

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND,
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
ARSTITEADUSKOND, BIOKEEMIA INSTITUUT
ARSTITEADUSKOND, MIKROBIOLOOGIA INSTITUUT

Ave Ahelik

**OKSÜDATIIVNE STRESS VILJATUTEL
PAARIDEL**

Magistritöö

Juhendaja dots Tiiu Kullisaar
Kaasjuhendaja dots Reet Mändar
Kaasjuhendaja dots Sulev Ingerpuu

Tartu 2013

SISUKORD

LÜHENDID	4
1. SISSEJUHATUS	5
2. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	6
2.1. PAARI VILJATUS KUI SAGENEV PROBLEEM.....	6
2.2. PAARI VILJATUSE PÕHJUSED.....	6
2.2.1. Naisepoolsed põhjused	7
2.2.2. Mehepoolsed põhjused	9
2.2.3. Oksüdatiivne stress (OxS) kui viljatuse võimalik põhjus.....	13
2.2.3.1. OxS-i mõiste.....	13
2.2.3.2. OxS-i põhjused	14
2.2.3.2.1. Endogeensed põhjused	14
2.2.3.2.2. Eksogeensed põhjused spermatoosidi näitel	15
2.2.3.3. OxS-i mõju naise viljakusele.....	17
2.2.3.4. OxS-i mõju mehe viljakusele	17
2.2.3.5. OxS-i markerid	19
2.2.3.6. Antioksidandid	21
2.2.3.6.1. Organismi antioksidandid.....	22
2.2.3.6.2. Antioksidantravi viljatuse korral	23
2.3. ABISTAV REPRODUKTIIVMEDITSIN (ART).....	24
2.3.1. ART meetodid ja näidustused	24
2.3.2. Tulemuslikkus ja ebaedu põhjused	26
3. UURIMISTÖÖ EESMÄRGID	28
4. MATERJAL JA METOODIKA	29
4.1. UURITAVAD PAARID.....	29
4.2. UURITAV MATERJAL	29
4.3. MIKROBIOLOOGILISED ANALÜÜSID	30
4.4. BIOKEEMILISED ANALÜÜSID	30
4.5. STATISTILINE ANALÜÜS	31
4.6. EETIKA	31
5. TULEMUSED JA ARUTELU.....	32
5.1. ART PROTSEDUURILE SUUNATUD PAARIDE ANDMED KÜSIMUSTIKU JA KLIINILISTE NÄITAJATE PÕHJAL.....	32

5.1.1. Tervislik seisund ja tervise anamnees ART protseduurile tulles	32
5.1.2. ART protseduurile suunatud paaride tervisekäitumine	33
5.1.3. ART protseduurile suunatud paaride kliinilised andmed	34
5.2. OKSÜDATIIVNE STRESS ART PROTSEDUURILE SUUNATUD PAARIDEL	39
5.2.1. 8-EPI tase viljatutel paaridel	39
5.2.2. 8-OHdG tase viljatutel paaridel	40
5.2.3. Seosed lokaalse ja süsteemse OxS-i ning kliiniliste näitajate vahel	40
6. JÄRELDUSED	47
KOKKUVÕTE	48
SUMMARY.....	50
KASUTATUD KIRJANDUSE LOETELU	52
KASUTATUD VEEBIAADRESSID.....	63
LISAD	64
LISA 1.....	64
LISA 2.....	65
LISA 3.....	68
LISA 4.....	71
TÄNUAVALDUSED	75
LIHTLITSENTS.....	76

LÜHENDID

8-OHdG	8-hüdroksü, 2'-deoksüguanosiin
8-EPI	8-iso-prostaglandin F2 α
-zsp	-zoospermia
AK+	antikehad esinevad
ART	abistav reproduktiivmeditsiini tehnoloogia
BMI	kehamassiindeks (ingl <i>body mass index</i>)
H ₂ O ₂	venisikperoksiid
HCV	hepatiit C viirus (ingl <i>hepatitis C virus</i>)
HSV	herpesviirus (ingl <i>herpes simplex virus</i>)
ICSI	seemneraku tsütoplasmasisene süstimine (ingl <i>intracytoplasmic sperm injection</i>)
IVF	kehaväline viljastamine (ingl <i>in vitro fertilization</i>)
IUI	emakasisene inseminatsioon (ingl <i>intrauterine insemination</i>)
MDA	maloondialdehüüd
NO \cdot	lämmastikoksiid
O ₂ \cdot^-	superoksiidi radikaal
OH \cdot	hüdrosüülradikaal
ONOO $^-$	peroksünitrit
OxS	oksüdatiivne stress (ingl <i>oxidative stress</i>)
PCOS	polütsüstiliste munasarjade sündroom (ingl <i>polycystic ovary syndrome</i>)
ROS	reaktiivsed hapniku osakesed (ingl <i>reactive oxygen species</i>)
RNS	reaktiivsed lämmastiku osakesed (ingl <i>reactive nitrogen species</i>)
SOD	superoksiidi dismutaas
WHO	Maailma Terviseorganisatsioon (ingl <i>World Health Organization</i>)

1. SISSEJUHATUS

Viljatuse on reproduktiivmeditsiini jaoks probleem, mis ei ole veel täielikku lahendust leidnud. Purunenud unistused lastest, sellega kaasnev kurbustunne, depressioon ning ühiskonna kritiseeriv suhtumine lastetusse abielupaari mõjutavad negatiivselt inimeste psüühikat ja kooselu oma partneriga. Arenenud maades probleeme tekitav negatiivne iive ning jätkuv esmas- ning korduvsünnitajate keskmise vanuse tõus suurendavad vajadust muuta abistava reproduktiivmeditsiini tehnoloogia (ART) senisest efektiivsemaks. Selle saavutamiseks tuleks süvendada teadmisi viljatuse põhjustest ning täiustada ravimeetodeid.

Maailma Terviseorganisatsiooni (WHO) soovitusel defineeritakse paari viljatust kui olukorda, mil naisel pole õnnestunud jääda rasedaks, olles minimaalselt aasta jooksul kaitsmata seksuaalvahekorras (Zegers-Hochschild jt., 2009). Samaaegselt üldise rahvastiku kasvuga maailmas on suurenenud ka viljatute paaride arv, mis 2010. a. oli hinnanguliselt 48,5 miljonit. Primaarset viljatust (pole võimeline esmakordselt rasestuma) esineb 20–44 aasta vanuste naiste seas 1,9% ning sekundaarset viljatust (pole suuteline sünnitama teist last) ülemaailmselt 10,5%. Maailma mastaabis on viljatuse tase kõrgeim Kesk- ja Ida-Euroopas, Kesk- ja Lõuna-Aasias, Lõuna-Sahara piirkonnas, Põhja-Aafrikas ning Lähis-Idas (Mascarenhas jt., 2012).

Viljatuse üheks võimalikuks põhjuseks on reaktiivsete hapniku osakeste (ROS) ülehulga tõttu esilekutsutud oksüdatiivne stress (OxS) – häire antioksidantide ja oksüdatiivsete faktorite tasakaalus. Varasemalt on leitud OxS-i seoseid mitmete haiguste (vähk, diabeet II, Parkinsoni ja Alzheimeri tõbi, ateroskleroos, hüpertensioon, tsüstiline fibroos), aga ka eluviiside (suitsetamine, liigne alkoholi tarbimine, rasvumine) vahel. Oksüdatiivset stressi on meestel seostatud seemnevedeliku langenud kvaliteedi ja seemnerakkude häirunud funktsioonidega ning naistel endometrioosi, polütsüstiliste munasarjade sündroomi (PCOS), raseduse katkemise, preeklampsia ja idiopaatilise viljatusega. Antioksidantidel põhinev ravi on üheks võimaluseks alandada OxS-i taset, olles viljatuse potentsiaalne ravimeetod (Al-Gubory jt., 2010).

Käesoleva magistr töö peamiseks eesmärgiks oli selgitada OxS-i tase viljatutel paaridel ning leida selle seoseid nii indiviidi enda kui tema partneri tervisliku seisundiga. Selleks määrati lipiidide peroksidatsiooni markeri 8-EPI ja DNA oksukahjustuse markeri 8-OHdG tase viljatutel paaridel, kes osalesid ART protseduuril. Eelnevalt on teada vaid üksikud uuringud indiviidi OxS-i taseme seostest tema seksuaalpartneri tervisliku seisundiga.

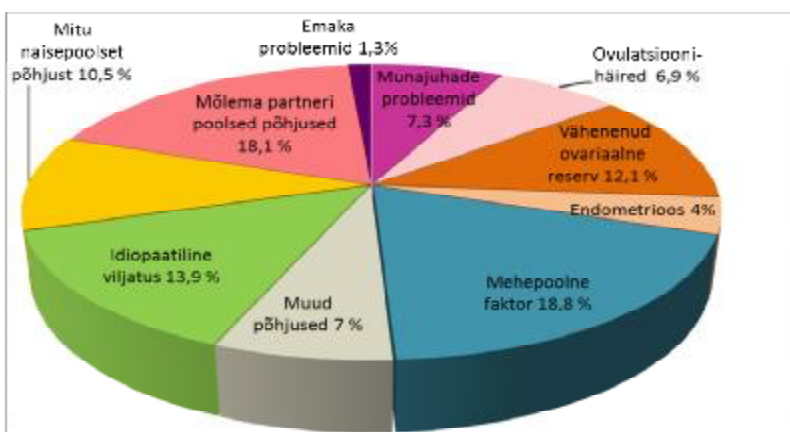
2. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

2.1. Paari viljatus kui sagenev probleem

Paari viljatuse all mõistetakse olukorda, mil naisel pole õnnestunud rasestuda minimaalselt aasta jooksul kaitsmata seksuaalvahekorras olles (Zegers-Hochschild jt., 2009). Viljatus on sagenev probleem, millega puutub kokku ligi 50 miljonit last soovivat paari maailmas (Mascarenhas jt., 2012). Viljatute paaride arv Eestis on 20% ehk ~35 000 perekonda (Viiron, 2009). Langemas on nii meeste kui naiste viljakusnäitajad ning üha enam paare otsib abi reproduktiivmeditsiinilt. Viljatuse põhjuste väljaselgitamisel peab arvestama, et tegemist on paari ühise probleemiga ning uurida tuleb mõlemat partnerit korraga.

2.2. Paari viljatuse põhjused

Uuemad andmed viljatuse põhjustest põhinevad USA 443 viljatusravikliiniku patsientide andmestikul, kellele teostati ART protseduur. Naisepoolse faktori osakaal moodustas ~40% (vähenenud ovariaalne reserv 12,1%; mitu naisepoolset põhjust 10,5%; munajuhade probleemid 7,3%; ovulatsioonihäired 6,9%; endometriosis 4% ja emaka probleemid 1,3%). Mehepoolne viljatuse faktor moodustas 18,8% ning idiopaatiline viljatus 13,9%. Muud viljatuse põhjused (immunoloogilised probleemid, kromosoomihäired, kemoterapia, tõsised haigused) hõlmasid 7% ning mõlema partneri poolset probleemid 18,1% (vt joonis 1) (Center for Disease Control and the Society of Assisted Reproductive Technology, 2012).



Joonis 1. USA viljatusravikliinikutes diagnoositud paari viljatuse põhjused aastal 2010

2.2.1. Naisepoolsed põhjused

Vanus — naise kõrgemat vanust on seostatud raseduse komplikatsioonidega. Enneaegsete ja väiksema sünnikaaluga laste, keisrilõike, surnultsündide ja seletamatu põhjusega loote surmade esinemissagedus korreleerub positiivselt naise kõrgema vanusega. Äkiline langus viljakusnäitajate osas toimub 35. eluaasta juures (Delbaere jt., 2007; de la Rochebrochard ja Thonneau, 2002; Center for Disease Control and the Society of Assisted Reproductive Technology, 2012; Kenny jt., 2013). Väga tähtis osa raseduse püsima jäämisel ning embrüo ja loote arengus on munaraku kvaliteedil. Munarakk saavutab oma arengukompetentsi (meioosi jätkamine, embrüo arenemine) follikulogeneesi ja ootsüüdi küpsemise käigus. Naise vananedes on tema ootsüüdid vähem kompetentsed. Vead kääviniidistiku moodustamises ning sellega kaasnevad embrüo kromosoomianomaaliad (sh Downi sündroom) on >35 aastaste sünnitajate seas märgatavalt sagedasemad (ESHRE Capri Workshop Group, 2005; Nelson jt., 2013).

Endometriosis — viljatust ning endometriosis (ebaselge tekkega krooniline haigus, mille puhul emakaõõnt vooderdav endomeetriumi sarnane kude paikneb ja funktsioneerib kolletena väljaspool emakat) on tihedalt seotud (Kennedy jt., 2005). Kogu inimpopulatsioonis on endometriosisiga naised 6-10% (ASRM, 2006). Endometriosisi põdevatel naistel esineb sagedamini viljatust (30-50%) ja viljatutel naistel sagedamini endometriosisi (25-50%) (Kokcu, 2013). Endometriosisiga naistel esinevad sagedamini ka ovulatsioonihäired (Giudice jt., 2004; Koch jt., 2012). Kuna endomeetriumi taoline kude kutsub esile põletikueelsete tsütokiinide sekreteerimise, tekib põletikuline keskkond, mis on toksiline gameetidele, embrüotele ning kahjustab munajuha morfoloogiat ja funktsiooni. Endometriosisile iseloomulike liidete teke vaagnapiirkonnas ning immunoloogilised muutused (antikehade teke, lümfotsüütide taseme tõus) takistavad viljastunud munaraku transporti munajuhas, halvendavad endomeetriumi vastuvõtlikkust ning embrüo implantatsiooni. Samuti on spermatooside aktiivsus põletikulises keskkonnas langenud. Endometriosisi põdevatel naistel on leitud madalam antioksidantide ja kõrgem OxS-i markerite tase (Szczepańska jt., 2003).

Ovulatsioonihäired — ovulatsioonihäired on rohkem kui pooltel juhtudel tingitud polütsüstiliste munasarjade sündroomist, teisteks põhjusteks võivad olla hormonaalsed regulatsioonihäired, hormoonaktiivsed kasvud munasarjas, prolaktiini ülemäärane tootmine, vanusest tingitud munasarjade talitlushäire, enneaegne ovariaalne puudulikkus või Turner'i sündroom (Broekmans jt., 2009). Nende häirete tõttu ei reageeri (või ei reageeri piisavalt) munasarjad hormoonidele, tekivad ebaregulaarsed ovulatsioonid, mille tulemusena

langeb naise viljakus. PCOS on hormonaalne häire, mis võib põhjustada muutusi menstruaaltsükli (kroonilist anovulatsiooni, tavalisest pikemat ning mitteregulaarset menstruaaltsükli), androgeensete hormoonide liiast tingitud sümptomeid (hirsutismi, aknet, alopeetsiat), rasvumist, hüperinsulineemiat ning muutunud signalisatsioonirada folliikulites (Goodarzi jt., 2011, Norman jt., 2007). Häiritud on folliikulite hulga säilitamine, aktivatsioon, küpsemine ja selektsioon, mis võivad põhjustada antraalsete folliikulite akumulatsiooni munasarja perifeerias, tekitades polütsüstilise morfoloogia (The Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group, 2004).

Munajuhade talitlushäired — munajuhad peavad tagama ootsüüdile viljastamiseks soodsa keskkonna ning vahendama viljastatud munaraku transporti emakasse, kus toimub embrüo implantatsioon. Naisepoolsetest viljatuse põhjustest viiendiku moodustavad munajuhade talitlushäired või läbimatus, mis võivad tekkida vaagnapiirkonna infektsioonide (enamasti munajuhapõletiku ehk salpingiidi ja väikevaagnapõletiku ehk salpingo-ooforiidi), endometriooosi või vaagnapiirkonna operatsioonide tõttu. Salpingiidi tagajärjel tekivad munajuhasisesed liited, munajuha valendik sulgub ning sinna võib koguneda põletikulist vedelikku (hüdrosalpinksi). Salpingo-ooforiidi sagedasemad tekitajad on *Neisseria gonorrhoeae* ja *Chlamydia trachomatis* (Sweet 2012). Munajuhade talitlushäirete korral võib munajuha olla läbitav, kuid juha sein on põletikust kahjustunud, mistõttu embrüo transporti emakaõõnde ei toimu. Sellisel juhul võib tekkida emakaväline rasedus (Lyons jt., 2006).

Vähenenud ovariaalne reserv — primaarse (enneaegse) ovariaalse puudulikkuse sümptomiteks on amenorröa (4 kuud) ning kõrgenenud folliikuleid stimuleeriva hormooni ja langenud östradioli (menopausaalsed) väärtused <40 aastastel naisel. Seetõttu ei pruugi naine ART protseduuris kasutatavale hormonaalsele munasarjade stimulatsioonile (gonadotropiini vabastava hormooni analoogi abil) ootuspäraselt reageerida, mis on üheks ART ebaedu põhjustest. Vähenenud ovariaalne reserv põhjustab naise reproduktiivpotentsiaali langust, mis on seotud munarakkude kvaliteedi ja kvantiteediga (folliikulite väike algul ja hävimine) või gonadotropiini vabastava hormooni stimulatsioonile reageerimisega (Welt, 2008). Uuringu põhjal on primaarse ovariaalse puudusega naistest võimelised rasestuma 5-10% (van Kasteren ja Schoemaker, 1999).

Emaka probleemid — viljatuse, enneaegse lapse sünni või raseduse varajase katkemise põhjusteks võivad osutada ka emaka kuju anomaaliad. Emakaõõnes esinevad patoloogiad (polüübid, liited, müoomid) ja põletik takistavad embrüo implanteerumist emaka limaskestale. Krooniline emakakaelapõletik muudab emakakaela lima iseloomu, mistõttu võib olla häiritud spermatoosidide funktsioon naise suguteedes (Rai ja Regan, 2006).

Immuunsüsteemi häired — autoimmuunsus kui sündroom, mille korral esineb häireid immuunsüsteemi regulatsioonis üldise autoimmuunse aktivatsiooni või spetsiifilise reproduktiivlundite vastu suunatud reaktsiooni näol, võib olla samuti viljatuse põhjuseks (Haller-Kikkatalo jt., 2009). Autoantikehad võivad omada kahjustavat toimet preimplantatiivsele embrüole ning implantatsiooniprotsessi ja platsenta moodustumisele (Forges jt., 2004).

Põletikud — bakteriaalset vaginooosi leitakse 13-55%-l rasedatel naistel (Hogan jt., 2007) ning seda on seostatud enneaegse sünnituse (McGregor jt., 1995) ja raseduse varajase katkemise (Ralph jt., 1999; Eckert jt., 2003) kahekordse ning raseduse hilise katkemise (Hay jt., 1994) viiekordselt suurenenud riskiga. Bakteriaalse vaginooosi puhul on langenud normaalse tupe mikrofloora koosseisu kuuluvate ja vesinikperoksiidi tootvate *Lactobacillus spp.* hulk ning suurenenud on anaeroobsete bakterite (sh *Gardnerella vaginalis*, *Bacteroides spp.*, *Mobiluncus spp.*, *Mycoplasma hominis*) osakaal (Nugent jt., 1991; Eckert jt., 2003).

Eluviis — naise eluviis mõjutab ka tema reproduktiivpotentsiaali. Ülekaalulistel ja rasvunud naistel algab menstruatsioon keskmisest varasemalt ning esineb sagedamini ovulatsiooni- ja menstruatsioonihäired (sh PCOS) ning viljatust (Jacobsen jt., 2012). Uuringud kinnitavad, et naistel, kelle kehamassiindeks (BMI) on >30, füüsiline aktiivsus vähene või kes on regulaarsed suitsetajad, saabub menopaus tavapärasest varem (Mikkelsen jt., 2007; Dratva jt., 2009). Rasvunud naistel on ka viljatusravis kehvemad tulemused ning esineb rohkem rasedusaegseid komplikatsioone (Pasquali jt., 2007; Zander-Fox jt., 2012). Suitsetamine kahjustab ovariaalset funktsiooni mitmel viisil (Matikainen jt., 2001). Krooniline suitsetamine raseduse ajal vähendab lisaks naise enda viljakusele ka tema järglaste viljakust (Fowler jt., 2011).

2.2.2. Mehepoolsed põhjused

Mõned mehe viljakust mõjutavad haigused on pärilikud (tsüstiline fibroos), põetakse läbi (mumpsorhiit), omandatakse (traumad, põletikud) või kujunevad välja puberteedieas ja sellele järgneval perioodil (varikotseele). Viljakuse vähenemise põhjuseks võib olla ka täiskasvanueas omandatud aja jooksul progresseeruv haigus (Jungwirth jt., 2012). Reproduktiivorganite (munandite, munandimanuse, seemnepõiekeste, peenise, eesnäärme, lisasugunäärmete) patoloogiad moodustavad enamuse mehepoolse viljatuse põhjustest. Iga protsess, mis mõjutab spermatooside produktsiooni ja kvaliteeti, on potentsiaalne faktor mehepoolse viljatuse tekkel (Esteves jt., 2011).

Mehe viljakuse hindamiseks tehakse seemnevedeliku analüüs. 1951. aastaks oli John MacLeodi poolt leitud, et mehed, kelle seemnevedelik sisaldab seemnerakke <20 miljonit/ml, on 3 korda suurema tõenäosusega viljatud (Yerram jt., 2012). Hetkel kehtivad kriteeriumid seemnevedeliku kvaliteedi hindamiseks on toodud tabelites 1 ja 2 (WHO, 2010).

Tabel 1. Seemnevedeliku hindamisel kasutatavad piirnormid

Parameeter	WHO piirnorm (WHO, 2010)
Seemnevedeliku maht	≥1,5 ml
Seemnerakkude kontsentratsioon	≥15 miljonit/ml
Seemnerakkude üldhulk ejakulaadi kohta	≥39 miljonit
Seemnerakkude liikuvus	≥40% liikuvaid seemnerakke (A+B+C%) ^a
Seemnerakkude väliskuju	≥4 % ideaalse väliskujuga rakke
Seemnevedeliku pH	≥7,2
Neutrofiilide kontsentratsioon	≤1 miljonit/ml

^a Seemnerakud jaotatakse nende liikuvuse järgi nelja klassi (A-D): A (kõige kiiremini ja suunatult liikuvad, trajektor ühtlane), B (liikumine kiire, trajektor ebahütlane), C (liikumine aeglane/kohapeal), D (liikumatud). WHO normide järgi peab A+B klassi olema ≥32% või kõiki liikuvaid klasse kokku ≥40%.

Tabel 2. Seemnevedeliku kvaliteeti iseloomustav terminoloogia

Nimetus	Lühend	Kirjeldus
Aspermia		Seemnepurse puudub või on retrograadne.
Azoospermia		Ejakulaadis puuduvad seemnerakud.
Leukotsütoospermia		Leukotsüüte seemnevedelikus >1 miljon/ml.
Astenoospermia	asteno-zsp	Progressiivselt liikuvate seemnerakkude osakaal alla piirnormi.
Astenoteratoospermia	AT-zsp	Progressiivselt liikuvate ja morfoloogiliselt normaalsete seemnerakkude osakaal alla piirnormi.
Nekroospermia	nekro-zsp	Vitaalseid seemnerakke alla ning liikumatuid üle piirnormi.
Normoospermia	normo-zsp	Seemnevedelik normväärtustega.
Oligoastenoospermia	OA-zsp	Seemnerakkude üldhulk ja progressiivselt liikuvate seemnerakkude osakaal alla piirnormi.
Oligoastenoteratoospermia	OAT-zsp	Seemnerakkude üldhulk, progressiivselt liikuvate ning morfoloogiliselt normaalsete seemnerakkude osakaal alla piirnormi.
Oligoteratoospermia	OT-zsp	Seemnerakkude üldhulk ja morfoloogiliselt normaalsete seemnerakkude osakaal alla piirnormi.
Oligoospermia	oligo-zsp	Seemnerakkude üldhulk alla piirnormi.
Teratoospermia	terato-zsp	Morfoloogiliselt normaalsete seemnerakkude osakaal alla piirnormi.

Kuigi seemnevedeliku analüüs annab ülevaate mehe sugutrakti funktsionaalsest seisundist, ei saa seda kasutada 100% mehe viljakuse „testina“. Normidele vastav tulemus ei tähenda alati viljakust ning normidest kõrvalekaldunud seemnevedeliku parameetritega mees ei pruugi olla infertiilne (Guzick jt., 2001). Seemnerakkude vähese hulga peamiseks

põhjusteks on varikotseele, sugutrakti põletikud (prostatiiit, leukotsütoospermia, mumpsorhiit, epididümiit) ja krüptorhism (Punab jt., 2003). Seemnerakkude arvust olulisemaks võib aga osutada nende DNA kvaliteet (Erenpreiss jt., 2008).

Varikotseele — varikotseele ehk munandikoti veenilaiend on üks levinumaid viljatuse riskifaktoreid. Üldpopulatsioonis esineb varikotseelet ~15%, primaarse viljatuse diagnoosiga meestel 19-41% ja sekundaarse viljatuse korral 45-81% (Kibar jt., 2002). Veenilaiend põhjustab puudulikest veeniklappidest tingitud vere tagasivoolu munandiveenis, jääkainete transpordihäireid ja munandi temperatuuri tõusu. Kõrge temperatuur, toksiliste metaboliitide tagasivool neerupealisest/neerust ja muutused hüpotalamus-ajuripats-munand teljel on varikotseele puhul võimalikeks spermatogeneesi häirete põhjustajateks (Naughton jt., 2001). Varikotseelega meestel esineb vähem progressiivselt liikuvaid ning rohkem liikumatuid, fragmenteerunud DNA ja inaktiivsete mitokondritega seemnerakke ning ka rohkem neutrofiile (Blumer jt., 2008). Infertiilsete varikotseele diagnoosiga meeste seemnevedelikus on madal antioksidantide tase, mis viitab tugeva OxS-i olulisele mõjule viljatuse tekkel (Ishikawa jt., 2007; Abd-Elmoaty jt., 2010).

Krüptorhism — krüptorhism ehk munandi laskumishäire on enamasti kaasasündinud patoloogia, mille puhul munand ei paikne munandikotis, vaid kõhuõõnes või kubemekanalis. Kolmandikul juhtudest laskub munand esimestel elukuudel spontaanselt munandikotti (Sijstermans jt., 2006). Laskumata munandi koe struktuur aga kahjustub juba varases lapseas ning ravi puudusel suureneb mehel hilisemal eluperioodil munandivähi ja viljatuse risk (Banks jt., 2013).

Geneetilised põhjused — geneetilistest viljatuse põhjustest on esikohal kromosoomianomaaliad (5,1% lastetutel meestel vs 0,4% üldpopulatsioonis). Kõige sagedamini esineb meestel sugukromosoomide arvuanomaaliaid (47,XXY esinemissagedus 3,7%), kuid sagedased on need ka autosoomide puhul. Kromosoomiaberratsioonide esinemissagedus on pöördvõrdeliselt seotud seemnerakkude arvuga. Azoospermiaga meeste seas esineb kromosoomianomaaliaid infertiilsuse põhjusena sagedamini (13,1-23,1%) kui oligospermiaga meestel (2,1-6,6%) (Lissitsina jt., 2006). Mõju viljakusele avaldavad ka monogeensed haigused (nt tsüstiline fibroos, Kallmanni sündroom), mil geenimutatsioon põhjustab häireid reproduktiivsüsteemis ja/või hormonaalses tasakaalus. Tsüstilise fibroosiga meestel on sageli munandimanuse, seemneväädi ja seemnepõiekeste kaasasündinud alaareng või anomaaliad, mis võivad põhjustada spermatogeneesi häireid ja viljatust (Lyon ja Bilton, 2002).

Infektsioon — omandatud häired seemnerakkude transpordil on enamasti tingitud suguteede infektsioonidest või genitaalpiirkonna operatsioonidest, mis võivad kahjustada munandite verevarustust ja seemneväädi funktsionaalsust (Pellati jt., 2008). Genitaalpiirkonna viiruselised ja bakteriaalsed infektsioonid on seotud takistuste tekkega sugutraktis, kehvea seemnevedeliku kvaliteedi (seemnerakkude väiksema kontsentratsiooni ja madalama liikuvuse, kahjustuste, DNA kvaliteedi halvenemise, väiksema seemnevedeliku mahu) ning ebanormaalse spermoplasmaga (Rusz jt., 2012). Infektsioonid võivad olla üheks seletuseks ka seemnerakkude vastaste antikehade olemasolule. Seemnerakkude pinnale kinnitunud antikehad on 3-7% juhtudest mehepoolse viljatuse faktoriks ning ilmne on seemnerakkude aglutineerumine ja liikumatute seemnerakkude suurem osakaal. Suurema hulga seemnerakkude vastaste antikehade teket on seostatud näiteks inimese papilloomiviiruse esinemisega (Garolla jt., 2013). Infektsioonid põhjustavad ROS-ide taseme tõusu organismis, mis mõjutab negatiivselt spermatooside funktsiooni ja mehe viljakust (Shi jt., 2012). Leukotsüütide hulga suurenemine viitab põletikule. Leukotsütoospermia esineb viljatute meeste seas 3-23% ning on seotud genitaalpiirkonna infektsioonide, kõrge seemnerakkude vastaste antikehade ja ROS-ide taseme ning spermatooside vähese hulga ja funktsioneerimishäiretega (Punab jt., 2003; Mändar jt., 2013). Seemnevedeliku kvaliteedi langust on seostatud ka epididümiidi (munandimanuse põletiku) ja orhiidiga (munandipõletikuga), mis tekivad enamasti urogenitaaltrakti infektsioonide (*C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, *E. coli*) või trauma tagajärjel. Epididümiiti põhjustav põletik võib üle kanduda ka munandile, mis viib orhiidi tekkele. Viimane võib kujuneda ka viirushaiguse mumps tagajärjel (Trojan jt., 2009).

Prostatiit — prostatiit ehk eesnäärme põletik on sagedaseks seksuaalhäirete, kusehäirete, mehepoolse viljatuse ja eesnäärmevähi faktoriks. Prostatiidi levimuseks on üldpopulatsioonis 2,7 kuni 14%. Haigestumise risk kasvab vanusega, mistõttu on 40-49 aastastel meestel 1,7 korda ja 50-59 aastastel 3,1 korda suurem tõenäosus põdeda/olla põdenud prostatiiti kui meestel, kes on vanuses 20-39 (Mehik jt., 2000; Nickel jt., 2005). Prostatiidi etioloogia pole veel täielikult selge, kuid võimalikeks faktoriteks on infektsioonid (sh *Enterococcus spp.*, *Myc-* ja *Ureaplasma spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Neisseria gonorrhoea*, *Chlamydia trachomatis*) ning traumad ja anatoomilised, immunoloogilised, neuromuskulaarsed, geneetilised ja endokriinsed põhjused. Prostatiidi põhjus võib olla ka polüetioloogiline — kujuneb mitmete omavahel seotud tegurite toimel ja haarab erinevaid patogeneesimehhanisme (Türk jt., 2010). Kroonilise prostatiidi olemasolul võivad kahjustada eesnääre ja seemnejuhad, mistõttu on seemnevedeliku mahu langus üks prostatiidi tagajärjedest (Dohle, 2003). Põletikulisele prostatiidile on iseloomulik leukotsüütide kõrge

konsentratsioon eesnäärmesekreedis, uriinis ja seemnevedelikus (National Institutes of Health, 1995). Prostatiidiga kaasnev põletik mõjutab spermatogeneesi: esineb seemnerakkude kvaliteedi langus, oligo-, azoo- ning leukotsütoospermia (Dohle, 2003; Kullisaar jt., 2007). Prostatiidiga meestel esineb kõrgem lokaalse ja süsteemse OxS-i tase, mis kahjustab seemnerakkude DNA-d, metabolismi ja liikuvust (Erenpreiss jt., 2008; Kullisaar jt., 2007; Kullisaar jt., 2012).

Eluviis — on leitud, et teatud ravimite, alkoholi ja kofeiini liigtarbimine, suitsetamine, kokkupuude kiirgusega ning väga intensiivne treening ja viljakus on pöördvõrdelises seoses (Schilling jt., 2012). Rasvumine põhjustab muutusi hormoonaaltsakaalus, mõjutades seega spermatogeneesi: halveneb seemnevedeliku kvaliteet (seemnerakkude hulk, liikuvus) ja modifitseerub seemnerakkude struktuur (Hammiche jt., 2012). Rasvunud meestel on sagedamad ka erektsioonihäired (Cheng ja Ng, 2007).

2.2.3. Oksüdatiivne stress (OxS) kui viljatuse võimalik põhjus

OxS-i on seostatud põletike (reumatoidartriidi) (Hassan jt., 2011), südamehaiguste (Dumitrascu jt., 2013), vähi (Han ja Chen, 2013), Alzheimeri (Guglielmotto jt., 2010) ja Parkinsoni tõve (Ciccione jt., 2013) ning paljude teiste haiguste esinemisega. OxS mõjutab ka mehe ja naise reproduktiivtervist ning on seega potentsiaalne faktor viljatuse tekkel (Agarwal jt., 2008; Doshi jt., 2012; Mändar jt., 2013).

2.2.3.1. OxS-i mõiste

Aeroobses keskkonnas olevad rakud puutuvad kokku hapniku paradoksiga: O_2 on eluks vajalik, ent selle metaboliidid võivad modifitseerida raku funktsioone, ohustades sellega raku ellujäämist.

Vabadele radikaalidele (sisaldavad vähemalt ühte paardumata elektroni) on iseloomulikud kiirelt kulgevad hargnevad ahelreaktsioonid, mille käigus muutub atakeeritav molekul ise uueks radikaaliks (Winterbourn, 2008). ROS hõlmab üldmõistena nii hapniku vabu radikaale (superoksiidi radikaal $O_2^{\cdot-}$, hüdroksüülradikaal OH^{\cdot} , rasvhappe peroksüülradikaal) aga ka hapniku-põhiseid reaktiivseid mitteradikaalilisi osakesi (vesinikperoksiid H_2O_2 , hüpokloorishape). Reaktiivsed lämmastiku osakesed (RNS) hõlmavad analoogselt lämmastiku vabu radikaale (lämmastikoksiid NO^{\cdot} ja lämmastikdioksiidi radikaal) kui lämmastiku-põhiseid mitteradikaalilisi osakesi (peroksünitrit $ONOO^{\cdot}$).

Nagu kahe näoga Janusele on kahepalgelisus iseloomulik ka vabadele radikaalidele: kontrollitud hulgal on vabad radikaalid vajalikud paljudeks raku funktsioonideks, ent nende

kestev liig põhjustab biomolekulide, rakkude ja kudede kahjustusi (Laurent jt., 2005). ROS-id osalevad signalisatsiooniradades, aktiveerides türosiinkinaase- ja fosfataase, MAP kinaase, transkriptsioonifaktoreid (NFκB, p53) ja avades ioonkanaleid (Ca²⁺) (Paravicini ja Touyz, 2006). Olenevalt rakutsükli staadiumist muutub ROS-ide tase rakus, mis osalevad raku vananemisel, proliferatsiooni ning apoptoosi stimuleerimisel/inhibeerimisel, rakkude diferentseerumisel, valkude posttranslatsioonilisel modifitseerumisel ja tsütokiinide ekspressiooni stimuleerimisel (Bartosz, 2009). Vabade radikaalide hulk organismis on reguleeritud antioksidantse regulatsioonisüsteemi poolt (Laurent jt., 2005).

Oksüdatiivne stressor on osake või faktor, mis olles kas vaba radikaal või tekitab vabu radikaale, soodustab vabaradikaaliliste protsesside teket ja kulgu ning on seega võimeline OxS-si esile kutsuma. Peamisteks oksüdatiivseteks stressoriteks inimesel on ROS-id ja RNS-id ning enamasti on nende kaudu vahendatud ka teiste oksüdatiivsete stressorite toime. **Häiret oksüdatiivsete stressorite ja antioksidantide normaalses tasakaalus esimeste kasuks nimetatakse oksüdatiivseks stressiks** (Burton ja Jauniaux, 2011). Täiendatud OxS-i definitsioon käsitleb OxS-si kui redoks-signalisatsiooni ja -kontrolli häirimist. Rakusisese redoks-seisundi oluline tagaja on glutatiooni redoks-suhe (Zilmer jt., 2010). Mida kestvam ja sügavam on OxS, seda tõsisemalt kahjustuvad biomolekulid (lipiidid, valgud, süsivesikud, nukleiinhapped), mis omakorda viib membraanide ning rakuvälise maatriksi kahjustuste, rakufunktsioonide häirimise ning koekahjustuste tekkeni. ROS-id mõjutavad otseselt DNA kvaliteeti ning põhjustavad struktuurseid deformatsioone lämmastikalustes (eelkõige guaniinis ja adeniinis) ja desoksüriboosis, mis võivad põhjustada DNA ahela katkemist ja ristseondumiste teket (Burton jt., 2011).

2.2.3.2. OxS-i põhjused

2.2.3.2.1. Endogeensed põhjused

Mitokondriaalne hingamisahel produtseerib superoksiidi radikaale, mistõttu väheneb ATP süntees ja võivad tekkida energeetilised probleemid. O₂⁻ osaleb teiste radikaalide tekkel (H₂O₂, ONOO⁻, OH⁻) (Vignini jt., 2006; Manoli jt., 2007).

Füsioloogilise põletikuvastuse ja fagotsüütide tegevuse käigus tekivad O₂⁻, OH⁻, H₂O₂ ja hüpokloorishape. Põletiku puhul genereeritakse oksüdatiivse purske vältel fagotsüütide poolt rohkesti ROS-se, sh suurel määral hüdroksüülradikaali ning vesinikperoksiidi (Rojkind jt., 2002; Wittmann jt., 2012). H₂O₂ tekib peamiselt superoksiidi dismutaasi (SOD) abil: 2O₂⁻ + 2H⁺ = H₂O₂ + O₂. Vesinikperoksiid on vähereaktiivne, kuid suure difusioonivõimega, tekitab kahjustusi valkudes ja soodustades omakorda teiste ROS-

ide teket. H_2O_2 on peamiseks ROS-ide tekitajaks spermatoosoidis. Kõrgenenud H_2O_2 kontsentratsioon põhjustab spermatoosoidide vähenenud liikuvust (ATP ebapiisava hulga ning aksoneemi valkude vähenenud fosforüleerimise kaudu) ja lipiidide peroksüdatsiooni, millele võib järgneda apoptoos (Maheshwari jt., 2009). $OH\cdot$ on kõige reaktiivsem radikaal ja koekahjustuste tekitaja. Selle lühikese elueaga (10^{-9} s) ja ülireaktiivse osakese vastu puuduvad organismil ka spetsiifilised antioksidandid (Pacher jt., 2007).

Ksantiini oksüdaas produtseerib superoksiidi radikaale puriinide katabolismi käigus.

Tsüklooksügenaas produtseerib rasvhapete peroksiide.

Vaba raud ja vask soodustavad $OH\cdot$ teket.

Arahhidoonhappe metabolismil tekivad rasvhapete peroksiidid.

Peroksüsoomid produtseerivad ROS-se vananenud biomolekulide lõhustumisel.

Lämmastikoksiidi süntaasi kaudu tekib mitokondrites L-arginiinist $NO\cdot$, mis osaleb mitmetes rakulistes protsessides. Üheks funktsiooniks on lõdvestada veresoonte silelihaseid. $NO\cdot$ liia korral on aga soodustatud elektronide leke hingamisahelas, seega ka $O_2\cdot^-$ teke (Ehrlich jt., 2009).

$NO\cdot$ ja $O_2\cdot^-$ omavahelisel reaktsioonil tekib suure difusioonivõimega $ONOO\cdot^-$, mis tekitab kahjustusi ka naaberrakkude lipiidides, valkudes ja DNA-s ning on protoneeritud kujul $OH\cdot$ allikaks (Vignini jt., 2006; Pacher jt., 2007).

H_2O_2 ja $ONOO\cdot^-$ omavahelisel reaktsioonil tekib ergastatud hapnik.

Tugev emotsionaalne stress

2.2.3.2.2. Eksogeensed põhjused spermatoosoidi näitel

Ravimid — teatud ravimid (tsüklofosfamiid, paratsetaamool, antidepressandid) võivad spermatoosoidides soodustada ROS-ide genereerimist (Saito jt., 2010; Türk jt., 2010).

Elustiil (suitsetamine, alkohol, toitumine, stress, treening, vananemine) — suitsetamist on seostatud seemnevedeliku halvenenud kvaliteediga arvukates uuringutes (Mostafa, 2010). Krooniline suitsetamine on positiivses korrelatsioonis spermatoosoidi DNA fragmentatsiooni ning aksoneemi kahjustustega (Elshal jt., 2009). Suitsetajate seemnevedelikus ja uriinis on mittersuitsetajatega võrreldes DNA oksükahjustuse tase kõrgem (Loft jt., 1992; Fraga jt., 1996; Shen jt., 1997) ning kahjustatud DNA-ga spermatoosoidide hulk suurem (Taha jt., 2012). Iseloomulik on ka spermatoosoidide väiksem üldarv ning vähenenud liikuvus (Horak jt., 2003; Taha jt., 2012). Suitsetajate seemnevedelikus on mittersuitsetajatega võrreldes 48% suurem leukotsüütide kontsentratsioon ja kõrgem ROS-ide tase (Horak jt., 2003; Saleh jt., 2002). Lisaks spermatoosoidide halvemale kvaliteedile, esineb

suitsetajatel madal antioksidantide (vitamiin C) tase spermaplasmas (Pasqualotto jt., 2008). Uuringu põhjal, kus seemnevedeliku proovid võeti meestudengitelt enne ja pärast stressiperioodi selgus, et vaimne stress mõjutab negatiivselt seemnevedeliku kvaliteeti ning suurendab ROS-ide taset (Eskiocak jt., 2005). Alkoholi liigtarbimine (Schilling jt., 2012) ja vale toitumine soodustavad samuti OxS-i teket (Celik jt., 2012). Rasvumise puhul toodetakse rasvkoos tsütokiine, mis stimuleerivad leukotsüüte suuremal määral ROS-se produtseerima (Singer ja Ganger, 2007). Ebapiisav, ent ka liigne füüsiline aktiivsus on seotud OxS-ga: suure treeningkoormusega meestel on täheldatud spermatoosoidide liikuvuse ja arvu kahanemist (Peake jt., 2007). Uuringus, kuhu olid kaasatud nii fertiilsed kui infertiilsed mehed, leiti kõrgem DNA fragmentatsiooni aste spermatoosoidides meestel, kes olid 40 aastased ja vanemad (Moskovtsev jt., 2006).

Keskkond (pakendid, kütus, raskemetallid, kiirgus) — plastikpakendites sisalduvad ftalaadid mõjuvad negatiivselt spermatogeneesile ning põhjustavad spermatoosoidides DNA kahjustusi (Hauser jt., 2007). Teatud säilitusained (sh SO₂) kutsuvad laboriloomadel esile OxS-i (Meng ja Bai, 2004). Õhusaastega (diislikütuse aurude sissehingamine) võib kaasneda suurenenud ROS-ide produktsioon leukotsüütides (Alaghmand ja Blough, 2007). Raskemetalle (plii, kaadmium) on seostatud testikulaarse OxS-i taseme tõusu, spermatoosoidide DNA oksukahjustuse ning seemnerakkude väiksema hulgaga (Acharya jt., 2003; Kiziler jt., 2007). Kokkupuude radioaktiivse ja UV-kiirguse, ultraheli ja vibratsiooniga põhjustab samuti OxS-i (Gonzalez Maglio jt., 2005; Krajnak jt., 2010).

Infektsioonid — urogenitaaltrakti infektsioonid põhjustavad leukotsüütide hulga suurenemist, millega kaasneb ROS-ide kõrge tootmine genitaaltraktis (Fraczek ja Kurpisz, 2007). Mitmed viirusinfektsioonid põhjustavad organismis leukotsüütide aktivatsiooni (viirusega nakatunud meestel esineb sageli leukotsütoospermia), mis on ühelt poolt vajalik kaasasündinud immuunvastuse aktiveerimiseks. Herpesviiruse (HSV) DNA viljatute meeste seemnevedelikus on väga sage leid (Kapranos jt., 2003). Ka meestel, kellel esineb hepatiit C viiruse (HCV) infektsioon, on ROS-ide tase oluliselt kõrgem ja seemnevedeliku näitajad halvemad kui kontrollgrupil (La Vignera jt., 2012). Spermaplasma viskoossuse suurenemist ja ROS-ide suuremat produktsiooni on seostatud ka *Ureaplasma urealyticum*i infektsiooniga (Wang jt., 2006). Mitmed kroonilised infektsioonid (tuberkuloos, malaaria, pidalitõbi) on seotud süsteemse OxS-ga (Tremellen jt., 2008).

Autoimmuunsus — kroonilise mittebakteriaalse prostatiidi patoloogia tekib enamasti autoimmuunreaktsiooni tõttu seemnevedeliku või eesnäärme antigeenide suhtes, mis viib seemnevedelikus põletikku soodustavate tsütokiinide tõusu, leukotsüütide aktivatsiooni ja suurenenud ROS-ide produktsioonini (Motrich jt., 2007).

Testikulaarsed põhjused – varikotseelega seotud ROS-ide suurenenud produktsioon korreleerub tugevalt spermatooside DNA oksükahjustusega (Agarwal jt., 2012).

2.2.3.3. OxS-i mõju naise viljakusele

Minimaalsed ROS-ide tasemed on vajalikud signaalradade regulatsioonis, mis osalevad naise reproduktiivtrakti füsioloogiliste funktsioonide tagamisel. ROS-ide ja antioksidantide balanss on seotud follikulogeneesi, luteaalfaasi, steroidhormoonide produtseerimise, endomeetriumi modifikatsioonide, ovulatsiooni, kollaskeha formeerumise/lagunemise ja funktsioneerimise, viljastamisprotsessi, embrüogeneesi, embrüo implantatsiooni, platsenta moodustumise, raseduse alalhoidmise ning sünnituse esilekutsumisega (Rizzo jt., 2011).

Idiopaatilist viljatust, PCOS-i, endometrioosi patogeneesi ning munasarjade funktsionaalsusest tingitud viljatuse kujunemist on mitmetes uuringutes seostatud OxS-ga (Agarwal jt., 2012; Carvalho jt., 2013). On leitud, et OxS avaldab negatiivset mõju ootsüütide küpsemisele ja mõjutab nende funktsioone (Combelles jt., 2009). Olenevalt ROS-ide tasemest ja OxS-si soodustavate faktorite kumulatiivsest efektist on OxS potentsiaalseks faktoriks ebanormaalselt kulgeva raseduse (spontaanse aborti, embrüo arenguhäirete, preeklampsia, loote arengu mahajäävuse, enneaegse sünnituse, väikse sünnikaalu, surnultsünni) tekkel (Gupta jt., 2007; Agarwal jt., 2012; Stein jt., 2008). ROS-id võivad kahjustada lootekesti (Mercei jt., 2010). Raseduse ajal on naistel loomuomaselt kõrgem ROS-ide tase (Myatt ja Cui, 2004). Platsenta (tagab loote hapnikuvarustuse) paikneb ema-loote hapnikugradiendi keskel, seega toimub seal ka suurenenud ROS-ide ja RNS-ide (O_2^- , NO , $ONOO^-$) teke ja on suurem tõenäosus tugeva OxS-i tekkeks (Al-Gubory jt., 2010). Kõrget ROS-ide ja RNS-ide hulka platsentas on seostatud erinevate raseduskomplatsioonidega (Myatt, 2010).

2.2.3.4. OxS-i mõju mehe viljakusele

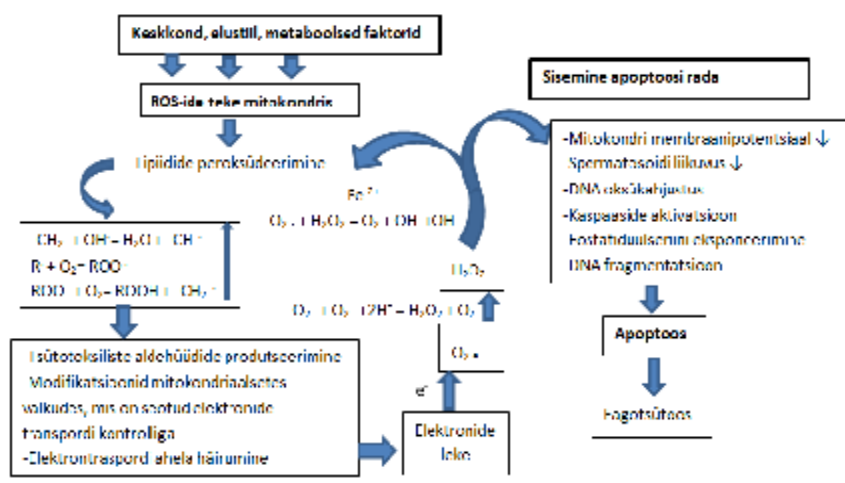
Tasakaal ROS-ide moodustamises ja kahjutuks tegemises on spermatoosidele eelduseks, et viljastada munarakk ja initsieerida kestav rasedus (Zorn jt., 2003). Spermatoosidid võivad ROS-se genereerida kahel teel: mitokondrites paikneva NADH-sõltuva oksüdüreduktaasi kaudu (Gavella ja Lipovac, 1992) ning spermatoosidi plasmamembraanil paikneva NADPH oksüdaasi süsteemi abil (Musset jt., 2012).

ROS-id on kontrollitud hulgal spermatooside jaoks obligatoorsed, osaledes nende funktsioneerimisel ning tagades munaraku viljastamise (Pfeifer jt., 2001; Kothari jt., 2010). Spermatoosid vajab O_2 , H_2O_2 ja NO radikaale nii spermogeneesiks, hüperaktivatsiooniks, akrosomaalreaktsiooniks, munarakku katva *zona pellucida*-ga kontakteerumiseks ja selle viljastamiseks (Kothari jt., 2010; De Lamirande jt., 1997). Kui viljastumist ei toimub, järgneb

fagotsütoos, blokeeritakse liikumisfunktsioon ning raku pinnale indutseeritakse fosfatidüülseriin, mille tunneb ära naispartneri immuunsüsteem (vt joonis 2) (de Vanterý Arrighi jt., 2009; Aitken jt., 2012).

Kui ROS-se produtseeritakse ülehulgas, on tulemuseks tugev OxS, millega kaasneb seemnerakkude halvem kvaliteet ja funktsioonide häirumine, mis omakorda tõstab mehepoolse viljatuse ning lapse sündidefektide riski (Aitken jt., 2010). Peroksüdaas-positiivsed leukotsüüdid (neutrofiidid, makrofaagid) ja ebaküpsed, kahjustatud, ebanormaalse morfoloogia ning rohke tsütoplasmaga spermatoosidid on seemnevedelikus peamisteks ROS-ide allikateks (Kothari jt., 2010). Kõige vähem produtseerivad ROS-se spermatoogoonid ja küpsed kahjustusteta spermatoosidid (Gil-Guzman jt., 2001). Võrreldes spermatoosididega produtseerivad aktiveeritud leukotsüüdid kuni 1000 x rohkem ROS-se ja RNS-se, mistõttu on seemnevedelikus enamus reaktiivseid osakesi genereeritud leukotsüütide poolt (Plasqualotto jt., 2001). Kuigi üldine ROS-ide produktsioon (leukotsüütides + spermatoosidides) on suurem kahjustatud DNA-ga spermatoosidide esinemisel, ilmneb tugevam seos just spermatoosidide endi poolt toodetud ROS-ide tasemega — seega tuleks viljatuse seisukohast olulisemaks pidada spermatoosidide poolt produtseeritud ROS-ide taset (Henkel jt., 2005).

Seemnerakkude diferentseerumisel kaotab rakk enamuse tsütoplasmast ning alles jäänud väike hulk kogutakse spermatoosidi keskossa. Jääktsütoplasmaga (tsütoplasma hulk >1/3 spermatoosidi peast) spermatoosidid on ebaküpsed ja funktsionaalselt defektsed ning võimelised produtseerima rohkem ROS-se ja RNS-se (Rengan jt., 2012). Spermatoosidid sisaldavad hulgaliselt mitokondreid, kuna vajavad liikumiseks palju energiat. Ebanormaalsete mitokondritega spermatoosidides on mitokondriaalne ROS-ide produktsioon suurenenud ja ATP produktsioon vähenenud ning teatud ROS-ide ja RNS-ide kontsentratsioonist alates pöörduvad nad apoptoosile (vt Joonis 2) (Koppers jt., 2010; Aitken jt., 2012).



Joonis 2. OxS-i teke spermatoosidides (modifikatsioonidega, Aitken jt., 2010)

Spermatoosidi DNA fragmentatsioon viljatute meeste hulgas korreleerub ROS-ide tasemega ning on pöördvõrdeline DNA metüleeritusega (Tunc ja Tremellen, 2009). Fertiiilsete meeste spermatoosidides on DNA protamiinide abil tihedalt pakitud, kuid viljatutel meestel on protaminatsioon ebapiisav, tehes DNA reaktiivsetele osakestele kättesaadavamaks (Oliva, 2006).

Meeste viljatuse markerite otsingul on OxS-i tase seemnevedelikus osutumas üheks suurema potentsiaaliga kandidaadiks. Uuringute põhjal on 25–88%-l infertiilsetel meestel seemnevedelikus kõrge ROS-ide hulk (Lewis jt., 1995; Sharma jt., 1999). Idiopaatilise viljatuse korral on meestel kõrge ROS-ide tase ning langenud on totaalne antioksidantide aktiivsus (Kodama jt., 1997; Agarwal jt., 2006; Aktan jt., 2013). Seega võiks eelkõige idiopaatilise viljatuse puhul keskenduda OxS-i väljaselgitamisele ning antioksidantidel põhineva ravi kasutamisele.

2.2.3.5. OxS-i markerid

OxS-i kvantifitseerimiseks kasutatavad markerid võib jaotada lokaalseteks ja süsteemseteks (Zeng jt., 2013). Reproduktiivvaldkonnas kuuluvad lokaalsete markerite alla suguteedega seotud kehapiirkondadest (nt seemnevedelikust, spermatoosididest, spermaplastast, platsentast, tupesekreedist, follikulaarvedelikust) mõõdetud markerid. Süsteemsed markerid määratakse verest või uriinist ja näitavad organismi kui terviku OxS-i taset (Kullisaar jt., 2012).

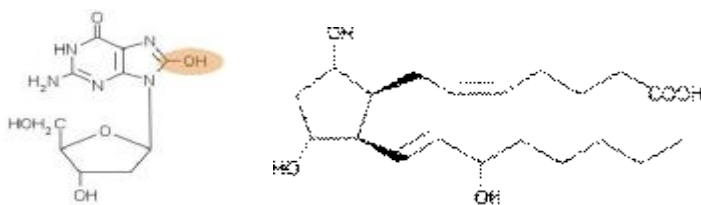
Seemnevedeliku rutiinse analüüsi käigus leitav kõrvalekalle seemnevedeliku standardnäitajatest viitab potentsiaalsele OxS-le. Vähenenud seemnerakkude liikuvus ja kontsentratsioon, muutunud morfoloogia esineb sageli meestel, kelle OxS-i tase on kõrgem (Agarwal jt., 2012; Cambi jt., 2013). OxS-i määramine viljatusravikliinikutes on saamas üldkasutatavaks meetodiks. Hetkel tuleb aga viia läbi täiendavaid ning võrdlevaid uuringuid lokaalse ja süsteemse OxS-i markerite määramise ning nende sobivuse kohta viljatusprobleemide hindamisel (Tremellen jt., 2008; Benedetti jt., 2012; Cambi jt., 2013).

Enim kasutatavad markerid OxS-i taseme määramisel on järgnevad:

a) NUKLEIINHAPPE KAHJUSTUS:

8-hüdrosüü, 2'-deoksüguanosiini (8-OHdG) — üks parimaid DNA oksükahjustuse markereid OxS-i kvantifitseerimisel rakkudest, kudetest, plasmast ja uriinist (vt joonis 3) (Loft jt., 1992; Kodama jt., 1997; Nakamura jt., 2002; Cambi jt., 2013). Uuringud kinnitavad,

et spermatooside kõrgema 8-OHdG taseme puhul on tõenäosus loomulikult teel viljastuda madalam (Zorn jt., 2003; Agarwal jt., 2012).



Joonis 3. 8-OHdG (vasakul), 8-EPI (paremal)

8-hüdroksüguanosiin — RNA oksukahjustuse määramiseks rakkudest, kudedest, plasmast ja uriinist (Isobe jt., 2009).

Apuriin/apürimidiin sait — transkriptsiooni inhibeeriv mutageenne sait, mida detekteeritakse rakkudest ja kudedest (Kojima jt., 2009).

Benzo(a)püreen-DNA adukt — määratakse rakkudest ja kudedest. Suitsetajatel on selle adukti tase spermatoosides oluliselt kõrgem kui mittesuitsetajatel (Perrin jt., 2012).

Kaksiahelalised DNA katked — detekteeritakse H2A.X histooni fosforüleerimise alusel rakkudest. Oligozoospermiaga meestel esineb rohkem kaheahelalisi DNA katkeid kui normozoospermiaga meestel. Langenud DNA kvaliteet suurendab tõenäosust embrüo ebakorrektselt arenguks (Derijck jt., 2007).

Pürimidiini dimeerid, tüüin-tüüin (6-4) fotoprodukt (Burgess jt., 2011).

b) LIPIIDIDE PEROKSÜDATSIOON:

8-isoprostaanid (8-iso Prostaglandin F_{2α} ehk 8-EPI) — 8-isoprostaanid on prostaglandiinide stereoisomeerid, mis tekivad ROS-ide toimel arahhidoonhappe mitte-ensümaatilisel peroksüdatsioonil ja mida on võimalik määrata rakkudest, kudedest, plasmast ja uriinist (Morrow, 2006). Isoprostaanid erinevad teineteisest poolestusaja, stabiilsuse, keemiliste omaduste ja prostaglandiini retseptorile seondumise afiinsuse poolest, mis tingib bioaktiivsuse erinevaid profile. 8-isoprostaanid on suhteliselt stabiilsed biomolekulid, mis tsirkuleerivad plasmas ja ekskrateeritakse uriiniga — see teeb neist ühe parima süsteemse OxS-i markeri (Partico jt., 2001 Kullisaar jt., 2003; Szczepańska M. jt., 2003).

Prostatiidiga meestel on 8-EPI kontsentratsioon uriinis oluliselt kõrgem kui kontrollgrupil (Kullisaar jt., 2012). Naistel, kelle partneril on leukotsütoospermia, on seksuaalvahekorra järgselt mõõdetud 8-EPI kontsentratsioon uriinis oluliselt tõusnud (Mändar jt., 2013);

4-hüdrosünoneaal — elektrofiilne aldehüüd, mida mõõdetakse rakkudest, kudetest ja plasmast (Aitken jt., 2012);

C₁₁-BODIPY^{581/591} — lipofiilne rasvhappe analoog, kergesti oksüdeeruv fluorofoor, mis inkorporeerub kergesti membraani ja muudab ROS-ide ataki ning järgneva lipiidide peroksüdeerumise tulemusena oma fluoressentsi (Partyka jt., 2011);

Maloondialdehüüd (MDA) — rakkudest, kudetest, plasmast ja uriinist (tiobarbituurhappe testi abil) mõõdetav marker (Agarwal ja Chase, 2002; Nakamura jt., 2002; Partyka jt., 2012). Viljatutel meestel on MDA tase kõrgem ja korreleerub seemnerakkude vähenenud liikuvuse ja ebakorrapärase morfoloogiaga (Shiva jt., 2011; Benedetti jt., 2012). Ka mitte-normozoospermiaga meestel on MDA tase oluliselt kõrgem kui normozoospermiaga meestel (Nakamura jt., 2002; Hsieh jt., 2006);

Oksüdeeritud madala tihedusega lipoproteiinid- oxLDL (Kullisaar jt., 2003; Pawlak jt., 2013).

c) **PROTEIINIDE KAHJUSTUS:**

Karbonüülrihma osakaal proteiinides (Chen jt., 2001; Shiva jt., 2011);

Mitte-ensümaatilise glükosüleerimise lõpp-produktid (Karimi jt., 2012) ja **oksüdeeritud valguproduktid** (Kaya jt., 2009);

Nitrotürosiin — peroksünitriti poolt nitreeritud türosiinijääk (Salvolini jt., 2012).

d) **ROS-id:**

Intratsellulaarsed ROS-id ja RNS-id (Martinez-Alborcia jt., 2012; Ungvari jt., 2013);
in vitro ROS-id (Yu jt., 2012).

e) **ANTIOKSÜDANDID:**

Katalaas (Shiva jt., 2011; Partyka jt., 2012);

Glutatiooni peroksüdaas, glutatiooni reduktaas — infertiilsetel meestel on glutatiooni peroksüdaasi aktiivsus 10 korda madalam kui fertiilsetel spermadoonoritel (Garrido jt., 2004; Partyka jt., 2012);

Superoksiidi dismutaas (SOD) (Shiva jt., 2011; Partyka jt., 2012);

Totaalne antioksidantne mahtuvus (Ungvari jt., 2013).

2.2.3.6. Antioksidandid

Et vabade radikaalide ja teiste reaktiivsete osakeste hulk ei ületaks limiteeritud vajalikku taset, on kehas antioksidantne kaitse- ja regulatsioonisüsteem. See on antioksidantide koordineeritud võrgustik, mis kontrollib/reguleerib oksüdatiivsete stressorite toimeid. Antioksidandid on ühendid (sh ka mitmed ensüümid), mis juba väga madalas

kontsentratsioon on suutelised takistama, vältima või likvideerima oksüdatiivsete stressorite kahjulikke toimeid (Zilmer jt., 2010).

2.2.3.6.1. Organismi antioksidandid

Inimkeha peamised antioksidandid on järgnevad:

Reaktiivsete osakeste püüdjad/kõrvaldajad (ahelreaktsioonide katkestajad): redutseeritud glutatioon, vitamiin C ja E, karotenoidid, kusihape, bilirubiin;

Antioksidantsed ensüümid (SOD, katalaas, glutatiooni peroksüdaas, glutatiooni reduktaas). SOD konverteerib superoksiidradikaali vähemreaktiivsemaks vesinikperoksiidiks (vt Joonis 2), mis omakorda detoksitseerikse katalaasi või glutatiooni peroksüdaasi abil. Glutatiooni peroksüdaas lagundab peroksiide (sh vesinikperoksiidi), kasutades elektronide doonorina redutseeritud glutatiooni, mis glutatiooni reduktaasi abil retsükleeritakse (Fujii jt., 2005; Birben jt., 2012);

Preventiivsed valgulised antioksidandid: apotrasferiin, tseruloplasmiin kui raua ja vase sidujad;

Reparatsiooniensüümid (DNA reparatsioonisüsteemid, metioniinsulfoksiidi reduktaas).

Antioksidantne võrgustik töötab integreeritult, seega peab antioksidante kasutama süsteemselt vajalikes kompositsioonides ning nende tasemete määramine on diagnostilise ja prognostilise tähtsusega (Zilmer jt., 2010).

Spermatoosidid on OxS-le eriti vastuvõtlikud (plasmamembraan sisaldab palju polüküllastamata rasvhappeid ning tsütoplasma sisaldab vähe antioksidante), mistõttu on antioksidandid olulised gameetidele kõikides arenguetappides (Aitken jt., 2012). Intratsellulaarsed antioksidandid ei saa kaitsta OxS-i eest spermatoosidi akrosoomi ja saba ümbritsevat membraani — vajalik on spermaplasma. Kuigi spermaplasma antioksidandid kaitsevad spermatooside OxS-i eest ejakulaadis, siis spermatogeneesi käigus kaitsevad seemnerakku endogeensed ja munandimanuse/munandite antioksidandid (Saleh jt., 2002).

Mehe suguteede põletike korral, mil urogenitaaltraktis on kõrgeenenud ROS-ide tootmine, on spermatoosidid OxS-le veelgi vastuvõtlikumad. Ka varikotseele diagnoosiga meestel on leitud kõrgem OxS-i tase ning suurenenud DNA kahjustuse hulk spermatogoonides ja spermatoosütides (Ishikawa jt., 2007). Infertiilsetel meestel on tuvastatud madalam antioksidantide tase vere- ja spermaplasmas, ulatuslikumad spermatoosidide oksukahjustused ning halvemad seemnevedeliku parameetrid kui kontrollgrupil (Pasqualotto jt., 2001; Shiva jt., 2011; Benedetti jt., 2012).

2.2.3.6.2. Antioksidantravi viljatuse korral

Antioksidantravi efektiivsust tõestavad uuringud viljatuse puhul on kohati vastuolulised (vt Tabel 3). Ravi kasutamisel tuleb arvestada OxS-i duaalse funktsiooniga organismis, mistõttu võib ravi olla ebaefektiivne ka seetõttu, et antioksidantide üledoseerimisel on takistatud teatud mehhanismid reproduktiivtraktis ja viljastamisprotsessis, mis vajaksid toimumiseks ROS-ide induktsiooni. Liigne OxS ei pruugi ka olla patsiendi sugurakkude kahjustuste peamine põhjus ning viljastamise õnnestumiseks tuleks ravida ka teisi faktoreid (Ménézo jt., 2012).

Kuna OxS on spermatoosides võimalikuks faktoriks biomolekulide kahjustuste tekkel, on nii finantsilisest kui ravi tulemuslikkuse aspektist oluline kompenseerida puudujääk antioksidantide tasemes ning parandada seemnevedeliku kvaliteeti. Antioksidantravi hõlmab suukaudset antioksidantide manustamist või ART protseduuris antioksidantide lisamist *in vitro*. Uuemaks ideeks viljatusravis on endogeense ROS-ide vastase kaitsesüsteemi stimulatsioon (stimuleerides nt glutatiooni sünteesi) (Ménézo jt., 2012). Antioksidantravi näol püütakse pakkuda alternatiivset võimalust kuluka ART-meetodi kasutamisele (või tõsta ART-meetodi tulemuslikkust), vähendades tugevat OxS-i ning soodustades loomulikult viljastumist (Gharagozloo ja Aitken, 2011).

Tabel 3. Uuringud antioksidantravi tulemuslikkusest

Manustatud antioksidandid	Uuringus osalenud mehed	Ravi tulemuslikkus
Vitamiin C, E	Idiopaatiline viljatus+ ↑DNA fragmentatsioon spermatoosides.	(+) DNA fragmentatsioon↓(Greco jt., 2005).
Vitamiin C, E, tsink, seleenium, β-karoteen	Idiopaatiline viljatus.	(+) DNA fragmentatsioon↓. (-) DNA kondensatsioon kasvas (Ménézo jt., 2007).
Lükopeen, folaat, tsink, vitamiin E, C, seleenium, küüslauk	Spermatooside ebakorrekne morfoloogia, liikumine↓, ↑DNA fragmentatsioon.	(+) Rasedusi tekkis rohkem (Tremellen jt., 2007).
Vitamiin C, E, tsink, β-karoteen	↑DNA kahjustus, lipiidide peroksüdatsioon. Sekusaalpartneril korduv raseduse katkemine.	(+) Katkenud rasedusi ei esinenud (Gil-Villa jt., 2009).
Vitamiin C, E, β-glükaan, papaia, laktoferrin	AT-zoospermia	(+) Spermatooside morfoloogia, liikuvus, DNA kvaliteet paranesid. Leukotsüütide hulk seemnevedelikus↓. (-) Spermatooside üldhulk ei tõusnud (Piomboni jt., 2008).
Vitamiin C, E, glutatioon	Spermatoosides 8-OHdG↑	(+) Spermatooside kontsentratsioon↑, 8-OHdG tase↓ (Kodama jt., 1997).
<i>in vitro</i> katalaas, EDTA		(+) ROS-ide tase ja DNA fragmentatsioon spermatoosides↓, spermatooside liikuvus ja akrosomaalreaktsiooni esinemine↑. (-) Lipiidide peroksüdatsioon ei vähenenud (Chi jt., 2008).
<i>in vitro</i> glutatioon, hüpotauriin	Normo- ja astenozoospermia.	(-) Spermatooside liikuvus ja DNA kvaliteet ei paranenud, ROS-ide produktsioon ei langenud (Donnelly jt., 2000).

N-atsetüülsüsteiin	Idiopaatiline viljatus.	(+) Seemnevedeliku maht ja spermatooside liikuvus, antioksüdantne kaitsevõime↑, viskoossus ja OxS-i tase↓. (-) Spermatooside morfoloogia ei paranenud (Ciftci jt., 2009).
N-atsetüülsüsteiin, mineraalained, kompleksvitamiinid	Oligozoospermia+ varikotseele.	(+) Spermatooside hulk↑, morfoloogia paranes. (-) Liikuvus ei paranenud, rasedusi ei tekkinud (Paradiso Galatioto jt., 2008).
N-atsetüülsüsteiin, seleenium	OAT-zoospermia.	(+) Spermatooside liikuvus, kontsentratsioon↑, morfoloogia paranes (Safarinejad ja Safarinejad, 2009).
Vitamiin C, E, tsink	Astenozoospermia.	(+) Seemnevedeliku parameetrid paranesid ning OxS, DNA fragmentatsioon, apoptoos spermatoosides ↓ (Omu jt., 2008).

2.3. Abistav reproduktiivmeditsiin (ART)

Abistava reproduktiivmeditsiini tehnoloogia all mõistetakse erinevaid lastetuse raviprotseduure, mis hõlmavad gameetide ja embrüte manipulatsiooni, kasutavad munasarjade stimulatsiooni ning sugurakkude või embrüote ülekannet naise reproduktiivtrakti (Ethical guidelines on assisted reproductive technology, 1996).

ART tehnoloogia on maailmas kasutusel alates 1978. aastast, mil sündis esimene kehavälise viljastamise (IVF) abil saadud laps Louise Brown (Steptoe ja Edwards, 1978). Baltimaade esimene IVF laps sündis 1995. a. Eestis (Sõritsa jt., 1997). Käesolevaks hetkeks on kunstliku viljastamise teel maailmas alates 1978. aastast sündinud hinnanguliselt üle 5 miljoni lapse (ESHRE Guidelines and Legal. ART fact sheet, 2010).

Sugurakkude käitlejaid on Eestis viis: Tartus Tartu Ülikooli Kliinikum ja Elite Kliinik; Tallinnas Ida-Tallinna Keskhaigla, Nova Vita ja BioEximi OÜ (Tervise Arengu Instituut, 2012). Kõik maailmas kasutatavad viljatusravi meetodid (välja arvatud surrogaatemadus) on Eestis patsientidele kättesaadavad. Aastal 2011 said Eestis viljatusravi 1841 paari, kes doonori abi ei vajanud, 215 paari kasutas spermadoonorlust, 140 munarakudoonorlust ja 12 paari embrüote doonorlust (Eesti Raviamet, 2012).

2.3.1. ART meetodid ja näidustused

IVF oli esimene "katseklaasilapse" tehnika (Steptoe ja Edwards, 1978). Meetodi etappideks on kontrollitud munasarjade stimulatsioon ovulatsiooni indutseerimiseks, folliikulite kasvu jälgimine, folliikulite punktsioon, seemnerakkude ettevalmistus (värsket või külmutatud seemnevedelikku kasutades), *in vitro* munarakkude viljastamine, embrüote kasvatamine ja kahe-kolme kõige kvaliteetsema embrüo siirdamine emakasse. Kõik ülejäänud eluvõimelised embrüod võib külmutada (-196 °C, kuni 7 aastaks) ja vajadusel järgnevateks embrüosiirdamiseks kasutada, vältimaks uut *in vitro* viljastamist. IVF on näidustatud, kui

esinevad munajuhade takistused, endometrioos, ovulatsioonihäired, vähenenud ovariaalne reserv, idiopaatiline, mehepoolne (seemerakkude väike hulk, ebakorrekne morfoloogia) või multifaktoriaalne viljatuse. Samuti sobib IVF preimplantatsioonilise geneetilise diagnostika läbiviimiseks. Kui partnerit ootab viljakuse languse risk (eelseisvad operatsioonid ja/või kiiritusravi) võidakse gameedid külmutada, mis annab võimaluse vältida tulevikus doonori abi kasutamist (Huang ja Rosenwaks, 2012).

Seemneraku tsütoplasmasisene süstimine (ICSI) on IVF protseduuri edasiarendus, kus viljastamine teostatakse mikroskoobi vaateväljas mikromanipulaatoreid kasutades: munarakk fikseeritakse hoidjapipetiga kindlasse asendisse ning seemneraku tuum süstitakse pipetiga läbi munaraku kestade tsütoplasmasse (Lu jt., 2012). ICSI on näidustatud mehepoolse viljatuse korral. Sealjuures ka väga vähese spermatooside hulga ning ejakulatsiooni puudumisel, mil spermatooside kogumiseks aspireeritakse spermatoosidid otse seemnejuhast, epididüümist või munanditest (Gangrade, 2013).

Inseminatsioon tähendab peenikese kateetri abil motiilsete spermatooside suspensiooni viimist naise reproduktiivtrakti – emakakaela, emakasse (sel puhul on meetodi nimetuseks emakasisene inseminatsioon ehk IUI), emakasse ja munajuhadesse või ainult munajuhadesse. Meespartneril/spermadoonoril peab olema spermatooside kõrge liikuvus, sobiv kontsentratsioon ning normaalne morfoloogia ja naispartneril terved munajuhad. Viljastamine viiakse läbi idiopaatilise viljatuse, kerge spermatoosia, endometrioosi või ovulatsioonihäirete näidustusel kuni kuuel korral, ebaõnnestumise korral järgneb IVF protseduur (Merviel jt., 2010).

Embrüote siirdamine hõlmab nii värskete embrüote või ka külmutatud embrüote ülekannet ehk FER, mil emakasse siirdatakse maksimaalselt kolm kõige kvaliteetsemat ja elujõulisemat embrüot (Pinborg jt., 2012).

Gameetide viimine munajuhasse tähendab spermatooside ja munasarjade punktsioonil saadud munaraku viimist munajuhasse. Naisel peab olema vähemalt üks normaalselt funktsioneeriv munajuha ning meetod on näidustatud mehepoolse või idiopaatilise viljatuse puhul (Wang ja Sauer, 2006).

Embrüo abistatud koorumine – enne implantatsiooni peab blastotsüst kooruma ehk väljuma teda kaitsva kihi *zona pellucida* seest. *Zona pellucida* funktsionaalne või struktuurne häire võib viia puudulikule embrüo koorumisele, mis takistab implantatsiooni. Selle vältimiseks on kasutusel erinevad manipulatsioonimeetodid (nt laseri abil) (Chailert jt., 2013).

2.3.2. Tulemuslikkus ja ebaedu põhjused

443 USA viljatusravikliiniku andmetel oli ART meetodi järgselt rasestumise osakaal embrüo ülekannetest alla 35 aastastel naistel 47,6%, 35-37 aastastel naistel 38,8%, 38-40 aastastel naistel 29,9%, 41-42 aastastel naistel 19,9%, 43-44 aastastel naistel 10,6% ja üle 44 aastastel naistel 3,2%. Kõikides vanusegruppides olevate naiste keskmine rasestumise osakaal embrüo ülekande kohta 2010. aastal oli 25% (Center for Disease Control and the Society of Assisted Reproductive Technology, 2012). Euroopa kliinikute andmetel on rasestumise osakaal embrüo ülekannetest IVF protseduuri puhul 33% (Eestis 40%), ICSI puhul 32% (Eestis 36%), IUI (doonori seemnevedelikuga) puhul 14% (Eestis 3%), FER meetodil 21% (Eestis 21%) ning munaraku doonorluse korral 43% (Eestis 50%). Kokku alustati Euroopas 2008. a. 532 260 ravitsükli, neist 2259 Eestis. IVF ja ICSI tsükli puhul siirdati 22%-l üks embrüo, 53%-l kaks embrüot, 22%-l kolm embrüot ja ~3%-l neli ja rohkem embrüot. Euroopa andmetel olid 78% (Eestis 76%) üksiklapse, 21% (Eestis 24%) kaksikute ja 1% (Eestis 0,4%) kolmikute sünid. Eestis sündis 2008. aastal 649 ART meetodil saadud last, moodustades 4,1% kõikidest elussündidest (Ferraretti jt., 2012).

Viljatusravi ebaedu põhjused on enamasti järkevad:

Ebakvaliteetsete sugurakkude/embrüote kasutamine — seemnerakkude liikuvus ja hulk ejakulaadis on olulised parameetrid loomulikul teel viljastumisel (ootsüüdini jõudmisel ja sellega fuseerumisel), ent ART seisukohast pole need kõige kaalukamateks parameetriteks — DNA kvaliteet (fragmentatsioon, oksüdatsioon, tertsiaalstruktuur) determineerib ART protseduuri edukuse (Schulte jt., 2010; Aitken jt., 2012). Seda seisukohta kinnitab fakt, et viljatust esineb ka normozoospermiaga meestel (Cooper jt., 2010).

Infektsioon mees- ja/või naispartneril — salpingiidile iseloomuliku hüdroosalpinksi eemaldamine IVF protseduuril (munarakkude punktsioonil) tõstab oluliselt viljastumise edukust (Hammadih jt., 2008). Bakteriaalse vaginoosiga naispartneril on suurem risk IVF abil saavutatud raseduse varajaseks katkemiseks (Ralph jt., 1999; Liversedge jt., 1999; Eckert jt., 2003). *Ureaplasma ssp.* olemasolu seemnevedelikus on samuti potentsiaalseks faktoriks ART protseduuri ebaõnnestumisel (Knox jt., 2003).

Emaka ja endomeetriumi patoloogia — korduvat IVF ebaõnnestumist naispartneril on seostatud vähenenud endomeetriumi retseptiivsusega, mis väljendub ebanormaalse emakaõõne, ebapiisava endomeetriumi tiheduse, immunoloogiliste probleemide, *zona pellucida* tihenemise ja endometrioosi esinemisel (Margalioth jt., 2006).

Ebasobiv ART meetod — viljatusravi seisukohast tuleb arvestada mõlema partneri tervisliku seisukorra (põletike, geneetika, suguteede anatoomia iseärasuste) ja gameetide kvaliteediga. Sobiva ART meetodi selgitamiseks on vajalik põhjalik kliiniline uuring mõlemal partneril. ART meetodi kasutamisel teostatav munasarjade stimulatsioon individualiseeritud protokoll järgides on üks osa personaalmeditsiinist: personaalse ravimeetodi ja -doosi valik on saamas üha levinumaks meetodiks (Fiedler ja Ezcurra, 2012).

OxS — on leitud, et seemnevedeliku kõrge ROS-ide taseme korral on IVF edukus ja raseduse tekkimise tõenäosus madalam ning ICSI meetodil saadud blastotsüsti staadiumis embrüod vähem arenenud (Zorn jt., 2003; Meseguer jt., 2007). Loomuliku suguühete järgselt blokeerib oksüdatiivne kahjustus spermatoosoidi membraanis viljastumisprotsessi, ennetamaks kahjustunud DNA-l embrüosse sattumast. ICSI vältel blokaadi ei teki ning mikroinjektsioonil emakasse sattunud kahjustunud DNA-ga spermatoosoid on võimeline munaraku viljastama. Kui DNA reparatsioonisüsteemid ei suuda piisavalt efektiivselt parandusi sooritada, võidakse mittetäielikult paardunud DNA-ga seemnerakku tolereerida ja mutatsioon levib, mis on potentsiaalseks allikaks geneetiliste haiguste ja vähi tekkele (Marchetti jt., 2007). Uuring, mis hõlmas 225 paari näitas, et seemnerakkude kõrge DNA oksükahjustuse (8-OHdG) puhul kulub paaridel viljastumiseks rohkem aega (Loft jt., 2003). IVF abil saadud laste elussündide osakaal on väiksem, kui kasutatakse tugevama DNA kahjustusega spermatoosoidide (Simon jt., 2013). Ka kunstliku viljastamise protsess ise võib olla potentsiaalseks OxS-i allikaks spermatoosoididele: seemnevedeliku tsentrifuugimine spermatoosoidide eraldamiseks spermoplasmast (millega eemaldatakse ka spermoplasma antioksidandid) võimendab kordades ROS-ide produktsiooni (Potts jt., 2000). Samuti suureneb OxS-i tase spermatoosoidides külmutamise käigus (Watson, 2000). Selleks et OxS-i taseme kvantifitseerimist saaks kasutada rutiinse protseduurina patsiendi tervisliku seisundi ja viljatusravi edukuse prognoosimisel, on vajalikud OxS-i markerite sobivust hindavad võrdlevad uuringud reproduktiivvaldkonnas (Cambi jt., 2013).

3. UURIMISTÖÖ EESMÄRGID

Käesoleva uurimuse eesmärgiks oli hinnata oksüdatiivse stressi taset paaridel, kellel viidi läbi kehaväline viljastamine. Selleks püstitati järgmised ülesanded:

1. selgitada erinevatest kehavedelikest mõõdetud DNA oksukahjustuse markeri 8-OHdG ning uriinist mõõdetud süsteemse OxS-i markeri 8-EPI kasutatavust OxS-i taseme hindamiseks kehavälise viljastamise protseduurile minevatel paaridel;
2. hinnata OxS-i seost uuritava tervisliku seisundiga;
3. hinnata OxS-i seost uuritava seksuaalpartneri tervisliku seisundiga;
4. hinnata OxS-i markerite kasutatavust viljatusravi edukuse prognoosimisel.

4. MATERJAL JA METOODIKA

4.1. Uuritavad paarid

Uuritavateks olid 79 viljatut paari, kellele teostati aastatel 2011-2012 Nova Vita Kliinikus viljatusravi. 58 paari osales IVF ning 21 paari ICSI protseduuril.

IVF või ICSI protseduuri järgselt ei tekkinud rasedust 63,3%-l (n=50) uuringugruppi kuulunud naistest. Ainult biokeemiliselt (rasedustesti abil) tuvastatav rasedus tekkis 8,8%-l (n=7) ning nii biokeemiliselt kui kliiniliselt (ultraheli abil) tuvastatav rasedus 27,9%-l (n=22) naispartneritest. Edasised andmed raseduse kulgemise kohta puuduvad.

Uuritavad täitsid uuringus osalemise teadliku nõusoleku vormi ning vastasid küsimustikule, mis oli nais- ja meespartneril mõnevõrra erinev (vt Lisa 1-3).

4.2. Uuritav materjal

Järgnevad proovid koguti Nova Vita Kliinikus folliikulite punktsiooni päeval:

- 1) uriiniproov nais- ja meespartnerilt (külmutati 1ml 1h jooksul -20°C);
- 2) 3 tupesekreedi proovi tagumise tupevälvi ülemisest kolmandikust (üks tampoon kuivas katsutis, teine anaeroobses transportsöötmes ning kolmas tampoon mikrobioloogilise preparaadi jaoks) (säilitati -20°C);
- 3) seemnevedeliku proovi andis meespartner masturbatsiooni teel steriilsesse proovinõusse (säilitati -20°C).

Seemnevedeliku analüüs ja tupesekreedi mikrobioloogiline preparaat tehti Nova Vita Kliinikus. Osa seemnevedelikust, uriiniproovid, tupesekreedi preparaat ja tampoonid tupesekreedi prooviga transporditi termokonteineris TÜ Mikrobioloogia Instituuti.

4.3. Mikrobioloogilised analüüsid

Seemnevedeliku analüüs viidi läbi Nova Vita Kliinikus vastavalt WHO soovitudele (WHO, 2010). Määrati seemnevedeliku maht (ml), seemnerakkude liikuvus (A+B vorm, %) ning seemnerakkude, ümarrakkude ja neutrofiilide kontsentratsioon (miljon/ml).

TÜ Mikrobioloogia Instituudis viidi läbi tupesekreedi preparaate analüüs mikroskoobiga (1000x) ning tupesekreedi puhverlahuse ettevalmistamine. Anaeroobses transportsöötmes olevat tupesekreedi prooviga tampooni loksutati 1ml-s fosfaatpuhvis 30 sekundi jooksul anaeroobses käsiboksis ning säilitati (-80°C) hilisema biokeemilise uuringu jaoks. Tupesekreedi mikrobioloogilist preparaati kasutati vaginaalse kandidoosi ja bakteriaalse vaginooosi hindamiseks. Bakteriaalse vaginooosi määramiseks leiti mikroobide morfootüüpide (*Lactobacillus spp.*, *Gardnerella vaginalis*, *Bacteroides spp.*, *Mobiluncus spp.*) hulga alusel mikroskoobi vaateväljas summaarne Nugent skoor (vt Tabel 4). Normaalseks tupe mikroflooraks loetakse skoor 0-3, vahepealseks 4-6 ja bakteriaalseks vaginooosiks skoor 7 või rohkem (Nugent jt., 1991).

Tabel 4. Nugent skoori määramine

<i>Lactobacillus spp.</i> morfootüüp	Skoor	<i>G. vaginalis/ Bacteroides spp.</i> morfootüüp	Skoor	<i>Mobiluncus spp.</i> morfootüüp	Skoor
≥30	0	0	0	0	0
5-30	1	<1	1	<1	1
1-4	2	1-4	2	1-4	1
<1	3	5-30	3	5-30	2
0	4	≥30	4	≥30	2

4.4. Biokeemilised analüüsid

4.4.1. Lipiidide peroksüdatsiooni määramine

Süsteemse OxS-i hindamiseks määrati TÜ Biokeemia Instituudis tunnustatud lipiidide peroksüdatsiooni markeri 8-EPI tase (mmol/ng kreatiniini kohta) uriinist kõikidel uuringus osalenud paaridel (n=79) kommertsiaalse ELISA kiti abil vastavalt tootja juhiste (BIOXYTECH 8-Isoprostane Assay, Cat. No. 21019; Oxis International, Inc., Portland, OR, USA). Tartu Ülikooli Kliinikumi Ühendlaboris määrati uriinist kineetilise kolorimeetrilise meetodi järgi neerude ekskretoorset funktsiooni iseloomustav kreatiniini kontsentratsioon, mida arvestati hiljem 8-EPI hulga leidmisel.

4.4.2. DNA oksukahjustuse määramine

TÜ Biokeemia Instituudis määrati lokaalne OxS-i tase DNA oksukahjustuse markeri 8-OHdG (nM) abil kõikidel uuringus osalevatel meespartneritel spermoplasmast (n=79) ning 20-l naispartneril tupsekreeდი puhverlahusest. Lisaks mõõdeti süsteemse OxS-i hindamiseks 50-l paaril 8-OHdG tase uriiniproovist. Spermoplasma saadi seemnevedeliku tsentrifugimisel 3000 g x 15 min. Samadel tingimustel tsentrifugiti enne biokeemilist analüüsi ka tupsekreeდი puhverlahus ja uriin. Algmaterjalidest valmistati biokeemiliseks analüüsiks 1:10 lahjendused. 8-OHdG määramiseks kasutati kommertsiaalset ELISA kit'i ning järgiti tootja juhiseid (Trevigen HT 8-oxo-dG ELISA Kit II, Cat. No. 4380-192-K; Trevigen, Inc., Gaithersburg, MD, USA).

4.5. Statistiline analüüs

Üldiseks statistiliseks analüüsiks kasutati arvutiprogramme SigmaPlot 12.0 (Systat Software Inc, IL, USA) ja Excel (Microsoft Corp., Redmond, OR, USA). Mees- ja naispartneri tervisliku seisundi ja anamneesi, biokeemiliste ja mikrobioloogiliste andmete statistiliseks analüüsiks kasutati *Student T*-testi andmete parameetrilise jaotuse puhul ning *Mann-Whitney Rank Sum* testi andmete mitteparameetrilise jaotuse puhul. Korrelatsioonianalüüsi ja kahefaktorilise dispersioonanalüüsi jaoks kasutati programmi Stata IC/12.1 (StataCorp LP, USA). Statistiliselt oluliseks loeti $p < 0,05$.

4.6. Eetika

Uuringu läbiviimiseks oli Tartu Ülikooli Inimuuringute Eetika Komitee luba. Andmete analüüsiks uuritavad kodeeriti, isikuandmed hoitakse uurimistulemustest eraldi. Uuringus osalemine oli vabatahtlik ja iga uuritav täitis informeeritud nõusoleku lehe ning kinnitas nõusolekut uuringus osaleda allkirjaga.

5. TULEMUSED JA ARUTELU

5.1. ART protseduurile suunatud paaride andmed küsimustiku ja kliiniliste näitajate põhjal

5.1.1. Tervislik seisund ja tervise anamnees ART protseduurile tulles

Küsimustik andis üldinformatsiooni uuritavate tervise, elustiili ning seksuaal- ja reproduktiivtervise kohta (vt Lisa 2 ja 3). Tabelis 5 on toodud uuringugruppi iseloomustav ülevaade nais- ja meespartnerite tervise anamneesist. Meespartneri keskmine vanus antud uuringus osutus oluliselt kõrgemaks kui nende partneritel (36 vs 33 aastat; $p=0,006$). Kirjanduse andmetel on kõrgemas eas meestel seemnerakkude DNA kahjustused ulatuslikumad (Moskovtsev jt., 2006). Hüppeline muutus naiste viljakusnäitajates ilmneb alates 35. eluaastast, ent juba vanuses 30-34 on suurem oht rasedusega seotud komplikatsioonideks (Kenny jt., 2013). Risk komplikatsioonideks on kõrgeim, kui naise vanus on ≥ 35 aastat ning tema partneril ≥ 40 aastat (de la Rochebrochard ja Thonneau, 2002).

Meespartnerite kehamassiindeks oli oluliselt kõrgem kui naistel (26,3 vs 21,9 kg/m²; $p<0,001$). Normaalkaalus (BMI 18,5-24,99) olevaid naisi oli rohkem kui mehi ning ülekaalus (BMI 25-29,9) ja rasvunud (BMI ≥ 30) meespartnereid rohkem kui naispartnereid. Rasvumine põhjustab muutusi hormonaaltasakaalus, viies meestel vähenenud seemnerakkude hulga, liikuvuse ja seemnerakkude struktuuri modifitseerumiseni (Hammiche jt., 2012). Kirjanduse andmetel esineb ülekaalulistel ja rasvunud naistel sagedamini ovulatsiooni- ning menstruatsioonihäired ja viljatust (Jacobsen jt., 2012).

Menstruatsioonitsükkel oli ebaregulaarne 25,3%-l naispartneritest. Suguühete ajal tundis ebamugavustunnet 86% naispartneritest, valu üle suguelundites kaebas 45,6% meespartneritest, enim esines valu ristluupiirkonnas. 65,8%-l meespartneritel esinesid urineerimishäired, enim tunti vajadust öösiti urineerida.

Tabel 5. Uuritavate tervise anamnees

	Mehed (n=79)	Naised (n=79)
Vanus (aasta)	36 (25...56)	33 (25...42)
BMI (kg/m²):	26,3 (19,2...35,4)	21,9 (17,9...38,3)
- BMI < 18,5	0/79	7/79
- BMI 18,5-24,99	26/79	54/79
- BMI 25-29,9	43/79	13/79
- BMI ≥ 30	10/79	5/79
Esimene menstruatsioon (vanus aastates)		13 (10...16)
Ebaregulaarne menstruaaltsükkel		20/79
Ebamugavus suguühete ajal:		
- puudub		11/79
- harva/alla poolte		58/79

- pooltel/üle poolte		10/79
Günekoloogilised, suguelundite piirk. operatsioonid	7/79 ^a	68/79 ^b
Esinevad urineerimishäired:	52/79	
- sage urineerimine (<2 tunni tagant)	6/79	
- pakiline urineerimisvajadus	4/79	
- nõrk juga	3/79	
- põis ei tühjene täielikult	2/79	
- valu, kipitus, ebamugavus	4/79	
- veri uriinis	1/79	
- järeltilkumine	8/79	
- alustamisega raskusi	1/79	
- öösiti urineerimise vajadus	12/79	
Valu suguelundites:	36/79	
- munandite piirkonnas	12/79	
- niuetes, kubemes	5/79	
- häbemeluu taga või alakõhus	4/79	
- peenises	5/79	
- lahklihas	5/79	
- ristluu piirkonnas	22/79	
- üldine ebamäärane tunne alakehas	3/79	

^aVarikotseele, hemorroidide ja krüptorhismi ravi.

^bLaparoskoopia, keisrilõige, hüsteroskoopia, abort, munajuhade sterilisatsioon ja läbitavuse taastamine, emakaõõne abratsioon.

5.1.2. ART protseduurile suunatud paaride tervisekäitumine

Kokkuvõtte uuritavate tervisekäitumisest partnerite poolt vastatud küsimustiku põhjal on toodud tabelis 6. Spordiga tegeles ~71% uuringus osalejatest. Enim harrastati jooksmist/kõndimist ning jalgrattasporti. Meespartnerite seas oli kroonilisi suitsetajaid 16,5% ning naispartnerite hulgas 5,1%. Periooditi suitsetas ligi 5% uuritavatest. Paaride puhul, kus naispartneril tekkis ART protseduuri järgselt nii biokeemiliselt kui kliiniliselt tuvastatav rasedus (n=22), olid üks nais- ja kaks meespartnerit kroonilised suitsetajad ja üks meespartner periooditi suitsetaja. Paaride puhul, kus naisel tekkis ainult biokeemiliselt tuvastatav rasedus, suitsetas igapäevaselt 2 meespartnerit.¹ Vaid 7,6% uuritavatest ei tarbinud alkoholi. 48,1% nais- ja 43,0% meespartneritest tarbisid alkoholi 1-2 korda kuus ning 17,7% naistest ja 40,5% meestest tarbisid alkoholi vähemalt korra nädalas. Varasemast on teada, et suitsetamine ning liigne alkoholi tarbimine vähendavad mõlema partneri reproduktiivpotentsiaali (Schilling jt., 2012). Kroonilistel suitsetajatel on seemnevedeliku kvaliteet oluliselt madalam kui mitesuitsetajatel (Mostafa, 2010). Ligi 22% uuritavatest kaebas stressi ja vaimse ülekoormuse üle. 37,9% paaridest olid suguühtes keskmiselt 1-2 korda nädalas.

¹ Käesoleva magistr töö käigus leitud seosed meespartnerite OxS-i taseme ning suitsetamise vahel on toodud tabelis 15, lk. 44.

Tabel 6. Paaride tervisekäitumine

	Naised (n=79)	Mehed (n=79)
Sport:		
- tegeleb spordiga	56/79	57/79
- jooks/kõnd	36/79	24/79
- jalgrattasõit	16/79	17/79
- ujumine	6/79	6/79
- aeroobika	12/79	2/79
- suusatamine	3/79	4/79
- rulluisutamine	3/79	3/79
- pallimängud	1/79	11/79
- jooga	10/79	2/79
- tants	5/79	1/79
- jõusaal	5/79	13/79
Suitsetamine:		
- krooniline suitsetaja	4/79	13/79
- ei ole kunagi suitsetanud	51/79	30/79
- suitsetab periooditi	4/79	5/79
- suitsetamisest loobunud	20/79	31/79
Alkohol:		
- ei tarbi alkoholi	6/79	6/79
- tarbib alkoholi korra aastas	4/79	1/79
- tarbib alkoholi 3-4 korda aastas	9/79	6/79
- tarbib alkoholi 1 kord kahe kuu tagant	8/79	0/79
- tarbib alkoholi 1-2 korda kuus	38/79	34/79
- tarbib alkoholi vähemalt korra nädalas	14/79	32/79
Töö riskifaktorid:		
- keemia	6/79	6/79
- hallitus/niiskus	2/79	8/79
- stress	17/79	18/79
- füüsiline koormus	4/79	9/79
Suguühe viimase 30 päeva jooksul:		
- iga päev/rohkem	1/79	
- 3-4 korda nädalas	6/79	
- 1-2 korda nädalas	30/79	
- kord nädalas	17/79	
- 2-3 korda kuus	15/79	
- kord kuus	2/79	
- suguühet ei olnud	8/79	
Seksuaalkäitumine:		
- oraalseks (mees-naisele)	25/79	
- oraalseks (naine-mehele)	21/79	
- anaalseks	3/79	

5.1.3. ART protseduurile suunatud paaride kliinilised andmed

Uuringus osalenute kliiniline informatsioon suguteede infektsioonide ja põletike kohta saadi Nova Vita Kliinikus teostatud seemnevedeliku analüüsi, androloogi/günekoloogi andmete ning TÜ Mikrobioloogia ja TÜ Biokeemia Instituudis teostatud analüüsides põhjal (vt Tabel 7 ja 8). Enne ART protseduuri läbiviimist kontrolliti ja vajadusel raviti Nova Vita Kliinikus

sugulisel teel levivad infektsioonid (*Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium*, *Trichomonas vaginalis*). Lisaks määrati ureaplastmade olemasolu suguteedes (*U. urealyticum*, *U. parvum*) ning HSV, HCV ja *T. pallidum*'i vastaste antikehade esinemine. Meespartneritel määrati leukotsütoospermia olemasolu, mis oli aluseks põletikulise prostatiidi diagnoosimisel. TÜ Mikrobioloogia Instituudis määrati naispartneritel lisaks bakteriaalse vaginooosi ja vaginaalse kandidoosi olemasolu.

Tabel 7. Meespartnerite infektsioonid/põletikud

	Mehed (n=79)
<i>Ureaplasma spp.</i>	5/79
HSV	1/79
<i>C. trachomatis</i>	1/79
HCV	2/79
Põletikuline prostatiit	4/79
Mittepõletikuline prostatiit	5/79
Eesnaha või sugutipea põletik	3/79

Tabel 8. Naispartnerite põletikud infektsioonid/põletikud

	Naised (n=79)
Urea- või <i>Mycoplasma spp.</i>	12/79
HSV	2/79
<i>C. trachomatis</i>	2/79
<i>T. pallidum</i>	2/79
Salpingo-ooforiit	14/79
Kandidoos	13/79
Bakteriaalne vaginooos	14/79

Uuringus osalenud meespartnerite sperma baasparameetrid ning meestel esinenud genitaalpiirkonna patoloogiad on toodud tabelis 9. Kõrvalekalle mõnes seemnevedeliku parameetris (mitte-normozoospermia) esines 37,9%-l meespartneritest [asteno-zsp (n=8), terato-zsp (n=6), AT-zsp (n=10), oligo-zsp (n=2), OA-zsp (n=2) ja OAT-zsp (n=2)]. Normozoospermia mehi oli kokku 49, ent nendest 13-l diagnoositi enne viljatusravi läbiviimist mõni põletik, infektsioon või muu kõrvalekalle [mittepõletikuline prostatiit (n=3); põletikuline prostatiit (n=2); eesnaha või sugutipea põletik (n=2); varikotseele (n=1); fimoos (n=1); HCV (n=2); *Ureaplasma spp.* (n=2); *C. trachomatis* (n=1)].

Uuritavate meespartnerite seemnevedeliku maht, seemnerakkude ja neutrofiilide arv ning seemnerakkude liikuvus jäid uuringugrupi mediaanväärtuste puhul WHO piirnormi. Seemnerakkude liikuvuse ja seemnevedeliku mahu osas mahtusid WHO piirnormi eranditult kõik uuringus osalenud 79 meespartnerit. Neljal meespartneril jäi seemnerakkude arv alla piirnormi. Leidus meespartner, kelle seemnerakkude arv oli normist 50 korda madalam. Neutrofiilide arv, mis viitab põletikule, oli normist kõrgem 23-l meespartneril (sh WHO soovitatud norme kasutades seitsmel meespartneril). Nagu kirjanduse ülevaates mainitud, ei saa meespartnerit ainuüksi WHO piirnormidesse mittemahtuvate seemnevedeliku baasparameetrite põhjal viljatuks tunnistada. Kõrgenenud neutrofiilide ja langenud seemnerakkude arv, väike seemnevedeliku maht ning vähenenud seemnerakkude liikuvus on aga abiks androloogile mehepoolse viljatuse põhjuste selgitamisel ning sobiva ART tehnoloogia valimisel (Erenpreiss jt., 2008) (Vt Tabel 9).

Tabel 9. Seemnevedeliku baasparameetrid ja genitaalpiirkonna patoloogiad

	Mediaanväärtus (min-max)	WHO normid (2010)	Meeste arv	Meeste arv, kellel esines kõrvalekalle normist
Seemnevedeliku maht (ml)	3,7 (1,5...9,0)	≥1,5		0/79
Seemnerakkude arv (10 ⁶ /ml)	65,0 (0,3...268,0)	≥15		4/79
Neutrofiilide arv (10 ⁶ /ml)	0,1 (0,0...4,1)	≤1/ (≤0,2) ^a		23/79
Seemnerakkude liikuvus (A+B%)	71,5(38,0...89,0)	≥32		0/79
Normozoospermia			49/79	30/79
- asteno-zoospermia			8/79	
- terato-zoospermia			6/79	
- AT-zoospermia			10/79	
- oligo-zoospermia			2/79	
- OA-zoospermia			2/79	
- OAT-zoospermia			2/79	
Fimoos			1/79	
Varikotseele			1/79	

^a Meie uuringus kasutati madalamat soovitatud piiri, milleks on ≤0,2 (miljonit/ml) (Punab jt., 2003).

Tabelis 10 on toodud naiste kliinilised andmed varasemate viljatusravi protseduuride, raseduste edukuse ja günekoloogiliste iseärasuste kohta. Eelnevalt oli IVF protseduuri teostatud 34-le ning ICSI protseduuri 9-le naispartnerile. Munajuhade probleemid esinesid ~43%-l, endometriosis ~20%-l ning väikese vaagna liiteline protsess 16,5%-l naistest. 69,6% (n=55) naistest oli varasemalt rasestunud; sünnitanud oli 36,7% (n=29) naistest (13 naist omas ühist last praeguse seksuaalpartneriga); 25,3% oli teinud aborti ning 24,1%-l naistest oli esinenud katkenud ja 15,2%-l emakaväline rasedus. Varasemalt polnud sünnitanud 63,3% (n=50) naistest (neist 24 polnud rasestunud ning 26 oli teinud aborti ja/või oli esinenud katkenud/emakaväline rasedus). 79-st meespartnerist omasid 12 meest vähemalt ühte ühist last praeguse partneriga, 11 meest eelmise seksuaalpartneriga ning 1 mees omas last mõlema seksuaalpartneriga. 69,6% (n=55) meestest olid lastetud (meeste infot pole tabelis kajastatud).

Tabel 10. Naispartnerite kliinilised andmed

	Naispartnerid (n=79)	Tsüklite arv, mediaan (min...max)
Varem teostatud viljatusravi protseduurid:		
- IVF	34/79;	2 (1...6)
- ICSI	11/79;	1 (1...8)
- IVF/ICSI	9/79;	1 (1..1)
- IUI	10/79;	1,5 (1..4)
- FET	28/79;	2 (1...5)
Munajuhade probleemid	34/79	
Väikese vaagna liiteline protsess	13/79	
Endometriosis	16/79	
Emakamüoom	7/79	
PCOS	8/79	
Ovulatsioonihäired	5/79	
Endomeetriumi polüüp	2/79	
Kilpnäärme probleemid	3/79	
Rasedused ja sünnitused:		
- on olnud rase	55/79	
- on sünnitanud vähemalt ühe lapse	29/79	
- on esinenud katkenud rasedus	19/79	
- on esinenud emakaväline rasedus	12/79	
- on teinud aborti	20/79	

Lisa 4 sisaldab illustreerivad joonised (L1-L8), mis kirjeldavad nais- ja meespartnerite kliinilist tausta olenevalt naisel tekkinud raseduste edukusest.

Edaspidises tulemuste analüüsis mainitud **terviseprobleemidega meeste gruppi** (n=43) kuulusid mehed, kelle seemnevedeliku baasparameetrites esines kõrvalekalle (mitte-normozoospermia), enne viljatusravi alustamist leiti *Ureaplasma ssp.* antikehad, *C. trachomatis*, HCV, HSV, fimoos, varikotseele, põletikuline või mittepõletikuline prostatiit ja/või eesnaha ja sugutipea põletik. **Tervete meeste grupi** (n=36) moodustasid normozoospermiaga mehed, kellel puudusid ka eelpool nimetatud suguteede põletikud, infektsioonid ja patoloogiad. Tulemuste analüüsil mainitud **terviseprobleemidega naiste gruppi** (n=51) kuulusid naised, kellel enne viljatusravi läbiviimist leiti *Urea-* või *Mycoplasma spp.*, või *T. pallidum*'i antikehad, *C. trachomatis*, HSV, bakteriaalne vaginosis, kandidoos, endometriosis, emakamüoom või salpingo-ooforiit. **Tervete naiste grupi** (n=28) moodustasid naised, kellel puudusid eelpool nimetatud suguteede infektsioonid, põletikud, patoloogiad ning Nugent skoor oli 0-6.

Tabelis 11 on toodud meespartnerite kliinilised andmed seemnevedeliku terminoloogia alusel koostatud gruppides. Oligo/OA/OAT-zsp grupis [WHO normist madalam seemnerakkude arv (oligo-zsp), progressiivselt liikuvate (asteno-zsp) ja morfoloogiliselt normaalsete (terato-zsp) seemnerakkude osakaal] osutus seemnevedeliku maht oluliselt suuremaks kui tervete meeste (4,8 vs 3,7 ml) ja AT-zsp (4,8 vs 3,6 ml) grupis. Kuna AT-zsp gruppi eristab oligo/OA/OAT-zsp grupist oligozoospermia komponendi puudumine, võib saadud tulemuse alusel oletada, et oligozoospermia ning seemnevedeliku suurem maht on omavahel seotud. Seda seost kinnitavad ka varasemad uuringud (Khan jt., 2012).

Kuigi kõikides mitte-normozoospermia gruppides mahtus seemnerakkude arvu keskväärts WHO piirnormi, oli AT-, terato- ja oligo/OA/OAT-zoospermiaga meestel seemnerakkude arv ootuspäraselt oluliselt madalam kui tervetel meestel. AT-, asteno-zsp ja terviseprobleemidega normozoospermia grupis oli seemnerakkude arv oluliselt kõrgem kui oligo/OA/OAT-zoospermiaga meestel. Kuigi terviseprobleemidega normozoospermia grupis oli seemnerakkude arv ka suurem kui AT-, terato- ja astenozoospermiaga meestel ja väiksem kui tervetel meestel, ei olnud erinevus statistiliselt oluline. Kirjanduse andmetel on normozoospermiaga meestel esinevad põletikud, infektsioonid ja patoloogiad üheks seemnerakkude arvu vähenemise põhjuseks (Dohle jt., 2003; McIntyre ja Fisch, 2010).

AT- ja teratozoospermiaga meestel oli A+B seemnerakkude liikuvus ootuspäraselt väiksem kui tervetel meestel, mis kinnitab, et ka morfoloogilised kõrvalekalded avaldavad seemnerakkude liikuvusele negatiivset mõju.

AT-zsp rühma meestel osutus neutrofiilide arv oluliselt kõrgemaks kui tervetel ning teratozoospermiaga meespartneritel. Kuna AT- ja terato-zsp rühma kuuluvate meeste ühiseks tunnuseks on morfoloogiliselt normaalsete seemnerakkude väiksem osakaal ja erinevuseks vähenenud seemnerakkude liikuvus, viitab saadud tulemus (kõrgem neutrofiilide hulk AT-zsp rühmas) sellele, et neutrofiilide kõrge kontsentratsioon (põletik) on seotud motiilsete seemnerakkude väiksema osakaaluga seemnevedelikus. Suguteede infektsioonid, põletikud ja patoloogiad reproduktiivtraktis häirivad seemnerakkude transporti ning liikuvust (Dosh, jt., 2003; Rusz jt., 2012).

BMI ning seemnevedeliku baasparameetrite vahel olulisi seoseid ei leitud. Oligo/OA/OAT-zoospermiaga mehed olid oluliselt vanemad kui terved ja astenozoospermiaga mehed. Kirjanduse andmetel on vähenenud seemnerakkude arv (ühine tunnus ka oligo/OA/OAT-zsp grupis) iseloomulik meestele, kelle vanus jääb alla 26 või üle 45 aasta (Fisch jt., 1996) (Vt Tabel 11).

Tabel 11. Seemnevedeliku parameetrite seos meespartneri kliiniliste näitajatega

	Terved mehed (n=36)	Terviseporbleemid, normo-zsp (n=13)	AT-zsp (n=10)	Asteno-zsp (n=8)	Oligo/OA/OAT-zsp (n=6)	Terato-zsp (n=6)	P-väärtus
Seemnevedeliku maht (ml)	3,7 (±0,8) ¹	4,1 (±1,2)	3,6 (±2,0) ²	3,8 (±1,7)	4,8 (±0,9) ¹⁻²	3,8 (±1,5)	¹ p=0,005 ² p=0,020 ³ p=0,032 ⁴ p=0,002
Seemnerakkude arv (10⁶/ml)	87,4 (±50,8) 3-5	77,9 (±42,2) 6	53,4 (±29,6) 3,7	59,8 (±23,0) 8	23,3 (±31,5) 4, 6-8	46,8 (±22,7) 5	⁵ p=0,032 ⁶ p=0,006 ⁷ p=0,034 ⁸ p=0,014
Seemnerakkude liikuvus (A+B%)	71,8 (±11,4) ⁹⁻¹⁰	68,9 (±13,9)	59,6 (±9,0) ⁹	61,5 (±19,0)	67,0 (±11,3)	61,0 (±14,9) ¹⁰	⁹ p=0,042 ¹⁰ p=0,047
Neutrofiilide arv (10⁶/ml)	0,2 (±0,4) ¹¹	0,2 (±0,3)	0,4 (±0,4) ¹¹⁻¹²	0,5 (±0,8)	0,7 (±1,6)	0,1 (±0,1) ¹²	¹¹ p=0,004 ¹² p=0,045
BMI (kg/m²)	27,3 (±3,1)	26,9 (±2,9)	25,5(±3,1)	26,4 (±2,5)	25,5 (±2,8)	25,3 (±1,6)	NS
Vanus (aasta)	35,7 (±4,9) ¹³	35,6 (±7,3)	38,7 (±9,9)	34,3 (±3,1) ¹⁴	39,8 (±6,6) ¹³⁻¹⁴	36,3 (±6,3)	¹³ p=0,040 ¹⁴ p=0,029

Tabelis toodud numbrilised väärtused on esitatud kujul keskvärtus (± standardhälve).

Tabelis 12 on toodud uuringus osalenud meespartnerite kliinilised andmed suguteede infektsioonide, põletike ja patoloogiate alusel koostatud gruppides. Meestel, kellel esines prostatiit, eesnaha või sugutipea põletik, oli seemnevedeliku maht oluliselt väiksem kui tervete meeste, *Ureaplasma/C. trachomatis*/HSV/HCV ja terviseprobleemidega normozoospermia grupis. Seemnevedeliku väiksem maht võib olla tingitud urogenitaaltraktis paiknevatest takistustest, mis tekivad enamasti (ravimata) põletiku tagajärjel (Dohle jt., 2003).

Eesnaha ja sugutipea põletiku, prostatiidi ja mitte-normozoospermiaga meestel osutus seemnerakkude arv ja seemnerakkude liikuvus ootuspäraselt oluliselt väiksemaks kui tervetel meestel. Mitte-normozoospermiaga meeste grupis oli seemnerakkude arv väiksem kui normozoospermia ja terviseprobleemidega meestel.

Prostatiidi, eesnaha ja sugutipea põletikuga meestel osutus neutrofiilide arv ootuspäraselt kõrgemaks kui tervetel meestel. Prostatiidi korral esinevad tihti purskejuha mittetäielikud taksitused, mistõttu on prostatiidiga meestel langenud ka seemnevedeliku kvaliteet (seemnevedeliku maht, seemnerakkude liikuvus/arv). Täielik juha takistus võib viia azoospermia/aspermia diagnoosini (Dohle jt., 2003; McIntyre ja Fisch, 2010).

Tabel 12. Seemnevedeliku analüüsi seos meespartneri infektsioonide, põletike ja patoloogiatega

	Terved mehed (n=36)	Terviseprobleemidega, normo-zsp (n=13)	Mitte-normo-zsp (n=30)	Ureaplasma/C.trachomatis/HSV/HCV(n=8)	Eesnaha ja sugutipea põletik, prostatiit (n=12)	P-väärtus
Seemnevedeliku maht (ml)	3,7 (±0,8) ¹	4,1 (±1,2) ²	4,0 (±1,6)	4,3 (±1,1) ³	3,2 (±0,7) ¹⁻³	¹ p=0,046 ² p=0,026 ³ p=0,012
Seemnerakkude arv (10 ⁶ /ml)	87,4 (±50,8) ⁴⁻⁵	77,9 (±42,2) ⁶	47,8 (±28,9) ^{4,6}	62,6 (±57,1)	57,7 (±26,5) ⁵	⁴ p<0,001 ⁵ p=0,045 ⁶ p=0,005
Seemnerakkude liikuvus (A+B%)	71,8 (±11,5) ⁷⁻⁸	68,9 (±13,9)	62,7 (±12,6) ⁷	66,6 (±15,3)	61,6 (±10,0) ⁸	⁷ p=0,014 ⁸ p=0,034
Neutrofiilide arv (10 ⁶ /ml)	0,2 (±0,4) ⁹	0,2 (±0,3)	0,4 (±0,8)	0,2 (±0,1)	0,4 (±0,4) ⁹	⁹ p=0,024
BMI (kg/m ²)	27,3 (±3,1) ¹⁰	26,9 (±2,9)	25,7 (±2,5) ¹⁰⁻¹¹	28,5 (±2,5) ¹¹⁻¹²	25,5 (±1,9) ¹²	¹⁰ p=0,018 ¹¹ p=0,005 ¹² p=0,004
Vanus (aasta)	35,7 (±4,9)	35,6 (±7,3)	37,3 (±7,2)	38,2 (±8,7)	38,5 (±9,5)	NS

Tabelis toodud numbrilised väärtused on esitatud kujul keskvärtus (± standardhälve).

5.2. Oksüdatiivne stress ART protseduurile suunatud paaridel

5.2.1. 8-EPI tase viljatutel paaridel

Tunnustatud süsteemse OxS-i markeri 8-EPI tase määrati uriinist kõikidel uuringus osalenud nais- ja meespartneritel. Meestel saadi 8-EPI mediaanväärtuseks 67,5 (27,7...114,6) ning naispartneritel 75,0 (22,1...128,9) mmol/ng kreatiniini kohta, mis osutus oluliselt kõrgemaks kui meestel määratud 8-EPI mediaanväärtus (p=0,009). Ilmnes positiivne korrelatsioon süsteemse OxS-i markeri 8-EPI tasemes mees- ja naispartnerite vahel (**r=0,42; p<0,001**).

5.2.2. 8-OHdG tase viljatutel paaridel

Uuringus osalenud paaridest määrati DNA oksükahjustuse markeri 8-OHdG tase uriinist 50-l paaril. Meestel saadi 8-OHdG mediaanväärtuseks 444,0 (83,4...723,9) ja naistel 412,3 (71,9...1315,8) nM. Partnerite vahel polnud erinevus statistiliselt oluliselt erinev. Ilmnes positiivne korrelatsioon naispartneri uriinist määratud 8-OHdG ja 8-EPI vahel ($\rho=0,32$; $p<0,022$).

Meeste uriinist määratud 8-OHdG mediaanväärtus 444,0 (83,4...723,9) osutus oluliselt suuremaks kui spermaplastmast määratud 8-OHdG mediaanväärtus 275,7 (116,1...983,5) nM ($p<0,001$). Tupesekreedist määrati 8-OHdG tase 20-l naisel. Saadud mediaanväärtus 10,1 (8,7...22,7) nM osutus oluliselt madalamaks kui naiste uriinist 412,3 (71,9...1315,8) ja mehe spermaplastmast 275,7 (116,1...983,5) leitud mediaanväärtused ($p<0,001$).

DNA oksükahjustus mõlema partneri uriinis osutus oluliselt kõrgemaks võrrelduna oksükahjustustega meeste spermaplastmas ja naiste tupesekreedis. Koos ülalnimetatud positiivse korrelatsiooniga mees- ja naispartnerite 8-EPI väärtuste vahel viitab see süsteemse OxS-i olulisele osale DNA oksükahjustuste tekkes.

5.2.3. Seosed lokaalse ja süsteemse OxS-i ning kliiniliste näitajate vahel

Tabelis 13 on toodud paaridel määratud OxS-i markerite väärtused lähtuvalt naispartnerite kliinilisest taustast. Gruppidevahelised erinevused esinesid naiste uriinist ja meeste spermaplastmast määratud 8-OHdG ning meespartnerite 8-EPI osas. *Urea*-ja *Mycoplasma/T. pallidum/C. trachomatis*/HSV, kandidoosi, salpingo-ooforiidi, endometrioosi, emakamüoomi, kõikide naispartnerite ning terviseprobleemidega naiste grupis oli 8-OHdG keskvärtus uriinis oluliselt kõrgem kui tervetel naistel. 8-OHdG tase osutus kõikide naispartnerite grupis oluliselt madalamaks kui kandidoosiga naistel, ent võrreldes endometrioosi grupiga ei osutunud tulemus statistiliselt oluliseks ($p=0,057$). OxS on kirjanduse andmetel naise organismis kandidoosi puhul levinud tagajärjeks. Vaginaalse kandidoosi peamine põhjustaja *Candida albicans* kasutab antioksidantset kaitsemehhanismi tugeva OxS-i keskkonnas ellujäämiseks (Frohner jt., 2009). Kirjanduse andmetel on endometrioosiga naistel nii DNA kahjustus kui lipiidide peroksüdatsioon ulatuslikum kui kontrollgrupil (Sharma jt., 2012). Bakteriaalse vaginooosiga naistel oli 8-OHdG väärtus uriinis küll kõrgem kui tervetel naistel, ent tulemus polnud statistiliselt oluliselt erinev ($p=0,069$). On teada, et bakteriaalne vaginooos põhjustab naise organismis tugevat OxS-si ning mõjutab seega raseduse edukust (Bogavac jt., 2012). 8-OHdG tase tupesekreedis polnud gruppide vahel oluliselt erinev, kuigi kandidoosi ja bakteriaalse vaginooosiga naiste grupis saadi kõrgemad tulemused.

Meestel, kelle partner kuulus terviseprobleemidega naiste, *Urea-ja Mycoplasma/T. pallidum/C. trachomatis/HSV*, kandidoosi, salpingo-ooforiidi või bakteriaalse vaginoosi gruppi, oli 8-OHdG tase spermaplasmat oluliselt kõrgem kui tervete partneritega meestel. Kandidoosiga naiste partneritel esines spermaplasmas oluliselt kõrgem 8-OHdG tase võrreldes endometriosisiga naiste partnerite ja kõikide uuringus osalenud meestega. Meestel, kelle naisel esines bakteriaalne vaginoos, oli spermaplasma 8-OHdG tase oluliselt kõrgem kui meestel, kelle partner kuulus terviseprobleemide, *Urea-ja Mycoplasma/T. Pallidum/C. trachomatis/HSV*, salpingo-ooforiidi, emakamüoomi või endometriosisi gruppi ning samuti võrreldes kõikide meespartnerite 8-OHdG keskväärtusega. Kahefaktoriline dispersioonianalüüsi mudel kinnitas, et bakteriaalse vaginoosiga naiste meespartnerite spermaplasma oluliselt kõrgem DNA oksükahjustuse tase on seotud just naisel esineva bakteriaalse vaginoosi ($p < 0.0005$), mitte mehe tervisliku seisundiga ($p = 0.1328$). *In vitro* katses on tõestatud, et bakteriaalse vaginoosi ravis kasutatavad vaginaalsed probiootikumid mõjuvad positiivselt seemnerakkude liikuvusele ja kaitsevad lipiidide peroksüdatsiooni eest (Barbonetti jt., 2011).

Meestel, kelle naisel esines salpingo-ooforiit ning ka kõikide terviseprobleemidega naiste partneritel osutus 8-EPI tase oluliselt kõrgemaks kui tervete naispartneritega meeste ja kõikide uuritavate meeste grupis. Hetkel puuduvad uuringud naispartneri tupe mikrofloora mõju kohta tema partneril. On teada, et seksuaalvahekord mõjutab oluliselt leukotsütoospermiaga meeste partnerite tupe mikrofloorat ning OxS-i taset (Borovkova jt., 2011; Mändar jt., 2013) (Vt Tabel 13).

Tabel 13. Lokaalse ja süsteemse Oxs-i seosed paaril olenevalt naispartneri kliinilisest taustast

	Kõik uuritavad (n=79)	Terved naised (n=28)	Terviseprob- leemidega naised (n=51)	Urea- ja <i>Mycoplasma/</i> <i>T.pallidum/HSV/</i> <i>C.trachomatis</i> (n=18)	Kandi- doos (n=13)	Salpingo- ooforiit (n=14)	Endo- metriooos (n=16)	Bakteriaalne vagiinooos (n=14)	Emaka- müoom (n=7)	P-väärtus
8-OHdG N uriin (nM)	434,3 (±200,1) 1-2	338,7 (±153,6) 1, 3-8	479,3 (±205,3) 3	487,6 (±137,6) 4	586,9 (±331,2) 2, 5	476,8 (±182,6) 6	555,7 (±301,4) 7	460,8 (±233,3)	473,4 (±182,2) 8	¹ p=0,042 ² p=0,044 ³ p=0,016 ⁴ p=0,008 ⁵ p=0,011 ⁶ p=0,024 ⁷ p=0,011 ⁸ p=0,048
8-OHdG tupesekreet (nM)	11,1 (±3,3)	9,9 (±0,9)	11,6 (±3,7)	12,2 (±5,9)	13,5 (±5,3)	10,4 (±0,8)	13,0 (±6,5)	13,2 (±5,4)	9,0 (±0)	NS
8-OHdG spermaplasma (nM)	297,0 (±128,3) 9-10	256,5 (±64,6) 11-15	319,2 (±148,4) 11, 16	314,8 (±116,7) 12, 17	401,1 (±218,9) 9, 13, 18	310,8 (±102,2) 14, 19	254,9 (±96,8) 18, 20	429,0 (±202,8) 10, 15-17, 19-21	267,6 (±60,8) 21	⁹ p=0,009 ¹⁰ p<0,001 ¹¹ p=0,018 ¹² p=0,017 ¹³ p=0,001 ¹⁴ p=0,021 ¹⁵ p<0,001 ¹⁶ p=0,014 ¹⁷ p=0,028 ¹⁸ p=0,012 ¹⁹ p=0,031 ²⁰ p=0,002 ²¹ p=0,028
8-OHdG M uriin (nM)	429,1 (±142,1)	446,6 (±126,9)	421,4 (±149,4)	474,3 (±158,4)	388,0 (±156,1)	400,6 (±164,2)	442,5 (±158,64)	386,8 (±149,3)	450,8 (±165,6)	NS
8-EPI N uriin (mmol/ng kreatiniin)	78,2 (±23,1)	73,5 (±22,1)	80,9 (±22,7)	82,8 (±18,9)	80,0 (±22,4)	80,9 (±23,2)	78,5 (±25,6)	77,9 (±23,3)	86,4 (±15,0)	NS
8-EPI M uriin (mmol/ng kreatiniin)	69,7 (±21,0) 22-23	67,0 (±18,0) 24, 25	77,7 (±25,0) 22, 24	77,3 (±24,1)	74,5 (±27,4)	80,8 (±27,0) 23,25	71,4 (±23,6)	75,3 (±27,0)	80,2 (±25,3)	²² p=0,026 ²³ p=0,042 ²⁴ p=0,046 ²⁵ p=0,029

Tabelis toodud numbrilised väärtused on esitatud kujul keskväärtus (± standardhälve).

Tabelis 14 on toodud mõlemal partneril määratud lokaalse ja süsteemse OxS-i tasemed rühmades, mis on moodustatud meespartneritel esinevate suguteede infektsioonide, põletike ja patoloogiate alusel. Gruppidevahelised erinevused esinesid spermaplasmast määratud 8-OHdG ning mõlema partneri 8-EPI keskvärtuste puhul. Meestel, kellel esines prostatiit, eesnaha või sugutipea põletik osutus 8-OHdG tase spermaplasmas oluliselt kõrgemaks kui tervete ja kõikide meespartnerite grupis.

Meestel, kellel esines prostatiit, eesnaha või sugutipea põletik, osutusid nii 8-OHdG tase spermaplasmas kui ka 8-EPI tase uriinis oluliselt kõrgemaks kui tervete ja kõikide meespartnerite grupis. Samade probleemidega meeste partneritel oli 8-EPI tase uriinis samuti oluliselt kõrgem kui kõikide uuringus osalenute ja tervete meeste partnerite grupis. 8-EPI tase oli oluliselt kõrgem ka neil meestel, kellel oli eelnevalt määratud *Urea*- või *Mycoplasma /C. trachomatis/HSV* või kes kuulusid terviseprobleemidega meeste gruppi (vt Tabel 14).

Saadud tulemused on kooskõlas meie varasemate uuringutega ja ka teiste uurijate andmetega – nii põletikulise kui mittepõletikulise prostatiidiga meestele on iseloomulik kõrgenenud süsteemse OxS-i tase (Pasqualotto jt., 2000; Kullisaar jt., 2012). Meie eelnevad uuringud on ka näidanud, et pärast seksuaalvahekorda tõuseb leukotsütoospermia diagnoosiga meeste naispartneritel organismis oluliselt süsteemse OxS-i tase (Mändar jt., 2013).

Tabel 14. Lokaalse ja süsteemse OxS-i seosed paaril olenevalt meespartneri kliinilisest taustast

	Kõik uuritavad (n=79)	Terved mehed (n= 36)	Tervise-probleemidega mehed (n=43)	<i>Ureaplasma/ C.trachomatis/ HSV/HCV</i> (n=8)	Eesnaha või sugutipea põletik, prostatiit (n=12)	P-väärtus
8-OHdG N uriin (nM)	434,3 (±200,1)	455,7 (±234,1)	399,4 (±124,7)	366,3 (±163,3)	381,1 (±167,6)	NS
8-OHdG tupesekreet (nM)	11,1 (±3,2)	12,8 (±5,5)	10,6 (±2,1)	10,0 (±1,1)	12,5 (±3,0)	NS
8-OHdG sperma-plasma (nM)	297,0 (±128,3) ¹	276,1 (±93,9) ²	314,4 (±150,2)	309,2 (±79,2)	389,3 (±204,7) ¹⁻²	¹ p=0,021 ² p=0,007
8-OHdG M uriin (nM)	429,1 (±142,1)	430,9 (±140,8)	426,0 (±148,2)	426,6 (±118,2)	404,4 (±103,1)	NS
8-EPI N uriin (mmol/ng kreatiniin)	78,2 (±23,1) ³	75,2 (±22,5) ⁴	80,7 (±23,5)	75,6 (±28,2)	93,0 (±19,4) ³⁻⁴	³ p=0,023 ⁴ p=0,011
8-EPI Muriin (mmol/ng kreatiniin)	69,7 (±21,0)	65,7 (±17,9) ⁵⁻⁷	74,2 (±22,1) ⁵	79,8 (±23,8) ⁶	77,9 (±21,6) ⁷	⁵ p=0,034 ⁶ p=0,027 ⁷ p=0,037

Tabelis toodud numbrilised väärtused on esitatud kujul keskvärtus (± standardhälve).

Tabelis 15 on toodud meespartnerite OxS-i taseme seos suitsetamisega. Kroonilistel suitsetajatel oli spermplasmas oluliselt kõrgem 8-OHdG tase ning kõikidel suitsetajatel esines oluliselt kõrgem 8-EPI tase mittesuitsetajatega võrreldes. Ka varasemad uurimused on näidanud, et suitsetajate seemnevedelikus ja uriinis on DNA oksükahjustuse tase kõrgem (Loft jt., 1992; Fraga jt., 1996; Shen jt., 1997) ning esineb rohkem kahjustatud DNA-ga spermatoosoidide (Taha jt., 2012).

Tabel 15. OxS-i seos meespartneri suitsetamisega

	Mittesuitsetajad (n=61)	Kroonilised suitsetajad (n=13)	Kroonilised ja periooditi suitsetajad (n=18)	P- väärtus
8-OHdG spermplasma (nM)	282,7 ($\pm 99,6$) ⁵	290,3 ($\pm 93,1$)	344,2 ($\pm 193,7$) ⁵	⁵ p=0,037
8-OHdG M uriin (nM)	433,9 ($\pm 144,4$)	430,2 ($\pm 114,5$)	416,9 (± 140)	NS
8-EPI M uriin (mmol/ng kreatiniin)	67,2 ($\pm 19,8$) ⁶⁻⁷	85,9 ($\pm 21,8$) ⁶	77,9 ($\pm 24,3$) ⁷	⁶ p=0,002 ⁷ p=0,029

Tabelis toodud numbrilised väärtused on esitatud kujul keskvärtus (\pm standardhälve)

Tabelis 16 on toodud lokaalse ja süsteemse OxS-i väärtused paaridel, olenevalt meespartneri seemnevedeliku parameetritest. Erinevused ilmnisid meespartneri 8-OHdG ja mõlemal partneril määratud 8-EPI puhul. DNA oksükahjustus spermatoosoidides osutus AT-zsp, oligo/OA/OAT-zsp ja terviseprobleemidega normo-zsp grupis statistiliselt oluliselt kõrgemaks kui tervetel meestel. Seemnevedeliku parameetrite alusel koostatud gruppide suurus oli väga väike ning kaalukamate järelduste tegemine nõuab edaspidist uurimist. Süsteemse OxS-i markeri tase terviseprobleemidega normozoospermiaga meeste [80,3 ($\pm 23,7$)] ja nende partnerite [87,6 ($\pm 16,4$)] uriinis osutus oluliselt kõrgemaks kui tervetel meestel [65,7($\pm 17,9$)] ja nende partneritel [75,2 ($\pm 22,5$)], mis näitab taas partnerite tervisemarkerite olulist seotust (Dohle jt., 2003; McIntyre ja Fisch, 2010).

Tabel 16. Lokaalse ja süsteemse OxS-i seosed paaridel olenevalt seemnevedeliku parameetritest

	Kõik uuritavad (n=79)	Terved mehed (n= 36)	Terviseprobleemidega (n=43)	Normo-zsp (n=49)	Terviseprobleemidega, normo-zsp (n=13)	Mitte-normo-zsp (n=30)	AT- zsp (n=10)	Asteno-zsp (n=8)	Oligo/OA/OAT-zsp (n=6)	Terato-zsp (n=6)	P-väärtus
8-OHdG N uriin(nM)	434,3 (±200,1)	455,7 (±234,1)	399,4 (±124,8)	443,8 (±221,2)	391,5 (±153,9)	404,0 (±111,72)	407,6 (±195,5)	467,0 (±66,3)	400,7 (±94,6)	372,4 (±94,0)	NS
8-OHdG tupesekreet(nM)	11,1 (±3,3)	12,8 (±5,5)	10,6 (±2,1)	11,5 (±4,2)	10,0 (±1,2)	10,8 (±2,3)	10,9 (±3,2)	10,5 (±0,7)	10,8 (±0,7)		NS
8-OHdG spermaplasma (nM)	297,0 (±128,3) 1	276,1 (±93,9) 2-4	314,4 (±150,2) 5	293,8 (±101,1) 6-7	342,8 (±107,8) 2, 8-9	302,1 (±165,3)	378,4 (±244,8) 1, 3, 7, 10	240,2 (±71,7) 8, 10-11	342,8 (±113,7) 4, 11-12	217,0 (±45,2) 5-6, 9, 12	1 p=0,049 2 p=0,018 3 p=0,023 4 p=0,046 5 p=0,029 6 p=0,023 7 p=0,037 8 p= 0,039 9 p=0,003 10 p= 0,072 11 p=0,030 12 p= 0,004
8-OHdG M uriin(nM)	429,1 (±142,1)	430,9 (±140,8)	426,0 (±148,3)	415,6 (±148,3)	347,5 (±172,7) ^{13}	475,9 (±111,4) ^{13}	455,8 (±86,7)	467,4 (±12,7)	513,6 (±72,1)	462,0 (±182,7)	^{13} p=0,036
8-EPI N uriin (mmol/ng kreatiniin)	78,2 (±23,1)	75,2 (±22,5) ^{14}	80,7 (±23,5)	78,5 (±21,6)	87,6 (±16,4) ^{14-15}	78,0 (±25,1)	84,1 (±29,0)	78,5 (±27,3)	70,6 (±24,7) ^{15}	74,4 (±17,7)	^{14} =0,038 ^{15} p=0,046
8-EPI M uriin (mmol/ng kreatiniin)	69,7 (±21,0) ^{16}	65,7 (±17,9) ^{17}	73,1 (±22,9)	70,3 (±20,9)	80,3 (±23,7) ^{16-17}	69,9 (±22,3)	62,2 (±29,2)	74,8 (±21,9)	71,1 (±10,3)	73,6 (±21,9)	^{16} p=0,049 ^{17} p=0,012

Tabelis toodud numbrilised väärtused on esitatud kujul keskväärtus (± standardhälve).

Tabelis 17 on toodud antud uuringus osalenud paaridele 2011/2012 aastal Nova Vita Kliinikus teostatud ART protseduuri edukuse seos partnerite OxS-i tasemega. Naistel, kellel tekkis pärast viljatusravi läbiviimist ainult biokeemiliselt tuvastatav rasedus, osutus 8-EPI tase oluliselt kõrgemaks võrreldes naistega, kelle rasedus oli ka kliiniliselt tuvastatav, kuid samuti võrreldes naistega, kellel rasedust ei tekkinud. Ka meespartneritel võis näha sama trendi – meestel, kelle partneril tekkis ravi järgselt ainult biokeemiliselt tuvastatav rasedus, osutus 8-EPI tase uriinis oluliselt kõrgemaks kui meestel, kelle partneril oli rasedus ka kliiniliselt tuvastatav, kuid samuti ka võrreldes meestega, kelle naisel rasedust ei õnnestunud.

Kuigi naised, kellel biokeemiliselt määratav rasedus kliiniliselt tuvastatavaks raseduseks ei arenenud, oli uuringugrupis vähe, ilmnisid gruppidevahelised statistiliselt olulised erinevused. Tugev süsteemne OxS mõlemal partneril gruppides, kus naisel tekkinud rasedus kliiniliselt määratavaks raseduseks ei arenenud, annab põhjuse oletada, et OxS-l võib olla võtmeroll just loote arengul ja raseduse alalhoidmisel ning see võib viia ebanormaalselt kulgeva raseduse tekkele (Myatt jt., 2010; Rizzo jt., 2011; Agarwal jt., 2012; Velthut jt., 2013). Kirjanduse andmetel on ICSI protseduuri tulemusena saadud embrüote kvaliteet kehvem naistel, kelle 8-EPI tase uriinis on oluliselt kõrgem. Samuti on kliiniliselt määratava raseduse saavutamise eelduseks antioksidantide suurem hulk vereplasmas (Velthut jt., 2013).

Tabel 17. IVF/ICSI ravi tulemuse seos partnerite OxS-i tasemega

	Biokeemiliselt ja kliiniliselt määratav rasedus (n=22)	Biokeemiliselt määratav rasedus (n=7)	Rasedust ei tekinud (n=50)	P-väärtus
8-OHdG N uriin (nM)	497,0 (±271,0)	386,8 (±158,4)	412,8 (±163,3)	NS
8-OHdG tupesekreet (nM)	10,4 (±1,4)	9,6 (±0)	11,3 (±3,5)	NS
8-OHdG spermaplasma (nM)	298,9 (±177,2)	322,5 (±99,4)	290,8 (±105,5)	NS
8-OHdG M uriin (nM)	380,0 (±136,3)	472,5 (±147,1)	446,5 (±140,6)	NS
8-EPI N uriin (mmol/ng kreatiniin)	72,9 (±22,9) ¹	97,8 (±16,7) ¹⁻²	77,6 (±22,4) ²	¹ p=0,007 ² p=0,014
8-EPI M uriin (mmol/ng kreatiniin)	72,1 (±22,6) ³	89,6 (±20,4) ³⁻⁴	66,9 (±19,8) ⁴	³ p=0,049 ⁴ p=0,006

Tabelis toodud numbrilised väärtused on esitatud kujul keskvaartus (± standardhälve).

6. JÄRELDUSED

1. Kehavälise viljastamise protseduurile minevatel paaridel esinevad suurimad gruppidevahelised erinevused DNA oksukahjustuse (8-OHdG) tasemes meespartnerite spermplasmas ja naispartnerite uriinis ning samuti mõlema partneri süsteemse OxS-i (8-EPI) tasemes. DNA oksukahjustus mõlema partneri uriinis on oluliselt kõrgem võrrelduna oksukahjustustega meeste spermplasmas ja naiste tupesekreedis. Süsteemse OxS-i markeri 8-EPI tasemed mees- ja naispartnerite uriinis on omavahel korrelatsioonis. Kõik see viitab süsteemse OxS-i olulisele osatähtsusele DNA oksukahjuste tekkes. Seetõttu võib nimetatud näitajatel olla potentsiaali OxS-i taseme hindamisel viljatusravi patsientidel.

2. Lokaalne oksüdatiivne stress seondub naispartneritel kõige enam suguteede infektsioonide, salpingo-ooforiidi, kandidoosi, endometrioosi, emakamüoomi ning reservatsioonidega ka bakteriaalse vaginosisiga. Meespartneritel seondub nii lokaalne kui süsteemne OxS enim prostatiidi, eesnaha ja sugutipea põletiku ning suitsetamisega.

3. OxS-i tase viljatute paaride osapooltel on lisaks enda tervislikule seisundile seotud ka partneri tervisliku seisundiga: nii mees- kui naispartnerite süsteemne OxS seondub partneri suguteede põletikega. Kahefaktorilise dispersioonianalüüsi mudeli alusel on meespartnerite spermplasma DNA oksukahjustuse tase seotud oluliselt rohkem naispartneri bakteriaalse vaginosisi kui mehe enda tervisega.

4. Kehavälise viljastamise tulemuslikkus seostub mõlema partneri süsteemse OxS-ga — viimane on oluliselt tugevam juhtudel, kui naisel tekkinud rasedus ei arene edasi kliiniliselt määratavaks raseduseks. See annab põhjuse oletada, et tugeval süsteemsel OxS-l võib olla võtmeroll just loote arengul ja raseduse alalhoidmisel, mis omakorda võib viia ebanormaalselt kulgeva raseduse tekkele.

Seetõttu võib süsteemsel OxS-i markeril, 8-EPI-l olla potentsiaali viljatusravi edukuse prognoosimisel.

KOKKUVÕTE

Viljatuse põhjuste selgitamisel ja viljatusravi meetodite kasutamisel tuleb arvestada, et tegemist on paari ühise probleemiga ning põhjus võib peituda ühes või ka mõlemas partneris. Kuigi nii naise- kui mehepoolsed viljatuse põhjused võivad olla väga erinevad, on järjest enam tähelepanu pööratud OxS-i võimalikule rollile. Erinevaid suguteede põletikke ja infektsioone on mõlemal partneril seostatud OxS-ga, mis võib olla üheks arvatavaks põhjuseks viljatuse probleemide tekkimisel. Seetõttu on antioksidantide ravi näol püütud pakkuda alternatiivset võimalust kuluka ART-meetodi kasutamisele (või tõsta ART-meetodi tulemuslikkust), vähendades tugevat OxS-i ning soodustades loomulikult viljastumist.

Antud töö eesmärgiks oli hinnata OxS-i taset kehavälise viljastamise protseduurile minevatel paaridel ning seostada seda mõlema partneri tervisliku seisundi ja kehavälise viljastamise tulemuslikkusega. Uuringus osales 79 paari, kellel määrati DNA oksükaahjustuse (8-OHdG) ja lipiidide peroksüdatsiooni (8-EPI) markerite tase ning selgitati nende seosed indiviidi ja tema partneri OxS-i ja kliiniliste parameetrite vahel.

DNA oksükaahjustus partnerite uriinis osutus kõrgemaks võrrelduna oksükaahjustustega spermplasmas või tupesekreedis. See viitab süsteemse OxS-i olulisele osale DNA oksükaahjustuste tekkes. Uuringust selgus, et kõige enam seostus mõlema partneri tervisliku seisundiga 8-OHdG tase spermplasmas ja naispartneri uriinis ning 8-EPI tase mõlema partneri uriinis. Suurimat mõju OxS-i tasemele avaldasid suguteede infektsioonid, salpingo-ooriit, endometriosis, emakamüoom ning meestel prostatiit, eesnaha ja sugutipea põletik ning suitsetamine. OxS-i tase viljatute paaride osapooltel oli lisaks enda tervislikule seisundile seotud ka partneri tervisliku seisundiga: OxS-i tase seonduis partneri suguteede põletikega.

Kehavälise viljastamise tulemuslikkus seostus 8-EPI tasemega mõlema partneri organismis — tugev süsteemne OxS ilmnes paaril, kus naisel tekkinud rasedus ei arenenud edasi kliiniliselt määratavaks raseduseks. Tugeval süsteemsel OxS-l võib olla võtmeroll raseduse alalhoidmisel ja loote arengul ning see võib viia ebanormaalselt kulgeva raseduse tekkele.

Töös leitud märkimisväärsed seosed OxS-i ja viljatusravi saanud paaride kliinilise tausta ja ka ART-protseduuri tulemuste vahel annavad lootust viljatusravi edukuse kasvuks ja selle tulemuslikkuse paremaks prognoosimiseks. Kuna OxS-i markerite hulk on suur ning nende määramiseks on palju erinevaid tehnoloogiaid, tuleks leida ühtsed standardiseeritud meetodid ning teha uuringuid suure valimiga. Käesoleva magistritöö tulemusena selgus, et nii DNA oksükaahjustuse marker 8-OHdG kui ka lipiidide peroksüdatsiooni marker 8-EPI sobivad reproduktiivvaldkonda puudutavate probleemide hindamiseks. Kuna antud töö puuduseks oli

mõnedes gruppides sisalduvate indiviidide väike arv, siis on vajalik saadud tulemuste kinnitamine suuremates uuringutes.

Oxidative stress in infertile couples

Ave Ahelik

SUMMARY

Medical definition of infertility is the failure to conceive following twelve months of unprotected intercourse (Zegers-Hochschild et al., 2009). Infertility affects about 48,5 million couples worldwide (Mascarenhas et al., 2012). Infertility may occur due to problems in the female, the male or a combination of both. Female factor infertility can result from a variety of causes, such as tubal and uterine factor, ovulatory dysfunction, diminished ovarian reserve, endometriosis, lifestyle, genetics and reproductive immune failure syndrome. Main causes of male factor infertility include infections, varicocele, genetic and anatomic reasons that affect spermatogenesis. Assisted reproductive technology (ART) offers excellent opportunities to infertile couples for achieving pregnancy. There have been a number of developments in technologies since its introduction 35 years ago (ESHRE Guidelines and Legal. ART fact sheet, 2010). Although infertility is a common problem, treatment is sometimes inadequate because the aetiology is not fully understood.

Reactive oxygen species (ROS) have a physiological and pathological role in the reproductive tract. Excessive ROS have been reported to cause DNA damage, lipid peroxidation (which principally alters the membrane structure and function) and protein damage. ROS influence oocytes (ovarian steroidogenesis, ovulation, corpus luteum function and luteolysis), spermatozoa (motility, acrosomal reaction, sperm-oocyte fusion) and embryos (follicular development) and their environments, maintenance of pregnancy and initiation of parturition. Oxidative stress (OxS) that is characterized by imbalance between production and detoxification of ROS affects both natural and assisted fertility by causing a peroxidative damage to the membranes and inducing nuclear DNA damage. Oxidative stress, in turn, affects spermatozoa quality, fertilization, early embryo development, implantation and pregnancy rates (Al-Gubory et al., 2010).

Aim of this research was to detect OxS in 79 couples attending ART procedure. 8-OHdG, one of the oxidative DNA damage byproducts was measured in urine, seminal plasma or vaginal fluid, and 8-EPI, marker of lipid peroxidation was measured in urine. The influence of sexual intercourse on oxidative stress level in women's organism has been previously described in one investigation only (Mändar et al., 2013). Taking that into account, the level of OxS was described in both, male and female partners.

The study showed that 8-OHdG (in seminal plasma and in urine of female partner) and also 8-EPI (in urine of both partners) reflect the clinical condition of both partners very well. The biggest affectors of OxS were genital tract infections, endometriosis, salpingo-oophoritis, bacterial vaginosis, candidosis, uterine myoma, smoking, prostatitis and inflammation of the foreskin or glans penis. Furthermore, the level of OxS was also affected by a partner's state of health. Genital tract infections in both partners affected the level of OxS. Outcome of the ART procedures that were carried out in Nova Vita Clinic 2011/2012, associated very well with 8-EPI in both partners: when pregnancy was detected by clinical method (in addition to biochemical method), the level of 8-EPI was significantly lower in both partners. According to that, high grade systemix oxidative stress may negatively affect the maintenance and outcome of pregnancy.

These results indicate that 8-OHdG and 8-EPI are both suitable markers for estimating the rate of OxS in infertile couples. Applying the detection of OxS in ART patients may select the patients with higher success rate and/or those who need antioxidant therapy. This would all in all lead to improvement of ART outcome as well as natural fertility.

KASUTATUD KIRJANDUSE LOETELU

A) Ajakirja-artiklid

- Abd-Elmoaty** MA, Saleh R, Sharma R, Agarwal A. (2010). Increased levels of oxidants and reduced antioxidants in semen of infertile men with varicocele. *Fertil Steril*. 94(4): 1531-4
- Acharya** UR., Acharya S., Mishra M. (2003). Lead acetate induced cytotoxicity in male germinal cells of Swiss mice. *Ind Health* 41: 291-4
- Agarwal** A., Aponte-Mellado A., Premkumar BJ., Shaman A., Gupta S. (2012). The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. *Reprod Biol Endocrinol* 10: 49
- Agarwal** R., Chase SD. (2002). Rapid, fluorimetric-liquid chromatographic determination of malondialdehyde in biological samples. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 775(1): 121-6
- Agarwal** A., Gupta S., Sekhon L., Shah R. (2008). Redox considerations in female reproductive function and assisted reproduction: from molecular mechanisms to health implications. *Antioxid Redox Signal*, 10: 1375-403
- Agarwal** A., Hamada A., Esteves SC. (2012). Insight into oxidative stress in varicocele-associated male infertility: part 1. *Nat Rev Urol* 9(12): 678-90
- Agarwal** A., Sharma RK., Nallella KP., Thomas AJ Jr., Alvarez JG., Sikka SC. (2006). Reactive oxygen species as an independent marker of male factor infertility. *Fertil Steril* 86(4): 878-85
- Aitken** RJ., De Iuliis GN., Finnie JM., Hedges A., McLachlan RI. (2010). Analysis of the relationships between oxidative stress, DNA damage and sperm vitality in a patient population: development of diagnostic criteria. *Hum Reprod*. 25(10): 2415-26
- Aitken** RJ., De Iuliis GN., Gibb Z., Baker MA. (2012). The Simmet lecture: new horizons on an old landscape--oxidative stress, DNA damage and apoptosis in the male germ line. *Reprod Domest Anim*. 47(4): 7-14
- Aitken** RJ., Jones KT., Robertson SA. (2012) Reactive Oxygen Species and Sperm Function — In *Sickness and In Health*. *J Androl* 33 (6): 1096-106
- Aitken** RJ., Whiting S., De Iuliis GN., McClymont S., Mitchell LA., Baker MA. (2012). Electrophilic aldehydes generated by sperm metabolism activate mitochondrial reactive oxygen species generation and apoptosis by targeting succinate dehydrogenase. *J Biol Chem*. 287(39): 33048-60
- Aktan** G., Doğru-Abbasoğlu S., Küçükgergin C., Kadioğlu A., Ozdemirler-Erata G., Koçak-Toker N. (2013). Mystery of idiopathic male infertility: is oxidative stress an actual risk? *Fertil Steril*. 99(5): 1211-5
- Alaghmand** M., Blough NV. (2007). Source-dependent variation in hydroxyl radical production by airborne particulate matter. *Environ Sci Technol* 41: 2364-70
- Al-Gubory** KH., Fowler PA., Garrel C. (2010). The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. *Int J Biochem Cell Biol* 42:1634-50.
- Alvarez** JG., Storey BT. (1995). Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 42:334-46
- Atosuo** JT., Lilius EM. (2011) The real-time-based assessment of the microbial killing by the antimicrobial compounds of neutrophils. *Sci World J* 11: 2382-90
- ASRM** (Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine). (2006). Endometriosis and Infertility. *Fertil Steril* 14:S156-60.
- Banks** K., Tuazon E., Berhane K., Koh CJ., De Filippo RE., Chang A., Kim SS., Daneshmand S., Davis-Dao C., Lewinger JP., Bernstein L., Cortessis VK. (2013) Cryptorchidism and testicular germ cell tumors: comprehensive meta-analysis reveals that association between these conditions diminished over time and is modified by clinical characteristics. *Front. Endocrin.* 3:182
- Barbonetti** A., Cinque B., Vassallo MR., Mineo S., Francavilla S., Cifone MG., Francavilla F. (2011). Effect of vaginal probiotic lactobacilli on in vitro-induced sperm lipid peroxidation and its impact on sperm motility and viability. *Fertil Steril* 95(8): 2485-8
- Bartosz** G. (2009). Reactive oxygen species: destroyers or messengers? *Biochem Pharmacol* 77: 1303-15
- Benedetti** S., Tagliamonte MC., Catalani S., Primiterra M., Canestrari F., De Stefani S., Palini S., Bulletti C. (2012). Differences in blood and semen oxidative status in fertile and infertile men, and their relationship with sperm quality. *Reprod Biomed Online* 25(3): 300-6

- Bhandary B.**, Marahatta A., Kim HR., Chae HJ. (2013). An Involvement of Oxidative Stress in Endoplasmic Reticulum Stress and Its Associated Diseases. *Int J Mol Sci* 14(1): 434–56
- Birben E.**, Sahiner UM., Sackesen C., Erzurum S., Kalayci O. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J* 5(1): 9-19
- Blumer CG.**, Fariello RM., Restelli AE., Spaine DM., Bertolla RP., Cedenho AP. (2008). Sperm nuclear DNA fragmentation and mitochondrial activity in men with varicocele. *Fertil Steril* 90(5): 1716-22
- Bogavac M.**, Lakic N., Simin N., Nikolic A., Sudji J., Bozin B. (2012). Bacterial vaginosis and biomarkers of oxidative stress in amniotic fluid. *J Matern Fetal Neonatal Med* 25(7):1050- 4
- Borovkova N.**, Korrovits P., Ausmees K., Türk S., Jöers K., Punab M., Mändar R. (2011). Influence of sexual intercourse on genital tract microbiota in infertile couples. *Anaerobe* 17(6): 414-8
- Bridges PJ.**, Jeoung M., Kim H., Kim JH., Lee DR., Ko C., Baker DJ. (2011). Methodology matters: IVF versus ICSI and embryonic gene expression. *Reprod Biomed Online* 23(2): 234–44
- Broekmans FJ.**, Soules MR., Fauser BC. (2009). Ovarian aging: mechanisms and clinical consequences. *Endocr Rev* 30:465–93.
- Burgess H.M.**, Richardson W.A., Anderson R. C., Salaun C., Graham S.V., Gray N.K. (2011). Nuclear Relocalisation of Cytoplasmic poly(A)-binding Proteins PABP1 and PABP4 in Response to UV Irradiation Reveals mRNA-dependent Export of Metazoan PABPs. *J. Cell Sci.* 124: 3344-55
- Burton GJ.**, Jauniaux E. (2011). Oxidative Stress. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 25 (3): 287–99
- Caimi G.**, Hopps E., Noto D., Canino B., Montana M., Lucido D., Lo Presti R., Averna MR. (2013). Protein oxidation in a group of subjects with metabolic syndrome. *Diabetes Metab Syndr* 7(1): 38-41
- Cambi M.**, Tamburrino L., Marchiani S., Olivito B., Azzari C., Forti G., Baldi E., Muratori M. (2013). Development of a specific method to evaluate 8-hydroxy, 2-deoxyguanosine in sperm nuclei: relationship with semen quality in a cohort of 94 subjects. *Reproduction* 145(3): 227-35
- Carvalho LF.**, Abrão MS., Biscotti C-, Sharma R., Nutter B., Falcone T. (2013). Oxidative Cell Injury as a Predictor of Endometriosis Progression. *Reprod Sci* doi: 10.1177/1933719112466301
- Celik M.**, Sermatov K., Abuhandan M., Zeyrek D., Kocuyigit A., Iscan A. (2012). Oxidative status and DNA damage in children with marasmic malnutrition. *J Clin Lab Anal* 26(3): 161-6
- Chailert C.**, Sanmee U., Piromlertamorn W., Samchinchom S., Vutyavanich T. (2013). Effects of partial or complete laser-assisted hatching on the hatching of mouse blastocysts and their cell numbers. *Reprod Biol Endocrinol* 11: 21
- Chen S.S.**, Chang L.S., Wei Y.H. (2001). Oxidative damage to proteins and decrease of antioxidant capacity in patients with varicocele. *Free Radic. Biol. Med* 30(11): 1328–34
- Cheng JY.**, Ng EM. (2007). Body mass index, physical activity and erectile dysfunction: an U-shaped relationship from population-based study. *Int J Obes (Lond)*, 31(10): 1571–8
- Chi HJ.**, Kim JH., Ryu CS., Lee JY., Park JS., Chung DY., Choi SY., Kim MH., Chun EK., Roh SI. (2008). Protective effect of antioxidant supplementation in sperm-preparation medium against oxidative stress in human spermatozoa. *Hum Reprod* 23: 1023–8
- Ciccone S.**, Maiani E., Bellusci G., Diederich M., Gonfloni S. (2013). Parkinson’s Disease: A Complex Interplay of Mitochondrial DNA Alterations and Oxidative Stress. *International Journal of Molecular Sciences* 14(2): 2388-409
- Ciftci H.**, Verit A., Savas M., Yeni E., Erel O. (2009). Effects of N-acetylcysteine on semen parameters and oxidative/antioxidant status. *Urology* 74: 73–6
- Combelles CMH.**, Gupta S., Agarwal A. (2009). Could oxidative stress influence the in-vitro maturation of oocytes? *Reprod Biomed Online* 18(6): 864–80
- Dalle-Donne I.**, Rossi R., Giustarini D., Milzani A., Colombo R. (2003). Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta* 329: 23-38
- de la Rochebrochard E.**, Thonneau P. (2002). Paternal age and maternal age are risk factors for miscarriage; results of a multicentre European study. *Hum Reprod* 17(6):1649- 56
- de Lamirande E.**, Gagnon C. (1995). Impact of reactive oxygen species on sperm: a balancing act between beneficial and detrimental effects. *Hum Reprod* 10(1): 15–21

- de Lamirande E., Leclerc P., Gagnon C. (1997).** Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization. *Mol Hum Reprod* 3(3): 175-94
- de Vantéry Arrighi C., Lucas H., Chardonnens D., de Agostini A. (2009).** Removal of spermatozoa with externalized phosphatidylserine from sperm preparation in human assisted medical procreation: effects on viability, motility and mitochondrial membrane potential. *Reprod Biol Endocrinol* 7: 1
- Derijck AA., van der Heijden GW., Ramos L., Giele M., Kremer JA., de Boer P. (2007).** Motile human normozoospermic and oligozoospermic semen samples show a difference in double-strand DNA break incidence. *Hum Reprod* 22(9): 2368-76
- Delbaere I., Verstraelen H., Goetgeluk S., Martens G., De Backer G., Temmerman M. (2007).** Pregnancy outcome in primiparae of advanced maternal age. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 135: 41-6
- Dohle GR. (2003).** Inflammatory-associated obstructions of the male reproductive tract. *Andrologia* 35:321-4
- Donnelly ET., McClure N., Lewis SE. (2000).** The effect of ascorbate and alpha-tocopherol supplementation in vitro on DNA integrity and hydrogen peroxide-induced DNA damage in human spermatozoa. *Mutagenesis* 14: 505-12
- Doshi SB., Khullar K., Sharma RK., Agarwal A. (2012).** Role of reactive nitrogen species in male infertility. *Reprod Biol Endocrinol* 10:109
- Dratva J., Gomez Real F., Schindler C., Ackermann-Liebrich U., Gerbase MW., Probst-Hensch NM., Svanes C., Omenaas ER., Neukirch F., Wjst M., Morabia A., Jarvis D., Leynaert B., Zemp E. (2009).** Is age at menopause increasing across Europe? Results on age at menopause and determinants from two population-based studies. *Menopause*, 16 (2): 385-94
- Dumitrascu R., Heitmann J., Seeger W., Weissmann N., Schulz R. (2013).** Obstructive sleep apnea, oxidative stress and cardiovascular disease: lessons from animal studies. *Oxid Med Cell Longev* ID 234631.
- Eckert LO., Moore DE., Patton DL., Agnew KJ., Eschenbach DA. (2003).** Relationship of vaginal bacteria and inflammation with conception and early pregnancy loss following in-vitro fertilization. *Infect Dis Obstet Gynecol* 11: 11-7
- Elshal MF., El-Sayed IH., Elsaied MA., El-Masry SA., Kumosani TA. (2009).** Sperm head defects and disturbances in spermatozoal chromatin and DNA integrities in idiopathic infertile subjects: association with cigarette smoking. *Clin Biochem* 42 (7-8): 589-94
- Erenpreiss J., Elzanaty S., Giwercman A. (2008).** Sperm DNA damage in men from infertile couples. *Asian J Androl* 10(5):786-90
- ESHRE Capri Workshop Group. (2005).** Fertility and ageing. *Hum Reprod Update*. 11: 261-76
- Eskiocak S., Gozen AS., Taskiran A., Kilic AS., Eskiocak M., Gulen S. (2005).** Association between mental stress & some antioxidant enzymes of seminal plasma. *Indian J Med Res* 122: 491-6
- Esteves SC., Miyaoka R., Agarwal A. (2011).** An update on the clinical assessment of the infertile male. *Clinics*. 66(4): 691-700
- Ferraretti AP., Goossens V., de Mouzon J., Bhattacharya S., Castilla JA., Korsak V., Kupka M., Nygren KG., Nyboe Andersen A.; European IVF-monitoring (EIM); Consortium for European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE). (2012).** Assisted reproductive technology in Europe, 2008: results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod* 27(9): 2571-84
- Fiedler K., Ezcurra D. (2012).** Predicting and preventing ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS): the need for individualized not standardized treatment. *Reprod Biol Endocrinol* 10: 32
- Fisch H., Goluboff ET., Olson JH., Feldshuh J., Broder SJ., Barad DH. (1996).** Semen analyses in 1,283 men from the United States over a 25-year period: no decline in quality. *Fertil Steril* 65: 1009-14
- Frohner IE., Bourgeois C., Yatsyk K., Majer O., Kuchler K. (2009).** Candida albicans cell surface superoxide dismutases degrade host-derived reactive oxygen species to escape innate immune surveillance. *Mol Microbiol* 71: 240-52
- Forges T., Monnier-Barbarino P., Faure GC., Béné MC. (2004).** Autoimmunity and antigenic targets in ovarian pathology. *Hum Reprod Update* 10:163-75
- Fowler PA, Bhattacharya S, Flannigan S, Drake AJ, O'Shaughnessy PJ. (2011).** Maternal cigarette smoking and effects on androgen action in male offspring: unexpected effects on second-trimester anogenital distance. *J Clin Endocrinol Metab* 96(9): E1502-6

- Fraczek M., Kurpisz M.** (2007). Inflammatory mediators exert toxic effects of oxidative stress on human spermatozoa. *J Androl* 28(2): 325-33
- Fujii J., Iuchi Y., Okada F.** (2005). Fundamental roles of reactive oxygen species and protective mechanisms in the female reproductive system. *Reprod Biol Endocrinol* 3:43
- Gangrade BK.** (2013). Cryopreservation of testicular and epididymal sperm: techniques and clinical outcomes of assisted conception. *Clinics (Sao Paulo)* 68(1) :131-40
- Garolla A., Pizzol D., Bertoldo A., De Toni L., Barzon L., Foresta C.** (2013). Association, prevalence, and clearance of human papillomavirus and antisperm antibodies in infected semen samples from infertile patients. *Fertil Steril* 99(1): 125-31
- Garrido N., Meseguer M., Alvarez J., Simon C., Pellicer A., Remohi J.** (2004). Relationship among standard semen parameters, glutathione peroxidase/glutathione reductase activity, and mRNA expression and reduced glutathione content in ejaculated spermatozoa from fertile and infertile men. *Fertil Steril* 82(3):1059–66
- Gavella M., Lipovac V.** (1992). NADH-dependent oxidoreductase (diaphorase) activity and isozyme pattern of sperm in infertile men. *Arch Androl* 28: 135-41
- Gharagozloo P., Aitken RJ.** (2011). The role of sperm oxidative stress in male infertility and the significance of oral antioxidant therapy. *Hum Reprod* 26(7): 1628-40
- Gil-Guzman E., Ollero M., Lopez MC., Sharma RK., Alvarez JG., Thomas AJ Jr, Agarwal A.** (2001). Differential production of reactive oxygen species by subsets of human spermatozoa at different stages of maturation. *Hum Reprod* 16(9): 1922-30
- Gil-Villa AM., Cardona-Maya W., Agarwal A., Sharma R., Cadavid A.** (2009). Role of male factor in early recurrent embryo loss: do antioxidants have any effect? *Fertil Steril* 92(2): 565-71
- Giudice LC., Kao LC.** (2004). Endometriosis. *The Lancet* 364:1789-99
- Gonzalez-Dosal R., Horan KA., Rahbek SH., Ichijo H., Chen ZJ., Mieyal JJ., Hartmann R., Paludan SR.** (2011). HSV infection induces production of ROS, which potentiate signaling from pattern recognition receptors: role for S-glutathionylation of TRAF3 and 6. *PLoS Pathog* 7: e1002250
- Gonzalez Maglio DH., Paz ML., Ferrari A., Weill FS., Czerniczyniec A., Leoni J., Bustamante J.** (2005). Skin damage and mitochondrial dysfunction after acute ultraviolet B irradiation: relationship with nitric oxide production. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 21(6): 311-7
- Goodarzi M.O., Dumesic D.A., Chazenbalk G., Azziz R.** (2011). Polycystic ovary syndrome: etiology, pathogenesis and diagnosis *Nat Rev Endocrinol*, 7: 219–31
- Greco E., Iacobelli M., Rienzi L., Ubaldi F., Ferrero S., Tesarik J.** (2005). Reduction of the incidence of sperm DNA fragmentation by oral antioxidant treatment. *J Androl* 26(3): 349-53
- Guglielmo M., Giliberto L., Tamagno E., Tabaton M.** (2010). Oxidative stress mediates the pathogenic effect of different Alzheimer's disease risk factors. *Front Aging Neurosci.* 2:3
- Gupta S., Agarwal A., Banerjee J., Alvarez J.** (2007). The role of oxidative stress in spontaneous abortion and recurrent pregnancy loss: a systematic review. *Obstet Gynecol Survey*, 62: 335–47
- Guzick DS., Overstreet JW., Factor-Litvak P., Brazil CK., Nakajima ST., Coutifaris C., Carson SA., Cisneros P., Steinkampf MP., Hill JA., Xu D., Vogel DL.; National Cooperative Reproductive Medicine Network.** (2001). Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. *N Engl J Med* 345(19):1388-93
- Haller-Kikkatalo K., Eomäe K., Sarapik A., Salumets A., Uibo R.** (2009). Autoimmuunsus ja naise viljatus II. Folliikuleid stimuleeriva hormooni vastased antihead autoimmuunse munasarjakahjustuse markerina. *Eesti Arst* 88(2): 91–8
- Hammadieh N., Coomarasamy A., Ola B., Papaioannou S., Afnan M., Sharif K.** (2008). Ultrasound-guided hydrosalpinx aspiration during oocyte collection improves pregnancy outcome in IVF: a randomized controlled trial. *Hum Reprod* 23(5): 1113-7
- Hammiche F, Laven JS, Twigt JM, Boellaard WP, Steegers EA, Steegers-Theunissen RP.** (2012). Body mass index and central adiposity are associated with sperm quality in men of subfertile couples. *Hum Reprod* 27(8): 2365-72.
- Han Y., Chen JZ.** (2013). Oxidative Stress Induces Mitochondrial DNA Damage and Cytotoxicity through Independent Mechanisms in Human Cancer Cells. *Biomed Res Int* ID 825065.

- Hassan SZ.**, Gheita TA., Kenawy SA., Fahim AT., El-Sorougy IM., Abdou MS. (2011). Oxidative stress in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis patients: relationship to disease manifestations and activity. *Int J Rheum Dis* 14(4): 325-31
- Hauser R.**, Meeker JD., Singh NP., Silva MJ., Ryan L., Duty S., Calafat AM. (2007). DNA damage in human sperm is related to urinary levels of phthalate monoester and oxidative metabolites. *Hum Reprod* 22: 688-95
- Hay PE.**, Lamont RF., Taylor-Robinson D., Morgan DJ., Ison C., Pearson J. (1994). Abnormal bacterial colonisation of the genital tract and subsequent preterm delivery and late miscarriage. *BMJ* 308: 295-8
- Henkel R.**, Kierspel E., Stalf T., Mehnert C., Menkveld R., Tinneberg HR., Schill WB., Kruger TF. (2005). Effect of reactive oxygen species produced by spermatozoa and leukocytes on sperm functions in non-leukocytospermic patients. *Fertil Steril* 83: 635-42
- Hogan VK.**, Culhane JF., Hitti J., Rauh VA., McCollum KF., Agnew KJ. (2007) Relative performance of three methods for diagnosing bacterial vaginosis during pregnancy. *Matern Child Health J* 11:532-9
- Horak S.**, Polanska J., Widlak P. (2003). Bulky DNA adducts in human sperm: relationship with fertility, semen quality, smoking and environmental factors. *Mutat Res* 537(1): 53-65
- Hsieh YY.**, Chang CC., Lin CS. (2006). Seminal malondialdehyde concentration but not glutathione peroxidase activity is negatively correlated with seminal concentration and motility. *Int J Biol Sci* 2: 23-9
- Huang JY.**, Rosenwaks Z. (2012). In vitro fertilisation treatment and factors affecting success. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 26(6): 777-88
- Ishikawa T.**, Fujioka H., Ishimura T., Takenaka A., Fujisawa M. (2007). Increased testicular 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in patients with varicocele 100: 863-6
- Isobe C.**, Abe T., Terayama Y. (2009). Homocysteine may contribute to pathogenesis of RNA damage in brains with Alzheimer's disease. *Neurodegener Dis* 6(5-6): 252-7
- Jacobsen BK.**, Knutsen SF., Oda K., Fraser GE. (2012). Obesity at age 20 and the risk of miscarriages, irregular periods and reported problems of becoming pregnant: the Adventist Health Study-2. *Eur J Epidemiol* 27(12): 923-31
- Jungwirth A.**, Giwercman A., Tournaye H., Diemer T., Kopa Z., Dohle G., Krausz C.; European Association of Urology Working Group on Male Infertility. (2012). European Association of Urology guidelines on Male Infertility: the 2012 update. *Eur Urol.* 62(2): 324-32
- Kapranos N.**, Petrakou E., Anastasiadou C., Kotronias D. (2003) Detection of herpes simplex virus, cytomegalovirus, and Epstein-Barr virus in the semen of men attending an infertility clinic. *Fertil Steril* 3: 1566-70
- Karimi J.**, Goodarzi MT., Tavilani H., Khodadadi I., Amiri I. (2012). Increased receptor for advanced glycation end products in spermatozoa of diabetic men and its association with sperm nuclear DNA fragmentation. *Andrologia* 44(1): 280-6
- Kaya C.**, Erkan AF., Cengiz SD., Dunder I., Demirel OE., Bilgihan A. (2009). Advanced oxidation protein products are increased in women with polycystic ovary syndrome: relationship with traditional and nontraditional cardiovascular risk factors in patients with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 92(4): 1372-7
- Kennedy S.**, Bergqvist A., Chapron C., D'Hooghe T., Dunselman G., Saridogan E., Greb R., Hummelshoj L., Prentice A., ESHRE Special Interest Group for Endometriosis and Endometrium Guideline Development Group. (2005). ESHRE guideline on the diagnosis and management of endometriosis. *Hum Reprod* (10):2698-704
- Kenny LC.**, Lavender T., McNamee R., O'Neill SM., Mills T., Khashan AS. (2013). Advanced maternal age and adverse pregnancy outcome: evidence from a large contemporary cohort. *PLoS One* 8(2): e56583
- Khan MS.**, Ullah R., Tahir F., Ashraf M., Sajjad M. (2012). Seminal volume in the investigation of male infertility. *J Coll Physicians Surg Pak.* 22(3): 159-62
- Kibar Y.**, Seckin B., Erduran D. (2002). The effects of subinguinal varicocelectomy on Kruger morphology and semen parameters. *J Urol,* 168: 1071-4
- Kiziler AR.**, Aydemir B, Onaran I, Alici B, Ozkara H, Gulyasar T, Akyolcu MC. (2007). High levels of cadmium and lead in seminal fluid and blood of smoking men are associated with high oxidative stress and damage in infertile subjects. *Biol Trace Elem Res* 120(1-3): 82-91

- Knox CL.**, Allan JA., Allan JM., Edirisinghe WR., Stenzel D., Lawrence FA., Purdie DM., Timms P. (2003). Ureaplasma parvum and Ureaplasma urealyticum are detected in semen after washing before assisted reproductive technology procedures. *Fertil Steril* 80(4): 921-9
- Koch J.**, Rowan K., Rombauts L., Yazdani A., Chapman M., Johnson N. (2012). Endometriosis and Infertility – a consensus statement from ACCEPT (Australasian CREI Consensus Expert Panel on Trial evidence). *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 52: 513–22
- Kodama H.**, Yamaguchi R., Fukuda J., Kasai H., Tanaka T. (1997). Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients. *Fertil Steril*. 68: 519–24
- Kojima N.**, Takebayashi T., Mikami A., Ohtsuka E. Komatsu Y. (2009). Development of novel chemical probes to detect abasic sites in DNA. *Nucleic Acids Symp Ser* 53 (1): 45-6.
- Kokcu A.**(2013). Possible effects of endometriosis-related immune events on reproductive function. *Arch Gynecol Obstet* 22
- Koppers AJ.**, Garg ML., Aitken RJ. (2010). Stimulation of mitochondrial reactive oxygen species production by unesterified, unsaturated fatty acids in defective human spermatozoa. *Free Radic Biol Med* 48: 112–9
- Kothari S.**, Thompson A., Agarwal A., du Plessis SS. (2010). Free radicals: their beneficial and detrimental effects on sperm function. *Indian J Exp Biol* 48: 425–35
- Krajnak K.**, Miller GR., Waugh S., Johnson C., Li S., Kashon ML. (2010). Characterization of frequency-dependent responses of the vascular system to repetitive vibration. *J Occup Environ Med* 52(6): 584-94
- Kullisaar T.**, Songisepp E., Mikelsaar M., Zilmer K., Vihalemm T., Zilmer M. (2003). Antioxidative probiotic fermented goats' milk decreases oxidative stress-mediated atherogenesis in human subjects. *Br J Nutr* 90: 449-56
- Kullisaar T.**, Türk S., Punab M., Korrovits P., Kisand K., Rehema A., Zilmer K., Zilmer M., Mändar R. (2008). Oxidative stress in leucocytospermic prostatitis patients: preliminary results. *Andrologia* 40(3): 161-72
- Kullisaar T.**, Türk S., Punab M., Mändar R. (2012). Oxidative stress--cause or consequence of male genital tract disorders? *Prostate* 72(9): 977-83
- La Vignera S.**, Condorelli RA., Vicari E., D'Agata R., Calogero AE. (2012). Sperm DNA damage in patients with chronic viral C hepatitis. *Eur J Intern Med* 23(1):19-24
- Laurent A.**, Nicco C., Chereau C., Goulvestre C., Alexandre J., Alves A., Levy E., Goldwasser F., Panis Y., Soubrane O., Weill B. Batteux F. (2005). Controlling tumor growth by modulating endogenous production of reactive oxygen species. *Cancer Res* 65:948–56
- Lewis SE.**, Boyle PM., McKinney KA., Young IS., Thompson W. (1995). Total antioxidant capacity of seminal plasma is different in fertile and infertile men. *Fertil Steril* 64: 868–70
- Lissitsina L.**, Ruth Mikelsaar R., Punab M. (2006). Kromosoomianomaaliad ja kromosoomivariandid infertiilsetel meestel. *Eesti Arst* 85(2): 84–90
- Liversedge NH.**, Turner A., Horner PJ., Keay SD., Jenkins JM., et al. (1999). The influence of bacterial vaginosis on in vitro fertilization and embryo implantation during assisted reproduction treatment. *Hum Reprod* 14: 2411–5
- Loft S.**, Kold-Jensen T., Hjollund NH., Giwercman A., Gylleborg J., Ernst E., Olsen J., Scheike T., Poulsen HE., Bonde JP. (2003). Oxidative DNA damage in human sperm influences time to pregnancy. *Hum Reprod* 18(6): 1265-72
- Loft S.**, Vistisen K., Ewertz M., Tjønneland A., Overvad K., Poulsen HE. (1992). Oxidative DNA damage estimated by 8-hydroxydeoxyguanosine excretion in humans: influence of smoking, gender and body mass index. *Carcinogenesis* 13(12): 2241-7
- Lu YH.**, Gao HJ., Li BJ., Zheng YM., Ye YH., Qian YL., Xu CM., Huang HF., Jin F. (2012). Different sperm sources and parameters can influence intracytoplasmic sperm injection outcomes before embryo implantation. *J Zhejiang Univ Sci B* 13(1): 1–10
- Lyon A.**, Bilton D. (2002). Fertility issues in cystic fibrosis. *Paediatr Respir Rev* 3(3): 236–40
- Lyons RA.**, Saridogan E., Djahanbakhch O. (2006). The reproductive significance of human Fallopian tube cilia. *Hum Reprod Update*. 12(4):363-72
- Maheshwari A.**, Misro MM., Aggarwal A., Sharma RK., Nandan D. (2009). Pathways involved in testicular germ cell apoptosis induced by H₂O₂ in vitro. *FEBS J* 276(3): 870-81

- Manoli I., Alesci S., Chrousos GP.** (2007). Mitochondria. *Encyclopedia of Stress (Second Edition)*: 754–61
- Marchetti F., Essers J., Kanaar R., Wyrobek A.J.** (2007). Disruption of maternal DNA repair increases sperm-derived chromosomal aberrations. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 17725–9
- Margalioth EJ., Ben-Chetrit A., Gal M., Eldar-Geva T.** (2006). Investigation and treatment of repeated implantation failure following IVF–ET. *Hum Reprod* 21: 3036–43
- Merviel P., Heraud MH., Grenier N., Lourdel E., Sanguinet P., Copin H.** (2010). Predictive factors for pregnancy after intrauterine insemination (IUI): an analysis of 1038 cycles and a review of the literature. *Fertil Steril* 93:79–88
- Martinez-Alborcia MJ., Valverde A., Parrilla I., Vazquez JM., Martinez EA., Roca J.** (2012). Detrimental effects of non-functional spermatozoa on the freezability of functional spermatozoa from boar ejaculate. *PLoS One* 7(5): e36550
- Mascarenhas MN., Flaxman SR., Boerma T., Vanderpoel S., Stevens GA.** (2012). National, Regional, and Global Trends in Infertility Prevalence Since 1990: A Systematic Analysis of 277 Health Surveys. *PLoS Med* 9(12): e1001356.
- Matikainen T., Perez GI., Juriscova A., Pru JK., Schlezinger, JJ., Ryu HY., Laine J., Sakai T., Korsmeyer, SJ., Casper RF., Sherr DH., Tilly JL.** (2001) Aromatic hydrocarbon receptor-driven Bax gene expression is required for premature ovarian failure caused by biohazardous environmental chemicals. *Nature Genetics*. 28: 355–60
- McIntyre M., Fisch H.** (2010). Ejaculatory duct dysfunction and lower urinary tract symptoms: chronic prostatitis. *Curr Urol Rep* 11(4): 271-5
- McGregor JA., French JJ., Parker R., Draper D., Patterson E., Jones W., Thorsgard K., McFee J.** (1995). Prevention of premature birth by screening and treatment for common genital tract infections: results of a prospective controlled evaluation. *Am J Obstet Gynecol* 173: 157–67
- Mehik A., Hellström P., Lukkarinen O., Sarpola A., Järvelin M.** (2000). Epidemiology of prostatitis in Finnish men: a population-based cross-sectional study. *BJU Int.* 86(4): 443-8
- Ménézo Y., Entezami F., Lichtblau I., Belloc S., Cohen M., Dale B.** (2012). Oxidative stress and fertility: incorrect assumptions and ineffective solutions? *Zygote* 12: 1-11
- Ménézo YJ., Hazout A., Panteix G., Robert F., Rollet J., Cohen-Bacrie P., Chapuis F, Clément P, Benkhalifa M.** (2007). Antioxidants to reduce sperm DNA fragmentation: an unexpected adverse effect. *Reprod Biomed Online* 14: 418–21
- Meng Z., Bai W.** (2004). Oxidation damage of sulfur dioxide on testicles of mice. *Environ Res* 96: 298-304
- Mercer BM., Abdelrahim A., Moore RM., Novak J., Kumar D., Mansour JM., Perez-Fournier M., Milluzzi CJ., Moore JJ.** (2010). The impact of Vitamin C supplementation in pregnancy and in-vitro upon fetal membrane strength and remodeling. *Reprod Sci* 17:685–95
- Meseguer M., Martínez-Conejero JA., O'Connor JE., Pellicer A., Remohí J., Garrido N.** (2008). The significance of sperm DNA oxidation in embryo development and reproductive outcome in an oocyte donation program: a new model to study a male infertility prognostic factor. *Fertil Steril* 89(5): 1191-9
- Mikkelsen TF., Graff-Iversen S., Sundby J., Bjertness E.** (2007). Early menopause, association with tobacco smoking, coffee consumption and other lifestyle factors: a cross-sectional study. *BMC Public Health*, 7: 149
- Morrow JD.** (2006). The isoprostanes – unique products of arachidonate peroxidation: their role as mediators of oxidant stress. *Curr Pharm* 12(8): 895-902
- Moskovtsev SI., Willis J., Mullen JB.** (2006). Age-related decline in sperm deoxyribonucleic acid integrity in patients evaluated for male infertility. *Fertil Steril* 85: 496-9
- Mostafa T.** (2010). Cigarette smoking and male infertility. *J Adv Res*, 1: 179–86
- Motrich RD., Maccioni M., Riera CM., Rivero VE.** (2007). Autoimmune prostatitis: state of the art. *Scand J Immunol* 66: 217-27
- Musset B., Clark RA., DeCoursey TE., Petheo GL., Geiszt M., Chen Y., Cornell JE., Eddy CA., Brzyski RG., El Jamali A.** (2012). NOX5 in human spermatozoa: expression, function, and regulation. *J Biol Chem* 287(12): 9376-88
- Mändar R., Kullisaar T., Borovkova N., Punab M.** (2013). Sexual intercourse with leucocytospermic men may be a possible booster of oxidative stress in female partners of infertile couples. *Andrology* 1(3): 464-8
- Myatt L.** (2010). Reactive Oxygen and Nitrogen Species and Functional Adaptation of the Placenta. *Placenta* 31: 66–9

- Myatt L.**, Cui X. (2004). Oxidative stress in the placenta. *Histochem Cell Biol* 122(4): 369-82
- Nakamura H.**, Kimura T., Nakajima A., Shimoya K., Takemura M., Hashimoto K., Isaka S., Azuma C., Koyama M., Murata Y. (2002). Detection of oxidative stress in seminal plasma and fractionated sperm from subfertile male patients. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 105: 155-60
- National Institutes of Health.** (1995). National Institutes of Health Summary Statement. National Institute of Health/National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases workshop on chronic prostatitis. Executive Summary, Bethesda, MD.
- Naughton CK.**, Nangia AK., Agarwal A. (2001). Pathophysiology of varicoceles in male infertility. *Human Reproduction Update*. 7(5): 473–81
- Nelson SM.**, Telfer EE., Anderson RA. (2013). The ageing ovary and uterus: new biological insights. *Human Reproduction Update*. 19 (1): 67–83
- Nickel JC.**, Teichman JM., Gregoire M., Clark J., Downey J. (2005). Prevalence, diagnosis, characterization, and treatment of prostatitis, interstitial cystitis, and epididymitis in outpatient urological practice: the Canadian PIE Study. *Urology* 66(5): 935-40
- Norman RJ.**, Dewailly D., Legro RS., Hickey TE. (2007). Polycystic ovary syndrome. *Lancet* 370:685-97
- Nugent RP.**, Krohn MA., Hillier SL. (1991). Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation. *J Clin Microbiol* 29: 297-301
- Ochsendorf FR.** (1999). Infections in the male genital tract and reactive oxygen species. *Hum Reprod Update*. 5(5): 399-420
- Oliva R.** (2006). Protamines and male infertility. *Human Reproduction Update* 12: 417–35
- Omu AE.**, Al-Azemi MK., Kehinde EO., Anim JT., Oriowo MA., Mathew TC. (2008). Indication of the mechanisms involved in improved sperm parameters by zinc therapy. *Med Princ Pract* 17: 108–16
- Orrenius S.**, Gogvadze V., Zhivotovsky B. (2007). Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 47: 143–83
- Pacher P.**, Beckman JS., Liaudet L. (2007). Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 87(1): 315-424
- Paradiso Galatioto G.**, Gravina GL., Angelozzi G., Sacchetti A., Innominato PF., Pace G., Ranieri G., Vicentini C. (2008). May antioxidant therapy improve sperm parameters of men with persistent oligospermia after retrograde embolization for varicocele? *World J Urol* 26(1): 97-102
- Paravicini TM.**, Touyz RM. (2006). Redox signaling in hypertension. *Cardiovasc Res*. 71:247–58
- Partyka A.**, Łukaszewicz E., Nizański W. (2012). Effect of cryopreservation on sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity in fowl semen. *Theriogenology* 77(8): 1497-504
- Partyka A.**, Łukaszewicz E., Nizański W., Twardoń J. (2011). Detection of lipid peroxidation in frozen-thawed avian spermatozoa using C(11)-BODIPY(581/591). *Theriogenology* 75(9): 1623-9
- Pasquali R.**, Patton L., Gambineri A. (2007). Obesity and infertility. 2007. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 14:482-7
- Pasqualotto FF.**, Sharma RK., Kobayashi H., Nelson DR., Thomas AJ Jr, Agarwal A. (2001). Oxidative stress in normo-spermic men undergoing infertility evaluation. *J Androl* 73: 459-64
- Pasqualotto, FF.**, Sharma, RK., Potts, JM., Nelson, DR., Thomas, AJ., Agarwal, A. (2000). Seminal oxidative stress in patients with chronic prostatitis. *Urology* 55 (6): 881–5
- Pasqualotto FF.**, Umezu FM., Salvador M., Borges E Jr., Sobreiro BP., Pasqualotto EB. (2008). Effect of cigarette smoking on antioxidant levels and presence of leukocytospermia in infertile men: a prospective study. *Fertility and Sterility* 90(2): 278-83
- Pawlak K.**, Mysliwiec M., Pawlak D. (2013). Oxidized low-density lipoprotein (oxLDL) plasma levels and oxLDL to LDL ratio - are they real oxidative stress markers in dialyzed patients? *Life Sci* 92(4-5): 253-8
- Peake JM.**, Suzuki K., Coombes JS. (2007). The influence of antioxidant supplementation on markers of inflammation and the relationship to oxidative stress after exercise. *J Nutr Biochem* 18: 357-71
- Pellati D.**, Mylonakis I., Bertoloni G., Fiore C., Andrisani A., Ambrosini G., Armanini D. (2008). Genital tract infections and infertility. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 140(1):3-11

- Perrin J.**, Tassistro V., Mandon M., Grillo JM., Botta A., Sari-Minodier I. (2011). Tobacco consumption and benzo(a)pyrene-diol-epoxide-DNA adducts in spermatozoa: in smokers, swim-up procedure selects spermatozoa with decreased DNA damage. *Fertil Steril* 95(6): 2013-7
- Pfeifer H.**, Conrad M., Roethlein D., Kyriakopoulos A., Brielmeier M., Bornkamm GW., Behne D. (2001). Identification of a specific sperm nuclei selenoenzyme necessary for protamine thiol cross-linking during sperm maturation. *FASEB J* 15(7): 1236-8
- Pinborg A.** (2012). To transfer fresh or thawed embryos? *Semin Reprod Med* 30(3): 230-5
- Piomboni P.**, Gambera L., Serafini F., Campanella G., Morgante G., De Leo V. (2008). Sperm quality improvement after natural anti-oxidant treatment of asthenoteratospermic men with leukocytospermia. *Asian J Androl* 10: 201-6
- Plante M.**, de Lamirande E., Gagnon C. (1994). Reactive oxygen species released by activated neutrophils, but not by deficient spermatozoa, are sufficient to affect normal sperm motility. *Fertil Steril* 62: 387-93
- Polak G.**, Wertel I., Barczyński B., Kwaśniewski W., Bednarek W., Kotarski J. (2013). Increased levels of oxidative stress markers in the peritoneal fluid of women with endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol pii: S0301-2115(13)00025-0*
- Potts RJ.**, Notarianni LJ., Jefferies TM. (2000). Seminal plasma reduces exogenous oxidative damage to human sperm, determined by the measurement of DNA strand breaks and lipid peroxidation. *Mutat Res* 447: 249-56
- Pratico D.**, Lawson JA., Rokach J., FitzGerald GA. (2001). The isoprostanes in biology and medicine. *Trends Endocrinol Metab* 12: 243-7
- Punab M.**, Korrovits P., Peetsalu A. (2003). Meeste viljakust mõjutavad haigused. *Eesti Arst* 82(3): 181-7
- Punab M.**, Lõivukene K., Kermes K., Mändar R. (2003). The limit of leucocytospermia from the microbiological viewpoint. *Andrologia* 35: 271-8
- Rai R.**, Regan L. (2006) Recurrent miscarriage. *Lancet* 368(9535): 601-11
- Ralph SG.**, Rutherford AJ., Wilson JD. (1999) Influence of bacterial vaginosis on conception and miscarriage in the first trimester: cohort study. *BMJ* 319: 220-3
- Rengan AK.**, Agarwal A., van der Linde M., du Plessis SS. (2012). An investigation of excess residual cytoplasm in human spermatozoa and its distinction from the cytoplasmic droplet. *Reprod Biol Endocrinol* 10:92
- Rizzo A.**, Roscino MT., Binetti F., Sciorsci RL. (2011). Roles of reactive oxygen species in female reproduction. *Reprod Domest Anim* 47(2): 344-52
- Rojkind M.**, Domínguez-Rosales JA., Nieto N., Greenwel P. (2002). Role of hydrogen peroxide and oxidative stress in healing responses. *Cellular and Molecular Life Sciences* 59(11): 1872-91
- Rusz A.**, Pilatz A., Wagenlehner F., Linn T., Diemer T., Schuppe H.C., Lohmeyer J., Hossain H., Weidner W. (2012). Influence of urogenital infections and inflammation on semen quality and male fertility. *World J Urol*, 30: 23-30
- Said TM.**, Agarwal A., Sharma RK., Thomas AJ Jr, Sikka SC. (2005). Impact of sperm morphology on DNA damage caused by oxidative stress induced by beta-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate. *Fertil Steril* 83: 95-103
- Safarinejad M.R.**, Safarinejad S. (2009). Efficacy of selenium and/or N-acetyl-cysteine for improving semen parameters in infertile men: a double-blind, placebo controlled, randomized study. *J. Urol* 181: 741-51
- Saito C.**, Zwingmann C., Jaeschke H. (2010). Novel mechanisms of protection against acetaminophen hepatotoxicity in mice by glutathione and N-acetylcysteine. *Hepatology* 51: 246-54
- Saleh RA.**, Agarwal A., Sharma RK., Nelson DR., Thomas AJ Jr. (2002). Effect of cigarette smoking on levels of seminal oxidative stress in infertile men: a prospective study. *Fertil Steril* 78(3): 491-9
- Salvolini E.**, Buldreghini E., Lucarini G., Vignini A., Di Primio R., Balercia G. (2012). Nitric oxide synthase and tyrosine nitration in idiopathic asthenozoospermia: an immunohistochemical study. *Fertil Steril* 97(3): 554-60
- Schilling K.**, Toth B., Rösner S., Strowitzki T., Wischmann T. (2012). Prevalence of behaviour-related fertility disorders in a clinical sample: results of a pilot study. *Arch Gynecol Obstet* 286(5): 1307-14
- Schulte RT.**, Ohl DA., Sigman M., Smith GD. (2010). Sperm DNA damage in male infertility: etiologies, assays, and outcomes. *J Assist Reprod Genet* 27(1): 3-12

- Sharma, I., Dhaliwal, L., Saha, S., Sangwan, S., Dhawan, V. (2010).** Role of 8-iso-prostaglandin F2alpha and 25-hydroxycholesterol in the pathophysiology of endometriosis. *Fertility and Sterility* 94 (1): 63-70
- Sharma RK., Pasqualotto FF., Nelson DR., Thomas AJ., Agarwal A Jr. (1999).** The reactive oxygen species—total antioxidant capacity score is a new measure of oxidative stress to predict male infertility. *Hum Reprod* 14: 2801–7
- Sharma R, Pasqualotto FF, Nelson DR, Thomas AJ Jr, Agarwal A. (2001).** Relationship between Seminal white bloodcell counts and oxidative stress in men treated at an infertility clinic. *J Androl* 22: 575-83
- Sharma RK., Sabanegh E., Mahfouz R., Gupta S., Thiyagarajan A., Agarwal A. (2010).** TUNEL as a test for sperm DNA damage in the evaluation of male infertility. *Urology* 76(6): 1380-6
- Sharma RK., Said T., Agarwal A. (2004).** Sperm DNA damage and its clinical relevance in assessing reproductive outcome. *Asian J Androl* 6(2):139-48
- Shi TY., Chen G., Huang X., Yuan Y., Wu X., Wu B., Li Z., Shun F., Chen H., Shi H. (2012).** Effects of reactive oxygen species from activated leucocytes on human sperm motility, viability and morphology. *Andrologia*. 44 (1): 696-703
- Shiva M., Gautam AK., Verma Y., Shivgotra V., Doshi H., Kumar S. (2011).** Association between sperm quality, oxidative stress, and seminal antioxidant activity. *Clin. Biochem* 44: 319–24
- Shen HM., Chia SE., Ni ZY., New AL., Lee BL., Ong CN. (1997).** Detection of oxidative DNA damage in human sperm and the association with cigarette smoking. *Reprod Toxicol*. 11(5): 675-80
- Shen H.M., Ong C. (2000).** Detection of oxidative DNA damage in human sperm and its association with sperm function and male fertility. *Free Radic Biol Med* 28: 529–36
- Sijstermans K., Hack WW., van der Voort-Doedens LM., Meijer RW., Haasnoot K. (2006).** Puberty stage and spontaneous descent of acquired undescended testis: implications for therapy? *Int J Androl* 29: 597-602
- Simon L., Proutski I., Stevenson M., Jennings D., McManus J., Lutton D., Lewis SE. (2013).** Sperm DNA damage has a negative association with live-birth rates after IVF. *Reprod Biomed Online* 26(1): 68-78
- Singer G., Granger DN. (2007).** Inflammatory responses underlying the microvascular dysfunction associated with obesity and insulin resistance. *Microcirculation* 14: 375-87
- Stein PT., Scholl TO., Schluter MD., Leskiw MJ., Chen X., Spur BW., Rodriguez A. (2008).** Oxidative stress early in pregnancy and pregnancy outcome. *Free Radic Res*. 42(10): 841-8
- Steptoe PC., Edwards RG. (1978).** Birth after reimplantation of a human embryo. *Lancet*, 312: 366
- Szczepańska M., Koźlik J., Skrzypczak J., Mikołajczyk M. (2003).** Oxidative stress may be a piece in the endometriosis puzzle. *Fertility and Sterility* 79: 1288–93
- Sweet RL. (2012).** Pelvic Inflammatory Disease: Current Concepts of Diagnosis and Management. *Curr Infect Dis Rep*. 14 (2): 194-203.
- Sõritsa A., Levkov L., Ott P. (1997).** Esimene sünnitus Eestis munarakudoonorluse tulemusena. *Eesti Arst* 1:22–5
- Zander-Fox DL., Henshaw R., Hamilton H., Lane M. (2012).** Does obesity really matter? The impact of BMI on embryo quality and pregnancy outcomes after IVF in women aged ≤ 38 years. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 52(3): 270-6
- Zalata AA., Ahmed AH., Allamaneni SS., Comhaire FH., Agarwal A. (2004).** Relationship between acrosin activity of human spermatozoa and oxidative stress. *Asian J Androl* 6: 313–8
- Zeng M., Li Y., Jiang Y., Lu G., Huang X., Guan K. (2013).** Local and systemic oxidative stress status in chronic obstructive pulmonary disease patients. *Can Respir J* 20(1): 35-41
- Zegers-Hochschild F., Adamson GD., de Mouzon J., Ishihara O., Mansour R., Nygren K., Sullivan E., Vanderpoel S., International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology, World Health Organization. (2009).** The International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary on ART terminology, 2009. *Fertil Steril* 92(5): 1520-4.
- Zorn B., Vidmar G, Meden-Vrtovec H. (2003).** Seminal reactive oxygen species as predictors of fertilization, embryo quality and pregnancy rates after conventional in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Int J Androl* 26 (5): 279–85

- Taha EA, Ez-Aldin AM, Sayed SK, Ghandour NM, Mostafa T. (2012).** Effect of smoking on sperm vitality, DNA integrity, seminal oxidative stress, zinc in fertile men. *Urology* 80(4): 822-5.
- The Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group. (2004).** Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). *Hum Reprod*, 19:41–7
- Tremellen K. (2008).** Oxidative stress and male infertility-a clinical perspective. *Hum Reprod Update* 14(3): 243-58
- Tremellen K., Miari G., Froiland D., Thompson J. (2007).** A randomised control trial examining the effect of an antioxidant (Menevit) on pregnancy outcome during IVF-ICSI treatment. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 47:216–21
- Tunc O., Tremellen K. (2009).** Oxidative DNA damage impairs global sperm DNA methylation in infertile men. *J Assist Reprod Genet* 26(9-10): 537-44
- Türk G, Ceribaşı AO, Sakin F, Sönmez M, Ateşşahin A. (2010).** Antiperoxidative and anti-apoptotic effects of lycopene and ellagic acid on cyclophosphamide-induced testicular lipid peroxidation and apoptosis. *Reprod Fertil Dev* 22(4): 587-96
- Türk S., Kermes K., Lõivukene K., Raukas E., Korrovits P., Punab M., Mändar R. (2010).** Sperma mikrofloora kroonilise prostatiidi korral. *Eesti Arst*, 89(2), 83 – 94
- Ungvari Z., Csiszar A., Sosnowska D., Philipp EE., Campbell CM., McQuary PR., Chow TT., Coelho M., Didier ES., Gelino S., Holmbeck MA., Kim I., Levy E., Sonntag WE., Whitby PW., Austad SN., Ridgway I. (2013).** Testing predictions of the oxidative stress hypothesis of aging using a novel invertebrate model of longevity: the giant clam (*Tridacna derasa*). *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 68(4): 359-67
- van Kasteren YM., Schoemaker J. (1999).** Premature ovarian failure: a systematic review on therapeutic interventions to restore ovarian function and achieve pregnancy. *Hum Reprod Update*. 5(5):483-92
- Velthut A., Zilmer M., Zilmer K., Kaart T., Karro H., Salumets A. (2013).** Elevated blood plasma antioxidant status is favourable for achieving IVF/ICSI pregnancy. *Reprod Biomed Online* 26(4): 345-52
- Vignini A., Nanetti L., Buldreghini E., Moroni C., Ricciardo-Lamonica G., Mantero F., Boscaro M., Mazzanti L., Balercia G. (2006).** The production of peroxynitrite by human spermatozoa may affect sperm motility through the formation of protein nitrotyrosine. *Fertil Steril* 85(4): 947-53
- Viiron, K. (2009).** Eestil on „titeturuks“ hea potentsiaal. *HEI* 10(19):23
- Wallace DC. (2005).** A Mitochondrial Paradigm of Metabolic and Degenerative Diseases, Aging, and Cancer: A Dawn for Evolutionary Medicine. *Annu Rev. Genet.* 39: 359–407
- Wang J., Sauer MV. (2006).** In vitro fertilization (IVF): a review of 3 decades of clinical innovation and technological advancement. *Ther Clin Risk Manag* 2(4): 355-64
- Watson PF. (2000).** The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci* 60–1: 481-92
- Welt CK. (2008).** Primary ovarian insufficiency: a more accurate term for premature ovarian failure. *Clinical Endocrinology*. 68 (4): 499–509
- WHO. (2010).** WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen, 5th ed. Geneva: World Health Organization.
- Winterbourn CC. (2008).** Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nature Chemical Biology* 4: 278-86
- Wittmann C., Chockley P., Singh SK., Pase L., Lieschke GJ., Grabher C. (2012).** Hydrogen Peroxide in Inflammation: Messenger, Guide, and Assassin. *Adv Hematol*: 541471
- Yerram N., Sandlow JI., Brannigan RE. (2012).** Clinical implications of the new 2010 WHO reference ranges for human semen characteristics *J Androl* 33(3): 289-90
- Yu Y., Wang J., Khaled W., Burke S., Li P., Chen X., Yang W., Jenkins NA., Copeland NG., Zhang S., Liu P. (2012).** Bcl11a is essential for lymphoid development and negatively regulates p53. *J Exp Med* 209(13): 2467-83

B) Raamatud

Zilmer, M., Karelson E., Vihalem T., Rehema A., Zilmer, K. (2010). Oksüdatiivne stress ja lipiidide peroksüdatsioon: biokeemilis-kiinilisi aspekte, p. 267-9. Inimorganismi biomolekulid ja nende meditsiiniliselt olulisemad ülesanded. Bit Foundation, Tartu.

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

Center for Disease Control and the Society of Assisted Reproductive Technology. (2012). Assisted Reproductive Technology Fertility Clinic Success Rates Report. URL (kasutatud 24.04.2013) http://www.cdc.gov/art/ART2010/PDFs/ART_2010_Clinic_Report-Full.pdf

Eesti Ravimiamet. (2012). Rakkude, kudede ja elundite 2011. aasta käitlemisandmete kokkuvõte. URL (kasutatud 24.04.2012) <http://www.sam.ee/rakkude-kudede-ja-elundite-2011-aasta-k%C3%A4itlemisandmete-kokkuv%C3%B5te>

Ethical guidelines on assisted reproductive technology (1996). URL (kasutatud 24.04.2012) http://www.nhmrc.gov.au/files_nhmrc/publications/attachments/e28.pdf

ESHRE Guidelines and Legal. ART fact sheet. URL (kasutatud 24.04.2013) <http://www.eshre.eu/ESHRE/English/Guidelines-Legal/ART-fact-sheet/page.aspx/1061>

Tervise Arengu Instituut. (2012). URL (kasutatud 28.04.13). <http://www.tai.ee/et/terviseandmed/tervisestatistika-ja-uuringute-andmebaas/uuendused/1485-kehavaline-viljastamine-ja-embruo-siirdamise-protseduurid-2011>

LISAD

Lisa 1

Uuritava teadliku nõusoleku vorm

Uuringu nimetus:

Inimese reproduktiivtervise mikroökoloogiliste aspektide teadusuuring

(Inimese viljakusfunktsiooni seisukohalt oluliste mikroobikoosluste uuring)

Mind,, on informeeritud ülalmainitud uuringust ja ma olen

teadlik läbiviidava uurimistöö eesmärgist, uuringu metoodikast ja uuringuga seotud võimalikest kahjuohtudest ja kinnitan oma nõusolekut selles osalemiseks allkirjaga.

Tean, et uuringute käigus tekkivate küsimuste ja võimalike tervisehäirete kohta

saan mulle vajalikku täiendavat informatsiooni uuringu teostajalt:

Paul Korrovits

amet: arst

töökoht: SA Tartu Ülikooli Kliinikum, Androloogiakeskus / Reproduktiivmeditsiini TAK

aadress: Puusepa 1A, 50406 Tartu / Tiigi 61b, 50410 Tartu

e-post: Paul.Korrovits@kliinikum.ee

telefon: 731 8206

Uuritava või patsiendi informeerimise ja teadliku nõusoleku leht vormistatakse 2 eksemplaris, millest üks jääb uuritavale ja teine uurijale.

Uuritava allkiri.....

Kuupäev, kuu, aasta

Uuritavale informatsiooni andnud isiku nimi:

Uuritavale informatsiooni andnud isiku allkiri:

Kuupäev, kuu, aasta

Uuritava kood: _____

Kuupäev: _____

Inimese reproduktiivtervise mikroökoloogiliste aspektide teadusuuring**Küsimustik meespartnerile****1. Üldandmed**

§ Sünniaeg: _____

§ Kehakaal: _____ kg

§ Pikkus: _____ cm

2. Üldine tervis ja eluviisid

§ Kas olete viimase 2 kuu jooksul kasutanud püsivalt mingeid ravimeid?

1 Ei

2 Jah, palun täpsustage _____

§ Kas Te kasutate igapäevases intiimhügieenis mõnda loetletud vahendit (*vajadusel mitu valikut*)?

1 Intiimpesuvahend

2 Tavaline pesuseep

3 Antibakteriaalne seep

4 Sugutiipa pesemiseks kasutan ainult sooja/leiget vett

5 Muu, palun täpsustage: _____

§ Kas olete suitsetaja?

1 Ei ole kunagi suitsetanud

2 Ei suitseta hetkel, kuid varem suitsetanud kokku _____ aastat

3 Suitsetamisest loobumise aasta _____

4 Suitsetan periooditi

5 Suitsetan käesoleval hetke, päevas kokku _____ sigaretti vm tubakatoodet

§ Kui sageli tarvitate alkohoolseid jooke?

1 Üldse mitte

2 Kord aastas või veel harvem

3 3-4 korda aastas

4 Kord kahe kuu tagant

5 Kord kuus

6 Paar korda kuus

7 Kord nädalas

8 Paar korda nädalas

9 Iga päev

10 Ei soovi vastata

§ Kui suures koguses tarvitasite järgnevaid alkohoolseid jooke viimase 7 päeva jooksul? (*palun märkige 0, kui ei tarvitanud üldse*):

1 Kerge alkoholi segu toonikuga, siider _____ liitrit

2 Lahja õlu _____ liitrit (*1 pudel = 0,5 liitrit*)

3 Keskmise kangusega õlu _____ liitrit

4 Vein _____ liitrit (*1 klaas = 100 ml*)5 Kange alkohol _____ ml (*1 pits = 4cl = 40ml*)6 Muu, mis? (*palun lisage tarvitatud kogus*): _____

§ Kui puutute tööalaselt kokku võimalike riskifaktoritega, siis palun kirjeldage (kemikaalid, radioaktiivsus, hallitus, niiskus, füüsiline või vaimne ülekoormus) _____

§ Kas harrastate praegu mingeid spordialasid (*vajadusel mitu valikut*):

1 Ei tegele spordiga

2 Jooksmine/kõndimine _____ korda nädalas

3 Jalgrattasõit _____ korda nädalas

4 Ujumine, vesiaeroobika _____ korda nädalas

5 Aeroobika, võimlemine _____ korda nädalas

6 Suusatamine _____ korda nädalas

7 Rulluisutamine _____ korda nädalas

8 Pallimängud _____ korda nädalas

9 Jooga, pilates _____ korda nädalas

10 Tantsimine _____ korda nädalas

11 Käin jõusaalis või treenin kodusel treažööril _____ korda nädalas

12 Muu (mis?) _____, _____ korda nädalas

3. Seksuaal- ja reproduktiivtervis

- § Kui olete abielus või vabaabielus, siis kui kaua on Teie **praegune** kooselu kestnud (arvestage ka abieluelsest kooseluperioodi)? _____ aastat ja _____ kuud
- § Kas teil on praeguse partneriga ühiseid lapsi, katkenud või omal soovil katkestatud rasedusi (aborte)?
- 1 Ei
- 2 Jah, palun täpsustage (lapse/laste vanus ja sugu või katkemise/abordi aasta): _____
- § Kas teil on varasemate partneritega ühiseid lapsi, katkenud või omal soovil katkestatud rasedusi (aborte)?
- 1 Ei
- 2 Jah, palun täpsustage (lapse/laste vanus ja sugu või katkemise/abordi aasta): _____
- § Kas Teil on olnud elus perioode, mil Te olete partneriga soovinud last, kuid see pole regulaarse seksuaalelu korral õnnestunud ühe aasta jooksul?
- 1 Ei
- 2 Jah, viimase aasta jooksul
- 3 Jah, kunagi varem
- § Kas Teid on uuritud ja/või ravitud võimaliku viljatuse suhtes?
- 1 Ei
- 2 Jah, viimati aastal _____
- § Kas Teil on olnud viimase kuu jooksul oraal- ehk suuseksi kogemusi praeguse püsipartneriga?
- 1 Jah, mees naisele
- 2 Jah, naine mehele
- 3 Ei
- § Kas Teil on olnud viimase kuue kuu jooksul anaal- ehk pärakuseksi kogemusi praeguse püsipartneriga?
- 1 Jah
- 2 Ei
- § Kui sageli olete olnud sugühtes viimase 30 päeva jooksul?
- 1 Iga päev või sagedamini
- 2 5-6 korda nädalas
- 3 3-4 korda nädalas
- 4 1-2 korda nädalas
- 5 1 kord nädalas
- 6 2-3 korda kuus
- 7 Üks kord kuus
- 8 Mul ei ole olnud sugühet viimase 30 päeva jooksul
- § Kas teil esineb või on varem esinenud järgmiseid urineerimishäireid? (*Vajadusel märkige mitu vastusevarianti*)
- 1 Mul ei ole olnud urineerimise vaevusi
- 2 Sage urineerimine (vähem kui 2-tunnise vahega)
- 3 Pakiline urineerimisvajadus
- 4 Nõrk juga
- 5 Põis ei tühjene kusemisel täielikult
- 6 Valu/kipitus/ebamugavus urineerimisel
- 7 Veri uriinis
- 8 Järetilkumine peale kusemist
- 9 Kusemise alustamine on raskenenud
- 10 Öösel peab kusel käima
- 11 Muu, täpsustage _____
- § Kas teil esineb või on varem esinenud valu/ebamugavustunnet järgmistes kehapiirkondades? (*Vajadusel märkige mitu vastusevarianti*)
- 1 Ei ole üldse valu / ebamugavustunnet
- 2 Munandite piirkonnas
- 3 Niuetes, kubemes
- 4 Häbemeluu taga või alakõhus
- 5 Peenises
- 6 Lahklihas (munandite ja pärasoole vahel)
- 7 Ristluude piirkonnas, alaseljas
- 8 Üldine ebamäärane tunne alakehas
- 9 Mujal / kus? _____
- § Millal olete neid vaevuseid tundnud?
- 1 Tunnen neid praegu
- 2 On olnud viimase aasta jooksul
- 3 On olnud kunagi varem

§ Kas Teil on viimase 3 kuu jooksul esinenud järgmisi suguteede haigusi (*palun vastake igale küsimusele, märkides vastavatesse lahtritesse ristid*)?

	<i>jah</i>	<i>ei</i>	<i>ei tea</i>
1 Suguelundite herpes			
2 Kondüloomid / papilloomiviirus (HPV)			
3 Klamüdiios			
4 Gonorröa ehk tripper			
5 Süüfilis			
6 HIV / AIDS			
7 Trihhomonoos			
8 Eesnaha- või sugutipea põletik (sügelus, punetus või lööve)			
9 Mükoplasmoos või ureaplasmoos			
10 Prostiit ehk eesnäärmepõletik			
11 Muu suguteede haigus _____			

§ Kas olete mõne eelmainitud haiguse tõttu saanud viimase 3 kuu jooksul ravi?

1 Ei

2 Jah, palun täpsustage _____

§ Kas teil on olnud suguelundite piirkonna operatsioone?

1 Jah, palun täpsustage _____

2 Ei

TÄNAME!

Uuritava kood: _____

Kuupäev: _____

Inimese reproduktiivtervise mikroökoloogiliste aspektide teadusuuring***Küsimustik naispartnerile*****1. Üldandmed**

§ Sünniaeg: _____

§ Kehakaal: _____ kg

§ Pikkus: _____ cm

2. Üldine tervis ja eluviisid

§ Esimene menstruatsioon _____ aasta vanuselt

§ Kas Teie menstruatsioonitsükkel on viimase 6 kuu jooksul olnud regulaarne?

1 Jah

2 Ei

§ Kas tsükli pikkus on 21-35 päeva?

1 Jah

2 Ei

§ Viimane menstruatsioon (*kuupäev*) _____

§ Kas olete viimase 2 kuu jooksul kasutanud püsivalt mingeid ravimeid?

1 Ei

2 Jah (*milliseid?*) _____

§ Kas Te kasutate igapäevases intiimhügieenis mõnda loetletud vahendit?

1 Tupeloputus

2 Tuplesised käsimüügivahendid (geelid, kreemid, küünlad vms)

3 Antibakteriaalne seep

4 Tamponid

5 Ei kasuta

6 Muu, palun täpsustage: _____

§ Kas olete suitsetaja?

1 Ei ole kunagi suitsetanud

2 Ei suitseta hetkel, kuid varem suitsetanud kokku _____ aastat

3 Suitsetamisest loobumise aasta _____

4 Suitsetan periooditi

5 Suitsetan käesoleval hetke, päevas kokku _____ sigaretti vm tubakatoodet

§ Kui sageli tarvitate alkohoolseid jooke?

1 Üldse mitte

2 Kord aastas või veel harvem

3 3-4 korda aastas

4 Kord kahe kuu tagant

5 Kord kuus

6 Paar korda kuus

7 Kord nädalas

8 Paar korda nädalas

9 Iga päev

10 Ei soovi vastata

§ Kui suures koguses tarvitasite järgnevaid alkohoolseid jooke viimase 7 päeva jooksul? (*palun märkige 0, kui ei tarvitanud üldse*):

1 Kerge alkoholi segu toonikuga, siider _____ liitrit

2 Lahja õlu _____ liitrit (*1 pudel = 0,5 liitrit*)

3 Keskmise kangusega õlu _____ liitrit

4 Vein _____ liitrit (*1 klaas = 100 ml*)5 Kange alkohol _____ ml (*1 pits = 4cl = 40ml*)6 Muu, mis? (*palun lisage tarvitatud kogus*): _____§ Kui puutute tööalaselt kokku võimalike riskifaktoritega, siis palun kirjeldage (kemikaalid, radioaktiivsus, hallitus, niiskus, füüsiline või vaimne ülekoormus):

- § Kas harrastate praegu mingeid spordialasid (*vajadusel mitu valikut*):
- 1 Ei tegele spordiga
 - 2 Jooksmine/kõndimine ___ korda nädalas
 - 3 Jalgrattasõit ___ korda nädalas
 - 4 Ujumine, vesiaeroobika ___ korda nädalas
 - 5 Aeroobika, võimlemine ___ korda nädalas
 - 6 Suusatamine ___ korda nädalas
 - 7 Rulluisutamine ___ korda nädalas
 - 8 Pallimängud ___ korda nädalas
 - 9 Jooga, pilates ___ korda nädalas
 - 10 Tantsimine ___ korda nädalas
 - 11 Käin jõusaalis või treenin kodusel treenažööril ___ korda nädalas
 - 12 Muu (*mis?*) _____, ___ korda nädalas

3. Rasedused ja sünnitused

- § Kas te olete olnud rase?
- 1 Jah
 - 2a Ei, viljatuse tõttu
 - 2b Ei, muul põhjusel (*võimalusel palun täpsustage*) _____
- § Mitu korda olete olnud rase? _____ korda
- § Palun märkige, millega need rasedused lõppesid:

	<i>Mitu</i>	<i>Millistel aastatel</i>
1 Raseduse iseeneslik katkemine		
2 Emakaväline rasedus		
3 Raseduse katkestamine (abort)		
4 Sünnitus		

4. Seksuaal- ja reproduktiivtervis

- § Kui olete abielus või vabaabielus, siis kui kaua on Teie praegune kooselu kestnud (arvestage ka abieluulset kooseluperioodi)? _____ aastat ja _____ kuud
- § Milliseid rasestumisvastaseid meetodeid olete tarvitanud viimase 2 kuu jooksul (*võite valida mitu vastust*)?
- 1 Ei kasuta rasestumisvastast meetodit, kuna soovin rasestuda
 - 2 Rasestumisvastased tabletid (ehk pillid)
 - 3 Rasestumisvastased plaastrid
 - 4 Tuperõngas ehk NuvaRing
 - 5 Emakasisene vahend (ehk spiraal)
 - 6 Kondoom
 - 7 Spermitsiid (ehk spermatooside hävitavad tupekuulid ja –kreemid)
 - 8 Pessaar
 - 9 Nahaalused implantaadid
 - 10 Steriliseerimine, mehe või naise (*palun tõmmake joon alla*)
 - 11 Kalendermeetod (ehk ohtlike päevade arvestamine)
 - 12 Katkestatud suguuhe (ehk mees ei lase spermat tuppe)
 - 13 Tupeloputus pärast suguuhet (*millega?*) _____
 - 14 Vahekorrajärgsed tabletid (ehk SOS-pillid, nt Postinor)
 - 15 Mingi muu meetod (*palun täpsustage*) _____
- § Kas Teil on olnud elus perioode, mil Te olete üritanud rasestuda, kuid see pole regulaarse seksuaalelu korral õnnestunud ühe aasta jooksul?
- 1 Ei
 - 2 Jah, viimase aasta jooksul
 - 3 Jah, kunagi varem
- § Kas Teid on uuritud ja/või ravitud võimaliku viljatuse suhtes?
- 1 Ei
 - 2 Jah, viimati aastal _____

§ Millist viljatuse ravi olete saanud? (palun vastake igale küsimusele, märkides vastavatesse lahtritesse ristid)

	jah	ei
1 Hormoonravi		
2 Inseminatsioon (IUI) ehk mehe sperma viimine emakasse		
3 Katseklaasiviljastamine (IVF)		
4 Mikroinjeksioon (ICSI) ehk spermatoosidi viimine munarakku		
5 Külmutatud embrüote siirdamine (FET)		
6 Muu (sh alternatiivravi) _____		

§ Kas Teil on olnud viimase kuu jooksul oraal- ehk suuseksi kogemusi praeguse püsipartneriga?

- 1 Jah, mees naisele
- 2 Jah, naine mehele
- 3 Ei

§ Kas Teil on olnud viimase kuue kuu jooksul anal- ehk pärakuseksi kogemusi praeguse püsipartneriga?

- 1 Jah
- 2 Ei

§ Kui sageli olete olnud sugühtes viimase 30 päeva jooksul?

- 1 Iga päev või sagedamini
- 2 5-6 korda nädalas
- 3 3-4 korda nädalas
- 4 1-2 korda nädalas
- 5 1 kord nädalas
- 6 2-3 korda kuus
- 7 Üks kord kuus
- 8 Mul ei ole olnud sugühet viimase 30 päeva jooksul

§ Kui sageli olete tundnud sugühte ajal või sellele järgnevalt valu või ebamugavustunnet suguelundite piirkonnas (tupe sissekäik, tupp, alakõht)?

- 1 Mitte kunagi
- 2 Väga harva / üksikutel kordadel
- 3 Vähem kui pooltel kordadel
- 4 Umbes pooltel kordadel
- 5 Rohkem kui pooltel kordadel
- 6 Peaaegu alati või alati
- 7 Ma pole saanud sugühtes olla valu tõttu / hirmu tõttu valu ees
- 8 Mul ei ole olnud sugühet

§ Kas Teil on viimase 3 kuu jooksul esinenud järgmisi suguteede haigusi (palun vastake igale küsimusele, märkides vastavatesse lahtritesse ristid)?

	jah	ei	ei tea
1 Suguelundite herpes			
2 Kondüloomid / papilloomiviirus (HPV)			
3 Klamüdiid			
4 Gonorröa ehk tripper			
5 Süüfilis			
6 HIV / AIDS			
7 Trihhomoonos			
8 Bakteriaalne vaginosis			
9 Tupe seenpõletik (kandidoos)			
10 Mükoplasmooos või ureaplasmoos			
11 Muu suguteede haigus (milline?) _____			

§ Kas olete mõne eelmainitud haiguse tõttu saanud viimase 3 kuu jooksul ravi?

- 1 Ei
- 2 Jah, palun täpsustage _____

§ Kas teil on olnud günekoloogilisi operatsioone?

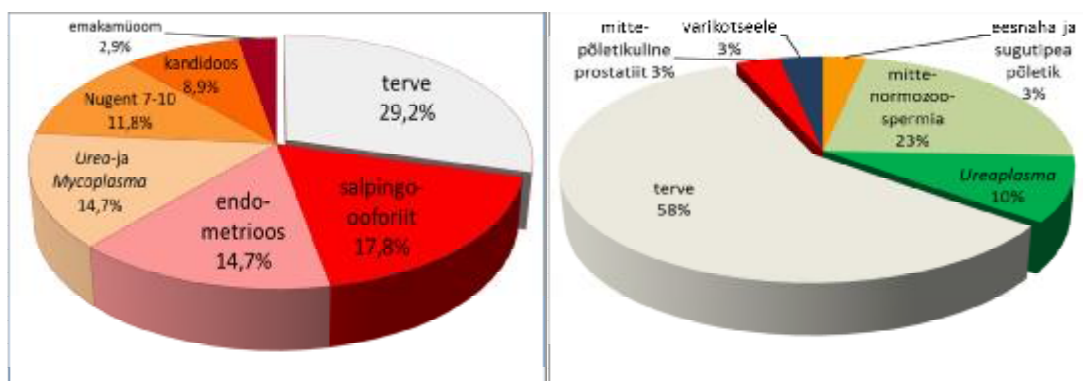
- 1 Jah, palun täpsustage _____
- 2 Ei

TÄNAME!

Lisa 4

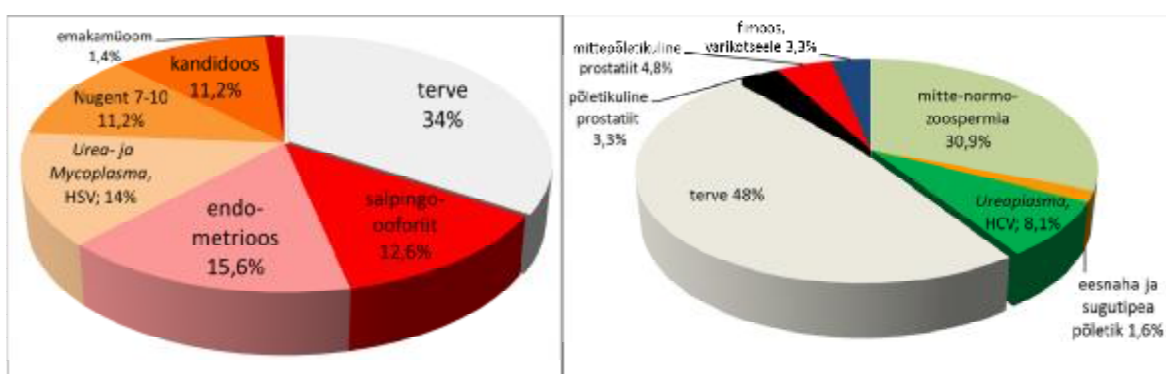
Nais- ja meespartnerite kliinilise tausta seos IVF/ICSI tulemiga

Paaridest, kus **naisel polnud kunagi õnnestunud rasestuda** (n=24) moodustasid terved naised 29,2% ning terviseprobleemidega naised 70,8%, nendest enim esines salpingo-ooriiti. Tervete meespartnerite osakaal oli 58,8% ning haigetel 42%. Ligi neljandikul meespartneritest esines mitte-normozoospermia (vt joonis L1).



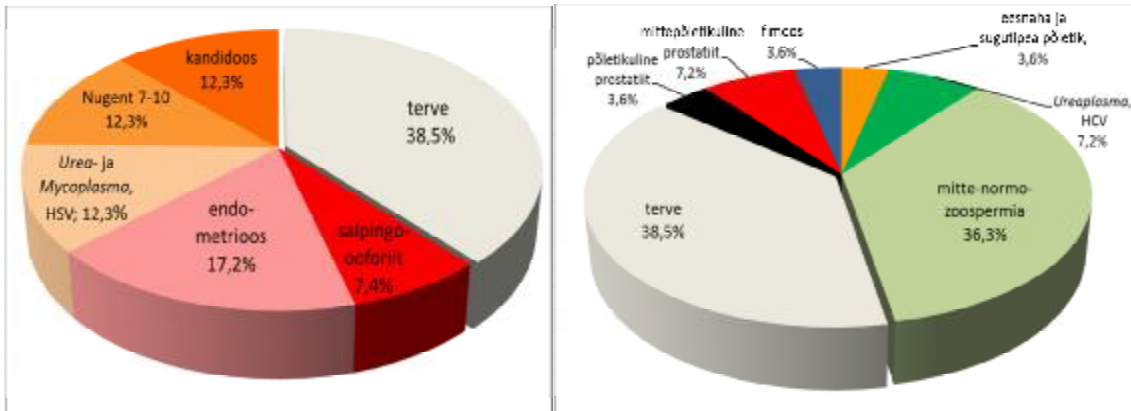
Joonis L1. Kliiniline taust nais- (vasakul) ja meespartneritel (paremal): naisel pole kunagi õnnestunud rasestuda

Paaridest, kus **naine polnud sünnitanud** (siia kuulusid naised, kes olid teinud aborti ja/või esinenud emakaväline/katkenud rasedus ja naised, kellel polnud kunagi rasedust tekkinud) (n=50), oli tervete naiste osakaal 34%. Terviseprobleeme esines 66%-l, enim endometriosisi. Meespartnerite seas oli terveid ja terviseprobleemidega mehi ~võrdselt (48% vs 52%). Ligi kolmandikul meestest esines kõrvalekalle seemnevedeliku parameetrites (vt joonis L2).



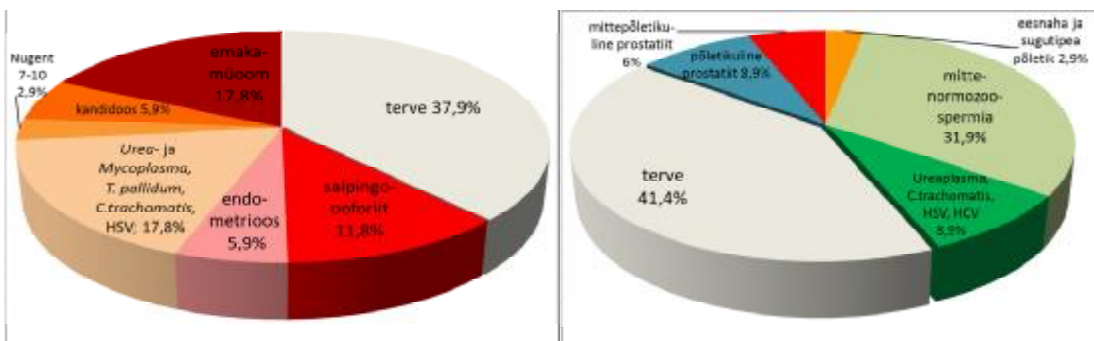
Joonis L2. Kliiniline taust nais- (vasakul) ja meespartnerite (paremal): naine polnud kunagi sünnitanud

Paaridest, kus naine **polnud kunagi sünnitanud, aga oli teinud aborti ja/või oli esinenud emakaväline/katkenud rasedus** (n=26) oli terveid nais- ja meespartnereid 38,5%. Terviseprobleeme esines 61,5%-l, naistel enim endometriosisi ning 36,3%-l meestest olid seemnevedeliku parameetrid normist kõrvale kaldunud (vt joonis L3).



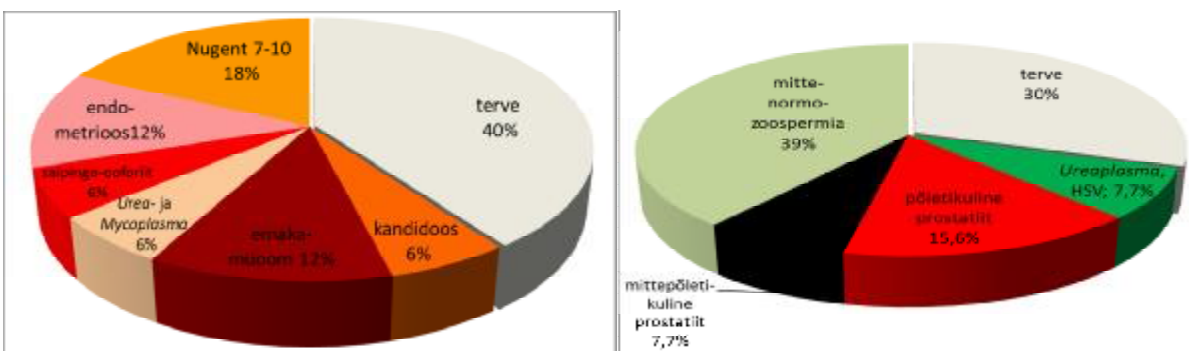
Joonis L3. Kliiniline taust nais- (vasakul) ja meespartnerite (paremal): naine polnud sünnitanud, aga oli teinud aborti ja/või oli esinenud emakaväline/katkenud rasedus

Paaridest, kus **naispartner oli sünnitanud** (n=29), moodustasid terved naised 37,9%. Terviseprobleeme esines 62,1%-l naistest, enim naised kuulus emakamüoomi ning *Urea- ja Mycoplasma/T. Pallidum/HSV* gruppi. Terveid mehi oli 41,4% ja terviseprobleeme esines 58,6%-l meestest. Ligi kolmandikul meespartneritest esines kõrvalekalle seemnevedeliku parameetrites (vt joonis L4).



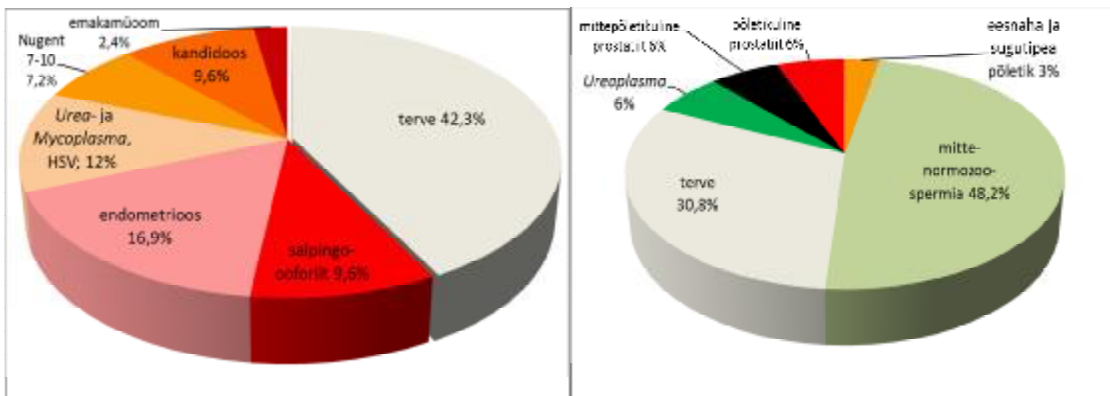
Joonis L4. Kliiniline taust nais- (vasakul) ja meespartneritel (paremal): naispartner oli sünnitanud

Paaridest, kus **naine oli sünnitanud, ent polnud teinud aborti ega esinenud emakavälist/katkenud rasedust** (n=10) oli tervete naiste osakaal 40%. Bakteriaalset vaginosisid esines 18%-l naispartneritest. Terveid mehi oli 30%. Seemnevedeliku parameetrites esines kõrvalekalle 39%-l meestest (vt joonis L5).



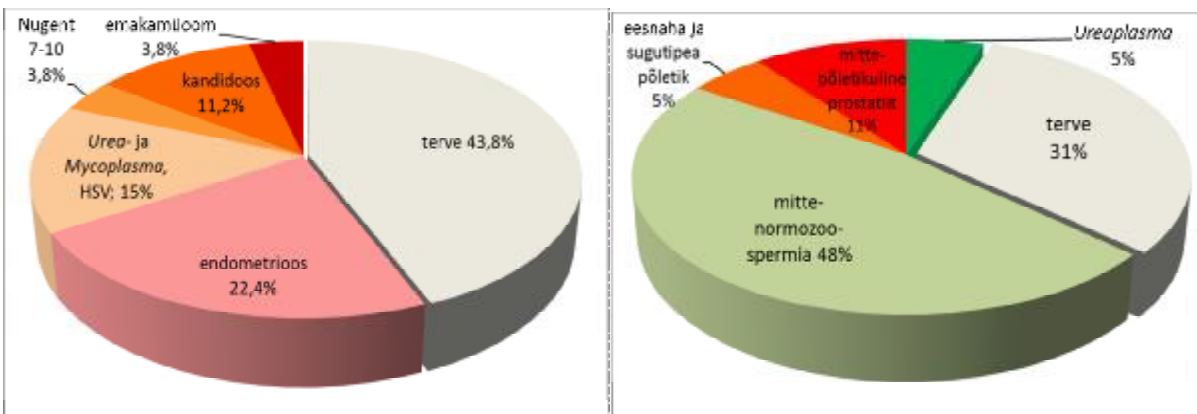
Joonis L5. Kliiniline taust nais- (vasakul) ja meespartneritel (paremal): naine oli sünnitanud, polnud teinud aborti ega esinenud emakavälist/katkenud rasedust

Paaridest, kus **naisel oli tekkinud varasem rasedus (lõppes sünni/mittesünniga) praeguse seksuaalpartneriga** (n=26), moodustasid terved naised 42,3% Terviseprobleeme esines 57,7%-l naispartneritest, enim endometriooosi. Tervete meespartnerite osakaal oli 30,8%. Terviseprobleemidega mehi oli 69,2%-l. Ligi pooltel meespartneritel esines seemnevedeliku parameetrites normist kõrvalekalle (vt joonis L6).



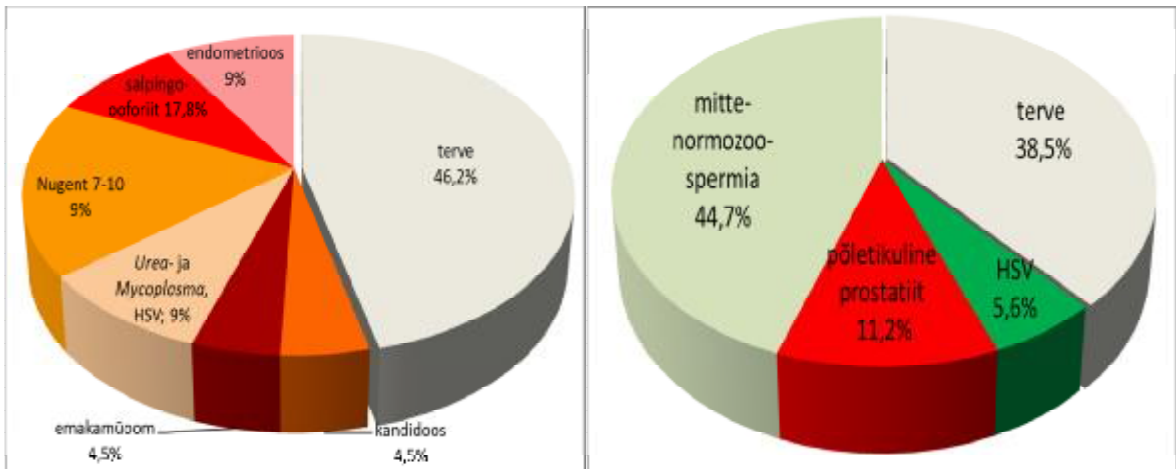
Joonis L6. Kliiniline taust nais- (vasakul) ja meespartneritel (paremal): naisel oli praeguse partneriga tekkinud rasedus

Paaridest, kus naispartneril oli **praeguse partneriga tekkinud rasedus, mis ei viinud sünnituseni** (n=16) oli tervete naiste osakaal 43,8%. Terviseprobleemidega naisi oli 56,2%. Ligi viiendikul naispartneritest esines endometriooos. Tervet meespartnereid oli ligi kolmandik. Terviseprobleeme esines 69%-l meestest. Ligi pooltel meespartneritest esines kõrvalekalle seemnevedeliku mõnes parameetris (vt joonis L7).



Joonis L7. Kliiniline taust nais- (vasakul) ja meespartneritel (paremal): naispartneril oli praeguse partneriga tekkinud rasedus, mis ei viinud sünnituseni

Paaridest, kes **omasid vähemalt ühte ühist sündinud last** (n=13) oli tervete naiste osakaal 46,2%. Terviseprobleeme esines 53,8%-l naistest, enim esines salpingooforiiti. Tervet meespartnereid oli 38,5%. Terviseprobleemidega mehi oli 61,5%. 44,7%-l meestest esines seemnevedeliku parameetrites kõrvalekalle (vt joonis L8).



Joonis L8. Kliiniline taust nais- (vasakul) ja meespartneritel (paremal): paar omas vähemalt ühte ühist sündinud last

TÄNUAVALDUSED

Sooviksin tänada oma juhendajaid Tiiu Kullisaart, Reet Mändarit ja Sulev Ingerpuud, kes andsid mulle võimaluse teha oma magistritöö minu jaoks väga huvitaval teemal ning olid alati abiks.

Täna dr. Paul Korrovits'i ja Nova Vita Kliiniku kollektiivi paaride leidmise, uuringusse kaasamise ning vajaliku materjali kogumise eest.

Samuti tahaksin tänada oma töökollektiivi TÜ Mikrobioloogia Instituudist, eriti Eleri Lappi hea nõu ja abi eest.

Töö valmis Eesti Haridus- ja Teadusministeeriumi (sihtfinantseeritav teema SF0180132s08) ja Reproduktiivmeditsiini TAK (grant nr. EU 30200) toel.

LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, AVE AHELIK

(sünnikuupäev:15.05.1989)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

„Oksüdatiivne stress viljatutel paaridel“

mille juhendajad on Tiiu Kullisaar, Reet Mändar, Sulev Ingerpuu,

1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 24.05.2013