

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ –

ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΣΤΗ ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΑ –
ΠΕΡΙΓΕΝΝΗΤΙΚΗ ΙΑΤΡΙΚΗ»

Διευθυντής ΠΜΣ : Καθηγητής ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ Ι. ΔΑΠΟΝΤΕ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Η επίδραση της κατάψυξης στην αντλία $\text{Na}^+ \text{-H}^+$ των
σπερματοζωαρίων»

ΚΑΡΟΛΙΔΟΥ ΚΥΡΙΑΚΗ

Μοριακή Βιολόγος και Γενετίστρια

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

ΛΑΡΙΣΑ

Σεπτέμβριος 2019

Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Εξεταστικής Επιτροπής:

1^{ος} Εξεταστής (Επιβλέπων)	Γεώργιο-Σπυρίδων Ανυφαντή Επίκουρο Καθηγητή Εμβρυολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
---	--

2^{ος} Εξεταστής (Σύμβουλος)	Αλέξανδρο Δαπόντε Καθηγητή Μαιευτικής και Γυναικολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
---	--

3^{ος} Εξεταστής (Μέλος)	Αποστολία Χατζηευθυμίου Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιατρικής Φυσιολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
---	---

Ευχαριστίες

Με την ολοκλήρωση της συγκεκριμένης μεταπτυχιακής εργασίας θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως τον Καθηγητή κ. Αλέξανδρο Δαπόντε, Καθηγητή Μαιευτικής και Γυναικολογίας, του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, καθώς έκανε πραγματοποιήσιμη την επιθυμία μου για φοίτησή στο πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών «Βιολογία της Αναπαραγωγής – Βιοδείκτες στη Μαιευτική και Γυναικολογία – Περιγεννητική Ιατρική».

Καρολίδου Κυριακή

«Η επίδραση της κατάψυξης στην αντλία $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ των σπερματοζωαρίων»

ΚΑΡΟΛΙΔΟΥ ΚΥΡΙΑΚΗ

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Ιατρικής, 2018

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ Ι. ΔΑΠΟΝΤΕ

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΜΑΙΕΥΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- Επιβλέπων:** Γεώργιο-Σπυρίδων Ανυφαντή
Επίκουρο Καθηγητή Εμβρυολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- Σύμβουλος :** Αλέξανδρο Δαπόντε
Καθηγητή Μαιευτικής και Γυναικολογίας Πανεπιστημίου
Θεσσαλίας
- Μέλος :** Αποστολία Χατζηευθυμίου
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιατρικής Φυσιολογίας
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Περίληψη

Η κατάψυξη είναι μία μέθοδος υποβοηθούμενης αναπαραγωγής που αποσκοπεί άλλοτε στην κατάψυξη των περισευόμενων εμβρύων, άλλοτε στη διατήρηση της γονιμότητας στις γυναίκες κι άλλοτε στη διατήρηση της γονιμότητας στους άνδρες. Σήμερα, η κατάψυξη θεωρείται από τις πιο ενδεικτικές μεθόδους σε προγράμματα Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής. Ο σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας, ήταν να ερευνηθεί κατά πόσο η διαδικασία της κατάψυξης και της απόψυξης επηρεάζει τη δράση της αντλίας Na^+/H^+ στην πλασματική μεμβράνη των σπερματοζωαρίων και κατ' επέκταση τις τιμές του ενδοκυττάριου pH αυτών. Προς αυτόν το σκοπό, εκτιμήθηκαν οι παράμετροι του σπέρματος, όπως κινητικότητα, συγκέντρωση κι όγκος, σε 6 δείγματα πριν την κατάψυξη αλλά και μετά την απόψυξη (WHO, 2010). Στη συνέχεια, χρησιμοποιώντας την κατάλληλη μεθοδολογία που περιλαμβάνει την εκπομπή και διέγερση φθορίζουσών ουσιών ασθενούς οξέος, εκτιμήθηκαν οι τιμές του φθορισμόμετρου στα δείγματα ελέγχου, αλλά και στα δείγματα που χρησιμοποιήθηκε η αμιλορίδη για συνολικό διάστημα 30 λεπτών. Οι τιμές του pH_i προέκυψαν μετά από αναγωγή των τιμών του φθορισμόμετρου σε πρότυπη καμπύλη. Τελικά, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση στις τιμές του pH_i , τόσο πριν (φρέσκο-ενδεικτικές τιμές: 6.5 ± 0.6 , 7 ± 1 , φρέσκο + αμιλορίδη-ενδεικτικές τιμές: 6.4 ± 0.6 , 6.6 ± 0.7) όσο και μετά την κατάψυξη (κατεψυγμένο-ενδεικτικές τιμές: 6 ± 0.7 , 7 ± 0.7 , κατεψυγμένο + αμιλορίδη-ενδεικτικές τιμές: 5.5 ± 1.2 , 6.4 ± 1.3), παρουσία του αναστολέα αμιλορίδη. Θεωρείται αναγκαίο η πραγματοποίηση και η εκτίμηση περισσότερων δειγμάτων προκειμένου να καταλήξουμε σε ασφαλή συμπεράσματα.

Λέξεις κλειδιά: σπερματοζωάριο, ταχεία κατάψυξη, απόψυξη, αντλία Na^+/H^+ , αμιλορίδη, pH

Abstract

Cryopreservation is a method of ART (Assisted Reproductive Technology) that is mostly used either for the storage of remaining embryos or for the maintenance of the female and male fertility. Today, cryopreservation is considered to be one of the strongly suggested methods in ART. The aim of the present study was to investigate whether cryopreservation and thawing processes effect the activity of Na^+/H^+ exchanger in the sperm plasma membrane and, therefore, its intracellular pH value. For that purpose, sperm parameters such as motility, concentration and volume, were estimated in 6 sperm samples, before cryopreservation and after thawing (WHO, 2010). We followed the appropriate methodology which includes both the emission and excitation of weak acid fluorescent substances, in control samples and in samples fused with amiloride, were estimated. Then, we quantified the fluorescence values in both sample groups for thirty minutes. The pH_i values were obtained according to the standard curve. Finally, although there was a relative decrease in pH_i . Our results were not statistically significant in the presence of the amiloride inhibitor, for neither before freezing (fresh-indicative values: 6.5 ± 0.6 , 7 ± 1 , fresh + amiloride-indicative values: 6.4 ± 0.6 , 6.6 ± 0.7) nor after thawing (thawed-indicative values: 6 ± 0.7 , 7 ± 0.7 , thawed + amiloride-indicative values: 5.5 ± 1.2 , 6.4 ± 1.3). Indeed, more samples need to be analysed in order to credibly draw any conclusion.

Key words: human spermatozoa, vitrification, thawing, Na^+/H^+ exchanger, amiloride, pH

Πίνακας Περιεχομένων

Ευχαριστίες	3
Περίληψη	5
Abstract	6
Πίνακας Περιεχομένων	7
Πίνακας συντομεύσεων	9
1. Εισαγωγή	10
1.1 Ιστορική αναδρομή	10
1.2 Ανδρική υπογονιμότητα.....	10
1.3 Μέθοδοι κρυοσυντήρησης και σύγκριση	11
1.4 Επίδραση της κρυοσυντήρησης στις παραμέτρους του σπέρματος	13
1.4.1 Κινητικότητα σπερματοζωαρίων	13
1.4.2 Βλάβη στο DNA - Κατακερματισμός.....	15
1.4.3 Διαταραχή στην ακεραιότητα της μεμβράνης.....	16
1.4.4 Βιωσιμότητα σπέρματος	16
1.5 pH σπέρματος	17
1.6 Ανταλλάκτης Na^+/H^+	18
1.7 Στόχος ερευνητικής εργασίας	22
2. Υλικά και μέθοδοι.....	23
2.1 Υλικά	23
2.1.1 BCECF-AM.....	23
2.1.2 Αμιλορίδη	23
2.2 Μέθοδοι	25
2.2.1 Αξιολόγηση παραμέτρων σπέρματος (φρέσκου ή κατεψυγμένου).....	25
2.2.2 Υαλοποίηση δειγμάτων	26
2.2.3 Απόψυξη δειγμάτων.....	26

2.2.4 Υπολογισμός pH_i	26
2.2.5 Στατιστική ανάλυση	28
2.3 Δείγματα	29
3. Αποτελέσματα.....	30
3.1 Παράμετροι σπέρματος σε φρέσκο και αποψυγμένο δείγμα.....	30
3.2 Τιμές του pH παρουσία αμιλορίδης (20 nM) σε φρέσκο και κατεψυγμένο σπέρμα	31
4. Συζήτηση	36
5. Βιβλιογραφία	39

Πίνακας συντομεύσεων

ART	Assisted Reproductive Technology	Τεχνικές Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής
BCECF	(2',7' -bis-(2-Carboxyethyl)-5-(6)-carboxyfluorescein)	(2',7' -δισ-(2-καρβοξυαίθυλο)-5-(6)-καρβοξυφθορεσκεΐνη)
BCECF-AM	2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5-(6)-carboxyfluorescein (acetoxymethyl) ester	2',7' -δισ-(2-καρβοξυαίθυλο)-5-(6)-καρβοξυφθορεσκεΐνη ακετοξυμέθυλο εστέρας
BMI	Body Mass Index	Δείκτης Μάζας Σώματος
CatSper	Cation Channel of Sperm	Κανάλι Κατιόντων Σπέρματος
CO₂	Carbon Dioxide	Διοξείδιο του Άνθρακα
CPA	Cryoprotectant	Κρυοπροστατευτικό
DMA	5-(N,N-dimethyl)amiloride	5-(N,N-διμεθυλό)αμιλορίδη
DMSO	Dimethylsulfoxide	Διμεθυλοσουλφοξείδιο
EIPA	5-(N-ethyl-N-isopropyl)amiloride	5-(N-Αιθυλό-N-ισοπροπυλό) αμιλορίδη
H⁺	Hydrogen	Υδρογόνο
H₂O₂	Hydrogen Peroxide	Υπεροξείδιο του Υδρογόνου
HCO₃⁻	Bicarbonate	Διττανθρακικό
HMA	5-(N,N-hexamethylene)amiloride	5-(N,N-εξαμεθυλό)αμιλορίδη
IM	Immotility	Ακινησία
MIBA	5-(N-methyl-N-isobutyl)amiloride	5-(N-μεθυλό-N-ισοβουτυλό)αμιλορίδη
M.O.	Mean	Μέσος Όρος
NH₃	Ammonia	Αμμωνία
NHE	Na ⁺ /H ⁺ Exchanger	Ανταλλάκτης Na ⁺ /H ⁺
NMR	Nuclear Magnetic Resonance	Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός
NPM	Non-Progressive Motility	Μη προοδευτική Κινητικότητα
O²⁻	Diatomic Oxygen	Διατομικό Οξυγόνο
OD	Optical Density	Οπτική πυκνότητα
OH	Hydroxide	Υδροξείδιο
ph_e	Extracellular pH	Εξωκυττάριο pH
pH_i	Intracellular pH	Ενδοκυττάριο pH
PRM	Progressive Motility	Προοδευτική Κινητικότητα
ROS	Reactive Oxygen Species	Δραστικές ρίζες οξυγόνου
SD (Sdt)	Standard Deviation	Τυπικά απόκλιση
SEM	Standard Error of the Mean	Τυπικό Σφάλμα Μέσου Όρου
sNHE	Sperm-specific Na ⁺ /H ⁺ exchanger	Ειδικός για το σπέρμα ανταλλάκτης Na ⁺ /H ⁺
SOA	Severe Oligoasthenozoospermia	Σοβαρή Ολιγοασθενοζωοσπερμία
VSOA	Very Severe Oligoasthenozoospermia	Πολύ Σοβαρή Ολιγοασθενοζωοσπερμία
WHO	World Health Organization	Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας

1. Εισαγωγή

1.1 Ιστορική αναδρομή

Για πρώτη φορά, το 1897, ο Davennort απέδειξε ότι τα ανθρώπινα σπερματοζώαρια έχουν τη δυνατότητα να επιβιώσουν μετά από κατάψυξη στους -17°C . Ο Jahnel, το 1938, ήταν ο πρώτος που κρυοσυντήρησε ανθρώπινα σπερματοζώαρια στους -79°C , στους -196°C , με αποθήκευση για 52 ώρες σε υγρό άζωτο, και στους -269°C , με αποθήκευση για 3 ώρες σε υγρό ήλιο και μετά την απόψυξή τους για μερικά λεπτά στους 37°C . Σημειώθηκε ότι κάποια σπερματοζώαρια είχαν την ίδια υψηλή κινητικότητα με τα φρέσκα δείγματα (Parkes, 1945). Από το 1949 κι έπειτα, άρχισε να χρησιμοποιείται η γλυκερόλη στην κατάψυξη των ανθρώπινων σπερματοζωαρίων, ως ένα διαπερατό κρυοπροστατευτικό που χρησιμοποιείται μέχρι και σήμερα σε επίπεδο ρουτίνας (Polge et al, 1949).

Εξήντα χρόνια μετά την έρευνα των Hoagland και Pincus (1942) δημοσιεύτηκαν τα αποτελέσματα έρευνας ανασκόπησης που σύγκρινε την αποτελεσματικότητα των τριών μεθόδων κρυοσυντήρησης ανθρώπινων σπερματοζωαρίων: τη συμβατική κατάψυξη με διαπερατά κρυοπροστατευτικά, την υαλοποίηση χωρίς κρυοπροστατευτικά καθώς και την υαλοποίηση με διαπερατά κρυοπροστατευτικά (Nawroth et al, 2002). Σήμερα, τα δύο ευρέως διαδεδομένα πρωτόκολλα κρυοσυντήρησης αφορούν τη συμβατική βραδεία κατάψυξη (Hammadeh et al, 1999) και την πιο σύγχρονη μέθοδο, την υαλοποίηση (Isachenko et al, 2012a) (Sanchez et al, 2012).

1.2 Ανδρική υπογονιμότητα

Ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα που καλούνται να αντιμετωπίσουν το 15-20% των σύγχρονων ζευγαριών, αφορά τον τομέα της υπογονιμότητας (National Institute for Health and Care Excellence, 2013). Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO), ως υπογονιμότητα ορίζεται «η αδυναμία επίτευξης εγκυμοσύνης, είτε λόγω ανικανότητας σύλληψης ενός παιδιού, είτε λόγω αδυναμίας ολοκλήρωσης μίας εγκυμοσύνης, ύστερα από 12 μήνες τακτικών-μη προστατευόμενων σεξουαλικών επαφών» (WHO, 2011). Στο 50% των περιπτώσεων υπογονιμότητας εκτιμάται ότι ο υπεύθυνος παράγοντας είναι ανδρικής προελεύσεως,

με αποκλειστική ευθύνη στο 30% των περιπτώσεων, ενώ στο 20% των περιπτώσεων παρατηρείται συνεισφορά γυναικείας προέλευσης (Winters and Walsh, 2014).

Η ανδρική υπογονιμότητα μπορεί να προκληθεί από ένα ευρύ φάσμα καταστάσεων, στο οποίο περιλαμβάνονται ανατομικές ή γενετικές ανωμαλίες, συστηματικές ή νευρολογικές ασθένειες, λοιμώξεις, τραύματα, ιατρογενείς βλάβες, παραγωγή γοναδοτοξινών ή ανάπτυξη αντισπερματικών αντισωμάτων. Στο 30 - 40% των περιπτώσεων ανδρικής υπογονιμότητας, δεν εντοπίζεται καμιά αιτία και ονομάζεται ιδιοπαθής ανδρική υπογονιμότητα (Jungwirth A., 2015). Σε αρκετές περιπτώσεις, προκειμένου να αντιμετωπιστεί το πρόβλημα της ανδρικής υπογονιμότητας, απαιτούνται οι τεχνικές της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής που συχνά συνεπάγεται κρυοσυντήρηση των σπερματοζωαρίων για ποικίλους λόγους. Η διατήρηση της γονιμότητας, η αδυναμία συλλογής σπέρματος λόγω άγχους την κατάλληλη χρονική στιγμή, η παρουσία πολύ λίγων σπερματοζωαρίων ή σπερματοζωαρίων με φτωχές σπερματικές παραμέτρους κατά την εκσπερμάτιση, το χειρουργικά ανακτημένο δείγμα σπέρματος αποτελούν μόνο μερικούς από τους λόγους όπου ένα κέντρο εξωσωματικής γονιμοποίησης και το υποψήφιο ζευγάρι επιλέγουν την κρυοσυντήρηση των αρσενικών γαμετών (Critser et al, 1988) (Tournaye et al, 2004) (Mossad et al, 1994). Με δεδομένο ότι οι κρυοσυντηρημένοι γαμέτες θα αξιοποιηθούν, στο μέλλον, για την ανάπτυξη εμβρύων, οι σχετικές μέθοδοι θα πρέπει να είναι εκτός από ασφαλείς, αναπαραγωγίμες αλλά και αποτελεσματικές για τη διατήρηση της γονιμότητας (Rienzi et al, 2017).

1.3 Μέθοδοι κρυοσυντήρησης και σύγκριση

Η συμβατική βραδεία κατάψυξη χρειάζεται περίπου 2 - 4 ώρες προκειμένου να ολοκληρωθεί και πραγματοποιείται σε 3 βήματα (Behrman and Sawada, 1966). Αρχικά εφαρμόζεται πτώση της θερμοκρασίας του σπέρματος, από τη θερμοκρασία του περιβάλλοντος μέχρι τους 5°C, με ταχύτητα 0.5 - 1°C / λεπτό. Στη συνέχεια, με ρυθμό πτώσης 1 - 10°C / λεπτό, η θερμοκρασία του δείγματος μειώνεται στους -80°C (Mahadevan and Trounson, 1984), και, τελικά, το δείγμα βυθίζεται σε υγρό άζωτο, στους -196°C, όπου και διατηρείται (Thachil and Jewett, 1981).

Η υαλοποίηση ή ταχεία κατάψυξη αποτελεί έναν εναλλακτικό τρόπο κρυοσυντήρησης των σπερματοζωαρίων, η οποία διαρκεί πολύ μικρότερο χρονικό

διάστημα. Σε αυτήν την τεχνική, τα καλαμάκια, μέσα στα οποία τοποθετείται το δείγμα με ίση ποσότητα κρυοπροστατευτικού, διατηρούνται, αρχικά, στους 4°C για 10 λεπτά. Στη συνέχεια, έρχονται σε άμεση επαφή με ατμούς υγρού αζώτου για 10 - 15 λεπτά (Brotherton, 1990) και τοποθετούνται σε οριζόντια θέση και σε απόσταση 15 - 20 cm από την επιφάνεια των ατμών υγρού αζώτου προκειμένου να ελαχιστοποιείται η διαφορά θερμότητας μεταξύ των δυο άκρων. Τέλος, τα δείγματα εμβαπτίζονται σε υγρό άζωτο στους -196°C, όπου και διατηρούνται (Fabbri et al, 2004).

Πέρα από το ρυθμό κατάψυξης, μία ακόμη σημαντική διαφορά, μεταξύ συμβατικής βραδείας κατάψυξης και υαλοποίησης, αφορά τις συγκεντρώσεις των κρυοπροστατευτικών (CPAs) που χρησιμοποιούνται. Τα κρυοπροστατευτικά είναι απαραίτητα στις συγκεκριμένες διαδικασίες, τόσο για την ελαχιστοποίηση της ωσμωτικής βλάβης όσο και για την αποφυγή σχηματισμού ενδοκυττάρων κρυστάλλων ή/ και εξωκυττάρου πάγου. Παρόλα αυτά, όμως, η χρήση τους μπορεί να είναι και τοξική για τα σπερματοζώαρια (Ozkavukcu et al, 2008). Υπάρχουν διαθέσιμες δύο διαφορετικές κατηγορίες κρυοπροστατευτικών. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν τα διαπερατά κρυοπροστατευτικά, στα οποία συμπεριλαμβάνονται το διμεθυλσουλφοξείδιο (DMSO), η γλυκερόλη, η γλυκόζη, το αιθυλένιο και η μεθανόλη. Τα συγκεκριμένα κρυοπροστατευτικά σταθεροποιούν τις πρωτεΐνες της πλασματικής μεμβράνης των κυττάρων (Arakawa et al, 1990). Στη δεύτερη κατηγορία ανήκουν τα μη διαπερατά κρυοπροστατευτικά, όπως οι αλβουμίνες, οι δεξτράνες, ο κρόκος του αβγού, το υδροξυαιθύλιο, οι πολυαιθυλενικές γλυκόλες, η πολυβινυλική πυρολλιδόνη και η σακχαρόζη, ελαχιστοποιούν τη δημιουργία κρυστάλλων ενδοκυτταρικά αυξάνοντας το ιξώδες του δείγματος (Moskovtsev et al, 2012).

Η συγκέντρωση των κρυοπροστατευτικών εξαρτάται από τους χρησιμοποιούμενους ρυθμούς κατάψυξης και απόψυξης (Salamon et al, 1995). Η συμβατική κρυοσυντήρηση σπέρματος περιλαμβάνει τη χρήση χαμηλών συγκεντρώσεων κρυοπροστατευτικού (συνήθως γλυκερόλης) μεγάλης διάρκειας αφυδάτωση και χαμηλού ρυθμού κατάψυξης. Αντίθετα, οι υψηλές συγκεντρώσεις κρυοπροστατευτικού, που χρησιμοποιούνται κατά την υαλοποίηση, αυξάνουν το ιξώδες του περιβάλλοντος των γαμετών δημιουργώντας μία κατάσταση υάλου, εμποδίζοντας το σχηματισμό πάγου κατά τη διάρκεια της κατάψυξης και της

απόψυξης. Η χρήση αυξημένων συγκεντρώσεων ενός μόνο κρυοπροστατευτικού έχει βρεθεί ότι είναι επιβλαβής για τα σπερματοζωάρια (Isachenko et al, 2003). Ο εξαιρετικά γρήγορος ρυθμός κατάψυξης ή ακόμη και ο συνδυασμός διαφορετικού τύπου κρυοπροστατευτικών, προάγουν την υαλώδη στερεοποίηση των γαμετών ελαχιστοποιώντας τις αρνητικές επιπτώσεις (Chen et al, 2015) (Isachenko et al, 2012a) (Isachenko et al, 2012b) (Sanchez et al, 2012) (Sánchez et al, 2012).

Σήμερα, η υαλοποίηση αποτελεί τη συνηθέστερα χρησιμοποιούμενη τεχνική για την κρυοσυντήρηση των ωαρίων και των εμβρύων, τα οποία δεν είναι ευάλωτα στις υψηλές συγκεντρώσεις των κρυοπροστατευτικών (Rienzi et al, 2017). Αντιθέτως, με αυτήν την τεχνική δεν μπορούν να διατηρηθούν με επιτυχία τα σπερματοζωάρια, διότι έχουν υψηλότερη ωσμωτική ευαισθησία από τους υπόλοιπους αναπαραγωγικούς ιστούς (Gilmore et al, 1997).

1.4 Επίδραση της κρυοσυντήρησης στις παραμέτρους του σπέρματος

Πολλές έρευνες αναφέρουν ότι δείγματα σπέρματος, που έχουν περάσει από τη διαδικασία κατάψυξης και απόψυξης, ενώ παρουσιάζουν μεγάλα πρακτικά οφέλη για την αναπαραγωγή, η ίδια η διαδικασία της κρυοσυντήρησης προκαλεί σοβαρές καταστροφικές αλλαγές στις λειτουργίες των σπερματοζωαρίων (Colás et al, 2009). Οι συγκεκριμένες διαδικασίες επηρεάζουν δυσμενώς την κινητικότητα, τη ζωτικότητα και τη λειτουργία του ακροσώματος των σπερματοζωαρίων, και τη σύσταση των λιπιδίων της μεμβράνης. Επίσης, μπορεί να προκαλέσουν βλάβες στο DNA των σπερματοζωαρίων (de Paula et al, 2006) (Hammadeh et al, 1999) (Isachenko et al, 2004) (Said et al, 2010) (Thomson et al, 2009) (Zribi et al, 2010). Έχει αναφερθεί ότι περίπου το 50% των σπερματοζωαρίων επιβιώνουν μετά τη διαδικασίες κατάψυξης-απόψυξης (Bailey et al, 2008) (Johnson et al, 2000).

1.4.1 Κινητικότητα σπερματοζωαρίων

Σύμφωνα με έρευνες που αφορούν την ποιότητα των σπερματοζωαρίων μετά από συμβατική βραδεία κατάψυξη, οι βλαπτικές επιδράσεις είναι πιο έντονες σε δείγματα ανδρών που παρουσιάζουν σοβαρή ολιγοασθενωοσπερμία σε σχέση με φυσιολογικά δείγματα (Verza et al, 2009) (Schuster T. G., 2003). Ειδικότερα, σύμφωνα με τις μελέτες αυτές, δε σημειώθηκε σημαντική διαφορά μεταξύ του όγκου,

της συγκέντρωσης και της μορφολογίας μεταξύ των δύο ομάδων, όμως η προοδευτική κινητικότητα των σπερματοζωαρίων με την υαλοποίηση, παρουσίασε σημαντικά υψηλότερα ποσοστά (Πίνακας 1.4.1.1).

Πίνακας 1.4.1.1 – Αξιολόγηση της κινητικότητας μετά την κρυοσυντήρηση προσαρμοσμένο από Karthikeyan and colleagues (2019).

Παράμετρος	Μ. Ο. (ελάχιστο-μέγιστο)		P value
	Αργή κατάψυξη	Υαλοποίηση	
<i>Υποομάδα SOA</i>			
Κινητικότητα	43.5 (14-58)	55.55 (40-80)	0.0031
Δυνατότητα απόψυξης/θέρμανσης (1 μήνας)	7 (1-13)	42 (22-74)	0.0151
Δυνατότητα απόψυξης/θέρμανσης (6 μήνες)	8 (0-11)	27 (13-62)	0.0669
<i>Υποομάδα VSOA</i>			
Κινητικότητα	15 (9-28)	21 (4-46)	0.003
Δυνατότητα απόψυξης/θέρμανσης (1 μήνας)	2.5 (0-4)	14.5 (2-32)	0.007
Δυνατότητα απόψυξης/θέρμανσης (6 μήνες)	2 (1-5)	12.5 (3-32)	0.019

Παρόμοια ήταν τα αποτελέσματα, μεταξύ συμβατικής βραδείας κατάψυξης και υαλοποίησης χωρίς διαπερατά κρυοπροστατευτικά, σε ασθενείς με ολιγοζωοσπερμία (Aizpurua et al, 2017). Τα δείγματα που είχαν υποστεί την τεχνική της υαλοποίησης παρουσίασαν αυξημένη κινητικότητα, γεγονός που συσχετίστηκε εν μέρει με τη λειτουργία των μιτοχονδρίων και με τη δομή της ουράς των σπερματοζωαρίων, τα οποία επηρεάζονται ιδιαίτερα από την τεχνική της βραδείας κατάψυξης. Η βλάβη στις μιτοχονδριακές μεμβράνες διακόπτει τη διαδικασία παραγωγής ενέργειας, οδηγώντας τα σπερματοζωάρια σε μειωμένη διαθεσιμότητα ATP. Η κρυοσυντήρηση μπορεί να προκαλέσει μη αναστρέψιμη περιτύλιξη των μαστιγίων, παρεμποδίζοντας την κίνηση της ουράς (O'Connell et al, 2002).

1.4.2 Βλάβη στο DNA - Κατακερματισμός

Η κρυοσυντήρηση μπορεί να προκαλέσει βλάβη στο DNA. Ο τρόπος με τον οποίο πακετάρεται το DNA στον πυρήνα ενός σπερματοζωαρίου ακολουθεί μια μακρά διαδικασία που αρχίζει από τη σπερμιογένεση, όπου οι ιστόνες, οι πρωτεΐνες γύρω από τις οποίες περιελίσσεται το DNA, αντικαθίστανται από πρωταμίνες (Boissonneault, 2002). Η ακεραιότητα των σπερματοζωαρίων φαίνεται να αποτελεί έναν καθοριστικό παράγοντα για την επιτυχία της γονιμοποίησης, τόσο με φυσικές όσο και με τις μεθόδους της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (Gandini et al, 2006). Έχει παρατηρηθεί ότι η μείωση της ποιότητας των σπερματοζωαρίων μετά την απόψυξη οφείλεται κυρίως στον κατακερματισμό του DNA που είναι αποτέλεσμα της κρυοσυντήρησης. Τέτοιες βλάβες στο DNA μπορεί να επηρεάσουν την ποιότητα και τη βιωσιμότητα του εμβρύου, στα πρώτα στάδια της ανάπτυξης. Επίσης, έχει σημειωθεί ότι διαφορετικά δείγματα σπέρματος εμφανίζουν διαφορετικά επίπεδα βλάβης του DNA. Τέτοια ευρήματα υποδεικνύουν την ανάγκη για αξιολόγηση της ακεραιότητας του DNA ως μέρος της διαδικασίας ρουτίνας που αφορά την αξιολόγηση-κατεργασία του κάθε δείγματος (Gosálvez et al, 2009). Τέλος, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι τα κατεψυγμένα με φυσιολογικές παραμέτρους δείγματα φαίνεται να φέρουν χαμηλότερα ποσοστά κατακερματισμού DNA μετά την απόψυξη σε σύγκριση με δείγματα χαμηλότερης ποιότητας (Sharma et al, 2015).

Οι πιθανοί μηχανισμοί που ευθύνονται για την καταστροφή της ακεραιότητας του DNA φαίνεται πως σχετίζονται με το οξωτικό στρες, το ψυχρό στρες, το σχηματισμό κρυσταλλικών δομών ενδοκυττάρου πάγου, την υπερβολική παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου (ROS) (Chatterjee and Gagnon, 2001) (Wang et al, 1997), την αλλοίωση των αντιοξειδωτικών αμυντικών μηχανισμών (Bilodeau et al, 2000) (Lasso et al, 1994), καθώς και με συνδυασμούς αυτών των συνθηκών (Amidi et al, 2016). Στα ROS ανήκουν το H_2O_2 , το O^{2-} και το $OH\cdot$. Τα στοιχεία αυτά, σε φυσιολογικές ποσότητες, έχουν κρίσιμο ρόλο στη λειτουργία των σπερματοζωαρίων, καθώς συμμετέχουν στην ενεργοποίηση του σπέρματος, στη διεκπεραίωση της ακροσωμικής αντίδρασης, καθώς και στην δέσμευσή του στη διαφανή ζώνη του ωαρίου (Agarwal et al, 2006). Η έκθεση των σπερματοζωαρίων όμως σε υψηλές συγκεντρώσεις ROS προκαλεί βλάβη των μιτοχονδριακών και πλασματικών μεμβρανών, καθώς και θραυσματοποίηση των χρωμοσωμάτων και κατακερματισμό

του DNA τους, μείωση τελικά της κινητικότητάς αλλά και της βιωσιμότητας των σπερματοζωαρίων (Taylor et al, 2009).

1.4.3 Διαταραχή στην ακεραιότητα της μεμβράνης

Η διαταραχή της ακεραιότητας της πλασματικής τους μεμβράνης οφείλεται σε θερμικές, χημικές, μηχανικές και ωσμωτικές τάσεις που εφαρμόζονται στην επιφάνειά της (Amann and Pickett, 1987) (Steponkus and Lynch, 1989). Η βλάβη προκαλείται κατά κύριο λόγο από την κυτταρική αφυδάτωση, ενώ και ο σχηματισμός ενδοκυτταρικού πάγου που συμβαίνει κυρίως στη συμβατική βραδεία κατάψυξη, μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο (Steponkus and Lynch, 1989). Η πρωτογενής βλάβη εμφανίζεται κατά τη διάρκεια της διαδικασίας κατάψυξης και απόψυξης, μεταξύ των -15°C και -60°C , κι όχι κατά την αποθήκευση των κυττάρων σε υγρό άζωτο. Ωστόσο, επειδή ο σχηματισμός κρυστάλλων πάγου είναι συνάρτηση του ρυθμού κατάψυξης και απόψυξης, ο αυστηρός έλεγχος των ρυθμών και των δύο διαδικασιών μπορεί να ελαχιστοποιήσει την κυτταρική βλάβη που προκαλείται από αυτόν (Amann and Pickett, 1987) (Hammerstedt et al, 1990).

Μελέτες έχουν δείξει, ότι δείγματα που έχουν υποστεί τη διαδικασία κατάψυξης και απόψυξης εμφανίζουν πιο ασταθείς μεμβράνες από τα φρέσκα δείγματα (Parks and Graham, 1992), με αποτέλεσμα να προκαλείται νωρίτερα αλλά και πιο εύκολα η ακροσωμική αντίδραση (Graham and Foote, 1987).

1.4.4 Βιωσιμότητα σπέρματος

Η ζωτικότητα των σπερματοζωαρίων, φαίνεται να επηρεάζεται από τη διαδικασία της κρυοσυντήρησης. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε μείωση της ζωτικότητας των σπερματοζωαρίων μετά από δύο διαφορετικά πρωτόκολλα κρυοσυντήρησης, με τη μείωση να είναι σημαντικά υψηλότερη σε δείγματα στα οποία εφαρμόστηκε η διαδικασία της αργής κατάψυξης, σε σχέση με τα υαλοποιημένα σπερματοζωάρια. Η παρατηρούμενη μείωση έχει αποδοθεί είτε σε μεταβολές της μεμβράνης, εξαιτίας των διακυμάνσεων της θερμοκρασίας (Alvarez et al, 1993) (Ozkavukcu et al, 2008). Άλλοι ερευνητές έχουν αποδώσει τη μείωση του αριθμού των ζωντανών σπερματοζωαρίων σε ωσμωτικές μεταβολές, σε συνδυασμό με την αφυδάτωση και

την επανυδάτωση των δειγμάτων που προκύπτει λόγω της χρήσης κρυοπροστατευτικών, καθώς και το σχηματισμό ενδοκυτταρικών κρυστάλλων (Morris, 2006) (Chaytor et al, 2012), Τα μεγαλύτερα ποσοστά επιβίωσης που παρατηρούνται μετά από υαλοποίηση είναι πιθανό να οφείλονται στη χρήση μη διαπερατού κρυοπροστατευτικού (Isachenko et al, 2008) και στην απουσία σχηματισμού ενδοκυτταρικών κρυστάλλων (Silva and Gadella, 2006).

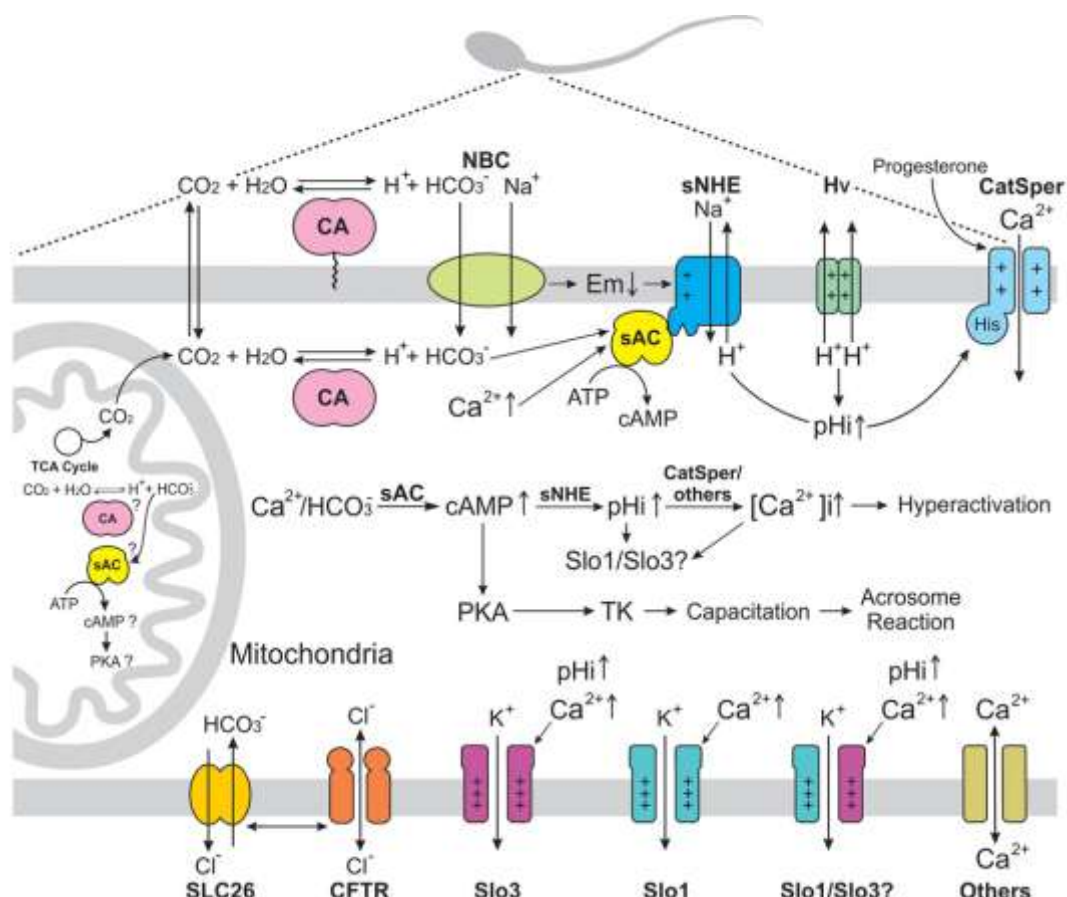
1.5 pH σπέρματος

Οι τιμές pH του σπέρματος προσδιορίζονται κυρίως από τις βασικές εκκρίσεις των σπερματικών κυστιδίων και τις πιο όξινες προστατικές εκκρίσεις. Στο σπερματικό πλάσμα περιέχονται $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$, ανόργανα ιόντα, οργανικά οξέα, σάκχαρα, λιπίδια, στεροειδή, αμινοξέα, πολυαμίνες, αζωτούχες βάσεις και πρωτεΐνες (Wolters-Everhardt et al, 1986). Ο συνδυασμός όλων αυτών, καθιστά το σπέρμα σωματικό υγρό με υψηλή ρυθμιστική ικανότητα. Η τιμή του pH του σπερματικού υγρού μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της βιωσιμότητας και της ποιότητας του σπέρματος, και στη γονιμοποιητική του ικανότητα. Αρκετές φλεγμονώδεις καταστάσεις, ιδιαίτερα του προστάτη ή των σπερματικών κυστιδίων, καθώς και η αγενεσία τόσο των αγγείων όσο και των σπερματικών κυστιδίων, μπορεί να μεταβάλλουν τις τιμές του σπερματικού pH (Haugen and Grotmol, 1998). Οι φυσιολογικές τιμές pH στα σπερματοζωάρια κυμαίνονται μεταξύ 7.2 και 8 (WHO, 2010).

Η διατήρηση του ενδοκυττάριου pH (pH_i), μέσα σε φυσιολογικά όρια είναι θεμελιώδης για τη λειτουργία των κυττάρων καθώς οι περισσότερες κυτταρικές λειτουργίες επιτελούνται εντός μιας περιορισμένης περιοχής pH_i . Οι μεταβολές στο pH_i επηρεάζουν την κατάσταση ιονισμού ασθενών οξέων και βάσεων που βρίσκονται στις περισσότερες πρωτεΐνες και σε πολλά βιομόρια (Boron, 2004). Τα κύτταρα ρυθμίζουν με ακρίβεια το pH_i με μηχανισμούς, που κυρίως στοχεύουν στη ρύθμιση της συγκέντρωσης του H^+ , Αυτό επιτυγχάνεται με μεταβολές της δραστηριότητας ειδικών μεταφορέων ιόντων της πλασματικής μεμβράνης, (Ruffin et al, 2014).

Τα σπερματοζωάρια είναι τα μοναδικά κύτταρα που εκτίθενται σε δραματικές μεταβολές της ιοντικής σύνθεσης του εξωκυττάριου περιβάλλοντος τους, καθώς περνούν μέρος της ζωής τους στο όξινο περιβάλλον της επιδιδυμίδας με χαμηλή

συγκέντρωση HCO_3^- , ενώ κατά τη μεταφορά τους στο γυναικείο αναπαραγωγικό σωλήνα καλούνται να επιβιώσουν σε ένα πιο βασικό περιβάλλον με υψηλή συγκέντρωση HCO_3^- (Liu et al, 2012). Όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.5, ο διάυλος Ca^{2+} , το κανάλι CatSper (Ren et al, 2001), ο διάυλος K^+ , Slo3, (Santi et al, 2010), ο ειδικός για το σπέρμα ανταλλάκτης Na^+/H^+ (Wang et al, 2003) και η διαλυτή αδενυλική κυκλάση (Esposito et al, 2004) (Hess et al, 2005) φαίνεται πως αποτελούν τους κύριους ρυθμιστές της συγκέντρωσης ιόντων στα σπερματοζώαρια.

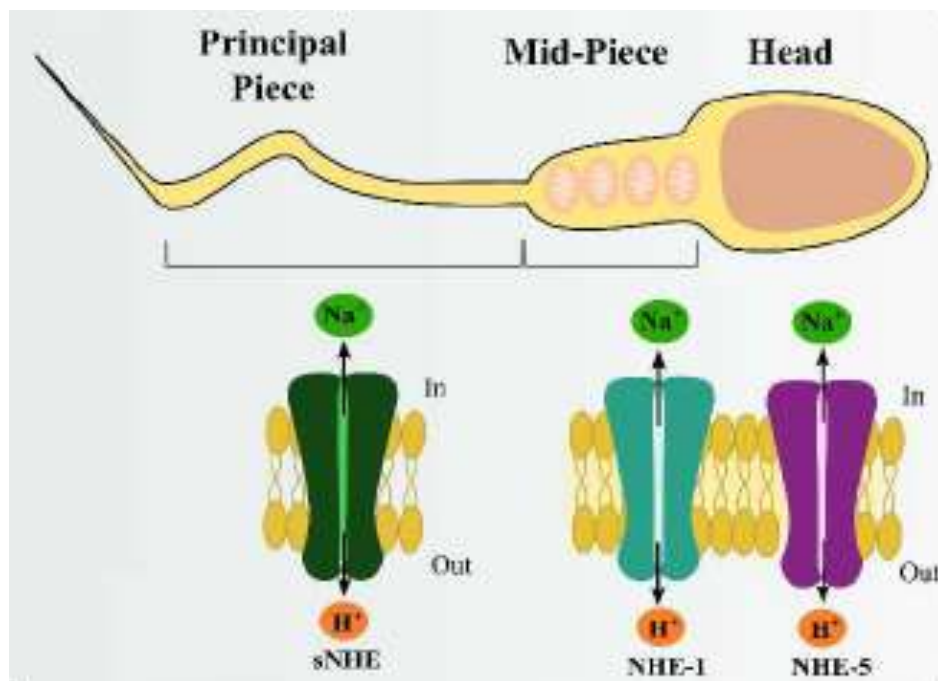


Εικόνα 1.5.1 – Μοντέλο ρύθμισης pH_i σπέρματος θηλαστικού (Nishigaki et al, 2014).

1.6 Ανταλλάκτης Na^+/H^+

Οι ανταλλάκτες Na^+/H^+ (NHE) αποτελούν καθοριστικό παράγοντα για τη ρύθμιση του pH_i των σπερματοζωαρίων σε διαφορετικά είδη, και σε διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους (Garcia and Meizel, 1999) (Schackmann and Chock, 1986) (Woo et al, 2002).

Οι NHE περιλαμβάνουν 13 ισομορφές, που κωδικοποιούνται από την υπερικογένεια των γονιδίων SLC9, αλλά μόνο τρεις από τους υποτύπους υπάρχουν στα σπερματοζωάρια, ο NHE1, ο NHE5 και ο ειδικός για το σπέρμα sNHE (Εικόνα 1.6.1) (Fuster and Alexander, 2014). Έχει βρεθεί ότι ποντίκια που εμφανίζουν έλλειψη έκφρασης NHE1 είναι γόνιμα, υποδεικνύοντας ότι ο NHE1 δεν εμπλέκεται στην κινητικότητα των σπερματοζωαρίων (Bell et al, 1999). Παρόμοια είναι και τα αποτελέσματα πειραμάτων που αφορούν το NHE5, η απουσία του οποίου δεν οδηγεί σε υπογονιμότητα (Quill et al, 2006). Ο NHE1, έχει βρεθεί, επίσης, ότι αποτελεί το βασικό ανταλλάκτη Na^+/H^+ της επιφάνειας των νευρώνων του κεντρικού νευρικού συστήματος, ρυθμίζοντας με αυτόν τον τρόπο το pHi τους και μεσολαβώντας στη σύνθεση του DNA, στον κυτταρικό όγκο, στην πρωτεϊνική λειτουργία, στην αποδόμηση και τη διαφοροποίηση των συγκεκριμένων κύτταρων (Ma and Haddad, 1997) (Slepkon et al, 2005). Επιπλέον, ανταλλάκτες Na^+/H^+ έχουν βρεθεί και σε καρκινικά κύτταρα προστάτη (Papadopoulou et al, 2008) (Papakonstanti et al, 2003), μαστού (Kallergi et al, 2007) (Kampa et al, 2008), παχέος εντέρου (Gu et al, 2009), και έχει αποδειχθεί ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του pHi των κυττάρων αυτών, επιδρώντας στη ρύθμιση του κυτταρικού όγκου (De Vito, 2006) (Heming and Bidani, 1995) (Hoffmann et al, 2009) (Lang et al, 1998), στη μετανάστευση (De Vito, 2006) (Fliegel, 2005) (Luo and Sun, 2007) (Orlowski and Grinstein, 2004) και στην επιβίωση των καρκινικών κυττάρων (Lang et al, 2000) (Chatterjee et al, 2014).



Εικόνα 1.6.1 – Η ποικιλία των Na^+/H^+ κατά μήκος των σπερματοζωαρίων (Martins et al, 2014).

Ο sNHE, που έχει βρεθεί σε σπερματοζώρια θηλαστικών (Brett et al, 2005) (Orlowski and Grinstein, 2004), εντοπίζεται κυρίως στο μαστίγιο του σπερματοζωαρίου (Εικόνα 1.6.1) και αποτελείται από 14 διαμεμβρανικά τμήματα (Wang et al, 2003), κι όχι από 12 τμήματα που φέρουν οι υπόλοιπες ισομορφές NHE (Orlowski and Grinstein, 2004). Το αμινοτελικό άκρο του sNHE περιέχει μία περιοχή με 10 διαμεμβρανικά τμήματα που είναι διατηρημένα εντός της υπερικογένειας των NHE. Το καρβοξυτελικό άκρο περιέχει μια μακριά μη διατηρημένη περιοχή (≈ 700 AA κατάλοιπα) που φαίνεται να εντοπίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα των σπερματοζωαρίων. Όλες οι NHE που εντοπίζονται στην πλασματική μεμβράνη έχουν μακριές κυτταροπλασματικές ουρές ($\approx 300-700$ AA κατάλοιπα), οι οποίες θεωρείται ότι ρυθμίζουν τη δραστηριότητα του ανταλλάκτη μέσω αλλαγών που αφορούν στη φωσφορύλωση του, καθώς και τις αλληλεπιδράσεις τους με διάφορες πρωτεΐνες (Brett et al, 2005), όπως τις πρωτεϊνικές κινάσες και φωσφατάσες, καθώς και συστατικά που σχετίζονται με τον κυτταροσκελετό (Orlowski and Grinstein, 2004). Αρκετά διακριτή από τις υπόλοιπες NHE των θηλαστικών, ο sNHE περιέχει μια συγκεκριμένη αλληλουχία για τη δέσμευση ενός κυκλικού νουκλεοτιδίου κοντά στο καρβοξυλικό της άκρο και τέσσερις διαμεμβρανικές έλικες που αντιπροσωπεύουν

το τμήμα ανίχνευσης τάσης, των ιοντικών διαύλων με τάση (Wang et al, 2003), υποδηλώνοντας ότι η λειτουργία της sNHE θα μπορούσε να ρυθμιστεί από τη δράση των κυκλικών νουκλεοτιδίων και από το δυναμικό της μεμβράνης του σπέρματος (Wang et al, 2007).

Προκειμένου να διαλευκανθεί η φυσιολογική λειτουργία των sNHE, πραγματοποιήθηκαν μελέτες οι οποίες αποσκοπούσαν στον έλεγχο της έκφρασης των sNHE στην πλασματική μεμβράνη διαφόρων ευκαρυωτικών κυττάρων. Οι συγκεκριμένες έρευνες δεν ήταν επιτυχημένες, περιορίζοντας την εξερεύνηση της λειτουργίας των sNHE μόνο στα σπερματοζωάρια. Για τον προσδιορισμό της φυσιολογικής λειτουργίας του sNHE, μελετήθηκε σε ποντίκια η απαλειφή του γονιδίου του sNHE και βρέθηκε ότι προκαλεί πλήρη υπογονιμότητα στα άρρενα ζώα λόγω ακινησίας των σπερματοζωαρίων, που αντιστρέφεται σε ένα ποσοστό 20% με την προσθήκη NH_3 , υποδηλώνοντας ότι το χαμηλό pH_i , είναι μερικώς υπεύθυνο για την έλλειψη της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων. Εναλλακτικά, ο πλέον αποτελεσματικός τρόπος αναστροφής του φαινοτύπου με ακίνητα σπερματοζωάρια και επαναφοράς της γονιμότητας είναι με την προσθήκη αναλόγων cAMP. Τα διαπερατά από το κύτταρο ανάλογα cAMP αποκαθιστούν το ποσοστό της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων σε επίπεδα συγκρίσιμα με αυτά των ζώων άγριου τύπου (Wang et al, 2003).

Η πραγματική μοριακή δραστηριότητα του sNHE παραμένει απροσδιόριστη. Η πρωτογενής αλληλουχία υποδεικνύει ότι ο ανταλλάκτης sNHE είναι εξελικτικά απομακρυσμένος από τα άλλα μέλη της οικογένειας μεταφορέων κατιόντων-πρωτονίων που αναγνωρίζονται σε ζωντανούς οργανισμούς (Brett et al, 2005). Κατά συνέπεια, είναι δύσκολη η πρόβλεψη μοριακών παραμέτρων που ρυθμίζουν τον ανταλλάκτη, όπως η εκλεκτικότητα των ιόντων, η ηλεκτρογενής μεταφορά, η ευαισθησία του αναστολέα και η ρύθμιση του σε σχέση με άλλα μέλη αυτής της οικογένειας.

Οι μεταβλητές θέσεις του sNHE, έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως ως θέσεις δέσμευσης αναστολέων της αντλίας Na^+/H^+ , σε κύτταρα διαφορετικών ιστών, προκειμένου να διερευνηθεί η λειτουργία της. Ένας από τους πιο κοινώς χρησιμοποιούμενους αναστολείς είναι η αμιλορίδη η οποία έχει χρησιμοποιηθεί σε πολλά πειράματα ως αναστολέας των NHE (Masereel et al, 2003), με τις ισομορφές NHE1 και NHE2, να εμφανίζουν τη μεγαλύτερη ευαισθησία (Chambrey et al, 1997), ενώ η πιο σπάνια

ισομορφή NHE5 απαιτεί μικρότερη συγκέντρωση αμιλορίδης, προκειμένου να ανασταλλεί η λειτουργία της (Szabó et al, 2000). Οι αναστολές DMA, EIPA, MIBA, HMA εμφανίζουν αυξημένη ισχύ και εκλεκτικότητα. Η βενζουγουανιδίνη αποτελεί έναν ακόμη αναστολέα της αντλίας Na^+/H^+ , με σημαντικές δομικές ομοιότητες με την αμιλορίδη και τα παράγωγά της, ο οποίος χρησιμοποιείται τα τελευταία χρόνια για την ισομορφή NHE1 (Masereel et al, 2003). Επίσης, η καριπορίδη και το εμπορικά διαθέσιμο fasudil έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία ως αναστολείς της ισομορφής NHE1 (Chatterjee et al, 2014).

Ο sNHE ρυθμίζει εκτός από το pH_i και τη διαδικασία ωρίμανσης των σπερματοζωαρίων. Η δυσλειτουργία του sNHE οδηγεί σε υπογονιμότητα (Fuster and Alexander, 2014) (Martins et al, 2014). Όπως και το κανάλι Catsper, ο ανταλλάκτης sNHE βρίσκεται στο κύριο κομμάτι του σπερματικού μαστιγίου (Wang et al, 2003), υποδηλώνοντας ότι το κανάλι Catsper μπορεί να αντιληφθεί τις μεταβολές του pH_i από το sNHE και κατά αυτόν τον τρόπο ρυθμίζεται η λειτουργία του (Sun et al, 2017).

1.7 Στόχος ερευνητικής εργασίας

Στόχος της εργασίας ήταν αρχικά να αναπτύξουμε τη μεθοδολογία εκτίμησης του pH_i σε σπερματοζωάρια. Στη συνέχεια, μελετήσαμε την επίδραση της κρυοσυντήρησης των σπερματοζωαρίων στη δραστηριότητα της αντλίας Na^+/H^+ που είναι ένας από τους κεντρικούς ρυθμιστές του ενδοκυττάριου pH και της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων. Όπως αναπτύσσεται παραπάνω, η κινητικότητα των σπερματοζωαρίων μεταβάλλεται μετά τη κρυοσυντήρηση.

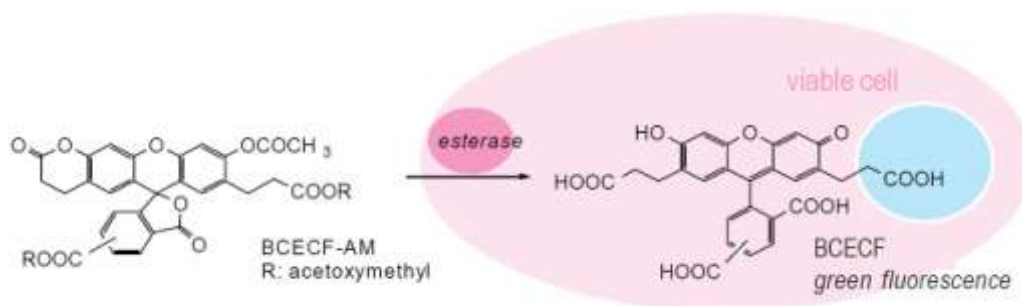
Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ήταν η μέτρηση pH_i με τη χρήση του BCECF-AM και τη μέτρηση του φθορισμού σε φθορισμόμετρο. Η δραστηριότητα της αντλίας μελετήθηκε με τη χρήση του αναστολέα της αντλίας, αμιλορίδη. Η μελέτη έγινε σε σπερματοζωάρια φρέσκα και σε σπερματοζωάρια που είχαν καταψυχθεί στους -196°C με την τεχνική της υαλοποίησης. Πριν και μετά την κατάψυξη των σπερματοζωαρίων έγινε εκτίμηση των παραμέτρων του σπέρματος (όγκος, συγκέντρωση, κινητικότητα).

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1 Υλικά

2.1.1 BCECF-AM

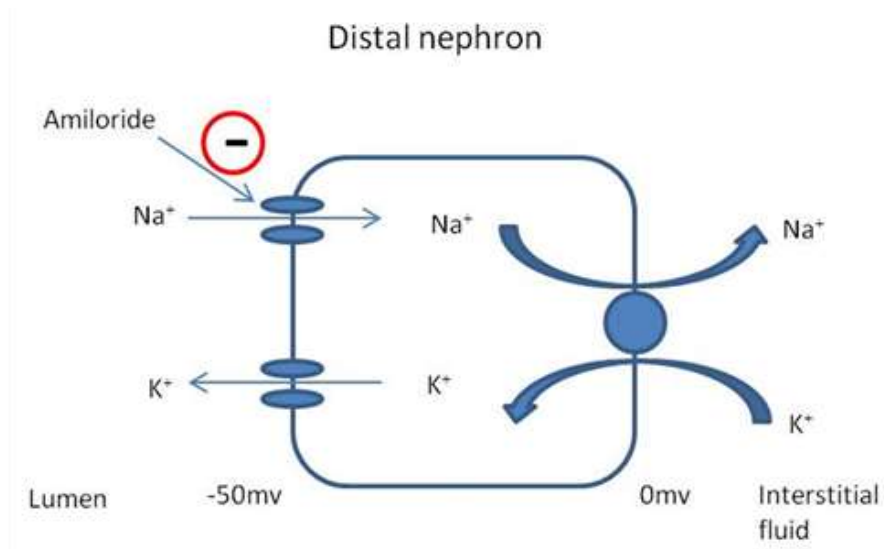
Το BCECF-AM (Merck Millipore) είναι ένας μη φορτισμένος εστέρας, ο οποίος διαχέεται εύκολα και γρήγορα διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης, φτάνοντας στο εσωτερικό του κυττάρου. Οι ενδοκυτταρικές εστεράσες διασπούν το δεσμό εστέρα, με αποτέλεσμα να απελευθερώνεται το BCECF και να φθορίζει σύμφωνα με το pH_i (Εικόνα 2.1.1.1) (Futsaether et al, 1993).



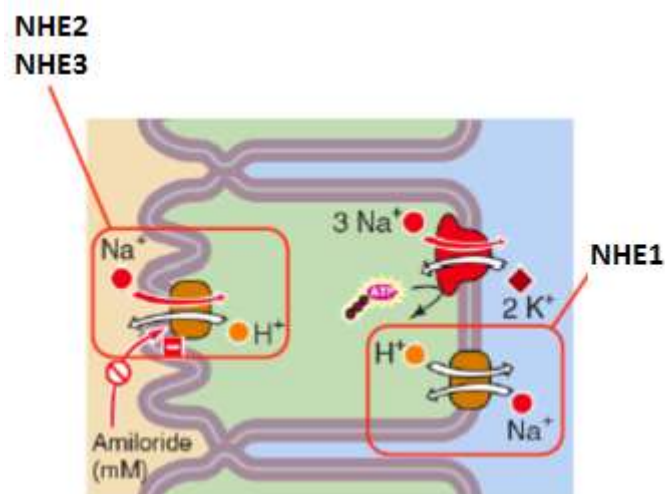
Εικόνα 2.1.1.1 – Μηχανισμός χρώσης κυττάρων με τη δράση του BCECF-AM
(πηγή: <https://www.dojindo.com/store/p/157-BCECF-AM.html>).

2.1.2 Αμιλορίδη

Το διουρητικό αμιλορίδη δρα ως γενικός αναστολέας των διαύλων Na⁺ (Kinsella and Aronson, 1981), εμποδίζοντας τη μεταφορά ιόντων Na⁺, με τρόπο ταχύ και αναστρέψιμο (Εικόνα 2.1.2.1) (Garty and Benos, 1988). Η αμιλορίδη, επίσης, επιδρά στην αντλία Na⁺/H⁺, και πιο συγκεκριμένα στις isoμορφές NHE1, NHE2 και NHE3, προκαλώντας συσσώρευση ιόντων H⁺, στον ενδοκυτταρικό χώρο (Εικόνα 2.1.2.2) (Shi et al, 2012) (Hosogi et al, 2012).



Εικόνα 2.1.2.1 – Μηχανισμός δράσης αμιλορίδης στους νεφρούς, ως διουρητικό
(πηγή: https://www.stepwards.com/?page_id=1788).



Εικόνα 2.1.2.2 – Μηχανισμό δράσης αμιλορίδης στις ισομορφές αντλίας Na^+/H^+ (NHE), NHE1, NHE2 και NHE3 (Shi et al, 2012).

2.2 Μέθοδοι

2.2.1 Αξιολόγηση παραμέτρων σπέρματος (φρέσκου ή κατεψυγμένου)

Η συσκευή μέτρησης makler, επιτρέπει την ταχεία και ακριβή αξιολόγηση του δείγματος σπέρματος, όσον αφορά τη συγκέντρωση του αλλά και την κινητικότητά του, με τη βοήθεια οπτικού μικροσκοπίου. Η συσκευή μέτρησης makler αποτελείται από δύο μέρη. Στο κάτω μέρος υπάρχει μία γυάλινη επιφάνεια πάνω στην οποία τοποθετείται μία σταγόνα από το δείγμα (10λ). Το επάνω μέρος αποτελείται από ένα γυάλινο κάλυμμα, που περιβάλλεται από μεταλλικό δακτύλιο. Στο γυάλινο κάλυμμα βρίσκεται ένα πλέγμα των 1 mm^2 υποδιαιρούμενο σε 100 τετράγωνα, με μέγεθος $0.1 \times 0.1\text{ mm}$ το καθένα.

Προκειμένου να υπολογιστεί η συγκέντρωση του φρέσκου δείγματος, προσμετράται ο αριθμός των κεφαλών των σπερματοζωαρίων σε δέκα τετράγωνα και ο αριθμός αυτός ισούται με τον αριθμό των σπερματοζωαρίων σε εκατομμύρια ανά χιλιοστόλιτρο (ml).

Για τον προσδιορισμό της κινητικότητας του φρέσκου δείγματος σπέρματος, είναι απαραίτητο να μετρηθούν 100 σπερματοζωάρια σε διαφορετικές περιοχές του πλέγματος, προκειμένου να υπολογιστεί το ποσοστό αυτών που ανήκουν σε κάθε μία από τις τρεις κατηγορίες, ανάλογα με την κίνηση που εκτελούν. Στην πρώτη κατηγορία (a+b) ανήκουν τα σπερματοζωάρια που κινούνται είτε ταχέως είτε βραδέως είτε πραγματοποιούν μεγάλους κύκλους ανεξαρτήτως ταχύτητας (PRM). Στη δεύτερη κατηγορία (c) ανήκουν τα σπερματοζωάρια που εκτελούν επιτόπια κίνηση (κίνηση σε μικρούς κύκλους, κίνηση μόνο της κεφαλής ή μόνο της ουράς τους, χωρίς να μετακινείται το υπόλοιπο τμήμα τους) (NPM), ενώ στην τρίτη κατηγορία (d) ανήκουν τα ακίνητα σπερματοζωάρια (IM). Η εκτίμηση πραγματοποιήθηκε με βάση τα πρότυπα του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (WHO, 2010).

2.2.2 Υαλοποίηση δειγμάτων

Κατά την υαλοποίηση, το δείγμα αναμιγνύεται με ίση ποσότητα κρυοπροστατευτικού (Fertipro) και τοποθετείται σε ειδικό σωληνάριο (cryotube), το οποίο διατηρείται για 10 λεπτά στους 4°C. Το σωληνάριο, στη συνέχεια, τοποθετείται σε υγρό άζωτο.

2.2.3 Απόψυξη δειγμάτων

Η απόψυξη του δείγματος πραγματοποιείται σε υδατόλουτρο, στους 37°C, για 10 λεπτά. Μόλις το δείγμα αποψυχθεί, πραγματοποιείται η απομάκρυνση του κρυοπροστατευτικού (Fertipro), με φυγοκέντρωση για 5 λεπτά σε μέγιστο rpm (φυγόκεντρος, Heraus Biofuge). Μετά τη φυγοκέντρωση απομακρύνεται το υπερκείμενο και συλλέγεται το ίζημα, στο οποίο περιέχονται τα σπερματοζώαρια.

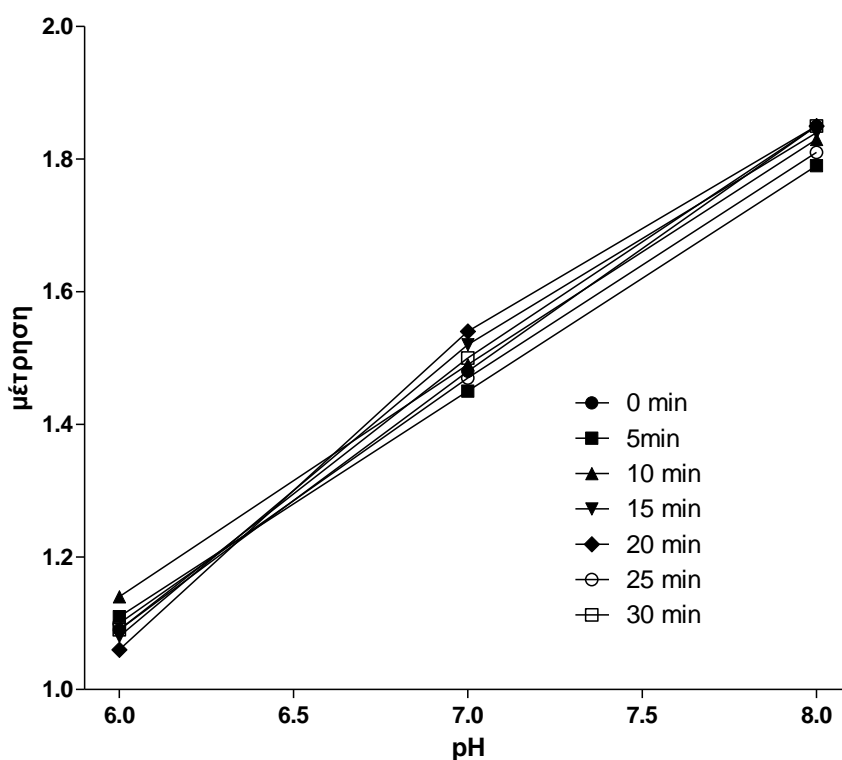
2.2.4 Υπολογισμός pH_i

Σε $2.5 - 3 \times 10^6$ κύτταρα/ml σπερματοζώαρια από φρέσκο δείγμα σπέρματος (δείγμα στους -20°C) έγινε προσθήκη BCECF-AM (0.5mM) και ακολούθησε επώαση στους 15-20°C για 45 λεπτά σε επίπεδο αναδευτήρα (700 rpm). Ακολούθησε φυγοκέντρωση για 5 λεπτά στους 4°C και στις 10.000 rpm (Heraus Biofuge). Στο ίζημα προστέθηκαν 2ml 1 x PBS και φυγοκεντρήθηκε για 5 λεπτά σε 10.000 rpm. Μετά τη φυγοκέντρωση το εναίωρημα απομακρύνθηκε και προστέθηκαν εκ νέου 2mL 1 x PBS και ακολούθησε φυγοκέντρωση. Η διαδικασία της φυγοκέντρωσης και της επαναιώρησης του δείγματος σε PBS έγινε 5 φορές. Όλες οι παραπάνω διεργασίες έγιναν υπό συνθήκες πλήρους σκότους. Έπειτα τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε κιβέτα φθορισμόμετρου Biograd, διεγέρθηκαν στα 490 nm και μετρήθηκαν στα 450 nm. Οι μετρήσεις στο φθορισμόμετρο πραγματοποιούνταν ανά 5 λεπτά για συνολικό χρόνο 30 λεπτών. Ο υπολογισμός pH_i έγινε με βάση πρότυπη καμπύλη

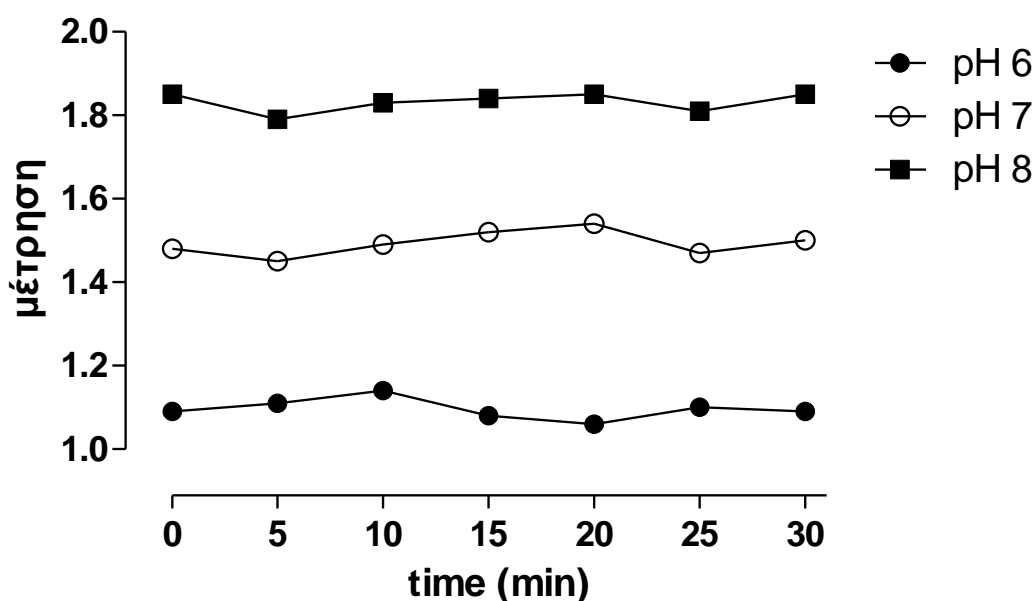
Η δημιουργία της πρότυπης καμπύλης έγινε σύμφωνα με την μεθοδολογία του Thomas και των συνεργατών του (1979). Συγκεκριμένα, προστέθηκαν 3×10^6 κύτταρα/ml σε τρία διαφορετικά διαλύματα με γνωστό pH. Το πρώτο διάλυμα περιείχε MES 30 mM με pH 6, το δεύτερο διάλυμα περιείχε MOPS 30 mM με pH 7 και το τρίτο διάλυμα περιείχε TRIS 30 mM με pH 8. Σε κάθε διάλυμα, προστέθηκαν

επίσης 440 mM KCl, 1 mM MgCl₂ καθώς και η ιονοφόρος ουσία, νιγερισίνη (nigericin, 6.7 mM). Η νιγερισίνη αποτελεί έναν K⁺/H⁺ ανταλλάκτη και σε συνδυασμό με την υψηλή συγκέντρωση εξωκυττάριου K⁺ που υπάρχει στο διάλυμα, επιτρέπει την εξισορρόπηση του pH_i με το pH_e. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, οι τιμές του pH_i για τα κύτταρα, στα τρία διαφορετικά διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν, MES, MOPS και TRIS να είναι παρόμοιες με το pH των διαλυμάτων δηλαδή 6, 7 και 8, αντίστοιχα.

Σύμφωνα με τις πρότυπες καμπύλες, οι τιμές του pH που προέκυψαν, είχαν γραμμική σχέση με τις μετρήσεις (Διάγραμμα 2.2.4.1) (Πίνακας 2.2.4.1) αλλά μεταβάλλονταν από 0-30 min (Διάγραμμα 2.2.4.2). Για το συγκεκριμένο λόγο, για τον υπολογισμό του pH_i των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές πρότυπες καμπύλες και οι εξισώσεις του αντίστοιχου χρόνου (Πίνακας 2.2.4.1).



Διάγραμμα 2.2.4.1 - Συσχέτιση μετρήσεων φθορισμόμετρου με τις τιμές pH για το χρονικό διάστημα 0-30 min.



Διάγραμμα 2.2.4.2 - Συσχέτιση μετρήσεων φθορισμόμετρου με χρονικό διάστημα από 0 έως 30 min, για τιμές pH 6, 7 και 8.

Πίνακας 2.2.4.1 – Εξισώσεις μετατροπής τιμών φθορισμόμετρου (OD) σε τιμές pH για το χρονικό διάστημα 0-30 min.

Χρόνος (min)	Εξίσωση pH	R ²
0	2.631 (OD) + 3.1237	0.9998
5	2.9412 (OD) + 2.7353	1
10	2.8983 (OD) + 2.6911	0.9999
15	2.6099 (OD) + 3.1374	0.9918
20	2.4932 (OD) + 3.3018	0.9848
25	2.8152 (OD) + 2.8898	0.9994
30	2.6261 (OD) + 3.1133	0.9979

2.2.5 Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση έγινε με τη βοήθεια του προγράμματος Graph Pad Prism 5. Τα αποτελέσματα παρουσιάστηκαν ως $MO \pm SD$ δηλαδή με τη μορφή του μέσου όρου (M. Ο.) συνοδευόμενο από τη τυπική απόκλιση (SD). Η κατανομή των τιμών των

δειγμάτων ήταν κανονική και η σύγκριση των τιμών έγινε με paired t-test για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις και unpaired t-test για ανεξάρτητες μετρήσεις. Στατιστικά σημαντική θεωρήθηκε η τιμή του p μικρότερη του 0.05 ($p < 0.05$).

2.3 Δείγματα

Στα πλαίσια της συγκεκριμένης εργασίας μελετήθηκαν 9 δείγματα σπέρματος από 9 διαφορετικούς άνδρες, οι οποίοι συμμετείχαν σε πρόγραμμα Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής στη Μονάδα Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής, της Μαιευτικής και Γυναικολογικής κλινικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Η ηλικία, το BMI, το ποσοστό των καπνιστών και των καταναλωτών αλκοόλ παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.3.1. Στους καπνιστές ανήκαν άτομα που κάπνιζαν πάνω από 5 τσιγάρα την ημέρα και καταναλωτές αλκοόλ θεωρούνταν αυτοί που έπιναν πάνω από 1 ποτήρι την ημέρα.

Πίνακας 2.3.1 – Επιδημιολογικά δεδομένα των 9 (N=9) ανδρών.

	M. O.	Std. Deviation	Ποσοστό (%)
Ηλικία (έτη)	38.86	5.96	
BMI	28.89	4.19	
Αλκοόλ			14.29
Κάπνισμα			14.29

3. Αποτελέσματα

3.1 Παράμετροι σπέρματος σε φρέσκο και αποψυγμένο δείγμα

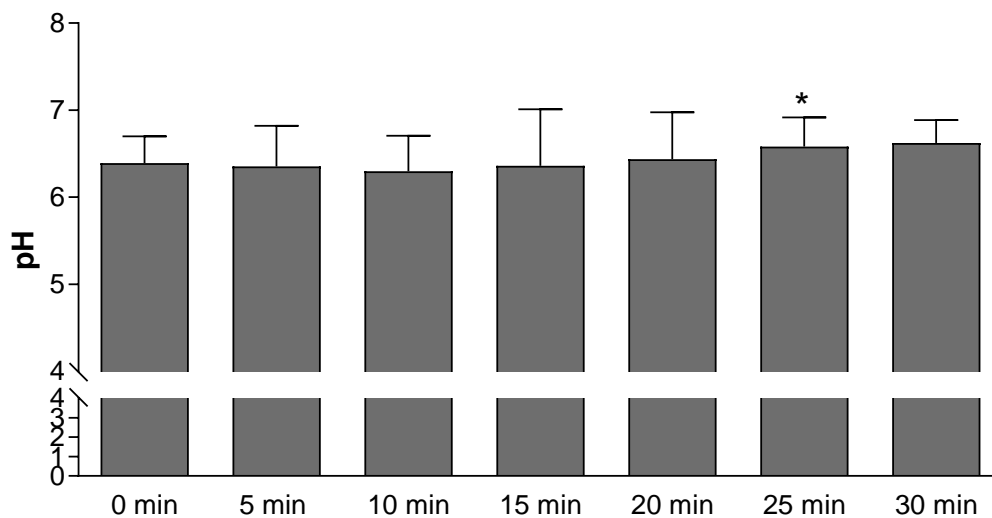
Οι εκτιμήσεις των δειγμάτων, πριν αλλά και μετά την κατάψυξη, με βάση τα πρότυπα του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (WHO, 2010), παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3.1.1). Μετά την απόψυξη η κινητικότητα (a+b) των σπερματοζωαρίων παρουσίασε σημαντική ελάττωση, η κινητικότητα (c) δεν παρουσίασε καμία στατιστικά σημαντική μεταβολή, ενώ η κινητικότητα (d) παρουσίασε σημαντική αύξηση.

Πίνακας 3.1.1 - Παράμετροι φρέσκων και αποψυγμένων σπερματοζωαρίων από 6 δείγματα (N=6).

		Φρέσκα δείγματα (-20°C)		Αποψυγμένα δείγματα (-196°C)		
		M. O.	Std. Deviation	M. O.	Std. Deviation	P value
Όγκος (ml)		2.58	0.51	2.58	0.51	
Συγκέντρωση (10 ⁶ /ml)		47.83	47.07	47.83	47.07	
Κινητικότητα	% (a+b)	54.83	11.97	34.33	11.06	0.00186
	% (c)	19.83	2.53	15.67	4.63	0.12802
	% (d)	25	10.56	50	14.97	0.0017

3.2 Τιμές του pH παρουσία αμιλορίδης (20 nM) σε φρέσκο και κατεψυγμένο σπέρμα

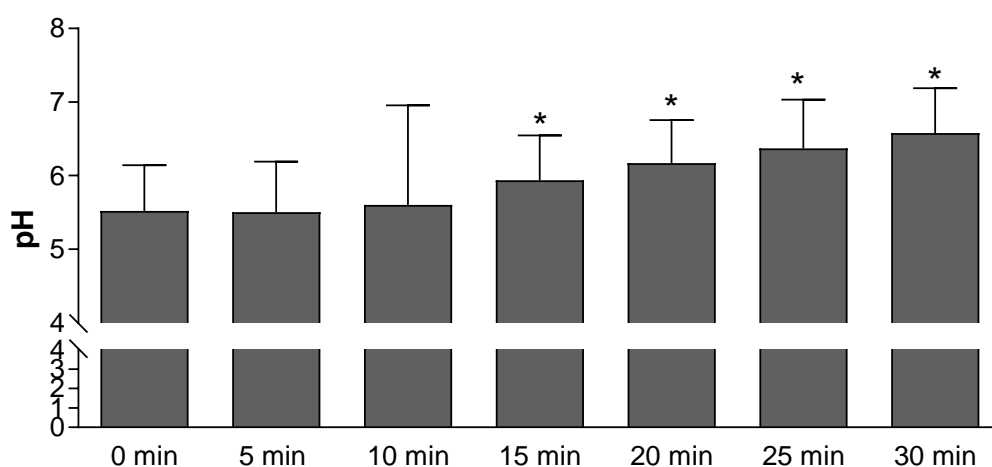
Από τα 6 δείγματα που μελετήθηκαν εξαιρέθηκαν 2 δείγματα φρέσκου και 2 δείγματα κατεψυγμένου σπέρματος, καθώς το pH_i βρέθηκε μικρότερο από 5.5, εκτός δηλαδή ορίων ευαισθησίας της μεθόδου.



Διάγραμμα 3.2.1 - Το pH_i σε φρέσκα σπερματοζώαρια παρουσία αμιλορίδης 20nM από 0-30 min, σε 4 δείγματα με τιμές pH_i >5.5.

Πίνακας 3.2.1 - Οι τιμές του pH_i σε φρέσκα σπερματοζώαρια παρουσία αμιλορίδης 20nM από 0-30 min, σε 4 δείγματα με τιμές $pH_i > 5.5$.

Χρόνος (min)	Τιμές pH_i (Mean \pm SD)	P Value (σε σύγκριση με 0 min)
0	6.391 \pm 0.6133	
5	6.355 \pm 0.9292	0.8371
10	6.300 \pm 0.8105	0.4859
15	6.360 \pm 0.6488	0.3435
20	6.437 \pm 0.5391	0.4248
25	6.581 \pm 0.6697	0.0285
30	6.623 \pm 0.5262	0.0584



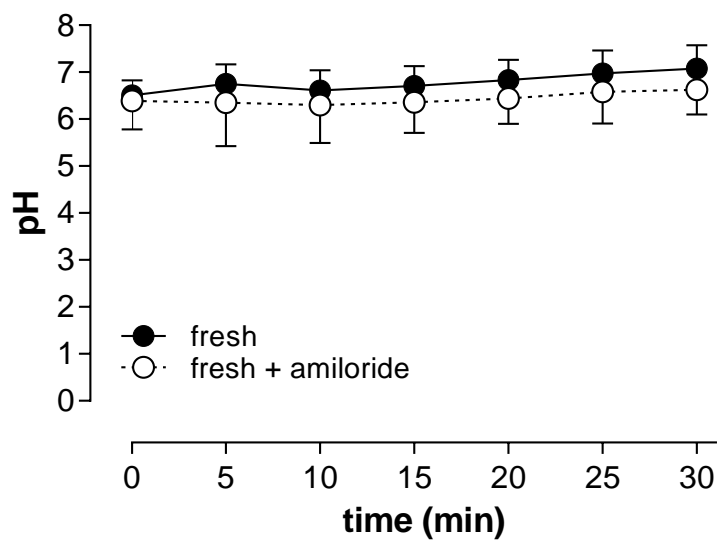
Διάγραμμα 3.2.2 - Το pH_i σε κατεψυγμένα σπερματοζώαρια παρουσία αμιλορίδης 20nM από 0-30 min, σε 4 δείγματα με τιμές $pH_i > 5.5$.

Πίνακας 3.2.2 - Οι τιμές του pH_i σε κατεψυγμένα σπερματοζώαρια παρουσία αμιλορίδης 20nM από 0-30 min, σε 4 δείγματα με τιμές pH_i >5.5.

Χρόνος (min)	Τιμές pH_i (Mean ± SD)	P Value (σε σύγκριση με 0 min)
0	5.520 ± 1.242	
5	5.504 ± 1.371	0.8485
10	5.603 ± 1.353	0.3224
15	5.938 ± 1.213	0.0180
20	6.171 ± 1.170	0.0121
25	6.370 ± 1.321	0.0131
30	6.577 ± 1.224	0.0113

Παρουσία αμιλορίδης, οι τιμές του pH_i μεταβάλλονται στο χρονικό διάστημα 0-30 min κατά την μέτρηση τους με την χρήση του παράγοντα BCECF-AM τόσο σε φρέσκο (Διάγραμμα 3.2.1) (Πίνακας 3.2.1) όσο και σε κατεψυγμένο σπέρμα (Διάγραμμα 3.2.2) (Πίνακας 3.2.2).

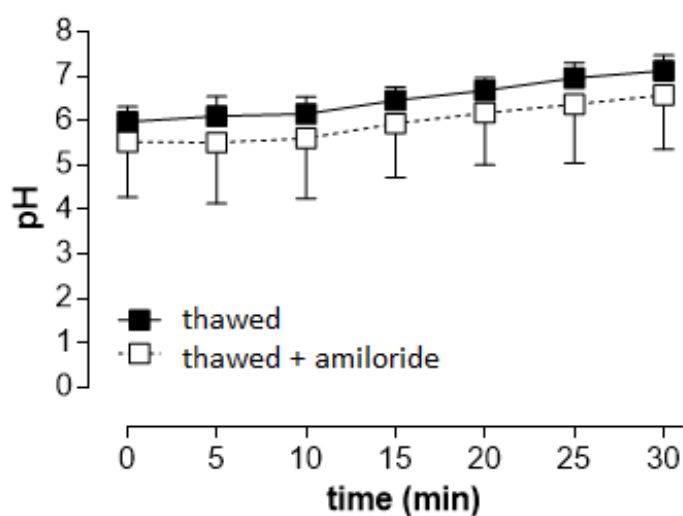
Η παρουσία της αμιλορίδης σε συγκέντρωση 20 nM δε μετέβαλε το pH τόσο στα φρέσκα (Διάγραμμα 3.2.1) (Πίνακας 3.2.1) όσο και στα κατεψυγμένα σπερματοζώαρια (Διάγραμμα 3.2.2) (Πίνακας 3.2.2). Παρατηρήθηκε μία αύξηση στις τιμές του pH_i στα 25 λεπτά σε φρέσκα σπερματοζώαρια και από τα 15 λεπτά στα κατεψυγμένα σπερματοζώαρια (Διάγραμμα 3.2.1) (Διάγραμμα 3.2.2), όπως και στα δείγματα ελέγχου.



Διάγραμμα 3.2.3 – Η μεταβολή του pH_i σε φρέσκο σπέρμα παρουσία αμιλορίδης 20 nM από 0-30 min, σε 4 δείγματα με τιμές pH_i >5.5.

Πίνακας 3.2.3 – Μεταβολές στις τιμές του pH_i σε φρέσκο σπέρμα παρουσία αμιλορίδης 20 nM από 0-30 min, σε 4 δείγματα με τιμές pH_i >5.5.

Χρόνος (min)	Φρέσκο (Mean ± SD)	Φρέσκο + αμιλορίδη (Mean ± SD)
0	6.505 ± 0.643	6.391 ± 0.613
5	6.751 ± 0.833	6.355 ± 0.93
10	6.612 ± 0.859	6.3 ± 0.811
15	6.704 ± 0.85	6.36 ± 0.649
20	6.832 ± 0.856	6.437 ± 0.539
25	6.971 ± 0.977	6.581 ± 0.67
30	7.078 ± 0.987	6.623 ± 0.526



Διάγραμμα 3.2.4 - Η μεταβολή του pH_i σε κατεψυγμένο σπέρμα παρουσία αμιλορίδης 20nM από 0-30 min, σε 4 δείγματα με τιμές $pH_i > 5.5$.

Πίνακας 3.2.4 – Μεταβολές στις τιμές του pH_i σε κατεψυγμένο σπέρμα παρουσία αμιλορίδης 20nM από 0-30 min, σε 4 δείγματα με τιμές $pH_i > 5.5$.

Χρόνος (min)	Κατεψυγμένο (Mean ± SD)	Κατεψυγμένο + αμιλορίδη (Mean ± SD)
0	5.97 ± 0.692	5.52 ± 1.242
5	6.096 ± 0.899	5.504 ± 1.371
10	6.155 ± 0.766	5.603 ± 1.353
15	6.454 ± 0.602	5.938 ± 1.213
20	6.676 ± 0.573	6.171 ± 1.17
25	6.961 ± 0.682	6.37 ± 1.321
30	7.121 ± 0.699	6.577 ± 1.224

4. Συζήτηση

Στην παρούσα μελέτη εκτιμήθηκε αρχικά η επίδραση της κατάψυξης στις παραμέτρους του σπέρματος (όγκο, συγκέντρωση σπερματοζωαρίων, κινητικότητα σπερματοζωαρίων). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα (Πίνακας 3.3.1), η κατάψυξη του σπέρματος, στους -196°C με τη μέθοδο της υαλοποίησης, ελαττώνει σημαντικά την προοδευτική κίνηση των σπερματοζωαρίων και αυξάνει σημαντικά το ποσοστό των ακίνητων σπερματοζωαρίων, ενώ η μη προοδευτική κίνηση των σπερματοζωαρίων δεν παρουσιάζει κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά. Το συγκεκριμένο εύρημα είναι ήδη γνωστό από παρόμοιες μελέτες, οι οποίες έχουν πραγματοποιηθεί σε σπερματοζωάρια. Στις μελέτες αυτές, συγκρίνεται η επίδραση που έχει η βραδεία κατάψυξη και η υαλοποίηση στην κινητικότητα των σπερματοζωαρίων. Μερικές από τις μελέτες αυτές, αναφέρουν ότι η υαλοποίηση εμφανίζει καλύτερα αποτελέσματα σχετικά με την επίδραση στην κινητικότητα των σπερματοζωαρίων (Pabon, 2015), ενώ άλλες αναφέρουν ότι η βραδεία κατάψυξη έχει καλύτερα αποτελέσματα (Le, 2019).

Για την μέτρηση του pH_i χρησιμοποιήθηκε η φθορίζουσα ουσία BCECF η οποία είναι ευαίσθητη για εύρος τιμών pH 6–8, τιμές οι οποίες βρίσκονται μέσα στο όριο των βιολογικών τιμών (Loiselle and Casey, 2010). Το ενδοκυττάριο pH των σπερματοζωαρίων κυμαίνεται φυσιολογικά από 7.2-8 (WHO, 2010) κι επομένως η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε είναι δόκιμη για τη συγκεκριμένη μελέτη. Ο BCECF έχει χρησιμοποιηθεί σε παρόμοιες μελέτες, οι οποίες αφορούσαν ανθρώπινα σπερματοζωάρια (Garcia and Meizel, 1999) (Cross and Razy-Faulkner, 1997). Εναλλακτικά, στις μεθόδους αξιολόγησης του pH_i συμπεριλαμβάνονται τα H^+ διαπερατά μικροηλεκτρόδια και η ανάλυση των μεταβολιτών μέσω NMR, όπου η συχνότητα συντονισμού τους επηρεάζεται από το pH (Wray, 1988) (Kotyk and Slavik, 1989). Στη δεύτερη μέθοδο εισάγεται ένα ηλεκτρόδιο αρκετά μικρό (διαμέτρου $\leq 1\mu\text{m}$), προκειμένου να μην υπάρξει βλάβη στο κύτταρο, διαμέσου της πλασματικής μεμβράνης. Το ηλεκτρόδιο γεμίζεται με διάλυμα χαμηλού pH , δημιουργώντας μία βαθμίδωση H^+ κατά μήκος του, παράγοντας ένα δυναμικό που επηρεάζεται από την εξωκυττάρια συγκέντρωση H^+ και τη διαπερατότητα της μεμβράνης από το H^+ . Στη φασματοσκοπία NMR, μετατοπίζεται η κορυφή του NMR

κατά την πρωτονίωση και αποπρωτονίωση των φωσφορικών ομάδων, η οποία εξαρτάται από το pH, μεταβάλλοντας το ηλεκτρικό περιβάλλον του πυρήνα. Στη μέθοδο αυτή, υπολογίζεται η σχέση της συγκέντρωσης πρωτονιωμένων και αποπρωτονιωμένων μορφών, επιτρέποντας με τον τρόπο αυτό τον εύκολο προσδιορισμό του pH_i (Kotyky and Slavik, 1989).

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων μας έδειξαν ότι στο φρέσκο σπέρμα η παρουσία της αμιλορίδης σε συγκέντρωση 20nM δεν μετέβαλε το pH_i . Ο αριθμός των δειγμάτων που μελετήθηκαν ήταν μικρός (4 δείγματα) για να επιτρέψει ασφαλή συμπεράσματα. Αν και η αντλία Na^+/H^+ έχει βρεθεί ότι εντοπίζεται στα σπερματοζώρια, περιορισμένος αριθμός μελετών δείχνει ότι είναι πιθανό η αντλία να μην εμπλέκεται στη ρύθμιση του ενδοκυττάριου pH των σπερματοζωαρίων (Gatti et al, 1993) (Hamamah et al, 1996) καθώς μπορεί κάτω υπό ορισμένες συνθήκες να είναι ανενεργή (Zeng et al, 1996).

Αν και χρειάζεται μεγαλύτερος αριθμός πειραμάτων για να επιβεβαιώσει το αποτέλεσμα αυτό δεν μπορούμε να αποκλείσουμε ότι η αδυναμία της αμιλορίδης να μεταβάλλει το pH_i μπορεί να οφείλεται στη συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε. Στα σπερματοζώρια βρίσκονται οι ισομορφές NHE1, NHE5 και sNHE (Fuster and Alexander, 2014). Οι συγκεντρώσεις της αμιλορίδης που προκαλούν αναστολή στο 50% (IC_{50}) της NHE είναι 1-1.6μM για την NHE1 και 21 μM για τη NHE5 (Masereel et al, 2003).

Παρόμοια με τα φρέσκα σπερματοζώρια και στα σπερματοζώρια που προηγουμένως είχαν καταψυχθεί, η αμιλορίδη δεν μετέβαλε το ενδοκυττάριο pH. Έχοντας τις ίδιες επιφυλάξεις σχετικά με τον αριθμό των πειραμάτων και τη συγκέντρωση της αμιλορίδης που χρησιμοποιήθηκε μπορούμε να υποθέσουμε ούτε στο κατεψυγμένο σπέρμα ο NHE συμμετέχει στη ρύθμιση του ενδοκυττάριου pH κι ότι η δραστηριότητα της NHE μεταβάλλεται με την κατάψυξη.

Πειράματα από διαφορετικούς επιστήμονες που αφορούσαν τη μελέτη της δραστηριότητας της αντλίας Na^+/H^+ , σε κύτταρα από διαφορετικούς οργανισμούς, κατέληξαν σε σημαντικά συμπεράσματα. Σύμφωνα με τη μελέτη του Mogas και των συνεργατών του (2011), που αφορούσε δείγματα από σκύλο, αποδείχτηκε ότι η αναστολή του ιοντοανταλλάκτη Na^+/H^+ δεν επηρέασε τις μορφολογικές αλλοιώσεις του ακροσώματος που προκλήθηκαν κατά τη διάρκεια της κατάψυξης και της απόψυξης των σπερματοζωαρίων, αλλά ούτε και τη βιωσιμότητά τους. Αντιθέτως, η

αναστολή του συγκεκριμένου ανταλλάκτη προσέφερε σαφή επίδραση στις αλλαγές της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων που προκλήθηκαν κατά τη διάρκεια της κατάψυξης και της απόψυξης. Από την άλλη, σύμφωνα με τη μελέτη του Caiza de la Cueva και των συνεργατών του (1997), που αφορούσε δείγματα από άλογα, αποδείχτηκε ότι ο ανταλλάκτης Na^+/H^+ φαίνεται να έχει σημαντικό ρόλο στην αντοχή των σπερματοζωαρίων, εξαιτίας των επιβλαβών ωσμωτικών καταστάσεων με τις οποίες έρχεται αντιμέτωπο το δείγμα κατά τη διάρκεια της κατάψυξης και της απόψυξης.

Το σύνολο των αποτελεσμάτων της παρούσας μελέτης, αποτελεί ένα κίνητρο με επιτακτική ανάγκη τη διερεύνηση ακόμη περισσότερων δειγμάτων. Προκειμένου να βελτιωθούν τα αποτελέσματα, απαιτείται η τροποποίηση κάποιων διαδικασιών. Στα μελλοντικά μας σχέδια ανήκει η αύξηση της συγκέντρωσης των κυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, για την αξιολόγηση της αντλίας Na^+/H^+ στις μεταβολές του pH_i . Επιπλέον, είναι σημαντικό να αυξηθεί η συγκέντρωση της αμιλορίδης, που έχει χρησιμοποιηθεί στην παρούσα μελέτη, προκειμένου να αξιολογηθεί η δράση της στις ισομορφές NHE, που εντοπίζονται στην πλασματική μεμβράνη των σπερματοζωαρίων. Εναλλακτικά, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί και κάποιος άλλος αναστολέας της αντλίας Na^+/H^+ , ο οποίος θα παρουσιάζει μεγαλύτερη ευαισθησία στις ισομορφές NHE, της πλασματικής μεμβράνης των σπερματοζωαρίων.

5. Βιβλιογραφία

- ❖ Agarwal A., Sharma R. K., Nallella K. P., Thomas A. J. Jr., Alvarez J. G., Sikka S. C. (2006, October). Reactive oxygen species as an independent marker of male factor infertility. *Fertility and sterility*, 86 (4), σσ. 878-885.
- ❖ Aizpurua J., Medrano L., Enciso M., Sarasa J., Romero A., Fernández M. A., Gómez-Torres M. J. (2017, October). New permeable cryoprotectant-free vitrification method for native human sperm. *Human reproduction (Oxford, England)*, 32 (10), σσ. 2007-2015.
- ❖ Alvarez J. G., Lasso J. L., Blasco L., Nuñez R. C., Heyner S., Caballero P. P., Storey B. T. (1993, July). Centrifugation of human spermatozoa induces sublethal damage; separation of human spermatozoa from seminal plasma by a dextran swim-up procedure without centrifugation extends their motile lifetime. *Human reproduction (Oxford, England)*, 8 (7), σσ. 1087-1992.
- ❖ Amann R. P. and Pickett B. W. (1987). Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science*, 7 (3), σσ. 145-173.
- ❖ Amidi F., Pazhohan A., Nashtaei M. S., Khodarahmian M., Nekoonam S. (2016, December). The role of antioxidants in sperm freezing: a review. *Cell and Tissue Banking*, 17 (4), σσ. 754-756.
- ❖ Arakawa T., Carpenter J. F., Kita Y. A., Crowe J. H. (1990). The basis for toxicity of certain cryoprotectants. *Cryobiology*, 27, σσ. 401-415.
- ❖ Bailey J. L., Lessard C., Jacques J., Brèque C., Dobrinski I., Zeng W., Galantino-Homer H. L. (2008, November). Cryopreservation of boar semen and its future importance to the industry. *Theriogenology*, 70 (8), σσ. 1251-1259.
- ❖ Behrman S. J. and Sawada Y. (1966, July-August). Heterologous and Homologous Inseminations with Human Semen Frozen and Stored in a Liquid-Nitrogen Refrigerator. *Fertility and Sterility*, 17 (4), σσ. 457-466.
- ❖ Bell S. M., Schreiner C. M., Schultheis P. J., Miller M. L., Evans R. L., Vorhees C. V., Shull G. E., Scott W. J. (1999, April). Targeted disruption of the murine Nhe1 locus induces ataxia, growth retardation, and seizures. *The American journal of physiology*, 276 (4), σσ. C788-795.
- ❖ Bilodeau J. F., Chatterjee S., Sirard M. A., Gagnon C. (2000, March). Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. *Molecular reproduction and development*, 55 (3), σσ. 282-288.

- ❖ Boissonneault G. (2002, March). Chromatin remodeling during spermiogenesis: a possible role for the transition proteins in DNA strand break repair. *FEBS letters*, 514 (2-3), σσ. 111-114.
- ❖ Boron W. F. (2004, December). Regulation of intracellular pH. *Advances in physiology education*, 28 (1-4), σσ. 160-179.
- ❖ Brett C. L., Donowitz M., Rao R. (2005, February). Evolutionary origins of eukaryotic sodium/proton exchangers. *American journal of physiology. Cell physiology*, 288 (2), σσ. C223-239.
- ❖ Brotherton J., (1990, March). Cryopreservation of Human Semen. *Journal Archives of Andrology*, 25 (2), σσ. 181-195.
- ❖ Caiza de la Cueva F. I., Pujol M. R., Rigau T., Bonet S., Miró J., Briz M., Rodriguez-Gill J. E. (1997, October). Resistance to osmotic stress of horse spermatozoa: The role of ionic pumps and their relationship to cryopreservation success. *Theriogenology*, 48 (6), σσ. 947-968.
- ❖ Chambrey R., Achard J. M., Warnock D. G. (1997, January). Heterologous expression of rat NHE4: A highly amiloride-resistant Na^+/H^+ exchanger isoform. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 272 (1 1-41), σσ. C90-C98.
- ❖ Chatterjee S. and Gagnon C. (2001, August). Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing. *Molecular reproduction and development*, 59 (4), σσ. 451-458.
- ❖ Chatterjee S., Schmidt S., Pouli S., Honisch S., Alkahtani S., Stournaras C., Lang F. (2014, May). Membrane androgen receptor sensitive Na^+/H^+ exchanger activity in prostate cancer cells. *The FEBS Journal*, 588 (9), σσ. 1571-1579.
- ❖ Chaytor J. L., Tokarew J. M., Wu L. K., Leclère M., Tam R. Y., Capicciotti C. J., Guolla L., von Moos E., Findlay C. S., Allan D. S., Ben R. N. (2012, January). Inhibiting ice recrystallization and optimization of cell viability after cryopreservation. *Glycobiology*, 22 (1), σσ. 123-133.
- ❖ Chen Y., Li L., Qian Y., Xu C., Zhu Y., Huang H., Jin F., Ye Y. (2015, August). Small-volume vitrification for human spermatozoa in the absence of cryoprotectants by using Cryotop. *Andrologia*, 47 (6), σσ. 691-699.
- ❖ Colás C., Junquera C., Pérez-Pé R., Cebrián-Pérez J. A., Muiño-Blanco T. (2009, August). Ultrastructural study of the ability of seminal plasma proteins to protect ram spermatozoa against cold-shock. *Microscopy research and technique*, 72 (8), σσ. 566-572.

- ❖ Critser J. K., Huse-Benda A. R., Aaker D. V., Arneson B. W., Ball G. D. (1988, August). Cryopreservation of human spermatozoa. III. The effect of cryoprotectants on motility. *Fertility and sterility*, 50 (2), σσ. 314-320.
- ❖ Cross N. L. and Razy-Faulkner P. (1997, May). Control of human sperm intracellular pH by cholesterol and its relationship to the response of the acrosome to progesterone. *Biology of Reproduction*, 56 (5), σσ. 1169-1174.
- ❖ de Paula T. S., Bertolla R. P., Spaine D. M., Cunha M. A., Schor N., Cedenho A. P. (2006, September). Effect of cryopreservation on sperm apoptotic deoxyribonucleic acid fragmentation in patients with oligozoospermia. *Fertility and sterility*, 86 (3), σσ. 597-600.
- ❖ De Vito P. (2006, April). The sodium/hydrogen exchanger: a possible mediator of immunity. *Cell immunology*, 240 (2), σσ. 69-85.
- ❖ Esposito G., Jaiswal B. S., Xie F., Krajnc-Franken M. A., Robben T. J., Strik A. M., Kuil C., Philipsen R. L., van Duin M., Conti M., Gossen J. A. (2004, March). Mice deficient for soluble adenylyl cyclase are infertile because of a severe sperm-motility defect. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101 (9), σσ. 2993-2998.
- ❖ Fabbri R., Ciotti P. M., Di Tommaso B., Magrini O., Notarangelo L., Porcu E., Contro E., Venturoli S. (2004). Tecniche di crioconservazione riproduttiva. *Rivista Italiana di Ostetricia e Ginecologia*, 3, σσ. 33-41.
- ❖ Fliegel L. (2005, January). The Na⁺/H⁺ exchanger isoform 1. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 37 (1), σσ. 33-37.
- ❖ Fuster D. G. and Alexander R. T. (2014, January). Traditional and emerging roles for the SLC9 Na⁺/H⁺ exchangers. *Pflügers Archiv : European journal of physiology*, 466 (1), σσ. 61-76.
- ❖ Futsaether C. M., Kjeldstad B., Johnsson A. (1993). Measurement of the intracellular pH of *Propionibacterium acnes*: comparison between the fluorescent probe BCECF and ³¹P-NMR spectroscopy. *Canadian Journal of Microbiology*, 39 (2), σσ. 180-186.
- ❖ Gandini L., Lombardo F., Lenzi A., Spanò M., Dondero F. (2006, June). Cryopreservation and Sperm DNA Integrity. *Cell and Tissue Banking*, 7 (2), σσ. 91-98.
- ❖ Garcia M. A. and Meizel S. (1999, February). Regulation of intracellular pH in capacitated human spermatozoa by a Na⁺/H⁺ exchanger. *Molecular reproduction and development*, 52 (2), σσ. 189-195.

- ❖ Garty H. and Benos D. J. (1988, April). Characteristics and regulatory mechanisms of the amiloride-blockable Na⁺ channel. *Physiological reviews*, 68 (2), σσ. 309-373.
- ❖ Gatti J. L., Chevrier C., Paquignon M., Dacheux J. L. (1993, July). External ionic conditions, internal pH and motility of ram and boar spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, 98 (2), σσ. 439-449.
- ❖ Gilmore J. A., Liu J., Gao D. Y., Critser J. K. (1997, January). Determination of optimal cryoprotectants and procedures for their addition and removal from human spermatozoa. *Human Reproduction*, 12 (1), σσ. 112-118.
- ❖ Gosálvez J., Núñez R., Fernández J. L., López - Fernández C., Caballero P. (2009, October). Dynamics of sperm DNA damage in fresh versus frozen-thawed and gradient processed ejaculates in human donors. *Andrologia*, 43, σσ. 373-377.
- ❖ Graham J. K. and Foote R. H. (1987, February). Dilauroylphosphatidylcholine liposome effects on the acrosome reaction and in vitro penetration of zona-free hamster eggs by bull sperm: II. A fertility assay for frozen-thawed semen. *Gamete research*, 16 (2), σσ. 147-158.
- ❖ Gu S., Papadopoulou N., Gehring E. M., Nasir O., Dimas K., Bhavsar S. K., Föller M., Alevizopoulos K., Lang F., Stournaras C. (2009, December). Functional membrane androgen receptors in colon tumors trigger pro-apoptotic responses in vitro and reduce drastically tumor incidence in vivo. *Molecular cancer*, 8, σ. 114.
- ❖ Hamamah S., Magnoux E., Royere D., Barthelemy C., Dacheux J. L., Gatti J. L. (1996, April). Internal pH of human spermatozoa: effect of ions, human follicular fluid and progesterone. *Molecular Human Reproduction*, 2 (4), σσ. 219-224.
- ❖ Hammadeh M. E., Askari A. S., Georg T., Rosenbaum P., Schmidt W. (1999, June). Effect of freeze-thawing procedure on chromatin stability, morphological alteration and membrane integrity of human spermatozoa in fertile and subfertile men. *International journal of andrology*, 22 (3), σσ. 155-162.
- ❖ Hammerstedt R. H., Graham J. K., Nolan J. P. (1990, January-February). Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *Journal of andrology*, 11 (1), σσ. 73-88.
- ❖ Haugen T. B. and Grotmol T. (1998, May). pH of human semen. *International Journal of Andrology*, 21 (2), σσ. 105-108.

- ❖ Heming T. A., Bidani A. (1995, April). Na(+)-H+ exchange in resident alveolar macrophages: activation by osmotic cell shrinkage. *Journal of leukocyte biology*, 57 (4), σσ. 609-616.
- ❖ Hess K. C., Jones B. H., Marquez B., Chen Y., Ord T. S., Kamenetsky M., Miyamoto C., Zippin J. H., Kopf G. S., Suarez S. S., Levin L. R., Williams C. J., Buck J., Moss S. B. (2005, August). The "soluble" adenylyl cyclase in sperm mediates multiple signaling events required for fertilization. *Developmental cell*, 9 (2), σσ. 249-259.
- ❖ Hoagland H. and Pincus G. (1942, January). Revival of mammalian sperm after immersion in liquid nitrogen. *The journal of general physiology*, 25 (3), σσ. 337-344.
- ❖ Hoffmann E. K., Lambert I. H., Pedersen S. F. (2009, January). Physiology of cell volume regulation in vertebrates. *Physiological reviews*, 89 (1), σσ. 193-277.
- ❖ Hosogi S., Miyazaki H., Nakajima K., Ashihara E., Niisato N., Kusuzaki K., Marunaka Y. (2012). An Inhibitor of Na⁺/H⁺ Exchanger (NHE), Ethyl-Isopropyl Amiloride (EIPA), Diminishes Proliferation of MKN28 Human Gastric Cancer Cells by Decreasing the Cytosolic Cl⁻ Concentration via DIDS-Sensitive Pathways. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 30, σσ. 1241-1253.
- ❖ Isachenko E., Isachenko V., Katkov I. I., Dessole S., Nawroth F. (2003, March). Vitrification of mammalian spermatozoa in the absence of cryoprotectants: from past practical difficulties to present success. *Reproductive biomedicine online*, 6 (2), σσ. 191-200.
- ❖ Isachenko E., Isachenko V., Weiss J. M., Kreienberg R., Katkov I. I., Schulz M., Lulat A. G., Risopatrón M. J., Sánchez R. (2008, August). Acrosomal status and mitochondrial activity of human spermatozoa vitrified with sucrose. *Reproduction (Cambridge, England)*, 136 (2), σσ. 167-173.
- ❖ Isachenko V., Isachenko E., Katkov I. I., Montag M., Dessole S., Nawroth F., Van Der Ven H. (2004, October). Cryoprotectant-free cryopreservation of human spermatozoa by vitrification and freezing in vapor: effect on motility, DNA integrity, and fertilization ability. *Biology of reproduction*, 17 (4), σσ. 1167-1173.
- ❖ Isachenko V., Isachenko E., Petrunkina A. M., Sanchez R. (2012a). Human spermatozoa vitrified in the absence of permeable cryoprotectants: birth of two healthy babies. *Reproduction, fertility and development*, 24 (2), σσ. 323-326.

- ❖ Isachenko V., Maettner R., Petrunkina A. M., Sterzik K., Mallmann P., Rahimi G., Sanchez R., Risopatron J., Damjanoski I., Isachenko E. (2012b, May-June). Vitrification of human ICSI/IVF spermatozoa without cryoprotectants: new capillary technology. *Journal of andrology*, 33 (3), σσ. 462-468.
- ❖ Johnson L. A., Weitze K. F., Fiser P., Maxwell W. M. (2000, August). Storage of boar semen. *Animal reproduction science*, 62 (1-3), σσ. 143-172.
- ❖ Jothipriya R., Sasikumar S., Madhankumar E. K., Pranetha A., Kalaiselvi S. (2014, December). A study of Hypo Osmotic Swelling Test in Human Spermatozoa. *International Journal of Current Research and Academic Review*, 2 (12), σσ. 47-63.
- ❖ Jungwirth A., Diemer T., Dohle G. R., Giwercman A., Kopa Z., Krausz C., Tournaye H. (2015). Guidelines on male infertility. *European Association of Urology 2015*.
- ❖ Kallergi G., Agelaki S., Markomanolaki H., Georgoulas V., Stournaras C. (2007). Activation of FAK/PI3K/Rac1 signaling controls actin reorganization and inhibits cell motility in human cancer cells. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 20 (6), σσ. 997-986.
- ❖ Kampa M., Pelekanou V., Castanas E. (2008, October). Membrane-initiated steroid action in breast and prostate cancer. *Steroids*, 73 (9-10), σσ. 953-960.
- ❖ Karthikeyan M., Arakkal D., Mangalaraj A. M., Kamath M. S. (2019, April-June). Comparison of Conventional Slow Freeze versus Permeable Cryoprotectant-Free Vitrification of Abnormal Semen Sample: A Randomized Controlled Trial. *Journal of Human Reproductive Sciences*, 12 (2), σσ. 150-155.
- ❖ Katz D. J., Teloken P., Shoshany O. (2017, September). Male infertility – The other side of the equation. *AFP*, 46 (9), σσ. 641-646.
- ❖ Kinsella J. L. and Aronson P. S. (1981, October). Amiloride inhibition of the $\text{Na}^+\text{-H}^+$ exchanger in renal microvillus membrane vesicles. *The American journal of physiology*, 241 (4), σσ. F374-379.
- ❖ Kotys A. S. and Slavik J. (1989, April). Intracellular pH and Its Measurement. *CRC Press*, σ. 192.
- ❖ Lang F., Busch G. L., Ritter M., Völkl H., Waldegger S., Gulbins E., Häussinger D. (1998, January). Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. *Physiological reviews*, 78 (1), σσ. 247-306.

- ❖ Lang F., Madlung J., Bock J., Lükewille U., Kaltenbach S., Lang K. S., Belka C., Wagner C. A., Lang H. J., Gulbins E., Lepple-Wienhues A. (2000, October). Inhibition of Jurkat-T-lymphocyte Na^+/H^+ -exchanger by CD95(Fas/Apo-1)-receptor stimulation. *Pflügers Archiv : European journal of physiology*, 440 (6), σσ. 902-907.
- ❖ Lasso J. L., Noiles E. E., Alvarez J. G., Storey B. T. (1994, June-July). Mechanism of superoxide dismutase loss from human sperm cells during cryopreservation. *Journal of andrology*, 15 (3), σσ. 255-265.
- ❖ Le M. T., Nguyen T. T. T., Nguyen T. T., Nguyen Ω. T., Nguyen T. T. A., Nguyen V. Q. H., Cao N. T. (2019, March). Cryopreservation of human spermatozoa by vitrification versus conventional rapid freezing: Effects on motility, viability, morphology and cellular defects. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 234, σσ. 14-20.
- ❖ Liu Y., Wang D. K., Chen L. M. (2012, April). The physiology of bicarbonate transporters in mammalian reproduction. *Biology of reproduction*, 86 (4), σ. 99.
- ❖ Loisel F. B. and Casey J. R. (2010, March). Measurement of Intracellular pH. *Q. Yan (ed.), Membrane Transporters in Drug Discovery and Development, Methods in Molecular Biology*, 637.
- ❖ Luo J. and Sun D. (2007, August). Physiology and pathophysiology of Na^+/H^+ exchange isoform 1 in the central nervous system. *Current neurovascular research*, 4 (3), σσ. 205-215.
- ❖ Ma E. and Haddad G. G., (1997, July). Expression and localization of Na^+/H^+ exchangers in rat central nervous system. *Neuroscience*, 79 (2), σσ. 591-603.
- ❖ Mahadevan M. and Trounson A. O. (1984). Effect of cooling, freezing and thawing rates and storage conditions on preservation of human spermatozoa. *Andrologia*, 16 (1), σσ. 52-60.
- ❖ Martins A. D., Bernardino R. L., Neuhaus-Oliveira A., Sousa M., Sá R., Alves M. G., Oliveira P. F. (2014, July). Physiology of Na^+/H^+ Exchangers in the Male Reproductive Tract: Relevance for Male Fertility. *Biology of Reproduction*, 91 (1), σσ. 1-6.
- ❖ Masereel B., Pochet L., Laeckmann D. (2003, June). An overview of inhibitors of Na^+/H^+ exchanger. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 38 (6), σσ. 547-554.
- ❖ Mogas M. T., del Álamo M. R., Rodríguez-Gil J. E. (2011, June). Roles of Na^+/K^+ -dependent ATPase, Na^+/H^+ antiporter and GLUT hexose transporters in the cryosurvival of dog spermatozoa: Effects on viability, acrosome state

- and motile sperm subpopulation structure. *Theriogenology*, 75 (9), σσ. 1669-1681.
- ❖ Morris J. G., (2006, August). Rapidly cooled human sperm: no evidence of intracellular ice formation. *Human Reproduction*, 21 (8), σσ. 2075-2083.
 - ❖ Moskovtsev S. I., Lulat G. M., Librach C. L. (2012.). Cryopreservation of Human Spermatozoa by Vitrification vs. Slow Freezing: Canadian Experience. *Current Frontiers in Cryobiology*.
 - ❖ Mossad H., Morshedi M., Toner J. P., Oehninger S. (1994, July-August). Impact of cryopreservation on spermatozoa from infertile men: implications for artificial insemination. *Archives of andrology*, 33 (1), σσ. 51-57.
 - ❖ National Institute for Health and Care Excellence. (2013, February). Fertility problems: assessment and treatment. London, Nice.
 - ❖ Nawroth F., Isachenko V., Dessole S., Rahimi G., Farina M., Vargiu N., Mallmann P., Dattena M., Capobianco G., Peters D., Orth I., Isachenko E. (2002, March-April). Vitrification of human spermatozoa without cryoprotectants. *Cryo Letters*, 23 (2), σσ. 93-102.
 - ❖ Nishigaki T., José O., González-Cota A. L., Romero F., Treviño C. L., Darszon A. (2014, August). Intracellular pH in Sperm Physiology. *Biochemical and biophysical research communications*, 450 (3), σσ. 1149-1158.
 - ❖ O'Connell M., McClure N., Lewis S. E. (2002). The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. *Human reproduction (Oxford, England)*, 17 (3), σσ. 704-709.
 - ❖ Orłowski J. and Grinstein S. (2004, February). Diversity of the mammalian sodium/proton exchanger SLC9 gene family. *Pflügers Archiv : European journal of physiology*, 447 (5), σσ. 549-565.
 - ❖ Ozkavukcu S., Erdemli E., Isik A., Oztuna D., Karahuseyinoglu S. (2008, August). Effects of cryopreservation on sperm parameters and ultrastructural morphology of human spermatozoa. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 25 (8), σσ. 403-411.
 - ❖ Pabon D., Meseguer M., Sevillano G., Cobo A., Romero J., Sota N., Mifsud A., de los Santos J., Remohi J., de los Santos M. (2015, September). Effect of human sperm freezing-thawing process on vitrification and conventional freezing: evaluation of survival, motility, DNA oxidation and mitochondrial activity. *Fertility and Sterility*, 104 (3), σσ. E272.
 - ❖ Papadopoulou N., Charalampopoulos I., Alevizopoulos K., Gravanis A., Stournaras C. (2008, October). Rho/ROCK/actin signaling regulates

- membrane androgen receptor induced apoptosis in prostate cancer cells. *Experimental cell research*, 314 (17), σσ. 3162-3174.
- ❖ Papakonstanti E. A., Kampa M., Castanas E., Stournaras C. (2003, May). A rapid, nongenomic, signaling pathway regulates the actin reorganization induced by activation of membrane testosterone receptors. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 17 (5), σσ. 870-881.
 - ❖ Parkes A. S. (1945, August). Preservation of Spermatozoa at Low Temperatures. *British medical journal*, 2 (4415), σσ. 212-213.
 - ❖ Parks J. E. and Graham J. K. (1992). Effects of cryopreservation procedurew on sperm membranes. *Theriogenology*, 38, σσ. 209-222.
 - ❖ Polge C., Smith A. U., Parkes A. S. (1949, October). Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, 164 (4172), σ. 666.
 - ❖ Quill T. A., Wang D., Garbers D. L. (2006, May). Insights into sperm cell motility signaling through sNHE and the CatSpers. *Molecular and cellular endocrinology*, 250 (1-2), σσ. 84-92.
 - ❖ Ren D., Navarro B., Perez G., Jackson A. C., Hsu S., Shi Q., Tilly J. L., Clapham D. E. (2001, October). A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature*, 413 (6856), σσ. 603-609.
 - ❖ Rienzi L., Gracia C., Maggiulli R., LaBarbera A. R., Kaser D. J., Ubaldi F. M., Vanderpoel S., Racowsky C. (2017, March). Oocyte, embryo and blastocyst cryopreservation in ART: systematic review and meta-analysis comparing slow-freezing versus vitrification to produce evidence for the development of global guidance. *Human Reproductive Update*, 23 (2), σσ. 139-155.
 - ❖ Ruffin V. A., Salameh A. I., Boron W. F., Parker M. D. (2014, February). Intracellular pH regulation by acid-base transporters in mammalian neurons. *Frontiers in physiology*, 5, σ. 43.
 - ❖ Said T. M., Gaglani A., Agarwal A. (2010, October). Implication of apoptosis in sperm cryoinjury. *Reproductive biomedicine online*, 21 (4), σσ. 456-462.
 - ❖ Salamon S. and Maxwell W. M. C. (1995, February). Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Animal Reproduction Science*, 37 (3-4), σσ. 185-249.
 - ❖ Sanchez R., Isachenko V., Petrunkina A. M., Risopatron J., Schulz M., Isachenko E. (2012, July-August). Live birth after intrauterine insemination with spermatozoa from an oligoasthenozoospermic patient vitrified without permeable cryoprotectants. *Journal of andrology*, 33 (4), σσ. 559-562.

- ❖ Sánchez R., Risopatrón J., Schulz M., Villegas J. V., Isachenko V., Isachenko E. (2012, December). Vitri-fied sperm banks: the new aseptic technique for human spermatozoa allows cryopreservation at -86 °C. *Andrologia*, 44 (6), σσ. 433-435.
- ❖ Santi C. M., Martínez-López P., de la Vega-Beltrán J. L., Butler A., Alisio A., Darszon A., Salkoff L. (2010, March). The SLO3 sperm-specific potassium channel plays a vital role in male fertility. *FEBS letters*, 584 (5), σσ. 1041-1046.
- ❖ Schackmann R. W. and Chock P. B. (1986, July). Alteration of intracellular $[Ca^{2+}]$ in sea urchin sperm by the egg peptide speract. Evidence that increased intracellular Ca^{2+} is coupled to Na^{+} entry and increased intracellular pH. *The Journal of biological chemistry*, 261 (19), σσ. 8719-8728.
- ❖ Schuster T. G., Keller L. M., Dunn R. L., Ohl D. A., Smith G. D. (2003, April). Ultra-rapid freezing of very low numbers of sperm using cryoloops. *Human reproduction (Oxford, England)*, 18 (4), σσ. 788-795.
- ❖ Sharma R., Kattoor A. J., Ghulmiyyah J., Agarwal A. (2015). Effect of sperm storage and selection techniques on sperm parameters. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 61 (1), σσ. 1-12.
- ❖ Shi Y., Kim D., Caldwell M., Sun D. (2012). The Role of Na^{+}/H^{+} Exchanger Isoform 1 in Inflammatory Responses: Maintaining H^{+} Homeostasis of Immune Cells. *Sodium Calcium Exchange: A Growing Spectrum of Pathophysiological Implications. Advances in Experimental Medicine and Biology*, 961, σσ. 411-418.
- ❖ Silva P. F. and Gadella B. M. (2006, March). Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology*, 65 (5), σσ. 958-978.
- ❖ Slepko E. R., Rainey J. K., Li X., Liu Y., Cheng F. J., Lindhout D. A., Sykes B. D., Fliegel L. (2005, May). Structural and functional characterization of transmembrane segment IV of the NHE1 isoform of the Na^{+}/H^{+} exchanger. *The Journal of biological chemistry*, 280 (18), σσ. 17863-17872.
- ❖ Steponkus P. L. and Lynch D. V. (1989, February). Freeze/thaw-induced destabilization of the plasma membrane and the effects of cold acclimation. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 21 (1), σσ. 21-41.
- ❖ Sun X. H., Zhu Y. Y., Wang L., Liu H. L., Ling Y., Li Z. L., Sun L. B. (2017). The Catsper channel and its roles in male fertility: a systematic review. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 15, σ. 65.
- ❖ Szabó E. Z., Numata M., Shull G. E., Orlowski J. (2000, March). Kinetic and pharmacological properties of human brain Na^{+}/H^{+} exchanger isoform 5

- stably expressed in Chinese hamster ovary cells. *Journal of Biological Chemistry*, 275 (9), σσ. 6302-6307.
- ❖ Taylor K., Roberts P., Sanders K., Burton P. (2009, February). Effect of antioxidant supplementation of cryopreservation medium on post-thaw integrity of human spermatozoa. *Reproductive biomedicine online*, 18 (2), σσ. 184-189.
 - ❖ Thachil J. V. and Jewett M. A. S. (1981). Preservation techniques for human semen. *Fertility and Sterility*, 35 (5), σσ. 546-548.
 - ❖ Thomson L. K., Fleming S. D., Aitken R. J., De Iuliis G. N., Zieschang J. A., Clark A. M. (2009, June). Cryopreservation-induced human sperm DNA damage is predominantly mediated by oxidative stress rather than apoptosis. *Human reproduction*, 24 (9)z, σσ. 2061-2070.
 - ❖ Tournaye H., Goossens E., Verheyen G., Frederickx V., De Block G., Devroey P., Van Steirteghem A. (2004, November-December). Preserving the reproductive potential of men and boys with cancer: current concepts and future prospects. *Human reproductive update*, 10 (6), σσ. 225-232.
 - ❖ Verza S. J., Feijo C. M., Esteves S. C. (2009, September-October). Resistance of human spermatozoa to cryoinjury in repeated cycles of thaw-refreezing. *International braz.j urol : official journal of the Brazilian Society of Urology*, 35 (5), σσ. 581-590.
 - ❖ Wang A. W., Zhang H., Ikemoto I., Anderson D. J., Loughlin K. R. (1997, June). Reactive oxygen species generation by seminal cells during cryopreservation. *Urology*, 49 (6), σσ. 921-925.
 - ❖ Wang D., King S. M., Quill T. A., Doolittle L. K., Garbers D. L. (2003, December). A new sperm-specific Na^+/H^+ exchanger required for sperm motility and fertility. *Nature cell biology*, 5 (12), σσ. 1117-1222.
 - ❖ Wang D., Hu J., Bobulescu I. A., Quill T. A., McLeroy P., Moe O. W., Garbers D. L. (2007, May). A sperm-specific Na^+/H^+ exchanger (sNHE) is critical for expression and in vivo bicarbonate regulation of the soluble adenylyl cyclase (sAC). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104 (22), σσ. 9325-9330.
 - ❖ Winters B. R. and Walsh T. J. (2014, February). The epidemiology of male infertility. *The Urologic clinics of North America*, 41 (1), σσ. 195-204.
 - ❖ Wolters-Everhardt E., Dony J. M., Lemmens W. A., Doesburg W. H., De Pont J. J. (1986, July). Buffering capacity of human semen. *Fertility and sterility*, 46 (1), σσ. 114-119.

- ❖ Woo A. L., James P. F., Lingrel J. B. (2002, July). Roles of the Na,K-ATPase alpha4 isoform and the Na⁺/H⁺ exchanger in sperm motility. *Molecular reproduction and development*, 62 (3), σσ. 348-356.
- ❖ World Health Organization (2010). WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen. 5th edition. Cambridge: Cambridge University Press. Ανάκτηση από Cambridge: Cambridge University Press.
- ❖ World Health Organization (2011). Introduction to reproductive health and the environment. (Draft for review).
- ❖ Wray S. (1988, February). Smooth muscle intracellular pH: measurement, regulation, and function. *The American journal of physiology*, 254 (2 Pt 1), σσ. C213-225.
- ❖ Zeng Y., Oberdorf J. A., Florman H. M. (1996, February). pH regulation in mouse sperm: identification of Na⁺-, Cl⁻-, and HCO₃⁻-dependent and arylaminobenzoate-dependent regulatory mechanisms and characterization of their roles in sperm capacitation. *Developmental Biology*, 173 (2), σσ. 510–520.
- ❖ Zribi N., Feki Chakroun N., El Euch H., Gargouri J., Bahloul A., Ammar Keskes L. (2010, January). Effects of cryopreservation on human sperm deoxyribonucleic acid integrity. *Fertility and sterility*, 93 (1), σσ. 159-166.
- ❖ <https://www.dojindo.com/store/p/157-BCECF-AM.html>
- ❖ https://www.stepwards.com/?page_id=1788