

## ΦΩΤΕΙΝΗ ΑΛΒΑΝΟΠΟΥΛΟΥ

### **“Επίδραση των επανειλημμένων κύκλων κατάψυξης-απόψυξης σε δείγματα σπέρματος”**

#### **ΠΕΡΙΛΗΨΗ**

**Εισαγωγή:** Η κρυοσυντήρηση των ανθρώπινων σπερματοζωαρίων αποτελεί σήμερα αναπόσπαστο μέρος της τεχνολογίας της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής.

**Σκοπός:** Ήταν η εύρεση της ανοχής των ανθρώπινων σπερματοζωαρίων σε επανειλημμένους κύκλους κατάψυξης-απόψυξης δειγμάτων σπέρματος και η διερεύνηση πιθανής διαφοροποίησης των αποτελεσμάτων της κρυοσυντήρησης σε σχέση με τη χρήση επεξεργασμένου ή αυτούσιου δείγματος.

**Μεθοδολογία:** Το υλικό της εργασίας αποτελείται από δείγματα σπέρματος ανδρών (n=31) που προσήλθαν στο εργαστήριο εξωσωματικής γονιμοποίησης Πανεπιστημιακής Κλινικής. Μετά την ρευστοποίηση του δείγματος προσδιορίζονται ο όγκος και το pH του, η συγκέντρωση και η κινητικότητα των σπερματοζωαρίων στο κάθε δείγμα, καθώς επίσης και η μορφολογία τους. Τα δείγματα κατηγοριοποιήθηκαν σε δείγματα με παραμέτρους σπέρματος εντός τιμών αναφοράς και δείγματα εκτός τιμών αναφοράς, σύμφωνα με τα προτεινόμενα κριτήρια του Π.Ο.Υ. Ένα μέρος του κάθε δείγματος, μετά την ολοκλήρωση των αρχικών μετρήσεων (1η ώρα), καταψυχόταν σε υγρό άζωτο ενώ ένα δεύτερο μέρος του ίδιου δείγματος, καταψυχόταν αφού είχε υποστεί την διαδικασία της ενεργοποίησης με φυγοκέντρηση κλασμάτων διαβαθμισμένης πυκνότητας. Ύστερα από παραμονή τουλάχιστον 48 ωρών στο υγρό άζωτο το κάθε δείγμα αποψύχεται και γίνεται μέτρηση της κινητικότητας και της μορφολογίας των σπερματοζωαρίων. Η ζωτικότητα των σπερματοζωαρίων προσδιορίστηκε όταν πλέον δεν ανιχνευόταν στο δείγμα κινητά σπερματοζωάρια.

**Αποτελέσματα:** Τα αρχικά δείγματα παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις δυο ομάδες μόνον στη μορφολογία των σπερματοζωαρίων, με τους άνδρες που παρουσίαζαν παραμέτρους σπέρματος εκτός τιμών αναφοράς να έχουν μικρότερο ποσοστό φυσιολογικών μορφών ( $p < 0,001$ ). Μετά την ενεργοποίηση, η συγκέντρωση μειώνεται περισσότερο από 50% ( $p < 0,001$ ) αλλά η κινητικότητα αυξάνεται κατά 30% ( $p < 0,001$ ) και το ποσοστό των σπερματοζωαρίων με φυσιολογικές μορφές βελτιώνεται κατά 60% περίπου ( $p = 0,003$ ). Βελτιώνεται επίσης η προωθητική κινητικότητα ( $p = 0,003$ ) όπως και ο αριθμός κύκλων κατάψυξης μέχρι τον μηδενισμό της κινητικότητας ( $p = 0,063$ ). Η προωθητική κινητικότητα και στις δύο ομάδες, προ ενεργοποίησης, μειώνεται σχεδόν εκθετικά κατά τους τρεις πρώτους κύκλους και στη συνέχεια προσεγγίζει το μηδέν. Τα ενεργοποιημένα δείγματα και των δύο ομάδων, φαίνεται να διατηρούν την προωθητική κινητικότητα για δύο παραπάνω κύκλους, σε σχέση με τα μη ενεργοποιημένα. Μετά την ενεργοποίηση, στα δείγματα με παραμέτρους εκτός τιμών αναφοράς παρατηρείται σταδιακή βελτίωση της ανάκτησης της ολικής κινητικότητας από τον δεύτερο έως και τον 4ο κύκλο, ενώ τα ποσοστά στον τελευταίο κύκλο και για τις δύο ομάδες είναι βελτιωμένα (37% και 42% για τους εντός και εκτός τιμών αναφοράς αντίστοιχα), σε σχέση με τα τελικά ποσοστά πριν από την ενεργοποίηση. Όταν συγκρίνεται η πτώση της κινητικότητας ανά κύκλο, στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των κύκλων παρατηρούνται μέχρι και τον πέμπτο κύκλο στους εντός τιμών αναφοράς και μέχρι και τον τέταρτο κύκλο στους εκτός τιμών αναφοράς.

**Συμπεράσματα:** Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης τονίζουν τα ευεργετικά αποτελέσματα της ενεργοποίησης του σπέρματος τόσο στους εντός τιμών αναφοράς όσο και στους εκτός τιμών αναφοράς και δείχνουν ότι είναι δυνατή η διατήρηση της κινητικότητας, ακόμα και μετά από 10 επαναλαμβανόμενους κύκλους ψύξης-απόψυξης σε δείγματα που παρουσιάζουν παραμέτρους εντός των τιμών αναφοράς. Γίνεται φανερό

πως άνδρες οι οποίοι παρουσιάζουν καταστροφικές για τη σπερματογένεση παθήσεις, κατανύχοντας περιορισμένης ποσότητας σπέρμα και με την βοήθεια της τεχνολογίας της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, διατηρούν ελπίδες να αποκτήσουν απογόνους που θα φέρουν το δικό τους γενετικό υλικό δίχως να χρειαστεί να αναζητήσουν σπέρμα από δότη.

## SUMMARY

**Introduction:** Cryopreservation of human spermatozoa is now an integral part of the assisted reproduction technology.

**Objective:** To detect the human spermatozoa cryoinjury resistance in case of repeated freezing–thawing cycles and investigate the possible diverse cryopreservation effects, depending on the use of prepared or neat semen samples.

**Materials and Methods:** The study consists in using semen samples (n=31) obtained from individuals that attended the IVF laboratory of a University Hospital in order to have a sperm examination. Once the liquefaction of the sample has taken place, the pH, the sample volume and concentration were determined, as well as the motility and the morphology of the spermatozoa present. Each sample was assigned in one of the groups under investigation: samples from patients that present normal sperm parameters or samples from patients that present abnormal sperm parameters, according to the WHO guidelines. After the initial measurements, a part of each sample was frozen using the liquid nitrogen vapor method, while a second portion of the same sample was frozen after preparation through a density gradient centrifugation. After remaining in liquid nitrogen storage for at least 48 hours, thawing of the samples took place and an aliquot from each sample was removed in order to determine the motility and morphology of the spermatozoa. Repeated freeze-thawing cycles were performed in each sample until no motile sperm were detected. At this point the vitality of the spermatozoa was determined, using the eosin/nigrosin staining method.

**Results:** Statistically significant differences between the two groups regarded only the morphologically normal sperm forms, where the group of patients presenting abnormal sperm parameters exhibited a smaller percentage ( $p<0,001$ ). In the prepared samples, the sperm concentration was more than 50% reduced ( $p<0,001$ ), but the motility, as well as the percentage of the morphologically normal spermatozoa were improved by 30% ( $p<0,001$ ) and almost 60% ( $p=0,003$ ) respectively. The progressive motility ( $p=0,003$ ) and the number of cycles withstanding the freeze-thawing procedure ( $p=0,063$ ) were also increased. Progressive motility in neat samples decreases exponentially during the first three cycles and after that point results nearly undetectable, on the other hand the prepared samples seem to resist for two cycles longer. In the prepared samples, the motility recovery rate was gradually improved from the second until the fourth cycle, in case of the patients that present abnormal sperm parameters, while the last cycle percentage of the recovered motility showed an improvement reaching 37% and 42% for the normal and abnormal sperm parameters groups respectively, compared with the rates observed in neat semen samples. When comparing the motility loss between successive cycles of freezing-thawing, statistically significant differences were observed until the fifth cycle in the patients with normal sperm parameters group, and up to the fourth cycle in the ones presenting abnormal sperm parameters.

**Conclusions:** The results of this study highlight the beneficial effects that the sperm preparation has, both on samples with normal sperm parameters, as well as on those that present the abnormal ones and show that it is possible to detect sperm motility in semen samples even after 10 repeated freeze-thawing cycles, which is the case of individuals presenting normal sperm parameters. It becomes evident that men suffering from

conditions that severely impair the spermatogenesis process, having stored a limited sperm quantity and using the help of the assisted reproductive technology, may still retain hopes to father their own children, without the need to seek for donor sperm.