

ΔΗΜΟΚΡΙΤΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΡΑΚΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

«Μελέτη της in-vitro επίδρασης αυξητικών παραγόντων επί της κινητικότητας και ζωτικότητας ανθρώπινων σπερματοζωαρίων»

Υποψήφια Διδάκτωρ: Δήμητρα Κορακάκη,
Διπλωματούχος Ιατρικών Εργαστηρίων, ΑΤΕΙ Θεσσαλονίκης & ΜΠΣ «Ανθρώπινη Αναπαραγωγή», Ιατρικό Τμήμα Δ.Π.Θ.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Πειραματική μελέτη που έχει ως στόχο να διευκρινίσει την in-vitro επίδραση αυξητικών παραγόντων επί της κινητικότητας και ζωτικότητας των ώριμων ανθρώπινων σπερματοζωαρίων και να καθορίσει βέλτιστες συγκεντρώσεις για την αύξηση της κινητικότητας και ζωτικότητας.

Η επίδραση των αυξητικών παραγόντων επί της κινητικότητας των ώριμων σπερματοζωαρίων αποτελεί ένα ανοιχτό επιστημονικό θέμα για τη Φυσιολογία του Αναπαραγωγικού Συστήματος. Παράλληλα, έχει μεγάλο κλινικό ενδιαφέρον γιατί η χρήση αυξητικών παραγόντων στα καλλιεργητικά υλικά επεξεργασίας σπέρματος μπορεί να βελτιώσει τα ποσοστά επιτυχίας στις Τεχνικές Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής.

Οι αυξητικοί παράγοντες είναι ουσίες που διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και πλήθος άλλων λειτουργιών στα κύτταρα. Είναι παρόντες σε κάθε σημείο του οργανισμού και εμπλέκονται σε όλες σχεδόν τις λειτουργίες του.

Απαντούν και στο σπερματικό υγρό όπου το καθιστούν περιβάλλον κατάλληλο για την επιβίωση, ωρίμανση και ενεργοποίηση των σπερματοζωαρίων. Η κινητικότητα και η ζωτικότητα αποτελούν δύο από τις σημαντικότερες παραμέτρους του σπέρματος οι οποίες σχετίζονται με επιτυχή γονιμοποίηση.

Η παρούσα διδακτορική μελέτη καλείται να απαντήσει στα εξής κύρια ερωτήματα:

- Η in-vitro επίδραση αυξητικών παραγόντων βελτιώνει την κινητικότητα των ανθρώπινων σπερματοζωαρίων;
- Ποια είναι η πλέον αποτελεσματική συγκέντρωση επί της κινητικότητας για κάθε ένα αυξητικό παράγοντα;
- Ποιος αυξητικός παράγοντας είναι ο πλέον αποτελεσματικός για την in-vitro βελτίωση της κινητικότητας;
- Η in-vitro επίδραση των αυξητικών παραγόντων βελτιώνει τη ζωτικότητα των ανθρώπινων σπερματοζωαρίων;

- Ποια είναι η πλέον αποτελεσματική συγκέντρωση αυξητικού παράγοντα που βελτιώνει την ζωτικότητα των σπερματοζωαρίων *in vitro*;
- Ποιος αυξητικός παράγοντας είναι ο πλέον αποτελεσματικός για την *in-vitro* βελτίωση της ζωτικότητας;

ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η μέθοδος προσέγγισης των ερευνητικών ερωτημάτων έχει ως εξής:

Θα συλλεχθούν συνολικά 100 δείγματα σπέρματος και θα αξιολογηθούν με τις καθιερωμένες διαδικασίες της βασικής ανάλυσης σπέρματος (ΠΟΥ, 2010).

Δείγματα σπέρματος θα ληφθούν από εθελοντές που θα πληρούν τα κάτωθι κριτήρια: ηλικία ≥ 18 ετών, γραπτή αποδοχή χρήσης του σπέρματος για

ερευνητικούς σκοπούς. Κριτήρια αποκλεισμού: ηλικία > 60 ετών, αζωοσπερμία, ασπερμία, ιστορικό χειρουργικών επεμβάσεων στα γεννητικά όργανα, ιστορικό νεοπλασιών, ιστορικό λήψης φαρμάκων που επηρεάζουν σπερματογένεση ή κινητικότητα κατά το προηγούμενο εξάμηνο. Κάθε ένα θα αξιολογηθεί με τις καθιερωμένες διαδικασίες της βασικής ανάλυσης σπέρματος (ΠΟΥ, 2010). Έτσι, θα εκτιμηθούν: όγκος, ρευστοποίηση, ιξώδες, ΡΗ, όψη, συγκέντρωση σπερματοζωαρίων, ολικός αριθμός σπερματοζωαρίων, κινητικότητα, ζωτικότητα, μορφολογία, ύπαρξη λευκών αιμοσφαιρίων. Η κινητικότητα θα αξιολογηθεί στις κάτωθι κατηγορίες, σύμφωνα με τις συστάσεις του ΠΟΥ (2010): προωθητική κινητικότητα, επιτόπια κινητικότητα, ακίνητα. Η εκτίμηση της συγκέντρωσης θα γίνει με αιματοκυτταρόμετρο Improved Neubauer, μετά από τις απαραίτητες αραιώσεις. Η εκτίμηση της ζωτικότητας θα γίνει με διάλυμα εωζίνης/νιγκροσίνης και παρατήρηση σε 100X. Η κινητικότητα θα εκτιμηθεί σε ορθό μικροσκόπιο με φακό 40X αντίθεσης φάσης.

Ανάλογα με τα αποτελέσματα, το δείγμα θα κατανεμηθεί σε μια από τις κατωτέρω υποομάδες: φυσιολογικά, ασθενοζωοσπερμικά, ολιγοζωοσπερμικά, ασθενο-ολιγοζωοσπερμικά.

Στη συνέχεια, κάθε δείγμα θα επεξεργασθεί με φυγοκέντρηση διαβαθμισμένης πυκνότητας ώστε να διαχωρισθούν τα κινητικά σπερματοζωάρια από τα ακίνητα, άλλα κυτταρικά στοιχεία και το σπερματικό πλάσμα. Το ίζημα, που θα περιέχει αυξημένο ποσοστό κινητικών σπερματοζωαρίων, σε σχέση με το αρχικό δείγμα, θα αναμιχθεί με καλλιεργητικό υλικό αναφοράς και θα φυγοκεντρηθεί δύο φορές. Στη συνέχεια, θα αξιολογηθεί πάλι, από τον ίδιο ερευνητή ως προς κινητικότητα, ζωτικότητα, συγκέντρωση και μορφολογία, και θα χωρισθεί σε ίσα μερίδια. Τα μερίδια αυτά, θα επωασθούν για δύο ώρες με ή χωρίς την προσθήκη αυξητικού παράγοντα. Με το πέρας του διώρου, θα γίνει αξιολόγηση της κινητικότητας και ζωτικότητας κάθε μεριδίου από τον ίδιο ερευνητή.

Εντός των πρώτων έξι μηνών, μετά από ενδελεχή μελέτη της βιβλιογραφίας, θα καταληχθούν τρεις αυξητικοί παράγοντες και οι διαφορετικές συγκεντρώσεις που θα δοκιμασθούν. Στη συνέχεια, θα παρασκευασθούν πρότυπα διαλύματα με βάση το καλλιεργητικό υλικό αναφοράς και προσθήκη κάθε αυξητικού παράγοντα.

Τα δεδομένα, θα καταχωρηθούν σε βάση δεδομένων, στην οποία δεν θα αναγράφονται τα ονόματα των εθελοντών, αλλά κωδικός δείγματος και εθελοντή. Όλες οι εργασίες θα διενεργηθούν σε εργαστήρια κατάλληλα εξοπλισμένα με θαλάμους νηματικής ροής κλάσης II, ορθά μικροσκόπια αντίθεσης φάσης,

φυγοκέντρους και άλλα όργανα, ώστε να εξασφαλίζεται άρτιο εργαστηριακό αποτέλεσμα, αλλά και ασφάλεια των ερευνητών.

Η στατιστική επεξεργασία βασικά θα αποσκοπεί στη σύγκριση των παραμέτρων κινητικότητας και ζωτικότητας πριν και μετά την επώαση με αυξητικό παράγοντα, καθώς και τη σύγκριση μεταξύ μεριδίων με ή χωρίς προσθήκη αυξητικού παράγοντα. Τα παραπάνω, θα αναλυθούν ξεχωριστά για κάθε υποομάδα, αλλά και για το σύνολο των δειγμάτων.

Η διδακτορική έρευνα θα υλοποιηθεί στο Εργαστήριο Φυσιολογίας του Ιατρικού Τμήματος Δ.Π.Θ.

Η τριμελής επιτροπή:

Ασημακόπουλος Βύρων, Αναπληρωτής Καθηγητής Φυσιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, ΔΠΘ

Νικολέττος Νικόλαος, Καθηγητής Φυσιολογίας με έμφαση στη Φυσιολογία Αναπαραγωγής- Εξωσωματική Γονιμοποίηση, Τμήμα Ιατρικής, ΔΠΘ

Σιμοπούλου Μάρα, Επίκουρη Καθηγήτρια Πειραματικής Φυσιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, ΕΚΠΑ

DEMOCRITUS UNIVERSITY OF THRACE

DEPARTMENT OF MEDICINE

Phd Dissertation

«Study of the in-vitro effect of growth factors on the mobility and vitality of human spermatozoa»

Phd Candidate: Dimitra Korakaki

Diploma in Medical Laboratories, ATEI Thessaloniki & MSc "Human Reproduction",
Medical Department of DUTH.

ABSTRACT

An experimental study aimed at clarifying the in-vitro effect of growth factors on the mobility and vitality of mature human spermatozoa and to determine optimal concentrations to increase mobility and vitality.

The effect of growth factors on the mobility of mature sperm is an open scientific topic for the Physiology of the Reproductive System. At the same time, it is of great clinical interest because the use of growth factors in sperm processing materials can improve success rates in Assisted Reproductive Techniques. Growth factors are substances that stimulate the proliferation, differentiation and number of other functions in the cells. They are present at every part of the body and are involved in almost all of its functions. They also respond to the seminal fluid, making it an environment suitable for the survival, maturation and activation of spermatozoa. Mobility and vitality are two of the most important parameters of sperm associated with successful fertilization.

This doctoral study is asked to answer the following main questions:

- Does the in-vitro effect of growth factors improves the mobility of human spermatozoa?
- What is the most effective concentration on mobility for each growth factor?
- Which growth factor is the most effective way to improve in-vitro mobility?
- Does the in-vitro effect of growth factors improve the vitality of human sperm?
- What is the most effective concentration of growth factor that improves sperm vitality in vitro?
- Which growth factor is the most effective for in-vitro improvement of vitality?

STUDY PROTOCOL

The method of approach to research questions is as follows:

A total of 100 sperm samples will be collected and evaluated according to standard procedures for basic sperm analysis (WHO, 2010).

Samples of semen will be obtained from volunteers who meet the following criteria: age \geq 18 years, written acceptance of semen use for research purposes. Exclusion criteria: age $>$ 60 years, azoospermia, aspermia, history of surgery on the genitals, history of neoplasia, history of medication affecting spermatogenesis or mobility in the previous semester. Each one will be evaluated by standard procedures for basic sperm analysis (WHO, 2010). Thus, we will estimate: volume, fluidization, viscosity, pH, appearance, sperm concentration, total sperm count, mobility, vitality, morphology, white blood cell count. Mobility will be assessed in the following categories, in line with the WHO(2010) recommendations:

progressive motile, non-progressive motile, non-motile. The assessment of the

concentration will be done with an Improved Neubauer hemacytometer, after the necessary dilutions. The estimation of vitality will be done with eosin / nigrosine solution and observation at 100X. Mobility will be assessed under a microscope at 40X phase contrast lens. Depending on the results, the sample will be classified into the following subgroups: Normal, Asthenozoospermia, Oligozoospermia, Astheno-Oligozoospermia.

Each sample will then be subjected to Density-Gradient centrifugation for the separation of the mobile and immobile spermatozoa, other cellular components and the seminal plasma. The precipitate, containing a higher percentage of motile sperm in comparison to the original sample will be mixed with reference culture medium and will be centrifuged twice. It will then be re-evaluated by the same researcher as to mobility, vitality, concentration and morphology, and will be divided into equal fragments. These portions will be incubated for two hours with or without growth factor. At the end of the two-hour period, the mobility and vitality of each fragment will be evaluated by the same researcher.

Within the first six months, after a thorough study of the literature, three growth factors and their different concentrations will be selected for trial. Subsequently, standard solutions based on the reference culture media with addition of each growth factor will be prepared. The data will be inserted into a database, in which the names of the volunteers will not be included, only sample and volunteer codes. All work will be carried out in laboratories properly equipped with Class II laminar flow cabinets, upright phase contrast microscopes, centrifuges and further equipment to ensure accurate laboratory results and laboratory safety.

Statistical analysis will primarily aim at the comparison of the mobility and vitality parameters prior to and after growth factor incubation and comparison of fragments with or without the addition of growth factor. The above will be analyzed separately for each subgroup, and for the entire sample.

The doctoral research will be carried out in the Laboratory of Physiology of the Medical Department of the DUTH.

The three-member committee:

Asimakopoulos Byron, Assoc. Professor of Physiology, Department of Medicine, Democritus University of Thrace

Nikolettos Nikolaos, Professor of Physiology, with an emphasis on Reproductive Physiology- In vitro Fertilization, Department of Medicine, Democritus University of Thrace

Simopoulou Mara, Assistant Professor of Experimental Physiology, Department of Medicine, National and Kapodistrian University of Athens