



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΟΣ
ΟΥΡΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**

**«Διέγερση ποσοτικών και ποιοτικών παραμέτρων των σπερματοζωαρίων
με φαρμακολογικούς παράγοντες in vivo
και in vitro»**

**Ευλαλία Β. Βλαχοπούλου
ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2013

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)».

Ημερομηνία αίτησης της κ. Βλαχοπούλου Ευλαλίας: 22-9-2008

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 653^α/3-2-2009

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Γιαννάκης Δημήτριος Επίκουρος Καθηγητής Ουρολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Μέλη

Σοφικίτης Νικόλαος Καθηγητής Ουρολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Μπαλτογιάννης Δημήτριος Επίκουρος Καθηγητής Ουρολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 16-2-2009

«Διέγερση ποσοτικών και ποιοτικών παραμέτρων των σπερματοζωαρίων με φαρμακολογικούς παράγοντες in vivo και in vitro».

ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 753^α/18-6-2013

Γεωργίου Ιωάννης	Καθηγητής Ιατρικής Γενετικής και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Μαιευτικής -Γυναικολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Ζηκόπουλος Κωνσταντίνος	Καθηγητής Μαιευτικής -Γυναικολογίας με έμφαση στην Υποβοηθούμενη Αναπαραγωγή, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Μακρودήμας Γεώργιος	Καθηγητής Μαιευτικής -Γυναικολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Παρασκευαΐδης Ευάγγελος	Καθηγητής Μαιευτικής -Γυναικολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Σοφικίτης Νικόλαος	Καθηγητής Ουρολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Γιαννάκης Δημήτριος	Αναπληρωτής Καθηγητής Ουρολογίας επί του επιστημονικού πεδίου της Φυσιοπαθολογίας του ουροποιητικού συστήματος και της ενδοσκοπικής ουρολογίας, της Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Μπαλτογιάννης Δημήτριος	Επίκουρος Καθηγητής Ουρολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 19-11-2013

**ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ
ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

Ανδρέας Φωτόπουλος
Καθηγητής Πυρηνικής Ιατρικής



Η Γραμματέας του Τμήματος

ΜΑΡΙΑ ΚΑΠΙΤΟΠΟΥΛΟΥ

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επιβλέποντα της Διδακτορικής Διατριβής μου τον κ. Δημήτριο Γιαννάκη Αναπληρωτή Καθηγητή Ουρολογίας, Ιατρικής Σχολής, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, για την ευκαιρία που έδωσε να πραγματοποιήσω και να ολοκληρώσω την εργασία αυτή.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Νικόλαο Σοφικίτη, μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, Καθηγητή Ουρολογίας και Διευθυντή Ουρολογικής Κλινικής, Ιατρικής Σχολής, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, για τις σημαντικές επιστημονικές, ερευνητικές και συγγραφικές συμβουλές του για την πραγματοποίηση της έρευνας αυτής.

Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Δημήτριο Μπαλτογιάννη, μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, Επίκουρο Καθηγητή Ουρολογίας Ουρολογικής Κλινικής, Ιατρικής Σχολής, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, για τις συμβουλές του για την ολοκλήρωση της έρευνας αυτής.

Δε θα μπορούσα να ξεχάσω τον κ. Ιωάννη Γεωργίου, Καθηγητή Ιατρικής Γενετικής και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Μαιευτικής-Γυναικολογίας, Ιατρικής Σχολής, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για τις συνεχείς συμβουλές του και για την καθοδήγηση του στην ολοκλήρωση των πειραμάτων της έρευνας αυτής.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Άννα Μπατιστάτου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας, Ιατρικής Σχολής, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για την πραγματοποίηση των ιστοπαθολογικών μελετών των οργάνων των επίμυων καθώς και για το σύνολο των παρατηρήσεων της επί των πειραμάτων βιοψίας των πειραματόζωων αλλά και τις γνώσεις που μου μετέδωσε για την μονιμοποίηση των ιστών, που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτήν την έρευνα.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Κωνσταντίνο Ζηκόπουλο, Καθηγητή Μαιευτικής-Γυναικολογίας με έμφαση στην υποβοηθούμενη Αναπαραγωγή για τις συμβουλές του στην ολοκλήρωση της έρευνας αυτής. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη της επταμελούς επιτροπής για την βοήθεια τους στην έρευνα αυτή.

Ευχαριστώ επίσης την κ. Ελευθερία Α.Δέσκα-Ζηκοπούλου, MD, PhD, Ιατρό Μικροβιολόγο (Βιοπαθολόγο), Διδάκτωρ Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για τη συμβολή της και τις γνώσεις που μου παρείχε στο Μικροβιολογικό της Εργαστήριο για την μέτρηση ορμονών που εκκρίνονται από όργανα πειραματόζωων.

Ευχαριστώ θερμά την κ. Μαρία Οβρένοβιτς, MD, PhD, Ιατρό Μικροβιολόγο, Διδάκτωρ Ιατρικής Σχολής, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για τη συμβολή της και την παραχώρηση ειδικού συστήματος Computer Assisted Sperm Analysis (CASA) για την μέτρηση παραμέτρων κίνησης των σπερματοζωαρίων.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στον κ. Γεώργιο Βαρθολομάτο, Βιοχημικό, Αιματολογικού Εργαστηρίου ΓΠΝΙ για την φιλοξενία του και τις γνώσεις που μου μετέδωσε στην κυτταρομετρία ροής στα in vivo και vitro πειράματά μου.

Δε θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω τον κ. Λέανδρο Λάζαρο, Βιολόγο, PhD, μεταδιδακτορικό ερευνητή της Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων για την απεριόριστη συμβολή του στην πραγματοποίηση πειραμάτων ανάλυσης της χρωματίνης των σπερματοζωαρίων. Αλλά και στις επιστημονικές και συγγραφικές συμβουλές που μου παρείχε.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Ηλία Καραγκούνη, Μοριακός-Κυτταρικός Βιολόγος, BSc, MSc, PhD, Μεταδιδακτορικός Ερευνητής Μονάδα Ακτινοβιολογίας και Radiopathology, Ιατρική Σχολή, Αλεξανδρούπολη, για την μεγάλη βοήθεια του στην πραγματοποίηση πειραμάτων ενδοφλέβιας χορήγησης ουσιών σε πειραματόζωα.

Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Λάμπρο Αθανασίου, Υποψήφιος Διδάκτωρ, Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Υλικών, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, για τη συνεργασία που είχαμε στη δημιουργία υπολογιστικού προγράμματος για τη μέτρηση παραμέτρων κίνησης των σπερματοζωαρίων.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Μοριακής Ουρολογίας και Ανθρώπινης Αναπαραγωγής και τα μέλη της Ουρολογικής Κλινικής και της Γραμματείας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για την άριστη συνεργασία που είχαμε.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους μου τους φίλους που μου συμπαραστάθηκαν και με βοήθησαν για την επίτευξη της εργασίας αυτής.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στο Γιώργο, Λάμπρο Νούσια και στο Νίκο, που δυστηχώς δεν είναι μαζί μας.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στο Σταύρο που ήταν και είναι πάντα εκεί για να μου συμπαρίσταται και να με υπομένει καθόλη τη διάρκεια της Διδακτορικής Διατριβής μου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω πολύ τον αδερφό μου, για την αμέριστη βοήθεια του και τις γνώσεις που μου παρείχε στη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου, για την αγάπη, την συμπαράσταση αλλά και την υποστήριξη που μου παρείχαν αυτά τα χρόνια.

«Έγινε έγκριση του Χειρουργικού Τομέα με αριθ. Πρωτ. 63/29/3-2012 και της Γενική Συνέλευση της Ιατρικής Σχολής στη συνεδρίαση 733^α/3-4-2012, με τις οποίες ενέκριναν τη συμβολή εθελοντών ως δότες σπέρματος με μόνο σκοπό την έρευνα αποκλειστικά».

«Έγινε έγκριση του Δ.Σ. του Γενικού Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων με αριθ. Πρωτ. 30/29-7-2013(Θ.1), η οποία ενέκρινε πείραμα πρωτοκόλλων μελέτης από την Επιτροπή Ερευνητικού Εργαστηριακού Πειραματοζώων Π.Γ.Ν.Ι.»

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Ο ρόλος του σεξ στο ανθρώπινο είδος, εκτός από την αναπαραγωγή για τη συνέχιση του είδους, είναι να προσφέρει στον άνθρωπο ευχαρίστηση. Συγκεκριμένα το σεξ για έναν άνδρα αποτελεί κυρίαρχο ρόλο της ζωής του, αφού οι περισσότεροι αισθάνονται πως ο ανδρισμός τους είναι ταυτισμένος με τη σεξουαλικότητά τους. Ανάμεσα σε όλους τους Ευρωπαίους, περισσότερο για τον Έλληνα το σεξ φτάνει να αποτελεί δείκτη ευτυχίας καθώς το θεωρεί βασικό μέρος της ύπαρξής του. Έτσι ακόμα και στα δύσκολα ποτέ δεν αφήνει τη σεξουαλική επιθυμία να χάνεται χωρίς να δώσει τις μάχες του. Μετά την ανάπτυξη των φαρμάκων που βοηθούν στην επίτευξη της στύσης αλλά και στη διατήρησή της, άνδρες μεγαλύτερης ηλικίας αλλά και άνδρες στην αναπαραγωγική ηλικία κάνουν χρήση των φαρμάκων αυτών.

Ένα άλλο σημαντικό κοινωνικό αλλά και προσωπικό πρόβλημα είναι η λαχτάρα του ανθρώπου για την απόκτηση ενός παιδιού, για τη διαίωνιση του είδους του. Το πρόβλημα της υπογονιμότητας είναι πολύ συχνό, καθώς στη χώρα μας περίπου 250.000 ζευγάρια αντιμετωπίζουν πρόβλημα υπογονιμότητας. Υπολογίζεται ότι περίπου στο 40-50% των υπογόνιμων ζευγαριών, το πρόβλημα εντοπίζεται στον ανδρικό παράγοντα ή και σε συνδυασμό με αναπαραγωγικά προβλήματα και της συντρόφου του.

Με βάση τον Φρόυντ τα βασικά ένστικτα του ανθρώπου είναι αυτά που διαιωνίζουν την ζωή του ατόμου με το να τον παρακινούν να ψάξει για φαγητό και νερό αλλά επίσης διαιωνίζουν την ζωή του είδους με το να τον παρακινούν να έχει σεξουαλική επαφή. Αυτό το ένστικτο για την διατήρηση της ζωής και την αναζήτηση ευχαρίστησης ο Φρόυντ το ονόμασε «Έρως». Συνδυάζοντας τα παραπάνω προσπάθησα να ερευνήσω τη σχέση φαρμάκων (αναστολέων της φωσφοδιεστεράσης 5) που χορηγούνται για την στύση του άνδρα, με την γονιμοποιητική ικανότητα του σπερματοζωαρίου. Εξάλλου:

" Η σεξουαλικότητα είναι το κλειδί για το πρόβλημα των νευρώσεων του ψυχισμού αλλά και των νευρώσεων σε γενικές γραμμές. Όποιος περιφρονεί αυτό το κλειδί δεν θα είναι ποτέ σε θέση να ξεκλειδώσει την πόρτα."

Σίγκμουντ Φρόυντ, Hysterie, 1895

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ	23
1.1.ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ ΚΑΙ ΕΜΒΡΥΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΑΝΔΡΙΚΟΥ	25
1.2.ΤΟ ΓΕΝΝΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΤΟΥ ΑΝΔΡΑ	26
1.3.ΕΜΒΡΥΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΟΡΧΕΩΣ.....	26
1.3.1.ΕΜΒΡΥΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΚΑΘΟΔΟΥ ΤΟΥ ΟΡΧΕΩΣ.....	28
1.3.2.ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΟΡΧΕΩΣ.....	29
1.3.3.ΑΙΜΑΤΩΣΗ ΤΟΥ ΟΡΧΕΩΣ.....	32
1.3.4.ΦΛΕΒΕΣ ΤΟΥ ΟΡΧΕΩΣ.....	32
1.4.ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΣΠΕΡΜΑΤΟΓΕΝΕΣΗΣ	33
1.4.1.ΤΟ ΩΡΙΜΟ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΟ	34
1.4.2.ΚΥΤΤΑΡΑ LEYDIG	38
1.4.3.ΚΥΤΤΑΡΑ SERTOLI.....	38
1.4.4.ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΣΠΕΡΜΙΟΓΕΝΕΣΗΣ	39
1.4.5.ΩΡΙΜΑΝΣΗ ΤΩΝ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΩΝ.....	40
1.4.6.ΕΠΙΔΙΔΥΜΙΑΔΑ.....	41
1.5.ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΑ	42
1.5.1.ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΩΝ	42
1.5.2.ΕΚΣΠΕΡΜΑΤΙΣΗ	43
1.5.3.ΣΠΕΡΜΑΤΙΚΟΣ ΠΟΡΟΣ	44
1.5.4.ΣΠΕΡΜΑΤΟΔΟΧΟΙ ΚΥΣΤΕΣ	44
1.5.5.ΟΙ ΒΟΛΒΟΟΥΡΗΘΡΑΙΟΙ ΑΔΕΝΕΣ.....	45
1.5.6.Ο ΠΡΟΣΤΑΤΗΣ.....	46
1.6.ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΤΟΥ ΠΕΟΥΣ ΚΑΙ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΣΤΥΣΗΣ.....	47
1.6.1.ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΠΕΟΥΣ	47
1.6.2.ΑΙΜΑΤΩΣΗ ΤΟΥ ΠΕΟΥΣ	51
1.6.3.ΝΕΥΡΩΣΗ ΤΟΥ ΠΕΟΥΣ	51
1.6.4.ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΣΤΥΣΗΣ.....	52
1.6.5.ΦΑΣΕΙΣ ΤΗΣ ΣΤΥΣΗΣ.....	53
1.7. ΕΝΔΟΚΡΙΝΗΣ ΟΡΧΙΚΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ.....	56
1.7.1.ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΤΗΣ ΤΕΣΤΟΣΤΕΡΟΝΗΣ	57
1.8.ΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ IN VIVO.....	59
1.9.ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑ.....	60
1.9.1.ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΘΕΣΗ ΤΗΣ ΑΝΔΡΙΚΗΣ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑΣ.....	60

1.9.2.ΑΙΤΙΑ ΑΝΔΡΙΚΗΣ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑΣ	61
1.9.3.ΠΡΟΟΡΧΙΚΑ ΑΙΤΙΑ.....	63
1.9.4.ΟΡΧΙΚΑ ΑΙΤΙΑ	67
1.9.5.ΜΕΤΑ-ΟΡΧΙΚΑ.....	75
1.10.ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΗΣ ΑΝΔΡΙΚΗΣ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑΣ.....	77
1.10.1.Ο ΡΟΛΟΣ ΚΑΙ Η ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ PDEs	82
1.10.2.Ο ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΦΩΣΦΟΔΙΕΣΘΕΡΑΣΩΝ	82
1.10.3.PDEs ΚΑΙ ΑΝΔΡΙΚΟ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ.....	83
1.10.4.PDE5 ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ:Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥΣ ΣΤΟΥΣ ΑΝΔΡΙΚΟΥΣ ΕΚΚΡΙΤΙΚΟΥΣ ΓΕΝΝΕΤΙΚΟΥΣ ΑΔΕΝΕΣ	84
1.11.Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ PDE5 ΣΤΙΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ ΤΟΥ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ.....	87
1.11.1. IN VITRO ΜΕΛΕΤΕΣ	87
1.11.2.IN VIVO ΜΕΛΕΤΕΣ	91
1.12.ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ	97
1.12.1.ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΚΑΙ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ	98
1.12.2.ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ.....	98
1.12.3.ΣΠΕΡΜΑΤΟΓΕΝΕΣΗ ΣΤΟΝ ΑΡΟΥΡΑΙΟ.....	99
2.ΣΚΟΠΟΣ	101
Β.ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	103
3.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	105
3.1. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ	105
3.1.1.ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ.....	105
3.1.2. ΟΡΓΑΝΑ ΚΑΙ ΣΥΣΚΕΥΕΣ.....	106
3.1.3. ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ ΥΛΙΚΑ	107
3.1.4.ΛΟΙΠΟΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ	108
3.1.5.ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ ΕΚΤΡΟΦΕΙΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΩΝ	108
3.2.IN VITRO ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ.....	109
3.2.1.ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΣΠΕΡΜΑΤΙΚΟΥ ΥΓΡΟΥ ΑΣΘΕΝΩΝ	109
3.2.2.ΕΠΙΠΡΟΣΘΕΤΑ ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΣΠΕΡΜΑΤΙΚΟΥ ΥΓΡΟΥ ΑΣΘΕΝΩΝ.....	112
3.3.ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....	114
3.3.1.ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΚΙΝΗΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΩΝ .	114

3.4.ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΚΙΝΗΣΗΣ ΤΩΝ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΩΝ.....	115
3.4.1.ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΚΙΝΗΣΗΣ ΤΩΝ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΩΝ	115
3.4.2.ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΣΕ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΟΥ ΕΙΧΕ ΤΟ COMPUTER AIDED SPERM ANALYSIS (CASA)	116
3.5.ΥΠΟΩΣΜΩΤΙΚΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΗΥΡΟ-OSMOTIC SWELLING TEST.	118
3.6.ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΟΜΗΣ ΤΗΣ ΧΡΩΜΑΤΙΝΗΣ ΤΩΝ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΩΝ/ SPERM CROMATIN STRUCTURE ASSAY (SCSA).....	119
3.7.ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΕΣΤΟΣΤΕΡΟΝΗΣ ΣΕ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΟΡΧΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΑΡΟΥΡΑΙΩΝ ΜΕ ΠΑΡΟΥΣΙΑ Η ΑΠΟΥΣΙΑ ΣΙΛΔΕΝΑΦΙΛΗΣ.....	121
3.8.ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΕΣΤΟΣΤΕΡΟΝΗΣ ΣΕ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΟΡΧΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΑΡΟΥΡΑΙΩΝ ΜΕ ΠΑΡΟΥΣΙΑ Η ΑΠΟΥΣΙΑ ΤΑΝΤΑΛΑΦΙΛΗΣ	122
3.9.ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....	123
3.10.ΙΝ VIVO ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ	124
3.10.1.ΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΩΝ.....	124
3.10.2.ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΕ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΩΝ	124
3.11.ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	131
3.11.1ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΣΙΛΔΕΝΑΦΙΛΗΣ Η ΤΑΝΤΑΛΑΦΙΛΗΣ ΑΠΟ ΤΟ ΣΤΟΜΑ (GAVAGE).....	131
3.11.2.ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΤΗΣ ΠΛΑΤΙΝΑΣ	131
3.11.3.ΕΝΔΟΚΟΙΛΙΑΚΗ ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΣΙΣΠΛΑΤΙΝΗΣ	132
3.11.4.ΕΝΔΟΦΛΕΒΙΑ ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΤΗΣ ΣΙΣΠΛΑΤΙΝΗΣ	132
3.11.5.ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΠΡΟΣΩΠΙΔΑΣ	133
3.11.6.ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΟΥ ΑΡΙΘΜΟΥ ΚΑΙ ΤΗΣ ΚΙΝΗΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΩΝ	136
3.11.7.ΜΕΤΡΗΣΗ ΣΥΜΠΥΚΝΩΣΗ ΤΗΣ ΧΡΩΜΑΤΙΝΗΣ ΚΑΙ DFI.....	137
3.11.8.ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....	138
3.12.ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....	139
3.12.1.ΙΝ VITRO ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ.....	139
3.12.2.ΙΝ VIVO ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ	140
4.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	141
4.1.ΙΝ VITRO ΜΕΛΕΤΕΣ.....	141

4.2.IN VIVO ΜΕΛΕΤΕΣ	148
4.2.1.ΑΡΙΘΜΟΣ ΤΩΝ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΩΝ.....	148
4.2.2.ΚΙΝΗΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΩΝ.....	149
4.2.3.ΒΑΡΟΣ ΟΡΧΕΩΝ ΤΩΝ ΑΡΟΥΡΑΙΩΝ	149
4.2.4.ΠΟΣΟΣΤΟ ΤΩΝ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΩΝ ΜΕ ΠΛΗΡΗ ΣΥΜΠΥΚΝΩΣΗ ΤΗΣ ΧΡΩΜΑΤΙΝΗΣ.....	149
4.2.5.DFI ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΩΝ	150
4.2.6.ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΠΟΓΟΝΩΝ.....	152
4.2.7.ΤΕΣΤΟΣΤΕΡΟΝΗ.....	153
4.2.8.ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	154
4.3.1.ΑΡΙΘΜΟΣ ΤΩΝ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΩΝ.....	159
4.3.2.ΚΙΝΗΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΩΝ.....	160
4.3.4.ΒΑΡΟΣ ΟΡΧΕΩΝ ΤΩΝ ΑΡΟΥΡΑΙΩΝ	161
4.3.4.ΠΟΣΟΣΤΟ ΤΩΝ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΩΝ ΜΕ ΠΛΗΡΗ ΣΥΜΠΥΚΝΩΣΗ ΤΗΣ ΧΡΩΜΑΤΙΝΗΣ.....	162
4.3.5.DFI ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΩΝ	163
4.3.6.ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΠΟΓΟΝΩΝ.....	165
4.3.7.ΤΕΣΤΟΣΤΕΡΟΝΗ.....	165
4.3.8.ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	166
5.ΣΥΖΗΤΗΣΗ	171
5.1.IN VITRO ΜΕΛΕΤΕΣ	171
5.1.1.ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΗΣ ΤΑΝΤΑΛΑΦΙΛΗΣ ΣΤΗΝ ΚΙΝΗΤΙΚΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΣΤΗ ΔΙΑΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ ΤΩΝ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΩΝ.....	171
5.1.2.ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΗΣ ΣΙΛΛΕΝΑΦΙΛΗΣ/ ΒΑΡΔΕΝΑΦΙΛΗΣ ΣΤΙΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ ΤΟΥ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ.....	172
5.1.3.Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ PDE5 ΣΤΙΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ ΚΙΝΗΣΗΣ ΤΩΝ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΩΝ	173
5.1.4.Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ PDE5 ΣΤΑ ΠΡΩΙΜΑ ΣΤΑΔΙΑ ΤΗΣ ΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗΣ.....	173
5.1.5.ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ PDE5 ΣΤΗ ΣΥΜΠΥΚΝΩΣΗ ΤΗΣ ΧΡΩΜΑΤΙΝΗΣ ΤΟΥ ΠΥΡΗΝΑ ΤΩΝ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΩΝ	175
5.2.IN VIVO ΜΕΛΕΤΕΣ	180
6.ΤΕΛΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	187

7.ΠΕΡΙΛΗΨΗ	189
8. ABSTRACT	191
9.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	193
10.ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ-ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ	217

A.ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στις ημέρες μας κάθε 1 λεπτό στον πλανήτη γη ένας άνδρας λαμβάνει έναν αναστολέα (σιλденаφίλη, βαρδεναφίλη, τανταλαφίλη) της φωσφοδιεστεράσης 5 (PDE5) για την αντιμετώπιση της στυτικής δυσλειτουργίας. Στη διεθνή βιβλιογραφία υπάρχει ένας περιορισμένος αριθμός μελετών που δείχνει αρχική θετική επίδραση αυτών των φαρμάκων στην ανδρική αναπαραγωγική ικανότητα. Ο σκοπός της μελέτης αυτής είναι να διερευνηθεί *in vitro* και *in vivo* επίδραση αναστολέων της PDE5 σε λειτουργικές δοκιμασίες ανθρώπινων σπερματοζωαρίων. Λαμβάνοντας υπόψη ότι οι λειτουργικές δοκιμασίες σπερματοζωαρίων έχουν στατιστικά σημαντική συσχέτιση με τη γονιμοποιητική τους ικανότητα, είναι φανερό ότι τα σχεδιαζόμενα *in vitro* πειράματα θα συσχετιστούν με την επίδραση των αναστολέων της PDE5 στη γονιμοποιητική ικανότητα του άνδρα. Επίσης μελετήθηκε σε επιπρόσθετες σειρές πειραμάτων η επίδραση της χορήγησης σιλденаφίλης και τανταλαφίλης στη γονιμοποιητική ικανότητα υγιών αρουραίων και αρουραίων με ορχική βλάβη (λόγω χορήγησης χημικοθεραπευτικών φαρμάκων).

Θα μελετηθεί επιπρόσθετα η επίδραση αναστολέων της PDE5 στη βιοσύνθεση και η έκκριση ορχικής τεστοστερόνης σε μοντέλο αρουραίου.

Οι αναστολείς της φωσφοδιεστεράσης-5 (σιλδεναφίλη, βαρδεναφίλη, τανταλαφίλη) είναι φάρμακα που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία της στυτικής δυσλειτουργίας και της πνευμονικής αρτηριακής υπέρτασης. Η σιλδεναφίλη είναι ένα φάρμακο που αρχικά δημιουργήθηκε από την Pfizer Pharmaceuticals το 1989 στο Sandwich , της Αγγλίας ως φάρμακο για τη θεραπεία ανδρών που πάσχουν από υπέρταση και στηθάγχη. Το 1991, οι επιστήμονες Andrew Bell, Dr David Brown και ο Dr Nicholas Terrett ανακάλυψαν ότι οι χημικές ενώσεις που ανήκουν στην κατηγορία της πυραζολοπυριμιδινόνης ήταν χρήσιμες στη θεραπεία των καρδιακών προβλημάτων , όπως η στηθάγχη. Ο Dr Nicholas Terrett τιμήθηκε το 1991 με το δίπλωμα ευρεσιτεχνίας για το κιτρικό άλας σιλδεναφίλης, το οποίο το ονόμασε Viagra, και οι ειδικοί τον θεωρούν ως ο πατέρας του Viagra. Ωστόσο, η κιτρική σιλδεναφίλη, ως φάρμακο για την καρδιά , δεν έδειξε τα αναμενόμενα αποτελέσματα και οι μελέτες σταμάτησαν το 1992.[1]



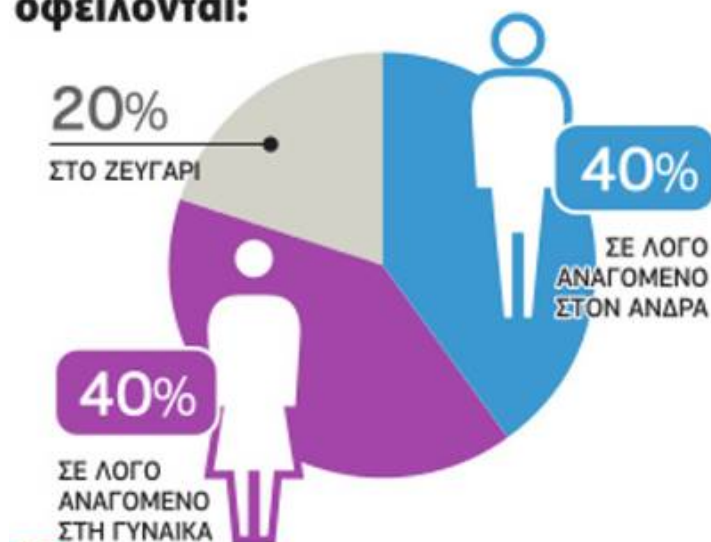
Εικόνα 1: Πρόβλημα στυτικής δυσλειτουργίας[2,3]

Το 1994, ο Dr Nicholas Terrett και ο Peoter Ellis ανακάλυψαν ότι με τη χορήγηση σιλδεναφίλης ως φάρμακο για την καρδιά, παρατηρήθηκε εισροή του αίματος στο πέος. Το φάρμακο αυτό δρα αναστέλλοντας την cGMP - ειδική φωσφοδιεστεράση τύπου 5 (PDE5), ένα ένζυμο που προάγει την αποικοδόμηση της cGMP , η οποία ρυθμίζει τη ροή του αίματος στο πέος . Με αυτό τον τρόπο αυξάνεται το μονοξείδιο του αζώτου (NO), που δρα ως μυοχαλαρωτικό και δημιουργείται αύξηση της ροής του αίματος στο πέος με αποτέλεσμα την επίτευξη της στύσης μετά από σεξουαλικό ερέθισμα. Έτσι «μια ευχάριστη παρενέργεια» του Viagra οδήγησε την εταιρία Pfizer να αποφασίσει να βγάλει στην αγορά το φάρμακο κατά της στυτικής δυσλειτουργίας, αντί για φάρμακο για την καρδιά.[1]

1.1. ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ ΚΑΙ ΕΜΒΡΥΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΑΝΔΡΙΚΟΥ ΓΕΝΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ

Ως υπογονιμότητα ορίζεται η αδυναμία σύλληψης μετά από ένα χρόνο σεξουαλικών επαφών χωρίς προφύλαξη ή χρήση αντισυλληπτικών μέσων. Στειρότητα ονομάζουμε την απόλυτη αδυναμία σύλληψης. Με βάση τον παραπάνω ορισμό στις ΗΠΑ εκτιμάται ότι το 10-15% των ζευγαριών θεωρείται υπογόνιμο. Περίπου στο 40% των περιπτώσεων υπεύθυνος είναι ο ανδρικός παράγοντας και σε ένα άλλο 40% ο γυναικείος. Στο υπόλοιπο 20% εμπλέκονται και τα δύο φύλα.

Οι περιπτώσεις υπογονιμότητας οφείλονται:



Εικόνα 2: Ποσοστό υπογονιμότητας[4]

Συγκεκριμένα η χώρα μας κατέχει ένα από τα χαμηλότερα ποσοστά γονιμότητας στην Ευρωπαϊκή Ένωση, γεγονός που αποτελεί την κύρια αιτία της γήρανσης του πληθυσμού στη χώρα. Σύμφωνα με τα στοιχεία της Eurostat το 2005, σε κάθε Ελληνίδα αντιστοιχούν 1,28 παιδιά, όταν ο ευρωπαϊκός μέσος όρος είναι 1,51 παιδιά. Ο σχετικός δείκτης ήταν πολύ υψηλότερος το 1975, όταν σε κάθε Ελληνίδα αναλογούσαν 2,32 παιδιά, ενώ σε κάθε Ευρωπαία 2,02.

Ο δείκτης γονιμότητας των Ελληνίδων είναι ο 5ος μικρότερος στην ΕΕ των «27» και ο χαμηλότερος μεταξύ των 15 «παλαιών» κρατών-μελών. Ο «κανόνας» των δύο παιδιών ανά οικογένεια δεν ισχύει πλέον ούτε στην ΕΕ, με μόνη εξαίρεση χώρες όπως η Γαλλία και η Ιρλανδία όπου ο δείκτης γονιμότητας παραμένει στο 1,92 και 1,88 αντίστοιχα, ενώ στο 1,8 βρίσκεται σε Φινλανδία, Δανία, και Βρετανία.



Εικόνα 3: Υπογονιμότητα στην Ελλάδα[5]

1.2.ΤΟ ΓΕΝΝΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΤΟΥ ΑΝΔΡΑ

Το ανδρικό γεννητικό σύστημα αποτελείται:

α) Από τους δύο όρχεις.

β) Από την εκφορητική οδό του σπέρματος, η οποία συγκροτείται εκατέρωθεν από την επιδιδυμίδα, το σπερματικό πόρο, τη σπερματοδόχο κύστη και τον εκσπερματικό πόρο, που εκβάλλει στην προστατική μοίρα της ουρήθρας. Από εκεί η εκφορά του σπέρματος γίνεται μέσω της ουρήθρας, από τα τοιχώματα της οποίας, παράγονται ο προστάτης και οι βολβουρηθραίοι αδένες. Για το λόγο αυτό τα όργανα αυτά (ουρήθρα, προστάτης και βολβουρηθραίοι αδένες) περιλαμβάνονται και στο γεννητικό σύστημα του άρρενος.

γ) Από το πέος.

1.3.ΕΜΒΡΥΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΟΡΧΕΩΣ

Η ανάπτυξη του όρχεως σαν αδιαφοροποίητη γονάδα γίνεται εμφανής κατά τη διάρκεια της 5ης εμβρυϊκής εβδομάδας, όταν μία πάχυνση του επιθηλίου, το βλαστικό επιθήλιο, αναπτύσσεται στη μέση πλευρά της ουρογεννητικής παρυφής. Ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων αυτών δημιουργεί μία διόγκωση στη μέση πλευρά κάθε μεσόνεφρου που είναι γνωστή σαν γοναδικός κρημνός. Επιθηλιακές ταινίες που

ονομάζονται πρωτογενείς φυλετικές ταινίες μεγαλώνουν σε λίγο μέσα στο υποκείμενο μεσέγγυμα. Η αδιαφοροποίητη γονάδα στον άνδρα έπειτα αποτελείται από α) έναν εξωτερικό φλοιό και β) από έναν εσωτερικό μυελό. Ο μυελός διαφοροποιείται σε όρχεις και ο φλοιός υποστρέφεται. Η αρρενοποιητική δράση του Y χρωματοσώματος οδηγεί στο να διαφοροποιηθούν οι πρωτογενείς φυλετικές ταινίες σε ορχικά σωληνάρια. Οι πρωτογενείς φυλετικές χορδές συμπυκνώνονται και διακλαδίζονται, έτσι τα άκρα τους αναστομώνονται και σχηματίζουν το Αλλήρειο δίκτυο. Οι φανερές πια φυλετικές χορδές (σπερματικές χορδές) χάνουν τη σύνδεσή τους με το βλαστικό επιθήλιο, καθώς αναπτύσσεται σιγά - σιγά μία παχιά ινώδης κάψα που ονομάζεται λευκός χιτώνας. Οι σπερματικές χορδές αναπτύσσονται σε σπερματικά σωληνάρια, στα ευθέα σωληνάρια και στο Αλλήρειο δίκτυο. Τα τοιχώματα των σπερματικών σωληναρίων αποτελούνται από δύο είδη κυττάρων. Στηρικτικά κύτταρα του Sertoli, που προέρχονται από το βλαστικό επιθήλιο και σπερματογόνια, που προέρχονται από τα αρχέγονα γεννητικά κύτταρα.

Πιο συγκεκριμένα, κατά την εμβρυική περίοδο γίνεται η έναρξη της γοναδικής διαφοροποίησης, κατά την οποία αρχίζει η ουσιαστική φυλετική διαφοροποίηση. Στο επίπεδο γεννητικής οδού γίνεται η ανάπτυξη των γεννητικών πόρων: των πόρων του Wolff (μεσονεφρικοί) και Müller (παραμεσονεφρικοί). Τα εξωτερικά γεννητικά όργανα προέρχονται από τον ουρογεννητικό κόλπο, το γεννητικό φύμα, τις γεννητικές πτυχές και τα γεννητικά ογκώματα.

Κατά την επίδραση της anti Mullerian hormone που εκκρίνεται από τα κύτταρα Sertoli ο πόρος του Müller ατροφεί, ενώ ο πόρος του Wolff, που, στο έμβρυο των 30 ημερών, έχει ήδη αναπτυχθεί μέχρι το ουραίο άκρο και εκβάλλει στον ουρογεννητικό κόλπο, διαφοροποιείται: α) στο κεφαλικό τμήμα που σχηματίζει την επιδιδυμίδα, β) στο μεσαίο τμήμα, το σπερματικό πόρο και γ) στο τελικό τμήμα μετατρέπεται στις σπερματοδόχες κύστεις. Συγχρόνως γίνεται ανάπτυξη του προστάτη από ενδοδερματικές εκβλαστήσεις του τοιχώματος της αρχέγονης ουρήθρας. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι από τους επικουρικούς γεννητικούς αδένες του άρρενος (προστάτης, σπερματοδόχες κύστεις, και βολβοουρηθραίοι αδένες), οι σπερματοδόχες κύστεις προέρχονται από τους πόρους του Wolff. Ο προστάτης έχει κυρίως ενδοδερματική προέλευση αλλά περιέχει και μερικά μεσοδερματικά στοιχεία, όπως των πόρων του Müller, ενώ αντίθετα οι βολβοουρηθραίοι αδένες προέρχονται από το ενδόδερμα. Στο έμβρυο των 10 εβδομάδων οι καταβολές των αδένων του προστάτη αναγνωρίζονται ως ενδοδερματικές επιθηλιακές εκβλαστήσεις στην κοιλιακή πλευρά

του ουρογεννητικού κόλπου, στο επίπεδο του παραμεσονεφρικού φύματος. Στην οπίσθια άνω μοίρα του αδένου δημιουργείται από τον μητροκολπικό σωλήνα το κολπικό πέταλο από το οποίο διαμορφώνεται ο προστατικός κόλπος (όργανο του Weber). Γύρω από αυτόν οι εκσπερματιστικοί πόροι (παράγωγα των πόρων του Wolff) εκβάλλουν στο παραμεσονεφρικό φύμα (λοφίδιο του Müller). Από αυτό δημιουργείται το σπερματικό λοφίδιο.

Από τον ουρογεννητικό κόλπο αναπτύσσονται το πρόσθιο τμήμα της ουρήθρας και οι αδένες του Cowper. Τέλος από το γεννητικό φύμα σχηματίζεται το πέος και τα σπυραγγώδη σώματα ενώ τα γεννητικά ογκώματα ενώνονται στη μέση γραμμή και σχηματίζουν το όσχεο και τη ραφή.[6, 7]

1.3.1.ΕΜΒΡΥΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΚΑΘΟΔΟΥ ΤΟΥ ΟΡΧΕΩΣ

Η κάθοδος των όρχεων αρχίζει κατά το 3^ο τρίμηνο της κύησης και ολοκληρώνεται μέχρι την 35η εβδομάδα της κύησης. Η κάθοδος των όρχεων προς περιβάλλον χαμηλής θερμοκρασίας στα θηλαστικά, είναι μια πολύπλοκη διαδικασία πολλαπλών σταδίων. Συγκεκριμένα η διαφοροποίηση των γονάδων στον άνθρωπο γίνεται την 7η - 8η εβδομάδα κύησης. Ο όρχις αναπτύσσεται από το γεννητικό έπαρμα του μεσοδέρματος κατά την έσω πλευρά του μεσονέφρου στο οπίσθιο κοιλιακό τοίχωμα του εμβρύου. Συνδέεται με το μεσοόρχιο που αποτελεί πτυχή του περιτοναίου, το οποίο εκτείνεται προς τη βουβωνική χώρα και με το διάφραγμα με την διαφραγματική πτυχή. Από το μεσοόρχιο αναπτύσσεται ο οίακας, που προσφύεται προς τα άνω στον κάτω πόλο του όρχεως και προς τα κάτω στα γεννητικά ογκώματα που θα σχηματίσουν στη συνέχεια το όσχεο. Καθώς ο οίακας δεν αναπτύσσεται με ρυθμό ανάλογο προς το σώμα, καθίσταται βραχύς και "κατευθύνει" τον όρχι προς το όσχεο. Ο όρχις συμπαρασύρει μαζί του σωληνοειδές εγκόλπωμα του περιτοναίου δημιουργώντας έτσι την ελυτροπεριτοναϊκή πτυχή και μέσα σε αυτή κατεβαίνει στο όσχεο. Το κατώτερο τμήμα της ελυτροπεριτοναϊκής πτυχής περιβάλλει τον όρχι και αποτελεί το ίδιο ελυτροειδή χιτώνα, ενώ το ανώτερο τμήμα αποφράσσεται φυσιολογικά. Κατά την κάθοδο του μέσω βουβωνικού πόρου, μαζί με τον σπερματικό τόνο, ο όρχις λαμβάνει τα τρία του περιβλήματα από στοιχεία του κοιλιακού τοιχώματος: τον κοινό ελυτροειδή χιτώνα από την εγκάρσια περιτονία, τον κρεμαστήρα μυ, από στοιχεία του έσω λοξού και εγκάρσιου κοιλιακού μυός, και την περιτονία του κρεμαστήρα από την απονεύρωση του έξω λοξού μυός. Στο τέλος της

καθόδου, η ελυτροπεριτοναϊκή πτυχή συνδέεται στο όσχεο με τον οσχεϊκό σύνδεσμο.[8] Η 1η φάση της ενδοκοιλιακής καθόδου ελέγχεται ξεχωριστά από την βουβωνοοσχεϊκή φάση. Η υποστροφή της διαφραγματικής πτυχής ελέγχεται από τα ανδρογόνα, αλλά δε φαίνεται να σχετίζεται με την κάθοδο του όρχεως. Η αύξηση του μεσοορχίου ελέγχεται από μια μη ανδρογόνο ορμόνη, τον παράγοντα Insl3 (Insuline-like factor 3). Η μετανάστευση του όρχεως από τη βουβωνική περιοχή στο όσχεο υπόκειται στον έλεγχο ανδρογόνων και συγκεκριμένα της τεστοστερόνης.

Σε περιπτώσεις ανεπαρκούς ανδρογονικής έκκρισης ή ανεπάρκειας γοναδοτροπίνης, η βουβωνοοσχεϊκή φάση δεν συμπληρώνεται [9].

Ο μηχανισμός του ανδρογονικού ελέγχου της καθόδου του μεσοορχίου είναι άγνωστος, υπάρχουν όμως ενδείξεις που εμπλέκουν το μηρογεννητικό νεύρο. Έχει προταθεί ότι η διέγερση των αισθητικών κλάδων του μηρογεννητικού νεύρου απελευθερώνει το πεπτιδίο CGRP (calcitonin gene-related peptide) που έμμεσα ελέγχει την κάθοδο (μέσω ενεργοποίησης της αύξησης της άκρης του μεσοορχίου)[4].

Η ενδοκοιλιακή πίεση που ασκείται μέσω της ελυτροπεριτοναϊκής επικοινωνίας και η τάση πρόπτωσης του κρεμαστήρα μυός που αναπτύσσεται, πιθανώς να αποτελούν τις φυσικές δυνάμεις της καθόδου[3]. Κατά τη φυλογένεση η θέση των όρχεων επηρεάζεται από την εμφάνιση της ομοιοθερμίας. Έτσι στα κατώτερα σπονδυλωτά(ψάρια, ερπετά, αμφίβια και μονοτρίματα) όπως και στα υδρόβια θηλαστικά (φάλαινες, δελφίνια) οι όρχεις βρίσκονται ενδοκοιλιακά. Επίσης σε ορισμένα θηλαστικά (στις νυχτερίδες και στους σκαντζόχοιρους) οι όρχεις βρίσκονται ενδοβουβωνικά ή ενδοκοιλιακά και κατεβαίνουν στο όσχεο μόνο κατά τη διάρκεια του οργασμού.[10]

1.3.2.ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΟΡΧΕΩΣ

Ο όρχις είναι ο γεννητικός αδένας του άρρενος. Είναι το "όργανο εργοστάσιο" το οποίο παράγει τα σπερματοζώαρια αλλά έχει και ενδοκρινή λειτουργία με την παραγωγή της τεστοστερόνης. Επιπρόσθετα είναι ένα όργανο που παρέχει τις κατάλληλες ανοσολογικά ευνοϊκές συνθήκες σαν δέκτης για προσπάθεια μεταμόσχευσης κυττάρων. Έχει κυανωπό χρώμα, μέγεθος καρυδιού (μήκος 4-5 εκ., βάρος 10-14 γραμμ.) και σχήμα έλλειψης, πεπλατυσμένης από τα πλάγια. Πιο συγκεκριμένα εμφανίζει δύο χείλη, πρόσθιο και οπίσθιο, δύο άκρα, άνω και κάτω και

δύο επιφάνειες, την έσω και την έξω. Το πρόσθιο χείλος είναι ελεύθερο, ενώ κατά μήκος του οπισθίου χείλους κατέρχεται το σώμα και η ουρά της επιδιδυμίδας, ανέρχεται δε ο σπερματικός πόρος. Ο άνω πόλος φέρεται προς τα μπρος και λίγο προς τα έξω εμφανίζοντας μια μικρή κυστεοειδή απόφυση, την ορχική υδατίδα. Πάνω σε αυτόν τον πόλο βρίσκεται η κεφαλή της επιδιδυμίδας. Ο κάτω πόλος συμφύεται με τον πυθμένα του οσχέου με τον οσχεικό σύνδεσμο ή οίακα του όρχεως. Η έσω επιφάνεια είναι επίπεδη, η δε έξω επιφάνεια χωρίζεται από την επιδιδυμίδα με μια κατάδυση του ιδίως ελυτροειδούς χιτώνα, που ονομάζεται κόλπος της επιδιδυμίδας. Ο κόλπος αυτός προς τα πάνω και προς τα κάτω αφορίζεται από δύο πτυχές, τον άνω και κάτω σύνδεσμο της επιδιδυμίδας. [10]

Ο όρχις είναι μικτός αδένας και αποτελείται από:

- 1) τον ινώδη χιτώνα,
- 2) από τα σπερματικά σωληνάκια,
- 3) από τη διάμεση ουσία και
- 4) από αγγεία και νεύρα.

Οι όρχεις περιβάλλονται από πολλούς χιτώνες που είναι προεκβολές των διαφόρων στιβάδων του πρόσθιου κοιλιακού τοιχώματος. Κατά το άνω τριτημόριο του οπισθίου χείλους του όρχεως σχηματίζεται μια πάχυνση, που λέγεται μεσαύλιο του όρχεως ή σώμα του Highmore. Από το σώμα αυτό φεύγουν ινώδη πετάλια, τα διαφραγμάτια του όρχεως, που φθάνουν ως τον ινώδη χιτώνα και χωρίζουν το παρέγχυμα του όρχεως σε 250-300 ορχικά λοβία. Σε κάθε ορχικό λοβίο βρίσκονται σπερματικά σωληνάκια και διάμεση ουσία.

Συγκεκριμένα ο όρχις περιβάλλεται από τους ακόλουθους χιτώνες από τα έξω προς τα μέσα:

1. Το όσχεο, που αποτελεί δερμάτινο περίβλημα των όρχεων και στερείται υποδορίου λίπους.
2. Ο δαρτός που συνάπτεται μετά του δέρματος.
3. Η κρεμαστήριος περιτονία που αποτελεί τη συνέχεια της επιπολής κοιλιακής περιτονίας.

4. Ο έξω κρεμαστήρ μυς που αποτελείται από δύο μοίρες, την έξω και την έσω. Η έξω μοίρα αποτελεί τη συνέχεια των ινών του έσω λοξού και του εγκάρσιου κοιλιακού μυός. Η έσω μοίρα εκφύεται εκ του ηβικού φύματος.
5. Ο κοινός ελυτροειδής χιτώνας, που αποτελεί προεκβολή της εγκάρσιου περιτονίας.
6. Ο ιδίως ελυτροειδής χιτώνας, που προέρχεται από τον περιτοναϊκό θύλακο.

Το παρέγχυμα του όρχεως αποτελείται από τα σπερματικά σωληνάρια και το διάμεσο ιστό. Η σπερματογένεση λαμβάνει χώρα στα σπερματικά σωληνάρια. Τα σπερματικά σωληνάρια περιλαμβάνουν τα germ (γεννητικά) κύτταρα και τα κύτταρα Sertoli. Τα σπερματικά σωληνάρια περιβάλλονται από μία μεμβράνη που αποτελείται από ινοβλάστες, μυϊκά κύτταρα και κολλαγόνες ίνες βυθισμένες σε ένα στρώμα πολυσακχαριδών. Ο διάμεσος ιστός βρίσκεται ανάμεσα στα σπερματικά σωληνάρια και περιλαμβάνει τα κύτταρα Leydig, αγγεία, λεμφαγγεία και μακροφάγα κύτταρα. Τα κύτταρα Leydig εκκρίνουν ανδρογόνα. Γι' αυτό το κυτταρόπλασμά τους είναι πλούσιο σε λείο ενδοπλασματικό δίκτυο. Τα κύτταρα Leydig δεν αποθηκεύουν τεστοστερόνη, αλλά την εκκρίνουν στο διάμεσο χώρο από όπου διαχέεται στο αίμα, στη λέμφο και στα σπερματικά σωληνάρια. [11]

Τα σπερματικά σωληνάρια αρχίζουν με τυφλό άκρο κάτω από τον ινώδη χιτώνα (3-4 σε κάθε ορχικό λοβίο), πορεύονται σπειροειδώς και συγκλίνουν προς το μεσαύλιο του όρχεως, κοντά στο οποίο σχηματίζουν ένα βραχύ κοινό σωληνάριο. Το σωληνάριο αυτό μπαίνει μέσα στο μεσαύλιο, όπου αναστομώνεται με άλλα όμοια σωληνάρια και έτσι συμβάλλει στο σχηματισμό του δικτύου του Haller (rete testis). Υπολογίζεται ότι το συνολικό μήκος των 600-1200 σπερματικών σωληναρίων του ανθρώπου φτάνει τα 250 μέτρα.

Σύμφωνα με αυτά, τα σπερματικά σωληνάρια διακρίνονται στα εσπειραμένα και στα ευθέα, από τα οποία τα μεν εσπειραμένα χρησιμεύουν για την παραγωγή των σπερματοζωαρίων, τα δε ευθέα για την αποχέτευσή τους.

Τα εσπειραμένα σπερματικά σωληνάρια αποτελούνται από βασικό υμένα και επιθήλιο με δύο είδη κυττάρων, τα βασικά κύτταρα (Sertoli) και τα σπερμιογόνα κύτταρα, τα οποία από έξω προς τα μέσα διακρίνονται στα σπερμιογόνα, τα σπερματοκύτταρα, τις στρογγυλές σπερματίδες και τις ώριμες σπερματίδες. Από αυτά οι σπερματίδες έχουν τον απλοειδή αριθμό χρωματοσωμάτων, περιβάλλονται από τα κύτταρα Sertoli και

μεταπλάσσονται σιγά-σιγά σε σπερματοζωάρια. Αυτά αποσπώνται από τα βασικά κύτταρα και πέφτουν στον αυλό των σπερματικών σωληναρίων (spermiation process). Η διάμεση ουσία αποτελείται από συνδετικό ιστό, μακροφάγα, λεμφοαγγεία, αιμοφόρα αγγεία, νεύρα, και τα διάμεσα κύτταρα (του Leydig), τα οποία βρίσκονται μέσα στο συνδετικό ιστό, ανάμεσα στα εσπειραμένα σπερματικά σωληνάκια. Τα κύτταρα αυτά πιθανώς αντικατοπτρίζουν την ενδοκρινή μοίρα του όρχεως και παράγουν την ορμόνη τεστοστερόνη που ρυθμίζει την γενετήσια ορμή και την ανάπτυξη των δευτερογενών χαρακτηρισμών του άρρενος φύλου. Στον άνθρωπο η διάμεση ουσία καταλαμβάνει το 20-30% του συνολικού όγκου του όρχεως.[11]

1.3.3.ΑΙΜΑΤΩΣΗ ΤΟΥ ΟΡΧΕΩΣ

ΑΓΓΕΙΑ ΚΑΙ ΝΕΥΡΑ ΤΟΥ ΟΡΧΕΩΣ

Αρτηρίες του όρχεως

Τρεις αρτηρίες είναι υπεύθυνες για την αιμάτωση του όρχεως. Είναι α) η έσω σπερματική αρτηρία, β) η εκφορητική αρτηρία και γ) η έξω σπερματική αρτηρία. Από τις αρτηρίες αυτές ο όρχις αγγειούται κυρίως από την έσω σπερματική (ορχική), που εκφύεται από την κοιλιακή αορτή, μεταξύ της νεφρικής και της κάτω μεσεντερίου αρτηρίας. Η πορεία της έσω σπερματικής αρτηρίας μέχρι τον όρχι δείχνει την οδό, την οποία διανύει ο όρχις καθώς κατεβαίνει στο όσχεο. Η εκφορητική αρτηρία, κλάδος της ομφαλικής ή της κάτω κυστικής αρτηρίας (έσω λαγονίου), διανέμεται κυρίως στο σπερματικό πόρο, η δε έξω σπερματική (κρεμαστήριος) αποτελεί κλάδο της κάτω επιγαστρίας αρτηρίας και συμβάλλει στην αγγείωση των περιβλημάτων του όρχεως. [12]

1.3.4.ΦΛΕΒΕΣ ΤΟΥ ΟΡΧΕΩΣ

Λεμφοαγγεία του όρχεως

Τα λεμφοαγγεία του όρχεως εκβάλλουν στα παρααορτικά, μεσοθωράκια και υπερκλείδια λεμφογάγγλια.

Νεύρα του όρχεως

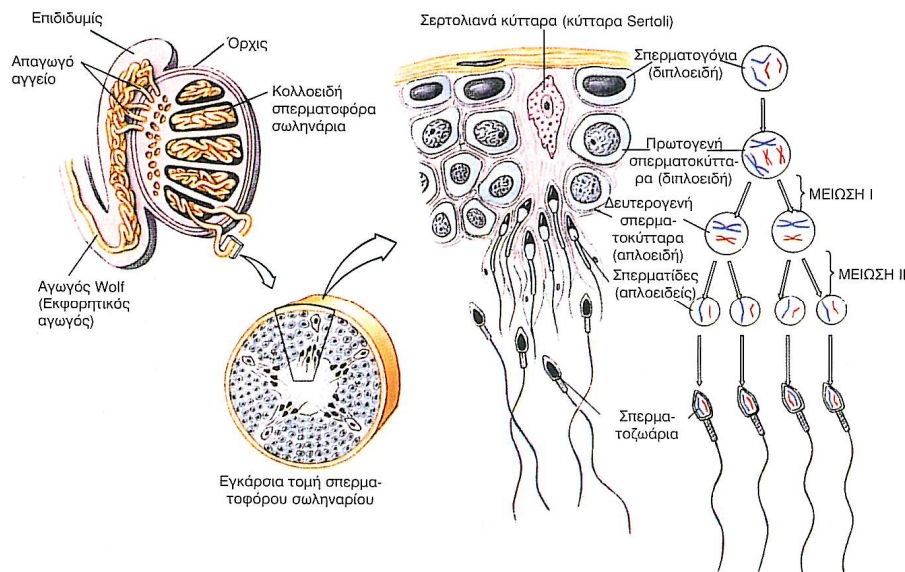
Τα νεύρα του όρχεως προέρχονται από το σπερματικό πλέγμα που φέρεται κατά μήκος της έσω σπερματικής αρτηρίας. Το πλέγμα αυτό αποτελεί δευτερεύον πλέγμα του κοιλιακού πλέγματος και αποτελείται από ίνες του συμπαθητικού και του παρασυμπαθητικού συστήματος.[10]

1.4.ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΣΠΕΡΜΑΤΟΓΕΝΕΣΗΣ

Η σπερματογένεση είναι μια πολύπλοκη διαδικασία κατά την οποία τα αρχέγονα κύτταρα διαιρούνται είτε για να ανανεώσουν τους εαυτούς τους, είτε για να παράγουν θυγατρικά κύτταρα που θα μετατραπούν σε σπερματοζώαρια. Αυτές οι διαδικασίες συμβαίνουν εντός των σπερματικών σωληναρίων. Η όλη διαδικασία ανάπτυξης ενός σπερματογονίου κυττάρου που εισέρχεται στην κατεύθυνση της διαφοροποίησης σε ώριμο σπερματοζώαριο διαρκεί 74 ημέρες. Άλλωστε το 90% του όγκου του όρχεως αποτελείται από σπερματικά σωληνάκια και γενετικά κύτταρα σε διάφορα στάδια διαφοροποίησης.

Η σπερματογένεση μπορεί να χωριστεί σε τρεις σημαντικές φάσεις:

- 1) Πολλαπλασιασμός και διαφοροποίηση των σπερματογονίων
- 2) Μείωση
- 3) Σπερμιογένεση που εκπροσωπεί την σύνθετη μεταμόρφωση της στρογγυλής σπερματίδας που προκύπτει από την μείωση, στην δομή του σπερματοζωαρίου.



Εικόνα 4:Στάδια σπερματογένεσης[13]

1.4.1.ΤΟ ΩΡΙΜΟ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΟ

Το ώριμο σπερματοζώαριο διαθέτει την κεφαλή, η οποία καταλαμβάνεται κυρίως από τον πυρήνα. Η χρωματίνη είναι ασυνήθιστα έντονα συμπυκνωμένη μέσα στον πυρήνα. Ο πυρήνας περιβάλλεται στο πρόσθιο τμήμα από ένα αρκετά επιμηκυσμένο εκκριτικό κυστίδιο, το ακρόσωμα. Η ουρά του σπερματοζωαρίου δομείται από τη χαρακτηριστική διάταξη των 9+2 μικροσωληνίσκων οι οποίοι συνδέονται μεταξύ τους με τους βραχίονες δυνεΐνης. Η δομή της δυνεΐνης, είναι γνωστή και ως αξονήμιο το οποίο δίνει στο σπερματοζώαριο τη χαρακτηριστική μαστιγοειδή του κίνηση. Επιπλέον, στην ουρά εντοπίζεται και ο δακτύλιος των μιτοχονδρίων τα οποία παρέχουν την ενέργεια που απαιτείται για την κίνηση των σπερματοζωαρίων. Τα ώριμο σπερματοζώαριο εκτός από το γενετικό του υλικό προσφέρει επίσης στο ώαριο κυτταροπλασματικούς παράγοντες οι οποίοι θεωρούνται απαραίτητοι για την ενεργοποίηση του ωαρίου. Επίσης παρέχει το εγγύς κεντρίλιο του, το οποίο θα αποτελέσει το κεντρόσωμα του ζυγώτη που θα οργανώσει την πρώτη κυτταρική διαίρεση. Στον άνδρα κάθε ώρα παράγονται 100 εκατομμύρια σπερματοζώαρια και σε κάθε εκσπερμάτωση, σε ένα γόνιμο άνδρα, απελευθερώνονται περίπου 60-300 εκατομμύρια σπερματοζώαρια[14].

Τα σπερματογόνια διαιρούνται μιτωτικά προμηθεύοντας τόσο ανανεωμένα αρχέγονα ή βλαστικά κύτταρα όσο και σπερματογόνια προοριζόμενα να εισέλθουν

στη διαδικασία της μείωσης. Η ταυτοποίηση των διαφόρων τύπων σπερματογονίων είναι αρκετά δύσκολη, κυρίως λόγω έλλειψης ειδικών διακριτικών χαρακτηριστικών. Μέχρι σήμερα, η ταξινόμηση αυτών των κυττάρων βασίζεται κυρίως σε χαρακτηριστικά των πυρήνων τους και πιο συγκεκριμένα στον τύπο της χρωματίνης τους.[15] Συγκεκριμένα στα θηλαστικά υπάρχουν δύο κύριες τάξεις σπερματογονίων: α) τα σπερματογόνια τύπου A (στα οποία η χρώση της χρωματίνης είναι λεπτή και ωχρή) και β) τα σπερματογόνια τύπου B (που παρουσιάζουν συλλογές χρωματίνης με τραχιά χρώση εντοπιζόμενη κοντά στην πυρηνική μεμβράνη).[16] Σε πολλά θηλαστικά τα σπερματογόνια τύπου A υποδιαιρούνται σε πολλούς διαφορετικούς υποτύπους, εκφράζοντας έτσι τις διαφορετικές φάσεις του πολλαπλασιασμού αλλά και της προέλασης προς τα σπερματογόνια τύπου B.

Τα σπερματογόνια τύπου B αντιπροσωπεύουν τα κύτταρα εκείνα που έχουν ως σκοπό να διαφοροποιηθούν και να εισέλθουν στην διαδικασία της μείωσης, τα λεγόμενα πρωτεύοντα σπερματοκύτταρα (primary spermatocytes).[17]

Τα σπερματογόνια εφάπτονται στη βασική μεμβράνη και ακολουθούνται από τα σπερματοκύτταρα 1ης τάξης, τα σπερματοκύτταρα 2ης τάξης και τις σπερματίδες όσο πλησιάζουμε στον αυλό των σωληναρίων. Συγκεκριμένα στον άνθρωπο έχουν παρατηρηθεί 13 διαφορετικά στάδια στη εξέλιξη των γενετικών κυττάρων. Επίσης τα σπερματογόνια τύπου A μπορούν να διακριθούν περαιτέρω σε A σκούρα (Ad) και A ωχρά (Ap), σε σπερματογόνια τύπου B[17], σε πριλεπτοταινή, λεπτοταινή, ζυγοταινή και παχυτινή σπερματοκύτταρα πρώτης τάξης, σπερματοκύτταρα δεύτερης τάξης (Sa), καθώς και σε Sb1, Sb2, Sc, Sd1, Sd2 σπερματίδες.

Η σπερματογένεση διαιρείται σε τρεις φάσεις:

Στην 1η φάση τα Ap σπερματογόνια διαιρούνται με μίτωση και αυτοανανεώνονται ή δίνουν τα B σπερματογόνια. Τα σπερματογόνια κύτταρα τύπου B αφού διαιρεθούν με μίτωση παράγουν τα διαφοροποιημένα σπερματοκύτταρα. Στην 2η φάση τα σπερματοκύτταρα υποβάλλονται σε δύο διαδοχικές διαιρέσεις από τις οποίες θα δημιουργηθούν οι σπερματίδες. Οι σπερματίδες είναι απλοειδή κύτταρα καθώς έχουν στον πυρήνα τους ακριβώς το μισό αριθμό χρωμοσωμάτων από αυτό των σωματικών κυττάρων. Τα σωματικά κύτταρα στον άνθρωπο περιέχουν 46 χρωμοσώματα ενώ τα σπερματοζωάρια και οι σπερματίδες 23. Οι δύο μειωτικές διαιρέσεις οδηγούν σε δύο γενιές σπερματοκυττάρων, σε πρώτη και δεύτερης τάξης. Προκειμένου τα σπερματοκύτταρα πρώτης τάξεως να γίνουν δεύτερης, περνούν από διάφορα στάδια. Στο πρώιμο στάδιο ή στάδιο πριν το λεπτοτενές, ο πυρήνας του σπερματοκυττάρου

πρώτης τάξης αντιγράφει το DNA. Τα κύτταρα περνάνε στο λεπτοτενές στάδιο όπου εμφανίζονται στον πυρήνα ως λεπτά νηματοειδή χρωμοσώματα. Στη συνέχεια, τα ομόλογα χρωμοσώματα πλησιάζουν μεταξύ τους και σχηματίζουν ζεύγη. Το φαινόμενο ονομάζεται σύναψη και το κύτταρο βρίσκεται στο στάδιο ζυγοταινίας. Στη συνέχεια στο στάδιο της παχυταινίας κάθε χρωμοσωμικό ζευγάρι κονταίνει και παχαίνει και διαμορφώνεται. Κατά τη διάρκεια του σταδίου αυτού ο πυρήνας και το κύτταρο αυξάνονται προοδευτικά σε όγκο. Ο πυρήνας από τα παχυτένη πρωτογεννή σπερματοκύτταρα περιέχει ένα πυρηνίσκο, ενδεικτικού της ενεργούς σύνθεσης ριβοσωμικού RNA, το οποίο εισέρχεται στο κυτταρόπλασμα και συμβάλλει στη σύνθεση πρωτεϊνών. Στη συνέχεια τα σπερματοκύτταρα 1ης τάξεως ολοκληρώνουν γρήγορα την πρώτη μειωτική διαίρεση περνώντας από την μετάφαση, την ανάφαση και την τελόφαση, κατά τη διάρκεια της οποίας τα ομόλογα χρωμοσώματα χωρίζονται και μετακινούνται προς τους πόλους του κυττάρου. Ακολουθεί η διαίρεση και ο σχηματισμός των δύο θυγατρικών κυττάρων, των σπερματοκυττάρων 2ης τάξης. Αυτά τα κύτταρα με τη σειρά τους διαιρούνται και κάθε θυγατρικό νέο κύτταρο περιέχει στον πυρήνα του και μισό αριθμό χρωμοσωμάτων (23). Τα νέα κύτταρα είναι πλέον οι σπερματίδες. Κατά την 3η φάση ή φάση σπερμιόγένεσης, τα νεοσχηματισμένα κύτταρα, οι σπερματίδες, μεταμορφώνονται. Μέσα δηλαδή από τα στάδια Sb1, Sb2, Sc, Sd1 και Sd2 κατά τα οποία ο πυρήνας προοδευτικά επιμηκύνεται, η χρωματίνη του συμπυκνώνεται και σταδιακά παίρνει το αποπλατυσμένο χαρακτηριστικό σχήμα της κεφαλής του ανθρώπινου σπερματοζωαρίου. Συγκεκριμένα η συσκευή Golgi είναι υπεύθυνη για το σχηματισμό του ακροσώματος, ενώ το κεντρόσωμα βρίσκεται στο εγγύς τμήμα της ουράς. Το κυτταρόπλασμα αποτελεί πλέον ένα υπολειπόμενο σωματίο που φαγοκυτταρώνεται και εξαφανίζεται από τα κύτταρα Sertoli. [18]

Η διαδικασία ωρίμανσης των σπερματοζωαρίων διαρκεί αρκετές εβδομάδες και απαιτεί τη σύνθεση εκατοντάδων νέων πρωτεϊνών και τη συναρμολόγηση μοναδικών οργανιδίων. Κατά τη διαφοροποίηση των σπερματίδων σε σπερματοζωάρια γίνονται οι εξής διεργασίες.

1. Δημιουργείται το ακρόσωμα από τη συσκευή Golgi
2. Δημιουργείται ένα μαστίγιο από τα κεντροσώματα.
3. Συμπυκνώνεται ο πυρήνας στο 10% του πρότερου μεγέθους του.
4. Χάνεται το υπόλοιπο κυτταρόπλασμα του κυττάρου.

Καθώς προχωρά η σπερματογένεση οι σπερματίδες κατευθύνονται προς τον αυλό του σπερματικού σωληναρίου. Με την συμπλήρωση της επιμήκυνσης της σπερματίδας το κυτταρόπλασμα των κυττάρων Sertoli αποτραβιέται από το αναπτυσσόμενο σπερματοζωάριο απογυμνώνοντας το από όλο το μη αναγκαίο κυτταρόπλασμα και εξωθώντας το προς τον αυλό του σωληναρίου.[19]

Ένα φυσιολογικό σπερματοζωάριο αποτελείται από την κεφαλή, το σώμα και την ουρά. Η κεφαλή έχει κατά μήκος διάμετρο 3,7-4,7μm και μεσαίο πλάτος 2,5-3,2μm, ενώ η διάμεση αναλογία μήκους-πλάτους κεφαλής υπολογίζεται μεταξύ 1,3-1,8. Το σώμα του σπερματοζωαρίου αποτελείται από τον αυχένα και το μέσο τμήμα. Ο αυχένας έχει μήκος περίπου 1μm και το μέσο τμήμα 5-7μm και διάμετρο 1μm. Η ουρά του σπερματοζωαρίου αποτελείται από το κύριο μέρος με μήκος 45 περίπου μm και το τελικό τμήμα της ουράς με μήκος 5-7μm, ξετυλιγμένη και λεπτή. Το μέσο τμήμα έχει μέσο μήκος 3,3-5,2μm και μεσαίο πλάτος 0,5-0,7μm.[20] Επίσης το μεσαίο τμήμα να είναι λιγότερο από το 1/3 του πλάτους της κεφαλής. Συγκεκριμένα η κεφαλή καλύπτεται από το ακρόσωμα, στο οποίο βρίσκεται ένας εξωτερικός και ένας εσωτερικός μανδύας πλούσιος σε γλυκοπρωτεΐνες, φωσφολιπίδια, και λυτικά ένζυμα. Το κυριότερο ένζυμο που είναι απαραίτητη για τη διείσδυση του σπερματοζωαρίου στο ωάριο και βρίσκεται στην κεφαλή, είναι η πρωτεάση ακρωσίνη. Η περιοχή του ακροσώματος πρέπει να καλύπτει 40-70% της περιοχής της κεφαλής. Το πρόσθιο τμήμα της κεφαλής, είναι επιφανειακό και αποπλατυσμένο. Στο μέσο της κεφαλής τελειώνει η επικάλυψη της από τον μανδύα, διευρυνόμενη δε σ' αυτό το σημείο υπό μορφή κοιλίας, μεταβαίνει στο μεταακροσωματικό τμήμα. Η προς τα μπρός κίνηση του σπερματοζωαρίου ενισχύεται από τις γρήγορες περιστροφές του γύρω από τον άξονα του. Συγκεκριμένα εντός της κεφαλής του βρίσκεται ο πυρήνας με τη συμπυκνωμένη χρωματίνη και ένα λεπτό στρώμα κυτταροπλάσματος. Η ουρά του σπερματοζωαρίου ονομάζεται μαστίγιο, αρχίζει ουσιαστικά από τον αυχένα, ο οποίος προέρχεται από τα κεντροσώματα και είναι υπεύθυνος για την κίνηση του σπερματοζωαρίου. Η ουρά αποτελείται από τρία κύρια τμήματα: α) ένα κεντρικό σκελετό, που αποτελείται από 11 μικροσωληνάρια, 2 κεντρικά και 9 περιφερικά (όλα μαζί λέγονται αξόνημα (αξονικό νημάτιο), β) μία λεπτή κυτταρική μεμβράνη η οποία καλύπτει το αξόνημα, και γ) μία ομάδα από μιτοχόνδρια, τα οποία περιβάλλουν το αξόνημα κατά το κεντρικό τμήμα της ουράς (σώμα της ουράς) [21]. Η κίνηση του σπερματοζωαρίου εξασφαλίζεται με τις κινήσεις της ουράς που είναι μαστιγοειδείς. Η πρόκληση της κίνησης στηρίζεται σε μια ρυθμική επιμήκη διολίσθηση μεταξύ των

προσθίων και οπισθίων σωληνίσκων που αποτελούν το αξόνημα. Τα φυσιολογικά σπερματοζώαρια μετακινούνται σε ευθεία γραμμή, με ταχύτητα 1-4 χιλιοστά ανά λεπτό. Η ενέργεια για αυτή την διεργασία προέρχεται από την ATP, που συντίθεται από τα μιτοχόνδρια που βρίσκονται στο σώμα της ουράς. [21]

1.4.2.ΚΥΤΤΑΡΑ LEYDIG

Τα κύτταρα Leydig βρίσκονται στο διάμεσο ιστό μεταξύ των σπερματικών σωληναρίων, κυρίως δίπλα από τα αιματικά αγγεία και τα σπερματικά σωληνάκια. Τα κύτταρα του Leydig αποτελούν περίπου το 20% της ολικής μάζας των όρχεων στον ενήλικα.[15] Τα κύτταρα Leydig είναι σχεδόν ανύπαρκτα στους όρχεις κατά την παιδική ηλικία. Όταν όμως οι όρχεις δεν εκκρίνουν σχεδόν καθόλου τεστοστερόνη, είναι πολυάριθμα στο νεογέννητο αγόρι, καθώς και στον ενήλικα άρρενα μετά την ήβη. Η εμβρυϊκή γενιά βρίσκεται υπό τον έλεγχο της ανθρώπινης χοριακής γοναδοτροπίνης (hCG) και παράγει τεστοστερόνη κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ζωής. Τα κύτταρα αυτά στον άνθρωπο μειώνονται και τελικά εξαφανίζονται μέσα στους πρώτους 12 μήνες ζωής του εμβρύου.[22] Η ενήλικη γενιά των κυττάρων Leydig στον άνθρωπο είναι υπό τον έλεγχο της LH κατά την φάση της εφηβείας. Η γενιά αυτή προκύπτει από τη διαίρεση και διαφοροποίηση μεσεγγυματικών πρόδρομων κυττάρων υπό τον έλεγχο της LH.[23] Συγκεκριμένα τα κύτταρα Leydig έχουν την ικανότητα να συνθέτουν χοληστερόλη από οξικό άλας ή να αποσπών το υπόστρωμα αυτό για την στεροειδογένεση από λιποπρωτεΐνες.[24,25] Τα κύτταρα Leydig εκκρίνουν στεροειδή, περιέχουν άφθονο λείο ενδοπλασματικό δίκτυο και μιτοχόνδρια οργανίδια απαραίτητα για την ενδοκυτταρική μεταφορά υποστρωμάτων ανάμεσα στα διάφορα οργανίδια προκειμένου να επιτύχουν την παραγωγή των ανδρογόνων.

1.4.3.ΚΥΤΤΑΡΑ SERTOLI

Τα κύτταρα του Sertoli βρίσκονται επί της βασικής μεμβράνης του σπερματικού σωληναρίου και εκτείνονται με τις κυτταροπλασματικές τους αποφύσεις μέχρι τον αυλό του σωληναρίου. Περιοχές της πλάγιας κυτταρικής μεμβράνης πάνω από το επίπεδο των σπερματογονίων, συνενώνονται μεταξύ τους μέσω αποφύσεων και σχηματίζουν ένα χώρισμα του επιθηλίου του σπερματικού σωληναρίου. Με αυτόν τον

τρόπο σε εγκάρσια διατομή διακρίνουμε το βασικό τμήμα πλησίον της βασικής μεμβράνης και το αυλικό τμήμα προς τον αυλό του σωληναρίου. Οι ενώσεις αυτές χαρακτηρίζονται ως οι πιο δυνατές διακυτταρικές ενώσεις του ανθρωπίνου σώματος.

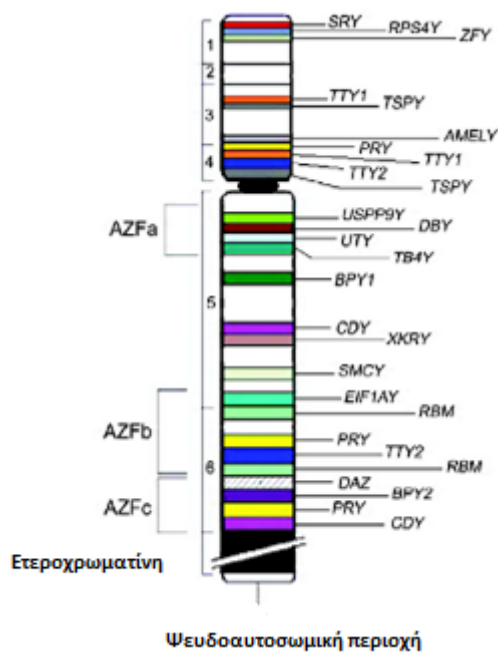
Οι κυριότερες λειτουργίες των κυττάρων Sertoli είναι:

- 1) στηρίζουν και προωθούν τα σπερματικά κύτταρα από τη βασική μεμβράνη προς τον αυλό του σπερματικού σωληναρίου,
- 2) δημιουργούν το κατάλληλο μικροπεριβάλλον για τη σπερματογένεση,
- 3) ρυθμίζουν τη μορφοποίηση και διαφοροποίηση των σπερματικών κυττάρων,
- 4) σχηματίζουν την αποφρακτική ζώνη (tight junctions) για τη ρύθμιση της διόδου των ουσιών από το αίμα προς τον όρχι (αιματοορχικός φραγμός),
- 5) εκκρίνουν πολλές πρωτεΐνες, μερικές από τις οποίες είναι ειδικές για τους όρχεις, όπως η ABP που δεσμεύει τα ανδρογόνα και άλλες παρόμοιες με τις πρωτεΐνες του πλάσματος, όπως η τρανσφερρίνη, που χρησιμεύει σαν πηγή σιδήρου για τις πρωτεΐνες της αίμης στα κύτταρα της σπερματογένεσης,
- 6) απορροφούν διάφορες ουσίες,
- 7) φαγοκυττάρωση κυρίως των καταλοίπων του σώματος των σπερματοζωαρίων και
- 8) διατρέφουν τα σπερματογόνα κύτταρα.[11]

1.4.4.ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΣΠΕΡΜΙΟΓΕΝΕΣΗΣ

Η σπερμιογένεση είναι μια σύνθετη διαδικασία μεταμόρφωσης της στρογγυλής σπερματίδας που προκύπτει από την τελική διαίρεση της μείωσης, στην σύνθετη δομή του σπερματοζωαρίου. Η στρογγυλή σπερματίδα χωρίς καμία κυτταρική διαίρεση γίνεται ένα ολοκληρωμένο σπερματοζωάριο και αρχίζει να κινείται. Ορισμένες μεταλλάξεις οδηγούν σε πρόβλημα στην πλήρη ολοκλήρωση της

σπερμιογένεσης. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τη στάση της σπερματογένεσης στο στάδιο της σπερματίδας ή στη δημιουργία σπερματοζωαρίου με ανατομικές ή λειτουργικές ανωμαλίες. Αρκετά γονίδια που ελέγχουν την σπερμιογένεση και περίπου το 30% των σπερματογενικών ανωμαλιών θεωρούνται γενετικής αιτιολογίας[26]. Μικροελλείψεις συγκεκριμένων περιοχών στο χρωμόσωμα Y έχουν βρεθεί σε πολλούς υπογόνιμους άνδρες. Μικροελλείμματα βρέθηκαν σε τρεις μη-αλληλοκαλυπτόμενες περιοχές του χρωματοσώματος Y, οι οποίες χαρακτηρίζονται ως αζωοσπερμικοί παράγοντες AZFa, AZFb και AZFc (AZoospermia Factor a, b και c). Τα ελλείμματα αυτών των περιοχών μπορούν να προκαλέσουν σοβαρές βλάβες στην σπερματογένεση από ολιγοζωοσπερμία ως και μη-αποφρακτική αζωοσπερμία. Η πιο συχνή μετάλλαξη είναι η έλλειψη στην περιοχή AZFc, όπου έχουν χαρτογραφηθεί τα γονίδια της οικογένειας DAZ (deleted azoospermic factor)[14].



Εικόνα 5:Χαρτογράφηση γονιδίων που βρίσκονται στο ανθρώπινο χρωμόσωμα Y. [27]

1.4.5.ΩΡΙΜΑΝΣΗ ΤΩΝ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΩΝ

Τα σπερματοζωάρια που βρίσκονται εντός του όρχεως έχουν μικρή έως και καθόλου δυνατότητα για κινητικότητα και έτσι δεν είναι ικανά να γονιμοποιήσουν το ωάριο. Μετά την απελευθέρωση στον αυλό των σπερματικών σωληναρίων τα

σπερματοζωάρια κατευθύνονται στο ορχικό δίκτυο και συνεχίζουν για να καταλήξουν στην επιδιδυμίδα.

1.4.6.ΕΠΙΔΙΔΥΜΙΔΑ

Η επιδιδυμίδα, ανήκει στην εκφορητική οδό του όρχεως, έχοντας σχήμα μηνοειδές και βρίσκεται στον άνω πόλο και στο οπίσθιο χείλος του όρχεως. Η επιδιδυμίδα καλύπτεται από ορογόνο χιτώνα και αποτελείται από τρία μέρη:

- α) την κεφαλή,
- β) το σώμα και
- γ) την ουρά.

Η κεφαλή βρίσκεται στον άνω πόλο του όρχεως, με τον οποίο συνδέεται με τα λόβια αυτής. Το σώμα της επιδιδυμίδας βρίσκεται στο οπίσθιο χείλος του όρχεως και χωρίζεται από την έξω επιφάνεια αυτού με τον κόλπο της επιδιδυμίδας. Η ουρά φτάνει ως τον κάτω πόλο, όπου απότομα ανακάμπτει προς τα πάνω και μεταπίπτει στον σπερματικό πόρο.

Η επιδιδυμίδα αποτελείται από ινώδη χιτώνα, τα λόβια της επιδιδυμίδας και από τον πόρο της.

- α) Ο ινώδης χιτώνας αποτελεί συνέχεια του ινώδους χιτώνα του όρχεως.

β) Κάθε λόβιο της επιδιδυμίδας αποτελείται από ένα εκφορητικό σωληνάριο, που αρχίζει από το δίκτυο του Haller. Αρχικά, πορεύεται ευθεία και στη συνέχεια φέρεται ελικοειδώς και σχηματίζει ένα κώνο, όπου η κορυφή του αντιστοιχεί στο δίκτυο του Haller, ενώ η βάση του στην κεφαλή της επιδιδυμίδας.

γ) Από τα λόβια σχηματίζεται η κεφαλή της επιδιδυμίδας. Τα σπερματοζωάρια μετακινούνται από την κεφαλή προς την ουρά της επιδιδυμίδας. Στην επιδιδυμίδα τα σπερματοζωάρια αποκτούν λειτουργικότητα αλλά και τις επιπλέον διαδικασίες ωρίμανσης που απαιτούνται. Έτσι εντός αυτής έχουν βελτίωση της κατασκευής της μεμβράνης τους, καθώς και αύξηση της γονιμοποιητικής ικανότητας. Υπολογίζεται ότι στον άνθρωπο ο χρόνος παραμονής των σπερματοζωαρίων στα σωληνάκια της επιδιδυμίδας, είναι 10-15 μέρες. Ο χρόνος αυτός δεν φαίνεται να επηρεάζεται από την ηλικία, ενώ αντίθετα παίζει ρόλο η υψηλή παραγωγή σπέρματος. Εντός της

επιδιδυμίδος τα σπερματοζωάρια βρίσκονται σε ένα υπερωσμωτικό μικροπεριβάλλον, εντελώς διαφορετικό σε σύνθεση από αυτό του πλάσματος του αίματος. Η διαφορά αυτής της ωσμωτικής πίεσης μεταξύ των υγρών της επιδιδυμίδας και της χαμηλότερης ωσμωτικής πίεσης των υγρών του όρχεως, οδηγεί στην έξοδο νατρίου, έτσι ώστε τα σπερματοζωάρια να συνεχίσουν να ωριμάζουν. Εντός της επιδιδυμίδας υπάρχουν ουσίες, όπως η L-καρνιτίνη, το σιαλικό οξύ, η γλυκερυλφωσφορυλχολίνη, η α-γλυκοσιδάση και η διυδροτεστοστερόνη. Επιπρόσθετα το ενδοαυλικό υγρό περιέχει διάφορα ιόντα όπως κάλιο, χλώριο, νάτριο, και διτανθρακικά.

Στην προετοιμασία των σπερματοζωαρίων για απόκτηση κινητικότητας σημαντικό ρόλο παίζουν η ελεύθερη καρνιτίνη, η γλυκερυλφωσφορυλχολίνη και τα ιόντα καλίου. Η όξινη πρωτεΐνη της επιδιδυμίδας (acid epididymal globulin) AEG προσδιορίζει το είδος της κινητικότητας και η πρωτεΐνη FMP (forward motility protein) την προωθητική κίνηση των σπερματοζωαρίων. Το pH στην επιδιδυμίδα είναι όξινο και προφυλάσσει τα σπερματοζωάρια επιτρέποντας την ωρίμανση τους. Όμως μεγάλη διαφορά παρουσιάζει το pH το οποίο στην εγγύς επιδιδυμίδα είναι 6,5 για να φτάσει στο 6,8 στην άπω επιδιδυμίδα. Σημαντικό ρόλο στην ωρίμανση των σπερματοζωαρίων παίζουν και άλλες πρωτεΐνες όπως η αλβουμίνη, η προεκεφαλίνη, η τρανσφερίνη, και ένζυμα όπως γλυκοσιδάσες, γάμμα γλουταμύλ τρανσπεπτιδάση και η γλουταθειόνη υπεροξειδάση. Ο πιο πιθανός μηχανισμός που θεωρείται άλλωστε και υπεύθυνος για την κίνηση των σπερματοζωαρίων εντός της επιδιδυμίδας είναι οι συσπάσεις των κυττάρων που περιβάλλουν στον πόρο της επιδιδυμίδας[28].

1.5.ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΟ

1.5.1.ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΩΝ

Μετά το πέρασμα από την κεφαλή και το σώμα της επιδιδυμίδας τα σπερματοζωάρια παραμένουν στην ουρά για διάφορες χρονικές περιόδους, οι οποίες εξαρτώνται από το βαθμό της σεξουαλικής δραστηριότητας. Έτσι στον άνθρωπο σχεδόν τα μισά από τα σπερματοζωάρια της επιδιδυμίδας βρίσκονται αποθηκευμένα στην περιοχή της ουράς. Τα σπερματοζωάρια αυτά μπορούν να παραμείνουν αποθηκευμένα και να διατηρούν τη γονιμότητα τους για χρονικό διάστημα τουλάχιστον ενός μηνός. Κατά το χρονικό διάστημα αυτό τα σπερματοζωάρια

παραμένουν σε μια κατάσταση ακινησίας και γενικότερης καταστολής, εξαιτίας των επιδράσεων πολλαπλών ανασταλτικών ουσιών που περιέχονται μέσα στις εκκρίσεις του γεννητικού σωλήνα[21].

1.5.2.ΕΚΣΠΕΡΜΑΤΙΣΗ

Ο διαρκής ερεθισμός του πέους αλλά και άλλης φύσης ερεθίσματα κατά τη διάρκεια του σεξουαλικού ερεθισμού δημιουργεί ώσεις, που κατευθύνονται προς το βασικό γεννησιακό κέντρο. Η ένταση των ερεθισμάτων αυτών βαθμιαία αυξάνεται, έως ότου ενεργοποιηθούν κατώτερα (νωτιαία) νευρικά κέντρα, από τα οποία φυγόκεντρες διεγέρσεις επιφέρουν την εκσπερμάτιση. Κατά τη διάρκεια της εκσπερμάτισης κλείνει ο αυχένας της ουροδόχου κύστης, έτσι ώστε να γίνεται η μονόδρομη εκσπερμάτιση. Το εκσπερμάτισμα προωθείται προς τα εμπρός με ρυθμικές συσπάσεις των λείων μυών που περιβάλλουν τους ανδρικούς γενετικούς πόρους καθώς και με συσπάσεις των πυελικών μυών.

Η διαδικασία της εκσπερμάτισης γίνεται σε δύο φάσεις.

Στην πρώτη φάση (φάση εκροής), ως αποτέλεσμα γίνεται ενεργοποίησης τμήματος του θωρακοσφυϊκού πυρήνα του συμπαθητικού συστήματος και παράγονται φυγόκεντρες διεγέρσεις, που άγονται με ίνες του συμπαθητικού. Οι διεγέρσεις αυτές προκαλούν σύσπαση των μυϊκών ινών της επιδιδυμίδας, του σπερματικού πόρου, των σπερματοδόχων κύστεων και του προστάτη. Κατά τη διάρκεια της εκσπερμάτισης και λόγω συσπάσεων, τα σπερματοζωάρια εισέρχονται στον σπερματικό πόρο (μήκους 30-35 εκατοστόμετρων), έναν αγωγό που προέρχεται από τον πόρο του Wolff. Ο σπερματικός πόρος αρχίζει από τον κάτω πόλο του όρχεως σαν συνέχεια της ουράς της επιδιδυμίδας και φθάνει μέχρι τη βάση του προστάτη, όπου και αναστομώνεται με τον πόρο της σπερματοδόχου κύστης και μεταπίπτει στον εκσπερματιστικό πόρο.[10] Με τις συσπάσεις, τα σπερματοζωάρια και το σπερματικό πλάσμα εκθλίβονται από αυτές τις ανατομικές δομές και συγκεντρώνονται στην προστατική και στη μεμβρανώδη μοίρα της ουρήθρας. Στο σημείο αυτό για να σχηματιστεί το σπερματικό υγρό, ήδη ρέει και το έκκριμα των βολβουρηθραίων και των ουρηθραίων αδένων. Εφόσον η ένταση της διέγερσης από τα αρχικά ερεθίσματα κορυφωθεί, ξεκινάει η δεύτερη (κύρια) φάση της εκσπερμάτισης, η οποία προκύπτει ως αποτέλεσμα μαζικής εκφόρτισης νευρικών διεγέρσεων στο Κ.Ν.Σ. Τα αντανεκλαστικά που υπεισέρχονται κατά την κύρια εκσπερμάτιση είναι περισσότερο σύνθετα από τα αντανεκλαστικά της

στύσης και της φάσης εκροής. Σε αυτό το σημείο, διεγέρσεις που άγονται με ίνες του συμπαθητικού, προκαλούν σύσπαση του έσω σφιγκτήρα της ουρήθρας ώστε να αποφευχθεί διοχέτευση του σπέρματος προς την ουροδόχο κύστη. Στη συνέχεια από διεγέρσεις που άγονται με ίνες του παρασυμπαθητικού, προκαλείται σύσπαση της ουρήθρας και τέλος από διεγέρσεις που άγονται με σωματικές ίνες προκαλούνται κλονικοί σπασμοί εγκαρσίων γραμμωτών μυών. Πολύ σημαντικές είναι οι σωματικές ίνες που περιέχονται στο αιδοϊκό νεύρο και οι οποίες είναι υπεύθυνες για τις ρυθμικές συσπάσεις του βολβοσηραγγώδους μυός. Οι συσπάσεις αυτές προκαλούν και την κατά κύματα απελευθέρωση του σπέρματος από το έξω στόμιο της ουρήθρας. Η στύση διέπεται από το παρασυμπαθητικό σύστημα κυρίως, ενώ η εκσπερμάτιση κυρίως από το συμπαθητικό. Αυτό φαίνεται και από το ότι σε άνδρες που έχει προκληθεί αμφοτερόπλευρη οσφυϊκή συμπαθηκτομή παύει η ικανότητα εκσπερμάτισης ενώ η στύση διατηρείται.[10]

1.5.3.ΣΠΕΡΜΑΤΙΚΟΣ ΠΟΡΟΣ

Ο σπερματικός πόρος είναι ένας ινομυώδης σωλήνας με μήκος 40-50εκ. Αποτελεί τον εκφορητικό πόρο του όρχεως. Ανάλογα με την θέση του διακρίνεται σε 5 μοίρες:

- 1) την ορχική,
- 2) την τονική,
- 3) τη βουβωνική,
- 4) την πυελική και
- 5) την κυστική

Ο σπερματικός πόρος εκτείνεται από την ουρά της επιδιδυμίδας στον εκσπερματικό πόρο. Ο εκσπερματιστικός πόρος είναι το τελευταίο στάδιο του εκφορητικού πόρου του ανδρικού αναπαραγωγικού συστήματος. [21]

1.5.4.ΣΠΕΡΜΑΤΟΛΟΧΟΙ ΚΥΣΤΕΣ

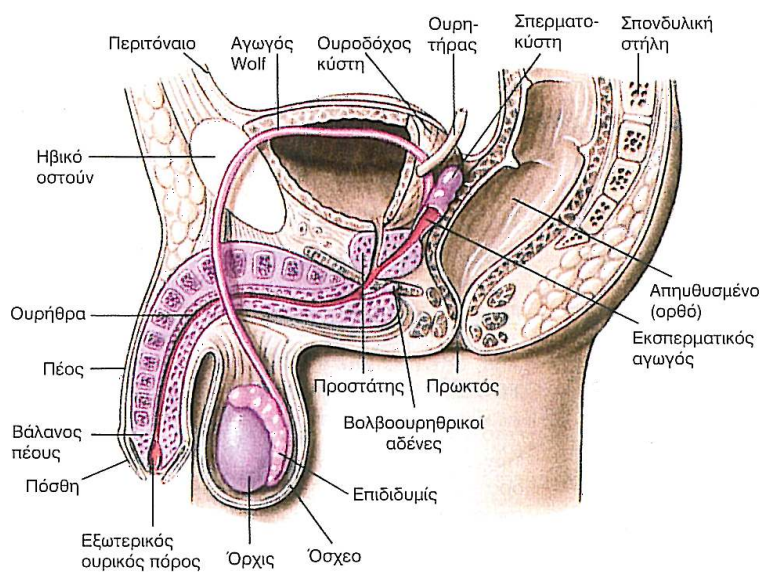
Βρίσκονται πάνω από τη βάση του προστάτη, ανάμεσα στον πυθμένα της ουροδόχου κύστης και στο απευθυσμένο. Η κάθε μια από αυτές εμφανίζει σχήμα σακοειδές-απιοειδές, αποπλατυσμένο από εμπρός προς τα πίσω και παρουσιάζει δύο επιφάνειες (πρόσθια και οπίσθια), δύο χείλη (έσω και έξω) και δύο άκρα (το έξω και

το έσω). Η πρόσθια επιφάνεια της σπερματοδόχου κύστης εφάπτεται προς τα πίσω με τον πυθμένα της ουροδόχου κύστης και προς τα εμπρός με τον προστάτη. Η οπίσθια επιφάνεια έρχεται σε επαφή με το ορθό, από το οποίο μπορεί να ψηλαφηθεί με δακτυλική εξέταση, ιδιαίτερα όταν είναι διογκωμένες ως συνέπεια ύπαρξης φλεγμονής. Το έσω χείλος εφάπτεται με τη σπερματική λήκυθο, ενώ το έξω χείλος έρχεται σε επαφή με τον προστάτη. Το έξω άκρο είναι σε στενή σχέση με τον ουρητήρα, ενώ, τέλος, το έσω άκρο είναι στενό και αναστομώνεται με το σύστοιχο πόρο, αντίστοιχα προς τη βάση του προστάτη για να σχηματιστεί ο εκσπερματιστικός πόρος, ο οποίος και διασχίζει την κεντρική ζώνη του τελευταίου. Στην σπερματοδόχο κύστη διακρίνεται ο βλεννογόνος, το υποβλεννογόνιο στρώμα και η κάψα. Το έκκριμα της σπερματοδόχου κύστης έχει ελαφρώς αλκαλική αντίδραση (pH 7,2-7,6), περιέχει διάφορες πρωτεΐνες και μικρομοριακά συστατικά, όπως φρουκτόζη και προσταγλανδίνες. Το έκκριμα της μαζί με το προστατικό έκκριμα, που αποτελούν το υγρό στοιχείο του σπέρματος, περιέχει φρουκτόζη σε μεγάλη αναλογία, η οποία αποτελεί την πηγή των ενεργειακών αναγκών των σπερματοζωαρίων. Επίσης περιέχει και τη σπερμολάση, ένα ένζυμο το οποίο σε συνδυασμό με την αλκαλικότητα του αντίδρασης του εκκρίματος, κινητοποιεί τα σπερματοζωάρια.

Η αιμάτωση των σπερματοδόχων κύστεων είναι η ίδια με εκείνη του προστάτη. Η νεύρωση προέρχεται από το κάτω υπογάστριο πλέγμα. Οι σπερματοδόχοι κύστεις παρέχουν περίπου στο 60-70% του συνολικού όγκου σπέρματος κατά την εκσπερμάτιση. [10]

1.5.5.ΟΙ ΒΟΛΒΟΥΡΗΘΡΑΙΟΙ ΑΔΕΝΕΣ

Οι βολβοουρηθραίοι αδένες είναι δύο, σε μέγεθος μπιζελιού και έχουν χρώμα καστανοκίτρινο. Βρίσκονται εντός του ουρογεννητικού τριγώνου, εντός του σφιγκτήρα της υμενώδους ουρήθρας και πίσω από το βολβό της ουρήθρας. Ο εκφορητικός τους πόρος, έχει μήκος περίπου 5 εκατοστών, εκβάλλοντας στο κάτω τοίχωμα της σηραγγώδους μοίρας της ουρήθρας. Οι αδένες αυτοί παράγουν αλκαλικό έκκριμα (PH>7.2), το οποίο επαλείφει την ουρήθρα. Με αυτό τον τρόπο γίνεται καταπολέμηση του όξινου περιβάλλοντος του κόλπου, έτσι ώστε να διατηρούν τα σπερματοζωάρια την κινητικότητά τους. Επίσης συστατικά του εκκρίματος αυτού είναι και μια γλυκοπρωτεΐνη, υπεύθυνη για την παρεμπόδιση της πρόωρης πήξης του σπέρματος στην ουρήθρα.[21]



Εικόνα 6:Ανατομία αρσενικού γενετικού συστήματος[13]

1.5.6.Ο ΠΡΟΣΤΑΤΗΣ

Ο προστάτης έχει σχήμα και μέγεθος κάστανου, βάρος 20-25 γραμμάρια, μήκος 3-3,5 εκατοστά και πλάτος 4 εκατοστά και αποτελείται από ινομυώδη και αδενικό ιστό. Μέσα από τον προστάτη διέρχεται η οπίσθια προστατική ουρήθρα. Επίσης, περιέχει τους εκσπερματιστικούς πόρους και τον προστατικό κόλπο. Βρίσκεται εντός της ελάσσοнос πύελου πριν από την ουροδόχο κύστη και μεταξύ ηβικής σύμφυσης και απευθυσμένου, από το οποίο χωρίζεται μέσω της ευθυπροστατικής περιτονίας ή περιτονίας του Denonvillier. Στην πίσω επιφάνεια του παρατηρούνται δύο λοβοί, δεξιός και αριστερός, οι οποίοι χωρίζονται μεταξύ τους με την κάθετη αύλακα του προστάτη. Οι αδένες του προστάτη είναι περίπου 30-50 πρόκειται για σύνθετους σωληνοειδείς-κυψελοειδείς εκφορητικούς πόρους που εκβάλλουν συνεννοούμενοι με 16-25 τοξοειδή ανοίγματα στα πλάγια του σπερματικού λοφιδίου στην προστατική ουρήθρα. Το επιθήλιο των αδενικών λοβιδίων είναι δίστιβο και αποτελείται από αδενικά και βασικά κύτταρα. Κύτταρα με μεγάλη εκκριτική δραστηριότητα περιέχουν εκκριτικά κοκκία αμύλου, τα οποία ονομάζονται αμυλοειδή κοκκία. Όταν υπάρχει απόφραξη και διαταραχή της ροής του προστατικού εκκρίματος, παρατηρείται συγκέντρωση εκκριτικού υλικού, το οποίο με την επιπλέον εναπόθεση ασβεστίου και πρωτεϊνών οδηγεί στο σχηματισμό των προστατικών λίθων. Τα προστατικά εκκρίματα περιέχουν ιόντα Na^+ , K^+ , Zn^{++} , Ca^{++} , Mg^{++} . Οι τρεις

κυριότερες πρωτεΐνες του προστατικού εκκρίματος είναι η προστατική όξινη φωσφατάση (PAP: Prostatic Acid Phosphatase), το ειδικό προστατικό αντιγόνο(PSA: Prostatic Specific Antigen) και η μικροπρωτεΐνη του σπέρματος. Η προστατική όξινη φωσφατάση και το ειδικό προστατικό αντιγόνο είναι πολύ σημαντικά καθώς χρησιμοποιούνται σαν καρκινικοί δείκτες του καρκίνου του προστάτη. Επίσης στο προστατικό έκκριμα βρίσκονται ακόμα διάφορα ένζυμα, όπως η γαλακτική δεϋδρογενάση, η β-γλυκουρονιδάση, η α-αμυλάση, μινωπεπτιδάσες κλπ. Ο προστατικός ιστός διαθέτει υποδοχείς για ανδρογόνα, οιστρογόνα, προγεστερόνη και κορτικοειδή. Ο προστάτης εκκρίνει περίπου 0,5 έως 1 ml έκκριμα για το σπέρμα, δηλαδή το προστατικό έκκριμα αποτελεί το 15%-30% μίας κατά μέσο όρο φυσιολογικής ποσότητας σπέρματος (3,5ml). Το έκκριμα του προστάτη έχει προστατευτική λειτουργία μεταξύ των επιφανειών της ουρήθρας και του σπέρματος και συμβάλλει στη ρευστοποίηση του πηγμένου σπέρματος. Το προστατικό έκκριμα λόγω των υψηλών ποσοτήτων χοληστερίνης και κεφαλίνης που περιέχει, είναι ένα γαλακτώδες υγρό και ελαφρώς όξινο (pH 6,5). Έχει χαρακτηριστική οσμή "βρασμένο κάστανο", η οποία οφείλεται στις διαμίνες, στη σπερμίνη και στη σπερμιδίνη που περιέχει. Η αγγείωση του προστάτη γίνεται μέσω κλάδων των κάτω κυστικών, των έσω αιδοϊκών και των μέσων αιμορροϊδικών αρτηριών. Οι φλέβες οδηγούν στο περιπροστατικό πλέγμα και από εκεί εκβάλλουν στις υπογάστριες φλέβες. Τα λεμφαγγεία οδηγούν στα υπογάστρια, ιερά, κυστικά και έξω λαγόνια λεμφογάγγλια.[21]

1.6.ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΤΟΥ ΠΕΟΥΣ ΚΑΙ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΣΤΥΣΗΣ

1.6.1ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΠΕΟΥΣ

Στο πέος διακρίνονται δυο μοίρες: η ελεύθερη και η περινεϊκή. Η ελεύθερη μοίρα, ξεκινά μπροστά από την βάλανο και καταλήγει στην ηβική σύμφυση. Έχει δυο μέρη, τη βάλανο και το σώμα, που χωρίζονται μεταξύ τους με την στεφανιαία αύλακα. Η βάλανος έχει κωνικό σχήμα και αποτελεί την κατάληξη του σπογγώδους σώματος της ουρήθρας. Αντιθέτως το σώμα έχει κυλινδρικό σχήμα σε φάση ηρεμίας, που μεταβάλλεται σε τριγωνικό πρίσμα κατά την στύση. Αποτελείται από τα δυο σπυραγγώδη σώματα και το σπογγώδες σώμα της ουρήθρας, στη κάτω επιφάνεια των

σηραγωγών σωμάτων. Η περινεϊκή μοίρα (ρίζα του πέους) βρίσκεται κάτω από την ηβική σύμφυση και σχηματίζεται από τη ρίζα του πέους που βρίσκεται στην ουρογεννητική περιοχή του περινέου. [29]

Η λειτουργίες του πέους είναι δύο:

α) Η δίοδος και η έξοδος των ούρων και

β) Η συνουσία και η μεταφορά του σπέρματος, ώστε να τοποθετηθεί στο βάθος του κόλπου, κοντά στον τράχηλο της μήτρας της γυναίκας. [10]

Η πόσθη, έτσι ονομάζεται το δερματικό περίβλημα του πέους, είναι λεία όταν το πέος βρίσκεται σε σύσση και ελαφρώς ρυτιδωμένη όταν βρίσκεται σε χαλάρωση. Η πόσθη αποτελεί συνέχεια του δέρματος του εφηβαίου και του οσχέου, γι' αυτό και στη μέση γραμμή της ουρηθραίας επιφάνειας παρατηρείται η ραφή του πέους, μία οβελιαία δερματική πτυχή (συνέχεια της αντίστοιχης ραφής του οσχέου). Η πόσθη συνίσταται από το κυρίως δέρμα, τον δαρτό και από υποδόριο συνδετικό ιστό. [10]

Το δέρμα της πόσθης είναι ιδιαίτερα λεπτό, λείο, ελαστικό, έχει άφθονη χρωστική, καθώς και άφθονους ιδρωτοποιούς και σμηγματογόνους αδένες. Είναι σχεδόν άτριχο, εκτός από την περιοχή της ρίζας του πέους. Η αυξημένη ελαστικότητα του δέρματος επιτρέπει σ' αυτό την προσαρμογή του στις αλλαγές του όγκου του πέους.

Ο δαρτός χιτώνας του πέους, που είναι συνέχεια του αντίστοιχου χιτώνα του οσχέου, αποτελεί ινομυώδη χιτώνα και περιέχει άφθονες δέσμες λείων μυϊκών ινών.

Ο υποδόριος συνδετικός ιστός της πόσθης χαρακτηρίζεται από την έλλειψη υποδορίου λίπους και από τη χαλαρότητα του. Μέσα στον υποδόριο ιστό πορεύεται η ραχιαία φλέβα του πέους. [10]

Η ακροποσθία ονομάζεται το μέρος της πόσθης που καλύπτει τη βάλανο αποτελώντας μια επικουρική δερματική πτυχή, η οποία σχηματίζεται από αναδίπλωση της πόσθης πάνω από τη βάλανο, ώστε στο μεταξύ τους διάστημα να σχηματίζεται ο θύλακας της ακροποσθίας. Έτσι δημιουργούνται δύο πέταλα ακροποσθίας, το έξω και το έσω, και ένα ελεύθερο χείλος. Το έξω έχει χαρακτήρες όμοιους με αυτούς της υπόλοιπης πόσθης. Αντίθετα το έσω πέταλο καλύπτεται από πολύστιβο πλακώδες μη κερατινοποιημένο επιθήλιο, έχει σμηγματογόνους αδένες στον αυχένα του πέους και δεν περιέχει τρίχες και ιδρωτοποιούς αδένες. Το στόμιο της ακροποσθίας κατά την παιδική ηλικία έχει μικρό εύρος και βρίσκεται μπροστά από τη βάλανο, ενώ με την

πάροδο της ηλικίας διευρύνεται, ώστε να επιτρέπει την έξοδο της βάλανου κατά τη συνουσία. Ο χαλινός της ακροποσθίας προς τα εμπρός φτάνει κοντά έως το έξω στόμιο της ουρήθρας και προς τα πλάγια μεταπίπτει στην έσω επιφάνεια της ακροποσθίας.[10]

Η βάλανος (το κεφάλι) του πέους έχει σχήμα κώνου με αποστρογγυλωμένη κορυφή. Η βάλανος μοιάζει με καπέλο προσαρμοσμένο στο ελεύθερο πέρας του σώματος του πέους. Στην κορυφή της βάλανου βρίσκεται μία κάθετα φερόμενη σχισμή, που αποτελεί το έξω στόμιο της ουρήθρας. Η βάση, της βάλανου αφορίζεται από ένα προέχον χείλος, το στέφανο της βάλανου, το οποίο φέρεται λοξά από τα άνω και πρόσω προς τα κάτω και πίσω. Ακριβώς πίσω από τον στέφανο της βάλανου βρίσκεται η στεφανιαία ή βαλανοπροσθική αύλακα, ο πυθμένας της οποίας αποτελεί το στενότερο μέρος της ελεύθερης μοίρας του πέους, τον αυχένα του πέους. Η στεφανιαία αύλακα είναι συνεχής στις άνω-πλάγιες επιφάνειες, ενώ προς τα κάτω διακόπτεται στη μέση γραμμή από μια πτυχή του δέρματος και η οποία ονομάζεται χαλινός της ακροποσθίας.[10]

Η ρίζα του πέους συνίσταται από τρεις μάζες σηραγγώδους στυτικού ιστού, που αποτελούν τα α) οπίσθια πέρατα των σηραγγωδών σωμάτων του πέους β) τα δύο πλάγια και γ) τα τμήματα της ουρήθρας (το μέσο ή κάτω). Τα σηραγγώδη σώματα βρίσκονται προσκολλημένα στο περίοστεο των σκελών της ηβικής περιοχής και στο ουρογεννητικό τρίγωνο αντίστοιχα. Τα τμήματα αυτά των σηραγγωδών σωμάτων του πέους παριστάνουν τα σκέλη του πέους, τα οποία προσαρμόζονται στις αύλακες που σχηματίζονται ανάμεσα στους ηβοϊσχιακούς κλάδους και την έξω περιτονία του περινέου. Τα σκέλη του πέους περιβάλλονται από τον ισχιοσηραγγώδη μυ και συγκλίνουν το ένα προς το άλλο μέχρι το κάτω χείλος της ηβικής σύμφυσης. Στο σημείο αυτό, αφού συνδέονται μεταξύ τους, στρέφονται απότομα προς τα μπρος και κάτω διαμορφώνοντας έτσι το σώμα του πέους.[10]

Τα δύο σηραγγώδη σώματα του πέους χωρίζονται μεταξύ τους από το κτενιοειδές διάφραγμα. Εξωτερικά περιβάλλονται από ένα παχύ λευκό στρώμα από ίνες κολλαγόνου και ελαστικές ίνες, τον ινώδη χιτώνα. Ο ινώδης χιτώνας αποτελείται από: α)ένα εξωτερικό στρώμα από επιμήκως φερόμενες ίνες και β) ένα εσωτερικό στρώμα από κυκλοτερώς φερόμενες ίνες. Το εξωτερικό στρώμα είναι αυτό που καθορίζει το πάχος αλλά και την ισχύ του ινώδους χιτώνα. Δεν είναι ομοιογενές και δημιουργεί διάφορες παχύνσεις, οι οποίες βρίσκονται στην 5η και 7η ώρα και στην 11η και την 1η ώρα. Αυτό επιτρέπει τη διόγκωση του σπογγώδους σώματος κατά τη

στύση χωρίς αυξημένη πίεση έτσι ώστε να μη δημιουργείται παρεμπόδιση της εκσπερμάτισης. Δεν παρατηρείται εξωτερικό στρώμα μεταξύ των κοιλιακών παχύνσεων.[29]

Μέχρι τη βάλανο εκτείνονται ραχιαίες παχύνσεις όπου και συνενώνονται στην 12η ώρα, ενώ κεντρικά διαχωρίζονται και καθλώνουν τα σκέλη των σηραγγωδών σωμάτων στα ηβικά οστά. Οι ασθενέστερες περιοχές παρατηρούνται στην 3η και την 9η ώρα. Σε αυτές τις περιοχές το πάχος του εξωτερικού στρώματος υπολογίζεται στο 1/3 του πάχους που παρατηρείται στην 5η και 7η ώρα. Οι περιοχές αυτές είναι πολύ ευαίσθητες και συχνά σε αυτές συμβαίνουν κακώσεις του πέους με ρήξη του ινώδους χιτώνα. Το εσωτερικό στρώμα χαρακτηρίζεται από κυκλοτερείς ίνες που σχηματίζουν ένα διάφραγμα. Το διάφραγμα αυτό είναι ατελές στο έξω τριτημόριο του πέους, όπου υπάρχει επικοινωνία μεταξύ των δύο σηραγγωδών σωμάτων, ενώ ξεκινούν από αυτό κάθετες προεκβολές, οι ενδοσηραγγώδεις στύλοι. Τέλος οι στύλοι αυτοί συμβάλουν το εσωτερικό δομικό σύστημα των σηραγγωδών σωμάτων και παρατηρούνται κυρίως στην τελική μοίρα του. Το εσωτερικό στρώμα του ινώδους χιτώνα σχηματίζει επιπλέον και πολυάριθμες δοκίδες, που αποτελούνται από λείες μυϊκές ίνες, ινοβλάστες, κολλαγόνο και ελαστίνη. Οι δοκίδες σχηματίζουν πολλαπλά κενοτόπια, τους αιματικούς κόλπους, οι οποίοι επικοινωνούν μεταξύ τους. Οι κεντρικοί κόλποι είναι μεγαλύτεροι και εκεί καταλήγουν οι αρτηρίες, ενώ οι περιφερικοί είναι μικρότεροι και απ' αυτούς ξεκινούν οι φλέβες. Η έσω επιφάνεια των δοκίδων επικαλύπτεται από αγγειακό ενδοθήλιο.[29]

Ο ινώδης χιτώνας του σπογγιώδους σώματος είναι πολύ λεπτότερος από εκείνον των σηραγγωδών, ενώ η βάλανος δεν έχει ινώδη χιτώνα. Οι αιματικοί κόλποι είναι μεγαλύτεροι των αντίστοιχων των σηραγγωδών σωμάτων και οι λείες μυϊκές ίνες είναι λιγότερες. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τη διάταση, αλλά όχι την σκληρότητα της βάλανου κατά την στύση, αφού ο ινώδης χιτώνας του σπογγιώδους σώματος δεν είναι σε θέση να εμποδίσει τη φλεβική επαναφορά (απουσία μηχανισμού φλεβικής σύγκλεισης).

Οι μύες του περινέου που σχετίζονται ανατομικά και λειτουργικά με το πέος είναι δύο: οι ισχιοσηραγγώδεις και οι βολβοσηραγγώδεις.

α) Οι ισχιοσηραγγώδεις με τη σύσπαση τους συμπιέζουν τα σκέλη των σηραγγωδών σωμάτων του πέους και συμβάλλουν στην επιπλέον αύξηση της ενδοσηραγγώδους πίεσης κατά τη φάση της άκαμπτης στύσης.

β) Οι βολβοσηραγγώδεις μύες περιβάλλουν τη βολβική μοίρα του σπογγιώδους σώματος της ουρήθρας και ενώνονται μεταξύ τους στην μέση γραμμή της ουρήθρας. Η σύσπαση τους συμβάλλει στην αποβολή και των τελευταίων σταγόνων ουρών από την βολβική ουρήθρα και συμμετέχουν στην εκσπερμάτιση, οδηγώντας το σπέρμα προς την πρόσθια ουρήθρα.[29]

1.6.2.ΑΙΜΑΤΩΣΗ ΤΟΥ ΠΕΟΥΣ

Η πεική αρτηρία είναι κλάδος της έσω αιδοϊκής αρτηρίας, διαπερνά το σύστημα των φλεβών που εξέρχονται από τα σηραγγώδη σώματα περνώντας από τον ινώδη χιτώνα. Η εν τω βάθει ραχιαία φλέβα εκβάλλει στο περιπροστατικό πλέγμα. Το εν τω βάθει φλεβικό σύστημα απάγει αίμα από το κεντρικό τμήμα του σπογγώδους σώματος και το κεντρικό τριτημόριο των σηραγγωδών σωμάτων. Κατά τη στύση, το φλεβικό σύστημα συμπιέζεται από τα σηραγγώδη σώματα με τελικό αποτέλεσμα την ελάττωση της απαγωγής του φλεβικού αίματος.[29]

1.6.3.ΝΕΥΡΩΣΗ ΤΟΥ ΠΕΟΥΣ

Η σωματική νεύρωση του πέους εξασφαλίζεται από το αιδοϊκό νεύρο. Το νεύρο αυτό αποτελείται από φυγόκεντρες κινητικές ίνες που προάγουν τη νεύρωση των μυών της πυέλου και του περινέου, καθώς και από κεντρομόλες αισθητικές ίνες που προέρχονται από το πέος και το δέρμα του περινέου. Ο αιδοϊκός κινητικός νευρώνας βρίσκεται στον πυρήνα του Onuf και οι νευρικές ίνες εξέρχονται μέσω των πρόσθιων ριζών των I2-I4 νευροτομιών. Αντιθέτως οι αισθητικές νευρικές ίνες εισέρχονται μέσω των οπίσθιων ριζών των I2-I4 νευροτομιών. [29]

Το αιδοϊκό νεύρο αποτελείται από τρεις τελικούς κλάδους:

α) τον κάτω αιμορροϊδικό, β) τον περινεϊκό και γ) το ραχιαίο νεύρο του πέους.

Συγκεκριμένα ο περινεϊκός κλάδος παρέχει κινητική νεύρωση στον ισχιοσηραγγώδη και το βολβοσηραγγώδη μυ.

Το ραχιαίο νεύρο του πέους βρίσκεται στην ραχιαία επιφάνεια του οργάνου, ακριβώς κάτω από την περιτονία του Buck και είναι κύριας σημασίας για την αντανάκλαση της στύσης, αφού μεταφέρει άμεσα αισθητικά ερεθίσματα από το δέρμα του πέους, την

πόσθη και την βάλανο. Η αισθητική νεύρωση της βάλανου προέρχεται κατά 90% από ελεύθερες νευρικές απολήξεις και ελάχιστα από τελικά σωματία (Αδ νευρικές ίνες).

Δημιουργείται συμπαθητική και παρασυμπαθητική νεύρωση του πέους. Η συμπαθητική, ξεκινά από τους ενδομυελικούς πλάγιους νευρώνες της φαιάς ουσίας με τη μορφή συμπαθητικών προγαγγλιακών ινών και έπειτα μετά τη δημιουργία συνάψεων σε διάφορα επίπεδα, μεταπίπτουν σε μεταγαγγλιακές ίνες που καταλήγουν στο πυελικό πλέγμα μέσω του δικτύου των σπλαχνικών νευρών.

Η παρασυμπαθητική νεύρωση ξεκινά από το διάμεσο πυρήνα (I2-I4 νευροτόμια) και καταλήγει στο πυελικό πλέγμα ως ιερά προγαγγλιακά νεύρα. Το πυελικό πλέγμα που λαμβάνει χώρα πίσω από την ουροδόχο κύστη, τον προστάτη και τις σπερματοδόχους κύστεις είναι υπεύθυνο για την νεύρωση των πιο πάνω οργάνων, καθώς και των σηραγγωδών σωμάτων του πέους. Τα σηραγγώδη νεύρα αποτελούνται από παρασυμπαθητικές αλλά και από συμπαθητικές νευρικές ίνες. Πορεύονται στην πίσω-πλάγια επιφάνεια του προστάτη, έπειτα πλάγια της ουρήθρας και πολύ κοντά με αυτήν, διαπερνούν τον ινώδη χιτώνα του σπογγώδους σώματος και τελικά εισέρχονται στα σκέλη των σηραγγωδών σωμάτων μαζί με τελικούς κλάδους της πείκης αρτηρίας και τις σηραγγώδεις φλέβες.[29]

1.6.4.ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΣΤΥΣΗΣ

Για την επίτευξη της στύσης του πέους πρέπει να αλληλεπιδράσουν αγγειακοί και νευρολογικοί μηχανισμοί, με σκοπό την συγκέντρωση του αίματος υπό πίεση στα σηραγγώδη σώματα, ώστε να επιτευχθεί η ικανή σκληρότητα για τη διείσδυση στον κόλπο. Μεταξύ των σηραγγωδών σωμάτων υπάρχει αγγειακή επικοινωνία παρά την ύπαρξη του κτενιοειδούς διαφράγματος, που το καθιστά ένα ενιαίο υδραυλικό λειτουργικό σύστημα. Ο στατικός ιστός περιλαμβάνει πολλαπλούς αιματικούς κόλπους που επικοινωνούν μεταξύ τους. Το τοίχωμα των αιματικών κόλπων αποτελείται από λείες μυϊκές ίνες, ελαστίνη και κολλαγόνο. Ο τόνος των λείων μυϊκών ινών (το 45% του στυτικού ιστού) καθορίζει τη χάλαση (χαλάρωση ή ηρεμία) και τη στύση του πέους. Σε ηρεμία (χάλαση του πέους), οι λείες μυϊκές ίνες βρίσκονται σε σύσπαση, οδηγώντας σε ελάχιστη αρτηριακή παροχή στα σηραγγώδη σώματα, και αυτό συμβαίνει για την τροφή και διατήρηση του κυτταρικού μεταβολισμού και μόνον, ενώ η φλεβική απαγωγή είναι ελεύθερη. Αντίθετα, κατά την στύση παρατηρείται χάλαση των λείων μυϊκών ινών, με αποτέλεσμα την αύξηση της

αρτηριακής παροχής στα σπυραγγώδη σώματα με ταυτόχρονη μείωση της φλεβικής απαγωγής. Η χάλαση και η σύσπαση των λείων μυϊκών ινών βρίσκονται υπό τον έλεγχο του αυτόνομου νευρικού συστήματος.[29]

Στη φάση της στύσης, η χάλαση των λείων μυϊκών ινών των αιματικών κόλπων και των ελικοειδών αρτηριών έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της ροής του αίματος στα σπυραγγώδη σώματα, τη διάταση των αιματικών κόλπων και την αύξηση της ενδοσπυραγγώδους πίεσης. Ενώ ατελής στύση παρατηρείτε όταν υπάρχει ανεπάρκεια του αρτηριακού μηχανισμού για να παρέχει ικανή ροή αίματος. Για την επίτευξη της στύσης απαιτείται η παροχή άφθονου αρτηριακού αίματος με υψηλή συγκέντρωση οξυγόνου, ώστε να υπάρξει υποστήριξη του αυξημένου κυτταρικού μεταβολισμού. Συγκεκριμένα, το οξυγόνο είναι απαραίτητο για τη σύνθεση, από το ενδοθήλιο των σπυραγγωδών σωμάτων, αγγειοδιασταλτικών ουσιών, κυρίως, του μονοξειδίου του αζώτου (Nitric Oxide, NO), με αποτέλεσμα περαιτέρω χάλαση των λείων μυϊκών ινών και επιπλέον ροή αίματος.

Η ροή του αρτηριακού αίματος διατείνει τα τοιχώματα των σπυραγγωδών κόλπων, που με τη σειρά τους συμπιέζουν τις φλέβες που βρίσκονται ανάμεσα στον ινώδη χιτώνα του πέους και στους σπυραγγώδεις κόλπους. Έτσι, μειώνεται η διαφυγή αίματος. Η βάλανος δεν έχει ινώδη χιτώνα, ενώ το σπυραγγώδες σώμα έχει λεπτό ινώδη χιτώνα. Γι' αυτό το λόγω κατά τη διάρκεια της στύσης, η βάλανος είναι σχετικά χαλαρή, ενώ το σπυραγγώδες σώμα είναι διογκωμένο και σκληρότερο.[29]

1.6.5.ΦΑΣΕΙΣ ΤΗΣ ΣΤΥΣΗΣ

1. Φάση ηρεμίας

Στη φάση αυτή το πέος βρίσκεται κατά κύριο λόγο κάτω από αδρενεργικό έλεγχο. Στη διατήρηση της χάλασης συμμετέχει επίσης το ενδοθήλιο των αγγείων και των αιματικών κόλπων των σπυραγγωδών σωμάτων με τη σύνθεση της ενδοθηλίνης, η οποία παρέχει σταθερό τόνο στις λείες μυϊκές ίνες. Το αποτέλεσμα της διπλής αυτής δράσης (συμπαθητικού και ενδοθηλίνης), είναι η παραμονή των σπυραγγωδών και ελικοειδών αρτηριών σε τονική σύσπαση που επιτρέπει ελάχιστη μόνο ποσότητα αίματος να εισέρχεται στα σπυραγγώδη σώματα, για θρεπτικούς και μόνο σκοπούς, ενώ είναι ελεύθερη η απομάκρυνση της μικρής αυτής ποσότητας αίματος από το φλεβικό σύστημα. Η φάση της ηρεμίας, χαρακτηρίζεται από αιμοδυναμικά χαμηλή αιματική

ροή και χαμηλή ενδοσηραγγώδη πίεση. Στη φάση αυτή τα αέρια του αίματος είναι ισοδύναμα με εκείνα του φλεβικού.[29]

2. Φάση πλήρωσης

Η φάση αυτή χαρακτηρίζεται από τη χάλαση των λείων μυϊκών ινών, τόσο των σηραγγωδών σωμάτων όσο και των αγγείων τους. Η χάλαση των μυών είναι αποτέλεσμα νευρικού ερεθίσματος με κύριο νευρομεταβιβαστή το NO. Το αποτέλεσμα της χάλασης είναι η αύξηση της ροής του αίματος στους κόλπους των σηραγγωδών σωμάτων, κατά την συστολική αλλά και κατά την διαστολική φάση, με σκοπό την πλήρωση τους. Το πέος επιμηκύνεται ελαφρά, η ενδοσηραγγώδης πίεση παραμένει αμετάβλητη και συνεχίζει να είναι ίδια με την πίεση του φλεβικού συστήματος. Ωστόσο, η μερική πίεση του οξυγόνου αυξάνεται ταχύτατα σε τιμές όμοιες με αυτές του αρτηριακού συστήματος.[29]

3. Φάση διόγκωσης

Στη φάση αυτή γίνεται χάλαση των λείων μυϊκών ινών των σηραγγωδών σωμάτων. Στη μυοχάλαση συμμετέχουν, εκτός από τους νευροδιαβιβαστές, και ουσίες του ενδοθηλίου που καλύπτει τους σηραγγώδεις κόλπους. Το γεγονός αυτό αποδίδεται στις μηχανικές δυνάμεις που ασκούνται στο ενδοθήλιο από τη ροή του αίματος και στη μεταφορά αγγειοδιασταλτικών ουσιών (π.χ. βραδυκινίνης). Το NO είναι η κύρια ουσία που ελευθερώνεται από το ενδοθήλιο και διαχέεται ταχύτατα στις λείες μυϊκές ίνες. Το πέος επιμηκύνεται και διογκώνεται. Με την διόγκωση των σηραγγωδών σωμάτων συμπιέζονται τα φλεβίδια απαγωγής του αίματος, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του μηχανισμού της φλεβικής απόφραξης. Η ενδοσηραγγώδης πίεση αυξάνεται ταχύτατα για να πλησιάσει ένα επίπεδο ισορροπίας που αντιστοιχεί στη μέση συστολική αρτηριακή πίεση. Μειώνεται η αρτηριακή ροή του αίματος και η ενδοσηραγγώδης πίεση υπερβαίνει την διαστολική, επομένως η είσοδος του αίματος στους σηραγγώδεις κόλπους γίνεται μόνο κατά την συστολική φάση. Η μερική πίεση του οξυγόνου βρίσκεται σε επίπεδα παρόμοια με αυτά που παρατηρούνται στο αρτηριακό σύστημα [29].

4. Φάση πλήρους στύσης

Στην διάρκεια της φάσης αυτής το πέος φτάνει στη μέγιστη χωρητικότητα του, λόγω της πλήρους ενεργοποίησης του μηχανισμού φλεβικής απόφραξης. Όταν η διόγκωση πλησιάζει στο ανώτατο όριο διατασιμότητας των σπυραγγωδών σωμάτων, η ενδοσπυραγγώδης πίεση αυξάνεται ταχύτατα και όταν υπερβεί τη διαστολική πίεση, η είσοδος του αίματος στους σπυραγγώδεις κόλπους γίνεται μόνο κατά την συστολική φάση. Η ενδοσπυραγγώδης πίεση τελικά σταθεροποιείται σε ένα επίπεδο που πλησιάζει την τιμή της αρτηριακής συστολικής πίεσης μείον την απώλεια πίεσης από την φλεβική απαγωγή του αίματος που εξαρτάται από την ακεραιότητα του μηχανισμού φλεβικής απόφραξης. Το πέος βρίσκεται σε γωνία <math><90^\circ</math> με το σώμα στην όρθια θέση. Η ενδοσπυραγγώδης πίεση σταθεροποιείται περίπου στο επίπεδο της μέσης αρτηριακής πίεσης. Η διάμετρος των σπυραγγωδών αρτηριών και η αιματική ροή εισόδου είναι τώρα μικρότερες απ' ό,τι στη φάση διόγκωσης και μεγαλύτερες απ' ό,τι στη φάση χάλασης. Η αρτηριακή ροή κατά τη συστολική φάση μειώνεται ακόμη περισσότερο καθώς αυξάνεται η ενδοσπυραγγώδης πίεση. [29]

5. Φάση άκαμπτης στύσης

Στη φάση αυτή, η ενδοσπυραγγώδης πίεση αυξάνεται σε επίπεδα μεγαλύτερα εκείνων της συστολικής πίεσης, με αποτέλεσμα την μέγιστη σκληρότητα του πέους και την επίτευξη της άκαμπτης στύσης. Η περαιτέρω αύξηση της ενδοσπυραγγώδους πίεσης οφείλεται στην βουλητική ή αντανακλαστική σύσπαση των ισχιοσπυραγγωδών μυών. Η αρτηριακή παροχή σταματά. Η διάρκεια της φάσης αυτής είναι ελάχιστη λόγω του γρήγορου κάματος των ισχιοσπυραγγωδών μυών, αποφεύγοντας έτσι την ισχαιμία και τις βλάβες στους ιστούς. Έτσι, το πέος αποκτά την απαιτούμενη σκληρότητα για την διείσδυση στον κόλπο. [29]

6. Φάση αποδιόγκωσης (σμίκρυνσης)

Μετά την εκσπερμάτιση ή την παύση του ερωτικού ερεθισμού επανέρχεται ο αδρενεργικός (συμπαθητικός) έλεγχος, προκαλώντας σύσπαση των λείων μυϊκών ινών γύρω από τους αιματικούς κόλπους και τα αρτηριόλια. Έτσι μειώνεται η αρτηριακή ροή, οι φλεβικές οδοί ανοίγουν απενεργοποιώντας τον μηχανισμό φλεβικής

απόφραξης, με αποτέλεσμα το άδειασμα των σπυραγγωδών σωμάτων και την σταδιακή μείωση της ενδοσπυραγγώδους πίεσης. Τελικά, το πέος επανέρχεται στη φάση χάλασης (ηρεμίας) και στο προηγούμενο του μήκος.[29]

1.7.ΕΝΔΟΚΡΙΝΗΣ ΟΡΧΙΚΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ

Ένα κατάλληλο ορμονικό περιβάλλον είναι απαραίτητο για τα όργανα αναπαραγωγής ώστε να παράγουν, να ωριμάζουν και να μεταφέρουν τους ανδρικούς γαμέτες. Η ορμονική ισορροπία διατηρείται μέσω του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-των γονάδων. Η έκκριση των γοναδοτροπινών FSH και LH ρυθμίζεται από τον υποθάλαμο μέσω εκκρίσεων της γοναδοτροπικής εκλυτικής ορμόνης (GnRH). Οι γοναδοτροπίνες που εκκρίνονται από την υπόφυση, FSH και LH μαζί με την τεστοστερόνη που παράγεται στον διάμεσο ορχικό ιστό από τα κύτταρα Leydig είναι σημαντικές για μια επιτυχή σπερματογένεση. [30]

Ο άξονας υποθαλάμου-πρόσθιου λοβού της υπόφυσης-γονάδας είναι ανάλογος με τον άξονα που συμβάλλει στην έκκριση του θυρεοειδούς και των επινεφριδίων και αποτελεί τη βασική ρύθμιση της λειτουργίας των γονάδων (όπως οι όρχεις). Ο υποθάλαμος λαμβάνει πληροφορίες από διάφορα εγκεφαλικά κέντρα όπως την αμυγδαλή, τον υπόκαμπο, τον θάλαμο, τη γέφυρα.

Οι υποθαλαμικοί νευρώνες παράγουν ορμόνες, οι οποίες εκλύουν ή αναστέλλουν τη σύνθεση και έκκριση των ορμονών στον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης. Η σημαντικότερη ορμόνη του υποθαλάμου, όσον αφορά τη ρύθμιση των οργάνων της αναπαραγωγής, είναι η ορμόνη GnRH (Gonadotropine Releasing Hormone). Η GnRH είναι ένα δεκαπεπτίδιο, το οποίο διεγείρει την έκκριση των γοναδοτροπινών LH και FSH στην υπόφυση. Η GnRH απελευθερώνεται στις πυλαίες φλέβες της υπόφυσης κατά παλμούς. Συγκεκριμένα σε έναν άνδρα εμφανίζονται 8-10 παλμοί την ημέρα.

Σημαντική επίδραση στην έκκριση ορμονών μπορούν να ασκήσουν η διατροφή, η σωματική άσκηση και το άγχος. [30]

Η LH στον όρχι διεγείρει την στεροειδογένεση εντός των κυττάρων Leydig προκαλώντας τη μετατροπή της χοληστερόνης σε πρεγνενολόνη και τελικά σε τεστοστερόνη εντός των μιτοχονδρίων. Η FSH διεγείρει την έκκριση οιστρογόνων από τα κοκκιώδη κύτταρα και από τα κύτταρα Sertoli. Επίσης διεγείρει την αύξηση των σπερματικών σωληναρίων κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και είναι ουσιαστική

για την έναρξη της σπερματογένεσης κατά την εφηβεία. Στους ενήλικες ο ρόλος της είναι η διατήρηση ποσοτικά φυσιολογικών επιπέδων σπερματογένεσης. Η προλακτίνη είναι η τρίτη ορμόνη που επιδρά πάνω στη γονιμότητα. Η κύρια δράση της είναι η σύνθεση γάλακτος στις γυναίκες κατά τη λοχεία. Στον άνδρα η δράση της δεν είναι ξεκάθαρη, παρόλα αυτά έχουν βρεθεί υποδοχείς της στον προστάτη, στις σπερματοδόχους κύστες και στα κύτταρα Leydig. Η δράση της βοηθά στη συντήρηση φυσιολογικών υψηλών ενδοορχικών επιπέδων τεστοστερόνης και στη διατήρηση της libido. [30]

1.7.1.ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΤΗΣ ΤΕΣΤΟΣΤΕΡΟΝΗΣ

Η τεστοστερόνη είναι η ανδρική στεροειδής ορμόνη η οποία παράγεται από τα ενδιάμεσα κύτταρα του όρχεως. Ένας φυσιολογικός άνδρας παράγει περίπου 7 mg τεστοστερόνης καθημερινά. Η τεστοστερόνη και ο μεταβολίτης της, η διϋδροτεστοτερόνη (DHT), είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη των ανδρικών δευτερογενών φυλετικών οργάνων (πέος, σπερματοαγωγοί και αδένες) και την ανάπτυξη των δευτερογενών χαρακτηριστικών του φύλου (αύξηση οστών και μυών, ποιότητα της φωνητικής χροιάς). Η FSH και η LH ελέγχει την έκκριση της τεστοστερόνης, η οποία με την σειρά της οδηγεί στην ανάπτυξη των όρχεων. Επιπλέον με τη δράση του ενζύμου 5-α αναγωγάση η τεστοστερόνη στον όρχι δίνει μικρότερες ποσότητες διϋδροτεστοτερόνης (DHT). [31]

Στους άνδρες η κυκλοφορούσα τεστοστερόνη και ανδροστενεδιόνη αποτελούν τις κύριες πηγές οιστραδιόλης και οιστρόνης του οργανισμού, αντίστοιχα. Παράγονται με αρωματοποίηση σε διάφορες περιοχές, όπως είναι ο λιπώδης ιστός και το ήπαρ. Μόνο το 1% έως 2% της κυκλοφορούσας τεστοστερόνης βρίσκεται υπό ελεύθερη μορφή. Το μεγαλύτερο ποσοστό της τεστοστερόνης και DHT που κυκλοφορούν στο αίμα είναι συνδεδεμένες με μια φυλο-στεροειδο-δεσμευτική σφαιρίνη (SSBG), η οποία έχει την ίδια ακολουθία αμινοξέων με την ανδρογόνου-δεσμευτική πρωτεΐνη που προέρχεται από τα κύτταρα Sertoli. Το υπόλοιπο συνδέεται με αλβουμίνη. Συμπερασματικά, το κλάσμα που είναι συνδεδεμένο με την SSBG αποτελεί ένα κυκλοφορόν απόθεμα ανδρογόνων, παρόμοιο με εκείνο των θυρεοειδικών ορμονών και της κορτιζόλης. Η συγκέντρωση SSBG μειώνεται από τα ανδρογόνα και αυξάνεται από τα οιστρογόνα. Έτσι, τα ανδρογόνα αυξάνουν από μόνα τους τη βιολογική διαθεσιμότητά τους, αυξάνοντας το ποσοστό της διαθέσιμης, μη δεσμευμένης ορμόνης. Η FSH, η LH και

η τεστοστερόνη συνολικά μαζί με την οιστραδιόλη, την ανασταλτίνη, την προλακτίνη και την αυξητική ορμόνη συμβάλλουν στη ρύθμιση της σπερματογένεσης.[30]

Η ενεργοποίηση των σπερματογονίων, τα οποία έχουν υποδοχείς για την FSH, αρχίζει αμέσως μόλις αρχίσει το ηβικό στάδιο αύξησης της FSH. Στη συνέχεια, αυξάνονται οι συγκεντρώσεις LH και τεστοστερόνης. Τα επίπεδα της τεστοστερόνης στους όρχεις είναι πολύ πιο υψηλά από ότι στο πλάσμα, κυρίως λόγω της ειδικής δράσης της LH στα κύτταρα Leydig. Είναι άγνωστο αν η τοπική τεστοστερόνη ρυθμίζει τη σπερματογένεση από μόνη της μέσω της μετατροπής της, στους όρχεις, σε διυδροτεστοστερόνη (DHT) ή σε οιστραδιόλη. Επίσης δεν έχει διευκρινισθεί πώς ή κατά πόσον τα στεροειδή του φύλου δρουν απευθείας στα σπερματοκύτταρα ή στις σπερματίδες, δεδομένου ότι τα γεννητικά αυτά κύτταρα δεν έχουν υποδοχείς για τις ορμόνες αυτές.

Η ανδρογονοδεσμευτική πρωτεΐνη (ABP) εκκρίνεται στο υγρό των σωληναρίων, όπου αποτρέπει την επαναρρόφηση των στεροειδών ορμονών από την επιδιδυμίδα, εξασφαλίζοντας έτσι διαθέσιμες ποσότητες για τα σπερματοζώαρια.

Οι επιδράσεις των ανδρογόνων σε ιστούς έξω από τους όρχεις μπορεί να διαχωρίζονται σε: α) εκείνες που περιλαμβάνουν την αναπαραγωγική λειτουργία και τα δευτερεύοντα χαρακτηριστικά του φύλου και β) σε εκείνες που περιλαμβάνουν τη διέγερση της σωματικής αύξησης και ωρίμασης.

Τελικά τα ανδρογόνα διεγείρουν την ανάπτυξη και διαφοροποίηση της επιδιδυμίδας και των επικουρικών αναπαραγωγικών οργάνων του άρρενος. Οι ορμές της λίμπιντο και η ικανότητα διατήρησης της στύσης ευνοούνται από τα ανδρογόνα. Τα ανδρογόνα δημιουργούν στους άνδρες μεγαλύτερη οστική μάζα σε σχέση με την οστική μάζα των γυναικών, δράση που προστατεύει τους άνδρες από την οστεοπόρωση.[30]

Η LH ελέγχει την παραγωγή και την έκκριση της τεστοστερόνης μέσω ειδικών υποδοχέων που βρίσκονται στην επιφάνεια των κυττάρων Leydig.[32,33] Η δομή του συγκεκριμένου υποδοχέα της LH αντιστοιχεί στην δομή της υπεροικογένειας επτά διαμεμβρανικών ζευγών υποδοχέων πρωτεΐνης G [34]. Η συνεχής χορήγηση LH έχει ως αποτέλεσμα την υπερτροφία και υπερπλασία των κυττάρων Leydig, καθώς η LH αυξάνει την μεταγραφή των γονιδίων που κωδικοποιούν μία σειρά ενζύμων απαραίτητων για την στεροειδογένεση [37, 38, 39]. Στον φυσιολογικό άνδρα η περιοδική διέγερση με LH στοχεύει στην αποφυγή παρατεταμένων περιόδων αδράνειας των κυττάρων Leydig στη δράση της LH [40].

1.8.Η ΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ IN VIVO

Το σπερματοζώαριο αποκτά την ικανότητα να γονιμοποιήσει το ωάριο κατά την οδύσσειά του μέσα στο γυναικείο γεννητικό σύστημα. Η γονιμοποίηση είναι η σύντηξη ενός θηλυκού και ενός αρσενικού γαμέτη, με την ακόλουθη συνένωση των πυρήνων τους.

Τα κύρια στάδια της γονιμοποίησης είναι:

- 1) Αναγνώριση των γαμετών, έλξη, επαφή και συνένωση
- 2) Σύντηξη γαμετών και φραγμός στην πολυσπερμία
- 3) Μεταβολική ενεργοποίηση
- 4) Ανακατατάξεις κυτταροπλασματικών ουσιών και
- 5) Σύντηξη γαμετικού υλικού

Η γονιμοποίηση συνήθως συμβαίνει στο ευρύτερο τμήμα των σαλπίνγων. Στη μέση του γυναικείου αναπαραγωγικού κύκλου η τραχηλική βλέννα αλλάζει και γίνεται πιο υδαρής. Οι αλλαγές προστατεύουν τα σπερματοζώαρια από το όξινο περιβάλλον του κόλπου και διευκολύνουν την είσοδο των σπερματοζωαρίων στη μήτρα. Κατά τη διάρκεια της διέλευσης του σπερματοζωαρίου στο γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα υπόκειται σε φυσιολογικές αλλαγές οι οποίες αναφέρονται ως ενεργοποίηση (hyperactivation). Ο ωαγωγός της γυναίκας διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη γονιμοποίηση, αφού το σπερματοζώαριο αποκτά ικανότητα γονιμοποίησης (capacitation) μέσα στον ωαγωγό. Η ενεργοποίηση αλλάζει τα χαρακτηριστικά των σπερματοζωαρίων, τροποποιεί το φορτίο της επιφανείας του και αυξάνει τη διαβατότητα της κυτταρικής μεμβράνης. Οι μεταβολές που γίνονται στο σπερματοζώαριο δεν έχουν διευκρινιστεί. Αλλά πιστεύεται ότι η απομάκρυνση της χοληστερόλης αποσταθεροποιεί την κυτταρική μεμβράνη του ακροσωμικού κυστιδίου και διευκολύνει την ακροσωμική αντίδραση.[41,42]

Η επαφή του σπερματοζωαρίου με το ωάριο προκαλεί αλλαγές στην κίνηση της ουράς του, με αποτέλεσμα να αυξάνονται και να γίνονται μαστιγοειδείς. Η περιοχή του ακροσώματος του σπερματοζωαρίου εκκρίνει λυτικά ένζυμα που συμβάλλουν στην είσοδο του στο ωάριο, διαδικασία γνωστή και ως αντίδραση του ακροσώματος. Η αντίδραση αυτή θεωρείται ότι προκύπτει εξαιτίας της εξόδου από τη διαφανή ζώνη μιας γλυκοπρωτεΐνης-υποδοχέα των σπερματοζωαρίων. Η αρχική επαφή μεταξύ σπερματοζωαρίου και ωαρίου είναι μια διαδικασία διαμέσου

υποδοχέων. Οι υποδοχείς των σπερματοζωαρίων στη διαφανή ζώνη είναι γλυκοπρωτεΐνες, γνωστές ως ZP1, ZP2 και ZP3. Δομικές αλλαγές σ' αυτές τις γλυκοπρωτεΐνες οδηγούν σε απώλεια της δράσης των υποδοχέων. [21]

Μετά τη διείσδυση του σπερματοζωαρίου, η διαφανής ζώνη του ωαρίου γίνεται αδιαπέραστη. Έτσι η ζώνη εμποδίζει την πολυσπερμία. Στη συνέχεια τα μιτοχόνδρια του σπερματοζωαρίου που έχουν μεταφερθεί στο ωάριο στο ανθρώπινο είδος καταστρέφονται. Ακολουθεί η ενεργοποίηση του ωαρίου, ο σχηματισμός των δύο προπυρήνων και τελικά η σύντηξή τους. Το υλικό της χρωματίνης της κεφαλής του σπερματοζωαρίου αποπυκνώνεται και εμφανίζεται ο ανδρικός προπυρήνας. Ο ανδρικός και ο θηλυκός προπυρήνας ενώνονται και σχηματίζεται η άτρακτος, όπου είναι τοποθετημένα τα χρωμοσώματα. Έτσι, όλα είναι έτοιμα να αρχίσει η πρώτη μιτωτική διαίρεση. [42]

1.9.ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑ

1.9.1.ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΘΕΣΗ ΤΗΣ ΑΝΔΡΙΚΗΣ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑΣ

Υπογονιμότητα ορίζεται η αποτυχία επίτευξης σύλληψης από ένα ζευγάρι, μετά από την προσπάθεια ενός έτους, με συχνές επαφές και χωρίς τη χρήση κανενός αντισυλληπτικού μέσου. Εκατομμύρια ζευγάρια σε όλον τον κόσμο αντιμετωπίζουν προβλήματα υπογονιμότητας και εκατοντάδες χιλιάδες από αυτά καταφεύγουν σε μεθόδους υποβοηθούμενης αναπαραγωγής για να αποκτήσουν έναν ή περισσότερους απογόνους. Στην Ελλάδα υπολογίζεται ότι το 10-15% των ζευγαριών που βρίσκονται σε αναπαραγωγική ηλικία εμφανίζουν κάποιο πρόβλημα γονιμότητας. Οι διαταραχές στη σπερματογένεση θεωρείται ότι έχουν γενετική βάση σε ορισμένες περιπτώσεις και την τελευταία δεκαετία, όλο και περισσότερο γίνονται κατανοητοί οι μοριακοί μηχανισμοί που εμπλέκονται σε αυτή. Η олиγοζωοσπερμία, η ασθενοζωοσπερμία, η τερατοζωοσπερμία και η αζωοσπερμία θεωρείται ότι σχετίζονται με το 20-25% των περιπτώσεων ανδρικής υπογονιμότητας. Η ανδρική υπογονιμότητα μπορεί είτε να αποτελεί το μόνο κλινικό χαρακτηριστικό μίας παθολογικής κατάστασης είτε να ανήκει σ' ένα γενικότερο σύνδρομο. Οι χρωματοσωμικές ανωμαλίες φαίνεται να υπάρχουν σε υψηλό ποσοστό στους άνδρες με αζωοσπερμία ή олиγοζωοσπερμία. Συγκεκριμένα περίπου 2.000 γονίδια ρυθμίζουν τη σπερματογένεση, τα περισσότερα

από τα οποία βρίσκονται στα αυτοσωμικά χρωμοσώματα, ενώ μόνο τα 30 χρωμοσώματα βρίσκονται στο χρωμοσώμα Y. Τα γονίδια στα αυτοσωμικά χρωμοσώματα ρυθμίζουν τη σπερματογένεση διαμέσου των μεταβολικών διαδικασιών των σωματικών κυττάρων. Τα γονίδια όμως που εντοπίζονται στο χρωμοσώμα Y παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στη φυσιολογική λειτουργία του όρχεως, αλλά και στη φυσιολογική λειτουργία του οργανισμού γενικότερα. [21]

Για μια επιτυχημένη γονιμοποίηση είναι σημαντική η σύζευξη του ωαρίου που βρίσκεται στο στάδιο της μετάφασης II με ένα ικανό προς γονιμοποίηση σπερματοζωάριο, το οποίο έχει ήδη υποστεί την ακροσωμική αντίδραση. Προβλήματα ίσως να προκύψουν από το βαθμό ωριμότητας του ωαρίου ή από την ποιότητα του σπέρματος. Οι παράμετροι ενός φυσιολογικού σπερμοδιαγράμματος έχουν οριστεί από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (World Health Organisation, WHO) και έχουν οριστεί ως εξής: όγκος υγρού εκσπερμάτισης 2-6ml, συγκέντρωση σπερματοζωαρίων $>15 \times 10^6/\text{ml}$, ποσοστό κινητών σπερματοζωαρίων με κινητικότητα $\alpha + \beta > 50\%$ των σπερματοζωαρίων, φυσιολογική μορφολογία σε $>4\%$ των σπερματοζωαρίων και ζωτικότητα: $\geq 58\%$ [20].

Υπάρχουν περιπτώσεις ανδρικής υπογονιμότητας και σεξουαλικής δυσλειτουργίας που δύναται να θεραπευθούν με κατάλληλη φαρμακευτική αγωγή, ψυχολογική υποστήριξη του ασθενούς ή κατάλληλους χειρουργικούς χειρισμούς. Σε άλλες περιπτώσεις αρκεί ο ασθενής να αποφύγει περιβαλλοντικούς παράγοντες και συνθήκες του σύγχρονου τρόπου ζωής που ευθύνονται για την πρόκληση της υπογονιμότητας του. [14,20]

1.9.2. ΑΙΤΙΑ ΑΝΔΡΙΚΗΣ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑΣ

A. Υπογοναδισμός

Ανδρικός υπογοναδισμός χαρακτηρίζεται η κατάσταση, κατά την οποία ο οργανισμός δεν παράγει την ποσότητα της τεστοστερόνης που χρειάζεται. Ο υπογοναδισμός μπορεί να υπάρχει κατά τη γέννηση ή να αναπτυχθεί αργότερα σε κάποια φάση της ζωής. Ο υπογοναδισμός μπορεί να διακριθεί σε δύο κατηγορίες: α) τον πρωτοπαθή ή υπεργοναδοτροφικό υπογοναδισμό και β) τον δευτεροπαθή ή υπογοναδοτροφικό υπογοναδισμό.

Όταν για την υπογονιμότητα ενός άνδρα ευθύνεται ο υπογοναδισμός, η θεραπεία που συνιστάται, είναι η περιοδική χορήγηση GnRH ταυτόχρονα με την

ενδομυϊκή χορήγηση των γοναδοτροπινών, της FSH και της LH. Σε περιπτώσεις διαταραχών του υποθαλάμου η χορήγηση της GnRH είναι αποτελεσματική. Από την άλλη πλευρά σε διαταραχές της υπόφυσης απαιτείται η χορήγηση γοναδοτροπινών (hMG + hCG, κατάλληλα απομονωμένη FSH ούρων, ανασυνδυασμένη ανθρώπινη FSH). Η GnRH ορμόνη χορηγείται περιοδικά και υποδόρια. Οι δόσεις κυμαίνονται από 5-20μg/φορά, καθορισμένες ανάλογα με τις τιμές των γοναδοτροπινών και της τεστοστερόνης καθώς και τον όγκο των όρχεων. Αυτή η θεραπεία είναι αποτελεσματική μόνο όταν η υπόφυση ανταποκρίνεται. Σε περίπτωση που η θεραπεία αυτή αποτύχει η υπογονιμότητα πιθανόν να οφείλεται σε μετάλλαξη του γονιδίου που κωδικοποιεί τον υποδοχέα της GnRH (αυτοσωμικό υπολειπόμενο). Μια δεύτερη πιθανή αιτία αποτυχίας της GnRH θεραπείας μπορεί να θεωρηθεί η παραγωγή αντι-GnRH αντισωμάτων μετά από την χορήγησή της. Η χρήση των γοναδοτροπινών αποτελεί μια ευρέως διαδεδομένη θεραπευτική αντιμετώπιση του υπογοναδοτροφικού υπογοναδισμού τόσο για οικονομικούς λόγους, όσο και για την μη παρατήρηση αντενδείξεων. Η ανθρώπινη χοριακή γοναδοτροπίνη (hCG) χορηγείται σε δόσεις των 2000-5000 IU εβδομαδιαίως. Η FSH διατίθεται τόσο σε ανασυνδυασμένη μορφή υψηλής καθαρότητας, όσο και σε υψηλά καθαρή μορφή που έχει απομονωθεί από ούρα. Η FSH χορηγείται σε δόσεις των 450-525 IU εβδομαδιαίως. Οι δύο γοναδοτροπίνες μπορούν να χορηγηθούν τόσο ενδομυϊκά όσο και υποδόρια.

Στον πρωτοπαθή υπογοναδισμό η δυσλειτουργία εντοπίζεται σε επίπεδο ορχικού ιστού. Η αιτιοπαθογένεια της νόσου μπορεί να είναι γενετική (σύνδρομο Klinefelter) ή να αποκτηθεί λόγω ορχικής ατροφίας μετά από κρυψορχία, ορχίτιδα, ακτινοθεραπεία, χημειοθεραπεία κ.τ.λ. Η γονιμότητα αυτών των ανδρών μειώνεται σημαντικά και οι συμβατικοί τρόποι θεραπείας της καθίστανται ελάχιστοι. Αντίθετα, η υποβοηθούμενη αναπαραγωγή καθίσταται εφικτή μετά από ορισμένους κύκλους βελτίωσης της ποιότητας του σπέρματος. [14]

B. Ιδιοπαθούς φύσεως υπογονιμότητα

Περισσότεροι από το 25% των ασθενών με υπογονιμότητα έχουν ανωμαλίες στο σπερμοδιάγραμμα τους, οι οποίες δεν μπορούν να ερμηνευθούν. Αυτή η κατάσταση ορίζεται ως ιδιοπαθούς φύσεως υπογονιμότητα. Στο 39% των ασθενών όλες οι παράμετροι του σπερμοδιαγράμματος είναι μη φυσιολογικές. Στο 24% των ασθενών ανωμαλίες παρουσιάζονται είτε μόνο στην κινητικότητα των

σπερματοζωαρίων είτε μόνο στην ζωτικότητα τους. Τέλος, στο 10% των ασθενών υπάρχουν μεμονωμένες μορφολογικές αλλοιώσεις. Όταν πρόκειται να χρησιμοποιηθεί κάποια φαρμακευτική θεραπεία για τη βελτίωση του σπέρματος, πρέπει να εφαρμοστεί για 3-6 μήνες, ώστε να συμπληρωθεί τουλάχιστον ένας πλήρης κύκλος σπερματογένεσης. Εάν η φαρμακευτική θεραπεία αποτύχει τότε συνήθως εφαρμόζεται κάποια από τις σύγχρονες μεθόδους υποβοηθούμενης αναπαραγωγής.[14]

Τα αίτια της ανδρικής υπογονιμότητας θα μπορούσαν να καταταχθούν σε τρία επίπεδα: προορχικό, ορχικό, μεταορχικό.

1.9.3.ΠΡΟΟΡΧΙΚΑ ΑΙΤΙΑ

Σε προορχικό επίπεδο υπογονιμότητας είναι κυρίως ορμονικής φύσεως.

ΝΟΣΟΙ ΤΟΥ ΥΠΟΘΑΛΑΜΟΥ

ΕΝΔΟΚΡΙΝΕΙΣ ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ

A. Ανεπάρκεια της FSH

Οι ασθενείς εμφανίζουν ολιγοσπερμία μέχρι αζωοσπερμία. Είναι μια πολύ σπάνια κατάσταση κατά την οποία δεν παράγεται επαρκής ποσότητα FSH από την υπόφυση.[43]

B. Ανεπάρκεια της LH (σύνδρομο γόνιμου ευνούχου)

Υπάρχει ανεπάρκεια της LH και δεν παράγεται αρκετή ενδοορχική τεστοστερόνη για αυτό πραγματοποιείται η σπερματογένεση, αλλά όχι και η αρρενοποίηση. Οι ασθενείς αυτοί έχουν ευνουχοειδή χαρακτηριστικά σώματος ποικίλου βαθμού αρρενοποίησης και συχνά εμφανίζουν γυναικομαστία. Οι όρχεις τους έχουν φυσιολογικό μέγεθος, αλλά έχουν μειωμένο αριθμό σπερματοζωαρίων.[44]

Γ. Ανεπάρκεια γοναδοτροπινών (σύνδρομο Kallmann)

Ο ασθενής εμφανίζει απουσία της GnRH συνδυασμένης ενίοτε με έλλειψη οσμής. Η λειτουργία της υπόφυσης είναι φυσιολογική. Επιπλέον κλινική συμπτωματολογία περιλαμβάνει νεφρικές ανωμαλίες, μικροφαλία, και κρυσορχία. Οι ασθενείς έχουν ατροφικούς όρχεις και στις βιοψίες υπάρχει στάση των γεννητικών κυττάρων και υποπλασία των κυττάρων του Leydig. Χορήγηση ορμονών FSH LH μπορεί να προκαλέσει αύξηση της γονιμοποιητικής ικανότητας. Τέλος αρρενοποίηση μπορεί επίσης να επιτευχθεί με τεστοστερόνη και hCG. [45]

Δ. Συγγενή σύνδρομα υπογοναδοτροπισμού

Αρκετά είναι τα σύνδρομα που μαζί με άλλα κλινικά ευρήματα προκαλούν δευτεροπαθή υπογοναδισμό.

To Bardet-Biedl είναι ένα σπάνιο σύνδρομο που χαρακτηρίζεται από νοητική υστέρηση, πολυδακτυλία και υπογοναδισμό.

To Prader-Willi χαρακτηρίζεται από παχυσαρκία, ιδιαίτερα μορφολογικά χαρακτηριστικά προσώπου, χαρακτηριστικά μικρά άκρα, κινητική και νοητική καθυστέρηση και υπογοναδισμό. Κυρίως χαρακτηρίζεται από ανεπάρκεια γοναδοτροπινών, οιστρογόνων και τεστοστερόνης. Η σπερματογένεση μπορεί να προκληθεί με εξωγενή χορήγηση LH και FSH.

Η παρεγκεφαλιδική αταξία μπορεί επίσης να σχετιστεί με υπογοναδοτροφικό υπογοναδισμό. Οι ασθενείς αυτοί έχουν ανωμαλίες στην ομιλία και αστάθεια στο βάδισμα με έντονο τρίκλισμα και συνήθως ευνοχοειδή εμφάνιση με ατροφικούς όρχεις. Η υποθαλαμουποφυσιακή δυσλειτουργία πιστεύεται ότι είναι η αιτία της υπογονιμότητας αυτής της νόσου. Οι παθολογικές αλλαγές της λευκής ουσίας της παρεγκεφαλίδος ίσως να αποτελούν τη βάση για τη δυσλειτουργία αυτή.[46]

ΝΟΣΟΙ ΤΗΣ ΥΠΟΦΥΣΗΣ

ΕΝΔΟΚΡΙΝΕΙΣ ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ

1. Ανεπάρκεια της υπόφυσης

Όγκοι, ακτινοβολία και επεμβάσεις αποτελούν ορισμένα μόνο από τα αίτια που ευθύνονται για την ανεπάρκεια της υπόφυσης. Στους ασθενείς αυτούς η τεστοστερόνη είναι χαμηλή ενώ ποικίλουν τα επίπεδα των LH, FSH. Στην δρεπανοκυτταρική αναιμία τα δρεπανόμορφα ερυθροκύτταρα αυξάνουν το ιξώδες του αίματος προκαλώντας στάση της ροής κυρίως σε μικρά αγγεία.

2.Υπερπρολακτιναιμία

Η αύξηση των επιπέδων της προλακτίνης συνήθως οδηγεί σε μείωση των επιπέδων της τεστοστερόνης και των FSH, LH και συνεπώς σε υπογονιμότητα. Έτσι εμφανίζονται συμπτώματα ανικανότητας, γυναικομαστίας, γαλακτορίας. Σε περιπτώσεις υπερπρολακτιναιμίας, αν εξαιρεθούν δευτερεύουσες αιτίες όπως φαρμακευτικά σκευάσματα, τότε ως πιο πιθανή και σημαντική αιτία είναι το αδένωμα της υπόφυσης που εκκρίνει προλακτίνη.[47]

3.Εξωγενής ή ενδογενής ορμόνες

A. Οιστρογόνα

Η διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ οιστρογόνων και ανδρογόνων οδηγεί σε υπογονιμότητα. Η παχυσαρκία μπορεί να οδηγήσει σε υπογονιμότητα μέσω της αυξημένης δράσης της περιφερικής αρωματάσης. Το ίδιο συμβαίνει και στην κίρρωση του ήπατος, όπου αυξάνεται η παραγωγή των ενδογενών οιστρογόνων εξαιτίας της αυξημένης δράσης της αρωματάσης του ήπατος που πάσχει. Η υπερβολική παραγωγή οιστρογόνων μειώνει την έκκριση γοναδοτροπινών από την υπόφυση οδηγώντας σε δευτεροπαθή ορμική βλάβη. Τα τελευταία χρόνια έχουν ενοχοποιηθεί οι επιδράσεις των εξωγενών οιστρογόνων, όπως αυτά που προέρχονται από το περιβάλλον και από την κατανάλωση τροφών που τα περιέχουν. [48]

B. Γλυκοκορτικοειδή

Η έκκριση της LH από την υπόφυση καταστέλλεται λόγω αυξημένων επιπέδων κορτιζόνης στο πλάσμα. Τόσο η εξωγενής λήψη (π.χ. για τη χρόνια θεραπεία του άσθματος, για την ελκώδη κολίτιδα ή τη ρευματοειδή αρθρίτιδα), όσο και η ενδογενής παραγωγή τους (σύνδρομο Cushing), οδηγούν στην αύξηση των γλυκοκορτικοειδών. Με τη διόρθωση των επιπέδων επανέρχεται και ενεργοποιείται η σπερματογένεση. [49]

Γ. Ανδρογόνα

Καταστολή της έκκρισης των γοναδοτροπινών προκαλείται επίσης και από την υπερβολική παραγωγή των ανδρογόνων. Η χρήση εξωγενών ανδρογόνων, αναβολικών από αθλητές, μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα παροδική "στειρότητα". Ο ασθενής θα πρέπει να διακόψει τη χορήγηση τους και να γίνει έλεγχος με σπερμοδιάγραμμα κάθε 3 και 6 μήνες.[50]

Δ. Αυξητική ορμόνη

Η αυξητική ορμόνη είναι μία ορμόνη της πρόσθιας υπόφυσης που διαθέτει υποδοχείς στους όρχεις. Διεγείρει έναν αυξητικό παράγοντα που πιθανόν να είναι σημαντικός για τη σπερματογένεση. Σε κάποιους υπογόνιμους άνδρες έχει παρατηρηθεί ανεπαρκής ανταπόκριση σε δοκιμές πρόκλησης αυξητικής ορμόνης και πιθανόν η χορήγηση της να βελτιώσει την ποιότητα του σπέρματος. [51]

Ε. Υπερθυρεοϊδισμός και υποθυρεοϊδισμός

Η θυρεοϊδική ισορροπία είναι σημαντική, καθώς μη φυσιολογικά επίπεδα των ορμονών επηρεάζουν τόσο την υπόφυση όσο και τον όρχι. Η φυσιολογική έκκριση της ορμόνης του υποθαλάμου καθώς και η ισορροπία των ανδρογόνων οιστρογόνων είναι σημαντική. Οποιαδήποτε μεταβολή στις ορμόνες του θυρεοειδούς επηρεάζει τη σπερματογένεση (περίπου 0,5% των αιτίων της υπογονιμότητας). [52]

1.9.4.ΟΡΧΙΚΑ ΑΙΤΙΑ

ΔΙΑΦΟΡΑ ΣΥΝΔΡΟΜΑ

A. Σύνδρομο Klinefelter

Το σύνδρομο Klinefelter αποτελεί την πιο κοινή αιτία αζωοσπερμίας με συχνότητα ίση με το 14% των περιπτώσεων. Εκδηλώνεται με τα εξής χαρακτηριστικά: μικρούς όρχεις, γυναικομαστία και αζωοσπερμία. Μπορεί επίσης να παρουσιάσει καθυστερημένη σεξουαλική ωρίμανση, αυξημένο ύψος, μειωμένη νοημοσύνη, σακχαρώδη διαβήτη, παχυσαρκία, λευχαιμία και αυξημένες πιθανότητες καρκίνου του στήθους. Το 91% των ανδρών φέρει ένα επιπλέον X χρωμόσωμα (47,XXY) και το 10% εμφανίζουν μωσαϊκισμό με συνδυασμό XXY/XY χρωμοσωμάτων. Η πατρότητα για όσους έχουν το σύνδρομο αυτό είναι σπάνια αν και υπάρχουν πιθανότητες πατρότητας στις μορφές με μωσαϊκισμό. Οι βιοψίες των όρχεων δείχνουν φυσιολογικό αριθμό των κυττάρων Leydig αλλά σκλήρυνση και υαλινοποίηση των σπερματικών σωληναρίων. Οι LH, FSH παρουσιάζονται αυξημένες, ενώ η τεστοστερόνη μειωμένη, με πτωτική τάση με την πάροδο του χρόνου, οδηγώντας έτσι τον ασθενή σε θεραπεία υποκατάστασης για αρρενοποίηση αλλά και για φυσιολογική σεξουαλική λειτουργία.[53] Σύγχρονες έρευνες δείχνουν εστιακή σπερματογένεση στο 40%-60% των ανδρών με μη-μωσαϊκό σύνδρομο Klinefelter.

B.XYY σύνδρομο

Οι ασθενείς που πάσχουν από 47,XYY είναι ψηλοί και σε ένα ποσοστό 2% αντικοινωνικοί, επιθετικοί, και μπορεί να παρουσιάσουν ακόμη και εγκληματική συμπεριφορά. Αυξημένα είναι τα επίπεδα της FSH, ενώ φυσιολογικά της LH και της τεστοστερόνης. Το σπερμοδιάγραμμα εμφανίζει είτε ολιγοσπερμία είτε αζωοσπερμία.

[54]

Γ.XX σύνδρομο άρρενος

Στο σύνδρομο αυτό παρατηρείται εμφάνιση αγοριών με γυναικομαστία ή ανδρών με αζωοσπερμία καθώς και αυξημένη εμφάνιση υποσπαδία με καθόλα τα άλλα φυσιολογικά εξωτερικά και εσωτερικά γεννητικά όργανα. Η τεστοστερόνη βρίσκεται σε χαμηλά ή φυσιολογικά επίπεδα, ενώ οι γοναδοτροπίνες είναι υψηλές. Η πιο πιθανή εξήγηση της νόσου είναι η μεταφορά της περιοχής που είναι υπεύθυνη για τον σχηματισμό του όρχεως (SR Y gene) από το Y στο X χρωμόσωμα, με αποτέλεσμα να έχουμε διαφοροποίηση του όρχεως. Εντούτοις τα γονίδια που ελέγχουν τη σπερματογένεση δεν μεταφέρονται, με αποτέλεσμα την αζωοσπερμία. [55,56]

Δ. Σύνδρομο Noonan

Ο καρυότυπος του συνδρόμου είναι είτε φυσιολογικός (46,XY) είτε με μωσαϊκισμό (X/XY). Το συγκεκριμένο σύνδρομο σχετίζεται με κοντό ανάστημα, καρδιαγγειακά προβλήματα, κρυσορχία (σε ποσοστό 75%) και ορχική ατροφία [57].

Ε. Σύνδρομο αμφοτερόπλευρης ανορχίας

Είναι γνωστό και σαν σύνδρομο των εξαφανισμένων όρχεων, αφορά άνδρες με XY και μη ψηλαφητούς όρχεις. Συναντάται σπάνια σε 1:20.000 άνδρες. Οι ασθενείς παρουσιάζουν σεξουαλική ανωριμότητα λόγω της έλλειψης ορχικών ανδρογόνων. Η εξαφάνιση των όρχεων οφείλεται πιθανώς σε λοίμωξη, τραυματισμό, συστροφή ή αγγειακή βλάβη κατά τη διάρκεια της εμβρυικής ζωής. Τα επίπεδα των γοναδοτροπινών είναι αυξημένα ενώ αντίθετα της τεστοστερόνης μειωμένα. Οι ασθενείς είναι υποχρεωμένοι να παίρνουν τεστοστερόνη εφόρου ζωής για εμφάνιση φυσιολογικών ανδρικών χαρακτηριστικών και φυσιολογική σεξουαλική λειτουργία, καθώς δεν ενδείκνυται κάποια άλλη θεραπεία. [58]

Ζ. Μικροελλείψεις στο Y χρωμόσωμα

Περίπου 7% των ανδρών με χαμηλό αριθμό σπερματοζωαρίων και το 13% των ανδρών με αζωοσπερμία εμφανίζουν μικροελλείψεις στο μακρύ σκέλος του χρωμοσώματος Y (Yq). Τα γονίδια που ευθύνονται για τη διαφοροποίηση του όρχεως

είναι ανεπηρέαστα, όμως ενίοτε υπάρχουν μεγάλες διαγραφές σε άλλα σημεία οι οποίες μπορεί να οδηγούν και σε ανεπαρκή σπερματογένεση.[59]

H. Μυοτονική δυστροφία

Η μυοτονική δυστροφία προκαλεί μυοτονία, δηλαδή καθυστερημένη μυϊκή χάλαση μετά από σύσπαση. Αναπτύσσεται επίσης ορχική ατροφία (σε ποσοστό 80%) με καταστροφή των σπερματικών σωληναρίων. Παρόλα αυτά τα επίπεδα των FSH, LH είναι φυσιολογικά.[60]

Θ. Sertoli cell-only syndrome

Το σύνδρομο αυτό διαγιγνώσκεται μόνο με ιστολογική εξέταση. Οι ασθενείς είναι αζωοσπερμικοί και στις ορχικές βιοψίες ανευρίσκονται όλων των ειδών τα κύτταρα εκτός των γεννητικών. Κλινικά οι όρχεις τους είναι φυσιολογικοί αν και λίγο μικρότεροι των φυσιολογικών. Τα επίπεδα FSH είναι συνήθως ανεβασμένα. Με ορχικές βιοψίες είναι δυνατόν να βρεθούν σπερματοζωάρια για υποβοηθούμενη αναπαραγωγή. Οι περισσότερες περιπτώσεις είναι ιδιοπαθείς, ενώ άλλες μπορεί να περιλαμβάνουν μικροελλείψεις στο Y (στην AZF περιοχή του χρωμοσώματος Y), σύνδρομο Klinefelter, έκθεση σε χημικές και τοξικές ουσίες, ακτινοθεραπείες ή προηγούμενο τραύμα. [61,62]

Γοναδοτοξικότητα

A. Φαρμακευτικές ουσίες

Υπάρχει ποικιλία μηχανισμών για τη δράση διαφόρων ουσιών πάνω στην υπογονιμότητα. Αρχικά η χημειοθεραπεία έχει σχεδιασθεί ώστε να σκοτώνει τα κύτταρα που διαιρούνται γρήγορα. Ένα ανεπιθύμητο αποτέλεσμα όμως είναι η κυτταροτοξικότητα σε φυσιολογικά αναπτυσσόμενους ιστούς όπως είναι οι όρχεις. Η τοξική δράση των φαρμάκων είναι δοσοεξαρτώμενη και χρονοεξαρτώμενη (διάρκεια θεραπείας). Σημαντικό ρόλο παίζουν παράγοντες όπως ο τύπος και το στάδιο της νόσου, η ηλικία και η γενική κατάσταση του ασθενούς, αλλά και η ορχική λειτουργία πριν την έναρξη της θεραπείας. Γενικά συνιστάται η πάροδος εξαμήνου μετά τη

χημειοθεραπεία, πριν την έναρξη προσπαθειών για σύλληψη. Επίσης ουσίες που αναστέλλουν τη σύνθεση της τεστοστερόνης όπως η κετοκοναζόλη, η σπιρονολακτόνη και το αλκοόλ επηρεάζουν τη σπερματογένεση. Η σιμετιδίνη είναι ανταγωνιστής των ανδρογόνων. Ναρκωτικά όπως η ηρωίνη, η μαριχουάνα, και η μεθαδόνη ρίχνουν τα επίπεδα τεστοστερόνης. Τέλος, πολλά λιπάσματα έχουν ενοχοποιηθεί να έχουν παρόμοια δράση με τα οιστρογόνα.[63]

B. Ακτινοβολία

Τα κύτταρα Leydig παρουσιάζουν μια σχετική ανθεκτικότητα όσον αφορά την ακτινοβολία. Αυτό είναι συνέπεια του χαμηλού ρυθμού κυτταρικής διαίρεσης που παρουσιάζουν. Αντίθετα τα κύτταρα Sertoli και τα γενετικά κύτταρα είναι εξαιρετικά ακτινοευαίσθητα. Όταν τα γενετικά κύτταρα παραμένουν ζωντανά, τότε ίσως οι ασθενείς ανακτήσουν τη γονιμότητα τους μετά την πάροδο κάποιων ετών. Στους ασθενείς αυτούς προτείνεται αποφυγή σύλληψης για ένα διάστημα έξι μηνών έως δύο ετών, εξαιτίας της πιθανότητας χρωμοσωμικών μεταλλάξεων στα σπερματοζώαρια, λόγω των ακτινοβολιών. [63,64]

Διάφορα νοσήματα

1. Νεφρική ανεπάρκεια

Η ουραιμία σχετίζεται με υπογονιμότητα, σεξουαλική δυσλειτουργία και γυναικομαστία. Ο υπογοναδισμός οφείλεται σε χαμηλή τεστοστερόνη, υψηλά επίπεδα FSH,LH και προλακτίνης.

2. Δρεπανοκυτταρική αναιμία

Η δρεπανοκυτταρική αναιμία είναι μια αυτοσωμική υπολειπόμενη ασθένεια, η οποία προκαλεί μείωση της συγκέντρωσης οξυγόνου, λόγω δρεπάνωσης των ερυθροκυττάρων. Το ίδιο πιθανώς συμβαίνει και εντός του ορχικού ιστού προκαλώντας έτσι και πρωτοπαθή υπογοναδισμό πέρα των επιπτώσεων στην υπόφυση, με τελικό αποτέλεσμα τη μείωση της σπερματογένεσης.[14]

3. Κίρρωση του ήπατος

Το αίτιο που προξένησε την ανεπάρκεια του οργάνου είναι σημαντικό. Αν αυτή έχει προκληθεί λόγω ηπατίτιδας με εμπύρετο και βακτηριαιμία, τότε η σπερματογένεση έχει επηρεασθεί τόσο από τον πυρετό όσο και από τους μικροοργανισμούς στο αίμα. Επίσης η υπερβολική χρήση αλκοόλ καταστέλλει την σύνθεση τεστοστερόνης στον όρχι.

Ελαττωματική δραστηριότητα των ανδρογόνων

A. Ανεπάρκεια της 5 α-αναγωγάσης

Η ανεπάρκεια του συγκεκριμένου ενζύμου προκαλεί διφορούμενα εξωτερικά γεννητικά όργανα ενώ αναπτύσσονται φυσιολογικά οι όρχεις και τα εσωτερικά γεννητικά όργανα. Έχει περιγραφεί σπερματογένεση, δεν αναφέρεται γονιμότητα εξαιτίας κυρίως των λειτουργικών ανωμαλιών των εξωτερικών γεννητικών οργάνων, καθώς επίσης και λόγω της ανεπάρκειας της 5α-αναγωγάσης. Κάποια άτομα με ανδρικό ψευδερμαφροδιτισμό, τα οποία μεγάλωσαν σαν κορίτσια, άλλαξαν το ψυχολογικό τους φύλο από θήλυ σε άρρεν, όταν κατά την ήβη εμφάνισαν σημαντική ανάπτυξη του πέους.[30]

B. Ανεπάρκεια των ανδρογονικών υποδοχέων

Ο ανδρογονικός υποδοχέας είναι μια πρωτεΐνη, της οποίας η έλλειψη ή λειτουργική αλλαγή, έχει ως συνέπεια η τεστοστερόνη ή η διυδροτεστοστερόνη να μην μπορεί να συνδεθεί με τα γονίδια, τα οποία αποτελούν στόχο τους. Άρα τα ανδρογόνα, αφού δεν έχουν καμία επίδραση πάνω στους ιστούς, τόσο τα εσωτερικά όσο και τα εξωτερικά γεννητικά όργανα επηρεάζονται. Τα αποτελέσματα ως προς την γονιμότητα εξαρτώνται από την ανεπάρκεια του υποδοχέα. Ασθενείς με 46,XY και με πλήρη αντίσταση στα ανδρογόνα έχουν γυναικεία εξωτερικά γεννητικά όργανα και ενδοκοιλιακούς όρχεις. Το γονίδιο για τον ανδρογονικό υποδοχέα βρίσκεται στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος X. Φυσιολογικά το σύνολο «ορμόνη-υποδοχέας» ενεργοποιείται και οδηγεί στη σύνθεση των πρωτεϊνών στο κυτταρόπλασμα. [11]

Ορχικές βλάβες

1.Ορχίτιδα

Πρόκειται για λοίμωξη μικροβιακής αιτιολογίας, εμφανίζεται όμως και σαν ιογενής στη μορφή της ορχίτιδας λόγω παρωτίτιδας. Σε ένα ποσοστό 30% των ενηλίκων που προσβάλλονται από παρωτίτιδα, η ιογενής λοίμωξη προκαλεί ορχική ατροφία. [65]

2. Τραύμα

Ο όρχις έχει ένα ιδιαίτερο ανοσολογικό περιβάλλον, είναι προφυλαγμένος από το υπόλοιπο σώμα. Το τραύμα όμως μπορεί να προκαλέσει μια ανώμαλη ανοσολογική απάντηση. Και τα δύο ίσως συνεισφέρουν στην ανάπτυξη υπογονιμότητας.

3.Συστροφή

Η συστροφή εμφανίζεται συχνά σε νεαρά αγόρια προεφηβικής και μετεφηβικής ηλικίας. Προκαλεί ισχαιμία στον όρχι και πρέπει να διαγνωστεί και να χειρουργηθεί εντός 6 ωρών.

4.Κιρσοκήλη

Κιρσοκήλη είναι η παθολογική κιρσοειδής ανεύρεση των φλεβών του φλεβικού πλέγματος του σπερματικού τόνου. Οι φλέβες του σπερματικού τόνου (ελικώδες και κρεμαστήριο πλέγμα), αφού διέλθουν στο βουβονικό πόρο, διαχωρίζονται αντίστοιχα προς το κοιλιακό στόμιο και μεταβαίνουν: η έξω σπερματική στην κάτω επιγάστριο, η εκφορητική στο φλεβώδες πλέγμα της σπερματοδόχου κύστης και η έσω σπερματική δεξιά στην κάτω κοίλη και αριστερά στη νεφρική φλέβα. Η κιρσοκήλη αποτελεί πάθηση της εφηβείας και σπάνια παρατηρείται σε αγόρια κάτω των 10 ετών. Το ποσοστό της εμφάνισης της σε άρρενες μεταξύ 12-25 ετών ανέρχεται στο 15%, ενώ σε περιπτώσεις ανδρικής υπογονιμότητας φθάνει το 40%. Ενώ παρατηρείται στο 10% του ανδρικού πληθυσμού. Αριστερά

εντοπίζεται στο 95% των περιπτώσεων στο 3% μόνο δεξιά και στο 17% αμφοτερόπλευρα.

Αίτια που οδηγούν στην εμφάνιση της κισσοκήλης κυρίως αριστερά μπορούν να θεωρηθούν: 1) Το γεγονός ότι η αριστερή έσω σπερματική φλέβα εκβάλλει απευθείας στη σύστοιχη νεφρική φλέβα υπό ορθή γωνία, δυσκολεύοντας με αυτό τον τρόπο τη φλεβική αποχέτευση, σε αντίθεση με την δεξιά σπερματική φλέβα που εκβάλλει στην κάτω κοίλη φλέβα υπό γωνία 30°. Η αιμοδυναμική πίεση είναι αυξημένη αριστερά και έτσι το αίμα παλινδρομεί στις φλέβες του ορχικού πλέγματος. 2) το μήκος της έσω αριστερής σπερματικής φλέβας το οποίο είναι κατά 10 εκατοστόμετρα μεγαλύτερο από αυτό της δεξιάς και 3) Η αριστερή σπερματική φλέβα συμπίεζεται μεταξύ της κοιλιακής αορτής και της άνω μεσεντερίου αρτηρίας (nut - cracker phenomenon, φαινόμενο καρυοθραύστη),[66] οδηγώντας έτσι σε αύξηση της πίεσης και παλινδρόμηση του αίματος από την αριστερή νεφρική φλέβα προς τη σπερματική φλέβα και τις φλέβες του πλέγματος του σπερματικού τόνου. Η βλαβερή επίδραση της κισσοκήλης εμφανίζεται τόσο στον αριθμό όσο και την κινητικότητα των σπερματοζωαρίων. Επίσης, εμφανίζεται μια αύξηση στις ανώριμες μορφές σπερματοζωαρίων.

Υπάρχουν αρκετές θεωρίες σχετικά με το πώς ακριβώς επηρεάζει η κισσοκήλη την ορχική λειτουργία.

1.Ανεπάρκεια του υποθαλάμου - υποφυσιακού - γοναδικού άξονα.

Οι περιφερικές συγκεντρώσεις τεστοστερόνης σε ασθενείς με κισσοκήλη είναι, συνήθως, εντός φυσιολογικών τιμών [67]. Οι λειτουργίες της υπόφυσης και των κυττάρων του Leydig σε ασθενείς με κισσοκήλη είναι φυσιολογικές. Οι Hudson και ο McKay το 1980 επίσης ανακοίνωσαν ότι άνδρες με κισσοκήλη έχουν φυσιολογικές συγκεντρώσεις τεστοστερόνης και γοναδοτροπινών. Γενικά, η λειτουργία του υποθαλάμου - υποφυσιακού - γοναδικού άξονα είναι φυσιολογική σε ασθενείς με κισσοκήλη, αλλά σε μερικές ειδικές υποομάδες ασθενών με κισσοκήλη η λειτουργία του άξονα είναι διαταραγμένη.[68]

2.Αύξηση της ορχικής θερμοκρασίας

Το γεγονός ότι η αύξηση της ορχικής θερμοκρασίας οδηγεί σε διαταραχή της σπερματογένεσης στον άνθρωπο και στα ζώα είναι εξακριβωμένο. Έχει παρατηρηθεί ότι η παλινδρομη ροή αίματος από τη νεφρική φλέβα στην αριστερή έσω σπερματική φλέβα, μπορεί να βλάπτει την αποτελεσματικότητα του συστήματος ανταλλαγής

θερμότητας του ελικώδους δικτύου του όρχεως, βλάπτοντας τελικά τη σπερματογένεση [69].

Η αύξηση της ορχικής θερμοκρασίας οδηγεί σε δυσλειτουργία των κυττάρων του Leydig και μπορεί να βλάπτει τη σπερματογένεση λόγω ελάττωσης της ενδοορχικής συγκέντρωσης τεστοστερόνης. Είναι γνωστό ότι η τεστοστερόνη είναι απαραίτητη για να διατηρηθεί φυσιολογική η λειτουργία της σπερματογένεσης.

3. Φλεβική στάση και υποξία

Η αυξημένη υδροστατική πίεση με την φλεβική στάση στην αριστερή έσω σπερματική φλέβα βλάπτουν τη σπερματογένεση και δημιουργούν τοπική υποξία. [69]

4. Παλινδρόμηση αίματος στη σπερματική φλέβα

Έτσι ορμόνες των επινεφριδίων αλλά και προϊόντα του μεταβολισμού των νεφρών δημιουργούν τοξική δράση στην ωρίμανση των σπερματοζωαρίων. Οι Javert και Clark (1944) πρώτοι υπέθεσαν τη δυνατότητα παλινδρόμησης αίματος μέσω της έσω σπερματικής φλέβας σε ασθενείς με κίρσοκήλη. [70]

5.Κρυσορχία

Σε αγόρια 1 έτους το να μην έχει κατέβει ο όρχις στη θέση του παρατηρείται σε ποσοστό 0,8%. Θεωρείται ως βλάβη της ανάπτυξης και θέτει σε μεγαλύτερο κίνδυνο για καρκίνο τον όρχι αυτό. Αρκετοί είναι οι παράγοντες που ενοχοποιούνται για αυτό. Κάποιοι ασθενείς φέρουν γενετικές αλλαγές του γονιδίου HOXA10. Πρόσφατα αποκαλύφθηκε και ο ρόλος του INSL3, ουσίας που παράγεται από τα κύτταρα Leydig και δρα πάνω στον οίακα κατά την δεύτερη φάση της καθόδου του όρχεως στο όσχεο. Εξίσου σημαντικός είναι και ο ρόλος της τεστοστερόνης, ελλείπει της οποίας μπορεί να οδηγήσει σε μη κάθοδο των όρχεων στην πρώτη φάση της καθόδου στη βουβωνική χώρα. Ο ετερόπλευρος όρχις είναι επίσης πιθανό να έχει ανωμαλίες στα γεννητικά κύτταρα. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα άνδρες με κρυσορχία με την πάροδο του χρόνου να έχουν κίνδυνο για εμφάνιση υπογονιμότητας. Συνιστάται ορχεοπηξία ως την ηλικία των 2 ετών, ώστε να είναι εφικτή η ψηλάφηση του όρχεως για περαιτέρω έλεγχο για εμφάνιση καρκίνου.

Ιδιοπαθή

Τουλάχιστον το 25% των ασθενών της ανδρικής υπογονιμότητας δεν έχει διευκρινισμένη αιτία.

1.9.5.ΜΕΤΑ-ΟΡΧΙΚΑ

Απόφραξη της αναπαραγωγικής οδού

Συγγενή εμπόδια

1. Κυστική ίνωση

Η κυστική ίνωση είναι συχνή γενετική διαταραχή και οφείλεται σε αυτοσωμικό υπολειπόμενο γονίδιο. Περίπου 1 στα 2000-2500 παιδιά εκτιμάται ότι γεννιούνται κάθε χρόνο στην Ελλάδα με κυστική ίνωση, ενώ το 4-5% του πληθυσμού είναι φορείς. Εμφανίζεται με χρόνια απόφραξη των πνευμόνων, ανεπάρκεια παγκρέατος και υπογονιμότητα. Στο 98% των ασθενών απουσιάζουν τμήματα της επιδιδυμίδας, οι σπερματοδόχοι κύστεις, ο εκφορητικός πόρος και οι εκσπερματιστικοί πόροι είναι ινώδεις, ατροφικοί ή απουσιάζουν. Συνέπεια όλων αυτών είναι η απόφραξη της αναπαραγωγικής οδού. Παρόλα αυτά η σπερματογένεση είναι συνήθως φυσιολογική.[71]

2. Ιδιοπαθής απόφραξη της επιδιδυμίδας

Είναι μια σπάνια κατάσταση που εντοπίζεται σε φυσιολογικά άτομα.

3.Σύνδρομο Young

Η χαρακτηριστική κλινική τριάδα είναι η χρόνια βρογχιεκτασία, ιγμορίτιδα, και αποφρακτική αζωοσπερμία. Η απόφραξη εντοπίζεται στην επιδιδυμίδα. Η σπερματογένεση συνήθως είναι φυσιολογική. Εντούτοις τα ποσοστά επιτυχίας των επεμβάσεων αποκατάστασης είναι συνήθως χαμηλότερα από ότι σε άλλες αποφρακτικές καταστάσεις. [72]

4. Πολυκυστική νόσος των ενηλίκων

Η νόσος σχετίζεται με την ύπαρξη κύστεων στο ήπαρ, στους νεφρούς, στο σπλήνα, στο πάγκρεας, , στις σπερματοδόχους κύστεις, στην επιδιδυμίδα και στους όρχεις. Οφείλεται σε αυτοσωμική επικρατούσα νόσο και εκδηλώνεται στην τρίτη με τέταρτη δεκαετία με υπέρταση, κολοιακά άλγη και νεφρική βλάβη. Η υπογονιμότητα είναι αποτέλεσμα της εμφάνισης κύστεων της επιδιδυμίδας και των σπερματοδόχων κύστεων.[14]

5. Απόφραξη του εκσπερματιστικού πόρου

Αποτελεί το κύριο αίτιο της υπογονιμότητας στο 5% των αζωοσπερμικών ανδρών. Κλινικά παρουσιάζει αιμοσπερμία, επώδυνη εκσπερμάτιση, ή υπογονιμότητα. Η απόφραξη μπορεί να είναι συγγενής, αποτέλεσμα πίεσης λόγω κύστεων των πόρων του Müller ή του Wolff ή ακόμα και επίκτητη από λίθους των σπερματοδόχων κύστεων ή από σχηματισμό ουλώδους ιστού μετά από λοίμωξη ή χειρουργική επέμβαση. Η διάγνωση επιβεβαιώνεται από το μικρό όγκο εκσπερματιστικού υγρού και με διορθικό υπέρηχο όπου εμφανίζονται διατάσεις των σπερματοδόχων κύστεων ή των εκσπερματιστικών πόρων. [14]

Επίκτητα εμπόδια

Επέμβαση βουβωνοκήλης

Στο 1% των επεμβάσεων μπορεί να οδηγήσει σε απόφραξη του εκφορητικού πόρου στην βουβωνική περιοχή.

Μικροβιακές λοιμώξεις

Τόσο τα κολοβακτηρίδια όσο και τα χλαμύδια μπορούν να προκαλέσουν ουλές στην επιδιδυμίδα και κατά συνέπεια απόφραξη.

Διατομή του σπερματικού πόρου

Αποτελεί μέθοδο αντισύλληψης κυρίως στις ΗΠΑ. Όμως ένα 5% επιθυμεί αργότερα την αναστόμωση του.

Λειτουργικά εμπόδια

Εκτός από την απόφραξη λόγω φυσικών εμποδίων, υπάρχει και αυτή που εμφανίζεται από τα λειτουργικά εμπόδια. Φαρμακευτικές ουσίες, παθήσεις όπως ο σακχαρώδης διαβήτης, η σκλήρυνση κατά πλάκας καθώς και βλάβες στα νεύρα, είναι δυνατό να προκαλέσουν βλάβη στη συσταλτικότητα των σπερματοδόχων κύστεων. Επίσης, μπορεί να προκληθούν ανατομικά προβλήματα όπως ο υποσπαδίας, που χαρακτηρίζεται από την έκτοπη εκβολή του έξω στομίου της ουρήθρας σε οποιοδήποτε σημείο της κάτω επιφάνειας του πέους αντί της κορυφής της βάλανου. Έτσι το σπέρμα τοποθετείται σε μη κατάλληλο σημείο με αποτέλεσμα την υπογονιμότητα. [14]

Διαταραχές σεξουαλικής επαφής

Ανικανότητα

Αν και μπορεί να υπάρχουν και οργανικά αίτια, συνήθως το άγχος της επίτευξης εγκυμοσύνης προκαλεί μη επαρκείς στύσεις.

1.10.ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΗΣ ΑΝΔΡΙΚΗΣ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑΣ

Οι σύγχρονες μέθοδοι υποβοηθούμενης αναπαραγωγής έδωσαν μια εναλλακτική μορφή στη θεραπεία της ανδρικής υπογονιμότητας. Στην πραγματικότητα η θεραπεία της αιτίας της ανδρικής υπογονιμότητας δεν αποτελεί τον αυτοσκοπό. Έτσι ενώ στον παρελθόν οι θεράποντες ιατροί στόχευαν στην αύξηση του αριθμού των σπερματοζωαρίων, στις μέρες μας στόχο αποτελεί η αύξηση της ποιότητας του σπέρματος. Ο ανδρικός υπογοναδισμός χαρακτηρίζεται από ανεπάρκεια στα ορχικά ανδρογόνα και υπογονιμότητα. Ο υπογοναδισμός μπορεί να διακριθεί σε

δύο κατηγορίες: α) τον πρωτοπαθή ή υπεργοναδοτροφικό υπογοναδισμό και β) τον δευτεροπαθή ή υπογοναδοτροφικό υπογοναδισμό. Όταν για την υπογονιμότητα ενός άνδρα ευθύνεται ο υπογοναδισμός, η θεραπεία που συνιστάται είναι η περιοδική χορήγηση :

➤ **GnRH-ανάλογα**

Ταυτόχρονα με την ενδομυϊκή χορήγηση των γοναδοτροπινών, της FSH και της LH. Η GnRH ορμόνη χορηγείται περιοδικά και υποδόρια, συνήθως στο κοιλιακό τοίχωμα, κάθε δύο ώρες. Οι δόσεις κυμαίνονται από 20-50ng/kg/ώση GnRH και έχει προταθεί σαν θεραπεία του εντοπισμένου υπογοναδοτροφικού υπογοναδισμού διότι επιτυγχάνει:

α) γρήγορη έναρξη της σπερματογένεσης

β) σημαντική αύξηση του όγκου του όρχεως.

γ) αποκατάσταση των επιπέδων τεστοστερόνης στα φυσιολογικά επίπεδα μετά από ένα μήνα θεραπείας. Αυτή η θεραπεία είναι αποτελεσματική μόνο όταν η υπόφυση ανταποκρίνεται. Είναι πιθανόν, ένα ποσοστό oligoζωοσπεμικών ασθενών να παρουσιάζει υποθαλαμική διαταραχή σε ότι αφορά τη συχνότητα και το μέγεθος των εκκριτικών ώσεων της GnRH. [14]

➤ **GnRH-ανταγωνιστές**

Καταστέλλοντας τη μη φυσιολογική έκκριση των γοναδοτροπινών από την υπόφυση με τη χρήση ενός GnRH ανταγωνιστή, στη συνέχεια διεγείρουμε τη φυσιολογική ορχική, ενδοκρινή και σπερματογονική λειτουργία με τη ρυθμική χορήγηση γοναδοτροπινών εξωγενώς. Σε περίπτωση που το θεραπευτικό αυτό σχήμα αποτύχει η υπογονιμότητα πιθανόν να οφείλεται σε μετάλλαξη του γονιδίου που κωδικοποιεί τον υποδοχέα της GnRH (αυτοσωμικός υπολειπόμενος τρόπος κληρονομικότητας). Μια άλλη πιθανή αιτία αποτυχίας της GnRH θεραπείας, μπορεί να θεωρηθεί η παραγωγή αντι-GnRH αντισωμάτων μετά από την ενδοφλέβια χορήγησή της. Η χρήση των γοναδοτροπινών αποτελεί μια ευρέως διαδεδομένη θεραπευτική αντιμετώπιση του υπογοναδοτροφικού υπογοναδισμού τόσο για οικονομικούς λόγους, όσο και για την μη ύπαρξη αντενδείξεων στα άτομα. [14]

➤ **Γοναδοτροπίνες**

Η hCG μπορεί να θεραπεύσει αποτελεσματικά την oligoζωοσπερμία σε ασθενείς με μετεφηβική έναρξη εντοπισμένου υπογοναδοτροφικού υπογοναδισμού. Η προσθήκη

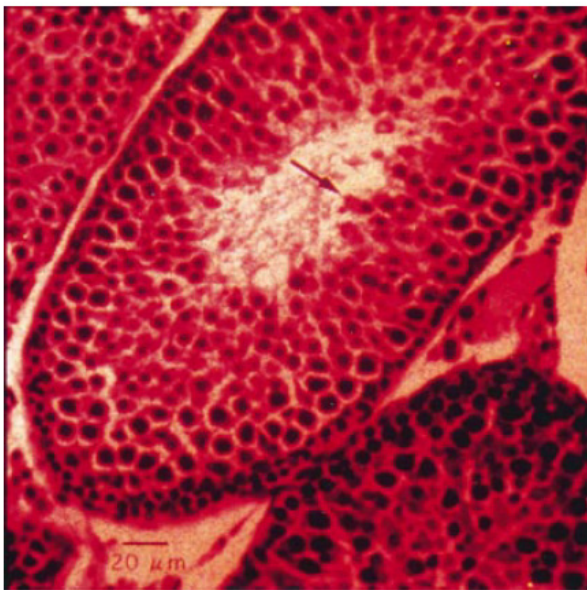
hMG είναι επίσης απαραίτητη για να βελτιωθεί ο αριθμός των σπερματοζωαρίων σε ασθενείς με προεφηβικό εντοπισμένο υπογοναδοτροπικό υπογοναδισμό όχι όμως όταν υπάρχει ιστορικό κρυφορχίας. Τα επίπεδα της FSH πριν την έναρξη της θεραπείας με hCG δεν αποτελούν προγνωστικό παράγοντα για την προσθήκη της hMG ενώ το μέγεθος του όρχεως μπορεί να αποτελέσει κριτήριο για την ταυτόχρονη χορήγηση hMG

- συνδυαστική χορήγηση hCG και hMG για αρχικό όγκο < 4 ml
- μόνο hCG για αρχικό μέσο όγκο του όρχεως >7 ml

Η ανταπόκριση των κυττάρων Leydig στη θεραπεία μπορεί να επιβεβαιωθεί από την αύξηση των επιπέδων της τεστοστερόνης. [73]

➤ Τεστοστερόνη

Η τεστοστερόνη είναι το πιο ισχυρό αντισυλληπτικό μέσο στον άνδρα. Σε έναν υπογόνιμο άνδρα με χαμηλή τεστοστερόνη ($250 < \text{ng/dl}$) ή χορηγείται εξωγενώς LH ή hCG και όχι τεστοστερόνη. Σε περίπτωση χορήγησης τεστοστερόνης προκαλείται πτώση της ενδοορχικής τεστοστερόνης με τελικό αποτέλεσμα την αζωοσπερμία.



Εικόνα 7: Μετά από εξωγενή χορήγηση τεστοστερόνης σε αρουραίους η σπερματογένεση διακόπτεται στο στάδιο 7-8 της σπερμιόγνεσης [74]

➤ Αντιοιστρογόνα

Η τεστολακτόνη είναι ένας αναστολέας των αρωματασών και αναστέλλει μερικώς τη μετατροπή της τεστοστερόνης σε οιστραδιόλη. Σε 20 άνδρες που είχαν ιδιοπαθούς

φύσεως oligoζωοσπερμία χορηγήθηκαν 100 mg τεστολακτόνης ημερησίως. Αυτό που παρατηρήθηκε ήταν αύξηση της συγκέντρωσης των σπερματοζωαρίων στο 81% των ασθενών και γονιμοποίηση στο 33% των ασθενών. Σε μια πρόσφατη δημοσίευση αναφέρεται ότι, υπογόνιμοι άνδρες με χαμηλό λόγο ορού τεστοστερόνης προς οιστραδιόλη, μπορούν να βελτιώσουν τις τιμές τους με αναστολέα των αρωματασών. Σε αυτήν την περίπτωση αυξήθηκε ο λόγος της τεστοστερόνης προς την οιστραδιόλη και παρατηρήθηκε βελτίωση στις παραμέτρους του σπερματοδιαγράμματος. Η αναστραζόλη φαίνεται να είναι το ίδιο αποτελεσματική με την τεστολακτόνη στη θεραπεία ασθενών με χαμηλό λόγο τεστοστερόνης προς οιστραδιόλη. Μόνη εξαίρεση αποτελεί η περίπτωση των ασθενών με σύνδρομο Klinefelter που η τεστολακτόνη είναι πιο αποτελεσματική[73].

➤ **Κιτρική κλομιφαίνη και ταμοξιφαίνη**

Τα αντι-οιστρογόνα δρουν στον υποθάλαμο όπου και συναγωνίζονται τα οιστρογόνα. Το αποτέλεσμα αυτής της δράσης είναι μία αρνητικά ελεγχόμενη ρύθμιση στην έκκριση της GnRH. Η GnRH ορμόνη στη συνέχεια θα αυξήσει τις γοναδοτροπίνες ενεργοποιώντας την ωρίμανση των γενετικών κυττάρων και την παραγωγή της τεστοστερόνης. Συνήθως γίνεται θεραπεία με κιτρική κλομιφαίνη σε δοσολογία 25mg ημερησίως. [14]

➤ **Βρομοκρυπτίνη**

Αναστέλλει την έκκριση της προλακτίνης σε περιπτώσεις υπογονιμότητας λόγω υπερπρολακτιναιμίας. Χορηγείται με 2.5-10 mg ημερησίως και είναι αποτελεσματική στην αποκατάσταση του αριθμού των σπερματοζωαρίων σε αυτή την ομάδα ασθενών[14]. Ο ίλιγγος είναι μια σημαντική παρενέργεια.

Μη ορμονική θεραπεία

➤ **Καλλικρεΐνη**

Αυξάνει την κινητικότητα, τη διαδικασία ενεργοποίησης και την διεισδυτική ικανότητα των σπερματοζωαρίων στην τραχηλική βλέννα. Επιπλέον, η καλλικρεΐνη διεγείρει τη λειτουργία των κυττάρων Sertoli, τα οποία ρυθμίζουν την ωρίμανση των σπερματικών κυττάρων. Βελτιώνει τη συγκέντρωση και την κινητικότητα των

σπερματοζωαρίων, όταν συγχωρηγείται με ταμοξιφένη σε ασθενείς με νορμογοναδοτροπική ολιγοασθενοζωοσπερμία

➤ **Πεντοξυφιλίνη**

Βελτιώνει την ορχική μικροκυκλοφορία του αίματος και την κινητικότητα των σπερματοζωαρίων. Χρησιμοποιείται τόσο in vitro κατά τη διάρκεια των μεθόδων υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, όσο και δια του στόματος. Αν και έχει αποδειχθεί η in vitro αποτελεσματικότητά της, τα in vivo αποτελέσματα παραμένουν ακόμη ασαφή.[14]

➤ **Ινδομεθακίνη**

Αποτελεί θεραπεία με μη στεροειδείς αντιφλεγμονώδεις παράγοντες, η οποία αναστέλλει τη σύνθεση των προσταγλανδινών οι οποίες έχει αποδειχθεί ότι:

α) αναστέλλουν τη σπερματογένεση

β) μειώνουν την κινητικότητα των σπερματοζωαρίων

γ) μειώνουν τη στεροειδογένεση. [14]

Η ινδομεθακίνη ευνοεί τη σύνθεση της τεστοστερόνης και καταστέλλει τη δημιουργία ελευθέρων ριζών οξυγόνου.

➤ **Αναστολείς του angiotensin I converting enzyme (ACE)**

Η χρήση των ACE αναστολέων μπορεί να αυξήσει τα επίπεδα των κινίνων στο ανδρικό γενετικό σύστημα διεγείροντας έτσι τη σπερματογένεση. Εναλλακτικά οι ACE αναστολείς θα μπορούσαν να μειώσουν την ανασταλτική δράση της αγγειοτασίνης II στα κύτταρα Leydig. [14]

➤ **Αργινίνη**

Τα επίπεδα της αργινίνης στο σπερματικό υγρό είναι χαμηλότερα σε ολιγοζωοσπερμικούς και αζωοσπερμικούς ασθενείς. Επίσης, τα επίπεδα της αργινίνης στο σπερματικό υγρό συνδέονται άμεσα με τον αριθμό και την κινητικότητα των σπερματοζωαρίων. [14]

➤ **Γλουταθιόνη**

Περιέχει μικρή τοξικότητα και μεγάλη αντιοξειδωτική δράση στην οξειδωτική καταστροφή των μεμβρανών των σπερματοζωαρίων.[14]

1.10.1.Ο ΡΟΛΟΣ ΚΑΙ Η ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ PDEs

Η ανδρική υπογονιμότητα αποτελεί όχι μόνο ένα προσωπικό, αλλά και ένα κοινωνικό πρόβλημα. Ένας δημοφιλής τρόπος θεραπευτικής αντιμετώπισης της υπογονιμότητας είναι η υποβοηθούμενη αναπαραγωγή (ART). Παρόλα αυτά ένας σημαντικός υποπληθυσμός των υπογόνιμων ανδρών παραμένει άτεκνος μετά από ενδομητρική σπερματέγχυση, εξωσωματική γονιμοποίηση (IVF) ή ενδοκυτοπλασμική έγχυση σπερματοζωαρίων (ICSI). Σημαντικό πρόβλημα αποτελεί η έλλειψη ενός ευρέως αποδεκτού και αποτελεσματικού φαρμακευτικού παράγοντα, για τη θεραπεία της ανδρικής υπογονιμότητας. Έτσι φαίνεται ότι η ανάπτυξη νέων πρωτότυπων φαρμακευτικών σκευασμάτων με θετική επίδραση στην ανδρική υπογονιμότητα είναι υψίστης σημασίας.

1.10.2.Ο ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΦΩΣΦΟΔΙΕΣΤΕΡΑΣΩΝ

Τα κυκλικά νουκλεοτίδια των φωσφοδιεστερασών (PDEs) παίζουν σημαντικό ρόλο στην αποικοδόμηση της κυκλικής μονοφωσφορικής αδενοσίνης (cAMP) και της κυκλικής μονοφωσφορικής γουανοσίνης (cGMP). Οι PDEs όπως και η αδενυλική κυκλάση (AC) και η γουανυλική κυκλάση (GC) ρυθμίζουν το μέγεθος και τη διάρκεια των ενδοκυττάρων σηματοδοτικών μηχανισμών. Αναλύσεις αλληλουχιών νουκλεοτιδίων δείχνουν ότι κατά τη διάρκεια της εξέλιξης των ειδών στον πλανήτη γη υπάρχει συντηρητική διατήρηση τουλάχιστον 11 διαφορετικών οικογενειών φωσφοδιεστερασών (PDEs) στα θηλαστικά. Πολλές από τις οικογένειες αυτές περιλαμβάνουν περισσότερα από ένα γονιδιακά προϊόντα [75, 76]. Χαρακτηριστικά το cGMP ή / και το cAMP υδρολύεται από συγκεκριμένες οικογένειες PDEs. Το cGMP εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό στις λείες μυϊκές ίνες κυττάρων των σπαραγγωδών σωμάτων του πέους και στα αγγεία των λείων μυϊκών ινών του πνεύμονα, επιτρέποντας την χρήση των PDE5 αναστολέων για τη θεραπεία της στυτικής δυσλειτουργίας [77] αλλά και της πνευμονικής υπέρτασης [78-82], αντιστοίχως. Σημαντικό ρόλο στην κυτταρική σηματοδότηση διαδραματίζουν οι φωσφοδιεστεράσες, οι οποίες υδρολύουν το cGMP ή/και το cAMP, επηρεάζοντας τη διάρκεια δράσης των κυκλικών νουκλεοτιδίων[75]. Καθορισμένα ισόενζυμα

φωσφοδιεστερασών συμπεριλαμβανομένων των PDE1A, PDE1B, PDE5, PDE6, PDE9 και ιδιαίτερα η PDE10 υδρολύουν το cGMP [75]. Στη διεθνή βιβλιογραφία αναφέρεται ότι τα ισοένζυμα PDE που εκφράζονται στους όρχεις υδρολύουν το cAMP, όπως για παράδειγμα τα ισοένζυμα PDE1C, PDE4A, PDE4C PDE7B και PDE8A [75].

1.10.3.PDEs ΚΑΙ ΑΝΔΡΙΚΟ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

Στους όρχεις και στην επιδιδυμίδα, κύτταρα λείων μυϊκών ινών και / ή μυοϊνοβλάστες είναι γνωστό ότι περιβάλλουν το επιθήλιο των σπερματικών σωληναρίων, των απαγωγών σωληναρίων, και τον επιδιδυμικό αυλό [83]. Τα συσταλτικά κύτταρα είναι υπεύθυνα για τη μεταφορά των ακίνητων σπερματοζωαρίων από τον όρχι στην ουρά της επιδιδυμίδας, η οποία εξασφαλίζει την ωρίμανση του σπέρματος και την απόκτηση της γονιμοποιητικής ικανότητας [83]. Συνήθως σε περιπτώσεις ιδιοπαθούς ανδρικής υπογονιμότητας ο περισωληνοειδής υποβλεννογόσιος χιτώνας είναι παχύτερος με μια μείωση των συσταλτικών στοιχείων και μια αύξηση των εξοκυτταρικών συστατικών, που θυμίζουν μεταβολές λόγω ίνωσης σε άλλα όργανα [84]. Προηγούμενες μελέτες, που αφορούν την έκφραση των PDEs στους όρχεις, δείχνουν ότι το cAMP υδρολύεται από καθορισμένες PDEs όπως η PDE1C, PDE4A, PDE4C PDE7B, και PDE8A. Επίσης οι παραπάνω μελέτες έχουν δείξει ότι η PDE3 συμβάλλει στη ρύθμιση της συσταλτικότητας της επιδιδυμίδας [85]. Τουλάχιστον τέσσερα γονίδια που κωδικοποιούν διαφορετικές ισομορφές των PDEs εκφράζονται διαφορετικά σε σωματικά και γεννητικά κύτταρα των όρχεων [86]. Μελέτες που εστιάζονται στην έκφραση των PDE στον όρχι δείχνουν ότι η PDE1 και η PDE2 εκφράζονται κυρίως σε γεννητικά κύτταρα, ενώ η PDE3 και η PDE4 κυρίως εκφράζονται στα κύτταρα Sertoli [87,88]. Επιπλέον, σε άλλες μελέτες, η PDE10A mRNA έχει αναφερθεί στους όρχεις και στα σπερματοζωάρια των ανθρώπων και των αρουραίων [89-92].

Ο ρόλος της PDE11 στη ρύθμιση της εξωκρινούς λειτουργίας του όρχεως και η επίδρασή της στην γονιμοποιητική ικανότητα των σπερματοζωαρίων, είναι ένα ζήτημα μείζονος κλινικής σημασίας δεδομένου ότι η PDE11 αναστέλλεται από την τανταλαφίλη [93]. Πράγματι, τα σπερματοζωάρια στο σπερματικό υγρό σε ένα

μοντέλο knockout ποντικών PDE11-/- εμφανίζει μειωμένη συγκέντρωση σπερματοζωαρίων, μειωμένη εμπρόσθια κίνηση και μειωμένο ποσοστό ζωντανών σπερματοζωαρίων [94].

1.10.4.PDE5 ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ: Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥΣ ΣΤΟΥΣ ΑΝΔΡΙΚΟΥΣ ΕΚΚΡΙΤΙΚΟΥΣ ΓΕΝΝΕΤΙΚΟΥΣ ΑΔΕΝΕΣ

A. Επιδιδυμίδα: Όσον αφορά τη συσταλτικότητα του σπερματικού πόρου, η ανδρική υπογονιμότητα έχει ήδη περιγραφεί σε ένα μοντέλο ποντικού με διαταραχές στην συσταλτική δράση των σπερματικών πόρων [95,96,97]. Έχει αποδειχθεί ότι το μόριο αγγελιοφόρος cGMP, που είναι γνωστό ότι προκαλεί χάλαση των λείων μυών του πέους, διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στην ρύθμιση της συσταλτικότητας της ουράς της επιδιδυμίδας [85]. Είναι γνωστό ότι ο δεύτερος αγγελιοφόρος cGMP μπορεί να δημιουργηθεί στο ανδρικό αναπαραγωγικό σύστημα από διαφορετικές οδούς [98,99]. Το cGMP-αναλόγου 8-Br-cGMP, το NO δότης SNP και τα νατριουρητικά πεπτίδια ANP και C-τύπου νατριουρητικό πεπτίδιο (CNP), έχουν εμφανιστεί περιφερικά να αυξάνουν τα αποτελέσματα της χαλάρωσης στις SC [85]. Σταθερά μια περιφερικά αυξανόμενη επιδιδυμική έκφραση eNOS, GC-A, και PKG I έχει βρεθεί. Η ανοσοαντιδραστικότητα της eNOS, sGC και PKG I είναι εντοπισμένη στα μυϊκά κύτταρα της επιδιδυμίδας [85]. Οι αυθόρμητες φασικές συσπάσεις (SCs), σχετιζόμενη δράση του NO, το ANP, και CNP είναι cGMP-εξαρτώμενα, και η δράση της 8-Br-cGMP, με τη σειρά της, είναι τροποποιημένη από επιθηλιακούς και αυλικούς παράγοντες[85]. Έχει αποδειχθεί ότι ένας ουσιαστικός ρόλος της cGMP στην σηματοδότηση του ελέγχου του επιδιδυμικού περισταλτισμού, επιτρέπει τη μεταφορά του σπέρματος αλλά και την ωρίμανση του [85]. Επιπλέον, στην ίδια μελέτη αναφέρεται ότι οι φωσφοδιεστεράσες παίζουν ρόλο στον περισταλτισμό της επιδιδυμίδας [85,98]. Από την άλλη πλευρά, ο Δημητριάδης και οι συνεργάτες του (2008) [100] αξιολόγησαν τα αποτελέσματα της χορήγησης βαρδεναφίλης (10mg ημερησίως για τουλάχιστον 45 ημέρες) στην εκκριτική λειτουργία της ανδρική επιδιδυμίδας. Η βαρδεναφίλη δεν έχει επηρεάσει την εκκριτική λειτουργία της επιδιδυμίδας. Επιπλέον, στην παραπάνω έρευνα μελετήθηκαν οι επιπτώσεις της σιλδεναφίλης (50 mg) στην επιδιδυμική εκκριτική λειτουργία [100]. Ελέγχθηκαν

δεκατρείς ολιγοσπερμικοί υπογόνιμοι άνδρες, που έδωσαν τρία δείγματα σπέρματος πριν από την χορήγηση σιλδεναφίλης και τρία δείγματα σπέρματος μετά την χορήγηση σιλδεναφίλης (50 mg). Οι ερευνητές αξιολόγησαν τα επίπεδα α-γλυκοσιδάσης στο σπέρμα ως δείκτη της επιδιδυμικής εκκριτικής λειτουργίας πριν και μετά τη θεραπεία με σιλδεναφίλη και διαπιστώθηκε απουσία σημαντικής διαφοράς [100].

Β. σπερματοδόχων κύστεων: Η μελέτη του Δημητριάδη και των συνεργατών του (2008) ανέφερε [100] τα αποτελέσματα της σιλδεναφίλης στην λειτουργία των σπερματοδόχων κύστεων. Τρία δείγματα σπέρματος συλλέχθηκαν από μια ομάδα 13 ολιγοσπερμικών υπογόνιμων ανδρών πριν και μετά τη θεραπεία με σιλδεναφίλη (50 mg). Στη συνέχεια αξιολόγησαν τη φρουκτόζη ως δείκτη της εκκριτικής λειτουργίας των σπερματοδόχων κύστεων και δε βρήκαν καμία σημαντική στατιστική διαφορά [100] στο προφίλ της φρουκτόζης στο σπέρμα, μεταξύ των δειγμάτων που συλλέχθηκαν πριν και μετά από την θεραπεία με σιλδεναφίλη. Επιπλέον έχουν αξιολογήσει [100] τα αποτελέσματα ενός άλλου αναστολέα της PDE5, της βαρδεναφίλης, στην λειτουργία των σπερματοδόχων κύστεων. Συγκεκριμένα δεκαοκτώ υπογόνιμοι άνδρες που συμμετείχαν σε πρόγραμμα υποβοηθούμενης αναπαραγωγής υποβλήθηκαν σε θεραπεία με βαρδεναφίλη καθημερινά (10 mg κάθε μέρα) για τουλάχιστον 45 ημέρες (οι άνδρες είχαν προηγουμένως τουλάχιστον μία δοκιμή με εξωσωματική γονιμοποίηση χωρίς επιτυχία). Πριν και μετά την θεραπεία με βαρδεναφίλη έξι δείγματα σπέρματος συλλέχθηκαν από κάθε άνδρα. Οι ερευνητές απέδειξαν ότι η χορήγηση της βαρδεναφίλης δεν οδήγησε σε σημαντική διαφορά στην εκκριτική λειτουργία των σπερματοδόχων κύστεων [100].

Γ. Σπερματικών πόρων: Προηγούμενες ανακαλύψεις δείχνουν ένα ρόλο του νιτρικού οξειδίου / cGMP (NO / cGMP) στη ρύθμιση της εκσπερμάτισης. Διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι η σιλδεναφίλη δρα ευεργετικά στην ανακούφιση της πρόωρης εκσπερμάτισης [101]. Ο Chen και οι συνεργάτες του (2003) αναφέρουν ότι σε ασθενείς με πρόωρη εκσπερμάτιση, η σιλδεναφίλη καθώς και η παροξετίνη έχουν σημαντικά υψηλότερο θεραπευτικό ποσοστό επιτυχίας (98%) από ότι από μόνη της η παροξετίνη (42%) [102]. Η ανασταλτική δράση της σιλδεναφίλης στην PDE5, το καταστροφικό ένζυμο της cGMP, αυξάνει το επίπεδο του cGMP στις μυϊκές ίνες στον σπερματικό πόρο, επιτυγχάνοντας τη χαλάρωση των λείων μυϊκών κυττάρων στον σπερματικό πόρο. Αυτό παρατείνει το χρονικό διάστημα που απαιτείται για την

επίτευξη της εκσπερμάτισης. Μελέτες με ανθρώπινα ερυθροκύτταρα έχουν δείξει ότι η οργανική ανιονική αντλία που μεταφέρει το cGMP στην εξωκυττάρια περιοχή εξαρτάται από α) ATP, β) την υδρόλυση του, και γ) την διέγερση δραστηριότητα της ATPάσης από την cGMP την ίδια [104]. Οι PDE αναστολείς μπλοκάρουν τις μεταφορές αυτές. Η σιλδεναφίλη αναστέλλοντας την PDE5 αυξάνει την cGMP στις μυϊκές ίνες των σπερματικών πόρων και επιπλέον εμποδίζει τη δραστηριότητα της οργανικής αντλίας ανιόντων. Το συνολικό αποτέλεσμα είναι μια αύξηση στην ενδοκυτταρική cGMP με α) την πρόληψη της καταστροφής του cGMP και β) την αναστολή της εξωκυτταρικής εξαγωγή του cGMP [103]. Έχει αναφερθεί ότι η σιλδεναφίλη ενεργοποιεί το άνοιγμα των διαύλων καλίου ώστε να μειώσει την αδρενεργική νευροδιαβίβαση μέσω μηχανισμών ανεξάρτητων του NO [104]. Με αυτό τον τρόπο η σιλδεναφίλη μπορεί να προωθεί μια μείωση στην αδρενεργική νευροδιαβίβαση των λείων μυϊκών ινών, να μεταβάλλει τον αδρενεργικό τόνο στις μυϊκές ίνες των σπερματικών πόρων και τελικά μπορεί να μειώσει το μοτίβο της συστολής. Αυτό μπορεί να επιβεβαιωθεί και από μελέτες που δείχνουν την έκφραση της PDE5 στον σπερματικό πόρο [105].

Δ. προστάτη: Το κύριο ανιόν στον ανθρώπινο σπερματικό υγρό είναι το κιτρικό οξύ που εκκρίνεται από τον προστάτη και είναι πολύ σημαντικό για τη διατήρηση της οσμωτικής ισορροπίας στο σπερματικό πλάσμα [106]. Το ρόλο του ισχυρού αντιβακτηριδιακού παράγοντα παίζει ο ψευδάργυρος, ο οποίος εκκρίνεται από τον προστάτη. Η υψηλή περιεκτικότητα του ψευδαργύρου στον πυρήνα του σπέρματος συμβάλλει στην σταθερότητα της τεταρτοταγούς δομής της χρωματίνης του πυρήνα των σπερματοζωαρίων [107]. Η σπερμίνη, μια ουσία στο σπερματικό υγρό, εκκρίνεται από τον προστάτη και σχετίζεται με την κινητικότητα των σπερματοζωαρίων. Επίσης σημαντικό ρόλο στη σταθεροποίηση της μεμβράνης των σπερματοζωαρίων παίζει η περιεκτικότητα χοληστερόλης στο σπέρμα, η οποία συντίθεται στον προστάτη και συμβάλλει στη σταθερότητα των σπερματοζωαρίων απέναντι στη θερμοκρασία και στο περιβαλλοντικό σοκ [108]. Οι παραπάνω εκκρινόμενες ουσίες του προστάτη επιδρούν ευεργετικά στην ποιότητα των σπερματοζωαρίων και αυξάνουν τα επίπεδα έκφρασης των εκκρίσεων τους είτε μετά από χορήγηση σιλδεναφίλης [100] είτε βαρδεναφίλης [100]. Η συνθετάση του μονοξειδίου του αζώτου έχει εντοπιστεί βιοχημικώς και ανοσοϊστοχημικώς τόσο στη μεταβατική όσο και στις περιφερειακές ζώνες του προστάτη [109]. Η συνθετάση του μονοξειδίου του αζώτου έχει βρεθεί στις

ίνες των νεύρων και των γάγγλιων που βρίσκονται στο προστατικό λείο μυϊκό σύστημα και δείχνει ότι το NO είναι σημαντικό για την λειτουργία του προστατικού λείου μυ [110]. Αυτό υποστηρίζεται από την δράση των δοτών NO, που έχουν αποδειχθεί ότι μεσολαβούν στη χαλάρωση του ανθρώπινου προστατικού λείου μυ *in vitro* [110]. Η PED4 και η PED5 έχουν αποδειχθεί ανοσοϊστοχημικά στη μεταβατική ζώνη του προστάτη [111]. Επιπλέον οι αναστολείς PDE5 μπορεί να έχουν κάποια ευεργετικά αποτελέσματα σε ασθενείς με χρόνια προστατίτιδα. Ο Grimsley και οι συνεργάτες του (2007) [112] θεωρούσαν ότι οι αναστολείς PDE5 χαλαρώνουν τις λείες μυϊκές ίνες του προστάτη, αλλάζοντας την ανάδρομη ροή των ούρων του προστάτη σε αγωγούς, που επιτρέπουν μεγαλύτερη έκπλυση των αγωγών και τη μείωση της συσσώρευσης των ούρων. Αυτό τελικά μπορεί να οδηγήσει σε μια μείωση της φλεγμονής του προστάτη. Προηγούμενες αναφορές έχουν δείξει ότι η ανθρώπινη PDE11 και ιδιαίτερα η συνδυασμένη μορφή του PDE11A4, εκφράζεται άφθονα στον προστάτη, γεγονός που υποδηλώνει ότι το γονίδιο PDE11A υφίσταται ιστο-ειδικό εναλλακτικό μάτισμα (splicing), που δημιουργεί διαφορετικά δομικά γονιδιακά προϊόντα [113, 114].

1.11.Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ PDE5 ΣΤΙΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ ΤΟΥ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ

1.11.1. IN VITRO ΜΕΛΕΤΕΣ

Μετά την εισαγωγή του σιλденаφίλης στην αγορά, αρκετές μελέτες έχουν αξιολογήσει τις *in vitro* επιδράσεις της στις παραμέτρους του σπέρματος. Ο Burger και οι συνεργάτες του (2000) [115] σε μια *ex vivo* μελέτη διερεύνησαν την επίδραση της σιλденаφίλης στην κινητικότητα και την βιωσιμότητα των ανθρώπινων σπερματοζωαρίων. Οι παραπάνω παράμετροι των σπερματοζωαρίων αξιολογήθηκαν σε δείγματα σπέρματος τόσο σε υγιείς δότες ($n = 6$), όσο και σε κλινικά υπογόνιμους άνδρες ($n = 6$). Τμήματα του αρχικού σπέρματος επώαστηκαν για 0 h, 1 h και 3 h απουσία ή παρουσία της σιλденаφίλης (125 ng / mL, 250 ng / mL, και 750 ng / mL), RTX (ως θετικός έλεγχος), είτε σε επωαστικό μέσο Ham's (ως έλεγχος αντιδραστηρίου). Οι συγγραφείς ανέφεραν μη στατιστικά σημαντική επίδραση της

σιλδεναφίλης στη βιωσιμότητα των σπερματοζωαρίων, στην κινητικότητα των σπερματοζωαρίων και στην προωθητική κίνηση των σπερματοζωαρίων μετά από επώαση σε διάφορες δόσεις σιλδεναφίλης. Ομοίως, σε μια άλλη μελέτη, η ομάδα του Andrade και οι συνεργάτες του (2000) [116], μελέτησαν την επίδραση της σιλδεναφίλης ή της φαιντολαμίνης στην κινητικότητα των σπερματοζωαρίων. Οι ερευνητές χρησιμοποιώντας δείγματα σπέρματος είτε μετά από πλύσεις είτε χωρίς πλύσεις, έκαναν επώαση για 30 λεπτά σε διάφορες συγκεντρώσεις σιλδεναφίλης ή φεντολαμίνης. Οι συγγραφείς έδειξαν μια δόσοεξαρτώμενη αναστολή της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων σε δείγματα που έλαβαν θεραπεία με φαιντολαμίνη, ενώ σε θεραπεία με σιλδεναφίλη (σε συγκέντρωση 200 µg/mL) δεν επηρέασε αρνητικά την κινητικότητα των σπερματοζωαρίων είτε μετά από πλύσεις είτε σε δείγματα σπέρματος χωρίς πλύσεις. Σε αντίθεση, η υψηλότερη δόση σιλδεναφίλης (2.000 µg/ml) μείωσε την κινητικότητα των σπερματοζωαρίων περίπου σε ένα επίπεδο 50% της αρχικής τιμής [117]. Η μελέτη του Mostafa (2007) [118] έδειξε μια δόσοεξαρτώμενη διεγερτική δράση της σιλδεναφίλης στην κινητικότητα των σπερματοζωαρίων. Συγκεκριμένα δείγματα σπέρματος από 86 ασθενοαζωοσπερικούς ασθενείς εκτέθηκαν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις σιλδεναφίλης (4,0 mg/ml, 2,0 mg/ml, 1,0 mg/ml, 0,5mg/mL, και 0.1 mg/mL). Εντούτοις, η αξιολόγηση της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων στην εν λόγω μελέτη διεξήχθη 3 ώρες μόνο μετά την έκθεση των σπερματοζωαρίων σε σιλδεναφίλη.

Ο Lefièvre και οι συνεργάτες του (2000) [119] διερεύνησαν αν η PDE5 είναι παρούσα στα ανθρώπινα σπερματοζωάρια και αν η σιλδεναφίλη επηρεάζει τη λειτουργία του σπέρματος. Οι συγγραφείς απέδειξαν ότι αυτός ο αναστολέας PDE5 διεγείρει την κινητικότητα των ανθρώπινων σπερματοζωαρίων, με μια αύξηση του ενδοκυτταρικού cAMP που υποδηλώνει μία ανασταλτική δράση σε PDE, διαφορετική από την PDE5. Ο Cuadra και οι συνεργάτες του (2000) [120], αξιολόγησαν την επίδραση της σιλδεναφίλης στην κινητικότητα των σπερματοζωαρίων. Σπερματοζωάρια εκτέθηκαν σε σιλδεναφίλη σε συγκεντρώσεις είτε 0 nmol/L, 0,4 nmol/L, 4,0 nmol/L, ή 40 nmol/L. Οι ερευνητές παρατήρησαν αύξηση των παραμέτρων κίνησης των σπερματοζωαρίων με την παρουσία σιλδεναφίλης 0,4 nmol/L σε σύγκριση με τα δείγματα ελέγχου τέσσερις ώρες μετά την έκθεση σε σιλδεναφίλη. Ωστόσο, οι παράμετροι κινητικότητας μειώθηκαν 48 ώρες μετά την

έκθεση σε σιλденаφίλη. Όταν σπερματοζωάρια εκτέθηκαν σε υψηλότερη συγκέντρωση σιλденаφίλης (40 nmol/L) έδειξαν μειωμένη κινητικότητα στις παραμέτρους των σπερματοζωαρίων. Το cGMP ρυθμίζει την είσοδο του ασβεστίου στους μικροσωληνίσκους της ουράς των σπερματοζωαρίων επηρεάζοντας την κινητικότητά τους. Οι συγγραφείς έδειξαν ότι η αναστολή της PDE5 από τη σιλденаφίλη ενισχύει τις επιδράσεις του cGMP στην κινητικότητα των σπερματοζωαρίων. Ο Cuadra και οι συνεργάτες του (2000) [120], έδειξαν ότι υπάρχει διεγερτική επίδραση στην κινητικότητα των σπερματοζωαρίων όταν ο PDE5 αναστέλλεται μερικώς, ωστόσο, η εκτεταμένη αναστολή της PDE5 φαίνεται να οδηγεί σε μειωμένη κινητικότητα των σπερματοζωαρίων. Μια άλλη ομάδα ερευνητών [121] επιχείρησε να προσδιορίσει την επίδραση της σιλденаφίλης στην κινητικότητα των σπερματοζωαρίων. Δείγματα σπέρματος από 57 άνδρες με επιλεγμένο προφίλ ασθενοαζωοσπερμίας εκτέθηκαν σε 0,67μmol/L σιλденаφίλης, η οποία είναι ισοδύναμη με τη συγκέντρωση της σιλденаφίλης στο πλάσμα αίματος, μία ώρα μετά την κατάποση 100 mg σιλденаφίλης [121]. Οι συγγραφείς διαπίστωσαν ότι τόσο ο αριθμός όσο και η ταχύτητα των προοδευτικά κινούμενων σπερματοζωαρίων αυξήθηκαν σημαντικά. Οι ερευνητές υποστηρίζουν ότι τα αυξημένα επίπεδα του cGMP, στο οποίο οφείλεται η ανασταλτική επίδραση της σιλденаφίλης, μπορεί να επηρεάσει την μεταφορά του ασβεστίου μέσα στα σπερματοζωάρια και ενδεχομένως να επηρεάζει την κίνηση των σπερματοζωαρίων. Επίσης από πολλές ερευνητικές ομάδες μελετήθηκαν οι επιδράσεις της τανταλαφίλης *in vitro* στην κινητικότητα των σπερματοζωαρίων.

Ο Mostafa το 2007 [122] αξιολόγησε τις επιδράσεις της τανταλαφίλης στην κινητικότητα των σπερματοζωαρίων σε 70 ασθενοαζωοσπερμικούς άνδρες. Τα δείγματα σπέρματος επώαστηκαν σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις τανταλαφίλης (4,0, 1,0, 0,5 mg /mL) και διαπιστώθηκε ότι τα δείγματα που εκτέθηκαν σε 4 mg/ml διαλύματος τανταλαφίλης είχαν σημαντική μείωση στην κινητικότητα των σπερματοζωαρίων σε σχέση με τα δείγματα ελέγχου. Από την άλλη πλευρά, δείγματα σπέρματος που επώαστηκαν με 1,0 ή 0,5 mg/ml τανταλαφίλης είχαν μια στατιστικά σημαντική αύξηση στην προοδευτική κινητικότητα των σπερματοζωαρίων. Εναλλακτικά, η επίδραση της τανταλαφίλης στην κινητικότητα των σπερματοζωαρίων μπορεί να συνδέεται επιπροσθέτως με την ανασταλτική δράση της παρούσας ένωσης

στην PDE11. Στην πραγματικότητα, η PDE11 έχει υψηλή έκφραση στους όρχεις και στον προστάτη, ακόμη και αν ο φυσιολογικός της ρόλος δεν είναι γνωστός.

Επιπλέον, ο Jaiswal και ο Majumder [123] σε μια *in vitro* μελέτη τους διερεύνησαν τον ρόλο της θεοφυλλίνης αποδεικνύοντας ότι αυτός ο αναστολέας PDE αυξάνει σημαντικά την κινητικότητα των σπερματοζωαρίων τράγου, που προέρχεται από το σώμα, μέσω τμήμα κεφαλής, άπω τμήμα κεφαλής, και εγγύς τμήμα της ουράς της επιδιδυμίδας. Ένας μη εκλεκτικός αναστολέας φωσφοδιεστεράσης, η καφεΐνη μελετήθηκε με *in vitro* πειράματα έχει επίσης αποδειχθεί ότι ο παραπάνω φαρμακευτικός παράγοντας αυξάνει την κινητικότητα και τον μεταβολισμό των σπερματοζωαρίων όταν προστίθεται στο σπέρμα [124, 125]. Ωστόσο, αυτή η ένωση προωθεί τις αυθόρμητες ακροσωμιακές αντιδράσεις του σπέρματος. Αυτή η επίδραση της καφεΐνης στην ακροσωμική αντίδραση του σπέρματος εξισορροπεί τα οφέλη από τον ρόλο της ως διεγερτικό της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων [126]. Η πεντοξυφυλλίνη (PTX), είναι ο πιο ευρέως μη εκλεκτικός αναστολέας PDE που έχει χρησιμοποιηθεί σε προγράμματα υποβοηθούμενης αναπαραγωγής [127,128-133]. Η PTX θεωρείται ότι διεγείρει την κινητικότητα των μαστιγίων, αυξάνοντας το ενδοκυτταρικό cAMP του σπέρματος [134-137]. Επίσης μειώνει το ενδοκυτταρικό ανιόν υπεροξειδίου και τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου που είναι γνωστό ότι βλάπτουν το DNA [138, 139]. Ειδικότερα η PTX τόσο σε *in vivo* όσο και σε *in vitro* μελέτες, φαίνεται να αυξάνει σημαντικά τη συχνότητα χτύπου της ουράς, τη γωνιακή ταχύτητα, καθώς και το ποσοστό των υπερενεργοποιημένων σπερματοζωαρίων [127, 124, 130, 131, 133, 140-144]. Επίσης θα πρέπει να αναφερθεί ότι και οι αναστολείς PDE4 αυξάνουν την κινητικότητα των σπερματοζωαρίων. Όπως έχει καταδειχθεί σε μια *in vitro* μελέτη [145], οι αναστολείς PDE4 δεν έχουν προφανή επίδραση στην ακροσωμική αντίδραση των σπερματοζωαρίων. Από την άλλη μεριά, οι αναστολείς της PDE1 φαίνεται να διεγείρουν επιλεκτικά την ακροσωμική αντίδραση [145]. Ο Wayman και οι συνεργάτες του το 2005 [94], μελέτησαν το ρόλο της PDE11 στη φυσιολογία των σπερματοζωαρίων, στην "ανάκτηση" των σπερματοζωαρίων από έλλειψη PDE11 σε μοντέλα ποντικών knockout (PDE11^{-/-}). Οι συγγραφείς διαπίστωσαν μειωμένη συγκέντρωση σπερματοζωαρίων, μειωμένη προωθητική κινητικότητα, και μειωμένο ποσοστό ζωντανών σπερματοζωαρίων στα ποντίκια, που δείχνουν έναν ρόλο της PDE11 στην σπερματογένεση και στη γονιμοποίηση. Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω αποτελέσματα των *ex vivo* μελετών, μπορούμε να

υποθέσουμε μια δοσοεξαρτώμενη επίδραση της σιλденаφίλης και της τανταλαφίλης στην κινητικότητα των σπερματοζωαρίων.

Συμπερασματικά, παρατηρείται ενίσχυση των σπερματοζωαρίων σε χαμηλές δόσεις αναστολέων της PDE5, ενώ παρατηρείται αρνητική επίδραση στα σπερματοζωάρια σε υψηλές συγκεντρώσεις αναστολέων της PDE5. Σίγουρα περαιτέρω έρευνες απαιτούνται για την αξιολόγηση των μηχανισμών που λαμβάνουν χώρα στα αποτελέσματα των εκλεκτικών αναστολέων PDE5 στην κινητικότητα των σπερματοζωαρίων.

1.11.2. IN VIVO ΜΕΛΕΤΕΣ

Η in vivo επίδραση των αναστολέων PDE στις παραμέτρους των σπερματοζωαρίων έχει ερευνηθεί από πολλούς συγγραφείς. Η θετική επίδραση της αναστολής των PDE στην κινητικότητα των σπερματοζωαρίων μπορεί να υποδηλώσει μια σχέση μεταξύ των ενδοκυτταρικών επιπέδων cAMP ή cGMP και της ικανότητας των σπερματοζωαρίων να κινηθούν [145, 146].

Πολλά χημικά μόρια έχουν μελετηθεί για να αξιολογηθούν οι επιπτώσεις τους στην λειτουργία του ανθρώπινου σπέρματος [126, 147]. Ευεργετικές επιδράσεις στην κινητικότητα των σπερματοζωαρίων έχουν αναγνωριστεί από το 1970 [148-151]. Σε μια διπλή-τυφλή, τεσσάρων περιόδων, αμφίδρομη, διασταυρούμενη μελέτη που έλαβαν μέρος 17 σεξουαλικά υγιείς άνδρες εθελοντές, ο Purvis και οι συνεργάτες του (2002) [152] εξέτασαν την επίδραση της σιλденаφίλης στην κινητικότητα των σπερματοζωαρίων και των παραμέτρων μορφολογίας. Οι συγγραφείς σύγκριναν μια δόση 101mg σιλденаφίλης με ένα εικονικό φάρμακο. Η σιλденаφίλη και το εικονικό φάρμακο χορηγήθηκαν μια φορά από το στόμα για δύο περιόδους που χωρίζονταν από μία περίοδο κάθαρσης τουλάχιστον για 5-7 ημέρες. Οι συγγραφείς ανέφεραν ότι η σιλденаφίλη δεν επηρέασε την κινητικότητα των σπερματοζωαρίων και δε διαπίστωσαν καμία στατιστικά σημαντική διαφορά, μεταξύ της ομάδας που λάμβανε σιλденаφίλη και της ομάδας που λάμβανε εικονικό φάρμακο, στο ποσοστό των κινητών σπερματοζωαρίων, στο ποσοστό των στατικών σπερματοζωαρίων, στο ποσοστό των ταχέως κινούμενων σπερματοζωαρίων, και στο ποσοστό των

προοδευτικά κινούμενων σπερματοζωαρίων. Οι μέσες τιμές του αριθμού των σπερματοζωαρίων, η μορφολογία, η βιωσιμότητα, καθώς επίσης και ο όγκος σπερματικού πλάσματος και ο βαθμός ιξώδους δεν ήταν στατιστικά σημαντικά διαφορετικά μεταξύ της ομάδας εικονικού φαρμάκου και της ομάδας ελέγχου. Η μελέτη από τον Purvis και τους συνεργάτες του (2002) [152] επιβεβαιώνει τα πορίσματα προηγούμενων μελετών από τον Aversa και τους συνεργάτες του (2000) [153]. Οι συγγραφείς πραγματοποίησαν μια προοπτική διπλά τυφλή μελέτη, ελεγχόμενη με εικονικό φάρμακο, διασταυρούμενη σε δύο-περιόδους έρευνας, με 20 άνδρες εθελοντές, οι οποίοι έπαιρναν θεραπεία με σιλденаφίλη ή εικονικό φάρμακο.

Μετά από μια περίοδο κάθαρσης των επτά ημερών, όλοι οι ασθενείς είχαν διασταυρωθεί για να λαμβάνουν εναλλακτική θεραπεία. Οι συγγραφείς διαπίστωσαν ότι δεν υπήρχε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά στις μέσες τιμές του αριθμού των σπερματοζωαρίων, της κινητικότητα του σπέρματος και του ποσοστού των μορφολογικά ανώμαλων σπερματοζωαρίων μεταξύ των δύο ομάδων. Στη συγκεκριμένη μελέτη, οι ερευνητές τόνισαν τις δυνατότητες χρήσης της σιλденаφίλης σε προγράμματα υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, όταν μια προσωρινή δυσλειτουργία μπορεί να συμβεί λόγω του άγχους και της ψυχολογικής πίεση για την παραγωγή σπέρματος. Αυτό τεκμηριώθηκε από τον Tur-Kaspa και τους συνεργάτες του (1999) [154] που προτείνουν τη χρήση της σιλденаφίλης σε άνδρες με στυτική δυσλειτουργία που είναι αποδεδειγμένη κατά τη διάρκεια της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (ART). Φαίνεται ότι το άγχος και η ψυχολογική πίεση για τη συλλογή σπέρματος γίνεται μεγαλύτερη, αν περισσότερα από ένα δείγματα σπέρματος είναι απαραίτητα κατά τη διάρκεια της ημέρας λήψης του ωαρίου. Σε αντίθεση με την παραπάνω μελέτη από τον Aversa και τους συνεργάτες του (2000) [153], η θετική επίδραση της σιλденаφίλης σε κάποια παράμετρο της κινητικότητα των σπερματοζωαρίων, αποδείχθηκε σε μια άλλη μελέτη. Σε μια διπλή-τυφλή, με εικονικό φάρμακο, διασταυρούμενη, δύο -περιόδους, κλινικής έρευνας, ο du Plessis και οι συνεργάτες του (2004) [155], προσδιόρισαν την επίδραση της χορήγησης σιλденаφίλης *in vivo*, στις παραμέτρους του σπέρματος και τη λειτουργία των σπερματοζωαρίων. Έλαβαν μέρος στη μελέτη 21 υγιείς εθελοντές οι οποίοι τυχαία κλήθηκαν να πάρουν μία μόνο δόση των 50mg σιλденаφίλης ή εικονικό φάρμακο. Οι συγγραφείς δεν ανέφεραν σημαντικές διαφορές στο ποσοστό των σπερματοζωαρίων με προοδευτική κινητικότητα και στην τροχιά της ταχύτητας των σπερματοζωαρίων, στην πλευρική μετατόπιση της κεφαλής των σπερματοζωαρίων, στη συχνότητα χτύπου της ουράς των

σπερματοζωαρίων και στην γραμμική κίνηση των σπερματοζωαρίων, μεταξύ της ομάδας που έλαβε σιλденаφίλη και αυτής που έλαβε το εικονικό φάρμακο. Ωστόσο οριακά στατιστικώς σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν στην ευθύγραμμη ταχύτητα των σπερματοζωαρίων. Επιπλέον, υπήρχε μια στατιστικά σημαντική αύξηση στο ποσοστό των ταχέως κινούμενων σπερματοζωαρίων μετά τη χορήγηση της σιλденаφίλης. Σε μία ανοιχτή πιλοτική μελέτη του Jannini και των συνεργατών του (2004) [156] διερευνήθηκε η επίδραση 50mg χορηγούμενης από το στόμα σιλденаφίλης σε μια ομάδα σεξουαλικά υγιών ανδρών που συμμετείχαν σε ένα πρόγραμμα ενδομήτριας τεχνητής γονιμοποίησης ή σε προγραμματισμένη συνουσία για να γίνει τεστ μετά τη συνουσία. Στην παραπάνω μελέτη οι συγγραφείς δε διαπίστωσαν καμία επίδραση της χορήγησης σιλденаφίλης στην κινητικότητα των σπερματοζωαρίων, σχετικά με την συγκέντρωση των σπερματοζωαρίων ή στο συνολικό αριθμό των σπερματοζωαρίων κατά την εκσπερμάτωση. Παρομοίως δεν υπάρχει επίδραση από τη χορήγηση σιλденаφίλης στο ποσοστό των μη γραμμικά προοδευτικών κινητών σπερματοζωαρίων. Ωστόσο, μια σημαντική αύξηση παρατηρήθηκε στην γραμμική προοδευτική κινητικότητα μετά τη χορήγηση σιλденаφίλης. Οι συγγραφείς έχουν επιπλέον υποστηρίξει ότι η χορήγηση σιλденаφίλης πριν από τη συλλογή σπέρματος σε προγράμματα ART μειώνει το στρες που βιώνεται από τον άνδρα στο δωμάτιο εκσπερμάτωσης. Παρόμοια συμπεράσματα έχουν αναφερθεί από την ίδια ομάδα συγγραφέων σε μια προηγούμενη μελέτη [157]. Αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της σιλденаφίλης στην ποιότητα των σπερματοζωαρίων ήταν ο στόχος μιας μελέτης που πραγματοποιήθηκε από τον Δημητριάδη και τους συνεργάτες του (2008) [100]. Οι συγγραφείς αποδεικνύουν ότι οι μέσες τιμές του συνολικού αριθμού των σπερματοζωαρίων, το ποσοστό των κινητών σπερματοζωαρίων και του κιτρικού οξέος στο σπερματικό πλάσμα ήταν σημαντικά μεγαλύτερο σε δείγματα που συλλέγονται μετά από τη χορήγηση σιλденаφίλης σε σύγκριση με δείγματα που συλλέχθηκαν πριν από τη χρήση σιλденаφίλης [100]. Οι συγγραφείς αναφέρουν ότι η αύξηση της εκκριτικής λειτουργία του προστάτη μετά τη χορήγηση σιλденаφίλης, εξηγεί την αυξημένη κινητικότητα των σπερματοζωαρίων. Αυτό είναι σύμφωνο με άλλες αναφορές, που έχουν αποδείξει ότι η δυσλειτουργία εκκρίσεως των αρσενικών γεννητικών αδένων, οφείλεται σε λοιμώξεις που μειώνουν την ανδρική γονιμοποιητική ικανότητα [158]. Στο σπερματικό υγρό [159] μπορεί να υπάρχουν παράγοντες που δεν είναι απολύτως απαραίτητοι για τη γονιμοποίηση. Ωστόσο, βέλτιστες συγκεντρώσεις των δεικτών

προστατικών εκκρίσεως μπορεί να παρέχουν ένα ιδανικό περιβάλλον για την κινητικότητα και τη μεταφορά του σπέρματος [160]. Η αύξηση της εκκριτικής λειτουργίας του προστάτη, της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων, και ο συνολικός αριθμός σπερματοζωαρίων, μπορεί να αποδοθούν σε υψηλότερη σεξουαλική ικανοποίηση που παρατηρήθηκε σε δείγματα που συλλέγονται μετά τη θεραπεία με σιλденаφίλη. [100] Η θετική επίδραση της σεξουαλικής ικανοποίησης και του οργασμού στην ποιότητα και την γονιμοποιητική ικανότητα του σπέρματος, έχουν αποδειχτεί σε μια άλλη μελέτη, όπου συγκρίνεται ο αυνανισμός με βιντεοσκοπημένες σεξουαλικές εικόνες και ο αυνανισμός χωρίς βιντεοσκοπημένες σεξουαλικές εικόνες. Αυνανισμός με βιντεοσκοπημένες σεξουαλικές εικόνες είχε ως αποτέλεσμα να υπάρχουν σπερματοζωάρια με μεγαλύτερη γονιμοποιητική ικανότητα [161]. Επιπλέον, σε μια παρόμοια αναφορά ο Σοφικίτης και ο Miyagawa το 1993 [160], έδειξαν βελτιωμένη κινητικότητα σπερματοζωαρίων σε δείγματα σπέρματος που συλλέχθηκαν μέσω της συνουσίας έναντι αυνανισμού σε υπογόνιμους άνδρες. Ο Σοφικίτης και ο Miyagawa το 1993 [160], υποστήριξαν ότι όσο υψηλότερη είναι η σεξουαλική διέγερση τόσο μεγαλύτερη είναι η εκκριτική λειτουργία του προστάτη και τόσο περισσότερο γεμίζει ο σπερματικός πόρος κατά τη διάρκεια της εκσπερμάτωσης. Η τελευταία πρόταση υποστηρίζεται από μια μελέτη που δείχνει ότι ο περιορισμός των ταύρων πριν από τη συλλογή σπέρματος αυξάνει τον αριθμό των κινητικών σπερματοζωαρίων έως 50% [162-164]. Ο Ali και οι συνεργάτες του (2007) [165] χορήγησαν 100-mg σιλденаφίλη σε διαβητικούς νευροπαθητικούς ασθενείς. Οι ερευνητές διαπίστωσαν ότι η κινητικότητα των σπερματοζωαρίων και ο όγκος σπέρματος αυξήθηκαν σε άντρες που έλαβαν σιλденаφίλη. Από την άλλη πλευρά η μορφολογία των σπερματοζωαρίων παρέμεινε ανεπηρέαστη. Επιπλέον, οι συγγραφείς έχουν προτείνει ότι η χορήγηση σιλденаφίλης συνδυάζεται με μια βελτίωση σε ολόκληρο το λείο μυϊκό σύστημα του αρσενικού αναπαραγωγικού συστήματος και του ουροποιητικού συστήματος, όταν η τροποποίηση του οφείλεται σε νευροπάθεια. Η χορήγηση σιλденаφίλης οδήγησε σε μείωση της υπερβολικής συσσώρευσης των διαμέσων κολλαγόνων ινών και στην αποτιάνωση σε λείες μυϊκές ίνες οι οποίες οδήγησαν στην ατονία της ουροδόχου κύστης στους διαβητικούς άνδρες. Αντίθετα οι συγγραφείς έχουν παρατηρήσει ότι η χρόνια χορήγηση σιλденаφίλης σχετίζεται με μια σημαντική μείωση στη συνολική παραγωγή σπέρματος. Ο Romara και οι συνεργάτες του (2007) [166] πραγματοποίησαν μια διπλά-τυφλή, τυχαιοποιημένη, διασταυρούμενη μελέτη που περιγράφει την οξεία επίδραση της σιλденаφίλης (50 mg)

και της τανταλαφίλης (20 mg) σε νέους υπογόνιμους άνδρες. Σε δεκαοκτώ νέους υπογόνιμους άνδρες χορηγήθηκε μια δόση είτε σιλδεναφίλης είτε τανταλαφίλης σε μια τυφλή, τυχαιοποιημένη σειρά. Δείγματα σπέρματος συλλέχθηκαν μία ή δύο ώρες μετά τη χορήγηση κάθε PDE-5 αναστολέα. Οι συγγραφείς ανέφεραν μία σημαντική αύξηση στην προοδευτική κινητικότητα του σπέρματος σε δείγματα σπέρματος που έχει συλλεχθεί μετά από τη χορήγηση σιλδεναφίλης, σε σύγκριση με δείγματα σπέρματος που συλλέχθηκαν πριν από τη χορήγηση σιλδεναφίλης. Οι συγγραφείς αναφέρουν ότι η διεγερτική επίδραση της σιλδεναφίλης στην κινητικότητα των σπερματοζωαρίων μπορεί να οφείλεται σε μια άμεση δράση της σιλδεναφίλης στα μιτοχόνδρια του σπέρματος και στα κανάλια ασβεστίου. Μια άλλη αναφορά [167] έχει αποδείξει ότι PDE5A εντοπίζεται κυρίως στη θάλασσα σε μαστίγια σπέρματος αχινού που ρυθμίζουν τα επίπεδα ενδοκυτταρικού cGMP. Έτσι, μια άμεση επίδραση της σιλδεναφίλης σε μαστίγια σπερματοζωαρίων δεν μπορεί να αποκλειστεί [167]. Ενδιαφέρον είναι ότι η μελέτη του Romaga και των συνεργατών του (2007) [166], αποκάλυψε μία σημαντική μείωση στην κινητικότητα των σπερματοζωαρίων μετά από μία μόνο δόση τανταλαφίλης [166]. Αυτά τα τελευταία ευρήματα δεν συνάδουν με μια προηγούμενη μελέτη, που διεξήχθη από τον Hellstrom και τους συνεργάτες του [168], ο οποίος ερεύνησε τις επιδράσεις της τανταλαφίλης σχετικά με τα χαρακτηριστικά του σπέρματος και τις συγκεντρώσεις των αναπαραγωγικών ορμονών στον ορό υγιών ανδρών και σε άνδρες με ήπια στυτική δυσλειτουργία. Ο Hellstrom και οι συνεργάτες του (2003) [168] έκαναν δύο τυχαιοποιημένες, διπλά-τυφλές, ελεγχόμενες με εικονικό φάρμακο, παράλληλες μελέτες της ομάδας (μία μελέτη για μια δόση 10-mg τανταλαφίλης και μια μελέτη για μια 20-mg δόση της τανταλαφίλης). Συμμετείχαν 204 ασθενείς στη μελέτη που λάμβαναν 10 mg τανταλαφίλης, και 217 άτομα στη μελέτη που λάμβαναν 20-mg τανταλαφίλης. Οι ερευνητές αξιολόγησαν την επίδραση της καθημερινής χορήγησης τανταλαφίλης ή εικονικού φαρμάκου για έξι μήνες σε δείγματα σπέρματος και τα επίπεδα των αναπαραγωγικών ορμονών (τεστοστερόνη, ωχρινοποιητική ορμόνη, και θυλακιοτρόπος ορμόνη) στον ορό των ανδρών αυτών. Οι ερευνητές έδειξαν ότι σε κάθε μελέτη η αναλογία των συμμετεχόντων με 50% ή μεγαλύτερη μείωση της συγκέντρωσης του σπέρματος, ήταν σχετικά μικρή και παρόμοια για την ομάδα placebo και την 10-mg τανταλαφίλη ομάδα ή την 20 mg-τανταλαφίλη ομάδα. Παρομοίως δεν υπήρχαν σημαντικές αλλαγές στη μορφολογία του σπέρματος ή την κινητικότητα του σπέρματος μετά τη θεραπεία με 10 mg ή 20 mg τανταλαφίλης. Επιπλέον, οι συγγραφείς απέδειξαν ότι δεν υπήρχαν

σημαντικές μεταβολές των επιπέδων των αναπαραγωγικών ορμονών στον ορό μετά τη χορήγηση τανταλαφίλης. Συμπερασματικά, στην παραπάνω μελέτη [168] η χορήγηση τανταλαφίλης σε δόσεις των 10 mg και 20 mg για έξι μήνες δεν επηρέασε αρνητικά τη σπερματογένεση των όρχεων ή τα επίπεδα των ορμονών στον ορό. Ωστόσο, άλλοι ερευνητές έχουν τονίσει το δίλημμα τους, σχετικά με τη χορήγηση τανταλαφίλης σε καθημερινή βάση, πιστεύοντας ότι μέχρι σήμερα τα διαθέσιμα στοιχεία που επιβεβαιώνουν την ασφάλεια της τανταλαφίλης στο να χορηγείται σε ημερήσια βάση, δεν είναι ακόμη επαρκή [166]. Λαμβάνοντας υπόψη το παραπάνω δίλημμα ο Hellstrom και οι συνεργάτες του (2008) [169], επέκτειναν την έρευνά τους σε μια διπλά-τυφλή, ελεγχόμενη με εικονικό φάρμακο αξιολόγηση των επιπτώσεων της τανταλαφίλης (20mg) στη σπερματογένεση, πάνω από τρεις κύκλους σπερματογένεσης, σε άνδρες ηλικίας άνω των 45 ετών. Οι ερευνητές έδειξαν ότι δεν υπήρχε κανένα επιβλαβές αποτέλεσμα της 9-μηνιαίας καθημερινής χορήγησης τανταλαφίλης (20 mg) για τη σπερματογένεση. Επιπλέον ο Bauer και οι συνεργάτες του (2002) [170], πραγματοποίησαν μία διπλά-τυφλή τυχαιοποιημένη, ελεγχόμενη με εικονικό φάρμακο, διασταυρούμενη μελέτη για τον προσδιορισμό των αποτελεσμάτων από μια απλή δόση της βαρδεναφίλης (20 mg) στις παραμέτρους του σπέρματος. Δεκαέξι υγιείς άνδρες συμμετείχαν σε αυτή τη μελέτη. Οι επιστήμονες δεν διαπίστωσαν στατιστικά σημαντική επίδραση της βαρδεναφίλης στην κινητικότητα των σπερματοζωαρίων, τη συγκέντρωση, τη βιωσιμότητα, και την μορφολογία των σπερματοζωαρίων.

Τέλος σε μια άλλη μελέτη, ο Δημητριάδης και οι συνεργάτες του (2008) [100], αξιολόγησαν τα αποτελέσματα της χορήγησης βαρδεναφίλης (10 mg) στην ποιότητα του σπέρματος. Οι επιστήμονες παρατήρησαν ότι τα δείγματα σπέρματος από υπογόνιμους άνδρες, που έλαβαν θεραπεία με 10 mg βαρδεναφίλης, παρουσίασαν α) ένα σημαντικά μεγαλύτερο συνολικό αριθμό σπερματοζωαρίων, β) ένα ποσοστό κινητικότητας, γ) μια ποιοτική κινητικότητα των σπερματοζωαρίων, και δ) ένα ποσοστό των μορφολογικά φυσιολογικών σπερματοζωαρίων, σε σχέση με δείγματα σπέρματος που συλλέχθηκαν πριν από την χορήγηση βαρδεναφίλης από τα ίδια άτομα. Οι συγγραφείς πρότειναν ότι η βαρδεναφίλη τόνωσε την προστατική εκκριτική λειτουργία. Αυτό οφείλεται σε μια ενισχυμένη σεξουαλική διέγερση που προκάλεσε αύξηση της ποσοτικής και ποιοτικής κινητικότητας των σπερματοζωαρίων και μείωσε τις ανωμαλίες των σπερματοζωαρίων. Ο Jarvi και οι συνεργάτες του (2008) [171],

πραγματοποίησαν μία τυχαιοποιημένη, διπλά τυφλή, ελεγχόμενη με εικονικό φάρμακο, παράλληλης ομάδας, πολυκεντρική μελέτη για τη διερεύνηση της επίδρασης της βαρδεναφίλης και της σιλδεναφίλης στα χαρακτηριστικά των σπερματοζωαρίων. Ένα σύνολο από 200 άνδρες με ή χωρίς στυτική δυσλειτουργία, που ήταν ικανοί να παράγουν δείγματα σπέρματος χωρίς θεραπεία για τη στυτική δυσλειτουργία, 25 έως 64 ετών, τυχαιοποιήθηκαν για την καθημερινή θεραπεία με βαρδεναφίλη, σιλδεναφίλη ή εικονικό φάρμακο για 6 μήνες. Η βαρδεναφίλη ή η σιλδεναφίλη δεν είχε καμία επίδραση έναντι του εικονικού φαρμάκου στο ποσοστό των ασθενών με 50% ή μεγαλύτερη μείωση στην συγκέντρωση σπέρματος [171]. Επιπλέον, η βαρδεναφίλη ή η σιλδεναφίλη δεν επηρεάζει οποιεσδήποτε παραμέτρους σπέρματος ή το προφίλ του περιφερικού ορού γοναδοτροπίνης [171].

1.12.ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ

Οι Wistar αρουραίοι κατατάσσονται στην κλάση: Mammalia και στην τάξη: Rodentia. Αποτελούν ετερόγαμο στέλεχος του αλμπίνο αρουραίων που ανήκουν στο είδος επίμυς (*Rattus norvegicus*). Ο αλφιστικός Wistar έχει λευκό τρίχωμα, δέρμα και κόκκινα μάτια. Είναι ανθεκτικός στις ασθένειες και δεν εμφανίζει αυτόματα νεοπλάσματα. Οι αρουραίοι στο εργαστήριο έχουν υπηρετήσει ως ένα σημαντικό ζωικό μοντέλο για την έρευνα στην ψυχολογία, την ιατρική, και σε άλλους τομείς. Το συγκεκριμένο στέλεχος αναπτύχθηκε στο Ινστιτούτο Wistar το 1906 για χρήση σε βιολογική και ιατρική έρευνα, και είναι το πρώτο στέλεχος αρουραίου που έχει αναπτυχθεί για να χρησιμεύσει ως πρότυπος οργανισμός σε μια εποχή που στα εργαστήρια χρησιμοποιούνται κυρίως κοινά οικιακά ποντίκια (*Mus musculus*). [172]Συγκεκριμένα ο αρουραίος Wistar χαρακτηρίζεται από μεγάλο κεφάλι, μακριά αυτιά, ενώ το μήκος της ουράς του είναι πάντα μικρότερο από το μήκος του σώματος του. Οι Sprague Dawley αρουραίου και οι Long - Evans αρουραίοι στελέχη αναπτύχθηκαν από αρουραίους Wistar. Οι Wistar επίμυες είναι πιο δραστήριοι από άλλα στελέχη, όπως οι Sprague Dawley rats. Οι επίμυες γενικά είναι φιλικά ζώα και πρέπει να δέχονται ήπιους χειρισμούς. Οι συχνοί χειρισμοί τα κάνουν ακόμη πιο φιλικά προς τον άνθρωπο. Έχουν συνήθως περιέργεια για την εξερεύνηση του γύρω χώρου. Θεωρούνται νυκτόβια ζώα δεδομένου ότι αναπτύσσουν δραστηριότητα κατά τις νυκτερινές κυρίως ώρες. Παρόλα αυτά, η όρασή τους δεν είναι καλή.

1.12.1.ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΚΑΙ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ

Η ανατομία και η φυσιολογία του επίμου μοιάζουν σε γενικές γραμμές με εκείνες του μυός. Παρακάτω αναφέρονται ορισμένες ιδιαιτερότητες. Οι επίμυες δεν έχουν χοληδόχο κύστη και τα επινεφρίδιά τους βρίσκονται μακριά από τα κεντρικά αιμοφόρα αγγεία, γεγονός που κάνει την επινεφριδεκτομή λιγότερο επικίνδυνη στο είδος αυτό. Ο επίμυς είναι νυκτόβιο ζώο, γι' αυτό και η δραστηριότητα του αυξάνεται κατά πολύ τις βραδινές ώρες. Είναι παμφάγο ζώο και έχει πολύ ισχυρά δόντια για τη σύνθλιψη και μάσηση της τροφής του. Το ήμισυ κάθε σιαγόνα του περιέχει έναν κοπήρα και τρεις γομφίους. Το μήκος των κοπήρων αυξάνεται καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής του και περιορίζεται με τη μάσηση [173]. Καθώς οι μύες έχουν αδύναμη όραση, ιδίως οι αλφικές ποικιλίες, εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από την οσμή και σημαίνουν το περιβάλλον τους με ούρα σε χαρακτηριστικά σημεία. Υπάρχουν σημαντικές διαφορές στην έκφραση και την ένταση της συμπεριφοράς αναλόγως της ποικιλίας. Στον έσω κανθό του οφθαλμού τους υπάρχει ο αδένας του Harder. Πρόκειται για τροποποιημένο δακρυϊκό αδένα, ο οποίος παράγει εκκρίσεις πλούσιες σε πορφυρίνη που λιπαίνουν τον οφθαλμό. Το σωματικό βάρος των ενήλικων επιμύων είναι 300-500 gr των αρσενικών και 250-300 gr των θηλυκών. Έχουν διάρκεια ζωής 2-3 χρόνια. Η θερμοκρασία του σώματός τους είναι 37,5-38,5°C και ρυθμίζεται με τη βοήθεια ιδρωτοποιών αδένων που βρίσκονται στην πελματιαία επιφάνεια του άκρου ποδός, αλλά και με διαστολή των αγγείων της ουράς. Η αναπνευστική τους ικανότητα είναι 100-200 αναπνοές/λεπτό. Ο καρδιακός ρυθμός είναι 300-500 παλμοί / λεπτό (σε στρεσογόνες όμως καταστάσεις η τιμή μπορεί να αυξηθεί μέχρι και στο διπλάσιο) και ο αναπνευστικός 70-110 αναπνοές / λεπτό. [175].

Οι λευκοί επίμυες Wistar, χρησιμοποιούνται πολύ συχνά στα πειραματικά εργαστήρια ως αντιπροσωπευτικά πειραματόζωα των θηλαστικών, γιατί οι ιστοί τους είναι παρόμοιοι με αυτούς του ανθρώπου. Επί πλέον, είναι ζώα ενδοθερμικά δηλαδή παράγουν θερμότητα από τον εσωτερικό μεταβολισμό) [176].

1.12.2.ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ

Ο επίμυς ενηλικιώνεται σε ηλικία 8 εβδομάδων, αλλά η σύζευξη με το άλλο φύλλο γίνεται σε ηλικία 12-16 εβδομάδων. Η διάρκεια της αναπαραγωγικής

δραστηριότητας των επιμύων είναι 12-18 μήνες. Οι ωοθηκικοί κύκλοι εκδηλώνονται καθ' όλη τη διάρκεια του έτους και διαρκούν 4-5 ημέρες, ενώ το στάδιο του οίστρου διαρκεί μόνο 14 ώρες. Χαρακτηριστικά συμπτώματα του οίστρου είναι η υπερβολική κινητικότητα του ζώου, το τρεμούλιασμα των αυτιών του και η λήψη στάσης ζευγαρώματος του θηλυκού. Η φυσιολογική εκδήλωση της αναπαραγωγικής δραστηριότητας θα πρέπει να διαρκεί 12-16 ώρες. Επίσης η παρατεταμένη έκθεση σε φως, π.χ. για 3 συνεχείς ημέρες, μπορεί να επηρεάσει σημαντικά, μειώνοντας τη γονιμότητα. Η επίβαση διαπιστώνεται με την ανεύρεση ζελατινώδους ουσίας (cp) στον κόλπο του ζώου που δέχτηκε επίβαση τις πρώτες 12-24 ώρες. Η εγκυμοσύνη διαρκεί 21-23 ημέρες, εκτός εάν κατά τη διάρκεια της η μητέρα γαλουχεί, γεγονός που παρατείνει την εγκυμοσύνη κατά 3-7 ημέρες. Συνήθως γεννιούνται 6-15 νεογέννητα βάρους 5-6 gr το καθένα. Ο απογαλακτισμός των ζώων γίνεται σε 21 ημέρες από τη γέννηση τους.[173]

1.12.3.ΣΠΕΡΜΑΤΟΓΕΝΕΣΗ ΣΤΟΝ ΑΡΟΥΡΑΙΟ

Στους όρχεις των τρωκτικών παρατηρούνται πολλαπλού τύπου σπερματογόνια, όπως τύπου A, ενδιάμεσων αλλά και τύπου B. Συγκεκριμένα στον αρουραίο, ο πολλαπλασιασμός των σπερματογονίων αρχίζει από την ημέρα 4-5, με την εμφάνιση του τύπου B σπερματογονίων τα οποία εντοπίζονται κατά την ημέρα 6 μετά τον τοκετό. Μετά την ολοκλήρωση μιας σειράς μιτωτικών διαιρέσεων, τα B τύπου σπερματογόνια εισέρχονται στο στάδιο της πριλεπτοταινίας της μειωτικής διαδικασίας. Η μετανάστευση των αρχέγονων γεννητικών κυττάρων στον όρχι εξαρτάται από την έκφραση των c-kit πρωτεϊνών, οι οποίες χρησιμεύουν ως υποδοχείς για τον παράγοντα αρχέγονων κυττάρων (SCF) ,που παράγεται από τα ανώριμα κύτταρα Sertoli [177]. Μεταλλάξεις στον c-kit υποδοχέα, που κωδικοποιείται στον ποντικό, οδηγεί σε αποτυχία της σπερματογένεσης λόγω απουσίας των γεννητικών κυττάρων από τους όρχεις [178]. Πολλές μελέτες έδειξαν ότι η μιτωτική αντιγραφή σπερμογονίων εξαρτάται από την έκφραση του c-kit και τη σύνθεση του SCF από τα κύτταρα Sertoli. Η αλληλεπίδραση μεταξύ SCF και c-kit φαίνεται να μεσολαβεί και να διαμορφώνει τον πολλαπλασιασμό των σπερματογονίων. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι μέχρι 35 % των σπερμογονίων εκφυλίζεται, και γι' αυτό το λόγο έχει ενοχοποιηθεί η απόπτωση ως κύρια διαδικασία η οποία απομακρύνει τα κύτταρα από

το επιθήλιο. Σε μια πρόσφατη μελέτη έγινε έλεγχος της απόπτωση των σπερματοκυττάρων σε όρχεις ανθρώπου και αρουραίου, πριν από την ήβη [179]. Μια αντίστοιχη ανάλογη μελέτη έγινε και σε σπερματοκύτταρα *in vitro* και αποδείχθηκε ότι κατά την αναπαραγωγική περίοδο, στον αρουραίο, η απόπτωση παρατηρείται κατά κύματα, κατά τη διάρκεια του κύκλου του σπερματικού επιθηλίου [180]. Από τη σύγκριση των αποτελεσμάτων μέσω ηλεκτροφόρησης του κερματισμένου του DNA, στον αρουραίο, είναι φανερό ότι υπάρχει διπλάσια ποσότητα στα στάδια I και XII-XIV, σε σχέση με το στάδιο VIII, ενώ η *in situ* ανάλυση δείχνει ότι το πλέον ευάλωτο είναι το στάδιο του σπερματοκυττάρου [181]. Τα προηγούμενα συμπεράσματα συμπληρώνουν τα ευρήματα του Kerr, που αναφέρει ότι μετά το στάδιο VII παρατηρείται μαζική εκφύλιση σε όλα τα μεταγενέστερα στάδια, με μέγιστο βαθμό στο στάδιο XIV[181].

2.ΣΚΟΠΟΣ

Ο σκοπός των σειρών των πειραμάτων που περιλαμβάνουν *in vitro* δοκιμασίες και *in vivo* μελέτες είναι να μελετηθεί ο ρόλος των αναστολέων της PDE5 στη συνολική γονιμοποιητική ικανότητα του άνδρα. Μελετήθηκε εάν τα δημοφιλέστατα φάρμακα στυτικής δυσλειτουργίας επιδρούν θετικά στην ικανότητα του άνδρα να αποκτήσει τα δικά του παιδιά. Επιπλέον αυτές οι σειρές των πειραμάτων έχουν την υψηλή πρωτοτυπία ότι περιλαμβάνουν και τους τρεις αναστολείς της PDE5 (σιλδεναφίλη, βαρδεναφίλη, τανταλαφίλη). Επίσης για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία θα μελετηθεί η επίδραση των αναστολέων της PDE5 στην ακεραιότητα του DNA σπερματοζωαρίων ανθρώπου ή αρουραίου. Αν οι αναστολείς της PDE5 βελτιώνουν την ποιότητα του σπέρματος χωρίς να προκαλούν βλάβη στο DNA του σπερματοζωαρίου, θα δικαιωθούν περισσότερο σαν πιθανοί φαρμακευτικοί παράγοντες για την αντιμετώπιση της ανδρικής υπογονιμότητας.

Επιπρόσθετα, πραγματοποιήθηκαν μελέτες χορήγησης αναστολέων PDE5 στα πειραματόζωα. Τα τελευταία χρόνια η χορήγηση σισπλατίνης σε ογκολογικούς ασθενείς είναι αρκετά διαδεδομένη. Πολλοί ογκολογικοί ασθενείς, που λαμβάνουν σισπλατίνη, χρησιμοποιούν αναστολείς της PDE5 για την αντιμετώπιση της στυτικής δυσλειτουργίας. Είναι λοιπόν πολύ ενδιαφέρον να μελετηθεί εάν αυτοί οι φαρμακευτικοί παράγοντες (αναστολείς PDE5) έχουν κάποια θετική επίδραση στο ήδη αρνητικά επηρεασμένο σπέρμα (από τη χημειοθεραπεία) των ασθενών αυτών που θέλουν να αποκτήσουν τα δικά τους παιδιά.

Επίσης μελετήθηκε για πρώτη φορά στη διεθνή βιβλιογραφία ο ρόλος της σιλδεναφίλης και τανταλαφίλης (αναστολέας της PDE5) στην έκκριση τεστοστερόνης *in vitro* σε καλλιέργειες ορχικών κυττάρων αρουραίου. Λαμβάνοντας υπόψη ότι η PDE5 εκφράζεται στα Leydig κύτταρα [182], είναι σημαντικό να ελεγχθεί αν οι αναστολείς της PDE5 αυξάνουν την έκκριση ορχικής τεστοστερόνης. Αυξημένη ορχική τεστοστερόνη λόγω της δράσης των αναστολέων της PDE5, ίσως εξηγεί τη βελτίωση της ποιότητας παραμέτρων του σπέρματος μετά τη χρήση αυτών των φαρμάκων.

Β.ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1. Υλικά και εξοπλισμός

Τα αντιδραστήρια και ο εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διατριβή έχουν καταχωρηθεί στην λίστα παρακάτω:

3.1.1.Αντιδραστήρια

- **Universal IVF Medium, Origio, REF 10310060A**
- **Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)/ Ham's Nutrient Mixture F 12 with L-glutamine 2.5mM/L, 115mM HEPES, Pyridoxine HCL, 55mg/L Sodium Pyruvate.SAFC Biosciences.**
- **Cialis 20mg tab, Eli Lilly Nederland B.V.**
- **Viagra 100mg tab, Pfizer Ltd**
- **Levitra 10mg tab, Bayer Pharma AG**
- **Pure Sperm Wash Medium, Genetics ΕΠΕ.**
- **Phosphate Buffered Saline (PBS) (ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων), Sigma-Aldrich®**
- **Tris(hydroxymethyl)aminomethane (TNE) 252859 Sigma-Aldrich**
- **Alkaline phosphatase (P3877, Sigma-Aldrich)**
- **Lysis solution [0.1% Triton X-100 (v/v), 0.15 M NaCl, 0.08 M HCl, pH 1.4]**
- **Triton X-100 Sigma-Aldrich,Chemical Co., St. Louis, MO)**
- **Staining Solution (for 1L),7.77 gr of 0.037M Citrid Acid,17.89 gr of 0.126M Na₂HPO₄,0.41 gr of 0.0011M EDTA,8.7 gr of 0.15M NaCl**
- **Acridine Orange (Fluka AG, Switzerland) chromatographically purified, Polysciences, Inc., Warrington, PA) solution (6 mg Acridine Orange/ml in**

buffer: citric acid included diamide [azodicarboxylic-acid-bis (dimethylamide); diazine- 0.1 M, Na₂HPO₄ 0.2 M, EDTA 1 mM, NaCl 0.15 M, pH 6).

- **Testosterone reagent kit της εταιρείας Leriva Diagnostics S.A.**
- **Access 2 Beckman Coulter Σύστημα μέτρησης ορμονών.**
- **Bouin's Fixative (Bouin's Fluid) BBC Biochemical.
Ethanol absolute (απόλυτη αιθανόλη), Sigma-Aldrich®, 24194**
- **Διάλυμα αιθανόλης 70%**
- **NaCl (χλωριούχο νάτριο), διάλυμα για ενδοφλέβια έγχυση 0.9% w/v, Fresenius, KabIAac**
- **cis-Diammineplatinum(II) dichloride.crystalline P4394 SIGMA-ALDRICH**
- **Water for injection, (αστεριωμένο ύδωρ για ενέσιμα διαλύματα, απυρετογόνο) Fresenius Kabi**

3.1.2. Όργανα και συσκευές

- **Οπτικό μικροσκόπιο (αντίθεσης φάσεως) Olympus BX41, με κάμερα για καταγραφή(φωτογραφία-βίντεο).**
- **Οπτικό στερεοσκόπιο SXH10 Research Stereo.**
- **Επωαστής (επωαστικός κλίβανος), Automatic Incubator CO₂, Forma Scientific, USA**
- **Κυτταρόμετρο, FACScalibur Flow Cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA).**
- **Καταψύκτης κατάψυξης (-20 °C)**
- **Αιμοκυτταρόμετρο newbauer (newbauer haemocytometer)**
- **Εστία κυτταροκαλλιέργειας κάθετης νηματικής ροής, (cell/tissue culture hood)**

- Ηλεκτρονική πιπέττα Thermo Scientific FinnpiAette (1-20μl και 20-300μl)
- Ισοφλουράνιο, Forenium[®] (Isoflurane 99.9% w/w), ABBOTT, No B506
- Ηλεκτρικό μοτέρ Parvalux (V:220/240, A:0.37, Hz: 50, W: 35, RPM: 1400), England, σε συσκευή παροχής μηχανικού αερισμού συνεχών θετικών πιέσεων, Harvard Aparatus Limited.
- Φιάλη Οξυγόνου
- Ειδικό δοχείο αποθήκευσης του πτητικού αναισθητικού ισοφλουρανίου, Isoflurane Vapor 19.3, Dräger Medizintechnik GmbH, Lübeck, Germany, Fabr. Nr. ARND-0516
- Ειδική κατασκευασμένη προσωπίδα για χορήγηση εισπνεόμενης αναισθησίας σε επίμυες
- Ειδική κυρτή βελόνα για χορήγηση ουσιών από το στόμα:FNC-18-2,18Gauge, 1,9 ίντσες (5 εκατοστά) μήκος, 2,4 χιλιοστά άκρη (kent scientific corporation)
- Computer Aided Sperm Analysis (CASA) και Software, VT-Sperm analysis, Video Test.
- Φορητός επωαστής για μεταφορά δειγμάτων(PORTABLE INCUBATOR 5.5L MAINS. OPERATED 100-240V Code:IN085-94),(The Labwarehouse.com)

3.1.3. Αναλώσιμα υλικά

- Σιφόνια Pasteur (Pasteur piAettes) γυάλινα-225mm, ISOLAB Laborgeräte GmbH, 084.01.002
- Σιφόνια (PIAettes) των 25, 10 και 5ml, Costar[®], Corning Incorporated, 4250, 4101, 4051
- Πλαστικοί σωλήνες, falcon (15 ή 50ml), Cellstar[®] Tubes, sterile, 118 271 και 227 261
- Σωλήνες Eppendorf
- Ρύγχη πιπετών διαφόρων μεγεθών

- Τρυβλία καλλιέργειας κυττάρων και ιστών Petri (100x20mm και 60x15mm), Cellstar®, greiner bio-one, 664 160 και 628 160
- Πιπέττες μηχανικής άντλησης και έγχυσης (0.5-2, 2-20, 20-200, 100-1000μl), Orange Scientific
- Σύριγγες 1ml, BD 324827
 - Βελόνες 22, 23, 27G
 - Δοχεία συλλογής ούρων, αποστειρωμένα, U-TEST, Latex A.B.E.E., Ελλάδα
 - Νυστέρια, Xinda, No 22 και 10

3.1.4.Λοιπός εργαστηριακός εξοπλισμός

- Λαβίδες Mosquito
- Στελέχη νυστεριών Νο3 και 4
- Ψαλίδια

3.1.5.Εξοπλισμός εκτροφείου πειραματόζωων

- Πλαστικοί κλωβοί (πολυανθρακικοί)
- Στρωμνή
- Τροφή σε μορφή συμπύκτων, με συγκέντρωση πρωτεϊνών 20-27%
- Ποτίστρες

3.2. IN VITRO ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ

3.2.1 ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΣΠΕΡΜΑΤΙΚΟΥ ΥΓΡΙΟΥ ΑΣΘΕΝΩΝ

Οι in vitro καλλιέργειες είναι γνωστές και ως τα "πειράματα στο δοκιμαστικό σωλήνα". Είναι οι μελέτες που διεξάγονται χρησιμοποιώντας συστατικά ενός οργανισμού, τα οποία έχουν απομονωθεί από τον οργανισμό αυτό, προκειμένου να γίνει δυνατή μια πιο λεπτομερής ανάλυση από ότι σε έναν ολόκληρο οργανισμό.



Εικόνα 8: In vitro καλλιέργεια[183]

Συγκεκριμένα in vitro καλλιέργειες του σπερματικού υγρού, γίνεται συνήθως με δύο τρόπους: την ισοπυκνική φυγοκέντρωση σε κλίση πυκνότητας κολλοειδών διαλυμάτων και τη μέθοδο swim-up.

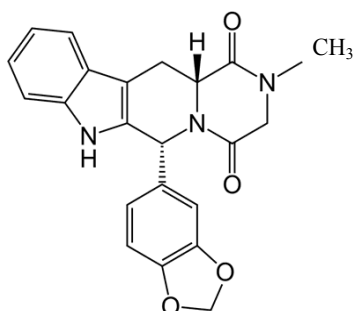


Εικόνα 9: Ανθρώπινα σπερματοζώαρια

Ένα δείγμα σπερματικού υγρού συλλέχθηκε από κάθε έναν από 119 άνδρες, οι οποίοι ήταν 23-50 ετών και επιλέχθηκαν από ένα γενικό πληθυσμό των ανδρών που επισκέπτονται μια ουρολογική κλινική.

A1) Δείγματα σπερματικού υγρού συλλέχθηκαν από 28 άνδρες (group A1), διαιρέθηκαν σε υποπληθυσμούς A1α και A1β. Κάθε υποπληθυσμός A1α και A1β θα υποστεί τεχνικές απομόνωσης σπερματοζωαρίων τύπου swim-up [184].

Η ομάδα A1 περιλάμβανε 28 δείγματα σπέρματος, τα οποία υποβλήθηκαν σε *in vitro* πειράματα, έτσι ώστε να αξιολογηθούν οι συνέπειες υψηλότερων δόσεων τανταλαφίλης από αυτές που παρατηρούνται στα επίπεδα ορού αίματος, μετά την κατανάλωση των 20mg τανταλαφίλης. Εν συντομία, τα κινητά σπερματοζωάρια που απομονώθηκαν χωρίστηκαν σε δύο δείγματα (Control (C)-και experimental (exp)-δείγματα), που το κάθε ένα είχε όγκο 1ml, για κάθε έναν από τους παραπάνω 28 άνδρες. Το δείγμα exp είχε έναν επιπρόσθετο όγκο θρεπτικού υλικού (1ml), στο οποίο υπήρχε διαλυμένη τανταλαφίλη, έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση στο δοκιμαστικό σωλήνα A1 να είναι 1mg/ml τανταλαφίλη. Το δείγμα C έλαβε 1ml χρησίμευσε ως δείγμα ελέγχου. Κάθε ζεύγος δειγμάτων επώαστηκε στους 37 ° C κάτω από CO 5% επί 8 ώρες.



Εικόνα 10: Τανταλαφίλη [185]

A2) Δείγματα σπερματικού υγρού συλλέχθηκαν από 26 άνδρες (group A2), διαιρέθηκαν σε υποπληθυσμούς A2α και A2β. Κάθε υποπληθυσμός A2α και A2β θα υποστεί τεχνικές απομόνωσης σπερματοζωαρίων τύπου swim-up [184].

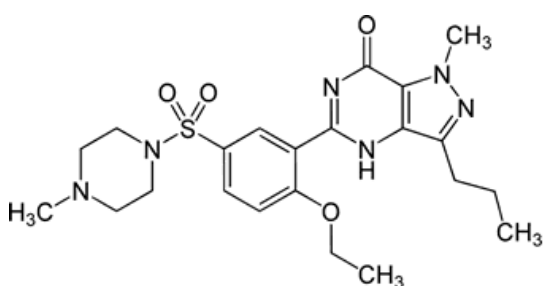
Η ομάδα A2 περιλάμβανε 26 δείγματα σπέρματος, τα οποία υποβλήθηκαν σε *in vitro* πειράματα, έτσι ώστε να αξιολογηθούν οι συνέπειες δόσεων τανταλαφίλης από αυτές που παρατηρούνται στα φυσιολογικά επίπεδα ορού αίματος, μετά την κατανάλωση των 20mg τανταλαφίλης. Εν συντομία, τα κινητά σπερματοζωάρια που απομονώθηκαν χωρίστηκαν σε δύο δείγματα (Control (C)-και experimental (exp)-

δείγματα), που το κάθε ένα είχε όγκο 1ml, για κάθε έναν από τους παραπάνω 26 άνδρες. Το δείγμα exp είχε ένα επιπρόσθετο όγκο θρεπτικού υλικού (1ml), στον οποίο υπήρχε διαλυμένη τανταλαφίλη, έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση στο δοκιμαστικό σωλήνα A2 να είναι 378 µg/L τανταλαφίλη[185]. Το δείγμα C έλαβε 1ml χρησίμευσε ως δείγμα ελέγχου. Κάθε ζεύγος δειγμάτων επωάστηκε στους 37 ° C κάτω από CO 5% επί 8 ώρες.

B1)Δείγματα σπερματικού υγρού συλλέχθηκαν από 30 άνδρες (group B1), διαιρέθηκαν σε υποπληθυσμούς B1α και B1β. Κάθε υποπληθυσμός B1α και B1β θα υποστεί τεχνικές απομόνωσης σπερματοζωαρίων τύπου swim-up [184]

Η ομάδα B1 περιλάμβανε 30 δείγματα σπέρματος, τα οποία υποβλήθηκαν σε in vitro πειράματα, έτσι ώστε να αξιολογηθούν οι επιπτώσεις υψηλότερων δόσεων σιλденаφίλης από αυτές που παρατηρούνται στα επίπεδα ορού αίματος μετά την κατανάλωση των 100mg σιλденаφίλης.

Εν συντομία, τα κινητά σπερματοζωάρια που απομονώθηκαν χωρίστηκαν σε δύο δείγματα(Control (C)-και experimental (exp)-δείγματα) που το κάθε ένα είχε όγκο 1ml, για κάθε έναν από τους παραπάνω 30 άνδρες. Το δείγμα exp είχε ένα επιπρόσθετο όγκο θρεπτικού υλικού (1ml) στον οποίο υπήρχε διαλυμένη σιλденаφίλη, έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση στο δοκιμαστικό σωλήνα B1 να είναι (1 mg/ml)σιλденаφίλη. Το δείγμα C έλαβε 1ml χρησίμευσε ως δείγμα ελέγχου. Κάθε ζεύγος δειγμάτων επωάστηκε στους 37 ° C κάτω από CO 5% επί 8 ώρες.



Εικόνα 11:Σιλденаφίλη [186]

B2) Δείγματα σπερματικού υγρού συλλέχθηκαν από 20 άνδρες (group B2), διαιρέθηκαν σε υποπληθυσμούς B2α και B2β. Κάθε υποπληθυσμός B2α και B2β θα υποστεί τεχνικές απομόνωσης σπερματοζωαρίων τύπου swim-up [184].

Η ομάδα B2 αποτελείται από 20 δείγματα σπέρματος ανδρών που υποβλήθηκαν σε επεξεργασία για *in vitro* πειράματα, έτσι ώστε να αξιολογηθούν οι επιπτώσεις φυσιολογικών δόσεων σιλδεναφίλης, που υπάρχουν στον ορό μετά την κατανάλωση των 100mg σιλδεναφίλης.

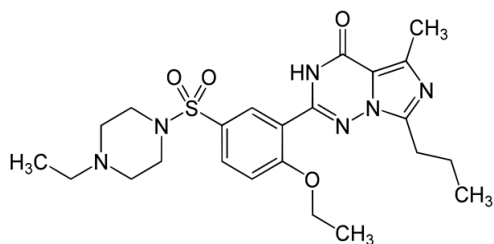
Εν συντομία, τα κινητά σπερματοζωάρια που απομονώθηκαν χωρίστηκαν σε δύο δείγματα (Control (C)-και experimental (exp)-δείγματα), που το κάθε ένα είχε όγκο 1ml, για κάθε έναν από τους παραπάνω 20 άνδρες. Το δείγμα exp είχε ένα επιπρόσθετο όγκο θρεπτικού υλικού (1ml), στον οποίο υπήρχε διαλυμένη σιλδεναφίλη, έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση στο δοκιμαστικό σωλήνα B2 να 450 ng/mL [100,121] σιλδεναφίλη. Το δείγμα C έλαβε 1ml χρησίμευσε ως δείγμα ελέγχου. Κάθε ζεύγος δειγμάτων επώαστηκε στους 37 ° C κάτω από CO 5% επί 8 ώρες.

3.2.2. ΕΠΙΠΡΟΣΘΕΤΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΣΠΕΡΜΑΤΙΚΟΥ ΥΓΡΟΥ ΑΣΘΕΝΩΝ

Ένα δείγμα σπερματικού υγρού συλλέχθηκε από κάθε έναν από τους 15 άνδρες, οι οποίοι ήταν 23-50 ετών, που επιλέχθηκαν από ένα γενικό πληθυσμό των ανδρών που επισκέπτονται μια ουρολογική κλινική.

Δείγματα σπερματικού υγρού συλλέχθηκαν από 15 άνδρες (group Γ), διαιρέθηκαν σε υποπληθυσμούς Γ1 και Γ2. Κάθε υποπληθυσμός Γ1 και Γ2 θα υποστεί τεχνικές απομόνωσης σπερματοζωαρίων τύπου swim-up [184]. Η ομάδα Γ περιλάμβανε 15 δείγματα σπέρματος, τα οποία υποβλήθηκαν σε *in vitro* πειράματα, έτσι ώστε να αξιολογηθούν οι επιπτώσεις υψηλότερων δόσεων βαρδεναφίλης από αυτές που παρατηρούνται στα επίπεδα ορού αίματος μετά την κατανάλωση των 20mg βαρδεναφίλης. Εν συντομία, ο υποπληθυσμός Γ1 αναμείχθηκε με βαρδεναφίλη έτσι ώστε να έχει τελική συγκέντρωση 1mg/ ml, (exp-δείγματα). Στον υποπληθυσμό Γ1 υπήρχαν σπερματοζωάρια που απομονώθηκαν και επώαστηκαν με καλλιεργητικό υλικό, που παρασκευάστηκαν για κάθε έναν από τους παραπάνω 15 άνδρες.

Αντίστοιχα, ο υποπληθυσμός Γ2 επώαστηκε μόνο με καλλιεργητικό υλικό (Control δείγματα) για κάθε έναν από τους παραπάνω 15 άνδρες.



Εικόνα 12: Βαρδεναφίλη [187]

Στο τέλος της περιόδου επώασης κάθε υποπληθυσμός A1, A2, B1, B2, Γ1 και Γ2, μελετήθηκε η κινητικότητα των σπερματοζωαρίων (MS%), η ικανότητα των σπερματοζωαρίων να ανταποκριθούν στο υποωσμωτικό τεστ (HOST%) [184] και μετρήθηκαν οι παράμετροι κίνησης των σπερματοζωαρίων. Επίσης υπολογίστηκε ο δείκτης κατακερματισμού του DNA (DFI) (μετρώντας την συμπύκνωση της χρωματίνης των σπερματοζωαρίων [SCSA]). Το υποωσμωτικό τεστ (περιλαμβάνει 30 λεπτά επώασης σε υποωσμωτικό υλικό) και ο υπολογισμός των παραμέτρων κίνησης των σπερματοζωαρίων (κατά τη διάρκεια επώασης 3 ωρών στους 37 °C κάτω από 5% CO₂), πραγματοποιήθηκαν με τις τεχνικές που έχουν περιγραφεί. Το αποτέλεσμα του υποωσμωτικού τεστ καθώς και οι παράμετροι κίνησης των σπερματοζωαρίων θεωρούνται δείκτες της γονιμοποιητικής ικανότητας των σπερματοζωαρίων. Επιπρόσθετα, ο δείκτης κατακερματισμού του DNA των σπερματοζωαρίων (DFI) σε κάθε υποπληθυσμό A1, A2, B1, B2, Γ1 και Γ2, εκτιμήθηκε με τον υπολογισμό της συμπύκνωσης της χρωματίνης των σπερματοζωαρίων (Sperm Chromatine Structure Assay (SCSA)) [188-190]. Ελέγχθηκαν 15 δείγματα από το group A1 και A2, όσον αφορά τις παραμέτρους κίνησης των σπερματοζωαρίων. Ελέγχθηκαν 16 δείγματα από το group B1 και B2, όσον αφορά τις παραμέτρους κίνησης των σπερματοζωαρίων. Ελέγχθηκαν 10 δείγματα από το group Γ1 και Γ2, όσον αφορά τις παραμέτρους κίνησης των σπερματοζωαρίων.

3.3.ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

3.3.1.ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΚΙΝΗΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΩΝ

Έγινε σπερμοδιάγραμμα σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας [20].Οι άνδρες είχαν 3 ημέρες σεξουαλική αποχή, πριν από τη συλλογή και την ανάλυση σπέρματος. Η συγκέντρωση του σπέρματος, ο όγκος του σπέρματος, και το ποσοστό των κινητικών σπερματοζωαρίων προσδιορίστηκαν.

Η κινητικότητα υπολογίστηκε με βάση τον παγκόσμιο οργανισμό υγείας, ως το ποσοστό % των κινητών σπερματοζωαρίων για τα C-και exp-δείγματα μετά την επώαση.

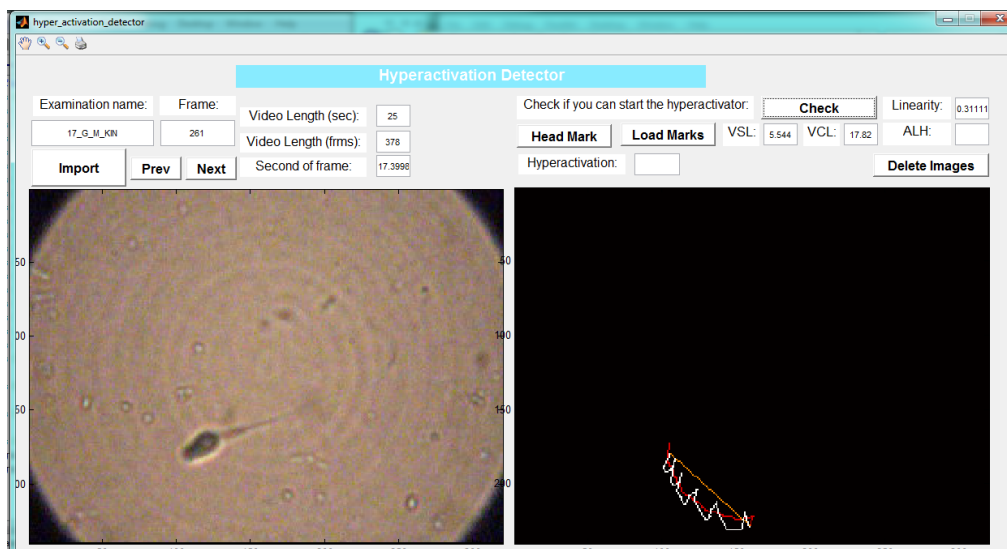
Πίνακας 1: In vitro μελέτες με αναστολείς PDE5

Αναστολείς PDE5	Δόση	Συγγραφείς	Επίδραση στην κινητικότητα των σπερματοζωαρίων
Σιλδεναφίλη	0.5mg/ml ή 1mg/ml	Mostafa et al (2007a)	Θετική
	4mg/ml	Mostafa et al (2007a)	Αρνητική
Τανταλαφίλη	0.5mg/ml ή 1mg/ml	Mostafa et al (2007b)	Θετική
	4mg/ml	Mostafa et al (2007b)	Αρνητική

3.4.ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΚΙΝΗΣΗΣ ΤΩΝ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΩΝ

3.4.1.ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΚΙΝΗΣΗΣ ΤΩΝ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΩΝ

Αρχικά έγιναν πολλές λήψεις βίντεο της κίνησης των σπερματοζωαρίων. Έπειτα, με τη χρήση του προγράμματος MATLAB δημιουργήθηκαν αλγόριθμοι για τη μέτρηση των παραμέτρων κίνησης των σπερματοζωαρίων. Έγινε χρήση των βίντεο, από τα οποία έγινε μέτρηση 15 εικόνων (frames) το δευτερόλεπτο και συνολικά μετρήθηκαν 2 δευτερόλεπτα ανά σπερματοζωάριο.



Εικόνα 13: Πρόγραμμα μέτρησης παραμέτρων κίνησης των σπερματοζωαρίων

Με τη βοήθεια του προγράμματος έγινε μέτρηση των παραμέτρων: (i) μέση ταχύτητα της ελικοειδούς πορείας $\mu\text{m}/\text{sec}$ (curvilinear velocity-VCL), (ii) μέση ταχύτητα της ευθύγραμμης κίνησης $\mu\text{m}/\text{sec}$ (straight line velocity -VSL), (iii) μέση προωθητική ταχύτητα (average path velocity-VAP), (iv) εύρος της πλευρικής μετατόπισης της κεφαλής, δηλαδή το πλάτος της ταλάντωσης της κεφαλής, μm (amplitude of lateral head displacement- ALH), (v) συχνότητα χτύπου της κεφαλής των σπερματοζωαρίων που διασχίζει κατά μέσο όρο το σπερματοζωάριο σε οποιαδήποτε κατεύθυνση, Hz. (BCF), (vi) ευθεία πορεία, η αναχώρηση από την πορεία

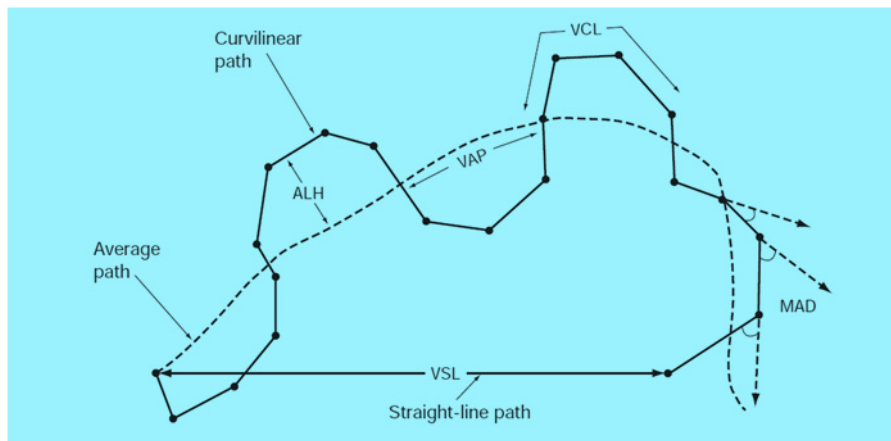
των κυττάρων σε μια ευθεία γραμμή,% (STR), (vii) γραμμικότητα, βαθμός ευθύτητας της γραμμής της διαδρομής των κυττάρων,% (LIN) ανά σπερματοζώαριο. Συνολικά μετρήθηκαν 200 κινητά σπερματοζώαρια ανά ασθενή. Λόγω της χρονοβόρας διαδικασίας της μέτρησης, 200 σπερματοζώαρια ανά ασθενή, οι μετρήσεις συνεχίστηκαν σε εργαστήριο που είχε το Computer Aided Sperm Analysis (CASA).

3.4.2.ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΣΕ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΟΥ ΕΙΧΕ ΤΟ COMPUTER AIDED SPERM ANALYSIS (CASA)

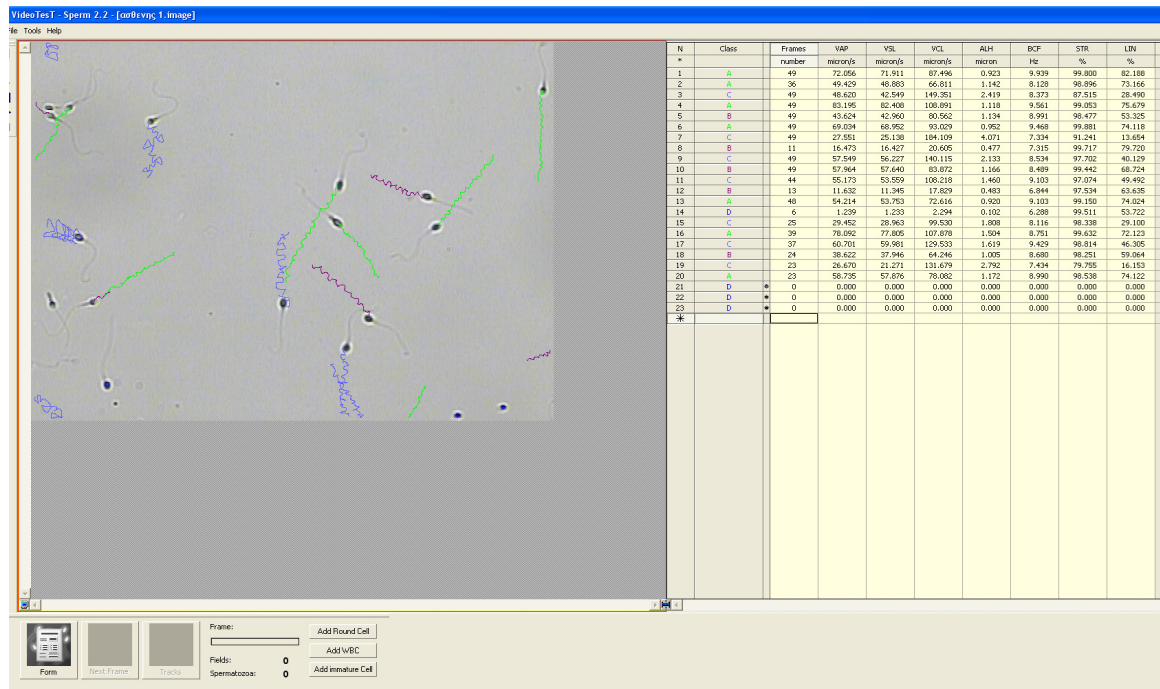
Οι παράμετροι κίνησης των σπερματοζωαρίων αξιολογήθηκαν χρησιμοποιώντας Computer Aided Sperm Analysis (CASA) και Software, VT-Sperm analysis, Video Test. Χρησιμοποιήθηκε φορητός επωαστής (PORTABLE INCUBATOR) για μεταφορά δειγμάτων σε κατάλληλες θερμοκρασίες 37 °C. Οι ακόλουθες παράμετροι αξιολογήθηκαν: (i) η μέση ταχύτητα της ελικοειδούς πορείας $\mu\text{m}/\text{sec}$ (curvilinear velocity-VCL), (ii) η μέση ταχύτητα της ευθύγραμμης κίνησης $\mu\text{m}/\text{sec}$ (straight line velocity -VSL), (iii) η μέση προωθητική ταχύτητα (average path velocity-VAP), (iv) εύρος της πλευρικής μετατόπισης της κεφαλής, δηλαδή το πλάτος της ταλάντωσης της κεφαλής, μm (amplitude of lateral head displacement- ALH), (v) συχνότητα χτύπου της κεφαλής των σπερματοζωαρίων που διασχίζει κατά μέσο όρο το σπερματοζώαριο σε οποιαδήποτε κατεύθυνση, Hz. (BCF), (vi) ευθεία πορεία, η αναχώρηση από την πορεία των κυττάρων σε μια ευθεία γραμμή,% (STR), (vii) γραμμικότητα, βαθμός ευθύτητας της γραμμής της διαδρομής των κυττάρων,% (LIN). Κάθε δείγμα προεπώαστηκε στους 38°C για τουλάχιστον 10 λεπτά, μια σταγόνα 6 μl φορτώθηκε σε θάλαμο Makler (SefiMedical Instruments, Haifa, Israel) και 12 μη-διαδοχικά πεδία αναλύθηκαν. Μετρήθηκαν τουλάχιστον 200 σπερματοζώαρια ανά δείγμα[191,192].

Η κινητικότητα των σπερματοζωαρίων εκτιμήθηκε το συντομότερο δυνατό μετά την ρευστοποίηση του δείγματος (μέσα σε 30 λεπτά), αλλά σε κάθε περίπτωση, μέσα σε 1 ώρα, μετά την εκσπερμάτιση. Έτσι, επιτυγχάνεται μείωση των επιβλαβών αποτελεσμάτων της αφυδάτωσης, των επιβλαβών αποτελεσμάτων του pH και των επιβλαβών αποτελεσμάτων της θερμοκρασίας στην κινητικότητα.

- Αναμείχθηκε καλά το δείγμα σπέρματος.
- Αφαιρέθηκε μια ποσότητα σπέρματος αμέσως μετά την ανάμειξη, χωρίς να περάσει χρόνος ώστε να μην καθιζάνουν τα σπερματοζώαρια από το εναιώρημα.
- Για κάθε επανάληψη, προετοιμάστηκε ένα υγρό παρασκεύασμα περίπου 20m βάθος.
- Περιμένουμε μέχρι το δείγμα να σταματήσει να "ρεύει" (εντός 60 δευτερολέπτων).
- Έγινε εξέταση σε μικροσκόπιο αντίθεσης φάσης σε $\times 200$ ή $400 \times$ μεγέθυνση.
- Εκτίμηση περίπου 200 σπερματοζώαρια ανά επανάληψη για το ποσοστό των διαφορετικών κατηγοριών κίνησης.
- Τέλος έγινε σύγκριση με τις επαναληπτικές τιμές για να ελέγξουμε αν είναι αποδεκτές. Αν ναι, προχωράμε με τους υπολογισμούς, αν όχι, προετοιμάστηκε νέο δείγμα.[20]



Εικόνα14:Παράμετροι κίνησης των σπερματοζωαρίων [20]



Εικόνα 15:Ανάλυση παραμέτρων κίνησης με σύστημα CASA

3.5.ΥΠΟΩΣΜΩΤΙΚΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ (HYPO-OSMOTIC SWELLING TEST (HOST))

Δείγματα σπέρματος επώαστηκαν με υποωσμωτικό διάλυμα (150 mOsm φρουκτόζης, Na 150 mOsm). Αρχικά 0.1 ml από κάθε δείγμα αναμίχθηκε με 1,0 ml διαλύματος υποωσμωτικό και επώαστηκαν στους 37 ° C για 30 λεπτά. Στη συνέχεια, τα σπερματοζωάρια εξετάστηκαν για τυπικό "στρίψιμο" ουράς όπως περιγράφεται από το Jeyendran και τους συνεργάτες του το 1984 [194]. Τουλάχιστον 200 σπερματοζωάρια εξετάστηκαν και το ποσοστό των κυττάρων με διόγκωση υπολογίστηκε [195,196].

Η λογική βάση των τεχνικών προσδιορισμού ζωτικότητας των σπερματοζωαρίων με την υποωσμωτική διαδικασία είναι ότι στην παρουσία υπο-οσμωτικού διαλύματος, τα ζωντανά κύτταρα απορροφούν ύδωρ, ενώ τα νεκρά δεν απορροφούν και δεν εμφανίζουν διόγκωση.

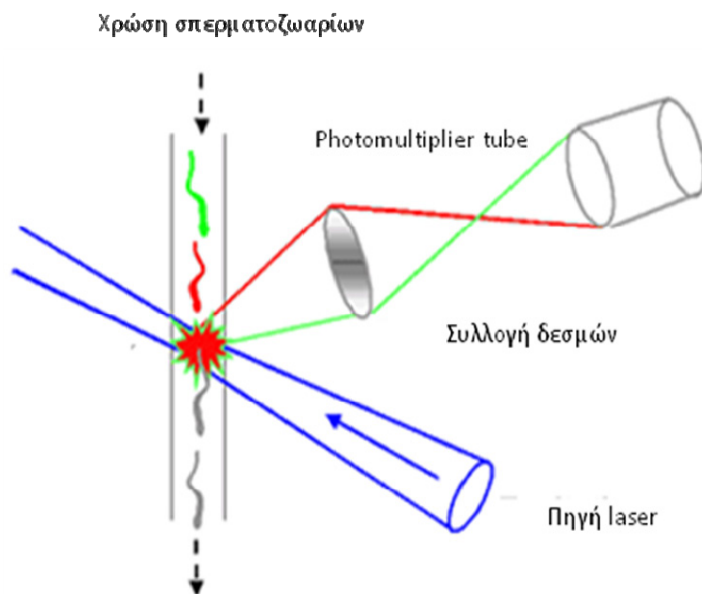


Εικόνα 16:Σπερματοζωάριο με "στρίψιμο" της ουράς

3.6.ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΟΜΗΣ ΤΗΣ ΧΡΩΜΑΤΙΝΗΣ ΤΩΝ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΩΝ/ SPERM CHROMATIN STRUCTURE ASSAY (SCSA)

Ανάλυση δομής της χρωματίνης των σπερματοζωαρίων αναπτύχθηκε από τον Dr. Donald Evenson το 1980 [197]. Με την τεχνική αυτή γίνεται χρώση των σπερματοζωαρίων με πορτοκαλόχρωμη ακριδίνη (AO) και μέσω της κυτταρομετρίας ροής γίνεται η ανίχνευση του κατεστραμμένου του DNA των σπερματοζωαρίων. Έτσι χρησιμοποιώντας χρώση AO σπερματοζωαρίων και κυτταρομετρία ροής, ελέγξαμε την ανώμαλη συμπύκνωση της χρωματίνης των σπερματοζωαρίων. Εν συντομία, 200μL του σπέρματος και 500 μL TNE αναμίχθηκαν ήπια μέσα σε 17x101 mm πώμα σωλήνα πολυπροπυλενίου (Becton Dickinson Falcon, Cat.No. 2059). Στη συνέχεια, 400 μl ρυθμιστικού λυτικού διαλύματος προστέθηκε με επακόλουθη ήπια ανάδευση. Το ρυθμιστικό λυτικό διάλυμα αφήνεται να αντιδράσει για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου και 1 ml διαλύματος χρώσης προστίθεται με επακόλουθη ήπια ανάδευση. Προστίθενται 10 μL χρώση Orange ακριδίνης και μετά από μια ήπια ανάδευση, τα δείγματα αναλύονται με κυτταρομετρία ροής. Τα επεξεργασμένα δείγματα σπέρματος εξετάστηκαν χρησιμοποιώντας κυτταρόμετρο ροής FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). Υπάρχει πράσινος φθορισμός (BP 530/30 φίλτρο) και ο κόκκινος φθορισμός (BP 650LP φίλτρο) στο μηχάνημα και έγιναν 30000 μετρήσεις / δείγματος μετά από διέγερση με 488 nm argon laser. Το Consort 40 (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των δεδομένων [188-190].

Πιο συγκεκριμένα, η τεχνική αυτή εκτιμά την ευαισθησία του DNA των σπερματοζωαρίων στην πρόκληση χημικής αποδιάταξης. Για το σκοπό αυτό τα σπερματοζωάρια υφίστανται επεξεργασία σε περιβάλλον με χαμηλό pH, οπότε ρηγνύετε ο κλώνος της μοριακής αλυσίδας του DNA σε διάφορες θέσεις. Μετά από την αποδιάταξη του DNA, ακολουθεί χρώση με πορτοκαλόχρωμη ακριδίνη και καταμέτρηση των σπερματοζωαρίων με ακέραιο ή μη DNA με τη βοήθεια του κυτταρόμετρου [198].

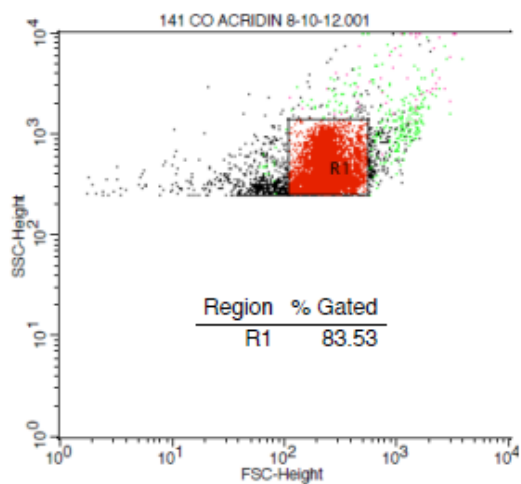


Εικόνα 17:Ανάλυση σε Κυτταρόμετρο ροής [199]

Τεχνική της πορτοκαλόχρωμης ακριδίνης:

Βασίζεται στην ιδιότητα της χρώσης να φθορίζει πράσινη, όταν συνδέεται με διπλό κλώνο ακέραιου DNA και κόκκινη, όταν συνδέεται με μονόκλωνο μετουσιωμένου DNA. Ποσοτικοποίηση της αποδιάταξης του DNA με το δείκτη κατακερματισμού του DNA (DFI), υπολογίστηκε ως η αναλογία του κόκκινου προς το άθροισμα του κόκκινου και πράσινου φθορισμού [200].

Στον άνθρωπο η τεχνική αυτή εφαρμόζεται (σε συνδυασμό με το κλασικό σπερμοδιάγραμμα), ως διαγνωστικό μέσο γονιμότητας στους δωρητές σπέρματος ή σε ασθενείς, καθώς και για τον έλεγχο του εκσπερματίσματος που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί σε in vitro διεργασίες [200].



Εικόνα 18: Ανάλυση από το κυτταρόμετρο ροής

3.7. ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΕΣΤΟΣΤΕΡΟΝΗΣ ΣΕ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΟΡΧΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΑΡΟΥΡΑΙΩΝ ΜΕ ΠΑΡΟΥΣΙΑ Ή ΑΠΟΥΣΙΑ ΣΙΛΔΕΝΑΦΙΛΗΣ

Εννέα αρσενικοί Wistar αρουραίοι ηλικίας 12 εβδομάδων θυσιάστηκαν. Ένα τεμάχιο, από τον αριστερό όρχι κάθε αρουραίου βάρους 500 mg, τοποθετήθηκε σε Eagle's testicular tissue culture medium [201] (τυβλίο A1). Επιπρόσθετα, ένα τεμάχιο βάρους 500 mg από το δεξιό όρχι κάθε αρουραίου τοποθετήθηκε σε ίσο όγκο του Eagle's testicular tissue culture medium (τυβλίο B1). Όλα τα παραπάνω τυβλία καλλιέργειας επώαστηκαν για 3 ώρες στους 34 °C κάτω από 5% CO₂ (Πρώτη Περίοδος Επώασης). Στο τέλος αυτής της Πρώτης Περιόδου Επώασης το Eagle's testicular tissue culture medium σε κάθε τυβλίο A1 αντικαταστάθηκε με ίσο όγκο Eagle's testicular tissue culture medium, ενώ το Eagle's testicular tissue culture medium σε κάθε τυβλίο B1 αντικαταστάθηκε με ίσο όγκο Eagle's testicular tissue culture medium που περιέχει σιλδεναφίλη σε συγκέντρωση 1mg/mL. Στη συνέχεια όλα τα τυβλία A και όλα τα τυβλία B1 επώαστηκαν για 5 ώρες στους 34 °C κάτω από 5% CO₂ (Δεύτερη Περίοδος Επώασης). Στο τέλος της Δεύτερης Περιόδου Επώασης μετρήθηκε η τεστοστερόνη, που εκκρίθηκε στο Eagle's testicular tissue culture medium σε όλα τα τυβλία A1 και σε όλα τα τυβλία B1. Η μέτρηση τεστοστερόνης, που εκκρίθηκε στο Eagle's testicular tissue culture medium, πραγματοποιήθηκε όπως έχουμε ήδη περιγράψει [201].

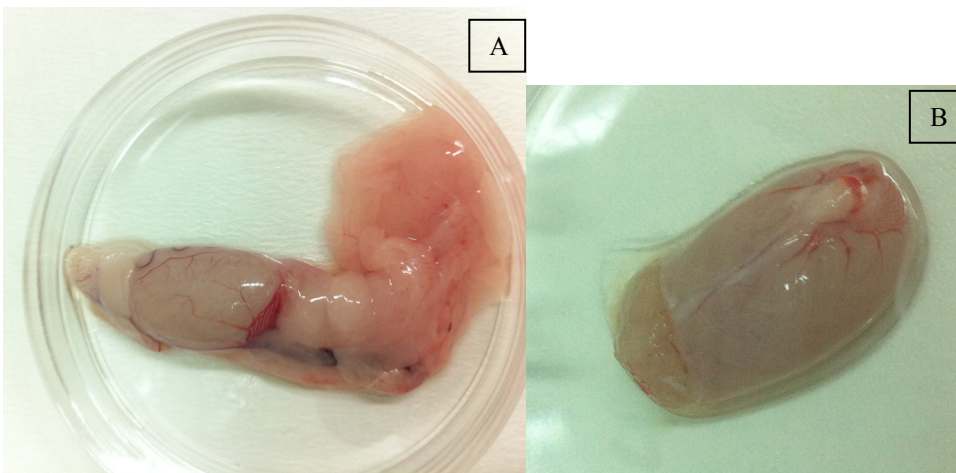
3.8. ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΕΣΤΟΣΤΕΡΟΝΗΣ ΣΕ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΟΡΧΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΑΡΟΥΡΑΙΩΝ ΜΕ ΠΑΡΟΥΣΙΑ Ή ΑΠΟΥΣΙΑ ΤΑΝΤΑΛΑΦΙΛΗΣ

Οκτώ αρσενικοί Wistar αρουραίοι ηλικίας 12 εβδομάδων θυσιάστηκαν. Ένα τεμάχιο από τον αριστερό όρχι κάθε αρουραίου βάρους 500 mg τοποθετήθηκε σε Eagle's testicular tissue culture medium [201] (τυβλίο A2). Επιπρόσθετα, ένα τεμάχιο βάρους 500 mg από το δεξιό όρχι κάθε αρουραίου τοποθετήθηκε σε ίσο όγκο του Eagle's testicular tissue culture medium (τυβλίο B2). Όλα τα παραπάνω τυβλία καλλιέργειας επώαστηκαν για 3 ώρες στους 34 °C κάτω από 5% CO₂ (Πρώτη Περίοδος Επώασης). Στο τέλος αυτής της Πρώτης Περιόδου Επώασης το Eagle's testicular tissue culture medium σε κάθε τυβλίο A2 αντικαταστάθηκε με ίσο όγκο Eagle's testicular tissue culture medium, ενώ το Eagle's testicular tissue culture medium σε κάθε τυβλίο B2 θα αντικαταστάθηκε με ίσο όγκο Eagle's testicular tissue culture medium, που περιέχει τανταλαφίλη σε συγκέντρωση 1mg/mL. Στη συνέχεια όλα τα τυβλία A2 και όλα τα τυβλία B2 επώαστηκαν για 5 ώρες στους 34 °C κάτω από 5% CO₂ (Δεύτερη Περίοδος Επώασης). Στο τέλος της Δεύτερης Περιόδου Επώασης μετρήθηκε η τεστοστερόνη, που εκκρίθηκε στο Eagle's testicular tissue culture medium σε όλα τα τυβλία A2 και σε όλα τα τυβλία B2. Η μέτρηση τεστοστερόνης, που εκκρίθηκε στο Eagle's testicular tissue culture medium, πραγματοποιήθηκε όπως έχουμε ήδη περιγράψει [201].





Εικόνα 19:Απομόνωση όρχεως (A,B)



Εικόνα 20:Όρχις αρουραίου (A,B)

3.9.ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Έγινε μέτρηση των δειγμάτων των τρυβλίων A1, B1, A2 και B2 με χρήση kit Testosterone reagent με δοκιμασία ανοσοανίχνευσης της εταιρίας Leriva Diagnostics S.A. στο Access 2 Beckman Coulter Σύστημα.

3.10. IN VIVO ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ

In vivo στα λατινικά σημαίνει "μέσα στο ζωντανό", επομένως πρόκειται για μελέτες που γίνονται σε έναν ολόκληρο ζωντανό οργανισμό και όχι σε τμήματα του οργανισμού.

3.10.1.ΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΩΝ

Η φροντίδα των πειραματοζώων συμμορφώθηκε απόλυτα με τους ευρωπαϊκούς και εθνικούς κανονισμούς που αφορούν στα ζώα, που χρησιμοποιούνται για ερευνητικούς σκοπούς καθώς και τις συστάσεις της FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Associations).

Οι επίμυες διατηρήθηκαν σε κλωβούς ανά δύο ζώα. Οι κλωβοί είναι κατά κανόνα πλαστικοί (πολυανθρακικοί). Το δάπεδό τους καλύπτονταν από αποστειρωμένη στρωμή πριονιδίου, η οποία αλλάζονταν σε τακτά χρονικά διαστήματα. Η θερμοκρασία ελέγχονταν συνεχώς έτσι ώστε να παραμένει σταθερή στους 20-24°C. Η σχετική υγρασία ήταν 60% και ο αέρας ανανεώνονταν 10-15 φορές την ώρα. Η φωτοπερίοδος, διαρκούσε 12 ώρες (12 ώρες φως/12 ώρες σκοτάδι). Η τροφή παρέχονταν από ανοξείδωτους τροφοδότες από χαλύβδινο σύρμα, σε μορφή συμπύκτων, με συγκέντρωση πρωτεϊνών 20-27% και το νερό παρέχονταν από ποτίστρες/πλαστικές φιάλες, με μεταλλική απόληξη. Τέλος, το νερό και η τροφή παρέχονταν για κατά βούληση κατανάλωση.

3.10.2.ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΕ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΩΝ



Εικόνα 21:Χειρισμός πειραματοζώων

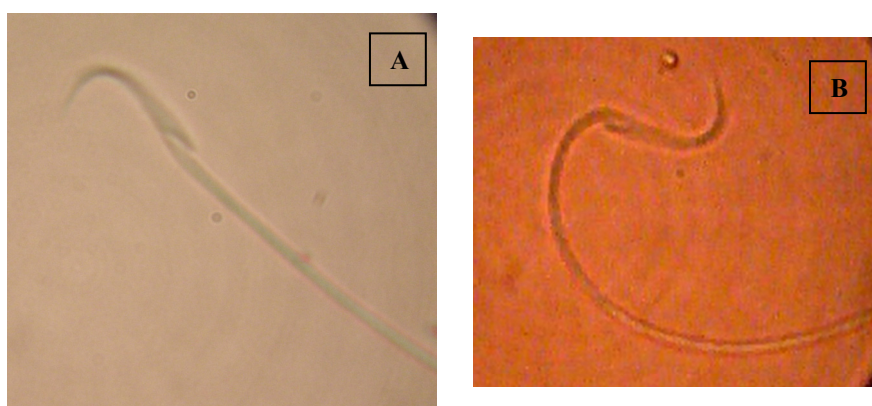
Αρσενικοί Wistar αρουραίοι (n=66) ηλικίας 8 εβδομάδων θυσιάστηκαν για την πραγματοποίηση in vivo πειραμάτων όπου χρησιμοποιήθηκαν αναστολείς της PDE5.



Εικόνα 22: Χώρος διατήρησης κλωβών πειραματοζώων

B1) Συγκεκριμένα, δέκα αρσενικοί Wistar αρουραίοι της ίδιας ηλικίας, αποτέλεσαν το group A (Cont) και χρησιμοποιήθηκαν σαν ομάδα ελέγχου. Επτά επιπρόσθετοι αρσενικοί Wistar αρουραίοι της ίδιας ηλικίας, αποτέλεσαν το group B. Επτά επιπρόσθετοι αρσενικοί Wistar αρουραίοι της ίδιας ηλικίας, αποτέλεσαν το group Γ. Οι αρουραίοι του group B καθώς και οι αρουραίοι του group Δ χρησίμευσαν ως μοντέλο πρωτοπαθούς ορχικής βλάβης μετά από ενδοκοιλιακή (IA) ένεση σισπλατίνης (6mg/kg), όπως έχει ήδη περιγραφεί από τον Bhat και τους συνεργάτες του [202]. Επιπρόσθετα, αρουραίοι του group E καθώς και οι αρουραίοι του group Z χρησίμευσαν ως μοντέλο πρωτοπαθούς ορχικής βλάβης μετά από ενδοφλέβια (IV) χορήγηση σισπλατίνης (6mg/kg) [202]. Από την ηλικία των 8 εβδομάδων μέχρι την ηλικία των 14 εβδομάδων, κάθε αρουραίος του group B και κάθε αρουραίος των group Γ και E, ελάμβανε στοματικό εναιώρημα σιλδεναφίλης καθημερινά για μια πλήρη σπερματογένεση. Συγκεκριμένα, το group B έλαβε ενδοκοιλιακά σισπλατίνη και στοματικό εναιώρημα σιλδεναφίλης (IA+Sild), το group Γ έλαβε μόνο σιλδεναφίλη (Sild) και το group E ενδοφλέβια σισπλατίνη και στοματικό εναιώρημα σιλδεναφίλης (IV+Sild). Η συγκέντρωση της σιλδεναφίλης που ελάμβανε καθημερινά κάθε αρουραίος του group B και κάθε αρουραίος του group Γ αλλά και group E, είναι 10 mg/kg διαλυμένο σε πόσιμο νερό και χορηγήθηκε με τεχνικές καθετηριασμού (gavage) όπως έχει περιγραφεί από τον Kutuk και τους συνεργάτες το 2012 [203]. Στην ηλικία των 18 εβδομάδων θυσιάστηκε κάθε αρουραίος των groups A, B, Γ, Δ, E

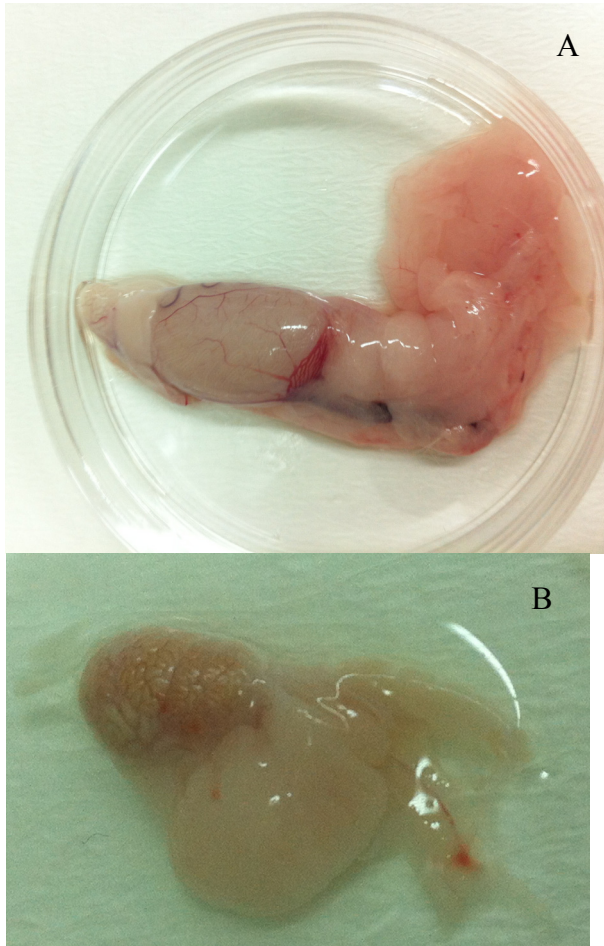
και Z. Οι αρουραίοι του group A καθώς και οι αρουραίοι του group Δ ελάμβαναν στάνταρ τροφή και νερό και χρησίμευαν ως control ομάδες. Στο τέλος της πειραματικής περιόδου, η γονιμοποιητική ικανότητα κάθε πειραματόζωου εκτιμήθηκε με πειράματα ζευγαρώματος (mating tests) με θηλυκούς αρουραίους. Κάθε αρσενικός αρουραίος από κάθε group είχε matings με δύο θηλυκούς αρουραίους ακολουθώντας τη μεθοδολογία που έχουμε ήδη περιγράψει [204]. Ένας αρσενικός αρουραίος θεωρήθηκε γόνιμος, εάν οι επαφές του με τους δυο θηλυκούς αρουραίους (εντός χρονικού διαστήματος 5 ημερών) κατέληγαν σε τουλάχιστον μια εγκυμοσύνη με τοκετό ενός τουλάχιστον ζωντανού υγιούς απογόνου.



Εικόνα 23: Σπερματοζώαριο αρουραίου (A,B)

Μετά το τέλος των mating tests, οι επιδιδυμίδες αλλά και σπερματοζώαρια συλλέχτηκαν από κάθε αρουραίο των groups A, B, Γ, Δ, E και Z από την αντίστοιχη ουρά επιδιδυμίδας με μεθόδους όπως έχουν ήδη περιγραφεί στο εργαστήριό μας [205]. Σε κάθε αρουραίο εκτιμήθηκε η κινητικότητα και ο αριθμός των επιδιδυμικών σπερματοζωαρίων. Επίσης, έγινε μέτρηση του βάρους των όρχων αλλά και καταμέτρηση των υγιών απογόνων που γεννήθηκαν. Επιπλέον, υπολογίστηκε ο δείκτης κατακερματισμού του DNA (DFI) μετρώντας την συμπύκνωση της χρωματίνης των σπερματοζωαρίων [SCSA][206]. Επιπρόσθετα, ένα τεμάχιο βάρους 500 mg από το δεξιό όρχι κάθε αρουραίου τοποθετήθηκε σε ίσο όγκο του Eagle's testicular tissue culture medium σε τρυβλίο. Όλα τα παραπάνω τρυβλία καλλιέργειας επωάστηκαν για 8 ώρες στους 34 °C κάτω από 5% CO₂. Στο τέλος της Περιόδου Επώασης μετρήθηκε η τεστοστερόνη, που εκκρίθηκε στο Eagle's testicular tissue culture medium σε όλα τα τρυβλία. Η μέτρηση τεστοστερόνης που εκκρίθηκε στο Eagle's testicular tissue culture medium πραγματοποιήθηκε όπως έχουμε ήδη περιγράψει [201]. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε και μια επιπλέον ομάδα, που περιείχε μόνο Eagle's testicular tissue

culture medium (negative control), στην οποία έγινε μέτρηση της τεστοστερόνης. Τέλος, έγινε ιστοπαθολογική ανάλυση των όρχεων, έτσι ώστε να εκτιμηθεί πιθανή διαταραχή στη σπερματογένεση.



Εικόνα 24:Όρχις αρουραίου (A) και ουρά της επιδιδυμίδας caudal(B)



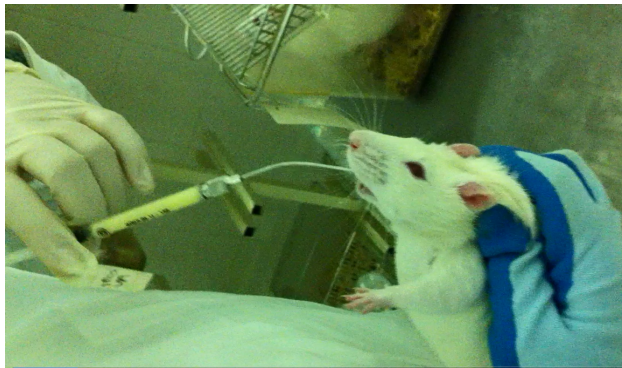
Εικόνα 25:Θυληκός αρουραίος μαζί με απογόνους



Εικόνα 26: Απόγονοι αρουραίων (A και B)

B2) Συγκεκριμένα δέκα αρσενικοί Wistar αρουραίοι της ίδιας ηλικίας αποτέλεσαν το group A, οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν σαν ομάδα ελέγχου. Επτά επιπρόσθετοι αρσενικοί Wistar αρουραίοι της ίδιας ηλικίας αποτέλεσαν το group B. Επτά επιπρόσθετοι αρσενικοί Wistar αρουραίοι της ίδιας ηλικίας αποτέλεσαν το group Γ. Οι αρουραίοι του group B (IA) καθώς και οι αρουραίοι του group Δ (IA) χρησίμευσαν ως μοντέλο πρωτοπαθούς ορχικής βλάβης μετά από ενδοκοιλιακή ένεση σισπλατίνης (6mg/kg) [202]. Επιπρόσθετα, αρουραίοι του group E (IV) καθώς και οι αρουραίοι του group Z (IV) χρησίμευσαν ως μοντέλο πρωτοπαθούς ορχικής βλάβης μετά από ενδοφλέβια ένεση σισπλατίνης (6mg/kg) [202]. Από την ηλικία των 8 εβδομάδων μέχρι την ηλικία των 12 εβδομάδων κάθε αρουραίος του group B και κάθε αρουραίος του group Γ και group E, ελάμβανε στοματικό εναιώρημα τανταλαφίλης καθημερινά. Συγκεκριμένα το group B έλαβε ενδοκοιλιακά σισπλατίνη και στοματικό εναιώρημα τανταλαφίλης (IA+Tad), το group Γ έλαβε μόνο τανταλαφίλη (Tad) και το group E ενδοφλέβια σισπλατίνη και στοματικό εναιώρημα τανταλαφίλης (IV+ Tad). Η συγκέντρωση της τανταλαφίλης, που ελάμβανε καθημερινά κάθε αρουραίος του group B και κάθε αρουραίος του group Γ, είναι 10 mg/kg διαλυμένο σε πόσιμο νερό και

χορηγήθηκε με τεχνικές καθετηριασμού (gavage) [203]. Στην ηλικία των 18 εβδομάδων θυσιάστηκε κάθε αρουραίος των groups A, B, Γ, Δ, E και Z. Οι αρουραίοι του group A καθώς και οι αρουραίοι του group Δ ελάμβαναν σάνταρ τροφή και νερό και χρησίμευαν ως control ομάδες. Στο τέλος της πειραματικής περιόδου, η γονιμοποιητική ικανότητα κάθε πειραματόζωου εκτιμήθηκε με πειράματα ζευγαρώματος (mating tests) με θηλυκούς αρουραίους. Κάθε αρσενικός αρουραίος από κάθε group είχε matings με δύο θηλυκούς αρουραίους ακολουθώντας τη μεθοδολογία που έχουμε ήδη περιγράψει [204]. Ένας αρσενικός αρουραίος θεωρήθηκε γόνιμος, εάν οι επαφές του με τους δυο θηλυκούς αρουραίους (εντός χρονικού διαστήματος 5 ημερών) κατέληγαν σε τουλάχιστον μια εγκυμοσύνη με τοκετό ενός τουλάχιστον ζωντανού υγιούς απογόνου.



Εικόνα 27: Gavage χορήγηση αναστολέων PDE5



Εικόνα 28: Ενδοκοιλιακή χορήγηση σισπλατίνης(IA) [207]

Μετά το τέλος των mating tests οι επιδιδυμίδες αλλά και σπερματοζωάρια συλλέχτηκαν από κάθε αρουραίο των groups A, B, Γ και Δ από την αντίστοιχη ουρά επιδιδυμίδας με μεθόδους όπως έχουν ήδη περιγραφεί στο εργαστήριο μας [205]. Σε κάθε αρουραίο εκτιμήθηκε η κινητικότητα και ο αριθμός των επιδιδυμικών σπερματοζωαρίων. Επίσης έγινε μέτρηση του βάρους των όρχων αλλά και καταμέτρηση των υγιών απογόνων που γεννήθηκαν. Επίσης υπολογίστηκε ο δείκτης κατακερματισμού του DNA (DFI), μετρώντας την συμπύκνωση της χρωματίνης των σπερματοζωαρίων [SCSA] [206]. Επιπρόσθετα, ένα τεμάχιο βάρους 500 mg από το δεξιό όρχι κάθε αρουραίου τοποθετήθηκε σε ίσο όγκο του Eagle's testicular tissue culture medium σε τρυβλίο. Όλα τα παραπάνω τρυβλία καλλιέργειας επώαστηκαν για 8 ώρες στους 34 °C κάτω από 5% CO₂. Στο τέλος της Περιόδου Επώασης, μετρήθηκε η τεστοστερόνη που εκκρίθηκε στο Eagle's testicular tissue culture medium σε όλα τα τρυβλία. Η μέτρηση τεστοστερόνης, που εκκρίθηκε στο Eagle's testicular tissue culture medium, πραγματοποιήθηκε όπως έχουμε ήδη περιγράψει [201]. Επίσης χρησιμοποιήθηκε και μια επιπλέον ομάδα, που περιείχε μόνο Eagle's testicular tissue culture medium (negative control), στην οποία έγινε μέτρηση της τεστοστερόνης. Τέλος, έγινε ιστοπαθολογική ανάλυση των όρχεων, έτσι ώστε να εκτιμηθεί πιθανή διαταραχή στη σπερματογένεση.

Η σισπλατίνη, cisplatinum ή cis- diamminedichloridoplatinum (II) (CDDP) είναι ένα σύμπλοκο μετάλλου με βάση την πλατίνα, το οποίο χρησιμοποιείται ως χημικοθεραπευτικό διαφόρων τύπων καρκίνου, συμπεριλαμβανομένων των σαρκωμάτων, μερικών καρκινωμάτων (π.χ. μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα, και του καρκίνου των ωοθηκών), λεμφωμάτων και των όγκων των γεννητικών κυττάρων. Η σισπλατίνη συντέθηκε για πρώτη φορά, το 1844, από τον Michele Peyrone [208]. Ήταν το πρώτο μέλος της κατηγορίας του, η οποία τώρα περιλαμβάνει επίσης την καρβοπλατίνη και την οξαλιπλατίνη. Μετά τη χορήγηση, η σισπλατίνη ενυδατώνεται για να σχηματιστούν $[Pt(NH_3)_2Cl(OH_2)]^+$ και $[[Pt(NH_3)_2(OH_2)_2]^{2+}$. Η σισπλατίνη προσδένεται στο DNA με διάφορους τρόπους μέσω διασταυρούμενων συνδέσεων, παρεμβαίνοντας στην κυτταρική διαίρεση με μίτωση. Το κατεστραμμένο DNA επάγει μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA, οι οποίοι με τη σειρά τους ενεργοποιούν την απόπτωση. Η σισπλατίνη έχει μια σειρά από παρενέργειες, που μπορούν να περιορίσουν τη χρήση του, όπως νεφροτοξικότητα, νευροτοξικότητα, ναυτία και έμετο, ωτοτοξικότητα, αλωπεκία και ηλεκτρολυτικές διαταραχές [209].

Η χορήγηση της σισπλατίνης, ως χημικοθεραπευτικό σκεύασμα, είναι γνωστή σε άνδρες με όγκο στους όρχεις. Επίσης η χορήγηση της σισπλατίνης συχνά οδηγεί σε μειωμένη σπερματογένεση αλλά και την μη φυσιολογική λειτουργία των κυττάρων Leydig. Παρόμοια ευρήματα έχουν επίσης αναφερθεί σε πειραματικές μελέτες με ζώα. Παρόλα αυτά, η παραγωγή των σπερματοζωαρίων έχει παρατηρηθεί να επανέρχεται στα φυσιολογικά επίπεδα σε 50 με 60% των ανδρών, που έλαβαν θεραπεία με σισπλατίνη μεταξύ 1 και 3 ετών μετά την διακοπή της θεραπείας. (MSD σισπλατίνη USP ένεση) [210].

3.11.ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

3.11.1.ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΣΙΛΔΕΝΑΦΙΛΗΣ Ή ΤΑΝΤΑΛΑΦΙΛΗΣ ΑΠΟ ΤΟ ΣΤΟΜΑ (GAVAGE)

Έγινε χρήση ειδικής κυρτής βελόνας FNC-18-2,18Gauge, 1,9 ίντσες (5 εκατοστά) μήκος, 2,4 χιλιοστά άκρη (kent scientific corporation), για τη χορήγηση τανταλαφίλης ή σιλденаφίλης σε αρουραίους. Η βελόνα αυτή είναι συναρμολογούμενη με μια ανοξείδωτη χαλύβδινη μπάλα στην άκρη κάθε σωλήνα, εξασφαλίζοντας μια δοσομετρητή χορήγηση ουσιών χωρίς τραυματισμό, σε ευαίσθητους ιστούς της τραχείας. Δισκία 20 mg τανταλαφίλης και 101 mg σιλденаφίλης κόπηκαν και διαλύθηκαν σε πόσιμο νερό για να δώσουν μία συγκέντρωση 1 mg / ml τανταλαφίλης ή σιλденаφίλης. Στα πειραματόζωα της μελέτης αυτής χορηγήθηκαν 10 mg/kg τανταλαφίλης ή σιλденаφίλης, με καθετήρα ημερησίως για 6 εβδομάδες, ενώ ίδιο όγκο πόσιμο νερού χορηγήθηκε με καθετήρα στις ομάδες ελέγχου.

3.11.2.ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΤΗΣ ΠΛΑΤΙΝΑΣ

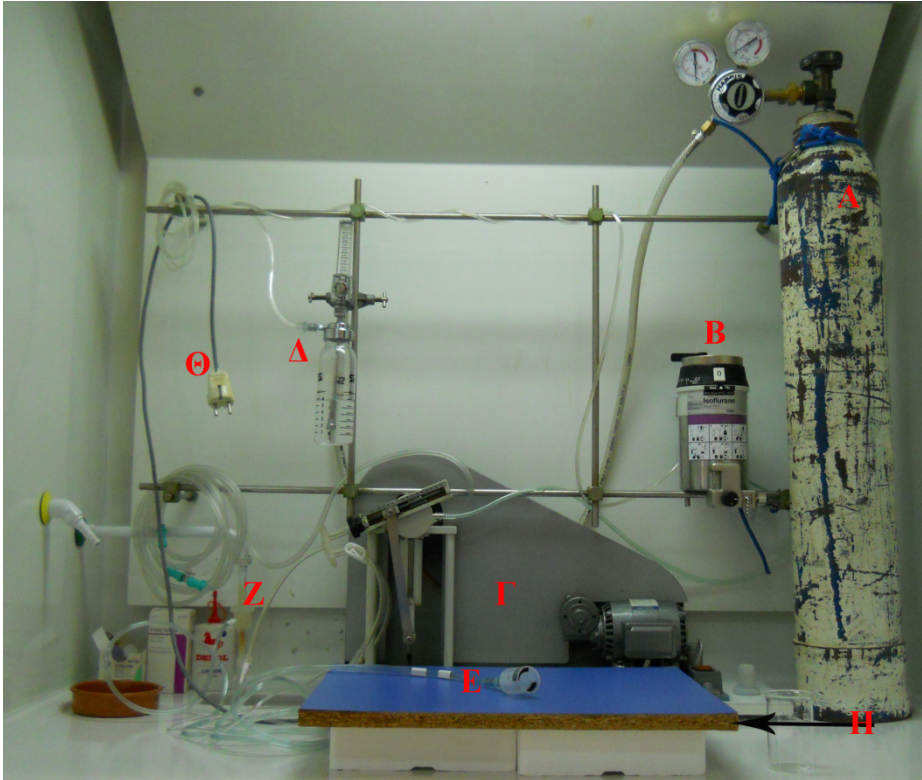
Έγινε χορήγηση 6mg cisplatin προστατευμένο από το φως και αραιωμένο σε αλατούχο διάλυμα 0,9%, εφάπαξ κατά την 8η εβδομάδα των πειραματόζωων. [210]

3.11.3.ΕΝΔΟΚΟΙΛΙΑΚΗ ΧΟΡΗΣΗ ΤΗΣ ΣΙΣΠΛΑΤΙΝΗΣ

Η ενδοκοιλιακή χορήγηση σισπλατίνης έγινε εφάπαξ την 8η εβδομάδα των πειραματόζων. Χρησιμοποιήθηκαν σύριγγες 1ml ινσουλίνης και βελόνες 25 ή 27 g, έτσι ώστε να αποφευχθεί η υπερβολική δόση φαρμάκου. Συγκεκριμένα, η βελόνα τοποθετήθηκε υπό γωνία περίπου 30° , ελαφρώς προς τα δεξιά της μέσης γραμμής , περίπου το ένα τρίτο έως το ήμισυ ανάμεσα στα πίσω πόδια και στο τέλος του θώρακα. Το έμβολο σύρεται ήπια προς τα πίσω πριν από την ένεση, για να εξασφαλιστεί ότι η βελόνα δεν έχει εισέλθει κατά λάθος σε αγγείο ή σε κοιλιακό όργανο. Εάν αίμα, ούρα ή άλλο υλικό εισέρχεται στην σύριγγα, όταν το έμβολο έλκεται προς τα πίσω, τότε η βελόνα πρέπει να ανακληθεί και η σύριγγα, η βελόνα και το περιεχόμενο απορρίπτονται. Τότε η ένεση πρέπει να γίνει και πάλι με μια νέα βελόνα και σύριγγα. [207]

3.11.4.ΕΝΔΟΦΛΕΒΙΑ ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΤΗΣ ΣΙΣΠΛΑΤΙΝΗΣ

Στην Εικόνα 36 παρουσιάζεται η πειραματική διάταξη, προκειμένου να διατηρηθούν οι επίμυες σε κατάσταση αναισθησίας κατά την διάρκεια της ενδοφλέβιας έγχυσης της σισπλατίνης. Στα βασικά μέρη της αποτελείται από μια αναπνευστική συσκευή μηχανικού αερισμού συνεχών θετικών πιέσεων, ένα ειδικό δοχείο αποθήκευσης του πτητικού αναισθητικού ισοφλουρανίου, μια φιάλη οξυγόνου και μία ειδική κατασκευασμένη προσωπίδα για την παροχή εισπνεόμενης αναισθησίας στους επίμυες.



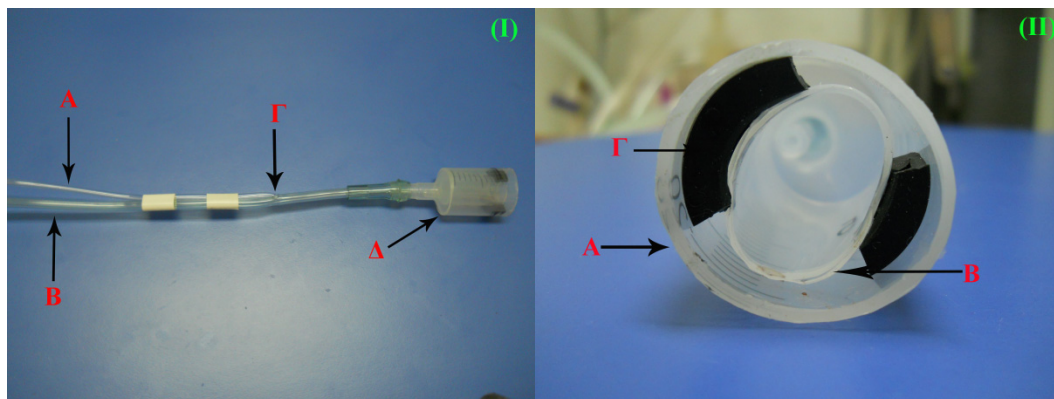
Εικόνα 29: Η διάταξη έχει σχηματιστεί μέσα σε απαγωγό, ώστε να εξαληφθεί οποιαδήποτε πιθανότητα διαρροής του ισοφλουρανίου. Α) Φιάλη οξυγόνου, Β) Δοχείο ισοφλουρανίου, Γ) αναπνευστική συσκευή μηχανικού αερισμού συνεχών θετικών πιέσεων Δ) Ρυθμιστής ροής οξυγόνου, Ε) Προσωπίδα παροχής αναισθησίας, Ζ) αρνητικής πίεσης σωλήνας συνδεδεμένος στη βρύση του απαγωγού, που ενώνεται με τον έναν από τους δύο σωλήνες της προσωπίδας, Η) επιφάνεια εργασίας, Θ) Πρίζα τροφοδοσίας ηλεκτρικού ρεύματος της συσκευής μηχανικού αερισμού.

3.11.5.ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΠΡΟΣΩΠΙΑΣ

Η χρήση προσωπίδας προτιμήθηκε για την παροχή εισπνεόμενου αναισθητικού και τη διατήρηση της κατάστασης της αναισθησίας στους επίμυες Wistar, μιας και παρείχε το πλεονέκτημα της άμεσης, εύκολης και ακίνδυνης χρήσης της έναντι, για παράδειγμα, της στοματοτραχειακής διασωλήνωσης.

Η προσωπίδα κατασκευάστηκε από φθηνά υλικά και αποτελείται ουσιαστικά από ένα μικρότερο πλαστικό, εύκαμπτο σωλήνα μέσα σε ένα μεγαλύτερο, πλαστικό και εύκαμπτο σωλήνα, όπου ο μικρότερος είναι συνδεδεμένος με τον εξαερωτήρα της αναισθητικής μηχανής και ο μεγαλύτερος με το σωλήνα απαγωγής. Στην άκρη των

σωλήνων αυτών είναι συνδεδεμένα τεμάχια από σύριγγες (η μικρότερη σύριγγα στο μικρό (εσωτερικό σωλήνα) και η μεγάλη στον εξωτερικό, οι οποίες σχηματίζουν την προσωπίδα. Το πρόσωπο του επίμοος εφαρμόζει στην μικρή και εσωτερική παροχή, ενώ η μεγάλη καλύπτει ένα ευρύτερο μέρος του προσώπου του. Έτσι οποιαδήποτε ποσότητα ισοφλουρανίου διαρρέυσει από την εσωτερική παροχή, θα απαχθεί από το μεγαλύτερο σωλήνα αναρρόφησης. Οι Balafas και συνεργάτες δίνουν μια αναλυτικότερη περιγραφή της κατασκευής της μάσκας στη δημοσίευσή τους το 2011 [211].



Εικόνα 30: Διάφορες απόψεις της προσωπίδας. (I) A) σωλήνας παροχής αναισθησίας, B) σωλήνας αναρρόφησης, Γ) Σημείο εισόδου του σωλήνα παροχής αναισθησίας στο σωλήνα αναρρόφησης, Δ) προσωπίδα. (II) A) Μεγάλη σύριγγα συνδέεται με το σωλήνα απαγωγής, B) μικρή σύριγγα συνδέεται με το σωλήνα παροχής της αναισθησίας, Γ) τμήματα από το πλαστικό έμβολο της σύριγγας, τα οποία είναι τοποθετημένα στο κενό διάστημα μεταξύ των τοιχωμάτων των δύο συριγγών στο οποίο πραγματοποιείται η απαγωγή του περίσσιου όγκου του πτητικού αναισθητικού.



Εικόνα 31: Αναισθησία πειραματόζωων



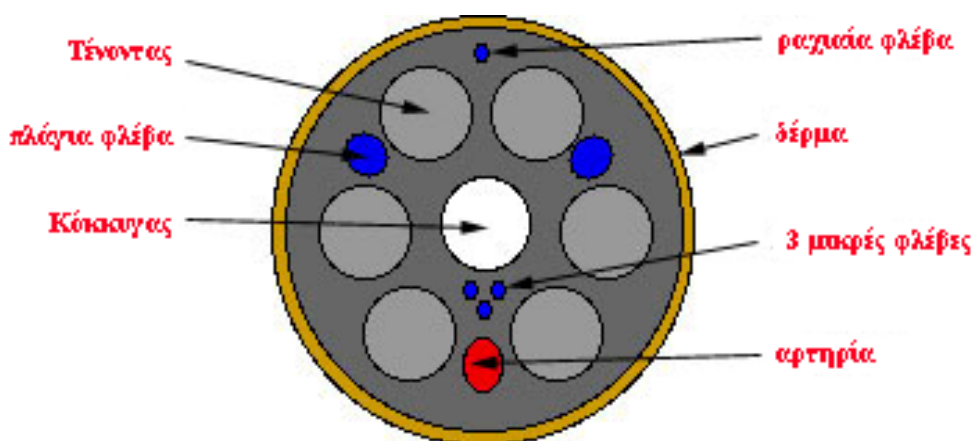
Εικόνα 32: Ενδοφλέβια χορήγηση σισπλατίνης (IV) από την ουρά (A και B)

Με την βοήθεια τεχνικής προς ακινητοποίηση του πειραματόζωου, πραγματοποιήθηκε η εφαρμογή της προσωπίδας στο πρόσωπο του, μέσω της οποίας χορηγήθηκε η πτητική αναισθησία. Ο όγκος χορήγησης ρυθμίστηκε στα 10ml/θετική πίεση. Επιπλέον, στον ατμοσφαιρικό αέρα είχε προστεθεί οξυγόνο 101% με ρυθμό παροχής 0.3 ml/λεπτό, ενώ το ισοφλουράνιο παρέχονταν στο μίγμα σε αναλογία 3.5-4% v/v. Μόλις αναισθητοποιήθηκε (~15-30sec), έγινε απολύμανση της περιοχής της ουράς με αιθανόλη 70% και σκουπίστηκε με γάζα.

Με την βοήθεια ενός ράμματος και μιας λαβίδας mosquito, πραγματοποιήθηκε περίσφιξη της βάσης της ουράς, προκειμένου να διαταθούν τα ουριαία αγγεία και έτσι να διευκολυνθεί η είσοδος του φλεβοκαθετήρα. Έπειτα, με ένα φλεβοκαθετήρα 24G, πραγματοποιήθηκε καθετηριασμός της πλάγιας κοκκυγικής φλέβας. Η είσοδος της βελόνας έγινε σχεδόν παράλληλα με το αγγείο, μειώνοντας έτσι τις πιθανότητες να περάσουμε κάτω από αυτό. Μόλις εισήλθαμε στη φλέβα, αφαιρέσαμε τη βελόνα και αίμα εισήλθε στο μπεκ του καθετήρα (ένδειξη ότι είμαστε μέσα στη φλέβα) και παράλληλα εισαγάγαμε βαθύτερα τον καθετήρα στη φλέβα, όπου η διαδικασία αυτή

γίνεται με άνεση εάν ο καθετηριασμός είναι επιτυχής. Αμέσως απελευθερώσαμε την βάση της ουράς από το ράμμα που την έσφιγγε, απελευθερώνοντας το από την λαβίδα mosquito. Εν συνεχεία, σηκώσαμε την ουρά με τον καθετήρα προς τα πάνω και στο μπεκ του καθετήρα στάξαμε πολύ προσεκτικά 1-2 σταγόνες από το κατάλληλο διάλυμα cisplatin, ώστε να αφαιρέσουμε τον αέρα. Ακολούθως προσαρμόσαμε τη σύριγγα του 1ml που περιείχε το δείγμα προς χορήγηση στο μπεκ του καθετήρα και αρχίσαμε την έγχυση. Ο ρυθμός έγχυσης δεν ξεπέρασε τα 0.5ml/min. Έγινε χορήγηση 6mg cisplatin προστατευμένο από το φως και αραιωμένο σε αλατούχο διάλυμα 0,9%, ενδοφλέβια εφάπαξ κατά την 8η εβδομάδα των πειραματόζωων. [210]

Με το τέλος της χορήγησης 6mg φαρμάκου, αφαιρέσαμε την άδεια σύριγγα και με μια γάζα κρατήσαμε την ουρά και τον καθετήρα στο σημείο εισόδου του καθετήρα στη φλέβα. Έπειτα, πιέζοντας ελαφρά το σημείο αυτό, αφαιρέσαμε τον καθετήρα και αμέσως αφαιρέσαμε και την προσωπίδα της αναισθησίας από το πειραματόζωο. Η επαναφορά των αισθήσεων του πειραματόζωου ήταν σχετικά άμεση με χρόνους περίπου 1-3min.



Εικόνα 33: Εγκάρσια τομή της ουράς επίμοσ Wistar. Ο καθετηριασμός πραγματοποιήθηκε στην μία από τις δύο πλάγιες φλέβες (μεγάλοι μπλε κύκλοι).

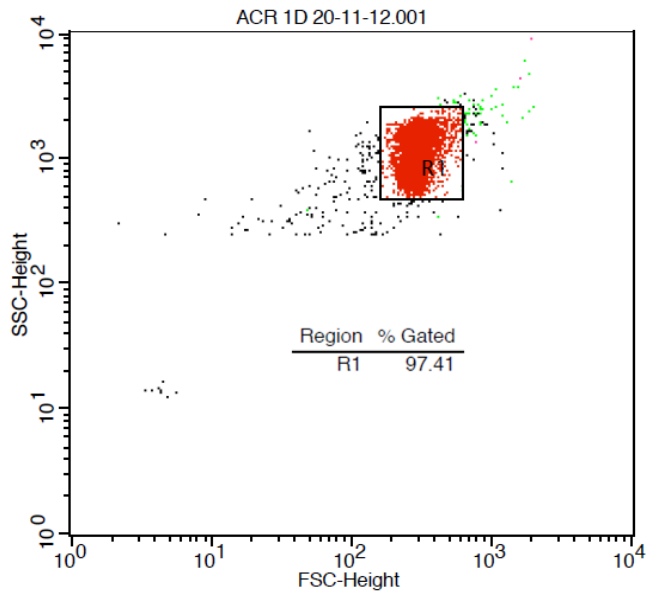
3.11.6.ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΟΥ ΑΡΙΘΜΟΥ ΚΑΙ ΤΗΣ ΚΙΝΗΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΩΝ

Μετά το πέρας της 18ης εβδομάδας τα πειραματόζωα θυσιάστηκαν μέσω εισπνοής αιθέρα, σε γυάλινο κώδωνα αναισθητοποίησης. Έπειτα, έγινε αφαίρεση του όρχεως και αφαίρεση της ουράς (cauda) της επιδιδυμίδας από όλους τους αρουραίους

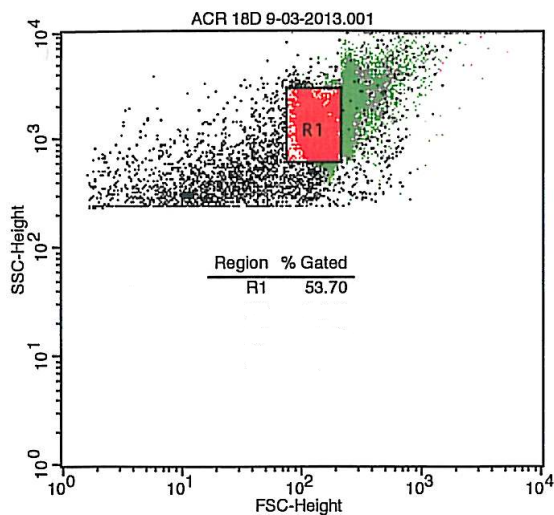
και έγιναν πλύσεις σε αλατούχο διάλυμα για να απελευθερωθούν τα σπερματοζώαρια και να γίνει μέτρηση του αριθμού και εκτίμηση της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων με βάση τις οδηγίες της WHO [20].

3.11.7.ΜΕΤΡΗΣΗ ΣΥΜΠΗΚΝΩΣΗΣ ΤΗΣ ΧΡΩΜΑΤΙΝΗΣ ΚΑΙ DFI

Έπειτα, έγινε η τεχνική swim up, δηλαδή έγινε υπό κλίση επώαση των σπερματοζωαρίων σε Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) για να απομονωθούν μόνο τα κινητά σπερματοζώαρια. Χρησιμοποιώντας χρώση AO σπερματοζωαρίων και κυτταρομετρία ροής, ελέγξαμε την ανώμαλη συμύκνωση της χρωματίνης των σπερματοζωαρίων. Συγκεκριμένα, περίπου δύο εκατομμύρια σπερματοζώαρια από την ουρά της επιδιδυμίδας αναμείχθηκαν με 200μL ρυθμισμένο με φωσφορικό αλατούχο PBS (PH 7.4) και υποβλήθηκαν σε in vitro μετουσίωση με επώαση σε 0.4 ml κρύο ρυθμιστικό λυτικό διάλυμα (0.1% Triton-X, 0,08 mol / L HCl, 0,15 mol / L NaCl) για 30 s και έγινε χρώση για 3 λεπτά με 1,2 mL κρύας πορτοκαλόχρωμης ακριδίνης (AO) (συγκέντρωσης απόθεμα 6 μg / ml), που παρασκευάστηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει 0,15 mol / L NaCl, 0,2 mol / L Na₂HPO₄ 4,1 mmol / L EDTA και 0,1 mol / L κιτρικού οξέος. Τα επεξεργασμένα δείγματα σπέρματος εξετάστηκαν χρησιμοποιώντας κυτταρόμετρο ροής FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). Υπάρχει πράσινος φθορισμός (BP 530/30 φίλτρο) και κόκκινος φθορισμός (BP 650LP φίλτρο) στο μηχάνημα και έγιναν 30000 μετρήσεις / δείγματος μετά από διέγερση με 488 nm argon laser. Το Consort 40 (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των δεδομένων [188-190]. Στα αντίστοιχα μήκη κύματος, η AO προσδένεται με τη διπλή έλικα του DNA και εκπέμπει φθορισμό.[212]



Εικόνα 34: % σπερματοζωαρίων με πλήρη συμύκνωση της χρωματίνης σε control δείγματα



Εικόνα 35: % σπερματοζωαρίων με πλήρη συμύκνωση της χρωματίνης σε πειραματόζωα που έλαβαν σιλδεναφίλη και σισπλατίνη ενδοκοιλιακά

3.11.8.ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Μετά το πέρας της 18ης εβδομάδας, τα πειραματόζωα θυσιάστηκαν μέσω εισπνοής αιθέρα, σε γυάλινο κώδωνα αναισθητοποίησης. Έπειτα, έγινε αφαίρεση των όρχεων και ξεπλύθηκαν σε παγωμένο φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα (PBS) και εμβαπτίστηκαν σε αποστειρωμένα δοχεία (ουροδοχεία), που περιείχαν Bouin Fixation

10% και τοποθετήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να μονιμοποιηθούν. Οι τομές αυτές, αφού υποβλήθηκαν στις χρώσεις αιματοξυλίνης και ηωσίνης, παρατηρήθηκαν σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, για την εξαγωγή πιθανών ιστοπαθολογικών βλαβών. [213]

Για την παρασκευή του Bouin Fixation (BF), 1,0 g ένυδρου πικρικό οξύ κρυστάλλων, 24 ml διαλύματος φορμαλδεΐδης 37% (9% φορμαλδεΐδη) και 4.76 ml οξικού οξέος (0.833 M) προστέθηκε σε 70 ml απιονισμένο νερό, για να δημιουργηθεί συνολικός όγκος των 100 ml. [214]

3.12.ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

3.12.1.IN VITRO ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ

Η στατιστική ανάλυση του % των κινητών σπερματοζωαρίων(MS%), των σπερματοζωαρίων που ανταποκρίθηκαν στο υποοσμωτικό τεστ HOST, % των σπερματοζωαρίων με συμπύκνωση της χρωματίνης, % των σπερματοζωαρίων με δείκτη κατακερματισμού του DNA (DFI) και η μέση τιμή της τεστοστερόνης, που εκκρίθηκε στο θρεπτικό υλικό των αποτελεσμάτων, έγινε με τη δοκιμασία Wilcoxon paired test και επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας μικρότερο ή ίσο του 5% ($p \leq 0,05$). Επίσης, η στατιστική ανάλυση διεξήχθη για να αξιολογήσει τις διαφορές (μεταξύ των C-και-Exp υποπολλαπλάσια) στις μέσες τιμές των ποσοτικών χαρακτηριστικών, όπως (i) η μέση ταχύτητα της ελικοειδούς πορείας $\mu\text{m}/\text{sec}$ (curvilinear velocity-VCL), (ii) η μέση ταχύτητα της ευθύγραμμης κίνησης $\mu\text{m}/\text{sec}$ (straight line velocity -VSL), (iii) η μέση προωθητική ταχύτητα (average path velocity-VAP), (iv) εύρος της πλευρικής μετατόπισης της κεφαλής, δηλαδή το πλάτος της ταλάντωσης της κεφαλής, μm (amplitude of lateral head displacement- ALH), (v) συχνότητα χτύπου της κεφαλής των σπερματοζωαρίων που διασχίζει κατά μέσο όρο το σπερματοζωάριο σε οποιαδήποτε κατεύθυνση, Hz. (BCF), (vi) ευθεία πορεία, η αναχώρηση από την πορεία των κυττάρων σε μια ευθεία γραμμή,%. (STR), (vii) γραμμικότητα, βαθμός ευθύτητας της γραμμής της διαδρομής των κυττάρων,% (LIN). Οι ομάδες δεν έδειξαν ισοδύναμη διακύμανση σε μία παράμετρο, έτσι κατά ζεύγη συγκρίσεις έγιναν με Mann-Whitney U-test. Όλες οι στατιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με το στατιστικό πακέτο SPSS 19.0 (SPSS Inc. Chicago, Illinois, USA).

3.12.2.IN VIVO ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ

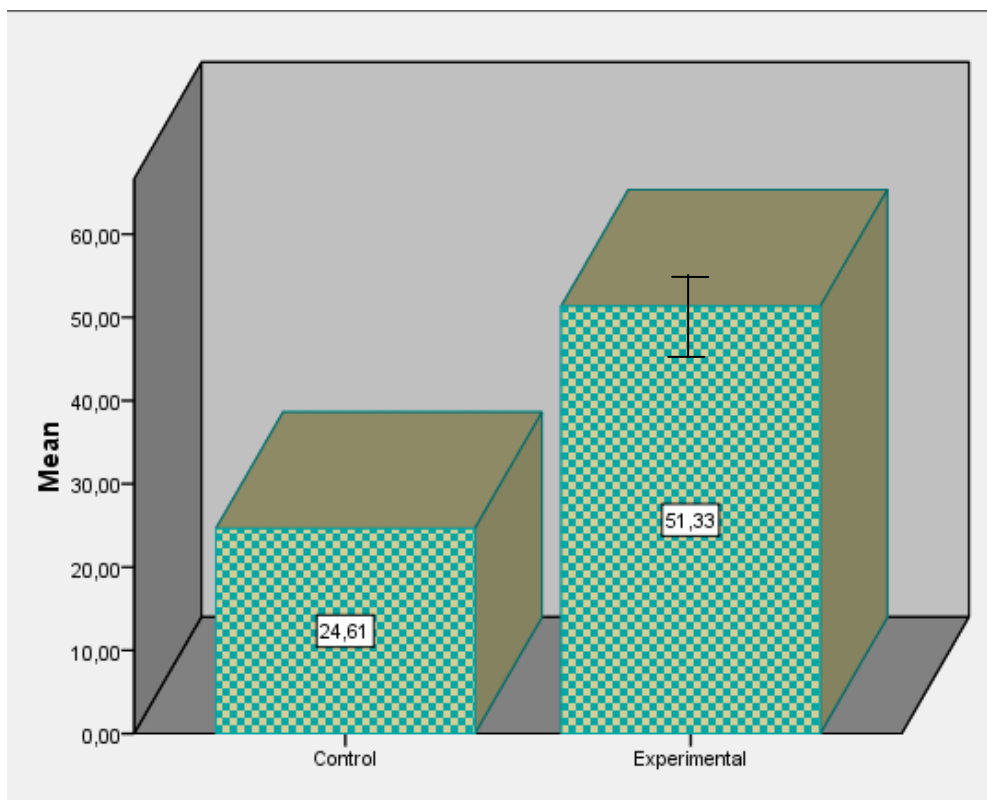
Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με τη δοκιμασία Anova one way, ακολουθούμενη από Tukey alpha (0.05) τεστ πολλαπλής σύγκρισης και επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας μικρότερο ή ίσο του 5% ($p \leq 0,05$). Όλες οι στατιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με το στατιστικό πακέτο SPSS 19.0 (SPSS Inc. Chicago, Illinois, USA).

4.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1.IN VITRO ΜΕΛΕΤΕΣ

Η ομάδα A1 αναφέρεται στις επιπτώσεις της τανταλαφίλης στα σπερματοζώαρια, σε συγκεντρώσεις υψηλότερες από τα επίπεδα ορού της τανταλαφίλης, που παρατηρείται μετά την κατανάλωση των 20mg τανταλαφίλης. Δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές ($P > 0,05$) στην μέση τιμή της% MS και στο αποτέλεσμα της υποοσμωτικής δοκιμασίας μεταξύ Expr-δείγματος και C-δείγματος, μέσα στην ομάδα A1. Επιπλέον, το ποσοστό των σπερματοζωαρίων με πλήρη συμπύκνωση της χρωματίνης του πυρήνα ήταν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερο στα C-δείγματα από ότι στα Expr-δείγματα. Από την άλλη πλευρά, το DFI ήταν στατιστικά σημαντικά μικρότερο στους C- δείγματα από ότι στους Expr-δείγματα.

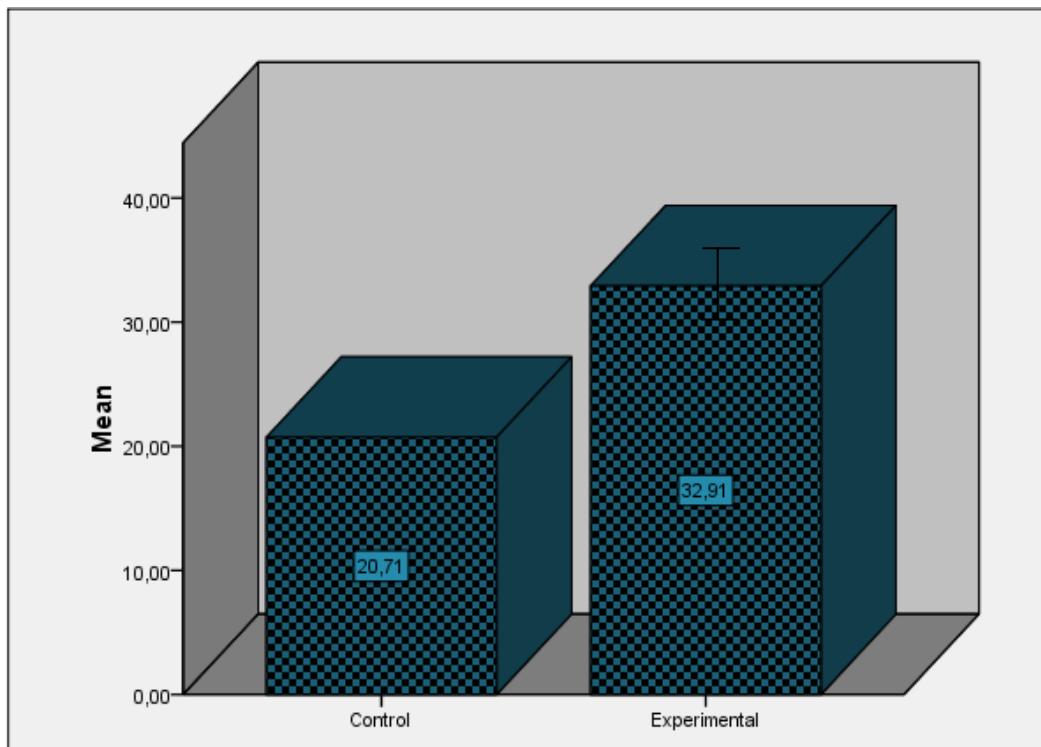
Εικόνα 36:Ιστόγραμμα επίδρασης 1mg τανταλαφίλης στο DFI

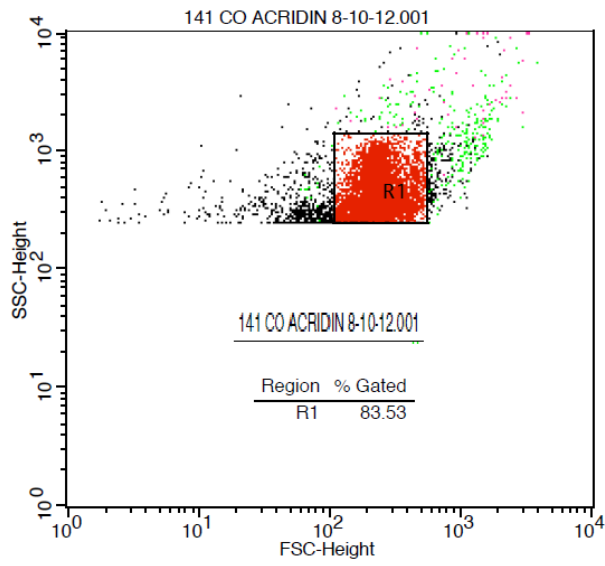


Η ομάδα A2 αναφέρεται στις επιπτώσεις της τανταλαφίλης στα σπερματοζώαρια, σε συγκεντρώσεις ίσες με τα επίπεδα ορού της τανταλαφίλης, που παρατηρούνται μετά την κατανάλωση των 20mg τανταλαφίλης.

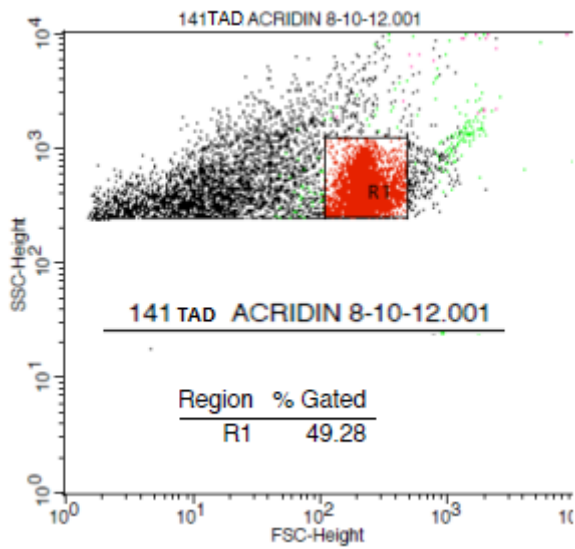
Δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές ($P > 0,05$) στην μέση τιμή της MS% και το αποτέλεσμα του υποοσμωτικού τεστ μεταξύ Expr-δειγμάτων και C- δειγμάτων, στην ομάδα A2. Επιπλέον, το ποσοστό των σπερματοζωαρίων με πλήρη συμπύκνωση της χρωματίνης του πυρήνα των σπερματοζωαρίων ήταν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερο στα C-δείγματα από ότι στα Expr-δείγματα. Αντιθέτως, το DFI ήταν σημαντικά μικρότερο σε C-δείγματα από ό, τι στα Expr- δείγματα.

Εικόνα 37: Ιστόγραμμα επίδρασης 378 $\mu\text{g/L}$ τανταλαφίλης στο DFI



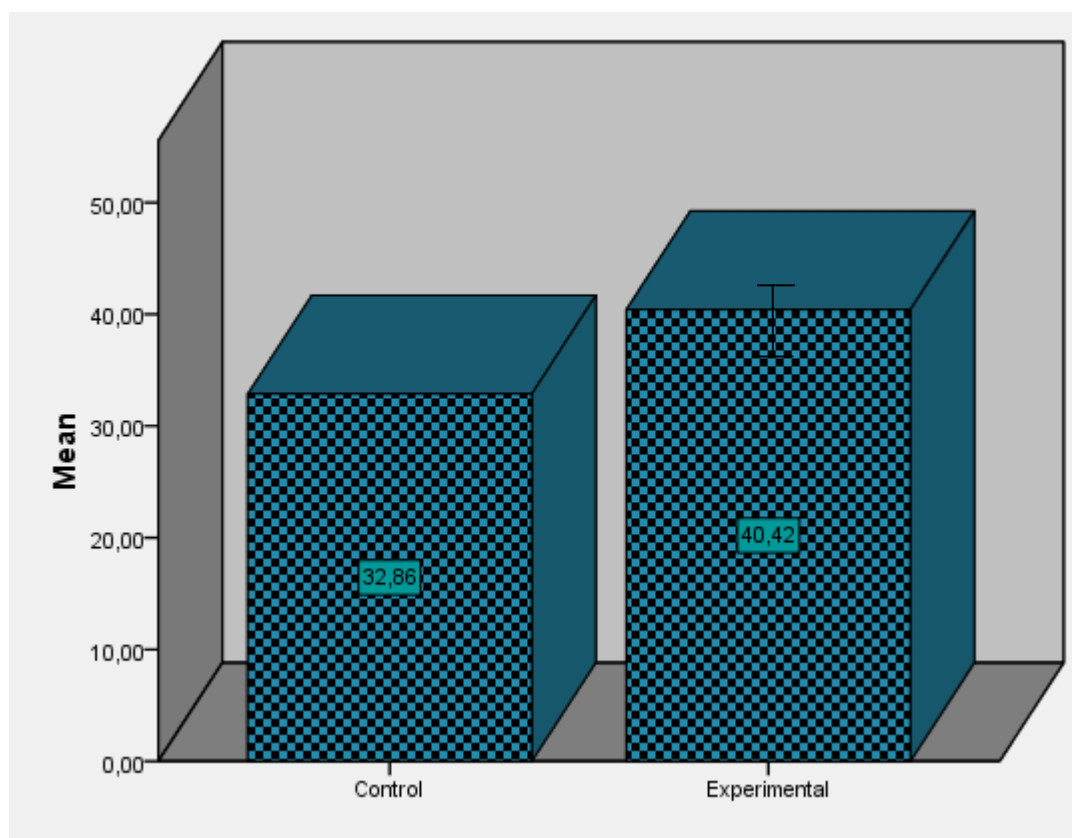


Εικόνα 38: % σπερματοζωαρίων με πλήρη συμπίκνωση της χρωματίνης σε control δείγματα



Εικόνα 39: % σπερματοζωαρίων με πλήρη συμπίκνωση της χρωματίνης σε δείγματα με 1mg τανταλαφίλης

Εικόνα 40: Ιστόγραμμα επίδρασης 1mg σιλδεναφίλης στο DFI



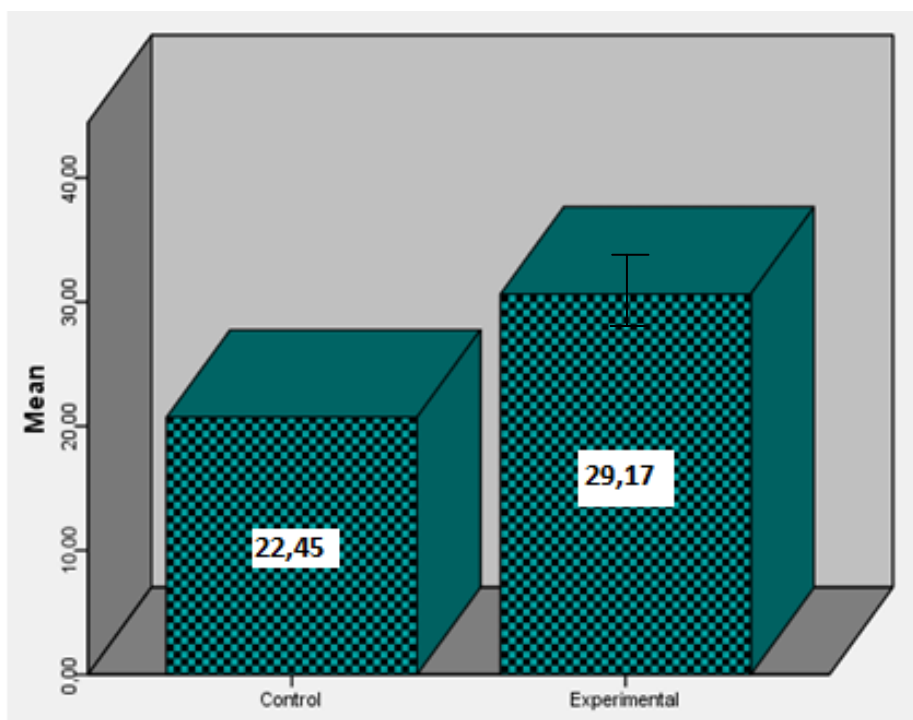
Πίνακας 2. In vitro επίδραση της τανταλαφίλης στη χρωματίνη των σπερματοζωαρίων

	378μg/L		1mg/ml	
	Experimental δείγματα	C-δείγματα	Experimental δείγματα	C-δείγματα
DFI%	32.91±13.96 ^a	20.71±10.77 ^b	51.33±29.82 ^a	24.61±15.38 ^b
% Συμπύκνωσης της χρωματίνης	68.03±14.89 ^a	80.29±10.77 ^b	48.67±29.82 ^a	75.39±15.38 ^b
%MS	38.30±24.57	40.30±22.08	25.36±20.81	26.85±25.13
%HOST	56.17±19.65	58.30±16.42	42.79±17.10	45.39±19.82

Η ομάδα B1 αναφέρεται στις επιπτώσεις της σιλδεναφίλης στα σπερματοζωάρια σε συγκεντρώσεις υψηλότερες από τα επίπεδα ορού της σιλδεναφίλης, που παρατηρείται μετά την κατανάλωση των 100mg σιλδεναφίλης. Δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές ($P > 0,05$) στην μέση τιμή της % MS και στο αποτέλεσμα της υποωσμωτικής

δοκιμασίας μεταξύ Expr-δειγμάτων και C-δειγμάτων, μέσα στην ομάδα B1. Επιπλέον, το ποσοστό των σπερματοζωαρίων με πλήρη συμπύκνωση της χρωματίνης του πυρήνα ήταν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερο στα C-δείγματα από ότι στα Expr-δείγματα. Από την άλλη πλευρά, το DFI ήταν στατιστικά σημαντικά μικρότερο στα C-δείγματα από ότι στα Expr-δείγματα.

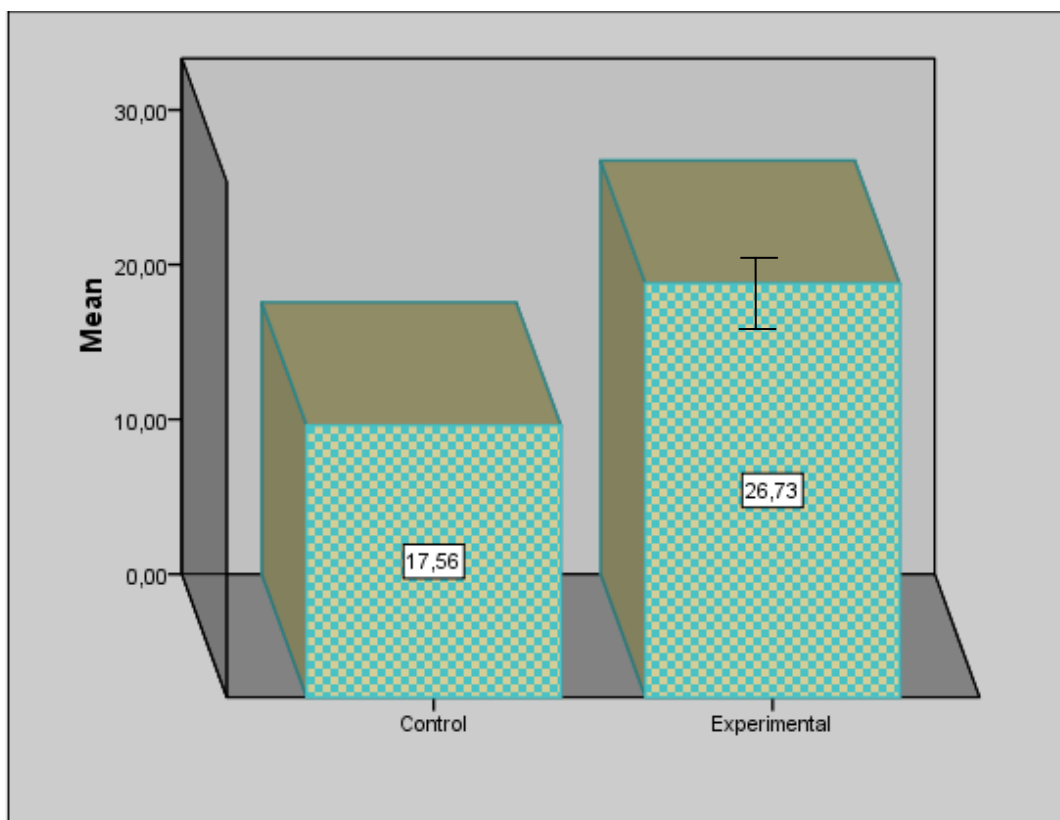
Εικόνα 41: Ιστόγραμμα επίδρασης 450 ng/mL σιλδεναφίλης στο DFI



Η ομάδα B2 αναφέρεται στις επιπτώσεις της σιλδεναφίλης στα σπερματοζώαρια σε συγκεντρώσεις ίσες με τα επίπεδα ορού της σιλδεναφίλης, που παρατηρούνται μετά την κατανάλωση των 100mg σιλδεναφίλης. Δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές ($P > 0,05$) στην μέση τιμή του % MS και στο αποτέλεσμα της υποωσμωτικής δοκιμασίας μεταξύ Expr-δειγμάτων και C-δειγμάτων, μέσα στην ομάδα B2. Επιπλέον, το ποσοστό των σπερματοζωαρίων με πλήρη συμπύκνωση της χρωματίνης του πυρήνα ήταν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερο στα C-δείγματα από ότι στα Expr-δείγματα. Από την άλλη πλευρά, το DFI ήταν στατιστικά σημαντικά μικρότερο στα C-δείγματα από ότι στα Expr-δείγματα.

Η ομάδα Γ αναφέρεται στις επιπτώσεις της βαρδεναφίλης στα σπερματοζωάρια σε συγκεντρώσεις υψηλότερες από τα επίπεδα ορού της βαρδεναφίλης, που παρατηρούνται μετά την κατανάλωση των 20mg βαρδεναφίλης. Δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές ($P > 0,05$) στην μέση τιμή της% MS και στο αποτέλεσμα της υποωσμωτικής δοκιμασίας μεταξύ Expr-δειγμάτων και C-δειγμάτων, μέσα στην ομάδα Γ. Επιπλέον, το ποσοστό των σπερματοζωαρίων με πλήρη συμπύκνωση της χρωματίνης του πυρήνα ήταν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερο στα C-δείγματα από ότι στα Expr-δείγματα. Από την άλλη πλευρά, το DFI ήταν στατιστικά σημαντικά μικρότερο στα C- δείγματα από ότι στα Expr-δείγματα.

Εικόνα 42: Ιστόγραμμα επίδοσης 1mg βαρδεναφίλης στο DFI



Η ομάδα A1 αναφέρεται στις επιπτώσεις της τανταλαφίλης στα σπερματοζωάρια σε συγκεντρώσεις υψηλότερες από τα επίπεδα ορού της τανταλαφίλης, που παρατηρούνται μετά την κατανάλωση των 20mg τανταλαφίλης. Ελέγχθηκαν 15 δείγματα με τανταλαφίλη όσον αφορά τις παραμέτρους κίνησης των σπερματοζωαρίων. Δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές (i) στη μέση ταχύτητα της ελικοειδούς πορείας $\mu\text{m}/\text{sec}$ (curvilinear velocity-VCL), (ii) στη μέση ταχύτητα της ευθύγραμμης κίνησης $\mu\text{m}/\text{sec}$ (straight line velocity -VSL), (iii) στη μέση προωθητική

ταχύτητα (average path velocity-VAP), (iv) στο εύρος της πλευρικής μετατόπισης της κεφαλής, δηλαδή το πλάτος της ταλάντωσης της κεφαλής, μm (amplitude of lateral head displacement- ALH), (v) στη συχνότητα χτύπου της κεφαλής των σπερματοζωαρίων, που διασχίζει κατά μέσο όρο το σπερματοζωάριο σε οποιαδήποτε κατεύθυνση, Hz. (BCF), (vi) στην ευθεία πορεία, η αναχώρηση από την πορεία των κυττάρων σε μια ευθεία γραμμή,%. (STR), (vii) στη γραμμικότητα, βαθμός ευθύτητας της γραμμής της διαδρομής των κυττάρων,% (LIN) μεταξύ Exp-δειγμάτων και C-δειγμάτων.

Η ομάδα Β1 αναφέρεται στις επιπτώσεις της σιλδεναφίλης στα σπερματοζωάρια σε συγκεντρώσεις υψηλότερες από τα επίπεδα ορού της σιλδεναφίλης, που παρατηρείται μετά την κατανάλωση των 101mg σιλδεναφίλης. Ελέγχθηκαν 16 δείγματα με σιλδεναφίλη όσον αφορά τις παραμέτρους κίνησης των σπερματοζωαρίων. Δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές (i) στη μέση ταχύτητα της ελικοειδούς πορείας $\mu\text{m}/\text{sec}$ (curvilinear velocity-VCL, (ii) στη μέση ταχύτητα της ευθύγραμμης κίνησης $\mu\text{m}/\text{sec}$ (straight line velocity -VSL), (iii) στη μέση προωθητική ταχύτητα (average path velocity-VAP), (iv) στο εύρος της πλευρικής μετατόπισης της κεφαλής, δηλαδή το πλάτος της ταλάντωσης της κεφαλής, μm (amplitude of lateral head displacement-ALH), (v) στη συχνότητα χτύπου της κεφαλής των σπερματοζωαρίων που διασχίζει κατά μέσο όρο το σπερματοζωάριο σε οποιαδήποτε κατεύθυνση, Hz. (BCF), (vi) στην ευθεία πορεία, η αναχώρηση από την πορεία των κυττάρων σε μια ευθεία γραμμή,%. (STR), (vii) στη γραμμικότητα, βαθμός ευθύτητας της γραμμής της διαδρομής των κυττάρων,% (LIN) μεταξύ Exp-δειγμάτων και C-δειγμάτων.

Η ομάδα Γ αναφέρεται στις επιπτώσεις της βαρδεναφίλης στα σπερματοζωάρια σε συγκεντρώσεις υψηλότερες από τα επίπεδα ορού της βαρδεναφίλης που παρατηρούνται μετά την κατανάλωση των 20mg βαρδεναφίλης. Ελέγχθηκαν 11 δείγματα με βαρδεναφίλη όσον αφορά τις παραμέτρους κίνησης των σπερματοζωαρίων. Δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές (i)στη μέση ταχύτητα της ελικοειδούς πορείας $\mu\text{m}/\text{sec}$ (curvilinear velocity-VCL), (ii) στη μέση ταχύτητα της ευθύγραμμης κίνησης $\mu\text{m}/\text{sec}$ (straight line velocity -VSL), (iii) στη μέση προωθητική ταχύτητα (average path velocity-VAP), (iv) στο εύρος της πλευρικής μετατόπισης της κεφαλής, δηλαδή το πλάτος της ταλάντωσης της κεφαλής, μm (amplitude of lateral head displacement-ALH), (v) στη συχνότητα χτύπου της κεφαλής των σπερματοζωαρίων που διασχίζει κατά μέσο όρο το σπερματοζωάριο σε οποιαδήποτε

κατεύθυνση, Hz. (BCF), vi) στην ευθεία πορεία, η αναχώρηση από την πορεία των κυττάρων σε μια ευθεία γραμμή,%. (STR), (vii) στη γραμμικότητα, βαθμός ευθύτητας της γραμμής της διαδρομής των κυττάρων,% (LIN) μεταξύ Exp-δειγμάτων και C-δειγμάτων.

Η μέτρηση της τεστοστερόνης έγινε στο θρεπτικό υλικό του τρυβλίου A1 (Control) και του τρυβλίου B1 (επώαση με 1mg/ml σιλδεναφίλη). Δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές ($P > 0,05$) στην μέση τιμή της τεστοστερόνης. Αντιθέτως, η μέτρηση της τεστοστερόνης που έγινε στο θρεπτικό υλικό του τρυβλίου A2 (Control) και του τρυβλίου B2 (επώαση με 1mg/ml τανταλαφίλη), ήταν στατιστικά σημαντικά μικρότερη ($P < 0,05$) στην μέση τιμή της τεστοστερόνης του τρυβλίου B2 σε σύγκριση με το τρυβλίο A2. Η τεστοστερόνη μετρήθηκε σε ng/ml σε όλα τα τρυβλία.

4.2.IN VIVO ΜΕΛΕΤΕΣ

Όσον αφορά το πείραμα B1 έγινε μέτρηση του αριθμού και της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων, του βάρους των όρχεων, καταμέτρηση των απογόνων, μέτρηση του ποσοστού των σπερματοζωαρίων με πλήρη συμπύκνωση της χρωματίνης του πυρήνα, μέτρηση του DFI των σπερματοζωαρίων και μέτρηση της τεστοστερόνης, που εκκρίθηκε από τον όρχι στο θρεπτικό υλικό.

4.2.1.ΑΡΙΘΜΟΣ ΤΩΝ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΩΝ

Ο αριθμός των σπερματοζωαρίων ήταν στατιστικά σημαντικά ($P < 0,05$) υψηλότερος στην ομάδα Z(IV) σε σύγκριση με την ομάδα Δ(IA), την ομάδα Γ (Sild), την ομάδα E(IV+ Sild) αλλά και την ομάδα B (IA +Sild).

Αντιθέτως, δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές ($P > 0,05$) στον αριθμό των σπερματοζωαρίων μεταξύ της ομάδας A (Control) και των υπόλοιπων ομάδων B (IA +Sild), Γ (Sild), Δ (IA), E (IV+Sild) και Z(IV). Δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές ($P > 0,05$) στον αριθμό των σπερματοζωαρίων μεταξύ της ομάδας Γ και της ομάδας Δ, E και της ομάδας B. Ομοίως, δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές ($P > 0,05$) στον αριθμό

των σπερματοζωαρίων μεταξύ της ομάδας E και της ομάδας Δ και της ομάδας B αλλά και μεταξύ της ομάδας B και της ομάδας Δ.

4.2.2.ΚΙΝΗΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΩΝ

Δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($P > 0,05$) στην μέση τιμή της% MS μεταξύ των ομάδων A ,B,Γ,Δ,E,Z.

4.2.3.ΒΑΡΟΣ ΟΡΧΕΩΝ ΤΩΝ ΑΡΟΥΡΑΙΩΝ

Επίσης, το βάρος του όρχεως ήταν στατιστικά σημαντικά ($P < 0,05$) μεγαλύτερο στην ομάδα A (Cont) σε σύγκριση με την ομάδα Z (IV), Δ (IA) και την ομάδα Γ (Sild). Επίσης το βάρος του όρχεως ήταν στατιστικά σημαντικά ($P < 0,05$) μικρότερο στην ομάδα Δ (IA) σε σύγκριση με την ομάδα E (IV+Sild) και την ομάδα B (IA Sild).

Αντιθέτως, δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($P > 0,05$) στο βάρος του όρχεως της ομάδας Z (IV) με την ομάδα Δ(IA), Γ(Sild), E (IV+Sild) και με την ομάδα B (IA +Sild). Ομοίως, δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($P > 0,05$) στο βάρος του όρχεως της ομάδας Δ με την ομάδα Γ. Επίσης δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($P > 0,05$) στο βάρος του όρχεως στην ομάδα Γ με την ομάδα E και B. Αντιθέτως, δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($P > 0,05$) στο μέσο βάρος του όρχεως της ομάδας E με την ομάδα B.

4.2.4.ΠΟΣΟΣΤΟ ΤΩΝ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΩΝ ΜΕ ΠΛΗΡΗ ΣΥΜΠΥΚΝΩΣΗ ΤΗΣ ΧΡΩΜΑΤΙΝΗΣ

Επιπρόσθετα, το ποσοστό των σπερματοζωαρίων με πλήρη συμπύκνωση της χρωματίνης ήταν στατιστικά σημαντικά ($P < 0,05$) υψηλότερο στην ομάδα A (Control) σε σύγκριση με την ομάδα B (IA+Sild),Γ (Sild),Δ (IA),E (IV+Sild) και Z (IV).

Επίσης, το ποσοστό των σπερματοζωαρίων με πλήρη συμπύκνωση της χρωματίνης ήταν στατιστικά σημαντικά ($P < 0,05$) υψηλότερο στην ομάδα Z(IV) σε σύγκριση με την ομάδα B(IA+Sild). Το ποσοστό των σπερματοζωαρίων με πλήρη συμπύκνωση της χρωματίνης ήταν στατιστικά σημαντικά ($P < 0,05$) υψηλότερο στην ομάδα Δ (IA) σε σύγκριση με την ομάδα E (IV+Sild) και την ομάδα B (IA+Sild). Επίσης, το ποσοστό των σπερματοζωαρίων με πλήρη συμπύκνωση της χρωματίνης ήταν στατιστικά σημαντικά ($P < 0,05$) υψηλότερο της ομάδας Γ (Sild) από την ομάδα B (IA+Sild). Το ποσοστό των σπερματοζωαρίων με πλήρη συμπύκνωση της χρωματίνης ήταν στατιστικά σημαντικά ($P < 0,05$) υψηλότερο της ομάδας E (IV+Sild) από την ομάδα B (IA+Sild).

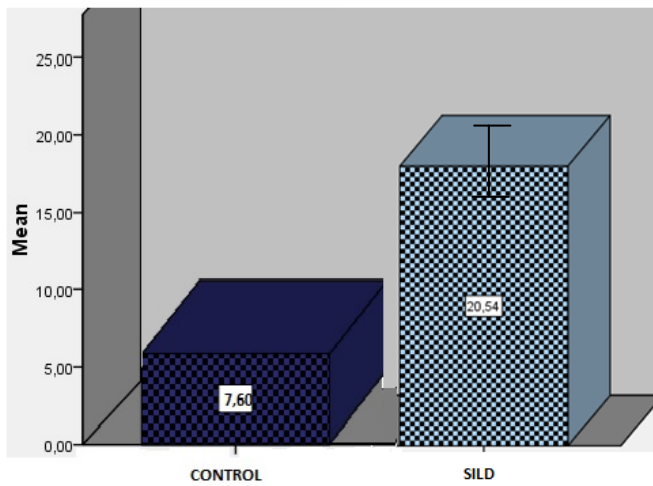
Αντιθέτως, δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($P > 0,05$) στο ποσοστό των σπερματοζωαρίων με πλήρη συμπύκνωση της χρωματίνης της ομάδας Δ (IA) σε σύγκριση με την ομάδα Z (IV) και με την ομάδα Γ (Sild). Επίσης, δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($P > 0,05$) στο ποσοστό των σπερματοζωαρίων με πλήρη συμπύκνωση της χρωματίνης στην ομάδα Z (IV) σε σύγκριση με την ομάδα Γ (Sild) και σε σύγκριση με την ομάδα E (IV+Sild). Τέλος, δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($P > 0,05$) στο ποσοστό των σπερματοζωαρίων με πλήρη συμπύκνωση της χρωματίνης στην ομάδα Γ (Sild) σε σύγκριση με την ομάδα E (IV+Sild).

4.2.5.DFI ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΩΝ

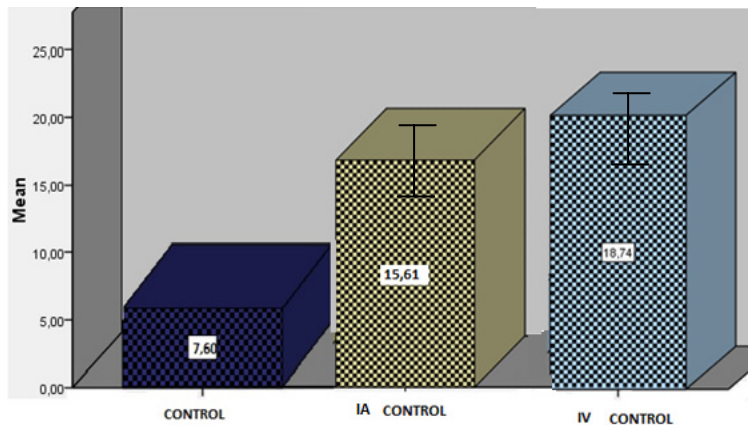
Επίσης, το ποσοστό των σπερματοζωαρίων με κατακερματισμό του DNA (DFI) ήταν στατιστικά σημαντικά ($P < 0,05$) χαμηλότερο στην ομάδα A (Control) σε σύγκριση με όλες τις υπόλοιπες ομάδες B (IA+Sild), Γ (Sild), Δ (IA), E (IV+Sild) και Z (IV). Επίσης, το ποσοστό των σπερματοζωαρίων με κατακερματισμό του DNA ήταν στατιστικά σημαντικά ($P < 0,05$) υψηλότερο στην ομάδα E (IV+Sild) σε σύγκριση με την ομάδα Δ (IA). Το ποσοστό των σπερματοζωαρίων με κατακερματισμό του DNA ήταν στατιστικά σημαντικά ($P < 0,05$) υψηλότερο στην ομάδα B (IA+Sild) σε σύγκριση με την ομάδα E (IV+Sild), την ομάδα Γ (Sild), την ομάδα Δ (IA) και την ομάδα Z (IV).

Αντιθέτως, δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($P > 0,05$) στο ποσοστό των σπερματοζωαρίων με κατακερματισμό του DNA της ομάδας Z (IV) με την ομάδα και με την ομάδα Δ (IA), με την ομάδα Γ (Sild) και με την ομάδα E (IV+Sild). Επίσης, δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($P > 0,05$) στο ποσοστό των σπερματοζωαρίων με κατακερματισμό του DNA της ομάδας Γ (Sild) με την ομάδα Z (IV) και με την ομάδα E (IV+Sild).

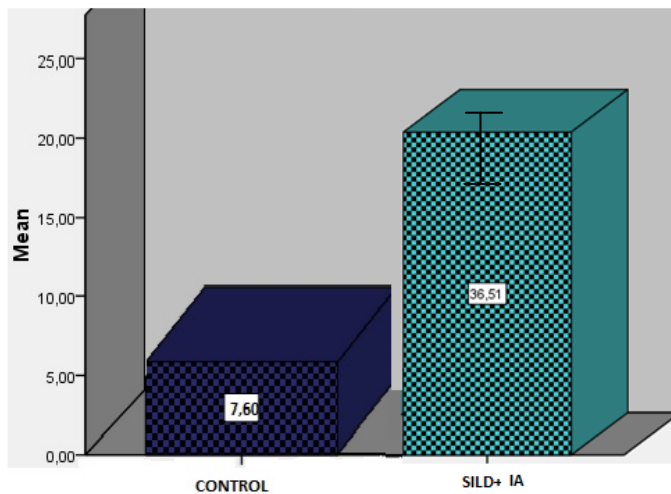
Εικόνα 43: Ιστόγραμμα επίδρασης 1mg σιλδεναφίλης στο DFI



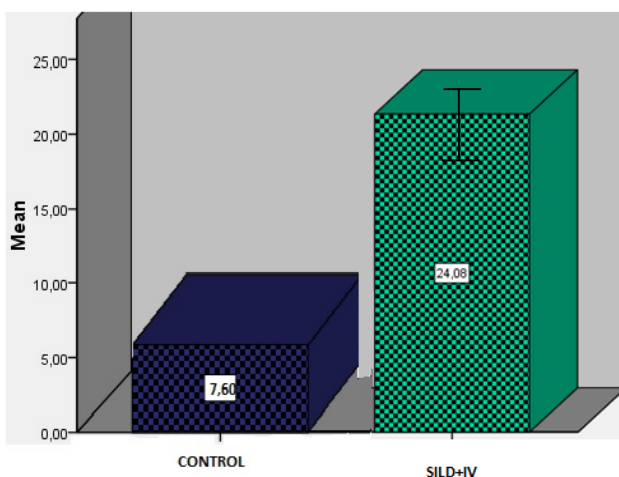
Εικόνα 44: Ιστόγραμμα επίδρασης 6mg σισπλατίνης (IV) ή (IA) στο DFI



Εικόνα 45:Ιστόγραμμα επίδρασης 6mg σισπλατίνης (IA) και 1mg σιλδεναφίλης στο DFI



Εικόνα 46:Ιστόγραμμα επίδρασης 6mg σισπλατίνης (IV) και 1mg σιλδεναφίλης στο DFI



4.2.6.ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΠΟΓΟΝΩΝ

Επιπρόσθετα, ο αριθμός των απογόνων ήταν στατιστικά σημαντικά ($P < 0,05$) υψηλότερος στην ομάδα A (Control) σε σύγκριση με όλες τις υπόλοιπες ομάδες B (IA+Sild), Γ (Sild), Δ (IA),E (IV+Sild) και Z (IV). Επίσης, ο αριθμός των απογόνων ήταν στατιστικά σημαντικά ($P < 0,05$) μικρότερος στην ομάδα Z (IV) σε σύγκριση με την ομάδα Γ (Sild), την ομάδα E (IV+Sild) και την ομάδα B (IA+Sild). Επίσης, ο αριθμός των απογόνων ήταν στατιστικά σημαντικά ($P < 0,05$) μικρότερος στην ομάδα

Δ (IA) σε σύγκριση με την ομάδα Γ (Sild), την ομάδα E (IV+Sild) και την ομάδα B (IA+Sild).

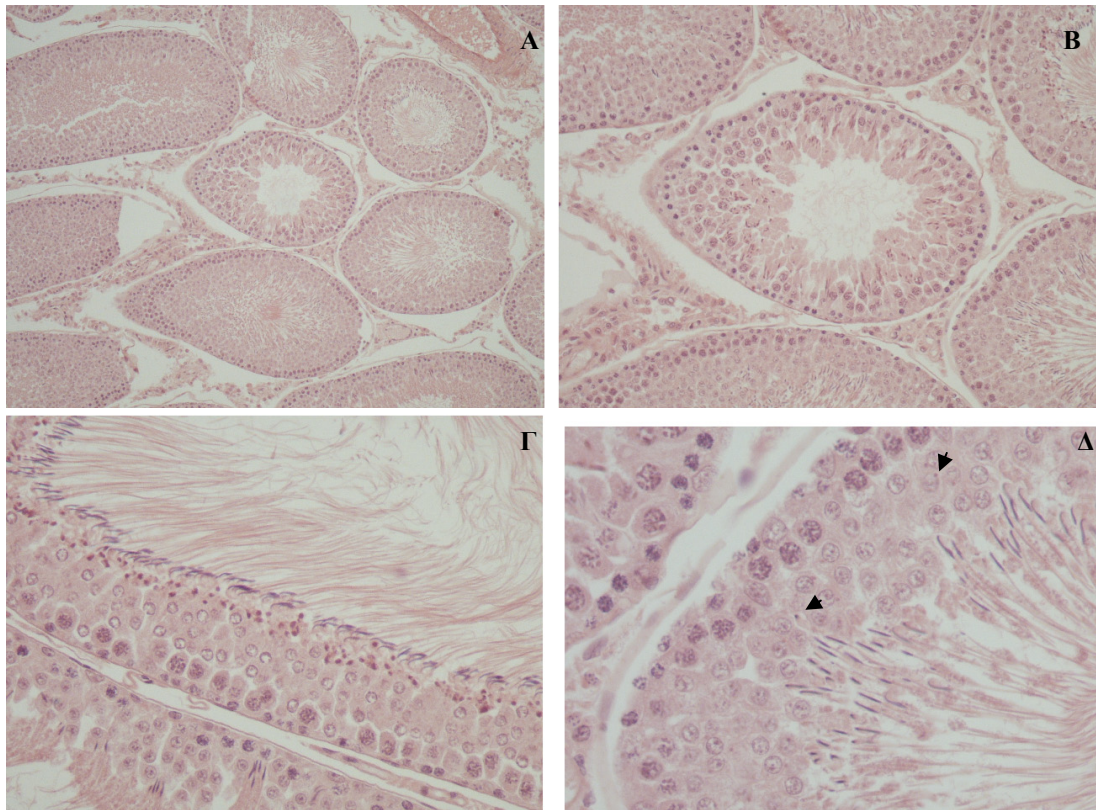
Αντιθέτως, δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($P>0,05$) στον αριθμό των απογόνων στην ομάδα Z (IV) σε σύγκριση με την ομάδα Δ (IA). Επίσης, δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($P>0,05$) στον αριθμό των απογόνων στην ομάδα Γ (Sild) σε σύγκριση με την ομάδα E (IV+Sild) αλλά και με την ομάδα B (IA+Sild). Δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($P>0,05$) στον αριθμό των απογόνων στην ομάδα E (IV+Sild) σε σύγκριση με την ομάδα B (IA+Sild).

4.2.7. ΤΕΣΤΟΣΤΕΡΟΝΗ

Η τιμή της τεστοστερόνης σε ng/ml που εκκρίθηκε στο Eagle's testicular tissue culture medium ήταν στατιστικά σημαντικά ($P< 0,05$) υψηλότερη στην ομάδα A(Cont) σε σύγκριση με την ομάδα B (IA+Sild), Γ (Sild), Δ (IA), E (IV+Sild) και την ομάδα Z (IV). Επίσης η τιμή της ομάδας Δ (IA) ήταν στατιστικά σημαντικά ($P< 0,05$) χαμηλότερη σε σύγκριση με την ομάδα Γ (Sild) και την ομάδα B (IA+Sild). Τέλος, η τιμή της ομάδας H (negat. cont) ήταν στατιστικά σημαντικά ($P< 0,05$) χαμηλότερη σε σύγκριση με την Δ (IA), την ομάδα E (IV+Sild), την ομάδα Z (IV), την ομάδα Γ (Sild) και την ομάδα B (IA+Sild).

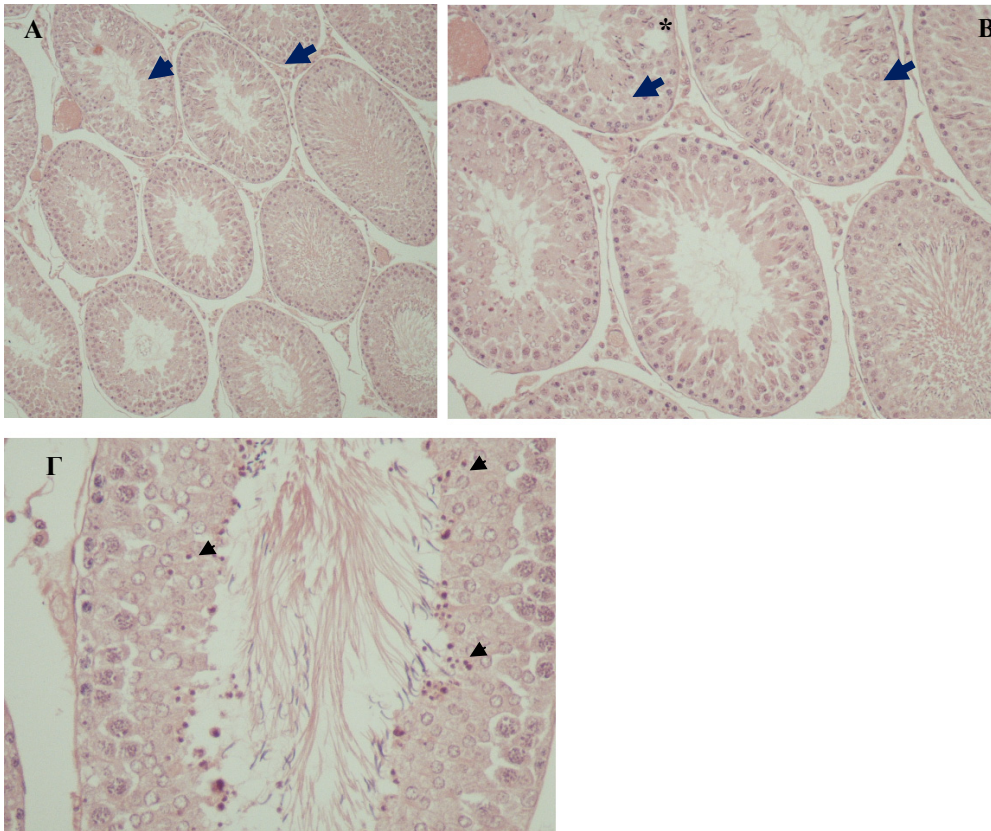
Αντιθέτως, δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές ($P> 0,05$) διαφορές στην τιμή της τεστοστερόνης σε ng/ml που εκκρίθηκε στο Eagle's testicular tissue culture medium στην ομάδα A(cont) σε σύγκριση με την ομάδα H (negat. cont). Επίσης, δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην τιμή της τεστοστερόνης στην ομάδα E (IV Sild) σε σύγκριση με την ομάδα Z (IV), την ομάδα Γ (Sild), την ομάδα B (IA+Sild) και την ομάδα Δ (IA). Ακόμα, δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές της τιμής της ομάδας Z (IV) σε σύγκριση με την ομάδα Γ (Sild), την ομάδα B (IA+Sild) και την ομάδα Δ (IA). Τέλος, δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην τιμή της τεστοστερόνης της ομάδας Γ (Sild) σε σύγκριση με την ομάδα B (IA+Sild).

4.2.8.ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ



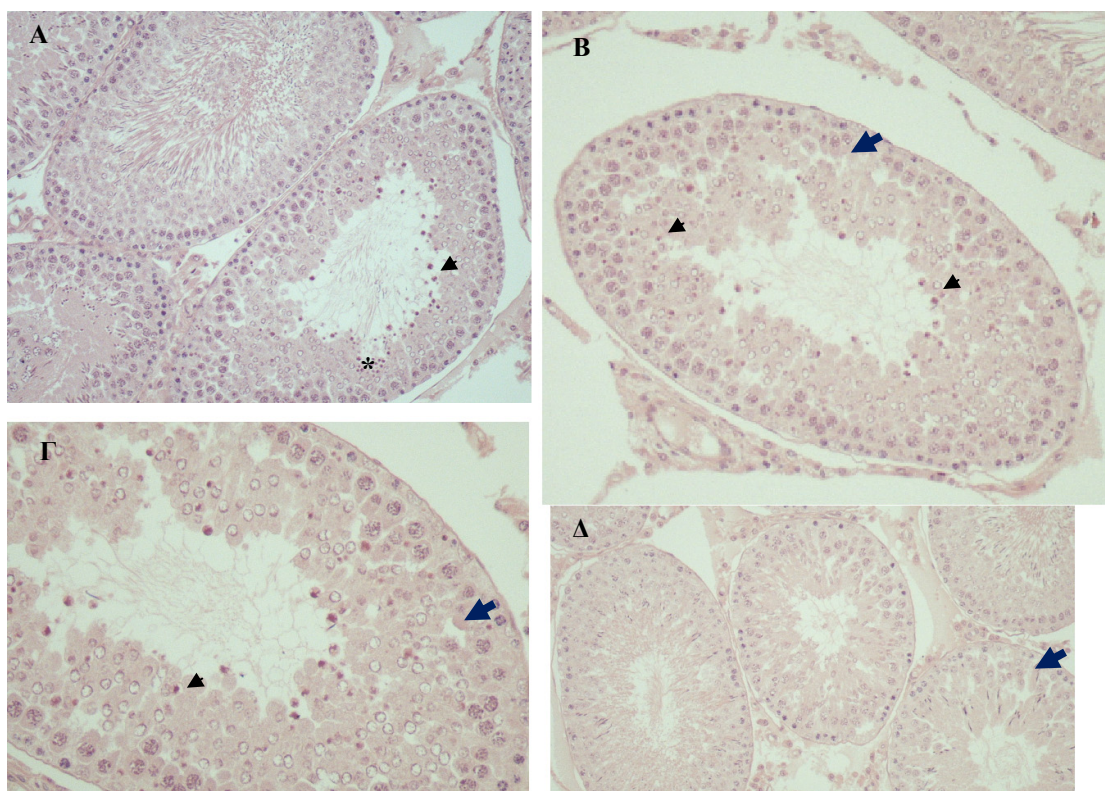
Εικόνα 47: Αντιπροσωπευτικές μικροσκοπικές εικόνες που απεικονίζουν τα στάδια της σπερματογένεσης της control ομάδας. Χρώση: Haematoxylin-eosin. (Α): (Β), (Γ) και (Δ): Βιοψία από όρχι των πειραματόζωων που ανήκαν στην ομάδα control. Μεγέθυνση: Α: X100, Β: X200, Γ: X400, Δ: X600.

Στις παραπάνω εικόνες παρουσιάζονται μικροσκοπικές εικόνες από βιοψίες όρχεως στην control ομάδα. Συγκεκριμένα, παρουσιάζονται σπερματικά σωληνάρια με φυσιολογικό αριθμό σπερματοζωαρίων και φυσιολογική ωρίμανση αυτών. Συγκεκριμένα, στην εικόνα Δ υπάρχει μικρός αριθμός εκφυλισμένων σπερματίδων (μαύρα βελάκια).



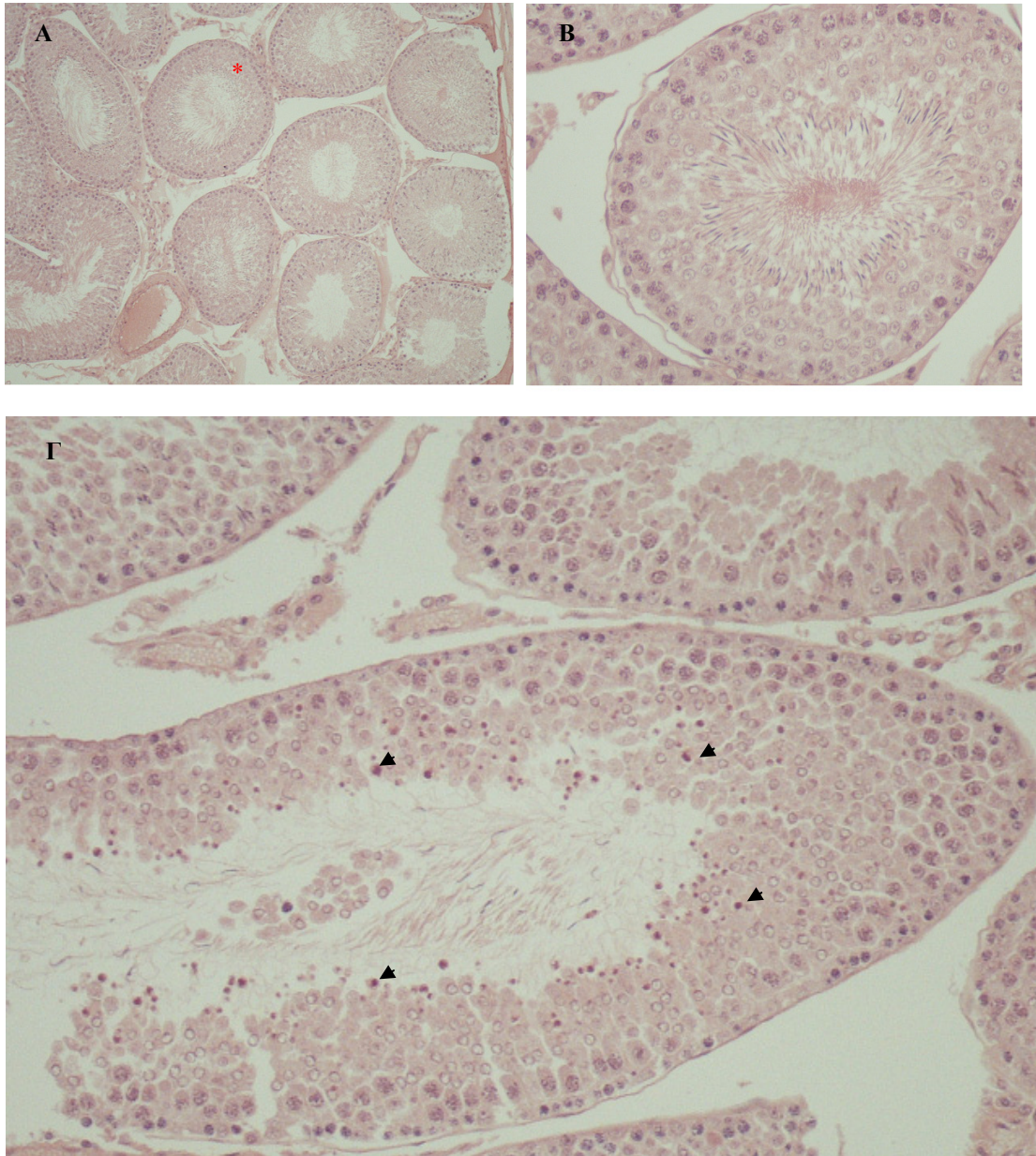
Εικόνα 48: Αντιπροσωπευτικές μικροσκοπικές εικόνες που απεικονίζουν τα στάδια της σπερματογένεσης της ομάδας που έλαβε σισπλατίνη ενδοκοιλιακά ΙΑ. Χρώση: Haematoxylin-eosin. Βιοψία από όρχι των πειραματόζων που ανήκαν στην ομάδα που έλαβε σισπλατίνη ενδοκοιλιακά ΙΑ. Μεγέθυνση: Α: X100, Β: X200, Γ: X400.

Στις παραπάνω εικόνες παρουσιάζονται μικροσκοπικές εικόνες από βιοψίες όρχεων, από την ομάδα που έλαβε σισπλατίνη ενδοκοιλιακά ΙΑ (Α). Συγκεκριμένα, παρουσιάζεται ελάττωση της συνοχής του επιθηλίου με "προβολή-πρόπτωση" των σπερματικών κυττάρων προς τον αυλό, γνωστό ως φαινόμενο sloughing (μπλε βελάκια). Επίσης, υπάρχει παρουσία κυστιδίων (Γ) (αστεράκι). Παρόλα αυτά υπάρχει σπερματογένεση και ο εκφυλισμός των σπερματίδων είναι πιο έντονος (Γ) (μαύρα βελάκια).



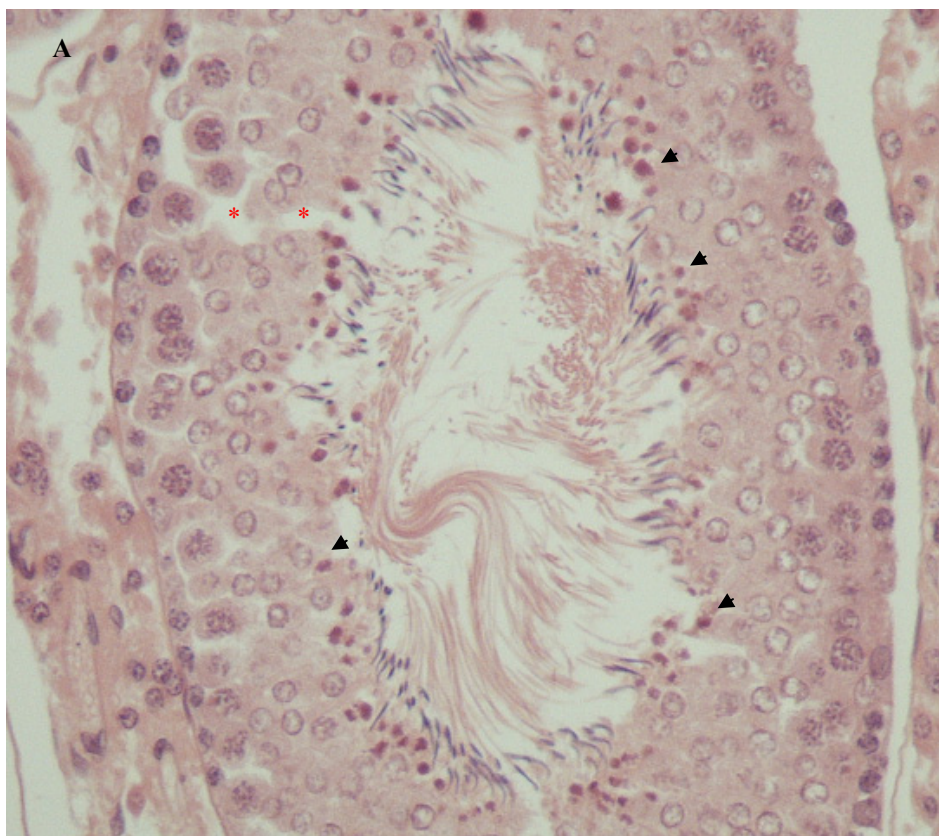
Εικόνα 49:Αντιπροσωπευτικές μικροσκοπικές εικόνες που απεικονίζουν τα στάδια της σπερματογένεσης της ομάδας που έλαβε σισπλατίνη ενδοφλέβια IV. Χρώση: Haematoxylin-eosin. Βιοψία από όρχι των πειραματόζωων που ανήκαν στην ομάδα που έλαβε σισπλατίνη ενδοφλέβια IV. Μεγέθυνση: A: X200, B: X200, Γ:X400, Δ:X400.

Στις παραπάνω εικόνες παρουσιάζονται μικροσκοπικές εικόνες από βιοψίες όρχεων, από την ομάδα που έλαβε σισπλατίνη ενδοφλέβια IV. Συγκεκριμένα, παρουσιάζεται ελάττωση της συνοχής του επιθηλίου με "προβολή-πρόπτωση" των σπερματικών κυττάρων προς τον αυλό, γνωστό ως φαινόμενο sloughing (μπλε βελάκια). Επίσης, υπάρχει παρουσία κυστιδίων (Γ) (αστεράκι). Παρόλα αυτά, υπάρχει σπερματογένεση και ο εκφυλισμός των σπερματίδων είναι πιο έντονος (Γ) (μαύρα βελάκια). Παρουσιάζεται πιο έντονη ελάττωση του αριθμού των σπερματοζωαρίων (B,Γ,Δ).



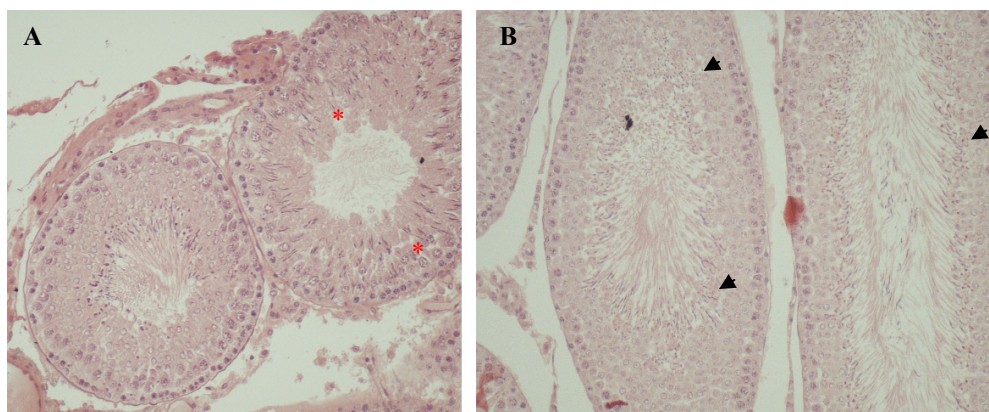
Εικόνα 50: Αντιπροσωπευτικές μικροσκοπικές εικόνες που απεικονίζουν τα στάδια της σπερματογένεσης της ομάδας που έλαβε σιλδεναφίλη από το στόμα. Χρώση: Haematoxylin-eosin. Βιοψία από όρχι των πειραματόζωων που ανήκαν στην ομάδα που έλαβε σιλδεναφίλη από το στόμα. Μεγέθυνση: A: X100, B: X400, Γ: X200.

Στις παραπάνω εικόνες παρουσιάζονται μικροσκοπικές εικόνες από βιοψίες όρχεων, από την ομάδα που έλαβε σιλδεναφίλη από το στόμα. Συγκεκριμένα, παρουσιάζεται οίδημα (κόκκινο αστεράκι). Παρόλα αυτά, υπάρχει εμφανής σπερματογένεση (B), αλλά υπάρχουν και σπερματικά σωληνάκια με αυξημένο αριθμό εκφυλισμένων σπερματίδων (Γ) (μαύρα βελάκια).



Εικόνα 51: Αντιπροσωπευτικές μικροσκοπικές εικόνες που απεικονίζουν τα στάδια της σπερματογένεσης της ομάδας που έλαβε σιλденаφίλη από το στόμα και χορήγηση ενδοκοιλιακά σισπλατίνης. Χρώση: Haematoxylin-eosin. Βιοψία από όρχι των πειραματόζωων που ανήκαν στην ομάδα που έλαβε σιλденаφίλη από το στόμα και χορήγηση ενδοκοιλιακά σισπλατίνης. Μεγέθυνση: Α: Χ400.

Στην παραπάνω εικόνα παρουσιάζεται μικροσκοπική εικόνα από βιοψίες όρχεων, από την ομάδα που έλαβε σιλденаφίλη από το στόμα και χορήγηση ενδοκοιλιακά σισπλατίνης ΙΑ. Συγκεκριμένα παρουσιάζεται οίδημα (κόκκινα αστεράκια), αλλά δεν αναγνωρίζονται κύστες. Παρόλα αυτά, υπάρχει σπερματογένεση, αλλά υπάρχουν και σπερματικά σωληνάρια με αυξημένο αριθμό εκφυλισμένων σπερματίδων (μαύρα βελάκια).



Εικόνα 52: Αντιπροσωπευτικές μικροσκοπικές εικόνες που απεικονίζουν τα στάδια της σπερματογένεσης της ομάδας που έλαβε σιλδεναφίλη από το στόμα και χορήγηση ενδοφλέβια σισπλατίνης IV. Χρώση: Haematoxylin-eosin. Βιοψία από όρχι των πειραματόζων που ανήκαν στην ομάδα που έλαβε σιλδεναφίλη από το στόμα και χορήγηση ενδοφλέβια σισπλατίνης IV. Μεγέθυνση: A: X200, B: X400.

Στην παραπάνω εικόνα παρουσιάζεται μικροσκοπική εικόνα από βιοψίες όρχεων, από την ομάδα που έλαβε σιλδεναφίλη από το στόμα και τους χορηγήθηκε ενδοφλέβια σισπλατίνης. Συγκεκριμένα, παρουσιάζεται περισσότερο οίδημα (A) (κόκκινα αστεράκια) από ότι στην προηγούμενη εικόνα. Παρόλα αυτά, υπάρχει σπερματογένεση, αλλά υπάρχουν και σπερματικά σωληνάρια με αυξημένο αριθμό εκφυλισμένων σπερματίδων (B) (μαύρα βελάκια).

Όσον αφορά το πείραμα B2, έγινε μέτρηση του αριθμού και της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων, του βάρους των όρχεων, καταμέτρηση των απογόνων, μέτρηση του ποσοστού των σπερματοζωαρίων με πλήρη συμπύκνωση της χρωματίνης του πυρήνα, μέτρηση του DFI των σπερματοζωαρίων και μέτρηση της τεστοστερόνης που εκκρίθηκε από τον όρχι στο θρεπτικό υλικό.

4.3.1. ΑΡΙΘΜΟΣ ΤΩΝ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΩΝ

Ο αριθμός των σπερματοζωαρίων ήταν στατιστικά σημαντικά ($P < 0,05$) ψηλότερος στην ομάδα Z (IV) σε σύγκριση με την ομάδα Δ(IA), Γ(Tad) αλλά και την ομάδα E (IV+Tad).

Αντιθέτως, δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές ($P > 0,05$) στον αριθμό των σπερματοζωαρίων μεταξύ της ομάδας A (Control) και των υπόλοιπων ομάδων B

(IA+Tad), Γ(Tad), Δ (IA), E (IV+Tad) και της ομάδας Z (IV). Επίσης, δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές ($P>0,05$) στον αριθμό των σπερματοζωαρίων μεταξύ της ομάδας Δ (IA) και των ομάδων Β (IA+Tad), Γ(Tad), E (IV+Tad). Ακόμα, δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($P>0,05$) στον αριθμό των σπερματοζωαρίων μεταξύ της ομάδας Z (IV) και της ομάδας Β (IA+Tad). Δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($P>0,05$) στον αριθμό των σπερματοζωαρίων της ομάδας Γ(Tad) σε σύγκριση με την ομάδα Β (IA+Tad) και την ομάδα E (IV+Tad). Τέλος, δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($P>0,05$) στον αριθμό των σπερματοζωαρίων μεταξύ της ομάδας E (IV+Tad) και της ομάδας Β (IA+Tad).

4.3.2. ΚΙΝΗΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΩΝ

Δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($P> 0,05$) στην μέση τιμή της% MS μεταξύ των ομάδων A ,B,Γ,Δ,E,Z.

Πίνακας 3: In vivo μελέτες με αναστολείς PDE5

Αναστολείς PDE5	Δόσεις	Συγγραφείς	Επίδραση στην κινητικότητα των σπερματοζωαρίων
Σιλδεναφίλη	50 mg	Jannini et al (2004)	Καμία επίδραση
	50 mg	du Plessis et al (2004)	Θετική επίδραση
	50 mg	Dimitriadis et. al. (2010)	Θετική επίδραση
	100mg	Purvis et. al. (2002)	Καμία επίδραση
	50mg	Pomara et al (2007)	Θετική επίδραση
Βαρδεναφίλη	20 mg	Bauer et al (2002)	Καμία επίδραση
	10 mg	Dimitriadis et. al. (2010)	Θετική επίδραση
Τανταλαφίλη	20mg	Pomara et al (2007)	Αρνητική επίδραση
	10mg or 20mg	Hellstrom et al (2003)	Καμία επίδραση

4.3.3.ΒΑΡΟΣ ΟΡΧΕΩΝ ΤΩΝ ΑΡΟΥΡΑΙΩΝ

Επίσης, το βάρος του όρχεως ήταν στατιστικά σημαντικά ($P < 0,05$) μεγαλύτερο στην ομάδα A (Cont) σε σύγκριση με την ομάδα Z (IV), Δ (IA) και με την ομάδα Γ (Tad). Επίσης, το βάρος του όρχεως ήταν στατιστικά σημαντικά ($P < 0,05$) μικρότερο στην ομάδα Δ (IA) σε σύγκριση με την ομάδα E (IV+Tad) και με την ομάδα B (IA Tad).

Αντιθέτως, δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($P > 0,05$) στο βάρος του όρχεως της ομάδας Z (IV) σε σύγκριση με την ομάδα Δ(IA), Γ(Tad), E (IV+Tad) και με την ομάδα B (IA+Tad). Ομοίως, δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($P > 0,05$) στο βάρος του όρχεως στην ομάδα Δ(IA) σε σύγκριση με την ομάδα Γ(Tad). Επίσης, δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($P > 0,05$) στο βάρος του όρχεως στην ομάδα Γ(Tad) σε σύγκριση με την ομάδα B(IA+Tad) και την ομάδα E(IV+Tad). Δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($P > 0,05$) στο βάρος του όρχεως στην ομάδα E(IV+Tad) με την ομάδα B(IA+Tad).

4.3.4.ΠΟΣΟΣΤΟ ΤΩΝ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΩΝ ΜΕ ΠΛΗΡΗ ΣΥΜΠΥΚΝΩΣΗ ΤΗΣ ΧΡΩΜΑΤΙΝΗΣ

Επιπρόσθετα, το ποσοστό των σπερματοζωαρίων με πλήρη συμπύκνωση της χρωματίνης ήταν στατιστικά σημαντικά ($P < 0,05$) υψηλότερο στην ομάδα A (Control) σε σύγκριση με τις υπόλοιπες ομάδες B (IA+Tad),Γ (Tad),Δ (IA),E (IV+Tad) και Z (IV). Επίσης, το ποσοστό των σπερματοζωαρίων με πλήρη συμπύκνωση της χρωματίνης ήταν στατιστικά σημαντικά ($P < 0,05$) υψηλότερο της ομάδας Z(IV) από την ομάδα B(IA+Tad). Το ποσοστό των σπερματοζωαρίων με πλήρη συμπύκνωση της χρωματίνης ήταν στατιστικά σημαντικά ($P < 0,05$) υψηλότερο στην ομάδα Δ (IA) σε σύγκριση με την ομάδα Γ (Tad) και την ομάδα B (IA+Tad). Επίσης, το ποσοστό των σπερματοζωαρίων με πλήρη συμπύκνωση της χρωματίνης ήταν στατιστικά σημαντικά ($P < 0,05$) χαμηλότερο στην ομάδα Γ (Tad) σε σύγκριση με την ομάδα E (IV+Tad). Το ποσοστό των σπερματοζωαρίων με πλήρη συμπύκνωση της χρωματίνης ήταν στατιστικά σημαντικά ($P < 0,05$) υψηλότερο στην ομάδα E (IV+Tad) σε σύγκριση με την ομάδα B (IA+Tad).

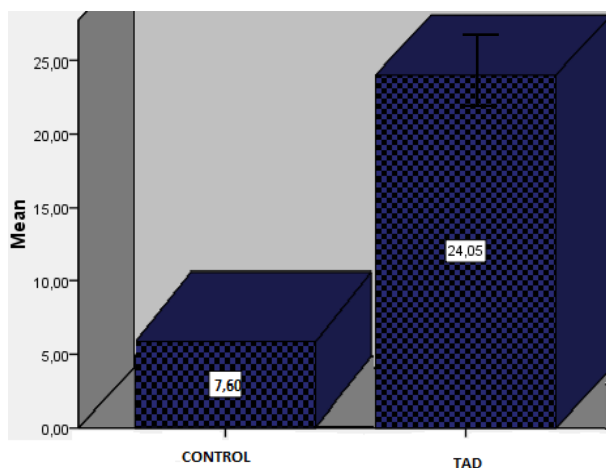
Αντιθέτως, δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($P > 0,05$) στο ποσοστό των σπερματοζωαρίων με πλήρη συμπύκνωση της χρωματίνης στην ομάδα Δ (IA) σε σύγκριση με την ομάδα Z (IV) και με την ομάδα E (IV+Tad). Ομοίως, δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($P > 0,05$) στο ποσοστό των σπερματοζωαρίων με πλήρη συμπύκνωση της χρωματίνης στην ομάδα Z (IV) σε σύγκριση με την ομάδα Γ (Tad) και την ομάδα E (IV+Tad). Τέλος, δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($P > 0,05$) στο ποσοστό των σπερματοζωαρίων με

πλήρη συμπίκνωση της χρωματίνης στην ομάδα Γ (Tad) σε σύγκριση με την ομάδα Β (IA+Tad).

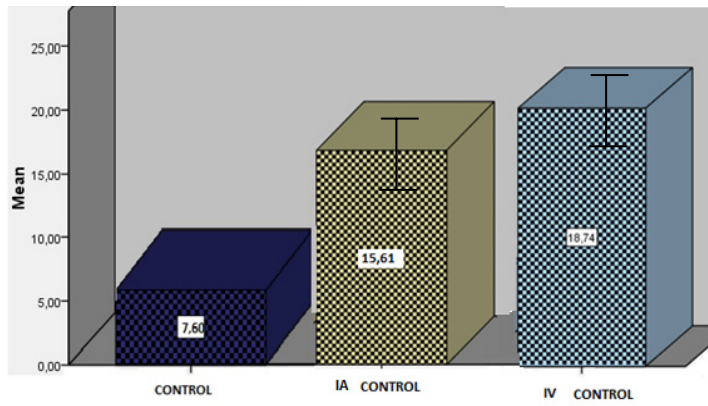
4.3.5.DFI ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΩΝ

Επίσης, το ποσοστό των σπερματοζωαρίων με κατακερματισμό του DNA (DFI) ήταν στατιστικά σημαντικά ($P < 0,05$) χαμηλότερο στην ομάδα Α (Control) σε σύγκριση με όλες τις υπόλοιπες ομάδες Β (IA+Tad), Γ (Tad), Δ (IA), Ε (IV+Tad) και Ζ (IV). Επίσης, το ποσοστό των σπερματοζωαρίων με κατακερματισμό του DNA ήταν στατιστικά σημαντικά ($P < 0,05$) υψηλότερο στην ομάδα Γ (Tad) σε σύγκριση με την ομάδα Δ (IA) και την ομάδα Ε (IV+Tad). Το ποσοστό των σπερματοζωαρίων με κατακερματισμό του DNA ήταν στατιστικά σημαντικά ($P < 0,05$) υψηλότερο στην ομάδα Β (IA+Tad) σε σύγκριση με την ομάδα Ε (IV+Tad), την ομάδα Δ (IA) και την ομάδα Ζ (IV).

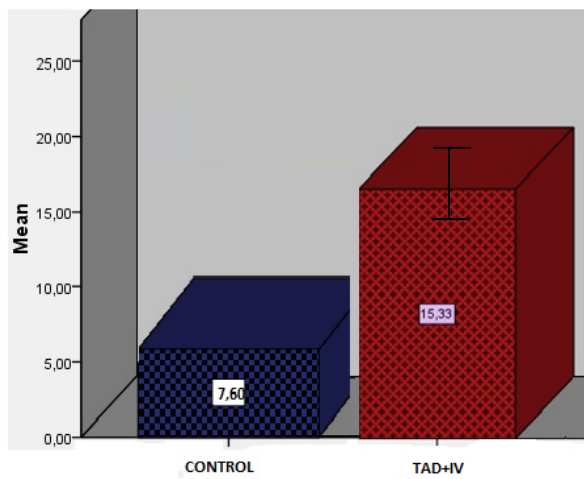
Αντιθέτως, δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($P > 0,05$) στο ποσοστό των σπερματοζωαρίων με κατακερματισμό του DNA στην ομάδα Ζ (IV) σε σύγκριση με την ομάδα Δ (IA), με την ομάδα Γ (Tad) και με την ομάδα Ε (IV+Tad). Επίσης, δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($P > 0,05$) στο ποσοστό των σπερματοζωαρίων με κατακερματισμό του DNA της ομάδας Δ (IA) με την ομάδα Ε (IV+Tad). Επίσης, δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($P > 0,05$) στο ποσοστό των σπερματοζωαρίων με κατακερματισμό του DNA στην ομάδα Γ (Tad) σε σύγκριση με την ομάδα Β (IA+Tad).



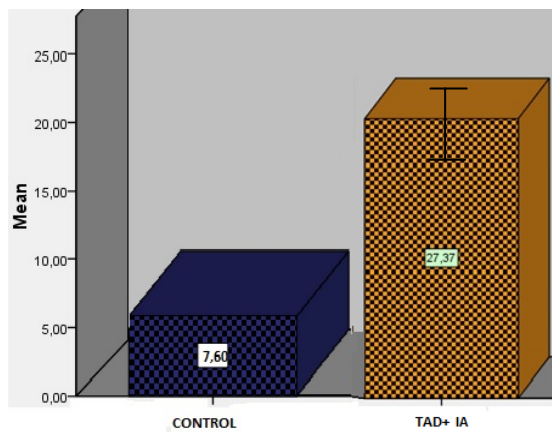
Εικόνα 53: Ιστόγραμμα επίδρασης 1mg τανταλαφίλης στο DFI



Εικόνα 54:Ιστόγραμμα επίδρασης 6mg σισπλατίνης (IA) ή (IV) στο DFI



Εικόνα 55:Ιστόγραμμα επίδρασης 6mg σισπλατίνης (IV) και 1mg τανταλαφίλης στο DFI



Εικόνα 56:Ιστόγραμμα επίδρασης 6mg σισπλατίνης (IA) και 1mg τανταλαφίλης στο DFI

4.3.6.ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΠΟΓΟΝΩΝ

Επιπρόσθετα, ο αριθμός των απογόνων ήταν στατιστικά σημαντικά ($P < 0,05$) υψηλότερος στην ομάδα A (Control) σε σύγκριση με όλες τις υπόλοιπες ομάδες B (IA+Tad), Γ (Tad), Δ (IA), E (IV+Tad) και Z (IV). Επίσης, ο αριθμός των απογόνων ήταν στατιστικά σημαντικά ($P < 0,05$) υψηλότερος στην ομάδα Z (IV) σε σύγκριση με την ομάδα E (IV+Tad). Ακόμα, ο αριθμός των απογόνων ήταν στατιστικά σημαντικά ($P < 0,05$) υψηλότερος στην ομάδα Δ (IA) σε σύγκριση με την ομάδα E (IV+Tad). Ο αριθμός των απογόνων ήταν στατιστικά σημαντικά ($P < 0,05$) υψηλότερος στην ομάδα Γ (Tad) σε σύγκριση με την ομάδα E (IV+Tad). Ο αριθμός των απογόνων ήταν στατιστικά σημαντικά ($P < 0,05$) υψηλότερος στην ομάδα B (IA+Tad) σε σύγκριση με την ομάδα E (IV+Tad).

Αντιθέτως, δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($P > 0,05$) στον αριθμό των απογόνων στην ομάδα Z (IV) σε σύγκριση με την ομάδα Δ (IA), με την ομάδα Γ (Tad) και με την ομάδα B (IA+Tad). Επίσης, δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($P > 0,05$) στον αριθμό των απογόνων στην ομάδα Δ (IA) σε σύγκριση με την ομάδα Z (IV), την ομάδα Γ (Tad) αλλά και με την ομάδα B (IA+Tad). Δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($P > 0,05$) στον αριθμό των απογόνων στην ομάδα Γ (Tad) σε σύγκριση με την ομάδα B (IA+Tad).

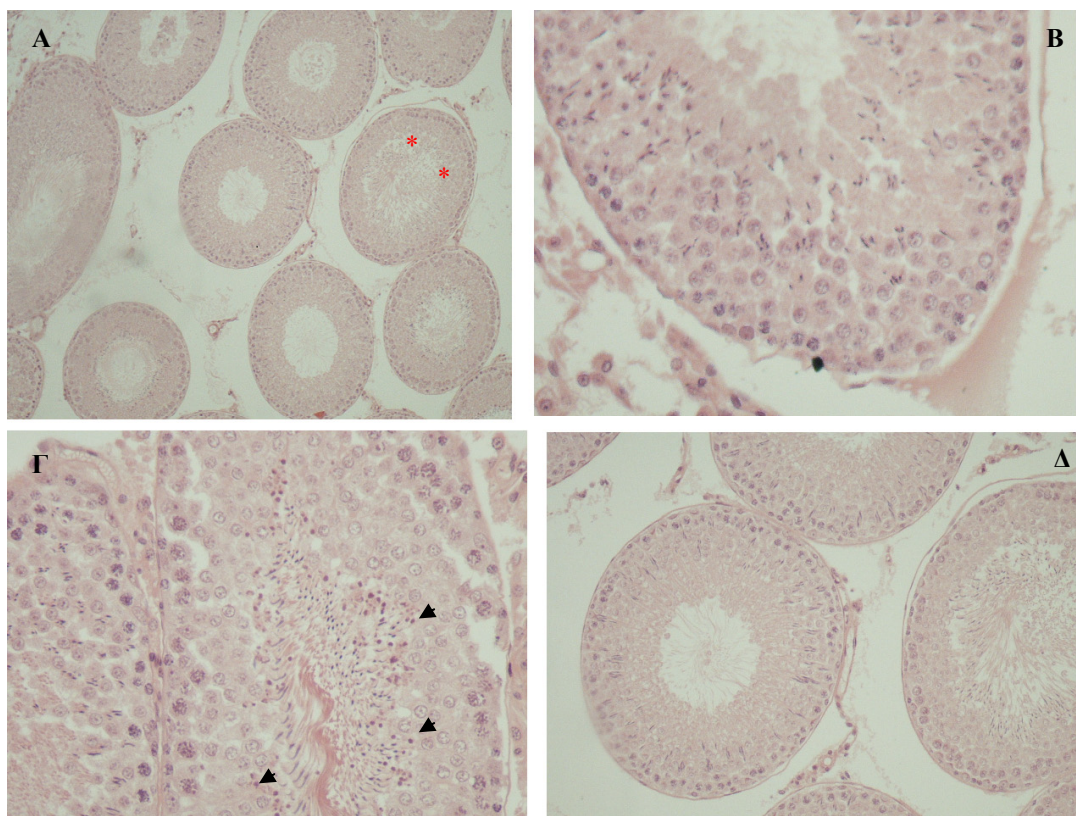
4.3.7.ΤΕΣΤΟΣΤΕΡΟΝΗ

Η τιμή της τεστοστερόνης σε ng/ml που εκκρίθηκε στο Eagle's testicular tissue culture medium ήταν στατιστικά σημαντικά ($P < 0,05$) χαμηλότερη στην ομάδα H (negat. cont), σε σύγκριση με την ομάδα Z (IV), την ομάδα E (IV+Tad), την ομάδα B (IA+Tad) και την ομάδα Γ (Tad). Επίσης, η τιμή της τεστοστερόνης σε ng/ml που εκκρίθηκε στο Eagle's testicular tissue culture medium ήταν στατιστικά σημαντικά ($P < 0,05$) υψηλότερη στην ομάδα Z (IV) σε σύγκριση με την ομάδα A(Cont) και με την ομάδα B (IA+Tad). Η τιμή της τεστοστερόνης σε ng/ml που εκκρίθηκε στο Eagle's testicular tissue culture medium ήταν στατιστικά σημαντικά ($P < 0,05$) υψηλότερη στην ομάδα Δ (IA) σε σύγκριση με την ομάδα A(Cont) και με την ομάδα B (IA+Tad). Επιπλέον, η τιμή της ομάδας B (IA+Tad) ήταν στατιστικά σημαντικά

($P < 0,05$) χαμηλότερη από εκείνη της ομάδας E (IV+Tad). Τέλος, η τιμή της ομάδας Γ (Tad) ήταν στατιστικά σημαντικά ($P < 0,05$) υψηλότερη από εκείνη της ομάδας A(Cont).

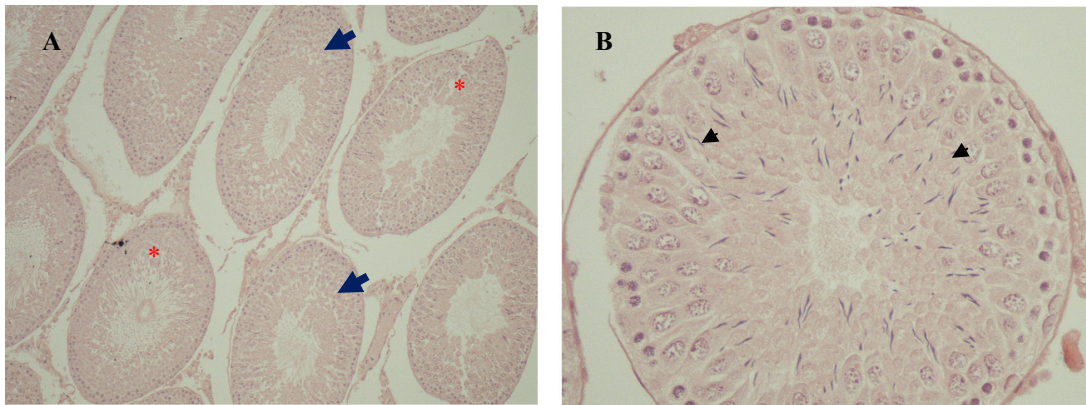
Αντιθέτως, η τιμή της τεστοστερόνης σε ng/ml που εκκρίθηκε στο Eagle's testicular tissue culture medium δεν ήταν στατιστικά σημαντικά διαφορετική ($P > 0,05$) μεταξύ της ομάδας A(Cont) με της ομάδας B (IA+Tad) και της ομάδας A με την ομάδα H (negat. cont).Επίσης, δεν ήταν στατιστικά σημαντικά διαφορετική ($P > 0,05$) η τιμή της τεστοστερόνης στην ομάδα Z (IV) σε σύγκριση με την ομάδα Δ (IA), την ομάδα E (IV+Tad) και την ομάδα Γ (Tad).Ακόμα, δεν ήταν στατιστικά σημαντικά διαφορετική ($P > 0,05$) η τιμή της τεστοστερόνης στην ομάδα Δ (IA) σε σύγκριση με την ομάδα E (IV Tad) και την ομάδα Γ (Tad). Ομοίως, η τιμή της ομάδας B (IA+Tad) σε σύγκριση με την ομάδα Γ (Tad), δεν ήταν στατιστικά σημαντικά διαφορετική. Τέλος, δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην τιμή της τεστοστερόνης στην ομάδα E (IV+Tad) σε σύγκριση με την ομάδα Γ (Tad).

4.3.8.ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ



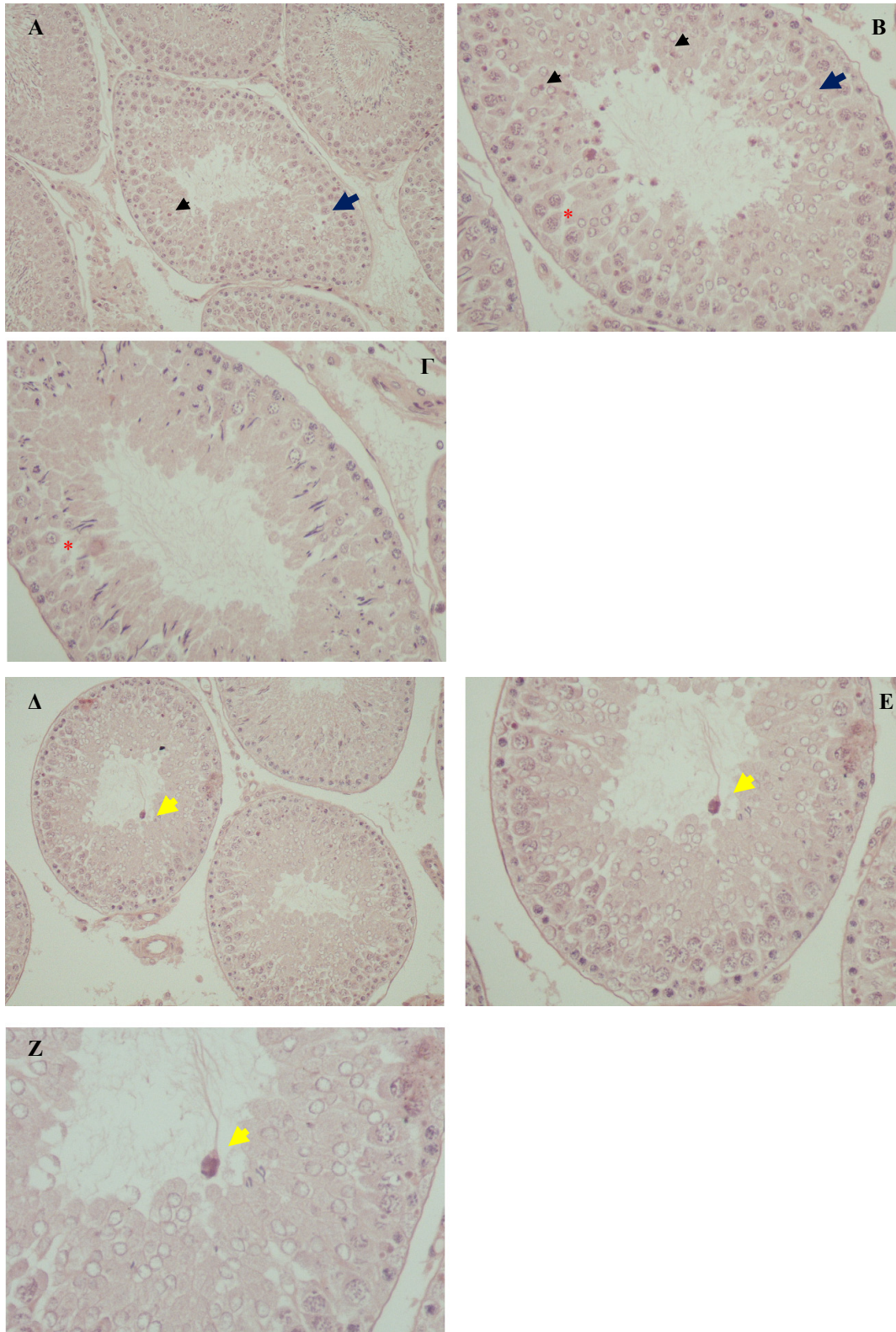
Εικόνα 57:Αντιπροσωπευτικές μικροσκοπικές εικόνες που απεικονίζουν τα στάδια της σπερματογένεσης της ομάδας πειραματόζωων που έλαβε τανταλαφίλη από το στόμα. Χρόση: Haematoxylin-eosin. (A): (B), (Γ) και (Δ): Βιοψία από όρχι των πειραματόζωων που ανήκαν στην ομάδα που έλαβε τανταλαφίλη από το στόμα. Μεγέθυνση: A: X100, B: X400, Γ: X400, Δ: X200.

Στις παραπάνω εικόνες παρουσιάζονται μικροσκοπικές εικόνες από βιοψίες όρχεων, από την ομάδα που έλαβε τανταλαφίλη από το στόμα. Συγκεκριμένα, παρουσιάζεται οίδημα (A) (κόκκινα αστεράκια) και ελάττωση της σπερματογένεσης (B). Παρατηρείται αύξηση του αριθμού των εκφυλισμένων σπερματίδων και ηωσινόφιλων κοκκίων (Γ) (μαύρα βελάκια). Σπερματίδες αναγνωρίστηκαν τόσο σε όλο τον αυλό, όσο και σε όλες τις κυτταρικές στοιβάδες των σπερματικών σωληναρίων. Δηλαδή εμφανίζεται μια διαταραχή της αρχιτεκτονικής της ωρίμανσης των σπερματοζωαρίων (B,Δ).



Εικόνα 58: Αντιπροσωπευτικές μικροσκοπικές εικόνες που απεικονίζουν τα στάδια της σπερματογένεσης της ομάδας πειραματόζωων που έλαβε τανταλαφίλη από το στόμα και ενδοκοιλιακή χορήγηση σισπλατίνης IA. Χρώση: Haematoxylin-eosin. (A): Βιοψία από όρχι των πειραματόζωων που ανήκαν στην ομάδα που έλαβε τανταλαφίλη από το στόμα και ενδοκοιλιακή χορήγηση σισπλατίνης. Μεγέθυνση: A: X101, B: X400.

Στις παραπάνω εικόνες παρουσιάζονται μικροσκοπικές εικόνες από βιοψίες όρχεων, από την ομάδα που έλαβε τανταλαφίλη από το στόμα και χορηγήθηκε ενδοκοιλιακά σισπλατίνης. Συγκεκριμένα, παρουσιάζεται οίδημα (A) (κόκκινα αστεράκια) με κυστίδια μεταξύ των σπερματογονίων κυττάρων. Ακόμη, παρουσιάζεται ελάττωση της συνοχής του επιθηλίου με "προβολή-πρόπτωση" των σπερματικών κυττάρων προς τον αυλό, γνωστό ως φαινόμενο sloughing (μπλε βελάκια) (A). Παράγονται σπερματίδες, αλλά ελαττωμένες σε αριθμό, και κυρίως με μια διαταραχή της αρχιτεκτονικής της ωρίμανσης των σπερματοζωαρίων (B)(μαύρα βελάκια).



Εικόνα 59: Αντιπροσωπευτικές μικροσκοπικές εικόνες που απεικονίζουν τα στάδια της σπερματογένεσης της ομάδας πειραματόζωων που έλαβε τανταλαφίλη από το στόμα και ενδοφλέβια χορήγηση σισπλατίνης IV. Χρώση: Haematoxylin-eosin. (A): Βιοψία από όρχι των πειραματόζωων που ανήκαν στην ομάδα που έλαβε τανταλαφίλη από το στόμα και ενδοφλέβια χορήγηση σισπλατίνης. Μεγέθυνση: A: X200, B: X400, Γ: X400, Δ: X200, E: X400, Z: X600.

Στις παραπάνω εικόνες παρουσιάζονται μικροσκοπικές εικόνες από βιοψίες όρχεων, από την ομάδα που έλαβε τανταλαφίλη από το στόμα και ενδοφλέβια χορήγηση σισπλατίνης. Συγκεκριμένα, παρουσιάζεται οίδημα (Α) (κόκκινα αστεράκια) με κυστίδια μεταξύ των σπερματογονίων κυττάρων. Επίσης, παρουσιάζεται ελάττωση του αριθμού των σπερματίδων (Β), με αύξηση του αριθμού των σπερματίδων που είναι εκφυλισμένες (μαύρα βελάκια) (Β). Ακόμα, παρατηρείται διαταραχή της αρχιτεκτονικής της ωρίμανσης των σπερματοζωαρίων (Γ) αλλά και ελάττωση της συνοχής του επιθηλίου με "προβολή-πρόπτωση" των σπερματικών κυττάρων προς τον αυλό, γνωστό ως φαινόμενο sloughing (μπλε βελάκια) (Γ).Επιπλέον, στις εικόνες Δ,Ε και Ζ εκτός από τα παραπάνω αναγνωρίζονται στον αυλό πολυπύρηνες σπερματίδες/ γιγαντοκύτταρο, που δεν έχει ωριμάσει ακόμα (κίτρινα βελάκια).[215]

5.ΣΥΖΗΤΗΣΗ

5.1.IN VITRO ΜΕΛΕΤΕΣ

5.1.1.ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΗΣ ΤΑΝΤΑΛΑΦΙΛΗΣ ΣΤΗΝ ΚΙΝΗΤΙΚΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΣΤΗ ΔΙΑΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ ΤΩΝ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΩΝ

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης σχετικά με την έλλειψη επίδρασης της τανταλαφίλης (είτε σε θεραπευτικές δόσεις είτε σε υψηλές δόσεις) στην κινητικότητα και στη διαπερατότητα της μεμβράνης των σπερματοζωαρίων, επιβεβαιώνονται και από προηγούμενες μελέτες [152,153,156], στις οποίες έγινε χρήση της σιλδεναφίλης. Η επίδραση της τανταλαφίλης στην κινητικότητα σπερματοζωαρίων 70 ασθenoαζοωσπερμικών ανδρών in vitro, έχει διερευνηθεί από τον Mostafa (2007) [122]. Τα δείγματα σπέρματος εκτέθηκαν σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις της τανταλαφίλης (4.0, 1.0, 0.5 mg/mL) και διαπιστώθηκε ότι στα δείγματα σπέρματος με συγκέντρωση 4 mg/ml διαλύματος τανταλαφίλης υπήρξε μια σημαντική μείωση στην κινητικότητα των σπερματοζωαρίων σε σχέση με τα δείγματα ελέγχου. Όταν τα δείγματα σπέρματος επώαστηκαν με 1,0 ή 0,5 mg/mL διαλύματος τανταλαφίλης, παρατηρήθηκε μια σημαντική αύξηση στην προοδευτική εμπρόσθια κινητικότητα των σπερματοζωαρίων. Οι συγγραφείς πρότειναν ότι η συγκέντρωση της τανταλαφίλης διαδραματίζει σημαντικό ρόλο όσον αφορά την βελτίωση ποσοτικών και ποιοτικών παραμέτρων του σπέρματος. Σε αντίθεση με την παραπάνω μελέτη του Mostafa (2007)[122], δεν βρήκαμε καμία επίδραση είτε σε δόση ίση με 1 mg/ml-τανταλαφίλη, είτε σε δόση ίση με 378μg/L- τανταλαφίλης ως προς την κινητικότητα των σπερματοζωαρίων. Το υποοσμωτικό τεστ χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης της διαπερατότητας της μεμβράνης των σπερματοζωαρίων. Ομοίως, δε βρέθηκε καμία επίδραση της τανταλαφίλης, της σιλδεναφίλης και της βαρδεναφίλης στη διαπερατότητα της μεμβράνης ακόμα και σε διαφορετικές συγκεντρώσεις των φαρμάκων αυτών. Είναι γνωστό ότι η διαπερατότητα της μεμβράνης των σπερματοζωαρίων, έχει μεγάλο συντελεστή συσχέτισης με τη γονιμοποιητική ικανότητα των σπερματοζωαρίων [216].

5.1.2.ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΗΣ ΣΙΛΔΕΝΑΦΙΛΗΣ/ΒΑΡΔΕΝΑΦΙΛΗΣ ΣΤΙΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ ΤΟΥ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ

Ομοίως με την τανταλαφίλη, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν, επίσης, την έλλειψη επίδρασης της σιλδεναφίλης (είτε σε θεραπευτικές δόσεις είτε σε υψηλές δόσεις) / βαρδεναφίλης στην κινητικότητα και στη διαπερατότητα της μεμβράνης των σπερματοζωαρίων, που επιβεβαιώνεται και από προηγούμενες μελέτες [152,153,156], στις οποίες έγινε χρήση της σιλδεναφίλης. Προηγούμενες μελέτες, επίσης, έδειξαν ότι η χορήγηση σιλδεναφίλης ή βαρδεναφίλης σε ολιγοασθενοσπερμικούς άνδρες, ενισχύει την εκκριτική λειτουργία των κυττάρων Leydig και τονώνει την σπερματογένεση και την διαδικασία ωρίμανσης των σπερματοζωαρίων στην επιδιδυμίδα, με αποτέλεσμα μια συνολικά θετική επίδραση στον αριθμό αλλά και στην κινητικότητα των σπερματοζωαρίων [217]. Η θετική επίδραση της σιλδεναφίλης ή της βαρδεναφίλης στην κινητικότητα των σπερματοζωαρίων έχει αποδοθεί στη βελτίωση της διαδικασίας ωρίμανσης των σπερματοζωαρίων στην επιδιδυμίδα [217], ή σε αυξημένη εκκριτική λειτουργία του προστάτη [100,218]. Μεταγενέστερες μελέτες από την ομάδα μας, έχουν δείξει ότι η βαρδεναφίλη ενισχύει την εκκριτική λειτουργία των κυττάρων Sertoli, σε άνδρες με μη αποφρακτική αζωοσπερμία. Επιπλέον, σε άνδρες με μη αποφρακτική αζωοσπερμία, οι ορχικές εστίες της σπερματογένεσης μέχρι το στάδιο των σπερματοζωαρίων, έχουν σημαντικά μεγαλύτερη ενδοορχική ειδική πρωτεΐνη, που δεσμεύει τα ανδρογόνα σε σύγκριση με άνδρες με μη αποφρακτική αζωοσπερμία, οι οποίοι είναι αρνητικοί για σπερματοζωάρια όρχεων. Η επίδραση της σιλδεναφίλης στη κινητικότητα των σπερματοζωαρίων σε *in vitro* μελέτες είναι αμφιλεγόμενη. Η έλλειψη επίδρασης της σιλδεναφίλης σε συγκεκριμένες παραμέτρους της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων έχει προταθεί από διάφορες μελέτες ανεξάρτητα [152,153,156]. Από την άλλη πλευρά, ο Mostafa και οι συνεργάτες του απέδειξαν μια εξαρτώμενη από τη συγκέντρωση διεγερτική επίδραση της σιλδεναφίλης στην κινητικότητα των σπερματοζωαρίων [118].

5.1.3. Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ PDE5 ΣΤΙΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ ΚΙΝΗΣΗΣ ΤΩΝ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΩΝ

Οι παράμετροι της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων αναλύεται με το σύστημα CASA. Η Γραμμικότητα, η μέση προωθητική ταχύτητα και η μέση ταχύτητα της ευθύγραμμης κίνησης $\mu\text{m}/\text{sec}$ έχουν αποδειχθεί ότι συσχετίζονται σημαντικά με το ποσοστό γονιμοποίησης *in vitro* [192,193]. Επίσης, η ανάλυση της εικόνας των παραμέτρων κίνησης: VCL, LIN και ALH, οι οποίες μπορεί να είναι χρήσιμες προάγγελοι της ανδρικής γονιμότητας. Πολλές μελέτες αναφέρουν ότι η ταχύτητα κολύμβησης (VCL) των εκσπερματισμένων σπερματοζωαρίων που μετράται με ένα ημιαυτόματο σύστημα ανάλυσης, έχει ισχυρή συσχέτιση με τα ποσοστά της εξωσωματικής γονιμοποίησης. Επίσης, η ALH των κινητών σπερματοζωαρίων που επιλέγονται από την τεχνική swim-up, συσχετίζεται με τα αποτελέσματα της εξωσωματικής γονιμοποίησης. Επίσης, η VCL των σπερματοζωάρια που διαχωρίζονται με swim-up, είναι ο πιο σημαντικός παράγοντας που σχετίζεται με την IVF. [192]. Τέλος, ο Barratt και οι συνεργάτες του το 1993 [193] αναφέρουν την μεγάλη προγνωστική και κλινική σημασία, στη γονιμότητα *in vivo*, της ανάλυσης της κίνησης των σπερματοζωαρίων μέσω υπολογιστή. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν έλλειψη επίδρασης είτε της σιλδεναφίλης, είτε της σιλδεναφίλης, είτε της βαρδεναφίλης (σε διαφορετικές δόσεις) στις παραμέτρους κίνησης των σπερματοζωαρίων.

5.1.4. Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ PDE5 ΣΤΑ ΠΡΩΙΜΑ ΣΤΑΔΙΑ ΤΗΣ ΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗΣ

Πολλοί συγγραφείς ασχολήθηκαν με την επίδραση των αναστολέων PDE5 στις λειτουργικές δοκιμασίες του σπέρματος. Αρχικά, ο Lefièvre και οι συνεργάτες του (2000) [119], διερεύνησαν το ενδεχόμενο επίδρασης του αναστολέα PDE5, της σιλδεναφίλης στην ικανότητα των σπερματοζωαρίων να υποβληθούν σε διαδικασία ενεργοποίησης των σπερματοζωαρίων. Οι συγγραφείς έδειξαν ότι η σιλδεναφίλη σε 30 $\mu\text{mol}/\text{L}$, 100 $\mu\text{mol}/\text{L}$, και 200 $\mu\text{mol}/\text{L}$ προκαλεί τη διαδικασία ενεργοποίησης σε σπερματοζωάρια μετά από πλύσεις. Οι συγγραφείς αναφέρουν ότι οι αναστολείς PDE-

5 από μόνοι τους δεν μπορούν να κινήσουν την ακροσωμική αντίδραση ούτε μπορούν να ενισχύουν την ακροσωμική αντίδραση της ενεργοποίησης των σπερματοζωαρίων.

Ο Cuadra και οι συνεργάτες του (2000) [120], ερεύνησαν την επίδραση της σιλденаφίλης στην ακροσωμική αντίδραση του σπέρματος. Τα σπερματοζωάρια εκτέθηκαν σε διαφορετικές δόσεις σιλденаφίλης (από 0 nmol/L έως 40nmol/L). Οι συγγραφείς ανέφεραν ότι η σιλденаφίλη επηρέασε την ακροσωμική αντίδραση των σπερματοζωαρίων, με μία αύξηση στο ποσοστό των σπερματοζωαρίων με ακροσωμική αντίδραση σχεδόν από 50% σε σύγκριση με τα δείγματα ελέγχου. Είναι γνωστό ότι cGMP ανοίγει άμεσα διαύλους κυκλικών νουκλεοτιδίων για την είσοδο ασβεστίου μέσα στα σπερματοζωάρια, ξεκινώντας την ακροσωμική αντίδραση [145].

Σε μία άλλη μελέτη, ο Glenn και οι συνεργάτες του (2007) [121], αξιολόγησαν την επίδραση της σιλденаφίλης στην ακροσωμική αντίδραση των σπερματοζωαρίων στο σπερματικό υγρό. Η μελέτη συμπεριέλαβε πενήντα επτά άνδρες με επιλεγμένο ασθενοαζωοσπερμικό προφίλ, που παρείχαν δείγματα σπέρματος τα οποία υπέστησαν περαιτέρω επεξεργασία για την απομόνωση των σπερματοζωαρίων. Τότε σπερματοζωάρια εκτέθηκαν σε 0,67μmol/L σιλденаφίλης. Οι ερευνητές [121] παρατήρησαν ότι η σιλденаφίλη προκάλεσε μια σημαντική αύξηση στο ποσοστό των σπερματοζωαρίων που έκαναν ακροσωμική αντίδραση. Σε αυτή την αναφορά, έγινε χορήγηση σιλденаφίλης για τη συλλογή σπέρματος για σκοπούς τεχνητής γονιμοποίησης. Οι ερευνητές απέτυχαν να γονιμοποιήσουν ωάρια, παρά την ενδοκυτοπλασμική έγχυση των σπερματοζωαρίων [154]. Παρόλο που αυτή η γονιμοποιητική αποτυχία αποδόθηκε στην προχωρημένη ηλικία των ωαρίων, λόγω της καθυστέρησης στην απόκτηση του δείγματος σπέρματος, μία επιβλαβής επίδραση της σιλденаφίλης στη λειτουργία των σπερματοζωαρίων, δεν μπορεί να αποκλειστεί και περαιτέρω έρευνες πρέπει να πραγματοποιηθούν.

Αρκετές μελέτες έχουν αξιολογήσει τις *in vitro* επιδράσεις των αναστολέων PDE5 για λειτουργικές δοκιμασίες του σπέρματος. Ο Burger και οι συνεργάτες του (2000) [115] μελέτησαν *in vitro* διερευνώντας και συγκρίνοντας τα αποτελέσματα της σιλденаφίλης επί της ακεραιότητας της μεμβράνης και την γονιμοποιητική ικανότητα των σπερματοζωαρίων μεταξύ υγιών δοτών και σε κλινικά υπογόνιμων ανδρών. Οι συγγραφείς σημειώνουν μια έντονη μείωση της ακεραιότητας της μεμβράνης στα σπερματοζωάρια των υπογόνιμων ασθενών που έλαβαν θεραπεία με σιλденаφίλη

[115]. Αυτή η παρατήρηση μπορεί να ληφθεί υπόψη όταν η θεραπεία με σιλденаφίλη είναι σχεδιασμένη σε υπογόνιμα ζευγάρια με έναν ανδρικό παράγοντα υπογονιμότητας [115]. Ωστόσο, η ανάλυση της διείσδυσης του σπέρματος έδειξε ότι δεν υπάρχει ούτε ευεργετική ούτε επιζήμια επίδραση της σιλденаφίλης στο αποτέλεσμα της διείσδυσης [115].

Προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου μας έχουν δείξει μια σημαντική θετική επίδραση της χορήγησης της βαρδεναφίλης αλλά και της σιλденаφίλης στη σπερματογένεση, στην διαδικασία της ωρίμανσης των σπερματοζωαρίων της επιδιδυμίδας, στην εκκριτική λειτουργία των κυττάρων Sertoli και εκκριτική λειτουργία των κυττάρων Leydig [100, 217,218]. Επιπλέον, in vitro μελέτες από άλλες ομάδες έχουν δείξει θετική επίδραση της σιλденаφίλης στην κινητικότητα των σπερματοζωαρίων [118]. Αντιθέτως, άλλες μελέτες δεν έχουν αναδείξει επίδραση της σιλденаφίλης στην κινητικότητα των σπερματοζωαρίων [152,153,156]. Η χορήγηση τανταλαφίλης έχει αποδειχθεί ότι δεν επηρέασε τις βασικές παραμέτρους ανάλυσης του σπέρματος [168,169]. Παρόλα αυτά η χορήγηση τανταλαφίλης σε σκύλους συνοδεύεται από αναστολή της σπερματογένεσης [168]. Επιπλέον, η in vitro επώαση των σπερματοζωαρίων σε τανταλαφίλη σε συγκέντρωση 1 mg/ml έχει δείξει σημαντική θετική επίδραση στην κινητικότητα των σπερματοζωαρίων ασθενοζωοσπερμικών ανδρών [122]. Σε μια άλλη μελέτη, ο Romara και οι συνεργάτες του (2007) [166] έχουν αποδείξει ότι η κινητικότητα των σπερματοζωαρίων φαίνεται να επηρεάζεται σε νέους, υπογόνιμους άνδρες με μια μόνο δόση σιλденаφίλης ή τανταλαφίλης, με διεγερτική δράση και ανασταλτική δράση, αντίστοιχα.

5.1.5. ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ PDE5 ΣΤΗ ΣΥΜΠΥΚΝΩΣΗ ΤΗΣ ΧΡΩΜΑΤΙΝΗΣ ΤΟΥ ΠΥΡΗΝΑ ΤΩΝ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΩΝ

Η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη στη βιβλιογραφία, που αξιολόγησε την επίδραση των αναστολέων φωσφοδιεστεράσης-5 ενδοπυρηνικά στα σπερματοζωάρια. Η παρούσα μελέτη δείχνει ότι είτε η τανταλαφίλη, είτε η σιλδεναφίλη είτε η βαρδεναφίλη, προκαλούν αποσυμπύκνωση της χρωματίνης των σπερματοζωαρίων, δεδομένου ότι το ποσοστό της συμπύκνωσης της χρωματίνης των σπερματοζωαρίων, ήταν σημαντικά χαμηλότερο σε δείγματα σπέρματος που έλαβαν είτε τανταλαφίλης

είτε σιλδεναφίλη είτε βαρδεναφίλη, σε θεραπευτικά ή υψηλές δόσεις, σε σχέση με δείγματα σπέρματος που δεν έλαβαν είτε τανταλαφίλη, είτε σιλδεναφίλη είτε βαρδεναφίλη και το DFI ήταν σημαντικά μεγαλύτερο στα παραπάνω δείγματα που έλαβαν τανταλαφίλη. Είναι δύσκολο να εξηγηθεί η δράση των φαρμάκων αυτών στον πυρήνα των σπερματοζωαρίων. Κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης γίνονται μεταβολές στην τελική δομή της κεφαλής των σπερματοζωαρίων. Γίνονται χημικές αλλαγές στο DNA, το οποίο σταθεροποιείται και καθίσταται ανθεκτικό στην πέψη από το ένζυμο DNase. Αυτή η σταθεροποίηση λαμβάνει χώρα, όταν περιοχές ιστονών, πλούσιες σε λυσίνη, αντικαθίστανται από περιοχές πλούσιες σε αργινίνη, ειδικές-ιστόνες του όρχεως στον πυρήνα του σπερματοζωαρίου. Κατά τη διάρκεια της συμπίκνωσης της χρωματίνης, υπάρχει μια προοδευτική μείωση στον πυρηνικό όγκο και δραματικές αλλαγές στο κυτταρικό σχήμα. Στο στάδιο της επιμήκυνσης των σπερματοζωαρίων, οι ιστόνες των στρογγυλών σπερματίδων αντικαθίστανται από πρωταμίνες. Οι μεταγραφικές πρωτεΐνες καθορίζουν την επιμήκυνση των σπερματίδων. Οι παράγοντες αυτοί προκαλούν απομάκρυνση των ιστονών από τον πυρήνα και τις αντικαθιστούν με πρωταμίνες. Μετά τη γονιμοποίηση, το DNA των σπερματοζωαρίων αποδεσμεύεται από τις πρωταμίνες και πάλι συνδέεται με ιστόνες μητρικής προέλευσης [221-223]. Η συμπίκνωση της χρωματίνης κατά την διάρκεια προχωρημένων σταδίων της σπερματογένεσης επιτρέπει στο σπερματοζωάριο να γίνει πιο ανθεκτικό σε περιβαλλοντικό σοκ εντός του γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος. Επιπλέον, αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι όσο μεγαλύτερο είναι το ποσοστό των σπερματοζωαρίων με μετουσιωμένο DNA, τόσο μικρότερη είναι η πιθανότητα για την επίτευξη της κύησης σε προγράμματα ενδομήτριας σπερματέγχυσης. Επιπλέον, όσο μεγαλύτερο είναι το ποσοστό των σπερματοζωαρίων με μετουσιωμένο DNA, τόσο χαμηλότερο είναι το ποσοστό επιτυχίας με εξωσωματική γονιμοποίηση αλλά και η βέλτιστη εμβρυϊκή ανάπτυξη [223,190]. Η απουσία στατιστικά σημαντικών διαφορών στο % MS ή στο HOST μεταξύ EXP και Control δειγμάτων, υποδεικνύει ότι η επίδραση των αναστολέων φωσφοδιεστεράσης-5 στο DFI δεν μπορεί να αποδοθεί σε κυτταρικό θάνατο των σπερματοζωαρίων που προκαλείται λόγω των φαρμάκων αυτών. Παρόλα αυτά, φαίνεται ότι φαρμακολογικοί παράγοντες επηρεάζουν την κατάσταση της πυρηνικής συμπίκνωσης της χρωματίνης των σπερματοζωαρίων. Αυτό μπορεί να έχει μία συνολική επιρροή στην ικανότητα του σπέρματος να γονιμοποιήσει, αλλά και να επηρεάσει την πρώιμη εμβρυϊκή ανάπτυξη και την εμφύτευση. Παρά το γεγονός ότι οι επιδράσεις των αναστολέων

PDE5 για την κινητικότητα και τη μορφολογία των σπερματοζωαρίων έχουν ερευνηθεί (βλ. ανωτέρω), δεν υπάρχουν μελέτες στη διεθνή βιβλιογραφία σχετικά με την επίδραση των αναστολέων PDE5 στην συμπύκνωση της χρωματίνης του πυρήνα ανθρώπινων σπερματοζωαρίων.

1ος προτεινόμενος μηχανισμός: Επιδράσεις στην χρωματίνη από τη cGMP-εξαρτώμενη πρωτεϊνική κινάση G

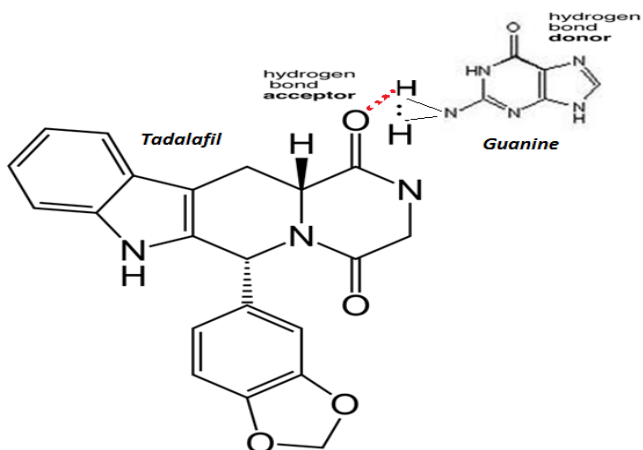
Μπορεί να προταθεί ότι η ενίσχυση των σπερματοζωαρίων από ένα δεύτερο αγγελιοφόρο cGMP λόγω της αναστολής της PDE5 από την τανταλαφίλη είτε τη σιλδεναφίλη είτε τη βαρδεναφίλη, ενεργοποιεί έναν πυρηνικό cGMP-εξαρτώμενη πρωτεϊνική κινάση G, με μια συνολικά επιζήμια επίδραση στη δομή της χρωματίνης του σπέρματος. Αυτή η υπόθεση υποστηρίζεται από μια προηγούμενη μελέτη από τον Hao και τους συνεργάτες του (2011)[224], αποκαλύπτοντας νέες cGMP-εξαρτώμενες πρωτεϊνικές κινάσες G που στοχεύουν στον πυρήνα, ανταποκρίνοντας στην ενίσχυση της cGMP. Στην εν λόγω μελέτη, το EGL-4, το *Caenorhabditis elegans* πρωτεϊνική κινάση G ορθόλογο δρα στον πυρήνα, μέσω ενός συντηρημένου συμπλέγματος αποακετυλάσης ιστόνης, που ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων που είναι σχετικές με φυσιολογικές αποκρίσεις σε cGMP. Ο Hesabi et. al (2012) [225] αποδεικνύει ότι ένας άλλος αναστολέας PDE-5, η σιλδεναφίλη, ενισχύει την πυρηνική φωσφορυλίωση πρωτεϊνών και την πυρηνική δραστηριότητα cGK. Οι παραπάνω μελέτες τείνουν να δείξουν ότι η αύξηση της cGMP ενεργοποιεί την cGMP- που εξαρτάται από την πρωτεϊνική κινάση G και μπορεί να επηρεάσει πυρηνικά γεγονότα, όπως η ρύθμιση των γονιδίων και των πρωτεϊνών της χρωματίνης. Μεταβολές στις πυρηνικές πρωτεΐνες των σπερματοζωαρίων μέσω ενός καταρράκτη ενδοπυρηνικών γεγονότων, που προκαλείται από την αύξηση της cGMP λόγω της αναστολής της PDE5, από την τανταλαφίλη μπορεί να επηρεάσει τη συμπύκνωση της χρωματίνης των σπερματοζωαρίων από πυρηνικές πρωτεΐνες που παίζουν ρόλο στην προστασία της χρωματίνης. Η υπόθεσή μας ότι τα φάρμακα αυτά επηρεάζουν πυρηνικά βιοχημικά γεγονότα που προκαλούνται από την PKG, αποδεικνύεται από μια προηγούμενη μελέτη, στην οποία η θεραπεία με βαρδεναφίλη αυξάνει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό [226].

2ος προτεινόμενος μηχανισμός: Επιδράσεις στην χρωματίνης από μια άμεση δράση ενδοπυρηνικά μέσω της διάχυτης NOS στον πυρήνα

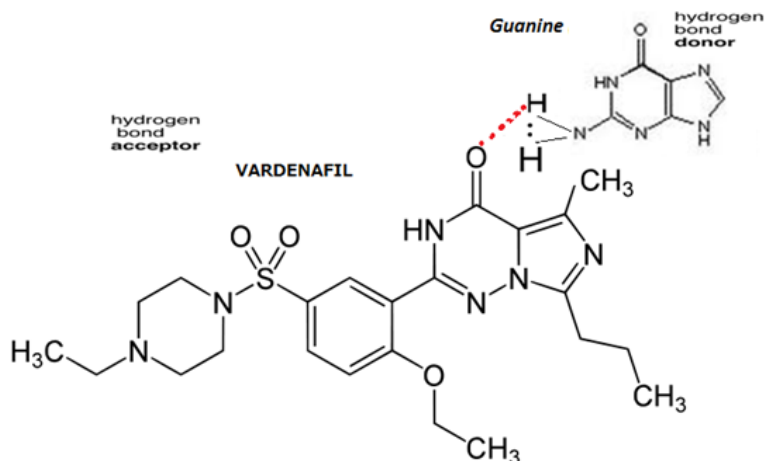
Ο Shin και οι συνεργάτες του (2010) [227] απέδειξε ότι ένας άλλος αναστολέας της φωσφοδιεστεράσης-5, η βαρδεναφίλη, αυξάνει την έκφραση συνθετάσης του μονοξειδίου του αζώτου (NOS) στον εγκέφαλο. Εάν η τανταλαφίλη, είτε η σιλδενναφίλη είτε η βαρδεναφίλη, αυξάνει την έκφραση του NOS στα σπερματοζωάρια, με παρόμοιο τρόπο, τότε το αυξημένο ενδοκυτταρικό μονοξείδιο του αζώτου μπορεί να διαχέεται στον πυρήνα του σπέρματος. Επίσης, αυξημένα επίπεδα NO, μπορεί να επιδρούν στον πυρήνα μέσω μεταγραφικών παραγόντων (TF) και μέσω αναδιαμόρφωσης ενζύμων της χρωματίνης, αλλά και ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης. Επιπλέον, το πυρηνικό NOS μπορεί από μόνο του να ενεργεί ως TF. Τέλος, το NO μπορεί να δρα άμεσα στη δομή της χρωματίνης με χημική τροποποίηση πυρηνικής πρωτεΐνης, όπως έχει ήδη προτείνει ο Illi και οι συνεργάτες του το 2009 [228].

3ος προτεινόμενος μηχανισμός: Επιδράσεις στην χρωματίνη με άμεση αλληλεπίδραση μεταξύ τανταλαφίλης/σιλδενναφίλης/βαρδεναφίλης και του DNA των σπερματοζωαρίων

Μια άλλη υπόθεση για να εξηγήσουμε τις επιδράσεις της τανταλαφίλης, ή της σιλδενναφίλης ή της βαρδεναφίλης, στο DNA σπέρματος / χρωματίνης, είναι ο σχηματισμός δεσμών υδρογόνου μεταξύ των ομάδων C=O του μορίου της τανταλαφίλης, είτε σιλδενναφίλης είτε βαρδεναφίλης, και της NH₂ ομάδας της γουανίνης του DNA (βλέπε παρακάτω εικόνες). Η υπόθεση αυτή υποστηρίζεται από μια μελέτη του Rauf και των συνεργατών του το 2007 [229], που έχουν δείξει αλληλεπίδραση της σιλδενναφίλης και του DNA σπερματοζωαρίου σολομού. Αυτό οφείλεται στο σχηματισμό δεσμού υδρογόνου μεταξύ των ομάδων C=O της πυριμιδινόνης ομάδας της σιλδενναφίλης και της NH₂ ομάδας της γουανίνης. Σε αυτή την προηγούμενη μελέτη, η γουανίνη οξειδώνεται στο +0,91V(pH 5), η οποία βρίσκεται σε συμφωνία με προηγουμένως αναφερθείσες τιμές του δυναμικού οξείδωσης για τη γουανίνη [230-233].



Εικόνα 60: Δεσμοί υδρογόνου με τανταλαφίλη



Εικόνα 61: Δεσμοί υδρογόνου με βαρδεναφίλη

Η ενδοεπιδιδυμική τεστοστερόνη, είναι γνωστό ότι είναι σημαντική για την ωρίμανση των σπερματοζωαρίων εντός της επιδιδυμίδας και κυρίως για τη βελτίωση της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων. Η ενδοεπιδιδυμική τεστοστερόνη εξαρτάται από την εκκριτική λειτουργία των κυττάρων Leydig [234-236]. Συνεπώς, η ενίσχυση της εκκριτικής λειτουργίας των κυττάρων Leydig με χορήγηση αναστολέων της φωσφοδιεστεράσης 5 μπορεί να συμβάλει στη βελτίωση της κινητικότητας, μέσω της ωρίμανσης των σπερματοζωαρίων στην επιδιδυμίδα.

Αντιθέτως, προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι, εάν και δεν υπάρχει σημαντική διαφορά στην περιφερειακή τεστοστερόνη πριν και μετά τη φαρμακευτική αγωγή με αναστολείς της PDE5, δεν μπορεί να αποκλεισθεί μια θετική επίδραση των αναστολέων PDE5 επί της εκκριτικής λειτουργίας των κυττάρων Leydig, δεδομένου

ότι είναι γνωστό ότι τα επίπεδα της περιφερική τεστοστερόνης συχνά αποτυγχάνουν να παρουσιάζουν μικρές μεταβολές στην εκκριτική λειτουργία των κυττάρων Leydig [234-236, 237].

Ο Scipioni και οι συνεργάτες του το 2005 απέδειξαν ότι τα κύτταρα Leydig και τα περιωληνιακά κύτταρα, εκφράζουν την PDE5, τόσο σε περιωληνιακά κύτταρα όσο και σε όρχεις ενήλικων αρουραίων. Στα θηλαστικά, στους όρχεις η cGMP-εξαρτώμενη επηρεάζει, όχι μόνο τα ορχικά αγγεία, αλλά μέσω της χαλάρωσης των περιωληνιακών κυττάρων επηρεάζεται και η σύνθεση της τεστοστερόνης από κύτταρα Leydig αλλά και η κινητικότητα των σπερματοζωαρίων [182]. Ακόμα, σε μία μελέτη του Greco [238], αποδείχτηκε ότι η μακροχρόνια χορήγηση της τανταλαφίλης συνδέεται με την αύξηση της αναλογίας Τεστοστερόνης: οιστραδιόλη κυρίως λόγω σημαντικής μείωσης των επιπέδων οιστραδιόλης σε άνδρες που έλαβαν τανταλαφίλη. Συμπερασματικά, η αυξημένη αναλογία Τεστοστερόνης: οιστραδιόλη δεν οφείλεται στη αύξηση των επιπέδων τεστοστερόνης στον ορό, αλλά πιθανότατα στην επίδραση της τανταλαφίλης στην δραστηριότητα της αρωματάσης [238]. Αντιθέτως, στη δική μας μελέτη παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση της τεστοστερόνης στα δείγματα που προστέθηκε τανταλαφίλη. Αντιθέτως, στα δείγματα που προστέθηκε σιλδεναφίλη δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές της τεστοστερόνης.

Η τεστοστερόνη, η οποία είναι απαραίτητη για τη φυσιολογική σπερματογένεση, συντίθεται από κύτταρα Leydig και διατηρείται σε υψηλά επίπεδα στους όρχεις. Οι mRNA μεταγραφές για γουανιλική κυκλάση (GC), πρωτεϊνική κινάση G (PKG) και PDE5A, έχουν ανιχνευθεί σε κύτταρα Leydig αρουραίων. Επιπλέον, ο Tsai και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι η χορήγηση αναστολέων PDE5 αυξάνει τα επίπεδα ενδοκυτταρικού cGMP, καθώς ενισχύει την παραγωγή ανδρογόνων[239].

5.2.IN VIVO ΜΕΛΕΤΕΣ

Όπως αναφέραμε και παραπάνω, η χρόνια χορήγηση (28-30 ημέρες) αναστολέα PDE5 (σιλδεναφίλης) ενισχύει, επίσης, την παραγωγή τεστοστερόνης σε ποντικούς [239]. Ακόμα, όπως έχει αναφερθεί και στα in vitro πειράματα μας αλλά και σε μία μελέτη του Greco [238], αποδείχτηκε ότι η μακροχρόνια χορήγηση της τανταλαφίλης συνδέεται με την αύξηση της αναλογίας Τεστοστερόνης : οιστραδιόλης κυρίως λόγω σημαντικής μείωσης των επιπέδων οιστραδιόλης σε άνδρες που έλαβαν

τανταλαφίλη. Ομοίως, και στη δική μας μελέτη στα in vivo πειράματα, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση της τεστοστερόνης στα ζώα που έλαβαν τανταλαφίλη.[240] Αυτό αποδεικνύεται από τις διαφορές μεταξύ των δύο φαρμάκων, στην αύξηση της τεστοστερόνης και στη μείωση της ωχρινοτρόπου ορμόνης (LH) μετά από 3 μήνες θεραπείας. Τα παραπάνω συσχετίζονται με τα επίπεδα τεστοστερόνης, τα οποία ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερα στην ομάδα που έλαβε τανταλαφίλη, από ότι στην ομάδα που έλαβε σιλδεναφίλη. Αυτό θα μπορούσε να ερμηνευτεί, λόγω του ότι η διαφορά της ενδοκρινικής λειτουργίας, θα μπορεί να οφείλεται σε μια συγκεκριμένη δράση της τανταλαφίλης στον άξονα υπόφυση -όρχεις. Συγκεκριμένα, στους ανθρώπινους όρχεις εκφράζεται ένα αρκετά υψηλό επίπεδο της PDE5.[241] Επίσης, σε μια άλλη μελέτη, η χορήγηση σιλδεναφίλης έδειξε αύξηση της FSH, LH και της τεστοστερόνης στον ορό.[242]

Ως εκ τούτου, είναι πιθανό ότι οι αναστολές PDE5 ενεργούν άμεσα επί της παραγωγής της τεστοστερόνης στους όρχεις. Αντιθέτως στη δική μας μελέτη, στα in vivo πειράματα, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση της τεστοστερόνης στα ζώα που δεν έλαβαν κανένα φάρμακο από τα ζώα που έλαβαν σιλδεναφίλη.

Μια μελέτη του Beytur και των συνεργατών του το 2012, έδειξε ότι τα επίπεδα της τεστοστερόνης στον ορό είχαν μειωθεί στατιστικά σημαντικά μετά από θεραπεία με σισπλατίνη σε αρουραίους. Αυτό μπορεί να ερμηνευτεί μέσω της παρεμβολής της σισπλατίνης στην έκφραση του υποδοχέα της LH, μέσω της διαταραχή της μείωση της κινητοποίησης της χοληστερόλης μέσω των μιτοχονδρίων κυτοχρώματος P450sec, ή μέσω της μείωσης της δραστηρότητας αυτού του ένζυμου, παρεμβαίνοντας έτσι στα πρώτα βήματα παραγωγής της τεστοστερόνης.[243]

Αντιθέτως, μια άλλη μελέτη έδειξε ότι, μετά από χορήγηση 1.8 mg/kg σισπλατίνης σε αρουραίους, τα επίπεδα τεστοστερόνης μειώθηκαν μετά τη χορήγηση σισπλατίνης, αλλά όχι στατιστικά σημαντικά.[244] Στη δική μας μελέτη, στα ζώα που έλαβαν σιλδεναφίλη αυξήθηκε στατιστικά σημαντικά η τεστοστερόνη, σε σχέση με τα ζώα που έγινε ενδοκοιλιακή χορήγηση σισπλατίνης. Επομένως, η σισπλατίνη μείωσε τις τιμές της τεστοστερόνης όπως αναφέρεται και στην παραπάνω μελέτη[243]. Επίσης, στα ζώα που έλαβαν σιλδεναφίλη και έγινε ενδοκοιλιακή χορήγηση σισπλατίνης αυξήθηκε στατιστικά σημαντικά η τεστοστερόνη, σε σχέση με τα ζώα που έγινε μόνο ενδοκοιλιακή χορήγηση σισπλατίνης. Συμπερασματικά, βλέπουμε μια προστατευτική δράση της σιλδεναφίλης, ώστε να διατηρήσει υψηλά τα

επίπεδα της τεστοστερόνης, σε ζώα που έχουν ορχική βλάβη λόγω χορήγησης σισπλατίνης.

Αντιθέτως, στα ζώα που έλαβαν τανταλαφίλη και ενδοκοιλιακή χορήγηση σισπλατίνης, μειώθηκε στατιστικά σημαντικά η τεστοστερόνη, σε σχέση με τα ζώα που έγινε μόνο ενδοκοιλιακή ή ενδοφλέβια χορήγηση σισπλατίνης. Επίσης, στα ζώα που έλαβαν τανταλαφίλη και ενδοφλέβια χορήγηση σισπλατίνης, μειώθηκε στατιστικά σημαντικά η τεστοστερόνη, σε σχέση με τα ζώα που έλαβαν τανταλαφίλη και έγινε ενδοκοιλιακή χορήγηση σισπλατίνης. Άρα, είναι πιθανόν η τανταλαφίλη να δρα ανασταλτικά στην διατήρηση της παραγωγής τεστοστερόνης, όταν χορηγείτε σε ζώα που τους έχει δημιουργηθεί ορχική βλάβη μετά από χορήγηση σισπλατίνης.

Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($P > 0,05$) στην μέση τιμή του % MS μεταξύ των ομάδων A, B, Γ, Δ, E, Z του B1 και B2 πειράματος. Το γεγονός ότι δεν παρουσιάστηκαν αλλαγές στην κινητικότητα των σπερματοζωαρίων μπορεί να οφείλεται στο ότι δεν υπήρχαν αλλαγές στην ωρίμανση των σπερματοζωαρίων μετά την διαδικασία της σπερματογένεσης. Επίσης, δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές ($P > 0,05$) στον αριθμό των σπερματοζωαρίων μεταξύ της ομάδας A (Control) και των ομάδων που έλαβαν σιλδεναφίλη ή τανταλαφίλη. Σε μια προηγούμενη μελέτη, ο Hellstrom και οι συνεργάτες του το 2003 [168] απέδειξαν ότι η καθημερινή χορήγηση 10 ή 20 mg τανταλαφίλης για 6 μήνες σε άνδρες, δεν είχε καμία επίδραση στη συγκέντρωση, στη μορφολογία και στην κινητικότητα των σπερματοζωαρίων. Επίσης, ο Jannini και οι συνεργάτες του το 2004 [156] ανέφεραν ότι δεν υπάρχουν αλλαγές στη μη γραμμική προοδευτική κίνηση των σπερματοζωαρίων των ανδρών που έλαβαν σιλδεναφίλη, από τα δείγματα των ίδιων ανδρών πριν να λάβουν σιλδεναφίλη. Παρομοίως και στη δική μας μελέτη, δεν παρουσιάστηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην κινητικότητα και στη συγκέντρωση των σπερματοζωαρίων, μετά τη χορήγηση τανταλαφίλης ή σιλδεναφίλης στα ζώα. Σε μια μελέτη του du Toit και των συνεργατών του, αποδείχτηκε ότι με χορήγηση χαμηλών συγκεντρώσεων σιλδεναφίλης (20-50 nM) σε αρουραίους, εμφανίστηκε βελτίωση στην λειτουργία της αιμάτωσης του καρδιακού ιστού. Αντιθέτως, σε υψηλότερες συγκεντρώσεις σιλδεναφίλης (200 nM) παρουσιάστηκε επιδείνωση της λειτουργίας αιμάτωσης του καρδιακού ιστού των αρουραίων.[245]

Επίσης, σε μια άλλη μελέτη [246], ανέφεραν ότι η χορήγηση υψηλών δόσεων (1,4mg/kg) σιλδεναφίλης, δεν είχε προστατευτικό αποτέλεσμα στην επαναιμάτωση των όρχων σε σύγκριση με την ομάδα control. Ο Khalaf και οι συνεργάτες του το 2012 απέδειξαν ότι μετά από τη χρόνια χορήγηση (6 μήνες-καθημερινά) τανταλαφίλης σε αρουραίους, παρουσιάστηκε σημαντική μείωση του βάρους των όρχεων στα ζώα αυτά. Επίσης, σε χορήγηση 3 μηνών τανταλαφίλης σε αρουραίους δεν παρουσιάστηκε στατιστικά σημαντική αλλαγή στο βάρος των αρουραίων.[247] Αντιθέτως στη δική μας μελέτη, παρουσιάζονται στατιστικά σημαντικά μειωμένο βάρος όρχεων στα ζώα που έλαβαν είτε τανταλαφίλη είτε σιλδεναφίλη, για διάστημα ενός πλήρους κύκλου σπερματογένεσης. Είναι γνωστό ότι το βάρος του όρχεως συσχετίζεται θετικά με την εκκριτική λειτουργία των κυττάρων Leydig. [248] Από τα παραπάνω, φαίνεται ότι οι αναστολείς της φωσφοδιεστεράσης-5, δρουν αρνητικά στην εκκριτική λειτουργία των κυττάρων Leydig. Επίσης, μετά από ενδοκοιλιακή ή ενδοφλέβια χορήγηση σισπλατίνης μειώθηκε το βάρος των όρχεων σε σχέση με την Control ομάδα. Αντιθέτως, η ενδοκοιλιακή χορήγηση σισπλατίνης οδήγησε σε στατιστικά σημαντικά χαμηλότερο βάρος του όρχεως σε σχέση με τις ομάδες που έλαβαν ενδοκοιλιακή ή ενδοφλέβια χορήγηση σισπλατίνης και χορήγηση σιλδεναφίλης είτε τανταλαφίλης. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί με βάση τη μελέτη του Pretorius [249], ο οποίος σύγκρινε την ενδοκοιλιακή και την ενδοφλέβια χορήγηση σισπλατίνης σε σκύλους. Στη μελέτη αυτή, αναφέρει ότι η ενδοκοιλιακή χορήγηση σισπλατίνης δρα τοξικά, κυρίως τοπικά, δημιουργώντας αιματηρούς ασκούς στα ζώα και μεμβρανώδεις συμφύσεις. Το συμπέρασμα αυτό μας τονίζει ότι μπορεί η ενδοκοιλιακή χορήγηση σισπλατίνης να δημιουργήσει και στα δικά μας πειραματόζωα ασκούς και συμφύσεις, που να οδήγησαν σε περαιτέρω μείωση του βάρους του όρχεως.

Επίσης, ο δείκτης κατακερματισμού του DNA (όπως υπολογίστηκε με βάση τη συμπύκνωση της χρωματίνης) ήταν στατιστικά σημαντικά χαμηλότερος στην ομάδα Control, από ότι στις ομάδες Β (IA+Tad), Γ (Tad), Δ (IA), Ε (IV+Tad), και Ζ (IV) και αντίστοιχα Β (IA+Sild), Γ (Sild) και Ε (IV+Sild). Τα αποτελέσματα αυτά, επιβεβαιώνουν τα *in vitro* πειράματα της μελέτης αυτής, που έδειξαν στατιστικά σημαντική αύξηση του δείκτη κατακερματισμού του DNA σε δείγματα σπέρματος που προστέθηκε σιλδεναφίλη ή τανταλαφίλη ή βαρδεναφίλη. Επίσης, η χορήγηση σισπλατίνης είναι γνωστό ότι χρησιμοποιείται σαν χημικοθεραπευτικό σκεύασμα για

την καταπολέμηση ογκολογικών νόσων στους όρχεις. Παρόλα αυτά, η μείωση της σπερματογένεσης αλλά και η μη φυσιολογική λειτουργία των κυττάρων Leydig, επιβεβαιώνει την αύξηση του δείκτη κατακερματισμού του DNA στα ζώα που χορηγήθηκε σισπλατίνη (IA ή IV). Επίσης, ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερος ο δείκτη κατακερματισμού του DNA στα ζώα που λάμβαναν ενδοκοιλιακά σισπλατίνη και σιλδεναφίλη, σε σύγκριση με τα ζώα που έλαβαν μόνο σιλδεναφίλη ή μόνο ενδοκοιλιακά σισπλατίνη. Επιπλέον, ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερος ο δείκτη κατακερματισμού του DNA στα ζώα που λάμβαναν ενδοφλέβια σισπλατίνη και σιλδεναφίλη, σε σύγκριση με τα ζώα που έλαβαν μόνο ενδοκοιλιακά σισπλατίνη. Ενώ ο δείκτη κατακερματισμού του DNA ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερος στα ζώα που λάμβαναν μόνο τανταλαφίλη, από τα ζώα που έλαβαν ενδοφλέβια σισπλατίνη και τανταλαφίλη. Ακόμα, ο δείκτη κατακερματισμού του DNA ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερος στα ζώα που λάμβαναν ενδοκοιλιακά σισπλατίνη και τανταλαφίλη, από τα ζώα που έλαβαν ενδοφλέβια ή ενδοκοιλιακά σισπλατίνη. Αποδεικνύεται μια επιπλέον βλάβη στο DNA των σπερματοζωαρίων, λόγω της χορήγησης τανταλαφίλης (εκτός από την σισπλατίνη). Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνονται από τη μελέτη του Wayman και των συνεργατών του το 2005 [94], όπου μελέτησαν το ρόλο της PDE11 στη ρύθμιση της εξωκρινούς λειτουργίας του όρχεως και την επίδρασή της στην γονιμοποιητική ικανότητα των σπερματοζωαρίων. Αυτό είναι πολύ σημαντικό, καθώς η τανταλαφίλη αναστέλλει την PDE11 [93]. Έτσι οι συγγραφείς μελέτησαν το ρόλο της PDE11 στη φυσιολογία των σπερματοζωαρίων, στην "ανάκτηση" των σπερματοζωαρίων από έλλειψη PDE11 σε μοντέλα ποντικών knockout (PDE11^{-/-}). Τελικά, διαπίστωσαν μειωμένη συγκέντρωση σπερματοζωαρίων, μειωμένη προωθητική κινητικότητα, και μειωμένο ποσοστό ζωντανών σπερματοζωαρίων στα ποντίκια, που δείχνουν έναν ρόλο της PDE11 στην σπερματογένεση και στη γονιμοποίηση. Επίσης, τα αποτελέσματα αυτά διαφέρουν όσον αφορά τον αριθμό των απογόνων, καθώς συγκρίνοντας την ομάδα που έλαβε ενδοφλέβια σισπλατίνη και τανταλαφίλη από την ομάδα που λάμβανε μόνο τανταλαφίλη ή μόνο ενδοφλέβια ή ενδοκοιλιακή σισπλατίνη, έκανε λιγότερους απογόνους και εμφάνισε πιο σοβαρή βλάβη στην παθολογοανατομική ανάλυση. Συγκεκριμένα, στην ομάδα E (IV+Tad) παρατηρήθηκε οίδημα με κυστίδια μεταξύ των σπερματογονίων κυττάρων. Επίσης, παρουσιάζεται ελάττωση του αριθμού των σπερματίδων, με αύξηση του αριθμού των σπερματίδων που είναι εκφυλισμένες, αλλά και διαταραχή της αρχιτεκτονικής της ωρίμανσης των σπερματοζωαρίων. Ελάττωση

της συνοχής του επιθηλίου με "προβολή-πρόπτωση" των σπερματικών κυττάρων προς τον αυλό, γνωστό ως φαινόμενο sloughing αλλά στην ομάδα E (IV+Tad), ακόμα αναγνωρίστηκαν στον αυλό πολυπύρηνες σπερματίδες/ γιγαντοκύτταρο, που δεν έχει ωριμάσει ακόμα.

Παρόλα αυτά, τα ζώα που έλαβαν ενδοφλέβια σισπλατίνη απέκτησαν λιγότερους απογόνους, από τα ζώα που έλαβαν μόνο σιλденаφίλη ή σιλденаφίλη και ενδοφλέβια ή ενδοκοιλιακά σισπλατίνη. Επίσης, η παθολογοανατομική ανάλυση της ομάδας που έλαβε ενδοφλέβια σισπλατίνη και σιλденаφίλη ήταν καλύτερη από την ομάδα που έλαβε ενδοφλέβια σισπλατίνη και τανταλαφίλη. Συγκεκριμένα, παρουσίαζαν οίδημα. Παρόλα αυτά υπάρχει σπερματογένεση, αλλά και σπερματικά σωληνάρια με αυξημένο αριθμό εκφυλισμένων σπερματίδων.

Με βάση τα παραπάνω, επιβεβαιώνεται ο παραπάνω ισχυρισμός μας για μια βλάβη στο DNA των σπερματοζωαρίων, λόγω της χορήγησης τανταλαφίλης, που αναστέλλει την PDE11 επιπρόσθετα στην PDE5[94].

6. ΤΕΛΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ:

- ▶ Στα *in vitro* πειράματα, η τανταλαφίλη σε συγκέντρωση είτε 1 mg/ml είτε 378 µg/L, προκαλεί αποσυμπύκνωση της χρωματίνης των σπερματοζωαρίων, αυξάνοντας το DFI των σπερματοζωαρίων και δεν επηρεάζει την κινητικότητα, τις παραμέτρους κίνησης και τη διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης των σπερματοζωαρίων.
- ▶ Ομοίως στα *in vitro* πειράματα, η σιλδεναφίλη σε συγκέντρωση είτε 1 mg/ml είτε 450 ng/mL, προκαλεί αποσυμπύκνωση της χρωματίνης των σπερματοζωαρίων, αυξάνοντας το DFI των σπερματοζωαρίων και δεν επηρεάζει την κινητικότητα, τις παραμέτρους κίνησης και τη διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης των σπερματοζωαρίων.
- ▶ Τέλος στα *in vitro* πειράματα, η βαρδεναφίλη σε συγκέντρωση 1 mg/ml, προκαλεί αποσυμπύκνωση της χρωματίνης των σπερματοζωαρίων, αυξάνοντας το DFI των σπερματοζωαρίων και δεν επηρεάζει την κινητικότητα και τη διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης των σπερματοζωαρίων.
- ▶ Στα *in vitro* πειράματα, η σιλδεναφίλη σε συγκέντρωση 1mg/ml, δεν επηρέασε την τεστοστερόνη που εκκρίθηκε από τον όρχι.
- ▶ Στα *in vitro* πειράματα, η τανταλαφίλη σε συγκέντρωση 1mg/ml, μείωσε την τεστοστερόνη που εκκρίθηκε από τον όρχι.
- ▶ Στα *in vivo* πειράματα, η χορήγηση σισπλατίνης μόνη της, η χορήγηση τανταλαφίλης μόνη της και η χορήγηση τανταλαφίλης και σισπλατίνης από κοινού, προκάλεσαν στατιστικά σημαντική βλάβη της ενδοκρινούς και εξωκρινούς λειτουργίας των όρχεων.
- ▶ Στα *in vivo* πειράματα, η χορήγηση σισπλατίνης μόνη της, η χορήγηση σιλδεναφίλης μόνη της και η χορήγηση σιλδεναφίλης και σισπλατίνης από κοινού, προκάλεσαν στατιστικά σημαντική βλάβη της ενδοκρινούς και εξωκρινούς λειτουργίας των όρχεων.

7.ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο σκοπός του συνόλου των παρόντων πειραμάτων ήταν να ρίξει φως στις επιδράσεις της τανταλαφίλης, βαρδεναφίλης ή σιλδεναφίλης στην γονιμοποιητική ικανότητα των σπερματοζωαρίων. Αποδείχτηκε ισχυρότατα ότι οι παραπάνω αναστολείς της φωσφοδιεστεράσης 5, στατιστικά σημαντικά ελάττωσαν το ποσοστό των σπερματοζωαρίων με ακέραια χρωματίνη. Αντίθετα, κανένας από τους παραπάνω φαρμακευτικούς παράγοντες δεν επηρέασε στατιστικά σημαντικά τις παραμέτρους κίνησης των σπερματοζωαρίων ή τη διαπερατότητα της μεμβράνης των σπερματοζωαρίων.

Σε επιπρόσθετες μελέτες, αποδείχτηκε ότι η χορήγηση των παραπάνω αναστολέων PDE-5, σε πειραματόζωα στατιστικά σημαντικά και επιζήμια, επέδρασε στη δομή της χρωματίνης. Συνδυασμένη χορήγηση τανταλαφίλης και σισπλατίνης ή σιλδεναφίλης και σισπλατίνης είχε όμοιο αποτέλεσμα.

Οι παρούσες *in vivo* και *in vitro* μελέτες παρέχουν ισχυρότατη απόδειξη για την βλαβερή επίδραση των αναστολέων της PDE-5, στη δομή της χρωματίνης των σπερματοζωαρίων.

8. ABSTRACT

The objective of the present thesis was to elucidate the effects of tadalafil, vardenafil or sildenafil on sperm fertilization capacity. In series of in vitro studies it was shown very vividly that all the above PDE-5 inhibitors significantly reduced the percentage of spermatozoa with intact chromatin.

In contrast, none of the above pharmaceutical factors affected significantly sperm motility, sperm motion analysis parameters or sperm membrane permeability. In series of in vivo studies it was demonstrated that tadalafil or sildenafil or cisplatin significantly and detrimentally affected sperm chromatin condensation. Combined administration of either tadalafil plus cisplatin or sildenafil plus cisplatin had a similar effect.

Our in vivo or in vitro studies demonstrate very vividly a detrimentally significant effect on sperm chromatin status.

9.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. <http://en.wikipedia.org/wiki/Sildenafil>
2. <http://www.zougla.gr/sexuality/article/ta-opiouxa-analgitika-ke-i-stitiki-islitourgi>.
3. http://www.tragiko.net/2013/09/blog-post_9696.html
4. <http://www.enet.gr/?i=news.el.article&id=370489>
5. <http://www.tovima.gr/politics/article/?aid=194027>
6. Αγγελουπούλου Ρ. Εμβρυολογία. Αθήνα: Ιατρικές εκδόσεις "Π.Χ Πασχαλίδης" 1993.
7. Haseltine F, Ohno S. Mechanisms of gonadal differentiation. Science.1981;211:1272-8.
8. Ashcraft KW, Holcomb GW, Murphy JP. Undescended testis and testicular tumors. Pediatric Surgery. 4th ed. 2005,50: 706-716.
9. Grosfeld Jay L, O'Neil J.A, Fonkalsrud Jr EW, Coran AG. Undescended testis, torsion and varicocele. Pediatric Surgery. 6th ed.2006, 75: 1193-1214.
10. Άγιος Α. Ε. , Περιγραφική και εφαρμοσμένη ανατομική, Τα σπλάχνα University Studio Press, 2008.
11. Παπαδόπουλος Ηλίας. Ανδρολογία. Παθήσεις των γεννητικών οργάνων του άρρενος Ζήτα Ιατρικές εκδόσεις,1990.
12. Jarow J. Clinical significance of intratesticular arterial anatomy. J Urol. 1991;145(4):777-9.
13. Hickman Romberts Larson. Ζωολογία Ολοκληρωμένες αρχές Α' Τόμος. Επιμέλεια Μαρία Αποστολοπούλου, Εκδόσεις Ίων
14. Σημειώσεις ανδρολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων Καθηγητής κ. Νικόλαος Σοφικίτης και Επίκουρος Καθηγητής κ. Δημήτριος Μπαλτογιάννης,2012.
15. de Kretser DM, Kerr JB. The cytology of the testis. In: Knobil E, Neill JD, eds. The Physiology of Reproduction. New York: 2nd ed. Raven Press; 1994:1177-290.
16. Fawcett DW, Bedford JM. The spermatozoon.Maturation,Motility,Surface Properties and comparative aspects. Munchen - Wien - Baltimore: Urban a. Schwarzenberg 1979.

17. Clermont Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol Rev* 1972;52(1):198-236.
18. Clermont Y. The cycle of the seminiferous epithelium in man. *Am J Anat* 1963(112):35.
19. Schultze C. Sertoli cells and Leydig cells in man. *Advanc Anat Embryol* 1984;88:1-104.
20. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, Fifth edition, 2010
21. Guyton. *Ιατρική φυσιολογία*. Philadelphia: Λίτσαζ 1992.
22. Prince FP. Ultrastructural evidence of mature Leydig cells and Leydig cell regression in the neonatal human testis. *Anat Rec* 1990;228(4):405-17.
23. Christensen AK, Peacock KC. Increase in Leydig cell number in testes of adult rats treated chronically with an excess of human chorionic gonadotropin. *Biol Reprod* 1980;22(2):383-91.
24. Christensen AK. Leydig cells. In: Hamilton DW, Greep RO, eds. *Endocrinology Male Reproductive System*. Baltimore: Williams and Wilkins; 1975:57-94.
25. Payne AH, Hardy MP, Russell LD. *The Leydig Cell*. Illinois: Cache River Press; 1996.
26. In vitro spermatogenesis as a method to bypass pre-meiotic or post-meiotic barriers blocking the spermatogenetic process: genetic and epigenetic implications in assisted reproductive technology. Georgiou I, Pardalidis N, Giannakis D, Saito M, Watanabe T, Tsounapi P, Loutradis D, Kanakas N, Karagiannis A, Baltogiannis D, Giotitsas N, Miyagawa I, Sofikitis N. *Andrologia*. 2007 Oct;39(5):159-76.
27. Georgiou I, Syrrou M, Pardalidis N, Karakitsios K, Mantzavinos T, Giotitsas N, Loutradis D, Dimitriadis F, Saito M, Miyagawa I, Tzoumis P, Sylakos A, Kanakas N, Moustakareas T, Baltogiannis D, Touloupides S, Giannakis D, Fatouros M, Sofikitis N. Genetic and epigenetic risks of intracytoplasmic sperm injection method. *Asian J Androl*. 2006 Nov;8(6):643-73.
28. Austin C. *Sperm maturation in the male and female genital tracts*. New York: Bioogy of Fertilisation, Academic Press 1985.

29. Βιβλίο Σύγχρονη Ουρολογία, Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, Μιχαήλ Δ. Μελέκος, Κεφάλαιο Γ. Στυτική δυσλειτουργία, Β.Π. Τζώρτζης, Κ. Χατζημουρατίδης, Α. Αποστολίδης, Α. Χατζηχρήστου.
30. Αρχές φυσιολογίας Τόμος II, Robert M. Berne, Matthew N. Levy
Επιστημονική επιμέλεια: Ηλίας Κούβελα, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης.
31. Baird DT, Galbraith A, Fraser IS, Newsam JE. The concentration of oestrone and oestradiol-17 in spermatic venous blood in man. *J Endocrinol* 1973;57(2):285-8.
32. De Kretser DM, Catt KJ, Paulsen CA. Studies on the in vitro testicular binding of iodinated luteinizing hormone in rats. *Endocrinology* 1971;88(2):332-7.
33. Loosfelt H, Misrahi M, Atger M, et al. Cloning and sequencing of porcine LH-hCG receptor cDNA: variants lacking transmembrane domain. *Science* 1989;245(4917):525-8.
34. Latronico AC, Chai Y, Arnhold IJ, Liu X, Mendonca BB, Segaloff DL. A in helix 7 of the luteinizing hormone receptor associated with familial testicular and ovarian resistance is due to both decreased cell surface expression and impaired effector activation by the cell surface receptor. *Mol Endocrinol* 1998;12(3):442-50.
35. Dufau ML. Endocrine regulation and communicating functions of the Leydig cell. *Annu Rev Physiol* 1988;50:483-508.
36. Dufau ML, Tsuruhara T, Horner KA, Podesta E, Catt KJ. Intermediate role of adenosine 3':5'-cyclic monophosphate and protein kinase during gonadotropin-induced steroidogenesis in testicular interstitial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977;74(8):3419-23.
37. Christensen AK, Peacock KC. Increase in Leydig cell number in testes of adult rats treated chronically with an excess of human chorionic gonadotropin. *Biol Reprod* 1980;22(2):383-91.
38. Waterman MR, Simpson ER. Regulation of steroid hydroxylase gene expression is multifactorial in nature. *Recent Prog Horm Res* 1989;45:533-63; discussion 63-6.

39. Hodgson YM, de Kretser DM. Acute responses of Leydig cells to hCG: evidence for early hypertrophy of Leydig cells. *Mol Cell Endocrinol* 1984;35(2-3):75-82.
40. Wu FC, Irby DC, Clarke IJ, Cummins JT, de Kretser DM. Effects of gonadotropin releasing hormone pulse-frequency modulation on luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone and testosterone secretion in hypothalamo/pituitary-disconnected rams. *Biol Reprod* 1987;37(3):501-10.
41. George H. Sack, Jr, Η Γενετική στην Ιατρική, Επιστημονικές εκδόσεις Παρισσιανού Α.Ε. 2002]
42. Βιολογία Ανάπτυξης, Ανδρονίκη Αναγνωστοπούλου-Μπέη 1993, Εκδόσεις ART of TEXT.
43. Mozaffarian G, Higley M, Paulse C. Clinical studies in an adult male patient with "isolated follicle stimulating hormone (FSH) deficiency." *J Androl.* 1983;4:393.
44. Fairman. The "fertile eunuch" syndrome: Demonstration of isolated luteinizing hormone deficiency by radioimmunoassay technique. *Mayo Clin Proc.* Mayo Clin Proc. 1968;43:661.
45. Liebllich. Syndrome of anosmia with hypogonadotropic hypogonadism (Kallman syndrome). *Am J Med.* 1982;73:506.
46. Bray G, Dahms W, Swerdloff R, al e. The Prader-Willi syndrome: A study of 40 patients and a review of the literature. *Medicine (Baltimore).* 1983;62:59-80.
47. Carter. Prolactin-secreting tumors and hypogonadism in 22 men. *N Engl J Med.* 1978;299:847.
48. Hargreave T, Elton R, Sweeting V, al e. Estradiol and male fertility. *Fertil Steril* 1988;49:871-5.
49. Gabrilove J, Nicolis G, Sohval A. The testis in Cushing's syndrome. *J Urol.* 1974;112:95-9.
50. Jarow JP, Lipshultz LI. Anabolic steroid-induced hypogonadotropic hypogonadism. *Am J Sports Med* 1990(18):429-31.
51. Ovesen P, al e. Growth hormone treatment of subfertile males. *Fertil Steril.* 1996;66:292.

52. Clyde H, Walsh P, English R. Elevated plasma testosterone and gonadotropin levels in infertile males with hyperthyroidism. *Fertil Steril* 1976;27:662–6.
53. Okada H, Fujioka H, Tatsumi N. Klinefelter's syndrome in the male infertility clinic. *Hum Reprod* 1999;14:946–52.
54. Baghdassarian A, Bayard F, Borgaonkar D, Arnold E, Solez K, Migeon C. Testicular function in XYY men. *Johns Hopkins Med J*. 1975;1975(136):15–24.
55. De la Chapelle A. The etiology of maleness in XX men. *Hum Genet* 1981;58:105–16.
56. Perez-Palacios G, Medina M, Ullao-Aguirre A, et al. Gonadotropin dynamics in XX males. *J Clin Endocrinol Metab* 1981;53:254–7.
57. Collins E TG. The Noonan syndrome—a review of the clinical and genetic features of 27 cases. *J Pediatr*. 1973;83:941–50.
58. Aynsley-Green A, Zachmann M, Illig R, Rampini S, Prader A. Congenital bilateral anorchia in childhood: A clinical, endocrine and therapeutic evaluation of twenty-one cases. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1976;5:381–91.
59. Ferlin A, Moro E, Garolla A, et al. Human male infertility and Y chromosome deletions: Role of the AZF-candidate genes DAZ, RBM and DFFRY. *Hum Reprod*. 1999(14):1710–6.
60. Drucker WD BW, Rowland MM, et al. The testis in myotonic muscular dystrophy: A clinical and pathologic study with a comparison with Klinefelter's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1963;23:59.
61. Rothman C, Sims C, Stotts C. Sertoli cell only syndrome *Fertil Steril*. 1982;38:388–90.
62. Tournaye H, Verheyen G, Nagy P, et al. Are there any predictive factors for successful testicular sperm recovery in azoospermic patients? *Hum Reprod* 1997;12:80–6.
63. Ohl DA, Sonksen J. What are the chances of infertility and should sperm be banked. *Semin Urol Oncol*. 1996;14:36–44.
64. Clifton DK, Bremmer W. The effect of testicular X-irradiation on spermatogenesis in man. *J Androl*. 1983(4):387.
65. McKendrick G, Nishtar T. Mumps orchitis and sterility. *Public Health* 1966;80:277–8.

66. Ahlberg NE, Bartley O, Chidekel N. Circumference of the left gonadal vein. An anatomical and statistical study. *Acta Radiol Diagn (Stockh)*. 1965 Nov;3(6):503-12.
67. Raboch J, Stárka L. Hormonal testicular activity in chromatin positive men. *Fertil Steril*. 1971 Mar;22(3):152-5.
68. Hudson RW, McKay DE. The gonadotropin response of men with varicoceles to gonadotropin-releasing hormone. *Fertil Steril*. 1980 Apr;33(4):427-32
69. Turner TT. *J Urol*. 1983 Apr;129(4):695-9. Varicocele: still an enigma.
70. Javert C, Clark R. *Surg Gyn Obst* 1944;79:644–650. Combined operation for varicocele and inguinal hernia: preliminary report.
71. Aitken M, Fiel S. Cystic fibrosis. *Dis Mon* 1993;39:1–52
72. Wilton L, Teichtahl H, Temple-Smith P, et al. Young's syndrome (obstructive azoospermia and chronic sinobronchial infection): A quantitative study of axonemal ultrastructure and function. *Fertil Steril* 1991;55:144–51.
73. "Clinical Andrology. EAU/ESAU Course Guidelines", Edited by Lars Björndahl, Aleksander Giwercman, Herman Tournaye, and Wolfgang Weidner. Published by Informa Healthcare USA, Inc. in association with the European Academy of Urology.
74. [Sofikitis N](#), [Ono K](#), [Yamamoto Y](#), [Papadopoulos H](#), [Miyagawa I](#). Influence of the male reproductive tract on the reproductive potential of round spermatids abnormally released from the seminiferous epithelium. *Hum. Repr.* 1999 Aug;14(8):1998-2006.
75. Bender AT, Beavo JA. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. *Pharmacol Rev* 2006; 58: 488-520.
76. Zaccolo M, Pozzan T. Discrete microdomains with high concentration of cAMP in stimulated rat neonatal cardiac myocytes. *Science* 2002; 295: 1711-5.
77. Lue TF. Erectile dysfunction. *N Engl J Med* 2000; 342: 1802-13.
78. Ghofrani HA, Wiedemann R, Rose F, Olschewski H, Schermuly RT, Weissmann N, et al. Combination therapy with oral sildenafil and inhaled iloprost for severe pulmonary hypertension. *Ann Intern Med* 2002; 136: 515-22.

79. Ghofrani HA, Olschewski H, Seeger W, Grimminger F. [Sildenafil for treatment of severe pulmonary hypertension and commencing right-heart failure]. *Pneumologie* 2002; 56: 665-72.
80. Ghofrani HA, Schermuly RT, Rose F, Wiedemann R, Kohstall MG, Kreckel A, et al. Sildenafil for long-term treatment of nonoperable chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167: 1139-41.
81. Schermuly RT, Kreisselmeier KP, Ghofrani HA, Yilmaz H, Butrous G, Ermert L, et al. Chronic sildenafil treatment inhibits monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 169: 39-45.
82. Galie N, Ghofrani HA, Torbicki A, Barst RJ, Rubin LJ, Badesch D, et al. Sildenafil citrate therapy for pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med* 2005; 353: 2148-57.
83. Setchell BP, Maddocks S, Brooks DE. In *The Physiology of Reproduction*, E. Knobil; J.D. Neill, eds.; New York, Raven Press:1994, pp. 1063-175.
84. Davidoff MS, Breucker H, Holstein AF, Seidl K. Cellular architecture of the lamina propria of human seminiferous tubules. *Cell Tissue Res* 1990; 262: 253-61.
85. Mewe M, Bauer CK, Muller D, Middendorff R. Regulation of spontaneous contractile activity in the bovine epididymal duct by cyclic guanosine 5'-monophosphate-dependent pathways. *Endocrinology* 2006; 147: 2051-62.
86. Swinnen JV, Joseph DR, Conti M. Molecular cloning of rat homologues of the *Drosophila melanogaster dunce* cAMP phosphodiesterase: evidence for a family of genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 5325-9.
87. Geremia R, Rossi P, Pezzotti R, Conti M. Cyclic nucleotide phosphodiesterase in developing rat testis. Identification of somatic and germ-cell forms. *Mol Cell Endocrinol* 1982; 28: 37-53.
88. Morena AR, Boitani C, de Grossi S, Stefanini M, Conti M. Stage and cell-specific expression of the adenosine 3',5' monophosphate phosphodiesterase genes in the rat seminiferous epithelium. *Endocrinology* 1995; 136: 687-95.

89. Fujishige K, Kotera J, Michibata H, Yuasa K, Takebayashi S, Okumura K, et al. Cloning and characterization of a novel human phosphodiesterase that hydrolyzes both cAMP and cGMP (PDE10A). *J Biol Chem* 1999; 274: 18438-45.
90. Fujishige K, Kotera J, Omori K. Striatum- and testis-specific phosphodiesterase PDE10A isolation and characterization of a rat PDE10A. *Eur J Biochem* 1999; 266:1118-27.
91. Soderling SH, Bayuga SJ, Beavo JA. Cloning and characterization of a cAMP-specific cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 8991-6.
92. Baxendale RW, Fraser LR. Mammalian sperm phosphodiesterases and their involvement in receptor-mediated cell signaling important for capacitation. *Mol Reprod Dev* 2005; 71: 495-508.
93. Francis SH. Phosphodiesterase 11 (PDE11): is it a player in human testicular function? *Int J Impot Res* 2005; 17: 467-8.
94. Wayman C, Phillips S, Lunny C, Webb T, Fawcett L, Baxendale R, et al. Phosphodiesterase 11 (PDE11) regulation of spermatozoa physiology. *Int J Impot Res* 2005; 17: 216-23.
95. Ricker DD. The autonomic innervation of the epididymis: its effects on epididymal function and fertility. *J Androl* 1998; 19: 1-4.
96. Mewe M, Bauer CK, Schwarz JR, Middendorff R. Mechanisms regulating spontaneous contractions in the bovine epididymal duct. *Biol Reprod* 2006; 75: 651-9.
97. Mulryan K, Gitterman DP, Lewis CJ, Vial C, Leckie BJ, Cobb AL, et al. Reduced vas deferens contraction and male infertility in mice lacking P2X1 receptors. *Nature* 2000; 403: 86-9.
98. Lucas KA, Pitari GM, Kazerounian S, Ruiz-Stewart I, Park J, Schulz S, et al. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacol Rev* 2000; 52: 375-414.
99. Glover TD, Nicander L. Some aspects of structure and function in the mammalian epididymis. *J Reprod Fertil Suppl* 1971; 13: Suppl13:39-50.

100. Dimitriadis F, Giannakis D, Pardalidis N, Zikopoulos K, Paraskevaidis E, Giotitsas N, et al. Effects of phosphodiesterase-5 inhibitors on sperm parameters and fertilizing capacity. *Asian J Androl* 2008; 10: 115-33.
101. Abdel-Hamid IA. Phosphodiesterase 5 inhibitors in rapid ejaculation: potential use and possible mechanisms of action. *Drugs* 2004; 64: 13-26.
102. Chen J, Mabjeesh NJ, Matzkin H, Greenstein A. Efficacy of sildenafil as adjuvant therapy to selective serotonin reuptake inhibitor in alleviating premature ejaculation. *Urology* 2003; 61:197-200.
103. Sundkvist E, Jaeger R, Sager G. Pharmacological characterization of the ATP dependent low K(m) guanosine 3',5'-cyclic monophosphate (cGMP) transporter in human erythrocytes. *Biochem Pharmacol* 2002; 63: 945-9.
104. Medina P, Segarra G, Torondel B, Chuan P, Domenech C, Vila JM, et al. Inhibition of neuroeffector transmission in human vas deferens by sildenafil. *Br J Pharmacol* 2000;131:871-4.
105. Bilge SS, Kesim Y, Kurt M, Aksoz E, Celik S. Possible role of sildenafil in inhibiting rat vas deferens contractions by influencing the purinergic system. *Int J Urol* 2005; 12:829-34.
106. Ponchietti R, Raugei A, Lanciotti E, Ademollo B, Galvan P, Poggini G. Calcium, zinc, magnesium, concentration in seminal plasma of infertile men with prostatitis. *Acta Eur Fert* 1984; 15:283-5.
107. Fair WR, Couch J, Wehner N. The purification and assay of the prostatic antibacterial factor (PAF). *Biochem Med* 1973; 8: 329-39.
108. Meares EM, Jr. Prostatitis. *Med Clin North Am* 1991; 75: 405-24.
109. Burnett AL, Maguire MP, Chamness SL, Ricker DD, Takeda M, Lepor H, et al. Characterization and localization of nitric oxide synthase in the human prostate. *Urology* 1995; 45: 435-9.
110. Takeda M, Tang R, Shapiro E, Burnett AL, Lepor H. Effects of nitric oxide on human and canine prostates. *Urology* 1995; 45: 440-6.
111. Uckert S, Kuthe A, Jonas U, Stief CG. Characterization and functional relevance of cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzymes of the human prostate. *J Urol* 2001;166: 2484-90.

112. Grimsley SJ, Khan MH, Jones GE. Mechanism of Phosphodiesterase 5 inhibitor relief of prostatitis symptoms. *Med Hypotheses* 2007; 69: 25-6.
113. Yuasa K, Kanoh Y, Okumura K, Omori K. Genomic organization of the human phosphodiesterase PDE11A gene. Evolutionary relatedness with other PDEs containing GAF domains. *Eur J Biochem* 2001; 268: 168-78.
114. Loughney K, Taylor J, Florio VA. 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase 11A: localization in human tissues. *Int J Impot Res* 2005; 17: 320-5.
115. Burger M, Sikka SC, Bivalacqua TJ, Lamb DJ, Hellstrom WJ. The effect of sildenafil on human sperm motion and function from normal and infertile men. *Int J Impot Res* 2000; 12: 229-34.
116. Andrade JR, Traboulsi A, Hussain A, Dubin NH. In vitro effects of sildenafil and phentolamine, drugs used for erectile dysfunction, on human sperm motility. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 182: 1093-5.
117. Su YH, Vacquier VD. Cyclic GMP-specific phosphodiesterase-5 regulates motility of sea urchin spermatozoa. *Mol Biol Cell* 2006;17: 114-21.
118. Mostafa T. In vitro sildenafil citrate use as a sperm motility stimulant. *Fertil Steril* 2007; 88: 994-6.
119. Lefievre L, De Lamirande E, Gagnon C. The cyclic GMP-specific phosphodiesterase inhibitor, sildenafil, stimulates human sperm motility and capacitation but not acrosome reaction. *J Androl* 2000;21: 929-37.
120. Cuadra DL, Chan PJ, Patton WC, Stewart SC, King A. Type 5 phosphodiesterase regulation of human sperm motility. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 182: 1013-5.
121. Glenn DR, McVicar CM, McClure N, Lewis SE. Sildenafil citrate improves sperm motility but causes a premature acrosome reaction in vitro. *Fertil Steril* 2007; 87: 1064-70
122. Mostafa T. Tadalafil as an in vitro sperm motility stimulant. *Andrologia* 2007; 39:12-5.
123. Jaiswal BS, Majumder GC. Cyclic AMP phosphodiesterase: a regulator of forward motility initiation during epididymal sperm maturation. *Biochem Cell Biol* 1996; 74:669-74.

124. Rees JM, Ford WC, Hull MG. Effect of caffeine and of pentoxifylline on the motility and metabolism of human spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1990; 90: 147-56.
125. Levin RM, Greenberg SH, Wein AJ. Quantitative analysis of the effects of caffeine on sperm motility and cyclic adenosine 3',5'- monophosphate (AMP) phosphodiesterase. *Fertil Steril* 1981; 36:798-802.
126. Tesarik J, Mendoza C, Carreras A. Effect of phosphodiesterase inhibitors, caffeine and pentoxifylline, on spontaneous and stimulus-induced acrosome reactions in human sperm. *Fertil Steril* 1992; 58: 1185-90.
127. Tesarik J, Thebault A, Testart J. Effect of pentoxifylline on sperm movement characteristics in normozoospermic and asthenozoospermic specimens. *Hum Reprod* 1992; 7: 1257-63.
128. Wang C, Chan CW, Wong KK, Yeung KK. Comparison of the effectiveness of placebo, clomiphene citrate, mesterolone, pentoxifylline, and testosterone rebound therapy for the treatment of idiopathic oligospermia. *Fertil Steril* 1983; 40: 358-65.
129. Marrama P, Baraghini GF, Carani C, Celani MF, Giovenco P, Grandi F, et al. Further studies on the effects of pentoxifylline on sperm count and sperm motility in patients with idiopathic oligoasthenozoospermia. *Andrologia* 1985; 17: 612-6.
130. Shen MR, Chiang PH, Yang RC, Hong CY, Chen SS. Pentoxifylline stimulates human sperm motility both in vitro and after oral therapy. *Br J Clin Pharmacol* 1991; 31: 711-4.
131. Pang SC, Chan PJ, Lu A. Effects of pentoxifylline on sperm motility and hyperactivation in normozoospermic and normokinetic semen. *Fertil Steril* 1993; 60:336-43.
132. Fuse H, Sakamoto M, Ohta S, Katayama T. Effect of pentoxifylline on sperm motion. *Androl* 1993; 31: 9-15.
133. Tournaye H, Van Steirteghem AC, Devroey P. Pentoxifylline in idiopathic male-factor infertility: a review of its therapeutic efficacy after oral administration. *Hum Reprod* 1994; 9: 996-1000.
134. Stefanovich V. Effect of 3,7-dimethyl-1-(5-oxo-hexyl)xanthine and 1-hexyl-3,7 dimethyl xanthine on cyclic AMP phosphodiesterase of the human

- umbilical cord vessels. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1973; 5: 655-62.
135. Garbers DL, Kopf GS. The regulation of spermatozoa by calcium cyclic nucleotides. *Adv Cyclic Nucleotide Res* 1980; 13: 251-306.
136. Tash JS, Means AR. Cyclic adenosine 3',5' monophosphate, calcium and protein phosphorylation in flagellar motility. *Biol Reprod* 1983; 28: 75-104.
137. Ward A, Clissold SP. Pentoxifylline. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and its therapeutic efficacy. *Drugs* 1987; 34: 50-97.
138. Twigg J, Fulton N, Gomez E, Irvine DS, Aitken RJ. Analysis of the impact of intracellular reactive oxygen species generation on the structural and functional integrity of human spermatozoa: lipid peroxidation, DNA fragmentation and effectiveness of antioxidants. *Hum Reprod* 1998; 13: 1429-36.
139. Lopes S, Jurisicova A, Sun JG, Casper RF. Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod* 1998; 13: 896-900.
140. Lewis SE, Moohan JM, Thompson W. Effects of pentoxifylline on human sperm motility in normospermic individuals using computer-assisted analysis. *Fertil Steril* 1993; 59: 418-23.
141. Moohan JM, Winston RM, Lindsay KS. Variability of human sperm response to immediate and prolonged exposure to pentoxifylline. *Hum Reprod* 1993; 8: 1696-700.
142. Centola GM, Cartie RJ, Cox C. Differential responses of human sperm to varying concentrations of pentoxifylline with demonstration of toxicity. *J Androl* 1995; 16:136-42.
143. Paul M, Sumpter JP, Lindsay KS. Factors affecting pentoxifylline stimulation of sperm kinematics in suspensions. *Hum Reprod* 1996;11: 1929-35.
144. Nassar A, Mahony M, Morshedi M, Lin MH, Srisombut C, Oehninger S. Modulation of sperm tail protein tyrosine phosphorylation by pentoxifylline and its correlation with hyperactivated motility. *Fertil Steril* 1999; 71: 919-23.

145. Fisch JD, Behr B, Conti M. Enhancement of motility and acrosome reaction in human spermatozoa: differential activation by type specific phosphodiesterase inhibitors. *Hum Reprod* 1998; 13: 1248-54.
146. Sikka SC, Hellstrom WJ. The application of pentoxifylline in the stimulation of sperm motion in men undergoing electroejaculation. *J Androl* 1991; 12: 165-70.
147. Tournaye H, Devroey P, Camus M, Van der Linden M, Janssens R, Van Steirteghem A. Use of pentoxifylline in assisted reproductive technology. *Hum Reprod* 1995; 10 Suppl 1: 72-9.
148. Schill WB, Pritsch W, Preissler G. Effect of caffeine and kallikrein on cryo-preserved human spermatozoa. *Int J Fertil* 1979; 24: 27-32.
149. Schill WB. Caffeine- and kallikrein-induced stimulation of human sperm motility: a comparative study. *Andrologia* 1975; 7: 229-36.
150. De Turner E, Aparicio NJ, Turner D, Schwarzstein L. Effect of two phosphodiesterase inhibitors, cyclic adenosine 3':5'-monophosphate, and a beta-blocking agent on human sperm motility. *Fertil Steril* 1978; 29: 328-31.
151. Haesungcharern A, Chulavatnatol M. Stimulation of human spermatozoal motility by caffeine. *Fertil Steril* 1973; 24: 662-5.
152. Purvis K, Muirhead GJ, Harness JA. The effects of sildenafil on human sperm function in healthy volunteers. *Br J Clin Pharmacol* 2002; 53 Suppl 1: 53S-60S.
153. Aversa A, Mazzilli F, Rossi T, Delfino M, Isidori AM, Fabbri A. Effects of sildenafil (Viagra) administration on seminal parameters and post-ejaculatory refractory time in normal males. *Hum Reprod* 2000; 15: 131-4.
154. Tur-Kaspa I, Segal S, Moffa F, Massobrio M, Meltzer S. Viagra for temporary erectile dysfunction during treatments with assisted reproductive technologies. *Hum Reprod* 1999; 14: 1783-4.
155. du Plessis SS, de Jongh PS, Franken DR. Effect of acute in vivo sildenafil citrate and in vitro 8-bromo-cGMP treatments on semen parameters and sperm function. *Fertil Steril* 2004; 81: 1026-33.
156. Jannini EA, Lombardo F, Salacone P, Gandini L, Lenzi A. Treatment of sexual

- dysfunctions secondary to male infertility with sildenafil citrate. *Fertil Steril* 2004; 81:705-7.
157. Lenzi A, Lombardo F, Salacone P, Gandini L, Jannini EA. Stress, sexual dysfunctions, and male infertility. *J Endocrinol Invest* 2003;26: 72-6.
 158. Sofikitis N, Miyagawa I. Secretory dysfunction of the male accessory genital glands due to prostatic infections and fertility; a selected review of the literature. *Jpn J Fertil Steril* 1991; 36: 690-9.
 159. Portnoy L. The diagnosis and prognosis of male infertility: a study of 44 cases with special reference to sperm morphology. *J Urol* 1946; 48: 735.
 160. Sofikitis NV, Miyagawa I. Endocrinological, biophysical, and biochemical parameters of semen collected via masturbation versus sexual intercourse. *J Androl* 1993; 14: 366-73.
 161. Yamamoto Y, Sofikitis N, Mio Y, Miyagawa I. Influence of sexual stimulation on sperm parameters in semen samples collected via masturbation from normozoospermic men or cryptozoospermic men participating in an assisted reproduction programme. *Andrologia* 2000; 32: 131-8.
 162. Salisbury GW, Vandermark NL, Freeman: 1961, pp. 395–6.
 163. Sharma OP, Hays RL. Release of an oxytocic substance following
 164. Hafs HD, Knisely RC, Desjardens C. Sperm output of dairy bulls with varying degrees of sexual preparation. *J Dairy Sci* 1962; 35:359-62.
 165. Ali ST, Rakkah NI. Neurophysiological role of sildenafil citrate (Viagra) on seminal parameters in diabetic males with and without neuropathy. *Pak J Pharm Sci* 2007; 20:36-42.
 166. Pomara G, Morelli G, Canale D, Turchi P, Caglieresi C, Moschini C, et al. Alterations in sperm motility after acute oral administration of sildenafil or tadalafil in young, infertile men. *Fertil Steril* 2007; 88: 860-5.
 167. Nomura M, Vacquier VD. Proteins associated with soluble adenylyl cyclase in sea urchin sperm flagella. *Cell Motil Cytoskeleton* 2006; 63: 582-90.
 168. Hellstrom WJ, Overstreet JW, Yu A, Saikali K, Shen W, Beasley CM, Jr., et al. Tadalafil has no detrimental effect on human spermatogenesis or reproductive hormones. *J Urol* 2003; 170: 887-91.
 169. Hellstrom WJ, Gittelman M, Jarow J, Steidle C, McMurray J, Talley D, et al. An evaluation of semen characteristics in men 45 years of age or older

- after daily dosing with tadalafil 20mg: results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo controlled, 9- month study. *Eur Urol* 2008; 53:1058-65.
170. Bauer RJ, Rohde G. A single oral dose of vardenafil had no acute effect on sperm motility in healthy males. 27th Annual Meeting of the American Society of Andrology. April 24-27, 2002. Seattle, Washington, USA. *J Androl* 2002; Suppl: 26.
171. Jarvi K, Dula E, Drehobl M, Pryor J, Shapiro J, Seger M. Daily vardenafil for 6 months has no detrimental effects on semen characteristics or reproductive hormones in men with normal baseline levels. *J Urol* 2008; 179: 1060-5.
172. Clause, B. T. (1998). The Wistar Institute Archives: Rats (Not Mice) and History, *Mendel Newsletter* February, 1998.], ["The Wistar Institute:History". The Wistar Institute. 2007. Retrieved 2008-11-09
173. Van Zutphen L.F.M, Baumans V., Beyens A.C., Επιμέλεια: Γ.Π. Πατρινός, Ν. Παπαϊωάννου. «Αρχές της Επιστήμης των Πειραματοζώων», 60-168, Σύγχρονη Παιδεία, 2002
174. Havenaar R, Meijer JC, Morton DB, Ritskes-Hoiting J, Zwart P. Biology and husbandry of laboratory animals. In: van Zutphen LFM, Baumans V, Beyen AC (eds). *Principles of Laboratory Animal Science. A contribution to the humane use and care of animals and to the quality of experimental results*. Elsevier, Amsterdam, 1993, p. 17-75.
175. Laboratory 10 Vertebrate form and function - www.framingham.edu/faculty/biology1/ratanatomy.htm - 48k
176. D.M.de Kretser et al. 1998, *Human Reproduction* Volume 13 Supplement 1.
177. Reith, A.D. and Bernstein, A. (1991) Molecular biology of the W and steel loci. *Genome Anal*, 3, 105-133
178. Li LH, Wine RN, Chapin RE. 2-Methoxyacetic acid (MAA)-induced spermatocyte apoptosis in human and rat testes: an in vitro comparison. *J Androl* 1996;17(5):538-49
179. Heiskanen P, Billig H, Toppari J, et al. Apoptotic cell death in the normal and cryptorchid human testis: the effect of human chorionic gonadotropin on testicular cell survival. *Pediatr Res* 1996;40(2):351-6.

180. Billig H, Furuta I, Rivier C, Tapanainen J, Parvinen M, Hsueh AJ. Apoptosis in testis germ cells: developmental changes in gonadotropin dependence and localization to selective tubule stages. *Endocrinology* 1995;136(1):5-12.
181. Kerr JB. Spontaneous degeneration of germ cells in normal rat testis: assessment of cell types and frequency during the spermatogenic cycle. *J Reprod Fertil* 1992;95(3):825-30. 154. Ross AJ, Waymire KG, Moss JE, et al. Testicular degeneration in Bclw deficient mice.)
182. Scipioni A, Stefanini S, Santone R, Giorgi M. Immunohistochemical localisation of PDE5 in Leydig and myoid cells of prepuberal and adult rat testis. *Histochem Cell Biol* 2005; 124:401-7.
183. <http://www.genengnews.com/gen-news-highlights/team-generates-3-d-epithelial-tumors-in-vitro-from-normal-human-primary-cells/81244276/>
184. Yamamoto Y, Maenosono S, Okada H, Miyagawa I, Sofikitis N. Comparisons of sperm quality, morphometry and function among human sperm populations recovered via SpermPrep II filtration, swim-up and Percoll density gradient methods. *Andrologia*. 1997 Nov-Dec;29(6):303-10
185. Monique P. Curran and Gillian M. Keating. Tadalafil. *Drugs* 2003; 63 (20) 2203- 2212.
186. http://en.wikiaedia.org/wiki/PDE5_inhibitor
187. <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Vardenafil.svg>
188. R.Golan, L.Shochat, R.Weissenberg, Y.Soffer, Z.Marcus, Y.Oschry and L.M.Lewin. Evaluation of chromatin condensation in human spermatozoa: a flow cytometric assay using Acridine Orange staining. *Molecular Human Reproduction* vol.3 no.1 pp. 47–54, 1997
189. Lazaros L, Kaponis A, Vartholomatos G, Hatzi E, Botsari S, Plachouras N, Makrydimas G, Zikopoulos K, Sofikitis N, Georgiou I. Using semen flow cytometry to evaluate association of ploidy status and chromatin condensation of spermatozoa with conventional semen parameters: clinical application in intrauterine insemination. *Fertil Steril*. 2011a Jan;95(1):110-5.
190. Lazaros LA, Vartholomatos GA, Hatzi EG, Kaponis AI, Makrydimas GV, Kalantaridou SN, Sofikitis NV, Stefos TI, Zikopoulos KA, Georgiou IA. Assessment of sperm chromatin condensation and ploidy status

- using flow cytometry correlates to fertilization, embryo quality and pregnancy following in vitro fertilization. *J Assist Reprod Genet.* 2011b Sep;28(10):885-91.
191. Check JH, Bollendorf A, Lee MA, Nazari A, Nowroozi K. Correlation of computerized semen analysis with successful fertilization of oocytes in an in vitro fertilization program. *Arch Androl.* 1990;24(3):229-34.
 192. Liu DY, Clarke GN, Baker HW. Relationship between sperm motility assessed with the Hamilton-Thorn motility analyzer and fertilization rates in vitro. *J Androl.* 1991 Jul-Aug;12(4):231-9.
 193. Barratt CL, Tomlinson MJ, Cooke ID. *Fertil Steril.* 1993 Sep;60(3):520-5. Prognostic significance of computerized motility analysis for in vivo fertility.
 194. Jeyendran RS, Van der Ven HH, Kennedy W, Perez-Pelaez M, Zaneveld LJ. *J Androl.* 1984 Jan-Feb;5(1):1-7. Comparison of glycerol and a zwitter ion buffer system as cryoprotective media for human spermatozoa. Effect on motility, penetration of zona-free hamster oocytes, and acrosin/proacrosin.
 195. Toda T, Sofikitis N, Miyagawa I, Zavos P, Harada T, Mio Y, Terakawa N. *Arch Androl.* 1992 Nov-Dec;29(3):219-24. The importance of the hypoosmotic swelling test and acrosin activity assay for identifying subpopulations of idiopathic infertile men.
 196. James D Stanger, Long Vo, John L Yovich, Ghanim Almahbobi *Reproductive BioMedicine Online* (2010) 21, 474– 484. Hypo-osmotic swelling test identifies individual spermatozoa with minimal DNA fragmentation
 197. Evenson DP, Jost LK, Baer RK, Turner TW, Schrader SM. Individuality of DNA denaturation patterns in human sperm as measured by the sperm chromatin structure assay. *Reprod Toxicol.* 1991;5(2):115-25.
 198. Evenson DP. *Methods Mol Biol.* 2013;927:147-64. Sperm chromatin structure assay(SCSA®).
 199. <https://www.scsadiagnostics.com/about-the-test>
 200. Tejada RI, Mitchell JC, Norman A, Marik JJ, Friedman S. *Fertil Steril.* 1984 Jul;42(1):87-91. A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence.

201. Antypas S, Sofikitis N, Rodriguez F, Zavos PM, Miyagawa I. *J Pediatr Surg.* 1994 Jun;29(6):828-31. Bilateral effect of unilateral vasectomy on testicular testosterone biosynthesis.
202. Satyanarayan G. Bhat, Zhongzhen Nie, Vickram Ramkumar .Cisplatin up-regulates adenosine A₁ receptors in rat testes. *European Journal of Pharmacology* 382 1999. 35–43
203. Mehmet Serdar Kutuk, Mahmut Tuncay Ozgun, Cem Batukan, Bulent Ozcelik, Mustafa Basbug, and Ahmet Ozturk. Oral tadalafil reduces intra-abdominal adhesion reformation in rats. *Human Reproduction*, Vol.27, No.3 pp. 733–737, 2012
204. Sofikitis N, Takahashi C, Kadowaki Het al. Surgical repair versus medical treatment of varicocele in the rat: pharmacological manipulation of the varicocele testicle. *Eur Urol* 1992;22:44–52.
205. Kapawa A, Giannakis D, Tsoukanelis K, Kanakas N, Baltogiannis D, Agapitos E, Loutradis D, Miyagawa I, Sofikitis N. Effects of paternal cigarette smoking on testicular function, sperm fertilizing capacity, embryonic development, and blastocyst capacity for implantation in rats. *Andrologia.* 2004 Apr;36(2):57-68.
206. Lewin LM, Golan R, Freidlin P, Shochat L. A comparative study of spermatozoal chromatin using acridine orange staining and flow cytometry. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 1999 Oct;124(2):133-7.
207. http://www.savt.ca/html/conference/proceedings/Rodent_Anesthesia/index.cfm
208. Peyrone M., 1844. Ueber die Einwirkung des Ammoniaks auf Platinchlorür. *Ann Chem Pharm* 51(1): 1-29.
209. <http://en.wikipedia.org/wiki/Cisplatin>.
210. MSDS, Cisplatin Injection, USP - BDI Pharma, Inc.
211. Balafas E, Papastefanou A, Katsimpoulas M Kostomitsopoulos N. A low cost face mask for inhalation anaesthesia in Rats. *Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science*, 2011; 38 (2): 111- 115
212. M. Aleem, V. Padwal, J. Choudhari, N. Balasinor, M. K. Gill-Sharma. Sperm protamine levels as indicators of fertilising potential in sexually mature male rats. *Andrologia.* 2008 Feb;40(1):29-37.

213. Dibyendu Dutta, In Park, And Nathaniel C. Mills. Fixation Temperature Affects DNA Integrity in the Testis as Measured by the TUNEL Assay *Toxicologic Pathology*, 40: 667-674, 2012
214. Kiernan, J. A. (1990). Fixation. In *Histological and Histochemical Methods: Theory and Practices*, pp. 10–31. Pergamon Press, London.
215. Ana Paula Alves Favareto, Fabvola Choqueta de Toledo, Wilma De Grava Kempinas. Paternal treatment with cisplatin impairs reproduction of adult male offspring in rats. *Reproductive Toxicology* 32 (2011) 425–433.
216. Van der Ven HH, Jeyendran RS, Al-Hasani S, Perez-Pelaez M, Diedrich K, Zaneveld LJ.J Correlation between human sperm swelling in hypoosmotic medium (hypoosmotic swelling test) and in vitro fertilization. *Androl.* 1986 May-Jun;7(3):190-6.
217. Dimitriadis F, Tsambalas S, Tsounapi P, Kawamura H, Vlachopoulou E, Haliasos N, Gratsias S, Watanabe T, Saito M, Miyagawa I, Sofikitis N. Effects of phosphodiesterase-5 inhibitors on Leydig cell secretory function in oligoasthenospermic infertile men: a randomized trial. *BJU Int.* 2010;106(8):1181-5.
218. Vlachopoulou E, Tsiriopoulos I, Dimitriadis F, Baltogiannis D, Miyagawa I, Sofikitis N. Effects of vardenafil on Sertoli cell secretory function. 24th annual EUA Congress. March 17th-21st 2009, Stockholm. *Eur Urol Suppl* 2009; 8: 148.
219. Dimitriadis F, Tsampalas S, Tsounapi P, Giannakis D, Chaliasos N, Baltogiannis D, Miyagawa I, Saito M, Takenaka A, Sofikitis N. Effects of phosphodiesterase-5 inhibitor vardenafil on testicular androgen-binding protein secretion, the maintenance of foci of advanced spermatogenesis and the sperm fertilising capacity in azoospermic men. *Andrologia.* 2012;44 Suppl 1:144-53.
220. Dimitriadis F, Giannakis D, Pardalidis N, Tsoukanelis K, Kanakas N, Saito M, Watanabe T, Miyagawa I, Tsounapi P, Sofikitis N. Effects of primary testicular damage on sperm DNA oxidative status and embryonic and foetal development. *Andrologia.* 2009 Oct;41(5):282-96.
221. Sofikitis N, Miyagawa I, Yamamoto Y, Loutradis D, Mantzavinos T, Tarlatzis

- V. Micro- and macro-consequences of ooplasmic injections of early haploid male. *Hum Reprod Update*. 1998 May-Jun;4(3):197-212.
222. Perreault SD and Zirkin BR. Sperm nuclear decondensation in mammals: role of sperm-associated proteinase in vivo. *J Exp Zool*. 1982 Dec10;224(2):253-7.
223. Fawcett DW, Eddy EM, Phillips DM. Observations on the fine structure and relationships of the chromatoid body in mammalian spermatogenesis. *Biol Reprod*. 1970 Feb;2(1):129-53.
224. Hao Y, Xu N, Box AC, Schaefer L, Kannan K, Zhang Y, Florens L, Seidel C, Washburn MP, Wiegraabe W, Mak HY. Nuclear cGMP-dependent kinase regulates gene expression via activity-dependent recruitment of a conserved histone deacetylase complex. *PLoS Genet*. 2011 May;7(5):e1002065.
225. Hesabi B, Danziger RS, Kotlo KU. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 is a novel cellular target of atrial natriuretic peptide signaling in renal epithelial cells. *Cell Signal*. 2012 May;24(5):1100-8.
226. Kim TS, Ko IG, Sung YH, Kim SE, Kim BK, Park SK, Shin MS, Kim CJ, Yoon SJ, Kim KH. Vardenafil increases cell proliferation in the dentate gyrus through enhancement of serotonin expression in the rat dorsal raphe. *J Korean Med Sci*. 2009 Dec;24(6):1099-104.
227. Shin MS, Ko IG, Sung YH, Kim SE, Kim BK, Kim CJ, Lee SW, Kim DH, Chang JH, Kim KH. Vardenafil Enhances Oxytocin Expression in the Paraventricular Nucleus without Sexual Stimulation. *Int Neurourol J*. 2010 Dec;14(4):213-9.
228. Illi B, Colussi C, Grasselli A, Farsetti A, Capogrossi MC, Gaetano C. NO sparks off chromatin: tales of a multifaceted epigenetic regulator. *Pharmacol Ther*. 2009 Sep;123(3):344-52.
229. Sakandar Rauf 1, Haq Nawaz 1, Kalsoom Akhtar, Muhammad A. Ghauri, Ahmad M. Khalid. Studies on sildenafil citrate (Viagra) interaction with DNA using electrochemical DNA biosensor. *Biosensors and Bioelectronics* 22 (2007) 2471–2477.
230. Brett AM, Macedo TR, Raimundo D, Marques MH, Serrano SH. Voltammetric behaviour of mitoxantrone at a DNA-biosensor. *Biosens Bioelectron*. 1998 Oct 1;13(78):861-7.

231. Brett PM, Parkar M, Olsen I, Tonetti M. Expression profiling of periodontal ligament cells stimulated with enamel matrix proteins in vitro: a model for tissue regeneration. *J Dent Res*. 2002 Nov;81(11):776-83.
232. Karadeniz H, Gulmez B, Sahinci F, Erdem A, Kaya GI, Unver N, Kivcak B, Ozsoz M. Disposable electrochemical biosensor for the detection of the interaction between DNA and lycorine based on guanine and adenine signals. *J Pharm Biomed Anal*. 2003 Sep 19;33(2):295-302.
233. Mello LD, Hernandez S, Marrazza G, Mascini M, Kubota LT. Investigations of the antioxidant properties of plant extracts using a DNA-electrochemical biosensor. *Biosens Bioelectron*. 2006 Jan 15;21(7):1374-82.
234. Sofikitis N, Miyagawa I, Dimitriadis D, Zavos P, Sikka S, Hellstrom W. Effects of smoking on testicular function, semen quality and sperm fertilizing capacity. *J Urol* 1995;154: 1030–42
235. Sofikitis N, Takahashi C, Kadowaki H et al. Surgical repair versus medical treatment of varicocele in the rat: pharmacological manipulation of the varicocele. *Eur Urol* 1992;22:44–52.
236. Sofikitis N, Giotitsas N, Tsounapi P, Baltogiannis D, Giannakis D, Pardalidis N. Hormonal regulation of spermatogenesis and spermiogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2008;109:323–30.
237. Weiss DB, Rodriguez-Rigau LJ, Smith KD, Steinberger E. Leydig cell function in oligospermic men with varicocele. *J Urol* 1978;120: 427–30.
238. Emanuela A. Greco, Marcello Pili, Roberto Bruziches, Giovanni Corona, Giovanni Spera, and Antonio Aversa. Testosterone:Estradiol Ratio Changes Associated with Long-Term. Tadalafil Administration: A Pilot Study. *J Sex Med* 2006;3:716–722.
239. Li-Chun Lisa Tsai and Joseph A Beavo. The roles of cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDEs) in steroidogenesis. *Current Opinion in Pharmacology*. 2011, 11:670–675.
240. Eleonora Carosa, Paolo Martini, Fulvia Brandetti, Savino M. Di Stasi, Francesco Lombardo, Andrea Lenzi and Emmanuele A. Jannini. Type V phosphodiesterase inhibitor treatments for erectile dysfunction increase testosterone levels. *Clinical Endocrinology* (2004)61, 382–386].

241. Morelli, A., Fillipi, S., Mancina, R., Luconi, M., Vignozzi, L., Marini, M., Orlando, C., Vannelli, G.B., Aversa, A., Natali, A., Forti, G., Giorgi, M., Jannini, E.A., Ledda, F. & Maggi, M. Androgens regulate phosphodiesterase type 5 expression and functional activity in corpora cavernosa. *Endocrinology*, 145, 2253–2263].
242. Harun Alp, Umut Cirit, Muzaffer Tas, Murat Mehmet Rifaioglu, Namik Kemal Hatipoğlu, Ismail Aytekin, Mehmet Yucel, Ugur Firat, Mehmet Ferit Ozmen, Ugur Seker, and Leyla Bilge Eren. Effects of Sildenafil Citrate, Isoniazid, and Streptomycin on Testicular Tissue and Epididymal Semen Quality in Rats. *J. urology*. 2012.05.016.
243. Ali Beytur, Osman Ciftci, Fatih Oguz, Hakan Oguzturk, Fethi Yilmaz. Montelukast attenuates side effects of cisplatin including testicular, spermatological, and hormonal damage in male rats. *Cancer Chemother Pharmacol* (2012) 69:207–213.
244. Geraldine Delbecc, Donovan Chan, Pirjo Pakarinen, Jacquetta M. Trasler, Barbara F. Hales and Bernard Robaire. Impact of the Chemotherapy Cocktail Used to Treat Testicular Cancer on the Gene Expression Profile of Germ Cells from Male Brown-Norway Rats. *Biology of reproduction* 80, 320–327 (2009).
245. du Toit EF, Rossouw E, Salie R, Opie LH, Lochner A. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2005 Jan;19(1):23-31. Effect of sildenafil on reperfusion function, infarct size, and cyclic nucleotide levels in the isolated rat heart model.
246. Hamit Yildiz, Ali Said Durmus, Halil Simsek, Ihsan Yaman. Effects of sildenafil citrate on torsion/detorsion-induced changes in red blood cell and plasma lipid peroxidation, antioxidants, and blood hematology of male rats. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 159 (2011) 359–363.
247. M. A. M. Khalaf, M. F. Abbas & H. M. El-Fakahany. Effects of chronic tadalafil use on the testes and sperm parameters of old albino rats *Andrologia* 2012, 44, 370–375.
248. Takihara H, Cosentino MJ, Sakatoku J, Cockett AT. Significance of testicular size measurement in andrology: II. Correlation of testicular size with testicular function. *J Urol*. 1987 Mar;137(3):416-9.

249. Pretorius RG, Petrilli ES, Kean CK, Ford LC, Hoeschele JD, Lagasse LD.
Comparison of the iv and IA routes of administration of cisplatin in
dogs. *Cancer Treat Rep.* 1981 Nov-Dec;65(11-12):1055-62.

10. ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ-ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ

Μέρος των αποτελεσμάτων της παρούσας μελέτης παρουσιάστηκαν σε Ελληνικά και Διεθνή συνέδρια.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

- Post-fertilization effects of chronic renal failure in male rats.

Dimitriadis F, Giannakis D, Giotitsas N, Parldalidis N, Baltogiannis D, Saito M, Watanabe T, Gratsias S, Zikopoulos K, Pashopoulos M, Tsambalas S, Kalaboki V, Tsounapi P, Vlachopoulou E, Gekas A, Melekos M, Makridimas G, Dalkalitsis N, Georgiou I, Agapitos E, Loutradis D, Kanakas N, Miyagawa I, Sofikitis N.

Int J Androl. 2009 Dec;32(6):675-86.

- Effects of phosphodiesterase-5 inhibitors on Leydig cell secretory function in oligoasthenospermic infertile men: a randomized trial.

Dimitriadis F, Tsambalas S, Tsounapi P, Kawamura H, Vlachopoulou E, Haliasos N, Gratsias S, Watanabe T, Saito M, Miyagawa I, Sofikitis N.

BJU Int. 2010 Oct;106(8):1181-5.

- Gynecomastia as a first clinical sign of nonseminomatous germ cell tumor.

Kolitsas N, Tsambalas S, Dimitriadis F, Baltogiannis D, Vlachopoulou E, Vappa S, Giannakis D, Tsounapi P, Takenaka A, Sofikitis N.

Urol Int. 2011;87(2):248-50.

- The (TAAAA)n polymorphism of sex hormone-binding globulin gene is not associated with testicular maldescent.

Mamoulakis C, Sofikitis N, Tsounapi P, Vlachopoulou E, Chatzikyriakidou A, Antypas S, Tzortzakakis D, Sofras F, Takenaka A, Georgiou I.

Andrologia. 2013 Feb;45(1):40-5.

- Θεραπευτική αντιμετώπιση της Ανδρικής Υπογονιμότητας σε συνδυασμό με Προγράμματα Παρένθετης Μητρότητας

Ιωάννης Π. Γιακουμάκης, Ευλαλία Β. Βλαχοπούλου, Παναγιώτα Ν. Τσουνάπη,, Νικόλαος Β. Σοφικίτης. Έγινε δεκτή στο περιοδικό "Ελληνική Ουρολογία" με αριθμό πρωτοκόλλου 765.

- **Intranuclear effects of tadalafil in human spermatozoa**

E. Vlachopoulou, L. Lazaros, S. Gratsias, I. Giannakis, D. Baltogiannis, P. Tsounapi, G. Vartholomatos, I. Georgiou, A. Takenaka, N. Sofikitis

Έχει αποσταλεί στο περιοδικό Andrologia (AND-13-291).

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΙΕΣ

- ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΕΣ ΚΑΙ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΕΣ ΘΕΡΑΠΕΙΕΣ ΣΤΗΝ ΑΝΔΡΙΚΗ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑ

Παρουσιάστηκε ως ανακοίνωση στο 4^ο Διεθνές Συνέδριο στο Πόρτο Χέλι, Πόρτο Χέλι, Ελλάδα

11 – 13 Ιουνίου 2009

Ευλαλία Βλαχοπούλου: Προσκεκλημένη Ομιλήτρια

- Ο ΜΙΚΡΟΚΟΣΜΟΣ ΤΟΥ DNA ΣΤΗΝ ΑΝΔΡΙΚΗ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑ

Παρουσιάστηκε ως ελεύθερη ανακοίνωση στο 19^ο Πανελλήνιο Ουρολογικό Συνέδριο, 1-5 Οκτωβρίου 2008, Porto Carras Grand Resort, Χαλκιδική

Νικόλαος Γιωτίτσας, Φωτεινή Παπαχρήστου, Παναγιώτα Τσουνάπη, **Ευλαλία Βλαχοπούλου**, Σταύρος Τουλουπίδης, Νικόλαος Σοφικίτης

- ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΩΝ ΣΤΟΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΥΚΛΟ ΚΑΙ ΘΑΝΑΤΟ ΤΩΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ ΠΙΝΕΥΜΟΝΑ ΚΑΙ ΤΟΥ ΠΡΟΣΤΑΤΗ.

*B. Γαλάνη, Μ. Κασταμούλας, Γ. Χονδρογιάννης, Γ. Βαρθολομάτος, **E. Βλαχοπούλου**, Δ. Μπαλτογιάννης, Α. Σφήκας, Τ. Μαρκοπούλου, Δ. Αρβανίτης, Μ. Μπάη, Τ. Λιλόγλου, Ε. Κωλέτας, Ν. Σοφικίτης, Π. Καναβάρος.*

Παρουσιάστηκε ως Πόστερ στο 6^ο ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ ,ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑΣ,ΚΕΦΑΛΟΝΙΑ 2010.

- EFFECTS OF VARDENAFIL ON SPERM CAPACITY TO UNDERGO HYPERACTIVATION

***E. Vlachopoulou**, D. Baltogiannis, M. Rimikis, S. Tsambalas, S. Gratsias, N. Sofikitis*

Παρουσιάστηκε στο: American Society of Andrology 34th Annual Conference Hyatt Regency, April 1 – 4, 2009, Philadelphia, Pennsylvania

- EFFECTS OF PHOSPHODIESTERASE-5 INHIBITORS ON LEYDIG CELL SECRETORY FUNCTION

*F. Dimitriadis, I. Tsiriopoulos , D. Baltogiannis , P. Tsounapi , S. Gratsias , **E. Vlachopoulou**, S. Tsambalas, S. Saito , T. Watanabe I, D. Giannakis , I. Miyagawa, N. Sofikitis*

Παρουσιάστηκε στο: 24th Annual European Association Urology Congress to be held from 17 to 21 March 2009, Stockholm.

- EFFECTS OF VARDENAFIL ON SERTOLI CELL SECRETORY FUNCTION

***E. Vlachopoulou** , I. Tsiriopoulos, F. Dimitriadis, D. Baltogiannis , I. Miyagawa, N. Sofikitis Παρουσιάστηκε στο: 24th Annual European Association Urology Congress από τις 17 έως τις 21 Μαρτίου 2009, Stockholm.*

- RAT EPIDIDYMISS CAN INDUCE HAMSTER SPERM MATURATION

*F. Dimitriadis , S. Tsambalas , P. Tsounapi , **E. Vlachopoulou** , T. Watanabe , D. Baltogiannis , S. Gratsias , D. Giannakis , I. Miyagawa, N. Sofikitis*

Παρουσιάστηκε στο: 24th Annual European Association Urology Congress από τις 17 έως τις 21 Μαρτίου 2009, Stockholm, Sweden

- Cytokine effects on the cell cycle and death of lung and prostate carcinoma cells.

*V. Galani, M. Kastamoulas, G. Chondrogiannis, G. Vartholomatos, **E. Vlachopoulou**, D. Arvanitis, T. Liloglou, E. Kolettas, D. Baltogiannis, N. Sofikiti, P. Kanavaros*

Παρουσιάστηκε στο: Virchows Archiv, The European Journal of Pathology 31 August-3 September 2010, με κωδικό 0244.

- SEXUAL FUNCTION IN AZOOSPERMIC AND OLIGOSPERMIC MEN

*Sotirios Koukos, Sofia Vappa, Dimitrios Baltogiannis, Dimitrios Giannakis, Panagiota Tsounapi, Atsushi Takenaka, **Evlalia Vlachopoulou**, Nikolaos Kolitsas, Nikolaos Sofikitis, Fotios Dimitriadis. Παρουσίαση πόστερ στο European Society of Sexual Medicine 1-4 Δεκεμβρίου 2011, Μιλάνο, Ιταλία.*

- Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΥΨΗΛΩΝ ΔΟΣΕΩΝ ΣΙΛΔΕΝΑΦΙΛΗΣ ΣΕ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ ΤΩΝ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΩΝ

***Ευλαλία Βλαχοπούλου**, Κωνσταντίνος Ζώτος, Γρηγόριος Δαλιγκάρος, Αθανάσιος Λαζαρίδης, Μαρία Οβρένοβιτς, Δημήτριος Μπαλτογιάννης, Σταύρος Τσαμπαλάς, Δημήτριος Γιαννάκης, Σταύρος Γρατσίας, Παναγιώτα Τσουνάπη, Νικόλαος Σοφικίτης Ανακοίνωση στο Πανελλήνιο Ουρολογικό Συνέδριο στις 11-14 Οκτωβρίου 2012, Αθήνα.*

- EFFECTS OF PDE5 INHIBITORS ON SPERM MOTILITY, SPERM MEMBRANE PERMEABILITY AND SPERM DNA STRUCTURE.

Evlalia Vlachopoulou, Stavros Gratsias, Athanasios Lazaridis , Maria Ovrenovits , Dimitrios Giannakis , Dimitrios Baltogiannis,Georgios Vartholomatos , Leandros Lazaros , Ioannis Georgiou and Nikolaos Sofikitis. Παρουσιάστηκε στο 38^ο Αμερικάνικο Συνέδριο Ανδρολογίας 13-16 Απριλίου 2013, Σαν Αντόνιο, Τέξας, Αμερικής. Η ανακοίνωση αυτή βραβεύτηκε από το International Liaison Committee.

- ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΤΑΝΤΑΛΑΦΙΛΗΣ ΣΤΗΝ ΚΙΝΗΤΙΚΟΤΗΤΑ, ΣΤΗ ΔΙΑΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ ΚΑΙ ΣΤΗ ΔΟΜΗ ΤΟΥ DNA ΤΩΝ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΩΝ

E. Βλαχοπούλου, Α. Λάζαρος, Σ. Γρατσίας, Δ.Γιαννάκης, Ι.Γιαννάκης, Δ. Μπαλτογιάννης Μ. Οβρένοβιτς, Γ. Βαρθολομάτος, Ι. Γεωργίου, Ν. Σοφικίτης
 Παρουσιάστηκε στο 1ο Συνέδριο του Σύνδεσμοι Ιατρικών Γενετιστών Ελλάδος (ΣΙΓΕ), 30 Μαΐου έως 1 Ιουνίου 2013, στην Αθήνα.

- EFFECTS OF SILDENAFIL ON SPERM DNA STRUCTURE

E. Vlachopoulou, I. Georgiou, I. Giakoumakis, I. Giannakis, D. Baltogiannis, L. Lazaros, D. Daphnis, F. Dimitriadis, A. Takenaka, N. Sofikitis
 Έγινε δεκτή στο 16ο European Society of Sexual Medicine 2014.

ΣΥΓΓΡΑΦΗ ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ ΣΕ ΒΙΒΛΙΟ

Fotios Dimitriadis, **Evlalia Vlachopoulou**, Stavros Gratsias, Dimitrios Baltogiannis, Dimitrios Giannakis, Panagiota Tsounapi, Takeshi Watanabe, Motoaki Saito, Michael Rimikis, Nikolaos Pardalidis, Ikuo Miyagawa, Nikolaos Sofikitis.

*Κεφάλαιο : **Androgen Replacement – Indications and Principles***

Τίτλος βιβλίου: “Clinical Andrology. EAU/ESAU Course Guidelines”.

Edited by Lars Björndahl, Aleksander Giwercman, Herman Tournaye, and Wolfgang Weidner.

Published by Informa Healthcare USA, Inc. in association with the European Academy of Urology.

