση εκφυλιστικών αλλοιώσεων. Δεδομένα δείχνουν να παίζει σημαντικό ρόλο σε νευροεκφυλιστικές νόσους όπως Alzheimer, Parkinson, νόσος του Huntington (Hwang et al, 2013; Nunomura et al., 2006; Kumar et al., 2016). Επιπλέον έχει βρεθεί συσχέτιση με την σκλήρυνση κατά πλάκας (Haider et al.,2011). Παρατηρείται επίσης εμπλοκή του οξειδωτικού στρες με την κατάθλιψη, τη σχιζοφρένεια και τις διαταραχές του αυτιστικού φάσματος (Hollis et al., 2017; Bošković et al., 2011).

Ο σακχαρώδης διαβήτης χαρακτηρίζεται από συσσώρευση λιπαρών οξέων και υπεργλυκαιμία. Αυτά με τη σειρά τους αυξάνουν το οξειδωτικό στρες. Ως αποτέλεσμα, προκαλείται συστηματική φλεγμονώδη αντίδραση στον οργανισμό με αποτέλεσμα διαβητική νευροπάθεια, οφθαλμοπάθεια και νεφροπάθεια (Dos Santos et al., 2019).

Στο καρδιαγγειακό σύστημα, η αυξημένη συγκέντρωση των ROS προκαλεί οξείδωση της λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας ή αλλιώς LDL, ενεργοποίηση των κυττάρων φλεγμονής και καταστροφή των ενδοθηλιακών κυττάρων. Τα παραπάνω γεγονότα συμβάλλουν στο σχηματισμό αθηρωματικής πλάκας. Επιπρόσθετα, η συσσώρευση ROS μπορεί να επιφέρει υπερτροφία των μυοκαρδιακών κυττάρων. Το γεγονός αυτό συνεπάγεται κυτταρική απόπτωση, η οποία έχει συσχετιστεί με καρδιακή ίνωση και τελικά πρόκληση καρδιακής ανεπάρκειας (Moris, D., et al., 2017). Ταυτόχρονα, μελέτες αναφέρουν σύνδεση της αρτηριακής υπέρτασης με το αυξημένο οξειδωτικό στρες (Senoner and Dichtl, 2019).

Πληθώρα ερευνών αποδεικνύει ότι το οξειδωτικό στρες αυξάνει τις μεταλλάξεις του DNA και αναστέλλει την κυτταρική απόπτωση των καρκινικών κυττάρων. Με τον τρόπο αυτό φαίνεται να ενοχοποιείται και για καρκινογένεση (Sosa et al., 2013)

Οξειδωτικό στρες και Ανδρική Υπογονιμότητα

Πρόσφατες έρευνες αποδεικνύουν την εμπλοκή των οξειδωτικών παραγόντων στην αναπαραγωγική λειτουργία ανδρών και γυναικών, με συνδυασμό ή μη διαφόρων επιβλαβών περιβαλλοντικών παραγόντων. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, το αυξημένο οξειδωτικό στρες μπορεί να προκαλέσει βλάβες στην κυτταρική μεμβράνη, καταστροφή του

DNA και να πυροδοτήσει την κυτταρική απόπτωση (Turpaev, 2002; Paravicini and Touyz, 2006).

Την κύρια πηγή των ROS στο σπερματικό υγρό αποτελούν τα σπερματοζωάρια. Επίσης, παράγονται από πολυμορφοπύρηνα λευκοκύτταρα (Aitken and Clarkson, 2004). Χαμηλά επίπεδα ROS χρειάζονται τόσο για την ενεργοποίηση όσο και για την ακροσωμική αντίδραση. Αντίθετα, μη φυσιολογικά σπερματοζωάρια και αυξημένος αριθμός λευκοκυττάρων συνεπάγονται υψηλά επίπεδα ROS ξεπερνώντας την προστατευτική ικανότητα του σπερματικού υγρού. Ως αποτέλεσμα, το οξειδωτικό στρες αυξάνει την πιθανότητα της καταστροφής του DNA, προκαλεί υπεροξείδωση των λιπιδίων της μεμβράνης και μειώνει την κινητικότητα των σπερματοζωαρίων (Aitken and De Iuliis, 2007; Ochsendorf, 1999; Armstrong et al., 1999). Το γεγονός αυτό οδηγεί σε μειωμένη ποιότητα σπέρματος, απώλεια της ικανότητας ακροσωμικής αντίδρασης και δυσκολία στην γονιμοποίηση του ωαρίου από το σπερματοζωάριο. Έτσι, μειώνεται η γονιμότητα τόσο in vitro όσο και in vivo (Aitken, and De Iuliis,2007; Aitken et al., 1992; Erenpreiss et al., 2002; Kühnert B and Nieschlag, 2004,).

Η αυξημένη παραγωγή ROS έχει συσχετιστεί με ελαττωμένη κινητικότητας στο σπερματοζωάριο (Armstrong et al., 1999). Αυτό πιθανώς να οφείλεται σε μια σειρά γεγονότων που καταλήγουν στη μείωση της φωσφορυλίωσης πρωτεϊνών του σπερματοζωαρίου και στην ακινητοποίηση του. Και οι δυο αυτές καταστάσεις σχετίζονται με μείωση της ρευστότητας της μεμβράνης, η οποία είναι απαραίτητη για τη σύντηξη των δυο γαμετών (Armstrong et al., 1999).

Στο σπέρμα, η καταστροφή του DNA μπορεί να έχει αρνητικές επιδράσεις στο αναπαραγωγικό αποτέλεσμα. Το ποσοστό κατάτμηση είναι πολύ μεγαλύτερο σε νέους άνδρες με ιδιοπαθή υπογονιμότητα και αρκετά εμφανής σε ηλικιωμένους άνδρες σύμφωνα με έρευνες (Saleh et al.,2002).Τα σπερματοζωάρια με κατεστραμμένο DNA υπογόνιμων ανδρών με φυσιολογικούς παραμέτρους σπέρματος είναι σημαντικά περισσότερα σε σύγκριση με τους γόνιμους άνδρες (Saleh et al., 2002; Venkatesh et al., 2011). Η καταστροφή του DNA μπορεί να οφείλεται στην ανώμαλη αναδίπλωση της χρωματίνης, στο οξειδωτικό στρες ή σε αστάθεια του DNA (Aitken and De Iuliis, 2007). Είναι γνωστό ότι τόσο η ωριμότητα της χρωματίνης όσο και η ακεραιότητα του DNA είναι αναγκαίες για την ολοκλήρωση της γονιμοποίησης και τη μετέπειτα ανάπτυξη του εμβρύου (Ahmadi and Ng, 1999).

Την κατάτμηση του DNA των σπερματοζωαρίων μπορεί να ακολουθήσει η απόπτωση αυτών , μια δραστηριότητα που επηρεάζεται από το οξειδωτικό στρες (Aitken and

De Iuliis, 2007). Μπορεί να προέρχεται από υπερβολική αναδίπλωση κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης (Bizzaro et al.,1993 ; Manicardi et al.; 1995), ελαττωματική απόπτωση πριν από την εκσπερμάτιση (Sakkas et al., 1999; Sakkas et al., 2002) ή ελαττωματική παραγωγή ROS στην εκσπερμάτιση (Lopes et al., 1998; Kodama et al., 1997; Moustafa et al., 2004). Επιπλέον της κατάτμησης του DNA, η οξείδωση των ακόρεστων λιπαρών οξέων στις μεμβράνες των σπερματοζωαρίων ενοχοποιείται για το μηχανισμό με τον οποίο τα ROS διαταράσσουν τη σπερματική λειτουργία και οδηγούν σε απόπτωση(Kühnert and Nieschlag, 2004; Singh et al., 2003). Τα δε μιτοχόνδρια, ως η βασική πηγή παραγωγής ROS και οξειδωτικού στρες, συμμετέχουν στην ενεργοποίηση προαποπτωτικών μορίων, στη κατάτμηση του DNA καθώς και στην απόπτωση. Μολονότι η οξειδωτική καταστροφή του μιτοχονδριακού DNA μειώνει την παραγωγή του ATP και κατά συνέπεια την αναπαραγωγική ικανότητα, η καταστροφή του πυρηνικού DNA είναι η κύρια αιτία βλάβης της μορφολογίας και της λειτουργία των σπερματοζωαρίων (Angelopoulou and Kyriazoglou, 2005).

Πηγές οξειδωτικού στρες στην Ανδρική Υπογονιμότητα

Διάφοροι παράγοντες έχουν συσχετιστεί με το αυξημένο οξειδωτικό στρες στο σπέρμα. Ορισμένες παθολογικές καταστάσεις, όπως για παράδειγμα η κιρσοκήλη, έχουν μελετηθεί εκτενώς και έχουν επιβεβαιωθεί ως αίτια. Αντίθετα, άλλοι παράγοντες, όπως η υπερομοκυστεϊναιμία, έχουν πρόσφατα έρθει στο προσκήνιο και χρειάζονται περεταίρω μελέτη.

Ιδιοπαθής

Διάφορες ερευνητικές ομάδες έχουν συνδέσει την ιδιοπαθή ανδρική υπογονιμότητα με οξειδωτικό στρες. Μία από τις κύριες αιτίες φαίνεται να είναι η παρατήρηση ότι το μορφολογικά ανώμαλο σπέρμα έχει αυξημένη ικανότητα δημιουργίας ROS και μειωμένη αντιοξειδωτική ικανότητα (Gomez et al., 1996; Garrido et al., 2004b; Said et al., 2004 ; Said et al., 2005). Περίπου το ένα τρίτο των υπογόνιμων ανδρών εμφανίζουν τερατοζωοσπερμία (Thonneau et al., 1991). Γι αυτό δεν προκαλεί έκπληξη το γεγονός ότι το οξειδωτικό στρες συνήθως εντοπίζεται στον ιδιοπαθή άγονο πληθυσμό. Ακόμη και άνδρες με νορμοζωοσπερμική ιδιοπαθή στειρότητα εμφανίζουν σημαντικά υψηλότερη παραγωγή ROS και χαμηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα από τους γόνιμους άντρες (Pasqualotto et al., 2001; Agarwal et al., 2006b), για άγνωστους ακόμη λόγους.

Ιατρογενείς παράγοντες

Η χρήση των Τεχνικών Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής αυξάνει το οξειδωτικό στρες στο σπερματοζωάριο. Κατά τη φυγοκέντρηση του σπέρματος, που εφαρμόζεται στην in vitro γονιμοποίηση (IVF) και την ενδομητρική έγχυση σπέρματος (IUI), η παραγωγή των ROS ενισχύεται (Iwasaki and Gagnon, 1992; Shekarriz et al., 1995a, b) και ταυτόχρονα απομακρύνονται τα προστατευτικά αντιοξειδωτικά από το πλάσμα του σπέρματος (Potts et al., 2000a, b). Η τεχνικής της κρυοσυντήρηση σπέρματος έχει επίσης συσχετιστεί με οξειδωτικό στρες (Watson, 2000).

Επιπλέον, διάφοροι φαρμακευτικοί παράγοντες έχουν ενοχοποιηθεί. Μερικοί από αυτούς είναι η κυκλοφωσφαμίδη, η ασπιρίνη και η ακεταμινοφαίνη. Έρευνες ισχυρίζονται ότι οι συγκεκριμένες φαίνεται να ενισχύουν τη δημιουργία ROS ((Das et al., 2002; Agarwal and Said, 2005).

Τρόπος ζωής

Είναι γνωστό ότι η κατανάλωση αλκοόλ, το κάπνισμα, η κακή διατροφή και το άγχος έχουν αρνητικές επιπτώσεις στον οργανισμό. Φαίνεται λοιπόν να συμμετέχουν και στην περίπτωση του οξειδωτικού στρες των σπερματοζωαρίων.

Το κάπνισμα οδηγεί σε αύξηση κατά 48% της συγκέντρωσης λευκοκυττάρων στο σπέρμα και αύξηση κατά 107% των επιπέδων ROS (Saleh et al., 2002a). Επιπλέον, καπνιστές έχουν μειωμένα επίπεδα αντιοξειδωτικών στο σπέρμα του πλάσματος, όπως η βιταμίνη E (Fraga et al., 1996) και η βιταμίνη C (Mostafa et al., 2006), θέτοντας το σπέρμα τους σε επιπλέον κίνδυνο οξειδωτικής βλάβης.

Οι διατροφικές ελλείψεις έχουν συνδεθεί με οξειδωτική βλάβη στο σπέρμα από αρκετές ερευνητικές ομάδες. Διάφορα αντιοξειδωτικά και θρεπτικές ουσίες, όπως οι βιταμίνες C και E, το β-καροτένιο, το φολικό οξύ και ο ψευδάργυρος, έχουν μελετηθεί και συσχετιστεί με την ποιότητα σπέρματος (Eskenazi et al., 2005). Ωστόσο, σε άλλες μελέτες δεν επιβεβαιώνεται η πρόκληση βλάβης στο DNA των σπερματοζωαρίων λόγω μειωμένης πρόσληψης αντιοξειδωτικών (Silver et al., 2005).

Επιπρόσθετα, η υπερβολική κατανάλωση αλκοόλ προκαλεί αύξηση του συστημικού οξειδωτικού στρες, καθώς η αιθανόλη διεγείρει την παραγωγή ROS, ενώ πολλοί χρήστες αλκοόλης έχουν δίαιτες ανεπαρκείς σε προστατευτικά αντιοξειδωτικά (Wu and Cederbaum, 2003; Koch et al., 2004). Μελέτη 46 αλκοολικών ανδρών αναπαραγωγικής ηλικίας έχει δείξει την παρουσία οξειδωτικού στρες στον όρχι, σημαντική μείωση της τεστοστερόνης στο πλάσμα, αύξηση των υποπροϊόντων υπεροξείδωσης των λιπιδίων στον ορό και μείωση των αντιοξειδωτικών (Maneesh et al., 2006). Άλλες μελέτες ανέφεραν παρόμοια αποτελέσματα, που περιγράφουν επιβλαβείς επιδράσεις στα μιτοχόνδρια με σημαντική αύξηση στη δημιουργία ROS και επιγενετικών τροποποιήσεων στα κύτταρα γαμετικής σειράς (Manzo-Avalos and Saavedra-Molina, 2010; Rompala and Homanics, 2019).

Ακραία άσκησης καθώς και καθιστική ζωή έχουν συσχετισθεί με οξειδωτικό στρες. Η έντονη άσκηση αντιστοιχεί σε αυξημένο οξειδωτικό στρες καθώς ο αερόβιος μεταβολισμός των μυών δημιουργεί μεγάλη ποσότητα ROS (Peake et al., 2007). Σε μοντέλο τρωκτικών, τα αυξανόμενα επίπεδα άσκησης συνδέονται με μείωση του αριθμού και της κινητικότητας του σπέρματος και αντίστοιχη αύξηση του οξειδωτικού στρες των όρχεων (Manna et al., 2004). Ταυτόχρονα, η παχυσαρκία παράγει οξειδωτικό στρες καθώς ο λιπώδης ιστός απελευθερώνει προφλεγμονώδεις κυτοκίνες, που αυξάνουν την παραγωγή ROS από τα λευκοκύτταρα (Singer and Granger, 2007). Επιπλέον, η συσσώρευση λιπώδους ιστού στην περιοχή της βουβωνικής χώρας οδηγεί σε θέρμανση του όρχεως, η οποία έχει συνδεθεί με οξειδωτικό στρες και μειωμένη ποιότητα σπέρματος (Banks et al., 2005; Ishii et al., 2005; Perez-Crespo et al., 2007).

Το άγχος και η αυξημένη ηλικία του πατέρα φαίνεται να παίζουν επίσης ρόλο. Πρόσφατες προοπτικές μελέτες έχουν συνδέσει παρατεταμένες περιόδους ψυχολογικού στρες με μείωση της ποιότητας του σπέρματος. Πιθανές αιτίες του γεγονότος αυτού μπορεί να είναι η αύξηση της παραγωγής ROS στο πλάσμα του σπέρματος καθώς και η μείωση της αντιοξειδωτικής προστασίας (Eskiocak et al., 2005, 2006). Ταυτόχρονα, αρκετές έρευνες έχουν αναφέρει ότι η βλάβη στο DNA του σπέρματος αυξάνεται καθώς προχωρά η ηλικία τόσο στους γόνιμους (Wyrobek et al., 2006) όσο και στους υπογόνιμους άνδρες (Singh et al., 2003).

Περιβαλλοντικοί παράγοντες

Αρκετοί περιβαλλοντικοί ρύποι έχουν συνδεθεί με το οξειδωτική βλάβη στους όρχεις, με αποτέλεσμα δυσλειτουργία στη σπερματογένεση. Η έκθεση σε βαρέα μέταλλα, όπως το κάδμιο και ο μόλυβδος, και διάφορα φυτοφάρμακα μπορούν να αυξήσουν το οξειδωτικό στρες (Hsu and Guo, 2002; Acharya et al., 2003; Chitra et al., 2001). Η μεθοξυαιθανόλη (γλυκόλη που υπάρχει στα χρώματα, υγρό φρένων αυτοκινήτου), το 2,4, 6 τρινιτροτολουένιο (συστατικό εκρηκτικών υλικών) και το θειϊκό διοξείδιο (παράγωγο καύσης προϊόντων πετρελαίου) επίσης ενοχοποιούνται (Kelton Tremellen, 2008).

Μολύνσεις

Παθογόνα, όπως *Streptococci* (*S. viridans* και *S. pyogens*), αρνητικά στην κοαγκουλάση *Staphylococci* (*S. epidermidis*, *S. haemolyticus*), gram-αρνητικά βακτήρια (*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*), άτυπα στελέχη ουρεαπλάσματος και μυκοπλάσματος (*Ureaplasma urealyticum, Mycoplasma hominis*) συνδέονται με προστατίτιδα και επιδρούν πρόσκαιρα ή μόνιμα στη γονιμότητα του άνδρα σε διαφορετικό βαθμό το καθένα. Όλα αυτά τα παθογόνα είναι ικανά να δημιουργήσουν μια οξεία φλεγμονώδη απόκριση με εισροή λευκοκυττάρων στο γεννητικό σύστημα και μια επακόλουθη αύξηση στην παραγωγή ROS (Mazzilli et al., 1994; Depuydt et al., 1996; Ochsendorf, 1999; Potts et al., 2000α, β). Η τρέχουσα ή η προηγούμενη λοίμωξη από χλαμύδια έχει επίσης συνδεθεί με αύξηση της οξειδωτικής βλάβης στο σπέρμα (Segnini et al., 2003). Επιπρόσθετα, η ιογενής λοίμωξη από HSV φαίνεται να παίζει πιθανό ρόλο στην έναρξη οξειδωτικής βλάβης στο σπέρμα (Kapranos et al., 2003).

Ορχικοί παράγοντες

Το οξειδωτικό στρες θεωρείται ότι είναι η κύρια υποκείμενη παθολογία που συνδέει την κιρσοκήλη με την ανδρική υπογονιμότητα (Smith et al., 2007). Επιπλέον, πρόσφατα έχει αναφερθεί ότι οι άνδρες με κρυψορχία, παρά τη χειρουργική διόρθωση σε νεαρή ηλικία, έχουν ακόμα σημαντικά αυξημένη παραγωγή ROS στο σπέρμα τους και κατακερματισμό DNA σε σύγκριση με γόνιμους άνδρες (Smith et al., 2007). Επίσης, είναι πλέον γενικά αποδεκτό ότι το οξειδωτικό στρες σχετίζεται με τον τραυματισμό. Μια παρατεταμένη περίοδος ισχαιμίας ακολουθούμενη από χειρουργική ή αυθόρμητη αποκατάσταση της ροής του αίματος οδηγεί σε εισροή ενεργοποιημένων λευκοκυττάρων και στους δύο όρχεις (Turner et al., 2004) και σε επακόλουθη αύξηση της παραγωγής ελεύθερων ριζών (Filho et al., 2004).

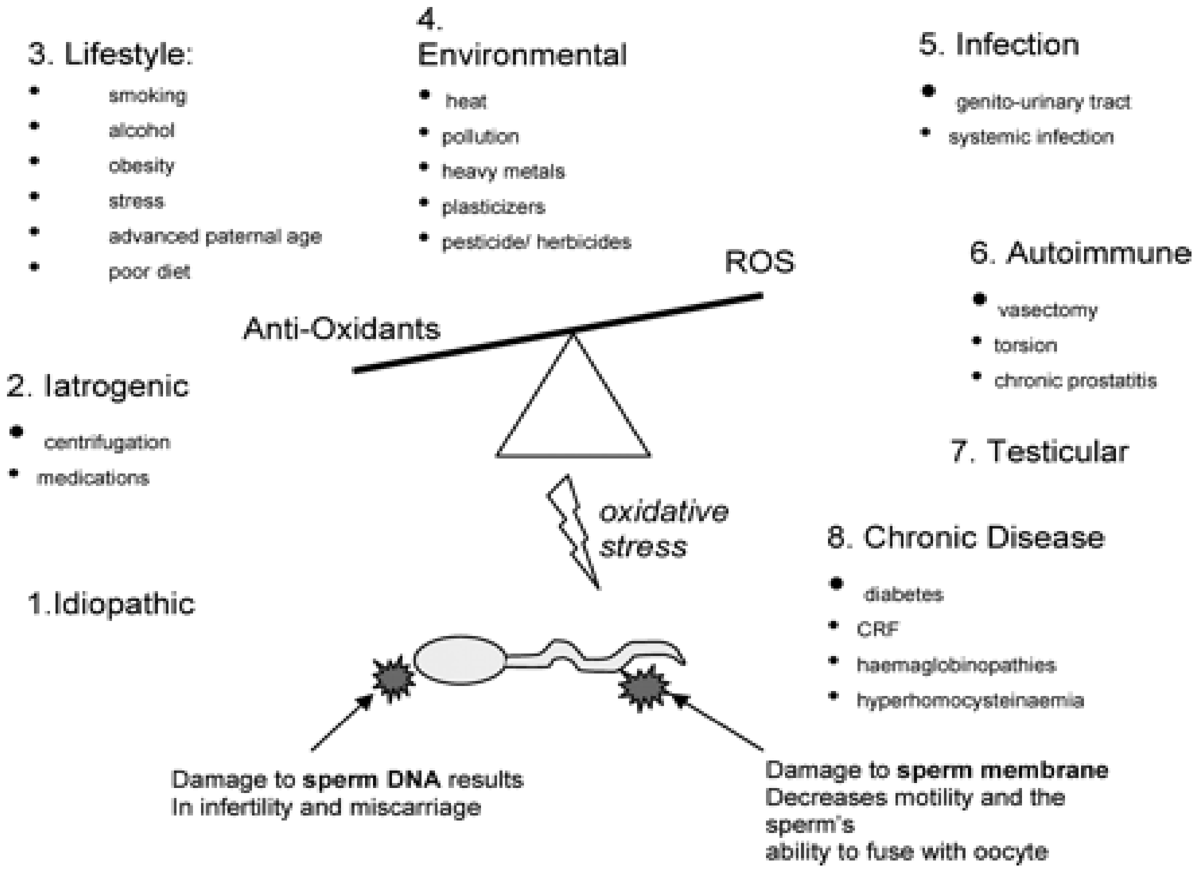
Χρόνια νοσήματα

Ο διαβήτης έχει αναγνωριστεί ότι επηρεάζει τη γονιμότητα των ανδρών παρεμβαίνοντας τόσο στη σπερματογένεση όσο και στη στυτική λειτουργία. Σε διαβητικούς ασθενείς, παρατηρούνται αυξημένα επίπεδα ROS και εξασθένιση της αντιοξειδωτικής αμυντικής ικανότητας (Bloch-Damti et al., 2005). Επίσης, έχει αναφερθεί ότι οι διαβητικοί άνδρες έχουν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα κατακερματισμού DNA σπέρματος από τους φυσιολογικούς μάρτυρες (Agbaje et al., 2007). Ταυτόχρονα, το οξειδωτικό στρες έχει συσχετιστεί με την υπεργλυκαιμία και φαίνεται να οφείλεται στην υπερπαραγωγή υπεροξειδίου στα μιτοχόνδρια (Valko et al.,2007; Du et al., 2001).

Επιπλέον, η τοξική συσσώρευση ομοκυστεΐνης μπορεί να προκαλέσει αναπαραγωγική δυσλειτουργία και οξειδωτικό στρες στους όρχεις (Forges et al., 2007; Sonmez et al., 2007). Η υπερομοκυστεϊναιμία συνήθως συμβαίνει λόγω της μη σωστής επαναμεθυλίωσης της ομοκυστεΐνης σε μεθειονίνη από το ένζυμο μεθυλοτετραϋδροφολική αναγωγάση (MTHFR). Προκαλείται από διατροφική ανεπάρκεια φυλλικού οξέος ή πολυμορφισμό ενός νουκλεοτιδίου (SNP) στο γονίδιο MTHFR (Selhub, 1999; Matthews , 2002). Αρκετοί ερευνητές ανέφεραν ότι τα SNP στο γονίδιο MTHFR βρίσκονται πιο συχνά στους στείρους άνδρες (Bezold et al., 2001; Park et al., 2005; Lee et al., 2006; Zhou-Cun et al. ., 2007), θέτοντας αυτούς τους άνδρες σε αυξημένο κίνδυνο οξειδωτικού στρες που προκαλείται από ομοκυστεΐνη.

Ασθενείς με αιμοσφαιρινοπάθειες, όπως η β-θαλασσαιμία, έχουν υψηλούς βαθμούς συστημικού οξειδωτικού στρες (Livrea et al., 1996). Αυτή η οξειδωτική βλάβη επιβεβαιώνεται ότι περιλαμβάνει και το σπέρμα (Carpino et al., 2004)

Οι ορμόνες του θυρεοειδούς έχουν επίσης ανακαλυφθεί ότι επηρεάζουν την ισορροπία μεταξύ ROS και αντιοξειδωτικών εντός των όρχεων (Resch et al., 2002). Μετά από υποθυρεοειδισμό που προκαλείται από φάρμακα σε ενήλικες αρουραίους, παρατηρήθηκε αύξηση των δεικτών οξειδωτικού στρες ενώ η δραστικότητα αντιοξειδωτικών αμυντικών μορίων μειώθηκε (Choudhury et al., 2003).



Εικόνα 1.3 Οι πηγές του οξειδωτικού στρες στο ανδρικό αναπαραγωγικό σύστημα (Kelton Tremellen, 2008).

Θεραπεία οξειδωτικού στρες στην Ανδρική Υπογονιμότητα

Δεδομένου ότι το οξειδωτικό στρες στο σπέρμα είναι ένας βασικός αιτιολογικός παράγοντας της ανδρικής υπογονιμότητας, η διάγνωση και η αντιμετώπιση του είναι ιδιαίτερα σημαντικές. Μεγάλος αριθμός μελετών έχει διεξαχθεί για τη δραστικότητα των διαφόρων θεραπειών τόσο στη βελτίωση της ποιότητας του σπέρματος όσο και την αύξηση της πιθανότητας εγκυμοσύνης. Η ορθή λήψη του ιστορικού είναι το πρώτο βήμα για την σωστή διαχείριση του προβλήματος. Έτσι, ανατρέχοντας στις πιθανές πήγες αυξημένου οξειδωτικού στρες στοχεύουμε στην εξατομικευμένη και βέλτιστη προσέγγιση για τον κάθε ασθενή (Kelton Tremellen, 2008).

Αρχικά, συστήνεται αλλαγή του τρόπου ζωής. Συνήθειες όπως το κάπνισμα, η κακή διατροφή, η κατάχρηση αλκοόλ, η παχυσαρκία ή το ψυχολογικό άγχος έχουν όλα συνδεθεί με το οξειδωτικό στρες (Saleh et al., 2002a; Eskenazi et al., 2005; Wu and Cederbaum, 2003;

Koch et al., 2004). Διατροφή με υψηλή περιεκτικότητα σε φρούτα και λαχανικά, διατήρηση του φυσιολογικού βάρους, διακοπή του καπνίσματος και η μείωση της κατανάλωσης αλκοόλ μπορούν να έχουν κάποια ευεργετική επίδραση (Kelton Tremellen, 2008). Το ίδιο ισχύει και για την έκθεση σε αυξημένη θερμοκρασία, τη ρύπανση και τις τοξίνες, όπως για παράδειγμα βαρέα μέταλλα (Acharya et al., 2003). Μείωση της έκθεσης στους παραπάνω παράγοντες μπορεί να δράσει θετικά.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, αύξηση στην παραγωγή ROS μπορεί να προκληθεί ύστερα από αύξηση του αριθμού των λευκοκυττάρων εξαιτίας κάποια λοίμωξης του ουρογεννητικού συστήματος του άνδρα (Mazzilli et al., 1994; Depuydt et al., 1996; Ochsendorf, 1999; Potts et al., 2000 a, b). Ως εκ τούτου, είναι αναγκαία η άμεση θεραπεία της υποκείμενης μόλυνσης από το εκάστοτε παθογόνο. Μελέτες έχουν επιβεβαιώσει την ικανότητα της αντιβιοτικής θεραπείας για χλαμύδια και ουρεάπλασμα να μειώσει το οξειδωτικό στρες και στη συνέχεια να βελτιώσει την ποιότητα του σπέρματος (Omu et al., 1998; Vicari, 2000).

Επιπλέον, η επιδιόρθωση της παθολογίας που σχετίζεται με το οξειδωτικό στρες θα μπορούσε να έχει θετικά αποτελέσματα. Αρκετοί ερευνητές αναφέρουν ότι η χειρουργική αντιμετώπιση της κιρσοκήλης μπορεί να μειώσει τα επίπεδα του ROS και να βελτιώσει την ακεραιότητα του DNA του σπέρματος (Mostafa et al., 2001). Ωστόσο, σε μετα-αναλύσεις της Cochrane υποδηλώνεται ότι δεν υπάρχει όφελος (Evers and Collins, 2004).

Αρκετές μελέτες έχουν αναφέρει ότι τα επίπεδα ROS στο σπέρμα μπορούν να μειωθούν χρησιμοποιώντας αντιοξειδωτικά συμπληρώματα. Ενώ σχετικά μικρές έρευνες έχουν δείξει ότι τα παραπάνω ενισχύουν τον αριθμό και την μορφολογία των σπερματοζωαρίων, οι περισσότερες μελέτες καλής ποιότητας δεν το κάνουν (Agarwal et al., 2004). Ωστόσο, πολλές υποστηρίζουν μικρές αλλά σημαντικές βελτιώσεις στην κινητικότητα του σπέρματος με συμπληρώματα καρνιτίνης (Lenzi et al., 2004), σεληνίου (Scott et al., 1998), Βιταμίνης Ε (Suleiman et al. ., 1996), Βιταμίνης Ε και σεληνίου (Keskes-Ammar et al., 2003), γλουταθειόνης (Lenzi et al., 1993) και ασταξανθίνης (Comhaire et al., 2005). Παρόλο που τα αντιοξειδωτικά φαίνεται να βοηθούν στη μείωση του οξειδωτικού στρες, περισσότερες μελέτες είναι αναγκαίο να γίνουν για τις δόσεις και τη διάρκεια χορήγησης τους.

2. ΣΚΟΠΟΣ

Η παρούσα μελέτη διενεργήθηκε στα πλαίσια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών (ΠΜΣ) "Αναπαραγωγική - Αναγεννητική Ιατρική" της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ. Σκοπό της μελέτης αποτέλεσε η διερεύνηση της επίδρασης του οξειδωτικού στρες στην ανδρική υπογονιμότητα.

Συγκεκριμένα αναζητήθηκε η συσχέτιση του Οξειδωτικού Στρες στο σπέρμα με τον τρόπο ζωής καθώς και γενετικές, μικροβιολογικές και ορμονικές παραμέτρους που επηρεάζουν την ανδρική υπογονιμότητα.

Οι ειδικότεροι στόχοι είναι εν συντομία περιλαμβάνουν:

- τη διερεύνηση της σχέσης του οξειδωτικού στρες με την ηλικία, το κάπνισμα, την κατανάλωση αλκοόλ και το BMI
- τη διερεύνηση της σχέσης του οξειδωτικού στρες με τα επίπεδα γλυκόζης και ομοκυστεΐνης
- τη διερεύνηση της σχέσης του οξειδωτικού στρες με την ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών στο σπέρμα
- τη διερεύνηση της σχέσης του οξειδωτικού στρες με το ορμονικό προφίλ, δηλαδή με τις FSH, TEST, TSH, T4 και PRL
- τη διερεύνηση της σχέσης του οξειδωτικού στρες με τα χαρακτηριστικά του σπέρματος, όπως ο όγκος, η συγκέντρωση, η ζωηρή και η συνολική προωθητική κίνηση των σπερματοζωαρίων

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Υπό μελέτη Πληθυσμός

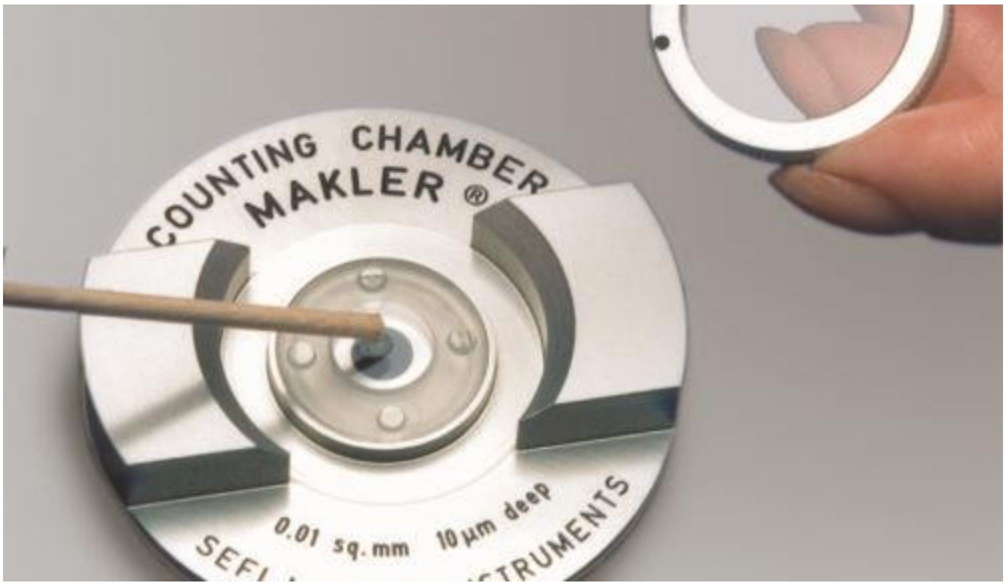
Η παρούσα μελέτη διεξάχθηκε στη Μονάδα Ιατρικώς Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής «ΒΙΟΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ» και συμμετείχαν 16 άνδρες, ηλικίας 31 με 68 ετών, οι οποίοι προσήλθαν στην μονάδα στα πλαίσια διαγνωστικής προσέγγιση. Όλοι οι συμμετέχοντες είχαν φυσιολογικό καρυότυπο άρρενος με 46 XY, όπως διαπιστώθηκε ύστερα από εξέταση που πραγματοποιήθηκε από το διαγνωστικό κέντρο γενετικής ανάλυσης ATG - Access To Genome. Κατά τη διάρκεια της μελέτης, οι συμμετέχοντες κλήθηκαν να συμπληρώσουν το ιατρικό τους ιστορικό. Συλλέχθηκαν επίσης το ύψος (m), το βάρος (kg) και υπολογίστηκε ο δείκτης μάζας σώματος (BMI, kg / m^2). Επιπλέον, καταγράφηκαν η κατανάλωση αλκοόλ (μονάδες αλκοόλ / εβδομάδα) καθώς και το κάπνισμα (τσιγάρα / ημέρα). Μία μονάδα αλκοόλ ισούται σύμφωνα με τον Π.Ο.Υ. ισούται με 10 ml, ή 8 g, καθαρής αλκοόλης είτε αυτή προέρχεται από κρασί (100ml / 12% vol) , οινοπνευματώδη ποτά (30ml / 40% vol) ή μπύρα (250ml / 5% vol).

Συλλογή δειγμάτων και ανάλυση σπέρματος

Μετά τη λήψη ενημερωμένης συγκατάθεσης για την συμμετοχή στη μελέτη, ιατρικού και οικογενειακού ιστορικού, συλλέχθηκαν δείγματα αίματος και σπέρματος από κάθε συμμετέχων.

Από κάθε άνδρα ελήφθησαν, με φλεβοκέντηση, 5 ml ολικού αίματος. Η αιμοληψία γινόταν πάντοτε πρωινές ώρες. Τα δείγματα αίματος νηστείας συλλέγονταν σε κατάλληλους σωλήνες EDTA. Αμέσως μετά την αιμοληψία, και μέσα σε 3 ώρες πραγματοποιούνταν η απομόνωση του ορού και φυλασσόταν σε 4 °C έως ότου ολοκληρωθούν οι επιθυμητές βιοχημικές εξετάσεις.

Τα δείγματα σπέρματος ελήφθησαν με αυνανισμό, ύστερα από 2 - 4 ημέρες αποχής. Αφέθηκαν τουλάχιστον 30 λεπτά για να πραγματοποιηθεί η υγροποίηση τους. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε η ανάλυση του σπέρματος. Με τη χρήση πιπέτας Pasteur καταμετρήθηκε ο όγκος του κάθε δείγματος. Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης, με πιπέτα Pasteur 10μl σπέρματος τοποθετήθηκαν στη Makler sperm-count chamber. Με τη χρήση μικροσκοπίου μετρήθηκε σε 10 τετραγωνάκια ο αριθμό των σπερματοζωαρίων. Ο μέσος όρος τριών διαδοχικών μετρήσεων πολλαπλασιασμένος με 10^6 αντιστοιχεί στην συγκέντρωση του σπέρματος. Ακολούθησε ο χαρακτηρισμός της κίνησης των σπερματοζωαρίων. Η αξιολόγηση του όγκου, της συγκέντρωσης και της κινητικότητας του σπέρματος έγιναν σύμφωνα με τις οδηγίες του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (ΠΟΥ, 2010).



Εινόνα 3.1. Makler sperm-count chamber (https://www.cryobiosystem.com/produit/cellule-de-makler)

Μέτρηση Οξειδωτικού Στρες

Η μέτρηση του οξειδωτικού στρες (ORP) πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το σύστημα MiOXSYS ANALYSER. Το ORP μετρά τη μεταφορά ηλεκτρονίων από ένα αναγωγικό σε ένα οξειδωτικό μέσο. Εντός μίας ώρας από την παραγωγή του και σε θερμοκρασία δωματίου, 30 mL υγροποιημένου σπέρματος εφαρμόστηκαν στον αισθητήρα MiOXSYS. Πριν φορτωθεί το δείγμα, ο αισθητήρας είχε τοποθετηθεί στον αναλυτή MiOXSYS για διάστημα μικρότερο των δύο λεπτών.

Το στατικό ORP (sORP), που μετράται σε millivolts (mV) και αποτελεί την τιμή που προκύπτει στον αναλυτή, είναι το ολοκληρωμένο μέτρο της υπάρχουσας ισορροπίας μεταξύ ολικών οξειδωτικών και αναγωγικών σε ένα βιολογικό σύστημα. Για τα δείγματα με συγκέντρωση μεγαλύτερη του ενός εκατομμυρίου, τα δεδομένα κανονικοποιήθηκαν διαιρώντας με τη συγκέντρωση του σπέρματος. Έτσι, τα δεδομένα παρουσιάζονται ως normalized ORP (nORP), το οποίο μετράται σε mV / 10^6 sperm / ml. Ως τιμή αναφοράς για το nORP χρησιμοποιήθηκε το 1,34 mV / 10^6 sperm / ml) (Agarwal A et al., 2019). Δείγματα με nORP μεγαλύτερο της τιμής αναφοράς χαρακτηρίστηκαν ως δείγματα με αυξημένο οξειδωτικό στρες. Αντίστοιχα, δείγματα με nORP μικρότερο της τιμής αναφοράς χαρακτηρίστηκαν ως δείγματα με αυξημένο αναγωγικό στρες.

Εικόνα 3.2. Εφαρμογή 30 mL υγροποιημένου σπέρματος στον αισθητήρα MiOXSYS (Agarwal A et al., 2019).

Βιοχημικός και Ορμονικός έλεγχος

Τα επίπεδα της ωοθυλακιοτρόπου ορμόνης (FSH, IU/L), της προλακτίνης (PRL, ng/ml), της ολική τεστοστερόνη (TESTO, ng/dL), της Θυρεοτρόπου Ορμόνης (TSH, mIU/L), της θυροξίνης (T4, ng/dL), της γλυκόζης (mg/dL) και της ομοκυστεΐνης (μmol/L) μετρήθηκαν από το Βιοπαθολογικό Εργαστήριο «Γονιδιωματική-Genelabs». Ο προσδιορισμός των επιπέδων των ορμονών από τον ορό του αίματος πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της ηλεκτροχημειοφωταύγειας σε αναλυτή COBAS e411της εταιρίας Roche. Η μέτρηση της γλυκόζης έγινε με ενζυματική φωτομετρική μέθοδο στον ίδιο αναλυτή. Η δε μέτρηση της ομοκυστεΐνης ορού πραγματοποιήθηκε με χημειοφωταύγεια (ανταγωνιστικός ανοσοπροσδιορισμός) χρησιμοποιώντας τον αναλυτή ADVIA Centaur της εταιρίας Siemens. Τα φυσιολογικά όρια των παραπάνω ορμονών και βιοχημικών δεικτών αναγράφονται στον ακόλουθο πίνακα.

	Ελάχιστη Φυσιολογική Τιμή	Μέγιστη Φυσιολογική Τιμή
TSH (mIU/L)	0.27	4.2
FREE T4 (ng/dL)	0.93	1.7
PRL (ng/ml)	4.04	17
TESTO (ng/dL)	241	827
FSH(IU/L)	1.5	12.4
Γλυκόζη(mg/dL)	74	106
Ομοκυστεΐνη(μmol/L)	6	14

Πίνακας 3.1. Ελάχιστη και μέγιστη φυσιολογική τιμή ορμονών, γλυκόζης και ομοκυστεΐνης.

Μικροβιολογικός έλεγχος

Τα δείγματα σπέρματος υποβλήθηκαν σε έλεγχο για χλαμύδια, ουρεάπλασμα και μυκόπλασμα μέσω της τεχνική PCR από το Διαγνωστικό Εργαστήριο «μικροσκόπηση». Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε αερόβια και αναερόβια καλλιέργεια από Βιοπαθολογικό Εργαστήριο «Γονιδιωματική-Genelabs».

Στατιστική Ανάλυση

Στην παρούσα μελέτη, Τα δεδομένα που συγκεντρώθηκαν κατηγοριοποιήθηκαν σε ποσοτικές και ποιοτικές μεταβλητές. Για τις ποσοτικές μεταβλητές, έγινε έλεγχος κανονικότητας με βάση το στατιστικό έλεγχο Kolmogorov – Smirnov. Η μηδενική υπόθεση είναι ότι η κατανομή της μεταβλητής είναι κανονική, έναντι της εναλλακτικής που είναι ότι η κατανομή της μεταβλητής δεν είναι κανονική. Για τις ποιοτικές μεταβλητές ως περιγραφικά στατιστικά μέτρα χρησιμοποιήθηκαν η απόλυτη συχνότητα (n) και η σχετική συχνότητα (%).

Για τον έλεγχο ύπαρξης στατιστικά σημαντικής σχέσης ανάμεσα σε μια ποσοτική μεταβλητή και σε μια ποιοτική με δύο κατηγορίες, χρησιμοποιήθηκε η στατιστική δοκιμασία του Mann-Whitney (Wilcoxon Rank Sum Test). Στις περιπτώσεις που η κατανομή δεν ήταν κανονική, δόθηκαν η διάμεσος (Median) και το ενδοτεταρτημοριακό (IQR) εύρος. Για τον έλεγχο ύπαρξης στατιστικά σημαντικής σχέσης ανάμεσα σε δύο ποιοτικές μεταβλητές, χρησιμοποιήθηκε το X^2 του Pearson. Η μηδενική υπόθεση του στατιστικού κριτηρίου αυτού είναι πως δεν υπάρχει καμία συσχέτιση ανάμεσα στις δύο μεταβλητές. Για την εφαρμογή του κριτηρίου αυτού θα πρέπει να ισχύουν οι εξής προϋποθέσεις: α) οι αναμενόμενες συχνότητες σε όλα τα κελιά να είναι μεγαλύτερες του 5, ή β) όλες οι αναμενόμενες τιμές να είναι μεγαλύτερες του 1 και το πολύ 20% από αυτές να είναι μικρότερες του 5.

Το στατιστικό πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε είναι το IBM SPSS® Software v20. Ως επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε το $p<0.05$. Για $0.5<p<0.1$ οι διαφορές χαρακτηρίστηκαν ως οριακά στατιστικά σημαντικές.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Χαρακτηριστικά του πληθυσμού της μελέτης

Στην παρούσα μελέτη συμμετείχαν 16 άνδρες, ηλικίας 31 με 68 έτη. Οι συμμετέχοντες υποβλήθηκαν σε χρωμοσωμικό έλεγχο και όπως διαπιστώθηκε όλοι είχαν φυσιολογικό καρυότυπο άρρενος, δηλαδή 46 XY. Επίσης, πραγματοποιήθηκε PCR για τον έλεγχο της μετάλλαξης ΔF508 της κυστικής ίνωσης, η οποία δεν ανιχνεύθηκε σε κανένα από τα δείγματα.

	Σύνολο – 16							
	n	**Mean**	**SD**	**Min**	**0.25**	**Median**	**0.75**	**Max**
Οξειδωτικό Στρες ($mV/10^6$ sperm/ml)	16	11.5	21.9	0	1	2.7	9.3	84.9
Όγκος (ml)	16	3	2.2	0.8	1.6	2	3.2	8
Συγκέντρωση ($x10^6$/ml)	16	28.2	41.4	0.6	1.8	13.5	30.8	150
Α κίνηση (%)	16	6.1	6.1	0	0	5	10.8	15
Α + Β κίνηση (%)	16	34.3	45.3	0.6	2.4	18.5	41.5	165
Ηλικία (έτη)	16	40.1	8.8	31	34.8	37.5	42.8	68
Κάπνισμα (τσιγάρα/ημέρα)	16	5.9	9.2	0	0	0	10	30
Αλκοόλ (μονάδες/εβδόμαδα)	16	1.7	2.6	0	0	1	2	10
BMI	16	29.5	4.1	24.8	26.5	28.4	31.8	37.7
Γλυκόζη (mg/dL)	16	92.7	19.4	74	80	89.5	94.2	150
TSH (mIU/L)	15	1.9	1.3	0	1.2	1.5	2.2	5.6
FREE T4 (ng/ dL)	15	1.3	0.2	0.9	1.2	1.3	1.4	2
FSH (IU/L)	15	8.8	6.7	2.4	4.4	6.1	11.6	23.5
TESTO (ng /dL)	15	407	119.2	239.3	307	408	464.5	661.7
PRL (ng/ml)	15	10.5	5.5	4.7	7.2	8.7	11.3	26.6
Ομοκυστεΐνη (μmol/L)	16	17.2	4.5	10.3	14.4	16.9	18.3	29.3

Πίνακας 4.1. Περιγραφικά χαρακτηριστικά του συνόλου των δειγμάτων.

Στον πίνακα 4.1, παρουσιάζονται η μέση τιμή (Mean), η τυπική απόκλιση(SD), η διάμεσος (Median), η ελάχιστη (Min) και μέγιστη (Max) τιμή, το πρώτο (0.25) καθώς και το τρίτο τεταρτημόριο (0.75) για κάθε μεταβλητή που μελετήθηκε στο σύνολο του πληθυσμού της έρευνας μας.

Η καταμέτρηση του οξειδοαναγωγικού στρες πραγματοποιήθηκε με το σύστημα MiOXSYS ANALYSER. Το σύνολο των δειγμάτων χωρίστηκε σε δυο ομάδες με κριτήριο το οξειδωτικό στρες προκειμένου να πραγματοποιηθεί η στατιστική επεξεργασία. Η πρώτη ομάδα αποτελείται από άνδρες με φυσιολογικές τιμές οξειδωτικού στρες, δηλαδή από 0.01 έως και 1.34 mV / 10^6 sperm / ml. Αντίθετα, η δεύτερη ομάδα αποτελείται από άνδρες με αυξημένο οξειδωτικό στρες, δηλαδή μεγαλύτερο του 1.34 mV / 106 sperm / ml (Agarwal A et al., 2019). Από τα αποτελέσματα προέκυψαν 11 άτομα με αυξημένο οξειδωτικό στρες, 4 άτομα με φυσιολογικά επίπεδα καθώς και 1 άτομο με αναγωγικό στρες. Στη συνέχεια, οι δύο ομάδες συγκρίθηκαν μεταξύ τους ως προς την ηλικία, το κάπνισμα, την κατανάλωση αλκοόλ, το BMI, τα επίπεδα γλυκόζης και ομοκυστεΐνης στο αίμα. Επιπλέον, μελετήθηκε το ορμονικό προφίλ, η ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών καθώς και τα χαρακτηριστικά του σπέρματος σε καθεμία από αυτές.

Συσχέτιση του οξειδωτικού στρες με την ηλικία, το κάπνισμα, την κατανάλωση αλκοόλ και το BMI

Προκειμένου να αναλύσουμε τα δεδομένα χωρίσαμε τους άνδρες σε τρεις ηλικιακές ομάδες. Με βάση τα αποτελέσματα μας το 54.6%, δηλαδή η πλειοψηφία των ανδρών με αυξημένο οξειδωτικό στρες, είναι άνω των 40 ετών. Για τους άνδρες με φυσιολογικό οξειδωτικό στρες το αντίστοιχο ποσοστό αγγίζει το 25%. Ωστόσο, η διαφορά αυτή δεν θεωρείται στατιστικά σημαντική ($p=0.754$).

Ταυτόχρονα, παρατηρείται ότι μόνο το 27.3% με αυξημένο οξειδωτικό στρες είναι καπνιστές ενώ αντίστοιχα το 50% των ανδρών με φυσιολογικές τιμές δηλώνει ότι καπνίζει. Επιπλέον, το 54.5% των ατόμων με αυξημένο οξειδωτικό στρες και το 75% των ατόμων με φυσιολογικό οξειδωτικό στρες καταναλώνει αλκοόλ. Αναλύοντας όμως στατιστικά τα δεδομένα προκύπτει ότι δεν υπάρχει σχέση του οξειδωτικού στρες με τις μεταβλητές του καπνίσματος ($p=0.560$) και της κατανάλωσης αλκοόλ ($p=0.604$), καθώς $p>0.05$ για κάθε περίπτωση.

Για την συσχέτιση του οξειδωτικού στρες με το BMI το δείγμα χωρίστηκε σε 3 ομάδες. Η πρώτη ομάδα αποτελείται από τα άτομα με φυσιολογικό BMI (BMI<25), τους υπέρβαρους

(25<BMI<30) και τους παχύσαρκους (BMI>30). Το μεγαλύτερο ποσοστό των ανδρών με αυξημένο οξειδωτικό στρες φαίνεται να είναι υπέρβαροι (45,5%) ή παχύσαρκοι (36,4%). Επίσης, το ποσοστών των ατόμων που έχουν οξειδωτικό στρες και είναι παχύσαρκοι φαίνεται να είναι μεγαλύτερο από εκείνων με φυσιολογικό. Παρ' όλα αυτά, δε βρέθηκε να υπάρχει στατιστικά σημαντική σχέση ανάμεσα στο BMI και το οξειδωτικό στρες (p=1).

	Σύνολο **n = 15**	**Φυσιολογικό Οξειδωτικό Στρες** **n = 4**	**Αυξημένο Οξειδωτικό Στρες** **n = 11**	**p-value**
Ηλικιακή ομάδα	**n (%)**	**n (%)**	**n (%)**	0.754
30-34	4 (26.7)	1 (25.0)	3 (27.3)	
35-39	4 (26.7)	2 (50.0)	2 (18.2)	
40+	7 (46.6)	1 (25.0)	6 (54.6)	
Κάπνισμα	**n (%)**	**n (%)**	**n (%)**	0.56
Όχι	9 (60.0)	2 (50.0)	8 (72.7)	
Ναι	6 (40.0)	2 (50.0)	3 (27.3)	
Κατανάλωση αλκοόλ	**n (%)**	**n (%)**	**n (%)**	0.604
Όχι	6 (40.0)	1(25.0)	5 (45.5)	
Ναι	9 (60.0)	3(75.0)	6 (54.5)	
BMI	**n (%)**	**n (%)**	**n (%)**	1
Παχύσαρκοι	5 (47.0)	1 (25.0)	4 (36.4)	
Υπέρβαροι	7 (33.0)	2 (50.0)	5 (45.5)	
Φυσιολογικοί	3 (20.0)	1 (25.0)	2 (18.2)	

Pearson's chi-squared test

Πίνακας 4.2. Συσχέτιση της ηλικίας, του καπνίσματος, της κατανάλωσης αλκοόλ και του δείκτη μάζας σώματος με το οξειδωτικό στρες.

Συσχέτιση του οξειδωτικού στρες με τα επίπεδα γλυκόζης και ομοκυστεΐνης

Στην συνέχεια, συγκρίθηκαν τα επίπεδα της ομοκυστεΐνης και της γλυκόζης πλάσματος μεταξύ ανδρών με φυσιολογικό και αυξημένο οξειδωτικό στρες. Όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στις διάμεσες τιμές της ομοκυστεΐνης μεταξύ των δύο ομάδων (p=0.043). Για την περίπτωση της γλυκόζης όμως η αντίστοιχη διαφορά μπορεί να χαρακτηριστεί ως οριακά στατιστικά σημαντική (p=0.089). Έτσι, σύμφωνα με τα ευρήματα της παρούσας μελέτης, οι άνδρες με αυξημένο στρες τείνουν να έχουν στο αίμα τους χαμηλότερα επίπεδα ομοκυστεΐνης και γλυκόζης από εκείνους με φυσιολογικό οξειδωτικό στρες.

	Φυσιολογικό Οξειδωτικό Στρες n=4		**Αυξημένο Οξειδωτικό Στρες n=11**		**p-value**
	Διάμεσος	IQR*	Διάμεσος	IQR*	
Γλυκόζη	100.5	92.2 - 110.2	87	76 - 92.4	**0.089**
Ομοκυστεΐνη	18.4	17.9- 19	15.5	13.2- 17.4	**0.043**

*IQR: Ενδοτεταρτημοριακό Εύρος
Mann-Whitney Test

Πίνακας 4.3. Συσχέτιση επιπέδων γλυκόζης με το οξειδωτικό στρες

Επιπλέον, ελέγξαμε την πιθανή ύπαρξη σχέσης της υπερομοκυστεΐναιμίας και της υπεργλυκαιμίας με το οξειδωτικό στρες. Στην περίπτωση των ανδρών με υπερομοκυστεΐναιμία, τα επίπεδα ομοκυστεΐνης στο αίμα είναι μεγαλύτερα του 12μmol/L. Αντίστοιχα, για τους άνδρες με υπεργλυκαιμία, τα επίπεδα της γλυκόζης παίρνουν τιμή μεγαλύτερη του 106 mg/dL. Όπως προκύπτει από τη στατιστική ανάλυση το οξειδωτικό στρες δεν συνδέεται ούτε με την υπερομοκυστεΐναιμία (p=1) ούτε με την υπεργλυκαιμία (p=0.561).

	Σύνολο n = 15	Φυσιολογικό Οξειδωτικό Στρες n = 4	Αυξημένο Οξειδωτικό Στρες n = 11	p-value
Υπερομοκυστεΐναιμία	**n (%)**	**n (%)**	**n (%)**	1
Ναι	14 (93.3)	4 (100.0)	10 (90.9)	
Όχι	1 (6.7)	0 (0.0)	1 (9.1)	
Υπεργλυκαιμία	**n (%)**	**n (%)**	**n (%)**	0.516
Ναι	3 (20.0)	2 (50.0)	1 (9.1)	
Όχι	12 (80.0)	2 (50.0)	10 (90.9)	

Pearson's chi-squared test

Πίνακας 4.4. Συσχέτιση της υπερομοκυστεΐναιμίας και υπεργλυκαιμίας με το οξειδωτικό στρες.

Συσχέτιση του οξειδωτικού στρες με την ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών στο σπέρμα

Τα δείγματα σπέρματος υποβλήθηκαν σε έλεγχο για χλαμύδια, ουρεάπλασμα και μυκόπλασμα μέσω της τεχνική PCR. Τα αποτελέσματα όμως ήταν αρνητικά και για τους τρεις μικροοργανισμούς για όλους τους άνδρες που συμμετείχαν στην μελέτη. Ταυτόχρονα, πραγματοποιήθηκε αερόβια και αναερόβια καλλιέργεια από το δείγμα σπέρματος με σκοπό τον εντοπισμό πιθανών παθογόνων μικροοργανισμών που είναι ικανοί να προκαλέσουν λοίμωξη στο ουρογεννητικό σύστημα του άντρα. Από τα αποτελέσματα των καλλιεργειών προέκυψε **ο πίνακας 4.5**. Σύμφωνα με αυτόν, στο 56.25% του συνολικού πληθυσμού της μελέτης δεν ανευρέθηκε κάποιο παθογόνο κατά την αερόβια και αναερόβια καλλιέργεια. Σε ορισμένες περιπτώσεις όμως ανιχνεύθηκαν οι μικροοργανισμοί *Escherichia coli* (18,75%), *Enterococcus faecalis* (6,25%), *Klebsiella pneumoniae* (6,25%) και *Staphylococcus aureus* (12,50%). Έτσι, εξετάσθηκε αν η μόλυνση από κάποιο παθογόνο είναι ικανή να επηρεάσει το οξειδωτικό στρες.

	Συχνότητα (n)	Ποσοστό (%)
Αρνητικό	9	56.25
Escherichia coli	3	18.75
Enterococcus faecalis	1	6.25
Klebsiella pneumoniae	1	6.25
Staphylococcus aureus	2	12.50
Σύνολο	**16**	**100.00**

Πίνακας 4.5. Ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών από δείγμα σπέρματος ανδρών

Το χαμηλό ποσοστό ανίχνευσης του κάθε μικροοργανισμού δεν μας επιτρέπει να μελετήσουμε τη σχέση του οξειδωτικού στρες με τον καθένα ξεχωριστά. Για το λόγο αυτό ελέγχθηκε η πιθανή ύπαρξη σχέσης ανεξαρτήτως παθογόνου. Όπως φαίνεται στον πίνακα 4.6, στο 75% των ατόμων με φυσιολογικό στρες παρατηρείται η ανάπτυξη κάποιου παθογόνου κατά την αερόβια και αναερόβια καλλιέργεια. Αντίθετα, μόνο το 27.3% των ανδρών με αυξημένα επίπεδα οξειδωτικού στρες ανήκει στην αντίστοιχη κατηγορία. Παρ' όλα αυτά, δεν βρέθηκε να υπάρχει κάποια στατιστικά σημαντική σχέση μεταξύ του οξειδωτικού στρες και της ανάπτυξης παθογόνων μικροοργανισμών και η πιθανότητα αυτές οι διαφορές να οφείλονται στην τύχη δεν μπορεί να απορριφθεί (p=0.235).

	Σύνολο n = 16	**Φυσιολογικό Οξειδωτικό Στρες** n = 4	**Αυξημένο Οξειδωτικό Στρες** n = 11	**p-value**
Ανάπτυξη Μικροοργανισμού	**n (%)**	**n (%)**	**n (%)**	0.235
Όχι	9 (56.3)	1 (25.0)	8 (72.7)	
Ναι	7 (43.8)	3 (75.0)	3 (27.3)	

Pearson's chi-squared test

Πίνακας 4.6. Συσχέτιση της ανάπτυξης παθογόνου μικροοργανισμού στο σπέρμα ανδρών με το οξειδωτικό στρες

Συσχέτιση του οξειδωτικού στρες με το ορμονικό προφίλ

	Φυσιολογικό Οξειδωτικό Στρες n=4		Αυξημένο Οξειδωτικό Στρες n=11		p-value
	Διάμεσος	IQR*	Διάμεσος	IQR*	
TSH	1.6	1.4 - 2.7	1.4	1 - 2.1	0.621
FREE T4	1.4	1.3 - 1.4	1.3	1.2 - 1.4	0.396
FSH	3.8	2.6 - 5.2	9.2	5.6 - 15.2	**0.040**
TESTO	407.2	326.1 - 459.9	421.2	337.8 - 480.5	0.525
PRL	8	7 - 9.2	9.6	8 - 13.9	0.289

*IQR: Ενδοτεταρτημοριακό Εύρος
Mann-Whitney Test

Πίνακας 4.7. Συσχέτιση επιπέδων ορμονών ανδρών με το οξειδωτικό στρες

Με την χρήση της κατάλληλων μεθόδων φθορισμού, υπολογίστηκαν τα επίπεδα της θυρεοτρόπου ορμόνης (TSH), της ελεύθερης θυροξίνης (FREE T4),της ωοθυλακιοτρόπου ορμόνης (FSH), της ολική τεστοστερόνη (TESTO) και της προλακτίνης (PRL) στον ορό του αίματος του κάθε συμμετέχον. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά των δύο υπό εξέταση ομάδων για τις TSH (p=0.621), FREE T4 (p=0.396), προλακτίνη (p=0.289) και τεστοστερόνη (p=0.525). Αντίθετα, προκύπτει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των διάμεσων τιμών στην περίπτωση της FSH(p=0.04). Ως εκ τούτου, οι άνδρες με υψηλότερα επίπεδα FSH φαίνεται να έχουν οξειδωτικό στρες.

Συσχέτιση του οξειδωτικού στρες με τα χαρακτηριστικά του σπέρματος

Στα πλαίσια της διερεύνησης της επίδρασης του οξειδωτικού στρες στην ανδρική υπογονιμότητα, ελέγχθηκε η πιθανή ύπαρξη σχέσης του οξειδωτικού στρες με τα χαρακτηριστικά του σπέρματος, όπως αυτά προέκυψαν από το σπερμοδιάγραμμα με βάση τις συστάσεις του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας. Τα χαρακτηριστικά που περιγράφονται παρακάτω είναι ο όγκος, η συγκέντρωση των σπερματοζωαρίων καθώς και η ζωηρή και η συνολική προωθητική κίνηση τους.

	Φυσιολογικό Οξειδωτικό Στρες n=4		**Αυξημένο Οξειδωτικό Στρες n=11**		**p-value**
	Διάμεσος	IQR*	Διάμεσος	IQR*	
Όγκος (ml)	2.4	1.7 - 3.8	2	1.6 - 3.2	0.948
Συγκέντρωση (x 10^6)	71	38.8 - 110.2	2.6	1 - 13.5	**0.011**
α κίνηση	14	11.2 - 15	0	0 - 5.5	**0.012**
(α + β) κίνηση	80.5	52.2 - 118.5	3	1.5 - 18.5	**0.007**

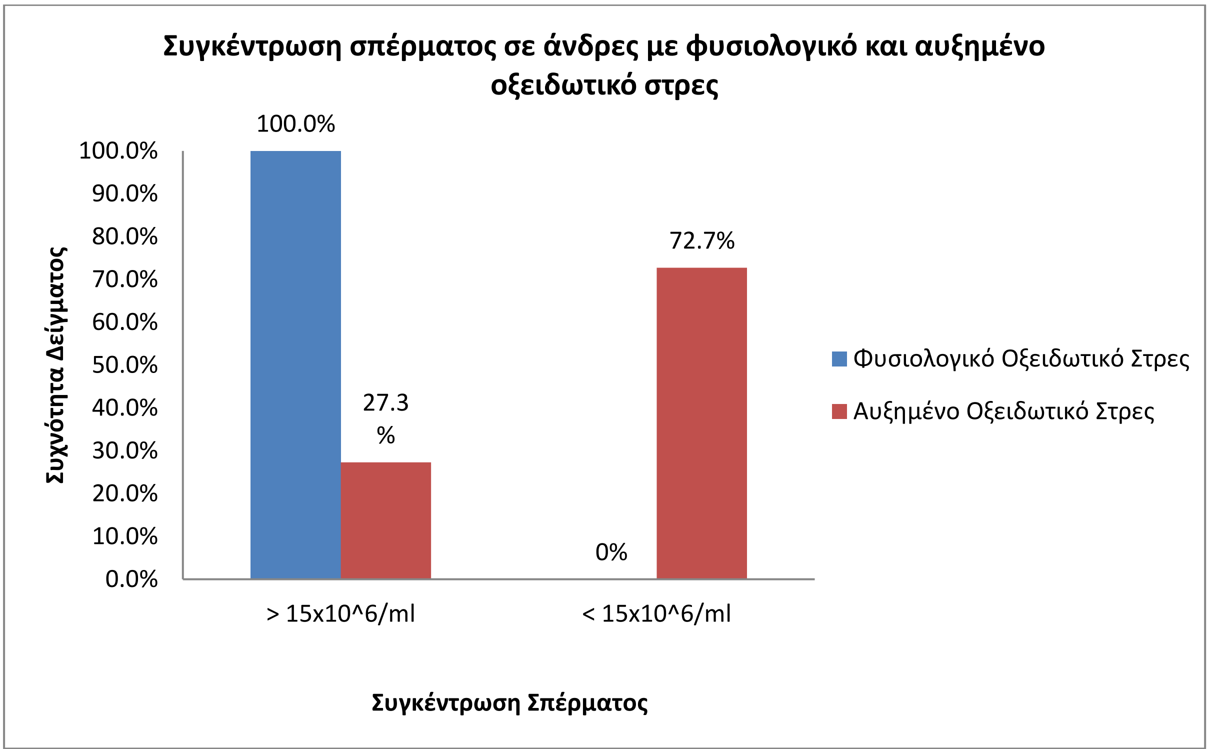
*IQR: Ενδοτεταρτημοριακό Εύρος
Mann-Whitney Test

Πίνακας 4.8 Σύγκριση των παραμέτρων του σπέρματος ανδρών με φυσιολογικό και αυξημένο οξειδωτικό στρες

Με βάση τα αποτελέσματα η διάμεσος της συγκέντρωσης, του αριθμού σπερματοζωαρίων με ζωηρή προωθητική κίνηση (α) καθώς και εκείνων με συνολική προωθητικής κίνησης (α + β) διαφέρει στατιστικά σημαντικά μεταξύ των δύο ομάδων ανδρών διότι p=0.011, p=0.012 και p=0.007 αντίστοιχα. Ωστόσο, στον όγκο δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στο φυσιολογικό και αυξημένο οξειδωτικό στρες (p=0.948). Ως εκ τούτου, τα άτομα με αυξημένες τιμές οξειδωτικού στρες τείνουν να έχουν μικρότερη συγκέντρωση σπέρματος και λιγότερα σπερματοζωάρια με ζωηρή και συνολική προωθητική κίνηση.

Κατανομές ποσοστών συγκέντρωσης, ζωηρής και συνολική προωθητικής κίνησης του σπέρματος με βάση το οξειδωτικό στρες

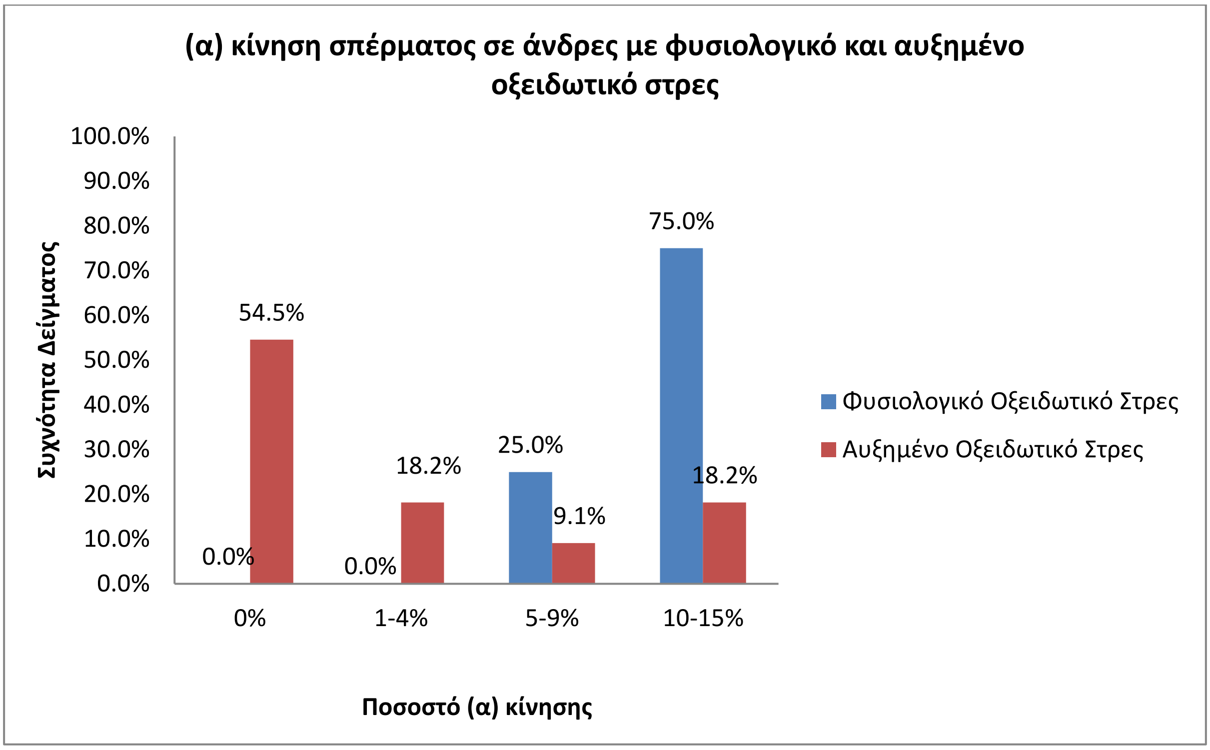
Προκειμένου να κατανοήσουμε καλυτέρα τις διαφορές στα χαρακτηριστικά του σπέρματος καθώς και την κλινική τους σημασία, υπολογίσθηκαν τα αντίστοιχα ποσοστά και συγκρίθηκαν μεταξύ των δύο ομάδων.



Γράφημα 4.1. Συγκέντρωση σπέρματος σε άνδρες με φυσιολογικό και αυξημένο οξειδωτικό στρες. (Α) Άνδρες με φυσιολογική συγκέντρωση σπέρματος (>15Χ10^6/ml). (Β) Άνδρες με μειωμένη συγκέντρωση σπέρματος (<15Χ10^6/ml).

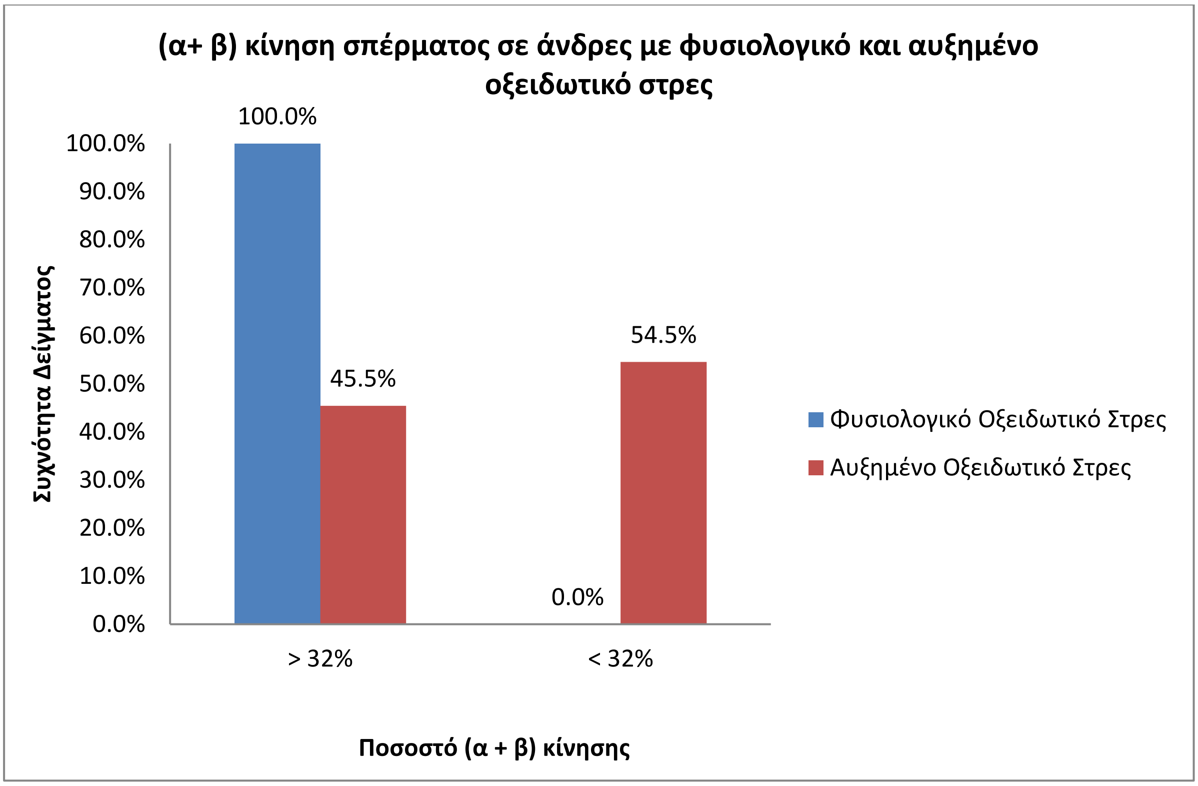
Όπως απεικονίζεται στο γράφημα 4.1, όλοι οι άνδρες με φυσιολογικές τιμές στρες είχαν και φυσιολογική συγκέντρωση, δηλαδή μεγαλύτερη από 15 x 10^6 σπερματοζωάρια ανά ml. Αντίθετα, παρατηρήθηκε συγκέντρωση χαμηλότερη του φυσιολογικού συγκέντρωση για το 72.7% των αντρών που είχαν οξειδωτικό στρες. Επομένως, όσοι έχουν μειωμένη συγκέντρωση σπέρματος είναι πιο πιθανό να έχουν οξειδωτικό στρες.

Στην συνέχεια, στο γράφημα 4.2, παρουσιάζεται η κατανομή της ζωηρής προωθητικής κίνησης των σπερματοζωαρίων στις δύο ομάδες. Παρατηρείται λοιπόν ότι στα άτομα με καθόλου (α) κίνηση βρέθηκε οξειδωτικό στρες σε ποσοστό 54.5% ενώ το αντίστοιχο ποσοστό ανδρών με φυσιολογικό στρες είναι 0%. Ομοίως, κανένας άνδρας με φυσιολογικά επίπεδα στρες δεν βρέθηκε στην κατηγορία με ποσοστό (α) κίνησης 1-4%. Αντίθετα, βρέθηκε ότι η (α) κίνηση κυμαίνεται μεταξύ 5-9% για το 25% των ανδρών με φυσιολογικό οξειδωτικό στρες και μεταξύ 10-15% για το 75% αυτής της ομάδας. Επομένως, όσοι έχουν χαμηλά ποσοστά (α) κίνησης είναι πιθανότερο να έχουν και οξειδωτικό στρες.



Γράφημα 4.2. Ζωηρή προωθητική κίνηση σπέρματος (α κίνηση) σε άνδρες με φυσιολογικό και αυξημένο οξειδωτικό στρες ως προς τη. (Α) Άνδρες με 0% (α) κίνηση. (Β) Άνδρες με 1-4% (α) κίνηση. (Γ) Άνδρες με 5-9% (α) κίνηση. (Δ) Άνδρες με 10-15% (α) κίνηση.

Τέλος, σύμφωνα με το γράφημα 4.3, όλοι οι άνδρες με φυσιολογικό οξειδωτικό στρες έχουν φυσιολογική συνολική προωθητική κίνηση, δηλαδή μεγαλύτερη από το 32% της ολικής (α +β) κινητικότητας των σπερματοζωαρίων σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας. Ωστόσο, στους άνδρες με αυξημένο οξειδωτικό στρες το αντίστοιχο ποσοστό ανέρχεται στο 45.5% ενώ το 54.6% παρουσίαζε μειωμένη συνολική προωθητική κίνηση. Άρα οι άνδρες με μειωμένη συνολική κινητικότητα είναι πιο πιθανό να έχουν και οξειδωτικό στρες.



Γράφημα 4.3. Ποσοστά ανδρών με φυσιολογικό και αυξημένο οξειδωτικό στρες ως προς τη συνολική προωθητική κίνηση σπέρματος (α+ β κίνηση). (Α) Άνδρες με φυσιολογική (α + β) κίνηση (>32% της ολικής κινητικότητας των σπερματοζωαρίων). (Β) Άνδρες με μειωμένη (α + β) κίνηση (<32% της ολικής κινητικότητας των σπερματοζωαρίων).

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Είναι γεγονός ότι η υπογονιμότητα απασχολεί αρκετά ζευγάρια παγκοσμίως (Agarwal, et al., 2015). Οι μισές από τις περιπτώσεις μάλιστα οφείλονται στον ανδρικό παράγοντα (Katz et al., 2017) και η αιτιολογία μπορεί να ποικίλει (Dimitriadis et al.,2017). Σήμερα είναι γνωστό ότι ένα σπέρμα με φυσιολογικές παραμέτρους, όπως αυτές ορίζονται από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, δεν θεωρείται από μόνο του αρκετό για την θετική έκβαση μιας προσπάθειας υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (Smit M et al., 2007; Cohen-Bacrie P et al.2009). Εξάλλου ένας άνδρας μπορεί να χαρακτηριστεί ως υπογόνιμος με κριτήριο την μειωμένη ικανότητα γονιμοποίησης και τις μη φυσιολογικές παραμέτρους του σπέρματος του. Τα τελευταία χρόνια δεδομένα αποδεικνύουν ότι το οξειδωτικό στρες αποτελεί παράγοντα-κλειδί στην ανδρική γονιμότητα. Αρκετές από τις αιτίες πίσω από την ανδρική υπογονιμότητα φαίνεται να είναι συνδεδεμένες με το οξειδωτικό στρες. Ως εκ τούτου, εξακρίβωση της εμπλοκής ορισμένων εξ αυτών στο οξειδωτικό στρες αποτελεί σημείο μείζονος ενδιαφέροντος.

Στην παρούσα μελέτη διερευνήσαμε την πιθανή συσχέτιση του οξειδωτικού στρες του σπέρματος με τον τρόπο ζωής καθώς και γενετικές, μικροβιολογικές και ορμονικές παραμέτρους που επηρεάζουν την ανδρική υπογονιμότητα. Επιπρόσθετα, εξετάσαμε τα χαρακτηριστικά του σπέρματος όπως ο όγκος, η συγκέντρωση και η κινητικότητα των σπερματοζωαρίων, ως προς το οξειδωτικό στρες.

Έχει αποδειχθεί ότι ο τρόπος ζωής έχει συνδεθεί με διάφορες παθήσεις στον ανθρώπινο οργανισμό. Για την περίπτωση του σπέρματος, προηγούμενες έρευνες έχουν συσχετίσει το κάπνισμα και την κατανάλωση αλκοόλ με αυξημένο οξειδωτικό στρες (Aboulmaouahib et al.,2018). Ωστόσο στα αποτελέσματα μας δεν βρέθηκε κάποια στατιστικά σημαντική σχέση όσο αναφορά τις παραπάνω μεταβλητές. Στη συνέχεια, μελετήσαμε την πιθανή σύνδεση του BMI με το οξειδωτικό στρες αφού χωρίσαμε τους άνδρες του δείγματος σε 3 κατηγορίες. Δεν προέκυψε καμία σημαντική διαφορά μεταξύ των ατόμων φυσιολογικού δείκτη, υπέρβαρων και παχύσαρκων, μολονότι η πλειοψηφία των ατόμων με αυξημένο οξειδωτικό στρες ανήκε στις τελευταίες δύο κατηγορίες. Τα αποτελέσματα μας δεν φαίνεται να συμφωνούν με τον Han et al, 2018, ο οποίος υπέδειξε θετική συσχέτιση του BMI με τις ROS σε πληθυσμό 138 ανδρών. Επίσης, σε παλαιότερη μελέτη, άνδρες άνω των 40 ετών παρουσίασαν στατιστικά υψηλότερα επίπεδα οξειδωτικής βλάβης στο DNA σπέρματος σε σύγκριση με τους νεότερους άνδρες (Koh et al.,2016). Παρόλο που βρέθηκε ότι το 54.6%, των ανδρών με αυξημένο οξειδωτικό στρες είναι άνω των 40 ετών, έναντι του αντίστοιχου 25% εκείνων με φυσιολογικά επίπεδα, η ηλικία του πατέρα δεν βρέθηκε να σχετίζεται με το οξειδωτικό στρες. Πιθανώς τα παραπάνω γεγονότα να οφείλονται στο μικρό μέγεθος του πληθυσμού της μελέτης μας.

Διάφορες παθήσεις έχουν ενοχοποιηθεί για αύξηση του οξειδωτικού στρες. Μεταξύ αυτών, ο σακχαρώδης διαβήτης, ο οποίος χαρακτηρίζεται από συσσώρευση λιπαρών οξέων και υπεργλυκαιμία, τα οποία είναι ικανά να προκαλέσουν συσσώρευση ROS σύμφωνα με την βιβλιογραφία (Valko et al.,2007; Du et al., 2001). Πρόσφατη έρευνα παρουσιάζει απουσία σχέσης μεταξύ της γλυκόζης και των ROS (Abbasihormozi et al.,2019). Στη δική μας μελέτη, συγκρίνοντας τα επίπεδα γλυκόζης, προκύπτει οριακά στατιστική διαφορά με τους άνδρες με αυξημένο οξειδωτικό στρες να έχουν χαμηλότερα επίπεδα σε σχέση με εκείνους που έχουν φυσιολογικό. Επίσης, δεν βρέθηκε κάποια σχέση μεταξύ υπεργλυκαιμίας και οξειδωτικού στρες. Αντίθετα, οι Rolo et al. υποστηρίζουν ότι μπορεί να υπάρχει αυξημένη παραγωγή μιτοχονδριακών ROS μετά από υπεργλυκαιμία. Τα μη αναμενόμενα αποτελέσματα ίσως να οφείλονται στο μικρό δείγμα, στη δυσκολία της ώρας για αιμοληψία νηστείας και το χαμηλό ποσοστό ανδρών με αυξημένα επίπεδα γλυκόζης σε σχέση με αυτούς που είχαν φυσιολογικά.

Ομοίως, εξετάσαμε τα επίπεδα της ομοκυστεΐνης στο ορό του αίματος για τις δύο ομάδες. Από την ανάλυση προέκυψε πως στους άνδρες με οξειδωτικό στρες η ομοκυστεΐνη κυμαίνεται σε χαμηλότερα επίπεδα αλλά δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική σχέση μεταξύ οξειδωτικού στρες και υπερομοκυστεϊναιμίας. Ωστόσο, διαφορετικά συμπεράσματα εξάγονται από άλλες έρευνες, οι οποίες υποδεικνύουν την ύπαρξη σχέσης και μάλιστα τη θετική συσχέτιση των επιπέδων της ομοκυστεΐνης με τον δείκτη κατακερματισμού του DNA των σπερματοζωαρίων (Liu et al., 2017; Haihong et al., 2017; Halim et al., 2014). Οι παραπάνω διαφορές πιθανά να οφείλονται στο γεγονός ότι το ποσοστό των ατόμων με φυσιολογικά επίπεδα ομοκυστεΐνης στον υπό μελέτη πληθυσμό ήταν πολύ χαμηλό.

Αρκετοί παθογόνοι μικροοργανισμοί μπορεί να προκαλέσουν μια οξεία φλεγμονώδη απόκριση με εισροή λευκοκυττάρων στο γεννητικό σύστημα και ως συνέπεια την αύξηση της παραγωγής ROS (Agarwal et al., 2018). Όμως, στην παρούσα εργασία, δεν βρέθηκε κάποια στατιστικά σημαντική σχέση μεταξύ του οξειδωτικού στρες και της ανάπτυξης παθογόνων μικροοργανισμών. Πιθανά αυτό να οφείλεται ότι μικρό δείγμα της μελέτης.

Δεδομένου ότι διαταραχές του άξονα υποθάλαμος-υπόφυση-όρχεις είναι ικανές να έχουν αντίκτυπο στην γονιμότητα του άνδρα (Clavijo and Hsiao, 2018). Για το λόγο αυτό εξετάστηκαν πιθανές διαφορές στα επίπεδα ορμονών μεταξύ των δύο ομάδων. Η βιβλιογραφία που έχει μελετήσει την πιθανή συσχέτιση των ορμονών με τα επίπεδα των ROS στο σπέρμα είναι περιορισμένη. Σύμφωνα με τα δεδομένα μας, δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά των TSH, FREE T4, προλακτίνης και τεστοστερόνης στις δύο υπό εξέταση ομάδες. Αντίθετα, προκύπτει στατιστικά σημαντική διαφορά των διάμεσων τιμών στην περίπτωση της FSH ($p=0.04$). Έτσι καταλήξαμε ότι οι άνδρες με υψηλότερα επίπεδα FSH φαίνεται να έχουν οξειδωτικό στρες. Τα αποτελέσματα μας φαίνεται να επιβεβαιώνονται από τους Arafa et al. 2019, οποίοι απέδειξαν θετική συσχέτιση της FSH με τις τιμές του ORP και ταυτόχρονη απουσία σχέσης με την προλακτίνη και την τεστοστερόνη. Ορισμένες μελέτες έχουν συσχετίσει τις παραπάνω ορμόνες του θυρεοειδούς αλλά με διαφορετικού δείκτες οξειδωτικού στρες (Dobrzyńska et al., 2004; Alahmar A et al., 2019).

Τέλος, στην παρούσα εργασία δείξαμε ότι τα άτομα με αυξημένο οξειδωτικό στρες έχουν μικρότερη συγκέντρωση σπέρματος και λιγότερα σπερματοζωάρια με ζωηρή και συνολική προωθητική κίνηση ενώ δεν βρέθηκαν διαφορές όσο αφορά τον όγκο του σπέρματος. Πιο συγκεκριμένα, βρήκαμε ότι άνδρες με συγκέντρωση κατώτερη του φυσιολογικού, χαμηλή ζωηρή προωθητική κίνηση και χαμηλή συνολική προωθητική κίνηση είναι πιο πιθανό να έχουν αυξημένο οξειδωτικό στρες είχαν. Προηγούμενη μελέτη επίσης παρουσιάζει αρνητική συσχέτιση του ORP με την συγκέντρωση, την κινητικότητα αλλά όχι με τον όγκο του σπέρματος (Arafa et al., 2019).

Το παραπάνω γεγονός επιβεβαιώνει ότι το οξειδωτικό στρες επηρεάζει την γονιμότητα του άνδρα. Μελέτες με μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε σαφέστερα συμπεράσματα. Η διάγνωση των παραγόντων που κρύβονται πίσω από το οξειδωτικό στρες είναι απαραίτητη για την αποτροπή της μη αναστρέψιμης βλάβης που μπορεί αυτό να προκαλέσει μακροπρόθεσμα. Επιπλέον, η στοχευμένη διαχείριση και θεραπεία τους θα μπορούσε να βοηθήσει αρκετά από τα ζευγάρια να επιτύχουν το στόχο τους αποκτώντας ένα υγιές παιδί.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Abbasihormozi SH, Babapour V, Kouhkan A, Niasari Naslji A, Afraz K, Zolfaghary Z, Shahverdi AH. Stress Hormone and Oxidative Stress Biomarkers Link Obesity and Diabetes with Reduced Fertility Potential. Cell J. 2019 Oct;21(3):307-313. doi: 10.22074/cellj.2019.6339. Epub 2019 Jun 15. PMID: 31210437; PMCID: PMC6582426.
2. Aboulmaouahib S, Madkour A, Kaarouch I, Sefrioui O, Saadani B, Copin H, Benkhalifa M, Louanjli N, Cadi R. Impact of alcohol and cigarette smoking consumption in male fertility potential: Looks at lipid peroxidation, enzymatic antioxidant activities and sperm DNA damage. Andrologia. 2018 Apr;50(3). doi: 10.1111/and.12926. Epub 2017 Nov 21. PMID: 29164649.
3. Acharya UR, Acharya S, Mishra M. Lead acetate induced cytotoxicity in male germinal cells of Swiss mice. Ind Health. 2003 Jul;41(3):291-4. doi: 10.2486/indhealth.41.291. PMID: 12916762.
4. Agarwal A, Rana M, Qiu E, AlBunni H, Bui AD, Henkel R. Role of oxidative stress, infection and inflammation in male infertility. Andrologia. 2018 Dec;50(11):e13126. doi: 10.1111/and.13126. PMID: 30569652.
5. Agarwal A, Sharma RK, Nallella KP, Thomas AJ Jr, Alvarez JG, Sikka SC. Reactive oxygen species as an independent marker of male factor infertility. Fertil Steril. 2006 Oct;86(4):878-85. doi: 10.1016/j.fertnstert.2006.02.111. PMID: 17027357.
6. Agarwal A, Panner Selvam MK, Arafa M, Okada H, Homa S, Killeen A, Balaban B, Saleh R, Armagan A, Roychoudhury S, Sikka S. Multi-center evaluation of oxidation-reduction potential by the MiOXSYS in males with abnormal semen. Asian J Androl. 2019 Nov-Dec;21(6):565-569. doi: 10.4103/aja.aja_5_19. PMID: 31006711; PMCID: PMC6859659.
7. Agarwal A, Mulgund A, Hamada A, Chyatte MR. A unique view on male infertility around the globe. Reprod Biol Endocrinol. 2015 Apr 26;13:37. doi: 10.1186/s12958-015-0032-1. PMID: 25928197; PMCID: PMC4424520.
8. Agbaje IM, Rogers DA, McVicar CM, McClure N, Atkinson AB, Mallidis C, Lewis SE. Insulin dependant diabetes mellitus: implications for male reproductive function. Hum Reprod. 2007 Jul;22(7):1871-7. doi: 10.1093/humrep/dem077. Epub 2007 May 3. PMID: 17478459.

9. Ahmadi A, Ng SC. Developmental capacity of damaged spermatozoa. Hum Reprod. 1999 Sep;14(9):2279-85. doi: 10.1093/humrep/14.9.2279. PMID: 10469696.
10. Aitken RJ, Buckingham D, West K, Wu FC, Zikopoulos K, Richardson DW. Differential contribution of leucocytes and spermatozoa to the generation of reactive oxygen species in the ejaculates of oligozoospermic patients and fertile donors. J Reprod Fertil. 1992 Mar;94(2):451-62. doi: 10.1530/jrf.0.0940451. PMID: 1317451.
11. Aitken RJ, Clarkson JS. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. J Reprod Fertil. 1987 Nov;81(2):459-69. doi: 10.1530/jrf.0.0810459. PMID: 2828610.
12. Aitken RJ, Clarkson JS. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. J Reprod Fertil. 1987 Nov;81(2):459-69. doi: 10.1530/jrf.0.0810459. PMID: 2828610.
13. Alahmar A., Dutta S., Sengupta P., Thyroid hormones in male reproduction and infertility. Asian Pac J Reprod 2019;8:203-10 doi: 10.4103/2305-0500.268135
14. Angelopoulou R, Kyriazoglou M. Sperm oxidative damage and the role of reactive oxygen species in male infertility. Arch Hellen Med 2005, 22:433–446.
15. Arafa M, Henkel R, Agarwal A, Majzoub A, Elbardisi H. Correlation of oxidation-reduction potential with hormones, semen parameters and testicular volume. Andrologia. 2019 Jun;51(5):e13258. doi: 10.1111/and.13258. Epub 2019 Feb 26. PMID: 30809834.
16. Armstrong JS, Rajasekaran M, Chamulitrat W, Gatti P, Hellstrom WJ, Sikka SC. Characterization of reactive oxygen species induced effects on human spermatozoa movement and energy metabolism. Free Radic Biol Med. 1999 Apr;26(7-8):869-80. doi: 10.1016/s0891-5849(98)00275-5. PMID: 10232830.
17. Balaban RS, Nemoto S, Finkel T. Mitochondria, oxidants, and aging. Cell. 2005 Feb 25;120(4):483-95. doi: 10.1016/j.cell.2005.02.001. PMID: 15734681.
18. Banks S, King SA, Irvine DS, Saunders PT. Impact of a mild scrotal heat stress on DNA integrity in murine spermatozoa. Reproduction. 2005 Apr;129(4):505-14. doi: 10.1530/rep.1.00531. PMID: 15798026.
19. Barták V. Sperm count, morphology and motility after unilateral mumps orchitis. J Reprod Fertil. 1973 Mar;32(3):491-4. doi: 10.1530/jrf.0.0320491. PMID: 4692345.
20. Beretta G. Iatrogenic infertility. In: Cavallini G, Beretta G, editors. Clinical management of male infertility. New York/Dordrecht/London: Springer; 2015. p. 145–51

21. Besser M. 1983 Hyperprolactinemia: effects on reproductive function in humans. The Neuroendocrine Aspects of Reproduction, 345–357
22. Bezold G, Lange M, Peter RU. Homozygous methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutation and male infertility. N Engl J Med. 2001 Apr 12;344(15):1172-3. doi: 10.1056/NEJM200104123441517. PMID: 11302150.
23. Bloch-Damti A, Bashan N. Proposed mechanisms for the induction of insulin resistance by oxidative stress. Antioxid Redox Signal. 2005 Nov-Dec;7(11-12):1553-67. doi: 10.1089/ars.2005.7.1553. PMID: 16356119.
24. Brinster RL. Male germline stem cells: from mice to men. Science. 2007 Apr 20;316(5823):404-5. doi: 10.1126/science.1137741. PMID: 17446391; PMCID: PMC4889115.
25. Cadman SM, Kim SH, Hu Y, González-Martínez D, Bouloux PM. Molecular pathogenesis of Kallmann's syndrome. Horm Res. 2007;67(5):231-42. doi: 10.1159/000098156. Epub 2006 Dec 21. PMID: 17191030.
26. Carani C, Rochira V, Faustini-Fustini M, Balestrieri A, Granata AR. Role of oestrogen in male sexual behaviour: insights from the natural model of aromatase deficiency. Clin Endocrinol (Oxf). 1999 Oct;51(4):517-24. doi: 10.1046/j.1365-2265.1999.00849.x. PMID: 10583321.
27. Carlsen E, Andersson AM, Petersen JH, Skakkebaek NE. History of febrile illness and variation in semen quality. Hum Reprod. 2003 Oct;18(10):2089-92. doi: 10.1093/humrep/deg412. PMID: 14507826.
28. Carpino A, Tarantino P, Rago V, De Sanctis V, Siciliano L. Antioxidant capacity in seminal plasma of transfusion-dependent beta-thalassemic patients. Exp Clin Endocrinol Diabetes. 2004 Mar;112(3):131-4. doi: 10.1055/s-2004-817821. PMID: 15052532.
29. Carreau S, Hess RA. Oestrogens and spermatogenesis. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2010 May 27;365(1546):1517-35. doi: 10.1098/rstb.2009.0235. PMID: 20403867; PMCID: PMC2871919.
30. Chehval MJ, Purcell MH. Deterioration of semen parameters over time in men with untreated varicocele: evidence of progressive testicular damage. Fertil Steril. 1992 Jan;57(1):174-7. doi: 10.1016/s0015-0282(16)54796-7. PMID: 1730313.
31. Chitra KC, Sujatha R, Latchoumycandane C, Mathur PP. Effect of lindane on antioxidant enzymes in epididymis and epididymal sperm of adult rats. Asian J Androl. 2001 Sep;3(3):205-8. PMID: 11561191.

32. Chiu WW, Chamley LW. Clinical associations and mechanisms of action of antisperm antibodies. Fertil Steril. 2004 Sep;82(3):529-35. doi: 10.1016/j.fertnstert.2003.09.084. PMID: 15374685.
33. Clavijo RI, Hsiao W. Update on male reproductive endocrinology. Transl Androl Urol. 2018 Jul;7(Suppl 3):S367-S372. doi: 10.21037/tau.2018.03.25. PMID: 30159243; PMCID: PMC6087844.
34. Clermont Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. Physiol Rev. 1972 Jan;52(1):198-236. doi: 10.1152/physrev.1972.52.1.198. PMID: 4621362.
35. Cohen-Bacrie P, Belloc S, Ménézo YJ, Clement P, Hamidi J, Benkhalifa M. Correlation between DNA damage and sperm parameters: a prospective study of 1,633 patients. Fertil Steril. 2009 May;91(5):1801-5. doi: 10.1016/j.fertnstert.2008.01.086. Epub 2008 Apr 25. PMID: 18439595.
36. Comhaire FH, El Garem Y, Mahmoud A, Eertmans F, Schoonjans F. Combined conventional/antioxidant "Astaxanthin" treatment for male infertility: a double blind, randomized trial. Asian J Androl. 2005 Sep;7(3):257-62. doi: 10.1111/j.1745-7262.2005.00047.x. PMID: 16110353.
37. Costabile RA, Spevak M. Cancer and male factor infertility. Oncology (Williston Park). 1998 Apr;12(4):557-62, 565; discussion 566-8, 570. PMID: 9575528..
38. Dabaja AA, Schlegel PN. Microdissection testicular sperm extraction: an update. Asian J Androl. 2013 Jan;15(1):35-9. doi: 10.1038/aja.2012.141. Epub 2012 Dec 17. PMID: 23241638; PMCID: PMC3739122
39. Dalton JC, Ranum LPW, Day JW. Myotonic dystrophy type 2. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, et al, editors. GeneReviews®. Seattle: University of Washington; 1993–2016. 2006 Sep 21 [updated 2013 Jul 3].
40. Das UB, Mallick M, Debnath JM, Ghosh D. Protective effect of ascorbic acid on cyclophosphamide- induced testicular gametogenic and androgenic disorders in male rats. Asian J Androl. 2002 Sep;4(3):201-7. PMID: 12364977.
41. EL CASTILLO EB, TRABUCCO A, DE la BALZE FA. Syndrome produced by absence of the germinal epithelium without impairment of the Sertoli or Leydig cells. J Clin Endocrinol Metab. 1947 Jul;7(7):493-502. doi: 10.1210/jcem-7-7-493. PMID: 20260948.
42. Depuydt CE, Bosmans E, Zalata A, Schoonjans F, Comhaire FH. The relation between reactive oxygen species and cytokines in andrological patients with or

without male accessory gland infection. J Androl. 1996 Nov-Dec;17(6):699-707. PMID: 9016401.

43. Dimitriadis, F., Adonakis, G., Kaponis, A., Mamoulakis, C., Takenaka, A., & Sofikitis, N. (2017). Pre-Testicular, Testicular, and Post-Testicular Causes of Male Infertility. Endocrinology of the Testis and Male Reproduction, 981–1027.
44. Ding EL, Song Y, Malik VS, Liu S. Sex differences of endogenous sex hormones and risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. JAMA. 2006 Mar 15;295(11):1288-99. doi: 10.1001/jama.295.11.1288. PMID: 16537739.
45. Dobrzyńska MM, Baumgartner A, Anderson D. Antioxidants modulate thyroid hormone- and noradrenaline-induced DNA damage in human sperm. Mutagenesis. 2004 Jul;19(4):325-30. doi: 10.1093/mutage/geh037. PMID: 15215333.
46. Dodé C, Hardelin JP. Clinical genetics of Kallmann syndrome. Ann Endocrinol (Paris). 2010 May;71(3):149-57. doi: 10.1016/j.ando.2010.02.005. Epub 2010 Apr 2. PMID: 20362962.
47. Dohle GR, Colpi GM, Hargreave TB, Papp GK, Jungwirth A, Weidner W; EAU Working Group on Male Infertility. EAU guidelines on male infertility. Eur Urol. 2005 Nov;48(5):703-11. doi: 10.1016/j.eururo.2005.06.002. Epub 2005 Jul 1. PMID: 16005562.
48. Dos Santos JM, Tewari S, Mendes RH. The Role of Oxidative Stress in the Development of Diabetes Mellitus and Its Complications. J Diabetes Res. 2019 May 5;2019:4189813. doi: 10.1155/2019/4189813. PMID: 31192263; PMCID: PMC6525877.
49. Du XL, Edelstein D, Dimmeler S, Ju Q, Sui C, Brownlee M. Hyperglycemia inhibits endothelial nitric oxide synthase activity by posttranslational modification at the Akt site. J Clin Invest. 2001 Nov;108(9):1341-8. doi: 10.1172/JCI11235. PMID: 11696579; PMCID: PMC209429.
50. Erenpreiss J, Hlevicka S, Zalkalns J, Erenpreisa J. Effect of leukocytospermia on sperm DNA integrity: a negative effect in abnormal semen samples. J Androl. 2002 Sep-Oct;23(5):717-23. PMID: 12185107.
51. Eskenazi B, Kidd SA, Marks AR, Sloter E, Block G, Wyrobek AJ. Antioxidant intake is associated with semen quality in healthy men. Hum Reprod. 2005 Apr;20(4):1006-12. doi: 10.1093/humrep/deh725. Epub 2005 Jan 21. PMID: 15665024.
52. Eskiocak S, Gozen AS, Taskiran A, Kilic AS, Eskiocak M, Gulen S. Effect of psychological stress on the L-arginine-nitric oxide pathway and semen quality. Braz J

Med Biol Res. 2006 May;39(5):581-8. doi: 10.1590/s0100-879x2006000500003. Epub 2006 Apr 20. PMID: 16648894.

53. Eskiocak S, Gozen AS, Yapar SB, Tavas F, Kilic AS, Eskiocak M. Glutathione and free sulphydryl content of seminal plasma in healthy medical students during and after exam stress. Hum Reprod. 2005 Sep;20(9):2595-600. doi: 10.1093/humrep/dei062. Epub 2005 May 12. PMID: 15890736.
54. ungwirth A, Giwercman A, Tournaye H, Diemer T, Kopa Z, Dohle G, Krausz C; European Association of Urology Working Group on Male Infertility. European Association of Urology guidelines on Male Infertility: the 2012 update. Eur Urol. 2012 Aug;62(2):324-32. doi: 10.1016/j.eururo.2012.04.048. Epub 2012 May 3. PMID: 22591628.
55. Evers JH, Collins J, Clarke J. Surgery or embolisation for varicoceles in subfertile men. Cochrane Database Syst Rev. 2009 Jan 21;(1):CD000479. doi: 10.1002/14651858.CD000479.pub4. Update in: Cochrane Database Syst Rev. 2012;10:CD000479. PMID: 19160180.
56. Feinberg AP. Phenotypic plasticity and the epigenetics of human disease. Nature. 2007 May 24;447(7143):433-40. doi: 10.1038/nature05919. PMID: 17522677.
57. Ferlin A, Raicu F, Gatta V, Zuccarello D, Palka G, Foresta C. Male infertility: role of genetic background. Reprod Biomed Online. 2007 Jun;14(6):734-45. doi: 10.1016/s1472-6483(10)60677-3. PMID: 17579990.
58. Filho DW, Torres MA, Bordin AL, Crezcynski-Pasa TB, Boveris A. Spermatic cord torsion, reactive oxygen and nitrogen species and ischemia-reperfusion injury. Mol Aspects Med. 2004 Feb-Apr;25(1-2):199-210. doi: 10.1016/j.mam.2004.02.020. PMID: 15051328.
59. Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. Nature. 2000 Nov 9;408(6809):239-47. doi: 10.1038/35041687. PMID: 11089981.
60. Forges T, Monnier-Barbarino P, Alberto JM, Guéant-Rodriguez RM, Daval JL, Guéant JL. Impact of folate and homocysteine metabolism on human reproductive health. Hum Reprod Update. 2007 May-Jun;13(3):225-38. doi: 10.1093/humupd/dml063. Epub 2007 Feb 16. PMID: 17307774.
61. Fraga CG, Motchnik PA, Wyrobek AJ, Rempel DM, Ames BN. Smoking and low antioxidant levels increase oxidative damage to sperm DNA. Mutat Res. 1996 Apr 13;351(2):199-203. doi: 10.1016/0027-5107(95)00251-0. PMID: 8622715.

62. Garrido N, Meseguer M, Alvarez J, Simón C, Pellicer A, Remohí J. Relationship among standard semen parameters, glutathione peroxidase/glutathione reductase activity, and mRNA expression and reduced glutathione content in ejaculated spermatozoa from fertile and infertile men. Fertil Steril. 2004 Oct;82 Suppl 3:1059-66. doi: 10.1016/j.fertnstert.2004.04.033. PMID: 15474074.
63. Gomez E, Buckingham DW, Brindle J, Lanzafame F, Irvine DS, Aitken RJ. Development of an image analysis system to monitor the retention of residual cytoplasm by human spermatozoa: correlation with biochemical markers of the cytoplasmic space, oxidative stress, and sperm function. J Androl. 1996 May-Jun;17(3):276-87. PMID: 8792218.
64. Gorelick JI, Goldstein M. Loss of fertility in men with varicocele. Fertil Steril. 1993 Mar;59(3):613-6. PMID: 8458466.
65. Gorelick JI, Goldstein M. Loss of fertility in men with varicocele. Fertil Steril. 1993 Mar;59(3):613-6. PMID: 8458466.
66. Haihong HE; Weiquan GUO; Xi LAN; Juanyu KE; Lei CHEN; Yiwen ZHOU. Study on the Relationship between Sperm DNA Fragmentation Index and Hcy Level in Patients with Severe Spermatoqenesis. Journal of Modern Laboratory Medicine ; (4): 83-86, 2017.
67. Hakim RB, Gray RH, Zacur H. Alcohol and caffeine consumption and decreased fertility. Fertil Steril. 1998 Oct;70(4):632-7. doi: 10.1016/s0015-0282(98)00257-x. Erratum in: Fertil Steril 1999 May;71(5):974. PMID: 9797089.
68. Halim, B. et al. "Correlation of Paternal Homocysteine Level and Sperm DNA Fragmentation in Couple with Idiopathic Recurrent Early Pregnancy Loss." Journal of Biology, Agriculture and Healthcare 4 (2014): 148-155.Halliwell B. Antioxidants in human health and disease. Annu Rev Nutr. 1996;16:33-50. doi: 10.1146/annurev.nu.16.070196.000341. PMID: 8839918.
69. Han RY, Ma J, Ma J, Liu WJ, An XT, Zhang ZD, Wang SS. [Correlation of reproductive hormone levels and seminal plasma oxidative stress with semen quality in obese males]. Zhonghua Nan Ke Xue. 2018 May;24(5):419-424. Chinese. PMID: 30171757.
70. Hassa H, Yildirim A, Can C, Turgut M, Tanir HM, Senses T, Sahin-Mutlu F. Effect of smoking on semen parameters of men attending an infertility clinic. Clin Exp Obstet Gynecol. 2006;33(1):19-22. PMID: 16761532.

71. Hollis F, Kanellopoulos AK, Bagni C. Mitochondrial dysfunction in Autism Spectrum Disorder: clinical features and perspectives. Curr Opin Neurobiol. 2017 Aug;45:178-187. doi: 10.1016/j.conb.2017.05.018. Epub 2017 Jun 16. PMID: 28628841.
72. Bošković M, Vovk T, Kores Plesničar B, Grabnar I. Oxidative stress in schizophrenia. Curr Neuropharmacol. 2011 Jun;9(2):301-12. doi: 10.2174/157015911795596595. PMID: 22131939; PMCID: PMC3131721.
73. Hsu PC, Guo YL. Antioxidant nutrients and lead toxicity. Toxicology. 2002 Oct 30;180(1):33-44. doi: 10.1016/s0300-483x(02)00380-3. PMID: 12324198.
74. Hutson JM, Balic A, Nation T, Southwell B. Cryptorchidism. Semin Pediatr Surg. 2010 Aug;19(3):215-24. doi: 10.1053/j.sempedsurg.2010.04.001. PMID: 20610195.
75. Hwang O. Role of oxidative stress in Parkinson's disease. Exp Neurobiol. 2013 Mar;22(1):11-7. doi: 10.5607/en.2013.22.1.11. Epub 2013 Mar 31. PMID: 23585717; PMCID: PMC3620453.
76. Ishii T, Matsuki S, Iuchi Y, Okada F, Toyosaki S, Tomita Y, Ikeda Y, Fujii J. Accelerated impairment of spermatogenic cells in SOD1-knockout mice under heat stress. Free Radic Res. 2005 Jul;39(7):697-705. doi: 10.1080/10715760500130517. PMID: 16036348.
77. Iwasaki A, Gagnon C. Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients. Fertil Steril. 1992 Feb;57(2):409-16. doi: 10.1016/s0015-0282(16)54855-9. PMID: 1735495.
78. Jungwirth A, Giwercman A, Tournaye H, Diemer T, Kopa Z, Dohle G, Krausz C; European Association of Urology Working Group on Male Infertility. European Association of Urology guidelines on Male Infertility: the 2012 update. Eur Urol. 2012 Aug;62(2):324-32. doi: 10.1016/j.eururo.2012.04.048. Epub 2012 May 3. PMID: 22591628.
79. Kapranos N, Petrakou E, Anastasiadou C, Kotronias D. Detection of herpes simplex virus, cytomegalovirus, and Epstein-Barr virus in the semen of men attending an infertility clinic. Fertil Steril. 2003 Jun;79 Suppl 3:1566-70. doi: 10.1016/s0015-0282(03)00370-4. PMID: 12801561.
80. Katz DJ, Teloken P, Shoshany O. Male infertility - The other side of the equation. Aust Fam Physician. 2017 Sep;46(9):641-646. PMID: 28892594.
81. Tremellen K. Oxidative stress and male infertility--a clinical perspective. Hum Reprod Update. 2008 May-Jun;14(3):243-58. doi: 10.1093/humupd/dmn004. Epub 2008 Feb 14. PMID: 18281241.

82. Keskes-Ammar L, Feki-Chakroun N, Rebai T, Sahnoun Z, Ghozzi H, Hammami S, Zghal K, Fki H, Damak J, Bahloul A. Sperm oxidative stress and the effect of an oral vitamin E and selenium supplement on semen quality in infertile men. Arch Androl. 2003 Mar-Apr;49(2):83-94. doi: 10.1080/01485010390129269. PMID: 12623744.
83. Koch OR, Pani G, Borrello S, Colavitti R, Cravero A, Farrè S, Galeotti T. Oxidative stress and antioxidant defenses in ethanol-induced cell injury. Mol Aspects Med. 2004 Feb-Apr;25(1-2):191-8. doi: 10.1016/j.mam.2004.02.019. PMID: 15051327.
84. Kodama H, Yamaguchi R, Fukuda J, Kasai H, Tanaka T. Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients. Fertil Steril. 1997 Sep;68(3):519-24. doi: 10.1016/s0015-0282(97)00236-7. PMID: 9314926.
85. Koh S-A, Sanders K, et al. Effect of male age on oxidative stress markers in human semen. J Reprod Biotechnol Fertil. 2016; doi.org/10.1177/2058915816673242
86. Krausz C. Male infertility: pathogenesis and clinical diagnosis. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2011 Apr;25(2):271-85. doi: 10.1016/j.beem.2010.08.006. PMID: 21397198.
87. Kroese AC, de Lange NM, Collins J, Evers JL. Surgery or embolization for varicoceles in subfertile men. Cochrane Database Syst Rev. 2012 Oct 17;10:CD000479. doi: 10.1002/14651858.CD000479.pub5. PMID: 23076888.
88. Kühnert B, Nieschlag E. Reproductive functions of the ageing male. Hum Reprod Update. 2004 Jul-Aug;10(4):327-39. doi: 10.1093/humupd/dmh030. Epub 2004 Jun 10. PMID: 15192059.
89. Kumar A, Ratan RR. Oxidative Stress and Huntington's Disease: The Good, The Bad, and The Ugly. J Huntingtons Dis. 2016 Oct 1;5(3):217-237. doi: 10.3233/JHD-160205. PMID: 27662334; PMCID: PMC5310831.
90. La Vignera S, Vita R. Thyroid dysfunction and semen quality. Int J Immunopathol Pharmacol. 2018 Jan-Dec;32:2058738418775241. doi: 10.1177/2058738418775241. PMID: 29737216; PMCID: PMC5946587.
91. Lee HC, Jeong YM, Lee SH, Cha KY, Song SH, Kim NK, Lee KW, Lee S. Association study of four polymorphisms in three folate-related enzyme genes with non-obstructive male infertility. Hum Reprod. 2006 Dec;21(12):3162-70. doi: 10.1093/humrep/del280. Epub 2006 Jul 22. PMID: 16861746.
92. Lelli JL Jr, Becks LL, Dabrowska MI, Hinshaw DB. ATP converts necrosis to apoptosis in oxidant-injured endothelial cells. Free Radic Biol Med. 1998 Oct;25(6):694-702. doi: 10.1016/s0891-5849(98)00107-5. PMID: 9801070.

93. Leme de Souza GL, Hallak J. Anabolic steroids and male infertility: a comprehensive review. BJU Int. 2011 Dec;108(11):1860-5. doi: 10.1111/j.1464-410X.2011.10131.x. Epub 2011 Jun 17. PMID: 21682835.
94. Lenzi A, Culasso F, Gandini L, Lombardo F, Dondero F. Placebo-controlled, double-blind, cross-over trial of glutathione therapy in male infertility. Hum Reprod. 1993 Oct;8(10):1657-62. doi: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a137909. PMID: 8300824.
95. Lenzi A, Sgrò P, Salacone P, Paoli D, Gilio B, Lombardo F, Santulli M, Agarwal A, Gandini L. A placebo-controlled double-blind randomized trial of the use of combined l-carnitine and l-acetyl-carnitine treatment in men with asthenozoospermia. Fertil Steril. 2004 Jun;81(6):1578-84. doi: 10.1016/j.fertnstert.2003.10.034. PMID: 15193480.
96. Li R, Jia Z, Trush MA. Defining ROS in Biology and Medicine. React Oxyg Species (Apex). 2016;1(1):9-21. doi: 10.20455/ros.2016.803. PMID: 29707643; PMCID: PMC5921829.
97. Liu KS, Pan F, Chen YJ, Mao XD. The influence of sperm DNA damage and semen homocysteine on male infertility, Reproductive and Developmental Medicine Oct 1, 2017doi: 10.4103/2096-2924.224910
98. Liu PY, Handelsman DJ. The present and future state of hormonal treatment for male infertility. Hum Reprod Update. 2003 Jan-Feb;9(1):9-23. doi: 10.1093/humupd/dmg002. PMID: 12638778.
99. Livrea MA, Tesoriere L, Pintaudi AM, Calabrese A, Maggio A, Freisleben HJ, D'Arpa D, D'Anna R, Bongiorno A. Oxidative stress and antioxidant status in beta-thalassemia major: iron overload and depletion of lipid-soluble antioxidants. Blood. 1996 Nov 1;88(9):3608-14. PMID: 8896430.
100. Lopes S, Jurisicova A, Sun JG, Casper RF. Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. Hum Reprod. 1998 Apr;13(4):896-900. doi: 10.1093/humrep/13.4.896. PMID: 9619544.
101. Lotti F, Maggi M. Ultrasound of the male genital tract in relation to male reproductive health. Hum Reprod Update. 2015 Jan-Feb;21(1):56-83. doi: 10.1093/humupd/dmu042. Epub 2014 Jul 19. PMID: 25038770.
102. Maneesh M, Dutta S, Chakrabarti A, Vasudevan DM. Alcohol abuse-duration dependent decrease in plasma testosterone and antioxidants in males. Indian J Physiol Pharmacol. 2006 Jul-Sep;50(3):291-6. PMID: 17193902.

103.Manicardi GC, Bianchi PG, Pantano S, Azzoni P, Bizzaro D, Bianchi U, Sakkas D. Presence of endogenous nicks in DNA of ejaculated human spermatozoa and its relationship to chromomycin A3 accessibility. Biol Reprod. 1995 Apr;52(4):864-7. doi: 10.1095/biolreprod52.4.864. PMID: 7540051.

104.Manna I, Jana K, Samanta PK. Effect of different intensities of swimming exercise on testicular oxidative stress and reproductive dysfunction in mature male albino Wistar rats. Indian J Exp Biol. 2004 Aug;42(8):816-22. PMID: 15573534.

105.Manzo-Avalos S, Saavedra-Molina A. Cellular and mitochondrial effects of alcohol consumption. Int J Environ Res Public Health. 2010 Dec;7(12):4281-304. doi: 10.3390/ijerph7124281. Epub 2010 Dec 21. PMID: 21318009; PMCID: PMC3037055.

106.Matthews RG. Methylenetetrahydrofolate reductase: a common human polymorphism and its biochemical implications. Chem Rec. 2002;2(1):4-12. doi: 10.1002/tcr.10006. PMID: 11933257.

107.Mazzilli F, Rossi T, Marchesini M, Ronconi C, Dondero F. Superoxide anion in human semen related to seminal parameters and clinical aspects. Fertil Steril. 1994 Oct;62(4):862-8. doi: 10.1016/s0015-0282(16)57017-4. PMID: 7926100.

108.McLachlan RI, O'Donnell L, Meachem SJ, Stanton PG, de K, Pratis K, Robertson DM. Hormonal regulation of spermatogenesis in primates and man: insights for development of the male hormonal contraceptive. J Androl. 2002 Mar-Apr;23(2):149-62. PMID: 11868805.

109.McLachlan RI, O'Donnell L, Meachem SJ, Stanton PG, de Kretser DM, Pratis K, Robertson DM. Identification of specific sites of hormonal regulation in spermatogenesis in rats, monkeys, and man. Recent Prog Horm Res. 2002;57:149-79. doi: 10.1210/rp.57.1.149. PMID: 12017541.

110.Vander Borght M, Wyns C. Fertility and infertility: Definition and epidemiology. Clin Biochem. 2018 Dec;62:2-10. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2018.03.012. Epub 2018 Mar 16. PMID: 29555319.

111.Mendez HM, Opitz JM. Noonan syndrome: a review. Am J Med Genet. 1985 Jul;21(3):493-506. doi: 10.1002/ajmg.1320210312. PMID: 3895929.

112.Moris D, Spartalis M, Spartalis E, Karachaliou GS, Karaolanis GI, Tsourouflis G, Tsilimigras DI, Tzatzaki E, Theocharis S. The role of reactive oxygen species in the pathophysiology of cardiovascular diseases and the clinical significance of myocardial redox. Ann Transl Med. 2017 Aug;5(16):326. doi: 10.21037/atm.2017.06.27. PMID: 28861423; PMCID: PMC5566734.

113.Mostafa T, Anis TH, El-Nashar A, Imam H, Othman IA. Varicocelectomy reduces reactive oxygen species levels and increases antioxidant activity of seminal plasma from infertile men with varicocele. Int J Androl. 2001 Oct;24(5):261-5. doi: 10.1046/j.1365-2605.2001.00296.x. PMID: 11554982.

114.Mostafa T, Tawadrous G, Roaia MM, Amer MK, Kader RA, Aziz A. Effect of smoking on seminal plasma ascorbic acid in infertile and fertile males. Andrologia. 2006 Dec;38(6):221-4. doi: 10.1111/j.1439-0272.2006.00744.x. PMID: 17081174.

115.Moustafa MH, Sharma RK, Thornton J, Mascha E, Abdel-Hafez MA, Thomas AJ Jr, Agarwal A. Relationship between ROS production, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility. Hum Reprod. 2004 Jan;19(1):129-38. doi: 10.1093/humrep/deh024. PMID: 14688171.

116.Nunomura A, Castellani RJ, Zhu X, Moreira PI, Perry G, Smith MA. Involvement of oxidative stress in Alzheimer disease. J Neuropathol Exp Neurol. 2006 Jul;65(7):631-41. doi: 10.1097/01.jnen.0000228136.58062.bf. PMID: 16825950.

117.O’Donnell L, Meachem SJ, Stanton PG, McLachlan RI. Endocrine regulation of spermatogenesis. In: Neill JD, editor. Physiology of Reproduction. 3rd ed. Amsterdam: Elsevier; (2006) p. 1017–69. https://doi.org/10.1016/B978-012515400-0/50026-9

118.O'Donnell L, Robertson KM, Jones ME, Simpson ER. Estrogen and spermatogenesis. Endocr Rev. 2001 Jun;22(3):289-318. doi: 10.1210/edrv.22.3.0431. PMID: 11399746.

119.Ochsendorf FR. Infections in the male genital tract and reactive oxygen species. Hum Reprod Update. 1999 Sep-Oct;5(5):399-420. doi: 10.1093/humupd/5.5.399. PMID: 10582780.

120.O'Donnell L, Nicholls PK, O'Bryan MK, McLachlan RI, Stanton PG. Spermiation: The process of sperm release. Spermatogenesis. 2011 Jan;1(1):14-35. doi: 10.4161/spmg.1.1.14525. PMID: 21866274; PMCID: PMC3158646.

121.Omu AE, al-Othman S, Mohamad AS, al-Kaluwby NM, Fernandes S. Antibiotic therapy for seminal infection. Effect on antioxidant activity and T-helper cytokines. J Reprod Med. 1998 Oct;43(10):857-64. PMID: 9800667.

122.Paravicini TM, Touyz RM. Redox signaling in hypertension. Cardiovasc Res. 2006 Jul 15;71(2):247-58. doi: 10.1016/j.cardiores.2006.05.001. Epub 2006 May 9. PMID: 16765337.

123.Park JH, Lee HC, Jeong YM, Chung TG, Kim HJ, Kim NK, Lee SH, Lee S. MTHFR C677T polymorphism associates with unexplained infertile male factors. J Assist

Reprod Genet. 2005 Oct;22(9-10):361-8. doi: 10.1007/s10815-005-6795-0. PMID: 16247718.

124. Pasqualotto FF, Sharma RK, Kobayashi H, Nelson DR, Thomas AJ Jr, Agarwal A. Oxidative stress in normospermic men undergoing infertility evaluation. J Androl. 2001 Mar-Apr;22(2):316-22. PMID: 11229806.

125. Peake JM, Suzuki K, Coombes JS. The influence of antioxidant supplementation on markers of inflammation and the relationship to oxidative stress after exercise. J Nutr Biochem. 2007 Jun;18(6):357-71. doi: 10.1016/j.jnutbio.2006.10.005. Epub 2006 Dec 6. PMID: 17156994.

126. Pérez-Crespo M, Pintado B, Gutiérrez-Adán A. Scrotal heat stress effects on sperm viability, sperm DNA integrity, and the offspring sex ratio in mice. Mol Reprod Dev. 2008 Jan;75(1):40-7. doi: 10.1002/mrd.20759. PMID: 17474098.

127. Potts JM, Sharma R, Pasqualotto F, Nelson D, Hall G, Agarwal A. Association of ureaplasma urealyticum with abnormal reactive oxygen species levels and absence of leukocytospermia. J Urol. 2000 Jun;163(6):1775-8. PMID: 10799180.

128. Potts RJ, Notarianni LJ, Jefferies TM. Seminal plasma reduces exogenous oxidative damage to human sperm, determined by the measurement of DNA strand breaks and lipid peroxidation. Mutat Res. 2000 Feb 14;447(2):249-56. doi: 10.1016/s0027-5107(99)00215-8. PMID: 10751608.

129. Resch U, Helsel G, Tatzber F, Sinzinger H. Antioxidant status in thyroid dysfunction. Clin Chem Lab Med. 2002 Nov;40(11):1132-4. doi: 10.1515/CCLM.2002.198. PMID: 12521231..

130. Rolo AP, Palmeira CM. Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycemia and oxidative stress. Toxicol Appl Pharmacol. 2006 Apr 15;212(2):167-78. doi: 10.1016/j.taap.2006.01.003. Epub 2006 Feb 20. PMID: 16490224..

131. Rompala GR, Homanics GE. Intergenerational Effects of Alcohol: A Review of Paternal Preconception Ethanol Exposure Studies and Epigenetic Mechanisms in the Male Germline. Alcohol Clin Exp Res. 2019 Jun;43(6):1032-1045. doi: 10.1111/acer.14029. Epub 2019 Apr 26. PMID: 30908630; PMCID: PMC6551262.

132. Rueffer U, Breuer K, Josting A, Lathan B, Sieber M, Manzke O, Grotenhermen FJ, Tesch H, Bredenfeld H, Koch P, Nisters-Backes H, Wolf J, Engert A, Diehl V. Male gonadal dysfunction in patients with Hodgkin's disease prior to treatment. Ann Oncol. 2001 Sep;12(9):1307-11. doi: 10.1023/a:1012464703805. PMID: 11697845.

133.Rybar R, Prinosilova P, Kopecka V, Hlavicova J, Veznik Z, Zajicova A, Rubes J. The effect of bacterial contamination of semen on sperm chromatin integrity and standard semen parameters in men from infertile couples. Andrologia. 2012 May;44 Suppl 1:410-8. doi: 10.1111/j.1439-0272.2011.01198.x. Epub 2011 Jul 18. PMID: 21762193.
134.Choudhury S, Chainy GB, Mishro MM. Experimentally induced hypo- and hyper-thyroidism influence on the antioxidant defence system in adult rat testis. Andrologia. 2003 Jun;35(3):131-40. doi: 10.1046/j.1439-0272.2003.00548.x. PMID: 12780529.
135.Said TM, Agarwal A, Sharma RK, Mascha E, Sikka SC, Thomas AJ Jr. Human sperm superoxide anion generation and correlation with semen quality in patients with male infertility. Fertil Steril. 2004 Oct;82(4):871-7. doi: 10.1016/j.fertnstert.2004.02.132. PMID: 15482762.
136.Said TM, Agarwal A, Sharma RK, Thomas AJ Jr, Sikka SC. Impact of sperm morphology on DNA damage caused by oxidative stress induced by beta-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate. Fertil Steril. 2005 Jan;83(1):95-103. doi: 10.1016/j.fertnstert.2004.06.056. PMID: 15652893.
137.Sakkas D, Mariethoz E, Manicardi G, Bizzaro D, Bianchi PG, Bianchi U. Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. Rev Reprod. 1999 Jan;4(1):31-7. doi: 10.1530/ror.0.0040031. PMID: 10051100.
138.Sakkas D, Moffatt O, Manicardi GC, Mariethoz E, Tarozzi N, Bizzaro D. Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. Biol Reprod. 2002 Apr;66(4):1061-7. doi: 10.1095/biolreprod66.4.1061. PMID: 11906926.
139.Saleh RA, Agarwal A, Sharma RK, Nelson DR, Thomas AJ Jr. Effect of cigarette smoking on levels of seminal oxidative stress in infertile men: a prospective study. Fertil Steril. 2002 Sep;78(3):491-9. doi: 10.1016/s0015-0282(02)03294-6. PMID: 12215323.
140.Saleh RA, Agarwal A, Nelson DR, Nada EA, El-Tonsy MH, Alvarez JG, Thomas AJ Jr, Sharma RK. Increased sperm nuclear DNA damage in normozoospermic infertile men: a prospective study. Fertil Steril. 2002 Aug;78(2):313-8. doi: 10.1016/s0015-0282(02)03219-3. PMID: 12137868.

141.Sarkar PS, Paul S, Han J, Reddy S. Six5 is required for spermatogenic cell survival and spermiogenesis. Hum Mol Genet. 2004 Jul 15;13(14):1421-31. doi: 10.1093/hmg/ddh161. Epub 2004 May 26. PMID: 15163633.
142.Schroeder-Printzen I, Ludwig M, Köhn F, Weidner W. Surgical therapy in infertile men with ejaculatory duct obstruction: technique and outcome of a standardized surgical approach. Hum Reprod. 2000 Jun;15(6):1364-8. doi: 10.1093/humrep/15.6.1364. PMID: 10831570.
143.Scott R, MacPherson A, Yates RW, Hussain B, Dixon J. The effect of oral selenium supplementation on human sperm motility. Br J Urol. 1998 Jul;82(1):76-80. doi: 10.1046/j.1464-410x.1998.00683.x. PMID: 9698665.
144.Segnini A, Camejo MI, Proverbio F. Chlamydia trachomatis and sperm lipid peroxidation in infertile men. Asian J Androl. 2003 Mar;5(1):47-9. PMID: 12647003.
145.Selhub J. Homocysteine metabolism. Annu Rev Nutr. 1999;19:217-46. doi: 10.1146/annurev.nutr.19.1.217. PMID: 10448523.
146.Senoner T, Dichtl W. Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases: Still a Therapeutic Target? Nutrients. 2019 Sep 4;11(9):2090. doi: 10.3390/nu11092090. PMID: 31487802; PMCID: PMC6769522.
147.Sharpe RM., Knobil, E., Neill, J.D. (1994) Regulation of spermatogenesis. In: The Physiology of Reproduction. Eds. New York, Raven Press. pp. 1363–434.
148.Shekarriz M, DeWire DM, Thomas AJ Jr, Agarwal A. A method of human semen centrifugation to minimize the iatrogenic sperm injuries caused by reactive oxygen species. Eur Urol. 1995;28(1):31-5. doi: 10.1159/000475016. PMID: 8521891.
149.Shekarriz M, Thomas AJ Jr, Agarwal A. Incidence and level of seminal reactive oxygen species in normal men. Urology. 1995 Jan;45(1):103-7. doi: 10.1016/s0090-4295(95)97088-6. PMID: 7817460.
150.Silver EW, Eskenazi B, Evenson DP, Block G, Young S, Wyrobek AJ. Effect of antioxidant intake on sperm chromatin stability in healthy nonsmoking men. J Androl. 2005 Jul-Aug;26(4):550-6. doi: 10.2164/jandrol.04165. PMID: 15955895.
151.Singer G, Granger DN. Inflammatory responses underlying the microvascular dysfunction associated with obesity and insulin resistance. Microcirculation. 2007 Jun-Jul;14(4-5):375-87. doi: 10.1080/10739680701283158. PMID: 17613809.
152.Singh NP, Muller CH, Berger RE. Effects of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm. Fertil Steril. 2003 Dec;80(6):1420-30. doi: 10.1016/j.fertnstert.2003.04.002. PMID: 14667878.

153.Slack Jonathan M.W. (1988) Βασικές Αρχές Βιολογίας Ανάπτυξης, 3η Έκδοση. 18: 568 - 571, 13:434 - 439
154.Smit M, Dohle GR, Hop WC, Wildhagen MF, Weber RF, Romijn JC. Clinical correlates of the biological variation of sperm DNA fragmentation in infertile men attending an andrology outpatient clinic. Int J Androl. 2007 Feb;30(1):48-55. doi: 10.1111/j.1365-2605.2006.00710.x. Epub 2006 Nov 29. PMID: 17163955.
155.Smith R, Kaune H, Parodi D, Madariaga M, Morales I, Ríos R, Castro A. Aumento del daño en el ADN y estrés oxidativo en espermatozoides de pacientes con oligozoospermia idiopática y antecedentes de criptorquidismo [Extent of sperm DNA damage in spermatozoa from men examined for infertility. Relationship with oxidative stress]. Rev Med Chil. 2007 Mar;135(3):279-86. Spanish. doi: 10.4067/s0034-98872007000300001. Epub 2007 Apr 26. PMID: 17505572.
156.Sönmez M, Yüce A, Türk G. The protective effects of melatonin and Vitamin E on antioxidant enzyme activities and epididymal sperm characteristics of homocysteine treated male rats. Reprod Toxicol. 2007 Feb;23(2):226-31. doi: 10.1016/j.reprotox.2006.11.003. Epub 2006 Nov 10. PMID: 17178211.
157.Sosa V, Moliné T, Somoza R, Paciucci R, Kondoh H, LLeonart ME. Oxidative stress and cancer: an overview. Ageing Res Rev. 2013 Jan;12(1):376-90. doi: 10.1016/j.arr.2012.10.004. Epub 2012 Oct 31. PMID: 23123177.
158.Suleiman SA, Ali ME, Zaki ZM, el-Malik EM, Nasr MA. Lipid peroxidation and human sperm motility: protective role of vitamin E. J Androl. 1996 Sep-Oct;17(5):530-7. PMID: 8957697.
159.Sussman EM, Chudnovsky A, Niederberger CS. Hormonal evaluation of the infertile male: has it evolved? Urol Clin North Am. 2008 May;35(2):147-55, vii. doi: 10.1016/j.ucl.2008.01.010. PMID: 18423236.
160.Tenorio F., Neto FT, Bach PV, Najari BB, Li PS, Goldstein M. Spermatogenesis in humans and its affecting factors. Semin Cell Dev Biol. 2016 Nov;59:10-26. doi: 10.1016/j.semcdb.2016.04.009. Epub 2016 Apr 30. PMID: 27143445.
161.Thonneau P, Marchand S, Tallec A, Ferial ML, Ducot B, Lansac J, Lopes P, Tabaste JM, Spira A. Incidence and main causes of infertility in a resident population (1,850,000) of three French regions (1988-1989). Hum Reprod. 1991 Jul;6(6):811-6. doi: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a137433. PMID: 1757519.
162.Turek PJ. Male infertility. In: Tanagho EA, McAninch JW, editors. Smith's general urology. New York: McGraw-Hill; 2008. p. 684–716.

163.Turner TT, Bang HJ, Lysiak JL. The molecular pathology of experimental testicular torsion suggests adjunct therapy to surgical repair. J Urol. 2004 Dec;172(6 Pt 2):2574-8. doi: 10.1097/01.ju.0000144203.30718.19. PMID: 15538211.

164.Turpaev KT. Reactive oxygen species and regulation of gene expression. Biochemistry (Mosc). 2002 Mar;67(3):281-92. doi: 10.1023/a:1014819832003. PMID: 11970728.

165.UK_Testicular_Cancer_Study_Group. Aetiology of testicular cancer: association with congenital abnormalities, age at puberty, infertility, and exercise. United Kingdom Testicular Cancer Study Group. BMJ. 1994a May 28;308(6941):1393-9. PMID: 7912596; PMCID: PMC2540340.

166. UK_Testicular_Cancer_Study_Group. Social, behavioural and medical factors in the aetiology of testicular cancer: results from the UK study. UK Testicular Cancer Study Group. Br J Cancer. 1994b Sep;70(3):513-20. doi: 10.1038/bjc.1994.337. PMID: 8080739; PMCID: PMC2033353.

167.Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int J Biochem Cell Biol. 2007;39(1):44-84. doi: 10.1016/j.biocel.2006.07.001. Epub 2006 Aug 4. PMID: 16978905.

168.Vander A, Sherman J, Luciano D, Τσακόπουλος Μ. (2011). Φυσιολογία του ανθρώπου, εκδόσεις Πασχαλίδης, Αθήνα.

169.Venkatesh S, Singh A, Shamsi MB, Thilagavathi J, Kumar R, Mitra DK, Dada R. Clinical significance of sperm DNA damage threshold value in the assessment of male infertility. Reprod Sci. 2011 Oct;18(10):1005-13. doi: 10.1177/1933719111401662. PMID: 21960513.

170.Vicari E. Effectiveness and limits of antimicrobial treatment on seminal leukocyte concentration and related reactive oxygen species production in patients with male accessory gland infection. Hum Reprod. 2000 Dec;15(12):2536-44. doi: 10.1093/humrep/15.12.2536. PMID: 11098023.

171.Vine MF. Smoking and male reproduction: a review. Int J Androl. 1996 Dec;19(6):323-37. doi: 10.1111/j.1365-2605.1996.tb00523.x. PMID: 9051418.

172.Vogt PH, Edelmann A, Kirsch S, Henegariu O, Hirschmann P, Kiesewetter F, Köhn FM, Schill WB, Farah S, Ramos C, Hartmann M, Hartschuh W, Meschede D, Behre HM, Castel A, Nieschlag E, Weidner W, Gröne HJ, Jung A, Engel W, Haidl G. Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in

Yq11. Hum Mol Genet. 1996 Jul;5(7):933-43. doi: 10.1093/hmg/5.7.933. PMID: 8817327.

173. Watson PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. Anim Reprod Sci. 2000 Jul 2;60-61:481-92. doi: 10.1016/s0378-4320(00)00099-3. PMID: 10844218.

174. Russell LD, Tallon-Doran M, Weber JE, Wong V, Peterson RN. Three-dimensional reconstruction of a rat stage V Sertoli cell: III. A study of specific cellular relationships. Am J Anat. 1983 Jun;167(2):181-92. doi: 10.1002/aja.1001670204. PMID: 6613903.

175. Wibowo E, Johnson TW, Wassersug RJ. Infertility, impotence, and emasculation--psychosocial contexts for abandoning reproduction. Asian J Androl. 2016 May-Jun;18(3):403-8. doi: 10.4103/1008-682X.173937. PMID: 26924280; PMCID: PMC4854090.

176. Winters S. Male hypogonadism. In: Melmed S, editor.(1999)Male reproductive function. Norwell:Kluwer; p. 119–38.

177. Wu D, Cederbaum AI. Alcohol, oxidative stress, and free radical damage. Alcohol Res Health. 2003;27(4):277-84. PMID: 15540798; PMCID: PMC6668865.

178. Wyrobek AJ, Eskenazi B, Young S, Arnheim N, Tiemann-Boege I, Jabs EW, Glaser RL, Pearson FS, Evenson D. Advancing age has differential effects on DNA damage, chromatin integrity, gene mutations, and aneuploidies in sperm. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Jun 20;103(25):9601-6. doi: 10.1073/pnas.0506468103. Epub 2006 Jun 9. PMID: 16766665; PMCID: PMC1480453.

179. A ZC, Yang Y, Zhang SZ, Li N, Zhang W. Single nucleotide polymorphism C677T in the methylenetetrahydrofolate reductase gene might be a genetic risk factor for infertility for Chinese men with azoospermia or severe oligozoospermia. Asian J Androl. 2007 Jan;9(1):57-62. doi: 10.1111/j.1745-7262.2007.00225.x. Epub 2006 Aug 4. PMID: 16888682.

180. Βενετίκου Μ.Σ. Οξειδωτικό stress Τεχνικές μελέτης και επίδραση στη γοναδική λειτουργία Αρχεία Ελληνικής Ιατρικής 2013,30(2):177-185.

181. Γάλαρης, Δ. 2015. Ελεύθερες ρίζες και οξειδωτικό stress. [ηλεκτρ. βιβλ.] Αθήνα:Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών. κεφ 2

182. Μέλεκος ΜΔ, Σύγχρονη Ουρολογία, 2005

183. Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας, ΠΟΥ. (2000)