

Seppo Kaskinen

Miehen tupakoinnin vaikutus alkionlaatuun

Syventävien opintojen kirjallinen työ

Kevätlukukausi 2015

Seppo Kaskinen

Miehen tupakoinnin vaikutus alkionlaatuun

Kliininen laitos

Kevätlukukausi 2015

Ohjaaja: Varpu Jokimaa

TURUN YLIOPISTO

Lääketieteellinen tiedekunta

KASKINEN, SEPPO: Miehen tupakoinnin vaikutus alkionlaatuun

Syventävien opintojen kirjallinen työ

Naistentautien klinikka

Maaliskuu 2015

---

On arvioitu, että noin puolet lapsettomuustapauksista liittyvät miehen heikentyneeseen hedelmällisyyteen. Koeputkihedelmöityksessä tuotetut alkiot voidaan siirtää kohtuun tai pakastaa myöhempää käyttöä varten. Tunnistamalla alkionlaatuun vaikuttavia tekijöitä on mahdollista valita kohtuun siirrettäväksi mahdollisimman laadukkaita alkioita, jotka tuottavat hyviä raskaustuloksia ja synnytyksiä. Kirjallisuuskatsauksen tarkoituksena on selvittää miehen tupakoinnin vaikutuksia alkionlaatuun.

Kirjallisuuskatsauksen artikkelit valittiin PubMed-tietokannasta. Aineiston valintakriteerinä oli elintapojen vaikutukset hedelmällisyyteen, tupakoinnin vaikutukset siemennesteeseen, siittiöiden perimään, hedelmöityshoitojen tuloksiin ja alkionlaatuun.

Tupakoinnin on havaittu heikentävän miehen hedelmällisyyttä eri mekanismein. Tupakointi heikentää siemenesteen laatua ja lisää erektiohäiriöitä. On myös viitteitä siitä, että tupakointi lisää siittiöiden DNA-vaurioita, mutta sen kliininen merkitys on vielä epäselvä. Miehen tupakoinnin hedelmällisyydelle haitallinen vaikutus saattaa lisääntyä iän myötä. Miehen tupakointi mahdollisesti heikentää lapsettomuushoitojen tuloksia, mutta tutkimuksia on vähän ja niiden laatu on puutteellista verrattuna tutkimuksiin naisen tupakoinnin vaikutuksesta. Miehen tupakoinnin vaikutukset hedelmöityshoitoihin välittyvät suoraan siittiövaikutusten kautta ja epäsuorasti naisen altistuessa passiivisesti tupakan haitallisille aineille puolison tupakoidessa. Miehen tupakoinnin ei ole luotettavasti havaittu vaikuttavan alkion laatuun. Aiheesta on tehty tällä hetkellä vain vähän tutkimuksia ja tutkimusasetelmissa on puutteita. Tällä hetkellä suurimmat puutteet tutkimuksissa miehen tupakoinnin vaikutuksista alkionlaatuun liittyvät keskeisen muuttujan, tupakoinnin vakioitiin tutkittavissa.

Asiasanat: alkionlaatu, tupakointi, hedelmällisyys, mies

## SISÄLLYS

1. JOHDANTO	1
1.1. Tilastotietoa lapsettomuudesta ja hedelmättömyyshoidoista	1
1.2. Lapsettomuuden syyt	3
1.2.1 Naisen hedelmättömyys	3
1.2.2 Miehen hedelmättömyys	3
1.2.3 Elintavat lapsettomuuden riskitekijänä	4
2. TUPAKOINTI	7
2.1. Tupakan aineenvaihduntatuotteet kudoksissa	8
2.2. Tupakoinnin tutkiminen	9
2.3. Tupakan vaikutukset miehen lisääntymisterveyteen	10
2.3.1 Erektiotoiminta	10
2.3.2 Tupakointi ja siemenneste	10
2.3.2.1 Tupakointi ja leukospermia	12
2.3.2.2 Tupakointi ja siittiöiden energia-aineenvaihdunta	13
2.3.3 DNA-fragmentaatio	13
2.3.3.1 Oksidatiivinen stressi ja DNA-fragmentaatio	13
2.3.3.2 Tupakointi ja siittiöiden DNA-fragmentaatio	14
2.4. Tupakoinnin vaikutukset hedelmöityshoitojen tuloksiin	18
2.5. Tupakoinnin vaikutus alkionlaatuun	22
3. POHDINTA	24
4. YHTEENVETO	26
LÄHTEET	27

## 1. JOHDANTO

Lapsettomuudella tarkoitetaan lääketieteessä tilannetta, jossa vähintään vuoden kestäneen säännöllisen sukupuolielämän jälkeen ei ole alkanut raskautta tai jos raskaus keskeytyy toistuvasti. Lapsettomuus voi olla taustaltaan myös sosiaalista tai se voi olla tietoinen valinta.

### 1.1. Tilastotietoa lapsettomuudesta ja hedelmättömyyshoidoista

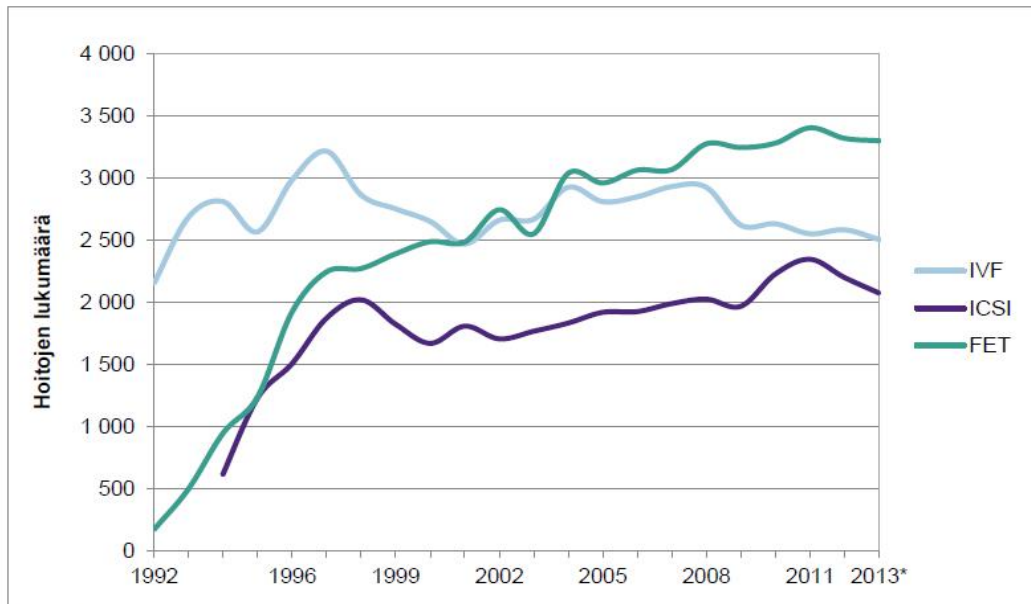
Tahattoman lapsettomuuden yleisyys vaihtelee eri tutkimusten mukaan. On arvioitu, että noin 15 % hedelmällisessä iässä olevista pareista kärsii elämänsä aikana lapsettomuudesta. (1). Toivottu lapsettomuus Eurobarometri 2011 –kyselytutkimuksen vastausten mukaan Euroopan maissa vaihtelee 0 % ja 12 % välillä. Suomessa noin 5 % 18 – 40-vuotiaista pitää lapsettomuutta ihanteenaan.

Lapsettomuus lisääntyy Euroopassa. Lapsettomien osuus on suurempi vähemmän koulutettujen miesten keskuudessa sekä joko hyvin vähän tai hyvin korkeasti koulutettujen naisten keskuudessa. Lapsettomuus on yleisempää maissa, joissa avioliitot solmitaan keskimääräistä vanhempina ja joissa äidiksi tulon ikä on korkea. (2).

Väestöliiton arvion mukaan vuosittain noin 3000 uutta paria hakee lääketieteellistä apua lapsettomuuteen. Vuonna 2012 Suomessa aloitettiin 13 916 hedelmöityshoitoa, mikä on 3,8 % vähemmän kuin vuonna 2011. Vuoden 2013 hedelmöityshoitotilastojen ennakkotietojen mukaan hoitoja aloitettiin 13 467 kappaletta eli 3,2 % vähemmän kuin edeltävänä vuonna. Vuonna 2012 koeputki- ja mikrohedelmöityshoitoja (IVF ja ICSI) sekä niihin liittyviä pakastetun alkion siirtoja (FET) tehtiin 9 388 kappaletta (67 % hedelmöityshoidoista) ja inseminaatiohoitoja 4 528 (33 %).

Valtaosa hedelmöityshoidoista tehdään omilla sukusoluilla; vuonna 2012 koeputki- ja inseminaatiohoitoja omilla sukusoluilla tehtiin 11 583 kappaletta, mikä määrä vastaa 83.2 %:n osuutta hoidoista. Luovutetuilla sukusoluilla tehtävien hedelmöityshoitojen osuus on kasvamassa hoitojen kokonaismäärän vähentyessä vuonna 2012 kasvua oli 1,2 prosenttiyksikköä edeltävästä vuodesta. Suomessa tehdään paljon yhden alkion siirtoja, esimerkiksi vuonna 2012 74,9 % siirroista oli yhden alkion siirtoja. Pakastetun alkion siirrot muodostavat yli 41 % hedelmöityshoidoista.

Vuonna 2012 hedelmöityshoidoista seurasi 2 976 raskautta, joista syntyi 2 446 lasta. (3)  
 Tämä vastaa 4,1%:a syntyneistä lapsista, jotka ovat hedelmöittyneet vuoden 2012 aikana.  
 (4) Viime vuosina tämä osuus on pysynyt melko tasaisena.



\* Ennakkotieto

Kuva 1 Aloitetut koeputkihedelmöityshoidot omilla sukusoluilla hoitomenetelmän mukaan 1992 – 2013. IVF, koeputkihedelmöitys. ICSI, siittiöiden mikroinjektiohoito. FET, pakastetun alkion siirto. Lähde: Hedelmöityshoidot 2012 – 2013, THL 2014, tilastoraportti, <http://urn.fi/URN:NBN:fi-fe2014052726022> 22.12.2014

Lapsettomuuslinikalla valittavaan hoitolinjaan vaikuttavat tutkimuksissa mahdollisesti selvinnyt lapsettomuuden syy, infertilitetin kesto, naisen ikä sekä parin omat toiveet ja perussairaudet (1,5,6). Joskus adoptio voi olla paras vaihtoehto. Suomessa lapsettomuushoitoja tarjoavat julkinen terveydenhuolto ja yksityiset toimijat, kuten Väestöliiton lapsettomuuskliniikka. Laki hedelmöityshoidoista ohjaa toimintaa.

Leikkaushoidolla voidaan syystä riippuen parantaa raskaaksi tulemisen mahdollisuutta. Suuria kohdun myoomia ja endometriosikudosta voidaan poistaa laparoskooppisella leikkauksella. Toisaalta, leikkauksessa voidaan myös vaurioittaa herkkiä rakenteita, kuten munasarjoja, eikä leikkaushoidoista saatava hyöty ole kiistatonta (6).

Munasolun kypsymistä ja irtoamista voidaan edistää lääkkeellisesti induktiohoidoin. Inseminaatiossa eli keinohedelmöityksessä kohtuun ruiskutetaan otollisessa

kuukautiskierron vaiheessa hyvin liikkuvia siittiöitä, jotka on eristetty siemenestenäytteestä. Koeputkihedelmöityksessä (IVF, in vitro fertilization) ultraääniohjauksessa kerätyt munasolut siirretään viljelymaljalle, jossa ne hedelmöitetään pestyillä siittiöillä. Siittiöiden mikroinjektiossa (ICSI, intracytoplasmic sperm injection) viljelymaljalla munasoluun siirretään yksi siittiösolu ohuella neulalla.

## 1.2. Lapsettomuuden syyt

Noin neljäsosa lapsettomuuden syistä liittyy naiseen, neljäsosa mieheen, ja neljäsosassa syitä on sekä miehessä että naisessa. Neljänneksessä tapauksista lapsettomuuden syy jää epäselväksi. Lapsettomuuden syytä selvittäessä on oleellista tutkia, tapahtuuko ovulaatio, onko raskauden alkamiselle rakenteellisia esteitä ja löytyykö siemennesteestä hedelmöittämiskykyisiä siittiöitä.

### 1.2.1 Naisen hedelmättömyys

Munasolun kysymis- ja irtoamishäiriöt eli ovulaatiohäiriöt ovat yleisimpiä hedelmättömyyttä aiheuttavia tiloja (18–32 %:ssa tapauksista). Ovulaatiohäiriöt voivat ilmentyä epäsäännöllisenä kuukautisrytminä ja vuotohäiriöinä. (7.) Kohdun limakalvon sirottumatauti alentaa naisen hedelmällisyyttä monilla mekanismeilla (8). Munajohdinvauriot ja kohdun rakenteelliset häiriöt vaikeuttavat sukusolujen kulkeutumista, hedelmöittymistä ja alkion kiinnittymistä. Sairastettu peritoniitti, pikkulantion tulehdus (PID, pelvic inflammatory disease) tai endometrioosi voivat muodostaa kiinnikkeitä suoliston ja synnytimelinten välille, jolloin munanjohtimen normaali liike estyy tai se tukkeutuu osittain tai kokonaan (sactosalpinx). (1.)

### 1.2.2 Miehen hedelmättömyys

Sperma-analyysi kuuluu lapsettomuuden perustutkimuksiin. WHO:n vuonna 2010 julkaisemassa ohjekirjassa määritetään siemennesteanalyysin osatutkimukset ja niiden kansainväliset viitearvot. Siemennestenäytteen normaalin tilavuuden alaraja on 1,5 millilitraa. Näytteessä tulisi olla vähintään  $39 \times 10^6$  siittiötä ja siittiöitiheyden olla vähintään 15 miljoonaa siittiötä millilitraa kohden. Liikkuvien siittiöiden osuuden normaalin alarajana on 40 % ja etenevien siittiöiden osuuden 32 %. Jos liikkuvia siittiöitä on vähemmän kuin normaalina pidetty määrä, arvioidaan elävien solujen osuus, jonka normaalin alaraja on 58

% . Siittiöiden ulkonäön tarkastelu kuuluu myös perustutkimuksiin. Morfologialtaan normaalien osuuden alaraja on 4 % . (9.)

Jos näytteen siittiötiheydeksi todetaan alle 5 miljoonaa siittiötä millilitrassa, voi taustalla olla kromosomihäiriö. Yleisin on Klinefelterin oireyhtymä (karyotyyppi XYY, 47), jota tavataan 0,2 %:lla miehistä. Potilaista, joilla todetaan atsoospermia tai vaikea oligotsoospermia löydetään 20 %:lla taustalta geneettinen syy. (10.) Atsoospermiaa voi aiheuttaa myös synnynnäinen tai hankittu kivistiehyen tukos (infektiot), gonadotropiinien erityksen häiriö (Kallmanin oireyhtymä) tai aivolisäkkeen toiminnan häiriö (11). Kivesten laskeutumattomuus, kivesten laskimolaajentumat eli varikoseelettä sekä tulehdukset, kuten sikotaudin aiheuttama kivistulehdus voivat alentaa miehen hedelmällisyyttä (12). On arvioitu, että edellä mainitun kaltaiset sairaustilat liittyvät 23 %:n miesten hedelmättömyystapauksista ja että ympäristötekijöillä, kuten saasteilla on merkittävä vaikutus hedelmällisyyden alenemiseen (13). Siittiöiden haploidin perimän vuoksi niiden solukalvon pintarakenteet ovat poikkeavia, jolloin kosketuksissa elimistön immuunipuolustuksen kanssa esimerkiksi trauman vuoksi syntyy siittiövasta-aineita. Hedelmättömillä miehillä on havaittu muuta väestöä enemmän vasta-aineita omia siittiöitä kohtaan (10). Miehen selkäydinvaurio voi alentaa hedelmällisyyttä erektio- ja ejakulaatio-ongelmien vuoksi.

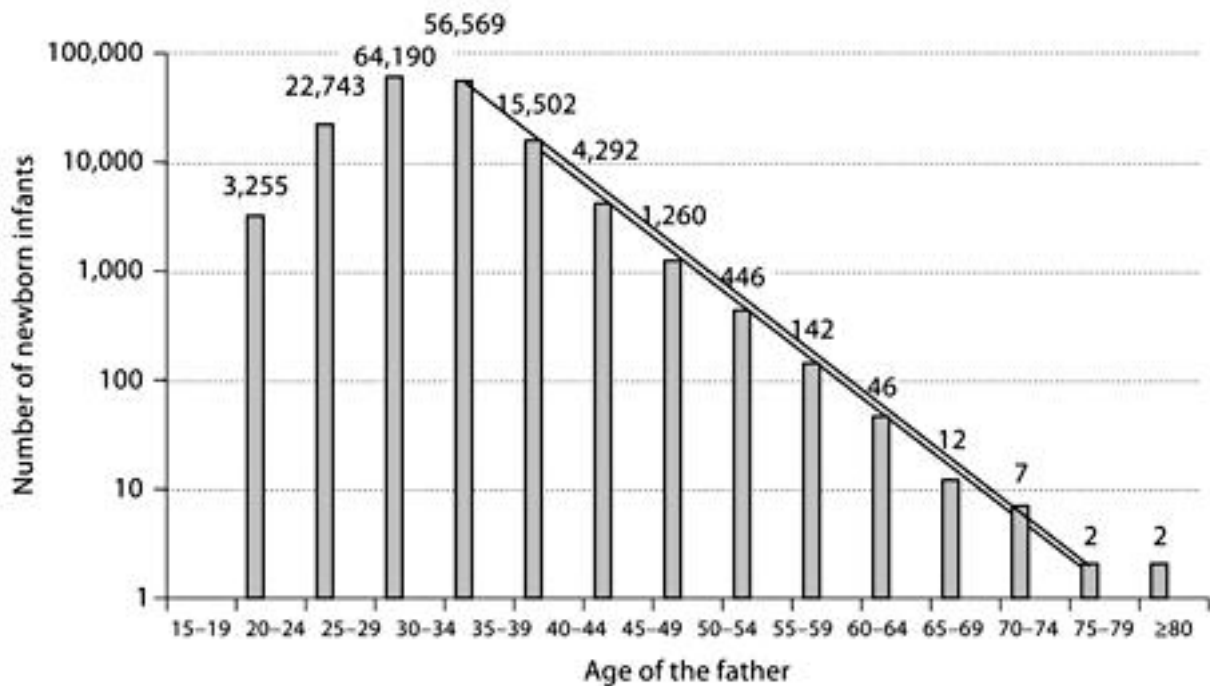
### 1.2.3 Elintavat lapsettomuuden riskitekijänä

Elintavoilla on suuri merkitys terveydelle ja hyvinvoinnille ja siten myös hedelmällisyydelle (14). Korkean elintason maissa terveydelle haitallisten elintapojen, kuten ylipainon ja liikunnan vähyyden merkitys korostuu sairauksien aiheuttajina ja myötävaikuttajina. Perussairaudet, ympäristötekijät ja perimän määrittämä alttius vaikuttavat siihen, kuinka suuri merkitys elintavoilla lopulta on yksilön terveyteen. Toisaalta, monia terveydelle haitallisia elintapoja on mahdollista, ainakin teoriassa muuttaa. Tutkimukseen perustuva tieto elintapojen vaikutuksista hedelmällisyyteen tarjoaa mahdollisuuden väestön lisääntymisterveyden edistämiseen (primääripreventio) ja lapsettomuushoitojen tulosten parantamiseen (sekundääripreventio) (15,16). Yleinen ja kohdennettu terveystiedotus sekä yhteiskunnalliseen päätöksentekoon vaikuttaminen lienevät tehokkaita keinoja näiden tavoitteiden saavuttamiseksi.



Systemaattisissa kirjallisuuskatsauksissa todetaan naisen iän olevan merkittävä hedelmällisyyteen vaikuttava tekijä. Raskaaksi tulemisen kesto ja hedelmättömyys lisääntyy sekä kyky ylläpitää raskautta vähenee iän myötä (15). Erityisen selvästi tämä vaikutus on havaittavissa yli 35-vuotiailla naisilla (14). Vuonna 1991 BMJ:ssa julkaistussa tutkimuksessa pääteltiin raskaaksi tulemisen todennäköisyyden pienentyvän 31 ikävuoden jälkeen noin 12 %:lla vuotta kohti. Yli 34-vuotiaiden kohortin 12 kuukauden kumulatiiviseksi raskauksien lukumääräksi kiertoa kohden (pregnancy rate/cycle) todettiin 0,49 ( CI 95%: 0,33 – 0,77 ), mikä oli noin puolet nuorempien ikäryhmien määrästä. (17.)

Myös miehen iän on todettu vaikuttavan hedelmällisyyteen (14,15). Vuonna 2011 julkaistussa espanjalaisessa väestötutkimuksessa havaittiin yli 35-vuotiaiden miesten ikäryhmissä johdonmukaisesti ja eksponentiaalisesti ( kulmakerroin – 0,12 ) syntyvän vähemmän lapsia kuin nuoremmassa ikäryhmissä, vaikka naisen ikä vakioitiin alle kolmeenkymmeneen ikävuoteen (Kuva 2) (18). Ikääntymisen on havaittu vaikuttavan heikentävästi siemennesteen tilavuuteen, siittiöiden lukumäärään ja liikkuvuuteen yli 35-vuotiailla miehillä (19). Vuonna 2013 julkaistu kirjallisuuskatsaus vahvistaa havainnot iän myötä heikkenevästä siemennesteen, siittiöiden ja niiden perimän laadusta (15). Lasten hankkimisen lykkääminen myöhemmälle iälle, esimerkiksi koulutuksen tai puuttuvan vakituisen parisuhteen vuoksi lisää lapsettomuuden riskiä.



Kuva 2 Syntyneiden lasten määrät ikäryhmittäin, kun äidin ikä on alle 30 vuotta. Matorras et al. 2011, Gynecologic and obstetric investigation, 71 (4), 229 – 35, [http://www.karger.com/Article/ShowPic/319236?image=000319236\\_f04.GIF](http://www.karger.com/Article/ShowPic/319236?image=000319236_f04.GIF)

Miehen ylipainoisuuden (  $BMI \geq 25 \text{ kg/m}^2$  ) todetaan useassa systemaattisessa kirjallisuuskatsauksessa vaikuttavan hedelmällisyyttä heikentävästi (14–16). Miehen suurentuneen painoindexin (BMI, body mass index) on todettu olevan yhteydessä alentuneeseen siemennesteen siittiötiheyteen, siittiöiden vähentyneeseen liikkuvuuteen ja perimän lisääntyneisiin DNA-vaurioihin (15). Vuonna 2013 julkaistu, 44 tutkimuksen aineistoihin perustuvan meta-analyysin mukaan atsoospermian tai oligotsoospermian riski on lisääntynyt ylipainoisilla ( OR 1,11 CI 95%: 1,01 – 1,21 ), lihavilla ( OR 1,28 CI 95%: 1,06 – 1,55 ) ja sairaaloisen lihavilla ( OR 2,04 CI 95%: 1,59 – 2,62 ) miehillä. Miehen alipainon (  $BMI \leq 19 \text{ kg/m}^2$  ) haitallista vaikutusta ei ole luotettavasti todettu ( OR 1,15 CI 95%: 0,93 – 1,43 ). (20.) Raskautta toivovien parien on hyödyllistä pyrkiä normaalipainoon sen hedelmällisyyttä ja terveyttä edistävien vaikutusten vuoksi.

Hyvin runsaasti urheiluvilla miehillä siittiöiden morfologian, liikkuvuuden ja siittiötiheyden on havaittu olevan huonompaa ja veren luteinisoivan hormonin (LH), follikkeliä stimuloivan hormonin (FSH) ja testosteronin pitoisuuksien olevan matalampia kuin kohtuullisesti (kolme kertaa viikossa) urheiluvilla miehillä (21,22). Liikunnan vaikutuksista hormonasojen pitkäaikaisvaikutuksiin on tosin vielä riittämättömästi näyttöä (23). Myös

hyvin runsaasti urheilevilla naisilla on havaittu kuukautiskierron häiriöitä, erityisesti, jos energian saanti ja kulutus ovat epätasapainossa (24). Raskautta suunnittelevien on hyödyllistä harrastaa säännöllisesti ja kohtuullisesti liikuntaa.

Alkoholilla on sekä naisen että miehen hedelmällisyyttä heikentävä vaikutus. Tällä hetkellä vahvin näyttö on runsaan alkoholin käytön haitallisista vaikutuksista. Runsaan alkoholin käytön rajana on pidetty kahdeksaa annosta viikossa tai neljääkymmentä grammaa puhdasta alkoholia päivässä. (14,23.) On myös viitteitä siitä, että haitat lisääntyvät annosmäärien kasvaessa (25). Turvallista annosmäärää ei kuitenkaan tällä hetkellä tiedetä. Kohtuullisen alkoholinkäytön vaikutuksista hedelmällisyyteen on julkaistu ristiriitaisia tuloksia (16). Lisäksi tutkimuksissa alkoholiannokset ovat usein tutkittavien itse ilmoittamia, joten ilmoitusharha mahdollisesti sekoittaa tuloksia. Raskautta toivovien parien kannattaa käyttää alkoholia kohtuudella tai ei lainkaan. Erityisesti naisten on hyödyllistä välttää alkoholinkäyttöä, koska alkionkehityksen ensi viikkoina raskaudesta ei välttämättä ole tietoa.

Eräs lapsettomuuden riskiä lisäävä elintapa on tupakointi. Tupakan ainesosat siirtyvät tehokkaasti keuhkojen kautta verenkierron mukana kaikkialle elimistöön. Tupakka aiheuttaa voimakasta riippuvuutta ja se on sosiaalisesti hyväksytty päihde. Seuraavissa kappaleissa keskitytään katsauksen pääteemaan, tupakoinnin vaikutuksiin lisääntymisterveyteen.

## 2. TUPAKOINTI

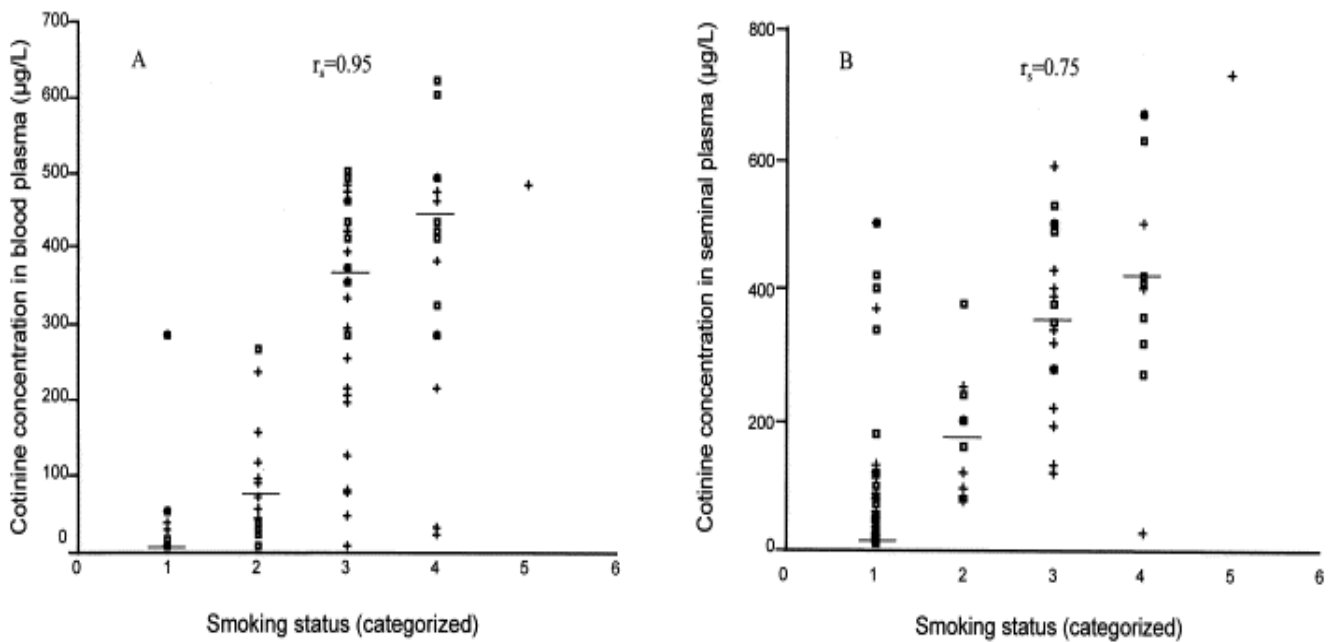
Suomessa aikuisten ( 16 – 64 –vuotiaiden ) tupakointitottumuksia on kartoitettu vuodesta 1974 asti vuosittaisella Aikuisväestön terveyskäyttäytyminen ja terveys – kyselytutkimuksella. Nuorten tupakointia on kartoitettu vuodesta 1977 lähtien Nuorten terveystapatutkimuksessa, joka toteutetaan joka toinen vuosi. Vuonna 2013 työikäisistä miehistä tupakoi päivittäin 19 % ja naisista 13 %. Nuoremassa ikäryhmässä (15 – 24 – vuotiaat) miehistä 12 % ja naisista 9 % tupakoi päivittäin. Miesten tupakointi on vähentynyt 1980 –luvulta lähtien. Naisten tupakointi pysyi pitkään 20 % tasolla, mutta 2000–luvulta lähtien trendi on ollut laskeva. (26.)

## 2.1. Tupakan aineenvaihduntatuotteet kudoksissa

Tupakan savu sisältää vaihtelevia määriä hiilimonoksidia, polysyklisiä hiilivetyjä, nitrosamiineja, alkaloideja, kuten nikotiinia ja raskasmetalleja, kuten kadmiumia, lyijyä ja elohopeaa (27). Nikotiinin päämetaboliatuote on kotiniini, jonka biologinen puoliintumisaika on pitkä, 18 – 20 tuntia (28). Polysyklisiä hiilivetyjä, kuten bentsopyreeniä (BaP), nikotiinia ja kotiniinia sekä kadmiumia on havaittu naisilla follikkelinesteessä ja pitoisuuksien on havaittu olevan korkeampia tupakoivilla kuin tupakoimattomilla. (Kuva 3) (29–33). Myös siemennesteessä on havaittu bentsopyreeniä (32), kadmiumia (34), nikotiinia ja kotiniinia (Kuva 4) enemmän tupakoivilla kuin tupakoimattomilla (35).

Aine	Seerumissa, ng/ml		Follikkelineste, ng/ml		Viite
	Ei tupakoi	Tupakoi	Ei tupakoi	Tupakoi	
<b>Kotiniini</b>			3,8	340	(31)
<b>Bentsopyreeni</b>	0,22	0,40	0,03	1,32	(36)
<b>Kadmium</b>	0,85	0,97	7,93	6,73	(33)

Kuva 2 Tupakansavun metaboliittien pitoisuudet veren seerumissa ja follikkelinesteessä tupakoivilla ja tupakoimattomilla. Muokattu Dechanet et al 2009, Human Reproduction Update, 17 (1), 76 – 95 pohjalta <http://humupd.oxfordjournals.org/content/17/1/76/T2.expansion.html>



Kuva 3. Kotiniinin pitoisuus plasmassa kasvaa päivittäisten savukemäärien lisääntyessä. Ilmoitettu tupakoinnin määrä ja kotiniinin pitoisuus plasmassa ja siemennesteessä. 1 = tupakoimaton, 2 = 1 – 5 savuketta/päivä, 3 = 6–15, 4 = 16 – 30, 5 = yli 30. Vaakaviiva kuvaa mediaania. Wong et al. 2000, Fertility and Sterility, 74 (5), 930 –935

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0015028200015673#>

## 2.2. Tupakoinnin tutkiminen

Vuonna 1994 julkaistussa tutkimuksessa Patrick et al arvioivat 26 julkaisun aineistojen perusteella biokemiallisesti määritetyn ja itse ilmoitetun tupakoinnin herkkyttä (sensiivisyys) ja tarkkuutta (spesifisyys). Tutkittavan ilmoittaman tupakoinnin paikkansapitävyys oli aineiston perusteella keskimäärin hyvä; herkkyys 87 % (vaihteluväli 6 % – 100 %) ja tarkkuus 89 % (33 % – 100 %), mutta lukemat vaihtelivat. Tutkijat päättelivät, että haastattelemalla saadut vastaukset olivat luotettavampia kuin kyselylomakkeella kerätyt. (37.) Arvioitaessa tutkimuksia tupakoinnin vaikutuksista on kriittisen lukijan syytä kiinnittää huomiota muun muassa siihen, millä tavoin osallistujien jako tupakoiviin ja tupakoimattomiin on tehty. Jaon tulisi perustua tupakan aineenvaihduntatuotteen, kuten kotiniinin pitoisuuteen kudoksissa. Kliinisessä lääkärintyössä tupakointia tulee tiedustella suoraan potilaalta, eikä luottaa ainoastaan mahdollisiin esitietolomakkeisiin.

## 2.3. Tupakan vaikutukset miehen lisääntymisterveyteen

### 2.3.1 Erektiotoiminta

Siittimen paisuvaiskudoksen täytyminen valtiomoverellä on mahdollista, vain jos paisuvaiskudoksen pienten valtimoiden sileälihaskerros relaxoituu. Perivaskulaarisista hermopäätteistä, endoteelisoluista ja itse sileän lihaksen soluista erittyvä vapaa typpioksidi (NO) välittää vaikutuksen sileälihaskerrokseen, jossa solunsisäinen syklisten guanosiinimonofosfaatin (cGMP) pitoisuus relaxoi pikkuvaltimon lihassäikeet. Typpioksidia syntetisoidaan L-arginiinistä. Tätä reaktiota katalysoi typpioksidisyntaasi-entsyymi, jota on kolme eri isoentsyymiä. Tupakan on havaittu vähentävän neuronaalisen typpioksidisyntaasin toimintaa hermosoluissa sekä *in vitro* että *in vivo* (38). Tupakan savun tiedetään myös vaurioittavan verisuonten endoteeliä ja vähentävän siten endoteliaalisen typpioksidisyntaasin määrää (39,40). Lisäksi tupakan metaboliittien aineenvaihdunnan tuottamien happiradikaalien on havaittu vähentävän suoraan typpioksidin pitoisuutta corpus cavernosumissa (41). Vuonna 2014 julkaistussa meta-analyysissä todetaan tupakoivilla olevan suurentunut riski erektio-ongelmille verrattuna tupakoimattomiin ( OR 1,81 CI 95 %: 1,34 – 2,44, n = 28 586 ) (42).

### 2.3.2 Tupakointi ja siemenneste

Tupakoinnin vaikutuksista siemennesteeseen on julkaistu kuluneen vuosikymmenen aikana runsaasti tutkimuksia. Tällä hetkellä kattavimman, vuonna 2011 julkaistun kiinalaisen meta-analyysin mukaan tupakointi heikentää siemennesteen tilavuutta, siittiötiheyttä, hyvin liikkuvien siittiöiden osuutta ja morfologisesti normaalien siittiöiden osuutta (Kuva 5) (43). Meta-analyysissä käytettiin normaalin ja epänormaalin löydöksen rajana WHO :n vuonna 2010 vahvistamia viitearvoja. Tutkimuksen aineistona on 54 julkaisua, 29 914 miestä 26 :sta eri maasta. Näistä tutkimuksista 46 :ssa ilmoitettiin riittävät tilastolliset tunnusluvut, joita käytettiin meta-analyysin aineistona. Yhdessätoista tutkimuksessa tilastolliset tunnusluvut oli ilmoitettu riittämättömällä tarkkuudella ja niiden tulokset arvioitiin laadullisesti.

<b>Muuttuja</b>	<b>Käänteisvarianssikerroin</b>	<b>95 %:n P–arvo</b>	<b>luottamusväli</b>
<b>Siemennesteen tilavuus</b>	- 0,25		(- 0,32 , - 0,18) < 0,00001
<b>Siittiötiheys</b>	- 7,07		(-10,03 , -4,10) < 0,00001
<b>Siittiöiden lukumäärä</b>	- 32,20		(-43,28 , -21,11) < 0,00001
<b>Siittiöiden liikkuvuus</b>	- 1,85		(-3,27 , -0,43) 0,01
<b>Siittiöiden normaali morfologia</b>	- 4,92		(-6,90 , -2,94) < 0,00001
<b>Siittiöiden epänormaali morfologia</b>	0,72		(0,15 , 1,29) 0,01

Kuva 4 Tupakoinnin vaikutuksista siemennesteen laatuun Muokattu Li et al, 2011, Fertility and Sterility, 95 (1), 116 – 23, pohjalta.

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0015028210009842>

Tämän meta-analyysin tulokset ovat samansuuntaiset aikaisemman, vuonna 1996 julkaistun meta-analyysin tulosten kanssa. Aikaisemman meta-analyysin siittiötiheyden aineistona oli 25 tutkimusta vuosilta 1966 – 1996, joista kahdessakymmenessä havaittiin tupakovien miesten siittiötiheyden olevan matalampi kuin tupakoimattomien. Näistä kahdeksassa tutkimuksessa ero oli tilastollisesti merkittävä (  $p < 0,05$  ). Tupakoiden siittiötiheyden havaittiin olevan keskimäärin 13 % pienempi kuin keskimääräinen siittiötiheys läpi aineiston. Siittiöiden liikkuvuutta arvioitiin 24 :n tutkimuksen aineistosta,

joista 15 :ssa havaittiin liikkuvuuden vähentyneen, näistä tutkimuksista yhdeksässä ero oli tilastollisesti merkittävä (  $p < 0,05$  ). Näiden yhdeksän tutkimuksen perusteella tupakoivien miesten siittiöiden liikkuvuus oli keskimäärin 13 % pienempi kuin liikkuvuus keskimäärin. Morfologiaa arvioitiin 24 :n tutkimuksen aineistosta, joissa 15 :sta havaittiin epämuotoisten osuuden lisääntyvän, näistä tutkimuksista seitsemässä ero oli tilastollisesti merkittävä. Tupakoivilla epämuotoisten siittiöiden osuus oli keskimäärin 3 % suurempi kuin epänormaalien siittiöiden osuus keskimäärin aineistossa. Poikkeama keskiarvosta vaihteli -8 % :n ja 19 %:n välillä, eivätkä tutkijat pitäneet havaintoa luotettavana. Tutkijat arvioivat vaihtelun johtuvan muun muassa siitä, että morfologian arvioiminen määrittäminen perustuu subjektiiviseen arvioon, jossa tutkijoiden väliset erot vaikuttavat tuloksiin. (44.)

Toisaalta, siemennesteen laadun, erityisesti siittiötiheyden, on todettu vaihtelevan merkittävästi myös terveillä miehillä. Vähiten vaihtelua esiintyy siittiöiden liikkuvuudessa, morfologiassa ja elävien siittiöiden osuudessa. (45.) On kaivattu uusia mittareita siemennesteen hedelmöityskyvyn arviointiin.

Italialaisessa, vuonna 2015 julkaistussa tutkimuksessa selvitettiin tupakoinnin vaikutuksia siemennesteeseen, sukupuolihormoneihin ja sukuelinten rakenteeseen. Lapsettomuusklinikan potilaina olleet 394 miestä jaettiin elintapoja kartoittavan kyselytutkimuksen vastausten perusteella tupakoiviin ja tupakoimattomiin. Tupakoivilla havaittiin siemennesteen tilavuuden (  $p < 0,01$  ) ja seminaalivesikkeleiden tilavuuden olevan pienempi ennen (  $p = 0,002$  ) ja jälkeen (  $p < 0,01$  ) ejakulaation kuin tupakoimattomilla, huolimatta korkeammasta testosteronipitoisuudesta ( kokonaispitoisuus  $p = 0,001$ , laskennallinen vapaa testosteroni  $p < 0,005$  ). Monimuuttuja-analyysissä tupakoinnin vaikutuksen siemennesteen tilavuuteen (  $r$ , regressiokerroin =  $-0,126$ ,  $p = 0,049$  ), seminaalivesikkeliä kokoon ennen (  $r = -0,195$ ,  $p = 0,004$  ) ja jälkeen (  $r = -0,219$ ,  $p = 0,001$  ) ejakulaation havaittiin voimistuvan askivuosien lisääntyessä. (46.)

#### 2.3.2.1 Tupakointi ja leukospermia

Tupakan metaboliittien on havaittu läpäisevän Sertolin solujen muodostaman veri–kives – esteen lisäten kudosten oksidatiivista stressiä (47). Tupakoivien hedelmättömien miesten siemennesteessä on havaittu 48 % enemmän leukosyyttejä (  $p = 0,0001$  ) ja 107 % enemmän happiradikaaleja (  $p = 0,001$  ) kuin tupakoimattomilla miehillä (48).



Siemennesteen leukosytoosin on havaittu olevan yhteydessä siemennesteen happiradikaalien lisääntymiseen (49).

### 2.3.2.2 Tupakointi ja siittiöiden energia-aineenvaihdunta

Tupakoinnin hedelmällisyyttä heikentävän vaikutuksen mekanismia ei ole varmuudella tunnistettu. On arveltu, että tupakointi muun muassa vähentää metabolisesti aktiivisen kiveskudoksen hapen saantia. Vuonna 2010 julkaistussa tutkimuksessa havaittiin, että tupakoivien miesten siittiöiden mitokondrioiden hapenkulutus on vähäisempää kuin tupakoimattomien ( $0,96 \mu\text{M} (\text{O}_2) / \text{min} / 10^8$  vs.  $1,39 \mu\text{M} (\text{O}_2) / \text{min} / 10^8$ ,  $p = 0,004$ ) (50).

### 2.3.3 DNA-fragmentaatio

Smit et al osoittivat 100 potilaan seurantatutkimuksessa, että siittiöiden kromatiinirakennetutkimuksella tarkasteltuna DNA-vaurioiden biologinen vaihtelu on vähäisempää kuin klassisen siemennesteanalyysin tulokset (51). DNA-vaurioita pidetään eräänä keskeisenä siemennesteen laadun mittarina ja sen diagnostisten sekä ennusteellisten ominaisuuksien on arveltu olevan perinteistä siemennesteanalyysiä parempia (52–54). Siittiöiden DNA-vaurioiden mittaamiseen on kehitelty eri menetelmiä. Kromatiinirakennetutkimuksella (SCSA, sperm chromatin structure assay) yksi- ja kaksisäikeiset DNA-ketjut erotetaan toisistaan virtausytometrisesti. Tulosten perusteella on mahdollista määrittää fragmentoitumisindeksi (DFI, DNA fragmentation index), joka kuvaa vaurioituneen DNA:n määrää. (55.) Hedelmällisyyden perusteella DFI-tulokset on jaettavissa eri luokkiin; normaaliin (DFI < 15 %), kohtalaiseen (16 – 30 %) ja poikkeavaan (> 30 %) (54).

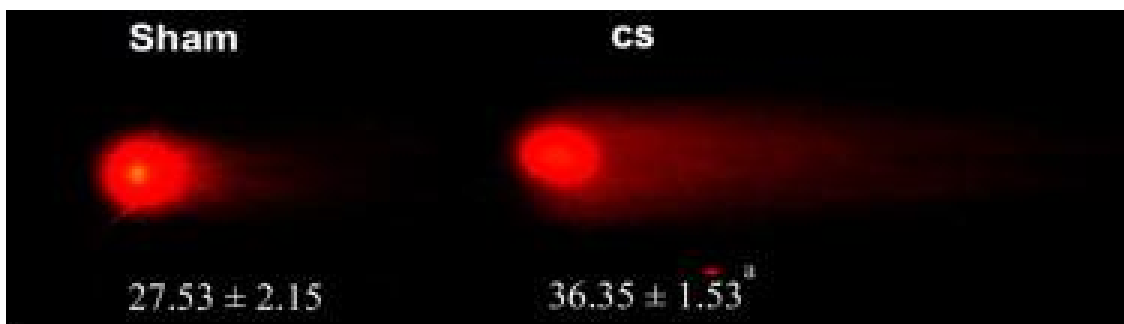
#### 2.3.3.1 Oksidatiivinen stressi ja DNA-fragmentaatio

Viimeisten vuosikymmenten aikana happiradikaalien aiheuttaman oksidatiivisen kuormituksen vaikutuksia miehen hedelmättömyyteen on tutkittu runsaasti. Oksidatiivisellä stressillä tarkoitetaan epätasapainoa hapettavien yhdisteiden ja antioksidanttien välillä. Kemiallisesti aktiiviset happiradikaalit voivat reagoida kudosten molekyylien, kuten DNA:n ja solukalvon tyydyttymättömien rasvahappojen kanssa. Tällaisia hapetus-pelkistys – reaktioille alttiita molekyyliä on siittiöissä tilavuuteen suhteutettuna runsaasti. Toisaalta, siittiöt myös tuottavat itse happiradikaaleja (56). Siittiöt muuttuvat hedelmöittymiskykyisiksi vasta kapasitaatioksi kutsutun prosessin myötä, jossa solukalvon proteiinit ja rasva-aineet

uudelleenjärjestäytyvät. Siittiöt tuottavat itse kapasitaatiossa tarvittavia happiradikaaleja, joita kulutetaan solukalvojen proteiinien tyrosiini–aminohappojen fosforyloimisessa. Antioksidantteina toimivat aineet, kuten sinkki, superoksididismutaasi, askorbiinihappo ja E–vitamiini suojaavat solujen molekyylejä (49). 1970-luvulla Harvardin yliopiston tutkimuksessa havaittiin siittiösolujen solukalvojen lipiden hapettumisen liittyvän siittiösolujen huonoon liikkuvuuteen (57). Sittenkin tämä havainto on vahvistettu useissa tutkimuksissa (58–60). Kypsissä siittiöissä perimä on pakattuna tiukasti kromatiinirakenteisiin, joissa somaattisille soluille ominaiset histonit ovat pääosin korvautuneet pienikokoisemmilla protamiineilla. Tiiviisti pakkautunut kromatiini on stabiili ja DNA resistentti kemiallisille vaurioille. Virheet pakkautumismekanismissa voivat altistaa DNA :n happiradikaalien aiheuttamille vaurioille. (54,56.) Tupakoivien siittiösoluissa on havaittu tupakoimattomia enemmän virheitä kromatiinin pakkausmekanismissa (61).

### 2.3.3.2 Tupakointi ja siittiöiden DNA-fragmentaatio

Vuonna 2015 julkaistussa tutkimuksessa La Maestra et al tutkivat tupakansavun vaikutuksia hiirten siittiöiden morfologiaan ja DNA :n pirstaloitumiseen. Hiiristä 23 altistettiin kymmenen viikon ajaksi tupakansavutiivisteelle päivittäin kolmen tunnin ajaksi. Vertailuryhmässä oli 25 hiirtä. Altistuneilla hiirillä todettiin olevan 1,32 – kertaisesti (  $p < 0,01$  ) enemmän vaurioita DNA :ssa, kun pilkkoutumista arvioitiin geelielektrtofooresilla (kuva 6). Lisäksi savulle altistuneiden hiirien paino oli pienempi (  $39,2 \text{ g} \pm 0,73 \text{ g}$  vs.  $44,9 \text{ g} \pm 1,55$  ,  $p < 0,001$  ), lisäkiveksestä kerättyjen siittiöiden lukumäärä oli pienempi (  $2,6 \pm 0,23 \times 10^6 / \text{ml}$  vs.  $3,4 \pm 0,3 \times 10^6 / \text{ml}$  ,  $p < 0,05$  ), ja hännättömien siittiöiden osuus oli isompi (  $29,1 \text{ ‰}$  vs  $20,8 \pm 1,75 \text{ ‰}$  ,  $p < 0,05$  ) kuin verrokkihiirten. (62.)



Kuva 5 Tupakan savulle altistuneella hiirellä on siittiöiden DNA–vaurioita enemmän kuin verrokilla. Sham, verrokkihiiri. CS, tupakansavulle altistettu hiiri. Elektroforeesiajo, COMET assay – menetelmä. DFI  $\pm$  SE, keskivirhe. La Maestra et al 2015, International journal of hygiene and environmental health, 218 (1), 117 – 22  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1438463914000819>

Vuonna 2014 julkaistussa tutkimuksessa De Bantel et al tutkivat, onko tupakoivien ja tupakoimattomien miesten siittiöiden DNA :n pirstaloitumisessa ja vitaliteetissa eroja. Tutkimuksiin osallistui 113 miestä, joista 73 :n näytteet tutkittiin Vitality-TUNEL assay –menetelmällä. Tutkittavat jaettiin tupakoiviin ja tupakoimattomiin uloshengityksen hiilimonoksidipitoisuuden perusteella ja tupakoivat edelleen kahteen ryhmään päivittäisen savukemäärien perusteella. Tutkimuksessa ei havaittu tilastollisesti merkittäviä eroja ryhmien välillä DNA :n pirstaloitumisessa ( tupakoimattomat 22,5 % [5,8 – 81,8] vs tupakoivat 18,9 % [3,7 – 74,3] ) (kuva 7). (63.)

*Sperm Parameters of Smokers and Non-Smokers*

Sperm parameters	Non-smokers <sup>a</sup> (n = 47)	Smokers (all) <sup>a</sup> (n = 26)	Heavy and moderate smokers <sup>a</sup> (n = 19)	P <sup>b</sup>
Volume mL	3 [1.4–8]	3 [1.8–7]	3 [1.8–7]	NS
Sperm count (10 <sup>6</sup> /mL)	60 [3–170]	46 [8–174]	55 [8–174]	NS
Mobility (a + b + c) %	50 [10–70]	50 [30–70]	50 [35–70]	NS
% Normal morphology(according David classification)	10.5 [0–42]	16.5 [5–40]	15 [5–40]	NS
% DNA fragmentation	22.5 [5.8–81.8]	18.9 [6–74.3]	18.8 [3.7–74.3]	NS
% spz presenting DNA fragmentation among all live spz	3.6 [0.6–36.8]	3.3 [0.9–9.6]	3.2 [0.9–9.6]	NS

Comparisons were performed between smokers and non-smokers on one hand, and between smokers and moderate—to heavy smokers on the other hand. Results expressed as median [min, max].

Spz = spermatozoa; NS =  $P > 0.05$ .

<sup>a</sup>Kruskal–Wallis one-way analysis of variance on ranks.

Kuva 6 Tupakoimattomien, tupakoivien ja runsaasti tupakoivien siittiöiden DNA:n pirstaloitumisessa ei havaittu merkitseviä eroja. Luvut mediaaneina. NS, non-significant, ei tilastollista merkitsevyyttä,  $p > 0,05$  De Bantel et al., 2014, Cytometry part B: Clinical Cytometry, 88 (2), 120 – 4, <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cyto.b.21185/full>

Myös toisenlaisia tuloksia on esitetty. Anifandis et al tutkivat vuonna 2014 julkaistussa tutkimuksessaan, vaikuttavatko tupakointi ja alkoholin käyttö siemennesteanalyysin ja DNA:n pirstaloitumistutkimuksen tuloksiin. Tutkimukseen osallistui 207 miestä, jotka jaettiin strukturoidun kyselytutkimuksen perusteella alaryhmiin. Miehistä tupakoimattomia oli 98 kappaletta, kohtalaisesti tupakoivia (0 – 1 askivuotta kuluneen vuoden aikana) 76 ja runsaasti tupakoivia ( yli askivuosi kuluneen vuoden aikana ) 33. Runsaasti tupakoivilla oli merkitsevästi enemmän DNA–vaurioita kuin tupakoimattomilla ( 39,81 %  $\pm$  1,6 vs 35,62 %  $\pm$  1,3 %,  $p < 0,05$  ). Myös kohtalaisesti tupakoivilla vaurioita oli tupakoimattomia enemmän ( 39,62 %  $\pm$  1,5 vs 35,62 %  $\pm$  1,3 %,  $p < 0,05$  ). Kohtalaisesti ja runsaasti tupakoivien DNA–vaurioiden määrä ei eronnut merkitsevästi (  $p = 0,06$  ) (kuva 8). (64.)

Smoking status	No smokers	Moderate smokers	Heavy smokers	p value
No.	98	76	33	
Age (years)	37.08 ± 0.5	37.47 ± 0.68	38.42 ± 0.8	NS
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	27.8 ± 0.4	27.23 ± 0.3	26.93 ± 0.6	NS
Volume (ml)	3.7 ± 0.1 <sup>a</sup>	3.15 ± 0.1 <sup>b</sup>	2.93 ± 0.2 <sup>b</sup>	<0.05
Concentration (10 <sup>6</sup> spermatozoa/ml)	42.03 ± 3.6	33.78 ± 4	42.51 ± 6.9	NS
PRM (%)	49.44 ± 2.2	46.89 ± 2.1	50.63 ± 3.9	NS
NPR (%)	17.29 ± 1	18.5 ± 1.1 <sup>a</sup>	14.24 ± 1.9 <sup>b</sup>	NS
IM (%)	33.25 ± 2.1	34.6 ± 2.1	35.18 ± 3.6	NS
Small halos (%)	7.05 ± 0.3	7.64 ± 0.4	6.37 ± 0.4	NS
No halos (%)	16.1 ± 0.8	17.94 ± 0.9	17.24 ± 1	NS
Degenerative spermatozoa (%)	12.37 ± 0.7 <sup>a</sup>	14.02 ± 0.8	16.19 ± 1 <sup>b</sup>	<0.05
SDF (%)	35.62 ± 1.3 <sup>a</sup>	39.62 ± 1.5 <sup>b</sup>	39.81 ± 1.6	<0.05

Kuva 7 Siemennesteanalyysin ja DNA-vaurioanalyysin tulokset. a, merkitsevyystaso  $p < 0,005$  verrattuna lukuun b, SDF, sperm DNA fragmentation, siittiöiden DNA-vaurio. Anifandis et al, 2014, Archives of gynecology and obstetrics, 290 (4), 777 – 82, <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00404-014-3281-x>

Puolalaisen, vuonna 2013 julkaistun tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää antioksidanttina toimivan entsyymin, superoksididismutaasin siemennestepitoisuuden, iän ja tupakoinnin vaikutusta DNA-vaurioiden määrään ja lapsettomuushoitojen tuloksiin. Tutkimuksen poissulkukriteerinä oli sairaus, jonka tiedettiin vaikuttavan siemennesteen laatuun ja hedelmällisyyteen, sekä *in vitro* hedelmöityshoidot. Tutkimukseen osallistui 186 miestä, joista 36 oli alle 26 –vuotiaita, 109 :n ikä vaihteli 26 :n ja 35 välillä ja 41 miestä olivat yli 35 –vuotiaita. Tutkittavista tupakoimattomia oli 72,58 % ( 135 miestä ) ja loput 27, 42 % ( 51 miestä ) tupakoi. Menetelmää, jolla jako tehtiin, ei julkaisussa kuvata. Siemennestenäytteiden superoksididismutaasin (SOD) pitoisuus määritettiin spektrofotometrisesti. DNA-vaurioiden määrä mitattiin katsauksessa aikaisemmin kuvatulla kromatiinirakennetutkimuksella (SCSA) ja tuloksista määritettiin DNA :n fragmentoitumisindeksi (DFI). Indeksien perusteella tutkittavat jaettiin neljään ryhmään: DFI <15 % (normaali), DFI 15 % – 19 % (kohtalainen vaurio), DFI 20 % – 25 % (huomattava vaurio) ja DFI yli 25 % (vaikeat vauriot). Tupakoinnin ja DFI :n välillä ei havaittu merkittävää yhteyttä (  $\chi^2 = 0,29$  ,  $p = 0.0926$  ) (kuva 9). Vuoden aikana onnistuneiden raskauksien ja DNA-vaurioiden välillä havaittiin merkitsevä yhteys; miehillä, joilla oli vähän vaurioita tulivat todennäköisemmin isiksi (  $t = 2,51$  ,  $p = 0,013$  ) (kuva 10). (65.)

**Table 4.** Relationship between DFI and tobacco smoking habit.

DFI	Non-smoker		Smoker	
	n	%	n	%
Below 15%	61	45.19	22	43.14
15%–19%	29	21.48	10	19.61
20%–25%	27	20.00	11	21.57
Over 25%	18	13.33	8	15.69
Total	135	100.00	51	100.00
M+SD	8.63±4.68		8.80±5.13	

Chi<sup>2</sup>=0.29; P=0.926

DFI, DNA Fragmentation Index.

Kuva 8 Tupakoinnin ja siittiöiden DNA :n pirstaloitumisen välillä ei havaittu merkitsevää yhteyttä. Bojar et al, 2013, Annals of agricultural and environmental medicine, 20 (4), 865 – 8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24364470>

**Table 2.** Relationship between DFI and percentage of pregnancies obtained after one year of infertility treatment.

DFI	Lack of pregnancy after one year of treatment		No. of pregnancies during 1 year of treatment	
	n	%	n	%
Below 15%	8	22.86	75	49.67
15%–19%	10	28.57	29	19.21
20%–25%	10	28.57	28	18.54
Over 25%	7	20.00	19	12.58
Total	35	100.00	151	100.00
M+SD	10.49±4.64		8.26±4.74	

t=2.51; P=0.013

DFI – DNA Fragmentation Index.

Kuva 10 DNA–vaurioindeksi ja raskaudet vuoden aikana. Bojar et al 2013, Annals of agricultural and environmental medicine, 20 (4), 865 – 8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24364470>

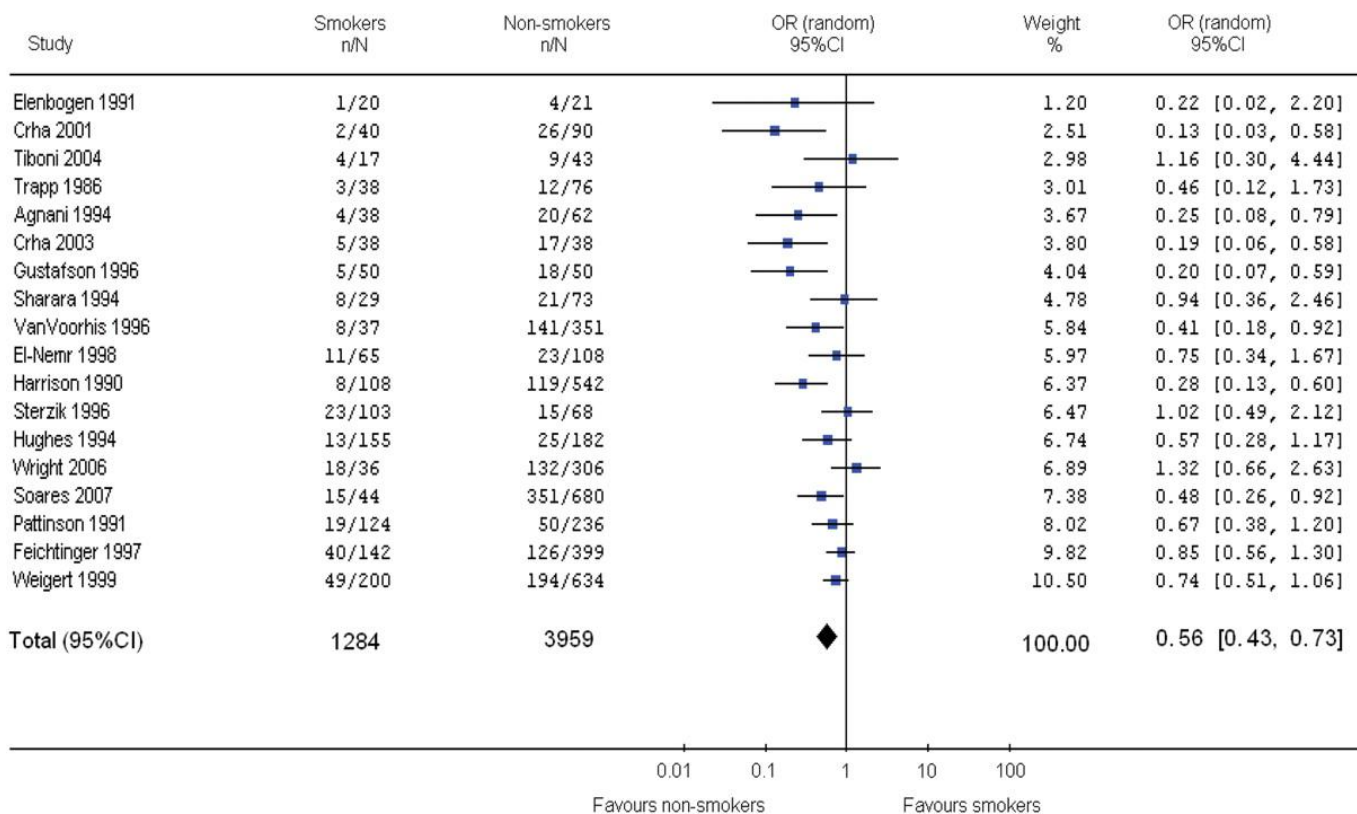
## 2.4. Tupakoinnin vaikutukset hedelmöityshoitojen tuloksiin

Miehen tupakoinnin vaikutukset hedelmöityshoitoihin välittyvät suoraan siittiövaikutusten kautta. Toisaalta, vaikutukset välittyvät myös epäsuorasti naisen altistuessa passiivisesti tupakan haitallisille aineille puolison tupakoidessa.

### 2.4.1 Naisen tupakoinnin vaikutukset hedelmöityshoitojen tuloksiin

Vuonna 2009 julkaistun meta-analyysin mukaan aktiivinen tupakointi heikentää merkittävästi hedelmöityshoitojen tuloksia. Meta-analyysin aineistona on 21 kohortti- ja tapaus-verrokkitutkimusta, jotka on julkaistu vuosien 1986 – 2007 välisenä aikana. Tupakoivilla naisilla havaittiin syntyvän vähemmän lapsia hoitosykliä kohden ( OR 0,54 , CI 95%: 0,30 – 0,99,  $n_{\text{sykli}} = 5465$  ), vähemmän raskauksia hoitosykliä kohden ( OR 0,56 , CI 95%: 0,43 – 0,73,  $n_{\text{sykli}} = 5243$  ) (kuva 11), enemmän keskeytyviä raskauksia ( OR 2,65 , CI 95%: 1,33 – 5,30 ,  $n_{\text{raskauksia}} = 1899$  ) ja enemmän kohdun ulkopuolisia raskauksia ( OR 15,69, CI 95%: 2,87 – 85,76,  $n_{\text{raskauksia}} = 52$  ). (66.)

Aikaisemmin julkaistut meta-analyysit tukevat havaintoa tupakoinnin hedelmöityshoitojen tuloksia heikentävästä vaikutuksesta. Vuonna 1998 julkaistussa meta-analyysissä todetaan tupakoiville tehtävien IVF-hoitojen tuottavan vähemmän raskauksia kuin tupakoimattomilla ( OR 0,66, CI 95%: 0,49 – 0,88, ) (67). Vuonna 1997 julkaistussa, kahdeksan tutkimuksen aineistoon perustuvassa meta-analyysissä todetaan tupakoivien naisten tarvitsevan keskimäärin 1,79 – kertaa enemmän IVF-hoitosyklejä kuin tupakoimattomien tullakseen raskaaksi (CI 95% : 1,24 – 2,59,  $n = 2314$ ) (68).



Kuva 9 Riskisuhde kliinisesti todettavien raskauksen vähenemiselle tupakoivilla naisilla. Kahdeksantoista tutkimuksen aineisto, tupakoivia 236, tupakoimattomia 1303. Waylen et al. 2009, Human Reproduction Update, 15 (1), 31 – 44  
<http://humupd.oxfordjournals.org/content/15/1/31/F2.expansion.htm>

Neal et al vuonna 2005 julkaiseman tutkimuksen tarkoituksena oli vertailla hedelmöityshoitojen tuloksia aktiivisesti tupakoivien (MS, mainstream smoking), tupakoimattomien (NS, non-smoking) ja passiivisesti tupakoivien (SS, sidestream smoking) naisten välillä. Ryhmät jaettiin kyselylomakkeen vastausten perusteella. Passiivisesti tupakoivien naisten puoliset tupakoivat. Aktiivisesti ja passiivisesti tupakan savulle altistuneille siirretyt alkiot kiinnittyivät huonommin kohtuun ( implantation rate, MS 12,0 %, SS 12,6 %, NS 25,0 %,  $p < 0,01$  ) ja alkionsiirroista saatiin vähemmän kliinisesti todettavia raskauksia kuin tupakoimattomilla ( pregnancy rate per embryo, MS 19,4 % , SS 20,0 %, NS 48,3 %,  $p < 0,001$ ). (69.)

Ruotsalaisessa, vuonna 2006 julkaistussa tapaus-verroksi –tutkimuksessa havattiin passiivisesti ( OR 1,67 , CI 95%: 1,17 – 2,38) ja aktiivisesti tupakoivien ( OR 2,11, CI 95%: 1,36 – 3,27 ) naisten raskauksien keskeytyvän todennäköisemmin kuin tupakan savulle altistumattomien. Tulosten merkitsevyytensä (P-arvoja) ei julkaisussa mainita.

Tutkimuksen vahvuutena on tutkittavien jakaminen aktiivisesti tupakoiviin, passiivisesti tupakoiviin ja tupakoimattomiin plasman kotiniinipitoisuuden mukaan. Muiden nikotiinilähteiden kuin tupakan, kuten nuuskan tai nikotiinikorvausvalmisteiden käyttö kartoitettiin elintapakyselyssä ja niiden käyttö johti tutkimuksesta pois sulkemiseen. (70.)

#### 2.4.2 Miehen tupakoinin vaikutukset hedelmöityshoitojen tuloksiin

Luotettavaa ja hyvänlaatuista tutkimustietoa aiheesta on niukasti. Waylen et al vuonna 2009 julkaiseman meta-analyysin aineiston tutkimuksista vain yhdeksässä mainittiin puolison tupakointi. Kolmessa aineiston tutkimuksessa miehen tupakointi mainittiin tutkimuksen poissulkukriteerinä, kahdessa puolison tupakointi mainittiin ilman analyysiin tarvittavia lisätietoja. Yhden analyysin aineistona käytetyn tutkimuksen, vuonna 1991 julkaistun kongressiabstractin mukaan miesten tupakoinnilla ei näyttänyt olevan merkitsevää vaikutusta syntyvien lasten lukumääriin (71). Kolmessa tutkimuksessa havaittiin miehen tupakoinnilla tilastollisesti merkitseviä vaikutuksia hedelmällisyshoitojen tuloksiin (69,72,73).

Vuonna 1998 julkaistun tutkimuksen mukaan tupakoivan miehen ikääntyminen vähentää IVF-hoitojen todennäköisyyttä tuottaa vähintään 12 viikkoa kestävä raskaus (OR 0,976, CI 95% : 0,956 – 0,996,  $p < 0,0164$ ). Vastaavaa vaikutusta ei havaittu tupakoimattomilla miehillä. (72.) On merkillä pantavaa, että tupakoinnin vaikutus saattaa riippua miehen iästä.

Toisen, vuonna 2003 julkaistun tutkimuksen mukaan miehen tupakointi heikentää IVF-hoitojen hedelmöitymistuloksia ( $p = 0,03$ ) ja kliinisesti todettavien raskauksien määrää ( $p = 0,003$ ) myös ICSI-hoidossa ( $p = 0,002$ ). Tupakoivien miesten IVF-hoitojen todettiin epäonnistuvan todennäköisemmin kuin tupakoimattomien (OR 2,65, CI 95%: 1,33 – 5,33,  $p = 0,006$ ). Samanlainen vaikutus havaittiin myös ICSI-hoidoissa (OR 2,95, CI 95%: 1,32 – 6,59,  $p = 0,009$ ). (73.)

Uudempan, Waylen et al julkaiseman meta-analyysin aineistoon kuulumattomaan tutkimukseen osallistui 166 pariskuntaa. Tutkimus julkaistiin vuonna 2010. Naisosallistujat jaettiin tupakoiviin ja tupakoimattomiin seerumin ja follikkelinesteen kotiniinipitoisuuden ja miesosallistujat elintapoja kartoittavan kyselylomakkeen vastausten perusteella. Tupakoivien naisten ryhmän jäsenet olivat vanhempia kuin tupakoimattomien ( $35,12 \pm 0,66$  vuotta vs.  $33,17 \pm 0,30$  vuotta,  $p < 0,05$ ), mutta ryhmät eivät eronneet toisistaan



painoindeksin, lapsettomuuden tai induktiohoidon keston, FSH :n perustason, estradiolipitoisuuden tai kerättyjen munasolujen lukumäärän suhteen. Tutkimuksessa havaittiin, että miehen tupakointi sukusolujen keräämistä edeltävän viikon aikana vähentää todennäköisyyttä elävän lapsen syntymiseen ( OR 0,36 , CI 95%: 0,14 – 0,92 , p < 0,05) riippumatta naisen tupakoinnista. Naisen tupakoinnin vaikutusta elävän lapsen syntymiseen ei voitu luotettavasti todeta ( OR 2,29 , CI 95 %: 0,94 – 5,59, p > 0,05 ). (74.)

Turkkilaisen, vuonna 2014 julkaistun tutkimuksen tavoitteena oli selvittää miehen ja naisen tupakoinnin vaikutuksia ICSI-hoidon tuloksiin. Tutkittavat jaettiin siemen- tai follikkelinesteen kotiniipitoisuuden mukaan tupakoiviin (96 miestä ja 43 naista) ja tupakoimattomiin (118 miestä ja 171 naista). Naiset jaettiin myös kolmeen alaryhmään käytetyn ovulaatioinduktiomenetelmän mukaan; GnRH–agonisti (118 tupakoimatonta, 16 tupakoivaa), GnRH–antagonisti (27 tupakoimatonta, 12 tupakoivaa) ja muut menetelmät (26 tupakoimatonta, 15 tupakoivaa). Antagonistiryhmän tupakoimattomien naisten keski-ikä oli tilastollisesti merkitsevästi korkeampi kuin tupakoivien ( $32,8 \pm 5,4$  vuotta vs.  $27 \pm 3,9$  vuotta, p = 0,002). Silti antagonistiryhmän tupakoivilta naisilta kerättiin enemmän munasoluja kuin tupakoimattomilta ( $22,7 \pm 14,6$  kpl vs.  $8,2 \pm 8,1$  kpl ). Iän vaikutuksen havaittiin siis olevan tupakointia voimakkaampi. Hoitoihin ryhtyessä, edellä mainittuja seikkoja lukuun ottamatta, ryhmät eivät tilastollisesti eronneet toisistaan iän, painoindeksin, alkukierron hormonitasojen (FSH, LH ja E<sub>2</sub>) suhteen. Miehen tupakoinnilla ei havaittu tilastollisesti merkitsevää vaikutusta raskauden alkamiseen tupakoivan ( OR 1,44 , CI 95 %: 0,66 – 3,16, p = 0,363 ) tai tupakoimattoman ( OR 2,00 , CI 95%: 0,76 – 5,29 , p = 0,163 ) puolison kanssa. (28.)

Miehen tupakoinnin vaikutuksesta hedelmöityshoitojen tuloksiin on tehty vähän tutkimuksia verrattuna tutkimuksiin naisen tupakoinnin vaikutuksista. Useimmiten luokittelu tupakoiviin tai tupakoimattomiin tehdään miehen oman tai puolison ilmoituksen perusteella, mikä heikentää tulosten luotettavuutta. Myös muut elintavat ja ympäristön olosuhteet, kuten työperäinen altistuminen ympäristön saasteille voivat vaikuttaa tuloksiin. Vaikka tällä hetkellä tutkimusten perusteella saatava tieto on melko vähäistä ja osin ristiriitaistakin, on viitteitä siitä, että miehen tupakointi vaikuttaa heikentävästi hedelmöityshoitojen tuloksiin.

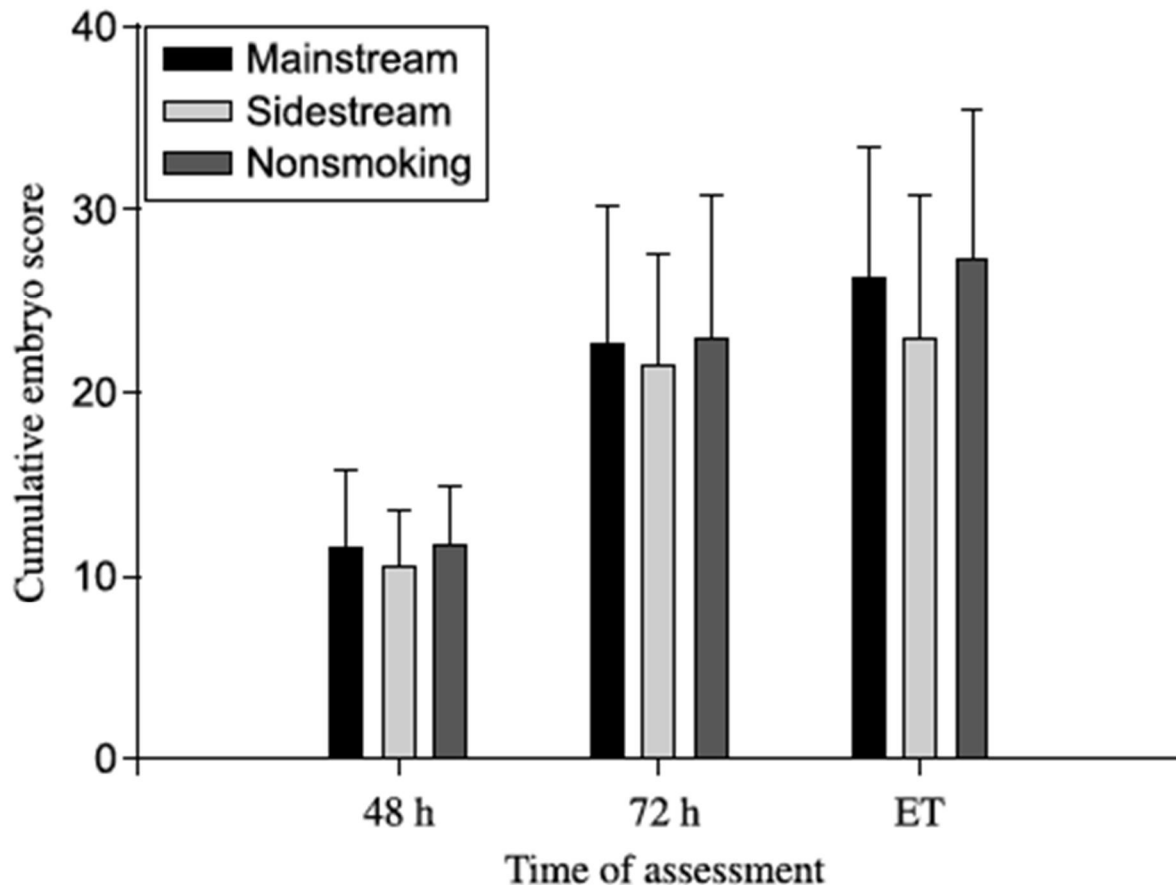
## 2.5. Tupakoinnin vaikutus alkionlaatuun

Australialaisessa, vuonna 1998 julkaistussa retrospektiivisessä tutkimuksessa ei havaittu miehen tupakoinnin merkitsevästi heikentävän alkion laatua. Tupakoivien miesten alkiot arvioitiin hieman tupakoimattomia parempilaatuisiksi, mutta ero ei ollut tilastollisesti merkittävä (  $p > 0,05$ ). Sen sijaan tupakoivien naisten havaittiin saavan vähemmän alkion laatua kuvaavia pisteitä kuin tupakoimattomien ( regressiokerroin 2,38 CI 95%: 0,68 – 4,09 ,  $p = 0,006$  ). (72.)

Tulosten luotettavuutta heikentää se, että jako tupakoiviin ja tupakoimattomiin perustui ensimmäisellä vastaanottokerralla täytetyn kyselylomakkeen vastauksiin, mikä ei luotettavasti kuvaa tupakointia ja päivittäisiä savukemääriä hoitohetkellä. Tupakointitottumukset selvitettiin ja kirjattiin potilasteksteihin 83,3 % :ssa hoitosykleistä. Lisäksi tupakoivien naisten ryhmän jäsenet olivat nuorempia kuin tupakoimattomien ryhmässä (  $33,1 \pm 4,7$  vuotta vs.  $34,6 \pm 4,7$  vuotta,  $p < 0,05$  ) (72). On myös mahdollista, että tupakoivan miehen puoliso altistuu passiivisesti tupakansavulle ja tulee väärin luokitelluksi tupakoimattomaksi.

Katsauksessa aiemmin kuvatussa Neal et al vuonna 2005 julkaisemassa tutkimuksessa ei havaittu tilastollisesti merkitseviä eroja alkion laadussa tupakoimattomien, aktiivisesti tai passiivisesti tupakoivien naisten ryhmien välillä (kuva 12). Alkion ulkonäköä ja kehitystä arvioitiin 48 tunnin, 72 tunnin kuluttua hedelmöityksestä ja siirtopäivänä. Alkiot pisteytettiin kumulatiivisesti CES :n ( cumulative embryo score ) periaatteiden mukaan. Kuten aiempaan katsauksessa kuvataan, tässä tutkimuksessa tupakoivien ja passiivisesti tupakoivien alkiot kiinnittyivät huonommin kohtuun ja synnytykseen johtavia raskauksia oli vähemmän kuin tupakoimattomilla. (69.)

Tämän retrospektiivisen tutkimuksen tuloksia heikentää mahdollinen luokitteluvirhe ryhmiin jaossa, sillä jako ei perustunut objektiivisesti todettavaan tupakan ainesosien metaboliittien pitoisuusmittaukseen plasmasta tai kudospainosta vaan tutkittavan ilmoitukseen omasta tai puolisonsa tupakoinnista. Lisäksi aktiivisesti tupakoivien naisten ryhmän puolisoista osa tupakoi ja osa oli tupakoimattomia.



Kuva 10 Aktiivisesti (musta pylväs) , passiivisesti tupakoivien (vaalean harmaa pylväs) ja tupakoimattomien (tumman harmaa pylväs) kumulatiiviset alkioipistemäärät 48, 72 tunnin kuluttua hedelmöityksestä ja alkionsiirtopäivänä (ET). Erot ryhmien välillä ovat tilastollisesti merkityksettömiä. Neal et al, 2005, Human Reproduction, 20 (9), 2531 – 5, <http://humrep.oxfordjournals.org.ezproxy.utu.fi:2048/content/20/9/2531.long>

Katsauksessa aikaisemmin kuvatussa, vuonna 2014 Cinar et al julkaisemassa tutkimuksessa ei havaittu miehen tai naisen aktiivisen tai passiivisen tupakoinnin vaikuttavan siirrettävän alkion laatuun (  $p = 0,281$  ). Eroa ei pidetty tilastollisesti merkitsevänä. Tupakoimattoman naisen ja tupakoimattoman miehen alkiot eivät olleet parempilaatuisia kuin tupakoimattoman naisen ja tupakoivan miehen (  $p = 0,281$  ). Naisen tupakoidessa miehen tupakoinnin ei havaittu vaikuttavan alkionlaatuun (  $p = 1,000$  ) (kuva 13). (28.)

Koska sekä miehet että naiset jaettiin tupakoiviin ja tupakoimattomiin siemen- ja follikkelinesteen kotiniinipitoisuuden perusteella, on tutkimuksen luokitteluvirhe pieni. Tutkijat myös huomattavat, että viljelymaljalla kehittyvät alkiot eivät altistu tupakan aineenvaihduntatuotteille, toisin kuin tupakoivan naisen kehossa (28).

		MALE	
		Nonsmoker (Mean ±SD)	Smoker (Mean ±SD)
Female	Nonsmoker		
	Fertilization rate	0.55 ± 0.25	0.56 ± 0.29
	Transferred Embryo Score	3.8 ± 0.8	3.6 ± 0.9
	Pregnancy rate (n; %)	23/69; %33	18/43; %42
Smoker	Fertilization rate	0.50 ± 0.27	0.52 ± 0.23
	Transferred Embryo Score	3.9 ± 0.9	3.9 ± 0.9
	Pregnancy rate (n; %)	6/16; %38	11/22; %50

\*  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

Kuva 11 Tupakoinnin ei havaittu vaikuttavan tilastollisesti merkittävästi siirrettyjen alkoiden laatuun. Alkiot luokiteltiin luokkiin 1 – 5, joista luokat 1 ja 2 alkiot ovat laadultaan parhaita. Luvut ovat keskiarvoja, keskipoikkeama ilmoitettu. Cinar et al, 2014, European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology, 174 (1), 106 – 110  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24424210>

### 3. POHDINTA

Koska tupakan savulle altistumisen tiedetään olevan haitallista, satunnaistettujen tutkimusten sijaan tieto tupakan vaikutuksesta lisääntymisterveyteen tai alkiokehitykseen perustuu havainnoiviin tutkimusmenetelmiin. Olisi epäeettistä asettaa tutkittavat ihmiset tai ihmisalkiot kokeelliseen tutkimusasetelmaan, jossa osalle tiedettäisiin aiheutettavan haittaa. Toisaalta, myös muunlaisiin ihmisalkioilla tehtäviin kokeellisiin tutkimusasetelmiin liittyy eettisiä kysymyksiä. Tällä hetkellä suurimmat puutteet tutkimuksissa miehen tupakoinnin vaikutuksista alkionlaatuun liittyvät keskeisen muuttujan, tupakoinnin vakioitiin tutkittavissa. Tupakan ainesosien metaboliittien pitoisuuden kudoksissa on luotettavasti todettu olevan yhteydessä tupakan savulle altistumiseen, joten tulevien tutkimusten tulosten luotettavuuden parantamiseksi on olemassa keinoja tältä osin.

Osa savukkeiden sisältämistä aineista, kuten erilaiset polysykliset aromaattiset hiiliyhdisteet on todettu DNA :ta vaurioittaviksi (75). Mieheen liittyvien tekijöiden on todettu vaikuttavan alkionkehitykseen jo varhaisvaiheessa, ennen alkion oman geenitoiminnan aktivoitumista (76,77). Hedelmöityshoidot tarjoavat mahdollisuuden tutkia alkionkehitystä ja siihen vaikuttavia tekijöitä *in vitro*. Tällä hetkellä miehen tupakoinnin vaikutuksesta alkion laatuun ei ole riittävästi näyttöä tiukkojen johtopäätösten tekemiseksi. Tunnistamalla alkionlaatuun vaikuttavia tekijöitä on mahdollista valita kohtuun siirrettäväksi mahdollisimman laadukkaita alkioita, jotka tuottavat hyviä raskaustuloksia ja synnytyksiä.

Tupakointi heikentää monella eri mekanismilla miehen hedelmällisyyttä ja lisääntymisterveyttä. Tupakointi lisää erektiohäiriöiden todennäköisyyttä, mikä voi lisätä lapsettomuusriskiä, aiheuttaa psykologista kuormitusta ja parisuhderistiriitoja. Miehen heikentyneen hedelmällisyyden tutkimusmenetelmiin on perinteisen siemennesteanalyysien rinnalle noussut siittiöiden DNA-analytiikka, jonka mahdollisuuksia ja sovellettavuutta lapsettomuushoitoihin tulee kartoittaa lisää. On mahdollista, että useat ympäristö- ja elintavoista johtuvat tekijät tupakoinnin ohella vaikuttavat kudosten DNA-vaurioihin ja vaikuttavat tutkimustuloksiin. Perintöainekseltaan muusta elimistöstä poikkeavat itusolut ovat siemennesteessä kehon ulkopuolella elimistön homeostaasia ylläpitävien mekanismien ulottumattomissa ja siten ainutlaatuinen tutkimuskohde ympäristötekijöiden vaikutuksista solujen toimintaan.

Tupakoinnin haitallisen vaikutuksen on muutaman retrospektiivisen tutkimuksen perusteella havaittu liittyvän miehen ikään siten, että haitat korostuvat vanhenemisen myötä. On mahdollista, että haittojen korostuminen johtuu lisääntyneistä askivuosista eli kokonaisaltistuksen kasvamisesta. Toisaalta, on myös mahdollista, että iän lisääntymisen myötä elimistön kyky kompensoida tupakan aineosien aiheuttamaa taakkaa hedelmällisyydelle heikkenee. Tupakalle altistumista on mahdollista seurata esimerkiksi kotiniinin plasmapitoisuuden avulla, sillä sen pitoisuuden on todettu riippuvan tupakoinnin määrästä. Tupakoinnin miehen hedelmällisyydelle aiheuttaman haitan annos-vaste –suhteen määrittämiseksi tarvitaan prospektiivisiä seurantatutkimuksia, joissa plasman kotiniinipitoisuuksia seurataan säännöllisesti. Kun tiedetään miehen hedelmällisyyttä heikentävän kokonaisaltistuksen määrä, on mahdollista suunnata riskiryhmille lapsettomuutta ennaltaehkäiseviä toimenpiteitä esimerkiksi työterveys- tai asevelvollisuustarkastusten yhteydessä.

Tupakoinnilla on haitallinen vaikutus hedelmällisyyteen ja lapsettomuushoitojen tuloksiin. Lapsettomuuspotilaiden kanssa kliinistä työtä tekevän lääkärin tulee tiedustella tupakointia potilaalta, koska haastattelemalla saatu tieto tupakoinnista on luotettavampaa kuin kyselylomakkeilla saatu. Myös lapsettomuudesta kärsivän parin mieheltä tulee kysyä tupakoinnista, erityisesti jos miehen ikä lähenee keski-ikää. Tupakoivia tulee tukea tupakoinnin lopettamisessa. Potilasta haastattelemalla lääkärin on myös mahdollista tunnistaa muutosvalmiuden vaihe. Muutosvaihemallin eri portailta olevat hyötyvät erilaisesta ohjauksesta. Myös aikaisemmasta tupakointitavasta on hyvä kysyä, sillä

lapsettomuuden aiheuttama psyykkinen kuormitus voi saada tupakoimattoman palaamaan haitalliseen tapansa.

#### 4. YHTEENVETO

Tupakoinnin on havaittu lisäävän erektiohäiriöitä ja heikentävän siemennesteen laatua. On myös viitteitä siitä, että tupakointi lisää DNA-vaurioita, mutta näyttö on ristiriitaista ja sen kliininen merkitys on vielä epäselvä. Tupakoinnin haitallinen vaikutus miehen hedelmällisyyteen saattaa korostua ikääntymisen myötä. Miehen tupakointi mahdollisesti heikentää lapsettomuushoitojen tuloksia, mutta tutkimuksia on vähän ja niiden laatu on puutteellista verrattuna tutkimuksiin naisen tupakoinnin vaikutuksesta. Miehen tupakoinnin ei ole tutkimuksissa havaittu vaikuttavan alkion laatuun. Hyvälaatuisia tutkimuksia aiheesta on kuitenkin vähän.

<b>Ydinasiat</b>
<b>Tupakointi lisää erektiohäiriöitä ja heikentää siemennesteen laatua.</b>
<b>Tupakointi saattaa lisätä siittiöiden DNA-vaurioita.</b>
<b>Miehen tupakointi saattaa heikentää lapsettomuushoitojen tuloksia</b>
<b>Miehen tupakoinnin ei ole havaittu vaikuttavan alkion laatuun, mutta asia vaatii lisää hyvinlaatuisia tutkimuksia.</b>
<b>Lääkärin tulee ottaa aktiivisesti puheeksi myös miehen tupakointi lapsettomuudesta kärsiviä pareja hoitaessaan, erityisesti jos mies lähenee keski-ikä.</b>

## LÄHTEET

1. Ylikorkala O, Tapanainen J. Naistentaudit ja synnytykset. Kustannus OY Duodecim; 2011.
2. Miettinen A, Rotkirch A, Ivett S, Tanturri M-L, Donno A. Increasing childlessness in Europe: time trends and country differences [Internet]. 2014 [cited 2014 Dec 20]. Report No.: 5. Available from: [http://vaestoliitto-fi-bin.directo.fi/@Bin/1f8237db4d6243b99c80de436f5576fe/1419082858/application/pdf/3746805/Working paper 5\\_Increasing Childlessness in Europe\\_1.pdf](http://vaestoliitto-fi-bin.directo.fi/@Bin/1f8237db4d6243b99c80de436f5576fe/1419082858/application/pdf/3746805/Working%20paper%205_Increasing%20Childlessness%20in%20Europe_1.pdf)
3. THL. Hedelmöityshoidot 2012–2013, 1798-0887; Tilastoraportti, 2014 [Internet]. Hedelmöityshoidot 2012-2013. 2014 [cited 2014 Dec 22]. Available from: <http://urn.fi/URN:NBN:fi-fe2014052726022>
4. THL. Syntyneiden lasten rekisteri 2012. 2013.
5. Tiitinen A. Lapsettomuuden hoidon valinta. Duodecim. 2002;118:517–21.
6. Härkki P, Heikinheimo O, Tiitinen A. Endometriosis ja lapsettomuus – mitkä tekijät vaikuttavat hoidon valintaan? Suom Lääkäril. 2015;(5/2015):221–6.
7. Morin-Papunen L, Koivunen R. Hedelmättömyyden hoidot - osa I. Lääketieteellinen Aikakauskirja Duodecim; 2012. p. 2012;128(14):1478–85.
8. Gupta S, Goldberg JM, Aziz N, Goldberg E, Krajcir N, Agarwal A. Pathogenic mechanisms in endometriosis-associated infertility. Fertil Steril [Internet]. 2008 Aug [cited 2015 Feb 5];90(2):247–57. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18672121>
9. WHO D of reproductive health. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, 5. painos [Internet]. 2010. Available from: [http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241547789\\_eng.pdf?ua=1](http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241547789_eng.pdf?ua=1)
10. Kaukoranta S, Suikkari A. Miehestä johtuva tahaton lapsettomuus. Suom Lääkäril. 2012;
11. Morin-Papunen L, Koivunen R. Hedelmättömyyden hoidot - osa II. Lääketieteellinen Aikakauskirja Duodecim; 2012. p. 2012;128(15):1568–75.
12. Taari K, Aaltomaa S, Nurmi M, Parpala T, Tammela T. Urologia. 3. painos. Kustannus OY Duodecim; 2013.
13. Wong EWP, Cheng CY. Impacts of environmental toxicants on male reproductive dysfunction. Trends Pharmacol Sci [Internet]. 2011 May [cited 2015 Jan 31];32(5):290–9. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3090518&tool=pmcentrez&render type=abstract>
14. Homan GF, Davies M, Norman R. The impact of lifestyle factors on reproductive performance in the general population and those undergoing infertility treatment: a review. Hum Reprod Update [Internet]. 2007 Jan [cited 2014 Dec 22];13(3):209–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17208948>

15. Sharma R, Biedenharn KR, Fedor JM, Agarwal A. Lifestyle factors and reproductive health: taking control of your fertility. *Reprod Biol Endocrinol* [Internet]. 2013 Jan [cited 2015 Feb 6];11:66. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3717046&tool=pmcentrez&render type=abstract>
16. Anderson K, Nisenblatt V, Norman R. Lifestyle factors in people seeking infertility treatment - A review. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* [Internet]. 2010 Feb [cited 2015 Feb 6];50(1):8–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20218991>
17. Van Noord-Zaadstra BM, Looman CW, Alsbach H, Habbema JD, te Velde ER, Karbaat J. Delaying childbearing: effect of age on fecundity and outcome of pregnancy. *BMJ* [Internet]. 1991 Jun 8 [cited 2015 Feb 9];302(6789):1361–5. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1670055&tool=pmcentrez&render type=abstract>
18. Matorras R, Matorras F, Expósito A, Martínez L, Crisol L. Decline in human fertility rates with male age: a consequence of a decrease in male fecundity with aging? *Gynecol Obstet Invest* [Internet]. 2011 Jan [cited 2015 Feb 9];71(4):229–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21160151>
19. Levitas E, Lunenfeld E, Weisz N, Friger M, Potashnik G. Relationship between age and semen parameters in men with normal sperm concentration: analysis of 6022 semen samples. *Andrologia* [Internet]. 2007 Apr [cited 2015 Feb 4];39(2):45–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17430422>
20. Sermondade N, Faure C, Fezeu L, Shayeb AG, Bonde JP, Jensen TK, et al. BMI in relation to sperm count: an updated systematic review and collaborative meta-analysis. *Hum Reprod Update* [Internet]. 2013 Jan 1 [cited 2015 Feb 7];19(3):221–31. Available from: <http://humupd.oxfordjournals.org/content/19/3/221.long>
21. Vaamonde D, Da Silva-Grigoletto ME, García-Manso JM, Vaamonde-Lemos R, Swanson RJ, Oehninger SC. Response of semen parameters to three training modalities. *Fertil Steril* [Internet]. 2009 Dec [cited 2015 Feb 7];92(6):1941–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19013565>
22. Safarinejad MR, Azma K, Kolahi AA. The effects of intensive, long-term treadmill running on reproductive hormones, hypothalamus-pituitary-testis axis, and semen quality: a randomized controlled study. *J Endocrinol* [Internet]. 2009 Mar [cited 2015 Feb 7];200(3):259–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19066291>
23. Barazani Y, Katz BF, Nagler HM, Stember DS. Lifestyle, environment, and male reproductive health. *Urol Clin North Am* [Internet]. 2014 Feb [cited 2015 Feb 7];41(1):55–66. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0094014313000943>
24. Redman LM. Physical activity and its effects on reproduction. *Reprod Biomed Online* [Internet]. 2006 May [cited 2015 Feb 7];12(5):579–86. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16790101>
25. Eggert J, Theobald H, Engfeldt P. Effects of alcohol consumption on female fertility during an 18-year period. *Fertil Steril* [Internet]. 2004 Feb [cited 2015 Feb 8];81(2):379–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14967377>



26. Helldán A, Helakorpi S, Virtanen S, Uutela A. Suomalaisen aikuisväestön terveyskäyttäytyminen ja terveys, kevät 2013. 2013.
27. Dechanet C, Anahory T, Mathieu Daude JC, Quantin X, Reyftmann L, Hamamah S, et al. Effects of cigarette smoking on reproduction. *Hum Reprod Update* [Internet]. 2011 [cited 2014 Oct 1];17(1):76–95. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20685716>
28. Cinar O, Dilbaz S, Terzioglu F, Karahalil B, Yücel C, Turk R, et al. Does cigarette smoking really have detrimental effects on outcomes of IVF? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* [Internet]. 2014 Mar [cited 2014 Dec 17];174(1):106–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24424210>
29. Zenzes MT, Krishnan S, Krishnan B, Zhang H, Casper RF. Cadmium accumulation in follicular fluid of women in in vitro fertilization-embryo transfer is higher in smokers. *Fertil Steril* [Internet]. 1995 Oct [cited 2015 Jan 31];64(3):599–603. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7641916>
30. Zenzes MT, Reed TE, Wang P, Klein J. Cotinine, a major metabolite of nicotine, is detectable in follicular fluids of passive smokers in in vitro fertilization therapy. *Fertil Steril* [Internet]. 1996 Oct [cited 2015 Feb 8];66(4):614–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8816626>
31. Zenzes MT, Puy LA, Bielecki R. Immunodetection of benzo[a]pyrene adducts in ovarian cells of women exposed to cigarette smoke. *Mol Hum Reprod* [Internet]. 1998 Feb [cited 2015 Feb 8];4(2):159–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9542974>
32. Neal MS, Zhu J, Foster WG. Quantification of benzo[a]pyrene and other PAHs in the serum and follicular fluid of smokers versus non-smokers. *Reprod Toxicol* [Internet]. 2008 Jan [cited 2015 Feb 9];25(1):100–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18065195>
33. Shaham J, Meltzer A, Ashkenazi R, Ribak J. Biological monitoring of exposure to cadmium, a human carcinogen, as a result of active and passive smoking. *J Occup Environ Med* [Internet]. 1996 Dec [cited 2015 Feb 9];38(12):1220–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8978513>
34. Keck C. Lack of correlation between cadmium in seminal plasma and fertility status of nonexposed individuals and two cadmium-exposed patients. *Reprod Toxicol* [Internet]. 1995 Feb [cited 2015 Feb 9];9(1):35–40. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/089062389400053Y>
35. Wong WY, Thomas CM., Merkus HMW., Zielhuis GA, Doesburg WH, Steegers-Theunissen RP. Cigarette smoking and the risk of male factor subfertility: minor association between cotinine in seminal plasma and semen morphology. *Fertil Steril* [Internet]. 2000 Nov [cited 2015 Feb 9];74(5):930–5. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0015028200015673>
36. Neal MS, Zhu J, Holloway AC, Foster WG. Follicle growth is inhibited by benzo-[a]-pyrene, at concentrations representative of human exposure, in an isolated rat follicle culture assay. *Hum Reprod* [Internet]. 2007 Apr [cited 2015 Feb 9];22(4):961–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17218370>
37. Patrick DL, Cheadle A, Thompson DC, Diehr P, Koepsell T, Kinne S. The validity of self-reported smoking: a review and meta-analysis. *Am J Public Health* [Internet]. 1994 Jul [cited

2015 Jan 30];84(7):1086–93. Available from:  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1614767&tool=pmcentrez&render type=abstract>

38. Xie Y, Garban H, Ng C, Rajfer J, Gonzalez-Cadavid NF. Effect of long-term passive smoking on erectile function and penile nitric oxide synthase in the rat. *J Urol* [Internet]. 1997 Mar [cited 2015 Feb 12];157(3):1121–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9072555>
39. Celermajer DS, Sorensen KE, Georgakopoulos D, Bull C, Thomas O, Robinson J, et al. Cigarette smoking is associated with dose-related and potentially reversible impairment of endothelium-dependent dilation in healthy young adults. *Circulation* [Internet]. 1993 Nov [cited 2015 Feb 12];88(5 Pt 1):2149–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8222109>
40. Butler R, Morris AD, Struthers AD. Cigarette smoking in men and vascular responsiveness. *Br J Clin Pharmacol* [Internet]. 2001 Dec 20 [cited 2015 Feb 12];52(2):145–9. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.0306-5251.2001.01434.x>
41. Orosz Z, Csiszar A, Labinsky N, Smith K, Kaminski PM, Ferdinandy P, et al. Cigarette smoke-induced proinflammatory alterations in the endothelial phenotype: role of NAD(P)H oxidase activation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* [Internet]. 2007 Jan [cited 2015 Feb 12];292(1):H130–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17213480>
42. Kovac JR, Labbate C, Ramasamy R, Tang D, Lipshultz LI. Effects of cigarette smoking on erectile dysfunction. *Andrologia* [Internet]. 2014 Dec 29 [cited 2015 Feb 12]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25557907>
43. Li Y, Lin H, Li Y, Cao J. Association between socio-psycho-behavioral factors and male semen quality: systematic review and meta-analyses. *Fertil Steril* [Internet]. 2011 Jan [cited 2015 Feb 10];95(1):116–23. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0015028210009842>
44. VINE MF. Smoking and male reproduction: a review. *Int J Androl* [Internet]. 1996 Dec [cited 2015 Feb 10];19(6):323–37. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2605.1996.tb00523.x>
45. Alvarez C, Castilla JA, Martínez L, Ramírez JP, Vergara F, Gaforio JJ. Biological variation of seminal parameters in healthy subjects. *Hum Reprod* [Internet]. 2003 Oct [cited 2015 Feb 11];18(10):2082–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14507825>
46. Lotti F, Corona G, Vitale P, Maseroli E, Rossi M, Fino MG, et al. Current smoking is associated with lower seminal vesicles and ejaculate volume, despite higher testosterone levels, in male subjects of infertile couples. *Hum Reprod* [Internet]. 2015 Mar [cited 2015 Mar 1];30(3):590–602. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25567620>
47. Mostafa T. Cigarette smoking and male infertility. *J Adv Res* [Internet]. 2010 Jul [cited 2015 Jan 31];1(3):179–86. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2090123210000585>
48. Saleh RA, Agarwal A, Sharma RK, Nelson DR, Thomas AJ. Effect of cigarette smoking on levels of seminal oxidative stress in infertile men: a prospective study. *Fertil Steril* [Internet]. 2002 Sep [cited 2015 Feb 12];78(3):491–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12215323>

49. Makker K, Agarwal A, Sharma R. Oxidative stress & male infertility. *Indian J Med Res* [Internet]. 2009 Apr [cited 2015 Feb 13];129(4):357–67. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19535829>
50. Chohan KR, Badawy SZA. Cigarette smoking impairs sperm bioenergetics. *Int braz j urol* [Internet]. Sociedade Brasileira de Urologia; 2010 Feb [cited 2015 Feb 12];36(1):60–5. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1677-55382010000100010&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1677-55382010000100010&lng=en&nrm=iso&tlng=en)
51. Smit M, Dohle GR, Hop WCJ, Wildhagen MF, Weber RFA, Romijn JC. Clinical correlates of the biological variation of sperm DNA fragmentation in infertile men attending an andrology outpatient clinic. *Int J Androl* [Internet]. 2007 Feb [cited 2015 Feb 11];30(1):48–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17163955>
52. Simon L, Brunborg G, Stevenson M, Lutton D, McManus J, Lewis SEM. Clinical significance of sperm DNA damage in assisted reproduction outcome. *Hum Reprod* [Internet]. 2010 Jul [cited 2015 Feb 12];25(7):1594–608. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20447937>
53. Taha EA, Ez-Aldin AM, Sayed SK, Ghandour NM, Mostafa T. Effect of smoking on sperm vitality, DNA integrity, seminal oxidative stress, zinc in fertile men. *Urology* [Internet]. 2012 Oct [cited 2015 Feb 12];80(4):822–5. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0090429512007686>
54. Koskimies AI, Savander M, Nordström A-M, Kurunmäki H. Siittiöiden DNA:n vauriot ja miehen hedelmättömyys (24/10) - Duodecim [Internet]. Lääketieteellinen Aikakauskirja Duodecim. 2010 [cited 2015 Feb 5]. Available from: [http://www.terveysportti.fi/dtk/ltk/avaa?p\\_artikkeli=duo99243](http://www.terveysportti.fi/dtk/ltk/avaa?p_artikkeli=duo99243)
55. Evenson DP. Sperm chromatin structure assay (SCSA®). *Methods Mol Biol* [Internet]. 2013 Jan [cited 2015 Feb 11];927:147–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22992911>
56. Aitken RJ, Baker MA, De Iuliis GN, Nixon B. New insights into sperm physiology and pathology. *Handb Exp Pharmacol* [Internet]. 2010 Jan [cited 2015 Feb 12];(198):99–115. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20839089>
57. Jones R, Mann T, Sherins R. Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa, spermicidal properties of fatty acid peroxides, and protective action of seminal plasma. *Fertil Steril* [Internet]. 1979 May [cited 2015 Feb 23];31(5):531–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/446777>
58. Alvarez JG, Storey BT. Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation. *Gamete Res* [Internet]. 1989 May [cited 2015 Feb 23];23(1):77–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2545584>
59. Aitken J, Fisher H. Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. *Bioessays* [Internet]. 1994 Apr [cited 2015 Feb 23];16(4):259–67. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8031303>
60. Agarwal A, Makker K, Sharma R. Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update. *Am J Reprod Immunol* [Internet]. 2008 Jan [cited 2015 Feb 23];59(1):2–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18154591>

61. Hamad MF, Shelko N, Kartarius S, Montenarh M, Hammadeh ME. Impact of cigarette smoking on histone (H2B) to protamine ratio in human spermatozoa and its relation to sperm parameters. *Andrology* [Internet]. 2014 Sep [cited 2015 Feb 13];2(5):666–77. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25044670>
62. La Maestra S, De Flora S, Micale RT. Effect of cigarette smoke on DNA damage, oxidative stress, and morphological alterations in mouse testis and spermatozoa. *Int J Hyg Environ Health* [Internet]. 2015 Jan [cited 2015 Feb 11];218(1):117–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25260855>
63. De Bantel A, Fleury-Feith J, Poirot C, Berthaut I, Garcin C, Landais P, et al. Simultaneous vitality and DNA-fragmentation measurement in spermatozoa of smokers and non-smokers. *Cytometry B Clin Cytom* [Internet]. 2014 Sep 13 [cited 2015 Feb 11]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25220539>
64. Anifandis G, Bounartzi T, Messini CI, Dafopoulos K, Sotiriou S, Messinis IE. The impact of cigarette smoking and alcohol consumption on sperm parameters and sperm DNA fragmentation (SDF) measured by Halosperm(®). *Arch Gynecol Obstet* [Internet]. 2014 Oct [cited 2015 Feb 11];290(4):777–82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24840110>
65. Bojar I, Witczak M, Wdowiak A. Biological and environmental conditionings for a sperm DNA fragmentation. *Ann Agric Environ Med* [Internet]. 2013 Jan [cited 2015 Feb 11];20(4):865–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24364470>
66. Waylen a L, Metwally M, Jones GL, Wilkinson a J, Ledger WL. Effects of cigarette smoking upon clinical outcomes of assisted reproduction: a meta-analysis. *Hum Reprod Update* [Internet]. 2009 [cited 2014 Oct 22];15(1):31–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18927070>
67. Augood C, Duckitt K, Templeton AA. Smoking and female infertility: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod* [Internet]. 1998 Jun 1 [cited 2015 Jan 30];13(6):1532–9. Available from: [http://humrep.oxfordjournals.org/content/13/6/1532.abstract?ijkey=9bbb7eb75eaa01258d4cb08858091f9351812f49&keytype2=tf\\_ipsecsha](http://humrep.oxfordjournals.org/content/13/6/1532.abstract?ijkey=9bbb7eb75eaa01258d4cb08858091f9351812f49&keytype2=tf_ipsecsha)
68. Feichtinger W, Papalambrou K, Poehl M, Krischker U, Neumann K. Smoking and in vitro fertilization: a meta-analysis. *J Assist Reprod Genet* [Internet]. 1997 Nov [cited 2015 Jan 30];14(10):596–9. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3454733&tool=pmcentrez&render type=abstract>
69. Neal MS, Hughes EG, Holloway AC, Foster WG. Sidestream smoking is equally as damaging as mainstream smoking on IVF outcomes. *Hum Reprod* [Internet]. 2005 Sep [cited 2014 Oct 22];20(9):2531–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15919779>
70. George L, Granath F, Johansson AL V, Annerén G, Cnattingius S. Environmental tobacco smoke and risk of spontaneous abortion. *Epidemiology* [Internet]. 2006 Sep [cited 2015 Feb 27];17(5):500–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16837826>
71. Pattinson HA, Taylor PJ, Pattinson MH. The effect of cigarette smoking on ovarian function and early pregnancy outcome of in vitro fertilization treatment. *Fertil Steril* [Internet]. 1991

Apr [cited 2015 Feb 20];55(4):780–3. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2010004>

72. Joesbury KA, Edirisinghe WR, Phillips MR, Yovich JL. Evidence that male smoking affects the likelihood of a pregnancy following IVF treatment: application of the modified cumulative embryo score. *Hum Reprod* [Internet]. 1998 Jun 1 [cited 2015 Jan 30];13(6):1506–13. Available from:  
[http://humrep.oxfordjournals.org/content/13/6/1506.abstract?ijkey=365afad954a5acfdde224f89d74d91fa7c2291cb6&keytype=tf\\_ipsecsha](http://humrep.oxfordjournals.org/content/13/6/1506.abstract?ijkey=365afad954a5acfdde224f89d74d91fa7c2291cb6&keytype=tf_ipsecsha)
73. Zitzmann M, Rolf C, Nordhoff V, Schröder G, Rickert-Föhring M, Gassner P, et al. Male smokers have a decreased success rate for in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* [Internet]. 2003 Jun [cited 2014 Oct 27];79(June):1550–4. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S001502820300339X>
74. Fuentes A, Muñoz A, Barnhart K, Argüello B, Díaz M, Pommer R. Recent cigarette smoking and assisted reproductive technologies outcome. *Fertil Steril* [Internet]. 2010 Jan [cited 2014 Oct 22];93(1):89–95. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18973890>
75. Rubin H. Synergistic mechanisms in carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons and by tobacco smoke: a bio-historical perspective with updates. *Carcinogenesis* [Internet]. 2001 Dec 1 [cited 2015 Feb 23];22(12):1903–30. Available from:  
<http://carcin.oxfordjournals.org/content/22/12/1903.abstract>
76. Tesarik J. Paternal effects acting during the first cell cycle of human preimplantation development after ICSI. *Hum Reprod* [Internet]. 2002 Jan 1 [cited 2015 Feb 21];17(1):184–9. Available from: <http://humrep.oxfordjournals.org.ezproxy.utu.fi:2048/content/17/1/184.long>
77. Braude P, Bolton V, Moore S. Human gene expression first occurs between the four- and eight-cell stages of preimplantation development. *Nature* [Internet]. 1988 Mar 31 [cited 2015 Feb 14];332(6163):459–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3352746>