



ΔΗΜΟΚΡΙΤΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΡΑΚΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών
«Κλινική Φαρμακολογία και Θεραπευτική»

Τίτλος :
Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΑΥΞΗΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΣΤΗΝ
ΚΙΝΗΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΩΝ

ΒΑΣΙΛΟΥΔΗ ΔΕΣΠΟΙΝΑ

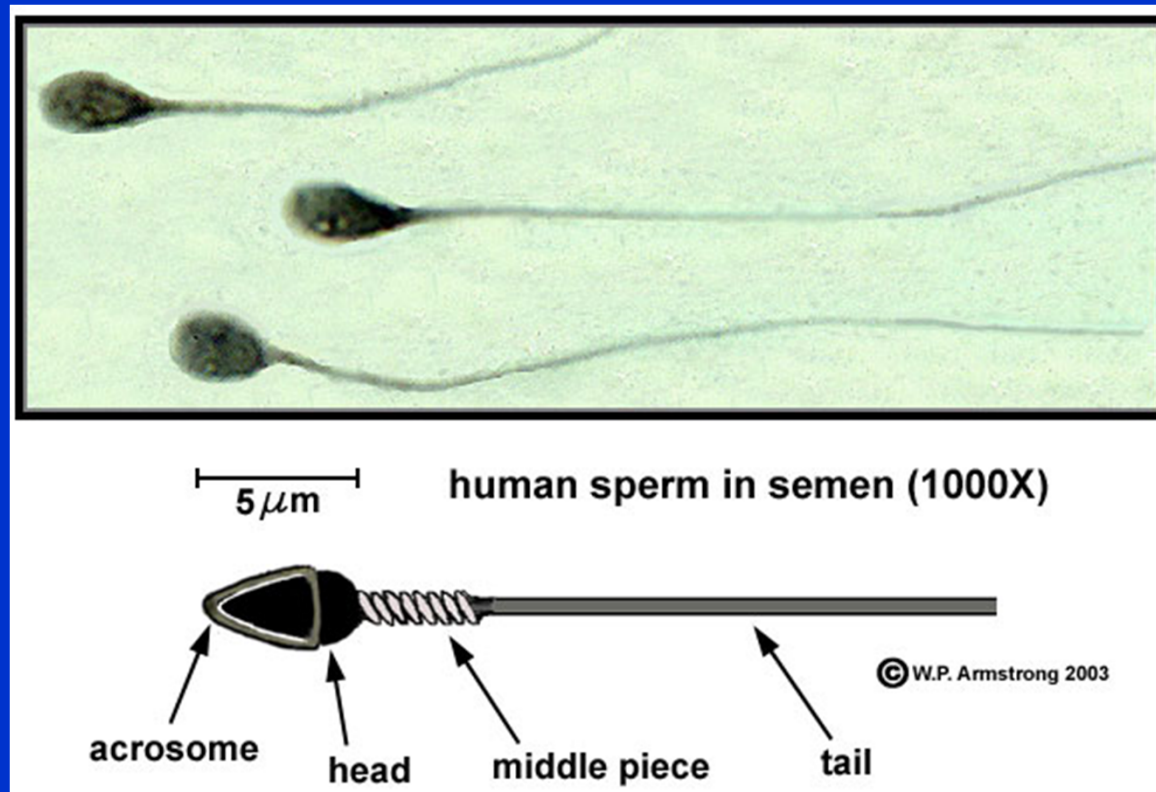
Επιβλέπων: ΒΥΡΩΝ ΑΣΗΜΑΚΟΠΟΥΛΟΣ , Αν. Καθηγητής Φυσιολογίας, Δ.Π.Θ.

ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΥΠΟΛΗ 2014

Μορφολογία σπερματοζωαρίου

Το σπερματοζωάριο αποτελείται από :

- την κεφαλή
- τον αυχένα
- και την ουρά



Βασική ανάλυση σπέρματος

Η βασική ανάλυση σπέρματος είναι εργαλείο αξιολόγησης του σπέρματος και διάγνωσης της ανδρικής υπογονιμότητας.

Παράμετροι βασικής ανάλυσης σπέρματος	Τιμές αναφοράς (ΠΟΥ, 2010)
Όγκος (ml)	1.5 (1.4–1.7)
Συνολικός αριθμός σπερματοζωαρίων (10^6 /εκσπερμάτωση)	39 (33–46)
Συγκέντρωση σπερματοζωαρίων (10^6 /ml)	15 (12–16)
Συνολική κινητικότητα (%)	40 (38–42)
Πρωθητική κίνηση (%)	32 (31–34)
Ζωτικότητα (ζωντανά σπερματοζωάρια, %)	58 (55–63)
μορφολογία (φυσιολογικά σπερματοζωάρια, %)	4 (3.0–4.0)
pH	≥ 7.2

Αξιολόγηση Κινητικότητας σπέρματος

Απευθείας παρατήρηση του υγρού παρασκευάσματος

- **Πρωθητική κίνηση:** περιλαμβάνει τα σπερματοζωάρια που μετακινούνται γρήγορα ή αργά με κίνηση της ουράς τους.
- **Μη πρωθητική κίνηση :** περιλαμβάνει σπερματοζωάρια που εμφανίζουν κίνηση ουράς δίχως όμως να μετατοπίζονται.
- **Ακινησία:** καμία κίνηση

Με χρήση της CASA

- ALH: Amplitude lateral head displacement
- VSL: Straight line velocity
- VAP: Average path velocity
- BCF: Beat-cross frequency
- LIN: linearity
- VCL: Curvilinear velocity

Γιατί μελετάμε ειδικά την κινητικότητα:

❖ Η μορφολογία, η κινητικότητα, η συγκέντρωση και το ποσοστό της προωθητικής κίνησης των σπερματοζωαρίων έχουν στενή σχέση με την επίτευξη εγκυμοσύνης.

(Jouannet et al., 1988; Larsen et al., 2000; Larsen, 2000; Zinaman et al., 2000; Ducot et al., 1988; Jouannet et al., 1988; Larsen et al., 2000; Zinaman et al., 2000)

❖ Η κινητικότητα των σπερματοζωαρίων έχει προταθεί ως προγνωστικός δείκτης για την ανδρική υπογονιμότητα.

(Quill et al., 2006; Yoshida et al., 2008; Subiran et al., 2010)

Αυξητικοί παράγοντες

Οι αυξητικοί παράγοντες παίζουν σημαντικό ρόλο στον παρακρινικό και αυτοκρινικό έλεγχο της ορχικής λειτουργίας

(Spiteri-Grech et al., 1992; Lin, 1995).

- Ινσουλινομιμητικός αυξητικός παράγοντας (IGF – I)
- Ερυθροποιητίνη (EPO)
- Αυξητικός παράγοντας ηπατοκυττάρων (HGF)
- Αυξητικός παράγοντας μετατροπής-β1 (Transforming Growth Factor, (TGF-β1)
- Αυξητικός/διαφοροποιητικός παράγοντας -15 (GDF-15)
- Αγγειακός Ενδοθηλιακός Αυξητικός παράγοντας (VEGF)
- Νευρικός αυξητικός παράγοντας (NGF)
- Επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF)

Σκοπός της μελέτης

- ❖ Ανασκοπεί δημοσιευμένες μελέτες που αφορούν στην επίδραση αυξητικών παραγόντων του σπερματικού πλάσματος επί της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων.
- ❖ Εντοπίζει αυξητικούς παράγοντες που επιδρούν θετικά επί της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων, πρόσφορους για πειραματική μελέτη βελτίωσης της κινητικότητας *in vitro*.

Μέθοδος

Αναζήτηση στη βάση δεδομένων PubMed με λέξεις-κλειδιά:

- «sperm motility»
- «seminal plasma»
- «growth factors»

Η έρευνα κατέληξε σε 293 άρθρα από το οποία διαβάστηκε η περίληψη και στη συνέχεια επιλέχθηκαν 149 που αφορούσαν στην κινητικότητα των σπερματοζωαρίων. Η μελέτη αυτών των 149 άρθρων οδήγησε στην ανεύρεση και μελέτη επιπλέον 43 άρθρων που σχετίζονταν με το θέμα μας.

IGF-I

- Η αλληλεπίδραση του IGF-I με τον υποδοχέα του ρυθμίζεται από μια ομάδα διαλυτών IGF -δεσμευτικών πρωτεϊνών (insulin growth factors binding proteins, IGFBPs).

(Bach et al., 1992; Rechler, 1993; Jones et al., 1995; Oh et al., 1996)

- Επιπρόσθετα έχουν βρεθεί και IGFBP πρωτεάσες οι οποίες τροποποιούν τις IGFBPs και άρα παίζουν κεντρικό ρόλο στη βιοδιαθεσιμότητα του IGF-I.

(Rajah et al., 1995)

IGF-I επί ανεπάρκειας GH

➤ Η θεραπεία με rbGH σε αρουραίους με ανεπάρκεια GH αύξησε σημαντικά τη συγκέντρωση του IGF-I στο πλάσμα του αίματος και την κινητικότητα των σπερματοζωαρίων.

(Breier et al., 1996)

➤ Η χορήγηση IGF-I μέσω μικρό-αντλίων σε αρουραίους με ανεπάρκεια GH έδειξε σημαντική αύξηση της κινητικότητας.

(Vickers et al., 1999)

➤ Μελέτη με ολιγοζωοσπερμικούς άνδρες, στους οποίους χορηγήθηκε GH για 12 εβδομάδες, έδειξε ότι η συγκέντρωση του IGF-I στο σπερματικό πλάσμα αυξήθηκε σημαντικά καθώς επίσης και η συνολική κινητικότητα.

(Ovesen et al., 1996)

IGF-I

➤ Σπερματοζωάρια ταύρων επωάστηκαν με IGF-I για δυο ώρες. Η επίδραση του στη συνολική κινητικότητα και στην προωθητική κίνηση των σπερματοζωαρίων ήταν θετική καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης.

(Selvaraju et al., 2009)

➤ Σε αντίθεση η συγκέντρωση του IGF-I στο σπερματικό πλάσμα ταύρων που παράγουν χαμηλής ποιότητας σπερματοζωάρια, είναι υψηλότερη από ότι αυτή στους φυσιολογικούς ταύρους *in vitro* .

(Hoeflich et al., 1999)

IGF-I

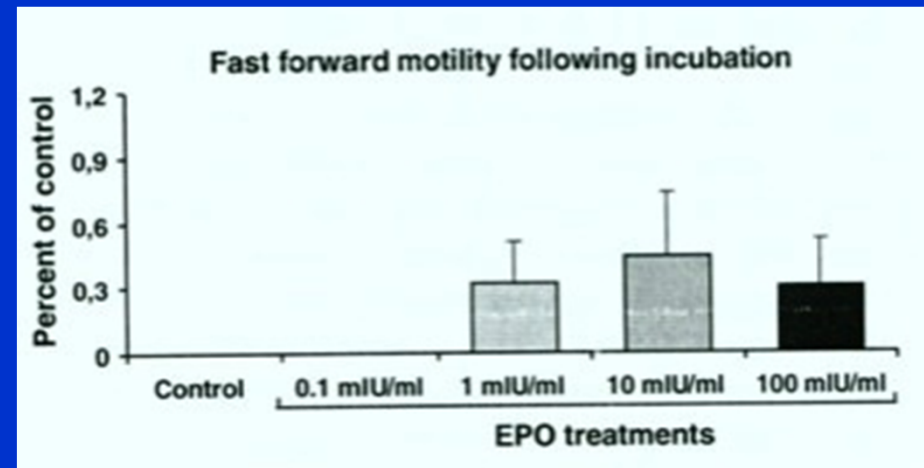
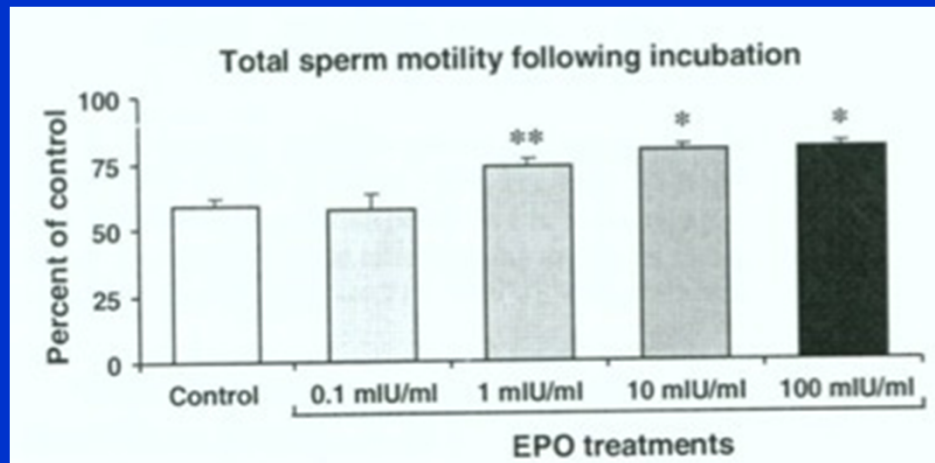
➤ Ανθρώπινα δείγματα επώαστηκαν για 60min με IGF-I , ο CV και ALH μειώθηκε σημαντικά.

Ο IGFBP-3 αύξησε τη γραμμικότητα και τη BCF και μείωσε ALH σημαντικά.

Ο συνδυασμός IGF-I/IGFBP-3, δεν είχε στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα.

EPO

➤ Επίδραση EPO σε ανθρώπινα σπερματοζώαρια

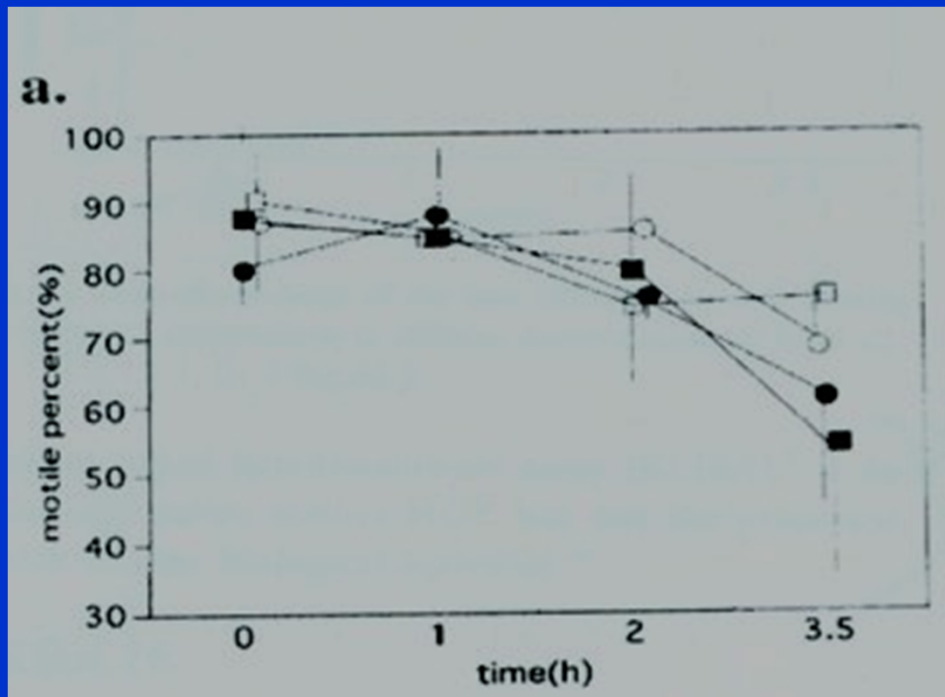


Πιθανόν τα αποτελέσματα να οφείλονται στην αντι-αποπτωτική της δράση.

HGF

➤ Ο HGF αύξησε κατά 5-15% την κινητικότητα ακινήτων σπερματοζωαρίων επίμυων *in vitro*. (Naz et al, 1994)

➤ Επίδραση HGF στην κινητικότητα ανθρώπινων σπερματοζωαρίων



(Wiltshire et al, 2000; Kitamura et al., 2000)

TGF-β1

Ο TGF-β έχει προσδιοριστεί ως ανοσοκατασταλτικός παράγοντας στο σπερματικό πλάσμα. (Ochsenkuhn et al., 2006)

➤ Δεν είχε επίδραση σε ανθρώπινα δείγματα τόσο στην συνολική κινητικότητα των σπερματοζωαρίων όσο και στην προωθητική κίνηση. (Naz et al., 1991)

GDF-15

Ο GDF-15 έχει βρεθεί στο σπερματικό πλάσμα σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις (40-200 ng/ml)

(Politch et al., 2007) (Pilch et al., 2006)

➤ Σε ανθρώπινα δείγματα βρέθηκε ότι δεν επιδρά στη συνολική κινητικότητα των σπερματοζωαρίων. (Soucek et al., 2010)

VEGF

Ο VEGF είναι ένα σημαντικό σηματοδοτικό πολυπεπίδιο που εμπλέκεται στην αγγειογένεση. (Ho et al., 2007)

➤ Σε μελέτη με ανθρώπινα σπερματοζωάρια τα όποια επωάστηκαν με VEGF σε συγκεντρώσεις (5,10,15,20 ng/ml) για 24h, ο VEGF είχε θετική επίδραση στην κινητικότητα .

Η επίδραση στην προωθητική κίνηση άγγιξε τα μεγαλύτερα ποσοστά στα 10 ng/ml και 15 ng/ml. Στατιστικά αυξημένα ήταν τα ποσοστά στα 15 ng/ml για VSL και VCL.

NGF

➤ Σπερματοζωάρια από τρωκτικά (golden hamsters) επωάστηκαν με NGF. Ο NGF είχε θετική επίδραση στη συνολική κινητικότητα των σπερματοζωαρίων, στην VSL καθώς και στην ALH, οι οποίες αυξάνονταν παράλληλα με τη συγκέντρωση και το χρόνο.

Στην ίδια μελέτη φάνηκε να επάγει την ακροσωμιακή αντίδραση των σπερματοζωαρίων μέσω του MAPK σηματοδοτικού μονοπατιού.

(Jin et al., 2010)

➤ Ανθρώπινα σπερματοζωάρια επωάστηκαν με NGF για 30min. Η συνολική κινητικότητα αυξήθηκε σημαντικά παράλληλα με τη συγκέντρωση.

Η VAP, η VSL, η VCL, η BCF και η LIN αυξανόταν παράλληλα με το χρόνο.

(Cui-Ge Shi et al., 2012)

EGF

➤ Σπερματοζώαρια κριού επώαστηκαν με EGF σε διάφορες συγκεντρώσεις

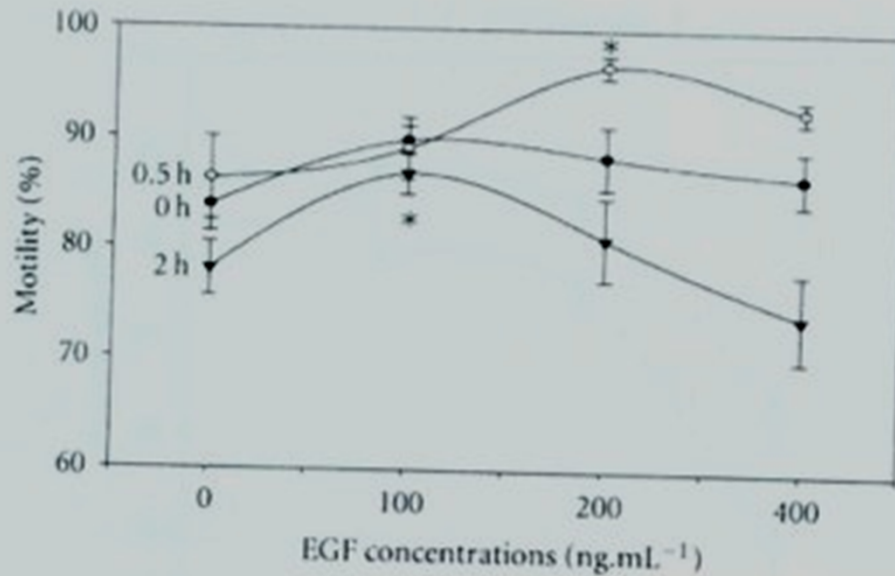


FIGURE 1: Dynamics of EGF effect on ram sperm motility. Significant difference compared to control, * $P < .05$.

(Spalekova et al., 2011)

EGF

➤ Σε μελέτη που έγινε με επίμυες, στους οποίους είχαν αφαιρεθεί κισσοκήλες από το όσχεο, συστηματική χορήγηση (10mg/kg x ημέρα) EGF φάνηκε να επιδρά αυξάνοντας σημαντικά την συνολική κινητικότητα σπερματοζωαρίων.

Η χειρουργική επέμβαση μαζί με τον EGF συνδυαστικά, είχαν καλύτερα αποτελέσματα.

EGF

➤ Επίδραση EGF στην κινητικότητα ανθρωπίνων σπερματοζωαρίων

Table 3. Effects of human recombinant EGF on human sperm motility parameters*

Treatment (nM)	Percent motility	Motility characteristics (mean \pm SD)			
		Velocity	Linearity	ALH†	Beat frequency
0.1	77.75 \pm 6.02	57.00 \pm 5.69	4.30 \pm 0.24	4.05 \pm 0.53	12.75 \pm 0.76
1.0	74.00 \pm 6.00	57.65 \pm 5.19	4.37 \pm 0.38	4.03 \pm 0.57	12.70 \pm 0.88
10	75.25 \pm 5.50	57.30 \pm 4.32	4.37 \pm 0.33	4.02 \pm 0.51	12.48 \pm 0.79
25	72.00 \pm 2.82	53.10 \pm 4.10‡	4.28 \pm 0.05	3.40 \pm 0.42‡	12.85 \pm 0.78
50	72.10 \pm 5.25	52.05 \pm 5.80‡	4.18 \pm 0.32	3.32 \pm 0.40‡	12.79 \pm 0.76
100	71.60 \pm 4.75	51.29 \pm 4.21‡	4.01 \pm 0.08‡	2.98 \pm 0.59‡	13.12 \pm 0.82‡
Control (PBS-BSA)	76.50 \pm 5.45	57.35 \pm 5.65	4.40 \pm 0.38	4.02 \pm 0.47	12.52 \pm 0.91

* Assays ($n = 3-5$) were performed on various days using sperm collected from three different fertile donors.

† ALH means amplitude of lateral head displacement.

‡ Versus control, $P = 0.02$ to <0.01 ; others were insignificant vs control.

(Naz et al., 1993)

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ 1

Αυξητικός παράγοντας στο σπερματικό πλάσμα	ΕΙΔΟΣ	Επίδραση στην κινητικότητα των σπερματοζωαρίων	Είδος κίνησης
IGF-I	Αρουραίοι έλλειψη GH	↑	ΣΥΝΟΛΙΚΗ ΚΙΝΗΤΙΚΟΤΗΤΑ
	Βοοειδή	↑	ΣΥΝΟΛΙΚΗ ΚΙΝΗΤΙΚΟΤΗΤΑ
	Άνδρες με έλλειψη GH	↑	ΣΥΝΟΛΙΚΗ ΚΙΝΗΤΙΚΟΤΗΤΑ
IGF-I,IGFBPs	Άνδρες	↓	CV, ALH

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ 2

Αυξητικός παράγοντας στο σπερματικό πλάσμα	ΕΙΔΟΣ	Επίδραση στην κινητικότητα των σπερματοζωαρίων	Είδος κίνησης
EPO	Άνδρες	↑	ΣΥΝΟΛΙΚΗ ΚΙΝΗΤΙΚΟΤΗΤΑ, ΠΡΟΩΘΗΤΙΚΗ
HGF	Επίμυες	ΑΠΟΚΤΗΣΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΚΙΝΗΣΗΣ	
	Άνδρες	–	
TGF-β 1	Άνδρες	–	
GDF-15	Άνδρες	–	

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ 3

Αυξητικός παράγοντας στο σπερματικό πλάσμα	ΕΙΔΟΣ	Επίδραση στην κινητικότητα των σπερματοζωαρίων	Είδος κίνησης
VEGF	Άνδρες	↑	ΣΥΝΟΛΙΚΗ ΚΙΝΗΤΙΚΟΤΗΤΑ, ΠΡΟΩΘΗΤΙΚΗ, VSL, VCL
NGF	Ποντίκια	↑	ΣΥΝΟΛΙΚΗ ΚΙΝΗΤΙΚΟΤΗΤΑ, VSL, ALH
	Άνδρες	↑	ΣΥΝΟΛΙΚΗ ΚΙΝΗΤΙΚΟΤΗΤΑ, VAP, VSL, VCL, BCF, LIN
EGF	Κριός	↑	ΣΥΝΟΛΙΚΗ ΚΙΝΗΤΙΚΟΤΗΤΑ
	Επίμυες	↑	ΣΥΝΟΛΙΚΗ ΚΙΝΗΤΙΚΟΤΗΤΑ
	Άνδρες	↑	ΤΑΧΥΤΗΤΑ, ΓΡΑΜΜΙΚΟΤΗΤΑ, ALH, BCF

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ 4

- ❖ Ο VEGF και ο NGF είχαν θετική επίδραση στη συνολική κινητικότητα των ανθρωπίνων σπερματοζωαρίων.
- ❖ Ο VEGF, η EPO και ο NGF είχαν θετική επίδραση στην προωθητική κίνηση των ανθρωπίνων σπερματοζωαρίων.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα **Αν. Καθηγητή Φυσιολογίας, κ. Βύρωνα Ασημακόπουλο** για την πολύτιμη βοήθεια και στήριξη του – επιστημονική και μη- καθ' όλη τη διάρκεια της συγγραφής.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επιστημονικά Υπεύθυνο του Μεταπτυχιακού Προγράμματος **Καθηγητή κ. Γεώργιο Κολιό, Διευθυντή του Τμήματος Φαρμακολογίας**, που μας μετέδωσε τις επιστημονικές του γνώσεις σε όλη τη διάρκεια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος, μεταφέροντας μας παράλληλα το πάθος του για την επιστήμη.

Ευχαριστώ το Διευθυντή του Εργαστηρίου Φυσιολογίας-στο οποίο εργάζομαι- **Καθηγητή κ. Κωνσταντίνο Χαραλαμπόπουλο** για τη θετική του στάση απέναντι στην απόφασή μου να συμμετάσχω στο Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου που μου έμαθε να αγωνίζομαι με συνέπεια για ό, τι αγαπώ.

Ενεργοποίηση (capasitation)

Τα σπερματοζωάρια πρέπει να περάσουν μια περίοδο στο γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα προτού αποκτήσουν την ικανότητα να γονιμοποιήσουν το ωκύτταρο. Αυτή η διαδικασία ονομάζεται ενεργοποίηση σπερματοζωαρίων (capasitation) και καθιστά το σπέρμα ικανό για γονιμοποίηση. Παρατηρήθηκε για πρώτη φορά από τους Austin και Chang ξεχωριστά.

(Austin, 1951; Chang, 1951)

VEGF

Το γεγονός ότι υπάρχουν υποδοχείς VEGF στα σπερματοζωάρια υποδηλώνει ότι ίσως η επίδραση του είναι άμεση στα σπερματοζωάρια. (Obermair et al., 1999)

Οι Ebisch et al υποστηρίζουν ότι ο VEGF επηρεάζει την κινητικότητα και τη ζωτικότητα των σπερματοζωαρίων, μέσω της επίδρασης που ασκεί στο μικροαγγειακό σύστημα των όρχεων δημιουργώντας, ένα ικανό περιβάλλον για τη σπερματογένεση. (Ebisch et al., 2008)