

## ΖΩΗ ΑΛΛΑΜ

“Ο ρόλος της βιταμίνης C κατά τη διάρκεια της κρυοσυντήρησης ανθρώπινου σπέρματος”

### ΠΕΡΙΛΗΨΗ

**ΕΙΣΑΓΩΓΗ-ΣΚΟΠΟΣ:** Οι τεχνικές της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, αποτελούν ένα χρήσιμο εργαλείο των υπογόνιμων ζευγαριών, για την επίτευξη επιτυχούς κύησης. Αυτές, προϋποθέτουν τη ύπαρξη σπέρματος ικανοποιητικής ποιότητας τη στιγμή που λαμβάνουν χώρα. Για την εξασφάλιση της παραπάνω προϋπόθεσης, μία τεχνική γνωστή ως κρυοσυντήρηση σπέρματος έχει ανακαλυφθεί και χρησιμοποιείται σήμερα ευρέως. Σύμφωνα με προηγούμενες έρευνες, η κρυοσυντήρηση δημιουργεί μία δραματική μείωση στην ποιότητα του σπέρματος, η οποία οφείλεται, μεταξύ άλλων παθοφυσιολογικών μηχανισμών, στη δημιουργία οσμωτικών αλλαγών και βλαβών στη μεμβράνη των κυττάρων αυτών, ως αποτέλεσμα του θερμικού σοκ κατά τη διάρκεια ψύξης και απόψυξης. Πιο αναλυτικά, κατά την έκθεση του σπέρματος στις ακραίες θερμοκρασιακές μεταβολές, παράγεται αυξημένη ποσότητα ελευθέρων ριζών (Reactive Oxygen Species, ROS). Στόχος της παρούσης έρευνας, ήταν η ελαχιστοποίηση της οξειδωτικής επίθεσης των ROS, μέσω προσθήκης ενός αντιοξειδωτικού στο μέσο κρυοσυντήρησης. Έγινε επιλογή της βιταμίνης C, λόγω της αποτελεσματικής αντιοξειδωτικής της δράσης και του βασικού πλεονεκτημάτος της να είναι μόριο διαλυτό στο νερό. Αυτό επιτρέπει τη προσθήκη του απ'ευθείας στο κρυοπροστατευτικό υλικό, χωρίς να υπάρχει ανάγκη διάλυσης σε άλλο μέσο, εφόσον το κρυοπροστατευτικό έχει ως βάση του το νερό.

**ΑΣΘΕΝΕΙΣ- ΜΕΘΟΔΟΙ:** Πραγματοποιήθηκε συλλογή δειγμάτων σπέρματος από 30 υγιείς άνδρες, χωρίς προβλήματα γονιμότητας, οι οποίοι προσήλθαν στο Τμήμα Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής του νοσοκομείου Αρεταίειο. Διεξήχθη ανάλυση σπέρματος ρουτίνας (σπερμοδιάγραμμα), ώστε να γίνει επιλογή σπερμάτων, αποκλείοντας τα δείγματα με ανώμαλες παραμέτρους. Στη μελέτη συμπεριλήφθηκαν 30 δείγματα σπέρματος που χαρακτηρίζονται «φυσιολογικά» σύμφωνα με τις τιμές αναφοράς, όπως αυτές διατυπώνονται στο *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, Fifth Edition 2010*. Κάθε ένα από τα επιλεγόμενα δείγματα σπέρματος, χωρίστηκε σε 2 ομάδες: κρυοσυντηρημένο σπέρμα

χωρίς προσθήκη αντιοξειδωτικού στο κρυοπροστατευτικό μέσο (ομάδα control) και μια ομάδα, στην οποία τοποθετήθηκε στο μέσο κρυοσυντήρησης το αντιοξειδωτικό ασκορβικό οξύ σε συγκέντρωση 300μM. Κάθε δείγμα υπέστη πρώτα τη διαδικασία της κρυοσυντήρησης και κατόπιν αυτή της απόψυξης, ενώ πριν και μετά την κρυοσυντήρηση, τα δείγματα σπέρματος ελεγχθήκαν για τη γενική τους ποιότητα (αριθμός σπερματοζωαρίων, κινητικότητα, μορφολογία). Κάθε ομάδα control μετά τη διαδικασία της απόψυξης και της διενέργειας σπερμοδιαγράμματος, χωρίστηκε σε 2 ομάδες : στην πρώτη έγινε επώαση με 300 μM ασκορβικού οξέος, για μία ώρα σε θερμοκρασία 37° C, ενώ η δεύτερη χρησιμοποιήθηκε ως control. Για τη σύγκριση μεταξύ των τεσσάρων ομάδων για τους παράγοντες κινητικότητας και μορφολογίας εφαρμόστηκε ένα γενικευμένο γραμμικό μοντέλο (GLM) με ανεξάρτητη μεταβλητή κάθε έναν από τους παράγοντες (π.χ ποσοστό καλώς κινουμένων σπερματοζωαρίων, ποσοστό ανωμαλιών αυχένα κ.λ.π) και εξαρτημένη μεταβλητή την ομάδα ανάλογα με το χειρισμό του σπέρματος. Ως ομάδα αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το δείγμα πριν την κατάψυξη. Τα αποτελέσματα δίνονται στην μορφή λόγου συμπληρωματικών πιθανοτήτων (Odds Ratio). Η στατιστική σημαντικότητα τέθηκε στο  $\alpha=5\%$ .

**ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ:** Η παρούσα έρευνα καταδεικνύει πως η διαδικασία της κρυοσυντήρησης, δημιουργεί σοβαρές βλάβες στο ανθρώπινο σπέρμα, μειώνοντας το ποσοστό των καλώς κινουμένων σπερματοζωαρίων και επηρεάζοντας αρνητικά τη μορφολογία του. Η προσθήκη 300μM ασκορβικού στο κρυοσυντηρητικό μέσο, βοηθά στη διατήρηση της καλής μορφολογίας των σπερματοζωαρίων, κατά τη διάρκεια ενός κύκλου κρυοσυντήρησης και απόψυξης. Η επώαση του αποψυγμένου σπέρματος με 300μM βιταμίνης C για μία ώρα, επηρεάζει αρνητικά τις ουρές των σπερματοζωαρίων. Είναι απαραίτητη η διεξαγωγή περαιτέρω έρευνας για την αξιολόγηση του αποτελέσματος αυτού.

## ABSTRACT

**OBJECTIVE:** Assisted Reproductive Techniques are useful in helping infertile couples achieve successful conception. Initial studies have shown that sperm cryopreservation, one step in assisted reproduction, causes a dramatic reduction in sperm quality. This has been attributed to, among other things, free radical activities. The aim of the present study was to minimize this oxidative attack, by adding an antioxidant into the sperm cryoprotectant. Vitamin C was selected for this purpose, due to its efficient free radical scavenging properties and solubility in aqueous phase.

**METHODS:** Semen samples were collected from 30 fertile males. Each sample was divided into four groups: fresh semen, cryopreserved semen without treatment, samples cryopreserved with ascorbate 300 $\mu$ M and samples incubated with 300 $\mu$ M ascorbate for one hour at 37° C, after thawing process. Seminal analysis of the baseline, prior to cryopreservation was performed and post-seminal analysis was conducted. Spermatozoa were examined for their motility and morphology, in the presence or absence of ascorbate during cryopreservation. Statistical analysis was performed, using a generalized linear model (GLM) with independent variable each of the factors analyzed (e.g. percentage of motile sperm) and dependent variable the group depending on the handling of semen.

**RESULTS:** This study demonstrates that cryopreservation produces various cryodamage to human spermatozoa, reducing the percentage of motile sperm and affecting sperm morphology. Supplementation of ascorbate 300 $\mu$ M, does have an improving effect on human sperm morphology in the process of freeze-thawing. Incubation of thawed sperm with ascorbate 300 $\mu$ M for one hour at t 37° C, does have a negative effect on sperm tails. Further studies will be necessary to confirm these findings.