



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ-ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ ΚΑΙ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑ»

Δήμητρα Χλιούμπη

Ιατρός Μαιευτήρας-Γυναικολόγος

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΤΡΑΧΑΝΑ ΒΑΡΒΑΡΑ , Επίκουρος Καθηγήτρια Τμ. Ιατρικής ΠΘ

ΤΣΕΖΟΥ ΑΣΠΑΣΙΑ , Καθηγήτρια Τμ. Ιατρικής ΠΘ

ΔΗΜΑΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ , Αν. Καθηγητής Τμ. Ιατρικής ΠΘ

ΛΑΡΙΣΑ, 2020



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES
FACULTY OF MEDICINE



POSTGRADUATE MASTER PROGRAM
“HUMAN GENETICS – GENETIC COUNSELING”

MASTER’S THESIS
«OXIDATIVE STRES AND INFERTILITY»

Dimitra Chlioumpi

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με την περάτωση της παρούσας εργασίας θα ήθελα να ευχαριστήσω την Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής Τσέζου Ασπασία που μου έδωσε την δυνατότητα να παρακολουθήσω το συγκεκριμένο πρόγραμμα μεταπτυχιακών σπουδών, ώστε να εμπλουτίσω τις γνώσεις μου σε έναν τομέα που είναι η απαρχή φυσιολογικών και παθολογικών καταστάσεων μιας επιστήμης που αποτελεί προπομπό από αυτή της κύριας ενασχόλησης μου.

Ευχαριστώ θερμά την Επίκουρο Καθηγήτρια-Κυτταρικής Βιολογίας Τραχανά Βαρβάρα επιτηρήτρια της διπλωματικής μου, η οποία με εξειδίκευση και πλήρη γνώση στο "Οξειδωτικό Στρες" συνέβαλε τα μέγιστα για το ποιοτικό αποτέλεσμα της εργασίας μου με τις εύστοχες παρατηρήσεις της τόσο στην παρούσα συγγραφή όσο και κατά την διάρκεια των αντίστοιχων παρουσιάσεων κατά την διάρκεια της εκπαίδευσης μας που σχολαστικά είχε επιμεληθεί.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή Ιατρικής Δήμα Κωνσταντίνο μέλος της τριμελούς επιτροπής, για το απαράμιλλο πάθος και την τεκμηρίωση της θεματολογίας κατά την διάρκεια των διαλέξεων. Ήταν πραγματικά τιμή μου και τύχη να παρευρίσκομαι έστω αυτό το σύντομο χρονικό διάστημα στο ακροατήριο του.

Φυσικά θα ήταν παράλειψη να μην απευθύνω τις ευχαριστίες μου στις κυρίες Μουρμούρα Εύη, Μοριακή Βιολόγο και Παπαθανασίου Ιωάννα, Βιολόγο-Ακαδημαϊκή Υπότροφο, που πέρα από την επιστημονική τους κατάρτιση προσέφερε απλόχερα την βοήθεια τους με χαρισματική υπομονή. Ένα μεγάλο ευχαριστώ επίσης στη σιωπηλή και αφανή αλλά δυναμική παρουσία της υπεύθυνης της γραμματείας του μεταπτυχιακού προγράμματος κα. Παπουτσόγλου Φωτεινής που με ειλικρινές ενδιαφέρον φρόντιζε για την διευθέτηση κάθε προβλήματος.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τα τρία μου παιδιά Μάρκο, Κλέαρχο, Αλέξανδρο για τη στήριξη, συμπαράσταση και κατανόηση που μου έδειξαν ο καθένας με τον δικό του τρόπο καθ' όλη τη διάρκεια του εγχειρήματος μου αφιερώνοντας τους την εργασία μου, τώρα που βρίσκονται στην αρχή των πανεπιστημιακών τους σπουδών.

Ευχαριστώ από καρδιάς τη συνοδοιπόρο μου στο ιατρείο τα τελευταία δέκα χρόνια και υπεύθυνη γραμματειακής στήριξης κα. Μαλιόγκα Κλεοπάτρα που ούσα σκιά μου με την επικοινωνιακή και πολύτιμη συμβολή της συμβάλλοντας τα μέγιστα στην ολοκλήρωση και εκπόνηση του συγγραφικού αυτού έργου.

Επίσης θα ήθελα να απευθύνω ένα θερμό ευχαριστώ στη φιλόλογο κα. Σελτσιώτη Ελένη για τη σημαντική καθοδήγηση στη διόρθωση του κειμένου, που συνέβαλε στην ολοκλήρωση της εικόνας του.

Χλιούμπη Δήμητρα!

Περίληψη

Το οξυγόνο αποτελεί προϋπόθεση ύπαρξης της ζωής αλλά εμπλέκεται και σε διαδικασίες επιβλαβείς για την ίδια τη ζωή, ανταλλάσσοντας ηλεκτρόνια είναι ικανό να δημιουργήσει δραστικά είδη ή ελεύθερες ρίζες με αναγωγική και οξειδωτική δράση.

Όταν η αύξηση της παραγωγής δραστικών ειδών οξυγόνου (ROS) και η δημιουργία ελεύθερων ριζών δεν μπορεί να αντισταθμιστεί από τις αντιοξειδωτικές άμυνες του οργανισμού (ενζυματικά ή και μη ενζυματικά αντιοξειδωτικά), τότε επικρατούν συνθήκες οξειδωτικού στρες. Οι ελεύθερες ρίζες παράγονται μέσω ενδογενών διεργασιών, όπως η κυτταρική αναπνοή, αλλά και εξωγενών με την επίδραση περιβαντολογικών παραγόντων και του τρόπου ζωής. Το οξειδωτικό στρες (OS) είναι η ανισορροπία μεταξύ της προ-οξειδωτικής και της αντιοξειδωτικής κατάστασης του οργανισμού.

Τα δραστικά είδη οξυγόνου αλλά και αζώτου προκαλούν βλάβη στα κυτταρικά μακρομόρια, λιπίδια, πρωτεΐνες, υδατάνθρακες αλλά και στα νουκλεϊκά οξέα, επηρεάζουν την δομή και την λειτουργία όλων των μακρομορίων. Το οξειδωτικό στρες και τα δραστικά είδη δεν έχουν μόνο επιβλαβείς επιδράσεις καθώς είναι απαραίτητα στην κυτταρική σηματοδότηση και τις βιοσυνθετικές αντιδράσεις. Είναι τα αντιοξειδωτικά που είτε προλαμβάνουν τις βλάβες, είτε τις επιδιορθώνουν διατηρώντας την κυτταρική ομοιότητα.

Μελέτες έχουν αναδείξει την συμμετοχή του οξειδωτικού στρες σε μια μεγάλη γκάμα ασθενειών και τα τελευταία χρόνια είναι εκτενής η αναφορά των επιπτώσεων του οξειδωτικού στρες στην υπογονιμότητα, επηρεάζοντας τα αναπαραγωγικά κύτταρα και την αναπαραγωγική διαδικασία.

Συγκεκριμένες ποσότητες ROS είναι απαραίτητες στην αναπαραγωγή αλλά οι υψηλές συγκεντρώσεις γίνονται παθολογικές. Πηγές ROS στο αναπαραγωγικό σύστημα μπορεί να είναι εξωγενείς προκαλούμενες από την ρύπανση του περιβάλλοντος, το κάπνισμα, το αλκοόλ και τα χημικά φυτοφάρμακα, καθώς και από λοιμώξεις του αναπαραγωγικού συστήματος αλλά και τα ίδια τα αναπαραγωγικά όργανα και κύτταρα αποτελούν πηγές ROS λόγω του υψηλού τους μεταβολισμού. Επίσης λειτουργικοί γενετικοί πολυμορφισμοί ή η γενετική διαταραχή των αντιοξειδωτικών γονιδίων CAT, GPX, GST, NOS, NRF2 και SOD έχουν συσχετιστεί με την υπογονιμότητα.

Στο ανδρικό αναπαραγωγικό σύστημα πηγή ROS αποτελούν τα ίδια τα σπερματοζώαρια, τα λευκά αιμοσφαίρια και η κισσοκήλη. Στο γυναικείο αναπαραγωγικό

σύστημα τα ωάρια, το ωοθυλακικό υγρό, τα κοκκώδη κύτταρα είναι πηγές δραστικών ειδών οξυγόνου.

Αυτή η μελέτη θα αποτελέσει μια ανασκόπηση της βιβλιογραφίας σχετικά με το πως επηρεάζει το οξειδωτικό στρες τις διάφορες παραμέτρους της υπογονιμότητας. Οι ελεύθερες ρίζες φαίνεται να επηρεάζουν την ποιότητα των γαμετών καθώς και την αλληλεπίδραση τους, να έχουν επίδραση στην ποιότητα των σπερματοζωαρίων, των ωαρίων, των εμβρύων αλλά και του περιβάλλοντος τους. Το οξειδωτικό στρες τροποποιεί τη σπερματική μεμβράνη και προκαλεί βλάβη στο πυρηνικό DNA καθώς μπορεί να επηρεάσει και την γονιμοποιητική ικανότητα των σπερματοζωαρίων, καθώς φαίνεται να έχει επιρροή και στην ορμονική ρύθμιση της αναπαραγωγής. Μελέτες προσπαθούν να διασαφηνίσουν το ρόλο των ελεύθερων ριζών στην ανάπτυξη ωοκυττάρων, την ωρίμανση, την ωοθυλακική ατρησία και τη λειτουργία του ωχρού σωματίου. Το οξειδωτικό στρες εμπλέκεται στις παθολογίες του γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος, όπως το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών (PCOS), η ενδομητρίωση, η ανεξήγητη υπογονιμότητα, οι οποίες επηρεάζουν τη διαδικασία της σύλληψης. Επίσης πολλές επιπλοκές της εγκυμοσύνης όπως αποβολή, ο πρόωρος τοκετός, η προεκλαμψία αλλά και καθυστερημένη εμβρυική ανάπτυξη σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες.

Το οξειδωτικό στρες έχει μελετηθεί και σε ότι αφορά την υποβοηθούμενη αναπαραγωγή καθώς και αν η χρήση αντιοξειδωτικών συμπληρωμάτων είναι αποτελεσματική για την αντιμετώπιση του.

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να αναλυθούν όλα τα θέματα της υπογονιμότητας συσχετιζόμενα με το οξειδωτικό στρες για να εξαχθούν συμπεράσματα σχετικά με αυτή τη σχέση, για να διασαφηνιστεί περαιτέρω το μονοπάτι της αναπαραγωγής και ίσως η πιθανή θεραπευτική παρέμβαση τόσο στη φυσική όσο και στην υποβοηθούμενη αναπαραγωγή.

Λέξεις κλειδιά:

Οξυγόνο

Ελεύθερες ρίζες

Οξειδωτικό στρες

Αντιοξειδωτικά

Οξειδωαναγωγή

Υπογονιμότητα

Επιπλοκες κύησης

Αναπαραγωγικές ασθένειες

Υποβοηθούμενη αναπαραγωγή

Αντιοξειδωτικά συμπληρώματα

Abstract

Oxygen is a prerequisite for the existence of life, but it is also involved in processes harmful to life itself, by exchanging electrons it is able to create active species or free radicals with reducing and oxidizing action.

When the increase in the production of active oxygen species (ROS) and the creation of free radicals cannot be compensated by the body's antioxidant defenses (enzymatic or non-enzymatic antioxidants), then conditions of oxidative stress prevail. Free radicals are produced through endogenous processes, such as cellular respiration, but also exogenous by the influence of environmental factors and lifestyle. Oxidative stress (OS) is the imbalance between the body's pre-oxidative and antioxidant status.

The active oxygen and nitrogen species cause damage to cellular macromolecules, lipids, proteins, carbohydrates and nucleic acids, affecting the structure and function of all macromolecules. Oxidative stress and active substances not only have harmful effects as they are essential for cellular signaling and biosynthetic reactions. They are the antioxidants that either prevent damage or repair it while maintaining cellular homeostasis.

Studies have shown the involvement of oxidative stress in a wide range of diseases and in recent years there has been extensive reference to the effects of oxidative stress on infertility, affecting reproductive cells and the reproductive process.

Specific amounts of ROS are essential for reproduction but high concentrations become abnormal. ROS sources in the reproductive system can be exogenous caused by environmental pollution, smoking, alcohol and chemical pesticides, as well as infections of the reproductive system and the reproductive organs and cells themselves are high ROS sources due to their high metabolism. Also functional genetic polymorphisms or genetic disorder of the antioxidant genes CAT, GPX, GST, NOS, NRF2 and SOD have been linked to infertility.

In the male reproductive system, the source of ROS is the sperm itself, the white blood cells and the varicose vein. In the female reproductive system, eggs, follicular fluid, and granular cells are sources of active oxygen species. Oxidative imbalance leads to infertility.

This study will be a review of the literature on how oxidative stress affects the various parameters of infertility. Free radicals seem to affect the quality of gametes as well as their interaction, affecting the quality of sperm, eggs, embryos and their environment. Oxidative stress alters the sperm membrane and causes damage to nuclear DNA as it can also affect sperm fertility. Oxidative stress also appears to have an effect on the hormonal regulation of

reproduction. Studies are trying to clarify the role of free radicals in the growth of oocytes, maturation, follicular atresia and the function of the corpus luteum. Oxidative stress is involved in pathologies of the female reproductive system, such as polycystic ovary syndrome (PCOS), endometriosis, unexplained infertility, which affect the process of conception. Also, many complications of pregnancy such as miscarriage, premature birth, preeclampsia and delayed fetal development are associated with oxidative stress.

Oxidative stress has also been studied in terms of assisted reproduction as well as whether the use of antioxidant supplements is effective in treating it.

The aim of this study is to analyze all the issues of infertility associated with oxidative stress to draw conclusions about this relationship, to further clarify the path of reproduction and perhaps the possible therapeutic intervention in both physical and assisted reproduction.

Key Words:

Oxygen

Free Radicals

Oxidative stress

Antioxidants

Oxidation reduction

Infertility

Complications of pregnancy

Reproductive diseases

Assisted reproduction

Antioxidant supplements

Περιεχόμενα

Κεφάλαιο 1^ο: Ελεύθερες Ρίζες Και Οξειδωτικό Στρες	15
Ενδογενείς και Εξωγενείς Πηγές Ελεύθερων Ριζών	16
Οξειδωτικό Στρες.....	22
Η Χημεία του Οξειδωτικού Στρες και οι Βλάβες των βιομορίων	23
Οξειδωτικό Στρες και Κυτταρική Οξειδοαναγωγή	26
Ενεργά Είδη Οξυγόνου και Αζώτου και η Φυσιολογική τους Δράση.....	28
Κεφάλαιο 2^ο: Αντιοξειδωτικοί Αμυντικοί Μηχανισμοί	33
Ενζυματικά Αντιοξειδωτικά.....	36
Μη Ενζυματικά Αντιοξειδωτικά	37
Γενετικοί Πολυμορφισμοί, Οξειδωτικό Στρες και Υπογονιμότητα.....	42
Κεφάλαιο 3^ο: Οξειδωτικό Στρες & Αναπαραγωγικό Σύστημα	49
ROS & Αντρικό Αναπαραγωγικό Σύστημα.....	52
Δημιουργία ROS & Σπερματοζωάρια	52
Λευκοκύτταρα	55
Κιρσοκήλη	57
Παθοφυσιολογικός Ρόλος του Οξειδωτικού Στρες στην Αντρική Αναπαραγωγή	58
Οξειδωτικό Στρες και Ανδρικές Αναπαραγωγικές Ορμόνες	61
Μηχανισμός Δράσης	62
ROS & Γυναικείο Αναπαραγωγικό Σύστημα.....	64
Ελεύθερες Ρίζες και Ωοθήκη	66
Ευεργετικός Ρόλος του OS στις Ωοθήκες	66
Ρόλος των RNOS	68
Ελεύθερες Ρίζες και Ωοθυλάκιο	69
Ελεύθερες Ρίζες και Ωχρο Σωμάτιο	71
Ελεύθερες Ρίζες και Ενδομήτριο	73
Ελεύθερες Ρίζες και Ωαγωγοί και Περιτοναϊκή Κοιλότητα.....	74
Στεροειδογένεση και Ωορρηξία	76
Κεφάλαιο 4^ο: Αναπαραγωγικές Ασθένειες και Οξειδωτικό Στρες	77
Οξειδωτικό Στρες και Ενδομητρίωση	78
Οξειδωτικό Στρες και Σύνδρομο Πολυκυστικών Ωοθηκών	84
Οξειδωτικό Στρες και Ανεξήγητη Υπογονιμότητα.....	87

Κεφάλαιο 5°: Επιπλοκές Κύησης και Οξειδωτικό Στρες	89
Οξειδωτικό Στρες και Αποβολή	94
Οξειδωτικό Στρες και Καθέξιν Απώλεια Εγκυμοσύνης	95
Οξειδωτικό Στρες και Προεκλαμψία	98
Οξειδωτικό Στρες και Περιορισμός Εμβρυικής Ανάπτυξης.....	102
Οξειδωτικό Στρες και Πρόωρος Τοκετός.....	104
Οξειδωτικό Στρες και Σακχαρώδης Διαβήτης Κύησης	106
Κεφάλαιο 6°: Παράγοντες που Διέπουν την Υπογονιμότητα και Οξειδωτικό Στρες	108
Ηλικία	109
Σωματικό Βάρος	110
Άσκηση	113
Παράγοντες Τρόπου Ζωής.....	114
Αλκοόλ	114
Κάπνισμα	116
Οπιοειδή Ναρκωτικά και Ψυχαγωγικά Φάρμακα	119
Περιβαντολογικοί και Επαγγελματική Έκθεση	121
Θερμότητα	125
Ηλεκτρομαγνητικές Ακτινοβολίες.....	125
Κεφάλαιο 7°: Οξειδωτικό Στρες και Υποβοηθούμενη Αναπαραγωγή	127
Ο Ρόλος του Οξειδωτικού Στρες στην Αλληλεπίδραση των Γαμετών.....	129
Οξειδωτικό Στρες και Τεχνικές Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής.....	131
Κλινικές Μελέτες για το Οξειδωτικό Στρες και την Υποβοηθούμενη Αναπαραγωγή.....	136
Αντιοξειδωτικά ως Βελτιωτικοί Παράγοντες	138
Κεφάλαιο 8°: Συμπεράσματα	143
Βιβλιογραφία.....	148

Συντομογραφίες:

8-iso-PGF2-άλφα: 8-ισο-προσταγλανδίνη F2-άλφα

8-OHdG: 8-οξοδεοξυγουανοσίνη

8-OxOdG: 8-οξο-7,8- διυδρο-2-δεοξυγουανουσίνη

AGE: Προηγμένα τελικά προϊόντα γλυκοζυλίωσης

ART: Υποβοηθούμενες αναπαραγωγικές τεχνικές

ASK: Κινάση ρύθμισης σηματοδότησης απόπτωσης

AT1-AA: Αυτοαντισώματα έναντι του υποδοχέα AT1

ATP: Τριφωσφορική αδενίνη

ΔΜΣ: Δείκτη μάζας σώματος

[Ca²⁺]_i: Ενδοκυτταρική συγκέντρωση ασβεστίου

CCE: Χωρητική είσοδος ασβεστίου

cGMP: Κυκλική μονοφωσφορική γουανοσίνη

CRP: (C-αντιδρώσα πρωτεΐνη)

CSH: Κυσταεμίνη

Cu: Χαλκός

DDT: 1, 1, 1-τριχλωρο-2, 2, -δισ (4-χλωροφαινυλο) -αιθάνιο

EDTA: Τετρα-οξικό οξύ αιθυλενοδιαμίνης

eNOS / NOS III: Ενδοθηλιακή συνθάση νιτρικού οξειδίου

ERK 1/2: Εξωκυτταρική ρυθμιζόμενη κινάση

ET: Μεταφορά ηλεκτρονίων

ETC: Αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων

EtOH: Αιθανόλη

ER: Ενδοπλασματικό πρόγραμμα

Fe²⁺ / ³⁺: Σίδηρο

FF: Ωοθυλακικό υγρό

FSH: Η ορμόνη των θυλακίων

GPx: Υπεροξειδάση γλουταθειόνης

GSH: Γλουταθειόνη

GSSG: Οξειδωμένη γλουταθειόνη

GWAS (Genome wide association studies): Μελέτες συσχέτισης σε ολόκληρο το γονιδίωμα

hCG: Ανθρώπινη χοριακή γοναδοτροπίνη

HDL: Λιποπρωτεΐνη υψηλής πυκνότητας

HIF: Παράγοντας που προκαλείται από υποξία
HO: οξυγενάση της αίμης
H₂O: Νερό
H₂O₂: Υπεροξείδιο του υδρογόνου
HRT: Θεραπεία αντικατάστασης ορμονών
HSP: Πρωτεΐνη θερμικού σοκ
ICSI:Ενδοκυτταροπλασματική ένεση σπέρματος
IL: Ιντερλευκίνη
iNOS / NOS II: Επαγωγή συνθάση νιτρικού οξειδίου
IUGR: Περιορισμός ενδομήτριας ανάπτυξης
IVF: Τεχνητή γονιμοποίηση
JNK: c-Jun N-τερματικές κινάσες
LH: Ωχρινική ορμόνη
MAPK: Κινασικές πρωτεΐνες ενεργοποιημένες από μιτογόνο
MDA:Μαλονδιαλδεΐδη
Mη:Μαγγάνιο
MTHFR:Αναγωγή μεθυλ-τετρα-υδροφολικού άλατος
NAC: N-ακετυλοκυστεΐνη
NADPH: Φωσφορικό νικολαμίδιο νικοτιναμίδης αδενίνης
NK:Φυσικός δολοφόνος
NOS:Συνθάση νιτρικού οξειδίου
nNOS / nNOS I: Νευρωνική συνθάση νιτρικού οξειδίου
NO: Νιτρικό οξύ
NO₂:Διοξείδιο του αζώτου
O₂:Οξυγόνο
OCP:Παρασιτοκτόνα οργανοχλωρίου
OH *:Υδροξυλική ρίζα
ONOO-:Περοξυνιτρίτης
OPC: Οργανοφωσφορικές ενώσεις
OS: Οξειδωτικό στρες
oxLDL:Οξειδωμένη λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας
PCB:Πολυχλωριωμένα διφαινύλια
PCOS:Σύνδρομο πολυκυκτικών ωοθηκών

PG: Προσταγλανδίνη

PON 1: Παραοξονάση-1

RNS: Δραστικά είδη αζώτου

ROS: Αντιδραστικά είδη οξυγόνου

RPL: Επαναλαμβανόμενη απώλεια εγκυμοσύνης

Se: Σελήνιο

sFlt-1: Διαλυτός υποδοχέας για αγγειακό ενδοθηλιακό αυξητικό παράγοντα

SHBG: Η σφαιρίνη που δεσμεύει την ορμόνη του φύλου

SNPs (single-nucleotide polymorphisms): πολυμορφισμός μονού νουκλεοτιδίου

SO₂: Υπεροξειδίο

SOD: Υπεροξειδίο δισμουτάση

STBM: Μembrάνη μικροκυττάρων συγκυτιοτροφοβλαστών

TAC: Συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα

TAS: Ολική αντιοξειδωτική κατάσταση

TBARS: Δραστικές ουσίες θειοβαρβιτουρικού οξέος

THC: Δέλτα-9-τετραϋδροκανναβινόλη

TNF: Παράγοντας νέκρωσης όγκου

Trx: Θειορεδοξίνη

VEGF: Αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας

Zn: Ψευδάργυρος.

Κεφάλαιο 1ο

Οξειδωτικό Στρες

Ελεύθερες Ρίζες και Οξειδωτικό Στρες

Παρά το γεγονός ότι η παρουσία του οξυγόνου αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την ύπαρξη της ζωής, η αφθονία του στα βιολογικά συστήματα, σε συνδυασμό με την ικανότητά του να δέχεται μονά ηλεκτρόνια, το καθιστούν τον σημαντικότερο παράγοντα δημιουργίας ελευθέρων ριζών στις αερόβιες μορφές ζωής. Η κατανόηση των μοριακών μηχανισμών δημιουργίας ελευθέρων ριζών από το οξυγόνο, αλλά και οι διάφορες μεταβολικές πορείες της δράσης τους σε φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις, παρά την εντυπωσιακή πρόοδο των τελευταίων ετών, παραμένουν εν πολλοίς άγνωστες.

Οι ελεύθερες ρίζες είναι εξαιρετικά αντιδραστικά άτομα ή μόρια με ένα ή περισσότερα μη συζευγμένα ηλεκτρόνια στην εξωτερική τους στοιβάδα, αυτό το ατελές κέλυφος ηλεκτρονίων είναι που προσδίδει την υψηλή αντιδραστικότητα τους (Burton 2011), και μπορούν να σχηματιστούν όταν το οξυγόνο αλληλοεπιδρά με ορισμένα μόρια (Chandrasekaran 2017). Αυτές οι ρίζες που προκύπτουν με απώλεια ή πρόσληψη ενός μόνο ηλεκτρονίου, έχουν οξειδωτική ή αναγωγική δράση (Lobo 2010). Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να παραχθούν από πολλά στοιχεία, αλλά στα βιολογικά συστήματα εκείνα που αφορούν το οξυγόνο και το άζωτο είναι τα πιο σημαντικά. (Burton 2011, Poljsak 2013, Riley 1994, Gutteridge 1994, Pisoschi 2015). Οι όροι δραστικοί τύποι οξυγόνου (ROS) και δραστικά είδη αζώτου (RNS) αναφέρονται σε δραστικά ριζικά και μη ριζικά παράγωγα οξυγόνου και αζώτου αντίστοιχα (Powers 2011). Τα αντιδραστικά είδη οξυγόνου και αζώτου (RONS) παράγονται από όλα τα αερόβια κύτταρα και παίζουν σημαντικό ρόλο στη γήρανση καθώς και στις ασθένειες που σχετίζονται με την ηλικία (Venkataraman 2013). Η δημιουργία των RONS δεν περιορίζεται μόνο σε επιβλαβείς επιδράσεις αλλά και στην παραγωγή ενέργειας από οργανικά μόρια, στην άμυνα του ανοσοποιητικού συστήματος και στη διαδικασία κυτταρικής σηματοδότησης (Genestra 2007 Liguori 2018).

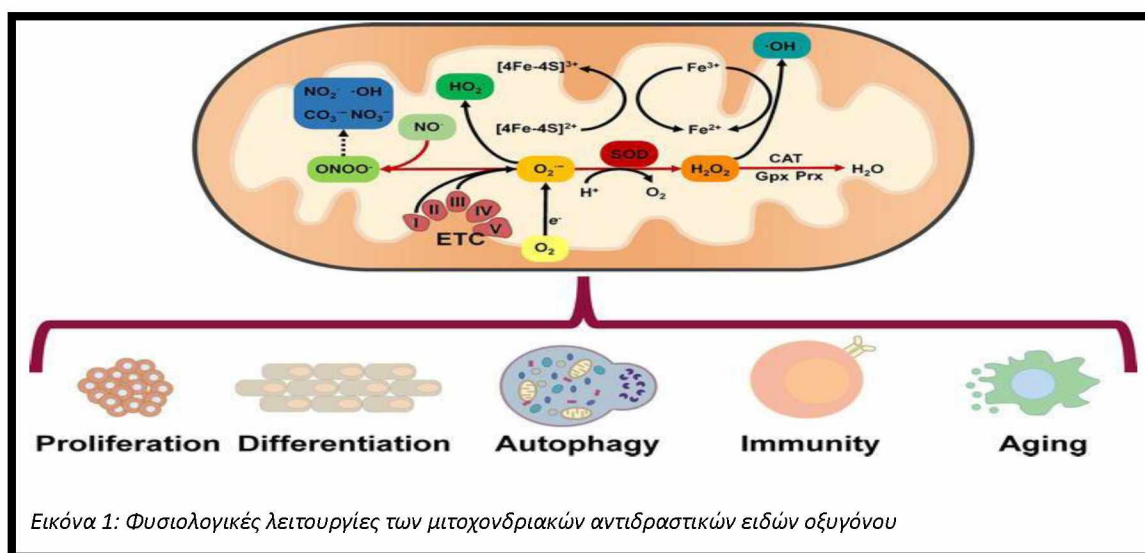
Ο όρος «αντιδρώντα είδη οξυγόνου» εφαρμόζεται τόσο στις ελεύθερες ρίζες όσο και στις μη ριζικές ενδιάμεσες ενώσεις τους (Burton 2011). Τα αντιδραστικά είδη οξυγόνου (ROS) αντιπροσωπεύονται από οξυγονωμένα μόρια ελευθέρων ριζών και μη ελευθέρων ριζών όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), το υπεροξείδιο (O_2), το οξυγόνο απλής ($1/2 O_2$) και η ρίζα υδροξυλίου (OH) . Αντιδραστικά είδη αζώτου, σιδήρου, χαλκού και θείου απαντώνται επίσης (Halliwell 1992, Riley 1994). Οξειδωτικό στρες και εξασθένιση του οξειδοαναγωγικού ισοζυγίου μπορεί να αποδοθεί σε αυτά τα ριζικά είδη.

Η ενδογενής και εξωγενής δημιουργία των ελευθέρων ριζών δεν μπορεί να παρεμποδιστεί, τόσο λόγω των μεταβολικών διεργασιών που συμβαίνουν, όσο και της δράσης των περιβαλλοντικών οξειδωτικών (Poljsak 2011). Τα δραστικά είδη οξυγόνου και αζώτου (RONS) παράγονται με διάφορες ενδογενείς και εξωγενείς διεργασίες και τα

αρνητικά τους αποτελέσματα εξουδετερώνονται με αντιοξειδωτικές άμυνες. Το οξειδωτικό στρες προκύπτει από την ανισορροπία μεταξύ παραγωγής RONS και αυτών των αντιοξειδωτικών αμυντικών μηχανισμών (Liguori 2018).

Οι πιο σημαντικές ενδογενείς πηγές οξειδωτικών ειδών που είναι υπεύθυνες για τη γήρανση εντοπίστηκαν στα μιτοχόνδρια, κυρίως στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων και αντιδράσεις που καταλύθηκαν με συνθάση από νιτρικό οξύ. Οι μη μιτοχονδριακές πηγές ελευθέρων ριζών είναι η αντίδραση Fenton, το μικροσωμικό σύμπλοκο ενζύμου κυτοχρώματος P450, η υπεροξυσμική βήτα οξείδωση και τα ενεργοποιημένα φαγοκυτταρικά κύτταρα (Gutteridge 1993, Poljsak 2013, Gilca 2007, Pisoschi 2015).

Το μιτοχόνδριο είναι το κύριο οργανικό κύτταρο υπεύθυνο για την παραγωγή ROS (Liu 2002, Inoue 2003). Παράγει ATP μέσω μιας σειράς οξειδωτικών διεργασιών φωσφορυλίωσης. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας, μπορούν να υπάρξουν μειώσεις ενός ή δύο ηλεκτρονίων αντί για τέσσερις μειώσεις ηλεκτρονίων του O_2 , που οδηγούν στο σχηματισμό O_2^- ή H_2O_2 , και αυτά τα είδη μπορούν να μετατραπούν σε άλλα ROS. Άλλες πηγές ROS μπορεί να είναι αντιδράσεις που περιλαμβάνουν υπεροξυσωματικές οξειδάσες (Dvorakova 2000), ένζυμα κυτοχρώματος P-450 (Geiszt 1997), οξειδάσες NADPH (Cheng 2001) ή οξειδάση ξανθίνης (Dorsam 2002, Rahal 2014), (Εικόνα 1).



Εικόνα 1: Φυσιολογικές λειτουργίες των μιτοχονδριακών αντιδραστικών ειδών οξυγόνου

Ενδογενείς και Εξωγενείς πηγές RONS

Οι ενδογενείς πηγές RONS περιλαμβάνουν οξειδάση νικοτιναμιδικής αδενίνης διουκλεοτιδικής φωσφορικής (NADPH) οξειδάσης, μυελοϋπεροξειδάση (MPO), λιποξυγενάση και αγγειοτενσίνη II (Salisbury 2015). Η NADPH οξειδάση είναι η επικρατούσα

πηγή του ριζικού ανιόντος υπεροξειδίου ($O_2\bullet$) που σχηματίζεται από την μείωση ενός ηλεκτρονίου του μοριακού οξυγόνου, με ηλεκτρόνια που παρέχονται από το NADPH, κατά τη διάρκεια της κυτταρικής αναπνοής. Το μεγαλύτερο μέρος του $O_2\bullet$ είναι διασκορπισμένο στο υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) από υπεροξειδική δισμουτάση (SOD) (Genestra 2007). H_2O_2 δεν είναι ελεύθερη ρίζα επειδή δεν έχει μη ζευγαρωμένα ηλεκτρόνια, αλλά είναι ικανό να σχηματίσει το εξαιρετικά αντιδραστικό ROS ανιόν υδροξυλίου ($OH\bullet$) μέσω της αντίδρασης Fenton ή Haber-Weiss. Οι ρίζες υδροξυλίου είναι εξαιρετικά δραστικές και αντιδρούν ιδιαίτερα με τα φωσφολιπίδια στις κυτταρικές μεμβράνες και τις πρωτεΐνες. Στα ουδετερόφιλα, το H_2O_2 παρουσία χλωριούχου και μυελοϋπεροξειδάσης μπορεί να μετατραπεί σε υποχλωριώδες οξύ, ένα ROS που προκαλεί κυρίως βλάβες στις κυτταρικές πρωτεΐνες (Genestra 2007).

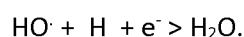
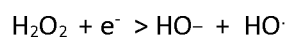
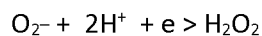
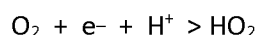
Το μονοξείδιο του αζώτου (NO) παράγεται από την 1-αργινίνη μέσω τριών κύριων ισομορφών συνθάσης νιτρικού οξειδίου (NOS): επιθηλιακού NOS, που σχετίζονται με αγγειοδιαστολή και αγγειακή ρύθμιση, νευρωνικό NOS, που συνδέονται με ενδοκυτταρική σηματοδότηση, και επαγωγίμα NOS, ενεργοποιημένο ως απόκριση σε διάφορα σήματα ενδοτοξίνης ή κυτοκίνης (Adams 2015). Τέλος, το O_2 μπορεί να αντιδράσει με NO για να σχηματίσει ένα άλλο σχετικά δραστικό μόριο, υπεροξυνιτρίτη ($ONOO^-$) (Genestra 2007, Salisbury 2015 Liguori 2018).

Εξωγενείς πηγές RONS είναι ρύπανση από τον αέρα και το νερό, καπνός, αλκοόλ, βαρέα ή μεταβατικά μέταλλα, φάρμακα, βιομηχανικοί διαλύτες, φαγητό (π.χ. καπνιστό κρέας και η ακτινοβολία, η οποία μέσα στο σώμα μεταβολίζεται σε ελεύθερες ρίζες (Phaniendra 2015).

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η συνηθέστερη ελεύθερη ρίζα οξυγόνου είναι το ανιόν υπεροξειδίου ($\bullet O_2^-$), και τα μιτοχόνδρια θεωρούνται η κύρια πηγή (Cadenas & Davies 2000). Η μεταφορά ηλεκτρονίων κατά μήκος των ενζύμων της αναπνευστικής αλυσίδας δεν είναι απόλυτα αποτελεσματική και διαρροή ηλεκτρονίων στο μοριακό οξυγόνο έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό ($\bullet O_2^-$). Ο ρυθμός σχηματισμού προσδιορίζεται από τον αριθμό των ηλεκτρονίων που υπάρχουν στην αλυσίδα και έτσι αυξάνεται υπό συνθήκες υπεροξίας ή υπό συνθήκες υποξίας. Υπό κανονικές συνθήκες, το 2% του καταναλισκόμενου οξυγόνου μετατρέπεται σε O_2 στα μιτοχόνδρια αντί να αναχθεί σε νερό. Λόγω του φορτίου του, το O_2 είναι αδιαπέραστο από τις μεμβράνες και έτσι παραμένει εντός του μιτοχονδριακού πλέγματος (Burton 2011).

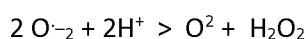
Στην αερόβια διαδικασία όπου χρησιμοποιείται οξυγόνο για την οξείδωση των βιομάζων που περιέχουν άνθρακα και υδρογόνο για να παράγουν χημική ενέργεια και θερμότητα, το μοριακό οξυγόνο μειώνεται σταδιακά σε μια σειρά ενδιάμεσων ειδών:

υδροπεροξυλική ρίζα, ανιόν ριζών υπεροξειδίου, υπεροξείδιο υδρογόνου, υδροξύλιο και ρίζα υδροξυλίου. Η προοδευτική μείωση μοριακού οξυγόνου συμβαίνει ως εξής (Poljsak 2011, Pisoschi 2015)



Το υπεροξείδιο προκύπτει από μία μείωση ηλεκτρονίων οξυγόνου από διάφορες οξειδάσες, όπως οξειδάση διουκλεοτιδίου φωσφορικής δινικοτιναμίδης αδενίνης, οξειδάση ξανθίνης, κυκλοοξυγονάση. Τα ανιόντα ριζών υπεροξειδίου μπορούν επίσης να σχηματιστούν στην μιτοχονδριακή αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, κατά την πορεία οξειδωτικής φωσφορυλίωσης που παράγει ATP (Evans 2005, Droese 2012). Η πρωτονωμένη μορφή, η υδροϋπεροξυλική ρίζα είναι τόσο ισχυρότερο οξειδωτικό όσο και αναγωγικό από το ανιόν υπεροξειδίου, αλλά το υδροϋπεροξύλιο είναι πολύ λιγότερο σταθερό από το ανιόν υπεροξειδίου, σε pH 7,40: σε αυτή την τιμή φυσιολογικού pH, η υδροπεροξυλική ρίζα $\text{HO}_2 \cdot$ με τιμή pK_a 4,80, αποσυνδέεται, οδηγώντας στη ρίζα ανιόντων υπεροξειδίου (Poljsak 2011).

Το ανιόν υπεροξειδίου διακρίθηκε ως ενεργό πυρηνόφιλο, ικανό να προσβάλλει θετικά φορτισμένα κέντρα και ως οξειδωτικός παράγοντας που μπορεί να αντιδρά με δότες υδρογόνου (π.χ. ασκορβικό και τοκοφερόλη). Η ρίζα ανιονικού υπεροξειδίου μπορεί να απομακρυνθεί, αποδίδοντας μοριακό οξυγόνο και υπεροξείδιο του υδρογόνου (Kohen 2002, Pisoschi 2015).



Το ανιόν ριζών υπεροξειδίου μπορεί να μετασχηματιστεί με ένζυμα που ανήκουν στην οικογένεια υπεροξειδίων δισμουτάσης, οι οποίες καταστρέφουν τις ρίζες ανιόντων υπεροξειδίου που προκύπτουν από τη δράση εξωκυτταρικών παραγόντων (συμπεριλαμβανομένης της ιονίζουσας ακτινοβολίας και οξειδωτικών βλαβών) ή από τον μεταβολισμό οξυγόνου στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων (Gandhi 2012, Miao 2009).

Το υπεροξείδιο του υδρογόνου H_2O_2 μπορεί να παραχθεί από οποιοδήποτε σύστημα που παράγει υπεροξείδιο. Η παρουσία οξειδάσεων (ουρική οξειδάση, οξειδάση γλυκόζης, οξειδάση D-αμινοξέος) μπορεί να οδηγήσει σε άμεση σύνθεση υπεροξειδίου του υδρογόνου με μεταφορά δύο ηλεκτρονίων σε μοριακό οξυγόνο (Poljsak 2011). Άλλες πηγές υπεροξειδίου υπό φυσιολογικές συνθήκες περιλαμβάνουν τα ένζυμα νικοτιναμίδική αδενίνη

δινουκλεοτιδική φωσφορική (NADPH) οξειδάση, η οποία παράγει σημαντικές ποσότητες κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης αλλά ιδιαίτερα στην πρώιμη εγκυμοσύνη, (Raijmakers 2006) κυτοχρώμα-P450 και άλλες οξειδοαναγωγάσες (Burton 2011). Ομοίως, το υπεροξειδίο μπορεί επίσης να δημιουργηθεί διαμέσου διαρροής ηλεκτρονίων από την συντομότερη αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων εντός του ενδοπλασματικού δικτύου (ER). (Tu 2004). Ο σχηματισμός δεσμών δισουλφιδίου κατά την αναδίπλωση πρωτεΐνης είναι μια οξειδωτική διαδικασία και παράγεται περίπου 25% O_2 μέσα στα κύτταρα εντός του ER. (Burton 2011).

Το υπεροξειδίο του υδρογόνου δεν είναι ελεύθερη ρίζα και έτσι είναι λιγότερο δραστικό από το O_2 . Εντούτοις, εμπίπτει στον όρο της ROS καθώς εμπλέκεται στενά στην παραγωγή και την αποτοξίνωση των ελεύθερων ριζών. Δεδομένου ότι είναι μη πολικό, είναι ικανό να διαχέεται μέσω μεμβρανών κυττάρων και οργανιδίων και ως εκ τούτου δρα ευρέως ως δεύτερος αγγελιοφόρος σε οδούς μεταγωγής σήματος (Burton 2011). Το H_2O_2 είναι ικανό να παράγει εξαιρετικά δραστικές ρίζες ως αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασής του με ιόντα μετάλλων (Poljsak 2011). Η υπερβολική παραγωγή υπεροξειδίου μπορεί επίσης να οδηγήσει σε αλληλεπιδράσεις με νιτρικό οξείδιο (NO) για να σχηματίσει υπεροξυνιτρώδες (ONOO). Ο υπεροξυνιτρώδης είναι ένα ισχυρό προ-οξειδωτικό. Καθώς είναι ικανό να διαχέεται, μέχρι 5 nm, και μπορεί να επηρεάσει τα γειτονικά κύτταρα (Pacher 2007, Burton 2011).

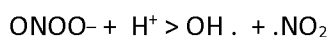
Η άμεση δράση του H_2O_2 περιλαμβάνει την επίθεση στη δομή των πρωτεϊνών με την απελευθέρωση του σιδήρου, την απενεργοποίηση των ενζύμων και την οξείδωση του DNA, των λιπιδίων, των ομάδων -SH και των κετο-οξέων (Kohen 2002). (Pisoschi 2015) Το H_2O_2 μπορεί να εξαντληθεί από την καταλάση, το ένζυμο που περιέχει σιδηρόθεμα που εμπλέκεται στην μετατροπή του υπεροξειδίου του υδρογόνου (αλλά όχι σε άλλα υπεροξειδία) σε νερό (Gandhi 2012, Droge 2002).

Η ρίζα OH είναι ένα εξαιρετικά επιθετικό ριζικό είδος, υπεύθυνο για την οξειδωτική βλάβη των περισσότερων βιομορίων. Αυτές οι ιδιαίτερα βλαπτικές ρίζες υδροξυλίου προκύπτουν από αντιδράσεις τύπου Fenton, μπορεί επίσης να προκύψουν από την ραδιόλυση του νερού (Poljsak 2011). Το OH έχει αναφερθεί ως η ισχυρότερη οξειδωτική ρίζα που μπορεί να αλληλοεπιδράσει με τα περισσότερα οργανικά και ανόργανα μόρια, DNA, πρωτεΐνες, λιπίδια, αμινοξέα, σάκχαρα και μέταλλα. Αυτές οι αντιδράσεις χαρακτηρίζονται από υψηλό ρυθμό που δίδει την αντιδραστικότητα και τη βραχεία διάρκεια ζωής των ριζών υδροξυλίου και περιλαμβάνει την άντληση, προσθήκη και μεταφορά ηλεκτρονίων (Kohen 2002, Halliwell 1990).

Το μοριακό οξυγόνο δεν είναι ελεύθερη ρίζα, αλλά θεωρείται οξυγονωμένο είδος με υψηλή αντιδραστικότητα, καθώς απομακρύνεται ο περιορισμός του οξυγόνου, ο οποίος

ενισχύει την οξειδωτική του ισχύ (Poljsak 2011). Το όζον αποδείχθηκε ιδιαίτερα οξειδωτικό προς τις πνευμονικές πρωτεΐνες, τα λιπίδια και το DNA (Pisoschi 2015).

Το μονοξειδίο του αζώτου και το διοξειδίο του αζώτου παρουσιάζουν μη ζευγαρωμένα ηλεκτρόνια και επομένως μπορούν να θεωρηθούν ως ελεύθερες ρίζες, ενώ το οξειδίο του αζώτου, όχι (Poljsak 2011). Το ενδογενές μονοξειδίο του αζώτου, βιοσυνθεμένο από την L-αργινίνη, το οξυγόνο και το NADPH, από ένζυμα που ανήκουν στην κατηγορία συνθάσης νιτρικού οξειδίου ή με αναγωγή ανόργανου νιτρικού άλατος, είναι ένα από τα σπάνια σηματοδοτικά μόρια που εμπλέκονται στη αγγειοδιαστολή και τη νευροδιαβίβαση. Επίσης απελευθερώνεται από τα φαγοκύτταρα (μονοκύτταρα, μακροφάγα και ουδετερόφιλα) ως αποτέλεσμα της αντίδρασης του ανοσοποιητικού συστήματος. Αντιδρά με ανιόν ριζών υπεροξειδίου, δίνοντας ένα εξαιρετικά δραστικό, επιβλαβές είδος αζώτου, δηλαδή υπεροξυνιτρίτη, ένα ισχυρό οξειδωτικό έναντι πολλών βιολογικών μορίων. Ο υπεροξυνιτρίτης μπορεί να αποσυντεθεί για να δώσει ρίζες υδροξυλίου, ανεξάρτητα από την παρουσία μεταβατικών μετάλλων (Poljsak 2011, Hou 1999, Stryer 1995, Green 1990)

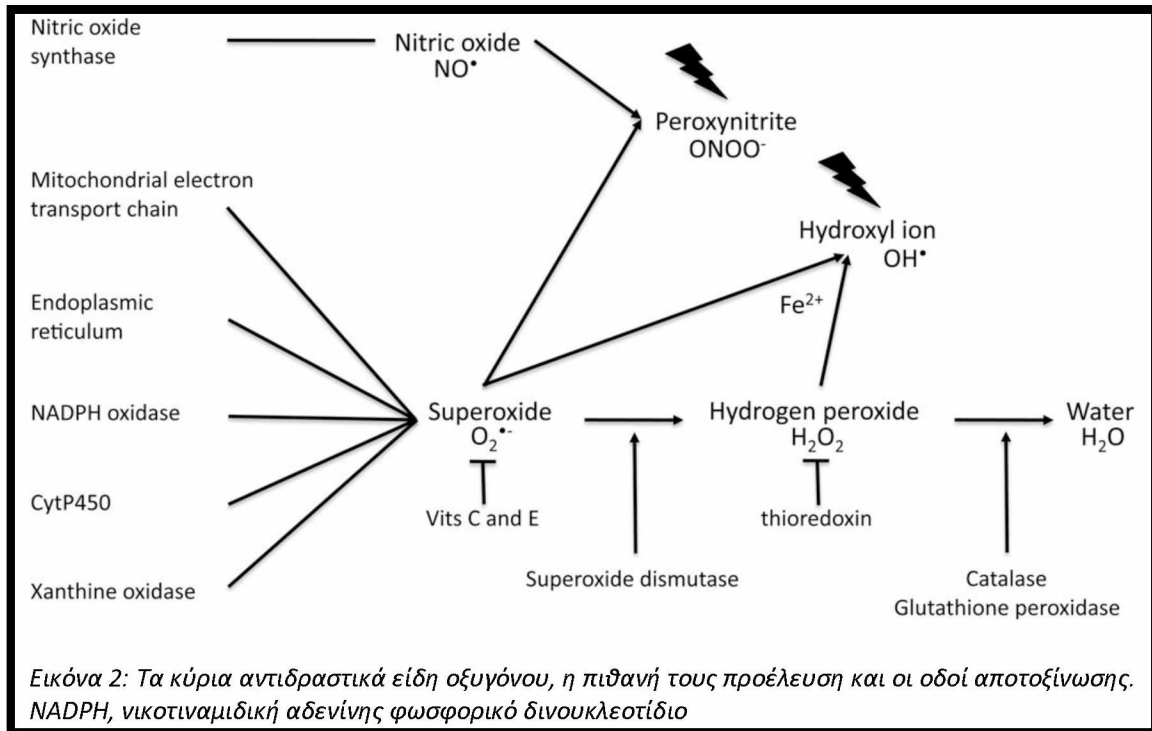


Η πρωτονιωμένη μορφή του υπεροξυνιτρώδους (ONOOH) είναι ένας ισχυρός οξειδωτικός παράγοντας που καθορίζει την εξάντληση των σουλφυδρυλικών ομάδων και την οξειδωτική βλάβη στα περισσότερα βιομόρια, ενεργώντας όμοια με τη ρίζα υδροξυλίου. Είναι επίσης υπεύθυνη για την καταστροφή του DNA και προκαλεί θραύσεις, οξείδωση πρωτεϊνών και νίτρωση των χαρακτηριστικών αρωματικών αμινοξέων σε πρωτεϊνική δομή (π.χ. 3-νιτροσοτυροσίνη) (Kohen 2002). Οι βασικές βιοχημικές αντιδράσεις που αφορούν το νιτρικό οξειδίο είναι επίσης η S- νίτρωση τωνθειολών και η νιτροζυλίωση των ιόντων μεταβατικών μετάλλων (van Faassen 2005).

Το υποχλωριώδες οξύ προκύπτει εξαιτίας της παρουσίας μυελοϋπεροξειδάσης σε μακροφάγα και ουδετερόφιλα και είναι προικισμένο με υψηλές οξειδωτικές ικανότητες. Η μυελοϋπεροξειδάση είναι υπεύθυνη για την καταλυτική παραγωγή υποχλωριώδους οξέος από υπεροξειδίο του υδρογόνου παρουσία ανιόντος χλωριδίου. Το HClO επάγει οξειδωτική χλωρίωση σε βιομόρια όπως λιπίδια, πρωτεογλυκάνες, αμινοξέα και επίσης άλλες μεμβρανικές ή ενδοκυτταρικές ενώσεις (Locatelli 2003).

Στη έναρξη και την αναπαραγωγή των ROS εμπλέκονται αρκετά κύτταρα και ενδογενή κυτταρικά συστατικά και είναι αυτοί οι παράγοντες οι οποίοι παίζουν καθοριστικό ρόλο στη διατήρηση της κυτταρικής ομοιόστασης. Ένας παράγοντας άγχους λειτουργεί για την έναρξη οποιουδήποτε από αυτούς τους μηχανισμούς. Όταν οι ομοιοστατικές μέθοδοι αποτυγχάνουν και η δημιουργία ελεύθερων ριζών υπερβαίνει κατά πολύ την ικανότητα της άμυνας του σώματος προκαλείται το οξειδωτικό στρες προωθώντας έτσι την κυτταρική

βλάβη και την βλάβη των ιστών. Αυτή η βλάβη μπορεί να περιλαμβάνει το κυτταρικό DNA, την υπεροξείδωση των πρωτεϊνών της κυτταρικής μεμβράνης, εισροή ασβεστίου και την μιτοχονδριακή διόγκωση και λύση (Reed 1995, Younes 1999, Marks 1996, Rahal 2014).



Εικόνα 2: Τα κύρια αντιδραστικά είδη οξυγόνου, η πιθανή τους προέλευση και οι οδοί αποτοξίνωσης. NADPH, νικοτιναμινική αδενίνης φωσφορικό δινουκλεοσίδιο

Οξειδωτικό Στρες

Για τις δύο τελευταίες δεκαετίες, το οξειδωτικό στρες ήταν ένα από τα πιο καυτά θέματα μεταξύ των βιολογικών ερευνών σε όλο τον κόσμο. Μπορούν να θεωρηθούν πολλοί λόγοι όπου δικαιολογούν τη σπουδαιότητά του, όπως η γνώση σχετικά με την παραγωγή δραστικού οξυγόνου και αζωτούχων ειδών και την αναγνώριση βιολογικών δεικτών για οξειδωτική βλάβη, στοιχεία σχετικά με την εκδήλωση χρόνιων αλλά και οξειών προβλημάτων υγείας συνεπεία του οξειδωτικού στρες, την αναγνώριση διαφόρων διαιτητικών αντιοξειδωτικών που υπάρχουν στις φυτικές τροφές ως βιοδραστικά μόρια και ούτω καθεξής (Rahal 2014).

Το βλαβερό αποτέλεσμα των ελεύθερων ριζών ROS και RNS που προκαλούν δυνητική βιολογική βλάβη ονομάζεται οξειδωτικό στρες και νιτροζωτικό στρες, αντίστοιχα (Konacic 2001, Ridnour 2005, Valko 2001, Durackova 2007). Αυτό είναι εμφανές στα βιολογικά συστήματα όταν υπάρχει είτε υπερβολική παραγωγή ROS / RNS και / ή ανεπάρκεια των ενζυμικών και μη-ενζυμικών αντιοξειδωτικών. Το οξειδωτικό στρες είναι μια σύνθετη διαδικασία και η επίδρασή του στον οργανισμό εξαρτάται από τον τύπο του οξειδωτικού, από την τοποθεσία και την ένταση της παραγωγής του, από τη σύνθεση και τις δραστηριότητες διαφόρων αντιοξειδωτικών και από την ικανότητα των συστημάτων επισκευής (Durackova 2007).

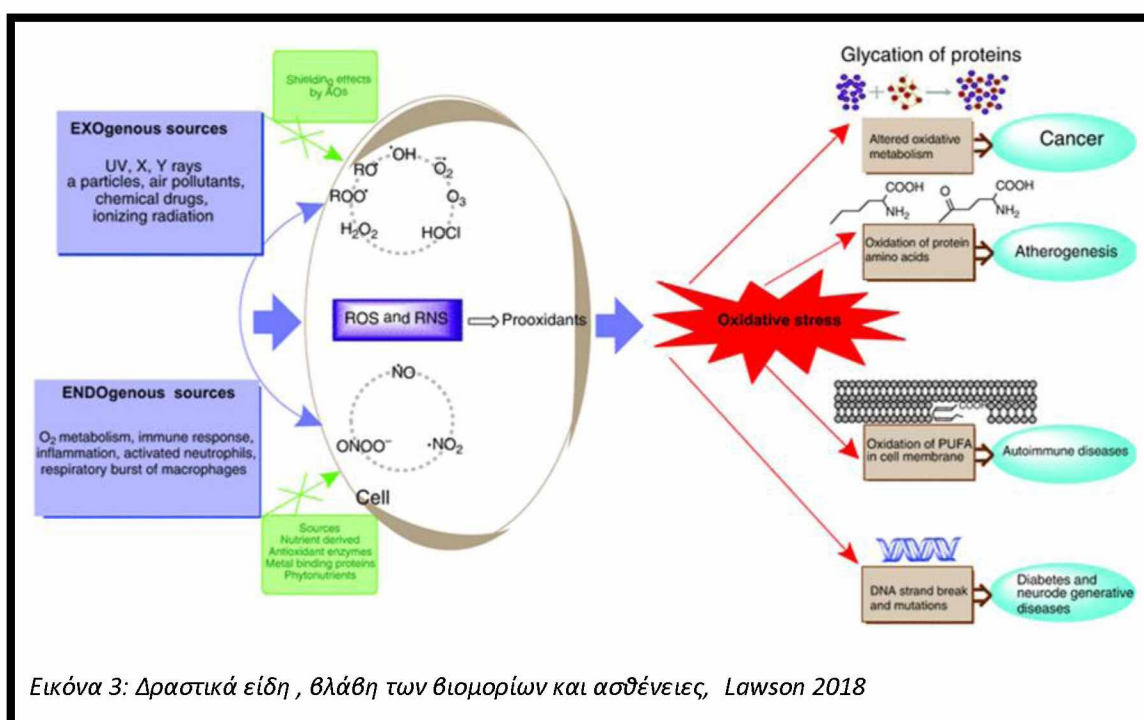
Το οξειδωτικό στρες χαρακτηρίστηκε αρχικά από το Sies (Sies 1991) ως "διαταραχή της αντιοξειδωτικής ισορροπίας υπέρ του οξειδωτικού είδους, που οδηγεί σε πιθανή βλάβη" (Al-Gubory 2010). Το οξειδωτικό στρες ορίστηκε ως η έλλειψη ισορροπίας μεταξύ της εμφάνισης δραστικών ειδών οξυγόνου / αζώτου (ROS / RNS) και της ικανότητας του οργανισμού να αντισταθμίζει τη δράση τους από τα συστήματα αντιοξειδωτικής προστασίας (Persson 2014, Burton 2010, Cindrova-Davies 2007, Ruder 2009) Το οξειδωτικό στρες είναι η επίδραση μιας αυξημένης εμφάνισης ελεύθερης ρίζας, αλλά και μιας μειωμένης δραστηριότητας του προστατευτικού αντιοξειδωτικού αμυντικού συστήματος (Poljsak, 2013, Pisoschi 2015). Η υπερβολική παραγωγή ROS, ωστόσο, μπορεί να υπερνικήσει το φυσικό αντιοξειδωτικό αμυντικό σύστημα του σώματος, δημιουργώντας ένα ακατάλληλο περιβάλλον για φυσιολογικές αντιδράσεις (Al-Gubory 2010, Agarwal 2012).

Το οξειδωτικό στρες εξαρτάται εν μέρει από το κυτταρικό διαμέρισμα στο οποίο παράγονται τα ROS. Υπάρχουν πολλές πιθανές πηγές ROS και οι σχετικές συνεισφορές αυτών θα εξαρτηθούν από τις επικρατούσες περιβαλλοντικές συνθήκες. Καθώς οι αντιδράσεις των ROS είναι συχνά περιορισμένες από τη διάχυση, οι επιδράσεις στη λειτουργία των κυττάρων εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τα βιομόρια που βρίσκονται σε άμεση γειτνίαση. Κατά

συνέπεια, διάφορες προσβολές θα οδηγήσουν σε διαφορετικά αποτελέσματα. (Burton 2011).

Η Χημεία του οξειδωτικού στρες: RONS & Βλάβες των Βιομορίων

Το RONS, είτε είναι ενδογενή είτε εξωγενή, προκαλούν οξειδωτική τροποποίηση σε καθένα από τα κύρια κυτταρικά μακρομόρια (υδατάνθρακες, λιπίδια, πρωτεΐνες και DNA) (Salisbury 2015), τα οποία μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες οξειδωτικού στρες (Frijhoff 2015). Το οξειδωτικό στρες καθορίζει τις τροποποιήσεις της δομής και τη διαμόρφωση της λειτουργίας σε νουκλεϊκά οξέα, λιπίδια και πρωτεΐνες (Εικόνα 3). Τα δραστικά είδη οξυγόνου ρυθμίζουν τη λειτουργία όλων των κατηγοριών βιομορίων, με στόχο σχεδόν όλα τα υποστρώματα στο κύτταρο. (Pisoschi 2015).



Εικόνα 3: Δραστικά είδη, βλάβη των βιομορίων και ασθένειες, Lawson 2018

Τα αντιδραστικά είδη οξυγόνου είναι ικανά να οξειδώσουν τόσο τη ραχοκοκαλιά όσο και την πλευρική αλυσίδα των πρωτεϊνών, οι οποίες στη συνέχεια αλληλοεπιδρούν με τις πλευρικές αλυσίδες αμινοξέων για να παράγουν καρβονυλικές ενώσεις (Pisoschi 2015). Το καρβονύλιο πρωτεΐνης (PC) σχηματίζεται με αντίδραση Fenton οξειδωτικών με λυσίνη, αργινίνη, προλίνη και θρεονίνη υπολείμματα πρωτεϊνικών πλευρικών αλυσίδων (Barreiro 2016). Πρωτεϊνική βλάβη μπορεί να προκληθεί με οξείδωση θειόλης, καρβονυλίωση, οξείδωση πλευρικής αλυσίδας, θρυμματισμό, εκδίπλωση και την εσφαλμένη αναδίπλωση, με αποτέλεσμα απώλεια δραστηριότητας (Headlamand 2004, Pisoschi 2015). Οι καρβονυλικές ομάδες μπορούν επίσης να προέρχονται από τη δέσμευση αλδεϋδικών προϊόντων οξείδωσης

λιπιδίων σε λυσίνη, κυστεΐνη ή υπολείμματα ιστιδίνης αποκαλούμενες αντιδράσεις προσθήκης Michael (Frijhoff 2015). Οι αντιδράσεις μεταξύ RNS και υπολειμμάτων τυροσίνης που είναι ελεύθερες ή εντός πολυπεπτιδικών αλληλουχιών επάγουν τον σχηματισμό νιτροτυροσίνης (NT) (Frijhoff 2015).

Όλα τα αμινοξέα, τόσο ελεύθερα όσο και σε πρωτεΐνες, είναι ευαίσθητα στην οξείδωση, οι κυστεΐνες και οι μεθειονίνες είναι άμεσα οξειδωτικές. Ωστόσο, πολλές από αυτές τις οξειδώσεις είναι αναστρέψιμες λόγω της δραστικότητας των δισουλφιδικών αναγωγάσεων. Μια σειρά *in vivo* μη αναστρέψιμων αλλοιώσεων μπορεί να συμβεί, όπως ο σχηματισμός της S-καρβοξυμεθυλοκυστεΐνης και της S- (2-Succinyl) κυστεΐνης (Alderson 2006, Zeng 2005). Αυτό συνεπάγεται σχηματισμό φουμαρικών και δικαρβονυλίου, ομοιοπολικά συνδεδεμένων με υπολείμματα κυστεΐνης. Η οξείδωση της λυσίνης, της προλίνης, της αργινίνης και της θρεονίνης παράγει επίσης δείκτες καρβονυλικών παραγόντων (Berlett 1997, Sung 2013, Pisoschi 2015). Τα αρωματικά αμινοξέα είναι επίσης επιδεκτικά να οξειδωθούν, η οξείδωση της τυροσίνης με ρίζα OH οδηγεί σε διτυροσίνη, η αντίδραση με δραστικά αζωτούχα είδη σχηματίζει 3-νιτροτυροσίνη, ενώ η αντίδραση με HClO δίνει 3-χλωροτυροσίνη (Sung 2013).

Σε φυσιολογικά επίπεδα, η νίτρωση πρωτεΐνης πιστεύεται ότι είναι μια εκλεκτική και αναστρέψιμη διαδικασία που οδηγεί σε ενεργοποίηση με τρόπο ανάλογο με τη φωσφορυλίωση, αλλά σε υψηλότερα επίπεδα μπορεί να είναι επιζήμια (Myatt 2010, Burton 2011). Η άντληση ιόντων υδρογόνου από την ομάδα θειόλης της κυστεΐνης μπορεί να οδηγήσει στον σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών και στην ανώμαλη αναδίπλωση πρωτεϊνών. Η μη φυσιολογική δίπλωση μπορεί να οδηγήσει σε απώλεια της λειτουργίας, αλλά και στη συσσώρευση πρωτεϊνών και στον κυτταρικό θάνατο (Burton 2011).

Οι λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας (LDLs) είναι οι κύριοι φορείς της χοληστερόλης στους ιστούς του σώματος. Η οξείδωση της LDL είναι μια περίπλοκη διαδικασία κατά τη διάρκεια της οποίας τόσο η πρωτεΐνη όσο και τα λιπίδια υφίστανται οξειδωτικές αλλαγές που μπορούν να προκαλέσουν συσσώρευση χοληστερόλης (Tzavara 2015).

Τα λιπίδια είναι τα πιο ευάλωτα σε οξείδωση. Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFAs), ιδιαίτερα τα λινολεϊκά και αραχιδονικά οξέα, είναι άλλοι σημαντικοί στόχοι της υπεροξειδωσης των λιπιδίων, μεσολαβούμενη από ρίζες υδροξυλίου και υπεροξυλίου. Η οξείδωση των λιπιδίων έχει βλαβερές συνέπειες στις κυτταρικές μεμβράνες. Η υπεροξειδωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων οδηγεί σε ισοπροσάνες (Milne 2005), σε αντιδραστικές αλδεΐδες, όπως μηλονική αλδεΐδη και 4-υδροξυεπενάλη. Οι τελευταίες

μπορούν να προσκολληθούν σε πρωτεΐνες και μπορεί συνεπώς να βλάψουν τη λειτουργία τους (Doorn 2003, Pisoschi 2015, Reynaert 2016).

Οι ρίζες υδροξυλίου είναι ικανές να προκαλούν υπεροξειδωση λιπιδίων στη μεμβράνη του πλάσματος ή σε οποιοδήποτε οργανίδιο που περιέχει μεγάλες ποσότητες πλευρικών αλυσίδων πολυακόρεστων λιπαρών οξέων. Με την απόσπαση υδρογόνου από την πλευρική αλυσίδα υδρογονανθράκων ενός λιπαρού οξέος, δημιουργούν μια ρίζα που έχει κεντρική θέση στον άνθρακα, C. Εάν υπάρχει οξυγόνο, αυτό μπορεί να αντιδράσει για να σχηματίσει μια ρίζα υπεροξυλίου (-C-OO), η οποία με τη σειρά της είναι ικανή να αντλεί υδρογόνο από ένα γειτονικό λιπαρό οξύ, ώστε να πολλαπλασιαστεί η αντίδραση (Burton 2011).

Τα ROS βλάπτουν τα νουκλεϊκά οξέα, επειδή μπορούν να προκαλέσουν διασταυρούμενη σύνδεση DNA-πρωτεΐνης, σπάσιμο κλώνου και αλλοίωση της δομής βάσεων πουρίνης και πυριδίνης, έχοντας ως αποτέλεσμα μεταλλάξεις DNA (Gandhi 2012, Pisoschi 2015). Το DNA προσβάλλεται κυρίως από ρίζες OH και μια ποικιλία προϊόντων μπορεί να δημιουργηθεί μέσω αντιδράσεων είτε με τις βάσεις DNA είτε με τα σάκχαρα δεοξυριβόζης (Halliwell 2002). Για παράδειγμα, το OH μπορεί να προστεθεί στην γουανίνη για να παράγει 8-υδροξυ-2'-δεοξυγουανοσίνη, η οποία μπορεί να μετρηθεί βιοχημικά και να ανιχνευθεί ανοσοϊστοχημικά. Οι επιθέσεις στα τμήματα σακχάρου μπορεί να προκαλέσουν θραύσεις των κλώνων, ενώ εκείνες στις πρωτεΐνες ιστονών μπορεί να οδηγήσουν σε διασυνδέσεις που παρεμποδίζουν την αναδίπλωση της χρωματίνης, την επιδιόρθωση και μεταγραφή του DNA. Συνεπώς, μπορεί να προκύψει μετάλλαξη ή αποκλίνουσα γονιδιακή έκφραση (Burton 2011, Jacob 2013, Liguori 2018, Pisoschi 2015).

Το μιτοχονδριακό DNA είναι ιδιαίτερα ευάλωτο στην επίθεση ROS λόγω της εγγύτητάς του με τη θέση της παραγωγής O₂ από την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, την έλλειψη προστασίας από την ιστόνη και τους ελάχιστους μηχανισμούς επιδιόρθωσης που υπάρχουν. Κατά συνέπεια, η βλάβη στο μιτοχονδριακό DNA είναι εκτεταμένη ακόμη και κάτω από κανονικές συνθήκες και οι μεταλλάξεις εμφανίζονται πέντε με δέκα γρηγορότερα σε σχέση με το πυρηνικό DNA (Richter 1988). Καθώς το μιτοχονδριακό DNA κωδικοποιεί διάφορες πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένων των ενζύμων της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων, οι μεταλλάξεις μπορεί να οδηγήσουν σε μειωμένη παραγωγή ενέργειας και ο κίνδυνος περαιτέρω διαρροής ηλεκτρονίων (Burton 2011).

Η οξειδωση των βάσεων RNA συμβαίνει παρομοίως, με τον πιο σχετικό δείκτη να είναι το ομόλογο της 8-υδροξυδεοξυγουανοσίνης, 8-υδροξυγουανοσίνης (Roulsen 2012). Υποστηρίχθηκε ότι το RNA μπορεί πιο εύκολα να υποβληθεί σε οξειδωση, τοποθετημένο σε στενότερη γειτνίαση με τις θέσεις εμφάνισης ROS στο κύτταρο. Το κύριο αποτέλεσμα της

οξειδώσεως του RNA αντιπροσωπεύεται από τη θραύση του νουκλεοτιδικού κλώνου και επίσης από τη ριβοσωμική δυσλειτουργία (Ding 2005, Pisoschi 2015).

Η αντιοξειδωτική άμυνα προστατεύει τα βιολογικά συστήματα από την τοξικότητα των ελεύθερων ριζών και περιλαμβάνει τόσο τα ενδογενή όσο και τα εξωγενή μόρια. Η έλλειψη ισορροπίας μεταξύ των οξειδωτικών και του αντιοξειδωτικού αμυντικού συστήματος μπορεί να προκαλέσει συγκεκριμένους παράγοντες υπεύθυνους για οξειδωτική βλάβη στο κύτταρο, υπερεκφράσεις γονιδίων και ογκογονιδίων, παραγωγή μεταλλαξιογόνων ενώσεων, προαγωγή της αθηρογενετικής δραστηριότητας, εμφάνιση φλεγμονής. Αυτό οδηγεί σε καρκίνο, νευροεκφυλισμό, καρδιαγγειακές παθήσεις, διαβήτη, νεφροπάθειες καθώς σχετίζεται και με την υπογονιμότητα (Pisoschi 2015).

Οξειδωτικό Στρες και Κυτταρική Οξειδωτική Αναγωγή

Είναι σημαντικό να υπενθυμίσουμε ότι η νέα έννοια του οξειδωτικού στρες δεν περιορίζεται στη βλάβη των ελεύθερων ριζών στα βιομόρια, αλλά βασίζεται στον εντοπισμό διαταραχών της κυτταρικής οξειδοαναγωγής (Lopez-Alarcon 2013). Με βάση τις πρόσφατες μελέτες για τις οδούς σηματοδότησης οξειδοαναγωγής, τον αντιοξειδωτικό μηχανισμό και τους δείκτες οξειδωτικού στρες, ο Dean Jones επαναπροσδιορίζει το οξειδωτικό στρες ως «διακοπή της σηματοδότησης και ελέγχου οξειδοαναγωγής», επομένως η δράση των αντιοξειδωτικών συστημάτων θεωρείται πιο περίπλοκη απ' αντιδραστικές ελεύθερες ρίζες (Jones 2006, Finley 2011).

Σε αυτή την προοπτική, έχουν περιγραφεί τα στάδια εμφάνισης ROS εστιάζοντας στο πώς αυτή η διαδικασία παραγωγής λαμβάνει χώρα στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων στην εσωτερική μεμβράνη μιτοχονδρίων (Persson 2014, Koorman 2010). Στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται από NADH και FADH₂ σε μοριακό οξυγόνο από τέσσερα μεμβρανικά δεσμευμένα σύμπλοκα (I - IV), με αποτέλεσμα την παροχή νερού (Koorman 2010). Σε αυτή τη διαδικασία, διαφεύγουν ηλεκτρόνια από την εσωτερική μεμβράνη και είναι ικανά να μειώνουν το μοριακό οξυγόνο σε ανιόντα ριζών υπεροξειδίου (O₂⁻). Το τελευταίο μπορεί να οδηγήσει σε άλλα ROS, όπως υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂), ρίζες υδροξυλίου (OH[·]) και ιόντα υδροξυλίου (OH). Τα δραστικά είδη αζώτου αναδύονται όταν το O₂ αντιδρά με οξειδίου του αζώτου (NO) για να παράγει υπεροξυνιτρίτη (ONOO⁻). Επιπλέον, αυτά είναι ικανά να σχηματίσουν άλλους τύπους αζωτούχων ειδών, όπως το διοξειδίου του αζώτου (NO₂) και το νιτροϋπεροξυανθρακικό (ONOOCOO⁻). Τα αστροκύτταρα εγκεφάλου και τα μικρογλοία παράγουν ROS και RNS όταν πυροδοτούνται και επίσης σε αντιδράσεις που καταλύονται από κατιόντα μεταβατικών μετάλλων, όπως ιόντα χαλκού και σιδήρου. Οι μεταβολές στο DNA, το RNA, τα λιπίδια και η πρωτεϊνική δομή που ξεκίνησε με

το ROS / RNS, μπορούν στη συνέχεια να οδηγήσουν σε πιο δραστικά μόρια (Doorn 2003, Pisoschi 2015)

Μια ενδιαφέρουσα πτυχή του στρες είναι ότι η βλάβη των μιτοχονδριακών μεμβρανών και της πρωτεϊνικής δομής μπορεί, με τη σειρά του να ενισχύουν την παραγωγή δραστικών οξυγονωμένων ειδών, οδηγώντας σε εξασθένηση του DNA και κυτταρικό θάνατο από απόπτωση (Ricci 2008). Η ρύθμιση της απόπτωσης που ρυθμίζεται από την κινάση-1 θεωρήθηκε σημαντικός δείκτης λαμβάνοντας υπόψη την έναρξη της απόπτωσης με οξειδωτικό στρες. Η δραστηριότητά της ελέγχεται κυρίως από θειορεδοξίνη-1, την οξειδοαναγωγική οξειδοαναγωγή που δεσμεύει την ανοιγμένη μορφή της κινάσης-1 ρυθμίζοντας την απόπτωση (Saitoh 1998). Όταν η θειορεδοξίνη-1 οξειδώνεται, εμποδίζεται η πρόσδεση σε κινάση-1 που ρυθμίζει την απόπτωση, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της επακόλουθης απόπτωτικής οδού του c-Jun N-τερματικής κινάσης (Nadeau 2007). Η δραστικότητα της κινάσης-1, ρυθμιστή του σήματος απόπτωσης, συντονίζεται επίσης από άλλες οξειδοαναγωγικές πρωτεΐνες που περιλαμβάνουν γλουταρεδοξίνη, πρωτεΐνες θερμικού σοκ και γλουταθειόνη-τρανσφεράση (Pisoschi 2015). Ένας άλλος ρυθμιστής της οξειδωτικής-μεσολαβούμενης απόπτωσης είναι η p53, η οποία μετά την μετατόπισή της στον πυρήνα είναι ικανή να ενεργοποιήσει προαποπτωτικά γονίδια (Yamamoto 2007, Pisoschi 2015).

Τα ROS ή τα RNS θεωρούνται όχι μόνο ως είδη ικανά να προκαλέσουν τη βλάβη των βιομορίων αλλά υποστηρίχθηκε ότι τα ενζυμικά συστήματα συνθέτουν δραστικά είδη όχι μόνο για χημική άμυνα ή αποτοξίνωση, αλλά και για κυτταρική σηματοδότηση και βιοσυνθετικές αντιδράσεις (Lopez-Alarcona 2013). (Pisoschi 2015).

Ενεργά είδη Οξυγόνου και Αζώτου και η Φυσιολογική τους Δράση

Οι ελεύθερες ρίζες δημιουργούνται κατά τις αερόβιες διαδικασίες, όπως η κυτταρική αναπνοή, η έκθεση σε μικροβιακές λοιμώξεις που περιλαμβάνουν ενεργοποίηση φαγοκυττάρων, κατά τη διάρκεια έντονης σωματικής δραστηριότητας ή τη δράση ρυπογόνων και τοξινών όπως καπνός τσιγάρων, αλκοόλ, ακτινοβολία ιονισμού και UV, παρασιτοκτόνα και όζον. Τα δραστικά οξυγονωμένα είδη σε μικρές ποσότητες αντιπροσωπεύουν μόρια σηματοδότησης, τα οποία εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της απόπτωσης και της γονιδιακής έκφρασης επάγοντας παράγοντες μεταγραφής. Η παραγωγή τους από τα φαγοκύτταρα είναι απαραίτητη στον αμυντικό μηχανισμό έναντι των διαφόρων βακτηρίων ή μυκήτων (Poljsak 2013, Pisoschi 2015). Τα αντιδραστικά είδη οξυγόνου παράγονται κατά τη διάρκεια κρίσιμων διαδικασιών κατανάλωσης οξυγόνου (O_2) (Fujii 2005). Οι βιολογικές διεργασίες που εξαρτώνται από το οξυγόνο και το άζωτο έχουν αποκτήσει μεγαλύτερη σημασία επειδή τα τελικά προϊόντα τους βρίσκονται συνήθως σε καταστάσεις υψηλών μεταβολικών απαιτήσεων, όπως παθολογικές διεργασίες ή εξωτερικές περιβαλλοντικές αλληλεπιδράσεις (Burton 2010, Agarwal 2012).

Το οξυγόνο έχει τόσο θετικά οφέλη όσο και δυνητικά επιβλαβείς παρενέργειες για τα βιολογικά συστήματα. Η αντιδραστικότητα επιτρέπει στο οξυγόνο να συμμετέχει στη μεταφορά ηλεκτρονίων υψηλής ενέργειας και επομένως υποστηρίζει τη δημιουργία μεγάλων ποσοτήτων 5-τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) μέσω οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Αυτό είναι απαραίτητο για να επιτρέψει την εξέλιξη πολύπλοκων πολυκύτταρων οργανισμών αλλά επίσης καθιστά πιθανό να προσβάλει οποιοδήποτε βιολογικό μόριο, είτε πρόκειται για πρωτεΐνη, λιπίδιο ή DNA. Κατά συνέπεια, το σώμα μας είναι υπό σταθερή οξειδωτική επίθεση από αντιδραστικά είδη οξυγόνου (ROS) (Burton 2011).

Το οξειδωτικό στρες αποτελεί ένα φυσιολογικό φαινόμενο στο σώμα. Υπό κανονικές συνθήκες, τα σημαντικά ενδοκυτταρικά επίπεδα των δραστικών ειδών διατηρούνται σε χαμηλά επίπεδα από διάφορα ενζυμικά συστήματα που συμμετέχουν στην *in vivo* ομοίωση της οξειδοαναγωγής (Rahal 2014). Η έννοια της προ-οξειδωτικής-αντιοξειδωτικής ισορροπίας είναι βασική για την κατανόηση του οξειδωτικού στρες για διάφορους λόγους. Πρώτον, υπογραμμίζει ότι η διαταραχή μπορεί να προκληθεί από αλλαγές στις δύο πλευρές της ισορροπίας (π.χ. ανώμαλη παραγωγή ROS ή ανεπάρκειες στις αντιοξειδωτικές άμυνες). Δεύτερον, υπογραμμίζει τις ομοιοστατικές συγκεντρώσεις του ROS. Παρόλο που τα ROS καταλήφθηκαν για πρώτη φορά στην προσοχή των βιολόγων ως δυνητικά επιβλαβή υποπροϊόντα του αερόβιου μεταβολισμού, αναγνωρίζεται πλέον ότι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο ως δευτερεύοντες αγγελιοφόροι σε πολλές ενδοκυτταρικές οδούς σηματοδότησης (Dröge 2002). Τέλος, η έννοια της ισορροπίας εστιάζει την προσοχή στο γεγονός ότι θα υπάρξει βαθμιαία απόκριση στο οξειδωτικό στρες. Ως εκ τούτου, μικρές

διαταραχές στην ισορροπία είναι πιθανό να οδηγήσουν σε ομοιοστατικές προσαρμογές σε απόκριση μεταβολών στο άμεσο περιβάλλον, ενώ μεγαλύτερες διαταραχές μπορεί να οδηγήσουν σε ανεπανόρθωτες βλάβες και κυτταρικό θάνατο. Το όριο μεταξύ φυσιολογικών αλλαγών και παθολογικών προσβολών είναι ως εκ τούτου αναπόφευκτα ασαφές (Burton 2011).

Σε ομοιοστατικά επίπεδα, τα ROS έχουν διαφορετικές δράσεις στη λειτουργία των κυττάρων (Droge 2002), συμπεριλαμβανομένης της ενεργοποίησης των παραγόντων οξειδοαναγωγής και της ενεργοποίησης πρωτεϊνικών κινασών (Burton 2011). Τα ROS εκτιμώνται ως σηματοδοτικά μόρια για τη ρύθμιση μιας ευρείας γκάμας φυσιολογικών διεργασιών του οργανισμού. Αρχική αναφορά έγινε τη δεκαετία του 1990, όταν το υπεροξείδιο του υδρογόνου αποδείχθηκε ότι είναι απαραίτητο για τη δράση της κυτοκίνης, της ινσουλίνης, του αυξητικού παράγοντα, της ενεργοποιητικής πρωτεΐνης-1 (AP-1) και της σηματοδότησης NF-κΒ (Tak and Firestein 2001). Ο ρόλος του υπεροξειδίου του υδρογόνου στην επαγωγή της αδρανοποίησης της φωσφατάσης με οξείδωση κυστεΐνης παρείχε έναν πιθανό βιοχημικό μηχανισμό με τον οποίο το ROS μπορεί να προσκρούσει στις οδούς σηματοδότησης (Rhee 2000). Ο ρόλος της ROS στη σηματοδότηση της απόπτωσης μεσολαβούμενης από το κυτόχρωμα C είναι επίσης καθιερωμένος (Liu 1996).

Τα ROS μπορούν να προκαλέσουν αναστρέψιμες μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις πρωτεϊνών για τη ρύθμιση των σηματοδοτικών οδών. Ένα τυπικό παράδειγμα του ευεργετικού ρόλου των ελευθέρων ριζών στη φυσιολογία είναι το μόριο του νιτρικού οξειδίου (NO). Το μονοξείδιο του αζώτου είναι ελεύθερη ρίζα με αγγειοδιασταλτικές ιδιότητες και είναι ένα σημαντικό κυτταρικό σηματοδοτικό μόριο, σχηματίζεται από την αργινίνη με τη δράση της NO-συνθάσης (NOS) (Pryor 2006). Το NO παράγεται από τα συστατικά NOS κατά τη διάρκεια των αγγειοδιασταλτικών διεργασιών (eNOS) ή κατά τη διάρκεια της μετάδοσης νευρικών παλμών (nNOS). Παρουσία στρεσογόνων παραγόντων, το NO παράγεται με καταλυτική δράση επαγωγίμου NOS (iNOS) και βρίσκεται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις (Olszanecki 2002, Pavanato 2003, Miyamoto 2002, Rahal 2014). Η δραστηριότητα του eNOS αυξάνεται σε ανταπόκριση της αύξησης της ωχρινοτρόπου ορμόνης (LH) και της ανθρώπινης χοριονικής γοναδοτροπίνης (hCG) (Kehrer 2000).

Αν και οι αγγειοδιασταλτικές επιδράσεις του NO μπορεί να είναι θεραπευτικές, η υπερβολική παραγωγή RNS μπορεί να επηρεάσει τη δομή και τη λειτουργία της πρωτεΐνης και έτσι μπορεί να προκαλέσει αλλαγές στην δραστηριότητα του καταλυτικού ενζύμου, να μεταβάλει την κυτταροσκελετική οργάνωση και να βλάψει το κυτταρικό μεταγωγικό σήμα (Chandra 2009, Kehrer 2000). Όπως ανασκοπήθηκε από τους Visioli και συν., η μειωμένη βιοδιαθεσιμότητα του NO είναι ένας βασικός παράγοντας που οδηγεί στη διάσπαση των αγγειακών λειτουργιών που σχετίζονται με καταστάσεις υπογονιμότητας (Visioli 2011). Έτσι,

η επιβίωση των κυττάρων εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τα διατηρούμενα φυσιολογικά επίπεδα NO (Agarwal 2005, Agarwal 2012).

Μέσα σε ένα κύτταρο, οι δράσεις του NO εξαρτώνται από τα επίπεδα του, την οξειδοαναγωγική κατάσταση του κυττάρου και την ποσότητα μετάλλων, πρωτεϊνών και θειολών, μεταξύ άλλων παραγόντων (Rosselli 1998, Agarwal 2012). Δεδομένου ότι οι επιδράσεις του NO εξαρτώνται από τη συγκέντρωση, θεωρείται ότι η κυκλική μονοφωσφορικήγουανοσίνη (cGMP) προκαλεί μεταγωγή σήματος σχετιζόμενη με NO ως δεύτερος αγγελιοφόρος σε χαμηλές συγκεντρώσεις NO (<1μM) NO (Rosselli 1998, Hanafy 2001 Agarwal 2012).

Η ενεργοποίηση των ευαίσθητων στην οξειδοαναγωγή παραγόντων μεταγραφής, όπως οι AP-1, p53 και NF-κB (Arrigo 1998), ρυθμίζουν την έκφραση προ-φλεγμονωδών και άλλων κυτοκινών, κυτταρικής διαφοροποίησης και απόπτωσης. Υπό κανονικές συνθήκες τα NF-κB διατηρούνται ανενεργά με τη δέσμευση της ανασταλτικής υπομονάδας IκB. Ωστόσο, υπό συνθήκες στρες, το IκB φωσφορυλιώνεται και αποσυνδέεται από το NF-κB, το οποίο στη συνέχεια μετατοπίζεται στον πυρήνα και ενεργοποιεί την έκφραση προ-φλεγμονωδών και άλλων κυτοκινών. Η ενεργοποίηση της οδού συνδέεται με αυξημένα επίπεδα ιστού του προφλεγμονώδους ενζύμου COX-2, της ιντερλευκίνης 1β, αυξημένη έκκριση του TNF-α και ενεργοποίηση του αποπτωτικού καταρράκτη όπως φανερώνεται με διάσπαση της κασπάσης (Cadenas 2000, Cindrova-Davies 2000 & 2009). Όλες αυτές οι επιδράσεις μπορούν να αποκλειστούν με την προσθήκη βιταμινών C και E ή σουλφασαλαζίνης, ενός αναστολέα της ενεργοποίησης του NF-κB (Burton 2011).

Με την ενεργοποίηση των πρωτεϊνικών κινασών, τα κύτταρα ανταποκρίνονται σε μια ποικιλία εξωκυτταρικών σημάτων και στρες μέσω μιας οικογένειας ενεργοποιημένων από μιτογόνα πρωτεϊνικών κινασών (MAPK). Τα ROS μέσω των MAPK προάγουν την ενεργοποίηση των εξωκυτταρικών ρυθμιζόμενων κινάσεων (ERK1 / 2) που γενικά προάγει την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, ενώ η διέγερση των αμινοατερματικών κινάσεων πρωτεΐνης p38MAPK (p38) και κινάσης πρωτεΐνης-c-Jun πρωτεΐνης (SAPK-JNK) προκαλεί απόπτωση. Οι p38 και SAPK-JNK ενεργοποιούνται με φωσφορυλίωση μέσω μιας ανοδικής κινάσης, κινάσης 1 σήματος ρύθμισης της απόπτωσης (ASK1). Οι παραπάνω απαντήσεις μπορούν να θεωρηθούν ως φυσιολογικές προσαρμογές στις αλλαγές του περιβάλλον με στόχο την αποκατάσταση της ομοιόστασης. Η πιο σοβαρή επίθεση από τα ROS μπορεί να οδηγήσει σε εκτεταμένη και ανεπανόρθωτη καταστροφή κυττάρων, που τελικά προκαλεί κυτταρικό θάνατο μέσω νέκρωσης ή απόπτωσης. Αυτές οι περισσότερο παθολογικές επιδράσεις προκαλούνται από το άνοιγμα των διαύλων ιόντων, την υπεροξειδωση των λιπιδίων, τις τροποποιήσεις των πρωτεϊνών και την οξειδωση του DNA. (Burton 2011).

Η συγκέντρωση ασβεστίου εντός του αυλού του ενδοπλασματικού δικτύου (ER) είναι πολύ υψηλότερη από ό, τι στο κυτοσόλιο, φθάνοντας σε χιλιοστομοριακά επίπεδα. Αυτή η συγκέντρωση διατηρείται με αντλίες που ανήκουν στην οικογένεια ATPase ασβεστίου και ενδοπλασματικού δικτυώματος ασβεστίου και είναι απαραίτητη για την σωστή λειτουργία του μηχανισμού δίπλωσης πρωτεϊνών. Οι ανισορροπίες της ROS οδηγούν σε απώλεια ενδοκυτταρικής ομοιοστασίας Ca^{2+} , με απελευθέρωση ιόντων Ca^{2+} από το ενδοπλασματικό δίκτυο και άλλα κυτταρικά διαμερίσματα (Hool 2007, Burton 2011). Η προκύπτουσα απελευθέρωση του Ca^{2+} από το ER θα ενεργοποιήσει διάφορες ευαίσθητες σε Ca^{2+} διεργασίες εντός του κυττάρου (Hool 2007, Berridge 2003) συμπεριλαμβανομένων πολλών από τις οδούς σηματοδότησης παραπάνω. (Χυ 2005, Ron & Walter 2007, Burton 2011).

Η αύξηση της συγκέντρωσης ιόντων κυτοσολικού Ca^{2+} θα επηρεάσει αρνητικά τη λειτουργία των μιτοχονδρίων (Kowaltowski 2001). Ως αποτέλεσμα, το δυναμικό της μεμβράνης των μιτοχονδρίων και η σύνθεση της ATP καταρρέουν. Εάν επηρεάζονται τα μιτοχόνδρια σε όλο το κύτταρο, οι συγκεντρώσεις ATP πέφτουν κατακρημνιστικά, η ιονική ομοιοστασία χάνεται και το κύτταρο υφίσταται πρωτογενή νέκρωση. Η συμμετοχή ενός πιο περιορισμένου αριθμού οργανιδίων ή παροδικού ανοίγματος του πόρου μπορεί να επιτρέψει τη διατήρηση του ATP σε επίπεδα επαρκή για να επιτραπεί η εμφάνιση της απόπτωσης (Leist 1997, Burton 2011).

Η διαμόρφωση της δραστηριότητας eNOS με αυξημένες συγκεντρώσεις ενδοκυτταρικού ασβεστίου [Ca^{2+}]_i, οι οποίες μπορεί να εμφανιστούν με οξύ τρόπο σε απόκριση σε αγωνιστές, συμπεριλαμβανομένης της οιστραδιόλης (Goetz 1999) και του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF) (Parapetropoulos 1997). Εντούτοις, η συνεχής εισροή Ca^{2+} διαμέσου της μεμβράνης του πλάσματος που οδηγεί σε αυξημένη [Ca^{2+}]_i, είναι γνωστή ως ικανότητα εισόδου ασβεστίου (CCE) και είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της eNOS δραστηριότητας (Lin 2000) και τη ρύθμιση του αγγειακού τόνου (Sladek 1997, Bird 2003). Σε κανονικές μακροχρόνιες καταστάσεις όπως οι υγιείς εγκυμοσύνες, η αγγειοδιαστολή είναι ιδιαίτερα εμφανής στα αγγεία της μήτρας (Sladek 1997, Bird 2003). Κατά την εγκυμοσύνη, η προσαρμογή στη σταθερή εισροή [Ca^{2+}]_i και η ανύψωση μέσω της απόκρισης CCE είναι επιτακτική για την ενεργοποίηση του eNOS (Boeldt 2011, Sullivan 2006) και παρατηρείται κυρίως από τις αγγειακές αλλαγές που σχετίζονται με την κανονική εγκυμοσύνη. Οι υποξικές καταστάσεις ρυθμίζουν επίσης το NOS (Ducsay 2011) και την ενισχυμένη έκφραση του eNOS έχει αναφερθεί στις αρτηρίες της μήτρας των ωών ως απάντηση στη χρόνια υποξία (Xiao 2001, Boeldt 2011, Agarwal 2012).

Επειδή τα ROS μπορεί να ενεργοποιήσουν τόσες πολλές κυτταρικές διεργασίες, δεν αποτελεί έκπληξη το γεγονός ότι το οξειδωτικό στρες σπάνια εμφανίζεται μεμονωμένα, αλλά συνοδεύεται συνήθως από άλλες μορφές κυτταρικού στρες. Όπως εξηγείται παραπάνω, οι στενές αλληλεπιδράσεις λαμβάνουν χώρα μεταξύ των ROS, της μιτοχονδριακής λειτουργίας και της λειτουργίας ER, που διαμεσολαβούνται μέσω της έκλυσης Ca^{2+} που μπορεί να αποτελέσει σύστημα προώθησης (Zhang 2010, Burton 2011).

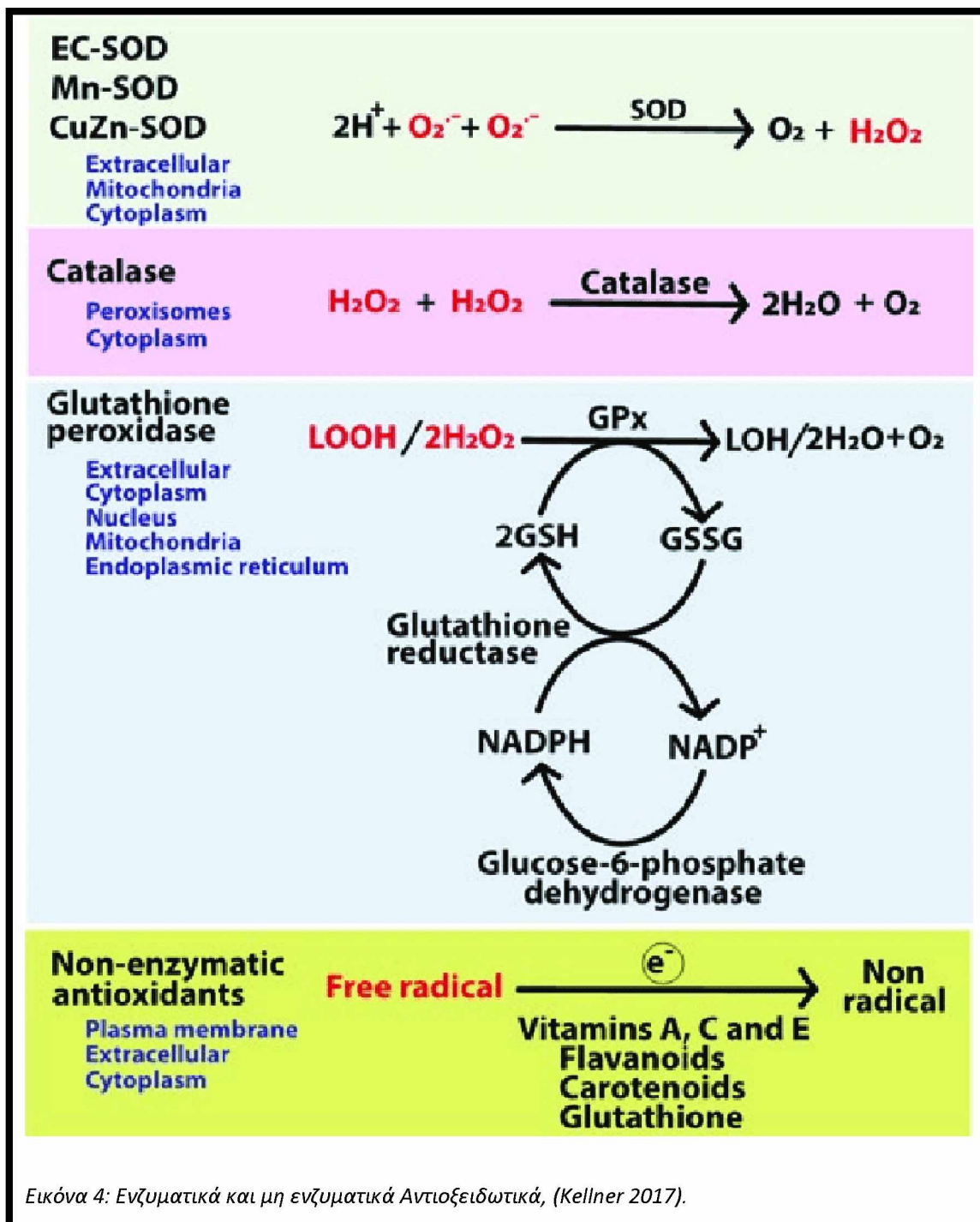
Κεφάλαιο 2ο

Αντιοξειδωτικοί Αμυντικοί Μηχανισμοί

Η έννοια του βιολογικού αντιοξειδωτικού αναφέρεται σε οποιαδήποτε ένωση που όταν είναι παρούσα σε χαμηλότερη συγκέντρωση σε σύγκριση με αυτή ενός οξειδώσιμου υποστρώματος, μπορεί να καθυστερήσει ή να εμποδίσει την οξείδωση του υποστρώματος (Halliwell 1999, Godic 2014). Τα αντιοξειδωτικά είναι σαρωτές που αποτοξινώνουν την περίσσεια ROS, η οποία βοηθά στη διατήρηση της ευαίσθητης οξειδωτικής / αντιοξειδωτικής ισορροπίας του σώματος (Agarwal 2012). Οι αντιοξειδωτικές λειτουργίες συνεπάγονται τη μείωση του οξειδωτικού στρες, των μεταλλάξεων του DNA, των κακοήθων μετασχηματισμών, καθώς και άλλων παραμέτρων της βλάβης των κυττάρων. Οι επιδημιολογικές μελέτες φανέρωσαν την ικανότητα των αντιοξειδωτικών να περιορίζουν τις επιδράσεις δραστηριότητας των δραστικών ειδών οξυγόνου και να μειώνουν τη συχνότητα εμφάνισης καρκίνου και άλλων εκφυλιστικών ασθενειών. Παρ' όλα αυτά, κυρίως σε συνεχή δράση ελεύθερων ριζών, η ικανότητα του αμυντικού συστήματος έναντι των ROS μπορεί να διαταραχθεί, οδηγώντας σε εμφάνιση ασθενειών (Godic 2014).

Η έννοια του αντιοξειδωτικού ορίζεται μαζί με μια συζήτηση των υφιστάμενων κριτηρίων ταξινόμησης: ενζυματικά και μη ενζυματικά, προληπτικά ή συστήματα επισκευής, ενδογενή και εξωγενή, πρωτογενή και δευτερογενή, υδροδιαλυτά και λιποδιαλυτά, φυσικά ή συνθετικά. Τα πρωτογενή αντιοξειδωτικά είναι ικανά να καθαρίζουν ριζικά είδη με δωρεά υδρογόνου. Τα δευτερεύοντα αντιοξειδωτικά είναι απλά οξυγονωτικά μέσα σβέσης, παράγοντες αποσύνθεσης υπεροξειδίου, χηλικά μέσα μετάλλων, αναστολείς οξειδωτικών ενζύμων ή απορροφητές ακτινοβολίας UV (Pisoschi 2015).

Οι πρώτοι αναγνωρισμένοι τύποι αντιοξειδωτικών αμυντικών συστημάτων που αναπτύχθηκαν κατά της οξειδωτικής βλάβης είναι αυτοί που εμποδίζουν την εμφάνιση αντιδραστικών ειδών οξυγόνου και εκείνοι που μπλοκάρουν, συλλαμβάνουν ριζικά που σχηματίζονται (Cheeseman 1993). Αυτά τα συστήματα που υπάρχουν σε υδατικά και μεμβρανικά διαμερίσματα κυττάρων μπορούν να είναι ενζυματικά και μη-ενζυματικά (Εικόνα 4).



Εικόνα 4: Ενζυματικά και μη ενζυματικά Αντιοξειδωτικά, (Kellner 2017).

Ένα άλλο σημαντικό αντιοξειδωτικό σύστημα του κυττάρου αντιπροσωπεύεται από διεργασίες επιδιόρθωσης, που αφαιρούν τα βιολογικά μόρια που έχουν υποστεί βλάβη, προτού η συσσώρευση τους καταστήσει δυνατή την αλλοίωση του κυτταρικού μεταβολισμού (Cheeseman 1993). Η παρέμβαση των συστημάτων επισκευής συνίσταται στην αποκατάσταση οξειδωτικών νουκλεϊνικών οξέων με ειδικά ένζυμα (Poljsak 2013), απομάκρυνση οξειδωμένων πρωτεϊνών από πρωτεολυτικά συστήματα και αποκατάσταση οξειδωμένων λιπιδίων από φωσφολιπάσες, υπεροξειδάσες ή ακυλοτρανοφεράσες (Hitchon 2004). Έχει υποτεθεί ότι η αποσύνθεση των συστημάτων επισκευής οδηγεί περισσότερο στη

γήρανση και τις ασθένειες που σχετίζονται με την ηλικία παρά σε μέτριες αλλαγές στην αντιοξειδωτική άμυνα κατά της εμφάνισης ROS (Gems 2009, Perez 2009, Jang 2009).

Έχει αναφερθεί ότι, υπό φυσιολογικές συνθήκες, η ισορροπία μεταξύ των προ-οξειδωτικών και των αντιοξειδωτικών ενώσεων ευνοεί μετρίως τις προ-οξειδωτικές ουσίες, δημιουργώντας έτσι ένα ελαφρύ οξειδωτικό στρες, που απαιτεί την παρέμβαση των ενδογενών αντιοξειδωτικών συστημάτων του οργανισμού (Droge 2002). Κάτω από αυτές τις συνθήκες, το οξειδωτικό στρες γίνεται πιο οξύ με την ηλικία, όταν τα ενδογενή αντιοξειδωτικά και τα συστήματα επισκευής δεν μπορούν να το εξουδετερώσουν αποτελεσματικά.

Η ομοίωση του κυττάρου εξασφαλίζεται από το σύνθετο ενδογενές αντιοξειδωτικό αμυντικό σύστημα, το οποίο περιλαμβάνει ενδογενή αντιοξειδωτικά ένζυμα όπως δισμουτάση υπεροξειδίου, καταλάση, υπεροξειδάση γλουταθειόνης και μη ενζυματικές ενώσεις όπως γλουταθειόνη, πρωτεΐνες (φερριτίνη, τρανσφερίνη, κερουλοπλασμίνη και ακόμη και λευκωματίνη) και σαρωτές χαμηλού μοριακού βάρους, όπως το ουρικό οξύ, το συνένζυμο Q και το λιποϊκό οξύ (Poljsak 2013). Οι ενζυματικές και μη ενζυματικές άμυνες αναστέλλουν την οξειδωτική επίθεση.

Ενζυματικά Αντιοξειδωτικά

Τα ενζυματικά αντιοξειδωτικά διαθέτουν ένα μεταλλικό κέντρο, ένα μεταβατικό μέταλλο στον πυρήνα τους, το οποίο τους δίνει τη δυνατότητα να αποκτήσουν διαφορετικά σθένη καθώς μεταφέρουν ηλεκτρόνια για να εξισορροπήσουν τα μόρια για τη διαδικασία αποτοξίνωσης. Εξουδετερώνουν την περίσσεια ROS και εμποδίζουν τη βλάβη στις κυτταρικές δομές. Τα ενδογενή αντιοξειδωτικά ένζυμα περιλαμβάνουν δισμουτάση υπεροξειδίου SOD, καταλάση, και οξειδάση γλουταθειόνης (Agarwal 2012).

Η αποσύνθεση του ανιόντος SO σε H₂O₂ από το SOD είναι θεμελιώδης για τις αντιοξειδωτικές αντιδράσεις. Το ένζυμο SOD υπάρχει ως τρία ισόένζυμα (Fujii 2005): SOD-1, SOD-2 και SOD-3. Το SOD-1 περιέχει Cu και ψευδάργυρο (Zn) ως συν-παράγοντες μεταλλικού χαρακτήρα και βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα. Το SOD-2 είναι μια μιτοχονδριακή ισομορφή που περιέχει μαγγάνιο (Mn) και το SOD-3 κωδικοποιεί την εξωκυτταρική μορφή. Το SOD-3 είναι δομικά παρόμοιο με το Cu, Zn-SOD, καθώς περιέχει Cu και Zn ως συμπάροντες (Agarwal 2012). Το υπεροξείδιο του υδρογόνου στη συνέχεια διασπάται σε νερό με τις δράσεις της καταλάσης ή της υπεροξειδάσης γλουταθειόνης, μιας τετραμερικής σεληνοπρωτεΐνης (Burton 2011).

Η δραστικότητα της υπεροξειδάσης γλουταθειόνης εξαρτάται από την παρουσία μειωμένης γλουταθειόνης (GSH) ως δότη υδρογόνου. Η γλουταθειόνη, είναι ένα μη ενζυματικό αντιοξειδωτικό και είναι το κύριο κυτταρικό ρυθμιστικό διάλυμα οξειδοαναγωγικής θειόλης στα κύτταρα (Ruder 2009, Fujii 2005). Στα κύτταρα, η GSH παίζει πολλαπλούς ρόλους, στους οποίους περιλαμβάνεται η διατήρηση των κυττάρων σε μειωμένη κατάσταση και ο σχηματισμός συζυγίων με ορισμένες επικίνδυνες ενδογενείς και ξеноβιοτικές ενώσεις (Agarwal 2012).

Οι πολυμορφισμοί στα αντιοξειδωτικά ένζυμα (Nicol 2000, Tempfer 2001) ή ο διαιτητικός περιορισμός των μικροθρεπτικών συστατικών, όπως το σελήνιο, μπορούν έτσι να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο στην προδιάθεση για το οξειδωτικό στρες και τις επιπλοκές όπως επιπλοκές της εγκυμοσύνης (Al-Kunani 2001, Burton 2011).

Μη ενζυματικά Αντιοξειδωτικά

Τα μη ενζυματικά αντιοξειδωτικά αποτελούνται από συμπληρώματα διατροφής και συνθετικά αντιοξειδωτικά όπως βιταμίνη C, γλουταθειόνη GSH, ταυρίνη, υποταρίνη, βιταμίνη E, Ζη, σελήνιο (Se), β-καροτένιο και καροτένιο (Sharma 2004). Η βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ) είναι ένας γνωστός οξειδοαναγωγικός καταλύτης που μπορεί να μειώσει και να εξουδετερώσει το ROS (Agarwal 2012).

Οι μη ενζυματικές ενώσεις όπως ασκορβικό (βιταμίνη C) και τοκοφερόλη (βιταμίνη E), λειτουργούν σε συνέργεια, με το ασκορβικό να είναι απαραίτητο για την αναγέννηση της μειωμένης α-τοκοφερόλης. Επιπλέον, θειολικές ενώσεις, όπως μια θειορεδοξίνη, είναι ικανές να αποτοξινώνουν το υπεροξειδίο του υδρογόνου, αλλά με τη σειρά τους απαιτούν τη μετατροπή στην ανοιγμένη μορφή με τη ρεδοκτάση της θειορεδοξίνης. Η κερουλοπλασμίνη και η τρανσφερίνη παίζουν επίσης σημαντικούς ρόλους διαχωρίζοντας τα ελεύθερα ιόντα σιδήρου και αναστέλλοντας έτσι την αντίδραση Fenton και την παραγωγή OH (Burton 2011).

Η γλουταθειόνη είναι ένα πεπτίδιο που απαντάται στις περισσότερες μορφές αερόβιας ζωής καθώς κατασκευάζεται στο κυτοσόλιο από κυστεΐνη, γλουταμικό άλας και γλυκίνη. Οι αντιοξειδωτικές του ιδιότητες προέρχονται από την ομάδα θειόλης, της συνιστώσας της κυστεΐνης, η οποία είναι ένας αναγωγικός παράγοντας που επιτρέπει την οξειδοποίηση και την ανάστροφη μεταβολή στην σταθερή μορφή (Behrman 2001). GSH συμμετέχει σε μεγάλο αριθμό αντιδράσεων αποτοξίνωσης που σχηματίζουν δισουλφίδιο γλουταθειόνης, το οποίο μετατρέπεται ξανά σε GSH με τη δράση της αναγωγάσης γλουταθειόνης εις βάρος του NADPH. Το τελευταίο παράγεται μέσω της οδού φωσφορικής

πεντόζης, από την οποία η αφυδρογονάση 6-φωσφορικής γλυκόζης είναι το πρώτο ένζυμο. Αυτό το ένζυμο υπόκειται σε κοινούς πολυμορφισμούς και η μειωμένη δραστικότητα μπορεί να θέσει σε κίνδυνο τις συγκεντρώσεις της GSH και να οδηγήσει σε εμβρυοπάθεια (Burton 2011, Perkins 2006, Agarwal 2008, Agarwal 2012). Η γλουταθειόνη είναι επίσης το κύριο μη-ενζυμικό αντιοξειδωτικό που βρίσκεται στα ωάρια και τα έμβρυα (Agarwal 2008, Agarwal 2012).

Η κυστεΐνη και η κυστεαμίνη (CSH) αυξάνουν την περιεκτικότητα GSH στο ωοκύτταρο. Η κυστεαμίνη δρα επίσης ως καθαριστής και είναι ένα αντιοξειδωτικό ουσιώδες για τη διατήρηση υψηλών επιπέδων GSH. Επιπλέον, η κυστεαμίνη μπορεί να μετατραπεί σε άλλο αντιοξειδωτικό, υποταυρίνη (Guerin 2001, Orsi 2005 Agarwal 2012), Οι συγκεντρώσεις πολλών αμινοξέων, συμπεριλαμβανομένης της ταυρίνης, κυμαίνεται σημαντικά κατά τη διάρκεια της ωοθυλακιογένεσης. Η ταυρίνη και η υποταυρίνη είναι σαρωτές που βοηθούν στη διατήρηση της οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης στους γαμέτες και τα δύο εξουδετερώνουν τα προϊόντα υπεροξειδωσής λιπιδίων, και η υποταυρίνη εξουδετερώνει περαιτέρω τις ρίζες υδροξυλίου (Orsi 2005, Agarwal 2012).

Όπως και το GSH, το σύστημα θειορεδοξίνης (Trx) ρυθμίζει τις γονιδιακές λειτουργίες και συντονίζει διάφορες ενζυμικές δραστηριότητες, αποτοξινώνει το H_2O_2 και το μετατρέπει στην μειωμένη κατάσταση του μέσω της αναγωγάσης θειορεδοξίνης (Borchert 2003). Κανονικά, η θειορεδοξίνη δεσμεύεται στην κινάση σήματος ρύθμισης της απόπτωσης-1 (ASK-1), καθιστώντας την ανενεργή. Εν τούτοις, όταν η ομάδαθειόλης της θειορεδοξίνης οξειδώνεται με το ανιόν SO , το ASK1 αποσπάται από τη θειορεδοξίνη και γίνεται ενεργό οδηγώντας σε αυξημένη απόπτωση. Το ASK1 μπορεί επίσης να ενεργοποιηθεί με έκθεση σε H_2O_2 , ή από υποξία και επανα-οξυοξυγόνωση και αναστέλλεται από τις βιταμίνες C και E (Burton 2010). Το σύστημα της θειορεδοξίνης παίζει επίσης ρόλο στην γυναικεία αναπαραγωγή και την ανάπτυξη του εμβρύου συμμετέχοντας στην κυτταρική ανάπτυξη, διαφοροποίηση και θάνατο (Agarwal 2012).

Η βιταμίνη E (α-τοκοφερόλη) είναι λιποδιαλυτή βιταμίνη με αντιοξειδωτική δράση. Αποτελείται από οκτώ τοκοφερόλες και τοκοτριενόλες. Διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στις αντιοξειδωτικές δραστηριότητες, διότι αντιδρά με ριζικά λιπιδίων που παράγονται κατά την υπεροξειδωση λιπιδίων (Behrman 2001). Αυτή η αντίδραση παράγει οξειδωμένες ρίζες α-τοκοφεροξυλίου οι οποίες μπορούν να μετασχηματιστούν πάλι στην ενεργό ανοιχτή μορφή με αντίδραση με άλλα αντιοξειδωτικά όπως το ασκορβικό, η ρετινόλη ή η ουβικινόλη (Agarwal 2012).

Η ορμόνη μελατονίνη είναι ένα αντιοξειδωτικό που, σε αντίθεση με τις βιταμίνες C και E και GSH, παράγεται από το ανθρώπινο σώμα. Σε αντίθεση με άλλα αντιοξειδωτικά,

ωστόσο, η μελατονίνη δεν μπορεί να υποβληθεί σε οξειδοαναγωγική κυκλοφορία. Όταν οξειδωθεί, η μελατονίνη δεν μπορεί να επιστρέψει στην μειωμένη της κατάσταση επειδή σχηματίζει σταθερά τελικά προϊόντα μετά την αντίδραση. Η τρανσφερίνη και η φερριτίνη, και οι δύο πρωτεΐνες δέσμευσης σιδήρου, παίζουν ρόλο στην αντιοξειδωτική άμυνα εμποδίζοντας την καταλυτική απελευθέρωση των ελεύθερων ριζών μέσω της χηλίωσης (Shkolnik 2011, Agarwal 2012). Τα θρεπτικά συστατικά όπως τα Se, Cu και Zn απαιτούνται για τη δράση ορισμένων αντιοξειδωτικών ενζύμων, αν και δεν έχουν ίδια αντιοξειδωτική δράση.

Οξειδωτικό στρες συμβαίνει όταν η παραγωγή ROS υπερβαίνει τα επίπεδα των αντιοξειδωτικών και μπορεί να έχει καταστροφικές επιπτώσεις στην υγεία αλλά στις αναπαραγωγικές ικανότητες και τόσο στους άντρες όσο και στις γυναίκες. Ωστόσο, θα πρέπει να υπενθυμίσουμε ότι το οξειδωτικό στρες θεωρείται επίσης φυσιολογική κατάσταση, η οποία είναι απαραίτητη για πολλές μεταβολικές διεργασίες και την κυτταρικής επιβίωση (Agarwal 2012).

Έχει επιβεβαιωθεί ότι τα εξωγενή αντιοξειδωτικά που υπάρχουν στα φρούτα και τα λαχανικά αντισταθμίζουν πάντα τη δραστηριότητα της προαναφερθείσας ενδογενούς αντιοξειδωτικής άμυνας. Τα αντιοξειδωτικά όπως η βιταμίνη C και E, τα καροτενοειδή και τα φαινολικά (στιλβένια, φαινολικά οξέα όπως βενζοϊκά και υδροξυβενζοϊκά οξέα, παράγωγα κινναμωμικού και υδροξυκινναμικού οξέος και флаβονοειδή-φλαβονόλια, φλαβάνες, φλαβανόνες, φλαβανόλες, φλαβόνες και ανθοκυανιδίνες ως αγλυκόνες ανθοκυανινών. φλαβίλιο ή σκελετό ιόντων 2-φαινυλοχρωμενυλίου), θεωρούνται σήμερα τα κύρια εξωγενή αντιοξειδωτικά. Οι κλινικές μελέτες απέδειξαν ότι μια δίαιτα πλούσια σε φρούτα, λαχανικά, ολικής αλέσεως, όσπρια και ωμέγα-3 λιπαρά οξέα θα μπορούσε να λειτουργήσει ως προληπτικός παράγοντας όσον αφορά την εμφάνιση της νόσου (Willett 2006).

Μια άλλη πηγή εξωγενών αντιοξειδωτικών αποτελείται από συμπληρώματα διατροφής, ως φορείς παροχής θρεπτικών ουσιών όπως βιταμίνες, ορυκτά, ίνες, λιπαρά οξέα ή αμινοξέα, τα οποία είτε λείπουν ή δεν βρέθηκαν σε απαραίτητες ποσότητες στη διατροφή. Τα συμπληρώματα διατροφής μπορούν να περιλαμβάνουν μια σειρά αντιοξειδωτικών όπως βιταμίνη A (ρετινοειδή, καροτίνες), βιταμίνες C και E (τοκοφερόλες), λυκοπένιο, λουτεΐνη, ουβικινόνη, γλουταθειόνη, πολυφαινόλες (φλαβονοειδή και μη φλαβονοειδή) ρεσβερατρόλη και N-ακετυλοκυστεΐνη (Poljsak 2013). Η παροχή των κυττάρων με εξωγενή αντιοξειδωτικά μπορεί να επιβραδύνει την πρόσληψη ενδογενών αντιοξειδωτικών, για να παραμείνει αμετάβλητο το συνολικό "αντιοξειδωτικό δυναμικό των κυττάρων". Έτσι, τα αντιοξειδωτικά συμπληρώματα μπορεί να βελτιώσουν την ικανότητα του οργανισμού να συγκρατεί το οξειδωτικό στρες, που δεν μπορεί να τροποποιηθεί με την παρέμβαση των ενδογενών αντιοξειδωτικών αμυντικών. Παρ' όλα αυτά, το θέμα των συνθετικών

αντιοξειδωτικών έχει υποβληθεί σε αντιπαραθέσεις, για παράδειγμα, υπάρχουν ισχυρισμοί ότι τα Συνιστώμενα Ημερήσια Δόση της βιταμίνης C και E δεν επαρκούν για να εξουδετερώσουν το οξειδωτικό στρες. Επιπλέον, ορίστηκε ότι η κατάποση υψηλών ποσοτήτων αντιοξειδωτικών συμπληρωμάτων μπορεί να έχουν ως αποτέλεσμα οξειδωτικές επιδράσεις ή το λεγόμενο "αντιοξειδωτικό στρες" (Poljsak 2012).

Πραγματοποιήθηκαν προσπάθειες για την ταξινόμηση των αντιοξειδωτικών συστημάτων από άποψη αντιδραστικότητας. Η αποκαλούμενη "πρώτη γραμμή άμυνας" αναγνωρίστηκε ως το ενζυματικό αντιοξειδωτικό σύστημα, συμπεριλαμβανομένων της υπεροξειδίου δισμουτάσης που εξαντλεί το ριζικό ανιόν υπεροξειδίου O_2 , της καταλάσης που αποσυνθέτει H_2O_2 , καθώς και το σύστημα γλουταθειόνης υπεροξειδάσης / αναγωγάσης γλουταθειόνης. Η "δεύτερη γραμμή άμυνας" αντιπροσωπεύεται κυρίως από μειωμένες θειόλες και αντιοξειδωτικά χαμηλού μοριακού βάρους. Τα τελευταία περιλαμβάνουν ένα ευρύ φάσμα μορίων που είναι, είτε συστατικά που απαντώνται σε διαιτητικά προϊόντα, είτε υδατοδιαλυτά είτε λιποδιαλυτά (τοκοφερόλες, ασκορβικά, ρετινόλες, πολυφαινόλες κλπ.) ή μεταβολικές ενώσεις (ουρικό, ασκορβικό και ανηγμένη γλουταθειόνη) (Pisoschi, 2015). Αυτές οι ενώσεις προσδίδουν βασικά την αντιοξειδωτική ικανότητα στα βιολογικά μέσα. Τα αντίστοιχα βιομόρια μπορούν να φτάσουν σε συγκεκριμένες θέσεις σε κύτταρα που επηρεάζονται από την οξειδωτική επίθεση (Kohen 2009, Tessutti 2013, Gandra 2004, Bencini 2010). Επιπλέον, μια άλλη ταξινόμηση των αντιοξειδωτικών (που αναφέρεται τόσο σε ενδογενή όσο και σε εξωγενή, φυσικά ή συνθετικά) είναι εκείνη που λαμβάνει υπόψη τη διαλυτότητα τους, όπως τα υδατοδιαλυτά (φλαβονοειδή, ασκορβικό οξύ, ουρικό οξύ, γλουταθειόνη) και λιποδιαλυτά (καροτενοειδή, τοκοφερόλες, παλμιτικός / στεατικός ασκορβυλεστέρας) αντιοξειδωτικά (Pisoschi 2012).

Τα αντιοξειδωτικά μπορούν να δράσουν σε διαφορετικά στάδια της διαδικασίας οξειδωτικής ρίζας (Yin 2011). Τα αντιοξειδωτικά μπορούν να δράσουν μέσω την εξάλειψη του μοριακού οξυγόνου ή μειώνοντας την τοπική συγκέντρωση, αφαιρώντας το προ-οξειδωτικό μέταλλο ιόντων, παγιδεύοντας επιθετικά αντιδραστικά είδη οξυγόνου (Martysiak-Zurowska 2012).

Τα αντιοξειδωτικά που αναστέλλουν την υπεροξειδωση των λιπιδίων με την απομάκρυνση του οξυγόνου, τα οποία δρουν με τη σβέση του O_2 , μειώνοντας τη συγκέντρωσή του ή απομακρύνοντας τα προ-οξειδωτικά ιόντα μεταβατικών μετάλλων, ονομάζονται προληπτικά αντιοξειδωτικά. Αυτά που είναι ικανά να καταστρέφουν καταλυτικά τα αντιδραστικά είδη οξυγόνου είναι επίσης προληπτικά και δεδομένου ότι αντιπροσωπεύονται από ένζυμα (π.χ., καταλάση, δισμουτάση υπεροξειδίου και υπεροξειδάση γλουταθειόνης) δεν καταναλώνονται στην αντίδραση. Από την άλλη πλευρά,

αλυσιδωτά αντιοξειδωτικά, μονάδες σβέσης οξυγόνου και χηλικοί παράγοντες μεταλλικών στοιχείων καταναλώνονται, ενώ εκπληρώνουν τον προστατευτικό ρόλο τους (Martysiak-Zurowska 2012).

Διαπιστώθηκε ότι τα αντιοξειδωτικά που αλλοίωσαν την αλυσίδα, ικανά να καθαρίσουν ριζικά είδη, ονομάζονται πρωτογενή αντιοξειδωτικά. Τα δευτερεύοντα αντιοξειδωτικά είναι μονάδες σβέσης οξυγόνου, αποικοδομητές υπεροξειδίων που παράγουν μη ριζικά είδη, χηλικούς παράγοντες μετάλλων, αναστολείς οξειδωτικού ενζύμου (π.χ. λιποξυγονάσης) ή απορροφητές υπεριώδους ακτινοβολίας (Pisoschi 2012, Stan 2007).

Τα δευτερογενή αντιοξειδωτικά μπορεί να παρουσιάζουν συνεργιστικά αποτελέσματα σε συνδυασμό με πρωτογενή αντιοξειδωτικά, ακολουθώντας αρκετούς δυνατούς μηχανισμούς (Stan 2007):

- σταθεροποίηση πρωτογενών αντιοξειδωτικών με τη δημιουργία όξινων περιβάλλον
- αναγέννηση πρωτογενών αντιοξειδωτικών με δωρεά υδρογόνου
- χηλικοποίηση προ-οξειδωτικών κατιόντων μετάλλων μεταπτώσεως
- σβήσιμο μοριακού οξυγόνου

Επιπλέον, έχει σημειωθεί ότι τα αντιοξειδωτικά ένζυμα μπορούν να καταλύσουν τη σύνθεση ή την αναγέννηση μη ενζυματικών αντιοξειδωτικών (Martysiak-Zurowska 2012).

Ενώ η βιολογία οξειδοαναγωγής υποδηλώνει ελαφρά αύξηση του επιπέδου των αντιδραστικών οξυγονωμένων ειδών, που προορίζεται να ενεργοποιήσει τις οδούς σηματοδότησης, το οξειδωτικό στρες συνεπάγεται αυξημένες ποσότητες ROS με αποτέλεσμα την εξασθένηση των νουκλεϊνικών οξέων, πρωτεϊνών ή λιπιδίων (Schieber 2014). Αν και έχει επιβεβαιωθεί ότι τα φρούτα και τα λαχανικά αντιπροσωπεύουν ασφαλείς πηγές αντιοξειδωτικών ποσών βιταμινών που μειώνουν το οξειδωτικό στρες, έχει αναφερθεί ότι η υψηλή αντιοξειδωτική συμπλήρωση μπορεί να αποδειχθεί ανασφαλής (Camire 1999).

Οι δοκιμές για την αντιοξειδωτική συμπλήρωση αποδεικνύουν διαφορές στα αναφερόμενα αποτελέσματα, που δικαιολογούνται από τον τύπο των ατόμων που εξετάζονται (με γενικό ή υψηλό κίνδυνο), τις διάφορες δόσεις συμπληρώματος (ποσότητες θρεπτικών ή υψηλότερες), τον αριθμό των αντιοξειδωτικών που χορηγούνται και εξετάζονται, τύπος πρόσληψης (μεμονωμένος ή ισορροπημένος συνδυασμός). Έχει παρατηρηθεί ότι μια συγκεκριμένη αντιοξειδωτική βιταμίνη που χορηγείται σε αυξημένες δόσεις σε άτομα που είναι επιρρεπή σε υψηλό κίνδυνο παθολογίας (όπως καπνιστές, άτομα

που έχουν εκτεθεί στον αμίαντο), δεν μπορεί να έχει σημαντικές ευεργετικές επιδράσεις και μπορεί να έχει αρνητικά αποτελέσματα (Herberg 1998, Pisoschi, 2015).

Οι διεργασίες που υποκρύπτουν αυτές τις επιδράσεις έχουν διερευνηθεί και έχει υποστηριχθεί ότι η αντιοξειδωτική συμπλήρωση, αν και καταστρέφει τα αντιδραστικά οξυγονωμένα είδη, μπορεί να επηρεάσει τη δραστηριότητα του συστήματος του ανοσοποιητικού ή με αμυντικούς μηχανισμούς υπεύθυνους για την εξάλειψη των διαταραγμένων κυττάρων, την απόπτωση και την αποτοξίνωση. Οι αντιοξειδωτικές ή οι οξειδωτικές δραστηριότητες επιβεβαιώθηκαν ως εξαρτώμενες από τη δόση (Pisoschi, 2015).

Ενώ η διατροφή παρέχει συνήθως ασφαλή ποσότητες βιταμινών, η αυξημένη αντιοξειδωτική συμπλήρωση μπορεί να αλλάξει τη φυσιολογική ισορροπία μεταξύ της παραγωγής ROS και της αφαίρεσης. Επιπλέον, οι μηχανισμοί άμυνας του κυττάρου (ενδογενή συστήματα και διαδικασίες αποκατάστασης), υπό συνθήκες αυξημένης ενεργοποίησης, χρησιμοποιούν σημαντικές ποσότητες ενέργειας, πολύ μεγάλες για να εξασφαλίσουν πλήρη προστασία από την οξειδωτική πτώση καθ' όλη τη διάρκεια ζωής τους. Πρόσφατες μελέτες προέβλεπαν ότι η ενεργοποίηση ενδογενών συστημάτων από μερικά προ-οξειδωτικά μπορεί να είναι ακόμη πιο επωφελής από την αντιοξειδωτική συμπλήρωση (Halliwell 2011). Πιστεύεται ότι μια σειρά στοιχείων όπως το πολυακόρεστο λίπος, η άσκηση και η ήπια πρόσληψη αλκοόλ, που αποτελούν μέρος του υγιεινού τρόπου ζωής στην καρδιά, γίνονται προοξειδωτικά (Williams 2005, Pisoschi, 2015).

Γενετικοί Πολυμορφισμοί, Οξειδωτικό Στρες και Υπογονιμότητα

Το οξειδωτικό στρες και τα είδη αντιδραστικού οξυγόνου (ROS) δημιουργούνται τόσο από ενδογενείς όσο και από περιβαλλοντικούς πόρους, οι οποίοι με τη σειρά τους μπορούν να οδηγήσουν σε ελαττωματική σπερματογένεση και ανδρική υπογονιμότητα. Αντιοξειδωτικά γονίδια, όπως καταλάση (CAT), υπεροξειδάση γλουταθειόνης (GPX), γλουταθειόνη S-τρανσφεράση (GST), συνθάση νιτρικού οξειδίου (NOS), πυρηνικό παράγοντα 2 που σχετίζεται με τον ερυθροειδή 2 (NRF2) και την υπεροξειδίο δισμουτάση (SOD), παίζουν σημαντικούς ρόλους στη σπερματογένεση και τη φυσιολογική λειτουργία του σπέρματος (Yu 2015).

Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι η γενετική διαταραχή ή οι λειτουργικοί πολυμορφισμοί (SNP, Single nucleotide polymorphisms) σε αυτά τα αντιοξειδωτικά γονίδια σχετίζονται με υψηλότερο κίνδυνο ανδρικής υπογονιμότητας, που περιλαμβάνουν χαμηλή ποιότητα σπέρματος, ολιγοασθενοτορατοζωοσπερμία, ολιγοζωοσπερμία και υπογονιμότητα. Έχουν επίσης αναφερθεί οι συνεργιστικές επιδράσεις του περιβαλλοντικού

ROS και των λειτουργικών πολυμορφισμών στα αντιοξειδωτικά γονίδια που έχουν ως αποτέλεσμα την ανδρική υπογονιμότητα. Ως εκ τούτου, οι παραλλαγές στα αντιοξειδωτικά γονίδια, που εμφανίζονται ανεξάρτητα ή συνεργιστικά με το περιβαλλοντικό ROS, επηρεάζουν τη σπερματογένεση και συμβάλλουν στην εμφάνιση της ανδρικής υπογονιμότητας (Yu 2015).

Η ανδρική υπογονιμότητα είναι μια πολυπαραγοντική κατάσταση και παρουσιάζει ετερογενή φαινοτυπικά χαρακτηριστικά. Οι γενετικοί παράγοντες ευθύνονται για έως και το 15% των περιπτώσεων υπογονιμότητας των ανδρών (Agarwal 2015). Ο εντοπισμός γενετικών ανωμαλιών παίζει ουσιαστικό ρόλο στην επιτυχία των υποβοηθούμενων αναπαραγωγικών θεραπειών (Kleber 2018).

Ένα πολυμορφικό γονίδιο έχει πολλαπλά αλληλόμορφα σε έναν τόπο με τουλάχιστον 1% συχνότητας σε δεδομένο πληθυσμό. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει την ισχυρή επίδραση των πολυμορφισμών σε μια μεγάλη ποικιλία γονιδίων, οδηγώντας σε ανδρική υπογονιμότητα. Πολυμορφισμός του γονιδίου Cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) και ο κίνδυνος ιδιοπαθούς ανδρικής υπογονιμότητας έχει διερευνηθεί. Το CYP1A1 ρυθμίζει το μεταβολισμό φάσης I πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων που μπορεί να είναι επιβλαβής για την ομοιοστάση του αναπαραγωγικού συστήματος θηλαστικών (McManus 1990). Μια μεγάλη γκάμα μελετών έχει διερευνήσει τη σχέση μεταξύ των πολυμορφισμών CYP1A1 και της υπογονιμότητας σε πληθυσμούς Κινέζων (Chen 2010, Lu 2008, Peng, 2012), Βραζιλιάνων (Barbosa 2016), Ινδών (Vani 2009), Τούρκων (Aydos 2009) και Γερμανών (Kobayashi 2007, Kleber 2018).

Το μονοπάτι σηματοδότησης του σχετιζόμενου με τον ερυθροειδή παράγοντα 2 / στοιχείο αντιοξειδωτικής απόκρισης (NRF2 / ARE) και τα ρυθμιζόμενα αντιοξειδωτικά ένζυμα έχουν αποδειχθεί ότι παίζουν κρίσιμο ρόλο στην άμυνα του κυτταρικού οξειδωτικού στρες κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης και της γονιμοποίησης (Kensler 2007, Nakamura 2010). Τα αντιοξειδωτικά ένζυμα και μόρια όπως οι υπεροξειδίου δισμουτάσες (SODs), η γλουταθειόνη (GSH) και οι καταλάσες (CATs) είναι σε μεγάλο βαθμό άφθονα στο πλάσμα του σπέρματος ή στα σπερματοζωάρια (Meseguer 2007, Yu 2015). Τα περισσότερα από αυτά τα γονίδια, συμπεριλαμβανομένων των NRF2, SOD, CAT, γλουταθειόνης S-τρανσφεράσης (GST), υπεροξειδάση γλουταθειόνης (GPX) και συνθάσης νιτρικού οξειδίου (NOS), παρουσιάζουν πολυμορφισμούς αλληλουχίας στον άνθρωπο, οι οποίοι με τη σειρά τους μπορεί να προκαλέσουν ανδρική υπογονιμότητα με διαφορετικούς τρόπους. Καθώς οι γενετικές παραλλαγές είναι ένας σημαντικός αιτιολογικός παράγοντας στην ανδρική υπογονιμότητα, αυτές μπορεί να συμβάλουν σημαντικά στην επίπτωση της ανδρικής υπογονιμότητας, ειδικά υπό περιβαλλοντικό στρες ROS (Carrell & Aston 2011). Μέχρι σήμερα μελέτες έχουν δείξει

πως λειτουργικοί πολυμορφισμοί αντιοξειδωτικών γονιδίων NRF2, SOD, GST, NOS, CAT και GPX, σχετίζονται με την ανδρική υπογονιμότητα στους ανθρώπους.

Η διαταραχή του Nrf2 έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζει τη σπερματογένεση με τρόπο που εξαρτάται από την ηλικία σε μοντέλο ποντικών νοκ-άουτ (Nakamura 2010). Στον άνθρωπο, δύο SNPs (rs6721961 και rs35652124) του Nrf2 έχουν συσχετιστεί με ολιγοασθενοζωοσπερμία και άτομα με 617 TT και 653 TT γονότυπους έχουν μεγαλύτερο κίνδυνο ολιγοασθενοζωοσπερμίας (Yu 2012). Επιπλέον, ο γονότυπος NRF2 rs6721961 TT εμφανίζεται σε υψηλότερη συχνότητα σε καπνιστές με περισσότερα από 25 τσιγάρα την ημέρα, με χαμηλή ποιότητα σπέρματος σε σύγκριση με αυτούς με υψηλή ποιότητα σπέρματος. Καπνιστές με περισσότερα από 25 τσιγάρα την ημέρα, με αυτόν τον γονότυπο έχουν σημαντικά χαμηλότερες συγκεντρώσεις και μετρήσεις σπέρματος σε σύγκριση με άλλους γονότυπους (Yu 2013). Σε επίπεδο mRNA, η έκφραση NRF2 ήταν σημαντικά χαμηλότερη σε υπογόνιμους ασθενείς από ότι στους μάρτυρες (Chen 2012) και παρατηρήθηκε σημαντική συσχέτιση μεταξύ του επιπέδου έκφρασης NRF2 mRNA και συγκεκριμένων λειτουργικών παραμέτρων σπέρματος όπως συγκέντρωση, προοδευτική κινητικότητα, ακινησία και ζωτικότητα (Chen 2012).

Τρεις τύποι GST SNPs, συγκεκριμένα, GSTT1-null, GSTM1-null και GSTP1 Ile105Val, έχουν αποδειχθεί εκτενώς ότι σχετίζονται με την ανδρική υπογονιμότητα σε διάφορους εθνικούς πληθυσμούς (Tirumala 2010, Roshdy 2015, Xiong 2014, Lakpour 2013). Μετα-ανάλυση επιβεβαίωσε περαιτέρω ότι οι πολυμορφισμοί GSTM1-null και GSTT1-null σχετίζονται με τον κίνδυνο υπογονιμότητας των ανδρών (Song 2013, Ying 2013, Wu 2013, Tang 2012). Μια πρόσφατη ανάλυση που περιελάμβανε 6934 άτομα έδειξε ότι ο γονότυπος GSTM1-null συσχετίστηκε σημαντικά με ιδιοπαθή ολιγοζωοσπερμία, ενώ ο μηδενικός γονότυπος GSTT1 συσχετίστηκε σημαντικά με τη νορμοζωοσπερμία και την αζωοσπερμία, και η σχέση μεταξύ του πολυμορφισμού GSTM1 και της ανδρικής υπογονιμότητας παρατηρήθηκε σε ομάδες τόσο ασιατικών και καυκάσιων πληθυσμών (Wu 2013).

Είναι γνωστό ότι η δραστηριότητα της σπερματικής SOD σχετίζεται θετικά με τη συγκέντρωση του σπέρματος και τη συνολική κινητικότητα, ενώ σχετίζεται αντιστρόφως με τον κατακερματισμό του σπέρματος DNA (Yan 2014). Οι γενετικοί πολυμορφισμοί στο SOD μπορεί να σχετίζονται με αναπαραγωγικά αποτελέσματα. Ο πολυμορφισμός Ala16Val στο γονίδιο SOD2 σχετίζεται με την υπογονιμότητα και το ποσοστό εγκυμοσύνης σε κύκλους εξωσωματικής γονιμοποίησης (Ruiz-Sanz 2011). Μη γόνιμοι άνδρες με παραλλαγές SOD2 rs4880 CC εμφάνισαν χαμηλό επίπεδο δραστηριότητας SOD (Yan 2014). Σε μελέτη αναλύθηκαν πολλαπλές παραλλαγές αντιοξειδωτικών γονιδίων, οι παραλλαγές PON1 Arg192Glu (rs662) και SOD2 Val16Ala (rs4880) συσχετίστηκαν με σημαντικά υψηλότερο κίνδυνο ανδρικής υπογονιμότητας και επίπεδα κατακερματισμού DNA σπέρματος και 8-

OHdG [41]. Μελέτη στη Βραζιλία για τον πολυμορφισμό Val16Ala της SOD2 και τη σχέση με τις παραμέτρους σπέρματος έδειξε ότι τα ετεροζυγωτικά δείγματα AV παρουσίασαν μικρότερο αριθμό τροποποιημένων παραμέτρων σπέρματος από ό,τι ομόζυγο σπέρμα. Η λιποπεροξειδωση ήταν υψηλότερη στα ομόζυγα από τα ετεροζυγώδη δείγματα σπέρματος (Yu 2015).

Ένας άλλος παράγοντας κινδύνου για την ανδρική υπογονιμότητα είναι ο πολυμορφισμός του γονιδίου μεθυλενοτετραϋδροφολικής αναγωγάσης (MTHFR). Το ενζυμικό προϊόν του γονιδίου MTHFR ρυθμίζει το μεταβολισμό του φυλλικού οξέος και σχετίζεται με τη μεθυλίωση του DNA. Μια μελέτη μεγάλης κλίμακας με 5.575 υπογόνιμους ασθενείς έδειξε στατιστικά σημαντική σχέση μεταξύ του πολυμορφισμού MTHFR και της στειρότητας των ανδρών. Η υπογονιμότητα που προκαλείται από ανωμαλία του ενζύμου MTHFR μπορεί να οφείλεται σε ανώμαλη μεθυλίωση του DNA του σπέρματος (Kleber 2018).

Στους όρχεις, το eNOS είναι υπεύθυνο για τη σύνθεση NO κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης και οι γενετικές παραλλαγές του eNOS μπορεί να είναι πιθανοί παράγοντες κινδύνου για εξασθενημένη σπερματογένεση (Ying 2013). Αρκετά αλληλόμορφα eNOS έχουν συσχετιστεί με ελαττώματα σπέρματος σε διάφορους εθνικούς πληθυσμούς. Συνολικά, αυτές οι μελέτες δείχνουν ότι οι γενετικοί πολυμορφισμοί στα eNOS αποτελούν παράγοντα κινδύνου για μειωμένη ποιότητα σπέρματος, συμπεριλαμβανομένου του κατακερματισμού του DNA, της κινητικότητας του σπέρματος και του σπερματικού ROS. Σύμφωνα με τον Mostafa και συν., υπάρχει μια σημαντική σχέση μεταξύ των γονότυπων eNOS T786C, G894T πολυμορφισμών με μειωμένες παραμέτρους σπέρματος και αυξημένο σπερματικό οξειδωτικό στρες (Mostafa 2015).

Οι ισομορφές του GPX είναι τρεις, δηλαδή, κυτοσολικές, μιτοχονδριακές και πυρηνικές GPX (Pushra-Rekha 1995). Στα ποντίκια έχουν συσχετιστεί με την σπερματογένεση (Pfeifer 2001) και την ανδρική υπογονιμότητα και μεταβολές τους οδήγησαν σε μειωμένη ποιότητα σπέρματος και σοβαρές δομικές ανωμαλίες, μειωμένη κινητικότητα σπέρματος και δυναμικό μιτοχονδριακής μεμβράνης [Schneider 2009, Imai 2009]. Στον άνθρωπο ωστόσο, μέχρι σήμερα κανένας πολυμορφισμός GPX δεν έχει συσχετιστεί με την ανδρική υπογονιμότητα (Diaconu 2006).

Σε ότο αφορά την καταλάση η δραστηριότητα ενζύμου καταλάσης (CAT) φαίνεται πως σχετίζεται με χαμηλή ποιότητα σπέρματος (Sabouhi 2015, Kawakami 2007) και μια μελέτη ανέφερε ότι ο γονότυπος CAT-262T / T ήταν αρνητικά που σχετίζεται με τη υπογονιμότητα σε ιδιοπαθή υπογόνιμα αρσενικά (Sabouhi 2015).

Το περιβάλλον και η γενετική ποικιλομορφία θα μπορούσαν να επηρεάσουν συνεργικά τη γονιμότητα των ανδρών (Storgaard 2006). Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι το

περιβάλλον και τα αντιοξειδωτικά γονίδια μπορούν να επηρεάσουν την ανδρική υπογονιμότητα (Paracchini 2005, Yarosh 2015, Yu 2013). Οι οικογένειες του κυτοχρώματος P450 (CYP) μπορεί να συμβάλουν στην εμφάνιση ενδογενούς οξειδωτικού στρες *in vivo* επειδή αυτά είναι ένζυμα αποτοξίνωσης που αλληλεπιδρούν με ένα ευρύ φάσμα περιβαλλοντικών τοξινών και καρκινογόνων που μπορούν να σχηματίσουν ROS. Μελέτη έδειξε μια σημαντική συνέργεια μεταξύ των γονότυπων GSTM1 και CYP1A1 και της υπογονιμότητας μεταξύ των ανθρώπων (Aydos 2009). Επομένως, οι γενετικοί πολυμορφισμοί των ενζύμων του μεταβολισμού των ξеноβιοτικών μπορεί επίσης να αλληλεπιδράσουν με τα αντιοξειδωτικά γονίδια για υπογονιμότητα που προκαλείται από το περιβάλλον (Aydos 2009).

Με την ανάπτυξη νέων προσεγγίσεων γενετικής ανάλυσης, χρησιμοποιήθηκε πρόσφατα μια μελέτη συσχέτισης σε ολόκληρο το γονιδίωμα (GWAS, Genome wide association studies) για την ανδρική υπογονιμότητα, και έχουν εντοπιστεί νέες θέσεις για την ανδρική υπογονιμότητα χρησιμοποιώντας το GWAS. Σε μια μεγάλη ομάδα ανδρών ευρωπαϊκής καταγωγής, αξιολογήθηκαν 172 υποψήφιοι πολυμορφισμοί για συσχέτιση με ολιγοζωοσπερμία ή αζωοσπερμία και πολλά SNPs ταυτοποιήθηκαν ή επιβεβαιώθηκαν ότι σχετίζονται σημαντικά με την ολιγοζωοσπερμία και / ή την αζωοσπερμία (Aston 2010). Μια άλλη έκθεση GWAS εντόπισε υποψήφια γονίδια για ανδρικά χαρακτηριστικά γονιμότητας και 9 SNPs που βρέθηκαν να σχετίζονται με μειωμένη γονιμότητα (Kosova 2012). Ωστόσο, εκτός από τον εντοπισμό νέων θέσεων για ανδρική υπογονιμότητα, το GWAS επιβεβαιώνει τη σχέση μεταξύ των προηγουμένως αναγνωρισμένων SNP σε αντιοξειδωτικά γονίδια και της ανδρικής υπογονιμότητας.

Ωστόσο, οι αντιοξειδωτικές οδοί σηματοδότησης που εμπλέκονται στην ανδρική υπογονιμότητα δεν έχουν αναλυθεί σε επίπεδο γονιδιώματος μέχρι σήμερα. Επιπλέον, μόνο λίγες ασθένειες όπως η αζωοσπερμία ή η ολιγοζωοσπερμία έχουν μελετηθεί σε επίπεδο γονιδιώματος.

Καθώς η επίπτωση της ανδρικής υπογονιμότητας συνεχίζει να αυξάνεται, η ανάλυση της σχέσης του με παραλλαγές αλληλουχίας στα αντιοξειδωτικά γονίδια μπορεί όχι μόνο να βοηθήσει στην κατανόηση των ρόλων του αντιοξειδωτικού σήματος στην ανδρική υπογονιμότητα που σχετίζεται με το ROS, αλλά επίσης να διευκολύνει την επικύρωση του δυναμικού του ως γενετικών δεικτών για τη διάγνωση και εκτίμηση κινδύνου για ανδρική υπογονιμότητα στην κλινική.

Επομένως, οι λειτουργικοί πολυμορφισμοί και το επίπεδο έκφρασης αντιοξειδωτικών καθώς και οι ρυθμιστές τους ενδέχεται να σχετίζονται με ελαττωματική σπερματογένεση στους ανθρώπους. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η γενετικά

προκαλούμενη οξειδωτική ανισορροπία θα μπορούσε να συμβάλει στην κακή ποιότητα του σπέρματος και να επηρεάσει τη γονιμότητα των ανδρών. Επομένως, γενετική διαταραχή ή λειτουργικοί πολυμορφισμοί μπορούν να οδηγήσουν σε ελαττωματική σπερματογένεση.

Αν και ο σημαντικός ρόλος των γενετικών παραγόντων στην παθογένεση της υπογονιμότητας αναγνωρίζεται πλέον όλο και περισσότερο, η σχέση μεταξύ των χρωμοσωμικών και γονιδιακών πολυμορφισμών και της υπογονιμότητας εξακολουθεί να είναι αμφιλεγόμενη, ιδιαίτερα η συσχέτιση μεταξύ της γυναικείας υπογονιμότητας και των πολυμορφισμών. Πρόσφατες μελέτες έχουν σημειώσει μεγάλη πρόοδο στην κατανόηση των γενετικών παραγόντων που συμβάλλουν στη μεταβολή των χαρακτηριστικών και των ασθενειών που επηρεάζουν τη γυναικεία γονιμότητα. (Gajbhiye 2018).

Το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών (PCOS) είναι μια πολύπλοκη, ορμονική και μεταβολική διαταραχή που επηρεάζει το 5-20% των γυναικών αναπαραγωγικής ηλικίας παγκοσμίως (Hayes 2015). Μελέτες δείχνουν ότι οι γενετικοί παράγοντες παίζουν ένα ισχυρό ρόλο στην παθογένεση του PCOS (Mykhalchenko 2017, Hayes 2015). Ο αιτιώδης ρόλος των SNP κινδύνου PCOS για υψηλότερο ΔΜΣ, υψηλότερη αντίσταση στην ινσουλίνη και χαμηλότερα επίπεδα σφαιρίνης δέσμωσης ορμονών φύλου (SHBG) έχει άμεσες κλινικές εφαρμογές για τον προγραμματισμό της τροποποίησης του τρόπου ζωής ως στρατηγικής πρόληψης και της συμπερίληψης της μετφορμίνης στα σχέδια θεραπείας για PCOS (Day 2015). Το γονίδιο PON1 βρίσκεται στο χρωμόσωμα 7, το οποίο κωδικοποιεί το ευέλικτο εξαρτώμενο από ασβέστιο αντιοξειδωτικό ένζυμο παραοξονάση 1 (PON1) (Perry 2015). Δύο ευρέως μελετημένοι πολυμορφισμοί, δηλαδή το L55M στο εξόνιο 3 και το Q192R στο εξόνιο 6 του γονιδίου PON1, έχουν αναγνωριστεί ότι ρυθμίζουν τη σταθερότητα και τη δραστική θέση του ενζύμου, επηρεάζοντας έτσι τα επίπεδα και την καταλυτική αποτελεσματικότητά τους αντίστοιχα (Montgomery 2014). Αρκετές μελέτες έχουν τεκμηριώσει τη συσχέτιση αυτών των πολυμορφισμών με διαταραχές όπως καρδιαγγειακές παθήσεις (Visscher 2017, Day 2015, Derom 2011), δυσμενή προφίλ λιπιδίων (Rhea 2017) και διαβήτη (Hartge 2009, Chumlea 2003). Μειωμένη δραστηριότητα PON1 έχει επίσης αναφερθεί σε παχύσαρκα άτομα, η οποία σχετίζεται με την επιταχυνόμενη έναρξη καρδιομεταβολικών ανωμαλιών (Herman-Giddens 2007, Mendle 2007). Η παχυσαρκία και το οξειδωτικό στρες συνδέονται μεταξύ τους και συχνά εμφανίζονται σε γυναίκες με PCOS, υποδεικνύοντας ότι η δραστηριότητα PON1 μπορεί επίσης να μεταβληθεί σε αυτές τις γυναίκες. Παλαιότερες μελέτες έχουν αναφέρει μειωμένη δραστηριότητα PON1 σε γυναίκες με PCOS, η οποία έδειξε επίσης μια αντίστροφη συσχέτιση με την υπερανδρογονιμία (James-Todd 2010, Parent 2003). Μερικές ομάδες ερευνητών έχουν επίσης διερευνήσει τη σχέση αυτών των πολυμορφισμών με το PCOS και τα σχετικά χαρακτηριστικά του (Ibitoye 2017, Glynn 2017, Marino 2013, Boden 2011).

ρόλο των πολυμορφισμών PON1 και τη δραστηριότητά του στη συμβολή στην παθοφυσιολογία της αντίστασης στην ινσουλίνη και της υπερανδρογονιμίας σε γυναίκες με PCOS. Επιπρόσθετες μελέτες σε άλλους πληθυσμούς δικαιολογούνται για να επικυρώσουν τα ευρήματά μας και να διευκρινίσουν περαιτέρω τον ρόλο του PON1 στην παθοφυσιολογία PCOS.

Τόσο οι περιβαλλοντικοί όσο και οι γενετικοί παράγοντες μπορούν να εμπλέκονται στη γυναικεία υπογονιμότητα. Το υπεροξειδίο του μαγγανίου δισμουτάση (MnSOD) είναι ένα κρίσιμο αντιοξειδωτικό ένζυμο μιτοχονδρίων που έχει βασικό ρόλο στην κυτταρική άμυνα ενάντια σε παράγοντες που προκαλούν οξειδωτικό στρες. Ο πολυμορφισμός του MnSOD A16V μπορεί να σχετίζεται με κίνδυνο γυναικείας υπογονιμότητας σύμφωνα με μελέτες στο βόρειο Ιράν. Ωστόσο, θα πρέπει να εξεταστούν περισσότερες μελέτες με μεγαλύτερο αριθμό ασθενών και ελέγχων για να επιβεβαιωθούν αυτό το συσχετισμό (Pournourali 2016).

Κατά την τελευταία δεκαετία, οι μοριακές γενετικές τεχνικές έχουν βελτιώσει τη διάγνωση και τη θεραπεία της υπογονιμότητας, μια πολύπλοκη και πολυπαραγοντική κατάσταση που επηρεάζει άνδρες και γυναίκες σε όλο τον κόσμο. Η γενετική βάση για την υπογονιμότητα κυμαίνεται από απλό πολυμορφισμό νουκλεοτιδίων έως μια πλήρη διαγραφή χρωμοσωμάτων. Οι κλινικές μελέτες, η έρευνα καρυότυπου και η έρευνα βιοδείκτη θα παρέχουν ένα μοριακό γενετικό πάνελ για να απαντήσει σε ερωτήσεις και να ρίξει διαφορετικές προοπτικές για την καλύτερη κατανόηση των κύριων αιτιών της υπογονιμότητας (Kleber 2018).

Κεφάλαιο 3^ο

Οξειδωτικό Στρες & Αναπαραγωγικό Σύστημα

Παγκοσμίως 48,5 έως 186 εκατομμύρια άνθρωποι επηρεάζονται από την ανικανότητα να τεκνοποιήσουν (Boivin, 2007, Inhorn, 2015, Mascarenhas, 2012) και η καθυστερημένη σύλληψη επηρεάζει το 10% έως 15% των ζευγαριών που προσπαθούν να συλλάβουν (Evers 2004). Η υπογονιμότητα έχει οριστεί από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (ΠΟΥ) ως "αποτυχία επίτευξης κλινικής εγκυμοσύνης μετά από 12 μήνες ή περισσότερο τακτικής μη προστατευμένης σεξουαλικής επαφής" (Zegers-Hochschild 2009, Agarwal 2014a) και αποτελεί σημαντικό πρόβλημα δημόσιας υγείας (Ruder 2008). Ευτυχώς, η καθιέρωση της τεχνολογίας υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (ART) στα τέλη της δεκαετίας του '70 έχει δώσει τη δυνατότητα σε εκατομμύρια υπογόνιμα ζευγάρια να συλλάβουν παιδιά (Smits 2018).

Η υπογονιμότητα μπορεί να αποδοθεί στον άντρα, στη γυναίκα ή και στους δύο. Μια μελέτη της ειδικής ομάδας του WHO στη δεκαετία του '80 πρότεινε ότι το 20% των περιπτώσεων υπογονιμότητας αποδίδονται αποκλειστικά στον άνδρα, 38% στη γυναίκα, 27% και στους δύο, και 15% όχι σαφώς (Comhaire 1987). Τα δεδομένα αυτά αλλάζουν συνεχώς, σύμφωνα με τις παγκόσμιες στατιστικές, τουλάχιστον ένα από τα έξι ζευγάρια έχει προβλήματα γονιμότητας (Ménézo 2012). Το 40% -50% της αιτιολογίας της στειρότητας που μελετάται οφείλεται σε γυναίκες (Duckitt 2003) και το 30% της αιτιολογίας της υπογονιμότητας που μελετάται οφείλεται στον ανδρικό παράγοντα (DeCherney 2003). Το 15% έως 25% των υπογόνιμων ζευγαριών δεν παρουσιάζουν έναν αναγνωρίσιμο αιτιολογικό παράγοντα και αυτό ορίζεται ως ανεξήγητη υπογονιμότητα (Agarwal 2014a, 2014b, Smits 2018, Merve 2016).

Υπάρχουν ενδείξεις ότι το οξειδωτικό στρες (OS) διαδραματίζει θεμελιώδη ρόλο στην εμφάνιση τόσο της αντρικής όσο και της γυναικείας υπογονιμότητας (Aitken 1987, Behrman 2001). Αναπόφευκτα, όταν τα κύτταρα χρησιμοποιούν οξυγόνο για να επιβιώσουν, παράγονται ROS ως τελικά προϊόντα. Μια ορισμένη ποσότητα ROS είναι επωφελής για την εξέλιξη των φυσιολογικών κυτταρικών λειτουργιών και αυτό περιλαμβάνει τα αναπαραγωγικά κύτταρα και τους ιστούς (Aitken 1994). Ωστόσο, οι υπερβολικές ποσότητες γίνονται παθολογικές και οδηγούν σε βλάβες στο DNA και ακόμη και σε απόπτωση. Αυξημένα επίπεδα ROS θα μπορούσαν είτε να οφείλονται σε ενδογενείς ή εξωγενείς παράγοντες. Στα αναπαραγωγικά κύτταρα οι πιο συνηθισμένες εξωγενείς αιτίες οξειδωτικού στρες είναι η ρύπανση του περιβάλλοντος, το κάπνισμα, το αλκοόλ, η κακή διατροφή και η παχυσαρκία. Οι λοιμώξεις και οι χρόνιες και αυτοάνοσες ασθένειες είναι επίσης γνωστές ως ενδογενείς αιτίες (Tremellen 2008, Smits 2018). Η σύγχρονη ζωή επηρεάζει τα προβλήματα γονιμότητας αυξάνοντας μέσω των χημικών ουσιών που προκαλούν ενδοκρινικές διαταραχές, των παρασιτοκτόνων, των ξηνοεστερογόνων, των πολυχλωροδιφαινυλίων, της δισφαινόλης Α,

των φθαλικών ενώσεων κλπ. Το οξειδωτικό στρες αυξάνεται σε ένα σημαντικό μέρος από αυτές τις ενώσεις (Merve 2016).

Τα ROS που σε χαμηλά και ελεγχόμενα επίπεδα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση της γονιμοποιητικής ικανότητας, στην υπερδραστηριοποίηση, στην ακροσωμική αντίδραση και στην γονιμοποίηση (Agarwal 2014a, Saleh & Agarwal 2002), αλλά οι περίσσεια δραστικών ριζών οξυγόνου είναι επιζήμια για τη λειτουργικότητα των σπερματοζωαρίων και θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε αντρική υπογονιμότητα (Agarwal 2014b). Τα ROS μειώνουν τον αριθμό των σπερματοζωαρίων και την κινητικότητα και αναστέλλουν την γονιμοποίηση (Ruder 2008). Οι ενδογενείς πηγές ROS στο αρσενικό αναπαραγωγικό σύστημα είναι: λευκά αιμοσφαίρια, ανώριμα σπερματοζωάρια και κισσοκήλη (Agarwal 2014a, 2014b). Το OS προκαλεί παθολογική υπεροξειδωση λιπιδίων, βλάβη DNA και παθολογική απόπτωση στην αντρική αναπαραγωγή (Agarwal 2014b). Σε φυσιολογικά επίπεδα, τα ROS παίζουν σημαντικό ρόλο στην γυναικεία αναπαραγωγή, συμπεριλαμβανομένης της στεροειδογένεσης των ωοθηκών, της ωρίμανσης των ωοκυττάρων, της ωοθυλακιογένεσης, της ωορρηξίας και της λουτεόλυσης (Agarwal 2006, Esfandiari 2005). Επίσης, τα ωάρια, τα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου και το ωοθυλακικό υγρό είναι οι ενδογενείς πηγές του ROS στο γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα (Agarwal 2014a, Merve, 2016). Η ανισορροπία μεταξύ των προ-οξειδωτικών και των αντιοξειδωτικών μπορεί να οδηγήσει σε αναπαραγωγικά νοσήματα στην γυναίκα όπως η ενδομητρίωση, το σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών και η ανεξήγητη υπογονιμότητα (Agarwal 2012). Επίσης, ορισμένες επιπλοκές της εγκυμοσύνης, όπως η αυθόρμητη έκτρωση, η επαναλαμβανόμενη απώλεια της εγκυμοσύνης και η προεκλαμψία, μπορεί επίσης να αναπτυχθούν σε απάντηση στο οξειδωτικό στρες (Agarwal 2012, Merve 2016).

Το οξειδωτικό στρες επηρεάζει τόσο τη φυσική όσο και την υποβοηθούμενη αναπαραγωγή (Agarwal 2004b). Έχουν βρεθεί βιοδείκτες οξειδωτικού στρες σε διάφορες θέσεις της γυναικείας αναπαραγωγικής οδού, γεγονός που υποδηλώνει το ρόλο τους σε διάφορες φυσιολογικές λειτουργίες. Άλλες μελέτες έχουν υποδείξει ότι οι ROS εμπλέκονται σε διάφορους αιτιολογικούς παράγοντες υπογονιμότητας, δηλαδή περιτοναϊκό παράγοντα, σαλπινγικό παράγοντα, ενδομητρίωση και ανεξήγητη υπογονιμότητα (Ho 1997, Murphy 1998, Ota 1998, Dong 2001, Polak 2001, Van Langendonck 2002, Szczepanska 2003). Η επιστημονική βάση της ανεξήγητης υπογονιμότητας παραμένει μια πρόκληση και το οξειδωτικό στρες μπορεί να έχει κάποιο ρόλο στην παθοφυσιολογία του (Agarwal 2012). Τα σαλπινγικά και περιτοναϊκά μικροπεριβάλλοντα επηρεάζουν τη γονιμοποίηση και την πρώιμη εμβρυϊκή ανάπτυξη. Αυξημένες συγκεντρώσεις ROS σε αυτά τα περιβάλλοντα μπορεί να έχουν αρνητικές επιπτώσεις στα σπερματοζωάρια, τα ωάρια, την αλληλεπίδραση των ωαρίων σπερματοζωαρίων και στα έμβρυα (Agarwal 2003). Ενεργοποιημένα μακροφάγα

εμπλέκονται στην παθογένεση της ενδομητρίωσης. Αυτά τα μακροφάγα είναι η πηγή της αυξημένης δημιουργίας ROS στο περιτοναϊκό περιβάλλον που συνδέεται με την ενδομητρίωση (Agarwal 2012).

ROS και Αντρικό Αναπαραγωγικό Σύστημα

Δημιουργία ROS σε σπερματοζωάρια

Τα ίδια τα σπερματοζωάρια αποτελούν σημαντική πηγή ROS και απαιτούνται φυσιολογικά επίπεδα ROS για διάφορες λειτουργίες σπερματοζωαρίων, όπως η ικανότητα, η ωρίμανση και η υπερδραστηριότητα (Aitken 1987). Ωστόσο, τα σπερματοζωάρια είναι πιο ευάλωτα από τα άλλα κύτταρα του σώματος όταν πρόκειται για βλάβες λόγω της υπερπαραγωγής του ROS (Smits 2018). Στα κύτταρα του σώματος, αντιοξειδωτικά ένζυμα είναι ευρέως παρόντα στο κυτταρόπλασμα. Ωστόσο, στα σπερματοζωάρια το κυτταρόπλασμα απομακρύνεται κατά τη διάρκεια των τελικών σταδίων της σπερματογένεσης, με αποτέλεσμα τα σπερματοζωάρια να εξαρτώνται από το σπερματικό πλάσμα, το οποίο είναι πλούσιο σε αντιοξειδωτικά (Zini 1993). Επιπλέον, οι μεμβράνες των σπερματοζωαρίων είναι πλούσιες σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, γεγονός που τα κάνει πιο ευάλωτα στην υπεροξειδωση των λιπιδίων από το OS (Jones 1973). Η βλάβη στην μεμβράνη οδηγεί σε μειωμένη ευκαμψία της μεμβράνης σπέρματος και έτσι σε μείωση της κίνησης της ουράς (Smits 2018).

Όπως τα σωματικά κύτταρα, τα σπερματοζωάρια παράγουν μικρές ποσότητες ROS ως παραπροϊόν της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια (Aitken & Clarkson, 1987, Koppers 2008). Τα κύρια παραγόμενα ROS είναι O_2^- και H_2O_2 , ενώ αντιοξειδωτικά όπως τα GPX, CAT και SOD, τα οποία εξουδετερώνουν αυτά, υπάρχουν τόσο στα μιτοχόνδρια όσο και στις εκκρίσεις του αναπαραγωγικού συστήματος (Starkov, 2008, Vernet 2004). Όταν υπάρχει υπερβολική παραγωγή ROS ή ελλείψει επαρκών αντιοξειδωτικών, οι συγκεντρώσεις ROS μπορεί να αυξηθούν.

Το H_2O_2 είναι ένα μη-φορτισμένο μεμβρανοπερατό μόριο το οποίο έχει βρεθεί ότι είναι ο κύριος εκκινητής της υπεροξειδωτικής βλάβης των μεμβρανών πλάσματος των γεννητικών κυττάρων (Agarwal 2014).

Το H_2O μπορεί επίσης να σχηματίσει την εξαιρετικά δραστική και καταστροφική OH ρίζα παρουσία χαλκού ή σιδήρου (αντιδράσεις Haber-Weiss και Fenton), (Kehrer, 2000). Αυξημένες συγκεντρώσεις τόσο του χαλκού όσο και του σιδήρου έχουν ανιχνευθεί στο σπερματικό πλάσμα των υπογόνιμων ανδρών (Aydemir 2006). Η ρίζα OH είναι ιδιαίτερα επιβλαβής για το DNA και τα λιπίδια (Kehrer, 2000, Kwenang 1987, Lloyd and Phillips, 1999).

Επιπλέον, το O_2^- έχει την ικανότητα να αλληλοεπιδρά με νιτρικό οξείδιο (NO) για να σχηματίσει υπεροξυνιτρίτη (ONOO), με επακόλουθες αντιδράσεις του οποίου μπορεί να οδηγήσει σε αποπτωτικό ή νεκρωτικό κυτταρικό θάνατο (Blaylock 1998, Darbandi 2018).

Η δημιουργία τέτοιων ROS συμβαίνει μέσω δύο μεθόδων: (1) στις κυτταρικές μεμβράνες, χρησιμοποιώντας NADPH οξειδάσες, και (2) στα μιτοχόνδρια, χρησιμοποιώντας οξειδο-αναγωγή NADH (Agarwal 2017). Τα ανθρώπινα σπερματοζώαρια περιέχουν άφθονα μιτοχόνδρια, ιδιαίτερα στο μεσαίο τμήμα (Ramalho-Santos 2009).

Τα ένζυμα οξειδάσης NADPH βρίσκονται στις κυτταρικές μεμβράνες των σπερματοζωαρίων (Agarwal 2014). Οι NADPH οξειδάσες είναι μια ομάδα ενζύμων που καταλύει τη μετατροπή μοριακού δισθενούς οξυγόνου σε υπεροξείδιο. Τα υποστρώματα για αυτές τις αντιδράσεις είναι μόρια NADPH που παράγονται από την αποκοπή της μονοφωσφορικής εξόζης (Musset 2012, Agarwal 2017). Η εξαρτώμενη από Ca_2^+ οξειδάση NADPH, που ονομάζεται NOX5 (κωδικοποιημένη από το γονίδιο NOX5), ανιχνεύθηκε αρχικά στον ανθρώπινο όρχι, αλλά βρέθηκε επίσης να υπάρχει στην ακροσωμική περιοχή και το μεσαίο τμήμα των ανθρώπινων σπερματοζωαρίων (Sabeur 2007). Το NOX5 είναι ένας σημαντικός παραγωγός των ROS και μπορεί στη συνέχεια να προκαλέσει οξειδωτικό στρες. Αυτό το ένζυμο ενεργοποιείται όταν το Ca_2^+ δεσμεύεται στο κυτοσολικό του N-τερματικό EF-χέρι και προκαλεί αλλαγές διαμόρφωσης στο κύτταρο μέσω OS (Petrushanko 2016, Darbandi 2018).

Υπάρχει μια σύνδεση μεταξύ της παραγωγής ROS και της δράσης της οξειδο-αναγωγής NADH στις εσωτερικές και εξωτερικές μιτοχονδριακές μεμβράνες κατά την κυτταρική αναπνοή των σπερματοζωαρίων. Η οξειδοαναγωγή NADH καταλύει τη μεταφορά ηλεκτρονίων από το NADH στο συνένζυμο Q10 στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων. Η διαρροή ηλεκτρονίων εμφανίζεται κατά την αντίστροφη μεταφορά ηλεκτρονίων, η οποία ενεργεί ως πηγή ηλεκτρονίων για τη μείωση του οξυγόνου στο ανιόν υπεροξειδίου (Agarwal 2017).

Τα σπερματοζώαρια είναι πλούσια σε μιτοχόνδρια επειδή απαιτούν συνεχώς ATP για κινητικότητα τους και διαθέτουν πολυάριθμα μιτοχόνδρια στο μεσαίο κομμάτι της ουράς (Griveau 1997). Στα μιτοχόνδρια, η διάσπαση του μεμβρανικού δυναμικού οδηγεί στη διαρροή ηλεκτρονίων στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων και εν συνεχεία παραγωγή ROS (Darbandi 2018). Το μιτοχονδριακό DNA καταστρέφεται επίσης από τα ROS, τα οποία μπορούν να περιορίσουν την παραγωγή ATP και την παροχή ενέργειας για την κινητικότητα των σπερματοζωαρίων, μειώνοντας τη γονιμότητα (Shamsi 2008a). Ωστόσο, οι μεταλλάξεις του μιτοχονδριακού DNA δεν επηρεάζουν την υγεία των απογόνων, καθώς το αρσενικό

μιτοχονδριακό DNA αποικοδομείται από το ώριο, αφήνοντας μόνο τη μητρική κληρονομιά (Sutovsky 2004, Wright 2014).

Η κυτταροπλασματική παραγωγή ROS σε σπερματικά κύτταρα έχει επίσης προταθεί, παρόλο που ο ακριβής μηχανισμός δεν έχει διευκρινιστεί ακόμα. Κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής σπερματογένεσης, η πλειοψηφία του κυτταροπλάσματος εξωθείται από τα σπερματοζωάρια ωρίμασης με τη δράση των κυττάρων Sertoli (Rengan 2012). Το υπόλοιπο κυτταρόπλασμα στο μεσαίο τμήμα περιέχει ένζυμα που απαιτούνται για την παραγωγή ενέργειας όπως η κινάση της κρεατινίνης και η αφυδρογονάση της γλυκόζης-6-φωσφορικής και εδώ παρατηρείται η απαραίτητη παραγωγή ROS για την γονιμοποιητική ικανότητα (Rengan 2012, Darbandi 2018).

Για τη μείωση του NADP⁺ προς NADPH απαιτείται η αφυδρογονάση της γλυκόζης-6-φωσφορικής και θεωρείται ότι παράγεται ROS με την οξειδάση NADPH (Aitken 1997, Dona 2011a). Θεωρείται ότι η περίσσεια υπολειμματικού κυτταροπλάσματος που παραμένει από την ελαττωματική σπερματογένεση αυξάνει την ποσότητα της αφυδρογονάσης γλυκόζης-6-φωσφορικής, οδηγώντας σε αυξημένη παραγωγή ROS (Gomez 1996). Για το λόγο αυτό, τα ανώριμα σπερματοζωάρια, ή τα «εσφαλμένα ωριμασμένα» σπερματοζωάρια, αντιπροσωπεύουν σημαντική πηγή ROS σε οξειδωτικό στρες και μπορούν να προκαλέσουν βλάβη στο DNA στα ώριμα σπερματοζωάρια κατά τη διάρκεια της κομβιοποίησης (συνδιαλλαγής) στην επιδιδυμίδα (Gil-Guzman 2001, Gomez 1996, Ollero 2001). Σε μια μελέτη όπου απομονώθηκαν τα σπερματοζωάρια από την εκσπερμάτωση, ο αριθμός των ανώριμων σπερματοζωαρίων συσχετίστηκε άμεσα με τα επίπεδα βλάβης του DNA στα ώριμα σπερματοζωάρια (Ollero 2001, Wright 2014).

Με τα χρόνια, έχει αποδειχθεί ότι οι υπογόνιμοι άνδρες, σε σύγκριση με τους γόνιμους άνδρες, έχουν υψηλότερα επίπεδα ROS και χαμηλότερα επίπεδα αντιοξειδωτικών στο σπέρμα τους (Bykova 2007, Smits 2018).

Έχει παρατηρηθεί σημαντική διαφορά στην ποσότητα ROS που παράγεται από σπερματοζωάρια σε διαφορετικό στάδιο ωρίμανσης, υποδηλώνοντας ότι το επίπεδο ωρίμανσης επηρεάζει την παραγωγή ROS (Gil-Guzman 2001). Τα ανώριμα σπερματοζωάρια χαρακτηρίζονται από τη διατήρηση υπερβολικού υπολειμματικού κυτταροπλάσματος (ERC) γύρω από το μεσαίο τμήμα τους. Ο κύριος σύνδεσμος μεταξύ της αυξημένης παραγωγής ROS και της κακής ποιότητας του σπέρματος είναι η παρουσία κυτταροπλασματικών σταγονιδίων μέσα στο κεφάλι του σπέρματος. Αυτές οι ρίζες υδροξυλίου προκαλούν επιδείνωση των λειτουργιών των σπερματοζωαρίων μέσω της έναρξης ενός καταρράκτη λιπιδικής υπεροξείδωσης (Agarwal 1994, Moazzam 2016). Επιπλέον, τα μη φυσιολογικά μορφολογικά σπερματοζωάρια παράγουν περισσότερα ROS από τα κανονικά αντίστοιχά τους (Saïd 2005).

Σε μία μελέτη, παρατηρήθηκε αρνητική συσχέτιση μεταξύ της παραγωγής ROS και του αριθμού των υγιούς σπέρματος με φυσιολογική ή οριακή μορφολογία. Στην ίδια μελέτη παρατηρήθηκε θετική συσχέτιση μεταξύ της παραγωγής ROS και του αριθμού των σπερματοζωαρίων με άμορφα κεφάλια, ελαττώματα της ουράς, περίσσεια κυτταροπλάσματος και μη φυσιολογικό μέσον (Aziz 2004, Agarwal 2017).

Επίσης ο ασβέστιο όσο και ο σίδηρος έδειξαν ισχυρούς αρνητικούς συσχετισμούς με τη συνολική κινητικότητα του σπέρματος και την κανονική μορφολογία του σπέρματος, αλλά μόνο ο σίδηρος συσχετίστηκε θετικά και σημαντικά με τον δείκτη πολλαπλών ανωμαλιών και τη συγκέντρωση των σπερματικών λευκοκυττάρων (Ammar 2019). Υπάρχουν θετικοί συσχετισμοί μεταξύ του περιεχομένου σπέρματος σιδήρου και ασβεστίου και των μελετημένων βιοδεικτών οξειδωτικού στρες. Το οξειδωτικό στρες και η περίσσεια ιχνοστοιχείων εμπλέκονται σε χαμηλή ποιότητα σπέρματος. Ο σίδηρος και το ασβέστιο μπορεί να είναι οι μεσολαβητές των επιδράσεων της οξειδωτικής βλάβης και προκαλεί υπεροξειδωση των λιπιδίων (Ammar 2019).

Στους γόνιμους άντρες, ο σίδηρος μπορεί να επηρεάσει αρνητικά την κινητικότητα του σπέρματος και να αυξήσει την ένταση του οξειδωτικού στρες. Ο σίδηρος ρυθμίζει επιπλέον τα επίπεδα αρκετών κυτοκινών στο ανθρώπινο σπέρμα (Kasperczyk 2016). Το υψηλότερο δυναμικό γονιμότητας που εκτιμάται με βάση τις τυπικές παραμέτρους σπέρματος σε γόνιμους άντρες σχετίζεται με χαμηλότερα επίπεδα Fe και υψηλότερες δραστηρότητες ορισμένων αντιοξειδωτικών ενζύμων λόγω χαμηλότερης έντασης οξειδωτικού στρες (Dobrakowski 2018).

Λευκοκύτταρα

Εκτός από τα ανώριμα / ανώμαλα σπερματοζωάρια, τα λευκοκύτταρα είναι η κύρια πηγή ROS και οξειδωτικού στρες (Aitken and West, 1990, Whittington & Ford, 1999). Χαμηλός αριθμός λευκοκυττάρων υπάρχει στην πλειοψηφία των φυσιολογικών εκσπερματώσεων. Ο ΠΟΥ έχει ορίσει λευκοκυτταροσπερμία μια κατάσταση στην οποία το δείγμα σπέρματος περιέχει περισσότερα από ένα εκατομμύριο θετικά υπεροξειδάσης λευκοκύτταρα ανά χιλιοστόλιτρο (WHO: Geneva, 2010, Darbandi 2018). Ωστόσο, η σημασία αυτού του ορίου εξακολουθεί να συζητείται. Παρόλο που οι μελέτες κατέδειξαν αρνητική συσχέτιση της συγκέντρωσης των λευκοκυττάρων με τις παραμέτρους του σπέρματος (Aziz 2004, Moskovtsev 2007, Omu 1999), άλλες έδειξαν ότι αυτό δεν μπορεί να είναι κλινικά σχετικό παρά μόνο αν υπάρχουν $> 10^6$ λευκοκύτταρα / ml (Yanushpolsky 1996). Σε μία μελέτη, η λευκοκυτταροσπερμία όπως ορίζεται από τον Π.Ο.Υ. ($1-3 \times 10^6$ λευκοκύτταρα/ml) αποδείχθηκε ότι έχει θετική επίδραση και συσχετίζεται με την έναρξη της ακρωσωμικής αντίδρασης και υπο-ωσμωτικής διόγκωσης (HOST) (Kaleli 2000). Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι η

λευκοκυτοσπερμία συνήθως συνυπάρχει με την αυξημένη βλάβη του DNA στα σπερματοζωάρια (Alvarez 2002, Erenpreiss 2002, Fariello 2009, Saleh 2002α). Η αύξηση σπερματικών ROS που σχετίζονται με λευκοκυτοσπερμία συνυπάρχει με μειωμένες συγκεντρώσεις αντιοξειδωτικών (Om 1999, Yadav 2006). Έτσι, οι ατομικές διαφορές στη συνολική σπερματική αντιοξειδωτική ικανότητα μπορεί να εξηγούν μεταβολές στην ευαισθησία σε βλάβη ROS από λευκοκύτταρα και σχετική δυσλειτουργία (Wright 2014).

Τα πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα (PMNL) αντιπροσωπεύουν περίπου το 50-60% των κυττάρων που υπάρχουν στο σπέρμα και είναι η κύρια πηγή της παραγωγής ROS. Η ενεργοποίηση των λευκοκυττάρων από τα ερεθίσματα, όπως οι φλεγμονές και οι μολύνσεις, οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή NADPH. Το NADPH, με τη σειρά του, επάγει την ενεργοποίηση του συστήματος μυελοϋπεροξειδάσης των λευκοκυττάρων, οδηγώντας περαιτέρω σε αναπνευστική έκρηξη, με επακόλουθο την αύξηση της παραγωγής ROS (Moazzam 2016).

Ο προστάτης και σπερματικά κυστίδια είναι οι κύριες πηγές λευκοκυττάρων που είναι θετικά σε υπεροξειδάση (πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα (50-60%) καθώς και μακροφάγα (20-30%) (Saleh 2003, Gharagozloo 2011, Gil-Guzman 2001). Οι φλεγμονώδεις αποκρίσεις πυροδοτούν αυτά τα κύτταρα να παράγουν ROS περίπου 100 φορές περισσότερο από ό, τι παράγεται υπό κανονικές συνθήκες (Agarwal 2014, Lavranos 2012, Agarwal 2003). Αυτή η αυξημένη παραγωγή ROS αποτελεί μέρος των φυσικών αμυντικών μηχανισμών αυτών των κυττάρων, όπου η παραγωγή NADPH είναι αυξημένη. Η συμμετοχή των λευκοκυττάρων στη φλεγμονή συνδέεται στενά με τη συνοδευτική λευκοκυτταροσπερμία (Azenabor 2015, Darbandi 2018).

Με λοίμωξη ή χρόνια φλεγμονή, τα ενεργοποιημένα λευκοκύτταρα αυξάνουν σημαντικά τις συγκεντρώσεις του ROS και μπορούν να απελευθερώσουν 1000 φορές περισσότερα ROS από τα σπερματοζωάρια (Plante 1994). Αυτές οι συγκεντρώσεις ROS μπορεί να κατακλύσουν τις αντιοξειδωτικές άμυνες του σπερματικού υγρού. Με τον τρόπο αυτό, ο χρόνος που αφιερώνεται στην εκσπερμάτιση είναι σχετικά μικρός και επομένως η μόλυνση της επιδιδυμίδας ή των όρχεων έχει τη μεγαλύτερη σημασία (Ochsendorf, 1999, Hamada 2011, Wright 2014). Τα ενεργοποιημένα λευκοκύτταρα (υπεροξειδάση θετικά) παράγουν μεγάλες ποσότητες ROS και έχει αποδειχθεί ότι τα λευκοκύτταρα είναι η κυρίαρχη πηγή ROS στο ανθρώπινο σπέρμα. Το ROS που παράγεται από λευκοκύτταρα πιστεύεται ότι αντιπροσωπεύει τοξικότητα έναντι ανθρώπινου σπέρματος.

Αν και είναι γενικά αποδεκτό ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ του αριθμού των λευκοκυττάρων στο σπερματικό υγρό και της υπερβολικής παραγωγής ROS, το OS μπορεί ακόμη να οδηγήσει στην απουσία λευκοκυτταροσπερμίας. Αξιοσημείωτο είναι ότι μία μελέτη ανέφερε ότι η παραγωγή ROS από PMN μέχρι συγκέντρωσης $0,5 \times 10^6 / \text{ml}$ είναι αμελητέα

(Oborna 2009). Αντίθετα, όταν τα λευκοκύτταρα PMN ενεργοποιούνται από λοίμωξη και / ή από φλεγμονή παρόμοιων ερεθισμάτων, ακολουθεί δημιουργία ROS (Lanranos 2012). Για παράδειγμα, τα ουδετερόφιλα που περιέχουν μυελοϋπεροξειδάση χρησιμοποιούν ανιόντα υπεροξειδίου για την οξειδωση ιόντων χλωρίου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή υποχλωριώδους οξέος (HOCl), που δρα ως αντιβακτηριακός παράγοντας αλλά είναι επίσης ένα είδος ROS. Επιπλέον, τα λευκοκύτταρα αυξάνουν την παραγωγή NADPH με την παραλλαγή μονοφωσφορικής εξόζης, αυξάνοντας έτσι τη δραστηριότητα των οξειδάσεων NADPH που τελικά αυξάνουν την παραγωγή ανιόντων υπεροξειδίου (Agarwal 2017).

Στην πραγματικότητα, υπάρχει ισχυρή συσχέτιση μεταξύ της παρουσίας μολύνσεων των βοηθητικών αδένων (MAGI) και των σπερματικών επιπέδων ROS. Η ανοσοαπόκριση στις μολύνσεις έχει ως αποτέλεσμα αυξημένο αριθμό λευκοκυττάρων στον γεννητικό σωλήνα, ο οποίος στη συνέχεια οδηγεί σε παραγωγή ROS (Agarwal 2014). Μελέτες έχουν συνδέσει την βακτηριακή προστατίτιδα και την αυτοάνοση απόκριση στα αντιγόνα του προστάτη με υπερβολική παραγωγή ROS (Shang 2018, Dinesh 2012, Agarwal 2017).

Κιρσοκήλη

Η κιρσοκήλη, μια κατάσταση που προκαλείται από μια ανώμαλη διαστολή των φλεβών στο πεπτινοειδές πλέγμα που περιβάλλει το όσχεο (Agarwal 2006), συνδέεται επίσης με αυξημένα επίπεδα ROS στο σπέρμα (Shiraishi 2012, Darbandi 2018). Οι μελέτες έχουν συσχετίσει την κιρσοκήλη με πολλές μη φυσιολογικές παραμέτρους του σπέρματος, συμπεριλαμβανομένης της βλάβης του DNA. Το τελευταίο έχει συνδεθεί με αυξημένα επίπεδα ROS και OS. Όσο υψηλότερη είναι η έκταση της κιρσοκήλης, τόσο μεγαλύτερη είναι η παραγωγή ROS (Agarwal 2012, Agarwal 2017).

Η κιρσοκήλη είναι η κύρια αιτία της υπογονιμότητας του ανδρικού παράγοντα, με ποσοστό 15% σε ολόκληρο τον αρσενικό πληθυσμό και 40% στους υπογόνιμους άνδρες (ASRM 2004). Το οξειδωτικό στρες είναι ένας σημαντικός παράγοντας στην παθοφυσιολογία της (Agarwal 2012) και τα αυξημένα επίπεδα κατακερματισμού του DNA έχουν αποδειχθεί σε πολυάριθμες μελέτες (Blumer 2012, Saleh 2003, Smith 2006, Talebi 2008, Zini and Dohle, 2011). Οι αυξημένες συγκεντρώσεις ROS και η μειωμένη αντιοξειδωτική ικανότητα συνυπάρχουν στην πλειονότητα των περιπτώσεων (Abd-Elmoaty 2010, Mostafa 2012, Pasqualotto 2008, Saleh 2003, Smith 2006). Είναι ενδιαφέρον ότι μερικές μελέτες έχουν δείξει αυξημένες συγκεντρώσεις αντιοξειδωτικών όπως SOD και CAT (Altunoluk 2012, Hurtado de Catalfo 2007, Ozbek 2008), που μπορεί να οφείλεται σε πρόωρη αύξηση της προστασίας πριν υπερκεραστούν (Wright 2014).

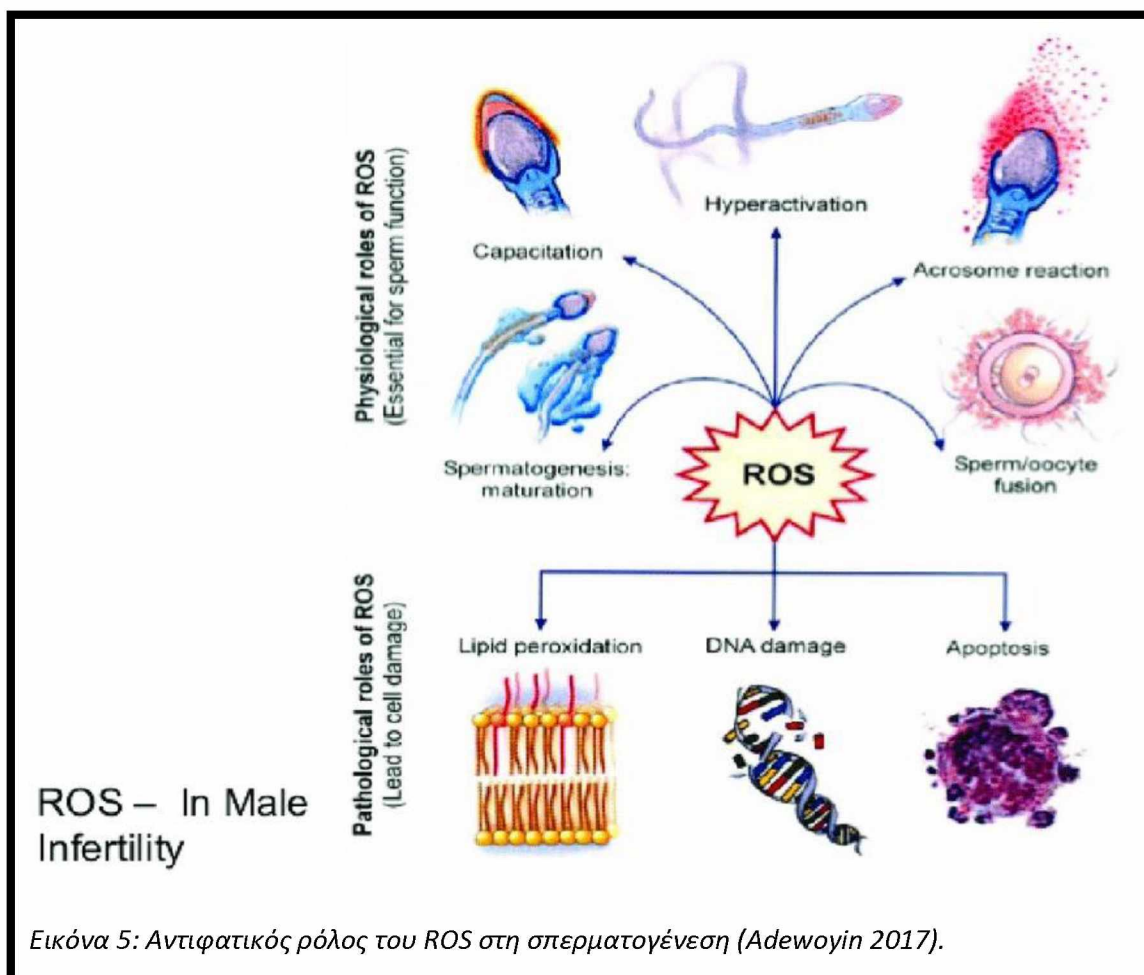
Η χειρουργική αποκατάσταση της κισσοκήλης συνδέεται με βελτιωμένες παραμέτρους σπέρματος, συμπεριλαμβανομένου του κατακερματισμού DNA, μειωμένου ROS και αυξημένων αντιοξειδωτικών και με αύξηση ποσοτών επιτυχίας της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, αλλά κυρίως με αυξημένη συχνότητα αυθόρμητης σύλληψης σε προγενέστερα υπογόνιμα άτομα (Baker 2013, Chen 2008, Hurtado de Catalfo 2007, Leung 2013, Mostafa 2001, Smit 2013, Wright 2014).

Παθοφυσιολογικός Ρόλος του OS στην Αντρική Γονιμότητα

Σε φυσιολογικά επίπεδα, η παραγωγή ROS από ανθρώπινα σπερματοζωάρια προάγει τη φωσφορυλίωση τυροσίνης σε συνδυασμό με τη γονιμοποιητική ικανότητα των σπερματοζωαρίων. Η ενίσχυση των συμβάντων φωσφορυλίωσης τυροσίνης από ROS σε ανθρώπινα σπερματοζωάρια εξαρτάται από την καταστολή της δραστηριότητας της φωσφατάσης τυροσίνης από το υπεροξειδίο του υδρογόνου καθώς και από τη διέγερση της δημιουργίας κυκλικής μονοφωσφορικής αδενοσίνης (cAMP) με αδενυλ κυκλάση. Η παραγωγή cAMP μέσω αυτού του μηχανισμού προκαλεί διέγερση φωσφορυλίωσης τυροσίνης μέσω εξαρτώμενου από πρωτεϊνοκινάση A (PKA) μηχανισμού και ενδιάμεσης κινάσης τυροσίνης (Baker 2005, Rivlin 2004). Αυτή η όλη διαδικασία ελέγχου οξειδοαναγωγής με τη φωσφορυλίωση τυροσίνης κατά τη διάρκεια της ικανότητας σπέρματος διατηρεί μια χαμηλή και σταθερή κατάσταση παραγωγής ROS. Ωστόσο, παράγοντες όπως η διήθηση λευκοκυττάρων στο σπερματικό πλάσμα διαταράσσει τον φυσιολογικό ρυθμό της παραγωγής ROS, προκαλώντας κατάσταση οξειδωτικού στρες (Aitken 1999). Τα αντιδραστικά είδη οξυγόνου πιστεύεται ότι εμπλέκονται σε διάφορες βιολογικές διεργασίες, ρυθμίζοντας τη φυσιολογία και τη λειτουργία της σπερματοζωαρίων. Η παθολογία προκύπτει ως αποτέλεσμα της υπεροξειδωσης λιπιδίων από τα ROS προκαλώντας αλλοιώσεις στη διαπερατότητα της πλασματικής μεμβράνης των σπερματοζωαρίων (Saleh 2002, Agarwal 2003). Θεωρήθηκε νωρίτερα ότι η ROS έχει επιβλαβείς επιδράσεις στις λειτουργίες των σπερματοζωαρίων, αλλά αυξανόμενα στοιχεία έχουν πλέον αποδείξει ότι οι χαμηλές συγκεντρώσεις ROS παίζουν ρόλο στους μηχανισμούς μεταγωγής σήματος (de Lamirande 1997).

Φυσιολογικά, το ROS παίζει έναν πολύ σημαντικό ρόλο στη γονιμοποίηση, στην ακροσωματική αντίδραση, στην υπερ-ενεργοποίηση, στην γονιμοποιητική ικανότητα και στην κινητικότητα του σπερματοζωαρίου (Agarwal 2004) (Εικόνα 5). Μία αύξηση των επιπέδων της cAMP συμβαίνει λόγω αυξημένων επιπέδων ενδοκυτταρικού ασβεστίου, κινάσης τυροσίνης και ROS, με αποτέλεσμα την υπερ-ενεργοποίηση και την γονιμοποιητική ικανότητα του σπέρματος. Αυτά τα ικανά υπερκινητικά σπερματοζωάρια υποβάλλονται σε

φυσιολογική αντίδραση ακροσώματος, αποκτώντας έτσι την ικανότητα γονιμοποίησης (Aitken 1995, Visconti 1995). Τα αντιδραστικά είδη οξυγόνου όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου, το οξείδιο του αζώτου και το υπεροξείδιο του ανιόντος, προάγουν όλα την ικανότητα του σπέρματος και την αντίδραση ακροσώματος (Zini 1995). Τα τελευταία χρόνια, το οξειδωτικό στρες (OS) έχει μελετηθεί εκτενώς ως ένας από τους σημαντικότερους δείκτες που εμπλέκονται στην πρόκληση υπογονιμότητας σε άνδρες (Sies 1993). Παρόμοια με οποιοδήποτε άλλο ζωντανό κύτταρο, τα σπερματοζωάρια αντιμετωπίζουν επίσης το «παράδοξο οξυγόνου» (Sies 1993), δηλαδή, όπου το οξυγόνο είναι απαραίτητο για τη στήριξη της ζωής, οι μεταβολίτες του, όπως τα ROS, μπορούν να μεταβάλλουν τις κυτταρικές λειτουργίες που θέτουν σε κίνδυνο την επιβίωση του κυττάρου (de Lamirande 1995). Ο John Macleod, κατέδειξε ότι το ένζυμο καταλάση είχε κάποιο ρόλο στην κινητικότητα των ανθρώπων σπερματοζωαρίων, επιδεικνύοντας έτσι έναν πιθανό ρόλο οξειδωτικού στρες στην ανδρική υπογονιμότητα (Baker 2005). Το OS που προκαλείται από την υπερπαραγωγή του ROS επηρεάζει τη διαδικασία γονιμοποίησης έχοντας επιβλαβείς επιδράσεις στα σπερματοζωάρια (Sikka 1996, Moazzam 2016).



Η ασυνήθιστα υψηλή συγκέντρωση λευκοκυττάρων στο σπέρμα ή η απομάκρυνση του σπερματικού πλάσματος κατά την επεξεργασία του σπέρματος κατά τις διαδικασίες υποβοηθούμενης αναπαραγωγής αποτελεί σημαντική πηγή ROS (Agarwal 2006, Potts 2003). Τα λευκοκύτταρα προκαλούν αυξημένη παραγωγή προφλεγμονωδών χημειοκινών που οδηγούν σε σημαντικά αυξημένο οξειδωτικό στρες στο σπέρμα υπογόνιμων αρσενικών (Sikka 1995). Η ύπαρξη αυξημένης ιντερλευκίνης-8 και μειωμένης δραστηριότητας δισμουτάσης υπεροξειδίου στο σπέρμα απεικονίζει μια συσχέτιση μεταξύ ενός ελαττωματικού μηχανισμού σαρώσεως ROS που ρυθμίζεται από προ-φλεγμονώδεις κυτοκίνες, υποδηλώνοντας μία ενεργή προφλεγμονώδη απόκριση (Rajasekaran 1996) (Moazzam 2016).

Από τα συστατικά των σπερματοζωαρίων που επηρεάζονται από το οξειδωτικό στρες, τα πιο ευάλωτα είναι τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA) που έχουν δύο διπλούς δεσμούς άνθρακα-άνθρακα εντός της μεμβράνης πλάσματος (Makker 2009). Η οξειδωτική φθορά της PUFA ονομάζεται υπεροξείδωση λιπιδίων (Halliwell 1989). Η υπεροξείδωση λιπιδίων της μεμβράνης του σπερματοζωαρίου πλάσματος προκαλεί μορφολογικά ελαττώματα του μεσαίου τεμαχίου με επιβλαβείς επιδράσεις στην αντίδραση του ακροσώματος και τη γονιμοποιητική ικανότητα των σπερματοζωαρίων (de Lamirande 1992). Η υπεροξείδωση των λιπιδίων (LPO) είναι ο βασικός μηχανισμός που εμπλέκεται στην επαγόμενη από ROS βλάβη των σπερματοζωαρίων που οδηγεί σε υπογονιμότητα (Alvarez 1987). Αυτή η εκδήλωση ενεργοποίησης οξυγόνου είναι συνήθως δύο τύπων (α) ενζυματικού LPO (εξαρτώμενο από NADPH και ADP) και (β) μη ενζυματικού LPO (Sikka 1995). Το LPO προκαλεί διαταραχές στους μηχανισμούς σηματοδότησης κυττάρων και σε όλες τις άλλες διεργασίες κυτταρικής μεταφοράς, καθώς και ανισορροπία ιοντικών και μεταβολιτών. Η αυξημένη δραστηριότητα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης προκαλεί την απομάκρυνση των μεταβολιτών LPO που επηρεάζουν περαιτέρω την ομοιοστασία του ασβεστίου στο σπερματοζωάριο (Lenzi 1994, Moazzam 2016).

Η δυσλειτουργία των σπερματοζωαρίων που προκαλείται από οξειδωτική βλάβη αποδίδεται στην παρουσία λευκοκυττάρων και μορφολογικά ανώμαλων σπερματοζωαρίων στο σπερματικό πλάσμα (Lenzi 1994). Η απόπτωση διαδραματίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην εξάλειψη των ανώμαλων σπερματοζωαρίων (Sinha 1999). Ένας μειωμένος αριθμός σπερματοζωαρίων θεωρείται ως συνέπεια των αυξημένων επιπέδων ROS (Sikka 2004).

Το ROS προσβάλλει το PUFA της μεμβράνης του σπερματοζωαρίου, την εξάντληση της ATP, τη φωσφορυλίωση πρωτεϊνών της ουράς και το μειωμένο ποσοστό της κινητικότητας του σπερματοζωαρίου (de Lamirande 1992). Η μειωμένη κινητικότητα των σπερματοζωαρίων μπορεί επίσης να είναι αποτέλεσμα μειωμένου αντιοξειδωτικού αμυντικού μηχανισμού λόγω της αναστολής του ενζύμου φωσφορική αφυδρογονάση

γλυκόζης-6, επιτρέποντας τη διάχυση υπεροξειδίου του υδρογόνου διαμέσου της μεμβράνης πλάσματος (Griveau 1995).

Το οξειδωτικό στρες στην κισσοκήλη μπορεί να είναι αποτέλεσμα αλλαγμένου μικροπεριβάλλοντος και αιμοδυναμικής των όρχεων. Η σπερματογενής δυσλειτουργία μπορεί να είναι αποτέλεσμα διαφόρων αντισταθμιστικών μηχανισμών που προσπαθούν να διατηρήσουν τη σπερματογένεση σε ασθενείς με κισσοκήλη. Αυτοί οι αντισταθμιστικοί μηχανισμοί μπορούν να προκαλέσουν ρύθμιση ή μείωση της ρύθμισης διαφόρων μοριακών μηχανισμών και οδών που εμπλέκονται στη δημιουργία ελεύθερων ριζών (Agarwal 2009). Μια εγγενής μειωμένη έκφραση αντιοξειδωτικών ενζύμων ή αυξημένο οξειδωτικό στρες λόγω της αυξημένης παραγωγής ROS προκαλεί αυξημένη υπεροξειδωση λιπιδίων, επηρεάζοντας τη βιωσιμότητα του σπέρματος και μειώνοντας την κινητικότητα των σπερματοζωαρίων (Sikka 1995). Αν και έχει ήδη προταθεί ότι το οξειδωτικό στρες στην κισσοκήλη οδηγεί σε εξασθένηση των παραμέτρων του σπέρματος, η αιτιολογία των αυξημένων οξειδωτικών επιπέδων εξακολουθεί να είναι ασαφής (French 2008). Οι ερευνητές συζητούν την έκταση της επίδρασης της κισσοκήλης στα χαρακτηριστικά του σπέρματος, καθώς προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι οι παράμετροι του σπερματοζωαρίου που παρατηρούνται σε ασθενείς με κισσοκήλη ποικίλλουν από την νορμοζωοσπερμία μέχρι την ήπια ή μέτρια ασθένεια, την τερατοζωοσπερμία και την αστενοτεραζωοσπερμία. Η συγκέντρωση του σπέρματος δεν επηρεάζεται αρχικά, αλλά αργότερα και οι τρεις παράμετροι των σπερματοζωαρίων, η κινητικότητα και η μορφολογία επιδεινώνονται, ακόμη και προκαλώντας αζωοσπερμία σε μερικές περιπτώσεις (Paradimas 1983, Moazzam 2016).

Οξειδωτικό Στρες και Ανδρικές Αναπαραγωγικές Ορμόνες

Το OS που συμβαίνει λόγω είτε της αυξημένης παραγωγής ROS είτε της μειωμένης διαθεσιμότητας αντιοξειδωτικών μπορεί να προκαλέσει υπεροξειδωση λιπιδίων στα κύτταρα Leydig και στα γεννητικά κύτταρα, βλάβη σε λιποπρωτεΐνες, συσσωμάτωση και θρυμματισμό πρωτεϊνών και αναστολή στεροειδικών ενζύμων (Darbandi 2016).

Το ορχικό οξειδωτικό στρες προκαλεί μείωση στην παραγωγή τεστοστερόνης, είτε ως αποτέλεσμα της βλάβης στα κύτταρα Leydig είτε σε άλλες ενδοκρινικές δομές όπως η πρόσθια υπόφυση (Zirkin 2000, Turner 2005). Αναφέρεται ότι η φυσιολογική στεροειδογένεση παράγει επίσης ROS, τα οποία παράγονται κατά κύριο λόγο με την αναπνοή των μιτοχονδρίων και τις καταλυτικές αντιδράσεις των στεροειδογόνων ενζύμων του κυτοχρώματος P450 (Hanukoglu 2006). Τα ROS που παράγονται με αυτόν τον τρόπο, με τη σειρά τους, έχουν ταυτοποιηθεί για την αναστολή των επακόλουθων παραγωγών

στεροειδών και για τη βλάβη των μιτοχονδριακών μεμβρανών των σπερματοζωαρίων (Luo 2006). Το OS συσχετίζεται με αυξημένο αριθμό ανώριμων σπερματοζωαρίων μέσω έμμεσης επίδρασης στην παραγωγή αρσενικών ορμονών που συσχετίζεται με τη σπερματογένεση (Aitken 2003, Agarwal 2003). Έχει αναφερθεί ότι οι συστηματικές ορμόνες (FSH, LH, τεστοστερόνη, E2, PRL) μπορούν να ρυθμίσουν την συνολική σπερματική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) (Meucci 2003, Mancini 2008). Μια θετική σχέση μεταξύ PRL ή ελεύθερου T4 (fT4) και αρνητική συσχέτιση μεταξύ γοναδοτροπίνων ή γοναδικών στεροειδών με σπερματική αντιοξειδωτική ικανότητα έχει επίσης καταδειχθεί (Mancini 2009).

Είναι προφανές ότι μερικές ορμόνες όπως η τεστοστερόνη και η μελατονίνη μπορεί να λειτουργήσουν ως αντιοξειδωτικά για την προστασία του σπέρματος και άλλων ορχικών κυττάρων από τη βλάβη που προκλήθηκε από το ROS (Shang 2004). Άλλοι μεταβολίτες της στεροειδογόνου οδού, όπως η DHEA, αναφέρθηκε ότι ενισχύουν το επίπεδο των κυτταρικών αντιοξειδωτικών, αλλά ο σωστός μηχανισμός εξακολουθεί να είναι ασαφής (Lakrouf 2012). Έχουν παρατηρηθεί άμεσες και έμμεσες σχέσεις μεταξύ επιπέδων τεστοστερόνης και αντιοξειδωτικών όπως το σελήνιο και / ή το συνένζυμο Q10 και μεταξύ της τεστοστερόνης και του ψευδαργύρου σε υπογόνιμους άντρες αντίστοιχα (Mancini 2009, Oluboyo 2012). Το συνένζυμο Q10 μπορεί να μειώσει τα επίπεδα FSH και LH (Oluboyo 2012). Μία αρνητική σχέση βρέθηκε μεταξύ του επιπέδου της ορμόνης της τεστοστερόνης, της E2, της fT4 και της βλάβης του DNA του σπέρματος (Richthoff 2016, Meeker 2008). Επίσης, η αντιοξειδωτική αναστολή θα μπορούσε να επηρεάσει την τριϊωδοθυρονίνη (T3), την θυροξίνη (T4), τον νευροδιαβιβαστή νοραδρεναλίνη και την αύξηση της βλάβης του DNA του σπέρματος (Dobrzyńska 2004). Η ενδομυϊκή ή υποδόρια ένεση υψηλής καθαρότητας FSH σε ιδιοπαθείς υπογόνιμους άνδρες μειώνει την παραγωγή ROS (Palomba 2011) και την επακόλουθη βλάβη του DNA του σπέρματος (Colacurci 2012). Αν και έχει αναφερθεί ότι η τεστοστερόνη μπορεί να προκαλέσει θρυμματισμό του DNA στα κύτταρα του Sertoli και στα γεννητικά κύτταρα με διέγερση των δραστηριοτήτων κασπάσης στα κύτταρα Sertoli (Tesarik 2002), οι μακροχρόνιες επιδράσεις των αντιοξειδωτικών μπορούν να μεταβάλουν τα επίπεδα FSH, τεστοστερόνης και ινχιμπίνης B (Nematollahi-Mahani 20014, Darbandi 2018).

Μηχανισμός Δράσης

Αναρίθμητοι εξωγενείς και ενδογενείς παράγοντες, όπως συζητήθηκε παραπάνω, μπορούν να παράγουν ROS στο αρσενικό αναπαραγωγικό σύστημα διακόπτοντας την ισορροπία των οξειδωτικών και των αντιοξειδωτικών. Μετά την παραγωγή του ROS, ο άξονας υποθαλάμου-υπόφυσης (HPA) ενεργοποιείται και απελευθερώνει κορτικοστερόνη (σε ζώα) και κορτιζόλη (στους ανθρώπους) σε απόκριση του στρες. Αυτές οι ορμόνες στρες, μέσω της αλληλεπίδρασης των αξόνων HPG και HPA, επηρεάζουν αρνητικά την έκκριση της LH από την

πρόσθια υπόφυση. Η μειωμένη LH αποτυγχάνει να διεγείρει τα κύτταρα Leydig να παράγουν αρκετή τεστοστερόνη. Η μειωμένη FSH μειώνει την απελευθέρωση της πρωτεΐνης δέσμησης ανδρογόνων (ABP) από τα κύτταρα Sertoli και, συνεπώς, παρατηρείται συνολική μείωση της κυκλοφορούσας τεστοστερόνης κατά τη διάρκεια σοβαρής λειτουργικής λειτουργίας. Το ROS επηρεάζει επίσης τον άξονα του HPT για τη μείωση της έκκρισης T3 και T4. Η μειωμένη T3 μειώνει τα επίπεδα του StAR mRNA και της πρωτεΐνης στα κύτταρα Leydig, καθώς και την παραγωγή τεστοστερόνης (Manna 1999). Το αυξημένο οξειδωτικό στρες επίσης μειώνει την έκκριση ινσουλίνης από το πάγκρεας, η οποία επηρεάζει περαιτέρω αρνητικά την απελευθέρωση T3 από τον θυρεοειδή αδένα και συνεπώς τη βιοσύνθεση της τεστοστερόνης. Συνθήκες όπως η παχυσαρκία δεν περιλαμβάνουν μόνο τους άξονες HPA και HPT, περιλαμβάνει επίσης αρκετές μεταβολικές ορμόνες που εκδηλώνουν αλλαγές που προκαλούνται από την ROS στις αναπαραγωγικές λειτουργίες του άρρενος. Τα ROS που προκαλούνται από την παχυσαρκία μπορεί να επηρεάσουν τα λιποκύτταρα για να εκκρίνουν περισσότερη λεπτίνη, η οποία μαζί με την ινσουλίνη, ρυθμίζουν αρνητικά την απελευθέρωση T3 και επομένως αναστέλλουν τις λειτουργίες των όρχεων. Η λεπτίνη, που εκκρίνεται από τα λιποκύτταρα, αναστέλλει επίσης την απελευθέρωση GnRH από τον υποθάλαμο (Darbandi 2018).

Ορχική E2 και η ανασταλτίνη παράγονται έντονα κατά τη διάρκεια του OS, οι οποίες στη συνέχεια αναστέλλουν την απελευθέρωση τεστοστερόνης. Μετά την έκθεση σε ROS αυξάνεται η δραστηριότητα της αρωματάσης η οποία έχει ως αποτέλεσμα μεγαλύτερη παραγωγή E2. Η έκθεση ROS αναφέρεται επίσης ότι αυξάνει την έκκριση της PRL από την πρόσθια υπόφυση που προκαλεί μειωμένη απελευθέρωση GnRH (Darbandi 2018).

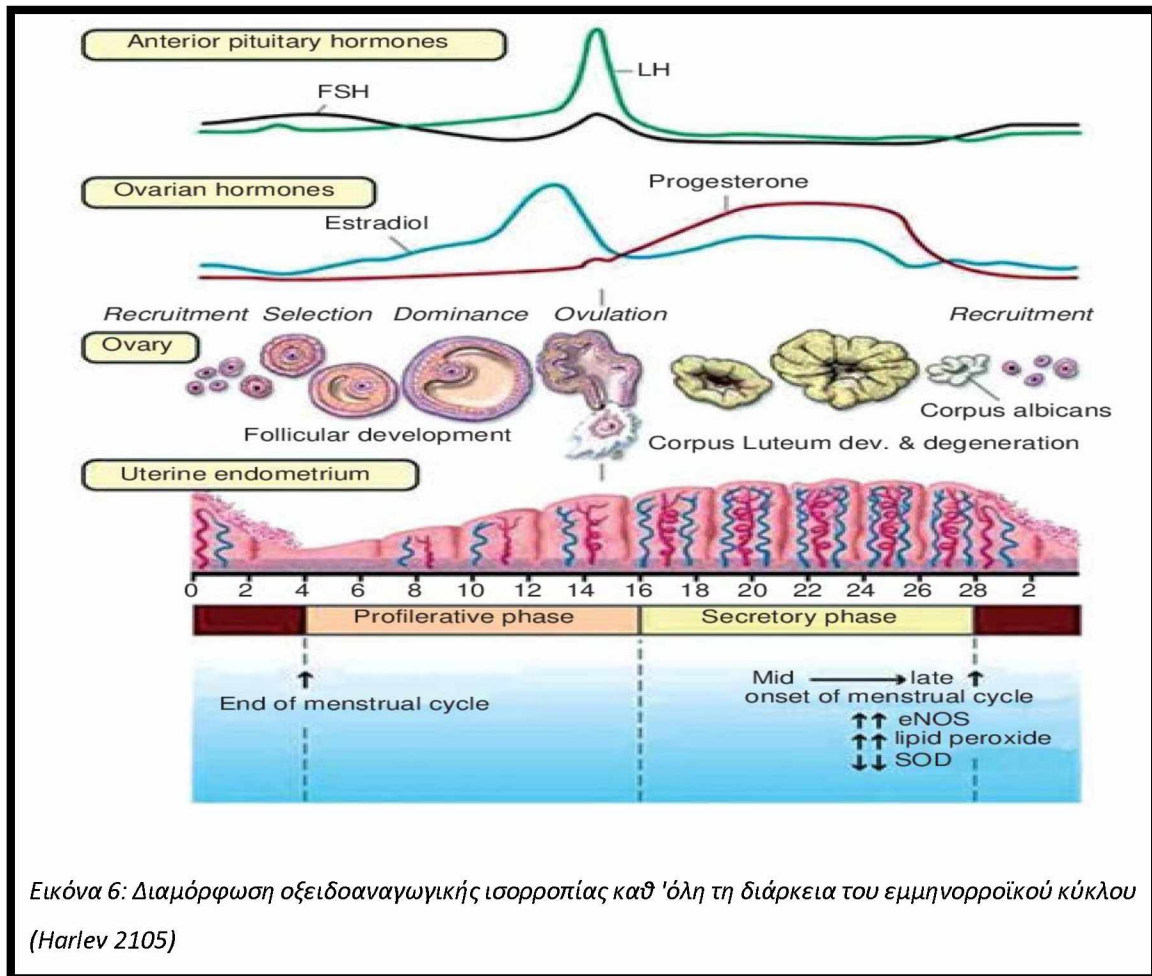
Οι λοιμώξεις στην αναπαραγωγική οδό μπορούν να οδηγήσουν στην παραγωγή προ-φλεγμονωδών κυτοκινών (TNF- α , IL-1b και IL-6) οι οποίες αναστέλλουν πάλι τόσο την απελευθέρωση GnRH όσο και την έκκριση τεστοστερόνης. Έτσι, μέσω των ενεργειών του σε έναν μεμονωμένο ορμονικό άξονα και / ή διακόπτοντας την αλληλεπίδραση μεταξύ των διαφόρων ενδοκρινολογικών συστημάτων, το ROS μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένη παραγωγή τεστοστερόνης ως αποτέλεσμα της ενδοκρινικής διαταραχής. Η μειωμένη τεστοστερόνη αποτυγχάνει να ρυθμίσει σωστά τη σπερματογένεση για να παράγει αρκετά ώριμα σπερματοζωάρια. Αποτυγχάνει επίσης να διατηρήσει τη φυσιολογική ανάπτυξη των βοηθητικών αναπαραγωγικών οργάνων που παίζουν κρίσιμο ρόλο στην ωρίμανση των σπερματοζωαρίων. Ως πρωταρχικός ρυθμιστής της ανδρικής αναπαραγωγικής συμπεριφοράς, η ανεπάρκεια τεστοστερόνης μπορεί να οδηγήσει σε κατασταλτική σεξουαλική συμπεριφορά μεταξύ των ανδρών. Έτσι, διακόπτοντας τις ενδοκρινικές αναπαραγωγικές λειτουργίες, το OS μπορεί να οδηγήσει σε ανδρική υπογονιμότητα (Darbandi 2018).

ROS και Γυναικείο Αναπαραγωγικό Σύστημα

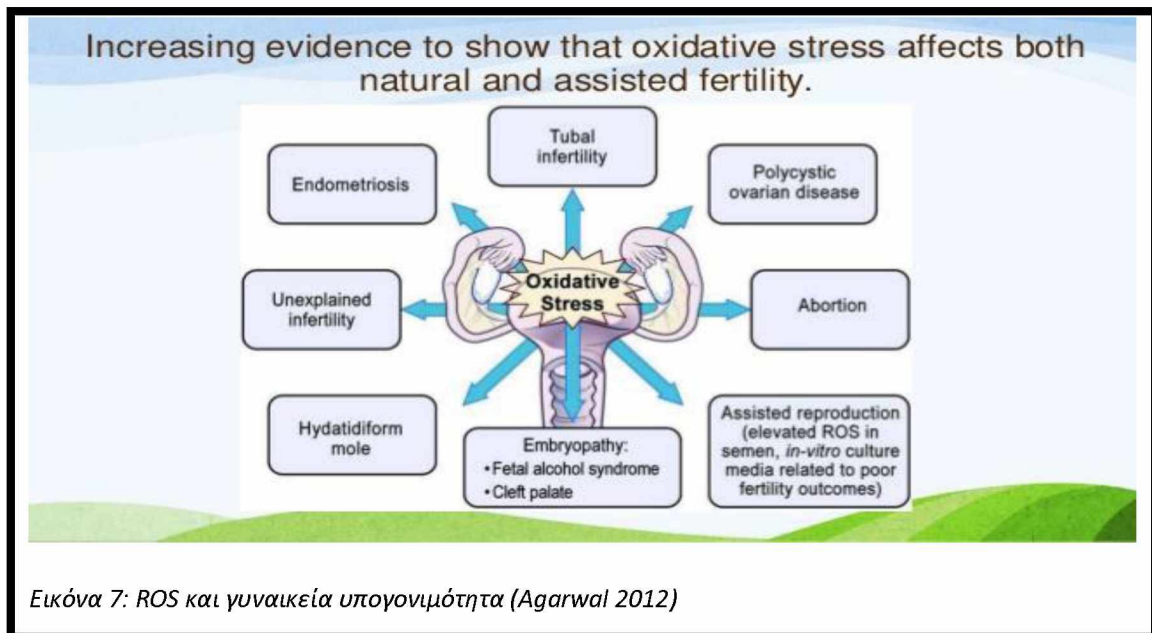
Ο εμμηνορρυσιακός κύκλος κατευθύνεται από μια πολύπλοκη αλληλεπίδραση θετικών και αρνητικών βρόγχων ανάδρασης μεταξύ του υποθάλαμου, της πρόσθιας υπόφυσης και των ωθηκών, γνωστού ως άξονας "HPO". Αυτές οι ορμονικές αλληλεπιδράσεις ρυθμίζουν δύο συναφείς ανατομικούς κύκλους που εμφανίζονται στις ωθήκες και τη μήτρα, οι οποίοι έχουν τρεις φάσεις. Για τις ωθήκες, αυτές περιλαμβάνουν: την ωθυλακική φάση, την φάση της ωορρηξίας και την ωχρινική φάση, και για τη μήτρα, την εμμηνορροϊκή φάση, την πολλαπλασιαστική φάση και την εκκριτική φάση. Για την εμφάνιση ωορρηξίας, οι ορμόνες διέγερσης των ωθυλακίων (FSH) από την πρόσθια υπόφυση οδηγούν στην ωρίμανση των ωθυλακίων. Καθώς τα ωθυλάκια (με τα ωάρια μέσα) μεγαλώνουν, δημιουργούν οιστραδιόλη (E2). Αυτή η αύξηση στην E2 οδηγεί στην ανάπτυξη του ενδομητρίου και ξεκινά την καταστολή της FSH. Το ωθυλάκιο που είναι πιο ευαίσθητο στη FSH θα είναι το επικρατές, ενώ τα άλλα ανταγωνιστικά θυλάκια θα υποστούν ατρησία. Η ύπαρξη αυξημένης E2 για περισσότερο από 50 ώρες προκαλεί την αύξηση της ωχρινοποιητικής ορμόνης (LH), η οποία προκαλεί την ωορρηξία. Το ωθυλάκιο που εκκρίνει το ωάριο στη συνέχεια μετατρέπεται στο ωχρό σωματίο και εκκρίνει την προγεστερόνη (εάν το ωάριο γονιμοποιηθεί) για να βοηθήσει στη διατήρηση της πρώιμης εγκυμοσύνης. Αν δεν προκύψει εγκυμοσύνη, τα επίπεδα E2 και προγεστερόνης πέφτουν, το ενδομήτριο χάνει και η FSH (δεν καταστέλλεται πλέον) θα ενεργοποιηθεί και πάλι την έναρξη μιας νέας φυλής ωρίμανσης ωθυλακίων (Fritz 2011, Steller 2018), (Εικόνα 6).

Τα ROS έχουν βρεθεί ότι έχουν φυσιολογικούς ρόλους σχεδόν σε κάθε βήμα αυτού του μονοπατιού, συμπεριλαμβανομένης της βιοσύνθεσης των ωθηκικών στεροειδών, της ωρίμανσης των ωοκυττάρων, της ωθυλακιωορρηξίας, του σχηματισμού βλαστοκυττάρων, της γονιμοποίησης, της εμφύτευσης, της λουτεόλυσης και της συντήρησης του ωχρού σωματίου (Lu 2018, Agarwal 2012, Ishikawa 1993, Shkolnik, 2011, Al-Gubory 2010). Αντιστρόφως, μια ανισορροπία στα προ-οξειδωτικά και τα αντιοξειδωτικά μπορεί να οδηγήσει σε έναν παθολογικό ρόλο σε κάθε ένα από αυτά τα στάδια και έχει συσχετιστεί με ενδομητρίωση, σύνδρομο πολυκυστικών ωθηκών και υπογονιμότητα. Περαιτέρω, η εγκυμοσύνη καθιστά την ισορροπία αυτή ακόμη πιο επισφαλής, μετακινώντας την ελαφρώς προς μια κατάσταση οξειδωτικού στρες (Belo 2004), η οποία είναι εμφανής στον πρώτο τρίμηνο της εγκυμοσύνης κατά τον σχηματισμό του πλακούντα (Jauniaux 2006) και στο τρίτο τρίμηνο, όπου αυξάνεται η ενεργοποίηση περιφερικών κοκκιοκυττάρων, μονοκυττάρων και λεμφοκυττάρων, τα οποία παράγουν ROS (Redman 2004). Ωστόσο, οποιαδήποτε περαιτέρω προ-οξειδωτική μετατόπιση μπορεί να οδηγήσει σε πληθώρα δυσμενών αποτελεσμάτων εγκυμοσύνης, όπως: αποβολή, επαναλαμβανόμενη απώλεια εγκυμοσύνης, εμβρυοπάθεια, προεκλαμψία,

περιορισμός ανάπτυξης εμβρύου (FGR), πρόωρη ρήξη μεμβρανών (PPROM) διαβήτη (GDM) (Pereira 2014, Steller 2018). (Εικόνα 7).



Εικόνα 6: Διαμόρφωση οξειδοαναγωγικής ισορροπίας καθ' όλη τη διάρκεια του εμμηνορροϊκού κύκλου (Harlev 2105)



Εικόνα 7: ROS και γυναικεία υπογονιμότητα (Agarwal 2012)

Ενώ ο ρόλος των ROS έχει διερευνηθεί εκτενώς στο αρσενικό αναπαραγωγικό σύστημα, η βιβλιογραφία είναι σχετικά χαμηλή σε μελέτες που ασχολούνται με το ρόλο των

ROS στο γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα. Οι ανεπιθύμητες ενέργειες του OS και των ROS στη γυναικεία αναπαραγωγική οδό έχουν διερευνηθεί με την πάροδο των ετών (Ruder 2008). Η διαδικασία της ωρίμανσης ωαρίων, της μείωσης I και II, επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από μεταβλητές ποσότητες ROS και αντιοξειδωτικών (Behrman 2001). Επίσης, το OS έχει άμεση επίδραση στο ωάριο, στο έμβρυο και στην εμφύτευση προκαλώντας υπεροξειδωση λιπιδίων κυτταρικής μεμβράνης, οξειδωση κυτταρικής πρωτεΐνης και βλάβη DNA. Το οξειδωτικό στρες σχετίζεται επίσης με καταστάσεις όπως η ενδομητρίωση, η υδροσάλπιγγα το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών (PCOS), η προεκλαμψία, οι επαναλαμβανόμενες απώλειες εγκυμοσύνης και η ανεξήγητη υπογονιμότητα (Agarwal 2012, Agarwal 2005, Smits 2018). Στο θηλυκό αναπαραγωγικό σύστημα, τα ROS εντοπίζονται κυρίως στα κύτταρα ωοθυλακίων, στις σάλπιγγες, στο ενδομήτριο και στο περιτόναιο (Agarwal 2017).

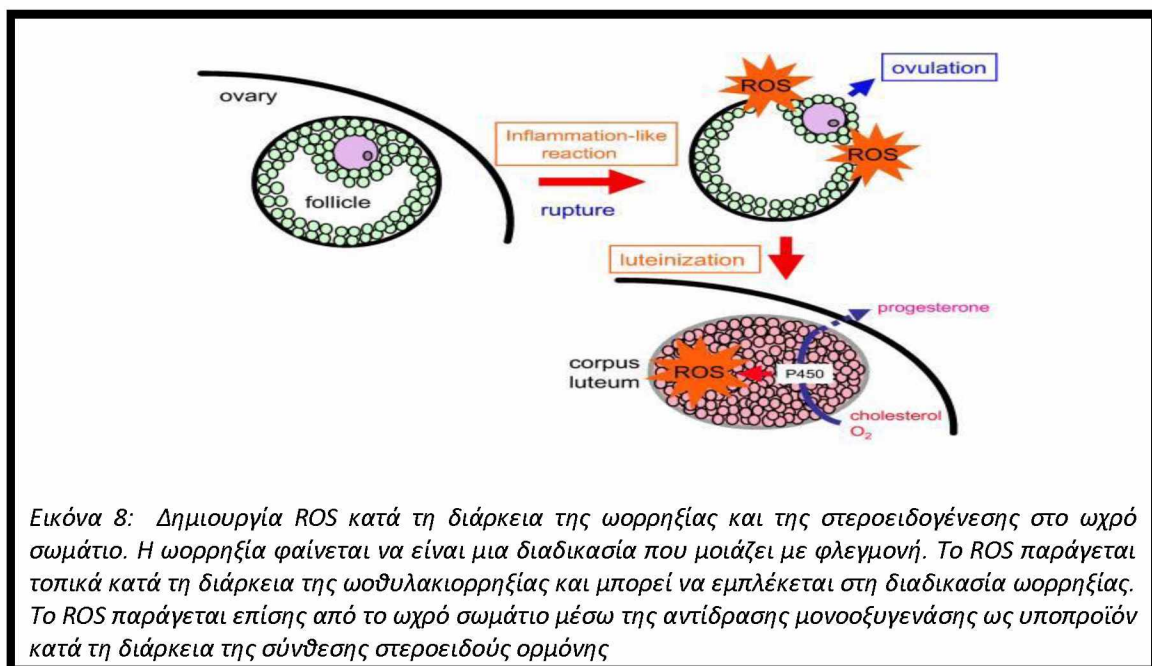
Ελεύθερες Ρίζες Και Ωοθήκη

Ευεργετικός Ρόλος του OS στις Ωοθήκες

Η θηλυκή αναπαραγωγική λειτουργία προσδιορίζεται άμεσα από τη διάρκεια ζωής των ωοθηκών. Οι ωοθήκες είναι ένα μεταβολικά δραστικό όργανο και χρησιμεύουν ως δεξαμενή γεννητικών κυττάρων κατά τη διάρκεια της αναπαραγωγικής ζωής του θηλυκού (Tatone 2015). Αποτελείται από περίπου 0,3 εκατομμύρια αρχέγονους θύλακες που περιέχουν διπλοειδή ωκύτταρα (Tatone 2015). Η αύξηση της γοναδοτροπίνης της υπόφυσης προκαλεί στεροειδογένεση, ανάπτυξη θυλακίων, ωρίμανση και ωορρηξία στα περισσότερα θηλαστικά (Agarwal 2005, Tiwari 2015, Tatone 2015). Το ROS δημιουργείται στις ωοθήκες λόγω του αυξημένου μεταβολισμού κατά τη διάρκεια των τελικών σταδίων της ωοθυλακιογένεσης και της ωοθυλακιωρρηξίας, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση του επιπέδου ROS που είναι δυνατόν λόγω της μειωμένης δραστικότητας των ενζυμικών αντιοξειδωτικών. Η πιθανότητα αυτή υποστηρίζεται περαιτέρω από τις παρατηρήσεις ότι η μείωση της δραστικότητας της καταλάσης και η αύξηση του υπεροξειδίου του υδρογόνου καθώς και το συνολικό επίπεδο ROS προκάλεσαν την επανεκκίνηση της μείωσης στα διπλοταινικά ωκύτταρα σε ωοθυλακία αρουραίων (Chaube 2005, Tripathi 2011, Tripathi 2009, Tiwari 2016, Behrman 2001). Μία μέτρια αύξηση του επιπέδου ROS ευνοεί τα ωκύτταρα στο στάδιο της διπλοταινίας να επαναλάβουν τη μείωση μέσα στο ωοθυλακικό περιβάλλον, υποδηλώνοντας τον ωφέλιμο ρόλο του επιπέδου ROS εντός των ωοθηκών (Tripathi 2011, Tiwari 2016, Chaube 2006, Tripathi 2013, Tiwari 2016). Το υψηλό φυσιολογικό επίπεδο της ROS έχει αναφερθεί σε κοιλιακά ωοθυλάκια κατά τα τελικά στάδια της ωοθυλακιογένεσης, τα οποία θα μπορούσαν να συσχετιστούν με την τελική

ωρίμανση των ωαρίων (Agarwal 2005, Pandey 2010, Singh 1998, Fujii 2005, Basini 2008, Rizzo 2009, Prasad 2016).

Η ωοθήκη είναι ένα μεταβολικά ενεργό όργανο και, ως εκ τούτου, είναι υπό συνεχές στρες. Τα ROS παίζουν φυσιολογικό ρόλο κατά την διάρκεια της ωορρηξίας που είναι παρόμοιος υπό ορισμένες απόψεις με τη φλεγμονή (Bjersing 1974, Espey 1980), (εικόνα 7). Η ωορρηξία καταστέλλεται από παράγοντες που αναστέλλουν τις αντιδράσεις οξειδίας φλεγμονής (Espey 1982). Δεδομένου ότι η ROS παράγεται κατά τη διάρκεια της φλεγμονώδους διαδικασίας, λογικά υποτίθεται ότι το ROS απελευθερώνεται σε σχέση με τη ρήξη των ωοθυλακίων και εμπλέκεται σε αυτή τη διαδικασία (Εικόνα 8). Η πηγή του ROS φαίνεται να είναι φλεγμονώδη κύτταρα, όπως τα μακροφάγα και τα ουδετερόφιλα, καθώς υπάρχουν σε ωοθήκες κατά την ωορρηξία (Nakamura 1987- Adashi 1990, Brannstrom 1993) και παράγουν τεράστια ποσότητα ελεύθερων ριζών. Αυτή η έννοια υποστηρίζεται από το εύρημα ότι η καταστολή των ROS από SOD και / ή καταλάση σε παρασκευάσματα ωοθηκών κουνελιού που έχουν υποστεί διήθηση *in-vitro*, εμποδίζει την ωορρηξία (Miyazaki 1991, Fujii 2005).



Εικόνα 8: Δημιουργία ROS κατά τη διάρκεια της ωορρηξίας και της στεροειδογένεσης στο ωχρό σωματίο. Η ωορρηξία φαίνεται να είναι μια διαδικασία που μοιάζει με φλεγμονή. Το ROS παράγεται τοπικά κατά τη διάρκεια της ωοθυλακιορρηξίας και μπορεί να εμπλέκεται στη διαδικασία ωορρηξίας. Το ROS παράγεται επίσης από το ωχρό σωματίο μέσω της αντίδρασης μονοοξυγενάσης ως υποπροϊόν κατά τη διάρκεια της σύνθεσης στεροειδούς ορμόνης

Η αντίδραση μονοοξυγενάσης, με τη μεσολάβηση του P450, απαιτείται για τη στεροειδογόνο διαδικασία της ωοθήκης και παράγει αναπόφευκτα ROS ως υποπροϊόντα. Τα επίπεδα ROS στο ωχρό σωματίο αυξάνονται στην πραγματικότητα κατά τη διάρκεια της φάσης παλινδρόμησης (Riley 1991, Sawada 1991 & 1994, Sugino 1993 & 1998, Shimamura 1995). Η NADPH-εξαρτώμενη παραγωγή υπεροξειδίου στην ωοθήκη του ποντικού αυξάνεται κατά την πρώιμη προ-ωορρηκτική φάση του κύκλου και κατά την ωχρινική φάση σε εγκυμονούντα ζώα (Jain 2000, Fujii 2005).

Η SOD υπάρχει στα αναπτυσσόμενα ωοθυλάκια, στην κοκκώδη μεμβράνη των γραφειανών ωοθυλακίων, στα ωορρηκτικά ωοθυλάκια και στα αιμοφόρα αγγεία. Έχουν αναφερθεί κυκλικές μεταβολές στα επίπεδα SOD κατά τη διάρκεια του αναπαραγωγικού κύκλου των αρουραίων και μια αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων του SOD και της ρίζας υπεροξειδίου (Laloraya 1988). Η SOD μπορεί να παίζει ρόλο στη ρύθμιση της ανάπτυξης των ωοθυλακίων, της ωορρηξίας και τις ωχρινικές λειτουργίες (Laloraya 1989). Στο ωχρό σωματίο κύησης, τα κύτταρα της θήκης και ωχρινικά κοκκώδη κύτταρα παρουσιάζουν έντονη και μέτρια ένταση χρώσης, αντίστοιχα (Shiotani 1991). Η δραστηριότητα του SOD είναι επίσης παρούσα στο ανθρώπινο προ-ωορρηκτικό ωοθυλακικό υγρό σε υψηλότερα επίπεδα από ό, τι στον ορό (Sabatini 1999). Περίπου 7 φορές υψηλότερο επίπεδο δραστηριότητας SOD υπάρχει στο υγρό των ωοθυλακίων χοίρου και φαίνεται να ασκεί προστασία έναντι οξειδωτικής βλάβης στα ωκύτταρα (Tatemoto 2004, Fujii 2005).

Τα επίπεδα SOD ελέγχονται από διάφορους παράγοντες. Η ανάπτυξη ωοθυλακίων αρουραίων με τη μεσολάβηση της γοναδοτροπίνης συμπίπτει με αυξημένη έκφραση του mRNA του Mn-SOD και του Cu-SOD. Η έκφραση Mn-SOD επάγεται και καταστέλλει την απόπτωση στο ωχρό σωματίο του κουνελιού *in vitro*, υποδηλώνοντας ότι το Mn-SOD είναι υπεύθυνο για τη μεσολαβούμενη από τη γοναδοτροπίνη αναστολή της απόπτωσης (Tilly 1995). Τόσο το επίπεδο mRNA του CuZn-SOD όσο και του Mn-SOD αυξάνεται στο ωχρό σωματίο του αρουραίου από την προλακτίνη (Sugino 1998), Fujii 2005).

Η διέγερση της ωχρινοποιημένης έκφρασης Cu, Zn-SOD με HCG μπορεί να είναι σημαντική για τη διατήρηση της ακεραιότητας του ωχρού σωματίου κατά την εμφάνιση της εγκυμοσύνης (Sugino 2000β). Στη διαδικασία της ακινητοποίησης, η οιστραδιόλη και η οξική μεδροξυπρογεστερόνη αυξάνουν την έκφραση Mn-SOD μέσω μιας cAMP-εξαρτώμενης οδού. Το Cu, το Zn-SOD ρυθμίζεται επίσης από αυτές τις ενώσεις, αλλά μέσω μιας διαφορετικής οδού από εκείνη που περιλαμβάνει cAMP (Sugino 2002, Fujii 2005).

Ρόλος των RNOS

Τα RNOS παίζουν επίσης πολλαπλούς ρόλους στην ωοθήκη (Rosselli 1998). Από τα τρία ισοένζυμα NOS, τα NOS II και NOS III εκφράζονται στις ωοθήκες (Nakamura 2002, Van Voorhis BJ 1995, Jablonka-Shariff 1997, Zackrisson 1996). Η έκφραση του NOS III αυξάνεται μετά από ένεση LH ή ένεση hCG. Η έκφραση του NOS III στα ωκύτταρα και ο αποκλεισμός της ωρίμανσης των ωαρίων με την από του στόματος χορήγηση αναστολέων NOS έχουν αναφερθεί (Jablonka-Shariff 1999). NO που παράγεται από NOS III διεγείρει την διαδικασία ωορρηξίας (Shukovski 1994, Bonello 1996, Yamauchi 1997- Hesla 1997, Jablonka-Shariff 1998

& 1999). Η ωρίμανση των μειωτικών ωοκυττάρων έχει σταματήσει σε ποντίκια με *knockout* NOS III (Jablonka-Shariff 1993, Jablonka-Shariff 2000). Ωστόσο, η πηγή του NO καθώς σχετίζεται με την ωρίμανση των ωαρίων βρίσκεται επί του παρόντος υπό συζήτηση.

Το NOS II εντοπίζεται κυρίως σε κοκκώδη κύτταρα και παράγει μεγάλες ποσότητες NO. Η μείωση της συγκέντρωσης νιτρικών / νιτρωδών σε προωρηκτικά ωοθυλάκια μετά από ένεση hCG συσχετίζεται κυρίως με μειωμένη έκφραση NOS II σε κοκκώδη κύτταρα (Yamagata 2002). NO, που παράγεται από NOS στα ανθρώπινα κοκκώδη-ωχρινικά κύτταρα, φαίνεται να αναστέλλει την έκκριση οιστραδιόλης μέσω άμεσης αναστολής της αρωματάσης (Van Voorhis 1997). Επιπλέον, η περίσσεια NO αναστέλλει την παραγωγή προγεστερόνης και προκαλεί αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο σε κοκκώδη κύτταρα αρουραίου (Yamagata 2002, Dave 1997). Ένας δότης NO, S-νιτροζο-N-ακετυλο-D, L-πενικιλλαμίνη (SNAP) δοσοεξαρτώμενα αναστέλλει τη διάσπαση του βλαστικού κυστιδίου σε απογυμνωμένα ωάρια και αυτό το αποτέλεσμα του SNAP μπορεί να αντιστραφεί με την προσθήκη αιμοσφαιρίνης (Nakamura 2004). Αυτά τα δεδομένα υποδηλώνουν ότι το σύστημα NOS II-NO- (cGMP) μπορεί να παίζει ρόλο στη μειωτική ωρίμανση των ωοκυττάρων, αλλά απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για να εξακριβωθεί η πραγματική λειτουργία των ωοθηκών (Fujii 2005).

Ελεύθερες Ρίζες και Ωοθυλάκιο

Μακροφάγα, λευκοκύτταρα και κυτοκίνες που υπάρχουν στο μικροπεριβάλλον των ωοθυλακίων είναι σημαντικές πηγές ROS (Agarwal 2004). Το ωάριο έχει αποδειχθεί ότι είναι πηγή ROS με διαφορετικούς μηχανισμούς. Πρώτον, η οξειδωτική φωσφορλίωση μέσα στο ωοκύτταρο χρησιμοποιεί το O₂ για την παραγωγή ενέργειας (ATP). Δεύτερον, το σύστημα οξειδάση ξανθίνης (XO) εξαλείφει τα τοξικά απόβλητα με τη μορφή ουρικού οξέος, αλλά σε βάρος της δημιουργίας ROS. Τέλος, το σύστημα οξειδάσης NADPH με το οποίο η οξειδωτική έκρηξη παράγει HOCl για να σκοτώσει τα μικρόβια. Όλα αυτά τα συστήματα αποτελούν προεξέχουσες πηγές ROS στο ωάριο (Agarwal 2004).

Τα ROS στο ωοθυλακικό υγρό εμπλέκονται στην ωοθυλακική ανάπτυξη, την ωρίμανση των ωοκυττάρων και τη βιοσύνθεση των στεροειδών ορμονών των ωοθηκών (Fujii 2005). Ταυτόχρονα, μια κρίσιμη διαδικασία για την ωοθυλακιογένεση, την επιλογή κυριάρχου ωοθυλακίου, τον σχηματισμό του ωχρού σωματίου και τον σχηματισμό εμβρύου είναι η αγγειογένεση (Geva 2000, Gordon 1996), η οποία είναι πολύπλοκη διαδικασία. Η αγγειογένεση προωθείται από τα οιστρογόνα που ρυθμίζουν ορισμένους κυτταρικούς παράγοντες, όπως ο VEGF (Albrecht 2003). Τα ROS που παράγονται από την οξειδάση NADPH (H) αποδείχθηκαν σημαντικά για αγγειογένεση *in vivo* και σηματοδότηση VEGF *in vitro* (Ushio-Fukai 2004). Συνεπώς, οι ROS εμπλέκονται στην ανάπτυξη των ωοθυλακίων εν μέρει

με ρύθμιση της αγγειογένεσης (Lu 2018). Επιπλέον, τα ROS συμμετέχουν επίσης στην ωορρηξία των θηλαστικών και στη θραύση των ωοθυλακίων. Η δημιουργία των δύο διεργασιών είναι το αποτέλεσμα αγγειακών μεταβολών ή του πρωτεολυτικού καταρράκτη. Η αλληλεπίδραση μεταξύ αυτών των δύο καταρρακτών προκαλείται από ROS, κυτοκίνες και αγγειακό ενδοθηλιακό αυξητικό παράγοντα (VEGF) (Ahmed 2009, Szpera-Gozdziewicz 2014).

Τα ROS επάγονται στα προωρηθητικά ωοθυλάκια με ταλαντώσεις προσταγλανδινών, κυτοκινών, πρωτεολυτικών ενζύμων και στεροειδών ορμονών, με αποτέλεσμα αλλοιώσεις της ροής αίματος και ενδεχόμενη θραύση των ωοθυλακίων (Du 2006). Με εξαίρεση το κυρίαρχο ωοθυλάκιο, το οποίο απελευθερώνεται για γονιμοποίηση, τα άλλα αναπτυσσόμενα ωοθυλάκια υποβάλλονται σε απόπτωση, και αυτή η διαδικασία προωθείται από τα ROS. Παράλληλα, η σύνθεση οιστρογόνων που προκαλείται από τη θυλακιοτρόπο ορμόνη (FSH) και η αύξηση των CAT και GSH στα αναπτυσσόμενα θυλάκια αντισταθμίζει την αποπτωτική διαδικασία για τη διατήρηση της ισορροπίας κατά την κανονική λειτουργία των ωοθηκών (Sugino 2006). Η Ad4BP, μια πρωτεΐνη ψευδαργύρου δέσμησης DNA, αναγνωρίστηκε ως ένας παράγοντας μεταγραφής που ρυθμίζει τα στεροειδογόνα γονίδια P-450 με τρόπο εξαρτώμενο από cAMP (Morohashi 1994) και μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η συσχέτιση μεταξύ έκφρασης Ad4BP και SOD προτείνοντας μια σχέση μεταξύ OS και γένεση ωοθηκικών στεροειδών (Lu 2018).

Η γήρανση ορίζεται από τη σταδιακή απώλεια λειτουργιών οργάνων και ιστών. Η γήρανση των ωαρίων συνδέθηκε με την παραγωγή ROS που μπορεί να αυξήσει την ωοθυλακική βλάβη (Fujii 2005). Αυτή η υπόθεση οδήγησε τους ερευνητές να υποθέσουν ότι η ROS μπορεί να σχετίζεται με την εμφάνιση συγγενών ανωμαλιών στα νεογνά που παρατηρούνται από ηλικιωμένες γυναίκες (Agarwal 2004). Έχει παρατηρηθεί ότι τα ωάρια γυναικών σε προχωρημένη ηλικία αναπαραγωγής φέρουν δυσλειτουργίες στο επίπεδο μιτοχονδριακού DNA και χρωμοσωμική ανευλοειδία. Ο δείκτης που χρησιμοποιήθηκε για την αξιολόγηση της βλάβης μιτοχονδριακού DNA (mtDNA) είναι ένα οξειδωμένο παράγωγο της βάσης δεοξυγουανοσίνης, δηλαδή η οξοδεοξυγουανοσίνη (8-OHdG) (Agarwal 2012). Η εμμηνόπαυση προκαλεί επίσης μειωμένη παραγωγή οιστρογόνων μαζί με τις προστατευτικές τους ιδιότητες έναντι οξειδωτικής βλάβης του ενδομητρίου (Catt 2000, Agarwal 2017).

Η ανάπτυξη των ωοθυλακίων από το αρχέγονο στάδιο στο κοιλοτικό ωοθυλάκιο συνοδεύεται από μια σημαντική αύξηση της μεταβολικής λειτουργίας των κοκκωδών κυττάρων, ιδιαίτερα μια μεγάλη αύξηση της δραστηριότητας του κυτοχρώματος P450 με βιοσύνθεση στεροειδών (Richards 1994). Μεγάλες ποσότητες ROS παράγονται κατά τη μεταφορά ηλεκτρονίων, υποδεικνύοντας ότι τα λειτουργικά κοκκώδη κύτταρα σχετίζονται με την προ-οξειδωτική κατάσταση στα ωοθυλάκια (Lu 2018). Τα κοκκώδη κύτταρα είναι μία από

τις κύριες πηγές ROS στο θραύσμα του γράφιανού ωοθυλάκιου. Τα μη διαφοροποιημένα κοκκώδη κύτταρα δημιουργούν τον ωοφόρο δίσκο, που προσδένει το ωάριο και το διατηρεί στη θέση του. Το SOD είναι το κύριο αντιοξειδωτικό που υπάρχει σε αυτά τα κύτταρα για να εξουδετερώσει την παραγωγή ROS (Agarwal 2004, Burton 2011). Το OS στα κοκκώδη κύτταρα και τον ωοφόρο δίσκο μπορεί να βλάψει τα περιεχόμενα του κυττάρου, συμπεριλαμβανομένου του DNA (Agarwal 2012). Έχει αποδειχθεί ότι μια θετική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων 8-OHdG στα κοκκώδη κύτταρα και της κακής ποιότητας ωαρίων (Tamura 2008, Seino 2002) αλλά οι ακριβείς μηχανισμοί παραγωγής ROS στα κοκκώδη κύτταρα και την ωοφόρο μάζα παραμένουν ασαφείς (Agarwal 2017).

Τα ROS και τα αντιοξειδωτικά βρίσκονται στο υγρό των ωοθυλακίων, τα οποία επίπεδα έχουν συνδεθεί με την ποιότητα των ωοκυττάρων (Behrman 2001). Δεδομένου ότι το ωοθυλακικό υγρό παράγεται τόσο από τα κοκκώδη κύτταρα όσο και από τα εσωτερικά κύτταρα της θήκης (Ruder 2009), είναι πιθανό αυτά τα στοιχεία να είναι οι πηγές των ROS και των αντιοξειδωτικών. Τα πιο άφθονα αντιοξειδωτικά στο ωοθυλακικό υγρό είναι μη ενζυματικά, όπως η βιταμίνη C, η βιταμίνη E, η γλουταθειόνη (GSH), η υποταυρίνη και η ταυρίνη (Behrman 2001). Το ωοθυλακικό υγρό έχει υψηλή μεταβολική δραστηριότητα και περιέχει στεροειδείς ορμόνες, αυξητικούς παράγοντες, λευκοκύτταρα, κυτοκίνες και κοκκώδη κύτταρα, τα οποία είναι γνωστό ότι αυξάνουν την παραγωγή ROS (Behrman 2001). Τα επίπεδα ROS έχουν μελετηθεί στο ωοθυλακικό υγρό των γυναικών που προσπαθούν να συλλάβουν μέσω υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (ART). Η συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) ήταν χαμηλότερη σε όσους δεν κατάφεραν να συλλάβουν (Pasqualotto 2004). Σε άλλη μελέτη, τα επίπεδα TAC αποδείχθηκαν υψηλότερα σε ωοθυλακικό υγρό που παρήγαγαν ωάρια που γονιμοποιήθηκαν με επιτυχία μέσω ART (Bedaiwy 2012, Agarwal 2017).

Ελεύθερες Ρίζες & Ωχροό Σωμάτιο

Η ωοθηκική καθώς επίσης και η μητρική NADPH-εξαρτώμενη παραγωγή υπεροξειδίου φαίνεται να είναι LH-επαγόμενη. Το ROS και οι σχετικές ενώσεις μπορεί να λειτουργούν ως ενδοκυτταρικοί ρυθμιστές στεροειδογένεσης και απελευθέρωσης προγεστερόνης στο ωχροό σωμάτιο (Sawada 1994, Carlson 1993 & 1995, Fujii 2005). Το ωχροό σωμάτιο σχηματίζεται μετά την ωορρηξία και παράγει προγεστερόνη (P4), η οποία είναι απαραίτητη για τη δημιουργία και τη διατήρηση της εγκυμοσύνης. Τα στεροειδογόνα κύτταρα είναι πιθανές πηγές ROS επειδή αυτές οι ενώσεις είναι παραπροϊόντα του φυσιολογικού μεταβολισμού, από την άλλη πλευρά, τα ROS επηρεάζουν την σύνθεση της P4 (Sugino 2006). Απαιτείται αντίδραση μονοοξυγενάσης, με τη μεσολάβηση του P450, για αυτή

τη στεροειδογόνο διαδικασία, αλλά αναπόφευκτα παράγει ROS ως παραπροϊόντα (Rizzo 2011).

Τα ROS παράγονται στο ωχροό σωματίο και εμπλέκονται στη λειτουργική λουτεόλυση. Υπάρχει σημαντική συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης P4 στον ορό, των δραστηριότητας SOD και των συγκεντρώσεων ROS (Rizzo 2011). Μία αύξηση των αμυντικών αντιοξειδωτικών των ωθηκών συμβαίνει για τη διατήρηση της δραστηριότητας του ωχρού σωματίου, στην ωχρινική φάση (Sugino 2006). Τα ROS και τα αντιοξειδωτικά σχετίζονται με τη σύνθεση προγεστερόνης στην ωχρινική φάση (Behrman 2001, Lu 2018). Το Cu / Zn-SOD αυξάνεται στο ωχροό σωματίο κατά την πρώιμη έως τη μέση ωχρινική φάση, αλλά μειώνεται κατά τη διάρκεια της φάσης παλινδρόμησης, γεγονός που θα μπορούσε να εξηγήσει την αύξηση των συγκεντρώσεων ROS κατά τη διάρκεια της παλινδρόμησης και αυτή η αλλαγή στη δραστηριότητα είναι παρόμοια με εκείνη των συγκεντρώσεων προγεστερόνης. Άλλη πιθανή εξήγηση για τη μείωση του Cu-Zn SOD κατά τη διάρκεια της φάσης παλινδρόμησης είναι η αύξηση της PGF_{2α} προσταγλανδίνης ή των μακροφάγων, μια άλλη αξιόπιστη εξήγηση είναι η μείωση της ροής αίματος των ωθηκών (Behrman 2001). Η προσταγλανδίνη F_{2α} διεγείρει την παραγωγή του ανιόντος SO από τα ωχρινικά κύτταρα και φαγοκυτταρικά λευκοκύτταρα στο ωχροό σωματίο. Η μείωση της ροής αίματος των ωθηκών προκαλεί βλάβη στον ιστό από την παραγωγή του ROS (Lu 2018). Ωστόσο, η συγκέντρωση του Mn-SOD στο ωχροό σωματίο κατά τη διάρκεια της παλινδρόμησης αυξάνεται, εξαλείφοντας έτσι το ROS που παράγεται στα μιτοχόνδρια από φλεγμονώδεις αντιδράσεις και κυτοκίνες. Επομένως, η πλήρης διάσπαση του ωχρού σωματίου οδηγεί σε σημαντική μείωση του Mn-SOD στα παλιδρομούμενα κύτταρα και ο κυτταρικός θάνατος είναι επικείμενος (Agarwal 2012, Lu 2018)

Τα επίπεδα των αντιδραστικών ειδών οξυγόνου στο ωχροό σώμα αυξάνονται κατά τη φάση παλινδρόμησης και προσομοιάζουν την έκφραση της κυκλοοξυγενάσης-2 (COX-2) και την επακόλουθη σύνθεση P_gF_{2α} ενεργοποιώντας έναν παράγοντα μεταγραφής, τον πυρηνικό παράγοντα-κάπα B (NF-κB, (Sugino 2006). Έχει αναφερθεί ότι η P_gF_{2α} προκάλεσε απόπτωση επίσης μέσω της αύξησης της παραγωγής ROS σε κύτταρα ωχρού σωματίου αρουραίου και ότι τα αντιοξειδωτικά και οι παράγοντες δέσμησης ελεύθερων ριζών ανέστειλαν την επαγωγή της απόπτωσης. Αυτό δείχνει ότι τα ROS προκαλούν αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο κατά τη διάρκεια της λουτεόλυσης (Rizzo 2011).

Μελέτες σε ζώα έδειξαν πως το ωχροό σωματίο των βοοειδών και του χοίρου είναι πλούσια σε αντιοξειδωτικά, ειδικά β-καροτένιο και ασκορβικό οξύ (Miszkiel 1999). Το β-καροτένιο μπορεί να χρησιμεύσει για την προστασία των ωθηκών και της μήτρας από οξειδωτική βλάβη, εξασφαλίζοντας έτσι ένα ευνοϊκότερο περιβάλλον για την ανάπτυξη εμβρύων σε περίπτωση εγκυμοσύνης. Μελέτη έδειξε πως η περιεκτικότητα του ωχρού σωματίου βοοειδών σε ασκορβικό οξύ είναι στο μέγιστο όριο όταν το ωχροό σωματίο είναι

πλήρως ώριμο, παραμένει υψηλό κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης και μειώνεται καθώς το ωχρο σωματίο υποχωρεί (Petroff 1997). Μια ενδιαφέρουσα μελέτη που διεξήχθη σε αγελάδες έδειξε υψηλές συγκεντρώσεις ελεύθερων ριζών και χαμηλές συγκεντρώσεις P4 κατά τη διάρκεια της κρίσιμης περιόδου για την επιβίωση του ωχρού σωματίου προκάλεσαν αποτυχία σύλληψης (Rizzo 2007, Rizzo 2011).

Ελεύθερες Ρίζες & Ενδομήτριο

Τα στρωματικά κύτταρα του ενδομητρίου παράγουν ROS ως υποπροϊόντα κανονικού μεταβολισμού (Freeman & Crapo 1982, Rizzo 2011). Τα επίπεδα ROS σε φυσιολογικά επίπεδα παράγονται εντός των ενδομητρικών κυττάρων οδηγούν στην αύξηση της προσταγλανδίνης F2 alpha (PGF2α), η οποία με τη σειρά της παίζει ρόλο στην ωχρινική παλινδρόμηση (Sugino 2004). Επιπλέον, η απόσυρση των οιστρογόνων και της προγεστερόνης προκαλεί μείωση των επιπέδων SOD και επακόλουθη αύξηση των επιπέδων ROS, η οποία προάγει τον παράγοντα μεταγραφής NF-KB για να εκφράσει το ένζυμο της κυκλο-οξυγενάσης-2 (COX-2). Το COX-2 θα καταλύει τη σύνθεση του PGF2α που συμβάλλει στη διαδικασία αποβολής του ενδομητρίου (Wu 2014, Agarwal 2017).

Οι μεταβολές του ενδομητρίου στην πολλαπλασιαστική και εκκριτική φάση κατά τη διάρκεια κάθε κύκλου επηρεάζονται από διάφορα αντιοξειδωτικά που εκφράζονται στο ενδομήτριο. Τα επίπεδα SOD αυξάνονται και τα επίπεδα ROS αυξάνονται στο ενδομήτριο στην ύστερη εκκριτική φάση λίγο πριν από την εμμηνόρροια, γεγονός που υποδεικνύει ότι αυτές οι μεταβολές στο επίπεδο έκφρασης υποδεικνύουν την αύξηση του ενδομητρίου στην διάσπαση και την αποβολή. Τα Cu, Zn-SOD και Mn-SOD ρυθμίζονται διαφορετικά από οιστρογόνα και προγεστερόνη σε ανθρώπινα στρωματικά κύτταρα του ενδομητρίου. Η μείωση του Cu, Zn-SOD μετά από απόσυρση ωθητικών στεροειδών μπορεί να εμπλέκεται στη διάσπαση του ενδομητρίου (Sugino 2002). Στην περίπτωση του Mn-SOD, η απόσυρση οιστρογόνων οδήγησε σε αυξημένη έκφραση του TNF-α (Tabibzadeh 1999), η οποία θα αυξήσει τα επίπεδα mRNA του Mn-SOD και τη δραστηριότητα Mn-SOD με τρόπο εξαρτώμενο από τη δόση στα ανθρώπινα στρωματικά κύτταρα του ενδομητρίου (Karube-Harada 2001). Η μείωση στην έκφραση Cu, Zn-SOD και η αύξηση στο υπεροξειδίο του λιπιδίου στο φθαρτό μπορεί να εμπλέκεται στον τερματισμό της αυθόρμητης έκτρωσης, η οποία προκαλείται μέσω της αύξησης της σύνθεσης του PGF2α. Αυτό υποδηλώνει ότι το Cu, Zn-SOD συμβάλλει στη διατήρηση της εγκυμοσύνης εμποδίζοντας τη συσσώρευση ριζών υπεροξειδίου που προκαλεί σύνθεση PGF2α (Sugino 2000, Gupta 2009). Το επίπεδο PGF2α είναι μέγιστο στην εμμηνόρροια και είναι υπεύθυνο για την αποβολή του ενδομητρίου. Επομένως, υπάρχει στενή αλληλεπίδραση μεταξύ των SOD, ROS και PGF2α με αποτέλεσμα την αποβολή του

ενδομητρίου κατά την εμμηνόρροια (Gupta 2009). Η διαφορική έκφραση των αντιοξειδωτικών δείχνει την ύπαρξη οξειδωτικού στρες κατά τη διάρκεια κυκλικών μεταβολών του ενδομητρίου. Η απόσυρση οιστρογόνου-προγεστερόνης προκαλεί διέγερση έκφρασης της κυκλοοξυγενάσης-2 (COX-2) και σύνθεση PGF2α μέσω ενεργοποίησης του πυρηνικού παράγοντα κάππα Β (NFκΒ) με μεσολάβηση ROS (Gupta 2009).

Επίσης η έκφραση ενδοθηλιακής και επαγωγίσιμης συνθάσης NO (eNOS και iNOS) έχει καταδειχθεί στο ανθρώπινο ενδομήτριο (Tseng 1996) και σε ενδομητρικά αγγεία (Taguchi 2000). Η συνθετάση ενδοθηλιακού NO, αρχικά αναγνωρισμένη σε αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα, κατανέμεται επίσης σε επιθηλιακά κύτταρα αδενικής επιφανείας στο ανθρώπινο ενδομήτριο. NO ρυθμίζει επίσης την μικροαγγειοπάθεια του ενδομητρίου και είναι σημαντική για το φαινόμενο της εμμήνου ρύσεως. Η έκφραση του mRNA του eNOS ανιχνεύθηκε επίσης στη φάση του μέσου εκκριτικού και στη φάση του μεταγενέστερου εκκριτικού, γεγονός που υποδηλώνει ένα ρόλο στην αποδυνάμωση του ενδομητρίου. Το ROS επιφέρει αλλαγές στο ενδομήτριο που το προετοιμάζουν για εμφύτευση (Agarwal 2005).

Ελεύθερες Ρίζες Ωαγωγοί & Περιτοναϊκή Κοιλότητα

Η συνθάση μονοξειδίου του αζώτου (NO) υπάρχει στα ανθρώπινα σαλπινγικά κύτταρα, η οποία καταλύει τον σχηματισμό NO, της πιο συνηθισμένης πηγής αντιδραστικών ειδών αζώτου (RNS). Το NO είναι ένας ισχυρός αγγειοδιασταλτικός παράγοντας και η παρουσία του στα σαλπινγικά κύτταρα προάγει τις συστολές της σάλπιγγας. Αυτές οι συστολές βοηθούν στην κίνηση του ωαρίου καθώς και των σπερματοζωαρίων (Ekerhond 2002). Τα αυξημένα επίπεδα NO προστατεύουν τις σάλπιγγες από τα μικρόβια, αλλά τέτοια επίπεδα είναι επίσης τοξικά για τα σπερματοζωάρια. Αντιστρόφως, τα μειωμένα επίπεδα NO συνδυάζονται με εξασθενημένες συστολές των σαλπίγγων, με αρνητικές επιπτώσεις τόσο στα σπερματοζωάρια όσο και στο ωάριο (Agarwal 2012).

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, σχηματίζεται NO από O₂ και 1-αργινίνη και αντιδρά περαιτέρω με ανιόν υπεροξειδίου για να σχηματίσει υπεροξείδιο. Ο υπεροξυνιτρίτης προκαλεί υπεροξειδωση λιπιδίων και νίτρωση μορίων τυροσίνης σε ένζυμα απαραίτητα για μεταγωγή σήματος. Υπάρχουν ουσιαστικά τρεις τύποι NOS: ενδοθηλιακό (eNOS), νευρωνικό (nNOS) και επαγωγίσιμο (iNOS). Το eNOS έχει αγγειοδιασταλτικά αποτελέσματα κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης και η παραγωγή του διεγείρεται από LH και hCG. Η iNOS σχετίζεται κυρίως με παθολογικές καταστάσεις καθώς βρίσκεται μέσα στα μακροφάγα που περιμένουν την διέγερση από τις κυτοκίνες (Agarwal 2005). Υψηλά επίπεδα NOS υπερδιέγερσης των εξαρτώμενων από την τυροσίνη ενζύμων και προκαλούν κυτταροτοξικότητα. Από την άλλη πλευρά, τα χαμηλά επίπεδα NOS λόγω απουσίας L-αργινίνης συνδέονται με αυξημένα

επίπεδα ανιόντων υπεροξειδίου, προκαλώντας έτσι OS. Η απουσία NO έχει αποδειχθεί ότι αποτελεί βασικό παράγοντα στη διάσπαση του αγγειακού συστήματος που οδηγεί σε υπογόνιμες καταστάσεις (Agarwal 2012). Συγκεκριμένα, οι σάλπιγγες είναι πλούσιες σε αντιοξειδωτικά ένζυμα (Agarwal 2005, Fujii 2005, Behrman 2001, Agarwal 2012, Agarwal 2004, Oγawoye 2003, Das 2006, Salmon 2010, Shkolnik 2011, Sugino 1996). Η επίδραση του ROS στην γονιμοποιητική ικανότητα του σπέρματος μπορεί να εμποδιστεί από αυτά τα αντιοξειδωτικά. Εναλλακτικές πηγές φυσιολογικών ROS, που ενδεχομένως δημιουργούνται από τα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου θα μπορούσαν να προωθήσουν την ικανότητα του σπερματοζωαρίου και να προετοιμάσουν το σπερματοζώαριο να γονιμοποιήσει (Agarwal 2017).

Οι κύριες πηγές ROS στην περιτοναϊκή κοιλότητα είναι τα μακροφάγα, τα ενδομητριακά κύτταρα, τα ερυθρά αιμοσφαίρια και τα υπολείμματα της εμμηνορροιας-αναρροής (Das 2006). Οι ιδιοπαθής μη γόνιμες γυναίκες αποδείχθηκαν ότι έχουν αυξημένα επίπεδα περιτοναϊκών λευκοκυττάρων, μέχρι 95% των οποίων είναι μακροφάγα. Αυξημένα επίπεδα μηλονικής αλδεϋδης, σταθερού τελικού προϊόντος υπεροξειδωσης λιπιδίων, βρέθηκαν σε ασθενείς με ιδιοπαθή γυναικεία υπογονιμότητα (Agarwal 2004, Attaran 2000, Oγawoye 2003, Das 2006, Paszkowski 1995, Jozwik 1999). Επιπλέον, η παρουσία υψηλότερου επιπέδου ROS και χαμηλότερου επιπέδου αντιοξειδωτικών στο περιτόναιο έχει προταθεί ότι προκαλεί ενδομητρίωση, μια κοινή αιτία γυναικείας υπογονιμότητας (Oγawoye 2003, Agarwal 2017).

Εν τω μεταξύ, έχει παρατηρηθεί πως υπάρχει σημαντική ανισορροπία μεταξύ των υπεροξειδωτικών / αντιοξειδωτικών με επακόλουθο αυξημένο (OS) σε ασθενείς με β-θαλασαιμία, η οποία προκαλείται κυρίως από τραυματισμό ιστού λόγω υπερπαραγωγής ελευθέρων ριζών από δευτερογενή υπερφόρτωση σιδήρου, αλλά επίσης λόγω αλλοίωσης των ιχνοστοιχείων στον ορό και των αντιοξειδωτικών ενζύμων. Η υπογονιμότητα των γυναικών με β-θαλασαιμία (BTM) φαίνεται να αποδίδεται στην εναπόθεση σιδήρου και στο οξειδωτικό στρες (OS) που προκαλείται από σίδηρο σε διάφορα ενδοκρινικά όργανα, όπως υποθάλαμος, υπόφυση και γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα, αλλά και μέσω της επίδρασης σιδήρου σε άλλα όργανα, όπως το ήπαρ και πάγκρεας, συμβάλλοντας στον μειωμένο μεταβολισμό των ορμονών και των αντιοξειδωτικών στον ορό επισημαίνοντας την σημαντικότητα των ιχνοστοιχείων και τη οξειδοτική –αντιοξειδωτική ισοποπία. Όχι μόνο η χρήση των κατάλληλων αντιοξειδωτικών, των βασικών ιχνοστοιχείων και των μετάλλων, αλλά και η ρύθμιση των τελικών προϊόντων προηγμένης γλυκοζυλίωσης, θα μπορούσε πιθανώς να μειώσει την έκταση της οξειδωτικής βλάβης και των σχετικών επιπλοκών και να ανακτήσει την υπογονιμότητα των γυναικών BTM (Roussou 2013).

Στεροειδογένεση και Ωορρηξία

Η ολοκλήρωση της μείωσης I κατά την ωρίμανση των ωαρίων προκαλείται από την αύξηση των ROS και αναστέλλεται από την αύξηση των αντιοξειδωτικών. Το αντίθετο συμβαίνει κατά τη διάρκεια της μείωσης II, υποδηλώνοντας έτσι ότι τα ROS παίζουν σημαντικό ρόλο κατά τη διάρκεια των προ-ωορρηκτικών καταστάσεων (Behrman 2001). Εκτός αυτού, η στεροειδογένεση συνδέεται επίσης με την αυξημένη παραγωγή ROS στις ωοθήκες με τη χρήση της οδού του κυτοχρώματος P450 (Aitken 1991). Μία προηγούμενη μελέτη στον αρουραίο έδειξε ότι τα επίπεδα του ROS στο σώμα του ωχρού αυξήθηκαν κατά τη διάρκεια της φάσης παλινδρόμησης (Sugino 1993).

Νεότερες μελέτες ρίχνουν φως στη σχέση μεταξύ των διαφόρων ορμονών και της παραγωγής ROS στην ωχρινική φάση. Στο αναπτυσσόμενο ωοθυλάκιο, τα ROS προκαλούν απόπτωση ενώ η FSH και η ανοιγμένη γλουταθειόνη (GSH) είναι αντι-αποπτωτικά. Η FSH διεγείρει την παραγωγή οιστρογόνων εντός των κοκκωδών κυττάρων, γεγονός που με τη σειρά της αυξάνει την καταλάση που αναστέλλει την απόπτωση (Devine 2012). Αντίθετα, η υπερβολική παραγωγή LH αυξάνει την παραγωγή ROS. Η αύξηση της LH στο ωορρηκτικό ωοθυλάκιο ακολουθείται από μία φλεγμονώδη φάση μετά την έξαρση. Εάν η έκκριση LH είναι σε περίσσεια, τα φλεγμονώδη πρόδρομα μόρια μετά την έξαρση μπορούν να αυξηθούν προκαλώντας έτσι ζημιές που προκαλούνται από OS λόγω του υπερβολικά παραγόμενων ROS (Agarwal 2004, Agarwal 2012). Μετά την ωορρηξία, το ωχρο σώμα παράγει προγεστερόνη. Διαπιστώθηκε ότι τόσο τα επίπεδα δισμουτάσης χαλκού / ψευδαργύρου-υπεροξειδίου δισμουτάσης (Cu / Zn-SOD) όσο και προγεστερόνης αυξάνονται στην πρώιμη μέση ωχρινική φάση αλλά μειώνονται στη φάση παλινδρόμησης. Το υπεροξείδιο του λιπιδίου αντιτίθεται στην Cu / Zn-SOD και την προγεστερόνη και στις δύο φάσεις (Agarwal 2004, Agarwal 2012). Αντίθετα, η δισμουτάση υπεροξειδίου του μαγγανίου (Mn-SOD) δεν επηρεάζεται από τα επίπεδα της προγεστερόνης και είναι ανεξάρτητη στη δράση της, όπου τα επίπεδα διατηρούνται για την προστασία των ωχρινικών κυττάρων από την επαγόμενη από OS φλεγμονή (Agarwal 2004, Agarwal 2017).

Κεφάλαιο 4^ο

Αναπαραγωγικές Ασθένειες και Οξειδωτικό στρες

Ο ρόλος των ROS στην γυναικεία υπογονιμότητα αποτέλεσε αντικείμενο σημαντικού ενδιαφέροντος και έρευνας κατά την τελευταία εικοσαετία (Agarwal 2005). Τα αντιδραστικά είδη οξυγόνου και τα αντιοξειδωτικά εμφανίζονται να έχουν φυσιολογικό ρόλο στις αναπαραγωγικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένης της ωρίμανσης ωαρίων, της γονιμοποίησης, της παλινδρόμησης του ωχρού σωματίου και της αποβολής του ενδομητρίου (Sabatini 1999, Riley 1991, Gupta 2009).

Τα αντιδραστικά είδη οξυγόνου είναι ένα νόμισμα με δυο όψεις, έχουν εντοπιστεί στη γυναικεία αναπαραγωγική οδό σε διάφορες μελέτες τόσο σε ζώα όσο και στον άνθρωπο. Ο εντοπισμός των ROS και των αντιοξειδωτικών στην ωοθήκη, τους ωαγωγούς και το ενδομήτριο καθώς και ο ρόλος της ROS στη ρύθμιση των κυκλικών λειτουργιών των ωοθηκών και του ενδομητρίου έχουν συζητηθεί στα προηγούμενα κεφάλαια. Υπάρχει κάποια κατανόηση του ρόλου του οξειδωτικού στρες στην υπογονιμότητα και στους παράγοντες που την προκαλούν, όπως η ενδομητρίωση, η ανεξήγητη υπογονιμότητα και η υπογονιμότητα σαλπινγικού παράγοντα (Dong 2001, Bedaiwy 2002, Ho 1997, Liu 2001) και το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών (PCOS) (Dong 2001, Ho 1997, Murphy 1998, Ota 1998, Polak 2001).

Οξειδωτικό Στρες και Ενδομητρίωση

Η ενδομητρίωση εμφανίζεται όταν ο ιστός που σχηματίζει την επένδυση της μήτρας (ενδομήτριο) παρουσιάζεται σε διάφορα όργανα μέσα στο σώμα. Η ενδομητρίωση είναι μια καλοήθης, εξαρτώμενη από οιστρογόνα, χρόνια γυναικολογική διαταραχή. Η ενδομητρίωση συνήθως βρίσκεται στην κάτω κοιλιακή χώρα ή στη λεκάνη, αλλά μπορεί επίσης να εμφανιστεί σε άλλα μέρη του σώματος (Banerjee & Bhattacharya 2019). Η ενδομητρίωση επηρεάζει το 6% έως 10% των γυναικών αναπαραγωγικής ηλικίας και είναι γνωστό ότι σχετίζεται με τον πυελικό πόνο και τη υπογονιμότητα (Giudice 2004), αν και είναι μια πολύπλοκη και πολυπαραγοντική ασθένεια που δεν μπορεί να εξηγηθεί από μια ενιαία θεωρία αλλά από ένα συνδυασμό θεωριών. Αυτές μπορεί να περιλαμβάνουν οπισθοδρομική εμμηνόρροια, εξασθενημένη ανοσολογική απόκριση, γενετική προδιάθεση και φλεγμονώδη συστατικά (Carvalho 2011). Ο μηχανισμός που πιθανότατα εξηγεί την πυελική ενδομητρίωση είναι η θεωρία της οπισθοδρομικής εμμήνου ρύσεως και εμφύτευσης. Αυτή η θεωρία θέτει ότι η επαναφορά του ενδομητρικού ιστού διαμέσου των σαλπίγγων κατά τη διάρκεια της εμμήνου ρύσεως εξηγεί τις εξω-σαλπινγικές θέσεις και την προσκόλληση στα πυελικά σπλάχνα (American College of Obstetricians & Gynecologists 2007, Agarwal 2012).

Η ενδομητρίωση είναι μια από τις πιο αινιγματικές ασθένειες με πολλαπλές θεωρίες όσον αφορά την αιτιοπαθογένεια της. Παρά την εκτεταμένη έρευνα, ο ακριβής μηχανισμός της υπογονιμότητας που σχετίζεται με την ενδομητρίωση είναι αμφιλεγόμενος. Υπάρχει

αυξημένος κύκλος εργασιών των μακροφάγων στην περιτοναϊκή κοιλότητα των γυναικών με ενδομητρίωση. Τα ενεργοποιημένα μακροφάγα στο περιτοναϊκό περιβάλλον έχουν προταθεί ως πηγή ROS (Szczeranska 2003) και η απόδειξη αύξησης της παραγωγής ROS έχει αποδειχθεί από υψηλότερα επίπεδα διάφορων βιοδεικτών OS σε γυναίκες με ενδομητρίωση. Τα ενεργοποιημένα περιτοναϊκά μακροφάγα σε ασθενείς με ενδομητρίωση, συσχετίζονται με αυξημένη δραστικότητα υποδοχέα σαρωτή των ελεύθερων ριζών (Murphy 1998, Agarwal 2005).

Το OS είναι υπεύθυνο για τις εντοπισμένες πυελικές φλεγμονώδεις αντιδράσεις με αυξημένες συγκεντρώσεις κυτοκινών, αυξητικών παραγόντων και άλλων προφλεγμονωδών μεσολαβητών. Οι Wang και συν., ανέφεραν υψηλότερη συγκέντρωση ROS, χρησιμοποιώντας ανάλυση χημειοφωταύγειας για περιτοναϊκό υγρό από γυναίκες με ενδομητρίωση και ανεξήγητη υπογονιμότητα σε σύγκριση με περιτοναϊκό υγρό από δείγματα ελέγχου σε απολίνωση σαλπίνγων (Wang 1997, Agarwal 2005). Η αύξηση αυτή των ROS δεν ήταν σημαντική, ίσως επειδή τα ROS περιτοναϊκού υγρού μπορεί να μην είναι άμεσα υπεύθυνα για την υπογονιμότητα σε αυτές τις γυναίκες (Gupta 2009).

Άλλοι δείκτες προ-οξειδωσης λιπιδίων όπως αντισώματα σε οξειδωμένες λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας έχουν αναφερθεί ότι είναι αυξημένοι σε γυναίκες με ενδομητρίωση (Murphy 1998, Liu 2001, Shanti 1999). Τα στοιχεία των αυξημένων βιοδεικτών του OS σε ενδομητρωτικές αλλοιώσεις, συμπεριλαμβανομένων των περιεχομένων 8-OH-deoxyguanosine (8-OH-dG) και λιποϋπεροξειδίου σε σύγκριση με τον φυσιολογικό ενδομητρικό ιστό, ενισχύουν περαιτέρω το ρόλο του OS στην ενδομητρίωση (Kao 2005). Τα αυξημένα σύμπλοκα λιποπρωτεϊνών και τα μειωμένα αντιοξειδωτικά συμβάλλουν στην υπερβολική ανάπτυξη ενδομητρικών στρωματικών κυττάρων που εμπλέκουν το ρόλο του OS στην υπογονιμότητα που σχετίζεται με την ενδομητρίωση (Foyouzi 2004, Agarwal 2005).

Οι Szczeranska και συν., ανίχνευσαν σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα υπεροξειδιοδισμού και υπεροξειδάσης γλουταθειόνης σε περιτοναϊκό υγρό γυναικών με ενδομητρίωση σε σύγκριση με εκείνες με ιδιοπαθή υπογονιμότητα (Liu 2001, Szczeranska 2003). Τόσο η SOD όσο και η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης είναι ισχυρά αντιοξειδωτικά με ικανότητα να αποτρέπουν τις δυσμενείς επιδράσεις του OS με αναστολή της δημιουργίας ρίζας υδροξυλίου. Σε αντίθεση με αυτά τα αποτελέσματα, άλλοι ερευνητές δεν βρήκαν διαφορά στις συγκεντρώσεις SOD στο περιτοναϊκό υγρό από ασθενείς με ενδομητρίωση που σχετίζονται με υπογονιμότητα, σε σύγκριση με τις γυναίκες με ιδιοπαθή υπογονιμότητα (Ishikawa 1993, Polak 2001). Αυτή η προφανής απόκλιση μεταξύ των μελετών μέτρησης των βιοδεικτών OS μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι το OS εμφανίζεται τοπικά στο σημείο της αιμορραγίας και δεν μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση της ολικής συγκέντρωσης των βιοδεικτών OS (Gupta 2009, Agarwal 2005).

Σε ότι αφορά προϊόντα μεταβολισμού NO στο περιτοναϊκό υγρό ασθενών με ενδομητρίωση δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στην ολική αντιοξειδωτική κατάσταση (Ho 1997). Η δραστικότητα NO συνθέτασης *in vitro* ήταν υψηλότερη σε περιτοναϊκά μακροφάγα που απομονώθηκαν από γυναίκες με ενδομητρίωση (Osborn 2002, Wu 2003). Η έκφραση επαγωγίσιμης συνθάσης NO ήταν υψηλότερη στον ιστό ενδομητρίου από γυναίκες με ενδομητρίωση από τους μάρτυρες. Στο περιτοναϊκό υγρό, τα ενεργοποιημένα μακροφάγα παράγουν αυξημένες συγκεντρώσεις κυτοκινών και το διέγερτικό παράγοντα αποικιών των μακροφάγων. Η ενδοθηλιακή έκφραση NO και η SOD στο ενδομήτριο έχουν αναφερθεί ότι αυξάνονται σε ασθενείς με ενδομητρίωση (Ota 1998, 1999, Agarwal 2005, Agarwal 2012).

Ο Bedaiwy και συν., (2002) βρήκαν στοιχεία που αναδεικνύουν ότι ιντερλευκίνη (IL)-6 ορού και οι συγκεντρώσεις του παράγοντα νέκρωσης όγκου (TNF-α) του περιτοναϊκού υγρού θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για τη διάκριση των ασθενών με ενδομητρίωση από εκείνους χωρίς υψηλό βαθμό ευαισθησίας και ιδιαιτερότητας. Οι συγκεντρώσεις ROS, από την άλλη πλευρά, ήταν παρόμοιες στο περιτοναϊκό υγρό ασθενών με ενδομητρίωση και στους μάρτυρες χωρίς ασθένεια (Bedaiwy & Falcone, 2003, Agarwal 2012).

Το περιτοναϊκό υγρό των ασθενών έχει βρεθεί ότι περιέχει υψηλές συγκεντρώσεις μηλονικής διαλδεύδης (MDA), προ-φλεγμονωδών κυτοκινών (IL-6, TNF-α και IL-β), αγγειογόνων παραγόντων (IL-8 και VEGF-1) (Mier-Cabrera 2010) και οξειδωμένη LDL (ox-LDL) (Rong 2002). Οι προ-φλεγμονώδεις και χημειοτακτικές κυτοκίνες παίζουν κεντρικό ρόλο στην πρόσληψη και ενεργοποίηση φαγοκυττάρων, οι οποίοι είναι οι κύριοι παραγωγοί τόσο των ROS όσο και των RNS (Mier-Cabrera 2010, Agarwal 2012).

Η μη ενζυματική υπεροξειδωση του αραχιδονικού οξέος οδηγεί στην παραγωγή F2-ισοπροστασών (Kao 2005). Η υπεροξειδωση των λιπιδίων, και συνεπώς το OS *in vivo* (Sharma 2010), έχει αποδειχθεί με αυξημένα επίπεδα του βιοδείκτη (8-ισο-προσταγλανδίνης F2-άλφα (8-ισο-PGF2-άλφα) (Montuschi 2004, Morrow 1992, Pavlovic 2002). Μαζί με τις αγγειοσυσπαστικές ιδιότητές του, το 8-iso-PGF2-α προάγει τη νέκρωση των ενδοθηλιακών κυττάρων και την πρόσφυση τους σε μονοκύτταρα και πολυμορφοπύρνα κύτταρα (Basu 2004). Μια μελέτη από τους Sharma και συν., (2010) μέτρησε τα περιτοναϊκά επίπεδα και αλλά και αυτά του πλάσματος του 8-iso-PGF2-α, *in vivo*, ασθενών με ενδομητρίωση. Διαπίστωσαν ότι τα επίπεδα 8-iso-PGF2-α τόσο στα ούρα όσο και στο περιτοναϊκό υγρό ασθενών με ενδομητρίωση ήταν σημαντικά αυξημένα σε σύγκριση με αυτά των μαρτύρων (Sharma 2010). Τα επίπεδα 8-iso-PGF2-α είναι πιθανόν να είναι χρήσιμα στην πρόβλεψη της οξειδωτικής κατάστασης σε ασθένειες όπως η ενδομητρίωση και μπορεί να είναι καθοριστικής σημασίας για τον προσδιορισμό της αιτίας της ταυτόχρονης υπογονιμότητας (Agarwal 2012).

Η πρωτεΐνη θερμικού σοκ 70 B (HSP-70b) είναι ένα επαγωγίμο μέλος της οικογένειας των πρωτεϊνών HSP που βρίσκεται σε χαμηλά επίπεδα κάτω από κανονικές συνθήκες (Rérole 2011) και σε υψηλά επίπεδα (Proctor 2011) σε καταστάσεις στρες. Λειτουργεί ως συνοδός για πρωτεοστατικές διεργασίες όπως η αναδίπλωση και η μετατόπιση, διατηρώντας παράλληλα τον ποιοτικό έλεγχο (Morishima 2005), προάγει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων μέσω της καταστολής της απόπτωσης, εκφραζόμενη σε υψηλά επίπεδα, όπως σημειώνεται σε πολλά καρκινικά κύτταρα (Proctor 2011, Arya 2007, Ciocca 2005, Khan 2008). Ως εκ τούτου, η HSP70 υπερεκφράζεται όταν υπάρχει αυξημένος αριθμός λανθασμένα πτυχωμένων πρωτεϊνών και συνεπώς, υπεραφλουσμός των ROS (Proctor 2011). Η απελευθέρωση του HSP70 κατά τη διάρκεια του OS διεγείρει την έκφραση των φλεγμονωδών κυτοκινών (Rérole 2011, Khan 2008) TNF-άλφα, IL-1 βήτα και IL-6, σε μακροφάγα (Khan 2008). Τα αυξημένα επίπεδα κυκλοφορίας του HSP70b μπορεί να υποδεικνύουν την παρουσία του OS εκτός της πυελικής κοιλότητας όταν βρέθηκε έκτοπος ενδομήτριος ιστός σε απομακρυσμένες θέσεις (Lambrinouadaki 2009).

Ο κατακερματισμός του HSP70 έχει προταθεί ότι οδηγεί σε μη ρυθμιζόμενη έκφραση του παράγοντα μεταγραφής NF-κάπα B (Chehna-Patel 2011), η οποία μπορεί περαιτέρω να προάγει τη φλεγμονή εντός της πυελικής κοιλότητας των ασθενών με ενδομητρίωση. Τα οξειδωτικά έχουν προταθεί ότι προάγουν την ανάπτυξη του εκτοπικού ενδομητριακού ιστού μέσω της επαγωγής κυτοκινών και αυξητικών παραγόντων (Santanam 2002). Η σηματοδότηση που προκαλείται από το NF-κάπα B διεγείρει τη φλεγμονή, την εισβολή, την αγγειογένεση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, εμποδίζει επίσης την απόπτωση ενδομητριοειδών κυττάρων. Η ενεργοποίηση του NF-κάπα B από OS έχει ανιχνευθεί σε ενδομητριοειδείς αλλοιώσεις και περιτοναϊκά μακροφάγα ασθενών με ενδομητρίωση (Kajihara 2011). Η N-ακετυλοκυστεΐνη (NAC) και η βιταμίνη E είναι αντιοξειδωτικά που περιορίζουν τον πολλαπλασιασμό των ενδομητριοειδών κυττάρων (Foyouzi 2004), πιθανώς αναστέλλοντας την ενεργοποίηση του NF-κάπα B (Li YQ). Μελλοντικές μελέτες μπορεί να συνεπάγονται θεραπευτικό αποτέλεσμα της συμπλήρωσης NAC και βιταμίνης E στην ενδομητριοειδή ανάπτυξη.

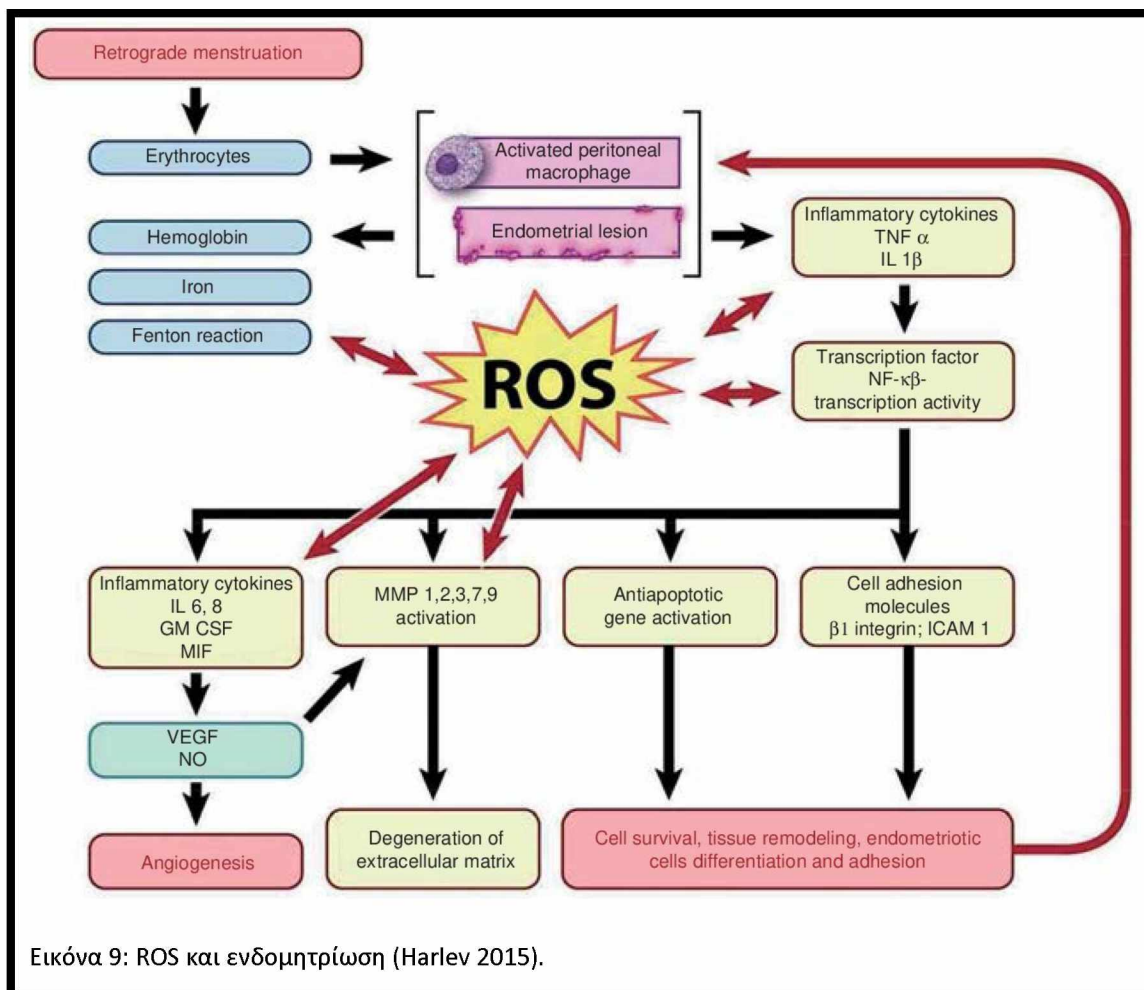
Παρόμοια με τα καρκινικά κύτταρα, τα ενδομητριοειδή κύτταρα (Ngo 2009) έχουν επιδείξει αυξημένο ROS και επακόλουθο κυτταρικό πολλαπλασιασμό, μέσω ενεργοποίησης της εξωκυτταρικής ρυθμιζόμενης κινάσης MAPK (ERK1 / 2) (McCubrey 2006). Η επιβίωση ανθρώπινων ενδομητριοειδών κυττάρων μέσω της ενεργοποίησης του MAPK ERK 1/2, του NF-κάπα B και άλλων οδών έχει επίσης αποδοθεί στην PG E2, η οποία δρα μέσω των υποδοχέων EP2 και EP4 (Banu 2009) για την αναστολή της απόπτωσης (Harada 2007). Αυτό μπορεί να εξηγήει τις αυξημένες εκφράσεις αυτών των πρωτεϊνών στον εκτοπικό έναντι του ευτοπικού ενδομητριοειδούς ιστού (Banu 2009).

Ο σίδηρος μεσολαβεί στην παραγωγή ROS μέσω της αντίδρασης Fenton και προκαλεί OS (Yamaguchi 2008). Στο περιτόναιο των ασθενών με ενδομητρίωση, η συσσώρευση σιδήρου και η αιμάτωση γύρω από τις ενδομητριοτικές αλλοιώσεις (Van Langendonck 2002) από την οπισθοδρομική εμμηνόρροια (Byrne 2003) ρυθμίζει εκ νέου τη δραστηριότητα iNOS και την παραγωγή NO από τους περιτοναϊκούς μακροφάγους (Osborn 2002). Η εκτεταμένη υποβάθμιση του DNA από τον σίδηρο αντιπροσωπεύει τη σημαντική δραστηριότητα των ελεύθερων ριζών. Οι χρόνιες οξειδωτικές βλάβες από τη συσσώρευση σιδήρου στις ενδομητριοτικές αλλοιώσεις μπορεί να αποτελέσουν βασικό παράγοντα για την ανάπτυξη της νόσου (Kobayashi 2009).

Οι υψηλές συγκεντρώσεις υπεροξειδίων λιπιδίων, 8-OHdG και αντιοξειδωτικών δεικτών σε κύστες ενδομητρίου υποδηλώνουν υπεροξείδωση λιπιδίων, βλάβη DNA και υψηλές αντιοξειδωτικές άμυνες αντιστοίχως. Αυτά τα ευρήματα υποδηλώνουν έντονα την τροποποιημένη οξειδοαναγωγική κατάσταση στις ενδομήτριες κύστες (Byrne 2003).

Τα συνολικά επίπεδα θειόλης, που χρησιμοποιούνται για την πρόβλεψη της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC), έχουν βρεθεί να μειώνονται σε γυναίκες με πυελική ενδομητρίωση και μπορεί να συνεισφέρουν στην κατάσταση του OS (Szczeranska 2003, Lambriinouadaki 2009). Αντιστρόφως, τα αποτελέσματα από μια πιο πρόσφατη μελέτη απέτυχαν να συσχετίσουν τα αντιοξειδωτικά θρεπτικά συστατικά με συνολικά επίπεδα θειόλης (Savaris 2011).

Το περιτοναϊκό υγρό των γυναικών με ενδομητρίωση περιέχει χαμηλές συγκεντρώσεις των αντιοξειδωτικών ασκορβικό οξύ (Mier-Cabrera 2010) και GPx (Szczeranska 2003). Η μείωση των επιπέδων GPx προτάθηκε να είναι δευτερογενής σε σχέση με τη μειωμένη απόκριση προγεστερόνης των ενδομητρικών κυττάρων (Burney 2007). Η σύνδεση μεταξύ έκφρασης γονιδίου για αντοχή προγεστερόνης και OS μπορεί να διευκολύνει την καλύτερη κατανόηση της παθογένειας της ενδομητρίωσης (Agarwal 2012).



Εικόνα 9: ROS και ενδομητρίωση (Harlev 2015).

Μεταξύ 20 και 40% των γυναικών με υπογονιμότητα, συνήθως υποφέρουν από ενδομητρίωση. Η ενδομητρίωση φαίνεται να εξασθενεί τη γονιμότητα με δύο τρόπους: πρώτον, προκαλώντας παραμόρφωση στις σάλπιγγες έτσι ώστε να μην είναι σε θέση να υποδεχθούν το ωάριο μετά την ωορρηξία και δεύτερον προκαλώντας φλεγμονές που με τη σειρά τους προκαλούν βλάβη στη λειτουργία των ωοθηκών, ωαρίων, σαλπίγγων ή μήτρας. (Banerjee & Bhattacharya 2019).

Οι ασθενείς με ενδομητρίωση τείνουν να έχουν χαμηλότερα ποσοστά εγκυμοσύνης από τις γυναίκες χωρίς την ασθένεια. Η χαμηλή ποιότητα ωαρίων και εμβρύων εκτός από το σπερματοτοξικό περιτοναϊκό υγρό μπορεί να μεσολαβείται από το OS και να συμβάλλει στην υπογονιμότητα που παρουσιάζουν οι ασθενείς με ενδομητρίωση (Augoulea 2009). Οι ασθενείς με ενδομητρίωση μπορεί να έχουν χειρότερα αποτελέσματα με τεχνικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, όπως η εξωσωματική γονιμοποίηση (IVF) λόγω της χαμηλότερης ποιότητας ωαρίων που παρατηρείται σε αυτές τις γυναίκες (Watson 1998). Η ανισορροπία μεταξύ ROS και αντιοξειδωτικού αμυντικού συστήματος θα μπορούσε να είναι η πιθανή αιτία της προκύπτουσας κατώτερης ποιότητας ωαρίων (Watson 1998). Το ROS μπορεί να "αυξήσει την ανάπτυξη και την πρόσφυση των ενδομητρικών κυττάρων στην περιτοναϊκή κοιλότητα", που θα μπορούσε να προωθήσει την ενδομητρίωση και την υπογονιμότητα (Gupta 2007, Tasha 2013).

Η επίτευξη μεγαλύτερης αντιοξειδωτικής ικανότητας σε ασθενείς με ενδομητρίωση έχει δείξει πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα (Watson 1998). Σε μια πειραματική μελέτη, οι ασθενείς με ενδομητρίωση αποκάλυψαν χαμηλότερα επίπεδα βιταμίνης C στο ωοθυλακικό υγρό, το οποίο πιθανότατα οφείλεται στην υπερβολική κατανάλωση αντιοξειδωτικών που προσπαθούν να καθαρίσουν την περίσσεια ROS (Watson 1998, Tasha 2013). Επιπλέον, οι ερευνητές βρήκαν σημαντικούς συσχετισμούς μεταξύ των επιπέδων βιταμίνης C και του αριθμού των ωαρίων που ανακτήθηκαν, του αριθμού των ώριμων ωαρίων και του αριθμού των γονιμοποιημένων ωαρίων (Watson 1998, Tasha 2013). Έχει προταθεί ότι οι δίαιτες που δεν διαθέτουν επαρκείς ποσότητες αντιοξειδωτικών μπορεί να προδιαθέτουν ορισμένες γυναίκες στην ενδομητρίωση (Parazzini 2004). Μελέτες έχουν δείξει μειωμένα επίπεδα OS σε άτομα που καταναλώνουν πλούσιες σε αντιοξειδωτικά δίαιτες ή λαμβάνουν αντιοξειδωτικά συμπληρώματα (Dragsted 2004, Huang 2002, Upritchard 2003, Sesti 2011). Σε ορισμένους πληθυσμούς παρατηρήθηκε ότι οι γυναίκες με ενδομητρίωση έχουν χαμηλότερη πρόσληψη βιταμινών A, C (Mier-Cabrera 2009), E (Mier-Cabrera 2009 & 2008-127), Cu και Zn (Mier-Cabrera 2009) από τις γόνιμες γυναίκες χωρίς την ασθένεια (Mier-Cabrera 2009 & 2008 - Hernández Guerrero 2006). Συνολικά, αυτά τα ευρήματα υποδεικνύουν ότι οι υπογόνιμες γυναίκες με ενδομητρίωση θα μπορούσαν να έχουν ελπιδοφόρα αποτελέσματα αν επιτευχθεί αυξημένη αντιοξειδωτική ικανότητα (Tasha 2013).

Οξειδωτικό Στρες και Σύνδρομο Πολυκυστικών Ωοθηκών (PCOS)

Η λέξη "πολυκυστική" σημαίνει "πολλές κύστες". Το PCOS λέγεται όταν αναπτύσσονται στις ωοθήκες, πολυάριθμες μικρές κύστες. Κάθε μία από αυτές τις κύστες είναι ένα ωοθυλάκιο με ένα ανώριμο ωάριο. Αυτά τα ωάρια δεν αναπτύσσονται για να ολοκληρώσουν τη διαδικασία ωορρηξίας. Και πάλι, λόγω αυτής της έλλειψης ωορρηξίας, υπάρχει μια αλλαγή στα ορμονικά επίπεδα του γυναικείου σώματος. Για παράδειγμα, τα επίπεδα οιστρογόνων και προγεστερόνης μειώνονται, ενώ τα επίπεδα ανδρογόνων είναι υψηλότερα. Επομένως, ο κύκλος της εμμήνου ρύσεως, διαταράσσεται εξαιτίας του υπερανδρογονισμού (Banerjee & Bhattacharya 2019). Έτσι, οι γυναίκες με λιγότερες περιόδους από το κανονικό, συχνά έχουν σύνδρομο PCOS. Το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών είναι η συνηθέστερη ενδοκρινική ανωμαλία των γυναικών αναπαραγωγής ηλικίας. Το 6-10% των προεμμηνόπαυσιακών γυναικών πάσχουν από PCOS (Asunción 2000, Banerjee & Bhattacharya 2019).

Η τρέχουσα αντίληψη είναι ότι η PCOS δεν είναι μόνο μια γυναικολογική κατάσταση αλλά ένα μεταβολικό σύνδρομο με συναφείς διαταραχές όπως η αντίσταση στην ινσουλίνη και η δυσλιπιδαιμία (Dunaif 1997). Πρόκειται για μια διαταραχή που χαρακτηρίζεται από

υπερανδρογονισμό, δυσλειτουργία της ωορρηξίας και πολυκυστικές ωοθήκες (Fauser BCJM 2004). Οι κλινικές εκδηλώσεις του PCOS περιλαμβάνουν συνήθως διαταραχές της εμμήνου ρύσεως, οι οποίες κυμαίνονται από αμηνόρροια έως μενορραία. Οι διαταραχές του δέρματος είναι επίσης πολύ συχνές μεταξύ αυτών των γυναικών. Επιπλέον, το 90% των γυναικών με PCOS δεν μπορούν να συλλάβουν.

Η υπογονιμότητα σχετίζεται με την αντίσταση στην ινσουλίνη, η οποία διαταράσσει το ορμονικό περιβάλλον στις γυναίκες αυτές. Η αντίσταση στην ινσουλίνη μπορεί να είναι κεντρική στην αιτιολογία του PCOS. Τα συμπτώματα της αντίστασης στην ινσουλίνη, όπως η υπέρταση, η παχυσαρκία και η κεντρική κατανομή του λίπους, σχετίζονται με άλλες σοβαρές καταστάσεις, όπως το μεταβολικό σύνδρομο, το μη αλκοολικό λιπώδες ήπαρ (Setji 2006) και η άπνοια κατά τον ύπνο. Όλες αυτές οι συνθήκες είναι παράγοντες κινδύνου για μακροχρόνιες μεταβολικές βλάβες, όπως καρδιαγγειακές παθήσεις και διαβήτη (Hardiman 2003). Το πιο σημαντικό, η περιφέρεια μέσης, ανεξάρτητα από το δείκτη μάζας σώματος (ΔΜΣ), είναι υπεύθυνη για την αύξηση του oxLDL (Crist 2009). Η αντίσταση στην ινσουλίνη και / ή η αντισταθμιστική υπερινσουλιναϊμία αυξάνουν τη διαθεσιμότητα τόσο των κυκλοφορούντων ανδρογόνων όσο και των ανδρογόνων από τα επινεφρίδια και τις ωοθήκες. (Creanga 2008).

Υπάρχουν τώρα στοιχεία που αποδεικνύουν ότι η χρόνια χαμηλή φλεγμονή είναι συχνά παρούσα στις γυναίκες με PCOS με τον πιθανό ρόλο του αυξημένου οξειδωτικού στρες. Είναι γνωστό ότι τα ROS απαντώνται περισσότερο σε ασθενείς με PCOS, ειδικά για ασθενείς με αντίσταση στην ινσουλίνη (Victor 2011, Banerjee & Bhattacharya 2019). Αυξημένα επίπεδα οξειδωμένων πρωτεϊνών και αντιστατοριακών αντισωμάτων έχουν ανιχνευθεί στον ορό γυναικών με PCOS σε σύγκριση με μάρτυρες (Palacio 2006). Περαιτέρω αυξημένα ROS θεωρούνται υπεύθυνα για την αντίσταση στην ινσουλίνη και τον υπερανδρογονισμό (Gupta 2009).

Το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών σχετίζεται επίσης με μειωμένες αντιοξειδωτικές συγκεντρώσεις και επομένως θεωρείται οξειδωτική κατάσταση (Palacio 2006). Η μείωση της κατανάλωσης μιτοχονδριακού O₂ και των επιπέδων GSH μαζί με αυξημένη παραγωγή ROS εξηγεί τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία σε ασθενείς με PCOS (Victor 20011). Η μείωση της περιεκτικότητας σε GSH και η αναλογία GSH προς GSSG στα λευκοκύτταρα υποδηλώνει επιδείνωση της λειτουργίας των μιτοχονδρίων και αύξηση του οξειδωτικού στρες που οδηγεί σε PCOS (Banerjee & Bhattacharya 2019). Τα μονοπυρηνικά κύτταρα των γυναικών με PCOS είναι αυξημένα σε αυτήν την φλεγμονώδη κατάσταση (Gonzalez 2006), η οποία συμβαίνει περισσότερο από μια αυξημένη απόκριση στην υπεργλυκαιμία και στην C-αντιδραστική πρωτεΐνη (CRP). Η φυσιολογική υπεργλυκαιμία δημιουργεί αυξημένα επίπεδα ROS από μονοπύρρηνα κύτταρα, τα οποία στη συνέχεια

ενεργοποιούν την απελευθέρωση του TNF-α και αυξάνουν τον φλεγμονώδη παράγοντα μεταγραφής NF-κΒ. Ως αποτέλεσμα, αυξάνονται περαιτέρω οι συγκεντρώσεις του TNF-α, γνωστού μεσολαβητή της αντίστασης στην ινσουλίνη. Τα επίπεδα SOD είναι υψηλότερα στους ασθενείς με PCOS, σε σύγκριση με αυτά των μαρτύρων ελέγχου. Δεδομένου ότι τα IL-6 (ιντερλευκίνη-6) και TNF-α είναι παράγοντες προ-φλεγμονώδους σημασίας οξειδωτικού στρες, είναι καλά αποδεδειγμένο ότι η IL-6 είναι αυξημένη σε ασθενείς με PCOS και ιδιαίτερα στην περίπτωση ασθενών PCOS με αντίσταση στην ινσουλίνη (Victor 2011). Ο TNF-α, από την άλλη πλευρά, είναι υψηλότερος τόσο στους PCOS με αντίσταση στην ινσουλίνη όσο και στους ασθενείς με PCOS-χωρίς αντίσταση στην ινσουλίνη (Banerjee & Bhattacharya 2019). Το προκύπτον οξειδωτικό στρες δημιουργεί ένα φλεγμονώδες περιβάλλον που αυξάνει περαιτέρω την αντίσταση στην ινσουλίνη και συμβάλλει στον υπερανδρογονισμό (Costello 2007).

Το καρβονύλιο πρωτεΐνης (PC) είναι σημαντικός βιοδείκτης οξειδωτικού στρες, παρατηρείται ότι η περιεκτικότητα σε PC είναι υψηλότερη στους ασθενείς με PCOS σε σύγκριση με τους υγιείς ασθενείς. Περαιτέρω, το περιεχόμενο PC είναι γνωστό ότι έχει θετική συσχέτιση με την ινσουλίνη νηστείας, υποδεικνύοντας μια ισχυρή συσχέτιση μεταξύ της αντίστασης στην ινσουλίνη και της οξείδωσης πρωτεϊνών σε PCOS. Η μαλονική διαλδεΐδη ή η MDA (που παράγεται κατά τη διάρκεια της αποσύνθεσης των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων) είναι ένας από τους βιοδείκτες του OS. Φαίνεται ότι τα επίπεδα MDA του αίματος είναι σημαντικά υψηλότερα ($P = 0,01$) σε νεαρές ασθενείς PCOS, λιποβαρής χωρίς αντίσταση στην ινσουλίνη σε σύγκριση με τον μάρτυρα (Lee 2010, Banerjee & Bhattacharya 2019).

Οι Gonzalez και συν., σε μελέτη τους παρατήρησαν ότι υπάρχει γενεά ROS από μονοπυρηνικά κύτταρα που παρουσιάστηκε σε απόκριση υπεργλυκαιμίας σε γυναίκες με PCOS. Αυτή η αύξηση στο ROS παρατηρήθηκε τόσο σε παχύσαρκες όσο και σε λιπόσαρκές PCOS ασθενείς σε σύγκριση με τους αντίστοιχους μάρτυρες και ήταν ανεξάρτητη από την παχυσαρκία (Gonzalez 2006). Διαταραγμένοι βιοδείκτες OS έχουν παρατηρηθεί ακόμη και σε λιπόσαρκές PCOS ασθενείς. Μελέτη από τους Yilmaz και συν., όπου μετρήθηκε σημαντικά χαμηλότερη αντιοξειδωτική κατάσταση στον ορό λιπόσαρκων PCOS ασθενών σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες. Η μαλονυλο-διαλδεΐδη του ορού, ένας δείκτης υπεροξειδωσίας λιπιδίων αυξήθηκε σε αυτά τα άτομα. Το αυξημένο οξειδωτικό στρες στο PCOS μπορεί να εξηγήσει τον αυξημένο κίνδυνο καρδιαγγειακής νόσου σε γυναίκες με PCOS (Fenki 2003). Έχουν υπάρξει πρόσφατες ενδείξεις ότι οι γυναίκες με PCOS έχουν χαμηλότερα επίπεδα γλουταθειόνης, ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό (Sabuncu 2001, Gupta 2009).

Η τροποποίηση του τρόπου ζωής είναι η βασική θεραπεία για τις γυναίκες με PCOS. Αυτό περιλαμβάνει την άσκηση και μια ισορροπημένη διατροφή, με έμφαση στον θερμιδικό περιορισμό (Shai 2008). Ωστόσο, αν οι τροποποιήσεις του τρόπου ζωής δεν επαρκούν,

υπάρχουν πολλές επιλογές για ιατρική θεραπεία. Συνδυασμένα από του στόματος αντισυλληπτικά θεωρούνται η κύρια θεραπεία για διαταραχές της εμμήνου ρύσεως. Επί του παρόντος, δεν υπάρχει σαφής πρωτοβάθμια θεραπεία αν και είναι γνωστό ότι οι θεραπείες συνδυασμού φαίνεται να παράγουν καλύτερα αποτελέσματα (Costello 2007).

Οξειδωτικό Στρες και Ανεξήγητη Υπογονιμότητα

Ανεξήγητη υπογονιμότητα ορίζεται ως η ανικανότητα να συλλάβουν μετά από 12 μήνες μη προστατευμένης συνουσίας σε ζευγάρια όπου έχουν αποκλειστεί γνωστά αίτια, είναι μια διάγνωση αποκλεισμού όταν δεν ανιχνεύεται καμιά αιτία στις εξετάσεις γονιμότητας. Η παθοφυσιολογία της παραμένει ασαφής, ωστόσο, η έρευνα έχει αποκαλύψει υψηλά επίπεδα ROS σε δείγματα περιτοναϊκού υγρού από γυναίκες με ανεξήγητη υπογονιμότητα σε αντίθεση με γόνιμους μάρτυρες που υποβάλλονται σε απολίνωση σαλπίνγγων (Wang 1997). Polak και συν., διαπίστωσαν ότι οι συγκεντρώσεις αντιοξειδωτικών σε ασθενείς με ανεξήγητη υπογονιμότητα ήταν σημαντικά χαμηλότερες από αυτές σε γόνιμους ασθενείς (Polak 2001).

Η μαλονιδαλδεϋδη, ένα τελικό προϊόν λιπούπεροξειδωσης, βρέθηκε σε υψηλότερες συγκεντρώσεις σε περιτοναϊκό υγρό γυναικών με ανεξήγητη υπογονιμότητα (Polak 2001, Polak 1991, Gupta 2009). Ακόμη και τα επίπεδα αντιοξειδωτικών φαίνεται να είναι χαμηλότερα σε αυτές τις γυναίκες σε σύγκριση με τα επίπεδα σε περιτοναϊκό υγρό από γόνιμες γυναίκες (Dong 2001, Agarwal 2012, Gupta 2009). Οι αυξημένες ποσότητες ROS σε αυτούς τους ασθενείς υποδηλώνουν μείωση των αντιοξειδωτικών αμυντικών, συμπεριλαμβανομένης της GSH και της βιταμίνης E. Η χαμηλή αντιοξειδωτική κατάσταση του περιτοναϊκού υγρού μπορεί να είναι καθοριστικός παράγοντας στην παθογένεση της ιδιοπαθούς υπογονιμότητας (Agarwal 2012).

Η Ν-ακετυλ κυστεΐνη (NAC) είναι ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό με αντι-αποπτωτικά αποτελέσματα. Είναι γνωστό ότι διατηρεί την αγγειακή ακεραιότητα και σε χαμηλότερα επίπεδα ομοκυστεΐνης, έναν επαγωγέα OS και απόπτωσης. Οι Badaiwy και συν., (2006) διεξήγαγαν μια τυχαιοποιημένη, ελεγχόμενη μελέτη στην οποία η NAC συγκρίθηκε με το κίτρινο κλομφαίνιο ως συμπαράγοντα για την πρόκληση ωορρηξίας σε γυναίκες με ανεξήγητη υπογονιμότητα (Badaiwy 2006). Η μελέτη, ωστόσο, κατέληξε στο συμπέρασμα ότι

η NAC ήταν αναποτελεσματική στην πρόκληση ωορρηξίας σε αυτούς τους ασθενείς (Badaiwy 2006).

Το φυλλικό οξύ είναι μια βιταμίνη B9 που θεωρείται απαραίτητη για την αναπαραγωγή. Παίζει ρόλο στον μεταβολισμό των αμινοξέων και στη μεθυλίωση των πρωτεϊνών, των λιπιδίων και των νουκλεϊνικών οξέων. Η επίκτητη ή κληρονομική ανεπάρκεια φυλλικού οξέος συμβάλλει στη συσσώρευση ομοκυστεΐνης. Το ένζυμο MTHFR συμμετέχει στη μετατροπή της ομοκυστεΐνης στη μεθειονίνη, πρόδρομο για τη μεθυλίωση του DNA, των λιπιδίων και των πρωτεϊνών. Οι πολυμορφισμοί στις οδούς των γονιδίων που μεταβολίζουν το φυλλικό οξύ μπορεί να αντιπροσωπεύουν την ανεξήγητη υπογονιμότητα που παρατηρείται σε αυτές τις γυναίκες, καθώς διαταράσσει τα επίπεδα ομοκυστεΐνης και στη συνέχεια μεταβάλλει την ομοιοστατική κατάσταση. Ο μειωμένος μεταβολισμός του φυλλικού οξέος διαταράσσει την ωρίμανση του ενδομητρίου και οδηγεί σε κακή ποιότητα ωαρίων (Altmae 2010).

Ρόλο όμως στην ανεξήγητη υπογονιμότητα έχει και ο αντρικός παράγοντας. Τα υψηλά επίπεδα κατακερματισμού του DNA έχουν αποδειχθεί ότι είναι ένας ισχυρός δείκτης ανδρικής υπογονιμότητας (Evenson 1999, Giwercman 2010, Nicoroullis 2008) όπως έχει συζητηθεί σε προηγούμενο κεφάλαιο. Καθώς ο σημαντικός κατακερματισμός του DNA μπορεί να υπάρχει στους νορμοζωοσπερμικούς υπογονιμούς άνδρες, μπορεί να είναι ένας σημαντικός παράγοντας σε ανεξήγητη υπογονιμότητα (Erenpreiss 2008, Oleszczuk 2013) και κυρίως με μειωμένη κινητικότητα (Appasamy 2007, Erenpreiss 2008). Ο υψηλός κατακερματισμός του DNA έχει επίσης εμπλακεί στην αιτιολογία της σχετιζόμενης με την ηλικία υπογονιμότητας στον άνδρα (Das 2013, Smit 2010, Vagnini 2007, Wright 2014)

Στην ολοκληρωμένη μελέτη των Evenson και συν., (1999), το κατώφλι του DFI> 30% έδειξε σημαντική και σημαντική μείωση του δυναμικού γονιμότητας (φυσική σύλληψη) συμπεριλαμβανομένου του χρόνου για την εγκυμοσύνη. Σε μια πιο πρόσφατη ανάλυση, οι Evenson και Wixon (2008) επιβεβαίωσαν ότι η πιθανότητα μιας φυσικής εγκυμοσύνης με DFI> 30% είναι πολύ χαμηλή (Wright 2014).

Κεφάλαιο 5

Επιπλοκές Κύησης και Οξειδωτικό Στρες

Ο πλακούντας είναι ένα ζωτικό όργανο της εγκυμοσύνης που χρησιμεύει ως μητρική-εμβρυϊκή σύνδεση μέσω της οποίας παρέχονται τα θρεπτικά συστατικά, το O₂ και πραγματοποιούνται οι ορμονικές ανταλλαγές. Παρέχει επίσης προστασία και ανοσία στο αναπτυσσόμενο έμβρυο. Στους ανθρώπους, ο σχηματισμός πλακούντα αρχίζει με την κατάλληλη τροφοβλαστική εισβολή των μητρικών σπειροειδών αρτηριών και είναι το βασικό γεγονός που πυροδοτεί την έναρξη αυτών των δραστηριοτήτων του πλακούντα (Webster 2008, Agarwal 2012). Τα κύτταρα τροφοβλάστης εισβάλλουν στο μυομήτριο και αντικαθιστούν τα ενδοθηλιακά και λεία μυϊκά κύτταρα στα σπειροειδή αρτηρίδια της μήτρας, που πιστεύεται ότι είναι κρίσιμα για τη μεσολάβηση της μείζονος αύξησης της μητρο-πλακουντιακής αιμάτωσης σε φυσιολογική εγκυμοσύνη (Maltepe 2015). Το αγγειακό σύστημα του πλακούντα υφίσταται αλλαγές για να εξασφαλίσει τη βέλτιστη μητρική αγγειακή αιμάτωση. Πριν από την αποσύνδεση των μητρικών σπειροειδών αρτηριών από την τροφοβλαστική εισβολή, η κατάσταση της χαμηλής τάσης του O₂ στην πρώιμη εγκυμοσύνη δημιουργεί φυσιολογική υποξία (Jauniaux 2001). Κατά τη διάρκεια αυτού του χρονικού διαστήματος, η συγκυτιοτροφοβλάστη στερείται αντιοξειδωτικών και έτσι παραμένει ευάλωτη σε οξειδωτική βλάβη (Watson 1998a, 1998b, Agarwal 2012).

Μελέτες έχουν δείξει ότι η κανονική απόπτωση των τροφοβλαστών του πλακούντα μπορεί να ξεκινήσει από υποξία και οξειδωτικό στρες. Αυτές οι συνθήκες είναι απαραίτητες για την πρώιμη ανάπτυξη του εμβρύου και του πλακούντα, τουλάχιστον εν μέρει μέσω της ρύθμισης της αγγειογένεσης κατά την εμφύτευση σε ανθρώπους, πρόβατα και ποντίκια (Al-Gubory 2010, Rizzo 2012). Το οξειδωτικό στρες παίζει έναν φυσιολογικό ρόλο, επιτρέποντας την δημιουργία υγιούς πλακούντα. Πιστεύεται ότι η πρώιμη ανάπτυξη του πλακούντα συμβαίνει σε ένα σχετικά χαμηλού οξυγόνου περιβάλλον για την προστασία του πρώιμου εμβρύου από το ROS (Jauniaux 2006, Jauniaux 2000, Burton 2003), και ότι όταν έχει εγκατασταθεί η αιματική ροή μήτρας-πλακούντα, η τριπλάσια αύξηση της συγκέντρωσης οξυγόνου συμβαίνει στον πλακούντα (Jauniaux 2006). Αυτό οδηγεί στην αύξηση της συγκέντρωσης των ROS στην συγκυτιοτροφοβλάστη η οποία διαθέτει χαμηλή συγκέντρωση αντιοξειδωτικών ενζύμων και αυτό φαίνεται να προωθεί έναν αποπτωτικό καταρράκτη στις περιφερικές λάχνες το οποίο οδηγεί στην δημιουργία ενός δισκοειδή πλακούντα (Jauniaux 2003, Watson 1997 & 1998, Steller 2018).

Τα στρωματικά κύτταρα του ενδομητρίου παράγουν ROS ως υποπροϊόντα κανονικού μεταβολισμού (Freeman & Crapo 1982). Σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις, το ROS διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και την έκφραση γονιδίων (Lunghi 2007). Ο εγκλιματισμός του πλακούντα σε αυξημένη τάση O₂ και OS στο τέλος του 1ου τριμήνου ρυθμίζει εκ νέου την αντιοξειδωτική γονιδιακή έκφραση και τη δραστηριότητα για την προστασία του εμβρυϊκού ιστού από τις επιβλαβείς επιδράσεις του ROS κατά τη διάρκεια

των κρίσιμων φάσεων εμβρυογένεσης και οργανογένεσης (Burton 2010). Επιπλέον, Cu / Zn-SOD και Mn-SOD υπάρχουν στο ενδομήτριο, ιδιαίτερα σε αδενικά επιθηλιακά κύτταρα και στρωματικά κύτταρα (Li 1995, Rizzo 2012). Μεταξύ των αναγνωρισμένων αντιοξειδωτικών πλακούντα είναι και η οξυγενάση αίμης (HO)₋₁ και ₋₂, καταλάση και GPx (Nakamura 2009, Agarwal 2012).

Η ίδια η εγκυμοσύνη είναι κατάσταση OS που προκύπτει από την αυξημένη μεταβολική δραστηριότητα στα μιτοχόνδρια του πλακούντα και την αυξημένη παραγωγή ROS λόγω της υψηλότερης μεταβολικής ζήτησης του αναπτυσσόμενου εμβρύου (Myatt 2004, Wisdom 1991, Myatt 2010). Ο πλακούντας δέχεται οξυγόνο από τη μητρική κυκλοφορία, αυτό έχει ως αποτέλεσμα αυξημένη παραγωγή ROS, κυρίως O₂-• και, κατά συνέπεια, σε υψηλότερη πιθανότητα ανάπτυξης οξειδωτικού στρες (Garrel 2010). Ο πλακούντας επίσης παράγει άλλα ROS όπως νιτρικό οξείδιο (NO), μονοξείδιο του άνθρακα (CO) και υπεροξείδιο του νατρίου (HNOO)), τα οποία έχουν έντονες επιδράσεις στην λειτουργία του πλακούντα, συμπεριλαμβανομένου του πολλαπλασιασμού των τροφοβλαστών και της διαφοροποίησης και αγγειακής αντιδραστικότητας. Τα ανιόντα υπεροξειδίου (SO) που παράγονται από τα μιτοχόνδρια του πλακούντα φαίνεται ότι αποτελούν σημαντική πηγή ROS καθώς και υπεροξειδάση λιπιδίων που συμβάλλουν στο OS στον πλακούντα (Wang 1998), υποστηριζόμενα από μιτοχονδριακή παραγωγή υπεροξειδίων λιπιδίων, ελεύθερων ριζών και βιταμίνης E στον πλακούντα, η οποία αυξάνεται καθώς η κύηση εξελίσσεται (Jauniaux 2003, Lu 2018).

Αν και τα ROS συχνά θεωρούνται ως ανεπιθύμητα προϊόντα βιολογικών οξειδώσεων, η παραγωγή μικρών ποσοτήτων ROS μπορεί να λειτουργήσει ως οδός φυσιολογικής σηματοδότησης στο έμβρυο (Covarrubias 2008). Τα αντιδραστικά είδη οξυγόνου, στην πραγματικότητα, ασκούν αγγειοδραστικές επιδράσεις στον πλακούντα, εμπλέκονται επίσης στη μεταγωγή σήματος (Myatt & Cui 2004). Ο πλακούντας είναι επίσης πλούσιος σε μακροφάγα που ευνοούν την τοπική παραγωγή πλακουντιακών ελεύθερων ριζών όπως τα αντιδραστικά είδη χλωρίου (RCIS) με αυτοκατάλυση παρουσία σιδήρου (Wisdom 1991). Κατά τη διάρκεια της εμφύτευσης, τα μακροφάγα έχουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της απόπτωσης που είναι κρίσιμη για την εμφύτευση του αναπτυσσόμενου εμβρύου (Abrahams 2004, Rizzo 2012).

Τα μακροφάγα του φθαρτού θεωρούνται επίσης ότι εμπλέκονται στην προστασία του εμβρύου από ενδομήτριες μολύνσεις μέσω της παραγωγής O₂-• και της TNF-α κατά της φλεγμονώδους κυτταροκίνης όταν προκαλείται με βακτηριακούς λιποπολυσακχαρίτες (Singh 2005, Rizzo 2012). Ο List και συν., (2010) δηλώσαν ότι υπάρχει ένας πραγματικός προστατευτικός ρόλος του πλακούντα ενάντια στην οξειδωτική βλάβη και υπάρχει μια

αρκετά μεγάλη ανταλλαγή ROS μεταξύ μητέρας και εμβρύου καθώς και αντίστοιχο πέρασμα αντιοξειδωτικών από τη μητέρα στο έμβρυο (Rizzo 2012).

Στο δεύτερο τρίμηνο, ο πλακούντας ωριμάζει σταδιακά και αυξάνεται σε μέγεθος και διαθέτει ευρύτερα αιμοφόρα αγγεία. Η κυτταροτροφοβλάστη γίνεται ένα μόνο κύτταρο και σταδιακά αντικαθιστά το ενδοθηλιακό στρώμα που καλύπτει τον λείο μυ της σπειροειδούς αρτηρίας. Αργά, το μητρικό αίμα διεισδύει από την σπειροειδή αρτηρία της μητέρας στο διαλαχνικό χώρο (Jauniaux 2003, Lim 1997, Jaffe 1997). Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας, ο ιστός του πλακούντα σχηματίζει μια μεγάλη ποσότητα ελεύθερων ριζών και λαμβάνει χώρα οξειδωση. Ο πλακούντας προσαρμόζεται βαθμιαία σε αυτό το περιβάλλον και επιστρέφει στο φυσιολογικό υπό τη δράση της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας (Jauniaux 2000, Sultana 2017, Lu 2018).

Είναι σημαντικό ότι τα δείγματα που ελήφθησαν από τις περιφερικές λάχνες φανέρωσαν αυξημένα επίπεδα HSP70, πρωτεΐνες θερμικού σοκ, οι οποίες αυξάνονται κατά τη διάρκεια του οξειδωτικού στρες και συμμετέχουν στην δίπλωση και αναδίπλωση συσσωματωμένων ή λανθασμένα πτυχωμένων πρωτεϊνών (Niforou 2004), καθώς επίσης και σε νιτροτυροσίνη που υποδηλώνει σχηματισμό του υπεροξυνιτρώδους (Jauniaux 2003). Τα ROS και προγραμματισμένη απόπτωση βρέθηκε επίσης ότι παίζει ρόλο στη διατήρηση της ομοιόστασης του ενδομητρίου της μήτρας κατά τη διάρκεια της εμφύτευσης εμβρύου (Zhang 2006, Pamper 1999) και τα αυξημένα επίπεδα υπεροξειδίου πιστεύεται ότι παίζουν ρόλο στην αύξηση της αγγειακής διαπερατότητας κατά τη διάρκεια της εμφύτευσης (Laloraya 1989). Τέλος, η πρώιμη διατήρηση του πλακούντα εξαρτάται από τη στεροειδογένεση του ωχρού σώματιδίου και από τα ενζυματικά και μη ενζυματικά αντιοξειδωτικά στη διάσωση του ωχρού σωματίου από την ROS επαγόμενη λουτεόλυση (Sugino 1993, 2000 a& b, Chew 1984, Miszkial 1999, Steller 2018).

Το κυοφορούμενο έμβρυο αναπτύσσει έναν καλό αμυντικό μηχανισμό ενάντια στις ελεύθερες ρίζες, έχοντας σε 5 εβδομάδες κύησης υψηλές συγκεντρώσεις αντιοξειδωτικών όπως ταυρίνη, βιταμίνη A και E και σε δώδεκα εβδομάδες αυξημένη έκφραση CAT, Cu, Zn-SOD, Mn-SOD σε λαχνικό πλακούντα (Jauniaux 2003). Ο αντιοξειδωτικός έλεγχος του ROS είναι σημαντικός για την ανάπτυξη μέσω των κυτταρικών οδών σηματοδότησης που εμπλέκονται στον πολλαπλασιασμό, τη διάγνωση και την απόπτωση και το οξειδωτικό στρες που προκαλείται από την ROS μπορεί να μεταβάλλει την εμβρυϊκή ανάπτυξη (Dennerly 2007, Rizzo 2012).

Παρόλο που διατηρείται φυσιολογική ισορροπία μεταξύ της ROS και της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας σε φυσιολογικές εγκυμοσύνες (Wang 1991), μια ανισορροπία μπορεί να αυξήσει το OS. Ο πλακούντας εμφανίζει αυξημένο επίπεδο OS σε

ορισμένες παθολογικές καταστάσεις της εγκυμοσύνης, συμπεριλαμβανομένου του διαβήτη κύησης, του περιορισμού της ανάπτυξης του εμβρύου, της προεκλαμψίας και της αποβολής (Menon 2011, Sbrana 2011, Smith 2013). Το OS οδηγεί σε δυσλειτουργία ενδοθηλιακών κυττάρων, στη μήτρα, η δυσλειτουργία των ενδοθηλιακών κυττάρων έχει συνδεθεί με την προεκλαμψία και η ενδομητρίωση. Υπάρχουν πολλές αιτίες που προκαλούν δυσλειτουργία ενδοθηλιακών κυττάρων. Ο TNF- α , μια κυτοκίνη πλάσματος, έχει αποδειχθεί ότι προκαλεί βλάβη ενδοθηλιακών κυττάρων, αλλά το αντιοξειδωτικό Mn-SOD εξουδετερώνει τα ανιόντα SO που παράγονται από την κυτοκίνη TNF- α . Αυτή η διαδικασία είναι ένας αυτοπροστατευτικός μηχανισμός κατά του OS που προκαλείται από τον TNF- α .

Επιπλέον, τα ROS που παράγονται από την οξειδάση NADP(H) είναι κρίσιμα για τη σηματοδότηση του VEGF *in vitro* και την αγγειογένεση *in vivo* (Ushio-Fukai 2004). Μικρές ποσότητες ROS παράγονται από ενδοθηλιακή οξειδάση NADP(H) ενεργοποιημένη από αυξητικούς παράγοντες και κυτοκίνες. Τα ROS που δημιουργούνται μέσα και γύρω από το αγγειακό ενδοθήλιο θα μπορούσαν να διαδραματίσουν ρόλο σε φυσιολογικούς μηχανισμούς κυτταρικής σηματοδότησης. Μπορεί επίσης να είναι σημαντικοί αιτιολογικοί παράγοντες στην ενδοθηλιακή δυσλειτουργία (Lu 2018).

Η εξάντληση των αντιοξειδωτικών συστημάτων του πλακούντα έχει προταθεί ως βασικός παράγοντας στην πρόωρη αποτυχία της εγκυμοσύνης του ανθρώπου (Liu 2006). Με δεδομένες αυτές τις συνθήκες, απαιτείται επαρκές αντιοξειδωτικό δυναμικό του πλακούντα για να αποφευχθεί το αποτέλεσμα πολλών επιπλοκών της μητέρας και του εμβρύου, ακόμη και αν η αποτελεσματικότητα των αντιοξειδωτικών αντιβιοτικών πλακούντα έναντι του οξειδωτικού στρες φαίνεται να ποικίλλει ανάλογα με το στάδιο ανάπτυξης του πλακούντα στους ανθρώπους (Qanungo και Mukherjea 2000, Rizzo 2012).

Μεταξύ των 10 και 12 εβδομάδων κύησης, τα τροφοβλαστικά έμβολα απομακρύνονται από τις σπειροειδείς αρτηρίες της μητέρας, πλημμυρίζοντας το διαλαχνικό χώρο με μητρικό αίμα. Το γεγονός αυτό συνοδεύεται από μια απότομη αύξηση της τάσης του O₂ (Jauniaux 2000), σηματοδοτώντας την καθιέρωση της πλήρους κυκλοφορίας της μητρικής αρτηρίας στον πλακούντα που συνδέεται με την αύξηση της ROS, η οποία οδηγεί σε OS (Myatt 2004, Agarwal 2012). Εάν η ροή αίματος της μητέρας φθάσει πρόωρα στον διαλαχνικό χώρο, το οξειδωτικό στρες του πλακούντα μπορεί να συμβεί πολύ νωρίς και να προκαλέσει αλλοίωση της συγγυτιοτροφοβλάστης. Αυτό μπορεί να προκαλέσει μια ποικιλία επιπλοκών συμπεριλαμβανομένης της αποβολής (Jauniaux 2000, Hempstock 2003, Jauniaux 2003), της επαναλαμβανόμενης απώλειας της εγκυμοσύνης (Jauniaux 2003) και της προεκλαμψίας, μεταξύ άλλων (Burton 2003, (Agarwal 2012) (Myatt & Cui 2004). Αυτές οι επιπλοκές θα συζητηθούν παρακάτω.

Οξειδωτικό Στρες και Αποβολή

Αποβολή ή αυθόρμητη έκτρωση είναι η ακούσια διακοπή της εγκυμοσύνης όταν το βάρος του εμβρύου είναι <500g πριν από την εμβρυϊκή βιωσιμότητα στις 20 εβδομάδες κύησης (Agarwal 2012, Banerjee 2019). Το οξειδωτικό στρες του πλακούντα είναι μία από τις κύριες αιτίες αποβολής. Λόγω της πρόωρης ενδοπλακουντιακής κυκλοφορίας στις 8 έως 9 εβδομάδες εγκυμοσύνης, αντί για 10-12 εβδομάδες κύησης, δημιουργείται υψηλό οξειδωτικό στρες (Watson 1998, Jauniaux 2003), όπως έχει αναφερθεί παραπάνω, το οποίο παραμορφώνει το στρώμα συγκυτιοτροφοβλάστης του πλακούντα, προκαλώντας έτσι βλάβη στον πλακούντα (Gurta 2007). Η απόπτωση των ιστών του πλακούντα μπορεί επίσης να εμφανιστεί λόγω επαγώγιμου οξειδωτικού στρες σε φλεγμονώδεις διεργασίες. Ως εκ τούτου, λόγω αυτού του εκφυλισμού του πλακούντα, εμφανίζεται συχνά αποβολή (Agarwal 2012, Banerjee 2019).

Μεταξύ των πολυάριθμων αιτιών για πρόωρη αποβολή, παρατηρείται συχνά η δημιουργία αδύναμου πλακούντα (Goto 2008) και διαταραχή της φυσιολογικής, μεσολαβούμενης από οξειδωτική βλάβη διεργασία σχηματισμού πλακούντα. Το συντριπτικό οξειδωτικό στρες του πλακούντα έχει προταθεί ως ένας αιτιώδης παράγοντας αυθόρμητης έκτρωσης. Σε αυτούς τους πλακούντες, οι Jauniaux και συν., έχουν παρατηρήσει παρόμοιες αυξήσεις του HSP70 και της νιτροτυροσίνης τόσο στις περιφερικές όσο και στα κεντρικές λάχνες στους πλακούντες που ελήφθησαν μετά από πρόωρη αποβολή (Watson 1997, Hempstock 2003, Jauniaux 2003) Επιπλέον, ο αποπτωτικός δείκτης είναι υψηλός και υπάρχουν μορφολογικά στοιχεία για την αποκοπή συγκυτιοτροφοβλαστών, με επακόλουθο τερματισμό της εγκυμοσύνης (Burton 2010).

Δεδομένου του υψηλού μεταβολικού ρυθμού του πλακούντα κατά την πρώιμη εγκυμοσύνη, η μείωση των αντιοξειδωτικών του πλακούντα έχει επίσης συσχετιστεί με την πρόωρη αποβολή (Myatt 2006). Άλλες μελέτες έχουν αποκαλύψει μειωμένη έκφραση SOD και αυξημένες υπεροξειδάσες λιπιδίων σε ιστό πλακούντα μετά από αποβολή (Sugino 2000a & b, Biri 2006, Toy 2010, Al-Kunani 2001, Thomas 2013) Τα αντιοξειδωτικά ένζυμα δεν είναι σε θέση να αντιμετωπίσουν τις αυξήσεις των ROS σε αυτό το σημείο, καθώς η έκφραση και η δραστηριότητά τους αυξάνονται με την ηλικία κύησης (Jauniaux 2000). Όταν το OS αναπτύσσεται πολύ νωρίς κατά την εγκυμοσύνη, μπορεί να επηρεάσει την ανάπτυξη του πλακούντα και / ή να ενισχύσει τον εκφυλισμό των συγκυτιοτροφοβλαστών, με αποκορύφωμα την απώλεια της εγκυμοσύνης (Gurta 2007, Agarwal 2012). Περαιτέρω, οι πολυμορφισμοί των ενζυματικών αντιοξειδωτικών, καθώς και η έλλειψη σεληνίου, έχουν συσχετιστεί με την αύξηση του κινδύνου αποβολής (Tempfer 2001, Sata 2003a & b, Zachara

2001, Thomas 2013). Η μειωμένη ικανότητα αποτοξίνωσης της GPx μπορεί να συμβεί στη ρύθμιση της έλλειψης Se, η οποία έχει συνδεθεί τόσο με την αυθόρμητη έκτρωση (Zachara 2001, Al-Kunani 2001) όσο και με την επαναλαμβανόμενη απώλεια της εγκυμοσύνης (Al-Kunani 2001, Agarwal 2012). Μικρές μελέτες έχουν αποκαλύψει ότι η συμπλήρωση του σεληνίου μπορεί να μειώσει το ποσοστό αποβολής σε ζώα (Mamon 2017) και η αντιοξειδωτική συμπλήρωση με N-ακετυλοκυστεΐνη έχει βελτιώσει την πιθανότητα επιτυχούς ανθρώπινης εγκυμοσύνης μετά από υποτροπιάζουσα απώλεια της εγκυμοσύνης (Amin 2008, Steller 2019).

Η δραστικότητα της προλιδάσης στον ορό, ενός βιοδείκτη της εξωκυτταριας ουσίας και της περιστροφής του κολλαγόνου, έχει παρατηρηθεί ότι μειώνεται σε ασθενείς με πρόωρη απώλεια της εγκυμοσύνης. Τα επίπεδα της έδειξαν επίσης ότι συσχετίζονται αρνητικά με αυξημένο οξειδωτικό στρες, ενδεχομένως δεικνύοντας την αυξημένη αγγειακή αντίσταση του πλακούντα και την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία δευτερεύουσα σε μειωμένη και μη ρυθμισμένη κυκλοφορία του κολλαγόνου (Toy 2010, Agarwal 2012). Μειωμένη δραστηριότητα της παραοξονάσης / αρυλεστεράσης στον ορό - ένας βασικός καθοριστικός παράγοντας της αντιοξειδωτικής κατάστασης της λιποπρωτεΐνης υψηλής πυκνότητας (HDL) - παρατηρήθηκε σε ασθενείς με πρόωρη απώλεια της εγκυμοσύνης. Μια αρνητική συσχέτιση με το υδροϋπεροξείδιο του λιπιδίου παρατηρήθηκε επίσης σε αυτούς τους ασθενείς, υποδεικνύοντας την υψηλή τους ευαισθησία στην υπεροξείδωση των λιπιδίων (Toy 2009, Agarwal 2012).

Η αντιοξειδωτική συμπλήρωση έχει ερευνηθεί στην πρόληψη της πρόωρης απώλειας της εγκυμοσύνης, με την ιδέα της αντικατάστασης των εξαντλημένων αντιοξειδωτικών αποθεμάτων για την καταπολέμηση ενός συντριπτικά οξειδωτικού περιβάλλοντος. Ωστόσο, μια μετα-ανάλυση σχετικών μελετών απέτυχε να αναφέρει τα αποδεικτικά στοιχεία των ευεργετικών αποτελεσμάτων της αντιοξειδωτικής συμπλήρωσης (Rumbold 2005, Agarwal 2012).

Οξειδωτικό Στρες Καθέξιν Απώλεια της Εγκυμοσύνης (RPL)

Η επαναλαμβανόμενη απώλεια της εγκυμοσύνης αναφέρεται σε περισσότερες από τρεις διαδοχικές απώλειες εγκυμοσύνης (Banerjee 2019), έχει επίπτωση 1% έως 3% (Agarwal 2012). Σε 50% των περιπτώσεων, μπορούν να εντοπιστούν αιτιολογικοί παράγοντες. Στο υπόλοιπο 50%, ωστόσο, δεν μπορεί να ανιχνευθεί καμία καθορισμένη αιτία (Queenby 1993, Rai 2006), αν και οι μελέτες έχουν επισημάνει το ρόλο του OS στην αιτιολογία της επαναλαμβανόμενης απώλειας εγκυμοσύνης (Agarwal 2008, Poston 2004). Οι περισσότερες από τις απώλειες εγκυμοσύνης είναι συνήθως πριν από 12 εβδομάδες κύησης. Υπάρχει ένα

σύνολο βιβλιογραφίας που υπογραμμίζει τους διάφορους παράγοντες κινδύνου και αιτιολογικούς παράγοντες όπως δημογραφικούς παράγοντες, όπως ηλικιακές και φυλετικές διαφορές, κυτταρογενετικές ανωμαλίες, ανατομικές ανωμαλίες της μήτρας και άλλες. Εκτός αυτών είναι οι αυτοάνοσες ασθένειες, οι λοιμώξεις, οι περιβαλλοντικοί παράγοντες και οι επαγγελματικές εκθέσεις (Cramer 2000, Gupta 2007) που ευθύνονται για αυθόρμητες ή επαναλαμβανόμενες αμβλώσεις. Σε περίπου πενήντα έως εξήντα τοις εκατό των αποβολών η αιτιολογία παραμένει άγνωστη, ενώ η ενδοθηλιακή βλάβη, η διαταραχή της αγγειοποίησης του πλακούντα και η ανοσοποιητική δυσλειτουργία είναι μερικοί από τους προτεινόμενους παράγοντες που παίζουν ρόλο στην ιδιοπαθή έκτρωση (Gupta 2007, Gupta 2009).

Πρόσφατα έχει προταθεί ότι οι μητρικές σπειροειδείς αρτηρίες, σε φυσιολογική κύηση, μπορεί να περιλαμβάνουν κύτταρα φυσικούς δολοφόνους (NK) της μήτρας ως ρυθμιστή της σωστής ανάπτυξης και αναδιαμόρφωσης. Οι αγγειογενείς παράγοντες είναι γνωστό ότι παίζουν βασικούς ρόλους στη διατήρηση της σωστής αναδιαμόρφωσης της σπειροειδούς αρτηρίας. Έτσι, η εμπλοκή των κυττάρων NK της μήτρας σε RPL έχει υποστηριχθεί από τα ευρήματα κατά την πρώιμη εγκυμοσύνη αυξημένων επιπέδων αγγειογενετικών παραγόντων που εκκρίνονται από τα κύτταρα NK της μήτρας (Lash 2006, Quenby 2008, Banerjee 2019), καθώς και αυξημένη *in vivo* και *in vitro* αγγειογένεση ενδοθηλιακών κυττάρων που επάγονται από κύτταρα NK της μήτρας (Hanna 2006) γυναικών που βιώνουν RPL. Τα αυξημένα ενδοθηλιακά κύτταρα NK, τα οποία συσχετίστηκαν θετικά με την πυκνότητα των αγγείων του ενδομητρίου. Συνεπώς, έχει προταθεί ότι η αύξηση των κυττάρων NK της μήτρας αυξάνει την αγγειογένεση πριν από την εμφύτευση, οδηγώντας σε μη πρώιμη ενδοκυτταρική μητρική κυκλοφορία και κατά συνέπεια, σημαντικά αυξημένο OS κατά την εγκυμοσύνη (Quenby 2009, Agarwal 2012).

Η συνκυτιροφροβλαστική φθορά και το OS που εμφανίζονται ως αποτέλεσμα της μη φυσιολογικής πλακουντοποίησης μπορεί να εξηγήσουν την αυξημένη ευαισθησία των συνκυττοτροφροβλαστών στο OS κατά τη διάρκεια του 1ου τριμήνου και θα μπορούσαν να συνεισφέρουν σημαντικά στην ιδιοπαθή RPL (Burton 2003) Έχει διαπιστωθεί ότι σε ασθενείς με RPL υπάρχει αύξηση των υπεροξειδίων λιπιδίων και GSH στο πλάσμα (Simsek 1998), επιπλέον της μείωσης των επιπέδων βιταμίνης E και β-καροτίνης, γεγονός που υποδηλώνει αυξημένο επίπεδο οξειδωτικού στρες (Miller 2000). Μια άλλη μελέτη, αποκαλύπτει ότι υπάρχουν σημαντικά μειωμένα επίπεδα αντιοξειδωτικών ενζύμων όπως GPx, SOD και καταλάσης, επιπλέον των αυξημένων επιπέδων MDA, σε ασθενείς με RPL, γεγονός που δείχνει και πάλι αυξημένο οξειδωτικό στρες (El-Far 2007, Banerjee 2019, Simsek 1998, Miller 2000). Μια άλλη μελέτη έδειξε σημαντικά χαμηλά επίπεδα αντιοξειδωτικών ενζύμων GPx, SOD και καταλάσης σε ασθενείς με ιδιοπαθή RPL, επιπλέον των αυξημένων επιπέδων MDA (El-Far 2007, Agarwal 2012). Οι πολυμορφισμοί των αντιοξειδωτικών ενζύμων έχουν

συσχετιστεί με υψηλότερο κίνδυνο RPL (Tempfer 2001, Sata 2003 a & b). Ο μηδενικός πολυμορφισμός γονότυπου ενζύμων GST που βρέθηκαν σε μερικούς ασθενείς με RPL έχει αναφερθεί ως παράγοντας κινδύνου για RPL (Agarwal 2008, Agarwal 2012).

Σε πρώιμα στάδια της εγκυμοσύνης παρατηρείται αύξηση του αριθμού των λευκοκυττάρων, προκαλώντας αύξηση της παραγωγής ριζών υπεροξειδίου (Sacks 1998, Fait 2005). Η αυξημένη παραγωγή ROS έχει καταδειχθεί με τεχνική χημειοφωταύγειας σε ασθενείς με υποτροπιάζουσα απώλεια της εγκυμοσύνης (Safronova 2003). Το επίπεδο ενεργοποίησης της αναπνευστικής έκκρισης έδειξε σημαντικά διαφορετικά αποτελέσματα. Οι διαφορές που παρατηρήθηκαν οφείλονται στη δραστικότητα οξειδάσης του αναστολέα πρωτεϊνικών κινασών τυροσίνης, φωσφορικών πρωτεϊνών και αναστολέων της αδενοποιημένης πρωτεϊνκινάσης p38 MAPK στις γυναίκες με υποτροπιάζουσες αμβλώσεις σε σύγκριση με γυναίκες με φυσιολογικές αναπαραγωγικές λειτουργίες (Safronova 2003). Χαμηλότερη συγκέντρωση α-τοκοφερόλης, ολικών θειολών και γλουταθειόνης παρατηρείται σε ασθενείς με ανεξήγητες αμβλώσεις (Vural 2000). Άλλη μελέτη έχει αναφέρει την ύπαρξη υψηλότερου επιπολασμού της υπερομοκυστεϊναιμίας σε γυναίκες με υποτροπιάζουσα απώλεια εγκυμοσύνης (RPL), αν και λίγα είναι γνωστά για την παθοφυσιολογία της (Wouters 1993). Η ελαττωματική αγγειοποίηση του χορίου είναι μια προτεινόμενη υπόθεση με την οποία η αυξημένη συγκέντρωση ομοκυστεϊνης συνδέεται με την RPL. Το φυλλικό οξύ και η βιταμίνη B6 έχουν και έναν ρόλο στο μεταβολισμό της ομοκυστεϊνης αμινοξέων. Η συμπλήρωση φυλλικού οξέος και βιταμίνης B6 μπορεί να αποτελέσει προληπτικό μέτρο για τη μείωση των αυξημένων επιπέδων ομοκυστεϊνης (Nelen 2000, Gupta 2009).

Αναφορά επίσης θα πρέπει να γίνει και στη συμβολή του αντρικού παράγοντα στην απώλεια εγκυμοσύνης. Η βλάβη του DNA του σπέρματος έχει εμπλακεί στην απόπτωση, το χαμηλό ποσοστό γονιμοποίησης, την υψηλότερη συχνότητα αποβολής και τη νοσηρότητα στους απογόνους (Agarwal 2014, Alahmar 2019). Τα αναδυόμενα στοιχεία υποδηλώνουν ότι στην ART υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της υψηλής SDF και του αυξημένου κινδύνου αποβολής. Σε μια συστηματική ανασκόπηση που αναφέρθηκε από τους Rilcheva και συν., διαπιστώθηκε ότι μετά από *in vitro* γονιμοποίηση (IVF) και ενδοκυτταροπλασματική έγχυση σπέρματος (ICSI), υπήρχαν αυξημένες πιθανότητες απώλειας εγκυμοσύνης λόγω υψηλού SDF (Rilcheva 2016) Μια άλλη συστηματική ανασκόπηση με 16 ατομικές ομάδες και 2969 ζευγάρια επιβεβαίωσε τα παραπάνω αποτελέσματα και παρατηρήθηκε μια αύξηση κατά 2,16 φορές στον κίνδυνο απώλειας εγκυμοσύνης μετά από IVF και ICSI με δείγματα σπέρματος με υψηλή SDF (Zhao 2014). Και οι δύο συστηματικές αναθεωρήσεις ανέφεραν ότι οι σημαντικοί συσχετισμοί μεταξύ των ποσοστών αποβολών και των υψηλών SDF ήταν ανεξάρτητοι από τη μέθοδο γονιμοποίησης που χρησιμοποιήθηκε (Alahmar 2019).

Η συμπλήρωση αντιοξειδωτικών μπορεί να είναι η απάντηση στην αποκατάσταση αντιοξειδωτικών αμυντικών και την καταπολέμηση των επιπτώσεων της απόπτωσης του πλακούντα και των φλεγμονωδών αποκρίσεων που σχετίζονται με εκτεταμένο οξειδωτικό στρες. Εκτός από τις πολύ γνωστές αντιοξειδωτικές του ιδιότητες, η Ν-ακετυλοκυστεΐνη είναι πλούσιο σε σουλφυδρυλικές ομάδες. Οι ιδιότητες θειόλης του δίνουν την ικανότητα να αυξάνουν τις ενδοκυτταρικές συγκεντρώσεις της GSH ή να καθαρίζουν άμεσα τις ελεύθερες ρίζες (Cotgreave 1997, Kelly 1998). Επιπλέον, η τοξικότητα του εμβρύου, ο θάνατος στη μήτρα και ο περιορισμός ενδομήτριας ανάπτυξης, που προκαλούνται από λιποπολυσακχαρίτες, θα μπορούσαν να προληφθούν από τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες της Ν-ακετυλοκυστεΐνης (Xu 2005). Είναι σημαντικό ότι οι Amin και συν., (2008) έδειξαν ότι ο συνδυασμός του Ν-ακετυλοκυστεΐνης και φυλλικού οξέος ήταν αποτελεσματικός στη βελτίωση των αποτελεσμάτων εγκυμοσύνης σε ασθενείς με ανεξήγητη υποτροπιάζουσα απώλεια εγκυμοσύνης (Amin 2008). Αναστέλλοντας την απελευθέρωση προ-φλεγμονωδών κυτοκινών (Larras 2003), ενδοθηλιακής απόπτωσης και οξειδωτικής γονιδιοτοξικότητας (Aluigi 2000), μέσω διατήρησης ενδοκυτταρικών επιπέδων GSH, η NAC μπορεί να αποδείχθει πολλά υποσχόμενη στην καταστολή του επαγόμενου οξειδωτικού στρες (Agarwal 2012).

Οξειδωτικό Στρες και Προεκλαμψία

Η προεκλαμψία είναι μια αγγειακή διαταραχή εγκυμοσύνης που συχνά συνεπάγεται διαταραχή της ανάπτυξης του πλακούντα (Lu 2018), αποτελεί μια συχνή και δυνητικά σοβαρή επιπλοκή της εγκυμοσύνης που χαρακτηρίζεται από αυξημένη αρτηριακή πίεση, πρωτεϊνουρία και ενδείξεις βλάβης των οργάνων στο τέλος (όπως δυσλειτουργία του ήπατος, νεφρική δυσλειτουργία, δυσλειτουργία του κεντρικού νευρικού συστήματος, θρομβοπενία ή πνευμονικό οίδημα). Επιπλέον, η επιδείνωση της προεκλαμψίας μπορεί να οδηγήσει σε επιληπτικές κρίσεις ή εγκεφαλικό επεισόδιο στην μητέρα και σχετίζεται με πολλαπλές ανεπιθύμητες ενέργειες εγκυμοσύνης, όπως περιορισμό εμβρυϊκής ανάπτυξης, πρόωρο τοκετό και αποκόλληση πλακούντα (ACOG 2013). Η παθοφυσιολογία εξακολουθεί να μην είναι καλά κατανοητή. Ωστόσο, υπάρχουν σαφείς δεσμοί μεταξύ αυτής της διαταραχής, οξειδωτικού στρες και μιας συστηματικής φλεγμονώδους απάντησης (Al-Gubory 2010, Peter Stein 2008, Redman 2009, Burton 2009, Fisher 2015, Ishihara 2004, Hsieh 2012- Ferguson 2017, Steller 2019).

Η ισχαιμία / υποξία του πλακούντα θεωρείται ότι παίζει σημαντικό ρόλο μέσω της επαγωγής του OS, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε δυσλειτουργία ενδοθηλιακών κυττάρων (Myatt 2004, Reslan 2010) και συστηματική αγγειοσυστολή (Khalil 2002). Το οξειδωτικό στρες είναι σημαντικό για τις φυσιολογικές λειτουργίες και την ανάπτυξη του

πλακούντα (Burton 2004). Ωστόσο, η προεκλαμψία αντιπροσωπεύει μια πολύ υψηλότερη κατάσταση του οξειδωτικού στρες από ό, τι συμβαίνει στις φυσιολογικές εγκυμοσύνες (Redman 2009, Agarwal 2012). Η βλάβη ισχαιμίας-επαναιμάτωσης που έχει συμβεί δευτερογενώς λόγω της μη φυσιολογικής αναδιαμόρφωσης των σπειροειδών αρτηριών στον πλακούντα, οδηγεί σε οξειδωτικό στρες (Burton 2004, Hung 2001, Dokras 2006, Steller 2019). Υπό κανονικές συνθήκες, η βλάβη της κυκλοφοριακής ομοιόστασης προκαλείται κυρίως από αγγειακή ενδοθηλιακή δυσλειτουργία στην προεκλαμψία. Χαρακτηρίζεται από την τάση να προκαλεί αγγειοσυστολή και χαμηλή αντιπηκτική δραστηριότητα (Lu 2018).

Η προεκλαμψία μπορεί να αναπτυχθεί πριν (πρώιμη έναρξη) ή μετά από (καθυστερημένη έναρξη) στις 34 εβδομάδες κύησης. Οι κύριες παθοφυσιολογικές διαταραχές είναι ο εστιακός αγγειόσπασμος και ένα πορώδες αγγειακό δέντρο που μεταφέρει το υγρό από τον ενδοαγγειακό στον εξωαγγειακό χώρο. Ο ακριβής μηχανισμός του αγγειόσπασμου είναι ασαφής, αλλά η έρευνα έδειξε ότι οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ αγγειοδιασταλτικών και αγγειοσυσταλτικών, όπως το NO, η ενδοθηλίνη 1, η αγγειοτενσίνη II, η προστακυκλίνη και η θρομβοξάνη, μπορεί να προκαλέσουν μείωση της διάχυσης ορισμένων οργάνων. Το πορώδες αγγειακό δέντρο είναι μία με μειωμένη οσμωτική πίεση κολλοειδούς και αυξημένη αγγειακή διαπερατότητα (ACOG 2002, Roberts 2003, Agarwal 2012).

Το πλακουντιακό οξειδωτικό στρες μπορεί να ανιχνευθεί μέσω αυξημένων συγκεντρώσεων ROS όπως το H_2O_2 (Aris 2009) ή σημείων υπεροξειδωσης λιπιδίων (Sharma 2006) όπως οι δραστικές ουσίες MDA (Gupta 2009, Sharma 2006, Haque 2010, Padmini 2009) και οι αντιδραστικές ουσίες του θειοβαρβιτουρικού οξέος (TBARS) (Gupta 2009, Sharma 2006). Αυξημένα επίπεδα κυκλοφορίας του αγγειοσυσταλτικού H_2O_2 (Kharfi 2005, Aris 2009) και μειωμένα επίπεδα του αγγειοδιασταλτικού NO (Aris 2009, Tsukimori 2008) έχουν παρατηρηθεί στην προεκλαμψία και μπορεί να συνιστούν τη αγγειοσυστολή και την υπέρταση που υπάρχουν στην ασθένεια. Ακόμα, μερικές μελέτες ανέφεραν αντιστρόφως αυξημένα επίπεδα NO στην κυκλοφορία (Bhatnagar 2007, Vural 2002) και τον πλακούντα (Shaamash 2000). Η αλλοίωση των ουδετεροφίλων που παρατηρείται στην προεκλαμψία είναι μια άλλη σημαντική πηγή ROS και οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή του ανιόντος SO και μειωμένη απελευθέρωση NO, η οποία τελικά προκαλεί βλάβη των ενδοθηλιακών κυττάρων σε ασθενείς με προεκλαμψία (Tsukimori 2005, Agarwal 2012).

Το ROS φαίνεται να διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στην ενδοθηλιακή δυσλειτουργία που σχετίζεται με την προεκλαμψία (Matsubara 2015). Με άλλα λόγια, το παθολογικό γεγονός στην προεκλαμψία είναι βλάβη στο αγγειακό ενδοθήλιο που ρυθμίζεται από αυξημένο πλακουντιακό ROS (Roberts 1989) ή μειωμένη αντιοξειδωτική δράση (Hubel 1989). Το OS προκαλεί αυξημένη νίτρωση του p38 MAPK, με αποτέλεσμα τη μείωση της καταλυτικής

του δραστηριότητας (Lu 2018). Αυτό μπορεί να προκαλέσει την κακή εμφύτευση και περιορισμό της ανάπτυξης που παρατηρήθηκε στην προεκλαμψία (Webster 2008). Έχει ταυτοποιηθεί υπερβολική απόπτωση των τροφοβλαστικών λαχνών σε ασθενείς με προεκλαμψία, από τους οποίους το OS έχει προταθεί ως πιθανή αιτία. Μικροσωματίδια μεμβράνης μικροκυψελών συγκυτιοτροποβλαστών (STBMs) έχουν βρεθεί σε όλη τη μητρική κυκλοφορία ασθενών με προεκλαμψία και είναι γνωστό ότι προκαλούν βλάβη ενδοθηλιακών κυττάρων *in vitro* (Sharp 2010, Agarwal 2012).

Η προεκλαμψία πρώιμης έναρξης σχετίζεται με αυξημένα επίπεδα καρβονυλίων πρωτεϊνών, υπεροξειδία λιπιδίων, υπολείμματα νιτροτυροσίνης και οξειδωση του DNA, τα οποία είναι όλα δείκτες του OS στον πλακούντα (Myatt 2004, Burton 2009). Το OS της προεκλαμψίας θεωρείται ότι προέρχεται από ανεπαρκή μετατροπή σπειροειδούς αρτηρίας (Nakamura 2009, Kharfi 2005, Roberts 2001) που οδηγεί σε ασυνεχή αιμάτωση του πλακούντα και σε χαμηλό επίπεδο βλάβης ισχαιμίας-επαναιμάτωσης (Burton 2004, Granger 2002, Hung 2001). Η πίστωση σε αυτή την υπόθεση είναι ότι η ισχαιμία και η επαναιμάτωση που συμβαίνει οδηγούν επίσης σε παρόμοια αύξηση των δεικτών οξειδωτικού στρες και αλλοιώσεων στην έκφραση γονιδίων (Cindrova-Davies 2007, Many 1997, Cindrova-Davies 2007). Αυτό το οξειδωτικό στρες του πλακούντα στη συνέχεια οδηγεί στην απελευθέρωση κυτοκινών, αγγειογόνων παραγόντων και αποπτωτικών θραυσμάτων στη μητρική κυκλοφορία, η οποία προκαλεί φλεγμονώδη απόκριση (Redman 2009, Steller 2019). Η ενεργοποίηση του ASK1, που προκαλείται από το H₂O₂ ή από την υποξία / επαναοξυγόνωση, οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα διαλυτού υποδοχέα για VEGF (sFlt-1) (Cindrova-Davies 2009), που έχει αντι-αγγειογόνες ιδιότητες (Nakamura 2009, Levine 2004). Τα αυξημένα επίπεδα κυκλοφορίας του sFlt-1 έχουν προταθεί ότι παίζουν ρόλο στην παθογένεση της προεκλαμψίας (Cindrova-Davies 2009, Levine 2004) και της σχετικής ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας (Levine 2004). Η πλακουντιακή τροφοβλαστική υποξία που έχει ως αποτέλεσμα OS έχει συνδεθεί με περίσσεια επίπεδα sFlt-1 στην κυκλοφορία των προεκλαμπτικών γυναικών (Nakamura 2009). Οι βιταμίνες C και E και η σουλφασαλαζίνη μπορούν να μειώσουν τα επίπεδα sFlt-1 (Cindrova-Davies 2009, Agarwal 2012).

Η οξυγενάση-1 (HO-1) της αίμης (Ahmed 2000) είναι ένα αντιοξειδωτικό ένζυμο που έχει αντιφλεγμονώδεις και κυτταροπροστατευτικές ιδιότητες. Η υποξία διεγείρει την έκφραση του HO-1 (De Marco 2006) σε καλλιεργημένα τροφοβλαστικά κύτταρα και χρησιμοποιείται για την ανίχνευση αυξημένου OS σε αυτό (Li 2005). Η προεκλαμψία μπορεί να σχετίζεται με μειωμένα επίπεδα HO στον πλακούντα (Ahmed 2000), γεγονός που υποδηλώνει μείωση των προστατευτικών μηχανισμών στην ασθένεια. Πιο πρόσφατα, μειώθηκαν οι κυτταρικές εκφράσεις του mRNA των HO-1, HO-2, SOD, GPx και καταλάσης στο αίμα των προεκλαμπτικών ασθενών (Nakamura 2009, Gupta 2009, Aris 2009). Ο ιστός από τη

χοριακή δειγματοληψία των εγκύων γυναικών που είχαν διαγνωστεί με προεκλαμψία αργότερα κατά την κύηση, αποκάλυψε σημαντικά μειωμένες εκφράσεις των HO-1 και SOD (Farina 2008). Η αποτυχία να εξουδετερωθεί το συντριπτικό OS μπορεί να οδηγήσει σε ελαττωμένη αντιοξειδωτική άμυνα (Agarwal 2012). Οι γυναίκες που έχουν προσβληθεί έχουν επίσης μειωμένη συνολική αντιοξειδωτική κατάσταση (TAS) και πλακουντιακή GPx (Walsh 2004, Gurta 2009), χαμηλά επίπεδα βιταμινών C και E (Aris 2009, Lu 2018). Η έλλειψη πρόσληψης βιταμίνης C φαίνεται να συνδέεται με αυξημένο κίνδυνο προεκλαμψίας και μερικές μελέτες έχουν δείξει ότι η συμπληρωματική χορήγηση με πολυβιταμίνες μπορεί να μειώσει τον κίνδυνο προεκλαμψίας σε γυναίκες με κανονικές ή λιποβαρείς καταστάσεις (Klemmensen 2009).

Τα επίπεδα TNF-α και oxLDL αυξάνονται στην προεκλαμψία και έχει αποδειχθεί ότι ενεργοποιούν την ενδοθηλιακή ισομορφή της οξειδάσης NAD(P)H, τελικά με αποτέλεσμα αυξημένα επίπεδα του ανιόντος SO. Αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η κατανάλωση αντιοξειδωτικών για την αντιμετώπιση της αυξημένης υπεροξειδώσεως των λιπιδίων μπορεί να προκαλέσει βλάβη στο αγγειακό ενδοθήλιο και θα μπορούσε να εμπλακεί στην παθογένεση της προεκλαμψίας (Uzun 2005). Τα μέλη της οικογένειας των οξειδάσεων NAD(P)H είναι σημαντικές γεννήτριες του ανιόντος SO σε πολλά κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων των τροφοβλαστών και των αγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων. Η αυξημένη παραγωγή ανιόντων SO μέσω ενεργοποίησης αυτών των ενζύμων μπορεί να συμβεί μέσω ενός από διάφορους φυσιολογικούς μηχανισμούς και έχει εμπλακεί στην παθογένεση ορισμένων αγγειακών νόσων (Griendling 2000). Τα αυτοαντισώματα κατά του υποδοχέα αγγειοτασίνης AT1, ιδιαίτερα του δεύτερου βρόχου (AT1-AA) (Wallekut 1999), μπορούν να διεγείρουν την οξειδάση NAD (P) H, οδηγώντας σε αυξημένη παραγωγή ROS. Σε καλλιεργημένα κύτταρα τροφοβλάστης και λείου μυός, ο υποδοχέας AT1 των προεκλαμπτικών γυναικών έχει παρατηρηθεί ότι προάγει τόσο τη δημιουργία του ανιόντος SO όσο και την υπερέκφραση της οξειδάσης NAD(P)H (Dechend 2003). Μεταξύ 6 και 8 εβδομάδων κύησης, το ενεργό NAD(P)H του πλακούντα αποδίδει σημαντικά περισσότερα ανιόντα SO από αυτά που παράγονται κατά τη διάρκεια της πλήρους περιόδου (Raijmakers 2004). Επομένως, η πρώιμη ανάπτυξη του πλακούντα μπορεί να επηρεαστεί από τη μη ρυθμισμένη αγγειακή ανάπτυξη και τη λειτουργία δευτερογενώς από την αλλοιωμένη γονιδιακή έκφραση (Griendling 2000, Wallukat 1999), με τη μεσολάβηση της NAD(P)H οξειδάσης (Iraní 2000, Griendling 2000). Οι γυναίκες με προεκλαμψία παράγουν ROS και εμφανίζουν υψηλότερη έκφραση NAD(P)H από εκείνες χωρίς τη νόσο (Dechend 2003). Πιο συγκεκριμένα, έχει αναφερθεί ότι γυναίκες με προεκλαμψία πρώιμης εκδήλωσης παράγουν υψηλότερες ποσότητες ανιόντος SO από ότι οι γυναίκες με νεοεμφανιζόμενη ασθένεια (Raijmakers 2004). Τα επίπεδα του TNF-α, και oxLDL αυξήθηκαν σε προεκλαμψία και έχει

φανεί ότι ενεργοποιούν την ενδοθηλιακή ισομορφή του NAD(P)H οξειδάση ήταν, με τελικό αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων του ανιόντος AA (Griendling 2000, Agarwal 2012).

Μία εξήγηση είναι ότι η βλάβη της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας κατά τη διάρκεια της πλακουντοποίησης μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση της υπεροξειδωσης των λιπιδίων και επακόλουθης βλάβης (Sagol 1999, Krishna Mohan 2007, Steller 2019). Αυξημένες συγκεντρώσεις ROS σε ασθενείς με προεκλαμψία έχουν αποδειχθεί από τα αυξημένα επίπεδα MDA, δείκτη υπεροξειδωσης λιπιδίων (Madazli 2002). Η παραοξονάση-1 (PON 1), ένα ένζυμο που συνδέεται με την HDL, δρα για να αντισταθμίζει την οξείδωση της LDL και να αποτρέπει την υπεροξειδωση των λιπιδίων (Costa 2005) στον μητρικό ορό. Οι Baker και συν., (2010) έδειξαν ότι τα επίπεδα PON 1 τείνουν να είναι υψηλά σε ασθενείς με προεκλαμψία, γεγονός που υποδηλώνει ότι το OS συμβάλλει στην παθογένεση της νόσου (Baker 2010). Η παραοξονάση-1 έχει επίσης μετρηθεί και είναι αυξημένη σε ασθενείς κατά τη μέση κύηση (Baker 2010), πιθανώς σε μια προσπάθεια να προστατευθεί από τις τοξικές επιδράσεις του υψηλού οξειδωτικού στρες που συναντάται στην προεκλαμψία. Αντίθετα, άλλες μελέτες έχουν παρατηρήσει σημαντικά μειωμένη PON 1 παρουσία κλινικών συμπτωμάτων (Kumru 2004, Uzun 2007) και σε ασθενείς με σοβαρή προεκλαμψία (Kumru 2004). Αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν την κατανάλωση αντιοξειδωτικών για την καταπολέμηση της αυξημένης υπεροξειδωσης των λιπιδίων, η οποία μπορεί να προκαλέσει βλάβη στο αγγειακό ενδοθήλιο και πιθανόν να εμπλακεί στην παθογένεση της προεκλαμψίας (Kumru 2004, Uzun 2007, Agarwal 2012).

Οξειδωτικό Στρες και Περιορισμός Εμβρυϊκής Ανάπτυξης

Ο περιορισμός της ενδομήτριας ανάπτυξης (IUGR) ορίζεται ως βρεφικό βάρος γέννησης κάτω από το 10ο εκατοστημόριο. Αυτή η πάθηση επηρεάζει το 10% των νεογνών (ACOG 2000) και αυξάνει τον κίνδυνο για περιγεννητική νοσηρότητα και θνησιμότητα. Ο περιορισμός εμβρυϊκής ανάπτυξης σχετίζεται με πολυάριθμους κινδύνους για την υγεία του βρέφους αργότερα στη ζωή, όπως το μεταβολικό σύνδρομο, ο διαβήτης τύπου II και οι καρδιαγγειακές παθήσεις (Valsamakīs 2006). Ενώ υπάρχουν πολυάριθμες αιτιολογίες για το περιορισμό εμβρυϊκής ανάπτυξης, συμπεριλαμβανομένης της χρόνιας νόσου της μητέρας, των χρωμοσωμικών ανωμαλιών του εμβρύου ή εμβρυϊκή μόλυνση η πλειοψηφία των περιπτώσεων είναι η ανεπάρκεια του πλακούντα (ACOG 2013). Πολλές μελέτες έχουν βρει αυξημένους δείκτες οξειδωτικού στρες και ενδείξεις υπεροξειδωσης λιπιδίων στο μητρικό και εμβρυϊκό / νεογνικό αίμα (Hsieh 2012, Kamath 2006, Karowicz-Bilinska 2002, Biri 2007, - Negi 2012), καθώς και μειωμένα επίπεδα ενζυματικών αντιοξειδωτικών στα νεογνά προσβεβλημένα από περιορισμό εμβρυϊκής ανάπτυξης (Hracsko 2008, Steller 2019).

Μελέτες δείχνουν επίσης ότι οι ασθενείς με IUGR αναπτύσσουν OS λόγω της ισχαιμίας του πλακούντα / επαναιμάτωσης δευτερογενώς σε ακατάλληλη ανάπτυξη σπειροειδούς αρτηρίας. Η τραυματισμός και η αποκατάσταση, καθώς και η ανώμαλη ανάπτυξη του λαχνικού δένδρου είναι χαρακτηριστικά του πλακούντα IUGR, προδιαθέτοντάς τους στην εξάντληση της συγκυτιοτροφοβλάστης με συνεπώς περιορισμένη ρύθμιση της μεταφοράς και της εκκριτικής λειτουργίας. Ως εκ τούτου, το οξειδωτικό στρες αναγνωρίζεται ως ένας σημαντικός παράγοντας στην ανάπτυξη του IUGR (Biri 2007, Agarwal 2012).

Οι γυναίκες με IUGR έχουν αναφερθεί ότι έχουν αυξημένη δραστικότητα ελεύθερων ριζών και δείκτες υπεροξειδωσης λιπιδίων (Karowicz-Bilinska 2004). Επιπλέον, οι Biri και συν., (2007) ανέφεραν ότι υψηλότερα επίπεδα MDA και οξειδάσης ξανθίνης και χαμηλότερα επίπεδα αντιοξειδωτικών συγκεντρώσεων στο πλάσμα, τον πλακούντα και τον ομφάλιο λώρο ασθενών με IUGR σε σύγκριση με τους μάρτυρες (Biri 2007). Η ουρική 8-οξο-7,8-διϋδρο-2-δεοξυγουανοσίνη (8-OxOdG), δείκτης της οξειδωσης του DNA, παρατηρήθηκε επίσης αυξημένη στις 12 και 28 εβδομάδες σε εγκυμοσύνες με έμβρυα περιορισμένης ανάπτυξης σε σύγκριση με ομάδα ελέγχου (Potdar 2009, Agarwal 2012).

Η ισχαιμία και ο τραυματισμός επαναιμάτωσης είναι ισχυροί παράγοντες σχηματισμού ROS και OS. Η ρυθμιστική αποπτωτική δράση της p53 (Biri 2007) αυξάνεται σημαντικά σε απόκριση σε υποξικές συνθήκες εντός των τροφοβλαστικών λαχνών (Levy 2002, Heazell 2008) και υποδηλώνει μεγαλύτερο βαθμό απόπτωσης δευτερογενώς προς την υποξία-επαναοξυγόνωση (Hung 2006) σε σχέση μόνο με την υποξία (Levy 2002). Μειώσεις στη μετάφραση και σηματοδότηση των πρωτεϊνών προστίθενται στο συντριπτικό OS σε πλακούντες IUGR (Yung 2008, Agarwal 2012).

Επιπλέον, η διαταραγμένη πρωτεϊνική μετάφραση και σηματοδότηση στον πλακούντα μπορεί επίσης να προκαλέσει στρες ενδοπλασματικού δικτύου (ER) στη συγκυτιοτροφοβλάστη και έχει παρουσιασθεί σε πλακούντες ασθενών με IUGR (Burton 2009). Το ER στρες αναστέλλει την πρωτεϊνική σύνθεση του πλακούντα, προκαλώντας τελικά απόπτωση (Yung 2008). Επιπλέον, επαγωγή των μονοπατιών p38 και NF-κρίπα Β μπορεί να συμβεί μέσω του στρες ER, επιδεινώνοντας τις φλεγμονώδεις αποκρίσεις (Uzun 2005). Η διαταραγμένη ομοιόσταση Ca²⁺ μπορεί να οδηγήσει σε διαταραγμένη αιμάτωση και να οδηγήσει σε στρες ER. Η χρονικότητα αυτών των γεγονότων μπορεί να εξηγήσει τον περιορισμό της ανάπτυξης του πλακούντα που παρατηρείται σε αυτές τις εγκυμοσύνες (Hafner 2003). Επιπλέον, η δραστικότητα της προλιδάσης στον ορό σε ασθενείς με IUGR ήταν σημαντικά αυξημένη και συσχετιζόταν αρνητικά με TAC, υποδηλώνοντας αυξημένη και μη ρυθμισμένη κυκλοφορία κολλαγόνου (Arioz 2009, Agarwal 2012).

Οξειδωτικό Στρες και Πρόωρος Τοκετός

Ο πρόωρος τοκετός (PPROM) παρουσιάζεται πριν από τις 37 εβδομάδες κύησης και αποτελεί την κύρια αιτία της περιγεννητικής νοσηρότητας και θνησιμότητας παγκοσμίως με συχνότητα μεταξύ 5% και 12% (Agarwal 2012).

Παρόλο που οι ακριβείς αιτιολογίες και ο μηχανισμός εκκίνησης του πρόωρου τοκετού παραμένουν ασαφείς, ο όρος "σύνδρομο" χρησιμοποιήθηκε από τον Romero και συν., (2006) για να περιγράψει πιθανές παθολογικές αιτιολογίες για την εμφάνιση πρόωρου τοκετού (Romero 2006, Agarwal 2012). Η αλληλουχία, συστολή της μήτρας, διαστολή του τραχήλου της μήτρας και ενεργοποίηση του φθαρτού υμένα αποτελούν τα συστατικά της μήτρας σε αυτή την οδό (Romero 2006). Ωστόσο, έχει προταθεί ότι η ενεργοποίηση αυτής της κοινής οδού μέσω φυσιολογικών σημάτων οδηγεί σε φυσιολογικό, χρονικά, τοκετό, ενώ μπορεί να συμβεί πρόωρος τοκετός από την αυθόρμητη ενεργοποίηση απομονωμένων πλευρών της κοινής οδού από την ύπαρξη παθολογικών καταστάσεων που μπορεί να προκληθούν από πολλαπλές αιτίες (Romero 1997) ή παράγοντες κινδύνου (Agarwal 2012).

Ο πρόωρος τοκετός γενικά χωρίζεται σε δύο διακριτικούς τύπους: προκαλούμενος, συνήθως λόγω μητρικών ή εμβρυϊκών λόγων, ή αυθόρμητος. Η πλειοψηφία των αυθόρμητων πρόωρων τοκετών προκύπτει από οποιαδήποτε από τις πρωτογενείς παθογόνους οδούς. Αυτές περιλαμβάνουν υπερδιέγερση της μήτρας, ισχαιμία, λοίμωξη, τραχηλική νόσο, ενδοκρινικές διαταραχές (Romero 2006), αιμορραγία του φθαρτού υμένα και ενεργοποίηση μητρικού-εμβρυϊκού άξονα υποθάλαμου-υπόφυσης, μεταξύ άλλων (Behrman 2009). Από αυτές τις αιτιολογίες, η ενδομήτρια μόλυνση και η φλεγμονή θεωρούνται ως κύριος παράγοντας της πρόωρης γέννησης (Norman 2007). Αυτοί οι παθογόνοι μηχανισμοί συγκλίνουν σε μια κοινή οδό που περιλαμβάνει αυξημένη έκφραση πρωτεάσης και μητροτονίνης. Μπορούν να πραγματοποιηθούν περισσότερες από μία διαδικασίες σε μια γυναίκα. Ο συνδυασμός της γενετικής και των φλεγμονωδών αποκρίσεων είναι ένας ενεργός τομέας έρευνας που μπορεί να εξηγήσει τον πρόωρο τοκετό σε μερικές γυναίκες με κοινούς παράγοντες κινδύνου (Challis 2001, ACOG 2010, Agarwal 2012).

Ο τοκετός προκαλεί μεταβολές στις χοριοαμνιακές μεμβράνες οι οποίες συμφωνούν με εντοπισμένες οξειές φλεγμονώδεις αποκρίσεις, παρά την απουσία ιστολογικών ενδείξεων φλεγμονής (Haddad 2006). Τα ενεργά είδη οξυγόνου ενεργοποιούν το NF-κάπα Β, το οποίο διεγείρει την έκφραση COX-2 και προάγει τη φλεγμονή με επακόλουθο τον τοκετό. Δεδομένα υποδεικνύουν ότι η κατάσταση του τοκετού, είτε πρόωρου είτε προκαλούμενη με όρο, απαιτεί τις δράσεις της GPx να περιορίσει την οξείδωση των λιπιδίων και συνδέεται με μια μείωση της αντιοξειδωτικής άμυνας που προκαλείται από τα ROS. (Khan 2010, Agarwal 2012).

Η πρόωρη ρήξη εμβρυικών υμένων φέρει κινδύνους μόλυνσης από τη μητέρα και το έμβρυο, τον πρόωρο τοκετό (PTD) και τους κινδύνους νεογνικής πρόωρης νόσου σε περίπτωση εμφάνισης PTD (Kuba 2018). Η έλλειψη δεδομένων που διερευνούν αυτόν τον σύνδεσμο υπάρχει, ωστόσο, τα *in vitro* μοντέλα που περιλαμβάνουν την έκθεση χόριοαμνίου στο υπεροξειδίο έχουν φανερώσει ότι προκαλούν αυξημένη ρύθμιση της μεταλλοπρωτεΐνης-9 μήτρας και πολλών φλεγμονωδών κυτοκινών που προδιαθέτουν σε PPRM (Buhimschi 2000). Η παραγωγή αντιδραστικών ειδών οξυγόνου, προσταγλανδινών, προφλεγμονωδών κυτοκινών και πρωτεασών έχει εμπλακεί στην έναρξη του πρόωρου τοκετού (Lappas 2003). Το οξειδωτικό στρες παίζει ρόλο στην αιτιολογία της χοριοαμνιώσεως (CAM). Στην CAM, υπάρχει αυξημένη δραστηριότητα NADP (H) οξειδάσης - ένα ένζυμο που παράγει ROS. Η CAM είναι η κύρια αιτία πρόωρου τοκετού και προκαλεί την επαγωγή σύνθεσης του ενζύμου COX-2 (κυκλοοξυγενάση-2) του πλακούντα και τη σύνθεση προσταγλανδίνης (Temma 2004). Μία μελέτη ανέφερε ότι 4 υδροξυενάλιο συσχετίστηκε με αυξημένη έκφραση COX-2 και προσταγλανδίνης E2 στον πλακούντα. Η υδροξυενάλη είναι ένας δείκτης οξειδωτικού στρες. Οι μεταλλοπρωτεΐνες είναι μια ομάδα ενζύμων ενδοπεπτιδάσης με κολλαγονωτική δραστηριότητα και ενεργοποιούνται σε πρόωρες ρήξεις μεμβρανών. Η οξειδοαναγωγική ισορροπία προσδιορίζει τη δραστηριότητα μεταλλοπρωτεΐνης των αμνοχωριονικών μεμβρανών (Buhimschi 2000). Η δραστηριότητα μεταλλοπρωτεΐνης βρέθηκε να αυξάνεται άμεσα με ανιόν υπεροξειδίου, ένα υποπροϊόν μακροφάγων και ουδετερόφιλων (Buhimschi 2000, Gupta 2009).

Ο πρόωρος τοκετός έχει συσχετιστεί με τη χοριοαμνιονίτιδα και η ιστολογική μόλυνση βρέθηκε ότι σχετίζεται με την αυξημένη έκφραση mRNA του Mn-SOD σε εμβρυϊκές μεμβράνες γυναικών σε πρόωρο τοκετό (Than 2009). Οι αυξημένες εκφράσεις Mn-SOD mRNA μπορεί να είναι αντισταθμιστική απόκριση στην παρουσία αυξημένου OS και φλεγμονή σε πρόωρο τοκετό (Agarwal 2012). Η φλεγμονή προκαλεί την ρύθμιση των ROS και μπορεί να προκαλέσει εμφανές OS, με αποτέλεσμα τραυματισμό ιστού και επακόλουθο πρόωρο τοκετό (Chadha 2007). Η συγκέντρωση του Mn-SOD αυξάνεται ως προστατευτική απόκριση στη φλεγμονή και στο OS και ρυθμίζει προς τα κάτω τις οδούς NF-κρίπα Β, ενεργοποιητή πρωτεΐνης-1 και MAPK (Oberley 2005). Συνεπώς, υψηλότερη έκφραση mRNA του Mn-SOD παρατηρήθηκε στις εμβρυϊκές μεμβράνες των γυναικών σε πρόωρο τοκετό σε σχέση με τις γυναίκες σε αυθόρμητο τοκετό σε φυσιολογικό χρόνο, γεγονός που μπορεί να υποδηλώνει μεγαλύτερη έκταση OS και φλεγμονώδεις διεργασίες στο πρώτο (Than 2009, Agarwal 2012).

Συγκεκριμένα, σημαντικές υψηλότερες ποσότητες των προ-φλεγμονωδών κυτοκινών IL-1 βήτα, IL-6 και IL-8, έχουν παρατηρηθεί στο αμνιο και χόριο ασθενών σε πρόωρο τοκετό παρά σε γυναίκες σε αυθόρμητο τοκετό σε φυσιολογικό χρόνο. Αυτά τα ευρήματα

υποστηρίζουν την ενεργοποίηση της φλεγμονώδους απόκρισης της μεμβράνης των γυναικών σε πρόωρο τοκετό (Keelan 1999, Agarwal 2012).

Οι Mustafa και συν., (2010) ανίχνευσαν αξιοσημείωτα υψηλότερα επίπεδα MDA και 8-OHdG και σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα GSH στο μητρικό αίμα των γυναικών με πρόωρο τοκετό σε σχέση με τις γυναίκες που γέννησαν σε φυσιολογικό χρόνο (Mustafa 2010). Αυτό το εύρημα υποδεικνύει ότι οι γυναίκες στον πρόωρο τοκετό έχουν μειώσει τις αντιοξειδωτικές ικανότητες για να υπερασπιστούν τις βλάβες που προκλήθηκαν από το OS. Επιπλέον, μειωμένες δραστηριότητες του FRAP, ένας προσδιορισμός που μετρά την ικανότητα του ατόμου να αντιμετωπίσει την οξειδωτική βλάβη, και η GST έχουν επίσης βρεθεί σε γυναίκες με πρόωρο τοκετό (Mustafa 2010, Pathak 2010, Hong 2002, Frosali 2004). Τα αποτελέσματα υποστηρίζουν περαιτέρω ότι ένα μητρικό περιβάλλον αυξημένου οξειδωτικού στρες και μειωμένων αντιοξειδωτικών καθιστά τόσο τη μητέρα όσο και το έμβρυο πιο ευαίσθητους στις βλάβες που προκαλούνται από την ROS (Agarwal 2012).

Οι γυναίκες με πρόωρες γεννήσεις έχουν επίσης βρεθεί ότι έχουν σημαντικά μειωμένη δραστικότητα παραοξονάσης-1 (PON-) σε σύγκριση με τους μάρτυρες (Baker 2010). Αυτό το εύρημα υποδηλώνει ότι η ενισχυμένη υπεροξειδωση των λιπιδίων και η μειωμένη αντιοξειδωτική δράση του PON-1, μπορούν να δημιουργήσουν από κοινού μια προ-οξειδωτική ρύθμιση και να αυξήσουν τον κίνδυνο πρόωρου τοκετού. Επιπρόσθετα, οι ασθενείς σε πρόωρο τοκετό είχαν σημαντικά μειωμένα επίπεδα GSH (Lee 2011). Τα χαμηλά επίπεδα σεληνίου του μητρικού ορού κατά την πρώιμη κύηση έχουν συσχετιστεί με την πρόωρη γέννηση (Rayman 2011). Ο πολυμορφισμός στο GST βρέθηκε να είναι σημαντικά υψηλότερος σε ασθενείς σε πρόωρο τοκετό, υποδεικνύοντας ότι αυτοί οι ασθενείς είναι πιο ευάλωτοι σε οξειδωτική βλάβη (Mustafa 2010).

Οι παρουσιαζόμενες ενδείξεις εμπλέκουν την φλεγμονή και την καταστολή των αντιοξειδωτικών αμυντικών στην παθογένεση του πρόωρου τοκετού. Επομένως, φαίνεται πιθανό ότι η αντιοξειδωτική συμπλήρωση μπορεί να βοηθήσει στην πρόληψη του πρόωρου τοκετού και της γέννησης που σχετίζεται με τη φλεγμονή. Λόγω των αντικρουόμενων αποτελεσμάτων των μελετών, δεν είναι σαφές εάν η μητρική αντιοξειδωτική συμπλήρωση παίζει κάποιο ρόλο στην πρόληψη της εμφάνισης του πρόωρου τοκετού (Agarwal 2012).

Οξειδωτικό Στρες και Σακχαρώδης Διαβήτης κύησης

Ο σακχαρώδης διαβήτης κύησης (GDM) είναι μια κατάσταση κατά την οποία οι εγκυμονούσες ασθενείς χωρίς προηγούμενο διαβήτη θα αναπτύξουν ανοχή στην ινσουλίνη και δυσανεξία στη γλυκόζη. Η αρχική θεραπεία περιλαμβάνει αλλαγές στη διατροφή,

συμπεριλαμβανομένου του ύπνου και της σωματικής άσκησης, ωστόσο, το συντομότερο απαιτεί ιατρική φροντίδα ή / και ινσουλίνη. Επιπλέον, το GDM φέρνει πολυάριθμους κινδύνους εγκυμοσύνης τόσο στη μητέρα όσο και στο έμβρυο και είναι ένας σημαντικός παράγοντας κινδύνου για την ανάπτυξη του σακχαρώδους διαβήτη μετά τον τοκετό (Gynecologists A.C.O.O 2017). Αμφότερες οι ενδείξεις αυξημένης υπεροξειδωσής λιπιδίων και αυξημένης δραστηριότητας / έκφρασης αντιοξειδωτικών έχουν βρεθεί σε ασθενείς που έχουν προσβληθεί από GDM, προκαλώντας ανησυχία για οξειδωτικό στρες ως πιθανό παράγοντα κινδύνου ή αιτιολογίας του GDM (Coughlan 2004, Al-Shebly 2012, Lappas 2010, Steller 2019).

Οι αυξημένες συγκεντρώσεις αντιδραστικών ουσιών του θειοβαρβιτουρικού οξέος (TBARS) και τα μειωμένα αντιοξειδωτικά ένζυμα δηλ. Υπεροξειδίου δισμουτάσης χαλκού (Cu ZnSOD)), καταλάση και υπεροξειδάση γλουταθειόνης ανιχνευθήκαν σε αιμολυμένα ερυθροκύτταρα από ασθενείς με διαβήτη κύησης (Djordjevic 2004). Οι παράμετροι οξειδωτικού στρες, η TBARS και η αντιοξειδωτική ικανότητα μετρήθηκαν και στα τρία τρίμηνα της εγκυμοσύνης (85, Peuchant 2004). Μια μεγάλη μελέτη σε 70 ασθενείς με διαβήτη έδειξε μια συσχέτιση μεταξύ φτωχών αποτελεσμάτων του εμβρύου και αυξημένων επιπέδων υπεροξειδίου και μειωμένης αντιοξειδωτικής ικανότητας (Wender-Ozegowska 2004). Σε μια ημι-τυχαίοποιημένη ελεγχόμενη δοκιμή για τη συμπλήρωση αντιοξειδωτικών κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης χρησιμοποιήθηκε ποσοστό ανταλλαγής αδελφών χρωματίδων (SCE) ως δείκτης της βλάβης του DNA. Η ομάδα δοκιμής που έλαβε τη συμπλήρωση πολυβιταμινών / ανόργανων συστατικών έδειξε μείωση των ρυθμών SCE μετά από 10 εβδομάδες συμπλήρωσης (Park 1999). Ο Park και συν., έδειξε τα οφέλη της αντιοξειδωτικής συμπλήρωσης με αποτέλεσμα τη μείωση της βλάβης του DNA (Park 1999). Ο εξαιρετικός γλυκαιμικός έλεγχος κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης μπορεί να βοηθήσει στη μείωση των επιπέδων οξειδωτικού στρες που συνδέονται με τον διαβήτη (Gurta 2009).

Κεφάλαιο 6ο

Παράγοντες που Διέπουν τη Υπογονιμότητα & Οξειδωτικό Στρες

Ηλικία

Η ηλικία είναι ένας ζωτικός παράγοντας για τη υπογονιμότητα, καθώς η γονιμότητα μειώνεται με την αύξηση της ηλικίας της μητέρας. Η πατρική ηλικία είναι επίσης σημαντική όσον αφορά τη γονιμότητα, την ποιότητα των γαμετών, τα αυξημένα επίπεδα οξειδωτικής βλάβης του DNA (ODD) και τη μείωση της ποιότητας του σπέρματος. (Bisht 2017, Crow 2000, Banerjee 2019). Η υπογονιμότητα που σχετίζεται με την ηλικία έχει συνδεθεί με βλάβη στο DNA, όπου η ηλικία συσχετίζεται θετικά με τον κατακερματισμό του DNA (Das 2013, Hammiche 2011, Rybar 2011, Wright 2014). Αρκετές μελέτες έχουν αναφέρει ότι η βλάβη στο DNA του σπέρματος αυξάνεται καθώς προχωρά η ηλικία τόσο στους γόνιμους (Wyrobek 2006) όσο και στους υπογόνιμους άντρες (Singh 2003, Moskovtsev 2006). Είναι πιθανό η αύξηση της οξειδωτικής βλάβης του DNA του σπέρματος να είναι η υποκείμενη παθολογία. Μια μεγάλη μελέτη παρατήρησης επιβεβαίωσε ότι το συστηματικό οξειδωτικό στρες αυξάνεται με την ηλικία (Junqueira 2004, Tremellen 2008).

Με την αύξηση της ηλικίας του άνδρα, τα κύτταρα Leydig καταστρέφονται οξειδωτικά λόγω της υπερβολικής παραγωγής ενδογενούς ROS και της μειωμένης συγκέντρωσης και δραστηριότητας των αντιοξειδωτικών ενζύμων (Fujii 2003). Ως αποτέλεσμα της υπερβολικής παραγωγής ROS, πραγματοποιούνται οξειδωτικές τροποποιήσεις του DNA και αλλοιώσεις στο δυναμικό των μιτοχονδριακών μεμβρανών που απαιτούνται για τη σύνθεση τεστοστερόνης (Allen 2006, Chen 2010). Παράλληλα με αυτές τις αλλαγές, εμφανίζεται μια αύξηση της ευαισθησίας της LH λόγω της μείωσης των υποδοχέων LH ανά κύτταρο και της μειωμένης ικανότητας της LH να ενεργοποιεί στεροειδογενή ρυθμιστική πρωτεΐνη (StAR), η οποία μεταφέρει χοληστερόλη από την εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη στο εσωτερικό, (Veldhuis 1999, Diemer 2003). Έτσι, η υπερπαραγωγή του ROS μπορεί να παίζει ρόλο στον εκφυλισμό των όρχεων που σχετίζεται με την ηλικία που σχετίζεται με την ανδρική υπογονιμότητα (Koksal 2003). Τα στεροειδογενή βήματα που ρυθμίζονται από τα ένζυμα P450 είναι οι πιο πιθανές θέσεις δράσης ROS (Hanukoglu 2006, Peltola 1996). Η FSH και η ανθρώπινη χοριακή γοναδοτροπίνη (hCG) έχουν αναφερθεί ότι διεγείρουν κυτταρικούς μεταβολισμούς που παράγουν ROS που επηρεάζουν τις διαδικασίες διαφοροποίησης στα γεννητικά κύτταρα (Koksal 2003, Perheentupa 1993). Επιπλέον, μετά την παραγωγή ROS, μειώνονται οι δραστηριότητες πολλών ενζύμων της βιοσυνθετικής οδού τεστοστερόνης, με αποτέλεσμα περαιτέρω μείωση της σύνθεσης και της έκκρισης τεστοστερόνης (Aitken 2008, Chigurupati 2008, Darbandi 2018).

Σωματικό βάρος

Από μελέτες έχει φανεί πως οι παχύσαρκες γυναίκες γενικά χρειάζονται περισσότερο χρόνο για να συλλάβουν και έχουν υψηλότερο κίνδυνο αποβολής (Metwally M2007). Η παχυσαρκία έχει συσχετιστεί με πολλές παθολογίες αναπαραγωγής, συμπεριλαμβανομένου του σακχαρώδους διαβήτη κύησης, της προεκλαμψίας και του PCOS, επηρεάζει αρνητικά τη γονιμότητα και την εγκυμοσύνη, προκαλεί επιπλοκές κατά τον τοκετό και εμβρυϊκές επιπλοκές (Abenhaim 2007, Agarwal 2012). Η παθογένεση της παχυσαρκίας σχετίζεται στενά με την υπερβολική παραγωγή ROS, δημιουργώντας έτσι οξειδωτικό στρες (Gurta 2009, Bloomer 2009). Ως εκ τούτου, το υπερβολικό βάρος μπορεί να περιπλέξει τα προβλήματα εγκυμοσύνης, τόσο από την άποψη της μητέρας όσο και της υγείας του εμβρύου. Επίσης, το δυσλειτουργικό ορμονικό σύστημα και η ακανόνιστη έμμηνος ρύση, είναι γνωστό ότι συνδέονται στενά με το υπερβολικό βάρος ή την παχυσαρκία ή το χαμηλό βάρος (Herrero-Mercado 2011, Banerjee 2019).

Το σπλαχνικό λίπος συνδέεται με διαταραγμένο μεταβολισμό και κατάσταση αδιποκίνης, μαζί με αντίσταση στην ινσουλίνη. Οι εναποθέσεις λίπους που είναι κεντρικά αποθηκευμένες είναι επιρρεπείς σε υπερχειλίση λιπαρών οξέων, ασκώντας έτσι λιποτοξικές επιδράσεις στην αναπαραγωγική ικανότητα των γυναικών (Igosheva 2010). Η συσσώρευση ενδοκυτταρικού λίπους μπορεί να διαταράξει τη μιτοχονδριακή λειτουργία, προκαλώντας συσσώρευση και επακόλουθη διαρροή ηλεκτρονίων από την αναπνευστική αλυσίδα. Η συνδυασμένη επίδραση των υψηλών επιπέδων λιπιδίων και του οξειδωτικού στρες διεγείρει την παραγωγή οξειδωμένων λιπιδίων, ιδιαίτερης σημασίας είναι τα υπεροξειδία των λιπιδίων, οι οξειδωμένες λιποπρωτεΐνες και οι οξυστερόλες. Οι ανεπιθύμητες ενέργειες του μητρικού δείκτη μάζας σώματος (ΔΜΣ) στα μιτοχόνδρια των ωαρίων θα μπορούσαν να επηρεάσουν αρνητικά τον εμβρυϊκό μεταβολισμό (Agarwal 2012).

Τα αυξημένα επίπεδα μη εστεροποιημένων λιπαρών οξέων στο πλάσμα μπορούν να προκαλέσουν το σχηματισμό της ρίζας νιτροξειδίου. Ως γνωστός φλεγμονώδης μεσολαβητής, το oxLDL μπορεί έμμεσα να μετρήσει το οξειδωτικό στρες που προκαλείται από λιπίδια, διευκρινίζοντας έτσι το ρόλο του στη φλεγμονώδη κατάσταση της παχυσαρκίας (Mistry 2011). Η παραγωγή οξυστερόλης σε λιποτοξικό περιβάλλον μπορεί δυνητικά να διαταράξει την ανάπτυξη του πλακούντα και τη λειτουργία των παχύσαρκων κυήσεων (Jarvie 2010). Η κατανάλωση γεύματος με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά έχει φανεί ότι αυξάνει τα επίπεδα τόσο των κυκλοφορούντων ενδοτοξινών όσο και των δεικτών ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας (Jarvie 2010, Basu 2011, DiBaise 2008). Η υπερβολική διατροφή μπορεί να παράγει ένα δυσμενώς πλούσιο αναπαραγωγικό περιβάλλον, που οδηγεί σε τροποποιημένο μεταβολισμό των ωαρίων και παρεμποδίζει την ανάπτυξη των εμβρύων (Igosheva 2010). Μια μελέτη των Bloomer και συν., (2009) διαπίστωσε μεγαλύτερη αύξηση της μεταγευματικής

MDA σε παχύσαρκες γυναίκες σε σχέση με αυτές φυσιολογικού βάρους (Bloomer 2009, Agarwal 2012). Η χαμηλή ποιότητα των ωαρίων έχει επίσης παρατηρηθεί σε παχύσαρκα θηλυκά. Πιο συγκεκριμένα, τα επίπεδα του CRP στο ωοθυλακικό υγρό (FF) παρατηρήθηκαν ότι ήταν ασυνήθιστα υψηλά (Anderson 2010). Η επακόλουθη διαταραχή της ανάπτυξης των ωαρίων μπορεί να επηρεάσει την ποιότητα των ωαρίων και ίσως τη γενική λειτουργία των ωοθηκών.

Η συσχέτιση μεταξύ του νιτροποιητικού στρες του πλακούντα από την αλλοιωμένη απελευθέρωση του αγγειακού ενδοθηλιακού NO και του υψηλού μητρικού ΔΜΣ (Robker 2009) μπορεί να οφείλεται σε ανισορροπίες οξειδωτικού και νιτρικού στρες, που μπορεί να εξασθενήσουν την προστασία στον πλακούντα (Higashi 2003). Τα αποτελέσματα από τους Ruder και συν., (2009) υποστήριξαν τη συσχέτιση του αυξημένου σωματικού βάρους της μητέρας και του αυξημένου νιτροσικού στρες, αλλά δεν έδειξαν σχέση με το οξειδωτικό στρες του πλακούντα (Ruder 2009).

Η παχυσαρκία σχετίζεται με την υπογονιμότητα ανδρικού παράγοντα και τις μη φυσιολογικές παραμέτρους του σπέρματος κυρίως λόγω ορμονικών εκτροπών και συχνότητας αρνητικών παραγόντων του τρόπου ζωής (Du Plessis 2010, Hammoud 2008). Η βλάβη του DNA έχει επίσης διερευνηθεί σε πολλές μελέτες παχύσαρκων ανδρών. Μία μελέτη 305 υπογόνιμων ανδρών (n= 36 παχύσαρκοι) έδειξε σημαντική αύξηση στον κατακερματισμό του DNA, στους παχύσαρκους (Fariello 2012a). Η ανάλυση σε άνδρες υπογόνιμων ζευγαριών έδειξε επίσης υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης σπερματοζωαρίων με κατακερματισμό DNA σε παχύσαρκους άνδρες (Chavarro 2010, Dupont 2013). Μια μελέτη 520 ανδρών που παρουσίασαν ανάλυση σπέρματος κατέδειξε θετική συσχέτιση μεταξύ δείκτη μάζας σώματος και DFI (Kort 2006). Τέλος, μια μελέτη φυσιολογικών εθελοντών από τον γενικό πληθυσμό (n = 50 παχύσαρκοι) επιβεβαίωσε επίσης τη σχέση μεταξύ του δείκτη μάζας σώματος και της βλάβης του DNA (La Vignera 2012, Wright 2014).

Η παχυσαρκία παράγει οξειδωτικό στρες με απελευθέρωση προ-φλεγμονώδους κυτοκίνης που αυξάνει την παραγωγή λευκοκυτταρών (Singer & Granger 2007). Επιπλέον, η συσσώρευση λιπώδους ιστού στην περιοχή της βουβωνικής περιοχής οδηγεί σε θέρμανση του όσχεος που έχει συνδεθεί με οξειδωτικό στρες και μειωμένη ποιότητα σπέρματος (Banks 2005, Ishii 2005, Perez-Crespo 2007, Tremellen 2008).

Η παχυσαρκία είναι μια πολύπλοκη διαταραχή της υγείας που επηρεάζει σοβαρά την ορμονική ισορροπία (Korelman 1994). Η παχυσαρκία διαταράσσει τα επίπεδα της λεπτίνης στον ορό (Ahima 2008), γκρελίνη (Álvarez-Castro 2013), αδιπονεκτίνη (Kawano 2009), ορεξίνη (Perez-Leighton 2013), οιστατίνη (Ren 2009) και άλλα προφίλ μεταβολικών ορμονών (Korelman 1994). Σύμφωνα με πληροφορίες, η λεπτίνη συσχετίζεται θετικά με τη μάζα

σωματικού λίπους και η δημιουργία ROS που προκαλείται από λεπτίνη σε ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα προκύπτει από αυξημένη οξειδωση μιτοχονδριακών λιπαρών οξέων (Bouloumie 1999, Yamagishi 2001). Η ενεργοποίηση του άξονα HPG θα μπορούσε να ενισχυθεί με λεπτίνη και έτσι να διεγείρει την απελευθέρωση των GnRH, FSH και LH (Wauters 2000). Επιπλέον, η λεπτίνη μπορεί να επηρεάσει άμεσα τις γονάδες λόγω των ισομορφών του υποδοχέα της στον γοναδικό ιστό (Wauters 2000). Αν και η επίδραση της γκρελίνης στο επίπεδο της τεστοστερόνης στον ορό είναι αμφισβητούμενη (Ishikawa 2007, Wang 2011, Greenman 2009), αναφέρεται ότι οι υποδοχείς γκρελίνης υπάρχουν στους όρχεις και ότι η γκρελίνη παίζει βασικό ρόλο στην παραγωγή τεστοστερόνης, αλλά όχι άμεσα στην σπερματογένεση (Ishikawa 2007). Τα αυξημένα επίπεδα ROS φαίνεται να προκαλούν αυξημένα επίπεδα γκρελίνης (Suzuki 2010) που μπορεί, με τη σειρά τους, να οδηγήσουν σε παχυσαρκία και περαιτέρω παραγωγή ROS. Το επίπεδο της αδιπονεκτίνης στον ορό συσχετίζεται αρνητικά τόσο με την τεστοστερόνη (Page 2005) όσο και με την παραγωγή ROS (Yuan 2012). Η ωρεξίνη (υποκριτίνη) είναι γνωστό ότι διεγείρει την παραγωγή τεστοστερόνης ενισχύοντας τις δραστηριότητες των στεροειδών ενζύμων στα κύτταρα Leydig (Zheng 2014). Αναφέρεται επίσης ότι μετριάζει την προκαλούμενη από ROS κυτταρική βλάβη (Duffy 2016, Darbandi 2018).

Οι μεταβολικές ορμόνες είτε άμεσα είτε έμμεσα μειώνουν το προφίλ ανδρογόνων στους άνδρες. Η περίπλοκη συνομιλία μεταξύ αυτών των ορμονών διακόπτεται στην παχυσαρκία, προκαλώντας έτσι μια μαζική εξόντωση του ορμονικού περιβάλλοντος, η οποία με τη σειρά της επηρεάζει τις αρσενικές αναπαραγωγικές λειτουργίες. (Aggerholm 2008, Al-Ali 2014, Darbandi 2018).

Οι συγκεντρώσεις 8-OHdG και MDA σηματοδοτούν συνήθως OS και είναι εντυπωσιακά αυξημένες τόσο σε χαμηλό ΔΜΣ όσο και σε παχύσαρκες γυναίκες σε σύγκριση με εκείνες με φυσιολογικό ΔΜΣ. Συγκεκριμένα, το 8-OHdG παράγεται μέσω αλληλεπίδρασης ρίζας υδροξυλίου με το DNA, και είναι πολύτιμο για την ανίχνευση της οξειδωτικής βλάβης του DNA (Higashi 2003, Agarwal 2012).

Οι αριθμοί των αρχέγονων, οι δευτερογενών και οι κοιλοτικών ωοθυλακίων μειώνονται σημαντικά σε σχέση με τα χρονικά διαστήματα περιορισμένης έκθεσης σε θρεπτικά συστατικά. Η ανεπαρκής μητρική διατροφή, ειδικά κατά τη διάρκεια κρίσιμων περιόδων εμβρυϊκής ανάπτυξης, εκδηλώνεται ως συνολική αύξηση του οξειδωτικού στρες των ωοθηκών, η οποία, μαζί με μειωμένη μιτοχονδριακή αντιοξειδωτική άμυνα, μπορεί να είναι υπεύθυνη για αυτούς τους σημαντικά μειωμένους αριθμούς ωοθυλακίων και την επακόλουθη ανάπτυξη του εμβρύου (Bernal 2010).

Η ανεπαρκής μητρική διατροφή κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής περιόδου επηρεάζει δυσμενώς την ανάπτυξη του εμβρύου, θέτοντας σε έγκυο γυναίκα τον κίνδυνο για βρέφος με χαμηλό βάρος γέννησης και πιθανή ενδοθηλιακή δυσλειτουργία (Higashi 2003). Ο υποσιτισμός εντός της μήτρας μειώνει τη συγκέντρωση NO, ενεργοποιώντας το οξειδωτικό στρες μαζί με την εξασθένηση της αγγειοδιαστολής που εξαρτάται από το ενδοθήλιο. Στα τρωκτικά, η έκθεση κυοφορίας σε περιορισμό θερμίδων και πρωτεϊνών είχε ως αποτέλεσμα χαμηλό βάρος γέννησης απογόνων (Higashi 2003). Η δραστικότητα του SOD βρέθηκε να μειώνεται με επακόλουθη αύξηση του ανιόντος SO στους απογόνους των υποσιτισμένων τρωκτικών, γεγονός που δείχνει επίσης μειωμένο σχηματισμό του H₂O₂. Τα αυξημένα επίπεδα ανιόντων SO διεγείρουν επίσης την απομάκρυνση του NO και την κυτταρική βλάβη που σχετίζονται με τη δυσλειτουργία του ενδοθηλίου (Franco 2004, Agarwal 2012).

Άσκηση

Η σωματική άσκηση παράγει μια οξειδωτική κατάσταση λόγω της υπερβολικής παραγωγής ROS. Οποιοσδήποτε τύπος ακραίας αερόβιας ή αναερόβιας δραστηριότητας (π.χ. τρέξιμο μαραθωνίου, προπόνηση με βάρη) μπορεί να συμβάλει στην κυτταρική βλάβη (Agarwal 2012). Σε αντίθεση με την τακτική άσκηση που ενισχύει τις αντιοξειδωτικές άμυνες στο σώμα, η ασυνήθιστη ή / και η εξαντλητική άσκηση μπορεί να οδηγήσει στην ανεπιθύμητη δημιουργία υπερβολικού ROS (Adefuye 2016, Darbandi 2018). Οι βέλτιστες ποσότητες οξειδωτικού στρες είναι απαραίτητες για τη φυσιολογική λειτουργία. Η σωματική δραστηριότητα προκαλεί αύξηση του ROS, το οποίο με τη σειρά του αυξάνει την αντιοξειδωτική απόκριση, παρέχοντας έτσι προστασία από μελλοντικές επιθέσεις (Fisher-Wellman 2009). Οι Leelarungrayub και συν., (2010) διαπίστωσαν ότι η αερόβια άσκηση μπορεί να αυξήσει το TAC και να μειώσει τα επίπεδα MDA, οδηγώντας σε καλύτερη φυσική κατάσταση γυναίκες με προηγούμενη καθιστική ζωή (Leelarungrayub 2011). Σε ένα μοντέλο τρωκτικών, τα αυξανόμενα επίπεδα άσκησης συνδέονται με μείωση του αριθμού και της κινητικότητας του σπέρματος και αντίστοιχη αύξηση των βιοχημικών σημείων του οξειδωτικού στρες των όρχεων (Manna 2004).

Αν και οι ακριβείς μηχανισμοί οξειδοαναγωγής παραμένουν αόριστοι, φαίνεται ότι τα μιτοχόνδρια, η οξειδάση NADPH (NOX) και η οξειδάση ξανθίνης (XO) είναι οι κύριες ενδογενείς πηγές ROS στον σκελετικό μυ (Adefuye 2016, Darbandi 2018).

Παράγοντες τρόπου ζωής

Ο 21ος αιώνας επιβαρύνεται με μια απότομη αύξηση στη χρήση πολλών ουσιών κατάχρησης. Αυτό το πρόβλημα επηρεάζει σημαντικά τις νεότερες γενιές, που βρίσκονται σε αναπαραγωγική ηλικία. Το κάπνισμα, η χρήση αλκοόλ και η ψυχαγωγική χρήση ναρκωτικών έχουν εμπλακεί στην παθογένεση αναπαραγωγικών μηχανισμών, οδηγώντας σε αυξημένους χρόνους σύλληψης και υπογονιμότητα (Wells 2005). Οι ανεπιθύμητες ενέργειες του καπνίσματος και του αλκοόλ στα αποτελέσματα των γεννήσεων έχουν τεκμηριωθεί καλά και τα αυξανόμενα στοιχεία δείχνουν ότι η έκθεση σε οποιοδήποτε από αυτά μπορεί να καθυστερήσει το χρόνο σύλληψης πιθανώς μέσω της αύξησης του οξειδωτικού στρες. Ο καπνός τσιγάρου περιέχει έναν αριθμό ROS και ο μεταβολισμός της αιθανόλης δημιουργεί ROS μέσω της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων, αν και υπάρχουν άλλοι μηχανισμοί που σχετίζονται με την υπογονιμότητα και αυτές οι εκθέσεις υπάρχουν (Rudera 2009).

Αλκοόλ

Η κατανάλωση αλκοόλ οδηγεί στην παραγωγή μεταβολιτών όπως ρίζες ακετυλίου και μεθυλίου, υπεύθυνοι για την παραγωγή ROS. Η τακτική κατανάλωση αλκοόλ, ενεργοποιεί την υπεροξειδωση των λιπιδίων και μειώνει την αντιοξειδωτική δράση του SOD μαζί με τα επίπεδα GSH, αυξάνοντας έτσι το επίπεδο ROS στο πλάσμα της εγκύου μητέρας. (Wu και Cederbaum, 2003, Koch 2004) Ως εκ τούτου, η χρήση αλκοόλ μπορεί συνεπώς να οδηγήσει σε περιορισμό ενδομήτριας ανάπτυξης (IUGR), χαμηλό βάρος γέννησης, αυξημένο κίνδυνο συγγενούς διαταραχής, απώλεια πρόωρης εγκυμοσύνης και αυθόρμητη άμβλωση (Agarwal 2012, Kovacic 2005).

Η πρωτογενής απομάκρυνση της αιθανόλης (EtOH) πραγματοποιείται μέσω ενός οξειδωτικού μηχανισμού μέσω του ηπατικού μεταβολισμού (Deng 2007). Κατά την κατάποση, το αλκοόλ υφίσταται αφυδρογόνωση σε ακεταλδεΐδη (Kovacic 2005, Toda 2010). Μετέπειτα περαιτέρω αφυδρογόνωση ακεταλδεΐδης παράγει οξικό οξύ με ρίζες ακετυλίου και μεθυλίου. Αυτοί οι μεταβολίτες είναι υπεύθυνοι για την παραγωγή ROS. Η τακτική χρήση αλκοόλ οδηγεί έτσι σε υπερπαραγωγή ROS, προκαλώντας υπεροξειδωση λιπιδίων και μείωση της αντιοξειδωτικής δράσης SOD και μείωση των επιπέδων GSH. Αυτή η τοξικότητα θεωρείται ότι προκαλείται κυρίως από ακεταλδεΐδη και πιθανώς διαδίδει την ανακύκλωση του κύκλου και την καταλυτική παραγωγή οξειδωτικού στρες (Kovacic 2005).

Εκτός από τις δυσμενείς επιπτώσεις του αλκοόλ στην εγκυμοσύνη, η κατανάλωση αλκοόλ μπορεί να επηρεάσει αρνητικά το χρόνο έως την εγκυμοσύνη. Η μέτρια κατανάλωση αλκοόλ σχετίζεται με μειωμένη συγκέντρωση αντιοξειδωτικών στο πλάσμα και αυξημένη

συγκέντρωση ισοπροστανών σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες (Hartman 2005). Μια παρόμοια αύξηση του οξειδωτικού στρες πιθανότατα συμβαίνει σε γυναίκες που προσπαθούν να συλλάβουν ως συνδυασμός υπεροξειδωσης λιπιδίων, οξειδωσης πρωτεΐνης και βλάβης στο DNA (Rudera 2009). Ακόμη και η μέτρια χρήση αλκοόλ κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης μπορεί να οδηγήσει σε IUGR και χαμηλό βάρος γέννησης και να αυξήσει τον κίνδυνο για συγγενείς ανωμαλίες. Η πρόωρη απώλεια εγκυμοσύνης και η αυθόρμητη άμβλωση αποδίδονται επίσης έντονα στην έκθεση του εμβρύου στη χρήση αλκοόλ από την μητέρα (Ornoy 2007).

Το οξειδωτικό στρες που προκαλείται πιθανώς από το μεταβολισμό EtOH (Sun 2001, Zima 2001) μπορεί να διεγείρει τα στάδια οξειδωσης της αντίδρασης Maillard για να αυξήσει την παραγωγή τελικών προϊόντων προηγμένης γλυκοζυλίωσης (AGE), τα οποία όταν συσσωρεύονται, θεωρούνται τοξικά (Spiteller 2008). Η συσσώρευση AGE σχετίζεται με έντονη ρύθμιση των αντιοξειδωτικών ενεργειών (Manzocco 2001). Όταν το AGE δεσμεύεται με τον υποδοχέα του, το RAGE, παράγεται μια φλεγμονώδης κατάσταση (Yan 1994, Bierhaus 1998, Kislinger 1999, Basta 2002) μέσω ενεργοποίησης του παράγοντα μεταγραφής NF-κappa B ακολουθούμενη από έκφραση κυτοκίνης (Yan 1994, Bierhaus 1998, Kislinger 1999, Haslbeck 2007, Kovacic 2011). Το αλκοόλ μπορεί να επιταχύνει το οξειδωτικό στρες μέσω άμεσων και έμμεσων μηχανισμών που αυξάνουν την απόπτωση, αλλοιώνουν τις δομές των κυττάρων και βλάπτουν τον ιστό (Sun 2001). Επιπλέον, η βλάβη στα μιτοχόνδρια σε συνδυασμό με την εξασθενημένη αντιοξειδωτική άμυνα μπορεί να προκαλέσει σχηματισμό ελεύθερων ριζών (Alikhani 2007, Chen 2006).

Σε μια μελέτη των Gauthier και συν., (2010), η κατανάλωση αλκοόλ από την μητέρα με περισσότερα από τρία ποτά ανά περίπτωση διαπιστώθηκε ότι παρήγαγε εξέχον συστηματικό οξειδωτικό στρες. Τα άτομα μετά τον τοκετό έδειξαν σημαντική μείωση της συστημικής GSH, μαζί με σημαντικές αυξήσεις στο ποσοστό οξειδωμένου GSSG και οξείδωση του GSH οξειδοαναγωγικού δυναμικού (Gauthier 2010). Τα έμβρυα ποντικού που εκτέθηκαν σε EtOH παρουσίασαν υψηλότερη παραγωγή ριζικής ανιόντος SO, υπεροξειδωση λιπιδίων και απόπτωση, καθώς και *in vitro* παραμόρφωση. Ωστόσο, αυτές οι τοξικότητες μειώθηκαν με ταυτόχρονη χορήγηση SOD (Kotch 1995). Παρόμοια αποτελέσματα βρέθηκαν *in vivo* από τους Heaton και συν., (Heaton 2010).

Ως προ-οξειδωτικό, η χρήση EtOH μπορεί να οδηγήσει σε απόπτωση και βλάβη στα προστατευτικά συστήματα πλακούντα. Η συνεχής έκθεση σε EtOH στη μήτρα (Kay 2000) θα μπορούσε επομένως να εξηγήσει την οξειδωτική βλάβη του πλακούντα που εμπλέκεται στην παθογένεση της απώλειας εγκυμοσύνης. Μελέτες σε τρωκτικά έχουν δείξει πιθανή συσχέτιση μεταξύ EtOH και αυξημένου NOS πλακούντα μαζί με μειωμένο NO εντός συγκυτιοτροφοβλαστών, η οποία μεταβάλλει τη ροή του αίματος του πλακούντα και

προκαλεί ανεπαρκή παροχή θρεπτικών ουσιών και O₂ στο έμβρυο. Έτσι, το IUGR είναι πιθανό αρνητικό αποτέλεσμα (Deng 2007, Toda 2010, Kay 2000). Το επίπεδο και η διάρκεια της έκθεσης σε EtOH είναι οι κύριοι παράγοντες που αντιπροσωπεύουν μεταβολές στην παραγωγή NO. Σε χαμηλές δόσεις, το EtOH αυξάνει τις δραστηριότητες των NO και eNOS, αυξάνοντας την ενδοθηλιακή αγγειοδιαστολή. Από την άλλη πλευρά, υψηλότερες δόσεις EtOH μπορεί να επηρεάσουν την ενδοθηλιακή λειτουργία (Deng 2007). Η βλάβη των κυττάρων από NO in vivo προκύπτει από την παραγωγή υπεροξυνιτρίτη κατά τη διάρκεια της αλληλεπίδρασης NO-SO υπό οξειδωτικές συνθήκες (Cooper 2008). Ως εκ τούτου, το NO θεωρείται σημαντικός παράγοντας που συμβάλλει στην εξασθενημένη ανάπτυξη των εμβρύων που εκτέθηκαν σε EtOH (Agarwal 2012).

Η κατανάλωση αλκοόλ προάγει τη δημιουργία ROS μέσω της οδού του μεταβολισμού στο ήπαρ, διεγείροντας τη δραστηριότητα των ενζύμων του κυτοχρώματος P450, αλλοίωση ορισμένων επιπέδων μετάλλων (ιδιαίτερα ελεύθερων ιόντων σιδήρου ή χαλκού) στο σώμα και, τέλος, μείωση των επιπέδων αντιοξειδωτικών (Wu 2003). Λόγω της κριτικής συμβολής ορισμένων μετάλλων (ιδιαίτερα σιδήρου και χαλκού) στην παραγωγή ρίζας υδροξυλίου, οτιδήποτε αυξάνει τα επίπεδα αυτών των μετάλλων μπορεί επίσης να προωθήσει την παραγωγή ROS και το οξειδωτικό στρες (Qureshi 2005). Έχει αναφερθεί ότι το αλκοόλ αυξάνει τα επίπεδα σιδήρου στο σώμα όχι μόνο με αλκοολούχα ποτά πλούσια σε σίδηρο, όπως το κόκκινο κρασί, αλλά και ενισχύοντας την απορρόφηση του σιδήρου από τα τρόφιμα (Whitfield 2001). Η χρόνια κατανάλωση αλκοόλ μπορεί να μειώσει τα επίπεδα τεστοστερόνης, LH και FSH στον ορό επηρεάζοντας τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των νευρικών και ενδοκρινικών συστημάτων (Emanuele 2001, Maneesh 2006). Το αλκοόλ διακόπτει τη διάσπαση του μορίου GnRH από τον πρόδρομο προ-προ GnRH του και εμποδίζει την κίνηση της πρωτεϊνικής κινάσης C15, η οποία είναι απαραίτητη για τη διέγερση GnRH των LH και FSH (Uddin 1996, Kim 2003). Τελικά, αυτό διαταράσσει την ενδοκρινική ισορροπία και στη συνέχεια επηρεάζει τις παραμέτρους του σπέρματος (Salonen 1990)(Zhu 2000, Darbandi 2018).

Κάπνισμα

Το μητρικό κάπνισμα σχετίζεται με τη υπογονιμότητα, τις επιπλοκές της εγκυμοσύνης και τη βλάβη στο αναπτυσσόμενο έμβρυο. Υψηλότερα ποσοστά απώλειας εμβρύου, μειωμένη ανάπτυξη του εμβρύου (Huang 2009) και πρόωρος τοκετός έχουν επίσης συσχετιστεί με το κάπνισμα. Ο κίνδυνος αυθόρμητης άμβλωσης διαπιστώθηκε ότι αυξήθηκε σημαντικά στους καπνιστές έναντι των μη καπνιστών (Kumar 2011). Τα στοιχεία δείχνουν ότι

το μητρικό κάπνισμα οδηγεί σε OS τόσο στη μητέρα όσο και στο έμβρυο (Kovacic 2005, Ornoy 2007).

Ο καπνός τσιγάρου αποτελείται από πολλές τοξικές χημικές ουσίες και προ-οξειδωτικά που μπορούν να παράγουν ROS. Ο εισπνεόμενος καπνός αποτελείται από δύο φάσεις: τη φάση σωματιδίων (πίσσα) που περιέχει σταθερές ελεύθερες ρίζες και τη φάση αερίου, η οποία περιέχει τοξίνες και ελεύθερες ρίζες. Αντιδρώντα είδη οξυγόνου όπως το ανιόν SO, το H₂O₂ και η ρίζα υδροξυλίου σχηματίζονται από υδατοδιαλυτά συστατικά πίσσας, και μπορούν να βλάψουν τα θεμελιώδη μέρη των κυττάρων και του DNA. Το NO είναι μόνο ένα είδος που περιέχεται στη φάση αερίου. Η υπερπαραγωγή προκαλεί επακόλουθο σχηματισμό υπεροξυνιτρώδους. Η περιεκτικότητα σε πίσσα τσιγάρου συσχετίζεται θετικά με την παραγωγή ρίζας υδροξυλίου, επαγωγέα βλάβης στο DNA (Valavanidis 2009).

Τα κύρια συστατικά που πιστεύεται ότι είναι υπεύθυνα για την τοξικότητα είναι η νικοτίνη και το βενζο (άλφα) πυρένιο μέσω υψηλού σχηματισμού ROS και επακόλουθου οξειδωτικού στρες (Werler 1997). Επιπλέον, μια κατάσταση υψηλής συγκέντρωσης ελευθέρων ριζών μπορεί να καταστρέψει προστατευτικά αντιοξειδωτικά (Chelchowska 2011), δηλαδή βιταμίνη E, βήτα-καροτένιο, SOD και καταλάση (onavic 2005). Ο αντίκτυπος των ROS και του OS πιστεύεται ότι κυμαίνεται με ποικίλες ποσότητες έκθεσης σε ενεργό καπνό (Ornoy 2007). Τα επίπεδα TBARS έχουν παρατηρηθεί στο πλάσμα και στους ιστούς των καπνιστών και συσχετίζονται με τον αριθμό των τσιγάρων που καπνίστηκαν (Northrop-Clewes 2007).

Μια μετα-ανάλυση 12 μελετών με αυστηρά κριτήρια συμπερίληψης ανέφερε υψηλότερη αναλογία πιθανότητας για υπογονιμότητα στις γυναίκες καπνίστριες σε σύγκριση με τις μη καπνίστριες, με ενδείξεις δοσοεξαρτώμενης σχέσης με τον αριθμό των τσιγάρων. Η μειωμένη γονιμότητα των καπνιστών έχει επίσης τεκμηριωθεί μεταξύ των γυναικών που υποβάλλονται σε εξωσωματική γονιμοποίηση για εγκυμοσύνες ανά αριθμό κύκλων που υποβάλλονται σε θεραπεία με εξωσωματική γονιμοποίηση σε καπνίστριες έναντι μη καπνιστών (Augood 1998). Ακόμη και η έκθεση στον παθητικό καπνό είχε συνδεθεί με μειωμένα ποσοστά εγκυμοσύνης και αυξημένο χρόνο στη σύλληψη (Anderson 2010, Ornoy 2007). Οι επιβλαβείς και καρκινογόνες επιδράσεις και των δύο τύπων καπνού έχουν τεκμηριωθεί καλά και, γενικά, κανένα επίπεδο έκθεσης στον καπνό δεν μπορεί να θεωρηθεί ασφαλές (Valavanidis 2009, Chelchowska 2011). Πιο πρόσφατα στοιχεία δείχνουν ότι η έκθεση σε παθητικό καπνό μπορεί να επηρεάσει αρνητικά το χρόνο στην εγκυμοσύνη (Ornoy 2007, Tiboni 2004). Μεταξύ 225 γυναικών ασθενών που υποβλήθηκαν σε εξωσωματική γονιμοποίηση (n = 97) ή εξωσωματική γονιμοποίηση με ενδοκυτταροπλασματική ένεση σπέρματος (ICSI, n = 128), τα ποσοστά εμφύτευσης γυναικών που εκτέθηκαν σε παθητικό καπνό ήταν παρόμοια σε εκείνα των ενεργών καπνιστριών (12,6 και 12,0%, αντίστοιχα) αλλά σημαντικά χαμηλότερες από εκείνες των μη καπνιστών γυναικών που δεν εκτίθενται σε

παθητικό καπνό (25,0%, $P < 0,01$). Τα ποσοστά εγκυμοσύνης μεταξύ ενεργών και παθητικών καπνιστριών ήταν επίσης χαμηλότερα από αυτά των μη καπνιστών (ενεργός καπνιστής = 12,0%, παθητικός καπνιστής = 12,6% και μη καπνιστής = 25,0%) (Neal 2005). Χαμηλότερη συγκέντρωση β-καροτενίου στο ωοθυλακικό υγρό και μειωμένη επιτυχία εξωσωματικής γονιμοποίησης έχουν τεκμηριωθεί μεταξύ των καπνιστών (Tiboni 2004), αλλά δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στις συγκεντρώσεις βιταμίνης E ή λυκοπενίου στο πλάσμα, γεγονός που υποδηλώνει ότι η απώλεια β-καροτενίου στο ωοθυλάκιο εμφανίζεται σε απόκριση σε σχέση με τον καπνό προκαλούμενο οξειδωτικό στρες (Ruder 2009, Tiboni 2004). Τόσο το ενεργό όσο και το παθητικό κάπνισμα μπορεί να απαιτούν αυξημένες αντιοξειδωτικές άμυνες (Alberg 2002, Dietrich 2003).

Μια μελέτη που εξέτασε τα ωοκύτταρα ποντικού ανέφερε μειωμένη ποιότητα των ωαρίων σε συνδυασμό με την έκθεση στον καπνό του τσιγάρου. Τα έμβρυα των μητέρων που εκτέθηκαν στον καπνό του τσιγάρου εμφάνισαν ελαττωματική ανάπτυξη λόγω οξειδωτικής βλάβης και κυτταρικού θανάτου (Huang 2009).

Το κάπνισμα αποτελεί μια πολύ γνωστή αιτία ανδρικής υπογονιμότητας (Meri 2013). Ένας σημαντικός μηχανισμός για αυτό το αποτέλεσμα φαίνεται να είναι η παραγωγή ROS από την παρεμβολή της παροχής οξυγόνου στους όρχεις που θέτει σε κίνδυνο τις υψηλές μεταβολικές απαιτήσεις της σπερματογένεσης (Meri 2013, Sheynkin 2013, Tostes RC). Το κάπνισμα απελευθερώνει επίσης μεγάλο αριθμό μεταλλαξιγόνων και μεταβολιτών (συμπεριλαμβανομένων ραδιενεργού πολωνίου, καδμίου, βενζοπυρενίου, μονοξειδίου του άνθρακα, πίσσας, ναφθαλινίου και αρωματικών υδρογονανθράκων) που διαταράσσουν την κανονική δομή και λειτουργία των ανδρικών αναπαραγωγικών οργάνων (Meri 2013, Sheynkin 2013). Μπορεί να ενισχύσει το οξειδωτικό στρες όχι μόνο άμεσα μέσω της παραγωγής αντιδραστικών ριζών οξυγόνου στον καπνό των τσιγάρων, αλλά και έμμεσα μέσω της αποδυνάμωσης των αντιοξειδωτικών αμυντικών συστημάτων (Halmenschlager 2009, Shiels 2009, Trummer 2002). Μελέτες έχουν δείξει ότι η έκθεση στον καπνό μπορεί να αλλάξει τα επίπεδα τεστοστερόνης, PRL, E2, FSH, LH και SHBG στο πλάσμα από επιδράσεις στα κύτταρα Leydig και Sertoli (Halmenschlager 2009, Shiels 2009, Trummer 2002). Μελέτες έχουν επίσης δείξει ότι το κάπνισμα συνδέεται με μεταβολές στην ποιότητα του σπέρματος τόσο των γόνιμων όσο και των στειρών ανδρών επηρεάζοντας τις λειτουργίες της υπόφυσης, του θυρεοειδούς, των επινεφριδίων και των όρχεων (Karoor 2005, Darbandi 2018).

Ο καπνός περιέχει υψηλές συγκεντρώσεις ROS συμπεριλαμβανομένων των O_2^- και $OH \cdot$, που φαίνεται να συμμετέχουν σε αντιδράσεις Fenton για την παραγωγή H_2O_2 και προκαλούν βλάβη στο DNA (Valavanidis 2009). Το κάδμιο και ο μόλυβδος που προέρχονται από τον καπνό του τσιγάρου προκαλούν επίσης σπασίματα κλώνων του DNA (Hengstler 2003) και είναι παρόντα σε σπερματικό υγρό που σχετίζεται με δείκτες οξειδωτικού στρες

(Kiziler 2007). Η νικοτίνη είναι οξειδωτική και μπορεί να προκαλέσει σπασίματα δίκλωνου DNA του σπέρματος *in vitro* (Arabi, 2004). Η κοτινίνη, ο κύριος μεταβολίτης της, ανιχνεύεται στο σπερματικό πλάσμα των καπνιστών (Wong 2000, Wright 2014).

Σε μια μικρή μελέτη (20 καπνιστές εξαιρουμένων των μαρτύρων), το κάπνισμα συσχετίστηκε με δραματικές αυξήσεις στις συγκεντρώσεις του ROS (κατά 107%) και στους αριθμούς των λευκοκυττάρων (κατά 48%) σε σύγκριση με τους μη καπνιστές (Saleh 2002b). Το κάπνισμα μειώνει τις συνολικές συγκεντρώσεις αντιοξειδωτικών στο σώμα, υποδεικνύοντας μειωμένη προστασία έναντι του οξειδωτικού στρες (Lesgardts 2002). Άμεσες συσχετίσεις με δείκτες βλάβης του DNA έχουν αποδειχθεί σε πολλές μελέτες σε γόνιμους άνδρες (Linschooten 2011, Taha 2012), άνδρες με κισσοκήλη (Fariello 2012b) και άνδρες με ιδιοπαθή υπογονιμότητα (Elshal 2009). Η μεγαλύτερη διαφορά παρουσιάστηκε στη αξιολογούμενη μελέτη ανδρών με ιδιοπαθή υπογονιμότητα (n = 70): ο μέσος όρος DFI των υπογόνιμων καπνιστών ήταν 37,66% σε σύγκριση με το 19,34% σε υπογόνιμους μη καπνιστές (P <0,001) ή 14,51% σε γόνιμους μάρτυρες (όχι σημαντικά διαφορετικό από τους υπογόνιμους μη καπνιστές). Αυτό καταδεικνύει τη σημασία του καπνίσματος στην αιτιολογία της ιδιοπαθούς υπογονιμότητας (Wright 2014).

Οπιοειδή, Ναρκωτικά και Ψυχαγωγικά Ναρκωτικά

Τα κανναβινοειδή είναι δραστικά συστατικά της μαριχουάνας, το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο ψυχαγωγικό φάρμακο που χρησιμοποιείται σε όλο τον κόσμο. Τα κανναβινοειδή μπορούν να δημιουργήσουν ελεύθερες ρίζες που μπορούν να αλλάξουν τη λειτουργία του κεντρικού και του περιφερειακού νευρικού συστήματος (Chan 1998). Το θεμελιώδες συστατικό της μαριχουάνας που είναι γνωστό ότι ασκεί ψυχολογικές επιπτώσεις στους καπνιστές είναι γνωστό ως δέλτα-9-τετραϋδροκανναβινόλη (THC) (Chan 1998). Ενδοκανναβινοειδείς υποδοχείς έχουν ανιχνευθεί σε γυναικεία αναπαραγωγικά όργανα όπως η ωοθήκη και η μήτρα (Anderson 2010). Τροποποιήσεις του συστήματος ενδοκανναβινοειδών με εξωγενή χορήγηση αγωνιστών κανναβινοειδών μπορούν να διαταράξουν τις φυσιολογικές αναπαραγωγικές διαδικασίες, πιθανώς μέσω της παραγωγής ελευθέρων ριζών (Battista 2018).

Η THC βρέθηκε ότι διαταράσσει την ανάπτυξη του εμβρύου και αναστέλλει την εμφύτευση. Η πλακούντιακή μεταφορά THC αντιπροσωπεύει τη συσσώρευσή της σε αναπαραγωγικά υγρά και έμβρυα που εκτίθενται σε THC δείχνουν ότι επηρεάζεται η μορφολογία (Schuel 2002). Η έκθεση στο THC στη μήτρα έχει συνδεθεί με χαμηλό βάρος γέννησης (Park 2004, Frider 2008), πρόωρη ωριμότητα, συγγενείς ανωμαλίες και θνησιγένεια (Park 2004, Mueller 1990)

Η παραγωγή του ROS (Konavic 2001 a & b, 2002) συνδέεται συχνά με θράυσεις κλώνου DNA που προκαλούνται από THC (Chan 1998). Η εποξειδωση της σύνδεσης 9, 10-αλκενίου από THC είναι ο προτεινόμενος μηχανισμός βλάβης του DNA (Marimatsu 1992) και η αλκυλίωση DNA από εποξειδία παράγει ταυτόχρονα ROS (Konavic 2001b, Konavic 2000). Σύμφωνα με τους Sarafian και συν., προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η χρόνια έκθεση σε μαριχουάνα προκαλεί συνεχή μείωση των αντιοξειδωτικών συστημάτων GSH και έχει ως αποτέλεσμα νεκρωτική απόπτωση (Kay 2000), παρέχοντας περαιτέρω στοιχεία για τις κυτταροτοξικές επιδράσεις της THC.

Η χρήση οπιοειδών σχετίζεται με διαταραγμένη σπερματογένεση και μειωμένη σεξουαλική απόδοση (Subiran 2011). Τόσο τα ενδογενή όσο και τα εξωγενή οπιοειδή αναστέλλουν την έκκριση GnRH, διαταράσσοντας τις λειτουργίες του άξονα HPG (Brown 2006). Σύμφωνα με μελέτες, δημιουργούν ROS (Sarafian 1999), προκαλούν φλεγμονή καθώς επίσης βλάβες στο DNA, χρωμοσωμικές βλάβες και απόπτωση στα κύτταρα από το p53 (Kim 2012, Faux 2009, Fronczak 2012). Το THC, επηρεάζει στον άξονα HPG προκαλώντας δοσοεξαρτώμενη μείωση στην παραγωγή τεστοστερόνης, βλάπτει τη σπερματογένεση (Fronczak 2012, Park 2004) σε διαφορετικά μιτωτικά και μειωτικά στάδια, με αποτέλεσμα αρκετά μορφογενετικά ελαττώματα του σπέρματος καθώς και γυναικομαστία, μειωμένη λίμπιντο, στυτική και εκσπερμάτιση δυσλειτουργία (Patra 1991, Darbandi 2018).

Η κοκαΐνη έχει ισχυρές διεγερτικές ιδιότητες που συμβάλλουν στο πολύ εθιστικό δυναμικό της (Ornoy 2007) και η χρήση της κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης έχει συνδεθεί με ανεπιθύμητα αποτελέσματα, όπως χαμηλό βάρος γέννησης, πρόωρη ωρίμανση, IUGR και αποβολή (Anderson 2010, Zimmerman 1994).

Η οξειδωτική οδός της κοκαΐνης αποδίδει αρκετούς μεταβολίτες που προκαλούν μεγαλύτερο βαθμό υπεροξειδωσης λιπιδίων από την ίδια την κοκαΐνη, με ταυτόχρονο κύκλο οξειδοαναγωγής και παραγωγή ριζών SO και λιπιδίων υπεροξυλίου (Lloyd 1993). Η φορμαλδεΰδη είναι ένας από τους πολλούς οξειδωτικούς μεταβολίτες της κοκαΐνης που περιγράφεται ότι δημιουργεί ROS (Konavic 2005). Η νορκοκαΐνη είναι ένας άλλος μεταβολίτης κοκαΐνης που μετά την οξείδωση μεταβιβάται περαιτέρω σε νιτροξειδίο (Konavic 2005), ο οποίος θα μπορούσε να γίνει τοξικός εάν αντιδράσει με NO ή υπεροξυνιτρίτη (Goldstein 2004). Το προκύπτον οξειδωτικό στρες οδηγεί σε εξάντληση των αποθεμάτων GSH (Konavic 2005, Agarwal 2012).

Τα αγγειοσυσταλτικά χαρακτηριστικά της κοκαΐνης μπορούν να επηρεάσουν την αγγείωση της μήτρας και του πλακούντα, υποβάλλοντας το έμβρυο σε υποξία, όπως φαίνεται σε αρουραίους με εντυπωσιακά αυξημένη GSSG με οξεία έκθεση σε κοκαΐνη και μειωμένη GSH με χρόνια έκθεση (Lipton 2003). Παρόμοιες μεταβολές στα επίπεδα της GSH

καταδείχθηκαν από τους Lee και συν., (2001), οι οποίοι βρήκαν σημαντική δοσοεξαρτώμενη μείωση της GSH με έκθεση σε κοκαΐνη και αυξημένη παραγωγή φλεγμονώδους κυτοκίνης μέσω αυξημένης έκφρασης TNF-άλφα και NP-κάππα Β (Lee 2001). Η θειόλη και η δεφεροξαμίνη βρέθηκαν να προλαμβάνουν την απόπτωση που προκαλείται από την κοκαΐνη, υποδεικνύοντας ότι το ROS επηρεάζει την απόπτωση που σχετίζεται με τη χρήση κοκαΐνης (Zaragoza 2001).

Συνολικά, τα ευρήματα από αυτές τις μελέτες εμπλέκουν το οξειδωτικό στρες ως συμβολή στη ζημία που προκαλείται από την κοκαΐνη. Η τερατογένεση και η απόπτωση που σχετίζεται με την κοκαΐνη αποδίδονται σε μεγάλο βαθμό στο οξειδωτικό στρες που παράγεται από μεταβολίτες κοκαΐνης, τα οποία υποστηρίζονται περαιτέρω από τα αποδεδειγμένα προστατευτικά αποτελέσματα του αντιοξειδωτικού (Konacic 2005).

Περιβαλλοντική και Επαγγελματική Έκθεση

Πιο πρόσφατα, περιβαλλοντικοί ρύποι συμπεριλαμβανομένων των φυτοφαρμάκων έχουν εμπλακεί στην παθογένεση των αναπαραγωγικών διαταραχών (Bagchi 1992, Abdollahi 2004) και της υπογονιμότητας. Οι άνθρωποι εκτίθενται συνεχώς σε ρύπους μέσω αέρα, εδάφους, κατάποσης μολυσμένων τροφίμων και νερού (Sutton 2011). Η μαζική παραγωγή χημικών και η διανομή τους σε πολλά καταναλωτικά αγαθά αποτελεί απειλή για την υγεία του γενικού πληθυσμού μέσω της άμεσης και περιβαλλοντικής έκθεσης (Luo 2009).

Οι οργανοχλωρίνες χρησιμοποιούνται εκτενώς σε φυτοφάρμακα. Εμφανίζουν ισχυρές υδρόφοβες ιδιότητες και είναι έντονα λιπόφιλες ενώσεις. Τα παρασιτοκτόνα οργανοχλωρίου (OCPs) είναι διαβόητα για τις τοξικές τους επιδράσεις στα νεύρα, αλλά η αργή συσσώρευσή τους στους ιστούς του σώματος με υψηλή περιεκτικότητα λιπιδίων με την πάροδο του χρόνου μπορεί να επηρεάσει αρνητικά τις αναπαραγωγικές ικανότητες της μητέρας, καθώς και το ίδιο το έμβρυο (Herrero-Mercado 2011). Αυξημένα επίπεδα πολλών OCP έχουν ανιχνευθεί σε διάφορα όργανα και ιστούς του σώματος, όπως αίμα, αμνιακό υγρό και τον πλακούντα (Pathak 2011). Στη μελέτη τους, οι Jirsova και συν., (2010), σημείωσαν ότι η έκθεση σε DDT προκάλεσε μείωση του αριθμού των διπλοειδών ωαρίων (Jirsova 2010).

Η έκθεση σε ανθεκτικούς οργανοχλωρικούς ρύπους όπως πολυχλωριωμένα διφαινύλια και μεταβολίτες τους μπορεί να προκαλέσει κατακερματισμό του DNA στα σπερματοζωάρια. Σε μελέτες ευρωπαϊκών ανδρών, τα επίπεδα έκθεσης συσχετίστηκαν με υψηλότερα επίπεδα DFI, ενώ αυτό δεν παρατηρήθηκε σε πληθυσμούς Inuit στη Γροιλανδία όπου η έκθεση θα ήταν υψηλότερη (μολυσμένα λιπαρά ψάρια), ίσως λόγω γενετικής διακύμανσης (Rignell-Hydbom 2005, Spano 2005, Stronati 2006). Το DFI έχει αποδειχθεί σημαντικά υψηλότερο σε εκτεθειμένους άνδρες με τροποποιήσεις του γονιδίου του

υποδοχέα ανδρογόνων (Giwercman 2007). Οι Sanchez-Pena και συν., (2004) έδειξε ότι το 75% των μεξικανών εργαζομένων που εκτέθηκαν σε φυτοφάρμακα οργανοφωσφόρου είχαν DFI > 30% ενώ οι μάρτυρες χωρίς έκθεση είχαν μέσο όρο 9,9% DFI. Ο μέσος όρος DFI των αγροτών της Βενεζουέλας που εκτέθηκαν σε οργανοφωσφορικά και καρβαμικά φυτοφάρμακα παρουσίασε παρόμοιες αυξήσεις στο 34,8% ($P < 0,0001$) αν και οι μη εκτεθειμένοι μάρτυρες είχαν υψηλότερο DFI από την μεξικανική κοόρτη (24,6%) (Miranda-Contreras 2013). Η επαγγελματική έκθεση στον μόλυβδο συσχετίζεται επίσης με τον κατακερματισμό του DNA στα σπερματοζώαρια (Hsu 2009, Vani 2012, Wright 2014).

Τα πολυχλωριωμένα διφαινύλια ή τα PCB (φυτοφάρμακα) είναι γνωστό ότι ενισχύουν τη δημιουργία ελευθέρων ριζών δημιουργώντας οξειδωτικό στρες, μέσω της επαγωγής ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας (Hennig 1999) και της καταστροφής των κυτταρικών μεμβρανών (Agarwal 2012). Είναι ενδιαφέρον ότι η έκθεση στο PCB προκαλεί καταστολή των επιπέδων βιταμίνης E (Hennig 1999).

Η επίδραση των PCB στην αναπαραγωγή των γυναικών έχει αποδειχθεί από την παρουσία τους σε ωοθυλακικό υγρό (Meeker 2009, De Felip 2004, Younglai 2002), ωοθήκες (Mes 1990), πλακούντα, μήτρα και αμνιακό υγρό (Polishuk 1997). Τα PCB έχουν επίσης ανιχνευθεί στα έμβρυα (Covaci 2002 Toft 2010), πιθανόν να συμβάλλουν στα αρνητικά τους αποτελέσματα.

Η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία που προκαλείται από τα PCB έχει επίσης αποδοθεί σε αυξημένο οξειδωτικό στρες (Narayanan 1998 Oakley GG 1996, Smith 1995). Είναι ενδιαφέρον ότι η έκθεση στο PCB παρατηρήθηκε ότι καταστέλλει τα επίπεδα της βιταμίνης E (Hennig 1999, Saito 1990, Toborek 1995). δεδομένου ότι η βιταμίνη E και άλλα αντιοξειδωτικά μπορούν να αποτρέψουν αυτήν την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, το OS είναι πιθανό να συμβάλλει στις τοξικότητες που σχετίζονται με το PCB (Hennig 2002) Επιπλέον, τα PCB είναι γνωστό ότι προκαλούν καταστροφή κυτταρικής μεμβράνης και αυξάνουν την παραγωγή ελευθέρων ριζών. Αν και οι άμεσες επιπτώσεις τους στη γονιμότητα παραμένουν ανεπιβεβαίωτες, πολλές μελέτες έχουν αποδείξει τον πιθανό ρόλο τους στην εξασθένιση της εμμηνορροίας και της ποιότητας του ενδομητρίου (Jirsova 2010).

Τα οργανοφωσφορικά φυτοφάρμακα από την άλλη πλευρά, προκαλούν εξάντληση της GSH μαζί με αύξηση του ROS, προκαλώντας οξειδωτικό στρες (52-54). Το οξειδωτικό στρες έχει εμπλακεί σε ανεπιθύμητα αναπαραγωγικά αποτελέσματα που προκαλούνται από οργανοφωσφορικές ενώσεις (OPCs) (Delescluse 2001– Banerjee 2001, Halliwell 2002). Μελέτες έχουν δείξει μειωμένες δραστηριότητες και επίπεδα αντιοξειδωτικών ενζύμων σε συνδυασμό με αυξημένη παραγωγή υπεροξειδίων λιπιδίων (Julka 1992). Η έκταση της βλάβης του DNA που προκλήθηκε από τα OPCs αποδείχθηκε ότι εξαρτάται από την ποσότητα

και τη διάρκεια της έκθεσης. Η εξάντληση του GSH με ταυτόχρονη αύξηση της γενιάς ROS ενεργοποίησε το οξειδωτικό στρες. Οι Samarawickrema και συν., (2008), οι οποίοι μελέτησαν τις επιπτώσεις της χαμηλής αλλά μακροχρόνιας έκθεσης σε περιβαλλοντικά και επαγγελματικά OPCs (Samarawickrema 2008). Διαπίστωσαν σημαντικά αυξημένα επίπεδα MDA στο αίμα του ομφάλιου λώρου σε δείγματα που ελήφθησαν κατά τις περιόδους ψεκασμού και αυξημένο κατακερματισμό του εμβρυϊκού DNA, υποδεικνύοντας αυξημένο οξειδωτικό στρες του εμβρύου.

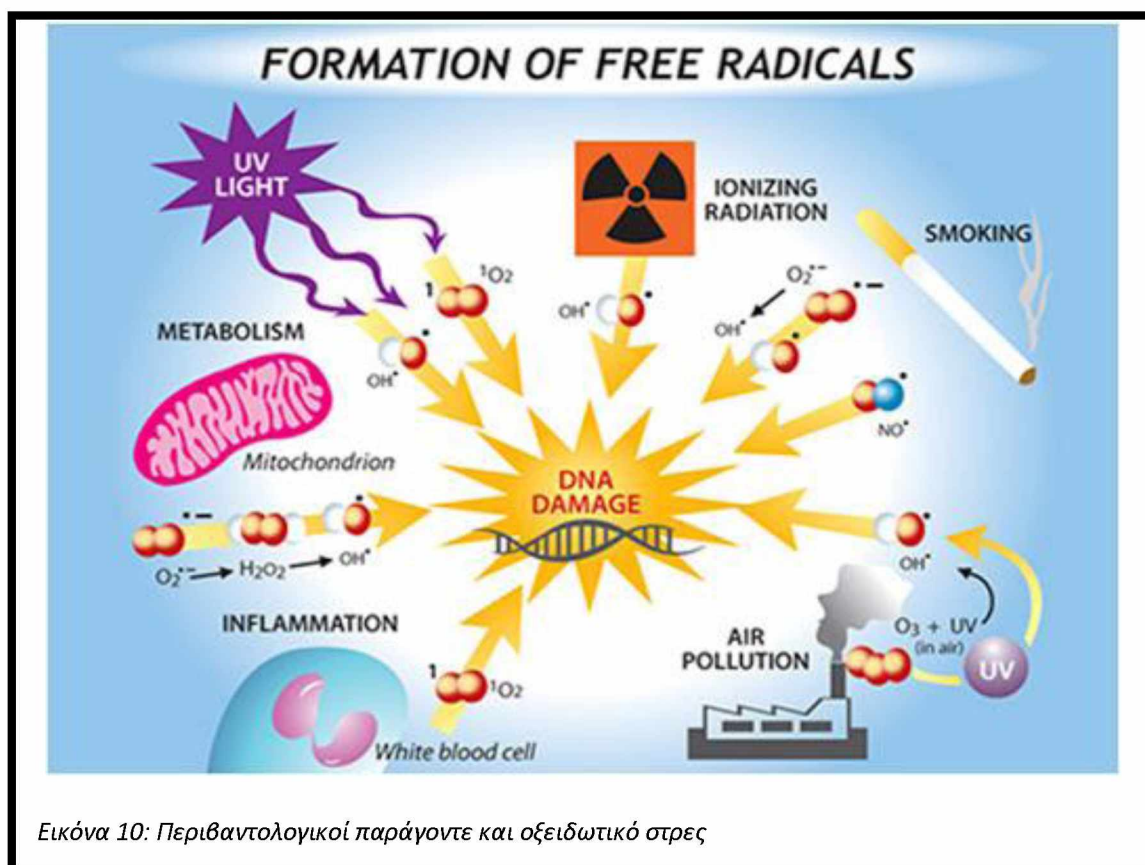
Η διφαινόλη Α είναι ένας σημαντικός ενδοκρινικός διαταράκτης και η έκθεση του ανθρώπου είναι ευρέως διαδεδομένη από τα δοχεία τροφίμων και ποτών και το περιβάλλον (Rubin, 2011). Μελέτες σε ζώα έχουν δείξει μεταλλαξιγόνα αποτελέσματα, βλάβη του DNA που προκαλείται στα σπερματοζώαρια και επιγενετικές τροποποιήσεις στους απογόνους (Dobrzynska & Radzikowska, 2013, Manikkam 2013, Tiwari & Vanage, 2013).

Οι φθαλικές ενώσεις είναι χημικές ουσίες που χρησιμοποιούνται ως μαλακτικό πλαστικών και περιέχονται σε μια ευρεία γκάμα προϊόντων συσκευασίας τροφίμων και προϊόντων προσωπικής φροντίδας. Η έκθεση σε φθαλικούς εστέρες μπορεί να συμβεί μέσω της διατροφικής κατανάλωσης, της δερματικής απορρόφησης ή της εισπνοής και έχει συνδεθεί με μειωμένη σπερματογένεση και αυξημένη βλάβη στο DNA του σπέρματος (Kasahara 2002, Hauser 2007).

Οι ατμοσφαιρικοί ρύποι όπως τα σωματίδια ντίζελ δρουν ως ισχυρά ερεθίσματα για την παραγωγή λευκοκυτταρικών ROS (GonzalezFlecha, 2004; Alaghmand & Blough, 2007). Αν και καμία μελέτη δεν έχει συνδέσει άμεσα τους ατμοσφαιρικούς ρύπους με το οξειδωτικό στρες των όρχεων, είναι πιθανό αυτή η οξειδωτική προσβολή να είναι υπεύθυνη για την αύξηση της βλάβης του DNA του σπέρματος που παρατηρείται μετά από περιόδους ατμοσφαιρικής ρύπανσης (Rubes 2005). Η εποχιακά αυξημένη ατμοσφαιρική ρύπανση (διοξείδιο του θείου, οξείδιο του αζώτου και σωματίδια) στην Τσεχική Δημοκρατία συσχετίστηκε με σημαντικά αυξημένο κατακερματισμό του DNA κατά τους μήνες της υψηλότερης έκθεσης, με προσαρμογή για το κάπνισμα και άλλες μεταβλητές (Rubes 2005). Η έκθεση σε βαρέα μέταλλα έχει συνδεθεί οριστικά με την οξειδωτική βλάβη του σπέρματος. Τόσο το κάδμιο όσο και ο μόλυβδος συνδέονται με μια αύξηση στο οξειδωτικό στρες των όρχεων (Hsu και Guo 2002, Acharya 2003) και μια επακόλουθη αύξηση στην οξείδωση του DNA σπέρματος (Xu 2003, Naha & Chowdhury, 2006, Tremellen 2008).

Η έκθεση σε περιβαλλοντικούς ρύπους επηρεάζει δυσμενώς το αναπαραγωγικό δυναμικό των ανδρών (Coutts 2007, Wong 2010). Η ανδρική υπογονιμότητα που προκαλείται από έκθεση σε περιβαλλοντικά τοξικά όπως το κάδμιο (Benoff 2009, Luparello 2011), ο υδράργυρος (Choy 2002, Mocevic 2013), η διφαινόλη Α (BPA) (Welshons 2006, Calafat 2003)

και η διοξίνη (Galimona 2015) είναι ένα παγκόσμιο πρόβλημα. Ακόμη και τα χημικά συστατικά της ατμοσφαιρικής ρύπανσης μπορούν να προκαλέσουν οξειδωτικό στρες ενεργοποιώντας οξειδοαναγωγικά μονοπάτια που οδηγούν στη συνέχεια σε διάφορες κακουχίες, όπως φλεγμονή και κυτταρικός θάνατος (Lodovici 2011). Αυτές οι μολύνσεις επιδεινώνουν τις παραμέτρους του σπέρματος, την ακεραιότητα του DNA μέσω της διαταραχής της λειτουργίας των κυττάρων Leydig και Sertoli, βιοσύνθεση ορμονών, έκφραση γονιδίων και επιγενετικές τροποποιήσεις (Diamanti-Kandarakis 2009, Pacey 2010, Skinner 2010). Αυτά τα τοξικά συνήθως λειτουργούν ως «ενδοκρινικές διαταραχές χημικών ουσιών» (EDCs) που παρεμβαίνουν σε φυσιολογικές ορμονικές λειτουργίες, αυξάνουν το επίπεδο κυκλοφορούσας κορτιζόλης λόγω επαγωγής OS (Güven 1999) και μειώνουν τα κυκλοφορούντα επίπεδα τεστοστερόνης (Herath 2004, Meeker 2010). Η αυξημένη κορτιζόλη μειώνει την έκκριση LH μέσω διασταύρωσης μεταξύ των αξόνων HPG-HPA. Αυτά τα τοξικά επηρεάζουν επίσης τις κυτταρικές επικοινωνίες και τις προσκολλήσεις μεταξύ κυττάρων Sertoli-Sertoli και κυττάρων Sertoli-μικροβίων μέσω της σηματοδοτικής οδού κινάσης 3-κινάσης φωσφατιδυλινοσιτόλης (PI3K) / c-Src / εστιακής προσκόλλησης (FAK) που οδηγεί σε αναπαραγωγική δυσλειτουργία (Shimon 2006, Sharma 2017, Darbandi 2018).



Εικόνα 10: Περιβαλλοντικοί παράγοντες και οξειδωτικό στρες

Θερμότητα

Η θέση του όσχεου δρα για να διατηρήσει τη θερμοκρασία των όρχεων χαμηλότερη από εκείνη του σώματος. Η αύξηση της θερμοκρασίας του όσχεου ή της υπερθερμίας σχετίζεται με την ανδρική υπογονιμότητα και την εξασθενημένη σπερματογένεση (Ivell 2007). Η σπερματογόνος διακοπή αυξάνει τον αριθμό των ανώριμων ή «εσφαλμένα ωριμασμένων» σπερματοζωαρίων στην επιδιδυμίδα και την εκσπερμάτιση (Dada 2003) (Paul 2008 & 2009, Yaeram 2006) και αυτές είναι μια σημαντική πηγή ROS (Gil-Guzman 2001, Ollero 2001). Η υπερθερμία του όσχεου προκαλεί μια σημαντική αύξηση τόσο στον κατακερματισμό του DNA όσο και στην αποσυμπύκνωση της χρωματίνης (Jung 2008, Southorn, 2002). Πολλές αναφορές έχουν τεκμηριώσει ότι παράγοντες όπως πυρετός, σάουνα ή ατμόλουτρο, στάση ύπνου, ή οδήγηση, αθλητικά στηρίγματα με επένδυση από πολυεστέρα, χρήση φορητού υπολογιστή στην αγκαλιά και ηλεκτρικές κουβέρτες επιφέρουν αρνητικές επιπτώσεις στις θερμοκρασίες του όσχεου και στη συνέχεια σπερματογένεση (Jung 2007, Garolla 2013). Ο πυρετός έχει αποδειχθεί ότι αυξάνει σημαντικά τον κατακερματισμό του DNA για μια περίοδο που διαρκεί τουλάχιστον 79 ημέρες, κορυφώνεται σε περίπου 1 μήνα μετά την ασθένεια (Sergeie 2007, Wright 2014). Σε αυτό το πλαίσιο, το θερμικό στρες είναι υπεύθυνο για την ενίσχυση της παραγωγής ROS καθώς και για τη μείωση των αντιοξειδωτικών ενζύμων, την αύξηση της δραστηριότητας της οξειδάσης NADPH και τη διακοπή της μιτοχονδριακής ομοιόστασης (Moon 2010, Belhadj Slimen 2014).

Το αυξημένο θερμικό στρες αυξάνει την παραγωγή ROS στην ανδρική αναπαραγωγική οδό επηρεάζοντας άμεσα τον κυτταρικό μεταβολισμό (Belhadj Slimen 2014) και επηρεάζοντας τα επίπεδα ορμονών του στρες (Megahed 2008). Η προκύπτουσα αύξηση στην παραγωγή ROS, με τη σειρά της, βλάπτει τα βλαστικά κύτταρα των όρχεων και άλλα ενδοκρινικά κύτταρα για να διαταράξει την ορμονική ισορροπία, περιορίζοντας έτσι τη γονιμότητα των ανδρών (Agarwal 2014, Darbandi 2018).

Ηλεκτρομαγνητικές ακτινοβολίες

Από τις τελευταίες δεκαετίες, έχει αναφερθεί ευρέως ότι η μακροχρόνια έκθεση σε ηλεκτρομαγνητικές ακτινοβολίες μπορεί να δημιουργήσει ROS σε αναπαραγωγικά όργανα, η οποία όχι μόνο μειώνει την κινητικότητα, τη βιωσιμότητα και τη φυσιολογική μορφολογία των λειτουργικών σπερματοζωαρίων (Vignera 2012, Darbandi 2017), αλλά και αποθαρρύνει το αναπαραγωγικό ορμονικό προφίλ. Η χρήση κινητών τηλεφώνων (Agarwal 2011), ασύρματου διαδικτύου (Yildirim 2015) και άλλων επαγγελματικών ή περιβαλλοντικών ακτινοβολιών (Al-Quzwini 2016) διαπιστώνεται ότι είναι σημαντικοί αιτιολογικοί παράγοντες

που αυξάνουν άμεσα την παραγωγή ROS στα αρσενικά αναπαραγωγικά όργανα (Agarwal 2008,2009).

Μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι ο κατακερματισμός του DNA ήταν η μόνη παράμετρος που άλλαξε σε χρήστες κινητών τηλεφώνων, σε μια ομάδα υψηλής χρήσης (> 4 ώρες ημερησίως) που αποθηκεύτηκε το τηλέφωνό τους στην τσέπη του παντελονιού (Rago 2013). Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει μεταβολές στην κινητικότητα, τη μορφολογία και ορμονικές διαταραχές (Agarwal 2008, Fejes 2005, Gutschli 2011). Η ακτινοβολία κινητού τηλεφώνου μπορεί να αυξήσει την παραγωγή ROS και να μειώσει τη δραστηριότητα των CAT, SOD και GPX (Desai 2009). Η βλάβη του DNA μπορεί να προκύψει από αυτό, όπως έχει καταδειχθεί σαφώς in vitro (De Iulii 2009a).

Η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία επηρεάζει τον άξονα HPA και αυξάνει την έκκριση αδρενοκορτικοτροπικής ορμόνης (ACTH) από την πρόσθια υπόφυση, αυξάνοντας έτσι την παραγωγή κορτιζόλης από φλοιό των επινεφριδίων (Mahdavi 2014). Αυτές οι ακτινοβολίες μπορούν επίσης να μειώσουν την έκκριση τεστοστερόνης από τα κύτταρα Leydig διαταράσσοντας τον αρσενικό αναπαραγωγικό ορμονικό άξονα (Meo 2005). Η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία επηρεάζει σημαντικά τα επίπεδα LH αλλά όχι τα επίπεδα FSH και PRL (Merhi 2012). Έχει επίσης αναφερθεί ότι η έκθεση σε ηλεκτρομαγνητικά κύματα επηρεάζει άμεσα τον επίφυση, επιδεινώνοντας έτσι τη βιολογική επίδραση της μελατονίνης στον παλμό GnRH στον υποθάλαμο (Stevens 1996). Έτσι, τα αλλοιωμένα επίπεδα GnRH επηρεάζουν την έκκριση FSH και LH και επηρεάζουν αρνητικά τη σύνθεση τεστοστερόνης στους όρχεις (Malpoux 1993, Darbandi 2018).

Κεφάλαιο 7

Οξειδωτικό Στρες και Υποβοηθούμενη Αναπαραγωγή

Η υπογονιμότητα, μια ασθένεια του αναπαραγωγικού συστήματος που ορίζεται από την αποτυχία επίτευξης κλινικής εγκυμοσύνης μετά από 12 μήνες ή περισσότερο της τακτικής σεξουαλικής επαφής χωρίς προστασία (Zegers-Hochschild 2009), επηρεάζει το 15% όλων των ζευγαριών, με σχεδόν το ένα τέταρτο των περιπτώσεων χωρίς αναγνωρίσιμο αιτιολογικό παράγοντα (Sharlip 2002, Agarwal 2014). Οι τεχνικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (ART) είναι προηγμένες τεχνολογικές διαδικασίες, οι οποίες είναι οι θεραπείες επιλογής σε πολλές περιπτώσεις γυναικείας και ανδρικής υπογονιμότητας. Λειτουργούν ως εναλλακτική λύση για την υπέρβαση των αιτιολογικών παραγόντων της υπογονιμότητας, όπως η ενδομητρίωση, η υπογονιμότητα σαλπινγικού παράγοντα, η υπογονιμότητα των ανδρικών παραγόντων και είναι επίσης χρήσιμες για γυναίκες με ανεξήγητη υπογονιμότητα (Gurta 2010). Αυτές οι τεχνικές περιλαμβάνουν ενδομήτρια σπερματέγχυση, εξωσωματική γονιμοποίηση και ενδοκυτταροπλασματική έγχυση σπέρματος (ICSI) (Agarwal 2012).

Η επιτυχής έκβαση της ART, συμπεριλαμβανομένης της γονιμοποίησης και της κλινικής εγκυμοσύνης που οδηγεί σε ζωντανή γέννηση, επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες - μεταξύ των οποίων τα είδη δραστικού οξυγόνου (ROS) έχουν σημαντικό ρόλο (Lampiao 2008). Η επακόλουθη ανάπτυξη του οξειδωτικού στρες συγκαταλέγεται μεταξύ των κύριων αιτιών ελαττωματικών γαμετών ή κακώς αναπτυσσόμενων εμβρύων στην ART (du Plessis 2008). Αυτό συμβαίνει επειδή η διαδικασία εξωσωματικής γονιμοποίησης που εκτελείται σε κλινικό εργαστηριακό περιβάλλον δεν μπορεί να αναδημιουργήσει τις ακριβείς συνθήκες υπό τις οποίες πραγματοποιείται φυσική γονιμοποίηση (Rakhit 2013). Μεταξύ των κρίσιμων παραγόντων που στερούνται οι διαδικασίες υποβοηθούμενης αναπαραγωγής είναι ο στενός έλεγχος των επιπέδων ROS που διατηρούνται εντός της φυσιολογικής συγκέντρωσης από αντιοξειδωτικά *in vivo* (Gurta 2010, Agarwal 2014). Το περιβάλλον *in vitro* εκθέτει τους γαμέτες και τα έμβρυα σε περίσσεια ROS με την απουσία ενζυματικής αντιοξειδωτικής προστασίας που συνήθως υπάρχει κατά τη γονιμοποίηση *in vivo* και την εγκυμοσύνη. Οι ελεύθερες ρίζες πιστεύεται ότι δρουν ως καθοριστικοί παράγοντες στα αναπαραγωγικά αποτελέσματα λόγω των επιδράσεών τους στα ωάρια, το σπέρμα και τα έμβρυα (Gurta 2010, Agarwal 2012).

Η *in vitro* γονιμοποίηση μπορεί να διαταράξει την οξειδωτική-αντιοξειδωτική ισορροπία, καθιστώντας τα μέσα καλλιέργειας λιγότερο προστατευμένα από την οξείδωση. Οι ανεπιθύμητες ενέργειες του παρατεταμένου οξειδωτικού στρες και η επακόλουθη απώλεια περιεκτικότητας σε αντιοξειδωτικά ωαρίων αποδείχθηκε ότι βελτιώθηκαν με την προσθήκη λιπόφιλων και υδροδιαλυτών αντιοξειδωτικών στα μέσα καλλιέργειας για τη μείωση του οξειδωτικού στρες (Martin-Romero 2008). Η από του στόματος συμπλήρωση βιταμινών και μετάλλων έχει αποδειχθεί ότι αυξάνει τις συγκεντρώσεις GSH στον ορό και τις

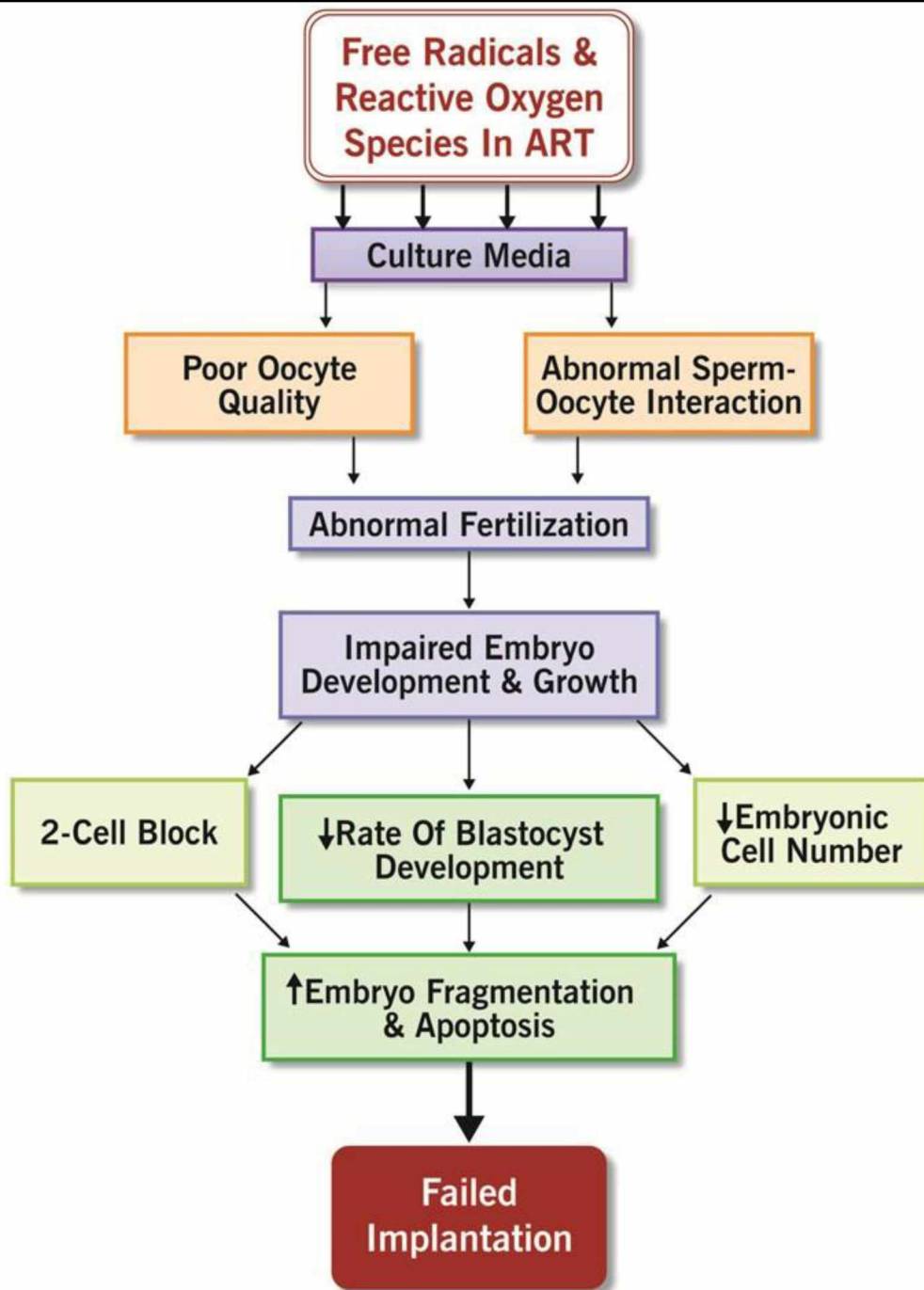
βιταμίνες C και E. Αυτά τα αντιοξειδωτικά έχουν προταθεί να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στα αποτελέσματα της εξωσωματικής γονιμοποίησης (Ozkaya 2010, Agarwal 2012).

Ο Ρόλος του OS στην Αλληλεπίδραση των Γαμετών

Τα ROS εμπλέκονται στη φυσιολογία της αλληλεπίδρασης σπέρματος-ωαρίου. Τόσο τα σπερματοζωάρια όσο και τα ωάρια δημιουργούν ROS. Ορισμένες συγκεντρώσεις ROS είναι απαραίτητες για το φυσιολογική λειτουργία των σπερματοζωαρίων και για αλληλεπίδραση σπέρματος-ωαρίου (Aitken 1989). Η παραγωγή ROS από τους γαμέτες εξισορροπείται από τα αντιοξειδωτικά. Εάν το προστατευτικό αποτέλεσμα των αντιοξειδωτικών είναι μικρότερο από το ROS που δημιουργείται, οδηγεί σε οξειδωτικό στρες. Οι υπερβολικές συγκεντρώσεις οξειδωτικού στρες μπορούν να επηρεάσουν τις λειτουργίες των σπερματοζωαρίων. Η υπερβολική παραγωγή ROS στο σπέρμα σχετίζεται με χαμηλότερους ρυθμούς γονιμοποίησης σε συμβατική εξωσωματική γονιμοποίηση (Krausz 1992, Sukcharoen 1996).

Οι συγκεντρώσεις του οξειδωτικού στρες ποικίλλουν σε μεγάλο βαθμό στους υπογόνιμους άνδρες. Οι φυσιολογικές συγκεντρώσεις του οξειδωτικού στρες μπορεί να είναι απαραίτητες για την ακροσωμική αντίδραση του σπέρματος και την αλληλεπίδραση σπέρματος-ωαρίου (Aitken 1989). Η υπερβολική παραγωγή ROS μπορεί να οδηγήσει σε βλάβη του DNA στα σπερματοζωάρια (Kodama 1997, Lopes 1998). Το σοβαρό οξειδωτικό στρες μπορεί να οδηγήσει σε υπογονιμότητα λόγω του αρνητικού αντίκτυπου σε συμβάντα σύντηξης, όπως αντίδραση ακροσωμάτων και σύντηξη σπέρματος-ωαρίων (Aitken 2003, Agarwal 2005)

Πολλοί παράγοντες επηρεάζουν την αλληλεπίδραση των σπερματοζωαρίων και των ωαρίων *in vivo* και *in vitro*. Η εγγενής ποιότητα των σπερματοζωαρίων και των ωαρίων είναι σημαντικοί καθοριστικοί παράγοντες για τα αποτελέσματα της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Η ανάπτυξη εμβρύων θηλαστικών μπορεί να καθυστερήσει παρουσία δυσμενών συνθηκών. Η ανάπτυξη βλαστοκύστης *in vitro* υστερεί πάντοτε έναντι της ανάπτυξης βλαστοκύστης *in vivo* (Bonì 1999; Viuff 1999). Οι συνθήκες καλλιέργειας μετά τη γονιμοποίηση επηρεάζουν τον αριθμό, την ποιότητα και την εκκόλαψη βλαστοκύστης. Το ROS στα μέσα καλλιέργειας επηρεάζει τη γονιμοποίηση, την ανάπτυξη εμβρύων και τα κλινικά ποσοστά εγκυμοσύνης. Αυξημένες συγκεντρώσεις ROS στα μέσα καλλιέργειας συσχετίστηκαν με χαμηλότερα ποσοστά κύησης τόσο με IVF όσο και με ICSI (Bedaiwy 2004, Agarwal 2005).



Εικόνα 11: Η επίδραση της παρουσίας ελεύθερων ριζών και ROS στην καλλιέργεια ART και επακόλουθες επιδράσεις στην ανάπτυξη εμβρύων (Agarwal 2012)

Οξειδωτικό Στρες στην ART

Παρά την πρόοδο των τεχνικών ART, οι γαμέτες και τα έμβρυα όταν χειρίζονται, για διαδικασίες ART, εκτίθενται σε διάφορους πιθανούς παράγοντες που προκαλούν ROS. *In vitro*, ο κίνδυνος ανάπτυξης οξειδωτικού στρες είναι μεγαλύτερος από ό, τι *in vivo* και η αρνητική του επίδραση μπορεί να ενισχυθεί λόγω της έλλειψης φυσιολογικών αμυντικών μηχανισμών, της απουσίας φυσικών αντιοξειδωτικών και της παρουσίας πολλαπλών πιθανών πηγών ROS (Lampriao 2012). Αυτές οι πηγές ROS κατά τη διάρκεια των διαδικασιών ART θα μπορούσαν είτε να είναι ενδογενώς από τους γαμέτες όπως έχει αναλυθεί στα προηγούμενα κεφάλαια, είτε μέσω εξωγενών περιβαλλοντικών παραγόντων (du Plessis SS 2008, Agarwal 2014). Περιβαλλοντικές συνθήκες όπως οξυγόνο, ορατό φως, μεταλλικά ιόντα και αμινοξειδάσες από νεκρά σπερματοζωάρια είναι πηγές εξωγενών ROS. Η υψηλή συγκέντρωση O₂ κατά τη διάρκεια καλλιέργειών *in vitro* οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα H₂O₂ που προκαλούν κατακερματισμό του DNA. Το ROS όπως το H₂O₂ υπήρξε η πηγή προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου ή απόπτωσης που εμποδίζει την ανάπτυξη εμβρύων σε βλαστοκύστη (Jurisicova 1996, Gurta 2009). Οι παράγοντες που προκαλούν οξειδωτικό στρες *In vitro* αναλύονται παρακάτω.

Ορατό φως

Ο *in vitro* χειρισμός των γαμετών και των εμβρύων συνεπάγεται την αναπόφευκτη έκθεση στο ορατό φως (400-700 nm), τόσο από το μικροσκόπιο όσο και από τον φωτισμό περιβάλλοντος (εργαστήριο / φθορίζον φως και φως της ημέρας / έμμεσο ηλιακό φως) (Li 2014, Ottosen 2007). Το φως εντός του ορατού φάσματος έχει επιζήμια αποτελέσματα στους γαμέτες και στην ανάπτυξη του εμβρύου. Η αρνητική επίδραση του ορατού φωτός επηρεάζεται από τη διάρκεια της έκθεσης, την ένταση και τη φασματική σύνθεση του φωτός (Ottosen 2007, Agarwal 2014).

Το μπλε φως (400-500 nm) είναι ιδιαίτερα επιζήμιο από το ορατό φως με μεγαλύτερα μήκη κύματος, καθώς το μπλε φως θα μπορούσε να δημιουργήσει υπεροξείδιο του υδρογόνου και να μεταβάλει τα ένζυμα στην αναπνευστική αλυσίδα (Hockberger 1999). Το έμβρυο ποντικού που εκτέθηκε σε γαλάζιο φως είχε μειωμένους ρυθμούς σχηματισμού βλαστοκύστεων, υψηλότερα ποσοστά βλαστομερούς απόπτωσης και υψηλότερη παραγωγή ROS (Oh 2007). Η χρήση φίλτρων φωτός σε μικροσκόπια επιθεώρησης (που μειώνει το φως <500 nm) (Ottosen 2007, 46), και ο μικρότερος δυνατός χρόνος επιθεώρησης θα μπορούσε να συμβάλει στη μείωση αυτών των φαινομένων (Ottosen 2007). Μελέτη έδειξε πως χρησιμοποιώντας χαμηλά επίπεδα φωτισμού κατά τη διάρκεια χειρισμού ανθρώπινων εμβρύων καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας *in vitro* γονιμοποίησης-μεταφοράς εμβρύου (IVF-ET) (και άλλα μέτρα για την ελαχιστοποίηση της ανάπτυξης οξειδωτικού στρες *in vitro*)

σε 110 κύκλους IVF έδωσε ένα σχετικά υψηλό ποσοστό βλαστοποίησης (Noda 1994). Επίσης, wάρια που είχαν προηγούμενη έκθεση σε φως περιβάλλοντος σχηματίζουν λιγότερες και χαμηλότερης ποιότητας βλαστοκύστες. Αυτή η επιβλαβής επίδραση της έκθεσης στο φως στις βλαστοκύστες βρέθηκε να αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου (Li 2014). Αρκετές άλλες μελέτες έχουν τεκμηριώσει την αρνητική επίδραση της έκθεσης στο ορατό φως στην ανάπτυξη των εμβρύων των ζώων (Squirrell 1999, Takenaka 2007, Moshkdanian 2011, Takahashi 1999, Agarwal 2014).

Ακτινοβολία φωτός (400 έως 800 nm με μέγιστη ενέργεια στα 600 nm για 3 λεπτά) ανθρώπινων σπερματοζωαρίων αύξησε την υπερ-ενεργοποιημένη κινητικότητα, χωρίς ενίσχυση της συνολικής κινητικότητας (Shahar 2011) Η υπερ-ενεργοποιημένη κινητικότητα μπορεί να είναι κρίσιμη για την εξασφάλιση επιτυχούς γονιμοποίησης (Ho 2001). Ωστόσο, η παραγωγή ROS σε αυτά τα σπερματοζωάρια αυξήθηκε μετά από 1 έως 3 λεπτά έκθεσης στο φως (Shahar 2011).

Μέσα Καλλιέργειας

Η σύνθεση των μέσων που χρησιμοποιήθηκαν κατά την καλλιέργεια ανθρώπινων ωαρίων και εμβρύων πριν από την εμφύτευση έχει άμεση επίδραση στην ποιότητα του εμβρύου και στη συνέχεια στην επιτυχία της ART (Agarwal 2006). Η παρουσία μεταλλικών ιόντων (σίδηρος, Fe²⁺ και χαλκός, Cu²⁺) σε μέσα καλλιέργειας θα μπορούσε να προκαλέσει αντιδράσεις που δημιουργούν ROS εντός των κυττάρων (Guerin 2001) και ο ρυθμός σχηματισμού ROS ποικίλλει ανάλογα με τη σύνθεση των μέσων καλλιέργειας (Jana 2010). Η προσθήκη χηλικών μετάλλων (π.χ. EDTA) μπορεί να μειώσει τον σχηματισμό ROS (Orsi 2001, Nasr-Esfahani 1992), ωστόσο, πρόσθετα συμπληρώματα (π.χ. λευκωματίνη) μπορεί αντ' αυτού να προκαλέσουν συσσώρευση φορτίου οξυγόνου (du Plessis 2008). Η συμπλήρωση μέσων καλλιέργειας με αντιοξειδωτικά (π.χ. ασκορβικό οξύ, άλφα-τοκοφερόλη) θα μπορούσε να βοηθήσει στην ανακούφιση των δυσμενών επιδράσεων του ROS στους γαμέτες (Sikka 2004).

Τα μέσα καλλιέργειας μπορούν να παράγουν ROS σε διαφορετικούς ρυθμούς ανάλογα με τη σύνθεσή τους (Jana 2010). Ο αντίκτυπος του οξειδωτικού στρες που ενεργοποιείται από τα μέσα καλλιέργειας μπορεί να καταστρέψει εν μέρει το περιεχόμενο GSH των ωαρίων, ενισχύοντας την επίδραση του παρατεταμένου οξειδωτικού στρες και έτσι, διακινδυνεύοντας τη γονιμοποίηση και τη βιωσιμότητα των ωαρίων (Martin-Romero 2008).

Τα αντιοξειδωτικά των ωοθυλακίων και οι αυξητικοί παράγοντες στο υγρό των σαλπίνγων και της μήτρας καθαρίζουν το υπερβολικό ROS που παράγεται *in vivo* (Guerin

2001). Δεδομένου ότι αυτού στερούνται οι συνθήκες καλλιέργειας *in vitro*, υπάρχει σίγουρα τραυματισμός που σχετίζεται με το οξειδωτικό στρες και συνεπώς μια συγκριτική καθυστέρηση της ποιότητας ανάπτυξης εμβρύου *in vitro* (Gupta 2009).

pH και θερμοκρασία

Η ενδοκυτταρική ομοιοστάση είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη σε αλλαγές στο pH (οι περισσότερες συμβαίνουν σε pH 6 έως 8), ιδιαίτερα βασικές διεργασίες όπως σύνθεση πρωτεϊνών, μιτοχονδριακή λειτουργία, κυτταροσκελετική ρύθμιση και κυτταρικός μεταβολισμός (Will 2011). Οι διακυμάνσεις της συγκέντρωσης ιόντων υδρογόνου (pH) σε μέσα καλλιέργειας θα μπορούσαν να επηρεάσουν αρνητικά την κινητικότητα των σπερματοζωαρίων, την ωρίμανση των ωαρίων και την ανάπτυξη εμβρύων (Will 2011, Bagger 1987). Έτσι, για να διατηρηθεί το pH των μέσων καλλιέργειας, τα επίπεδα του CO₂ στον επωαστήρα πρέπει να διατηρούνται σταθερά, καθώς τα χαμηλά επίπεδα CO₂ τείνουν να αυξάνουν το pH των μέσων καλλιέργειας (Will 2011). Η αύξηση του pH θα μπορούσε να υποβάλει τα κύτταρα σε συνθήκες οξειδωτικού στρες.

Η θερμοκρασία του επωαστήρα θα πρέπει επίσης να διατηρείται συνεχώς σε θερμοκρασία ανθρώπινου σώματος, καθώς οι αυξανόμενες θερμοκρασίες μειώνουν τα επίπεδα pH και pKa (Ferguson 1980), διαταράσσουν τις ενδοκυτταρικές διεργασίες και μπορούν περαιτέρω να προκαλέσουν προκαλούμενη από ROS κυτταρική βλάβη (Larkindale 2002).

Συγκέντρωση οξυγόνου

Κατά τη διάρκεια της εξωσωματικής γονιμοποίησης και της ICSI, τα έμβρυα πριν από την εμφύτευση καλλιεργούνται στο εργαστήριο ART, συνήθως υπό τη συγκέντρωση οξυγόνου είτε σε ατμοσφαιρικές (~ 20%) είτε σε χαμηλές (~ 5%) συγκεντρώσεις οξυγόνου *in vitro* (Calzi 2012). Σε σύγκριση με τις ατμοσφαιρικές (~ 20%) συγκεντρώσεις οξυγόνου, η καλλιέργεια εμβρύου σε χαμηλότερες (~ 5%) συγκεντρώσεις οξυγόνου μοιάζει περισσότερο με τη φυσιολογική συγκέντρωση οξυγόνου στην ωθήκη και τη μήτρα (~ 2% έως 8%) (Calzi 2012). Οι υπεροξικές καταστάσεις θα μπορούσαν να ενισχύσουν τη δραστηριότητα των ενζύμων οξειδάσης που εξαρτώνται από το οξυγόνο (Guerin 2001). Έτσι, οι συγκεντρώσεις οξυγόνου σε ατμοσφαιρικά επίπεδα θα μπορούσαν να δημιουργήσουν ROS και να προκαλέσουν την ανάπτυξη οξειδωτικού στρες (Cohen 1997), επηρεάζοντας έτσι αρνητικά την ποιότητα του εμβρύου.

Μια συστηματική ανασκόπηση Cochrane (7 μελέτες, 2422 συμμετέχοντες) και μετα-ανάλυση (4 μελέτες, 1382 συμμετέχοντες) ανέφεραν ότι τα έμβρυα αναπτύχθηκαν καλύτερα και ήταν υψηλότερης ποιότητας όταν καλλιεργήθηκαν σε χαμηλές (5%) συγκεντρώσεις οξυγόνου, οδηγώντας σε βελτιωμένη συνεχιζόμενη και κλινική εγκυμοσύνη και ποσοστά ζωντανών γεννήσεων (Bontekoe 2012, Kovacic 2010)

Φυγοκέντρηση

Στην ART, η φυγοκέντρηση είναι ένα συνηθισμένο βήμα που χρησιμοποιείται στις τεχνικές παρασκευής σπερματοζωαρίων για την απομάκρυνση του σπερματικού πλάσματος, το οποίο είναι μια πιθανή πηγή ROS (Shekarriz 1995). Ωστόσο, η ίδια η διαδικασία φυγοκέντρησης συμβάλλει στα επίπεδα ROS, με τη διάρκεια του χρόνου φυγοκέντρησης να έχει μεγαλύτερη επίδραση στη δημιουργία-ROS σχηματισμού σε σύγκριση με την εφαρμοζόμενη δύναμη g (Shekarriz 1995). Παρά την αρχική ποιότητα των σπερματοζωαρίων, ο μεγαλύτερος χρόνος φυγοκέντρησης εκθέτει τα σπερματοζωάρια σε υψηλότερη θερμοκρασία και προκαλεί μεγαλύτερη ζημιά στις παραμέτρους του σπέρματος (Henkel 2003).

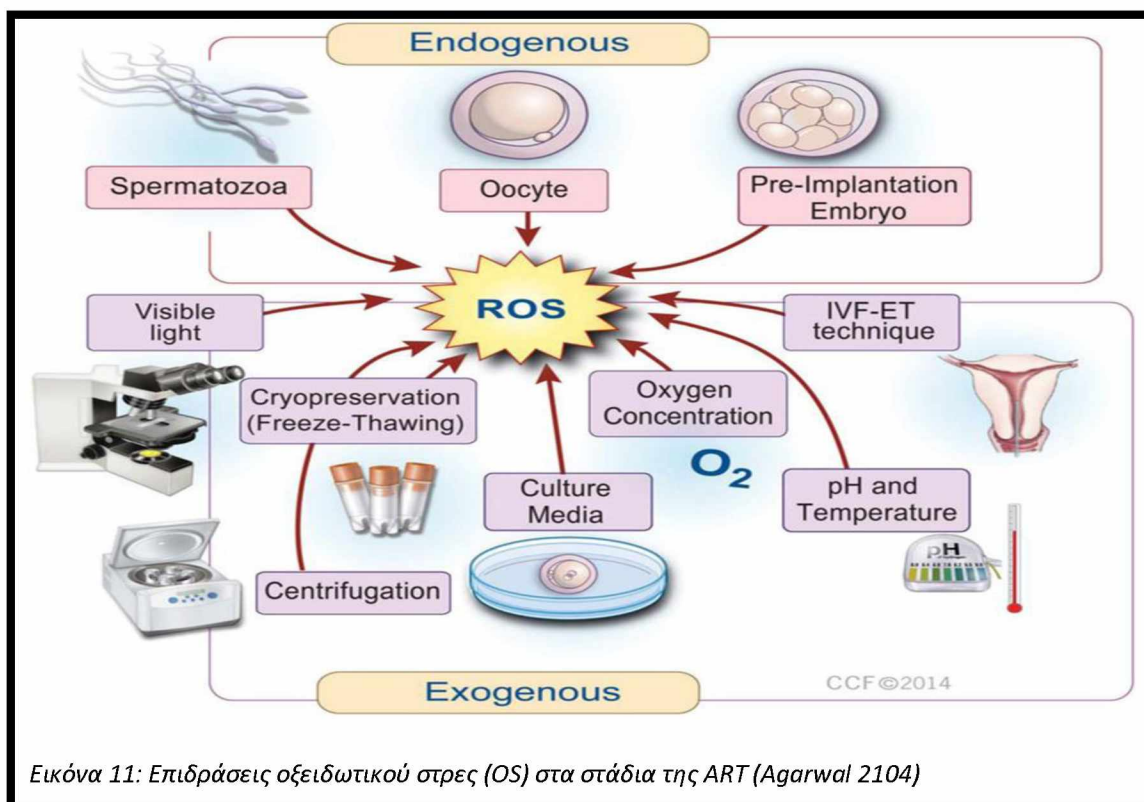
Τεχνική ART

Στο κλινικό περιβάλλον, ο χειρισμός γαμετών και εμβρύων *in vitro* κατά τη διάρκεια της ART είναι μια πιθανή πηγή παραγωγής ROS (Lampiao 2012). Μια διαδικασία εξωσωματικής γονιμοποίησης περιλαμβάνει μακρό χρόνο επώασης σπερματοζωαρίων, ωαρίων και κοκκωδών κυττάρων του (τα οποία είναι δυνητικοί παραγωγοί ROS) στο μέσο γονιμοποίησης. Αντίθετα, το ICSI έχει μικρότερη περίοδο επώασης που περιλαμβάνει μόνο ένα σπερματοζώαριο και ένα ωάριο που έχουν αφαιρεθεί τα κοκκώδη κύτταρα. Ως εκ τούτου, το ICSI ενέχει μικρότερο κίνδυνο παραγωγής ROS κατά τη γονιμοποίηση σε σύγκριση με την εξωσωματική γονιμοποίηση (Rakhit 2013). Στο ICSI από την άλλη πλευρά, ένα σπέρμα εγχέεται στο κυτταρόπλασμα των ωαρίων (Gurta 2009), παρακάμπτει τη φυσική επιλογή επιτρέποντας έτσι την έγχυση των κατεστραμμένων σπερματοζωαρίων στο ωάριο, παρά το γεγονός ότι το επιλεγμένο σπερματοζώαριο έχει μορφολογικά φυσιολογική εμφάνιση, (Agarwal 2003). Εναλλακτικά, η διαδικασία εξωσωματικής γονιμοποίησης αποτρέπει τη γονιμοποίηση από σπερματοζωάρια που έχουν υποστεί βλάβη στο DNA (Sikka 2003).

Κρυοσυντήρηση (κατάψυξη / απόψυξη)

Η κρυοσυντήρηση περιλαμβάνει τη διατήρηση γαμετών / εμβρύων και ολόκληρων ιστών ωθηκών ή όρχεων με ψύξη σε θερμοκρασίες κάτω από το μηδέν και στη συνέχεια απόψυξη για χρήση σε θεραπείες ART (Pegg 2007). Αν και η χρήση κρυοπροστατευτικών και βελτιστοποιημένων πρωτοκόλλων φαίνεται να ενισχύει τη βιωσιμότητα των κυττάρων, η διαδικασία κατάψυξης-απόψυξης είναι ένας ακραίος στρεσογόνος παράγοντας που μπορεί να τροποποιήσει τη δομή και την ακεραιότητα του κυττάρου, π.χ. μεμβράνη πλάσματος σπερματοζωαρίων (Di Santo 2011). Κατά τη διάρκεια της κρυοσυντήρησης, οι διαδικασίες κατάψυξης-απόψυξης αυξάνουν τα επίπεδα οξειδωτικής βλάβης και κατακερματισμού του DNA, με αποτέλεσμα τα σπερματοζωάρια μετά την απόψυξη να έχουν χαμηλότερη κινητικότητα και βιωσιμότητα (Thomson 2009, Zribi 2010). Τα αντιοξειδωτικά συμπληρώματα προστατεύουν τα σπερματοζωάρια από τις επιπτώσεις της διαδικασίας κατάψυξης-απόψυξης (Zini 2011). Η δημιουργία ROS έχει παρατηρηθεί κατά την κρυοσυντήρηση των σπερματοζωαρίων κυρίως μέσω υπεροξειδωσής των λιπιδίων και βλάβης των λιπιδικών μεμβρανών (Alvarez 1992). Είναι εύλογο ότι η κρυοσυντήρηση των εμβρύων μπορεί να αυξήσει τους ρυθμούς υπεροξειδωσής των λιπιδίων εντός της κυτταρικής μεμβράνης λόγω των αυξημένων επιπέδων ριζών οξυγόνου. Έτσι, ένα τέτοιο άγχος μπορεί να προκαλέσει μειωμένη βιωσιμότητα των εμβρύων (Gurta 2009).

Ωστόσο, η χρήση νεότερων τεχνικών κρυοσυντήρησης όπως η υαλοποίηση έχει αποδώσει υαλοποιημένα ωάρια που είναι τόσο βιώσιμα όσο τα φρέσκα ωάρια όσον αφορά τον ρυθμό εμφύτευσης, το ποσοστό επιβίωσης του εμβρύου και το κλινικό ποσοστό εγκυμοσύνης (Sole 2013).



Εικόνα 11: Επιδράσεις οξειδωτικού στρες (OS) στα στάδια της ART (Agarwal 2104)

Κλινικές Μελέτες για το Οξειδωτικό Στρες και την Υποβοηθούμενη Αναπαραγωγή

Τα μη βέλτιστα ωάρια και η ποιότητα του εμβρύου είναι ένας από τους πολλούς λόγους που συμβάλλουν στα χαμηλά ποσοστά εγκυμοσύνης μετά την εξωσωματική γονιμοποίηση. Καθώς η κατανόησή μας για το μεταβολισμό των γαμετών και των εμβρύων έχει αυξηθεί τα τελευταία χρόνια, καταλήξαμε να υποθέσουμε ότι το οξειδωτικό στρες επηρεάζει αρνητικά το ανθρώπινο έμβρυο (Pasqualotto 2004) και την ανάπτυξη (Agarwal 2006).

In vivo οι ανθρώπινοι γαμέτες εκτίθενται σε φυσιολογικά επίπεδα ROS και διαθέτουν φυσικές αντιοξειδωτικές άμυνες. Μια φυσιολογική ποσότητα ROS στο ωοθυλακικό υγρό υποδηλώνει υγιή ανάπτυξη ωαρίων (Ruder 2008, Attaran 2000). Μία προοπτική μελέτη αξιολόγησε τη συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) χρησιμοποιώντας ωοθυλακικό υγρό που συλλέχθηκε από γυναίκες που υποβάλλονται σε λήψη ωαρίων για εξωσωματική γονιμοποίηση (Ruder 2008, Ογαωογε 2003,). Μέσα στη μελέτη, ένα TAC χαμηλότερης γραμμής αναφοράς παρατηρήθηκε στο ωοθυλακικό υγρό των εμβρύων που επέζησαν μέχρι την ημέρα της μεταφοράς (Ruder 2008, Ογαωογε 2003, **Tasha Harris 2013**). Βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ επιτυχούς γονιμοποίησης και υψηλότερης αντιοξειδωτικής ικανότητας ωοθυλακικού υγρού (Ruder 2008, Ογαωογε 2003). Αυτή η μελέτη δείχνει ότι η υψηλότερη αντιοξειδωτική κατάσταση αυξάνει τη πιθανότητα επιτυχούς σύλληψης χρησιμοποιώντας IVF.

Οι στρατηγικές για να ξεπεραστεί το οξειδωτικό στρες στοχεύουν στην ελαχιστοποίηση της έκθεσης των γαμετών σε περιβάλλοντα που δημιουργούν ελεύθερες ρίζες. Τα σπερματοζωάρια είναι μία από τις εξωγενείς πηγές του ROS. Οι Pasqualotto και συν., μέτρησαν τα επίπεδα της LPO και της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) στο ωοθυλακικό υγρό από γυναίκες που υποβλήθηκαν σε θεραπεία εξωσωματικής γονιμοποίησης και διαπίστωσαν ότι και οι δύο δείκτες συσχετίστηκαν θετικά με το αποτέλεσμα της εγκυμοσύνης. Δήλωσαν ότι ένα ορισμένο κρίσιμο επίπεδο ριζών οξυγόνου είναι απαραίτητο για την ωρίμανση των ωαρίων. Περαιτέρω υψηλά επίπεδα TAC εξουδετερώνουν ευνοϊκά το οξειδωτικό στρες του LPO. Αυτό παρατηρήθηκε σε μια παρόμοια μελέτη από τους Das και συν., όπου το ωοθυλακικό υγρό από γυναίκες που υποβλήθηκαν σε εξωσωματική γονιμοποίηση αξιολογήθηκε για βιοδείκτες OS συμπεριλαμβανομένων των LPO και TAC (Pasqualotto 2004, Das 2006, **Gupta 2009**).

Μια πρόσφατη μελέτη του οξειδωτικού στρες και ποιότητας των ωαρίων σε γυναίκες που υποβάλλονται σε εξωσωματική γονιμοποίηση, χρησιμοποιώντας το 8-OHdG ως βιοδείκτη για OS, έδειξε ότι το 8-OHdG ήταν σημαντικά υψηλότερο στο ωοθυλακικό υγρό των γυναικών υποβάλλονται σε εξωσωματική γονιμοποίηση και μεταφορά εμβρύου που παρουσίασαν υψηλό ποσοστό εκφυλιστικών ωαρίων σε σύγκριση σε γυναίκες με χαμηλά ποσοστά εκφυλιστικών ωαρίων (Tamura 2009). Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης δείχνουν ότι το οξειδωτικό στρες επηρεάζει αρνητικά την ωρίμανση των ωαρίων και η συμπλήρωση μελατονίνης, βιταμίνης E ή ένας συνδυασμός των δύο θα μπορούσε να βελτιώσει την ποιότητα των ωαρίων και να παρέχει προστασία από το οξειδωτικό στρες (Tamura 2009). Τα αποτελέσματα προτείνουν επίσης ένα στενή σχέση μεταξύ οξειδωτικού στρες και κακής ποιότητας ωαρίων (Tasha 2013).

Σε μια μελέτη Seino και συν., οι επιδράσεις του οξειδωτικού στρες στην ποιότητα των ωαρίων και των εμβρύων σε κύκλους IVF και ICSI προσδιορίστηκαν με ποσοτική μέτρηση των επιπέδων της 8-υδροξυ-2δεοξυγουανοσίνης (8-OHdG), δείκτη βλάβης του κυτταρικού DNA στα κοκκώδη κύτταρα από αναρρόφηση ωαρίων. Υψηλότερα επίπεδα 8-OHdG συσχετίστηκαν με χαμηλή γονιμοποίηση και στη συνέχεια χαμηλής ποιότητας έμβρυα. Οι γυναίκες με ενδομητρίωση είχαν περαιτέρω υψηλότερα επίπεδα 8-OHdG από ό,τι οι ασθενείς με άλλες ενδείξεις για εξωσωματική γονιμοποίηση. Έτσι, η επιταχυνόμενη βλάβη που προκαλείται από το οξειδωτικό στρες στα κοκκώδη κύτταρα μπορεί να είναι υπεύθυνη για τα κακά αποτελέσματα σε γυναίκες με ενδομητρίωση που υποβάλλονται σε διαδικασίες εξωσωματικής γονιμοποίησης (Seino 2001).

Το οξειδωτικό στρες έχει εμπλακεί στη διακοπή της ανάπτυξης εμβρύων και των εμβρύων κακής ποιότητας που αναπτύσσονται *in vitro*. Μια ανισορροπία στην οξειδοαναγωγική κατάσταση του αναπτυσσόμενου εμβρύου, ως αποτέλεσμα υποβέλτιστων συνθηκών καλλιέργειας, οδηγεί σε αλλοιωμένη γονιδιακή έκφραση και εξασθενημένη παραγωγή τριφωσφορικής αδενοσίνης (Hyslop 1988), η τελευταία εκ των οποίων μπορεί να επηρεάσει την ανάπτυξη του πλακούντα και του εμβρύου (Harvey 2002). **Gupta 2009**

Οι Yang και συν., βρήκαν υψηλότερη συγκέντρωση ενδοκυτταρικού ROS όπως φαίνεται από τα αυξημένα επίπεδα του H₂O₂ από κατακερματισμένα ανθρώπινα έμβρυα σε σύγκριση με τα μη κατακερματισμένα έμβρυα (Yang 1998). Η ανάπτυξη υγιών εμβρύων σχετίζεται στενά και συντονίζεται από τη διαδικασία ωρίμανσης των ωαρίων. Μια μελέτη των Bosco και συν., εξέτασε 63 ασθενείς που υποβλήθηκαν σε υποβοηθούμενη γονιμοποίηση με ICSI. Τα ωάρια που απέτυχαν να γονιμοποιηθούν παρουσίασαν απόπτωση και αυξημένη βλάβη στο DNA σε σύγκριση με τον έλεγχο των ωαρίων μετά την παραλαβή (Bosco 2005). Το OS εμπλέκεται στην κακή ανάπτυξη των εμβρύων, όπως φαίνεται από τα μειωμένα επίπεδα TAC που μετριοούνται σε μέσα καλλιέργειας από έμβρυα κακής ποιότητας

(Paszkowski 1996). Οι Bedaiwy και συν., ανέφεραν ότι το ROS παράγεται σε μέσα καλλιέργειας από την ανάπτυξη εμβρύου και είναι σημαντικά υψηλό όταν υπάρχει χαμηλή γονιμοποίηση, χαμηλή διάσπαση, χαμηλή ανάπτυξη βλαστοκύστης και αυξημένος κατακερματισμός. Αυτό ήταν ειδικό στους κύκλους ICSI, όπως εξηγείται από τη δυνητική αντιοξειδωτική δράση της κυτταρικής μάζας κυττάρων γύρω από τα ωάρια που αποφεύγονται κατά τη διάρκεια του ICSI (Bedaiwy 2004). Σε μια μεταγενέστερη μελέτη, η ίδια ομάδα εντόπισε το ρόλο του TAC στην ανάπτυξη ανθρώπινων εμβρύων *in vitro*. Υψηλά επίπεδα TAC μετρήθηκαν σε μέσα καλλιέργειας από έμβρυα με υψηλό αριθμό κυττάρων, χαμηλό κατακερματισμό και ανάπτυξη βλαστοκύστης μετά από συμβατικά IVF και ICSI. Τα αντιοξειδωτικά στα μέσα καλλιέργειας φαίνεται να εξουδετερώνουν το ROS που παράγεται από έμβρυα κακής ποιότητας και κατά συνέπεια να μειώνουν τα επίπεδα TAC (Bedaiwy 2004, Bedaiwy 2006, Gupta 2009).

Αντιοξειδωτικά ως Βελτιωτικοί Παράγοντες

Για τη διατήρηση των φυσιολογικών επιπέδων ROS και την πρόληψη της ανάπτυξης οξειδωτικού στρες, η περίσσεια ROS πρέπει να εξουδετερώνεται συνεχώς. Τα αντιοξειδωτικά είναι σε θέση να εξουδετερώσουν τα προ-οξειδωτικά είτε αποτρέποντας τον σχηματισμό τους μέσω τερματισμού των πολλαπλασιαστικών οξειδωτικών αλυσιδωτών αντιδράσεων είτε απομακρύνοντας το υπάρχον ROS, διατηρώντας έτσι την ευαίσθητη ισορροπία προ-οξειδωτικού / αντιοξειδωτικού και συνεπώς προστατεύοντας το κύτταρο και το μικροπεριβάλλον του από οξειδωτική βλάβη (Lampiao 2012, Bansal 2010). Παραδείγματα αντιοξειδωτικών συστημάτων περιλαμβάνουν ένζυμα όπως SOD, καταλάση και γλουταθειόνη υπεροξειδάση / αναγωγάση, και μια ποικιλία μη ενζύμων όπως βιταμίνες (E, C, B complex), πολυφαινόλες (φλαβονοειδή), καροτενοειδή και ιχνοστοιχεία μεταξύ άλλων (Agarwal 2014). Τα συστατικά του ανθρώπινου αναπαραγωγικού συστήματος περιέχουν αντιοξειδωτικά που είτε σχηματίζονται ενδογενώς είτε αποκτώνται από διατροφικές πηγές (Gupta 2009). Στις γυναίκες, αντιοξειδωτικά υπάρχουν στις ωοθήκες, το ωοθυλάκιο, τις σάλπιγγες και το περιτοναϊκό υγρό και το επιθήλιο του ενδομητρίου (Agarwal 2014).

Σε μια ρύθμιση ART, τα αντιοξειδωτικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη βελτίωση των επιβλαβών επιπτώσεων της περίσσειας ROS στους γαμέτες και τα έμβρυα. Οι στρατηγικές θεραπείας που χρησιμοποιούν αντιοξειδωτικά μπορούν να προσεγγιστούν με δύο γενικούς τρόπους, είτε ως από του στόματος συμπλήρωση του υπογόνιμου ζευγαριού αρκετούς μήνες πριν από τον κύκλο ART τους, είτε ως *in vitro* συμπλήρωση στα μέσα κατά τη διάρκεια του ίδιου του πρωτοκόλλου ART, προκειμένου να ελαχιστοποιηθούν οι ενδογενείς και εξωγενείς πηγές ROS, αντίστοιχα (Agarwal 2014).

Ο ρόλος των αντιοξειδωτικών στην υποβοηθούμενη αναπαραγωγή είναι πράγματι μεγάλης σημασίας. Για παράδειγμα, σε υπογόνιμους άνδρες που υποβάλλονται σε εξωσωματική γονιμοποίηση και ICSI, τα υψηλά επίπεδα σπέρματος ROS συσχετίζονται αρνητικά με τη μορφολογία και τη ζωτικότητα των σπερματοζωαρίων και τα ποσοστά γονιμοποίησης, ενώ τα επίπεδα των σπερματικών αντιοξειδωτικών έδειξαν θετική συσχέτιση με τα ποσοστά γονιμοποίησης. Αν και τα επίπεδα ROS ήταν υψηλότερα στην εξωσωματική γονιμοποίηση από ό, τι σε ομάδες ασθενών με ICSI, η συνολική συγκέντρωση αντιοξειδωτικών στο σπερματικό πλάσμα και τα ποσοστά γονιμοποίησης δεν διέφεραν μεταξύ των ομάδων IVF και ICSI (Hammadeh 2008). Τα σπερματικά αντιοξειδωτικά, γενικά ενισχύουν την ποιότητα των σπερματοζωαρίων, οδηγώντας σε υψηλότερα ποσοστά επιτυχίας ART.

Μια ανασκόπηση Cochrane σχετικά με την πρόσληψη αντιοξειδωτικών σε άνδρες συντρόφους ζευγών που υποβλήθηκαν σε ART (34 δοκιμές, 2876 ζευγάρια) ανέφερε αυξημένο ποσοστό εγκυμοσύνης (15 δοκιμές, 964 ζευγάρια, 96 εγκυμοσύνες) (αναλογία συγκεντρωτικών πιθανοτήτων (OR) 4,18, 95% CI 2,65-6,59 · P <0,00001, I² = 0%) και αυξημένες γεννήσεις (3 μελέτες, 214 ζευγάρια, 20 ζωντανές γεννήσεις) (συγκεντρωμένες I^2 4,85, 95% CI 1,92-12,24) · P = 0,0008, I² = 0%) σε άνδρες που λαμβάνουν αντιοξειδωτικά από του στόματος (Showell 2011).

Από την άλλη πλευρά, μια ανασκόπηση Cochrane σχετικά με την από του στόματος αντιοξειδωτική συμπλήρωση σε γυναίκες που υποβάλλονται σε εξωσωματική γονιμοποίηση (28 δοκιμές, 3548 γυναίκες) ανέφερε στοιχεία χαμηλής ποιότητας που υποδεικνύουν ότι η πρόσληψη αντιοξειδωτικών δεν συσχετίστηκε ούτε με αυξημένο ποσοστό εγκυμοσύνης (13 δοκιμές, 2441 γυναίκες) (I^2 1,30, 95% CI 0,92-1,85; P = 0,14, I² = 55%) ούτε με ζωντανό ποσοστό γεννήσεων (2 δοκιμές, 97 γυναίκες) (I^2 1,25, 95% CI 0,19-8,26, P = 0,82, I² = 75%). Ωστόσο, δεδομένα από 3 δοκιμές (276 γυναίκες) έδειξαν ότι η πεντοξυφυλλίνη συσχετίστηκε με αυξημένα ποσοστά κλινικής εγκυμοσύνης (OR 2,03, 95% CI 1,19-3,44, P = 0,009, I² = 0%) σε υπογόνιμες γυναίκες (Showell 2013). Και οι δύο αυτές αναθεωρήσεις περιέγραψαν την ανάγκη για καλύτερη ποιότητα αποδεικτικών στοιχείων που θα επέτρεπαν μια πιο οριστική ετυμηγορία σχετικά με τη χρησιμότητα της στοματικής αντιοξειδωτικής θεραπείας στον πληθυσμό ART.

Η εκτίμηση των επιπέδων ROS σπέρματος στους υπογόνιμους άνδρες μπορεί να βοηθήσει στον προσδιορισμό των ατόμων που μπορούν να επωφεληθούν από αντιοξειδωτική θεραπεία. Έχουν αναπτυχθεί διάφορες δοκιμές για την ανίχνευση των σπερματικών επιπέδων ROS που μπορούν να ταξινομηθούν σε άμεσες και έμμεσες δοκιμασίες. Επί του παρόντος, δεν υπάρχουν οδηγίες υπογονιμότητας που να συνιστούν ρουτίνα μέτρησης ROS και υπάρχει ακόμη μια συνεχιζόμενη συζήτηση σχετικά με το είδος

των ασθενών που πρέπει να εξεταστούν για το οξειδωτικό φορτίο. Η ασθενοζωοσπερμία σε ένα δείγμα σπέρματος είναι πιθανώς δείκτης OS (Agarwal 2014). Το υπερξιδωδες είναι επίσης υποδηλωτικό για αυξημένο οξειδωτικό στρες επειδή αποδίδεται σε αυξημένα επίπεδα μηλονδιαλδεΐδης. Αυξημένα λευκοκύτταρα ή στρογγυλά κύτταρα που είναι μια από τις κύριες πηγές του ROS μπορεί να προτείνουν περαιτέρω δοκιμές για οξειδωτικό στρες. Η ανώμαλη μορφολογία του σπέρματος λόγω κυτταροπλασματικών υπολειμμάτων συσχετίζεται επίσης με υψηλά επίπεδα ROS (Wagner 2018) Η δοκιμή υπο-οσμωτικής διόγκωσης υποδηλώνει βλάβη της μεμβράνης στο σπέρμα λόγω υπεροξειδωσης των λιπιδίων και αυτό μπορεί να συνεπάγεται υψηλότερα επίπεδα ROS στο σπέρμα. Εκτός αυτού, ορισμένες μελέτες προτείνουν τη δοκιμή ROS σε άτομα με ιδιοπαθή υπογονιμότητα. (Mayorga-Torres 2017, Alahmar 2019).

Βιβλιογραφική μελέτη αποκάλυψε τόσο θετικά όσο και αρνητικά αποτελέσματα με θεραπεία αντιοξειδωτικών (Ebisch 2007). Το φυλλικό οξύ παίζει σημαντικό ρόλο στη σύνθεση του DNA και στη σπερματογένεση. Το φυλλικό οξύ έχει την ικανότητα να καθαρίζει τις ελεύθερες ρίζες και ως εκ τούτου είναι ένα αντιοξειδωτικό (Joshi 2001). Το φυλλικό οξύ έχει αποδειχθεί ότι αυξάνει τον αριθμό των σπερματοζωαρίων, αυξάνει την κινητικότητα του σπέρματος και μειώνει τα ανώριμα κύτταρα στο σπέρμα (Bentivoglio 1993). Στη γυναικεία αναπαραγωγή, το φυλλικό οξύ παίζει σημαντικό ρόλο στην ποιότητα και την ωρίμανση των ωαρίων, την εμφύτευση, τον πλακούντα, την ανάπτυξη του εμβρύου και την ανάπτυξη οργάνων. Οι γυναίκες που έλαβαν συμπλήρωμα φυλλικού οξέος είχαν ωάρια υψηλότερης ποιότητας και υψηλότερο βαθμό ωρίμανσης από εκείνες που δεν έλαβαν συμπληρώματα. Περαιτέρω, τα επίπεδα ομοκυστεΐνης που συσχετίζονται αρνητικά με την ποιότητα των ωαρίων ήταν σημαντικά χαμηλότερα στο ωοθυλακικό υγρό σε γυναίκες με συμπληρώματα φυλλικού οξέος ενώ υποβλήθηκαν σε ART (Szymanski 2003, Gupta 2009).

Ο ψευδάργυρος διαθέτει αντιοξειδωτικές και αντι-αποπτωτικές ιδιότητες που εξουδετερώνουν το ROS (Zago 2001). Άνδρες με χαμηλό αριθμό σπερματοζωαρίων ≤ 20 εκατομμύρια ανά ml είχαν χαμηλότερη συγκέντρωση ψευδαργύρου στο πλάσμα από τους άνδρες με φυσιολογικό αριθμό σπερματοζωαρίων (Saaranen 1987). Ενώ η ανεπάρκεια ψευδαργύρου είναι σπάνια σε γυναίκες, μελέτες σε ζώα σε κουνέλια υποδηλώνουν ότι η ανεπάρκεια ψευδαργύρου θα μπορούσε να επηρεάσει την ωορρηξία (Shaw 1974). Οι Ng και συν., διερεύνησαν τα επίπεδα ψευδαργύρου σε ωοθυλακικά υγρά σε 33 γυναίκες που υποβλήθηκαν σε εξωσωματική γονιμοποίηση. Δεν βρήκαν συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων ψευδαργύρου και της παρουσίας ωαρίων με τα ποσοστά γονιμοποίησης. Επομένως, αυτή η μελέτη δείχνει ότι η περιεκτικότητα σε ψευδάργυρο δεν είχε καμία σχέση με την κατάσταση των ωαρίων ή την επιτυχία της εξωσωματικής γονιμοποίησης (Ng 1987). Ωστόσο, ποια

δοσολογία και διάρκεια χορήγησης φυλικού οξέος και ψευδαργύρου απαιτούνται για τη βελτίωση του αποτελέσματος γονιμότητας χρειάζεται περαιτέρω έρευνα (Gurta 2009).

Τα αντιοξειδωτικά όπως η βιταμίνη E (ά τοκοφερόλη), η βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ) και η βιταμίνη A βοηθούν στη διατήρηση της ισορροπίας οξειδωτικών-αντιοξειδωτικών στους ιστούς. Η συνδυασμένη θεραπεία με 400 mg γλουταθειόνης (GSH), 200 mg βιταμίνης C και 200 mg βιταμίνης E για 2 μήνες βελτίωσε σημαντικά τη συγκέντρωση του σπέρματος και μείωσε την οξειδωτική βλάβη του DNA (Kodama 1997). Ενώ οι περισσότερες μελέτες ανέφεραν βελτιωμένη εγκυμοσύνη μετά τη θεραπεία ανδρών συντρόφων με φυσικούς κύκλους, υπήρξε πρόσφατη αναφορά για υψηλότερο ποσοστό εγκυμοσύνης όταν οι άνδρες έλαβαν αντιοξειδωτικά πριν από τους κύκλους ICSI (Gurta 2009).

Σε μια πρόσφατη προοπτική τυχαιοποιημένη διπλή τυφλή ελεγχόμενη με εικονικό φάρμακο δοκιμή, οι Tremellen και συν., μελέτησαν αντιοξειδωτικά συμπληρώματα χρησιμοποιώντας Menevit (συνδυασμός λυκοπενίου, βιταμίνης E, βιταμίνης C, ψευδάργυρου, σεληνίου, φολικού οξέος, σκόρδου και φοινικέλαιου) στους άντρες συντρόφους που υποβάλλονται σε IVF-ICSI. Παρατήρησαν σημαντική βελτίωση στο βιώσιμο ποσοστό εγκυμοσύνης σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (38,5% έναντι 18%), οι οποίοι έλαβαν εικονικό φάρμακο (Tremellen 2007). Τα αντιοξειδωτικά συμπληρώματα μπορεί επίσης να έχουν όμως ανεπιθύμητες ενέργειες της αποσυγχρονισμένης συμπύκνωσης χρωματίνης (Gurta 2009).

Τα οφέλη των αντιοξειδωτικών στο γυναικείο αναπαραγωγικό στρες αμφισβητήθηκαν. Σε ασθενείς που υποβάλλονται σε εξωσωματική γονιμοποίηση, η συμπλήρωση βιταμινών κατά τη διάρκεια ορμονικής διέγερσης οδήγησε σε υψηλότερη συγκέντρωση βιταμίνης C στα ωοθυλάκια (Crha 2003). Τα ποσοστά εγκυμοσύνης αν και δεν είναι σημαντικά βελτιωμένα στην ομάδα αυτή. Σε μια πιλοτική διπλή τυφλή ελεγχόμενη με εικονικό φάρμακο δοκιμαστική μελέτη, οι Westphal και συν., μελέτησαν την επίδραση των συμπληρωμάτων που περιέχουν βιταμίνη E, σίδηρο, ψευδάργυρο, σελήνιο και L-αργινίνη στη βελτίωση της γονιμότητας στις γυναίκες. Οι ασθενείς που έλαβαν συμπλήρωμα ανέφεραν σημαντική αύξηση στα ποσοστά ωορρηξίας και εγκυμοσύνης σε σύγκριση με το εικονικό φάρμακο (Westphal 2004). Σε ακόμη μια τυχαιοποιημένη ελεγχόμενη δοκιμαστική συμπλήρωση ασκορβικού οξέος (750 mg ημερησίως) είχε ως αποτέλεσμα σημαντικά υψηλότερες συγκεντρώσεις προγεστερόνης στον ορό και ποσοστά εγκυμοσύνης σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (Henmi 2003). Το κάπνισμα σχετίζεται με κακή γονιμοποίηση και χαμηλότερο αποτέλεσμα εγκυμοσύνης κατά τη διάρκεια των διαδικασιών ART. Τα επίπεδα των ωοθυλακικών ROS αυξήθηκαν σε γυναίκες που είχαν παρατεταμένο ιστορικό καπνίσματος. Η αποφυγή του καπνίσματος βοηθά σίγουρα τις γυναίκες καθώς εξαλείφει το οξειδωτικό στρες που προκαλείται από το κάπνισμα (Paszkowski 2002). Αντιοξειδωτικά

συμπληρώματα μπορούν να προταθούν σε αυτή την ομάδα γυναικών για βελτίωση της γονιμότητας (Crha 2003, Gupta 2009).

Σε αυτές τις γραμμές, απαιτούνται περαιτέρω μεγάλες, καλά σχεδιασμένες τυχαιοποιημένες ελεγχόμενες κλινικές δοκιμές για την από του στόματος συμπλήρωση αντιοξειδωτικών, προκειμένου να δοθούν ισχυρότερες ενδείξεις και να προσδιοριστεί πιο πειστικά σχετικά με την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα της αντιοξειδωτικής θεραπείας στη βελτίωση της ποιότητας των γαμετών σε υπογόνιμους άντρες και γυναίκες. Παρομοίως, θα πρέπει επίσης να εξεταστεί η χρήση αντιοξειδωτικών *in vitro* στο κλινικό εργαστηριακό περιβάλλον κατά τις διαδικασίες ART, παράλληλα με τη βελτίωση των τεχνικών ART και τη βελτιστοποίηση του εργαστηριακού περιβάλλοντος. Καθώς ακόμη και ορισμένες από τις μελέτες που αποτελούν τη βάση για τις προηγούμενες αναφορές Cochrane υπόκεινται σε σημαντική ετερογένεια, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η απεριόριστη σύσταση αντιοξειδωτικών συμπληρωμάτων θα μπορούσε ακόμη και να είναι επικίνδυνη για τους ασθενείς.

Η προφυλακτική από του στόματος αντιοξειδωτική θεραπεία και η συμπλήρωση μέσου για καλλιέργεια, επώαση / χειρισμός και κρυοσυντήρηση μπορεί ενδεχομένως να συμβάλει στη βελτίωση της ποιότητας των γαμετών και στην ενίσχυση του αναπτυσσόμενου εμβρύου. Ωστόσο, τα κατάλληλα αντιοξειδωτικά και δοσολογίες (είτε ως μοναδική ένωση είτε ως συνδυασμός) κατάλληλα για διάφορες μορφές ζητημάτων υπογονιμότητας εξακολουθούν να παραμένουν ένας συνεχής τομέας έρευνας. Η από του στόματος αντιοξειδωτική συμπλήρωση είναι ένα αμφιλεγόμενο ζήτημα παρόλο που πολλοί ερευνητές έχουν εξετάσει αυτό το θέμα τα τελευταία χρόνια. Ενώ η τρέχουσα θεραπεία των υπογόνιμων ζευγαριών είναι εμπειρική.

Συμπεράσματα

Το οξυγόνο είναι ο σημαντικότερος παράγοντας δημιουργίας ελεύθερων ριζών στις αερόβιες μορφές ζωής. Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να παραχθούν από πολλά στοιχεία αλλά στα βιολογικά συστήματα το οξυγόνο και το άζωτο είναι τα σημαντικότερα. Μια ανασκόπηση της υπάρχουσας βιβλιογραφίας καταδεικνύει τον ρόλο που διαδραματίζει το OS στη διαμόρφωση ενός φάσματος φυσιολογικών λειτουργιών και του ρόλου του στις παθολογικές διαδικασίες. Τα δραστικά είδη δεν έχουν μόνο επιβλαβείς επιδράσεις αλλά συμμετέχουν και στην παραγωγή ενέργειας στο κύτταρο, στην άμυνα του ανοσοποιητικού συστήματος και την διαδικασία της κυτταρικής σηματοδότησης, καθώς ρυθμίζουν την λειτουργία όλων των βιομορίων (Pisochi 2015, Liguori 2018).

Τα δραστικά είδη οξυγόνου και αζώτου παράγονται με διάφορες ενδογενείς και εξωγενείς διεργασίες και η δημιουργία τους δεν μπορεί να παρεμποδιστεί λόγω των μεταβολικών διαδικασιών και των περιβαντολογικών παραγόντων. Το οξειδωτικό στρες προκύπτει από την ανισορροπία μεταξύ της παραγωγής δραστικών ειδών και της αντιοξειδωτικής άμυνας. Το βλαβερό αποτέλεσμα των ελευθέρων ριζών ονομάζεται οξειδωτικό στρες.

Η αντιοξειδωτική άμυνα προστατεύει τα βιολογικά συστήματα από την τοξικότητα των ελεύθερων ριζών και περιλαμβάνει τόσο τα ενδογενή όσο και τα εξωγενή μόρια. Η έλλειψη ισορροπίας μεταξύ των οξειδωτικών και του αντιοξειδωτικού αμυντικού συστήματος μπορεί να προκαλέσει συγκεκριμένους παράγοντες υπεύθυνους για οξειδωτική βλάβη στο κύτταρο, υπερεκφράσεις γονιδίων και ογκογονιδίων, παραγωγή μεταλλαξιόγόνων ενώσεων, εμφάνιση φλεγμονής (Pisoschi 2015). Η υπερβολική παραγωγή ROS και το προκύπτον οξειδωτικό στρες συμβάλουν στη γήρανση και σε αρκετές ασθένειες που επηρεάζουν την αναπαραγωγή ανδρών και γυναικών.

Όταν τα επίπεδα ROS υπερβαίνουν την ικανότητα σάρωσης του αντιοξειδωτικού συστήματος, ενζυματικές και μη διεργασίες οξειδοαναγωγής, μπορούν να επισκευάσουν τα οξειδωμένα μόρια και να καταστρέψουν μόρια που έχουν υποστεί βλάβη. Έτσι, η διατήρηση υψηλού δυναμικού οξειδοαναγωγής είναι απαραίτητη προϋπόθεση για τη διατήρηση των αναπαραγωγικών συστημάτων σε υγιή κατάσταση (Fujii 2005, Lu 2018).

Το οξειδωτικό στρες που εμφανίζεται κατά την αναπαραγωγή και ενεργοποιεί, επηρεάζει αναπαραγωγικά κύτταρα και όργανα και λαμβάνει μέρος στην ανάπτυξη ασθενειών που σχετίζονται με την υπογονιμότητα αλλά και σε επιπλοκές της κύησης (Lu 2018). Το οξειδωτικό στρες έχει θεμελιώδη ρόλο στην εμφάνιση της υπογονιμότητας. Αυξημένα επίπεδα ROS θα μπορούσαν είτε να οφείλονται σε ενδογενείς ή εξωγενείς παράγοντες.

Τα ROS που σε χαμηλά και ελεγχόμενα επίπεδα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην γονιμοποιητική ικανότητα, υπερδραστηριοποίηση, ακροσωμική αντίδραση των σπερματοζωαρίων, στην γονιμοποίηση αλλά και στην ορμονική ρύθμιση της σπερματογένεσης. Στην γυναικεία αναπαραγωγή εμπλέκονται στη στεροειδογένεση των ωοθηκών, στην ωρίμανση των ωοκυττάρων, στην ωοθυλακιογένεση, την ωορρηξία και την λουτεόλυση (Agarwal 2006, Esfandiari 2005). Οι ενδογενείς πηγές ROS στο αρσενικό αναπαραγωγικό σύστημα είναι τα λευκά αιμοσφαίρια, τα ανώριμα σπερματοζωάρια και η κισσοκήλη, ενώ αντίστοιχα στο γυναικείο είναι τα ωάρια, τα κοκκώδη κύτταρα και το ωοθυλακικό υγρό (Agarwal 2014a, 2014b).

Μια ανισορροπία οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών μπορεί να οδηγήσει σε πληθώρα δυσμενών αποτελεσμάτων επηρεάζοντας τις λειτουργίες των σπερματοζωαρίων την σπερματογένεση και να προκαλέσει ανδρική υπογονιμότητα αλλά και να οδηγήσει σε αναπαραγωγικά νοσήματα στην γυναίκα. Η ενδομητρίωση, το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών αλλά και η ανεξήγητη υπογονιμότητα μπορεί να προκληθούν από οξειδωτικό στρες. Επίσης, ορισμένες επιπλοκές της κύησης, όπως η αυθόρμητη έκτρωση, η επαναλαμβανόμενη απώλεια της εγκυμοσύνης, ο σακχαρώδης διαβήτης κύησης και η προεκλαμψία, μπορεί επίσης να αναπτυχθούν σε απάντηση στο οξειδωτικό στρες (Merve 2016).

Μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί σε ότι αφορά τις γενετικές διαφορές και πολυμορφισμούς στα κύρια αντιοξειδωτικά γονίδια ενδέχεται να μεταβάλουν την ευαισθησία ενός άνδρα σε υπογονιμότητα και ελαττωματική σπερματογένεση. Τις τελευταίες δύο δεκαετίες, πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι οι λειτουργικοί πολυμορφισμοί ή η γενετική διαταραχή των γονιδίων CAT, GPX, GST, NOS, NRF2 και SOD συσχετίστηκαν με την ανδρική υπογονιμότητα. Μελέτες έχουν περιγράψει τη σχέση μεταξύ SNP στα γονίδια CAT, GPX, GST, NOS, NRF2 και SOD και την υπογονιμότητα. Αρκετές μελέτες έχουν επίσης αναφέρει τις συνεργιστικές επιδράσεις των αντιοξειδωτικών γονιδιακών πολυμορφισμών και του περιβαλλοντικού ROS όπως το κάπνισμα και η έκθεση σε περιβαλλοντικούς ρύπους. Επομένως, τα αντιοξειδωτικά γονίδια μπορεί να διαδραματίσουν καθοριστικό ρόλο στη σπερματογένεση και τη λειτουργία του σπέρματος, και οι γενετικές παραλλαγές τους μπορεί να τροποποιήσουν την αντιοξειδωτική ικανότητα του ανθρώπινου αναπαραγωγικού συστήματος και να αυξήσουν τον κίνδυνο για ανδρική υπογονιμότητα.

Ωστόσο, οι περισσότερες μελέτες για τη σχέση μεταξύ αντιοξειδωτικών γονιδιακών παραλλαγών και ανδρικής υπογονιμότητας έχουν διεξαχθεί σε ζωικά μοντέλα ή σε συγκεκριμένο γεωγραφικό πληθυσμό. Επιπλέον, οι συστηματικές μελέτες των ολοκληρωμένων οδών σηματοδότησης αντιοξειδωτικών στη σπερματογένεση και μελέτες σε πολλά κέντρα ή μελέτες μεγάλων κοόρτων είναι περιορισμένες. Η ανακάλυψη και επικύρωση

αντιοξειδωτικών γενετικών παραλλαγών ως γενετικών δεικτών για τη διάγνωση και η εκτίμηση κινδύνου για την ανδρική υπογονιμότητα μπορεί να διευκολύνει τη βελτίωση των κλινικών προσεγγίσεων για τη συγκεκριμένη διαταραχή.

Στις ασθένειες του γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος έχει ταυτοποιηθεί, σε διάφορες μελέτες, η παρουσία δεικτών οξειδωτικού στρες αλλά και χαμηλότερα επίπεδα αντιοξειδωτικών ενζύμων και υα μπορούσαν να θεβρηθούν ως οξειδωτικές καταστάσεις.

Τα αντιδραστικά είδη οξυγόνου και αζώτου μπορούν να επηρεάσουν αρνητικά την εμφύτευση εμβρύου και μπορεί να επηρεάσουν την ανάπτυξη αναπαραγωγικών διαταραχών όπως η ενδομητρίωση και η προεκλαμψία. Αν και η παθογένεση της προεκλαμψίας δεν έχει ακόμη προσδιοριστεί, η ισχαιμία / υποξία του πλακούντα θεωρείται σημαντικός παράγοντας μέσω της επαγωγής OS, η οποία με τη σειρά της μπορεί να προκαλέσει χαρακτηριστική δυσλειτουργία των ενδοθηλιακών κυττάρων της νόσου. Οι τροποποιημένες αγγειοκινητικές λειτουργίες έχουν αποδειχθεί με αποτυχημένη εμφύτευση εμβρύου και μειωμένη αιμάτωση του πλακούντα στην προεκλαμψία και την ενδομητρίωση. Αυτές οι επιδράσεις έχουν αναφερθεί ότι βελτιώνονται με τη βοήθεια αντιοξειδωτικών και συνεπώς θα μπορούσαν να ελαχιστοποιήσουν τον σχετικό κίνδυνο για τη στειρότητα.

Οι επιπλοκές της κύησης έχουν κοινό γνώρισμα την εσφαλμένη ανάπτυξη του πλακούντα (Rizzo 2012). Το οξειδωτικό στρες παίζει ένα φυσιολογικό ρόλο στην ανάπτυξη του υγιούς πλακούντα. Η ισορροπία οξειδωτικού στρες και αντιοξειδωτικών ενζύμων παίζει κύριο ρόλο στην πρώιμη διατήρηση του πλακούντα. Οι αυξημένες συγκεντρώσεις αντιδραστικών ειδών και η εξάντληση των αντιοξειδωτικών ενζύμων ενέχονται στις επιπλοκές της κύησης (Gupta 2009). Η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία δευτεροβάθμια του οξειδωτικού στρες συμβάλλει στην ανάπτυξη μαιευτικών επιπλοκών (Agarwal 2012).

Στα αναπαραγωγικά κύτταρα οι πιο συνηθισμένες εξωγενείς αιτίες οξειδωτικού στρες είναι η ρύπανση του περιβάλλοντος, το κάπνισμα, το αλκοόλ, η κακή διατροφή και η παχυσαρκία, οι λοιμώξεις. Η σύγχρονη ζωή επηρεάζει τη γονιμότητα αυξάνοντας το οξειδωτικό στρες. Ο υψηλός αλλά και ο χαμηλός ΔΜΣ έχουν αποδειχθεί ότι επηρεάζουν αρνητικά τη γονιμότητα των γυναικών και επηρεάζουν δυσμενώς τα έμβρυα μέσω οξειδωτικών μηχανισμών. Η μέτρια άσκηση μπορεί να βοηθήσει τις παχύσαρκες γυναίκες να μειώσουν το βάρος και να αποκαταστήσουν τη γονιμότητά τους. Παράγοντες τρόπου ζωής, όπως το κάπνισμα, η κατανάλωση αλκοόλ και η ψυχαγωγική χρήση ναρκωτικών διεγείρουν την παραγωγή δυσμενών ποσοτήτων ROS που οδηγούν σε οξειδωτικό στρες, γεγονός που καθιστά τις φυσιολογικές διαδικασίες αναπαραγωγής των γυναικών και το έμβρυο ευάλωτο σε βλάβες που προκαλούνται από οξειδωτικά. Η έκθεση σε περιβαλλοντική ρύπανση μπορεί επίσης να προκαλέσει υπερβολικό οξειδωτικό στρες κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης και

αυξάνει όλο και περισσότερο την ανησυχία για τον αντίκτυπο της έκθεσης των ρύπων στην υγεία της μητέρας και του εμβρύου.

Οι επιδράσεις των ελεύθερων ριζών στα ωκύτταρα, το σπέρμα και τα έμβρυα έχουν εμπλακεί σε ανεπαρκή αναπαραγωγικά αποτελέσματα στην υποβοηθούμενη αναπαραγωγή. Το περιβάλλον *in vitro* υποβάλλει γαμέτες και έμβρυα σε αφθονία ROS απουσία ενζυματικών αντιοξειδωτικών άμυνας που συνήθως υπάρχουν κατά τη διάρκεια της γονιμοποίησης *in vivo* και της εγκυμοσύνης. Στην ιδανική περίπτωση, η επιτυχία του ART μπορεί να επιτευχθεί εάν οι συνθήκες *in vivo* μιμηθούν επαρκώς. Για το σκοπό αυτό, αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι η αντιοξειδωτική συμπλήρωση των μέσων καλλιέργειας μπορεί να βελτιώσει τα αποτελέσματα της εγκυμοσύνης.

Παρά τις υποθέσεις σχετικά με τα οφέλη της αντιοξειδωτικής συμπλήρωσης στα αποτελέσματα της εγκυμοσύνης, κλινικές δοκιμές που διερευνούν τη χρήση αντιοξειδωτικών για τη θεραπεία αναπαραγωγικών διαταραχών έχουν αναφέρει σε μεγάλο βαθμό αντιφατικά αποτελέσματα. Επιπλέον, το μεγαλύτερο μέρος των στοιχείων που στηρίζουν τις θεραπευτικές επιδράσεις των αντιοξειδωτικών μέχρι σήμερα, έχουν παρατηρηθεί μέσω πειραματικών μελετών σε ζώα ή μέσω *in vitro* μελετών. Στο μέλλον, οι κλινικές δοκιμές στον άνθρωπο θα βοηθήσουν στην αποσαφήνιση της αποτελεσματικότητας των αντιοξειδωτικών ως πιθανών θεραπειών για την υπογονιμότητα.

Βιβλιογραφία

- Abd-Aziz, (2014), *ASM Sci J*, 8, 117–24.
- Abdel Aziz, (2008), *Andrologia*;40:292–7.
- Abdel, (2010), *Andrologia* 2010;42:236–41.
- Abdollahi, (2004), *Med Sci Monit.*, 10, RA141-RA147.
- Abenhaim, (2007), *Arch Gynecol Obstet.*, 275, 39-43.
- Acharya, (2003), *Ind Health.*, 41, 291-294.
- Adams, (2015), *Exp Biol Med (Maywood).*, 240(6), 711–717.
- Adashi, (1990), *Endocr Rev*, 11, 454–464.
- Adefuye, (2016) *J Immunol Res*, 1–13
- Agarwal & Said, (2003), *Hum Reprod Update*, 9, 331–345.
- Agarwal & Said, (2005), *BJU Int.*, 95, 503–7.
- Agarwal A, (2014), *Syst Biol Reprod Med*, 60(4), 206–216
- Agarwal, (2003), *Fertil Steril.*, 79(4), 829–43.
- Agarwal, (2004), *Middle East Soc Fertil J*, 9, 187–197.
- Agarwal, (2004), *Reprod Biomed Online* 9(3), 338–347
- Agarwal, (2005), *Reprod Biol Endocrinol*, 3, 28.
- Agarwal, (2006), *Curr Opin Obstet Gynecol.*, 18, 325-332.
- Agarwal, (2006), *Fertil Steril.*, 86, 503–512.
- Agarwal, (2006), *J Clin Embr.*, 9, 5-22.
- Agarwal, (2006), *Reprod BioMed Online*, 12(5), 630–3.
- Agarwal, (2008), *Antioxid Redox Signal*, 10,1375–1403.
- Agarwal, (2008), *Fertil Steril.*, 2009, 92(4), 1318–25.
- Agarwal, (2008), *Fertil. Steril.*, 89, 124-128
- Agarwal, (2009), *International Journal of Fertility and Sterility*, 4, Feb-Mar, 147-164
- Agarwal, (2011), *Int Braz J Urol.*, 37(4), 432–54.

Agarwal, (2012), *Nat Rev Urol* 9 (12), 678–690

Agarwal, (2012), *Reprod Biol Endocrinol* 10, 49.

Agarwal, (2014), *Reprod Biol Endocrinol.*, 12, 112

Agarwal, (2014), *World J Mens Health* 32, 1-17.

Agarwal, (2016), *Curr Opin Obstet Gynecol*, 28, 164–71

Agarwal, (2017), Springer International Publishing AG

Aggarwal, (2013), India, Springer, 27–51.

Aggerholm, (2008), *Fertil Steril.*, 90(3), 619–26.

Ahima, (2008), *J Clin Invest.*, 118(7), 2380.

Ahmed, (2000), *Mol Med.*, 6, 391-409.

Ahmed, (2009), *Biochem Soc Trans*, 37, 1237–42.

Aitken and Clarkson, (1987), *J Reprod Fertil*; 81: 459–469

Aitken, (1989), *Biol Reprod*, 41, 183–97.

Aitken, (1993), *J Reprod Fertil.*, 97 (2), 441–450

Aitken, (1999), *J Reprod Fertil.*, 115, 1–7.

Aitken, (2003), *Reproductive BioMedicine Online*, 7, 65–70.

Aitken, (2008), *Oxidative Med Cell Longev*, 1(1), 15–24.

Aitken, (2014), *Asian J Androl*, 16, 31–8.

Aitken, and Fisher, (1994), *Bioessays*, 16, 259–267

Akyol O, (2004), *In Vivo*, 18, 3, 377–390,

Alaghmand, (2007), *Environ Sci Technol.*, 41, 2364-2370

Alahmar, (2017), *Int J Infertil Fetal Med.*, 8, 45–9.

Alahmar, (2019), *J Hum Reprod Sci.*, 12(1), 4-18.

Al-Ali, (2014), *Andrologia*, 46(2), 106–11.

Alberg, (2002), *Toxicology*, 180, 121–137.

Albrecht, (2003), *Hum Reprod*, 18, 2039–47.

- Alderson, (2006), *Arch. Biochem. Biophys.*, 450, 1e8.
- Al-Gubory, (2010), *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 42, 1634–1650.
- Alikhani, (2007), *Am J Physiol Cell Physiol.*, 292, C850–C856.
- Al-Kunani, (2001), *BJOG*, 108, 1094–1097.
- Allen, (2006), *Endocrinology*, 147(8), 3924–35.
- Al-Quzwini, (2016), *Middle East Fertil Soc J.*, 21(4), 236–40.
- Al-Shebly, (2012), *Oxid. Med. Cell. Longev*, 329743.
- Altmae, (2010), *Fertil Steril*, 94, 130-137.
- Aluigi, (2000), *Anticancer Res.*, 20, 3183-3187.
- Alvarez, (1992), *J Androl.*, 3, 232- 241.
- Alvarez, (1995). *Mol Reprod Dev*, 42, 334–46.
- Álvarez-Castro, (2013), *Mini Rev Med Chem.*, 13(4), 541–52.
- American College of Obstetricians & Gynecologist, (2010), *American College of Obstetricians & Gynecologists*, 84-91.
- American College of Obstetricians and Gynecologists, (2002), *Obstet Gynecol.*, 99, 159-167.
- American College of Obstetricians and Gynecologists, *Practice Bulletin No. 12.* (2000). *Obstet Gynecol.*, 95, 1-3.
- Amin, (2008). *Reprod Biomed Online*, 17: 722-726.
- Ammar, (2019), *Environ Sci Pollut Res Int.*, May, 26(14), 14097-14105.
- Anderson, (2010), *Aust N Z J Obstet Gynaecol.*, 50, 8-20.
- Angelopoulou, (2007), *Reprod Biol Endocrinol.*, 5, 36.
- Angelucci, (2006), *Biochim Biophys Acta*, 1764, 1775–1785.
- Appasamy, (2007), *Reprod. Biomed. Online*, 14, 159-165
- Arabi, (2004), *Andrologia*, 36, 305-310
- Arioz, (2009), *Int J Gynecol Canc.*, 19, 1244-1247.
- Aris, (2009), *Placenta.*, 30, 342-347.

- Arrigo & Kretz-Remy, (1998). In Aruoma OI & Halliwell B (eds.), Saint Lucia: OICA International, pp. 183–223.
- Arya, (2007), *J Biosci.*, 32, 595-610.
- Aston, (2010), *Human Reproduction*, vol. 25, no. 6, pp. 1383–1397.
- Asunción, (2000), *J Clin Endocrinol Metab* 85, 2434-8
- Attaran, (2000), *Int J Fertil Womens Med.*, 45, 314-320.
- Augood , (1998). *Hum Reprod (Oxf)*, 13, 1532–1539.
- Augoulea, (2009). *Gynecol Endocrinol*, 25, 75-81.
- Aydos, (2009), *Fertility and Sterility*, vol. 92, no. 2, pp. 541–547.
- Azenabor, (2015), *J Reprod Infertil*, 16(3), 123.
- Aziz, (2004), *Fertil Steril* 81(2), 349–354
- Badaiwy, (2006), *Fertil Steril.*, 86, 647-650.
- Bagchi, (1992), *Arch Environ Contam Toxicol.*, 23, 1-5.
- Bagchi, (1995), *Toxicology*, 104, 129-140.
- Bagger, (1987), *J Reprod Fertil.*, 80, 251–255.
- Baker, (2010), *Am J Obstet Gynecol.*, 203 (246), e241-e244.
- Banerjee, (2001), *Rev Environ Health*, 16, 1-40.
- Banerjee, (2019), *Glob J Fertil Res*, ISSN, 2640-7884
- Banks, (2005), *Reproduction*, 129, 505-514
- Bansal, (2010), *Vet Med Int.*, Sep 7, 686137.
- Banu, (2009), *Mol Endocrinol.*, 23, 1291-1305.
- Barbosa, (2016) *Genet Mol Res* 15.
- Bari, (2011), *Front Biosci.*, 16, 498-516.
- Barratt, (2017), *Hum Reprod Update*, 23, 660–680
- Barreiro, (2016), *Proteomes*, 4(2), 18.
- Basini, (2008), *Reprod Fertil Dev*, 20, 269–74.
- Basta, (2002), *Circulation*, 105, 816-822.

- Basu, (2004), *Free Radic Res.*, 38, 105-122.
- Basu, (2011), *Obesity (Silver Spring)*, 19, 476-482.
- Battista, (2008), *J Neuroendocrinol.*, 20 (Suppl 1), 82-89.
- Beckman. (1998), *Physiol Rev.*, 78(2), 547–581.
- Bedaiwy, (2002), *Human Reproduction* 17, 426–431.
- Bedaiwy, (2004), *Fertil Steril.*, 82: 593-600.
- Bedaiwy, (2006), *Fertil Steril.*, 86, 304-309
- Bedaiwy, (2012), *Gynecol Endocrinol* 28(1), 51–55
- Beere, (2005), *J Clin Invest.*, 115, 2633-2639.
- Behrman, (2001), *J Soc Gynecol Investig*, 8, S40–S42
- Belhadj, (2014), *Rev Int J Hyperthermia*, 30(7), 513–23.
- Belo, (2004), *Atherosclerosis*, 177, 391–399.
- Bencini, (2010), *Agents Med. Chem.* 8 128e146.
- Benoff, (2009). *Mol Med.*, 15(7–8):248–62.
- Bentivoglio, (1993), *Fertil Steril.* 60: 698-701.
- Berlett, (1997), *J. Biol. Chem.* 272, 20313e20316.
- Bernal, (2010), *PLoS One.*, 5, e15558
- Berridge, (2003), *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4, 517–529.
- Bhatnagar, (2007), *Aust N Z J Obstet Gynaecol*, 47, 477-482.
- Bienert, (2007). *Journal of Biological Chemistry*, 282, 2, 1183–1192.
- Bierhaus, (1998), *Cardiovasc Res.*, 37, 586-600.
- Birben, (2012). *World Allergy Organ J.*, 5(1), 9–19.
- Bird, (2003), *Am J PhysiolRegulIntegr Comp Physiol*, 284, R245–R258.
- Biri, (2006), *J. Soc. Gynecol. Investig*, 13, 384–388.
- Biri, (2007), *Gynecol Obstet Invest.*, 64, 187-192.
- Bisht, (2017), *Nat Rev Urol.*, 14(8), 470–85.

- Bjersing, (1974), *Cell Tissue Res.*, 153, 31–44.
- Blaylock, (1998), *Free Radic Biol Med.*, 25(6), 748–52.
- Bloomer, (2009), *Oxid Med Cell Longev.*, 2, 19-25.
- Boden, (2011), *Am. Acad. Child Psy* 50, 132–140, e135
- Boeldt, 2011), *J Endocrinol.*, 210, 243–258.
- Boivin, (2007), *Hum Reprod.*, 22, 1506–1512
- Bonello N, (1996), *Biol Reprod.*, 54, 436–445.
- Boni, (1999), *Biology of Reproduction*, 61, 1050–1055.
- Bontekoe, (2012), *Cochrane Database Syst Rev.*, Jul 11, (7), CD008950.
- Borchert, (2003), *J Biol Chem.*, 278, 2571–2580.
- Bosco, (2005), *Fertil Steril.*, 84, 1417-1423.
- Bouloumie, (1999), *FASEB J.*, 13(10), 1231–8.
- Boutros, (2008), *Pharmacol Rev.*, 60, 261–310.
- Boveris & Chance, (1973), *Biochem J.*, 134, 707–16.
- Brannstrom, (1993), *Biol Reprod.*, 48, 277–286.
- Broekmans and Fauser, (2016). in: J.L. Jameson, L.J. De Groot, D.M. de Krester, (Eds.) *Endocrinology: adult and pediatric*. 7th ed. Elsevier Saunders, Philadelphia, 2260–2274
- Brown, (2006), *Am J Infect Dis.*, 2(3):130–5.
- Brown, (2009), *Cell Signal*, 21, 462–469.
- Buhimschi, (2000), *Am J Obstet Gynecol.*, 182, 458- 464.
- Bui, (2018), *Andrologia*, 50, e13012.
- Burney, (2007), *Endocrinology*, 148, 3814-3826.
- Burton & Jauniaux, (2004), *J Soc Gynecol Investig.*, 11, 342-352.
- Burton & Jauniaux, (2010), *Best Pract Res Clin ObstetGynaecol*, 25, 287–299.
- Burton, (1998), *Am. J. Clin. Nutr.*, 67, 669e684.
- Burton, (2003), *Reprod. Biomed. Online*, 6, 84–96.
- Burton, (2009), *Placenta*, 30 (Suppl A), S43-S48.

- Bykova M, (2007), *Fertil Steril*, 88, 305
- Byrne, (2003), *Arch Mal Coeur Vaiss.*, 96, 214-221.
- Cadenas, (2000), *Free Rad Biol Med.*, 29, 222–230.
- Calafat, (2008), *Environ Health Perspect.*, 116(1), 39–44.
- Calzi, (2012), *Clin Lab.*, 58, 997–1003.
- Camire, (1999), *Food Technol.*, 53 87e95.
- Carlson, (1993), *Free Radic Biol Med*, 14, 79–84.
- Carlson, (1995), *Steroids*, 60, 272–276.
- Carrell and Aston, (2011). *Systems Biology in Reproductive Medicine*, vol. 57, no. 1-2, pp. 17–26.
- Carvalho, (2011), *J Minim Invasive Gynecol*, 18, 419-427.
- Catt, (2000), *Hum Reprod* 15(Suppl 2), 199–206
- Chadha, (2007), *J Obstet Gynaecol Res.*, 33, 710-717.
- Challis, (2001), *Biol Neonate.*, 79, 163-167.
- Chan, (1998), *J Neurosci.*, 18, 5322-5332.
- Chandra, (2009), *Arch Med*, 5, 528–542.
- Chandrasekaran, (2017), *Redox Biol.*, 11, 91–102.
- Chaube, (2005), *Apoptosis*, 10, 863–75.
- Chaube, (2006), *Fertil Steril*, 86, 1106–11
- Chavarro, (2010), *Fertil. Steril.*, 93, 2222-2231
- Cheeseman, (1993), *Br. Med. Bull.*, 49, 481e493.
- Chehna-Patel, (2011), *Fertil Steril.*, 95, 1560-1567.
- Chelchowska, (2011), *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.*, 155, 132-136.
- Chen H, (2010), *Mol Cell Endocrinol.*, 323(2), 147–54.
- Chen W, (2010), *Guangdong Med J* 13: 1669-1671.
- Chen, (2006), *Life Sci.*, 79, 1040-1048.
- Chen, (2012), *Tohoku Journal of Experimental Medicine*, vol. 228, no. 3, pp. 259–266.

Cheng, (2001), *Gene*, 269, 1-2, 131–140.

Chew, (1984), *J. Dairy Sci*, 67, 1316–1322.

Chigurupati, (2008), *J Endocrinol.*, 199(2), 333–41.

Choy, (2002), *Fertil Steril.*, 78(2), 426–8.

Chumlea, (2003), *Pediatrics* 111, 110–113.

Cimino, (2016), *Nat Commun*, 7, 10055.

Cindrova-Davies, (2007), *Am J Pathol*, 170, 1511–1520.

Cindrova-Davies, (2007), *Am J Pathol.*, 171, 1168-1179.

Cindrova-Davies, (2009), *Placenta*, 30 (Suppl A), S55-S65.

Cinkaya, (2010), *J Obstet Gynaecol Res.*, 36, 1185-1188.

Ciocca, (2005), *Cell Stress Chaperones*, 10, 86-103.

Cobo, (2010), *Hum Reprod*, 25, 2239–2246.

Cohen, (1997), *Hum Reprod.*, 12, 1742–1749.

Comhaire, (2000), *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.*, 63, 159-165.

Cooper, (2008), *Indian J Physiol Pharmacol.*, 52, 11-18.

Costa, (2005), *Biochem Pharmacol.*, 69, 541-550.

Costantini, (2008), *Ecology Letters*, 11, 11, 1238–1251.

Costello, (2007), *Hum Reprod*, 22, 1200–9.

Cotgreave IA, (1997), *Adv Pharmacol.*, 38, 205-227.

Coughlan, (2004), *Placenta*, 25, 78–84.

Coutts, (2007), *Hum Reprod.*, 22(11), 2912–8.

Covaci, (2002), *Sci Total Environ.*, 298, 45-53.

Cramer, (2000), *Semin Reprod Med*, 18, 331-339.

Creanga, (2008), *Obstet Gynecol*, 111, 959-968.

Crha, (2003), *Cent Eur J Public Health*, 11, 63-67.

Crist, (2009), *J Womens Health (Larchmt)*, 18, 795-801.

Crow, (2000), *Nat Rev Genet* 1, 40-47.

Cutler & Mattson, (2003), *Critical Reviews of Oxidative Stress and Aging e Advances in Basic Science, Diagnostic and Intervention*, vol. 1, World Scientific Publishing Co, New Jersey, USA, p. 131 (chapter 8).

Cutler, (2003), *Critical Reviews of Oxidative Stress and Aging e Advances in Basic Science, Diagnostic and Intervention*, vol. 2, World Scientific Co, New Jersey, USA, p. 1146 (chapter 64).

Dada, (2003), *Teratog. Carcinog. Mutagen.*, 235-243

Dalle-Donne, (2003), *Clin Chim Acta*, 329, 23–38.

Darbandi, (2017), *Altern Ther Health Med.*, 23

Darbandi, (2018), *Reprod Biol Endocrinol. Sep 11*, 16(1), 87.

Das M, (2013), *J. Assist. Reprod. Genet.*, 30: 843-848

Das, (2006), *Hum Reprod*, 21, 2403-2407.

Dave, (1997), *Clin Sci*, 92, 277–284.

Day, (2015), *Nat. Commun.* 6, 8464.

Day, (2015), *Sci. Rep.* 5, 11208.

De Felip, (2004), *Chemosphere*, 54, 1445-1449.

De luliis, (2009), *Biol. Reprod.*, 81, 517-524

de Lamirande, (1992), *J Androl.*, 13, 368–78.

De Marco, (2002). *Placenta*, 23, S58-S68.

Dechend, (2003), *Circulation*, 107, 1632-1639.

DeCherney, (2003), McGraw Hill, New York 6, 979-990.

Delescluse, (2001), *Biochem Pharmacol*, 61, 399-407.

Deng, (2007), *Curr Clin Pharmacol.*, 2, 145-153.

Dennerly (2004), *Antioxid Redox Signal*, 6, 147–153.

Depuydt, (1996). *J Androl.*, 17, 699–707.

Derom, (2011), *Hum. Reprod.* 26, 2247–2252.

Desai N, (2009), *Fertil Steril*, 92, 1626–31.

Desai, (2009), *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 7, 114

Devine, (2012), *Biol Reprod.*, 86 (2),27

- Dharmarajan, (1999), *Endocrinology*, 140, 2555–2561.
- Di Santo, (2012), *Adv Urol.*, 2012, 854837.
- Diaconu, (2006), *Andrologia*, vol. 38, no. 4, pp. 152–157.
- Diamanti-Kandarakis, (2009), *Endocr Rev.*, 30 (4), 293–342.
- DiBaise, (2008), *Mayo Clin Proc.*, 83, 460-469.
- Diemer, (2003), *Endocrinology*, 144 (7), 2882–91.
- Dietrich, (2003), *Am J Clin Nutr.*, 77, 160–166
- Dinesh, (2012), *Reprod Sys Sexual Disorders*, 1 (114), 2
- Ding, (2005), *J. Neurosci.* 25, 9171e9175.
- Djordjevic, (2004), *J Matern Fetal Neonatal Med.*, 16, 367-372
- Dobrakowski, (2018), *TOxid Med Cell Longev.*, Sep 4, 6249536.
- Dobrzynska, (2013), *Drug Chem. Toxicol*, 36, 19-26
- Dokras A, (2006), *Biol. Reprod*, 75, 899–907.
- Dong, (2001), *J Reprod Med*, 46, 887891.
- Doorn, (2003), *Endocrinology*, 147, 2442–2457.
- Dorsam, (2000), *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 292, 1, 271– 279.
- Dragsted, (2004), *Am J Clin Nutr.*, 79, 1060-1072.
- Droge, (2002). *Physiol Rev*, 82, 47–95.
- Drose, (2012), *Adv. Exp. Med. Biol.* 748, 145e169.
- du Plessis, (2008), *Expet Rev Obstet Gynecol.*, 3, 539–554.
- Du Plessis, (2010), *Nat. Rev. Urol*, 7, 153-161
- Du, (2006), *Fertil Steril*, 85, 366–70.
- Duckitt, (2003), *Clin Evid*, 2044-2073.
- Ducsay, (2011), *J Endocrinol*, 210, 259–269.
- Duffy, (2016), *Mol Cell Neurosci*, 75, 93–100.
- Dunaif, (1997), *Endocr Rev*, 18, 774-800.
- Dupont, (2013), *Asian J. Androl.*, 15, 622-625

Durackova, (1999), Eds., Free Radicals and Antioxidants in Medicine (II), SAP, Bratislava, Slovakia.

Durackova, (2007). in The Activity of Natural Compounds in Diseases Prevention and Therapy, Eds., 11-59, SAP, Bratislava, Slovakia.

Durackova, (2010), Physiological Research, 59, 4, 459-469.

Dvorakova, (2000), Brain Research, 852, 2, 349-354,

Ebisch, (2007), Hum Reprod Update., 13, 163-174.

Ekerhovd, (2004), Gynecol Endocrinol 19(5), 239-246

El-Far, (2007), Clin Chem Lab Med 45, 879-883.

Elshal, (2009), Clin. Biochem., 42, 589-594

Emanuele MA, (2001), Alcohol Res Health., 25(4), 282-7.

Erenpreiss, (2008), Asian J. Androl., 10, 786-790

Esfandiari, (2005), Obstet Gynecol., 105, 653-660.

Espey, (1980), Biol Reprod., 22, 73-106.

Espey, (1982), Fertil Steril., 38, 238-247.

Esteves, (2015), Fertil Steril., 104, 1398-405.

Evans, (2005), Diabetes, 52 1e8.

Evenson, (1999), Hum. Reprod., 14, 1039-1049

Evers, (2002), Lancet, 360, 151-159

Fait, (2005), J Soc Gynecol Investig., 12: 46-49.

Fariello, (2012), BJU Int., 110, 863-867

Fariello, (2012), Hum. Reprod, 27, 3140-3149

Farina, (2008), Prenat Diagn., 28, 956-961.

Fausser, (2004) Hum Reprod (19), 41-7.

Faux, (2009), Biomarkers, 1, 90-6.

Fejes, (2005), Arch. Androl., 51, 385-393

Fenkci, (2003), Fertil Steril, 80, 123-127.

- Ferguson, (1980), *Anal Biochem*, 104, 300–310.
- Ferguson, (2017), *Am. J. Obstet. Gynecol*, 216, e527-1.
- Ferrara, (2008), *Rejuvenation Res.*, 11(1), 139–150.
- Finkel, (1998), *Current Opinion in Cell Biology*, 10, 2, 248–253.
- Finley, (2011), *J. Agric. Food Chem.*, 59, 6837e6846.
- Fisher, (1997), *J Exp Zool*, 277, 390–400.
- Fisher, (2015), *Am. J. Obstet. Gynecol*, 213, S115–S122.
- Fisher-Wellman, (2009), *Oxid Med Cell Longev*, 2, 43-51.
- Flatt, (2012), *Front Genet*, 3, 148.
- Flessel, (1993), *Environ Mol Mutagen.*, 22, 7-17.
- Flynn, (1997), *Int J Sports Med.*, 18(03), 191–6.
- Forman H, (2010), *Biochemistry*, 49, 5, 835– 842.
- Foyouzi, (2004), *Fertil Steril.*, 82 Suppl 3., 1019-1
- Fraczek, (2005), *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 59, 523–34.
- Franco, (2002), *J Cardiovasc Pharmacol.*, 40, 501-509.
- Fride, (2008), *J Neuroendocrinol.*, 20 (Suppl 1), 75-81.
- Frijhoff, (2015), *Antioxid Redox Signal.*, 23(14), 1144–1170.
- Fritz. (2011), In *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*, 8th ed., Seigafuse, S., Ed., Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, USA, 199–242.
- Fronczak, (2012), *J Androl.*, 33(4), 515–28.
- Frosali, (2004), *Biol Neonate.*, 85, 188-194.
- Fujii, (2003), *Asian J Androl.*, 5(3), 231–42.
- Fujii, (2005), *Reprod Biol Endocrinol*, 3, 43.
- Galimova, (2015), *Environ Sci Pollut Res Int.*, 22(19), 14566–9.
- Gandhi, (2012), *Oxid. Med. Cell. Longev*, 11 pages.
- Garolla, (2013), *Hum Reprod.*, 28(4), 877–85.
- Gauthier, (2010), *Alcohol Clin Exp Res.*, 34, 123-130.

Geiszt, (1997), *Journal of Biological Chemistry*, 272, 42, 26471–26478.

Gems, (2009), *Cell. Cycle* 8, 1681e1687.

Genestra, (2007), *Cell Signal.*, 19(9), 1807–1819.

Geva, (2000), *Obstetrical & Gynecological Survey*, 55, 511–9.

Gharagozloo, (2011), *Hum Reprod*, 26(7), 1628–40.

Gilca, (2007), *J. Postgrad. Med.* 53, 207e213.

Gil-Guzman, (2001), *Hum Reprod* 16(9), 1922–1930

Giudice, (2004). *Endometriosis. Lancet*, 364, 1789-1799.

Giwercman, (2010), *Int. J. Androl.*, 33, e221-e227

Glynn, (2014), *eLife* 3, e01604.

Godic, (2014), *Oxid. Med. Cell. Longev*, 6 pages.

Goetz, (1999), *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 2788–2793.

Goldstein, (2004), *Chem Res Toxicol.*, 17, 250-257.

Gomez, (1996), *J Androl.*, 17, 276–87.

Gonzalez , (2006), *J Clin Endocrinol Metab*, 91, 336-340.

Gonzalez-Flecha B, (2004), *Mol Aspects Med.*, vol. 25, 169-182

Gordon, (1996), *J Clin Endocrinol Metab*, 81, 353–9.

Gosalvez, (2017). *J Assist Reprod Genet*, 34, 697–707

Goto, (1993), *Free Radic Biol Med.*, 15, 69-75.

Goto, (2008), *Oncogene*, 27, 9–19.

Granger, (2002) *Microcirculation*, 9, 147-160.

Grataroli, (2000), *Biol Reprod*; 63:1473–81.

Green, (1990), *Immunol. Lett.*, 25, 15e19.

Greenman, (2009), *Neuroendocrinology*, 89(1), 79–85.

Griendling, (2000), *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 20, 2175-2183.

Griendling, (2000), *Circ Res.*, 86, 494-501.

Griveau, (1997), *Int J Androl* 20(2), 61–69

- Guerin, (2001), *Hum Reprod Update*, 7175–189.
- Gupta, (2006). *Reprod Biomed Online*, 13, 126–134.
- Gupta, (2007), *Obstet Gynecol Surv.*, 62, 335-347.
- Gupta, (2009), *Arch Med.*, 5, 151-173.
- Gupta, (2009), *Int J Fertil Steril*;2:147–164.
- Gupta, (2009), *Obstet Gynecol Surv* 64, 750-759.
- Gupta, (2010), *Curr Wom Health Rev.*, 6, 227-238.
- Gurin, (1989), *Sechenova*, 75, 4, 542–547.
- Gutsch, (2011), *Andrologia*, 43, 312-316
- Gutteridge, (1993), *Free Radic. Res. Com.*, 19, 141e158.
- Gutteridge, (1994), *Chem. Biol. Interact.*, 91, 133e140.
- Güven, (1999), *Hum Exp Toxicol.*, 18 (10), 598–601.
- Gynecologists A.C.O.O. (2013), *Obstet. Gynecol.*, 121, 1122–1133.
- Gynecologists A.C.O.O. (2017), *Obstet. Gynecol*, 130, e17–e37.
- Haddad, (2006), *Am J Obstet Gynecol.*, 195 (394), e391-324.
- Hafner, (2003), *Iacenta*, 24, 336-342.
- Hagenas, (1978), *Int J Androl.*, 1(Supplement 2), 449–58.
- Halliwell & Gutteridge, (2007), *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford University Press, Oxford, UK, 3rd edition.
- Halliwell, (1990), *Methods Enzymol*, 186, 1–85.
- Halliwell, (1992), *J. Lab. Clin. Med.* 119, 598e620.
- Halliwell, (1997), *Nutr. Rev.*, 55, S44eS51.
- Halliwell, (2002), *Free Radic Biol Med.*, 32, 968-974.
- Halliwell, (2004), *British Journal of Pharmacology*, 142, 2, 231–255.
- Halliwell, (2011), *Trends Pharmacol. Sci.*, 32, 125e130.
- Halmenschlager, (2009), *J Sex Med.*, 6(6), 1763–72.
- Hammadeh, (2008), *Arch Gynecol Obstet*, 277, 515–526.

Hammiche, (2011), *J. Androl.*, 32, 70-76

Hammoud, (2008), *Fertil. Steril.*, 90: 897-904

Hanafy, (2001), *Med Sci Monit*, 7, 801–819.

Hanna, (2006), *Nat Med.*, 12, 1065-1074.

Hansen, (2009), *Philosophical transactions of the Royal Society of London B. Biol Sci.*, 364(1534), 3341–50.

Hanukoglu, (2006), *Drug Metab Rev.*, 38(1–2), 171–96.

Haque, (2010). *Hypertens Pregnancy.*, 29, 69-81.

Harada, (2007), *Front Biosci.*, 12, 3140-3151.

Hardiman, (2003), *Lancet*, 361, 1810-1812.

Harley, (2008), *J Occup Environ Med.*, 50, 1335-1342.

Hartge, (2009). *Nat. Genet.* 41, 637–638.

Hartman, (2005), *Eur J Clin Nutr.*, 59, 161–168.

Harvey, (2002), *Reproduction*, 123, 479–486.

Haslbeck, (2007), *Neurol Res.*, 29,103-110.

Hauser, (2007), *Hum Reprod.*, 22, 688-695

Hayes, (2015), *Nat. Commun.* 6, 7502.

Headlamand, (2004), *Free Radic. Biol. Med.*, 36, 1175e1184.

Heaton, (2002), *Neurosci Lett.*, 334, 83-86.

Heazell, (2008), *Placenta*, 29, 175-186.

Hekmatdoost, (2009), *Avicenna J Med Biotechnol*, 1, 147–60.

Hempstock, (2003), *Hum Pathol.*, 34, 1265-1275.

Hendin, (1999), *J Urol.*, 161, 1831–4.

Hengstler, (2003), *Carcinogenesis*, 24, 63-73

Henkel, (1998), *Andrologia*, 30(Suppl 1), 91–7.

Henkel, (2003), *Reprod Biol Endocrinol*, 1,108.

Henkel, (2005), *Fertil Steril*, 83, 635–42.

Henkel, (2011), *Asian J Androl*, 13, 43–52.

Henmi, (2003), *Fertil Steril.*, 80, 459-461.

Hennig, (1999), *J Biochem Mol Toxicol* 13, 83-91.

Hennig, (2002), *Int J Hyg Environ Health*, 205, 95–102.

Herath, (2004), *Endocrine.*, 25(2), 163–72.

Hercberg, (1998), *Nutrition*, 14, 513e52

Herman-Giddens, (2007), *J. Adolesc. Health* 40, 201–203.

Hernández Guerrero, (2006). *Ginecol Obstet Mex.*, 74, 20-28.

Herrero-Mercado M, (2011). *Bull Environ Contam Toxicol* 86: 289-293.

Hesla, (1997), *Fertil Steril*, 67, 548–552.

Higashi, (2003), *J Am Coll Cardiol.*, 42, 256-263.

Hilali, (2013), *PCOS. Clin Endocrinol*, 79, 105–10.

Hitchon, (2004), *Arthritis Res. Ther.*, 6, 265e278.

Ho, (1997), *Hum Reprod*, 12, 2810-2815

Ho, (2001), *Reproduction*, 122, 519–526.

Hockberger, (1999), *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 96, 6255–6260.

Hong, (2002), *Toxicol Lett.*, 129, 255-262.

Hool, (2007), *Antioxid Redox Signal*, 9, 409–435.

Hou, (1999), *Curr. Pharm.Des* 5, 417e441.

Hracsco (2008), *Free Radic. Res*, 13, 11–16.

Hsieh (2012), *Reprod. Sci.*, 19, 505–512.

Hsu, (2002), *Toxicology*, 180, 33-44

Hsu, (2009), *Fertil. Steril.*, 91, 1096-1103

Huang (2002). *Am J Clin Nutr.*, 76, 549-555.

Huang J, (2009). *Fertil Steril.*, 92, 1456-1465.

Huang, (1995), *Nature*, 377, 239–242.

Huang, (2005). *J. Agric. Food Chem.*, 53, 1841e1856.

- Hubel, (1989), *Am J Obstet Gynecol*, 161, 1025–34.
- Hung & Burton, (2006). *Taiwan J Obstet Gynecol.*, 45, 189-200.
- Hung, (2001). *Am J Pathol*, 159, 1031–1043.
- Hyslop, (1988), *J Biol Chem.*, 263, 1665-1675.
- Ibitoye, (2017), *PLOS ONE* 12, e0178884.
- Ignarro, (2002), *J Physiol Pharmacol*, 53, 503–514.
- Igosheva (2010), *PLoS One*. 5, e10074-
- Imai, (2009), *Journal of Biological Chemistry*, vol. 284, no. 47, pp. 32522– 32532.
- Inhorn and Patrizio, (2015), *Hum Reprod Update*, 21, 411–426
- Inoue, (2003), *Current Medicinal Chemistry*, 10, 23, 2495–2505.
- Irani, (2000), *Circ Res*, 87, 179–183.
- Ishihara, (2004), *Free Radic. Res*, 38, 913–918.
- Ishii, (2005), *Free Radic Res*, 39, 697-705
- Ishikawa, (1993), *Nihon Sanka Fujinka Gakkai zasshi*, 45, 842–8.
- Ishikawa, (2007), *J Androl.*, 28(2), 320–4.
- Ivell, (2007), *Reprod Biol Endocrinol.*, 5(1), 15.
- Jablonka-Shariff & Olson, (1997), *Endocrinology*, 138, 460–468.
- Jablonka-Shariff & Olson, (1998), *Endocrinology*, 139, 2944–2954.
- Jablonka-Shariff & Olson, (2000). *Mol Reprod Dev*, 55, 412–421.
- Jablonka-Shariff (1999), *J Soc Gynecol Invest;*, 6, 95–101.
- Jablonka-Shariff, (1999). *Biol Reprod*, 61, 171–177.
- Jacob, (2013), *Mech Ageing Dev.*, 134 (3–4), 139–157.
- Jaffe, (1997), *Am J Obstet Gynecol.*, 176, 695–705.
- Jain, (2000), *Life Sci*, 66, 1139–1146.
- James-Todd, (2010), *Ann. Epidemiol.*, 20, 836.
- Jana, (2010), *Reprod Toxicol*, 29, 447–451.
- Jang, (2009), *Exp. Gerontol.* 44, 256e260.

- Jarvie, (2010). *Clin Sci (Lond)*, 119, 123-129.
- Jauniaux, (2000), *Am J Pathol.*, 157, 2111-2122.
- Jauniaux, (2001), *Am J Obstet Gynecol.*, 184: 998-1003.
- Jauniaux, (2003), *Placenta*, 24(Suppl A), S86–93.
- Jauniaux, (2003), *Reprod Biomed Online*, 7, 250-253.
- Jauniaux, (2006), *Hum. Reprod. Update*, 12, 747–755.
- Jirsova, (2010), *FertilSteril*, 93, 1831–1836.
- Jones and Mann, (1973), *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 184, 103–107
- Jones, (2006), *Antioxid. Redox Signal* 8, 1865e1879.
- Joshi, (2001), *Free Radic Biol Med.*, 30, 1390-1399.
- Jozwik, (1999), *Mol Hum Reprod*, 5 (5), 409–413
- Julka, (1992), *Exp Mol Pathol.*, 56, 144-152.
- Jung & Schuppe, (2007), *Andrologia*, 39(6), 203–15.
- Jung, (2008), *Int. J. Androl*, 31, 403-407
- Junqueira, (2004), *Mol Aspects Med*, 25, 5-16
- Juriscova, (1996). *Mol Hum Reprod.*, 2, 93-98.
- Kajihara (2011), *Gynecol Endocrinol.*, 27, 73-79.
- Kamata, (2005), *Cell*, 120, 649–661.
- Kamath, (2006), *Indian J. Clin. Biochem. IJCB.*, 21, 111–115.
- Kao, (2005), *Ann N Y Acad Sci*, 1042, 186-194.
- Kapoor & Jones, (2005), *Eur J Endocrinol*, 152(4), 491–9.
- Karowicz-Bilinska A, (2002), *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.*, 8, Cr211–Cr216.
- Karowicz-Bilinska, (2004), *Ginekol Pol.*, 75, 6-9.
- Karube-Harada, (2001), *Mol Hum Reprod*, 7, 1065–1072.
- Kasahara, (2002), *Biochem J*, 365, 849-856
- Kasperczyk, (2016), *Ann Agric Environ Med.*, 23(2), 292–296

Kawakami, (2007), *Journal of Veterinary Medical Science*, vol. 69, no. 2, pp. 133–136.

Kawamura, (2010), *J Clin Invest.*, 120, 2817-2828.

Kawano & Arora, (2009), *J Cardiometab Syndr.*, 4(1), 44–9.

Kay, (2000), *Am J Obstet Gynecol.*, 182, 682-688.

Keelan, (1999), *Am J Obstet Gynecol.*, 181: 1530-1536.

Kehrer, (2000), *Toxicology*, 149, 43–50.

Kelly, (1998), *Altern Med Rev.*, 3, 114-127.

Kemal, (2000), *Fertil Steril*, 74, 1200–7.

Khalil & Granger (2002), *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*, 283, R29-R45.

Khan (2008), *Hum Reprod.*, 23, 2210-2219.

Khan, (2010), *Reprod Sci.*, 17, 78-84.

Kharfi, (2005), *Clin Biochem.*, 38, 717-721.

Kim, (2003), *Brain Res.*, 989(1), 91–8.

Kim, (2012), *Environ Health Toxicol.*, 27, e2012017.

Kindermann & Jurimae, (2001). *J Sports Med Phys Fitness.*, 41(1), 73.

Kindermann, (1982), *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.*, 49(3), 389–99.

Kislinger, (1999), *J Biol Chem.*, 274, 31740-31749.

Kiyose, (1997), *Am. J. Clin. Nutr.*, 65, 785e789.

Kiziler, (2007), *Biol. Trace Elem. Res.*, 120, 82-91

Kleber, (2018), *Trends in Res*, 2018 Volume 1(2): 1-2

Kleber, (2018), *Trends in Res*, Volume 1(2): 1-2

Klemmensen, (2009), *BJOG.*, 116, 964–74.

Klimp, (2002), *Critical Reviews in Oncology and Hematology*, 44, 2, 143–161.

Knott, (2009), *Antioxidants and Redox Signaling*, 11, 3, 541–553.

Kobayashi, (2007), *Hum Mol Genet* 16: 2542-2551.

Kobayashi, (2009), *Gynecol Endocrinol.*, 25, 39-52.

Koch, (2004), *Mol Aspects Med*, 25, 191-198

- Kodama, (1997), *Fertility and Sterility* 68, 519–524.
- Kohen & Nyska, (2002), *Toxicol Pathol.*, 30, 620e650.
- Koksal, (2003), *Asian J Androl.*, 5(2), 95–100.
- Koopman, (2010), *Antioxid. Redox Signal* 12, 1431e1470.
- Kopelman, (1994), *Baillieres Clin Endocrinol Metab.*, 8(3), 549–75.
- Kosova, (2012), *American Journal of Human Genetics*, vol. 90, no. 6, pp. 950–961.
- Kotch, (1995), *Teratology*, 52, 128-136.
- Kovacic & Jacintho, (2001), *Curr Med Chem.*, 8, 863-892.
- Kovacic & Jacintho, (2001), *Curr Med Chem.*, 8, 773-796.
- Kovacic & Vlasisavljevic, (2008), *Reprod Biomed Online.*, 17:229–236.
- Kovacic P, (2000) *Curr Pharm Des.*, 6, 277-309.
- Kovacic, (2002), *Curr Med Chem.*, 9, 823-847.
- Kovacic, (2005), *Med Hypotheses* 65, 90-96.
- Kovacic, (2005), *Med Hypotheses*, 64, 350-356.
- Kovacic, (2010), *Fertil Steril.*, 94, 511–519.
- Kovacic, (2011), *J Recept Signal Transduct Res.*, 31, 332-339.
- Kowaltowski (2001), *FEBS Lett*, 495, 12–15.
- Krishna, (2007), *Indian J. Physiol. Pharmacol.*, 51, 284–288.
- Kuba, (2018), *Obstet. Gynecol.*, 131, 1163–1164.
- Kumar, (2011), *Reprod Sci.*, 18, 915-930.
- Kumru, (2004), *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.*, 114, 177-181.
- Kussmaul & Hirst J, (2006), *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(20), 7607–12.
- La Vignera, (2013), *Asian J Androl.*, 15, 221–5.
- Lakpour, (2013), *Disease Markers*, vol. 34, no. 3, pp. 205–210.
- Laloraya, (1988), *Biochem Biophys Res Commun.*, 157, 146–153.
- Laloraya, (1989), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 161, 762–770.
- Laloraya, (1989), *J Reprod Fertil.*, 86, 583–587.

Lambrinouadaki, (2009), *Fertil Steril.*, 91, 46-50.

Lampiao, (2012), *World J Obstet Gynecol.*, 1, 29–34.

Lappas, (2003), *J Clin Endocrinol Metab.*, 88, 1723-1729.

Lappas, (2010), *J. Endocrinol.*, 204, 75–84.

Larkindale & Knight, (2002), *Plant Physiol.*, 128, 682–695.

Lash, (2006), *J Leukoc Biol.*, 80, 572-580.

Lavranos, (2012), *Reprod Toxicol*, 34(3), 298–307.

Lee & Davis, (2011), *Curr Opin Pediatr.*, 23, 161-166.

Lee, (2001), *Brain Res.*, 920, 125-133.

Lee, (2005), *J. A. M. A.*, 294, 56e65.

Lee, (2010), *Current Women’s Health Reviews*, 6, 96-107.

Leelarungrayub, (2011), *J Bodyw Mov Ther.*, 15, 355-362.

Leist, (1997), *J Exp Med*, 185, 1481–1486.

Lesgards, (2002). *Health Perspect.* 110, 479-486

Levine, (2004), *N Engl J Med.*, 350, 672-683.

Levy, (2000), *Am J Physiol Cell Physiol.*, 278, C982-C988.

Levy, (2002), *Am J Obstet Gynecol.*, 186, 1056-1061.

Li, (2005), *Placenta*, 26, 210-217.

Li, (2006), *Acta Pharmacol Sin.*, 27, 339-346.

Li, (2015), *Zygote, Jun*, 23(3), 378-83.

Li, (2016), *Development*, 28(9), 1424–32.

Liang, (2014), *Antioxid Redox Signal*, 20, 1902–16.

Lim, (1997), *Am J Pathol*, 151, 1809–18.

Lin, (2000), *J Biol Chem*, 275, 17979–17985.

Linschooten, (2011), *Reprod. Toxicol.*, 32, 106-111

Liochev, (1999), *Met Ions Biol Syst.*, 36, 1–39.

- Lipton, (2003), *Brain Res Dev Brain Res.*, 147, 77-84.
- Liu & Keefe, (2000), *Biol Reprod*, 62, 1828–1834.
- Liu L, (2002), *Aging Cell*, 1:40–6.
- Liu, (1996), *Cell*, 86, 1, 147–157.
- Liu, (1999), *J. Biomed. Sci.*, 6, 226e235.
- Liu, (2000), *Biol Reprod*, 62, 1745–1753.
- Liu, (2001), *J Tongji Med Univ*, 21, 166-167.
- Liu, (2002), *Journal of Neurochemistry*, 80, 5, 780–787.
- Lloyd, (1993), *Mol Pharmacol.* 43, 645-648.
- Lobo, (2010), *Pharmacogn Rev.*, 4(8), 118–126.
- Locatelli, (2003), *Nephrol. Dial. Transpl.*, 18, 1272e1280.
- Lodovici & Bigagli E, (2011), *Journal of toxicology*, 2011, 1–9.
- Lopes, (1998), *Human Reproduction*, 13, 896–900.
- Lopez-Alarcona, (2013), *Anal. Chim. Acta*, 763, 1e10.
- Lu, (2008), *Int J Androl* 31: 527-533.
- Lu, (2018), *Reproductive Biology and Endocrinology*, 16, 80
- Lunghi, (2007), *Reprod Biol Endocrinol.*, 5, 6.
- Luo, (2009), *Med Hypotheses*, 74, 318-324.
- Luparello, (2011), *Crit Rev Toxicol.*, 41(1), 75–82.
- Machala, (1998), *Ecotoxicol Environ Saf.*, 41, 107-111.
- Madazli, (2002), *J Obstet Gynaecol.*, 22, 477–80.
- Mahdavi, (2014), *Biomolecules Ther.*, 22(6), 570.
- Maiorino, (2003), *Biol Reprod*, 68, 1134–1141.
- Makino, (2004), *Biochimica et Biophysica Acta*, 1673, 3, 149–159
- Makker, (2009), *Indian J Med Res*, 129, 357–67.
- Malpoux, (1993), *Biol Reprod.*, 48(4), 752–60.
- Maltepe & Fisher, (2015), *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 31, 523–552.

- Mamon, (2017), *J. Anim. Sci. Technol.*, 59, 7.
- Manda, (2007), *Cell Biol Toxicol*, 23, 129–37.
- Maneesh, (2006), *Indian J Physiol Pharmacol.*, 50(3), 291.
- Manikkam, 2013, *PLoS One.*, 8, e55387
- Manna, (2004), *Indian J Exp Biol*, 42, 816-822
- Many & Roberts, (1997), *Placenta*, 18, 725–726.
- Manzocco, (2001), *Trends Food Sci Technol.*, 11, 340-346.
- Marcon & Boissonneault, (2004), *Biol Reprod.*, 70, 910–8.
- Marimatsu, (1992). *Drug Metab Dispos*, 20: 79-83.
- Marino, (2013), *Pediatrics* 132, 1028–1036.
- Marks, (1996), in *Basic Medical Biochemistry: A Clinical Approach*, 327–340, Williams and Wilkins, Baltimore, Md, USA.
- Marnett, (2000). *Carcinogenesis*, 21, 3, 361–370.
- Martin-Romero, (2008), *Reprod Biomed Online*, 17, 652-661.
- Martysiak-Zurowska, (2012), *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.*, 11, 83e89.
- Mascarenhas, (2012), *PLoS Med*, 9, e1001356
- Matsubara, (2015), *Int J Mol Sci*, 16, 4600–14.
- Matsuzawa, (2008), *Biochim Biophys Acta*, 1780, 1325–1336.
- Maulik, (2013), *Oxid Med Cell Longev.*, 2013, 820679
- Mayorga-Torres BJ, (2017). *Andrologia*, 49 (5).
- McCubrey, (2006), *Antioxid Redox Signal.*, 8, 1775-1789.
- McManus, (1990), *Cancer Res* 50: 3367-3376
- McManus, (1990), *Cancer Res* 50: 3367-3376
- Meeker, (2009), *Environ Health.*, 8, 32
- Meeker, (2010), *Fertil Steril.*, 93(1), 130–40.
- Meeker, (2011), *Environ Health Perspect*, 119, 1010-1016.
- Megahed, (2008), *Reprod Domest Anim.*, 43(6), 672–7.

- Mendle, (2007), *Dev. Rev.* 27, 151.
- Ménézo, (2012), *Gynecol Obstet Fertil* 40, 787-796.
- Menon, (2011), *Placenta*, 32, 317–22.
- Meo, (2010), *Saudi Med J.*, 31(8), 869–73.
- Merhi, (2012), *J Assist Reprod Genet.*, 29(4), 293–7.
- Meri, (2013), *Oman Med J.*, 28(1), 12–6.
- Mes, (1990), *Bull Environ Contam Toxicol.*, 45, 681-688.
- Metwally, (2007), *Obes Rev.*, 8, 515-523.
- Miao & Clair, (2009), *Free Radic. Bio. Med.*, 47, 344e356.
- Mier-Cabrera J, (2009), *Reprod Biol Endocrinol.*, 5, 1-11.
- Mier-Cabrera, (2008), *Int J Gynaecol Obstet.*, 100, 252-256.
- Mier-Cabrera, (2010), *BJOG.*, 118, 6-16.
- Miller, (2000), *Fertil Steril.*, 74, 1257-1258.
- Milne, (2005), *Biomarkers* 10 (Suppl. 1) S10eS23.
- Miranda-Contreras, (2013), *J. Occup. Health*, 55, 195-203
- Misro, (2004), *Int J Androl.*, 27, 82–7.
- Mistry & Williams, (2011), *Oxid Med Cell Longev.*, 841749
- Miszkiel, (1999), *Reprod. Nutr. Dev.*, 39, 509–516.
- Miyamoto, (2002), *Anticancer Research A*, 22, 6, 3293–3301.
- Miyazaki, (1991), *J Reprod Fertil*, 91,207–212.
- Mocevic, (2013), *Asian J Androl.*, 15(1), 97–104.
- Monaghan, (2009), *Ecology Letters*, 12, 1, 75– 92.
- Montgomery, (2014), *Mol. Hum. Reprod.* 20, 1–14
- Montuschi, (2004), *FASEB J.*, 18, 1791-1800.
- Moon, (2010), *Proc Natl Acad Sci.*, 107(47), 20477–82.
- Morishima, (2005), *J Biochem.*, 2005, 137, 449-453.
- Morohashi, (1994), *Mol Endocrinol.*, 8, 643–53.

- Morrow, (1992), *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 10721-10725.
- Moshkhdanian, (2011), *J Assist Reprod Genet.*, 28, 343–349.
- Moskovtsev, (2006), *Fertil Steril.*, 85, 496-499
- Mostafa, (2009) *Andrologia*;41:125–9.
- Mostafa, (2014), *Urology*;84:590–5.
- Mostafa, (2015). *Urology.* ;85(5):1058–1061.
- Mueller, (1990), *Epidemiology*, 1, 195-200.
- Murphy, (1998), *Fertil Steril.*, 69, 1085-1091
- Murphy, (1998), *Fertil Steril.*, 69, 1092-1094
- Musset, (2012), *J Biol Chem.*, 287(12), 9376–9388
- Mustafa, (2010), *Clin Biochem.*, 43, 1124-1128.
- Myatt, (2004), *Histochem Cell Biol.*, 122, 369-382.
- Myatt, (2006), *J. Physiol.*, 572, 25–30.
- Myatt, (2010), *Placenta*, 31(suppl), S66–S69.
- Mykhalchenko, (2017), *Expert Rev. Mol. Diagn.* 17, 723–733.
- Myung, (2013), *J. Cancer Prev.*, 18, 135e143.
- Nadeau, (2007), *Mol. Biol. Cell.*, 18, 3903e3913
- Nagai, (2007), *J Biochem Mol Biol.*, 40, 1–6.
- Naha & Chowdhury, (2006), *J UOEH*, 28, 157-171
- Nakamura, (1987), *Biol Reprod.*, 37, 546–549.
- Nakamura, (2002), *Biol Reprod.*, 67, 1588–1592.
- Nakamura, (2009), *Prenat Diagn.*, 29, 691-696.
- Nakamura, (2010), *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 49, no. 9, pp. 1368–1379.
- Narayanan, (1998), *J Leukoc Biol.*, 63, 216-224.
- Nasr-Esfahani, (1992), *J Reprod Fertil.*, 96, 219–231.
- Neal, (2005), *Hum Reprod. (Oxf)*, 20, 2531–2535.
- Negi, (2012), *J. Matern. Fetal Neonatal Med.*, 25, 1338–1341.

Nelen, (2000), *Hum Reprod.*, 15, 954-960

Ng, (1987), *Gynecol Obstet Invest.*, 23, 129-132.

Ngo, (2009), *Am J Pathol.*, 175, 225-234.

Ni, (2016), *Andrology*, 4, 816–24.

Nicol, (2000), *FASEB J*, 14, 111–127.

Nicopoulos, (2008), *BJU Int.*, 101, 1553-1560

Niforou, (2014), *Redox Biol*, 2, 323–332.

Nistico, (2008). *British Journal of Pharmacology*, 153, 5, 1022–1029.

Noda, (1994), *Fertil Steril.*, 62, 1022–1027.

Noonan, (2007), *Cell Stress Chaperones*, 12, 393-402.

Norman, (2007), *BMC Pregnancy Childbirth.*, 7 (Suppl 1), S7

Northrop-Clewes & Thurnham, (2007), *Clin Chim Acta.*, 377, 14-38.

Nowicka-Bauer, (2018), *J Physiol Pharmacol*, 69 (3).

Oakley, (1996), *Chem Res Toxicol.*, 9, 1285-1292.

Oberley, (2005), *Biomed Pharmacother.*, 59, 143-148.

Oborna, (2009), *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.*, 153(1), 53–57

Oh, (2007), *Fertil Steril.*, 88, 1150–1157.

Oleszczuk, (2013), *Andrology.*, 1, 357-360

Oliva, (2006), *Hum Reprod Update*, 12, 417–35

Oliveira, (2015), *Reprod Biomed Online*, 31, 544–56.

Ollero, (2000), *Mol. Reprod. Dev.*, 55, 326-334

Olszanecki, (2002), *Journal of Physiology and Pharmacology*, 53, 4, 571–584.

Oner-Iyidogan, (2004), *Gynecol Obstet Investig.*, 57, 214–7.

Ornoy, (2007), *Reprod Toxicol.*, 24, 31-41.

Orsi & Leese, (2001), *Mol Reprod Dev.*, 59, 44–53.

Orsi, (2005), *Reproduction*, 129, 219–228.

Osborn, (2002), *Fertil Steril.*, 77, 46-51.

Ota, (1998), *Fertil Steril.*, 69, 303-308

Ottosen, (2007), *J Assist Reprod Genet.*, 24, 99–103.

Oyawoye, (2003), *Hum Reprod.*, 18(11), 2270–2274

Ozkaya & Naziroglu, (2010), *Fertil Steril.*, 94, 2465-2466.

Pacey, (2010), *Hum Fertil.*, 13(4), 189–93.

Pacher, (2007), *Physiol Rev.*, 87, 315–424.

Padmini, (2009), *Clin Chem Lab Med.*, 47, 1073-1080.

Page, (2005), *J Androl.*, 26(1), 85–92.

Palacio, (2006), *Clin Exp Immunol.*, 144, 217-222

Pampfer, (1999), *Cell Death Differ.*, 6, 533–545.

Pandey, (2010), *J Cell Biochem.*, 111, 521–8.

Papapetropoulos, (1997), *J Clin Invest.*, 100, 3131–3139.

Paracchini, (2005), *Mutation Research*, vol. 586, no. 2, pp. 97–101.

Parazzini, (2004), *Hum Reprod.*, 19, 1755-1759.

Parent, (2003), *Endocr. Rev.* 24, 668–693.

Park, (1999), *Int J Vitam Nutr Res.*, 69, 396-402.

Park, (2004), *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 70(2), 189–97.

Pasqualotto, (2000), *Fertil Steril.*, 73, 459–64.

Pasqualotto, (2004), *Fertil Steril.*, 81, 973-976

Paszkowski T, (2002), *Hum Reprod.*, 17, 921-925

Paszkowski, (1995), *Clin Chim Acta*, 236(2), 173–180

Paszkowski, (1996), *Hum Reprod.*, 11, 2493-2495.

Pathak (2010), *Hum Exp Toxicol.*, 29, 351-358.

Pathak, (2011), *Reprod Toxicol.*, 31, 534-539.

Patra & Wadsworth, (1991), *Andrologia*, 23(2), 151–6.

Paul, (2008), *Reprod.*, 136(1), 73–84.

- Paul, (2009), *Biol Reprod.*, 80(5), 913–9.
- Pavanato, (2003), *Digestive Diseases and Sciences*, 48, 4, 824–829.
- Pavlovic, (2002), *Med Biol.*, 19, 131-137.
- Pegg, (2007), *Methods Mol Biol.*, 368, 39–57.
- Peltola, (1996), *Endocrinology*, 137(1), 105–12.
- Peng, (2012), *J Ningxia Med Univ* 03: 208-210.
- Pennington, (2007), *Curr Pharm Des.*, 13, 3368-3377.
- Perdichizzi, (2007), *J Clin Immunol*; 27:152–62.
- Pereira & Martel, (2014), *Cell Biol. Toxicol.*, 30, 301–312.
- Perez, (2009), *Biochim. Biophys. Acta*, 1790, 1005e1014.
- Perez-Crespo, (2007), *Mol Reprod Dev*, vol. 75, 40-47
- Perez-Leighton, (2013), *Int J Obes.*, 37(2), 167–74.
- Perheentupa, *Mol Cell Endocrinol.*, 1993, 93(2), 135–41.
- Perkins, (2006), *Aust N Z J Obstet Gynaecol.*, 46,77–83.
- Perry, (2015), *Nat. Rev. Endocrinol.* 11, 725–734.
- Persson, (2014), *Oxid. Med. Cell. Longev.*, Article ID 427318, 11 pages.
- Peter, (2008), *Free Radic. Res.*, 42, 841–848.
- Petrelli, (2003), *Environ Health Prev Med.*, 8, 77-81.
- Petrushanko, (2016), *PLoS One*, 11(7), e0158726.
- Peuchant, (2004), *Clin Biochem.*, 37, 293-298.
- Pfeifer, (2001), *The FASEB Journal*, vol. 15, no. 7, pp. 1236–1238, 2001
- Phaniendra, (2015), *Indian J Clin Biochem.*, 30(1), 11–26.
- Pisoschi & Pop, (2015), *Eur J Med Chem.*, 97, 55–74.
- Plante, (1994), *Fertil Steril*, 62, 387–93.
- Polak G, (1999), *Ginekol Pol.*, 70, 135-140.
- Polak, (2001), *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 94, 261-263.
- Polak, (2001), *Ginekol Pol*, 72, 1316-1320

Pole, (2016), *AIMS Mol Sci.*, 3(3), 300–324.

Polishuk, (1977), *Pestic Monit J.*, 10, 121-129.

Poljsak, (2012), *Oxid Med Cell Longev.*, 2012, 480895.

Poljsak, (2013), *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 11 pages.

Poston, (2004), *Placenta*, 25 (Suppl A), S72-S78.

Potdar, (2009), *BJOG.*, 116, 637-642.

Poulsen, (2012), *Free Radic. Biol. Med.* 52, 1353e1361.

Pournourali (2016), *Taiwan J Obstet Gynecol.* Dec;55(6):801-803.

Powers, (2011), *Compr Physiol.*, 1(2), 941–969.

Prasad, (2016), *J Biomed Sci.* Mar 29, 23, 36.

Preterm, (2007), Behrman, Washington DC, National Academies Press (US)

Proctor, (2011), *PLoS One.*, 6, e22038-

Pryor, (2006), *American Journal of Physiology*, vol 291, 3, R491–R511.

Pushpa-Rekha, (1995), *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 270, no. 45, pp. 26993–26999.

Queiroz & Waissmann, (2006), *Cad Saude Publica*, 22, 485–93.

Quenby, (1993), *Obstet Gynecol.*, 82, 132-138.

Quenby, (2009), *Hum Reprod.*, 24, 45-54.

Qureshi, (2005), *Brill Online.*, 19(2), 147–69.

Rago, (2013), *J. Endocrinol. Invest.*, 36, 970-974

Rahal, (2014), *Biomed Res Int.*, 761264.

Rai & Regan, (2006), *Lancet.*, 368, 601-611.

Raijmakers, (2004), *Placenta*, 25 (Suppl A), S85-S89.

Raijmakers, (2006), *Placenta*, 27, 158–163.

Rakhit, (2013), *Studies on Women’s Health*, 237–262.

Ramalho-Santos, (2009), *Hum Reprod Update*, 15(5), 553–72

Rao, (2015), *Asian J Androl*, 17, 668–75.

Rayman, (2011), *CMAJ.*, 183, 549-555.

- Redman & Sargent, (2003). *Placenta*, 24 (Suppl. A), S21–S27.
- Redman, (2009), *Placenta*. 30 (Suppl A), S38-S42.
- Reed, (1995), De Matteis and L. L. Smith, Eds., pp. 35–68, CRC Press, Boca Raton, Fla, USA
- Rees, (1989), *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, 3375–3378.
- Ren, (2009). *Peptides*, 30(2), 439–44.
- Rengan, (2012), *Reprod Biol Endocrinol*, 10(1), 92.
- Rérole, (2011), Edited by: Calderwood SK, Prince TL., Heidelberg, Springer Science+Business Media, LLC, 205-230.
- Reslan, (2010), *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem.*, 8, 204-226.
- Reynaert, (2016), *Int J Biochem Cell Biol.*, 81(Pt B), 403–418.
- Rhea, (2017), *Behav. Genet* 47, 581–584.
- Rhee, (2000), *Science STKE*, 10, 53, 1.
- Rhynes & Ewing, (1973), *Endocrinology*, 92(2), 509–15.
- Ricci, (2008), *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 294, C413eC422.
- Rice-Evans, (1992), *Mol. Asp. Med.*, 13 1e111.
- Rice-Evans, (1993). *Free Radic. Biol. Med.*, 15, 77e96.
- Richards, (1994). *Endocr Rev.*, 15, 725–51.
- Richter, (1988), *Proc Nat Acad Sci USA*, 85, 6465–6467.
- Ridnour, (2005), *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 37, 13147–13152.
- Rignell-Hydbom, (2005), *Environ. Health Perspect.*, 113, 175-179
- Rilcheva, (2016), *J Biomed Clin Res.*, 9, 21–9.
- Riley & Behrman, (1991), *Endocrinology*, 128, 1749–1753.
- Riley, (1991). *Proc Soc Exp Biol Med.*, 198, 781-791.
- Riley, (1994). *Int. J. Radiat. Biol.*, 65, 27e33.
- Rima, (2016), *Asian Pac J Cancer Prev.*, 17, 4517–25.
- Rizzo, (2009), *Immunopharmacol Immunotoxicol.*, 31, 631–5.

- Rizzo, (2012), *Reprod Domest Anim. Apr*, 47(2), 344-52
- Roberts, & Cooper, (2001), *Lancet.*, 357, 53-56.
- Roberts, (1989), *Am J Obstet Gynecol*, 161, 1200-4.
- Roberts, (2003), *Hypertens Pregnancy*, 22, 109-127.
- Robker, (2009), *J Clin Endocrinol Metab.*, 94, 1533-1540.
- Romero, (1997), New York, Churchill Livingstone, 29-49.
- Romero, (2006), *BJOG.*, 113 (Suppl 3), 17-42.
- Ron, & Walter, (2007), *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8, 519-529.
- Rong, (2002), *Fertil Steril.*, 78, 843-848.
- Roshdy, (2015), *Andrologia*, vol. 47, no. 5, pp. 587-593.
- Rosselli, (1998), *Hum Reprod Update*, 4, 3-24.
- Roussou, (2013), *Anemia*, 617204.
- Rubes, (2005), *Hum. Reprod.*, 20, 2776-2783
- Rubin, (2011), *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 127, 27-34
- Ruder, (2008), *Human reproduction update*, 14(4), 345-357.
- Ruder, (2009), *Curr Opin Obstet Gynecol.*, 21: 219-222.
- Rudera, (2009), *Curr Opin Obstet Gynecol.*, June, 21(3), 219-222.
- Ruiz-Sanz, (2011), *Fertility and Sterility*, vol. 95, no. 5, pp. 1601-1605.
- Rumbold, (2005), *Cochrane Database Syst Rev*, 4, CD004227
- Rybar, (2011), *Andrologia*, 43, 286-291
- Saaranen, (1987), *Hum Reprod*, 2, 475-479.
- Sabatini, (1999), *Fertil Steril*, 72, 1027-1034.
- Sabatini, (1999), *Int J Reprod Biomed (Yazd)*, 14, 231-40.
- Sabeur & Ball, (2007), *Reprod.*, 134 (2), 263-70.
- Sabouhi, (2015), *Andrologia*, vol. 47, no. 1, pp. 97-101.
- Sabuncu, (2001), *Clin Biochem*, 34, 407413.
- Sacks, (1998), *Am J Obstet Gynecol.*, 179, 80-86.

- Safarinejad, (2009), *J Endocrinol.*, 200(3), 259–71.
- Safronova, (2003), *Bull Exp Biol Med.*, 136, 257-260.
- Sagol, (1999), *Int. J. Gynaecol. Obstet.*, 64, 121–127.
- Said, (2005), *Fertil Steril.*, 83, 95–103.
- Saito, (1990), *Biochim Biophys Acta*, 1046, 301-308.
- Saitoh M, (1998), *EMBO J.*, 17, 2596e2606.
- Sakkas, (1995), *Biol Reprod.*, 52, 1149–55.
- Sakkas, (1999), *Rev Reprod.*, 4, 31–7.
- Saleh, & Agarwal, (2002), *J Androl.*, 23, 737-752.
- Saleh, (2002), *Fertil Steril.*, 78, 1215–24.
- Saleh, (2003), *Fertil Steril*, 79, 1597–605.
- Salisbury & Bronas, (2015), *Nurs Res.*, 64(1), 53–66.
- Salmon, (2010), *Free Radic Biol Med.*, 48(5), 642–655
- Salonen & Huhtaniemi, (1990), *Biol Reprod.*, 42(1), 55–62.
- Samarawickrema, (2008), *Clin Toxicol (Phila)*, 46, 489-495.
- Sanocka-Maciejewska, (2005), *J Reprod Immunol*, 67, 51–6.
- Santanam, (2002), *Ann N Y Acad Sci.*, 955, 183-198
- Sarafian, (1999), *Am J Respir Cell Mol Biol.*, 20(6), 1286–93.
- Sata, (2003), *Mol Hum Reprod.*, 9, 165-169.
- Sata, (2003), *Mol Hum Reprod.*, 9, 725-728.
- Savaris, (2011), *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.*, 158, 314-318.
- Sawada & Carlson, (1991), *Endocrinology*, 128, 2992–2998.
- Sawada & Carlson, (1996), *Endocrinology*, 137, 1580–1584.
- Sawada, (1994), *Endocrinology*, 135, 1645–1650.
- Sbrana, (2011), *Am J Obstet Gynecol.*, 205, 7.
- Schieber, (2014), *Curr. Biol.*, 24, R453eR462.

Schneider, (2009), *The FASEB Journal*, vol. 23, no. 9, pp. 3233–3242, 2009.

Schuel, (2002), *Chem Phys Lipids*, 121, 211-227.

Schuppe, (2008), *Andrologia*, 40, 84–91.

Seino, (2002), *Fertil Steril.*, 77, 1184-1190

Sengupta, (2014), *Hum Exp Toxicol.*, 33(10), 1017–39.

Sergerie, (2007), *Fertil. Steril.*, 88, e1-e7

Sesti, (2011), *Nutr Res Rev.*, 25, 1-8.

Setji, (2006), *J Clin Endocrinol Metab.*, 91, 1741-1747.

Shaamash, (2000), *Int J Gynaecol Obstet.*, 68, 207-214.

Shahar, (2011), *Hum Reprod.*, 26, 2274–2282.

Shai, (2008), *N Engl J Med.*, 359, 229-241.

Shamsi, (2011), *Indian J Med Res.*, 133, 550–1.

Shang, (2014), *Sci Rep.*, 4, 7233

Sharlip, (2002), *Fertil Steril.*, 77, 873–882.

Sharma & Agarwal, (2004), *Reprod Med Biol.*, 3, 177–199.

Sharma, (1996), *Urology*, 48, 835–50.

Sharma, (2006), *Int J Gynaecol Obstet.*, 94, 23-27.

Sharma, (2010), *Fertil Steril.*, 94, 63-70.

Sharma, (2016), *Eur Urol.*, 70, 635–45.

Sharma, (2017), *Environ Int.*, 99, 1–14.

Sharp, (2010), *Am J Reprod Immunol.*, 64, 159-169.

Shaw, (1974), *Lab Anim.*, 8, 1-7.

Shekarriz, (1995), *Eur Urol.*, 28, 31–35.

Sheynkin & Gioia, (2013), *AUA Update Ser.*, 32(4), 30–8.

Shiels, (2009), *Cancer Causes Control.*, 20(6), 877–86.

Shimamura, (1995), *J Reprod Fertil.*, 105, 253–257.

Shimon, (2006), *J Androl.*, 27(3), 358–64.

- Shiotani, (1991), *Hum Reprod.*, 6, 1349–1353.
- Shiraishi, (2012), *Int J Urol.*, 19(6), 538–50.
- Shkolnik, (2011), *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 108, 1462–1467.
- Showell, (2011), *Cochrane Database Syst Rev.*, (1), CD007411.
- Showell, (2013), *Cochrane Database Syst Rev. Antioxidants for female subfertility.*
- Shukovski & Tsafri, (1994), *Endocrinology*, 135, 2287–2290.
- Sies, (1985), Academic Press, London.
- Sies, (1991), *Am. J. Med.*, 91, 31e38.
- Sikka, (1995), *J Androl.*, 16, 464–468
- Sikka, (2003), *Curr Med Chem.*, 10, 2679-2692.
- Sikka, (2004), *J Androl.*, 25, 5–18.
- Simon, (2014), *Hum Reprod.*, 29, 2402–12.
- Simon, (2017). *Andrologia*, 49 (2)
- Simsek, (1998), *Cell Biochem Funct.*, 16, 227-231.
- Singer, (2007), *Microcirculation*, vol. 14, 375-387
- Singh, (1998), *Indian J Exp Biol*, 36, 421–3.
- Singh, (2003), *Fertil Steril.*, 80, 1420-1430
- Skinner, (2010), *Trends Endocrinol Metab*, 21(4), 214–22.
- Sladek, (1997), *Am J Physiol*, 272, R441–R463.
- Smit, (2010), *Fertil. Steril.*, 94, 1748-1752
- Smith, (1995), *Toxicol Lett.*, 82–83, 945-950.
- Smith, (2013). *Placenta*, 34, 310–3.
- Smits, (2018). *Fertil Steril.*, Sep, 110(4), 578-580.
- Sole, (2013), *Hum Reprod.*, 28, 2087–2092.
- Song, (2006). *Int J Androl.*, 29, 569–75.
- Song, (2013), *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, vol. 30, no. 1, pp. 131–141.
- Southorn, (2002), *Fam. Plann. Reprod. Health Care*, 28, 211-213

Spano, (2005), *Hum. Reprod.*, 20, 3488-3499

Spiteller, (2008), *Ann N Y Acad Sci.*, 1126, 128-133.

Squirrell, (1999), *Nat Biotechnol.*, 17, 763–767.

Steller, (2018), *Int J Mol Sci.* Nov 23, 19 (12).

Stevens & Davis, (1996), *Environ Health Perspects*, 104(Suppl 1), 135.

Storgaard, (2006), *Epidemiology*, vol. 17, no. 6, pp. 674–681.

Strasser, (2000). *Annu Rev Biochem*; 69:217–45.

Stronati, (2006), *Reproduction.*, 132, 949-958.

Stryer, (1995). *Biochemistry*, fourth ed., W.H. Freeman and Company, New York, p. 732.

Subiran, (2011), *Mol Med.*, 17(7–8), 846–53.

Sugino, (1993), *J Reprod Fertil.*, 97(2), 347–351

Sugino, (1996), *Hum Reprod.*, 11(5), 1073–1078

Sugino, (1998), *Biol Reprod.*, 59, 599–605.

Sugino, (2000), *Mol Hum Reprod.*, 6, 19–25.

Sugino, (2000), *Mol Hum Reprod.*, 6, 642–647.

Sugino, (2002), *Mol Hum Reprod.*, 8, 68–74.

Sugino, (2002). *Hum Reprod.*, 17, 1709–1714.

Sugino, (2004), *J Reprod Dev* 50(2), 215–225

Sugino, (2006), *Anim Sci J.*, 77, 556–65.

Sullivan, (2006), *Am J Pathol.*, 171, 1168–1179.

Sultana, (2017), *Am J Reprod Immunol.*, 77, e12653.

Sun (2001). *Alcohol Clin Exp Res.*, 25: 237S-243S.

Sung, (2013), *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 15 pages.

Sutton, (2011), *Health Aff (Millwood)*, 30, 888-897.

Suzuki, (1999), *Fertil Steril*, 72, 720–6.

Suzuki, (2010), *J Clin Biochem Nutr.*, 48(2), 122–5.

Szczepanska, (2003), *Fertil Steril*, 79, 1288-1293

- Szpera-Gozdziewicz & Breborowicz, (2014), 19, 734–46.
- Szymanski & Kazdepka-Zieminsk, (2003), *Ginekol Pol.*, 74, 1392-1396.
- Tabibzadeh, (1999), *Mol Hum Reprod*, 5, 1141–1149.
- Tak, (2001), *Journal of Clinical Investigation*, 107, 1, 7–11,.
- Takahashi, (1999), *Mol Reprod Dev.*, 54, 1–7.
- Takenaka, (2007). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 14289–14293.
- Tamate, (1995), *J Obstet Gynaecol (Tokyo)*, 21,401–9.
- Tamura, (2008), *Journal of pineal research*, 44 (3), 280-287.
- Tang, (2012), *Gene*, vol. 511, no. 2, pp. 218–223.
- Tasha, (2013). East Tennessee State University
- Tatemoto, (2004), *Biol Reprod.*, 71,1150–1157.
- Tatone, (2015), *Oxid Med Cell Longev.*, 2015, 659687
- Tawadrous, (2013), *Urology*;82:820–3.
- Taymour & Taymour (2016). *J Adv Res. Mar*; 7(2): 185–192.
- Temma, (2004), *Mol Hum Reprod.*, 10, 167-171.
- Tempfer, (2001), *Hum Reprod.*, 16, 1644–1647.
- Tessutti, (2013), *Anal. Biochem.*, 441 109e114.
- Than, (2009), *J Matern Fetal Neonatal Med.*, 22, 1000-1013.
- Thomas, (2013), *BMC Women’s Health*, 13, 40.
- Thomson, (2009), *Hum Reprod.*, 24, 2061–2070.
- Tiboni, (2004), *Int J Immunopathol Pharmacol*, 17, 389-393.
- Tiligada, (2006), *Endocr Relat Cancer*, 13(Suppl 1), S115–24.
- Tilly, (1995), *Endocrinology*, 136, 242–252.
- Tirumala, (2010), *Andrologia*, vol. 42, no. 4, pp. 213– 217.
- Tiwari & Vanage, (2013), *Reprod. Toxicol.*, 40C, 60-68
- Tiwari, (2015), *Apoptosis*, 20, 1019–25.
- Tiwari, (2016), *J Obstet Gynaecol Res.*, May, 42 (5), 536-46

- Tiwari, (2016), *Reactive Oxygen Species*, 1, 110–6.
- Toborek, (1995), *J Biochem Toxicol.*, 10, 219-226.
- Toda, (2010), *Alcohol.*, 45, 347-355.
- Toda, (2011), *Chin. Med.*, 2, 29e31.
- Toft, (2010), *Environ Health*, 9, 22
- Tonks, (2005), *Cell*, 121, no. 5, 667–670.
- Tostes, (2008), *J Sex Med.*, 5(6), 1284–95.
- Toy, (2009), *Swiss Med Wkly*, 139, 76-81.
- Toy, (2010), *Gynecol Obstet Invest.*, 69, 122-127.
- Tremellen, (2007), *Aust N Z J Obstet Gynaecol.*, 47, 216-221.
- Tremellen, (2008), *Hum Reprod Update*, May-Jun, 14(3), 243-58.
- Tripathi, (2009), *Free Radic Res.*, 43, 287–94
- Tripathi, (2011), *Eur J Pharmacol.*, 667, 419–24.
- Tripathi, (2013), *Intl J Basic Med Res.*, 3, 27–36.
- Trpkovic, (2015), *Crit Rev Clin Lab Sci.*, 52(2), 70–85.
- Trum, (1998), *Fertil Steril.*, 70:315–9.
- Trummer, (2002), *Hum Reprod.*, 17(6), 1554–9.
- Tsukimori, (2005), *Hypertension.*, 46, 696-700.
- Tsukimori, (2008), *Am J Hypertens.*, 21, 477-481.
- Tu, (2004), *J Cell Biol.*, 164, 341–346.
- Tunc & Tremellen, (2009), *J Assist Reprod Genet.*, 26, 537–44.
- Turrens, (2003), *J Physiol.*, 552 (2), 335–344
- Uddin, (1996), *Alcohol Clin Exp Res.*, 20(3), 556–60.
- Upritchard, (2003), *Am J Clin Nutr.*, 78, 985-992.
- Ushio-Fukai, (2004), *Mol Cell Biochem*, 264, 85–97.
- Uzun, (2005), *Gynecol Obstet Investig*, 60, 195–200.

- Vagnini, (2007), *Reprod, Biomed, Online*, 15, 514-519
- Valavanidis, (2009), *Int J Environ Res Publ Health.*, 6, 445-462.
- Valavanidis, (2009), *J. Environ. Sci. Health, Part C*, 27, 120e139.
- Valko, (2001), *Biochimica et Biophysica Acta*, 1527, 3, 161–166
- Valsamakis, (2006), *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1092, 138–147.
- van Faassen, (2005), *Encyclopedia of Analytical Science*, 6, Elsevier, 183e191.
- Van Langendonckt, (2002), *Fertil Steril.*, 77, 861-870.
- Van Voorhis, (1994), *Endocrinology*, 135, 1799–1806.
- Van Voorhis, (1995), *J Clin Invest.*, 96, 2719–2726.
- Vani, (2009), *Clin Chim Acta* 410: 43-47.
- Vani, (2012), *Genet. Test Mol. Biomarkers*, 16, 1001-1006
- Vega, (1995). *J Endocrinol.*, 147, 177–82.
- Veldhuis, (1999), *J Androl.*, 20(1), 1–18.
- Venkataraman, (2013), *Int J Mol Sci.*, 14(9), 17897–17925.
- Versari, (2009), *Br J Pharmacol.*, 157, 527–536.
- Victor, (2011), *J Clin Endocrinol Metab.*, 96, 3115-3122.
- Vignera, (2012), *J Androl.*, 33 (3), 350–6.
- Vinogradov, (2005), *Biochem Mosc*, 70 (2), 120–7.
- Visioli, (2011), *Pharmacol Res.*, 64, 431–437.
- Visscher, (2017), *Am. J. Hum. Genet* 101, 5–22.
- Viuff, (1999), *Biology of Reproduction*, 60, 1273–1278.
- von Schantz, (1999), *Proceedings of the Royal Society B*, 266, 1414, pp. 1–12.
- Vural, (2000), *Clin Chim Acta*, 295, 169-177.
- Vural, (2002), *Clin Chim Acta*, 317, 65-70.
- Wagner, (2018), *Arab J Urol*.
- Wallekut, (1999), *J Clin Invest.*, 103, 945-952.
- Walsh, (2004), *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 70, 223–32.

- Wang, (1991), *Am J Obstet Gynecol.*, 165, 1690–4.
- Wang, (1997), *Urology*, 49, 921-925.
- Wang, (1998), *Placenta*, 19, 581–6.
- Wang, (2011), *Systems Biol Reprod Med.*, 57(3), 119–23.
- Watson, (1997), *Placenta*, 18, 295–299.
- Watson, (1998), *J Clin Endocrinol Metab.*, 83, 1697-1705.
- Watson, (1998), *Placenta* 19, 27-34.
- Wauters, (2000), *Eur J Endocrinol*, 143(3), 293–311.
- Webster, (2008), *Placenta*, 29, 985–994.
- Weisberg, (2003), *J Clin Invest.*, 112, 1796-1808.
- Wells, (2005), *Toxicol Appl Pharmacol*, 207, 354-366.
- Welshons, (2006), *Endocrinology*, 147(6 Suppl), S56–69.
- Wender-Ozegowska, (2004), *Free Radic Res.*, 38, 795-803.
- Werler, (1997), *Teratology*, 55, 382-388.
- Westphal, (2004), *J Reprod Med.*, 49, 289-293.
- Whitfield, (2001), *Alcohol Clin Exp Res.*, 25(7), 1037–45.
- Wiener-Megnazi, (2012), *Asian J Androl.*, 14, 69–76.
- Will, (2011), *J Assist Reprod Genet.*, 28, 711–724.
- Willett, (2006), *Public Health Nutr.*, A 9, 105e110.
- Williams, (2005), *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, 8, 139e146.
- Wisdom, (1991), *Am J Obstet Gynecol*, 165, 1701–4.
- Wong, (2000), *Fertil. Steril*, 74, 930-935
- Wong, (2010), *Oxford: Elsevier*, 167–88.
- World Health Organisation (2010) (5th edn) Geneva,
- Wouters, (1993), *Fertil Steril*, 60, 820-825.
- Wright, (2014), *Reprod Biomed Online*, Jun, 28(6), 684-703.

- Wu, (2003), *Alcohol Res Health*, 27, 277–84.
- Wu, (2013), *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 46, 200–206.
- Wu, (2013), *Scientific Reports*, vol. 3, article 2258.
- Wu, (2014), *Endocrinology* 155(9), 3638–3648
- Wyrobek, (2006), *Proc Natl Acad Sci USA*, 103, 9601-9606
- Xiao, (2001), *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 280, H812–H820.
- Xiong, (2014), *Asian Journal of Andrology*, vol. 17, no. 3, pp. 481–486.
- Xu, (2005), *J Clin Invest*, 115, 2656–2664.
- Xu, (2005), *Toxicol Sci.*, 88, 525-533.
- Yaeram, (2006). *Reprod Fertil Dev*, 18(6), 647–53.
- Yamagata, (2002). *Endocr J.*, 49, 219–226.
- Yamagishi, (2001), *J Biol Chem.*, 276(27), 25096–100.
- Yamaguchi, (2008), *Clin Cancer Res.*, 14, 32-40.
- Yamamoto, (2007), *Genes. Cells*, 12, 461e471.
- Yamauchi, (1997), *Endocrinology*, 138, 3630–3637.
- Yan, (1994), *J Biol Chem.*, 269, 9889-9897.
- Yan, (2014), *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, vol. 31, no. 5, pp. 549–554.
- Yang, (1998), *Hum Reprod.*, 13, 998-1002.
- Yarosh, (2015), *Andrologia*, vol. 47, no. 9, pp. 980–986.
- Yi, (2005), *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*, 28, R140–R148.
- Yi, (2010), *Biol Reprod.*, 82, 66–75.
- Yildirim, (2015), *J Med Sci.*, 31(9), 480–4.
- Yin, (2011), *Chem. Rev.*, 111, 5944e5972.
- Ying, (2013), *Biomarkers*, vol. 18, no. 5, pp. 412–417.
- Ying, (2013), *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, vol. 17, no. 7, pp. 535–542.
- Younes M, (1999), *Kidney International*, 67, 4, 1371–1380.
- Younglai, (2002), *Arch Environ Contam Toxicol.*, 43, 121-126.
- Yu & Huang (2015), *Biomed Res Int.*:513196.

- Yu, (2012), *Journal of Molecular Medicine*, vol. 90, no. 11, pp. 1333–1342.
- Yu, (2013), *Biology of Reproduction*, vol. 89, no. 1, article 5.
- Yuan, (2012), *Mol Med Rep.*, 6(2), 449–53.
- Yung, (2008), *Am J Pathol.*, 173, 451-462.
- Zachara, (2001), *BJOG Int. J. Obstet. Gynaecol.*, 108, 244–247.
- Zackrisson, (1996), *Hum Reprod.*, 11, 2667–2673.
- Zago & Oteiza, (2001), *Free Radic Biol Med.*, 31, 266-274.
- Zaragoza, (2001), *Br J Pharmacol.*, 132, 1063-1070.
- Zegers-Hochschild, (2009), *Fertil Steril.*, 2009, 92, 1520–1524.
- Zegers-Hochschild, (2009), *Hum Reprod.*, 24, 2683–2687.
- Zeller, (1987), *Am J Reprod Immunol Microbiol.*, 13, 78-82.
- Zeng & Davies, (2005), *Chem. Res. Toxicol.*, 18, 1232e1241.
- Zhang & Kaufman, (2008), *Nature*, 454, 455–462.
- Zhang, (2006), *Endocrinology*, 147, 2215–2227.
- Zhang, (2010), *Int J Clin Exp Med.*, 3, 33–40.
- Zhao, (2014), *Fertil Steril.*, 102, 998–1005.e8.
- Zheng, (2014), *J Endocrinol Investig.*, 37(3), 285–92.
- Zhu, (2000), *Alcohol Clin Exp Res.*, 24(10), 1550–6.
- Zhu, (2007), *Cell. Mol. Life Sci.*, 64, 2202e2210.
- Zima, (2001), *J Biomed Sci.*, 8: 59-70.
- Zimmerman, (1994), *Teratology*, 49, 192-201.
- Zini & Dohle, (2011), *Fertil Steril.*, 96, 1283–1287.
- Zini, (1993), *Int J Androl.*, 16, 183–8.
- Zini, (2009), *J Assist Reprod Genet*, 26, 427–32.
- Zini, and Al-Hathal, (2011), *Asian J Androl.*, 13, 374–381.
- Zribi, (2010), *Fertil Steril.*, 93,159–166.