ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Επίδραση του παράγοντα glyphosate στην κατάτμηση του DNA δειγμάτων σπέρματος»

ΛΑΓΟΔΟΝΤΗ ΓΕΩΡΓΙΑ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΛΑΡΙΣΑ
Σεπτέμβριος 2016

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/05/2024 21:41:31 EEST - 3.145.18.80

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ

ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ Ι. ΔΑΠΟΝΤΕ

ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΜΑΙΕΥΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπων: Γεώργιος-Σπυρίδων Ανυφαντής

Μέλος : Κωνσταντίνος Νταφόπουλος

Μέλος : Γεώργιος Αμοιρίδης

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/05/2024 21:41:31 EEST - 3.145.18.80

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στη Μονάδα Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας, στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος << Βιολογία της Αναπαραγωγής >> κατά τους μήνες Ιούνιο - Σεπτέμβριο 2016 και είχε ως θέμα την επίδραση του παράγοντα glyphosate στην κατάτμηση του DNA δειγμάτων σπέρματος.

Θα ήθελα, αρχικά, να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή κ. Ιωάννη Μεσσήνη που με εμπιστεύτηκε πριν 3 χρόνια, μου έδωσε τη δυνατότητα να πραγματοποιήσω την Πρακτική μου Άσκηση, ως προπτυχιακή φοιτήτρια Βιολογίας και κατάφερα έτσι να γνωρίσω τον κόσμο της Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής και να θέλω να αποτελέσω κομμάτι του. Οι εμπειρίες που αποκόμισα τότε , αποτέλεσαν το βασικό λόγο για την ένταξή μου στο συγκεκριμένο μεταπτυχιακό.

Ακόμη, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στο Διευθυντή του Μεταπτυχιακού Προγράμματος ΄΄Βιολογία της Αναπαραγωγής΄΄ κ. Αλέξανδρο Ι. Δαπόντε για τη δυνατότητα που μου έδωσε να πραγματοποιήσω τη διπλωματική μου εργασία, ακριβώς στο αντικείμενο του ενδιαφέροντός μου.

Οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στον κ. Ανυφαντή Γεώργιο-Σπυρίδων, για τις πολύτιμες γνώσεις που μου μετέδωσε, τόσο σε εργαστηριακό όσο και σε θεωρητικό επίπεδο καθώς και για τη βοήθειά του σε επιστημονικά και διαδικαστικά ζητήματα μέχρι την ολοκλήρωση της διπλωματικής αυτής εργασίας. Επίσης, ευχαριστώ θερμά την υπόλοιπη τριμελή επιτροπή της παρούσας διπλωματικής κ. Νταφόπουλο Κωνσταντίνο και κ. Αμοιρίδη Γεώργιο για την εμπιστοσύνη που έδειξαν στο πρόσωπό μου.

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στο νοσηλευτικό προσωπικό της μονάδας της Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής και συγκεκριμένα στη κ . Τζαβέλα Αναστασία για την πολύτιμη βοήθεια και ηθική στήριξη που μου πρόσφερε. Ευχαριστώ, επίσης, ιδιαίτερα τη φίλη μου και συμφοιτήτριά μου, Κατσανάκη Κατερίνα, για την πολύτιμη βοήθεια, την υπομονή και την στήριξή της όλους αυτούς τους μήνες.

Τέλος, το μεγαλύτερο ευχαριστώ ανήκει στην οικογένεια μου, που με στηρίζουν και είναι δίπλα μου σε κάθε μου απόφαση και όνειρο και που χωρίς εκείνους δεν θα είχα καταφέρει τίποτα.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/05/2024 21:41:31 EEST - 3.145.18.80

Περιεχόμενα

Περίληψη…….....4

Abstract……....5

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Υπογονιμότητα……....6

1.1 Ανδρική Υπογονιμότητα…….…...6
1.1.2 Νέα παράμετρος αξιολόγησης της ανδρικής υπογονιμότητας: ο κατακερματισμός/ η κατάτμηση του Dna των σπερματοζωαρίων ……10
1.1.2Α Ερμηνεία του όρου κατακερματισμός ή κατάτμηση του Dna των σπερματοζωαρίων….11
1.1.2Β Παράγοντες που επάγουν κατακερματισμό ή κατάτμηση του Dna των Σπερματοζωαρίων……..13
1.1.2Γ Μέθοδοι μέτρησης-αξιολόγησης του κατακερματισμού/κατάτμησης του σπερματικού DNA……...19

1.2 Επίδραση περιβάλλοντος……20
1.2.1 Φυτοφάρμακα…….,……..20
1.2.2 Glyphosate……21
1.2.3 Χημικές και φυσικές ιδιότητες…….....23
1.2.4 Τρόπος Δράσης του Glyphosate……...24
1.2.5 Μεταβολισμός και αποικοδόμηση του Glyphosate……..26
1.2.6 Επιπτώσεις Glyphosate στην υγεία του ανθρώπου……...26
1.2.7 Επιπτώσεις του glyphosate στο αρσενικό αναπαραγωγικό σύστημα……...27

2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Προετοιμασία ασθενών……....29
2.2 Προετοιμασία διαλύματος Gluphosate……....30
2.3 Προετοιμασία δειγμάτων σπέρματος……...30
2.4 Πειραματικό Μέρος……31
2.5 Στατιστική Ανάλυση……....35

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/05/2024 21:41:31 EEST - 3.145.18.80

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Δημογραφικά στοιχεία των 30 δειγμάτων……...36
3.2 Ποσοστό κατακερματισμού DNA (SDF) των δειγμάτων ελέγχου και των δειγμάτων μετά την επίδραση του Glyphosate……...37

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ……..40

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ……..42-49

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/05/2024 21:41:31 EEST - 3.145.18.80

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Μία από τις κυριότερες αιτίες των ολοένα και αυξανόμενων ποσοστών ανδρικής υπογονιμότητας αποτελεί η έκθεση σε περιβαλλοντικούς κινδύνους, όπως τα φυτοφάρμακα. Στη μελέτη αυτή, χρησιμοποιήθηκε το Glyphosate, κύριο συστατικό του φυτοφαρμάκου Roundup.Το Roundup είναι το πρώτο σε πωλήσεις και αποτελεσματικότητα ευρέος φάσματος ζιζανιοκτόνο στον κόσμο.Ο κύριος μεταβολίτης του Glyphosate είναι το AMPA. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση του παράγοντα Glyphosate στην κατάτμηση του DNA του σπέρματος σε 30 δείγματα ανδρών που συμμετείχαν σε συμβατικούς κύκλους εξωσωματικής γονιμοποίησης καθώς και σε διενέργεια σπερμοδιαγράμματος. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε in vitro χορήγηση glyphosate , τελικής συγκέντρωσης 0,36mg/lt που αντιστοιχεί στην περιεκτικότητα του glyphosate σε 1ppm Roundup, στα δείγματα σπέρματος. Ακολούθησε επεξεργασία των δειγμάτων και μετά το πέρας 1 ώρας και 30 λεπτών από την ώρα χορήγησης του παράγοντα, προσδιορισμός του ποσοστού του κατακερματισού του DNA των σπερματοζωαρίων στα δείγματα ελέγχου και στα δείγματα μετά την επίδραση του Glyphosate. Με βάση τα αποτελέσματα διαπιστώθηκε ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική μεταβολή μεταξύ των ποσοστών κατάτμησης DNA των ίδιων δειγμάτων πριν και μετά την επίδραση του παράγοντα Glyphosate.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/05/2024 21:41:31 EEST - 3.145.18.80

ABSTRACT

One of the main causes of ever increasing rates of male infertility is the exposure to environmental hazards, such as pesticides. In this study, we used the Glyphosate, the main ingredient of the pesticide Roundup.To Roundup is the first in sales effectiveness and broad-spectrum herbicide in the world.The main metabolite is the AMPA. In the present study we research the effect of Glyphosate factor in DNA fragmentation of 30 semen samples in 30 men who took part in conventional IVF cycles and semen analysis. Specifically, we performed in vitro administration of glyphosate, the final concentration 0,36mg / lit corresponding to the content of glyphosate on Roundup 1ppm, in semen samples. Followed by treatment of the samples and after 1 hour and 30 minutes from the time of administration of the factor, we determined the percentage of DNA fragmentation of semen in control samples and in samples after the effect of Glyphosate. Based on the results we found that there is no statistically significant change between the DNA fragmentation levels of the same samples before and after the effect of Glyphosate factor.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/05/2024 21:41:31 EEST - 3.145.18.80

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Υπογονιμότητα

Η υπογονιμότητα αποτελεί στις μέρες μας ένα από τα μεγαλύτερα προβλήματα υγείας, καθώς επηρεάζει το 10-15 % των ζευγαριών σε παγκόσμια κλίμακα. Ορίζεται ως η αδυναμία ενός ζευγαριού να επιτύχει σύλληψη και να αποκτήσει τέκνο έπειτα από τουλάχιστον ένα έτος τακτικών σεξουαλικών επαφών χωρίς αντισυλληπτική προστασία. Η συχνότητα της υπογονιμότητας στο γενικό πληθυσμό είναι δύσκολο να καθορισθεί και διαφέρει στις διάφορες χώρες (Ευρώπη,Ασία,Αμερική). Η κατανομή των αιτιών υπογονιμότητας είναι επίσης δύσκολο να καθορισθεί επακριβώς λόγω πολλών παραγόντων (ζεύγη που αναζητούν ή όχι ιατρική βοήθεια , πότε την αναζητούν, εξειδίκευση του ιατρικού κέντρου, δοαγνωστικές δυνατότητες του κέντρου, απόλυτα και σχετικά αίτια υπογονιμότητας κτλ.). Στο 40% περίπου από τα ζεύγη που έρχονται αντιμέτωπα με την υπογονιμότητα, το αίτιο αποδίδεται στον άνδρα, είτε αποκλειστικά είτε σε συνδυασμό με αίτια από τη γυναίκα. Οι παράγοντες που προκαλούν υπογονιμότητα πολλές φορές είναι περισσότεροι του ενός και έχουν τόσο ανδρική όσο και γυναικεία προέλευση (Λαινάς, 2006).Σε ότι αφορά τη διαγνωστική προσέγγιση, αυτή οφείλει να έχει την έννοια της αξιολόγησης της δυνητικής γονιμότητας του άνδρα και της γυναίκας μέσα στα πλαίσια του ζεύγους σαν πάσχουσας μονάδας και όχι ενός εκάστου ανεξάρτητα. Επιπλέον , η διάγνωση πρέπει να αποσκοπεί στον έλεγχο όλων των λειτουργικών και οργανικών προυποθέσεων των οποίων η ακεραιότητα έχει ως αποτέλεσμα τη γονιμότητα του ζεύγους. Η διερέυνηση του ζευγαριού συνήθως επιβάλλεται όταν υπάρχουν ελεύθερες σχέσεις πέραν του ενός έτους, αλλά αυτό εξαρτάται από την ηλικία και τα δεδομένα του ιστορικού, επίσης (Eisa Tahmassbpour et. al,2014). Στη συνέχεια θα εστιάσουμε στα αίτια της ανδρικής υπογονιμότητας, στις πηγές προέλευσής τους αλλά και στις επιδράσεις τους στην επίτευξη εγκυμοσύνης.

1.1.1. Ανδρική Υπογονιμότητα

Η ανδρική υπογονιμότητα ευθύνεται παγκοσμίως για το 10-15% των υπογόνιμων ζευγαριών. Συγκεκριμένα στις δυτικές χώρες ο άνδρας είναι υπογόνιμος στο 15% των ζευγαριών. (Tahmasbpour E et. al , 2014).Μεγίστης δυσκολίας είναι όμως ο προσδιορισμός της ανδρικής υπογονιμότητας παγκοσμίως διότι οι διαφορές από κοινωνία σε κοινωνία όσον αφορά τη παράδοση, την εξέλιξη και την ανάπτυξή τους είναι σημαντικά μεγάλες. Σύμφωνα με έρευνα τον Απρίλιο του 2015 το λιγότερο 30 εκατομμύρια άνδρες παγκοσμίως είναι υπογόνιμοι με τα υψηλότερα ποσοστά στην Αφρική και στην ανατολική Ευρώπη, με χαρακτηριστικά υψηλό ποσοστό υπογόνιμων ανδρών στην Ευρώπη απο 8% εως 12% (Agarwal A et. al, 2015). Η ανδρική υπογονιμότητα είναι ένα πολυπαραγοντικό σύνδρομο με μεγάλη ποικιλία αιτιών τόσο από απλές ορμονικές διαταραχές όσο και από ψυχολογικά αίτια (άγχος, υποτονία κ.α.)και τρόπο ζωής (κακή

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/05/2024 21:41:31 EEST - 3.145.18.80

διατροφή, διαταραχές στους κερκαδικούς ρυθμούς κ.α.). Η συνολική υγεία του άνδρα συχνά έχει αντίκτυπο στη γονιμότητά του. Εάν στη κλινική εξέταση για τη μέτρηση του σπέρματος δειχθεί ότι ο αριθμός σπερματοζωαρίων στο σπέρμα του άνδρα, είναι λιγότερο από 15 εκατομμύρια / ml σπέρματος (σύμφωνα με το WHO) τότε οφείλει να ανησυχήσει . Ωστόσο όμως ο αριθμός των σπερματοζωαρίων στο δείγμα του σπέρματος δεν υποδηλώνει την γονιμότητα διότι άνδρες με υψηλό αριθμό σπερματοζωαρίων αποδείχθηκαν υπογόνιμοι ενώ άλλοι με χαμηλό, ολιγοσπερμικοί, γόνιμοι. Η μειωμένη ανδρική γονιμότητα μπορεί να είναι το αποτέλεσμα συγγενών και επίκτητων ανωμαλιών του ουρογεννητικού, λοιμώξεων του γεννητικού συστήματος, αυξημένης θερμοκρασίας του οσχέου (κιρσοκήλη), ενδοκρινικών διαταραχές, γενετικών ανωμαλιών και ανοσολογικών παραγόντων (World Health Organization. WHO Manual for the Standardized Investigation and Diagnosis of the Infertile Couple. Cambridge: Cambridge University Press, 2000). Ανεξήγητοι παράγοντες υπογονιμότητας ανέρχονται στο 60-75% των περιπτώσεων (ιδιοπαθής ανδρική υπογονιμότητα). Αυτοί οι άνδρες δεν έχουν ιστορικό με προβλήματα γονιμότητας και φυσιολογικές τιμές κλινικών εξετάσεων αλλά στην ανάλυση σπέρματος εμφανίζεται μικρός αριθμός σπερματοζωαρίων (G.R. Dohle et. al, GUIDELINES ON MALE INFERTILITY. European Association of Urology. (Pag: 41-42)). Μια πληθώρα παραγόντων που αφορούν ή/και επηρεάζουν την παραγωγή, τη μεταφορά και τη λειτουργία του σπέρματος ευθύνονται για την ανδρική υπογονιμότητα. Οι πιο κοινές αιτίες ανδρικής υπογονιμότητας συνοψίζονται παρακάτω (Πίνακα 1).

Πίνακας 1

Αίτια ανδρικής υπογονιμότητας	**Ποσοστό**
Κιρσοκήλη	37-40%
Ενδοκρινικές Διαταραχές	>20%
Λοιμώξεις γεννητικών οργάνων	8-35%
Ορχική ανεπάρκεια	9%
Γενετικές Διαταραχές	15-30%
Αντισπερμικά Αντισώματα	8-19%
Ιδιοπάθεια	15-25%

Πηγή :http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4156950/

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/05/2024 21:41:31 EEST - 3.145.18.80

Η συχνότητα εμφάνισης των παραγόντων πρόκλησης της ανδρικής υπογονιμότητας ποικίλλει με υψηλότερο ποσοστό εμφάνισης την Ιδιοπαθής Ανεπάρκεια του Σπερματικού Επιθηλίου (Πίνακας 2).

Πίνακας 2

Τα αίτια ανδρικής υπογονιμότητας ανάλογα με τη συχνότητα εμφάνισης
1.ΙΑΣΕ (ιδιοπαθής ανεπάρκεια σπερματικού επιθηλίου) 2.Κιρσοκήλη 3.Λοιμώξεις επικουρικών αδένων 4.Χρωμοσωματικές Ανωμαλίες 5.Λοίμωξη και Κιρσοκήλη 6.Κρυψορχία 7.Αποφρακτική Αζωοσπερμία 8.Ενδοκρινικά Αίτια 9.Σεξουαλικές Διαταραχές 10.Μεταπαρωτιδική Ορχίτιδα 11.Ανοσολογικός Παράγοντας 12.Συστηματικές Παθήσεις 13.Αντισπερματικά Αντισώματα 14.Όγκοι Όρχεων 15.Λοιπές Αιτίες

Πηγή: http://www.eugonia.com.gr/ypogonimotita/aitia-ypogonimothtas/andrikos-paragwn/aitia/

Τα αίτια πρόκλησης της ανδρικής υπογονιμότητας χωρίζονται ανάλογα με το που λαμβάνουν χώρα σε αίτια πριν από τον όρχη,δηλαδή γενετικά, επιγενετικά ή ενδοκρινικά κ.α. που συνήθως είναι εκ΄γενετής παθήσεις, σε ορχικά αίτια, αυτά που συμβαίνουν στον όρχι και επιδρούν στη γονιμότητα του άνδρα και τέλος σε μεταορχικά, τα οποία σχετίζονται με την εκσπερμάτιση, την απουσία σπερματικού πόρου κ.α. Σημαντικές είναι και οι σεξουαλικές διαταραχές στον άνδρα που αποτρέπουν ή μειώνουν τη συχνότητα της ενδοκολπικής σπερματέγχυσης (Bradley D. et.al, 2013). Στον Πίνακα 3 αναφέρονται τα αίτια ανδρικής υπογονιμότητας αναλυτικά σύμφωνα με το διαχωρισμό τους.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/05/2024 21:41:31 EEST - 3.145.18.80

Πίνακας 3

Κοινές Αίτίες Ανδρικής Υπογονιμότητας *Σεξουαλικές διαταραχές* - Στυτική δυσλειτουργία - Αποτυχία σεξουαλικής επαφής - Έλλειψη της λίμπιντο - Δυσλειτουργία σχέσεων Ανοργασμία		
Προ-ορχικά αίτια	Ορχικά αίτια	Μετα-ορχικά αίτια
Γενετικές ανωμαλίες: - Χρωμοσωμικές ανωμαλίες - Ελλείψεις του Y χρωμοσώματος - Γενετικές μεταλλάξεις - Πολυμορφισμοί γονιδίων	Κιρσοκήλη	Απουσία σπερματικού πόρου
Ενδοκρινικές ανωμαλίες: **Υπογοναδοτροφικός Υπογοναδισμός** (χαμηλά επίπαδα LH και FSH) - Αυξημένα επίπεδα προλακτίνης - Φαρμακολογικά - Σύνδρομο Kallmann - Σύνδρομο Klinefelter	Κρυψορχία	Σύνδρομο του Young
	Καρκίνος των όρχεων	Απόφραξη αεραγωγών για εκσπερμάτιση/ Δυσειτουργία σπερματοδόχου κυστής
	Ιονίζουσα Ακτινοβολία	Βασεκτομή/ Αντίστροφη Βασεκτομή
	Γενετική Αζωοσπερμία / ολιγοσπερμία	Τραυματισμός Νευρώνων
	Χημειοθεραπεία	Φάρμακα
	Περιβαλλοντικοί Παράγοντες	Εκτομή του προστάτη

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/05/2024 21:41:31 EEST - 3.145.18.80

	Τραυματισμός όρχεων	Μη φυσιολογική συνουσία
	Πρωτου βαθμού ακτινοειδής δυσκινησία	
	Σύνδρομο Sertoli Cell-Only	
	Αντισπερματικά Αντισώματα	
	Βλάβες στο DNA	

Πηγές:http://188.14.110.26/alessandronatali/uploadedfiles/o_18g1jpnjm10v45ue17pa1put5hs8.pdf http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4614-3335-4_1
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3763976/
http://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-3-662-45018-5_12

Η θεραπευτική προσέγγιση της ανδρικής υπογονιμότητας μπορεί να ταξινομηθεί σε αιτιολογική (προσανατολισμένη στο αίτιο) και μη αιτιολογική (εμπειρική, προσανατολισμένη στο αποτέλεσμα). Συγκεκριμένα, διακρίνουμε τις εξής θεραπείες :

1.Φαρμακευτικές προσεγγίσεις και λήψη βιταμινούχων σκευασμάτων-αντιοξειδωτικών
2.Ορμονική διέγερση-αποκατάσταση ορμονών
3. Χειρουργική αντιμετώπιση
4. Αντιμετώπιση με μεθόδους υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (IUI-IVF-ICSI)
(Γούλης ΔΓ, 2008. (Σελ:10)).

1.1.2 Νέα παράμετρος αξιολόγησης της ανδρικής υπογονιμότητας: ο κατακερματισμός/ η κατάτμηση του Dna των σπερματοζωαρίων

(A.Borini et al, 2006.)

Το γενετικό υλικό του σπέρματος είναι γνωστό ότι συμβάλλει κατά το ήμισυ του γενετικού υλικού των απογόνων και μελέτες του παρελθόντος έδειξαν πως η πατρική επίδραση ευθύνεται σημαντικά για επαναλαμβανόμενες προσπάθειες εξωσωματικής γονιμοποίησης.(Hammadeh, Hum. Reprod., 11, 2468– 2471), (Vanderzwalmen, Hum. Reprod., 6, 581–588), (Parinaud, J.,y. Fertil. Steril., 60, 888–892.), (Janny, L., Mol. Reprod. Dev., 38, 36–42.), (Shoukir, Y.,Hum. Reprod., 13, 1632–1637.) , (Shoukir, Y,Hum. Reprod., 13, 1632–1637.).
Η ανδρική υπογονιμότητα παραδοσιακά έχει διαγνωσθεί με μικροσκοπική εκτίμηση του σπέρματος όπως κινητικότητα, μορφολογία και ποσότητα, παράγοντες που δεν αντανακλούν πάντα τη ποιότητα του σπέρματος. Σημαντική πρόοδος έχει σημειωθεί προς την κατεύθυνση για την εφαρμογή αξιόπιστων δοκιμών όσον αφορά την ακεραιότητα της χρωματίνης του σπέρματος και βλάβες στο DNA του. Ορόσημο αποτελεί η πρόταση του Evenson et al. (1980)**, (**Science, 240,

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/05/2024 21:41:31 EEST - 3.145.18.80

1131–1133.) που αναφέρεται στο ότι η εκτίμηση της ακεραιότητας του DNA του σπέρματος μπορεί να είναι ένας χρήσιμος και δυνητικά ανεξάρτητος δείκτης γονιμότητας των ανδρών. Στις μέρες μας, καθίσταται γνωστό ότι η ποιότητα του σπέρματος εξαρτάται και από τη κατάτμηση-κατακερματισμό του Dna των σπερματοζωαρίων. Περίπου το 20% των σπερματοζωαρίων κατά την εκσπερμάτιση εμφανίζουν κατάτμηση στο dna τους με συχνότερη εμφάνιση σε ολιγοσπερμικά δείγματα. (Muriel L et. al.,2006), (Oosterhuis GJ et. al, 2000). Όταν το ποσοστό κατακερματισμού του Dna ξεπερνάει της τιμή του 30% που ορίζεται σύμφωνα με το Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας(WHO) τότε το σπέρμα μπορεί να ευθύνεται για τη μη ανάπτυξη των εμβρύων πέρα της 3ης μέρας, τη μη επίτευξη εγκυμοσύνης ή και την αποβολή του εμβρύου. Έχει παρατηρηθεί ότι άνδρες με υψηλό ποσοστό κατάτμησης του dna των σπερματοζωαρίων τους μπορεί να έχουν φυσιολογικές ή ακόμη και πολύ καλές τιμές των κλασσικών παραμέτρων αξιολόγησης του σπέρματος τους ως ένδειξη αυξημένης απόπτωσης των σπερματοζωαρίων, και αντίθετα άνδρες με χαμηλό ποσοστό κατάτμησης του dna των σπερματοζωαρίων τους να εμφανίζουν χαμηλές τιμές των κλασσικών παραμέτρων. (Muriel L et al, 2006)

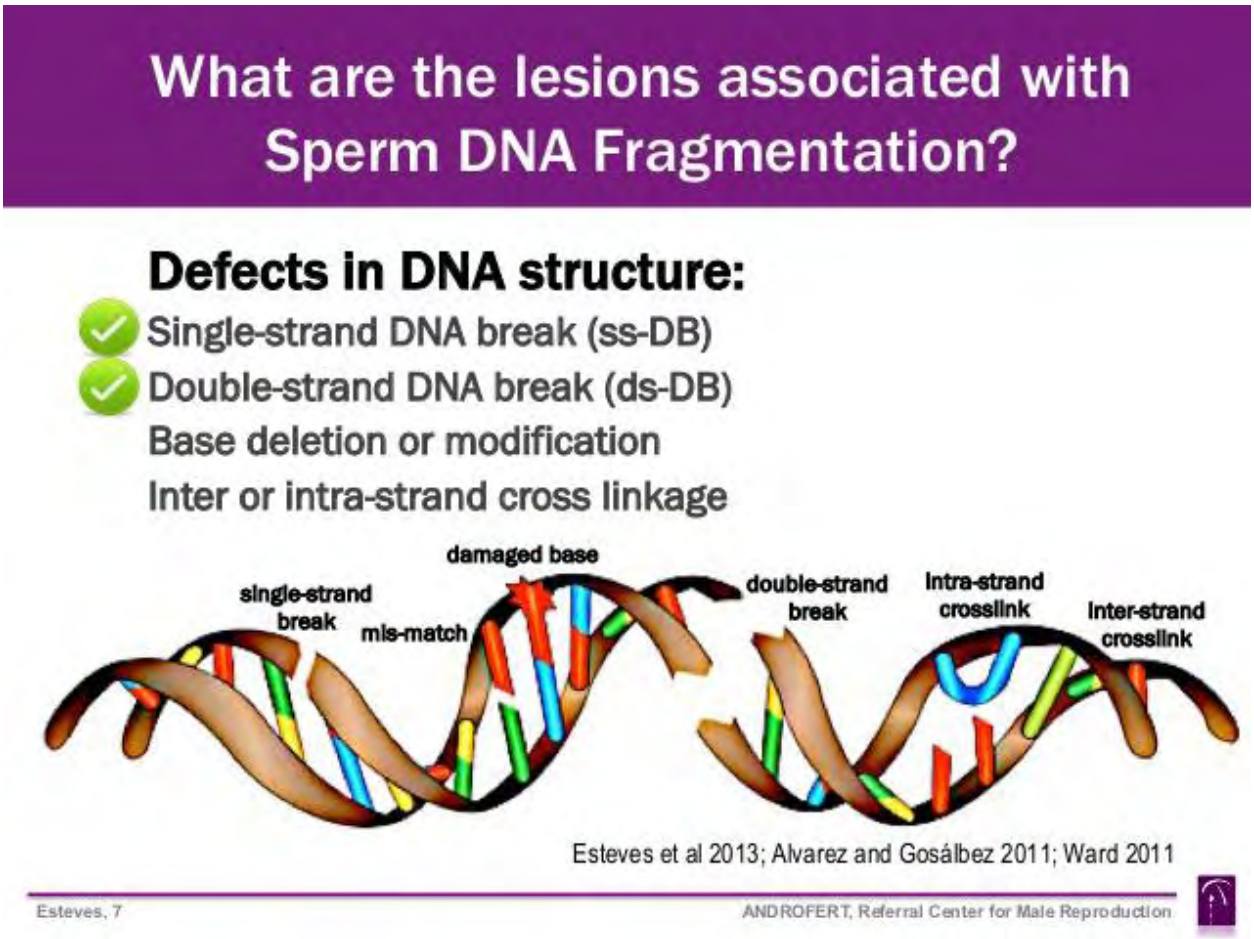
1.1.2Α Ερμηνεία του όρου κατακερματισμός ή κατάτμηση του Dna των σπερματοζωαρίων

Το σπερματοζωάριο είναι ένα αξιοσημείωτο επίτευγμα της φύσης. Αυτό είναι το μικρότερο και το πιο ενεργό κύτταρο στο ανθρώπινο σώμα και είναι ιδιαίτερα εξειδικευμένο για μία απλή λειτουργία – τη γονιμοποίηση του ωαρίου. Το σπέρμα αποτελείται από μια ουρά που συνδέεται με μια βιολογική μηχανή που παρέχει τεράστιο ενεργειακό εφοδιασμό κατά τη διάρκεια του ταξιδιού προς το ωάριο για γονιμοποίηση. Στο κεφάλι του σπέρματος βρίσκεται μία δομή σαν σάκος που ονομάζεται ακροσωματίο, το οποίο εκρήγνυται σε επαφή με το ωάριο, απελευθερώνοντας ένζυμα τα οποία διασχίζουν τα εξωτερικά στρώματα του ωαρίου και επιτρέπουν την πρόσβαση του σπέρματος στην επιφάνεια του ωαρίου όπου αυτό τα δεσμεύει. Μεταξύ ακροσωματίου στο κεφάλι και τον κινητήρα στην ουρά είναι το ωφέλιμο φορτίο του σπέρματος, το αρσενικό DNA. Το DNA καταλαμβάνει το μεγαλύτερο μέρος της περιοχής της κεφαλής του σπέρματος ενώ υπάρχει και ένας αριθμός μιτοχονδρίων. Όλα τα άλλα συστατικά του κυττάρου είναι απόντα από το σπερματοζωάριο και το έμβρυο τα αντλεί από το ωάριο. Αυτός είναι ο λόγος που το ωάριο είναι το μεγαλύτερο κύτταρο στον άνθρωπο. Το γενετικό υλικό (DNA) που βρίσκεται στη κεφαλή των σπερματοζωαρίων και στο εσωτερικό των ωαρίων είναι υπεύθυνο για τη μεταβίβαση των γενετικών χαρακτηριστικών των γονιών στην επόμενη γενεά. Έχει τη μορφή διπλής
έλικας η οποία ως γνωστόν σταθεροποιείται με χημικούς δεσμούς. Αν οι δεσμοί αυτοί σπάσουν τότε η έλικα γίνεται ασταθής . Η αστάθεια αυτή στο DNA των σπερματοζωαρίων λέγεται **κατάτμηση ή κατακερματισμός** και δεν αντιπροσωπεύεται από το συμβατικό σπερμοδιάγραμμα. Με τον όρο ανάλυση του κατακερματισμού του DNA του σπερματοζωαρίου εννοούμε πολύ απλά

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/05/2024 21:41:31 EEST - 3.145.18.80

τον έλεγχο της δομής του DNA των σπερματοζωαρίων, δηλαδή έλεγχο για ρωγμές ή σπασίματα (κατατμήσεις) της γνωστής σε όλους μας ελικοειδούς αλυσίδας. Οι βλάβες αυτές εμφανίζονται στο DNA κάθε κυττάρου όταν αυτό «γερνάει», ή όταν κάποια εξωγενής αιτία το οδηγεί στο θάνατο. Το ίδιο συμβαίνει και στα σπερματοζωάρια. Είναι αναμενόμενο λοιπόν τα νεκρά ή «γερασμένα» σπερματοζωάρια να φέρουν κατατμήσεις. Αυτό το φαινόμενο δεν αποτελεί πρόβλημα, αφού τα αδύναμα αυτά σπερματοζωάρια δεν θα γονιμοποιήσουν το ωάριο. Υπάρχουν ωστόσο περιπτώσεις όπου φαινομενικά υγιή σπερματοζωάρια μπορεί να φέρουν κατατμήσεις στο DNA τους. Τα σπερματοζωάρια αυτά μπορεί να έχουν φυσιολογική μορφολογία και κινητικότητα και να είναι ικανά να γονιμοποιήσουν ένα ωάριο ενώ να μη πραγματοποιηθεί ενεργοποίηση του εμβρυϊκού γονιδιώματος τη 3η ημέρα ανάπτυξής του. Στα ικανά προς γονιμοποίηση φυσιολογικής μορφολογίας σπερματοζωάρια οι συνέπειες εμφανίζονται μετά τη γονιμοποίηση, αφού το σπασμένο DNA του σπερματοζωαρίου δεν μπορεί να λειτουργήσει σωστά. Έτσι, οι κατατμήσεις μπορεί να εμποδίσουν την ανάπτυξη του εμβρύου στα πρώτα στάδια προκαλώντας βιοχημικές ή παλίνδρομες κυήσεις. Στην περίπτωση μη φυσιολογικού δείκτη κατακερματισμού,που εξαρτάται από τη μέθοδο μέτρησης κατακερματισμού του Dna, είναι αυξημένη επίσης και η πιθανότητα αποτυχημένης εξωσωματικής και αποβολών. (Juergen Liebermann. Vitrification of Oocytes and Embryos.Fertility Centers of Illinois, Chicago, IL USA)

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/05/2024 21:41:31 EEST - 3.145.18.80

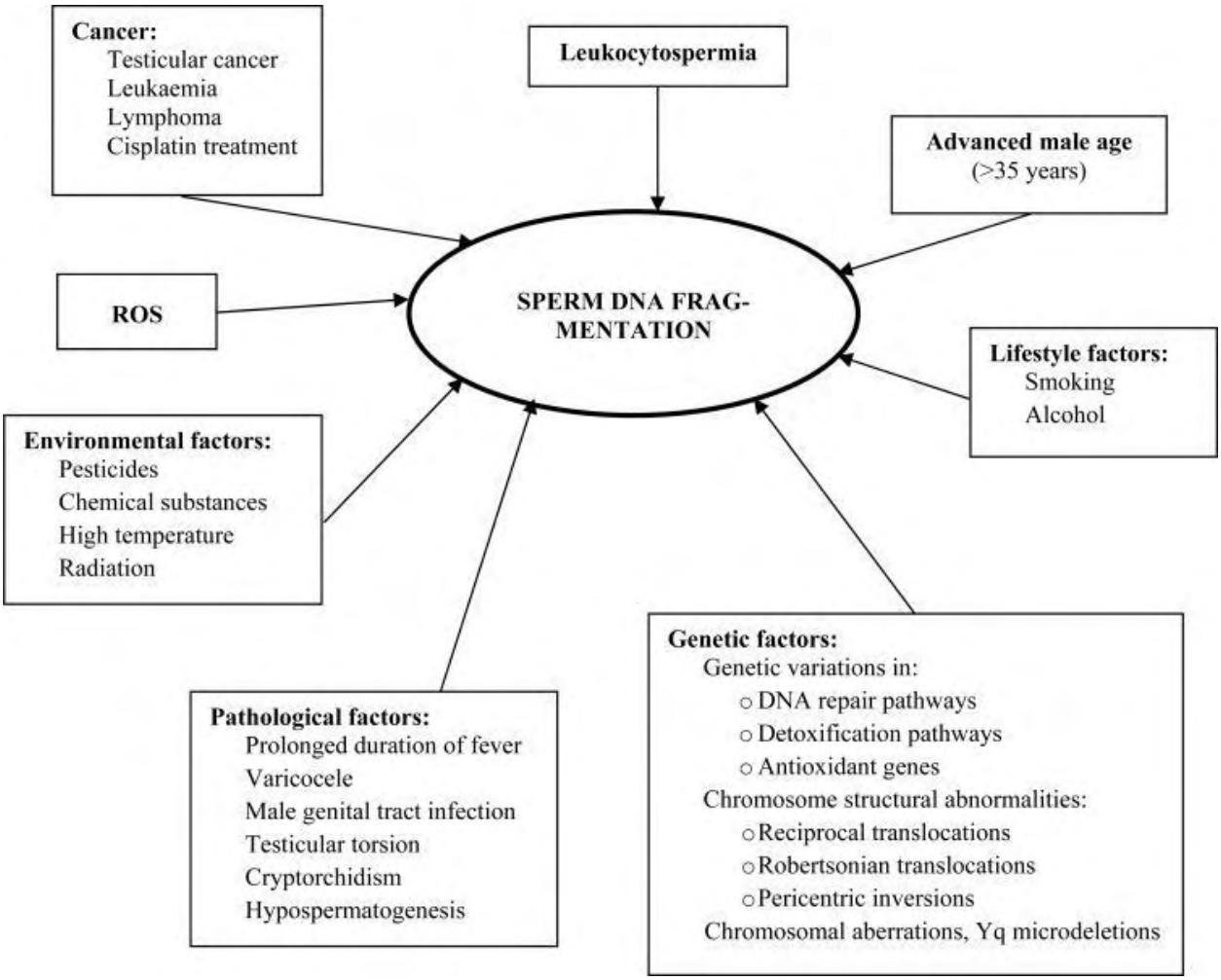


Πηγή: http://www.slideshare.net/sandroesteves/sperm-dna-fragmentation-in-male-infertility
Εικόνα 1: Τύποι κατακερματισμού του σπερματικού Dna (Kyung S., Reprod Med. 2013 Dec; 40(4): 143–147.)

1.1.2Β Παράγοντες που επάγουν κατακερματισμό ή κατάτμηση του Dna των σπερματοζωαρίων

Οι παράγοντες που μπορούν να προκαλέσουν κατακερματισμό του σπερματικού Dna διακρίνονται τόσο ως προς το αν προέρχονται από το εξωτερικό περιβάλλον και από συνήθειες του άνδρα όσο και από διάφορες παθήσεις και γενετικές αλλαγές. Η δράση τους αφορά τη χρωματίνη σε σπασίματα είτε στη μία είτε και στις δύο αλυσίδες του Dna . Στο παρακάτω Γράφημα βρίσκονται οι περισσότεροι από αυτούς τους παράγοντες.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/05/2024 21:41:31 EEST - 3.145.18.80



Πηγή : http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3955419/

Σχήμα 1 : Οι κυριότεροι παράγοντες κατακερματισμού του DNA του σπερματοζωαρίου (Fernández JL, s. Mutat Res. 2000 Sep 20;453(1):77-82.)

Υπάρχουν πολλά διαφορετικά επίπεδα ανωμαλιών στη χρωματίνη του σπέρματος που είναι σημαντικό να λαμβάνονται υπόψη: 1) βλάβη στην ακεραιότητα του DNA , με τη μορφή των "σπασιμάτων" στη μία ή και στις δύο έλικες του DNA, 2) ελαττώματα στη πυρηνική πρωτεΐνη, η οποία μπορεί να επηρεάσει την μετατροπή της ιστόνης σε πρωταμίνη και την επακόλουθη συμπύκνωση του DNA, και 3) δομικές ανωμαλίες της χρωματίνής που προκαλούν αλλοίωση στη τριτοταγή δομή της. Το περιβαλλοντικό στρες, οι γονιδιακές μεταλλάξεις,οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες μπορούν να διαταράξουν βιοχημικά γεγονότα που συμβαίνουν κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης, πράγμα που τελικά να οδηγήσει σε ανώμαλη δομή της χρωματίνης προκαλώντας υπογονιμότητα. Τα ωάριο είναι σε θέση να επισκευάσει τη βλάβη του DNA του

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/05/2024 21:41:31 EEST - 3.145.18.80

σπέρματος σε κάποιο βαθμό αλλά όταν η βλάβη του DNA του σπέρματος είναι εκτεταμένη, το ωάριο μπορεί να μην έχει την ικανότητα επισκευής ώστε να επιτραπεί φυσιολογικά η γονιμοποίηση. (J Stern. et .al,2014)

Υπάρχει μια ποικιλία από αιτιολογικούς παράγοντες που έχουν συσχετιστεί με τον κατακερματισμό του DNA του σπέρματος και / ή την εξασθενημένη ακεραιότητα της χρωματίνης. Αυτές οι αιτίες είναι πολλές και κυμαίνονται από περιβαλλοντικές συνθήκες όπως το κάπνισμα τσιγάρων , η ακτινοβολία , η χημειοθεραπεία σε παθοφυσιολογικές καταστάσεις όπως leukocytospermia, η κιρσοκήλη και ο καρκίνος Ακόμη και ιατρογενείς αιτίες, όπως η κρυοσυντήρηση του σπέρματος έχουν συσχετιστεί με βλάβες στο DNA των σπερματοζωαρίων. Οι ακριβής μοριακοί μηχανισμοί με τους οποίους αυτές οι συνθήκες οδηγούν σε βλάβες στο DNA των σπερματοζωαρίων και σε ανωμαλίες της χρωματίνης DNA δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητοί, αλλά αξίζουν προσοχής έξι κύριοι μηχανισμοί πρόκλησης βλαβών στο dna των σπερματοζωαρίων που μπορούν να συμβούν τόσο κατά τη παραγωγή όσο και κατά τη μεταφορά των σπερματοζωαρίων:

1. Απόπτωση κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης
2. Σπασίματα-εγκοπές στο DNA που δημιουργούνται κατά τη διαδικασία αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης του σπέρματος στη σπερμιογένεση
3. Μετά-όρχικός κατακερματισμός του DNA του σπέρματος που προκαλείται κυρίως από ρίζες οξυγόνου, συμπεριλαμβανομένων των ριζών υδροξυλίου και νιτρικού οξειδίου, κατά τη μεταφορά του σπέρματος μέσω των σπερματικών σωληναρίων και της επιδιδυμίδας
4. Κατάτμηση του σπερματικού DNA από ενδογενείς κασπάσες και ενδονουκλεάσες
5. Βλάβες στο DNA προκαλούμενες από ακτινοθεραπεία και χημειοθεραπεία και
6. Βλάβες στο DNA προερχόμενες από περιβαλλοντικές τοξικές ουσίες.

Από τους έξι αυτούς μηχανισμούς, αυτός που μπορεί να συμβάλλει χαρακτηριστικά στο κατακερματισμό του DNA του σπέρματος είναι η μετα-ορχική βλάβη κατά τη μεταφορά του σπέρματος μέσα από την επιδιδυμίδα. Αυτό υποστηρίζεται από μελέτες που αποδεικνύουν ότι ο κατακερματισμός του DNA είναι υψηλότερος στην ουρά της επιδιδυμίδας και τα εκσπερματισμένα σπερματοζωάρια μοιάζουν με τα σπερματοζωάρια των όρχεων.

Επαγωγή της απόπτωσης κατά τη διαδικασία της σπερματογένεσης

Κατά τη διαδικασία της σπερματογένεσης ο μηχανισμός ελέγχου των γεννητικών κυττάρων πραγματοποιείται από τα κύτταρα Sertoli και είναι υπεύθυνος για την επαγωγή της απόπτωσης στο 50% -60% του συνόλου των γεννητικών κυττάρων που εισέρχονται στη μείωση I. Αυτά τα κύτταρα "μαρκάρονται" με αποπτωτικούς δείκτες τύπου Fas και φαγοκυττάρώνονται από τα Sertoli με τα οποία είναι συνδεδεμένα. Ωστόσο, ο μηχανισμός αυτός δεν λειτουργεί πάντα αποτελεσματικά και ένα μεταβλητό ποσοστό αυτών των ελαττωματικών γεννητικών κυττάρων (Committed The role of assisted hatching in in vitrofertilization: A review of the literature. A committee opinion. Fertility and Sterility Vol 90, Suppl 3, 2008.) εισέρχεται στη διαδικασία της διαμόρφωσης του σπέρματος στη σπερματογένεση ενώ τα κύτταρα αυτά εμφανίζονται και κατά την εκσπερμάτωση. Όσον αφορά την επιτυχία αυτού του μηχανισμού διαλογής, τα αποτελέσματα

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/05/2024 21:41:31 EEST - 3.145.18.80

μιας πρόσφατης μελέτης από τον Burrello et.al.,(Burrello et.al., 2004) δείχνουν ότι η ποιότητα του γονιδιώματος του βλαστικού κυττάρου δε σχετίζεται με την διαμόρφωση του σπέρματος κατά τη σπερματογένεση. Αυτό σημαίνει ότι ο πυρήνας του βλαστικού κυττάρου μπορεί να έχει " διαταραχθεί " λόγω απόπτωσης ή να φέρει κάποια ανευπλοιδία ενώ το σπερματοζωάριο που προκύπτει να έχει φυσιολογική μορφολογία. Έτσι, όταν γίνεται ICSI με σπερματοζωάριο φυσιολογικής μορφολογίας δεν σημαίνει κατ 'ανάγκη ότι και το dna του είναι φυσιολογικό. Έχει αποδειχθεί ότι ολιγοσπερμικοί άνδρες έχουν περισσότερες πιθανότητες να εμφανίζουν ανευπλοιδίες στα φυσιολογικής μορφολογίας σπερματοζωάρια τους παρά οι άνδρες με κανονικό αριθμό σπερματοζωαρίων. Αυτό πιθανότατα σχετίζεται με μη ολοκληρωμένη ωρίμανση των σπερματοζωαρίων σε συνδυασμό με μειωτικές αλλαγές. Επίσης, το γεγονός ότι ένα ποσοστό των σπερματοζωαρίων κατά την εκσπερμάτωση εκφράζουν αποπτωτικούς δείκτες, για παράδειγμα, Fas, φωσφατιδυλοσερίνη, Bcl-XL, p53, δείχνει ότι το φαινόμενο αυτό θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για να επιλεχθούν μη αποπτωτικά σπερματοζωάρια από το δείγμα.

Σπασίματα-εγκοπές στο DNA που δημιουργούνται κατά τη διαδικασία αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης του σπέρματος στη σπερμιογένεση

Αλλαγές στη διαδικασία αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης κατά τη σπερμιογένεση μπορεί να οδηγήσουν σε κατακερματισμό του dna των σπερματοζωαρίων .Ο Mc Pherson και ο Longo, (McPherson S, et.al., 1993.), (McPherson SM, et.al., 1992), υποστηρίζουν ότι η παρουσία σπασιμάτων στο dna των σπερματοζωαρίων που εμφανίζονται στην ανάλυση του δείγματος είναι ενδεικτική για βλάβες κατά την ωρίμανση τους. Υπέθεσαν ότι η συσπείρωση της χρωματίνης απαιτεί τη δράση ενδονουκλεάσης τόσο για τη δημιουργία όσο και για τη σύνδεση των σπασιμάτων- αποκοπών διευκολύνοντας έτσι τη δράση των πρωταμινών. Η παρουσία των σπασιμάτων πιστεύεται ότι ενισχύει τη σωστή συσπείρωση της χρωματίνης κατά τη διάρκεια μετατόπισης των ιστονών από τις πρωταμίνες. Ο μη σωστός έλεγχος αυτής της διαδικασίας μπορεί να προκαλέσει ανωμαλίες στη συσπείρωση της χρωματίνης ή έλλειψη επιδιόρθωσης των σπασιμάτων στο dna των σπερματοζωαρίων.

Μετά-όρχικός κατακερματισμός του DNA του σπέρματος που προκαλείται κυρίως από ρίζες οξυγόνου, συμπεριλαμβανομένων των ριζών υδροξυλίου και νιτρικού οξειδίου, κατά τη μεταφορά του σπέρματος μέσω των σπερματικών σωληναρίων και της επιδιδυμίδας

Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι τα ανώριμα σπερματοζωάρια, τα οποία παράγουν υψηλά επίπεδα των ROS (Reactive oxygen species), μπορεί να προκαλέσουν βλάβη στο DNA ώριμου σπέρματος. Αυτή η βλάβη μπορεί να πραγματοποιηθεί κατά τη μετανάστευση των ώριμων και των ανώριμων σπερματοζωαρίων από τα σπερματικά σωληνάρια στην ουρά της επιδιδυμίδας. Αν και ο χρόνος ημίσειας ζωής των ROS είναι της τάξης των νανοδευτερολέπτων σε μικροδευτερόλεπτα είναι αρκετός ΄ώστε να προκληθούν βλάβες από αυτά στο DNA του σπέρματος, ενώ πακετάρεται στην επιδιδυμίδα . Τα ROS μπορούν να βλάψουν το DNA του σπέρματος, άμεσα ή έμμεσα μέσω της ενεργοποίησης των κασπασών του σπέρματος και των ενδονουκλεασών. Αυτό φαίνεται κατά τη φυγοκέντρηση του σπέρματος ανώριμων (που παράγουν υψηλά επίπεδα ROS) με ώριμα σπερματοζωάρια που έχει ως αποτέλεσμα την επαγωγή του

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/05/2024 21:41:31 EEST - 3.145.18.80

κατακερματισμού του DNA του ώριμου σπέρματος, επειδή υπό συγκεκριμένες συνθήκες, ώριμα και ανώριμα σπερματοζωάρια βρίσκονται σε στενή επαφή. Έτσι, η in vitro έκθεση του ώριμου σπέρματος σε ROS οδηγεί σε σημαντική βλάβη στο DNA του. Από την άλλη πλευρά, τα επιθηλιακά κύτταρα της επιδιδυμίδας μπορούν επίσης να διαδραματίσουν ενεργό ρόλο στη ROS επαγόμενη βλάβη του DNA :1) διαμέσου των ROS, όπως ρίζα υδροξυλίου ή νιτρικού οξειδίου ή 2) μέσω ενεργοποίησης από κασπασες του σπέρματος και από ενδονουκλεάσες φυσικοχημικών παραγόντων, όπως υψηλή θερμοκρασία και περιβαλλοντικοί παράγοντες . Υποθετικά, η ζημία αυτή θα μπορούσε να προληφθεί με την χρήση αντιοξειδωτικών αλλά όμως αυτή η θεραπεία μπορεί να μην είναι αποτελεσματική. Στην μελέτη των Greco et al.(Greco E, et. al., 2005) , η χρήση αντιοξειδωτικών οδήγησε σε σημαντική μείωση των επιπέδων κατακερματισμού του DNA του σπέρματος. Ωστόσο, η προσοχή πρέπει στραφεί στη χρήση αντιοξειδωτικής θεραπεία γιατί μερικά αντιοξειδωτικά, όπως η βιταμίνη C, μπορούν να αυξήσουν τη συμπύκνωση της χρωματίνης με μείωση των δισουλφιδικών δεσμών διασταυρούμενης σύνδεσης (disulfide cross-linking) στις σπερματικές πρωταμίνες . Το πιο πιθανό είναι ότι τα σπερματοζωάρια που έχουν υψηλότερα επίπεδα των βλαβών του DNA θα είναι εκείνα που εμφανίζουν χαμηλότερα επίπεδα δισουλφιδίων διασταυρούμενης σύνδεσης στη χρωματίνη του σπέρματος τους κατά την ωρίμανσης του στην επιδιδυμίδα. Ενδιαφέρον είναι ότι, σε γενικές γραμμές, ο βαθμός κατακερματισμού του DNA του σπέρματος από την εκσπερμάτωση είναι υψηλότερος σε σχέση με το σπέρμα από τους όρχεις και το σπέρμα από τη κεφαλή της επιδιδυμίδας, διότι εκεί γίνεται η διαδικασία της διασταυρούμενης σύνδεσης δισουλφιδίων, ενώ ο κατακερματισμός του DNA του σπέρματος στην επιδιδυμίδα θα μπορούσε να σχετίζεται με τη γονιδιωματική ποιότητά των σπερματοζωαρίων. Θα πρέπει να επισημανθεί ότι ο κατακερματισμός του DNA του σπέρματος που προκαλείται από τη ρίζα υδροξυλίου και την ιονίζουσα ακτινοβολία γίνεται αρχικά στο σχηματισμό του 8-OH- γουανίνης και 8-OH-20-δεοξυγουανοσίνη (8-OHdG) και ακολουθεί κατακερματισμός σε μονόκλωνο DNA. Επιπλέον, η ρίζα υδροξυλίου μπορεί να προκαλέσει κατακερματισμό στη δίκλωνη έλικα του DNA ενεργοποιώντας τις κασπάσες και τις ενδονουκλεάσες του σπερματοζωαρίου. Η πρώτης μορφής βλάβη του DNA (8-OH-γουανίνης και 8-OH-20- δεοξυγουανοσίνη (8-OHdG)) μπορεί να επισκευαστεί από το ωάριο ή το εμβρύου,όμως η γονιμοποίηση ενός ωαρίου από ένα σπερματοζωάριο με εκτεταμένο κατακερματισμό της διπλής έλικας του DNA του είναι σχεδόν αδύνατον να επισκευαστεί και το έμβρυο να έχει φυσιολογική ανάπτυξη.

Κατάτμηση του σπερματικού DNA από ενδογενείς κασπάσες και ενδονουκλεάσες

Η ενεργοποίηση των κασπασών του σπέρματος και των ενδονουκλεασών από ρίζες οξυγόνου και φυσικοχημικούς παράγοντες μπορεί να επάγει τη κατάτμηση του DNA του σπέρματος. Μελέτες έδειξαν ότι η έκθεση του σπέρματος ποντικού στους 40oC οδηγεί σε σημαντική αύξηση στο κατακερματισμό του DNA των σπερματοζωαρίων. Πιο πρόσφατα, οι Banks et al.(Banks S., et. al., 2005) παρατήρησαν κατακερματισμό στο DNA του σπέρματος in vivo έπειτα από έκθεση του όρχι του ποντικού στους 42oC. Επειδή η αύξηση του κατακερματισμού του DNA του σπέρματος παρατηρήθηκε σε αυτούς τους ποντικούς εντός 1 ώρας μετά την έκθεση σε θερμότητα οι ερευνητές κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η παρατηρούμενη βλάβη πρέπει να έχει συμβεί στην επιδιδυμίδα και θα μπορούσε να έχει προκληθεί είτε από ROS είτε από ενεργοποίηση των

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/05/2024 21:41:31 EEST - 3.145.18.80

κασπασών του σπέρματος και των ενδονουκλεασών. Το γεγονός ότι ο πυρήνας του σπερματοζωαρίου του ποντικού έχει πιο ομοιογενής συσπείρωση αυξάνει τη πιθανότητα, το ανθρώπινο σπέρμα να είναι πιο επιρρεπές στη θερμότητα , λόγω των χαμηλότερων επιπέδων πρωταμινών στο πυρήνα και περισσότερη ετερογένεια στην συσπείρωση.

Βλάβες στο DNA προκαλούμενες από ακτινοθεραπεία και χημειοθεραπεία

Η έκθεση σε χημειοθεραπεία και ακτινοθεραπεία μπορεί να οδηγήσει στην επαγωγή του κατακερματισμού του DNA του σπέρματος. Πιστεύεται γενικά ότι οι θεραπείες του καρκίνου επηρεάζουν αρνητικά την ανδρική γονιμότητα και ότι η μείωση της παραγωγής του σπέρματος προκύπτει από τα κυτταροτοξικά αποτελέσματα της χημειοθεραπείας ή της ακτινοθεραπεία στο σπερματικό επιθήλιο . Αν και ειδική εξέταση του DNA του σπέρματος έχει οριστεί σε ασθενείς με καρκίνο, μια πρόσφατη μελέτη από τον O'Flaherty et al. (O'Flaherty C, et. al. 2008)δείχνει ότι η ακεραιότητα του DNA του σπέρματος και η συμπίεση επηρεάζονται σε ασθενείς με καρκίνο των όρχεων και λέμφωμα. Hodgkin, πριν από τη χημειοθεραπεία. Έχοντας δοκιμάσει διάφορες τεχνικές γα την εκτίμηση της βλάβης του DNA, όπως η SCSA, η TUNEL και η COMET οι ερευνητές κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η τελευταία ήταν η βέλτιστη για χρήση σε ασθενείς με καρκίνο. Ο συνδυασμός της τεχνικής COMET με τεστ που αξιολογούν τη συμπύκνωση του dna του σπέρματος, όπως η κυτταρομετρία ροής που βασίζεται σε CMA3 και mBBr δοκιμασίες, πιστεύεται ότι είναι κατάλληλος για να χαρακτηριστεί η ποιότητα της χρωματίνης του σπέρματος σε ασθενείς με καρκίνο.

Βλάβες στο DNA προερχόμενες από περιβαλλοντικές τοξικές ουσίες

Προηγούμενες μελέτες έχουν αποδείξει ότι υπάρχει συσχετισμός μεταξύ έκθεσης σε υψηλά επίπεδα ατμοσφαιρικής ρύπανσης και αύξησης της βλάβης του DNA στο ανθρώπινο σπέρμα. Σε μια πρόσφατη μελέτη,ο Rubes et al. (Rubes et al,2009)επέκτειναν αυτές τις παρατηρήσεις υποθέτοντας ότι οι άνδρες που είναι ομόζυγοι μηδέν για τη γλουταθειόνη-S-τρανσφεράση M1 είναι λιγότερο ικανοί να αποτοξινώσουν δραστικούς μεταβολίτες των καρκινογόνων πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων που βρίσκονται στη ρύπανση της ατμόσφαιρας. Κατά συνέπεια, αυτοί οι άνθρωποι είναι πιο ευαίσθητοι στις επιδράσεις της ατμοσφαιρικής ρύπανσης στην χρωματίνη του σπέρματος τους. Κάνοντας μια μελέτη στην οποία οι άνδρες που έδιναν δείγμα σπέρματος κατά τη διάρκεια περιόδων τόσο χαμηλής όσο και υψηλής ρύπανσης του αέρα, αποδείχθηκε σημαντική συσχέτιση μεταξύ της γλουταθειόνης-S-τρανσφεράσης M1,μηδενικός γονότυπος, και της αύξησης του κατακερματισμού του DNA του σπέρματος. Επιπλέον, οι άνδρες με μηδενικό γονότυπο για τη γλουταθειόνη-S-τρανσφεράση M1 έδειξαν επίσης υψηλότερα επίπεδα κατακερματισμού του DNA του σπέρματος.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/05/2024 21:41:31 EEST - 3.145.18.80

1.1.2Γ Μέθοδοι μέτρησης-αξιολόγησης του κατακερματισμού/κατάτμησης του σπερματικού Dna

Για να είναι μία τεχνική μέτρησης κατακερματισμού του DNA του σπέρματος κλινικά αποδεκτή πρέπει να παρέχει ισχυρή προγνωστική ικανότητα για εγκυμοσύνη με μικρή επικάλυψη μεταξύ γόνιμων και υπογόνιμων δειγμάτων. Οι τέσσερις τεχνικές που χρησιμοποιούνται συχνότερα σήμερα είναι : η SCSA, η TUNEL, η COMET και η SCD ή Halosperm. Οι τεχνικές αυτές μέτρησης κατάτμησης του DNA του σπέρματος είναι όλες διαφορετικές μεταξύ τους. Μετρούν διαφορετικές πτυχές της βλάβης του DNA και έχουν διαφορετικές ευαισθησίες.(J Ribas-Maynou et. al., 2013) **Στην παρούσα Διπλωματική χρησιμοποιήσαμε την τεχνική SCD ή Halosperm.**

SCD (Sperm Chromatin Decondensation)

Ακέραια σπερματοζωάρια σταθεροποιούνται σε ένα στρώμα αγαρόζης από τα οποία αποσυμπυκνώνεται το κατατμημένο DNA μετά από τη δράση δ/τος οξέος. Ακολουθεί λύση των κυττάρων με δ/μα λύσης, το οποίο έχει σαν αποτέλεσμα την απομάκρυνση των μεμβρανικών και πυρηνικών πρωτεϊνών, η οποία με τη σειρά της οδηγεί στο σχηματισμό πυρηνοειδών, που περιλαμβάνουν ένα κεντρικό πυρήνα και μια περιφερειακή Halo-στεφάνη διασκορπισμένων βρόχων DNA. Τέλος, ακολουθεί χρώση του παρασκευάσματος.

- % ποσοστό σπερματοζωαρίων με Halo-στεφάνη μεγάλης διαμέτρου
- Μικροσκόπιο φωτεινού πεδίου ή Μικροσκόπιο φθορισμού

Τα σπερματοζωάρια με Halo στεφάνη μεγάλης διαμέτρου έχουν μη κατακερματισμένο Dna.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/05/2024 21:41:31 EEST - 3.145.18.80

1.2 Επίδραση του περιβάλλοντος

Το ερώτημα που προβληματίζει τα τελευταία χρόνια, ολοένα και περισσότερο, την ανθρώπινη κοινωνία είναι η αναζήτηση των παραγόντων που οφείλονται για την μείωση της γονιμότητας των δύο φύλων. Ένας από τους παράγοντες που συμβάλλουν αρνητικά στην αναπαραγωγική λειτουργία των ανθρώπων φαίνεται πως αποτελεί το περιβάλλον. Όπως έχει ήδη αναφερθεί , οι επιβλαβείς περιβαλλοντικοί παράγοντες επιδρούν με διάφορους τρόπους στο αναπαραγωγικό σύστημα , κυρίως του άνδρα, καθιστώντας δύσκολη την επίτευξη σύλληψης. Υπάρχουν πολλών ειδών επιβλαβείς περιβαλλοντικοί παράγοντες: φυσικοί - υψηλή θερμοκρασία, ακτινοβολία κτλ, φυσιοπαθολογικοί - λοιμώδη νοσήματα, διαιτητικοί - συντηρητικά τροφών, χρωστικές ουσίες και οι φαρμακευτικοί και χημικοί παράγοντες με τους οποίους και θα ασχοληθούμε εκτενέστερα.(Κούτρας Δ. Α., 1994)

Πιο αναλυτικά, στους χημικούς περιβαλλοντικούς παράγοντες ανήκουν τα φυτοφάρμακα και συγκεκριμένα τα ζιζανιοκτόνα

. Στην παρούσα διπλωματική, θα μελετήσουμε την επίδραση των φυτοφαρμάκων στον κατακερματισμό του DNA του σπέρματος.

1.2.1 Φυτοφάρμακα

Η εξέλιξη της σύγχρονης κοινωνίας, τα τελευταία χρόνια, επέφερε αλλαγές στον τρόπο αλλά και στην ποιότητα ζωής μας. Η αύξηση του πληθυσμού σε συνδυασμό με την εξέλιξη της τεχνολογίας αποτέλεσαν τις βασικές αιτίες για την ολοένα και αυξανόμενη εκμετάλλευση του περιβάλλοντος. Ο άνθρωπος άρχισε να επεμβαίνει στο φυσικό περιβάλλον με σκοπό την παραγωγή μεγαλύτερου αριθμού τροφίμων. Καθοριστικό ρόλο στην αύξηση αυτή , έπαιξε η εμφάνιση των φυτοφαρμάκων.

Τα φυτοφάρμακα οι χημικές αυτές ενώσεις που παράγει ο άνθρωπος για την ελλάτωση των ζημιών της καλλιέργειας από πάσης φύσεως προσβολές. Αναπτύχθηκαν τα τελευταία εξήντα περίπου χρόνια. Το 1942 ο Ελβετός Muller ανακαλύπτει το DDT, ενώ το 1946 τα εργαστήρια της εταιρίας φαρμάκων BAYER κατασκευάζουν το παραθείο. Τα πρώτα χρόνια της ανακάλυψής τους, η συμβολή τους στην προστασία της αγροτικής παραγωγής, γέννησε πολλές ελπίδες για τη λύση του προβλήματος τροφής που αντιμετώπιζε η ανθρωπότητα με την αύξηση του πληθυσμού. (Αναστασία, Δρ Δημητρίου, 2001)

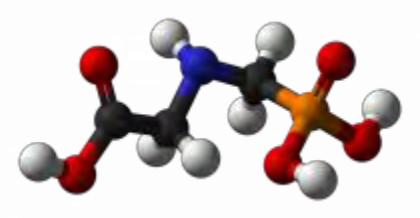
Ταυτόχρονα η προσφορά τους ήταν μεγάλη και στην προστασία της δημόσιας υγείας με την καταπολέμηση ενοχλητικών εντόμων, που έφεραν διάφορες ασθένειες στον άνθρωπο και ανοίγονται νέοι ορίζοντες στη βελτίωση της ποιότητας της ανθρώπινης ζωής.

Έτσι τα φυτοφάρμακα αντιμετωπίζονται απ' όλους μόνο από τη θετική τους πλευρά και οι βιομηχανίες φαρμάκων συναγωνίζονται μεταξύ τους για την παραγωγή νέων φυτοφαρμάκων με μεγαλύτερη δράση. Ωστόσο, τα θετικά αποτελέσματα όσον αφορά την απόδοση των φυτών και τον έλεγχο των φυτοπαράσιτων ήταν πρόσκαιρα. Ο εθισμός στις χρησιμοποιούμενες δόσεις

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/05/2024 21:41:31 EEST - 3.145.18.80

φυτοφαρμάκων οδήγησε στην αύξηση των δόσεων ή στην ανεύρεση νέων τοξικών ουσιών, για να φτάσουμε τελικά σήμερα στα φυτοφάρμακα τρίτης γενιάς. Τα υπολείμματα φυτοφαρμάκων σε λαχανικά, φρούτα, ζώα, ψάρια, φυτά είναι προφανές ότι καταλήγουν στην κορυφή της τροφικής αλυσίδας, στον άνθρωπο. Από τις πιο ανησυχητικές επιδράσεις των φυτοφαρμάκων είναι η διαταραχή της αναπαραγωγικής διαδικασίας, του ανοσοποιητικού συστήματος, της όρασης, ο κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου, καθώς και βλάβες στο νευρικό σύστημα και στο συκώτι. Τις πιο άμεσες επιπτώσεις από τα φυτοφάρμακα έχουν προφανώς οι αγρότες, οι οικογένειές τους και οι εργάτες στη βιομηχανία παραγωγής και συσκευασίας φυτοφαρμάκων. Ζιζανιοκτόνα, εντομοκτόνα, μυκητοκτόνα είναι οι πιο γνωστές κατηγορίες φυτοφαρμάκων ανάλογα με τον οργανισμό που προσβάλλουν. Εμείς θα μελετήσουμε τον παράγοντα glyphosate, που αποτελεί συστατικό του ευρέως χρησιμοποιούμενου ζιζανιοκτόνου, Roundup. (Ευθαλία Λουπάκη, 2009)

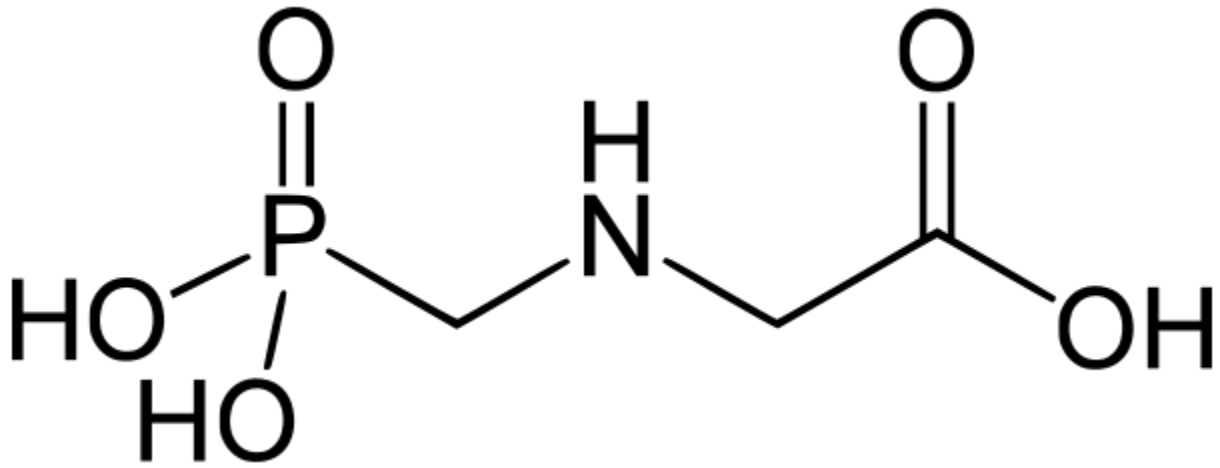
1.2.2 Glyphosate



Το Roundup είναι το πρώτο σε πωλήσεις και αποτελεσματικότητα ευρέως
φάσματος χημικό φυτοφάρμακο (ζιζανιοκτόνο) στο κόσμο.Το κύριο δραστικό συστατικό του είναι το glyphosate (γλύφοσεϊτ) ενώ περιέχει διάφορα αδρανή στοιχεία, όπως η διοξίνη και η polyexyethylameamine (POEA),αδρανής ουσία που αποτελεί το 15% του ζιζανιοκτόνου και το βοηθά να εισχωρήσει στις ρίζες των ζιζανίων. Πιο αναλυτικά, το glyphosate ή N-(phosphonomethyl)glycine αποτελεί ένα μεταφυτρωτικό, μη εκλεκτικό, διασυστηματικό ζιζανιοκτόνο πολύ δραστικό εναντίων των περισσότερων ζιζανίων, πολυετώνδυσκολοεξόντωτων ή μονοετών. Είναι ένα από τα ευρέως χρησιμοποιούμενα ζιζανιοκτόνα και αντιπροσωπεύει περίπου το 25% της παγκόσμιας αγοράς ζιζανιοκτόνων. Η ευρεία χρήση του στη γεωργία οφείλεται στο γεγονός ότι προσφέρει έναν απλό και οικονομικό τρόπο αποτελεσματικής αντιμετώπισης των ζιζανίων. Τα περισσότερα προιόντα glyphosate χρησιμοποιούνται στη γεωργία , αλλά σε ορισμένες χώρες χρησιμοποιούνται για να ελέγξουν τα ζιζάνια στους κήπους, σε βιομηχανικά συγκροτήματα ή και κατά μήκος των σιδηροδρομικών γραμμών. Ο Henri Martin , ήταν αυτός που συνέθεσε για πρώτη φορά το glyphosate σε μία μικρή ελβετική εταιρία. Ωστόσο, ο χημικός John E. Franz της εταιρίας Monsanto, ήταν ο πρώτος που δοκίμασε το glyphosate ως ζιζανιοκτόνο, στις αρχές της δεκαετίας του 1970. Η εταιρία Monsanto το κυκλοφόρησε σthν αγορά το 1974 για πρώτη φορά, με την εμπορική ονομασία Roundup. Το Roundup αποτελεί ένα

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/05/2024 21:41:31 EEST - 3.145.18.80

μη επιλεκτικό ζιζανιοκτόνο, το οποίο δρα στα περισσότερα είδη φυτών. Χρησιμοποιείται κυρίως για την μεταφυτρωτική καταπολέμηση ετήσιων και πολυετών (αγρωστωδών και πλατύφυλλων) και υδροχαρών ζιζανίων. Τα προϊόντα τύπου glyphosate είναι εγκεκριμένα σε περισσότερες από 130 χώρες για τον έλεγχο των ζιζανίων σε περισσότερα από 100 σπαρτά. Κανένα άλλο ζιζανιοκτόνο δεν έχει τόσες εγκεκριμένες χρήσεις (Μονσάντο,2002).
Το glyphosate αποτελεί το αρχικό όνομα ενός ασθενούς οργανικού οξέος, το οποίο αποτελείται από τμήμα γλυκίνης και φωσφονομεθυλίου (phosphonomethyl). Το χημικό του όνομα είναι N-(phosphonomethyl)glycine. Το glyphosate είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί σε ποικίλα σκευάσματα, όπως Roundup® UltraMAX , Roundup Pro®, Roundup Ready-to-Use Weed and Grass Killer (Μονσάντο,2002) . Το κυριότερο σκεύασμα του αποτελεί το Roundup, το οποίο είναι ένα υδατικό διάλυμα, που περιέχει 36% β/ο δραστική ουσία (glyphosate υπό μορφή άλατος ισοπροπυλαμίνης) και 67,6% β/β βοηθητικές ουσίες. Υπάρχουν σκευάσματα του Roundup που χαρακτηρίζονται από άλλες συγκεντρώσεις δραστικών ουσιών ή ακόμα άλλους επιφανειοδιαβρέκτες (surfactants) που έχουν αναπτυχθεί για συγκεκριμένες εφαρμογές.
Σύνθεση του Roundup®: glyphosate (36%), polyethoxylated tallowamine surfactant και νερό Ο μοριακός του τύπος είναι C3H8NO5P και αναλυτικότερα:



Εικόνα 2:

Το μοριακό του βάρος είναι 169,07 g/mole. Το glyphosate έχει καθαρότητα ≥80%, αλλά γενικότερα η καθαρότητα του υπερβαίνει το 90%. Το Roundup είναι ένα υδατικό διάλυμα, ελαφρώς κίτρινο και με ελαφρά οσμή (αμίνης). Δεν αναφλέγεται και δεν εκρήγνυται. (Θεοδοσία Φουντούλη, 2005)

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/05/2024 21:41:31 EEST - 3.145.18.80

1.2.3 Χημικές και φυσικές ιδιότητες

Το glyphosate είναι ένα ασθενές οργανικό οξύ που αποτελείται από ένα μόριο γλυκίνης και ένα τμήμα φωσφονομέθυλίου. Ο εμπειρικός τύπος είναι C3H8NO5P. Το glyphosate υπάρχει συνήθως με τη μορφή ενός άλατος του αποπρωτονιωμένου οξέος του glyphosate και ένα κατιόν, π.χ., ισοπροπυλαμίνη ή τριμεθυλσουλφονίου. Η καθαρότητα του τεχνικού βαθμού glyphosate είναι γενικά πάνω από 90%. Αυτού του τύπου το glyphosate είναι άοσμη λευκή κρυσταλλική σκόνη με ένα ειδικό βάρος 1,704, με πολύ χαμηλή τάση ατμών και υψηλή διαλυτότητα στο νερό.Ο συντελεστή κατανομής οκτανόλης-νερού (log Kow) είναι -2.8. Glyphosate είναι αμφοτερικά και μπορούν να υφίστανται ως διαφορετικά ιοντικά είδη, που εξαρτώνται από το pH. (Emmanouil N Papadakis et. al., 2008)

Πίνακας 4: Φυσικές και χημικές ιδιότητες του glyphosate (Πηγές:European Commission, WHO, 1994)

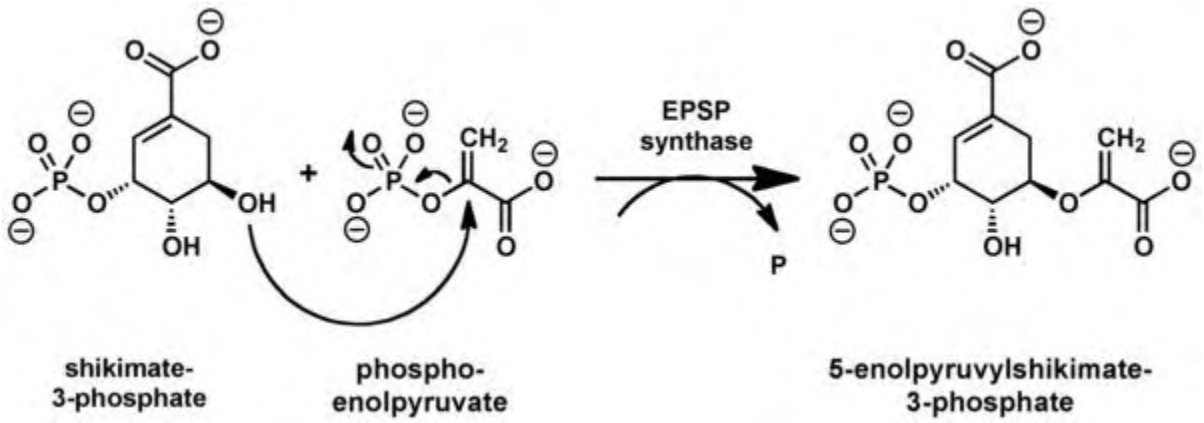
Εμπορικό όνομα σκευάσματος	Roundup
Όνομα δραστικής ουσίας	glyphosate
Μοριακός τύπος	C3H8NO5P
Μοριακό Βάρος	169,07
Φυσική κατάσταση	κρυσταλλική σκόνη
Χρώμα	λευκό
Οσμή	καμία
Σημείο τήξης	184,5 καθαρότητα 96%
Σημείο βρασμού	decomposition(EC)*
Ειδική πυκνότητα	1,704 20oC -καθαρότητα 100%
Πίεση ατμών	<1*10-5 Pa 25oC

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/05/2024 21:41:31 EEST - 3.145.18.80

Διαλυτότητα στο νερό	10 g/l 20oC καθαρότητα 96%
Σταθερά νόμου του Henr	y <7*10-11
Συντελεστής κατανομής οκτανόλης-ύδατος (logkow)	-2.8
Επιφανειακή τάση	0,072N/m 0.5% (w/v) σε 25oC
pKa τιμές	< 2, 2.6, 5.6, 10.6
Μοριακή απορρόφηση	0,086 l/mol ανά cm 295 nm
Αναφλεξιμότητα	μη εύφλεκτο

1.2.4 Τρόπος Δράσης του Glyphosate

Το glyphosate ανήκει στην ομάδα των παρεμποδιστών της βιοσύνθεσης αρωματικών οξέων της οικογένειας των γλυκινών (Glycines) (Ελευθεροχωρινός, 2008). Η δράση του βασίζεται στη αναστολή της σύνθεσης αρωματικών αμινοξέων

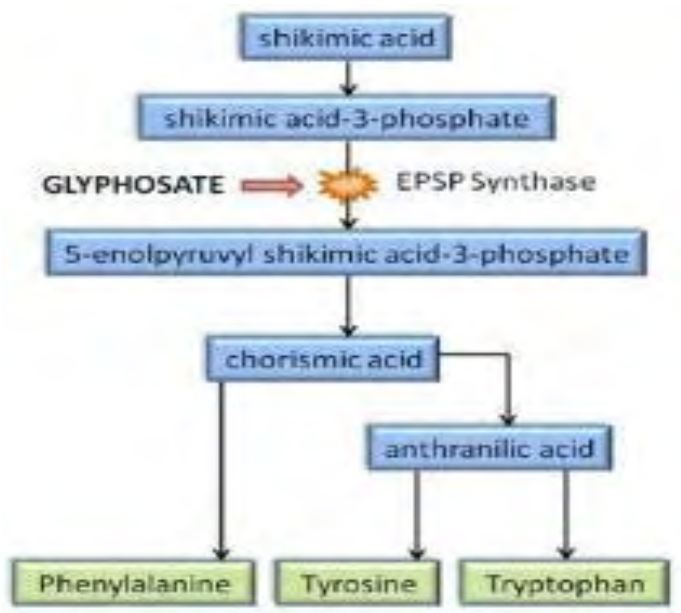


Εικόνα 3 : Η απενεργοποίηση του ενζύμου EPSPS
Πηγή :http://Isbzix.rc.unesp.br/skpdb/EPSPS.html

Πιο συγκεκριμένα απενεργοποιεί το ένζυμο Συνθετάση του 5–ενολοπυρουβιλσικιμικού -3-φωσφορικού οξέως (EPSP Synthase) με την προσκόλληση του στο ένζυμο αυτό (Moreland et.al., 1997). Η απενεργοποίηση του ενζύμου EPSPS (Εικόνα 3) έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της σύνθεσης EPSP (χορισμικό οξύ), το οποίο αποτελεί πρόδρομη ουσία σε πολλά μονοπάτια βιοσύνθεσης συστατικών των κυττάρων όπως των αρωματικών αμινοξέων τρυπτοφάνη, τυροσίνη

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/05/2024 21:41:31 EEST - 3.145.18.80

και φαινυλανίνη (Εικόνα 4) (Devine et al., 1993; Μουρκίδου, 2008). Το glyphosate δεν αναστέλλει απλώς τη βιοσύνθεση των αρωματικών αμινοξέων αλλά και μιας πληθώρας άλλων σημαντικών ουσιών για την λειτουργία και επιβίωση των κυττάρων (Μουρκίδου, 2008). Ακόμα παρεμβαίνει στη αναπνοή, την φωτοσύνθεση και στην βιοσύνθεση της χλωροφύλλης. Το σικιμικό μονοπάτι βιοσύνθεσης ανήκει μόνο στα φυτά και στους μικροοργανισμούς. Επομένως αυτός είναι ο λόγος που το glyphosate επηρεάζει μόνο φυτά, ορισμένα βακτήρια και μύκητες και θεωρείται σχετικά ασφαλές για τα θηλαστικά και τα ψάρια, δεδομένου ότι ο μηχανισμός στον οποίο παρεμβαίνει δεν απαντάται σε αυτά.



Εικόνα 4 : Τρόπος δράσης του glyphosate . Σχηματική απεικόνιση της μεταβολικής οδού του σικιμικού στη βιοσύνθεση των αρωματικών αμινοξέων τρυπτοφάνη, τυροσίνη και φαινυλαλανίνη και των σημείων παρεμπόδισής της**(http://www.glyphosate.eu/)**

1.2.5 Μεταβολισμός και αποικοδόμηση του Glyphosate

Όπως έχουμε ήδη αναφέρει, ο κύριος μεταβολίτης του glyphosate είναι το AMPA (αμινομεθυλο - φωσφονικό οξύ)(Pete Rilley et. al.,2011). Πολλοί ερευνητές υποστηρίζουν την άποψη ότι η αποικοδόμηση του glyphosate στο έδαφος θεωρείται κατά βάση μια καθαρά μικροβιακή διαδικασία (Sprankle et al., 1975b)(Rueppel et al., 1977) (Gimsing et al., 2004). Ακόμα πολλοί εδαφικοί παράγοντες (τύπος εδάφους, pH, θερμοκρασία) επηρεάζουν την αποικοδόμηση και τον ρυθμό της (Heinonen-Tanski, 1989) (Grunewald et al., 2001)(Borggaard and Gimsing, 2008). Το

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/05/2024 21:41:31 EEST - 3.145.18.80

glyphosate είναι δυνατόν να αποικοδομηθεί στο έδαφος από διάφορα είδη βακτηρίων με δύο τρόπους. Η μία διαδρομή είναι μέσω του σχηματισμού του AMPA, κατά την οποία το πρώτο βήμα αποτελεί η διάσπαση του δεσμού C–N (Balthazor and Hellas, 1986)(Jacob et al., 1988)(Franz et al., 1997) (Barry et al., 1998;). Η άλλη διαδρομή είναι μέσω του σχηματισμού μεθυλιωμένης γλυκίνης (N-methyl-glycine) γνωστής με το όνομα σαρκοσίνη και ορθοφωσφορικού οξέως και στην συνέχεια ο σχηματισμός γλυκίνης και μιας μονο-ανθρακικής ομάδας, που τελικά μπορεί να σχηματίσει CO2. Σε αυτή την διαδρομή το πρώτο βήμα είναι η διάσπαση του δεσμού C-P (Shinabarger and Braymer, 1986)(Kishore and Jacob, 1987)(Dick and Quinn, 1995). Μέχρι τα μέσα της δεκαετίας του 1980 υπήρχε η αντίληψη ότι το AMPA είναι ο κύριος μεταβολίτης του glyphosate (Rueppel et al., 1977)(Carlisle and Trevors, 1988). Ωστόσο το 1986 έγινε η απομόνωση ενός βακτηρίου Pseudomonas το οποίο είχε την ικανότητα να διασπάσει το glyphosate μέσω της διαδρομής σχηματισμού της σαρκοσίνης, η οποία διαδρομή προτάθηκε ως μοναδική σε αυτό το βακτήριο (Shinabarger and Braymer, 1986). Σήμερα είναι γνωστό ότι υπάρχουν πολυάριθμα είδη μικροοργανισμών του εδάφους όπως διάφορα βακτήρια, ορισμένοι μύκητες (actinomycetes) και μικροοργανισμοί αγνώστων στοιχείων που είναι σε θέση να διασπάσουν το glyphosate.

Παρόλα αυτά, στους ανθρώπους φαίνεται πως ένα μικρό ποσοστό μόνο (1-2%) μεταβολίζεται προς AMPA, ενώ το υπόλοιπο που απορροφάται παραμένει αμετάβλητο και πολύ πιθανό να διανέμεται και να εισέρχεται στην κυκοφορία του αίματος , στους ιστούς και τελικά να αποβάλλεται μέσω των ούρων (Gary M. Williams et.al., *2000,.)*

1.2.6 Επιπτώσεις Glyphosate στην υγεία του ανθρώπου

Πολλές δημοσιεύσεις και έρευνες γίνονται κατά καιρούς, σχετικά με την τοξικότητα του κύριου συστατικού του ζιζανιοκτόνου Roundup, glyphosate. Το Γερμανικό Ομοσπονδιακό Ινστιτούτο στην προσπάθειά του να αξιολογήσει τον κίνδυνο της τοξικότητας του glyphosate, το 2013, διαπίστωσε πως ‘τα διαθέσιμα δεδομένα είναι αντιφατικά και μη πειστικά’ όσον αφορά τη συσχέτιση της έκθεσης σε σκευάσματα glyphosate και τον κίνδυνο διαφόρων μορφών καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου του non-Hodgkin λεμφώματος. (Renewal Assessment Report: Glyphosate. Volume 1. Report and Proposed Decision. December 18, 2013. German Institute for Risk Assessment, page 65.). Πρόσφατες επιδημιολογικές μελέτες δεν βρίσκουν συσχετίσεις μεταξύ μακροπρόθεσμης, χαμηλού επιπέδου, έκθεσης σε glyphosate και οποιαδήποτε ασθένεια.(Mink PJ et.al., 2011)

Μια ανασκόπηση του 2000 κατέληξε στο συμπέρασμα ότι "υπό τις παρούσες και τις αναμενόμενες συνθήκες νέας χρήσης, δεν υπάρχει δυνατότητα για το ζιζανιοκτόνο Roundup να θέσει σε κίνδυνο την υγεία του ανθρώπου». (Williams GM, Kroes R, Munro IC (Apr 2000).Μια ανασκόπηση του 2002 από την Ευρωπαϊκή Ένωση κατέληξε στο ίδιο συμπέρασμα. ("Review report for the active substance glyphosate" (PDF).2002-01-21.) Το 2013 η Ευρωπαϊκή Επιτροπή

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/05/2024 21:41:31 EEST - 3.145.18.80

επανεξέτασε τη διαπίστωση του 2002 που είχε συναφθεί με διφορούμενα αποδεικτικά στοιχεία μιας σχέσης μεταξύ της έκθεσης glyphosate κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης και των καρδιαγγειακών δυσπλασιών και διαπίστωσε ότι "δεν υπάρχει αυξημένος κίνδυνος σε επίπεδα έκθεσης χαμηλότερα από εκείνα που προκάλεσαν τοξικότητα στη μητέρα.» (Kimmel GL et. al., 2013). Μία ανασκόπηση του 2013, ωστόσο, διαπίστωσε ότι ούτε το glyphosate ούτε τυπικά σκευάσματα με βάση το glyphosate θέτουν σε κίνδυνο γονοτοξικότητας ανθρώπους κάτω από κανονικές συνθήκες περιβαλλοντικής έκθεσης. (Kier LD et.al., 2013).Το 2014, ένα άρθρο ανασκόπησης ανέφερε σημαντική συσχέτιση μεταξύ του λεμφώματος των Β-κυττάρων και της εκτεταμένης έκθεσης σε glyphosate (Schinasi L. et. al., 2014). Τον Μάρτιο του 2015, ο WHO ταξινόμησε το glyphosate ως «πιθανώς καρκινογόνο για τον άνθρωπο» (κατηγορία 2A) με βάση επιδημιολογικές μελέτες, μελέτες σε ζώα και μελέτες in vitro. (Guyton KZ et. al., 2015) Ωστόσο, το 2016, μια κοινή συνεδρίαση της ομάδας εμπειρογνωμόνων για τα υπολείμματα φυτοφαρμάκων στα τρόφιμα και στο περιβάλλον και της Ομάδας Οργάνωσης Υγείας και Αξιολόγησης για τα υπολείμματα φυτοφαρμάκων των Ηνωμένων Εθνών (FAO), κατέληξε στο συμπέρασμα ότι, με βάση τα διαθέσιμα στοιχεία " το glyphosate είναι απίθανο να αποτελέσει καρκινογόνο παράγοντα για τον άνθρωπο από την έκθεση μέσω της διατροφής “ ("JOINT FAO/WHO MEETING ON PESTICIDE RESIDUES" (PDF). May 2016. Retrieved June 2016.)

1.2.7 Επιπτώσεις του glyphosate στο αρσενικό αναπαραγωγικό σύστημα

Μέχρι σήμερα, η αναπαραγωγή και οι δοκιμές αυξανόμενης τοξικότητας πρέπει να διενεργούνται σε δύο είδη θηλαστικών (αρουραίους και κουνέλια), και περιλαμβάνουν μια μελέτη πολλαπλών γενεών. Μελέτες έχουν γίνει και σε μερικά είδη ψαριών. Η έκθεση σε glyphosate έχει συνδεθεί με προβλήματα στην αναπαραγωγική ικανότητα. Οι μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί μέχρι σήμερα, είναι λίγες και αφορούν κυρίως αρουραίους, κουνέλια και ψάρια. Στον άνθρωπο δεν έχει μελετηθεί ακόμη επίδραση του glyphosate στο αρσενικό αναπαραγωγικό σύστημα.

Πιο αναλυτικά, στη μελέτη που πραγματοποίησε ο Samsel και η ομάδα του (Anthony Samsel et. al., 2013)*)* , διαπιστώθηκε πως η θεεική χοληστερόλη και ο ψευδάργυρος , των οποίων ο ρόλος είναι καταλυτικός στη γονιμοποίηση και στη λειτουργεία του ανδρικού αναπαραγωγικού συστήματος , βρίσκονται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στο σπέρμα. Το glyphosate , δρα, μειώνοντας τη βιοδιαθεσιμότητα αυτών των δύο συστατικών , προκαλώντας έτσι προβλήματα υπογονιμότητας.

Οι περισσότερες μελέτες για τις επιπτώσεις του glyphosate στο αναπαραγωγικό σύστημα των αρσενικών, έχουν γίνει σε διάφορα είδη αρουραίων. Στη συνέχεια θα αναφερθούν περιληπτικά τα πειράματα και τα αποτελέσματα που προέκυψαν από αυτά. Ο Sunny et al , χρησιμοποίησε στη

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/05/2024 21:41:31 EEST - 3.145.18.80

μελέτη του αρουραίους Wistar, στους οποίους χορήγησε μέσω του στόματος 5mg/k glyphosate 3 φορές την εβδομάδα για 52 ημέρες (χρονική περίοδος που αντιστοιχεί με αυτή της σπερματογένεσης στους αρουραίους).(Bairy L. et.al., 2010) Ελέχθηκαν μετά την έκθεσή τους αυτή οι αρουραίοι ως προς το βάρος του ήπατος, των όρχεων, του προστάτη και των σπερματοδόχων κύστεων. Δεν παρατηρήθηκε μεγάλη μεταβολή. Επιπλέον, μετρήσανε τα επίπεδα ορμονών LH ΚΑΙ fsh στο πλάσμα καθώς και τη δραστηριότητα της 3β-υδροξυστεροειδικής αφυδρογονάσης στους όρχεις. Δεν παρατηρήθηκε, επίσης, μεγάλη μεταβολή. Μεταβολή παρατηρήθηκε στον αριθμό, την κινητικότητα και τη ζωτικότητα των σπερματοζωαρίων. Η μείωση αυτή αποδόθηκε στα χαμηλά επίπεδα τεστοστερόνης. (Sunny O. et. al.,2014)

Άλλη μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε αρουραίους έδειξε ότι μετά από έκθεση σε glyphosate, αυξάνονται τα επίπεδα του ενζύμου της αρωματάσης. Ως αποτέλεσμα, αυξάνεται η οιστραδιόλη, η ποία δρα μέσω των υποδοχέων Gper1 , που ρυθμίζουν τη διαδικασία της σπερματογένεσης. Παρατηρήθηκε αλλοίωση , λόγω αύξησης της έκφρασης και άλλων παραγόντων τόσο της μορφολογίας όσο και της πυρηνικής ποιότητας του σπέρματος.(Cassault - Meyer E.et.al., 2014)

Άλλη επίπτωση που μπορεί να προκαλέσει η επίδραση του παράγοντα gluphosate , είναι μείωση της ακεραιότητας της μεμβράνης του πλάσματος του σπέρματος , όπως μελετήθηκε στο είδος P.Vivipara. Επιπλέον, σημειώθηκε φθορά στη λειτουργικότητα των μιτοχονδρίων αλλά και στην ακεραιότητα του DNA, με αποτέλεσμα τη μείωση της κινητικότητας του σπέρματος. Τι συμβαίνει όμως με την έκθεση της μέλλουσας μητέρας σε glyphosate? Έρευνα που πραγματοποιήθηκε από την ομάδα του Dallegrave, στους αρουραίους Wistar, έδειξε πως η έκθεση της μέλουσας μητέρας σε glyphosate (50mg/kg σωματικού βάρους/μέρα) διαταράσσει τη διαδικασία της αρρενοποίησης, προκαλεί ιστολογικά και ενδοκρινολογικά προβλήματα και αλλαγές συμπεριφοράς που αποτυπώνονται στις αναπαραγωγικές παραμέτρους των απογόνων. (Dallegrave, E. et.al., 2007)

Είναι γνωστό, ότι τα κύτταρα Leydig στους όρχεις παράγουν TESTO διαδραματίζοντας σημαντινό ρόλο στην αναπαραγωγική λειτουργία του άρρενος. Σημαντικό βήμα στη στεροειδογένεση αποτελεί και η πρωτείνη StAr. Σε μία μελέτη, αρουραίοι εκτέθηκαν σε Roundup (25ppm) , για 2 ώρες, προκαλώντας διαταραχή στην έκφραση της StAr πρωτείνης. Υπήρξε,λοιπόν,επίπτωση και στην παραγωγή τεστοστερόνης. Σε υψηλότερες συγκεντρώσεις θα μπορούσε να προκληθεί νέκρωση και απόπτωση των ορχικών κυττάρων (Walsh L. P. et. al., 2000).

Τέλος, μελετήθηκε η έκθεση σε Glyphosate σε άσπρα κουνέλια Νέας Ζηλανδίας. Ο Yousef και η ομάδα του διαπίστωσαν μεταβολές στα χαρακτηριστικά του σπέρματος, όπως μειωμένο όγκο, συγκέντρωση, επίπεδα φρουκτόζης και οσμωτικότητα. Παράλληλα, παρατήρησαν αύξηση στιν αριθμό των ανώμαλων και νεκρών σπερματοζωαρίων (Yousef et. al, 1995)

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/05/2024 21:41:31 EEST - 3.145.18.80

2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Προετοιμασία ασθενών

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν 30 δείγματα ανδρών που συμμετείχαν σε συμβατικούς κύκλους εξωσωματικής γονιμοποίησης, στη Μονάδα Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας, για τη λήψη σπέρματος καθώς και για τη λήψη ιστορικού.

Θα πρέπει να σημειώσουμε ότι η λήψη του σπέρματος πραγματοποιείται σε ειδικά διαμορφωμένο χώρο στο ανδρολογικό εργαστήριο. Οι ασθενείς έχουν 2-4 ημέρες αποχή από σεξουαλική επαφή. Το χρονικό αυτό διάστημα έχει πολύ μεγάλη σημασία , δεδομένου ότι μικρότερος ή μεγαλύτερος χρόνος αποχής από τον καθορισμένο,μπορεί να οδηγήσει σε λανθασμένα αποτελέσματα. Η λήψη γίνεται μηχανικά, με αυνανισμόσε ένα αποστειρωμένο δοχείο. Είναι σημαντικό να μην χαθεί ποσότητα του δείγματος και κυρίως η πρώτη σταγόνα. Μετά τη συλλογή και αφού έχει πραγματοποιηθεί η ρευστοποίηση (20-60min), ακολουθεί μικροσκοπική και μακροσκοπική εξέταση του δείγματος (σπερμοδιάγραμμα). Ενδεικτικά παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα τα χαρακτηριστικά του φυσιολογικού σπέρματος , όπως έχουν οριστεί από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO).

Table A1.1 Lower reference limits (5th centiles and their 95% confidence intervals) for semen characteristics

Parameter	Lower reference limit
Semen volume (ml)	1.5 (1.4–1.7)
Total sperm number (10^6 per ejaculate)	39 (33–46)
Sperm concentration (10^6 per ml)	15 (12–16)
Total motility (PR + NP, %)	40 (38–42)
Progressive motility (PR, %)	32 (31–34)
Vitality (live spermatozoa, %)	58 (55–63)
Sperm morphology (normal forms, %)	4 (3.0–4.0)

Εικόνα 5 : Φυσιολογικοί παράμετροι σπέρματος
Πηγή : WHO Manual for Semen Analysis 5th edn,2010.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/05/2024 21:41:31 EEST - 3.145.18.80

2.2 Προετοιμασία διαλύματος Gluphosate

Βασισμένοι στη βιβλιογραφία και ύστερα από δοκιμές πραγματοποιήσαμε αραίωση στη σκόνη του παράγοντα, του οποίου η αρχική συγκέντρωση ήταν 250 mg/lt. Για την αραίωση χρησιμοποιήθηκε Buffer και η τελική συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε στα δείγματα ήταν 0,36 mg/lt. Η ποσότητα αυτή αναλογεί σε συγκέντρωση 1 ppm του φυτοφαρμάκου Roundup, του οποίου και αποτελεί βασικό συστατικό το glyphosate. Στη συνέχεια τοποθετήσαμε σε eppendorfs το διάλυμα glyphosate και το διατηρήσαμε στους 4ºC.

2.3 Προετοιμασία δειγμάτων σπέρματος

Αρχικά έγινε αξιολόγηση του σπέρματος τόσο μακροσκοπικά όσο και μικροσκοπικά και χρησιμοποιήθηκε οπτικό μικροσκόπιο για παρατήρηση της συγκέντρωσης και της κινητικότητας του δείγματος, όπως ήδη αναφέρθηκε..Η αξιολόγηση των παραμέτρων έγινε με πλάκα Mekler Counting Chamber σε οπτικό μικροσκόπιο και με χρήση μετρητή αριθμού σπερματοζωαρίων (Sperm Counter). Στη συνέχεια, πραγματοποιήσαμε φυγοκέντρηση στις 1800 στροφές για 5 λεπτά σε 1ml περίπου του κάθε μας δείγματος. Αφαιρώντας το υπερκείμενο, τοποθετήσαμε 70μl διαλύματος glyphosate και 300-350μl Sperm, έτσι ώστε ο τελικός όγκος να είναι 500μl. Παράλληλα, διατηρούμε στις ίδιες συνθήκες μικρή ποσότητα του δείγματος για control.
Μετά από 1-2 ώρες ξεκινά η προετοιμασία του δείγματος για τον προσδιορισμό του κατακερματισμού του DNA του σπέρματος.

Η εκτέλεση του πειράματος πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο προσδιορισμού κατακερματισμού σπερματικού Dna ,Sperm Chromatin Decondensation (SCD).Επιλέχθηκε το Halosperm Kit από τη Halotech Dna.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/05/2024 21:41:31 EEST - 3.145.18.80

2.4 Πειραματικό Μέρος

Εξοπλισμός

1. Distilled water
2.Ethanol at 70% and 100%
3.Optical microscope
4.Fridge at 4 ° C
5.Incubation bath at 37° C and 95-100° C
6.Plastic gloves
7.Glass coverslips (24x25mm)
8.Micropipettes
9.Petri dishes
10.Disposable pipettes
11.Sperm Counter
12.Mekler Counting Chamber

Υλικά

1.Agarose cell support (ACS)
2.Super-coated slides (SCS)
3.Eppendorf Tubes

Διαλύματα

1.Acid denaturation solution (DA)
2.Lysis solution (LS)
3.Staining solution A (SSA) (red)
4.Staining solution B (SSB) (blue)

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/05/2024 21:41:31 EEST - 3.145.18.80

Εικόνα 6 : Περιεχόμενο kit Halosperm G2.
Πηγή : www.**halotech**dna.com

Πριν την έναρξη των πειραματικών εργασιών πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός της αγαρόζης σε eppendors των 50μl έτσι ώστε να επαρκέσει για την επεξεργασία 60 συνολικά δειγμάτων. Χρησιμοποιήσαμε τα δείγματα 30 περιστατικών, αλλά επειδή μελετήσαμε τον κατακερματισμό με και χωρίς την προσθήκη του παράγοντα glyphosate (control δείγμα/glyphosate δείγμα) ουσιαστικά δουλέψαμε σε 60 δείγματα και για αυτά έχουμε και αποτέλεσμα SDF. Η επεξεργασία του δείγματος με το kit της Halotech πραγματοιήθηκε μετά από επώαση μιας ώρας και 30 λεπτών στη συγκέντρωση του glyphosate που προαναφέρθηκε.

Εκτέλεση

1. Το δείγμα του σπέρματος διαλύεται σε κατάλληλο PBS (Sperm στην περίπτωσή μας) ώστε η συγκέντρωσή του να είναι 10 εκατομμύρια/ml το μέγιστο.

2. Το eppendorf με 25μl αγαρόζης τοποθετείται σε υδατόλουτρο το οποίο βρίσκεται στους 90- 100 ° C για 5 λεπτά ή έως ότου η αγαρόζη να τήξει καλά.

3. Το eppendorf τοποθετείται σε υδατόλουτρο (37 ° C) για 5 λεπτά μέχρι να εξισορροπηθεί η θερμοκρασία.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/05/2024 21:41:31 EEST - 3.145.18.80

4. 25μl του δείγματος του σπέρματος που διαλύθηκε σε PBS προστίθενται στα 25μl αγαρόζης 37° C και αναμιγνύονται καλά και γρήγορα με μικροπιπέτα .

5. Σταγόνα των 10μl του εναιωρήματος τοποθετούνται σε αντικειμενοφόρο πλάκα (SCS) και καλύπτεται με καλυπτρίδα ώστε να απλωθεί στη πλάκα.

Η αντικειμενοφορος πλάκα τοποθετείται:

6. Σε θερμοκρασία 4° C στο ψυγείο για 5 λεπτά ώστε να σταθεροποιηθεί η αγαρόζη και έπειτα αφαιρείται η καλυπτρίδα σε θερμοκρασία δωματίου 22° C .

7. Στο denaturation solution για 7 λεπτά με την αντικειμενοφόρο πλάκα σε οριζόντια θέση

8. Στο lysis solution για 20 λεπτά μη την αντικειμενοφόρο πλάκα σε οριζόντια θέση

9. Σε απεσταγμένο νερό για 5 λεπτά χρησιμοποιώντας πιπέτα μίας χρήσης για τη τοποθέτησή του στην αντικειμενοφόρο οριζόντιας θέσης

10. Σε αιθανόλη 70% για 2 λεπτά με τον ίδιο τρόπο.

11. Σε αιθανόλη 100% για 2 λεπτά με τον ίδιο τρόπο, επίσης.

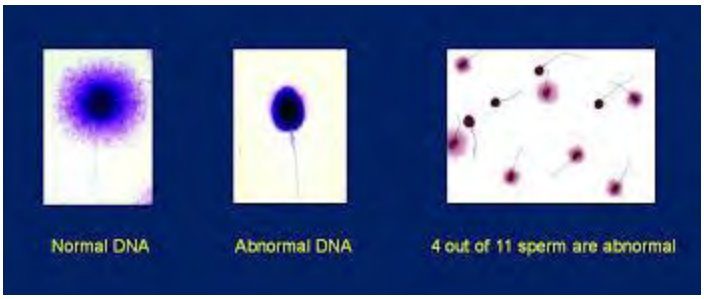
12. Στο staining solution A για 6 λεπτά χρησιμοποιώντας πιπέτα μίας χρήσης για τη τοποθέτηση του.

13.Στο staining solution B για 6 λεπτά χρησιμοποιώντας πιπέτα μίας χρήσης για τη τοποθέτηση του.

14. Τέλος, η αντικειμενοφόρος πλάκα αφήνεται να στεγνώσει και είτε παρατηρείται στο οπτικό μικροσκόπιο, είτε αποθηκεύεται στους 4° C και παρατηρείται άλλη στιγμή.

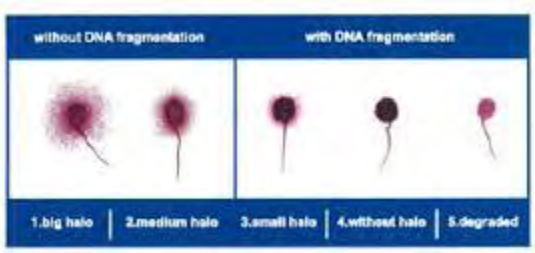
Στην αντικειμενοφόρο πλάκα που παρατηρείται στο οπτικό μικροσκόπιο βλέπουμε χρωματισμένα σπερματοζωάρια που είτε εμφανίζουν τη στεφάνη Halo και δεν έχουν κατακερματισμένο Dna είτε δεν εμφανίζουν τη στεφάνη Halo και έχουν κατακερματισμένο Dna (Εικόνα) :

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/05/2024 21:41:31 EEST - 3.145.18.80



Εικόνα 7 : Αποτέλεσμα εφαρμογής Halosperm Kit για κατακερματισμένα ή μη σπερματοζωάρια
Πηγή:http://www.biocareeurope.com/sites/default/files/Halosperm%20instructions.pdf

Μετρήσαμε συνολικά 400 σπερματοζωάρια σε κάθε δείγμα και τα κατατάξαμε στις κατηγορίες 1-5.



Εικόνα 8 : Κατηγορίες κατακερματισμού DNA , Halosperm Kit.
Πηγή : www.**halotech**dna.com

1.big halo,μη κατακερματησμένο DNA
2.medium halo, μη κατακερματισμένο DNA
3.small halo, κατακερματησμένο DNA
4.without halo, κατακερματησμένο DNA
5.degraded, μη μετρήσιμα

Στη συνέχεια ακολουθώντας τον τύπο : small halo + without halo + degraded / total = SDF , υπολογίζουμε το ποσοστό κατακερματισμού του DNA στα χρωμοσώματα με και χωρίς την επίδραση του παράγοντα Glyphosate.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/05/2024 21:41:31 EEST - 3.145.18.80

2.5 Στατιστική Ανάλυση

Για την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήσαμε το πρόγραμμα SPSS.

Το SPSS είναι ένα στατιστικό πακέτο ανάλυσης δεδομένων, το οποίο προσφέρει στο χρήστη δυνατότητες για δημιουργία αναφορών, ανάλυση και μοντελοποίηση δεδομένων καθώς και για γραφική αναπαράσταση τους. Διαθέτει πολλές στατιστικές συναρτήσεις για ανάλυση δεδομένων μέσα από ένα εύχρηστο γραφικό περιβάλλον.

Με την βοήθεια του SPSS όλα τα στάδια της αναλυτικής διαδικασίας ολοκληρώνονται κάτω από ένα ενοποιημένο περιβάλλον εργασίας καλύπτοντας την ανάλυση από άκρο σε άκρο (Πηγή: spss.gr)

Πιο συγκεκριμένα, επιλέξαμε το Dependent Paired T-test, για να συγκρίνουμε στην ίδια ομάδα ατόμων την παράμετρο, ποσοστό του κατακερματισμού του DNA του σπέρματος, πριν και μετά την επίδραση ενός παράγοντα, του Glyphosate. Στο κεφάλαιο 3 παρουσιάζονται αναλυτικά τα αποτελέσματα της πειραματικής μας διαδικασίας.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/05/2024 21:41:31 EEST - 3.145.18.80

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Δημογραφικά στοιχεία των 30* δειγμάτων

Πίνακας 4 : Μέσοι όροι και τυπικές αποκλίσεις για τα δημογραφικά και μη στοιχεία των 30 δειγμάτων σπέρματος.

	30	**Αριθμός δειγμάτων (n_0)**
Ηλικία (έτη)	40,83 ± 8,44 30	30
BMI	28,28 ± 4,59	21/30
Όγκος	3,28 ± 1,4	29/30
Συγκέντρωση σπέρματος (εκατ./ml)	56,83 ± 44,35 29	29/30
Ημέρες Αποχής	3,07 ± 1,11	13/30
Κατανάλωση αλκοόλ (%)	**ΝΑΙ** 20%	5/25
	ΟΧΙ 80%	20/25
Κάπνισμα (%)	**ΝΑΙ** 46,16%	12/26
	ΟΧΙ 53,84%	14/26

*Κατά τη διεξαγωγή του πειράματος, λόγω πειραματικού σφάλματος δεν είχαμε μετρήσεις για το δείγμα 26 control. Για το λόγο αυτό το συγκεκριμένο δείγμα δεν συμπεριλήφθηκε στην στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων με το πρόγραμμα SPSS. Συνεπώς, τα αποτελέσματα που σας παρουσιάζω παρακάτω αφορούν 29 δείγματα σπέρματος.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/05/2024 21:41:31 EEST - 3.145.18.80

3.2 Ποσοστό κατακερματισμού DNA (SDF) των δειγμάτων ελέγχου και των δειγμάτων μετά την επίδραση του Glyphosate

Πίνακας 5 : Μέσοι όροι και τυπικές αποκλίσεις του SDF των δειγμάτων ελέγχου και των δειγμάτων με το Glyphosate μετά το πέρας 1 ώρας και 30 λεπτών από την χορήγηση του Glyphosate.

	SDF
Control (1και30’)	51,83 ± 21,86
Glyphosate (1και30’)	50,89 ± 22,74

SDF control vs SDF glyphosate $P_{value} > 0,05$ not significant

Πίνακας 6 : Μέσοι όροι και τυπικές αποκλίσεις των κατηγοριών Small halo, No halo και Degraded του Kit της Halosperm, των δειγμάτων ελέγχου και των δειγμάτων με το Glyphosate μετά το πέρας 1 ώρας και 30 λεπτών από την χορήγηση του Glyphosate.

	Small Halo	No Halo	Degraded
Control (1και30’)	8,64 ± 7,16	26,59 ± 14,87	16 ± 15,14
Glyphosate (1και30’)	7,93 ± 4,58	29,36 ± 16,73	14,43 ± 7,66

Small Halo control vs Small Halo glyphosate $P_{value} > 0,05$ not significant

No Halo control vs No Halo glyphosate $P_{value} > 0,05$ not significant

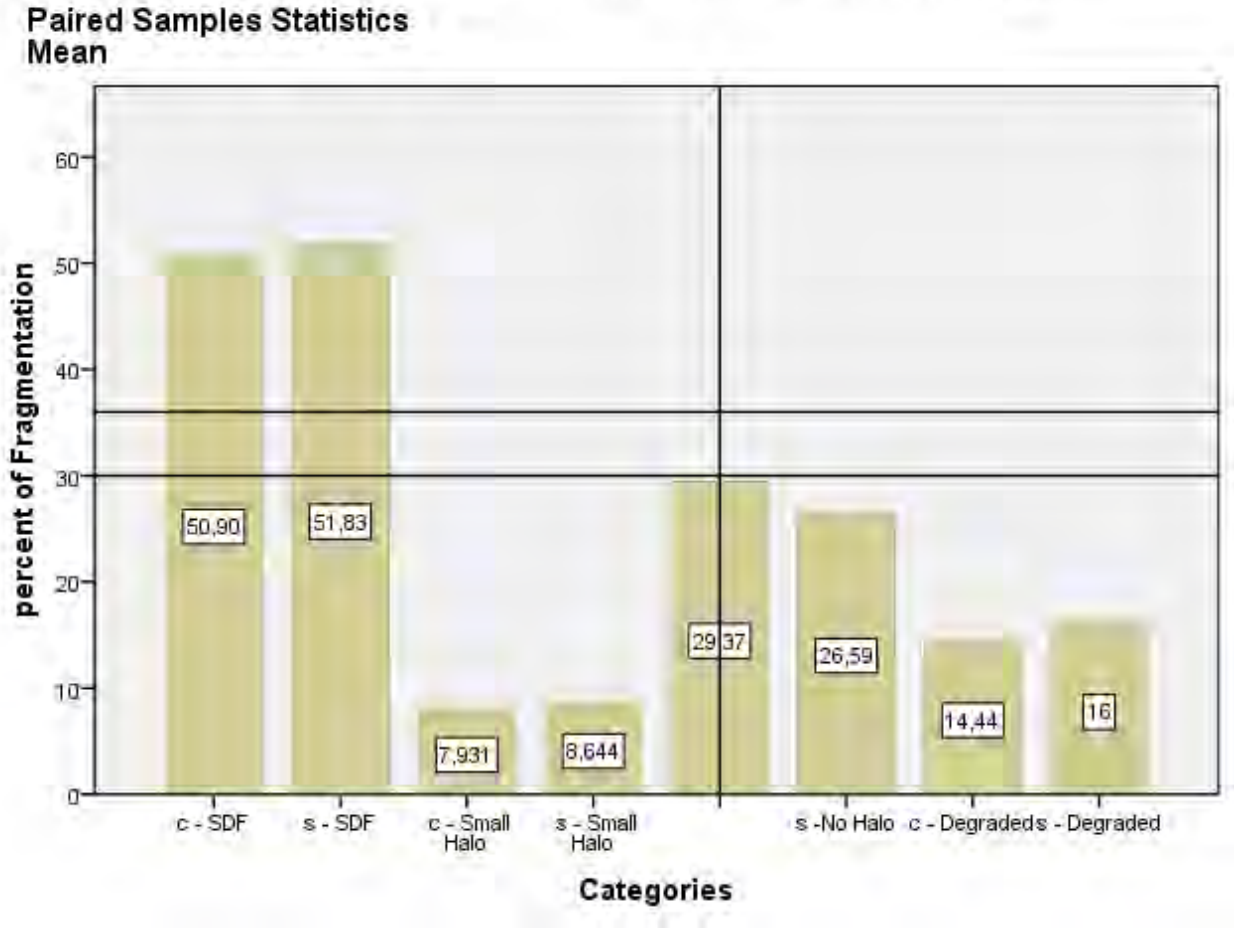
Degraded control vs Degraded glyphosate $P_{value} > 0,05$ not significant

Ένα paired-samples t-test χρησιμοποιήθηκε για να προσδιορίσουμε εάν ήταν στατιστικά σημαντική η διαφορά ανάμεσα στο ποσοστό κατακερματισμού του DNA σπέρματος σε δείγματα

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/05/2024 21:41:31 EEST - 3.145.18.80

ελέγχου και σε δείγματα μετά από επώαση μιας ώρας και 30 λεπτών υπό την επίδραση του glyphosate. Τα δεδομένα είναι μέση τιμή ± τυπική απόκλιση. Η μέση διαφορά δεν ήταν στατιστικά διαφορετική από το μηδέν. Αυτό φαίνεται και στους παρακάτω πίνακες, όπου συγκρίνουμε τόσο το τελικό ποσοστό κατακερματισμού (SDF) , όσο και τις εκάστοτε διαβαθμίσεις κατακερματισμένων σπερματοζωαρίων. Ως εκ τούτου, δεν μπορούμε να απορρίψουμε την αρχική υπόθεση και δεν μπορούμε να δεχτούμε την εναλλακτική υπόθεση, ότι το glyphosate έχει όντως επίδραση στο DNA του σπέρματος αυξάνοντας το ποσοστό κατακερματισμού του.

Γράφημα 1: Μέσες τιμές κατηγοριών κατακερματισμένου DNA (Halosperm) , πριν και μετά την επίδραση Glyphosate και ποσοστού SDF.



Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/05/2024 21:41:31 EEST - 3.145.18.80

Το παραπάνω γράφημα επιβεβαιώνει τις μικρές διαφορές στο ποσοστό κατακερματισμού που παρατηρούνται πριν και μετά την προσθήκη Glyphosate σε δείγματα σπέρματος. Οι στατιστικές αναλύσεις επιβεβαιώνουν πως η μεταβολή των ποσοστών κρίνεται ως στατιστικά ΜΗ σημαντική.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/05/2024 21:41:31 EEST - 3.145.18.80

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, μία από τις κυριότερες αιτίες των ολοένα και αυξανόμενων ποσοστών ανδρικής υπογονιμότητας αποτελεί η έκθεση σε περιβαλλοντικούς κινδύνους, όπως τα φυτοφάρμακα. Στη μελέτη αυτή, χρησιμοποιήθηκε το Glyphosate, κύριο συστατικό του φυτοφαρμάκου Roundup. Το Roundup είναι το πρώτο σε πωλήσεις και αποτελεσματικότητα ευρέος φάσματος ζιζανιοκτόνο στον κόσμο. Ο κύριος μεταβολίτης του Glyphosate είναι το AMPA (αμινομεθυλο-φωσφονικό οξύ)(Pete Riley et. al,2011). Ωστόσο, στον ανθρώπινο οργανισμό, μικρή ποσότητα του εισερχόμενου Glyphosate μεταβολίζεται προς AMPA. Το υπόλοιπο απορροφάται από τον οργανισμό, με αποτέλεσμα να διανέμεται στην κυκλοφορία του αίματος, στους διάφορους ιστούς και τελικά να αποβάλλεται μέσω των ούρων. Το γεγονός ότι όλες οι μελέτες που έχουν διεξαχθεί σε αρουραίους, κουνέλια και ψάρια , μέχρι σήμερα, έχουν δείξει μεσοπρόθεσμη και μακροπρόθεσμη τοξικότητα στο αρσενικό αναπαραγωγικό σύστημα καθιστά αναγκαία την περαιτέρω έρευνα για το πόσο ασφαλής είναι τελικά η χρήση του Roundup. Γι' αυτό ακριβώς το λόγο στην παρούσα εργασία, μελετήσαμε την επίδραση του Glyphosate, βασικού συστατικού του φυτοφαρμάκου Roundup σε δείγματα σπέρματος που προήλθαν από άνδρες που συμμετείχαν σε κύκλους εξωσωματικής γονιμοποίησης και στη διενέργεεια σπερμοδιαγράμματος. Το ερώτημα που τέθηκε, λοιπόν, είναι εάν το Glyphosate, επιδρά στην αύξηση του ποσοστού κατακερματισμού του DNA των σπερματοζωαρίων. Η συγκέντρωση που χρησιμοιποιήθηκε, βασισμένη σε προηγούμενη εργασία, ήταν 0,36 mg/lt Glyphosate, που αντιστοιχεί στη μικρότερη δυνατή συγκέντρωση για έκθεση σε Roundup που είναι 1 ppm. Πραγματοποιήθηκε επώαση για 1 ώρα και 30 λεπτά. Στη συνέχεια χρησιμοποιήσαμε το kit της Halotech, Halosperm G2, για τον προσδιορισμό του ποσοστού κατακερματισμού του DNA των σπερματοζωαρίων σε δείγματα ελέγχου και σε δείγματα μετά από την επίδραση του Glyphosate. Με βάση τα αποτελέσματα συμπεραίνουμε πως δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στα ποσοστά SDF με και χωρίς την επίδραση του Glyphosate, όπως φαίνεται και από τον Πίνακα 1, που προέκυψε μετά από στατιστική ανάλυση. Αναλύοντας στατιστικά τα ποσοστά της κάθε κατηγορίας κατακερματισμένων σπερματοζωαρίων, όπως αυτά ορίζονται από το kit (Small Halo/No Halo/Degraded), παρατηρούμε πως δεν υπάρχει αξιοσημείωτη μεταβολή (Πίνακας 5). Το Γράφημα 1 μας δίνει μια συνολική απεικόνιση των αποτελεσμάτων.

Ο κατακερματισμός του DNA του σπέρματος, συσχετίζεται με την έκθεση σε περιβαλλοντικούς τοξικούς παράγοντες που αυξάνουν τη βλάβη στο DNA των σπερματοζωαρίων. Το Glyphosate, ως κύριο συστατικό του φυτοφαρμάκου Roundup, συμπεριλαμβάνεται στους παράγοντες αυτούς. Ο μηχανισμός δράσης, της τοξικότητας των περιβαλλοντικών παραγόντων, βρίσκει εφαρμογή σε άνδρες που είναι ομόζυγοι μηδέν για τη γλουταθειόνη-S-τρανσφεράση M1 καθώς είναι λιγότερο ικανοί να αποτοξινώσουν δραστικούς μεταβολίτες των καρκινογόνων πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων που βρίσκονται στη ρύπανση της ατμόσφαιρας. Κατά συνέπεια, τα δείγματα σπέρματος αυτών των ανθρώπων είναι πιο ευαίσθητα στις επιδράσεις της ατμοσφαιρικής ρύπανσης στην χρωματίνη του σπέρματος τους και εμφανίζουν μεγαλύτερα ποσοστά

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/05/2024 21:41:31 EEST - 3.145.18.80

κατακερματισμού του DNA.(Rubes J. et. al,2009). Ακόμη και αυτό το ενδεχόμενο, όμως, δεν έχει μελετηθεί ιδιαίτερα.

Παρατηρώντας τον Πίνακα 5 διαπιστώνουμε, πως το ποσοστό SDF των deιγμάτων σπέρματος ελέγχου είναι εξαιρετικά υψηλό. Η τιμή αυτή, πολύ πιθανό, να οφείλεται σε παράγοντες που επηρεάζονται από τον τρόπο ζωής των ανθρώπων των οποίων χρησιμοποιήθηκε δείγμα τους, όπως είναι το κάπνισμα, το αλκοόλ, η διατροφή και η άσκηση. Στον Πίνακα 4 καταγράφεται το ποσοστό των καπνιστών που αντιστοιχεί σε 46,16%. Δεν γνωρίζουμε ακόμη με ποιο μηχανισμό, ωστόσο το κάπνισμα επηρεάζει τον κατακαρματισμό του DNA των σπερματοζωαρίων, αυξάνοντας κατά πολύ το ποσοστό SDF των καπνιστών (Anifandis et. al, 2014). Το υψηλό ποσοστό των καπνιστών στα δείγματα που μελετήθηκαν δικαιολογεί το υψηλό ποσοστό SDF που προέκυψε από τα δείγματα ελέγχου, χωρίς την προσθήκη Glyphosate.

Επομένως, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι το Glyphosate, κύριο συστατικό του φυτοφαρμάκου Roundup, δεν επηρεάζει τον κατακερματισμό του DNA του σπέρματος με το πέρας της 1 ώρας και 30 λεπτών από την επίδρασή του. Θα πρέπει να σημειωθεί, πως η εργασία αυτή περιορίστηκε σε μικρό αριθμό δειγμάτων (30). Ο μεγαλύτερος αριθμός δειγμάτων, καθιστά πάντα αποτελέσματα μεγαλύτερης σημαντικότητας. Επιπλέον, το συμπέρασμά αυτό, αναφέρεται στην επίδραση του Glyphosate, ύστερα από επώαση για μικρό χρονικό διάστημα. Η επώαση για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα θα μπορούσε να επιφέρει διαφορετικό αποτέλεσμα. Ο μηχανισμός επίδρασης του Glyphosate δεν έχει αποδειχθεί ακόμη επιστημονικά, οπότε ευελπιστούμε στο μέλλον να δωθούν απαντήσεις σε όσα ερωτήματα μας ταλαντεύουν ακόμη, μέσα από τη διεξαγωγή μεγάλων πειραμάτων και επιστημονικών ερευνών.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/05/2024 21:41:31 EEST - 3.145.18.80

1. Λαινάς, Τρύφων Γεώργ. Ανθρώπινη αναπαραγωγή & εξωσωματική γονιμοποίηση, β΄τόμος. s.l. : ΙΕΜ - Ιατρικές Εκδόσεις Μανιατέα, 2006.

2. Tahmasbpour E, Balasubramanian D and Agarwal A. A multi-faceted approach to understanding male infertility: gene mutations, molecular defects and assisted reproductive techniques (ART). J Assist Reprod Genet. 2014 Sep; 31(9): 1115–1137.

3. Agarwal A, Mulgund A, Hamada A and Chyatte MR. A unique view on male infertility around the globe. Reprod Biol Endocrinol. 2015; 13: 37.

4. World Health Organization. WHO Manual for the Standardized Investigation and Diagnosis of the Infertile Couple. Cambridge: Cambridge University Press, 2000.

5. G.R. Dohle, W. Weidner, A. Jungwirth, G. Colpi, G. Papp, J. Pomerol, T.B. Hargreave. GUIDELINES ON MALE INFERTILITY. European Association of Urology. (Pag: 41-42)

6. Bradley D. Anawalt.Approach to Male Infertility and Induction of Spermatogenesis. J Clin Endocrinol Metab. 2013 Sep; 98(9): 3532–3542.

7. Dohle GR. Male Factors in Couple's Infertility. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015

8. Γούλης ΔΓ, Τσιτλατίδης Δ, Παπαδήμας Ι. Θέματα Γυναικολογικής Ενδοκρινολογίας και Αναπαραγωγής, Ανδρική υπογονημότητα. Μαστοράκος Γ, Αθήνα 2008. (Σελ:10)

9. A.Borini, N.Tarozzi, D.Bizzaro, M.A.Bonu, L.Fava, C.Flamigni and G.Coticchio. Sperm DNA fragmentation: paternal effect on early post-implantation embryo development in ART. Human Reproduction Vol.21, No.11 pp. 2876–2881, 2006.

10. Hammadeh, M.E., Al-Hassani, S., Stieber, M. et al. (1996) The effect of chromatin condensation 89 (aniline blue staining) and morphology (strict criteria) of human sperm on fertilization, cleavage and pregnancy rates in an intracytoplasmic sperm injection programme. Hum. Reprod., 11, 2468– 2471

11. Vanderzwalmen, P., Bertin Segal, G., Geerts, L. et al. (1991) Sperm morphology and IVF pregnancy rate: comparison between Percoll gradient centrifugation and swim-up procedures. Hum. Reprod., 6, 581–588

12. Parinaud, J., Mieusset, R., Vieitez, G. et al. (1993) Influence of sperm parameters on embryo quality. Fertil. Steril., 60, 888–892.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/05/2024 21:41:31 EEST - 3.145.18.80

13. Janny, L. and Menezo, Y.J.R. (1994) Evidence for a strong paternal effect on human preimplantation embryo development and blastocyst formation. Mol. Reprod. Dev., 38, 36–42.

14. Shoukir, Y., Chardonnens, D., Campana, A. et al. (1998) Blastocyst development from supernumerary embryos after intracytoplasmic sperm injection: a paternal influence? Hum. Reprod., 13, 1632–1637.

15. Shoukir, Y., Chardonnens, D., Campana, A. et al. (1998) Blastocyst development from supernumerary embryos after intracytoplasmic sperm injection: a paternal influence? Hum. Reprod., 13, 1632–1637.

16. Muriel L, Meseguer M, Fernandez JL, Alvarez J, Remohi J, Pellicer A , Garrido N. Value of the sperm chromatin dispersion test in predicting pregnancy outcome in intrauterine insemination: a blind prospective study. Hum Reprod. 2006; 21(3): 738-44.

17. Burrello N, Arcidiacono G, Vicari E, Asero P, Di BD, De PA, et al. Morphologically normal 90 spermatozoa of patients with secretory oligo-asthenoteratozoospermia have an increased aneuploidy rate. Hum Reprod 2004;19:2298–302.

18. Juergen Liebermann. Vitrification of Oocytes and Embryos.Fertility Centers of Illinois, Chicago, IL USA

19. Kyung S, Soo J, Chang W, Yeon H, Hye J, Chang Y, Jin H, and Won D In vitro maturation: Clinical applications Clin Exp Reprod Med. 2013 Dec; 40(4): 143–147.

20. Fernández JL, Vázquez-Gundín F, Delgado A, Goyanes VJ, Ramiro-Díaz J, de la Torre J, Gosálvez JDNA breakage detection-FISH (DBD-FISH) in human spermatozoa: technical variants evidence different structural features. Mutat Res. 2000 Sep 20;453(1):77-82

21. J Stern. Preimplantation Genetic Diagnosis: Prenatal Testing for Embryos Finally Achieving Its Potential Harvey. J. Clin. Med. 2014,

22. Committed The role of assisted hatching in in vitrofertilization: A review of the literature. A committee opinion. Fertility and Sterility Vol 90, Suppl 3, 2008.

23. McPherson S, Longo FJ. Chromatin structure–function alterations during mammalian spermatogenesis: DNA nicking and repair in elongating spermatids. Eur J Histochem 1993;37:109 28.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/05/2024 21:41:31 EEST - 3.145.18.80

24. McPherson SM, Longo FJ. Localization of DNase Ihypersensitive regions during rat spermatogenesis: stage-dependent patterns and unique sensitivity of elongating spermatids. Mol Reprod Dev 1992;31: 268–79.

25. McPherson SM, Longo FJ. Nicking of rat spermatid and spermatozoa DNA: possible involvement of DNA topoisomerase II. Dev Biol 1993;158:122–30.

26. Greco E, Scarselli F, Iacobelli M, Rienzi L, Ubaldi F, Ferrero S, et al. Efficient treatment of infertility due to sperm DNA damage by ICSI with testicular spermatozoa. Hum Reprod 2005;20: 226–30.

27. Banks S, King SA, Irvine DS, Saunders PT. Impact of a mild scrotal heat stress on DNA integrity in murine spermatozoa. Reproduction 2005;129:505–14.

28. O'Flaherty C, Vaisheva F, Hales BF, Chan P, Robaire B. Characterization of sperm chromatin quality in testicular cancer and Hodgkin's lymphoma patients prior to chemotherapy. Hum Reprod 2008;23:1044–52.

29. J Ribas-Maynou, A Garcıa-Peiro, A Fernandez-Encinas, C Abad, MJ Amengual, E Prada, J Navarro and J Benet. Original Article. Comprehensive analysis of sperm DNA fragmentation by five different assays: TUNEL assay, SCSA, SCD test and alkaline and neutral Comet assay. 2013 American Society of Andrology and European Academy of Andrology

30. ΚούτραςΔ. Α., Αδαμόπουλος Δ. Α., Ράπτης Σ. Α., Σουβατζόγλου Α. Μ., Περιβάλλον και αναπαραγωγική λειτουργία στον άνδρα. Βασική Ενδοκρινολογία S.I : Παρισιάνου Α. Ε., 1994)

31. Αναστασία, Δρ Δημητρίου. Αγωγή Υγείας και Περιβάλλοντος - Έκθεση και προστασία από τις επικίνδυνες ουσίες. Θεσσαλονίκη : ΙνστιτούτοΥγιεινής και ασφάλειας της εργασίας, 2001.

32. Ευθαλία Λουπάκη. Φυτοπροστατευτικά προιόντα και περιβάλλον με έμφαση στις επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία. s.I. : ΤΕΙ - Ηρακλείου - Σχολή Τεχνολογίας Γεωπονίας, 2009.

33. Θεοδοσία Φουντούλη. Μελέτη κινητικότηττας του ζιζανιοκτόνου Roundup σε αγοτικές καλλιέργειες. Χανιά : Πολυτεχνείο Κρήτης, Τμήμα Μηχανικών Περιβάλλοντος,2005.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/05/2024 21:41:31 EEST - 3.145.18.80

34. Emmanouil N Papadakis, Despina Lzazarou, Raphael Grougnet, Prokopios Magiatis, Effect of the form of the sesame-based diet on the absorption of lignans. Journal of agricultural and food chemistry. 2008, Τομ. 59(14): 7601-8.

35. Ελευθεροχωρινός, ΗΓ., 2008. Ζιζάνια και ζιζανιοκτόνα. Εκδόσεις Αγρότυπος, Αθήνα 2008, σελ 408.
36. Moreland D.E., 1980. Mechanisms of Action of Herbicides. Annual Review of Plant Physiology, 31:597-638.

37. Μουρκίδου, Ε.Π., 2008. Χημεία, Φαρμακολογία (Φαρμακοκινητική / Μεταβολισμός / Τρόπος δράσης), Τοξικολογία, Οικοτοξικολογία και Συμπεριφορά στο περιβάλλον. Εκδόσεις Μέθεξης, Θεσσαλονίκη 2008, σελ 569.

38. Pete Rilley, Herbicide tolerance and GM Crops. s.I : Becky Price, Myrto Pispini, Greenpeace International,2011

39. Sprankle, P., W.F. Meggitt, and Penner, D. 1975a. Rapid inactivation of glyphosate in soil. Weed Science, 28:224-228.

40. Sprankle, P., W.F. Meggitt, and Penner, D. 1975b. Adsorption, mobility and microbial degradation of glyphosate in the soil. Weed Science, 23:229-234.

41. Heinonen-Tanski, H., 1989. The effect of temperature and liming on degradation of glyphosate in two arctic forest soils. Soil Biology, 46:1217-1223.

42. Gimsing, A.L., O.K. Borggaard, M. Bang, 2004. Influence of soil composition on adsorption of glyphosate and phosphate by contrasting Danish surface soils. European Journal of Soil Science, 55:183-191.

43. Hance, R. J., 1976. Adsorption of glyphosate by soils. Pesticide Science, 7:363-366.

44. Rueppel, ML, B.B. Brightwell, J., Schaefer and J., Marvel, 1977. Metabolism and degradation of glyphosate in soil and water. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 25:517–528.

45. Jacob, G.S., J.R. Garbow, L.E Hallas, M.N. Kimack, G.M. Kishore and J, Schaefer, 1988. Metabolism of glyphosate in Pseudomonas sp. strain LBr. Applied and Environmental Microbiology, 54:2953–2958.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/05/2024 21:41:31 EEST - 3.145.18.80

46. Franz, J.E., M.K. Mao and J.A. Sikorski, 1997. Glyphosate: A Unique and Global Herbcide. ACS Monograph No. 189. American Chemical Society, Washington, DC, pp. 653.

47. Barry, G.F. and G.M. Kishore, 1998. Glyphosate tolerant plant. US Patent 5,776,760.

48. Shinabarger, D.L. and H.D. Braymer, 1986. Glyphosate catabolism by Pseudomonas sp. strain PG2982. Journal of Bacteriology, 168:702–707.

49. Gary M. Williams, Glyphosate for Humans. *Regular toxicology and Pharmacology. New York: Academic Press, 2000,31*

50. Renewal Assessment Report: Glyphosate. Volume 1. Report and Proposed Decision. December 18, 2013. German Institute for Risk Assessment, page 65

51. Mink PJ, Mandel JS, Lundin JI, Sceurman BK (Nov 2011). "Epidemiologic studies of glyphosate and non-cancer health outcomes: a review". *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 61 (2): 172–84.

52. Williams GM, Kroes R, Munro IC (Apr 2000). "Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans". *Regulatory Toxicology and Pharmacology*

53. "Review report for the active substance glyphosate" (PDF). *Commission working document*. European Commission, Health and Protection Directorate-General: Directorate E – Food Safety: plant health, animal health and welfare, international questions: E1 - Plant Health. 2002-01-21

54. Kimmel GL, Kimmel CA, Williams AL, DeSesso JM (Feb 2013). "Evaluation of developmental toxicity studies of glyphosate with attention to cardiovascular development". *Critical Reviews in Toxicology*. 43 (2): 79–95.

55. Kier LD, Kirkland DJ (Apr 2013). "Review of genotoxicity studies of glyphosate and glyphosate-based formulations". *Critical Reviews in Toxicology*. 43 (4): 283–315.

56. Schinasi L, Leon ME (Apr 2014). "Non-Hodgkin lymphoma and occupational exposure to agricultural pesticide chemical groups and active ingredients: a systematic review and meta-analysis". *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 11 (4): 4449–527.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/05/2024 21:41:31 EEST - 3.145.18.80

57. Guyton KZ, Loomis D, Grosse Y, El Ghissassi F, Benbrahim-Tallaa L, Guha N, Scoccianti C, Mattock H, Straif K (May 2015). "Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate". *The Lancet. Oncology*.

58. "JOINT FAO/WHO MEETING ON PESTICIDE RESIDUES" (PDF). May 2016. Retrieved June 2016.

59. Anthony Samsel, Stephanie Seneff, *Glyphosate's Suspression of Cytochrome P450 Enzymes and Amino Acid Biosynthesis by the Gut Microbiome : Pathways to Modern Diseases. 15, USA : Entropy, 2013. 1416-1463*

60. Bairy L.,Reprodustive toxicity of sodium valproate in male rats. Indian J. Pharmacol.2010, TOM.42, 90-4

61. Sunny O. Abarkwu, Combined effects of repeated administration of Bretmont Wipeout (glyphosate) and Ultrazin (atrazine) on testosterone, oxidative stressand sperm qualityof Wistar rats. Toxicology Mechanisms and Methods. 2014

62. Cassault - Meyer E., An acute exposure to glyphosate - based herbicide alters aromatase levels in testis and sperm nuclear quality. Environ. Toxicol. Pharmacol. 2014, Τομ. 38,131-140.

63. Dallegrave, E., The teratogenic potential of the herbicide glyphosate-Roundup in Wistar Rats. Toxicol.Lett.2003, Τομ. 142, 45-52 και Pre and postnatal toxicity of the commercial glyphosate formulation in Wistar rats.. Arch. Toxicol.2007, Τομ. 81,665-73

64. Walsh L. P., Roundup inhibits steroidogenesis by dirupting steroidogenic acute regulatory (StAr) protein exression. Environ Health Persp. 2000, Τομ 108, 769-776.

65. Yousef M. I., M. H. Saelm, H. Z. Ibrahim, Helmi S., M. A. Seehy, Bertheussen. Toxic effects of carbofuran and glyphosate on semen characteristics in rabbits. Journal of Enviroinmental Science and Health, Part B : Pesticides, Food Contaminants and Agricultural Wastes.1995.

66. J. Rubes a,*, R. Rybar a, P. Prinosilovaa, Z. Veznika, I. Chvatalova b, I. Solansky b, R.J. Sramb,Genetic polymorphisms influence the susceptibility of men to sperm DNA damage associated with exposure to air pollution,Mutation Research 683 (2010) 9-15.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/05/2024 21:41:31 EEST - 3.145.18.80

67. G. Anifandis · T. Bounartzi · C. I. Messini · K. Dafopoulos · S. Sotiriou · I. E. Messinis, The impact of cigarette smoking and alcohol consumption on sperm parameters and sperm DNA fragmentation (SDF) measured by Halosperm, Arch Gynecol Obstet. **2014** Oct;290(4):777-82.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/05/2024 21:41:31 EEST - 3.145.18.80

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/05/2024 21:41:31 EEST - 3.145.18.80