



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 κινητικότητα δειγμάτων σπέρματος»

ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ ΚΑΤΣΑΝΑΚΗ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΛΑΡΙΣΑ
Σεπτέμβριος 2016

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ
ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ Ι. ΔΑΠΟΝΤΕ
ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΜΑΙΕΥΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΑΣ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπων: Γεώργιος-Σπυρίδων Ανυφαντής

Μέλος : Γεώργιος Αμοιρίδης

Μέλος : Αλέξανδρος Δαπόντε

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Πρωτίστως θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κύριο Ιωάννη Μεσσίνη, με τη βοήθεια του οποίου κατάφερα να έλθω για πρώτη φορά σε επαφή με το αντικείμενο της Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής, καθώς και το προσωπικό της Μονάδας Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας, το οποίο συνέβαλε στην απόκτηση χρήσιμων γνώσεων και εμπειρίας κατά τη διάρκεια της πρακτικής μου άσκησης σε προπτυχιακό και μεταπτυχιακό επίπεδο.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω το Διευθυντή του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών «Βιολογία της Αναπαραγωγής», κύριο Αλέξανδρο Δαπόντε, για την ευκαιρία που μου προσέφερε να εμβαθύνω τις γνώσεις μου σε διάφορους τομείς που αφορούν στην Ανθρώπινη Αναπαραγωγή.

Ιδιαίτερες και θερμές ευχαριστίες στον κύριο Γεώργιο Ανυφαντή για την εμπιστοσύνη και την πολύτιμη καθοδήγηση του σε όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής αυτής εργασίας, αλλά και της πρακτικής άσκησης. Ευχαριστώ επίσης τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής.

Για τις χρήσιμες συμβουλές της και το ενδιαφέρον της ευχαριστώ την κυρία Φανή Μπουναρτζή.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου, η οποία είναι δίπλα μου και με στηρίζει σε κάθε μου προσπάθεια.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ανδρική υπογονιμότητα, η οποία συμβάλλει σημαντικά στην αδυναμία ενός ζευγαριού να τεκνοποιήσει, οφείλεται σε ποικίλες αιτίες. Η έκθεση σε περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως τα φυτοφάρμακα, εγείρει προβληματισμούς για τις πιθανές επιδράσεις στην ποιότητα του σπέρματος, ιδιαίτερα για τους άνδρες που ασχολούνται με αγροτικές καλλιέργειες. Ένα από τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα φυτοφάρμακα, το Roundup, έχει απασχολήσει πολλούς επιστήμονες που μελέτησαν τις επιδράσεις του σε διάφορες συγκεντρώσεις, κυρίως σε ζωικούς οργανισμούς. Το δραστικό συστατικό του είναι το glyphosate, το οποίο εισέρχεται στο έδαφος και μεταβολίζεται κυρίως σε AMPA (aminomethylphosphonic acid), ενώ περιέχει και βοηθητικούς επιφανειοδραστικούς παράγοντες. Ο άνθρωπος εκτίθεται περισσότερο μέσω της διατροφής και του νερού, και λιγότερο διαδερμικά και μέσω της αναπνοής. Στο πλαίσιο της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας, εξετάστηκαν 30 δείγματα σπέρματος ανδρών χωρίς και με την επίδραση του παράγοντα glyphosate σε διάλυμα τελικής συγκέντρωσης 1ppm, περίπου 90 λεπτά μετά από τη ρευστοποίηση και την αρχική εκτίμηση των παραμέτρων τους. Τα αποτελέσματα δείχνουν μείωση της προωθητικής κίνησης, η οποία όμως δεν ήταν στατιστικά σημαντική, και αύξηση του ποσοστού των ακίνητων σπερματοζωαρίων, στατιστικά σημαντικής, στα δείγματα που εκτέθηκαν στον παράγοντα σε σχέση με τα δείγματα ελέγχου.

ABSTRACT

Male infertility, which contributes to some extent to the inability of a couple to acquire a child, has many causes. The exposure to environmental factors, such as the herbicides, raises concerns about the possible influences on sperm quality, especially for men who work in agriculture. Roundup is one of the most used herbicides worldwide and many scientists have examined its influences in various concentrations, mainly on animals. Its active substance is glyphosate, which enters the soil and is metabolized into AMPA (aminomethylphosphonic acid), while it also contains adjuvants. People are exposed mainly through diet and water, and to a lesser extent dermally and through inhalation. In this study, 30 semen samples have been examined without and with glyphosate in dilution with final concentration of 1ppm, approximately 90 minutes after their liquefaction and the initial evaluation of their parameters. The results show a decrease in the progressive motility, which is not significant, and an increase of the percentage of the immotile spermatozoa, which is significant, in the samples treated with glyphosate in comparison with the control samples.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	8
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
1.1. ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑ.....	9
1.1.1. ΑΝΔΡΙΚΗ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑ.....	9
1.1.2. ΑΙΤΙΑ ΑΝΔΡΙΚΗΣ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑΣ.....	10
1.2. ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ.....	11
1.2.1. ΖΙΖΑΝΙΟΚΤΟΝΑ.....	11
1.2.2. GLYPHOSATE.....	12
1.2.2.1. Τι είναι;.....	13
1.2.2.2. Χημική Σύσταση και Ιδιότητες.....	13
1.2.2.3. Τρόπος Δράσης.....	14
1.2.2.4. Μεταβολισμός και Αποικοδόμηση.....	16
1.2.2.5. Ανθρώπινη Έκθεση.....	17
1.2.2.6. Επιπτώσεις στο Ανδρικό Αναπαραγωγικό Σύστημα.....	18
1.3. ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ.....	20
1.3.1. ΛΗΨΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ.....	21
1.3.2. ΑΡΧΙΚΗ ΜΑΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ.....	21
1.3.3. ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ.....	22
1.3.4. ΚΙΝΗΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΩΝ.....	22
1.3.5. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ.....	23
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	26
2.1. ΥΛΙΚΑ.....	26
2.2. ΟΡΓΑΝΑ.....	26
2.3. ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ.....	26
2.4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	27
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	30
3.1. ΔΗΜΟΓΡΑΦΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΕΞΕΤΑΖΟΜΕΝΩΝ.....	30
3.2. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΡΧΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ.....	30

3.3. ΚΙΝΗΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΧΩΡΙΣ Ή ΜΕ ΤΗΝ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ GLYPHOSATE.....	31
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ/ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	35
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	37

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η υπογονιμότητα στις μέρες μας αποτελεί ένα ιδιαίτερα σημαντικό ζήτημα, με το οποίο έρχονται αντιμέτωποι περίπου το 15% των ζευγαριών που επιθυμούν να τεκνοποιήσουν. Τα αίτια της μπορεί να οφείλονται στη γυναίκα, στον άνδρα ή και στους δύο, ενώ υπάρχει και ένα ποσοστό στο οποίο δεν διαγιγνώσκεται κάποιο παθολογικό εύρημα. Η ανδρική υπογονιμότητα επηρεάζεται από ποικίλους παράγοντες ανάμεσα στους οποίους περιλαμβάνονται και οι περιβαλλοντικοί, ιδιαίτερα τα τελευταία χρόνια με τις τεράστιες αλλαγές στον τρόπο ζωής των ανθρώπων. Η αυξανόμενη χρήση φυτοφαρμάκων σε αγροτικές καλλιέργειες, και συνεπώς η μεγαλύτερη έκθεση του ανθρώπου σε αυτά, προκαλεί ανησυχία για τις πιθανές επιδράσεις στην υγεία και στην αναπαραγωγική λειτουργία των ανδρών. Ένα από τα φυτοφάρμακα που χρησιμοποιούνται σε μεγάλη έκταση είναι το Roundup, του οποίου δραστική ουσία αποτελεί το glyphosate, ενώ οι εμπορικά διαθέσιμες μορφές του περιέχουν και βοηθητικούς επιφανειοδραστικούς παράγοντες που συμβάλλουν στην καλύτερη απορρόφηση από τα φυτά-στόχους. Σκοπός της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας είναι η διερεύνηση της επίδρασης του glyphosate στην κινητικότητα των σπερματοζωαρίων, εκτελώντας in vitro πείραμα σε δείγματα σπέρματος και μικροσκοπική εξέταση.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑ

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (World Health Organization, WHO) και την International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) η υπογονιμότητα ορίζεται ως η αδυναμία επίτευξης κλινικής κύησης μετά από 12 μήνες ή περισσότερο τακτικών και ελεύθερων σεξουαλικών επαφών. Η υπογονιμότητα διακρίνεται σε πρωτοπαθή και δευτεροπαθή. Στην πρωτοπαθή υπογονιμότητα δεν έχει επιτευχθεί κύηση από το ζευγάρι ποτέ στο παρελθόν, ενώ στη δευτεροπαθή υπογονιμότητα έχει επιτευχθεί κύηση στο παρελθόν, ανεξάρτητα από την έκβασή της.

Το ζήτημα της υπογονιμότητας απασχολεί ολοένα και περισσότερα ζευγάρια. Υπολογίζεται ότι περίπου το 15% των ζευγαριών που επιθυμούν να τεκνοποιήσουν, δεν καταφέρνουν να πετύχουν εγκυμοσύνη μέσα στον 1^ο χρόνο ελεύθερων σεξουαλικών επαφών. Διάφοροι κοινωνικοί και πολιτισμικοί παράγοντες, αλλά και η ραγδαία εξέλιξη της επιστημονικής γνώσης και τεχνολογικής εμπειρίας τα τελευταία χρόνια, έχουν συμβάλει σημαντικά στην αύξηση του αριθμού των ζευγαριών που ενημερώνονται και εξετάζονται με σκοπό την εύρεση ενός πιθανού προβλήματος στην ικανότητα τεκνοποίησης και κατ' επέκταση την αναζήτηση εφαρμογής ιατρικών μεθόδων για την απόκτηση παιδιού. Το γεγονός αυτό μας επιτρέπει να έχουμε μία σαφέστερη εικόνα των αιτιών της υπογονιμότητας. Σήμερα γνωρίζουμε ότι τα αίτια της υπογονιμότητας αφορούν είτε στη γυναίκα είτε στον άνδρα σε παρόμοια ποσοστά, ή σε συνδυασμό και των δύο. Επιπλέον υπάρχουν περιπτώσεις υπογονιμότητας ανεξήγητης αιτιολογίας.

1.1.1 ΑΝΔΡΙΚΗ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑ

Ο ανδρικός παράγοντας είναι υπεύθυνος για το 20% των υπογόνιμων ζευγαριών και σε ένα ποσοστό 30-40% συνδυάζεται με κάποιο αίτιο προερχόμενο από τη γυναίκα. Η διάγνωσή της ανδρικής υπογονιμότητας, όπως επίσης και της γυναικείας, δεν είναι απλή διαδικασία. Απαιτείται η λήψη ενός λεπτομερούς ιστορικού, φυσική εξέταση και κυρίως

σπερμδιάγραμμα (τουλάχιστον δύο). Σε περίπτωση που οι προαναφερθείσες εξετάσεις δεν δώσουν κάποιο παθολογικό αποτέλεσμα που να δικαιολογεί τη δυσκολία γονιμοποίησης, ακολουθεί η εφαρμογή άλλων μεθόδων για περαιτέρω διερεύνηση, όπως για παράδειγμα ορμονικός έλεγχος, ανάλυση ούρων μετά από εκσπερμάτιση, υπερηχογράφημα των γεννητικών οργάνων, εξειδικευμένα κλινικά τεστ για το σπέρμα και τα σπερματοζώαρια, γενετικός έλεγχος. (American Urological Association, 2010)

1.1.2 ΑΙΤΙΑ ΑΝΔΡΙΚΗΣ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑΣ

Η διερεύνηση της ανδρικής υπογονιμότητας είναι πολύπλοκη λόγω των ποικίλων παραγόντων που εμπλέκονται σε αυτή. Με βάση τις οδηγίες της European Association of Urology του 2010 πάνω στην ανδρική υπογονιμότητα, τα βασικότερα αίτια της είναι τα εξής:

- Συγγενείς ή επίκτητες ουρογεννητικές ανωμαλίες
- Κακοήθειες
- Λοιμώξεις/Φλεγμονές του ουρογεννητικού συστήματος, πχ. ορχίτιδα, προστατίτιδα, επιδιδυμίτιδα, ουρηθρίτιδα
- Αυξημένη θερμοκρασία οσχέου
- Ενδοκρινικές διαταραχές
- Γενετικές ανωμαλίες, πχ. Σύνδρομο Klinefelter
- Ανοσολογικοί παράγοντες
- Τραύματα ή εγχειρήσεις στην περιοχή του γεννητικού συστήματος
- Αζωοσπερμία, αποφρακτική ή μη αποφρακτική (ορχική ανεπάρκεια)
- Κιρσοκήλη
- Κρυψορχία
- Διαταραχές εκσπερμάτισης, πχ απουσία εκσπερμάτισης, ανοργασμία, πρόωρη, καθυστερημένη, ασθενική, παλίνδρομη εκσπερμάτιση
- Ιδιοπαθής (30%-40% των περιπτώσεων ανδρικής υπογονιμότητας)

Η ανδρική υπογονιμότητα μπορεί επίσης να οφείλεται σε:

- Ψυχολογικούς παράγοντες, που μπορεί να οδηγήσουν σε στυτική δυσλειτουργία ή διαταραχές της εκσπερμάτισης (Wincze, 2015)
- Περιβαλλοντικούς παράγοντες, πχ. φάρμακα, κάπνισμα, αλκοόλ, έκθεση σε υψηλές θερμοκρασίες, ακτινοβολία και χημικές ουσίες (Sharpe, 2000)

1.2 ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Μία από τις αιτίες της ανδρικής υπογονιμότητας θεωρείται η επίδραση διάφορων περιβαλλοντικών παραγόντων. Η αυξανόμενη χρήση φυτοφαρμάκων, όπως ζιζανιοκτόνων σε αγροτικές καλλιέργειες και άλλες εργασίες με την πάροδο του χρόνου, και συνεπώς η μεγαλύτερη έκθεση σε αυτά, προκαλούν ανησυχία για τις επιπτώσεις στην αναπαραγωγική λειτουργία του ανθρώπου.

1.2.1 ΖΙΖΑΝΙΟΚΤΟΝΑ

Τα ζιζανιοκτόνα (herbicides) εμποδίζουν ή μεταβάλλουν την κανονική αύξηση-ανάπτυξη των φυτών, νεκρώνουν ή γενικά ζημιώνουν τα ανεπιθύμητα φυτά σε ένα αγροοικοσύστημα. (Λόλας, 2007) Τα ζιζανιοκτόνα μπορεί να είναι φυσικά, περιέχοντας φυσικές τοξίνες ανώτερων φυτών ή οργανισμών, ή χημικώς συντιθέμενα, περιέχοντας οργανικές ή ανόργανες ενώσεις που ανακαλύφθηκαν και συντέθηκαν στο εργαστήριο. (Ελευθεροχωρινός, 1996)

Λαμβάνοντας υπόψη διάφορα κριτήρια, τα ζιζανιοκτόνα μπορούν χωριστούν σε ορισμένες κατηγορίες. (Λόλας, 2007)

Ανάλογα με τη θέση εφαρμογής τους σε σχέση με το φυτό διακρίνονται σε ζιζανιοκτόνα του εδάφους και σε ζιζανιοκτόνα του φυλλώματος.

Με βάση τη θέση δράσης τους μπορούν να διαχωριστούν σε ζιζανιοκτόνα επαφής, τα οποία δρουν σε σχετικά σύντομο χρονικό διάστημα μετά την εφαρμογή τους στη θέση επαφής τους με το φυτό, και σε διασυστηματικά, τα οποία δρουν σε σχετικά μεγάλο χρονικό διάστημα ακόμη και σε σημεία τα οποία είναι απομακρυσμένα από τη θέση εφαρμογής.

Όσον αφορά στο φάσμα δράσης τα εκλεκτικά ζιζανιοκτόνα αντιμετωπίζουν ένα ή περισσότερα ζιζάνια, χωρίς να ζημιώνουν την καλλιέργεια, ενώ τα γενικά ή μη εκλεκτικά ζημιώνουν, σχεδόν με την ίδια αποτελεσματικότητα, όλα τα φυτά, είτε τα ζιζάνια είτε αυτά της καλλιέργειας.

Σημαντική είναι η κατηγοριοποίηση των ζιζανιοκτόνων με κριτήριο το χρόνο δράσης τους. Τα προσπαρτικά ή προφυτευτικά ζιζανιοκτόνα εφαρμόζονται πριν τη σπορά ή φύτευση της καλλιέργειας, πριν ή μετά από το φύτευμα των ζιζανίων. Τα προφυτρωτικά ζιζανιοκτόνα εφαρμόζονται μετά τη σπορά, πριν φυτρώσουν τα ζιζάνια ή τα καλλιεργούμενα φυτά. Τα μεταφυτρωτικά ζιζανιοκτόνα εφαρμόζονται μετά το φύτευμα των ζιζανίων και/ή των φυτών της καλλιέργειας.

Τα ζιζανιοκτόνα κατατάσσονται σε διάφορες ομάδες με βάση τον τρόπο-μηχανισμό δράσης τους, σύμφωνα με την HRAC (Herbicide Resistance Action Committee) και την WSSA (Weed Science Society of America). Μία από αυτές τις ομάδες, η οποία παρουσιάζει ενδιαφέρον για την παρούσα εργασία, περιλαμβάνει τους αναστολείς βιοσύνθεσης των αμινοξέων, οι οποίοι δρουν στο βιοχημικό μονοπάτι σύνθεσης των αμινοξέων εμποδίζοντας τη δράση ενός ενζύμου. Στην ομάδα αυτή ανήκει η οικογένεια των αμιξέων ή γλυκινών, με βασική μονάδα δομής το αμινοξύ γλυκίνη και τις πλευρικές, χημικά ενεργές ομάδες $-CH$ και $-H_2PO_3$. (Λόλας, 2007) Στο πλαίσιο της συγκεκριμένης μελέτης θα μας απασχολήσει ο παράγοντας glyphosate, που ανήκει στην προαναφερθείσα ομάδα.

1.2.2 GLYPHOSATE

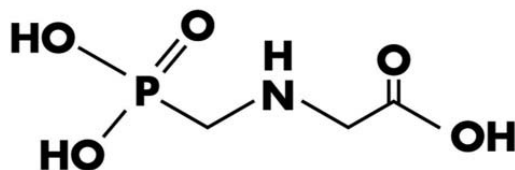
Το glyphosate ανακαλύφθηκε ως ουσία από τον Ελβετό χημικό Henri Martin, ο οποίος εργαζόταν στη φαρμακευτική εταιρεία Cilag, το 1950. Η αρχική χρήση του δεν αφορούσε στην αντιμετώπιση των ζιζανίων, έως το 1974 οπότε ο John Franz ανακάλυψε τις γνωστές σήμερα ιδιότητές του και το εισήγαγε ως δραστικό συστατικό ενός φυτοφαρμάκου, το οποίο λανσαρίστηκε από την εταιρεία Monsanto με την εμπορική ονομασία Roundup. (Glyphosate Task Force, 2013) Χρησιμοποιείται ευρέως για την αναστολή της ανάπτυξης μη επιθυμητών ετήσιων ή πολυετών ζιζανίων στη γεωργία, στη βιομηχανία, στη δασοκομία, αλλά και στους κήπους κατοικιών. (Williams *et al*, 2000)

1.2.2.1 Τι είναι;

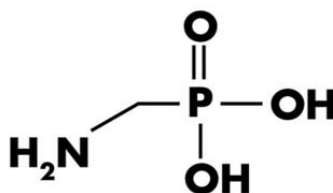
Το glyphosate είναι ένα μεταφωσφωρικό, μη εκλεκτικό, διασυστηματικό ζιζανιοκτόνο πολύ δραστικό εναντίον των περισσότερων ζιζανίων. (Λόλας, 2007) Είναι ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο φυτοφάρμακο σε παγκόσμια κλίμακα, απλό στη χρήση και αποδοτικό οικονομικά. Ψεκάζεται αραιωμένο σε διάλυμα στα φύλλα των φυτών. (Glyphosate Task Force, 2013)

1.2.2.2 Χημική Σύσταση και Ιδιότητες

Το glyphosate (*Εικόνα 1.1*) είναι ένα παράγωγο γλυκίνης, όπου ένα άτομο Η έχει αντικατασταθεί με μια ομάδα φωσφονομεθυλίου [N-(phosphonomethyl)glycine] και έχει μοριακό βάρος 169,07g/mole. Είναι αμφοτερικό στοιχείο, δηλαδή έχει ιδιότητες οξέος και βάσης, έχει μεγάλη διαλυτότητα στο νερό (12mg/l), ενώ είναι αδιάλυτο σε οργανικούς διαλύτες. Εφαρμόζεται συνήθως με τη μορφή άλατος (isopropylamine salt, IPA), διαλυμένο σε νερό σε διάφορες συγκεντρώσεις, και δρα σε συνεργασία με βοηθητικούς επιφανειοδραστικούς παράγοντες, κυρίως με polyoxyethyleneamines (POEA), για καλύτερη διαλυτότητα και διεισδυτικότητα. (Williams *et al*, 2000; Williams *et al*, 2012)

A

Glyphosate
(CAS RN 1071-83-6)

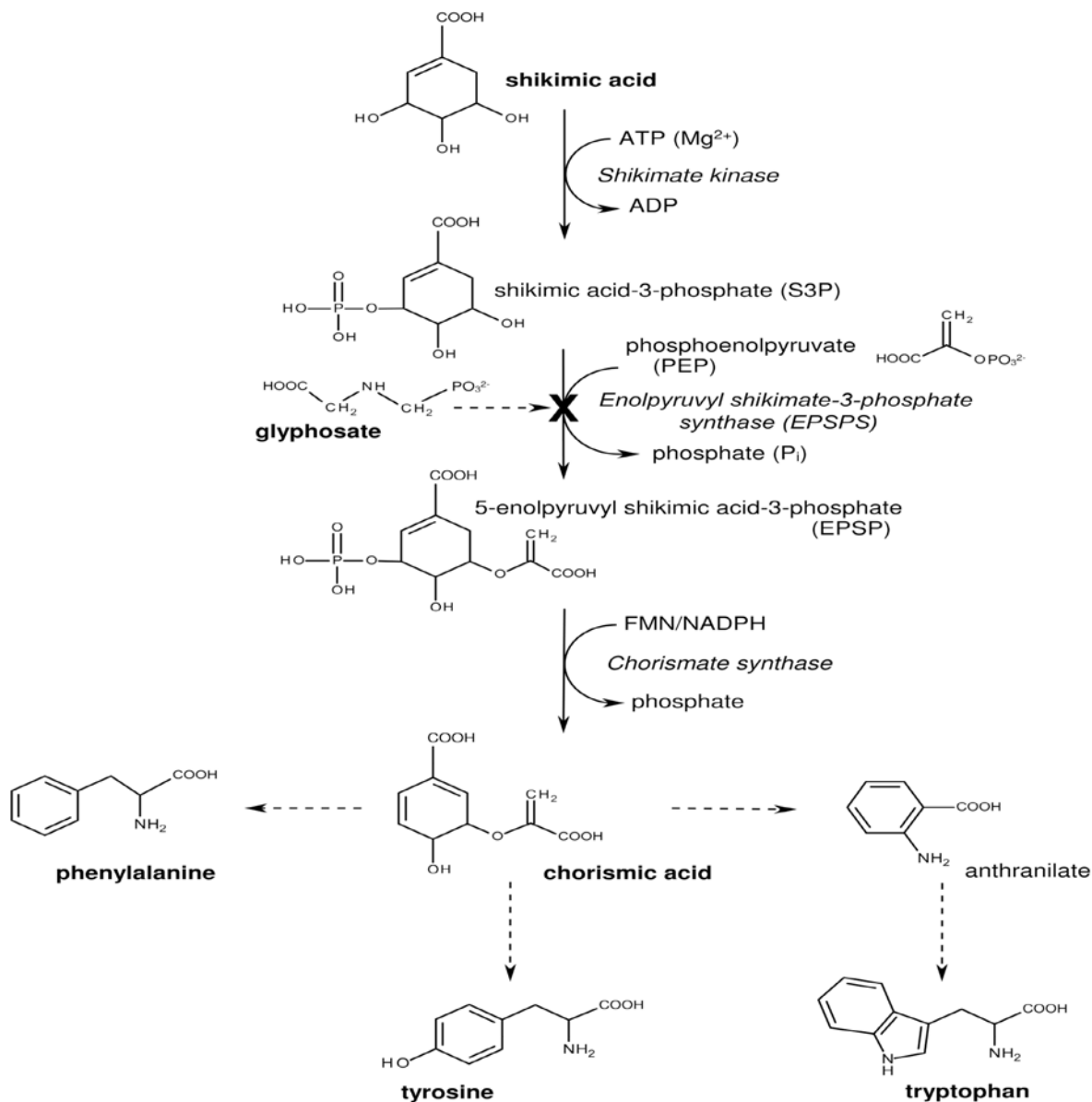
B

AMPA
(aminomethylphosphosphonic acid; CAS RN 1066-51-9)

Εικόνα 1.1 Χημική δομή glyphosate (A) και του κύριου μεταβολικού προϊόντος AMPA (B).

1.2.2.3 Τρόπος δράσης

Το glyphosate επεμβαίνει στο βιοχημικό μονοπάτι του σικιμικού οξέος (*Εικόνα 1.2*), εμποδίζοντας το σχηματισμό των αρωματικών αμινοξέων φαινυλαλανίνη, τυροσίνη και τρυπτοφάνη στους χλωροπλάστες των φυτών. Το glyphosate προσδέεται στο ένζυμο EPSP synthase (συνθετάση του 5-ενολπυρουβιλσικιμικού-3-φωσφορικού οξέος) και δρα αλλοστερικά, αλλάζοντας το σχήμα της θέσης πρόσδεσης του υποστρώματος (PEP), το οποίο συνεπώς δεν μπορεί να προσδεθεί. Κατ' αυτόν τον τρόπο, εμποδίζεται η δράση του ενζύμου, που καταλύει την αντίδραση του S3P (shikimate-3-phosphate) και phosphoenol-pyruvate σε χορισμικό (EPSP, 5enolpyruvyl-shikimate-3phosphate), που είναι πρόδρομος των αρωματικών αμινοξέων, απαραίτητων για την ανάπτυξη των φυτών. (Λόλας, 2007)

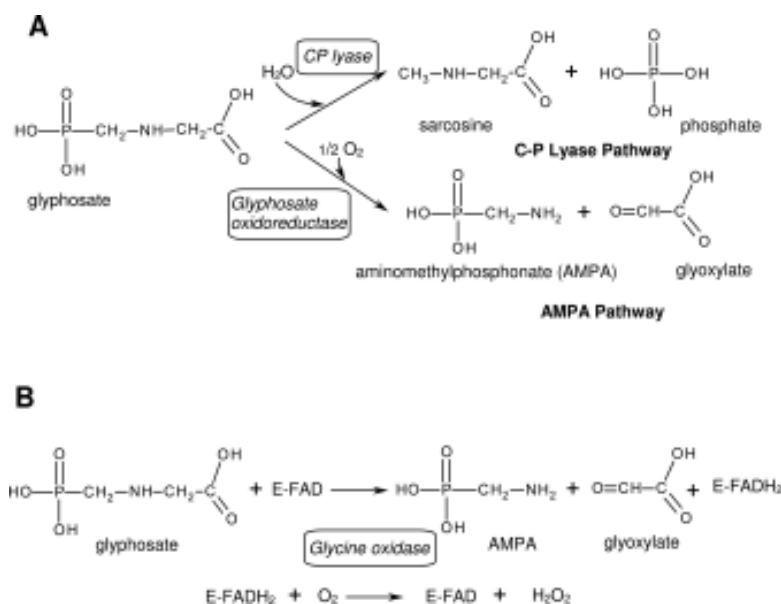


Εικόνα 1.2 Βιοχημικό μονοπάτι σικιμικού οξέος που οδηγεί στη βιοσύνθεση αρωματικών αμινοξέων. Το glyphosate αναστέλλει τη δράση του ενζύμου EPSP synthase.

Το μονοπάτι του σικιμικού οξέος συναντάται στα κύτταρα των φυτών, στους μύκητες και στα βακτήρια. Για το λόγο αυτό, δεν αναμένεται το glyphosate να επιδρά αρνητικά στον άνθρωπο και σε άλλα θηλαστικά κάτω από φυσιολογικές συνθήκες. (Williams *et al*, 2012)

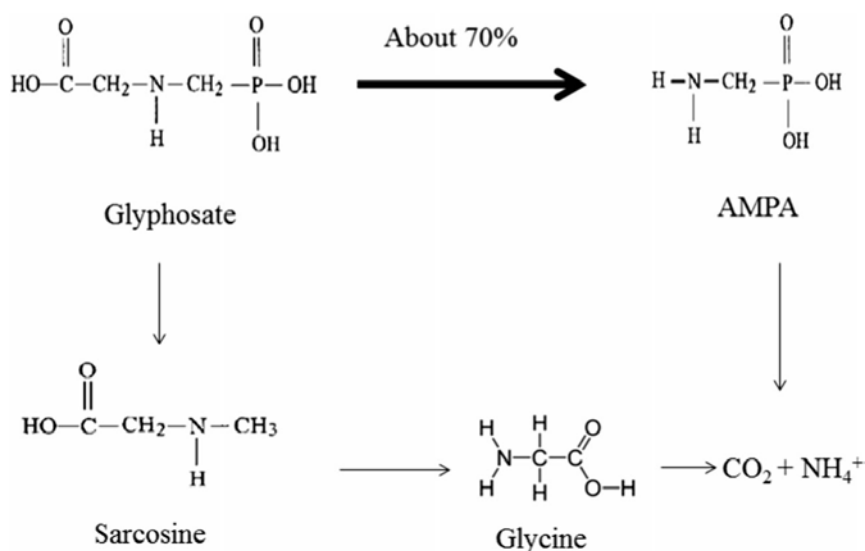
1.2.2.4 Μεταβολισμός και Αποικοδόμηση

Το κύριο προϊόν μεταβολισμού του glyphosate είναι το AMPA (aminomethylphosphonic acid, **Εικόνα 1.1**). Η είσοδός του στο έδαφος μέσω του ριζικού συστήματος είναι πολύ μικρή και ο χρόνος ημιζωής του είναι 2-197 ημέρες, σύμφωνα με National Pesticide Information Center fact sheet για το glyphosate. Είναι μη πτητικό και συνδέεται στενά στα περισσότερα εδάφη, έτσι ώστε είναι δύσκολο να μεταναστεύσει στα υπόγεια ύδατα ή σε φυτά μη-στόχους. Στο νερό ο χρόνος ημιζωής του έχει εύρος από μερικές έως 91 ημέρες. Η αποικοδόμησή του στο περιβάλλον γίνεται κυρίως από μικροοργανισμούς και μέσω περιορισμένου μεταβολισμού στα φυτά. Οι μικροοργανισμοί του εδάφους μπορούν να μεταβολίσουν το glyphosate με δύο τρόπους. Η μία οδός περιλαμβάνει τη διάσπαση του δεσμού C-P με τελικό αποτέλεσμα το σχηματισμό σαρκosίνης (N-methyl-glycine) και φωσφορικού οξέος (μονοπάτι C-P λυάσης). Η άλλη οδός στηρίζεται στη διάσπαση του δεσμού C-N στο καρβοξυτελικό άκρο από την glyphosateoxidoreductase (GOX) για το σχηματισμό των AMPA και glyoxylate (μονοπάτι AMPA). (Pollegioni *et al*, 2012) Στην **Εικόνα 1.3** δίνονται συνοπτικά οι μηχανισμοί αποικοδόμησης του glyphosate από μικροοργανισμούς.



Εικόνα 1.3 Μικροβιακοί μηχανισμοί αποικοδόμησης του glyphosate.

Το μονοπάτι AMPA φαίνεται να είναι κύριο για το μεταβολισμό του glyphosate στο έδαφος. (Pollegioni *et al*, 2012) Τα τελικά προϊόντα μεταβολισμού του glyphosate παρουσιάζονται στην **Εικόνα 1.4**.



Εικόνα 1.4 Τελικά προϊόντα αποικοδόμησης του glyphosate. Το κύριο μονοπάτι είναι αυτό του AMPA

1.2.2.5 Ανθρώπινη Έκθεση

Ο άνθρωπος εκτίθεται με διάφορους τρόπους στα φυτοφάρμακα, όπως είναι π.χ. η ακούσια έκθεση των οφθαλμών κατά την ανάμειξη και εφαρμογή των φυτοφαρμάκων. Η δερματική έκθεση λόγω ανάμειξης/εφαρμογής των φυτοφαρμάκων και η άμεση επαφή του δέρματος με επιφάνειες φυτών που έχουν ψεκάσει δεν είναι ιδιαίτερα σημαντική, λόγω της χαμηλής απορρόφησης. Η στοματική έκθεση γίνεται μέσω της κατανάλωσης τροφίμων που έχουν ψεκάσει και της κατάποσης μολυσμένου νερού. Τέλος, η έκθεση μέσω εισπνοής είναι ελάχιστη και δεν έχει σημαντική αξία. (Williams *et al*, 2012) Πειράματα έχουν δείξει ότι το glyphosate και το AMPA δεν βιοσυσσωρεύονται στους ζωικούς ιστούς. (Williams *et al*, 2000)

Η πολιτεία της Αυστραλίας έχει καθορίσει για το glyphosate την τιμή NOAEL (no-observed-adverse-effect level) για τον άνθρωπο στα 30mg/Kg σωματικού βάρους και την τιμή ADI (Acceptable Daily Intake) στα 0,3mg/Kg σωματικού βάρους. NOAEL είναι η μέγιστη χορηγούμενη δόση που δεν προκαλεί κάποια ανιχνεύσιμη αρνητική επίπτωση σε μελέτες που γίνονται σε ζώα. Η παράμετρος ADI εκφράζει το επίπεδο πρόσληψης ενός χημικού το οποίο μπορεί να ληφθεί μέσω τροφής ημερησίως για ολόκληρη τη διάρκεια ζωής χωρίς να προκαλέσει κάποιο υπολογίσιμο κίνδυνο στην υγεία του ανθρώπου. Υπολογίζεται διαιρώντας το NOAEL με το συντελεστή ασφάλειας, το μέγεθος του οποίου επιλέγεται για να υπολογίσει την αβεβαιότητα της προέκτασης των δεδομένων για τα ζώα στον άνθρωπο, τη διακύμανση μεταξύ των ανθρώπων, την πληρότητα τα τοξικολογικής βάσης δεδομένων και της φύσης των αρνητικών επιπτώσεων.

1.2.2.7 Επιπτώσεις στο Ανδρικό Αναπαραγωγικό Σύστημα

Δεν υπάρχουν πολλά στοιχεία για την επίδραση του glyphosate στο ανδρικό αναπαραγωγικό σύστημα του ανθρώπου. Οι περισσότερες μελέτες έχουν γίνει σε διάφορα άλλα είδη και μάλιστα σε αυτές χρησιμοποιήθηκαν φυτοφάρμακα με βάση το glyphosate, ενώ είναι λίγες αυτές στις οποίες χρησιμοποιήθηκε το glyphosate μόνο του ως ουσία. Τα αποτελέσματα είναι αμφιλεγόμενα. Για παράδειγμα, το Μάιο του 2016 στη συνεδρίαση της Γενεύης μεταξύ του World Health Organization και του Food and Agriculture Organization of the United Nations, μετά από αξιολόγηση πολλών ερευνών για την επίδραση του glyphosate διαφορετικών συγκεντρώσεων σε διάφορα είδη, εξήχθη το συμπέρασμα ότι ο παράγοντας αυτός δεν θέτει κίνδυνο καρκινογένεσης στον άνθρωπο από την έκθεση μέσω διατροφής. Αντιθέτως, στη συνεδρίαση ειδικών του International Agency for Research on Cancer το Μάρτιο του 2015 με θέμα την καρκινογένεση, αξιολογήθηκαν μελέτες, με βάση τις οποίες το glyphosate κατατάσσεται στους πιθανούς καρκινογενετικούς παράγοντες. Σημαντικό στοιχείο που συνέβαλε σε αυτή την κατάταξη είναι η ανίχνευση του στο αίμα και στα ούρα αγροτικών εργατών, ενώ η ανίχνευση του μεταβολικού προϊόντος AMPA υποδηλώνει πιθανό εντερικό μεταβολισμό.

Το Roundup βρέθηκε ότι μειώνει τη στεροειδογένεση σε καρκινικά κύτταρα MA-10 Leydig αρσενικών ποντικών, παρεμποδίζοντας την έκφραση της StAR πρωτεΐνης μετα-

μεταγραφικά, ενώ το glyphosate δεν ασκεί την ίδια επίδραση. (Walsh *et al*, 2000) Οι πιθανοί μηχανισμοί δράσης του φυτοφαρμάκου είναι σε επίπεδο μετάφρασης του mRNA σε πρωτεΐνη, στη σχέση της πρωτεΐνης StAR με την εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη ή στη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης. Σαν συνέπεια, μειώνεται η ποσότητα της χοληστερόλης που μεταφέρεται στο P450_{scc}, αλλά και η δράση αυτού του ενζύμου. Αντίστοιχα, πραγματοποιήθηκε η μελέτη των Levine *et al* (2007), στον ίδιο τύπο κυττάρων, διαπιστώνοντας ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της διατάραξης της μιτοχονδριακής μεμβράνης από κοινούς επιφανειοδραστικούς παράγοντες που χρησιμοποιούνται στη σύνθεση των φυτοφαρμάκων και της παρεμπόδισης της στεροειδογένεσης. Παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων της πρωτεΐνης StAR και της προγεστερόνης.

Σύμφωνα με τη μελέτη των Caussault-Meyer *et al* (2014), κατά την οποία μελετήθηκε η επίδραση του Roundup σε ποντίκια, βρέθηκε ότι αυτό επηρεάζει την έκφραση του ενζύμου αρωματάση (P450 arom), αυξάνοντας τα επίπεδα mRNA και πρωτεΐνης στα κύτταρα των όρχεων, με αποτέλεσμα την πρόκληση διαταραχών στην ισορροπία ανδρογόνων-οιστρογόνων. Αντίθετα δεν επηρεάστηκε η έκφραση των ανδρογονικών και οιστρογονικών υποδοχέων, εκτός από αυτή του Gper1 (G protein-coupled estrogen receptor 1). Η εξέταση της μεταβολής των επιπέδων ορισμένων δεικτών λόγω της έκθεσης στο φυτοφάρμακο οδήγησε στην αιτιολόγηση της αύξησης του ποσοστού ανώμαλης μορφολογίας και της πιθανής αλλαγής στην πυρηνική ωρίμανση. Η συγκέντρωση, η ζωτικότητα και η κινητικότητα δεν παρουσίασαν μεταβολή. Από την άλλη πλευρά, σε μία πολύ πρόσφατη εργασία (Dai *et al*, 2016) μελετήθηκε η επίδραση του glyphosate στα αναπαραγωγικά όργανα σεξουαλικά ώριμων αρσενικών ποντικών Sprague-Dawle, συμπεραίνοντας ότι ο παράγοντας αυτός από μόνος του έχει χαμηλότερη τοξικότητα από το Roundup. Δεν βρέθηκε αναπαραγωγική τοξικότητα. Μόνο σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις (500mg/ml) παρατηρήθηκε μείωση του συνολικού αριθμού σπερματοζωαρίων και διαφορά στο βάρος της σπερματοδόχου κύστης.

Σε μελέτη που έγινε σε ώριμα αρσενικά άσπρα κουνέλια New Zealand (Yousef *et al*, 1995) παρατηρήθηκε διαφορά στην ποιότητα του σπέρματος αυτών που εκτέθηκαν στο glyphosate. Πιο συγκεκριμένα, διαπιστώθηκε μείωση του όγκου εκσπερμάτισης, μείωση της συγκέντρωσης των σπερματοζωαρίων, αύξηση του ποσοστού των ανώμαλων μορφολογικά και νεκρών σπερματοζωαρίων, μείωση των επιπέδων της φρουκτόζης και της ωσμωτικότητας.

Η έκθεση θηλυκών ποντικών στο Roundup κατά την περιγεννητική περίοδο οδηγεί σε αλλαγές στη συμπεριφορά, ιστολογικά και ενδοκρινικά προβλήματα σε ορισμένες παραμέτρους, περιλαμβάνοντας υπερέκκριση ανδρογόνων και αυξημένη δραστηριότητα των γονάδων, αυξημένη παραγωγή σπέρματος και λίμπιντο τους αρσενικούς απογόνους. Δεν είναι γνωστό αν η δόση του παράγοντα που χρησιμοποιήθηκε είναι αντιπροσωπευτική της έκθεσης του πληθυσμού στο glyphosate. (Romano *et al*, 2014) Αντίθετα, η έκθεση θηλυκών ποντικών Wistar στο ίδιο φυτοφάρμακο κατά την περίοδο κύησης και θηλασμού οδήγησε στην μειωμένη παραγωγή σπέρματος, μειωμένη τεστοστερόνη στον ορό του αίματος (εξαρτώμενη από τη δόση) στην εφηβεία, μείωση του αριθμού των σπερματοζωαρίων και αυξημένο ποσοστό ανώμαλης μορφολογίας στους αρσενικούς απογόνους. Δεν παρατηρήθηκε μητρική τοξικότητα. (Dallegrave *et al*, 2007)

Όσον αφορά στην επίδραση του glyphosate στην κινητικότητα των σπερματοζωαρίων και στη μιτοχονδριακή δραστηριότητα, οι πληροφορίες προέρχονται κυρίως από είδη πέραν των θηλαστικών. Το glyphosate μόνο του βρέθηκε να έχει πιθανώς επιβλαβείς δράσεις στο αναπαραγωγικό σύστημα των αρσενικών ατόμων *Danio rerio*, όπως είναι η μείωση της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων και η καταστροφή του DNA του σπέρματος, η μείωση της ακεραιότητας της μιτοχονδριακής μεμβράνης και της λειτουργικότητας. (Lopes *et al*, 2014) Στα αρσενικά άτομα *Poecilia vivipara* βρέθηκαν όμοια αποτελέσματα από την επίδραση του Roundup από τους Harayashiki *et al*, 2013.

1.3 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ

Η πιο απλή εξέταση ρουτίνας για ένα δείγμα σπέρματος είναι το σπερμοδιάγραμμα, ενώ διάφορες άλλες προαιρετικές εξετάσεις μπορούν να δώσουν επιπρόσθετες πληροφορίες. Η εκτίμηση της ποιότητας του σπέρματος ενός άνδρα δεν είναι ιδιαίτερα εύκολη, καθώς οι παράμετροί του ενδέχεται να παρουσιάσουν διακυμάνσεις με τη λήψη δειγμάτων σε διαφορετικές χρονικές στιγμές. Για το λόγο αυτό, για να έχουμε μια πιο σαφή εικόνα, θα πρέπει να πραγματοποιηθούν δύο σπερμοδιαγράμματα σε διάστημα 3 εβδομάδων. Αν υπάρχει μεγάλη διαφορά, θα πρέπει η εξέταση να επαναληφθεί και τρίτη φορά. (Ζεγκινιάδου, 2004)

1.3.1 ΛΗΨΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Κατά τη διάρκεια της εκσπερμάτισης το σπέρμα παράγεται από ένα συμπυκνωμένο αιώρημα σπερματοζωαρίων, αποθηκευμένο στις επιδιδυμίδες, αραιωμένο σε υγρές εκκρίσεις των βοηθητικών γεννητικών οργάνων. (WHO, 2010)

Το δείγμα συλλέγεται με αυνανισμό σε ειδικό δωμάτιο κοντά στο εργαστήριο, μέσα σε ένα δοχείο μη τοξικό για τα σπερματοζώαρια, στο οποίο αναγράφεται το ονοματεπώνυμο του εξεταζόμενου και η ώρα παραγωγής του δείγματος. Το δείγμα θα πρέπει απαραίτητως να συλλέγεται ολόκληρο, με ιδιαίτερη προσοχή να μη χαθεί το πρώτο κλάσμα. Αυτό περιέχει προστατικά υγρά πλούσια σε σπερματοζώαρια, ενώ τα επόμενα αποτελούνται κυρίως από υγρό της σπερματοδόχου κύστης. Ο χρόνος αποχής από τη σεξουαλική επαφή πρέπει να είναι 2-7 ημέρες. Το δοχείο συλλογής πρέπει να διατηρηθεί σε σταθερή θερμοκρασία 20-37°C μέχρι να γίνει η ανάλυσή του. Σε περίπτωση αδυναμίας λήψης δείγματος στην κλινική, μπορεί ο εξεταζόμενος να το συλλέξει στο σπίτι με αυνανισμό, και όχι με σεξουαλική επαφή, ακολουθώντας τις αντίστοιχες οδηγίες και μεταφέροντας το άμεσα, οπωσδήποτε μέσα σε μία ώρα, και σε σταθερή θερμοκρασία στο εργαστήριο. Ακολουθεί η μακροσκοπική και η μικροσκοπική εξέταση του δείγματος, που περιγράφεται στη συνέχεια με βάση το εγχειρίδιο του WHO (2010) για την εξέταση και επεξεργασία του ανθρώπινου σπέρματος και το εγχειρίδιο της ESHRE (European Society of Human Reproduction and Embryology) για τη βασική εξέταση του σπέρματος (2002).

1.3.2 ΑΡΧΙΚΗ ΜΑΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ

Η αρχική γενική εκτίμηση του δείγματος γίνεται στα 30 λεπτά περίπου, όποτε το δείγμα έχει ρευστοποιηθεί (η ρευστοποίηση ενδέχεται να ολοκληρωθεί στα 15 λεπτά). Εάν αυτό δε συμβεί, η εκτίμηση γίνεται μερικά λεπτά αργότερα, αλλά πάντα εντός μιας ώρας, ώστε να αποφευχθούν η αφυδάτωση και οι αλλαγές της θερμοκρασίας. Η ρευστοποίηση αναγνωρίζεται καθώς το σπέρμα από την αρχική ημιστερεή παχύρευστη μορφή του γίνεται περισσότερο ρευστό και ομοιόμορφο.

Η εμφάνιση ενός φυσιολογικά ρευστοποιημένου σπέρματος είναι ομοιογενής και γκριζωπή. Ένα δείγμα είναι λιγότερο αδιαφανές, όταν η συγκέντρωση του σε σπερματοζωάρια είναι μικρή. Το κόκκινο-καφέ χρώμα αποτελεί ένδειξη ύπαρξης ερυθρών αιμοσφαιρίων (αιμοσπερμία), ενώ το κίτρινο χρώμα υποδεικνύει πιθανή λήψη βιταμινών, ναρκωτικών ή ίκτερο. Ακολουθεί η μέτρηση του όγκου και η εκτίμηση του ιξώδους. Αν το σπέρμα αναρροφηθεί με πιπέτα και πέφτει σε μικρές ξεχωριστές σταγόνες, το ιξώδες είναι φυσιολογικό, ενώ αν πέφτει σε μορφή νήματος >2cm, το ιξώδες χαρακτηρίζεται ως μη φυσιολογικό. Η μέτρηση του pH είναι προαιρετική.

1.3.3 ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ

Μετά το πέρας της μακροσκοπικής εξέτασης ακολουθεί ο προσδιορισμός επιπλέον παραμέτρων μικροσκοπικά. Σε αυτές περιλαμβάνονται η συγκέντρωση των σπερματοζωαρίων σε 10⁶/ml δείγματος, η κινητικότητα και ο συνολικός αριθμός τους που υπολογίζεται πολλαπλασιάζοντας τη συγκέντρωση με το συνολικό όγκο. Εκτιμάται περαιτέρω η ζωτικότητα, η οποία είναι ιδιαίτερα σημαντική σε δείγματα με μειωμένη κινητικότητα, η παρουσία συσσωματωμάτων (προσκολλήσεις σπερματοζωαρίων κινητών ή και ακίνητων μεταξύ τους σε βλενώδεις εκκρίσεις ή βρωμιές), συγκολλήσεων (διάφορες μορφές προσκόλλησης κινητών σπερματοζωαρίων), αλλά και άλλων κυτταρικών στοιχείων, όπως για παράδειγμα επιθηλιακών κυττάρων, κυττάρων της σπερματογένεσης, λευκοκυττάρων ή ερυθροκυττάρων.

1.3.4 ΚΙΝΗΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΩΝ

Για την εκτίμηση της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων ενός δείγματος, ελέγχεται μία μικρή ποσότητα αυτού σε μικροσκόπιο αντίθετης φάσης, 30 λεπτά περίπου μετά από τη λήψη του. Με βάση τις νέες οδηγίες του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (2010), η κινητικότητα διακρίνεται στις εξής τρεις κατηγορίες:

- 1) Προωθητική κίνηση (Progressive Motility, **PRM**): Στην κατηγορία αυτή κατατάσσονται τα σπερματοζωάρια που κινούνται ενεργά, είτε ευθύγραμμα είτε σε μεγάλους κύκλους, ανεξάρτητα από την ταχύτητα.
- 2) Επιτόπια κίνηση (Non-Progressive Motility, **NPM**): Η κατηγορία αυτή περιλαμβάνει οποιοδήποτε άλλο πρότυπο κίνησης, όπως κίνηση σε μικρούς κύκλους, κίνηση της κεφαλής ή της ουράς χωρίς να κινείται το υπόλοιπο τμήμα.
- 3) Ακινησία (Immobility, **IM**): Απουσία κίνησης.

Σύμφωνα με την προηγούμενη ισχύουσα κατηγοριοποίηση, τα σπερματοζωάρια κατατάσσονταν σε τέσσερις ομάδες, την ταχεία προωθητική κίνηση (a) και τη νωθρή προωθητική κίνηση (b), οι οποίες διέφεραν ως προς την ταχύτητα και πια ανήκουν στην ίδια κατηγορία, την επιτόπια κίνηση (c) και την ακινησία (d).

Για την αντικειμενικότερη δυνατή εκτίμηση της κινητικότητας ακολουθούνται συγκεκριμένα βήματα. Κατά τη διαδικασία της μέτρησης παρατηρούνται διαφορετικές περιοχές, τυχαία επιλεγόμενες και γίνεται όσο το δυνατόν γρηγορότερη καταμέτρηση των σπερματοζωαρίων που βρίσκονται στην περιοχή μια συγκεκριμένη χρονική στιγμή. Δύο μετρήσεις από διαφορετικές σταγόνες του δείγματος, κάθε μία από τις οποίες περιλαμβάνει 200 σπερματοζωάρια από τουλάχιστον 5 διαφορετικές περιοχές, συγκρίνονται μεταξύ τους. Αν οι διαφορές είναι εντός των αποδεκτών ορίων, υπολογίζονται οι μέσοι όροι των δύο μετρήσεων για κάθε κατηγορία. Σε αντίθετη περίπτωση διαγράφονται και γίνονται εκ νέου δύο μετρήσεις ακολουθώντας την ίδια διαδικασία.

1.3.5 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Ο χαρακτηρισμός ενός δείγματος σπέρματος ως φυσιολογικό ή μη φυσιολογικό στηρίζεται σε στη σύγκριση των παραμέτρων του με τιμές αναφοράς (reference values), καθορισμένες από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας. Στον **Πίνακα 1.1** δίνονται συνοπτικά αυτές οι τιμές.

Πίνακας 1.1 Κατώτερα όρια αναφοράς για τα χαρακτηριστικά του σπέρματος.

ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΣ	ΚΑΤΩΤΕΡΕΣ ΤΙΜΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ
Όγκος	1,5ml
Συγκέντρωση	15x10 ⁶ /ml
Συνολικός Αριθμός Σπερματοζωαρίων	39x10 ⁶ /εκσπερμάτιση
Ζωτικότητα	58% ζωντανά σπερματοζωάρια
Κινητικότητα	32% προωθητική κίνηση ή > 40% προωθητική και επιτόπια κίνηση
Μορφολογία	4% φυσιολογικές μορφές

Όταν οι τιμές των παραμέτρων ενός δείγματος είναι πάνω από τα κατώτερα ορισμένα όρια, τότε μπορεί να χαρακτηριστεί ως φυσιολογικό. Αντίθετα, όταν μία ή συνδυασμός περισσότερων παραμέτρων βρίσκονται κάτω από αυτά τα όρια, το δείγμα χαρακτηρίζεται ως παθολογικό και κατατάσσεται στην αντίστοιχη κατηγορία.

- Ολιγοζωοσπερμία: ο συνολικός αριθμός σπερματοζωαρίων ή η συγκέντρωση του δείγματος είναι κάτω από το φυσιολογικό όριο.
- Ασθενοζωοσπερμία: το ποσοστό των προωθητικώς κινούμενων σπερματοζωαρίων είναι κατώτερο του φυσιολογικού.
- Τερατοζωοσπερμία: το ποσοστό των μορφολογικώς φυσιολογικών σπερματοζωαρίων είναι κάτω από την τιμή αναφοράς.
- Πιθανοί συνδυασμοί αυτών των τριών παθολογικών καταστάσεων είναι η ολιγοασθενοσπερμία, η ολιγοτερατοζωοσπερμία, η ασθενοτερατοζωοσπερμία και η ολιγοασθενοτερατοζωοσπερμία.

Άλλες περιπτώσεις μη φυσιολογικών δειγμάτων:

- Ασπερμία: απουσία εκσπερμάτισης (ή η παλίνδρομη εκσπερμάτιση).
- Αζωοσπερμία: απουσία σπερματοζωαρίων από το σπέρμα.

- Κρυπτοζωοσπερμία: σπερματοζωάρια δεν υπάρχουν στο φρέσκο δείγμα, αλλά ανευρίσκονται μετά από φυγοκέντρωση.
- Νεκροζωοσπερμία: χαμηλό ποσοστό ζωντανών και υψηλό ποσοστό ακίνητων σπερματοζωαρίων.
- Νορμοζωοσπερμία: ο συνολικός αριθμός σπερματοζωαρίων ή η συγκέντρωση, το ποσοστό των προωθητικώς κινούμενων και μορφολογικά φυσιολογικών σπερματοζωαρίων είναι χαμηλότερα των τιμών αναφοράς.
- Αιμοσπερμία: παρουσία ερυθρών αιμοσφαιρίων
- Λευκοσπερμία: παρουσία $>10^6$ λευκών αιμοσφαιρίων/ml.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΥΛΙΚΑ

- Glyphosate PESTANAL 250MG (Sigma-Aldrich)
- Buffer medium
- Sperm medium

2.2 ΌΡΓΑΝΑ

- Μικροσκόπιο αντίθετης φάσης
- Makler counting chamber
- Πιπέτα Microlit 0,1-10μL
- Πιπέτα Microlit 20-200μL
- Πιπέτα Biohit 100-1000μL
- Φυγόκεντρος
- Μετρητής Lab Count Denominator

2.3 ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ

- Ουροσυλλέκτες (urobox)
- Biosphere Filter Tips 0,1-10μL
- Biosphere Filter Tips 2-200μL
- Safety Space Filter Tips 50-1000μL
- Eppendorfs
- 15mL Polystyrene Conical Tubes (Falcons)

4.4 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Για τη διεκπεραίωση της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας μελετήθηκαν 30 δείγματα σπέρματος ανδρών που συμμετείχαν σε κύκλους υποβοηθούμενης αναπαραγωγής ή εξετάστηκαν με σπερμοδιάγραμμα για την ποιότητα του σπέρματός τους στη Μονάδα Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας.

Για την πειραματική διαδικασία ήταν απαραίτητη η προετοιμασία ενός διαλύματος με glyphosate τελικής συγκέντρωσης 1ppm, που αντιστοιχεί σε 0,36mg/l. Το glyphosate είναι διαθέσιμο σε μορφή σκόνης και διαλύθηκε σε buffer medium, λαμβάνοντας υπόψη τις οδηγίες της εταιρείας προμήθειας, με κατάλληλες αραιώσεις, ώστε να έχει την επιθυμητή τελική συγκέντρωση.

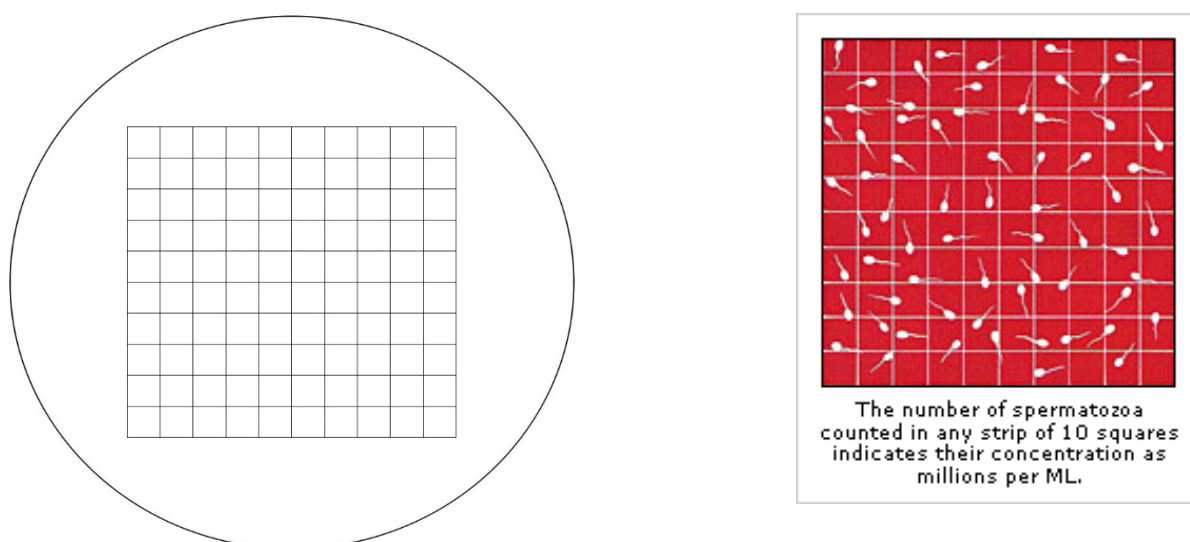
Η συλλογή των δειγμάτων γίνεται σε ειδικό χώρο της μονάδας, κοντά στο εργαστήριο. Οι εξεταζόμενοι έδιναν το δείγμα με αυνανισμό σε δοχείο-συλλέκτη (urobox), στο οποίο αναγράφεται το ονοματεπώνυμό τους ή της συντρόφου και η ώρα παραγωγής του. Το κάθε δείγμα παραμένει στο hood για περίπου 20-30 λεπτά, μέχρι να ρευστοποιηθεί.



Εικόνα 4.1 Makler counting chamber

Ακολουθεί ο υπολογισμός του όγκου του δείγματος σε mL. Στη συνέχεια, τοποθετούνται με πιπέτα 10μL αδιάλυτου δείγματος σε Makler counting chamber (**Εικόνα 4.1**) για μικροσκοπική παρατήρηση (*αρχικό δείγμα*) σε μικροσκόπιο αντίθετης φάσης με μεγέθυνση x10 στους προσοφθάλμιους φακούς και x25 στους αντικειμενικούς φακούς. Στο οπτικό πεδίο

εμφανίζεται ένα πλέγμα 100 τετραγώνων. Ο καθορισμός της συγκέντρωσης των σπερματοζωαρίων του δείγματος γίνεται με την απευθείας αναγωγή σε εκατομμύρια ανά mL του αριθμού των σπερματοζωαρίων που μετρήθηκαν σε μία σειρά 10 τετραγώνων οριζόντια ή κάθετα (**Εικόνα 4.2**). Η μέτρηση γίνεται υπολογίζοντας τις κεφαλές των σπερματοζωαρίων που βρίσκονται στη συγκεκριμένη περιοχή. Για μεγαλύτερη ακρίβεια στον καθορισμό της συγκέντρωσης γίνονται επαναληπτικές μετρήσεις και υπολογίζεται ο μέσος όρος των τιμών που προκύπτουν. Υπολογίζεται επίσης η κινητικότητα των σπερματοζωαρίων σε ποσοστά που εκφράζουν την προωθητική κίνηση (PRM), την επιτόπια κίνηση (NPM) και την ακινησία (IM). (Makler, 1980)



Εικόνα 4.2 Πλέγμα τετραγώνων Makler counting chamber στο οπτικό πεδίο του μικροσκοπίου

Σε δύο erpendorfs τοποθετούνται 0,2 και 0,5mL σπέρματος που θα χρησιμοποιηθούν σαν *control* και *sample* αντίστοιχα. Επάνω αναγράφεται ο αριθμός που έχει καθοριστεί για κάθε εξεταζόμενο και το γράμμα C ή G, για το ανεπεξέργαστο δείγμα και για το δείγμα στο οποίο θα τοποθετηθεί το διάλυμα με το glyphosate αντίστοιχα. Το δείγμα *control* δεν υφίσταται καμία επεξεργασία. Το δείγμα *sample* τοποθετείται σε falcon στη φυγόκεντρο με αντίβαρο για φυγοκέντρωση για 5 λεπτά στις 1800 στροφές. Μετά το πέρας αυτής, απομακρύνεται το

υπερκείμενο και τοποθετείται στο ίζημα sperm medium, κάνοντας ήπια ανάδευση με την πιπέτα. Κατόπιν, τοποθετούνται 70μL διαλύματος με glyphosate. Η ποσότητα του sperm medium που προστίθεται, υπολογίζεται ώστε ο τελικός όγκος στο erpendorf να είναι 0,5mL. Τα δύο δείγματα αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου για 90 λεπτά.

Κατά τρόπο ανάλογο με το αρχικό δείγμα, τοποθετούνται 10μL από τα δείγματα *control* και 10μL *sample* σε Makler counting chamber ξεχωριστά για τον καθορισμό της κινητικότητάς των σπερματοζωαρίων τους. Προηγείται ήπια ανάδευση, ώστε να υπάρχει κατά το δυνατό ομοιόμορφη κατανομή των σπερματοζωαρίων στο υγρό και η ποσότητα που αναρροφάται να είναι αντιπροσωπευτική του συνόλου ως προς τη συγκέντρωση και την κινητικότητα.

Για τη στατιστική ανάλυση και παρουσίαση των αποτελεσμάτων στην *Ενότητα 3* χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα IBM SPSS (paired t-test), Microsoft Excel 2013 και Microsoft Word 2013.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 ΔΗΜΟΓΡΑΦΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΕΞΕΤΑΖΟΜΕΝΩΝ

Ο συνολικός αριθμός των δειγμάτων που μελετήθηκαν στο πλαίσιο της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας και συμπεριλήφθηκαν στη στατιστική ανάλυση είναι 30. Στον *Πίνακα 3.1* παρουσιάζονται χαρακτηριστικά των εξεταζόμενων, τα οποία δίνουν κάποιες χρήσιμες πληροφορίες για την ποιότητα του σπέρματος των εξεταζόμενων.

Πίνακας 3.1 Δημογραφικά στοιχεία των ανδρών που έδωσαν δείγμα σπέρματος.

	N	Mean	Std Deviation
Ηλικία (έτη)	30	40,83	8,44
BMI (Βάρος/Υψος²)	21	28,28	4,59
Ημέρες αποχής	13	3,08	1,12
Κάπνισμα	26	ΝΑΙ 46,16% ΌΧΙ 53,84%	
Αλκοόλ	25	ΝΑΙ 20% ΌΧΙ 80%	

3.2 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΡΧΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Τα δείγματα εξετάστηκαν μετά τη ρευστοποίηση του σπέρματος, 20-30 λεπτά από την ώρα παραγωγής, ως προς τα βασικά χαρακτηριστικά τους, τα οποία δίνονται στον *Πίνακα*

3.2. Η κινητικότητα χωρίζεται σε τρεις κατηγορίες: την προωθητική κίνηση (PRM), την επιτόπια κίνηση (NPM) και την ακινησία (IM), όπως περιγράφεται στην *Ενότητα 1.3.4*.

Πίνακας 3.2 Χαρακτηριστικά των αρχικών δειγμάτων σπέρματος μετά τη ρευστοποίησή τους.

	N	Mean	Std Deviation
Συγκέντρωση Σπερματοζωαρίων (x10⁶/mL)	29	56,83	44,35
Όγκος (mL)	29	3,28	1,4
PRM (%)	30	56	15,66
NPM (%)	30	10,83	5,94
IM (%)	30	33,17	16,48

3.3 ΚΙΝΗΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΧΩΡΙΣ Ή ΜΕ ΤΗΝ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ GLYPHOSATE

Τα δείγματα *control* εξετάστηκαν ως προς την κινητικότητά τους 90 λεπτά μετά την αρχική εξέταση. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον *Πίνακα 3.3*, δοσμένα σε ποσοστά για την κάθε κατηγορία κινητικότητας.

Πίνακας 3.3 Κινητικότητα των δειγμάτων ελέγχου (*control*).

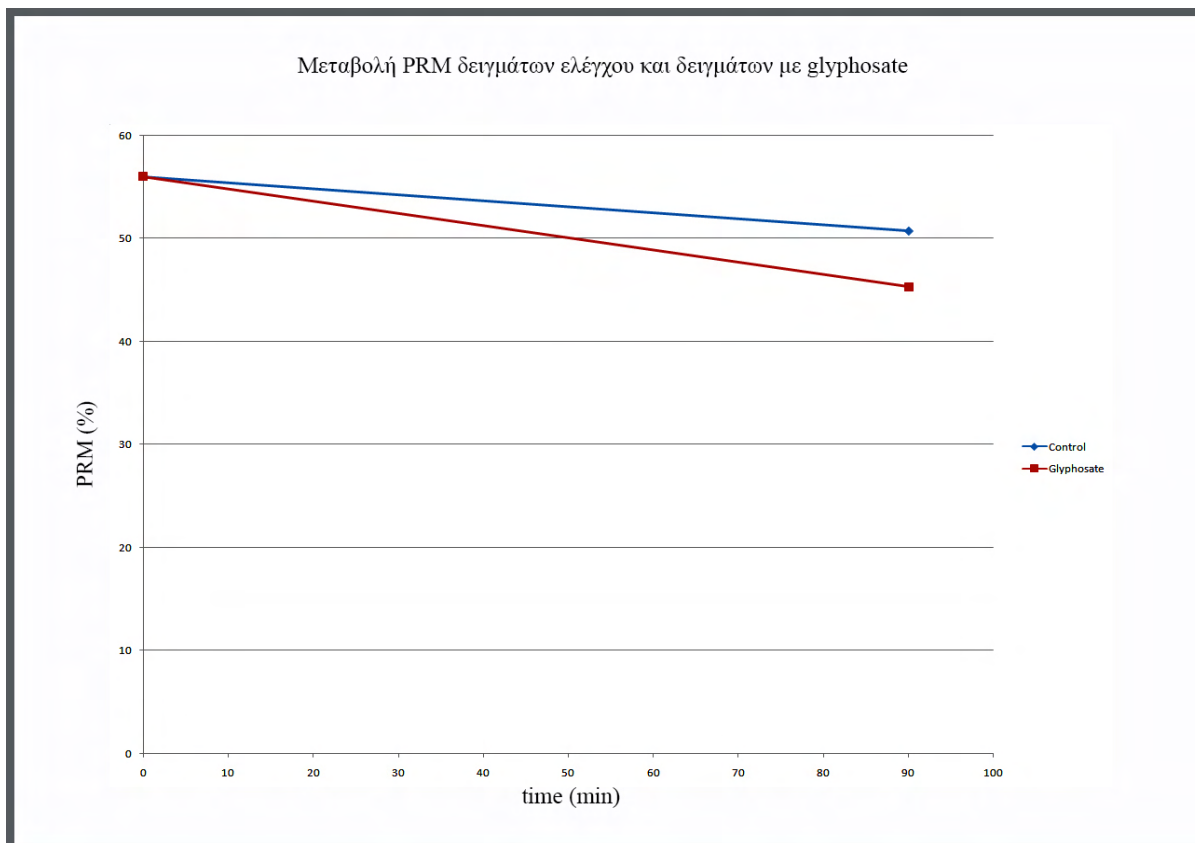
	N	Mean	Std Deviation
PRM (%)	30	50,73	15,2
NPM (%)	30	10,07	6,1
IM (%)	30	39,2	14,52

Στη συνέχεια εξετάστηκε η κινητικότητα στα δείγματα *sample*, 90 λεπτά από την αρχική τους εξέταση και τη στιγμή κατά την οποία προστέθηκε ο παράγοντας glyphosate, με την ίδια κατηγοριοποίηση της κινητικότητας που χρησιμοποιήθηκε και για τα δείγματα *control*. Ο **Πίνακας 3.4** περιλαμβάνει τα στοιχεία αυτά.

Πίνακας 3.4 Κινητικότητα των δειγμάτων μετά την επίδραση του glyphosate.

	N	Μέση Τιμή	Τυπική Απόκλιση (s_x)
PRM (%)	30	45,33	20,2
NPM (%)	30	8,5	5,64
IM (%)	30	46,17	20,56

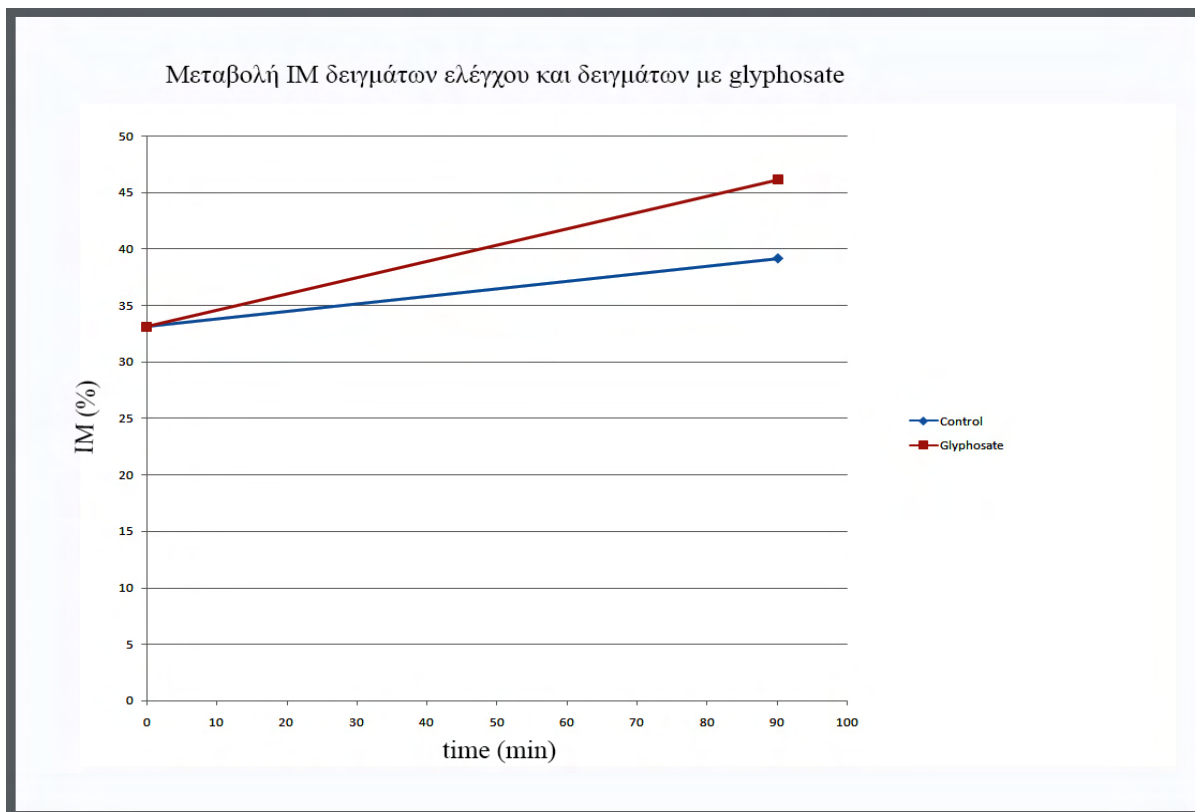
Στο **Διάγραμμα 3.1** παρουσιάζεται η μεταβολή της προωθητικής κίνησης για τα δείγματα χωρίς και με την επίδραση του glyphosate.



Διάγραμμα 3.1 Μεταβολή της προωθητικής κίνησης (PRM) στα δείγματα ελέγχου και στα δείγματα με glyphosate.

Από την εφαρμογή του t-test στο πρόγραμμα στατιστικής ανάλυσης SPSS για τις τιμές της προωθητικής κίνησης μεταξύ των δειγμάτων *control* και των δειγμάτων *sample* (με glyphosate) προέκυψε ότι οριακά το $P_{value} > 0,05$. Συνεπώς η διαφορά μεταξύ των δειγμάτων χωρίς και με την επίδραση του παράγοντα glyphosate ως προς την **κίνηση PR** είναι **ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ ΜΗ ΣΗΜΑΝΤΙΚΗ**.

Στο **Διάγραμμα 3.2** παρουσιάζεται η μεταβολή του ποσοστού των ακίνητων σπερματοζωαρίων για τα δείγματα χωρίς και με την επίδραση του glyphosate.



Διάγραμμα 3.2 Μεταβολή του ποσοστού των ακίνητων σπερματοζωαρίων στα δείγματα ελέγχου και στα δείγματα με glyphosate.

Από την εφαρμογή του t-test για τις τιμές των ακίνητων σπερματοζωαρίων μεταξύ των δειγμάτων *control* και των δειγμάτων *sample* (με glyphosate) προέκυψε ότι το $P_{value} < 0,05$. Η διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων δειγμάτων ως προς τα **ποσοστά ακινησίας (ΙΜ)** είναι **ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ ΣΗΜΑΝΤΙΚΗ**.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ένα σημαντικό ποσοστό των περιπτώσεων υπογόνιμων ζευγαριών οφείλεται σε παράγοντες που αφορούν στον άνδρα ή σε συνυπευθυνότητα γυναικείας και ανδρικής υπογονιμότητας. Σήμερα γνωρίζουμε ότι ο τρόπος ζωής και οι περιβαλλοντικοί παράγοντες επηρεάζουν τη γονιμότητα των ανδρών. (Sharpes, 2000) Σε αυτούς τους παράγοντες συμπεριλαμβάνονται και τα φυτοφάρμακα. Έχουν γίνει αρκετές μελέτες που εξετάζουν τις επιπτώσεις των φυτοφαρμάκων με βάση τον παράγοντα glyphosate, όπως είναι το Roundup, λόγω της ευρείας χρήσης τους σε αγροτικές και άλλες εργασίες, με συνέπεια την αυξανόμενη έκθεση των ανθρώπων σε αυτά. Η ανάγκη για διευκρίνιση της ασφάλειας ως προς τη χρήση των φυτοφαρμάκων οδήγησε σε σχεδιασμό πειραμάτων, κυρίως σε ζωικούς οργανισμούς. Τα αποτελέσματα είναι αμφιλεγόμενα λόγω της χρησιμοποίησης διαφορετικών συγκεντρώσεων του φυτοφαρμάκου από τους ερευνητές σε διαφορετικές μελέτες. Σε πολλές από αυτές γίνεται λόγος για αρνητικές επιπτώσεις στο αναπαραγωγικό σύστημα άρρενων ατόμων (Caussault-Meyer *et al*, 2014; Romano *et al*, 2014), αν και η τοξικότητα του glyphosate αμφισβητείται από πολλούς επιστήμονες, θεωρώντας ότι η έκθεση του ανθρώπου σε αυτό είναι πολύ μικρή (Williams *et al*, 2012).

Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας δείχνουν ότι η κινητικότητα των σπερματοζωαρίων μεταβάλλεται από την επίδραση του glyphosate. Η προωθητική κίνηση μειώνεται, αν και διαφορά, μετά από στατιστική ανάλυση, δεν είναι φαίνεται να είναι σημαντική. Τα ακίνητα σπερματοζωάρια είναι αυξημένα στα δείγματα, στα οποία προστέθηκε το glyphosate, και η αύξηση αυτή είναι στατιστικά σημαντική.

Ένας πιθανός τρόπος δράσης του glyphosate στα σπερματοζωάρια είναι μέσω των μιτοχονδρίων. Διαταραχές των λειτουργιών αυτών των οργανιδίων σχετίζονται με χαμηλή ποιότητα του σπέρματος, και κυρίως με μειωμένη κινητικότητα των σπερματοζωαρίων. (Amaral *et al*, 2013) Όπως έχει ήδη αναφερθεί στην *Ενότητα 1.2.2.7*, το glyphosate βρέθηκε να έχει πιθανή βλαπτική δράση στην ακεραιότητα της μιτοχονδριακής μεμβράνης και στη λειτουργικότητα του μιτοχονδρίου σε ψάρια (Harayashiki *et al*, 2013; Lopes *et al*, 2013) Κατά συνέπεια, αναμένεται και επίδραση στην κινητικότητα των σπερματοζωαρίων, κάτι που παρατήρησαν και οι ερευνητές στις προαναφερθείσες μελέτες. Παρόλα αυτά θα πρέπει ο

μηχανισμός δράσης του glyphosate να αποδειχθεί πειραματικά και να διασαφηνιστεί η μοριακή βάση του.

Επιπλέον, θα πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι η μελέτη των Dai *et al* (2016) που έγινε σε ποντίκια, υποστηρίζει ότι η χρήση του glyphosate έχει χαμηλότερη τοξικότητα σε σχέση με αυτή της εμπορικά διαθέσιμης μορφής Roundup. Το ίδιο συμπέρασμα προκύπτει και από την εργασία των Walsh *et al* του 2000, ως προς την επίδραση των Roundup και glyphosate στην έκφραση της πρωτεΐνης StAR, και κατ' επέκταση στη στεροειδογένεση MA-Leydig κυττάρων. Βασισμένοι στην εργασία αυτή, οι Levine *et al* (2007), χρησιμοποιώντας το εμπορικά διαθέσιμο Roundup και ένα σκεύασμα με την ίδια σύσταση εκτός του glyphosate, διαπίστωσαν παρόμοια μείωση των επιπέδων της προγεστερόνης, συμπεραίνοντας ότι ο επιφανειοδραστικός παράγοντας που περιέχεται στο Roundup παίζει σημαντικό ρόλο σε αυτή. Η οριακά μη σημαντική διαφορά της προωθητικής κίνησης ανάμεσα στα δείγματα χωρίς ή με την επίδραση του glyphosate που βρέθηκε μετά τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων του πειράματος υποστηρίζεται από την υπόθεση ότι η τοξικότητα του ενισχύεται από τους βοηθητικούς επιφανειοδραστικούς παράγοντες που προστίθενται στα σκευάσματα των φυτοφαρμάκων. Η υπόθεση αυτή χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

Λόγω του μικρού αριθμού δειγμάτων, δεν μπορεί να διατυπωθεί κάποιο ασφαλές συμπέρασμα. Η μελέτη επιπρόσθετων δειγμάτων θα έδινε μία πληρέστερη και σαφέστερη εικόνα της επίδρασης του glyphosate στην κινητικότητα των σπερματοζωαρίων.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Acceptable Daily Intakes for Agricultural and Veterinary Chemicals, 2016. *Australian Government, Department of Health, Office of Chemical Safety.*
2. Amaral, A., Lourenço, B., Marques, M., Ramalho-Santos, J., 2013. Mitochondria functionality and sperm quality. *Society of Reproduction and Fertility*, ISSN 1470-1626.
3. American Urological Association Education and Research, Inc., 2010. The Optimal Evaluation of the Infertile Male: AUA Best Practice Statement.
4. Casault-Meyer, E., Gress, S., Séralini, G.E., Galeraud-Denis, I., 2014. An acute exposure to glyphosate-based herbicide alters aromatase levels in testis and sperm nuclear quality. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 38, 131-140.
5. Dai, P., Hu, P., Tang, J., Li, T., Li, C., 2016. Effect of glyphosate on reproductive organs in male rat. *Acta Histochemica*, 118, 519-526.
6. Dallegrave, E., Mantese, F.D., Oliveira, R.T., Andrade, A.J.M., Dalsenter, P.R., Langeloh, A., 2007. Pre- and postnatal toxicity of the commercial glyphosate formulation in Wistar rats. *Reproductive Toxicology*, 81: 665-673.
7. ESHRE Monographs: Manual on Basic Semen Analysis pp.1–4, 2002.
8. Glyphosate Task Force, Glyphosate Facts

9. Guyton, K.Z., Loomis, D., Grosse, Y., El Ghissassi, F., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., Scoccianti, C., Mattock, H., Straif, K., 2015. Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate. *Lancet Oncology*, Vol.16, No 5, p. 490-491.
10. Harayashiki, C.A.Y., Varela Junior, A.S., Machado, A.A.S., Cabrera, L.C., Primel, E.G., Bianchini, A., Corcini, C.D., 2013. Toxic effects of the herbicide Roundup in the guppy *Poecilia vivipara* acclimated to fresh water. *Aquatic Toxicology*, 142-143, 176-184.
11. Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues Summary Report, 2016, Geneva.
12. Jungwirth, A., Diemer, T., Dohle, G.R., Giwercman, A., Copa, Z., Krausz, C., Tournaye, H., 2015. Guidelines on Male Infertility, European Association of Urology.
13. Levine, S.L., Han, Z., Liu, J., Farmer, D.R., Papadopoulos, V., 2007. Disrupting mitochondrial function with surfactants inhibits MA-10 Leydig cell steroidogenesis. *Cell Biology and Toxicology*, 23:385-400.
14. Lopes, F.M., Varela Junior, A.S., Corcini, C.D., DaSilva, A.C., Guazzelli, V.G., Tavares, G., DaRosa, C.E., 2014. Effect of glyphosate on the sperm quality of zebrafish *Danio rerio*. *Aquatic Toxicology*, 155, 322-326.
15. Makler, A., 1980. The improved ten-micrometer chamber for rapid sperm count and motility evaluation. *Fertility and Sterility*, Vol.33, No.3.
16. National Pesticide Information Center. Glyphosate technical fact sheet. Accessed March 12, 2014.
17. Pollegioni, L., Schonbrunn, E., Siehl, D., 2012. Molecular basis of glyphosate resistance: Different Approaches through protein engineering. *The FEBS Journal*, 278(16): 2753-2766.

18. Romano, M.A., Romano, R.M., Santos, L.D., Wisniewski, P., Campos, D.A., de Souza, P.B, Viau, P., Bernardi, M.M., Nunes, M.T., de Oliveira, C.A., 2012. Glyphosate impairs male offspring reproductive development by disrupting gonadotropin expression. *Reproductive Toxicology*, 86:663-673.
19. Sharpe, R.M., 2000. Lifestyle and environmental contribution to male infertility. *British Medical Bulletin*, 56, No 3, 630-642.
20. Trevor, C., Noonan, E., Eckardstein, S., Auger, J., Baker, G., Behre, H., Haugen, T., Cruger, T., Wang, C., Mbizvo, M., Volgesong, K., 2010. World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Human Reproduction Update*, Vol.16, No 3, pp. 231-245.
21. Walsh, L.P., McCormick, C., Martin, C., Stocco, D.M., 2000. Roundup Inhibits Steroidogenesis by Disrupting Steroidogenic Acute Regulatory (StAR) Protein Expression. *Environmental Health Perspectives*, Vol.108, No 8, p.769-776.
22. WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen (5th edition), 2010.
23. WHO manual for the investigation and diagnosis of the infertile couple, 1985.
24. Williams, A.L., Watson, R., DeSesso, J., 2012. Developmental and Reproductive Outcomes in Humans and Animals After Glyphosate Exposure: A Critical Analysis. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 15:1, 39-96.
25. Williams, G., Kroes, R., Munro, I., 2000. Safety Evaluation and Risk Assessment of the Herbicide Roundup and Its Active Ingredient, Glyphosate, for Humans. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 31, 117-165.

26. Wincze, J.P., 2015. Psychosocial aspects of ejaculatory dysfunction and male reproduction. *Fertility and Sterility*, Vol. 104, No 5, p.1089-1094
27. Yousef, M.I., Salem, M.H., Ibrahim, H.Z., Helmi, S., Seehy, M.A., Bertheussen, K., 1995. Toxic effects of carbofuran and glyphosate on semen characteristics in rabbits. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 30:4, 513-534.
28. Zegers-Hochschild, F., Adamson, G.D., Mouzon, J., Ishihara, O., Mansour, R., Nygren, K., Sullivan, E., Vanderpoel, S., 2009. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology. *Fertility and Sterility*, Vol.92, No5, pp. 1521-1524.
29. Ελευθεροχωρινός, Η.Γ., 1996. Ζιζανιολογία, Αθήνα, εκδ.ΑγρόΤυπος, σελ.408.
30. Ελληνική Ανδρολογική Εταιρεία, 2004. Ενδοκρινολογία Αναπαραγωγής στη γυναίκα και τον άνδρα, Θεσσαλονίκη, εκδ. Γράμμα.
31. Λόλας, Π., 2007. Ζιζανιολογία, Ζιζάνια-ζιζανιοκτόνα, Τύχη και συμπεριφορά στο περιβάλλον, Θεσσαλονίκη, εκδ. Σύγχρονη παιδεία.

EIKONEΣ

<http://www.micropticsl.com/products/disposables/motility-concentration/makler/>

<https://www.microscopeinternational.com/product/grid-10mm-in-100-squares-without-numbers-and-letters/>

<https://ivfmadesimple.files.wordpress.com/2012/06/maklergrid.gif>

