



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

Διευθυντής: ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ Ι. ΔΑΠΟΝΤΕ, Καθηγητής

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Διευθυντής: ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΒΑΜΒΑΚΟΠΟΥΛΟΣ, Καθηγητής

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ»

Διευθυντής ΠΜΣ: ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ Ι. ΔΑΠΟΝΤΕ, Καθηγητής

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Επίδραση της χορήγησης Vitamin D συγκέντρωσης 0,01nM στη διαδικασία της κατάψυξης (Vitrification) δείγματος σπέρματος»

**ΔΡΙΒΑ ANNA MAPIA
ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

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** **Γεώργιος-Σπυρίδων Ανυφαντής**
(Επιβλέπων) Επίκουρος Καθηγητής Εμβρυολογίας του Τμήματος Ιατρικής
 του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- 2^{ος} Εξεταστής** **Κωνσταντίνος Νταφόπουλος**
 Καθηγητής Μαιευτικής & Γυναικολογίας του Τμήματος
 Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- 3^{ος} Εξεταστής** **Αλέξανδρος Δαπόντε**
 Καθηγητής Μαιευτικής & Γυναικολογίας του Τμήματος
 Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στην Μονάδα Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας υπό την καθοριστική και επίβλεψη του Επίκουρου Καθηγητή Εμβρυολογίας Γ. Ανυφαντή τον οποίο και ευχαριστώ θερμά πρωτίστως, αρχικά για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε κατά την ανάθεση αυτής της εργασίας και στη συνέχεια για την αμέριστη βοήθεια, καθοδήγηση και στήριξη που μου προσέφερε όλον αυτό τον καιρό.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Διευθυντή του Π.Μ.Σ. και Καθηγητή Α. Δαπόντε, για το ενδιαφέρον ως προς την διεξαγωγή αυτής της διπλωματικής, τον υπεύθυνο της Μονάδος και Καθηγητή Κ. Νταφόπουλο, χάρη στον οποίο ήρθα πιο κοντά στο αντικείμενο της Γυναικολογίας και για τις διαφωτιστικές του απαντήσεις σε βασικά μου ερωτήματα και τις Αναστασία Τζαβέλα και Σωτηρία Παππά που στελεχώνουν την Μ.Υ.Α και έπαιζαν καθοριστικό ρόλο στην εκπαίδευση μας και την εξοικείωση με τον χώρο της εξωσωματικής, όλον αυτόν τον χρόνο.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ απευθύνεται στον Καθηγητή Ανάργυρο Μουλά, και την Βιοχημικό Μαρία Βάϊου του Εργαστηρίου Βιοχημείας του Τμήματος Τεχνολόγων Γεωπόνων στο Τ.Ε.Ι. Θεσσαλίας, για τα φώτα τους πάνω στην βιταμίνη D, την παροχή της και την καθοριστική τους συμβολή στην δημιουργία των πρωτοκόλλων.

Επίσης, το μεγαλύτερο ευχαριστώ απευθύνεται στην Κωνσταντίνα Καλτσουνάκη, με την οποία συνεργαστήκαμε για την διεξαγωγή αυτής της διπλωματικής, και στις Βασιλική Γκαμπλιά και Έλενα Σελιώνη, χωρίς την πολύτιμη βοήθεια των οποίων, θα ήταν αδύνατη η συγκέντρωση των δειγμάτων.

Τέλος δεν θα μπορούσα να παραλείψω τους αγαπημένους μου γονείς, που όλα αυτά τα χρόνια με συντηρούν και με στηρίζουν με αγάπη σε όλες μου τις κινήσεις, όσο χρόνο και αν χρειάζονται, μέχρι να ορθοποδήσω ανεξάρτητη και τον φίλο μου Matt, που για χρόνια με στηρίζει και μου συμπαραστέκεται με υπομονή σε ό,τι κρίνω σκόπιμο για την πορεία μου.

Δρίβα Άννα-Μαρία

ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ

Εκπαίδευση

- **9/16 εως σήμερα** : Μεταπτυχιακή φοιτήτρια στο Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών «ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ» του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και εκπόνηση μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας στην Μονάδα Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας.
- **9/2011-6/2016** : Φοιτήτρια στο τμήμα Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης- Κατεύθυνση Μοριακής Βιολογίας με γενικό μέσο όρο μέχρι σήμερα 7,87/10.
- **9/2015-6/2016** : **Πτυχιακή εργασία** στο εργαστήριο της Δρ. Δήμητρα Θωμαΐδου στο Τμήμα Νευροβιολογίας & Μονάδα Οπτικής Μικροσκοπίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ με τίτλο «Επαναπρογραμματισμός αστροκυττάρων προς νευρώνες με την χρήση των microRNAs miR-124/ miR-125b *in vitro*».
- **3/2015-6/2015** : **Τριμηνιαία πρακτική άσκηση** υπό την επίβλεψη των Δρ. Χαραλαμπίδου και Δρ.Γραβάνη στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης, με θέμα « Δράση του συνθετικού αναλόγου BNN219 της DHEA στο μονοπάτι διάσωσης του αποπτωτικού θανάτου των νευρικών κυττάρων».
- **9/2014-12/2014** : **Πρακτική άσκηση** στο εργαστήριο του Δρ. Σκουλάκη στο BSRC Fleming με θέμα "Metal binding and oxidative stress in Tauopathies in *Drosophila Melanogaster*".
- **1/2014-6/2014** : **Erasmus** στο Université Montpellier 2- Facultés et sciences techniques- Biologie moléculaire de la cellule et biotechnologies.

Συνέδρια – Ημερίδες

- **12/2016**: 5^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γονιμότητας και Στειρότητας, της Ελληνικής Εταιρείας Γονιμότητας και Στειρότητας, Θεσσαλονίκη
- **5/2016**: 4^η Ετήσια Εκπαιδευτική Δημερίδα για τους χρήστες ζώων Εργαστηρίου του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ & Τμήματος ζωικών προτύπων βιοϊατρικής έρευνας με θέμα «Εισαγωγή στην Επιστήμη Ζώων Εργαστηρίου»
- **7/2015**: "The Onassis Foundation Science Lecture Series 2015", FORTH, Ηράκλειο Κρήτης με θέμα "Stem cells: From basic biology to translational research"

«Επίδραση της χορήγησης Vitamin D συγκέντρωσης 0,01nM στη διαδικασία της κατάψυξης (Vitrification) δείγματος σπέρματος»

ΔΡΙΒΑ ANNA MAPIA

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 του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Σύμβουλος: Κωνσταντίνος Νταφόπουλος, Καθηγητής Μαιευτικής & Γυναικολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Μέλος: Αλέξανδρος Δαπόντε, Καθηγητής Μαιευτικής & Γυναικολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	7
ABSTRACT.....	8
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
1.1 Υπογονιμότητα	9
1.1.1 Ορισμός.....	9
1.1.2 Αίτια υπογονιμότητας.....	9
1.1.3 Πρόληψη υπογονιμότητας.....	10
1.1.4 Προστασία της ανδρικής γονιμότητας και κρυοσυντήρηση σπέρματος .	11
1.2 Η βιταμίνη D.....	13
1.2.1 Σύνθεση και μεταβολισμός της βιταμίνης D	13
1.2.3 Μηχανισμοί δράσης της βιταμίνης D και υποδοχέας VDR.....	14
1.2.3 Ιστοί- στόχοι της βιταμίνης D.....	16
1.2.4 Ανδρική αναπαραγωγική οδός και βιταμίνη D.....	17
1.2.5 Η μη γενωμική επίδραση της Βιταμίνης D στο σπέρμα.....	19
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	21
2.1. Υλικά.....	21
2.2. Εργαστηριακός εξοπλισμός	21
2.3 Πειραματικό μέρος	22
2.3.1 Εκτίμηση δείγματος.....	22
2.3.2 Πρωτόκολλο κατάψυξης (vitrification) σπέρματος με βιταμίνη D	24
2.3.3 Πρωτόκολλο απόψυξης σπέρματος και εκτίμηση νέας κινητικότητας ...	25
2.3.4 Στατιστική ανάλυση μετρήσεων.....	26
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	27
3.1 Ιστορικό δειγμάτων.....	27
3.2 Επίδραση της βιταμίνης D στην κινητικότητα σπερματοζωαρίων μετά από απόψυξη.....	28
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	30
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	32

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ανδρική υπογονιμότητα, που συμβάλλει στο ήμισυ περίπου στην αδυναμία ενός ζευγαριού να τεκνοποιήσει, οφείλεται σε διάφορες αιτίες. Πέρα από τις παθολογικές αιτίες ή δυσλειτουργίες που αφορούν το ανδρικό αναπαραγωγικό σύστημα, τα τελευταία χρόνια έρευνες δείχνουν ότι η υπογονιμότητα μπορεί να οφείλεται εν μέρει και στον τρόπο ζωής, σε περιβαλλοντικούς παράγοντες και στην διατροφή.

Ένα από τα ευρέως συζητημένα μόρια την τελευταία δεκαετία είναι η βιταμίνη D καθώς η ανεπάρκεια της έχει συσχετιστεί με πολλές ασθένειες και δυσλειτουργίες, μια εκ των οποίων η ανδρική και η γυναικεία υπογονιμότητα. Συγκεκριμένα, από μελέτες σε ζώα και ανθρώπους έχειδειχθεί ότι η βιταμίνη D επιδρά θετικά στην ποιότητα του σπέρματος και ότι συμπληρώματα με βιταμίνη D μπορούν να βελτιώσουν την κινητικότητα του σπέρματος σε άνδρες με ανεπάρκεια και ασθενοζωοσπερμία και ίσως σε υπογόνιμους άνδρες από ζευγάρια που εμπλέκονται με την υποβοηθούμενη αναπαραγωγή. Αντίστοιχα, σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στην Μ.Υ.Α του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας φάνηκε ότι η κινητικότητα των σπερματοζωαρίων βελτιώνεται εντός μισής ώρας μετά την προσθήκη βιταμίνης D σε συγκεντρώσεις 0,01nM και 0,1nM.

Με βάση τα παραπάνω δεδομένα, και γνωρίζοντας ότι δεν έχει μελετηθεί η επίδραση της βιταμίνης D σε δείγματα σπέρματος που καταψύχθηκαν, θελήσαμε να δείξουμε αν υπάρχει κάποια επίδραση της βιταμίνης D συγκέντρωσης 0,01nM στην κινητικότητα των σπερματοζωαρίων μετά από κατάψυξη και σχεδιάστηκε η παρακάτω μελέτη.

Συνοπτικά, τα αποτελέσματα από 17 δείγματα, έδειξαν ότι η προσθήκη βιταμίνης D συγκέντρωσης 0,01nM σε δείγματα σπέρματος που καταψύχθηκαν και στην συνέχεια αποψύχθηκαν, μειώνει την στατιστικά σημαντικά την προωθητική κινητικότητα και αντίστοιχα αυξάνει στατιστικά σημαντικά το ποσοστό ακίνητων σπερματοζωαρίων.

Συμπερασματικά, φαίνεται ότι πιθανώς η διαδικασία της κατάψυξης - απόψυξης ενδέχεται να επηρεάζει τον υποδοχέα VDR ή μόρια και δομές που συμμετέχουν στην ακόλουθη ενεργοποίηση του, και συνεπώς φαίνεται πως η βιταμίνη D συγκέντρωσης 0,01nM δεν έχει την θετική αναμενόμενη επίδραση στην διαδικασία της κατάψυξης. Τέλος, χρειάζεται σχεδιασμός περαιτέρω πειραματικών μελετών, με μεγαλύτερο αριθμό ομαδοποιημένων δειγμάτων για την διαλεύκανση του ρόλου της βιταμίνης D στην ανδρική υπογονιμότητα και στα πρωτόκολλα κατάψυξης σπέρματος.

ABSTRACT

Male infertility, that contributes almost at the same extent as female, to the inability of an infertile couple to achieve a pregnancy, can be the result of many causes. Apart from pathological reasons and male reproductive system dysfunctions, lately researches have shown that other potential causes of subfertility could be related to lifestyle, diet and environmental factors.

Over the last decade vitamin D has been a molecule of great research interest, as its deficiency is related to many diseases and dysfunctions, one of which is male and female infertility. Specifically, available studies in animal models and humans suggest that vitamin D exerts the most consistent beneficial effect on semen quality, and suggest that vitamin D supplementation might improve sperm motility in men with vitamin D deficiency displaying asthenozoospermia and possibly fertile men from couples enrolled in assisted reproductive programs. Respectively, experiments that took place in the ART unit of the University General Hospital of Larissa, showed that sperm motility is improved within half hour post vitamin D addition at concentrations of 0,01nM και 0,1nM.

Therefore, considering the data above, and given the fact that to date no studies have assessed the impact of vitamin D on frozen semen samples, we designed this study, to determine if there is an effect of vitamin D in concentration of 0,01nM on semen motility after vitrification and thawing.

Briefly, out of 17 samples, our results showed that the addition of 0,01nM vitamin D to semen samples that got frozen, reduces the motility after thawing with statistical significance and respectively increases the immotile spermatozoa with statistical significance.

Conclusively, it seems that the vitrification-thawing procedure itself, probably affects the VDR receptor and other molecules or structures downstream of the activation triggered from the VDR, and therefore it doesn't seem that 0,01nM vitamin D has the expected positive effect.

Finally there is need for more prospective experimental studies, with more grouped samples, aimed at better characterizing the definitive role of vitamin D in male fertility and especially on semen vitrification protocols, in order to fulfill the need of shedding new light in this extremely challenging field.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Υπογονιμότητα

1.1.1 Ορισμός

Στείρωση ή υπογονιμότητα είναι η αδυναμία ενός ζευγαριού να πετύχει κλινική κύηση μετά από τη συμπλήρωση ενός έτους τακτικών και ελεύθερων σεξουαλικών επαφών, σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (World Health Organization, WHO) και με την Διεθνή Επιτροπή Καταγραφής των Τεχνολογιών Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής (International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology, ICMART). Η συχνότητα της στειρώσης στο γενικό πληθυσμό δεν είναι απόλυτα γνωστή, υπολογίζεται όμως ότι το πρόβλημα της στειρώσης αντιμετωπίζουν ένα στα πέντε νιόπαντρα ζευγάρια και συγκεκριμένα το 15% που επιθυμούν να τεκνοποιήσουν, δεν καταφέρνουν να πετύχουν εγκυμοσύνη μέσα στον πρώτο χρόνο, ενώ συνολικά ένα 20% μετά την παρέλευση και του δεύτερου χρόνου ελεύθερων σεξουαλικών επαφών (Slama R et al., 2012, Thoma ME et al., 2013). Η δε μειωμένη αναπαραγωγική ικανότητα (fecundity) που συμπεριλαμβάνει την στειρότητα και την δυσκολία διεκπεραίωσης μιας εγκυμοσύνης φαίνεται να επηρεάζει τον διπλάσιο αριθμό ζευγαριών, με αποτέλεσμα την αύξηση θεραπευτικών αγωγών για την αντιμετώπιση της υπογονιμότητας.

1.1.2 Αίτια υπογονιμότητας

Τα αίτια υπογονιμότητας φαίνεται ότι αφορούν είτε στην γυναίκα σε ποσοστό 40%, είτε στον άνδρα με παρόμοιο ποσοστό 40%, ενώ η ανεξήγητη υπογονιμότητα που μπορεί να οφείλεται και στους δύο απασχολεί ένα 20% των περιπτώσεων υπογονιμότητας. Η γυναικεία υπογονιμότητα μπορεί να οφείλεται σε διαταραχές ωοθυλακιορρηξίας, διαταραχές στην λειτουργία των σαλπίγγων, ενδομητρίωση, τραχηλικό παράγοντα, αλλά αίτια (μήτρα) ή ανεξήγητη υπογονιμότητα. Η ανδρική υπογονιμότητα μπορεί να οφείλεται σε συγγενείς ανωμαλίες, χρωμοσωμικές ανωμαλίες, ενδοκρινείς διαταραχές, φλεγμονές των γεννητικών οργάνων, κίρσοκήλη, νευρολογικές ή ψυχικές διαταραχές ή σε ιδιοπαθή στειρότητα, καταστάσεις που οδηγούν στην απουσία (αζωοσπερμία) ή στην παρουσία μη φυσιολογικού σπέρματος (ασθενοζωοσπερμία, ολιγοζωοσπερμία) και κατ' επέκταση σε κακό σπερμοδιάγραμμα. Ακόμη έχει βρεθεί ότι η ανδρική υπογονιμότητα μπορεί επίσης να επιδεινώνεται από ψυχολογικούς παράγοντες (Wincze, J.P., 2015) και

περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως τοξικές ουσίες, φάρμακα, αλκοόλ, ναρκωτικά, ακτινοβολία και υψηλές θερμοκρασίες (Sharpe, R.M., 2000). Για το λόγο αυτό τα τελευταία χρόνια έχει επεκταθεί η βιβλιογραφία που τείνει να διαλευκάνει την σχέση που έχει ο τρόπος ζωής και η διατροφή με την υπογονιμότητα (Gaskins AJ et al., 2017).

1.1.3 Πρόληψη υπογονιμότητας

Η χρήση μεθόδων υποβοηθούμενης αναπαραγωγής έχει αυξηθεί σημαντικά αφού υπολογίζεται ότι μόνο στις ΗΠΑ οι υποβοηθούμενοι κύκλοι έχουν αυξηθεί από 60.000 mmτο 1995 σε 209.000 το 2015 (ART 1998, Preliminary SART 2015) και ο συνδυασμός υψηλής συχνότητας περιστατικών υπογονιμότητας, υψηλού κόστους θεραπείας και περιορισμένης γεωγραφικής πρόσβασης σε κέντρα υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, οδήγησαν στην αναζήτηση τρόπων πρόληψης και αντιμετώπισης με βάση τις αλλαγές στην συνήθεια και την καθημερινότητα (Chambers, G.M et al., 2009, Harris, J.A et al., 2017). Η διευκρίνιση εύκολα τροποποιήσιμων, παραγόντων του τρόπου ζωής, όπως η διατροφή, που επηρεάζουν την ανθρώπινη γονιμότητα έχουν μείζονα κλινική σημασία και αξία για την δημόσια υγεία και άλλωστε έχει φανεί ότι ο τρόπος ζωής, η διατροφή και το περιβάλλον παίζουν να σημαντικό ρόλο στην αναπαραγωγική απόδοση του άντρα όσο και της γυναίκας (Rossi BV et al., 2016). Στα πλαίσια λοιπόν της πρόληψης της υπογονιμότητας για την αντιμετώπιση της, μελετώνται διαφορά μόρια που μπορεί να βελτιώσουν τον υπογόνιμο φαινότυπο ενός ζεύγους. Για παράδειγμα η πρόσληψη συμπληρώματος φολικού οξέος, αντιοξειδωτικών σκευασμάτων, βιταμίνης B & D καθώς και η μείωση γαλακτοκομικών, σόγιας, τρανς-λιπαρών, αλκοόλ και καφεΐνης φαίνεται να βοηθούν στην αντιμετώπιση της γυναικείας ή ανδρικής υπογονιμότητας αναλόγως (Gaskins AJ et al., 2017).

Συγκεκριμένα για την βιταμίνη D και την επίδραση της στην γυναικεία γονιμότητα έχει φανεί ότι σε γυναίκες που υποβάλλονται σε κύκλους IVF τα ποσοστά κυήσεων είναι τετραπλάσια σε αυτές που έχουν επαρκή βιταμίνη D σε σχέση με τις ανεπαρκείς, καθώς και άλλες παρόμοιες έρευνες έχουν δείξει την θετική επίδραση της στην γυναικεία γονιμότητα (Ozkan S et al., 2010, Paffoni A et al., 2014, Garbedian K et al., 2013, Polyzos NP et al., 2014 Rudick B et al., 2012), αλλά βιβλιογραφικά παραμένει ασαφές το κατά πόσο η βιταμίνη D δίνει πλεονέκτημα γονιμότητας όταν

υπάρχει σε μεγάλες ποσότητες, καθώς υπάρχουν και μελέτες που δεν δείχνουν καμία (Aleyasin A et al., 2011, Franasiak JM et al., 2015, Firouzabadi RD et al., 2014, Abadia L Neville G et al., 2016) ή αρνητική συσχέτιση (Anifandis GM et al., 2010) . Ακόμη, η επίδραση της βιταμίνης D στην ανδρική υπογονιμότητα δεν έχει μελετηθεί εκτενώς και γι' αυτό αποτελεί ενδιαφέρον αντικείμενο μελλοντικής έρευνας και θα αναλυθεί στην συνέχεια.

1.1.4 Προστασία της ανδρικής γονιμότητας και κρυοσυντήρηση σπέρματος

Ο σύγχρονος άνδρας καλείται καθημερινά να αντιμετωπίσει αντίξοους παράγοντες που ενδέχεται να απειλούν την γονιμότητά του. Το άγχος (American Psychiatric Association; 1994, Hjollund NH et al., 2004) η μόλυνση του φυσικού περιβάλλοντος (Sokol et al. 2006), οι επιβαρυνμένες συνθήκες εργασιακού περιβάλλοντος όπως η αυξημένη θερμοκρασία (Ikeda M, et al., 1999), η πολύωρη καθιστική στάση (Figa-Talamanca et al. 1996, Bujan et al. 2000), η παχυσαρκία (Hammoud AO et al., 2006, Liu Y et al., 2017), η μη ισορροπημένη διατροφή, κάποιες συνήθειες του καθημερινού τρόπου ζωής, όπως το κάπνισμα και η υπέρμετρη κατανάλωση αλκοόλ (Mattison DR et al., 1982, Ramlau-Hansen C.H, et al 2006), αποτελούν μερικούς από τους πιθανούς λόγους που μπορεί να προκαλέσουν σταδιακή μείωση της ποιότητας του ανδρικού σπέρματος. Η επίδραση των παραπάνω παραγόντων στην ανδρική γονιμότητα είναι αυξητικά ανάλογη με την πάροδο του χρόνου και εντείνεται επιπλέον με την πρόοδο της ηλικίας. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό δεδομένου ότι σήμερα η πλειονότητα των αναπαραγωγικά ώριμων ανδρών αναβάλλουν την δημιουργία οικογένειας για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα απ' ότι στο παρελθόν.

Η πρόοδος των βιοϊατρικών επιστημών παρέχει την δυνατότητα προστασίας από τις δυσμενείς προοπτικές για την ανδρική γονιμότητα, 'παγώνοντας' τον χρόνο. Ο τρόπος με τον οποίο διασφαλίζεται η δυνατότητα ενός άνδρα να δημιουργήσει τους δικούς του βιολογικά απογόνους, οποιαδήποτε χρονική στιγμή το αποφασίσει, είναι η Κατάψυξη και Κρυοσυντήρηση σπέρματος.

Η κατάψυξη σπέρματος αφορά συνολικά μεγάλο αριθμό ανδρών κι συγκεκριμένα άνδρες που: 1) πρόκειται να εκτεθούν σε τοξικούς περιβαλλοντικούς παράγοντες ή να υποβληθούν σε χειρουργικές ή άλλους είδους ιατρικές θεραπείες, που μπορεί να προκαλέσουν βλάβη στη γονιμότητα 2) πρόκειται να υποβληθούν σε μεθόδους

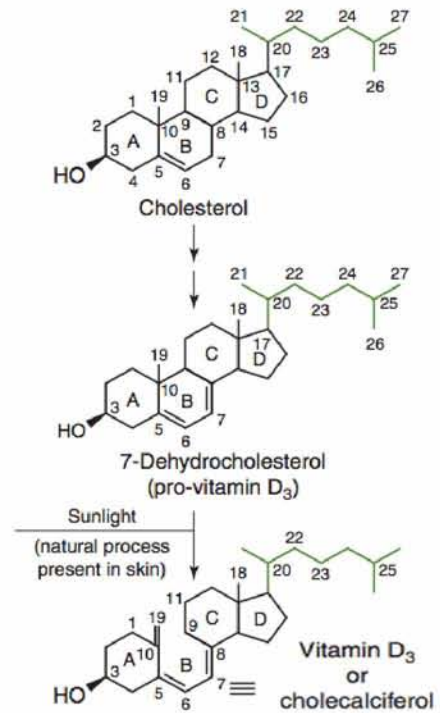
ιατρικώς υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (ενδομήτρια σπερματέγχυση – εξωσωματική γονιμοποίηση) με τις συζύγους τους και αδυνατούν να παράσχουν το δείγμα σε προγραμματισμένο χρόνο ή ενδέχεται να απουσιάζουν λόγω επαγγελματικών υποχρεώσεων 3) πρόκειται να υποβληθούν σε χειρουργική συλλογή σπερματοζωαρίων από όρχι ή επιδιδυμίδα, εφ’ όσον η διαδικασία επιτύχει τη λήψη επαρκούς ποσότητας σπερματοζωαρίων 4) φέρουν διαπιστωμένη χαμηλή ποιότητα σπέρματος και επιθυμούν να συγκεντρώσουν ένα ικανοποιητικό απόθεμα αναπαραγωγικού υλικού από πολλαπλές λήψεις 5) εκτίθενται συστηματικά σε σπερματοτοξικούς παράγοντες στο χώρο διαβίωσης ή εργασίας τους, π.χ. χημικές ουσίες, ακτινοβολίες, υψηλές θερμοκρασίες 6) επιθυμούν να τεκνοποιήσουν σε μεταγενέστερο χρονικό διάστημα και θέλουν να εξασφαλίσουν το αναπαραγωγικό τους δυναμικό από οποιαδήποτε δυσμενή συνθήκη, ως κίνηση προνοητικότητας (fertility preservation).

Συνεπώς, η κρυοσυντήρηση σπέρματος αφορά σε ένα σημαντικό ποσοστό ανδρών και μέθοδοι βελτίωσης της διαδικασίας κατάψυξης του σπέρματος όπως νέες τεχνολογίες, τροποποίηση των πρωτοκόλλων, ή προσθήκη μορίων που αυξάνουν τα ποσοστά επιβίωσης και κινητικότητας μετά την απόψυξη του, αποτελούν στόχο ερευνών με μεγάλο ενδιαφέρον. Στα πλαίσια αυτά η προσθήκη βιταμίνης D, ως ένα από τα πιθανώς ευεργετικά μόρια, σε δείγματα σπέρματος προς κατάψυξη, αποτέλεσε το αντικείμενο αυτής της μελέτης με αμφίβολα αποτελέσματα.

1.2 Η βιταμίνη D

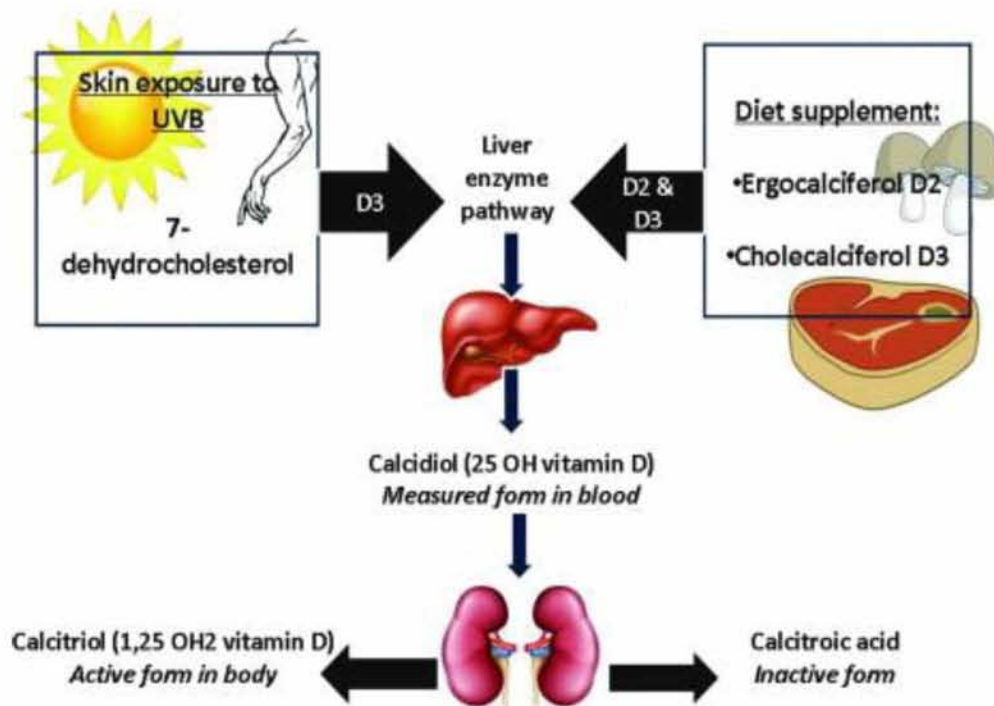
1.2.1 Σύνθεση και μεταβολισμός της βιταμίνης D

Η ομάδα της βιταμίνης D συμπεριλαμβάνει πέντε διαφορετικά συστατικά, εκ των οποίων τα δύο σχετίζονται κυρίως με βιολογικές διεργασίες και είναι η εργοκαλσιφερόλη (βιταμίνη D₂) και κυρίως η χολεκαλσιφερόλη (βιταμίνη D₃) (Henry HL et al., 2011). Η ανενεργή μορφή βιταμίνης D₃ λαμβάνεται μερικώς από λιπαρές τροφές όπως ο σολομός, ο τόνος, οι σαρδέλες, τα στρείδια, οι γαρίδες, ο κρόκος αυγού και τα μανιτάρια. Παρόλ' αυτά συντίθεται κατά βάση ενδογενώς, κυρίως στο δέρμα όπου η ακτινοβολία UV-B μετατρέπει την 7-δεϋδροχοληστερόλη σε ανενεργή χολεκαλσιφερόλη που στην συνέχεια ενεργοποιείται μετά από δύο ενζυματικές διεργασίες (**Εικόνα 1.1**).



Εικόνα 1.1 Η ενεργοποίηση της 7-δεϋδροξυχοληστερόλης από την ακτινοβολία του ηλίου, και η χημική της δομή

Η χολεκαλσιφερόλη εισέρχεται στην κυκλοφορία και μέσω της Vitamin D Bonding Protein (DBP) μεταφέρεται στο ήπαρ όπου λαμβάνει χώρα η πρώτη υδροξυλίωση από το ένζυμο CYP2R1 (25-υδροξυλάση) οδηγώντας στον σχηματισμό της 25-υδροξυ-βιταμίνης D₃ που πριν επανέλθει στην κυκλοφορία στους νεφρούς λαμβάνει χώρα και η δεύτερη υδροξυλίωση από το ένζυμο CYP27B1(1α-υδροξυλάση) οδηγώντας στον σχηματισμό της 1α,25-δεϋδροξυ-βιταμίνης D₃, που αποτελεί και την τελική ενεργή μορφή βιταμίνης D₃ στην οποία αναφερόμαστε και ως Βιταμίνη D (Nykjaer A et al., 1999, Prosser DE et al., 2004, Henry HL et al.,2011, Chun RF et al.,2014). Η ενεργή μορφή, δηλαδή η 1α,25-δεϋδροξυ-βιταμίνης D₃ είναι αυτή που προσδένεται και ενεργοποιεί τον υποδοχέα VDR της Βιταμίνης D στα κύτταρα στόχους (Haussler MR et al., 2011) και τελικώς απενεργοποιείται από το ένζυμο CYP24A1 (24-υδροξυλάση) (Prosser DE et al., 2004, Henry HL et al.,2011, Veldurthy V et al.,2016). Σχηματικά η σύνθεση της βιταμίνης D παρουσιάζεται στην **Εικόνα 1.2** (Mostafa, W.Z et al., 2015).

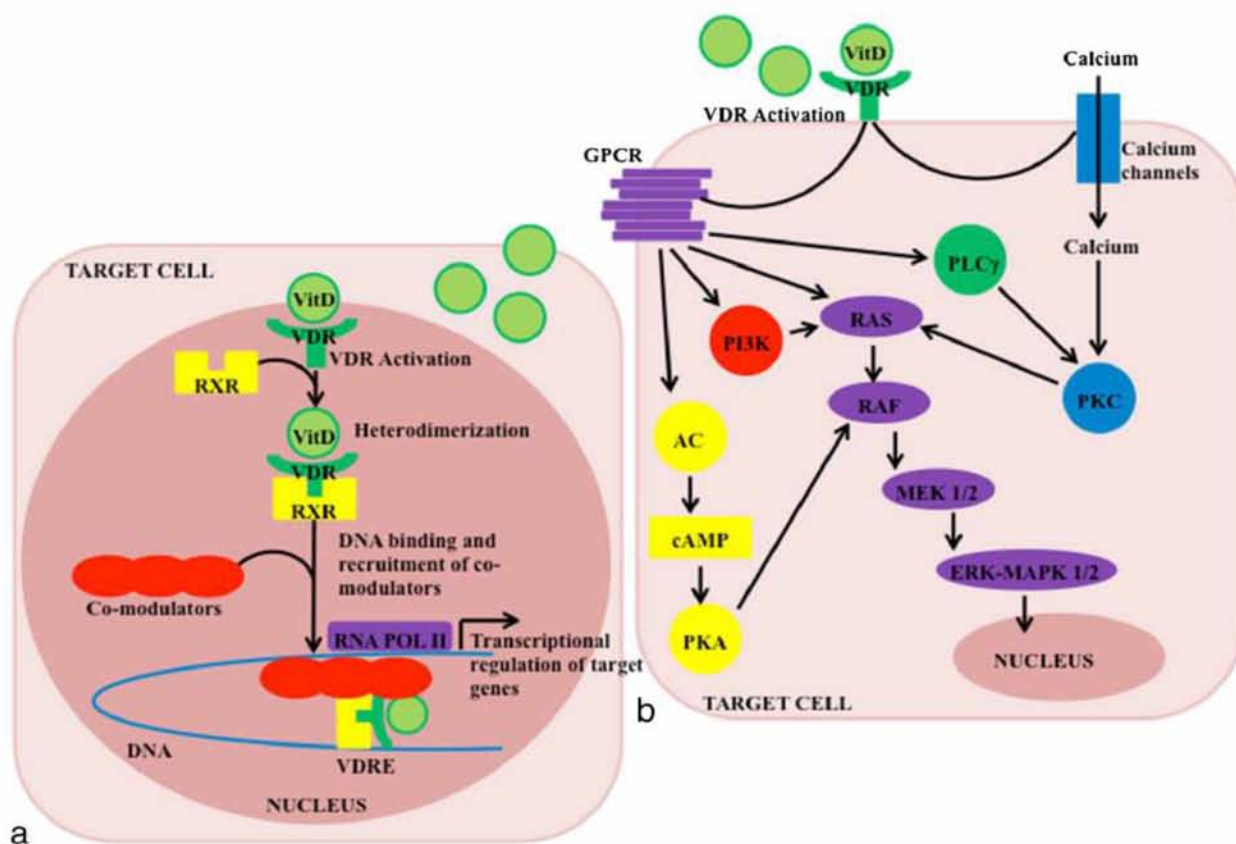


Εικόνα 1.2 Σχηματική αναπαράσταση παραγώγων και ενεργοποίησης της χολεκαλσιφερόλης στους ιστούς (Mostafa, W.Z et al., 2015).

1.2.3 Μηχανισμοί δράσης της βιταμίνης D και υποδοχέας VDR

Την τελευταία δεκαετία η Βιταμίνη D έχει χαρακτηριστεί ως ένα πλειοτροπικό μόριο με ποικίλες αυτοκρινείς, παρακρινείς και ενδοκρινείς δράσεις, με θεμελιώδη σημασία για την ανάπτυξη των οστών και την ομοιόσταση ασβεστίου-φωσφόρου που έχει ως βασική λειτουργία (Holick et al., 2007, Holick and Chen., 2008). Οι αλλαγές που συμβαίνουν ενδοκυτταρικά μετά την δράση του μορίου, προκύπτουν από κλασικές γενωμικές δράσεις του μορίου (genomic actions) που έχουν ως αποτέλεσμα την τροποποίηση της γονιδιακής έκφρασης των γονιδίων στόχων, αλλά και από μη κλασικές, μη γενωμικές δράσεις (non-genomic actions) που έχουν ως αποτέλεσμα την επαγωγή ενδοκυτταρικών σηματοδοτικών μονοπατιών που τροποποιούν διάφορες κυτταρικές λειτουργίες και στοχεύουν σε διαφορά όργανα, ιστούς και συστήματα (Haussler MR et al., 2011). Υπάρχουν δύο τύποι υποδοχέων βιταμίνης D, ο κλασικός πυρηνικός VDR και ο μη-κλασικός μεμβρανικός VDR, που μεσολαβούν για τις γενωμικές και τις μη γενωμικές δράσεις της βιταμίνης D αντιστοίχως (Haussler MR et al., 2011). Ο κλασικός VDR ανήκει στην οικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων και είναι DNA-binding μεταγραφικός παράγοντας, και η δράση του στην μεταγραφή και

μετάφραση των γονιδίων στόχων κάνει από ώρες μέχρι ημέρες για να ολοκληρωθεί σε αντίθεση με τις μη γενωμικές αλλαγές του μεμβρανικού VDR που συμβαίνουν εντός 1-2 λεπτών μέχρι 15-45 λεπτά, λόγω άμεσης αλληλεπίδρασης των σηματοδοτικών μονοπατιών. Ο μη κλασικός μεμβρανικός VDR, και οι μη γενωμικές δράσεις της βιταμίνης D, αρχικά ανακαλύφθηκαν στις κυτταρικές μεμβράνες των εντερικών κυττάρων (Nemere I et al., 1984, Norman AW et al., 2002, Haussler MR et al., 2011, Zanatta L et al., 2011). Ο μεμβρανικός VDR βασικά ρυθμίζει μεμβρανικούς και κυτταροπλασματικούς δευτέρους αγγελιοφόρους που οδηγούν σε κινάσες και φωσφατάσες με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση ενδοκυτταρικών μονοπατιών όπως αυτά της πρωτεϊνικής κινάσης A (PKA), της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC), της μιτογόνου πρωτεϊνικής κινάσης (MPK), καθώς και καναλιών χλωρίου-ασβεστίου, χωρίς όμως να είναι γνωστό τι σηματοδοτεί την μη γενωμική δράση της βιταμίνης D (Haussler MR et al., 2011, Zanatta L et al., 2011). Οι δύο μηχανισμοί δράσης της βιταμίνης D φαίνονται σχηματικά στην **Εικόνα 1.3** (de Angelis C et al., 2017), αλλά στην συνέχεια θα αναλυθεί το μη κλασικό γενωμικό μονοπάτι της βιταμίνης D, καθώς μέσω αυτού δρα η βιταμίνη στα σπερματοζώαρια και την κινητικότητα τους.



Εικόνα 1.3 *a.* Οι γενωμικές δράσεις της βιταμίνης D μέσω του κυτταροπλασματικού VDR
b. Οι μη γενωμικές δράσεις της βιταμίνης D μέσω του μεμβρανικού VDR.

1.2.3 Ιστοί- στόχοι της βιταμίνης D

Ο όρος βιταμίνη D αναφέρεται σε μια ομάδα λιποδιαλυτών βιταμινών με βιοχημική δομή παρόμοια με αυτή των στεροειδών ορμονών, των οποίων η βασική δράση είναι η ρύθμιση της ενδοκυτταρικής ομοιόστασης του ασβεστίου και του φωσφόρου σε ιστούς όπως το έντερο, το σκελετικό σύστημα, ο νεφρός και οι παραθυροειδείς αδένες (Dusilova-Sulkova S et al., 2009). Η πολύπλοκη ρύθμιση του μεταβολισμού της βιταμίνης D είναι απαραίτητη για την διατήρηση της σωστής ομοιόστασης ασβεστίου και φωσφόρου συστηματικά (DeLuca HF et al., 1980) και ειδικά εφόσον η βιταμίνη D επάγει την απορρόφηση του ασβεστίου και του φωσφόρου στο έντερο, την απορρόφηση ασβεστίου και την έκκριση φωσφόρου στον νεφρό, και επηρεάζει τον σχηματισμό οστών βάσει των κυκλοφορούμενων επιπέδων ασβεστίου (DeLuca HF et al., 1980). Επιπρόσθετα, τα τελευταία χρόνια έχει αυξηθεί εντυπωσιακά το εύρος των γνωστών οργάνων στόχων της βιταμίνης D και περιλαμβάνει τον λιπώδη ιστό (Savastano S et al., 2017), τον θυροειδή (Nettore IC et al., 2017), το ανοσοποιητικό σύστημα (Altieri B et al., 2017), το πάγκρεας (Altieri B et al., 2016), το καρδιαγγειακό σύστημα (Muscogiuri G et al., 2017), το κεντρικό νευρικό σύστημα (Focker M et al., 2017), όπως και το αναπαραγωγικό σύστημα (Dusilova-Sulkova S. et al., 2009, Focker M et al., 2017, Tirabassi G et al., 2016). Αντίστοιχα, φαίνεται ότι και τα μεταβολικά ένζυμα της βιταμίνης D καθώς και η έκφραση τους, δεν περιορίζονται μόνο στο ήπαρ και στους νεφρούς αλλά απαντώνται και σε άλλα όργανα και συστήματα, συμπεριλαμβανομένου και του ανδρικού αναπαραγωγικού, υποδηλώνοντας ότι η βιταμίνη D μπορεί και να παράγεται τοπικά σε άλλα όργανα και ιστούς πέρα από τα κλασικά (Verstuyf A et al., 2010).

Η ανεπάρκεια σε βιταμίνη D έχει συσχετιστεί με υπερπαραθυροειδισμό, οστεομαλακία, και έχει προταθεί ως παράγοντας ρίσκου για διάφορες κλινικές καταστάσεις όπως παχυσαρκία, δυσλειτουργία του θυροειδή, αυτοάνοσα νοσήματα, άνοια, καρκίνο και υπογονιμότητα. Παρόλ' αυτά, υπάρχουν ακόμα διαφωνίες για το αν η ανεπάρκεια βιταμίνης D αυτή κάθε αυτή παίζει κάποιον απευθείας ρόλο σε αυτές τις καταστάσεις (Muscogiuri G et al., 2017, Haimi et al., 2017), γεγονός που την καθιστά ενδιαφέρον αντικείμενο έρευνας.

1.2.4 Ανδρική αναπαραγωγική οδός και βιταμίνη D

Πειραματικές μελέτες έχουν δείξει τον θετικό ρόλο που παίζει η βιταμίνη D στην ανδρική γονιμότητα κυρίως μέσω της ορμονικής τροποποίησης με γενωμικές και μη δράσεις, και μέσω της ποιοτικής βελτίωσης του σπέρματος με μη γενωμικές δράσεις. Παρότι οι κλινικές μελέτες δίστανται για την ακριβή επίδραση της βιταμίνης D στην ορμονική ρύθμιση, στο ανδρικό αναπαραγωγικό σύστημα, φαίνεται να είναι πιο σαφείς σχετικά με την θετική επίδραση της στην ποιότητα του σπέρματος και συγκεκριμένα στην κινητικότητα, την ενεργοποίηση (capacitation) και την ακροσωμική αντίδραση. Μελέτες σε ζώα καθώς και στον άνθρωπο, έχουν δείξει ότι τα επίπεδα της βιταμίνης D στην κυκλοφορία καθώς και ο τοπικός μεταβολισμός της στην ανδρική αναπαραγωγική οδό έχουν μεγάλη σημασία στην ανδρική αναπαραγωγική υγεία και στην ρύθμιση λειτουργιών του όρχεως όπως η παραγωγή ορμονών και η σπερματογένεση (Ward WS et al., 1994, Prosser DE et al., 2004, Mizwicki MT et al., 2010) και η ανεπάρκεια βιταμίνης D σε τρωκτικά οδηγεί σε μειωμένη ποσότητα και κινητικότητα σπέρματος και χαμηλότερη γονιμότητα σε θηλυκά που γονιμοποιήθηκαν από ανεπαρκείς σε βιταμίνη D ποντικούς (Kwieceński et al., 1989). Η βιταμίνη D παίζει βασικό ρόλο στην συστημική ρύθμιση της ομοιόστασης του ασβεστίου και ο ρόλος του ασβεστίου στην ωρίμανση του ανθρώπινου σπερματοζωαρίου έχει καταγραφεί, εφόσον τα επίπεδα του είναι 2-3 φορές περισσότερα στα υγρά της επιδιδυμίδας και του προστάτη σε σχέση με αυτά της κυκλοφορίας (Bouillon et al., 2008). Αναλυτικότερα, υπάρχει θετική συσχέτιση των επιπέδων βιταμίνης D του ορού και της κινητικότητας του σπέρματος, μέσω της απευθείας δράσης της 1α-25-δεϋδροξυ-βιταμίνης D στην ενδοκυτταρική συγκέντρωση ασβεστίου, την κινητικότητα και την ακροσωμική αντίδραση στα ώριμα σπερματοζωάρια (Blomberg J et al., 2010).

Σχετικά με τον υποδοχέα της βιταμίνης D, VDR, έχει βρεθεί ότι VDR Knock out μοντέλα ποντικού παρουσιάζουν υπογόνιμο φαινότυπο (Kinuta et al., 2000; Bouillon et al., 2008), ενώ η έκφραση του μετάγραφου και της πρωτεΐνης του VDR υποδοχέα έχουν καταγραφεί στον προστάτη, τα σπερματικά κυστίδια και την επιδιδυμίδα (Cariati F et al., 2013 a & b, Cariati F et al., 2012). Στον όρχι, η VDR πρωτεΐνη έχει εντοπιστεί στα κύτταρα Leydig, σε ανώριμα κύτταρα Sertoli και σε σπερματογόνια και σπερματίδες ενώ λιγότερο σε σπερματοκύτταρα και σπερματοζωάρια (Aquila S et al., 2008, 2009, Blomberg J et al., 2010, Cariati F et al., 2012, Cariati F et al., 2013b).

Στα ανθρώπινα σπερματοζωάρια ο VDR φαίνεται να έχει ετερογενή διάταξη, αφού εντοπίζεται στην κεφαλή (Corbett ST et al., 2006, Aquila S et al., 2008, Aquila S et al., 2009, Blomberg J et al., 2010), στην μετά-ακροσωμική περιοχή (Corbett ST et al., 2006, Blomberg J et al., 2010), στον αυχένα (Aquila S et al., 2008, Blomberg J et al., 2010) και το μεσαίο τμήμα (Corbett ST et al., 2006, Aquila S et al., 2009, Blomberg J et al., 2010).

Αντίστοιχα, τα ένζυμα που συμμετέχουν στην σύνθεση και τον μεταβολισμό της βιταμίνης D έχουν εντοπιστεί στην ανδρική αναπαραγωγική οδό και σε συγκεκριμένα σημεία του σπερματοζωαρίου. Η 25-υδροξυλάση έχει εντοπιστεί στον προστάτη, στα σπερματικά κυστίδια, την επιδιδυμίδα και στον όρχι, συγκεκριμένα στα κύτταρα Leydig, τα σπερματοκύτταρα, τις σπερματίδες και στα σπερματοζωάρια στον αυχένα, την ουρά και την μετά-ακροσωμική περιοχή (Blomberg J et al., 2010). Η 1-α υδροξυλάση εντοπίστηκε επίσης στον προστάτη, στα σπερματικά κυστίδια, την επιδιδυμίδα και στον όρχι, συγκεκριμένα στα κύτταρα Leydig, τα σπερματογόνια, τα σπερματοκύτταρα, τις σπερματίδες και στα σπερματοζωάρια κυρίως στον αυχένα, την μετά-ακροσωμική περιοχή και το μεσαίο τμήμα (Blomberg J et al., 2010). Τέλος η 24-υδροξυλάση έχει εντοπιστεί στον προστάτη, στα σπερματικά κυστίδια, την επιδιδυμίδα και στον όρχι, συγκεκριμένα στα κύτταρα Leydig, τα σπερματογόνια, τις σπερματίδες και στα σπερματοζωάρια κυρίως στον αυχένα και στο annulus (τμήμα μετά το μέσο τμήμα, στην αρχή της ουράς) (Blomberg J et al., 2010).

Συμπερασματικά, έρευνες σε ζώα και στον άνθρωπο δείχνουν πως η σύνθεση της καθώς και η ρύθμιση της έκφραση της βιταμίνης D, του υποδοχέα της VDR, καθώς και των ενζύμων που την μεταβολίζουν (25-υδροξυλάση, 1α-υδροξυλάση, 24-υδροξυλάση) στο ανδρικό αναπαραγωγικό σύστημα και συγκεκριμένα στον όρχι και στα σπερματοζωάρια, παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανδρική γονιμότητα και ειδικά στην ποιότητα και την κινητικότητα του σπέρματος και πιθανώς να επηρεάζουν την ορμονική σύνθεση του όρχεως και την σπερματογένεση. Συνεπώς, η περαιτέρω έρευνα πάνω στην θετική επίδραση της βιταμίνης D στην ποιότητα και στις λειτουργίες των σπερματοζωαρίων, ειδικά μετά από εργαστηριακές διαδικασίες, όπως η κατάψυξη σπέρματος, που εμπλέκονται άμεσα σε μεθόδους υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, είναι απαραίτητη για την διαλεύκανση αυτού του ερωτήματος διεξήχθη η συγκεκριμένη εργασία.

1.2.5 Η μη γενωμική επίδραση της Βιταμίνης D στο σπέρμα

Είναι γνωστό ότι τα σπερματοζώαρια είναι μεταγραφικά σιωπηρά, εφόσον το γονιδίωμα τους είναι σφιχτά πακεταρισμένο στον πυρήνα του (Ward et al., 1994). Συνεπώς a priori η βιταμίνη D δεν θα μπορούσε να δράσει άμεσα μέσω του κλασικού γενωμικού μονοπατιού και αυτό καθιστά το σπερματοζώαριο, ιδανικό σύστημα για μελέτη της επίδρασης του μη κλασικού, μη γενωμικού μονοπατιού του υποδοχέα VDR.

Η βιταμίνη D (1,25-διυδροξυ-D3) μέσω του μη κλασικού μονοπατιού του VDR, οδηγεί κυρίως σε αύξηση της συγκέντρωσης των ιόντων ασβεστίου που ελευθερώνονται από ενδοκυτταρικές δεξαμενές (Bouillon et al., 2008). Πέρα όμως από αυτή που είναι η βασική της δράση, οδηγεί και σε εκροή χοληστερόλης, φωσφορυλίωση σε κατάλοιπα τυροσίνης και θρεονίνης σε συγκεκριμένες πρωτεΐνες και σε αυξημένη επιβίωση και κινητικότητα σπερματοζωαρίων όταν προστεθεί σε σπερματικό υγρό χωρίς διαδικασία ενεργοποίησης (Blomberg et al., 2011), χωρίς όμως να έχει διευκρινιστεί αν αυτά τα γεγονότα είναι αποτέλεσμα της ενδοκυτταρικής αύξησης του ασβεστίου ή απευθείας δράσης του υποδοχέα VDR (Aquila et al., 2008, Aquila et al., 2009). Αντίθετα, σε άλλη μελέτη όταν προστέθηκε σε σπερματικό υγρό χωρίς διαδικασία ενεργοποίησης, ήταν ακόμη χαμηλότερη η αύξηση της κινητικότητας (Aquila et al., 2009), χωρίς κάποια σαφή εξήγηση για την διαφορά, εφόσον και τα δύο πειράματα αφορούσαν μη ενεργοποιημένα σπερματοζώαρια. Παρόλ' αυτά η έκφραση του VDR υποδοχέα και των μεταβολικών ενζύμων της βιταμίνης D, θα μπορούσαν να εξηγήσουν αυτή την διαφορά, καθώς εκφράζονται σε μεγαλύτερο βαθμό σε σπερματοζώαρια καλής ποιότητας που απομένουν μετά την διαδικασία της ενεργοποίησης από την φυγοκέντρωση (Jimenez-Gonzalez et al., 2005). Αυτό υποστηρίζεται και σε άλλη μελέτη που επιβεβαιώνει ότι η βιταμίνη D δεν είναι σε θέση να επάγει την κινητικότητα σε σπερματοζώαρια υπογόνιμων ανδρών που δεν έχουν υποστεί την διαδικασία της ενεργοποίησης, καθώς έχουν χαμηλή έκφραση του VDR υποδοχέα και των μεταβολικών ενζύμων (Blomberg et al., 2012).

Τέλος, η ακροσωμική αντίδραση είναι επίσης εξαρτώμενη από την συγκέντρωση του ασβεστίου και ίσως να επάγεται από την κλιμακωτή αύξηση του ασβεστίου μετά από την διέγερση της βιταμίνης D στην κεφαλή. Ακόμη, έχει βρεθεί ότι η προσθήκη

βιταμίνης D σε ενεργοποιημένα σπερματοζώαρια οδήγησε στην αύξηση των κινητών που ακολούθως κάνανε ακροσωμική αντίδραση (Blomberg et al.,2011).

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Υλικά

- Δείγματα σπέρματος από της Μονάδα Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής (Μ.Υ.Α) του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας
- Υλικά επεξεργασίας και κρυοσυντήρησης σπέρματος

Προϊόν	Εταιρεία	Κωδικός	Συσκευασία
Sydney IVF Sperm Cryopreservation Buffer	Cook Medical	K-SISC-20	20 mL
1 α ,25-Dihydroxyvitamin D3	Sigma-Aldrich	D1530	10 ug
Ethanol 99 % denatured with 1 % MEK pure A5007	Pancreac Applichem	A5007,2500	2.5 L

2.2. Εργαστηριακός εξοπλισμός

- Όργανα
 - ✓ Οπτικό μικροσκόπιο WANG Biomedical
 - ✓ Makler counting chamber
 - ✓ Πιπέτα eppendorf Reference2 0,1-2,5 μ L
 - ✓ Πιπέτα Biohit Proline 100-1000 μ L
 - ✓ Φυγόκεντρος Hettich Universal II
 - ✓ Δεξαμενή Υγρού Αζώτου GT 40
 - ✓ Ψυγείοκαταψύκτης Whirlpool
 - ✓ Hood Holten LaminAir
 - ✓ Κυτταρόμετρο Lab count Denominator
 - ✓ Θερμόμετρο
 - ✓ Δοχείο για υδατόλουτρο
- Αναλώσιμα
 - ✓ Urobox-BBD Urine Container 120 mL Polypropylene, sterile A
 - ✓ Biohit Presterilised Filter tips 0,1-10 μ L
 - ✓ Safety Space Filter tips 50-1000 μ L
 - ✓ Cryo Tube Vials χωρητικότητας 1 mL της εταιρείας Nunc

✓ Polystyrene Conical Tubes (Falcon) όγκου 15 mL της εταιρείας FALCON.

2.3 Πειραματικό μέρος

Για την διεκπεραίωση της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας μελετήθηκαν 17 δείγματα σπέρματος ανδρών που συμμετείχαν σε κύκλους υποβοηθούμενης αναπαραγωγής ή εξετάστηκαν με σπερμοδιάγραμμα για την ποιότητα τους σπέρματος τους στην Μ.Υ.Α του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας. Η μακροσκοπική και μικροσκοπική εξέταση των δειγμάτων έγινε με βάση το εγχειρίδιο του WHO για την εξέταση και επεξεργασία του ανθρώπινου σπέρματος (WHO, 2010) και της ESHRE για την βασική εξέταση του σπέρματος (ESHRE, 2002) .

2.3.1 Εκτίμηση δείγματος

Η συλλογή των δειγμάτων γίνεται σε ειδικό χώρο εντός της Μ.Υ.Α, που βρίσκεται δίπλα στο εργαστήριο επεξεργασίας σπέρματος. Για τον κάθε εξεταζόμενο σημειώνονται χαρακτηριστικά όπως η ηλικία, το βάρος, το ύψος, το επάγγελμα, το κάπνισμα και το αλκοόλ, για την πιθανή μελλοντική στατιστική ανάλυση και συσχέτιση των δημογραφικών χαρακτηριστικών με την κινητικότητα του σπέρματος των δειγμάτων . Οι εξεταζόμενοι δίνουν το δείγμα ακέραιο μετά από 2-7 ημέρες αποχής με αυνανισμό σε μη τοξικό δοχείο-συλλέκτη (ugobox), στο οποίο αναγράφεται το επώνυμο τους ή της συζύγου και η ώρα εκσπερμάτισης. Το κάθε δείγμα παραμένει στην Hood σε θερμοκρασία δωματίου, για περίπου 20-30 λεπτά μέχρι να ρευστοποιηθεί. Η ρευστοποίηση αναγνωρίζεται, καθώς το σπέρμα από την αρχική ημιστερεή παχύρρευστη μορφή του, γίνεται ρευστό και ομοιογενές, και όσο πιο αδιαφανές είναι το δείγμα σημαίνει ότι έχει μεγάλη συγκέντρωση σπερματοζωαρίων, ενώ αν είναι κόκκινο-καφέ υπάρχει ένδειξη ύπαρξης ερυθρών αιμοσφαιρίων και σε τέτοια περίπτωση το δείγμα δεν χρησιμοποιείται στην πειραματική διαδικασία.

Στην συνέχεια εντός 1 ώρας ακολουθεί ο υπολογισμός του όγκου δείγματος σε mL , όπου αν αυτός ξεπερνάει τα 2 mL, τότε το δείγμα χρησιμοποιείται στην πειραματική διαδικασία και τοποθετείται όγκος 10 μ L στο Makler counting chamber, μετά από ήπια ανάδευση του ugobox. Ακολουθεί η μικροσκοπική παρατήρηση του δείγματος σε μικροσκόπιο αντίθεσης φάσης με μεγέθυνση x10 στον προσοφθάλμιου και x25 στον αντικειμενικό φακό. Στο οπτικό πεδίο εμφανίζεται ένα πλέγμα 100 τετραγώνων και ο καθορισμός της συγκέντρωσης του δείγματος γίνεται με την αναγωγή του

αριθμού των σπερματοζωαρίων που μετρώνται σε 10 τετράγωνα, κάθετα ή οριζόντια σε εκατομμύρια ανά mL αρχικού δείγματος. Η μέτρηση γίνεται υπολογίζοντας τις κεφαλές των σπερματοζωαρίων στην συγκεκριμένη περιοχή και αν η συγκέντρωση είναι μεγαλύτερη από 2 εκατομμύρια στο mL, τότε το δείγμα χρησιμοποιείται στην πειραματική διαδικασία.

Αναφορικά με την εκτίμηση της κινητικότητας ενός δείγματος, σύμφωνα με την προηγούμενη ισχύουσα κατηγοριοποίηση κινήσεων των σπερματοζωαρίων, αυτά κατατάσσονται σε τέσσερις κατηγορίες κινήσεων: (a) για ταχεία προωθητική, (b) για νωθρή προωθητική, (c) για επιτόπια και (d) για ακινησία.

Σύμφωνα με τις νεότερες οδηγίες του WHO (2010), η κινητικότητα διακρίνεται στις εξής τρεις κατηγορίες :

- 1) **Προωθητική κίνηση (Progressive Motility, PM)** όπου κατατάσσονται τα σπερματοζωάρια που κινούνται ενεργά είτε ευθύγραμμα είτε σε μεγάλους κύκλους ανεξάρτητα από την ταχύτητα, και στην οποία συμπεριλαμβάνονται οι κατηγορίες a+b της προηγούμενης ισχύουσας κατηγοριοποίησης
- 2) **Επιτόπια κίνηση (Non-Progressive Motility, NPM)** στην οποία συμπεριλαμβάνονται τα σπερματοζωάρια με οποιοδήποτε άλλο πρότυπο κίνησης, όπως κίνηση σε μικρούς κύκλους, κίνηση κεφαλής ή ουράς χωρίς κίνηση του υπόλοιπου τμήματος. Σε αυτή τη κατηγορία ανήκουν τα σπερματοζωάρια κατηγορίας c της προηγούμενης ισχύουσας κατηγοριοποίησης
- 3) **Ακινησία (Immobility, IM)** στην οποία υπάρχει απουσία κίνησης, αντίστοιχα με τα σπερματοζωάρια κατηγορίας d της προηγούμενης ισχύουσας κατηγοριοποίησης.

Για την εκτίμηση της κινητικότητας των δειγμάτων μετρήθηκαν 100 σπερματοζωάρια μίας περιοχής και ανάλογα με τον χαρακτηρισμό της κίνησης τους κατατάχθηκαν σε κάθε μια από τις κατηγορίες κινήσεων: a για ταχεία προωθητική, b για στροβιλοειδή, c για επιτόπια και d για ακινησία. Το άθροισμα κινήσεων κατηγορίας a+b σημειώθηκε για κάθε δείγμα και εκτιμήθηκε συγκριτικά με το ίδιο άθροισμα μετά του χειρισμούς με την βιταμίνη D και την απόψυξη.

Για μεγαλύτερη εγκυρότητα, στις μετρήσεις συγκέντρωσης και κινητικότητας του αρχικού δείγματος καθώς και κινητικότητας μετά την απόψυξη, αυτές έγιναν από δύο

διαφορετικούς παρατηρητές και για τα αποτελέσματα των πειραμάτων λήφθηκε υπόψη ο μέσος όρος των μετρήσεων των δυο παρατηρητών.

2.3.2 Πρωτόκολλο κατάψυξης (vitrification) σπέρματος με βιταμίνη D

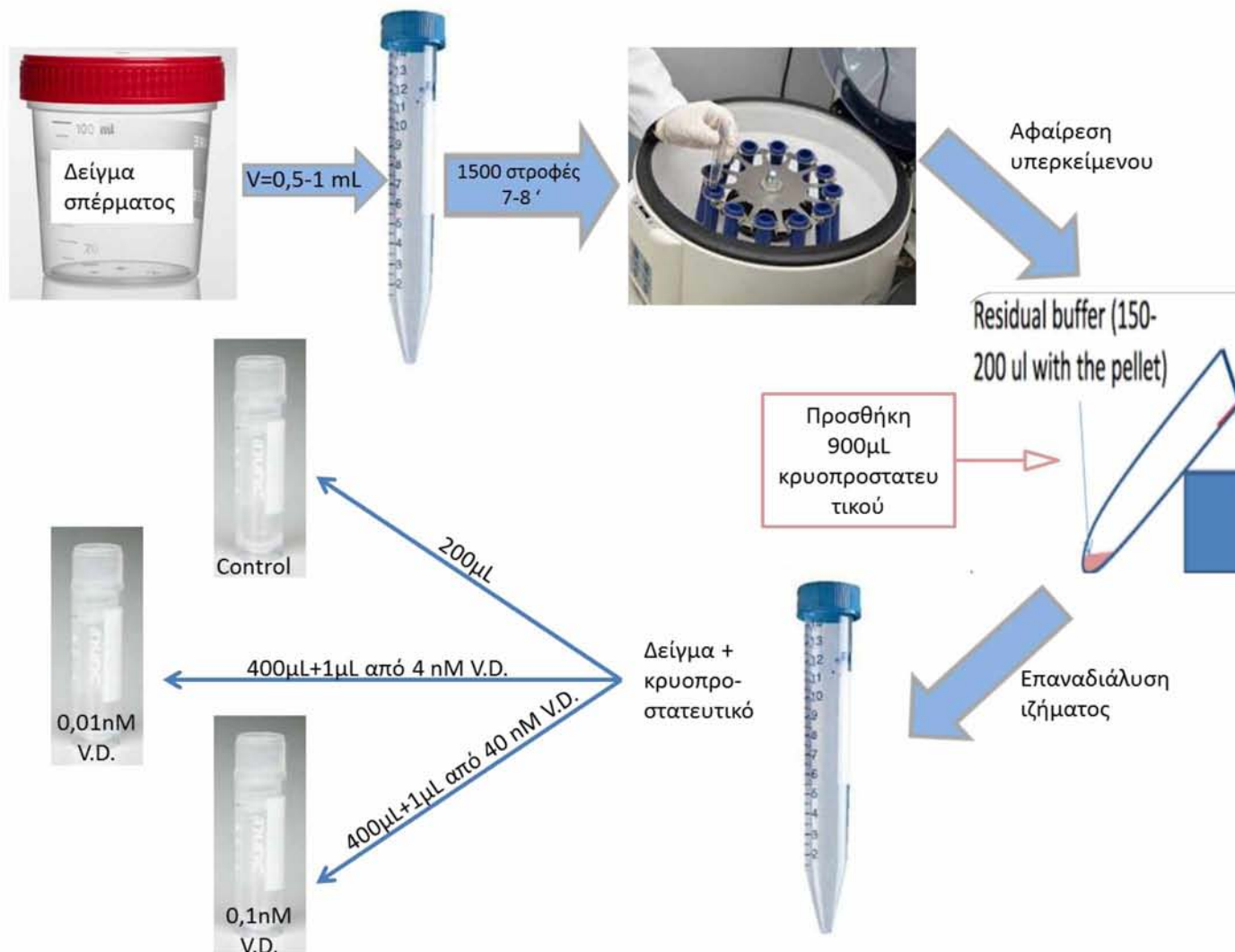
Το πειραματικό πρωτόκολλο κατάψυξης για την διερεύνηση του ρόλου της βιταμίνης D σε συγκέντρωση 0,01 nM στην κινητικότητα του σπέρματος, έγινε ταυτόχρονα και στα ίδια δείγματα και για την διερεύνηση του ρόλου της βιταμίνης D σε συγκέντρωση 0,1 nM, σε συνεργασία με την Καλτσουνάκη Κωνσταντίνα για την διεξαγωγή της δικής της διπλωματικής, επομένως είναι κοινό και περιλαμβάνει και τις δύο συγκεντρώσεις.

Για την διάλυση της σκόνης της βιταμίνης, με βάση τις προδιαγραφές της κατασκευάστριας εταιρείας, το αρχικό stock που ετοιμάζουμε είναι 24 uM (δηλαδή με υπολογισμούς χρειάζεται 1mL αιθανόλης για την διάλυση της σκόνης). Οι αραιώσεις σε αιθανόλη που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 4 nM και 40 nM, ώστε από αυτά να παίρνεται 1 μL και να προκύπτει σε τελικό όγκο 400 μL, 0.01 nM και 0.1 nM αντίστοιχα.

Σε falcon tube 15 mL, τοποθετείται ο διαθέσιμος όγκος δείγματος και φυγοκεντρείται για 7-8 λεπτά στις 1500 στροφές. Στην συνέχεια προσεκτικά, με το falcon υπό κλίση αφαιρείται το υπερκείμενο, αφήνοντας ίζημα με ελάχιστο σπερματικό πλάσμα όγκου 150-200 μL. Ακολουθεί προσθήκη Sperm Cryopreservation Buffer, που βρίσκεται για τουλάχιστον 10 λεπτά εκτός ψυγείου και σε θερμοκρασία δωματίου, μέχρι τελικού όγκου περίπου 900 μL. Η διαδικασία περιγράφεται στην **Εικόνα 2.1**.

Σε τρία cryopreservation vials, σημειώνεται ο αριθμός του δείγματος και η συγκέντρωση της βιταμίνης D που εξετάστηκε. Πχ. Για το δείγμα με αριθμό 1, #1 control, #1 0,01 nM, #1 0,1 nM. Στα δυο vials που θα προστεθεί η βιταμίνη προστίθενται 400 μL του παραπάνω εναιωρήματος και 1μL αραιωμένης βιταμίνης D ανά περίπτωση και ακολουθεί επώαση των δειγμάτων με βιταμίνης D σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 10 λεπτά. Δηλαδή για να επιτύχω τελική συγκέντρωση βιταμίνης D 0,01 nM σε όγκο 400 μL, παίρνω 1 μL από stock με συγκέντρωση 4 nM, και αντίστοιχα για να επιτύχω τελική συγκέντρωση βιταμίνης D 0,1 nM σε όγκο 400 μL, παίρνω 1 μL από stock με συγκέντρωση 40 nM, βάσει της σχέσης $C_1V_1 = C_2V_2$. Ο όγκος του παραπάνω εναιωρήματος που περισσεύει, που

είναι περίπου 100 μL , χαρακτηρίζεται ως μάρτυρας- control και καταψύχεται ως έχει. Αφού σφραγιστούν και τα τρία vials τοποθετούνται πάνω σε μεταλλική ράβδο στήριξης και εμβαπτίζονται άμεσα σε δεξαμενή υγρού αζώτου ($-196\text{ }^\circ\text{C}$).



Εικόνα 2.1. Σχηματική αναπαράσταση πρωτοκόλλου επεξεργασίας και κατάψυξης δειγμάτων σπέρματος με βιταμίνη D.

Τα cryovials είναι τοποθετημένα σε ομάδες των τριών για κάθε δείγμα πάνω σε μεταλλική ράβδο και βρίσκονται στο υγρό άζωτο. Βγάζοντας την ράβδο από το άζωτο απομακρύνονται από την μεταλλική ράβδο και επωάζονται σε υδατικό υδατόλουτρο 37°C για 10 λεπτά. Στην συνέχεια απομακρύνονται από το υδατόλουτρο και μένουν στον πάγκο σε θερμοκρασία δωματίου για 20-30 λεπτά μέχρι να ανοιχθούν. Τελικώς γίνεται η επανεκτίμηση της κινητικότητας των δειγμάτων

σπέρματος με τοποθέτηση όγκου 10 μL στο Makler counting chamber όπως περιγράφηκε παραπάνω.

2.3.4 Στατιστική ανάλυση μετρήσεων

Για την σύγκριση και την στατιστική ανάλυση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα, IBM SPSS Software και Microsoft Excel 2010. Έγινε paired t-test για την προωθητική κινητικότητα a+b μεταξύ της ομάδας δειγμάτων με την βιταμίνη σε συγκέντρωση 0,01nM και της ομάδας ελέγχου (control) μετά από απόψυξη, δηλαδή σύγκριση για a+b σε control-0,01nM και control-0,1nM. Αντίστοιχα έγινε η σύγκριση με paired t-test για τα ακίνητα σπερματοζώαρια d, μεταξύ της ομάδας δειγμάτων με την βιταμίνη σε συγκέντρωση 0,01nM και της ομάδας ελέγχου (control) μετά από απόψυξη δηλαδή σύγκριση για d σε control-0,01nM και control-0,1nM.

Στην παρούσα μελέτη, καθώς είναι πιλοτική και εφόσον τα δείγματα που τελικά συλλέχθηκαν ήταν μόνο 18, τα δείγματα δεν χωρίστηκαν σε ομάδες με βάση την αρχική τους συγκέντρωση σε φυσιολογικά (>15 εκ./mL) και σε μη φυσιολογικά (<15 εκ./mL) όπως ορίζει ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO).

Συνεπώς, ένα από τα δείγματα εξαιρέθηκε από την στατιστική ανάλυση γιατί είχε μεγάλη απόκλιση από τα υπόλοιπα και επίσης προέκυψε μεγάλη τυπική απόκλιση μέσα στις ομάδες των δειγμάτων ως προς την κινητικότητα καθώς τα ασθενζωοσπερμικά δείγματα συμπεριφέρονται διαφορετικά από τα φυσιολογικά.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στα αποτελέσματα συμπεριλαμβάνονται και οι αντίστοιχες μετρήσεις με βιταμίνη D συγκέντρωσης 0,1nM, καθώς μελετήθηκε συγχρόνως στα ίδια δείγματα από την Κ. Καλτσουνάκη και τα συμπεράσματα και η συζήτηση πάνω σε αυτή τη συγκέντρωση αναλύονται στην δική της πτυχιακή.

3.1 Ιστορικό δειγμάτων

Στοιχεία Δειγμάτων	Μέση Τιμή ± Τυπική Απόκλιση
Ηλικία (έτη)	40,5 ± 5,55
Όγκος σπέρματος V (mL)	3,26 ± 1,07
Συγκέντρωση σπέρματος C (εκ./mL)	39,11 ± 57,58
Κάπνισμα (%)	41,18 OXI
	58,82 ΝΑΙ
Αλκοόλ (%)	52,95 OXI
	47,05 ΝΑΙ

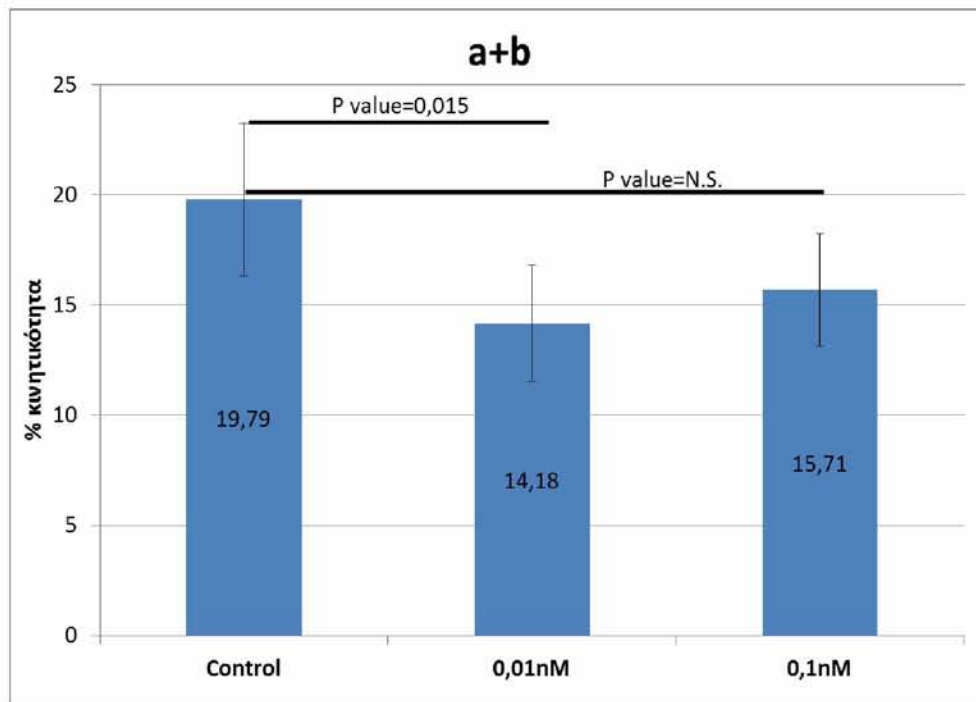
Πίνακας 1. Ιστορικό των ανδρών που έδωσαν δείγμα για την έρευνα. Απεικονίζεται η μέση τιμή ± 1 τυπική απόκλιση των ηλικιών και του όγκου των δειγμάτων, της συγκέντρωσης σε σπερματοζώαρια, καθώς και τα ποσοστά των ανδρών που κάπνιζαν ή έκαναν κατανάλωση σε αλκοόλ.

n=17	PM (a+b)	NPM (c)	IM (d)
Νωπό	42,08 ± 16,16	21,05 ± 6,78	36,82 ± 16,18
ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΑΠΟΨΥΞΗ			
Δείγμα ελέγχου	19,79 ± 14,32	14,32 ± 8,32	65,88 ± 16,39
βιταμίνη D [0,01nM]	14,17 ± 10,88	13,88 ± 8,82	71,97 ± 16,96
βιταμίνη D [0,1nM]	15,70 ± 10,54	15,97 ± 10,44	68,29 ± 17,71

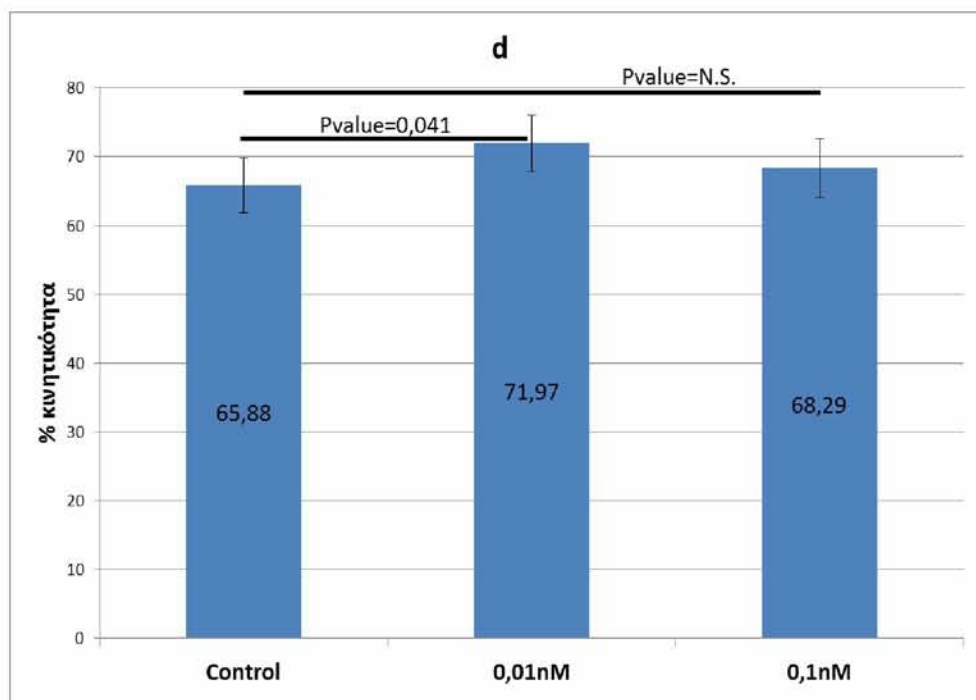
Πίνακας 2. Συγκεντρωτικός πίνακας των επί τις εκατό μέσων όρων ± 1 τυπική απόκλιση της προωθητικής κινητικότητας, *Progressive Motility* PM ως άθροισμα των επιμέρους κινήσεων *a* και *b*, της επιτόπιας κινητικότητας, *Non Progressive Motility* NPM ως *c* και της ακινησίας, *Immobility* IM ως *d*, για τα δείγματα πριν την επεξεργασία για κατάψυξη (νωπό), μετά την απόψυξη για το δείγμα έλεγχου χωρίς προσθήκη βιταμίνης D και τα δύο δείγματα στα οποία είχε προστεθεί βιταμίνη D σε συγκεντρώσεις 0,01 nM και 0,1 nM.

3.2 Επίδραση της βιταμίνης D στην κινητικότητα σπερματοζωαρίων μετά από απόψυξη

Στα παρακάτω γραφήματα παρατίθενται οι μετρήσεις των κατηγοριών κινητικότητας PRM (a+b) και ακινησίας IM (d) κατά μέσο όρο στα 17 δείγματα, με μπάρες σφάλματος βασισμένες στο τυπικό σφάλμα της κάθε ομάδας και τα p value (two tailed) που πρόεκυψαν από τα 4 paired t-test που έγιναν για τις μετρήσεις a+b: 1) μεταξύ της ομάδας έλεγχου (control) και της ομάδας με βιταμίνη D σε 0,01nM 2) μεταξύ της ομάδας έλεγχου (control) και της ομάδας με βιταμίνη D σε 0,1nM στο **Γράφημα 1** και για την μέτρηση d: 3) μεταξύ της ομάδας έλεγχου (control) και της ομάδας με βιταμίνη D σε 0,01nM 4) μεταξύ της ομάδας έλεγχου (control) και της ομάδας με βιταμίνη D σε 0,1nM στο **Γράφημα 2**.



Γράφημα 1. Γραφική αναπαράσταση των επί τις εκατό ποσοστών προωθητικής κινητικότητας, *Progressive Motility PM* ως άθροισμα των επιμέρους κινήσεων *a* και *b*, στην συνθήκη ελέγχου (*control*) και στις δύο πειραματικές συνθήκες μετά από προσθήκη βιταμίνης *D* σε 0,01nM και 0,1nM αντίστοιχα.



Γράφημα 2. Γραφική αναπαράσταση των επί τις εκατό ποσοστών ακινησίας, *Immobility IM* ή *d*, στην συνθήκη ελέγχου (*control*) και στις δύο πειραματικές συνθήκες μετά από προσθήκη βιταμίνης *D* σε 0,01nM και 0,1nM αντίστοιχα.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Με βάση τα αποτελέσματα που προέκυψαν από 17 δείγματα φαίνεται ότι η βιταμίνη D σε συγκέντρωση 0,01 nM προκαλεί στατιστικά σημαντική ($P < 0,05$) μείωση της προωθητικής κίνησης σε ποσοστό 5,61 % και επίσης στατιστικά σημαντική αύξηση ($P < 0,05$) της ακινησίας σε ποσοστό 6,09 %.

Οι επιβλαβείς επιδράσεις της κρυοσυντήρησης στην κινητικότητα, την ζωτικότητα και το DNA των σπερματοζωαρίων (Zhang H.B et al., 2008) και οι δυσμενείς επιπτώσεις των χαμηλών θερμοκρασιών που σχετίζονται με τον σχηματισμό πάγου και την υψηλή οσμωτική πίεση κατά τη διάρκεια της διαδικασίας που οδηγούν σε βλάβες σε διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, όπως ο VDR (Sinan et al., 2008) και σε δομές και λειτουργίες του σπέρματος (Guler H. et al., 2016), είναι γνωστές. Συνολικά οι παραπάνω επιδράσεις ίσως εξηγούν την πιθανή καταστροφή υποδοχέων VDR, ενζύμων ή δόμων και μορίων που συμμετέχουν στο μονοπάτι ενεργοποίησης του VDR, λόγω της διαδικασίας κατάψυξης-απόψυξης. Συνεπώς, το γεγονός ότι βρέθηκε σημαντική μείωση στη κινητικότητα των σπερματοζωαρίων μετά την διαδικασία της απόψυξης φαίνεται να οφείλεται σε ένα μέρος στην διαδικασία της κατάψυξης αυτή καθ' αυτή.

Ακόμη είναι γνωστό, ότι οι υπογόνιμοι άντρες έχουν βρεθεί με χαμηλότερη βιταμίνη D ορού και ότι σε μη φυσιολογικά, κατά WHO σπέρματα (< 15 εκ./mL), υπάρχει χαμηλότερη έκφραση VDR και των μεταβολικών ενζύμων (Blomberg et al., 2012). Από τα 17 δείγματα που εξετάστηκαν τα έξι (~35%) κατατάσσονται στην κατηγορία των υπογόνιμων, μη φυσιολογικών σπερμάτων. Αυτό δείχνει ότι ένα σημαντικό ποσοστό των δειγμάτων, πιθανώς να είχαν μειωμένη έκφραση υποδοχέων VDR και ενζύμων δράσης της βιταμίνης D και ίσως για αυτό να μην ανταποκρίθηκαν θετικά όπως αναμενόταν στην επίδραση της. Επίσης, συνδυαστικά με την καταστροφική επίδραση της κατάψυξης μπορεί να υπήρξε πιθανή ελλιπής ενεργοποίηση του μοριακού μηχανισμού δράσης της βιταμίνης D στην συγκέντρωση 0,01nM, που αντί να αυξάνει, βρέθηκε να μειώνει την κινητικότητα των σπερματοζωαρίων.

Παράλληλα, το γεγονός ότι τα δείγματα ήταν τόσο λίγα, δεν μας επέτρεψε να τα χωρίσουμε σε φυσιολογικά βάσει συγκέντρωσης και να βγάλουμε ξεχωριστά αποτελέσματα για την επίδραση της βιταμίνης D στα υπογόνιμα και στα φυσιολογικά

σπέρματα μετά από κατάψυξη, γεγονός που δυσχεραίνει την ερμηνεία των αποτελεσμάτων και σε μελλοντική σχετική μελέτη θα πρέπει να ληφθεί υπόψη συνδυαστικά με μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων.

Επιπροσθέτως, στο παράλληλο πείραμα που έγινε συγχρόνως στα ίδια δείγματα σπέρματος και που αναλύεται στην διπλωματική της Κωνσταντίνας Καλτσουνάκη, εν συντομία δεν βρέθηκε κάποια στατιστικά σημαντική μείωση της κινητικότητας με τη προσθήκη βιταμίνης D σε συγκέντρωση 0,1nM. Αυτό είναι ενδεικτικό μιας πιθανώς βελτιωμένης δράσης της βιταμίνης D, σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, καθώς ίσως η μεγαλύτερη δόση αντισταθμίζει το effect της 0,01nM και αυξάνει και την επιβίωση και την κινητικότητα, στοχεύοντας στον μοριακό μηχανισμό και τους υποδοχείς VDR με καλύτερη αποτελεσματικότητα. Συνεπώς, σε μελλοντικά πειράματα θα ήταν ενδιαφέρον να δοκιμαστεί το ίδιο πρωτόκολλο κατάψυξης με μεγαλύτερα συγκεντρώση βιταμίνης (>0,1 nM), που θα μπορούσε να δώσει θετικά αποτελέσματα.

Μια τελευταία αλλαγή που θα μπορούσε να εξεταστεί μελλοντικά, είναι η προσθήκη βιταμίνης D σε ενεργοποιημένα σπερματοζώαρια μετά από φυγοκέντρηση με gradients, έτσι ώστε να επιλέγουν μόνο τα ζώντα και κινητά σπερματοζώαρια για κατάψυξη και να μελετηθεί η επίδραση της βιταμίνης D σε αυτά. Τα σπερματοζώαρια που επιλέγονται μετά από αυτή την διαδικασία, είναι λειτουργικά και πιο φυσιολογικά από τα σπερματοζώαρια που η συγκεκριμένη φυγοκέντρηση αφαιρεί. Έτσι, ουσιαστικά θα άλλαζε η ποιότητα του δείγματος, στο οποίο κάνουμε τον χειρισμό, προς το καλύτερο και πιθανώς με αυτόν τον τρόπο τα σπερματοζώαρια που θα μείνουν να δείχνουν καλύτερη απάντηση στην βιταμίνη, καθώς ίσως έχουν πιο πολλούς υποδοχείς VDR και ενζυμα μεταβολισμού της βιταμίνης D.

Συμπερασματικά, η βιταμίνη D φαίνεται να είναι ένα μόριο κλειδί για πολλές λειτουργίες του οργανισμού και σε σχέση με την γονιμότητα χρειάζεται περαιτέρω μελέτη για να διαλευκανθεί ο ρόλος και η δράση της σε διάφορα συστήματα. Η υπογονιμότητα είναι ένα ζήτημα που όλο και εντείνεται στις μέρες μας και μέθοδοι βελτιστοποίησης των μέχρι σήμερα πρωτόκολλων και διαδικασιών, μπορούν να προσφέρουν λύσεις σε ακόμα περισσότερο κόσμο και συνεπώς χρήζουν περαιτέρω έρευνας. Στα πλαίσια αυτά, η βελτίωση της μεθόδου κρυοσυντήρησης για σπέρμα ή ακόμα και για ωάρια ή έμβρυα έχει μεγάλο ενδιαφέρον, και η βιταμίνη D ίσως μελλοντικά αποτελέσει ένα κομμάτι βελτίωσης των πρωτοκόλλων κρυοσυντήρησης.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abadia L, Gaskins AJ, Chiu YH, Williams PL, Keller M, Wright DL, Souter I, Hauser R, Chavarro JE. Serum 25-hydroxyvitamin D concentrations and treatment outcomes of women undergoing assisted reproduction. *The American journal of clinical nutrition*. 2016 Sep 1;104(3):729-35.
- Aleyasin A, Hosseini MA, Mahdavi A, Safdarian L, Fallahi P, Mohajeri MR, Abbasi M, Esfahani F. Predictive value of the level of vitamin D in follicular fluid on the outcome of assisted reproductive technology. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2011 Nov 30;159(1):132-7.
- Altieri B, Grant WB, Casa SD, Orio F, Pontecorvi A, Colao A et al. Vitamin D and pancreas: the role of sunshine vitamin in the pathogenesis of diabetes mellitus and pancreatic cancer. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2016;0. doi:10.1080/10408398.2015.1136922
- Altieri B, Muscogiuri G, Barrea L, Mathieu C, Vallone CV, Mascitelli L, et al. Does vitamin D play a role in autoimmune endocrine disorders? A proof of concept. *Rev Endocr Metab Disord*. 2017; doi:10.1007/s11154-016-9405-9.
- American Psychiatric Association. *Diagnostic and statistical manual of mental disorders*. 4th ed. Washington, DC: American Psychiatric Association; 1994.
- Anifandis GM, Dafopoulos K, Messini CI, Chalvatzas N, Liakos N, Pournaras S, Messinis IE. Prognostic value of follicular fluid 25-OH vitamin D and glucose levels in the IVF outcome. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2010 Jul 28;8(1):91.
- Aquila S, Guido C, Middea E, Perrotta I, Bruno R, Pellegrino M, et al. Human male gamete endocrinology: 1alpha, 25- dihydroxyvitamin D3 (1,25(OH)2D3) regulates different aspects of human sperm biology and metabolism. *Reprod Biology Endocrinol*. 2009;7:140. doi:10.1186/1477-7827-7-140.
- Aquila S, Guido C, Perrotta I, Tripepi S, Nastro A, Ando S. Human sperm anatomy: ultrastructural localization of 1alpha,25- dihydroxyvitamin D receptor and its possible role in the human male gamete. *J Anat*. 2008;213(5):555–64. doi:10.1111/j.1469-7580.2008.00975.x.
- ART, Assisted reproductive technology in the United States and Canada: 1995 results generated from the American Society for Reproductive Medicine/Society for Assisted Reproductive Technology Registry. *Fertil Steril* 1998;69:389-98
- Blomberg JM, Jørgensen A, Nielsen JE, Bjerrum PJ, Skalkam M, Petersen JH, Egeberg DL, Bangsbøll S, Andersen AN, Skakkebaek NE, Juul A. Expression of the vitamin D metabolizing enzyme CYP24A1 at the annulus of human spermatozoa may serve as a novel marker of semen quality. *International journal of andrology*. 2012 Aug 1;35(4):499-510.

- Blomberg JM, Nielsen JE, Jorgensen A, Rajpert-De Meyts E, Kristensen DM, Jorgensen N, et al. Vitamin D receptor and vitamin D metabolizing enzymes are expressed in the human male reproductive tract. *Hum Reprod.* 2010;25(5):1303–11. doi:10.1093/humrep/deq024.
- Blomberg JM. Vitamin D and male reproduction. *Nat Rev Endocrinol.* 2014;10(3):175–86. doi:10.1038/nrendo.2013.262. Chun RF, Peercy BE, Orwoll ES, Nielson CM, Adams JS.
- Bouillon R, Carmeliet G, Verlinden L, van EE, Verstuyf A, Luderer HF, Lieben L, Mathieu C, Demay M. Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice. *Endocr Rev* 2008;29:726–776.
- Bujan L., Daudin M., Charlet J. P., Thonneau P., Mieusset R. 2000. Increase in scrotal temperature in car drivers. *Hum. Reprod.* 15, 1355–1357
- 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: Cleup SC; 2013. p. 291–5. (a)
- Cariati F, Gigantino V, Coppola G, Pivonello C, Galdiero M, Botti G, Gandini L, Lenzi A, Franco R, Colao A, Pivonello R. Identification of vitamin D (VDR) and retinoic X (RXR) receptor in normal and neoplastic human reproductive tissues. Copenhagen: ECE; 2013. (b)
- Cariati F, Negri A, Pivonello C, Ferro M, Sarnataro M, Terracciano D, Galdiero M, Vitale P, Altieri V, Colao A, Pivonello R. Vitamin D in prostate cancer from genetic to clinics: Study of association between FoKI and TaqI vitamin D receptor polymorphisms and prostate cancer. In: Cleup SC, editor. R I P R O D U Z I O N E E S E S S U A L I T À : DALLA SPERIMENTAZIONE ALLA CLINICA. Padova, Italy: Cleup SC; 2012. p. 419–22
- Chambers, G.M., Sullivan, E.A., Ishihara, O., Chapman, M.G. and Adamson, G.D., 2009. The economic impact of assisted reproductive technology: a review of selected developed countries. *Fertility and sterility*, 91(6), pp.2281-2294.
- Chandra, A., Copen, C.E. and Stephen, E.H., 2013. Infertility and impaired fecundity in the United States, 1982-2010: data from the National Survey of Family Growth (No. 2013). *Natl Health Stat Report* 2013:1-18, 1 p following 19.
- Corbett ST, Hill O, Nangia AK. Vitamin D receptor found in human sperm. *Urology.* 2006;68(6):1345–9. doi:10.1016/j.urology.2006.09.011.
- DeAngelis, C., Galdiero, M., Pivonello, C., Garifalos, F., Menafrà, D., Cariati, F., Salzano, C., Galdiero, G., Piscopo, M., Vece, A. and Colao, A., 2017. The role of vitamin D in

male fertility: A focus on the testis. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 18(3), pp.285-305.

DeLuca HF. The control of calcium and phosphorus metabolism by the vitamin D endocrine system. *Ann N Y Acad Sci*. 1980;355:1–17.

Dusilova-Sulkova S. Vitamin D metabolism and vitamin D traditional and non traditional, target organs: implications for kidney patients. *J Ren Care*. 2009;35(Suppl 1):39–44. doi:10.1111/j. 1755-6686.2009.00066.x.

ESHRE Monographs: Manual on basic semen analysis, by Oxford University Press, 2002

Figa-Talamanca I., Traina M. E., Urbani E. 2001. Occupational exposures to metals, solvents and pesticides: recent evidence on male reproductive effects and biological markers. *Occup. Med.* 51, 174–188. doi:10.1093/occmed/51.3.174

Firouzabadi RD, Rahmani E, Rahsepar M, Firouzabadi MM. Value of follicular fluid vitamin D in predicting the pregnancy rate in an IVF program. *Archives of gynecology and obstetrics*. 2014 Jan 1;289(1):201-6.

Focker M, Antel J, Ring S, Hahn D, Kanal O, Ozturk D, et al. Vitamin D and mental health in children and adolescents. *Eur Child Adolesc Psychiatry*. 2017; doi:10.1007/s00787-017-0949-3.

Franasiak JM, Molinaro TA, Dubell EK, Scott KL, Ruiz AR, Forman EJ, Werner MD, Hong KH, Scott RT. Vitamin D levels do not affect IVF outcomes following the transfer of euploid blastocysts. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2015 Mar 31;212(3):315-e1.

Garbedian K, Boggild M, Moody J, Liu KE. Effect of vitamin D status on clinical pregnancy rates following in vitro fertilization. *CMAJ open*. 2013 May;1(2):E77.

Gaskins AJ, Chavarro JE, Diet and Fertility: A Review, *American Journal of Obstetrics and Gynecology* (2017), doi: 10.1016/j.ajog.2017.08.010.

Gürler, H., Malama, E., Heppelmann, M., Calisici, O., Leiding, C., Kastelic, J. et al. Effects of cryopreservation on sperm viability, synthesis of reactive oxygen species and DNA damage of bovine sperm. *Theriogenology*. 2016; 86: 562–571

Haimi M, Kremer R. Vitamin D deficiency/insufficiency from childhood to adulthood: insights from a sunny country. *World J Clin Pediat*. 2017;6(1):1–9. doi:10.5409/wjcp.v6.i1.1.

Hammoud, A. O, Et al, 2006, ‘Obesity and Male Reproductive Potential’ *Journal of Andrology*, The American Society of Andrology Society publication.

- Harris, J.A., Menke, M.N., Haefner, J.K., Moniz, M.H. and Perumalswami, C.R., 2017. Geographic access to assisted reproductive technology health care in the United States: a population-based cross-sectional study. *Fertility and Sterility*, 107(4), pp.1023-1027.
- Haussler MR, Jurutka PW, Mizwicki M, Norman AW. Vitamin D receptor (VDR)-mediated actions of 1 α ,25(OH)₂vitamin D(3): genomic and non-genomic mechanisms. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2011;25(4):543–59. doi:10.1016/j.beem.2011.05.010.
- Henry HL. Regulation of vitamin D metabolism. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2011;25(4):531–41. doi:10.1016/j.beem.2011.05.003.
- Hewison M. Vitamin D and DBP: the free hormone hypothesis revisited. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2014;144(Pt A):132–7. doi:10.1016/j.jsbmb.2013.09.012.
- Hjollund NH, Bonde JP, Henriksen TB, Giwercman A, Olsen J, Danish First Pregnancy Planner Study Team. Reproductive effects of male psychologic stress. *Epidemiology.* 2004;15(1):21–7.
- Holick MF, Chen TC. Vitamin D deficiency: a worldwide problem with health consequences. *The American journal of clinical nutrition.* 2008 Apr 1;87(4):1080S-6S.
- Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl j Med.* 2007 Jul 19;2007(357):266-81.
- Ikeda M, Kodama H, Fukuda J, Shimizu Y, Murata M, Kumagai J, et al. Role [23]of radical oxygen species in rat testicular germ cell apoptosis induced by heat stress. *Biol Reprod.* 1999;61:393–99.
- Jimenez-Gonzalez C, Michelangeli F, Harper CV, Barratt CL, Publicover SJ. Calcium signalling in human spermatozoa: a specialized ‘toolkit’ of channels, transporters and stores. *Human Reproduction Update.* 2005 Dec 7;12(3):253-67.
- Kinuta K, Tanaka H, Moriwake T, Aya K, Kato S, Seino Y. Vitamin D is an important factor in estrogen biosynthesis of both female and male gonads. *Endocrinology* 2000;141:1317–1324.
- Kwiecinski GG, Petrie GI, DeLuca HF. Vitamin D is necessary for reproductive functions of the male rat. *J Nutr* 1989;119:741–744.
- Liu Y, Ding Z. Obesity, a serious etiologic factor for male subfertility in modern society. *Reproduction.* 2017 Oct 1;154(4):R123-31.
- Mattison DR. The effects of smoking on fertility from gametogenesis to implantation. *Environ Res.* 1982;28:410–33.

- Mizwicki MT, Menegaz D, Yaghmaei S, Henry HL, Norman AW. A molecular description of ligand binding to the two overlapping binding pockets of the nuclear vitamin D receptor (VDR): Structure-function implications. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2010;121(1–2):98–105.
- Mostafa, W.Z. and Hegazy, R.A., 2015. Vitamin D and the skin: Focus on a complex relationship: A review. *Journal of advanced research*, 6(6), pp.793-804.
- Muscogiuri G, Altieri B, Annweiler C, Balercia G, Pal HB, Boucher BJ, et al. Vitamin D and chronic diseases: the current state of the art. *Arch Toxicol*. 2017;91(1):97–107. doi:10.1007/s00204-016-1804-x.
- Muscogiuri G, Annweiler C, Duval G, Karras S, Tirabassi G, Salvio G, et al. Vitamin D and cardiovascular disease: from atherosclerosis to myocardial infarction and stroke. *Int J Cardiol*. 2017;230:577–84. doi:10.1016/j.ijcard.2016.12.053.
- Nemere I, Yoshimoto Y, Norman AW. Calcium transport in perfused duodena from normal chicks: enhancement within fourteen minutes of exposure to 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Endocrinology*. 1984;115(4):1476–83. doi:10.1210/endo-115-4-1476.
- Nettore IC, Albano L, Ungaro P, Colao A, Macchia PE. Sunshine vitamin and thyroid. *Rev Endocr Metab Disord*. 2017; doi:10.1007/s11154-017-9406-3.
- Neville G, Martyn F, Kilbane M, O'riordan M, Wingfield M, McKenna M, McAuliffe FM. Vitamin D status and fertility outcomes during winter among couples undergoing in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*. 2016 Nov 1;135(2):172-6.
- Norman AW, Bishop JE, Bula CM, Olivera CJ, Mizwicki MT, Zanello LP, et al. Molecular tools for study of genomic and rapid signal transduction responses initiated by 1 alpha,25(OH)₂-vitamin D₃. *Steroids*. 2002;67(6):457–66.
- Nykjaer A, Dragun D, Walther D, Vorum H, Jacobsen C, Herz J, et al. An endocytic pathway essential for renal uptake and activation of the steroid 25-(OH) vitamin D₃. *Cell*. 1999;96(4):507–15.
- Ozkan S, Jindal S, Greenseid K, Shu J, Zeitlian G, Hickmon C, Pal L. Replete vitamin D stores predict reproductive success following in vitro fertilization. *Fertility and sterility*. 2010 Sep 30;94(4):1314-9.
- Paffoni A, Ferrari S, Viganò P, Pagliardini L, Papaleo E, Candiani M, Tirelli A, Fedele L, Somigliana E. Vitamin D deficiency and infertility: insights from in vitro fertilization cycles. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2014 Nov 1;99(11):E2372-6.

- Polyzos NP, Anckaert E, Guzman L, Schiettecatte J, Van Landuyt L, Camus M, Smits J, Tournaye H. Vitamin D deficiency and pregnancy rates in women undergoing single embryo, blastocyst stage, transfer (SET) for IVF/ICSI. *Human reproduction*. 2014 Jun 20;29(9):2032-40.
- Preliminary SART Clinic Summary Report: SART (Society for Assisted Reproductive Technologies), 2015 (vol 2017).
- Prosser DE, Jones G. Enzymes involved in the activation and inactivation of vitamin D. *Trends Biochem Sci* 2004;29(12):664–73.
- Ramlau-Hansen C.H, et al 2006. 'Is Smoking a Risk Factor for Decreased Semen Quality? A Cross-Sectional Analysis' *Human Reproduction* Vol.22, No.1 pp. 188–196, 2007 doi:10.1093/humrep/del364 Advance Access publication September 11
- Rossi BV, Bressler LH, Correia KF, Lipskind S, Hornstein MD, Missmer SA. Lifestyle and in vitro fertilization: what do patients believe?. *Fertility Research and Practice*. 2016 Oct 12;2(1):11.
- Rudick B, Ingles S, Chung K, Stanczyk F, Paulson R, Bendikson K. Characterizing the influence of vitamin D levels on IVF outcomes. *Human reproduction*. 2012 Aug 21;27(11):3321-7.
- Savastano S, Barrea L, Savanelli MC, Nappi F, Di Somma C, Orio F, et al. Low vitamin D status and obesity: role of nutritionist. *Rev Endocr Metab Disord*. 2017; doi:10.1007/s11154-017-9410-7.
- Sharpe, R.M., 2000. Lifestyle and environmental contribution to male infertility. *British medical bulletin*, 56(3), pp.630-642.
- Sinan Ozkavukcu, Esra Erdemli, Ayca Isik, Derya Oztuna, Sercin Karahuseyinoglu, Effects of cryopreservation on sperm parameters and ultrastructural morphology of human spermatozoa, *J Assist Reprod Genet* (2008) 25:403–411
- Slama, R., Hansen, O.K.H., Ducot, B., Bohet, A., Sorensen, D., Giorgis Allemand, L., Eijkemans, M.J.C., Rosetta, L., Thalabard, J.C., Keiding, N. and Bouyer, J., 2012. Estimation of the frequency of involuntary infertility on a nation-wide basis. *Human reproduction*, 27(5), pp.1489-1498.
- Sokol R. Z., Kraft P., Fowler I. M., Mamet R., Kim E., Berhane K. T. 2006 Exposure to environmental ozone affects semen quality. *Environ. Health Perspect*. 114, 360–365
- Thoma, M.E., McLain, A.C., Louis, J.F., King, R.B., Trumble, A.C., Sundaram, R. and Louis, G.M.B., 2013. Prevalence of infertility in the United States as estimated by the current duration approach and a traditional constructed approach. *Fertility and sterility*, 99(5), pp.1324-1331.

- Tirabassi G, Cutini M, Muscogiuri G, Delli Muti N, Corona G, Galdiero M, et al. Association between vitamin D and sperm parameters: clinical evidence. *Endocrine*. 2016; doi:10.1007/s12020-016-1198-9.
- transporters and stores. *Hum Reprod Update* 2006;12(3):253–67.
- Veldurthy V, Wei R, Campbell M, Lupicki K, Dhawan P, Christakos S. 25-Hydroxyvitamin D(3) 24-hydroxylase: a key regulator of 1,25(OH)(2)D(3) catabolism and calcium homeostasis. *Vitam Horm*. 2016;100:137–50. doi:10.1016/bs.vh.2015.10.005.
- Verstuyf A, Carmeliet G, Bouillon R, Mathieu C. Vitamin D: a pleiotropic hormone. *Kidney Int*. 2010; 78(2):140–5. doi:10.1038/ki.2010.17.
- Ward WS. The structure of the sleeping genome: Implications of sperm DNA organization for somatic cells. *J Cell Biochem* 1994;55(1):77–82.
- Ward WS. The structure of the sleeping genome: Implications of sperm DNA organization for somatic cells. *J Cell Biochem* 1994;55(1):77–82.
- Wincze JP. Psychosocial aspects of ejaculatory dysfunction and male reproduction. *Fertility and sterility*. 2015 Nov 30;104(5):1089-94.
- World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen.
- Zanatta L, Zamoner A, Zanatta AP, Bouraima-Lelong H, Delalande C, Bois C, et al. Nongenomic and genomic effects of 1 α ,25(OH) $_2$ vitamin D $_3$ in rat testis. *Life Sci*. 2011;89(15–16):515–23. doi:10.1016/j.lfs.2011.04.008.
- Zhang, H.B., Lu, S.M., Ma, C.Y., Wang, L., Li, X., and Chen, Z.J. Early apoptotic changes in human spermatozoa and their relationships with conventional semen parameters and sperm DNA fragmentation. *Asian J Androl*. 2008; 10: 227–235