



**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 του φυτοφαρμάκου (roundup) στις παραμέτρους  
του σπέρματος >>**

ΚΑΧΠΑΝΗ ΕΛΛΗ

ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΟΣ & ΓΕΝΕΤΙΣΤΡΙΑ

ΛΑΡΙΣΑ

Σεπτέμβριος 2015

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ

*ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ Ι. ΔΑΠΟΝΤΕ*

*ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ*

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπων: Γεώργιος –Σπυρίδων Ανυφαντής

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή : Γεώργιος –Σπυρίδων Ανυφαντής

Κωνσταντίνος Νταφόπουλος

Γεώργιος Αμοιρίδης

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

*Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμότερες ευχαριστίες μου στον κ. Ιωάννη Μεσσήνη που με επέλεξε στο συγκεκριμένο μεταπτυχιακό πρόγραμμα και κατάφερα να αποκομίσω πολύτιμες εμπειρίες και γνώσεις.*

*Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Διευθυντή του Μεταπτυχιακού Προγράμματος ‘‘Βιολογία της Αναπαραγωγής ‘’ κ. Αλέξανδρο Ι. Δαπόντε για την δυνατότητα που μου έδωσε να πραγματοποιήσω την διπλωματική μου εργασία.*

*Επίσης ένα ιδιαίτερο <<ευχαριστώ>> στην τριμελή επιτροπή της παρούσης διπλωματικής εργασίας, κ. Γεώργιο-Σπυρίδων Ανυφαντή, κ. Κωνσταντίνο Νταφόπουλο και κ. Γεώργιο Αμοιρίδη για τη βοήθεια τους σε επιστημονικά και διαδικαστικά ζητήματα, για την συνεχή πρακτική και ηθική υποστήριξη τους και για την εμπιστοσύνη τους.*

*Τέλος, ένα μεγάλο <<ευχαριστώ>> από τα βάθη της καρδιάς μου στα αγαπημένα μου πρόσωπα και στην οικογένεια μου που αποδέχθηκαν όλες τις επιλογές μου και μου παρείχαν στήριξη όλο αυτό το διάστημα.*

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ανδρική υπογονιμότητα μπορεί να έχει διάφορες αιτίες, όμως με την πάροδο του χρόνου φαίνεται πως η κύρια και πιο συχνή αιτία είναι η έκθεση σε περιβαλλοντικούς κινδύνους, όπως τα φυτοφάρμακα. Το πιο γνωστό και πρώτο σε πωλήσεις χημικό φυτοφάρμακο (ζιζανιοκτόνο) στον κόσμο είναι το Roundup. Το κύριο συστατικό του είναι το glyphosate ενώ περιλαμβάνει διάφορα αδρανή στοιχεία, όπως η διοξίνη και η polyoxyethylamine (POEA). Ο κύριος μεταβολίτης του είναι το AMPA. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν οι επιδράσεις του φυτοφαρμάκου Roundup στις παραμέτρους του σπέρματος σε 66 δείγματα ανδρών που συμμετείχαν σε συμβατικούς κύκλους εξωσωματικής γονιμοποίησης. Συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκε in vitro χορήγηση Roundup τελικής συγκέντρωσης 1ppm στα δείγματα σπέρματος και μετέπειτα μικροσκοπική ανάλυση των δειγμάτων αυτών μετά το πέρας μίας ώρας και τριών ωρών αντίστοιχα από την ώρα χορήγησης του φυτοφαρμάκου. Υπήρξαν δύο ομάδες ελέγχου με βάση τη συγκέντρωση του σπέρματος σύμφωνα με τα κριτήρια του WHO. Η μία αποτελούνταν από δείγματα με συγκέντρωση  $\geq 15$  εκατ. σπερματοζωάρια /ml και η άλλη από δείγματα με συγκέντρωση  $<15$  εκατ. σπερματοζωάρια /ml. Με βάση τα αποτελέσματα διαπιστώθηκε ότι η μεγαλύτερη επίδραση του φυτοφαρμάκου παρατηρήθηκε με το πέρας της μίας ώρας από την χορήγηση του Roundup στη μικρότερη δυνατή συγκέντρωση. Επίσης δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστική διαφορά στην επίδραση του φυτοφαρμάκου μεταξύ των φυσιολογικών και μη φυσιολογικών δειγμάτων σπέρματος.

## **ABSTRACT**

Male infertility can have various causes, but over the time it appears that the main and the most common cause is the exposure to environmental hazards, such as pesticides. The most famous and best-selling chemical pesticide (herbicide) in the world is Roundup. Its main ingredient is glyphosate and includes various inactive ingredients, such as dioxin and polyoxyethylamine (POEA). The main metabolite is the AMPA. In the present study we research the effects of the pesticide Roundup in semen parameters in 66 samples of men who took part in conventional IVF cycles. It took place in vitro administration of Roundup with final concentration of 1ppm in the semen samples and subsequent microscopic analysis of these samples after one hour and three hours respectively from the time of administration of the pesticide. There were two control groups based on the concentration of sperm according to the criteria of WHO. One was composed of samples with concentration  $\geq 15$  mil. Spermatozoa / ml and the other samples with concentration  $<15$  mil. Spermatozoa / ml. Based on the results we found that the greatest impact of the pesticide was observed at the end of one hour of administration of Roundup at the lowest concentration. Also no statistical difference in the effect of the pesticide was observed between normal and abnormal semen samples.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Ευχαριστίες.....	3
Περίληψη.....	4
Abstract.....	5
Περιεχόμενα.....	6
Πρόλογος.....	7
1. Εισαγωγή.....	8
1.1 Υπογονιμότητα.....	8
1.1.1 Αίτια Υπογονιμότητας.....	8
1.1.2 Ανδρική Υπογονιμότητα.....	9
1.1.3 Αίτια Ανδρικής Υπογονιμότητας.....	9-10
1.2 Περιβαλλοντικοί Παράγοντες.....	10
1.2.1 Φυτοφάρμακα.....	11-12
1.2.2 Φυτοφάρμακο Roundup.....	13-14
1.2.3 Χημική Ταυτότητα- Ιδιότητες.....	14-15
1.2.4 Τρόπος Δράσης του Glyphosate.....	15-17
1.2.5 Μεταβολισμός και Αποικοδόμηση του Glyphosate.....	17-19
1.2.6 Επιπτώσεις Roundup στην Υγεία του Ανθρώπου.....	20-22
1.2.7 Επιπτώσεις Roundup στο Αρσενικό Αναπαραγωγικό Σύστημα.....	22-26
2. Υλικά και Μέθοδοι.....	27
2.1 Προετοιμασία Ασθενών.....	27-28
2.2 Προετοιμασία φυτοφαρμάκου (Roundup).....	29
2.3 Πειραματικό Μέρος.....	29-31
3. Αποτελέσματα.....	32
3.1 Δημογραφικά Στοιχεία των 66 δειγμάτων.....	32
3.2 Χαρακτηριστικά κινητικότητας των 66 δειγμάτων ελέγχου και των δειγμάτων με το φυτοφάρμακο.....	33-38
4. Συζήτηση.....	39-41
5. Βιβλιογραφία.....	42-47

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Περίπου το 15% των ζευγαριών δεν είναι σε θέση να συλλάβουν μετά από ένα χρόνο ελεύθερων σεξουαλικών επαφών. Ο ανδρικός παράγοντας είναι αποκλειστικά υπεύθυνος για το 40% των υπογόνιμων ζευγαριών και συνεισφέρει επίσης ένα ποσοστό 20% στις περιπτώσεις που συμμετέχει και ο γυναικείος παράγοντας. Ο ανδρικός παράγοντας υπογονιμότητας σχεδόν πάντα διαπιστώνεται με παθολογική ανάλυση σπέρματος, παρόλο που και άλλοι λόγοι μπορούν να παίζουν ρόλο στην υπογονιμότητα ακόμη και όταν η ανάλυση σπέρματος είναι φυσιολογική. Η ανδρική υπογονιμότητα μπορεί να έχει διάφορες αιτίες από ορμονικές ανισορροπίες, βιολογικά –ανατομικά προβλήματα καθώς και βαθύτερα ψυχολογικά αίτια ή τρόπο διαβίωσης. Ένα κύριο αίτιο χαμηλού αριθμού σπέρματος είναι και η έκθεση σε περιβαλλοντικούς κινδύνους και τοξίνες όπως για παράδειγμα τα φυτοφάρμακα. Τα περισσότερα φυτοφάρμακα είναι πάρα πολύ τοξικά μέχρι επικίνδυνα για τον άνθρωπο. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με την όλο και διευρυνόμενη χρήση των φυτοφαρμάκων σε αγροτικές κυρίως περιοχές τα καθιστούν μια από τις πιο επικίνδυνες ομάδες ουσιών για τη δημόσια υγεία. Στην παρούσα εργασία θα γίνει αναφορά σε ένα ευρέως φάσματος χημικό φυτοφάρμακο ( ζιζανιοκτόνο), γνωστό ως Roundup, και θα αναλύσουμε κατά πόσο το συγκεκριμένο φυτοφάρμακο επηρεάζει τις παραμέτρους του σπέρματος. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε *in vitro* πείραμα και μικροσκοπική εκτίμηση με την οποία εκτιμάται ο αριθμός και η κινητικότητα των σπερματοζωαρίων σε έναν ικανοποιητικό αριθμό δειγμάτων σπέρματος από άνδρες που συμμετείχαν σε συμβατικούς κύκλους εξωσωματικής γονιμοποίησης. Στη συνέχεια θα γίνει η σύγκριση των αποτελεσμάτων.

## **1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

### **1.1 ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑ**

Υπογονιμότητα ονομάζουμε την αδυναμία σύλληψης μετά από 12 μήνες σεξουαλικών επαφών χωρίς προφύλαξη ή χρήση αντισυλληπτικών μέσων. Η υπογονιμότητα διακρίνεται σε πρωτοπαθή και δευτεροπαθή. Στην πρωτοπαθή δεν έχει επιτευχθεί σύλληψη στο παρελθόν, ενώ στη δευτεροπαθή έχει επιτευχθεί σύλληψη. Δεν πρέπει να συγχέεται με την «στεριότητα», που είναι η απόλυτη βιολογική αδυναμία τεκνοποίησης (για παράδειγμα, μια γυναίκα που έχει υποβληθεί σε ολική αφαίρεση μήτρας και ωοθηκών αδυνατεί προφανώς να τεκνοποιήσει). Το πρόβλημα της υπογονιμότητας εμφανίζεται συχνά και είναι διαχρονικό. Διεθνώς το 15% των ζευγαριών αντιμετωπίζουν δυσκολία στη σύλληψη γενικώς, ή στη σύλληψη του επιθυμητού αριθμού παιδιών, σύμφωνα με εκτιμήσεις του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (Π.Ο.Υ.). (1)

#### **1.1.1 ΑΙΤΙΑ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑΣ**

Τα αίτια της υπογονιμότητας μπορούμε να τα διακρίνουμε σε αυτά που οδηγούν στη γυναικεία υπογονιμότητα και αυτά που αφορούν στην ανδρική υπογονιμότητα ή ο συνδυασμός και των δύο. Οι συχνότεροι παράγοντες που μπορούν να οδηγήσουν σε γυναικεία υπογονιμότητα είναι : διαταραχές ωοθυλακιορρηξίας, σαλπινγικός παράγοντας (απόφραξη σαλπίγγων) , ενδομητρίωση , παθήσεις μήτρας (π.χ ινομυώματα), παθήσεις τραχήλου και εχθρική συμπεριφορά τραχηλικής βλέννης , παρουσία αντισωμάτων , ηλικία γυναίκας.

Οι συχνότεροι παράγοντες που μπορούν να οδηγήσουν σε ανδρική υπογονιμότητα είναι : ολιγοσπερμία , ασθενοσπερμία , τερατοσπερμία και συνδυασμοί αυτών , αζωοσπερμία , αντισπερμικά αντισώματα. Υπάρχει πάντα και η ανεξήγητη υπογονιμότητα, υπογονιμότητα δηλαδή σε ένα ζευγάρι όταν όλοι οι παραπάνω παράγοντες έχουν ελεγχθεί και είναι φυσιολογικοί. (1) (2)



### 1.1.2 ΑΝΔΡΙΚΗ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑ

Σε αντίθεση με τις αντιλήψεις του παρελθόντος, όπου η υπογονιμότητα αποδίδονταν κυρίως στον γυναικείο παράγοντα, στη σημερινή εποχή, έχει πλήρως τεκμηριωθεί, ότι ο ανδρικός παράγων είναι δυνατόν να ευθύνεται αποκλειστικά ή εν μέρει για την υπογονιμότητα των ζευγαριών. Πιο συγκεκριμένα, σύμφωνα με την βιβλιογραφία, ο ανδρικός παράγων είναι η κύρια αιτία της υπογονιμότητας σε ποσοστό 20-26% των ζευγαριών. Η ανάλυση του σπέρματος (σπερμοδιάγραμμα) αποτελεί την κύρια μέθοδο εκτίμησης της ανδρικής υπογονιμότητας. Εάν το σπερμοδιάγραμμα βρεθεί εντός φυσιολογικών ορίων η εξέταση του άνδρα δεν έχει καμμία επιπρόσθετη αξία, ενώ στο άλλο άκρο, η αζωοσπερμία είναι αδιαμφισβήτητη και εύκολα διαγνώσιμη αιτία έλλειψης ανδρικής γονιμότητας. (2)

Η ανδρική υπογονιμότητα εκδηλώνεται κυρίως με διαταραχές του αριθμού, της κινητικότητας ή και της μορφολογίας των σπερματοζωαρίων. Εάν τα κριτήρια δεν πληρούνται, διακρίνουμε τις παρακάτω παθήσεις: ολιγοσπερμία , ασθενοσπερμία, τερατοσπερμία, όλιγο -ασθενο -τερατοσπερμία (OAT), αζωοσπερμία (αποφρακτική ή μη αποφρακτική) , ασπερμία και αντισπερμικά αντισώματα. (1) (3)

### 1.1.3 ΑΙΤΙΑ ΑΝΔΡΙΚΗΣ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑΣ

Τα αίτια που μπορεί να προκαλέσουν ανδρική υπογονιμότητα μπορεί να οφείλονται σε παθολογία των όρχεων , των αποχετευτικών οδών του σπέρματος , των επικουρικών αδένων , διαταραχές του σπέρματος, δυσλειτουργία σε κεντρικό επίπεδο (υποθάλαμο-υποφυσιακό ) ή στα όργανα στόχους των ανδρογόνων. Οι παράγοντες που επηρεάζουν την ποιότητα του σπέρματος παροδικά μπορεί να είναι το άγχος, οι γενικές λοιμώξεις, οι αυτόματες διακυμάνσεις στην παραγωγή, η ατελής στύση και η ατελής συλλογή. Πιο αναλυτικά τα κύρια αίτια που μπορεί να προκαλέσουν ανδρική υπογονιμότητα είναι κυρίως:

- Οι μηχανικοί παράγοντες: τραύματα ή εγχειρήσεις στην περιοχή των όρχεων, του προστάτη, της ουροδόχου κύστης, της ουρήθρας, η συστροφή όρχεως, τραύμα στον

σπερματικό πόρο ή στη σπερματική αρτηρία κατά τη διάρκεια των εκφορητικών οδών κατά την αφαίρεση του προστάτη.

- Η συχνότητα σεξουαλικής επαφής: οι πολύ συχνές επαφές προκαλούν μείωση του όγκου του σπέρματος, ενώ η μεγάλη αποχή προκαλεί μείωση της κινητικότητας.
- Το ψυχολογικό στρες μπορεί να προκαλέσει πρόωρη εκσπερμάτιση.
- Η μεγάλη σωματική κόπωση ή οι ασθένειες με υψηλό πυρετό επηρεάζουν την ποιότητα του σπέρματος παροδικά.
- Οι ενδοκρινικοί παράγοντες όπως η νόσος Cushing, η ακρομεγαλία, οι όγκοι υπόφυσης.
- Ορισμένοι γενετικοί παράγοντες.
- Οι διαταραχές της εκσπερμάτισης (παλίνδρομη εκσπερμάτιση, απουσία εκσπερμάτισης ή νευρολογική βλάβη) : η παλίνδρομη εκσπερμάτιση στην ουροδόχο κύστη εκδηλώνεται σπάνια και παρατηρείται σε άνδρες με διαβητική νευροπάθεια, ή σε άνδρες μετά από προστατεκτομή ή τραύμα της σπονδυλικής στήλης (διαγιγνώσκεται με την απουσία εκσπερμάτισης μετά τον οργασμό και επιβεβαιώνεται με την παρουσία των σπερματοζωαρίων στα ούρα).
- Οι περιβαλλοντικές επιδράσεις : αυξημένη θερμοκρασία, τοξικές ουσίες, ακτινοβολία, υπερβολική κατανάλωση καπνού, οιοπνεύματος, ναρκωτικών, καφέ. Επίσης τα φυτοφάρμακα- ζιζανιοκτόνα αποτελούν έναν πολύ σοβαρό περιβαλλοντικό παράγοντα που έχει άμεσες και έμμεσες επιδράσεις στο ανδρικό αναπαραγωγικό σύστημα. (1) (4) (5)

## 1.2 ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Η επίδραση του περιβάλλοντος στην υγεία και την αναπαραγωγική λειτουργία του ανθρώπου διερευνάται λεπτομερώς τα τελευταία χρόνια. Πολλοί περιβαλλοντικοί παράγοντες ασκούν βλαπτική επίδραση σε ένα ή περισσότερα επίπεδα της αναπαραγωγικής λειτουργίας ιδιαίτερα στον άνδρα με συνέπεια την διαταραχή της σεξουαλικής δραστηριότητας , της αναπαραγωγικής ικανότητας ή και των δύο μαζί. Οι επιβλαβείς

περιβαλλοντικοί παράγοντες χωρίζονται σε φυσικούς (ακτινοβολία, μικροκύματα, υψηλή θερμοκρασία, τραυματισμοί), φυσιολογικούς- φυσιοπαθολογικούς (λοιμώδη νοσήματα) , ψυχολογικούς, διαιτητικούς (συντηρητικά τροφίμων, χρωστικές ουσίες), φαρμακευτικούς και χημικούς παράγοντες όπως τα μέταλλα , τα ορυκτέλαια, τα φυτοφάρμακα και τα ζιζανιοκτόνα. (2) (6)

Με τα τελευταία θα ασχοληθούμε στην παρούσα διπλωματική εργασία και θα μελετήσουμε πως τα φυτοφάρμακα επηρεάζουν τις παραμέτρους του σπέρματος.

### **1.2.1 ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΑ**

Τα τελευταία χρόνια με την αύξηση του πληθυσμού και την ανάπτυξη της τεχνολογίας , ο άνθρωπος άρχισε να επεμβαίνει αλόγιστα στο φυσικό περιβάλλον με σκοπό να παράγει περισσότερα τρόφιμα. Έτσι σήμερα η καλλιέργεια της γης γίνεται με σύγχρονα μέσα, με τη βοήθεια της επιστήμης και με τη χρήση διάφορων μέσων. Ένα από αυτά είναι και η χρήση των φυτοφαρμάκων. Η ατμόσφαιρα ρυπαίνεται , το νερό μολύνεται , το έδαφος καταστρέφεται , η χλωρίδα και η πανίδα εξαφανίζεται . Επίσης και η υγεία των ανθρώπων βρίσκεται σε κίνδυνο. Τα τρόφιμα που παράγει τώρα η γη δεν είναι απόλυτα υγιεινά , αφού οι βλαβερές ουσίες που περιέχουν τα φυτοφάρμακα εισχωρούν σ' αυτά σιγά σιγά και βλάπτουν κατά επέκταση τον οργανισμό του ανθρώπου. (7) Φυτοφάρμακα λοιπόν λέγονται μια σειρά από φάρμακα, χημικές ουσίες που φτιάχνονται για την αποτελεσματική καταπολέμηση των εχθρών των φυτών. Είναι δυνατά δηλητήρια, προϊόντα υψηλής τεχνολογίας, που δρουν και σκοτώνουν ζωικούς και φυτικούς οργανισμούς που βλάπτουν τις καλλιέργειες. Αναπτύχθηκαν τα τελευταία εξήντα περίπου χρόνια. Το 1942 ο Ελβετός Muller ανακαλύπτει το DDT (διχλωρο-διφαινυλοτριχλωροαιθάνιο), ενώ το 1946 τα εργαστήρια της εταιρίας φαρμάκων BAYER κατασκευάζουν το παραθείο. Τα πρώτα χρόνια της ανακάλυψής τους, η συμβολή τους στην προστασία της αγροτικής παραγωγής, γέννησε πολλές ελπίδες για τη λύση του προβλήματος τροφής που αντιμετώπιζε η ανθρωπότητα με την αύξηση του πληθυσμού. Ταυτόχρονα η προσφορά τους ήταν μεγάλη και στην προστασία της δημόσιας υγείας με την καταπολέμηση ενοχλητικών εντόμων, που έφεραν

διάφορες ασθένειες στον άνθρωπο και ανοίγονται νέοι ορίζοντες στη βελτίωση της ποιότητας της ανθρώπινης ζωής. Έτσι τα φυτοφάρμακα αντιμετωπίζονται απ' όλους μόνο από τη θετική τους πλευρά και οι βιομηχανίες φαρμάκων συναγωνίζονται μεταξύ τους για την παραγωγή νέων φυτοφαρμάκων με μεγαλύτερη δράση. Καμιά φωνή δεν ακούγεται για τυχόν επιπτώσεις και συνέπειες στην ανθρώπινη ζωή. Μόνο τα τελευταία χρόνια διατυπώνονται οι πρώτες ανησυχίες για τη δράση τους αφού σε ορισμένους τόπους, επιστήμονες ανακαλύπτουν και δημοσιεύουν αποτελέσματα ερευνών με τις οποίες διαπιστώνονται βλάβες στην υγεία του ανθρώπου και συγκεκριμένα στην αναπαραγωγική λειτουργία. Έτσι μερικά από τα πρώτα φυτοφάρμακα αποσύρονται από την κυκλοφορία στις σύγχρονες χώρες, εξακολουθούν όμως να κυκλοφορούν σε άλλες. (8) (9) (10)

Τα φυτοφάρμακα χωρίζονται σε κατηγορίες ανάλογα με τον οργανισμό – στόχο , ζωικό ή φυσικό , εναντίον του οποίου στρέφονται:

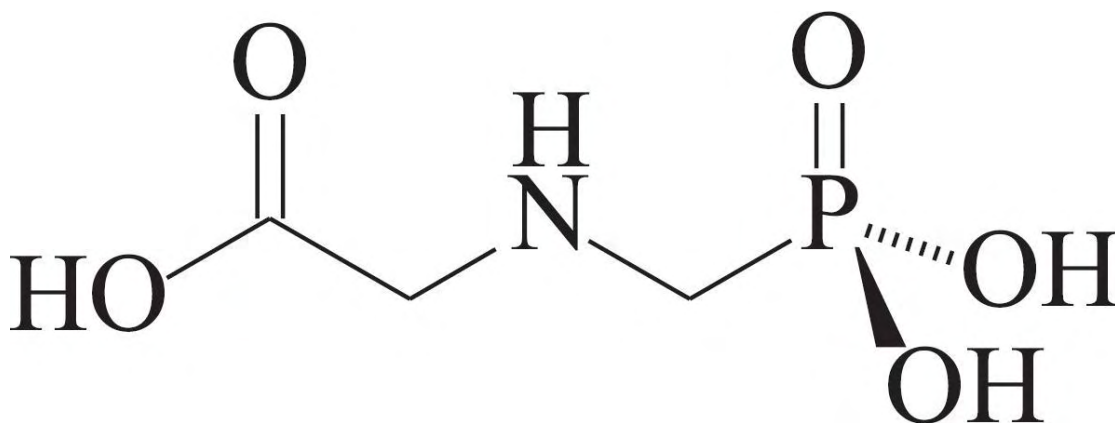
<b>ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΟ ΠΡΟΪΟΝ</b>	<b>ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ- ΣΤΟΧΟΣ</b>
Ζιζανιοκτόνα	Ζιζάνια
Εντομοκτόνα	Έντομα
Μυκητοκτόνα	Μύκητες
Ακαρεοκτόνα	Ακάρεα
Νηματοδοκτόνα	Νηματώδεις σκώληκες
Βακτηριοκτόνα	Βακτήρια
Μαλακιοκτόνα	Μαλάκια
Μυοκτόνα	Τρωκτικά
φυκοκτόνα	φύκη
Ιχθυοκτόνα	Ψάρια
Καμπιοκτόνα	Κάμπιες και άλλα είδη
πτηνοκτόνα	πτηνά

Εικόνα 1: Κατηγορίες φυτοφαρμάκων

## 1.2.2 ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΟ ROUNDUP

Το Roundup είναι το πρώτο σε πωλήσεις και αποτελεσματικότητα ευρέως φάσματος χημικό φυτοφάρμακο (ζιζανιοκτόνο) στον κόσμο. Το κύριο συστατικό του είναι το glyphosate ενώ περιλαμβάνει διάφορα αδρανή στοιχεία , όπως η διοξίνη και η polyoxyethylene (POEA) , αδρανή στοιχεία που αποτελεί το 15% του ζιζανιοκτόνου και το βοηθά να εισχωρήσει στις ρίζες των ζιζανίων. Ποσότητες του glyphosate έχουν βρεθεί τόσο στο έδαφος , στα νερά , στην ατμόσφαιρα καθώς και στα γενετικά τροποποιημένα τρόφιμα. Η σύνθεση του glyphosate έγινε για πρώτη φορά σε μια μικρή Ελβετική, φαρμακευτική εταιρία από τον Henri Martin, χωρίς όμως η χρήση του να προορίζεται για την καταπολέμηση ζιζανίων. Ο πρώτος που συνέθεσε και δοκίμασε το glyphosate ως ζιζανιοκτόνο ήταν ο John E. Franz της εταιρίας Monsanto, στις αρχές της δεκαετίας του 1970 όπου και πήρε άδεια κυκλοφορίας . Το 1974 το glyphosate διατέθηκε στην αγορά ως άλας ισοπροπυλαμίνης με την επωνυμία Roundup ως ένα μη εκλεκτικό ζιζανιοκτόνο φυλλώματος και από το 1995 συνοδεύει πακέτο τα περισσότερα είδη των γενετικά τροποποιημένων φυτών, τα γνωστά RR-Roundup Ready (ράουντ απ ρέτι) που έχουν την δυνατότητα όχι μόνο να μην επηρεάζονται από το ζιζανιοκτόνο αυτό αλλά και να το αφομοιώνουν. Έτσι, υπολείμματά του ευρίσκονται σε όλα τα προϊόντα των RR γενετικά τροποποιημένων φυτών με αποτέλεσμα να εισέρχονται στη διατροφική αλυσίδα, είτε ως συστατικά διαφόρων ειδών διατροφής, είτε ως ζωοτροφές , οπότε μέσω των ζωικών προϊόντων μπαίνουν στην ανθρώπινη διατροφή. Από τότε η χρήση του ακολούθησε κατακόρυφη ανοδική πορεία και η δημοτικότητα του αυξήθηκε σταθερά για πολλούς λόγους που έχουν να κάνουν κυρίως με τον τρόπο δράσης του, την μεγάλη αποτελεσματικότητά του, το περιβαλλοντικό του προφίλ κ.α. Σήμερα το glyphosate διατίθεται στην αγορά από διάφορες εταιρείες. Τα σκευάσματα που περιέχουν glyphosate είναι εγκεκριμένα σε περισσότερες από 130 χώρες για τον έλεγχο ζιζανίων σε περισσότερες από 100 καλλιέργειες. Κανένα άλλο ζιζανιοκτόνο δεν έχει τόσες εγκεκριμένες χρήσεις. Το glyphosate αποτελεί το αρχικό όνομα ενός ασθενούς οργανικού οξέος, το οποίο αποτελείται από τμήμα γλυκίνης και φωσφονομεθυλίου (phosphonomethyl). Το χημικό του όνομα είναι N-(phosphonomethyl)glycine. Ένας κοινός τύπος σκευάσματος glyphosate που χρησιμοποιείται ευρέως είναι το glyphosate 36% SL, το οποίο είναι πυκνό διάλυμα, που

περιέχει 36% β/ο σε δραστική ουσία (glyphosate υπό μορφή άλατος ισοπροπυλαμίνης) και 67,6% β/β βοηθητικές ουσίες. (11)



Εικόνα 2 : Χημική σύσταση του glyphosate

Το μοριακό του βάρος είναι 169,07 g/ mole . Το glyphosate έχει καθαρότητα  $\geq 80\%$ , αλλά γενικότερα η καθαρότητα του υπερβαίνει το 90%. Το Roundup είναι ένα υδατικό διάλυμα, ελαφρώς κίτρινο και με ελαφρά οσμή (αμίνης). Δεν αναφλέγεται και δεν εκρήγνυται. (12)

### 1.2.3 ΧΗΜΙΚΗ ΤΑΥΤΟΤΗΤΑ –ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

Το glyphosate είναι παράγωγο φωσφονικού οξέως και γλυκίνης (N- φωσφονομεθύλο-γλυκίνη ) με μεγάλη διαλυτότητα στο νερό (12 gr/l), αδιάλυτο σε πολλούς οργανικούς διαλύτες, είναι ασθενές οξύ που τυποποιείται υπό μορφή αλάτων και δεν είναι πτητικό. (13)

Στην παρακάτω εικόνα αναφέρονται ορισμένες από τις ιδιότητες του glyphosate. (14)

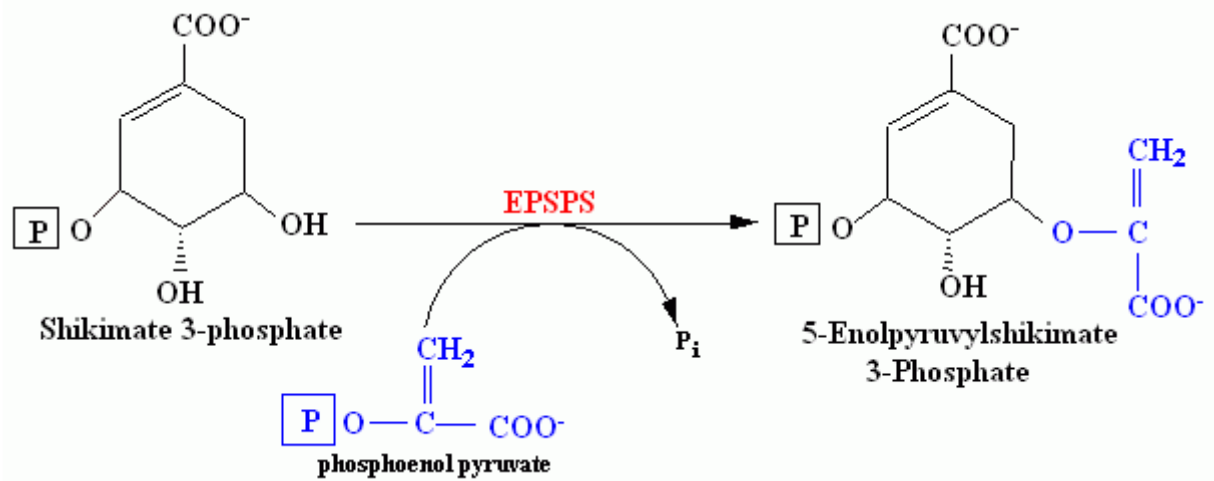
<b>Όνομα δραστικής ουσίας</b>	<b>Glyphosate</b>
<b>Μοριακός τύπος</b>	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> NO <sub>5</sub> P
<b>Μοριακό βάρος</b>	169,07
<b>Φυσική κατάσταση</b>	Κρυσταλλική σκόνη
<b>Χρώμα</b>	Λευκό
<b>Οσμή</b>	Καμία
<b>Σημείο τήξης</b>	184,5
<b>Σημείο βρασμού</b>	Decomposition (EC)
<b>Ειδική πυκνότητα</b>	1,704
<b>Πίεση ατμών</b>	<1*10 <sup>-5</sup> Pa
<b>Διαλυτότητα στο νερό</b>	10g/l
<b>Αναφλεξιμότητα</b>	Μη εύφλεκτο
<b>Εκρηκτικότητα</b>	Μη εκρηκτικό

Εικόνα 3 : Φυσικές και χημικές ιδιότητες του glyphosate

#### 1.2.4 ΤΡΟΠΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ GLYPHOSATE

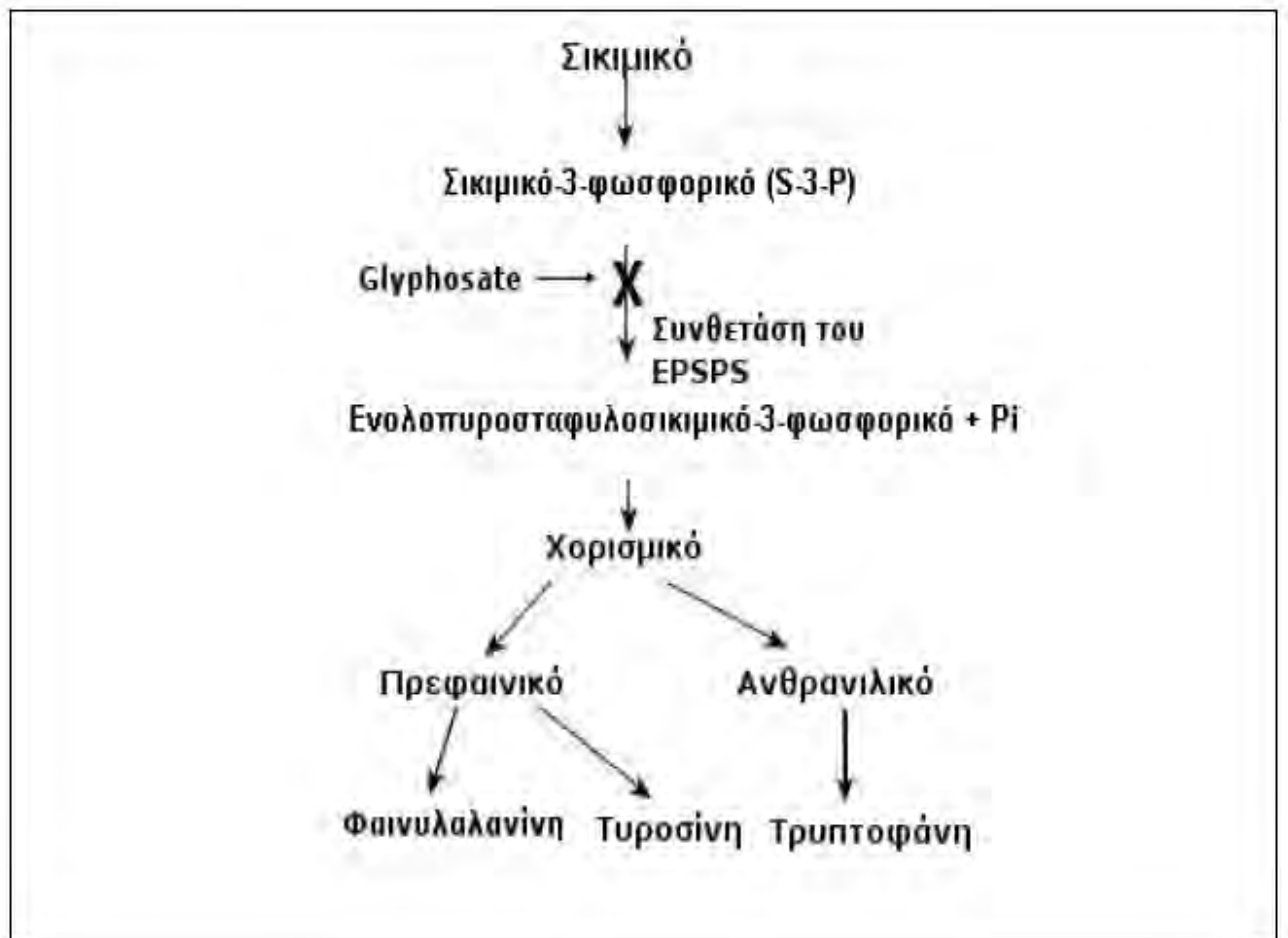
Το glyphosate ανήκει στην ομάδα των παρεμποδιστών της βιοσύνθεσης αρωματικών οξέων της οικογένειας των γλυκινών . Η δράση του βασίζεται στη αναστολή της σύνθεσης αρωματικών αμινοξέων. Πιο συγκεκριμένα απενεργοποιεί το ένζυμο συνθετάση του 5-

Ενολοπυρουβιλσικιμικού -3-φωσφορικού οξέως (EPSP Synthase) με την προσκόλληση του στο ένζυμο αυτό. Η απενεργοποίηση του ενζύμου EPSPS έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της σύνθεσης EPSP (χορισμικό οξύ), το οποίο αποτελεί πρόδρομη ουσία σε πολλά μονοπάτια βιοσύνθεσης συστατικών των κυττάρων όπως των αρωματικών αμινοξέων τρυπτοφάνη, τυροσίνη και φαινυλανίνη. Το glyphosate δεν αναστέλλει απλώς τη βιοσύνθεση των αρωματικών αμινοξέων αλλά και μιας πληθώρας άλλων σημαντικών ουσιών για την λειτουργία και επιβίωση των κυττάρων. Το σικιμικό μονοπάτι βιοσύνθεσης ανήκει μόνο στα φυτά και στους μικροοργανισμούς. Επομένως αυτός είναι ο λόγος που το glyphosate επηρεάζει μόνο φυτά, ορισμένα βακτήρια και μύκητες και θεωρείται σχετικά ασφαλές για τα θηλαστικά και τα ψάρια, δεδομένου ότι ο μηχανισμός στον οποίο παρεμβαίνει δεν απαντάται σε αυτά. (15)



Εικόνα 4 : Η απενεργοποίηση του ενζύμου EPSPS



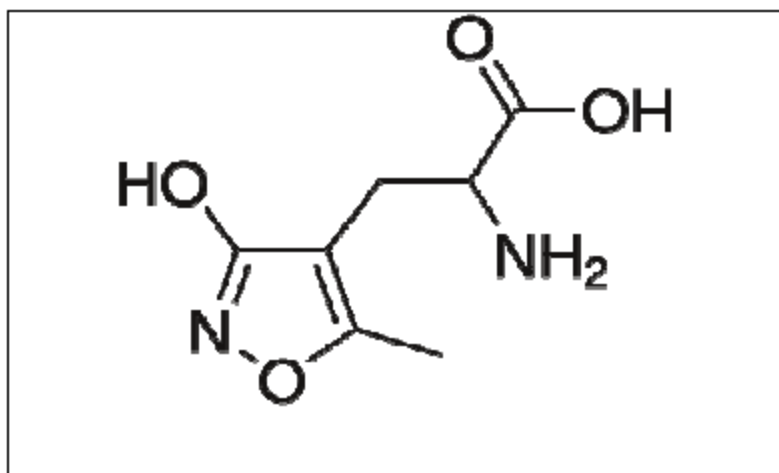


Εικόνα 5 : Τρόπος δράσης του glyphosate .Σχηματική απεικόνιση της μεταβολικής οδού του σικιμικού στη βιοσύνθεση των αρωματικών αμινοξέων τρυπτοφάνη , τυροσίνη και φαινυλαλανίνη και των σημείων παρεμπόδισης της

### 1.2.5 ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ ΤΟΥ GLYPHOSATE

Ο κύριος μεταβολίτης του glyphosate είναι το AMPA (αμινομεθυλο - φωσφονικό οξύ). (15) Στους ανθρώπους , μόνο μικρές ποσότητες (1-2%) του glyphosate μεταβολίζονται προς AMPA ( υπάρχουν ενδείξεις ότι έχει επιπτώσεις στην υγεία των ζώων και την ανθρώπινη υγεία και το περιβάλλον) και το υπόλοιπο που απορροφάται παραμένει αμετάβλητο και μπορεί να διανέμεται και να εισέρχεται στην κυκλοφορία του αίματος και στους ιστούς και τελικά να

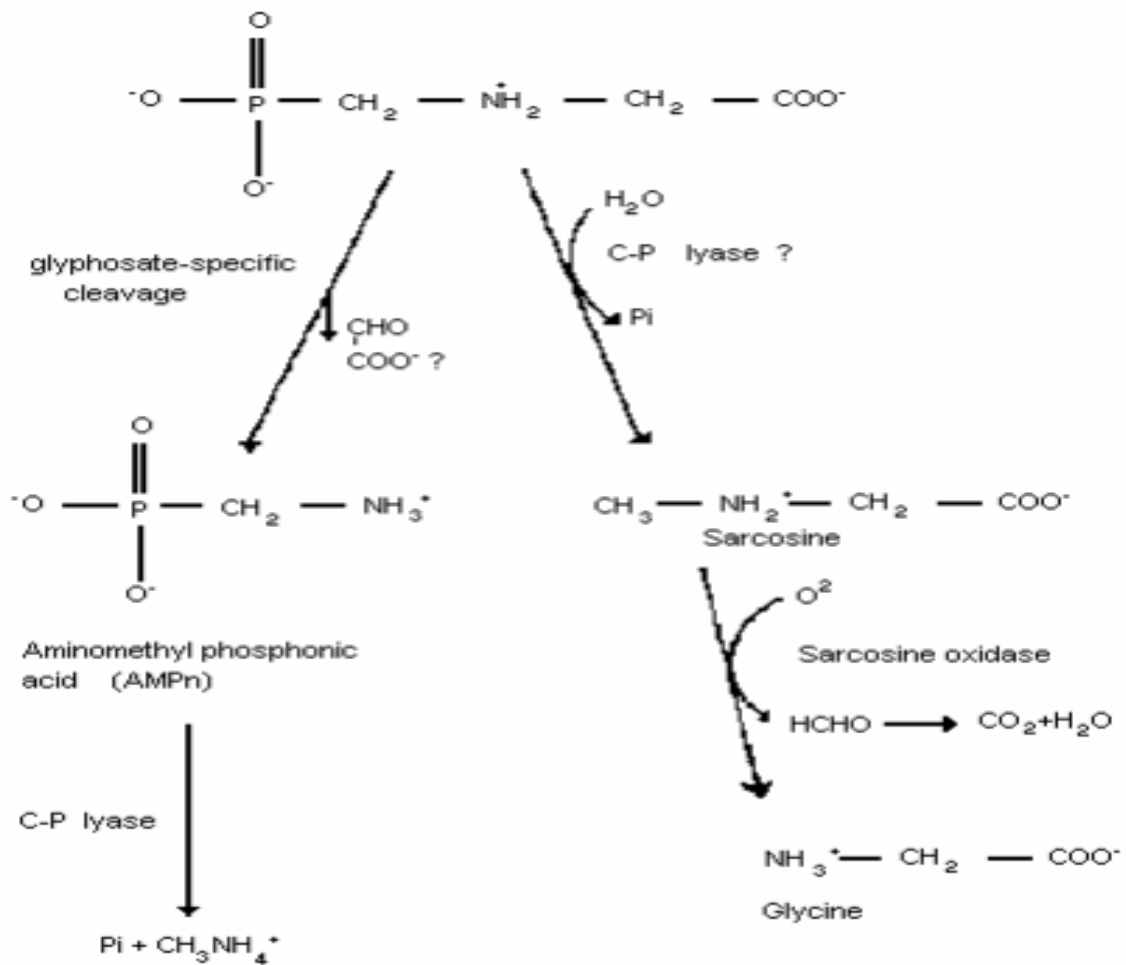
αποβάλλεται μέσω των ούρων. Κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης είναι σε θέση να διαπεράσει τον πλακούντα. (16)



Εικόνα 6 : Χημική δομή του AMPA

Πολλοί ερευνητές υποστηρίζουν την άποψη ότι η αποικοδόμηση του glyphosate στο έδαφος θεωρείται κατά βάση μια καθαρά μικροβιακή διαδικασία. Ακόμα πολλοί εδαφικοί παράγοντες (τύπος εδάφους, pH, θερμοκρασία) επηρεάζουν την αποικοδόμηση και τον ρυθμό της. Το glyphosate είναι δυνατόν να αποικοδομηθεί στο έδαφος από διάφορα είδη βακτηρίων με δύο τρόπους. Η μία διαδρομή είναι μέσω του σχηματισμού του AMPA, κατά την οποία το πρώτο βήμα αποτελεί η διάσπαση του δεσμού C-N. (14) Ωστόσο αυτή η οδός είναι παρούσα σε βακτήρια του εντέρου, τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο και μέχρι τώρα είχαν αγνοηθεί σε μεγάλο βαθμό στην ανθρώπινη φυσιολογία. Εκτός από τη βοήθεια της πέψης, η μικροχλωρίδα του εντέρου συνθέτει βιταμίνες, αποτοξινώνει ξενοβιοτικές ουσίες και συμμετέχει στην ομοιόσταση του ανοσοποιητικού συστήματος. Η άλλη διαδρομή είναι μέσω του σχηματισμού μεθυλιωμένης γλυκίνης (N-methyl - glycine) γνωστής με το όνομα σαρκοσίνη και ορθοφωσφορικού οξέως και στην συνέχεια ο σχηματισμός γλυκίνης και μιας μονο-ανθρακικής ομάδας, που τελικά μπορεί να σχηματίσει CO<sub>2</sub>. Σε αυτή την διαδρομή το πρώτο βήμα είναι η διάσπαση του δεσμού C-P. Μέχρι τα μέσα της δεκαετίας του 1980 υπήρχε η αντίληψη ότι το AMPA είναι ο κύριος μεταβολίτης του glyphosate. Ωστόσο το 1986 έγινε η απομόνωση ενός βακτηρίου *Pseudomonas* το οποίο είχε την ικανότητα να διασπάσει

το glyphosate μέσω της διαδρομής σχηματισμού της σαρκosίνης, η οποία διαδρομή προτάθηκε ως μοναδική σε αυτό το βακτήριο . Σήμερα είναι γνωστό ότι υπάρχουν πολυάριθμα είδη μικροοργανισμών του εδάφους όπως διάφορα βακτήρια, ορισμένοι μύκητες (actinomycetes) και μικροοργανισμοί αγνώστων στοιχείων που είναι σε θέση να διασπάσουν το glyphosate. (17) (18)



Εικόνα 7 : Το μονοπάτι της αποικοδόμησης του glyphosate στο έδαφος.

Εκτός από την παρουσία του glyphosate στο έδαφος διεθνή δεδομένα αναφέρουν ότι υπολείμματα glyphosate έχουν ανιχνευθεί σε δείγματα επιφανειακών νερών καθώς και στην ατμόσφαιρα.

## 1.2.6 ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ROUNDUP ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

Το Roundup αποδείχθηκε ότι όχι μόνο δεν είναι ασφαλές για την υγεία των ανθρώπων, αλλά όλες τις βασικές κατηγορίες τοξικολογικών εξετάσεων που ακολουθούσαν μετά από κάθε έρευνα, έδειξαν μεσοπρόθεσμη και μακροπρόθεσμη τοξικότητα. Συγκεκριμένα φάνηκε ότι προκαλεί : γενετική βλάβη (τερατογενέσεις) , προβλήματα στην αναπαραγωγή, που μπορεί να περιλαμβάνουν και αποβολές, καρκινογένεση , άμεσα ορατά προβλήματα υγείας όπως αναπνευστικά, γαστρεντερικά , ταχυκαρδία , ναυτία , έμετο, υψηλή πίεση , παχυσαρκία, διαβήτης, ευαισθησία στα μάτια, δερματοπάθειες, προβλήματα στο καρδιαγγειακό σύστημα , νεφρική ανεπάρκεια , σπασμούς, non-Hodgkin's lymphoma κ.α. (11) (19) Τα τυπικά συμπτώματα είναι διάβρωση του γαστρεντερικού συστήματος και γαστρεντερική αιμορραγία. Τα υπόλοιπα όργανα προσβάλλονται λιγότερο συχνά (πνεύμονες 23%, ήπαρ19%, καρδιαγγειακό σύστημα18%, νεφρό14%). Σε σπάνιες περιπτώσεις έχει προκληθεί θάνατος ώρες μετά την κατάποση και η ποσότητα του αδιάλυτου Roundup στις περιπτώσεις αυτές ήταν από 85 έως 200 ml. Γενικά, μέτρια συμπτώματα παρατηρούνται σε δόσεις 20 έως 500 ml, ήπια συμπτώματα με 5 έως 150 ml και καθόλου συμπτώματα με 5 έως 50 ml. (20) Στην παρακάτω εικόνα καταγράφονται συνοπτικά διάφορες μελέτες (οι περισσότερες σε ανθρώπους), όπου μας δείχνουν τις επιδράσεις του glyphosate σε διάφορες συγκεντρώσεις. (21)

Author	Species (cells)	Product	Time	Dose (mg/L)	Result
(Walsh et al., 2000)	Mouse (Leydig MA-10)	R/G	2 h	10–100	Steroidogenesis disruption through a post-transcriptional reduction in STAR protein expression ↳ (Bu) <sub>2</sub> cAMP-stimulated progesterone production (steroidogenesis disruption) for R not G from 25 mg/L; ↳ activation of P450 <sub>17</sub> enzyme activity and 3 $\beta$ -HSD mRNA levels; ↑ STAR transcription and ↳ STAR protein expression distal to PKA activation. Antagonist effects in mixtures
(Aveirad et al., 2003)	Mouse (NB2a neuroblastoma cells)	R/G	24 h	See right	Neurotoxicity: ↳ of neurite outgrowth for G at 268 and for R at 1.6 mg/L G + adjuvants
(Géhin et al., 2005)	Human (HaCat)	R/G	24–48 h	1690–4000	Cytotoxicity: IC <sub>50</sub> of G and R: 3700 and 3295 mg/L respectively (24 h); Protective effects of vitamin C and E
(Peixoto, 2005)	(Rat) liver mitochondria	R/G	5 min	85–2535	Cytotoxicity: ↳ mitochondrial respiration (≥ 85 mg/L for R, no effects for G); ↳ energization and phosphorylation capacities of mitochondria (≥ 169 mg/L for R, not for G); ↳ complex II and III, ATPase, ATPsynthase activities but not complex IV; No effects on mitochondrial swelling; non-specific mitochondrial membrane permeabilization by R
(Potti and Sehgal, 2005)	Human (prostate epithelial cell line PZ-7)	R/G	3 d	0.2	Carcinogenesis: R ↑ urokinase plasminogen activator protein expression, not G. Combined effects with another pesticide
(Richard et al., 2005)	Human (JEC3, placental human) and testicular equine microsomes	R/G	1 h	10–20,000	Cytotoxicity: IC <sub>50</sub> of JEC3 (1 h) in serum-free medium, for R and G respectively 0.7 and ≥ 2% Endocrine disruption in JEC3: aromatase activity ↑ in 1 h and ↳ in 18 h with R (≥ 100 ppm), no effects of G; ↳ Aromatase mRNA (≥ 200 ppm in 18 h); In microsomes competitive inhibition (≥ 500 ppm for R and 5000 ppm for G); Spectral evidence of a direct interaction with the heme of aromatase; Inhibition of reductase (IC <sub>50</sub> of 5% R)
(Géhin et al., 2006)	Human (HaCat)	R 3plus/G	24–48 h	1690–3380	Oxidative stress: ↳ GSH levels (from 1690 mg/L, more with R than G); C55G-Reductase ↑ with 1690 mg/L R; ↑ GSH-Px for high doses; ↳ catalase for 2535 mg/L G more than with R; ↑ SOD G at 1690 mg/L more than with R; ↑ TBARS; Protective effect of Vitamin C and E
(Chan et al., 2007)	Rat	GlyBH(G)/Adjuvants	20 min	169	Cardioxicity: Inhibition of the twitch tension (GlyBH and adjuvants) and vasorelaxative effects of rat aorta (GlyBH and G, but more for GlyBH)
(Martinez et al., 2007)	Human (peripheral blood mononuclear cell)	R/G	24 h-96 h	0–2000	Cytotoxicity: IC <sub>50</sub> of 56.4 mg/L of G in the form of R and 1640 mg/L for G (24 h).
(Benachour et al., 2007)	Human (JEC3, HEK293, microsomes)	R Bioforce/G	1–48 h	10–20,000	Cytotoxicity: Time dependent ↑ of toxicity (HEK293: LD50 of 0.3% in 1 h to 0.06% in 72 h); Differential toxicity R/G; Effects delayed by 48 h with serum; Endocrine disruption: ↳ Aromatase activity (HEK293, 24 h, ≥ 0.01%); No influence of pH but of temperature; For human placental or equine testicular microsomes, IC <sub>50</sub> of 30,000–40,000 mg/L of R. Effects from 0.5% (R or G) or human placental microsomes
(Benachour and Séralini, 2009)	Human (JEC3, HEK293, HUVEC)	R/G/AMPA/POEA	6–24 h	1–20,000	Cytotoxicity: Different cytotoxic effect from 20 ppm in 24 h, always more than G; R target the membrane, G mainly cytotoxic by apoptosis at higher levels. AMPA is cytotoxic and the adjuvant is the major toxicant. Combined synergistic effects of the formulations constituents. Fresh HUVEC cells are very sensitive to apoptosis induced by G
(Gasnier et al., 2009)	Human (HepC2, Transfected MDA-MB453-kb2)	R/G	24–48 h	0.25–20000	Cytotoxicity: Differential cytotoxic effect from 5 ppm in 24 h. ↑ Apoptosis (60 ppm). Endocrine disruption: ↳ Aromatase activity, ↳ Androgen Receptor mRNA (≥ 0.5 ppm) and Estrogen Receptors mRNA (≥ 2 ppm). Genotoxicity ↑ DNA Strand break (>5 ppm).

Εικόνα 8 : Επιδράσεις του Roundup και του glyphosate σε διάφορα είδη, σε διαφορετικές κυτταρικές σειρές

### 1.2.7 ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ROUNDUP ΣΤΟ ΑΡΣΕΝΙΚΟ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

Η έκθεση σε glyphosate έχει συνδεθεί με προβλήματα στην αναπαραγωγική ικανότητα. Βέβαια ο αριθμός των μελετών που συσχετίζει τις επιδράσεις του Roundup με την ανδρική αναπαραγωγή είναι πολύ μικρός και ακόμη δεν έχουν μελετηθεί στον άνθρωπο. Όλες οι μελέτες που θα αναφέρουμε λοιπόν παρακάτω αφορούν διάφορα είδη όπως αρουραίους, κουνέλια , ψάρια κτλ.

Μια μελέτη αναφέρει πως η θειϊκή χοληστερόλη που παίζει ουσιαστικό ρόλο στη γονιμοποίηση και ο ψευδάργυρος που είναι απαραίτητος για το ανδρικό αναπαραγωγικό σύστημα , βρίσκονται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στο σπέρμα. Η έκθεση σε glyphosate μειώνει τη βιοδιαθεσιμότητα αυτών των δύο θρεπτικών συστατικών , με αποτέλεσμα τη δημιουργία προβλημάτων υπογονιμότητας. (16)

Τα κύτταρα Leydig στους όρχεις παράγουν TESTO και παίζουν κρίσιμο ρόλο στην ανδρική αναπαραγωγική λειτουργία. Η πρωτεΐνη StAR αποτελεί σημαντικό βήμα στη στεροειδογένεση. Σε μια πρόσφατη μελέτη *in vitro* σε αρουραίους, σε όγκο κυτταρικής σειράς Leydig , το φυτοφάρμακο Roundup φάνηκε να διαταράσσει την έκφραση της StAR πρωτεΐνης μετά από 2ωρη έκθεση στο φυτοφάρμακο (25ppm), παρεμβαίνοντας έτσι στην παραγωγή της TESTO. Δείχθηκε λοιπόν ότι το Roundup παρεμβαίνει στη σύνθεση της TESTO ακόμη και σε πολύ χαμηλές δόσεις περιβάλλοντος και οι υψηλότερες δόσεις συσχετίστηκαν με νέκρωση και απόπτωση σε κύτταρα όρχεων αρουραίων. Επίσης διαπιστώθηκε ότι το Roundup διαταράσσει μοναδικά την ικανότητα των κυττάρων να παράγουν προγεστερόνη. (22)

Για τη στεροειδογένεση , εκτός από την πρωτεΐνη StAR απαιτείται επίσης το ένζυμο διάσπασης πλευρικής αλυσίδας (P450<sub>sc</sub>). Οι συγγραφείς διαπίστωσαν ότι το Roundup

ανέστειλε τη δραστηριότητα του P450sc<sub>c</sub> όσο και της StAR. Μέσω τυπικών μετρήσεων αποδείχθηκε ότι τα επίπεδα της StAR μειώνονται κατά 90%, ενώ του P450sc<sub>c</sub> κατά 71%. Η πρωτεΐνη StAR διαδραματίζει έναν σημαντικό ρόλο στην παραγωγή στεροειδών όχι μόνο στα αναπαραγωγικά όργανα , αλλά και στα επινεφρίδια. Έτσι η έκθεση σε Roundup θα αναμενόταν να επηρεάζει αρνητικά τη γονιμότητα και να βλάπτει τη σύνθεση των γλυκοκορτικοειδών και αλατοκορτικοειδών στα επινεφρίδια. (23)

Σε in vivo μελέτη , η χορήγηση glyphosate σε κύτταρα όρχεων ενήλικων αρουραίων (5mg/kg σωματικού βάρους/μέρα) διαταράσσει τα επίπεδα του ενζύμου της αρωματάσης. (24) Στο ίδιο στέλεχος αρουραίων , η χορήγηση 0,5mg/l Roundup είχε ως αποτέλεσμα την αναστολή της μεταγραφικής δραστηριότητας των ανδρογονικών και των οιστρογονικών υποδοχέων . Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται σε οξειδωτικό στρες και έτσι να προκαλεί κυτταρικό θάνατο των κυττάρων Sertoli σε όρχεις προεφηβικών αρουραίων. Οι συγγραφείς πρότειναν ότι το Roundup προκάλεσε υπερφόρτωση των Ca<sup>2+</sup> και απορρύθμιση της κυτταρικής σηματοδότησης. Η κυτταρική αντίδραση στο στρες και οι εξαντλημένες αντιοξειδωτικές άμυνες θα μπορούσαν να επηρεάσουν την σπερματογένεση και έτσι την ανδρική γονιμότητα. (25)

Ο Yousef κ.ά. ανέφεραν ότι η έκθεση σε glyphosate σε άσπρα κουνέλια Νέας Ζηλανδίας προκάλεσε διαταραγμένα χαρακτηριστικά σπέρματος, όπως μειωμένο όγκο εκσπερμάτισης, συγκέντρωση, αρχικά επίπεδα φρουκτόζης καθώς και μειωμένη οσμωτικότητα σπέρματος. Η μελέτη επίσης ανέφερε και αύξηση των ανώμαλων και νεκρών σπερματοζωαρίων. (26) Τα αποτελέσματα της παραπάνω μελέτης φαίνονται στην παρακάτω εικόνα.

**TABLE 7.** Overall Mean Semen Characteristics of New Zealand White Rabbits Treated Orally With A Glyphosate-Based Formulation (Yousef et al. 1995)

Dose	Body weight (kg)	Semen volume (ml)	Sperm conc. ( $\times 10^4$ /cc)	Abnormal sperm (%)	Dead sperm (%)	Methylene blue reduction time (min)	Initial fructose (mg/100 ml)	Semen osmolality
Pretreatment period								
0	2.944 $\pm$ 0.030	0.88	264	9.4	6.6	5.07	337	248
1/100 LD <sub>50</sub>	2.979 $\pm$ 0.060	0.83	265	9.7	6.4	5.22	324	255
1/10 LD <sub>50</sub>	3.173 $\pm$ 0.050*	0.88	262	10.3	6.5	5.07	336	253
Treatment period								
0	3.008 $\pm$ 0.020	0.83	413	12.5	8.9	3.53	359	283
1/100 LD <sub>50</sub>	2.811 $\pm$ 0.060*	0.6*	242*	21.9*	19.5*	6.54*	281*	252*
1/10 LD <sub>50</sub>	3.125 $\pm$ 0.030	0.62*	262*	22.6*	21.4*	7.26*	267*	261*
Recovery period <sup>^</sup>								
0	3.108 $\pm$ 0.010	0.82	596	20.4	4.1	3.48	312	278
1/100 LD <sub>50</sub>	2.816 $\pm$ 0.070*	0.68*	473*	25.7*	6.2	5.0*	298	284
1/10 LD <sub>50</sub>	3.368 $\pm$ 0.020*	0.73*	467*	24.1*	7.5*	5.29*	297	278

#### Εικόνα 9 : Αποτελέσματα της μελέτης του Yousef et al

Μια ακόμη μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε ενήλικους αρουραίους έδειξε ότι μετά από έκθεση σε glyphosate αυξάνονται τα επίπεδα του ενζύμου της αρωματάσης . Αυτό υποδηλώνει μια αύξηση στην οιστραδιόλη , η οποία δρα μέσω των υποδοχών όπως οι Gper1 ( ρυθμίζουν και αυτοί τη διαδικασία της σπερματογένεσης, η έκφραση τους ανιχνεύεται σε παχυνταίνια σπερματοκυττάρων και σε στρόγγυλες σπερματίδες) που χρησιμοποιούν το μη γενωμικό μονοπάτι. (27) Επιπλέον , η αύξηση της έκφρασης της occludin και της connexin 43 έχει ως αποτέλεσμα την αλλοίωση τόσο της μορφολογίας του σπέρματος όσο και της πυρηνικής ποιότητας . (24) (28)

Βρέθηκε ακόμη σε αρουραίους ότι η έκθεση της μέλλουσας μητέρας σε glyphosate (50mg/kg σωματικού βάρους/μέρα) διαταράσσει τη διαδικασία της αρρενοποίησης και προωθούνται αλλαγές συμπεριφοράς , καθώς και ιστολογικά και ενδοκρινολογικά προβλήματα , με συνέπειες για τις αναπαραγωγικές παραμέτρους των απογόνων. (29) (30) Με την παρακάτω εικόνα διακρίνονται καθαρά τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης.



**TABLE 9.** Effects of In Utero and Lactational Roundup Exposure on Sperm Production-Related Parameters (Dallegrave et al. 2007)

Dose (mg/kg/d)	Daily sperm production ( $\times 10^6$ )	Number of sperm ( $\times 10^6$ )	Sperm transit rate (d)	Abnormal sperm (%)	Tubules with spermatogenesis (%)	Tubule diameter ( $\mu\text{m}$ )	Testosterone level (ng/ml)
Puberty (65 d of age)							
0	11.1	44.2	4.1	8.6	84	166.7	5.2
50	12.2	53.9	4.6	16.7*	77	159.6	4
150	12.1	67.2	5.3	9.2	78.7	159.6	3.2
450	11.7	57.4	5.1	11.6	75	160.4	1.5*
Adulthood (140 d of age)							
0	20.5	344.7	17.7	5.4	92	180.8	3.9
50	15.3*	251.0*	17.5	8.3	73.5	187.3	3.4
150	19.7	368.7	20.2	8.4	74.5	173.4	6.3
450	14.7*	257.1*	18.5	7.7	65	185.1	3.3

Εικόνα 10 : Αποτελέσματα της μελέτης του Dallegrave et al. 2007

Τα ευρήματα μιας μελέτης στο είδος *P. Vinipara* έδειξαν ότι, όταν εκτίθενται στο φυτοφάρμακο Roundup το σπέρμα τους επηρεάζεται αρνητικά, καθώς μειώνεται η ακεραιότητα της μεμβράνης πλάσματος του σπέρματος, η λειτουργικότητα των μιτοχονδρίων, η ακεραιότητα του DNA καθώς μειώνεται και η κινητικότητα του σπέρματος. Το ίδιο αποτέλεσμα παρατηρήθηκε σε αρσενικά ψάρια, τα οποία εκτίθενται στην υψηλότερη συγκέντρωση του φυτοφαρμάκου που δοκιμάστηκε (700 $\mu\text{g/l}$ ). (31) Αυτή η συγκέντρωση προκάλεσε επίσης μια μικρή αλλά όχι σημαντική αύξηση στην πυκνότητα των σπερματικών κυττάρων, η οποία θα μπορούσε να είναι μια απάντηση στην πτωχότερη ποιότητα σπέρματος. (32)

Σε μια τελευταία μελέτη σε αρουραίους Wistar, χορηγήθηκε μέσω του στόματος 5mg/k glyphosate 3 φορές την εβδομάδα για 52 μέρες. Αυτή η περίοδος επιλέχθηκε επειδή αντιστοιχεί στενά με τη διάρκεια του κύκλου της σπερματογένεσης στους αρουραίους. (33) Δεν παρατηρήθηκε όμως σημαντική διαφορά στο βάρος του ήπατος, των όρχεων, του προστάτη και των σπερματοδόχων κυστιδίων. Επίσης δεν παρατηρήθηκε μεγάλη μεταβολή στα επίπεδα των ορμονών LH, FSH στο πλάσμα καθώς και της δραστηριότητας της 3 $\beta$ -υδροξυστεροειδική αφυδρογονάση στους όρχεις. Όμως διαπιστώθηκε πως η έκθεση σε glyphosate προκαλεί σημαντική μείωση στον αριθμό των σπερματοζωαρίων στην επιδιδυμίδα, στους όρχεις, στην κινητικότητα του σπέρματος καθώς και στην αναλογία

ζωντανών / νεκρών σπερματοζωαρίων. Τα γεγονότα αυτά είναι αποτέλεσμα του χαμηλού επιπέδου της τεστοστερόνης. (34) (35) Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής διακρίνονται συνοπτικά στην παρακάτω εικόνα.

Table 5. Effects of combined exposure to atrazine (ATZ) and glyphosate (GLY) on sperm parameters of male Wistar rats.

Variable	Control	ATZ	GLY	ATZ + GLY
Sperm counts per epididymides ( $\times 10^7$ )	115.2 $\pm$ 12.5	80 $\pm$ 7.8*	64.3 $\pm$ 8.2**	89.8 $\pm$ 14*
Sperm counts per testis ( $\times 10^7$ )	33.5 $\pm$ 5	21.3 $\pm$ 2.5*	19.3 $\pm$ 2.2*	20.8 $\pm$ 2.5*
DSP ( $\times 10^6$ )	5.2 $\pm$ 0.5	3.6 $\pm$ 0.8*	3.1 $\pm$ 0.4*	3.4 $\pm$ 0.4*
DSP/g testis ( $\times 10^6$ )	3.8 $\pm$ 0.6	2.2 $\pm$ 0.3*	2.7 $\pm$ 0.5*	2.4 $\pm$ 0.4*
Live/dead ratio, %	97.4 $\pm$ 1.34	85 $\pm$ 4.08*	66.1 $\pm$ 11.1**	87.5 $\pm$ 6.5*
Total abnormal sperms, %	10.2 $\pm$ 1.1	13.8 $\pm$ 0.9*	13.6 $\pm$ 0.9*	14.1 $\pm$ 0.7*
Sperm motility, %	86 $\pm$ 14.8	45 $\pm$ 5.8*	30 $\pm$ 11.6**	53 $\pm$ 14.1*

Εικόνα 11 : Αποτελέσματα της μελέτης του Sunny et al

## **2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **2.1 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΑΣΘΕΝΩΝ**

Για την παρούσα εργασία μελετήθηκαν 66 δείγματα από άνδρες που συμμετείχαν σε συμβατικούς κύκλους εξωσωματικής γονιμοποίησης, στη Μονάδα Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας για τη συλλογή σπέρματος καθώς και για τη λήψη ιστορικού. Πάνω σ' αυτά τα δείγματα πραγματοποιήθηκε και η συγκεκριμένη διπλωματική εργασία.

Γενικά ο τρόπος λήψης του σπέρματος είναι ιδιαίτερα σημαντικός ώστε το σπέρμα να αξιολογηθεί σωστά και να γίνει η κατάλληλη επεξεργασία του στο ανδρολογικό εργαστήριο. Για να διατηρήσει το σπέρμα τα χαρακτηριστικά του και την πλήρη γονιμοποιητική του δυνατότητα χωρίς επιμολύνσεις ή απώλειες, πρέπει να υπάρχει αποχή από σεξουαλική επαφή ή εκσπερμάτιση από μία μέχρι τέσσερις μέρες. Η λήψη του σπέρματος θα πρέπει να γίνεται στον ειδικά διαμορφωμένο χώρο που υπάρχει στο ανδρολογικό εργαστήριο, μηχανικά με αυνανισμό σε ένα αποστειρωμένο δοχείο. Μετά τη συλλογή του σπέρματος, αφού έχει ρευστοποιηθεί (χρόνος ρευστοποίησης 20-60 λεπτά), πραγματοποιείται το σπερμοδιάγραμμα (ανάλυση σπέρματος). (1) Η γενική εξέταση του σπέρματος περιλαμβάνει:

- Τη μακροσκοπική εκτίμηση, κατά την οποία ελέγχονται ο όγκος του δείγματος, ο χρόνος ρευστοποίησης, το pH, η χροιά και η γλοιότητα του σπέρματος.
- Τη μικροσκοπική εκτίμηση του σπέρματος, με την οποία εκτιμώνται:
  1. Ο αριθμός (συγκέντρωση) των σπερματοζωαρίων (εκφράζεται σε εκατομμύρια/ml).
  2. Η κινητικότητα των σπερματοζωαρίων, η οποία αξιολογείται σε τρεις βαθμίδες, προωθητική κίνηση (PRM-progressive motility), μη προωθητική κίνηση (NPM-non progressive motility) και σε ακινησία (IM-immotility).
  3. Η μορφολογία των σπερματοζωαρίων (κεφαλής, αυχένα, ουράς) με καταγραφή του δείκτη πολλαλών ατυπιών.
  4. Ο αριθμός των λευκών αιμοσφαιρίων.

Σύμφωνα με τα κριτήρια που έχει θεσπίσει ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO), τα χαρακτηριστικά του φυσιολογικού σπέρματος αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα (36):

<b>Πίνακας 2: Κατώτερες τιμές αναφοράς (5th centiles and their 95% confidence intervals) για τα χαρακτηριστικά του σπέρματος</b> (WHO Manual for Semen Analysis, 5th edn, 2010)	
<b>Παράμετρος</b>	<b>Κατώτερες τιμές αναφοράς</b>
Όγκος (mL)	1,5 (1,4-1,7)
Ολικός αριθμός σπερματοζωαρίων (10 <sup>6</sup> ανά εκσπερμάτιση)	39 (33-46)
Συγκέντρωση σπέρματος (10 <sup>6</sup> ανά mL)	15 (12-16)
Συνολική κινητικότητα (προοδευτική και μη-προοδευτική, %)	40 (38-42)
Προοδευτική κινητικότητα (%)	32 (31-34)
Βιωσιμότητα (ζωντανά σπερματοζώαρια, %)	58 (55-63)
Μορφολογία (φυσιολογικές μορφές, %)	4 (3,0-4,0)
<i>Άλλες κατ' ομοφωνία κατώτερες τιμές</i>	
pH	> 7,2
Περοξιδάση – θετικά λευκοκύτταρα (10 <sup>6</sup> per mL)	< 1,0
MAR test (κινητά σπερματοζώα με δεσμευμένα σωματίδια, %)	< 50
Immunobead test (κινητά σπερματοζώα με δεσμευμένα σωματίδια, %)	< 50
Ψευδάργυρος σπέρματος (μmol/εκσπερμάτιση)	> 2,4
Φρουκτόζη (μmol/ εκσπερμάτιση)	> 13
Ουδέτερη γλυκοσιδάση (mU/εκσπερμάτιση)	> 20

Εικόνα 12 : Φυσιολογικές παράμετροι σπέρματος

## 2.2 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΟΥ (ROUNDUP)

Με βάση τις βιβλιογραφικές αναφορές οι οποίες αναφέρονται σε ποντίκια, κουνέλια και ψάρια και έπειτα από πολλές δοκιμές βρέθηκε η μικρότερη συγκέντρωση του φυτοφαρμάκου Roundup που θα μπορούσε να επηρεάσει τα *in vitro* δείγματα σπέρματος. Η αρχική συγκέντρωση του φυτοφαρμάκου stock ήταν 10 ppm , έπειτα όμως με κατάλληλες αραιώσεις η τελική συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε ήταν 1ppm (part per million).

## 2.3 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Μετά τη συλλογή του κάθε σπέρματος και αφού γίνει η ρευστοποίηση του, πραγματοποιείται η μικροσκοπική ανάλυση του (εκτίμηση συγκέντρωσης , κινητικότητας σπερματοζωαρίων). Αρχικά από όλο το δείγμα του σπέρματος , η ποσότητα που απαιτείται για τη μελέτη είναι 0,5ml . Γι' αυτό το λόγο ακριβώς σ' ένα νέο erpendorf όπου αναγράφεται το όνομα του άνδρα μεταφέρεται η συγκεκριμένη ποσότητα. Στη συνέχεια πραγματοποιείται φυγοκέντρηση του δείγματος σε 1300 rpm για 10' λεπτά έτσι ώστε να μετακινηθούν όλα τα σπερματοζωάρια στο ίζημα και το πλάσμα στο υπερκείμενο. Μόλις τελειώσει η φυγοκέντρηση του δείγματος απομακρύνεται το υπερκείμενο και παραμένει το ίζημα μέσα στο erpendorf. Αφού πλέον έχουν απομονωθεί τα σπερματοζωάρια , τοποθετείται το φυτοφάρμακο με τελική συγκέντρωση 1ppm . Μετά το πέρας μίας ώρας πραγματοποιείται ξανά μικροσκοπική εκτίμηση του σπέρματος (κινητικότητα) για να διαπιστωθούν τυχόν επιδράσεις του φυτοφαρμάκου Roundup. Το ίδιο βήμα επαναλαμβάνεται μετά από δύο ώρες, δηλαδή 3 ώρες μετά από τη χορήγηση του φυτοφαρμάκου.

Παρακάτω φαίνεται σχηματικά το πειραματικό κομμάτι της παρούσης διπλωματικής εργασίας.



Προσθήκη  
0,5ml σπέρματος



Φυγοκέντρηση  
στις 1300 rpm για  
10' λεπτά



Αφαίρεση του  
Υπερκείμενου



Προσθήκη Roundup  
συγκέντρωσης 1ppm



Επώαση



Μικροσκοπική ανάλυση  
σπέρματος μετά από 1 ώρα επώασης  
και μετά από 3 ώρες

Στη παρούσα εργασία υπήρξαν δύο ομάδες ελέγχου, με βάση τη συγκέντρωση του σπέρματος σύμφωνα με τα κριτήρια που έχει θεσπίσει ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO). Η μία ομάδα αποτελούνταν από δείγματα όπου η συγκέντρωσή τους ήταν  $\geq 15$  εκατ. σπερματοζωάρια /ml (φυσιολογική συγκέντρωση) και η άλλη ομάδα αποτελούνταν από δείγματα με συγκέντρωση  $< 15$  εκατ. σπερματοζωάρια /ml (μη φυσιολογική συγκέντρωση). Ο διαχωρισμός αυτός έγινε για να διαπιστωθεί κατά πόσο το φυτοφάρμακο Roundup επιδρά στα φυσιολογικά και πώς στα μη φυσιολογικά δείγματα σπέρματος. Στο σημείο αυτό να αναφερθεί πως δείγματα σπέρματος  $< 1$  εκατ./ml δεν μελετήθηκαν.

Για τη σύγκριση και τη στατιστική ανάλυση των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα IBM SPSS Software (paired t-test, Independent t-test) και τα προγράμματα Microsoft Excel και Microsoft Word 2007.

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 3.1 ΔΗΜΟΓΡΑΦΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΩΝ 66 ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Πίνακας 1: Μέσοι όροι, τυπικές αποκλίσεις και επί τις εκατό ποσοστά για τα δημογραφικά και μη στοιχεία των 66 δειγμάτων σπέρματος

Αριθμός δειγμάτων (n <sub>0</sub> )	<b>66</b>
Ηλικία (έτη)	40,21 ± 6,1
BMI (kg/ml)	28,65 ± 3,47
Όγκος σπέρματος (ml)	3,33 ± 1,42
Συγκέντρωση σπέρματος (εκατ./ml)	49,61 ± 50,9
Χρήση αλκοόλ (%)	68,18 % - <b>OXI</b>
	31,82 % - <b>ΝΑΙ</b>
Κάπνισμα (%)	43,94 % - <b>OXI</b>
	56,06 % - <b>ΝΑΙ</b>
10 τσιγάρα/μέρα	18,92 %
20 τσιγάρα/μέρα	62,16 %
30 τσιγάρα/μέρα	16,22 %
40 τσιγάρα/μέρα	2,7 %



## 3.2 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΚΙΝΗΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ 66 ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΕΛΕΓΧΟΥ ΚΑΙ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΜΕ ΤΟ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΟ

Πίνακας 2: Μέσοι όροι και τυπικές αποκλίσεις της κινητικότητας (PRM,NPM,IM) των δειγμάτων ελέγχου και των δειγμάτων με το φυτοφάρμακο μετά το πέρας 1 ώρας και μετά το πέρας 3 ωρών από την ώρα χορήγησης του φυτοφαρμάκου.

	PRM	NPM	IM
Control (ώρα 0)	53,54 ± 16,43	13,57 ± 7,93	32,61 ± 15,85
Control (ώρα 1)	46,42 ± 16,19	12,21 ± 9,22	41,35 ± 15,33
Roundup (ώρα 1)	35,26 ± 15,21	10,17 ± 7,68	54,89 ± 17,42
Control (ώρα 3)	36,86 ± 13,42	11,09 ± 9,87	52,05 ± 13,7
Roundup (ώρα 3)	30,53 ± 11,67	9,17 ± 8,72	60,47 ± 15,33

### 1<sup>η</sup> ΩΡΑ

Πρωθητική κίνηση (PRM) Control vs Roundup  $P_{value} < 0,05$  significant

Ακινήσια (IM) Control vs Roundup  $P_{value} < 0,05$  significant

### 3<sup>η</sup> ΩΡΑ

Πρωθητική κίνηση (PRM) Control vs Roundup  $P_{value} < 0,05$  significant

Ακινήσια (IM) Control vs Roundup  $P_{value} < 0,05$  significant

Με βάση τον παραπάνω πίνακα και τα στατιστικά αποτελέσματα διακρίνουμε ότι η μείωση της κινητικότητας όλων των δειγμάτων αναφοράς (control) είναι δυσανάλογη με την μείωση

της κινητικότητας των δειγμάτων παρουσία φυτοφαρμάκου. Αυτό γίνεται αντιληπτό με το πέρας της πρώτης ώρας (μεγαλύτερη επίδραση φυτοφαρμάκου ) καθώς βλέπουμε μειωμένη προωθητική κινητικότητα (PRM) και αυξημένη ακινησία (IM) των δειγμάτων με Roundup σε σύγκριση με τα δείγματα ελέγχου.

Στους πίνακες και τα γραφήματα που ακολουθούν διακρίνεται η κινητικότητα των δειγμάτων παρουσία φυτοφαρμάκου σε σύγκριση με τα δείγματα αναφοράς (control) στις 2 κατηγορίες που αναφέραμε στα “ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ” , δηλαδή για συγκεντρώσεις  $\geq 15$  εκατ. σπερματοζωάρια /ml και  $<15$  εκατ. σπερματοζωάρια /ml.

**Πίνακας 3: Κινητικότητα των δειγμάτων παρουσία φυτοφαρμάκου σε σύγκριση με τα δείγματα αναφοράς (control) για συγκεντρώσεις δειγμάτων  $\geq 15$  εκατ. σπερματοζωάρια /ml.**

$\geq 15 * 10^6$ σπερμ. / ml	PRM	NPM	IM
Control (ώρα 0)	53,55 $\pm$ 16,5	13,58 $\pm$ 7,93	32,61 $\pm$ 15,85
Control (ώρα 1)	46,42 $\pm$ 16,19	12,21 $\pm$ 9,22	41,35 $\pm$ 15,33
Roundup (ώρα 1)	35,26 $\pm$ 15,21	10,17 $\pm$ 7,68	54,89 $\pm$ 17,42
Control (ώρα 3)	36,02 $\pm$ 13,42	11,69 $\pm$ 9,87	52,29 $\pm$ 13,7
Roundup (ώρα 3)	29,02 $\pm$ 11,67	8,97 $\pm$ 8,72	62,18 $\pm$ 15,33

**ΔΕΙΓΜΑΤΑ CONTROL ΚΑΙ ROUNDUP ΜΕ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ  $\geq 15$  ΕΚΑΤ./ml**

**Προωθητική κίνηση (PRM) Control vs Roundup  $P_{value} < 0,05$  significant**

**Ακινησία (IM) Control vs Roundup  $P_{value} < 0,05$  significant**

Υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της προωθητικής κίνησης και της ακινησίας στα φυσιολογικά δείγματα σπέρματος. Μπορούμε να συμπεράνουμε με λίγα λόγια πως το φυτοφάρμακο επιδρά στα συγκεκριμένα δείγματα σπέρματος.

**Πίνακας 4: Κινητικότητα των δειγμάτων παρουσία φυτοφαρμάκου σε σύγκριση με τα δείγματα αναφοράς (control) για συγκεντρώσεις δειγμάτων <15 εκατ. σπερματοζωάρια /ml.**

<15 * 10 <sup>6</sup> σπερμ. / ml	PRM	NPM	IM
Control (ώρα 0)	52,25 ± 16,87	14,03 ± 8,01	33,41 ± 16,40
Control (ώρα 1)	44,71 ± 15,93	12,81 ± 9,40	42,46 ± 15,43
Roundup (ώρα 1)	33,19 ± 14,34	10,59 ± 7,89	56,58 ± 17,24
Control (ώρα 3)	35,46 ± 14,02	11,75 ± 10,27	52,79 ± 14,85
Roundup (ώρα 3)	28,7 ± 13,23	9,11 ± 8,66	62,37 ± 17,13

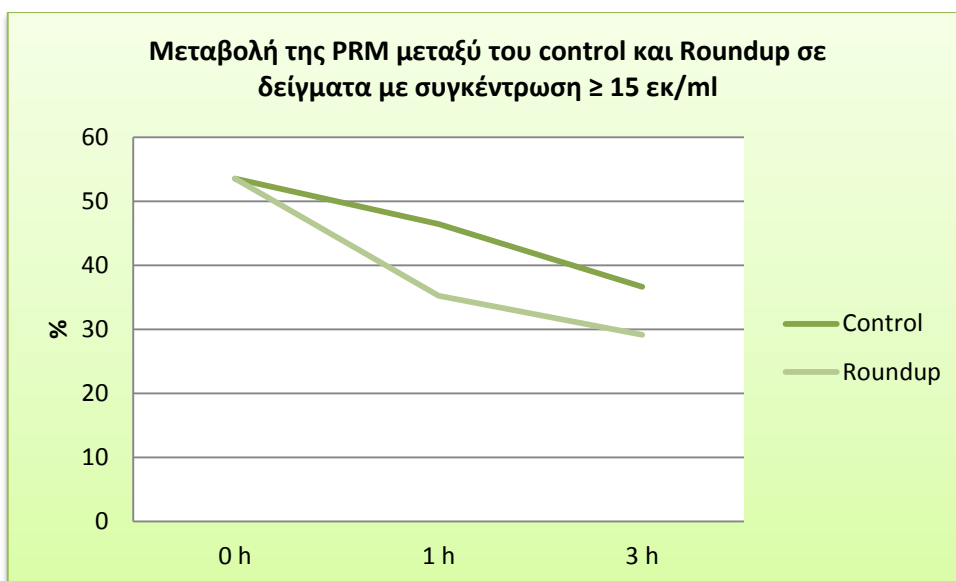
#### **ΔΕΙΓΜΑΤΑ CONTROL ΚΑΙ ROUNDUP ΜΕ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ < 15 ΕΚΑΤ./ml**

**Προωθητική κίνηση (PRM) Control vs Roundup P<sub>value</sub> <0,05 significant**

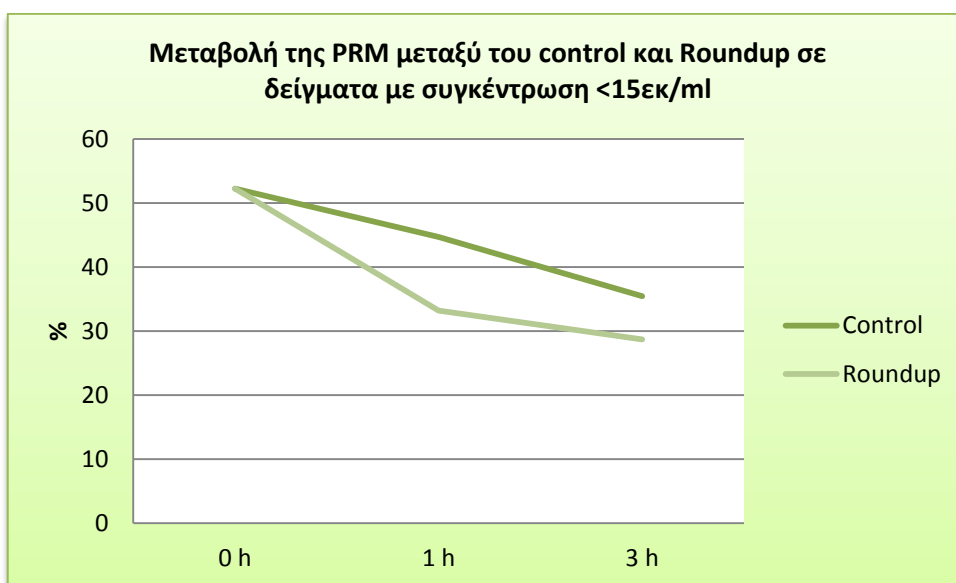
**Ακινησία (IM) Control vs Roundup P<sub>value</sub> <0,05 significant**

Το ίδιο παρατηρούμε και εδώ. Υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της προωθητικής κίνησης και της ακινησίας στα μη φυσιολογικά δείγματα σπέρματος. Μπορούμε επίσης να συμπεράνουμε πως το φυτοφάρμακο επιδρά και σε αυτά τα δείγματα σπέρματος.

**Γράφημα 1:** Η επί τις εκατό προωθητική κίνηση (PRM) των δειγμάτων ελέγχου και των δειγμάτων με το φυτοφάρμακο, για συγκεντρώσεις δειγμάτων  $\geq 15$  εκατ. σπερματοζωάρια/ml.



**Γράφημα 2:** Η επί τις εκατό προωθητική κίνηση (PRM) των δειγμάτων ελέγχου και των δειγμάτων με το φυτοφάρμακο, για συγκεντρώσεις δειγμάτων  $< 15$  εκατ. σπερματοζωάρια/ml.

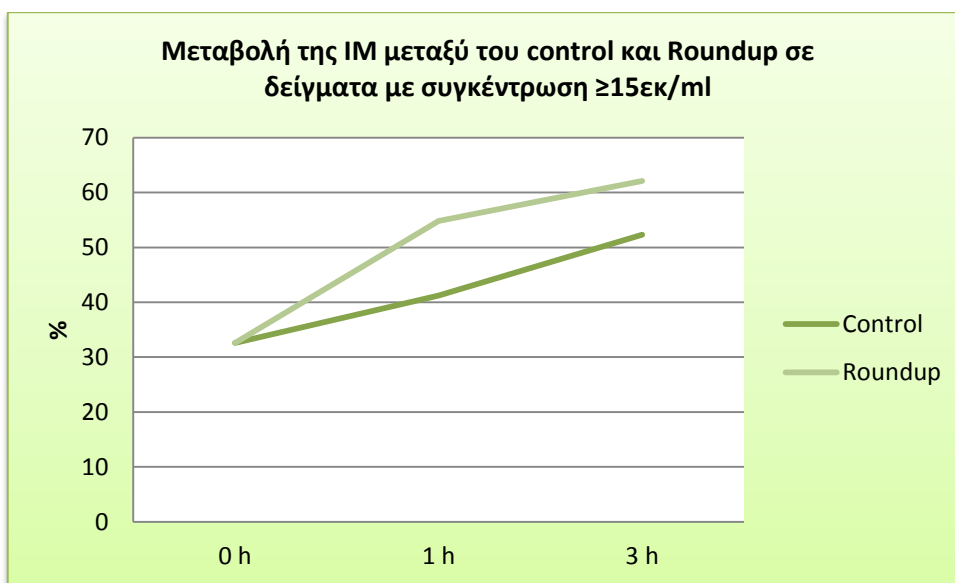


## ΜΕΤΑΒΟΛΗ ΤΗΣ PRM ΜΕΤΑΞΥ ΤΟΥ CONTROL ΚΑΙ ROUNDUP

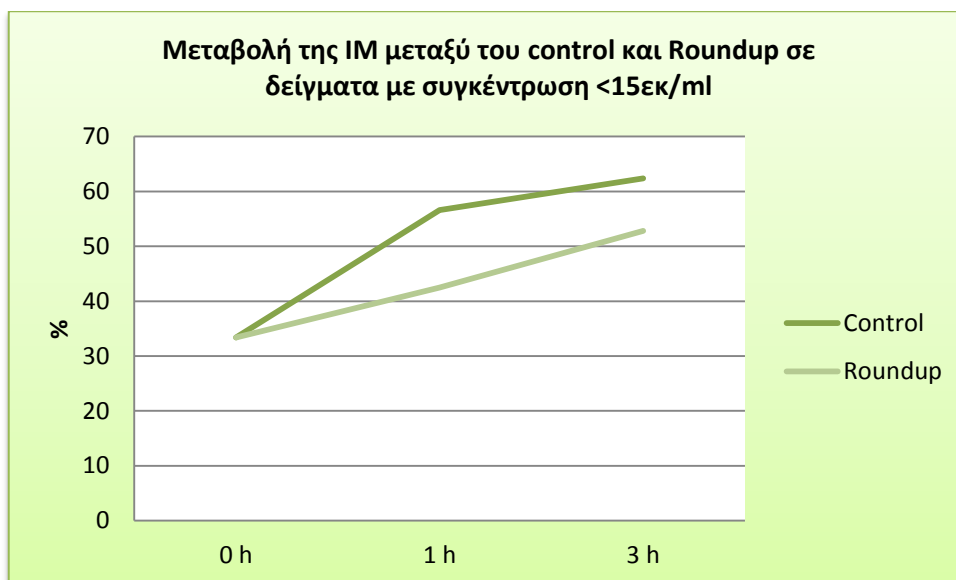
Δείγματα με συγκέντρωση  $\geq 15$  εκατ./ml vs Δείγματα με συγκέντρωση  $< 15$  εκατ./ml  $P_{value} > 0,05$  non sign.

Με μια γρήγορη ματιά, και στις δύο ομάδες η μεταβολή της προωθητικής κίνησης μεταξύ των δειγμάτων αναφοράς και των δειγμάτων με το φυτοφάρμακο είναι σχεδόν η ίδια και κυμαίνεται περίπου στο 7%. Με βάση τις στατιστικές αναλύσεις φαίνεται πως η προωθητική κίνηση μεταβάλλεται με τον ίδιο ρυθμό τόσο στα φυσιολογικά (συγκέντρωση  $\geq 15$  εκατ./ml) δείγματα σπέρματος όσο και στα μη φυσιολογικά (συγκέντρωση  $< 15$  εκατ./ml).

**Γράφημα 3: Η επί τις εκατό ακινησία (IM) των δειγμάτων ελέγχου και των δειγμάτων με το φυτοφάρμακο, για συγκεντρώσεις δειγμάτων  $\geq 15$  εκατ. σπερματοζωάρια/ml.**



**Γράφημα 4: Η επί τις εκατό ακινησία (IM) των δειγμάτων ελέγχου και των δειγμάτων με το φυτοφάρμακο, για συγκεντρώσεις δειγμάτων < 15 εκατ. σπερματοζωάρια/ml.**



#### ΜΕΤΑΒΟΛΗ ΤΗΣ IM ΜΕΤΑΞΥ ΤΟΥ CONTROL ΚΑΙ ROUNDUP

**Δείγματα με συγκέντρωση  $\geq 15$  εκατ./ml vs Δείγματα με συγκέντρωση  $< 15$  εκατ./ml  $P_{value} > 0,05$  non sign.**

Το ίδιο συμβαίνει και σε αυτή την περίπτωση. Με μια γρήγορη ματιά, και στις δύο ομάδες η μεταβολή της ακινησίας μεταξύ των δειγμάτων αναφοράς και των δειγμάτων με το φυτοφάρμακο είναι σχεδόν η ίδια και κυμαίνεται περίπου στο 10%. Με βάση τις στατιστικές αναλύσεις φαίνεται πως η ακινησία μεταβάλλεται με τον ίδιο ρυθμό τόσο στα φυσιολογικά (συγκέντρωση  $\geq 15$  εκατ./ml) δείγματα σπέρματος όσο και στα μη φυσιολογικά (συγκέντρωση  $< 15$  εκατ./ml).

## 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η ανδρική υπογονιμότητα μπορεί να έχει διάφορες αιτίες, όμως με την πάροδο του χρόνου φαίνεται πως η κύρια και πιο συχνή αιτία είναι η έκθεση σε περιβαλλοντικούς κινδύνους, όπως τα φυτοφάρμακα. Το Roundup είναι το πρώτο σε πωλήσεις και αποτελεσματικότητα ευρέως φάσματος χημικό φυτοφάρμακο (ζιζανιοκτόνο) στον κόσμο. Το κύριο συστατικό του είναι το glyphosate ενώ περιλαμβάνει και διάφορα αδρανή στοιχεία. Ο κύριος μεταβολίτης του glyphosate είναι το AMPA . Στους ανθρώπους , μόνο μικρές ποσότητες του glyphosate μεταβολίζονται προς AMPA και το υπόλοιπο που απορροφάται παραμένει αμετάβλητο και μπορεί να διανέμεται και να εισέρχεται στην κυκλοφορία του αίματος και στους ιστούς και τελικά να αποβάλλεται μέσω των ούρων. Το Roundup αποδείχθηκε ότι όχι μόνο δεν είναι ασφαλές για την υγεία των ανθρώπων , αλλά όλες τις βασικές κατηγορίες που ακολουθούσαν μετά από κάθε έρευνα έδειξαν μεσοπρόθεσμη και μακροπρόθεσμη τοξικότητα στο αρσενικό αναπαραγωγικό σύστημα. Γι' αυτό , σκοπός της παρούσης διπλωματικής εργασίας ήταν να μελετήσουμε την επίδραση του φυτοφαρμάκου Roundup σε δείγματα σπέρματος ανδρών που συμμετείχαν σε συμβατικούς κύκλους εξωσωματικής γονιμοποίησης.

Με βάση τα αποτελέσματα συμπεραίνουμε πως η μέγιστη δράση του φυτοφαρμάκου εμφανίζεται με το πέρας της μίας ώρας από την έκθεση του στη μικρότερη δυνατή συγκέντρωση (1ppm). Το γεγονός αυτό διαπιστώνεται εύκολα καθώς όση περισσότερη ώρα εκτίθενται τα δείγματα σπέρματος στο φυτοφάρμακο φαίνεται να μειώνεται η προωθητική κινητικότητα των σπερματοζωαρίων και να αυξάνεται η ακινησία των σπερματοζωαρίων ,σε σχέση με τα δείγματα σπέρματος που δεν είχαν εκτεθεί στο φυτοφάρμακο. Με βάση τόσο τον Πίνακα 2, όσο και τις στατιστικές αναλύσεις , καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι από την πρώτη ώρα έκθεσης του φυτοφαρμάκου παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά τόσο της προωθητικής κίνησης όσο και της ακινησίας ανάμεσα στα δείγματα ελέγχου και στα δείγματα με φυτοφάρμακο. Δηλαδή , με το πέρας της πρώτης ώρας φαίνεται ξεκάθαρα η μέγιστη επίδραση του φυτοφαρμάκου ενώ στη συνέχεια , ενώ υπάρχει επιπλέον μείωση φαίνεται να ελαττώνεται η επίδραση του φυτοφαρμάκου .

Αυτό μπορεί να εξηγηθεί με βάση τη θεωρία της κατάληψης των υποδοχέων που ενεργοποιούνται για την κίνηση. Η επίδραση του Roundup στην κινητικότητα του σπέρματος

ήταν αναμενόμενη γι' αυτό προχωρήσαμε στο διαχωρισμό με βάση τη συγκέντρωση σπέρματος σύμφωνα με τα κριτήρια του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (WHO) , σε φυσιολογικά δείγματα με συγκέντρωση  $\geq 15$  εκατ. σπερματοζωάρια /ml και σε δείγματα με συγκέντρωση  $<15$  εκατ. σπερματοζωάρια /ml. Ο διαχωρισμός αυτός έγινε για να διαπιστωθεί πως το φυτοφάρμακο Roundup επιδρά στα φυσιολογικά δείγματα σπέρματος και πως στα μη φυσιολογικά. Αρχικά να αναφέρουμε πως σε κάθε μία κατηγορία ξεχωριστά με βάση πάντα τα στατιστικά δεδομένα παρατηρείται μεταβολή τόσο της προωθητικής κινητικότητας όσο και της ακινησίας , η οποία είναι στατιστικά σημαντική. Άρα και στις δύο κατηγορίες ξεχωριστά παρατηρείται η επίδραση του φυτοφαρμάκου. Σύμφωνα με τους πίνακες 3-4 , τα γραφήματα 1-4 και τις στατιστικές αναλύσεις ανάμεσα στις δύο κατηγορίες δεν εμφανίζεται στατιστικά σημαντική διαφορά στην επίδραση του φυτοφαρμάκου. Και στις δύο κατηγορίες τόσο η προωθητική κίνηση (PRM) όσο και η ακινησία (IM) μεταβάλλονται με τον ίδιο ρυθμό. Με λίγα λόγια δηλαδή, το φυτοφάρμακο Roundup προκαλεί σχεδόν την ίδια επίδραση τόσο στα φυσιολογικά δείγματα σπέρματος όσο και στα μη φυσιολογικά.

Γενικότερα ο μηχανισμός δράσης του φυτοφαρμάκου Roundup δεν έχει ακόμη μελετηθεί. Γνωρίζουμε όμως ότι η κινητικότητα των σπερματοζωαρίων σχετίζεται άμεσα με τη μιτοχονδριακή δραστηριότητα και την παραγωγή ATP (37) , είναι πολύ πιθανόν λοιπόν να σχετίζεται με καταστάσεις που καταλήγουν σε διάφορες μορφές ασθενοσπερμίας. Όπως ήδη έχουμε αναφέρει , το Roundup αναστέλλει την δραστηριότητα του κυτοχρώματος P450scs, το οποίο δραστηριοποιείται μέσα στα μιτοχόνδρια και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη στεροειδογένεση (23). Επίσης αναστέλλει τη μεταγραφική δραστηριότητα των ανδρογονικών και οιστρογονικών υποδοχέων (25). Η υπόθεση που μπορούμε να κάνουμε σχετικά με την επίδραση του φυτοφαρμάκου στην κινητικότητα των σπερματοζωαρίων είναι ότι μέσω ενός μέχρι στιγμής αγνώστου μονοπατιού, το φυτοφάρμακο μέσω κάποιων υποδοχέων δρα στη μιτοχονδριακή δραστηριότητα και επομένως μειώνεται η κινητικότητα των δειγμάτων αυτών. Ακόμη , λόγω της αναστολής του κυτοχρώματος P450scs , παύει η μιτοχονδριακή δραστηριότητα και έχει ως αποτέλεσμα την ελάττωση της κινητικότητας. Αν και είναι δεδομένη η σχέση της μιτοχονδριακής δραστηριότητας με την κινητικότητα, θα πρέπει ο μηχανισμός αυτός να αποδειχθεί.

Επομένως, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι το φυτοφάρμακο Roundup επηρεάζει την κινητικότητα των σπερματοζωαρίων με το πέρας της μίας ώρας από την έκθεση του και επίσης ότι επηρεάζει το ίδιο, τόσο τα φυσιολογικά δείγματα σπέρματος όσο και τα μη



φυσιολογικά. Βέβαια ο μηχανισμός με τον οποίο επιδρά το Roundup δεν έχει ακόμη αποδειχθεί επιστημονικά.

## 5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **Λαϊνάς, Τρύφων Γεωργ.** *Ανθρώπινη αναπαραγωγή & εξωσωματική γονιμοποίηση* , β' τόμος. s.l. : IEM-Ιατρικές Εκδόσεις Μανιατέα, 2006.
2. **Ενδοκρινολογίας, Ελληνική Εταιρεία Γυναικολογικής.** *Ανδρική Υπογονιμότητα* , Μέρος Πρώτο. Αθήνα : Αθανάσιος Χρυσικόπουλος, 2005.
3. **A. Jungwirth, T. Diemer, G.R. Dohle, A. Giwercman, Z. Kopa, C. Krausz, H. Tournaye.** *Guidelines on Male Infertility.* s.l. : European Association of Urology, 2014.
4. **al, Sperrof L. et.** *Male Infertility, Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility, 5th ed.* Baltimore : Williams and Wilkins, 1994.
5. **DS, Irvine.** *Epidemiology and aetiology of male Infertility. Human Reproduction.* 1998.
6. **Κούτρας Δ. Α., Αδαμόπουλος Δ. Α. , Ράπτης Σ. Α. , Σουβατζόγλου Α. Μ.** *Περιβάλλον και αναπαραγωγική λειτουργία στον άνδρα. Βασική Ενδοκρινολογία.* s.l. : Παρισιάνου Α. Ε., 1994.
7. **Αναστασία, Δρ Δημητρίου.** *Αγωγή Υγείας και Περιβάλλοντος-Έκθεση και Προστασία από τις επικίνδυνες ουσίες.* Θεσσαλονίκη : Ελληνικό Ινστιτούτο Υγιεινής και Ασφάλειας της Εργασίας, 2001.
8. **Ευθαλία, Λουπάκη.** *Φυτοπροστατευτικά προϊόντα και περιβάλλον με έμφαση στις περιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία.* s.l. : ΤΕΙ Ηρακλείου - Σχολή Τεχνολογίας Γεωπονίας, 2009.
9. **Κ., Καμπόση.** *Φυτοφάρμακα και Επιπτώσεις στην Υγεία των Εργαζομένων , των Καταναλωτών και του Περιβάλλοντος.* Αθήνα : Εθνική Σχολή Δημόσιας Υγείας, 2000. σελ 10-13, 41-44.
10. **Γ., Καραγκιουλάκης.** *Οξεία και χρόνια Δηλητηρίαση από Παρασιτοκτόνα Φάρμακα.* Θεσσαλονίκη : Ιατρική Σχολή, Έδρα Φαρμακολογίας, 1983. σελ.4-25, 27,59.

11. **Antoniou, M., Habib, M. M., Howard V. C., Jennings C. R., Leifert C., Nodari O. R.,** *Roundup and birth defects: Is the public being kept in the dark?* . s.l. : Earth Open Source, 2011.
12. **Θεοδοσία, Φουντούλη.** *Μελέτη κινητικότητας του ζιζανιοκτόνου Roundup σε αγροτικές καλλιέργειες* . Χανιά : Πολυτεχνείο Κρήτης , Τμήμα Μηχανικών Περιβάλλοντος, 2005.
13. **Emmanouil N Papadakis, Despina Lazarou, Raphael Grougnet, Prokopios Magiatis,** Effect of the form of the sesame-based diet on the absorption of lignans. *Journal of agricultural and food chemistry* . 2008, Τόμ. 59(14):7601-8.
14. **Βουλγαρίδης, Μάριος.** *Μελέτη συμπεριφοράς του ζιζανιοκτόνου glyphosate στο έδαφος και της δράσης του στα φυτά μετά από απορρόφηση από τις ρίζες*. Ηράκλειο : ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΘΕΡΜΟΚΗΠΙΑΚΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΚΑΙ ΑΝΘΟΚΟΜΙΑΣ, 2014.
15. **Pete Riley, Dr. Janet Cotter , Marco Contiero , Dr Meriel Watts.** *Herbicide tolerance and GM Crops*. s.l. : Becky Price, Myrto Pispini, Greenpeace International, 2011.
16. **Anthony Samsel, Stephanie Seneff.** *Glyphosate's Suppression of Cytochrome P450 Enzymes and Amino Acid Biosynthesis by the Gut Microbiome : Pathways to Modern Diseases*. 15, USA : Entropy, 2013. 1416-1463.
17. **Gary M. Williams, Robert Kroes , Ian C. Munro.** Safety Evaluation and Risk Assessment of the Herbicide Roundup and Its Article Ingredient, Glyphosate for Humans. *Regular Toxicology and Pharmacology*. New York : Academic Press, 2000, 31.
18. **Paul K. Mensah, Carolyn G. Palmer , Oghenekaro N. Odume.** Ecotoxicology of Glyphosate and Glyphosate - Based Herbicides- Toxicity to Wildlife and Human. *Toxicity and Hazard of Agrochemicals*. Grahamstown, South Africa : s.n., 2015.
19. **Pankus, Andreas Bauer-**. *Testbiotech comment on the German Renewal Assessment Report (RAR) on the active ingredient glyphosate*. München : Testbiotech, Institute for Independent Impact Assessment in Biotechnology, 2014.

20. **(WHO), World Health Organization.** *Glyphosate. Environment Health Criteria* . Geneva, Switzerland : United Nations Environment Programme, the International Labour Organization, 1994. #159.
21. **R. Mesnage, N. Defarge, J. Spiroux de Vendomois, G. E. Seralini.** Potential toxic effects of glyphosate and its commercial formulations below regulatory limits. *Food and Chemical Toxicology*. 2015.
22. **Walsh L. P., McCormick C. , Martin C. , Stocco D. M.** Roundup inhibits steroidogenesis by disrupting steroidogenic acute regulatory (StAR) protein expression. *Environ Health Persp.* 2000, Τόμ. 108, 769-776.
23. **Clair E., Mesnage R. , Travert C. , Seralini G. E.** A glyphosate-based herbicide induces necrosis and apoptosis in mature rat testicular cells in vitro and testosterone decrease at lower levels. *Toxicology In Vitro*. 2012, Τόμ. 26, 269-279.
24. **Cassault -Meyer E., Gress S. , Seralini G.E. , Galeraud -Denis I.** An acute exposure to glyphosate -based herbicide alters aromatase levels in testis and sperm nuclear quality. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2014, Τόμ. 38, 131-140.
25. **de Liz Oliviera Cavalli V. L., Cattani D. , Elise Heinz Rieg C. , Pierozan P., Zanatta L. , Benedetti Parisotto E. , Wilhelm Filho d. , Regina Mena Barreto Silva F. , Pessoa-Pureur R. Zamoner A.** Roundup disrupted male reproductive functions by triggering calcium-mediated cell death in rat testis and Sertoli cells. *Free Radic. Biol. Med.* 2013, Τόμ. 65, 335-346.
26. **Yousef M. I., M. H. Saelm, H. Z. Ibrahim, Helmi S. , M. A. Seehy , Bertheussen.** Toxic effects of carbofuran and glyphosate on semen characteristics in rabbits. *Journal of Environmental Science and Health , Part B: Pesticides , Food Contaminants and Agricultural Wastes*. 1995.
27. **Chimento, A., Sirianni, R., Delalande, C., Silandre, D., Bois, C.,Andò, S., Maggiolini, M., Carreau, S., Pezzi, V.,.** 17 $\beta$  -Estradiol activates rapid signaling pathways involved in rat pachytene spermatocytes apoptosis through GPR30 and ER $\alpha$ . *Mol. Cell. Endocrinol.* 2010, Τόμ. 320, 136-144.

28. **Chimento, A., Sirianni, R., Zolea, F., Bois, C., Delalande, C., Andò, S., Maggiolini, M., Aquila, S., Carreau, S., Pezzi, V.** Gperand ESRs are expressed in rat round spermatids and mediate oestrogen-dependent rapid pathways modulating expression of cyclin B1 and Bax. *Int. J. Androl.* 2011, Τόμ. 34, 420-429.
29. **Dallegrave, E., Mantese, F. D., Coelho, R. S., Pereira, J. D., Dalsenter, P. R.** The teratogenic potential of the herbicide glyphosate-Roundup in Wistar Rats. *Toxicol. Lett.* 2003, Τόμ. 142, 45-52.
30. **Dallegrave, E., Mantese, F. D., Oliveira, R. T., Andrade, A. J. M., Dalsenter, P. R., and Langeloh, A.** Pre- and postnatal toxicity of the commercial glyphosate formulation in Wistar rats. *Arch. Toxicol.* 2007, Τόμ. 81, 665-73.
31. **Guilherme, S., Gaivão, I., Santos, M.A., Pacheco, M.** European eel (*Anguilla*) genotoxic and pro-oxidant responses following short-term exposure to Roundup® – a glyphosate-based herbicide. *Mutagenesis.* 2010, Τόμ. 25, 523-530.
32. **Cyntia Ayumi Yokota Harayashikia, Antonio Sergio Varela Junior, Anderson Abel de Souza Machado, Liziara da Costa Cabrera, Ednei Gilberto Primel, Adalto Bianchini, Carine Dahl Corcini.** Toxic effects of the herbicide Roundup in the guppy *Poecilia vivipara*. *Aquatic Toxicology.* 2013, Τόμ. 25, 523-530.
33. **Bairy L., Paul V., Rao Y.** Reproductive toxicity of sodium valproate in male rats. *Indian J. Pharmacol.* 2010, Τόμ. 42, 90-4.
34. **Li H., Chen Q., Li S. et al.** Effect of Cr exposure on sperm quality, human and animal studies. *Ann Occup Hyg.* 2001, Τόμ. 45, 505-511.
35. **Sunny O. Abarkwu, Oghenetega F. Akiri, Mojisola A. Durojaiye and Alabi Adenike.** Combined effects of repeated administration of Bretmont Wipeout (glyphosate) and Ultrazin (atrazine) on testosterone, oxidative stress and sperm quality of Wistar rats. *Toxicology Mechanisms and Methods.* 2014.

36. **A. Jungwirth, T. Diemer , A. Giwercman , Z. Kopa , C. Krausz , H. Tournaye , G. R. Dohle.** Κατευθυντήριες Οδηγίες για τη Διερεύνηση και Θεραπεία της ανδρικής υπογονιμότητας. 2010.

37. **Treulen F., Uribe P. ,Boguen R. , Villegas JV.** Mitochondrial permeability transition increases reactive oxygen species production and induces DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum. Reprod.* 2015, 30(4):767-76.

Εικόνα 1 :

<http://nemertes.lis.upatras.gr/jspui/>

Εικόνα 2 :

[http://www.axysanalytical.com/services/specialty\\_analysis/glyphosate\\_and\\_metabolites/](http://www.axysanalytical.com/services/specialty_analysis/glyphosate_and_metabolites/)

Εικόνα 3 :

<http://nefeli.lib.teicrete.gr/browse/steg/agr/2014/VoulgaridisMarios/attached-document-1413734403-790306-5690/VoulgaridisMarios2014.pdf>

Εικόνα 4 :

<http://lsbzix.rc.unesp.br/skpdb/EPSPS.html>

Εικόνα 5 :

<http://nefeli.lib.teicrete.gr/browse/steg/agr/2014/VoulgaridisMarios/attached-document-1413734403-790306-5690/VoulgaridisMarios2014.pdf>

Εικόνα 6 :

<http://nefeli.lib.teicrete.gr/browse/steg/agr/2014/VoulgaridisMarios/attached-document-1413734403-790306-5690/VoulgaridisMarios2014.pdf>

Εικόνα 7 :

<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc159.htm>

Εικόνα 8 :

<http://www.journals.elsevier.com/food-and-chemical-toxicology>

Εικόνα 9 :

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7797819>

Εικόνα 10 :

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17634926>

Εικόνα 11 :

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25403740>

Εικόνα 12 :

<http://uroweb.org/wp-content/uploads/Male-Infertility-pocket-2011-edn..pdf>