



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Η επίδραση των φυτοοιστρογόνων στις παραμέτρους του σπέρματος»

ΔΙΒΑΝΟΓΛΟΥ ΝΑΤΑΛΙΑ
ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΟΣ & ΓΕΝΕΤΙΣΤΡΙΑ
ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΟΣ-ΔΙΑΤΡΟΦΟΛΟΓΟΣ

ΛΑΡΙΣΑ

Σεπτέμβριος 2015

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ

ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ Ι. ΔΑΠΟΝΤΕ

ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπων: Γεώργιος-Σπυρίδων Ανυφαντής , Λέκτορας

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή : Γεώργιος-Σπυρίδων Ανυφαντής, Λέκτορας

Αλέξανδρος Δαπόντε, Αναπληρωτής Καθηγητής

Χριστίνα Μεσσήνη, Λέκτορας

Περιεχόμενα

Πρόλογος.....	4
Περίληψη.....	5
Abstract	6
1. Εισαγωγή.....	7
1.1 Η οικογένεια των φυτοοιστρογόνων	8
1.1.1 Απορρόφηση & μεταβολισμός των φυτοοιστρογόνων	10
1.1.2 Μηχανισμοί δράσης των φυτοοιστρογόνων	13
1.2 Ανδρική Υπογονιμότητα	16
1.2.1 Φυτοοιστρογόνα και ανδρικό αναπαραγωγικό σύστημα.....	18
2. Αντικείμενο μελέτης	26
3. Μεθοδολογία.....	28
3.1 Συλλογή δειγμάτων	31
3.2 Εκτίμηση δειγμάτων-σπερμοδιάγραμμα	29
3.3 Προετοιμασία φυτοοιστρογόνου	31
3.4 Προετοιμασία δειγμάτων.....	32
4. Αποτελέσματα.....	33
4.1 Ιστορικό δειγμάτων	34
4.2 Αποτελέσματα κινητικότητας.....	35
5. Συζήτηση.....	37
6. Βιβλιογραφία.....	40

Πρόλογος

Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια διπλωματικής εργασίας του μεταπτυχιακού προγράμματος "Βιολογία της Αναπαραγωγής" της Σχολής Επιστημών Υγείας του Τμήματος της Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Η συλλογή των δειγμάτων αλλά και η πραγματοποίηση της πειραματικής διαδικασίας έλαβαν χώρα στη Μονάδα Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής (Μ.Υ.Α) του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου της Θεσσαλίας.

Αρχικά, Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Ιωάννη Μεσσήνη, Καθηγητή, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε δίνοντας μου την ευκαιρία να παρακολουθήσω το συγκεκριμένο πρόγραμμα σπουδών. Επίσης, ένα μεγάλο ευχαριστώ στον κ. Αλέξανδρο Δαπόντε, Αναπληρωτή Καθηγητή, Διευθυντή της Μαιευτικής-Γυναικολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου της Θεσσαλίας, επικεφαλής του μεταπτυχιακού προγράμματος "Βιολογία της Αναπαραγωγής" και μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής της παρούσας εργασίας για την ευκαιρία που μου έδωσε να εκπονήσω την πειραματική αυτή μελέτη.

Ευχαριστώ θερμά την κα. Χριστίνα Μεσσήνη, Λέκτορα, μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής της παρούσας εργασίας για το ενδιαφέρον, την συμπαράσταση και την καθοδήγησή της τόσο καθ'όλη τη χρονιά του μεταπτυχιακού προγράμματος όσο και κατά την εκπόνηση της εργασίας.

Οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στον κ. Γεώργιο-Σπυρίδων Ανυφαντή, Λέκτορα, επιβλέπων και μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής της παρούσας εργασίας για την άριστη συνεργασία μας, για την εμπιστοσύνη και την εκτίμηση που έδειξε στο πρόσωπό μου και βέβαια για το αμέριστο ενδιαφέρον του να εντριφήσουμε τόσο εγώ όσο και οι συμφοιτητριάς μου στον τομέα της εξωσωματικής γονιμοποίησης.

Ευχαριστώ θερμά όλα τα μέλη της Μονάδας Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής (Μ.Υ.Α) καθώς και όλες τις συμφοιτητριάς μου για την άψογη συνεργασία μας και την άριστη συναδελφικότητά τους.

Τέλος, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στους γονείς μου και την οικογένεια μου που ενθαρρύνουν τα όνειρα μου και στηρίζουν έμπρακτα κάθε μου προσπάθεια.

Περίληψη

Τα φυτοοιστρογόνα εμφανίζουν ενδιαφέρον τόσο για τις πιθανές συνδέσεις που μπορεί να έχουν μεταξύ της διατροφής και της υγείας του ανθρώπου, όσο και για την κατανόηση που μπορούν να παρέχουν για τους κινδύνους από την πληθώρα των συνθετικών ουσιών του περιβάλλοντος που εμφανίζουν οιστρογονική δράση (1).

Οι επιστημονικές απόψεις για τα φυτοοιστρογόνα διχάζονται ανάμεσα στα ευεγερτικά αποτελέσματα τους στη μείωση του κινδύνου για οστεοπόρωση, καρδιακές παθήσεις, καρκίνο του μαστού, καθώς και στην αντιμετώπιση των συμπτωμάτων της εμμηνόπαυσης, και στις επιβλαβείς επιδράσεις τους ως ενδοκρινικοί διαταράκτες. Η πολυπλοκότητα των επιπτώσεων τους φαίνεται να συνδέεται με την εθνικότητα, την ηλικία, την κατάσταση της υγείας, το επίπεδο της κατανάλωσης, ακόμα και με την παρουσία ή απουσία συγκεκριμένων μικροοργανισμών που συντελούν τη μικροχλωρίδα του εντέρου (2).

Τα ενδογενή οιστρογόνα είναι ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη και λειτουργία του ανδρικού αναπαραγωγικού συστήματος. Οι δράσεις τους ποικίλουν στην ανδρική αναπαραγωγική οδό από οιστρογονομιμητικές σε μη οιστρογονομιμητικές. Η παρουσία τους διευκολύνει την ανάπτυξη και τη διατήρηση της ιδιαίτερα πολύπλοκης διαδικασίας της σπερματογένεσης στο πλαίσιο ενός προσεκτικά ρυθμισμένου φάσματος συγκέντρωσης. Ωστόσο, οποιαδήποτε αύξηση των κυκλοφορούντων οιστρογόνων στον οργανισμό προκαλεί πολλές επιβλαβείς επιδράσεις (4).

Η σχετική έλλειψη σχεδιασμένων μελετών *in vitro* για την επίδραση της έκθεσης του σπέρματος σε φυτοοιστρογόνα μας οδήγησε να σχεδιάσουμε αυτή τη μελέτη. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η καταγραφή των μεταβολών των παραμέτρων ποιότητας του σπέρματος (κινητικότητα) ύστερα από την εφαρμογή σε αυτά 0,1 μg/ml φυτοοιστρογόνου daidzein. Πιο αναλυτικά, συλλέξαμε συνολικά 10 δείγματα σπέρματος από υπογόνιμα ζευγάρια που είχαν καταφύγει στην Μονάδα Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής (Μ.Υ.Α) του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου της Θεσσαλίας. Σε κάθε δείγμα πραγματοποιήσαμε συνολικά 5 μετρήσεις κινητικότητας. Οι τρεις μετρήσεις αφορούσαν το δείγμα ελέγχου την ώρα 0h, 1h και 3h μετά την έναρξη της πειραματικής διαδικασίας, ενώ οι άλλες δύο μετρήσεις αφορούσαν τα δείγματα σπέρματος στα οποία εφαρμόστηκε το φυτοοιστρογόνο την ώρα 1h και 3h μετά την έναρξη της πειραματικής διαδικασίας.

Σε γενικές γραμμές καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι το φυτοοιστρογόνο, daidzein, στην συγκέντρωση των 0,1 μg/ml που εφαρμόστηκε διατήρησε την κινητικότητα των σπερματοζωαρίων σε αρχικά επίπεδα. Παρόλα αυτά, είναι σημαντικό να ειπωθεί ότι ο αριθμός των δειγμάτων μας ήταν μικρός επομένως καθίσταται σημαντική η εφαρμογή της πειραματικής διαδικασίας σε μεγαλύτερο δείγμα ώστε να διαπιστωθεί αν οι διαφορές αυτές μεταξύ των δειγμάτων ελέγχου και φυτοοιστρογόνου είναι στατιστικά σημαντικές έτσι ώστε να ισχυροποιηθεί και το συμπέρασμά μας.

Abstract

Phytoestrogens are of interest both for the potential links they may make between diet and human health, and for the insights they may provide for understanding the risks posed by the many synthetic substances in the environment that also influence oestrogen action (1).

Nowadays, phytoestrogens have a double-edged reputation, for being either beneficial in lowering risk of osteoporosis, heart disease, breast cancer, and menopausal symptoms, or harmful as endocrine disruptors. The complexity of their effects seems to be depend on different factors such as ethnicity, age, health status, level of consumption, and even the presence or absence of specific gut microflora (2).

Endogenous oestrogens play a crucial role in the development and function of male reproductive system using a variety of oestrogenic and non-oestrogenic mechanisms. Their presence facilitates the development and maintenance of the highly complex process of spermatogenesis within a carefully regulated concentration range. However, any increase in circulating oestrogen concentration to an oestrogenic insult with numerous deleterious effects (4).

The absent of scientific in vitro studies on the effects of exposure of sperm in phytoestrogens led us to design this study. The purpose of this study was to evaluate changes in the quality of sperm parameters (motility) before and after supplemented with 0,1µg/ml phytoestrogen called daidzein. To achieve this, a total of 10 human semen samples had been collected from infertile couples in the Assisted Reproduction Unit of University Hospital of Thessaly in Greece. Each sample has been measured five times about its mobility. The control sample has been measured at time 0h, 1h and 3h after the initiation of the experimental process, while the phytoestrogen sample has been measured at time 1h and 3h after the initiation of the experimental process.

Taken together, our data indicated that the phytoestrogen, daidzein, at a concentration of 0,1µg /ml maintained sperm motility at initial levels after a period of 3h. However, it is important to say that a limitation of this study is the small sample. Therefore, in order to strengthen our conclusion, it would be useful to repeat this study to a bigger sample for determining whether the differences between the control and phytoestrogen samples are significant.

1.Εισαγωγή

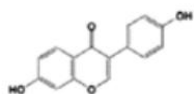
1.1 Η οικογένεια των φυτοοιστρογόνων

Τα φυτοοιστρογόνα αποτελούν μία μεγάλη οικογένεια, προερχομένων από τα φυτά, μη στεροειδών ουσιών, οι οποίες προσομοιάζουν δομικά και λειτουργικά τα ενδογενή φυσικά οιστρογόνα και τους ενεργούς μεταβολίτες τους. Ως εκ τούτου, έχουν σημαντική οιστρογονική (αγωνιστική / ανταγωνιστική) δραστηριότητα (5). Ανήκουν στη γενικότερη οικογένεια των δευτερογενών φυτοχημικών, ουσίες που διαθέτουν πολλές λειτουργίες στο δευτερογενή μεταβολισμό των φυτών όπως στην άμυνα, το χρώμα, τη μυρωδιά και τη ρύθμιση της ανάπτυξης τους (6).

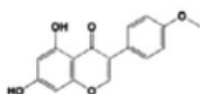
Οι κύριες ομάδες φυτοοιστρογόνων είναι οι ισοφλαβόνες (genistein, daidzein, equol, biochanin A, glycitein), οι λιγνάνες (enterolactone, enterodiol), οι κουμεστάνες (coumestrol), οι στυλβόνες (resveratrol) και τα φλαβονοειδή (quercetin, kaempferol) (5). Είναι πολυφαινόλες και υπάρχουν πάνω από 8000 φαινολικές δομές στο φυτικό βασίλειο που απαντώνται ως απλοί φαινολικοί δακτύλιοι ή ως πολυμερή (τανίνες) (7). Τα φλαβονοειδή χωρίζονται σε 6 υποκατηγορίες και πλην ορισμένων δεν έχουν οιστρογονικές ιδιότητες. Σημαντικές πηγές τους είναι τα σταφύλια, μήλα, εσπεριδοειδή, κρεμμύδι, μούρα, μπρόκολο, σόγια, τσάι, καφές, κακάο, κόκκινο κρασί. Οι στυλβόνες κατατάσσονται στα μη στεροειδή συνθετικά οιστρογόνα όπως η diethylstilbestrol (DES). Οι περισσότερες μελετημένες ισοφλαβόνες genistein και daidzein προέρχονται από τροφές σόγιας που κυρίως καταναλώνουν στην Ανατολή, ενώ οι λιγνάνες (λιναρόσπορος, σησάμι, σίκαλη και δημητριακά εν γένει, όσπρια, και λαχανικά), αποτελούν μεγάλο μέρος της διατροφής των Ευρωπαίων. Η ποσότητα τους στη φύση, εξαρτάται από την γενετική του φυτού και από παράγοντες του περιβάλλοντος (8) (9).

Τα φυτοοιστρογόνα ανήκουν επίσης σε μία μεγαλύτερη οικογένεια, αυτή των ξενοοιστρογόνων, που περιλαμβάνει τα συνθετικά οιστρογόνα (DES, 17α- ethinylestradiol), τα μυκητοοιστρογόνα (zearalenol, με αντιανδρογονική δράση παρόμοια με της futamide), το γάλα αγελάδας (οιστρόνη), πλήθος χημικών ουσιών όπως το εντομοκτόνο DDT, Bisphenol A, φθαλικά άλατα, και μετάλλων όπως το κάδμιο (7).

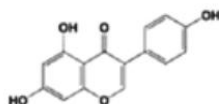
Isoflavones:



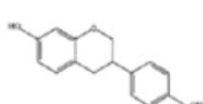
Daidzein



Biochanin A

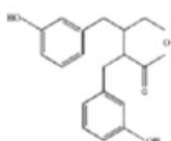


Genistein

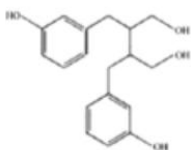


Equol

Lignans:

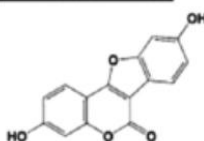


Enterolactone



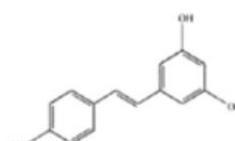
Enterodirol

Coumestans:



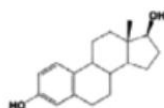
Coumestrol

Stilbenes:



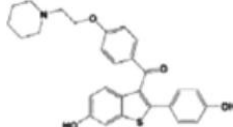
Resveratrol

Estrogens:

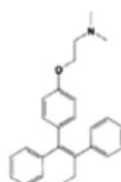


Estradiol

SERMs:



Raloxifene



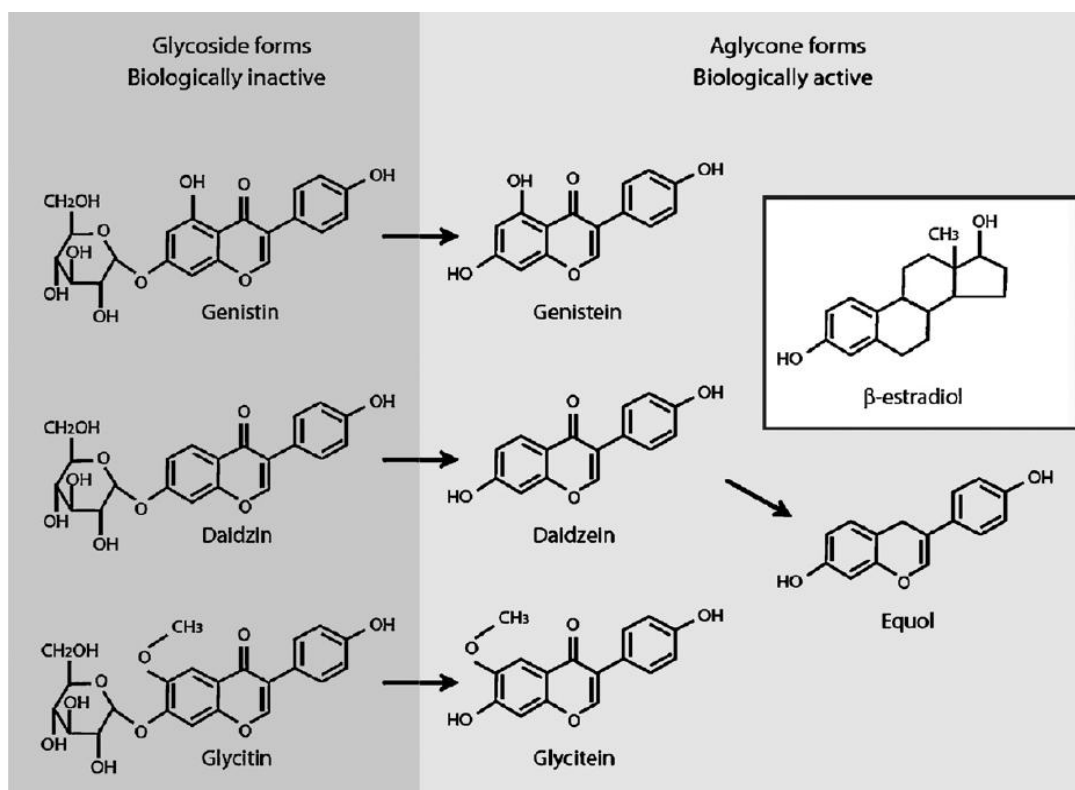
Tamoxifen

Εικόνα 1: Δομική σύγκριση των πιο γνωστών φυτοοιστρογόνων, εκλεκτικών τροποποιητών των οιστρογονικών υποδοχέων με την 17β-οιστραδιόλη (38)

1.1.1 Απορρόφηση & μεταβολισμός φυτοοιστρογόνων

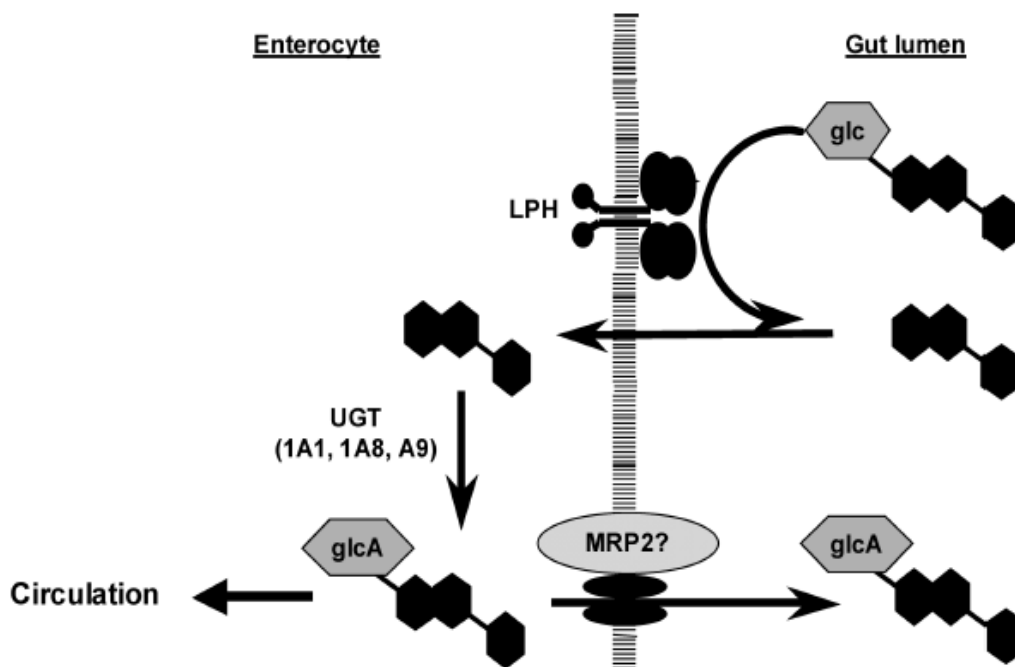
Οι ατομικές διαφορές στην βιοδιαθεσιμότητα των φυτοοιστρογόνων εξαρτάται από την εντερική χλωρίδα και την εντερική απορρόφηση του κάθε οργανισμού. Επίσης, φαίνεται να επηρεάζεται από του στόματος λήψη αντιβιοτικών, την κατάσταση υγείας και την ηλικία του ατόμου. Η ομάδα του Franke και των συνεργατών του (2014) έδειξε ότι η βιοδιαθεσιμότητα των ισοφλαβονών είναι υψηλότερη στα παιδιά σε σύγκριση με τους ενήλικες, υψηλότερη σε υγιή έναντι μη υγιή άτομα, ενώ είναι μειωμένη σε παιδιά έναντι ενηλίκων κατά τη διάρκεια αγωγής με από του στόματος αντιβιοτικά (10). Έχει βρεθεί, επιπλέον, διαφορά στο μεταβολισμό των φυτοοιστρογόνων ανάμεσα σε άνδρες και γυναίκες, με τις δεύτερες να τα μεταβολίζουν αποτελεσματικότερα (11).

Προσλαμβάνονται κυρίως από τη σόγια σαν ανενεργείς γλυκοσίδες (ή γλυκοζίτες) (daidzin, genistin), και μετατρέπονται στο έντερο σε δραστικές βιολογικά αγλυκονικές μορφές (daidzein, genistein), με την δράση των βακτηριακών β-γλυκοσιδασών (12).



Εικόνα 2: μεταβολισμός και ενεργοποίηση των γλυκοσιδίων (13).

Μόνο οι αγλυκονικές μορφές είναι βιολογικά ενεργές μορφές και μπορούν να απορροφηθούν από την ψυκτροειδή παρυφή του εντέρου (13). Η υδρολάση λακτάσης-φθοριζίνης (LPH, lactase phlorizin hydrolase) είναι μια γλυκοπρωτεΐνη της ψυκτροειδούς παρυφής του εντέρου που προκαλεί υδρόλυση πολυφαινολών Ο-γλυκοσιδών. Επίσης, ευθύνεται για τη δραστηριότητα τόσο της λακτάσης, δισακχαριδάσης της λακτόζης, όσο και της φλοριζίνης, υδρολάση που ευθύνεται για τη πέψη των β-γλυκοσιλκεραμιδασών (14).



Εικόνα 3: LPH, υδρολάση λακτάσης-φθοριζίνης GLC, η γλυκόζη UGT, UDPglucuronosyltransferase ΟΙΟΑ, γλυκουρονικό οξύ (14).

Μετά την απορρόφηση των μεταβολιτών από την ψυκτροειδή παρυφή του εντερικού σωλήνα περνούν στην κυκλοφορία και μεταφέρονται στο ήπαρ όπου επανασυνδέονται κυρίως σε γλυκουρονικό και λιγότερο σε θειικό οξύ (15). Η daidzein μπορεί να μεταβολισθεί περαιτέρω σε equol στο 30%-50% των ανθρώπων και σε o-demethylangolensin (O-DMA) στο 80%-90% του πληθυσμού και η genistein σε p-ethyl phenol (13).

Από το ήπαρ είτε απεκκρίνονται μέσω της χολής και επαναρροφώνται με την εντεροηπατική κυκλοφορία είτε απεκκρίνονται από τα ούρα. Τα βασικά φυτοοιστρογόνα που ανιχνεύονται στο αίμα και στα ούρα των θηλαστικών είναι daidzein, genistein, equol, O-DMA. Ο μεταβολισμός τους, βασικά εντερικός, και ηπατικός διαφέρει μεταξύ παιδιών, εφήβων και ενηλίκων, με αποτέλεσμα να υπάρχει δυσκολία στην ερμηνεία των διαφόρων μετρήσεων (14).

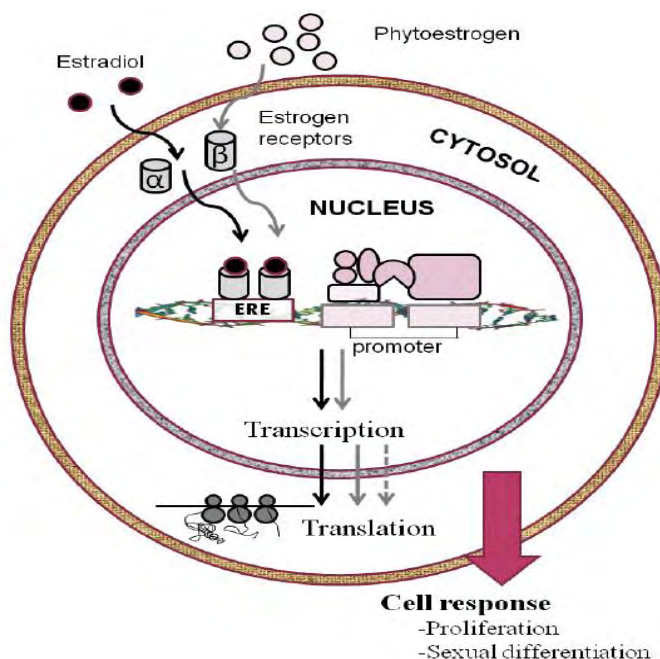
Αρκετές πρόσφατες μελέτες έχουν διερευνήσει τη πιθανή σχέση των γλυκοσιδών και αγλυκονικών μορφών των ισοφλαβονοειδών τόσο σε καθαρές ενώσεις όσο και σε τρόφιμα σόγιας ώστε να εκτιμηθεί η διαφορά τους στην απορρόφηση, κατανομή, μεταβολισμό και απέκκριση. Ορισμένες μελέτες αναφέρουν ότι τα αγλυκονικά ισοφλαβονοειδή (που περιέχονται σε προϊόντα σόγιας) απορροφήθηκαν πιο αποτελεσματικά από ότι οι γλυκοσίδες, ενώ άλλα δεδομένα δείχνουν ότι η προκύπτουσα βιοδιαθεσιμότητα της daidzein και της genistein ήταν μεγαλύτερη όταν οι ισοφλαβόνες σόγιας προσλαμβάνονταν ως γλυκοσίδες και όχι ως αγλυκόνες . Η διακριτή διαφορά σε αυτά τα αποτελέσματα μπορεί να εξηγηθεί από παράγοντες όπως η ηλικία, το φύλο, το είδος των τροφίμων σόγιας ή του παρασκευάσματος ισοφλαβονών που χρησιμοποιήθηκε ή ακόμα και στην κατάσταση της ύλης της πηγής (υγρή ή στερεή) (12).

1.1.2 Μηχανισμοί δράσης των φυτοοιστρογόνων

Ο φυσικός ρόλος των φυτοοιστρογόνων στα φυτά δεν είναι απόλυτα κατανοητός. Μια από τις δράσεις που φαίνεται να ασκούν είναι η αντιοξειδωτική τους δράση προστατεύοντάς τα φυτά από UV ακτινοβολία και μύκητες.

Τα φυτοοιστρογόνα μπορούν να συνδεθούν με τους οιστρογονικούς υποδοχείς α και β (Estrogen receptors, ERs) ERα και ERβ αντίστοιχα, με τον ίδιο τρόπο που συνδέονται και οι εκλεκτικοί τροποποιητές των υποδοχέων των οιστρογόνων (selective estrogen-receptor modulator, SERMs) προκαλώντας εκλεκτική (τόσο ιστοειδική όσο και κυτταροειδική) τροποποιητική ρύθμιση στην τελική γονιδιακή έκφραση, δρώντας σε μεταγραφικούς παράγοντες. Γι' αυτό και αναφέρονται και ως οι φυσικοί SERMs. Επιπλέον, τα οιστρογόνα φαίνεται ότι επάγουν και ταχεία μη γενωμική απόκριση μέσω μεμβρανικών υποδοχέων συζευγμένων με G πρωτεΐνες, τις GPR30 / GPER (16) (17). Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι η κυτταρική σηματοδότηση που επάγεται από οιστρογόνα/ξενοοιστρογόνα είναι αποτέλεσμα συνδυασμού και των δυο προαναφερθέντων οδών (18).

Όσον αφορά τη χημική τους συγγένεια με τους υποδοχείς ERα και ERβ μπορεί να είναι δοσοεξαρτώμενη αλλά είναι μικρότερη από εκείνη των οιστρογόνων. Έτσι, σε γενική ομολογία είναι ασθενή οιστρογόνα αλλά η συγγένεια ορισμένων από αυτών και η ενεργοποίηση του ERβ είναι 100 φορές ισχυρότερη από του ERα. Θεωρείται συνεπώς ότι έχουν ευεργετική επίδραση σε ιστούς με ισχυρή παρουσία του ERβ όπως ωοθήκη, προστάτης, πνεύμονας, κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ), ουροδόχος κύστη, γαστρεντερικό.



Εικόνα 4: ενδοκυτταρικός οιστρογονικός-φυτοοιστρογονικός σηματοδοτικός καταρράκτης διαμέσου των ER (39).

Κάθε φυτοοιστρογόνο παρουσιάζει διαφορετική οιστρογονική ισχύ. Για παράδειγμα, στην ομάδα των φλαβονοειδών, η genistein είναι ισχυρότερη από τη biochanin A, η οποία είναι ισχυρότερη από τη daidzein. Ο Kuiper και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι η ένταση της διέγερσης της μεταγραφικής δραστηριότητας από τον υποδοχέα ποικίλει και εξαρτάται από την οιστρογονική ισχύ του φυτοοιστρογόνου που είναι συνδεδεμένο (19). Όπως προαναφέρθηκε, τα φυτοοιστρογόνα καθώς και τα συνθετικά οιστρογόνα παρουσιάζουν διαφορετικό βαθμό συγγένειας για καθεμία από τις δυο ισομορφές του οιστρογονικού υποδοχέα. Γενικά, φαίνεται ότι τα φυτοοιστρογόνα συνδέονται, κατά προτίμηση, με τους ERβ παρά με τους ERα. Τα φυτοοιστρογόνα έχουν περιορισμένη τροποποιητική ικανότητα των υποδοχέων των οιστρογόνων. Μελέτες έχουν δείξει ότι οι ισοφλαβόνες έχουν αγωνιστική και ανταγωνιστική δράση αλλά είναι ισχυροί ERβ και ήπιοι ERα αγωνιστές (11).

Η δομική δομή των ισοφλαβονών με το φαινολικό δακτύλιο είναι παρόμοια με της 17β-οιστραδιόλης. Η ομοιότητα αυτή επιτρέπει στις ισοφλαβόνες να συνδέονται στον οιστρογονικό υποδοχέα, υποκαθιστώντας, ουσιαστικά, τη 17β-οιστραδιόλη. Η δράση τους αυτή μπορεί να ερμηνεύσει τον τρόπο με τον οποίο τα φυτοοιστρογόνα δρουν προστατευτικά έναντι του καρκίνου του μαστού, αφού οι ERβ εμποδίζουν την ανάπτυξη του κυττάρων του μαστού, ενώ οι ERα την προωθούν (20). Ωστόσο, δεν είναι γνωστό εάν οι ισοφλαβόνες συνδέονται στον οιστρογονικό υποδοχέα συναγωνιστικά στην κύρια θέση σύνδεσης των οιστρογόνων, ή εάν έχουν διαφορετική θέση σύνδεσης. Εξάλλου, έχει βρεθεί ότι η genistein συνδέεται στην ενεργή θέση σύνδεσης των οιστρογόνων στο ERβ (11).

Τα φυτοοιστρογόνα μπορούν, ακόμη, να προάγουν τη διαφοροποίηση και να αναστείλουν την αγγειογένεση, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (μέσω αναστολής των MAPK, Mitogen-activated Protein Kinase), τη δράση της κινάσης της τυροσίνης και της τοποϊσομεράσης και επάγουν την αποδέσμευση ορμονών από τις SHBG (sex hormone-binding globulin). Με αυτόν τον τρόπο, εμποδίζουν την αύξηση των όγκων. Μελέτες με αντικείμενο τα φυτοοιστρογόνα έχουν δείξει ότι η επιστράτευση συρρυθμιστικών μορίων έχει, ενδεχομένως, σημαντικό ρόλο στον καθορισμό της λειτουργίας τους. Συγκεκριμένα, οι ισοφλαβόνες φαίνεται ότι ενεργοποιούν επιλεκτικά μεταγραφικές οδούς, που ξεκινούν από τον ERβ, και ιδιαίτερα, τη μεταγραφική καταστολή. Η συγγένεια που παρουσιάζουν οι ισοφλαβόνες για τον ERβ έχει ως αποτέλεσμα τη μεταβολή της δομής του υποδοχέα, ο οποίος με τον τρόπο αυτό εκδηλώνει μεγαλύτερη χημική συγγένεια για συγκεκριμένους συρρυθμιστές, από ό,τι ο ERα (20).

Τα φυτοοιστρογόνα έχουν, επίσης, διττή δράση σε σηματοδοτικές οδούς με αφετηρία τους οιστρογονικούς υποδοχείς. Για παράδειγμα, η πρωτεϊνική κινάση B (protein kinase B, PKB), της οποίας η φωσφορυλίωση ακολουθεί φυσιολογικά την ενεργοποίηση του ERα, ρυθμίζεται προς τα πάνω από τη genistein και τη daidzein σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού θετικές για την έκφραση οιστρογονικών υποδοχέων, ενώ η resveratrol έχει αναστέλλει τη φωσφορυλίωση της PKB (21). Αντίθετα, σε κυτταρικές σειρές αρνητικές για την έκφραση οιστρογονικών υποδοχέων, η resveratrol και η daidzein

ενεργοποιούν την PKB, ενώ η genistein αναστέλλει τη φωσφορυλίωσή της. Η έρευνα για την επίδραση των φυτοοιστρογόνων στους ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου και στους παράγοντες της μεταγραφής συμβάλλει στη δημιουργία συνθετικών ουσιών, που αναστέλλουν τις οδούς και τους παράγοντες που ρυθμίζονται προς τα πάνω από τους οιστρογονικούς υποδοχείς (11).

Αναστέλλουν επίσης σημαντικά τον μεταβολισμό των στεροειδών ένζυμα, όπως της 17β-HSDs, 3β-HSD1, αρωματάσης, σουλφατάσης, και σουλφοτρανσφεράσης, που μετατρέπουν ασθενή οιστρογόνα και ανδρογόνα, σε ισχυρά οιστρογόνα με μιτωγόνο δράση. Τα ανωτέρω προκύπτουν τόσο από *in vitro* κυτταρικά συστήματα, όσο και από *in vivo* μοντέλα υποφυσεκτομηθέντων, ωοθηκεκτομηθέντων, (ανάλογα με τον καταληκτικό στόχο) πειραματόζωων. Τα ισοφλαβονοειδή και οι λιγνάνες, για παράδειγμα, αναστέλλουν τη δράση της 5α-αναγωγάσης, μειώνοντας έτσι την μετατροπή της τεστοστερόνης στη δραστική διυδροτεστοστερόνη (Dihydrotestosterone, DHT) (22).

Όπως και τα οιστρογόνα ασκούν ανεξάρτητη των οιστρογόνων δράση έτσι και η genistein μπορεί να αλλάξει την έκφραση των υποδοχέων της προγεστερόνης, ανδρογόνων, και οξυτοκίνης με άγνωστη κλινική σημασία. Ασκούν ανεπιθύμητες επιδράσεις στο αναπαραγωγικό σύστημα, γυναικείο και ανδρικό. Οι πρώτες παρατηρήσεις έγιναν σε πρόβατα που εμφάνισαν υπογονιμότητα τρώγοντας *subterranean clover* (Bennetts et al., 1946). Επίσης χρόνια έκθεση σπερματοζωαρίων σε υψηλές δόσεις genistein προκάλεσε υπογονιμότητα, μέσω αναστολής της ακροσωμικής αντίδρασης και επηρεασμού της κινητικότητας τους.

Πίνακας 1: οιστρογονική ενεργότητα των φυτοοιστρογόνων (2)

Item Name	Summary of estrogenic activity
Coumestrol	Binds ER α (IC ₅₀ = 11 nM) and ER β (IC ₅₀ = 2 nM)
Daidzein	Binds both ERs with similar affinity (IC ₅₀ s = 4 μ M)
Daidzin	Anti-oxidant, anti-carcinogenic & anti-atherosclerotic activities
Emodin	Binds ER α (K _i = 0.77 μ M) and ER β (K _i = 1.5 μ M)
(\pm)-Enterolactone	Reduces risk of acute coronary events & hormone-dependent cancers
(\pm)-Equol	Binds ER α (EC ₅₀ = 200 nM) and ER β (EC ₅₀ = 74 nM)
(S)-Equol	Binds ER β (K _i = 0.73 nM) with lower affinity for ER α (K _i = 6.41 nM)
(R)-Equol EXCLUSIVE	Higher agonist activity at ER α (EC ₅₀ = 66 nM) than ER β (EC ₅₀ = 330 nM)
Genistein	Binds with greater affinity to ER β (IC ₅₀ = 0.2 μ M) than ER α
Genistin	Promotes proliferation of osteoblasts; suppresses bone turnover
Glycitein	Weak binding of ERs (IC ₅₀ s = 3.9 μ M)
Glycitin	Promotes proliferation of osteoblasts; suppresses bone turnover
Matairesinol	Reduces incidence of breast cancer
Puerarin	Antithrombotic, anti-allergic, and other salutary effects
Quercetin	Selectively binds ER β over ER α

1.2 Ανδρική υπογονιμότητα

Η ανδρική υπογονιμότητα αντιπροσωπεύει περίπου το 50% των αιτιών της υπογονιμότητας και μπορεί να αποδοθεί σε ποικίλες αιτίες όπως γενετικές και συγγενείς ανωμαλίες, μόλυνση, πολυσυστηματικές ασθένειες, κίρσοκήλη (3). Εκδηλώνεται με τη μορφή της αζωοσπερμίας, ασπερμίας, ολιγοσπερμίας και τερατοσπερμίας.

Μελέτες έχουν δείξει ότι διαφορές που έγκεινται στη διατροφή, στο αλκοόλ, στο τσιγάρο, στη κατάχρηση φαρμάκων, στην άσκηση καθώς και το γενετικό υπόβαθρο συνεισφέρουν σημαντικά στη διαμόρφωση των παραμέτρων του σπέρματος (23). Η εκτίμηση των παραμέτρων του σπέρματος έχει δραματικά αλλάξει τις τελευταίες δυο δεκαετίες. Τα ποσοστά των φυσιολογικών παραμέτρων που χρησιμοποιούνται ως κριτήρια για τον χαρακτηρισμό ενός φυσιολογικού σπέρματος σενεχώς τροποποιούνται. Αυτό το φαινόμενο εξηγείται ως εξής:

1. Κάθε σπερματέγχυση περιέχει υψηλά ποσοστά μη φυσιολογικών σπερματοζωαρίων
2. Παρατηρείται μεγάλο εύρος ανωμαλιών ακόμα και σε φυσιολογικά σπέρματα.
3. Το ποσοστό των σπερματοζωαρίων που εμφανίζουν ανωμαλίες στο κεφάλι, στον αυχένα και την ουρά είναι υψηλό
4. Είναι δύσκολο κλινικά να αξιολογηθεί η σχέση της μορφολογίας του σπέρματος και της γονιμοποιητικής ικανότητας του δείγματος τόσο *in vivo* (συνουσία ή ενδομήτρια σπερματέγχυση) όσο και *in vitro* (IVF και ICSI) (24).

Παρακολουθώντας τα χαμηλότερα φυσιολογικά όρια των παραμέτρων του σπέρματος όπως αυτά παρουσιάζονται από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (World Health Organization, WHO) από το 1980 μέχρι και σήμερα μπορούμε να διαπιστώσουμε την όλο και μεγαλύτερη μείωση των φυσιολογικών ορίων. Πιο συγκεκριμένα, η χαμηλότερη φυσιολογική συγκέντρωση σπερματοζωαρίων άλλαξε από 20.000.000/ml σε 15.000.000/ml, η προοδευτική κινητικότητα (κίνηση α και β) από 50% σε 32% και το ποσοστό των φυσιολογικών μορφών σπερματοζωαρίων από 14% σε 4% (25).

Η αζωοσπερμία μπορεί να χαρακτηριστεί ως αποφρακτικού τύπου (εκ γενετής έλλειψη του σπερματικού πόρου, πορογενής απόφραξη ή εκτομή σπερματικού πόρου) ή μη αποφρακτικού τύπου (πρωτογενή ανεπάρκεια των όρχεων). Γενετικά αίτια που συνδέονται με αζωοσπερμία περιλαμβάνουν το σύνδρομο Klinefelter (47, XXY), μικροελλείψεις και μεταλλάξεις του χρωμοσώματος Y. Η ολιγοσπερμία μπορεί να προκύψει από ορμονικά προβλήματα, παλίνδρομη εκσπερμάτιση ή κίρσοκήλη. Επιπλέον, η έκθεση σε παράγοντες όπως κοκαΐνη, αναβολικά στεροειδή, αλκοόλη και καπνό μπορεί να εκδηλώσει ολιγοσπερμία με αποτέλεσμα την εξασθένηση της γονιμότητας. Άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν την ανδρική γονιμότητα είναι η στυτική δυσλειτουργία, οι λοιμώξεις του ουρογεννητικού συστήματος, και οι ελλείψεις ιχνοστοιχείων (ψευδάργυρος, σελήνιο και φυλλικό οξύ) που είναι αναγκαία για τη σπερματογένεση (3).

Η παγκόσμιας κλίμακας μείωση στην ποιότητα του σπέρματος φαίνεται να σχετίζεται με αυξημένη έκθεση σε περιβαλλοντικές χημικές ουσίες που δρουν ως ενδοκρινικοί διαταράκτες, ως αποτέλεσμα της αυξημένης χρήσης φυτοφαρμάκων, πλαστικών, και άλλων ανθρωπογενών υλικών. Πληθώρα επιστημονικών δεδομένων έχουν δείξει ότι η έκθεση σε ορισμένους ενδοκρινικούς διαταράκτες συνδέεται με αναπαραγωγικές διαταραχές όπως ανωμαλίες του ανδρικού αναπαραγωγικού συστήματος (κρυπορχία, υποσπαδίας), μειωμένη ποιότητα σπέρματος, και εξασθένιση της γονιμότητας στους ενήλικες (3).

1.2.1 Φυτοοιστρογόνα και ανδρικό αναπαραγωγικό σύστημα

Η σπερματογένεση και στερεοειδογένεση ρυθμίζονται από τον άξονα υποθάλαμο-υπόφυση-όρχεις υπό τον έλεγχο της υποθαλαμικής GnRH (gonadotropin releasing hormone) και των δυο γοναδοτροπινών, ωχρινोटρόπου ορμόνης (luteinizing hormone ,LH) και ωοθυλακιотρόπου ορμόνης (follicle-stimulating hormone,FSH), της τεστοστερόνης και των διαφόρων τοπικών παραγόντων συμπεριλαμβανομένων των οιστρογόνων. Πιο συγκεκριμένα, είναι ήδη γνωστό ότι η οιστραδιόλη (E2) ρυθμίζει τα στάδια της σπερματογένεσης συμπεριλαμβανομένων του πολλαπλασιασμού των γονοκυττάρων και σπερματογονίων, της μείωσης ,της λειτουργίας των κυττάρων Sertoli, της σπερμιογένεσης, της μεταφοράς του σπέρματος καθώς και της επιδιδυμικής ωρίμανσης του σπέρματος (26).

Η ενδοκρινική διαταραχή της σπερματογένεσης περιλαμβάνει τέσσερις μηχανισμούς α) επιγενετικές μεταβολές στο γονιδίωμα, β) την απόπτωση των γεννητικών κυττάρων, γ) απορύθμιση της ανδρογονικής σηματοδότησης, και δ) διαταραχή των κυττάρων Sertoli αλλά και άλλων υποστηρικτικών κυττάρων. Η οιστρογονική ενδοκρινική διαταραχή της σπερματογένεσης είναι από τις πιο καλά χαρακτηρισμένες. Οι οιστρογονικοί υποδοχείς α και β βρίσκονται σε πληθώρα στο ανδρικό αναπαραγωγικό σύστημα και αντιπροσωπεύουν ένα μεταγραφικό μηχανισμό με τον οποίο οι ενδοκρινικοί διαταράκτες μπορούν να μεταβάλουν τη γονιδιακή έκφραση (3).

Όπως ήδη προαναφέραμε, ο ρόλος των οιστρογόνων στη διαδικασία της σπερματογένεσης είναι καθοριστικός, γεγονός που εξηγεί τις επιβλαβείς επιπτώσεις από τη υπερβολική έκθεση οιστρογόνων στο ανδρικό αναπαραγωγικό σύστημα ιδιώς κατά τη σεξουαλική διαφοροποίηση στην αρχή της ζωής του εμβρύου. Επίσης, έχει γίνει εμφανές στην επιστημονική κοινότητα ότι τοξικές περιβαλλοντικές ουσίες με οιστρογονομιμητική δράση φαίνεται ότι διαταράσσουν την ανδρική γονιμότητα (18).

Υπάρχουν αρκετές μελέτες μέτρησης της επίδρασης των φυτοοιστρογόνων στις παραμέτρους της αναπαραγωγικής ικανότητας (3). Ο πίνακας 2 αναφέρει συγκεντρωτικά τις μελέτες αξιολόγησης της έκθεσης σε ισοφλαβονοειδή κατά την κυοφορία και μετά τη γέννηση στην ανδρική γονιμότητα μέχρι το 2010 όπως αυτές αναφέρονται στο άρθρο ανασκόπησης του Cederroth και των συναργατών του (27).

Πίνακας 2: Μελέτες αξιολόγησης της έκθεσης σε ισοφλαβονοειδή κατά την κυοφορία και κατά τη γέννηση στην ανδρική γονιμότητα.

Ethnic group	Diet	Isoflavone intake (mg/day)	Duration of exposure	No. subjects	Plasma isoflavone levels (μM)	Urine isoflavone levels (ng/ μmol creatinine)	Sperm production	Sperm motility	Seminal volume	Blood hormone levels	Reference
Caucasian	Tofu	70	4 weeks	21 (21)	ND	G: 201 D: 401	ND	ND	ND	T: No effect	Habito <i>et al.</i> , (2000)
Caucasian	Soy extract	40	2 months	15	G: 1 D: 0.5	ND	No effect	No effect	No effect	T, LH, FSH: No effect	Mitchell <i>et al.</i> , (2001)
Caucasian	Soy food	<22.3	Less and more than 2 months	100	ND	ND	Decreased	No effect	No effect	ND	Chavarro <i>et al.</i> , (2008)
Japanese	Soy milk	76.8	8 weeks	17 (17)	ND	ND	ND	ND	ND	T: No effect	Nagata <i>et al.</i> , (2001)
Japanese	Soy product	30	Life long	69	ND	ND	ND	ND	ND	T: Decreased	Nagata <i>et al.</i> , (2000)

For control groups, the number of individuals (n) is shown in parentheses.
ND, not determined; G, genistein; D, daidzein; T, testosterone.

Σε μια από αυτές, ο Mitchell και οι συνεργάτες του (2001) χορήγησαν συμπληρώματα φυτοοιστρογόνων σε μια ομάδα νεαρών υγιών ανδρών και μελέτησαν τόσο την ποιότητα του σπέρματος όσο και την ενδοκρινή λειτουργία τους. Η ομάδα των ανδρών έλαβε συμπληρώματα 500 mg όπου περιείχαν 40 mg ισοφλαβονών genistein, daidzein, και glycitein καθημερινά για 2 μήνες. Κάθε άνδρας δώρισε σπέρμα 2 μήνες πριν την έναρξη του συμπληρώματος και 4 μήνες μετά τη διακοπή αυτού. Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής έδειξαν ότι το μέγεθος των όρχεων δεν επηρεάστηκε από τη χορήγηση συμπληρώματος αλλά ούτε και οι τιμές της οιστραδιόλης, τεστοστερόνης, FSH και LH. Επίσης, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η χορήγηση συμπληρωμάτων φυτοοιστρογόνων δεν προκαλεί αλλαγές στον όγκο και στη συγκέντρωση του σπέρματος αλλά και στον αριθμό και την κινητικότητα των σπερματοζωαρίων (28).

Αντίθετα, η συγχρονική ανάλυση (cross sectional analysis) των Chavarro και των συνεργατών του (2008) μελετά το πώς επηρεάζει η διατροφική πρόσληψη σόγιας και ισοφλαβονοειδών την ποιότητα του σπέρματος σε μια ομάδα 99 ανδρών (υπογόνιμων ζευγαριών) ύστερα από τη χορήγηση 3 μηνών. Κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η υψηλή πρόσληψη σόγιας και ισοφλαβονοειδών συνδέεται με χαμηλότερη συγκέντρωση σπέρματος. Ενώ, δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική αλλαγή ούτε στην κινητικότητα και τη μορφολογία των σπερματοζωαρίων ούτε στον όγκο του σπέρματος. Στην μελέτη αυτή είναι σημαντικό να ειπωθεί ότι τόσο το σύνολο των ισοφλαβονοειδών όσο και των ειδικών daidzein, genistein και glycitein δεν μετρήθηκαν στον ορό αίματος, αλλά αντί αυτού υπολογίστηκε η συνεισφορά τους στις διατροφικές συνήθειες της ομάδας με τη βοήθεια ερωτηματολογίου (29).

Δύο άλλες μελέτες διερεύνησαν τις επιδράσεις της διατροφικής παρέμβασης με σόγια στο ανδρικό αναπαραγωγικό σύστημα. Η πρώτη αποτελεί μια διασταυρούμενη μελέτη (crossover study) κατά την οποία 42 άνδρες κατανάλωσαν 150g άπαχο κρέας ή 290g τόφου (αντιστοιχεί σε 70mg ισοφλαβονοειδών) καθημερινά για 4 βδομάδες. Η πρόσληψη σόγιας δεν επηρέασε τα επίπεδα της οιστραδιόλης, τεστοστερόνης και διϋδροτεστοστερόνης, αν και τα επίπεδα της SHBG ήταν 9% υψηλότερα (30). Παρομοίως, η δεύτερη μελέτη του Nagata και των συνεργατών του (2001) χρησιμοποίησε μια ομάδα 35 ανδρών που κατανάλωναν για 8 εβδομάδες 400ml γάλα σόγιας (αντιστοιχεί σε 48mg ισοφλαβονοειδών) αλλά δεν εντόπισαν καμία αλλαγή στα επίπεδα των ανωτέρω δεικτών (31). Αντίθετα, μελέτη της ίδιας ομάδας (2000) ανέφερε οριακή αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ της πρόσληψης προϊόντων σόγιας με την συγκέντρωση των ανδρογόνων και οιστρογόνων στο ορό των ανδρών. Στη μελέτη αυτή 69 Ιάπωνες κατανάλωναν καθημερινά κατά μέσο όρο 22mg ισοφλαβονοειδών (32).

Μια άλλη ομάδα, του Casini και των συνεργατών του (2006), αναφέρουν μια περίπτωση ενός υπογόνιμου ζευγαριού όπου κατάφεραν να συλλάβουν ύστερα από την εξάμηνη χορήγηση συμπληρώματος φυτοοιστρογόνων στον άνδρα. Πιο συγκεκριμένα, ο ολιγοσπερμικός άντρας λάμβανε συμπλήρωμα φυτοοιστρογόνων 80 mg ημερησιώς για διάστημα 6 μηνών. Μετά το πέρας του διαστήματος αυτού, οι παράμετροι του σπέρματος είχαν βελτιωθεί επαρκώς με αποτέλεσμα τη σύλληψη της γυναίκας του ύστερα από την πραγματοποίηση ενδομήτριας σπερματέγχυσης (33).

Πολυάριθμες μελέτες έχουν διεξαχθεί και στα ζώα διερευνώντας τις επιδράσεις των φυτοοιστρογόνων στην αναπαραγωγική τους λειτουργία. Παρακάτω δίνονται οι συγκενρωτικοί πίνακες 3,4 και 5 με όλες τις μελέτες πάνω στα ζώα που αφορούν τις επιδράσεις των φυτοοιστρογόνων στις αναπαραγωγικές παραμέτρους των διαφόρων ειδών μέχρι το 2010 (27).

Πίνακας 3: Μελέτες αξιολόγησης της γονιμότητας ενήλικων ζώων από την έκθεση σε ισοφλαβονοειδή κατά την κυοφορία και κατά τη γέννηση αυτών.

Table 2 Animal studies evaluating the adult effects of gestational and post-natal exposure to isoflavones on male reproduction

Species and strain	Period of exposure	Dose	Serum isoflavone levels	No. animals	Litter size	Sperm production	Testis weight	Seminal vesicle weight	Blood hormone levels	Reference
<i>Oral gavage of genistein</i>										
Mice		mg/kg/day								
B6D2F1 (C57BL/6 × DBA/2)	E12 to P20	0.1–10	ND	ND	ND	No effect	No effect	No effect	ND	Fielden <i>et al.</i> , (2003)
Rats										
Sprague–Dawley	E6 to P20	0.4	ND	ND	ND	No effect	Increased	Increased	ND	Kang <i>et al.</i> , (2002)
		4.0	ND	ND	ND	No effect	No effect	No effect	ND	
Rabbits										
New Zealand	E0 to P29	10–20	ND	12 (12)	ND	No effect	No effect	ND	ND	Cardoso & Bao, (2008)
<i>Dietary supplementation with aglycone genistein</i>										
Mice		mg/kg/day								
NIH/S	E0 to P21	8	ND	ND	ND	ND	No effect	No effect	ND	Ryokkynen <i>et al.</i> , (2006)
C57BL/6 mice	E0 to P21	5; 300 (ppm)	ND	7 (10)	ND	No effect	No effect	No effect	T: No effect	Wisniewski <i>et al.</i> , (2005)
Mink		mg/kg/day								
Wild type	E0 to P21	8	ND	ND	ND	No effect	+11%	ND	T: No effect	Ryokkynen <i>et al.</i> , (2005)
Rats		ppm								
Sprague–Dawley	E15 to P10	20–1000	ND	5 (5)	ND	ND	No effect	ND	ND	Masutomi <i>et al.</i> , (2003)
Long Evans	E0 to P21	5	ND	12 (12)	ND	No effect	No effect	No effect	T: –52%	Wisniewski <i>et al.</i> , (2003)
		300%	ND	12 (12)	ND	No effect	No effect	No effect	T: –40%	
Rabbits										
New Zealand	E0 to P29	18%	ND	12 (12)	ND	No effect	No effect	ND	ND	Cardoso & Bao, (2008)
<i>Drinking solution of resveratrol</i>										
Rats		μM								
Sprague–Dawley	E0 to P22	5–100	ND	9 (11)	ND	ND	+9%	ND	–60%	Henry & Witt, (2006)

For control groups, the number of individuals (*n*) is shown in parentheses.

ND, not determined; ppm, parts per million; E, embryonic day; P, post-natal day; T, testosterone.

Πίνακας 4 : Μελέτες αξιολόγησης της γονιμότητας ενήλικων ζώων από την χρόνια έκθεσή τους σε ισοφλαβονοειδή.

Species and strain	Period of exposure	Dose	Serum isoflavone levels	No. animals	Litter size	Sperm production	Testis weight	Seminal vesicle weight	Blood hormone levels	Reference
<i>Subcutaneous injections of genistein</i>										
Mice	M10 for 7 days	mg/kg/day 2.5	ND	5 (5)	ND	ND	ND	ND	T: -80% LH: -40%	Strauss et al., (1998)
<i>Oral gavage of genistein</i>										
Mice	P1 to P56	mg/kg/day 2.5	ND	10 (10)	ND	No effect	No effect	ND	ND	Jung et al., (2004)
ICR mice	P21 to P56	2.5-5.0	ND	10 (10)	ND	No effect	No effect	ND	ND	Lee et al., (2004a)
ICR mice	M6 for 5 weeks	2.5	ND	10 (10)	ND	No effect	No effect	ND	ND	Lee et al., (2004b)
<i>Dietary supplementation with genistein</i>										
Rats		ppm								
Sprague-Dawley	P21 to P35	250	1785	8 (8)	ND	ND	No effect	ND	T: No effect	Fritz et al., (2003)
NIH/S	Adult	1000	9640	8 (8)	ND	ND	No effect	ND	T: No effect	
Wistar	W7 for 52 weeks	5	BLD	10 (10)	ND	ND	No effect	ND	T: +25%	Ryokkynen et al., (2006)
		50	177	30	ND	ND	No effect	ND	ND	McClain et al., (2007)
		500	1108	30	ND	ND	No effect	ND	ND	
<i>Dietary supplementation with isoflavones aglycone</i>										
Mice		mg/day (Gen:Daid)								
ApoE-null	W6 to W16	120 (10:1)	G: 927 D: 142	10 (10)	ND	ND	No effect	No effect	T: No effect	Cline et al., (2004)
		120 (2:1)	G: 241 D: 191	10 (10)	ND	ND	-41%	-73%	T: -90%	
		120 (1:10)	G: 51 D: 736	10 (10)	ND	ND	No effect	-73%	T: -85%	
Rats		ppm								
Wistar-Unilever	W8 for 12 months	200 ^a	ND	ND	ND	No effect	No effect	ND	ND	Faqi et al., (2004)
		2000 ^a	ND	ND	ND	No effect	No effect	ND	ND	
Monkeys										
Cynomolgus macaques	Adult	94 ^a	799 ^a	30 (30)	ND	No effect	No effect	ND	T: No effect	Perry et al., (2007)
		1188 ^a	1458 ^a	30 (30)	ND	No effect	No effect	ND	T: No effect	
<i>Dietary supplementation with dietary soy</i>										
Rats		ppm isoflavone	ng/ml							
Sprague-Dawley	Adult	600 ^a	2224 ^a	57 (57)	ND	ND	No effect	ND	T: -50% LH: No effect	Weber et al., (2001)
<i>Soy formula milk dietary</i>										
Monkeys		mg/L (aglycone)								
Mammoset	P4 to P45	25.5 ^a	ND	15 (15)	ND	ND	No effect	ND	-55%	Shame et al., (2002)
Mammoset	P4 to P45	25.5 ^a	ND	7 (7)	No effect	ND	+14%	No effect	T: No effect (from W40)	Tan et al., (2006)

For control groups, the number of individuals (n) is shown in parentheses.
 ND, Not determined; P, post-natal day; W, week; M, month; BLD, below the limit of detection.
^aTotal isoflavone content. Serum genistein values are expressed in nM.

Πίνακας 5: Μελέτες αξιολόγησης της γονιμότητας ενήλικων ζώων από την χρόνια έκθεσή τους σε ισοφλαβονοειδή από τη γέννηση μέχρι την ενήλικο ζωή.

Species and strain	Period of exposure	Dose	Serum genistein levels	No. animals	Litter size	Sperm production	Testis weight	Seminal vesicle weight	Blood hormone levels	Reference
Oral gavage of genistein										
Rats										
Wistar Han	E0 onward	mg/kg/day 1	ND	≥15	-45%	No effect	No effect	No effect	No effects for LH, FSH, T	Eustache et al., (2009)
		10	ND	≥15	-40%	Decreased	No effect	No effect	FSH: no effect LH: no effect T: -40%	
Dietary supplementation with genistein										
Rats										
Sprague-Dawley	E0 onward	ppm 200-1000	ND	6 (6)	ND	ND	No effect	ND	ND	Casanova et al., (1999)
Sprague-Dawley	E17 onward	5	ND	8 (8)	ND	No effect	-14%	No effect	LH: -67% T: No effect	Roberts et al., (2000)
Sprague-Dawley	E7 onward	5-1250	ND	ND	ND	ND	No effect	No effect	ND	Deldos et al., (2001)
Dietary supplementation with dietary soy										
Mice										
C57BL/6CR Slc	E0 onward	ppm 0.05% ^a	ND	10 (21)	ND	ND	-5%	ND	ND	Takahima-Sasaki et al., (2006)
CD-1	E0 onward	600 ^a	~10 ^a	20 (18)	-21%	-25%	No effect	-30%	T: No effect	Cederroth et al., (2009)
CD-1	E0 onward	ND	ND	22 (24)	ND	ND	+8%	+22%	ND	Ruhlen et al., (2008)
Rats										
Wistar	E0 onward	15.5% ^a	ND	ND	No effect	ND	-10%	ND	FSH: +12%	Atanassova et al., (1999)

For control groups, the number of individuals (n) is shown in parentheses.

ND, Not determined; E, embryonic day; T, testosterone.

^aTotal isoflavone content. Serum genistein values are expressed in μM .

Υπάρχουν λίγες μελέτες *in vitro* που έχουν πραγματοποιηθεί με σκοπό να διαπιστώσουν τις επιδράσεις των φυτοοιστρογόνων απευθείας σε δείγματα ανδρικού σπέρματος. Σε μια από αυτές ο Sierens και οι συνεργάτες του το 2002 θέλησαν να διαπιστώσουν την επίδραση των ισοφλαβονοειδών (genistein και equol) στην επαγόμενη από το υπεροξειδίο του υδρογόνου βλάβη του DNA στο σπέρμα. Στο τέλος της μελέτης αυτής, διαπιστώθηκε ότι προ-θεραπεία με genistein ή equol σε δόσεις των 0,01 – 100 mmol/l επέδρασε προστατευτικά στην οξειδωτική βλάβη του DNA του σπέρματος. Επίσης, προστατευτική επίδραση είχαν τόσο το ασκορβικό οξύ (10 έως 600 mmol/l) όσο και η α-τοκοφερόλη (1-100 mmol/l). Φάνηκε ότι η genistein είχε την πιο ισχυρή αντιοξειδωτική δράση ενώ ακολουθούσε η equol, το ασκορβικό οξύ και η α-τοκοφερόλη. Φαίνεται λοιπόν ότι τα φυτοοιστρογόνα μπορεί να ασκούν αντιοξειδωτική προστασία κατά της ανδρικής στειρότητας (34).

Επίσης, μελέτες έχουν δείξει ότι οι ισοφλαβόνες μπορούν να αλλάξουν την ωρίμανση ή την ενεργοποίηση (capacitation) των ανθρώπινων σπερματοζωαρίων. Έχει αποδειχθεί πρόσφατα ότι χαμηλή συγκέντρωση genistein (1, 10 και 100 nM) προκάλεσε αυξημένη κυκλική AMP διέγερση οδηγώντας σε επιτάχυνση της διαδικασίας ενεργοποίησης και της ακροσωμικής αντίδρασης των σπερματοζωαρίων σε ανθρώπινα σπερματοζωάρια *in vitro*. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα να αυξηθεί το ποσοστό εκείνο των σπερματοζωαρίων που δεν εμφανίζει την ικανότητα να γονιμοποιήσει το ωάριο (35). Επίσης, η ίδια ομάδα απέδειξε ότι ο συνδυασμός genistein και daidzein εμφανίζει πιο αρνητικές επιπτώσεις στο σπέρμα (36).

Μια πρόσφατη μελέτη (2010), αξιολόγησε τις επιδράσεις συμπληρώματος genistein, ως πρόσθετου προϊόντος κατάψυξης, στις παραμέτρους του ανθρώπινου σπέρματος ύστερα από απόψυξη. Οι παράμετροι που αξιολόγησαν ήταν η κινητικότητα των σπερματοζωαρίων, η ικανότητα ενεργοποίησης τους (capacitation), η παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου ROS (reactive oxygen species), η συμύκνωση της χρωματίνης και η βλάβη του DNA. Διαπίστωσαν η genistein (10 mmol /L) έχει αντιοξειδωτικές ιδιότητες για το σπέρμα προστατεύοντας το κατά τη διαδικασία της κρυοσυντήρησης μειώνοντας την κυτταρική βλάβη που προκαλεί η μέθοδος αυτή. Επιπλέον, παρατήρησαν μείωση της παραγωγής των ROS στο σπέρμα βελτιώνοντας έτσι αλαφρά την κινητικότητα των σπερματοζωαρίων, μειώνοντας τη βλάβη της λιπιδικής μεμβράνης και του DNA των σπερματοζωαρίων (37).

Τα προϊόντα με βάση τη σόγια έχουν καταναλωθεί από εκατομμύρια βρέφη κατά τη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών χωρίς προφανείς επιβλαβείς επιπτώσεις. Παρόλα αυτά γνωρίζουμε ότι η βρεφική-παιδική ηλικία είναι ευαίσθητες περίοδοι για τη δημιουργία κάποιας ενδοκρινικής διαταραχής επομένως η έκθεση σε σημαντικά επίπεδα φυτοοιστρογόνων μπορεί τελικά να οδηγήσει σε διαταραχές στην ενήλικη ζωή. Γενικότερα, μπορούμε να πούμε ότι υπάρχει έλλειψη δεδομένων για τον άνθρωπο όσον αφορά τις επιδράσεις της κατανάλωσης σόγιας/ισοφλαβονών με την ποιότητα του σπέρματος και το ανδρικό αναπαραγωγικό ορμονικό προφίλ. Σε αυτό το πλαίσιο, παιδιατρικοί φορείς και οργανισμοί υγείας θεωρούν ότι δεν υπάρχει κανένα αποδεικτικό στοιχείο από μελέτες τόσο

σε πειραματόζωα όσο και στον άνθρωπο ότι τροφές ισοφλαβονοειδών μπορούν να επηρεάσουν αρνητικά την ανθρώπινη ανάπτυξη, την αναπαραγωγή ή την ενδοκρινική λειτουργία (National Toxicology program 2006). Αν και δεν έχουν παρατηρηθεί μακροπρόθεσμες αρνητικές επιδράσεις στην ανάπτυξη ή τη σεξουαλική ωρίμανση, είναι σημαντικό να ειπωθεί ότι το κέντρο αξιολόγησης των κινδύνων για την ανθρώπινη αναπαραγωγή ,CERHR (Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction) το οποίο ιδρύθηκε από το NTP(National Toxicology Program) και το NIEHS(National Institute of Environmental Health Sciences), απέτυχε να εκδώσει οριστικές συστάσεις σχετικά με την αναπαραγωγή και την τοξικότητα των ισοφλαβονοειδών (13).

2. Αντικείμενο μελέτης

Δεδομένα από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO) δείχνουν ότι περίπου το 15% των ζευγαριών που αποπειρώνται την πρώτη τους κύηση αποτυγχάνουν. Το φαινόμενο της αναπαραγωγής παραμένει εξαιρετικά σύνθετο γεγονός που καθιστά ακόμα πιο σύνθετη την κατανόηση και θεραπεία της ανθρώπινης υπογονιμότητας. Τα άλματα της επιστήμης στον τομέα αυτό έχουν δείξει ότι μπορεί να επιτευχθεί τεκνοποίηση στο περίπου 65% των υπογόνιμων ζευγαριών που αναζητούν θεραπεία στους ειδικούς.

Ο άνδρας είναι τουλάχιστον κατά το ήμισυ (50%) συνυπεύθυνος για την υπογονιμότητα του ζευγαριού. Η ανδρική υπογονιμότητα εκδηλώνεται με τη μορφή της αζωοσπερμίας, ασπερμίας, ολιγοσπερμίας και τερατοσπερμίας. Μελέτες έχουν δείξει ότι διαφορές που έγκεινται στη διατροφή, στο αλκοόλ, στο τσιγάρο, στη κατάχρηση φαρμάκων, στην άσκηση, στο περιβάλλον καθώς και στο γενετικό υπόβαθρο συνεισφέρουν σημαντικά στη διαμόρφωση των παραμέτρων του σπέρματος (23). Τα φυτοοιστρογόνα αποτελούν τόσο έναν διατροφικό όσο και ένα φαρμακευτικό παράγοντα που έχει φανεί τα τελευταία χρόνια ότι επηρεάζει την ανδρική υπογονιμότητα και κατατάσσονται στην οικογένεια των ενδοκρινικών διαταράκτων.

Υπάρχουν ποικίλες μελέτες με αντικρουόμενα αποτελέσματα που δείχνουν είτε θετική είτε αρνητική συσχέτιση των παραμέτρων της ανδρικής αναπαραγωγικής ικανότητας με τη διατροφική ή φαρμακευτική κατανάλωση φυτοοιστρογόνων εξαρτώμενη από την συγκέντρωση αυτών (36). Ο ρόλος των οιστρογόνων στη διαδικασία της σπερματογένεσης είναι καθοριστικός, γεγονός που εξηγεί τις επιβλαβείς επιπτώσεις από τη υπερβολική έκθεση οιστρογόνων στο ανδρικό αναπαραγωγικό σύστημα ιδίως κατά τη σεξουαλική διαφοροποίηση στην αρχή της ζωής του εμβρύου (18). Επίσης, αυτός ο οιστρογονομιμητικός ρόλος των φυτοοιστρογόνων, όταν αυτά εφαρμόζονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις, εξηγεί και τις όποιες θετικές επιδράσεις στο ανδρικό αναπαραγωγικό σύστημα.

Παρόλα αυτά, υπάρχει μια σχετική έλλειψη σχεδιασμένων μελετών *in vitro* για την επίδραση της έκθεσης του σπέρματος σε φυτοοιστρογόνα καταγράφοντας τις αλλαγές στις παραμέτρους ποιότητας του σπέρματος όπως κινητικότητα και μορφολογία σπερματοζωαρίων (3). Γι' αυτό το λόγο οδηγηθήκαμε στο σχεδιασμό της παρούσας μελέτης με σκοπό να διαπιστώσουμε την ανωτέρω επίδραση. Για το σκοπό αυτό συλλέχθηκαν 10 δείγματα σπέρματος από υπογόνιμα ζευγάρια που είχαν καταφύγει στη Μονάδα Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής (ΜΥΑ) του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου της Θεσσαλίας και μελετήθηκαν ως προς τις αλλαγές που υπέστησαν ύστερα από την έκθεση τους σε φυτοοιστρογόνα.

3.Μεθοδολογία

3.1 Συλλογή δειγμάτων

Η μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια διπλωματικής διατριβής του μεταπτυχιακού προγράμματος "βιολογία της αναπαραγωγής" της σχολής επιστημών υγείας του τμήματος της ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Η συλλογή των δειγμάτων αλλά και η πραγματοποίηση της πειραματικής διαδικασίας έλαβαν χώρα στη Μονάδα Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής (Μ.Υ.Α) του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου της Θεσσαλίας.

Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν αφορούσαν δείγματα σπέρματος ανδρών από υπογόνιμα ζευγάρια που κατέφυγαν στην Μ.Υ.Α με σκοπό την αναπαραγωγική υποβοήθησή τους. Πιο αναλυτικά, τα δείγματα σπέρματος ελήφθησαν με αυνανισμό και συλλέχθηκαν σε αποστειρωμένα δοχεία μετά από 3-5 ημέρες αποχής από σεξουαλική δραστηριότητα. Η ρευστοποίηση των δειγμάτων λάμβανε χώρα συνήθως σε 10-15 λεπτά στους 37 ° C με 5% CO₂ σε αέρα.

3.2 Εκτίμηση δειγμάτων-σπερμοδιάγραμμα

Όλα τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ακέραια και ύστερα από τη ρευστοποίησή τους εξετάστηκαν για τον όγκο τους, τη συγκέντρωση, τη μορφολογία αλλά και την κινητικότητα των σπερματοζωαρίων σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO)(πίνακας 5).

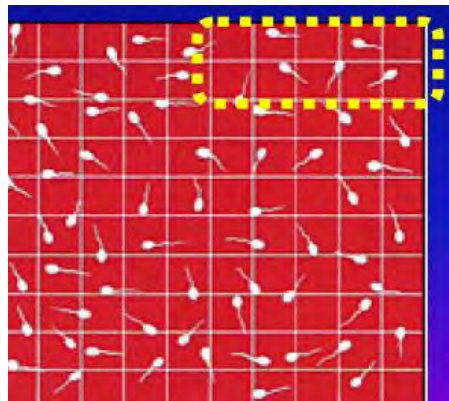
Πίνακας 5: τα χαμηλότερα όρια αναφοράς (5^η εκατοστιαία θέση) των σπερματικών παραμέτρων με βάση τον WHO (25).

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)
Other consensus threshold values	
pH	≥7.2
Peroxidase-positive leukocytes (10 ⁶ per ml)	<1.0
MAR test (motile spermatozoa with bound particles, %)	<50
Immunobead test (motile spermatozoa with bound beads, %)	<50
Seminal zinc (μmol/ejaculate)	≥2.4
Seminal fructose (μmol/ejaculate)	≥13
Seminal neutral glucosidase (mU/ejaculate)	≥20

Για την εκτίμηση του όγκου των δειγμάτων χρησιμοποιούσαμε βαθμονομημένες πιπέτες. Η συγκέντρωση του κάθε δείγματος υπολογιζόταν ύστερα από την τοποθέτηση 10μl του δείγματος σε αντικειμενοφόρο πλάκα makler counting chamber και παρατήρηση σε οπτικό μικροσκόπιο με φακό x 40. Η αντικειμενοφόρος αυτή φέρει καλυπτρίδα με πλέγμα εμβαδού 1 mm² υποδιαιρεμένο σε 100 τετράγωνα, 0.1 x 0.1 mm το καθένα. Η συγκέντρωση του δείγματος υπολογιζόταν με τη μέτρηση των σπερματοζωαρίων σε 10 από τα 100 τετράγωνα (αριθμός α) και εκφραζόταν σε α εκατομμύρια/ml.



Εικόνα 5: αντικειμενοφόρος πλάκα makler counting chamber



Εικόνα 6: τα 100 τετράγωνα του πλέγματος. Το κίτρινο πλαίσιο οριοθετεί την περιοχή που μετρίονται τα σπερματοζωάρια για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης

Για τον υπολογισμό της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων μετρώνται συνολικά 100 σπερματοζωάρια σε τουλάχιστον 5 οπτικά πεδία. Η μέτρηση επαναλαμβάνεται σε 2 εκατοντάδες σπερματοζωαρίων και υπολογίζεται ο μέσος όρος. Κάθε σπερματοζωάριο που μετράται κατατάσσεται σε μία από τις εξής κατηγορίες:

- a : Ταχεία προωθητική κίνηση
- b : Νωθρή προωθητική κίνηση
- c : Επιτόπια κίνηση
- d : Ακίνησία

Έκφραση των τεσσάρων κατηγοριών κινητικότητας σε ποσοστά %.

Σύμφωνα με το νέο WHO η κινητικότητα των σπερματοζωαρίων εκτιμάται σύμφωνα:

- Κίνηση σπερματοζωαρίων (είτε κινούνται ταχέως είτε βραδέως είτε πραγματοποιούν μεγάλους κύκλους) ανεξαρτήτως ταχύτητας (κατηγορία a+b)
- Επιτόπια κίνηση (κίνηση σε μικρούς κύκλους, κίνηση της κεφαλής ή της ουράς χωρίς να κινείται το υπόλοιπο τμήμα του σπερματοζωαρίου) (κατηγορία c)
- Ακίνησία (κατηγορία d)

Είναι σημαντικό να ειπωθεί ότι η εκτίμηση της κινητικότητας έγινε μόνο σε εκείνα τα σπερματοζωάρια που ήταν ακέραια χωρίς συγκολλήσεις.

Κατά την εκτίμηση του σπερμοδιαγράμματος είναι δυνατόν να βρεθούν διάφορες ανωμαλίες οι οποίες κατατάσσονται ως εξής:

- Ολιγοσπερμία: όπου ο αριθμός των σπερματοζωαρίων είναι μικρότερος από 40 εκατομμύρια σε κάθε εκσπερμάτιση, ενώ οι παράμετροι της μορφολογίας και της κινητικότητας είναι ίδιοι με αυτές των φυσιολογικών.
- Ασθενοσπερμία: ο αριθμός και η μορφολογία των σπερματοζωαρίων αγγίζουν τα φυσιολογικά δεδομένα αλλά το $a+b+c < 40\%$ ή το $a+b < 32\%$.
- Τερατοσπερμία: όταν η μορφολογία των σπερματοζωαρίων είναι $< 30\%$.
- Αζωοσπερμία: ανυπαρξία σπερματοζωαρίων στο πλάσμα ή ακόμα και στο ίζημα μετά τη φυγοκέντρωση.
- Ασπερμία: παντελής έλλειψη σπερματικού πλάσματος

Συνδυασμός των παραπάνω όπως ολιγοασθενοσπερμία ή ΟλιγοΑσθενοΤερατοσπερμία (OTA) δύναται να υπάρχει. Συνήθως σπέρματα με ολιγοσπερμία συνοδεύονται και από ασθενή κινητικότητα γεγονός που σημαίνει ότι ο αριθμός σχετίζεται με την κινητικότητα και το αντίστροφο.

3.3 Προετοιμασία φυτοοιστρογόνου

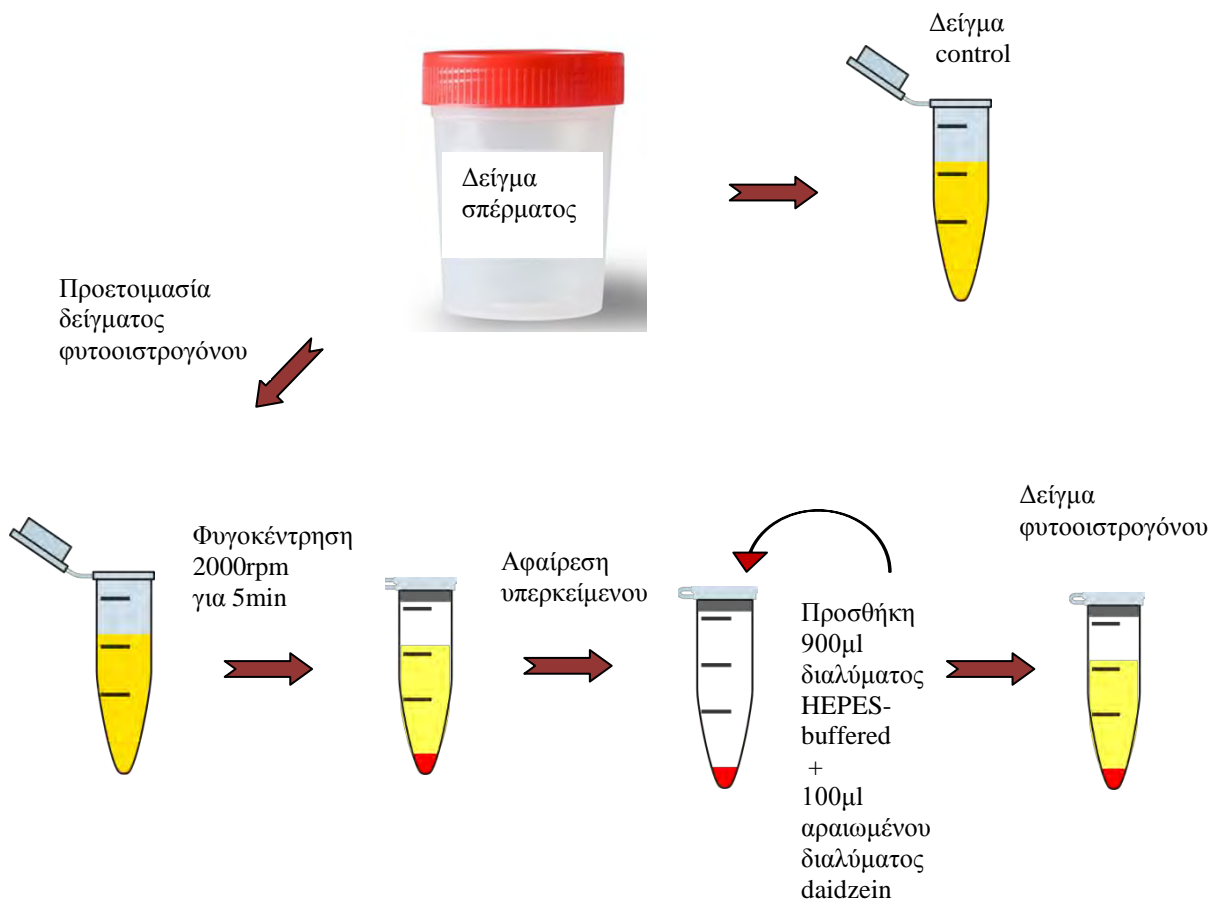
Το φυτοοιστρογόνο που επιλέχθηκε ήταν το daidzein (D7802, Sigma-Aldrich Quimica) σε ποσότητα 25mg. Αρχικά διαλύθηκε σε 2,5ml διαλύτη Dimethylsulphoxide (DMSO, D8418 Sigma-Aldrich Quimica) 10mg/ml σε αναλογία 1:1 DMSO:H₂O (Water for Injection). Το διάλυμα φυτοοιστρογόνου μοιράστηκε σε 50 κλάσματα (eppendorf) των 50μl συγκέντρωσης 10mg/ml (stock solution) και αποθηκεύτηκε στους -20°C μέχρι τη στιγμή της χρησιμοποίησής τους.

Για την πραγματοποίηση της πειραματικής διαδικασίας χρησιμοποιούνταν 10μl ενός κλάσματος stock solution και με αραίωση παρασκεύαζονταν διάλυμα 0,1μg/ml (αραιωμένο διάλυμα daidzein) τελικού όγκου 1000ml. Η αραίωση πραγματοποιούνταν με διάλυμα HEPES-buffered το οποίο χρησιμοποιείται σε γαμέτες εκτός επωαστικού κλιβάνου.

3.4 Προετοιμασία δειγμάτων

Μετά από την εκτίμηση των δειγμάτων όπως αυτή αναφέρθηκε σε προηγούμενη ενότητα προετοιμάζαμε τα δείγματα με το φυτοοιστρογόνο. Αρχικά, κρατούσαμε ποσότητα από το δείγμα σπέρματος ως δείγμα ελέγχου (control) και στην υπόλοιπη ποσότητα σπέρματος πραγματοποιούσαμε φυγοκέντρηση σε 2000rpm για 5 λεπτά. Αφαιρούσαμε το υπερκείμενο και στο ίζημα προσθέταμε 900μl διάλυμα HEPES-buffered και 100μl αραιωμένου διαλύματος daidzein. Επομένως, η τελική συγκέντρωση του daidzein που εφαρμόζαμε στα δείγματα ήταν 0,1μg/ml. Είναι σημαντικό να ειπωθεί ότι αρχικά στα πρώτα δείγματα εφαρμόζαμε και άλλη μια συγκέντρωση φυτοοιστρογόνου, 10 φορές πιο πυκνό από αυτό που αναφέρθηκε αλλά διαπιστώσαμε έντονες αρνητικές επιδράσεις σε αυτό.

Τέλος, πραγματοποιούσαμε μετρήσεις υπολογισμού κινητικότητας σπερματοζωαρίων τόσο στο δείγμα ελέγχου (control) όσο και στο δείγμα φυτοοιστρογόνου + σπέρματος μετά από 1h και 2h από τη στιγμή τοποθέτησης του φυτοοιστρογόνου.



Εικόνα 7: σχηματική αναπαράσταση της πειραματικής διαδικασίας.

4.Αποτελέσματα

4.1 Ιστορικό δειγμάτων

Πίνακας 6: Πληροφοριακός πίνακας της ηλικίας, του Δείκτη Μάζας Σώματος(ΔΜΣ) και των συνηθειών (κάπνισμα-αλκοόλ) των ανδρών που έδωσαν δείγμα καθώς και του αρχικού όγκου και της συγκέντρωσης του δείγματος σπέρματος.

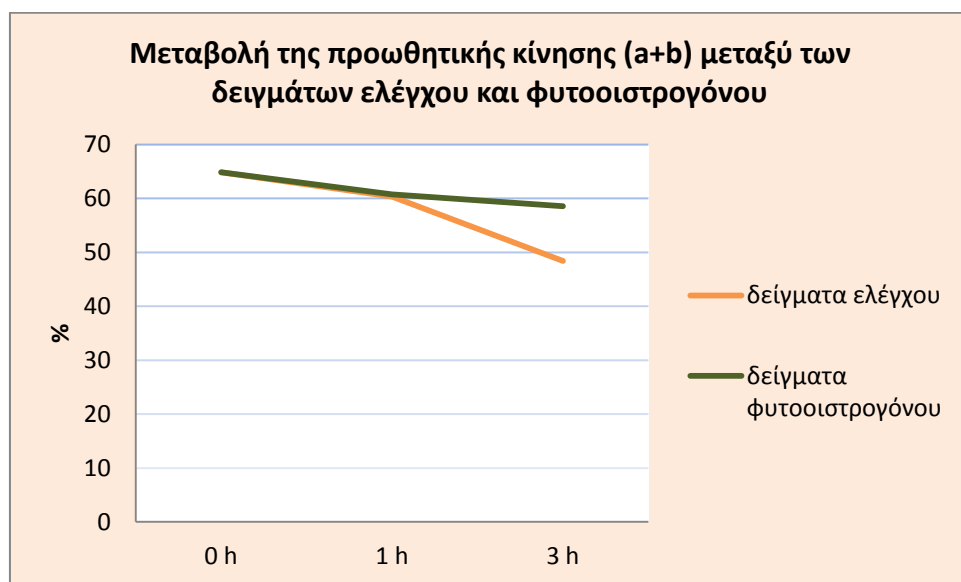
Στοιχεία δειγμάτων	Μέση τιμή ± τυπική απόκλιση
Ηλικία (έτη)	39,40 ± 4,53
ΔΜΣ (kg/m^3)	28,97 ± 3,72
Κάπνισμα (τσιγάρα/μέρα)	50% όχι
	22,6 ± 12,19
Αλκοόλ (ποτά/βδομάδα)	60% όχι
	2,00 ± 1,15
Όγκος σπέρματος $V (ml)$	3,36 ± 1,33
Συγκέντρωση σπέρματος $C (εκ/ml)$	41,00 ± 23,12

4.2 Αποτελέσματα κινητικότητας

Πίνακας 7: Συγκεντρωτικός πίνακας των μέσων όρων της κινητικότητας των δειγμάτων ελέγχου σπέρματος και δειγμάτων σπέρματος με φυτοοιστρογόνο πριν την εφαρμογή του φυτοοιστρογόνου, την 1^η και 3^η ώρα μετά την εφαρμογή αυτού.

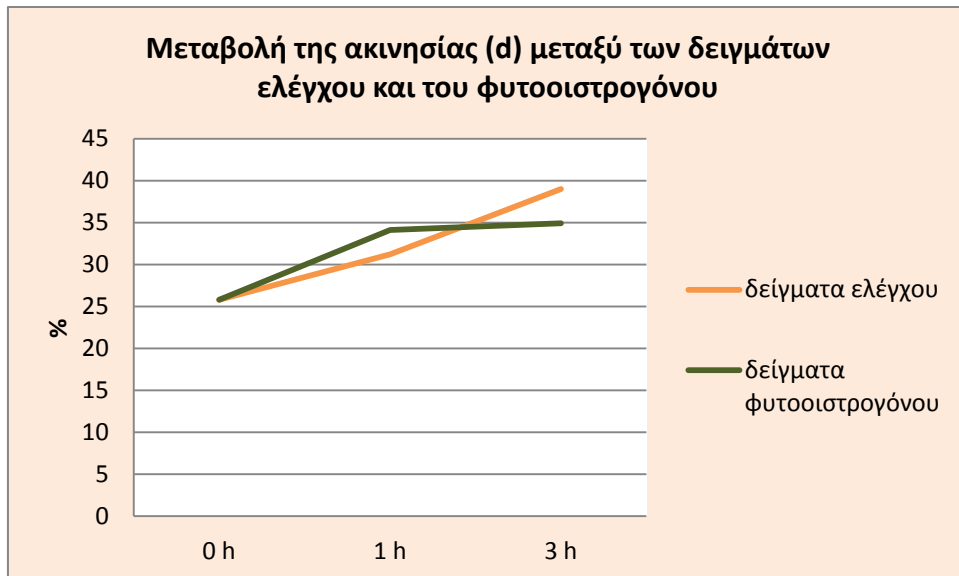
n=10	Ωρα μέτρησης	Κινητικότητα δειγμάτων		
		κίνηση a+b	κίνηση c	κίνηση d
<i>Δείγματα ελέγχου</i>	0h	64,80±12,80	9,40±5,99	25,80±11,74
	1h	60,30±13,51	8,60±5,10	31,20±15,18
	3h	48,40±12,75	12,50±8,14	39,00±13,44
<i>Δείγματα φυτοοιστρογόνου</i>	1h	60,70±14,73	6,30±5,29	34,10±16,04
	3h	58,50±14,31	6,60±7,50	34,90±16,04

Το διάγραμμα που ακολουθεί απεικονίζει την μεταβολή της κίνησης (a+b) των σπερματοζωαρίων στα δείγματα ελέγχου και φυτοοιστρογόνου την 0h, 1h και 3h μετά την εφαρμογή του φυτοοιστρογόνου.



διάγραμμα 1: μεταβολή κίνησης (a+b) των σπερματοζωαρίων

Το διάγραμμα που ακολουθεί απεικονίζει την μεταβολή της ακινησίας (d) των σπερματοζωαρίων στα δείγματα ελέγχου και φυτοοιστρογόνου την 0h, 1h και 3h μετά την εφαρμογή του φυτοοιστρογόνου.



διάγραμμα 2: μεταβολή ακινησίας των σπερματοζωαρίων

5.Συζήτηση

Η σχετική έλλειψη σχεδιασμένων μελετών *in vitro* για την επίδραση της έκθεσης του σπέρματος σε φυτοοιστρογόνα όσον αφορά τις αλλαγές στις παραμέτρους ποιότητας του σπέρματος όπως συγκέντρωση σπέρματος, κινητικότητα και μορφολογία (3), υπήρξε ο λόγος που μας οδήγησε στο σχεδιασμό της παρούσας μελέτης. Για το σκοπό αυτό συλλέξαμε 10 δείγματα σπέρματος από υπογόνιμα ζευγάρια που είχαν καταφύγει στη Μονάδα Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής (ΜΥΑ) με σκοπό να τα μελετήσουμε ως προς τις αλλαγές που υπέστησαν ύστερα από την έκθεσή τους σε φυτοοιστρογόνα.

Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήσαμε το φυτοοιστρογόνο *daidzein* σε συγκεντρώσεις 0,1μg/ml και 1μg/ml σε δείγματα σπέρματος που είχαν υποστεί μια φυγοκέντρωση. Ύστερα από την εφαρμογή κάποιων δοκιμών διαπιστώθηκε ότι η δεύτερη συγκέντρωση είχε άμεσα έντονα αρνητικές επιδράσεις στην κινητικότητα των σπερματοζωαρίων. Για το λόγο αυτό, πραγματοποιήσαμε την πειραματική διαδικασία εφαρμόζοντας την αραιότερη συγκέντρωση φυτοοιστρογόνου. Πιο αναλυτικά, σε κάθε δείγμα πραγματοποιήσαμε συνολικά 5 μετρήσεις κινητικότητας. Οι τρεις μετρήσεις αφορούσαν το δείγμα ελέγχου την ώρα 0h, 1h και 3h μετά την έναρξη της πειραματικής διαδικασίας, ενώ οι άλλες δύο μετρήσεις αφορούσαν τα δείγματα σπέρματος στα οποία εφαρμόστηκε το φυτοοιστρογόνο την ώρα 1h και 3h μετά την έναρξη της πειραματικής διαδικασίας.

Σε γενικές γραμμές καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι το φυτοοιστρογόνο, *daidzein*, στην συγκέντρωση των 0,1μg/ml που εφαρμόστηκε διατήρησε την κινητικότητα των σπερματοζωαρίων σε αρχικά επίπεδα. Πιο αναλυτικά, όπως γίνεται εμφανές και από το διάγραμμα 1, όσον αφορά την κίνηση (a+b) των σπερματοζωαρίων διατηρήθηκε σε υψηλότερα ποσοστά στα δείγματα σπέρματος με φυτοοιστρογόνο σε σύγκριση με τα δείγματα ελέγχου με την πάροδο του χρόνου. Η διαφορά αυτή γίνεται εντονότερα εμφανής μετά το πέρας της 3^{ης} ώρας. Το εύρημα αυτό καθίσταται σημαντικό εφόσον αναλογιστούμε ότι η γονιμοποίηση του ωαρίου επιτυγχάνεται από τα σπερματοζωάρια που εμφανίζουν προωθητική κίνηση (δηλ κίνηση a ή b). Επόμενως, διατηρώντας το ποσοστό αυτών των σπερματοζωαρίων σε υψηλό επίπεδο αυξάνεται και η πιθανότητα για τη γονιμοποίηση του ωαρίου.

Όσον αφορά την ακινησία των σπερματοζωαρίων, όπως είναι εμφανές και από το διάγραμμα 2, εμφανίστηκε σε μικρότερα ποσοστά στα δείγματα σπέρματος με το φυτοοιστρογόνο σε σύγκριση με τα δείγματα ελέγχου με την πάροδο των ωρών. Η υπερίσχιση των δειγμάτων σπέρματος με το φυτοοιστρογόνο γίνεται εντονότερα εμφανής μετά το πέρας της 3^{ης} ώρας. Φαίνεται λοιπόν ότι το φυτοοιστρογόνο μπορεί να ασκεί μια προστατευτική δράση στα σπερματοζωάρια διατηρώντας τα σε κίνηση.

Η διαφορετική επίδραση του φυτοοιστρογόνου στο σπέρμα ανάλογα με τη συγκέντρωση στην οποία εφαρμόζεται σε αυτά έγινε αντιληπτό και από τη δικιά μας μελέτη. Θα μπορούσαμε να πούμε ότι το φυτοοιστρογόνο σε χαμηλές συγκεντρώσεις λειτουργεί ως ασθενές οιστρογόνο καταλαμβάνοντας τους οιστρογονικούς υποδοχείς επηρεάζοντας σηματοδοτικά μονοπάτια στο σπέρμα. Η ύπαρξη όμως μεγαλύτερης συγκέντρωσης φυτοοιστρογόνου πιθανόν να προκαλεί ανταγωνιστική οιστρογονική δράση

μπλοκάρωντας του ήδη κορεσμένους οιστρογονικούς υποδοχείς, γι αυτό και να ασκεί έντονα αρνητικές επιδράσεις.

Παρόλα αυτά, είναι σημαντικό να ειπωθεί ότι ο αριθμός των δειγμάτων μας είναι μικρός επομένως καθίσταται σημαντική η εφαρμογή της πειραματικής διαδικασίας σε μεγαλύτερο δείγμα ώστε να διαπιστωθεί αν οι διαφορές αυτές μεταξύ των δειγμάτων ελέγχου και φυτοοιστρογόνου είναι στατιστικά σημαντικές έτσι ώστε να ισχυροποιηθεί και το συμπέρασμά μας.

6.Βιβλιογραφία

1. **Patricia L. Whitten, Frederick Naftolin.** Reproductive actions of phytoestrogens. *Bailliere's Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1998, Τόμ. 12, 4.
2. *Cayman chemical*. [Ηλεκτρονικό] 2015. <https://www.caymanchem.com>.
3. **Karen P. Phillips, Nongnuj Tanphaichitr.** Human exposure to endocrine disrupters and semen quality. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. Part B, 2008, 11:188–220.
4. **Mhairi C.L. West, Lorraine Anderson, Neil McClure and Sheena E.M. Lewis.** Dietary oestrogens and male fertility potential. *Human Fertility*. 2005, 8(3): 197 – 207.
5. **Paraskevi Moutsatsou.** The spectrum of phytoestrogens in nature: our knowledge. *HORMONES*. 2007, 6(3):173-193.
6. **Hans Konrad Biesalski, Peter Grimm.** *Εγχειρίδιο Διατροφής*. Αθήνα : Π.Χ. Πασχαλίδης, 2008.
7. **Kasum, Julie A. Ross and Christine M.** Dietary Flavonoids: Bioavailability, Metabolic Effects, and Safety. *Annu. Rev. Nutr.* . 2002, 22:19–34.
8. **Dixon, Richard A.** Phytoestrogens. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2004, 55:225–61.
9. **Madar, Aliza Stark and Zecharia.** Phytoestrogens: A Review of Recent Findings. *Journal of Pediatric Endocrinology & Metabolism*. 2002, 15, 561-572.
10. **Adrian A. Franke, Jennifer F. Lai, and Brunhild M. Halm.** Absorption, distribution, metabolism, and excretion of isoflavonoids after soy intake. *Arch Biochem Biophys.* . 2014 , 559: 24–28.
11. **Α. Καρκανάκη, Ν. Πράπας, Δ. Βαβίλης.** Φυτοοιστρογόνα: εναλλακτική επιλογή για την ορμονική θεραπεία υποκατάστασης στην εμμηνόπαυση. *Ελληνική Μαιευτική και Γυναικολογία*. 2009, 21(1):000-000.
12. **Sonia de Pascual-Teresa, T, Jesper Hallund, Duncan Talbot, Joyce Schroot, Christine M. Williams, Susanne Bugel, Aedin Cassidy.** Absorption of isoflavones in humans: effects of food matrix and processing. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2006, Τόμ. 17, 257–264.
13. **Christopher R. Cederroth, Serge Nef.** Soy, phytoestrogens and metabolism: A review. *Molecular and Cellular Endocrinology* . 2009, 304: 30–42.
14. **Williamson, Inge Lise Finne Nielsen and Gary.** Review of the Factors Affecting Bioavailability of Soy Isoflavones in Humans. *Nutrition and Cancer*. 2007, 57(1), 1–10.
15. **Stephen Barnes, Jeevan Prasain, Tracy D'Alessandro, Ali Arabshahib, Nigel Botting, Mary Ann Lila, George Jackson, Elsa Janle, and Connie M. Weaver.** The

metabolism and analysis of isoflavones and other dietary polyphenols in foods and biological systems. *Food Funct.* 2011 , 2(5): 235–244.

16. **Prossnitz ER, Maggiolini M.** Mechanisms of estrogen signaling and gene expression via GPR30. *Mol Cell Endocrinol.* 2009, 308(1-2):32-8.

17. **Wendy N. Jefferson, Heather B. Patisaul, and Carmen J. Williams.** Reproductive Consequences of Developmental Phytoestrogen Exposure. *Reproduction.* . 2012, 143(3): 247–260.

18. **Giwerzman, Aleksander.** Estrogens and phytoestrogens in male infertility. *Current Opinion in Urology* . 2011, Τόμ. 21:6, pp:519-526.

19. **George G. J. M. Kuiper, BO Carlsson, Kaj Grandien, Eva Enmark, Johan Ha" Ggblad, Stefan Nilsson, and Jan-Åke Gustafsson.** Comparison of the Ligand Binding Specificity and Transcript Tissue Distribution of Estrogen Receptors a and b. *Endocrinology.* 1997, Τόμ. 138, 3.

20. **Jinping An, Christina Tzagarakis-Foster, Tiffany C. Scharschmidt, Nouredine Lomri and Dale C. Leitman.** Estrogen Receptor β -Selective Transcriptional Activity and Recruitment of Coregulators by Phytoestrogens. *The Journal of Biological Chemistry.* 2001, 276, 17808-17814.

21. **Delia M. Brownson, Nicolas G. Azios, Brie K. Fuqua, Su F. Dharmawardhane, and Tom J. Mabry.** Flavonoid Effects Relevant to Cancer. *The American Society for Nutritional Sciences.* 2002, Τόμ. 132, 11 3482S-3489S.

22. **Evans BA1, Griffiths K, Morton MS.** Inhibition of 5 alpha-reductase in genital skin fibroblasts and prostate tissue by dietary lignans and isoflavonoids. *J Endocrinol.* . 1995, 147(2):295-302.

23. **Anawalt, Bradley D.** The silent spermatozoon: are man-made endocrine disruptors killing male fertility? *Asian Journal of Andrology.* 2013, 15, 165–168.

24. **Veeck, Lucinda L.** *An Atlas of human gametes and conceptuses.* s.l. : Parthenon, 1999.

25. *Examination and processing of human semen.* s.l. : World Health Organization, 2010. 5th edition .

26. **Adele Chimento, Rosa Sirianni , Ivan Casaburi and Vincenzo Pezzi.** GPER signaling in spermatogenesis and testicular tumors. *Cancer Endocrinology.* 2014, Τόμ. 5.

27. **Christopher R. Cederroth, Jacques Auger, Celine Zimmermann, Florence Eustache and Serge Nef.** Soy, phyto-oestrogens and male reproductive function:a review. *International Journal of Andrology* 33 (2010), . 2010, 33: 304–316.

28. **Julie H. Mitchell, Elizabeth Cawood, David Kinniburgh, Anne Provan, Andrew R. Collins and D. Stewart Irvine.** Effect of a phytoestrogen food supplement on reproductive health in normal males. *Clinical Science*. 2001, 100, 613–618.
29. **Chavarro JE, Toth TL, Sadio SM, Hauser R.** Soy food and isoflavone intake in relation to semen quality parameters among men from an infertility clinic. *Hum Reprod*. 2008, 23(11):2584-90.
30. **Habito, R. C., Montalto, J., Leslie, E. & Ball, M. J.** Effects of replacing meat with soyabean in the diet on sex hormone concentrations in healthy adult males. *British Journal of Nutrition* . 2000, 84:557–563.
31. **Nagata, C., Takatsuka, N., Shimizu, H., Hayashi, H., Akamatsu, T. & Murase, K.** Effect of soymilk consumption on serum estrogen and androgen concentrations in japanese men. . *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*. 2001, 10:179–184.
32. **Nagata, C., Inaba, S., Kawakami, N., Kakizoe, T. & Shimizu, H.** Inverse association of soy product intake with serum androgen and estrogen concentrations in japanese men. *Nutrition and Cancer*. 2000, 36:14-18.
33. **Casini ML, Gerli S, Unfer V.** An infertile couple suffering from oligospermia by partial sperm maturation arrest: can phytoestrogens play a therapeutic role? A case report study. *Gynecol Endocrinol*. 2006, 22(7):399-401.
34. **J. Sierens, J.A. Hartley, M.J. Campbell, A.J.C. Leathem, and J.V. Woodside.** In Vitro Isoflavone Supplementation Reduces Hydrogen Peroxide-Induced DNA Damage in Sperm. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis* . 2002, 22:227–234.
35. **Fraser LR, Beyret E, Milligan SR, Adeoya-Osiguwa SA.** Effects of estrogenic xenobiotics on human and mouse spermatozoa. *Hum Reprod*. 2006, 21(5):1184-93.
36. **West, Mhairi C.L.** The impact of dietary oestrogens on male and female fertility. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2007, 19: 215-221.
37. **Juan Carlos Martinez-Soto, Juan de Dios Hourcade, Alfonso Gutiérrez-Adán, José Lorenzo Landeras, Joaquín Gadea.** Effect of genistein supplementation of thawing medium on characteristics of frozen human spermatozoa. *Asian Journal of Andrology* . 2010, 12: 431–441.
38. **Tawakalitu Oseni, Roshani Patel, Jennifer Pyle and V. Craig Jordan.** Selective Estrogen Receptor Modulators and Phytoestrogens. *Planta Med*. 2008, 74(13): 1656–1665.
39. **Socorro Retana-Márquez, Horacio Hernández, José Alfredo Flores, Minerva Muñoz-Gutiérrez, Gerardo Duarte, Jesús Vielma, Gonzalo Fitz-Rodríguez, Ilda Graciela Fernández, Matthieu Keller and José Alberto Delgadillo.** Effects of phytoestrogens on mammalian reproductive physiology. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 2012, Τόμ. 15, SUP 1: S129 – S145.

