



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

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 στο ενδοκυτταρικό pH των σπερματοζωαρίων»



ΛΑΜΠΡΟΠΟΥΛΟΥ ΖΩΗ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

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

ΛΑΡΙΣΑ

Οκτώβριος 2019

Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Εξεταστικής Επιτροπής:

**1^{ος} Εξεταστής
(Επιβλέπων)**

Γεώργιος-Σπυρίδων Ανυφαντής
Επίκουρος Καθηγητής Εμβρυολογίας, Τμήμα Ιατρικής
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

2^{ος} Εξεταστής

Αλέξανδρος Δαπόντε
Καθηγητής Μαιευτικής και Γυναικολογίας, Τμήμα Ιατρικής
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

3^{ος} Εξεταστής

Αποστολία Χατζηευθυμίου
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιατρικής Φυσιολογίας, Τμήμα
Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Για την διεξαγωγή της παρούσας εργασίας θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Αλέξανδρο Δαπόντε, Καθηγητή Μαιευτικής και Γυναικολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, που με αποδέχθηκε στο πρόγραμμα Μεταπτυχιακών σπουδών «Βιολογία της Αναπαραγωγής- Βιοδείκτες στη Μαιευτική και Γυναικολογία- Περιγεννητική Ιατρική» και είχα την τιμή να το παρακολουθήσω.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τους επιβλέποντές μου, κ. Γεώργιο-Σπυρίδων Ανυφαντή, Επίκουρο Καθηγητή Εμβρυολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και την κ. Αποστολία Χατζηευθυμίου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιατρικής Φυσιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για την παρακολούθηση και την εποπτεία καθόλη την διάρκεια διεξαγωγής και εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας.

Ζωή Λαμπροπούλου

«Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΚΑΤΑΨΥΞΗΣ ΣΤΟ ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ pH ΤΩΝ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΩΝ »

ΛΑΜΠΡΟΠΟΥΛΟΥ ΖΩΗ

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Ιατρικής, 2019

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ Ι. ΔΑΠΟΝΤΕ

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΜΑΙΕΥΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

**Επιβλέπων:
(Επιβλέπων)**

Γεώργιος-Σπυρίδων Ανυφαντής
Επίκουρος Καθηγητής Εμβρυολογίας, Τμήμα Ιατρικής
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Σύμβουλος :

Αλέξανδρος Δαπόντε
Καθηγητής Μαιευτικής και Γυναικολογίας, Τμήμα Ιατρικής
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Μέλος :

Αποστολία Χατζηευθυμίου
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιατρικής Φυσιολογίας, Τμήμα
Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Αντικείμενο μελέτης της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτελεί η διερεύνηση της επίδρασης της κρυοσυντήρησης, και συγκεκριμένα της υαλοποίησης, στο ενδοκυττάριο pH (pH_i) των ανθρώπινων σπερματοζωαρίων. Η διαδικασία μέτρησης του pH_i περιλάμβανε, τη συλλογή δειγμάτων και την εκτίμηση των παραμέτρων του σπέρματος πριν την κατάψυξη και μετά την απόψυξη των δειγμάτων. Για τη μέτρηση του pH_i , χρησιμοποιήθηκε μέθοδος φθορισμού με τη βοήθεια του ανιχνευτή BCECF. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι η PRM εμφάνισε σημαντική μείωση μετά την απόψυξη, από 49.73 ± 16.40 σε 31.11 ± 10.59 με $p=0.0039$, ενώ η IM αυξήθηκε από 24.67 ± 8.902 σε 46.67 ± 13.45 με $p=0.0001$ και η NPM δεν παρουσίασε καμία στατιστικά σημαντική μεταβολή. Ο μέσος όρος pH_i σε φρέσκα σπερματοζωάρια ήταν 7.124 ± 0.9605 . Αν και τα σπερματοζωάρια, μετά από κατάψυξη, είχαν πιο όξινο pH (6.861 ± 1.071) σε σύγκριση με τα φρέσκα, σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας φαίνεται η κατάψυξη να μην επηρεάζει σημαντικά το pH_i των σπερματοζωαρίων. Ο αριθμός των δειγμάτων ήταν πολύ μικρός και ως εκτούτου για την διεξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων χρειάζεται περεταίρω διερεύνηση.

ABSTRACT

The aim of the present study was to investigate the possible effect of cryopreservation and especially of vitrification, on the intracellular pH (pH_i) of human spermatozoa. The whole study was conducted in the Obstetrics and Gynecology Department of Medical School of University of Thessaly. The process involves semen collection and analysis so as before cryopreservation as well as after thawing. For that purpose it was used, fluorescence method by using a BCECF detector. The results showed that PRM was significantly reduced after thawing from 49.73 ± 16.40 to 31.11 ± 10.59 with $p=0.0039$, while immotility was increased from 24.67 ± 8.902 to 46.67 ± 13.45 with $p=0.0001$. The mean pH_i in fresh samples was 7.1. After thawing the mean pH_i was 6.86 which was a little bit acid, but did not reach significant level in comparison to the pH_i of fresh samples. The number of cases studied was relatively small and therefore more samples are needed in order to clarify the above results.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	5
ABSTRACT.....	6
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
1. Ιστορική αναδρομή.....	8
2. Κρυοσυντήρηση σπερματοζωαρίων.....	9
2.1 Μέθοδοι κρυοσυντήρησης.....	10
2.2 Κρυοπροστατευτικά υλικά CPAs.....	11
2.3 Αργή κατάψυξη.....	12
2.4 Υαλοποίηση.....	13
2.5 Επιδράσεις της κρυοσυντήρησης.....	14
3. Ενδοκυττάριο pH (pH_i)	16
3.1 Κατιονικός διάυλος σπέρματος, CatSper.....	18
3.2 Ρύθμιση του CatSper.....	20
ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	22
ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ.....	23
1. Συλλογή δειγμάτων.....	23
2. Εκτίμηση σπέρματος.....	24
3. Μέτρηση ενδοκυτταρίου pH (pH_i) σε σπερματοζωάρια.....	25
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	29
1. Μεταβολές των παραμέτρων του σπέρματος με την κατάψυξη.....	29
2. Μεταβολές του pH_i με την κατάψυξη.....	30
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	34
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....	36
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	37

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Ιστορική αναδρομή

Το ενδιαφέρον για την αποθήκευση και την κρυοσυντήρηση του σπέρματος χρονολογείται από το 1776, όταν ο Lazaro Spallanzani, ένας ιταλός ιερέας και φυσιολόγος, διαπίστωσε ότι το σπέρμα ακινητοποιείται όταν ψύχεται στο χιόνι. Σε λιγότερο από 100 χρόνια αργότερα, ένας άλλος Ιταλός επιστήμονας, ο Montegazza, περιέγραψε τη δυνατότητα δημιουργίας τραπεζών για κατεψυγμένο ανθρώπινο σπέρμα. Μάλιστα πρότεινε ότι *«ένας άνθρωπος που πεθαίνει σε ένα πεδίο μάχης μπορεί να γεννήσει έναν νόμιμο κληρονόμο με το σπέρμα του να καταψύχεται και να αποθηκεύεται στο σπίτι»*.

Στα τέλη της δεκαετίας του 1930 και στις αρχές τη δεκαετίας του 1940, διαπιστώθηκε ότι το σπέρμα θα μπορούσε να επιβιώσει σε θερμοκρασία μικρότερη των -160°C . Περαιτέρω επιστημονική πρόοδος, έγινε αργότερα, με την ανακάλυψη των κρυοπροστατευτικών ιδιοτήτων της γλυκερόλης (Anger et al., 2003). Σήμερα η κρυοσυντήρηση του σπέρματος είναι μια αποτελεσματική μέθοδος για τη διαχείριση και τη διατήρηση της αρσενικής γονιμότητας, τόσο σε ανθρώπους, όσο και σε ζώα (Le et al., 2019).

Η κρυοσυντήρηση υπήρξε σημείο καμπής στον τομέα της διατήρησης της γονιμότητας. Οι πρώτοι απόγονοι που παρήχθησαν από σπερματοζωάρια που είχαν κρυοσυντηρηθεί αναφέρθηκαν για την αγελάδα το 1951, για τον άνθρωπο το 1953, για τον χοίρο και το άλογο το 1957, και για το πρόβατο το 1967. Οι τράπεζες για την κατάψυξη σπερματοζωαρίων αναπτύχθηκαν τη δεκαετία του 1960 για τα βοοειδή και τη δεκαετία του 1970 για τον άνθρωπο. Σήμερα, στη διαδικασία της σπερματέγχυσης, που αποτελεί μια τεχνική υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, τόσο στα ζώα όσο και στον άνθρωπο, χρησιμοποιούνται συστηματικά τα σπερματοζωάρια που έχουν προηγουμένως καταψυχθεί. Ωστόσο, παρά τα ποικίλα επιτεύγματα της κρυοβιολογίας του σπέρματος, η έρευνα συνεχίζεται προκειμένου να βρεθούν μέθοδοι που να μπορούν να ανακτήσουν αφενός βιώσιμα και αφετέρου ποιοτικά βέλτιστα σπερματοζωάρια μετά από την κατάψυξη (Hezavehei et al., 2018).

2. Κρυοσυντήρηση σπερματοζωαρίων

Η κρυοσυντήρηση ανθρώπινων δειγμάτων σπέρματος έχει γίνει αποδεκτή τη σημερινή εποχή. Πρόκειται για μια μέθοδο υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (Assisted reproductive technology - ART). Η σημασία της τράπεζας κρυοσυντήρησης σπέρματος, έγκειται στο να διατηρήσει τη μελλοντική γονιμότητα των ανδρών που χάνουν προσωρινά ή μόνιμα τη γονιμότητά τους λόγω ποικίλων λόγων (E, 2019). Σκοποί της κρυοσυντήρησης είναι η διατήρηση της λειτουργικότητας και της γονιμοποιητικής ικανότητας του σπέρματος σε περιπτώσεις ακτινοθεραπείας ή χημειοθεραπείας. Η δομή και η ακεραιότητα των σπερματοζωαρίων είναι απαραίτητες για τη γονιμοποίηση ενός ωαρίου και οι μεταβολές στη λειτουργία του θα πρέπει να καταγράφονται μετά από κατάψυξη και απόψυξη (Gómez-Torres et al., 2017).

Οι αρνητικές επιδράσεις της κρυοσυντήρησης σχετίζονται με την κινητικότητα, τη βιωσιμότητα και την ικανότητα γονιμοποίησης των σπερματοζωαρίων (Karabulut et al., 2018). Έχει αναφερθεί ότι η χρήση κατεψυγμένων δειγμάτων σπέρματος σε τεχνικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, συμπεριλαμβανομένης της ενδομήτριας σπερματέγχυσης (Intrauterine insemination - IUI), της εξωσωματικής γονιμοποίησης (In vitro fertilisation - IVF) και της μικρογονιμοποίησης (Intracytoplasmic sperm injection - ICSI), πιθανόν να έχει αρνητικά αποτελέσματα, όπως μείωση της κινητικότητας, μείωση του ποσοστού γονιμοποίησης και κατά συνέπεια μείωση της αναπτυξιακής δυναμικής και εμφύτευσης των παραγόμενων εμβρύων ενώ δεν αποκλείεται και αύξηση του ποσοστού των αποβολών.

Υπάρχει περιορισμένη γνώση για τη μοριακή βάση της διαδικασίας κρυοσυντήρησης σχετικά με τη βλάβη του σπέρματος που παρατηρείται. Οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στις αρνητικές επιδράσεις της κατάψυξης περιλαμβάνουν τη βλάβη στις μεμβράνες, μεταβολές στη διαπερατότητα των μεμβρανών, στη δομή του κυτταρικού σκελετού και βλάβη των μιτοχονδρίων. Επιπλέον βλάβη που μπορεί να παρατηρηθεί στη διαδικασία της κατάψυξης είναι το φαινόμενο της κρυο-ενεργοποίησης, δηλαδή η καταστροφή της ακεραιότητας της μεμβράνης προκειμένου να πραγματοποιήσει την ακροσωμική αντίδραση. Κατά κύριο λόγο οφείλεται στον σχηματισμό ενδοκυτταρικών και εξωκυτταρικών κρυστάλλων πάγου καθώς και στις μεταβολές της οσμωτικότητας, με αποτέλεσμα

την οσμωτική καταπόνηση του κυττάρου, βλάβη της κυτταροπλασματικής του μεμβράνης και την καταστροφή του (Εικόνα 1)(*Hezavehei et al., 2018*).

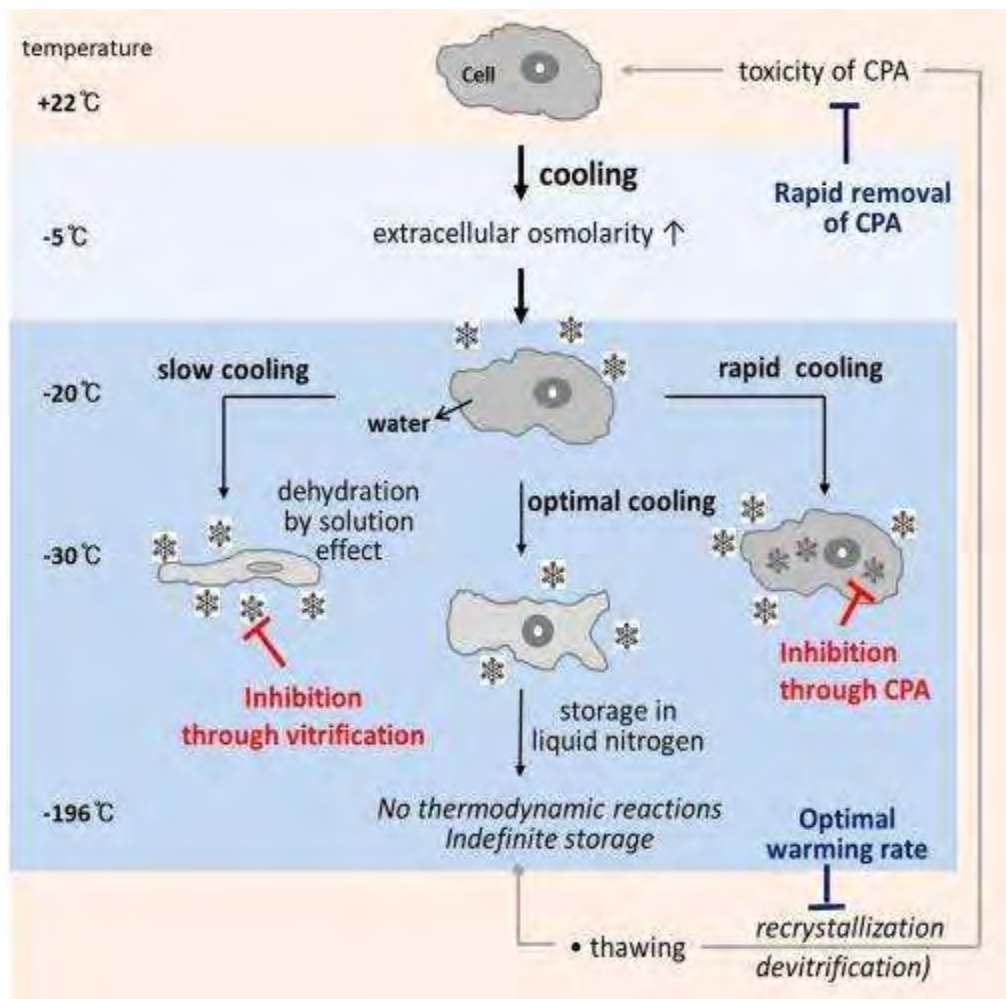
Κατά τη διάρκεια της κρυοσυντήρησης, το ενδοκυτταρικό και εξωκυτταρικό περιβάλλον των σπερματοζωαρίων υφίστανται τεράστιες μεταβολές. Οι μεταβολές αυτές σχετίζονται με δύο παράγοντες, την προσθήκη κατά την κατάψυξη και την αφαίρεση κατά την απόψυξη κρυοπροστατευτικών παραγόντων καθώς και το σχηματισμό κρυστάλλων πάγου (Εικόνα 1). Επίσης η κατάψυξη και η απόψυξη καταστρέφουν τη ρευστότητα και επηρεάζουν την ακεραιότητα της πλασματικής μεμβράνης των σπερματοζωαρίων. Οι παραπάνω βλάβες μπορεί να οφείλονται είτε στο οξειδωτικό στρες, είτε στις αλλαγές της μιτοχονδριακής δραστηριότητας, είτε στην αποσυμπύκνωση χρωματίνης και κατακερματισμού του DNA (*Gómez-Torres et al., 2017*).

Η μερική ή η ολική καταστροφή της ακροσωμικής μεμβράνης που παρατηρείται μερικές φορές κατά την κατάψυξη του σπέρματος κατά πάσα πιθανότητα οφείλονται στον σχηματισμό κρυστάλλων πάγου κατά τη διαδικασία της κατάψυξης των εξωκυττάρων υγρών, με αποτέλεσμα βλάβη στη δομή της φωσφολιπιδικής μεμβράνης (*Hezavehei et al., 2018*).

2.1 Μέθοδοι κρυοσυντήρησης

Ο κύριος στόχος της κρυοσυντήρησης των σπερματοζωαρίων, είναι η διατήρηση της βιωσιμότητας, της κινητικότητας, και της ικανότητας γονιμοποίησης τους (*Le et al., 2019*). Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι κρυοσυντήρησης οι οποίες διαφέρουν μεταξύ τους όσον αφορά τους ρυθμούς κατάψυξης, τη κατηγορία των κρυοπροστατευτικών (διαπερατά-μη διαπερατά) που χρησιμοποιούνται, τον εργαστηριακό εξοπλισμό και το πρωτόκολλο απόψυξης.

Έχουν υιοθετηθεί δύο βασικές διαδικασίες για την κρυοσυντήρηση των σπερματοζωαρίων, η συμβατική κατάψυξη και η υαλοποίηση (*Shi et al., 2017*). Η αργή κατάψυξη είναι μία παλιά τεχνική, ενώ η υαλοποίηση είναι μια γρήγορη εναλλακτική τελευταίας τεχνολογίας μέθοδος ταχείας κατάψυξης. Η τελευταία έχει πολλά πλεονεκτήματα καθώς απαιτεί απλό εργαστηριακό εξοπλισμό και η εγκατάσταση της στα κέντρα υποβοηθούμενης αναπαραγωγής καθίσταται ιδιαίτερα εύκολη (Πίνακας 1) (*Le et al., 2019*).

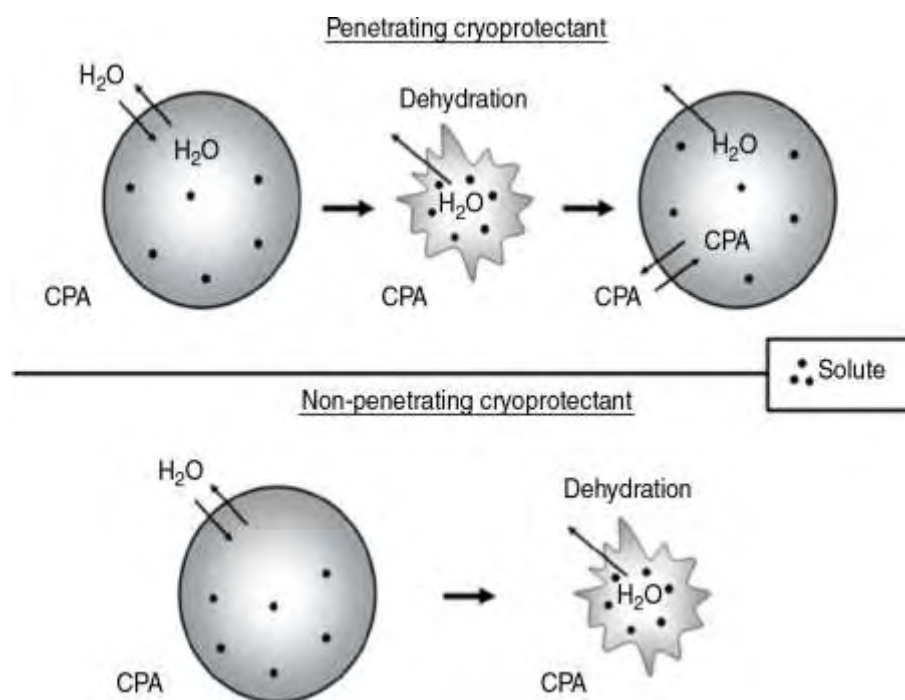


Εικόνα 1. Σχηματισμός κρυστάλλων και ωσμωτικό σοκ κατά τη διάρκεια της κατάψυξης των σπερματοζωαρίων (Jang et al., 2017).

2.2 Κρυοπροστατευτικά υλικά (Cryoprotectants - CPAs)

Οι συμβατικές μέθοδοι κατάψυξης περιλαμβάνουν τη χρήση CPAs (Εικόνα 2) για την ελαχιστοποίηση των μεταβολών της οσμωτικότητας και την αποφυγή σχηματισμού ενδοκυτταρικού και εξωκυτταρικού κρυσταλλικού πάγου (Shi et al., 2017). Στην κρυοσυντήρηση με τη χρήση κρυοπροστατευτικών υλικών πετυχαίνεται η προστασία των ενδοκυτταρικών δομών και των βιομορίων του δείγματος και κατά συνέπεια προστατεύονται οι λειτουργίες της κυτταρικής μεμβράνης. Οι διαπερατοί κρυοπροστατευτικοί παράγοντες είναι γενικά μικρά μη-ιονικά μόρια. Οι συνηθέστερα χρησιμοποιούμενοι μεμβρανοδιαπερατοί κρυοπροστατευτικοί παράγοντες είναι το διμεθυλοσουλφοξείδιο (dimethylsulfoxide - DMSO) και η γλυκερόλη. Εναλλακτικά, μπορεί να χρησιμοποιηθεί

αιθυλενογλυκόλη, μεθυλοφορμαμίδιο ή διμεθυλοφορμαμίδιο. Οι μη διαπερατοί κρυοπροστατευτικοί παράγοντες διακρίνονται σε οσμωτικά δραστικές ουσίες, όπως είναι οι δισακχαρίτες, και οσμωτικά ανενεργές ουσίες, όπως είναι το υδροξυαίθυλο άμυλο (Sieme, Oldenhof and Wolkers, 2016). Στα μη διαπερατά CPAs συμπεριλαμβάνονται οι λευκωματίδες, οι δεξτράνες και ο κιτρικός κρόκος αυγού. Είναι γνωστό ότι τα διαπερατά CPAs σταθεροποιούν τη σπερματική πλασματική μεμβράνη και τα μη διαπερατά CPAs, ελαχιστοποιούν τον ενδοκυτταρικό σχηματισμό κρυστάλλων πάγου. Ωστόσο, στις περισσότερες περιπτώσεις, τα μη διαπερατά κρυοπροστατευτικά υλικά, φαίνεται ότι παίζουν κάποιο υποστηρικτικό ρόλο στα διαπερατά κρυοπροστατευτικά, αυξάνοντας με τον τρόπο αυτό την αποτελεσματικότητα των διαπερατών CPAs (Εικόνα 2) (Shi et al., 2017).



Εικόνα 2. Οι δύο κατηγορίες κρυοπροστατευτικών υλικών και ο μηχανισμός δράσης τους (De Waele, 2018).

2.3 Αργή κατάψυξη

Η αργή κατάψυξη διαρκεί από 2 έως 4 ώρες (Πίνακας 1). Με την τεχνική αυτή το δείγμα καταψύχεται σταδιακά από τη θερμοκρασία δωματίου (24°C) στους 5°C με ταχύτητα 0.5-1°C / min. Στη συνέχεια η θερμοκρασία μειώνεται περαιτέρω με

ρυθμό 1-10°C / min για να φτάσεις στους -80°C. Τέλος το δείγμα βυθίζεται σε υγρό άζωτο (LN₂) στους -196°C. Το μειονέκτημα της τεχνικής είναι η συρρίκνωση των κυττάρων λόγω του φαινομένου της ώσμωσης και για τον λόγο αυτό ο ρυθμός της κατάψυξη πρέπει να είναι ελεγχόμενος (*Sharma et al., 2014*).

Πίνακας 1. Σύγκριση αργής κατάψυξης και υαλοποίησης (*Jang et al., 2017*)

Χαρακτηριστικά	Αργή κατάψυξη	Υαλοποίηση
Διάρκεια	> 3 ώρες	< 10 λεπτά
Κόστος	Ακριβή μέθοδος Απαιτείται μηχανήμα κατάψυξης	Μικρό Δεν απαιτείται μηχανήμα κατάψυξης
Όγκος δείγματος (μL)	100–250	1–2
Συγκέντρωση του CPA	Χαμηλή	Υψηλή
Πιθανότητα βλάβης σπερματοζωαρίων	Μεγάλη	Μικρή
Βιωσιμότητα σπερματοζωαρίων μετά την απόψυξη	Υψηλή	Υψηλή
Τύπος συστήματος	Μόνο κλειστό σύστημα	Ανοιχτό ή κλειστό σύστημα
Πιθανή μόλυνση από παθογόνους παράγοντες	Χαμηλή	Υψηλή
Ικανότητα χειρισμού	Εύκολη	Δύσκολη

2.4 Υαλοποίηση

Λόγω τη αργής κατάψυξης και των μειονεκτημάτων της (Πίνακας 1) έχουν αναπτυχθεί νέες εναλλακτικές τεχνικές για τη βελτίωση της κρυοσυντήρησης των σπερματοζωαρίων. Μια από τις πιο καινοτόμες μεθόδους είναι η υαλοποίηση. Η τεχνική αυτή βασίζεται στην ταχεία αύξηση κατά την κατάψυξη και μείωση κατά την απόψυξη, θερμοκρασιών με τη χρήση διαπερατών ή μη κρυοπροστατευτικών. Κατά τη διάρκεια της υαλοποίησης, το νερό παγώνει σε υαλώδη μορφή, μέσω αύξησης του ιξώδους. Αυτό πραγματοποιείται χωρίς να συμβεί σχηματισμός ενδοκυτταρικών κρυστάλλων πάγου, καθιστώντας τη διαδικασία αυτή περισσότερο

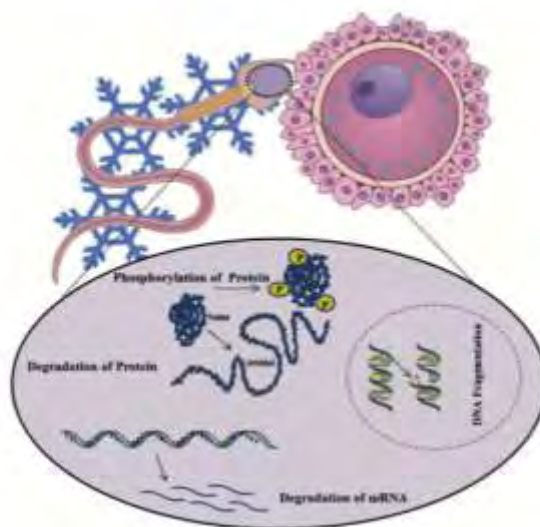
ασφαλή και γρήγορη σε σύγκριση με την αργή κατάψυξη (Πίνακας 1). Ωστόσο, θεωρείται ότι η υαλοποίηση δε μπορεί να διατηρήσει τη βιωσιμότητα των σπερματοζωαρίων σε αυξημένο ποσοστό, διότι τα σπερματοζωάρια είναι περισσότερο ευαίσθητα στις μεταβολές της οσμωτικότητας σε σύγκριση με την αργή κατάψυξη (Πίνακας 1) (Hezavehei et al., 2018) αλλά και σε σύγκριση με άλλους ιστούς (Aizpurua et al., 2017). Χρησιμοποιώντας αυτή τη μέθοδο, το εναιώρημα του σπέρματος βυθίζεται κατευθείαν σε υγρό άζωτο και τα σπερματοζωάρια ψύχονται με εξαιρετικά γρήγορο ρυθμό. (Hezavehei et al., 2018)

2.5 Επιδράσεις της κρυοσυντήρησης

Παρά τις έρευνες που έχουν γίνει στον τομέα της κρυοβιολογίας, συμπεριλαμβανομένης της υαλοποίησης και της ταχείας, προγραμματιζόμενης κατάψυξης, τα ποσοστά επιβίωσης των σπερματοζωαρίων μετά την κατάψυξη εξακολουθούν να είναι χαμηλά, λόγω πιθανής βλάβης των σπερματοζωαρίων. Για το λόγο αυτό είναι απαραίτητη η βελτιστοποίηση του πρωτοκόλλου κατάψυξης των σπερματοζωαρίων, καθώς η κρυοσυντήρηση του σπέρματος είναι σήμερα η μόνη μέθοδος για τη διατήρηση της ανδρικής γονιμότητας σε ορισμένες περιπτώσεις (Palomar Rios et al., 2017). Αρκετές μελέτες δείχνουν μειωμένη ικανότητα των κατεψυγμένων σπερματοζωαρίων να γονιμοποιήσουν με επιτυχία ένα ωοκύτταρο, συγκριτικά με τα φρέσκα σπερματοζωάρια. Αυτό συμβαίνει καθώς η κρυοσυντήρηση οδηγεί σε μειωμένο αριθμό κινητών σπερματοζωαρίων και σε μείωση της ταχύτητας αυτών που παραμένουν κινητά. Οι αλλαγές αυτές προκύπτουν κατά κύριο λόγο από τη ρήξη της πλασματικής μεμβράνης λόγω του σχηματισμού ενδοκυττάριου πάγου. Αρκετοί είναι οι υπεύθυνοι παράγοντες για την απώλεια της λειτουργικότητας των σπερματοζωαρίων κατά τη διάρκεια της κρυοσυντήρησης. Οσμωτικό στρες, αφυδάτωση, σχηματισμός ROS, ενδοκυττάριος σχηματισμός κρυστάλλων πάγου και τοξικότητα λόγω των κρυοπροστατευτικών υλικών, αποτελούν μερικούς από τους παράγοντες αυτούς. Οι παράγοντες αυτοί είναι υπεύθυνοι για το 25% - 75% της απώλειας της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων, τον κατακερματισμό του DNA μετά την απόψυξη και για την μείωση της βιωσιμότητάς τους (Alshawwa et al., 2019).

Οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στην επίδραση της κρυοσυντήρησης στις μεταβολές των παραμέτρων του σπέρματος δεν είναι πλήρως κατανοητοί. Μελέτες

προτείνουν ότι τα γονίδια των σπερματοζωαρίων, η πρωτεϊνική έκφραση και η σταθερότητα του mRNA και η επιγενετική περιεκτικότητα των σπερματοζωαρίων (Εικόνα 3) πιθανόν να εμπλέκονται στις μεταβολές των παραμέτρων του σπέρματος που παρατηρούνται κατά την κατάψυξη-απόψυξη των σπερματοζωαρίων. Ειδικότερα, έχει βρεθεί ότι η κρυοσυντήρηση μπορεί να επηρεάσει την έκφραση βασικών γονιδίων που σχετίζονται με τη γονιμότητα. Η πρωτεΐνη 90 (HSP90), η οποία παίζει σημαντικό ρόλο στα χαρακτηριστικά της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων, μειώνεται σημαντικά μετά την κατάψυξη. Η πρωτεϊνική ανάλυση των σπερματοζωαρίων έδειξε σημαντικές μεταβολές σε πρωτεΐνες όπως οι ACO2, OXCT1, TEK1, άλφα-ενολάση (ENO1) και βιμεντίνη όπως και στο επίπεδο φωσφορυλίωσης της τυροσίνης σε κατεψυγμένα σπερματοζωάρια σε σύγκριση με τα φρέσκα. Αυτές οι πρωτεΐνες σχετίζονται με την κινητικότητα, τη βιωσιμότητα και την ακροσωμική ακεραιότητα των σπερματοζωαρίων (Hezavehei et al., 2018).



Εικόνα 3. Επισκόπηση της τροποποίησης των πρωτεϊνών, του mRNA και του γονιδιώματος των κρυοσυντηρημένων σπερματοζωαρίων (Hezavehei et al., 2018).

Τα επιβλαβή αποτελέσματα της κρυοσυντήρησης οφείλονται σε μηχανικές και οσμωτικές βλάβες που προκύπτουν λόγω της μείωσης της θερμοκρασίας και της προσθήκης κρυοπροστατευτικών παραγόντων. Η “κρυο-ενεργοποίηση”, επηρεάζει την ακεραιότητα της μεμβράνης, επομένως η βιωσιμότητα του σπέρματος επηρεάζεται από την κατάψυξη. Παρατηρείται μείωση της κινητικότητας του σπέρματος και στα αποψυγμένα δείγματα, εν μέρει ως αποτέλεσμα μιτοχονδριακής βλάβης. Η βιωσιμότητα και η κινητικότητα των σπερματοζωαρίων είναι δύο

παράμετροι που έχουν άμεση συσχέτιση, δεδομένου ότι τα σπερματοζωάρια που παρουσιάζουν οποιοδήποτε τύπο κινητικότητας είναι βιώσιμα (*Palomar Rios et al., 2017*). Ενώ οι αρνητικές επιδράσεις της κρυοσυντήρησης στην κινητικότητα, τη μορφολογία και τη βιωσιμότητα του σπέρματος τεκμηριώνονται, το ζήτημα της πιθανής αλλαγής στην ακεραιότητα του DNA του σπέρματος μετά από τις διαδικασίες κατάψυξης-απόψυξης εξακολουθεί να υπάρχει (*Karabulut et al., 2018*). Ένα ακόμα μειονέκτημα της υαλοποίησης είναι η απώλεια της κινητικότητας και της ζωτικότητας των σπερματοζωαρίων. Κατά τη κρυοσυντήρηση, το σπέρμα εκτίθεται σε φυσικό και χημικό στρες που έχει ως αποτέλεσμα αλλαγές στη σύνθεση μεμβρανικών λιπιδίων. Παρατηρείται βλάβη της πλασματικής μεμβράνης, του ακρόσωματος (και επομένως στην ακροσωμική αντίδραση) και τελικά απόπτωση λόγω οξειδωτικού στρες. Όλες αυτές οι αλλαγές έχουν ως αποτέλεσμα τη μείωση της ικανότητας γονιμοποίησης των ανθρώπινων σπερματοζωαρίων μετά από τη διαδικασία της κρυοσυντήρησης (*Rahiminia et al., 2017*).

Ενας άλλος σημαντικός παράγοντας που εμπλέκεται στον έλεγχο της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων και της ακροσωμικής αντίδρασης είναι το ασβέστιο. Μια αυξημένη ενδοκυτταρική συγκέντρωση ασβεστίου (Ca^{2+}), μπορεί να ελαττώσει ή και να καταστείλει την κινητικότητα των σπερματοζωαρίων. Το σπερματικό πλάσμα περιέχει υψηλή συγκέντρωση Ca^{2+} που αυξάνεται περαιτέρω καθώς αυτό συμπυκνώνεται, λόγω σχηματισμού πάγου. Κατά τη διάρκεια της κρυοσυντήρησης, η αρχιτεκτονική της κυτταροπλασματικής μεμβράνης διαταράσσεται από την κρυσταλλοποίηση των λιπιδίων και ο ρυθμός μεταβολισμού μειώνεται. Οι δύο αυτοί παράγοντες μειώνουν την ικανότητα των κυττάρων να ρυθμίζουν την ενδοκυτταρική συγκέντρωση Ca^{2+} . Ως εκ τούτου, είναι πιθανόν η κρυοσυντήρηση να μεταβάλλει και την ενδοκυτταρική συγκέντρωση Ca^{2+} στα σπερματοζωάρια, η οποία φαίνεται να συμβάλει στις παρατηρούμενες μεταβολές των πρωτεϊνών TEKINS, που επηρεάζουν το σχηματισμό της ουράς όπως και στην κινητικότητα του σπέρματος και συνεπώς στη γονιμότητα (*Alshawwa et al., 2019*).

3. Ενδοκυττάριο pH (pHi)

Το σπερματοζωάριο είναι το μόνο ανθρώπινο κύτταρο που εκτελεί τη λειτουργία του έξω από το αρσενικό σώμα. Το μικροπεριβάλλον του σπέρματος, το σπερματικό πλάσμα, έχει ιδιαίτερη σημασία. Πρόκειται για ένα μείγμα εκκρίσεων

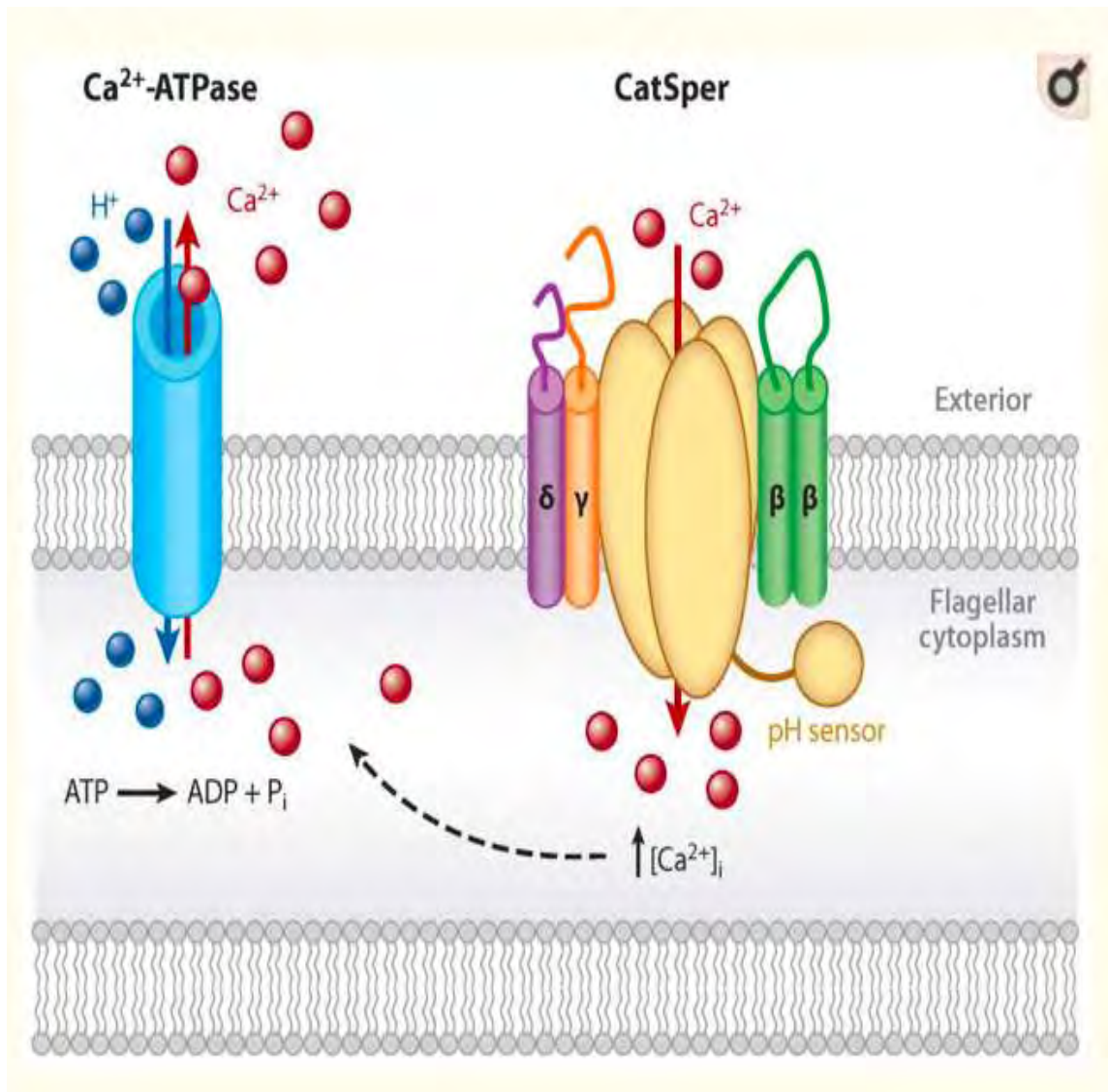
από τους όρχεις και την επιδιδυμίδα. Το σπερματικό πλάσμα περιέχει HCO_3^- / CO_2 , ανόργανα ιόντα, οργανικά οξέα, σάκχαρα, λιπίδια, στεροειδή, αμινοξέα, πολυαμίνες, αζωτούχες βάσεις και πρωτεΐνες. Συνεπώς, το σπερματικό πλάσμα έχει μια υψηλή ρυθμιστική ικανότητα, μεγαλύτερη από αυτή των υπόλοιπων σωματικών υγρών. Το pH του σπερματικού πλάσματος μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της βιωσιμότητας και της ποιότητας του σπέρματος και στην εξασφάλιση της γονιμοποίησης (Zhou et al., 2015). Τα σπερματοζωάρια των θηλαστικών, από τα τμήματα της επιδιδυμίδας, έχουν όξινο ενδοκυττάριο (pH_i), περίπου 6.8, και βρίσκονται ουσιαστικά σε ηρεμία. Όταν αναμειχθούν, κατά την εκσπερμάτιση, με το σπερματικό πλάσμα, του οποίου το pH είναι μεγαλύτερο από 7.0 (≈ 7.5), το κυτταρόπλασμα του σπέρματος αλκαλοποιείται και τα σπερματοζωάρια γίνονται κινητά. Παρά το γεγονός όμως ότι είναι κινητά, καθίστανται ανίκανα ή μερικώς ικανά να γονιμοποιήσουν το ωοκύτταρο. Για να αποκτήσουν την ικανότητα αυτή θα πρέπει να υποβληθούν στη διαδικασία της “ενεργοποίησης” (capacitation), φαινόμενο που πρωτοαναφέρθηκε το 1951 από τους Min Chueh Chang και Colin Russell Austin (Lishko et al., 2012). Ωστόσο, δεν είναι ακόμη σαφές ποια ακριβώς είναι τα σήματα που προκαλούν υπερ-ενεργοποίηση, αλλά είναι γνωστό ότι το εξωκυττάριο pH και τα ιόντα HCO_3^- παίζουν σημαντικό ρόλο (Hamamah S, 2019).

Μεταξύ των διαφόρων εξωτερικών παραγόντων που είναι γνωστοί για την επίδρασή τους στη φυσιολογία των σπερματοζωαρίων, τα ιόντα παίζουν καθοριστικό ρόλο. Το ενδοκυττάριο pH (pH_i), είναι σημαντική παράμετρος για την διεκπεραίωση των κυτταρικών λειτουργιών (Hamamah S, 2019). Η ενδοκυττάρια συγκέντρωση H^+ ρυθμίζεται από ενδοκυττάρια ρυθμιστικά διαλύματα, ενεργούς και παθητικούς μεταφορείς καθώς και αντλίες ιόντων (Berger et al., 2017). Η διατήρηση του pH_i , μέσα σε φυσιολογικά όρια είναι θεμελιώδης για τη λειτουργία των κυττάρων καθώς οι περισσότερες κυτταρικές διεργασίες διαμορφώνονται και λειτουργούν εντός μιας συγκεκριμένης περιοχής τιμών pH_i . Ειδικότερα, το pH_i επηρεάζει την κατάσταση ιοντισμού των αδύναμων οξέων και βάσεων που υπάρχουν στις περισσότερες πρωτεΐνες αλλά και σε άλλα βιομόρια. Ο μεταβολισμός επηρεάζει το pH στο εξωκυττάριο περιβάλλον και η πιθανή έλλειψη ρύθμισης του pH_i μπορεί να έχει σοβαρές λειτουργικές συνέπειες για τα κύτταρα. Αξίζει να σημειωθεί ότι στα σπερματοζωάρια, η απουσία αρκετών μεταφορέων ιόντων ή ενζύμων προκαλεί υπογονιμότητα. Οι μεταφορείς αυτοί εξαρτώνται από

το pH_i ή/και σχετίζονται κατά κάποιον τρόπο με τη ρύθμιση του. Οι μεταφορείς H⁺ και οι μεταφορείς HCO³⁻ είναι μεταξύ των βασικότερων παραγόντων για τη ρύθμιση του pH_i (Hamamah S, 2019).

3.1 Κατιονικός διάυλος σπέρματος, CatSper

Οι ιοντικοί διάυλοι ελέγχουν το δυναμικό της μεμβράνης του σπέρματος, τη συγκέντρωση ασβεστίου και το ενδοκυττάριο pH, τα οποία με τη σειρά τους ρυθμίζουν την κινητικότητα, την ακροσωμική αντίδραση και πολλές άλλες φυσιολογικές διεργασίες που είναι απαραίτητες για την επιτυχή γονιμοποίηση του ωοκυττάρου. Σημαντικό ρόλο στην κατανόηση των διαύλων αυτών έπαιξε η ανακάλυψη του διαύλου CatSper (κατιονικός διάυλος σπέρματος). Πρόκειται για ένα σύνθετο διάυλο ιόντων που διαμεσολαβεί την είσοδο Ca²⁺ στην ουρά του σπερματοζωαρίου, που απαιτείται για την ενεργοποίηση του και κατ' επέκταση είναι σημαντικό για την αρσενική γονιμότητα (Lishko et al., 2012). Το κανάλι Catsper ενεργοποιείται από αλκαλικό ενδοκυττάριο pH. Επιτρέπει εκτός από την είσοδο Ca²⁺ στα σπερματοζωάρια, υπό φυσιολογικές συνθήκες, και τη μετακίνηση μονοσθενών (Na⁺, Cs⁺) ή και δισθενών (Ba²⁺) κατιόντων, εάν δεν υπάρχει εξωκυττάριο Ca²⁺. Το σύμπλεγμα του διαύλου Catsper αποτελείται από τέσσερις υπομονάδες (Catsper 1-4) και τουλάχιστον τρεις βοηθητικές υπομονάδες (Catsper β, Catsper γ και Catsper δ). Η πρώτη υπομονάδα του Catsper, η Catsper1, ανακαλύφθηκε το 2001 και παίζει ζωτικό ρόλο στη κινητικότητα των σπερματοζωαρίων (Sun et al., 2017). Άνθρωποι με μεταλλάξεις εντός των γονιδίων CatSper1 ή CatSper2 έχει αποδειχθεί ότι είναι στείροι (Ritagliati et al., 2018). Ο διάυλος Catsper επιτρέπει την είσοδο Ca²⁺, ενώ η αντλία Ca²⁺ (Ca²⁺/ATPase) απομακρύνει το ενδοκυττάριο ασβέστιο από τα σπερματοζωάρια σε ανταλλαγή με H⁺, για τη διατήρηση της σταθερής ενδοκυττάριας συγκέντρωσης Ca²⁺ (εικόνα 4) (Sun et al., 2017).



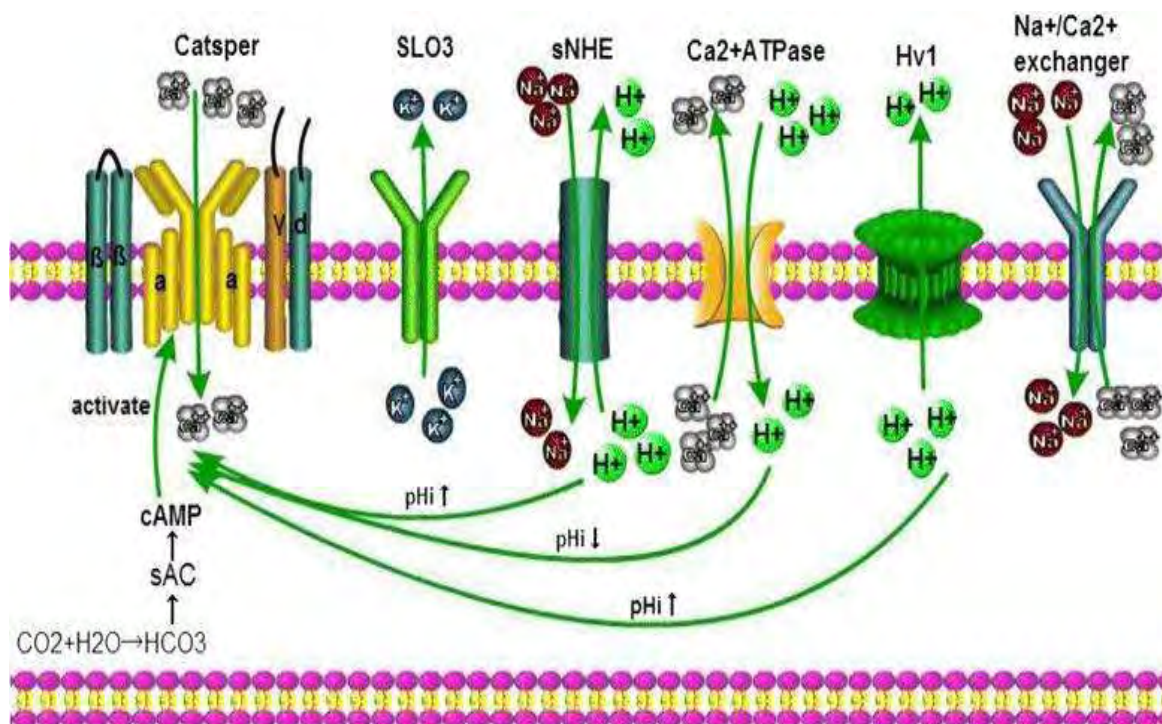
Εικόνα 4. Ρύθμιση του Ca^{2+} . Είσοδος του Ca^{2+} στην ουρά του σπερματοζωαρίου μέσω του ενεργοποιημένου από το αλκαλικό pH, διαύλου CatSper και έξοδος του Ca^{2+} με την Ca^{2+} -ATPase. Υδρόλυση ATP από την Ca^{2+} -ATPase, με σκοπό την έξοδο του κυτταροπλασματικού Ca^{2+} και την είσοδο εξωκυττάριων πρωτονίων (Lishko et al., 2012).

Για παραπάνω από τρεις δεκαετίες ήταν γνωστό ότι η προγεστερόνη και η ZP3, συστατικό της zona pellucida, προκαλούν την ακροσωμική αντίδραση, με αυστηρά υψηλή απαίτηση για αυξημένο ενδοκυττάριο Ca^{2+} . Η αύξηση του ασβεστίου, κατά τη διάρκεια της ακροσωμικής αντίδρασης, επηρεάζεται από το pH_i (Hamamah S, 2019). Ο διάυλος CatSper είναι ευαίσθητος στο pH_i . Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες, το σπέρμα των ποντικών παρουσιάζει αύξηση του Ca^{2+} σε ένα αλκαλικό ενδοκυττάριο περιβάλλον (Sun et al., 2017).

Μελέτες σχετικές με τη ρύθμιση του pH_i έδειξαν ότι οι μηχανισμοί ρύθμισης του περιλαμβάνουν τις αντλίες Na^+/H^+ και K^+/H^+ , τους συµµεταφορείς $NaCl / HCO_3^-$, H^+ , ΑΤΡασες κ.α. (Hamamah and Gatti, 1998). Πολλές μέθοδοι έχουν εξελιχθεί τα τελευταία 30 χρόνια για να μετρήσουν το pH_i . Αυτές οι τεχνικές εφαρµόζονται είτε σε κυτταρικούς πληθυσµούς, είτε σε µεμονωµένα κύτταρα και περιλαμβάνουν: (1) τον πυρηνικό µαγνητικό συντονισµό (NMR), (2) την κατανοµή οξέων-βάσεων και (3) τις τεχνικές φθορισµού. Τα τελευταία χρόνια το pH_i που µετράται στο σπέρµα, µελετάται χρησιµοποιώντας κυρίως ανιχνευτές φθορισµού (Hamamah S, 2019).

3.2 Ρύθμιση του CatSper

Το φορτίο H^+ είναι ο κύριος ρυθµιστής του µικροπεριβάλλοντος οξέων-βάσεων, ενώ η αντλία Na^+/H^+ (NHEs) και το κανάλι $Hn1$ είναι λειτουργούν βοηθητικά. Οι ανταλλάκτες NHEs εισάγουν Na^+ στην πλασµατική µεµβράνη και εξάγουν τα H^+ εκτός των σπερµατοζωαρίων. Το κανάλι $Hn1$ αποµακρύνει το ενδοκυττάριο H^+ για να διατηρήσει την ισορροπία του pH_i στα σπερµατοζωάρια. Επιρροή στο ιοντικό περιβάλλον του ανθρώπινου σπέρµατος, ασκούν και οι αντλίες Na^+/K^+ και Na^+/Ca^{2+} . Υψηλά επίπεδα ενδοκυτταρικού Ca^{2+} και χαμηλά επίπεδα ενδοκυτταρικού H^+ συµβάλλουν στην υπερδραστηριότητα του σπέρµατος (Sun et al., 2017). Η σχέση των διαφόρων αυτών διαύλων ιόντων µε το κανάλι CatSper περιγράφεται στην εικόνα 5.



Εικόνα 5. Ρύθμιση του CatSper

Ο ειδικός διάυλος K^+ του σπέρματος (SLO3), διατηρεί το δυναμικό της μεμβράνης. Η αντλία Na^+/H^+ (NHE), μέσω της κυκλικής μονοφωσφορικής αδενοσίνης (cAMP) παίζει ρόλο στη γονιμότητα του σπέρματος, καθώς παράγεται cAMP. Το HCO_3^- ενεργοποιεί την αδενυλική κυκλάση (sAC). Ο διάυλος CatSper ενεργοποιείται με την αύξηση του ενδοκυτταρικού pH, το οποίο εξαρτάται από τη sNHE και τον τασεο-εξαρτώμενο διάυλο Hv1, που οδηγεί σε έξοδο H^+ από το κύτταρο. Η ισορροπία ασβεστίου διατηρείται με τις αντλίες Na^+/Ca^{2+} και τη δράση της $Ca^{2+}/ATPase$. Η αντλία Na^+/Ca^{2+} εξάγει ένα ιόν Ca^{2+} από το κύτταρο και επιτρέπει την είσοδο τριών ιόντων Na^+ . Ωστόσο η Ca^{2+} -ATPάση, απομακρύνει το ενδοκυτταρικό Ca^{2+} και επιτρέπει την είσοδο ιόντων H^+ στο σπερματοζωάριο. Τα δύο κανάλια NHE και Hv1 είναι θετικοί ρυθμιστές του καναλιού CatSper, ενώ η αντλία Ca^{2+} -ATPase είναι αρνητικός ρυθμιστής (Sun et al., 2017).

3.3 Ρόλος ενδοκυτταρίου pH στη ρύθμιση της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων

Στα περισσότερα είδη, τα σπερματοζωάρια αποθηκεύονται στους όρχεις (ή στην επιδιδυμίδα στην περίπτωση των θηλαστικών). Θεωρείται ότι η ήρεμη κατάσταση αυτή του σπέρματος διατηρείται λόγω του όξινου pH_i . Η ρύθμιση της κινητικότητας μέσω του pH είναι καλά μελετημένη σε σπέρμα αχινού. Τα σπερματοζωάρια της θάλασσας παραμένουν αμετάβλητα στις γονάδες λόγω χαμηλού pH_i που

διατηρείται από την υψηλή τάση CO_2 . Όταν τα σπερματοζωάρια απελευθερώνονται στο θαλασσινό νερό (pH 8.0), εμφανίζεται μια γρήγορη εκροή H^+ , αυξάνοντας το pH_i από 7.2 σε 7.6. Δεδομένου ότι το μιτοχόνδριο είναι η μόνη πηγή ATP, η κινητικότητα και η κυτταρική αναπνοή συνδέονται στενά και ρυθμίζονται από το pH_i . Τόσο το pH_i του σπέρματος όσο και η κινητικότητα εξαρτώνται από την ιοντική σύνθεση στο εξωκυττάριο περιβάλλον. Για παράδειγμα χαμηλό pH (5.0), υψηλή συγκέντρωση K^+ (200 mM) ή απουσία Na^+ μειώνει το pH_i των σπερματοζωαρίων σε 5.7 - 6.6 εμποδίζοντας την κινητικότητά του. Η αλκαλοποίηση του pH_i με προσθήκη NH_4Cl αποκαθιστά την κινητικότητα του σπέρματος υπό αυτές τις συνθήκες, καθορίζοντας με τον τρόπο αυτό την άμεση συσχέτιση του pH_i με τη κινητικότητα (*Nishigaki et al., 2015*).

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η κινητικότητα, η λειτουργικότητα της πλασματικής μεμβράνης των σπερματοζωαρίων, η ακεραιότητα του ακροσώματος και η συνολική βιωσιμότητα των σπερματοζωαρίων μετά την απόψυξη, είναι συνήθως μειωμένη συγκριτικά με την αρχική τους κατάσταση. Ωστόσο, ο μηχανισμός μέσω του οποίου μειώνεται η κινητικότητα δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως μέχρι σήμερα. Μέχρι σήμερα υπεύθυνοι παράγοντες θεωρούνται ο σχηματισμός κρυστάλλων που προκαλεί βλάβες στη μεμβράνη και κατά συνέπεια μείωση της βιωσιμότητας των σπερματοζωαρίων. Όταν τα σπερματοζωάρια καταψύχονται εκτίθενται σε “κρύο σοκ”, σε σχηματισμό κρυστάλλων πάγου και σε έντονη αφυδάτωση, με αποτέλεσμα να δημιουργείται πιθανή μη αναστρέψιμη βλάβη. Οι περισσότερες κυτταρικές διεργασίες πραγματοποιούνται εντός μιας συγκεκριμένης περιοχής τιμών ενδοκυτταρίου pH . Είναι γνωστό ότι το pH_i επηρεάζει σημαντικά το μεταβολισμό του κυτταροπλάσματος και σε περίπτωση που η ρύθμιση του είναι ελλιπής, μπορεί να οδηγήσει σε βλάβες της σπερματικής κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Βλάβες στη πλασματική μεμβράνη παρατηρούνται επίσης και σε περιπτώσεις κατάψυξης των σπερματοζωαρίων.

Η σχέση κατάψυξης - μεταβολών pH στα ανθρώπινα σπερματοζωάρια δεν έχει μελετηθεί μέχρι σήμερα. Για το λόγο αυτό, η παρούσα μελέτη είχε ως στόχο την

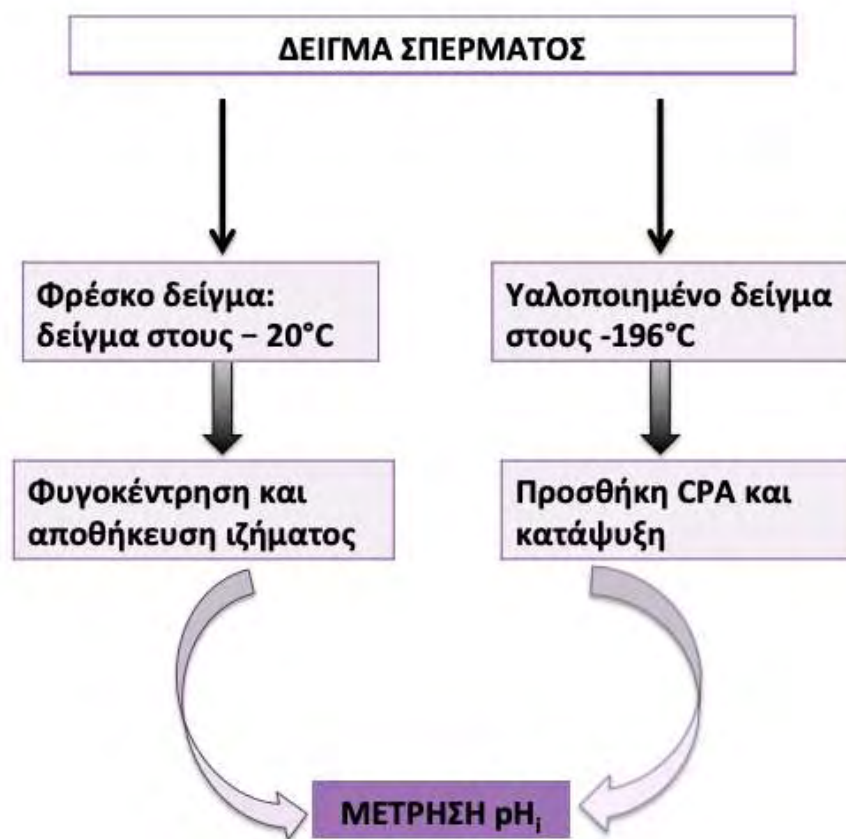
ανάπτυξη της μεθοδολογίας μέτρησης του ενδοκυττάριου pH στα σπερματοζωάρια και στη συνέχεια τη διερεύνηση της πιθανής επίδρασης της υαλοποίησης στο ενδοκυττάριο pH.

ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Συλλογή δειγμάτων

Μελετήθηκαν συνολικά 9 δείγματα σπέρματος που συλλέχθηκαν από ζευγάρια που μπήκαν στη διαδικασία υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Η συλλογή των δειγμάτων έγινε στην Πανεπιστημιακή Μαιευτική και Γυναικολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας. Η συλλογή του κάθε δείγματος γινόταν μετά από 2 έως 6 ημέρες αποχής, σε ειδικά αποστειρωμένα ουροδοχεία. Τα δείγματα αφέθηκαν για 15 τουλάχιστον λεπτά ώστε να ρευστοποιηθούν.

Ποσότητα από το αρχικό δείγμα (<200μL) χωρίστηκε σε δύο ισόποσες ομάδες. Η πρώτη ομάδα (φρέσκο δείγμα) φυγοκεντρήθηκε στη φυγόκεντρο Heraeus Biofuge για 5 λεπτά και 10.000 rpm. Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης απομακρύνθηκε το υπερκείμενο και το ίζημα διατηρήθηκε στους -20°C για τη μέτρηση του pH_i. Στη δεύτερη ομάδα προστέθηκε ίση ποσότητα CPA (Fertipro), παρέμεινε για 10 λεπτά για να ομογενοποιηθεί το δείγμα και στη συνέχεια ψύχθηκε σε υγρό άζωτο στους -196°C. Για τη μέτρηση του ενδοκυττάριου pH στο φρέσκο δείγμα έγινε προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος 1xPBS (Phosphate Buffer Solution) μέχρι τελικού όγκου 2mL πριν τη μέτρηση. Όσον αφορά το κατεψυγμένο δείγμα, τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο για 10 λεπτά, φυγοκεντρήθηκε και έπειτα ακολούθησε προσθήκη 2mL 1xPBS (Εικόνα 6).



Εικόνα 6. Διαγραμματική απεικόνιση της πειραματικής διαδικασίας.

2. Εκτίμηση σπέρματος

Η εκτίμηση του σπέρματος έγινε σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (Π.Ο.Υ.). Συγκεκριμένα, η κινητικότητα του δείγματος αναλύθηκε με Makler chamber, με τη χρήση μικροσκοπίου αντίθεσης φάσης (Axiovert 40C, Carl Zeiss, GERMANY) σε μεγέθυνση 20x. Η κινητικότητα του σπέρματος που παρατηρήθηκε ήταν τεσσάρων κατηγοριών:

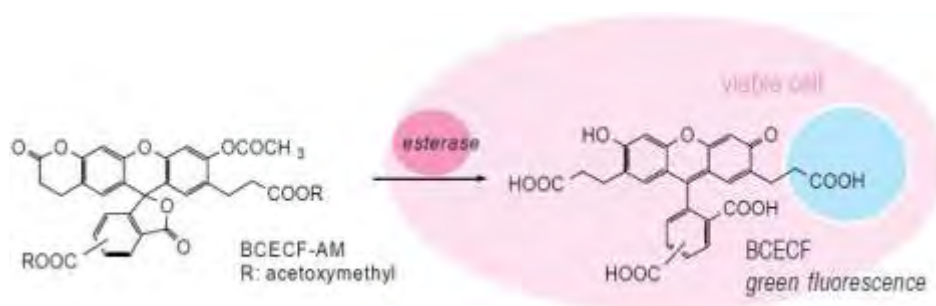
- πρώτη κατηγορία (α): ανήκουν τα σπερματοζωάρια με ταχεία προωθητική κίνηση
- δεύτερη κατηγορία (b): ανήκουν τα σπερματοζωάρια με βραδεία κίνηση
- τρίτη κατηγορία (c): ανήκουν τα σπερματοζωάρια με επιτόπια κίνηση
- τέταρτη κατηγορία (d): ανήκουν τα σπερματοζωάρια που χαρακτηρίζονται από πλήρη ακινησία.

Τόσο πριν όσο και μετά την απόψυξη πραγματοποιήθηκε καταγραφή των παραμέτρων του σπέρματος (σπερμοδιάγραμμα). Ειδικότερα, εκτιμήθηκε η

συγκέντρωση των σπερματοζωαρίων, η κινητικότητα, ο όγκος και η μορφολογία τους και σημειώθηκαν οποιεσδήποτε ανωμαλίες τους.

3. Μέτρηση ενδοκυττάρου pH (pH_i) σε σπερματοζωάρια

Για τη μέτρηση του ενδοκυττάρου pH των σπερματοζωαρίων χρησιμοποιήθηκε μέθοδος φθορισμού. Το pH_i μετρήθηκε με τη βοήθεια του ανιχνευτή BCECF-AM (2',7'-Bis (2-carboxyethyl) -5 (6) - carboxyfluorescein acetoxymethyl ester). Το BCECF-AM είναι μη φορτισμένο μόριο το οποίο περνά την κυτταρική μεμβράνη. Στο εσωτερικό του κυττάρου, οι ενδοκυτταρικές εστεράσες διασπούν τον δεσμό εστέρα και απελευθερώνεται ο BCECF, ο οποίος φθορίζει ανάλογα με την τιμή του ενδοκυττάρου pH (Εικόνα 7)(Ozkan and Mutharasan, 2002).



Εικόνα 7. Συντακτικός τύπος του φθορίζοντα ανιχνευτή BCECF-AM.

Για τη μέτρηση του ενδοκυττάρου pH ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία.

Χρησιμοποιήθηκε συγκέντρωση $2.5 - 3 \times 10^6$ κύτταρα/mL σπερματοζωάρια από φρέσκο δείγμα σπέρματος ή δείγμα στους -20°C . Έγινε προσθήκη 3μL (0.5mM) BCECF-AM και ακολούθησε επώαση στους $15-20^{\circ}\text{C}$ (RT) για 45 λεπτά σε επίπεδο αναδευτήρα (700 rpm). Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στους 4°C και στις 10.000 rpm. Στο ίζημα προστέθηκαν 2 mL 1xPBS και φυγοκεντρήθηκε για 5 λεπτά σε 10.000 rpm. Μετά τη φυγοκέντρηση το εναιώρημα απομακρύνθηκε και προστέθηκαν εκ νέου 2mL 1xPBS και ακολούθησε φυγοκέντρηση. Η διαδικασία της φυγοκέντρησης 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 Biorad, διεγέρθηκαν στα 490

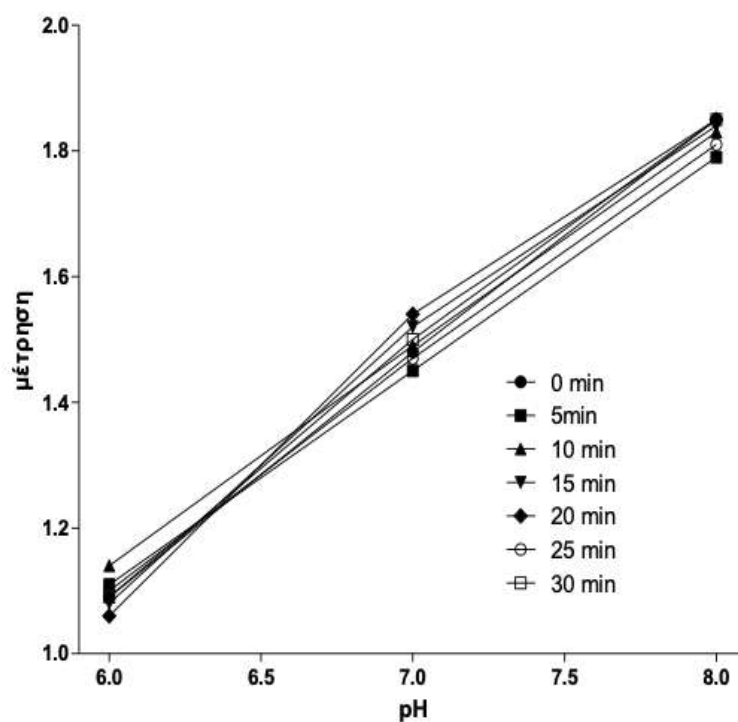
nm και μετρήθηκαν στα 450 nm. Οι μετρήσεις στο φθορισμόμετρο πραγματοποιούνταν ανά 5 λεπτά για συνολικό χρόνο 30 λεπτών.

Υπολογισμός pH με βάση πρότυπη καμπύλη

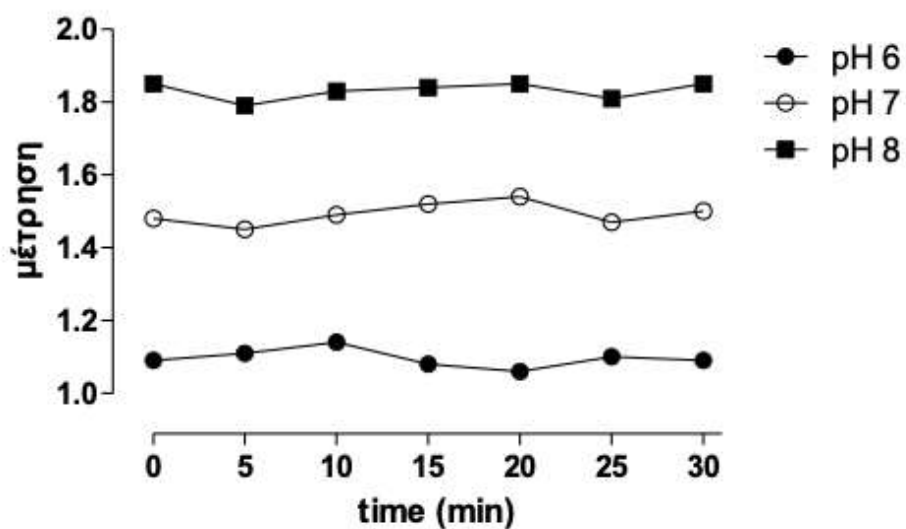
Η αναγωγή των τιμών απορρόφησης (OD) σε τιμές pH_i έγινε με τη βοήθεια πρότυπης καμπύλης και του προγράμματος Microsoft Excel.

Η δημιουργία της πρότυπης καμπύλης έγινε σύμφωνα με την μεθοδολογία των Thomas και συν (1979). Συγκεκριμένα 3×10^6 κύτταρα/ml προστέθηκαν σε διαφορετικά διαλύματα γνωστού pH: MES 30 mM (pH 6), MOPS 30 mM (pH 7) ή TRIS 30 mM (pH 8). Κάθε διάλυμα περιείχε 440 mM KCl και 1 mM MgCl₂ καθώς και το ιονοφόρο νιγερισίνη (nigericin, 6.7 mM). Η νιγερισίνη αποτελεί ανταλλάκτη K⁺/H⁺ που επιτρέπει, σε συνδυασμό με την υψηλή συγκέντρωση εξωκυττάριου K⁺ που υπάρχει στο διάλυμα, την εξισορρόπηση του ενδοκυττάριου pH με το εξωκυττάριο και κατά συνέπεια οι τιμές του ενδοκυττάριου pH για τα κύτταρα που διαλύθηκαν στα τρία διαφορετικά διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν, MES, MOPS ή TRIS είναι παρόμοια με το pH των διαλυμάτων δηλαδή 6, 7 και 8 αντίστοιχα.

Οι τιμές του pH είχαν γραμμική σχέση με τις μετρήσεις (Διάγραμμα 1, Πίνακας 2) αλλά μεταβάλλονταν από 0-30 min (Διάγραμμα 2). Για τον λόγο αυτό για τον υπολογισμό του pH των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν οι εξισώσεις του αντίστοιχου χρόνου (Πίνακας 2).



Διάγραμμα 1. Σχέση μετρήσεων φθορισμόμετρου - pH για χρονικό διάστημα 0-30 min



Διάγραμμα 2. Σχέση μετρήσεων φθορισμόμετρου-χρόνου (0-30 min) για pH 6, 7 και 8.

Πίνακας 2. Σχέσεις μέτρησης στο φθορισμόμετρο (OD) με το pH για χρονικό διάστημα 0-30 min.

Χρόνος (min)	Εξίσωση	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

ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως $MO \pm SD$. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων και τα διαγράμματα έγιναν με τη βοήθεια του προγράμματος GraphPad Prism 5. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως τιμές μέσου όρου (M.O) \pm τυπική απόκλιση (S.D.). 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 ($p < 0.05$).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Μεταβολές των παραμέτρων του σπέρματος με την κατάψυξη

Μελετήθηκαν συνολικά 9 δείγματα από 9 διαφορετικούς άνδρες, μέσης ηλικίας σε έτη 39.88 ± 5.74 . Η ηλικία, το BMI, το ποσοστό των καπνιστών και των καταναλωτών αλκοόλ των ατόμων παρουσιάζονται στον πίνακα 3. Στους καπνιστές ανήκαν άτομα που κάπνιζαν πάνω από 5 τσιγάρα την ημέρα και καταναλωτές αλκοόλ θεωρήθηκαν αυτοί που έπιναν πάνω από 2 ποτήρια τη βδομάδα.

Πίνακας 3. Χαρακτηριστικά των ατόμων, ηλικία, BMI, το ποσοστό καπνιστών και ατόμων με κατανάλωση αλκοόλ που συμμετείχαν στη μελέτη.

ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΣ	
ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ (N)	9
ΗΛΙΚΙΑ (έτη, mean \pm SD)	39.88 ± 5.74
BMI (mean \pm SD)	27.57 ± 4.10
ΚΑΠΝΙΣΤΕΣ (% ατόμων)	42.86%
ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗ ΑΛΚΟΟΛ (% ατόμων)	14.29%

Από τα 9 δείγματα που μελετήθηκαν τα 5 παρουσίαζαν ολιγοσπερμία, ενώ κανένα δείγμα δεν ήταν ασθενοσπερμικό ή τερατοσπερμικό. Οι παράμετροι του σπέρματος τόσο των φρέσκων δειγμάτων όσο και των δειγμάτων μετά από υαλοποίηση παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.

Μετά την κατάψυξη το ποσοστό της προοδευτικής κίνησης των σπερματοζωαρίων (PRM) ελαττώθηκε σημαντικά από 49.73 ± 16.40 σε 31.11 ± 10.59 ($p=0.0039$) ενώ το ποσοστό πλήρους ακινησίας (IM) αυξήθηκε από 24.67 ± 8.902 σε 46.67 ± 13.45 ($p=0.0001$). Το ποσοστό της μη προοδευτικής κίνησης NPM δεν παρουσίασε καμία στατιστικά σημαντική μεταβολή (Πίνακας 4).

Πίνακας 4. Παράμετροι του σπέρματος των 9 δειγμάτων που μελετήθηκαν πριν και μετά την κατάψυξη. *PRM: ποσοστό της προοδευτικής κίνησης των*

σπερματοζωαρίων (a+b), NPM: ποσοστό της μη προοδευτικής κίνησης (c) και το IM: ποσοστό πλήρους ακινησίας (d).

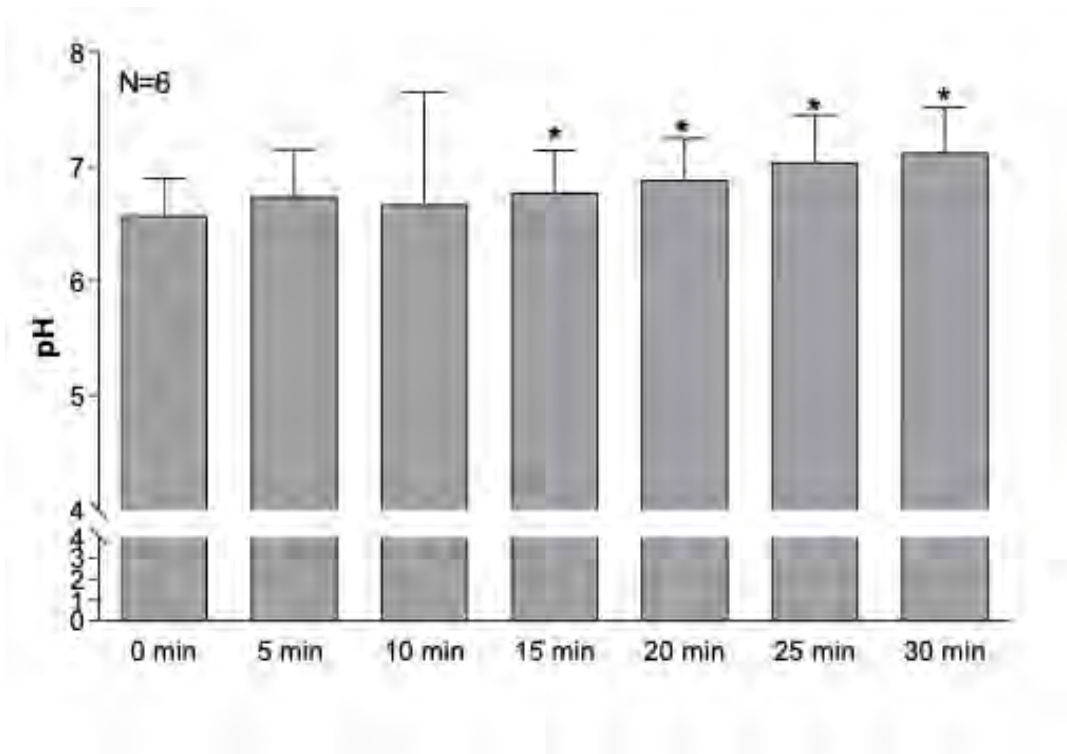
ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΣ	Πριν την κατάψυξη	Μετά την κατάψυξη	P value
Όγκος (mL)	2.738 ± 0.7909	-	
Συγκέντρωση (10^6 /mL)	41.56 ± 38.68	-	
PRM % (a+b)	49.73 ± 16.40	31.11 ± 10.59	0.0039
NPM % (c)	17.44 ± 4.391	18.00 ± 5.916	0.8539
IM % (d)	24.67 ± 8.602	46.67 ± 13.45	0.0001

2. Μεταβολή του pH_i με την κατάψυξη

Από τα 9 δείγματα που μελετήθηκαν εξαιρέθηκαν 3 δείγματα φρέσκου σπέρματος και 5 δείγματα κατεψυγμένου με τιμές pH_i που προσδιορίστηκαν <5.5 καθώς δεν ανταποκρίνονταν στην ευαισθησία της μεθόδου.

Οι τιμές του ενδοκυττάριου pH μεταβάλλονται στο χρονικό διάστημα επώασης με BCECF-AM από 0 έως 30 min τόσο στο φρέσκο (Διάγραμμα 3, Πίνακας 5) όσο και στο κατεψυγμένο σπέρμα (Διάγραμμα 4, Πίνακας 6).

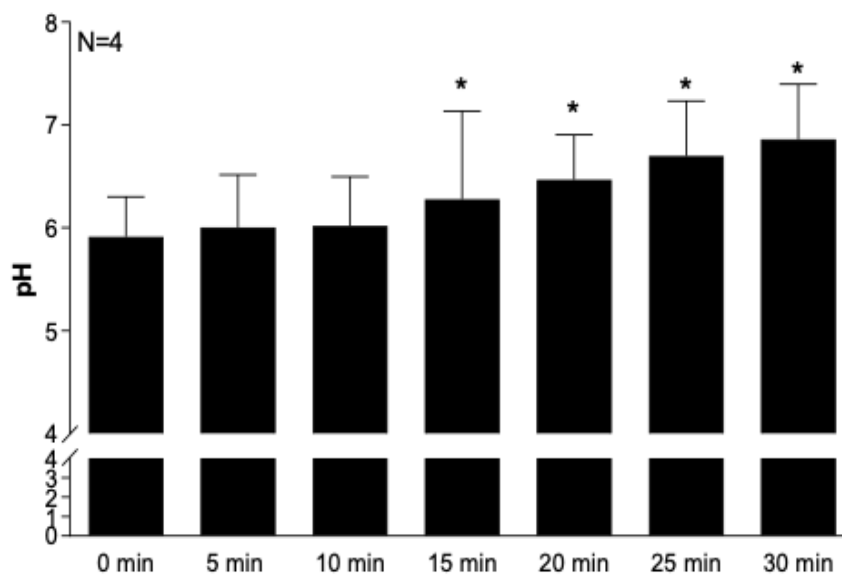
Στο φρέσκο σπέρμα το pH_i αυξάνεται μετά από 20 λεπτά (Διάγραμμα 3, Πίνακας 5). Ενδεικτικά μετά από 30 λεπτά επώασης με BCECF-AM, η τιμή του pH_i είναι 7.124±0.9605.



Διάγραμμα 3. Μεταβολή του pH_i σε φρέσκα σπερματοζωάρια σε χρονικό διάστημα επώασης με BCECF-AM από 0 έως 30 min. Οι τιμές παρουσιάζονται ως mean±SD από 6 δείγματα (N=6).

Πίνακας 5. Τιμές του ενδοκυττάριου pH (pH_i) σε φρέσκα σπερματοζωάρια σε χρονικό διάστημα επώασης με BCECF-AM από 0 έως 30min σε 6 δείγματα με τιμές pH_i >5.5.

Χρόνος (min)	Τιμές pH _i	P Value (σε σύγκριση με 0 min)
0	6.572 ± 0.7868	
5	6.743 ± 0.9899	0.1614
10	6.669 ± 0.9780	0.3068
15	6.775 ± 0.8970	0.0427
20	6.885 ± 0.8804	0.0141
25	7.040 ± 1.000	0.0167
30	7.124 ± 0.9605	0.0134



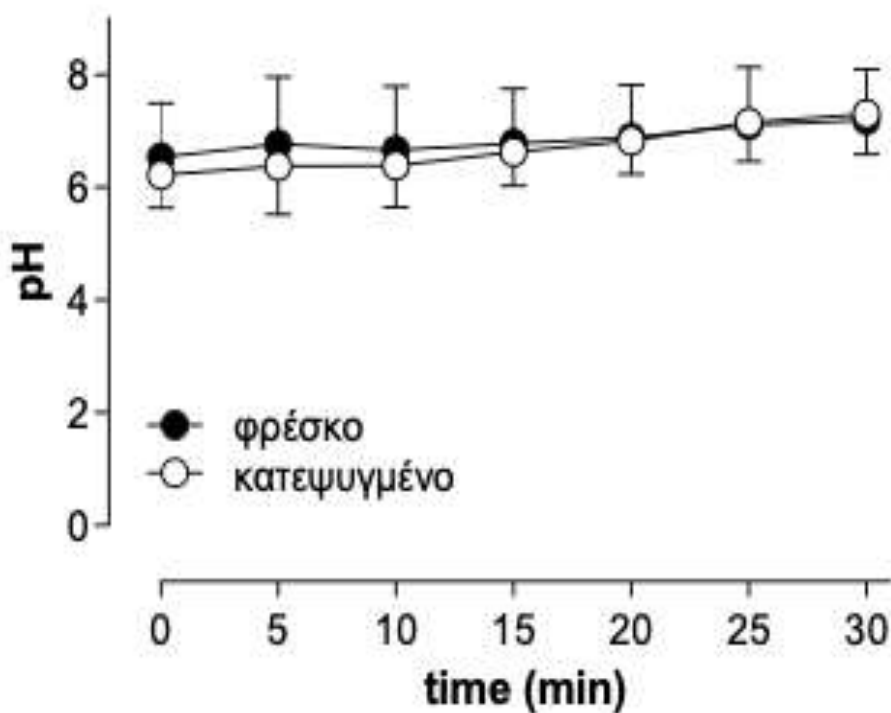
Διάγραμμα 4. Μεταβολή του pH_i σε σπερματοζώαρια, που προηγουμένως είχαν καταψυχθεί για 1-3 ημέρες, για το χρονικό διάστημα επώασης με BCECF-AM από 0 έως 30min. Οι τιμές παρουσιάζονται ως mean±SD από 4 δείγματα.

Πίνακας 6. Τιμές του ενδοκυττάριου pH (pH_i) σε σπερματοζώαρια, που προηγουμένως είχαν καταψυχθεί για 1-3 ημέρες, σε χρονικό διάστημα επώασης με BCECF-AM από 0 έως 30min σε 4 δείγματα με τιμές pH_i >5.5.

Χρόνος (min)	Τιμές pH _i	P Value (σε σύγκριση με 0 min)
0	5.913 ± 0.7786	
5	6.004 ± 1.024	0.5312
10	6.017 ± 0.9602	0.3656
15	6.276 ± 0.8581	0.0270
20	6.468 ± 0.8705	0.0213
25	6.697 ± 1.071	0.0364
30	6.861 ± 1.071	0.0325

Παρόμοια με το φρέσκο και στο κατεψυγμένο σπέρμα το pH_i αυξάνεται μετά από 15 λεπτά (Διάγραμμα 4, Πίνακας 6). Μετά από 30 λεπτά επώασης με BCECF-AM, η τιμή του pH_i είναι 6.861 ± 1.071 .

Με την κατάψυξη του σπέρματος οι τιμές του ενδοκυττάριου pH δεν μεταβλήθηκαν στατιστικά σημαντικά (Διάγραμμα 5).



Διάγραμμα 5. Μεταβολή του pH_i σε φρέσκα σπερματοζωάρια ή σε σπερματοζωάρια που προηγουμένως είχαν καταψυχθεί για 1-3 ημέρες. Τα δείγματα επωάστηκαν με BCECF-AM από 0 έως 30min. Οι τιμές παρουσιάζονται ως $mean \pm SD$ από 3 δείγματα.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η κρυοσυντήρηση του σπέρματος είναι μια διαδικασία υψίστης σημασίας για τη διαχείριση της αρσενικής γονιμότητας στις τεχνικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (ART). Ωστόσο, οι διαδικασίες κατάψυξης και απόψυξης, μπορεί να οδηγήσουν σε κυτταρική βλάβη και κατά συνέπεια διαταραχή στη λειτουργία του σπέρματος. Κατά τη διαδικασία της κρυοσυντήρησης, το σπέρμα αποθηκεύεται σε ατμούς υγρού αζώτου στους -196°C και μπορεί να οδηγήσει σε μεταβολές των παραμέτρων του σπέρματος. Η κατανόηση των μηχανισμών που εμπλέκονται στις μεταβολές αυτές παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον και αποτελεί πεδίο εκτεταμένης έρευνας, ιδιαίτερα τα τελευταία χρόνια (Le et al., 2019). Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η πιθανή επίδραση της κρυοσυντήρησης στο ενδοκυττάριο pH (pHi) των σπερματοζωαρίων. Ο προσδιορισμός του pHi των σπερματοζωαρίων έγινε με μέθοδο φθορισμού, με τη βοήθεια του ανιχνευτή BCECF-AM. Μελετήθηκαν συνολικά 9 δείγματα σπέρματος, τα οποία συλλέχθηκαν στην Πανεπιστημιακή Μαιευτική και Γυναικολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας από άντρες που είχαν προσέλθει λόγω κάποιας αιτίας υπογονιμότητας.

Το ποσοστό κινητικότητας των σπερματοζωαρίων εκτιμήθηκε σε φρέσκο σπέρμα και σε σπέρμα που προηγουμένως είχε διατηρηθεί σε -196°C για 1-7 μέρες. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν στατιστικά σημαντική διαφορά στην κινητικότητα των σπερματοζωαρίων πριν από την κατάψυξη και μετά την απόψυξη. Ειδικότερα η προοδευτική κίνηση των σπερματοζωαρίων (PRM) εμφάνισε σημαντική μείωση μετά την απόψυξη των εν λόγω δειγμάτων (από 49.73 ± 16.40 σε 31.11 ± 10.59 με $p=0.0039$), ενώ το ποσοστό πλήρους ακινησίας (IM) αυξήθηκε από 24.67 ± 8.902 σε 46.67 ± 13.45 με $p=0.0001$. Ωστόσο, το ποσοστό της μη προοδευτικής κίνησης NPM δεν παρουσίασε καμία στατιστικά σημαντική μεταβολή. Όπως είναι ήδη γνωστό η κατάψυξη επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό τις παραμέτρους του σπέρματος. Η κρυοσυντήρηση των δειγμάτων σπέρματος έχει επιδράσεις στις παραμέτρους του όπως στην κινητικότητα, τη βιωσιμότητα και τη μορφολογία. Η υαλοποίηση προκαλεί μείωση της κινητικότητας και της βιωσιμότητας των σπερματοζωαρίων μετά τη απόψυξη, μη φυσιολογική μορφολογία και αύξηση προβλημάτων στην κεφαλή των σπερματοζωαρίων. Με βάση αυτά τα ευρήματα υποδεικνύεται ότι οι διεργασίες κατάψυξης και απόψυξης μπορεί να έχουν εκθέσει το σπέρμα σε οσμωτικό στρες, με υψηλή συγκέντρωση CPAs και σε σχηματισμό ενδοκυττάρων

κρυστάλλων που μπορεί να οδηγήσει σε κυτταρική βλάβη που διακυβεύει τη λειτουργία του σπέρματος (Le et al., 2019). Τα δείγματα μας, αν και παρέμειναν στους -196°C για μικρό χρονικό διάστημα, το διάστημα αυτό αποδείχθηκε αρκετό για να οδηγήσει σε μεταβολές στις παραμέτρους αυτές. Οδηγούμαστε λοιπόν, στο συμπέρασμα ότι ακόμα και η μικρή παραμονή των δειγμάτων σπέρματος στους ατμούς υγρού αζώτου, έχει ιδιαίτερη επίδραση και δημιουργεί πιθανόν βλάβη στα σπερματοζωάρια.

Αρκετές μελέτες δείχνουν ότι η τιμή του ενδοκυττάριου pH των σπερματοζωαρίων σχετίζεται με τη κινητικότητα τους (Nishigaki et al., 2015). Υποθέσαμε λοιπόν ότι οι μεταβολές στη κινητικότητα των σπερματοζωαρίων που παρατηρείται μετά από την κατάψυξή τους μπορεί να συνοδεύονται ή/και να σχετίζονται με μεταβολές στο pH_i. Για το λόγο αυτό μετρήσαμε το pH_i σε φρέσκα και κατεψυγμένα σπερματοζωάρια (μετά από απόψυξη) με τη βοήθεια της φθορίζουσας ουσίας BCECF-AM. Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε με τη χρήση του BCECF-AM για τον προσδιορισμό του pH_i στα σπερματοζωάρια είναι ενδεδειγμένη. Ο παράγοντας αυτός μπορεί να προσδιορίσει τιμές pH_i 6-8, μέσα στο εύρος τιμών pH_i στα σπερματοζωάρια. Το BCECF-AM περνά την πλασματική μεμβράνη και στο εσωτερικό των κυττάρων διασπάται από εστεράσες. Για το λόγο αυτό και οι τιμές φθορισμού που μετρήθηκαν τόσο στα φρέσκα δείγματα όσο και στα σπερματοζωάρια που προηγουμένως είχαν καταψυχθεί μεταβλήθηκαν στο χρονικό διάστημα 0 έως 30 λεπτά.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, ο μέσος όρος pH_i σε φρέσκα σπερματοζωάρια ήταν 7.124 ± 0.9605 και βρίσκονται στο όριο τιμών, 7.2 έως 8.0, που αναφέρονται στη βιβλιογραφία (Nishigaki et al., 2014). Αν και τα σπερματοζωάρια, μετά από κατάψυξη, είχαν πίο όξινο pH (6.861 ± 1.071) σε σύγκριση με τα φρέσκα, σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας φαίνεται η κατάψυξη δεν επηρεάζει σημαντικά το pH_i των σπερματοζωαρίων. Βέβαια το συμπέρασμα αυτό είναι ιδιαίτερα επισφαλές κυρίως για τους λόγους που σχετίζονται με τη μεθοδολογία. Ειδικότερα, κατά τον προσδιορισμό του pH_i, θεωρήθηκαν φρέσκα σπερματοζωάρια αυτά που παρέμειναν για 1-7 μέρες σε -20°C . Οι λόγοι που οδήγησαν στην διατήρηση των σπερματοζωαρίων στους -20°C ήταν καθαρά πρακτικοί (καθυστερημένη ώρα συλλογής δείγματος). Καθώς δεν έχει μελετηθεί, ούτε υπάρχουν βιβλιογραφικά δεδομένα για την επίδραση της παραμονής του σπέρματος στους -20°C στο pH_i χρειάζεται πειραματικά να αποκλειστεί η πιθανή επίδραση της παραμονής των

σπερματοζωαρίων στους -20°C στο pH_i πριν αυτό θεωρηθεί ότι αποτυπώνει τις πραγματικές τιμές του pH_i στα φρέσκα σπερματοζωάρια. Επίσης ο αριθμός των δειγμάτων ήταν πολύ μικρός και ως εκτούτου αποτρεπτικός για την διεξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων. Μόλις 3 δείγματα μελετήθηκαν για το pH_i πριν και μετά την κατάψυξη. Επομένως το ερώτημα κατά πόσο η κατάψυξη των σπερματοζωαρίων μπορεί να επηρεάσει το ενδοκυττάριο pH και πως αυτό μπορεί να σχετίζεται με τις μεταβολές που παρατηρούνται στη λειτουργία τους χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση.

Συντομογραφίες

Πλήρης ονομασία	Συντομογραφία
<i>Assisted reproductive technology</i>	<i>ART</i>
<i>Intrauterine insemination</i>	<i>IUI</i>
<i>In vitro fertilisation</i>	<i>IVF</i>
<i>Intracytoplasmic sperm injection</i>	<i>ICSI</i>
<i>Cryoprotectant</i>	<i>CPA</i>
<i>Dimethylsulfoxide</i>	<i>DMSO</i>
<i>2',7'-Bis (2-carboxyethyl) -5 (6) - carboxyfluorescein acetoxymethyl ester</i>	<i>BCECF-AM</i>

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Aizpurua, J., Medrano, L., Enciso, M., Sarasa, J., Romero, A., Fernández, M. and Gómez-Torres, M. (2017). New permeable cryoprotectant-free vitrification method for native human sperm. *Human Reproduction*, 32(10), pp.2007-2015.

Alshawwa, E., Laqqan, M., Montenarh, M. and Hammadeh, M. (2019). Influence of cryopreservation on the CATSPER2 and TEKT2 expression levels and protein levels in human spermatozoa. *Toxicology Reports*, 6, pp.819-824.

Berger, T., Fußhöller, D., Goodwin, N., Bönigk, W., Müller, A., Dokani Khesroshahi, N., Brenker, C., Wachten, D., Krause, E., Kaupp, U. and Strünker, T. (2017). Post-translational cleavage of Hv1 in human sperm tunes pH- and voltage-dependent gating. *The Journal of Physiology*, 595(5), pp.1533-1546.

E, A. (2019). *Chapter 5 Slow Freezing of Human Sperm.* - PubMed - NCBI. [online] Ncbi.nlm.nih.gov. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28421489> [Accessed 14 Oct. 2019].

Ferramosca, A. and Zara, V. (2014). Bioenergetics of Mammalian Sperm Capacitation. *BioMed Research International*, 2014, pp.1-8.

Gómez-Torres, M., Medrano, L., Romero, A., Fernández-Colom, P. and Aizpurúa, J. (2017). Effectiveness of human spermatozoa biomarkers as indicators of structural damage during cryopreservation. *Cryobiology*, 78, pp.90-94.

Hamamah S, e. (2019). *Internal pH of human spermatozoa: effect of ions, human follicular fluid and progesterone.* - PubMed - NCBI. [online] Ncbi.nlm.nih.gov. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9238683> [Accessed 5 Sep. 2019].

Hamamah, S. and Gatti, J. (1998). Role of the ionic environment and internal pH on sperm activity. *Human Reproduction*, 13(suppl 4), pp.20-30.

Hezavehei, M., Sharafi, M., Kouchesfahani, H., Henkel, R., Agarwal, A., Esmaeili, V. and Shahverdi, A. (2018). Sperm cryopreservation: A review on current molecular cryobiology and advanced approaches. *Reproductive BioMedicine Online*, 37(3), pp.327-339.

Jang, T., Park, S., Yang, J., Kim, J., Seok, J., Park, U., Choi, C., Lee, S. and Han, J. (2017). Cryopreservation and its clinical applications. *Integrative Medicine Research*, 6(1), pp.12-18.

Jin, S. and Yang, W. (2016). Factors and pathways involved in capacitation: how are they regulated?. *Oncotarget*, 8(2).

Karabulut, S., Demiroğlu-Zergeroğlu, A., Yılmaz, E., Kutlu, P. and Keskin, İ. (2018). Effects of human sperm cryopreservation on apoptotic markers in normozoospermic and non-normozoospermic patients. *Zygote*, 26(4), pp.308–313.

Le, M., Nguyen, T., Nguyen, T., Nguyen, V., Nguyen, T., Nguyen, V. and Cao, N. (2019). 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, pp.14-20.

Lishko, P., Kirichok, Y., Ren, D., Navarro, B., Chung, J. and Clapham, D. (2012). The Control of Male Fertility by Spermatozoan Ion Channels. *Annual Review of Physiology*, 74(1), pp.453-475.

Nishigaki, T., José, O., González-Cota, A.L., Romero, F., Treviño, C.L. and Darszon, A. (2015). Intracellular pH in sperm physiology. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, [online] 450(3), pp.1149–1158.

Ozkan, P. and Mutharasan, R. (2002). A rapid method for measuring intracellular pH using BCECF-AM. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1572(1), pp.143-148.

Palomar Rios, A. and Molina Botella, I. (2017). Sperm parameters that play a major role in the assessment of semen quality after cryopreservation. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 34(10), pp.1271-1276.

Palomar Rios, A., Gascón, A., Martínez, J., Balasch, S. and Molina Botella, I. (2017). Sperm preparation after freezing improves motile sperm count, motility, and viability in frozen-thawed sperm compared with sperm preparation before freezing-thawing process. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 35(2), pp.237-245.

Puga Molina, L., Luque, G., Balestrini, P., Marín-Briggiler, C., Romarowski, A. and Buffone, M. (2018). Molecular Basis of Human Sperm Capacitation. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 6.

Rahiminia, T., Hosseini, A., Anvari, M., Ghasemi-Esmailabad, S. and Talebi, A. (2017). Modern human sperm freezing: Effect on DNA, chromatin and acrosome integrity. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*, 56(4), pp.472-476.

Ritagliati, C., Baro Graf, C., Stival, C. and Krapf, D. (2018). Regulation mechanisms and implications of sperm membrane hyperpolarization. *Mechanisms of Development*, 154, pp.33-43.

Sharma, R., Kattoor, A., Ghulmiyyah, J. and Agarwal, A. (2014). Effect of sperm storage and selection techniques on sperm parameters. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 61(1), pp.1-12.

Shi, Q., Xie, Y., Wang, Y. and Li, S. (2017). Vitrification versus slow freezing for human ovarian tissue cryopreservation: a systematic review and meta-analysis. *Scientific Reports*, 7(1).

Sieme, H., Oldenhof, H. and Wolkers, W. (2016). Mode of action of cryoprotectants for sperm preservation. *Animal Reproduction Science*, 169, pp.2-5.

Sun, X., Zhu, Y., Wang, L., Liu, H., Ling, Y., Li, Z. and Sun, L. (2017). The Catsper channel and its roles in male fertility: a systematic review. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 15(1).

Zhou, J., Chen, L., Li, J., Li, H., Hong, Z., Xie, M., Chen, S. and Yao, B. (2015). The Semen pH Affects Sperm Motility and Capacitation. *PLOS ONE*, 10(7), p.e0132974.