



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΜΑΚΕΔΟΝΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΩΝ ΥΓΕΙΑΣ & ΠΡΟΝΟΙΑΣ

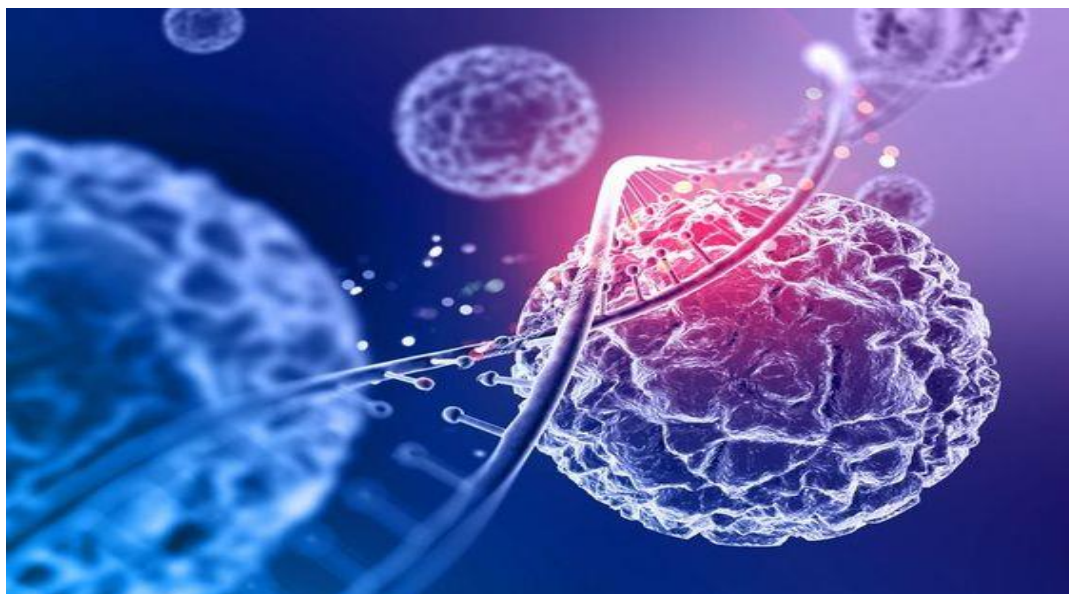


ΤΜΗΜΑ ΜΑΙΕΥΤΙΚΗΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΤΙΤΛΟΣ:

ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ & ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑ



ΜΑΡΙΑ ΕΙΡΗΝΗ ΦΛΩΡΟΥ

ΑΜ: MW00152

Επιβλέπων Καθηγητής: ΚΥΡΙΑΚΗ ΣΠΥΡΟΠΟΥΛΟΥ, Ακαδημαϊκή Υπότροφος,
Τμήμα Μαιευτικής, ΠΔΜ

Μέλος: Παρασκευή Κλάζογλου, Ακαδημαϊκή Υπότροφος, ΣΕΥ, ΠΔΜ

Μέλος: Αναστασία Κεχαγιά, Ακαδημαϊκή Υπότροφος, ΠΔΜ

Πτολεμαΐδα, 2023

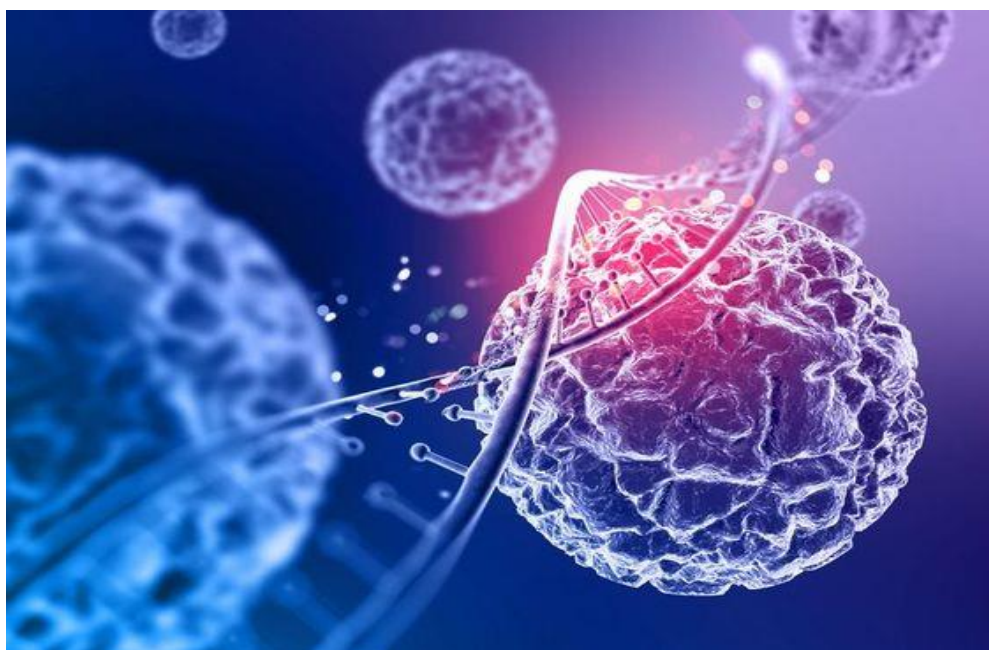


UNIVERSITY OF WESTERN MACEDONIA
FACULTY OF HEALTH AND WELFARE SCIENCES
DEPARTMENT OF OBSTETRICS



THESIS

TITLE:
OXIDATIVE STRESS&INFERTILITY



MARIA EIRINI FLOROU

RN: MW00152

Supervisor professor:

SPYROPOULOU KYRIAKI

Ptolemaida, 2023

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑ

1. Υπογονιμότητα.....	12
1.1 Αίτια Γυναικείας και Ανδρικής Υπογονιμότητας.....	13
1.2 Ανεξήγητη υπογονιμότητα	17

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ

2. Οξειδωτικό Στρες.....	21
2.1 Ελεύθερες Ρίζες και Οξειδωτικό Στρες.....	21
2.2 Αντιοξειδωτικοί Αμυντικοί μηχανισμοί	25

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΕΙΟ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

3. ROS & Γυναικείο Αναπαραγωγικό Σύστημα	32
3.1 Ελεύθερες Ρίζες και Ωοθήκη	34
3.2 Ελεύθερες Ρίζες και Ωοθυλάκιο.....	38
3.3 Ελεύθερες Ρίζες και Ωχρό Σωμάτιο.....	41
3.4 Ελεύθερες Ρίζες και Ενδομήτριο.....	43
3.5 Ελεύθερες Ρίζες και Περιτοναϊκή κοιλότητα.....	46
3.6 Οξειδωτικό Στρες και Γυναικείες Αναπαραγωγικές Ασθένειες.....	47

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ ΚΑΙ ΑΝΔΡΙΚΟ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

4. ROS & Ανδρικό Αναπαραγωγικό Σύστημα	54
4.1 Παθοφυσιολογικός Ρόλος του Οξειδωτικού Στρες στην Ανδρική Υπογονιμότητα..	56
4.2 Αντιοξειδωτικά & ROS.....	60
4.3 Λευκοκυττοσπερμία & ROS.....	62
4.4 Εργαστηριακός Έλεγχος Οξειδωτικού Στρες στο Σπέρμα.....	63

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗΣ

5. Οξειδωτικό στρες & Τεχνητή Υποβοηθούμενη Αναπαραγωγή.....	67
5.1 Πηγές ROS & Υποβοηθούμενη Αναπαραγωγή.....	68
5.2 Τεχνική ART & Κρυοσυντήρηση.....	74

5.3 Αξιολόγηση οξειδωτικού στρες και κλινική χρήση βιοδεικτών οξειδοαναγωγής στην ανδρική υπογονιμότητα.....	76
--	----

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6^ο ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ

6. Αντιοξειδωτικά ως βελτιωτικά μέσα.....	79
6.1 Πιθανή θεραπεία για την πρόληψη εμφάνισης γυναικολογικών παθήσεων του οξειδωτικού στρες.....	80
6.2 Θεραπεία της ανδρικής υπογονιμότητας που σχετίζεται με το οξειδωτικό στρες....	82
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ.....	85
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	87

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η απόκτηση παιδιού αποτελεί την φυσική συνέχιση αλλά και εξέλιξη του κύκλου της ανθρώπινης αναπαραγωγής και η γονιμότητα επηρεάζει σημαντικά τόσο την ψυχολογική κατάσταση του ζευγαριού όσο και την επιτυχία σύλληψης και επίτευξης εγκυμοσύνης. Ωστόσο, οι σύγχρονοι ρυθμοί ζωής και η καθημερινότητα (άγχος, κακή διατροφή, έλλειψη ύπνου, οξειδωτικό στρες...) η οποία έχει αναπτύξει ο σύγχρονος άνθρωπος έχουν αρχίσει να φθείρουν την ανθρώπινη ζωή, με απόρροια την μη φυσιολογική λειτουργία του οργανισμού. Έτσι, δημιουργούνται βλάβες σε μαζικά συστήματα του οργανισμού, όπως για παράδειγμα αυτό της αναπαραγωγής. Συγκεκριμένα, ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες που συμβάλλουν στην υπογονιμότητα ενός ζευγαριού αποτελεί το οξειδωτικό στρες, το οποίο πλήττει τόσο την γυναικεία όσο και την ανδρική γονιμότητα.

Το οξειδωτικό στρες αναφέρεται στην ανισορροπία που δημιουργείται μεταξύ των προ-οξειδωτικών και των αντιοξειδωτικών παραγόντων του οργανισμού, δηλαδή της παραγωγής των ελεύθερων ριζών οξυγόνου (ROS) από τον οργανισμό και της αντιοξειδωτικής ικανότητας αυτού. Όπως έχει επισημανθεί το οξειδωτικό στρες είναι ένα φυσιολογικό φαινόμενο που λαμβάνει χώρα σε πολλά συστήματα του οργανισμού προκειμένου να πραγματοποιηθούν ορισμένες βιολογικές διεργασίες, όπως η ωογένεση και η σπερματογένεση. Ωστόσο, όταν οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (ROS) παράγονται σε μεγαλύτερα επίπεδα έναντι του φυσιολογικού στον οργανισμό, μπορεί να προκαλέσουν βλάβη στα κύτταρα καθώς και στα μόρια τους με απόρροια, την εμφάνιση οξειδωτικών βλαβών σε αυτά.

Η οξειδωτική βλάβη που προκαλείται από την εμφάνιση του οξειδωτικού στρες στον οργανισμό, είναι ικανή να επηρεάσει τη λειτουργία πολλών οργάνων και συστημάτων, συμπεριλαμβανομένου και του αναπαραγωγικού συστήματος. Συγκεκριμένα, υπάρχουν αποδείξεις πως το οξειδωτικό στρες μπορεί να επηρεάσει σημαντικά τις παραμέτρους του σπέρματος όπως είναι η μορφολογία, η κινητικότητα και η ικανότητα γονιμοποίησης των σπερματοζωαρίων, καθώς επίσης μπορεί να επηρεάσει και τη παρουσία

λευκοκυττάρων στο σπέρμα αλλά και να συμβάλλει στον κατακερματισμό του DNA των σπερματοζωαρίων με αποτέλεσμα την μη επιτυχή επίτευξη εγκυμοσύνης με φυσικό, αλλά και με μη φυσικό τρόπο σύλληψης.

Από την άλλη, στην περίπτωση της γυναικείας γονιμότητας το οξειδωτικό στρες μπορεί να έχει δυσμενή επίδραση σε αυτήν. Ειδικότερα, μπορεί να προκαλέσει βλάβη τόσο στα ωοκύτταρα όσο και στα υπόλοιπα όργανα του αναπαραγωγικού συστήματος, δηλαδή το ενδομήτριο, τις σάλπιγγες, τις ωοθήκες και την περιτοναϊκή κοιλότητα, γεγονός που μπορεί να επηρεάσει άμεσα τόσο την διαδικασία της ωορρηξίας και την εμφύτευση του εμβρύου στο ενδομήτριο όσο και την ανάπτυξη του μετέπειτα. Μάλιστα το οξειδωτικό στρες φαίνεται να συμβάλλει σημαντικά και στην εμφάνιση διάφορων αναπαραγωγικών ασθενειών όπως είναι το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών, η ενδομητρίωση, η ανωοθυλακιορρηξία, οι αποβολές, η προεκλαμψία και πολλά άλλα.

Εκτός από το γυναικείο και ανδρικό αναπαραγωγικό σύστημα, το οξειδωτικό στρες φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά και τις τεχνικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (ART). Κατά την διάρκεια των διαδικασιών ART, όπως η εξωσωματική γονιμοποίηση (IVF) και η μικρογονιμοποίηση (ICSI), η οξειδωτική βλάβη μπορεί να προκληθεί από πολλούς παράγοντες όπως είναι η υπέρμετρη παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου (ROS), η απώλεια αντιοξειδωτικής ικανότητας των εμβρύων και οι ορμονικές αλλαγές που συμβαίνουν κατά την διάρκεια της διαδικασίας, καθώς επίσης και τους περιβαλλοντικούς αλλά και τους τεχνικούς τρόπους υπό τους οποίους διενεργείται η διαδικασία της γονιμοποίησης στα εργαστήρια. Η οξειδωτική βλάβη μπορεί να επηρεάσει τόσο την ποιότητα των εμβρύων όσο και την επιβίωση, αλλά και την εμφύτευσή τους στο ενδομήτριο.

Για την αντιμετώπιση όλων αυτών, πολυάριθμες έρευνες στηρίζονται στον αντιοξειδωτικό μηχανισμό που διαθέτει ο ίδιος ο οργανισμός αλλά και στην χορήγηση αντιοξειδωτικών συμπληρωμάτων στο ζευγάρι. Συγκεκριμένα οι αντιοξειδωτικοί παράγοντες συμβάλλουν στην αντιμετώπιση του οξειδωτικού στρες, προστατεύοντας τα κύτταρα από την οξειδωτική βλάβη που μπορεί να δημιουργηθεί. Αυτοί οι παράγοντες περιλαμβάνουν βιταμίνες όπως η βιταμίνη C, η βιταμίνη E, διάφορα μέταλλα και ιχνοστοιχεία όπως είναι το σελήνιο, ο ψευδάργυρος και πολλά άλλα. Επιπρόσθετα, για την αντιμετώπιση του οξειδωτικού στρες και ταυτόχρονα την βελτίωση των αποτελεσμάτων των τεχνικών ART έχουν προταθεί διάφορες προσεγγίσεις όπως είναι η πρόσληψη αντιοξειδωτικών συμπληρωμάτων, δηλαδή η βιταμίνη C&E, το σελήνιο και το συνένζυμο Q₁₀. Επίσης, υποστηρίζεται πως μια σωστή και ισορροπημένη διατροφή τόσο της γυναίκας όσο και του άνδρα σε συνδυασμό με την αποφυγή του καπνίσματος, του αλκοόλ και της μείωσης του άγχους μπορούν να συμβάλλουν στην προστασία του οργανισμού από το οξειδωτικό στρες και να βελτιώσουν την υπογονιμότητα του ζευγαριού κατά την διάρκεια των τεχνικών ART.

ABSTRACT

Having a child is the natural continuation and evolution of the cycle of human reproduction and fertility has a significant impact on both the psychological state of the couple and the success of conception and pregnancy. However, the modern rhythms of life and everyday life (stress, pressure, running, poor diet, lack of sleep, oxidative stress...) that modern people has developed have begun to wear out human life, resulting in abnormal functioning of the body. So this causes damage to massive systems of the organism, such as reproduction. In particular, one of the most interesting factors contributing to a couple's infertility is oxidative stress, which affects both female and male fertility.

Oxidative stress refers to the imbalance created between the pro-oxidants and antioxidants of the body, i. e. the production of oxygen free radicals (ROS) by the body and its antioxidant capacity. As has been pointed out, oxidative stress is a physiological phenomenon that takes place in many systems of the body in order to carry out certain biological processes, one of which is both oogenesis and spermatogenesis. However, when oxygen free radicals (ROS) are produced at higher than normal levels in the body, they can cause damage to cells and their molecules, resulting in oxidative damage.

The oxidative damage caused by the occurrence of oxidative stress in the body is capable of affecting the health and function of many organs and systems, including the reproductive system. Specifically, there is evidence that oxidative stress can significantly affect sperm parameters such as morphology, motility and fertilization capacity of sperm, as well as the presence of leukocytes in the sperm and the fragmentation of sperm DNA, resulting in unsuccessful natural and non-natural conception.

On the other hand, in the case of female fertility, oxidative stress can have an adverse effect on it. In particular, it can cause damage to both oocytes and the reproductive system components, i. e. the endometrium, fallopian tubes, ovaries and peritoneal cavity, which can directly affect both the ovulation process and implantation of the embryo in the endometrium and its subsequent development. In fact, oxidative stress seems to contribute significantly to the occurrence of various reproductive diseases such as polycystic ovary syndrome, endometriosis, anovulatory syndrome, miscarriages, pre-eclampsia and many others.

In addition to the female and male reproductive systems, oxidative stress appears to have a significant impact on assisted reproductive techniques (ART). During ART procedures, such as IVF and ICSI, oxidative damage can be caused by many factors such as excessive production of oxygen free radicals

(ROS), loss of antioxidant capacity of the embryos and hormonal changes that occur during the procedure as well as the environmental and technical ways in which the fertilization process is carried out in the embryos workshops. Oxidative damage can affect both the quality of the embryos and their survival and implantation chances in the endometrium.

To deal with all this, numerous researches rely on the antioxidant mechanism available in the body itself and the administration of antioxidant supplements to the couple. Specifically, antioxidant agents help to counteract oxidative stress, protecting cells from oxidative damage that can occur. These factors include vitamins such as vitamin C, vitamin E, various minerals and trace elements such as selenium, zinc and many others. In addition, to address oxidative stress and at the same time improve the results of ART techniques, various approaches have been proposed different methods such as the intake of antioxidant supplements, i. e. vitamin C & E, selenium and coenzyme Q10. It is also argued that a proper and balanced diet for both the woman and the man combined with avoiding smoking, alcohol and reducing the stress levels in the organism can help protect the body from oxidative stress and improve the couple's infertility during ART techniques.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

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

AGE: Προηγμένα τελικά προϊόντα γλυκοζυλίωσης

ART: Υποβοηθούμενες αναπαραγωγικές τεχνικές

[Ca²⁺ +]: Ενδοκυτταρική συγκέντρωση ασβεστίου

CCE: Χωρητική είσοδος ασβεστίου

cGMP: Κυκλική μονοφωσφορική γουανοσίνη

CRP: C-αντιδρώσα πρωτεΐνη

eNOS / NOS III: Ενδοθηλιακή συνθάση νιτρικού οξειδίου

ET: Μεταφορά ηλεκτρονίων

ETC: Αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων

ER: Ενδοπλασματικό πρόγραμμα

Fe²⁺ / Fe³⁺: Σίδηρος

FF: Ωοθυλακικό υγρό

FSH: Η ορμόνη των θυλακίων

GPx: Υπεροξειδάση γλουταθειόνης

GSH: Γλουταθειόνη

GSSG: Οξειδωμένη γλουταθειόνη(δυσουλφίδιο γλουταθειόνης)

H₂O₂: Υπεροξείδιο του υδρογόνου

ICSI: Ενδοκυτταροπλασματική έγχυση σπέρματος

IL: Ιντερλευκίνη

iNOS / NOS II: Επαγωγίμη συνθάση νιτρικού οξειδίου

IVF: Τεχνητή γονιμοποίηση

JNK: N-τερματικές κινάσες c-Jun

MDA: Μαλονδιαλδεΰδη

NADPH: φωσφορικό δινουκλεοτίδιο νικοτιναμίδης αδενίνης

NOS: Συνθάση νιτρικού οξειδίου

nNOS / nNOS I: Νευρωνική συνθάση νιτρικού οξειδίου

NO: Νιτρικό οξύ

NO₂: Διοξείδιο του αζώτου

OH: μονοξειδίο του υδρογόνου

OS: Οξειδωτικό στρες

PCOS: Σύνδρομο πολυκυκτικών ωοθηκών

PG: Προσταγλανδίνη

RNS: Δραστικά είδη αζώτου

ROS: Αντιδραστικά είδη οξυγόνου ή ελεύθερες ρίζες οξυγόνου

SOD: Υπεροξειδίο δυσμουτάσης

TAC: Συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα

TAS: Ολική αντιοξειδωτική κατάσταση

TNF: Παράγοντας νέκρωσης όγκου

VEGF: Αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας

Zn: Ψευδάργυρος

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο

ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ ΚΑΙ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑ

1. ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑ

Η υπογονιμότητα σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας(WHO) και την Διεθνή Επιτροπή Παρακολούθησης Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής(CMART) θεωρείται νόσος του αναπαραγωγικού συστήματος και ορίζεται από την αδυναμία επίτευξης κλινικής εγκυμοσύνης(υπερηχογραφική απεικόνιση ενός ή περισσότερων σάκων κύησης ή απόλυτων σημείων εγκυμοσύνης) μετά από 12 μήνες σεξουαλικών επαφών χωρίς προφύλαξη[1]. Σύμφωνα μάλιστα με διάφορες επιδημιολογικές μελέτες που έχουν γίνει και με βάση την WHO τουλάχιστον το 10-12% των ζευγαριών που βρίσκονται σε αναπαραγωγική ηλικία αντιμετωπίζει κάποιας μορφής δυσκολία ως προς την προσπάθειά του να αποκτήσει απογόνους[2]. Παγκοσμίως 48,5 έως 186 εκατομμύρια άνθρωποι επηρεάζονται από την ανικανότητα να τεκνοποιήσουν [3],[4],[5]και η καθυστερημένη σύλληψη επηρεάζει το 10% έως 15% των ζευγαριών που προσπαθούν να συλλάβουν[6].

Η υπογονιμότητα κλινικά διακρίνεται σε δύο κατηγορίες την Πρωτοπαθή Υπογονιμότητα και την Δευτεροπαθή Υπογονιμότητα. Ως Πρωτοπαθής υπογονιμότητας ορίζεται η αδυναμία τεκνοποίησης είτε λόγω αδυναμίας επίτευξης εγκυμοσύνης είτε λόγω αδυναμίας ολοκλήρωσης της κύησης έως ότου γεννηθεί ζωντανό νεογνό. Στις γυναίκες που πάσχουν από πρωτοπαθή υπογονιμότητα συγκαταλέγονται εκείνες που έχουν αποβάλει ή που δεν έχουν γεννήσει ζωντανό νεογνό.

Δευτεροπαθής υπογονιμότητα από την άλλη ορίζεται η αδυναμία τεκνοποίησης, είτε λόγω αδυναμίας επίτευξης εγκυμοσύνης είτε λόγω αδυναμίας ολοκλήρωσης της κυοφορίας μέχρι την γέννηση ζωντανού νεογνού, μετά από προηγούμενη εγκυμοσύνη ή προηγούμενη γέννηση ζωντανού νεογνού. Πάσχοντες θεωρούνται οι γυναίκες που κατ' επανάληψη αποβάλλουν ή που η εγκυμοσύνη τους καταλήγει σε γέννηση μη ζώντος νεογνού ή αυτές που μετά από μια προηγούμενη εγκυμοσύνη, δεν μπορούν να κυοφορήσουν μέχρι τη γέννηση ζωντανού νεογνού[1]

1.1 ΑΙΤΙΑ ΓΥΝΑΙΚΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΝΔΡΙΚΗΣ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑΣ

Τα αίτια της υπογονιμότητας ποικίλουν τόσο στον άνδρα όσο και στην γυναίκα και περίπου στο 40% των ζευγαριών εμφανίζονται πολλαπλές αιτίες[7]. Η υπογονιμότητα μπορεί να είναι αποτέλεσμα είτε ενός συγκεκριμένου, μείζονος προβλήματος(π.χ. απόφραξη σαλπίγγων) είτε πολλαπλών μικρών δυσλειτουργιών. Παλαιότερες μελέτες υποστήριζαν πως το 20%-40% των περιπτώσεων υπογονιμότητας αφορούσε τους

άνδρες ενώ ένα ποσοστό κοντά στο 50%-65% αφορούσε τις γυναίκες με την ανεξήγητη υπογονιμότητα να αγγίζει το ποσοστό των 10%-15%[7][8]. Τα δεδομένα αυτά ωστόσο αλλάζουν συνεχώς, με βιβλιογραφίες να θέλουν τα δύο φύλα να μοιράζονται το ποσοστό υπογονιμότητας. Με αποτέλεσμα σήμερα να υποστηρίζεται πως η υπογονιμότητα οφείλετε κατά 40% σε γυναικείο παράγοντα και κατά 40% σε ανδρικό, με την ανεξήγητη υπογονιμότητα να κατέχει ένα ποσοστό των 20%. [1]

ΑΙΤΙΕΣ ΓΥΝΑΙΚΕΙΑΣ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑΣ

1. Ηλικία

Ως πρώτη και βασική αιτιολογία της υπογονιμότητας θεωρείται η ηλικία της γυναίκας καθώς είναι ευρέως αποδεκτό πως η γονιμότητα της γυναίκας μειώνεται δραματικά με την πάροδο του χρόνου. Συγκεκριμένα το ποσοστό υπογονιμότητας σε σχέση με την ηλικία αγγίζει το 4,5% στην ηλικία των 25, το 7% στην ηλικία των 30, το 12% στην ηλικία των 35 και το 20% στην ηλικία των 38. Ύστερα την ηλικία των 40 τα ποσοστά αρχίζουν να μεγαλώνουν ταχύτατα με ποσοστό υπογονιμότητας μόλις 50% να εμφανίζεται στην ηλικία των 41 και κοντά στο 90% στην ηλικία των 45, με διάστημα χρόνου μόνο 4 χρόνια ηλικιακά[9].

2. Διαταραχές ωοθυλακιορρηξίας

Σύμφωνα με την Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας(WHO) διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες διαταραχών ωοθυλακιορρηξίας.

Κατηγορία 1^η κατά WHO: Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν οι διαταραχές που προκαλούνται από την μη λειτουργία του υποθάλαμου και της υπόφυσης, και αφορά περίπου το 10% των διαταραχών της ωοθυλακιορρηξίας. Οι γυναίκες που ανήκουν στην κατηγορία αυτή παρουσιάζουν πρωτοπαθή ή δευτεροπαθή αμηνόρροια, με χαμηλές γοναδοτροπίνες και ανεπάρκεια οιστρογόνων. Στην Ομάδα αυτή απαντώνται γυναίκες με νευρική ανορεξία, αθλήτριες με χαμηλό δείκτη μάζας σώματος(BMI) και γυναίκες με υψηλά επίπεδα στρες[1].

Κατηγορία 2^η κατά WHO: Αφορά την πλειοψηφία των γυναικών με διαταραχές της ωοθυλακιορρηξίας περίπου ένα 85%. Οι διαταραχές προκαλούνται από δυσλειτουργία του άξονα υποθάλαμος- υπόφυση- ωοθήκες και στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνονται το Σύνδρομο Πολυκυστικών Ωοθηκών(PCOS) και η

υπερπρολακτιναιμική αμηνόρροια. Οι γυναίκες αυτές συνήθως παρουσιάζουν συμπτώματα ολιγομηνόρροιας[1].

Κατηγορία 3^η κατά WHO: Είναι η κατηγορία με την μικρότερη συχνότητα εμφάνισης και προκαλείται από ωθηκική ανεπάρκεια , υψηλά επίπεδα γοναδοτροπινών και χαμηλά οιστρογόνα[1].

3. Σάλπιγγικός παράγοντας

Οι σάλπιγγες είναι υπεύθυνες για τη μεταφορά των αρσενικών και θηλυκών γαμετών και παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην συνάντηση του ωαρίου και του σπερματοζωαρίου καθώς, στις σάλπιγγες πραγματοποιείται η γονιμοποίηση τους[1]. Η υπογονιμότητα που οφείλεται στην απόφραξη σαλπίγγων /περισαλπιγγικές συμφύσεις είναι η πιο συχνή μορφή γυναικείας υπογονιμότητας. Η απόφραξη μπορεί να συμβεί σε τρεις θέσεις: στο επίπεδο των κροσσών, στο μεσαίο τμήμα της σάλπιγγας ή στον ισθμό αυτής. Η απόφραξη στον κώδωνα-κροσσούς είναι η πιο κοινή. Οι συμφύσεις από την άλλη μπορεί να αναπτυχθούν από ενδομητρίωση ή/και σαλπιγγίτιδα μετά από φυματίωση καθώς και από διάφορες χειρουργικές επεμβάσεις[1][7].

4. Ενδομητρίωση

Η ενδομητρίωση είναι μια καλοήθης πάθηση του γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος που επηρεάζει περίπου το 10-15% των γυναικών που βρίσκονται σε αναπαραγωγική ηλικία. Πρόκειται για μια οιστρογονοεξαρτώμενη φλεγμονώδης νόσος που χαρακτηρίζεται από την παρουσία και ανάπτυξη ενδομήτριου ιστού εκτός της ενδομήτριας κοιλότητας με κοινά συμπτώματα το πυελικό άλγος και την υπογονιμότητα καθώς και σε μερικές περιπτώσεις την εμφάνιση δυσπαρευνίας και δυσμηνόρροιας[10]. Μάλιστα σε περιπτώσεις σοβαρής ενδομητρίωσης οι συμφύσεις που προκαλούνται μπορεί να οδηγήσουν σε δυσλειτουργία των σαλπίγγων[1]. Ο μηχανισμός με τον οποίο δρα η ενδομητρίωση στην υπογονιμότητα και η αιτιολογία της ωστόσο, παραμένουν ακόμα ασαφής, με την θεωρία του Sampson , την μεταπλασματική θεωρία του Mayer και την θεωρία πρόκλησης να αποτελούν τρεις κλασσικές πιθανές θεωρίες[10].

5. Μητριάιοι παράγοντες

Στους μητριάιους παράγοντες που επηρεάζουν την γονιμότητα συγκαταλέγονται οι γυναίκες με προβλήματα στην μήτρα συγγενή όπως: διάφραγμα μήτρας, μονόκερως μήτρα ή επίκτητα όπως:

ινομώματα (υποβλεννογόνια ή ενδοτοιχωματικά), πολύποδες, συμφύσεις που μπορεί να παρουσιάσουν υπογονιμότητα που είναι δυνατόν να εκδηλώνεται ως καθ' ἑξίν αποβολές ή μειωμένη πιθανότητα σύλληψης. Η επίπτωση των συγγενών ανωμαλιών ποικίλλει ανάλογα με τον υπο μελέτη πληθυσμό και τη διαγνωστική τεχνική. Συγκεκριμένα το ποσοστό επίπτωσης στον γενικό πληθυσμό κυμαίνεται στο 4,3-6,7%, σε υπογόνιμο πληθυσμό στο 3,4-8% ενώ σε γυναίκες με καθ' ἑξίν αποβολές το ποσοστό ανέρχεται στο 12,6-18,2%. Επομένως σύμφωνα με τα παραπάνω ποσοστά προκύπτει πως η παρουσία συγγενών ανωμαλιών της μήτρας μειώνουν σημαντικά την πιθανότητα εγκυμοσύνης ενώ το ποσοστό αποβολής αυξάνεται και παράλληλα αυξάνεται σημαντικά και ο κίνδυνος εμφάνισης περιγεννητικής θνησιμότητας[1].

6. Τραχηλικός παράγοντας

Η εχθρική τραχηλική βλέννα θεωρείται από πολλούς ερευνητές βασική αιτία υπογονιμότητας καθώς φαίνεται να βλάπτει τουλάχιστον το 9-10% των υπογόνιμων ζευγαριών. Ωστόσο είναι μια άποψη που δεν είναι από όλους αποδεκτή καθώς πολλοί ερευνητές αμφισβητούν την ύπαρξή της ως αιτία υπογονιμότητας[1].

ΑΙΤΙΑ ΑΝΔΡΙΚΗΣ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑΣ

Η ανδρική υπογονιμότητα μπορεί να οφείλεται σε τρεις κύριες κατηγορίες αιτιών

1. Προ-ορχικά αίτια[1]

- Διαταραχές υποθαλάμου, υπόφυσης ή περιφερικών οργάνων όπως: υπογοναδοτροφικός υπογοναδισμός, σύνδρομο Kallman
- Συγγενή σύνδρομα όπως: Prader-Will
- Υψηλά επίπεδα εξωγενών ή ενδογενών ανδρογόνων: χρήση στεροειδών αναβολικών, μεταβολικές διαταραχές, όγκοι που εκκρίνουν ανδρογόνα
- Υψηλά επίπεδα οιστρογόνων: ηπατική δυσλειτουργία(κίρρωση ήπατος), όγκοι που εκκρίνουν οιστρογόνα, νοσογόνος παχυσαρκία
- Υψηλά επίπεδα προλακτίνης: όγκοι που εκκρίνουν προλακτίνη, ιδιοπαθής υπερπρολακτιναμία
- Υψηλά επίπεδα γλυκοκορτικοειδών

- Υπερθυρεοειδισμός

2. Ορχικά αίτια[1]

- Γενετικές /καρυοτυπικές ανωμαλίες
- Ανατομικές ανωμαλίες: κρυπορχία (ετερόπλευρη ή αμφοτερόπλευρη), σύνδρομο εξαφανιζόμενου όρχεως (αμφοτερόπλευρη ανορχία-XY άνδρες με μη ψηλαφητούς όρχεις)
- Γοναδοτοξίνες: χημειοθεραπεία, ακτινοβολία, κάπνισμα, μαριχουάνα κατάχρηση αλκοόλ, έκθεση σε βαρέα μέταλλα(μόλυβδος, υδράργυρος) θειούχα φάρμακα
- Κιρσοκήλη
- Δομικές ανωμαλίες που μειώνουν την κινητικότητα: σύνδρομο ακίνητων κροσσών, ακίνητα ζωντανά σπερματοζώαρια
- Ορχίτιδα, παρωτίτιδα μετά την εφηβεία, ορχεο-επιδιδυμίτιδα, σύφιλη, γονόρροια, λέπρα
- Αντισπερματοζωαρικά αντισώματα(τραυματισμός όρχεως, προηγούμενη εκτομή σπερματικού πόρου)
- Καρκίνος όρχεων
- Ιδιοπαθής: στο 25% των ασθενών με μη φυσιολογική ανάλυση σπέρματος

3. Μετα-ορχικά αίτια[1]

Διαταράσσουν τη μεταφορά του σπέρματος μετά την παραγωγή του στους όρχεις όπως:

- Απόφραξη σπερματικού πόρου(συγγενής αμφοτερόπλευρη απουσία του σπερματικού πόρου ,διατομή του σπερματικού πόρου, ανάπτυξη ουλώδους ιστού μετά από σεξουαλικά μεταδιδόμενα νοσήματα
- Παλίνδρομη εκσπερμάτιση:(πολλαπλή σκλήρωση, διαβήτης, εκτομή οπισθοπεριτοναϊκών λεμφαδένων.)
- Αδυναμία εκσπερμάτισης(βλάβη νωτιαίου σωλήνα, εκτομή οπισθοπεριτοναϊκών λεμφαδένων).

1.2 ΑΝΕΞΗΓΗΤΗ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑ

Με τον όρο ανεξήγητη υπογονιμότητα αναφερόμαστε σε ένα ποσοστό ζευγαριών περίπου 20% τα οποία ύστερα από 12 μήνες προσπάθειας σύλληψης χωρίς προφύλαξη και διερεύνησης της υπογονιμότητας του ζευγαριού αδυνατούν να αποκτήσουν απογόνους χωρίς να υπάρχει κάποιος παθολογικός παράγοντας στο προσκήνιο[1][12]. Η ανεξήγητη υπογονιμότητα μπορεί να προκύψει με δύο τρόπους: στον πρώτο μπορεί να προκύψει μέσω κάποιου λεπτού μη ανιχνεύσιμου ελαττώματος στην αναπαραγωγική διαδικασία, και στον δεύτερο μπορεί να προκύψει τυχαία από κάποια απλή καθυστέρηση της σύλληψης μην ξεχνάμε ωστόσο πως στον γενικό πληθυσμό των ζευγαριών που επιχειρούν σύλληψη, το 84% θα συλλάβει μέσα στον χρόνο και ένα ποσοστό 92% θα συλλάβει μετά από 2 χρόνια[1][11].

Η διάγνωση της ανεξήγητης υπογονιμότητας τίθεται όταν διαπιστωθεί η βατότητα των σαλπίγγων (υστεροσαλπιγγογραφία και/ή λαπαροσκόπηση) , ο έλεγχος ωοθυλακιορρηξίας(βασική θερμοκρασία σώματος, μεταβολές της τραχηλικής βλέννας), ανίχνευση αιχμής της LH και φυσιολογική ανάλυση σπέρματος[1][11].

Η ανεξήγητη υπογονιμότητα είναι πολυπαραγοντική και μπορεί να οφείλεται και σε παράγοντες που επηρεάζουν την καθημερινότητα του ζευγαριού και την ποιότητα ζωής τους. Τέτοιοι παράγοντες θεωρούνται: οι διαταραχές βάρους, το κάπνισμα, η υπερβολική κατανάλωση αλκοόλ και καφεΐνης, οι περιβαλλοντικοί και εργασιακοί παράγοντες, το στρες καθώς και η υπερβολική άσκηση[1].

Διαταραχές Βάρους

Η παχυσαρκία καθώς και η ανορεξία επηρεάζουν σημαντικά την γονιμότητα τόσο στις γυναίκες όσο και στους άνδρες καθώς τα επίπεδα τεστοστερόνης δρουν αρνητικά και επηρεάζουν την ποιότητα αλλά και ποσότητα σπέρματος[1].

Κάπνισμα

Το κάπνισμα φαίνεται να επιδρά αρνητικά στην γονιμότητα καθώς αποδεδειγμένα επιταχύνει την απώλεια της αναπαραγωγικής λειτουργίας και μπορεί να προκαλέσει από ένα έως και τέσσερα έτη νωρίτερα εμμηνόπαυση. Παράλληλα, αρκετά δεδομένα έχουν συνδέσει το κάπνισμα με αυξημένο παράγοντα αποβολών και έκτοπων κήσεων. Επίσης, το κάπνισμα εκτός από την γονιμότητα του ζευγαριού μπορεί να επηρεάσει σημαντικά και την διαδικασία της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής καθώς μειώνει σημαντικά τα αποτελέσματα επιτυχίας έστω αν ένας από τους δύο συντρόφους καπνίζει[1].

Υπερβολική κατανάλωση αλκοόλ

Η υπερβολική κατανάλωση αλκοόλ φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά την γονιμότητα και στα δυο φύλα και ειδικά στους άνδρες καθώς μειώνει την κινητικότητα αλλά και τον αριθμό των σπερματοζωαρίων[1].

Υπερβολική κατανάλωση καφεΐνης

Δεν φαίνεται να υπάρχει αξιοσημείωτη συσχέτιση της κατανάλωσης καφεΐνης με την γονιμότητα αλλά η υπερβολική κατανάλωση της φαίνεται να επιδρά αρνητικά ως προς τα ποσοστά επιτυχίας της IVF[1].

Περιβαλλοντικοί και εργασιακοί παράγοντες

Η έκθεση σε τοξικά προϊόντα, σε υψηλές θερμοκρασίες και ακτινοβολία μπορούν να βλάψουν σημαντικά την γονιμότητα[1].

Στρες

Ολοένα και περισσότερες μελέτες έχουν δείξει πως το στρες επηρεάζει σημαντικά την γονιμότητα τόσο στην γυναίκα όσο και στον άνδρα μέσω μιας σειράς μεταβολών που μπορούν να επηρεάσουν τόσο την διαδικασία ωορρηξίας όσο και την διαδικασία της σπερματογένεσης αντίστοιχα[1].

Υπερβολική άσκηση

Η έντονη και επίπονη άσκηση επηρεάζει αρνητικά την διαδικασία της ωορρηξίας με απόρροια την εμφάνιση διαταραχών ωοθυλακιορρηξίας και αυξάνοντας έτσι το ποσοστό υπογονιμότητας. Από την άλλη η

μέτρια και σωστή άσκηση δείχνει να βοηθάει σημαντικά στην γονιμότητα και να έχει υψηλά ποσοστά εγκυμοσύνης ανεξάρτητα από το BMI[1].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο

ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ

2. ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ

Η παρουσία του οξειδωτικού στρες στο ανθρώπινο οργανισμό αποτελεί ένα φυσιολογικό φαινόμενο. Τις τελευταίες δύο δεκαετίες, μάλιστα αποτέλεσε ένα από τα πιο καυτά δημοσιεύματα για όλους τους βιολόγους ανά τον κόσμο. Υπάρχουν αρκετοί λόγοι οι οποίοι μπορούν να δικαιολογήσουν την σπουδαιότητά του, ανάμεσα σε αυτούς: η κατανόηση και η γνώση παραγωγής αλλά και μεταβολισμού δραστικών μορίων όπως είναι αυτό του αντιδραστικού οξυγόνου και των αζωτούχων ειδών, η αναγνωρισιμότητα διάφορων βιολογικών δεικτών σχετικά με την δημιουργία της οξειδωτικής βλάβης, η εύρεση στοιχείων σχετικά με την εμφάνιση χρόνιων αλλά και οξειών προβλημάτων υγείας απόρροια του οξειδωτικού στρες και η αναγνώριση ποικίλων διαιτητικών αντιοξειδωτικών που εμπεριέχονται στις φυτικές τροφές ως βιοδραστικά μόρια και ούτω καθεξής[13].

Το οξειδωτικό στρες προκαλείται από την ανισορροπία που δημιουργείται μεταξύ των προ-οξειδωτικών και των αντιοξειδωτικών προϊόντων στον οργανισμό. Αυτή η αναλογία ενεργοποιείται από τα αυξημένα επίπεδα των ελεύθερων ριζών οξυγόνου(ROS) και/ή των ελεύθερων νιτρικών ριζών ή από την μείωση των αντιοξειδωτικών του μηχανισμού άμυνας του οργανισμού[14]. Μία άλλη θεωρία θέλει την παρουσία του οξειδωτικού στρες να ευθύνεται στην υπερπαραγωγή των ελεύθερων ριζών οξυγόνου(ROS) από τον οργανισμό ή στην αδυναμία της σωστής λειτουργίας του αντιοξειδωτικού αμυντικού μηχανισμού[15]. Όπως και να έχει το οξειδωτικό στρες αποτελεί μια αρκετά περίπλοκη διαδικασία, καθώς η επιρροή που ασκεί στον οργανισμό εξαρτάται από τον τύπο του οξειδωτικού, δηλαδή την θέση που εντοπίζεται αλλά και την δυναμική παραγωγής του σε σχέση με την σύνθεση και την δραστηριότητα ποικίλων άλλων αντιοξειδωτικών, καθώς επίσης και την ικανότητα του μηχανισμού επιδιόρθωσης του οργανισμού[13].

2.1. ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ ΚΑΙ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ

Το οξυγόνο αποτελεί ένα βασικό στοιχείο της αερόβιας ζωής και ο οξειδωτικός μεταβολισμός περιλαμβάνει μια πολύ σημαντική πηγή ενέργειας για τα κύτταρα. Μέσω του αερόβιου μεταβολισμού παράγονται προ-οξειδωτικά μόρια που ονομάζονται Ελεύθερες Ρίζες Οξυγόνου ή δραστικοί τύποι Οξυγόνου (ROS)[18]. Τα αντιδραστικά είδη οξυγόνου λοιπόν, παράγονται κατά την διάρκεια κρίσιμων διεργασιών κατανάλωσης οξυγόνου(O₂). Αποτελούνται από ελεύθερα και μη ελεύθερα ριζικά ενδιάμεσα προϊόντα, με τις πρώτες να θεωρούνται οι πιο δραστικές. Αυτή η αντιδραστικότητα προκύπτει από την παρουσία ενός ή περισσότερων ασύζευκτων ηλεκτρονίων στο εξωτερικό κέλυφος ενός ατόμου. Επιπλέον, οι βιολογικές διεργασίες που εξαρτώνται από το οξυγόνο και το άζωτο έχουν αποκτήσει μεγαλύτερη σημασία επειδή τα τελικά τους προϊόντα συνήθως ανευρίσκονται σε περιπτώσεις υψηλών μεταβολικών απαιτήσεων, όπως σε παθολογικές διεργασίες ή σε εξωτερικές περιβαλλοντικές αλληλεπιδράσεις[14].

Πριν αρκετό καιρό οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου(ROS) θεωρούνταν ότι προέρχονται αποκλειστικά από τον μεταβολισμό των μιτοχονδρίων. Πράγματι τα μιτοχόνδρια μέσω του μεταβολισμού τους παράγουν ROS, και μάλιστα μέσα από την φυσιολογική λειτουργία τους, ο τελικός υποδοχέας των ηλεκτρονίων οξυγόνου μετατρέπεται σε νερό, και είναι πιθανό, ιδίως υπο παθολογικές συνθήκες, τα ηλεκτρόνια να αρχίσουν να διαρρέουν πρόωρα από το σύστημα με αποτέλεσμα να δημιουργούνται οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου(ROS)[18]. Επομένως, η κύρια πηγή ROS στα κύτταρα είναι τα μιτοχόνδρια ως υποπροϊόν της

μεταβολικής αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων(ETC) [13][16][20]. Έχει προταθεί μάλιστα πως τα μιτοχόνδρια συμβάλλουν στο 90% της ποσότητας ROS που παράγεται στα κύτταρα[20].

Σε κυτταρικό επίπεδο, ωστόσο τα δραστικά είδη οξυγόνου (ROS) παράγονται ως μεταβολικά υποπροϊόντα εκτός από τα μιτοχόνδρια και από τα υπεροξισώματα και την οξειδάση της ξανθίνης (XO). Ενώ αντίθετα, οι φαγοκυτταρικές οξειδάσες NADPH και οι διπλές οξειδάσες (DUOX) δημιουργούν ROS ως το κύριο ενζυματικό προϊόν[20].

Οι ελεύθερες ρίζες Οξυγόνου (ROS) θεωρούνται εξαιρετικά αντιδραστικά μόρια τα οποία στην εξωτερική τους στοιβάδα διαθέτουν ένα ή περισσότερα μη συζευγμένα ηλεκτρόνια, από τα οποία σχηματίζεται ένα ατελές κέλυφος ηλεκτρονίων οπότε τελικά είναι και αυτό που προσδίδει στις ελεύθερες ρίζες την υψηλή αντιδραστικότητά τους και μπορούν να σχηματιστούν όταν το οξυγόνο αλληλοεπιδρά με ορισμένα μόρια. Υπο συνθήκες φυσιολογίας, η πιο κοινή ελεύθερη ρίζα οξυγόνου(ROS) θεωρείται πως είναι το ανιόν υπεροξειδίου(O_2^-)[16]. Άλλοι βασικοί τύποι Ελεύθερων Ριζών Οξυγόνου(ROS) εκτός από το υπεροξείδιο, είναι το υπεροξείδιο του υδρογόνου(H_2O_2) και το υδροξύλιο(OH^*)[17]. Η ρίζα του υπεροξειδίου σχηματίζεται όταν ηλεκτρόνια διαρρέουν από την αλυσίδα μεταφοράς των ηλεκτρονίων. Αν και το υπεροξείδιο του υδρογόνου μπορεί να σχηματιστεί και από ορισμένα ένζυμα οξειδάσης, η αποδιάταξη του υπεροξειδίου οδηγεί και αυτή στον σχηματισμό του υπεροξειδίου του υδρογόνου(H_2O_2). Το υδροξύλιο(OH) με την σειρά του είναι ένα αρκετά δραστικό ιόν και έχει την δυνατότητα να τροποποιεί τις πουρίνες και τις πυριμιδίνες και κατεπέκταση μπορεί να προκαλέσει το σπάσιμο των αλυσίδων του DNA με απόρροια το ανθρώπινο γονιδίωμα να υποστεί σημαντική βλάβη[17]. Η πιο σοβαρή, μάλιστα επίθεση από τα ROS μπορεί να οδηγήσει σε εκτεταμένη και ανεπανόρθωτη καταστροφή κυττάρων, που τελικά μπορεί να προκαλέσει κυτταρικό θάνατο μέσω νέκρωσης ή απόπτωσης. Από αυτές οι περισσότερες παθολογικές επιδράσεις προκαλούνται από το άνοιγμα των διαύλων ιόντων, την υπεροξείδωση των λιπιδίων, την τροποποίηση των πρωτεϊνών και την οξείδωση του DNA[16].

Η αντίδραση του Haber-Weiss αποτελεί τον βασικότερο μηχανισμό παραγωγής της υψηλής αντιδραστικότητας ρίζα του υδροξυλίου(OH). Αυτή η αντίδραση ωστόσο, είναι ικανή να παράξει πολλές τοξικές ρίζες μέσω αλληλεπιδράσεων μεταξύ του ανιόντος υπεροξειδίου(O_2^-) και του υπεροξειδίου του υδρογόνου(H_2O_2). Από την άλλη η αντίδραση του Fenton, στην οποία εμπεριέχονται δυο αντιδράσεις, συμπεριλαμβάνει την χρήση των ιόντων μετάλλου ως καταλύτη προκειμένου να παραχθεί OH. Μάλιστα ορισμένα κατιόντα μετάλλου όπως ο χαλκός(Cu) και ο σίδηρος($Fe^{2+/3+}$) μπορεί να συμβάλλουν σημαντικά στην δημιουργία ROS[14].

Μέσα από τις φυσιολογικές διεργασίες του οργανισμού που χρησιμοποιούν το οξυγόνο(O_2) ως υπόστρωμα όπως, οι αντιδράσεις οξυγενάσης και οι αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίων(ET) δημιουργούνται μεγάλα ποσά ROS, μέσα στις οποίες συγκαταλέγεται και το ανιόν υπεροξειδίου(O_2^-). Άλλες πηγές O_2^- αποτελούν: η

μικρή αλυσίδα ηλεκτρονίων στο ενδοπλασματικό δίκτυο(ER), το κυτόπλασμα P450 και το φωσφορικό δινουκλεοτίδιο νικοτιναμιδίου-αδενίνης(NADPH) τα οποία παράγουν σημαντικές ποσότητες O_2^- , ειδικά κατά την διάρκεια των πρώτων μηνών εγκυμοσύνης, μαζί με άλλες οξειδωαναγωγάσες[14].

Το ανιόν υπεροξειδίου(O_2^- ή SO) αποτοξικοποιείται από το ένζυμο δυσμουτάση του υπεροξειδίου(SOD), το οποίο το μετατρέπει σε H_2O_2 . Η καταλάση και η υπεροξειδάση γλουταθειόνης(GPx) αποικοδομούν περαιτέρω το τελικό προϊόν σε νερό(H_2O). Παρόλα αυτά το H_2O_2 δεν θεωρείται τεχνικά ελεύθερη ρίζα, συνήθως αναφέρεται έτσι λόγω της ανάμειξής του στην παραγωγή αλλά και στην διάσπαση των ελεύθερων ριζών[14].

Οι όροι δραστικά είδη οξυγόνου (ROS) και δραστικά είδη αζώτου (RNS) ή αλλιώς RONS είναι μια ομάδα ριζών υψηλής αντίδρασης και μη ριζικών χημικών ουσιών που περιέχουν οξυγόνο και άζωτο αντίστοιχα[19][20]. Η βιοχημεία των RONS είναι πολύπλοκη και παράγονται είτε ενζυματικά είτε μη ενζυματικά. Σε διάφορες συγκεντρώσεις, ο σχηματισμός τους έχει ευεργετικό ρόλο καθώς λειτουργούν ως δευτερογενείς κυτταρικοί αγγελιοφόροι. Τα RONS ασκούν τη μικροβιοκτόνο δράση τους προσβάλλοντας ζωτικά κυτταρικά βιομόρια, προκαλώντας μη αναστρέψιμη και μη ειδική βλάβη σε πρωτεΐνες, λιπίδια και νουκλεϊκά οξέα, οδηγώντας έτσι σε θάνατο των παθογόνων [20].

Κύρια κεντρική ρίζα των δραστικών ειδών αζώτου(RNS) θεωρείται πως είναι το νιτρικό οξείδιο ή αλλιώς μονοξείδιο του αζώτου(-NO), το οποίο παράγεται από την μετατροπή του L-αργινίνης σε L-κιτρουλίνη μέσω της παρουσίας μοριακού οξυγόνου[20]. Μια αντίδραση που καταλύεται από την οικογένεια ενζύμων που ονομάζονται Συνθάση Νιτρικού Οξειδίου(NOS)[17][20]. Δυο συχνά παραδείγματα δραστικών ειδών αζώτου(RNS) αποτελούν το μονοξείδιο του αζώτου(-NO) όπως αναφέρεται και παραπάνω, και το διοξείδιο του αζώτου($-NO_2$) εκτός από τα μη αντιδραστικά είδη όπως το υπεροξυνιτρώδες($ONOO^-$) και οι νιτροζαμίνες[14][17]. Με ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο, το -NO, το οποίο είναι μια εξαιρετικά δραστική ελεύθερη ρίζα, καταστρέφει τις πρωτεΐνες, τους υδατάνθρακες, τα νουκλεοτίδια και τα λιπίδια, και μαζί με άλλους φλεγμονώδεις μεσολαβητές οδηγεί σε κυτταρικές και ιστικές βλάβες αλλά και σε χαμηλού βαθμού φλεγμονή και συμφύσεις[17]. Από την άλλη μεριά η Συνθάση Νιτρικού Οξειδίου(NOS) χωρίζεται σε τρεις κατηγορίες στα θηλαστικά: 1. Ενδοθηλιακό NO(eNOS) 2. Νευρωνικό NO(nNOS) και 3. Επαγωγικό NO(iNOS)[14][17]. Μάλιστα το ενδοθηλιακό NO ανευρίσκεται τόσο στα ωοθηκικά κύτταρα όσο στα κοκκιώδη κύτταρα αλλά και στην επιφάνεια του ωοκυττάρου κατά την διαδικασία ανάπτυξης ωοθυλακίου[17].

Όπως έχει ανασκοπηθεί από τους Visioli και συν., η μειωμένη βιοδιαθεσιμότητα του μονοξειδίου του αζώτου(NO) αποτελεί βασικό παράγοντα που οδηγεί στην διαταραχή των αγγειακών λειτουργιών που σχετίζονται με καταστάσεις υπογονιμότητας[14]. Έτσι, η επιβίωση των κυττάρων εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τα διατηρούμενα φυσιολογικά επίπεδα του NO καθώς, η υπερβολική παραγωγή του μονοξειδίου

του αζώτου(NO) μπορεί να είναι τοξική[14][17]. 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[14].

Οι ανισορροπίες των ROS οδηγούν σε απώλεια της ενδοκυττάριας ομοιόστασης Ca^{2+} με απελευθέρωση ιόντων Ca^{2+} από το ενδοπλασματικό και άλλα κυτταρικά διαμερίσματα. Η συγκέντρωση ασβεστίου εντός του αυλού του ενδοπλασματικού δικτύου (ER) είναι πολύ υψηλότερη απ' ό,τι στο κυτταρόλυμα, φθάνοντας σε χιλιοστομοριακά επίπεδα. Η συγκέντρωση αυτή διατηρείται με αντλίες που ανήκουν στην οικογένεια ATPασών ασβεστίου του σαρκοειδούς και του ενδοπλασματικού δικτύου και είναι απαραίτητη για την σωστή λειτουργία του μηχανισμού αναδίπλωσης των πρωτεϊνών. Οι ROS είναι σε θέση να ενεργοποιούν διαύλους απελευθέρωσης ασβεστίου στη μεμβράνη του ER, οι οποίοι περιλαμβάνουν τον υποδοχέα τριφωσφορικής ινοσιτόλης-1,4,5(IP3R) και τον υποδοχέα της ριανοδίνης. Η προκύπτουσα απελευθέρωση του Ca^{2+} από το ER θα ενεργοποιήσει διάφορες ευαίσθητες σε Ca^{2+} διεργασίες εντός του κυττάρου συμπεριλαμβανομένων πολλών από τις οδούς σηματοδότησης[16].

Από την άλλη, η διαμόρφωση της δραστηριότητας του ενδοθηλιακού μονοξειδίου του αζώτου(eNOS) από αυξημένες συγκεντρώσεις ενδοκυττάριας ασβεστίου Ca^{2+} , οι οποίες μπορεί να εμφανιστούν με οξύ τρόπο ως απόκριση σε αγωνιστές, συμπεριλαμβανομένης της οιστραδιόλης και του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα(VEGF). Εντούτοις, μαζί με την συνεχή εισροή Ca^{2+} διαμέσου της πλασματικής μεμβράνης οδηγεί στην αυξημένη παραγωγή ασβεστίου, η οποία είναι γνωστή ως ικανότητα εισόδου ασβεστίου(CCE) και είναι απαραίτητη για την διατήρηση της δραστηριότητας του eNOS και την ρύθμιση του αγγειακού τόνου. Καθόλη την διάρκεια της εγκυμοσύνης η προσαρμογή στη διαρκεί εισροή και αύξηση του Ca^{2+} μέσω της απόκρισης της CCE είναι επιβεβλημένη για την ενεργοποίηση του eNOS και σημειώνεται κυρίως μέσα από τις αγγειακές μεταβολές που σχετίζονται με την φυσιολογική εγκυμοσύνη, οι υποξικές καταστάσεις ρυθμίζουν επίσης τα επίπεδα NOS και η αυξημένη έκφραση του ενδοθηλιακού NOS έχει παρατηρηθεί στις μητριαίες αρτηρίες των ωών ως απάντηση στην χρόνια υποξία[14].

Τα ROS επομένως, μπορούν να ενεργοποιήσουν πολλές κυτταρικές διεργασίες προκαλώντας ανεπανόρθωτη βλάβη τόσο στα κύτταρα όσο και στους ιστούς. Είναι αποδεκτό πως το οξειδωτικό στρες σπάνια εμφανίζεται μεμονωμένα, αλλά συνοδεύεται συνήθως από άλλες μορφές κυτταρικού στρες. Τέλος οι στενές αλληλεπιδράσεις των ROS λαμβάνουν χώρα μεταξύ της μιτοχονδριακής και ενδοπλασματικής λειτουργίας, που διαμεσολαβούνται μέσω των διαύλων ασβεστίου που αποτελούν συνήθως σύστημα πρόωθησης και παραγωγής ROS[16].

2.2. ANTIOΞΕΙΔΩΤΙΚΟΙ ΑΜΥΝΤΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ

Τα κύτταρα του οργανισμού μας διαθέτουν από μόνα τους μηχανισμούς που δρουν κατά των ελεύθερων ριζών οξυγόνου (ROS) που δημιουργούνται στο σώμα μας, διατηρώντας μια ισορροπία μεταξύ των οξειδωτικών και των αντιοξειδωτικών στοιχείων[15]. Υπάρχουν δύο είδη αντιοξειδωτικών στον οργανισμό τα ενζυματικά και τα μη ενζυματικά αντιοξειδωτικά[14]. Τα αντιοξειδωτικά είναι σαρωτές που αποτοξινώνουν την περίσσεια ROS, η οποία βοηθάει στη διατήρηση της ευαίσθητης οξειδωτικής/αντιοξειδωτικής ισορροπίας του σώματος[14]. Υπο φυσιολογικές συνθήκες, οι σαρωτές αυτοί έχουν την ιδιότητα να μετατρέπουν τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου σε νερό (H₂O) για να αποτρέψουν με αυτό τον τρόπο την αυξημένη παραγωγή των ROS στον οργανισμό[17]. Οι αντιοξειδωτικές λειτουργίες συνδέονται με την μείωση του οξειδωτικού στρες, των μεταλλάξεων του DNA, των κακοήθων μετασχηματισμών καθώς και άλλων παραμέτρων της βλάβης των κυττάρων. Τα αντιοξειδωτικά όπως φαίνεται περιορίζουν τις επιδράσεις των δραστικών ειδών οξυγόνου και περιορίζουν τη συχνότητα εμφάνισης καρκίνου καθώς και άλλων εκφυλιστικών ασθενειών. Ωστόσο η παρατεταμένη και συνεχής παραγωγή των ROS μπορεί να εξασθενήσει τους αμυντικούς αυτούς μηχανισμούς συμβάλλοντας στην ανάπτυξη διάφορων ασθενειών[21][23].

Σύμφωνα με την έννοια που δόθηκε το 1989 από τους Halliwell & Gutteridge ως αντιοξειδωτικό αναφέρεται οποιαδήποτε ουσία που όταν ανευρίσκεται σε χαμηλότερη συγκέντρωση σε σύγκριση με αυτή ενός οξειδωσιμου υποστρώματος, μπορεί να καθυστερήσει ή να αναστείλει την οξείδωση του εν λόγω υποστρώματος. Ο ορισμός αυτός περιλαμβάνει ενώσεις μη ενζυμικής καθώς και ενζυμικής φύσης[22]. Η έννοια του αντιοξειδωτικού, στην συνέχεια ορίζεται, μαζί με μια συζήτηση για τα υπάρχοντα κριτήρια ταξινόμησης: ενζυματικό και μη ενζυματικό, προληπτικά ή επισκευαστικά συστήματα, ενδογενή και εξωγενή, πρωτογενή και δευτερογενή, υδροδιαλυτά και λιποδιαλυτά, φυσικά ή συνθετικά. Τα πρωτογενή αντιοξειδωτικά είναι κυρίως διακόπτες αλυσίδας, ικανά να καθαρίσουν ριζικά είδη μέσω της δωρεάς υδρογόνου. Τα δευτερεύοντα αντιοξειδωτικά από την άλλη, είναι μονές αποσβέσεις οξυγόνου, αποικοδομητές υπεροξειδίου, χηλικοί παράγοντες μετάλλου, αναστολείς οξειδωτικών ενζύμων ή απορροφητές ακτινοβολίας UV[23].

Οι πρώτοι πιο αναγνωρίσιμοι τύποι του αντιοξειδωτικού αμυντικού μηχανισμού, οι οποίοι αναπτύχθηκαν κατά της οξειδωτικής βλάβης, είναι εκείνοι που εμποδίζουν την εμφάνιση των αντιδραστικών ειδών οξυγόνου και εκείνοι που εμποδίζουν αλλά και συλλαμβάνουν τις ρίζες που σχηματίζονται. Τα συστήματα αυτά υπάρχουν σε υδατικά και μεμβρανικά κυτταρικά διαμερίσματα και μπορούν να είναι ενζυμικά και μη ενζυμικά. Ένα άλλο σημαντικό αντιοξειδωτικό σύστημα του κυττάρου αντιπροσωπεύεται από την διαδικασία επιδιόρθωσης, η οποία απομακρύνει τα κατεστραμμένα βιομόρια πριν η συσσώρευσή τους

επιτρέπει την αλλοίωση του κυτταρικού μεταβολισμού. Η παρέμβαση αυτή που πραγματοποιείται από το σύστημα συνίσταται στην επιδιόρθωση των οξειδωτικά κατεστραμμένων νουκλεϊκών οξέων με ειδικά ένζυμα, την απομάκρυνση των οξειδωμένων πρωτεϊνών με πρωτεολυτικά συστήματα και την επιδιόρθωση των οξειδωμένων λιπιδίων με φωσφολιπάσες, υπεροξειδάσες ή ακυλοτρανσφεράσες. Μάλιστα έχει παρατηρηθεί πως η φθορά των συστημάτων επιδιόρθωσης οδηγεί περισσότερο στην γήρανση και στις ασθένειες που σχετίζονται με την γήρανση απ' ό,τι οι μέτριες αλλαγές στο δυναμικό της αντιοξειδωτικής άμυνας έναντι της εμφάνισης ROS[23].

Σε δεύτερη φάση και όπως αναφέρθηκε πιο πάνω, διαπιστώθηκε ότι τα αντιοξειδωτικά τα οποία είναι ικανά να μεταβάλλουν την αλυσίδα του DNA και να καθαρίσουν τα ριζικά είδη, ονομάζονται πρωτογενή αντιοξειδωτικά. Τα δευτερογενή αντιοξειδωτικά από την άλλη είναι μονάδες σβέσης οξυγόνου, αποικοδομητές υπεροξειδίων που παράγουν μη ριζικά είδη, χηλικούς παράγοντες μετάλλων, αναστολείς οξειδωτικού ενζύμου(π.χ. λιποξυγενάσης) ή απορροφητές υπεριώδους ακτινοβολίας. Τα δευτερογενή αντιοξειδωτικά μπορεί να παρουσιάζουν συνεργιστικά αποτελέσματα σε συνδυασμό με τα πρωτογενή αντιοξειδωτικά, ακολουθώντας αρκετούς δυνατούς μηχανισμούς όπως:

- Σταθεροποίηση πρωτογενών αντιοξειδωτικών με την δημιουργία όξινου περιβάλλοντος
- Αναγέννηση πρωτογενών αντιοξειδωτικών μέσω της δωρεάς οξυγόνου
- Χηλικοποίηση προ-οξειδωτικών κατιόντων μετάλλων μετάπτωσης
- Απόσβεση του μοριακού οξυγόνου

Επιπλέον έχει παρατηρηθεί ότι τα αντιοξειδωτικά ένζυμα μπορούν να καταλύσουν τη σύνθεση ή τη αναγέννηση μη ενζυματικών αντιοξειδωτικών[23].

ENZYMATIKA ANTIOΞEIDΩTIKA

Τα ενζυματικά αντιοξειδωτικά γνωστά και ως φυσικά αντιοξειδωτικά, εξουδετερώνουν την περίσσεια των ROS που σχηματίζεται και τις εμποδίζουν από το να καταστρέψουν την κυτταρική δομή. Τα ενζυματικά αντιοξειδωτικά διαθέτουν όλα ένα μέταλλο μετάπτωσης στο πυρήνα τους, ικανό να παίρνει διαφορετικές

τιμές καθώς μεταφέρουν ηλεκτρόνια για να εξισορροπήσουν τα μόρια για την διαδικασία της αποτοξίνωσης[14][16]. Τα ενδογενή αντιοξειδωτικά ένζυμα περιλαμβάνουν την δυσμουτάση υπεροξειδίου(SOD), την καταλάση(CAT) και την υπεροξειδάση γλουταθειόνης(GPx)[14].

Η διάσπαση του ανιόντος SO σε H₂O₂ από το SOD είναι θεμελιώδης για τις αντιοξειδωτικές αντιδράσεις. Το ένζυμο SOD χωρίζεται σε τρία ισοένζυμα: SOD-1, SOD-2 και SOD-3. Το SOD-1 περιέχει χαλκό (Cu)και ψευδάργυρο(Zn) ως μεταλλικούς συν-παράγοντες, και βρίσκεται στο κυτταρόλυμα. Η SOD-2 από την άλλη είναι μια μιτοχονδριακή ισομορφή που περιέχει μαγγάνιο(Mn) και η SOD-3 κωδικοποιεί την εξωκυτταρική μορφή. Το SOD-3 είναι δομικά παρόμοιο με το Cu, Zn-SOD, καθώς περιέχει Cu και Zn ως συμπαραγοντες[14]. Στην συνέχεια το υπεροξείδιο του υδρογόνου διασπάται σε νερό με την δράση της καταλάσης ή την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης(GPx)[16].

Η δραστηριότητα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης(GPx) εξαρτάται από την παρουσία της μειωμένης γλουταθειόνης(GSH) ως δότη υδρογόνου. Η γλουταθειόνη(GSH) είναι ο κύριος κυτταρικός οξειδωαναγωγικός ρυθμιστής θειόλης στα κύτταρα και συντίθεται από το L- γλουταμινικό, την L-κυστεΐνη και την γλυκίνη στο κυτοσόλιο[16]. Στα κύτταρα η GSH έχει πολλαπλούς ρόλους, μέσα στους οποίους συγκαταλέγεται η διατήρηση των κυττάρων σε μειωμένη κατάσταση και το σχηματισμό συζυγίων με ορισμένες επικίνδυνες ενδογενείς και ξеноβιοτικές ενώσεις[14].

Η οικογένεια ενζύμων της γλουταθειόνης(GSH) περιλαμβάνει την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης(GPx), την GST και την αναγωγή της γλουταθειόνης. Η GPx χρησιμοποιεί την συμπυκνωμένη μορφή της GSH ως δότη υδρογόνου H⁺ για την αποικοδόμηση των υπεροξειδίων. Η εξάντληση της GSH έχει ως αποτέλεσμα να προκαλούνται βλάβες στο DNA και να εμφανίζονται αυξημένες συγκεντρώσεις H₂O₂ στον οργανισμό, ως εκ τούτου η γλουταθειόνη αποτελεί ένα απαραίτητο αντιοξειδωτικό. Ωστόσο κατά την διάρκεια αναγωγής του H₂O₂ σε H₂O και O₂ η γλουταθειόνη(GSH) οξειδώνεται σε δυσουλφιδική γλουταθειόνη(GSSG) από την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης(GPx). Η αναγωγή της γλουταθειόνης από την άλλη συμμετέχει στην αντίστροφη αντίδραση και χρησιμοποιεί την μεταφορά ενός πρωτονίου δότη από το φωσφορικό δινουκλεοτίδιο νικοτιναμίδης αδενίνης(NADPH) στη δυσουλφιδική γλουταθειόνη(GSSG), με αποτέλεσμα την ανακύκλωση της GSH[14].

Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης(GPx) χωρίζεται σε πέντε ισόμορφες στο ανθρώπινο σώμα: την GPx1, την GPx2, την GPx3, την GPx4 και την GPx5. Η GPx1 είναι μια κυτταρολογική ισομορφή, η οποία είναι ευρέως κατανοημένη σε ιστούς ενώ η GPx2 κωδικοποιεί μια γαστρεντερική μορφή χωρίς ωστόσο να επιτελεί κάποια συγκεκριμένη λειτουργία. Η GPx3 είναι παρούσα στο πλάσμα και στο επιδιδυμικό υγρό. Η GPx4 ειδικά αποτοξινώνει τα φωσφολιπίδια υδροϋπεροξειδίου εντός των βιολογικών μεμβρανών, τέλος η GPx5 βρίσκεται στην επιδιδυμίδα[14].

Η καταλάση αντιπροσωπεύει το ένζυμο που εμπλέκεται στην αναγωγική αποικοδόμηση του H₂O₂ σε νερό. Εκφράζεται στην πλειονότητα των κυττάρων, των οργάνων και των ιστών και σε αυξημένες συγκεντρώσεις

ανευρίσκεται στο ήπαρ και στα ερυθροκύτταρα. Άλλα ενζυμικά αντιοξειδωτικά, συμπεριλαμβανομένης της υπεροξυρεδοξίνης, της αναγωγάσης της θειορεδοξίνης και της υπεροξειδάσης της γλουταθειώνης, κυρίως ενδοκυτταρικά, είναι υπεύθυνοι για την αδρανοποίηση του υπεροξειδίου του υδρογόνου(H_2O_2) και των οργανικών υπεροξειδίων, αποδίδοντας νερό/αλκοόλες και οξυγόνο[23].

ΜΗ ΕΝΖΥΜΑΤΙΚΑ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ

Τα μη ενζυματικά αντιοξειδωτικά αποτελούνται από συμπληρώματα διατροφής και συνθετικά αντιοξειδωτικά όπως είναι: η Βιταμίνη C, η γλουταθειώνη(GSH), η ταυρίνη, η υποταυρίνη, η Βιταμίνη E, ο ψευδάργυρος(Zn), το σελήνιο(Se), το β-καροτένιο και το καροτένιο. Η Βιταμίνη C ή αλλιώς ασκορβικό οξύ είναι ένας γνωστός οξειδωαναγωγικός καταλύτης ο οποίος μπορεί να μειώσει και να εξουδετερώσει τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου(ROS). Η συμπυκνωμένη μορφή της διατηρείται μέσω μιας σειράς αντιδράσεων που πραγματοποιούνται με την βοήθεια της γλουταθειώνης(GSH) και καταλύεται από την πρωτεϊνική δυσουλφιδική ισομεράση και τις γλουταρεδοξίνες. Η γλουταθειώνη από την άλλη είναι ένα πεπτίδιο που βρίσκεται στις περισσότερες μορφές αερόβιας ζωής, καθώς παράγεται στο κυτταρόλυμα από κυστεΐνη, γλουταμινικό και γλυκίνη είναι επίσης το σημαντικότερο μη ενζυματικό αντιοξειδωτικό το οποίο ανευρίσκεται στα ωάρια του γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος και τα έμβρυα. Οι αντιοξειδωτικές της ιδιότητες μάλιστα προέρχονται από την ομάδα θειόλης, της συνιστώσας της κυστεΐνης, η οποία είναι ένας αναγωγικός παράγοντας που επιτρέπει την οξειδοποίηση και την αντίστροφη μεταβολή στην σταθερή μορφή[14].

Η γλουταθειώνη συμμετέχει σε μεγάλο αριθμό αντιδράσεων αποτοξίνωσης σχηματίζοντας έτσι δυσουλφίδιο γλουταθειώνης, το οποίο με την σειρά του μετατρέπεται ξανά σε GSH με την δράση της αναγωγάσης γλουταθειώνης εις βάρος του NADPH. Το τελευταίο μάλιστα παράγεται μέσω της οδού της φωσφορικής πεντόζης, από την οποία η αφυδρογονάση 6-φωσφορικής γλυκόζης είναι το πρώτο ένζυμο. Το ένζυμο αυτό υπόκειται σε συνήθεις πολυμορφισμούς και η μειωμένη δραστηριότητά του μπορεί να θέσει σε κίνδυνο τις συγκεντρώσεις GSH και να οδηγήσει σε εμβρυοπάθεια. Σημαντικό είναι να προσθέσουμε πως οι πολυμορφισμοί στα αντιοξειδωτικά ένζυμα ή ο διαιτητικός περιορισμός των μικροθρεπτικών συστατικών, όπως το σελήνιο(Se), μπορεί να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο στην προδιάθεση για οξειδωτικό στρες και στην εμφάνιση επιπλοκών κατά την εγκυμοσύνη[16].

Οι μη ενζυματικές ενώσεις όπως το ασκορβικό οξύ(Βιταμίνη C) και η α-τοκοφερόλη(Βιταμίνη E) δρουν σε συνέργεια, με το ασκορβικό να είναι απαραίτητο για την αναγέννηση της μειωμένης α-τοκοφερόλης.

Επιπλέον, θειολικές ενώσεις όπως είναι η θειορεδοξίνη(Trx), είναι ικανές να αποτοξινώνουν το υπεροξειδίο του υδρογόνου(H_2O_2), αλλά με την σειρά τους απαιτούν την μετατροπή στην ανοιγμένη μορφή με την βοήθεια της ρυδοκτάσης της θειορεδοξίνης. Η κερουλοπλασμίνη και η τρανσφερίνη έχουν επίσης σημαντικό ρόλο καθώς δεσμεύουν ελεύθερα ιόντα σιδήρου αναστέλλοντας έτσι την αντίδραση Fenton και την παραγωγή OH [16].

Άλλα μη ενζυματικά αντιοξειδωτικά είναι η κυστεΐνη και η κυστεαμίνη(CSH) οι οποίες αυξάνουν την περιεκτικότητα γλουταθειόνης(GSH) στο ωοκύτταρο. Η κυστεαμίνη μάλιστα δρα και ως καθαριστής και είναι ένα αντιοξειδωτικό απαραίτητο για την διατήρηση των υψηλών επιπέδων γλουταθειόνης(GSH). Επιπλέον, η κυστεαμίνη μπορεί και μετατρέπεται σε άλλο αντιοξειδωτικό, που ονομάζεται υποταυρίνη. Οι συγκεντρώσεις τώρα πολλών αμινοξέων, συμπεριλαμβανομένης της ταυρίνης, αυξομειώνεται σημαντικά κατά την διάρκεια της ωοθυλακιογένεσης. Η ταυρίνη και η υποταυρίνη θεωρούνται σαρωτές που συμβάλλουν στην διατήρηση της οξειδωαναγωγικής ομοιόστασης στους γαμέτες, καθώς και οι δυο εξουδετερώνουν τα προϊόντα υπεροξειδωσίας των λιπιδίων, και η υποταυρίνη εξουδετερώνει περαιτέρω τις ρίζες υδροξυλίου[14].

Όπως η γλουταθειόνη(GSH), το σύστημα θειορεδοξίνης(Trx) ρυθμίζει τις γονιδιακές λειτουργίες και συντονίζει διάφορες ενζυμικές δραστηριότητες, αποτοξινώνει το H_2O_2 και το μετατρέπει στην μειωμένη κατάστασή του μέσω της αναγωγάσης θειορεδοξίνης. Κανονικά η θειορεδοξίνη δεσμεύεται στην κινάση σήματος ρύθμισης της απόπτωσης (ASK-1), καθιστώντας την ανενεργή. Ωστόσο όταν η θειολική ομάδα της Trx οξειδώνεται από το ανιόν SO , το ASK-1 αποσπάται από την θειορεδοξίνη και ενεργοποιείται οδηγώντας σε αυξημένη απόπτωση. Το ASK-1 ωστόσο μπορεί να ενεργοποιηθεί και μέσω της έκθεσης του στο H_2O_2 ή μέσω υποξίας και επανα-οξυγόνωσης με απόρροια να ανασταλεί η λειτουργία του από τις βιταμίνες E και C. Το σύστημα της θειορεδοξίνης παίζει σημαντικό ρόλο στην γυναικεία αναπαραγωγή και κυρίως στην ανάπτυξη του εμβρύου λαμβάνοντας χώρα στην κυτταρική ανάπτυξη, την διαφοροποίηση και τον θάνατο[14].

Η Βιταμίνη E ή αλλιώς α -τοκοφερόλη είναι μια λιποδιαλυτή βιταμίνη με αντιοξειδωτική δράση. Αποτελείται από οκτώ τοκοφερόλες και τοκοτριενόλες και έχει τεράστια σημασία στις αντιοξειδωτικές δραστηριότητες, διότι δρα με τις λιπιδικές ρίζες που παράγονται κατά την διάρκεια της υπεροξειδωσίας των λιπιδίων. Αυτή η αντίδραση παράγει οξειδωμένες ρίζες α -τοκοφερόλης οι οποίες έχουν την δυνατότητα να μετασχηματίζονται ξανά στην ενεργό ανοιχτή μορφή της αντιδρώντας με άλλα αντιοξειδωτικά όπως το ασκορβικό οξύ(Βιταμίνη C), η ρετινόλη ή η ουμπικινόλη[14].

Τέλος, η ορμόνη μελατονίνη είναι ένα αντιοξειδωτικό που σε αντίθεση με την βιταμίνη C, E και την γλουταθειόνη(GSH), παράγεται από το ανθρώπινο σώμα. Σε αντίθεση με άλλα αντιοξειδωτικά, ωστόσο η μελατονίνη δεν μπορεί να υποστεί οξειδωαναγωγικό κύκλο καθώς, μόλις οξειδωθεί δεν μπορεί να επιστρέψει στην μειωμένη της κατάσταση, επειδή σχηματίζει σταθερά τελικά προϊόντα μετά την αντίδραση. Η τρανσφερίνη και η φερίτινη αμφοτέρως πρωτεΐνες δέσμησης σιδήρου, παίζουν ρόλο στην αντιοξειδωτική άμυνα εμποδίζοντας την καταλυτική απελευθέρωση των ελεύθερων ριζών μέσω της χηλίωσης. Τα θρεπτικά συστατικά τώρα όπως το σελήνιο(Se), ο χαλκός(Cu) και τον ψευδάργυρο(Zn) είναι απαραίτητα για την δράση ορισμένων αντιοξειδωτικών ενζύμων, αν και τα ίδια δεν έχουν αντιοξειδωτική δράση[14].

Επομένως, το οξειδωτικό στρες συμβαίνει όταν η παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου ROS υπερβαίνει τα επίπεδα των αντιοξειδωτικών και έχει καταστροφικές επιπτώσεις στην υγεία επηρεάζοντας δυσμενώς τόσο την ανδρική όσο και την γυναικεία αναπαραγωγική ικανότητα. Ωστόσο θα πρέπει να ανατρέξουμε στο γεγονός ότι το οξειδωτικό στρες θεωρείται μια φυσιολογική διαδικασία όπως έχουμε ήδη αναφέρει, η οποία είναι απαραίτητη για την λειτουργία των βιολογικών συστημάτων καθώς και την λειτουργία πολλών μεταβολικών διεργασιών προκειμένου να επιτευχθεί η κυτταρική επιβίωση[14].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο

ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ & ΓΥΝΑΙΚΕΙΟ

ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

3. ROS & ΓΥΝΑΙΚΕΙΟ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

Ο εμμηνορρυσιακός κύκλος επηρεάζεται από μια περίπλοκη αλληλεπίδραση θετικών και αρνητικών βρόγχων ανάδρασης μεταξύ του υποθάλαμου, της πρόσθιας υπόφυσης και των ωοθηκών, γνωστός και ως άξονας Υ-Υ-Ω. Αυτές οι ορμονικές αλληλεπιδράσεις διέπουν δύο ταυτόχρονους ανατομικούς κύκλους που συμβαίνουν στην ωοθήκη και τη μήτρα, οι οποίοι έχουν τρεις φάσεις. Για τις ωοθήκες, αυτές περιλαμβάνουν: την ωοθυλακική φάση, την φάση της ωορρηξίας και την ωχρινική φάση ενώ για την μήτρα έχουμε: την εμμηνορροϊκή φάση, την πολλαπλασιαστική φάση και την εκκριτική φάση. Για να συμβεί ωορρηξία, παράγονται από την πρόσθια υπόφυση ορμόνες διέγερσης των ωοθυλακίων, όπως είναι η θυλακιοτρόπος ορμόνη (FSH), που οδηγούν στην ωρίμανση των ωοθυλακίων. Καθώς τώρα τα ωοθυλάκια (μαζί με τα ωάρια) μεγαλώνουν, παράγουν οιστραδιόλη (E₂). Η αύξηση στην οιστραδιόλη (E₂) οδηγεί στην ανάπτυξη του ενδομητρίου και ξεκινά την καταστολή των επιπέδων της θυλακιοτρόπου ορμόνης (FSH). Το ωοθυλάκιο στην συνέχεια, που είναι πιο ευαίσθητο στην FSH, θα είναι και το επικρατές ως προς την

ωρίμανση, ενώ τα υπόλοιπα ωοθυλάκια θα υποστούν ατρησία. Στην συνέχεια όσον αναφορά την οιστραδιόλη (E₂), η ύπαρξη αυξημένων τιμών παραγωγής της για περισσότερο από 50 ώρες προκαλεί άνοδο της ωχρινοτρόπου ορμόνης (LH), η οποία και αυτή με την σειρά της πυροδοτεί την ωορρηξία και την αποβολή του ωαρίου από το ωοθυλάκιο. Το ωοθυλάκιο που εκκρίνει το ωάριο στην συνέχεια μετατρέπεται στο ωχρο σωματίο και εκκρίνει προγεστερόνη (εάν το ωάριο γονιμοποιηθεί) για να βοηθήσει στην διατήρηση μιας πρώιμης εγκυμοσύνης. Εάν δεν προκύψει εγκυμοσύνη, τα επίπεδα της οιστραδιόλης καθώς και της προγεστερόνης πέφτουν, το ενδομήτριο αποπίπτει και η θυλακιοτρόπος ορμόνη (που δεν καταστέλλεται πλέον) θα πυροδοτήσει ξανά την έναρξη μιας νέας κύκλου ωρίμανσης ωοθυλακίων [24].

Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου(ROS) έχουν βρεθεί ότι έχουν φυσιολογικό ρόλο σχεδόν σε κάθε βήμα αυτής της οδού, συμπεριλαμβανομένης της βιοσύνθεσης στεροειδών των ωοθηκών, της ωρίμανσης των ωαρίων, της ωορρηξίας, του σχηματισμού βλαστοκύστεων, της γονιμοποίησης, της εμφύτευσης, της ωχρινοποίησης και της συντήρησης του ωχρού σωματίου. Αντιστρόφως, μια ανισορροπία στα προ-οξειδωτικά και τα αντιοξειδωτικά, μπορεί να οδηγήσει σε μία παθολογική κατάσταση σε κάθε ένα από αυτά τα στάδια, δημιουργώντας έτσι την προδιάθεση εμφάνισης ενδομητρίωσης, σύνδρομου πολυκυστικών ωοθηκών(PCOS) και φυσικά υπογονιμότητας. Αξιοσημείωτο μάλιστα είναι και το γεγονός ότι η εγκυμοσύνη από μόνη της είναι μια κατάσταση που καθιστά την ισορροπία αυτή ακόμη πιο ασταθή καθιστώντας την εγκυμοσύνη ,από την φύση της, ως μία κατάσταση οξειδωτικού στρες, η οποία είναι εμφανής στο πρώτο τρίμηνο της εγκυμοσύνης, κατά τον σχηματισμό του πλακούντα, και στο τρίτο τρίμηνο, όπου αυξάνεται η ενεργοποίηση των περιφερικών κοκκιοκυττάρων, μονοκυττάρων και λεμφοκυττάρων, τα οποία παράγουν και αυτά ROS. Ωστόσο, οποιαδήποτε περαιτέρω προ-οξειδωτική μεταβολή μπορεί να οδηγήσει σε πληθώρα δυσμενών αποτελεσμάτων εγκυμοσύνης όπως: αποβολή, επαναλαμβανόμενες αποβολές , εμβρυοπάθεια, προεκλαμψία, ενδομήτρια καθυστέρηση ανάπτυξης(IUGR), πρόωρη ρήξη μεμβρανών(PPROM) και διαβήτη κύησης(GDM)[24].

Τα ROS παίζουν σημαντικό ρόλο κατά την διάρκεια της ωορρηξίας, παρόμοιο με αυτόν της φλεγμονής. Η ωορρηξία καταστέλλεται από παράγοντες που αναστέλλουν τις οξειδωτικές φλεγμονώδεις αντιδράσεις. Εφόσον οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (ROS) δημιουργούνται κατά την διάρκεια της φλεγμονώδους διαδικασίας, εύλογα υποτίθεται ότι τα ROS απελευθερώνονται με την ρήξη του ωοθυλακίου και εμπλέκονται στην διαδικασία. Η πηγή των ROS φαίνεται να είναι φλεγμονώδη κύτταρα, όπως τα μακροφάγα και τα ουδετερόφιλα, καθώς υπάρχουν στην ωοθήκη κατά την ωορρηξία και παράγουν τεράστιες ποσότητες ελεύθερων ριζών[28].

Η παρουσία τώρα, των ελεύθερων ριζών οξυγόνου(ROS) και των αντιοξειδωτικών στο γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα έχει επιβεβαιωθεί μέσα από πολυάριθμες μελέτες που έχουν γίνει τόσο σε ζώα όσο και σε ανθρώπους. Ωστόσο η ακριβής πηγή των ROS στο γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα εξακολουθεί να αποτελεί αντικείμενο συζήτησης. Μάλιστα αρκετά αντιδραστικά είδη οξυγόνου καθώς και διάφορα αντιοξειδωτικά έχουν ανιχνευθεί στο ωοθυλακικό υγρό, στο σαλπγγικό υγρό, στα ωάρια καθώς

και στα έμβρυα. Πιο συγκεκριμένα γονίδια για την δυσμουτάση του υπεροξειδίου (SOD) αλλά και για την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης(GPx) ανευρίσκονται στα ωοκύτταρα, τα έμβρυα αλλά και στις σάλπιγγες. Τα αντιδραστικά είδη οξυγόνου στις ωοθήκες πιθανώς προέρχονται από πολλαπλά κύτταρα, όπως τα φαγοκυτταρικά μακροφάγα, παρεγχυματικά στεροειδή κύτταρα και ενδοθηλιακά κύτταρα. Τα αντιδραστικά είδη οξυγόνου εκτός από τις ωοθήκες, τις σάλπιγγες και το περιτόναιο ανευρίσκονται και στο ενδομήτριο. Επιπλέον, έχει βρεθεί πως η SOD είναι παρούσα καθόλη την διάρκεια του εμμηνορρυσιακού κύκλου και κατά την διάρκεια της πρώιμης εγκυμοσύνης. Η διαδικασία της ωρίμανσης ωαρίων, της μείωσης I και της μείωσης II, επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από μεταβλητές ποσότητες ROS και αντιοξειδωτικών. Κάθε μήνα μια ομάδα ωοκυττάρων αρχίζει να μεγαλώνει και να αναπτύσσεται στην ωοθήκη, αλλά η μείωση I συνεχίζεται μόνο σε ένα από αυτά, το κυρίαρχο ωοκύτταρο. Η διαδικασία αυτή ενεργοποιείται από αύξηση των ROS και αναστέλλεται από τα αντιοξειδωτικά. Αντίθετα η εξέλιξη της μείωσης II προωθείται από αντιοξειδωτικά, γεγονός που υποδηλώνει ότι υπάρχει μια πολύπλοκη σχέση μεταξύ ROS και αντιοξειδωτικών στην ωοθήκη. Η αύξηση της παραγωγής στεροειδών στο αναπτυσσόμενο ωοθυλάκιο προκαλεί αύξηση του P450, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό ROS. Τα αντιδραστικά είδη οξυγόνου που παράγονται από τον προ-ωοθυλακιορρηκτικό ωοθυλάκιο θεωρούνται σημαντικοί επαγωγείς της ωορρηξίας[14]. Επίσης, έχει σημειωθεί πως το οξειδωτικό στρες έχει άμεση επίδραση στο ωάριο, στο έμβρυο και στην εμφύτευση προκαλώντας υπεροξειδωση λιπιδίων κυτταρικής μεμβράνης, οξείδωση κυτταρικής πρωτεΐνης και βλάβη στο DNA[25].

3.1. ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ & ΩΟΘΗΚΗ

Η διάρκεια ζωής των ωοθηκών είναι ο κύριος καθοριστικός παράγοντας της γυναικείας αναπαραγωγικής λειτουργίας. Οι ωοθήκες θεωρούνται ένα αρκετά δραστικό μεταβολικά όργανο και χρησιμεύουν ως δεξαμενές γεννητικών κυττάρων κατά την διάρκεια της γυναικείας αναπαραγωγικής ζωής. Κατά την διάρκεια της αναπαραγωγικής ζωής τα αποθέματα ωοθυλακίων μειώνονται σταδιακά. Στην εφηβεία η γονάδα είναι προικισμένη με 300.000 αρχέγονα ωοθυλάκια που περιέχουν διπλοειδή ωοκύτταρα[26].

Μέσα από την θεωρία του οξειδωτικού στρες της γήρανσης προκύπτει ότι, ως αναπόφευκτα υποπροϊόντα του μεταβολισμού, τα αντιδραστικά είδη οξυγόνου (ROS) παράγονται συνεχώς μέσα στα κύτταρα, κυρίως από την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων (ETC) των μιτοχονδρίων. Εάν αυτά τα δραστικά χημικά είδη δεν καθαρίζονται αποτελεσματικά, μπορεί να προκληθεί οξειδωτική βλάβη στα βιομόρια. Πάνω από μια δεκαετία ύστερα από την δημοσίευση της θεωρίας του Tarin σχετικά με τις ελεύθερες ρίζες για την γήρανση των ωοθηκών, η βιολογική και η κλινική έρευνα έχει παραθέσει πολυάριθμες ενδείξεις ότι η αυξημένη

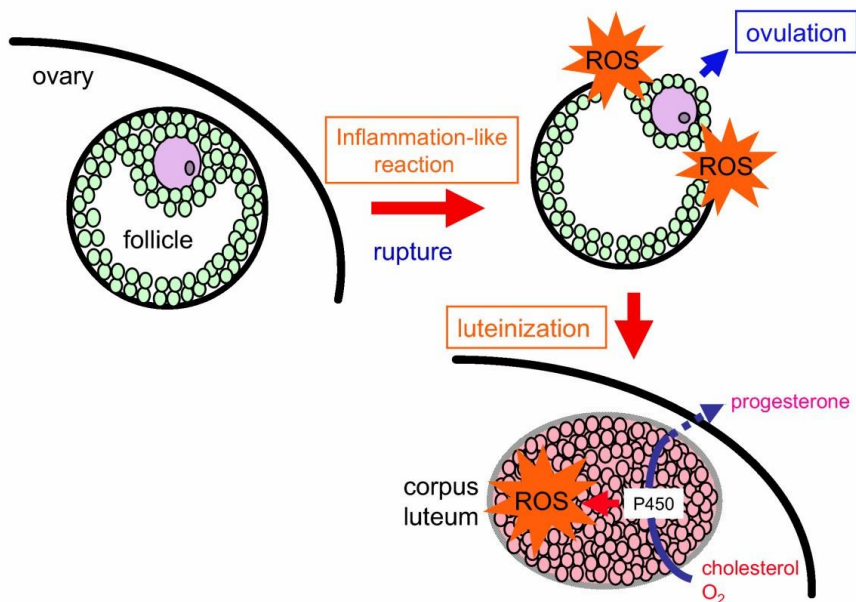
παραγωγή ROS μπορεί να συμβάλλει στην ατρησία των ωοθυλακίων και στην γήρανση των ωαρίων στις ωοθήκες. Το οξειδωτικό στρες που δημιουργείται λοιπόν, από τη δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων θεωρείται κύρια αιτία για την βράχυνση των τελομερών, τις διαταραχές του χρωμοσομικού διαχωρισμού, τις αποτυχίες ωρίμανσης και γονιμοποίησης ή τον κατακερματισμό ωαρίων/εμβρύων[26]. Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου επομένως, επηρεάζουν ποικίλες φυσιολογικές λειτουργίες της ωοθήκης, και το οξειδωτικό στρες θεωρείται σημαντικός ρυθμιστής της φυσιολογίας των ωοθηκικών γεννητικών κυττάρων και των στρωματικών κυττάρων. Οι συγκεντρώσεις ROS θα μπορούσαν επίσης να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο στην εμφύτευση και γονιμοποίηση των ωαρίων, καθώς μια σχετική μελέτη έδειξε τον εντοπισμό της δυσμουτάσης του υπεροξειδίου (SOD) στην ωοθήκη και διαπίστωσε ότι η Cu-Zn SOD ανευρίσκεται στα κοκκώδη κύτταρα των αναπτυσσόμενων ωοθυλακίων και των ώριμων γραφιανών ωοθυλακίων, αλλά και η υπεροξειδική δυσμουτάση του μαγγανίου (MnSOD) ανευρίσκεται στα ωχρινικά κύτταρα του ωχρού σωματιού, σε έρευνα που διεξάχθηκε σε αρουραίους[15].

Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου(ROS) ωστόσο, ασκούν τόσο αρνητικές όσο και θετικές επιδράσεις στις ωοθήκες των θηλαστικών, καθώς επηρεάζουν πολλαπλές φυσιολογικές δραστηριότητες στις ωοθήκες, από την ωρίμανση των ωοκυττάρων μέχρι και την γονιμοποίηση. Στις ωοθήκες διάφοροι δείκτες του οξειδωτικού στρες επηρεάζονται αρνητικά. Τα μακροφάγα, τα λευκοκύτταρα και οι κυτοκίνες που υπάρχουν στο μικροπεριβάλλον του ωοθυλακικού υγρού αποτελούν κύριες πηγές ROS. Μαζί με τις φυσιολογικές λειτουργίες των ωοθηκών που πραγματοποιούνται με την βοήθεια παραγωγής των ROS, επιτελείται ταυτόχρονα και μια άλλη κρίσιμη διαδικασία για την ωοθηκική ωοθυλακιογένεση, την κυρίαρχη επιλογή ωοθυλακίου, το σχηματισμό του ωχρού σωματιού (CL) και τον σχηματισμό εμβρύου, που ονομάζεται αγγειογένεση. Η διαδικασία της αγγειογένεσης αποτελεί μια εξαιρετικά πολύπλοκη διαδικασία η οποία προωθείται από τα οιστρογόνα που ρυθμίζουν ορισμένους κυτταρικούς παράγοντες, όπως ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF). Οι ROS που παράγονται από την οξειδάση NADPH, αποδείχθηκε ότι είναι σημαντικοί για την διαδικασία της αγγειογένεσης in vivo και τη σηματοδότηση του VEGF in vitro. Κατά συνέπεια οι ROS εμπλέκονται στην ανάπτυξη των ωοθυλακίων εν μέρει μέσω της ρύθμισης της αγγειογένεσης. Η κατάλληλη ποσότητα ROS που παράγονται από το προωθυλακιόρρηκτικό ωοθυλάκιο θεωρούνται κρίσιμοι επαγωγής της ωορρηξίας και η αναστολή παραγωγής των ελεύθερων ριζών οξυγόνου έχει επιβεβαιωθεί ότι διαταράσσει την διαδικασία της ωορρηξίας[15].

Η στέρηση οξυγόνου διεγείρει την αγγειογένεση του ωοθυλακίου, η οποία είναι σημαντική για την άφθονη αύξηση αλλά και ανάπτυξη των ωοθυλακίων στις ωοθήκες. Η ανάπτυξη των ωοθυλακίων από το αρχέγονο στάδιο στα δευτερογενή ωοθυλάκια συνοδεύεται από σημαντική αύξηση της μεταβολικής λειτουργίας των granulosa, και ιδίως μιας μεγάλης αύξησης της δραστηριότητας του κυτοχρώματος P450 με την βιοσύνθεση των στεροειδών. Μεγάλες ποσότητες ROS παράγονται κατά την διάρκεια της μεταφοράς

ηλεκτρονίων, υποδεικνύοντας πως τα λειτουργικά κύτταρα granulosa σχετίζονται με την προ-οξειδωτική κατάσταση στα ωοθυλάκια. Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (ROS) επάγονται στα ωοθυλακιορρηκτικά ωοθυλάκια με την παλινδρόμηση των προσταγλανδινών, των κυτοκινών, των πρωτεολυτικών ενζύμων και των στεροειδών, με αποτέλεσμα να προκύπτουν μεταβολές στην ροή του αίματος και τελικά να επέρχεται ωορρηξία. Με εξαίρεση τα κυρίαρχα ωοθυλάκια, τα οποία απελευθερώνονται για την γονιμοποίηση, τα άλλα αναπτυσσόμενα ωοθυλάκια υποβάλλονται όλα σε απόπτωση και η διαδικασία αυτή σηματοδοτείται από τις ROS. Παράλληλα, η θυλακιοτρόπος ορμόνη (FSH) που προκαλείται από την σύνθεση των οιστρογόνων και τη ρύθμιση της καταλάσης (CAT) και της γλουταθειόνης (GSH) στα αναπτυσσόμενα ωοθυλάκια αντιστέκεται στην απόπτωση, μια διαδικασία σημαντική για την διατήρηση της ισορροπίας κατά την διάρκεια της φυσιολογικής ωοθηκικής λειτουργίας. Οι ROS επίσης, παράγονται στο ωχρό σωμάτιο (CL) και εμπλέκονται στην λειτουργική λυτεόλυση (ωχρινόλυση). Οι ROS και τα αντιοξειδωτικά σχετίζονται με την σύνθεση της προγεστερόνης στην ωχρινική φάση[15].

Η υπερβολική στέρηση οξυγόνου από την άλλη, είναι ικανή να προκαλέσει βλάβη στα ωοθυλάκια. Μάλιστα η Cu-Zn SOD αυξάνεται στο ωχρό σωμάτιο (CL) κατά την διάρκεια της πρώιμης μέχρι την μέση ωχρινική φάση, αλλά μειώνεται κατά την διάρκεια της διαδικασίας της παλινδρόμησης, γεγονός που θα μπορούσε να εξηγήσει την αύξηση των ελεύθερων ριζών οξυγόνου (ROS) κατά την διάρκεια της παλινδρόμησης. Αυτή η αλλαγή μάλιστα στην δραστηριότητα είναι παρόμοια με εκείνη στις συγκεντρώσεις προγεστερόνης. Μια άλλη πιθανή εξήγηση για την μείωση της Cu-Zn SOD κατά την παλινδρόμηση είναι η αύξηση της προσταγλανδίνης PGF₂α ή των μακροφάγων, ενώ μια άλλη αξιόπιστη εξήγηση αποτελεί και η μείωση της αιματικής ροής στις ωοθήκες. Η προσταγλανδίνη F₂α διεγείρει την παραγωγή του ανιόντος SO από τα ωχρινικά κύτταρα και τα φαγοκυτταρικά λευκοκύτταρα στην CL. Η μείωση της ωοθηκικής αιματικής ροής προκαλεί ιστική βλάβη από την παραγωγή ROS. Ωστόσο, η συγκέντρωση της Mn-SOD στο ωχρό σωμάτιο (CL) κατά την διάρκεια της παλινδρόμησης είναι αυξημένη, και η απομάκρυνση των ROS που παράγονται στα μιτοχόνδρια γίνεται από τις φλεγμονώδεις αντιδράσεις που δημιουργούνται και από τις κυτοκίνες. Ως εκ τούτου, η πλήρης διακοπή της CL οδηγεί σε σημαντική μείωση της Mn-SOD στα κύτταρα που υποστρέφονται και ο κυτταρικός θάνατος είναι επικείμενος[15].



Εικόνα 1: Δημιουργία ROS κατά την ωορρηξία και στεροειδογένεση στο ωχρό σωματίο. Η ωορρηξία φαίνεται να είναι μια διαδικασία που μοιάζει με φλεγμονή. Τα ROS παράγονται τοπικά κατά την ρήξη του ωοθυλακίου και μπορεί να εμπλέκεται στη διαδικασία της ωορρηξίας. Τα ROS παράγονται επίσης από το ωχρό σωματίο μέσω της αντίδρασης μονοοξυγενάσης ως υποπροϊόν κατά την σύνθεση στεροειδών ορμονών[28].

ΕΥΕΡΓΕΤΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ROS ΣΤΗΝ ΩΟΘΗΚΗ

Η γυναικεία αναπαραγωγική λειτουργία καθορίζεται άμεσα από την διάρκεια ζωής των ωοθηκών. Η ωοθήκη είναι ένα μεταβολικά ενεργό όργανο και χρησιμεύει ως δεξαμενή γεννητικών κυττάρων κατά την διάρκεια της αναπαραγωγικής ζωής της γυναίκας. Αποτελείται περίπου από 0,3 εκατομμύρια αρχέγονα ωοθυλάκια που περιέχουν ωκύτταρα ακινητοποιημένα με διπλοτένιο. Η αύξηση των γοναδοτροπινών της υπόφυσης προκαλεί στεροειδογένεση, ανάπτυξη και ωρίμανση ωοθυλακίων καθώς και ωορρηξία στα περισσότερα είδη θηλαστικών. Οι ROS δημιουργούνται στην ωοθήκη λόγω αυξημένου μεταβολισμού κατά τα τελικά στάδια ωοθυλακιογένεσης και της ρήξης των ωοθυλακίων, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση του επιπέδου των ελεύθερων ριζών οξυγόνου (ROS) λόγω μειωμένης αντιοξειδωτικής δραστηριότητας. Αυτή η πιθανότητα υποστηρίζεται περαιτέρω από τις παρατηρήσεις ότι η μείωση της δραστηριότητας της καταλάσης (CAT) και η αύξηση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) καθώς και το

συνολικό επίπεδο ROS πυροδοτούν τη μειωτική επανάληψη από τη διακοπή του διπλοτενίου σε ωοθυλακικά ωοκύτταρα αρουραίου. Μια μέτρια αύξηση του επιπέδου των ROS ευνοεί τα ωοκύτταρα που έχουν συλληφθεί με διπλοτένιο να επαναλάβουν τη μείωση μέσα στο μικροπεριβάλλον του ωοθυλακίου, υποδηλώνοντας τον ευεργετικό ρόλο του επιπέδου ROS εντός της ωοθήκης. Το υψηλό φυσιολογικό επίπεδο ROS έχει αναφερθεί σε ανθρακικά ωοθυλάκια κατά τα τελικά στάδια της ωοθυλακιογένεσης, τα οποία θα μπορούσαν να συσχετιστούν με την τελική ωρίμανση των ωαρίων[27].

ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ RNOS ΣΤΗΝ ΩΟΘΗΚΗ

Οι ελεύθερες ρίζες αζώτου παίζουν επίσης πολλαπλούς ρόλους στην ωοθήκη. Μάλιστα από τα τρία ισόένζυμα NOS, το NOSI και το NOSIII εκφράζονται στην ωοθήκη. Η έκφραση του NOSIII αυξάνεται ύστερα από την αύξηση της LH ή ύστερα από την διενέργεια χορήγησης hCG. Έχει αναφερθεί η έκφραση του NOSIII σε ωοκύτταρα και ο αποκλεισμός της ωρίμανσης των ωαρίων από την από του στόματος χορήγηση αναστολέων NOS. Το NO που παράγεται από το NOSIII διεγείρει την διαδικασία της ωορρηξίας. Επιπλέον αναφέρεται πως η μειωτική ωρίμανση των ωοκυττάρων έχει σταματήσει σε ποντίκια με knock out NOSIII. Ωστόσο, η πηγή του νιτρικού οξειδίου(NO) εξακολουθεί να είναι υπο συζήτηση καθώς επίσης έχει αποδειχθεί πως σχετίζεται στενά με την ωρίμανση των ωαρίων. Το NOSII από την άλλη εντοπίζεται κυρίως στα κοκκιώδη κύτταρα και παράγει μεγάλες ποσότητες NO. Η μείωση της συγκέντρωσης νιτρωδών στα προωορρηκτικά ωοθυλάκια μετά από ένεση συσχετίζεται κυρίως με μειωμένη έκφραση NOSII σε κοκκιώδη κύτταρα. Το NO, που παράγεται από NOS που υπάρχουν στα ανθρώπινα κοκκιώδη- ωχρινικά κύτταρα, φαίνεται να αναστέλλει την έκκριση οιστραδιόλης μέσω άμεσης αναστολής της αρωματάσης. Επιπλέον η περίσσεια NO αναστέλλει την παραγωγή προγεστερόνης και προκαλεί αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο σε κοκκιώδη κύτταρα αρουραίου. 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 αναστραφεί με την προσθήκη αιμοσφαιρίνης. Αυτά τα δεδομένα υποδηλώνουν ότι το σύστημα NOSII-NO-(cGMP) μπορεί να παίζει ρόλο στη μειωτική ωρίμανση των ωοκυττάρων, αλλά απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για να εξακριβωθεί η πραγματική λειτουργία τους στην ωοθήκη[28].

3.2. ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ ΚΑΙ ΩΟΘΥΛΑΚΙΟ

Πολλές μελέτες έχουν αποδείξει τη συμμετοχή των ROS στο περιβάλλον του ωοθυλακικού υγρού, στη θυλακιογένεση και τη στεροειδογένεση. Είναι γνωστό ότι η υποξία των κοκκιοκυττάρων επάγει την ωοθυλακική αγγειογένεση, η οποία είναι σημαντική για την ωοθυλακική ανάπτυξη. Η εξασθένηση της

αγγειογένεσης συμβάλλει στην ατρησία των ωοθυλακίων. Η υποξία διαμορφώνει την παραγωγή ROS που δρουν ως μετατροπείς σήματος ή ενδοκυτταρικούς αγγελιοφόρους αυτής της αγγειογενετικής απόκρισης. Επιπλέον, η μετάβαση των αναπτυσσόμενων ωοθυλακίων από πρωτογενή σε δευτερογενή ωοθυλάκια σχετίζεται με μια σημαντική αύξηση της μεταβολικής λειτουργίας των κυττάρων granulosa, κυρίως στην παραγωγή των στεροειδών μέσω της αυξημένης δραστηριότητας του κυτοχρώματος P450. Η μεταφορά ηλεκτρονίων που σχετίζεται με τη στεροειδογενετική παραγωγή είναι ένας βασικός σταθμός παραγωγής των ελεύθερων ριζών οξυγόνου, γεγονός που υποδηλώνει ότι η διαφοροποίηση και η λειτουργική δραστηριότητα των κυττάρων granulosa εντός του ωοθυλακίου συμπίπτει με την αυξημένη προ-οξειδωτική κατάσταση[31].

Διάφορες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί σε τρωκτικά και συγκεκριμένα σε αρουραίους, υποστηρίζουν την ύπαρξη κυκλικών μεταβολών στα επίπεδα της δυσμουτάσης του υπεροξειδίου(SOD) καθώς επίσης αναφέρουν την ύπαρξη μιας αντίστροφης συσχέτισης μεταξύ των επιπέδων της SOD και του οξυγόνου(O₂). Επιπλέον, έχουν πραγματοποιηθεί μελέτες ανοσοχρωματισμού και ELISA οι οποίες απέδειξαν την ύπαρξη και την έκφραση της δυσμουτάσης του υπεροξειδίου στα σπερματοζώαρια που περιβάλλουν τα ωάρια, καθώς και στο ωοθυλακικό υγρό (FF), όπου προστατεύει τα ωάρια από τις βλαβερές επιδράσεις των ROS. Ειδικότερα, έχει αποδειχθεί πως οι γοναδοτροπίνες ενισχύουν την έκφραση της δυσμουτάσης του υπεροξειδίου του μαγγάνιου (Mn-SOD) και της εξωκυττάριας δυσμουτάσης του υπεροξειδίου του mRNA(EC-SODmRNA) σε ωοθυλάκιο αρουραίου[31].

Μελέτες επίσης καταδεικνύουν την εντατικοποιημένη υπεροξείδωση των λιπιδίων στην προ-ωορρηξία και συγκεκριμένα στο γραφιανό ωοθυλάκιο. Επιπλέον, ο μηχανισμός της ωορρηξίας εμφανίζεται μέσω της εμφάνισης οξείας φλεγμονής, η φλεγμονή αυτή που συνοδεύει την διαδικασία της ωορρηξίας χαρακτηρίζεται από αύξηση της παραγωγής κυτοκινών και προσταγλανδινών, ενεργοποίηση πρωτεολυτικών ενζύμων όπως μεταλλοπρωτεϊνάση της μήτρας και από την αύξηση της αγγειακής διαπερατότητας. Τα αντιδραστικά είδη οξυγόνου είναι σημαντικοί μεσολαβητές αυτών των φλεγμονωδών αντιδράσεων που εμπλέκονται στην ρήξη του ωοθυλακίου. Το επαγόμενο οξειδωτικό στρες λοιπόν, μέσα και γύρω από τα ωοθυλάκια, προκαλεί την απόπτωση των κοκκιωδών κυττάρων προκειμένου να πραγματοποιηθεί η ωοθυλακιωρρηξία μέσω ενός μηχανισμού που μπορεί να ανασταλεί από την απομάκρυνση των ROS[31].

Πιθανές πηγές ROS κατά την διάρκεια της ωορρηξίας θα μπορούσαν να είναι τα λευκοκύτταρα που εντοπίζονται γύρω από τα προ-ωοθυλακιωρρηκτικά ωοθυλάκια. Επιπλέον η προ-ωοθυλακιωρρηκτική έξαρση της ωχρινοτρόπου ορμόνης (LH) αποδείχθηκε ότι ενεργοποιεί και τα πολυμορφοπύρηνα κύτταρα

(PMN) με αποτέλεσμα να ενισχύεται η ωοθηκική παραγωγή ROS. Μάλιστα έχει αναφερθεί ότι τα PMN λευκοκύτταρα του περιφερικού αίματος φέρουν υποδοχείς της ωχρινοτρόπου ορμόνης (LHr), οι οποίοι κατά την ενεργοποίησή τους, ενισχύουν την παραγωγή O_2 . Εκτός από τη δράση στα λευκοκύτταρα PMN, η LH συνδέεται με επιφανειακά επιθηλιακά κύτταρα των ωοθηκών (OSEs) προκαλώντας μια αύξηση της έκφρασης και της απελευθέρωσης της ουροκινάσης τύπου ενεργοποιητή πλασμινογόνου (u-PA). Αυτός ο παράγοντας, με τη σειρά του, ενεργοποιεί λανθάνουσες κολλαγενάσες και διεγείρει, από το ενδοθήλιο του θύλακα την απελευθέρωση του παράγοντα νέκρωσης όγκων (TNF- α), μιας από τις κύριες κυτταροκίνες που εμπλέκονται στην απόπτωση. Εκτός από την ενίσχυση της απόπτωσης των κυττάρων που αποτελούν το ωοθυλακικό τοίχωμα, ο διαλυτός TNF- α ενισχύει την κολλαγονόλυση μέσω επαγωγής της γονιδιακής έκφρασης των μεταλλοπρωτεϊνών μήτρας: MMP-1, MMP-2 και MMP-9. Επακόλουθο αυτού είναι η αποδυνάμωση του ακραίου τοιχώματος του ωοθυλακίου όπου οδηγεί στον σχηματισμό ωοθηκικού στίγματος και ρήξη ωοθυλακίου[31].

Μακροφάγα, λευκοκύτταρα και κυτοκίνες που υπάρχουν στο μικροπεριβάλλον των ωοθυλακίων είναι σημαντικές πηγές ROS[29]. Ενώ το ωοθυλακικό μικροπεριβάλλον παίζει κρίσιμο ρόλο στην ωρίμανση των ωοκυττάρων, οι αλλαγές στην σύνθεση του ωοθυλακικού υγρού (FF) μπορεί να επηρεάσουν την ποιότητα των ωοκυττάρων, επηρεάζοντας τη γονιμοποίηση, την πρόιμη εμβρυική ανάπτυξη και την επακόλουθη εγκυμοσύνη[30]. Μάλιστα, διάφοροι ερευνητές υποστηρίζουν ότι οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (ROS) εμπλέκονται στην διαδικασία της ωοθυλακιογένεσης, της ωρίμανσης του ωοθυλακίου, της ωορρηξίας αλλά και στην διαδικασία της σωστής λειτουργίας του ωχρού σωματίου[29]. Το ωοθυλακικό υγρό είναι ένα μεταβολικά ενεργό μικροπεριβάλλον που περιέχει στεροειδείς ορμόνες, αυξητικούς παράγοντες, κυτταροκίνες, ROS και αντιοξειδωτικά, μεταξύ άλλων παραγόντων, που παράγονται από τα κύτταρα *granulosa*, τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα λευκοκύτταρα. Αν και οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (ROS) είναι σημαντικές για ορισμένες λειτουργίες του γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος, συμπεριλαμβανομένης του βασικού τους ρόλου στην ωοθυλακιορρηκτική απόκριση. Όταν οι ROS είναι σε περίσσεια (και ενδεχομένως συνοδευόμενες από ανεπαρκή αντιοξειδωτική απόκριση) μπορεί να έχουν αρνητικό αντίκτυπο, ιδίως στα επίπεδα οιστραδιόλης(E_2), τα οποία αποτελούν σημαντικό προγνωστικό παράγοντα της ωοθηκικής απόκρισης, βλάπτοντας έτσι την στεροειδογένεση και κατά συνέπεια την ωρίμανση των ωαρίων και την ωορρηξία[30].

Όσον αφορά, τα κύτταρα που εμπλέκονται στη στεροειδογένεση όπως, τα κύτταρα *theca*, τα κύτταρα της κοκκιώδους λουτεΐνης και τα κύτταρα *hilus* έχει αναφερθεί πως παρουσιάζουν ισχυρότερη οξειδωτική ενζυμική δραστηριότητα. Η έκφραση των διαφόρων βιοδεικτών του οξειδωτικού στρες έχει αποδειχθεί πως παρουσιάζεται στις ανθρώπινες ωοθήκες που ακολουθούν έναν φυσιολογικό κύκλο. Η έκφραση της υπεροξειδικής δυσμουτάσης Cu-Zn-SOD και των Mn-SOD έχει ανιχνευθεί με ανισοϊστοχημική χρώση. Οι μειωμένες συγκεντρώσεις της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης(GPx), ενός προστατευτικού ένζυμου, μπορούν να επηρεάσουν την γονιμοποιητική ικανότητα των γαμετών, καθώς επίσης η μειωμένη ρύθμιση

της GPx στο ωοθυλακικό υγρό σχετίζεται σημαντικά με χαμηλά ποσοστά γονιμοποίησης. Μελέτες μάλιστα έχουν αποδείξει πως το κάπνισμα μειώνει δραματικά τις συγκεντρώσεις της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης(GPx) στο ωοθυλακικό υγρό. Η έκφραση mRNA αντιοξειδωτικών ουσιών όπως η Cu-Zn-SOD, Mn-SOD, καταλάση, υπεροξειδάση της γλουταθειόνης(GPx) και γ-γλουταμυλοσυνθεάση μελετήθηκαν σε ανθρώπινα ωοκύτταρα. Στα ωοκύτταρα της μετάφασης II διαπιστώθηκε η έκφραση της Cu-Zn-SOD, ενώ τα αντιοξειδωτικά Mn-SOD και η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης(GPx) φαίνεται να εκφράζονται στο στάδιο της βλαστικής κυψελίδας και της μετάφασης II του ωαρίου. Ένα γεγονός που υποδηλώνει πως τα ένζυμα αυτά αποτελούν ξεκάθαρα δείκτες για την ωρίμανση του ωαρίου. Συγκεκριμένα η έκφραση αυτών των ενζύμων υποδηλώνει ότι τα ωοκύτταρα εκτίθενται στο οξειδωτικό στρες και ότι τα ενζυμικά αντιοξειδωτικά δρουν ως καταλύτες στην εξουδετέρωση των ελεύθερων ριζών οξυγόνου(ROS). Η παραγωγή τώρα, ενός βιώσιμου ωοκυττάρου διαμορφώνεται από μια σύνθετη αλληλεπίδραση ενδοκρινών, παρακρινών και αυτοκρινών παραγόντων[29].

Το μονοξείδιο του αζώτου (NO) είναι ένας τοπικός παράγοντας που εμπλέκεται στην αυτοκρινή και παρακρινή διαμόρφωση της ωοθυλακιογένεσης και της στεροειδογένεσης. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις μάλιστα, δηλαδή $1 \mu\text{mol/L}$, η δράση μεταγωγής του NO πραγματοποιείται μέσω της ενεργοποίησης των διαλυτών γουανυλοκυκλάσης, και διαμεσολαβείται μέσω της κυκλικής μονοφωσφορικής γουανίνης(cGMP). Ο ρόλος των NOS έχει καθοριστεί από την έκφραση της συνθάσης του νιτρικού οξειδίου (NOS) ή από την συγκέντρωση νιτρικών στο πλάσμα. Συγκεκριμένα, μελέτες υποστηρίζουν πως οι συγκεντρώσεις του ωοθυλακικού μονοξειδίου του αζώτου (NO) αυξάνονται στην εκκριτική φάση και κορυφώνονται στα μέσα του κύκλου. Χαμηλές συγκεντρώσεις NO στο ωοθυλακικό υγρό συσχετίστηκαν με ωοθυλάκια που περιείχαν ώριμα ωάρια τα οποία τελικά μπόρεσαν να γονιμοποιηθούν. Οι συγκεντρώσεις του NO στο ωοθυλακικό υγρό έχουν συσχετιστεί αρνητικά με την ποιότητα του εμβρύου καθώς και τον ρυθμό διαίρεσης του μετά την γονιμοποίηση. Μάλιστα βάση επιστημονικών ερευνών που διεξήχθησαν οι συγκεντρώσεις NO στον ορό φάνηκαν να είναι αυξημένες σε ασθενείς με σαλπινγικό παράγοντα ή περιτοναϊκό παράγοντα υπογονιμότητας. Τώρα από την άλλη, οι υψηλότερες συγκεντρώσεις NO στον ορό έχουν συσχετισθεί με την αδυναμία εμφύτευσης του ωαρίου και κατ'επέκταση με χαμηλά ποσοστά επίτευξης εγκυμοσύνης. Το μονοξείδιο του αζώτου μπορεί να επάγει την απόπτωση, με αποτέλεσμα τον εμβρυϊκή απώλεια[29].

Το οξειδωτικό στρες μπορεί να επηρεάσει τα κύτταρα του μεσοκυττάρου ιστού προκαλώντας τον πολλαπλασιασμό και την ανάπτυξη τους. Αυτός ο πολλαπλασιασμός έχει αποδειχθεί σε μεσοκυττάρια κύτταρα αρουραίων ότι είναι in-vitro δόσοεξαρτώμενος. Ωστόσο, τα υψηλά επίπεδα οξειδωτικού στρες φαίνεται να αναστέλλουν αυτόν τον πολλαπλασιασμό. Επίσης σημαντικό είναι να αναφερθεί πως το οξειδωτικό στρες μπορεί να επάγει και τον πολλαπλασιασμό των μεσεγχυματικών κυττάρων των ωοθηκών σε ασθενείς με σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών (PCOS). Η επίδραση του οξειδωτικού στρες και στους δύο τύπους κυττάρων χρήζει περαιτέρω διερεύνησης[29].

3.3. ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ & ΩΧΡΟ ΣΩΜΑΤΙΟ

Το ωχρο σωματίο σχηματίζεται μετά την ωορρηξία και παράγει προγεστερόνη P4, η οποία είναι απαραίτητη για την εγκατάσταση και διατήρηση της εγκυμοσύνης. Τα στεροειδή κύτταρα αποτελούν δυνητικές πηγές ROS, και αυτό γιατί τα κύτταρα αυτά αποτελούν υποπροϊόντα του φυσιολογικού μεταβολισμού, επομένως, οι ROS επηρεάζουν την σύνθεση της P4. Η διαδικασία αυτή της στεροειδογένεσης γίνεται με την αντίδραση της μονοοξυγενάσης με μεσολαβητή το P450, όπου με αυτό τον τρόπο παράγονται αναπόφευκτα ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (ROS) ως υποπροϊόντα. Εκτός από το γεγονός ότι οι ROS παράγονται ταυτόχρονα με την προγεστερόνη P4 στα κύτταρα του ωχρού σωματίου, οι ROS ασκούν και μια διφασική επίδραση στην παραγωγή της προγεστερόνης P4 η οποία περιλαμβάνει: την *in vitro* επεξεργασία των μεσαίων ωχρινικών κυττάρων με χαμηλή συγκέντρωση H₂O₂ όπου διεγείρει την έκκριση της P4, ενώ οι υψηλές συγκεντρώσεις της εν λόγω ένωσης αναστέλλουν την έκκριση της P4 που διεγείρεται από την χοριακή γοναδοτροπίνη[31].

Από την άλλη πλευρά, η P4 είναι επίσης ικανή να ρυθμίζει την παραγωγή ROS. Μάλιστα υπάρχει σημαντική συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης της P4 στον ορό, της δράσης της SOD και της συγκέντρωσης των ROS[31]. Η έκφραση της Cu-Zn-SOD κορυφώνεται από την πρώιμη έως τη μέση εκκριτική φάση, συμβαδίζοντας με την παραγωγή της προγεστερόνης P4 από το ωχρο σωματίο. Έτσι η δυσμουτάση υπεροξειδίου του χαλκού και του ψευδάργυρου(Cu-Zn-SOD) έχει έναν προστατευτικό ρόλο στη διατήρηση του ωχρού σωματίου. Αντιθέτως, η έκφραση της δυσμουτάσης του υπεροξειδίου του μαγγανίου(Mn-SOD) κορυφώνεται προς τα τέλη της ωχρινικής φάσης, γεγονός που υποδηλώνει τον ρόλο της στην παλινδρόμηση του ωχρού σωματίου. Σημαντικό είναι να προσθέσουμε πως κυτταροκίνες επηρεάζουν την επαγωγή της Mn-SOD[29].

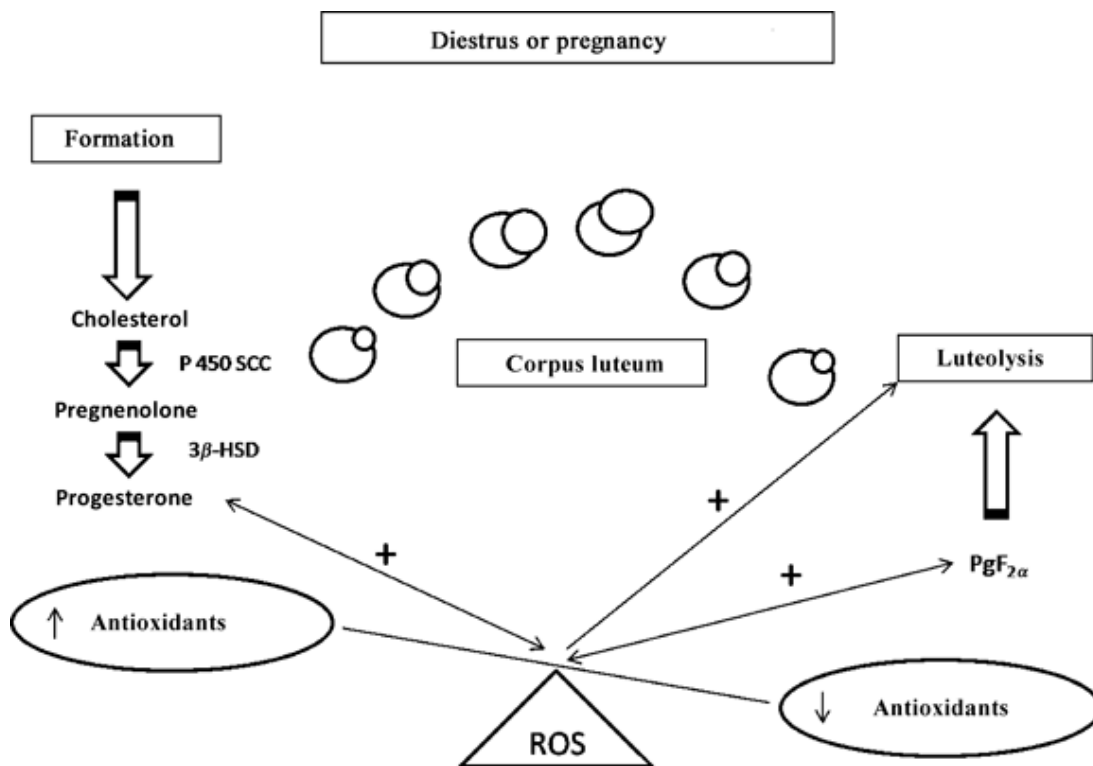
Μια αύξηση στην αντιοξειδωτική άμυνα των ωοθηκών σημειώνεται προκειμένου να διατηρηθεί η δραστηριότητα του ωχρού σωματίου, κατά την ωχρινική φάση. Σε μια πρόσφατη μελέτη που πραγματοποιήθηκε στην ωχρινική φάση μιας θηλυκής σκυλίτσας, οι Rizzo και συν. παρατήρησαν την μείωση της συγκέντρωσης των ROS σε σύγκριση με τις συγκεντρώσεις των ROS κατά την διάρκεια της ωοθυλακικής φάσης. Αυτό μπορεί να προκύπτει λόγω της ισορροπίας μεταξύ της αύξησης της ωχρινικής στεροειδικής δραστηριότητας, των αντιοξειδωτικών και των ανοσοτροποποιητικών επιδράσεων που προκαλούνται από την υψηλή συγκέντρωση της P4 και τις αυξήσεις των αντιοξειδωτικών ουσιών όπως το Cu-Zn-SOD, το ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C) και τα καροτεϊνοειδή, στο ωχρο σωματίο[31].

Επίσης, η μείωση της δραστηριότητας της SOD παράλληλα με την αύξηση των ROS έχουν επίδραση στην λουτεόλυση όπως φαίνεται και στην παρακάτω εικόνα. Τα επίπεδα τώρα των δραστικών ειδών οξυγόνου

(ROS) στο ωχρό σωματίο αυξάνονται κατά την φάση της παλινδρόμησης και προσημειώνουν την έκφραση της κυκλοοξυγενάσης-2 (COX-2) και την επακόλουθη σύνθεση της προγεστερόνης F2a ενεργοποιώντας έτσι έναν παράγοντα μεταγραφής, τον πυρηνικό παράγοντα κάππα-B (NF-kB). Στην συνέχεια, μέσω μιας μελέτης που διεξήχθη σε αρουραίους έχει διαπιστωθεί ότι η προγεστερόνη F2a επάγει την απόπτωση των κυττάρων μέσω της αύξησης της παραγωγής των ROS στα ωχρινικά κύτταρα και ότι τα αντιοξειδωτικά και οι αναστολείς των ελεύθερων ριζών αναστέλλουν την επαγωγή της απόπτωσης. Αυτό δείχνει λοιπόν, πως οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου επάγουν τον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο κατά την διάρκεια της λουτεόλυσης[31].

Η προγεστερόνη F2a διεγείρει την παραγωγή O₂ όχι μόνο από τα ωχρινικά κύτταρα αλλά επίσης από τα φαγοκυτταρικά λευκοκύτταρα. Τα ουδετερόφιλα, τα μακροφάγα και τα λεμφοκύτταρα είναι γνωστό ότι παράγουν τοξικές εκρήξεις ROS, και κυτταροκίνες συμπεριλαμβανομένων των ιντερλευκινών (IL), των ιντερφερόνων (INF) και τον παράγοντα νέκρωσης όγκων (TNF). Η εισροή, τώρα των ουδετερόφιλων μπορεί να συμβάλλει στην παραγωγή της προγεστερόνης F2a, η οποία με την σειρά της προκαλεί μια σειρά από ωχρινολυτικά συμβάντα, και των ROS, που παράγονται στο ωχρό σωματίο και μπορούν να λειτουργήσουν ως πιθανοί μεσολαβητές συσσώρευσης των ουδετερόφιλων. Συνεπώς η PgF2a και οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (ROS) φαίνεται να σχετίζονται και να δρουν μαζί κατά την διάρκεια της ωχρινόλυσης. Επιπλέον, είναι γνωστό ότι η μείωση της αιματικής ροής κατά την φάση της ωχρινικής παλινδρόμησης ενεργοποιεί το ένζυμο οξειδάση της ξανθίνης, ένα ένζυμο το οποίο φαίνεται να ενισχύει την παραγωγή των ελεύθερων ριζών οξυγόνου (ROS) υπο την παρουσία O₂, με αποτέλεσμα να επέρχονται ιστικές βλάβες μετέπειτα[31].

Μελέτες σε ζώα έδειξαν πως το ωχρό σωματίο των βοοειδών και του χοίρου είναι πλούσια σε αντιοξειδωτικά, ειδικά β-καροτένιο και ασκορβικό οξύ. Το β-καροτένιο μπορεί να χρησιμεύσει για την προστασία των ωοθηκών και της μήτρας από οξειδωτική βλάβη, εξασφαλίζοντας έτσι ένα ευνοϊκότερο περιβάλλον για την ανάπτυξη εμβρύων σε περίπτωση εγκυμοσύνης. Μάλιστα μελέτη έδειξε πως η περιεκτικότητα του ωχρού σωματίου βοοειδών σε ασκορβικό οξύ είναι στο μέγιστο όριο όταν το ωχρό σωματίο είναι πλήρως ώριμο, παραμένει υψηλό κατά την διάρκεια της εγκυμοσύνης και μειώνεται καθώς το ωχρό σωματίο υποχωρεί. Επίσης, μια ενδιαφέρουσα μελέτη που διεξήχθη σε αγελάδες έδειξε υψηλές συγκεντρώσεις ελεύθερων ριζών και χαμηλές συγκεντρώσεις P4 κατά την διάρκεια της κρίσιμης περιόδου για την επιβίωση του ωχρού σωματίου, οι οποίες προκάλεσαν και την αποτυχία σύλληψης[31].



Εικόνα 2: Ο ρόλος των δραστικών ειδών οξυγόνου(ROS) και των αντιοξειδωτικών στην ρύθμιση της ωχρινικής λειτουργίας. Η σύνθεση της προγεστερόνης συνοδεύεται από μια ορισμένη παραγωγή ROS και τα χαμηλά επίπεδα ROS, με τη σειρά τους, ασκούν ωχρινοτροφικές επιδράσεις. Κατά την διάρκεια του σχηματισμού του ωχρού σωματίου, τα αντιοξειδωτικά αυξάνονται και η δραστηριότητα των ROS μειώνεται, ενώ κατά την διάρκεια της ωχρινόλυσης συμβαίνει η αντίθετη κατάσταση, ως συνέπεια της προφλεγμονώδους και λουτεολυτικής επίδρασης της PgF_{2α}.

3.4.ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ & ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΟ

Το ενδομήτριο παίζει καθοριστικό ρόλο στην επιτυχή εμφύτευση του εμβρύου αλλά και στην επίτευξη εγκυμοσύνης. Υπάρχει μια λεπτή ισορροπία μεταξύ των αντιοξειδωτικών μηχανισμών και των αντιδραστικών ειδών οξυγόνου(ROS) στο ενδομήτριο. Όταν επέλθει εγκυμοσύνη, η επιτυχής εμφύτευση έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή ανθρώπινης χοριακής γοναδοτροπίνης(HCG) η οποία διατηρεί τα επίπεδα προγεστερόνης. Η προγεστερόνη με την σειρά της, αυξάνει την δραστηριότητα της δυσμουτάσης του υπεροξειδίου(SOD) στο ενδομήτριο, η οποία καταστέλλει την παραγωγή των δραστικών ειδών οξυγόνου και της προσταγλανδίνης F_{2α}. Από την άλλη, σε απουσία εγκυμοσύνης, τα επίπεδα προγεστερόνης μειώνονται με επακόλουθο την μείωση της δραστηριότητας της SOD. Ως απόρροια όλου αυτού, το ένζυμο κυκλοοξυγενάση-2(COX-2) και η PGF_{2α} αυξάνονται και έτσι ακολουθεί η διαδικασία της εμμηνορροϊάς. Η χοριακή γοναδοτροπίνη(HCG) μπορεί να βελτιώσει το περιβάλλον της μήτρας πριν την εμφύτευση, καταστέλλοντας την αποπτωτική απόκριση στο οξειδωτικό στρες στο μητρικό δεκίδιο[33].

Η ταχεία διάσπαση και αποβολή του ενδομητρίου σε κάθε εμμηνορροϊκό κύκλο είναι μια μοναδική διαδικασία. Η απόσυρση της προγεστερόνης P4 είναι το κύριο έναυσμα για τη διάσπαση και την αποβολή του ενδομητρίου[32]. Τα στρωματικά κύτταρα του ενδομητρίου παράγουν ROS ως υποπροϊόντα κανονικού μεταβολισμού[31]. Τα επίπεδα ολικής δυσμουτάσης υπεροξειδίου(SOD), Cu-SOD, Mn-SOD στο ανθρώπινο ενδομήτριο μειώνονται στην όψιμη εκκριτική φάση, ενώ το υπεροξείδιο των λιπιδίων φτάνει τα μέγιστα επίπεδα στην όψιμη εκκριτική φάση. Αυτές οι παρατηρήσεις λοιπόν, υποδηλώνουν ότι τα

φυσιολογικά επίπεδα των ελεύθερων ριζών οξυγόνου(ROS), είναι κρίσιμα για τη ρύθμιση της εμμήνου ρύσεως. Επιπλέον, υποστηρίζεται πως τα ROS προέρχονται από φλεγμονώδη κύτταρα όπως τα μακροφάγα και τα ουδετερόφιλα, τα οποία επηρεάζουν τη διάσπαση και την επιδιόρθωση του ενδομητρίου κατά την διάρκεια της εμμήνου ρύσεως. Ωστόσο, τα ROS φαίνεται να ενεργοποιούν τη σηματοδότηση του πυρηνικού παράγοντα NF k-B και της κυκλοοξυγενάσης-2(COX-2) σε ανθρώπινα στρωματικά κύτταρα in vitro καθώς επίσης, σε προηγούμενη έρευνα που διεξήχθη παρατηρήθηκε ότι η σηματοδότηση NF k-B-COX-2 ήταν κρίσιμη στην ενδομήτρια διάσπαση. Έτσι, από το πόρισμα αυτό υποθέτετε ότι τα ROS είναι βασικοί ρυθμιστές, που η απομάκρυνση της προγεστερόνης P4 πυροδότησε μέσω της σηματοδότησης NF k-B-COX-2 για την καταστροφή του ενδομητρίου[32].

Μάλιστα, μέσα από μελέτες που έχουν διεξαχθεί σε ποντίκια συγκεκριμένα το 1984 με μοντέλα που μοιάζουν με την εμμηνόρροια, έχει παρατηρηθεί ότι η απομάκρυνση της προγεστερόνης P4 οδηγεί στην διάσπαση του ενδομητρίου ύστερα από την αποκέντρωση των στρωματικών κυττάρων, που προκλήθηκε από κάποιο έλαιο. Επιπρόσθετα, ένα μοντέλο που αναπτύχθηκε το 2007 ,παρόμοιο με την έμμηνο ρύση σε ποντίκια, που περιλάμβανε ανταγωνιστές της προγεστερόνης P4 σε επίπεδο υποδοχέα, διαπιστώνει και αυτό πως τα φυσιολογικά επίπεδα ROS και η ικανότητά τους να ρυθμίζουν εν μέρη την σηματοδότηση NF k-B-COX-2 είναι σημαντικά για τη διάσπαση του ενδομητρίου[32].

Υπάρχει μια λεπτή ισορροπία μεταξύ του οξειδωτικού στρες και των διαφόρων αμυντικών συστημάτων κατά του οξειδωτικού στρες στο ενδομήτριο. Υπο φυσιολογικές, αερόβιες συνθήκες το ενδομήτριο αποτελεί ένα τέλειο παράδειγμα της ισορροπίας μεταξύ των ελεύθερων ριζών οξυγόνου(ROS) και του αντιοξειδωτικού συστήματος. Η διαταραχή της ισορροπίας μπορεί να οδηγήσει σε ανωμαλίες των φυσιολογικών λειτουργιών της αναπαραγωγικής διαδικασίας, όπως η έμμηνος ρύση και η αποσιδήρωση. Τα στρωματικά κύτταρα του ενδομητρίου χρησιμεύουν ως δυνητική πηγή αντιδραστικών ειδών οξυγόνου. Το ενδοπλασματικό δίκτυο και το σύστημα μεταφοράς ηλεκτρονίων τόσο στα μιτοχόνδρια όσο και στον πυρήνα αποτελούν τις ενδοκυτταρικές πηγές ROS. Η δυσμουτάση του υπεροξειδίου(SOD) μάλιστα, εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό στα αδενικά επιθηλιακά κύτταρα καθώς επίσης και στα στρωματικά κύτταρα του ενδομητρίου. Στην συνέχεια, τα δύο αυτά συστήματα, δηλαδή τα αντιδραστικά είδη οξυγόνου(ROS) και η δυσμουτάση του υπεροξειδίου(SOD) εξισορροπούνται μεταξύ τους και παίζουν πολύ σημαντικούς ρόλους στην αναπαραγωγική φυσιολογία όπως η έμμηνος ρύση και η αποσιδήρωση του ενδομητρίου[33].

ΕΚΦΡΑΣΗ NOS ΣΤΟ ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΟ

Μέχρι σήμερα γνωρίζουμε πως η ύπαρξη του ενδοθηλιακής και της επαγωγικής συνθάσης του μονοξειδίου του αζώτου(eNOS & iNOS) έχει αποδειχθεί πως εκφράζεται στο ανθρώπινο ενδομήτριο καθώς και στα ενδομήτρια αγγεία. Η eNOS, η οποία αρχικά αναγνωρίστηκε στα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα, είναι επίσης κατανεμημένη στην αδενική επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων του ενδομητρίου. Έχει παρατηρηθεί πως το μονοξείδιο του αζώτου ρυθμίζει το μικραγγειακό σύστημα του ενδομητρίου και είναι σημαντικό προκειμένου να πραγματοποιηθεί η έμμηνος ρύση. Η έκφραση του eNOS mRNA αναφέρεται μάλιστα πως έχει ανιχνευθεί στη μέση εκκριτική φάση και στην όψιμη εκκριτική, γεγονός που υποδηλώνει ότι διαδραματίζει μεγάλο ρόλο στην φθαρτοποίηση του ενδομητρίου. Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου(ROS) από την άλλη το προετοιμάζουν για την εμφύτευση[29].

Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ SOD ΣΤΗΝ ΑΠΟΚΕΝΤΡΩΣΗ ΤΟΥ ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΟΥ

Η αποκέντρωση αναφέρεται στις λειτουργικές και μορφολογικές αλλαγές που συμβαίνουν μέσα στο ενδομήτριο για να υποδεχθεί την εμφύτευση της βλαστοκύστης. Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει την μετατροπή των κυττάρων του ενδομητρίου σε ένα ειδικό τύπο κυττάρων που ονομάζονται “decidualized

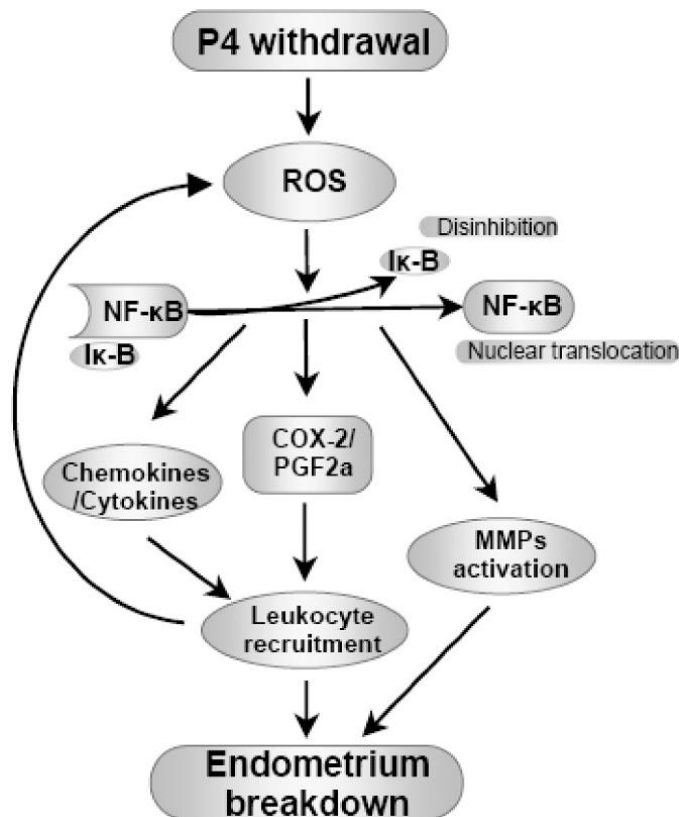
stromal cells”(DSCs). Ειδικότερα, συμβαίνει η στρατολόγηση των λευκοκυττάρων και η διαφοροποίηση των ενδομήτριων ινοβλαστικών στρωματικών κυττάρων(ESCs) σε DSCs. Το βασικό στοιχείο μετασχηματισμού της ρίζας, τώρα, φαίνεται να είναι η ικανότητα των ESCs να διαφοροποιούνται σε αυτήν την εναλλακτική κατάσταση κυττάρου. Τα DSCs από την άλλη, δεν είναι απλά τροποποιημένα ESCs είναι ένας ξεχωριστός τύπος κυττάρων που προκύπτει από την τερματική διαφοροποίηση και τον γενετικό επαναπρογραμματισμό των ESCs. Αυτός ο επαναπρογραμματισμός περιλαμβάνει την απορρύθμιση των γονιδίων που εμπλέκονται στην προ φλεγμονώδη απόκριση και στην αντίσταση στην εισβολή των ιστών μαζί με την αυξημένη έκφραση γονιδίων που σηματοδοτούν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την ενίσχυση της ανοχής και διευκολύνουν την εισβολή στους ιστούς[34].

Η επιτυχής εμφύτευση εξαρτάται από την αποδελτίωση των στρωματικών κυττάρων. Η αποδελτίωση σηματοδοτεί την έναρξη της εγκυμονούσας μήτρας και είναι απαραίτητη για την διατήρηση της εγκυμοσύνης. Η δράση της προγεστερόνης στο ενδομήτριο αυξάνει την έκκριση του αδενικού επιθηλίου, διεγείρει την συγκέντρωση του γλυκογόνου στο στρώμα των κυττάρων και προάγει τη στρωματική αγγείωση των σπειροειδών αρτηριδίων. Στη συνέχεια, το αντιοξειδωτικό σύστημα είναι απαραίτητο για τον επιτυχή μετασχηματισμό του ενδομητρίου σε decidua. Συγκεκριμένα, η δυσμουτάση του υπεροξειδίου(SOD) όπως εκείνη του χαλκού-ψευδάργυρου(Cu-Zn-SOD) και του μαγγανίου(Mn-SOD) είναι πολύ σημαντικές για την διενέργεια της διαδικασίας της αποδελτίωσης. Το ανθρώπινο ενδομήτριο έχει μελετηθεί εκτενώς τόσο κατά την διάρκεια του εμμηνορροϊκού κύκλου όσο και στα πρώτα στάδια της εγκυμοσύνης. Μάλιστα, στο αδενικό επιθήλιο του ενδομητρίου παρουσιάζεται μια σταθερή ανοσοχρωμάτωση του Cu-Zn-SOD καθώς και της Mn-SOD καθόλη την διάρκεια του εμμηνορροϊκού κύκλου. Τα στρωματικά κύτταρα ωστόσο, δεν εμφανίζουν ανοσοχρωματισμό για καμία από τις παραπάνω υπεροξειδικές δυσμουτάσες κατά την διάρκεια της φάσης του πολλαπλασιασμού, εμφανίζεται μόνο ένας μικρός ανοσοχρωματισμός στα στρωματικά κύτταρα που παρουσιάζουν μορφολογικά αποκρυσταλλωμένες αλλαγές μετά την εκκριτική φάση. Από την άλλη πλευρά, παρατηρείται έντονος ανοσοχρωματισμός στα αποδομημένα στρωματικά κύτταρα της πρώιμης εγκυμοσύνης[33]. Μάλιστα, μελέτες που έχουν διεξαχθεί υποστηρίζουν πως το επίπεδο ανοσοχρωματισμού στην μέση εκκριτική φάση ήταν το ίδιο με εκείνο στην πρώιμη εκκριτική φάση της εγκυμοσύνης[35].

Υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι η έκφραση της δυσμουτάσης του υπεροξειδίου στα στρωματικά κύτταρα σχετίζεται με την αποδελτίωση. Ο Sugino μελέτησε την σχέση μεταξύ των ωθηθικών στεροειδών και της δυσμουτάσης του υπεροξειδίου. Μέσα από αυτήν την μελέτη προκύπτει πως τα οιστρογόνα και η προγεστερόνη φαίνεται να αύξησαν την Cu-Zn-SOD καθώς και τα επίπεδα mRNA[33]. Μάλιστα, υποστηρίζεται ότι η έκφραση πρωτεϊνών και mRNA τόσο της Cu-Zn-SOD όσο και της Mn-SOD είναι αυξημένες στα ανθρώπινα ESCs με την αποδελτίωση[35]. Η κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη(cAMP) δεν έχει καμία επίδραση. Αντιθέτως η δραστηριότητα της υπεροξειδικής δυσμουτάσης του μαγγανίου(Mn-SOS) καθώς και τα επίπεδα mRNA αυξήθηκαν τόσο από τα οιστρογόνα και την προγεστερόνη όσο και από την κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη(cAMP). Αυτές οι διεγερτικές επιδράσεις, ωστόσο αναστέλλονται από τον αναστολέα της πρωτεϊνικής κινάσης-A(PKA). Ωστόσο, η Cu-Zn-SOD ρυθμίζεται από ένα ξεχωριστό μονοπάτι. Ενδεχομένως, λοιπόν υπάρχουν διαφορετικοί ρόλοι για τους δύο τύπους της SOD στα ενδομήτρια στρωματικά κύτταρα που υφίστανται αποδελτίωση[33].

Στην συνέχεια, είναι γνωστό ότι η Mn-SOD βελτιώνει την επιβίωση των κυττάρων απομακρύνοντας τις ρίζες υπεροξειδίου που παράγονται στα μιτοχόνδρια. Η αποδελτίωση διεγείρει την παραγωγή πολλών βιοδραστικών ουσιών, όπως αυξητικοί παράγοντες, κυτταροκίνες και μόρια προσκόλλησης. Αυτή η αύξηση του μεταβολισμού διεγείρει την παραγωγή ριζών του υπεροξειδίου στα μιτοχόνδρια και αυτό επειδή, οι

ρίζες του υπεροξειδίου παράγονται κανονικά κατά την διάρκεια της φυσιολογικής μεταβολικής δραστηριότητας. Επίσης, ο αποκλεισμός της επαγωγής της Mn-SOD φαίνεται να προκαλεί κυτταρικό θάνατο που προκαλείται από το οξειδωτικό στρες στα ανθρώπινα ESCs. Ως εκ τούτου, προτείνεται ότι η Mn-SOD προστατεύει τα ESCs από το οξειδωτικό στρες για την επιτυχή αποδελτίωση μέσω της απομάκρυνσης των ριζών υπεροξειδίου που παράγονται στα μιτοχόνδρια[35].



Εικόνα 3[32]: Προτεινόμενο μοντέλο για τη ρύθμιση της διάσπασης του ενδομήτριου από τα ROS.

3.5. ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ & ΠΕΡΙΤΟΝΑΪΚΗ ΚΟΙΛΟΤΗΤΑ

Το περιτοναϊκό υγρό είναι κρίσιμο για τη φυσιολογική γονιμοποίηση και την πρόιμη εμβρυϊκή ανάπτυξη. Σύμφωνα με διάφορες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν το περιτοναϊκό υγρό σε γυναίκες με ενδομητρίωση και ανεξήγητη υπογονιμότητα επηρέασαν αρνητικά την λειτουργία του σπέρματος. Μάλιστα για αυτήν την αρνητική επίδραση φαίνεται να είναι υπεύθυνα τόσο οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου(ROS) όσο και τα τοξικά προϊόντα υπεροξειδωσής που προκύπτουν όπως τα υπεροξειδία των λιπιδίων. Πιο συγκεκριμένα το περιτοναϊκό υγρό περιέχει έναν αριθμό κυττάρων που μπορούν να παράγουν ROS, όπως τα μακροφάγα. Κανονικά, τα αντιοξειδωτικά στο περιτοναϊκό υγρό διατηρούν τις συγκεντρώσεις των ελεύθερων ριζών οξυγόνου(ROS) σε ένα φυσιολογικό εύρος. Οι αυξημένες συγκεντρώσεις ROS από την άλλη είναι αποδεδειγμένο πως μπορούν να βλάψουν τόσο το ωάριο μετά την απελευθέρωσή του από την ωοθήκη, όσο το ζυγωτό/έμβρυο αλλά και, κυρίως, τα σπερματοζωάρια. Είναι πλέον γνωστό ότι, μια ελάχιστη ποσότητα ROS απαιτείται για την διαδικασία σύντηξης ωαρίου-σπερματοζωαρίου, αλλά οι υπερβολικές συγκεντρώσεις είναι επιζήμιες για τα σπερματοζωάρια[25].

Στην συνέχεια, οι αυξημένες συγκεντρώσεις ROS στο περιτοναϊκό υγρό μπορεί να ευθύνονται εν μέρει για την ανεξήγητη υπογονιμότητα. Σύμφωνα μάλιστα, με τους Wang και άλλους, οι οποίοι σύγκριναν τις συγκεντρώσεις ROS στο περιτοναϊκό υγρό μεταξύ γυναικών που υποβλήθηκαν σε λαπαροσκόπηση, για την αξιολόγηση της υπογονιμότητας, και γόνιμες γυναίκες που υποβλήθηκαν σε απολίνωση των σαλπίγγων διαπίστωσαν την ύπαρξη υψηλών συγκεντρώσεων ROS στις ασθενείς με ιδιοπαθή υπογονιμότητα τόσο στο μη επεξεργασμένο όσο και στο επεξεργασμένο (μετά από κυτταρικό διαχωρισμό) περιτοναϊκό υγρό. Μια άλλη μελέτη, επίσης αναφέρει μια σημαντική διαφορά στις συγκεντρώσεις ROS στο μη επεξεργασμένο περιτοναϊκό υγρό μεταξύ γυναικών με ιδιοπαθή υπογονιμότητα και υγιών γόνιμων γυναικών. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (ROS) μπορεί να διαδραματίζουν κάποιο ρόλο σε ασθενείς με ιδιοπαθή υπογονιμότητα και πιστεύεται πως μέσω της εκτίμησης των συγκεντρώσεων ROS στο περιτοναϊκό υγρό μπορεί να εντοπισθεί η αιτία πρόκλησης της ιδιοπαθούς υπογονιμότητας[25].

Σε δεύτερη φάση, πραγματοποιήθηκαν από τον Polak και τους άλλους, μετρήσεις στις συγκεντρώσεις των αντιοξειδωτικών σε ασθενείς με ανεξήγητη υπογονιμότητα, σαλπιγγικό παράγοντα υπογονιμότητας, ενδομητρίωση και γόνιμες γυναίκες με καλοήγη μη φλεγμονώδεις όγκους ωοθηκών. Σύμφωνα, τώρα με την μελέτη αυτή διαπιστώθηκε ότι οι συγκεντρώσεις των αντιοξειδωτικών στο περιτοναϊκό υγρό των ασθενών με ανεξήγητη υπογονιμότητα ήταν σημαντικά χαμηλότερες από τις συγκεντρώσεις στις γόνιμες ασθενείς ($0,46 \pm 0,21$ έναντι $0,67 \pm 0,24$ - $P=0,02$). Στην ερευνά τους ανέφεραν επίσης, πως οι γυναίκες με ιδιοπαθή υπογονιμότητα είχαν υψηλότερες συγκεντρώσεις της μαλονδιαλδεϋδης (MDA), στο περιτοναϊκό υγρό σε σχέση με τις γόνιμες γυναίκες. Τα αποτελέσματα αυτά, λοιπόν δείχνουν ότι η ισορροπία των προ-οξειδωτικών/ αντιοξειδωτικών διαταράσσεται στις υπογόνιμες γυναίκες, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε οξειδωτικό στρες και βλάβη στα ωάρια καθώς και στα σπερματοζώαρια. Επειδή το σαλπιγγικό υγρό είναι σε συνεχή επαφή με το περιτοναϊκό υγρό, επομένως σε πρώιμο στάδιο τα έμβρυα στις σάλπιγγες θα μπορούσαν επίσης να υποστούν βλάβη[25].

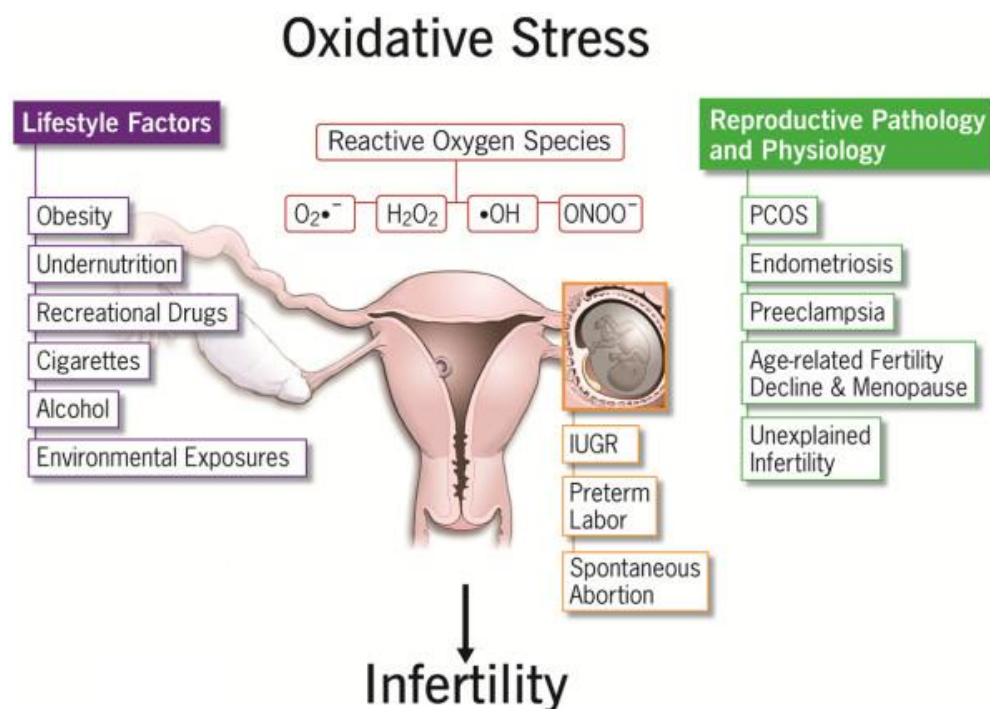
3.6.ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ & ΓΥΝΑΙΚΕΙΕΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΕΣ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ

Πρόσφατα, έχει αποδειχθεί ότι τα δραστικά είδη οξυγόνου (ROS) διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη φυσιολογική λειτουργία του αναπαραγωγικού συστήματος καθώς και στην παθογένεια της υπογονιμότητας στην γυναίκα. Τα αντιδραστικά είδη οξυγόνου επίσης όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω διαδραματίζουν μεγάλο ρόλο και στα υπόλοιπα αναπαραγωγικά όργανα της γυναίκας, δημιουργώντας διάφορες παθολογίες όπως για παράδειγμα είναι η ενδομητρίωση. Όπως έχει ήδη αναφερθεί το οξειδωτικό στρες αναπτύσσεται όταν υπάρχει ανισορροπία μεταξύ της παραγωγής ROS και της ικανότητας απορρόφησης των αντιοξειδωτικών στο αναπαραγωγικό σύστημα. Επηρεάζει τόσο την φυσιολογική όσο και την υποβοηθούμενη γονιμότητα. Μάλιστα, επειδή οι τεχνικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής χρησιμοποιούνται ευρέως στην θεραπεία της υπογονιμότητας, είναι κρίσιμη η κατανόηση των in-vitro συνθηκών που επηρεάζουν την γονιμοποίηση και ανάπτυξη του εμβρύου[25].

Συγκεκριμένα, τα τελευταία χρόνια η μελέτη του οξειδωτικού στρες και η επιρροή που έχει στο γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα και την δημιουργία παθογένειας σε αυτό είναι ιδιαίτερα δημοφιλής. Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (ROS) αποτελούν δίκωπο μαχαίρι, καθώς όχι μόνο διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο ως δευτερεύοντες αγγελιοφόροι σε πολλά ενδοκυτταρικά μονοπάτια σηματοδότησης αλλά επίσης ασκούν απαραίτητες επιδράσεις στις παθολογικές διεργασίες που αφορούν το γυναικείο γεννητικό σύστημα. Μάλιστα, έχουν εντοπιστεί στη γυναικεία αναπαραγωγική οδό σε διάφορες μελέτες τόσο σε ζώα όσο και

στον άνθρωπο. Πολλά μονοπάτια σηματοδότησης που εμπλέκονται στην γυναικεία αναπαραγωγή, συμπεριλαμβανομένων των Keap1-Nrf2, NF-kB, FOXO και MAPK μονοπάτια, τα οποία επηρεάζονται από το OS, περιγράφονται, παρέχοντας νέες ιδέες για τον μηχανισμό των αναπαραγωγικών ασθενειών[15].

Οι ανισορροπίες, τώρα μεταξύ προ-οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών φαίνεται πως θα μπορούσαν να οδηγήσουν στην δημιουργία διάφορων ασθενειών του γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος όπως είναι: η ενδομητρίωση, το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών(PCOS), οι αποβολές, η προεκλαμψία, HIVκ.α.[15].



Εικόνα 4: Παράγοντες που συμβάλλουν στην ανάπτυξη οξειδωτικού στρες και οι επιπτώσεις τους στο γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα[14].

ΣΥΝΔΡΟΜΟ ΠΟΛΥΚΥΣΤΙΚΩΝ ΩΟΘΗΚΩΝ(PCOS)

Το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών είναι η πιο συχνή ενδοκρινική ανωμαλία των γυναικών αναπαραγωγικής ηλικίας με τον επιπολασμό του συνδρόμου να πλησιάζει το 18%. Πρόκειται για μια διαταραχή που χαρακτηρίζεται από υπερανδρογονισμό, δυσλειτουργία ωοθυλακιωρρηξίας καθώς επίσης το βασικότερο εύρημα στο συγκεκριμένο σύνδρομο είναι η εμφάνιση πολυκυστικής μορφολογίας των ωοθηκών στον υπέρηχο[14]. Οι κλινικές εκδηλώσεις του συνδρόμου των πολυκυστικών ωοθηκών περιλαμβάνουν συνήθως: διαταραχές της εμμήνου ρύσεως, οι οποίες μπορεί να εμφανισθούν και ως αμηνόρροια, και διαταραχές στην τριχοφυΐα λόγω του υπερανδρογονισμού[14].

Στην συνέχεια, η παθογένεση του PCOS στο πλαίσιο του οξειδωτικού στρες μπορεί να περιλαμβάνει διαταραχές στις μοριακές και βιοχημικές διεργασίες των κυτταρικών οργανιδίων. Το πιο σχετικό παράδειγμα μπορεί να είναι η σχέση μεταξύ μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας και του συνδρόμου των πολυκυστικών ωοθηκών. Πιο συγκεκριμένα, έχει προταθεί ότι η μειωμένη κατανάλωση O_2 , η γλουταθειόνη(GSH) καθώς και η αυξημένη παραγωγή των ROS συμβάλλουν στην μιτοχονδριακή δυσλειτουργία σε ασθενείς που εμφανίζουν PCOS[36]. Το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών σχετίζεται

επίσης με μειωμένες συγκεντρώσεις αντιοξειδωτικών και, ως εκ τούτου, θεωρείται οξειδωτική κατάσταση[14].

Η μείωση της μιτοχονδριακής κατανάλωσης O₂ και των επιπέδων γλουταθειόνης(GSH) μαζί με την αυξημένη παραγωγή των ROS εξηγεί την μιτοχονδριακή δυσλειτουργία σε ασθενείς με PCOS. Έχει διαπιστωθεί επίσης πως στις γυναίκες αυτές τα μονοκύτταρα τους σε αυτή την φλεγμονώδη κατάσταση είναι αυξημένα, μια κατάσταση η οποία εμφανίζεται περισσότερο από την αυξημένη απόκριση στην υπεργλυκαιμία και την C-αντιδρώσα πρωτεΐνη(CRP). Η φυσιολογική υπεργλυκαιμία δημιουργεί αυξημένα επίπεδα ROS από τα μονοκύτταρα, τα οποία στην συνέχεια ενεργοποιούν την απελευθέρωση του TNF-a και αυξάνουν τον φλεγμονώδη μεταγραφικό παράγοντα NF-kappaB. Ως αποτέλεσμα, οι συγκεντρώσεις τους TNF-a, γνωστού μεσολαβητή της αντίστασης στην ινσουλίνη, αυξάνονται περεταίρω. Το προκύπτον οξειδωτικό στρες, στην συνέχεια δημιουργεί ένα φλεγμονώδες περιβάλλον που με την σειρά του αυξάνει την αντίσταση στην ινσουλίνη και με αυτόν τον τρόπο συμβάλλει στην δημιουργία του υπερανδρογονισμού. Η τροποποίηση του τρόπου ζωής αποτελεί τον ακρογωνιαίο λίθο της θεραπείας για γυναίκες με PCOS. Αυτό περιλαμβάνει την άσκηση και μια ισορροπημένη διατροφή, με έμφαση στον θερμιδικό περιορισμό. Ωστόσο, εάν οι τροποποιήσεις του τρόπου ζωής δεν επαρκούν, υπάρχουν διάφορες επιλογές ως προς την ιατρική θεραπεία[14].

OXIDATIVE STRESS

Selected oxidant markers in PCOS	Oxidant PCOS markers linked to:				Selected antioxidant markers in PCOS	Antioxidant PCOS markers linked to:			
	REPRODUCTION	METABOLIC COMPLICATION	CVD	CANCER		REPRODUCTION	METABOLIC COMPLICATION	CVD	CANCER
MDA	✓	✓	✓	✓	SOD		✓	✓	
Hcy		✓	✓		TAC	✓		✓	
ADMA		✓	✓						
NEO	✓								
AGEs	✓	✓	✓						
ROS	✓	✓							
XO	✓	✓							
TOS	✓	✓							
LPO	✓								
CO			✓						
PLD	✓		✓						
OSI	✓								

Εικόνα 5[36]: Οι επιλεγμένοι δείκτες οξειδωτικού στρες(οξειδωτικά και αντιοξειδωτικά) στο σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών(PCOS) συνδέονται με την αναπαραγωγή, τις μεταβολικές επιπλοκές, τις καρδιαγγειακές παθήσεις(CVD) και τον καρκίνο. Οξειδωτικά: (ADMA)

ασύμμετρη διμεθυλαργινίνη, (AGEs)προηγμένα γλυκοζυλιωμένα τελικά προϊόντα. CO, πρωτεΐνη καρβονύλιο, (Hcy) ομοκυστεΐνη, (LPO) υπεροξειδωση λιπιδίων,(MDA) μαλονδιαλδεΐδη,(NEO)νεοπτερίνη,(OSI) δείκτης οξειδωτικού στρες, (PLD)προλιδάση, (ROS)δραστικά είδη οξυγόνου, (TOS) ολική οξειδωτική κατάσταση, (XO)οξειδάση ξανθίνης, Αντιοξειδωτικά: (SOD)υπεροξειδική δυσμουτάση, (TAC) συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα.

ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΩΣΗ

Η ενδομητρίωση είναι μια χρόνια καλοήγητος φλεγμονώδη οιστρογονοεξαρτώμενη πυελική γυναικολογική διαταραχή που χαρακτηρίζεται από την εμφύτευση αλλά και την ανάπτυξη ενδομητρικού ιστού εκτός της κοιλότητας της μήτρας[10][37]. Προσβάλλει περίπου το 10-15% των γυναικών αναπαραγωγικής ηλικίας και μπορεί να παρεμβαίνει στην διαδικασία της ωορρηξίας προκαλώντας μέχρι και απόφραξη σαλπίνγων[10][37]. Τα συνηθέστερα συμπτώματα της νόσου είναι ο πυελικός πόνος και η υπογονιμότητα. Ωστόσο, η ενδομητρίωση μπορεί να είναι ασυμπτωματική ή να συνοδεύεται από συμπτώματα όπως δυσμηνόρροια και δυσπαρεύνια[10]. Πρόκειται λοιπόν, για μια σύνθετη και πολυπαραγοντική νόσο που δεν

μπορεί να εξηγηθεί από μόνο μια θεωρία, αλλά από ένα συνδυασμό θεωριών. Σε αυτές μπορεί να περιλαμβάνεται η παλίνδρομη έμμηνος ρύση, διαταραχή της ανοσολογικής απόκρισης, γενετική προδιάθεση και φλεγμονώδεις συνιστώσες. Ο μηχανισμός, τώρα, που εξηγεί την πυελική ενδομητρίωση είναι η θεωρία της παλίνδρομης εμμηνορρυσίας και της εμφύτευσης. Αυτή η θεωρία υποστηρίζει ότι η οπισθοδρόμηση του ενδομήτριου ιστού μέσω των σαλπίνγων κατά την διάρκεια της έμμηνου ρύσεως εξηγεί τις εξω-σαλπγγικές θέσεις και την προσκόλλησή του στα πυελικά σπλάγχνα[14].

Μέσα από μελέτες που εξετάζουν την παθοφυσιολογία της ενδομητρίωσης σχετικά με την παρουσία του οξειδωτικού στρες σε αυτήν, προκύπτει ότι οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου(ROS) φαίνεται να σχετίζονται με την αυξημένη ανάπτυξη και προσκόλληση των ενδομήτριων κυττάρων στην περιτοναϊκή κοιλότητα, με απόρροια την εμφάνιση ενδομητρίωσης. Μάλιστα μέσα από τις ανεξάρτητες αυτές μελέτες βρέθηκε πως στο περιτοναϊκό υγρό γυναικών που πάσχουν από την συγκεκριμένη ασθένεια ανευρίσκονται διάφοροι βιοδείκτες του οξειδωτικού στρες. Συγκεκριμένα, φαίνεται να ανευρίσκονται στο περιτοναϊκό υγρό αυξημένα επίπεδα MDA(μαλονδιαλδεϋδη), 8-OHdG(8-Υδροξυ-Δεοξυγουανοσίνη), OGG1 (DNA γλυκοζυλάση της 8-οξυουανίνης), πρωτεϊνικά καρβονύλια, ιντερλευκίνη-6(IL-6), TNF-a, ιντερλευκίνη-1β(IL-1β), ιντερλευκίνη-8(IL-8), αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας(VEGF), 8-ισοπροσταγλανδίνη F2a(8-iso-PGF2a). Επιπλέον, σημαντική σημείωση θεωρείται πως τα επίπεδα της 8-iso-PGF2a είναι χρήσιμα για την πρόβλεψη της οξειδωτικής βλάβης σε ασθενείς με ενδομητρίωση[37].

Επιπρόσθετα, ένα μέλος της οικογένειας της πρωτεΐνης θερμικού σοκ των 70kDa(HSP70) και συγκεκριμένα η HSP70b', η οποία είναι γνωστό ότι είναι παρόν υπο αυξημένες οξειδωτικές συνθήκες, βρέθηκε να είναι παρόν με υψηλές συγκεντρώσεις στο αίμα γυναικών που πάσχουν από ενδομητρίωση. Επίσης, παρατηρήθηκαν χαμηλές συγκεντρώσεις αντιοξειδωτικών όπως η βιταμίνη A, C και E, ψευδάργυρος(Zn) και χαλκός(Cu). Τέλος, η βιταμίνη E εμφανίζεται να είναι σημαντικά μειωμένη σε ασθενείς με ενδομητρίωση πριν από την έναρξη της ωορρηξίας, ίσως λόγω του γεγονότος ότι τα αντιοξειδωτικά καταναλώνονται κατά την διάρκεια αντιδράσεων οξείδωσης. Μετά την ωορρηξία και την επαγωγή με εξωγενείς γοναδοτροπίνες, οι ασθενείς με ενδομητρίωση παρουσίασαν αυξημένη υπεροξείδωση των λιπιδίων καθώς επίσης φάνηκε να διατηρούν χαμηλότερα επίπεδα βιταμίνης E στον ορό, γεγονός που υποθετικά θα μπορούσε να θέσει σε κίνδυνο την ποιότητα των ωαρίων. Ωστόσο την ημέρα της ωοθυλακιορρηξίας τόσο το δυναμικό υπεροξείδωσης των λιπιδίων στον ορό όσο και τα επίπεδα της βιταμίνης E βρέθηκαν παρόμοια και στις δύο ομάδες[37].

Τα συσσωρευμένα δεδομένα συσχετίζουν επομένως το οξειδωτικό στρες στην περιτοναϊκή κοιλότητα και την παθογένεια της ενδομητρίωσης και καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι το οξειδωτικό στρες ως βιοδείκτης κυτταρικής βλάβης φαίνεται να είναι μια αξιόπιστη ποσοτική εξέταση της σοβαρότητας της ενδομητρίωσης[37].

ΑΥΤΟΜΑΤΕΣ ΑΠΟΒΟΛΕΣ & ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΗ ΑΠΩΛΕΙΑ ΚΥΗΣΗΣ

Η αυτόματη αποβολή μπορεί να χαρακτηριστεί ως η ακούσια διακοπή της εγκυμοσύνης πριν το έμβρυο θεωρηθεί βιώσιμο ή εναλλακτικά, όταν το βάρος του εμβρύου είναι μικρότερο από 500γρ. παρουσιάζει συχνότητα εμφάνισης 8-20% του συνόλου των εγκυμοσύνων και φαίνεται να είναι κυρίως αποτέλεσμα χρωμοσωμικής ανωμαλίας, η οποία ευθύνεται για το 50% όλων των αποβολών. Το υπόλοιπο 50% σχετίζεται με συγγενείς και μητρικές ανωμαλίες, λοιμώξεις, μητρικές ασθένειες και ιδιοπαθή αίτια[37].

Μέσω μελέτης που διεξάχθηκε σε εγκυμονούσες με διακοπή της κύησης πριν το τέλος του πρώτου τριμήνου, βρέθηκε μια απότομη αύξηση της πλακουντιακής πίεσης O₂ μεταξύ των εβδομάδων κύησης 8-12, που συμπίπτει με την εγκατάσταση της μητρικής αιμάτωσης του πρώιμου πλακούντα[37]. Μάλιστα, υπάρχουν στοιχεία που αποδεικνύουν πως ο ανώμαλος πλακούντας οδηγεί σε οξειδωτικό στρες στον πλακούντα με επακόλουθες βλαβερές συνέπειες στην συγκυτιοτροφοβλάστη και έχει προταθεί ως ένας μηχανισμός που εμπλέκεται στην αιτιοπαθογένεια της αυτόματης αποβολής[17]. Στην παραπάνω μελέτη που αναφέραμε, παρατηρήθηκε στον πλακουντιακό ιστό από απώλειες στην αρχή της εγκυμοσύνης μια αύξηση των βιοδεικτών του οξειδωτικού στρες όπως η MDA και τα υπεροξειδία των λιπιδίων παρά την αυξημένη ρύθμιση των αντιοξειδωτικών ουσιών όπως η καταλάση(CAT), η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης(GPx), Cu-Zn-SOD και Mn-SOD[37].

Μια απότομη αιχμή λοιπόν, στην έκφραση των δεικτών του οξειδωτικού στρες στην τροφοβλάστη ανιχνεύθηκε σε φυσιολογικές κυήσεις και αυτή η οξειδωτική αύξηση αν είναι υπερβολική εικάζεται ότι αποτελεί αιτία πρόωρης απώλειας της εγκυμοσύνης[17]. Διάφοροι ερευνητές πρότειναν ότι τα αυξημένα επίπεδα παραγωγής ROS μπορεί να είναι αποτέλεσμα μιας πρόωρης και απότομης εγκαθίδρυσης της αιμάτωσης του μητρικού πλακούντα. Αντίθετα, άλλες μελέτες πρότειναν επίσης ότι η οξειδωτική βλάβη στην τροφοβλάστη που προκαλείται από πρόωρη και εκτεταμένη έναρξη της μητρικής πλακουντιακής κυκλοφορίας είναι βασικός παράγοντας για την πρόωμη απώλεια εγκυμοσύνης. Ως συμπέρασμα προκύπτει πως τα αυξημένα επίπεδα ROS προκύπτουν από την έλλειψη αντιοξειδωτικών, τα οποία έχουν την ικανότητα εξάλειψης του οξειδωτικού στρες[37].

Παρόλο που δεν υπάρχει αποδεδειγμένη αιτιολογία της επαναλαμβανόμενης απώλειας κύησης το οξειδωτικό στρες φαίνεται να παίζει τεράστιο ρόλο. Συγκεκριμένα έχουν διερευνηθεί οι γονιδιακοί πολυμορφισμοί των ενζύμων της οικογένειας της γλουταθειόνης, της S-τρανσφεράσης της γλουταθειόνης(GSTM1) σε ασθενείς που παρουσιάζουν επαναλαμβανόμενες αποβολές με απόρροια ο αυξημένος κίνδυνος αποβολής βρέθηκε πως συσχετίζεται με τον πολυμορφισμό μηδενικού γονότυπου CSTM1. Επιπλέον, τα αυξημένα επίπεδα γλουταθειόνης σε έγκυες ασθενείς με ιστορικό επαναλαμβανόμενων αποβολών σχετίζονται με κακές εκβάσεις[37].

Παρόλα αυτά, η πρόσληψη αντιοξειδωτικών σε σχέση με την πρόληψη αποβολών δεν φαίνεται να έχουν καμία συσχέτιση, παρά την σύσταση των μαιευτήρων για λήψη βιταμινών E, δεν υπάρχουν αποδείξεις ότι η λήψη συμπληρωμάτων αντιοξειδωτικών βιταμινών, μόνα τους ή σε συνδυασμό με άλλους παράγοντες, πριν την εγκυμοσύνη ή στην αρχή της εγκυμοσύνης αποτρέπει από μια πιθανή αποβολή[37].

ΙΔΙΟΠΑΘΗΣ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑ

Όπως έχει προαναφερθεί και πιο πάνω ως ιδιοπαθή ή ανεξήγητη υπογονιμότητα ορίζεται η αδυναμία σύλληψης ύστερα από 12 μήνες σεξουαλικών επαφών χωρίς προφύλαξη, σε ζευγάρια που έχουν αποκλειστεί από άλλες πιθανές αιτίες υπογονιμότητας. Μια παθογένεια η οποία διαγιγνώσκεται συνήθως με την διαδικασία αποκλεισμού. Έρευνες μάλιστα, υποστηρίζουν πως τουλάχιστον το 15% του πληθυσμού στις ΗΠΑ πάσχει από ανεξήγητη υπογονιμότητα. Τώρα, όσον αφορά το οξειδωτικό στρες και την ιδιοπαθή υπογονιμότητα, υποστηρίζεται πως τα αυξημένα επίπεδα των ROS και κυρίως των βιοδεικτών του οξειδωτικού στρες παίζουν τεράστιο ρόλο στην εμφάνιση της υπογονιμότητας. Πιο συγκεκριμένα σε μελέτες που πραγματοποιήθηκαν φαίνεται να είναι ιδιαίτερα αυξημένα τα επίπεδα του δείκτη υπεροξειδωσίας των λιπιδίων καθώς και της MDA σε σύγκριση με την συγκέντρωση αντιοξειδωτικών στην περιτοναϊκή κοιλότητα[14][37].

Τα αυξημένα επίπεδα ROS επομένως σε αυτούς τους ασθενείς υποδηλώνουν μια σημαντική μείωση των αντιοξειδωτικών όπως είναι η γλουταθειόνη(GSH) και η Βιταμίνη E. Η χαμηλή αυτή αντιοξειδωτική

κατάσταση του περιτοναϊκού υγρού μπορεί να αποτελεί καθοριστικό παράγοντα στην παθογένεια της ιδιοπαθούς υπογονιμότητας[14]. Μάλιστα δεδομένου ότι το σπέρμα είναι ιδιαίτερα ευαίσθητο στο οξειδωτικό στρες, τα αποτελέσματα αυτά φαίνεται να οδηγούν στο συμπέρασμα πως ασθενείς που παρουσιάζουν υψηλές συγκεντρώσεις ROS και χαμηλά επίπεδα αντιοξειδωτικών στο περιτοναϊκό υγρό, μέσω διάχυσης των σαλπίνγων θα μπορούσαν να βλάψουν σημαντικά το σπέρμα και έτσι να εμποδίσουν μια πιθανή γονιμοποίηση[37].

Τέλος, όπως έχει αναφερθεί και πιο πάνω η ποιότητα των ωαρίων επηρεάζεται σημαντικά από την παρουσία του οξειδωτικού στρες. Κατά την διάρκεια της πρώτης μειωτικής φάσης στο ωοκύτταρο καθώς και στην ωοθυλακιογένεση είναι απαραίτητη η παρουσία μιας μικρής ποσότητας ελεύθερων ριζών οξυγόνου(ROS). Έτσι αναμένεται ότι υπο υπερβολική αύξηση των επιπέδων αυτών, μπορεί να εμφανισθεί βλάβη στην ωρίμανση των ωοκυττάρων κατά την διάρκεια της μείωσης II, η οποία σε συνδυασμό με μια ανεπαρκή ενδοκυτταρική αντιοξειδωτική ικανότητα, θα περιορίσει την επιτυχή ωοθυλακιορρηξία και ύστερα την γονιμοποίηση[37].

Η Ν-ακετυλοκυστεΐνη(NAC)είναι ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό με αντιαποπτωτικές επιδράσεις. Είναι γνωστό ότι διατηρεί την αγγειακή ακεραιότητα και μειώνει τα επίπεδα ομοκυστεΐνης, ενός επαγωγέα του οξειδωτικού στρες και της απόπτωσης. Μέσω μια τυχαίοποιημένης και ελεγχόμενης μελέτης η οποία διεξήχθη από τους Badaiwy και άλλους... κατά την οποία σύγκριναν τα επίπεδα NAC με την κιτρική κλομιφαΐνη ως συμπαράγοντας για την πρόκληση ωορρηξίας σε γυναίκες με ανεξήγητη υπογονιμότητα, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η NAC ήταν αναποτελεσματική στην πρόκληση ωορρηξίας στις συγκεκριμένες ασθενείς[14].

Επιπρόσθετα, το φαλλικό οξύ είναι μια βιταμίνη Β9 που θεωρείται απαραίτητη για την αναπαραγωγή. Παίζει ρόλο στον μεταβολισμό των αμινοξέων και στην μεθυλίωση των πρωτεϊνών, των λιπιδίων και των νουκλεϊκών οξέων. Η επίκτητη ή κληρονομική ανεπάρκεια φυλλικού οξέος συμβάλλει στην συσσώρευση ομοκυστεΐνης. Πρόσφατα μάλιστα, μια ομάδα ερευνητών διαπίστωσε πως η πιο σημαντική παραλλαγή στον μεταβολισμό του φυλλικού οξέος όσον αφορά τις επιπτώσεις είναι ο πολυμορφισμός του γονιδίου της μεθυλο-τετραϋδροφυλλικής αναγωγάσης (MTHFR). Το ένζυμο αυτό συμμετέχει στην μετατροπή της ομοκυστεΐνης σε μεθειονίνη, μια πρόδρομη ουσία για την μεθυλίωση του DNA, των λιπιδίων και των πρωτεϊνών. Σημαντικό επίσης είναι να προσθέσουμε πως ορισμένοι πολυμορφισμοί σε μονοπάτια γονιδίων που μεταβολίζουν το φυλλικό οξύ, μπορεί να ευθύνονται για την ανεξήγητη υπογονιμότητα που παρατηρείται στις γυναίκες αυτές, καθώς φαίνεται να διαταράσσει τα επίπεδα ομοκυστεΐνης που έχει ως απόρροια να μεταβάλλεται η ομοιόσταση. Ο διαταραγμένος αυτός μεταβολισμός του φυλλικού οξέος, λοιπόν διαταράσσει την ωρίμανση του ενδομητρίου και συνεπώς και την ποιότητα των ωαρίων[14].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο

ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ & ΑΝΔΡΙΚΟ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

4. ROS & ΑΝΔΡΙΚΟ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

Είναι ευρέως γνωστό πλέον πως ο ανδρικός παράγοντας στην υπογονιμότητα αποτελεί το 50% των περιπτώσεων. Ωστόσο ο ακριβής μηχανισμός της δυσλειτουργίας αυτής που δημιουργείται στο σπέρμα δεν είναι απολύτως σαφής μέχρι και σήμερα σε πολλές περιπτώσεις. Αρκετές έρευνες που διεξήχθη μέσα στην τελευταία δεκαετία θέτουν την ταυτοποίηση των ελεύθερων ριζών οξυγόνου ή αντιδραστικών ειδών οξυγόνου(ROS) ως μεσολαβητές της δυσλειτουργίας του σπέρματος τόσο σε ειδικές διαγνώσεις όσο και σε ιδιοπαθείς περιπτώσεις ανδρικής υπογονιμότητας. Μάλιστα υποστηρίζεται πως οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου(ROS) είναι αυξημένες σε άνδρες που αντιμετωπίζουν προβλήματα υπογονιμότητας με το ποσοστό αυτό να αγγίζει το 30 εως και το 80% των ανδρών αυτών. Γι' αυτό ο ρόλος των ROS έχει μελετηθεί εκτενώς στην διαδικασία της ανθρώπινης αναπαραγωγής. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί πως το οξειδωτικό στρες επηρεάζει τόσο τις σύνηθες παραμέτρους του σπέρματος όσο και την ικανότητα γονιμοποίησης, καθώς μελέτες αναφέρουν πως τα υψηλά επίπεδα ROS έχουν συσχετισθεί με έλλειψη ή κακή έκβαση γονιμότητας μετά από φυσική σύλληψη ή υποβοηθούμενη αναπαραγωγή[38].

Ο ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ROS ΣΤΑ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΑ

Φυσιολογικά, τα ROS θεωρούνται ρυθμιστές αρκετών ενδοκυτταρικών διεργασιών, ρυθμίζοντας λοιπόν με αυτόν τον τρόπο την ενεργοποίηση διαφορετικών παραγόντων μεταγραφής[39]. Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου(ROS), φαίνεται να επάγουν την κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη(cAMP) στα σπερματοζώαρια, ενεργοποιώντας έτσι την φωσφορυλίωση της τυροσίνης και αναστέλλοντας την παραγωγή της φωσφατάσης της τυροσίνης. Συγκεκριμένα, το υπεροξειδίο του υδρογόνου(H_2O_2), διεγείρει τη χωρητικότητα μέσω της φωσφορυλίωσης της τυροσίνης ενεργοποιώντας με αυτόν τον τρόπο έναν καταρράκτη ενδοκυτταρικής σηματοδότησης. Η καταλάση(CAT) ωστόσο, έχει την δυνατότητα καταστολής της χωρητικότητας αυτής[40]. Γνωρίζουμε πως ένα ορισμένο επίπεδο παραγωγής ROS είναι απαραίτητο για την φυσιολογική λειτουργία του σπέρματος, ενώ αντιθέτως, η υπερβολική παραγωγή των ελεύθερων ριζών οξυγόνου μπορεί να έχει επιζήμια επίδραση στη λειτουργία των σπερματοζωαρίων και επομένως και στην μετέπειτα γονιμοποίηση αλλά και υγεία των απογόνων[38].

Έρευνες περιγράφουν ότι τα υψηλά επίπεδα παραγωγής ROS διεγείρουν την χωρητικότητα και προάγουν την αντίδραση των ακροσωμάτων, ενώ η παρουσία της καταλάσης(CAT) ή της δυσμουτάσης του υπεροξειδίου(SOD) αναστέλλουν την αντίδραση αυτή[40]. Εκτός από την χωρητικότητα και την αντίδραση των ακροσωμάτων οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου παίζουν ρόλο στην υπερενεργοποίηση του σπέρματος, τη κινητικότητα, την χημειοταξία καθώς και τη συμπίεση της χρωματίνης σε ώριμα σπερματοζώαρια. Επιπλέον, μέσα από αυτές τις έρευνες φαίνεται οι ROS να βελτιώνουν την ικανότητα δέσμευσης του σπέρματος στη διάφανη ζώνη, με αποτέλεσμα να προκαλείται σύντηξη σπέρματος-ωοκυττάρου. Ωστόσο, μελέτες αναφέρουν ότι και τα αντιοξειδωτικά μόρια μπορούν να αλλάξουν την ωρίμανση των σπερματοζωαρίων, παρεμποδίζοντας έτσι τη φυσιολογική λειτουργία του σπέρματος[39].

Σημαντική παρατήρηση ωστόσο είναι και το γεγονός πως μέσα από τις τεχνικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής(διαβαθμίσεις Percoll, πλύση σπέρματος, φυγοκέντρηση) μπορεί να προκληθεί βλάβη στα σπερματοζώαρια είτε αφαιρώντας ακούσια την ικανότητα καθαρισμού του σπερματικού πλάσματος είτε αυξάνοντας την παραγωγή ROS από τα σπερματοζώαρια. Η κυτταρική βλάβη τώρα, αφορά το αποτέλεσμα μιας ακατάλληλης ισορροπίας μεταξύ της παραγωγής ROS και των δραστηριοτήτων απορρόφησης. Το δυναμικό απορρόφησης των σπερματοζωαρίων διατηρείται κανονικά με επαρκή επίπεδα δυσμουτάσης του υπεροξειδίου(SOD), καταλάσης και πιθανώς και υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης(GSH) αλλά και αναγωγάσης στο σπερματικό πλάσμα[41].

ΚΥΡΙΕΣ ΠΗΓΕΣ ROS ΣΤΟ ΑΝΔΡΙΚΟ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

Υπάρχουν πολλές εικασίες σχετικά με το αν η προέλευση των ROS στο σπέρμα προέρχεται από τα σπερματοζώαρια ή από τα λευκοκύτταρα[41]. Έρευνες, λοιπόν, υποστηρίζουν πως τα λευκοκύτταρα και τα μορφολογικά ανώμαλα σπερματοζώαρια αναγνωρίζονται ως κύριες πηγές ROS στην ανδρική αναπαραγωγική οδό. Μάλιστα, κατά την διάρκεια της φλεγμονής και της λοίμωξης που δημιουργείται, τα ενεργοποιημένα λευκοκύτταρα είναι ικανά να παράγουν έως και 100 φορές πιο μεγάλες ποσότητες ελεύθερων ριζών οξυγόνου(ROS) σε σχέση με τα μη ενεργοποιημένα λευκοκύτταρα. Από την άλλη, η αυξημένη παρουσία λευκοκυττάρων στο σπέρμα μπορεί επίσης να διεγείρει την παραγωγή τα ανθρώπινα σπερματοζώαρια και αυτά με την σειρά τους να αρχίσουν να παράγουν ποσότητες ROS. Η διέγερση αυτή όπως αναφέρεται μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε μέσω της άμεσης επαφής “cell to cell”(κύτταρο με κύτταρο) είτε μέσω διάφορων διαλυτών προϊόντων που απελευθερώνονται από τα λευκοκύτταρα[38].

Το 1992 μέσα από μελέτες που πραγματοποιήθηκαν αναφέρεται πως τα κλάσματα Percoll χωρίς λευκοκύτταρα στα δείγματα σπέρματος που ελήφθησαν από μη αζωοσπερμικούς υπογόνιμους άνδρες,

παράγουν μια ποσότητα ανιχνεύσιμων τιμών ROS σε σύγκριση με το σπέρμα φυσιολογικών και αζωοσπερμικών ανδρών. Γεγονός που υποδηλώνει ότι τα κατεστραμμένα σπερματοζωάρια είναι πιθανό να είναι μια πηγή παραγωγής των ROS. Επιπλέον, μέσα από την έρευνα αυτή προέκυψε πως υψηλές τιμές ROS συσχετίζονται με μειωμένο αριθμό κινούμενων σπερματοζωαρίων. Ενώ, επίσης παρατηρήθηκε μεγαλύτερη κινητικότητα των σπερματοζωαρίων σε δείγματα με μικρότερες ποσότητες ανιχνεύσιμων ROS[41].

Είναι γνωστό πως τα ανθρώπινα σπερματοζωάρια παράγουν O_2 , το οποίο αυθόρμητα ή ενζυμικά διασπάται σε υπεροξειδίο του υδρογόνου(H_2O_2). Υπό την παρουσία μεταλλικών ιόντων όπως είναι ο σίδηρος το O_2 και το H_2O_2 παράγουν υδροξειδίο(OH). Στην συνέχεια, η παραγωγή ROS είναι αυξημένη σε ασθενείς που εμφανίζουν μεγάλο ποσοστό σπερματοζωαρίων με περίσσεια υπολειπόμενου κυτταροπλάσματος στην περιοχή του μεσαίου τεμαχίου τους, το οποίο περιέχει ένζυμα όπως η γλυκόζη-6-φωσφορική αφυδρογονάση(G6PD) και η κινάση κρεατίνης(CPK). Η οξειδωτική βλάβη μπορεί επίσης να επηρεάσει την μορφολογία των φυσιολογικών ώριμων σπερματοζωαρίων, καθώς η βλάβη αυτή μπορεί να εντοπισθεί στην επιδιδυμίδα και στα σπερματικά σωληνάρια, όπου βρίσκονται και σε επαφή με τα ανώριμα σπερματοζωάρια που στο τέλος είναι και αυτά που παράγουν τα ROS σπερματοζωάρια[38].

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ROS ΣΤΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΟΥ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ

Μέσα από έρευνα 4ετούς παρακολούθησης, προέκυψε μια αντίστροφη σχέση μεταξύ των επιπέδων ROS στο πλυμένο σπέρμα και της επακόλουθης συχνότητας εμφάνισης αυτόματης εγκυμοσύνης. Μάλιστα, φαίνεται πως τα επίπεδα ελεύθερων ριζών οξυγόνου(ROS) επηρεάζουν σημαντικά την ανδρική γονιμότητα μέσα από διάφορους μηχανισμούς που χρησιμοποιούν τα σπερματοζωάρια για να γονιμοποιήσουν το ωάριο και να συμβάλλουν στην ανάπτυξη του εμβρύου. Συγκεκριμένα, οι ROS επηρεάζουν όχι μόνο την ποιότητα αλλά και τον αριθμό των σπερματοζωαρίων που διέρχονται στην γυναικεία αναπαραγωγική οδό. Στην συνέχεια, έχει αναφερθεί πως μέσα από την υπεροξειδωτική βλάβη της μεμβράνης του σπέρματος επηρεάζεται σημαντικά και η κινητικότητα των σπερματοζωαρίων με πιθανή αιτία της μειωμένης αυτής κινητικότητας να αποτελεί η βλάβη των αξοναϊκών πρωτεϊνών. Η υπερβολική παραγωγή ROS, τώρα, φαίνεται να προκαλεί ταχεία απώλεια ATP με αποτέλεσμα να μπλοκάρεται η διαδικασία της φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών, με απόρροια η υπερβολική αυτή παραγωγή ελεύθερων ριζών να σχετίζεται σοβαρά με την εμφάνιση ολιγοζωοσπερμίας[38].

Το DNA των σπερματοζωαρίων αποτελεί έναν άλλον σημαντικό τόπο δράσης, μέσω του οποίου οι ROS μπορούν να επηρεάσουν την γονιμότητα ενός άνδρα αλλά ταυτόχρονα και την υγεία των απογόνων του. Μάλιστα, το ποσοστό των σπερματοζωαρίων που έχουν υποστεί βλάβη φαίνεται να σχετίζεται αρνητικά με το ποσοστό γονιμοποίησης, καθώς οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου(ROS) έχουν την ικανότητα να εμποδίζουν την έναρξη των γεγονότων σύντηξης των σπερματοζωαρίων-ωοκυττάρων. Η αδυναμία αυτή των σπερματοζωαρίων να συγχωνευθούν με ένα ωοκύτταρο φαίνεται να οφείλεται στις επιδράσεις των ROS στη μεμβράνη των σπερματοζωαρίων με αποτέλεσμα την αποδιοργάνωση της αρχιτεκτονικής της μεμβράνης. Ως επακόλουθο, τα σπερματοζωάρια δεν είναι σε θέση να ξεκινήσουν τις απαραίτητες βιοκλινικές ενέργειες που σχετίζονται με την αντίδραση του ακροσώματος, τη δέσμευση των σπερματοζωαρίων στην διάφανη ζώνη και την διείσδυσή τους στο ωοκύτταρο. Ανεξάρτητα, λοιπόν από την κλινική διάγνωση η παρουσία σπερματικού οξειδωτικού στρες σε υπογόνιμους άνδρες υποδηλώνει ότι παίζει ρόλο στην παθοφυσιολογία της υπογονιμότητας μέσω διάφορων μηχανισμών που δρουν σε συγχρονισμό για να επηρεάσουν τα χαρακτηριστικά του σπέρματος και την ικανότητά του για γονιμοποίηση. Τα αυξημένα επίπεδα ROS και τα καταθλιπτικά επίπεδα της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας έχει αποδειχθεί πως σχετίζονται με την εμφάνιση κυρσοκλήλης. Επίσης, αξιοσημείωτο είναι και το γεγονός πως το ιστορικό καπνίσματος συνδέεται στενά με την αυξημένη παραγωγή ROS και την εμφάνιση οξειδωτικού στρες στο σπέρμα[38].

4.1. ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ ΣΤΗΝ ΑΝΔΡΙΚΗ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑ

Οι ROS όπως έχει αποδειχθεί επηρεάζουν τα περισσότερα μακρομόρια συμπεριλαμβανομένων των λιπιδίων, των προτεϊνών και των νουκλεϊκών οξέων. Η έκταση της βλάβης που προκαλείται από το οξειδωτικό στρες εξαρτάται από την ποιότητα, την έκθεση, την διάρκεια και τον τύπο των εμπλεκόμενων ROS (O_2 , H_2O_2 , OH κτλ.) καθώς επίσης, και από παράγοντες του περιβάλλοντος όπως είναι η θερμοκρασία, η τάση του οξυγόνου και η σύνθεση του σπερματικού υγρού που περιλαμβάνει ιόντα, πρωτεΐνες και ROS “scavengers”. Τα μεταλλικά αυτά ιόντα, επομένως που περιέχει το σπερματικό υγρό όπως είναι ο σίδηρος, φαίνεται να διαδραματίζουν καταλυτικό ρόλο στην δράση των ROS[38]. Από την άλλη, η μεμβράνη των ανθρώπινων σπερματοζωαρίων έχει βρεθεί πως περιέχει μεγάλες ποσότητες πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, τα οποία διατηρούν την ρευστότητά τους. Η υπεροξείδωση των λιπαρών οξέων αποδεδειγμένα οδηγεί στην απώλεια τόσο της ρευστότητας της μεμβράνης όσο και στην μείωση της δραστηριότητας των ενζύμων αλλά και των διαύλων ιόντων που εμπεριέχονται σε αυτήν. Με αποτέλεσμα, οι φυσιολογικοί κυτταρικοί μηχανισμοί που απαιτούνται για τη γονιμοποίηση να διαταράσσονται[38].

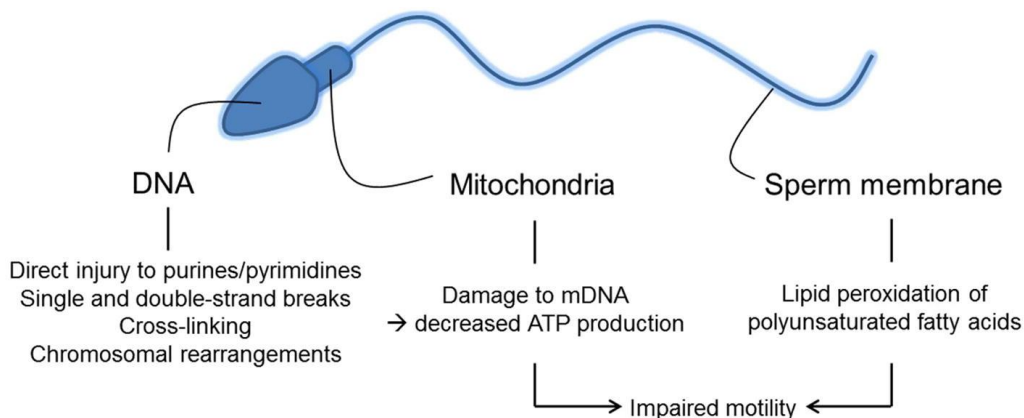
Παρόλο που οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου(ROS) είναι απαραίτητες για την φυσιολογική λειτουργία του σπέρματος, το υπερβολικό οξειδωτικό στρες μπορεί να προκαλέσει αυξημένη ευαισθησία στην βλάβη του DNA, οδηγώντας με αυτόν τον τρόπο όχι μόνο στην στειρότητα αλλά και σε υποτροπιάζουσα απώλεια εγκυμοσύνης ή στην εμφάνιση γενετικών κληρονομικών μεταλλάξεων που προκαλούν παιδιατρικές ασθένειες. Στην συνέχεια, λόγω της αυξημένης ευαισθησίας της περιεκτικότητας του σπέρματος σε ακόρεστα λιπαρά οξέα, είναι πιθανόν να προκληθεί εκτεταμένη βλάβη στην μεμβράνη του σπερματοζωαρίου. Συγκεκριμένα, μόλις ξεκινήσει η διαδικασία οξείδωσης των λιπιδίων, οι διπλοί δεσμοί, ενός ακόρεστου λιπαρού οξέος, προσβάλλονται από μια ελεύθερη ρίζα προκειμένου να δημιουργηθεί μια ρίζα υπεροξειδίου των λιπιδίων. Η ρίζα αυτή που δημιουργείται, στην συνέχεια αντιδρά με το γειτονικό μόριο λιπιδίου πυροδοτώντας μια αλυσίδα αντιδράσεων, η οποία μπορεί να οδηγήσει πάνω από το 50% της πλασματικής μεμβράνης του σπέρματος σε οξείδωση. Επίσης, τα υποπροϊόντα της οξείδωσης των λιπιδίων περιλαμβάνουν μεταλλαξιογόνα και γονιδιοτοξικά μόρια μαλονδιαλδεϋδης(MDA) και 4-υδροξυνεεάλης (4-HNE) στοιχεία που αποδεδειγμένα έχει βρεθεί πως προκαλούν έμμεσα βλάβη του DNA[40].

Στην συνέχεια, γνωρίζουμε πως οι ROS διαθέτουν την ικανότητα να βλάπτουν άμεσα το DNA του σπέρματος προσβάλλοντας τις βάσεις πουρίνης και πυριμιδίνης. Συγκεκριμένα, λοιπόν οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου(ROS) προκαλούν βλάβες στο σπάσιμο της μονής και διπλής αλυσίδας του DNA, με επακόλουθο την διαταραχή των διασταυρούμενων συνδέσμων και την δημιουργία χρωμοσωμικών αναδιατάξεων. Το μεγαλύτερο μέρος του γονιδιώματος του σπέρματος και συγκεκριμένα το 85%, είναι γνωστό πως είναι συνδεδεμένο με κεντρικές νουκλεοπρωτεΐνες, οι οποίες το προστατεύουν από τις ελεύθερες ρίζες. Έρευνες μάλιστα υποδεικνύουν πως υπογόνιμοι άνδρες εμφανίζουν συχνά ανεπαρκή πρωτεϊνική δράση, γεγονός που έχει αποδειχθεί πως μπορεί να κάνει το DNA του σπέρματος πιο ευάλωτο σε τυχόν βλάβες από τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου(ROS)[40].

Διάφορες μελέτες έχουν αποδείξει την ύπαρξη υψηλών επιπέδων ROS σε ασθενείς με ολιγοσπερμία. Με αποτέλεσμα τα υψηλά αυτά επίπεδα παραγωγής ROS να διαταράσσουν τις μιτοχονδριακές μεμβράνες, οδηγώντας στην ενεργοποίηση των κασπασών και τελικά στην απόπτωση. Η απελευθέρωση του συμπλέγματος του κυτοχρώματος ή αλλιώς του κυτοχρώματος C κατά την διάρκεια της αποπτωτικής οδού αυξάνει περαιτέρω τα επίπεδα ROS, προάγοντας έτσι την βλάβη και τον κατακερματισμό του DNA και ενδεχομένως αυξάνοντας τον αποπτωτικό κύκλο. Σημαντική σημείωση αποτελεί το γεγονός πως τα σπερματοζωάρια με υψηλά επίπεδα οξειδωτικού στρες, ειδικά τα σπερματοζωάρια μετά από κύκλους

κατάψυξης/ απόψυξης, εμφανίζουν υψηλότερα επίπεδα ενεργοποίησης της κασπάσης, που μπορεί να πυροδοτήσει την απόπτωση[40].

Από την άλλη, ένας άλλος μηχανισμός βλάβης του σπερματικού DNA είναι η απόπτωση. Γνωρίζουμε πως η διαδικασία της απόπτωσης είναι μια διαδικασία που συμβάλλει στην απομάκρυνση των μη φυσιολογικών γεννητικών κυττάρων στον άνθρωπο και στην πρόληψη της υπερπαραγωγής τους. Οι ROS, επομένως που δημιουργούνται είναι ικανές να πυροδοτήσουν μια αλυσίδα αντιδράσεων που οδηγούν τελικά στην απόπτωση. Η διαδικασία της απόπτωσης, λοιπόν φαίνεται πως μπορεί να επιταχυνθεί μέσα από βλάβες που δημιουργούνται στο DNA από την αυξημένη παραγωγή των ROS στα σπερματοζωάρια, οι οποίες μάλιστα μπορούν να οδηγήσουν και στην μείωση του αριθμού των σπερματοζωαρίων[38] Τα σπερματοζωάρια, ωστόσο διαθέτουν περιορισμένη ικανότητα να επιδιορθώνουν το DNA και μάλιστα μπορούν να επέμβουν μόνο σε συγκεκριμένα στάδια της σπερματογένεσης. Για αυτό οι μηχανισμοί επιδιόρθωσης στα απλοειδή σπερματοζωάρια είναι απαραίτητοι προκειμένου να πραγματοποιηθεί η αναδιαμόρφωση της χρωματίνης. Οι αλληλεπιδράσεις του σπέρματος με ένα ωάριο, μέσα από μελέτες έχει αναφερθεί πως μπορούν να επιτρέψουν την πραγματοποίηση ορισμένων επισκευών του DNA, οι οποίες μάλιστα μπορούν να επηρεάσουν και την διαδικασία της γονιμοποίησης[40].



Εικόνα 6: οξειδωτικό στρες και τραυματισμός του DNA, των μιτοχονδρίων και της πλασματικής μεμβράνης των σπερματοζωαρίων[40].

ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΩΣΗ ΤΩΝ ΛΙΠΙΔΙΩΝ(LPO)

Τα σπερματοζωάρια σε σχέση με άλλα κύτταρα, είναι μοναδικά ως προς την δομή, την λειτουργία και την ευαισθησία σε βλάβες από την υπεροξειδωση των λιπιδίων(LPO)[41]. Οι Jones και άλλοι.. ήταν οι πρώτοι που τόνισαν την ευαισθησία της υπεροξειδωσης των λιπιδίων που προκαλείται από το οξειδωτικό στρες στα ανθρώπινα σπερματοζωάρια. Τα φωσφολιπίδια της πλασματικής μεμβράνης του ανθρώπινου σπέρματος έχουν αφθονία σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα(PUFA). Τα PUFA περιέχουν διάφορους διπλούς δεσμούς που διαχωρίζονται από ομάδες μεθυλενίου, οι οποίες είναι ευαίσθητες στην δημιουργία υπεροξειδίων λιπιδίων

και αλδεϋδων, που σχετίζονται με μειωμένη κινητικότητα, βιωσιμότητα, δομική ακεραιότητα και μεταβολική δραστηριότητα του ανθρώπινου σπέρματος[42].

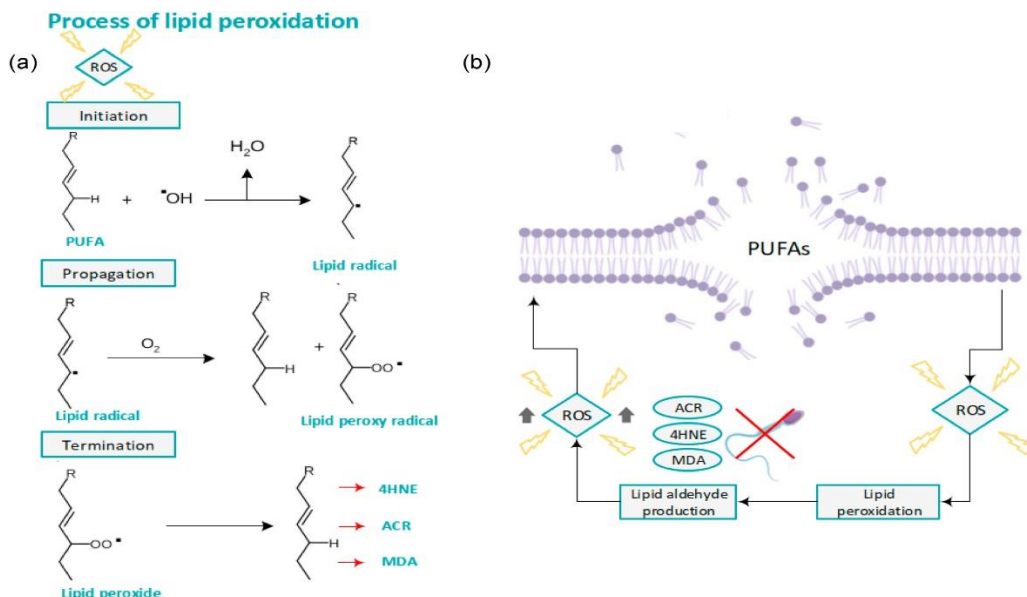
Η υπεροξειδωση λιπιδίων αναφέρεται στην οξειδωτική αποικοδόμηση των λιπιδίων. Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου(ROS) « κλέβουν» ηλεκτρόνια από τα λιπίδια στις μεμβράνες των σπερματοζωαρίων, δημιουργώντας κυτταρική βλάβη όπως αλλαγές στην δομή, συσσώρευση και δυναμική των λιπιδικών μεμβρανών, που οδηγεί σε έναρξη του μηχανισμού αλυσιδωτής αντίδρασης ελεύθερων ριζών, προκαλώντας ενώσεις υψηλής αντίδρασης. Ο καταρράκτης αυτός υπεροξειδωσης λιπιδίων μπορεί να εξηγηθεί μέσω τριών σταδίων, που ονομάζονται έναρξη, διάδοση και τερματισμός[42].

Στην συνέχεια, κατά την φάση έναρξης τα υψηλά επίπεδα ROS ενεργοποιούν την απελευθέρωση των PUFAS. Για παράδειγμα άτομα υδρογόνου από τα PUFA των μεμβρανών πλάσματος του ανθρώπινου σπέρματος απομονώνονται και μόλις συνδυαστούν με ρίζες υδροξυλίου (OH), παράγεται νερό μαζί με λιπιδικές ρίζες. Αμέσως επόμενο έρχεται το στάδιο διάδοσης, το οποίο χαρακτηρίζεται από την αντίδραση ασταθών λιπιδικών ριζών με οξυγόνο(O₂) με αποτέλεσμα να δημιουργούνται ρίζες υπεροξυλίου.

Προκειμένου όμως να σταθεροποιηθούν, αυτά τα μόρια έχουν την τάση να αντιδρούν περεταίρω με άτομα υδρογόνου από τα λιπίδια της πλασματικής μεμβράνης του σπέρματος. Αυτός ο μηχανισμός αλυσιδωτής αντίδρασης οδηγεί σε συνεχιζόμενη επιβλαβή υπεροξειδωση λιπιδίων. Στο τέλος, κατά την διάρκεια του σταδίου του τερματισμού, σχηματίζεται ένα τελικό προϊόν. Μέσω της αντίδρασης δύο ριζών και όταν η συγκέντρωση αυτών είναι αρκετά υψηλή ώστε να προκαλέσει την σύγκρουση τους δημιουργούνται διάφορες ηλεκτροφιλικές λιπιδικές αλδεϋδες όπως η 4-υδροξυνεεάλη(4HNE), η μαλονδιαλδεϋδη(MDA) και η ακρολεΐνη(ACR), οι οποίες θα τερματίσουν και την αντίδραση[42].

Η 4HNE, η MDA και η ACR, τώρα, είναι ισχυρά ηλεκτρόφιλα που σχηματίζουν προϊόντα προσθήκης με αρκετές πρωτεΐνες στα σπερματοζωάρια και προκαλούν μείωση της λειτουργίας των σπερματοζωαρίων. Μετέπειτα, η σύνδεση με πρωτεΐνες στην μιτοχονδριακή μεταφορά ηλεκτρονίων οδηγεί σε εκροή ηλεκτρονίων τα οποία αντιδρούν με το οξυγόνο και φέρουν ως αποτέλεσμα την παραγωγή ακόμα περισσότερων (μιτοχονδριακών) ROS. Τέλος μέσα από μια μελέτη που πραγματοποιήθηκε, προέκυψε πως η 4-υδροξυνεεάλη(4HNE) επηρεάζει τη λειτουργία του σπέρματος μέσω επιγενετικών τροποποιήσεων και μειωμένης κινητικότητας[42].

Εκτός από τις επιδράσεις στην μεμβράνη του σπέρματος η LPO μπορεί να προκαλέσει εξίσου σημαντικές βλαβες στο DNA και στις πρωτεΐνες, είτε μέσω της οξειδωσης των βάσεων του DNA(κυρίως της γουανίνης μέσω λιπιδικών υπεροξυλικών ή αλκοξυλικών ριζών) είτε μέσω της ομοιοπολικής σύνδεσης της MDA, με αποτέλεσμα την εμφάνιση σπασίματος και διασταυρώσεων στις αλυσίδες του DNA. Το 1995, μάλιστα οι Aitken και άλλοι... έδειξαν ότι η διέγερση της ενδογενούς, εξαρτωμένη από την NADPH, παραγωγή ROS στο ανθρώπινο σπέρμα φαίνεται να ρυθμίζει την ακροσωμιακή αντίδραση μέσω της φωσφορυλίωσης της τυροσίνης. Γενικά, όμως οι οξειδωτικές συνθήκες φαίνεται να αυξάνουν την φωσφορυλίωση της τυροσίνης[41].



Εικόνα 7: Υπεροξειδωση λιπιδίων[42]

- Φαίνεται ο καταρράκτης υπεροξειδωσης των λιπιδίων που εξηγείται σε τρία στάδια: έναρξη, διάδοση και τερματισμός.
- Η υπεροξειδωση των λιπιδίων φαίνεται να προκαλεί την παραγωγή διαφόρων ηλεκτροφιλικών λιπιδαιδεύδων όπως είναι η ακρολεΐνη(ACR), η 4-υδροξυενεάλη(4HNE) και μαλονδιαλδεΐδη(MDA). Με αποτέλεσμα να μειώνεται η λειτουργία των σπερματοζωαρίων καθώς αυξάνεται περαιτέρω η παραγωγή των ROS.

ΒΛΑΒΗ ΣΤΟ DNA

Όπως έχει ήδη αναφερθεί το οξειδωτικό στρες μπορεί να επηρεάσει σημαντικά και την ακεραιότητα του DNA, με αποτέλεσμα την μη φυσιολογική λειτουργία του σπέρματος. Η ανδρική υπογονιμότητα έχει συσχετισθεί με την παρουσία υψηλών επιπέδων κατακερματισμού του DNA στα σπερματοζωάρια σε σύγκριση με τους γόνιμους άνδρες. Συγκεκριμένα τα υπερβολικά επίπεδα ROS τα οποία συνδέονται και με μειωμένα επίπεδα αντιοξειδωτικών μπορούν να οδηγήσουν στην εμφάνιση οξειδωτικού στρες και στην συνέχεια να δημιουργήσουν βλάβη στο πυρηνικό και μιτοχονδριακό DNA[42].

Ο Mahfouz και οι συνεργάτες του μελέτησαν τον κατακερματισμό του DNA μεταξύ μιας ομάδας με φυσιολογικά επίπεδα σπερματικών ROS και μιας άλλης ομάδας με υψηλά επίπεδα σπερματικών ROS. Μέσω της έρευνας αυτής προέκυψε λοιπόν, μια μικρή αύξηση της τάξης των 25% στα επίπεδα του σπερματικού ROS η οποία μάλιστα οδήγησε σε αύξηση του ποσοστού κατακερματισμού του DNA κατά 10%[42].

Η βλάβη που μπορεί να υποστεί το DNA αντιπροσωπεύεται σε διάφορες μορφές τροποποιήσεων όπως είναι ο μονόκλωνος ή διπλόκλωνος κατακερματισμός του DNA, η δημιουργία αβασικών θέσεων, οι αλλαγές στην πουρίνη/ πυριμιδίνη/ δεοξυριβόζη και η διασύνδεση του DNA. Αυτές οι τροποποιήσεις λοιπόν, μπορεί να έχουν ως αποτέλεσμα την έναρξη ή την διακοπή της γονιδιακής μεταγραφής, αυξημένη αποικοδόμηση του τελομερούς DNA, επιγενετικές αλλοιώσεις, σφάλματα αντιγραφής και μετατροπές GC σε TA. Γενικά, οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου(ROS) δημιουργούν προϊόντα προσθήκης οξειδωμένης βάσης DNA εντός των κλώνων του DNA, όπως είναι η 8-υδροξυ-2-δεοξυγουανωσίνη(8-OHdG), η οποία επηρεάζει την ακεραιότητα της χρωματίνης του σπέρματος. Μάλιστα, αναφέρεται πως υπογόνιμοι άνδρες συχνά παρουσιάζουν κακή συσσώρευση χρωματίνης σε σύγκριση με γόνιμους άνδρες, καθιστώντας έτσι το DNA του σπέρματος εξαιρετικά ευάλωτο στην παρουσία του οξειδωτικού στρες[42].

Έχει αναφερθεί πως τα σπερματοζώαρια διαθέτουν μόνο ένα ένζυμο επιδιόρθωσης εκτομής βάσης(BER), υπεύθυνο για την αποκατάσταση βλάβης του DNA. Αυτό το ένζυμο ονομάζεται 8-οξυγουανίνη DNA γλυκοζυλάση 1(OGG1), η οποία είναι υπεύθυνη για την απελευθέρωση προϊόντων προσθήκης βάσης DNA. Τα σπερματοζώαρια δεν έχουν ένζυμα BER όπως η απουρινική ενδονουκλεάση 1(APE1) και η διασταυρούμενη συμπληρωματική πρωτεΐνη 1 επιδιόρθωσης ακτίνων X(XRCC1). Για τον λόγο αυτό, η ικανότητα επιδιόρθωσης του DNA των σπερματοζωαρίων είναι εύθραυστη, γεγονός που οδηγεί στην δυσμενή επιδιόρθωση των οξειδωμένων ουσιών προσθήκης βάσης DNA, όπως το 8-OHdG. Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι το 8-OHdG προκαλεί μεταλλάξεις βλαστικής σειράς, που οδηγεί έμμεσα σε κατακερματισμό του DNA στα ανθρώπινα σπερματοζώαρια[42].

4.2. ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ & ROS

Προκειμένου, να διατηρηθούν οι φυσιολογικοί οξειδωτικοί μηχανισμοί, με παράλληλη ελαχιστοποίηση του κινδύνου τραυματισμού του κυττάρου, είναι απαραίτητη η ύπαρξη μιας ισορροπίας μεταξύ ROS και αντιοξειδωτικών. Τα αντιοξειδωτικά όπως έχει ήδη αναφερθεί είναι αναγωγικοί παράγοντες που ρυθμίζουν την παραγωγή των ελεύθερων ριζών οξυγόνου(ROS) και λειτουργούν ως μια μορφή άμυνας του οργανισμού ενάντια στο οξειδωτικό στρες[40]. Ως μηχανισμός αυτοάμυνας και προστασίας, το ανθρώπινο σπερματικό πλάσμα περιέχει αντιοξειδωτικά ένζυμα. Ωστόσο, τα ίδια τα σπερματοζώαρια δεν έχουν πολλά αντιοξειδωτικά ένζυμα και έτσι η προστασία τους βασίζεται στα αντιοξειδωτικά συστήματα που υπάρχουν στο σπέρμα[42].

Κατά την διάρκεια της σπερματογένεσης, το σπέρμα αποβάλλει το κυτταρόπλασμα. Το σπερματικό πλάσμα που εκκρίνεται από τις σπερματοδόχους κύστες, τον προστάτη και τον βολβουρηθραίο αδένά παρέχει το βέλτιστο pH, ιζώδες, θρέψη καθώς και ένα σημαντικό μέρος αντιοξειδωτικών εντός του σπέρματος για την υποστήριξη των σπερματοζωαρίων. Από την άλλη, σύμφωνα με έρευνα που έχει πραγματοποιηθεί, μετρώντας τα επίπεδα δραστηριότητας των ενζυματικών αντιοξειδωτικών κατά την εκσπερμάτιση των γόνιμων ανδρών και των ανδρών που είχαν προηγουμένως υποβληθεί σε βαζεκτομή βρέθηκε πως τα επίπεδα ήταν παρόμοια και στις δυο περιπτώσεις. Γεγονός που υποδηλώνει πως η αντιοξειδωτική δράση που απαιτείται για την γονιμότητα παράγεται και εκκρίνεται στο σπερματικό πλάσμα[40].

Σημαντικά ενζυματικά αντιοξειδωτικά στην υπογονιμότητα αποτελούν η δυσμουτάση του υπεροξειδίου(SOD), η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης(GPx) και η καταλάση(CAT). Η δυσμουτάση του υπεροξειδίου(SOD) αποδεδειγμένα, είναι ένα ένζυμο το οποίο όχι μόνο μειώνει σημαντικά τους δείκτες του οξειδωτικού στρες αλλά προστατεύει το σπέρμα από την υπεροξείδωση των λιπιδίων, μειώνει τυχόν βλάβες στο DNA και σχετίζεται με την κινητικότητα στα ανθρώπινα σπερματοζώαρια. Συγκεκριμένα, αναφέρεται πως στα κύτταρα Sertoli ανευρίσκονται υψηλά επίπεδα SOD, ενώ τα γεννητικά κύτταρα εμφανίζουν υψηλά επίπεδα δραστηριότητας τα οποία διατηρούνται κατά την διάρκεια της σπερματογένεσης στα αναπτυσσόμενα και ωριμαζόμενα σπερματοζώαρια. Εκτός από τα κύτταρα Sertoli η δυσμουτάση του υπεροξειδίου(SOD) ανευρίσκεται τόσο στο σπερματικό πλάσμα όσο και σε όλη την επιδιδυμίδα[40].

Στην συνέχεια, η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης(GPx) ως γνωστόν χρησιμοποιεί την γλουταθειόνη ως δότη ηλεκτρονίων προκειμένου να καταλύσει το H₂O₂ και το ανιόν υπεροξειδίου. Έχει καταγραφεί, μάλιστα πως η GPx εκφράζεται και εκκρίνεται από την κεφαλή της επιδιδυμίδας και ανευρίσκεται στο σπέρμα, γεγονός που δικαιολογεί την προστατευτική της ικανότητα από την υπεροξείδωση των λιπιδίων στην πλασματική μεμβράνη των σπερματοζωαρίων. Η ύπαρξη υψηλών επιπέδων GPx ανευρίσκεται επίσης, και στα κύτταρα Sertoli[40].

Η καταλάση(CAT), μετέπειτα πρόκειται για ένα ένζυμο που βρίσκεται στα υπεροξισώματα και μετατρέπει ως γνωστόν το H_2O_2 σε H_2O και O_2 . Παρόλο που όπως έχει αποδειχθεί η ύπαρξη της καταλάσης είναι ελάχιστη στο αναπτυσσόμενο σπέρμα, υπάρχει ένα μικρό αλλά σταθερό επίπεδο δραστηριότητας στον όρχι. Μελέτες υποστηρίζουν πως άνδρες με ασθενοζωοσπερμία παρουσιάζουν χαμηλότερα επίπεδα CAT στο σπέρμα σε σύγκριση με τους νορμοσπερμικούς άνδρες, αποδεικνύοντας πιθανώς την σημασία των επιπέδων CAT στο σπερματικό πλάσμα[40].

Από την άλλη, οι μη ενζυματικές ομάδες οι οποίες είναι ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους, καθαρίζουν κι αδρανοποιούν κάθε τύπο ROS που παράγεται από τη μεταβολική δραστηριότητα. Τα πιο κοινά παραδείγματα είναι η γλουταθειόνη, το ουρικό οξύ και το συνένζυμο Q_{10} [42]. Στην συνέχεια, μη ενζυματικά αντιοξειδωτικά όπως είναι η βιταμίνη C, η οποία εξουδετερώνει τα ROS και μπορεί και προστατεύει την καταστροφή του DNA στο σπέρμα, αλλά και η βιταμίνη E, η οποία μειώνει την υπεροξείδωση των λιπιδίων στα σπερματοζωάρια, είναι δύο πολύ σημαντικά αντιοξειδωτικά τα οποία έχουν τεράστια σημασία στην καταπολέμηση του οξειδωτικού στρες στο σπέρμα. Άλλα ιχνοστοιχεία που λειτουργούν ως αντιοξειδωτικά είναι το σελήνιο(Se), ο ψευδάργυρος(Zn), το λυκοπένιο και η ουμπικινόλη. Μάλιστα, η ουμπικινόλη είναι η μειωμένη μορφή του συνένζυμου Q_{10} , ανευρίσκεται στο σπερματικό πλάσμα και έχει συσχετιστεί με χαμηλά επίπεδα ROS και αντίστοιχη αύξηση στον αριθμό και την κινητικότητα των σπερματοζωαρίων[40]. Η μη ενζυματική ομάδα μπορεί περαιτέρω να χωριστεί σε υδρόφιλες και υδρόφοβες ομάδες. Το πρώτο υπάρχει κυρίως στον ορό του αίματος, στο εξωκυτταρικό και στο σπερματικό πλάσμα. Ενώ οι υδρόφοβες προστατεύουν τις μεμβράνες από την προκαλούμενη από ROS λιπιδική υπεροξειδάση[42].

Έρευνα, μάλιστα περιγράφει τη δυσκολία του σπερματοζωαρίου να προστατεύει την ουρά και την μεμβράνη του από την υπεροξείδωση των λιπιδίων. Σύμφωνα με αυτό, μια πρόσφατη μελέτη για τα υδατοδιαλυτά και λιποδιαλυτά αντιοξειδωτικά έδειξε ότι τα υδρόφιλα αντιοξειδωτικά είναι ο κύριος αμυντικός μηχανισμός. Οι ανεπάρκειες, ωστόσο τόσο σε ενζυματικά όσο και μη ενζυματικά αντιοξειδωτικά έχουν αποδειχθεί ότι οδηγούν σε οξειδωτικό στρες. Συγκεκριμένα, ένας συνδυασμός προσθήκης πολλαπλών αντιοξειδωτικών συμπληρωμάτων in vitro, έχει αποδειχθεί αποτελεσματικός στη βελτίωση των παραμέτρων του σπέρματος. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι τα αντιοξειδωτικά είναι ικανά από μόνα τους να στοχεύουν τα εξωγενή ROS όπως για παράδειγμα γίνεται με τα λευκοκύτταρα. Δυστυχώς, όμως αυτό δεν ισχύει για την βλάβη του DNA που προκαλείται από τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου(ROS)[42].

Παρά το γεγονός, λοιπόν πως τα αντιοξειδωτικά μπορούν να αποτρέψουν ή και να επιδιορθώσουν την οξειδωτική βλάβη, η μη ρυθμιζόμενη χορήγηση συμπληρωμάτων αυτών, πιστεύεται πως μπορεί να οδηγήσει σε παθολογική αφθονία με απόρροια την δημιουργία ανισορροπίας μεταξύ οξείδωσης και αναγωγής. Μάλιστα, αναφέρεται πως η αυξημένη παραγωγή των αντιοξειδωτικών μπορούν να επιδεινώσουν τον τραυματισμό των ιστών μέσω της απώλειας των οξειδωτικών μηχανισμών και κατεπέκταση της αύξησης της παραγωγής των ελεύθερων ριζών οξυγόνου(ROS)[40]. Όπως έχει αποδειχθεί, επομένως η οξείδωση παίζει τεράστιο ρόλο στην ανδρική αναπαραγωγή και η μη ρυθμιζόμενη χορήγηση συμπληρωμάτων αντιοξειδωτικών, ως πιθανή πρόληψη τυχόν βλάβης του DNA και εμφάνισης οξειδωτικού στρες, μπορεί να αναστείλει αυτούς τους μηχανισμούς[40][42].

4.3. ΛΕΥΚΟΚΥΤΟΣΠΕΡΜΙΑ & ROS

Είναι γνωστό πως τα περισσότερα σπερματικά λευκοκύτταρα προέρχονται από την επιδιδυμίδα. Μάλιστα, η εμφάνιση λευκοκυττάρων στο ανδρικό αναπαραγωγικό σύστημα και στην εκσπερμάτιση είναι συχνή, καθώς παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανοσοεπιτήρηση[43]. Στην συνέχεια, η παρουσία λευκοκυττάρων και κυρίως κοκκιοκυττάρων στο σπέρμα έχει συσχετισθεί με σοβαρό ανδρικό παράγοντα υπογονιμότητας[41]. Η λευκοκυτταροσπερμία αποτελεί έναν καθιερωμένο δείκτη λοίμωξης στην ανδρική ουρογεννητική οδό, αν και άλλοι μικροοργανισμοί όπως βακτήρια και ιοί μπορεί επίσης να συμβάλλουν στην αιτιολογία της ανδρικής υπογονιμότητας. Η παθοφυσιολογία, τώρα αυτών των μολυσματικών παραγόντων μπορεί να ξεκινήσει από μια τοπική φλεγμονώδη αντίδραση που οδηγεί σε αύξηση των αντιδραστικών ειδών οξυγόνου(ROS). Αυτό οδηγεί στον τραυματισμό των όρχεων, επηρεάζοντας έτσι την μορφολογία, την κινητικότητα και την βιωσιμότητα του σπέρματος καθώς επίσης και την ανύψωση του σπερματικού λευκοκυττάρου ως αποτέλεσμα της λοίμωξης του γεννητικού συστήματος[43].

Ορισμένοι ερευνητές υποστηρίζουν πως τα σπερματικά λευκοκύτταρα μπορεί να μην είναι απλά μια απάντηση στη λοίμωξη, αλλά μάλλον δρουν για να απομακρύνουν τα μη φυσιολογικά γεννητικά κύτταρα, αποκτώντας με αυτόν τον τρόπο θετικό ρόλο στην επιτήρηση και φαγοκυττάρωση των ανώμαλων και νεκρών σπερματοζωαρίων. Άλλες μελέτες, ωστόσο θέτουν τα λευκοκύτταρα ως κύριους συντελεστές της παραγωγής ROS στο σπέρμα[43].

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας(Π.Ο.Υ) η συγκέντρωση των λευκοκυττάρων στο σπέρμα δεν πρέπει να υπερβαίνει το 1 εκατομμύριο ανά ml. Συγκεντρώσεις λευκοκυττάρων οι οποίες υπερβαίνουν την τιμή αυτή θεωρούνται σημάδι εμφάνισης λευκοκυτταροσπερμίας. Η λευκοκυτταροσπερμία από την άλλη, που δημιουργείται μέσω βλάβης του σπέρματος φαίνεται να είναι αποτέλεσμα των υψηλών επιπέδων ROS που προέρχονται από τα ίδια τα λευκοκύτταρα και τους φλεγμονώδεις μεσολαβητές.

Πειραματικά, υποστηρίζεται πως η παραγωγή ROS από τα σπερματοζωάρια και τα μολυσματικά λευκοκύτταρα μπορεί να διεγερθεί από εστέρες φορβόλης και ορισμένα φορμυλικά πεπτίδια. Γεγονός που έχει δυσμενείς επιδράσεις στο σπέρμα όσον αφορά την κινητικότητα αλλά και την ικανότητα γονιμοποίησης των σπερματοζωαρίων. Μέσα από μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί προκύπτει το γεγονός πως ανεξαρτήτως της παρουσίας των λευκοκυττάρων στο σπέρμα δεν καταγράφηκε πτώση της *in vitro* γονιμοποιητικής ικανότητας των σπερματοζωαρίων. Αντιθέτως, φάνηκε πως η εισαγωγή των λευκοκυττάρων σε πλυμένα παρασκευάσματα σπέρματος μείωσε την λειτουργία των σπερματοζωαρίων μέσω της παραγωγής ROS. Μέσα από τα ευρήματα αυτά, στην συνέχεια αποδείχθηκε πως το σπερματικό πλάσμα περιέχει σημαντικά αντιοξειδωτικά ή ελεύθερες ρίζες οξυγόνου(ROS) που μπορεί να αποτρέψουν την βλάβη του σπέρματος από τα λευκοκύτταρα[41].

Επιπρόσθετα, μια συσχέτιση που πραγματοποιήθηκε μεταξύ λευκοκυτταροσπερμίας και ROS βρέθηκε πρόσφατα ότι σχετίζεται με αυξημένα επίπεδα κυτοκινών όπως είναι η ιντερλευκίνη-8(IL-8) και μειωμένη δραστηριότητα της SOD[41]. Συγκεκριμένα, τα λευκοκύτταρα απελευθερώνουν προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες(IL-6) και (IL-8), οι οποίες με την σειρά τους διαμορφώνουν την ενεργοποίηση του προ-οξειδωτικού και αντιοξειδωτικού συστήματος και προάγουν μια οξειδωτική έκρηξη με την ταυτόχρονη παραγωγή ROS[43]. Αυτό, λοιπόν καταδεικνύει πως η εμφάνιση του οξειδωτικού στρες κατά την διάρκεια της λευκοκυτταροσπερμίας είναι αποτέλεσμα της ύπαρξης ενός ελαττωματικού συστήματος απορρόφησης ROS, το οποίο είναι πιθανό να προκύπτει από ορισμένες προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες[41].

Σημαντική προσθήκη αποτελεί και το γεγονός πως η υπερβολική παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου(ROS) συχνά θεωρείται μηχανισμός μέσω του οποίου διάφορα παθογόνα και λευκοκύτταρα προκαλούν βλάβη στα αρσενικά γεννητικά κύτταρα, προκαλώντας την υπεροξειδωση των λιπιδίων(LPO) και ταυτόχρονα καταστρέφοντας την μιτοχονδριακή δραστηριότητα[43].

Όπως ήδη προαναφέρθηκε η εμφάνιση λευκοκυττάρων στην εκσπερμάτιση αποτελεί φυσιολογικό εύρημα, αν και υπογόνιμοι άνδρες εμφανίζουν γενικά υψηλότερα σπερματικά λευκοκύτταρα. Ο επικρατέστερος τύπος λευκοκυττάρων στα ανθρώπινα εκσπερματικά κύτταρα είναι τα κοκκιοκύτταρα τα οποία ανευρίσκονται σε ποσοστό 50-60%, με αμέσως επόμενο τα μακροφάγα σε ποσοστό 20-30% και τελευταία τα Τ-λεμφοκύτταρα με ποσοστό 2-5%. Μάλιστα κατά την συσχέτιση του αριθμού των υποπληθυσμών με συγκεκριμένες μεταβολές της ποιότητας του σπέρματος, τα υψηλά επίπεδα Τ-λεμφοκυττάρων συσχετίστηκαν με μειωμένη ταχύτητα σπέρματος. Αυτό θα μπορούσε να είναι μια επίδραση της ιντερφερόνης- γ , η οποία έχει αναφερθεί ότι αναστέλλει την κινητικότητα του σπέρματος[43].

Όπως έχει αναφερθεί ήδη, η λευκοκυτταροσπερμία προκαλεί αύξηση των ROS και των προφλεγμονωδών κυτταροκινών και κυρίως των IL-6 και IL-8, οι οποίες έχει αποδειχθεί πως ανευρίσκονται σε υψηλές συγκεντρώσεις στο σπέρμα ανδρών που αντιμετωπίζουν φλεγμονή του γεννητικού συστήματος. Ως εκ τούτου, οι αυξημένες συγκεντρώσεις λευκοκυττάρων στο σπέρμα μπορεί να αντανακλούν σε λοίμωξη του γεννητικού συστήματος ή να είναι αποτέλεσμα μιας δευτερογενούς ανοσολογικής απόκρισης. Εκτός από τις λοιμώξεις του γεννητικού συστήματος βέβαια, άλλοι παράγοντες που μπορούν να αυξήσουν τις συγκεντρώσεις των σπερματικών λευκοκυττάρων είναι το κάπνισμα, το αλκοόλ καθώς και η χρήση μαριχουάνας[43].

Παρά λοιπόν, την σημαντική συσχέτιση μεταξύ του αριθμού των σπερματικών λευκοκυττάρων και των επιπέδων ROS στο σπέρμα, μια πρόσφατη μελέτη διαπιστώνει πως δεν υπάρχουν υψηλά ποσοστά βλάβης του DNA σπέρματος, σε δείγματα τα οποία είχαν υψηλό αριθμό λευκοκυττάρων. Μέσα από τις μελέτες, λοιπόν που πραγματοποιήθηκαν προκύπτει πως το οξειδωτικό στρες του σπέρματος έχει πολυπαραγοντική διάσταση και τα λευκοκύτταρα αποτελούν μόνο έναν από τους πολλούς παράγοντες, οι οποίοι συμβάλλουν στην εμφάνιση οξειδωτικού στρες στο σπέρμα[43].

4.4. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ ΣΤΟ ΣΠΕΡΜΑ

Σύμφωνα με τις οδηγίες του ΠΟΥ απαραίτητο είναι ο έλεγχος να ξεκινήσει από τα μακροσκοπικά χαρακτηριστικά. Εδώ μπορεί να μετρηθεί η κινητικότητα, η ζωτικότητα(ακεραιότητα μεμβράνης) και ο συνολικός αριθμός σπερματοζωαρίων. Οι πιο μελετημένες και κατανοητές παράμετροι της ποιότητας του σπέρματος είναι η συγκέντρωση, η κινητικότητα, και η μορφολογία. Ωστόσο, καθώς οι γνώσεις μας για την παθολογία του σπέρματος αυξάνονται, άλλες παράμετροι, όπως τα επίπεδα ROS, η ακεραιότητα του DNA και η υπεροξειδωση των λιπιδίων, γίνονται δυνητικά πιο σημαντικές[42].

Οι πιο άμεσοι τρόποι για τον προσδιορισμό των επιπέδων ROS και την άμεση ανίχνευσή τους στο σπέρμα χρησιμοποιούν χημικές ουσίες, οι οποίες αντιδρούν με τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου(ROS). Οι δοκιμασίες χημειοφωταυγείας αποτελούν τις πιο χρησιμοποιούμενες τεχνικές στην κλινική πράξη. Αυτή η δοκιμή βασίζεται στην χρήση της λουμινόλης ως ανιχνευτή για την ενδοκυτταρική και εξωκυτταρική παραγωγή ROS. Για αυτό τον λόγο λοιπόν, μετρώνται ολόκληρες εκσπερματώσεις ή καθαρό σπέρμα. Στην συνέχεια, η φωταυγεία που παράγεται λόγω της οξείδωσης του ανιχνευτή λουμινόλης μετράται με ένα φωτόμετρο και το σήμα εκφράζεται ως σχετική μονάδα φωτός(RLU) ανά δευτερόλεπτο ανά συγκέντρωση σπέρματος(RLU/s/ 10^6 σπέρμα). Μέσα από μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τους Agarwal και τους άλλους... ,οι οποίοι μάλιστα όρισαν μια τιμή αποκοπής για τη διαφοροποίηση μεταξύ υπογόνιμων και υγιών δοτών ελέγχου, ανακαλύφθηκε πως οι ασθενείς με μειωμένες παραμέτρους του σπέρματος όπως κινητικότητα, μορφολογία, συγκέντρωση(υπογόνιμοι ασθενείς) παρουσιάζουν υψηλότερα επίπεδα ROS σε σχέση με τους υγιείς δότες ελέγχου. Ωστόσο, σημαντικό είναι να προσθέσουμε πως η ποιότητα των

μετρήσεων εξαρτάται από την επιλογή υγιών δοτών ελέγχου και την αποδεδειγμένη ικανότητα γονιμότητας τους[43].

Η αξιολόγηση, λοιπόν του ρυθμού παραγωγής των αντιδραστικών ειδών οξυγόνου(ROS) μέσω της χρήσης της λουμινόλης ως ανιχνευτή μπορεί να αποτελέσει δυναμικό μέτρο του οξειδωτικού στρες. Παρόλα αυτά, η κλινική αξιολόγηση του τρόπου παραγωγής των ROS φαίνεται να επηρεάζεται από τον σύντομο χρόνο ημιζωής τους. Γι' αυτό τον λόγο έχουν αναπτυχθεί και άλλες μέθοδοι που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση του οξειδωτικού στρες, οι οποίες μάλιστα χρησιμοποιούν την μέτρηση συγκεκριμένων οξειδωμένων συστατικών που παραμένουν αναλλοίωτα στα σωματικά υγρά. Τέτοιες μέθοδοι είναι: οι TBA-αντιδρώσες ουσίες, η ισορροπία μεταξύ GSH/GSSG και η μέτρηση των επιπέδων της βιταμίνης E & C[41].

Ωστόσο, παρά το γεγονός πως υπήρξαν και ακόμη υπάρχουν ανησυχίες σχετικά με την ειδικότητα, την παρεμβολή και την αξιοπιστία της μέτρησης της δραστηριότητας των TBA-MDA ως δείκτη της υπεροξειδωσης των λιπιδίων(LPO), η δοκιμασία αυτή εξακολουθεί να παραμένει μια από τις πιο αποτελεσματικές μεθόδους όσον αφορά την αξιολόγηση της οξειδωτικής βλάβης στο σπέρμα[41].

Το οξειδωτικό στρες που παράγεται από ROS μπορεί επίσης να μετρηθεί και ως στατικό δυναμικό οξειδωσης-μείωσης(sORP). Μια τεχνική η οποία μετράει τη μεταφορά ηλεκτρονίων στο δείγμα, λαμβάνοντας ταυτόχρονα υπόψη τόσο τα οξειδωτικά μόρια όσο και τα αντιοξειδωτικά. Συγκεκριμένα υψηλές συγκεντρώσεις sORP υποδηλώνουν υψηλό ποσοστό οξειδωτικού στρες στα σπερματοζώαρια που συσχετίζεται με την εμφάνιση μειωμένων παραμέτρων του σπέρματος. Το sORP φαίνεται, λοιπόν να είναι ένας πιο σταθερός προσδιορισμός με την πάροδο του χρόνου και της θερμοκρασίας για την εκτίμηση του οξειδωτικού στρες από τις μεθόδους χημειοφωταυγείας και επιτρέπει παράλληλα μεγαλύτερη ευελιξία για το χειρισμό του δείγματος. Ωστόσο, αυτή η μέτρηση μπορεί να επηρεαστεί από τη σύνθεση του δείγματος και την παρουσία πολυμορφοπυρηνικών λευκοκυττάρων, οπότε η χημειοφωταυγεία δίνει μια πιο ακριβή προσέγγιση για τα επίπεδα ROS[43].

Άλλοι τύποι αξιολόγησης των επιπέδων ROS στο σπέρμα είναι και οι μέθοδοι που περιλαμβάνουν φθορίζουσες ετικέτες, οι οποίες επιτρέπουν την ταυτοποίηση ορισμένων συγκεκριμένων μορίων ROS και τον εντοπισμό τους στα σπερματοζώαρια. Οι πιο συνηθισμένοι ανιχνευτές είναι μόρια που οξειδώνονται υπο την παρουσία των ελεύθερων ριζών οξυγόνου(ROS), παράγοντας ένα φθορίζον μόριο του οποίου η ένταση μπορεί αργότερα να μετρηθεί χρησιμοποιώντας κυτταρομετρία ροής ή μικροσκοπία φθορισμού. Συγκεκριμένα αυτές οι ετικέτες μπορούν να συνδεθούν με μόρια που τις κατευθύνουν είτε στο κυτοσόλιο είτε στα μιτοχόνδρια. Μια από τις πιο κοινές ετικέτες για ενδοκυτταρικά ROS αποτελεί η διγλωροδιϋδροφθοροσκεϊνη(H_2 DCFDA), η οποία μπορεί και ανιχνεύει το υπεροξειδίου του υδρογόνου(H_2O_2), τα υπεροξυνιτρώδη($ONOO^-$) και το υδροξύλιο(OH). Το H_2 DCFDA λοιπόν, όπως έχει αναφερθεί ανιχνεύει κυρίως ROS που δημιουργούνται κοντά στην κυτταρική μεμβράνη των σπερματοζωαρίων. Από την άλλη πλευρά το διυδροαιθίδιο(DHE), που χρησιμοποιείται συνήθως για την ανίχνευση του κυτοσολικού υπεροξειδίου, φαίνεται να είναι ικανό να ανιχνεύει την ενισχυμένη οξειδοαναγωγική δραστηριότητα που σχετίζεται με ελλατωματικά, χαμηλής πυκνότητας ανθρώπινα σπερματοζώαρια.[43].

Από την άλλη η παραγωγή μιτοχονδριακού ROS σπέρματος μπορεί να αξιολογηθεί χρησιμοποιώντας το MitoSox Red, έναν ανιχνευτή που αποτελείται από δύο μόρια. Το πρώτο είναι το διυδροαιθίδιο(DHE), το οποίο μπορεί και αλληλεπιδρά με ρίζες του υπεροξειδίου και το δεύτερο είναι το τρυφαινυλοφωσφόνιο(TPP), το οποίο στοχεύει και κατευθύνει το DHE μέσα στα μιτοχόνδρια. Μέσα από έρευνες προέκυψε τελικά πως η βιωσιμότητα του σπέρματος αποδείχθηκε ότι συσχετίζεται αρνητικά με την παραγωγή μιτοχονδριακών ROS στα σπερματοζώαρια[43].

Στην συνέχεια, δεδομένου ότι τα ROS αποτελούν βραχύβια και αντιδραστικά μόρια είναι συνήθως δύσκολο να μετρηθούν άμεσα. Έτσι, η μέτρηση της βλάβης που προκαλούν στο DNA των σπερματοζωαρίων μπορούν να ανιχνευτούν μέσω αρκετών μεθόδων αξιολόγησης δειγμάτων σπέρματος όπως είναι: η μέτρηση

2,4 δινιτροφαινυλδραζίνη[DNPΗ](ανίχνευση πρωτεΐνης καρβονυλίου) , η χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης[HPLC](ανίχνευση λιπιδίων, διαχωρισμός, ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση κάθε συστατικού σε ένα μείγμα), η χρήση αέριας χρωματογραφίας-φασματομετρίας μάζας[GC-MS](διαχωρίζει τα χημικά μείγματα και αναγνωρίζει τα συστατικά σε μοριακό επίπεδο), ενζυμική ανοσοπροσροφητική δοκιμασία[ELISA](δείκτης βλάβης του DNA, με βάση την αντίδραση αντιγόνου-αντισώματος), ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς ζώνης[CZE](διαχωρισμός φορτισμένων μορίων DNA, RNA, πρωτεΐνες και μεταφορά τους μέσω ηλεκτρικού πεδίου), ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης(αξιολόγηση της σχετικής γονιδιακής έκφρασης των γονιδίων του οξειδωτικού στρες και τέλος, ο έλεγχος της αλληλουχίας του RNA(ποσοτικοποίηση και αλληλουχία του RNA σε ένα δείγμα/ ανάλυση έκφρασης γονιδίων)[43].

Τέλος, εξίσου σημαντικό στον έλεγχο και την ανίχνευση της παρουσίας ROS θεωρείται τόσο η αξιολόγηση της ύπαρξης οξειδωτικού στρες στο σπέρμα όσο και ταυτόχρονα η ανίχνευσή των δραστικών μορίων οξυγόνου στα κοιλικά υγρά της γυναίκας, πριν κατά την διάρκεια αλλά και μετά τις κλινικές δοκιμές[41].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο

ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ & ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗΣ

5. ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ & ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ

Όπως έχουμε ήδη αναφέρει, με τον όρο υπογονιμότητα ορίζεται η αδυναμία ενός ζευγαριού να συλλάβει μετά από τουλάχιστον 12 μήνες συχνών σεξουαλικών επαφών χωρίς προφύλαξη. Επηρεάζεται 1 στα 6 ζευγάρια παγκοσμίως και αποτελεί μια από τις πιο σημαντικές αιτίες κοινωνικής αλλά και συναισθηματικής δυσφορίας των ζευγαριών[44]. Η ιατρική θεραπεία για την στειρότητα περιλαμβάνει την εξωσωματική γονιμοποίηση(IVF) και την ενδοκυτταροπλασματική έγχυση σπέρματος(ICSI), οι οποίες και οι δύο αποτελούν τις πιο κοινές παρεμβάσεις που χρησιμοποιούνται στην τεχνολογία υποβοηθούμενης αναπαραγωγής(ART). Σύμφωνα, μάλιστα και με τα ιστορικά δρόμενα της ιατρικής επιστήμης το 1978 η τεχνολογία της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής φέρνει στον κόσμο το πρώτο της παιδί μέσω της εξωσωματικής γονιμοποίησης(IVF)[44].

Η τεχνολογία υποβοηθούμενης αναπαραγωγής(ARTs) αποδεδειγμένα αντιπροσωπεύει μια σημαντική θεραπευτική επιλογή για πολλά υπογόνιμα ζευγάρια που αντιμετωπίζουν προβλήματα υπογονιμότητας, είτε οφείλεται σε ανδρικό ή γυναικείο παράγοντα, είτε σε ιδιοπαθή. Ωστόσο, η χρήση τεχνικών ART, συνοδεύεται από τις δικές της προκλήσεις, καθώς όπως έχει επισημανθεί το περιβάλλον *in vitro* δεν θεωρείται τόσο ιδανικό όσο το *in vivo* περιβάλλον, όπου η συσσώρευση των αντιδραστικών ειδών οξυγόνου(ROS) που οδηγεί σε οξειδωτικό στρες διατηρείται σε σταθερά επίπεδα μέσω των ενδογενών αντιοξειδωτικών συστημάτων[46].

Η επιτυχής έκβαση της ART, συμπεριλαμβανομένης της γονιμοποίησης και της κλινικής κήσης που καταλήγει σε ζωντανή εγκυμοσύνη, επηρεάζεται από μια πλειάδα παραγόντων, μεταξύ των οποίων το αντιδραστικό είδος οξυγόνου(ROS) παίζει σημαντικό ρόλο. Επιπρόσθετα, η επακόλουθη ανάπτυξη του οξειδωτικού στρες θεωρείται μια από τις κύριες αιτίες ελαττωματικών γαμετών ή κακώς αναπτυσσόμενων εμβρύων στην ART. Αυτό συμβαίνει επειδή η διαδικασία εξωσωματικής γονιμοποίησης που πραγματοποιείται σε κλινικό εργαστηριακό περιβάλλον δεν μπορεί να αναδημιουργήσει τις ακριβείς συνθήκες κάτω από τις οποίες λαμβάνει χώρα η φυσική διαδικασία γονιμοποίησης. Μεταξύ των κρίσιμων αυτών παραγόντων στις διαδικασίες της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής συγκαταλέγεται και ο αυστηρός έλεγχος των επιπέδων ROS που διατηρούνται εντός φυσιολογικών επιπέδων συγκέντρωσης μέσω των αντιοξειδωτικών *in vivo*[46].

Το οξειδωτικό στρες, λοιπόν έχει καθιερωθεί ως ένας σημαντικός παράγοντας ο οποίος μπορεί να επηρεάσει αρνητικά τα αποτελέσματα της ART. Μάλιστα, σε χαμηλές συγκεντρώσεις αναφέρεται πως οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου(ROS) δρουν φυσιολογικά ως μόρια σηματοδότησης ικανές να εκτελέσουν διάφορες διεργασίες. Στην ανδρική αναπαραγωγή κιάλας, αυτοί οι μηχανισμοί οξειδοαναγωγής παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση πολλών λειτουργιών όπως είναι η σπερματογένεση, η συμπύκνωση χρωματίνης, η ωρίμανση του σπέρματος κατά την μεταφορά στην επιδιδυμίδα, η υπερενεργοποίηση του σπέρματος, η χωρητικότητα, η αντίδραση ακροσωμάτων καθώς και οι αλληλεπιδράσεις σπέρματος-ωοκυττάρου. Από την άλλη, στην γυναικεία αναπαραγωγική διαδικασία η οξειδοαναγωγική ομοιόσταση αναφέρεται ότι είναι ιδιαίτερα κρίσιμη για την διαδικασία της θυλακιογένεσης, της εμφύτευσης καθώς και του σχηματισμού του πλακούντα[45].

Αντιθέτως, τώρα τα υψηλά επίπεδα συγκέντρωσης των ROS πιστεύεται πως μπορούν να βλάψουν σημαντικά τα κυτταρικά λιπίδια, τα οργανίδια και το DNA, να αλλάξουν την ενζυματική λειτουργία αλλά και να πυροδοτήσουν την διαδικασία της απόπτωσης. Μάλιστα, η υπεροξείδωση των λιπιδίων(LPO), η οποία όπως έχουμε ήδη αναφέρει προκύπτει από την αυξημένη παραγωγή των ROS, οδηγεί στην παραγωγή προϊόντων υψηλής αντίδρασης και μεταλλαξιογόνων. Σε μια ρύθμιση ART, επίσης πολλοί παράγοντες μπορεί να είναι υπεύθυνοι για την αυξημένη παραγωγή ROS, οδηγώντας σε μη βέλτιστα αποτελέσματα ART. Γνωρίζουμε πως οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου μπορούν να παραχθούν ενδοκυτταρικά, από ανώριμο σπέρμα, ωοκύτταρα και έμβρυα. Τα τελευταία, μάλιστα μπορούν να είναι ιδιαίτερα ευάλωτα στο οξειδωτικό στρες λόγω της έλλειψης προστατευτικών αντιοξειδωτικών στο φυσιολογικό τους μικροπεριβάλλον κατά την διάρκεια *in vitro* συνθηκών ART[45].

Οι περισσότεροι ιστοί του σώματος, συμπεριλαμβανομένων και των σαλπίνγων, λειτουργούν σωστά σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις οξυγόνου(O_2) που κυμαίνονται από 4% έως και 10%. Μέσα από μελέτες που πραγματοποιήθηκαν το 1989 ο Pabon απέδειξε την τοξική επίδραση των επιπέδων του ατμοσφαιρικού οξυγόνου στα έμβρυα, ένα γεγονός που έρχεται να επιβεβαιώσει μετέπειτα και ο Umaoka το 1992, φτάνοντας στο συμπέρασμα πως όλο αυτό είναι απόρροια της υπερβολικής παραγωγής ROS που προκαλεί το οξειδωτικό στρες. Αντιθέτως, μια πολύ χαμηλή τάση οξυγόνου κάτω του 2% είναι επίσης επιζήμια για την εμβρυική ανάπτυξη τόσο λόγω αναστολής βασικών αναπτυξιακών βημάτων όσο και της απελευθέρωσης περίσσειας μιτοχονδριακών ROS[45].

Στην συνέχεια, συνθήκες οι οποίες συμβάλλουν στην λειτουργία και ρύθμιση της ART είναι: ο αέρας του εργαστηρίου, τα αέρια που χρησιμοποιούνται, τα αναλώσιμα ART καθώς και η ποιότητα των μέσων καλλιέργειας. Ενώ ταυτόχρονα σημαντικό ρόλο παίζουν και συνθήκες που αφορούν την χρήση του ορατού φως, της θερμοκρασίας αλλά και της υγρασίας του δείγματος η οποία μπορεί να επηρεάσει άμεσα ή έμμεσα την ενεργοποίηση του οξειδωτικού στρες. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί πως μέσω της διαδικασίας της κρυοσυντήρησης αλλά και της απόψυξης των γαμετών ή των εμβρύων αυξάνεται η παραγωγή των ελεύθερων ριζών οξυγόνου με αποτέλεσμα ταυτόχρονα να αυξάνεται και ο κίνδυνος κρυοφθοράς που προκαλείται από τα ROS[45].

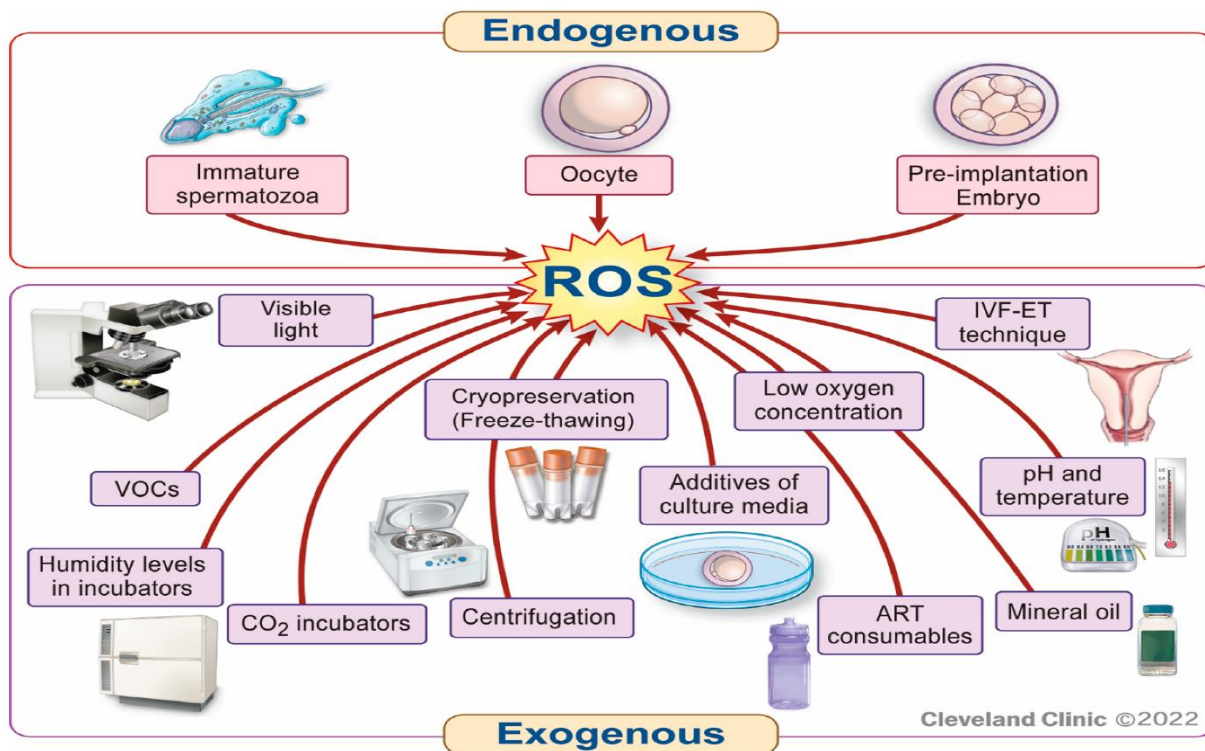
Όλοι αυτοί οι παράγοντες που αναφέρονται παραπάνω, μπορούν να δράσουν σε οποιοδήποτε στάδιο κατά την διάρκεια της ART από την προετοιμασία γαμετών και την γονιμοποίηση έως το στάδιο της ανάπτυξης του εμβρύου μέχρι και το στάδιο της βλαστοκύστης. Ωστόσο, όλοι αυτοί οι παράγοντες μπορούν να ρυθμιστούν μέσω της ανάπτυξης στρατηγικών που αποσκοπούν στην μείωση του κινδύνου εμφάνισης του οξειδωτικού στρες στην διαδικασία της ART, οι οποίες θα περιλαμβάνουν την βελτιστοποίηση του εργαστηριακού περιβάλλοντος, τεχνικές προετοιμασίας σπέρματος, μέσα καλλιέργειας εμβρύων και την δημιουργία πρωτόκολλων κρυοσυντήρησης[45].

5.1. ΠΗΓΕΣ ROS & ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ

Μπορεί να υπάρχουν πολλαπλές πηγές ROS στο περιβάλλον της εξωσωματικής γονιμοποίησης(IVF), συμπεριλαμβανομένων των ωοκυττάρων, της μάζας των σπερμοκυττάρων και τα σπερματοζώαρια που χρησιμοποιούνται για τη σπερματέγχυση. Οι πιο πιθανές κυτταρικές πηγές ROS στο περιβάλλον, τώρα της μικρογονιμοποίησης(ICSI) φαίνεται να αποτελούν τα ωάρια και τα εγγεόμενα σπερματοζώαρια. Σημαντική παρατήρηση βέβαια αποτελεί και το γεγονός πως υπάρχουν δυο ειδών πηγές ROS στην υποβοηθούμενη αναπαραγωγή η ενδογενείς πηγές ROS και η εξωγενείς πηγές ROS[25]. Μάλιστα, διάφοροι περιβαλλοντικοί παράγοντες που λαμβάνουν χώρα τόσο κατά την διάρκεια της εξωσωματικής γονιμοποίησης όσο και της ενδοκυτταροπλασματικής έγχυσης σπέρματος(ICSI) αναπόφευκτα εκθέτουν το σπέρμα, τα ωάρια και τα έμβρυα σε ROS, τα οποία πιστεύεται ότι επηρεάζουν σημαντικά τα αποτελέσματα αυτών των διαδικασιών[44].

Η ενδογενή πηγή ROS στην υποβοηθούμενη αναπαραγωγή μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσα από ανώριμο σπέρμα, ωοκύτταρα ή έμβρυα. Ενώ εξωγενείς πηγές οι παράγοντες ενεργοποίησης παραγωγής των ROS αποτελούν η εξαιρετικά υψηλή ή χαμηλή συγκέντρωση οξυγόνου(O_2), τυχόν πιθανή μόλυνση του αέρα του εργαστηρίου, επωαστήρες CO_2 ή αναλώσιμα ART(πλαστικά, δισφαινόλες) με πτητικές οργανικές ενώσεις(VOCs). Επιπλέον, η φυγοκέντρωση, το ορατό φως, η θερμοκρασία, τα επίπεδα υγρασίας στις θερμοκοιτίδες, το ορυκτέλαιο, τα πρόσθετα των μέσων καλλιέργειας, η τεχνική in vitro γονιμοποίησης(IVF)- εμβρυομεταφορά(ET) και η κρυοσυντήρηση γαμετών ή εμβρύων όπως έχουν

αναφερθεί και πιο πάνω είναι ικανές να συμβάλλουν στην δημιουργία των ελεύθερων ριζών οξυγόνου(ROS) σε μια ρύθμιση της ART[45].



Εικόνα 8[45]: Εξωγενείς και ενδογενείς πηγές παραγωγής ROS στην υποβοηθούμενη αναπαραγωγή.

Ωστόσο, η μεγαλύτερη πηγή εξωγενών ROS αναφέρεται πως είναι τα σπερματοζώαρια που χρησιμοποιούνται για την γονιμοποίηση των ωαρίων in vitro, αλλά άλλες πηγές δεν μπορούν να αποκλειστούν, ιδίως δεδομένου ότι οι ROS όπως είναι γνωστό επηρεάζουν την μικρογονιμοποίησης(ICSI), μια διαδικασία όπου χρησιμοποιούνται μεμονωμένα σπερματοζώαρια[25]. Αδιαμφισβήτητο γεγονός αποτελεί και ο μεγαλύτερος χρόνος επώασης κατά την διάρκεια της εξωσωματικής γονιμοποίησης(IVF), η οποία θέτει τον γαμέτη σε μεγαλύτερο κίνδυνο έκθεσης σε ROS σε σχέση με την ICSI. Η ICSI, ενέχει όπως έχει ερευνηθεί μεγαλύτερο κίνδυνο πρόκλησης βλάβης στο DNA του ωαρίου που προκαλείται από τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου μέσω της άμεσης έγχυσης που περιέχει ROS μαζί με το σπέρμα κατά την διάρκεια της διαδικασίας. Μάλιστα η ICSI, παρακάμπτει την ευκαιρία φυσικής επιλογής σπέρματος με αποτέλεσμα να εμφανίζει μεγαλύτερα ποσοστά πιθανής έγχυσης σπερματοζωαρίων με βλάβη στο DNA που προκαλείται από την υψηλή περιεκτικότητα ROS στο ωάριο[44].

ΟΞΥΓΟΝΟ(O₂)

Είναι ευρέως αποδεκτό πως κατά την πρώιμη εμφύτευση, το έμβryo αναπτύσσεται σε σχεδόν ανοξικές συνθήκες μέσα στην μήτρα. Αυτή η αλλαγή στην τάση οξυγόνου από περίπου 2% έως 5% στις ωοθήκες σε σχεδόν ανοξική συνοδεύεται από μια αλλαγή στον εμβρυικό μεταβολισμό που δημιουργείται μέσα από την διαδικασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης με ταυτόχρονα χαμηλά επίπεδα γλυκόζης στην σάλπιγγα, ενώ μέσω της γλυκόλυσης έχουμε υψηλά επίπεδα γλυκόζης στην μήτρα κατά την διαδικασία εμφύτευσης και λίγο μετά την εμφύτευση ευνοώντας την προεμφυτευτική ανάπτυξη του εμβρύου και του πλακούντα. Μετέπειτα, κατά την λεγόμενη μετεμφυτευτική αλλαγή εμβρυικού μεταβολισμού, ο ρυθμός γλυκόλυσης

αρχίζει να μειώνεται ξανά και η διαδικασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης να πραγματοποιείται με ταχύτερους ρυθμούς. Στην συνέχεια εγκαθίστανται η κυκλοφορία του αίματος του πλακούντα και τα επίπεδα οξυγόνου αυξάνονται προκαλώντας τον πολλαπλασιασμό, την ανάπτυξη αλλά και την διαφοροποίηση των κυττάρων. Αυτό δείχνει, λοιπόν ότι απαιτείται μια καλά ελεγχόμενη ισορροπία οξειδοαναγωγής για την γονιμοποίηση, την ανάπτυξη, την εμφύτευση και την περαιτέρω διαφοροποίηση του εμβρύου[45].

Έρευνες, οι οποίες έχουν μελετήσει τα ανθρώπινα εμβρυικά βλαστοκύτταρα πρότειναν ότι η φυσιολογική συγκέντρωση οξυγόνου ωφελεί τα έμβρυα μειώνοντας το κυτταρικό στρες και αποτρέποντας έτσι την επιγενετική αλλοίωση και την μη αναστρέψιμη αδρανοποίηση του χρωμοσώματος X. Συγκεκριμένα, η βέλτιστη συγκέντρωση οξυγόνου για την καλλιέργεια εμβρύων θηλαστικών *in vitro*, έχει απασχολήσει σε μεγάλο βαθμό την επιστημονική κοινότητα τις τελευταίες δεκαετίες, οι οποίες έχουν φτάσει στο συμπέρασμα πως τα ποσοστά γονιμοποίησης, διάσπασης και εμφύτευσης της βλαστοκύστης δεν ήταν σημαντικά διαφορετικά όταν χρησιμοποιήθηκαν συγκεντρώσεις οξυγόνου 5% ή 20% κατά την διάρκεια της καλλιέργειας εμβρύων μέχρι την 2^η ή την 3^η ημέρα. Ωστόσο, μέσα από μια συστηματική ανασκόπηση Cochrane προέκυψε πως η καλλιέργεια εμβρύου σε χαμηλή συγκέντρωση οξυγόνου 5% έχει κλινικό όφελος στην έκβαση της ART σε σύγκριση με τις ατμοσφαιρικές συγκεντρώσεις οξυγόνου[45].

Στην συνέχεια, σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες της Ευρωπαϊκής Εταιρείας Ανθρώπινης Αναπαραγωγής και Εμβρυολογίας(ESHRE) συνιστάται η καλλιέργεια των ανθρώπινων εμβρύων να γίνεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου που κυμαίνονται στο 2%-8%. Μάλιστα πρόσφατες μελέτες που διενεργήθηκαν σε καλλιέργεια εμβρύων ποντικών αποδεικνύουν πως χαμηλότερες τιμές οξυγόνου και συγκεκριμένα γύρω στο 5%, αύξησαν τον αριθμό των μιτοχονδρίων στα βλαστομερή, με επακόλουθο την επιτυχή ανάπτυξη της βλαστοκύστης και την αύξηση του ποσοστού πιθανής εγκυμοσύνης[45].

Τα έμβρυα θεωρείται πως είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στην παρουσία του οξειδωτικού στρες, η οποία προκαλείται από την υψηλή συγκέντρωση οξυγόνου στην ατμόσφαιρα στα αρχικά στάδια δηλαδή, πριν από την ενεργοποίηση του εμβρυικού γονιδιώματος. Σημαντική παρατήρηση επίσης, αποτελεί και το γεγονός πως στα μέσα που καλλιεργήθηκαν με ποσοστό οξυγόνου <5% φαίνεται πως τα επίπεδα ROS ήταν χαμηλότερα συγκριτικά με τα δείγματα που πραγματοποιήθηκαν σε ατμοσφαιρικές συγκεντρώσεις οξυγόνου. Απόδειξη όλου αυτού αποτελεί και η έρευνα του Kaser και των άλλων... η οποία ανέφερε πως τα έμβρυα που καλλιεργήθηκαν σε εξαιρετικά χαμηλές συγκεντρώσεις O₂ είναι πιο πιθανό να εξελιχθούν σε καλές βλαστοκύστες από τα αντίστοιχα έμβρυα αδελφών που καλλιεργήθηκαν <5% O₂. Καθώς επίσης, η μείωση της τάσης οξυγόνου από 5% σε 2% την 3^η ημέρα και μετά δεν φαίνεται να βελτιώνει περαιτέρω την ανάπτυξη του εμβρύου κατά την εκτεταμένη καλλιέργεια ανθρώπινου εμβρύου[45].

ΟΡΑΤΟ ΦΩΣ

Ο *in vitro* χειρισμός γαμετών και εμβρύων περιλαμβάνει την αναπόφευκτη έκθεσή τους στο ορατό φως(400-700nm), τόσο από το μικροσκόπιο όσο και από τον φωτισμό περιβάλλοντος(εργαστήριο/ φθορίζον φως και φως ημέρας/ έμμεσο ηλιακό φως). Το φως εντός του ορατού φάσματος(ορατό φως) έχει επιζήμια αποτελέσματα στους γαμέτες και στο αναπτυσσόμενο έμβρυο. Η αρνητική επίδραση του ορατού φως επηρεάζεται από την διάρκεια της έκθεσης, της έντασης και της φασματικής σύνθεσης του φωτός[46].

Το φως μάλιστα αποδεδειγμένα φαίνεται να είναι επιβλαβές για την καλλιέργεια εμβρύων είτε άμεσα είτε έμμεσα προκαλώντας υπεροξειδωση ελαίου και φωτοοξειδωση του μέσου καλλιέργειας. Συγκεκριμένα, μέσα από μελέτες που πραγματοποιήθηκαν παρατηρήθηκε πως συγκεκριμένα μήκη κύματος απορροφώνται από ένζυμα της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων, με αποτέλεσμα την αυξημένη παραγωγή ROS[45]. Το μπλε φως θεωρείται ιδιαίτερα επιζήμιο σε σχέση με το ορατό φως καθώς διαθέτει μεγαλύτερα μήκη

κύματος και είναι ικανό να δημιουργήσει υπεροξείδιο του υδρογόνου(H_2O_2) και να αλλάξει τα ένζυμα στην αναπνευστική αλυσίδα. Έμβρυο ποντικού το οποίο εκτέθηκε στο μπλε φως είχε μειωμένους ρυθμούς σχηματισμού βλαστοκύστης, υψηλότερα ποσοστά βλαστομερικής απόπτωσης και υψηλότερη παραγωγή ROS στο μερίδιο[46]. Όλα αυτά μπορούν να μειωθούν μέσω της χρήσης κάποιων παραμέτρων όπως είναι η χρήση ειδικών φίλτρων, τα οποία μπορούν να αποκλείσουν την ακτινοβολία στα μπλε φάσματα, τα επίπεδα φωτισμού να διατηρούνται στο ελάχιστο χωρίς να διακυβεύεται η οπτική επιθεώρηση και να υπάρχει μικρότερος χρόνος έκθεσης του κυττάρου στο φως προτού αυξηθεί το λειτουργικό σύστημα: δηλαδή μια παροδική έκθεση 5 λεπτών[45][46].

Η έκθεση στο φως μετράται ως μονάδες έντασης φωτισμού(lux) ή με το επίπεδο ακτινοβολίας(W/m^2). Η χρήση χαμηλών επιπέδων φωτισμού κατά την διάρκεια χειρισμού ανθρώπινου εμβρύου σε όλες τις διαδικασίες in vitro γονιμοποίησης-εμβρυομεταφοράς σε 110 κύκλους εξωσωματικής γονιμοποίησης απέδωσε σχετικά υψηλό ποσοστό εκτόξευσης. Μάλιστα σε μια πρόσφατη in vitro μελέτη, παρθενογενετικά ενεργοποιημένα έμβρυα χοίρου που αναπτύχθηκαν σε μέσο καλλιέργειας με προηγούμενη 24ωρη έκθεση στο φως του περιβάλλοντος απέδωσαν υψηλότερο ποσοστό βλαστοκύστεων με κακή μορφολογία. Επιπρόσθετα, τα ενεργοποιημένα ωκύτταρα που είχαν εκτεθεί πριν από 1 ώρα στο φως του περιβάλλοντος σχημάτισαν λιγότερες και χαμηλότερης ποιότητας βλαστοκύστες. Η βλαβερή αυτή επίδραση της έκθεσης των βλαστοκύστεων στο φως, λοιπόν βρέθηκε να αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου[46].

Επιπρόσθετα, η ακτινοβολία φωτός($40 mW/cm^2$ ορατό φως ή 400 έως 800nm με μέγιστη ενέργεια στα 600nm για 3 λεπτά) των ανθρώπινων σπερματοζωαρίων σε μέσα χωρητικότητας αύξησε την υπερ-ενεργοποιημένη κινητικότητα, χωρίς να ενισχύει την ολική κινητικότητα, καθώς επίσης έχει σημειωθεί πως η υπερενεργοποιημένη κινητικότητα κλιμακώνει την ταχύτητα κολύμβησης των σπερματοζωαρίων και βοηθάει στην παραγωγή επαρκούς δύναμης διείσδυσης. Επίσης η ανάπτυξη της υπερενεργοποιημένης κινητικότητας κατά την διαδικασία χωρητικότητας των σπερματοζωαρίων μπορεί να είναι κρίσιμη στην επιτυχή πραγματοποίηση εγκυμοσύνης. Ωστόσο, η παραγωγή ROS σε αυτά τα σπερματοζωάρια φαίνεται να αυξάνεται μετά από 1 έως 3min. έκθεσης στο φως[46].

pH & θερμοκρασία

Το pH των ανθρώπινων ωαρίων και εμβρύων ποικίλει ελαφρώς κατά την ανάπτυξη, για τα ωάρια τα αποδεκτά όρια pH κυμαίνονται μεταξύ των τιμών 6,98-7,0 και για τα έμβρυα είναι το pH 7,12. Ωστόσο, είναι ακόμα ασαφές εάν το pH 7,2 θεωρείται καλό ή επιζήμιο για τα ανθρώπινα έμβρυα σε σχέση με ένα pH 7,3 στον χειρισμό μέσων. Τα ανθρώπινα ωκύτταρα και τα έμβρυα διάσπασης είναι πιο ικανά να ρυθμίζουν την αλκαλικότητα στο κυτταρόπλασμα που προκαλείται από υψηλά επίπεδα pH αλλά από την άλλη έχει βρεθεί πως δεν μπορούν να ρυθμίσουν την οξέωση. Γεγονός, που υποδηλώνει ότι το περιβάλλον των εξωτερικών ωαρίων και των εμβρύων διάσπασης δεν είναι τόσο όξινο όσο αυτό του κυτταροπλάσματος[45].

Η ενδοκυτταρική ομοιόσταση είναι πολύ ευαίσθητη σε αλλαγές στο pH, οι περισσότερες μάλιστα συμβαίνουν σε pH 6-8), ειδικά σε βασικές διαδικασίες όπως η πρωτεϊνοσύνθεση, η μιτοχονδριακή λειτουργία, η κυτταροσκελετική ρύθμιση και ο κυτταρικός μεταβολισμός. Στην συνέχεια, οι διακυμάνσεις της συγκέντρωσης ιόντων υδρογόνου(pH) στα μέσα καλλιέργειας φαίνεται πως θα μπορούσαν να επηρεάσουν αρνητικά την κινητικότητα των σπερματοζωαρίων, την ωρίμανση των ωαρίων καθώς επίσης και την ανάπτυξη του εμβρύου. Έτσι, προκειμένου να διατηρηθεί το pH των μέσων καλλιέργειας τα επίπεδα CO_2 του επωαστήρα θα πρέπει να διατηρούνται σταθερά, καθώς τα χαμηλά επίπεδα CO_2 φαίνεται να αυξάνουν σημαντικά το pH των μέσων καλλιέργειας. Σημαντική παρατήρηση αποτελεί και το γεγονός πως τα αυξημένα επίπεδα pH θα μπορούσαν να υποβάλλουν τα κύτταρα σε συνθήκες οξειδωτικού στρες.

Έρευνες θέλουν την χρήση ρυθμιστικών διαλυμάτων στα μέσα καλλιέργειας να συμβάλλουν στην διατήρηση των σταθερών επιπέδων του pH. Παράδειγμα αυτού αποτελεί το διττανθρακικό νάτριο (NaHCO_3) κατά την διαδικασία της εξωσωματικής γονιμοποίησης και το ρυθμιστικό διάλυμα HEPES για την αποθήκευση και τον χειρισμό των σπερματοζωαρίων. Τώρα, σε περίπτωση διαδικασιών σε θερμοκρασία δωματίου, όπως συλλογή γαμετών, κρυοσυντήρηση, μικρογονιμοποίηση (ICSI) και εμβρυομεταφορά (ET) το εξωτερικό pH εκτός του επωαστήρα διατηρείται συμπεριλαμβάνοντας ένα άλλο ρυθμιστικό pH μαζί με το χειρισμό μέσων τα οποία περιέχουν χαμηλότερα επίπεδα διττανθρακικών [46].

Τέλος, η αυξανόμενη παραγωγή τόσο των ελεύθερων ριζών οξυγόνου (ROS) όσο και του μονοξειδίου του αζώτου (NO) στα κύτταρα μπορεί να προσδιοριστεί από αλλαγές στη βαθμίδα του pH στα μιτοχόνδρια. Έτσι, το pH μπορεί να θεωρηθεί ως ένας πιθανός διεγέρτης του οξειδωτικού στρες [45].

Από την άλλη, στα εργαστήρια ART, η θερμοκρασία των επωαστών CO_2 έχει παραδοσιακά προσαρμοστεί στους 37°C για να μιμείται τις συνθήκες in vivo. Δεδομένου, λοιπόν ότι η θερμοκρασία των επωαστών και των πλακών θέρμανσης δεν είναι σχεδόν ποτέ αντανάκλαση της θερμοκρασίας των μέσων, οι θερμοκρασίες θα πρέπει να μετρώνται απευθείας στο μέσο καλλιέργειας εμβρύου κατά την διάρκεια μιας διαδικασίας παρόμοιας με την ART. Οι έλεγχοι αυτοί θα πρέπει να είναι τακτικοί προκειμένου να αποφύγουμε τυχόν αλλοιώσεις στην καλλιέργεια [45]. Η θερμοκρασία λοιπόν του επωαστήρα θα πρέπει να διατηρείται συνεχώς στη θερμοκρασία του ανθρώπινου σώματος, καθώς οι αυξανόμενες θερμοκρασίες φαίνεται να μειώνουν τα επίπεδα pH και pK_a , να διαταράσσουν τις ενδοκυτταρικές διεργασίες και μπορεί να προκαλέσουν περαιτέρω κυτταρική βλάβη η οποία προκαλείται από τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (ROS) [46].

Παρά τις διάφορες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν, οι οποίες σύγκριναν καλλιέργειες που αναπτύχθηκαν στους 37°C σε σχέση με καλλιέργειες που αναπτύχθηκαν σε θερμοκρασία των 36°C , δεν βρέθηκαν να υπάρχουν τουλάχιστον επί του παρόντος στοιχεία τα οποία να αποδεικνύουν ότι η επώαση σε μια φυσιολογική θερμοκρασία έναντι μιας ψυχρότερης βελτιώνει τα αποτελέσματα εγκυμοσύνης. Ωστόσο, τα έμβρυα έχει αποδειχθεί πως μπορούν να ανεχθούν τις χαμηλότερες θερμοκρασίες καλύτερα σε σχέση με τις πιο υψηλές, με αποτέλεσμα να υπάρχουν καλύτερα ποσοστά εγκυμοσύνης όταν το περιβάλλον του επωαστήρα είναι κάτω των 37°C . Ενώ αντιθέτως θερμοκρασίες που ξεπερνάνε τους 37°C φαίνεται να είναι ικανές να προκαλέσουν θερμικό στρες στα έμβρυα με απόρροια την ραγδαία αύξηση των επιπέδων ROS [45].

Προκειμένου, λοιπόν να σταθεροποιηθεί η θερμοκρασία κατά τον χειρισμό, είναι σημαντικό να ληφθεί υπόψη πως οι χειρισμοί και οι περιβαλλοντικές συνθήκες μπορούν να επηρεάσουν σημαντικά την απώλεια θερμότητας των μέσων καλλιέργειας. Η ψύξη των ωαρίων από την άλλη, στους 25°C φαίνεται πως είναι ικανή να διαταράξει προσωρινά τους μικροσωλινίσκους και τα κέντρα οργάνωσης των μικροσωλινίσκων και κατεπέκταση να μετατοπίσει τα χρωμοσώματα. Αν και η ανάπτυξη στο στάδιο της βλαστοκύστης αυτών των γονιμοποιημένων ωοκυττάρων παραμένει παρόμοια με τους μη ψυχόμενους ελέγχους. Παρόμοια αποτελέσματα παρουσιάστηκαν και στην έκθεση και των δύο ανθρώπινων ωαρίων σε θερμοκρασία δωματίου κατά την διάρκεια διαδικασιών υαλοποίησης και απόψυξης, αναφέροντας κλινικά αποτελέσματα που ήταν συγκρίσιμα με αυτά των μη ψυχθέντων κυττάρων. Απόρροια όλων αυτών είναι το γεγονός πως πολλές αλλαγές που προκαλούνται από την έκθεση των ωαρίων σε χαμηλές θερμοκρασίες είναι αναστρέψιμες σε πολλά αλλά όχι σε όλα τα ωοκύτταρα κατά την αποκατάστασή τους στους 37°C για 1 ώρα. Οι μεγάλες αλλά μικρές αλλαγές στη θερμοκρασία ή στην συγκέντρωση του CO_2 κατά την επώαση του εμβρύου επηρεάζουν έντονα το pH του μέσου καλλιέργειας, επηρεάζοντας έτσι αρνητικά την ανάπτυξη του εμβρύου και τα κλινικά αποτελέσματα λόγω του αυξημένου οξειδωτικού στρες [45].

ΥΓΡΑΣΙΑ

Σημαντική επιρροή τώρα στην ανάπτυξη των εμβρύων έχει και η ύγρανση των επωαστών, η οποία μπορεί να επηρεάσει σημαντικά την ωσμωτικότητα της καλλιέργειας των εμβρύων, η οποία θεωρείται καθοριστικής σημασίας για την επιτυχία της ART. Όπως είναι αποδεδειγμένο γνωρίζουμε πως τα υπερτονικά μέσα μπορούν να επηρεάσουν σε μεγάλο βαθμό την ανάπτυξη του εμβρύου καθώς επίσης και τα κλινικά αποτελέσματα. Αυτές οι επιβλαβείς επιδράσεις, μάλιστα πιστεύεται πως συμβαίνουν μέσω της ενεργοποίησης πολλών μηχανισμών όπως είναι η εμφάνιση του οξειδωτικού στρες, η κυτταρική συρρίκνωση, η μιτοχονδριακή ή DNA βλάβη, η διακοπή του κυτταρικού κύκλου και η απόπτωση. Σύμφωνα, τώρα με όλα αυτά πρόσφατη μελέτη η οποία σύγκρινε τα αποτελέσματα της ανθρώπινης ART σε συνθήκες υγρής καλλιέργειας και συγκεκριμένα στα 285-290 mOsm με ξηρές καλλιέργειες στους 308 mOsm, αναφέρει πως τα ποσοστά αποβολών είναι αρκετά υψηλότερα στην πρώτη περίπτωση σε σχέση με τα δείγματα της ξηρής καλλιέργειας. Ωστόσο μέσα από την τελευταία συστηματική ανασκόπηση του Cochrane δεν επαλήθευσε τίποτα από τα παραπάνω, μόνο το γεγονός πως η καλλιέργεια σε ξηρό περιβάλλον μπορεί να έχει επιζήμιες επιπτώσεις στην ανάπτυξη του εμβρύου και αυτό κυρίως λόγω των αυξημένων επιπέδων του οξειδωτικού στρες, που παράγεται μέσα από αυτήν την διαδικασία[45].

ΠΟΛΙΤΙΣΤΙΚΑ ΜΕΣΑ

Τα μέσα καλλιέργειας της εξωσωματικής γονιμοποίησης έχουν εξελιχθεί από έναν ειδικό για το στάδιο μέσο σε ένα στάδιο μέσο για να ικανοποιούν τις ανάγκες του εμβρύου προσομοιώνοντας τη μεταφορά του στον ωαγωγό, καθώς επίσης η ανανέωση του μέσου καλλιέργειας εμβρύου μειώνει την περίσσεια αμμωνίας[45]. Η σύνθεση των μέσων που χρησιμοποιούνται κατά την καλλιέργεια ανθρώπινων ωοκυττάρων και εμβρύων πριν από την διαδικασία της εμφύτευσης έχει άμεση επίδραση στην ποιότητα των εμβρύων και κατεπέκταση και στα ποσοστά επιτυχίας της ART. Περαιτέρω, η παρουσία μεταλλικών ιόντων στα μέσα καλλιέργειας όπως ο σίδηρος Fe^{2+} και ο χαλκός Cu^{2+} θα μπορούσε να προκαλέσει αντιδράσεις που δημιουργούν ROS εντός των κυττάρων, καθώς επίσης αξιοσημείωτο είναι και το γεγονός πως ο ρυθμός σχηματισμού των ROS ποικίλοι ανάλογα με τη σύνθεση των μέσων καλλιέργειας. Από την άλλη, η προσθήκη μεταλλικών χηλικών παραγόντων όπως η EDTA μπορεί να μειώσει σημαντικά τον σχηματισμό των ROS. Αν και πρόσθετα συμπληρώματα όπως είναι η λευκωματίνη μπορεί να προκαλέσουν συσσώρευση του φορτίου οξυγόνου. Η συμπλήρωση, τώρα των μέσων καλλιέργειας με αντιοξειδωτικά όπως είναι η βιταμίνη C & E μπορούν να συμβάλλουν στην ανακούφιση των δυσμενών επιπτώσεων των ελεύθερων ριζών οξυγόνου(ROS) στους γαμέτες[46]. Τέλος τα οφέλη της καλλιέργειας ενός εμβρύου έναντι της διαδοχικής καλλιέργειας μέσου περιλαμβάνουν τη μείωση των πιθανοτήτων εμβρυικής απώλειας, μόλυνσης και σφαλμάτων χειρισμού καθώς επίσης την εμφάνιση μικρότερου στρες και μειωμένες αλλαγές θερμοκρασίας και pH, χωρίς διαφορά στην μορφοκινητική και ανάπτυξη του εμβρύου[45].

ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΗΣΗ

Στην τεχνητή υποβοηθούμενη αναπαραγωγή(ART), η φυγοκέντρωση είναι ένα βήμα ρουτίνας που χρησιμοποιείται σε τεχνικές παρασκευής σπερματοζωαρίων για την απομάκρυνση του σπερματικού πλάσματος, το οποίο είναι μια πιθανή πηγή ROS. Ωστόσο, η ίδια η διαδικασία φυγοκέντρωσης συμβάλλει στα επίπεδα ROS, μέσω της διάρκειας του χρόνου, η οποία έχει σημαντική επιρροή στον σχηματισμό επαγωγής-ROS σε σύγκριση με την δύναμη g που εφαρμόζεται. Παρά την ποιότητα την οποία έχουν τα σπερματοζωάρια στην αρχή της φυγοκέντρωσης, η μεγαλύτερη διάρκεια της διαδικασίας αυτής φαίνεται να εκθέτει σημαντικά τα σπερματοζωάρια σε υψηλότερες θερμοκρασίες με αποτέλεσμα να προκαλείται μεγαλύτερη βλάβη στις παραμέτρους του σπέρματος. Έτσι, έχει αναφερθεί πως κατά την διάρκεια των πρωτοκόλλων παρασκευής των σπερματοζωαρίων, η προσθήκη αντιοξειδωτικών όπως η πεντοξυφυλλίνη,

πριν από το βήμα της φυγοκέντρωσης, είναι ικανή να μειώσει την παραγωγή ROS που προκαλείται τόσο από τη διαδικασία της φυγοκέντρωσης όσο και από τη βλάβη στα επεξεργασμένα σπερματοζώαρια[46].

5.2. ΤΕΧΙΚΗ ART & ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗ

Σε μια ρύθμιση ART οι γαμέτες υφίστανται in vitro χειρισμό, ο οποίος αποδεδειγμένα φαίνεται να αποτελεί μια πιθανή πηγή ROS εκθέτοντας τους γαμέτες σε οξειδωτικό στρες. Αυτό βέβαια, ισχύει ιδιαίτερος για τα σπερματοζώαρια τα οποία έχουν περιορισμένη ποσότητα ενδοκυτταρικών AOX. Πιο συγκεκριμένα κατά την διαδικασία προετοιμασίας του σπέρματος για ART, τα δείγματα σπέρματος είναι γνωστό πως πλένονται και το σπερματικό πλάσμα αφαιρείται. Ως γνωστόν το σπερματικό πλάσμα παρέχει φυσιολογικά προστασία AOX, καθώς περιέχει ένα ευρύ φάσμα τόσο ενζυματικής(SOD, καταλάση, GPx) όσο και μη ενζυματικής(βιταμίνη C&E, γλουταθειόνη κ.λπ.) ενώσεις με αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Επίσης κατά το στάδιο της κολύμβησης το σπέρμα μπορεί να έρθει σε στενή επαφή με λευκοκύτταρα και ανώριμα γεννητικά κύτταρα πριν μεταναστεύσουν στην επιφάνεια, όπου σε αυτή την περίπτωση και τα δυο αντιπροσωπεύουν κύριες πηγές ROS. Επίσης όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω η διαδικασία φυγοκέντρωσης του σπέρματος οδηγούν περεταίρω σε αυξημένη παραγωγή ROS, με την αύξηση του χρονικού διαστήματος της φυγοκέντρωσης να σχετίζεται με υψηλότερες ποσότητες παραγωγής ROS και πρόκληση βλάβης στο σπέρμα[45].

Έχει παρατηρηθεί πως μια διαδικασία εξωσωματικής γονιμοποίησης περιλαμβάνει μεγάλο χρόνο επώασης των σπερματοζωαρίων, του ωοκυττάρου και των κυττάρων του συσσωρευμένου όγκου στο μέσο γονιμοποίησης. Από την άλλη η μικρογονιμοποίηση(ICSI) διαθέτει μικρότερη περίοδο επώασης που περιλαμβάνει μόνο ένα σπερματοζώαριο και αντίστοιχα ωάριο που έχει αφαιρεθεί από τα κύτταρα συσώρευσης. Ως απόρροια αυτού, η μικρογονιμοποίηση(ICSI), ενέχει χαμηλότερο κίνδυνο παραγωγής ελεύθερων ριζών οξυγόνου(ROS) κατά την γονιμοποίηση σε σχέση με την εξωσωματική(IVF). Βέβαια, η ICSI διαθέτει μεγαλύτερο κίνδυνο έκθεσης του DNA του ωαρίου σε βλάβη που προκαλείται από ROS, καθώς υπάρχει κίνδυνος μεταφοράς μικρής ποσότητας μέσου καλλιέργειας που περιέχει ROS μαζί με το σπερματοζώαριο στο ωάριο προκειμένου να γίνει η γονιμοποίηση. Παρά επομένως, το γεγονός ότι το επιλεγμένο σπερματοζώαριο έχει μορφολογικά φυσιολογική εμφάνιση, μπορεί να ενέχει μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης τυχόν βλάβης στο DNA καθώς η φυσιολογική επιλογή σπερματοζωαρίων παρακάμπτεται κατά την διενέργεια της μικρογονιμοποίησης(ICSI) και πιο συγκεκριμένα η μικρογονιμοποίηση αποτελεί τεχνική διαλογής όταν η ποιότητα των σπερματοζωαρίων είναι κακή[46].

ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗ(ΚΑΤΑΨΥΞΗ/ΑΠΟΨΥΞΗ)

Η κρυοσυντήρηση περιλαμβάνει την διαδικασία διατήρησης γαμετών/ εμβρύων αλλά και ολόκληρων ωοθηκικών ιστών ή ιστών όρχεων μέσω της ψύξης αυτών σε θερμοκρασίες κάτω του μηδενός. Ύστερα από την διαδικασία της κρυοσυντήρησης ακολουθεί η απόψυξη προκειμένου τα ανάλογα δείγματα να χρησιμοποιηθούν στην ανάλογη θεραπεία τεχνητής υποβοηθούμενης αναπαραγωγής(ART)[46]. Σύμφωνα

λοιπόν, με τα νεότερα δεδομένα η χρήση κατεψυγμένων εμβρύων σε προγράμματα ART έχει αυξηθεί σημαντικά σε σχέση με παλαιότερα δεδομένα. Απόρροια αυτού, αποτελεί η ανάπτυξη της μεθόδου υαλοποίησης, η υιοθέτηση της στρατηγικής freeze-all καθώς επίσης και η δυνατότητα απόκτησης πλεονάσματος εμβρύων αλλά και αποφυγής του συνδρόμου υπερδιέγερσης των ωοθηκών[45].

Πριν από την ανάπτυξη της τεχνικής της υαλοποίησης, η αργή κατάψυξη γαμετών/ εμβρύων ή και ιστών αποτελούσε μια από τις πιο ευρέως διαδεδομένες χρησιμοποιούμενες μεθόδους στην ART. Ωστόσο, εν τέλει έρευνες τεκμηρίωσαν το γεγονός πως μέσω της αργής κατάψυξης αυξάνεται ο σχηματισμός ενδοκυτταρικών αλλά και εξωκυτταρικών κρυστάλλων πάγου στις καλλιέργειες αλλά και αυξημένο λειτουργικό σύστημα. Αντιστοίχως, μέσω της διαδικασίας της κρυοσυντήρησης προκύπτουν διάφορες συνθήκες οι οποίες φαίνεται να αυξάνουν το ποσοστό εμφάνισης οξειδωτικού στρες. Οι συνθήκες αυτές αποτελούνται από την αραίωση δειγμάτων σπέρματος(και σπερματικού υγρού), έκθεση σε τοξικά κρυοπροστατευτικά και pH καθώς και οσμωτικές αλλαγές που προκαλούνται από ψύξη σε κρυογονικές θερμοκρασίες και επαναθέρμανση για απόψυξη[45].

Πιο συγκεκριμένα μελέτες πάνω σε ανθρώπινους γαμέτες καθώς και σε ποντίκια αλλά και ανθρώπινα έμβρυα έδειξε πως κατά την διάρκεια της διαδικασίας της κρυοσυντήρησης η παραγωγή των ελεύθερων ριζών οξυγόνου(ROS) είναι σημαντικά αυξημένη. Ενώ αντιθέτως ο σχηματισμός κρυστάλλων πάγου είναι χαμηλότερος όταν εκτελείται υαλοποίηση, με χαμηλότερο οσμωτικό σοκ λόγω εξαιρετικά γρήγορης κατάψυξης. Ως συνέπεια αυτού η υαλοποίηση έχει συσχετιστεί με υψηλότερη επιβίωση ωαρίων και εμβρύων καθώς επίσης και με βελτιωμένο μεταβολισμό και ρυθμού σχηματισμού βλαστοκύστης σε σύγκριση με την διαδικασία της αργής κατάψυξης[45].

Τελικά, αν και η χρήση κρυοπροστατευτικών και βελτιστοποιημένων πρωτοκόλλων φαίνεται να ενισχύουν την βιωσιμότητα των κυττάρων, η διαδικασία κατάψυξης-απόψυξης είναι ένας ακραίος στρεσογόνος παράγοντας που μπορεί να τροποποιήσει την δομή και την ακεραιότητα του κυττάρου όπως για παράδειγμα την πλασματική μεμβράνη των σπερματοζωαρίων. Επομένως, κατά την διάρκεια της κρυοσυντήρησης, οι διαδικασίες κατάψυξης-απόψυξης φαίνεται να αυξάνουν την οξειδωτική βλάβη καθώς και τα επίπεδα κατακερματισμού του DNA, με αποτέλεσμα τα σπερματοζωάρια μετά την απόψυξη να έχουν φτωχότερη κινητικότητα και βιωσιμότητα, με αποτέλεσμα τα σπερματοζωάρια μετά την απόψυξη να έχουν φτωχότερη κινητικότητα αλλά και βιωσιμότητα[46].

Είναι γνωστό, πως τα αντιοξειδωτικά προστατεύουν τα σπερματοζωάρια από τις επιπτώσεις που έχει η διαδικασία της κρυοσυντήρησης-απόψυξης. Παράδειγμα αυτού αποτελεί η συμπλήρωση του μέσου κρυοσυντήρησης με κερκετίνη και καταλάση, μια διαδικασία η οποία φάνηκε να προστατεύει τα σπερματοζωάρια από τυχόν βλάβες που προκαλούνται από το οξειδωτικό στρες κατά την διαδικασία κατάψυξης-απόψυξης, και να βελτίωσε την κινητικότητα, την βιωσιμότητα αλλά και την ακεραιότητα του DNA των σπερματοζωαρίων. Επιπρόσθετα η προσθήκη βιταμίνης E και πεντοξυφυλλίνης αντίστοιχα στο μέσο κρυοσυντήρησης/ πριν από την κρυοσυντήρηση βελτίωσε σημαντικά την κινητικότητα μετά την απόψυξη. Η ποιότητα τώρα των σπερματοζωαρίων μετά την απόψυξη επηρεάζεται επίσης από την τεχνική κρυοσυντήρησης και τον τύπο του κρυοπροστατευτικού που χρησιμοποιείται. Παρόλα αυτά η χρήση νεότερων τεχνικών κρυοσυντήρησης όπως αναφέραμε παραπάνω έχει προσφέρει πολύ καλά ποιοτικός υαλοποιημένα ωάρια που μάλιστα θεωρούνται τόσο βιώσιμα όσο τα φρέσκα ωάρια, όσον αφορά το ποσοστό εμφύτευσης καθώς και το ποσοστό επιβίωσης του εμβρύου με σκοπό την επίτευξη εγκυμοσύνης[45].

5.3. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΗ ΧΡΗΣΗ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ ΟΞΕΙΔΩΑΝΑΓΩΓΗΣ ΣΤΗΝ ΑΝΔΡΙΚΗ ΥΠΟΔΟΝΙΜΟΤΗΤΑ

Η ανάλυση των παραμέτρων του σπέρματος σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (Π.Ο.Υ.) αντιπροσωπεύει επί του παρόντος, το χρυσό πρότυπο για την διάγνωση της ανδρικής υπογονιμότητας. Αρκετές μελέτες όπως έχουμε αναφέρει έχουν δείξει ότι η επαγόμενη οξειδωση από τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (ROS) του σπέρματος μπορεί να οδηγήσει σε αλλοιώσεις του σπέρματος με επακόλουθο την μείωση του δυναμικού γονιμοποίησης του σπέρματος. Μέσα από τις δοκιμές για την ανίχνευση του οξειδωτικού στρες μπορεί να προκύψουν νέες βιοχημικές προσεγγίσεις για τη βελτίωση της διάγνωσης και διαχείρισης της ανδρικής υπογονιμότητας, χρησιμοποιώντας απλές, γρήγορες και λιγότερο δαπανηρές τεχνικές[39].

Το οξειδωτικό στρες έχει αποδειχθεί πως μπορεί να αξιολογηθεί σε διαφορετικά βιολογικά δείγματα όπως είναι στο πλάσμα, τον ορό, τα ούρα, το ωοθυλακικό/ περιτοναϊκό και σπερματικό υγρό, αποκτώντας μια ακριβή εικόνα της κατάστασης οξειδοαναγωγής και τελικά προγραμματίζοντας ένα θεραπευτικό συμπλήρωμα με αντιοξειδωτικά όπου χρειάζεται. Υπάρχουν διάφορες δοκιμασίες οξειδωτικού στρες οι οποίες εστιάζουν στην ανίχνευση των ROS, των προϊόντων υπεροξειδωσης των λιπιδίων και στην συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα. Η μέτρηση ROS λοιπόν, στο σπέρμα περιλαμβάνει διάφορες μεθόδους όπως την χρήση χημειοφωταυγείας, τεστ νιτροκυανού τετραζολίου (NBT), δοκιμή μείωσης του κυτοχρώματος c και συντονισμό των ηλεκτρονίων[39].

Επίσης, αρκετές έρευνες προτείνουν και την χρήση της κυτταρομετρίας ως μέσο αξιολόγησης της ενδοκυτταρικής παραγωγής ROS στα σπερματοζωάρια, καθώς και σε άλλες κυτταρικές κατηγορίες επιάζοντας τα κύτταρα με τον φθορίζοντα ανιχνευτή H2DCF-DA. Μάλιστα, ο συγκεκριμένος ανιχνευτής θεωρείται μια από τις πιο βασικές μεθόδους μέτρησης των ενδοκυτταρικών επιπέδων ROS, την ανίχνευση των διακυμάνσεων της οξειδωαναγωγικής και του κυτταρικού οξειδωτικού στρες[39].

Άλλη πιθανή μέθοδος μέτρησης και αξιολόγησης των επιπέδων οξειδωσης των λιπιδίων της μεμβράνης των σπερματοζωαρίων αποτελεί και η κυτταροφθορισμετρική ανάλυση, μέθοδος όπου χρησιμοποιείται ένας ανιχνευτή φθορισμού (BODIPY 581/591 C11). Επιπρόσθετα, η αξιολόγηση του οξειδωτικού στρες μπορεί να πραγματοποιηθεί και μέσω της αξιολόγησης των επιπέδων LPO (υπεροξειδωσης λιπιδίων) και του TAC (ολική αντιοξειδωτική ικανότητα πλάσματος) στα βιολογικά υγρά. Πιο συγκεκριμένα τα επίπεδα της LPO μπορούν να ανιχνευθούν μετρώντας τα τελικά προϊόντα της οξειδωσης των λιπιδίων όπως η MDA (μαλονδιαλδεΐδη), 4HNE (4-υδροξυνονεάλη) και ισοπροστανές μέσω φασματοφθορισμετρικές ή ανοσοχημικές δοκιμασίες. Η δοκιμασία θειοβαρβιτουρικού οξέος(TBA) ή η δοκιμασία ALDETECT θεωρούνται οι πιο χρησιμοποιούμενες εξετάσεις για την αξιολόγηση της υπεροξειδωσης των λιπιδίων[39].

Παράλληλα, το επίπεδο TAC (ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας πλάσματος) μπορεί να μετρηθεί χρησιμοποιώντας τεχνικές ενισχυμένης χημειοφωταυγείας ή χρωματομετρίας. Μεταξύ των μεθόδων χημειοφωταυγείας, ο προσδιορισμός ικανότητας απορρόφησης ριζών οξυγόνου (ORAC) βασίζεται στην ένταση της διάσπασης φθορισμού ενός ανιχνευτή φθορισμού, της φλουορεσκεΐνης, ως αποτέλεσμα της οξείδωσής του από τα είδη των ελεύθερων ριζών. Με βάση λοιπόν, τις μεταβολές των οξειδοαναγωγικών βιοδεικτών σε υπογόνιμους άνδρες αρκετές μελέτες τόνισαν την σημασία της επεξεργασίας μιας συγκεκριμένης παραμέτρου/δείκτη ικανού να διακρίνει τους γόνιμους από τους υπογόνιμους άνδρες με μεγαλύτερη ακρίβεια σε σχέση με την χρήση της μεθόδου των ROS ή του TAC μεμονωμένα. Ειδικότερα, η βαθμολογία του ROS-TAC, που προέρχεται τόσο από τα επίπεδα ROS όσο και από την αντιοξειδωτική ικανότητα σε ένα δεδομένο σύνολο ασθενών, προτάθηκε ως νέο εργαλείο για τη διερεύνηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης στην ανδρική υπογονιμότητα. Συγκεκριμένα, οι υπογόνιμοι άνδρες με ανδρικό ή ιδιοπαθείς διαγνώσεις είχαν σημαντικά διαφορετικά επίπεδα ROS-TAC σε σχέση με τους ελέγχους. Ειδικότερα, η συγκεκριμένη μέθοδος προτάθηκε για την πρόβλεψη της οξειδωτικής βλάβης των δειγμάτων σπέρματος σε ασθενοζωοσπερμικούς άνδρες[39].

Ωστόσο, νέα δεδομένα φέρνουν στην επιφάνεια μια νέα γρήγορη και εξαιρετικά παραγωγική μέθοδος τη μέτρηση δυναμικού μείωσης της οξειδωσης (ORP), μια μέθοδος η οποία μας δίνει την δυνατότητα να αξιολογήσουμε την παρουσία του οξειδωτικού στρες στο σπερματικό υγρό. Το ORP υπογραμμίζει την αναλογία μεταξύ των οξειδωτικών και των αντιοξειδωτικών μορίων, αξιολογώντας τη δυνατότητα των ηλεκτρονίων να μετακινούνται από το ένα χημικό είδος στο άλλο. Η συγκεκριμένη μέθοδος αξιολογείται μέσω της δοκιμής MiOSYS, η οποία μετράει την μεταφορά των ηλεκτρονίων από τα αντιοξειδωτικά στα οξειδωτικά μέσα υπο την παρουσία ενός μειωτικού ρεύματος χαμηλής τάσεως. Τα αποτελέσματα που προκύπτουν στην συνέχεια αντιπροσωπεύουν την οξειδωτική και την αντιοξειδωτική δράση σε ένα δείγμα ιδιαίτερα, τα υψηλά επίπεδα ORP έχουν συσχετισθεί με την παρουσία οξειδωτικού στρες στα σπερματοζώαρια[39].

Πολλές έρευνες αναφέρουν μια καλή συσχέτιση μεταξύ του επιπέδου ORP και των παραμέτρων του σπέρματος, καθώς έχει βρεθεί πως σε υπογόνιμους άνδρες τα επίπεδα ORP είναι υψηλότερη σε σχέση με υγιείς ασθενείς. Επίσης, αρκετοί ερευνητές θέλουν την ORP (μέτρηση δυναμικού μείωσης της οξειδωσης) να αποτελεί καλό προγνωστικό παράγοντα για την διάγνωση και την διαχείριση της ανδρικής υπογονιμότητας, ένα γεγονός που επιβεβαιώνεται και μέσα από έρευνες η οποίες δείχνουν σημαντική συσχέτιση της ORP τόσο με τις παραμέτρους του σπέρματος(συγκέντρωση σπέρματος και συνολικός αριθμός κινητικότητας, κινητικότητα και μορφολογία) όσο και με τον κατακερματισμό του DNA σε υπογόνιμους άνδρες. Τέλος είναι σημαντικό να προσθέσουμε πως πολλοί ερευνητές θεωρούν την μέθοδο ORP ένα από τα πιο ακριβές εργαλείο για την διερεύνηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης στην ανδρική υπογονιμότητα μέσω της αξιολόγησης ROS υπο χημειοφωταυγείας[39].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6^ο
ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ

6. ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ ΩΣ ΒΕΛΤΙΩΤΙΚΑ ΜΕΣΑ

Μέσα από πολυάριθμες μελέτες προκύπτει το γεγονός πως πολλοί επιστήμονες, ως πιθανή αντιμετώπιση του οξειδωτικού στρες και των παρακείμενων προβλημάτων που δημιουργεί, συνιστούν την χρήση των αντιοξειδωτικών, είτε πρόκειται για γυναικείο είτε για ανδρικό παράγοντα, καθώς επίσης και για την υποβοηθούμενη αναπαραγωγή. Γνωρίζουμε πως τα αντιοξειδωτικά εμποδίζουν τις δράσεις των ελεύθερων ριζών της οξείδωσης του υποστρώματος. Συγκεκριμένα, τα αντιοξειδωτικά ενδέχεται να συνιστώνται όταν η συγκεκριμένη αιτιολογία δεν μπορεί να προσδιοριστεί όπως συμβαίνει στην ιδιοπαθή υπογονιμότητα, καθώς δεν υπάρχει άλλη θεραπεία βασισμένη σε ακράδαντα στοιχεία και οι αναφορές υποδεικνύουν την παρουσία του οξειδωτικού στρες. Βασικό πλεονέκτημα της χρήσης των αντιοξειδωτικών είναι πως μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην ART, με σκοπό την επιτυχή αντιμετώπιση της υπογονιμότητας, χρησιμοποιώντας στρατηγικές για την υπέρβαση των συνθηκών οξειδωτικού στρες *in vitro* και την εξισορρόπηση μεταξύ *in vivo* και *in vitro* περιβάλλοντος[17].

Προκειμένου λοιπόν να διατηρηθούν τα φυσιολογικά επίπεδα ROS και να αποτραπεί η ανάπτυξη οξειδωτικού στρες, η περίσσεια ROS πρέπει να εξουδετερώνεται συνεχώς. Τα αντιοξειδωτικά είναι σε θέση να εξουδετερώνουν τα προοξειδωτικά είτε αποτρέποντας τον σχηματισμό τους μέσω του τερματισμού των πολλαπλασιαστικών οξειδωτικών αλυσιδωτών αντιδράσεων, είτε μέσω του καθαρισμού των ήδη υπάρχοντων ελεύθερων ριζών οξυγόνου (ROS), διατηρώντας με αυτόν τον τρόπο την ισορροπία μεταξύ των αντιοξειδωτικών και των προοξειδωτικών. Αποτέλεσμα αυτού επομένως, είναι η προστασία του κυττάρου και του μικροπεριβάλλοντός του από την οξειδωτική βλάβη. Παραδείγματα τέτοιων αντιοξειδωτικών συστημάτων αποτελούν ένζυμα όπως είναι η SOD, η καταλάση και η υπεροξειδάση γλουταθειόνης(GPx) καθώς και ένα σύμπλεγμα βιταμινών όπως είναι η βιταμίνη C, E & B , οι πολυφαινόλες, τα καροτεϊνοειδή και διάφορα ιχνοστοιχεία[46].

Τα συστατικά του ανθρώπινου αναπαραγωγικού συστήματος περιέχουν αντιοξειδωτικά που είτε σχηματίζονται ενδογενώς είτε μπορούν να προσληφθούν μέσω της διατροφής. Στον γυναικείο οργανισμό τα αντιοξειδωτικά ανευρίσκονται στις ωοθήκες, τα ωοθυλάκια, το ωοθυλακικό, το σαλπγγικό και το περιτοναϊκό υγρό καθώς και στο ενδομήτριο επιθήλιο. Ενώ στον ανδρικό οργανισμό τα αντιοξειδωτικά εντοπίζονται στους όρχεις, στην επιδιδυμίδα, τις εκκρίσεις των ανδρικών βοηθητικών οργάνων και το σπερματικό πλάσμα[46].

Οι θεραπευτικές στρατηγικές με χρήση αντιοξειδωτικών μπορούν να προσεγγιστούν με δύο γενικούς τρόπους, είτε ως από του στόματος συμπλήρωμα του υπογόνιμου ζευγαριού αρκετούς μήνες πριν από την έναρξη του κύκλου ART, είτε ως in vitro συμπλήρωση σε μέσα κατά την διάρκεια του κύκλου εξωσωματικής προκειμένου να ελαχιστοποιηθούν οι ενδογενείς και οι εξωγενείς πηγές ROS αντίστοιχα. Ο ρόλος των αντιοξειδωτικών στην υποβοηθούμενη αναπαραγωγή είναι πράγματι πολύ σημαντικός. Για παράδειγμα, σε υπογόνιμους άνδρες που υποβάλλονται σε εξωσωματική γονιμοποίηση (IVF) και μικρογονιμοποίηση (ICSI) τα υψηλά επίπεδα σπερματικών ROS φάνηκε να σχετίζονται αρνητικά με τη γονιμότητα και να επηρεάζουν σημαντικά τόσο την μορφολογία και την ζωτικότητα των σπερματοζωαρίων, όσο και τα ποσοστά γονιμοποίησης. Αντιθέτως, τα επίπεδα των αντιοξειδωτικών στο σπέρμα έδειξαν να έχουν θετική συσχέτιση με τα ποσοστά γονιμοποίησης, καθώς γνωρίζουμε πως τα σπερματικά αντιοξειδωτικά ενισχύουν την ποιότητα των σπερματοζωαρίων με επακόλουθο την αύξηση των ποσοστών επιτυχίας της ART[46].

Επομένως, όπως μπορούμε να διακρίνουμε μέσα από την μελέτη πολυάριθμων άρθρων προκύπτει το γεγονός πως μια πιθανή θεραπεία της υπογονιμότητας που προκύπτει από το οξειδωτικό στρες είναι η χρήση αντιοξειδωτικών συμπληρωμάτων. Ωστόσο πρόκειται για μια μέθοδο που χρήζει περαιτέρω διερεύνηση καθώς τα αποτελέσματα δεν είναι εκατό τις εκατό ακλόνητα και υπάρχουν διαφορούμενες απόψεις από πολλούς ερευνητές σχετικά με το θέμα αυτό.

6.1. ΠΙΘΑΝΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΡΟΛΗΨΗ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΩΝ ΠΑΘΗΣΕΩΝ ΤΟΥ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ

Είναι ευρέως διαδεδομένο πως τα αντιοξειδωτικά συμβάλλουν στην αντιμετώπιση των δυσμενών και παθολογικών αποτελεσμάτων του οξειδωτικού στρες. Το οξειδωτικό στρες, όπως έχουμε ήδη αναφέρει, μπορεί να οδηγήσει σε ωχρινική παλινδρόμηση, με αποτέλεσμα την έλλειψη ωχρινικής υποστήριξης της εγκυμοσύνης. Επίσης μπορεί να βλάψει τόσο τα ωάρια στα αναπτυσσόμενα ωοθυλάκια καθώς και τα σπερματοζωάρια στην περιτοναϊκή κοιλότητα, όσο και το ίδιο το έμβρυο και όλα αυτά κυρίως μέσα από την ανισορροπία των αντιοξειδωτικών στον οργανισμό. Όλα αυτά λοιπόν, αποτέλεσαν έναυσμα για την διερεύνηση των αντιοξειδωτικών και τον ρόλο τους στην θεραπεία του οξειδωτικού στρες καθώς και της παρακείμενης υπογονιμότητας[17].

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία υπάρχουν μελέτες που χρησιμοποίησαν συμπληρώματα διατροφής και αντιοξειδωτικά, όπως είναι τα συμπληρώματα βιταμίνης C, για την προστασία της γυναικείας γονιμότητας από την υπέρμετρη παραγωγή ROS. Ωστόσο, προς το παρόν υπάρχει έλλειψη συναίνεσης σχετικά με τον τύπο και την δόση των αντιοξειδωτικών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν[17].

Πολλά κλινικά και ερευνητικά κέντρα διερευνούν την χρησιμότητα των αντιοξειδωτικών συμπληρωμάτων και τον ρόλο τους στην γυναικεία αναπαραγωγή, καθώς το οξειδωτικό στρες έχει ως αποτέλεσμα να επηρεάζει σημαντικά αυτόν τον τομέα. Συγκεκριμένα, η χορήγηση αντιοξειδωτικών συμπληρωμάτων όπως είναι η βιταμίνη C&E έχει αποδειχθεί πως έχει ευεργετικά αποτελέσματα στην πρόληψη της ανεπάρκειας της ωχρινικής φάσης και την επακόλουθη αύξηση του ποσοστού εγκυμοσύνης[18]. Μάλιστα, πρόσφατη τυχαίοποιημένη μελέτη, εξέτασε την επίδραση των συμπληρωμάτων βιταμίνης C και συγκεκριμένα η χορήγηση 750mg/ημέρα σε ασθενείς με δυσλειτουργία στην ωχρινική φάση απέδειξε πως τα ποσοστά εγκυμοσύνης ήταν υψηλότερα στην ομάδα θεραπείας απ' ότι στους ελέγχους. Ομοίως, οι συγκεντρώσεις των αντιοξειδωτικών βρέθηκαν να είναι σημαντικά χαμηλότερες σε γυναίκες με ιστορικό επαναλαμβανόμενων αποβολών και δυσλειτουργία ωχρινικής φάσης σε σχέση με υγιείς γυναίκες[17]. Ωστόσο η διάρκεια και η δόση των αντιοξειδωτικών που χρησιμοποιούνται στην γυναικεία υπογονιμότητα είναι ακόμα υπο διερεύνηση[29].

Η συστηματική χορήγηση συμπληρωμάτων με βιταμίνη C έχει χρησιμοποιηθεί, όπως αναφέρθηκε, σε ασθενείς υπογόνιμες που αντιμετωπίζουν κάποια δυσλειτουργία στην ωχρινική φάση του κύκλου ή έχουν ιστορικό επαναλαμβανόμενων αποβολών με αποτέλεσμα να προκύπτει τα γεγονόσ πως η βιταμίνη C μπορεί να έχει καίριο ρόλο στην γονιμοποίηση. Σε μια άλλη μελέτη στην οποία συμμετείχαν 65 γυναίκες οι οποίες υποβλήθηκαν σε εξωσωματική γονιμοποίηση και εμβρυομεταφορά, οι ερευνητές απέδειξαν πως οι συγκεντρώσεις του ασκορβικού οξέος (βιταμίνη C) ήταν υψηλότερες στα ώριμα ωοθυλάκια των ωοθηκών απ' ότι στον ορό, γεγονός που υποδηλώνει την ενεργή πρόσληψη της βιταμίνης C από το ωοθυλάκιο με αποτέλεσμα την δέσμευση της βιταμίνης C και την εμφάνιση υψηλότερων συγκεντρώσεων της στο ωοθυλακικό υγρό. Μάλιστα, αναφέρθηκε πως τα ποσοστά εγκυμοσύνης ήταν υψηλότερα στην ομάδα γυναικών που λάμβανε το συμπλήρωμα και ιδίως των γυναικών που δεν κάπνιζαν σε σχέση με τις υπόλοιπες[29]. Ωστόσο, μια άλλη μελέτη που εξέτασε την βραχυπρόθεσμη συμπληρωματική χορήγηση υψηλών δόσεων βιταμίνης C κατά την διάρκεια της ωχρινικής φάσης στην εξωσωματική γονιμοποίηση ανέδειξε πως δεν υπήρξε καμία βελτίωση στο ποσοστό επίτευξης εγκυμοσύνης και επομένως δεν υπήρξε καμία σύνδεση μεταξύ της βιταμίνης C και της καταπολέμησης του οξειδωτικού στρες στην υπογονιμότητα. Γεγονός που αποδεικνύει πως όχι μόνο δεν υπάρχουν πολυάριθμες μελέτες σχετικά με την θεραπεία του οξειδωτικού στρες στην γυναικεία αναπαραγωγή αλλά και οι μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί είναι διαφορούμενες και απαιτούν περαιτέρω διερεύνηση[17].

6.2.ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΗΣ ΑΝΔΡΙΚΗΣ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑΣ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΕΤΑΙ ΜΕ ΤΟ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ

ΣΤΡΕΣ

Μέχρι και σήμερα και με βάση τα βιβλιογραφικά δεδομένα εξακολουθούν να λείπουν συγκεκριμένες οδηγίες για την θεραπεία της ανδρικής υπογονιμότητας που σχετίζεται με το οξειδωτικό στρες. Ωστόσο μέσα σε αυτά τα χρόνια, πραγματοποιήθηκαν πολλές μελέτες σχετικά με την διερεύνηση των επιδράσεων των αντιοξειδωτικών συμπληρωμάτων όπως είναι η L-καρνιτίνη, το σελήνιο, το συνένζυμο Q10, η ουβικινόλη και η βιταμίνες C&E στο οξειδωτικό στρες του σπερματικού υγρού και στις παραμέτρους του σπέρματος. Μάλιστα πολλοί από τους ερευνητές ανέφεραν πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα των αντιοξειδωτικών στη συγκέντρωση σπέρματος, την κινητικότητα, την μορφολογία και τον κατακερματισμό του DNA. Μέσα από είκοσι κλινικές δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν αναλύθηκαν και μελετήθηκαν τα αποτελέσματα της αντιοξειδωτικής θεραπείας στο οξειδωτικό στρες του σπέρματος. Μέσα από αυτές προέκυψε πως μόνο οι δεκαεννιά από αυτές σημείωσαν βελτίωση στην οξειδοαναγωγική κατάσταση του σπέρματος και τις παραμέτρους του σπέρματος καθώς επίσης συσχετίστηκαν με καλή έκβαση της εγκυμοσύνης μετέπειτα[39].

Ωστόσο, παρόλες τις έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί ο ρόλος της αντιοξειδωτικής θεραπείας στην ανδρική υπογονιμότητα εξακολουθεί να είναι αμφιλεγόμενος. Μάλιστα μια τυχαίοποιημένη κλινική δοκιμή, έδειξε ότι παρά την 3μηνη αντιοξειδωτική θεραπεία σε υπογόνιμους άνδρες δεν φάνηκε να βελτιώνει τις παραμέτρους του σπέρματος και τον κατακερματισμό του DNA, καθώς επίσης δεν παρατηρήθηκε να υπάρχει κάποια ευεργετική επίδραση στην εγκυμοσύνη. Μέσα από αυτές τις παρατηρήσεις προκύπτει το γεγονός ότι τα στοιχεία που υποστηρίζουν τη χρήση αντιοξειδωτικών στην ανδρική υπογονιμότητα είναι ακόμα αβέβαια[39]. Παρακάτω θα αναλυθούν λίγα από τα πιο καίρια αντιοξειδωτικά συμπληρώματα στην ανδρική υπογονιμότητα.

Βιταμίνη E ως αντιοξειδωτικό συμπλήρωμα

Η βιταμίνη E είναι ένα φυσικά απαντώμενο λιποδιαλυτό αντιοξειδωτικό. Σύμφωνα με διάφορες τυχαίοποιημένες ελεγχόμενες δοκιμές (RCTs) προκύπτει πως η από του στόματος χορήγηση αντιοξειδωτικών συμπληρωμάτων βιταμίνης E μειώνει την βλάβη της υπεροξειδωσης των λιπιδίων, βελτιώνει την κινητικότητα και την λειτουργία των σπερματοζωαρίων καθώς επίσης φαίνεται να αυξάνει τα ποσοστά επίτευξης εγκυμοσύνης. Μάλιστα σε μια μικρή προοπτική μελέτη (n=15) αποδείχθηκε πως η από

του στόματος χορήγηση βιταμίνης E και συγκεκριμένα 200mg ημερησίως για 3 μήνες, αύξησε σημαντικά τον ρυθμό γονιμοποίησης των ωαρίων ανά κύκλο εξωσωματικής γονιμοποίησης σε γόνιμους, νορμοζωοσπερμικούς άνδρες που είχαν αρχικά χαμηλά ποσοστά γονιμοποίησης κατά την διάρκεια προηγούμενης προσπάθειας εξωσωματικής(IVF). Ύστερα, λοιπόν από αντιοξειδωτική θεραπεία με βιταμίνη E, αυτοί οι άνδρες παρουσίασαν επίσης χαμηλότερα επίπεδα υπεροξειδωσης λιπιδίων στα σπερματοζωάρια τους. Τώρα όσον αφορά την in vitro επίδραση της βιταμίνης E σε φυσιολογικά και μη φυσιολογικά σπερματοζωάρια κατά την διάρκεια της κρυοσυντήρησης αποδείχθηκε πως υπήρξε μια βελτίωση ως προς την κινητικότητα μετά την απόψυξη καθώς και την ακεραιότητα του DNA, ενώ η προσθήκη κατά την επώαση βελτίωσε την κινητικότητα και την βιωσιμότητα των μη φυσιολογικών σπερματοζωαρίων[46].

Βιταμίνη C ως αντιοξειδωτικό συμπλήρωμα

Το ασκορβικό οξύ ή βιταμίνη C που λαμβάνεται ως θεραπεία από το στόμα βελτιώνει την ποιότητα των σπερματοζωαρίων. Η προσθήκη βιταμίνης C στα κρυομέσα φάνηκε να βελτίωσε την κινητικότητα αλλά και να μείωσε την πιθανότητα εμφάνισης βλαβών στο DNA των σπερματοζωαρίων ύστερα από απόψυξη. Ομοίως τα συμπληρώματα βιταμίνης C στα μέσα καλλιέργειας φαίνεται πως μείωσαν την υπεροξειδωση των λιπιδίων και την βιωσιμότητα των σπερματοζωαρίων κατά την ολοκλήρωση της διαδικασίας της ART[46].

Βιταμίνη B- φυλλικό οξύ

Τα επίπεδα φυλλικού οξέος στο σπερματικό πλάσμα είναι υψηλότερα απ' ότι στον ορό και στους γόνιμους άνδρες σε σύγκριση με τους υπογόνιμους άνδρες. Επιπρόσθετα, οι γόνιμοι άνδρες βρέθηκαν να εμφανίζουν υψηλότερα επίπεδα ψευδαργύρου στο σπέρμα σε σύγκριση με τους υπογόνιμους άνδρες καθώς η ανεπάρκεια ψευδαργύρου έχει αποδειχθεί πως μειώνει την απορρόφηση και το μεταβολισμό του φυλλικού οξέος. Μάλιστα, αξιοσημείωτο αποτελεί το γεγονός πως οι περισσότερες μελέτες συνδυάζουν τα συμπληρώματα φυλλικού οξέος με ψευδαργύρου για καλύτερα αποτελέσματα. Ο ψευδάργυρος, λοιπόν φάνηκε να είναι ένα ιχνοστοιχείο το οποίο δρα ως σαρωτής των ROS και ρυθμίζει την κινητικότητα του σπέρματος. Συγκεκριμένα κλινική δοκιμή η οποία εξέτασε την ημερήσια πρόσληψη θειϊκού ψευδαργύρου 500mg για 3 μήνες σε άνδρες που εμφάνιζαν ασθενοζωοσπερμία απέδειξε πως υπήρξε βελτίωση της ποιότητας των σπερματοζωαρίων όσον αφορά τον αριθμό, την προοδευτική κινητικότητα και την ικανότητα γονιμοποίησης. Επίσης, φάνηκε πως η πρόσληψη θειϊκού ψευδαργύρου μείωσε σημαντικά την συχνότητα εμφάνισης αντισωμάτων κατά του σπέρματος[46].

Συνένζυμο Q₁₀

Το συνένζυμο Q₁₀ είναι μια λιποδιαλυτή ουσία που μοιάζει με βιταμίνη και υπάρχει στα περισσότερα ευκαρυωτικά κύτταρα καθώς αποτελεί μέρος της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας. Το συγκεκριμένο ένζυμο μπορεί να υπάρχει στην οξειδωμένη του (ουβικινόλη) ή την ανηγμένη του μορφή (ουμπικινόλη). Μέσα από τα αποτελέσματα μιας συστηματικής ανασκόπησης και μετα-ανάλυσης της θεραπείας με συνένζυμο Q₁₀ στην ανδρική υπογονιμότητα προκύπτει ότι η από του στόματος χορήγησή του αύξησε τόσο τα επίπεδα του σπερματικού συνένζυμου Q₁₀, όσο την συγκέντρωση αλλά και την κινητικότητα των σπερματοζωαρίων. Ωστόσο, δεν φάνηκε να υπήρξε κάποια βελτίωση και αύξηση στα ποσοστά εγκυμοσύνης. Στην συνέχεια, μέσα από την διενέργεια τεσσάρων διπλών τυφλών, ελεγχόμενων με εικονικό φάρμακο RCT δοκιμών, προέκυψε πως η χορήγηση του συνένζυμου Q₁₀ σε άνδρες με ιδιοπαθή στείρωση φάνηκε πως είναι ικανό να μειώσει τα ποσοστά εμφάνισης υπεροξειδωσης των λιπιδίων και οξειδωτικού στρες στο σπερματικό πλάσμα. Περαιτέρω μελέτες που πραγματοποιήθηκαν, ανέφεραν πως υπήρξε βελτιωμένη αντίδραση ακροσωμάτων και ποσοστά εγκυμοσύνης. Συγκεκριμένα σε υπογόνιμους άνδρες με προηγούμενη αποτυχημένη IVF/ICSI η συμπλήρωση συνένζυμου Q₁₀ αύξησε τα ποσοστά γονιμοποίησης στον επόμενο κύκλο εξωσωματικής[46].

Τέλος, όλες αυτές οι παρατηρήσεις και οι μελέτες για την από του στόματος πρόσληψη αντιοξειδωτικών συμπληρωμάτων χρήζουν μεγαλύτερης και βαθύτερης διερεύνησης, προκειμένου να δοθούν στο φως της δημοσιότητας ακράδαντα στοιχεία για τον αν η χορήγηση των συμπληρωμάτων αυτών είναι ευεργετική για την καταπολέμηση της υπογονιμότητας που προκύπτει από το οξειδωτικό στρες, καθώς επίσης και για την αποτελεσματικότητα της θεραπείας όσον αφορά την βελτίωση της ποιότητας των γαμετών σε υπογόνιμους άνδρες αλλά και γυναίκες. Ομοίως σημαντικό είναι να συνεχιστούν και οι έρευνες για την χρήση αντιοξειδωτικών in vitro στο κλινικό εργαστηριακό περιβάλλον κατά την διάρκεια των διαδικασιών ART παράλληλα με την βελτιστοποίηση των τεχνικών αυτών και του περιβάλλοντος όπου λαμβάνει χώρα η όλη διαδικασία προκειμένου να ελαχιστοποιηθούν οι πιθανότητες εμφάνισης ROS στα μέσα των καλλιέργειών[46].

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Η υπογονιμότητα αποτελεί μια από τις πιο κοινές παθήσεις του 21^{ου} αιώνα, η οποία επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό την αναπαραγωγική ικανότητα τόσο του γυναικείου όσο και του ανδρικού φύλου. Μάλιστα, πολλά έτη ερευνών έχουν αποδείξει πως η υπογονιμότητα είναι πολυπαραγοντική πάθηση και μπορεί να επηρεάσει την γονιμότητα του άνδρα και της γυναίκας από τα πολύ αρχικά στάδια της ωογένεσης αλλά και της σπερματογένεσης αντίστοιχα. Μέσω της υπογονιμότητας είναι γνωστό πως μπορούν να επηρεαστούν σημαντικά τόσο οι ορμονικοί όσο και οι νευρικοί υποδοχείς και των δυο φύλων και να προκύψει μια αλυσίδα αναταράξεων οι οποίες φαίνεται πως μπορούν να οδηγήσουν στην εμφάνιση παθολογικών καταστάσεων.

Σημαντική ανακάλυψη των τελευταίων δύο δεκαετιών, αποτελεί η συσχέτιση του οξειδωτικού στρες (OS) και της υπογονιμότητας, δίνοντας «φως» σε πολλά αναπάντητα ερωτήματα σχετικά με την δημιουργία αλλά και την πηγή έναρξης της υπογονιμότητας και την συσχέτισή του οξειδωτικού στρες τόσο με την εγκυμοσύνη όσο και με την δημιουργία διάφορων γυναικολογικών παθήσεων, οι οποίες επηρεάζουν έμμεσα αν όχι άμεσα την αναπαραγωγική ικανότητα της γυναίκας. Αντίστοιχα, στον ανδρικό πληθυσμό πολυάριθμες μελέτες απέδειξαν την συσχέτιση του οξειδωτικού στρες (OS) με την δημιουργία των σπερματοζωαρίων και της σωστής λειτουργίας του καθώς και την σημασία του OS στην εμφάνιση διάφορων παθολογικών καταστάσεων που επηρεάζουν την γονιμότητα.

Το οξειδωτικό στρες γνωρίζουμε πως αποτελεί ένα φυσιολογικό φαινόμενο στον οργανισμό και πως προκαλείται από την ανισορροπία που δημιουργείται μεταξύ των προ-οξειδωτικών και των αντιοξειδωτικών προϊόντων στον οργανισμό. Ωστόσο, μπορεί να εξελιχθεί σε ένα παθολογικό φαινόμενο για τον οργανισμό. Αυτή η αναλογία φαίνεται να προκύπτει από την αυξημένη παραγωγή των ελεύθερων ριζών οξυγόνου (ROS) και/ή των ελεύθερων νιτρικών ριζών (RNS) σε συνδυασμό με την μειωμένη λειτουργικότητα του αντιοξειδωτικού αμυντικού μηχανισμού του ανθρώπινου οργανισμού. Το οξυγόνο όπως είδαμε αποτελεί τον πιο σημαντικό παράγοντα δημιουργίας των ελεύθερων ριζών στις αερόβιες μορφές ζωής και ο οξειδωτικός μεταβολισμός περιλαμβάνει μια πολύ σημαντική πηγή ενέργειας για τα κύτταρα.

Η αυξημένη παραγωγή των ελεύθερων ριζών οξυγόνου (ROS) και των νιτρικών ριζών (RNS) καθώς και μια σειρά από άλλες χημικές αντιδράσεις αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την εμφάνιση υπογονιμότητας, καθώς και πολλών αναπαραγωγικών παθήσεων, οι οποίες επηρεάζουν σημαντικά την λειτουργία και την παραγωγή των ωαρίων και των σπερματοζωαρίων αντίστοιχα, καθώς επίσης μπορούν να προκαλέσουν εκτεταμένη βλάβη του DNA των κυττάρων με αποτέλεσμα την αποτυχία επίτευξης εγκυμοσύνης. Μερικές

από τις παθήσεις που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες είναι η ενδομητρίωση, το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών (PCOS), οι αυτόματες αποβολές, η προεκλαμψία (σε επίπεδο εγκυμοσύνης), η ιδιοπαθής υπογονιμότητα καθώς και προβλήματα που αφορούν άμεσα το έμβρυο όπως είναι η ανάπτυξη IUGR, ο πρόωρος τοκετός και οι επαναλαμβανόμενες απώλειες κύησης. Αντίστοιχα στο ανδρικό φύλο, η υπέρμετρη παραγωγή ROS φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά τις παραμέτρους του σπέρματος και να δημιουργεί εκτεταμένες βλάβες στο DNA του, καθώς επίσης ευθύνεται και για πολλές παθήσεις όπως είναι και η κισσοκήλη.

Εκτός από το γυναικείο αλλά και το αντρικό αναπαραγωγικό σύστημα, το οξειδωτικό στρες και οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου φαίνεται να επηρεάζουν σημαντικά και τις τεχνικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (ART,) τόσο την εξωσωματική γονιμοποίηση (IVF) όσο και την μικρογονιμοποίηση (ICSI). Μέσα από μια σειρά αντιδράσεων φαίνεται να επηρεάζεται σημαντικά η ικανότητα γονιμοποίησης των γαμετών εργαστηριακά και αυτό κυρίως μέσω της επίδρασης που έχουν η παραγωγή ROS στα καλλιεργητικά μέσα που μπορεί να προκύψει είτε λόγω εξωγενών, είτε λόγω ενδογενών παραγόντων, με αποτέλεσμα την μη επίτευξη εγκυμοσύνης.

Τέλος, μεγάλη σημασία έχει η αντιοξειδωτική ικανότητα του οργανισμού, καθώς είναι αυτή η οποία συμβάλει στην διατήρηση των επιπέδων ROS σταθερών στον οργανισμό και επομένως και την αποφυγή εμφάνισης οξειδωτικού στρες. Μάλιστα, γνωρίζουμε πως τα αντιοξειδωτικά χωρίζονται σε ενζυματικά και μη ενζυματικά και κατέχουν τεράστιο ρόλο στην καταπολέμηση του οξειδωτικού στρες μιας και μελέτες, θέλουν την χρήση αντιοξειδωτικών συμπληρωμάτων να αποτελούν πιθανή θεραπεία τόσο στο γυναικείο και στο ανδρικό υπόβαθρο της υπογονιμότητας, όσο και στις τεχνικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής όπως είναι η IVF και η ICSI. Ωστόσο, η χρήση αντιοξειδωτικών συμπληρωμάτων ως μέσο θεραπείας του οξειδωτικού στρες στην υπογονιμότητα κρίνεται περαιτέρω διερεύνησης, καθώς τα στοιχεία τα οποία υπάρχουν είναι αμφιλεγόμενα και οι απόψεις δίστανται.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Λουτράδης Δ., Δεληγεώρογλου Ε., Παπαντωνίου Ν. και Παππά Κ., 2017. Μαιευτική και Γυναικολογία. Broken Hill
2. Παγκόσμια Ημέρα Γονιμότητας. Υπουργείο Υγείας. Published June 15, 2011. Accessed January 12, 2023. <https://www.moh.gov.gr/articles/news/508-pagkosmia-hmera-gonimothtas>
3. Boivin J, Bunting L, Collins JA, Nygren KG. International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. *Human Reproduction*. 2007;22(6):1506-1512. doi:<https://doi.org/10.1093/humrep/dem046>
4. Inhorn MC, Patrizio P. Infertility around the globe: new thinking on gender, reproductive technologies and global movements in the 21st century. *Human Reproduction Update*. 2015;21(4):411-426. doi:<https://doi.org/10.1093/humupd/dmv016>
5. Mascarenhas MN, Flaxman SR, Boerma T, Vanderpoel S, Stevens GA. National, Regional, and Global Trends in Infertility Prevalence Since 1990: A Systematic Analysis of 277 Health Surveys. Low N, ed. *PLoS Medicine*. 2012;9(12):e1001356. doi:<https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001356>
6. Evers JL. Female subfertility. *The Lancet*. 2002;360(9327):151-159. doi:[https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(02\)09417-5](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(02)09417-5)
7. Hacker, Gambone and Hobel. Αρχές στη Μαιευτική & Γυναικολογία. 6^η Έκδοση. Ιατρικές Εκδόσεις Λαγός Δημήτριος
8. Αθανάσιος Χ. Χρυσικόπουλος. Υπογονιμότητα Στείρωση Προβλήματα Αναπαραγωγής. Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης
9. Vander Borgh M, Wyns C. Fertility and infertility: Definition and epidemiology. *Clinical Biochemistry*. 2018;62:2-10. doi:<https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2018.03.012>
10. Scutiero G, Iannone P, Bernardi G, et al. Oxidative Stress and Endometriosis: A Systematic Review of the Literature. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2017;2017:1-7. doi:<https://doi.org/10.1155/2017/7265238>
11. Ray A, Shah A, Gudi A, Homburg R. Unexplained infertility: an update and review of practice. *Reproductive BioMedicine Online*. 2012;24(6):591-602. doi:<https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2012.02.021>
12. Mol BW, Hart RJ. Unexplained Infertility. *Seminars in Reproductive Medicine*. 2020;38(01):001-002. doi:<https://doi.org/10.1055/s-0040-1721425>

13. Rahal A, Kumar A, Singh V, et al. Oxidative Stress, Prooxidants, and Antioxidants: The Interplay. *BioMed Research International*. 2014;2014:1-19. doi:<https://doi.org/10.1155/2014/761264>
14. Agarwal A, Aponte-Mellado A, Premkumar BJ, Shaman A, Gupta S. The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2012;10(1):49. doi:<https://doi.org/10.1186/1477-7827-10-49>
15. Lu J, Wang Z, Cao J, Chen Y, Dong Y. A novel and compact review on the role of oxidative stress in female reproduction. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2018;16(1). doi:<https://doi.org/10.1186/s12958-018-0391-5>
16. Burton GJ, Jauniaux E. Oxidative stress. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*. 2011;25(3):287-299. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2010.10.016>
17. Agarwal A, Gupta S, Sharma RK. Role of oxidative Stress in female reproduction. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2005;3(1):28. doi:<https://doi.org/10.1186/1477-7827-3-28>
18. Agarwal A, Gupta S, Sikka S. The role of free radicals and antioxidants in reproduction. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*. 2006;18(3):325-332. doi:<https://doi.org/10.1097/01.gco.0000193003.58158.4e>
19. Powers SK, Ji LL, Kavazis AN, Jackson MJ. REACTIVE OXYGEN SPECIES: IMPACT ON SKELETAL MUSCLE. *Comprehensive Physiology*. 2011;1(2):941-969. doi:<https://doi.org/10.1002/cphy.c100054>
20. Al-Shehri SS. Reactive oxygen and nitrogen species and innate immune response. *Biochimie*. 2021;181:52-64. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2020.11.022>
21. Godić A, Pojšak B, Adamič M, Dahmane RG. Corrigendum to “The Role of Antioxidants in Skin Cancer Prevention and Treatment.” *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2020;2020:1-1. doi:<https://doi.org/10.1155/2020/1969760>
22. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology*. 1997;82(2):291-295. doi:<https://doi.org/10.1113/expphysiol.1997.sp004024>
23. Pisoschi AM, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2015;97:55-74. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040>
24. Steller J, Alberts J, Ronca A. Oxidative Stress as Cause, Consequence, or Biomarker of Altered Female Reproduction and Development in the Space Environment. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018;19(12):3729. doi:<https://doi.org/10.3390/ijms19123729>
25. Agarwal A, Allamaneni SS. Role of free radicals in female reproductive diseases and assisted reproduction. *Reproductive BioMedicine Online*. 2004;9(3):338-347. doi:[https://doi.org/10.1016/s1472-6483\(10\)62151-7](https://doi.org/10.1016/s1472-6483(10)62151-7)

26. Tatone C, Di Emidio G, Vitti M, et al. Sirtuin Functions in Female Fertility: Possible Role in Oxidative Stress and Aging. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2015;2015:659687. doi:<https://doi.org/10.1155/2015/659687>
27. Prasad S, Tiwari M, Pandey AN, Shrivastav TG, Chaube SK. Impact of stress on oocyte quality and reproductive outcome. *Journal of Biomedical Science*. 2016;23. doi:<https://doi.org/10.1186/s12929-016-0253-4>
28. Fujii J, Iuchi Y, Okada F. Fundamental roles of reactive oxygen species and protective mechanisms in the female reproductive system. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2005;3(1). doi:<https://doi.org/10.1186/1477-7827-3-43>
29. Agarwal A, Gupta S, Sharma R. Oxidative stress and its implications in female infertility – a clinician’s perspective. *Reproductive BioMedicine Online*. 2005;11(5):641-650. doi:[https://doi.org/10.1016/s1472-6483\(10\)61174-1](https://doi.org/10.1016/s1472-6483(10)61174-1)
30. Da Broi MG, Navarro PA. Oxidative stress and oocyte quality: ethiopathogenic mechanisms of minimal/mild endometriosis-related infertility. *Cell and Tissue Research*. 2015;364(1):1-7. doi:<https://doi.org/10.1007/s00441-015-2339-9>
31. Rizzo A, Roscino M, Binetti F, Sciorsci R. Roles of Reactive Oxygen Species in Female Reproduction. *Reproduction in Domestic Animals*. 2011;47(2):344-352. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2011.01891.x>
32. Wu B, Chen X, He B, et al. ROS are critical for endometrial breakdown via NF-κB-COX-2 signaling in a female mouse menstrual-like model. *Endocrinology*. 2014;155(9):3638-3648. doi:<https://doi.org/10.1210/en.2014-1029>
33. Rizk B, Badr MH, Talerico C. Oxidative Stress and The Endometrium. Published online January 1, 2013;61-74. doi:https://doi.org/10.1007/978-1-62703-041-0_3
34. Ng SW, Norwitz GA, Pavlicev M, Tilburgs T, Simón C, Norwitz ER. Endometrial Decidualization: The Primary Driver of Pregnancy Health. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(11):4092. doi:<https://doi.org/10.3390/ijms21114092>
35. Sugino N. The Role of Oxygen Radical-mediated Signaling Pathways in Endometrial Function. *Placenta*. 2007;28:S133-S136. doi:<https://doi.org/10.1016/j.placenta.2006.12.002>
36. Rudnicka E, Duszewska AM, Kucharski M, Tyczyński P, Smolarczyk R. Oxidative stress in polycystic ovary syndrome (PCOS). *Reproduction*. Published online October 2022. doi:<https://doi.org/10.1530/rep-22-0152>
37. Pereira AC, Martel F. Oxidative stress in pregnancy and fertility pathologies. *Cell Biology and Toxicology*. 2014;30(5):301-312. doi:<https://doi.org/10.1007/s10565-014-9285-2>

38. Agarwal A, Allamaneni SSR. Free radicals and male reproduction. *Journal of the Indian Medical Association*. 2011;109(3):184-187. Accessed June 5, 2023.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22010591/>
39. Mannucci A, Argento FR, Fini E, et al. The Impact of Oxidative Stress in Male Infertility. *Frontiers in Molecular Biosciences*. 2022;8. doi:<https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.799294>
40. Wagner H, Cheng JW, Ko EY. Role of reactive oxygen species in male infertility: An updated review of literature. *Arab Journal of Urology*. 2018;16(1):35-43.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.aju.2017.11.001>
41. Sikka SC, Rajasekaran M, Hellstrom WJ. Role of oxidative stress and antioxidants in male infertility. *Journal of Andrology*. 1995;16(6):464-468. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8867595/>
42. Evans EPP, Scholten JTM, Mzyk A, et al. Male subfertility and oxidative stress. *Redox Biology*. 2021;46:102071. doi:<https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.102071>
43. Henkel R, Offor U, Fisher D. The role of infections and leukocytes in male infertility. *Andrologia*. 2020;53(1). doi:<https://doi.org/10.1111/and.13743>
44. Agarwal A, Majzoub A. Role of Antioxidants in Assisted Reproductive Techniques. *The World Journal of Men's Health*. 2017;35(2):77. doi:<https://doi.org/10.5534/wjmh.2017.35.2.77>
45. Agarwal A, Maldonado Rosas I, Anagnostopoulou C, et al. Oxidative Stress and Assisted Reproduction: A Comprehensive Review of Its Pathophysiological Role and Strategies for Optimizing Embryo Culture Environment. *Antioxidants*. 2022;11(3):477.
doi:<https://doi.org/10.3390/antiox11030477>
46. Agarwal A, Durairajanayagam D, du Plessis SS. Utility of antioxidants during assisted reproductive techniques: an evidence based review. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2014;12(1):112.
doi:<https://doi.org/10.1186/1477-7827-12-112>