



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

Διευθυντής : ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ Ι. ΔΑΠΟΝΤΕ, Καθηγητής

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Διευθυντής: Καθηγητής ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΒΑΜΒΑΚΟΠΟΥΛΟΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ»

Διευθυντής ΠΜΣ : ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ Ι. ΔΑΠΟΝΤΕ, Καθηγητής

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Επίδραση της χορήγησης συγκεντρώσεων
1nM και 10nM βιταμίνης D
στην κινητικότητα δειγμάτων σπέρματος»

Σελιώνη Έλενα
Βιολόγος

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των
απαιτήσεων για την απόκτηση του
Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης

ΛΑΡΙΣΑ

Οκτώβριος 2017

Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Εξεταστικής Επιτροπής:

**1^{ος} Εξεταστής
(Επιβλέπων)**

Γεώργιος – Σπυρίδων Ανυφαντής
Επίκουρος Καθηγητής Εμβρυολογίας
Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

2^{ος} Εξεταστής

Ανάργυρος Μουλάς
Καθηγητής
Κοσμήτορας Σχολής Τεχνολογίας Γεωπονίας
και Τεχνολογίας Τροφίμων και Διατροφής
Τ.Ε.Ι. Θεσσαλίας

3^{ος} Εξεταστής

Χριστίνα Μεσσήνη
Λέκτορας Μαιευτικής και Γυναικολογίας
Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Με την ολοκλήρωση της εργασίας αυτής επισήμως φθάνω στην απόκτηση του μεταπτυχιακού τίτλου σπουδών «Βιολογία της Αναπαραγωγής» από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και νιώθω την ανάγκη να ευχαριστήσω τους ανθρώπους που συντέλεσαν στο γεγονός αυτό. Με ιδιαίτερη εκτίμηση θα ήθελα να ευχαριστήσω τον διευθυντή του μεταπτυχιακού προγράμματος, τον καθηγητή Αλέξανδρο Δαπόντε για την ευκαιρία που προσέφερε να εμβαθύνω τις γνώσεις μου στον τομέα της ανθρώπινης αναπαραγωγής.

Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερος θερμά τον επιβλέποντα μου, κύριο Γεώργιο – Σπυρίδωνα Ανυφαντή για την εμπιστοσύνη του και πολύτιμη καθοδήγησή του καθ' όλη την διάρκεια της διπλωματικής εργασίας αλλά και κατά την πρακτική άσκηση στη μονάδα υποβοηθούμενης αναπαραγωγής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας. Ακόμη, θα ήθελα να εκφράσω την βαθιά ευγνωμοσύνη μου στον κύριο Ανάργυρο Μουλά, καθηγητή Σχολής Τεχνολογίας Γεωπονίας και Τεχνολογίας Τροφίμων και Διατροφής του Τ.Ε.Ι. Θεσσαλίας και την διδάκτορα Μαρία Βαΐου για την άψογη συνεργασία και την πολύτιμη βοήθειά του για την αποπεράτωση των πειραμάτων. Ευχαριστώ επίσης την κυρία Χριστίνα Μεσσήνη για την μετάδοση των γνώσεων κατά τις διαλέξεις του μεταπτυχιακού προγράμματος αλλά και κατά την πρακτική άσκηση στην μονάδα υποβοηθούμενης αναπαραγωγής.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τις συναδέλφους και συνεργάτιδες Βασιλική Γκαμπλιά, Άννα Μαρία Δρίβα και Κωνσταντία Καλτσουνάκη για το πνεύμα αλληλοσυνεργασίας και βοήθειας που υπήρχε καθ' όλη την διάρκεια των πειραμάτων.

Πέραν του πανεπιστημίου, θα ήθελα να ευχαριστήσω από το οικογενειακό μου περιβάλλον, τους γονείς μου και τον θείο μου που με στήριξαν με κάθε δυνατό τρόπο στην ολοκλήρωση των μεταπτυχιακών μου σπουδών.

“...I dream of painting and then I paint my dream.. ”

Vincent Van Gogh

«Βιολογία της Αναπαραγωγής»

Σελιώνη Έλενα

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Ιατρικής, 2017

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ Ι. ΔΑΠΟΝΤΕ

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΜΑΙΕΥΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- Επιβλέπων:** **Γεώργιος – Σπυρίδων Ανυφαντής**
Επίκουρος Καθηγητής Εμβρυολογίας
Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- Σύμβουλος :** **Ανάργυρος Μουλάς**
Καθηγητής
Κοσμήτορας Σχολής Τεχνολογίας Γεωπονίας
και Τεχνολογίας Τροφίμων και Διατροφής
Τ.Ε.Ι. Θεσσαλίας
- Μέλος :** **Χριστίνα Μεσσήνη**
Λέκτορας Μαιευτικής και Γυναικολογίας
Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Περίληψη

Είναι γνωστό ότι η βιταμίνη D δρα και στο ανδρικό αναπαραγωγικό σύστημα και έχουν γίνει πολλές έρευνες τόσο σε ζωικά μοντέλα όσο και στον άνθρωπο που πιστοποιούν την σχέση μεταξύ της βιταμίνης D και της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων. Προκειμένου να μελετηθεί αυτή η συσχέτιση, επιχειρήσαμε να χορηγήσουμε *in vitro* βιταμίνη D, συγκεκριμένα τον ενεργό μεταβολίτη της στον ανθρώπινο οργανισμό, την 1,25-βιταμίνη D, σε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις 1nM και 10nM σε 18 δείγματα σπερματοζωαρίων και στη συνέχεια να μετρήσουμε την κινητικότητά τους ανά τακτά χρονικά διαστήματα. Έγινε στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων των μετρήσεων κινητικότητας και για τις δύο συγκεντρώσεις και για κάθε χρονική στιγμή και δεν φάνηκε να υπάρχει κάποια σημαντική συσχέτιση μεταξύ των συγκεκριμένων συγκεντρώσεων και της επίδρασής τους στην κινητικότητα των σπερματοζωαρίων.

Abstract

It is widely known from previous studies that vitamin D plays a role in the male reproductive system and there is a potential correlation between vitamin D and sperm motility described in several animal and human studies. In order to investigate the possible association between them, we conducted in vitro studies of 18 semen samples exposed to 1,25Vitamin D, the active metabolite of Vitamin D, for two different concentrations 1nM and 10nM and, after incubation for different time duration, we assessed the sperm motility at each time point. The results from the in vitro studies were statistically analyzed for each concentration and at every time point, however there seems to be no significant correlation between the given concentrations and the sperm motility at the time points' checked.

Περιεχόμενα

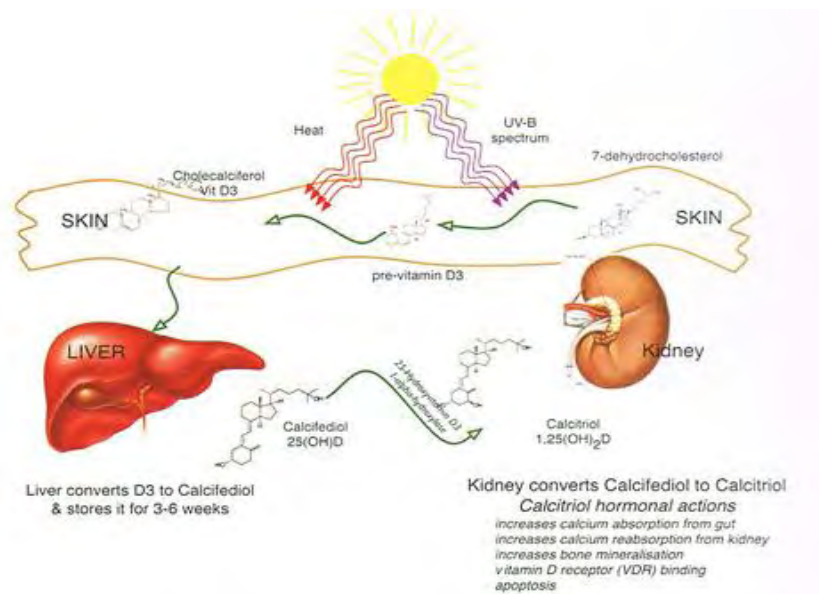
Περίληψη	6
Abstract	7
Εισαγωγή	9
Η σύνθεση της βιταμίνης D.....	10
Μηχανισμοί ανατροφοδότησης της βιταμίνη D.....	12
Υποδοχέας της βιταμίνης D.....	14
Έκφραση του υποδοχέα και των ενζύμων της βιταμίνης D στο ανθρώπινο ανδρικό αναπαραγωγικό σύστημα.....	15
Βιταμίνη D και Τεστοστερόνη.....	16
Βιταμίνη D και ανδρική υπογονιμότητα.....	17
Σκοπός	19
Υλικά και Μέθοδοι	21
1. Προέλευση δειγμάτων.....	22
2. Τρόπος συλλογής και εκτίμησης δειγμάτων.....	22
3. Παρασκεύασμα βιταμίνης D.....	26
4. Χειρισμός των δειγμάτων σπέρματος με την βιταμίνη D.....	26
Αποτελέσματα	28
Συμπεράσματα – Συζήτηση	35
Βιβλιογραφία	38

Εισαγωγή

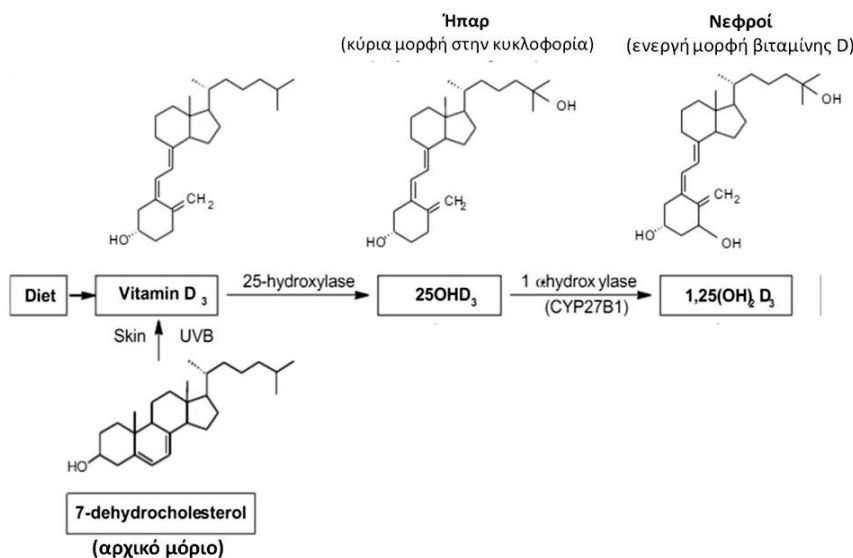
Η σύνθεση της βιταμίνης D

Η ομάδα των βιταμινών D περιλαμβάνει πέντε λιποδιαλυτές βιταμίνες, που έχουν παρόμοια βιοχημική διάταξη με αυτή των στεροειδών ορμονών, και ο κύριος ρόλος τους είναι η ρύθμιση της ομοιόστασης του ασβεστίου και του φωσφόρου. Όργανα στόχοι των βιταμινών αυτών αποτελούν οι παραθυρεοειδείς αδένες, τα οστά, οι νεφροί και τα έντερα. Παρόλα αυτά, τα τελευταία χρόνια έχουν διαπιστωθεί και άλλα όργανα στόχοι, όπως ο θυρεοειδής αδένας, ο λιπώδης ιστός, το πάγκρεας, το κεντρικό νευρικό σύστημα και το αναπαραγωγικό σύστημα (Dusilova et al. 2009; Muscogiuri et al. 2017; Tirabassi et al. 2016). Από τα πέντε μόρια βιταμινών, οι δύο πιο βιολογικά δραστικές είναι η βιταμίνη D₂ (ergocalciferol) και η D₃ (cholecalciferol).

Η βιταμίνη D₃ προέρχεται κυρίως μετά από ενδογενή σύνθεση της στο δέρμα, όπου η δεϋδροχοληστερόλη μετατρέπεται σε cholecalciferol υπό την επίδραση της υπεριώδους Β ηλιακής ακτινοβολίας. Προκειμένου να μετατραπεί στην βιολογικά ενεργή μορφή της, η ανενεργή βιταμίνη D₃ (cholecalciferol) υποβάλλεται σε δύο ενζυματικά στάδια επεξεργασίας. Αρχικά, η cholecalciferol προσδέεται στην πρωτεΐνη DBP (vitaminD-Binding-Protein) και μεταφέρεται στο ήπαρ, όπου μέσω ενδοκυττάρωσης εισέρχεται στα ηπατοκύτταρα και υπόκειται σε ενζυμική κατάλυση στον 25^ο άνθρακα από το ένζυμο 25-υδροξυλάση. Το ενδιάμεσο προϊόν που παράγεται είναι η 25-διϋδρόξυ-βιταμίνη D₃ και πρόκειται για την κύρια μορφή βιταμίνης D στην κυκλοφορία. Στην συνέχεια η 25-διϋδρόξυ βιταμίνη D₃ που απελευθερώνεται από το ήπαρ δεσμεύεται στην DBP και μεταφέρεται στους νεφρούς όπου μέσω ενδοκυττάρωσης εισέρχεται στα επιθηλιακά κύτταρα του εγγύς σωληναρίου και υπόκειται σε υδροξυλίωση του 1^{ου} άνθρακα από το ένζυμο 1α-υδροξυλάση. Το προϊόν που παράγεται είναι η 1α-25-διϋδρόξυ-βιταμίνη D₃, που είναι ουσιαστικά η βιολογικά ενεργή βιταμίνη D. (Chun et al., 2014)



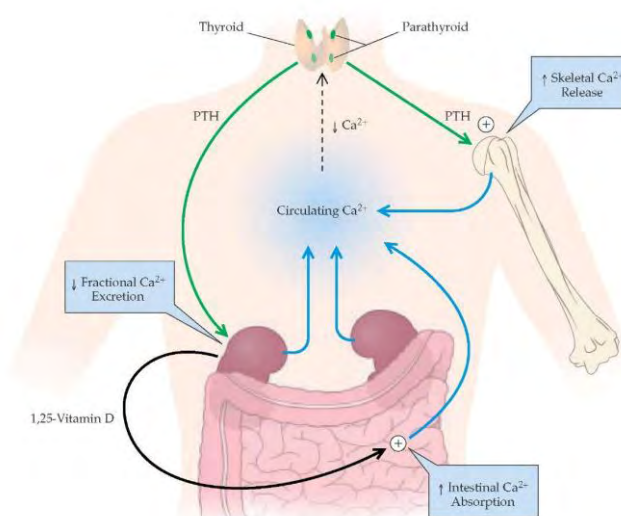
Εικόνα: Τα βήματα της βιοσύνθεσης της βιταμίνης D αρχικά με την επίδραση της ηλιακής ακτινοβολίας και ακόλουθη μετατροπή στις άλλες μορφές στο ήπαρ και στους νεφρούς. (πηγή ηλεκτρονικό άρθρο του Bill Fleming, endocrinesurgery.net.eu)



Εικόνα: Σύνθεση και μεταβολισμός της βιταμίνης D. Η βιταμίνη D₃ συντίθεται φωτοχημικά στο δέρμα από την 7- δεϋδροχοληστερόλη από την υπεριώδη Β ακτινοβολία και μετατρέπεται στην 25(OH)D₃ από την 25-υδροξυλάση στο ήπαρ, που είναι η κύρια μορφή βιταμίνης D στην κυκλοφορία. Στη συνέχεια η 25(OH)D₃ υφίσταται υδροξυλίωση στους νεφρούς από το ένζυμο 1^α-υδροξυλάση (κωδικοποιείται από το γονίδιο CYP27B1) και μετατρέπεται στην βιολογικά ενεργή μορφή, την 1,25-διυδροξυ βιταμίνη D₃. (Πηγή Shin et al, 2010. Τροποποιημένο)

Μηχανισμοί ανατροφοδότησης της βιταμίνη D

Το ένζυμο 24-υδροξυλάση, που παράγεται στο ήπαρ και σε διάφορα όργανα στόχους της βιταμίνης D είναι υπεύθυνο για την απενεργοποίηση της δράσης όλων των μορφών βιταμίνης D. Οι κύριοι ρυθμιστές του μεταβολισμού της βιταμίνης D είναι η παραθορμόνη (PTH) που παράγεται στους παραθυροειδείς αδένες και ο fibroblast growth factor 23 (FGF23) που παράγεται στους οστεοβλάστες και στους οστεοκλάστες, οι οποίοι ρυθμίζονται από το ασβέστιο και τον φώσφορο της



Εικόνα: Η παραθορμόνη (PTH) δρα σε τρία όργανα, στους νεφρούς, στα οστά και, έμμεσα, στον γαστρεντερικό σωλήνα. Η δράση της και στα τρία όργανα οδηγεί τελικά στην αύξηση της εισροής ασβεστίου στο πλάσμα και στην άνοδο των επιπέδων συγκέντρωσής του (πηγή εικόνας από ηλεκτρονικό άρθρο στο www.stepwards.com)

κυκλοφορίας καθώς και από την ίδια την βιταμίνη D. Η παραθορμόνη και ο FGF23 κυρίως στοχεύουν την νεφρική 1α- υδροξυλάση, γεγονός που σημαίνει ότι το βήμα της μετατροπής από 25-διϋδροξυ-βιταμίνη D₃ σε 1α-25-διϋδροξυ-βιταμίνη D₃ είναι το σημαντικότερο για την ενεργοποίηση της βιταμίνης D.

Η μείωση των επιπέδων ασβεστίου και βιταμίνης D στην κυκλοφορία διεγείρει την έκκριση της παραθορμόνης, η οποία ρυθμίζει την απελευθέρωση ασβεστίου ξανά στην κυκλοφορία και προκαλεί την έκκριση του ενζύμου 1α-υδροξυλάσης ώστε να μετατρέψει την 25-διϋδροξυ βιταμίνη D₃ σε 1α-25-διϋδροξυ-βιταμίνη D₃ καθώς επίσης αναστέλλει την δράση της 24-υδροξυλάσης. Μόλις αυξηθεί το ασβέστιο και η βιταμίνη D στην κυκλοφορία, καταστέλλεται η δράση της παραθορμόνης καθώς και της 1α-υδροξυλάσης ενώ ενεργοποιείται η 24-υδροξυλάση. Είναι σαφές τελικά ότι η δράση της παραθορμόνης και της βιταμίνης D και του

ασβεστίου ρυθμίζονται βάση μηχανισμού ανατροφοδότησης (Brenza & DeLuca, 2000)

Ο παράγοντας FGF23 επάγεται από αύξηση των επιπέδων φωσφόρου και της 25-διϋδροξυ βιταμίνης D₃ και πέρα από την ρύθμιση της απέκκρισης του φωσφόρου μέσω των νεφρών, αναστέλλει την έκφραση του ενζύμου 1α-υδροξυλάση και επάγει την έκφραση της 24-υδροξυλάσης με αποτέλεσμα την άμεση μείωση των επιπέδων της βιταμίνης D στον ορό του αίματος. (Fukumoto, 2014). Η μείωση του φωσφόρου και της βιταμίνης D που επιτεύχθηκε οδηγεί στην μείωση της έκφρασης του παράγοντα FGF23 κλείνοντας και αυτό τον βρόχο ανατροφοδότησης (feedback loop).

Η βιταμίνη D, όπως διαπιστώθηκε, ρυθμίζει τον μεταβολισμό της μέσω μηχανισμών ανατροφοδότησης (feedback mechanisms) που στοχεύουν κυρίως το ένζυμο 1α-υδροξυλάση των νεφρών και την 24-υδροξυλάση, συγκεκριμένα μειώνοντας την έκφραση της 1α – υδροξυλάσης και αυξάνοντας την έκφραση της 24-υδροξυλάσης και αυτό έχει αποδειχθεί τόσο σε *in vivo* όσο και σε *in vitro* πειράματα (Henry et al., 2011; Chen & DeLuca, 1995). Η σύνθετη ρύθμιση της βιταμίνης D είναι απαραίτητη για την διατήρηση της ομοιόστασης του ασβεστίου και του φωσφόρου. Μάλιστα, η κύρια δράση της 1,25-(OH)₂-D₃ εντοπίζεται στο έντερο, όπου αυξάνει την απορρόφηση ασβεστίου. Γι' αυτό όταν παρατηρείται ανεπάρκεια βιταμίνης D, η εντερική απορρόφηση του ασβεστίου είναι μειωμένη και συνεπακόλουθα η συγκέντρωση ασβεστίου στο πλάσμα είναι μειωμένη. Ακόμη η βιταμίνη D ελέγχει αυστηρά την ισορροπία μεταξύ σχηματισμού και επαναπορρόφησης ασβεστίου από τα οστά, δηλαδή ασκεί σημαντική επίδραση στην οστική μάζα και τη συγκέντρωση ασβεστίου των οστών. Τέλος, τα ένζυμα του μεταβολισμού της βιταμίνης D εκφράζονται και σε άλλα όργανα, συμπεριλαμβανομένου του αντρικού αναπαραγωγικού συστήματος, γεγονός που υποδεικνύει πιθανή αυτοκρινής ή παρακρινής δράση της βιταμίνης D σε αυτά τα όργανα (Verstuyf et al., 2010).

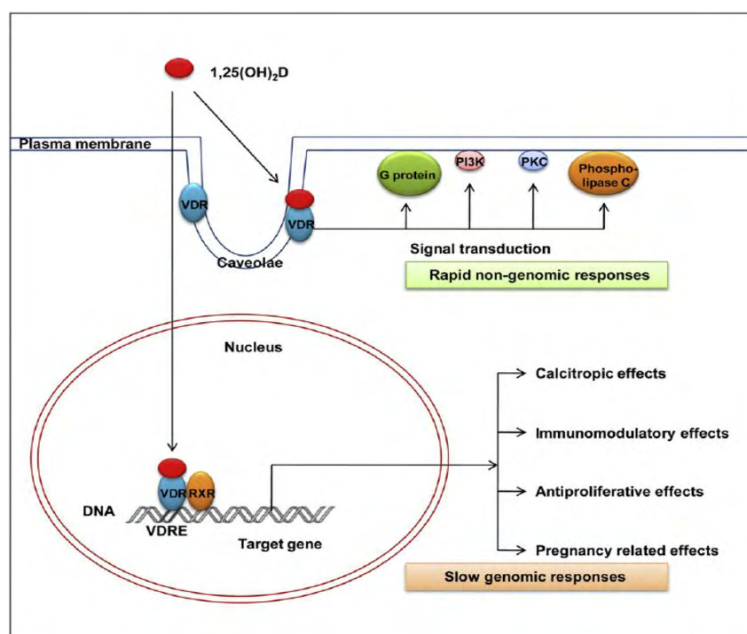
Υποδοχέας της βιταμίνης D

Η βιταμίνη D επάγει πολλές βιολογικές διαδικασίες μέσω του υποδοχέα της VDR (Vitamin D Receptor), ο οποίος μπορεί να ασκήσει τόσο γενομική (genomic) όσο και μη-γενομική (non-genomic) επίδραση. Η γενομική επίδραση σε γονίδιο – στόχο αφορά στην τροποποίηση της έκφρασής του ενώ μη-γενομική επίδραση συνίσταται στην ενεργοποίηση καταρράκτη σημάτων εντός του κυττάρου που τελικά προκαλεί αλλαγές στις λειτουργίες του (Hausssler et al., 2011).

Το γονίδιο που κωδικοποιεί τον υποδοχέα της βιταμίνης D βρίσκεται στο χρωμόσωμα 12, στον μακρύ βραχίονα στην περιοχή 1, στην ζώνη 1, στην υπο-ζώνη 11. (12q13.11) και κωδικοποιεί πρωτεΐνη μήκους 427 αμινοξέων. Ορθόλογο γονίδιο βρίσκεται σε 178 οργανισμούς, συμπεριλαμβανομένου του χιμπατζή, του ποντικού, του αρουραίου, του zebrafish, της κότας και του βατράχου. Επίσης, έχουν ταυτοποιηθεί μεταλλάξεις στο γονίδιο του VDR που σχετίζονται με την εμφάνιση ραχίτιδας τύπου II.

Υπάρχουν δύο είδη υποδοχέων VDR, ο πυρηνικός υποδοχέας και ο μεμβρανικός υποδοχέας και ασκούν γενομική και μη-γενομική επίδραση, αντίστοιχα. Ο πυρηνικός υποδοχέας VDR είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που προσδένεται σε DNA και στα κύτταρα - στόχους της βιταμίνης D βρίσκεται αρχικά στο κυτταρόπλασμα και αφού προσδεθεί στην βιταμίνη, μετατοπίζεται στον πυρήνα και σχηματίζει ένα ετεροδιμερές με ένα ελεύθερο υποδοχέα ρετινοειδούς X (retinoid X receptor – RXR) που απαντάται σε τρεις υποτύπους, RXR α , RXR β και RXR γ . Στη συνέχεια, η επικράτεια που προσδένεται στο DNA (DNA-binding domain) κάθε ετεροδιμερούς, αναγνωρίζει μια αλληλουχία στην περιοχή του υποκινητή των γονιδίων στόχων της βιταμίνης D που ονομάζεται «στοιχείο απόκρισης βιταμίνης D» (Vitamin D Response Element – VDRE) και αφού προσδεθεί το ετεροδιμερές στην αλληλουχία αυτή, ρυθμίζει την μεταγραφή των γονιδίων. Παραλλαγές στην αλληλουχία των VDRE στα διάφορα γονίδια – στόχους της βιταμίνης D καθορίζουν διαφορετική συγγένεια πρόσδεσης του ετεροδιμερούς VDR/RXR, και επομένως προκύπτει διαφορετική ευαισθησία στη μεταγραφική δραστηριότητα των γονιδίων υπό την επίδραση της βιταμίνης D. Ο πυρηνικός υποδοχέας VDR χρειάζεται ώρες έως μέρες για να ρυθμίσει την μεταγραφική ενεργοποίηση των κατάλληλων γονιδίων ενώ ο μεμβρανικός υποδοχέας VDR απαιτεί μεταξύ 2- 45 λεπτά για να μεσολαβήσει στα ενδοκυτταρικά μονοπάτια. Η μη – γενομική επίδραση του μεμβρανικού υποδοχέα VDR μελετήθηκε πρώτα σε κύτταρα του γαστρεντερικού συστήματος και μεταξύ των

μορίων που σχετίζονται στο σηματοδοτικό μονοπάτι είναι οι πρωτεϊνικές κινάσες A και C, η MAP κινάση, η PI3K, η φωσφολιπάση C καθώς και αντλίες χλωρίου και ασβεστίου. Ωστόσο δεν υπάρχει συμφωνία μεταξύ των ερευνητών για το μήνυμα που πυροδοτεί την έναρξη του σηματοδοτικού μονοπατιού (Haussler et al. 2011; Zanatta et al., 2011)



Εικόνα: Σχηματική απεικόνιση της γενομικής και μη γενομικής απόκρισης των VD υποδοχέων. Στην γενομική απόκριση η 1,25(OH)₂D₃ προσδένεται στον πυρηνικό υποδοχέα, ο οποίος σχηματίζει ετεροδιμερές με τον RXR το οποίο έπειτα προσδένεται στη συνέχεια στα στοιχεία απόκρισης βιταμίνης D (VDRE) και ρυθμίζει την μεταγραφή του γονιδίου στόχου. Στην μη-γενομική απόκριση η 1,25(OH)₂D₃ προσδένεται στον μεμβρανικό VDR και προκαλούν στην συνέχεια τάχιστα μεταγωγή σήματος με την μεσολάβηση μορίων όπως πρωτεΐνες G, κινάση C, φωσφολιπάση C κ.ά. (Πηγή Shin et al., 2010)

Έκφραση του υποδοχέα και των ενζύμων της βιταμίνης D στο ανθρώπινο ανδρικό αναπαραγωγικό σύστημα

Η έκφραση του mRNA και της πρωτεΐνης του υποδοχέα VDR δεν έχει ερευνηθεί πλήρως στο ανδρικό αναπαραγωγικό σύστημα του ανθρώπου, παρόλα αυτά υπάρχουν δεδομένα που υποδεικνύουν την ύπαρξη του mRNA και της πρωτεΐνης του υποδοχέα στον προστάτη, στις σπερματοδόχες κύστες και στην επιδιδυμίδα. (Cariati et al., 2013) Στον όρχι, ο υποδοχέας εντοπίστηκε στα κύτταρα Leydig, στα ανώριμα κύτταρα Sertoli και στα γεννητικά κύτταρα από σπερματογόνια ως σπερματοζώαρια. Στα ανθρώπινα σπερματοζώαρια η τοποθεσία του VDR έδειξε

μεγάλη ετερογένεια αφού βρέθηκε στην κεφαλή, στην μετα-ακροσωματική περιοχή, στην περιοχή του αυχένα και/ή στο μεσαίο τμήμα. (Corbett et al., 2006; Aquila et al., 2009; Blomberg Jensen et al., 2010). Μέχρι στιγμής καμία μελέτη δεν εκτίμησε την ύπαρξη του RXR στον ανθρώπινο όρχι.

Από τα ένζυμα που μεταβολίζουν την βιταμίνη D, η 25-υδροξυλάση βρέθηκε στον προστάτη, στις σπερματοδόχες κύστες, στην επιδιδυμίδα και στον όρχι, ιδιαίτερα στα κύτταρα Leydig και στα σπερματοκύτταρα και τις σπερματίδες. Όσον αφορά τα σπερματοζώαρια, η 25-υδροξυλάση εντοπίστηκε κυρίως στην μετα-ακροσωμική περιοχή, στον αυχένα και στην ουρά. Η 1α-υδροξυλάση βρέθηκε στον προστάτη, στις σπερματοδόχες κύστες, στην επιδιδυμίδα και στον όρχι και κυρίως στα κύτταρα Leydig, στα σπερματοκύτταρα, στις σπερματίδες και στα σπερματοζώαρια. Στα σπερματοζώαρια η 1α-υδροξυλάση εντοπίστηκε κυρίως στην μετα-ακροσωμική περιοχή, στον αυχένα και στο μεσαίο τμήμα. Τέλος, η 24-υδροξυλάση βρέθηκε στον προστάτη, στις σπερματοδόχες κύστες, στην επιδιδυμίδα, στον όρχι και κυρίως στα κύτταρα Leydig, στα σπερματογόνια και στις σπερματίδες. Στα σπερματοζώαρια η 24-υδροξυλάση εντοπίστηκε πρωτίστως στον αυχένα και στην στεφάνη (annulus) που βρίσκεται στο τέλος του μεσαίου τμήματος και πριν αρχίσει η ουρά (Blomberg Jensen et al., 2010). Είναι εμφανής ο συνεντοπισμός των ενζύμων μεταβολισμού της βιταμίνης D στον ανδρικό αναπαραγωγικό σύστημα, γεγονός που επιβεβαιώνει την δράση της βιταμίνης D στο σύστημα αυτό.

Βιταμίνη D και Τεστοστερόνη

Η τεστοστερόνη παράγεται από τα κύτταρα Leydig και είναι υπεύθυνη για τα πρωτογενή και τα δευτερογενή χαρακτηριστικά του φύλου. Η συγκέντρωσή της στον όρχι είναι 100πλάσια από αυτή στον ορό του αίματος και η βιοσύνθεσή της ελέγχεται από την πλακουντιακή χοριακή γοναδοτροφίνη (hCG) κατά την πρώιμη εμβρυική ζωή μέχρι να αρχίσει η υπόφυση να παράγει ωχρινοτρόπο ορμόνη (Luteinizing Hormone – LH). (Huhtaniemi & Torppari, 1995). Η LH επάγει την στεροειδογένεση αυξάνοντας την συγκέντρωση του κυκλικού AMP και του ενδοκυτταρικού ασβεστίου (Ca^{2+}) στα κύτταρα Leydig και η $1,25(OH)_2D_3$ ίσως ασκεί επίδραση ρυθμίζοντας την απόκριση του ασβεστίου στην LH. Ο λόγος τεστοστερόνη:LH είναι ένας καλός δείκτης της ευαισθησίας των κυττάρων Leydig στην LH. Σε knock out ποντίκια για το γονίδιο του VDR βρέθηκε ελαττωμένος λόγος τεστοστερόνη:LH στον όρχι και

υπερπλασία των κυττάρων Leydig ενώ τα επίπεδα τεστοστερόνης και LH στον ορό του αίματος δεν ήταν στατιστικά διαφορετικά από τα ποντίκια αγρίου τύπου. Ακόμη, χορήγηση hCG σε παιδιά με κληρονομική ραχίτιδα (μη λειτουργικός υποδοχέας VDR) προκάλεσε φυσιολογική έκκριση τεστοστερόνης (Hochberg et al., 1985) και σε άλλη μελέτη χορήγηση 1,25-διϋδροξυβιταμίνη D₃ για 3 μέρες σε υγιείς άνδρες δεν προκάλεσε καμία αλλαγή στα επίπεδα της τεστοστερόνης και της LH στον ορό. (Zofkoná et al., 1989) Από τα παραπάνω εξάγεται το λογικό συμπέρασμα ότι δεν υπάρχει αιτιατή σχέση μεταξύ της ενεργότητας του υποδοχέα VDR και της τεστοστερόνης. Παρόλα αυτά, υπάρχουν μελέτες που αποδεικνύουν θετική συσχέτιση μεταξύ της 25-υδροξυβιταμίνης D₃ και της SHBG (Sex Hormone-Binding Globulin) (Valimaki et al. 2004; Ramlau-Hansen et al. 2011; Chin et al. 2015; Anic et al., 2016) και το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι η βιταμίνη D ίσως επηρεάζει την κυκλοφορούσα SHBG, παρά την τεστοστερόνη, με αποτέλεσμα να ρυθμίζει έμμεσα την βιοδιαθέσιμη τεστοστερόνη στην κυκλοφορία. Σε μελέτες ομάδων ηλικιωμένων ανδρών (>60 χρονών) βρέθηκαν ανομοιογενή αποτελέσματα, σε πολλές δεν βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ της βιταμίνης D και της SHBG και της τεστοστερόνης, σε μερικές βρέθηκε θετική συσχέτιση και σε μία αρνητική συσχέτιση. (Wehr et al. 2010; Nimptsch et al. 2012; Wang et al. 2015). Πιθανή εξήγηση των αποτελεσμάτων που αφορούν τους ηλικιωμένους άνδρες μπορεί να είναι η γενικότερη ελαττωμένη έκκριση τεστοστερόνης με την ηλικία καθώς και συνοσηρότητα, δηλαδή ύπαρξη πολλών νοσημάτων όπως καρδιαγγειακά προβλήματα, μεταβολικά σύνδρομα κ.ό.κ. Χρειάζονται περισσότερες κλινικές μελέτες και ανάλυση δεδομένων μεγάλης κλίμακας προκειμένου να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα για την συσχέτιση βιταμίνης D με την SHBG.

Βιταμίνη D και ανδρική υπογονιμότητα

Κατά προσέγγιση 10-15% των ζευγαριών είναι υπογόνιμα και η ευθύνη μοιράζεται ισόποσα μεταξύ των δύο φύλων. Η ανδρική υπογονιμότητα ελέγχεται με την διενέργεια ανάλυσης σπέρματος (semen analysis) και μέχρι στιγμής δεν υπάρχει θεραπεία για την μειωμένη ποιότητα σπέρματος, που έχει κυρίως ιδιοπαθή αίτια. Η βιταμίνη D φάνηκε να έχει θετική επίδραση όταν στο πείραμα των Kwiecinski et al. 1989 έγινε γονιμοποίηση ωαρίων αρουραίου με σπέρμα από αρουραίους με έλλειψη βιταμίνης D και με σπέρμα από αρουραίους με επαρκή βιταμίνη D και στην δεύτερη

περίπτωση προέκυψαν 71% περισσότερες κήσεις απ' ότι στην πρώτη. Μια ακόλουθη έρευνα των ίδιων ερευνητών (Uhland, Kwiecinski et al. 1992) προσπάθησε να διορθώσει την ταυτόχρονη υπασβεστιαμία στους αρουραίους με έλλειψη βιταμίνης D. Παρόλα αυτά τα ποσοστά κήσεως από σπέρμα αρουραίων με νορμοασβεστιαμία (μετά την διόρθωση) και έλλειψη σε βιταμίνη D ήταν 43% χαμηλότερα από τα ποσοστά κήσεως από σπέρμα αρουραίων με νορμοασβεστιαμία και επάρκεια σε βιταμίνη D. Επομένως, έφτασαν στο συμπέρασμα ότι είναι πολύ πιθανόν να υπάρχει μια άμεση επίδραση της βιταμίνης D στην ανδρική γονιμότητα. Η υπογονιμότητα σε αρσενικά ζώα με έλλειψη βιταμίνης D (όπως ποντικούς, αρουραίους και αγριόχοιρους που έχουν γίνει μελέτες) οφείλεται στην χαμηλή κινητικότητα του σπέρματος και, πολλές φορές, στην κακή μορφολογία του σπέρματος. Μάλιστα, στην μελέτη των Kinuta et al. 2000 διαγονιδιακά ποντίκια με μηδενική μετάλλαξη του VDR (VDR-null) βρέθηκαν να έχουν μειωμένο ολικό αριθμό σπέρματος (κατά 40%) και κινητικότητας σπέρματος (9 φορές χαμηλότερη) σε σχέση με τα ποντίκια αγρίου τύπου. Η κακή ποιότητα του σπέρματος και κατ' επέκταση και η γονιμότητα των ποντικών αυτών βελτιώθηκε μετά από συμπλήρωμα ασβεστίου στην διατροφή τους αλλά έγινε φυσιολογική μετά από χορήγηση και ασβεστίου και οιστρογόνων. Αυτό το εύρημα υποδεικνύει ότι η ανδρική γονιμότητα, πέραν από την επίδραση της βιταμίνης D, επηρεάζεται και από συστημακές αλλαγές του ασβεστίου και των οιστρογόνων.

Η παρούσα εργασία αφορά στην μελέτη της επίδρασης της βιταμίνης D, συγκεκριμένα της 1,25-διϋδροξυ-βιταμίνης D₃ στην κινητικότητα του σπέρματος. Το εγχείρημα αυτό αποτελεί μια συνεργασία μεταξύ της μονάδας ιατρικώς υποβοηθούμενης αναπαραγωγής του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας και του εργαστηρίου Τεχνολόγων Γεωπόνων του αντίστοιχου τμήματος Τ.Ε.Ι. Θεσσαλίας με έδρα την Λάρισα. Η μελέτη της συσχέτισης μεταξύ **βιταμίνης D₃** και **κινητικότητας** σπέρματος από την ομάδα μας έγινε προκειμένου να συγκεντρωθεί περισσότερη γνώση γύρω από τον μηχανισμό δράσης της βιταμίνης D στο ανδρικό αναπαραγωγικό σύστημα. Σε περίπτωση που αποδειχθεί από το σύνολο της επιστημονικής κοινότητας εμπεριστατωμένα θετική συσχέτιση, η βιταμίνη D θα μπορούσε να αξιοποιηθεί μελλοντικά στην αντιμετώπιση ορισμένων περιπτώσεων ανδρικής υπογονιμότητας που οφείλονται σε χαμηλή κινητικότητα του σπέρματος (ασθενοσπερμία).

Υλικά και Μέθοδοι

1. Προέλευση δειγμάτων

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος «Βιολογία της Αναπαραγωγής» του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Η συλλογή των δειγμάτων για τους σκοπούς της διπλωματικής εργασίας πραγματοποιήθηκε στην Μονάδα Ιατρικώς Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής (M.I.Y.A.) της Μαιευτικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Θεσσαλίας με έδρα την Λάρισα.

Τα δείγματα συλλέχθηκαν με τήρηση της ανωνυμίας και του ιατρικού απορρήτου και αφορούν δείγματα σπέρματος ανδρών από ζευγάρια που έχουν προσέλθει στην μονάδα υποβοηθούμενης αναπαραγωγής αντιμετωπίζοντας πρόβλημα υπογονιμότητας. Από το σύνολο των δειγμάτων δημιουργήθηκε ένα αρχείο δημογραφικών στοιχείων των συμμετεχόντων, που περιλαμβάνει υψομετρικά χαρακτηριστικά, φαρμακευτικές αγωγές, εάν τυχόν λαμβάνουν, και συνήθειες, όπως κατανάλωση αλκοόλ και κάπνισμα προκειμένου να εξεταστεί ενδεχόμενη συσχέτιση μεταξύ του τρόπου ζωής και των αποτελεσμάτων στην παρούσα ή σε μετα-αναλυτική φάση της μελέτης.

2. Τρόπος συλλογής και εκτίμησης των δειγμάτων

Η συλλογή των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (W.H.O.). Συγκεκριμένα μετά από αποχή 2-7 ημερών (όχι παραπάνω από 7) από πάσης φύσεως σεξουαλική δραστηριότητα, λαμβάνεται ακέραιο δείγμα σπέρματος δια αυνανισμού το οποίο συλλέγεται σε ειδικό μη τοξικό πλαστικό δοχείο όπου αναγράφεται το όνομα του δότη, η μέρα και ώρα συλλογής του δείγματος καθώς και οι μέρες αποχής. Η διαδικασία ιδανικά πραγματοποιείται σε ειδικά διαμορφωμένο χώρο στο εργαστήριο ενώ αν δεν είναι δυνατόν αυτό, τότε το δείγμα οφείλει να προσκομιστεί στο εργαστήριο μέχρι ένα ημίωρο από την συλλογή του φυλασσόμενο σε θερμοκρασία περίπου 37° C κατά την μεταφορά. Να σημειωθεί ότι δείγματα μη ακέραια απορρίπτονται διότι δεν πρέπει να αξιολογούνται.

Μακροσκοπικά χαρακτηριστικά

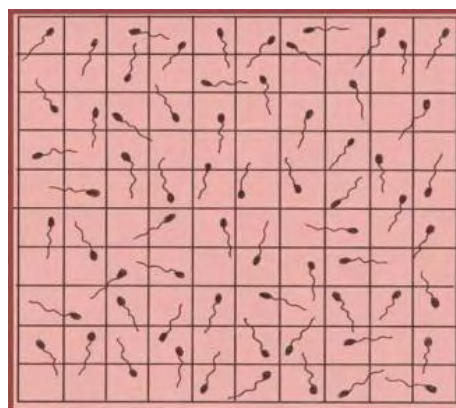
Μετά την συλλογή του δείγματος, αξιολογούνται ορισμένες μακροσκοπικές και μικροσκοπικές παράμετροι. Αρχικά συμβαίνει η ρευστοποίηση του δείγματος σπέρματος, η οποία πρέπει να συμβεί εντός της μίας ώρας, και στη συνέχεια μετράται ο όγκος με ειδικές βαθμονομημένες πιπέτες ενώ αξιολογείται η χροιά του δείγματος και το ιξώδες. Μακροσκοπικά ένα φυσιολογικό δείγμα έχει ομοιογενή εμφάνιση, χρώμα ώχρας-γκρι και, εφόσον αναρροφηθεί με πιπέτα και αφεθεί, δεν πρέπει να σχηματίζει νήματα > 2cm (φυσιολογικό ιξώδες). Αξιολογείται επίσης το pH του σπέρματος με χρήση pH stick με φυσιολογικές τιμές 7.2-8.0

Συγκέντρωση και ολικός αριθμός σπερματοζωαρίων

Στη συνέχεια γίνεται μικροσκοπική παρατήρηση του δείγματος, όπου 10μl του δείγματος σπέρματος τοποθετούνται στην αντικειμενοφόρο πλάκα του Makler counting chamber και αμέσως εφαρμόζεται η καλυπτρίδα. Η καλυπτρίδα φέρει πλέγμα εμβαδού 1mm^2 , υποδιαιρεμένο σε 100 τετράγωνα $0,1 \times 0,1\text{mm}$ το καθένα. Το Makler τοποθετείται για παρατήρηση σε οπτικό μικροσκόπιο υπό μεγέθυνση αντικειμενικού φακού 25x και προσοφθάλμιου 10x. Μετρώνται τα σπερματοζωάρια σε 10 τετράγωνα του Makler και αυτός ο αριθμός εκφράζει την συγκέντρωση των σπερματοζωαρίων σε εκατομμύρια ανά ml σπέρματος. Αφού υπολογιστεί η συγκέντρωση με τον τρόπο αυτό, για τον υπολογισμό του ολικού αριθμού σπερματοζωαρίων αρκεί να πολλαπλασιάσουμε την συγκέντρωση των σπερματοζωαρίων με τον όγκο του σπέρματος.



Εικόνα: Makler counting chamber. Διακρίνεται η αντικειμενοφόρος και η καλυπτρίδα (Πηγή: Irvine Scientific, www.irvinesci.com)



Εικόνα: τα 100 τετράγωνα του πλέγματος του Makler (counting grid). Ο αριθμός των σπερματοζωαρίων σε οποιαδήποτε 10άδα τετραγώνων αντιπροσωπεύει την συγκέντρωση σπερματοζωαρίων σε εκατομμύρια ανά ml. (Πηγή: Irvine Scientific, www.irvinesci.com)

Κινητικότητα των σπερματοζωαρίων

Τα σπερματοζωάρια χαρακτηρίζονται από προωθητική ή επιτόπια κίνηση ή είναι ακίνητα. Μόνο τα σπερματοζωάρια που κινούνται προωθητικά είναι ικανά να φθάσουν έως το ωάριο και να το γονιμοποιήσουν. Η κινητικότητα βαθμολογείται με μία κλίμακα από το a έως το d, σύμφωνα με τα κριτήρια του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (WHO, 2010). Μια σταγόνα σπέρματος τοποθετείται είτε σε απλή αντικειμενοφόρο πλάκα είτε σε Makler και μετρώνται 100 σπερματοζωάρια σε 5 τουλάχιστον οπτικά πεδία ενώ παράλληλα ταυτοποιείται η κίνηση που κάνει το καθένα. Η μέτρηση επαναλαμβάνεται και δεύτερη φορά και εξάγεται ο μέσος όρος. Προσμετρώνται μόνο τα ακέραια σπερματοζωάρια καθώς αυτά υπολογίζονται και για την συγκέντρωση.

Κατηγορίες κινήσεων:

a: ταχεία προωθητική κίνηση, όταν το σπερματοζωάριο κινείται σε ευθεία γραμμή και διανύει απόσταση ίση ή μεγαλύτερη από το μισό του μήκους της ουράς του ανά δευτερόλεπτο

b: νωθρή προωθητική κίνηση, όταν το σπερματοζωάριο μετατοπίζεται ενεργά είτε σε καμπύλη είτε σε τεθλασμένη γραμμή

c: επιτόπια κίνηση, όταν το σπερματοζωάριο κινεί την ουρά του αλλά δεν μετακινείται προς τα εμπρός και δεν μετατοπίζεται (pin down)

d: ακινησία, όταν το σπερματοζωάριο δεν παρουσιάζει καμία ένδειξη κίνησης

Στην τελευταία οδηγία του W.H.O. η κίνηση a και η κίνηση b χαρακτηρίζονται ως μία, προωθητική κίνηση (a+b) και με αυτόν τον τρόπο χαρακτηρίστηκε η κινητικότητα στα δείγματα σπέρματος που αναλύθηκαν.

Η κατάταξη της κίνησης καθενός σπερματοζωαρίου την στιγμή της μέτρησης γίνεται με την βοήθεια χειροκίνητου απαριθμητή όπου κάθε πλήκτρο αντιστοιχεί σε ένα μόνο είδος κίνησης. Στο τέλος των μετρήσεων κάθε είδος κίνησης εκφράζεται σε ποσοστό τοις εκατό (%).



Εικόνα: Μετρητής χειροκίνητος εργαστηρίου (totalizer laboratory denominator). Κάθε πλήκτρο αντιστοιχεί σε ένα είδος κίνησης και στο τέλος υπολογίζεται το ποσοστό της κάθε κίνησης επί τοις εκατό.

Οι φυσιολογικές τιμές κινητικότητας είναι **a+b ≥ 32%** (ανεκτά όρια 31-34) ή **a+b+c ≥ 40%** (ανεκτά όρια 38-42), επομένως κάθε απόκλιση από τις τιμές αυτές συνιστά ανωμαλία του δείγματος σπέρματος.

Οι ανωμαλίες που δύνανται να υπάρχουν κατατάσσονται ως εξής:

Ολιγοσπερμία: όταν ο αριθμός των σπερματοζωαρίων ανά ml είναι μικρότερος από 15 εκατομμύρια ανά ml (WHO, 5^η έκδοση).

Ηπια ολιγοσπερμία	10-15 εκατ/ml
Μέτρια ολιγοσπερμία	5-10 εκατ/ml
Σοβαρή ολιγοσπερμία	<5 εκατ/ml

Ασθenoσπερμία: όταν το ποσοστό κινητών σπερματοζωαρίων a+b < 32% ή a+b+c < 40% ενώ ο αριθμός και η μορφολογία των σπερματοζωαρίων είναι φυσιολογικά

Τερατοσπερμία: όταν το ποσοστό των φυσιολογικών μορφολογικά σπερματοζωαρίων είναι μικρότερο από 4% (WHO, 5^η έκδοση)

Αζωοσπερμία: ανυπαρξία σπερματοζωαρίων στο σπερματικό πλάσμα ή ακόμη και στο ίζημα μετά από φυγοκέντρηση

Ασπερμία: απουσία σπερματικού πλάσματος

Έχει παρατηρηθεί ότι όταν υπάρχει Ολιγοσπερμία και Ασθenoσπερμία, συνυπάρχει και Τερατοσπερμία, δηλαδή δείγμα σπέρματος χαμηλής συγκέντρωσης και κακής κινητικότητας συνήθως παρουσιάζει και κακή μορφολογία (Ο.Τ.Α.).

Κατώτερα φυσιολογικά όρια παραμέτρων σπέρματος (WHO, 5 ^η έκδοση, 2010)	
Παράμετρος	Κατώτερες τιμές αναφοράς
Όγκος σπέρματος (ml)	1,5 (1,4-1,7)
Συνολικός αριθμός σπερματοζωαρίων (10 ⁶ /εκσπερμάτιση)	39 (33-46)
Συγκέντρωση σπερματοζωαρίων (10 ⁶ /ml)	15 (12-16)
Συνολική κινητικότητα (a+b)	40 (38-42)
Πρωθητική κινητικότητα (a)	32 (31-34)
Ζωτικότητα (ζωντανά σπερματοζωάρια,%)	58 (55-63)
Μορφολογία σπερματοζωαρίων (φυσιολογικές μορφές, %)	4 (3,0-4,0)
pH	≥7,2
Λευκοκύτταρα (10 ⁶ /ml)	<1,0

Πίνακας: Συγκεντρωτικά οι τιμές αναφοράς των παραμέτρων σπέρματος σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, 5η έκδοση, 2010.

3. Παρασκεύασμα βιταμίνης D

Η 1,25-διϋδροξύ βιταμίνη D₃ [1,25(OH)₂D₃] παραχωρήθηκε ευγενικά από τον κ. Μουλά Ανάργυρο, καθηγητή του τμήματος Τεχνολόγων Γεωπόνων του ΤΕΙ Θεσσαλίας στα πλαίσια της συνεργασίας με το εργαστήριό του για το θέμα της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Για τα πειράματα χρησιμοποιήθηκε 1,25-διϋδροξύβιταμίνης D₃ (1,25(OH)₂D₃ ή 1,25 D) της εταιρείας Sigma-Aldrich® (Cat Nr.: D1530). Η βιταμίνη διαλύθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας σε καθαρή αιθανόλη από stock διάλυμα συγκέντρωση 24 uM. Για τα πειράματα δόσης-απόκρισης, χρησιμοποιήθηκαν συγκεντρώσεις 1 και 10nM βιταμίνης 1,25(OH)₂D₃ σε διάλυμα αιθανόλης της Sigma-Aldrich® (Cat Nr: 24194-2.5L-R). Τα αραιωμένα διαλύματα αποθηκεύτηκαν στους -80° C

4. Χειρισμός των δειγμάτων σπέρματος με την βιταμίνη D

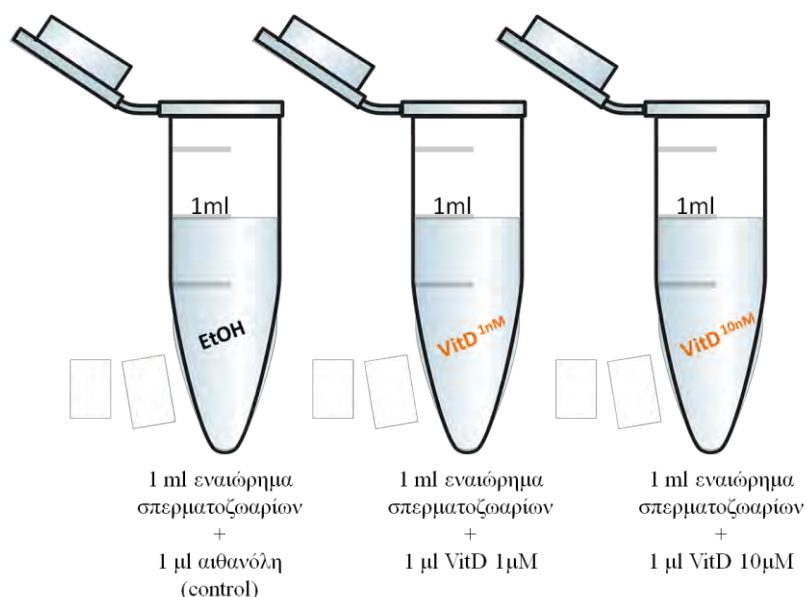
Για την μελέτη της επίδρασης της βιταμίνης D στην κινητικότητα του σπέρματος συλλέχθηκαν συνολικά 18 δείγματα σπέρματος ανδρών που συμμετείχαν σε κύκλους υποβοηθούμενης αναπαραγωγής ή έκαναν εξέταση σπερμοδιαγράμματος στην Μονάδα Ιατρικώς Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας.

Η συλλογή των δειγμάτων έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο του W.H.O., όπως περιγράφηκε προηγουμένως και τα δείγματα αμέσως μετά την παράδοσή τους στο εργαστήριο παρέμειναν σε εστία νηματικής ροής και σε θερμοκρασία δωματίου (room temperature 25° C) για 20-30 λεπτά έως ότου ρευστοποιηθούν.

Αφού γίνει η ρευστοποίηση, υπολογίστηκε ο όγκος, η συγκέντρωση και η κινητικότητα κάθε δείγματος σύμφωνα με τις οδηγίες του W.H.O. που περιγράφηκαν προηγουμένως. Για μεγαλύτερη ακρίβεια έγιναν μετρήσεις από δύο παρατηρητές και εξάχθηκε ο μέσος όρος των μετρήσεων. Η κινητικότητα των σπερματοζωαρίων υπολογίστηκε σε ποσοστά που εκφράζουν την προωθητική κίνηση (PRM), την επιτόπια κίνηση (NPM) και την ακινησία (IM) (Makler, 1980).

Στη συνέχεια έγινε φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στα 1300 rpm και έγινε διαχωρισμός σπερματικού πλάσματος (υπερκείμενο) από τα σπερματοζωάρια (ίζημα). Απορρίφθηκε το υπερκείμενο και τα κύτταρα που βρίσκονται στο ίζημα

επαναιωρήθηκαν σε τελικό όγκο 5ml Sperm Medium της εταιρείας COOK Medical[®] (Cat Nr: G19017), το οποίο είναι θρεπτικό μέσο μη-ενεργοποίησης των σπερματοζωαρίων (incapacitating medium). Σε τρία κωνικά φιαλίδια μοιράστηκε από 1ml του εναιωρήματος των κυττάρων, το ένα εκ των οποίων θα είναι το control και θα έχει μόνο εναιώρημα κυττάρων και 1μl αιθανόλη (τον διαλύτη της βιταμίνης D) και τα υπόλοιπα δύο φιαλίδια θα είναι τα δείγματα (samples), το καθένα εκ των οποίων θα έχει 1ml εναιώρημα κυττάρων και 1μl βιταμίνη D 1μM και 10μM, αντίστοιχα.



Εικόνα: Σχηματική απεικόνιση των φιαλιδίων με το control και τα δύο δείγματα με τις δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις της βιταμίνης D. Καθένα φιαλίδιο περιέχει 1ml εναιώρημα σπερματοζωαρίων σε sperm medium. EtOH: αιθανόλη, VitD^{1nM}: βιταμίνη D συγκέντρωσης 1nM, VitD^{10nM}: βιταμίνη D συγκέντρωσης 10nM, όπου VitD η 1,25(OH)₂D₃

Γίνεται επώαση των κυττάρων με την βιταμίνη και σε χρονικές στιγμές 30λεπτών, 60 λεπτών, 180 λεπτών και 24 ωρών από την αρχική στιγμή τοποθέτησης της βιταμίνης (t=0 min) έγινε μέτρηση κινητικότητας κάθε δείγματος καθώς και του control. Η μέτρηση της κινητικότητας έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες του W.H.O. που περιγράφηκαν παραπάνω και από δύο παρατηρητές για βελτιστοποίηση της αντικειμενικότητας των μετρήσεων.

Τέλος έγινε συγκέντρωση των αποτελεσμάτων κάθε δείγματος και κάθε χρονικής μέτρησης με την βοήθεια του Microsoft Excel 2007 και πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση (paired t-test) με το στατιστικό πρόγραμμα IBM SPSS.

Αποτελέσματα

Δημογραφικά στοιχεία των δειγμάτων

Αρχικά παραθέτουμε τα δημογραφικά στοιχεία των 18 δειγμάτων σπέρματος που προσήλθαν στην Μονάδα Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας. Τα δείγματα συγκεντρώθηκαν ανώνυμα και έγινε καταγραφή μόνο των δημογραφικών χαρακτηριστικών κάθε δείγματος

Αριθμός δειγμάτων	18	
Ηλικία (έτη)	36,8 ± 5,8	
BMI	29,6±6,2	Φυσιολ. τιμές 18,5-24,9
Όγκος σπέρματος (ml)	2,9 ± 0,9	
Συγκέντρωση σπέρματος (εκατ/ml)	76,2 ± 53,7	Φυσιολ. τιμές ≥15εκατ/ml
Κατανάλωση αλκοόλ	64,30 % ΟΧΙ	35,70 % ΝΑΙ
Κάπνισμα	64,30 % ΟΧΙ	35,70 % ΝΑΙ

Πίνακας: Μέσοι όροι και ποσοστιαίες αναφορές των δημογραφικών και μη στοιχείων των 18 δειγμάτων σπέρματος.

Αποτελέσματα κινητικότητας

Ακολουθούν συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα των μετρήσεων της κινητικότητας των δειγμάτων σπέρματος παρουσία ή απουσία βιταμίνης (control). Να σημειωθεί ότι οι μετρήσεις έγιναν 30 λεπτά μετά την προσθήκη ή μη βιταμίνης, 1 ώρα μετά, 3 ώρες μετά και τέλος 24 ώρες μετά την προσθήκη ή μη βιταμίνης. Οι συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν είναι η 1nM και η 10nM ενώ στο control δεν προστέθηκε βιταμίνη, παρά μόνο 1ul αιθανόλης, ο διαλύτης της βιταμίνης D.

30 λεπτά

N=18	Control	1nM	10nM
Κινητικότητα a+b	45±20,9	47,6 ±17,9	44,7±21,0
Ακινησία d	40,1±19,8	37,1±18,6	36,9±21,6

1 ώρα

N=18	Control	1nM	10nM
Κινητικότητα a+b	46,4±20,3	47,3±17,3	47,2±19,5
Ακινησία d	37,3±18,7	35,5±18,1	36,6±21,0

3 ώρες

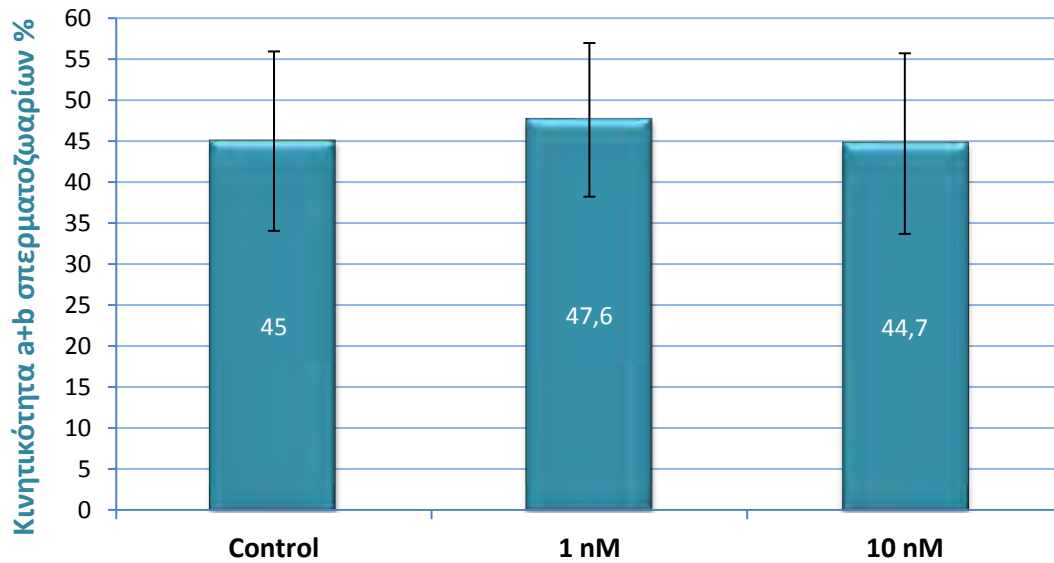
N=18	Control	1nM	10nM
Κινητικότητα a+b	44,8±19,3	44,4±20,1	42,3±16,6
Ακινησία d	36,5±17,0	37,5±18,2	39,2±14,2

24 ώρες

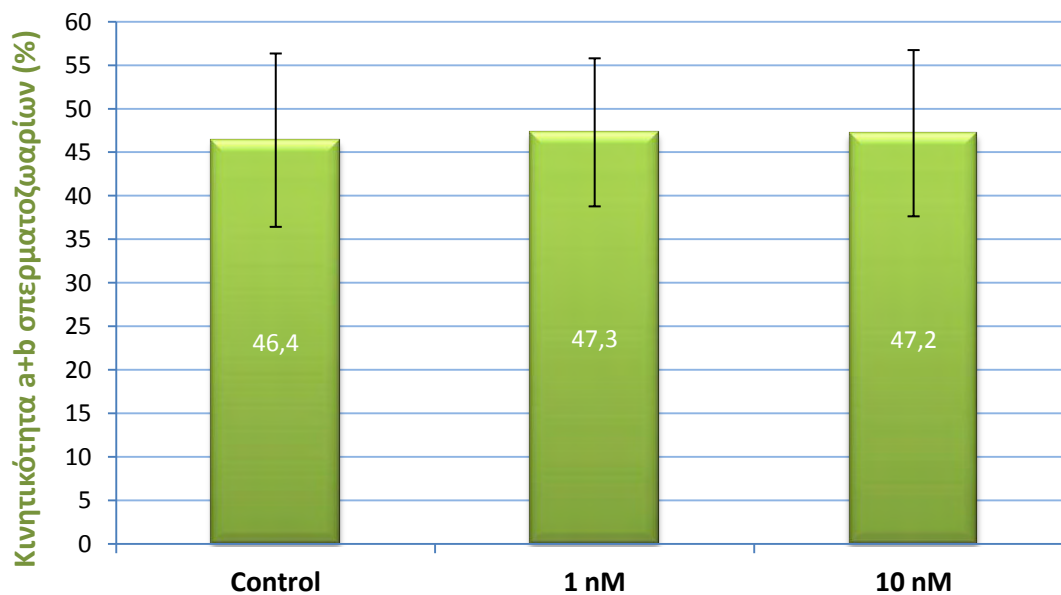
N=18	Control	1nM	10nM
Κινητικότητα a+b	31,5±17,3	34,4±20,8	32,1±21,2
Ακινησία d	50,3±18,3	50,1±21,8	51,7±21,8

Ακολουθεί διαγραμματική απεικόνιση των μετρήσεων για κάθε χρονική στιγμή συσχετίζοντας την συγκέντρωση της κάθε βιταμίνης με το ποσοστό κινητικότητας των σπερματοζωαρίων (προωθητική κίνηση a+b). Σε κάθε στήλη καθενός διάγραμμα σημειώνεται και το **95% διάστημα εμπιστοσύνης**, με την μορφή γραμμή σφάλματος, που αντιστοιχεί στις μετρήσεις αυτές.

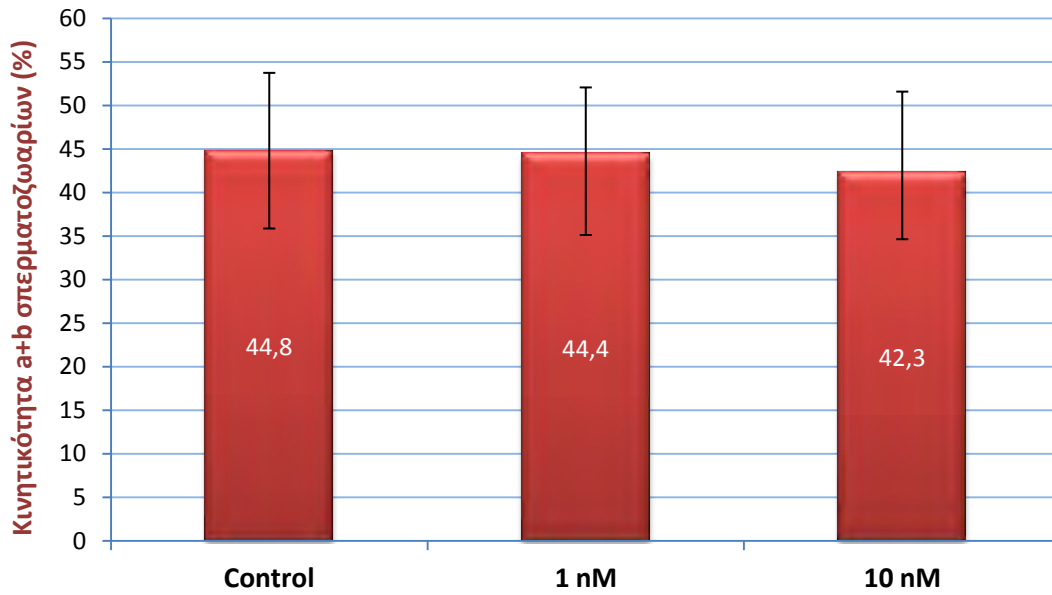
30 λεπτά



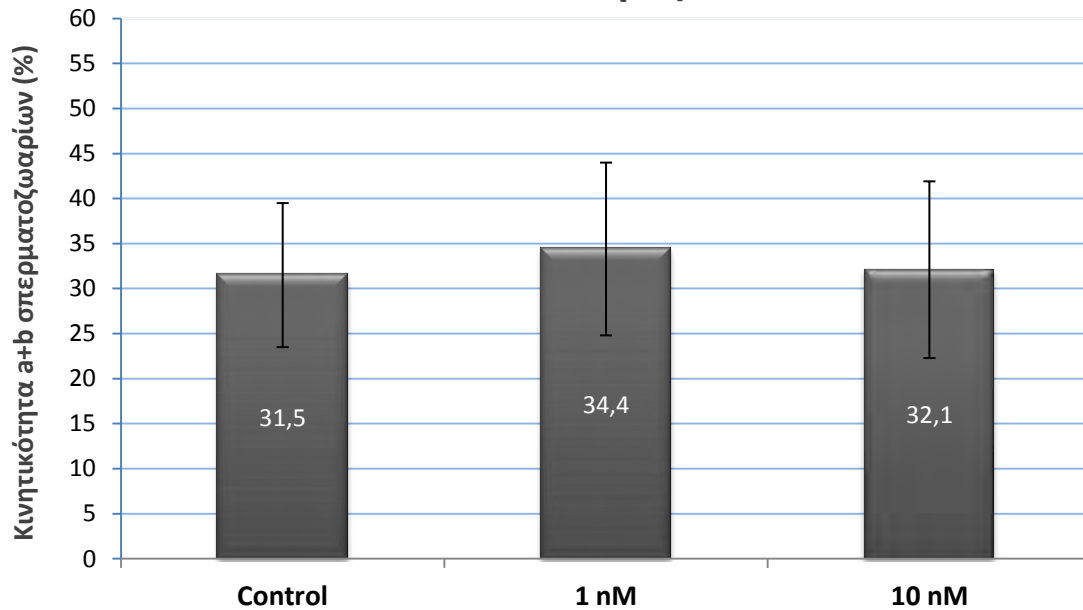
1 ώρα



3 ώρες

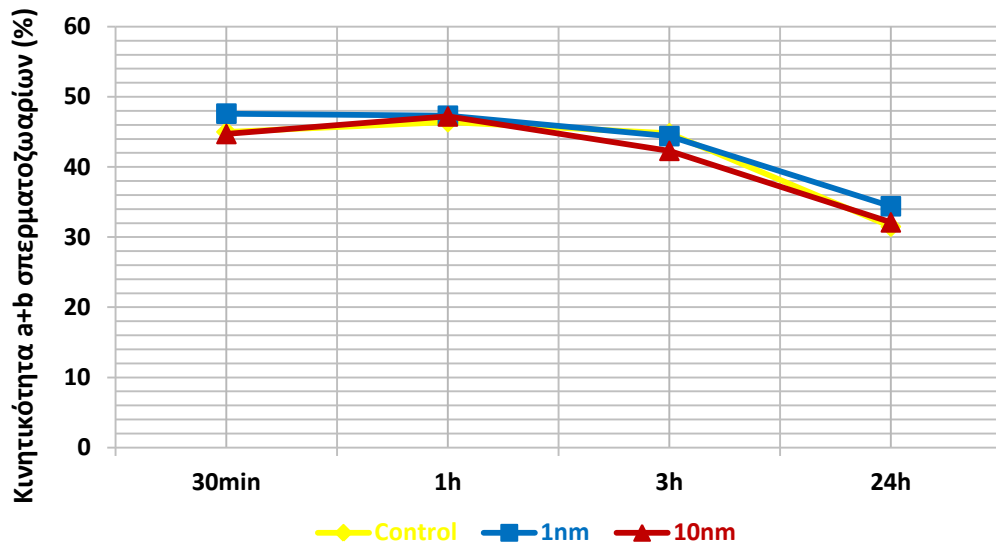


24 ώρες

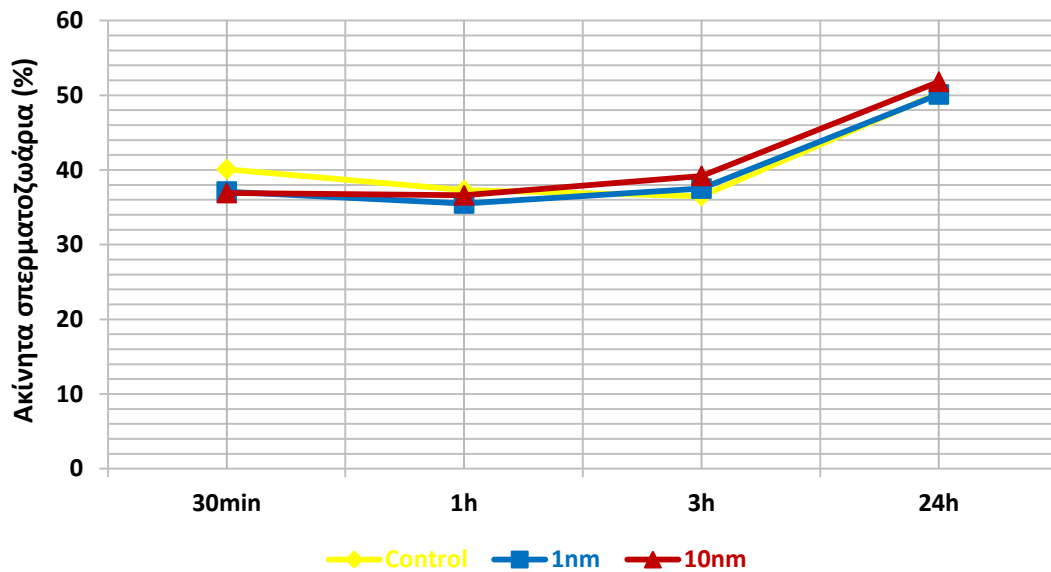


Ακολουθούν γραφήματα που αναπαριστούν τις μετρήσεις κινητικότητας και ακινησίας στο control και στα δειγμάτων βιταμίνης συγκεντρωτικά για κάθε χρονική στιγμή των μετρήσεων.

Κινητικότητα (a+b) σε σχέση με τον χρόνο



Ακίνησια (d) σε σχέση με τον χρόνο



Με βάση την στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων με paired t-test στο λογισμικό SPSS βρήκαμε:

- **30 λεπτά**

Προωθητική κίνηση (a+b) Control vs. **1 nM**:

P-value >0.05 NS (Non significant)

Προωθητική κίνηση (a+b) Control vs. **10 nM**:

P-value >0.05 NS (Non significant)

- **1 ώρα**

Προωθητική κίνηση (a+b) Control vs. **1 nM**:

P-value > 0.05 NS (Non significant)

Προωθητική κίνηση (a+b) Control vs. **10 nM**:

P-value > 0.05 NS (Non significant)

- **3 ώρες**

Προωθητική κίνηση (a+b) Control vs. **1 nM**:

P-value > 0.05 NS (Non significant)

Προωθητική κίνηση (a+b) Control vs. **10 nM**:

P-value > 0.05 NS (Non significant)

- **24 ώρες**

Προωθητική κίνηση (a+b) Control vs. **1 nM**:

P-value > 0.05 NS (Non significant)

Προωθητική κίνηση (a+b) Control vs. **10 nM**:

P-value > 0.05 NS (Non significant)

Δεν διαπιστώθηκε στατιστική σημαντικότητα μεταξύ της προωθητικής κίνησης των σπερματοζωαρίων και της καθεμιάς συγκέντρωσης βιταμινών (1nM και 10nM). Συνεπώς δεν μπορούμε να συμπεράνουμε ότι οι συγκεκριμένες συγκεντρώσεις βιταμίνης D επιδρούν στην κινητικότητα των σπερματοζωαρίων.

Συμπεράσματα - Συζήτηση

Η σχετική έλλειψη σχεδιασμένων μελετών *in vitro* για την επίδραση της βιταμίνης D στην κινητικότητα του σπέρματος υπήρξε ο λόγος που μας οδήγησε στην πραγματοποίηση του παρόντος πειράματος. Για τον σκοπό αυτό συλλέξαμε 18 δείγματα σπέρματος από υπογόνιμα ζευγάρια που κατέφυγαν στη Μονάδα Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής (Μ.Υ.Α.) του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας και οργανώσαμε κατάλληλη πειραματική πορεία, που να επικεντρώνεται στην κινητικότητα των σπερματοζωαρίων.

Συγκεκριμένα χρησιμοποιήσαμε την 1,25 βιταμίνη D, τον ενεργό μεταβολίτη της βιταμίνης D στον ανθρώπινο οργανισμό, σε τελικές συγκεντρώσεις 1nM και 10nM και την χορηγήσαμε σε δείγματα σπέρματος, παίρνοντας μετρήσεις κινητικότητας (σύμφωνα με τις οδηγίες του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας) στα 30 λεπτά, στην 1 ώρα, στις 3 ώρες και στις 24 ώρες μετά την χορήγηση της βιταμίνης.

Σε γενικές γραμμές στα 18 δείγματα σπέρματος που επεξεργαστήκαμε, δεν βρήκαμε στατιστικά σημαντική επίδραση καμίας από τις συγκεντρώσεις βιταμινών στην κινητικότητα των σπερματοζωαρίων. Ενδεχομένως οι συγκεντρώσεις που δοκιμάστηκαν να μην ήταν οι πιο αποτελεσματικές, καθώς από πειραματικά δεδομένων άλλων ερευνητών (Aquila et al. 2009;Blomberg et al. 2011) φαίνεται να δρουν αποτελεσματικά μικρότερες συγκεντρώσεις βιταμίνης D στην αύξηση της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων. Ωστόσο, οφείλαμε να δοκιμάσουμε τις εν λόγω συγκεντρώσεις (1nM και 10nM) προκειμένου να διερευνήσουμε από όλες τις πλευρές το φαινόμενο της επίδρασης της βιταμίνης D στην κινητικότητα. Το πείραμα στην ολότητά του αποτελεί για μας μια πιλοτική προσπάθεια μελέτης του ρόλου της βιταμίνης D στο ανδρικό αναπαραγωγικό σύστημα, οπότε κάθε αποτέλεσμα που θα προέκυπτε είχε να συνεισφέρει μόνο θετικά, δημιουργώντας χώρο για εποικοδομητικό προβληματισμό.

Σε μελλοντικό στάδιο της μελέτης της επίδρασης αυτής, θα μπορούσαμε να διαχωρίσουμε τα δείγματα ανάλογα με την συγκέντρωση σπερματοζωαρίων και την κινητικότητά τους σε ολιγοσπερμικά και ασθενοσπερμικά, αντίστοιχα. Με αυτόν τον τρόπο θα εμβαθύνουμε στην μελέτη του φαινομένου και θα επικεντρωθούμε στις διαφορές μεταξύ των δύο αυτών κατηγοριών. Ακόμη, θα μπορούσαμε να ερευνήσουμε και για συσχέτιση μεταξύ των δημογραφικών χαρακτηριστικών των δειγμάτων και της κινητικότητας υπό την επίδραση της βιταμίνης D, όπως για παράδειγμα για τον δείκτη μάζας σώματος των ανδρών, την κατανάλωση αλκοόλ, το κάπνισμα και ακόμα και τις συνθήκες εργασίας (π.χ. εργαζόμενοι σε χώρο υψηλών

θερμοκρασιών). Θα ήταν επιθυμητό στο μέλλον να γίνει συλλογή περισσότερων δειγμάτων σπέρματος, ώστε να διαπιστωθεί εάν υπάρχει επίδραση της βιταμίνης D με μεγαλύτερη στατιστική βεβαιότητα.

Τέλος, στόχος όλων των ερευνών που επικεντρώνονται στην αύξηση της κινητικότητας υπό την επίδραση της βιταμίνης D είναι η αξιοποίηση των ωφέλιμων αποτελεσμάτων στην εξωσωματική γονιμοποίηση. Αναζητούμε, δηλαδή, εφαρμόσιμους τρόπους αύξησης της κινητικότητας δειγμάτων σπέρματος που προορίζονται για τεχνικές, όπως η ενδομήτρια σπερματέγχυση, που παίζει καθοριστικό ρόλο η κινητικότητα.

Βιβλιογραφία

1. Abbasihormozi S., Kouhkan A., Alizadeh A.R., Shahverdi A.H., Nasr-Esfahani M.H., Sadighi Gilani M.A., Salman Yazdi R., Matinibehzad A., Zolfaghari Z. **Association of vitamin D status with semen quality and reproductive hormones in Iranian subfertile men.** *American Society of Andrology* 2017;**5**:113-18

2. Anic G.M., Albanes D., Rohrmann S., Kanarek N., Nelson W.G., Bradwin G. **Association between serum 25-hydroxyvitamin D and serum sex steroid hormones among men in NHANES.** *Clinical Endocrinology* 2016;**85**(2):258-66 doi:10.1111/cen.13062
3. Aquila S., Guido C., Middea E., Perrotta I., Bruno R., Pellegrino M., Andò S. **Human male gamete endocrinology: 1 α , 25-dihydroxyvitamin D3 (1,25(OH)2D3) regulates different aspects of human sperm biology and metabolism.** *Reproductive Biology and Endocrinology* 2009;**7**:140-153. doi:10.186/1477-7827-7-140
4. Aquila S., Guido C., Perrotta I., Tripepi S., Nastro A., Andò S. **Human sperm anatomy: ultrastructural localization of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 receptor and its possible role in the human male gamete.** *Journal of Anatomy* 2008;**213**:555-564
5. Blomberg Jensen M., Bjerrum P.J., Jessen T.E., Nielsen J.E., Joensen U.N., Olesen I.A., Petersen J.H., Juul A., Dissing S., Jørgensen N. **Vitamin D is positively associated with sperm motility and increases intracellular calcium in human spermatozoa.** *Human Reproduction* 2011;**26**:1307-17. doi:10.1093/humrep/der059
6. Blomberg Jensen M., Dissing S. **Non-genomic effects of vitamin D in human spermatozoa.** *Steroids* 2012;**77**:903-09
7. Blomberg Jensen M., Nielsen J.E., Jørgensen A., Rajpert-De Meyts E., Møbjerg Kristensen D., Jørgensen N., Skakkebaek N.E., Juul A., Leffers H. **Vitamin D receptor and vitamin D metabolizing enzymes are expressed in the human male reproductive tract.** *Human Reproduction* 2010;**25**:1303-11. doi:10.1093/humrep/deq024
8. Blomberg Jensen M. **Vitamin D supplementation and male infertility: the CBG- study a randomized clinical trial,** *Clin. Trials* (2016). <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT01304927?term=blomberg&rank=12>.
9. Boisen I.M., Bøllehuus Hansen L., Mortensen L.J., Lanske B., Juul A., Blomberg Jensen M. **Possible influence of vitamin D on male reproduction.** *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 2016;**173**:215-222 doi:10.1016/j.jsbmb.2016.09.023
10. Brenza H.L., DeLuca H.F. **Regulation of 25-hydroxyvitamin D3 1 α -hydroxylase gene expression by parathyroid hormone and 1,25-dihydroxyvitamin D3.** *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2000;**381**(1):143-152 doi:10.1006/abbi.2000.1970
11. Cariati F., Gigantino V., Coppola G., Pivonello C., Galdiero M., Botti G., Gandini L., Lenzi A., Franco R., Colao A., Pivonello R. **Localization of VDR and RXR in germ cell testicular cancer.** In editor: *Medicina Della Riproduzione tra Clinica e Tecnologie*, Padova, Italy; 2013: 291-5
12. Chen KS, DeLuca HF. **Cloning of the human 1 α , 25-dihydroxyvitamin D3 24-hydroxylase promoter and identification of two vitamin D-responsive elements.** *Biochimica et Biophysica acta* 1995;**1263**(1):1-9
13. Chin K.Y., Ima-Nirwana S., Wan Ngah W.Z. **Vitamin D is significantly associated with total testosterone and sex hormone-binding globulin in Malaysian men.** *Journal of the International Society for the Study of the Aging Male* 2015;**18**(3):175-9 doi:10.3109/13685538.2015.1034686
14. Chun R.F., Percy B.E., Orwoll E.S., Nielson C.M., Adams J.S., Hewison M. **Vitamin D and DBP: the free hormones hypothesis revisited.** *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2014;**144**(Pt A):132-137 doi:10.1016/j.jsbmb.2013.09.012

15. Cooper T.G., Noonan E., von Eckardstein S., Auger J., Gordon Baker H.W., Behre H.M., Haugen T.B., Kruger T., Wang C., Mbizvo M.T., Vogelsong K.M. **World Health Organization reference values for human semen characteristics.** *Human Reproduction Update* 2010;**16**:231-245. doi:10.1093/humupd/dmp048
16. Corbett S.T., Hill O., Nangia A.K. **Vitamin D receptor found in human sperm.** *Urology* 2006;**68**:1345-49. doi:10.1016/j.urology.2006.09.011
17. Dawson MI, Xia Z. **The retinoid X receptors and their ligands.** *Biochimica et Biophysica acta* 2012; **1821**(1):21-56. doi:10.1016/j.bbali.2011.09.014.
18. de Angelis C., Galdiero M., Pivonello C., Garifalos F., Menafra D., Cariati F., Salzano C., Galdiero G., Piscopo M., Vece A., Colao A., Pivonello R. **The role of vitamin D in male fertility: A focus on the testis.** *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders* 2017;**18**:285-305. doi:10.1007/s11154-017-9425-0
19. Fukumoto S. **Phosphate metabolism and vitamin D.** *BoneKEy Reports* 2014;**3**:497 doi: 10.1038/bonekey.2013.231
20. Hammoud A.O, Meikle A.W., Peterson C.M., Stanford J., Gibson M., Carrell D.T. **Association of 25-hydroxy-vitamin D levels with semen and hormonal parameters.** *Asian Journal of Andrology* 2012;**14**:855-59. doi:10.1038/aja.2012.77
21. Haussler MR, Jurutka PW, Mizwicki M, Norman AW. **Vitamin D receptor (VDR)-mediated actions of 1 α ,25(OH) $_2$ vitamin D $_3$: genomic and non-genomic mechanisms.** *Best Practice & Research. Clinical endocrinology & metabolism* 2011; 25(4):543-59 doi 10.1016/j.beem.2011.05.010
22. Henry H.L. **Regulation of vitamin D metabolism.** *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 2011; **25**(4):543-59 doi:10.1016/j.beem.2011.05.010
23. Hochberg Z. et al. **Does 1,25-dihydroxyvitamin D participate in the regulation of hormone release from endocrine glands?** *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 1985;**60**:57-61
24. Huhtaniemi I. & Toppari J. **Endocrine, paracrine and autocrine regulation of testicular steroidogenesis.** *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1995;**377**:33-54
25. Kinuta K. et al. **Vitamin D is an important factor in estrogen biosynthesis of both female and male gonads.** *Endocrinology* 2000;141:1317-24
26. Kwiecinski G. G., Petrie G.I., & DeLuca H.F. **Vitamin D is necessary for reproductive functions of the male rat.** *Journal of Nutrition* 1989;**119**:741-44
27. Makler A. **The improved ten-micrometer chamber for rapid sperm count and motility evaluation.** *Fertility and Sterility* 1980;**33**(3):337-338
28. Nimptsch K., Platz E.A., Willett W.C., Giovannucci E. **Association between plasma 25-OH vitamin D and testosterone levels in men.** *Clinical Endocrinology* 2012;**77**(1):106-12 doi:10.1111/j.1365-2265.2012.04332.x

29. Ramlau-Hansen C.H., Moeller U.K., Bonde J.P., Olsen J., Thulstrup A.M. **Are serum levels of vitamin D associated with semen quality? Results from a cross-sectional study in young healthy men.** *Fertility and Sterility* 2011;**95**:1000-004. doi:10.1016/fertnstert.2010.11
30. Ren D., Navarro B., Perez G., Jackson A.C., Shyuefang H., Shi Q., Tilly J.L., Clapham D.E. **A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility.** *Nature* 2001;**413**:603-09
31. Shin J.S., Choi M.Y., Longtine M.S., Nelson D. M. **Vitamin D effects on pregnancy and the placenta.** *Placenta* 2010;**31**:1027-1034 doi: :10.1016/j.placenta.2010.08.015
32. Uhland A.M., Kwiecinski G.G. & DeLuca H.F. **Normalization of serum calcium restores fertility in vitamin D-deficient male rats.** *Journal of Nutrition* 1992;**122**:1338-44
33. Valimaki V.V., Alfthan H., Ivaska K.K., Loyttyniemi E., Petterson K., Stenman U.H. **Serum estradiol, testosterone and sex hormone-binding globulin as regulators of peak bone mass and bone turnover rate in young Finnish men.** *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2004;**89**(8):3785-9 doi:10.1210/jc.2003-032187
34. Verstuyf A., Carmeliet G., Bouillon R., Mathieu C. **Vitamin D: a pleiotropic hormone.** *Kidney International* 2010;**78**(2):21-56 doi:10.1016/j.bbaliip.2011.09.014
35. Wang N., Han B., Li Q., Chen Y., Chen Y., Xia F. **Vitamin D is associated with testosterone and hypogonadism in Chinese men: results from a cross-sectional SPECT-China study.** *Reproductive Biology & Endocrinology* 2015;**13**:74 doi:10.1186/s12958-015-0068-2
36. Wehr E., Pilz S., Boehm B.O., Marz W., Obermayer-Pietsch B. **Association of vitamin D status with serum androgen levels in men.** *Clinical Endocrinology* 2010;**73**(2):243-8 doi:10.1111/j.1365-2265.2009.03777.x
37. Zanatta L., Zamoner A., Zanatta A.P., Bouraima – Lelong H., Delalande C., Bois C. **Nongenomic and genomic effects of 1alpha,25(OH)₂Vitamin D₃ in rat testis.** *Life Sciences* 2011; **89**(15-16):515-23 doi:10.1016/j.lfs.2011.04.008
38. Zofková I., Scholz G., Stárka L. **Effect of calcitonin and 1,25(OH)₂ vitamin D₃ on the FSH, LH and testosterone secretion at rest and LHRH stimulated secretion.** *Hormone and Metabolic Research* 1989;**21**:682-685