



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
&
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΑΘΗΝΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΜΑΙΕΥΤΙΚΗΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΕΡΕΥΝΑ ΣΤΗ ΓΥΝΑΙΚΕΙΑ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ»

ΕΠΙΠΕΔΑ ΒΙΣΦΑΤΙΝΗΣ ΣΤΟ ΣΠΕΡΜΑΤΙΚΟ ΠΛΑΣΜΑ

Όνομα μεταπτυχιακής φοιτήτριας : Αναγνωστοπούλου Καλλιόπη
Ιδιότητα : Βιολόγος
Α.Μ. : 20110248

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

1. Σταυρούλα Μπάκα (Αναπληρώτρια Καθηγήτρια) – Επιβλέπουσα
2. Δημήτριος Χασιάκος (Αναπληρωτής Καθηγητής)
3. Αλέξανδρος Γρυπάρης (PhD)

Αθήνα, 2014

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτρια μου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Σταυρούλα Μπάκα, για την αρμονική συνεργασία που είχαμε καθ' όλη τη διάρκεια της εργασίας και τη βοήθεια που μου προσέφερε απλόχερα. Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Δημήτριο Χασιάκο για την πολύτιμη βοήθεια του καθώς και τον κύριο Αλέξανδρο Γρυπάρη για την αμέριστη κατανόηση, υπομονή και βοήθεια στην στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων. Επιπρόσθετα, οφείλω ένα τεράστιο ευχαριστώ στην κυρία Δέσποινα Τζανακάκη, η οποία με δέχθηκε στο εργαστήριο εξωσωματικής του Αρεταιείου Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου και με βοήθησε με την συλλογή των δειγμάτων και την επεξεργασία τους. Κλείνοντας θα ήθελα να ευχαριστήσω την κυρία Στέλλα Δεμερίδου για την πολύτιμη προσφορά της στον προσδιορισμό της βισφατίνης και την κυρία Μαρία Ρήγα για την ευρύτερη βοήθεια της.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ	4
2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	5
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	8
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	13
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	21
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	25

1.ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η βισφατίνη πρωτοανακαλύφθηκε αρκετά χρόνια πριν με το όνομα φωσφοριβοσυλτρανσφεράση του νικοτιναμιδίου (NAMPT), η οποία συμμετέχει στην βιοσύνθεση του NAD. Η NAMPT ξαναανακαλύφθηκε λίγα χρόνια αργότερα ως PBEF1 (pre-B cell colony-enhancing factor), μια κυτοκίνη που ενισχύει την ωρίμανση των πρόδρομων B-λεμφοκυττάρων. Αργότερα, βρέθηκε και στο λιπώδη ιστό ως μια αδιποκυττοκίνη με ισχυρή ινσουλινομιμική ιδιότητα. Σκοπός της εργασίας αυτής είναι η ανίχνευση της βισφατίνης σε σπερματικό πλάσμα ανθρώπου και η συσχέτισή της με τα χαρακτηριστικά των σπερματοζωαρίων (συγκέντρωση, κινητικότητα, μορφολογία). Αποτέλεσμα της εργασίας αυτής είναι η ανίχνευση της βισφατίνης σε σπερματικό πλάσμα ανθρώπου και η ύπαρξη μιας ελαφριάς αρνητικής συσχέτισης μεταξύ της βισφατίνης και της συγκέντρωσης αλλά και του συνολικού αριθμού των σπερματοζωαρίων. Συμπερασματικά, η βισφατίνη μπορεί να παίζει ένα μικρό ρόλο στη σπερματογένεση αλλά περαιτέρω έρευνα θεωρείται απαραίτητη.

1.ABSTRACT

Visfatin was discovered many years ago as nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT), which is involved in nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) biosynthesis. NAMPT was rediscovered a few years later as PBEF1 (pre-B cell colony-enhancing factor), a cytokine that plays an important role in pre-B lymphocytes maturation. Later on, visfatin was found in the adipose tissue as an adipocytokine with a strong insulin-mimetic effect. The aim of this study is to detect visfatin on human seminal plasma and to investigate a possible correlation between visfatin and the characteristics of spermatozoa (concentration, motility, morphology). The results of this study were the detection of visfatin on human seminal plasma and a mildly negative correlation between visfatin and sperm concentration, as well as to the total number of spermatozoa. In conclusion, visfatin might play a small role in spermatogenesis but further research is required.

2.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο λιπώδης ιστός δεν θεωρείται πλέον ένας αδρανής ιστός που στόχος του είναι μόνο η αποθήκευση λίπους. Ο ιστός αυτός επιδρά στο μεταβολισμό ολόκληρου του σώματος. Ως ένα ενδοκρινές όργανο λοιπόν, είναι υπεύθυνος για τη σύνθεση και την έκκριση πολλών ορμονών. Οι ουσίες αυτές εκκρίνονται από τα λιποκύτταρα για αυτό και ονομάζονται λιποκυττοκίνες (ή αδιποκυττοκίνες). Οι λιποκυττοκίνες εκκρίνονται αποκλειστικά ή κατά κυρίαρχο τρόπο από το λιπώδη ιστό, αλλά κάποιες από αυτές έχει βρεθεί ότι εκφράζονται και εκκρίνονται και από άλλους ιστούς. Οι κυριότερες από αυτές είναι η λεπτίνη, η ρεζιστίνη, η αντιπονεκτίνη, η βισφατίνη, η αγγειοτενσίνη, η IL-6, η απελίνη και ο TNF- α . Οι αδιποκυττοκίνες παίζουν σημαντικό ρόλο σε πολλές διεργασίες όπως η πρόσληψη τροφής, η ευαισθησία στην ινσουλίνη, η φλεγμονή, ο μεταβολισμός των λιπιδίων, η αθηροσκλήρωση και η αναπαραγωγή [1]. Στην εργασία αυτή θα ασχοληθούμε μόνο με τη βισφατίνη, η οποία είναι μια μεγάλη πρωτεΐνη μοριακού βάρους 52 kDa. Το γονίδιο αυτής εδράζεται στο έβδομο χρωμόσωμα και αποτελείται από έντεκα εξώνια και δέκα εσώνια [2].

Η βισφατίνη πρωτοανακαλύφθηκε αρκετά χρόνια πριν με το όνομα φωσφοριβοσυλτρανσφεράση του νικοτιναμιδίου (NAMPT) [2-4]. Η NAMPT καταλύει την αντίδραση του νικοτιναμιδίου σε μονονουκλεοτιδικό νικοτιναμίδιο (NMN), το οποίο είναι υπόστρωμα για την βιοσύνθεση του νικοτιναμίδιο - αδενίνου δινουκλεοτιδίου (NAD) [5]. Η NAMPT συμμετέχει στην βιοσύνθεση του NAD τόσο ως ενδοκυττάριο ένζυμο όσο και ως εξωκυττάριο [6]. Το NAD καθώς και τα παράγωγα του είναι πολύ σημαντικά συνένζυμα στις οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις όλων των κυττάρων όλων των ζωντανών οργανισμών αλλά συμμετέχουν κιόλας και σε πολλά μονοπάτια σήματος. Χαρακτηριστικά μονοπάτια σήματος που συμμετέχουν είναι η σύνθεση της κυκλικής διφοσφορικής αδενοσινικής ριβόζης (c ADP-ribose) και της νικοτινικής αδενικής δινουκλεοτιδικής φωσφατάσης (NAADP) [5, 7]. Επιπλέον, παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της μεταγραφής [8, 9].

Η NAMPT ξαναανακαλύφθηκε λίγα χρόνια αργότερα ως PBEF1 (pre-B cell colony-enhancing factor), μια κυτοκίνη που ενισχύει την ωρίμανση των πρόδρομων B-

λεμφοκυττάρων παρουσία ιντερλευκίνης 7 και είναι και παράγοντας των βλαστικών κυττάρων [10]. Αργότερα, η έυρεσή της και στον λιπώδη ιστό ως μια αδιποκυττοκίνη [11] της προσέδωσε το σημερινό της όνομα ως βισφατίνη. Η βισφατίνη εκτός από την ενζυμική της δράση βρέθηκε ότι έχει την ικανότητα να ενεργοποιεί υποδοχείς διαφόρων κυτταρικών τύπων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η σύνδεση-ενεργοποίηση του υποδοχέα της ινσουλίνης που της προσδίδει το προσωνύμιο της ινσουλινομιμητικής ουσίας [11]. Εκτός των παραπάνω δράσεων η βισφατίνη παρουσιάζει προφλεγμονώδεις και ανοσοπροσαρμοστικές ιδιότητες [12, 13], έχει σχέση με την αντίσταση στην ινσουλίνη [13] και την λειτουργία των Β κυττάρων του παγκρέατος [6], επηρεάζει το λιπιδικό προφίλ [13-18] και τον μεταβολισμό των κυττάρων και φαίνεται ότι παίζει κάποιο ρόλο στην αγγειογένεση και στην απόπτωση [19].

Η βισφατίνη έχει ανιχνευθεί στο γάλα [20], στο αίμα, στο σπερματικό πλάσμα [21] και στο ωοθυλακικό υγρό γυναικών, οι οποίες υποβάλλονται σε υπερδιέγερση ωοθηκών [22, 23]. Τα επίπεδα αυτής έχουν συνδεθεί με πολλές νοσογόνες καταστάσεις. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αυτών είναι η παχυσαρκία [24, 25], ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 [11, 24], το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών [26], η αθηροσκλήρωση [27], ο καρκίνος [28], η ρευματοειδής αρθρίτιδα [29], το γήρας, η σήψη και το οξύ πνευμονικό οίδημα [30]. Επιπλέον, η βισφατίνη έχει βρεθεί ότι εκφράζεται σε πάρα πολλούς ιστούς ανάμεσα στους οποίους είναι το πάγκρεας [31], ο λιπώδης ιστός [11], ο μυελός των οστών, το ήπαρ, οι μύες, οι πνεύμονες, τα νεφρά, η καρδιά, ο πλακούντας [10] και ο εγκέφαλος [32]. Πέραν όμως των ιστών αυτών, η βισφατίνη έχει βρεθεί και σε πιο ιδιαίτερους ιστούς όπως αυτός των όρχεων [21, 33] και των κοκκιωδών κυττάρων των ωοθυλακίων [22, 34].

Ο τρόπος με τον οποίο εκκρίνεται η βισφατίνη δεν είναι απόλυτα γνωστός [30, 35]. Ωστόσο, έχει αποδειχθεί ότι η βιολογικά δραστική μορφή της βισφατίνης είναι απαραίτητη για την επιβίωση, καθώς στα ομόζυγα ποντίκια με μεταλλάξεις των NAMPT αλληλομόρφων παρατηρείται ενδομήτριος θάνατος. Το αποτέλεσμα αυτό παρατηρείται κυρίως λόγω της έλλειψης της βιοσυνθετικής οδού του NAD από την βισφατίνη και όχι από την έλλειψη της ινσουλινομιμητικής ιδιότητάς της [6].

Η βισφατίνη, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, πολύ πρόσφατα ανακαλύφθηκε και στο ανθρώπινο σπερματικό πλάσμα [21]. Με τον όρο σπερματικό πλάσμα εννοούμε το

σύνολο των συστατικών του σπέρματος εκτός των σπερματοζωαρίων. Το σπερματικό πλάσμα αποτελείται από εκκρίσεις των όρχεων (περίπου 5%), των σπερματοδόχων κύστεων (46%-80%), του προστάτη (13%-33%) και των βολβουρηθραίων αδένων (2%-5%) [36].

Μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί σε πειραματόζωα δείχνουν ότι το NAD πιθανώς δρα στην αύξηση της μεταβολικής δραστηριότητας των κυττάρων Sertoli και των γεννητικών κυττάρων των όρχεων μετά την μείωση [33]. Γνωρίζοντας τη δράση της βισφατίνης, ως ενδοκυττάριο ένζυμο, στη βιοσύνθεση του NAD [5] μπορούμε να υποθέσουμε ότι η βισφατίνη δύναται να παίζει ενεργό ρόλο στην σπερματογένεση και στην στεροειδογένεση. Με αυτόν τον τρόπο, πιθανόν να υπάρχουν συνέπειες και στη λειτουργία των σπερματοζωαρίων .

Σκοπός της εργασίας αυτής είναι η ανίχνευση της βισφατίνης σε σπερματικό πλάσμα ανθρώπου και η συσχέτιση των επιπέδων αυτής με τα χαρακτηριστικά των σπερματοζωαρίων (συγκέντρωση, κινητικότητα και φυσιολογικές μορφές).

3.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Στη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 79 δείγματα σπέρματος από άνδρες που προσήλθαν στο Εργαστήριο Εξωσωματικής του Τμήματος Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Β' Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής του Αρεταιείου Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου για ανάλυση σπέρματος (σπερμοδιάγραμμα). Κάθε άνδρας υπέγραψε δύο πανομοιότυπες φόρμες συγκατάθεσης με τις οποίες συμφωνούσε να συμμετάσχει στην έρευνα και από τις οποίες μία κράτησε ο ίδιος και μία παρέμεινε στο Εργαστήριο Εξωσωματικής του Τμήματος Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής του Αρεταιείου Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου. Πριν τη λήψη του δείγματος κάθε άνδρας συμπλήρωσε ένα ιστορικό που αφορούσε τόσο προσωπικά του στοιχεία όσο και στοιχεία που είτε άμεσα είτε έμμεσα αφορούσαν το δείγμα.

ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Η συλλογή του δείγματος πραγματοποιήθηκε είτε στον ειδικά διαμορφωμένο χώρο που υπάρχει στο Εργαστήριο Εξωσωματικής του Τμήματος Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής του Αρεταιείου Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου είτε στο σπίτι. Η συλλογή του δείγματος στο σπίτι προϋπόθετε την σημείωση της ακριβούς ώρας εκσπερμάτισης, τη μεταφορά του δείγματος εντός μίας ώρας στο Εργαστήριο Εξωσωματικής καθώς και τη διατήρηση του δείγματος κατά την μεταφορά σε θερμοκρασία μεταξύ των 20 και 37 °C. Η λήψη του δείγματος και στις δύο περιπτώσεις πραγματοποιήθηκε μέσω αντανισμού σε αποστειρωμένο ουροσυλλέκτη. Οι άνδρες έπρεπε να έχουν αποχή από σεξουαλικές επαφές από 2 έως 5 ημέρες [37].

ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Η επεξεργασία του δείγματος ξεκινούσε με την ώρα ρευστοποίησης του δείγματος. Η φυσιολογική ώρα ρευστοποίησης κυμαίνεται από 30 έως 60 λεπτά μετά την εκσπερμάτιση. Το επόμενο βήμα στην επεξεργασία ήταν η παρατήρηση των μακροσκοπικών χαρακτηριστικών του δείγματος, δηλαδή του όγκου, του χρώματος και του pH του δείγματος [37].

Η μέτρηση του όγκου γινόταν με αποστειρωμένες πιπέτες των 5ml και κάθε τιμή άνω του 1,5ml θεωρούνταν φυσιολογική. Όσον αφορά το χρώμα, το κάθε δείγμα κατατασσόταν είτε στο υπόλευκο (φυσιολογικό), είτε στο λευκοκίτρινο είτε στο

κιτρινωπό. Τέλος, η μέτρηση του pH γινόταν με χαρτάκια pH και κάθε ένδειξη άνω του 7,2 θεωρούνταν φυσιολογική [37].

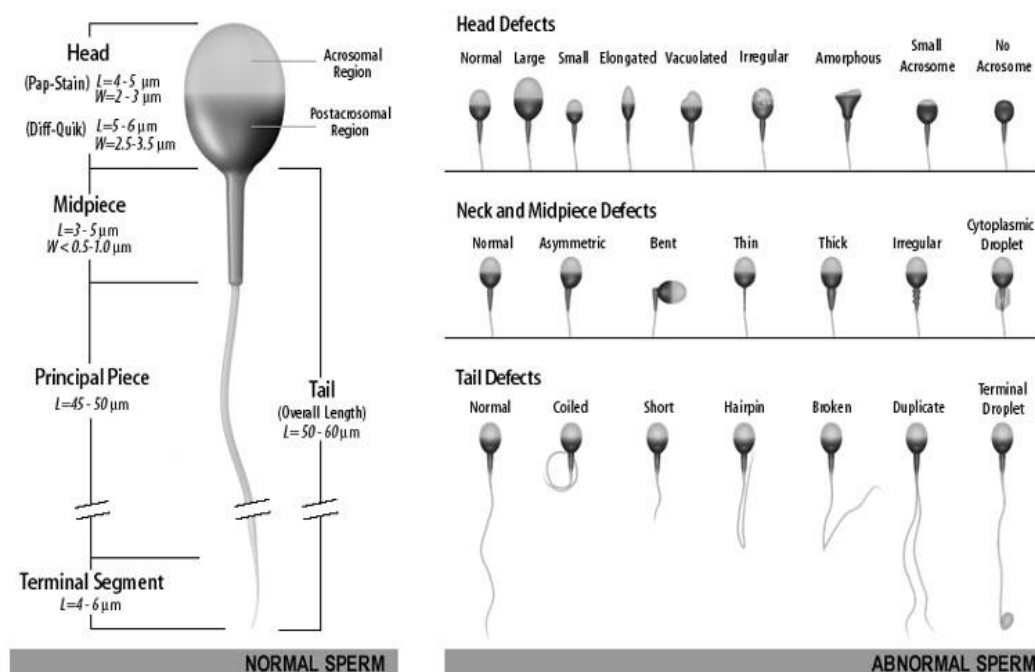


sepalreproductivedevices.com

Εικόνα 1 : Απεικόνιση της Makler πολλών χρήσεων.

Το τελευταίο βήμα στην επεξεργασία του δείγματος ήταν η παρατήρηση των μικροσκοπικών χαρακτηριστικών, δηλαδή της συγκέντρωσης, της κινητικότητας και της μορφολογίας των σπερματοζωαρίων. Αξίζει να σημειωθεί ότι πριν από οποιαδήποτε μέτρηση το δείγμα είχε αναδευθεί πάρα πολύ καλά. Η μέτρηση της συγκέντρωσης και της κινητικότητας του δείγματος πραγματοποιήθηκε με makler πολλών χρήσεων (εικόνα 1) εντός το πολύ μίας ώρας από την στιγμή της εκσπερμάτισης. Η συγκέντρωση θεωρούνταν φυσιολογική όταν η τιμή της ήταν ίση ή μεγαλύτερη των 15 εκατομμυρίων σπερματοζωαρίων ανά ml ή ο συνολικός αριθμός των σπερματοζωαρίων ήταν ίσος ή μεγαλύτερος των 39 εκατομμυρίων. Αξίζει να αναφερθεί ότι ο συνολικός αριθμός των σπερματοζωαρίων υπερಿಸχύει της συγκέντρωσης σπερματοζωαρίων ανά ml στην κατάταξη ενός δείγματος ως φυσιολογικό ή μη. Όσον αφορά την κινητικότητα, το κάθε σπερματοζωάριο κατατασσόταν είτε ως ταχέως προωθητικά κινούμενο (Α), είτε ως βραδέως προωθητικά κινούμενο (Β), είτε ως επιτόπια κινούμενο (Γ) είτε ως ακίνητο (Δ). Αν το δείγμα μας είχε συνολική προωθητική κίνηση μεγαλύτερη ή ίση του 32% ή αν είχε συνολική κίνηση μεγαλύτερη ή ίση του 40% τότε θεωρούνταν φυσιολογικό. Τέλος, η αξιολόγηση της μορφολογίας έγινε με χρώση με την βοήθεια προβαμμένων

πλακιδίων. Κάθε σπερματοζωάριο εξετάζοταν για τυχόν ανωμαλίες στο κεφάλι, στον αυχένα και στην ουρά (εικόνα 2). Αν παρατηρούνταν περισσότερα από 4% ή 4% απόλυτα φυσιολογικά σπερματοζωάρια τότε το δείγμα θεωρούνταν φυσιολογικό. Σε δείγματα με πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις ($<1 \times 10^6$ σπερμ./ml) δεν πραγματοποιήθηκε μορφολογία γιατί θεωρείται αναξιόπιστη ενώ σε δείγματα με συγκεντρώσεις μεταξύ 1 και 2 εκατομμυρίων σπερματοζωαρίων ανά ml πραγματοποιήθηκε ελαφριά φυγοκέντρηση (8 λεπτά στις 1300 στροφές) του δείγματος και μεταφέρθηκε στο πλακάκι μόνο το ίζημα [37].



www.thebabystepsblog.com

Εικόνα 2 : Απεικόνιση ενός σπερματοζωαρίου με φυσιολογική μορφολογία (αριστερά) και σπερματοζωαρίων με ανωμαλίες σε κεφαλή, αυχένα και ουρά (δεξιά) .

Αξίζει να αναφερθεί ότι ένα φυσιολογικό δείγμα σπέρματος δεν πρέπει να περιέχει ερυθρά αιμοσφαίρια και συγκολλήσεις σπερματοζωαρίων ενώ μπορεί να περιέχει έως 1 εκατομμύριο ανά ml λευκοκύτταρα και έως 3 εκατομμύρια ανά ml ανώριμες γεννητικές μορφές [37]. Σε όποιο δείγμα λοιπόν, μέσω της βοήθειας της makler, βρέθηκαν τιμές διαφορετικές των παραπάνω καταγράφηκαν στις παρατηρήσεις του δείγματος.

ΜΕΤΡΗΣΗ ΒΙΣΦΑΤΙΝΗΣ

Ο προσδιορισμός της βισφατίνης πραγματοποιήθηκε στο πλάσμα του σπέρματος με την μέθοδο της ELISA. Κάθε δείγμα ,μετά την επεξεργασία του, φυγοκεντρήθηκε για 5 λεπτά στις 2500 στροφές και το σπερματικό πλάσμα αυτού συλλέχθηκε και διατηρήθηκε σε βαθιά κατάψυξη (-70° C) μέχρι την πραγματοποίηση των μετρήσεων.

Το kit της ELISA που χρησιμοποιήθηκε ανήκε στην PHOENIX PHARMACEUTICALS και είχε την επωνυμία Visfatin C-terminal (Human) EIA Kit. Το συγκεκριμένο kit ήταν μια ανταγωνιστικού τύπου ELISA που είχε τα ακόλουθα χαρακτηριστικά:

Ευαισθησία : 2,21 ng/ml

Ενδοαναλυτικός συντελεστής διακύμανσης : <10%

Διαναλυτικός συντελεστής διακύμανσης : <15%

Διακύμανση : 0,1-1000 ng/ml

ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ

Από τα δεδομένα της μελέτης προέκυψαν 9 μεταβλητές : η συγκέντρωση της βισφατίνης, ο δείκτης μάζας σώματος , ο όγκος του σπέρματος, ο αριθμός τσιγάρων ανά μέρα, η συγκέντρωση των σπερματοζωαρίων, ο συνολικός αριθμός των σπερματοζωαρίων, η κινητικότητα των σπερματοζωαρίων, η μορφολογία των σπερματοζωαρίων και το σπερμοδιάγραμμα. Κάθε μία από τις μεταβλητές αυτές κατατάχθηκε ως ποσοτική ή ως ποιοτική. Επιπλέον όλες οι ποσοτικές μεταβλητές εκτός της συγκέντρωσης της βισφατίνης μετατράπηκαν και σε ποιοτικές με δύο επίπεδα. Η μετατροπή αυτή πραγματοποιήθηκε βάση του από ποια τιμή και πάνω ή κάτω κάθε μεταβλητή θεωρείται φυσιολογική σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας.

Στο πρώτο μέρος της στατιστικής ανάλυσης πραγματοποιήθηκε περιγραφική στατιστική σε κάθε μεταβλητή. Για κάθε ποσοτική μεταβλητή δημιουργήθηκε το ιστόγραμμα της και υπολογίστηκαν αντιπροσωπευτικές τιμές των κατανομών συχνοτήτων της, συγκεκριμένα η μέση τιμή, η διάμεσος, η τυπική απόκλιση, η ελάχιστη και η μέγιστη τιμή. Για κάθε ποιοτική μεταβλητή δημιουργήθηκε το κυκλικό διάγραμμα της κατανομής συχνοτήτων της.

Βασική μεταβλητή της μελέτης είναι η συγκέντρωση της βισφατίνης. Επομένως πραγματοποιήθηκαν αμφίπλευροι έλεγχοι για την ανεύρεση πιθανής σχέσης της συγκέντρωσης της βισφατίνης με κάποια από τις υπόλοιπες μεταβλητές. Η μη κανονική κατανομή της βισφατίνης, το είδος της μεταβλητής (ποιοτική ή ποσοτική) με την οποία ελεγχόταν κάθε φορά και οι προϋποθέσεις εφαρμογής της κάθε δοκιμασίας καθόρισαν τα είδη των δοκιμασιών που πραγματοποιήθηκαν. Η δοκιμασία Wilcoxon, ο συντελεστής γραμμικής συσχέτισης ρ (rho) του Spearman και η πολλαπλή γραμμική παλινδρόμηση ήταν οι δοκιμασίες που επιλέχθηκαν. Επιπλέον, στην πολλαπλή γραμμική παλινδρόμηση ελέγχθηκαν ως πιθανοί συγχυτικοί παράγοντες ο δείκτης μάζας σώματος και ο αριθμός των τσιγάρων ανά μέρα.

Οι παραπάνω δοκιμασίες πραγματοποιήθηκαν τόσο για τις συνολικές παρατηρήσεις όλων των ατόμων (ομάδα 1) καθώς και για τις παρατηρήσεις από τις οποίες είχαν αφαιρεθεί δύο δείγματα (ομάδα 2). Τα δύο αυτά δείγματα παρουσίαζαν πολύ υψηλές τιμές συγκέντρωσης βισφατίνης και αφαιρέθηκαν διότι δεν ήταν δυνατόν να εξακριβωθεί αν οι υψηλές μετρήσεις ήταν αληθινές ή οφείλονταν σε κάποιο λάθος στην μέθοδο προσδιορισμού της βισφατίνης. Έτσι εξετάσαμε κατά πόσο τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσής μας είναι ευαίσθητα στις 2 αυτές ακραίες τιμές.

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό SPSS 17.0 . Ως στατιστικό επίπεδο σημαντικότητας χρησιμοποιήθηκε το 0,05. Έτσι, οποιοσδήποτε στατιστικός έλεγχος κατέληγε σε $p\text{-value} < 0,05$ κρίθηκε στατιστικά σημαντικός ενώ όποιος κατέληγε σε $0,05 \leq p\text{-value} \leq 0,10$ κρίθηκε ως ενδεικτικός.

4.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στον πίνακα 1 παρουσιάζονται τα δημογραφικά χαρακτηριστικά των μεταβλητών.

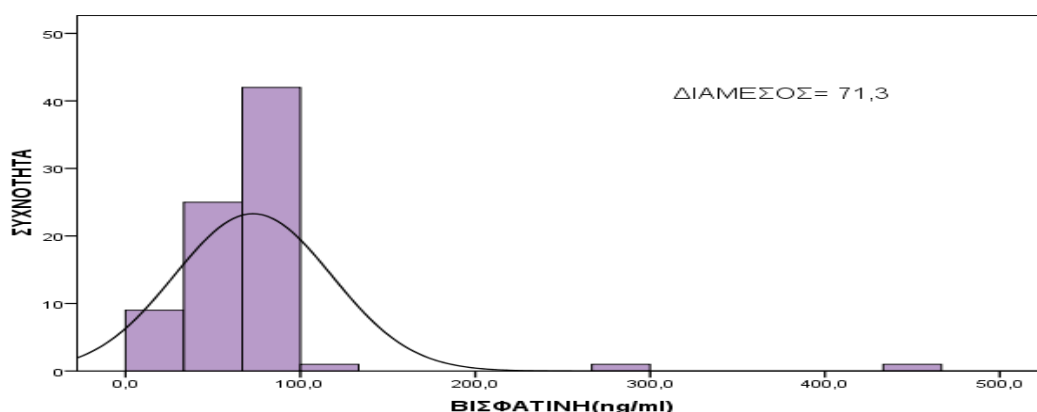
Πίνακας 1 : Δημογραφικά χαρακτηριστικά όλων των μεταβλητών στο σύνολο των δειγμάτων και ανά κατηγορία σπερμοδιαγράμματος (φυσιολογικό ή μη).

Παράμετροι	Σύνολο δειγμάτων	Σπερμοδιάγραμμα		p-value
		Φυσιολογικό	Μη Φυσιολογικό	
Αριθμός δειγμάτων	79	35	44	
Ηλικία	40 (28-52)	40 (28-51)	40 (33-52)	0,420
Αποχή	4 (2-20)	4 (2-15)	3 (2-20)	0,221
Αριθμός τσιγάρων/μέρα	0 (0-60)	5 (0-35)	0 (0-60)	0,385
Συγκέντρωση σπερματοζωαρίων (εκατ./ml)	30 (<0,1-190)	57 (15-190)	10 (<0,1-170)	<0,001*
Συνολικός αριθμός σπερματοζωαρίων (εκατ.)	85 (<0,1-858,6)	224,0 (52,5- 858,6)	35,5 (<0,1- 231,0)	<0,001*
Κινητικότητα σπερματοζωαρίων (%)	58 (0-90)	69 (37-90)	51 (0-82)	<0,001*
Μορφολογία σπερματοζωαρίων (% φυσιολογικές μορφές)	6 (1-19)	8 (4-19)	3 (1-19)	<0,001*
Όγκος (ml)	3,4 (1,0-8,1)	3,6 (1,6-6,3)	3,1 (1,0-8,1)	0,140
Ύψος (m)	1,70 (1,65-1,94)	1,7 (1,6-1,9)	1,8 (1,7-1,9)	0,055**
Βάρος (kg)	85 (57-140)	82 (62-139)	89 (57-140)	0,161
Δείκτης μάζας σώματος (kg/m ²)	27,4 (19,3-47,0)	26,8 (19,4- 47,0)	28,1 (19,3-43,2)	0,646
Βισφατίνη (ng/ml)	71,3 (8,1-442,4)	66,6 (8,1-96,5)	72,7 (10,0- 442,4)	0,114

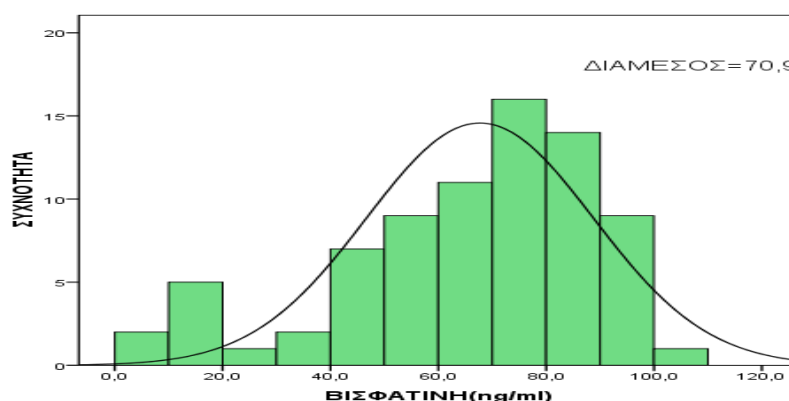
Σημείωση: Οι μεταβλητές λόγω της μη κανονικής τους κατανομής περιγράφονται ως διάμεσος (ελάχιστη τιμή-μέγιστη τιμή). Η σχέση μεταξύ του σπερμοδιαγράμματος και των υπολοίπων παραμέτρων αναλύθηκε με τη δοκιμασία Wilcoxon. *: στατιστικά σημαντικό. **: ενδεικτικό.

Η συγκέντρωση των σπερματοζωαρίων, ο συνολικός τους αριθμός, η κινητικότητα και η μορφολογία τους είναι οι παράμετροι που επηρεάζουν στατιστικώς σημαντικά το αν ένα σπερμοδιάγραμμα θα καταταχθεί ως φυσιολογικό ή μη, όπως φαίνεται στον πίνακα 1. Αυτό ήταν αναμενόμενο άλλωστε αφού το σπερμοδιάγραμμα είναι μία μεταβλητή που κατασκευάστηκε από αυτές τις παραμέτρους. Στο δείγμα μας τα άτομα με φυσιολογικό σπερμοδιάγραμμα είχαν μεγαλύτερη συγκέντρωση σπερματοζωαρίων, υψηλότερο συνολικό αριθμό, καλύτερη μορφολογία και πιο υψηλή κινητικότητα σε σχέση με τα άτομα με μη φυσιολογικό σπερμοδιάγραμμα.

Η βισφατίνη στις ομάδες 1 και 2 δεν ακολουθεί την κανονική κατανομή όπως φαίνεται στις Εικόνες 3 και 4. Επιπλέον, στην Εικόνα 3 είναι φανερό και οι δύο ακραίες μετρήσεις βισφατίνης, για τις οποίες δεν μπορούσαμε να προσδιορίσουμε αν είναι αληθινές.



Εικόνα 3 : Ιστόγραμμα βισφατίνης στην ομάδα 1.



Εικόνα 4 : Ιστόγραμμα βισφατίνης στην ομάδα 2

Η σχέση της βισφατίνης με τις υπόλοιπες μεταβλητές (στην ποιοτική τους μορφή) τόσο στην ομάδα 1 όσο και στην ομάδα 2 παρουσιάζονται στον πίνακα 2.

Πίνακας 2: Σχέση βισφατίνης και υπολοίπων παραμέτρων στην ομάδα 1 και 2.

Παράμετροι	ΟΜΑΔΑ 1		ΟΜΑΔΑ 2	
	Βισφατίνη (ng/ml)	p-value	Βισφατίνη (ng/ml)	p-value
Φυσιολογικό Σπερμοδιάγραμμα	66,6	0,114	66,6	0,201
Μη Φυσιολογικό Σπερμοδιάγραμμα	72,7		71,9	
Φυσιολογική Συγκέντρωση	70,4	0,302	69,1	0,178
Μη Φυσιολογική Συγκέντρωση	71,9		71,9	
Φυσιολογική Κινητικότητα	72,1	0,980	71,3	0,874
Μη Φυσιολογική Κινητικότητα	66,8		66,6	
Φυσιολογική Μορφολογία	66,6	0,084**	66	0,104
Μη Φυσιολογική Μορφολογία	77,1		76,4	
Φυσιολογικός Συνολικός αριθμός σπερματοζωαρίων	70,4	0,391	69,1	0,250
Μη Φυσιολογικός Συνολικός αριθμός σπερματοζωαρίων	72,8		72,8	
Φυσιολογικός Όγκος	72,1	0,823	71,7	0,226
Μη Φυσιολογικός Όγκος	61		60,1	
Φυσιολογικός Δείκτης μάζας σώματος	74,3	0,787	71,3	0,966
Μη Φυσιολογικός Δείκτης μάζας σώματος	71,1		70,9	
Καπνιστής	70	0,309	69,1	0,300
Μη Καπνιστής	74,3		73,2	

Σημείωση : Για την μεταβλητή δείκτης μάζας σώματος (Δ.Μ.Σ.) ισχύει Φυσιολογικός Δ.Μ.Σ.<25. και Μη Φυσιολογικός Δ.Μ.Σ.> 25. Για όλες τις υπόλοιπες μεταβλητές φυσιολογική θεωρείται η τιμή που ορίζεται από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (2010). Η βισφατίνη, λόγω της μη κανονικής της κατανομής, περιγράφεται ως διάμεσος. Η σχέση μεταξύ της βισφατίνης και των υπολοίπων μεταβλητών αναλύθηκε με τη δοκιμασία Wilcoxon. **: ενδεικτικό

Η σχέση της μορφολογίας με την βισφατίνη στην ομάδα 1 όπως φαίνεται από τον πίνακα 2 είναι η μοναδική που παρουσιάζει ενδεικτικό αποτέλεσμα. Στην περίπτωση αυτή, είναι πιθανό να μην καταφέραμε να βρούμε στατιστικά σημαντικά

αποτελέσματα λόγω του μικρού μεγέθους του δείγματος. Σε γενικές γραμμές τα αποτελέσματα μεταξύ των ομάδων δεν φαίνεται να διαφέρουν μεταξύ τους, γεγονός που υποδεικνύει ότι οι δύο ακραίες παρατηρήσεις των τιμών βισφατίνης (που αφαιρέθηκαν στην ομάδα 2) δεν επηρεάζουν πολύ τα αποτελέσματα.

Η γραμμική συσχέτιση της βισφατίνης με τις υπόλοιπες ποσοτικές μεταβλητές παρουσιάζεται στον πίνακα 3 και για τις 2 ομάδες.

Πίνακας 3 : Γραμμική συσχέτιση βισφατίνης και υπολοίπων παραμέτρων στην ομάδα 1 και 2.

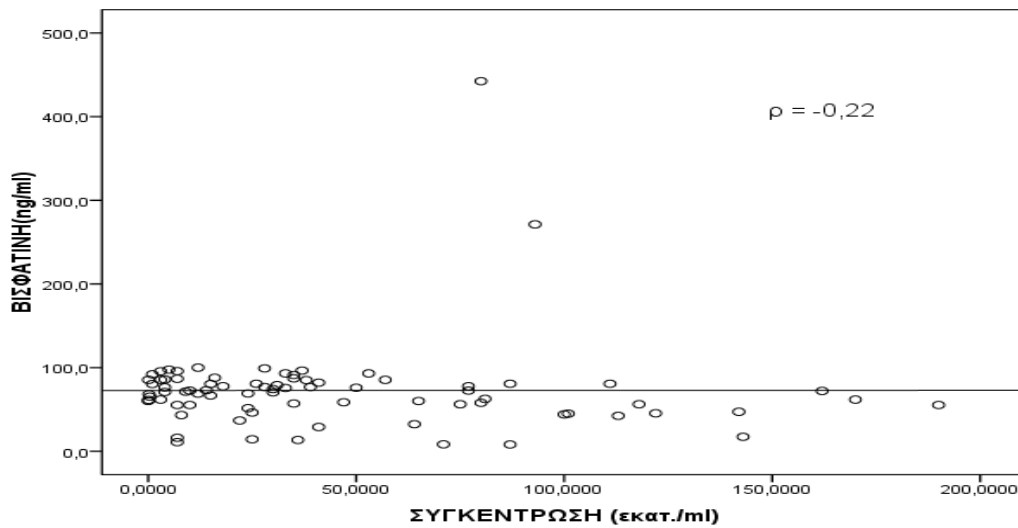
Παράμετροι	Βισφατίνη			
	Ομάδα 1		Ομάδα 2	
	Συντελεστής συσχέτισης Spearman (ρ)	p-value	Συντελεστής συσχέτισης Spearman (ρ)	p-value
Συγκέντρωση σπερματοζωαρίων (εκατ./ml)	-0,22	0,053**	-0,28	0,014*
Συνολικός αριθμός σπερματοζωαρίων (εκατ.)	-0,28	0,013*	-0,3	0,009*
Κινητικότητα σπερματοζωαρίων (%)	-0,07	0,509	-0,12	0,290
Μορφολογία σπερματοζωαρίων (% φυσιολογικές μορφές)	-0,1	0,419	-0,12	0,313
Όγκος (ml)	-0,1	0,387	-0,03	0,769
Δείκτης μάζας σώματος (kg/m ²)	-0,06	0,621	-0,05	0,680
Αριθμός τσιγάρων/μέρα	0,05	0,675	0,06	0,574

Σημείωση : Η γραμμική συσχέτιση της βισφατίνης με τις υπόλοιπες μεταβλητές πραγματοποιήθηκε με τον συντελεστή γραμμικής συσχέτισης ρ (rho) του Spearman. *: στατιστικά σημαντικό. **: ενδεικτικό.

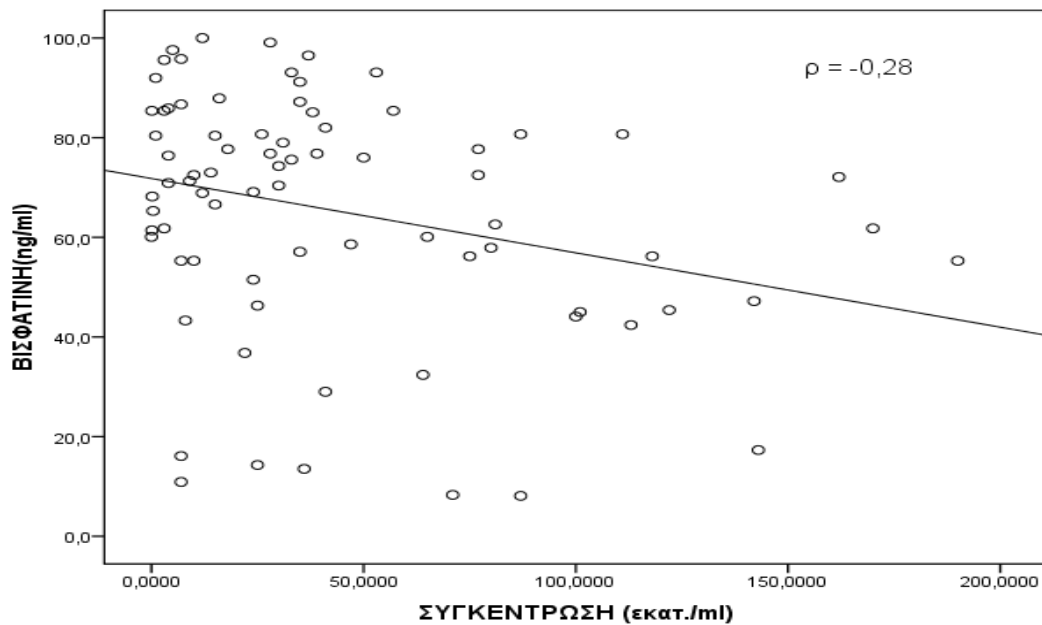
Επομένως, παρατηρούμε ότι τόσο στην ομάδα 1 όσο και στην ομάδα 2 τα μόνα στατιστικώς σημαντικά αποτελέσματα είναι αυτά μεταξύ της βισφατίνης και της συγκέντρωσης και της βισφατίνης και του συνολικού αριθμού σπερματοζωαρίων. Η συσχέτιση της βισφατίνης με τη συγκέντρωση στην ομάδα 1 να διευκρινίσουμε ότι

είναι ενδεικτική. Σε γενικές γραμμές και εδώ τα αποτελέσματα μεταξύ των ομάδων δεν φαίνεται να διαφέρουν ουσιαστικά μεταξύ τους.

Στις εικόνες 5 και 6 παρατηρούμε γραφικά την ελαφρώς αρνητική γραμμική συσχέτιση μεταξύ της βισφατίνης και της συγκέντρωσης στις ομάδες 1 και 2.

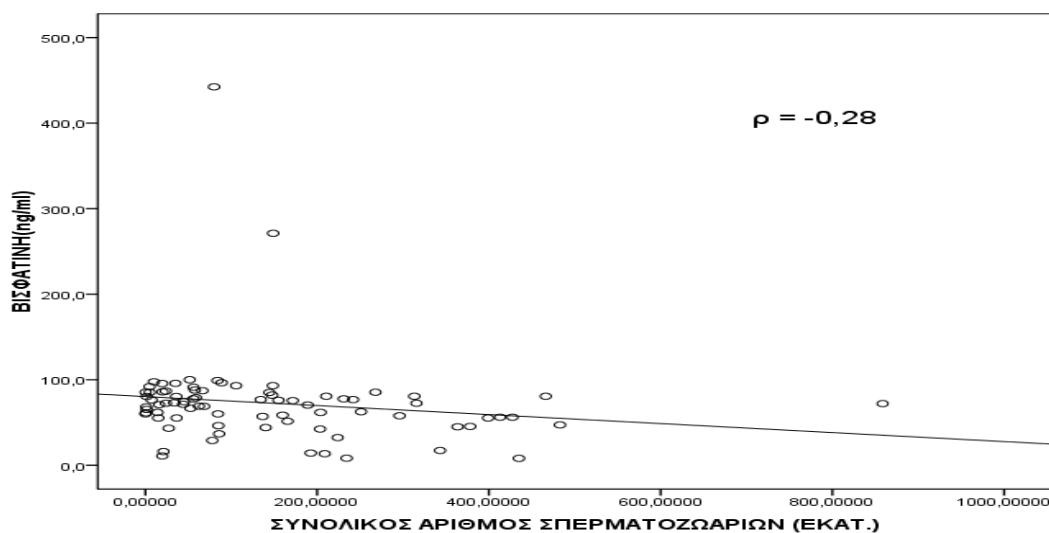


Εικόνα 5 : Στικτόγραμμα βισφατίνης και συγκέντρωσης στην ομάδα 1.

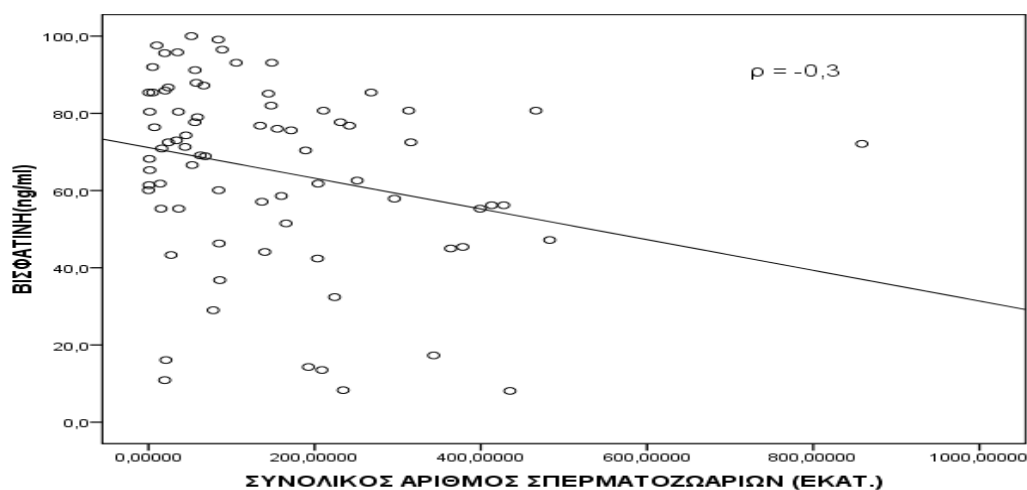


Εικόνα 6 : Στικτόγραμμα βισφατίνης και συγκέντρωσης στην ομάδα 2.

Στις εικόνες 7 και 8 παρατηρούμε γραφικά την ελαφρώς αρνητική γραμμική συσχέτιση μεταξύ της βισφατίνης και του συνολικού αριθμού σπερματοζωαρίων στις ομάδες 1 και 2.



Εικόνα 7 : Στικτόγραμμα βισφατίνης και συνολικού αριθμού σπερματοζωαρίων στην ομάδα 1.



Εικόνα 8 : Στικτόγραμμα βισφατίνης και συνολικού αριθμού σπερματοζωαρίων στην ομάδα 2.

Η πολλαπλή γραμμική εξάρτηση της βισφατίνης από τις υπόλοιπες μεταβλητές και ο ταυτόχρονος έλεγχος για πιθανούς συγχυτικούς παράγοντες παρουσιάζεται στον πίνακα 4.

Πίνακας 4 : Πολλαπλή γραμμική εξάρτηση βισφατίνης και υπολοίπων μεταβλητών στην ομάδα 1 και 2.

Εξαρτημένη Μεταβλητή	Ανεξάρτητες μεταβλητές		ANOVA p-value		
			Ομάδα 1	Ομάδα 2	
Βισφατίνη	Σπερμοδιάγραμμα	Αριθμός τσιγάρων/μέρα	Δ.Μ.Σ.	0,349	0,514
	Σπερμοδιάγραμμα	-	Δ.Μ.Σ.	0,231	0,346
	Σπερμοδιάγραμμα	Αριθμός τσιγάρων/μέρα	-	0,203	0,346
	Συγκέντρωση	Αριθμός τσιγάρων/μέρα	Δ.Μ.Σ.	0,922	0,057**
	Συγκέντρωση	-	Δ.Μ.Σ.	0,974	0,023*
	Συγκέντρωση	Αριθμός τσιγάρων/μέρα	-	0,827	0,040*
	Συγκέντρωση	-	-	-	0,011*
	Συνολικός Αριθμός Σπερματοζωαρίων	Αριθμός τσιγάρων/μέρα	Δ.Μ.Σ.	0,491	0,108
	Συνολικός Αριθμός Σπερματοζωαρίων	-	Δ.Μ.Σ.	0,375	0,050**
	Συνολικός Αριθμός Σπερματοζωαρίων	Αριθμός τσιγάρων/μέρα	-	0,340	0,063**
	Συνολικός Αριθμός Σπερματοζωαρίων	-	-	-	0,021*
	Κινητικότητα	Αριθμός τσιγάρων/μέρα	Δ.Μ.Σ.	0,676	0,839
	Κινητικότητα	-	Δ.Μ.Σ.	0,626	0,700
	Κινητικότητα	Αριθμός τσιγάρων/μέρα	-	0,539	0,731
	Μορφολογία	Αριθμός τσιγάρων/μέρα	Δ.Μ.Σ.	0,604	0,660
	Μορφολογία	-	Δ.Μ.Σ.	0,454	0,477
	Μορφολογία	Αριθμός τσιγάρων/μέρα	-	0,399	0,505
	-	Αριθμός τσιγάρων/μέρα	Δ.Μ.Σ.	0,789	0,830
	-	-	Δ.Μ.Σ.	0,820	0,650
	-	Αριθμός τσιγάρων/μέρα	-	0,538	0,640

Σημείωση: Δ.Μ.Σ.= Δείκτης μάζας σώματος. *: στατιστικά σημαντικό. **: ενδεικτικό. ANOVA p-value: ελέγχει συνολικά την στατιστική σημαντικότητα του μοντέλου.

Από τον Πίνακα 4 φαίνεται ότι οι μεταβλητές που εξετάστηκαν ως πιθανοί συγχυτικοί παράγοντες (δείκτης μάζας σώματος, αριθμός τσιγάρων/μέρα) δεν είναι στατιστικά σημαντικές. Άρα, οι μεταβλητές αυτές είναι πολύ πιθανό να μη δρουν ως συγχυτικοί παράγοντες στον πληθυσμό μας. Η συγκέντρωση και ο συνολικός αριθμός σπερματοζωαρίων στην ομάδα 2 είναι οι μόνες μεταβλητές που παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα. Όλες οι υπόλοιπες μεταβλητές τόσο στην ομάδα 1 όσο και στην 2 δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα.

5.ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σκοπός της εργασίας αυτής είναι η ανίχνευση της βισφατίνης σε σπερματικό πλάσμα ανθρώπου και η συσχέτιση των επιπέδων αυτής με τα χαρακτηριστικά των σπερματοζωαρίων (συγκέντρωση, κινητικότητα και φυσιολογικές μορφές).

Όταν στήθηκε το πρωτόκολλο αυτής της εργασίας δεν υπήρχε καμία δημοσίευση που να ασχολείτο με την ανίχνευση της βισφατίνης σε ανθρώπινο σπερματικό πλάσμα. Το δεδομένο αυτό σε συνδυασμό με τις δημοσιεύσεις που υπήρχαν για ύπαρξη της βισφατίνης τόσο σε σπερματικό πλάσμα πειραματοζώου (όρνιθας) [33] όσο και στο ωοθυλακικό υγρό γυναικών, οι οποίες υποβάλλονται σε υπερδιέγερση ωοθηκών [22, 23] έθεσε την ανίχνευση της βισφατίνης σε σπερματικό πλάσμα ανθρώπου βασικό στόχο της εργασίας. Όμως λίγους μήνες μετά, δημοσιεύτηκε από τους Thomas et al, μια εργασία η οποία για πρώτη φορά πιστοποιούσε αυτή την ύπαρξη της βισφατίνης [21]. Επομένως η ανίχνευση της βισφατίνης σε σπερματικό πλάσμα ανθρώπου της δικής μας εργασίας επιβεβαίωσε την ήδη υπάρχουσα δημοσίευση.

Η μεγάλη διαφορά των δύο εργασιών είναι η συγκέντρωση της βισφατίνης. Στη δική μας εργασία, η συγκέντρωση έχει διάμεσο τα 71,3 ng/ml ενώ στην εργασία Thomas et al τα 146 ng/ml (στην ομάδα των ανδρών με φυσιολογικό βάρος) και τα 125 ng/ml (στην ομάδα των υπέρβαρων/παχύσαρκων ανδρών) [21]. Ο λόγος που θα μπορούσε να εξηγήσει αυτή τη διαφορά είναι το δείγμα. Ενώ ο αριθμός των δειγμάτων στις δύο εργασίες έχει μικρή διαφορά (< 20 άτομα διαφορά), η σύσταση και η επιλογή των μελών διαφέρουν. Η δική μας εργασία αναφέρεται σε έναν πολύ συγκεκριμένο πληθυσμό, των ανδρών δηλαδή που προσέρχονται στο Εργαστήριο Εξωσωματικής του Τμήματος Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Β' Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής του Αρεταιείου Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου για ανάλυση σπέρματος. Επομένως ο πληθυσμός αυτός δεν είναι τυχαίος, επηρεάζεται από το δημόσιο χαρακτήρα και την περιοχή του Νοσοκομείου και υπάρχει υποψία για άμεση ή έμμεση υπογονιμότητα. Επιπλέον, το δείγμα χρησιμοποιήθηκε χωρίς κριτήρια αποκλεισμού. Από την άλλη πλευρά, η άλλη εργασία, χρησιμοποίησε εθελοντές. Από αυτούς αποκλείστηκαν άνδρες που είχαν κάποιο πρόβλημα (γενετικό ή επίκτητο) που συνδεόταν άμεσα με υπογονιμότητα όπως κρυπορχία και κισσοκίλη

καθώς και έμμεσα όπως η κατανάλωση ναρκωτικών, βιταμινών και η χρήση εξωγενών ορμονών [21].

Σε μια πρόσφατη μελέτη, οι Ocón-Grove et al, χρησιμοποιώντας Real-time PCR, απέδειξαν ότι το NAMPT mRNA ήταν 4 φορές υψηλότερο στους όρχεις των ενηλίκων κοτόπουλων σε σχέση με τα προεφηβικά, ενώ στο πλάσμα του αίματος των ίδιων πειραματόζωων η βισφατίνη ανευρέθηκε 28 φορές υψηλότερη [33]. Επιπλέον σε μια πιο πρόσφατη μελέτη (2013) στον άνθρωπο, η βισφατίνη ανιχνεύθηκε στατιστικώς σημαντικά υψηλότερη στο σπερματικό πλάσμα από ότι στο πλάσμα του αίματος [21]. Επιπρόσθετα, φαίνεται από μελέτες σε πειραματόζωα, ότι το NAD πιθανώς δρα στην αύξηση της μεταβολικής δραστηριότητας των κυττάρων Sertoli και των γεννητικών κυττάρων των όρχεων μετά την μείωση. Η δράση αυτή είναι αποτέλεσμα της αύξησης κάποιων ενζύμων και αυξητικών παραγόντων ως αποτέλεσμα της αύξησης του NAD [33]. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η αύξηση μιας ομάδας απακετυλασών με το όνομα sirtuins, οι οποίες παίζουν σημαντικό ρόλο στην λειτουργία των όρχεων και έλλειψη αυτών δημιουργεί πρόβλημα στην σπερματογένεση [38]. Άλλο παράδειγμα, είναι η αύξηση της έκφρασης του ενδοθηλιακού αγγειακού αυξητικού παράγοντα (VEGFA) λόγω της αύξησης του NAD [39], ο οποίος επηρεάζει την αγγείωση του όρχεος και υποδοχείς αυτού ανευρίσκονται τόσο στα σπερματογόνια όσο και στις σπερματίδες [40]. Αν στα ευρήματα αυτά προσθέσουμε τη δράση της βισφατίνης, ως ενδοκυττάριο ένζυμο, στη βιοσύνθεση του NAD [5] τότε τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι η βισφατίνη είναι δυνατόν να έχει σημαντικό ρόλο στον κυτταρικό μεταβολισμό και στην αγγείωση του όρχεος καθώς και στη λειτουργία των κυττάρων Sertoli και Leydig. Με άλλα λόγια η βισφατίνη δύναται να παίζει ενεργό ρόλο στην σπερματογένεση και στην στεροειδογένεση. Ο παραπάνω συλλογισμός οδήγησε στη δημιουργία του επόμενου ερωτήματος της εργασίας, δηλαδή αν τα επίπεδα της βισφατίνης έχουν κάποια επιρροή στα χαρακτηριστικά των σπερματοζωαρίων. Με τον όρο αυτό εννοούμε την συγκέντρωση, τον συνολικό αριθμό, τη μορφολογία και την κινητικότητα των σπερματοζωαρίων.

Τα αποτελέσματα της εργασίας αναλύθηκαν με τρεις διαφορετικές δοκιμασίες ώστε να υπάρξει μια σφαιρική εικόνα. Επιπλέον, επειδή δεν μπορούσαμε να αποφανθούμε για το αν οι δύο ακραίες μετρήσεις βισφατίνης ήταν αληθινές ή οφείλονταν σε

εργαστηριακό σφάλμα, πραγματοποιήσαμε κάθε στατιστική δοκιμασία και στις δύο ομάδες: η πρώτη περιέχει όλες τις μετρήσεις ενώ στη δεύτερη έχουν αφαιρεθεί οι δύο ακραίες τιμές βισφατίνης.

Στη δοκιμασία Wilcoxon κανένα αποτέλεσμα σε καμία ομάδα δεν είναι στατιστικά σημαντικό. Υπάρχει μόνο μια ενδεικτική σχέση μεταξύ της μορφολογίας και της βισφατίνης.

Στο συντελεστή γραμμικής συσχέτισης, και στις δύο ομάδες ο συνολικός αριθμός σπερματοζωαρίων παρουσιάζει στατιστικά σημαντική σχέση με την βισφατίνη. Επιπρόσθετα, η συγκέντρωση παρουσιάζει στατιστικά σημαντική σχέση με την βισφατίνη στην ομάδα 2 αλλά ενδεικτική σχέση στην ομάδα 1.

Στην πολλαπλή γραμμική εξάρτηση, καμία μεταβλητή στην ομάδα 1 δεν παρουσιάζει στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα. Αντίθετα, στην ομάδα 2 η συγκέντρωση και ο συνολικός αριθμός σπερματοζωαρίων παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα. Επίσης ο δείκτης μάζας σώματος και ο αριθμός των τσιγάρων ανά μέρα ελέγχθησαν και είναι πολύ πιθανό να μη δρουν ως συγχυτικοί παράγοντες στον πληθυσμό μας.

Τόσο η δοκιμασία Wilcoxon όσο και ο συντελεστής γραμμικής συσχέτισης δεν επηρεάζονται ιδιαίτερα από ακραίες τιμές για αυτό και δεν παρατηρούμε ιδιαίτερη διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων των δύο ομάδων. Δεν ισχύει το ίδιο για την πολλαπλή γραμμική εξάρτηση, η οποία είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη σε ακραίες τιμές πράγμα που δικαιολογεί απόλυτα τις διαφορές των αποτελεσμάτων μεταξύ των δύο ομάδων. Επιπλέον, ένα ακόμα γεγονός που δίνει περισσότερο βάρος στα αποτελέσματα της δοκιμασίας Wilcoxon και του συντελεστή γραμμικής συσχέτισης είναι ότι στην πολλαπλή γραμμική παλινδρόμησή μας δεν είναι ξεκάθαρο αν ισχύει μια από τις προϋποθέσεις: η κανονική κατανομή των υπολοίπων μεταβλητών.

Συνοψίζοντας, στον πληθυσμό μας η μόνη σχέση που φαίνεται να υπάρχει μεταξύ της βισφατίνης και των χαρακτηριστικών των σπερματοζωαρίων είναι στην συγκέντρωση και στον συνολικό αριθμό σπερματοζωαρίων. Δηλαδή με κάποιον τρόπο μάλλον επηρεάζεται η σπερματογένεση. Στο σημείο αυτό να τονίσουμε ότι τα αποτελέσματα αφορούν μόνο τον πληθυσμό αναφοράς και η σχέση που εμφανίζεται είναι μόνο

στατιστική. Η παθοφυσιολογία πίσω από την σχέση αυτή δεν είναι γνωστή, πρέπει να διερευνηθεί και μόνο υποθέσεις μπορούν να γίνουν.

Η δική μας υπόθεση για την αρνητική συσχέτιση που υπάρχει μεταξύ της βισφατίνης και της συγκέντρωσης αλλά και του συνολικού αριθμού σπερματοζωαρίων είναι βάση της δράσης της βισφατίνης, ως ενδοκυττάριο ένζυμο, στη βιοσύνθεση του NAD [5]. Η πιθανή επίδραση του NAD στην σπερματογένεση περιγράφεται αναλυτικά στην αρχή της συζήτησης όπου μπαίνει και ο δεύτερος στόχος της εργασίας. Εκτός όμως από την υπόθεση αυτή πρέπει να λάβουμε υπ' όψιν μας ότι υπάρχει περίπτωση η σχέση που παρουσιάστηκε να μην απολύτως έγκυρη λόγω του τρόπου συλλογής του δείγματος. Δεν χρησιμοποιήθηκαν κριτήρια αποκλεισμού για άνδρες που είχαν επιβεβαιωμένα ή πιθανά αίτια υπογονιμότητας.

Όσον αφορά τη βιβλιογραφία, υπάρχει μόνο μία εργασία που έχει διερευνήσει τη σχέση μεταξύ της βισφατίνης και των χαρακτηριστικών των σπερματοζωαρίων, η οποία όμως δεν αναφέρει κανένα στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα [21]. Η διαφορά που προκύπτει μεταξύ της δικής μας εργασίας και των Thomas et al υποθέτουμε για άλλη μια φορά ότι οφείλεται στο δείγμα. Δηλαδή στον τρόπο συλλογής και σύστασής του, όπως αναλυτικά περιγράφηκε στην αρχή της συζήτησης (για την διαφορά που υπήρχε και στην συγκέντρωση της βισφατίνης).

Κλείνοντας, η εργασία αυτή είναι η πρώτη στον Ελληνικό χώρο και η δεύτερη παγκοσμίως που ανίχνευσε τη βισφατίνη σε ανθρώπινο σπερματικό πλάσμα. Επιπλέον, παρουσιάζει μια ελαφρώς αρνητική συσχέτιση μεταξύ της βισφατίνης και της συγκέντρωσης των σπερματοζωαρίων στον πληθυσμό των ανδρών που προσέρχονται στο Εργαστήριο Εξωσωματικής του Τμήματος Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Β' Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής του Αρεταιείου Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου για ανάλυση σπέρματος. Αντίστοιχα ισχύει και για τον συνολικό αριθμό των σπερματοζωαρίων.

Πιστεύουμε, ότι η εργασία αυτή, με τις όποιες παραλήψεις, προσέθεσε ένα μικρό λιθαράκι στη γνώση για τη βισφατίνη και τον πιθανό ρόλο της στην σπερματογένεση και ευελπιστούμε στο μέλλον να υπάρξουν περισσότερες και καλύτερες εργασίες που θα διερευνήσουν αυτόν της το ρόλο.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Coelho M, O.T., Fernandes R., *Biochemistry of adipose tissue: an endocrine organ*. Archives of medical sciences, 2013. **9**(2): p. 191-200.
2. Dietrich L, F.L., Yero I, Martinez L., *Nicotinamide mononucleotide pyrophosphorylase activity in animal tissues*. The journal of biological chemistry, 1966. **241**(1): p. 188-191.
3. Powanda M, M.O., Dietrich L., *Studies on the mechanism of rat liver nicotinamide mononucleotide pyrophosphorylase*. Biochemistry, 1969. **8**(5): p. 1869-1873.
4. Streffer C, B.J., *Nicotinamide mononucleotide. Determination of its enzymatic formation in vitro and its physiological rôle for the biosynthesis of nicotinamide-adenine dinucleotide in mice*. European journal of biochemistry, 1971. **21**(3): p. 357-362.
5. Rongvaux A, S.R., Mulks M, Gigot D, Urbain J, Leo O, Andris F., *Pre-B-cell colony-enhancing factor, whose expression is up-regulated in activated lymphocytes, is a nicotinamide phosphoribosyltransferase, a cytosolic enzyme involved in NAD biosynthesis*. European journal of immunology, 2002. **32**(11): p. 3225-3234.
6. Revollo J, K.A., Mills K, Satoh A, Wang T, Garten A, Dasgupta B, Sasaki Y, Wolberger C, Townsend R, Milbrand J, Kiess W, Imai S., *Nampt/PBEF/visfatin regulates insulin secretion in β cells as a systemic NAD biosynthetic enzyme*. Cell Metabolism, 2007. **6**(5): p. 363-375.
7. Belenky P, B.K., Brenner C., *NAD⁺ metabolism in health and disease*. Trends in biochemical science, 2007. **32**(1): p. 12-19.
8. J., D., *Linking chromatin function with metabolic networks: Sir2 family of NAD(+)-dependent deacetylases*. Trends in biochemical science, 2003. **28**(1): p. 41-48.
9. Lin S, G.L., *Nicotinamide adenine dinucleotide, a metabolic regulator of transcription, longevity and disease*. Current opinion in cell biology, 2003. **15**(2): p. 241-246.
10. Samal B, S.Y., Stearns G, Xie C, Suggs S, McNiece I., *Cloning and characterization of the cDNA encoding a novel human pre-B-cell colony-enhancing factor*. Molecular and Cellular Biology 1994. **14**(2): p. 1431-1437.
11. Fukuhara A, M.M., Nishizawa M, Segawa K, Tanaka M, Kishimoto K, Matsuki Y, Murakami M, Ichisaka T, Murakami H, Watanabe E, Takagi T, Akiyoshi M, Ohtsubo T, Kihara S, Yamashita S, Makishima M, Funahashi T, Yamanaka S, Hiramatsu R, Matsuzawa Y, Shimomura I., *Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin*. Science, 2005. **307**(5708): p. 426-430.
12. Moschen A, K.A., Enrich B, Mosheimer B, Theurl M, Niederegger H, Tilg H., *Visfatin, an adipocytokine with proinflammatory and immunomodulating properties*. Journal of Immunology, 2007. **178**(3): p. 1748-1758.
13. Chang Y, C.T., Lee W, Chuang L., *The relationship of visfatin/pre-B-cell colony-enhancing factor/nicotinamide phosphoribosyltransferase in adipose tissue with inflammation, insulin resistance, and plasma lipids*. Metabolism Clinical and Experimental, 2010. **59**(1): p. 93-99.
14. Wang P, v.G.M., Bouwman F, Brouwers M, van der Kallen C, Smit E, Keijer J, Mariman E., *The circulating PBEF/NAMPT/visfatin level is associated with*

- a beneficial blood lipid profile. European journal of physiology, 2007. 454(6): p. 971-976.*
15. Filippatos T, D.C., Kiortsis D, Tselepis A, Elisaf M., *Increased plasma levels of visfatin/pre-B cell colony-enhancing factor in obese and overweight patients with metabolic syndrome. Journal of endocrinological investigation, 2007. 30(4): p. 323-326.*
 16. Chen C, L.T., Li C, Liu C, Lin W, Wu M, Lai M, Lin C., *The relationship between visfatin levels and anthropometric and metabolic parameters: association with cholesterol levels in women. Metabolism - Clinical and Experimental, 2007. 56(9): p. 1216-1220.*
 17. Sun G, B.J., Khalili S, Vasdev S, Gill V, Pace D, Fitzpatrick D, Randell E, Xie Y, Zhang H., *Serum visfatin concentrations are positively correlated with serum triacylglycerols and down-regulated by overfeeding in healthy young men. The american journal of clinical nutrition, 2007. 85(2): p. 399-404.*
 18. Jin H, J.B., Tang J, Lu W, Wang W, Zhou L, et al. , *Serum visfatin concentrations in obese adolescents and its correlation with age and high-density lipoprotein cholesterol. Diabetes research and clinical practice, 2008. 79(3): p. 412-418.*
 19. Sun Z, L.H., Zhang Z., *Pre-B cell colony enhancing factor (PBEF), a cytokine with multiple physiological functions. Cytokine and Growth Factor Reviews, 2013(13): p. 53-54.*
 20. Yonezawa T, H.S., Kobayashi Y, Takahashi T, Obara Y., *Visfatin is present in bovine mammary epithelial cells, lactating mammary gland and milk, and its expression is regulated by cAMP pathway. FEBS Letters, 2006. 580(28-29): p. 6635-6643.*
 21. Thomas S, K.D., Schaab M, Scholz M, Grunewald S, Thiery J, Paasch U, Kratzsch J., *Seminal plasma adipokine levels are correlated with functional characteristics of spermatozoa. Fertility and Sterility, 2013. 99(5): p. 1256-1263.*
 22. Shen C, T.E., Lee J, Chen Y, Lee C, Chan T., *The concentrations of visfatin in the follicular fluids of women undergoing controlled ovarian stimulation are correlated to the number of oocytes retrieved. Fertility and Sterility, 2010. 93(6): p. 1844-1850.*
 23. Plati E, K.E., Malamitsi-Puchner A, Boutsikou M, Kaparos G, Baka S., *Visfatin and leptin levels in women with polycystic ovaries undergoing ovarian stimulation. Fertility and Sterility, 2010. 94(4): p. 1451-1456.*
 24. Chen M, C.F., Chang D, Tsai J, Huang H, Shin S, Lee Y. , *Elevated plasma level of visfatin/pre-B cell colony-enhancing factor in patients with type 2 diabetes mellitus. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 2006. 91(1): p. 295-299.*
 25. Stastny J, B.-V.J., Vasku A., *Visfatin and its role in obesity development. Diabetes and Metabolic Syndrome, 2012. 6(2): p. 120-124.*
 26. Chan T, C.Y., Chen H, Lee C, Jong S, Tsai E., *Increased plasma visfatin concentrations in women with polycystic ovary syndrome. Fertility and Sterility, 2007. 88(2): p. 401-405.*
 27. Dahl T, Y.A., Skjelland M, Øie E, Dahl A, Michelsen A, Damås J, Tunheim S, Ueland T, Smith C, Bendz B, Tonstad S, Gullestad L, Frøland S, Krohg-Sørensen K, Russell D, Aukrust P, Halvorsen B., *Increased expression of visfatin in macrophages of human unstable carotid and coronary*

- atherosclerosis: possible role in inflammation and plaque destabilization.* Circulation, 2007. **115**(8): p. 972-980.
28. Hufton S, M.P., Brandwijk R, de Bruïne A, Arends J, Hoogenboom H., *A profile of differentially expressed genes in primary colorectal cancer using suppression subtractive hybridization.* FEBS Letters, 1999. **463**(1-2): p. 77-82.
 29. Otero M, L.R., Gomez R, Lago F, Dieguez C, Gómez-Reino J, Gualillo O., *Changes in plasma levels of fat-derived hormones adiponectin, leptin, resistin and visfatin in patients with rheumatoid arthritis.* Annals of the Rheumatic Diseases, 2006. **65**(9): p. 1198-1201.
 30. Zhang L, H.D., Ye S., *Nicotinamide Phosphoribosyltransferase in Human Diseases.* Journal of Bioanalysis and Biomedicine, 2011. **7**: p. 013-025.
 31. Kover K, T.P., Watkins D, Clements M, Stehno-Bittel L, Novikova L, Bittel D, Kibiryeveva N, Stuhlsatz J, Yan Y, Ye S, Moore W., *Expression and Regulation of Nampt in Human Islets.* PLoS One, 2013. **8**(3).
 32. Reddy P, U.S., Thota B, Tandon A, Pandey P, Hegde A, Balasubramaniam A, Chandramouli B, Santosh V, Rao M, Kondaiah P, Somasundaram K., *PBEF1/NAmPRTase/Visfatin: a potential malignant astrocytoma/glioblastoma serum marker with prognostic value.* Cancer Biology and Therapy, 2008. **7**(5): p. 663-338.
 33. Ocón-Grove O, K.-W.S., Maddineni S, Hendricks G, Ramachandran R., *NAMPT (visfatin) in the chicken testis: influence of sexual maturation on cellular localization, plasma levels and gene and protein expression.* Reproduction, 2010. **139**(1): p. 217-226.
 34. Reverchon M, C.M., Cloix L, Ramé C, Guerif F, Royère D, Dupont J., *Visfatin is expressed in human granulosa cells: regulation by metformin through AMPK/SIRT1 pathways and its role in steroidogenesis.* Molecular Human Reproduction, 2013. **19**(5): p. 313-326.
 35. Tanaka M, N.M., Fukuhara A, Segawa K, Aoki N, Matsuda M, Komuro R, Shimomura I., *Visfatin is released from 3T3-L1 adipocytes via a non-classical pathway.* Biochemical and Biophysical Research Communications 2007. **359**(2): p. 194-201.
 36. Grudzinkas J, Y.J., *Gametes-The spermatozoon.* 1995.
 37. World-Health-Organization, *WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen-fifth edition.* 2010.
 38. Coussens M, M.J., Yanagimachi R, Maeda G, Allsopp R., *Sirt1 deficiency attenuates spermatogenesis and germ cell function.* PLoS One, 2008. **3**(2): p. 1571.
 39. Adya R, T.B., Punn A, Chen J, Randeve H., *Visfatin induces human endothelial VEGF and MMP-2/9 production via MAPK and PI3K/Akt signalling pathways: novel insights into visfatin-induced angiogenesis.* Cardiovascular research, 2008. **78**(2): p. 356-365.
 40. Nalbandian A, D.L., Dym M, Ravindranath N., *Expression of vascular endothelial growth factor receptors during male germ cell differentiation in the mouse.* Biology of Reproduction, 2003. **69**(3): p. 985-994.