

ΑΝΗΡ 2013
Τεύχος προσκεκλημένων εκδοτών

Κρυοσυντήρηση σπέρματος και ορχικού ιστού

Θ. Ζεγκινιάδου, Δ.Γ. Γουλής

Κρυοσυντήρηση σπέρματος και ορχικού ιστού

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Πρόλογος των εκδοτών	Θ. Ζεγκινιάδου, Δ.Γ. Γουλής	3
Κρυοσυντήρηση σπέρματος: Βασικές αρχές	Θ. Ζεγκινιάδου, Κ. Βαρδάκη	4
Κρυοσυντήρηση σπέρματος: Εργαστηριακές τεχνικές	Ε. Ευγενή, Α. Κουρή	8
Ο ρόλος της κρυοσυντήρησης σπέρματος στον καρκίνο του όρχεως	Κ.Ν. Νεανίδης, Χ. Καρανικιώτης	14
Επίδραση της κρυοσυντήρησης σπέρματος στις παραμέτρους του σπέρματος και τη γονιμοποιητική ικανότητα	Ι. Βακαλόπουλος	16
Ο ρόλος της κρυοσυντήρησης του ορχικού ιστού στην υποβοηθούμενη αναπαραγωγή	Σ. Ανδρεαδάκης, Χ. Κωνσταντινίδης	21
Επίδραση της κρυοσυντήρησης σπέρματος και ορχικού ιστού στην υποβοηθούμενη αναπαραγωγή	Α.Ι. Μητσόλη, Ε.Μ. Κολυμπανάκης, Β.Κ. Ταρλατζής	23
Σύγχρονες απόψεις για την κρυοσυντήρηση σπέρματος ή ορχικού ιστού στην κισσοκήλη και σε άλλες θεραπείες της ανδρικής υπογονιμότητας	Φ. Δημητριάδης, Δ. Χατζηχρήστου	27
Κρυοσυντήρηση σπέρματος και ορχικού ιστού: η νομική διάσταση	Κ. Φουντεδάκη	40
Κρυοσυντήρηση σπέρματος και ορχικού ιστού: η ψυχολογική πλευρά	Κ. Χατζηλάκου, Μ. Μαυρίδου, Α. Μητσογιάννη	54

ΠΡΟΛΟΓΟΣ ΤΩΝ ΕΚΔΟΤΩΝ

Η κρυοσυντήρηση των ανθρώπων σπέρματοζωαρίων αποτελεί έναν εφαρμοσμένο τομέα της Κρυοβιολογίας, που αναγνωρίζεται, σήμερα, ως αναπόσπαστο τμήμα της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Η κρυοσυντήρηση, που εφαρμόστηκε για πρώτη φορά κατά τη δεκαετία του 1960, αποτελεί πλέον απαραίτητη διαδικασία στο χειρισμό της ανδρικής υπογονιμότητας. Η πιο σύγχρονη μέθοδος της κρυοσυντήρησης ορχικού ιστού μπορεί, επίσης, να οδηγήσει σε επίτευξη εγκυμοσύνης.

Παρά τη σημαντικότητα και επικαιρότητα του θέματος, η ελληνική βιβλιογραφία στο συγκεκριμένο τομέα παραμένει πτωχή. Αυτό το κενό κλήθηκε να καλύψει μία ομάδα επιστημόνων με ευρύτατο φάσμα γνωστικών αντικειμένων (ουρολόγοι, μαιευτήρες - γυναικολόγοι, ενδοκρινολόγοι, βιολόγοι, μικροβιολόγοι, ψυχολόγοι, νομικοί) και κοινό κριτήριο επιλογής τους την εμπειρία στα θέματα που κλήθηκαν να διαπραγματευθούν.

Στις **“Βασικές αρχές”** περιγράφονται τα γενικά θέματα που άπτονται της κρυοσυντήρησης των σπέρματοζωαρίων, όπως οι αλλαγές που υφίστανται τα τελευταία κατά τη μετάβαση τους σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες και ο τρόπος που οι κρυοπροστατευτικές ουσίες βελτιώνουν τη βιωσιμότητά τους μετά την απόψυξη.

Στις **“Εργαστηριακές τεχνικές”** περιγράφονται αναλυτικά η μεθοδολογία, οι εργαστηριακές τεχνικές κατάψυξης, το είδος και η συγκέντρωση των κρυοπροστατευτικών υλικών, ο ρυθμός ψύξης και απόψυξης, καθώς, επίσης, οι περιέκτες που χρησιμοποιούνται, οι οποίοι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην όλη διαδικασία.

Στο **“ρόλο της κρυοσυντήρησης σπέρματος στον καρκίνο του όρχεος”** συζητείται η φύλαξη σπέρματος, στις περιπτώσεις όπου η θεραπευτική παρέμβαση για την αντιμετώπιση του καρκίνου του όρχι μπορεί να πλήξει την αναπαραγωγική ικανότητα. Το γεγονός της μακράς επιβίωσης ή, συχνά, της πλήρους ίασης των ασθενών με νεοπλασία του όρχι, καθιστά το θέμα της μελλοντικής γονιμότητας ιδιαίτερα σημαντικό.

Στην **“επίδραση της κρυοσυντήρησης στις παραμέτρους του σπέρματος και τη γονιμοποιητική ικανότητα”** συζητείται η επίδραση των μεθόδων στην κινητικότητα και τη βιωσιμότητα των σπέρματοζωαρίων. Το όποια προβλήματα μπορούν να υπερκεραστούν με την επιλογή ζωήρα κινούμενων σπέρματοζωαρίων μετά την απόψυξη, την κατάψυξη μαζί με σπερματικό πλάσμα, την προσθήκη αντιοξειδωτικών ουσιών και τη χρήση ουσιών, που ενεργοποιούν την κινητικότητα των σπέρματοζωαρίων μετά την απόψυξη. Ως συνέπεια, τα ποσοστά κύησης κατά την υποβοηθούμενη αναπαραγωγή δεν διαφέρουν σημαντικά μεταξύ του νωπού και του αποψυγμένου σπέρματος.

Στο **“ρόλο της κρυοσυντήρησης του ορχικού ιστού στην υποβοηθούμενη αναπαραγωγή”** αναδεικνύεται η αξία της κρυοσυντήρησης του ορχικού ιστού, με την περιγραφή των ενδείξεων και

των εφαρμογών της στη σημερινή κλινική πράξη. Παράλληλα, αναφέρονται οι μελλοντικές προοπτικές, που σήμερα βρίσκονται σε ερευνητικό στάδιο.

Στις **“εφαρμογές της κρυοσυντήρησης σπέρματος και ορχικού ιστού στην υποβοηθούμενη αναπαραγωγή”** συζητούνται, μεταξύ άλλων, η βραχυχρόνια και η μακροχρόνια φύλαξη σπέρματος. Η βραχυπρόθεσμη φύλαξη αφορά σε άνδρες με oligo-ασθενοζωοσπερμία, δυσκολία κατά τη συλλογή σπέρματος, λόγω προβλήματος υγείας ή άγχους, ή απουσίας του άνδρα κατά την ημέρα της ωοληψίας ή της σπερματέγχυσης. Η μακροπρόθεσμη φύλαξη σπέρματος χρησιμοποιείται για τη διατήρηση της ανδρικής γονιμότητας. Η κρυοσυντήρηση ορχικού ιστού χρησιμοποιείται σε περιπτώσεις αζωοσπερμίας, προς αποφυγή επαναλαμβανόμενων βιοψιών.

Στις **“Σύγχρονες απόψεις για την κρυοσυντήρηση σπέρματος ή ορχικού ιστού στην κισοκήλη και σε άλλες θεραπείες της ανδρικής υπογονιμότητας”** συζητείται, μεταξύ άλλων, η ενδεχόμενη δυνατότητα κρυοσυντήρησης άωρου σπερματικού ιστού πριν την εφαρμογή γοναδοτοξικής θεραπείας, με σκοπό την διατήρηση της γονιμότητας (in vitro maturation - IVM). Επιπρόσθετο σκοπό του άρθρου αποτελεί η ευαισθητοποίηση του θεράποντος ιατρού στο θέμα της ποιότητας της ζωής του ασθενή, σε σχέση με τη διατήρηση ή εξασφάλιση της γονιμότητάς του και της δυνατότητας απόκτησης των δικών του βιολογικών του παιδιών.

Στη **“Νομική πλευρά”** συζητούνται τα ζητήματα της ιατρικής υποβοήθησης στην ανθρώπινη αναπαραγωγή, τα οποία ρυθμίστηκαν, για πρώτη φορά, στη χώρα μας με το νόμο 3089/2002. Ο νόμος αυτός αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα νομοθετήματα στο χώρο του ελληνικού οικογενειακού δικαίου και ένα από τα πλέον φιλελεύθερα στο θέμα, σε διεθνές επίπεδο. Ο νόμος ακολουθεί τη λογική της προστασίας του παιδιού που γεννιέται με τέτοιες μεθόδους, ιδίως από την άποψη της κατοχύρωσης της ίδρυσης της συγγένειάς του με τους γονείς. Επίσης, στο ελληνικό δίκαιο αναγνωρίζονται και ρυθμίζονται δυο «αμφιλεγόμενες» περιπτώσεις της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, η παρένθετη μητρότητα και η μεταθανάτια (post mortem) γονιμοποίηση.

Τέλος, στην **“Ψυχολογική πλευρά”** συζητείται η ανάγκη προετοιμασίας και των δύο συντρόφων απέναντι στο ενδεχόμενο μη επιτυχούς έκβασης της θεραπείας. Σε συγκεκριμένες περιπτώσεις, θα μπορούσε να συστήνεται στο ζευγάρι ή στον άνδρα θεραπεία ζεύγους ή ατομική ψυχοθεραπεία, αντίστοιχα, για τη διαχείριση του πολύπλοκου θέματος της υπογονιμότητας.

Ελπίζουμε το παρόν συλλογικό τεύχος να καλύψει το δεδομένο κενό στην ελληνική ιατρική βιβλιογραφία, επιτελώντας το σκοπό της έγκυρης ενημέρωσης των επιστημόνων, που ασχολούνται με το σημαντικό αυτό αντικείμενο.

Θ. Ζεγκινιάδου, Δ.Γ. Γουλής
Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης
Προσκεκλημένοι εκδότες του τεύχους
“Κρυοσυντήρηση σπέρματος και ορχικού ιστού”

ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ: ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ

Θ. Ζεγκινιάδου¹, Κ. Βαρδάκη²

¹ MHS, PhD, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσ/νίκης, ² MSc, υποψήφια διδάκτωρ Πανεπιστημίου Κρήτης

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η κρυοσυντήρηση των γαμετών αποτελεί πλέον αναπόσπαστο κομμάτι των τεχνικών της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Το παρόν άρθρο επικεντρώνεται στα εργαστηριακά θέματα που άπτονται της κρυοσυντήρησης των σπερματοζωαρίων. Περιγράφονται οι αλλαγές που υφίστανται στα σπερματοζωάρια κατά την μετάβαση τους σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες, καθώς και ο τρόπος που οι κρυοπροστατευτικές ουσίες βελτιώνουν την βιωσιμότητά τους μετά την απόψυξη. Περιγράφονται επίσης εργαστηριακές λεπτομέρειες, όπως ο ρυθμός προσθήκης του κρυοπροστατευτικού και ο ρυθμός της κατάψυξης που είναι καθοριστικές παράμετροι για την επιτυχή διατήρηση των σπερματοζωαρίων.

Λέξεις ευρετηριασμού: κρυοσυντήρηση σπερματοζωαρίων, κρυοπροστατευτικά, ρυθμός κατάψυξης

ABSTRACT

Sperm cryopreservation has become an important part of assisted reproduction. This review is focused on laboratory issues related to cryopreservation. The changes that take place to the cell during the drop of temperature are described as well as the way cryoprotectants improve cell viability after thawing. Other laboratory details that determine the success of cryopreservation are described, such as the rate of addition of the cryoprotectant and the rate of freezing.

Key words: sperm cryopreservation, cryoprotectants, rate of freezing

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η διαδικασία η οποία καθιστά δυνατή τη διατήρηση των κυττάρων σε κρυογονικές θερμοκρασίες, ονομάζεται κρυοσυντήρηση και αποτελεί ένα εφαρμοσμένο κλάδο της κρυοβιολογίας ή αλλιώς της μελέτης της ζωής σε χαμηλές θερμοκρασίες. Πληθώρα πλεονεκτημάτων από την εφαρμογή της τεχνολογίας της κρυοσυντήρησης, έχουν οδηγήσει στην ανάπτυξη μεθόδων οι οποίες επιτρέπουν τη συντήρηση μιας ποικιλίας κυτταρικών τύπων, συμπεριλαμβανομένων των αρσενικών και των θηλυκών γαμετών αλλά και πολυκύτταρων οργανισμών όπως τα έμβρυα, σε ιδιαίτερα χαμηλές θερμοκρασίες [1].

Προσπάθειες για τη συντήρηση σπερματικών κυττάρων αναφέρονται ακόμη και από τα τέλη του 16^{ου} αιώνα [2]. Το 1776 ο Lazzaro Spallanzani διατύπωσε την παρατήρηση ότι το σπέρμα διατηρείται στο χιόνι, αν και χάνει την κινητικότητά του όταν ψύχεται και λίγο αργότερα, το 1866, ο Montegazza, ήταν ο πρώτος που πρότεινε την κρυοσυντήρηση ανθρώπινου σπέρματος, για τους στρατιώτες που είχαν πεθάνει στη μάχη [3]. Από τότε, αρκετοί επιστήμονες για πολλά χρόνια, παρατηρούσαν της επίδραση που έχει η χαμηλή θερμοκρασία στην κυτταρική δομή και λειτουργία. Τελικά, η κρυοσυντήρηση σπέρματος εισήχθη στο

χώρο της γονιμότητας ως τεχνική μετά το 1953 και από τότε κερδίζει ολοένα και περισσότερο έδαφος, αποτελώντας πλέον αναπόσπαστο κομμάτι της τεχνολογίας της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (Assisted Reproduction Technologies, ARTs) [4].

Η ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Η κρυοσυντήρηση διατηρεί τα κύτταρα και τους ιστούς σε ιδιαίτερα χαμηλές θερμοκρασίες, μεταξύ -140°C και -200°C. Σε αυτές τις θερμοκρασίες αναστέλλεται η βιολογική δραστηριότητα των κυττάρων και κατά συνέπεια διατηρούνται αναλλοίωτα για μεγάλα χρονικά διαστήματα. Για το ανθρώπινο σπέρμα, το μεγαλύτερο χρονικό διάστημα επιτυχούς κρυοσυντήρησης που έχει αναφερθεί είναι τα 21 χρόνια [5]. Η πρώτη ανθρώπινη εγκυμοσύνη που επιτεύχθηκε με γονιμοποίηση από κατεψυγμένο σπέρμα, αναφέρθηκε το 1953 από τους Sherman και Bunge [6]. Η κρυοσυντήρηση σε αυτή την περίπτωση πραγματοποιήθηκε με απλή ψύξη και αποθήκευση σε ξηρό πάγο στους -75°C. Η τεχνική όμως δεν χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια, αφού η κινητικότητα των σπερματοζωαρίων διαρκώς ελαττωνόταν, για όσο χρονικό διάστημα αυτά παρέμεναν στον ξηρό πάγο. Σαν συνέπεια, το δείγμα του σπέρματος δεν μπορούσε να διατηρηθεί κατεψυγμένο, παρά μόνο για μικρά χρονικά διαστήματα.

Νέα ώθηση στην κρυοσυντήρηση σπέρματος δόθηκε από τον Sherman το 1963, ο οποίος χρησιμοποίησε το υγρό άζωτο (-196°C) για την κρυοσυντήρηση δειγμάτων και παρατήρησε την υπεροχή της νέας αυτής τεχνικής, αφού σε αυτή την περίπτωση αποφεύχθηκε η ελάττωση της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων [7]. Ακολουθούν έτσι από το 1964 και μετά πολυάριθμες αναφορές επιτυχούς γονιμοποίησης, κυήσεων και γεννήσεων, με τη χρήση σπέρματος κρυοσυντηρημένου σε υγρό άζωτο στους -196°C. Αν και αρχικά, το χρονικό διάστημα συντήρησης σπέρματος δεν υπερέβαινε τους πέντε μήνες [8], πλέον το διάστημα της διατήρησης είναι ουσιαστικά χωρίς περιορισμούς [5].

Είναι γνωστό ότι ένα ποσοστό μόνο των κυττάρων θα αντέξουν την διαδικασία της κατάψυξης και θα διατηρήσουν την βιωσιμότητά τους μετά την απόψυξη. Οι αλλαγές που προκαλούνται επηρεάζουν όχι μόνο την βιωσιμότητα αλλά, στην περίπτωση των σπερματοζωαρίων, και την κινητικότητα ή τους μοριακούς μηχανισμούς που είναι απαραίτητοι για την είσοδο του στο ωάριο. Η επίδραση στην κινητικότητα είναι μείζονος σημασίας και καθοριστικός παράγοντας για την επιτυχία της κατάψυξης-απόψυξης σε ένα δείγμα σπέρματος. Στην περίπτωση που η κινητικότητα μετά την απόψυξη είναι περίπου στο 50% της αρχικής τότε η κατάψυξη θεωρείται πολύ ικανοποιητική [9]. Το κρυοσυντηρημένο δείγμα δεν πρέπει να εκτίθεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος γιατί η αύξομείωση της θερμοκρασίας, αν αυτή διαρκέσει μεγάλο χρονικό διάστημα, θα προκαλέσει πιθανά μη αντιστρέψιμες αλλαγές [10], επομένως η κατάψυξη και απόψυξη του ίδιου δείγματος δε συνίσταται [11].

Οι αλλαγές που συμβαίνουν στην κινητικότητα οφείλονται στις αλλοιώσεις που προκαλεί η πτώση της θερμοκρασίας, ακόμη και όταν γίνεται βαθμιαία

και με χαμηλό ρυθμό, στην μεμβράνη. Γενικά, έχει δειχθεί ότι οι αλλαγές της δομής της μεμβράνης γίνονται γύρω στους 5 - 15°C βαθμούς χωρίς να είναι γνωστό το αν η περαιτέρω ελάττωση της θερμοκρασίας έχει και άλλες επιπτώσεις στο δείγμα [12]. Όπως έχουν δείξει μελέτες από μικροσκοπία κατάψυξης-θραύσης, οι δύο στιβάδες των φωσφολιπιδίων της μεμβράνης απομακρύνονται η μία από την άλλη χωρίς να μπορούν να επανέλθουν τελείως στην αρχική τους θέση μετά την απόψυξη [13, 14]. Βέβαια, αλλαγές συμβαίνουν επίσης και στις πρωτεΐνες που εντοπίζονται στη διπλοστιβάδα. Η απομάκρυνση των στιβάδων έχει σαν αποτέλεσμα οι πρωτεΐνες να συσσωρεύονται και να προκαλείται αλλαγή στην λειτουργικότητά τους, ειδικά αν λειτουργούν ως κανάλια ιόντων. Είναι γνωστό ότι η διαπερατότητα της μεμβράνης αυξάνεται κατά την κατάψυξη και πιθανά να εμπλέκονται, εκτός από τα κανάλια ιόντων και άλλες πρωτεΐνες που έχουν την δράση καναλιών [15, 16].

Η ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΝ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΚΑΤΑΨΥΞΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Κατά την διαδικασία της κατάψυξης συμβαίνουν μια σειρά από γεγονότα: αρχικά δημιουργούνται κρύσταλλοι στον εξωκυττάριο χώρο. Όλες οι διαλυμένες ουσίες που υπάρχουν στο διάλυμα αναγκάζονται έτσι να συγκεντρωθούν στον όσο διαθέσιμο χώρο δημιουργείται από το νερό που δεν έχει μετατραπεί σε κρυστάλλους. Καθώς η θερμοκρασία ελαττώνεται, ο διαθέσιμος αυτός χώρος λιγοστεύει ακόμη περισσότερο και εκεί φυσικά η συγκέντρωση των διαλυμένων ουσιών αυξάνεται. Στον ίδιο όμως χώρο βρίσκονται και τα κύτταρα, που έτσι βρίσκονται εκτεθειμένα σε υπερτονικό διάλυμα. Λόγω των οσμωτικών φαινομένων λοιπόν, το νερό που υπάρχει στο εσωτερικό των κυττάρων αναγκάζεται να μεταφερθεί στον εξωκυττάριο χώρο [17].

Ο ρυθμός της κατάψυξης καθορίζει αν όλη η ποσότητα του νερού που βρίσκεται μέσα στο κύτταρο θα μετακινηθεί ή αν κάποια ποσότητα θα παραμείνει στο εσωτερικό του κυττάρου. Στην περίπτωση που έστω και μικρή ποσότητα νερού παραμείνει στο εσωτερικό του κυττάρου τότε στις χαμηλές θερμοκρασίες της κρυοσυντήρησης θα δημιουργηθούν ενδοκυτταρικά κρύσταλλοι, που θα οδηγήσουν στην καταστροφή του κυττάρου. Η μετακίνηση του νερού είναι συνάρτηση του ρυθμού κατάψυξης και η κινητική αυτής της αφυδάτωσης του κυτταροπλάσματος μπορεί να περιγραφεί με βάση θεωρητικά μοντέλα, όπως έχει δείχθει από δεδομένα σπερματοζωαρίων ποντικού, και μπορούν να προβλέψουν την συμπεριφορά των κυττάρων στις χαμηλές θερμοκρασίες [18].

Οι κρύσταλλοι που δημιουργούνται στο εσωτερικό των κυττάρων γίνονται ορατοί με την τεχνική της οπτικής κρυο-μικροσκοπίας και συσχετίζονται με τα θεωρητικά μοντέλα [19]. Τα δεδομένα όμως για τα σπερματοζωάρια είναι διαφορετικά και δεν φαίνεται να ακολουθούν τα θεωρητικά αυτά πρότυπα [20]. Συγκεκριμένα ο Morris μελέτησε την δημιουργία κρυστάλλων σε ανθρώπινα σπερματοζωάρια, με ρυθμούς κατάψυξης από 0,3 - 3.000°C/min, και δεν βρήκε καμία ένδειξη για την δημιουργία κρυστάλλων στο εσωτερικό αυτής της κατηγορίας κυττάρων [21]. Αντίθετα θεωρεί ότι η καταστροφή των σπερματοζωαρίων οφείλεται στις οσμωτικές αλλαγές που συμβαίνουν κατά την απόψυξη.

ΟΙ ΚΡΥΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ

Η πρόκληση λοιπόν για τα κύτταρα δεν είναι να διατηρηθούν σε βιώσιμη κατάσταση στις χαμηλές θερμοκρασίες, αλλά να αντέξουν την αλλαγή της θερμοκρασίας κατά την ψύξη και την απόψυξη. Το πρόβλημα του σχηματισμού κρυστάλλων άρχισε να λύνεται το 1949, όταν ο Polge παρατήρησε ότι η γλυκερόλη έχει προστατευτικό ρόλο για τα κύτταρα σε χαμηλές θερμοκρασίες [22]. Από τότε, μία ποικιλία ουσιών με κρυοπροστατευτική δράση έχουν αναφερθεί για την επιτυχή κρυοσυντήρηση κυττάρων.

Τα κρυοπροστατευτικά (cryoprotectants, CPA), είναι χημικές ουσίες, μικρού ή μεγάλου μοριακού βάρους, οι οποίες διαλύονται στο νερό, χαμηλώνουν το σημείο τήξεως του διαλύματος και παρέχουν στα κύτταρα προστασία που οφείλεται στην αλλαγή που προκαλούν στα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του διαλύματος στο οποίο βρίσκονται [23]. Χωρίς την παρουσία του κρυοπροστατευτικού, και με υψηλούς ρυθμούς κατάψυξης, σχεδόν το σύνολο του όγκου του νερού παγώνει. Με την προσθήκη του κρυοπροστατευτικού ο πάγος καταλαμβάνει μικρότερο μέρος του όγκου του διαλύματος και τα κύτταρα έτσι έχουν περισσότερο χώρο διαθέσιμο για να επιβιώσουν μεταξύ των κρυστάλλων [23]. Μία συγκέντρωση 5-10% του κρυοπροστατευτικού συνήθως απαιτείται για να επιτραπεί η επιβίωση ενός σημαντικού κλάσματος των απομονωμένων κυττάρων μετά από ψύξη-απόψυξη σε υγρό άζωτο στους -196°C.

Αρχικά, τα κρυοπροστατευτικά που χρησιμοποιήθηκαν στην συντήρηση σπέρματος περιείχαν κρόκο αυγού, που εξασφάλιζε μεγαλύτερα ποσοστά βιωσιμότητας κατά την απόψυξη. Ο κρόκος όμως προέρχεται από ζώα και μπορεί να μεταφέρει μικροοργανισμούς και για αυτό τον λόγο δεν χρησιμοποιείται πλέον [24]. Το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο κρυοπροστατευτικό για την κρυοσυντήρηση ανθρώπινου σπέρματος είναι η γλυκερόλη. Το γεγονός αυτό οφείλεται στην υψηλή διαλυτότητα της γλυκερόλης στο νερό και στη χαμηλή τοξικότητα που παρουσιάζει στα κύτταρα κατά την έκθεσή τους σε αυτήν για μεγάλα χρονικά διαστήματα. Γενικά, για να χρησιμοποιηθεί μια ουσία σαν κρυοπροστατευτικό πρέπει να μην παρουσιάζει τοξικότητα στα κύτταρα [25]. Είναι σημαντικό εδώ να αναφερθεί ότι η τοξικότητα των κυττάρων, όταν αυτά βρίσκονται σε χαμηλή θερμοκρασία και χωρίς την συνηθισμένη ποσότητα νερού στο εσωτερικό τους, διέπεται από διαφορετικούς κανόνες.

Τόσο η γλυκερόλη, όσο και το DMSO, είναι ουσίες μικρού μοριακού βάρους που έχουν την ικανότητα να διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη, ανήκουν δηλαδή στην κατηγορία των διεισδυτικών κρυοπροστατευτικών. Κρυοπροστασία μπορούν επίσης να παρέχουν και ουσίες μεγάλου μοριακού βάρους, που δεν έχουν τη δυνατότητα να διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη. Ο κρυοπροστατευτικός ρόλος των ουσιών αυτών έγκειται στο γεγονός ότι αναστέλλουν την ανάπτυξη κρυστάλλων πάγου ενδοκυτταρικά, απομακρύνοντας το νερό από το κυτταρόπλασμα, και προκαλώντας έτσι αφυδάτωση. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν η σοκρόζη, η γλυκόζη, το polyvinylpyrrolidone (PVP) κ.α. Στα διαλύματα που χρησιμοποιούνται για την κρυοπροστασία των κυττάρων συνυπάρχουν και άλλες ουσίες, όπως παράγοντες που σταθεροποιούν την πλασματική μεμβράνη, EDTA ή κιτρικό που δεσμεύει το ασβέστιο και ελαττώνει τις διαφορές της συγκέντρωσής κατά μήκος της μεμβράνης και ρυθμιστικά διαλύματα, για την ρύθμιση του pH [26].

Ο ΡΥΘΜΟΣ ΠΡΟΣΘΗΚΗΣ ΤΟΥ ΚΡΥΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΟΥ

Μία ακόμη παράμετρος κριτικής σημασίας για την επιτυχία της κρυοσυντήρησης, είναι ο ρυθμός προσθήκης και αφαίρεσης του κρυοπροστατευτικού. Καθώς προστίθεται το κρυοπροστατευτικό αυξάνεται η οσμωμοριακότητα του διαλύματος στον εξωκυττάριο χώρο. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη συρρίκνωση του κυττάρου, αφού μεγάλη ποσότητα νερού διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη προς τον εξωκυττάριο χώρο. Στη συνέχεια, όταν το κρυοπροστατευτικό αρχίσει να εισέρχεται στο εσωτερικό του κυττάρου, το νερό ακολουθεί αντίθετη πορεία, προκαλώντας τη διόγκωση του κυττάρου. Η συγκέντρωση δηλαδή του κρυοπροστατευτικού εξισώνεται εντός και εκτός του κυττάρου και τότε τα κύτταρα επιστρέφουν στον επιθυμητό όγκο, που θα επιτρέψει την επιβίωσή τους κατά τη διαδικασία της ψύξης.

Η προσθήκη των κρυοπροστατευτικών μπορεί να γίνει σε ένα βήμα ή σταδιακά. Στην πρώτη περίπτωση το κρυοπροστατευτικό προστίθεται απότομα και αμέσως μετά τα κύτταρα καταψύχονται, οπότε ελαττώνεται ο χρόνος κατά τον οποίο τα κύτταρα εκτίθενται στο κρυοπροστατευτικό. Αντίθετα, στην περίπτωση που το κρυοπροστατευτικό προστεθεί σταδιακά, τα κύτταρα δεν υφίστανται οσμωτικό στρες και αυτό έχει ως αποτέλεσμα να διατηρείται ο όγκος των κυττάρων εντός των επιτρεπτών του ορίων [27, 28]. Γενικά, αν η αυξομείωση στο μέγεθος του κυττάρου είναι απότομη το κύτταρο ξεπερνάει τα επιτρεπτά όρια του και επέρχεται μη αντιστρεπτή βλάβη [29]. Τα σπερματοζωάρια μπορούν να αυξήσουν το μέγεθός τους κατά 110% και μπορούν να συρρικνωθούν στο 75% του όγκου τους χωρίς αλλοίωση της κινητικότητάς τους [27, 28]. Επομένως, ο ρυθμός προσθήκης του κρυοπροστατευτικού θα πρέπει να είναι τέτοιος ώστε να μην μεταβάλλεται δραματικά ο όγκος του κυττάρου με συνέπεια το εσωτερικό και το εξωτερικό του κυττάρου να βρίσκεται σε μία διαρκή ισορροπία. Η αυξομείωση του μεγέθους επίσης επηρεάζει τον κυταροσκελετό και το πλέγμα των νημάτων ακτίνης που συγκρατεί το κυτταρόπλασμα [30, 31].

Ο ΡΥΘΜΟΣ ΚΑΤΑΨΥΞΗΣ

Η μεταβολή της θερμοκρασίας από τη θερμοκρασία περιβάλλοντος στους -196°C, θα πρέπει να γίνεται με συγκεκριμένο ρυθμό. Όπως ήδη αναφέρθηκε, κατά τη διάρκεια της κατάψυξης των κυττάρων, πυρήνες πάγου σχηματίζονται αρχικά στον εξωκυττάριο χώρο, προκαλώντας οσμωτική διαφορά κατά μήκος της μεμβράνης [32]. Αν ο ρυθμός ψύξης (cooling rate) είναι χαμηλός, όλη η ποσότητα του νερού που βρίσκεται στο εσωτερικό του κυττάρου, διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη προς τον εξωκυττάριο χώρο, το κύτταρο αφυδατώνεται και υπάρχει ο κίνδυνος το κύτταρο να γίνει οσμωτικά ανενεργό [33]. Αντίθετα, αν ο ρυθμός ψύξης είναι υψηλός, τότε σχηματίζονται κρύσταλλοι πάγου στο εσωτερικό του κυττάρου, καθιστώντας και πάλι το κύτταρο ανενεργό οσμωτικά, λόγω απώλειας της ακεραιότητας της μεμβράνης του [17].

Επομένως, για την επιτυχή διατήρηση των κυττάρων, η ταχύτητα με την οποία ελατώνεται η θερμοκρασία δεν πρέπει να είναι ούτε υψηλή, ούτε χαμηλή, και για κάθε κατηγορία κυττάρων υπάρχει ένας ιδανικός ρυθμός ψύξης. Ο ιδανικός αυτός ρυθμός δεν πρέπει να προκαλεί μη αναστρέψιμη μεταβολή στην κυτταρική μεμβράνη [34]. Τα διαγράμματα που παρουσιάζουν την επιβίωση των κυττάρων μετά την

ψύξη-απόψυξη σε συνάρτηση με τον ρυθμό κατάψυξης έγιναν από τον Mazur πριν από πολλά χρόνια και παρουσιάζουν την εικόνα ανεστραμμένου U [35]. Γενικά, είναι δυνατό για διάφορες κατηγορίες κυττάρων, μετρώντας την διαπερατότητα της πλασματικής μεμβράνης, να καθοριστεί τόσο ο ρυθμός αφυδάτωσης όσο και η δημιουργία ενδοκυττάριου πάγου. Τα σπερματοζωάρια έχουν μικρό μέγεθος και ανώμαλο σχήμα και για αυτή την κατηγορία κυττάρων ο Divireddy προσπάθησε να καθορίσει τη διαπερατότητα της πλασματικής μεμβράνης του σπερματοζωαρίου, χρησιμοποιώντας ειδικές τεχνικές και μαθηματικά μοντέλα [36]. Με βάση δεδομένα από εργασίες του Devismita, ο ιδανικός ρυθμός κατάψυξης των σπερματοζωαρίων υπολογίζεται κοντά στους 17°C/min [37]. Στην πράξη η θερμοκρασία πέφτει από την θερμοκρασία περιβάλλοντος στους 5°C με ρυθμό 0,5 - 1,0°C/min, κατόπιν το δείγμα καταψύχεται από τους 5°C στους -80°C με ρυθμό 1 - 10°C/min και μετά τοποθετείται στο υγρό άζωτο [38].

Η κρυοσυντήρηση ανθρώπινων σπερματοζωαρίων αποτελεί ένα κομμάτι της κρυοβιολογίας που αναπτύσσεται με ταχύτερους ρυθμούς. Κατά τη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών σημαντικές είναι οι γνώσεις που έχουν προστεθεί στις τεχνικές κρυοσυντήρησης σπέρματος, με στόχο τη βελτίωση των τεχνικών αυτών και την ασφαλή συντήρηση των δειγμάτων. Η επιτυχία της κρυοσυντήρησης σπέρματος, εξαρτάται από τη διατήρηση της δομικής και λειτουργικής ακεραιότητας του κυττάρου. Ωστόσο, για τη διατήρηση της λειτουργικής ακεραιότητας, απαραίτητη είναι η προστασία της διαμερισματοποίησης του κυττάρου, έτσι ώστε μετά την απόψυξη το κύτταρο να διαθέτει τη γονιμοποιητική του ικανότητα στο υψηλότερο εφικτό ποσοστό. Ο στόχος αυτός επιτυγχάνεται με τη χρήση ολοένα και πιο εξελιγμένων κρυοπροστατευτικών ουσιών, και την τήρηση συγκεκριμένου πρωτοκόλλου όσον αφορά στον ρυθμό προσθήκης της κρυοπροστατευτικής ουσίας και στον ρυθμό απόψυξης του δείγματος.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **Shufaro Y, Schenker JG.** Cryopreservation of human genetic material. *Annals of The New York Academy of Sciences* 2010, 1205:220-4.
2. **Sherman JK.** Research on frozen human sperm. In 20th Annual Meeting of the American Society for the Study of Sterility. Bal Harbour, 1964.
3. **Walters E, Benson J, Woods E, Critser J.** The history of sperm cryopreservation in Sperm Banking: Theory and Practice, eds Pacey AA, Tomilson MJ, Cambridge University Press, 2009:1-17.
4. **Woods EJ, Benson JD, Aqca Y, Critser JK.** Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. *Cryobiology* 2004, 48:146-56.
5. **Sharma V.** Sperm storage for cancer patients in the UK: a review of current practice. *Hum Reprod*, 2001, 26:2935-43.
6. **Sherman JK, Bunge RG.** Observations on preservation of human spermatozoa at low temperatures. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Soc Exp Biol Med* 1953, 82:686-8.
7. **Sherman JK.** Improved methods of preservation of human spermatozoa by freezing and freezing-drying. *Fertil Steril* 1963, 14:49-64.
8. **Perloff WH, Steinberger E, Sherman JK.** Conception with human spermatozoa frozen by

- nitrogen vapor technic. *Fertil Steril* 1964, 25: 501-4.
9. **David G, Czyglik F, Mayaux MJ et al.** Artificial insemination with frozen sperm: protocol, method of analysis and results for 1188 women. *Br. J Obstet Gynaecol* 1980, 87:1022-8.
 10. **Tyler JP, Kime L, Cooke S et al.** Temperature change in cryo-containers during short exposure to ambient temperatures. *Hum Reprod* 1996, 11:1510-2.
 11. **Ofeim O, Brown TA, Gilbert BR.** Effects of serial thaw-freeze cycles on human sperm motility and viability. *Fertil Steril* 2001, 75:1242-3.
 12. **Drobnis EZ, Crowe LM, Berger T, Anchordoguy T, Overstreet JW, Crowe JH.** Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: a demonstration using sperm as a model. *J Exp Zool* 1993, 265: 432-7.
 13. **Holt WV, North RD.** Partially irreversible cold-induced lipid phase transitions in mammalian sperm plasma membrane domains: freeze-fracture study. *J. Exp. Zool.* 1984, 230:473-83.
 14. **de Leeuw FE, Chen HC, Colenbrander B, Verkleij AJ.** Cold-induced ultrastructural changes in bull and boar sperm plasma membranes. *Cryobiology* 1990, 27:171-83.
 15. **Robertson L, Watson PF.** Calcium transport in diluted or cooled ram semen. *J. Reprod. Fertil.* 1986, 77:177-85.
 16. **Robertson L, Watson PF, Plummer JM.** Prior incubation reduces calcium uptake and membrane disruption in boar spermatozoa subjected to cold shock. *Cryo-Lett.* 1988, 9:286-93.
 17. **Mazur P.** Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol* 1984, 247:125-42.
 18. **Mazur P, Koshimoto C.** Is intracellular ice formation the cause of death of mouse sperm frozen at high cooling rates? *Biol Reprod* 2002, 66:1485-90.
 19. **Mazur P.** Principles of cryobiology. In *Life in the frozen State*, eds Fuller BJ, Lane N and Benson EE. CRC Press, Boca Raton, FL, 2004:3-65.
 20. **Gilmore JA, Liu J, Woods EJ, Peter AT, Crister JK.** Cryoprotective agent and temperature effects on human sperm membrane permeabilities; convergence of theoretical and empirical approaches for optimal cryopreservation methods. *Hum Reprod* 2000, 15:335-343.
 21. **Morris GJ.** Rapidly cooled human sperm: no evidence of intracellular ice formation. *Human Reproduction* 2006, 21:2075-83.
 22. **Polge C, Smith A, Parkes A.** Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* 1949, 164:666.
 23. **Wowk Br.** How cryoprotectants work. *Cryonics* 2007, 28:6-7.
 24. **Stacey G.** Validation of cell culture media components. *Hum Fertil* 2004, 7:113-8.
 25. **Fahy GM.** The relevance of cryoprotectant toxicity to cryobiology. *Cryobiology* 1986, 23:1-13.
 26. **Keel BA, Webster BW.** Semen cryopreservation methodology and results. In *Barrat and Cooke ID, eds. Donor Insemination.* Cambridge. Cambridge University Press 1993:96-71.
 27. **Gao D, Liu J, Liu C et al.** Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of glycerol. *Hum Reprod* 1995, 10:1109-22.
 28. **Gilmore JA, Liu J, Gao DY et al.** Determination of optical cryoprotectants for their addition and removal from human spermatozoa. *Hum Reprod* 1997, 12:112-8.
 29. **Merryman HT.** The exceeding of a minimum tolerable cell volume in hypertonic suspension as a cause of freezing injury. In *The frozen cell*, eds Wolstenholme G.E., O'Connor M. London: Churchill Press 1970:565-9.
 30. **Hall SM, Evans J, Haworth SG.** Influence of cold preservation on the cytoskeleton of cultured pulmonary arterial endothelial cells. *Am J Respir Cell Mol. Biol* 1993, 9:106-14.
 31. **Saunders KM, Parks JE.** Effects of cryopreservation procedures on the cytology and fertilization rate of in vitro-matured bovine oocytes. *Biol Reprod* 1999, 61:178-87.
 32. **Mazur P.** Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. *J Gen Physiol* 1963, 47:347-69.
 33. **Lovelock JE.** The haemolysis of human red blood-cells by freezing and thawing. *Biochim Biophys Acta.* 1953, 10:414-26.
 34. **Parks JE, Graham JK.** Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology* 1992, 38:209-22.
 35. **Mazur P, Leibo SP, Chu EH.** A two-factor hypothesis of freezing injury. Evidence from Chinese hamster tissue-culture cells. *Exp Cell Research* 1972, 71:345-55.
 36. **Devireddy RV, Swanlund DJ, Roberts KP, Pryor JL, Bischof JC.** The effect of extracellular ice and cryoprotective agents on the water permeability parameters of human sperm plasma membrane during freezing. *Hum Reprod* 2000, 15:1125-35.
 37. **Devissmita D, Kumar A, Krishna Kumar R.** Cryopreservation of Human sperm: Effect of Cooling Rate on Intracellular Ice Formation. *Int J Sci Engin Res* 2012, 6.
 38. **Di Santo M, Tarozzi N, Nadalini M, Borini A.** Human Sperm Cryopreservation: Update on Techniques, Effect on DNA Integrity, and Implications for ART. *Adv Urol* 2012.

ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ: ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

Ε. Ευγενή ¹, Α. Κουρή ²

¹ MPhil, Τράπεζα Κρυοσυντήρησης "Κρυογονία", ² Ανδρολογικό Εργαστήριο "Μητέρα"

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η κρυοσυντήρηση των ανθρώπινων σπερματοζωαρίων αποτελεί έναν εφαρμοσμένο τομέα της Κρυοβιολογίας, που αναγνωρίζεται σήμερα ως αναπόσπαστο τμήμα της Ιατρικής Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής (ΙΥΑ). Ως κρυοσυντήρηση ορίζεται η διαδικασία κατά την οποία τα κύτταρα σταθεροποιούνται σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες. Η μεθοδολογία, οι εργαστηριακές τεχνικές κατάψυξης, το είδος και η συγκέντρωση του κρυοπροστατευτικού υλικού, ο ρυθμός ψύξης και απόψυξης, καθώς επίσης και οι περιέκτες που χρησιμοποιούνται, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στο βαθμό αποτελεσματικότητας της διαδικασίας. Παρά την πρόοδο που έχει επιτευχθεί κατά τις τελευταίες δεκαετίες αναφορικά με τα πρωτόκολλα κρυοσυντήρησης, η βελτιστοποίησή τους παραμένει ουσιώδους σημασίας, διότι έχει ως απώτερο στόχο την καλύτερη προστασία των γαμετών, πράγμα που ανατανακλά άμεσα σε υψηλότερες πιθανότητες επιτυχίας στην αναπαραγωγική προσπάθεια.

Λέξεις ευρετηριασμού: Κρυοσυντήρηση, εργαστηριακές μέθοδοι, πρωτόκολλα ψύξης - απόψυξης

ABSTRACT

Human sperm cryopreservation is an applied sector of Cryobiology, currently recognized as an integral part of Assisted Reproductive Technologies (ART). Cryopreservation is the procedure of cell stabilization at ultra low temperature conditions. The applied methodology, the laboratory freezing techniques, the nature and concentration of cryoprotectant media, the freeze-thawing rates, as well as the containers used, constitute important factors in the effectiveness of the procedure. Despite the progress that has been achieved during the last decades with regard to cryopreservation protocols, their optimization remains a goal of utmost importance, as the improved protection of cryopreserved gametes promotes increased success rates in assisted reproduction.

Key words: cryopreservation, laboratory methods, freeze-thawing protocols

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η απαρχή της ιδέας της διατήρησης των σπερματοζωαρίων σε χαμηλές θερμοκρασίες τοποθετείται το 1776, όταν ο Lazaro Spallanzani παρατήρησε τη συμπεριφορά των σπερματοζωαρίων σε χιόνι. Το 1866 προτάθηκε από τον Montegazza η δημιουργία της πρώτης τράπεζας κρυοσυντήρησης σπέρματος, για τη διατήρηση δειγμάτων σπέρματος στρατιωτών, προκειμένου να χρησιμοποιηθούν από τις συζύγους τους σε περίπτωση που οι ίδιοι δεν επέστρεφαν από το μέτωπο [1]. Εως το 1938 ήταν πλέον γνωστή η δυνατότητα επιβίωσης των σπερματοζωαρίων σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες (-269°C) και κατέστη επιτυχής η κρυοσυντήρηση στους -79°C [2].

Οι πρώτες εφαρμογές της κατάψυξης και κρυοσυντήρησης σπέρματος αφορούσαν πρωτόγονες και απλές τεχνικές, όπως η διατήρηση σε ξηρό πάγο, με χαμηλά επίπεδα επιβίωσης. Η χρήση υγρού αζώτου για τη διατήρηση του σπέρματος σε θερμοκρασία -196°C εισήχθη κατά τη δεκαετία του 1960, με επακόλουθες αναφορές σε επιτυχείς προσπάθειες υποβοηθούμενης γονιμοποίησης, εγκυμοσύνης και γεννήσεων. Η πρώτη επιτυχής εγκυμοσύνη με χρήση κατεψυγμένου ανδρικού σπέρματος χρονολογείται το 1953 από τον καθηγητή Sherman και η πρώτη γέννηση φυσιολογικού παιδιού με κρυοσυντηρημένο σπέρμα επιτεύχθηκε το 1973. Οι πρώτες οργανωμένες τράπεζες σπέρματος δημιουργήθηκαν στις αρχές του 1970 (1972) και η μέγιστη διάρκεια κρυοσυντήρησης σπέρματος πριν τη χρήση του με επιτυχή γέννηση είναι 21 χρόνια [2].

Σε όλο το προαναφερθέν διάστημα, τα πρωτόκολλα κρυοσυντήρησης εμπλουτίστηκαν με την προσθήκη κρυοπροστατευτικών υλικών και πρόοδος σημειώθηκε στη αποδοτικότητα της μεθόδου, με βελτιστοποίηση των τεχνικών κατάψυξης, κρυοσυντήρησης, απόψυξης και περιεκτών [3]. Πρόσφατα, προτάθηκε η εφαρμογή της τεχνολογίας της υαλοποίησης (vitrification) με στόχο την αποφυγή του ενδοκυτταρικού σχηματισμού πάγου και τη μείωση του θερμοκρασιακού στρες που υφίστανται τα κύτταρα κατά την κατάψυξη - απόψυξη [2].

Στόχος των ερευνητικών προσπαθειών στον εργαστηριακό τομέα της κρυοσυντήρησης παραμένει η ελαχιστοποίηση των απωλειών και της επιδείνωσης των σπερματολογικών παραμέτρων, με ταυτόχρονη μεγιστοποίηση της αποτελεσματικότερης επανάκτησης ζώντων - λειτουργικών σπερματοζωαρίων για χρήση σε τεχνικές ΙΥΑ.

ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΤΑΨΥΞΗΣ

Δύο είναι οι βασικές τεχνικές κατάψυξης που εφαρμόζονται στην εργαστηριακή ρουτίνα: η αργή και η ταχεία. Επιπλέον, έχουν προταθεί και άλλα εργαστηριακά πρωτόκολλα, με ειδικές ενδείξεις, τα κυριότερα χαρακτηριστικά των οποίων περιγράφονται ακολούθως.

1. ΑΡΓΗ

Η τεχνική της αργής κατάψυξης σπερματοζωαρίων προτάθηκε αρχικά από τους Behrman και Sawada [3] και συνίσταται στην προοδευτική ψύξη των κυττάρων εντός 2-4 ωρών σε 2 ή 3 βήματα με χρήση μη αυτοματοποιημένου ή αυτοματοποιημένου καταψύκτη.

1.1. Μη αυτοματοποιημένη

Η μη αυτοματοποιημένη μέθοδος περιλαμβάνει τη μείωση της θερμοκρασίας του σπέρματος με ταυτόχρονη σταδιακή προσθήκη κρυοπροστατευτικού υλικού βήμα βήμα και ακολούθως βύθιση σε υγρό αζώτο. Έχει βρεθεί ότι ο βέλτιστος ρυθμός ψύξης από τη θερμοκρασία περιβάλλοντος στους 5°C είναι 0,5 - 1°C/min. Στη συνέχεια, τα δείγματα καταψύχονται από τους 5°C έως τους -80°C σε ρυθμό 1-10°C/min. Τελικώς, τα

δείγματα βυθίζονται σε υγρό άζωτο στους -196°C εντός 30 sec [4].

1.2. Αυτοματοποιημένη

Η ανάγκη για επίτευξη μεγαλύτερης επαναληψιμότητας της διαδικασίας συνδέεται στην διερεύνηση της χρήσης αυτοματοποιημένων πρωτοκόλλων. Η τεχνική περιλαμβάνει τη χρήση ειδικής συσκευής (καταψύκτη) με υποδοχή για τους περιέκτες του σπέρματος. Η ψύξη επιτυγχάνεται με τη βοήθεια ατμών υγρού αζώτου που τοποθετείται σε μια δεξαμενή κάτω από την υποδοχή των περιεκτών.

Ο ρυθμός ψύξης προγραμματίζεται με βάση συγκεκριμένο λογισμικό και είναι από τους 20°C έως τους -80°C $1,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ και ακολούθως $6^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Κατά την ολοκλήρωση του προγράμματος, οι περιέκτες τοποθετούνται στους -196°C εντός υγρού αζώτου.

Η διάρκεια της διαδικασίας είναι περίπου 40 min. Τα πλεονεκτήματα του αυτοματοποιημένου πρωτοκόλλου είναι η απλότητα στη χρήση, το γεγονός ότι δεν απαιτεί τη συνεχή παρέμβαση του χειριστή και η αυξημένη επαναληψιμότητα [4].

2. ΤΑΧΕΙΑ

Η μέθοδος, που προτάθηκε αρχικώς από τον Sherman [5], απαιτεί άμεση επαφή των περιεκτών του σπέρματος με τους ατμούς του υγρού αζώτου για 8-10 min με επακόλουθη βύθιση σε υγρό άζωτο στους -196°C .

Σύμφωνα με το εργαστηριακό πρωτόκολλο, το δείγμα αναμιγνύεται αρχικά στάγδην με ίσο όγκο κρύου κρυοπροστατευτικού υλικού. Το μίγμα φορτώνεται στους περιέκτες και επωάζεται στους 4°C για 10 min. Οι περιέκτες στη συνέχεια τοποθετούνται σε απόσταση 15-20 cm πάνω από το επίπεδο του υγρού αζώτου (-80°C) για 15 min. Κατόπιν, οι περιέκτες βυθίζονται στο υγρό άζωτο.

Κατά τη διάρκεια της ψύξης, είναι προτιμότερο οι περιέκτες να τοποθετούνται σε οριζόντια θέση, για να ελαχιστοποιηθεί η θερμοκρασιακή διαφορά μεταξύ των δύο άκρων.

Η μέθοδος παρουσιάζει κάποια μειονεκτήματα που αφορούν κυρίως στη χαμηλή επαναληψιμότητα λόγω μη επαρκούς ελέγχου της καμπύλης πτώσης της θερμοκρασίας και της ενδεχόμενης διαφοροποίησης της θερμοκρασίας κατάψυξης σε επίπεδα που μπορεί να ποικίλλουν ανάμεσα σε -70°C , -80°C και -99°C [6].

3. ΥΑΛΟΠΟΙΗΣΗ (VITRIFICATION)

Η υαλοποίηση είναι μια σύγχρονη τεχνική κατάψυξης, η οποία εφαρμόστηκε αρχικώς σε ωάρια και έμβρυα, με εξαιρετικά αποτελέσματα σε σχέση με παλαιότερες μεθόδους [7]. Η εφαρμογή της προτάθηκε επίσης και στο σπέρμα ως εναλλακτική των συμβατικών μεθόδων.

Η τεχνική περιλαμβάνει μικρής ποσότητας σπέρματος ανά περιέκτη, σε ανοικτή ή κλειστή μορφή, με χρήση ή μη κρυοπροστατευτικού υλικού [8]. Πρόκειται για μια μέθοδο ταχείας κατάψυξης, κατά την οποία τα κύτταρα παγώνουν με απ' ευθείας βύθιση σε υγρό άζωτο.

Στην περίπτωση κατά την οποία προστίθεται κρυοπροστατευτικό υλικό, προηγείται αφυδάτωση [9]. Εναλλακτικά, όταν δεν χρησιμοποιείται κρυοπροστατευτικό υλικό, πραγματοποιείται ταχεία ψύξη σταγόνων μικρού όγκου (20 μl) σπέρματος άμεσα ή εντός ανοικτών ή κλειστών περιεκτών

(παγετών - straws) ή φιλμ σε κρυοδακτυλίου (cryoloops).

Κατά τη διαδικασία της υαλοποίησης, ο ρυθμός ψύξης είναι υψηλός, ενώ ο όγκος του δείγματος και του κρυοπροστατευτικού υλικού είναι χαμηλός. Αυτό επιτυγχάνεται με χρήση περιεκτών όπως οι πλάκες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας, παγέτες ανοικτού συστήματος με λεπτά τοιχώματα και μικροί δακτύλιοι από nylon [1]. Τα κατεψυγμένα δείγματα μπορούν να κρυοσυντηρηθούν ακόμα και στους -80°C , χωρίς τη χρήση υγρού αζώτου, πράγμα που μειώνει το κόστος κρυοσυντήρησης [10].

Η μέθοδος είναι σχετικά απλή, οικονομική και αποδοτική σε ό,τι αφορά στην επανάκτηση ζώντων σπερματοζωαρίων [8] με λιγότερες βλάβες στο DNA [11]. Μειονεκτεί, ωστόσο, έναντι των συνήθων μεθόδων ως προς τον χαμηλό αριθμό των σπερματοζωαρίων που μπορούν να καταψυχθούν και τον περιορισμένο χρόνο κρυοσυντήρησης [8, 9].

4. ΆΛΛΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

4.1. Ειδικά πρωτόκολλα

Πρόσφατες έρευνες κατέδειξαν εναλλακτικές μεθόδους κατάψυξης των σπερματοζωαρίων, με εφαρμογή πρωτοκόλλων που δεν περιλαμβάνουν τη χρήση υγρού αζώτου.

Η **λυοφιλίωση** (freeze-drying ή lyophilization) προτάθηκε πρόσφατα από την ομάδα του Gianaroli, ως μέθοδος κατάψυξης η οποία δεν επηρεάζει την ακεραιότητα του DNA των σπερματοζωαρίων. Ωστόσο, η βλάβη που προκαλείται στις μεμβράνες των κυττάρων είναι τόσο μεγάλη, ώστε ελαχιστοποιεί την κινητικότητα και τη ζωτικότητα τους [12].

Η διατήρηση των σπερματοζωαρίων σε **υλικό ελεύθερο από ηλεκτρολύτες** φαίνεται, επίσης, ότι μπορεί να μην προκαλεί σημαντική βλάβη στην ακεραιότητα της χρωματίνης. Η τεχνική περιλαμβάνει καθαρισμό του σπέρματος με φυγοκέντρηση σε υλικά διαβαθμισμένης πυκνότητας, αραίωση στο ειδικό υλικό και ψύξη στους 4°C . Μειονέκτημά της αποτελεί η δυνατότητα μικρού χρονικού διαστήματος κρυοσυντήρησης, της τάξεως μερικών εβδομάδων [13].

Και οι δύο προαναφερθείσες μέθοδοι δεν μπορούν να βρουν ευρεία εφαρμογή στο πλαίσιο των απαιτήσεων της εργαστηριακής ρουτίνας μιας σύγχρονης τράπεζας σπέρματος και προς το παρόν παρουσιάζουν μόνο ερευνητικό ενδιαφέρον.

4.2. Κατάψυξη χαμηλού αριθμού σπερματοζωαρίων

Η αποτελεσματική κρυοσυντήρηση δειγμάτων με χαμηλή περιεκτικότητα σπερματοζωαρίων, όπως π.χ. σπερματοζωάρια που έχουν συλλεχθεί από επιδιδυμίδα ή όρχι με χειρουργικές μεθόδους, απαιτεί ειδικούς χειρισμούς. Σύγχρονες μεθοδολογικές προσεγγίσεις έχουν προταθεί για τον σκοπό αυτόν, προκειμένου να επιτευχθεί η κρυοσυντήρηση περιορισμένου αριθμού σπερματοζωαρίων σε μικρό όγκο. Οι τεχνικές αυτές περιλαμβάνουν τη χρήση ποικίλων περιεκτών βιολογικής ή μη βιολογικής προέλευσης, όπως συνοψίζεται στον **πίνακα 1** [4].

Έως σήμερα, δεν έχουν πραγματοποιηθεί τυχαίοποιημένες προοπτικές μελέτες μεγάλης κλίμακας για τη συγκριτική αξιολόγηση των μεθόδων αυτών και η εφαρμογή τους παραμένει περιορισμένη στην κλινική πρακτική της ΙΥΑ [4].

Πίνακας 1. Μεθοδολογικές προσεγγίσεις για την κατάψυξη χαμηλού αριθμού σπερματοζωαρίων (προσαρμογή από Di Santo et al, 2012).

Τεχνική	Αρχή της μεθόδου	Βασικά πλεονεκτήματα	Βασικά μειονεκτήματα
Κενές διαφανείς ζώνες ωαρίων	Τοποθέτηση μεμονωμένων σπερματοζωαρίων σε κενές διαφανείς ζώνες ανθρώπινης ή ζωικής προέλευσης	Αποφυγή μεγάλου χρόνου αναζήτησης κινητών σπερματοζωαρίων Η προσθήκη και απομάκρυνση του κρυοπροστατευτικού υλικού γίνεται χωρίς απώλειες σε σπερματοζωάρια	Κίνδυνος βιολογικής επιμόλυνσης
Μικροσταγόνες	Αποθήκευση σταγόνων μίγματος σπέρματος / κρυοπροστατευτικού στην επιφάνεια ξηρού πάγου και άμεση βύθιση σε υγρό άζωτο	Αποφυγή απωλειών σπερματοζωαρίων μέσω επικόλλησης στο φορέα	Κίνδυνος επιμολύνσεων μεταξύ δειγμάτων Το σχήμα και μέγεθος των φορέων δεν επιτρέπει τον εύκολο χειρισμό και αποθήκευση σε συνθήκες καταψύξης και δοχεία υγρού αζώτου
Πιπέτα ICSI	Αποθήκευση σπερματοζωαρίων σε πιπέτα ICSI	Αποστειρωμένο, απλό και εύχρηστο σύστημα	Όχι πρακτικό για μακροχρόνια κρυοσυντήρηση Ευθραυστότητα των πιπέτων Κίνδυνος επιμολύνσεων μεταξύ δειγμάτων
Σφαίρες Volvox globator	Αποθήκευση σπερματοζωαρίων σε σφαίρες Volvox globator	Σημαντική επανάκτηση κινητών σπερματοζωαρίων μετά την απόψυξη	Έκθεση σε γενετικό υλικό του φύκους Απρόσκοπτη προμήθεια του φύκους
Σφαιρίδια φυτικής προέλευσης	Μικροεγκόλπωση σε σφαιρίδια φυτικής προέλευσης	Αδρανής φύση των σφαιριδίων	Μείωση της κινητικότητας λόγω εγκόλπωσης
Κρυοδακτύλιο	Μεμονωμένα σπερματοζωάρια τοποθετούνται άμεσα σε κρυπτοπροστατευτικό φιλμ που καλύπτει τον δακτύλιο του nylon και βυθίζονται σε υγρό άζωτο	Εξαιρετικός φορέας για υαλοποίηση Δεν απαιτεί επιπρόσθετη προετοιμασία	Ανοικτό σύστημα: κίνδυνος επιμολύνσεων μεταξύ δειγμάτων
Μικροσφαίρες αгарόζης	Αποθήκευση σπερματοζωαρίων που φορτώνονται σε μικροσφαίρες αгарόζης	Μη βιολογικός φορέας	Η κλινική σημασία της μεθόδου δεν έχει αξιολογηθεί
Παγέτες	Τοποθέτηση μίγματος σπέρματος / κρυοπροστατευτικού στην παγέτα μικρού όγκου	Αποστειρωμένο, απλό και εύχρηστο σύστημα	Όχι ιδανική για δείγματα ιδιαίτερα χαμηλής ποιότητας Απώλεια σπερματοζωαρίων λόγω επικόλλησης στο φορέα

4.3. Κρυοσυντήρηση ορχικού ιστού

Η κρυοσυντήρηση ακέραιων τεμαχίων ορχικού ιστού αποτελεί μια επιστημονική πρόκληση λόγω της διαφορετικής βιολογικής σύστασής τους σε σχέση με το νωπό σπέρμα ή το εναιώρημα των απομονωμένων σπερματοζωαρίων [9]. Επιπλέον, τα τεμάχια ορχικού ιστού περιλαμβάνουν πλήθος πρώιμων σπερματικών κυττάρων σε διάφορα στάδια ανάπτυξης, καθώς επίσης και άλλων σημαντικών κυττάρων (Leydig, Sertoli), που συνεργάζονται για την ορθή λειτουργία του όρχι (σπερματογένεση και στεροειδογένεση) [14].

Τα προβλήματα που τίθενται κατά τη διαδικασία αφορούν σε περιορισμούς στη μετακίνηση θερμότητας και μάζας, την ποικιλομορφία των κυτταρικών τύπων και την προστασία των κυτταρικών αλληλεπιδράσεων, προκειμένου να διατηρηθεί η λειτουργική ακεραιότητα του ιστού μετά την απόψυξη. Η διαμερισματοποίηση των κυτταρικών στοιχείων και το μέγεθος του ιστού σχετίζεται με τη διαμόρφωση καταστρεπτικών χημικών και θερμοδυναμικών επιπέδων διαβάθμισης, πράγμα που δημιουργεί περίπλοκες συνθήκες μεταφοράς νερού και άλλων ουσιών [14].

Επίσης, τα σπερματοφόρα σωληνάρια έχουν την τάση να παγιδεύουν μόρια νερού, πράγμα που μπορεί να οδηγήσει στο σχηματισμό πάγου μέσα στον ιστό. Η δημιουργία πάγου αποτελεί ιδιαίτερα δυσμενή παράγοντα, γιατί ενδέχεται να προκαλέσει καταστροφή του αιματο-ορχικού φραγμού και / ή της δομής των σπερματοφόρων σωληναρίων με απώτερες συνέπειες κατά την τελική εφαρμογή [14]. Πειραματικά δεδομένα σε υλικό από προεφηβικούς ασθενείς κατέδειξαν καλύτερη διατήρηση της ακεραιότητας του ορχικού ιστού σε αργή, προγραμματισμένη κατάψυξη και χρήση DMSO ως κρυοπροστατευτικού αντί γλυκερόλης ή 1,2-προπανεδιόλης [9].

ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΠΟΨΥΞΗΣ

Η απόψυξη αποτελεί ένα εξίσου σημαντικό βήμα, κατά το οποίο το κύτταρο πρέπει να έχει το χρόνο να ανακτήσει τις φυσιολογικές του βιολογικές λειτουργίες, αποφεύγοντας κατά το δυνατόν τις απότομες θερμοκρασιακές αλλαγές.

Σε γενικές γραμμές, τα πρωτόκολλα απόψυξης χρησιμοποιούν τη θερμοκρασία των 37°C. Μεγαλύτερες θερμοκρασίες, αν και επιτρέπουν την ταχύτερη απόψυξη, δεν χρησιμοποιούνται γιατί

αυξάνουν τον κίνδυνο κυτταρικής βλάβης. Οι συνηθέστερα εφαρμοζόμενες μέθοδοι απόψυξης είναι:

- Απόψυξη σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min και επακόλουθη τοποθέτηση σε κλίβανο 37°C για 10 min
- Απόψυξη σε κλίβανο και υδατόλουτρο 37°C για 10 min
- Απόψυξη σε θερμοκρασία δωματίου για 15 min

Μετά την απόψυξη, το σπέρμα πρέπει να διαχωρίζεται από το κρυοπροστατευτικό υλικό μέσω καθαρισμού ή έκπλυσης σε καλλιεργητικό υλικό μέσω φυγοκέντρησης [4].

ΚΡΥΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ

Σε κάθε διαδικασία κρυοσυντήρησης σπέρματος χρησιμοποιείται κατάλληλο κρυοπροστατευτικό υλικό, το οποίο περιέχει συστατικά που προστατεύουν το σπέρμα κατά τη φάση της ψύξης, κρυοσυντήρησης και απόψυξης. Τα συστατικά τους περιλαμβάνουν κατά κύριο λόγο κρόκο αυγού, αντιβιοτικά και ειδικές ουσίες με κρυοπροστατευτική δράση.

Οι ουσίες αυτές προστατεύουν τους βιολογικούς ιστούς από καταστροφή κατά τη διαδικασία της κατάψυξης. Συνηθέστερα είναι: οι γλυκόλες (π.χ. η αιθυλική γλυκόλη, η προπυλενική γλυκόλη και η γλυκερόλη), το DMSO (Dimethyl sulfoxide), η σουκρόζη, η 2-μεθυλ-2,4-πεντανεδιόλη (MPD), καθώς και η δεξτρόζη [15].

Ο συνδυασμός τέτοιων ουσιών εμφανίζει λιγότερη τοξικότητα και η δράση του είναι πιο αποτελεσματική σε σύγκριση με τη χρήση ενός μόνο κρυοπροστατευτικού. Ως εκ τούτου, επί σειρά ετών, μίγματα κρυοπροστατευτικών με τα προαναφερθέντα συστατικά χρησιμοποιήθηκαν προκειμένου να προστατεύσουν τα σπερματοζωάρια κατά τη διαδικασία της κρυοσυντήρησης (αποφυγή δημιουργίας παγοκρυστάλλων, μετουσίωσης των πρωτεϊνών της κυτταρικής μεμβράνης, καθώς και μείωσης της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων) [16, 17]. Κατά συνέπεια, κατέστη δυνατή η πολυετής διατήρηση των κρυοσυντηρημένων δειγμάτων σπέρματος εντός υγρού αζώτου [18].

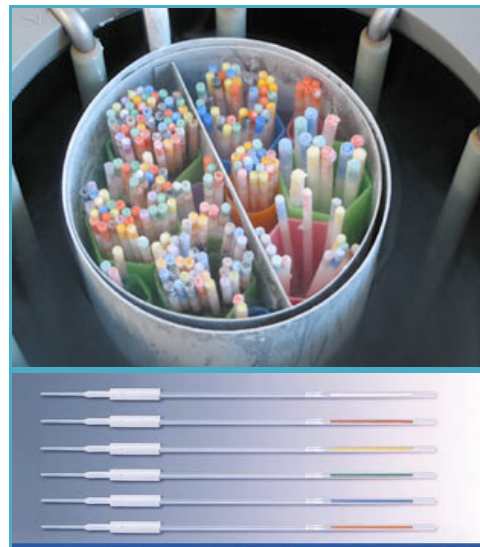
Τα πλέον ευρέως διαθέσιμα στην αγορά και χρησιμοποιούμενα από τα εργαστήρια σπέρματος διαλύματα κρυοπροστατευτικών είναι: το SpermFreezing medium της εταιρείας ORIGIO και το αντίστοιχο της εταιρείας FERTIPRO. Παρόμοια υλικά διατίθενται από τις εταιρείες Medicult, LifeGlobal και Irvine [19,20].

ΠΕΡΙΕΚΤΕΣ ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗΣ

Οι συνηθέστερα χρησιμοποιούμενοι περιέκτες στο εσωτερικό των οποίων πραγματοποιείται η κρυοσυντήρηση σπέρματος είναι δύο: οι παγέτες (straws) και οι αμπούλες (vials).

Οι παγέτες χρησιμοποιούνται ευρέως γιατί είναι μικρές σε μέγεθος και συνεπώς καταλαμβάνουν ελάχιστο όγκο στο δοχείο υγρού αζώτου. Η χωρητικότητα τους δεν ξεπερνά τα 0,5ml σπέρματος (0,3 - 0,5 ml) και το μήκος τους τα 133 mm. Εξυπηρετούν συνήθως την κατάψυξη δειγμάτων σπέρματος με χαμηλό όγκο, όπου η διαδικασία τοποθέτησής

τους στους περιέκτες δεν είναι χρονοβόρα, αφού για αυτήν αρκεί ένα σχετικά ολιγάριθμο πλήθος παγετών [21].



Εικόνα 1. Παγέτες.

Οι αμπούλες (vials) αποτελούν το δεύτερο είδος περιέκτη, με μεγαλύτερο όγκο (1,8-2 ml), που προφανώς έχουν τη δυνατότητα αποθήκευσης μεγάλης ποσότητας σπέρματος. Η ιδιότητά τους αυτή εξυπηρετεί κατά κανόνα δείγματα μεγάλου όγκου, γιατί παρέχει δυνατότητα οικονομίας χώρου και χρόνου κατά την κρυοσυντήρηση. Επίσης, κατά την απόψυξη, τις περισσότερες φορές αρκεί μόλις ένα σωληνάριο για να δώσει την απαιτούμενη ποσότητα σπέρματος, προκειμένου να χρησιμοποιηθεί μετά από επεξεργασία σε οποιαδήποτε τεχνική Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής.



Εικόνα 2. Αμπούλα.

Οι παγέτες διαθέτουν λεπτά τοιχώματα με αποτέλεσμα τα σπερματοζωάρια να έρχονται σε έμμεση επαφή με το υγρό άζωτο και η κρυοσυντήρηση να γίνεται ομοιόμορφα κατά μήκος του περιέκτη. Επίσης, λόγω της δυνατότητας τους να σφραγίζουν καλά όταν κλείνουν και από τις δύο μεριές δεν αφήνουν περιθώρια μετάδοσης ιών

(ηπατίτιδας, HIV) μεταξύ των κρυοσυντηρημένων δειγμάτων [21, 22].

Αντίθετα, οι αμπούλες έχουν παχύτερα τοιχώματα (καπάκι ιδιαίτερα παχύ) και έτσι αργεί περισσότερο το περιβάλλον των σπερματοζωαρίων να αποκτήσει την επιθυμητή θερμοκρασία (-196°C). Επίσης, χρειάζεται ιδιαίτερη προσοχή κατά την απόψυξη γιατί αν το καπάκι ανοιχτεί απότομα θα χαθεί ποσότητα σπέρματος λόγω υψηλής πίεσης [23].

Στην εργαστηριακή ρουτίνα, και οι δύο τύποι περιεκτών χρησιμοποιούνται ευρέως στη διαδικασία της κρυοσυντήρησης, ανάλογα με τις ανάγκες και τις απαιτήσεις κάθε εργαστηρίου σπέρματος.

ΣΗΜΕΙΑ ΕΝΔΙΑΦΕΡΟΝΤΟΣ

1. ΡΥΘΜΟΣ ΚΑΤΑΨΥΞΗΣ - ΑΠΟΨΥΞΗΣ

Ο ρυθμός μετάβασης από τη θερμοκρασία περιβάλλοντος στη θερμοκρασία κρυοσυντήρησης και πίσω στη θερμοκρασία περιβάλλοντος παίζει κρίσιμο ρόλο στην αποτελεσματικότητα των μεθόδων κατάψυξης. Ένας ταχύς ρυθμός κατάψυξης προκαλεί σχηματισμό ενδοκυτταρικού πάγου λόγω μη εξόδου του νερού από την κυτταρική μεμβράνη, πράγμα που συνεπάγεται υπέρψυξη και επακόλουθη μείωση της κυτταρικής επιβίωσης. Αντίθετα, ένας πολύ αργός ρυθμός κατάψυξης δημιουργεί αυξημένη συγκέντρωση διαλυτών στοιχείων εντός του κυττάρου (λόγω αυξημένης εξόδου νερού) και οσμωτικής πίεσης. Το γεγονός αυτό προκαλεί μεταβολές του κυτταρικού όγκου, αφυδάτωση και τοξικές επιδράσεις [14].

Βλαβερές συνέπειες μπορούν επίσης να προκληθούν και κατά την απόψυξη, όπου ο πάγος λιώνει και ανακρυσταλλώνεται. Το φαινόμενο αυτό σημειώνεται ενδο- και εξω- κυτταρικά με τη μορφή θερμοδυναμικά ασταθών κρυστάλλων μικρού μεγέθους που ανασυντίθεται όσο αυξάνει η θερμοκρασία [4, 24]. Το καθαρό νερό υπερψύχεται και δημιουργεί πάγο από τους -39°C, θερμοκρασία πολύ χαμηλότερη από τους 0°C όπου ο πάγος είναι θερμοδυναμικά σταθερός. Προσμίξεις, όπως η σκόνη, δρουν ως επαγωγείς του σχηματισμού πάγου και ξεκινούν τη δημιουργία μεγάλων κρυστάλλων σε θερμοκρασίες πολύ υψηλότερες των -39°C [7].

Η επίδραση του ρυθμού απόψυξης επηρεάζει με διαφορετικό τρόπο τα διάφορα είδη κυττάρων [14]. Πρόσφατες έρευνες υποστηρίζουν ότι σε κατάψυξη ταχέως ρυθμού, π.χ. υαλοποίηση ή λυοφιλίωση, η βλάβη των σπερματοζωαρίων αποδίδεται σε μια οσμωτική ανισορροπία κατά την απόψυξη και όχι στη δημιουργία ενδοκυτταρικού πάγου [25].

2. ΠΙΘΑΝΟΤΗΤΑ ΕΠΙΜΟΛΥΝΣΗΣ ΜΕΤΑΞΥ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ:

Ο κίνδυνος μετάδοσης μολύνσεων μεταξύ δειγμάτων κατά τη φάση της κρυοσυντήρησης θεωρείται κατά κανόνα απειροελάχιστος. Παρά το γεγονός ότι έως σήμερα δεν έχει υπάρξει καμία αναφορά τέτοιου συμβάντος, η πιθανότητα να προκύψει είναι υπαρκτή. Για το λόγο αυτό, θα πρέπει να λαμβάνονται όλα τα απαραίτητα μέτρα ποιοτικού ελέγχου, προκειμένου οι συνθήκες συλλογής, κατάψυξης, κρυοσυντήρησης, απόψυξης και επεξεργασίας του κατεψυγμένου σπέρματος να συμβάλλουν στην αποφυγή τέτοιων περιπτώσεων [26, 27].

3. ΧΡΟΝΟΣ ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗΣ

Ο χρόνος παραμονής στο υγρό άζωτο δεν επηρεάζει τις λειτουργικές ιδιότητες των σπερματοζωαρίων,

δεδομένου ότι στην κατάσταση 'ανεσταλμένης δραστηριότητας' ('suspended animation') παύει κάθε λειτουργική δράση. Η HFEA (Human Fertilization and Embryology Authority) πρόσφατα αποφάσισε να παρατείνει τον επιτρεπόμενο χρόνο κρυοσυντήρησης του σπέρματος στα 55 χρόνια [2]. Σύμφωνα με το ισχύον νομοθετικό πλαίσιο (νόμος 3305/2005), στη χώρα μας ο χρόνος κρυοσυντήρησης ορίζεται στα 5 χρόνια με δυνατότητα παράτασης για 5 επιπλέον χρόνια, κατόπιν έγγραφης συναίνεσης του ενδιαφερομένου.

4. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑΣ

Οι διαδικασίες κατάψυξης και κρυοσυντήρησης εφαρμόζονται κατά βάση σε νωπό σπέρμα, στο οποίο προστίθεται κρυοπροστατευτικό υλικό. Με τον τρόπο αυτό, διατηρείται η αντιοξειδωτική προστατευτική του δράση προς τα σπερματοζωάρια, που αυξάνει την ανθεκτικότητά τους στις επιβλαβείς επιδράσεις της κατάψυξης [24]. Ωστόσο, σε περιπτώσεις όπου κρίνεται απαραίτητος ο διαχωρισμός και επιλογή ώριμων, λειτουργικών σπερματοζωαρίων για κρυοσυντήρηση, προηγείται καθαρισμός με φυγοκέντρηση σε υλικά διαβαθμισμένης πυκνότητας (τύπου Percoll) ή μετακίνηση σε καλλιεργητικά υλικά (swim-up). Στις περιπτώσεις αυτές συνιστάται ο εμπλουτισμός των κρυοπροστατευτικών υλικών σε αντιοξειδωτικές ουσίες, προκειμένου να αντισταθμιστεί η απουσία του σπερματικού υγρού [24].

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η τεχνολογία πίσω από την κρυοσυντήρηση αναπαραγωγικών κυττάρων και ιστών έχει τις ρίζες της σε βασικά επιστημονικά αξιώματα, που αναπτύχθηκαν κατά την τελευταία πενήντακονταετία. Ο συνδυασμός της θεωρίας με την εμπειρική έρευνα έχει οδηγήσει ήδη σε πολλά επιτεύγματα. Ωστόσο, προκλήσεις υπάρχουν ακόμα μπροστά μας, αναφορικά με τη βελτιστοποίηση των μεθόδων κρυοσυντήρησης, μέσω της αποτελεσματικότερης χρήσης κρυοπροστατευτικών υλικών, του προσδιορισμού του βέλτιστου ρυθμού και των σταδίων της διαδικασίας κατάψυξης-απόψυξης και της αποφυγής των καταστρεπτικών επιδράσεων του πάγου και των οσμωτικών φαινομένων [14] στην ποιότητα του κατεψυγμένου σπέρματος [4, 24].

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **Shufaro Y, Schenker JG.** Cryopreservation of human genetic material. *Ann N Y Acad Sci*, 2010; 1205:220-4.
2. **Sharma V.** Sperm storage for cancer patients in the UK: a review of current practice. *Hum Reprod*, 2001; 26:2935-43.
3. **Behrman SJ, Sawada Y.** Heterologous and homologous inseminations with human semen frozen and stored in a liquid-nitrogen refrigerator. *Fertil Steril*, 1966; 17:457-66.
4. **Di Santo M, Tarozzi N, Nadalini M, Borini A.** Human Sperm Cryopreservation: Update on techniques, effect on DNA integrity and implications for ART. *Adv Urol*, 2012; article ID 854837, 1-12.
5. **Sherman J.** Cryopreservation of human semen, 1990, in: *Handbook of the Laboratory Diagnosis and Treatment of Infertility*, Keel b and Webster BW Eds, CRC Press, Boca Raton, Fla, USA.
6. **Holt WV.** Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reprod Sci*, 2000; 62:3-22.
7. **Barrett SL, Woodruff TK.** Gamete Preservation. *Cancer Treat Res*, 2010; 156:25-36.

8. **Endo Y, Fujii Y, Shintani K, Seo M, Motoyama H, Funahashi H.** Simple vitrification for small numbers of human spermatozoa. *Reprod Biomed Online*, 2012; 24:301-307.
9. **Holoch P, Wald M.** Current options for preservation of fertility in the male. *Fertil Steril*, 2011; 96:286-290.
10. **Sánchez R, Risopatrón J, Schulz M, Villegas JV, Isachenko V, Isachenko E.** Vitrified sperm banks: the new aseptic technique for human spermatozoa allows cryopreservation at -86°C. *Andrologia*, 2012; doi: 10.1111/j.1439-0272.2012.01314.x.
11. **Satirapod C, Treetampinich C, Weerakiet S, Wongkularb A, Rattanasiri S, Choktanasiri W.** Comparison of cryopreserved human sperm from solid surface vitrification and standard vapor freezing method: on motility, morphology, vitality and DNA integrity. *Andrologia*, 2012, doi: 10.1111/j. 1439-0272.2011.01267.x.
12. **Gianaroli L, Magli MC, Stanghellini I, Crippa A, Crivello AM, Pescatori ES, Ferraretti AP.** DNA integrity is maintained after freeze-drying of human spermatozoa. *Fertil Steril*, 2012; 97:1067-1073.
13. **Riel JM, Yamauchi Y, Huang TTF, Grove J and Ward MA.** Short-term storage of human spermatozoa in electrolyte-free medium without freezing maintains sperm chromatin integrity better than cryopreservation. *Biology of Reproduction*, 2011; 85: 536-547.
14. **Woods EJ, Benson JD, Agca Y, Critser JK.** Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. *Cryobiology*, 2004; 48:146-56.
15. **Anchordoguy TS, Rudolph AS, Carpenter JF, Crowe JH.** Model of interaction of cryopreservation with membrane phospholipids during freezing. *Cryobiology*, 1987; 24:324-31.
16. **Critser JK, Huse-Benda AR, Aaker DR.** Cryopreservation of human spermatozoa. The effect of cryopreservation on motility. *Fertil Steril*, 1988; 50:314-20.
17. **Brander JK, Kollman S, Loy SD.** The influence of cryoprotective media and processing procedures on motility and migration of frozen-thawed human sperm. *Asian J Androl*, 2002; 4:137-41.
18. **Crowe JH, Boeing ST, Forbes C.** Membrane stabilization during freezing. *Cryobiology*, 1984; 22:367-77.
19. **Verza S, Manzzi C, Telles D, Schneider SC.** A comparative study of three commercially available cryoprotectants for cryopreservation of human sperm. *ANDROFERT - Centro de Referência em Infertilidade Masculina*, Campinas, Brazil.
20. **Gilmore JA, Liu J, Gao DY, Critser JK.** Determination of optimal cryoprotectants and procedures for their addition and removal from human spermatozoon. *Hum Reprod*, 1997; 12: 112-118.
21. **Estar Medical.** www.estar-medical.com/art. CBS high security sperm straws.
22. **Carnes P, Goodman A, Kasl CD.** Sperm cryopreservation; is there a significant risk of cross-contamination? *Hum Reprod*, 1999; 14(12): 2941-2943.
23. **California Cryobank.** Working safely with cryopreservation vials.
24. **Said MT, Gaglani A, Agarwal A.** Implication of apoptosis in sperm cryoinjury. *Reprod Biomed Online*, 2010; doi: 10.1016/j. rbmo.2010.05.011.
25. **John Morris G, Acton E, Murray BJ, Fonseca F.** Freezing injury: the special case of the sperm cell. *Cryobiology*, 2012; 64:71-80.
26. **Mortimer D.** Current and future concepts and practices in human sperm cryobanking. *Reprod Biomed Online*, 2004; 9:134-51.
27. **Wu Y, Yao KS.** [Risk of cross-contamination and its prevention in human sperm cryobanking]. *Zhonghua Nan Ke Xue*, 2010; 16:55-9.

Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗΣ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΟΡΧΕΟΣ

Κ.Ν. Νεανίδης, Χ. Καρανικιώτης

Ογκολογική Κλινική, 424 Γενικό Στρατιωτικό Νοσοκομείο Εκπαιδεύσεως, Θεσσαλονίκη

Ο καρκίνος του όρχεος ανήκει στην κατηγορία των όγκων από γεννητικά κύτταρα, με συχνότερη εντόπιση στους όρχεις και σπανιότερα στο οπισθοπεριτόναιο ή το το μεσοθωράκιο. Απαντά πρωτίστως σε άνδρες της λευκής φυλής και είναι ο συνηθέστερος καρκίνος σε άνδρες ηλικίας 20-40 ετών. Πλήθος δημοσιεύσεων αναφέρουν ότι υπάρχει άνοδος της επίπτωσης της νόσου στις βιομηχανικές χώρες τις τελευταίες δεκαετίες [1]. Στους παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση της νόσου συγκαταλέγονται η κρυφορχία, σπερματική ή ορχική δυσγενεσία, σύνδρομο Klinefelter, το οικογενειακό ιστορικό. Απαντά επίσης συχνά με την ιστολογική μορφή του Σεμινώματος σε άτομα που νοσούν από τον ιό του συνδρόμου επίκτητης ανοσοανεπάρκειας (Human Immunodeficiency Virus) [2]. Ανεξαρτήτως του σταδίου και της εντόπισης της νόσου, αντικειμενικός σκοπός είναι η ίαση της νόσου. Ελπιδοφόρο είναι μάλιστα το γεγονός ότι ο αριθμός των ατόμων που επιβιώνουν από τον καρκίνο του όρχεος σε νεαρή ηλικία έχει αυξηθεί ριζικά τα τελευταία 20 χρόνια. Παράγοντες που συντελούν σε αυτό είναι τόσο η πρώιμη διάγνωση, όπως επίσης και η ολοκληρωμένη συνεργασία των θεραπευτικών χειρισμών με τον συνδυασμό της χειρουργικής επέμβασης, χημειοθεραπείας, ακτινοθεραπείας. Θεωρείται ότι άνω του 75% των νέων ασθενών είναι μακράν επιβιώσαντες στις ημέρες μας. Από την άλλη όμως, οι θεραπευτικοί χειρισμοί ενδέχεται να επιφέρουν μακροχρόνιες συνέπειες στην υγεία του νεαρού ατόμου. Εκτιμάται ότι τα 2/3 των ατόμων που επιβιώνουν του καρκίνου μπορούν να έχουν ανεπιθύμητες παρενέργειες, με το 1/3 από αυτές να είναι ιδιαίτερα σοβαρές ή και απειλητικές για την ζωή [3]. Οι ανεπιθύμητες αυτές παρενέργειες περιλαμβάνουν καρδιαγγειακές και πνευμονικές νόσους, νευροτοξικότητα, νεφρική ανεπάρκεια, δευτερογενείς κακοήθειες και υπογονιμότητα.

Είναι σκόπιμο να αναφερθεί ότι η υπογονιμότητα ενδεχομένως να συμβαίνει στα πλαίσια της ίδιας της νόσου, με ορμονικές ή μεταβολικές διαταραχές που επηρεάζουν την λειτουργία των γονάδων. Οι ορμόνες αναπαραγωγής ίσως να είναι χαμηλές στους ασθενείς με καρκίνο όρχεος, αποτέλεσμα του stress, ενδοκρινών ουσιών που παράγει ο όγκος (όπως της β-χοριακής γοναδοτροπίνης), άλλων μεταβολικών διαταραχών όπως η υποθρεψία λόγω της νόσου, έλλειψη βιταμινών και ιχνοστοιχείων, παρουσία ενός εμπυρέτου στα πλαίσια της νόσου με αρνητική επίδραση στην σπερματογένεση, την επίδραση των κυττοκινών που εκκρίνει ο όγκος στην λειτουργία και την κινητικότητα των σπερματοζωαρίων. Σε μια μελέτη 764 ανδρών που απευθύνθηκαν για κρυοσυντήρηση σπέρματος πριν από χημειοθεραπεία, βρέθηκαν ανωμαλίες στο εξεταζόμενο σπέρμα σε ποσοστό 64%. Στο 12% των ασθενών δεν συντηρήθηκε σπέρμα λόγω της χαμηλής του ποιότητας [4]. Στην υπογονιμότητα ασφαλώς όμως συντελούν και οι θεραπευτικοί χειρισμοί. Τα κυτταροτοξικά φάρμακα της χημειοθεραπείας ως γνωστό έχουν αρνητική επίδραση στην σπερματογένεση [5]. Από τα χημειοθεραπευτικά που χρησιμοποιούνται πλέον επικίνδυνη είναι η ιφωσφαμίδα, ακολουθούν η πλατίνη, καρβοπλατίνη και ετοποσίδη και έπονται η

μπλεομυκίνη, βινκριστίνη και βινπλαστίνη. Ο συνδυασμός μάλιστα αυτών, όπως συνηθίζεται σε πολλά στάδια της νόσου, είναι πολλαπλάσια τοξικός. Η ανάταξη της σπερματογένεσης εξαρτάται τόσο από τον συνδυασμό των φαρμάκων που θα χρησιμοποιηθούν, όσο επίσης και από την συνολική δόση. Πέρα όμως από την χημειοθεραπεία, η ακτινοθεραπεία επίσης μπορεί να επηρεάσει αρνητικά την γονιμότητα. Οι όρχεις είναι εξαιρετικά ευαίσθητοι στη ακτινοβολία. Δόση άνω των 4 Gy μπορεί να προκαλέσει μόνιμη βλάβη των γονάδων. Συνήθως οι όρχεις πάντα προστατεύονται με χρησιμοποίηση ακτινοπροστατευτικών μέσων όταν χρειάζεται η εφαρμογή ακτινοθεραπείας στην περιοχή ακριβώς γαι την πρόληψη βλάβης στις γονάδες [5].

Για τη διασφάλιση της γονιμότητας σε ασθενείς με καρκίνο όρχεος που πρόκειται να ακολουθήσουν θεραπευτικούς χειρισμούς τοξικών για τις γονάδες, ενδείκνυται η κρυοσυντήρηση σπέρματος. Η μέθοδος προτάθηκε αρχικά στην επιστημονική κοινότητα την δεκαετία του 1960 [6] και στις ημέρες έχει βελτιωθεί σε βαθμό που να αποτελεί την πλέον καθιερωμένη μέθοδο διατήρησης της γονιμότητας σε ασθενείς επιβιώσαντες από καρκίνο όρχεος. Υπάρχουν δύο κύριες τεχνικές κρυοσυντήρησης σπέρματος. Η πρώτη αφορά την τεχνική της αργής ψύξης που προτάθηκε από τους Behrman & Sawada [7] και η οποία αφορά προδευτική ψύξη του σπέρματος σε διάστημα 2 - 4 ωρών και σε διαδικασία 2 - 3 βημάτων, με ταυτόχρονη μείωση της θερμοκρασίας του σπέρματος και προσθήκη παράλληλα κρυοπροστατευτικού παράγοντα. Η διαδικασία διενεργείται από άτομο του εργαστηρίου και περιλαμβάνει την ψύξη του σπέρματος από την θερμοκρασία δωματίου έως τους 5°C με ρυθμό 0,5-1°C/min. Έπειτα το σπέρμα ψύχεται από τους 5°C στους -80°C με ρυθμό 1-10°C/min. Μετά το δείγμα τοποθετείται σε υγρό άζωτο στους -196°C. Εντούτοις, από την ανωτέρω διαδικασία προκύπτουν μερικές φορές κάποια προβλήματα χειρισμών, γεγονός που οδήγησε στην δημιουργία αυτόματων καταψυκτών σπέρματος, εύκολων και ασφαλών στη χρήση. Η δεύτερη τεχνική αφορά την άμεση ψύξη του δείγματος και προτάθηκε από τον Sherman [8]. Η τεχνική αφορά την άμεση έκθεση του δείγματος σε περιβάλλον ατμών υγρού αζώτου για 8 - 10 min και μετά την τοποθέτηση του δείγματος σε υγρό άζωτο στους -196°C. Τα κρυοπροστατευτικά που χρησιμοποιούνται σε αυτές τις μεθόδους είναι χημικές ουσίες χαμηλού μοριακού βάρους και υψηλής διαπερατότητας που προστατεύουν τα σπερματοζωάρια κατά την διαδικασία της ψύξης με την αποτροπή δημιουργίας κρυστάλλων εντός αυτών. Υπάρχουν τέσσερις βασικές ουσίες, όπως glycerol, ethylene glycol, dimethyl sulphoxide, 1,2-propanediol. Η διαδικασία της απόψυξης του σπέρματος είναι εξίσου σημαντική και τα κύτταρα του σπέρματος πρέπει να επιστρέψουν στην αρχική τους βιολογική μορφή προσπαθώντας να αποφύγουμε απότομες θερμικές αλλαγές που θα έχουν επίπτωση στην ποιότητα τους. Τεχνικές που χρησιμοποιούνται είναι η απόψυξη σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min και ακολούθως η θέρμανση τους στους 37°C για άλλα 10 min, η απόψυξη σε υδάτινο λουτρό στους

37°C για 10 min, η απόψυξη σε θερμοκρασία δωματίου για 15 min. Μετά την απόψυξη το σπέρμα διαχωρίζεται από το κρυοσυντηρητικό μέσο με πλύση και φυγοκέντρηση. Υπάρχουν πολλά ερωτηματικά για την επίδραση της διαδικασίας της κρυοσυντήρησης στην ποιότητα του σπέρματος. Διάφορες μελέτες δείχνουν ότι η κρυοσυντήρηση μπορεί να έχει επιβλαβή δράση στην δομή και την λειτουργία του σπέρματος [9]. Αυτό συμβαίνει με διάφορους πιθανά μηχανισμούς, όπως την δημιουργία ενδοκυττάρων κρυστάλλων κατά την διαδικασία της ψύξης, την επανακρυσταλοποίηση κατά την διαδικασία της απόψυξης, την διαταραχή της ωσμωτικής ισορροπίας των κυττάρων, την αλλοίωση της δομής της κυτταρικής μεμβράνης και των μιτοχονδρίων, την απώλεια της αντιοξειδωτικής ικανότητας των κυττάρων και την απόπτωση τους. Διχογνωμία υπάρχει επίσης και στο κατά πόσο η διαδικασία της κρυοσυντήρησης επηρεάζει την ακεραιότητα του DNA, με πλήθος μελετών με αντικρουόμενα αποτελέσματα [10]. Εντούτοις, μελέτες με σκοπό την εκτίμηση της αποτελεσματικότητας του αναπαραγωγικού αποτελέσματος μετά από κρυοσυντήρηση σπέρματος, έδειξαν ότι κατά την τεχνική της ενδοκυτταροπλασματική έγχυσης σπέρματος (intracytoplasmic sperm injection) με συντηρημένο ή φυσικό δείγμα σπέρματος, τα αποτελέσματα ήταν ανάλογα [10].

Στις ημέρες μας, η κρυοσυντήρηση σπέρματος είναι κοινά αποδεκτή και χρησιμοποιείται ευρέως για την φύλαξη σπέρματος σε περιπτώσεις όπου η θεραπευτική παρέμβαση για την αντιμετώπιση του καρκίνου του όρχεος μπορεί να πλήξει την αναπαραγωγική ικανότητα. Το γεγονός μάλιστα της μακράς επιβίωσης ή και συχνά πλήρους ίασης των ασθενών αυτών, καθιστά το θέμα της γονιμότητας ιδιαίτερα βασικό στον καθορισμό της ποιότητας ζωής. Υπάρχει βέβαια διχογνωμία στο κατά πόσο η διαδικασία της κρυοσυντήρησης επηρεάζει την ακεραιότητα του γενετικού υλικού και κατά πόσο επίσης η διαφορετική τεχνική κρυοσυντήρησης έχει διαφορετικό ανάλογα αντίκτυπο στο φαινόμενο αυτό. Θεωρούνται αναγκαίες περαιτέρω πολυκεντρικές μελέτες με μεγάλο αριθμό ασθενών που να

οδηγήσουν στην κατανόηση της επίδρασης της κρυοσυντήρησης σπέρματος στην ποιότητα του διατηρημένου γενετικού υλικού, την εφαρμογή της πλέον κατάλληλης τεχνικής και την εκτίμηση του βέλτιστου αποτελέσματος στην χρησιμοποίησή του κρυοσυντηρημένου σπέρματος στην διαδικασία της τεχνητής γονιμοποίησης.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **Huyghe E, et al.** Fertility after Testicular Cancer Treatments, Results of a Large Multicenter Study. Eric, 2004 American Cancer Society.
2. **ASCO SEP Medical Oncology Self-Evaluation Program**, Second Edition, 2010, American Society of Clinical Oncology.
3. **Dohle GR.** Male infertility in cancer patients: Review of the literature. *Int J Urol* 2010, 17:327-31.
4. **Van Casteren NJ, Boellaard WP, Romijn JC, Dohle GR.** Gonadal dysfunction in male cancer patients before cytotoxic treatment. *Int J Androl* 2009.
5. **Wallace WH, Anderson RA, Irvine DS.** Fertility preservation for young patients with cancer: who is at risk and what can be offered? *Lancet Oncol* 2005; 6:209-18.
6. **Sherman JK.** Synopsis of the use of frozen human semen since 1964: state of the art of human semen banking. *Fertil Steril* 1973; 24:397-412.
7. **Behrman SJ, Sawada Y.** Heterologous and homologous inseminations with human semen frozen and stored in a liquid-nitrogen refrigerator. *Fertil Steril* 1966, 17:457-66.
8. **Sherman J.** Cryopreservation of human semen. *Handbook of the Laboratory Diagnosis and Treatment of Infertility*. Keel B, Webster BW (eds), CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 1990.
9. **Watson PF.** The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci* 200; 60-61:481-92.
10. **di Santo M, Tarozzi N, Nadalini M, Borini A.** Human Sperm Cryopreservation: Update on Techniques, Effect on DNA Integrity, and Implications for ART. *Adv Urol* 2012

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗΣ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ ΣΤΙΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ ΤΟΥ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΤΗ ΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ

I. Βακαλόπουλος

A' Ουρολογική Κλινική, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Νοσοκομείο «Γ. Γεννηματάς»

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η κρυοκατάψυξη ως μέσον αποθήκευσης του σπέρματος για την εκτέλεση υποβοηθούμενης αναπαραγωγής συνοδεύεται από σημαντικά πλεονεκτήματα ως προς τον προγραμματισμό της διαδικασίας, την αποφυγή της δυσάρεστης έκπληξης της μη ανεύρεσης σπερματοζωαρίων από το δότη σε περίπτωση ταυτόχρονης προετοιμασίας της γυναίκας και την μη ανάγκη της υποβολής του δότη στη διαδικασία συλλογής σπερματοζωαρίων ανά κύκλο.

Παρόλο που η κρυοκατάψυξη επηρεάζει την κινητικότητα και τη βιωσιμότητα των σπερματοζωαρίων, το πρόβλημα αυτό μπορεί να υπερκεραστεί με την επιλογή ζωνηρά κινούμενων σπερματοζωαρίων μετά την απόψυξη, την κατάψυξη μαζί με σπερματικό υγρό, την προσθήκη αντιοξειδωτικών ουσιών στο υλικό, και τη χρήση ουσιών, που ενεργοποιούν την κινητικότητα των σπερματοζωαρίων μετά την απόψυξη, με συνέπεια τα αποτελέσματα στα ποσοστά κύησης με υποβοηθούμενη αναπαραγωγή να μη διαφέρουν μεταξύ του φρέσκου και του αποψυγμένου σπέρματος.

Παρόλο που η διαδικασία κατάψυξης - απόψυξης σχετίζεται με υψηλότερο ποσοστό βλάβης του DNA των σπερματοζωαρίων, τα αποτελέσματα σύλληψης και κύησης δεν επηρεάζονται καθόλου με την εφαρμογή της ICSI, αλλά και σχεδόν καθόλου με την κλασσική IVF. Αυτό, που φαίνεται να αυξάνει είναι η συχνότητα αυτόματων αποβολών.

Η πρόσφατη ανίχνευση των μοριακών δομών των σπερματοζωαρίων, που ρυθμίζουν κομβικές διαδικασίες για τη γονιμοποίηση θα προσφέρουν σημαντικές δυνατότητες φαρμακευτικών παρεμβάσεων και βελτίωση των γονιμοποιητικών δυνατοτήτων των αποψυγμένων σπερματοζωαρίων, πράγμα πολύ σημαντικό, όταν αυτά είναι πολύ λίγα και δεν υπάρχει η πολυτέλεια επιλογής τους, όπως συμβαίνει σε ορισμένες περιπτώσεις μη αποφρακτικής αζωοσπερμίας.

ABSTRACT

Sperm cryopreservation as method of sperm storage for assisted reproduction (ART), has big advantages in proper scheduling of the procedure, avoiding the unpleasant surprise of not retrieving spermatozoa from the donor in a simultaneous programmed intracytoplasmic sperm injection (ICSI), and avoiding performing surgical sperm retrieval in every ART cycle.

Although, sperm freezing decreases sperm motility and viability, the problem may be overcome by proper selection of spermatozoa with good motility after thawing, freezing of spermatozoa with seminal fluid, adding of antioxidants in the freezing solution and using motility activating substances after thawing. Thus, pregnancy rates with ART do not differ between using fresh and frozen-thawed sperm.

Although, freezing-thawing procedure is related with higher percent of spermatozoa DNA fragmentation, conception rates are almost not affected after classic IVF and not at all affected after ICSI application. However, as DNA fragmentation rate increases miscarriage rate increases too. Recent detection of molecules regulating major spermatozoa fertilizing actions may offer novel pharmaceutical treatments to enhance fertilizing capacity of post thawed spermatozoa especially, when very few spermatozoa are retrieved, as it usually happens in cases of non obstructive azoospermia.

Η ιδέα της κρυοκατάψυξης του σπέρματος χρονολογείται ήδη από το 1776, όταν ο Lazzaro Spallanzani ανέφερε ότι τα σπερματοζώαρια χάνουν την κινητικότητα τους, όταν ψυχθούν με χιόνι. Το 1866 ο Montegazza ήταν ο πρώτος που πρότεινε την χρήση κατεψυγμένου σπέρματος από ετοιμοθάνατους στρατιώτες, που στέλλονταν στην πατρίδα, για τη γονιμοποίηση των συζύγων τους. Η εφαρμογή της χρήσης κρυοπροστατευτικών ουσιών αργότερα έδωσε σημαντική ώθηση στην συντήρηση σπέρματος με κρυοκατάψυξη [1].

Η πρώτη εγκυμοσύνη σε άνθρωπο με χρήση αποψυγμένου σπέρματος έγινε το 1953 [2]. Η κρυοσυντήρηση των ανθρώπινων σπερματοζωαρίων γινόταν με ψύξη και αποθήκευση σπέρματος σε ξηρό πάγο. Ωστόσο, λόγω αντιρρήσεων σχετικών με την ηθική της διαδικασίας, χρειάστηκε μια δεκαετία ακόμη για να εδραιωθεί. Η ψύξη και αποθήκευση σπέρματος σε υγρό άζωτο στους -196°C εισήχθη το 1960. Έκτοτε ακολούθησαν πολλές αναφορές για επιτυχείς γονιμοποιήσεις, εγκυμοσύνες και γεννήσεις με αποψυγμένο σπέρμα. Η χρήση των κρυοπροστατευτικών ουσιών, όπως η γλυκερόλη και η προπανεδιόλη βοήθησαν στο περιορισμό της βλαπτικής επίδρασης της ψύξης στα σπερματοζώαρια μειώνοντας το ωσμωτικό stress με το να μειώνουν τη συγκέντρωση του άλατος και να αυξάνουν το κλάσμα του μη παγωμένου νερού στο κατεψυγμένο σπέρμα [3]. Σήμερα, η γλυκερόλη και η λεκιθίνη του αυγού είναι τα πιο δημοφιλή κρυοπροστατευτικά, που χρησιμοποιούνται για να διατηρούν τη δομική ακεραιότητα των κατεψυγμένων σπερματοζωαρίων. Έτσι η κρυοκατάψυξη του σπέρματος έγινε σήμερα μια διαδικασία ρουτίνας με υψηλή αναπαραγωγικότητα. Οι τεχνικές βελτιώνονται συνέχεια, ώστε η επιβίωση του αποψυγμένου σπέρματος να βελτιώνεται συνέχεια, πράγμα που έχει επεκτείνει σημαντικά τις εφαρμογές της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής.

Η γονιμοποιητική ικανότητα του κρυοσυντηρημένου και αποψυγμένου σπέρματος μελετάται για περισσότερα από 50 χρόνια [2,4-6]. Σε μερικές μελέτες το αποψυγμένο σπέρμα είχε μικρότερη γονιμοποιητική ικανότητα σε σύγκριση με το φρέσκο σπέρμα [7-8]. Ωστόσο, σε άλλες δημοσιεύσεις η γονιμοποιητική ικανότητα φρέσκου και κατεψυγμένου σπέρματος είναι παρόμοια [9-10]. Σε μια πολύ μεγάλη μελέτη από την Γαλλία μελετήθηκε η γονιμοποιητική ικανότητα του αποψυγμένου σπέρματος φυσιολογικών δοτών σε 22 κέντρα.

Συγκεκριμένα έγινε λεπτομερής προοπτική καταγραφή των γεννήσεων, που προέκυψαν μετά από σπερματέγχυση και εξωσωματική γονιμοποίηση από το 1987 έως το 1994. Συνολικά καταγράφηκαν 21.597 γεννήσεις. Μεταξύ άλλων ένα από τα συμπεράσματα της μελέτης ήταν, ότι η χρήση του κρυοκατεψυγμένου σπέρματος δότη δεν αλλάζει τα ποσοστά γεννήσεων σε σχέση με το φυσιολογικό πληθυσμό [10].

Ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι μελέτες, που συγκρίνουν τα αποτελέσματα των ποσοστών γονιμοποίησης των ωαρίων και γεννήσεων με φρέσκο και κατεψυγμένο σπέρμα στα ίδια ζευγάρια, γιατί έτσι αποφεύγονται σφάλματα λόγω των μεταβλητών του γυναικείου αναπαραγωγικού παράγοντα (ηλικία, κατάσταση γεννητικού συστήματος κλπ). Στη μελέτη των Hutchon et al δεν παρατηρήθηκε διαφορά στα ποσοστά γονιμοποίησης με ICSI μεταξύ φρέσκων και κατεψυγμένων σπερματοζωαρίων, που ελήφθησαν από τις επιδιδυμίδες ασθενών με αποφρακτική αζωοσπερμία, αλλά παρατηρήθηκαν λιγότερα κορυφαίου βαθμού έμβρυα στην ομάδα των κατεψυγμένων σπερματοζωαρίων [11]. Ωστόσο, δεν αναφέρεται ο χρόνος μεταξύ των δύο κύκλων ICSI. Για να αποφευχθεί το πρόβλημα αυτό οι Cayan et al. μελέτησαν τα ποσοστά γονιμοποίησης και εγκυμοσύνης σε 19 ζευγάρια με αποφρακτική αζωοσπερμία του άνδρα, όπου η γυναίκα υποβλήθηκε σε δύο διαδοχικούς κύκλους ICSI, τον πρώτο με φρέσκα σπερματοζωάρια και τον δεύτερο με κατεψυγμένα. Έτσι κάθε ζευγάρι λειτούργησε ως control του ίδιου και αποφεύχθηκαν σφάλματα σχετικά με τη μεταβολή του αναπαραγωγικού δυναμικού της γυναίκας λόγω παρέλευσης σημαντικού χρόνου μεταξύ των δύο κύκλων. Τα ποσοστά γονιμοποίησης και εγκυμοσύνης αντιστοιχία για τους δύο κύκλους ήταν 58,4% και 31,6% για τον πρώτο κύκλο και 62% και 36,8% για τον κύκλο με τα κατεψυγμένα σπερματοζωάρια. Όπως είναι προφανές δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους και συνεπώς τα κινούμενα αποψυγμένα σπερματοζωάρια, που λαμβάνονται από την επιδιδυμίδα ανδρών με αποφρακτική αζωοσπερμία είναι αναπαραγωγικά ισοδύναμα με τα φρέσκα σπερματοζωάρια [12].

Τι συμβαίνει όμως με την γονιμοποιητική ικανότητα των αποψυγμένων σπερματοζωαρίων σε άνδρες με μη αποφρακτική αζωοσπερμία, όπου με την βιοψία του όρχεως (TESE) ανευρίσκονται λίγα κινούμενα ή ακίνητα σπερματοζωάρια; Στην ενδιαφέρουσα δημοσίευση των Hauser et al μελετήθηκαν 13 ζευγάρια αζωοσπερμικών ανδρών, όπου με την TESE βρέθηκαν λίγα κινούμενα ή ακίνητα σπερματοζωάρια (σοβαρή υποσπερματογένεση) και όπου οι γυναίκες υποβλήθηκαν σε δύο ταυτόχρονες ICSI, μία με φρέσκα σπερματοζωάρια, που ελήφθησαν με TESE, που έγινε αμέσως πριν την ICSI και μία με κατεψυγμένα σπερματοζωάρια, που ελήφθησαν κατά την αρχική διαγνωστική βιοψία όρχεων. Παρόλο, που η κατάψυξη των σπερματοζωαρίων μειώνει την κινητικότητα τους και η κινητικότητα επηρεάζει σημαντικά την γονιμοποιητική ικανότητα, τόσο των αποψυγμένων, όσο και των φρέσκων, το συνολικό ποσοστό γονιμοποίησης δεν παρουσίαζε σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων σπερματοζωαρίων (44,9% έναντι 41,1%). Παρόμοια ήταν και τα ποσοστά εγκυμοσύνης (18,2% έναντι 15,4%). Συνεπώς ακόμη και στις σοβαρές μορφές υποσπερματογένεσης η χρήση κατεψυγμένων σπερματοζωαρίων, παρά την ανάγκη ίσως περισσότερων κύκλων ICSI λόγω της απώλειας της κινητικότητας τους δεν επηρεάζει τη

συνολική γονιμοποιητική ικανότητα και τα ποσοστά εγκυμοσύνης [13]. Το συμπέρασμα αυτό επιβεβαιώνεται και σε παλαιότερες μελέτες, όπου φαίνεται, ότι η κρυοκατάψυξη των σπερματοζωαρίων ασθενών με μη αποφρακτική αζωοσπερμία, δεν μειώνει τα ποσοστά εγκυμοσύνης με την ICSI [14].

Το πρόβλημα γενικά σε αυτές τις περιπτώσεις μη αποφρακτικής αζωοσπερμίας είναι η ανεύρεση λίγων ή πολύ λίγων σπερματοζωαρίων στη βιοψία του όρχεως. Είναι προφανές, ότι η διατήρησή τους με κρυοκατάψυξη βοηθά σημαντικά στην αποφυγή επανειλημμένων βιοψιών, που μπορεί να συνοδεύονται από σημαντικές παρενέργειες ιδιαίτερα στους ασθενείς με μικρούς όρχεις και έχουν υψηλό κόστος. Επίσης βοηθά στον προγραμματισμό για την εκτέλεση της ICSI και στην αποφυγή της δυσάρεστης έκπληξης της μη ανεύρεσης σπερματοζωαρίων κατά την ημέρα της ωοληψίας. Ωστόσο, οι κλασσικές τεχνικές κρυοκατάψυξης φαίνεται, ότι δεν είναι κατάλληλες για την διατήρηση μεμονωμένων σπερματοζωαρίων ή μικροποσοτήτων σπέρματος. Οι Abdel Hafez et al. δημοσίευσαν μια ενδιαφέρουσα βιβλιογραφική ανασκόπηση τεχνικών για την κρυοκατάψυξη μεμονωμένων σπερματοζωαρίων ή μικροποσοτήτων σπέρματος. Αναγνώρισαν 30 μελέτες στις οποίες αναφέρονται 9 μεταφορείς (δύο βιολογικοί και 7 μη βιολογικοί) σπερματοζωαρίων για κρυοκατάψυξη. Τα ποσοστά ανάνηψης μικρού αριθμού κατεψυγμένων σπερματοζωαρίων μετά την απόψυξη κυμαίνονταν από 59-100%. Τα ποσοστά γονιμοποίησης των ωαρίων μετά από ICSI κυμαίνονται από 18-67%. Τα σπερματοζωάρια μετά την ανάνηψη χρησιμοποιήθηκαν για ICSI σε 5 μελέτες και προέκυψαν λίγες γεννήσεις. Το συμπέρασμα των συγγραφέων είναι, ότι χρειάζεται μια ελεγχόμενη πολυκεντρική μελέτη με ικανοποιητικό διάστημα παρακολούθησης, ώστε να τεκμηριωθεί το όφελος από την κρυοκατάψυξη μεμονωμένων σπερματοζωαρίων ή μικροποσοτήτων σπέρματος [15].

Σε παρόμοια συμπεράσματα σχετικά με τη συνολική γονιμοποιητική ικανότητα του κατεψυγμένου σπέρματος καταλήγει και η δημοσίευση των Marcus-Braun et al., όπου μελετήθηκε η επίδραση της κρυοκατάψυξης στην ποιότητα του σπέρματος και την γονιμοποιητική ικανότητα 178 δειγμάτων κατεψυγμένου σπέρματος από 44 δότες, που χρησιμοποιήθηκαν για εξωσωματική γονιμοποίηση 624 ωαρίων από 62 γυναίκες και συγκρίθηκαν με τα δεδομένα 175 δειγμάτων φρέσκου σπέρματος από 76 ζευγάρια, που υποβλήθηκαν και αυτά σε εξωσωματική γονιμοποίηση. Παρόλο, που παρατηρήθηκε επιδείνωση και στις τρεις παραμέτρους, που καθορίζουν την ποιότητα του σπέρματος, η γονιμοποιητική ικανότητα του κρυοκατεψυγμένου σπέρματος ήταν ίδια με του φρέσκου. Στην ίδια μελέτη αναφέρεται, ότι η ποιότητα της κίνησης των σπερματοζωαρίων έπαιξε το σημαντικότερο ρόλο για τη γονιμοποιητική τους ικανότητα σε σχέση με τη συγκέντρωση και το ποσοστό της κινητικότητας τους, τόσο στην ομάδα του κρυοκατεψυγμένου σπέρματος, όσο και στην ομάδα ελέγχου. Θετικό γεγονός για το τελικό αποτέλεσμα αποτελεί το, ότι η ποιότητα της κίνησης επηρεάζεται λιγότερο με τη διαδικασία της κρυοκατάψυξης από τις άλλες παραμέτρους του σπέρματος. Μάλιστα η παράμετρος αυτή είναι η μόνη, που βελτιώνεται με την κατεργασία του αποψυγμένου σπέρματος σε στήλη Percoll. Έτσι εξηγείται το εύρημα της μελέτης, ότι η ποιότητα της κίνησης του αποψυγμένου και κατεργασμένου σπέρματος ήταν καλύτερη από, ότι στην ομάδα ελέγχου [16].

Η σημασία της καλής κινητικότητας του αποψυγμένου σπέρματος για την γονιμοποιητική του ικανότητα, είναι γνωστή από παλιά. Οι Shibahara et al. παρατήρησαν μείωση στο μισό της γονιμοποιητικής ικανότητας των ακίνητων σε σχέση με τα κινούμενα αποψυγμένα σπερματοζωάρια, που ελήφθησαν από την επιδιδυμίδα ανδρών με αποφρακτική αζωοσπερμία και στη συνέχεια ακολούθησε ICSI [17]. Εξάλλου η ίδια παρατήρηση υπήρχε και για μη κατεψυγμένα σπερματοζωάρια, που ελήφθησαν είτε από ορχική βιοψία, είτε και από εκσπερμάτιση [18, 19]. Και στη δημοσίευση των Park et al σε 160 ασθενείς με αποφρακτική αζωοσπερμία έγινε λήψη ορχικού ιστού με ανοικτή βιοψία (TESE) και ακολούθησε ενδοκυτταροπλασματική ένεση σπερματοζωαρίων (ICSI). Τα ποσοστά γονιμοποίησης και εγκυμοσύνης ήταν 77% και 44,3% αντίστοιχα με τη χρήση φρέσκων κινούμενων σπερματοζωαρίων σε σχέση με 29,3% και 20% αντίστοιχα με τη χρήση ακίνητων. Παρόμοια εικόνα υπήρχε και με τη σύγκριση των αποτελεσμάτων μεταξύ κινούμενων και ακίνητων σπερματοζωαρίων από κατεψυγμένα σπερματικά σωληνάρια. Συμπερασματικά λοιπόν οι συγγραφείς επισημαίνουν τη σημασία της καλής κινητικότητας των σπερματοζωαρίων, είτε πρόκειται για φρέσκο, είτε για κατεψυγμένο σπέρμα [20]. Οι Donnelly et al διαπίστωσαν ότι η κρυοκατάψυξη σπερματοζωαρίων μαζί με το σπερματικό πλάσμα βελτιώνει την κινητικότητα μετά την απόψυξη [21].

Σε επιλεγμένες περιπτώσεις, όπου δεν υπάρχουν καθόλου κινούμενα σπερματοζωάρια μετά την απόψυξη μπορεί να χρησιμοποιηθούν κάποιες ουσίες ενίσχυσης της κινητικότητας. Η πεντοξυφυλίνη, που είναι αναστολέας της φωσφοδιεστεράσης, χρησιμοποιήθηκε για να αυξήσει την κινητικότητα και την γονιμοποιητική ικανότητα κρυοκατεψυγμένων σπερματοζωαρίων επιδιδυμίδικης προέλευσης μετά την απόψυξη [22]. Ωστόσο, η μεταφορά πεντοξυφυλίνης μέσα στο ωάριο κατά την εκτέλεση της ICSI μπορεί να είναι τοξική για το ωάριο. Το υαλουρονικό οξύ που είναι ένα φυσικό συστατικό και του ανθρώπινου αναπαραγωγικού συστήματος μπορεί να χρησιμοποιηθεί εναλλακτικά για την ενίσχυση της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων, χωρίς τέτοιου είδους προβλήματα [23]. Η επαναφορά της κινητικότητας με τη χρήση αυτών των ουσιών είναι δείκτης σίγουρης βιωσιμότητας αυτών των σπερματοζωαρίων, μια που η ειδική χρώση για τον προσδιορισμό της βιωσιμότητας, δεν μπορεί να εφαρμοσθεί σε πολύ λίγα σπερματοζωάρια, που προορίζονται για ICSI.

Ένας σχετικά πρόσφατος δείκτης της γονιμοποιητικής ικανότητας των σπερματοζωαρίων, που όμως χρειάζεται ακόμη αρκετή διερεύνηση, όσον αφορά την προγνωστική του ικανότητα είναι το ποσοστό του κατακερματισμού του DNA των σπερματοζωαρίων (DFI). Τιμές μικρότερες του 15% συνοδεύονται από εξαιρετική δυνητική γονιμότητα, από 15 - 30% με καλή δυνητική γονιμότητα και άνω του 30% με χαμηλή δυνητική γονιμότητα [24]. Οι Gosalvez et al. έδειξαν, ότι το DFI αμέσως μετά και ύστερα από 6 ώρες από την απόψυξη κρυοκατεψυγμένων σπερματοζωαρίων, ήταν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερο σε σύγκριση με το DFI του φρέσκου σπέρματος. Μάλιστα με την πάροδο του χρόνου ο ρυθμός αύξησης του κατακερματισμού του DNA ήταν μεγαλύτερος για το αποψυγμένο σπέρμα [25]. Για το λόγο αυτό σε προηγούμενη μελέτη οι ίδιοι συγγραφείς είχαν συστήσει την πραγματοποίηση της υποβοηθούμενης

αναπαραγωγής, όσο το δυνατόν συντομότερα μετά την απόψυξη των σπερματοζωαρίων [26]. Παρόλα αυτά υπάρχουν αντικρουόμενες δημοσιεύσεις για το κατά πόσο ο DFI επηρεάζει τα αποτελέσματα της ICSI. Έτσι ορισμένοι ερευνητές υποστηρίζουν πως η αύξηση του DFI επηρεάζει αρνητικά τα αποτελέσματα της ICSI [27, 28], ενώ άλλοι διαφωνούν [29, 30]. Οι Robinson et al. δημοσίευσαν πρόσφατα μια μετα-ανάλυση 16 μελετών για τη συσχέτιση του DFI και των αποτελεσμάτων της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Έτσι όσον αφορά την εξωσωματική γονιμοποίηση (IVF) και την ICSI και παρά τα προβλήματα σύγκρισης του DFI ανάλογα με τη μέθοδο προσδιορισμού του φαίνεται, ότι οι περισσότερες μελέτες, που διερευνούν τη συσχέτιση υψηλού ποσοστού βλάβης του DNA και ποσοτών σύλληψης δείχνουν αποτελέσματα με μια μέτρια αρνητική συσχέτιση με την παραδοσιακή IVF και λίγη ή καθόλου αρνητική συσχέτιση με την ICSI. Ωστόσο, τα ποσοστά αποβολών φαίνεται, ότι συσχετίζονται άμεσα το βαθμό βλάβης του DNA. Οι συγγραφείς αναφέρουν, ότι ο σχετικός κίνδυνος αποβολής αυτών με σημαντικό βαθμό βλάβης του DNA είναι 2,16 [risk ratio 2,16 (1,54 - 3,03), $p < 0,00001$] σε σχέση με αυτούς με χαμηλό ποσοστό βλάβης. Μια ανάλυση των υποομάδων έδειξε, ότι η συσχέτιση των αποβολών είναι ισχυρότερη με την εφαρμογή της τεχνικής TUNEL [risk ratio 3,94 (2,45 - 6,32), $p < 0,00001$] [31].

Οι Zribi et al. διαπίστωσαν ότι η αύξηση του DFI και της οξειδωσης του DNA με τη εφαρμογή της διαδικασίας κρυοκατάψυξης και απόψυξης περιορίστηκε με την εφαρμογή της αντιοξειδωτικής ουσίας quercetin μέσα στο μέσο απόψυξης. Συγκεκριμένα η προσθήκη της quercetin είχε ως αποτέλεσμα τη σημαντική βελτίωση της κινητικότητας και της βιωσιμότητας των σπερματοζωαρίων, καθώς και της ακεραιότητας του DNA [32]. Παρόμοια συμπεράσματα προέκυψαν από τη χρήση ενός άλλου αντιοξειδωτικού της καταλάσης στη δημοσίευση των Moubasher et al [33].

Σχετικά πρόσφατα βρέθηκε, ότι ορισμένα κανάλια ιόντων της κυτταρικής μεμβράνης των σπερματοζωαρίων είναι υπεύθυνα για κάποιες κομβικές για τη γονιμοποίηση λειτουργίες τους, όπως η χημειοταξία, η υπερενεργοποιημένη κινητικότητα και η ακροσωμιακή αντίδραση. Έτσι τα CatSper and KSper κανάλια ιόντων ασβεστίου, που υπάρχουν στη μεμβράνη της ουράς των σπερματοζωαρίων επιβεβαιώθηκε, ότι αποτελούν πρωταρχικά κανάλια ιόντων τους. Μεταλλάξεις και διαγραφές των γονιδίων, που ρυθμίζουν τα κανάλια αυτά επηρεάζουν την γονιμοποιητική ικανότητα των σπερματοζωαρίων χωρίς να επηρεάζουν καμία άλλη φυσιολογική λειτουργία τους. Αυτό τα καθιστά ιδανικούς στόχους για κάποια φάρμακα, είτε για την πρόκληση αντισύλληψης, είτε για τη βελτίωση της γονιμοποιητικής ικανότητας των αποψυγμένων σπερματοζωαρίων [34].

Συμπερασματικά, η χρήση του κρυοκατεψυγμένου σπέρματος για την εκτέλεση υποβοηθούμενης αναπαραγωγής συνοδεύεται από σημαντικά πλεονεκτήματα ως προς τον προγραμματισμό της διαδικασίας, την αποφυγή της δυσάρεστης έκπληξης της μη ανεύρεσης σπερματοζωαρίων από το δότη σε περίπτωση ταυτόχρονης προετοιμασίας της γυναίκας και την μη ανάγκη της υποβολής του δότη στη διαδικασία συλλογής σπερματοζωαρίων ανά κύκλο. Παρόλο, που η διαδικασία της κατάψυξης-απόψυξης μειώνει τα ποσοστά κινητικότητας των σπερματοζωαρίων, δε φαίνεται να επηρεάζει την ποιότητα της κίνησης. Έτσι, όταν επιλέγονται

κινούμενα σπερματοζωάρια μετά την απόψυξη τα αποτελέσματα της ICSI είναι παρόμοια με του φρέσκου σπέρματος, όσον αφορά την ικανότητα γονιμοποίησης και σύλληψης, παρά το υψηλότερο DFI των αποψυγμένων, αν και το αυξημένο DFI σχετίζεται με συχνότερες αποβολές. Αναμένεται η τεκμηρίωση της επιβοηθητικής χρήσης αντιοξειδωτικών ουσιών στο υλικό της κρυοκατάψυξης. Πρόβλημα είναι η μη ανεύρεση κινούμενων μετά την απόψυξη μικροποσοτήτων ή μεμονωμένων σπερματοζωαρίων, όπως συμβαίνει σε ασθενείς με σοβαρή υποσπερματογένεση, οπότε η χρήση κάποιων ουσιών μπορεί να επαναφέρει την κινητικότητα τους αποδεικνύοντας έτσι και τη βιωσιμότητά τους. Η πρόσφατη ανίχνευση των μοριακών δομών των σπερματοζωαρίων, που ρυθμίζουν κομβικές διαδικασίες για τη γονιμοποίηση θα προσφέρουν σημαντικές δυνατότητες φαρμακευτικών παρεμβάσεων, ώστε να την ενισχύουν, όταν αυτό είναι επιθυμητό, ή να την αναστέλλουν ως αντισυλληπτική μέθοδος.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **Anger JT, Gilbert BR, Goldstein M.** Cryopreservation of sperm: indications, methods and results. *J. Urol* 2003; 170:1079-84.
2. **Bunge RG, Sherman JK.** Fertilizing capacity of frozen human spermatozoa. *Nature* 1953; 172:767.
3. **Donnelly ET, McClure N, Lewis SE.** Cryopreservation of human semen and prepared sperm: effects on motility parameters and DNA integrity. *Fertil Steril* 2001; 76:892-900.
4. **Polge C, Smith AU, Parker AS.** Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperature. *Nature* 1949; 164:666-7.
5. **Ragni G, Lombroso Finzi GC, Caccamo A, Dalla Serra A, Crosignani PG.** Enhanced sperm quality with TEST-yolk buffer: preliminary results in intraperitoneal insemination for male infertility. In: *Proceedings of the Abstracts of the 7th Annual Meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology*. Paris; Hum Reprod 1991; 6:421.
6. **Royere D, Barthelemy C, Hamamah S, Lansac J.** Cryopreservation of spermatozoa: a 1996 review. *Hum Reprod Update* 1996; 2:553-9.
7. **Smith KD, Rodriguez-Rigau LJ, Steinberger E.** The influence of ovulatory dysfunction and timing of insemination on the success of artificial insemination donor (AID) with fresh or cryopreserved semen. *Fertil Steril* 1981; 36:496-502.
8. **Subak LL, Adamson GD, Boltz NL.** Therapeutic donor insemination: a prospective randomized trial of fresh versus frozen sperm. *Am J Obstet Gynecol* 1992; 70:313-6.
9. **Ashkenazi J, Dicker D, Feldberg D, Goldman JA.** Fresh versus frozen thawed semen for initial and late insemination in IVF-ET cycles. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1991; 42:115-7.
10. **Lansac J, Thepot F, Mayaux MJ, Czyglick F, Wack T, Selva J, et al.** Pregnancy outcome after artificial insemination or IVF-ET with frozen semen donor: a collaborative study of the French CECOS Federation on 21597 pregnancies. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1997; 74:223-8.
11. **Hutchon S, Thornton S, Hall J, Bishop M.** Frozen-thawed epididymal sperm is effective for intracytoplasmic sperm injection: Implications for the Urologist. *Br J Urol* 1998; 81:607-11.
12. **Cayan S, Lee D, Givens AC, Ryan I, Schriock E, Turek P.** A comparison of ICSI outcomes with fresh cryopreserved epididymal spermatozoa from the same couples *Hum Rep* 2001 ;16:495-9.
13. **Hauser R, Yogev L, Amit A, Yavetz H, Botchan A, Azem F et al.** Severe Hypospermatogenesis in Cases of Nonobstructive Azoospermia: Should We Use Fresh or Frozen Testicular Spermatozoa? *J Androl* 2005;26:772-8.
14. **Ben Yosef D, Yogev L, Hauser R, Yavetz H, Azem F, Yovel I, Lessing JB, Amit A.** Testicular sperm retrieval and cryopreservation prior to initiating ovarian stimulation as the first line approach in patients with non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 1999; 14:1794-1801.
15. **Abdel Hafez F, Bedaiwy M, El-Nashar SA, Sabanegh E, Desai N.** Techniques for cryopreservation of individual or small numbers of human spermatozoa: a systematic review. *Hum Rep Update* 2009; 15:153-64.
16. **Marcus-Braun N, Braun G, Potashnik G, Harvardi I.** Effect of cryopreservation on quality and fertilization capacity of human sperm *Eur J Obst Gyn Rep Biol* 2004; 116:63-6.
17. **Shibahara H, Hamada Y, Hasegawa A, Toji H, Shigeta M, Yoshimoto T et al.** Correlation between the motility of frozen-thawed epididymal spermatozoa and the outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Int J Androl* 1999; 22:324-8.
18. **Nagy ZP, Joris H, Verheyen G, Tournaye H, Devroey P, Van Steirteghem AC.** Correlation between motility of testicular spermatozoa, testicular histology and the outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1998; 13:890-5.
19. **Nagy ZP, Liu J, Joris H, Verheyen G, Tournaye H, Camus M, Derde M-P, Devroey P, Van Steirteghem AC.** The result of intracytoplasmic sperm injection is not related to any of the three basic sperm parameters. *Hum Rep* 1995 10:1123-9.
20. **Park YS, Lee SH, Song SJ, Jun JH, Koong MK, Seo JT.** Influence of motility on the outcome of in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection with fresh vs. frozen testicular sperm from men with obstructive azoospermia *Fertil Steril* 2003; 80:526-30.
21. **Donnelly ET, McClure N, Lewis SE.** Cryopreservation of human semen and prepared sperm: effects on motility parameters and DNA integrity. *Fertil Steril* 2001; 76:892-900.
22. **Buch JP, Philips KA, Kolon TF.** Cryopreservation of microsurgically extracted ductal sperm: pentoxifylline enhancement of motility. *Fertil Steril* 1994; 62:418-20.
23. **Sbracia M, Grasso J, Sayme N, Stronk J, Huszar G.** Hyaluronic acid substantially increases the retention of motility in cryopreserved / thawed human spermatozoa. *Hum Rep* 1997; 12:1949-54.
24. **Brahem S et al.** Semen parameters and sperm DNA fragmentation as causes of recurrent pregnancy loss. *Urology* 2011; 78:792-6.
25. **Gosalvez J, Nunez R, Fernandez J.L, Lopez-Fernandez C, Caballero P.** Dynamics of sperm DNA damage in fresh versus frozen-thawed and gradient processed ejaculates in human donors. *Andrologia* 2011; 43:373-7.

26. **Gosalvez J, Cortes-Gutierrez E, Lopez-Fernandez C, Fernandez JL, Nunez R, Caballero P.** Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation dynamics in fertile donors. *Fertil Steril* 2009; 92:170-3.
27. **Jiang H, He RB, Wang CL, Zhu J.** The relationship of sperm DNA fragmentation index with the outcomes of in-vitro fertilisation-embryo transfer and intracytoplasmic sperm injection. *J Obstet Gynaecol* 2011; 31:636-9.
28. **Simon L, Castillo J, Oliva R, Lewis SE.** Relationships between human sperm protamines, DNA damage and assisted reproduction outcomes. *Reprod Biomed Online* 2011; 23:724-34.
29. **Esbert M, Pacheco A, Vidal F, Florensa M, Riqueros M, Ballesteros A et al.** Impact of sperm DNA fragmentation on the outcome of IVF with own or donated oocytes. *Reprod Biomed Online* 2011; 23:704-10.
30. **Sharbatoghli M, Valojerdi MR, Amanlou M, Khosravi F, Jafar-Abadi MA.** Relationship of sperm DNA fragmentation, apoptosis and dysfunction of mitochondrial membrane potential with semen parameters and ART outcome after intracytoplasmic sperm injection. *Arch Gynecol Obstet* 2012 [Epub ahead of print].
31. **Robinson L, Gallos ID, Conner SJ, Rajkhowa M, Miller D, Lewis S et al.** The effect of sperm DNA fragmentation on miscarriage rates: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod* 2012;27:2908-17.
32. **Zribi N, Chakroun NF, Ben Abdallah F, Elleuch H, Sellami, Gargouri J et al.** Effect of freezing - thawing process and quercetin on human sperm survival and DNA integrity. *Cryobiology* 2012 [Epub ahead of print].
33. **Moubasher AE, El Din AM, Ali ME, El-Sherif WT, Gaber HD.** Catalase improves motility, vitality and DNA integrity of cryopreserved human spermatozoa. *Andrologia* 2012 [Epub ahead of print].
34. **Lishko PV, Kirichok Y, Ren D, Navarro B, Chung JJ, Clapham DE.** The control of male fertility by spermatozoan ion channels. *Annu Rev Physiol* 2012; 74:453-75.

Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗΣ ΤΟΥ ΟΡΧΙΚΟΥ ΙΣΤΟΥ ΣΤΗΝ ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ

Σ. Ανδρεαδάκης, Χ. Κωνσταντινίδης

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η κρυοσυντήρηση για την αποκατάσταση της γονιμότητας υπογονίμων ανδρών και γυναικών, έχει αποτελέσει ένα συνεχώς εξελισσόμενο πεδίο στην επιστήμη της ιατρικής της αναπαραγωγής από το 1949, οπότε και γεννήθηκε το πρώτο ζώο (το οποίο - για την ιστορία - ήταν κοτόπουλο) με τη χρήση κατεψυγμένου σπέρματος [1]. Το 1953 ανακαλύφθηκε η μέθοδος της *in vitro* γονιμοποίησης [2], η οποία οδήγησε τελικά στην επίτευξη της πρώτης γέννησης ζωντανού παιδιού το 1978.

Το 1993 επιτυγχάνεται σαν συνέχεια των προηγούμενων εξελίξεων η γονιμοποίηση ωαρίου με τη μέθοδο της ICSI, χρησιμοποιώντας σπερματοζωάρια ορχικής προέλευσης [3, 4]. Το γεγονός αυτό επέφερε πραγματική επανάσταση στο χώρο της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, καθώς κατέστη δυνατόν, άνδρες οι οποίοι έπασχαν από παραγωγικού τύπου αζωοσπερμία και οι οποίοι ως τότε θεωρούνταν μη αναστρέψιμα στείροι, να γίνουν βιολογικοί πατέρες, αρκεί να βρίσκονταν λίγα μόλις σπερματοζωάρια από τους όρχεις τους. Όπως γίνεται εύκολα κατανοητό, η δυνατότητα αυτή έδωσε και μεγάλη αξία στη διαδικασία της κρυοσυντήρησης του ορχικού ιστού. Τη σημασία αυτή ακριβώς θα προσπαθήσουμε να αναδείξουμε σε αυτό το κεφάλαιο, περιγράφοντας τις ενδείξεις και εφαρμογές κατάψυξης του ορχικού ιστού που εφαρμόζονται στη σημερινή κλινική πράξη, αλλά αναφέροντας και τις πιθανές μελλοντικές προοπτικές εφαρμογής που βρίσκονται προς το παρόν σε ερευνητικό στάδιο.

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗΣ ΟΡΧΙΚΟΥ ΙΣΤΟΥ

Με τα σημερινά δεδομένα, η κρυοσυντήρηση ορχικού ιστού αφορά ιστό που περιέχει ώριμα σπερματοζωάρια, τα οποία μπορούν να εξαχθούν μετά την απόψυξη και να χρησιμοποιηθούν για ICSI.

ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΙΣΤΟΥ ΣΕ ΑΖΩΟΣΠΕΡΜΙΚΟΥΣ ΑΝΔΡΕΣ ΠΟΥ ΣΥΜΜΕΤΕΧΟΥΝ ΣΕ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ICSI

Η βιοψία όρχεος για εξασφάλιση σπερματοζωαρίων που θα χρησιμοποιηθούν για μικρογονιμοποίηση, είναι πλέον μια πολύ διαδεδομένη και συνήθης διαδικασία κατά την υποβοηθούμενη αναπαραγωγή. Μπορεί να πραγματοποιηθεί σε άνδρες τόσο με αποφρακτική, όσο και με μη αποφρακτική αζωοσπερμία.

Σε άνδρες με αποφρακτικής αιτιολογίας αζωοσπερμία, εφ' όσον έχει αποτύχει η προσπάθεια αποκατάστασης της βατότητας της γεννητικής οδού ή αυτή δεν είναι εφικτή, η μόνη πηγή σπέρματος είναι ο όρχις. Η πιθανότητα ανάκτησης σπέρματος από τους όρχεις αυτών των ανδρών είναι μπορούμε να πούμε βέβαιη, ακόμα και με αναρρόφηση με βελόνη. Ωστόσο η τελευταία μέθοδος είναι τυφλή και μπορεί σε αρκετές περιπτώσεις να προκαλέσει σημαντικά αιματώματα στο παρέγχυμα του όρχι, ή να μην αποδώσει τόσο καλό υλικό, σε αντίθεση με την ανοικτή βιοψία που θα αποδώσει μεγάλο αριθμό σπερματοζωαρίων που θα μπορέσουν να καταψυχθούν και να χρησιμοποιηθούν και σε

μελλοντικούς κύκλους ICSI χωρίς να χρειαστεί επαναληπτική λήψη σπέρματος. Παρ' όλο που κατά τη διαδικασία της κρυοσυντήρησης και της απόψυξης τα σπερματοζωάρια χάνουν ένα ποσοστό της ζωτικότητάς τους, ωστόσο τα αποτελέσματα μετά από ICSI είναι παρόμοια, τόσο με τη χρήση φρέσκων όσο και κατεψυγμένων σπερματοζωαρίων [5]. Έτσι λοιπόν η κρυοσυντήρηση ορχικού ιστού σε άνδρες με αποφρακτική αζωοσπερμία είναι μια ευρέως αποδεκτή και διαδεδομένη τεχνική.

Σε άνδρες με μη αποφρακτική (παραγωγική) αζωοσπερμία, η ανοικτή ορχική βιοψία για την ανεύρεση ώριμων σπερματοζωαρίων για τη χρήση τους σε ICSI αποτελεί μονόδρομο, ενώ είναι και η μοναδική ευκαιρία τους να αποκτήσουν βιολογικά τέκνα. Οι άνδρες αυτοί έχουν μόνο εσιακή σπερματογένεση και μάλιστα σε ποσοστό που είναι ουσιαστικά άγνωστο. Τα ποσοστά ανεύρεσης σπέρματος βελτιώθηκαν σημαντικά με την εφαρμογή της μικροχειρουργικής βιοψίας (micro TESE) που ανέρχονται στο 60 - 70%, αλλά και σε 50% περίπου των ανδρών στους οποίους ήταν αδύνατη η ανεύρεση σπέρματος με κλασική βιοψία όρχεος [6], καθιστώντας τη micro TESE ως την gold standard τεχνική στους άνδρες αυτούς. Επειδή ο αριθμός των σπερματοζωαρίων είναι συνήθως μικρός, η φύλαξη και κρυοσυντήρησή τους δεν μπορεί να γίνει σε φιαλίδια ή σωληνάρια όπως με τα σπερματοζωάρια που προέρχονται από εκσπερμάτιση, γιατί πολλές φορές δεν ανευρίσκονται σπερματοζωάρια μετά την απόψυξη, αλλά θα πρέπει να φυλαχθούν με τον ιστό που τα περιέχει και να εξαχθούν απ' αυτόν αφού αποψυχθεί [7]. Και σε αυτές τις περιπτώσεις τα αποτελέσματα με φρέσκα ή κρυοσυντηρημένα σπερματοζωάρια είναι συγκρίσιμα ως προς την έκβαση της ICSI [8], αν και τα ποσοστά επιτυχών κύκλων ICSI είναι χαμηλότερα σε σχέση με τα ποσοστά με σπερματοζωάρια από εκσπερμάτιση ή άνδρες με αποφρακτικής αιτιολογίας αζωοσπερμία [9].

Η σημασία της κρυοσυντήρησης σε αυτά τα ζευγάρια έχει ιδιαίτερη σημασία, καθώς η ανεύρεση σπέρματος δεν είναι καθόλου βέβαιη, οπότε μπορεί να διαχωριστεί η διαδικασία λήψης σπέρματος από τη διαδικασία της μικρογονιμοποίησης, αποφεύγοντας έτσι μία ενδεχομένως μη απαραίτητη θεραπεία διέγερσης της συζύγου [7], ιδίως όταν δεν είναι αποδεκτή από το ζευγάρι η χρήση σπέρματος δότη. Εκτός αυτού όμως, μπορεί ενδεχομένως από μια λήψη να καλυφθούν αρκετές προσπάθειες ICSI που μπορεί να απαιτηθούν για την επίτευξη κύησης, κάτι σύνθετο αν σκεφτούμε τα χαμηλά ποσοστά επιτυχίας ανά κύκλο σε αυτές τις περιπτώσεις, αποφεύγοντας έτσι μια επαναληπτική TESE [7].

ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΟΡΧΙΚΟΥ ΙΣΤΟΥ ΩΣ ΜΕΤΡΟ ΠΡΟΛΗΨΗΣ ΠΡΙΝ ΑΠΟ ΚΑΘΕ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΠΟΥ ΜΠΟΡΕΙ ΝΑ ΟΔΗΓΗΣΕΙ ΣΕ ΣΤΕΙΡΩΣΗ ΤΟΥ ΑΡΡΕΝΟΣ ΑΣΘΕΝΟΥΣ

Τα ποσοστά επιβίωσης ή και ίασης νέων ανδρών που πάσχουν από διάφορα είδη καρκίνου, έχουν βελτιωθεί σε πολύ μεγάλο βαθμό τα τελευταία χρόνια, λόγω των βελτιωμένων διαγνωστικών τεχνικών, αλλά και των καλύτερων θεραπευτικών επιλογών που είναι σήμερα διαθέσιμες. Οι

περισσότεροι ωστόσο από αυτούς θα εκτεθούν σε γοναδοτοξικούς παράγοντες (ακτινο- ή χημειοθεραπεία), με αποτέλεσμα προσωρινή ή μόνιμη απώλεια της γονιμότητάς τους. Το γεγονός ότι πολλοί από αυτούς τους άνδρες δεν έχουν ολοκληρώσει ή δεν έχουν καν αρχίσει τη δημιουργία οικογένειας, σε συνδυασμό με τη διαθεσιμότητα μεθόδων τεχνητής γονιμοποίησης (ICSI), καθιστά καθήκον των θεραπόντων ιατρών τη διαφύλαξη της γονιμότητας των ασθενών αυτών πριν από την εισαγωγή της γοναδοτοξικής θεραπείας.

Κρυοσυντήρηση ορχικού ιστού σε ενήλικες ογκολογικούς ασθενείς

Η κατάψυξη σπέρματος από εκσπερμάτιση είναι μια απλή και συνήθως διαδικασία για τη διαφύλαξη της γονιμότητας της μεγάλης πλειοψηφίας αυτών των ασθενών, με τη δυνατότητα μακροχρόνιας συντήρησης του σπέρματος να είναι καλά εμπεριστατωμένη. Αρκετοί ωστόσο νέοι άνδρες ανευρίσκονται αζωοσπερμικοί ή με παρουσία ανώριμων μόνο σπερματοζωαρίων στο εκσπερμάτισμα κατά το χρόνο της διάγνωσης κάποιας νεοπλασίας που θα απαιτήσει πρόσθετη δυνητικά στείρο γονόθεραπεία, σε ποσοστό που φτάνει το 17% [10]. Στους ασθενείς αυτούς, αν πρόκειται να υποβληθούν σε κάποια χειρουργική επέμβαση, είτε για την αφαίρεση του όγκου είτε για την τοποθέτηση κάποιου συσκευής έγχυσης για τη χημειοθεραπεία, θα πρέπει να τους προτείνεται να πραγματοποιηθεί στον ίδιο χρόνο χειρουργική διερεύνηση των όρχεων για ανεύρεση σπέρματος. Στους ασθενείς με καρκίνο όρχεων, θα πρέπει να διερευνάται το υγιές παρέγχυμα του αφαιρεθέντος όρχι για ώριμα σπερματοζωάρια [11], ή/και να πραγματοποιείται διερεύνηση και βιοψία και του υγιούς όρχεος (ανάλογα με τις ενδείξεις) καθώς ελλοχεύει πάντα και ο κίνδυνος παρουσίας καρκινώματος in situ. Στο 50% περίπου των ασθενών που πάσχουν από ορχικό καρκίνο και είναι αζωοσπερμικοί κατά τη διάγνωση της νόσου θα βρεθούν ώριμα σπερματοζωάρια στη βιοψία, ποσοστό που είναι ίδιο και για την αντίστοιχη ομάδα ασθενών που πάσχουν από λέμφωμα [11]. Αυτό καθιστά την κρυοσυντήρηση του ορχικού ιστού σε αυτούς τους άνδρες μια πολύ σημαντική στρατηγική για τη διαφύλαξη της μελλοντικής τους δυνατότητας να αποκτήσουν βιολογικά δικά τους παιδιά.

Κρυοσυντήρηση ορχικού ιστού σε έφηβους ογκολογικούς ασθενείς

Στους περισσότερους έφηβους η σπερματογένεση είναι ενεργή και το σπέρμα μπορεί συνήθως εύκολα να δοθεί με φυσιολογική εκσπερμάτιση. Σε κάποιες περιπτώσεις όμως, δεν είναι δυνατή η λήψη με αυνανισμό, λόγω του ότι ο έφηβος δεν είναι εξοικειωμένος με τη διαδικασία και δεν μπορεί να γίνει λήψη ούτε με δονητικό ερεθισμό (vibrostimulation), αλλά ούτε και με διορθική ηλεκτρική διέγερση (electroejaculation). Σε αυτές τις περιπτώσεις εφήβων ογκολογικών ασθενών, η χειρουργική ανάκτηση σπέρματος και η κρυοσυντήρηση ορχικού ιστού μπορεί να είναι μια αποδεκτή θεραπευτική επιλογή για τη διαφύλαξη της μελλοντικής τους γονιμότητας. Μετά τη λήψη του ορχικού ιστού, πριν την κατάψυξη, θα πρέπει να γίνεται έλεγχος για την παρουσία ώριμων σπερματοζωαρίων, ούτως ώστε το πρωτοκόλλο κατάψυξης να διαφοροποιείται και να εξειδικεύεται ανάλογα με την περίπτωση. Έτσι, αν ανευρεθούν σπερματοζωάρια ο ιστός θα πρέπει να ψυχθεί εστιάζοντας στη μέγιστη επιβίωση των σπερματοζωαρίων, ενώ αν η σπερματογένεση δεν είναι ακόμη ενεργή, τότε η διαδικασία της ψύξης θα πρέπει να τροποποιηθεί κατάλληλα για τη διαφύλαξη

της ζωτικότητας και της λειτουργικότητας των πρόδρομων σπερματοκυττάρων μέσα στον ορχικό ιστό, καθώς υπάρχουν πλέον πολλά στοιχεία από την έρευνα στο πεδίο αυτό όπως θα δούμε στην επόμενη παράγραφο, που υποστηρίζουν τη μελλοντική χρήση αυτών των κυττάρων για την αποκατάσταση της γονιμότητας [12].

ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗΣ ΟΡΧΙΚΟΥ ΙΣΤΟΥ

Η συνεχής έρευνα στον τομέα της Ιατρικής της Αναπαραγωγής, οδήγησε τα τελευταία χρόνια σε νέες τεχνικές κρυοσυντήρησης ανθρώπινων ιστών και κυττάρων γοναδικής προέλευσης, που βελτιώνουν θεαματικά τη βλάβη των τελευταίων από την κατάψυξη, αλλά και τη ζωτικότητά τους μετά την απόψυξη. Η πρόοδος που έχει σημειωθεί στη συντήρηση ορχικού ιστού είναι ιδιαίτερα σημαντική για τη διαφύλαξη της γονιμότητας αρρένων παιδιών και εφήβων που πάσχουν από δυνητικά ιάσιμες κακοήθειες νεοπλασίες, των οποίων όμως οι όρχεις βρίσκονται σε στάδιο προ της έναρξης της σπερματογένεσης. Υπολογίζεται ότι στην κατηγορία αυτή εμπίπτουν 1 στους 3 ογκολογικούς ασθενείς παιδικής ή πρώιμης εφηβικής ηλικίας [13]. Έτσι η έρευνα στο πεδίο αυτό έχει πάρει μια στροφή προς τη συντήρηση των πρόδρομων γεννητικών κυττάρων, καθώς από τη μελέτη του μηχανισμού της σπερματογένεσης υπάρχουν σοβαρές ενδείξεις για τη δυνατότητα των κυττάρων αυτών να εκκινήσουν ή να επανεκκινήσουν τη σπερματογένεση. Οι Brinster και Zimmermann ανακάλυψαν μια μέθοδο με την οποία η έγχυση αρσενικών πρόγονων γεννητικών κυττάρων στα σπερματικά σωληνάρια αζωοσπερμικών ποντικών, μπορούσε να οδηγήσει σε επανέναξη της σπερματογένεσης σε 1/3 των ληπτών [14]. Εκτοτε έχει γίνει σημαντική πρόοδος, αλλά παραμένουν και σημαντικά αναπάντητα ερωτηματικά. Φαίνεται ότι η επικοινωνία μεταξύ των γεννητικών κυττάρων και των κυττάρων Sertoli που τα περιβάλλουν είναι πρωταρχικής σημασίας για τη σωστή λειτουργία τους και την δημιουργία σπερματοζωαρίων [15], ενώ το εξωκυττάριο περιβάλλον είναι πολύ σημαντικό για την επιβίωση των σπερματογονίων σε μακροχρόνια συντήρηση, με τα ποσοστά επιβίωσης σπερματογονίων από κατεψυγμένο – αποψυγμένο με συμβατικές μεθόδους ορχικό ιστό να είναι αρκετά χαμηλά (< 37%) [16]. Ο λόγος των χαμηλών ποσοστών φαίνεται να σχετίζεται με τη ρήξη των συνδέσεων μεταξύ των κυττάρων και κυττάρων – στρώματος στο διάμεσο ιστό και στα σπερματικά σωληνάρια, αλλά και με την αποκόλληση των σπερματογονίων από την βασική μεμβράνη μετά την απόψυξη [17]. Μέχρι τώρα έχουν γεννηθεί ζώντα ποντίκια μετά από μεταμόσχευση φρέσκων αλλά όχι κατεψυγμένων ορχικών γεννητικών κυττάρων και ορχικού ιστού. Επίσης ως τώρα δεν έχει επιτευχθεί λειτουργικότητα σε κρυοσυντηρημένο και μεταμοσχευθέντα όρχι. Μελέτες ωστόσο με ετερότοπα μοσχεύματα με σκοπό την ωρίμανση γεννητικών κυττάρων δείχνουν ότι υπάρχει δυνατότητα να οδηγήσουν σε σπερματογένεση σε ευνοησιμένα πειραματόζωα, ακόμα και από ξενομοσχεύματα από άλλα είδη [18,19]. Αυτή η δυνατότητα έχει καταδειχθεί και με τη χρήση προεμφετικού ιστού που παρήγαγε αρκετά σπερματοζωάρια ικανά για ICSI, μετά από υποδόρια εμφύτευση [20]. Οι τελευταίες αναφερόμενες μελέτες έχουν γίνει βάσει του κλασσικού μοντέλου φρέσκου – κατεψυγμένου ιστού, οπότε φαίνεται ότι υπάρχει ανάγκη για μελέτες σχετικά με νεότερες μεθόδους κρυοσυντήρησης, όπως είναι η «υαλοποίηση» (vitrification) - η μέθοδος δηλαδή κατά την οποία το νερό που περιέχεται στον ιστό στερεοποιείται με την

προσθήκη ειδικών ουσιών χωρίς να δημιουργεί πάγο- για να εξεταστεί κατά πόσον μπορούν να διατηρήσει καλύτερα την αρχιτεκτονική δομή του ορχικού ιστού κατά την κρυοσυντήρηση, κάτι που θα μπορούσε να ενισχύσει τη λειτουργική δυνατότητα των μοσχευμάτων σε εναλλακτικές θέσεις εμφύτευσης [21]. Η συντήρηση με τη μέθοδο της υαλοποίησης φαίνεται ότι ίσως είναι η λύση στην κρυοσυντήρηση κυτταρικών συστημάτων σε άρτια κατάσταση για καλύτερη ζωτικότητα και λειτουργικότητα. Ο ορχικός ιστός συνήθως καταψύχεται σε μικρά τεμάχια και μετά αποψύχεται για την ανάκτηση των γεννητικών κυττάρων. Εδώ είναι που η υαλοποίηση ίσως έχει ένα πλεονέκτημα, διαφυλάσσοντας τη δομή των κυττάρων Sertoli και Leydig που περιβάλλουν τα σπερματογόνια [21]. Σε μια μελέτη η μέθοδος απέφερε σημαντικά μεγαλύτερο αριθμό άδίκτων αρχέγονων γεννητικών κυττάρων και με καλύτερη ζωτικότητα [22].

Αυτή ακριβώς η πιθανή δυνατότητα διατήρησης και μελλοντικής χρήσης του ορχικού ιστού για εκκίνηση της σπερματογένεσης σε προεφηβικούς ογκολογικούς ασθενείς, είναι που καθιστά αποδεκτή τη σύσταση για κρυοσυντήρηση ορχικού ιστού ακόμα και σε παιδιά, παρ' όλα τα ερωτηματικά για την ασφάλεια και αποτελεσματικότητα της διαδικασίας. Είναι σημαντικό να εξηγείται σαφώς στον ασθενή και στους γονείς του ότι η φύλαξη προεφηβικού ορχικού ιστού θεωρείται ακόμη μια πειραματική προληπτική μέθοδος χωρίς καμία απόδειξη για την ασφάλεια και αποτελεσματικότητά της και μπορεί να εφαρμόζεται μόνο μετά από έγγραφη συγκατάθεση των γονέων και του παιδιού (όταν είναι δυνατόν) και χωρίς οικονομικές απαιτήσεις [23].

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **Polge C, Smith AY, Parkes AS.** Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* 1949; 164:666.
2. **Bunge RG, Sherman JK.** Fertilizing capacity of frozen human spermatozoa. *Nature* 1953; 172:767-8.
3. **Schoysman R, Vanderzwalmen P, Nijs M, Segal L, Segal-Bertin G, Geerts L, van Roosendaal E, Schoysman D.** Pregnancy after fertilization with human testicular spermatozoa. *Lancet* 1993; 342:1237.
4. **Craft I, Bennett V, Nicholson N.** Fertilising ability of testicular spermatozoa. *Lancet* (Letter) 1993; 342:864.
5. **Verheyen G, Nagy Z, Joris H, De Croo I, Tournaye H, Van Steirteghem A.** Quality of frozen-thawed testicular sperm and its preclinical use for intracytoplasmic sperm injection into in vitro-matured germinal-vesicle stage oocytes. *Fertil Steril* 1997; 67:74-80.
6. **Ishikawa T.** Surgical recovery of sperm in non-obstructive azoospermia. *Asian J Androl* 2012; 14:109-115.
7. **EAU Guidelines on Male Infertility** 2012.
8. **Giorgetti C, Chinchole JM, Hans E, Charles O, Franquebalme JP, Glowaczower E, Salzmann J, Terriou P, Roulier R.** Crude cumulative delivery rate following ICSI using intentionally frozen-thawed testicular spermatozoa in 51 men with non-obstructive azoospermia. *Reprod Biomed Online* 2005; 11:319-24.
9. **Nicopoulos J, Gilling-Smith C, Almeida P, Norman-Taylor J, Grace I et al.** Use of surgical sperm retrieval in azoospermic men: a meta-analysis. *Fertil Steril* 2004; 82:691-700.
10. **Lass A, Akagbosu F, Abusheikha N, Hassouneh M, Blayney M, Avery S, Brinsden P.** A programme of semen cryopreservation for patients with malignant disease in a tertiary infertility centre: lessons from 8 years' experience. *Hum Reprod*. 1998;13:3256-61.
11. **Schrader M, Muller M, Sofikitis N, Straub B, Krause H, Miller K.** "Onco-tese": testicular sperm extraction in azoospermic cancer patients before chemotherapy-new guidelines? *Urology* 2003; 61:421-5.
12. **Crabbe E, Verheyen G, Tournaye H, Van Steirteghem A.** Freezing of testicular tissue as a minced suspension preserves sperm quality better than whole-biopsy freezing when glycerol is used as cryoprotectant. *Int J Androl* 1999; 22:43-8.
13. **Thomson AB, Campbell AJ, Irvine DC, Anderson RA, Kelnar CJ, Wallace WH.** Semen quality and spermatozoal DNA integrity in survivors of childhood cancer: a case-control study. *Lancet* 2002; 360:361-7.
14. **Brinster LR, Zimmermann JW.** Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Developmental Biology* 1994; 91:11298-302.
15. **Nordhoff V, Schlatt S.** The developing testis – physiology and pathophysiology. Karger publishers, series; Endocrine Development. Ed. Olle Soder, Basel, Karger: Present and future options for preservation of testis tissue and function; p. 136-54, 2003.
16. **Meistrich ML, Wilson G, Kangasniemi M, Huhtaniemi I.** Mechanism of protection of rat spermatogenesis by hormonal pretreatment: stimulation of spermatogonial differentiation after irradiation. *J Androl* 2000; 21:464-9.
17. **Keros V, Rosenlund B, Hultenby K, Aghajanova L, Levkov L, Hovatta O.** Optimizing cryopreservation of human testicular tissue: comparison of protocols with glycerol, propanediol and dimethylsulphoxide as cryoprotectants. *Hum Reprod* 2005; 6:1676-87.
18. **Orwig EK, Schlatt S.** Cryopreservation and Transplantation of Spermatogonia and Testicular Tissue for Preservation of Male Fertility. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2005; 34:51-6.
19. **Dobrinski I.** Germ cell transplantation and testis tissue xenografting in domestic animals. *Animal Reproduction Science* 2005; 1-4:137-145.
20. **Gosden RG.** Gonadal tissue cryopreservation and transplantation. *Reprod Biomed Online* 2002; 4(suppl 1):64-7.
21. **Song Y, Sharp R, Lu F, Hassan M.** The Future Potential of Cryopreservation for Assisted Reproduction. *Cryobiology* 2010; 60(3S):S60-5.
22. **Neri QV, Feliciano M, Tanaka N, Palermo L, Schlegel PN, Palermo GD.** Vitrification of testicular tissue is more gentle on germ cells. *Fertility and Sterility* 2004; 82(suppl2):S184.
23. **Bahadur G.** Ethics of testicular stem cell medicine. *Hum Reprod* 2004; 19: 2702-10.

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗΣ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΟΡΧΙΚΟΥ ΙΣΤΟΥ ΣΤΗΝ ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ

A.I. Μητσόλη, E.M. Κολυμπιανάκης, B.K. Ταρλατζής

Μονάδα Ανθρώπινης Αναπαραγωγής, Α' Μαιευτική και Γυναικολογική Κλινική,
Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η αντίδραση των σπερματοζωαρίων στην κρυοσυντήρηση υπήρξε αντικείμενο μελέτης από πολύ νωρίς. Στις μέρες μας, η κρυοσυντήρηση σπέρματος έχει πλέον καθιερωθεί και θεωρείται διαδικασία ρουτίνας στα πλαίσια της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, ενώ η κρυοσυντήρηση ορχικού ιστού μπορεί επίσης να οδηγήσει τα ζευγάρια σε επίτευξη εγκυμοσύνης. Η κρυοσυντήρηση σπέρματος έχει εφαρμογή τόσο για ιδιωτική χρήση, όσο και για δωρεά σπέρματος. Άνδρες που κρυοσυντηρούν σπέρμα για ιδιωτική τους χρήση μπορούν να φυλάξουν δείγματα είτε για άμεση είτε για μελλοντική χρήση. Η βραχυπρόθεσμη φύλαξη σπέρματος αφορά κυρίως σε άνδρες με ολιγοασθενοζωοσπερμία (ΟΤΑ). Σε αυτές τις περιπτώσεις κρυοσυντηρείται σπέρμα, η χρήση του οποίου μπορεί να γίνει σε περίπτωση μη ικανοποιητικού φρέσκου δείγματος την ημέρα της λήψης ωαρίων σε γυναίκες που υποβάλλονται σε εξωσωματική γονιμοποίηση. Η βραχυπρόθεσμη κρυοσυντήρηση σπέρματος εφαρμόζεται ακόμα και σε άνδρες που αντιμετωπίζουν δυσκολία κατά την συλλογή σπέρματος, λόγω προβλήματος υγείας ή λόγω άγχους. Τέλος, μπορεί να αποτελέσει λύση σε περίπτωση απουσίας του άνδρα την ημέρα της ωοληψίας ή της σπερματέγχυσης. Η μακροπρόθεσμη φύλαξη σπέρματος χρησιμοποιείται για την διατήρηση της ανδρικής γονιμότητας. Αυτό αφορά άνδρες που αντιμετωπίζουν προβλήματα υγείας τα οποία απαιτούν λήψη φαρμάκων, εφαρμογή χημειοθεραπειών ή ακτινοθεραπειών ή επέμβαση στους όρχεις, που μπορούν να οδηγήσουν σε μελλοντική πτώση της ποιότητας του σπέρματος ή σε αζωοσπερμία. Η κρυοσυντήρηση ορχικού ιστού χρησιμοποιείται σε περιπτώσεις αζωοσπερμίας (απουσία σπερματοζωαρίων στην εκσπερμάτιση), προς αποφυγή επαναλαμβανόμενων βιοψιών, οι οποίες είναι απαραίτητες για την ανάκτηση σπερματοζωαρίων.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Για περισσότερο από τρεις δεκαετίες οι μέθοδοι της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής διευκολύνουν την προσπάθεια των υπογόνιμων ζευγαριών για την επίτευξη εγκυμοσύνης. Ωστόσο, πολύ νωρίτερα από την ανάπτυξη τους είχε διερευνηθεί η ικανότητα του σπέρματος να επιβιώνει και να γονιμοποιεί ωάρια μετά από την κρυοσυντήρηση του. Η πρώτη εγκυμοσύνη μετά από τεχνητή γονιμοποίηση με χρήση κατεψυγμένου-αποψυγμένου σπέρματος σημειώθηκε το 1953 [1, 2].

Η κρυοσυντήρηση των σπερματοζωαρίων δεν επηρεάζει τη ζωτικότητα τους, η οποία θεωρητικά μπορεί να διατηρηθεί για απεριόριστο χρονικό διάστημα όταν αυτά φυλάσσονται σε υγρό άζωτο στους -196°C, καθώς και την δυνατότητα τους να χρησιμοποιηθούν στις διάφορες μεθόδους υποβοηθούμενης αναπαραγωγής όποτε αυτό κριθεί απαραίτητο. Τα πλεονεκτήματα της διαδικασίας αυτής είναι η διατήρηση σπέρματος φυσιολογικής ποιότητας που θα χρησιμοποιηθεί αργότερα, όταν

αναμένεται να χειροτερέψει η ποιότητα του ή ακόμα όταν δεν θα υπάρχουν καθόλου σπερματοζωάρια. Επίσης, μπορεί να φυλαχθεί δείγμα σπέρματος για μελλοντική χρήση, σε περιπτώσεις όπου δεν είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί φρέσκο.

Σε περιπτώσεις αζωοσπερμίας (απουσία σπερματοζωαρίων στο δείγμα της εκσπερμάτισης) η κρυοσυντήρηση αφορά τον ορχικό ιστό, παρά το γεγονός ότι η βιωσιμότητα και η κινητικότητα των ορχικών σπερματοζωαρίων μειώνονται σημαντικά όταν υποστούν κρυοσυντήρηση σε σύγκριση με φρέσκα σπερματοζωάρια ορχικής προέλευσης (ποσοστό βιωσιμότητας 22% έναντι 68% και ποσοστό κινητικότητας 6% έναντι 21% αντίστοιχα) [3]. Το ποσοστό γονιμοποίησης με τη χρήση κρυοσυντηρημένων ορχικών σπερματοζωαρίων δεν διαφέρει από αυτό με τη χρήση φρέσκων [4, 5].

ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ

Η κρυοσυντήρηση σπέρματος εφαρμόζεται τόσο σε ζευγάρια που υποβάλλονται σε υποβοηθούμενη αναπαραγωγή, όσο και στη δημιουργία τραπέζων σπέρματος. Τα δείγματα σπέρματος μπορούν να κρυοσυντηρηθούν με σκοπό την άμεση ή την αργότερη χρησιμοποίησή τους.

ΒΡΑΧΥΠΡΟΘΕΣΜΗ ΦΥΛΑΞΗ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ

Ο ανδρικός παράγοντας είναι μια συχνή αιτία υπογονιμότητας (~40%), ενώ η χρήση σπέρματος μειωμένης ποιότητας συνδέεται με τη μειωμένη αποτελεσματικότητα της κλασσικής εξωσωματικής γονιμοποίησης. Η εισαγωγή της μικρογονιμοποίησης ή αλλιώς ενδοκυτταροπλασματικής έγχυσης (ICSI) το 1992 έδωσε λύση στα ζευγάρια αυτά, επιτρέποντας την αποτελεσματική γονιμοποίηση των ωαρίων που λαμβάνονται κατά την ωοληψία. Κατά την ICSI εκτός από τη χρήση σπερματοζωαρίων προερχόμενων από εκσπερμάτιση, μπορούν να χρησιμοποιηθούν σπερματοζωάρια από την επιδιδυμίδα ή από τον όρχι.

Ο συνδυασμός της ICSI και της κρυοσυντήρησης σπέρματος ενδείκνυνται σε ζευγάρια όπου ο σύντροφος παρουσιάζει βαριά ολιγοασθενοτεροζωοσπερμία (ΟΤΑ). Παρά το γεγονός ότι η διαδικασία της κατάψυξης-απόψυξης σπέρματος σχετίζεται με πτώση τόσο της βιωσιμότητας όσο και της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων, δεν φαίνεται να επηρεάζονται τα ποσοστά γονιμοποίησης και εγκυμοσύνης μετά από μικρογονιμοποίηση [6]. Σε άνδρες με σοβαρή ΟΤΑ είναι πιθανόν την ημέρα της ωοληψίας να μη βρεθούν καθόλου σπερματοζωάρια στο φρέσκο δείγμα σπέρματος. Στην περίπτωση αυτή, εάν δεν υπάρχει κρυοσυντηρημένο δείγμα σπέρματος θα πρέπει να δίνεται στο ζευγάρει η πιθανότητα επιλογής για κρυοσυντήρηση ωαρίων.

Η βραχυπρόθεσμη κρυοσυντήρηση σπέρματος μπορεί επίσης να φανεί χρήσιμη σε άνδρες που αντιμετωπίζουν δυσκολία κατά τη συλλογή σπέρματος για ψυχολογικούς λόγους ή λόγω τραυματισμού της σπονδυλικής στήλης. Η φύλαξη κρυοσυντηρημένου δείγματος σπέρματος στις

παραπάνω περιπτώσεις μειώνει σημαντικά το άγχος των ζευγαριών εξασφαλίζοντας τη διαθεσιμότητα σπέρματος σε περίπτωση αδυναμίας συλλογής σπέρματος την ημέρα της σπερματέγχυσης ή της ωοληψίας.

Επίσης, η κρυοσυντήρηση σπέρματος αποτελεί λύση σε περιπτώσεις όπου είναι δυνατόν ο άνδρας να απουσιάζει την ημέρα της σπερματέγχυσης ή της ωοληψίας.

ΜΑΚΡΟΠΡΟΘΕΣΜΗ ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ

Η μακροπρόθεσμη κρυοσυντήρηση σπέρματος εκτός από τη δυνατότητα που δίνει στα ζευγάρια να χρησιμοποιήσουν τα κρυοσυντηρημένα δείγματα σπέρματος σε μελλοντικές προσπάθειες, χρησιμοποιείται επίσης για την διατήρηση της ανδρικής γονιμότητας. Αυτό αφορά κυρίως άνδρες που αντιμετωπίζουν προβλήματα υγείας τα οποία μπορούν να οδηγήσουν σε μελλοντική πτώση της ποιότητας του σπέρματος ή αζωοσπερμία. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν άνδρες που πρόκειται να υποβληθούν σε χημειοθεραπεία ή ακτινοθεραπεία για αντιμετώπιση κακοήθειας. Αυτές οι δραστικές θεραπείες μπορούν να έχουν σοβαρές επιπτώσεις στη σπερματογένεση [7]. Η έκταση της ζημιάς που μπορεί να προκληθεί στους όρχεις εξαρτάται από την ηλικία του ασθενή, το είδος της χημειοθεραπείας και τη δόσολογία, καθώς και από το σημείο που γίνεται η ακτινοθεραπεία και τη συχνότητα επανάληψης της [8]. Στις περιπτώσεις αυτές κρυοσυντηρείται δείγμα σπέρματος πριν από την έναρξη της θεραπείας.

Σε αυτή την κατηγορία εντάσσονται επίσης άνδρες που πάσχουν από κάποιες αιματολογικές νόσους, όπως μεσογειακή αναιμία, και οι οποίοι είναι υποχρεωμένοι να λαμβάνουν μακροχρόνια θεραπεία με φάρμακα η χρήση των οποίων έχει συσχετιστεί με τερατογένεση. Λύση στις περιπτώσεις αυτές μπορεί να αποτελέσει η κρυοσυντήρηση σπέρματος μετά από διακοπή ή τροποποίηση της θεραπείας, για ένα απαραίτητο χρονικό διάστημα. Μακροπρόθεσμη κρυοσυντήρηση σπέρματος εφαρμόζεται και σε περιπτώσεις όπου το ζευγάρι επιλέγει τη διατομή του σπερματικού πόρου ως μέθοδο στειρώσης ή σε περίπτωση προστατεκτομής.

ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΟΡΧΙΚΟΥ ΙΣΤΟΥ

Ένα σοβαρό αίτιο υπογονιμότητας, που οδηγεί πολλά ζευγάρια στην εξωσωματική γονιμοποίηση, είναι η αζωοσπερμία [9]. Η αζωοσπερμία μπορεί να είναι είτε αποφρακτική, όπου παράγονται σπερματοζωάρια, τα οποία δεν μπορούν να συλληθούν με εκσπερμάτιση λόγω της ύπαρξης απόφραξης στην εκφορητική οδό του σπέρματος, είτε μη αποφρακτική, στην οποία το πρόβλημα εντοπίζεται στην σπερματογένεση [10]. Στην τελευταία περίπτωση έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχώς σπερματοζωάρια προερχόμενα από βιοψία όρχεως (TESE), για μικρογονιμοποίηση ωαρίων [11, 12]. Στις περιπτώσεις αυτές η περίσσεια ορχικού ιστού που συλλέγεται κατά την TESE μπορεί να κρυοσυντηρηθεί και να χρησιμοποιηθεί σε νέα προσπάθεια εξωσωματικής γονιμοποίησης προς αποφυγή νέας επέμβασης.

Έχει παρατηρηθεί ότι τα ποσοστά της βιωσιμότητας και κινητικότητας των ορχικών σπερματοζωαρίων μειώνονται αισθητά μετά από κρυοσυντήρηση (συγκεκριμένα από 68% σε 22% και από 21% σε 6% αντίστοιχα) [3]. Ωστόσο, ενθαρρυντικά είναι τα ποσοστά γονιμοποίησης με χρήση ορχικών

σπερματοζωαρίων προερχόμενων από κρυοσυντήρηση, καθώς δεν διαφέρουν από αυτά που προέρχονται από χρήση φρέσκων ορχικών σπερματοζωαρίων [4, 5]. Επιπλέον, η κρυοσυντήρηση τεμαχισμένου και επεξεργασμένου ορχικού ιστού υπό τη μορφή εναιωρήματος μπορεί να διατηρήσει καλύτερα την ποιότητα των σπερματοζωαρίων, σε σχέση με τη κρυοσυντήρηση ορχικών ιστοτεμαχίων [13].

Τέλος, έρευνες γίνονται και για την εφαρμογή κρυοσυντήρησης ορχικού ιστού σε προ-εφηβικά αγόρια στα οποία δεν έχει γίνει έναρξη της σπερματογένεσης και τα οποία επρόκειτο να υποβληθούν σε χημειοθεραπεία ή ακτινοθεραπεία [14, 15].

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **Bunge RG, Sherman JK.** Fertilizing capacity of frozen human spermatozoa. *Nature* 1953; 172:767-8.
2. **Walters EM, Benson JD, Woods EJ, Critser JK.** The history of sperm cryopreservation. In: *Sperm Banking: Theory and Practice*. Cambridge University Press 2009:1-17.
3. **Verheyen G, Nagy Z, Joris H, De Croo I, Tournaye H, Van Steirteghem A.** Quality of frozen-thawed testicular sperm and its preclinical use for intracytoplasmic sperm injection into in vitro-matured germinal-vesicle stage oocytes. *Fertil Steril* 1997; 67:74-80.
4. **Friedler S, Raziel A, Soffer Y, Strassburger D, Komarovsky D, Ron-EI R.** Intracytoplasmic injection of fresh and cryopreserved testicular spermatozoa in patients with nonobstructive azoospermia- a comparative study. *Fertil Steril* 1997; 68:892-7.
5. **Ben-Yosef D, Yogev L, Hauser R, Yavetz H, Azem F, Yovel I et al.** Testicular sperm retrieval and cryopreservation prior to initiating ovarian stimulation as the first line approach in patients with non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 1999; 14:1794-1801.
6. **Kuczynski W, Dhont M, Grygoruk C, Grochowski D, Wolczynski S, Szamotowicz M.** The outcome of intracytoplasmic injection of fresh and cryopreserved ejaculated spermatozoa - a prospective randomized study. *Hum Reprod* 2001; 16: 2109-13.
7. **Howell S, Shalet S.** Gonadal damage from chemotherapy and radiotherapy. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1998; 27:927-43.
8. **Jensen JR, Morbeck DE, Coddington CC.** Fertility preservation. *Mayo Clin Proc* 2011; 86:45-9.
9. **Hull MG, Glazener CM, Kelly NJ, Conway DI, Foster PA, Hinton RA et al.** Population study of causes, treatment, and outcome of infertility. *Br Med J* 1985; 291:1693-97.
10. **Dafopoulos K, Griesinger G, Schultze-Mosgau A, Orif Y, Schöpper B, Nikolettos N, et al.** Cumulative pregnancy rate after ICSI with cryopreserved testicular tissue in non-obstructive azoospermia. *RBM Online* 2005; 10:461-6.
11. **Schoysman R, Vanderzwalmen P, Nijs M, Segal L, Segal-Bertin G, Geerts L et al.** Pregnancy after fertilisation with human testicular spermatozoa. *Lancet* 1993; 342:1237.
12. **Devroey P, Liu J, Nagy Z, Tournaye H, Silber S, Van Steirteghem A.** Normal fertilization of human oocytes after testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection (TESE and ICSI). *Fertil Steril* 1994; 62:639-41.

13. **Crabbe E, Verheyen G, Tournaye H, Van Steirteghem A.** Freezing of testicular tissue as a minced suspension preserves sperm quality better than whole-biopsy freezing when glycerol is used as cryoprotectant. *Int J Androl* 1999; 22:43-8.
14. **Keros V, Hultenby K, Borgström B, Fridström M, Jahnukainen K, Hovatta O.** Methods of cryopreservation of testicular tissue with viable spermatogonia in pre-pubertal boys undergoing gonadotoxic cancer treatment. *Hum Reprod* 2007; 22: 1384-95.
15. **Hovatta O.** Cryopreservation of testicular tissue in young cancer patients. *Hum Reprod Update* 2001; 7:378-83.

ΣΥΓΧΡΟΝΕΣ ΑΠΟΦΕΙΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ Η ΟΡΧΙΚΟΥ ΙΣΤΟΥ ΣΤΗΝ ΚΙΡΣΟΚΗΛΗ ΚΑΙ ΣΕ ΆΛΛΕΣ ΘΕΡΑΠΕΙΕΣ ΤΗΣ ΑΝΔΡΙΚΗΣ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑΣ

Φ. Δημητριάδης, Δ. Χατζηχρήστου

Β' Ουρολογική Κλινική, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Νοσοκομείο "Παπαγεωργίου"

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η κρυοσυντήρηση σπερματοζωαρίων ανθρώπου, η οποία εφαρμόστηκε πρώτη φορά στη δεκαετία του 1960, αποτελεί πλέον μία απαραίτητη διαδικασία στο χειρισμό της ανδρικής υπογονιμότητας, κυρίως πριν από θεραπεία για κακοήθεις νόσους, απολίνωση σπερματικού πόρου ή χειρουργικές θεραπείες υπογονιμότητας, που σκοπό έχει την αποθήκευση σπερματοζωαρίων του δότη και του συντρόφου, πριν την εφαρμογή θεραπειών υποβοηθούμενης αναπαραγωγής και τη διασφάλιση ενός μικρού έστω αριθμού σπερματοζωαρίων σε περιπτώσεις βαριάς ανδρικής υπογονιμότητας. Προς το παρόν δεν υπάρχουν διαθέσιμα κυτταροπροστατευτικά φάρμακα που να μπορούν *in vivo* να διασφαλίσουν την επιβίωση των αρχέγονων σπερματικών κυττάρων στον άνθρωπο. Ωστόσο, σύγχρονα επιστημονικά δεδομένα υποστηρίζουν την ενδεχόμενη δυνατότητα κρυοσυντήρησης άωρου σπερματικού ιστού πριν την εφαρμογή κάποιας γοναδοτοξικής θεραπείας, με σκοπό την διατήρηση της γονιμότητας. Πειραματικές μελέτες καταλήγουν σε ενθαρρυντικά αποτελέσματα, μιας και έχουν γεννηθεί υγιείς απόγονοι μετά από μεταμόσχευση κρυοσυντηρημένων άωρων σπερματικών κυττάρων σε εναιώρημα ή άωρου σπερματικού ιστού. Ωστόσο μέχρι σήμερα καμία από τις υπάρχουσες εναλλακτικές ανάκτησης της γονιμότητας από κρυοσυντηρημένο ιστό συμπεριλαμβανομένων μεταμόσχευση κυτταρικού εναιωρήματος ή ιστού, ή ωρίμανση άωρων σπερματικών κυττάρων στο εργαστήριο (IVM), δεν έχει αποδειχθεί επαρκώς αποδοτική και ασφαλής ώστε να εφαρμοστεί στην κλινική πράξη.

Ενώ χρειάζονται ακόμα περισσότερες έρευνες για την οριοθέτηση των καταλληλότερων συνθηκών κρυοσυντήρησης άωρων σπερματικών κυττάρων με σκοπό την μεταμόσχευση ή την IVM, στην ανασκοπική αυτή μελέτη καταγράφονται οι ενδείξεις για την εφαρμογή αυτών των τεχνικών καθώς και οι περιορισμοί στη χρήση τους. Επιπλέον, περιγράφονται οι ενδείξεις και οι περιορισμοί της κρυοσυντήρησης του σπέρματος και του ορχικού ιστού. Τέλος, σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η ευαισθητοποίηση του θεράποντος ιατρού στο θέμα της ποιότητας της ζωής του ασθενή σε σχέση με την διατήρηση ή εξασφάλιση της γονιμότητας του και της δυνατότητάς του για απόκτηση των δικών του βιολογικών του παιδιών σε μακροχρόνια βάση και η παροχή των εναλλακτικών αυτών όταν ο ιατρός συμβουλεύει τον ασθενή ή σχεδιάζει τη θεραπευτική στρατηγική.

ABSTRACT

Cryopreservation of human spermatozoa - introduced in the 1960's - has been recognized as an efficient procedure for management of male fertility before therapy for malicious diseases, vasectomy or surgical infertility treatments, to store donor and partner spermatozoa before assisted reproduction treatments and to ensure the recovery of a small number of spermatozoa in severe male factor infertility.

Currently there is no effective gonadoprotective drug available for *in vivo* spermatogonial stem cell protection in humans. On the other hand, recent scientific evidence supports the feasibility of immature testicular tissue cryopreservation before gonadotoxic treatment with a view to fertility preservation. Animal data show encouraging results, since healthy offsprings have been generated after transplantation of frozen testicular cell suspensions or tissue pieces. However, up today none of the fertility restoration options from frozen tissue, including cell suspension transplantation, tissue grafting and *in vitro* maturation (IVM) have proved efficient and safe in the human.

While additional evidence is required to define optimal conditions for immature testicular tissue cryopreservation with a view to transplantation or IVM, the putative indications for such techniques, as well as their limitations according to disease, are outlined. Moreover, this work provides a review of the present state of technology, practicability and limits of cryopreservation of human spermatozoa. Its aim is to encourage physicians and health care providers to consider the needs of a patient's quality of life with respect to his family planning and fertility on a long-term basis and to include these topics when counselling the patient and planning therapy.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η βαριά ολιγοασθενοσπερμία και η αζωοσπερμία αποτελούν πρόβλημα όχι μόνο του άνδρα αλλά του ζευγαριού σαν σύνολο, με έντονες κοινωνικές και ψυχολογικές προεκτάσεις. Υπάρχουν ωστόσο περιπτώσεις, όπως στις ογκολογικές παθήσεις, τόσο κατά την ενήλικη ζωή όσο και κατά την παιδική ηλικία, όπου μπροστά στο τρέχον πρόβλημα υγείας το θέμα της διατήρησης της γονιμότητας του άνδρα έρχεται σε δεύτερη μοίρα. Εξάλλου η σύγχρονη θεραπευτική προσέγγιση των ογκολογικών ασθενών έχει βελτιωθεί σημαντικά τα τελευταία χρόνια και υπολογίζεται ότι το 80% των παιδιών που εμφανίζουν κάποια μορφή κακοήθειας τελικά θα καταφέρουν να επιβιώσουν [1-4], με δραματικές όμως πολλές φορές συνέπειες στη γονιμότητα των αγοριών [5-7]. Αυτό συμβαίνει διότι ο στόχος της χημειοθεραπείας και της ακτινοθεραπείας είναι τα κύτταρα με γρήγορο ρυθμό αναπαραγωγής και επομένως όχι μόνο τα καρκινικά κύτταρα αλλά και τα σπερματικά κύτταρα ακόμα και όταν πρόκειται για τα πολυδύναμα σπερματικά κύτταρα (σπερματογόνια) τα οποία είναι λιγότερο ενεργά [8]. Επομένως ακόμα και στον προεφηβικό όρχι που δεν έχει ακόμα ολοκληρώσει τη σπερματογένεση σε όλο της το φάσμα μία κυτταροτοξική θεραπεία θα επηρεάσει αρνητικά τη γονιμότητα του αγοριού [9-11].

Η βαριά ολιγοασθενοσπερμία και η αζωοσπερμία μπορεί να είναι συνέπεια και άλλων μη ογκολογικών παθήσεων. Ανάμεσά τους, η κίρσοκηλη αποτελεί τον συχνότερο αιτιολογικό παράγοντα υπογονιμότητας στον άνδρα καθώς διαγιγνώσκεται στο 35-40% των ανδρών με πρωτοπαθή υπογονιμότητα και στο 80%

των ανδρών με δευτεροπαθή υπογονιμότητα [12-14]. Αν και ο παθογενετικός μηχανισμός της βλάβης που προκαλεί η κισσοκήλη στη λειτουργία του όρχι δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί πλήρως, ωστόσο οι αρνητικές συνέπειες που έχει στη λειτουργία του όρχι και στο σπέρμα του άνδρα έχουν πλέον περιγραφεί με επάρκεια [15-20]. Οι συνέπειες της κισσοκήλης ποικίλουν αλλά συχνά καταλήγουν σε μία γενικευμένη επιδείνωση της παραγωγής του σπέρματος με υποβάθμιση της ποιότητάς του από απλή олиγοσπερμία μέχρι πλήρη αζωοσπερμία [21]. Επίσης η κισσοκήλη δεν επηρεάζει μόνο την φυσιολογία και την αναπαραγωγική ικανότητα του σπέρματος αλλά και την γονιμοποιητική ικανότητα του απλοειδούς γαμέτη [22]. Η αζωοσπερμία ή η βαριά олиγοασθενόσπερμία σε συνδυασμό με κλινικά σημαντική κισσοκήλη μπορεί να μην είναι αρκετά συχνή αλλά παρατηρείται ωστόσο σε ποσοστό που ποικίλει από 4,3% μέχρι 13,3% [23, 24].

Η πρώτη παρατήρηση ότι η κινητικότητα των σπερματοζωαρίων μπορεί να διατηρηθεί μετά από ψύξη-απόψυξη έγινε από τον Spallanzani το 1776 [25]. Ωστόσο, η μακροπρόθεσμη κρυοσυντήρηση των σπερματοζωαρίων στον άνθρωπο έγινε πραγματικότητα όταν ο Polge και συν. [26] ανακάλυψαν τις κρυοπροστατευτικές ιδιότητες της γλυκερόλης ενώ άλλοι [27] ανέπτυξαν τεχνικές για την επιτυχή απόψυξη του σπέρματος. Από τότε και κατά την διάρκεια της δεκαετίας του 1970 δημιουργήθηκαν συστηματικά τράπεζες σπέρματος και σήμερα η κατάψυξη σπέρματος αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι στον καθημερινό κύκλο εργασιών μία κλινικής υπογονιμότητας. Σε περιπτώσεις όπου η λήψη σπέρματος δεν είναι δυνατή όπως σε παιδιά ή άνδρες με αποφρακτική αζωοσπερμία, η κατάψυξη ορχικού ιστού είναι ενδεδειγμένη [28]. Η βιοψία του όρχι παρουσιάστηκε αρχικά από τον Silber και συν. [4] σαν μία μέθοδος ανεύρεσης σπερματοζωαρίων σε άνδρες με αποφρακτική αζωοσπερμία προκειμένου να προχωρήσουν σε κύκλο μικρογονιμοποίησης (intra cytoplasmic sperm injection ή ICSI) ενώ στη συνέχεια εφαρμόστηκε με επιτυχία και σε άνδρες με μη αποφρακτική αζωοσπερμία [28].

Σκοπός της παρούσας ανασκόπησης είναι η ενημέρωση του αναγνώστη για τις εναλλακτικές που υπάρχουν στην διατήρηση της γονιμότητας του άνδρα και η ανάλυση των περιπτώσεων όπου η κρυοσυντήρηση του σπέρματος και του ορχικού ιστού είναι ενδεδειγμένη. Για αυτό το λόγο θα προηγηθεί μία σύντομη περιγραφή της φυσιολογίας και της κυτταρικής βιολογίας του σπερματογόνιου.

ΠΟΛΥΔΥΝΑΜΑ ΣΠΕΡΜΑΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Τα σπερματογόνια προέρχονται από αρχέγονα σπερματικά κύτταρα (primordial germ cells ή PGCs), τα οποία μεταναστεύουν από έξω-εμβρυϊκές θέσεις στην γενετική πτυχή του εμβρύου για να την αποικίσουν κατά την διάρκεια της εμβρυϊκής ζωής [29]. Στα έμβρυα θηλακού γένους τα αρχέγονα σπερματικά κύτταρα αναπαράγονται με έντονο ρυθμό και πέριξ του τοκετού μπαίνουν και σταματούν σε μειωτική πρόφαση. Στα έμβρυα αρσενικού γένους αντίθετα, είναι πολύ σημαντικό να σταματήσει ο πολλαπλασιασμός των σπερματικών κυττάρων και να ανασταλεί η είσοδος τους σε μειωτική διαίρεση και αυτό επιτυγχάνεται με την έγκαιρη έκφραση του γονιδίου SRY [30]. Κατά αυτόν τον τρόπο τα γενετικά κύτταρα του άρρενος συνάπτουν σχέση με σωματικά κύτταρα του ιστού που πρόκειται να διαμορφωθεί σε όρχι και σχηματίζουν συγκεκριμένες δομές (testicular cords) οι οποίες σηματοδοτούν την έναρξη της

διαφοροποίησης των αρχέγονων σπερματικών κυττάρων σε γονοκύτταρα. Κατά διάρκεια της προεφηβικής ηλικίας τα γονοκύτταρα διαφοροποιούνται σε σπερματογόνια με σκοπό να αποτελέσουν την πρωταρχική πηγή κυττάρων της σπερματικής σειράς στον άνδρα. Το σπερματικό επιθήλιο του ενήλικα είναι ένας από τους πιο παραγωγικούς και αυτό-αναπαραγόμενους ιστούς στα θηλαστικά, παράγοντας εκατομμύρια σπερματοζωάρια καθημερινά. Στην ενήλικη ζωή, η σπερματογένεση υποστηρίζεται από τα σπερματογόνια τα οποία εξισορροπούν την διαφοροποίηση τους και την αυτό-αναπαραγωγή τους κατά τέτοιο τρόπο ώστε να διατηρείται σταθερός ο πληθυσμός τους στο σπερματικό επιθήλιο του όρχι αλλά και να ικανοποιούνται οι βιολογικές απαιτήσεις του οργάνου σε αριθμό σπερματοζωαρίων [31]. Εξαιτίας της έντονης αναπαραγωγικής του δραστηριότητας το σπερματικό επιθήλιο αποτελεί αναπόφευκτά και μη ηθελημένα ιατρογενή στόχο των χημειο- και ακτινοθεραπειών. Το μέγεθος της βλάβης που μπορεί να προκληθεί είναι σε εξάρτηση από τη δόση, τον τύπο και τη συχνότητα χορήγησης του κυτταροτοξικού παράγοντα [32, 33].

Στους όρχεις των πρωτευόντων θηλαστικών μπορούν να παρατηρηθούν δύο τύποι σπερματογόνιων με βάση τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά [34]. Τα χωρά σπερματογόνια τύπου A και τα σκουρόχρωμα σπερματογόνια τύπου A. Τα πρώτα είναι τα ενεργά πολυδύναμα κύτταρα. Η συνεχόμενες μιτωτικές διαιρέσεις του δημιουργούν ομάδες διαφοροποιούμενων σπερματικών κυττάρων αλλά χωρίς να μεταβάλλεται ο αρχικός του πληθυσμός. Τα σκουρόχρωμα σπερματογόνια τύπου A αποτελούν την αποθήκη των πολυδύναμων σπερματικών κυττάρων και μιτωτικά είναι αδρανή [35]. Όπως αποδείχθηκε σε πειραματικό μοντέλο πιθήκου ράτσας «macaques» η έναρξη εκ νέου της σπερματογένεσης μετά από ακτινοβολία ξεκινάει από τα σκούρα σπερματογόνια τύπου A τα οποία μετατρέπονται σε χωρά σπερματογόνια τύπου A πριν ξεκινήσουν την παραγωγή σπερματικών κυττάρων που σταδιακά διαφοροποιούνται σε ολόκληρη τη σπερματική σειρά [36]. Η ενεργοποίηση των σκουρόχρωμων σπερματογόνιων τύπου A μετά από τη δράση κάποιου γοναδοτοξικού παράγοντα εξηγεί το γεγονός ότι ένα μεμονωμένο επεισόδιο προσβολής κάποιου γοναδοτοξικού παράγοντα είναι λιγότερο επιβλαβές για το σπερματικό επιθήλιο από ότι πολλαπλά επεισόδια μικρότερης έντασης, όπως φάνηκε μετά από ακτινοθεραπευτικές μελέτες που έγιναν τόσο σε πιθήκους όσο και σε ανθρώπους [37, 38].

ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ ΤΗΣ ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ

Η ιδέα της δημιουργίας τράπεζας σπέρματος πρωτοεμφανίστηκε στα μέσα του 1900 με σκοπό την αποθήκευση σπέρματος βοοειδών. Περίπου την ίδια χρονική περίοδο εξετάστηκε και η πιθανότητα κατάψυξης σπερματοζωαρίων στρατιωτών πριν αναχωρήσουν για τη μάχη με σκοπό να μπορέσουν οι γυναίκες τους να προχωρήσουν ενδεχομένως σε κύηση μετά το θάνατό των συζύγων τους. Ωστόσο, σημαντικές προσπάθειες για την βελτίωση των τεχνικών απαιτήσεων της κρυοσυντήρησης του σπέρματος έγιναν στο πρώτο μισό του εικοστού αιώνα [39]. Ουσιαστική βελτίωση της τεχνικής επιτεύχθηκε με την προσθήκη της πρώτης κρυο-προστατευτικής ουσίας της γλυκερόλης στη διαδικασία της κρυοσυντήρησης με σκοπό την προστασία του σπερματοζωαρίου κατά την κατάψυξη. Αυτό οδήγησε στην επιτυχή κατάψυξη

σπερματοζωαρίων ανθρώπου σε ξηρό πάγο στους -79°C [26]. Στη συνέχεια ως μέσο κατάψυξης προτιμήθηκε το υγρό άζωτο (-196°C) και λίγο αργότερα αναφέρθηκε και η πρώτη επιτυχής γονιμοποίηση και εγκυμοσύνη με κατεψυγμένο σπέρμα. Από τότε χιλιάδες γεννήσεις από χρήση κρυοσυντηρημένου σπέρματος δότη έχουν αναφερθεί παγκοσμίως [40]. Τελευταία, με την επιτυχή εισαγωγή της ICSI οι τεχνικές αναπτύχθηκαν ώστε να περιλαμβάνουν και κατάψυξη ορχικού και επιδιδυμικού ιστού από όπου επιλέγεται ένα σπερματοζωάριο (με χειρουργικές και μικροχειρουργικές τεχνικές). Οι πιο συχνή περίπτωση κατά την οποία χρειάζεται να γίνει κατάψυξη σπέρματος είναι αυτή του σπέρματος δότη για βραχυπρόθεσμη ή μακροπρόθεσμη διατήρηση της γονιμοποιητικής του ικανότητας.

ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΟΡΧΙΚΟΥ ΙΣΤΟΥ: ΕΝΔΕΙΞΕΙΣ

1. ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ ΤΗΣ ΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑΣ

Η κατάψυξη σπέρματος μπορεί να προταθεί σε άνδρες που πρόκειται να υποβληθούν σε κάποια επέμβαση ή έκθεση σε παράγοντα που μπορεί να επηρεάσει την γονιμότητά τους. Τέτοια παραδείγματα είναι ποικίλες ογκολογικές θεραπείες κυρίως με κυτταροτοξικούς αλκυλιωτικούς παράγοντες, ακτινοθεραπεία, επεμβάσεις που μπορούν να βλάψουν την παραγωγή ή την διέλευση του σπέρματος, η απολίνωση των σπερματικών πόρων ως μέσο πρόληψης εγκυμοσύνης και η κίρσοκλή σε περιπτώσεις βαριάς ολιγοασθενοσπερμίας ή αζωοσπερμίας [21, 41, 42]. Σε σπανιότερες περιπτώσεις η κατάψυξη σπέρματος ή ορχικού ιστού πραγματοποιείται σε άνδρες με πιο ασυνήθιστα αίτια όπως αλλαγή φύλου, επικίνδυνα επαγγέλματα (σώματα ασφαλείας, έντοπλες δυνάμεις) και άλλα (Πίνακας 1).

Σε ασθενείς που πρόκειται να υποβληθούν σε χημειοθεραπεία ή ακτινοθεραπεία ή συλλογή του σπέρματος πρέπει να γίνεται πριν την εφαρμογή της οποιας θεραπείας λόγω της ενδεχόμενης πιθανότητας που υπάρχει να μεταλλαχθούν γενετικά τα σπερματοζωάρια [43]. Ασθενείς που πρόκειται να υποβληθούν σε μεταμόσχευση οργάνου ή θεραπεία για ρευματοειδή αρθρίτιδα, νόσο του Crohn ή γαγγρενώδη κολίτιδα, επίσης θέτουν σε κίνδυνο τη σπερματογενετική τους ικανότητα οπότε πρέπει να προβαίνουν σε κατάψυξη σπερματοζωαρίων πριν την θεραπεία. Επίσης σε ορισμένα κράτη, και όπου αυτό προβλέπεται από το νόμο, συστήνεται η κατάψυξη σπέρματος σε άνδρες με επικίνδυνα επαγγέλματα όπως στις δυνάμεις στρατού, προκειμένου να μπορέσουν οι σύζυγοι τους να προχωρήσουν σε εγκυμοσύνη μετά από ενδεχόμενο θάνατό τους.

Η κρυοσυντήρηση του σπέρματος προσφέρει την δυνατότητα προφύλαξης από τις δυσμενείς συνέπειες που μπορεί να έχει κάποια ασθένεια ή κάποια θεραπεία στη γονιμότητα και μπορεί να συνεισφέρει στην ψυχολογική υποστήριξη κυρίως νεαρών ανδρών που περνούν την κρίση οξεία αυτή φάση. Εξάλλου οι περισσότεροι ασθενείς που επιλέγουν τελικά να καταψύξουν σπερματοζωάρια είναι εκείνοι που πάσχουν από κάποια ογκολογική νόσο και πρόκειται να υποβληθούν σε κυτταροτοξική θεραπεία. Σε άλλες περιπτώσεις η κατάψυξη σπέρματος συστήνεται όταν η πρόγνωση της ασθένειας δεν είναι ακόμα σαφής και ενδεχομένως

μπορεί να προκύψει θέμα κυτταροτοξικής θεραπείας ακόμα και σε καλοήγη νόσο που μπορεί να βλάψει της ορχική λειτουργία.

2. ΑΠΟΛΙΝΩΣΗ ΣΠΕΡΜΑΤΙΚΩΝ ΠΟΡΩΝ

Η κρυοσυντήρηση σπερματοζωαρίων πρέπει να προτείνεται σε όλους τους άνδρες που υποβάλλονται σε απολίνωση των σπερματικών πόρων ως μέθοδο αντισύλληψης, μια που δεν υπάρχει κάποιος ορμονικός ή άλλος φαρμακευτικός χειρισμός όπως το αντίστοιχο χάπι αντισύλληψης στη γυναίκα [44]. Η απολίνωση των σπερματικών πόρων είναι μία επεμβατική και πολλές φορές μη αναστρέψιμη μέθοδος αντισύλληψης και γι' αυτό το λόγο ο άνδρας ή το ζευγάρι θα πρέπει να λάβει σημαντικές αποφάσεις σχετικά με το οικογενειακό του πλάνο. Η καθημερινή κλινική πράξη ωστόσο, αποδεικνύει ότι κάποιοι άνδρες επιθυμούν ξανά την απόκτηση ενός δικού τους παιδιού (περίπτωση χαμού κάποιου παιδιού ή χαμού της συζύγου, σύναψη μίας νέας σχέσης κ.λ.π.) οπότε και τίθεται το θέμα της επανένωσης των σπερματικών πόρων (vasovasostomy) ή της αναστόμωσής τους με την επιδιδυμίδα (vasoepididymostomy). Σε αυτές τις περιπτώσεις μία προηγηθείσα κατάψυξη σπέρματος μπορεί να διασφαλίσει μία νέα εγκυμοσύνη διαμέσου τεχνικών υποβοηθούμενης σύλληψης, όταν το χειρουργείο αποκατάστασης της βατότητας των σπερματικών πόρων δεν έχει επιτυχία ή δεν είναι δυνατόν να πραγματοποιηθεί. Εξάλλου ακόμα και μετά από μία πετυχημένη χειρουργική αποκατάσταση της βατότητας των σπερματικών πόρων, υπάρχει πάντα ο κίνδυνος να είναι περιστασιακή και στη συνέχεια ο ασθενής να οδηγηθεί και πάλι σε αποφρακτική αζωοσπερμία. Γι' αυτό το λόγο συστήνεται η διεγχειρητική λήψη σπερματοζωαρίων με αναρρόφηση από το σπερματικό πόρο ή από την επιδιδυμίδα ή λήψη σπέρματος με εκσπερμάτωση μετεγχειρητικά με σκοπό την κατάψυξη. Στο ένα τρίτο των περιπτώσεων η αναρρόφηση σπερματοζωαρίων από το σπερματικό πόρο ή την επιδιδυμίδα διεγχειρητικά αποδίδει किνούμενα σπερματοζωάρια τα οποία μπορούν να καταψυχθούν και να χρησιμοποιηθούν αργότερα σε τεχνικές υποβοηθούμενης σύλληψης όταν η χειρουργική αποκατάσταση της βατότητας των σπερματικών πόρων δεν αποβεί επιτυχής [45]. Εναλλακτικά, στον ίδιο χρόνο που αποκαθίσταται η βατότητα των σπερματικών πόρων και εφόσον η ποιότητα των σπερματοζωαρίων με την αναρρόφηση δεν είναι ικανοποιητική μπορεί να παρθεί ιστοτεμάχιο από τον όρχι με σκοπό την κατάψυξη [46].

3. ΟΓΚΟΛΟΓΙΚΕΣ ΝΟΣΟΙ ΣΤΗΝ ΕΦΗΒΙΚΗ ΗΛΙΚΙΑ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΕΝΗΛΙΚΗ ΖΩΗ

Οι κακοήθειες στην εφηβική ηλικία και στους ενήλικες θεραπεύονται με ποικίλους τρόπους που περιλαμβάνουν χειρουργική εξαίρεση, χημειο- και/ή ακτινοθεραπεία, με υψηλό πλέον ποσοστό επιτυχίας, που σταδιακά αυξάνουν τόσο την «ελεύθερη νόσο» περίοδο όσο και το ποσοστό επιβίωσης των ασθενών αυτών. Ωστόσο, οι παραπάνω θεραπείες έχουν συχνά αρνητικές επιπτώσεις στη γονιμότητα των ασθενών και οι επιπτώσεις αυτές πολλές φορές είναι μη αναστρέψιμες και εξαρτώνται από την θεραπευτική πρακτική, τις ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν, τη δοσολογία, τη χρονική διάρκεια της θεραπείας αλλά και την ευαισθησία του ορχικού ιστού σε κάθε ασθενή [47, 48] (Πίνακας 2). Σε κάθε περίπτωση, η έκταση της βλάβης στην αναπαραγωγική ικανότητα του άνδρα που υπόκειται σε αυτές τις θεραπείες δεν μπορεί να προβλεφθεί

Πίνακας 1. Ενδείξεις κατάψυξης σπέρματος ή ορχικού ιστού. Τροποποιημένο από Tomlinson [113].

Αίτιο	Ποσοστό (%)
Ογκολογικό (ενήλικες, έφηβοι)	44,79
Αιματολογικό	22,92
Ουρολογικό	13,72
Αυτοβούλως (π.χ. πριν από απολίνωση σπερματικού πόρου)	6,77
Θέμα γονιμότητας	2,95
Νεφρολογικό	2,43
Ογκολογικό (παιδιά)	1,91
Ρευματολογικό	1,74
Νωτιαίου μυελού	1,04
Χειρουργικό	0,87
Ενδοκρινολογικό	0,52

Πίνακας 2. Πρόγνωση μακροπρόθεσμης διατήρησης γονιμότητας μετά από θεραπεία με διάφορους παράγοντες. Τροποποιημένο από Meirou και Schenker [114], Howell και Shalet [89].

Καλή	Μέτρια	Πτωχή
Azathioprine	Thiotepa	Cyclophosphamide ($> 7,5 \text{ g/m}^2$) [115]
Fludarabine	Gemcitabine	Ifosfamide ($> 60 \text{ g/m}^2$) [116]
Methotrexate	Cisplatin	Mustine, carmustine
6-mercaptopurine	Oxaliplatin	Busulfan
Vincristine	Carboplatin	Chlorambucil ($> 1,4 \text{ g/m}^2$)
Vinblastine	Doxorubicin	Melphalan (140 mg/m^2)
Bleomycin	Dacarbazine	Chlormethine
Actinomycin-D	Cytosine-arabinoside (cytarabine)	Procarbazine ($> 4 \text{ g/m}^2$) [117]
Etoposide	Daunorubicin	Cisplatin ($> 600 \text{ mg/m}^2$) [118, 119]
	Mitoxantrone	Mechlorethamine

Πίνακας 3. Ενδείξεις κρουσυντήρησης άωρων σπερματικών κυττάρων σε περιπτώσεις κακοηθειών ή μη-κακόηθων νόσων. Τροποποιημένο από Wyns et al. 2010 [70].

Κακοήθειες	Μη-κακοήθεις νόσοι
Λευχαιμία	Μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων σε περιπτώσεις:
	- αιματολογικών παθολογιών όπως θαλασσαιμία, δρεπανοκυτταρική αναιμία, απλαστική αναιμία, αναιμία Fanconi
Νόσος Hodgkin's	- Πρωτογενείς ανοσοανεπάρκειες
Λέμφωμα Non-Hodgkin's	- Σοβαρά αυτοάνοσα νοσήματα που δεν αντιδρούν σε ανοσοκατασταλτική θεραπεία όπως νεανική ιδιοπαθής αρθρίτιδα, νεανικός γενικευμένος ερυθματώδης λύκος, γενικευμένη σκλήρυνση, ανοσο-κυτταροπενία.
Μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα	- Οστεοπόρωση
Συμπαγείς όγκοι	Νόσοι ενζυμικής ανεπάρκειας όπως νόσος Hurler's
Σάρκωμα μαλακών μορίων	Κίνδυνος εκφύλισης του όρχι
	- Σύνδρομο Klinefelter

οριστικά έχει όμως σημαντικές επιπτώσεις στην προσωπική του ζωή και στην ποιότητα της διαβίωσής του. Μέχρι τώρα δεν έχουν αναπτυχθεί επαρκώς τεχνικές ή φαρμακευτικοί παράγοντες που να επιτρέπουν την προφύλαξη της σπερματογενετικής ικανότητας του άνδρα που υπόκειται σε τοξικούς χημειοθεραπευτικούς ή/και ακτινοθεραπευτικούς παράγοντες [49]. Η παλινδρόμη εκσπερμάτωση μετά από οπισθοπεριτοναϊκό λεμφαδενικό καθαρισμό μπορεί να θεραπευτεί εμπειρικά σε κάποιο βαθμό με φαρμακευτική αγωγή, αλλά η αδυναμία παραγωγής σπέρματος μετά από μείζονες χειρουργικές επεμβάσεις όπως ριζική προστατεκτομή, κυστεοπροστατεκτομή ή ορθο-σιγμοειδεκτομή μπορεί να θεραπευτεί μόνο με βιοψία όρχι [50].

Σε ασθενείς με όγκους όρχεων ή άλλες κακοήθειες (π.χ. νόσος του Hodgkin, λευχαιμία), η έκπτωση της ορχικής λειτουργίας είναι γνωστή. Ωστόσο, οι υποκείμενες αιτίες της υπογονιμότητας σε σχέση με

τις κακοήθεις νόσους δεν είναι κατανοητές [51, 52]. Μελέτες αναφέρουν μειωμένες τιμές παραμέτρων σπέρματος, δείχνοντας ολιγοσπερμία στο 63% των ανδρών με όγκους όρχεων, στο 43% των ανδρών με λεμφογενείς ή μη λευχαιμίες και στο 45% ασθενών με άλλους παρεγχυματικούς όγκους [25], πριν την κρουσυντήρηση. Ωστόσο, έχει αποδειχθεί ότι οι μειωμένες τιμές σπέρματος δεν έχουν σημαντικό ρόλο στην επιτυχία των υποβοηθούμενων τεχνικών σύλληψης [53]. Η κινητικότητα του σπέρματος μειώνεται ιδιαίτερα από την διαδικασία της κρουσυντήρησης [25]. Και ενώ η μέση προωθητική κινητικότητα του σπέρματος σε ογκολογικούς ασθενείς είναι περίπου 40%, σημειώνεται σημαντική πτώση της περίπου στο 21% αμέσως μετά την κατάψυξη και απόψυξη ενός δείγματος, ανεξάρτητα από την υποκείμενη νόσο και την ηλικία του ασθενούς [47]. Όσο καλύτερη είναι η κινητικότητα του σπέρματος πριν την κατάψυξη, τόσο καλύτερη τείνει να είναι και μετά την απόψυξη [25]. Εξάλλου, επειδή η κινητικότητα του σπέρματος θεωρείται ότι είναι μία από τις σημαντικότερες παραμέτρους για την αύξηση

του ποσοστού επιτυχίας στη σπερματέγχυση και σε τεχνικές IVF [54], η μείωση της κινητικότητας του σπέρματος εξαιτίας αυτής καθεαυτής της κρυοσυντήρησης μπορεί να εξηγήσει τις συχνές ανεπιτυχείς σπερματεγγύσεις και τους αναποτελεσματικούς κύκλους IVF. Ωστόσο, στην τεχνική της ICSI, το ποσοστό κινητικότητας των σπερματοζωαρίων δε φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο [25]. Στην τεχνική της ICSI η κινητικότητα των σπερματοζωαρίων αποτελεί δείκτη βιωσιμότητας των σπερματοζωών, που επιλέγονται για τη μικρογονιμοποίηση.

4. ΟΓΚΟΛΟΓΙΚΕΣ ΝΟΣΟΙ ΣΤΗΝ ΠΑΙΔΙΚΗ ΗΛΙΚΙΑ

Τα ποσοστά επιβίωσης των ογκολογικών ασθενών που νόσησαν κατά τη νεαρή ηλικία, π.χ. με όγκους όρχεων, νόσο Hodgkin, λευχαιμία ή σάρκωμα Ewing, έχουν αυξηθεί, χάρη στην έγκαιρη διάγνωση και των βελτιωμένων θεραπευτικών πρωτοκόλλων. Η κρυοσυντήρηση σπέρματος μπορεί να εφαρμοστεί επιτυχώς όχι μόνο σε ενήλικες, αλλά και σε νεαρούς ασθενείς με κακοήθειες. Πριν και μετά την κρυοσυντήρηση, οι έφηβοι εμφανίζουν σπερματικές παραμέτρους συγκρίσιμες με αυτές των ενηλίκων, ανεξαρτήτως της υποκείμενης ογκολογικής νόσου [47, 55]. Παρόλο που τα χημειοθεραπευτικά πρωτόκολλα που εφαρμόζονται στην παιδική ηλικία έχουν γίνει λιγότερο επιβλαβή, η πρόγνωση όσον αφορά στη τοξικότητα των όρχεων και στη συνεπακόλουθη έκπτωση της λειτουργίας τους, σε μακροχρόνια βάση, παραμένει δύσκολη και εξαρτάται από τους χημειοθεραπευτικούς συνδυασμούς και την αναγκαιότητα των ποικίλων θεραπευτικών επιλογών που εφαρμόζονται [25] (Πίνακας 3). Πάνω από 16% των ασθενών που υποβάλλονται σε θεραπείες που δεν περιέχουν αλκυλιωτικούς παράγοντες (π.χ. αδριαμυκίνη, βινκριστίνη, μεθοτρεξάτη) εμφάνισαν αζωοσπερμία κατά τη διάρκεια της ενήλικης ζωής τους, μετά από θεραπεία στην παιδική ηλικία [25] (Πίνακας 2).

Όταν χρησιμοποιούνται χημειοθεραπείες βασισμένες σε cis-platin, ένας μέσος όρος 37% των θεραπευμένων ασθενών παραμένουν αζωοσπερμικοί στην ενήλική τους ζωή [25] (Πίνακας 2). Αν κατά την παιδική ηλικία χρησιμοποιήθούν θεραπείες με αλκυλιωτικούς παράγοντες (π.χ. κυκλοφωσφαμίδη ή προκαρβαζίνη), η υπογονιμότητα μπορεί να εμφανιστεί στο 68% αυτών των ασθενών κατά την ενήλικη ζωή τους [47] (Πίνακας 2). Εάν η πιθανότητα λήψης δείγματος ορχικού ιστού από ογκολογικούς ασθενείς σε προεφηβική ηλικία πριν την τοξική θεραπεία θα προσφέρει τη δυνατότητα για μετέπειτα επανεμφύτευση, με σκοπό την επανάκτηση της γονιμότητας, εξαρτάται από τις μελλοντικές ερευνητικές εξελίξεις. Μέχρι σήμερα έχουν γίνει οι πρώτες πειραματικές προσπάθειες για να εδραιώσουν τις τεχνικές εμφύτευσης σπερματικών κυττάρων [56, 57]. Σε κάθε περίπτωση, προφυλακτική δράση της κρυοσυντήρησης στα σπερματοζωάρια και η μακροχρόνια διατήρηση της ποιότητάς τους, με σκοπό την επίτευξη πατρότητας, θα πρέπει να τίθεται υπόψη του νεαρού ασθενή και των γονέων του, πριν τη θεραπεία, η οποία μπορεί να αποδειχθεί τοξική για τους όρχεις.

5. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ ΣΤΗΝ ΚΙΡΣΟΚΗΛΗ

Είναι πλέον ευρέως αποδεκτό ότι η κίρσοκλήλη αποτελεί ένα από τα συχνότερα αίτια ανδρικής υπογονιμότητας. Έχουν προταθεί αρκετές θεωρίες για να εξηγήσουν την παρατηρούμενη παθολογία της κίρσοκλήλης. Η ποιότητα του σπέρματος εκπίπτει σε πειραματόζωα μετά από πρόκληση κίρσοκλήλης, ακόμη και όταν προκαλείται κίρσοκλήλη μόνο

αριστερά [58]. Σε ποντικούς μετά από χειρουργική πρόκληση κίρσοκλήλης βρέθηκε ότι για τη μείωση της σύνθεσης της τεστοστερόνης ευθύνεται κυρίως η μείωση της δράσης του ενζύμου 17, 20 δεσμολάση [59]. Οι Zorngiotti και MacLeod ανέφεραν ότι άνδρες με κίρσοκλήλη έχουν υψηλότερη ενδορχική θερμοκρασία από ότι η ομάδα ελέγχου [20]. Η πτώση της οσχείκης θερμοκρασίας μετά από χειρουργική διόρθωση της κίρσοκλήλης υποδηλώνει τον αιτιολογικό ρόλο της αυξημένης θερμοκρασίας στην υπογονιμότητα που προκαλείται από την κίρσοκλήλη [19]. Οι Comhaire και Vermeulen βρήκαν ότι ο λόγος της συγκέντρωσης των κατεχολαμινών στις σπερματικές φλέβες προς τη συγκέντρωσή τους στις περιφερικές φλέβες είναι υψηλότερος σε άνδρες με κίρσοκλήλη από ότι είναι στην ομάδα ελέγχου [15]. Η αυξανόμενη υδροστατική πίεση στις έσω σπερματικές φλέβες λόγω παλινδρόμησης από τη νεφρική φλέβα και η προκληθείσα υποξία έχουν προταθεί ως ένας πιθανός μηχανισμός στην παθολογία της κίρσοκλήλης [18]. Έχουν γίνει πρόσφατα μελέτες που εξετάζουν το ρόλο του οξειδωτικού στρες στην ανδρική υπογονιμότητα και οι οποίες έδειξαν ότι οι υπογόνιμοι άνδρες με κίρσοκλήλη έχουν αυξημένα επίπεδα ελευθέρων ριζών οξυγόνου, παραγόμενες από τα σπερματοζωάρια [16, 17]. Αν και η παθογένεση της κίρσοκλήλης παραμένει ανεξήγητη, οι βασικές αλλοιώσεις στον όρχι λόγω κίρσοκλήλης είναι καλά τεκμηριωμένες. Οι επιπτώσεις της κίρσοκλήλης ποικίλλουν, αλλά μπορεί συχνά να επιφέρουν γενικευμένη μείωση της παραγωγής σπερματοζωαρίων, η οποία χαρακτηρίζεται από ανωμαλίες στην ποιότητα του σπέρματος που ποικίλλουν από ολιγοσπερμία μέχρι αζωοσπερμία [23, 24].

Λίγες μόνο μελέτες δείχνουν ότι οι ασθενείς με μη αποφρακτική αζωοσπερμία και ταυτόχρονη παρουσία κίρσοκλήλης, διαπιστωμένης στην κλινική εξέταση, μπορούν να ωφεληθούν από τη θεραπεία της κίρσοκλήλης [24, 60-63]. Η πρώτη μελέτη για τη σημασία της κίρσοκλήλης στην ανδρική υπογονιμότητα ανέφερε την ενδιαφέρουσα περίπτωση αυθόρμητης κύησης μετά τη θεραπεία της κίρσοκλήλης σε αζωοσπερμικό άνδρα [63]. Από τότε, η διόρθωση της κίρσοκλήλης έγινε η πιο συχνή χειρουργική επέμβαση στην αντιμετώπιση της ανδρικής υπογονιμότητας. Οι λίγες δημοσιευμένες μελέτες για αζωοσπερμικούς άνδρες αναφέρουν βελτίωση των παραμέτρων σπέρματος σε πάνω από το 50% των περιπτώσεων καθώς και περιπτώσεις αυθόρμητων κύσεων μετά από μικροχειρουργική βουβωνική διόρθωση κίρσοκλήλης [24, 60-63]. Μία μελέτη 28 ασθενών [62] και μια άλλη 10 ασθενών [60] έδειξαν ότι η ορχική ιστοπαθολογία ήταν ο πιο σημαντικός προγνωστικός παράγοντας. Διαπιστώθηκε ότι στους ασθενείς με απλασία γεννητικών κυττάρων και παύση της ωρίμανσης στο στάδιο του σπερματοκύτταρου δεν προέκυψε βελτίωση της ποιότητας του σπέρματος. Ωστόσο, στο 50% των αζωοσπερμικών ανδρών με παύση της ωρίμανσης στο στάδιο της σπερματίδας και στο 55, 6% των αζωοσπερμικών με υποσπερματογένεση μετεγχειρητικά επιτεύχθηκε βελτίωση της ποιότητας του σπέρματος. Πάντως παρά τη μετεγχειρητική βελτίωση των σπερματικών παραμέτρων, πιθανόν να χρειαστεί στην πλειονότητα των περιπτώσεων η εφαρμογή κάποιας τεχνικής υποβοηθούμενης γονιμοποίησης, για επίτευξη κύησης [21, 53, 64]. Ένα στοιχείο μείζονος σημασίας είναι ότι το σημαντικό ποσοστό του 71,4% των ασθενών με αζωοσπερμία και κίρσοκλήλη, οι οποίοι 6 μήνες μετά από διόρθωση της κίρσοκλήλης έδειξαν βελτίωση της ποιότητας του σπέρματός τους, επανήλθε στην πρότερη κατάσταση αζωοσπερμίας 12 μήνες μετά το

χειρουργείο [21]. Κατά συνέπεια, με όποιους μηχανισμούς κι αν αύξησε η διόρθωση της κισσοκήλης τη σπερματογένεση, αυτοί δε φάνηκαν ικανοί να διατηρήσουν αυτή την αύξηση για μεγάλο χρονικό διάστημα. Αυτό το ανησυχητικό δεδομένο υποδεικνύει ότι η κατάψυξη σπέρματος πρέπει να γίνεται αμέσως μόλις εμφανιστούν σπερματοζωάρια στο σπέρμα του ασθενούς [65]. Σε κάθε περίπτωση η αζωοσπερμία σε συνδυασμό με μία κλινικά σημαντική κισσοκήλη αποτελεί πολύ άσχημο προγνωστικό παράγοντα για αυτόματη σύλληψη μετά τη διόρθωση της κισσοκήλης [21]. Επομένως σε αυτές τις περιπτώσεις συστήνεται λήψη βιοψίας ορχικού ιστού από τον ετερόπλευρο όρχι με σκοπό την ανεύρεση και κρυοσυντήρηση σπερματοζωαρίων. Εναλλακτικά, η διόρθωση της κισσοκήλης θα μπορούσε να παρακαμφτεί και ο ασθενής να υποβληθεί μόνο σε βιοψία όρχι, ιδιαίτερα όταν συντρέχουν και άλλοι λόγοι όπως μικρό μέγεθος όρχεων (4-6 ml ή και λιγότερο), όρχεις μαλακής σύστασης, αυξημένα επίπεδα γοναδοτροπινών, ηλικία συντρόφου που υπερβαίνει τα 37 έτη κ.λ.π. Η βιοψία του όρχι, ανοιχτή ή με τη χρήση μικροσκοπίου, θα μπορούσε σε αυτές τις περιπτώσεις να προσφέρει άμεση λύση στο θέμα της υπογονιμότητας του ασθενή ή/και ζευγαριού παρέχοντας γενετικό υλικό ικανό για την εφαρμογή αρκετών κύκλων ICSI.

6. ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΑΩΡΩΝ ΓΑΜΕΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Τα αγόρια στην προεφηβική ηλικία δεν μπορούν να δώσουν σπέρμα για κατάψυξη. Επομένως, μία εναλλακτική λύση για να διασφαλίσουν τη γονιμότητα τους είναι η κατάψυξη ορχικού ιστού με σκοπό κάποια στιγμή στο μέλλον να αναπτυχθούν οι κατάλληλες τεχνικές που θα το επιτρέψουν [66]. Στον πίνακα 3 αναφέρονται οι κυριότερες ενδείξεις για κρυοσυντήρηση άωρων σπερματικών κυττάρων σε περιπτώσεις κακοήθειας ή μη-κακοήθων νόσων. Είναι πάντως σημαντικό να τονιστεί σε αυτό το σημείο ότι όλες οι τεχνικές που έχουν εφαρμοστεί μέχρι τώρα είναι καθαρά πειραματικές. Καθώς ο προεφηβικός ορχικός ιστός περιλαμβάνει αρχέγονα σπερματικά κύτταρα, από τα οποία τελικά προκύπτουν απλοειδή σπερματοζωάρια, τα αρχέγονα αυτά κύτταρα μπορούν να φανούν μελλοντικά πολύ χρήσιμα και μπορούν να κρυοσυντηρηθούν σαν κυτταρικό εναιώρημα [67] ή με τη μορφή ιστού [68-70]. Εξάλλου είναι σημαντικό να γνωρίζουμε κανείς ότι το 20 % των αγοριών που βρίσκονται σε στάδιο II της κλίμακας Tanner έχουν ήδη ξεκινήσει την οστεριόγνωση [71] και επομένως θα είναι δυνατή η ανεύρεση και κατάψυξη σπερματοζωαρίων.

ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑΣ

Οι άνδρες μπορούν να καταψύξουν σπερματοζωάρια προκειμένου να προχωρήσουν σε σπερματέγχυση, IVF ή ICSI, σε περιπτώσεις ολιγοσπερμίας, περιστάσιαστικής παρουσίας κινούμενων σπερματοζωαρίων στο σπέρμα ή μερικώς επιτυχημένη θεραπεία υπογονιμότητας, όπως χειρουργική διόρθωση αποφρακτικής αζωοσπερμίας ή ορμονική θεραπεία για υπογοναδοτροπικό υπογοναδισμό. Σε ειδικές περιπτώσεις, όπως υποβοηθούμενη εκσπερμάτιση σε ασπερμία, τα σπερματοζωάρια μπορούν να ληφθούν από τα ούρα μετά από παλινδρόμη εκσπερμάτιση ή να συλλεχθούν χειρουργικά [βιοψία όρχι (TESE) ή μικροχειρουργική αναρρόφηση από την επιδιδυμίδα (MESA)]. Χρησιμοποιείται σπάνια σε ασθενείς που αδυνατούν να δώσουν φρέσκο σπέρμα την ημέρα της θεραπευτικής διαδικασίας.

1. ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗ ΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ

Η κρυοσυντήρηση των χειρουργικά συλλεχθέντων σπερματοζωαρίων, για χρήση σε τεχνικές υποβοηθούμενης γονιμοποίησης, έχει γίνει σημαντική στις μέρες μας. Οι τεχνικές MESA και TESE έχουν γίνει επεμβάσεις ρουτίνας σε κέντρα αναπαραγωγής, σε περιπτώσεις διορθώσιμης και μη-διορθώσιμης απόφραξης και πρωτογενούς ορχικής ανεπάρκειας (μη αποφρακτική αζωοσπερμία) [25]. Οι πληροφορίες για την ποιότητα των κρυοσυντηρημένων σπερματικών δειγμάτων για υποβοηθούμενη γονιμοποίηση είναι ποικίλες. Καμία πληροφορία από συστηματικές μελέτες δεν είναι ακόμα διαθέσιμη για τον αριθμό των θεραπευτικών κύκλων, τις μεθόδους της γυναικολογικής θεραπείας και τον συνολικό αριθμό των θεραπευμένων ανδρολογικών ασθενών [25].

Ταυτόχρονα με την περαιτέρω εξέλιξη των τεχνικών της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (σπερματέγχυση, IVF, ICSI), αυξήθηκαν οι πιθανότητες πρόκλησης εγκυμοσύνης χάρη της βελτίωσης της ποιότητας του σπέρματος, λόγω των καλύτερων τεχνικών κατάψυξης που οδηγεί σε βελτιωμένη σπερματική λειτουργία. Κατά συνέπεια τα «ελάχιστα κριτήρια» για σπερματοζωάρια υποψήφια για κρυοσυντήρηση (π.χ. κινητικότητα μετά από απόψυξη 10% τουλάχιστον, συγκέντρωση σπέρματος $>10 \times 10^6$ /ml) [25] τα οποία ήταν γενικώς αποδεκτά αρκετά χρόνια πριν, έχουν καταστεί πλέον ξεπερασμένα όταν πρόκειται να εφαρμοστεί ICSI [25].

2. ΔΕΙΓΜΑΤΑ MESA ΚΑΙ TESE, ΣΥΜΠΕΡΙΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΗΣ ONCO-TESE

Στα πλαίσια της μικροχειρουργικής στην ανδρική υπογονιμότητα, η MESA προσφέρει τη δυνατότητα λήψης σπερματοζωαρίων από ασθενείς με αποφρακτική αζωοσπερμία, οι οποίοι δεν μπορούν να θεραπευτούν επιτυχώς με επαναδιορθωτική μικροχειρουργική. Σε αυτή τη θεραπευτική κατηγορία ανήκουν ασθενείς με μεταλοιμώδη αποφρακτική αζωοσπερμία, καθώς κι αυτοί με συγγενή αμφωτερόπλευρη αγενεσία των σπερματικών πόρων ή ανωμαλίες των επιδιδυμίδων [72]. Σπερματοζωάρια που λήφθηκαν με αναρρόφηση και που δε χρησιμοποιούνται για θεραπεία γονιμότητας μπορούν να κρυοσυντηρηθούν και να χρησιμοποιηθούν για μελλοντικούς θεραπευτικούς κύκλους υποβοηθούμενης γονιμοποίησης. Η εμπειρία σχετικά με την ποιότητα αυτών των κρυοσυντηρημένων δειγμάτων έδειξε ότι η θεραπεία με ICSI μπορεί να εκτελεστεί επιτυχώς με φρέσκα καθώς και με κρυοσυντηρημένα, επιδιδυμικά σπερματοζωάρια. Ωστόσο, είναι γνωστό ότι η κινητικότητα μετά από απόψυξη των επιδιδυμικών σπερματοζωαρίων και τα ποσοστά εγκυμοσύνης είναι χαμηλότερα συγκρινόμενα με αυτά της θεραπείας με ICSI με φρέσκα σπερματοζωάρια [73].

Επίσης μπορούν να καταψυχθούν ορχικά σπερματοζωάρια από ασθενείς με ολιγοασθενόσπερμία ή υπεργοναδοτροπική αζωοσπερμία και ορχική δυσλειτουργία εξαιτίας εστιακού συνδρόμου Sertoli cell-only ή ατελούς σπερματογένεσης. Γι' αυτό, βιοψία όρχι χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με ICSI [74, 75] και θα πρέπει να προτείνεται στους ασθενείς η δυνατότητα κρυοσυντήρησης ορχικού ιστού για μελλοντική προετοιμασία και χρήση σε θεραπευτικούς κύκλους. Η εμπειρία των τελευταίων ετών έδειξε ότι η TESE μόνη της ή με κρυοσυντηρημένο ορχικό ιστό, είναι μία αποτελεσματική θεραπευτική επιλογή σε αζωοσπερμικούς άνδρες. Γενικά, σε ένα ποσοστό

της τάξης του 70% των αζωοσπερμικών ανδρών, τα σπερματοζωάρια μπορούν να ληφθούν από ορχικό ιστό [76]. Ωστόσο τα ποσοστά κύησης ποικίλλουν από 10% μέχρι 30% ανάλογα με το κέντρο και κυρίως τη σπερματογενετική ικανότητα [77]. Οι πιθανότητες γονιμοποίησης και κύησης με ορχικά σπερματοζωάρια είναι πολύ υψηλότερες σε σχέση με εκείνες από σπερματοζωάρια που ανευρίσκονται στο ίζημα σπέρματος μετά από φυγοκέντρηση [73]. Συγκρίνοντας τις διάφορες τεχνικές απόκτησης σπερματοζωαρίων σε άνδρες με αποφρακτική αζωοσπερμία, συνάγεται ότι η παρακέντηση δεν επιτρέπει κανένα έλεγχο του σημείου της παρακέντησης και επιπλέον ότι η διαδερμική αναρρόφηση σπερματοζωαρίων διά μέσω βελόνης είναι θετική μόνο στο 61% των περιπτώσεων [25]. Με τις χειρουργικές τεχνικές MESA ή TESE, τα ποσοστά ανάκτησης σπερματοζωαρίων είναι 93% και 100% αντίστοιχα [25]. Το υλικό που συλλέγεται με τεχνική MESA κατά τη διάρκεια μίας επέμβασης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για συνολικά επτά κύκλους ICSI, αν χρειαστεί. Επιπλέον, ο τραυματισμός από τη βελόνη παρακέντησης είναι χειρότερος από αυτόν που προκαλείται από ανοιχτή βιοψία όρχι [78]. Ειδικά σε άνδρες με σοβαρό πρόβλημα υπογονιμότητας, και συγκεκριμένα με μη αποφρακτική αζωοσπερμία, η ανοιχτή βιοψία όρχι έχει καλύτερα ποσοστά ανάκτησης σπερματοζωαρίων συγκριτικά με την αναρρόφηση με βελόνη. Σε 452 αζωοσπερμικούς άνδρες, σε 63 συνολικά ήταν θετική η ανεύρεση σπερματοζωαρίων με MESA (14%), ενώ με TESE ήταν θετική σε 228 άνδρες (50%) [77, 79]. Μένει να διασαφηνιστεί με περαιτέρω μελέτες εάν επιτυγχάνεται περαιτέρω βελτίωση των κρυσυντηρημένων σπερματοζωαρίων με τη μικροχειρουργική μέθοδο TESE [80]. Επιπλέον, η ιστολογική μελέτη του ορχικού ιστού είναι σημαντική σε υπεργοναδοτροπικούς υπογονίμους άνδρες, οι οποίοι έχουν μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης TIN (testicular intraepithelial neoplasia) ή όγκου όρχεων από ότι οι υγιείς άνδρες. Επιπρόσθετα, η onco-TESE μπορεί να παίξει σημαντικό ρόλο σε ασθενείς με ετερόπλευρο ή αμφοτερόπλευρο όγκο όρχεων και αζωοσπερμία μετά από χημειοθεραπεία, χωρίς προηγούμενης να έχει καταψυχθεί επαρκές υλικό [25]. Αυτή η βαριά πάσχουσα υποκατηγορία ογκολογικών ασθενών χρήζει ειδικής προσοχής. Αμφοτερόπλευρος όγκος όρχεων (ταυτόχρονος ή ετερόχρονος) μπορεί να προκύψει στο 2-3% των ασθενών με ορχικό όγκο και ετερόπλευρο TIN σε ένα άλλο 5% αυτών [25]. Εφόσον η ανάλυση σπέρματος αποκαλύψει αζωοσπερμία, η εξαίρεση όγκου ή η ορχεκτομή σε ανήλικους πρέπει να συνδυάζεται με TESE για κρυσυντήρηση σε εξειδικευμένα κέντρα. Σε μακροχρόνια επιβιώσαντες ογκολογικούς ασθενείς που αποδεικνύονται αζωοσπερμικοί, μπορεί να γίνει βιοψία όρχεως για διάγνωση και TESE για εξασφάλιση πιθανοτήτων γονιμοποίησης [81].

3. ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΑΔΥΝΑΜΙΑ ΕΚΣΠΕΡΜΑΤΙΣΗΣ

Μια μικρότερη ομάδα ασθενών είναι αυτή με βλάβες σπονδυλικής στήλης. Πάνω από το 95% αυτών των ανδρών χάνουν την ικανότητα εκσπερμάτισης. Σε αυτές τις περιπτώσεις η εκσπερμάτιση μπορεί να προκληθεί με ηλεκτρική δόνηση ή με ηλεκτροδιέγερση από το ορθό και το σπέρμα να χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για υποβοηθούμενη γονιμοποίηση [50]. Η πείκη ηλεκτροδιέγερση είναι μία πιο απλή τεχνική από την ορθική ηλεκτροδιέγερση, η οποία είναι πολύπλοκη, άβολη και εξαρτάται από τη στενή συνεργασία ασθενούς και γιατρού. Και σ' αυτή την περίπτωση, η κρυσυντήρηση προσφέρει το πλεονέκτημα της συλλογής δειγμάτων σπέρματος για περαιτέρω χρήση σε θεραπείες τεχνητής γονιμοποίησης [82].

4. ΣΠΕΡΜΑ ΔΟΤΗ

Σπέρμα υγιών δοτών, οι οποίοι είναι γνωστό ή υποτίθεται ότι είναι γόνιμοι, μπορεί να καταψυχθεί. Οι δότες μπορεί να επιλεχθούν από κλινικές ή από τράπεζες σπέρματος, διατηρώντας ή μη την ανωνυμία τους. Η χρήση σπερματοζωαρίων από δότες είναι δεκτή σε κάποιες χώρες, αλλά όχι σε άλλες. Όπου είναι αποδεκτή, υπάρχουν σχετικές οδηγίες διαλογής και ελέγχου των δοτών. Ωστόσο, η νομοθεσία ποικίλλει από χώρα σε χώρα [25]. Για παράδειγμα, η ανωνυμία των δοτών απαιτείται σε κάποιες χώρες, ενώ σε άλλες τα παιδιά μπορούν να ενημερωθούν το όνομα του δότη, όταν φτάσουν στην καθορισμένη από την εκάστοτε νομοθεσία ηλικία [25]. Η χρήση κατεψυγμένου σπέρματος δότη για υποβοηθούμενη γονιμοποίηση γίνεται σε διάφορες χώρες και εξαρτάται από την κατά τόπους νομοθεσία [83].

Τα σπερματοζωάρια δότη μπορούν να χρησιμοποιηθούν για IUI, IVF ή ICSI, όταν ο υπογόνιμος άνδρας δεν έχει ζωντανά σπερματοζωάρια ή επιμικυμένες σπερματίδες κατάλληλες για ICSI, ή όπου η θεραπεία έχει αποτύχει ή έχει υψηλό κόστος. Άλλες περιπτώσεις όπου χρησιμοποιούνται σπερματοζωάρια δότη είναι οι καθ' έξη αποβολές, καθώς και περιπτώσεις ελεύθερων ή ομοφυλόφιλων γυναικών, που επιθυμούν να κυοφορήσουν [25].

5. ΚΑΤΑΨΥΞΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΕΝΑΙΩΡΗΜΑΤΟΣ ΣΠΕΡΜΑΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Τα κυτταρικά εναιωρήματα σπερματικών κυττάρων αναπτύχθηκαν προκειμένου να διευκολυνθεί η κατάψυξη του καθώς η ετερογένεια των κυττάρων σε ένα κομμάτι ιστού καθιστά πιο πολύπλοκες τις απαιτήσεις για κατάψυξη και συντήρησή του. Για την παρασκευή εναιωρήματος κυττάρων απαιτούνται τεχνικές μηχανικής διάσπασης και ενζυμικής πέψης του ορχικού ιστού που αφενός μειώνουν το ποσοστό επιβίωσης των σπερματικών κυττάρων [67] και αφετέρου καταστρέφουν την επαφή και άρα και την κυτταρική αλληλεπίδραση κυττάρου προς κύτταρο η οποία είναι απαραίτητη για τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των σπερματικών κυττάρων [84]. Σε πειραματικά μοντέλα ζώων έχει φανεί ότι το ποσοστό επιβίωσης κυττάρων μετά από απόψυξη κυμαίνεται από 29-82% [85] ενώ στο άνθρωπο φτάνει στο 60% ανεξαρτήτως του κρυσποφυλακτικού παράγοντα που χρησιμοποιείται [67, 86].

6. ΚΑΤΑΨΥΞΗ ΙΣΤΟΤΕΜΑΧΙΩΝ ΟΡΧΙΚΟΥ ΙΣΤΟΥ

Η κρυσυντήρηση ορχικού ιστού αποτελεί μία εναλλακτική μέθοδο που επιτρέπει τη διατήρηση των κυτταρικών δεσμών μεταξύ των γενετικών κυττάρων και των κυττάρων Sertoli και επομένως διατηρεί την μεταξύ τους αλληλεπίδραση που είναι απαραίτητη για την επιβίωση των άωρων σπερματικών κυττάρων μέσα στον ορχικό ιστό και την επακόλουθη ωρίμανση-διαφοροποίηση τους [87]. Ένα ακόμη πλεονέκτημα της μεθόδου κατάψυξης ορχικού ιστού είναι η διατήρηση των κυττάρων Sertoli, καθώς υπάρχουν ενδείξεις ότι η χημειοθεραπεία οδηγεί τα εν λόγω κύτταρα σε πρότερο στάδιο διαφοροποίησης και επομένως λιγότερο ικανά να στηρίξουν την σπερματογένεση μετά τη χημειοθεραπευτική αγωγή [88]. Επίσης τα βασικά κύτταρα του διάμεσου ιστού, δηλαδή τα κύτταρα Leydig, επίσης διασώζονται με την τεχνική της κατάψυξης ορχικού ιστού το οποίο είναι επίσης πολύ σημαντικό, καθώς τα κύτταρα Leydig πρωτοστατούν στην επανάκτηση και διατήρηση της ορμονικής ισορροπίας που μπορεί να προκαλέσει μία κυτταροτοξική θεραπεία [89].

7. ΚΑΤΑΨΥΞΗ ΟΛΟΚΛΗΡΟΥ ΤΟΥ ΟΡΓΑΝΟΥ

Δεδομένης της μικρής ποσότητας που μπορεί να παρθεί κατά την βιοψία του όρχη και δεδομένου του μικρού μεγέθους που έχει ο όρχης στην παιδική ηλικία, η κρυοσυντήρηση ολόκληρου του οργάνου μπορεί να θεωρηθεί μία πιο κατάλληλη θεραπευτική προσέγγιση με την προοπτική της αυτόλογης μεταμόσχευσης οργάνου σε δεύτερο χρόνο [70]. Σε κάθε περίπτωση η τεχνική για την κρυοσυντήρηση ολόκληρου του οργάνου πρέπει ακόμα να εξελιχθούν περαιτέρω προκειμένου να γίνουν περισσότερο ασφαλείς για το όργανο όπως αυτό έχει ήδη πραγματοποιηθεί για την περίπτωση κατάψυξης ολόκληρων ωοθηκών [90, 91].

8. ΑΝΑΚΤΗΣΗ ΤΗΣ ΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑΣ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΑΔΡΟΥ ΟΡΧΙΚΟΥ ΙΣΤΟΥ

Νεότερα δεδομένα από πειραματικές μελέτες που αφορούν στην κατάψυξη διπλοειδών σπερματικών κυττάρων δίνουν ελπίδα σε υπογόνιμα αγόρια προεφηβικής ηλικίας τα οποία δεν έχουν ακόμα εξελίξει απλοειδή γενετικά κύτταρα στον ορχικό ιστό τους. Μέχρι σήμερα έχουν δοκιμαστεί τρεις διαφορετικές θεραπευτικές προσεγγίσεις [70]:

- Μεταμόσχευση καθαρών διαλυμάτων σπερματικών κυττάρων πίσω στους όρχεις από όπου πάρθηκε αρχικά το ιστοεμάχιο.
- Αυτόλογη μεταμόσχευση ορχικού ιστού ή ολόκληρου του οργάνου.
- Ωρίμανση γενετικών κυττάρων στο εργαστήριο (in vitro maturation ή IVM) μέχρι ενός σταδίου που να είναι συμβατά με τη χρήση τους σε τεχνικές μικρογονιμοποίησης (ICSI).

Καμία από τις παραπάνω θεραπευτικές προσεγγίσεις δεν έχει ακόμα χαρακτηριστεί ως αρκετά ασφαλής και αποδοτική ώστε να αρχίσει να χρησιμοποιείται στην κλινική πράξη [70].

8.1. Μεταμόσχευση ορχικών σπερματικών κυττάρων

Με την τεχνική αυτή η σπερματογένεση ξαναρχίζει μετά από μεταμόσχευση απομονωμένων αρχέγονων ορχικών κυττάρων σε όρχεις οι οποίοι δεν περιέχουν καθόλου γενετικά κύτταρα. Τα αρχέγονα σπερματικά κύτταρα αναγνωρίζονται από τα κύτταρα Sertoli και μετατοπίζονται από τον αυλό των σπερματικών σωληναρίων προς τη βασική μεμβράνη του σπερματικού επιθηλίου. Επειδή τα αρχέγονα σπερματικά κύτταρα έχουν απεριόριστες δυνατότητες αναπαραγωγής και διαφοροποίησης σε επόμενες σπερματικές σειρές η μεταμόσχευση αρχέγονων σπερματικών κυττάρων προσφέρει θεωρητικά τη δυνατότητα μίας μακροπρόθεσμης ανάκτησης της φυσιολογικής γονιμότητας του άνδρα.

Η τεχνική περιγράφηκε για πρώτη φορά από τους Brinster και Zimmermann το 1994 όταν διαπίστωσαν σε πειραματικό μοντέλο ποντικού ότι η μεταμόσχευση αρχέγονων σπερματικών κυττάρων οδήγησε σε παραγωγή σπερματικών κυττάρων μετά τη μεταμόσχευση [92]. Στην παραπάνω μελέτη, σπερματικά κύτταρα που απομονώθηκαν από όρχεις ποντικών προεφηβικής ηλικίας, εγχύθηκαν στα σπερματικά σωληναρία ενήλικων ποντικών με Sertoli-cell-only σύνδρομο, το οποίο είχε προκληθεί μετά από θεραπεία με μπουσουλόφάνη [92]. Αρχισε και διατηρήθηκε φυσιολογική σπερματογένεση των δοτών, η οποία χαρακτηρίζεται από την ανάπτυξη γεννητικών κυττάρων που φέρουν το γονίδιο lacZ, που κωδικοποιεί για τη β-γαλακτοσιδάση. Παρόλο που η τεχνική αυτή αποδείχθηκε επιτυχής σε

πειραματικό επίπεδο, με την παραγωγή απλοειδών κυττάρων [93], δεν έχει αποδειχθεί ακόμη το ίδιο επιτυχές σε ανθρώπους [70].

8.2. Μεταμόσχευση ορχικού ιστού

Η μεταμόσχευση ορχικού ιστού περιλαμβάνει μεταμόσχευση αρχέγονων σπερματικών κυττάρων σε αέριο κομμάτι ορχικού ιστού και επομένως στο αρχικό τους μικρο-περιβάλλον. Διαθέσιμα στοιχεία υπάρχουν μόνο μετά από παρατηρήσεις σε πειραματόζωα, μιας και δεν έχει ακόμη αναφερθεί μεταμόσχευση ορχικού ιστού σε άνθρωπο. Έως τώρα, απλοειδικά σπερματικά κύτταρα που απομονώθηκαν από όρχι ποντικού, στον οποίο είχε μεταμοσχευθεί ορχικός ιστός άλλου ποντικού, και από όρχι κονίκλου, στον οποίο είχε μεταμοσχευθεί ορχικός ιστός άλλου ζώου, έχουν χρησιμοποιηθεί σε ICSI [94-96]. Σπερματοζωάρια πιθήκων ράτσας rhesus που πάρθηκαν από όρχεις ξενιστών ποντικών αποδείχθηκαν ικανά προς γονιμοποίηση, επιτυγχάνοντας ποσοστά ανάπτυξης εμβρύων in vitro παρόμοια με αυτά των σπερματοζωαρίων πιθήκων rhesus, που πάρθηκαν από τους όρχεις των ίδιων των πιθήκων [97]. Βάσει αυτών των ενθαρρυντικών αποτελεσμάτων σε πειραματικό επίπεδο, είμαστε αισιόδοξοι ότι στο κοντινό μέλλον θα είναι πιθανή η αυτόλογη μεταμόσχευση κατεψυγμένου ορχικού ιστού ασθενών που πιθανό να εμφανίσουν υπογονιμότητα, μετά από επιβλαβείς θεραπείες, διαφυλάττοντας έτσι την ικανότητά τους για γονιμοποίηση.

8.3. IVM γεννητικών κυττάρων

Η in vitro ωρίμανση αρχέγονων γεννητικών κυττάρων, τα οποία οδηγούν σε ανάπτυξη απλοειδών γαμετών διαθέσιμων για ICSI, παρακάμπτει τον κίνδυνο επανεισαγωγής κακόθων κυττάρων, καθιστώντας δυνητικά αυτή τη διαδικασία πολύ χρήσιμη σε ογκολογικούς ασθενείς. Οι προσπάθειες έχουν εστιαστεί στη δημιουργία in vitro ευνοϊκών συστημάτων κυτταροκαλλιέργειας, έτσι ώστε να επιτευχθεί η ολοκλήρωση της μείωσης των γεννητικών κυττάρων και η επιμήκυνση των σπερματίδων σε πειραματικές συνθήκες. Πρώωρες μελέτες της in vitro μείωσης έγιναν από τον Staub [98].

Μέχρι τώρα, και παρά τις αρκετές ελπιδοφόρες μελέτες σε πειραματόζωα, δεν έχει καταστεί εφικτή η δημιουργία ενός συστήματος κυτταρικής καλλιέργειας, που να υποστηρίζει πλήρη in vitro σπερματογένεση από σπερματογόνια [99, 100]. Η μελέτη του Feng et al. [99] είναι αξιοσημείωτη, μιας και οι συγκεκριμένοι ερευνητές ανέπτυξαν σπερματοκύτταρα και σπερματίδες in vitro από αρχέγονα σπερματικά κύτταρα ποντικού με γονοτυπικά και φαινοτυπικά χαρακτηριστικά σπερματογονίων τύπου A, χρησιμοποιώντας ειδικές αθάνατες κυτταρικές σειρές (telomerase-immortalized cell lines) σε απουσία κυττάρων στήριξης.

ΘΕΜΑΤΑ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ

1. ΕΠΙΜΟΛΥΝΣΗ ΜΕ ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Το πιο σημαντικό σημείο κατά την μεταμόσχευση σπερματογονίων είναι ο κίνδυνος επανεισαγωγής καρκινικών κυττάρων. Πράγματι, η πλειονότητα των παιδιατρικών κακοηθειών μεθίστανται διαμέσου του αίματος, ελλοχεύοντας υψηλό κίνδυνο επιμόλυνσης των όρχεων με καρκινικά κύτταρα. Ο κίνδυνος είναι μεγαλύτερος στους αιματολογικούς καρκίνους, όπου οι όρχεις μπορούν να προσφέρουν ανοσολογικό καταφύγιο στα λευχαιμικά κύτταρα. Πράγματι, έχει ήδη αποδειχθεί ότι η εισαγωγή έστω και 20 λευχαιμικών κυττάρων στον όρχη μπορεί να

προκαλέσει υποτροπή της νόσου [101]. Γι' αυτό η απομόνωση των γεννητικών κυττάρων και οι τεχνικές κατανομής κυττάρων που επιτρέπουν την ολοκληρωτική διαλογή των αρχέγονων σπερματικών κυττάρων χρειάζεται να επακτιμωθεί, πριν τη διενέργεια μιας ασφαλούς μεταμόσχευσης. Ενώ οι μέθοδοι κατανομής κυττάρων είχαν πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα σε πειραματικά μοντέλα [102], δε συνέβη το ίδιο με ανθρώπους [103, 104]. Η επιμόλυνση με καρκινικά κύτταρα είναι ένα σημείο μείζονος σημασίας και στην αυτόλογη μεταμόσχευση ιστών. Εφόσον έχει αναφερθεί αφενός ότι τα λευχαιμικά κύτταρα μπορούν να επιβιώσουν μετά από κρυοσυντήρηση/μεταμόσχευση σε άλλο είδος (ξενομεταμόσχευση) και να αυξήσουν την επίπτωση γενικευμένης λευχαιμίας σε ποντικούς που στερούνται T- λεμφοκυττάρων (nude mouse host) [105], και αφετέρου ότι βλάβη στον ορχικό ιστό ή διαταραχή του αγγειακού φραγμού σε κατεψυγμένο ιστό μπορεί να ευνοήσει την αιματογενή διασπορά επιζώντων καρκινικών κυττάρων στα μοσχεύματα, η αυτόλογη μεταμόσχευση ορχικού ιστού, μετά από θεραπεία, προτείνεται σε ασθενείς που δε διατρέχουν κίνδυνο ορχικής μετάστασης ή σε αυτούς που υποβλήθηκαν σε γοναδοτοξικές θεραπείες για μη κακοήγη νοσήματα.

2. ΜΕΤΑΔΟΣΗ ΛΟΙΜΩΔΩΝ ΝΟΣΗΜΑΤΩΝ

Εξαιτίας του κινδύνου μετάδοσης λοιμωδών νοσημάτων από ζώα σε ανθρώπους [106], η ορχική ξενομεταμόσχευση δεν προτείνεται για αναπαραγωγικούς σκοπούς, προς το παρόν.

3. ΚΙΝΔΥΝΟΣ ΣΥΓΓΕΝΩΝ ΑΝΩΜΑΛΙΩΝ

Οι Goossens et al. [107] πρόσφατα ανέφεραν μικρότερο αριθμό εμβρύων, σημαντικά μικρότερο βάρος εμβρύου και μειωμένο μήκος στην πρώτη γενιά ποντικών μετά από μεταμόσχευση γεννητικών κυττάρων, υποδηλώνοντας ανωμαλίες τύπου imprinting [108], δηλαδή αυτές όπου ένα αλληλίο σε ένα συγκεκριμένο σημείο του DNA αλλοιώνεται ή απενεργοποιείται ανάλογα από το αν κληρονομείται από τη μητέρα ή τον πατέρα. Απαιτούνται επομένως επιπλέον έρευνες για να διασαφηνιστούν οι υποκείμενοι παράγοντες, έτσι ώστε η αυτόλογη μεταμόσχευση να μπορεί να εφαρμοστεί με ασφάλεια στην κλινική πράξη. Εκτός από αυτή τη μελέτη, πολύ λίγες πληροφορίες είναι διαθέσιμες για τις πιθανές συγγενείς ανωμαλίες μετά από τεχνικές ανάκτησης γονιμότητας και οι οποίες κυρίως επικεντρώνεται σε IVM διπλοειδικών γαμετών.

Χρωμοσωμικές ανωμαλίες βρέθηκαν σε έμβρυα, που προήλθαν από ανεπτυγμένα in vitro απλοειδικά γεννητικά κύτταρα, τα οποία προέκυψαν από διπλοειδικά γεννητικά κύτταρα. Αυτές οι ανωμαλίες μπορούν να αποδοθούν στο γεγονός ότι η ολοκλήρωση της μείωσης ή ένα μέρος της σπερμιόγenezης έγιναν σε συνθήκες in vitro, ενώ και η προέλευση του άωρου ιστού που χρησιμοποιήθηκε (άνδρες με μη αποφρακτική αζωοσπερμία) μπορεί επίσης να έπαιξε το ρόλο της [109]. Επίσης, σημαντική προσοχή πρέπει να δοθεί στη γενετική και επιγενετική κατάσταση των κυττάρων που ωρίμασαν in vitro [110]. Πράγματι, η επιτάχυνση της κυτταροπλασματικής και νουκλεοπρωτεϊνικής ωρίμανσης των γεννητικών κυττάρων, που συμβαίνει σε συνθήκες in vitro, μπορεί να υποσκελίζει τους φυσιολογικούς ενδογενείς ελεγκτικούς μηχανισμούς που συμμετέχουν στη συμπίκνωση του DNA, προκαλώντας έτσι διαταραχή στον επιγενετικό επαναπρογραμματισμό, και έχοντας ως αποτέλεσμα μη φυσιολογικές εκφράσεις γονιδίων, ανώμαλα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά και μειωμένη ικανότητα

του γεννητικού κυττάρου για γονιμοποίηση και φυσιολογική ανάπτυξη του εμβρύου [70].

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η ανάπτυξη στρατηγικών που να αποσκοπούν στη διατήρηση ικανοποιητικής ικανότητας για γονιμοποίηση σε νεαρούς ασθενείς που υποβάλλονται σε γοναδοτοξικές θεραπείες αποτελεί πρόκληση για τον τομέα της αναπαραγωγικής ιατρικής, αλλά κάθε ένας από αυτούς τους ασθενείς θα πρέπει να έχει τη δυνατότητα να γνωρίζει όλες τις τεχνικές που διατηρούν τη γονιμότητα, επειδή οι επιβλαβείς επιπτώσεις αυτών των θεραπειών στην ορχική λειτουργία παραμένουν απρόβλεπτες. Ο ορμονικός ή κυτταροπροστατευτικός φαρμακευτικός χειρισμός που αποσκοπεί στην αυθόρμητη ανάκτηση της σπερματογένεσης παραμένει υπό διερεύνηση και μένει να αναπτυχθεί περαιτέρω μελλοντικά. Η διατήρηση των αρχέγονων γεννητικών κυττάρων προσφέρει αρκετές πραγματοποιήσιμες εναλλακτικές εφαρμογές, αν και όλες παραμένουν ακόμη σε πειραματικό επίπεδο. Οι μελλοντικές εξελίξεις στην τεχνολογία της διατήρησης της γονιμότητας βασίζονται στην καλύτερη κατανόηση της κρυοβιολογίας του ορχικού ιστού.

Η σωστή επιλογή ασθενών είναι σημαντική πριν από την εφαρμογή κάποιας θεραπευτικής προσέγγισης της ανδρικής υπογονιμότητας, κι αυτό επειδή οι κίνδυνοι ποικίλλουν ανάλογα με την ασθένεια. Η έρευνα τα επόμενα χρόνια θα πρέπει να εστιάσει στον τρόπο αναγωγής των πειραματικών δεδομένων σε νεαρούς ασθενείς και στην εξεύρεση του ιδανικού μικρο-περιβάλλοντος για την ανάπτυξη των αρχέγονων γεννητικών κυττάρων. Μιας και η επιβίωση και διαφοροποίηση των γεννητικών κυττάρων φαίνεται να απαιτεί καλλιέργειες σωματικών κυττάρων, η κρυοσυντήρηση ορχικού ιστού που περιέχει κύτταρα Sertoli μπορεί να φανεί ιδιαίτερα χρήσιμη, μέσα από το πρίσμα μιας πιθανής επανάκτησης της γονιμότητας μέσω IVM.

Εφόσον η αυξημένη σπερματογένεση, μετά από διόρθωση της κισσοκλήλης, οδηγήσει στην εμφάνιση σπερματοζωαρίων στην ανάλυση σπέρματος, ο ασθενής θα πρέπει να ενημερώνεται για την πιθανότητα υποτροπής σε αζωοσπερμία και να του προσφέρεται η δυνατότητα κατάψυξης των σπερματοζωαρίων. Αζωοσπερμικοί άνδρες με απλασία γεννητικών κυττάρων σε δείγμα βιοψίας ενός μόνο τεμαχίου από έναν αρκετά μεγάλο όρχι μπορεί να έχουν βελτίωση της ποιότητας του σπέρματος μετά από διόρθωση της κισσοκλήλης. Ωστόσο, εξαιτίας του σημαντικού κινδύνου υποτροπής σε αζωοσπερμία μετά από τη βελτίωση της ποιότητας του σπέρματός τους μετεγχειρητικά, οι ασθενείς θα πρέπει να ενημερώνονται για τα πλεονεκτήματα της κατάψυξης σπερματοζωαρίων. Μία π7ρακτική που διασφαλίζει ακόμα πιο πολύ την επιτυχία της θεραπείας της υπογονιμότητας του ασθενή είναι η ταυτόχρονη λήψη βιοψίας από τον ετερόπλευρο όρχι σε ασθενείς με βαριά ολιγοασθενοσπερμία, ενώ όταν συντρέχουν και άλλοι λόγοι που δυσχεραίνουν ακόμα πιο πολύ την επίτευξη αυτόματης κύησης, τότε η διόρθωση της κισσοκλήλης θα πρέπει να αποφεύγεται και ο ασθενής να υποβάλλεται σε βιοψία όρχι με σκοπό την κρυοσυντήρηση ωρίμων σπερματικών κυττάρων για την πραγματοποίηση κύκλων υποβοηθούμενης σύλληψης, όταν αυτό γίνει επιθυμητό.

Αν και η ορχική μεταμόσχευση φαίνεται πολλά υποσχόμενη σε πειραματικά μοντέλα, τεχνικά πιο εύκολη και πιο αποδοτική απ' ό,τι η μεταμόσχευση

αρχέγονων γεννητικών κυττάρων [111], θα πρέπει να εφαρμόζεται σε ασθενείς στους οποίους δεν υφίσταται κίνδυνος επιμόλυνσης του ιστού με καρκινικά κύτταρα. Η πιο ελπιδοφόρα προσέγγιση θα περιλαμβάνει προφανώς ορθότοπη αυτόλογη μεταμόσχευση ώρου ορχικού ιστού ή και ολόκληρων των όρχεων, που ελήφθησαν πριν από την έναρξη της γοναδοτοξικής θεραπείας σε περιπτώσεις καλοηθών παθολογικών καταστάσεων ή, με περισσότερη περίσκεψη, σε περιπτώσεις αιματολογικών καρκίνων που δε μεθίστανται. Πριν από την ανάπτυξη πρωτοκόλλων, ηθικά και επιστημονικά αποδεκτών, θα πρέπει να λυθούν πολυάριθμα τεχνικά ζητήματα, έτσι ώστε η μεθοδολογία για την απόκτηση της γονιμότητας και τη διατήρηση γεννητικού υλικού να γίνει ασφαλής και αποδοτική. Μέχρι τότε, τα δείγματα θα πρέπει να συντηρούνται μετά από λεπτομερή ενημέρωση του ασθενή ότι η επιτυχία δεν είναι εξασφαλισμένη, και την έγγραφη συγκατάθεσή του [112]. Η συντήρηση ορχικού ιστού από ασθενείς σε προεφηβική ηλικία θα τους δώσει τη δυνατότητα επιλογής μεταξύ ποικίλλων εναλλακτικών τεχνικών ανάκτησης της γονιμότητας, οι οποίες θα τελειοποιηθούν τα επόμενα 20-30 χρόνια, δίνοντάς τους την ελπίδα απόκτησης παιδιών με το δικό τους γενετικό υλικό.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Brenner, H., E. Steliarova-Foucher, and V. Arndt, *Up-to-date monitoring of childhood cancer long-term survival in Europe: methodology and application to all forms of cancer combined*. Ann Oncol, 2007. **18**(9): p. 1561-8.
- Magnani, C., et al., *Trends in survival after childhood cancer in Europe, 1978-1997: report from the Automated Childhood Cancer Information System project (ACCIS)*. Eur J Cancer, 2006. **42**(13): p. 1981-2005.
- Steliarova-Foucher, E., et al., *Geographical patterns and time trends of cancer incidence and survival among children and adolescents in Europe since the 1970s (the ACCISproject): an epidemiological study*. Lancet, 2004. **364**(9451): p. 2097-105.
- Stiller, C.A., et al., *Cancer incidence and survival in European adolescents (1978-1997). Report from the Automated Childhood Cancer Information System project*. Eur J Cancer, 2006. **42**(13): p. 2006-18.
- Brougham, M.F., et al., *Male fertility following childhood cancer: current concepts and future therapies*. Asian J Androl, 2003. **5**(4): p. 325-37.
- Howell, S. and S. Shalet, *Gonadal damage from chemotherapy and radiotherapy*. Endocrinol Metab Clin North Am, 1998. **27**(4): p. 927-43.
- Wallace, W.H., R.A. Anderson, and D.S. Irvine, *Fertility preservation for young patients with cancer: who is at risk and what can be offered?* Lancet Oncol, 2005. **6**(4): p. 209-18.
- Bucci, L.R. and M.L. Meistrich, *Effects of busulfan on murine spermatogenesis: cytotoxicity, sterility, sperm abnormalities, and dominant lethal mutations*. Mutat Res, 1987. **176**(2): p. 259-68.
- Kenney, L.B., et al., *High risk of infertility and long term gonadal damage in males treated with high dose cyclophosphamide for sarcoma during childhood*. Cancer, 2001. **91**(3): p. 613-21.
- Mackie, E.J., M. Radford, and S.M. Shalet, *Gonadal function following chemotherapy for childhood Hodgkin's disease*. Med Pediatr Oncol, 1996. **27**(2): p. 74-8.
- Rivkees, S.A. and J.D. Crawford, *The relationship of gonadal activity and chemotherapy-induced gonadal damage*. JAMA, 1988. **259**(14): p. 2123-5.
- Kamal, K.M., K. Jarvi, and A. Zini, *Microsurgical varicocelectomy in the era of assisted reproductive technology: influence of initial semen quality on pregnancy rates*. Fertil Steril, 2001. **75**(5): p. 1013-6.
- Schlesinger, M.H., I.F. Wilets, and H.M. Nagler, *Treatment outcome after varicocelectomy. A critical analysis*. Urol Clin North Am, 1994. **21**(3): p. 517-29.
- Witt, M.A. and L.I. Lipshultz, *Varicocele: a progressive or static lesion?* Urology, 1993. **42**(5): p. 541-3.
- Comhaire, F. and A. Vermeulen, *Varicocele sterility: cortisol and catecholamines*. Fertil Steril, 1974. **25**(1): p. 88-95.
- Hendin, B.N., et al., *Varicocele is associated with elevated spermatozoal reactive oxygen species production and diminished seminal plasma antioxidant capacity*. J Urol, 1999. **161**(6): p. 1831-4.
- Pasqualotto, F.F., et al., *Relationship between oxidative stress, semen characteristics, and clinical diagnosis in men undergoing infertility investigation*. Fertil Steril, 2000. **73**(3): p. 459-64.
- Shafik, A. and G.A. Bedeir, *Venous tension patterns in cord veins. I. In normal and varicocele individuals*. J Urol, 1980. **123**(3): p. 383-5.
- Sofikitis, N., et al., *Surgical repair of secondary right varicocele in rats with primary left varicocele: effects on fertility, testicular temperature, spermatogenesis, and sperm maturation*. Arch Androl, 1992. **28**(1): p. 43-52.
- Zorgniotti, A.W. and J. Macleod, *Studies in temperature, human semen quality, and varicocele*. Fertil Steril, 1973. **24**(11): p. 854-63.
- Pasqualotto, F.F., et al., *Induction of spermatogenesis in azoospermic men after varicocele repair*. Hum Reprod, 2003. **18**(1): p. 108-12.
- Sofikitis, N.V., et al., *Detrimental effect of left varicocele on the reproductive capacity of the early haploid male gamete*. J Urol, 1996. **156**(1): p. 267-70.
- Czaplicki, M., L. Bablok, and Z. Janczewski, *Varicocelectomy in patients with azoospermia*. Arch Androl, 1979. **3**(1): p. 51-5.
- Matthews, G.J., E.D. Matthews, and M. Goldstein, *Induction of spermatogenesis and achievement of pregnancy after microsurgical varicocelectomy in men with azoospermia and severe oligoasthenospermia*. Fertil Steril, 1998. **70**(1): p. 71-5.
- Kliesch, S., et al., *Cryopreservation of Human Spermatozoa*, in *Andrology. Male Reproductive Health and Dysfunction*, E. Nieschlag, H.M. Behre, and S. Nieschlag, Editors. 2010, Springer-Verlag: Berlin Heidelberg. p. 505-520.
- Polge, C., A.U. Smith, and A.S. Parkes, *Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures*. Nature, 1949. **164**(4172): p. 666.
- Sherman, J.K., *Synopsis of the use of frozen human semen since 1964: state of the art of human semen banking*. Fertil Steril, 1973. **24**(5): p. 397-412.

28. Colpi, M.G., et al., *Surgery for male infertility: Surgical sperm retrievals*, in *Clinical Andrology EAU/ESAU Course Guidelines*, L. Bjorndahl, et al., Editors. 2010, Informa UK Ltd: United Kingdom. p. 98-104.
29. Bendel-Stenzel, M., et al., *The origin and migration of primordial germ cells in the mouse*. *Semin Cell Dev Biol*, 1998. **9**(4): p. 393-400.
30. Tilmann, C. and B. Capel, *Cellular and molecular pathways regulating mammalian sex determination*. *Recent Prog Horm Res*, 2002. **57**: p. 1-18.
31. Meachem, S., V. von Schonfeldt, and S. Schlatt, *Spermatogonia: stem cells with a great perspective*. *Reproduction*, 2001. **121**(6): p. 825-34.
32. Meistrich, M.L., *Effects of chemotherapy and radiotherapy on spermatogenesis*. *Eur Urol*, 1993. **23**(1): p. 136-41; discussion 142.
33. Meistrich, M.L., et al., *Restoration of spermatogenesis after exposure to toxicants: genetic implications*. *Adv Exp Med Biol*, 2003. **518**: p. 227-37.
34. Clermont, Y. and C.P. Leblond, *Differentiation and renewal of spermatogonia in the monkey, Macacus rhesus*. *Am J Anat*, 1959. **104**: p. 237-73.
35. Clermont, Y., *Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal*. *Physiol Rev*, 1972. **52**(1): p. 198-236.
36. van Alphen, M.M., H.J. van de Kant, and D.G. de Rooij, *Depletion of the spermatogonia from the seminiferous epithelium of the rhesus monkey after X irradiation*. *Radiat Res*, 1988. **113**(3): p. 473-86.
37. Ash, P., *The influence of radiation on fertility in man*. *Br J Radiol*, 1980. **53**(628): p. 271-8.
38. de Rooij, D.G., et al., *Long-term effects of irradiation before adulthood on reproductive function in the male rhesus monkey*. *Biol Reprod*, 2002. **66**(2): p. 486-94.
39. Trottmann, M., et al., *Semen quality in men with malignant diseases before and after therapy and the role of cryopreservation*. *Eur Urol*, 2007. **52**(2): p. 355-67.
40. Leibo, S.P., H.M. Picton, and R.G. Gosden, *Cryopreservation of human spermatozoa*, in *Current practices and controversies in assisted reproduction*, E. Vayena, P.J. Rowe, and P.D. Griffin, Editors. 2002, World Health Organization: Geneva. p. 152-165.
41. Meseguer, M., et al., *Sperm cryopreservation in oncological patients: a 14-year follow-up study*. *Fertil Steril*, 2006. **85**(3): p. 640-5.
42. Schmidt, K.L., et al., *Assisted reproduction in male cancer survivors: fertility treatment and outcome in 67 couples*. *Hum Reprod*, 2004. **19**(12): p. 2806-10.
43. Krause, W., *Procreation by means of cryopreserved spermatozoa from tumor patients*. *J Reprod Med Endocrinol* 2007. **4**: p. 9-96.
44. Djerassi, C. and S.P. Leibo, *A new look at male contraception*. *Nature*, 1994. **370**(6484): p. 11-2.
45. Belker, A.M. and D.A. Bergamini, *The feasibility of cryopreservation of sperm harvested intraoperatively during vasectomy reversals*. *J Urol*, 1997. **157**(4): p. 1292-4.
46. Kolettis, P.N., et al., *Secondary azoospermia after vasovasostomy*. *Urology*, 2005. **65**(5): p. 968-71.
47. Kliesch, S., et al., *Cryopreservation of semen from adolescent patients with malignancies*. *Med Pediatr Oncol*, 1996. **26**(1): p. 20-7.
48. Palmieri, G., et al., *Gonadal function after multimodality treatment in men with testicular germ cell cancer*. *Eur J Endocrinol*, 1996. **134**(4): p. 431-6.
49. Kamischke, A., et al., *Gonadal protection from radiation by GnRH antagonist or recombinant human FSH: a controlled trial in a male nonhuman primate (Macaca fascicularis)*. *J Endocrinol*, 2003. **179**(2): p. 183-94.
50. Kamischke, A. and E. Nieschlag, *Treatment of retrograde ejaculation and anejaculation*. *Hum Reprod Update*, 1999. **5**(5): p. 448-74.
51. Hansen, P.V., et al., *Paternity in patients with testicular germ cell cancer: pretreatment and post-treatment findings*. *Eur J Cancer*, 1991. **27**(11): p. 1385-9.
52. Viviani, S., et al., *Testicular dysfunction in Hodgkin's disease before and after treatment*. *Eur J Cancer*, 1991. **27**(11): p. 1389-92.
53. Palermo, G., et al., *Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte*. *Lancet*, 1992. **340**(8810): p. 17-8.
54. De Geyter, C., et al., *Subnormal sperm parameters in conventional semen analysis are associated with discrepancies between fertilization and pregnancy rates in in-vitro fertilization and embryo transfer*. *Int J Androl*, 1992. **15**(6): p. 485-97.
55. Kamischke, A., et al., *Cryopreservation of sperm from adolescents and adults with malignancies*. *J Androl*, 2004. **25**(4): p. 586-92.
56. Bahadur, G. and D. Ralph, *Gonadal tissue cryopreservation in boys with paediatric cancers*. *Hum Reprod*, 1999. **14**(1): p. 11-7.
57. Schlatt, S., et al., *Germ cell transfer into rat, bovine, monkey and human testes*. *Hum Reprod*, 1999. **14**(1): p. 144-50.
58. Sofikitis, N. and I. Miyagawa, *Bilateral effect of unilateral varicocele on testicular metabolism in the rabbit*. *Int J Fertil Menopausal Stud*, 1994. **39**(4): p. 239-47.
59. Rajfer, J., et al., *Inhibition of testicular testosterone biosynthesis following experimental varicocele in rats*. *Biol Reprod*, 1987. **36**(4): p. 933-7.
60. Esteves, S.C. and S. Glina, *Recovery of spermatogenesis after microsurgical subinguinal varicocele repair in azoospermic men based on testicular histology*. *Int Braz J Urol*, 2005. **31**(6): p. 541-8.
61. Kadioglu, A., et al., *Microsurgical inguinal varicocele repair in azoospermic men*. *Urology*, 2001. **57**(2): p. 328-33.
62. Kim, E.D., et al., *Varicocele repair improves semen parameters in azoospermic men with spermatogenic failure*. *J Urol*, 1999. **162**(3 Pt 1): p. 737-40.
63. Tulloch, W.S., *Consideration of sterility; subfertility in the male*. *Med. J.*, 1952. **59**: p. 29-34.
64. Aboulghar, M.A., et al., *Fertilization and pregnancy rates after intracytoplasmic sperm injection using ejaculate semen and surgically retrieved sperm*. *Fertil Steril*, 1997. **68**(1): p. 108-11.
65. Pasqualotto, F.F. and A. Agarwal, *Should we offer semen cryopreservation to men with testicular cancer?* *Cleve Clin J Med*, 2001. **68**(2): p. 101-2.
66. Tournaye, H., et al., *Preserving the reproductive potential of men and boys with*

- cancer: current concepts and future prospects. Hum Reprod Update, 2004. **10**(6): p. 525-32.
67. Brook, P.F., et al., *Isolation of germ cells from human testicular tissue for low temperature storage and autotransplantation*. Fertil Steril, 2001. **75**(2): p. 269-74.
 68. Keros, V., et al., *Methods of cryopreservation of testicular tissue with viable spermatogonia in pre-pubertal boys undergoing gonadotoxic cancer treatment*. Hum Reprod, 2007. **22**(5): p. 1384-95.
 69. Kvist, K., et al., *Cryopreservation of intact testicular tissue from boys with cryptorchidism*. Hum Reprod, 2006. **21**(2): p. 484-91.
 70. Wyns, C., et al., *Options for fertility preservation in prepubertal boys*. Hum Reprod Update, 2010. **16**(3): p. 312-28.
 71. Schaefer, F., et al., *Assessment of gonadal maturation by evaluation of spermaturia*. Arch Dis Child, 1990. **65**(11): p. 1205-7.
 72. Craft, I. and M. Tsirigotis, *Simplified recovery, preparation and cryopreservation of testicular spermatozoa*. Hum Reprod, 1995. **10**(7): p. 1623-6.
 73. Palermo, G.D., et al., *Fertilization and pregnancy outcome with intracytoplasmic sperm injection for azoospermic men*. Hum Reprod, 1999. **14**(3): p. 741-8.
 74. Devroey, P., et al., *Pregnancies after testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection in non-obstructive azoospermia*. Hum Reprod, 1995. **10**(6): p. 1457-60.
 75. Silber, S.J., et al., *The use of epididymal and testicular spermatozoa for intracytoplasmic sperm injection: the genetic implications for male infertility*. Hum Reprod, 1995. **10**(8): p. 2031-43.
 76. Jezek, D., U.A. Knuth, and W. Schulze, *Successful testicular sperm extraction (TESE) in spite of high serum follicle stimulating hormone and azoospermia: correlation between testicular morphology, TESE results, semen analysis and serum hormone values in 103 infertile men*. Hum Reprod, 1998. **13**(5): p. 1230-4.
 77. Friedler, S., et al., *Intracytoplasmic injection of fresh and cryopreserved testicular spermatozoa in patients with nonobstructive azoospermia--a comparative study*. Fertil Steril, 1997. **68**(5): p. 892-7.
 78. Shufaro, Y., et al., *Impact of repeated testicular fine needle aspirations (TEFNA) and testicular sperm extraction (TESE) on the microscopic morphology of the testis: an animal model*. Hum Reprod, 2002. **17**(7): p. 1795-9.
 79. Mercan, R., et al., *Outcome of testicular sperm retrieval procedures in non-obstructive azoospermia: percutaneous aspiration versus open biopsy*. Hum Reprod, 2000. **15**(7): p. 1548-51.
 80. Colpi, G.M., et al., *Microsurgical TESE versus conventional TESE for ICSI in non-obstructive azoospermia: a randomized controlled study*. Reprod Biomed Online, 2009. **18**(3): p. 315-9.
 81. Schrader, M., et al., *"Onco-tese": testicular sperm extraction in azoospermic cancer patients before chemotherapy-new guidelines?* Urology, 2003. **61**(2): p. 421-5.
 82. Chung, P.H., et al., *Assisted fertility using electroejaculation in men with spinal cord injury--a review of literature*. Fertil Steril, 1995. **64**(1): p. 1-9.
 83. ESHRE, Taskforce 7: *Ethical considerations for the cryopreservation of gametes and reproductive tissues for self use*. Hum Reprod, 2004. **19**(2): p. 460-2.
 84. Griswold, M.D., *The central role of Sertoli cells in spermatogenesis*. Semin Cell Dev Biol, 1998. **9**(4): p. 411-6.
 85. Geens, M., et al., *Autologous spermatogonial stem cell transplantation in man: current obstacles for a future clinical application*. Hum Reprod Update, 2008. **14**(2): p. 121-30.
 86. Hovatta, O., *Cryopreservation of testicular tissue in young cancer patients*. Hum Reprod Update, 2001. **7**(4): p. 378-83.
 87. Ogawa, T., I. Dobrinski, and R.L. Brinster, *Recipient preparation is critical for spermatogonial transplantation in the rat*. Tissue Cell, 1999. **31**(5): p. 461-72.
 88. Bar-Shira Maymon, B., et al., *Sertoli cell inactivation by cytotoxic damage to the human testis after cancer chemotherapy*. Fertil Steril, 2004. **81**(5): p. 1391-4.
 89. Howell, S.J. and S.M. Shalet, *Testicular function following chemotherapy*. Hum Reprod Update, 2001. **7**(4): p. 363-9.
 90. Courbiere, B., et al., *Cryopreservation of the ovary by vitrification as an alternative to slow-cooling protocols*. Fertil Steril, 2006. **86**(4 Suppl): p. 1243-51.
 91. Jadoul, P., et al., *Laparoscopic ovariectomy for whole human ovary cryopreservation: technical aspects*. Fertil Steril, 2007. **87**(4): p. 971-5.
 92. Brinster, R.L. and J.W. Zimmermann, *Spermatogenesis following male germ-cell transplantation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(24): p. 11298-302.
 93. Brinster, R.L. and M.R. Avarbock, *Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(24): p. 11303-7.
 94. Shinohara, T., et al., *Birth of offspring following transplantation of cryopreserved immature testicular pieces and in-vitro microinsemination*. Hum Reprod, 2002. **17**(12): p. 3039-45.
 95. Ohta, H. and T. Wakayama, *Generation of normal progeny by intracytoplasmic sperm injection following grafting of testicular tissue from cloned mice that died postnatally*. Biol Reprod, 2005. **73**(3): p. 390-5.
 96. Schlatt, S., et al., *Progeny from sperm obtained after ectopic grafting of neonatal mouse testes*. Biol Reprod, 2003. **68**(6): p. 2331-5.
 97. Honaramooz, A., et al., *Accelerated maturation of primate testis by xenografting into mice*. Biol Reprod, 2004. **70**(5): p. 1500-3.
 98. Staub, C., *A century of research on mammalian male germ cell meiotic differentiation in vitro*. J Androl, 2001. **22**(6): p. 911-26.
 99. Feng, L.X., et al., *Generation and in vitro differentiation of a spermatogonial cell line*. Science, 2002. **297**(5580): p. 392-5.
 100. Lee, D.R., M.T. Kaproth, and J.E. Parks, *In vitro production of haploid germ cells from fresh or frozen-thawed testicular cells of neonatal bulls*. Biol Reprod, 2001. **65**(3): p. 873-8.
 101. Jahnukainen, K., et al., *Intratesticular transplantation of testicular cells from leukemic rats causes transmission of leukemia*. Cancer Res, 2001. **61**(2): p. 706-10.
 102. Fujita, K., et al., *Transplantation of spermatogonial stem cells isolated from leukemic mice restores fertility without inducing leukemia*. J Clin Invest, 2005. **115**(7): p. 1855-61.

103. Fujita, K., et al., *Isolation of germ cells from leukemia and lymphoma cells in a human in vitro model: potential clinical application for restoring human fertility after anticancer therapy*. Cancer Res, 2006. **66**(23): p. 11166-71.
104. Geens, M., et al., *The efficiency of magnetic-activated cell sorting and fluorescence-activated cell sorting in the decontamination of testicular cell suspensions in cancer patients*. Hum Reprod, 2007. **22**(3): p. 733-42.
105. Hou, M., et al., *Xenotransplantation of testicular tissue into nude mice can be used for detecting leukemic cell contamination*. Hum Reprod, 2007. **22**(7): p. 1899-906.
106. Patience, C., Y. Takeuchi, and R.A. Weiss, *Zoonosis in xenotransplantation*. Curr Opin Immunol, 1998. **10**(5): p. 539-42.
107. Goossens, E., et al., *Reproductive capacity of sperm obtained after germ cell transplantation in a mouse model*. Hum Reprod, 2003. **18**(9): p. 1874-80.
108. Goossens, E., et al., *Evaluation of in vivo conception after testicular stem cell transplantation in a mouse model shows altered post-implantation development*. Hum Reprod, 2006. **21**(8): p. 2057-60.
109. Sousa, M., et al., *Developmental potential of human spermatogenic cells co-cultured with Sertoli cells*. Hum Reprod, 2002. **17**(1): p. 161-72.
110. Bahadur, G., *Ethics of testicular stem cell medicine*. Hum Reprod, 2004. **19**(12): p. 2702-10.
111. Van Saen, D., et al., *Regeneration of spermatogenesis by grafting testicular tissue or injecting testicular cells into the testes of sterile mice: a comparative study*. Fertil Steril, 2009. **91**(5 Suppl): p. 2264-72.
112. Hovatta, O., *Cryobiology of ovarian and testicular tissue*. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2003. **17**(2): p. 331-42.
113. Tomlinson, M., *Therapeutic sperm cryopreservation*, in *Clinical Andrology EAU/ESAU Course Guidelines*, L. Bjorndahl, et al., Editors. 2010, Informa UK Ltd: United Kingdom. p. 95-104.
114. Meirrow, D. and J.G. Schenker, *Cancer and male infertility*. Hum Reprod, 1995. **10**(8): p. 2017-22.
115. Meistrich, M.L., et al., *Impact of cyclophosphamide on long-term reduction in sperm count in men treated with combination chemotherapy for Ewing and soft tissue sarcomas*. Cancer, 1992. **70**(11): p. 2703-12.
116. Williams, D., P.M. Crofton, and G. Levitt, *Does ifosfamide affect gonadal function?* Pediatr Blood Cancer, 2008. **50**(2): p. 347-51.
117. Bokemeyer, C., et al., *Long-term gonadal toxicity after therapy for Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphoma*. Ann Hematol, 1994. **68**(3): p. 105-10.
118. Petersen, P.M., et al., *Dose-dependent impairment of testicular function in patients treated with cisplatin-based chemotherapy for germ cell cancer*. Ann Oncol, 1994. **5**(4): p. 355-8.
119. Pont, J. and W. Albrecht, *Fertility after chemotherapy for testicular germ cell cancer*. Fertil Steril, 1997. **68**(1): p. 1-5.

ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΟΡΧΙΚΟΥ ΙΣΤΟΥ: Η ΝΟΜΙΚΗ ΔΙΑΣΤΑΣΗ

Κ. Φουντεδάκη

Καθηγήτρια Τμήματος Νομικής, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

ΠΡΟΛΕΓΟΜΕΝΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΑ ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ, ΤΟ ΓΕΝΝΗΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΤΗΝ ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗ

1. Η ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΑ ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΣΤΟ ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΔΙΚΑΙΟ

Τα ζητήματα της ιατρικής υποβοήθησης στην ανθρώπινη αναπαραγωγή¹ ρυθμίστηκαν για πρώτη φορά στη χώρα μας με το **ν. 3089/2002 για την «ιατρική υποβοήθηση στην ανθρώπινη αναπαραγωγή»**, του οποίου ρυθμίσεις, κατά ένα μεγάλο μέρος, εντάχθηκαν στον Αστικό Κώδικα² (νέα άρθρα 1455-1460, τροποποιήσεις στα άρθρ. 1461 επ. ΑΚ σχετικά με τη συγγένεια). Ο νόμος αυτός αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα νομοθετήματα στο χώρο του ελληνικού οικογενειακού δικαίου και ένα από τα πλέον φιλελεύθερα στο θέμα, σε διεθνές επίπεδο. Οι ρυθμίσεις του ν. 3089/2002 αναφέρονται, πολύ συνοπτικά, α) στις γενικές προϋποθέσεις του επιτρεπτού των μεθόδων της υα β) στις επιμέρους μεθόδους της υα γ) στις συναίνεσεις των εμπλεκόμενων προσώπων, στην τύχη του γεννητικού υλικού³ και στην ανωνυμία των τρίτων δοτών του δ) στις επιπτώσεις της εφαρμογής των μεθόδων της υα στο αστικό δίκαιο (ιδίως στο οικογενειακό και στο κληρονομικό δίκαιο).

Ο ν. 3089/2002 είχε την ακόλουθη λογική: Οι μέθοδοι της υα ήταν ήδη από αρκετά χρόνια διαδεδομένες και στην Ελλάδα και υπήρχε σαφής ανάγκη υποβολής τους σε νομικούς κανόνες. Οι κανόνες αυτοί, σε μια πρώτη τουλάχιστον φάση, έπρεπε να έχουν ως σκοπό την προστασία του παιδιού που γεννιέται με τέτοιες μεθόδους, ιδίως από την άποψη της κατοχύρωσης της ιδρύσεως της συγγένειάς του με τους γονείς (ή τον γονέα) που επιθυμούσαν την απόκτησή του. Έτσι ο νόμος 3089/2002 περιέχει κανόνες και προϋποθέσεις για τα κυριότερα ζητήματα της υα, χωρίς όμως να προβλέπει για την παράβασή τους και κυρώσεις σε κάθε περίπτωση. Επίσης ο ν. 3089/2002, σύμφωνα με την ίδια λογική, δεν αναφέρθηκε σε θέματα όπως οι προδιαγραφές λειτουργίας των ιατρικών «κέντρων» ή «μονάδων» κρυοσυντήρησης του γεννητικού υλικού και εφαρμογής των μεθόδων υα, και οι ιατρικής φύσης προϋποθέσεις για τη συμμετοχή ενός προσώπου σε μια διαδικασία υα.

Τα θέματα αυτά, όπως και άλλα (λ.χ. έρευνα στο γεννητικό υλικό) αντιμετωπίστηκαν με το μεταγενέστερο ν. 3305/2005. Όπως και στην αιτιολογική έκθεση του ν. 3305/2005 αναφέρεται, ο νόμος αποβλέπει α) στη συμπλήρωση του ν. 3089/2002 στα θέματα που αυτός ήδη ρυθμίζει (με την περαιτέρω εξειδίκευση των όρων προσφυγής στην υα και με την πρόβλεψη ποινικών και διοικητικών κυρώσεων για την παράβαση των διατάξεών του) και β) στη ρύθμιση και άλλων ζητημάτων που άπτονται της υα, όπως οι όροι ιδρύσεως και λειτουργίας των μονάδων υα και των

τραπεζών κρυοσυντήρησης και η ίδρυση ανεξάρτητης Εθνικής Αρχής Ιατρικής Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής⁴. Κατά συνέπεια, ο ν. 3089/2002 παραμένει το βασικό νομοθέτημα για την υα, στο οποίο αποτυπώνονται βασικές επιλογές της ελληνικής έννομης τάξης στο θέμα. Από την άλλη πλευρά, ο ν. 3305/2005 έχει περισσότερο τεχνικό χαρακτήρα και συμπληρωματικό ρόλο στο νομικό οικοδόμημα της υα, εμφανίζει πάντως και ενδιαφέρον από την άποψη της *ιατρικής ευθύνης*, καθώς εξειδικεύει τις υποχρεώσεις του γιατρού κατά την εφαρμογή των μεθόδων υα.

Δικαιολογείται, ωστόσο, η γενική παρατήρηση, που επαληθεύεται και με βάση μια σειρά από επιμέρους ρυθμίσεις, ότι η προαναφερόμενη διάκριση «ρόλων» μεταξύ των δυο νομοθετημάτων δεν είναι πάντοτε σαφής. Ο ν. 3305/2005 φαίνεται σε ορισμένα σημεία να αγνοεί την προηγούμενη ρύθμιση του ν. 3089/2002, δηλαδή οι δυο ρυθμίσεις εμφανίζονται να διατυπώνονται παράλληλα και ανεξάρτητα η μια από την άλλη, με αποτέλεσμα επικαλύψεις και ερμηνευτικές δυσχερείες.

Εκτός από τους δυο ειδικούς νόμους, χωρίς να εισάγουν διαφορετική ρύθμιση, στην υα αναφέρονται επίσης το άρθρ. 14 Σύμβασης Οβιέδο (Σύμβαση για τα Ανθρώπινα Δικαιώματα και τη Βιοϊατρική, ν. 2619/1998), το πρόσθετο Πρωτόκολλο στην ίδια Σύμβαση, που έχει ως αντικείμενο την κλωνοποίηση, και το άρθρ. 30 Κώδικα Ιατρικής Δεοντολογίας (ν. 3418/2005)⁵. Οι διατάξεις αυτές σε γενικές γραμμές δεν εισάγουν διαφορετική ρύθμιση από αυτή των ν. 3089/2002 και 3305/2005. Μνεία όμως πρέπει να γίνει στην § 5 του άρθρ. 30 Κώδικα Ιατρικής Δεοντολογίας, που προβλέπει για το γιατρό την ευχέρεια να αρνηθεί την εφαρμογή μεθόδων της υα ή τη σύμπραξή του σε αυτές, επικαλούμενος «τους κανόνες και τις αρχές της ηθικής συνείδησής του».

Με βάση τους ν. 3089/2002 και 3305/2005, στην έννοια της υα υπάγονται δυο μέθοδοι, που αναφέρονται στο άρθρ. 2 § 1 ν. 3305/2005: α) η τεχνητή σπερματέγχυση, δηλαδή η *in vivo* εισαγωγή σπερματοζωαρίων στο γυναικείο γεννητικό σύστημα με οποιονδήποτε άλλο τρόπο εκτός από τη γενετήσια επαφή (ο ορισμός αυτός δίνεται στο άρθρ. 3 αρ. 7 ν.

¹ Στο εξής η ιατρικά υποβοηθούμενη αναπαραγωγή και η ιατρική υποβοήθηση της αναπαραγωγής θα αναφέρονται με τη συντομογραφία **υα**.

² Στο εξής με την καθιερωμένη συντομογραφία **ΑΚ**.

³ Για την έννοια του όρου βλ. κατωτ. στο σημείο 1.2.β.

⁴ Στο εξής «Αρχή υα». Πρέπει πάντως να σημειωθεί ότι, ενώ ιδρύθηκε σχετικά σύντομα μετά την ψήφιση του ν. 3305, η Αρχή ουδέποτε λειτουργήσε κανονικά, λόγω άρνησης της πολιτείας να καλύψει τις λειτουργικές και διοικητικές ανάγκες της και οδηγήθηκε και σε τυπική αναστολή λειτουργίας το 2011. Αν αναλογιστεί κανείς πόσο πολλές διατάξεις του ν. 3305 αναφέρονται στον εποπτικό και αδειοδοτικό ρόλο της Αρχής, είναι αδιανόητο για το νομικό μας πολιτισμό το ότι η αρχή αυτή δεν λειτουργεί **και ότι** οι προβλεπόμενες στο νόμο αρμοδιότητές της δεν έχουν ανατεθεί σε άλλο όργανο ή υπηρεσία. Αν πράγματι για το πρώτο (λειτουργία της Αρχής) δεν υπήρχαν ή πλέον δεν υπάρχουν τα αναγκαία κονδύλια, ισχύει άραγε το ίδιο και για την πολύ φθηνότερη ανάθεση των αρμοδιοτήτων της σε κάποια υπηρεσία του Υπουργείου Υγείας;

⁵ Στο εξής αναφέρεται ως **ΚΙΔ**.

3305) και β) η εξωσωματική γονιμοποίηση in vitro, δηλαδή η εκτός του γυναικείου σώματος γονιμοποίηση ωαρίων που έχουν ληφθεί επεμβατικά, και η μεταφορά των γονιμοποιημένων ωαρίων στη μήτρα (και αυτός ο ορισμός περιέχεται στο άρθρ. 3 αρ. 8 ν. 3305). Προς εφαρμογή των μεθόδων αυτών χρησιμοποιούνται, σύμφωνα με τους σύγχρονους αποδεκτούς κανόνες της ιατρικής⁶, μια σειρά από τεχνικές, οι οποίες απαριθμούνται στο άρθρ. 2 § 2 ν. 3305 και ορίζονται στο άρθρ. 3 του ίδιου νόμου.

Βασικό είναι ότι ο Έλληνας νομοθέτης προβλέπει και ρυθμίζει την υα τόσο ως *ομόλογη*, όσο και ως *ετερόλογη*. Ο πρώτος όρος αναφέρεται στην περίπτωση όπου το γεννητικό υλικό προέρχεται εξ ολοκλήρου από τα πρόσωπα που επιθυμούν να αποκτήσουν παιδί, και ο δεύτερος στην περίπτωση όπου το γεννητικό υλικό προέρχεται κατά το ένα μέρος ή εξ ολοκλήρου από τρίτους δότες. Ειδικότερα η *ετερόλογη* γονιμοποίηση μπορεί, από ιατρική άποψη, να εμφανιστεί με τις ακόλουθες μορφές: α) γονιμοποίηση ξένου σπέρματος β) γονιμοποίηση ξένου ωαρίου γ) γονιμοποίηση ξένου γονιμοποιημένου ωαρίου, δηλαδή προερχόμενου από την ένωση ξένου σπέρματος με ξένο ωάριο.

Επίσης στο ελληνικό δίκαιο αναγνωρίζονται και ρυθμίζονται και δυο «αμφιλεγόμενες» περιπτώσεις της υα, δηλαδή η *παρένθετη μητρότητα* και η *μεταθανάτια (post mortem) γονιμοποίηση*. Σύμφωνα με το άρθρ. 3 αρ. 9 ν. 3305, παρένθετη μητρότητα συνιστά «η περίπτωση κατά την οποία μια γυναίκα (φέρουσα ή κυοφόρος) κυοφορεί και γεννά, ύστερα από εξωσωματική γονιμοποίηση και μεταφορά γονιμοποιημένων ωαρίων [έννοιες που ορίζονται στο άρθρ. 13 αρ. 8 ν. 3305], με χρήση ωαρίου ξένου προς την ίδια, για λογαριασμό μιας άλλης γυναίκας, η οποία επιθυμεί να αποκτήσει παιδί αλλά αδυνατεί να κυοφορήσει για ιατρικούς λόγους» (βλ. και άρθρ. 1458 ΑΚ). Εξάλλου, όπως προκύπτει από το άρθρ. 1457 ΑΚ, μεταθανάτια γονιμοποίηση είναι η τεχνητή γονιμοποίηση που γίνεται μετά το θάνατο του συζύγου ή του μόνιμου συντρόφου της γυναίκας με κρυοσυντηρημένο γεννητικό υλικό που είχε ληφθεί από το νεκρό άνδρα όσο ζούσε⁷. Σύμφωνα με την Εισηγητική Έκθεση του ν. 3089 στο άρθρ. 1457 ΑΚ, η ρύθμιση είναι προσανατολισμένη στην περίπτωση που πεθαίνει ο άνδρας, αλλά μπορεί να καλύψει, αναλογικά εφαρμοζόμενη, και την περίπτωση που πεθαίνει η γυναίκα.

2. ΓΕΝΝΗΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗ

2.1. Γενικά για την κρυοσυντήρηση. Ως *κρυοσυντήρηση* ορίζεται στο νόμο (άρθρ. 3 αρ. 13 ν. 3305) η συντήρηση γεννητικού υλικού σε υγροποιημένο άζωτο. Η κρυοσυντήρηση (γεννητικού υλικού) προβλέπεται σε πολλά σημεία της νομοθεσίας για την υα. Λ.χ. ο ν. 3305 αναφέρει την κρυοσυντήρηση στις τεχνικές της υα (άρθρ. 2 § 2 δ), την ορίζει (άρθρ. 3 αρ. 13) και προβλέπει ειδικούς όρους για την εφαρμογή της (άρθρ. 7). Επίσης, κατά

το άρθρ. 7 § 2 ν. 3305, η κρυοσυντήρηση γίνεται μόνο σε κατάλληλα οργανωμένες «Τράπεζες Κρυοσυντήρησης», για τις οποίες προβλέπονται ειδικές προδιαγραφές ίδρυσης και λειτουργίας στο άρθρ. 18 του ίδιου νόμου. Ουσιαστικά πρόκειται για μια τεχνική που μπορεί να αξιοποιηθεί σε κάθε εφαρμογή υα, από την πιο απλή (τεχνητή σπερματέγχυση σε ομόλογη γονιμοποίηση) μέχρι την πιο σύνθετη (παρένθετη μητρότητα με ωάριο τρίτης γυναίκας που γονιμοποιείται με σπέρμα τρίτου δότη). Η ειδικότερη χρησιμότητα της κρυοσυντήρησης συνδέεται (βλ. άρθρο 7 § 1 ν. 3305) με τη δυνατότητα διαφύλαξης του γεννητικού υλικού για μελλοντική χρήση του είτε για τους σκοπούς της υα είτε για ερευνητικούς και θεραπευτικούς σκοπούς.

Η κρυοσυντήρηση *σπέρματος*⁸ είναι υποχρεωτική, όταν αυτό προέρχεται από τρίτο δότη: το άρθρ. 8 § 9 ν. 3305 απαγορεύει τη χρήση νωπού σπέρματος τρίτου και για την παράβαση της διάταξης αυτής προβλέπεται σοβαρή ποινική κύρωση (άρθρο 26 § 9 ν. 3305, φυλάκιση *τουλάχιστο* δυο ετών) και διοικητική κύρωση (άρθρο 27 § 5 ν. 3305, ανάκληση της άδειας άσκησης του επαγγέλματος του δράστη για τουλάχιστον έξι μήνες). Αντίθετα, όταν το σπέρμα προέρχεται από το ίδιο το πρόσωπο που επιθυμεί να αποκτήσει παιδί με ιατρική υποβοήθηση, η κρυοσυντήρηση για μελλοντική χρήση αποτελεί *δυνατότητα*⁹. Πάντως το σπέρμα που καταλήγει να χρησιμοποιηθεί για *ερευνητικούς ή θεραπευτικούς σκοπούς*, υπό τους ειδικότερους όρους των άρθρ. 11 και 12 ν. 3305, είναι αναγκαστικά κρυοσυντηρημένο, ακόμη και όταν δεν προέρχεται από τρίτο δότη.

2.2. Η έννοια του όρου «γεννητικό υλικό».

Πρόκειται για έναν όρο που ίσως δεν είναι ιατρικά δόκιμος, αλλά από νομική- νομοθετική- νομοτεχνική άποψη είναι ιδιαίτερα λειτουργικός και χρήσιμος, γιατί περιλαμβάνει όλες τις διαφορετικές κατηγορίες υλικού (σπέρμα, ωάριο, γονιμοποιημένο ωάριο, ορχικό και ωοθηκικό ιστό, γεννητικά κύτταρα), που έχουν *ενιαία νομική αντιμετώπιση*. Δυστυχώς στο μεταγενέστερο νόμο 3305/2005 δεν λήφθηκε παρά ελάχιστη πρόνοια για την ενότητα ορολογίας με το ν. 3089/2002, ο οποίος, όπως προαναφέρθηκε, είναι αυτός που περιέχει τις βασικές νομοθετικές επιλογές στο θέμα της υα. Η επιλογή των συντακτών του ν. 3089/2002 να αποφύγουν τη χρήση πολλών και διαφορετικών τεχνικών όρων ήταν από νομοτεχνική άποψη επιτυχής και μπορούσε/ έπρεπε να ακολουθηθεί και στο ν. 3305/2005, κάτι που δεν έγινε¹⁰. Ενόψει όλων αυτών, και της ανάγκης

⁶ Σύμφωνα με την Αιτιολογική έκθεση του ν. 3305 στο άρθρ. 2, πρόκειται για τεχνικές που «έχουν καθιερωθεί και εφαρμόζονται σήμερα διεθνώς».

⁷ Σύμφωνα με τη λογική της ΑΚ 1457, ο σύζυγος ή σύντροφος έχει προβεί στην κατάθεση και κρυοσυντήρηση του γεννητικού του υλικού όσο ήταν ακόμη ζωντανός. Η λήψη σπέρματος από νεκρό άτομο είναι μια τεχνική που περιλαμβάνει κινδύνους και πρέπει να αποφεύγεται. Η ρύθμιση του άρθρ. 9 § 4 ν. 3305, κατά την οποία σε περίπτωση μεταθανάτιας γονιμοποίησης κατ' εξαίρεση επιτρέπεται η λήψη γαμετών από κλινικούς νεκρό άτομο, προφανώς προήλθε από παρανόηση.

⁸ Ο νόμος δεν διακρίνει μεταξύ σπέρματος και ορχικού ιστού στα ζητήματα της κρυοσυντήρησης, επομένως όταν στη μελέτη γίνεται λόγος για σπέρμα, εννοείται ότι η αναφορά ισχύει και για τον ορχικό ιστό.

⁹ Αν δεν κρυοσυντηρηθεί, το σπέρμα προφανώς θα χρησιμοποιηθεί αμέσως για in vitro ή in vivo γονιμοποίηση· στην πρώτη περίπτωση είναι δυνατό στη συνέχεια να κρυοσυντηρηθεί το γονιμοποιημένο ωάριο ή τα γονιμοποιημένα ωάρια (βλ. και άρθρ. 1459 § 2 ΑΚ, που ορίζει ότι τα μη κρυοσυντηρημένα γονιμοποιημένα ωάρια καταστρέφονται 14 μέρες μετά τη γονιμοποίηση).

¹⁰ Στο ν. 3305/2005 δεν ορίζεται, παρά μόνον έμμεσα (άρθρ. 3) το «γεννητικό υλικό», ο όρος όμως εμφανίζεται σε επόμενα σημεία του ν. 3305 (λ.χ. τίτλοι των Κεφαλαίων Β και Γ, άρθρα 7 § 1, 14, 15)· επιπλέον, στους ορισμούς του άρθρ. 3 «προστίθενται» οι όροι «γεννητικά κύτταρα» και «ζυγώτης», των οποίων η διαφοροποίηση αντίστοιχα

ενότητας και σαφήνειας της ορολογίας, στην παρούσα μελέτη ακολουθείται κατά βάση η προσέγγιση του ν. 3089, και ειδικότερα -ως απλό γεννητικό υλικό νοούνται το σπέρμα και ο ορχικός ιστός, το ωάριο και ο ωοθηκικός ιστός -ως *γεννητικό υλικό* νοούνται το σπέρμα και ο ορχικός ιστός, το ωάριο και ο ωοθηκικός ιστός, και το γονιμοποιημένο ωάριο -ως *γονιμοποιημένο ωάριο* εννοείται το ωάριο μετά τη γονιμοποίηση και πριν παρέλθουν δεκατέσσερις ημέρες από αυτή -ως *κυοφορούμενο ή έμβρυο* εννοείται το γονιμοποιημένο ωάριο μετά τη σύλληψη, δηλαδή μετά την εμφύτευσή του στη μήτρα.

2.3. Νομική φύση και νομική αντιμετώπιση του γεννητικού υλικού. Όταν ξεκίνησε η εφαρμογή των μεθόδων της υα, που προϋποθέτουν την απομόνωση και διατήρηση του γεννητικού υλικού έξω από το ανθρώπινο σώμα, για το δίκαιο τέθηκε το ερώτημα της *νομικής φύσης* του εξωσωματικού γεννητικού υλικού¹¹. Ειδικότερα, το πρόβλημα αφορούσε την ένταξη του γεννητικού υλικού σε μια από τις δυο βασικές κατηγορίες του δικαίου, των *προσώπων* (δηλ. αυτών που είναι *υποκείμενα* δικαιωμάτων και υποχρεώσεων¹²) και των *πραγμάτων* (που είναι *αντικείμενα* των διάφορων έννομων σχέσεων, λ.χ. πωλούνται, κληρονομούνται κ.λπ.). Αφετηρία για τον προβληματισμό αποτέλεσε η *ιδιότητα του γεννητικού υλικού ότι μπορεί να εξελιχθεί σε άνθρωπο, δηλαδή πρόσωπο*, η οποία έθεσε το ερώτημα μήπως το γεννητικό υλικό μπορεί να θεωρηθεί και το ίδιο «πρόσωπο», ως άνθρωπος «εν τη γενέσει» ή ως φορέας «ανθρώπινης ζωής». Είναι φανερό ότι μεγαλύτερο προβληματισμό σε αυτό το πλαίσιο δημιουργούσε το γονιμοποιημένο ωάριο, που βρίσκεται «πιο κοντά» στη δημιουργία συγκεκριμένης ανθρώπινης προσωπικότητας από το απλό γεννητικό υλικό. Το ερώτημα, πάντως, τέθηκε και για το απλό σπέρμα. Πρέπει να σημειωθεί ότι δεν πρόκειται καθόλου για ένα θεωρητικό θέμα, αναγόμενο στο δόγμα ή στη φιλοσοφία του δικαίου, αλλά αντίθετα η απάντηση στο ερώτημα της νομικής φύσης του γεννητικού υλικού συνδέεται με μια σειρά από πρακτικές συνέπειες : αν το υλικό είναι πρόσωπο -ή έστω εν δυνάμει πρόσωπο ή φορέας ανθρώπινης ζωής-, τότε είναι *νομικά αδύνατο* να κρυοσυντηρηθεί, να χρησιμοποιηθεί με οποιοδήποτε

από το «γεννητικό υλικό» και το «γονιμοποιημένο ωάριο» δεν είναι σαφές για το μη ειδικό. Ακόμη, ο ν. 3305/2005 δεν διακρίνει, όπως η Εισηγητική Έκθεση του ν. 3089, αν το «γονιμοποιημένο ωάριο» νοείται και μετά τη 14^η μέρα μετά τη γονιμοποίηση, στοιχείο που, κατά τη λογική του ν. 3089, είναι απολύτως κρίσιμο για τη νομική αντιμετώπισή του, όπως αναλύεται στη συνέχεια. Πάντως, ο ν. 3305 δεν χρησιμοποιεί ούτε αυτός τον όρο «έμβρυο» τον οποίο η Εισηγητική Έκθεσή του ταυτίζει με το «γονιμοποιημένο ωάριο», για λόγους, όπως αναφέρεται, «νομικής ενότητας και συνοχής» με το ν. 3089/2002. Φυσικά η «ευθύνη» για τις ανακολουθίες της ορολογίας δεν βαρύνει τους γιατρούς- συντάκτες του νόμου 3305, αλλά τους αρμόδιους για τη νομοτεχνική επεξεργασία του.

¹¹ Για το γεννητικό υλικό που βρίσκεται μέσα στο ανθρώπινο σώμα ισχύει ό,τι και για τους υπόλοιπους ιστούς του σώματος, δηλ. ότι αποτελούν στοιχείο της προσωπικότητας του ανθρώπου, που προστατεύεται με το άρθρο 57 ΑΚ.

¹² Πρόσωπο είναι (χωρίς καμιά εξαίρεση ή προϋπόθεση) ο γεννημένος άνθρωπος και κάποια μορφώματα που αναγνωρίζει το δίκαιο ως πρόσωπα (λ.χ. μια ανώνυμη εταιρία, ένα σωματείο).

τρόπο, να δωριστεί ή να καταστραφεί με μόνη τη βούληση άλλων προσώπων (αυτών από τα οποία προέρχεται, αυτών για τα οποία προορίζεται ή του γιατρού). Είναι, επομένως, πολύ βασικό αν το γεννητικό υλικό οποιασδήποτε μορφής θα ενταχθεί στην έννοια του υποκειμένου ή του αντικειμένου των έννομων σχέσεων.

Ο νομοθέτης, με το ν. 3089, όπως συνάγεται από τις προπαρασκευαστικές εργασίες και την Εισηγητική Έκθεσή του, συντάχθηκε, χωρίς βέβαια να το αναφέρει ρητά στο νομοθετικό κείμενο, με την άποψη ότι το γεννητικό υλικό που αποχωρίζεται από το ανθρώπινο σώμα, και μάλιστα όχι μόνο το απλό (σπέρμα και ωάριο), αλλά και το γονιμοποιημένο ωάριο *μέσα στις δεκατέσσερις πρώτες μέρες μετά τη γονιμοποίηση*, δεν είναι φορέας ανθρώπινης ζωής, αλλά έχει διπλή νομική φύση: *αυτή του πράγματος και του στοιχείου της προσωπικότητας του προσώπου από το οποίο προέρχεται* (ή για το οποίο προορίζεται, βλ. στη συνέχεια), αφού ενσωματώνει τη δυνατότητά του για αναπαραγωγή. Η (κρατούσα) αντίληψη αυτή για τη νομική φύση του γεννητικού υλικού συνάντησε κάποιες αντιρρήσεις μεταξύ των νομικών, αλλά είναι, κατά τη γνώμη μου, η ορθότερη, στηριζόμενη (ως προς το γονιμοποιημένο ωάριο) στη διαπίστωση ότι πριν την πάροδο της 14^{ης} μέρας από τη γονιμοποίηση δεν μπορεί να γίνει λόγος για εξατομικευμένη ανθρώπινη ζωή, αφού μέχρι τότε δεν έχει αναπτυχθεί η νωτιαία χορδή, που είναι ο πρόδρομος του κεντρικού νευρικού συστήματος του ανθρώπου, το οποίο μπορεί να εξελιχθεί μόνο μέσα στη μήτρα. Με την έννοια αυτή το γεννητικό υλικό είναι αντικείμενο και όχι υποκείμενο του δικαίου και επιτρέπεται η χρήση του με τη βούληση των δοτών του, επομένως και η ειδικότερη τεχνική της κρυοσυντήρησής του. Επίσης, ο ίδιος νομικός χαρακτηρισμός του γεννητικού υλικού έχει ως αποτέλεσμα η παράνομη χρήση ή η καταστροφή του να επισύρουν τις έννομες συνέπειες της προσβολής τόσο της κυριότητας, όσο και της προσωπικότητας, όπως αναλύεται σε επόμενο σημείο.

2.4. Διάρθρωση της εξέτασης των ζητημάτων της κρυοσυντήρησης. Η ειδικότερη επεξεργασία των νομικών ζητημάτων που θέτει η κρυοσυντήρηση σπέρματος και ορχικού ιστού προϋποθέτει μια βασική διάκριση, μεταξύ της *κρυοσυντήρησης που γίνεται με σκοπό την υποβοήθηση της αναπαραγωγής του ίδιου του προσώπου από το οποίο προέρχεται το υλικό* και της (υποχρεωτικής, όπως ήδη αναφέρθηκε) *κρυοσυντήρησης που γίνεται στο πλαίσιο διάθεσης (δωρεάς) σπέρματος*, δηλ. της προσφοράς του σπέρματος από έναν άνδρα προς υποβοήθηση της αναπαραγωγής άλλων προσώπων. Οι δυο περιπτώσεις διαφέρουν ριζικά μεταξύ τους από την άποψη των προϋποθέσεων, των ειδικότερων ζητημάτων, των συνεπειών κ.ά., και η διαφορά αυτή επιβάλλει την ξεχωριστή εξέτασή τους, κάτι που δυστυχώς δεν κάνει ο ίδιος ο νόμος : η ενιαία ρύθμιση της κρυοσυντήρησης στο άρθρο. 7 και σε άλλα σημεία του ν. 3305/2005 δημιουργεί σειρά ερμηνευτικών ζητημάτων.

ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΠΟΥ ΓΙΝΕΤΑΙ ΜΕ ΣΚΟΠΟ ΤΗΝ ΥΠΟΒΟΗΘΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΤΟΥ ΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΠΡΟΣΩΠΟΥ ΑΠΟ ΤΟ ΟΠΟΙΟ ΠΡΟΕΡΧΕΤΑΙ ΤΟ ΣΠΕΡΜΑ ΚΑΙ Ο ΟΡΧΙΚΟΣ ΙΣΤΟΣ

1. ΠΡΟΫΠΟΘΕΣΕΙΣ ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗΣ

Όπως προαναφέρθηκε, αυτή η κρυοσυντήρηση δεν είναι υποχρεωτική, αλλά συναρτάται με τις επιλογές του γιατρού και των υποβοηθούμενων προσώπων αναφορικά με την πορεία της υα. Ως προς τις *προϋποθέσεις του επιτρεπτού* της κρυοσυντήρησης,

το άρθρ. 7 § 1 ν. 3305 ορίζει ότι «Η κρυσυντήρηση γεννητικού υλικού, ζυγωτών και γονιμοποιημένων ωαρίων εφαρμόζεται για τη διαφύλαξη και τη μελλοντική χρήση τους σε μεθόδους ΙΥΑ ή για ερευνητικούς και θεραπευτικούς σκοπούς». Από την άλλη μεριά, ως τεχνική της υα (άρθρ. 2 § 2 δ ν. 3305/2005), η κρυσυντήρηση υπόκειται στις γενικές προϋποθέσεις της υα, που προβλέπονται στα άρθρα 1455-1456 ΑΚ και 1, 4 ν. 3305. Παρά τη σύγχυση που δημιουργεί ο νόμος, η πρώτη διάταξη αναφέρεται γενικά στην κρυσυντήρηση, ενώ οι δεύτερες στην εδώ εξεταζόμενη κρυσυντήρηση προς το σκοπό της υποβοήθησης της αναπαραγωγής του προσώπου από το οποίο προέρχεται το σπέρμα. Αυτή η ειδικότερη περίπτωση κρυσυντήρησης προϋποθέτει :

1.1. Η αδυναμία απόκτησης παιδιών με φυσικό τρόπο. Ο νομοθέτης ρυθμίζει την υα ως κατά βάση *θεραπευτική* ιατρική αγωγή ή γενικότερα αγωγή επιβαλλόμενη για ιατρικούς λόγους. Το άρθρ. 1455 § 1 ΑΚ θέτει ως γενική προϋπόθεση για την εφαρμογή όλων των μεθόδων και τεχνικών της υα τη χρήση τους «για να αντιμετωπίζεται η αδυναμία απόκτησης τέκνων με φυσικό τρόπο ή για να αποφεύγεται η μετάδοση στο τέκνο σοβαρής ασθένειας»¹³. Σε σχέση με την ιατρική αναγκαιότητα της υα πρέπει να γίνει η ακόλουθη διευκρίνιση: Η προϋπόθεση της ιατρικής αναγκαιότητας δεν έχει την έννοια ότι οι εφαρμογές και οι ιατρικές πράξεις της υα είναι θεραπευτικές για όλα τα εμπλεκόμενα πρόσωπα: λ.χ. σε ένα ζευγάρι ο άνδρας πάσχει από κακή ποιότητα σπέρματος (λ.χ. αζωοσπερμία), η γυναίκα δεν εμφανίζει κανένα πρόβλημα στο αναπαραγωγικό της σύστημα, αλλά είναι αυτή που θα υποβληθεί σε ιατρικές πράξεις (λ.χ. τεχνητή σπερματέγχυση), προκειμένου να αποκτήσει παιδί με το συγκεκριμένο άνδρα. Στο πλαίσιο, δηλαδή, της υα, ο νόμος αναγνωρίζει και επιτρέπει υπό προϋποθέσεις μια σειρά πράξεων που δεν είναι *θεραπευτικές για το πρόσωπο που υποβάλλεται σε αυτές*, δηλαδή δεν αποσκοπούν στην αποκατάσταση ή βελτίωση της δικής του υγείας, αλλά στην αντιμετώπιση της στειρότητας ή της υπογονιμότητας άλλου προσώπου. Σε σχέση, πάντως, ειδικά με την υα σε ζευγάρια συζύγων ή συντρόφων, από τη ρύθμιση του νόμου μπορεί να συναχθεί ότι η αδυναμία απόκτησης απογόνων με φυσικό τρόπο, και επομένως η ιατρική αναγκαιότητα προσφυγής στην υα, δεν αντιμετωπίζεται για το κάθε μέλος του ζευγαριού συζύγων ή συντρόφων ξεχωριστά, αλλά θεωρείται ότι χαρακτηρίζει συνολικά το ζεύγος. Επομένως οι πράξεις υα είναι *θεραπευτικές για το συγκεκριμένο ζευγάρι* προσώπων, ανεξάρτητα από το ποιος είναι αυτός που αντιμετωπίζει το πρόβλημα στειρότητας.

Η ιατρική αναγκαιότητα (στεριότητα ή υπογονιμότητα) ως προϋπόθεση της εφαρμογής των μεθόδων υα,

επομένως και της κρυσυντήρησης, πρέπει καταρχήν να αποτελεί *παρούσα κατάσταση και όχι μελλοντική*. Μόνο για τους ανηλίκους, προβλέπει ρητά ο νόμος τη δυνατότητα κρυσυντήρησης ενόψει μελλοντικής στειρότητας (βλ. άρθρ. 4 § 1 εδ. 3 ν. 3305). Ωστόσο, η ρύθμιση αυτή είναι αδικαιολόγητα περιοριστική. Λ.χ. αν η ικανότητα φυσικής αναπαραγωγής ενός άνδρα προβλέπεται με βεβαιότητα να καταργηθεί ή μειωθεί σοβαρά από ασθένεια που καταστρέφει τα αναπαραγωγικά όργανα ή λόγω επικείμενης χημειοθεραπείας που επιφέρει το ίδιο αποτέλεσμα, η κατά γράμμα ερμηνεία του άρθρ. 1455 ΑΚ οδηγεί στο εξής αποτέλεσμα: όσο ο άνδρας αυτός δεν έχει χάσει την αναπαραγωγική του ικανότητα, δεν μπορεί να προσφύγει στην υα προληπτικά, ιδίως να προβεί σε κρυσυντήρηση του γεννητικού υλικού του, αλλά οφείλει να επιδιώξει μόνο την φυσική αναπαραγωγή (η οποία, ενόψει της ασθένειάς του και της σχετικής βιολογικής και ψυχολογικής επιβάρυνσης δεν θα είναι πολύ πιθανή). Η προσφυγή στην υα, με την ίδια άποψη, επιτρέπεται μόνο αφότου ο άνδρας αυτός στερηθεί την αναπαραγωγική του ικανότητα, οπότε όμως η απόκτηση απογόνου με το δικό του σπέρμα θα είναι κατά πολύ δυσκολότερη ή αδύνατη. Πιο σκόπιμη, κατά συνέπεια εμφανίζεται η επιεικέστερη άποψη – που ανταποκρίνεται και στη συνήθη ιατρική πρακτική-, σύμφωνα με την οποία η προσφυγή στην υα, και ιδίως στην τεχνική της κρυσυντήρησης του γεννητικού υλικού, επιτρέπεται και όταν, λόγω ασθένειας, δεν είναι παρούσα *αλλά επίκειται με βεβαιότητα ή σοβαρή πιθανότητα* η αδυναμία απόκτησης παιδιών με φυσικό τρόπο.

Ένα ακόμη ερώτημα που δημιουργεί η ιατρική αναγκαιότητα ως προϋπόθεση της υα ειδικά για την *κρυσυντήρηση* είναι αν κάθε πρόσωπο μπορεί να κρυσυντηρήσει το γεννητικό υλικό του ή αν αυτό γίνεται μόνο στο πλαίσιο διαδικασίας υα, και, συνακόλουθα, αν για μόνη την κρυσυντήρηση του γεννητικού υλικού ισχύει η γενική προϋπόθεση της υα, δηλαδή «η αδυναμία απόκτησης τέκνων με φυσικό τρόπο» (ΑΚ 1455 § 1). Η απάντηση που δίνει η νομοθεσία μας είναι ότι *η κρυσυντήρηση δεν αποτελεί ευχέρεια κάθε προσώπου*, αλλά είναι δυνατή αποκλειστικά σε δυο περιπτώσεις : α) στην απλή διάθεση (δωρεά) από τρίτο δότη, δηλαδή από πρόσωπο που δεν αποβλέπει στην απόκτηση δικών του παιδιών, όπου μάλιστα είναι και υποχρεωτική (βλ. άρθρ. 7 § 3 α, 8 § 9, 26 § 9 ν. 3305)¹⁴ β) στο πλαίσιο συγκεκριμένης διαδικασίας υα. Στη δεύτερη περίπτωση είναι προφανές ότι απαιτείται να συντρέχουν για τα υποβοηθούμενα πρόσωπα οι γενικές προϋποθέσεις της υα, επομένως και η ιατρική αναγκαιότητα, τουλάχιστον για το ένα μέρος του ζευγαριού. Επομένως ένας υγιής, μη υπογόνιμος άνδρας, ο οποίος δεν απειλείται από κανένα κίνδυνο μελλοντικής στειρότητας, επιτρέπεται να προβεί σε κρυσυντήρηση του σπέρματός του μόνον α) προκειμένου να το διαθέσει σε άλλους β) η σύζυγος ή σύντροφός του πάσχει από υπογονιμότητα ή στειρότητα και προχωρούν μαζί σε προσπάθεια απόκτησης παιδιού με υα.

1.2. Όρια ηλικίας: ανώτατα όρια και ενηλικιότητα. Με την ίδια γενική προϋπόθεση της ιατρικής αναγκαιότητας συνδέεται και η αναφορά του άρθρ. 1455 § 1 εδ. 2 ΑΚ στο επιτρεπτό της υα μόνο «μέχρι την ηλικία φυσικής ικανότητας αναπαραγωγής του υποβοηθούμενου προσώπου». Η σχετική ρύθμιση τέθηκε με το ν. 3089/2002, για να μη δημιουργηθεί

¹³ Από τα μεταγενέστερα άρθρα 2 και 4 ν. 3305/2005, που επίσης αναφέρονται στις γενικές προϋποθέσεις εφαρμογής των μεθόδων υα, λείπει η αναφορά στην προϋπόθεση της ιατρικής αναγκαιότητας. Η παράλειψη αυτή οφείλεται μάλλον σε παραδρομή και δεν μπορεί να ερμηνευθεί ως απομάκρυνση του νομοθέτη από την αρχική επιλογή που έγινε με το ν. 3089/2002, και επομένως η προϋπόθεση της ιατρικής αναγκαιότητας εξακολουθεί να ισχύει. Βλ. την Έκθεση της Επιστημονικής Υπηρεσίας της Βουλής (εισηγητής Στ. Κουτσουμπίνης) στο άρθρ. 4 ν. 3305, σελ. 3. Η ερμηνεία αυτή βρίσκει σαφές έρεισμα και στην Εισηγητική Έκθεση του ν. 3305 (Α. Γενικές παρατηρήσεις), που αναφέρεται ρητά στην αδυναμία αναπαραγωγής ως όρο προσφυγής στην υα.

¹⁴ Και δεν απαιτεί, φυσικά, αδυναμία αναπαραγωγής του δότη. Βλ. γενικότερα για τη δωρεά σπέρματος στη συνέχεια υπό III.

σύγχυση και θεωρηθεί η απλή πάροδος της φυσιολογικής ηλικίας αναπαραγωγής ως «αδυναμία απόκτησης τέκνων με φυσικό τρόπο», επομένως περίπτωση όπου επιτρέπεται η υα¹⁵. Εξάλλου ο νομοθέτης δεν ήθελε να ευνοήσει την απόκτηση παιδιών από γονείς προχωρημένης ηλικίας, επειδή συνδέεται με κινδύνους τόσο για την υγεία, όσο και για την περαιτέρω εξέλιξη και ανάπτυξη του παιδιού. Η σχετική πρόβλεψη επαναλήφθηκε στο άρθρ. 4 § 1 ν. 3305, το οποίο επιπρόσθετα εξειδίκευσε τη φυσική ηλικία αναπαραγωγής μόνο για τη γυναίκα κατ' ανώτατο όριο στο πενήτηκοστό έτος, ενώ για τον άνδρα δεν προβλέπεται ανάλογο ηλικιακό όριο.

Αρχικά πρέπει να σημειωθεί, ότι, όταν πρόκειται για υα σε ζεύγος συζύγων ή συντρόφων, αντίθετα με την εντύπωση που δημιουργεί η διατύπωση των σχετικών διατάξεων, το όριο της ηλικίας φυσικής αναπαραγωγής εφαρμόζεται σε σχέση και με τα δυο μέλη του ζεύγους, ανεξάρτητα από το ποιος από τους δυο αντιμετωπίζει το πρόβλημα στειρότητας ή το ποιος υποβάλλεται στις ιατρικές πράξεις της υα. Κατά δεύτερο λόγο πρέπει να παρατηρηθεί ότι, σύμφωνα με την ορθότερη άποψη, η ρύθμιση του άρθρ. 4 § 1 ν. 3305, που προβλέπει συγκεκριμένο όριο ηλικίας μόνο για τη γυναίκα και όχι και για τον άνδρα, είναι αντίθετη με το άρθρ. 4 § 2 Σ για την ισότητα των δυο φύλων και επομένως δεν εφαρμόζεται. Κατά την άποψη, δηλαδή, αυτή, μπορεί ο γιατρός να προχωρήσει στην κρυσταλλοποίηση σπέρματος με σκοπό την υποβοήθηση της αναπαραγωγής ζευγαριού, και όταν η γυναίκα έχει περάσει το όριο ηλικίας των 50 ετών, εφόσον πάντως βρίσκεται εντός των ορίων της ηλικίας φυσικής αναπαραγωγής των γυναικών.

Γενική προϋπόθεση εφαρμογής των μεθόδων υα που προβλέπεται στο νόμο (άρθρ. 4 § 1 εδ. 1 ν. 3305) είναι επίσης να αφορούν *ενήλικα* πρόσωπα. Η εφαρμογή τους σε ανηλίκους μόνο κατ' εξαίρεση επιτρέπεται, «λόγω σοβαρού νοσήματος που επισύρει κίνδυνο στειρότητας, για να εξασφαλιστεί η δυνατότητα τεκνοποίησης» (άρθρ. 4 § 1 εδ. 3 ν. 3305), δηλαδή όταν η προσφυγή στην υα επιβάλλεται για συγκεκριμένους ιατρικούς λόγους που αφορούν τον ανήλικο. Η εξαίρεση αυτή αφορά κατά βάση την *κρυσταλλοποίηση* (λ.χ. αγόρι που πρόκειται να υποβληθεί σε χημειοθεραπεία, η οποία ενδέχεται να προκαλέσει βλάβη στα αναπαραγωγικά του όργανα, μπορεί να κρυσταλλοποιήσει το σπέρμα του). Ο νόμος, δηλαδή, ενδιαφέρεται για την εξασφάλιση της *δυνατότητας* τεκνοποίησης, την οποία τεκνοποίηση κατά βάση τοποθετεί μετά την ενηλικίωση.

Δεν θα έπρεπε, πάντως, να αποκλειστούν, έστω με αναλογική εφαρμογή των άρθρ. 4 § 1 εδ. 3 και 7 § 6 ν. 3305, και άλλες εφαρμογές υα σε ανηλίκους, σε εξαιρετικές περιπτώσεις.

Για την παράβαση των προϋποθέσεων που αφορούν τα όρια ηλικίας των άρθρ. 1455 § 1 ΑΚ και 4 § 1 ν. 3305 και τις συναινέσεις ο ν. 3305 προβλέπει ποινικές και διοικητικές κυρώσεις (άρθρ. 26 §§ 5 και 6, 27 §§ 6 και 7 αντίστοιχα).

1.3. Συναινέσεις. Άλλες διατάξεις. Σύμφωνα με το άρθρ. 1456 ΑΚ, «κάθε ιατρική πράξη που αποβλέπει στην υποβοήθηση της ανθρώπινης αναπαραγωγής... διενεργείται με την έγγραφη συναίνεση των προσώπων που επιθυμούν να αποκτήσουν τέκνο». Η συναίνεση του δότη ορίζεται ρητά ως προϋπόθεση

για το επιτρεπτό της κρυσταλλοποίησης και στο άρθρο 7 § 6 ν. 3305, που ορίζει ότι «*Η κρυσταλλοποίηση γεννητικού υλικού, ζυγωτών και γονιμοποιημένων ωαρίων πραγματοποιείται κατόπιν έγγραφης συναίνεσης των προσώπων που τα καταθέτουν, σύμφωνα με το άρθρ. 1456 ΑΚ*». Η διάταξη αυτή δεν ήταν αναγκαία, αφού η προϋπόθεση της συναίνεσης και ο χρόνος στον οποίο πρέπει αυτή να δοθεί προέκυπτε ήδη από τη γενική διάταξη του άρθρου 1456 ΑΚ. Εξάλλου, το άρθρ. 5 ν. 3305 επιβάλλει την ενημέρωση των προσώπων «*που επιθυμούν να προσφύγουν ή να συμμετάσχουν στις μεθόδους ΥΙΑ*», ως προϋπόθεση της απαιτούμενης συναίνεσής τους (βλ. άρθρ. 8 § 2).

Το άρθρ. 1 ν. 3305 («*Οι μέθοδοι της ιατρικής υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (ΥΙΑ) εφαρμόζονται με τρόπο που εξασφαλίζει το σεβασμό της ελευθερίας του ατόμου και του δικαιώματος της προσωπικότητας και την ικανοποίηση της επιθυμίας για απόκτηση απογόνων, με βάση τα δεδομένα της ιατρικής και της βιολογίας, καθώς και τις αρχές της βιοηθικής*» - Κατά την εφαρμογή των παραπάνω μεθόδων πρέπει να λαμβάνεται υπόψη το συμφέρον του παιδιού που θα γεννηθεί») δεν μπορεί να θεωρηθεί ότι εισάγει πρόσθετες προϋποθέσεις, αλλά έχει μάλλον διακηρυκτικό χαρακτήρα: η πρώτη παράγραφος επαναλαμβάνει όσα συνάγονται έτσι και αλλιώς από τις διατάξεις του Συντάγματος και του ΑΚ για την προστασία της προσωπικότητας, καθώς και από ρυθμίσεις του Κώδικα Ιατρικής Δεοντολογίας (λ.χ. υποχρέωση τήρησης των κανόνων της ιατρικής, άρθρο 3 ΚΙΔ). Η δεύτερη παράγραφος, που αναφέρεται στο συμφέρον του παιδιού, δεν θέτει μια γενική και αφηρημένη προϋπόθεση επιτρεπτού της υα, αλλά έναν *δεοντολογικό* κανόνα που απευθύνεται στο γιατρό, με την έννοια ότι ο τελευταίος σε *συγκεκριμένη περίπτωση* έχει την ηθική υποχρέωση να επιλέξει εκείνες τις μεθόδους και τεχνικές υα, που κρίνει ότι είναι πιο πρόσφορες για να προστατευθεί καλύτερα το συμφέρον του παιδιού που πρόκειται να γεννηθεί. Με το ίδιο κριτήριο ο γιατρός σε συγκεκριμένη περίπτωση μπορεί και να αρνηθεί την εφαρμογή της υα, δυνατότητα που έτσι κι αλλιώς προβλέπεται ρητά στον ΚΙΔ, με γενικότερη αναφορά στους «κανόνες και τις αρχές της ηθικής συνείδησής του» (άρθρ. 30 § 5 ΚΙΔ).

Σε πολλές διατάξεις του ν. 3305 υποδεικνύονται συγκεκριμένες υποχρεώσεις του γιατρού αναφορικά με τις πράξεις της υα, οι οποίες αναφέρονται στο καθαρά ιατρικό σκέλος της υα. Τέτοιες είναι λ.χ. οι διατάξεις που αναφέρονται στον υποχρεωτικό έλεγχο των προσώπων που μετέχουν στην υα για τους ιούς της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV-1, HIV-2), καθώς και για ηπατίτιδα Β και C και σύφιλη (άρθρ. 4 § 2 ν. 3305), στον αριθμό των μεταφερόμενων ωαρίων και γονιμοποιημένων ωαρίων (άρθρ. 6 ν. 3305), στην απαγόρευση της χρήσης γαμετών από περισσότερους δότες ή από νεκρά άτομα (άρθρ. 9 § 1 και 4 ν. 3305) κ.ά. Οι διατάξεις αυτές δεν εισάγουν γενικές ή ειδικές προϋποθέσεις *επιτρεπτού* της υα, αλλά ιδρύουν συγκεκριμένες νομικές υποχρεώσεις του γιατρού σε σχέση με τον τρόπο άσκησης της ιατρικής στο ειδικότερο πεδίο της υα. Ουσιαστικά πρόκειται για νομοθετική εξειδίκευση και αποτύπωση ορισμένων υποχρεώσεων επιμέλειας του γιατρού στο πλαίσιο της υα, των οποίων η παράβαση συνιστά παρανομία με την έννοια της ΑΚ 914 και, εφόσον συντρέχουν και οι υπόλοιποι όροι, δημιουργεί σε βάρος του γιατρού υποχρέωση αποζημίωσης (αστική ευθύνη).

Ειδικά στην περίπτωση που το πρόσωπο που επιθυμεί να τεκνοποιήσει με υα είναι οροθετικό για

¹⁵ Δηλ. από τη ρύθμιση αυτή συνάγεται σαφέστερα ότι η αδυναμία φυσικής αναπαραγωγής πρέπει να οφείλεται σε ιατρικούς αποκλειστικούς λόγους.

τον ιδί της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας, απαιτείται για την υποβολή σε μεθόδους υα (επομένως και σε κρυοσυντήρηση) ειδική άδεια από την Αρχή υα (άρθρ. 4 § 3 ν. 3305).

1.4. Χρονικά όρια κρυοσυντήρησης. Το άρθρ. 7 § 3 ν. 3305 καθορίζει τα ανώτατα χρονικά όρια της κρυοσυντήρησης, για όλα τα είδη γεννητικού υλικού. Για το σπέρμα και τον ορχικό ιστό που έχουν καταταθεί προς προσωπική χρήση του δότη το όριο τοποθετείται στα πέντε χρόνια. Σύμφωνα με την § 4 του άρθρ. 7, μετά την πάροδο των προβλεπόμενων προθεσμιών το γεννητικό υλικό που δεν έχει χρησιμοποιηθεί είτε διατίθεται για ερευνητικούς και θεραπευτικούς σκοπούς είτε καταστρέφεται με απόφαση της Αρχής, ύστερα από αίτηση της τράπεζας κρυοσυντήρησης. Από τη διάταξη αυτή συνάγεται ότι η μετά την πάροδο των προθεσμιών χρησιμοποίηση του κρυοσυντηρημένου υλικού για την απόκτηση απογόνων είναι παράνομη πράξη, που μπορεί να θεμελιώσει ευθύνη του γιατρού.

1.5. Κρυοσυντήρηση από άνδρα που δεν έχει σύζυγο ή γυναίκα σύντροφο; Από τη ρύθμιση του νόμου συνάγεται ότι δεν είναι δυνατή η υα σε ομόφυλα ζευγάρια (ανδρών ή γυναικών)¹⁶ ούτε σε μοναχικό άνδρα. Ειδικότερα, για την απόκτηση παιδιού με υα από μοναχικό άνδρα¹⁷, είναι αναγκαία τόσο η χρησιμοποίηση ωαρίου από δότη, όσο και (με δεδομένο ότι ο άνδρας δεν μπορεί να κυοφορήσει), η παρεμβολή *παρένθετης* μητέρας. Η τελευταία όμως προϋποθέτει οπωσδήποτε την ύπαρξη «κοινωνικής μητέρας», δηλαδή μιας άλλης γυναίκας, στην οποία χορηγείται η δικαστική άδεια της ΑΚ 1458, και η οποία είναι η νομική μητέρα του παιδιού (ΑΚ 1464 §1). Έτσι, η νομοθεσία για την υα επιτρέπει τη δημιουργία παιδιών χωρίς (νομικό) πατέρα (περίπτωση της υα σε μοναχική γυναίκα), όχι όμως και παιδιών χωρίς (νομική) μητέρα. Πρόβλημα άνισης μεταχείρισης των μοναχικών ανδρών έναντι των μοναχικών γυναικών (που μπορούν να αποκτήσουν παιδί με υα, βλ. ΑΚ 1456) δεν δημιουργεί αυτή η άποψη, αφού δεν πρόκειται για όμοιες περιπτώσεις: η παρένθετη μητρότητα συνδέεται με την αδυναμία κυοφορίας για ιατρικούς λόγους και τέτοιος βέβαια λόγος δεν είναι η ανδρική ιδιότητα. Η αδυναμία κυοφορίας αφορά εξ ορισμού μόνο τις γυναίκες και η βιολογική διαφορά ανδρών και γυναικών δικαιολογεί τη διαφορετική μεταχείριση. Ωστόσο, η αντίθετη άποψη, που υποστηρίχθηκε αρχικά από μέρος της θεωρίας, παρά τα εναντίον της επιχειρήματα και τα περαιτέρω νομικά προβλήματα που δημιουργεί, έγινε δεκτή πρόσφατα από ορισμένα δικαστήρια¹⁸ και από το Νομικό Συμβούλιο του Κράτους¹⁹.

¹⁶ Υπενθυμίζεται ότι στην Ελλάδα δεν αναγνωρίζεται γάμος ή σύμφωνο συμβίωσης (που προβλέπεται στο ν. 3719/2008) μεταξύ προσώπων του ίδιου φύλου.

¹⁷ Ή και από άνδρα που συζεί σε ελεύθερη ένωση με άλλον άνδρα (για το εξεταζόμενο θέμα οι περιπτώσεις δεν διαφέρουν).

¹⁸ Μονομελούς Πρωτοδικείου Αθηνών 2827/2008, δημοσιευμένη στο περιοδικό Χρονικά Ιδιωτικού Δικαίου 2009, σελ. 817 επ. και Μονομελούς Πρωτοδικείου Θεσσαλονίκης 13707/2009 δημοσιευμένη στο περιοδικό Χρονικά Ιδιωτικού Δικαίου 2011, σελ. 267. Οι αποφάσεις αφορούσαν δικαστική άδεια παρένθετης μητρότητας. Κατά της δεύτερης απόφασης ασκήθηκε έφεση και η απόφαση ανατράπηκε (η εφετειακή απόφαση δεν έχει ακόμη δημοσιευτεί σε περιοδικό).

¹⁹ Γνωμοδότηση υπ' αριθμό 261/2010, δημοσιευμένη στο περιοδικό Εφαρμογές Αστικού Δικαίου 2010 σελ.1213.

Συμπερασματικά, σύμφωνα με την ορθότερη άποψη, ένας άνδρας που δεν έχει γυναίκα σύζυγο ή σύντροφο μπορεί να προβεί στην κρυοσυντήρηση του σπέρματός του, όταν αντιμετωπίζει σοβαρό κίνδυνο να χάσει την αναπαραγωγική του ικανότητα στο μέλλον²⁰. Για να χρησιμοποιήσει όμως αυτό το σπέρμα προς απόκτηση απογόνων με υα, θα πρέπει να έχει σύζυγο ή γυναίκα σύντροφο, ώστε ως ζευγάρι πλέον να ξεκινήσουν τη διαδικασία της υα. Σύμφωνα όμως με την άποψη που πρόσφατα έγινε δεκτή από τη νομολογία και από το Νομικό Συμβούλιο του Κράτους, ο μοναχικός άνδρας μπορεί να προβεί σε κρυοσυντήρηση του σπέρματός του και στη συνέχεια σε απόκτηση παιδιού με υα.

1.6. Οι ειδικές προϋποθέσεις για την κρυοσυντήρηση με σκοπό τη μεταθανάτια γονιμοποίηση. Μια αμφιλεγόμενη εφαρμογή της υα, που απαγορεύεται σε πολλές χώρες, και την οποία επέτρεψε ο ν. 3089/2002, με αυστηρές πάντως προϋποθέσεις, είναι η *μεταθανάτια (post mortem) γονιμοποίηση*. Ειδικότερα στην έννοια της μεταθανάτιας γονιμοποίησης κατά το νόμο περιλαμβάνεται α) η χρησιμοποίηση κρυοσυντηρημένου σπέρματος για τη *γονιμοποίηση* ωαρίου *in vitro* ή για τη σπερματέγχυση *in vivo* μετά το θάνατο του άνδρα που χορήγησε το σπέρμα (κατά κυριολεξία ή με στενή έννοια μεταθανάτια γονιμοποίηση) και β) η μεταθανάτια *εμφύτευση* κρυοσυντηρημένου γονιμοποιημένου ωαρίου, του οποίου δηλ. η γονιμοποίηση έγινε εργαστηριακά, όταν ο άνδρας που χορήγησε το σπέρμα ήταν ακόμη ζωντανός (μεταθανάτια εμφύτευση).

Σύμφωνα με την προσέγγιση που θεωρώ ορθότερη, το δικαίό μας *μόνο κατ' εξαίρεση* επιτρέπει τη μεταθανάτια γονιμοποίηση και επομένως οι σχετικές προϋποθέσεις (βλ. άρθρ. 1457 ΑΚ) πρέπει να ερμηνεύονται στενά. Η θέση αυτή μπορεί να αξιοποιηθεί για την επίλυση ορισμένων ερμηνευτικών ζητημάτων της μεταθανάτιας γονιμοποίησης. Έτσι λ.χ. τίθεται το ζήτημα, αν η μεταθανάτια γονιμοποίηση υπόκειται στη γενική προϋπόθεση της ιατρικής αναγκαιότητας του άρθρ. 1455 § 1 ΑΚ, αν δηλαδή, εκτός από τους όρους που προβλέπονται στο άρθρ. 1457 ΑΚ ειδικά για τη μεταθανάτια γονιμοποίηση, απαιτείται επιπρόσθετα και το ζευγάρι για το οποίο πρόκειται να αντιμετωπίζε πρόβλημα στειρότητας ή υπογονιμότητας. Λ.χ. μπορεί να γίνει κρυοσυντήρηση με σκοπό τη μεταθανάτια γονιμοποίηση, όταν κανένα από τα δυο μέλη του ζευγαριού δεν πάσχει από υπογονιμότητα ή στειρότητα, αλλά απλώς ο άνδρας αναχωρεί για μια εμπόλεμη ζώνη; Κρατούσα είναι η καταφατική απάντηση, δηλ. ότι αυτή η περίπτωση (κίνδυνος θανάτου) εξαιρείται από τη γενική προϋπόθεση της ιατρικής αναγκαιότητας του άρθρ. 1455 § 1 ΑΚ. Μπορούν όμως εναντίον αυτής της άποψης να διατυπωθούν σοβαρές επιφυλάξεις.

Με βάση την ΑΚ 1457, οι ειδικές προϋποθέσεις της κρυοσυντήρησης σπέρματος με σκοπό τη μεταθανάτια γονιμοποίηση είναι:

1. Να πρόκειται για ετερόφυλο ζευγάρι συζύγων ή συντρόφων.
2. Ο σύζυγος ή μόνιμος σύντροφος να έπασχε από ασθένεια που συνδέεται με σοβαρό κίνδυνο στειρότητας ή να αντιμετωπίζε κίνδυνο θανάτου.
3. Ο σύζυγος ή ο μόνιμος σύντροφος της γυναίκας να έχει συναινέσει με

²⁰ Βλ. ανωτ. στο σημείο α.

συμβολαιογραφικό έγγραφο και στη μεταθανάτια γονιμοποίηση με το δικό του σπέρμα.

Σύμφωνα με τα άρθρ. 26 § 12 και 21 § 10 ν. 3305 η χρησιμοποίηση γεννητικού υλικού μετά το θάνατο εκείνου από τον οποίο προέρχονται χωρίς να τηρηθούν οι όροι του άρθρ. 1457 ΑΚ συνεπάγεται ποινικές και διοικητικές κυρώσεις αντίστοιχα.

2. ΝΟΜΙΚΗ ΤΥΧΗ ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΜΕΝΟΥ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ

Το κρυοσυντηρημένο σπέρμα μπορεί να καταστεί πλεονάζον, με την έννοια ότι για οποιοδήποτε λόγο παύει να προορίζεται για χρήση από το υποβοηθούμενο ζευγάρι συζύγων ή συντρόφων ή τον υποβοηθούμενο άνδρα με σκοπό την τεκνοποίηση (λ.χ. επειδή τα πρόσωπα αυτά απέκτησαν το παιδί που επιθυμούσαν ή επειδή άλλαξαν γνώμη και δεν επιθυμούν παιδιά). Σε αυτές τις περιπτώσεις ανακύπτει το ζήτημα της τύχης αυτού του γεννητικού υλικού που δεν πρόκειται πλέον να χρησιμοποιηθεί από το πρόσωπο από το οποίο προέρχεται. Ανάλογα προβλήματα σχετικά με την τύχη του κρυοσυντηρημένου σπέρματος ανακύπτουν και όταν κατά τη διάρκεια της υα μεσολαβήσει κάποιο γεγονός στα υποβοηθούμενα πρόσωπα, όπως το διαζύγιο ή ο θάνατος.

2.1. Η δήλωση της ΑΚ 1459. Τα πρόσωπα που προσφεύγουν στην υα με σκοπό την τεκνοποίηση οφείλουν, μαζί με την προβλεπόμενη στην ΑΚ 1456 συναίνεση τους στην υα, να δηλώσουν και σχετικά με την τύχη του γεννητικού υλικού τους, όταν αυτό καταστεί πλεονάζον με την προαναφερόμενη έννοια. Σχετικά προβλέπουν τόσο το άρθρ. 1459 ΑΚ, όσο και το άρθρ. 7 § 6 ν. 3305. Η δήλωση αυτή, όταν πρόκειται για ζεύγος συζύγων ή συντρόφων, είναι κοινή. Σε σχέση με τον τύπο της δήλωσης, όπως προκύπτει από το άρθρ. 7 § 6 ν. 3305, που συμπληρώνει στο σημείο αυτό το άρθρ. 1459 ΑΚ, εφόσον πρόκειται για συζύγους, η κοινή δήλωση πρέπει να συμπεριληφθεί στο (απλό) έγγραφο με το οποίο δηλώνονται οι κατ' ΑΚ 1456 συνααινέσεις τους, χωρίς πάντως να δημιουργείται ακυρότητα της δήλωσης και αν συμπεριληφθεί σε χωριστό έγγραφο, υπό τον όρο ότι γίνεται πριν την έναρξη της διαδικασίας (ΑΚ 1459). Αν πρόκειται για ζεύγος συντρόφων, των οποίων η κατ' ΑΚ 1456 συναίνεση δηλώνεται με συμβολαιογραφικό έγγραφο, η δήλωση για την τύχη του γεννητικού υλικού υποβάλλεται σε χωριστό έγγραφο (άρθρ. 7 § 6 ν. 3305, τελευταίο εδάφιο), το οποίο μπορεί να είναι και απλό.

Το περιεχόμενο της δήλωσης για την τύχη του γεννητικού υλικού μπορεί να αναφέρεται σε τρεις εκδοχές που τίθενται στο νόμο εναλλακτικά (ΑΚ 1459, στην οποία παραπέμπει και το άρθρ. 7 § 6 ν. 3305). Αυτές είναι α) η διάθεσή του χωρίς αντάλλαγμα σε άλλα πρόσωπα για δική τους υποβοήθηση της αναπαραγωγής, β) η διάθεσή του χωρίς αντάλλαγμα για ερευνητικούς ή θεραπευτικούς σκοπούς και γ) η καταστροφή του.

Η τύχη του κρυοσυντηρημένου σπέρματος *ανήλικου* που καθίσταται πλεονάζον μετά την ενηλικίωση²¹ είναι ένα θέμα που δεν ρυθμίζεται στο νόμο. Δυσ είναι οι δυνατές ερμηνευτικές λύσεις: Η μια είναι να αντιμετωπιστεί η περίπτωση ως *έλλειψη* δήλωσης για την τύχη του γεννητικού υλικού, και να εφαρμοστεί το

άρθρ. 7 § 7 ν. 3305. Επικέαιστερη, ωστόσο, είναι η άποψη ότι εν προκειμένω το ίδιο πρόσωπο μπορεί, μόλις ενηλικιωθεί, να αποφασίσει για την τύχη του γεννητικού υλικού του. Πρέπει, δηλαδή, κατ' εξαίρεση εδώ να γίνει δεκτό ότι, επειδή το υποβοηθούμενο πρόσωπο είναι ανήλικο, η δήλωση σχετικά με την τύχη του πλεονάζοντος γεννητικού υλικού του δεν γίνεται πριν από την έναρξη της διαδικασίας υα (της κρυοσυντήρησης), όπως ορίζει το άρθρ. 1459 ΑΚ, αλλά κατά το χρονικό σημείο της ενηλικίωσης του προσώπου.

Ειδικά στην περίπτωση όπου η δήλωση της ΑΚ 1459 προβλέπει τη διάθεση του πλεονάζοντος γεννητικού υλικού για την τεκνοποίηση άλλων προσώπων, ανακύπτουν δυστυχώς πολλά ερμηνευτικά ζητήματα λόγω του συνδυασμού με το άρθρ. 8 ν. 3305, το οποίο ρυθμίζει γενικά τη διάθεση γεννητικού υλικού για τους σκοπούς της υα. Λ.χ. φαίνεται πιο σκόπιμο και συστηματικά ορθότερο να απαιτείται ο ίδιος βαθμός *δικαιοπρακτικής ικανότητας* για τη συναίνεση στην υα (ΑΚ 1456), για τη δήλωση της ΑΚ 1459 και για τη *βάσει αυτής της δήλωσης* διάθεση του σπέρματος. Αυτό σημαίνει ότι η προβλεπόμενη στο άρθρ. 8 § 7 εδ. 1 ν. 3305 πλήρης δικαιοπρακτική ικανότητα των δωτών του γεννητικού υλικού, με διορθωτική συσταλτική ερμηνεία της διάταξης, πρέπει να θεωρηθεί ότι εφαρμόζεται μόνο στην απλή δωρεά σπέρματος ή ωαρίου και όχι στην εξεταζόμενη περίπτωση της διάθεσης κρυοσυντηρημένου πλεονάζοντος υλικού. Αντίθετα εφαρμόζονται και στη διάθεση του πλεονάζοντος σπέρματος τα ανώτατα ηλικιακά όρια του εδ. 2 και 3 του άρθρ. 8 § 7 ν. 3305. Επίσης, για τη διάθεση του πλεονάζοντος γεννητικού υλικού ισχύει η *απαγόρευση της συμφωνίας οικονομικού ανταλλάγματος* για τη διάθεση του γεννητικού υλικού (άρθρ. 8 § 1 ν. 3305), που προβλεπόταν ήδη στο άρθρ. 1459 ΑΚ. Επίσης εφαρμόζεται ο κανόνας της *ανωνυμίας των δωτών*, σύμφωνα με το άρθρ. 1460 ΑΚ. Επομένως και σε αυτή την εκδοχή διάθεσης γεννητικού υλικού, οι δότες δεν μπορούν να επιλέξουν συγκεκριμένους αποδέκτες της προσφοράς τους.

2.2. Ανάκληση και έλλειψη της δήλωσης για την τύχη του κρυοσυντηρημένου υλικού. Το πεδίο όπου οι διατάξεις του ν. 3305 και ο συνδυασμός τους με αυτές του ΑΚ δημιουργούν πραγματικές «σπαζοκεφαλίες» και ενίοτε αδιέξοδα είναι τα θέματα της *έλλειψης* της προαναφερόμενης δήλωσης για την τύχη του γεννητικού υλικού, της *ανάκλησης* της δήλωσης αυτής και της μεταγενέστερης *μεταστροφής* των δηλούντων. Δεν είναι υπερβολή να λεχθεί ότι είναι αδύνατον ένας γιατρός να τηρήσει πλήρως το νόμο στα θέματα αυτά, αφού και οι νομικοί με δυσκολία ερμηνεύουν τις σχετικές διατάξεις! Η απουσία της Αρχής υα επιτείνει, αυτονόητα, το πρόβλημα.

Μια έστω και σύντομη παρουσίαση των διάφορων προβλημάτων στο πλαίσιο αυτής της μελέτης κινδυνεύει να είναι ακατάληπτη για το μη νομικό. Έτσι η μοναδική διέξοδος φαίνεται να είναι η συνοπτική αναφορά στη ρύθμιση του νόμου, ως απάντηση σε κάποια βασικά ερωτήματα.

1. *Είναι δυνατή, και με ποιους όρους, η ανάκληση της δήλωσης των υποβοηθούμενων προσώπων σχετικά με την τύχη του κρυοσυντηρημένου σπέρματος (ΑΚ 1459);* Η ανάκληση προβλέπεται ρητά μόνο όταν οι ενδιαφερόμενοι είχαν επιλέξει τη διάθεση του κρυοσυντηρημένου υλικού σε τρίτους: Το άρθρ. 8 § 4 ν. 3305 προβλέπει ότι «*Η διάθεση ανακαλείται ελεύθερα πριν από τη χρησιμοποίηση των γαμετών ή των γονιμοποιημένων ωαρίων. Στην περίπτωση αυτή,*

²¹ Πριν την ενηλικίωση το κρυοσυντηρημένο υλικό δεν μπορεί να θεωρηθεί πλεονάζον. Αν ο ανήλικος πεθάνει, εφαρμόζεται η § 7 του άρθρ. 7 ν. 3305, για την οποία γίνεται λόγος στη συνέχεια.

οι δότες υποχρεούνται να δηλώσουν εγγράφως εάν επιθυμούν οι γαμέτες ή τα γονιμοποιημένα ωάρια τους α. να χρησιμοποιηθούν από τους ίδιους, οπότε υποχρεούνται να καλύψουν τις σχετικές δαπάνες, β. να διατεθούν για ερευνητικούς ή θεραπευτικούς σκοπούς, ή γ. να καταστραφούν». Σύμφωνα με την ορθότερη άποψη, όταν πρόκειται για ζευγάρι, αυτή η ανάκληση της διάθεσης πλεονάζοντος γεννητικού υλικού μπορεί να γίνει και μονομερώς, αλλά η νέα δήλωση για την παραπέρα τύχη του γεννητικού υλικού πρέπει να είναι κοινή. Γενικότερα πάντως, σύμφωνα με το άρθρο 7 § 7 ν. 3305, είναι δυνατόν η δήλωση του άρθρ. 1459 ΑΚ να ανατραπεί με τη μεταγενέστερη διαφωνία (μεταστροφή) του ενός μέλους του ζευγαριού. Η περίπτωση αυτή (που δημιουργεί διάφορα προβλήματα) αντιμετωπίζεται από το νόμο ως έλλειψη της δήλωσης. Τι γίνεται όμως αν υπάρχει μεταγενέστερη αλλαγή γνώμης και των δυο μελών του ζευγαριού, δηλαδή μεταγενέστερη διαφορετική συμφωνία τους αναφορικά με την τύχη του πλεονάζοντος υλικού τους; Ο νόμος δεν προβλέπει σχετικά, με αποτέλεσμα ανακολουθίες και αντιφάσεις. Η λύση είναι να γίνει δεκτή η δυνατότητα ελεύθερης ανάκλησης της δήλωσης της ΑΚ 1459 και νέας ρύθμισης της τύχης του πλεονάζοντος γεννητικού υλικού, ανεξάρτητα από το περιεχόμενο της αρχικής δήλωσης, δηλαδή και όταν η δήλωση αυτή δεν προβλέπει τη διάθεση του πλεονάζοντος υλικού σε τρίτους, αλλά την καταστροφή του ή τη χρήση του στην έρευνα. Με την εκδοχή αυτή, τα πρόσωπα από τα οποία προέρχεται το πλεονάζον υλικό μπορούν να ανακαλέσουν τη δήλωση της ΑΚ 1459, μέχρι το χρονικό σημείο της υλοποίησης αυτής της δήλωσης (λ.χ. αν η δήλωση προβλέπει την καταστροφή του γεννητικού υλικού που καθίσταται πλεονάζον, μπορεί να ανακληθεί όσο αυτό δεν έχει ακόμη καταστραφεί). Η ορθή όμως αυτή εκδοχή, δύσκολα μπορεί να θεωρηθεί εναρμονισμένη με τις διάφορες (ατυχείς) διατάξεις του ν. 3305. Γενικότερα, πάντως, αυτό που θα πρέπει να ληφθεί υπόψη σε μια ενδεχόμενη μελλοντική τροποποίηση της νομοθεσίας για την τύχη του πλεονάζοντος γεννητικού υλικού είναι ότι οι όποιες λύσεις θα πρέπει να είναι σαφείς: είτε η απόφαση των υποβοηθούμενων προσώπων θα είναι αμετάκλητη και ανεπηρέαστη από μεταγενέστερα γεγονότα είτε θα είναι ελεύθερα και μονομερώς ανακλητή μέχρι την υλοποίησή της.

2. Τι συμβαίνει όταν λείπει η δήλωση των υποβοηθούμενων προσώπων σχετικά με την τύχη του κρυοσυντηρημένου σπέρματος (ΑΚ 1459); Η έλλειψη αυτής της δήλωσης μπορεί να είναι αρχική ή να οφείλεται σε μεταγενέστερη μεταστροφή του ενός ή και των δυο ενδιαφερομένων (βλ. άρθρ. 7 § 7 ν. 3305) ή σε ανάκληση της αρχικής δήλωσης χωρίς οι ενδιαφερόμενοι να προβούν σε νέα δήλωση. Για όλες αυτές τις περιπτώσεις, το άρθρ. 7 § 7 ν. 3305 προβλέπει ότι «το γεννητικό υλικό, οι ζυγώτες και τα γονιμοποιημένα ωάρια διατηρούνται ή χρησιμοποιούνται για ερευνητικούς ή θεραπευτικούς σκοπούς ή καταστρέφονται... ύστερα από απόφαση της Αρχής [Εθνική Αρχή Ιατρικώς Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής] κατόπιν αιτήσεως της Τράπεζας Κρυοσυντήρησης»²².

²² Το (χρονικά προγενέστερο) άρθρο 1459 ΑΚ επιβάλλει την υποχρεωτική διατήρηση του γεννητικού υλικού για μια πενταετία. Το μεταγενέστερο άρθρο 7 § 7 ν. 3305/2005 κατάργησε σιωπηρά αυτή τη ρύθμιση, με αποτέλεσμα να μπορεί η περαιτέρω διάθεση ή καταστροφή του υλικού με απόφαση της Αρχής να γίνει αμέσως.

Με την έλλειψη της δήλωσης ο νόμος εξομοιώνει και ορισμένες περιστάσεις, όπως ο θάνατος, η λήξη της έγγαμης σχέσης (ακύρωση του γάμου, διαζύγιο) ή της ελεύθερης ένωσης²³ και η διάσταση των συζύγων. Η έννοια εδώ είναι ότι η υα ματαιώνεται, και το γεννητικό υλικό που είχε ληφθεί για τους σκοπούς της ακολουθεί την τύχη που διαγράφεται στη διάταξη. Και αυτή είναι μια ρύθμιση που δημιουργεί πολλές αμφιβολίες και ίσως είναι αντίθετη με τη νομολογία του Ευρωπαϊκού Δικαστηρίου Δικαιωμάτων του Ανθρώπου²⁴. Δημιουργείται, δηλαδή, το ερώτημα, γιατί θα έπρεπε η κοινή δήλωση της ΑΚ 1459 να απενεργοποιείται αυτόματα με τη λήξη της σχέσης των ενδιαφερομένων, ενώ η δήλωση αυτή είναι, όπως προαναφέρθηκε, ελεύθερα ανακλητή; Είναι δυνατόν λ.χ. οι πρώην σύζυγοι ή σύντροφοι, παρά τη λήξη της μεταξύ τους σχέσης, να εμμένουν στην απόφασή τους να παραχωρήσουν το πλεονάζον υλικό τους για την υποβοήθηση της αναπαραγωγής άλλων προσώπων. Γιατί θα πρέπει αυτό το υλικό υποχρεωτικά είτε να καταστραφεί είτε να διατεθεί για ερευνητικούς σκοπούς; Αυτό όμως προβλέπει ο νόμος στο άρθρ. 7 § 7 ν. 3305. Επίσης (κι αυτό είναι σοβαρότερο), μπορεί ο άνδρας να χρειάζεται το κρυοσυντηρημένο σπέρμα του για να αποκτήσει απόγονο με άλλη γυναίκα. Λόγω όμως του διαζυγίου, το υλικό αυτό πρέπει υποχρεωτικά είτε να καταστραφεί είτε να διατεθεί για ερευνητικούς σκοπούς, σύμφωνα με το άρθρο 7 § 7 ν. 3305!

Ένα ακόμη πρόβλημα που τίθεται είναι πώς θα πληροφορηθεί η μονάδα υα ή η τράπεζα κρυοσυντήρησης τη διάσταση, το διαζύγιο κ.λπ., καθώς και αν αρκεί η σχετική προφορική πληροφόρησή τους από έναν σύζυγο ή σύντροφο ή, προκειμένου να αποφασίσει η Αρχή σύμφωνα με το άρθρ. 7 § 7 ν. 3305, απαιτείται και κάποια απόδειξη των κρίσιμων γεγονότων. Υποστηρίζεται ότι για την εφαρμογή του άρθρ. 7 § 7 ν. 3305 απαιτείται και αρκεί η δήλωση των κρίσιμων γεγονότων από τα πρόσωπα που έχουν καταθέσει το γεννητικό υλικό τους προς την τράπεζα κρυοσυντήρησης ή τη μονάδα υα.

3. Ανάκληση της συναίνεσης και τύχη του κρυοσυντηρημένου σπέρματος. Όπως προαναφέρθηκε, για κάθε πράξη υα και ειδικότερα και για την κρυοσυντήρηση απαιτείται η συναίνεση των προσώπων που προσφεύγουν σε αυτή. Σύμφωνα με το άρθρο 1456 ΑΚ «Η συναίνεση ανακαλείται με τον ίδιο τύπο μέχρι τη μεταφορά των γαμετών ή των γονιμοποιημένων ωαρίων στο γυναικείο σώμα». Με την ανάκληση της συναίνεσης έστω και ενός από τα πρόσωπα που είχαν προσφύγει στην υα με σκοπό την απόκτηση παιδιού, η τεχνητή γονιμοποίηση ματαιώνεται. Το γεννητικό υλικό που είχε ληφθεί –και ενδεχομένως κρυοσυντηρηθεί– καθίσταται «πλεονάζον», και για την παραπέρα τύχη του ισχύουν όσα αναφέρθηκαν ως τώρα. Επομένως, αν ένα ζευγάρι συζύγων ή συντρόφων είχε προσφύγει στην υα και το σπέρμα του άνδρα είχε κρυοσυντηρηθεί και στη συνέχεια η γυναίκα για οποιοδήποτε λόγο ανακαλεί τη συναίνεσή της στην υα, το κρυοσυντηρημένο σπέρμα δεν «αποδίδεται» στον άνδρα, αλλά υποχρεωτικά ακολουθεί την τύχη που είχε προδιαγράψει το ζευγάρι κατά την έναρξη της υα, με την κοινή δήλωση της ΑΚ 1459. Ακόμη κι αν ο άνδρας αυτός εκφράσει τη μεταγενέστερη διαφωνία του με αυτή τη δήλωση, η περίπτωση θα αντιμετωπιστεί σύμφωνα με το άρθρ.

²³ Εννοείται και η λύση του συμφώνου συμβίωσης του ν. 3719/2008.

²⁴ Απόφαση Evans κατά Ηνωμένου Βασιλείου, 7.3.2006, περιοδικό Νομικό Βήμα 2006, σελ. 610.

7 § 7 ν. 3305 ως έλλειψη δήλωσης, με συνέπεια τη χρήση του σπέρματος για ερευνητικούς σκοπούς ή την καταστροφή του, ύστερα από απόφαση της Αρχής υα. Με άλλες λέξεις, ο άνδρας αυτός, ακόμη κι αν στο μεταξύ έχει καταστεί υπογόνιμος και χρειάζεται το κρυοσυντηρημένο σπέρμα του προκειμένου να τεκνοποιήσει, λόγω της ανάκλησης της συναίνεσης της γυναίκας δεν μπορεί να το κάνει. Πρόκειται για ένα παράλογο αποτέλεσμα, το οποίο μάλλον είναι αντίθετο προς τη νομολογία του Ευρωπαϊκού Δικαστηρίου Δικαιωμάτων του Ανθρώπου²⁵.

Το συμπέρασμα που αβίαστα συνάγεται από την προηγούμενη ανάλυση είναι ότι ο ίδιος ο νόμος, με τις αστοχίες και τις αντιφάσεις του, σχεδόν εξωθεί τις μονάδες υα να παρανομούν στο συγκεκριμένο ζήτημα, ενώ από την άλλη μεριά προβλέπει ποινικές και διοικητικές κυρώσεις για τις παραβάσεις.

ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΣΕ ΔΩΡΕΑ (ΔΙΑΘΕΣΗ) ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΟΡΧΙΚΟΥ ΙΣΤΟΥ ΜΕ ΣΚΟΠΟ ΤΗΝ ΤΕΚΝΟΠΟΙΙΑ ΑΛΛΩΝ

1. ΠΡΟΫΠΟΘΕΣΕΙΣ

Όπως ήδη αναφέρθηκε, όταν το σπέρμα που χρησιμοποιείται στην υα προέρχεται από τρίτο δότη, είναι υποχρεωτικά κρυοσυντηρημένο (άρθρ. 8 § 9 ν. 3305.2005). Επομένως, σχετικά με αυτή την περίπτωση κρυοσυντήρησης είναι χρήσιμο να αναφερθούν συνοπτικά οι προϋποθέσεις της δωρεάς σπέρματος και οι συνέπειές της για την περαιτέρω τύχη του.

Στη δωρεά σπέρματος δεν δημιουργούνται τριβές μεταξύ των διατάξεων του ν. 3305 με αυτές του ν. 3089/2002 και του ΑΚ· ουσιαστικά, η δωρεά σπέρματος ρυθμίζεται εξ ολοκλήρου από το ν. 3305 (εκτός από τον κανόνα της ανωνυμίας των δωτών, που είχε ήδη τεθεί με το ν. 3089/2002, άρθρ. 1460 ΑΚ).

1.1. Έλλειψη οικονομικού ανταλλάγματος. Η διάθεση γεννητικού υλικού²⁶ πρέπει να γίνεται *χωρίς οικονομικό αντάλλαγμα* (άρθρ. 8 § 1 ν. 3305)²⁷. Σύμφωνα με την § 5 του ίδιου άρθρου, δεν συνιστά αντάλλαγμα η καταβολή των δαπανών που είναι απαραίτητες για τη λήψη και την κρυοσυντήρηση των γαμετών, στις οποίες περιλαμβάνονται α) οι ιατρικές, εργαστηριακές και νοσηλευτικές δαπάνες πριν, κατά και μετά τη λήψη των γαμετών β) τα έξοδα της μετακίνησης και της διαμονής του δότη γ) κάθε θετική ζημία του δότη εξαιτίας αποχής από την εργασία του, καθώς και οι αμοιβές από εξαρτημένη εργασία που ο δότης στερήθηκε εξαιτίας της απουσίας του για την προετοιμασία και πραγματοποίηση της λήψης των γαμετών. Στο άρθρ. 8 § 5 ερωτηματικά δημιουργεί το σημείο β, σε σχέση με τα έξοδα μετακίνησης και διαμονής του δότη. Αφού ο δότης και οι λήπτες του γεννητικού υλικού είναι πρόσωπα που υποχρεωτικά δεν γνωρίζονται μεταξύ τους (ΑΚ 1460), δεν είναι αντιληπτό γιατί ένας δότης θα πρέπει να ταξιδεύει και

να διαμένει εκτός του τόπου κατοικίας του, προκειμένου να προβεί στη δωρεά του γεννητικού υλικού του, εκτός βέβαια αν πρόκειται για δότες που κατοικούν μακριά από μονάδα υα ή τράπεζα κρυοσυντήρησης.

1.2. Ηλικία και δικαιοπρακτική ικανότητα. Οι δότες σπέρματος πρέπει να είναι «*ενήλικες και με πλήρη δικαιοπρακτική ικανότητα*» (άρθρ. 8 § 7 εδ. 1 ν. 3305). Αυτή η απαίτηση του νόμου για πλήρη δικαιοπρακτική ικανότητα είναι ίσως υπερβολική, αν ληφθεί υπόψη ότι τέτοια ικανότητα δεν απαιτείται για ιδιαίτερα σοβαρές δικαιοπραξίες του δικαίου των προσώπων, όπως ο γάμος, η συναίνεση για υιοθεσία και η εκούσια αναγνώριση πατρότητας²⁸. Ο νόμος προβλέπει επίσης *ανώτατα όρια ηλικίας των δωτών* (για το δότη σπέρματος το τεσσαρακοστό έτος, βλ. άρθρ. 8 § 7 εδ. 2 και 3). Όπως προκύπτει από την επόμενη § 8 του άρθρ. 8, τα όρια αυτά επιβάλλονται επειδή σε μεγαλύτερες ηλικίες υπάρχει αυξημένος κίνδυνος εκδήλωσης γενετικού νοσήματος²⁹.

1.3. Συναίνεσεις. Άλλες διατάξεις. Η διάθεση γεννητικού υλικού γίνεται με την έγγραφη *συναίνεση* των δωτών (άρθρ. 8 § 2 εδ. 1 ν. 3305). Η χρήση του όρου «συναίνεση» εδώ δεν είναι εύστοχη ούτε ακριβής, αφού δεν νοείται ένα πρόσωπο να συναινεί σε δική του πράξη, όπως είναι η από το ίδιο το πρόσωπο διάθεση του γεννητικού υλικού του. Στη δωρεά σπέρματος, που δεν απαιτεί την υποβολή του δότη σε ιατρική θεραπεία ή πράξη, η χρήση του όρου «συναίνεση» είναι εμφανέστερα ανακριβής. Έτσι ουσιαστικά η έννοια της απαιτούμενης κατά το άρθρ. 8 § 2 εδ. 1 ν. 3305 «συναίνεσης» του δότη στη δωρεά σπέρματος δεν έχει παρά την έννοια της ρητής έκφρασης της βούλησής του να παραχωρήσει το γεννητικό υλικό του για τους σκοπούς της υα.

Σε περίπτωση που ο δότης είναι έγγαμος ή συζεί σε σύμφωνο συμβίωσης του ν. 3719/2008 ή σε ελεύθερη ένωση, απαιτείται και η έγγραφη συναίνεση της συζύγου ή συντρόφου του (άρθρ. 8 § 2 εδ. 2)³⁰. Η απαίτηση του νόμου για αυτή τη συναίνεση δεν φαίνεται να δικαιολογείται: Η δωρεά σπέρματος με σκοπό την υποβοήθηση της αναπαραγωγής άλλων προσώπων κατά κανόνα δεν συνεπάγεται καμία έννομη συνέπεια για τους δότες και τους συζύγους ή συντρόφους τους στο πεδίο της συγγένειας³¹. Εφόσον εξάλλου ισχύει ο κανόνας της ανωνυμίας μεταξύ των δωτών και των ληπτών (ΑΚ 1460), για την παράβαση του οποίου προβλέπονται και ποινικές

²⁵ Απόφαση Evans κατά Ηνωμένου Βασιλείου, βλ. προηγ. σημ.

²⁶ Ο νόμος ρυθμίζει *ενιαία* τη διάθεση σπέρματος και τη διάθεση ωαρίου από τρίτο δότη και τρίτη δώτρια αντίστοιχα. Ο έλληνας νομοθέτης δεν συντάχθηκε με κάποιες αλλοδαπές νομοθεσίες, που απαγορεύουν *ειδικά* τη δωρεά ωαρίου. Για την τελευταία ισχύουν κατά βάση τα ίδια με τη δωρεά σπέρματος.

²⁷ Η λήψη ή η παραχώρηση οικονομικού ανταλλάγματος για το γεννητικό υλικό επισείει ποινικές και διοικητικές κυρώσεις (άρθρ. 26 § 2 και 27 § 2 ν. 3305).

²⁸ Σύμφωνα με την Εισηγητική Έκθεση του ν. 3305 στο άρθρ. 8 § 7, η απαίτηση για πλήρη δικαιοπρακτική ικανότητα τέθηκε στο νόμο «προς αποφυγή πιθανής εκμετάλλευσης ασθενών που έχουν απωλέσει την ικανότητα αυτή λ.χ. για λόγους ψυχικού νοσήματος».

²⁹ Βλ. και την Εισηγητική Έκθεση του ν. 3305 στην ίδια διάταξη, που κάνει λόγο για αυξημένο κίνδυνο πρόκλησης χρωμοσωματικών ανωμαλιών και συγγενών βλαβών στο έμβρυο.

³⁰ Στην ελεύθερη ένωση ο σύντροφος μπορεί να είναι και άνδρας.

³¹ Ο δότης σπέρματος δεν καθίσταται κατά νόμο πατέρας του παιδιού που γεννιέται με υα, και αποκλείεται η δικαστική αναγνώριση της πατρότητάς του (ΑΚ 1479 § 2). Το ενδεχόμενο να αποκτήσει ο δότης συγγένεια με το παιδί είναι περιθωριακή: ο δότης σπέρματος μπορεί να αναγνωριστεί *εκούσια* (με τη θέλησή του) το παιδί, εφόσον συναινεί και η κατά νόμο μητέρα του. Και σε αυτή πάντως την περίπτωση δεν φαίνεται να δικαιολογείται η προϋπόθεση της συναίνεσης της συζύγου ή συντρόφου του δότη.

κυρώσεις (άρθρ. 26 § 11 ν. 3305), είναι και από πρακτική άποψη απίθανο να έχει η διάθεση αντίκτυπο στην προσωπική και οικογενειακή ζωή του δότη. Το σπέρμα και το ωάριο αποτελούν στοιχεία της προσωπικότητας του προσώπου από το οποίο προέρχονται και μόνο, και είναι περιεργό η νόμιμη αλτρουιστική προσφορά τους να υπόκειται στην έγκριση του συζύγου ή συντρόφου του. Θα μπορούσε μάλιστα να υποστηριχθεί ότι αυτή η δωρεά δεν αποτελεί καν θέμα του συζυγικού βίου, που προϋποθέτει συναπόφαση των συζύγων. Σε σχέση, τέλος, με τη συναίνεση του συντρόφου, πρέπει επίσης να παρατηρηθεί ότι είναι αδύνατο να ελέγξει ο γιατρός αν ο δότης συζεί σε σε ελεύθερη ένωση ή όχι³².

Το άρθρο 7 § 6 ν. 3305 δημιουργεί το ερώτημα, αν απαιτείται ξεχωριστή/ πρόσθετη έγγραφη συναίνεση του δότη σπέρματος και ειδικά για την κρυοσυντήρηση. Ο νόμος δεν δίνει σαφή απάντηση. Ως ορθότερη εμφανίζεται η αρνητική απάντηση: όπως ήδη αναφέρθηκε, το άρθρ. 8 § 2 ν. 3305 απαιτεί την έγγραφη συναίνεση του δότη για τη *διάθεση* του γεννητικού υλικού του σε άλλα πρόσωπα, υποχρεωτικό προστάδιο της οποίας, όταν πρόκειται για παροχή σπέρματος, αποτελεί η κρυοσυντήρηση. Αν λοιπόν απαιτείται έγγραφη συναίνεση του τρίτου δότη για τη διάθεση του σπέρματος που καταθέτει, θα ήταν ίσως υπερβολικό να απαιτείται και ξεχωριστή έγγραφη συναίνεσή του και ειδικότερα για την κρυοσυντήρηση.

Όλες οι προβλεπόμενες συναινέσεις, αφού προέρχονται από πρόσωπα που «συμμετέχουν» έμμεσα ή άμεσα στην να προϋποθέτουν ότι έχει προηγηθεί η προβλεπόμενη στο άρθρ. 5 ν. 3305 ενημέρωση³³.

Τέλος, ξεχωριστή θέση στις επιλογές του έλληνα νομοθέτη κατέχει η πλήρης³⁴ απαγόρευση της γνωστοποίησης της ταυτότητας του δότη γεννητικού υλικού στους λήπτες του και αντίστροφα (ΑΚ 1460). Με βάση τον κανόνα αυτό, είναι σαφές ότι οι δότες δεν μπορούν να επιλέξουν συγκεκριμένα πρόσωπα που θα υποβοηθηθούν από τη δική τους προσφορά γεννητικού υλικού ούτε οι λήπτες μπορούν να επιλέξουν συγκεκριμένους δότες.

2. ΑΝΑΚΛΗΣΗ ΤΗΣ ΔΙΑΘΕΣΗΣ

³² Ακόμη πιο υπερβολικό ή και ανεξήγητο είναι το γεγονός ότι, σύμφωνα με το άρθρ. 26 § 5 ν. 3305, η χρήση του γεννητικού υλικού χωρίς την έγγραφη συναίνεση συζύγων ή συντρόφων τιμωρείται με ποινή πολύ βαρύτερη (φυλάκιση τουλάχιστον ενός έτους), από την εφαρμογή μεθόδων να χωρίς τις έγγραφες (επομένως έγκυρες) συναινέσεις των συμμετεχόντων (φυλάκιση μέχρι ένα έτος). Δηλαδή ο νόμος θεωρεί πολύ σοβαρότερη παράβαση τη δωρεά σπέρματος χωρίς τη συναίνεση της συζύγου του δότη από την υποβολή μιας γυναίκας σε επέμβαση αφαίρεσης των ωαρίων της χωρίς την έγκυρη συναίνεσή της ή από τη διενέργεια μεταθανάτιας γονιμοποίησης χωρίς τη συναίνεση του συζύγου κατά το άρθρ. 1457 ΑΚ.

³³ Η αναφορά του άρθρ. 5 § 1 ν. 3305 στα πρόσωπα «που επιθυμούν να *συμμετάσχουν* στις μεθόδους ΙΥΑ» πρέπει να θεωρηθεί ότι ακριβώς αφορά τους τρίτους δότες και τους συζύγους ή συντρόφους τους.

³⁴ Προβλέπεται βέβαια, όπως ήταν απαραίτητο, η τήρηση ιατρικών πληροφοριών για τους δότες, σε κωδικοποιημένη μορφή (άρθρ. 1460 § 1 εδ. 2, § 6 ν. 3305), αφού αυτές οι πληροφορίες μπορεί να είναι κρίσιμες για την υγεία του παιδιού που θα γεννηθεί.

Η διάθεση είναι δυνατό να *ανακληθεί ελεύθερα* από το δότη μέχρι τη χρησιμοποίηση του γεννητικού υλικού (άρθρ. 8 § 4 ν. 3305). Η δήλωση της ανάκλησης πρέπει να είναι έγγραφη, όπως προκύπτει από την πρόβλεψη του νόμου ότι μαζί με την ανάκληση ο δότης οφείλει να δηλώσει έγγραφως τη βούλησή του σχετικά με την περαιτέρω χρήση του γεννητικού υλικού του. Ενόψει και των όσων αναφέρθηκαν σε σχέση με την προϋπόθεση της συναίνεσης του συζύγου ή συντρόφου του δότη στη διάθεση του σπέρματος ή του ωαρίου, πρέπει να γίνει δεκτό ότι η συναίνεση αυτή *δεν απαιτείται* και για την ανάκληση της διάθεσης. Πάντως σε σχέση με το *κρυοσυντηρημένο* γεννητικό υλικό η δυνατότητα ανάκλησης υπάρχει μέσα στα χρονικά όρια της κρυοσυντήρησης που προβλέπονται στο άρθρ. 7 § 3 ν. 3305, μετά την πάροδο των οποίων εφαρμόζεται το άρθρ. 7 § 4 ν. 3305 (το υλικό είτε διατίθεται για ερευνητικούς και θεραπευτικούς σκοπούς είτε καταστρέφεται με απόφαση της Αρχής να, μετά από αίτηση της τράπεζας κρυοσυντήρησης).

Σχετικά με την *τύχη* του γεννητικού υλικού σε περίπτωση ανάκλησης της διάθεσης ο δότης έχει να επιλέξει μεταξύ τριών δυνατοτήτων, τη χρησιμοποίησή του από τον ίδιο το δότη για τεκνοποιία, τη διάθεσή του για ερευνητικούς σκοπούς ή την καταστροφή του (άρθρ. 8 § 4 ν. 3305). Από τη νομοθετική ρύθμιση, επομένως, συνάγεται ότι ένα πρόσωπο δεν μπορεί να διαθέσει *εξαρχής* το γεννητικό του υλικό για ερευνητικούς ή θεραπευτικούς σκοπούς, αλλά μπορεί να το κάνει αυτό μόνο εφόσον αρχικά το έχει καταθέσει με σκοπό την υποβοήθηση στην αναπαραγωγή άλλων προσώπων και *στη συνέχεια* ανακαλέσει τη δήλωση διάθεσης προς τρίτους, κάτι που ενδεχομένως δημιουργεί απορία. Εξάλλου, η δυνατότητα που έχει ο δότης, με την ανάκληση της διάθεσης, να δηλώσει ότι στο εξής το γεννητικό υλικό του θα χρησιμοποιηθεί από τον ίδιο, πρέπει να θεωρηθεί ότι ισχύει μόνον εφόσον δημιουργήθηκε ή πρόκειται να δημιουργηθεί στο δότη αδυναμία φυσικής αναπαραγωγής, για να εμποδίζεται η καταστράτηγηση της προϋπόθεσης της ιατρικής αναγκαιότητας σύμφωνα με την ΑΚ 1455 §1, ως γενικού όρου κάθε πράξης να.

Ένα άλλο ερώτημα που δημιουργείται είναι τι συμβαίνει στην περίπτωση που ο δότης ανακαλεί τη συναίνεσή του στη διάθεση του γεννητικού υλικού του, χωρίς παράλληλα να προβεί στην προβλεπόμενη δήλωση για την περαιτέρω τύχη του. Εδώ μάλλον θα πρέπει να εφαρμοστεί αναλογικά η § 7 του άρθρ. 7 ν. 3305, που αναφέρεται στην έλλειψη δήλωσης σχετικά με την τύχη του *πλεονάζοντος* γεννητικού υλικού, οπότε το αν θα χρησιμοποιηθεί (άμεσα ή μελλοντικά) το σπέρμα και το ωάριο για ερευνητικούς ή θεραπευτικούς σκοπούς ή αν θα καταστραφεί αποφασίζεται από την Αρχή να, ύστερα από αίτηση της τράπεζας κρυοσυντήρησης. Σύμφωνα με άλλη άποψη, όταν δεν υπάρχει η δήλωση επιλογής του άρθρ. 8 § 4 ν. 3305 η ανάκληση της διάθεσης του γεννητικού υλικού δεν ισχύει.

ΔΙΚΑΙΩΜΑΤΑ ΕΠΙ ΤΟΥ ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΜΕΝΟΥ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ - ΙΑΤΡΙΚΗ ΕΥΘΥΝΗ

1. ΟΙ ΤΡΑΠΕΖΕΣ ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗΣ

Οι τράπεζες κρυοσυντήρησης προβλέπονται στο άρθρ. 17 ν. 3305/2005 ως φορείς διατήρησης και διάθεσης κρυοσυντηρημένου γεννητικού υλικού. Η ίδρυσή τους προϋποθέτει την άδεια του αρμόδιου φορέα, μετά από σύμφωνη γνώμη της Αρχής να. Μετά την αναστολή λειτουργίας της Αρχής είναι

προφανές ότι η αποφασιστική αρμοδιότητα για τη χορήγηση άδειας λειτουργίας έχει περιοριστεί στον κατά νόμο «αρμόδιο φορέα», και μάλλον δεν εφαρμόζεται ούτε αυτή³⁵. Οι τράπεζες λειτουργούν «σε νοσοκομεία, ιδιωτικές κλινικές ή άλλους ιδιωτικούς φορείς είτε εντός των μονάδων ιατρικά υποβοηθούμενης αναπαραγωγής είτε αυτοτελώς». Δηλ. είτε ένα φυσικό πρόσωπο με τις προδιαγραφές του άρθρου 17 § 4 στοιχ. α ν. 3305 (ιατρός ή επιστήμονας βιοιατρικών επιστημών πτυχιούχος πανεπιστημιακής εκπαίδευσης, με αποδεδειγμένη τουλάχιστο διετή πείρα στο γνωστικό αντικείμενο της υα σε αναγνωρισμένο κέντρο της Ελλάδας ή του εξωτερικού) είτε ένα νομικό πρόσωπο, μπορούν να είναι αυτοτελείς φορείς μιας τράπεζας κρυσυντήρησης. Όπως όμως ήδη αναφέρθηκε, μπορεί να δοθεί άδεια λειτουργίας τράπεζας κρυσυντήρησης και σε άλλους φορείς παροχής ιατρικών υπηρεσιών, όπως οι (προβλεπόμενες στο άρθρο 16 ν. 3305) μονάδες υα.

Επτά χρόνια μετά την ψήφιση του ν. 3305, η πρόβλεψη του νόμου για τη χορήγηση άδειας για τη λειτουργία τράπεζας κρυσυντήρησης παραμένει ανεφάρμοστη, αφού το προβλεπόμενο στο άρθρ. 17 ν. 3305 Προεδρικό Διάταγμα, το οποίο θα όριζε σχετικά με τους ειδικότερους όρους και τις προϋποθέσεις της άδειας, δεν έχει ακόμη εκδοθεί (όπως δεν έχει εκδοθεί και το αντίστοιχο πδ σχετικά με την αδειοδότηση των μονάδων υα). Αυτό το γεγονός, σε συνδυασμό με τη «μη λειτουργία» της Αρχής υα, όχι μόνο δεν περιποιεί τιμή στην ελληνική έννομη τάξη, αλλά δυστυχώς δημιουργεί και υποψίες ότι κάποιοι επιδίωξαν και πέτυχαν τη διατήρηση ενός καθεστώτος έλλειψης ελέγχου.

Σε όλα αυτά πρέπει επιπρόσθετα να ληφθούν υπόψη ότι όροι για τις προδιαγραφές και την εποπτεία των «ιδρυμάτων ιστών» προβλέπονται και στο πδ 26/2008³⁶. Πραγματικά, από πολλές διατάξεις του πδ 26/2008, αλλά και από το άρθρ. 42 ν. 3984/2011 περί μεταμοσχεύσεων συνάγεται ότι στην έννοια των «κυττάρων», που υπόκεινται στη ρύθμιση του πδ 26/2008 υπάγονται και τα αναπαραγωγικά κύτταρα, επομένως και οι τράπεζες κρυσυντήρησης υπάγονται στην έννοια των «ιδρυμάτων ιστών», για τα οποία θεσπίζονται προδιαγραφές, διαδικασίες πιστοποίησης και ελέγχου κ.λπ. Όπου ο νόμος θέλει, εξαιρεί ειδικά τις τράπεζες κρυσυντήρησης ή το γεννητικό υλικό από τις γενικές αυτές ρυθμίσεις. Και εδώ όμως το σύστημα ελέγχου εμποδίζεται από την αναστολή λειτουργίας της Αρχής υα, η οποία είχε οριστεί από το ελληνικό κράτος ως εποπτεύουσα αρχή και για την εφαρμογή του πδ 26/2008.

2. ΣΕ ΠΟΙΟΝ «ΑΝΗΚΕΙ» ΤΟ ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΜΕΝΟ ΣΠΕΡΜΑ;

Η απάντηση συναρτάται με όσα έχουν ήδη γίνει δεκτά για τη νομική φύση του εξωσωματικού γεννητικού υλικού³⁷: αυτό είναι ένα «πράγμα», αλλά

όχι απλώς ένα πράγμα: είναι παράλληλα και στοιχείο της προσωπικότητας. Σε ποιον όμως ανήκει κατά κυριότητα (ιδιοκτησία) το κρυσυντηρημένο σπέρμα και με τίνο την προσωπικότητα ειδικότερα συνδέεται; Για να ξεκινήσουμε από το δεύτερο ερώτημα, το γεννητικό υλικό είναι στοιχείο της προσωπικότητας κάποιου, στο μέτρο που ενσωματώνει τη δυνατότητά του να αποκτήσει απογόνους. Αυτό σημαίνει ότι το κρυσυντηρημένο σπέρμα είναι στοιχείο της προσωπικότητας του άνδρα από τον οποίο προέρχεται, όταν αυτός το τοποθετεί σε μια τράπεζα, με σκοπό να το χρησιμοποιήσει για τη δική του τεκνοποιία στο μέλλον. Αλλά ακόμη και στην περίπτωση της δωρεάς σπέρματος, όταν δηλαδή κάποιος καταθέτει το σπέρμα του προκειμένου αυτό να χρησιμοποιηθεί για την υποβοήθηση της αναπαραγωγής άλλων, για όσο χρόνο ο δότης αυτός μπορεί να ανακαλέσει τη δωρεά και να χρησιμοποιήσει το υλικό για τη δική του αναπαραγωγή (άρθρο 8 § 4 ν. 3305), το υλικό παραμένει συνδεδεμένο με τη δική του προσωπικότητα. Επομένως, μέχρι την έναρξη της χρήσης του για την αναπαραγωγή άλλων, το κρυσυντηρημένο σπέρμα που δωρήθηκε παραμένει στοιχείο της προσωπικότητας του δότη του· μετά από αυτό το χρονικό σημείο (οπότε η ανάκληση της διάθεσης του σπέρματος αποκλείεται), το κρυσυντηρημένο αυτό σπέρμα ενσωματώνει πλέον τη δυνατότητα αναπαραγωγής των λήπτών του, επομένως είναι πλέον στοιχείο της δικής τους προσωπικότητας.

Σε σχέση με την κυριότητα³⁸, είναι διαδεδομένη η άποψη ότι το γεννητικό υλικό που «κατατίθεται» στην τράπεζα κρυσυντήρησης ανήκει στη δική της κυριότητα. Αυτό σίγουρα δεν είναι σωστό για το γεννητικό υλικό που τοποθετείται στην τράπεζα από κάποιον, με σκοπό την υποβοήθηση της δικής του αναπαραγωγής: το υλικό αυτό ανήκει, χωρίς αμφιβολία, κατά κυριότητα στο δότη του. Κατά την άποψή μου, κυριότητα της τράπεζας δεν μπορεί να γίνει δεκτή ούτε αναφορικά με το σπέρμα του δότη σε δωρεά σπέρματος: είναι προτιμότερο και συνεπέστερο ο φορέας των δυο δικαιωμάτων που συναρτώνται με τη διπλή νομική φύση του γεννητικού υλικού (προσωπικότητα- κυριότητα) να είναι το ίδιο πρόσωπο και να αποσυνδέεται και από τα δυο κατά την ίδια χρονική στιγμή. Μπορεί λοιπόν να γίνει δεκτό, ενόψει και όσων προαναφέρθηκαν για τη σύνδεση με την προσωπικότητα του δότη, ότι όταν ο δωρητής σπέρματος το καταθέτει στην τράπεζα κρυσυντήρησης, δεν μεταβιβάζει και την κυριότητά του, αλλά τη διατηρεί. Από τη χρονική στιγμή που το υλικό αυτό χρησιμοποιηθεί για την αναπαραγωγή άλλων (οπότε και αποκλείεται η ανάκληση της δωρεάς), το υλικό μεταβιβάζεται απευθείας κατά κυριότητα στους λήπτες του. Περίπτωση που η τράπεζα αποκτά την κυριότητα συντρέπει, όταν ο δότης πεθάνει μετά την κατάθεση του σπέρματος, χωρίς να έχει ανακαλέσει τη δωρεά και πριν τη χρησιμοποίησή του από συγκεκριμένους λήπτες.

Στην υποστηριζόμενη αυτή εκδοχή, κατά κανόνα η τράπεζα κρυσυντήρησης απλώς «φυλάγει» το υλικό, οπότε μπορούν να εφαρμοστούν αναλογικά οι

³⁵ Όπως επίσης και για τη διατήρηση, ανανέωση και αναστολή της ίδιας άδειας, για τα οποία επίσης ο νόμος προβλέπει εμπλοκή της Αρχής υα.

³⁶ «Εναρμόνιση της Ελληνικής Νομοθεσίας προς την οδηγία 2004/23/EK του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της 31.3.2004 για τη θέσπιση προτύπων, ποιότητας και ασφάλειας για τη δωρεά, την προμήθεια, τον έλεγχο, την επεξεργασία, τη συντήρηση, την αποθήκευση και τη διανομή ανθρώπινων ιστών και κυττάρων (EEL102/7.4.2004) και τις συναφείς προς αυτήν οδηγίες 2006/17/EK (EEL 38/9.2.2006) και 2006/86/EK (EEL 294/25.10.2006)».

³⁷ Ανωτ. στο Ι.2.γ.

³⁸ Πρέπει να σημειωθεί ότι στο δικαίό μας η αναζήτηση του ιδιοκτήτη του γεννητικού υλικού δεν έχει σημασία για τη δυνατότητα κληρονόμησής του, αφού η τύχη του σε περίπτωση θανάτου του υποβοηθούμενου προσώπου ή των υποβοηθούμενων προσώπων ρυθμίζεται ειδικά (βλ. άρθρ. 7 § 7 ν. 3305 και στο κείμενο σημείο ΙΙ.2.β.2). Για το θάνατο του δωρητή σπέρματος βλ. στο κείμενο.

διατάξεις για το θεματοφύλακα στην παρακαταθήκη (ΑΚ 823-824). Πάντως η *κρυοσυντήρηση* είναι και *σύμβαση έργου* (ΑΚ 681 επ.), αφού δεν περιλαμβάνει μόνο τη φύλαξη, αλλά και τη διατήρηση του γεννητικού υλικού με εφαρμογή ορισμένης τεχνικής.

3. Η ΕΥΘΥΝΗ ΤΟΥ ΓΙΑΤΡΟΥ ΚΑΙ ΤΗΣ ΜΟΝΑΔΑΣ ΥΑ ΓΙΑ ΠΑΡΑΒΙΑΣΗ ΤΩΝ ΔΙΑΤΑΞΕΩΝ ΠΟΥ ΑΦΟΡΟΥΝ ΤΗΝ ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΚΑΙ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΜΕΝΟΥ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ

3.1. Ποινική ευθύνη και διοικητικές κυρώσεις. Τα άρθρα 26 και 27 ν. 3305 προβλέπουν κυρώσεις (ποινικές και διοικητικές αντίστοιχα) για την παραβίαση πολλών από τις διατάξεις που συνδέονται με την κρυοσυντήρηση, για τις οποίες έχει ήδη γίνει λόγος. Λ.χ. τιμωρείται η εμπορία και πώληση γεννητικού υλικού (άρα και κρυοσυντηρημένου σπέρματος και ορχικού ιστού), η χρήση γεννητικού υλικού για σκοπούς διαφορετικούς από τους προβλεπόμενους στη νομοθεσία για την υα ή χωρίς την έγγραφη συναίνεση των προσώπων όπου την προβλέπει ο νόμος, η παράβαση των ορίων ηλικίας για τα υποβοηθούμενα πρόσωπα και τους δότες, η χρήση νωπού σπέρματος τρίτου, η αποκάλυψη της ταυτότητας των δωτών και των ληπτών του γεννητικού υλικού, η χρήση κρυοσυντηρημένου σπέρματος μετά το θάνατο του προσώπου από το οποίο προέρχεται για τη δημιουργία απογόνων του, ενώ δεν συντρέχουν οι όροι της μεταθανάτιας γονιμοποίησης κ.ά. Διοικητική κύρωση (πρόστιμο 2000- 4000 ευρώ) επιβάλλεται γενικά για οποιαδήποτε παράβαση των όρων για την κρυοσυντήρηση του γεννητικού υλικού. Σε σχέση πάντως με τις διοικητικές κυρώσεις δημιουργείται πρόβλημα, με δεδομένο ότι αυτές, εκτός της ανάκλησης της άδειας λειτουργίας, επιβάλλονται κατά το νόμο από την Αρχή υα (που, όπως προαναφέρθηκε, ουδέποτε λειτουργήσε κανονικά και πλέον βρίσκεται σε αναστολή λειτουργίας).

3.2. Αστική ευθύνη³⁹ για καταστροφή σπέρματος και για παράνομη χρήση του. Η παράβαση των νόμιμων προϋποθέσεων της διάθεσης και της χρήσης του γεννητικού υλικού κατά κανόνα δεν συνδέεται με την προσβολή του σώματος, της υγείας ή της ζωής ορισμένου προσώπου (είτε κάποιου από τα εμπλεκόμενα πρόσωπα είτε του παιδιού που γεννιέται), και επομένως οι σχετικές ρυθμίσεις δεν είναι κρίσιμες για την ίδρυση της «κλασικής» αστικής ευθύνης του γιατρού. Εξάιρεση αποτελούν οι διατάξεις για τα νόμιμα όρια ηλικίας των δωτών και για την ανώτατη χρονική διάρκεια της κρυοσυντήρησης, η παράβαση των οποίων μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα τη γέννηση ενός παιδιού με προβλήματα υγείας, οπότε ο παραβάτης γιατρός θα υπέχει την ευθύνη⁴⁰ να αποκαταστήσει την περιουσιακή ζημία και την ηθική βλάβη που οφείλονται στο πρόβλημα.

Όταν υπάρχει παράνομη χρήση ή καταστροφή του γεννητικού υλικού, η αστική ευθύνη του γιατρού για αποζημίωση και ικανοποίηση της ηθικής βλάβης θα ιδρύεται ενόψει των όσων έγιναν δεκτά για τη νομική φύση του γεννητικού υλικού και για τις συνέπειες της

διάθεσής του. Επίσης, η παράνομη χρήση και καταστροφή του *πλεονάζοντος* γεννητικού υλικού συνιστά και παράβαση της *σύμβασης ιατρικής αγωγής* που καταρτίζεται μεταξύ του γιατρού ή της μονάδας υα και των υποβοηθούμενων προσώπων. Στη δωρεά σπέρματος η παράνομη χρήση του συνιστά παράβαση της σύμβασης παρακαταθήκης – σύμβασης έργου που δημιουργείται μεταξύ του δότη και της μονάδας υα ή της τράπεζας κρυοσυντήρησης. Δηλ. η αξίωση αποζημίωσης για περιουσιακή ζημία (όχι και χρηματικής ικανοποίησης της ηθικής βλάβης) κατά του γιατρού μπορεί να θεμελιωθεί και σε αυτές τις συμβάσεις.

Παράνομη χρήση του κρυοσυντηρημένου σπέρματος υπάρχει, όταν παραλείπεται ή παραβιάζεται οποιοσδήποτε σχετικός νόμιμος όρος (συναίνεση από τα προβλεπόμενα στο νόμο πρόσωπα, τύπος της συναίνεσης, ενημέρωση, δικαιπρακτική ικανότητα, όρια ηλικίας, έλλειψη οικονομικού ανταλλάγματος). Παρανόμια υπάρχει και όταν το (πλεονάζον) γεννητικό υλικό χρησιμοποιείται με τρόπο διαφορετικό από τον οριζόμενο στη δήλωση της ΑΚ 1459, και γενικότερα (και πριν, δηλαδή, καταστεί αυτό πλεονάζον) όταν η χρήση του αντιβαίνει στη βούληση που έχουν νόμιμα εκφράσει οι ενδιαφερόμενοι (λ.χ. ο σύζυγος παραχωρεί το σπέρμα του για να διενεργηθεί τεχνητή σπερματέγχυση στη σύζυγό του και ο γιατρός χρησιμοποιεί το σπέρμα για τη διενέργεια πειραμάτων ή για τη γονιμοποίηση άλλων προσώπων). Τέλος, παράνομη χρήση του γεννητικού υλικού υπάρχει και όταν αυτό διατίθεται, παρά το γεγονός ότι η διάθεση έχει ανακληθεί, σύμφωνα με τα άρθρ. 8 § 4 και 7 § 7 ν. 3305, καθώς και όταν, μετά την ανάκληση, το γεννητικό υλικό χρησιμοποιείται κατά τρόπο διαφορετικό από αυτόν που προσδιορίζει η δήλωση που συνοδεύει την ανάκληση (άρθρ. 8 § 4 εδ. 2).

Σε όλες αυτές τις περιπτώσεις υπάρχει παράνομη προσβολή της κυριότητας και της προσωπικότητας του δότη, η οποία θεμελιώνει κατά κανόνα αξίωση για *χρηματική ικανοποίηση λόγω ηθικής βλάβης* (ΑΚ 59, 932). Το ύψος της χρηματικής ικανοποίησης προσδιορίζεται με βάση τη συγκεκριμένη περίπτωση. Δεν νομίζω, πάντως, ότι θα πρέπει το ύψος της χρηματικής ικανοποίησης να αυξάνεται, όταν πρόκειται για γονιμοποιημένο ωάριο, σε σχέση με το απλό γεννητικό υλικό, ενόψει του ότι ο νόμος τα αντιμετωπίζει ενιαία. Εξάλλου είναι δυνατό να προκύψουν και *αξιώσεις αποκατάστασης και περιουσιακής ζημίας (αποζημίωσης)*. Αυτό συμβαίνει, όταν ο δότης υποβάλλεται σε έξοδα για την εκ νέου λήψη και κρυοσυντήρηση γεννητικού υλικού, που του χρειάζεται για την απόκτηση δικών του απογόνων με υα, επειδή η μονάδα υα από αμέλεια κατέστρεψε ή διέθεσε το γεννητικό υλικό του σε άλλα πρόσωπα χωρίς να συντρέχουν οι όροι του νόμου (λ.χ. διάθεση του κρυοσυντηρημένου σπέρματος, ενώ ο δότης ανακάλεσε τη διάθεση, δηλώνοντας ότι επιθυμεί να το χρησιμοποιήσει για τον εαυτό του, σύμφωνα με το άρθρ. 8 § 4 ν. 3305).

Αξίωση, τέλος, χρηματικής ικανοποίησης λόγω ηθικής βλάβης μπορεί να έχει και ο δότης, του οποίου η ταυτότητα έγινε γνωστή στους λήπτες του γεννητικού υλικού του, κατά παράβαση του κανόνα της ΑΚ 1460⁴¹.

³⁹ Ως αστική ευθύνη εννοείται η υποχρέωση κάποιου να αποκαταστήσει, με την καταβολή χρηματικού ποσού, την περιουσιακή ζημία ή να επανορθώσει την ηθική βλάβη (την ψυχική ταλαιπωρία) που προκάλεσε σε κάποιον άλλο με παράνομη και υπαίτια συμπεριφορά του.

⁴⁰ Η αναφορά σε ευθύνη του γιατρού έχει και τη γενικότερη έννοια της ευθύνης της μονάδας υα ή της τράπεζας κρυοσυντήρησης για πράξεις ή παραλείψεις του προσωπικού της.

⁴¹ Το ίδιο ισχύει και για την αντίστροφη περίπτωση, όπου η ταυτότητα των ληπτών γνωστοποιείται παράνομα στους δότες. Η αξίωση αυτή είναι ανεξάρτητη από το γεγονός ότι η γνωστοποίηση αυτή δεν επάγεται συνέπειες στο πεδίο της συγγένειας,

Δικαιούχος της αξίωσης αποκατάστασης της ηθικής βλάβης του είναι κατά πρώτο λόγο το ίδιο το πρόσωπο από το οποίο προέρχεται το γεννητικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε ή καταστράφηκε παράνομα. Δημιουργείται περαιτέρω το ερώτημα αν η παράνομη χρήση ή καταστροφή κρυοσυντηρημένου σπέρματος θεμελιώνει αξιώσεις και υπέρ της συζύγου ή συντρόφου του άνδρα από τον οποίο προήλθε το σπέρμα. Για την απάντηση σε αυτό το ερώτημα είναι αναγκαίο να διακρίνουμε για άλλη μια φορά μεταξύ του σπέρματος που έχει ληφθεί με σκοπό να αποκτήσει παιδιά το ζευγάρι, και του σπέρματος δότη – δωρητή (δηλ. που το διέθεσε για την αναπαραγωγή άλλων). Στην πρώτη περίπτωση, όπως αναφέρθηκε, κατά τη λογική του νόμου η υα συνιστά θεραπευτική αγωγή για το ζευγάρι και όχι για μεμονωμένο πρόσωπο. Και το απλό γεννητικό υλικό, που λαμβάνεται από το ένα μέλος του ζευγαριού μέσα από μια τέτοια διαδικασία, *ενσωματώνει τη δυνατότητα του ζευγαριού να αποκτήσει παιδιά*. Γι' αυτό το λόγο η δήλωση για την τύχη και του απλού γεννητικού υλικού είναι υποχρεωτικά κοινή (ΑΚ 1459). Με βάση τις σκέψεις αυτές μπορεί να θεωρηθεί ότι ο γιατρός υπέχει αστική ευθύνη για παράνομη χρήση ή καταστροφή του σπέρματος έναντι και των δυο συζύγων ή συντρόφων, και όχι μόνο έναντι του άνδρα. Στη δωρεά σπέρματος αρμόζει διαφορετική απάντηση. Οι γαμέτες που προέρχονται από τον έναν σύζυγο ή σύντροφο δεν αποτελούν στοιχεία της προσωπικότητας του άλλου ούτε βέβαια του ανήκουν κατά κυριότητα, παρά την απαίτηση του νόμου να υπάρχει και η δική του συναίνεση για τη διάθεση (άρθρ. 8 § 2 εδ. 2). Επομένως, στη δωρεά σπέρματος η παράνομη χρήση ή καταστροφή του τελευταίου δεν δημιουργεί αξιώσεις αποζημίωσης και υπέρ της συζύγου ή συντρόφου του δότη.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Λόγω της ιδιαιτερότητας και αυτοτέλειας του ελληνικού δικαίου για την ιατρικά υποβοηθούμενη αναπαραγωγή είναι πιο χρήσιμη η παράθεση τίτλων από την πλούσια ελληνική βιβλιογραφία.

- Αγαλλοπούλου Π., /Κουτσουράδης Αχ.,** Ιατρική υποβοήθηση στην ανθρώπινη αναπαραγωγή (προπαρασκευαστικές εργασίες-συζήτηση στη Βουλή) (2004)
- Ανδρουλιδάκη- Δημητριάδη Ι.,** Η υποχρέωση ενημέρωσης του ασθενούς (1993)
- Νομικά προβλήματα από την τεχνητή γονιμοποίηση (προβλήματα αστικού δικαίου), ΝοΒ 1986, 10
- Η σύμβαση ιατρικής υποβοήθησης στην ανθρώπινη αναπαραγωγή, Γενέθλιον Απόστολου Γεωργιάδη Ι (2006), 27
- Αστική ευθύνη του γιατρού από την τεχνητή ανθρώπινη αναπαραγωγή, Digesta 2004 (τεύχος Δ), 433
- Βάρκα-Αδάμη Α.,** Βιοϊατρικά επαγγέλματα και ιατρική ευθύνη, Συνήγορος 2001, τ. 28, 410
- Ο ν. 3089/2002 για την «ιατρική υποβοήθηση στην ανθρώπινη αναπαραγωγή». Μια πρώτη προσέγγιση, ΕΛΛΔνη 2003, 1510
- Βελλής Γ.,** Ζητήματα από το ν. 3089/2002 για την υποβοηθούμενη ανθρώπινη αναπαραγωγή, ΧρΙΔ 2003, 495

δηλ. ο δότης σπέρματος δεν μπορεί να υποχρεωθεί να αναγνωρίσει το παιδί και να συνδεθεί νομικά μαζί του. Η αποκάλυψη της ταυτότητας αντίκειται στην προστασία της ιδιωτικής ζωής και των ευαίσθητων προσωπικών δεδομένων δотών και ληπτήτων.

- Βιδάλης Τ.,** Ζωή χωρίς πρόσωπο-Το Σύνταγμα και η χρήση του ανθρώπινου γενετικού υλικού (2003)
- Το πρόταγμα της οικογένειας: Η συνταγματικότητα του νόμου για την «ιατρική υποβοήθηση στην ανθρώπινη αναπαραγωγή», ΝοΒ 2003, 834.
- Ο έλεγχος της ιατρικώς υποβοηθούμενης αναπαραγωγής από τη Διοίκηση, ΕΔΔΔΔ 2006, 16
- Βιβλιοθήκη Κριτικής Επιθεώρησης 1: Ιατρική Υποβοήθηση στην Ανθρώπινη Αναπαραγωγή και Αστικό Δίκαιο (2002)
- Δημοσιεύματα Ιατρικού Δικαίου και Βιοηθικής Ι: Ο νέος Κώδικας Ιατρικής Δεοντολογίας (ν. 3418/2005): Βασικές ρυθμίσεις (νομική, ιατρική και κοινωνιολογική προσέγγιση) (2006)
- Ελληνική Εθνική Επιτροπή Βιοηθικής,** Εισηγήσεις στα θέματα: Κλωνοποίηση, Ιατρικώς Υποβοηθούμενη Αναπαραγωγή, Κώδικας Ιατρικής Δεοντολογίας, www.bioethics.gr/ επιτροπή/εισηγήσεις.
- Καϊάφα-Γκμπάντι Μ.,** Οι ποινικές διατάξεις του ν. 3305/2005: συμβολικό ποινικό δίκαιο για τις καταχρήσεις της βιοϊατρικής στην ανθρώπινη αναπαραγωγή; Δημοσιεύματα Ιατρικού Δικαίου και Βιοηθικής 2: Ζητήματα βιοτεχνολογίας- κλωνοποίηση (Biotechnology issues-Cloning) (2006), 79
- Καράκωστας Ι.,** Τα νομικά προβλήματα της τεχνητής γονιμοποίησης και οι λύσεις του ν. 3089/2002, ΔΕΕ 2/2003, 132= Τιμητικός Τόμος Κ. Μπέη ΙΙΙ (2003), 2769
- Καράσης Μ.,** Το Σχέδιο Νόμου για την «ιατρική υποβοήθηση στην ανθρώπινη αναπαραγωγή»- Κριτική θεώρηση, ΧρΙΔ 2002, 577
- Η κρίση του οικογενειακού δικαίου μετά το ν. 3089/2002 για την «ιατρική υποβοήθηση στην ανθρώπινη αναπαραγωγή», Αρμ 2004, 1233
- Το νέο Σχέδιο Νόμου για την «εφαρμογή των μεθόδων της ιατρικώς υποβοηθούμενης αναπαραγωγής» (Προβλήματα συνταγματικότητας και προτάσεις), Αρμ 2005, 829
- Κοτζάμπασα Α.,** Η ανωνυμία του δότη σπέρματος στην τεχνητή γονιμοποίηση ως νομικό και ηθικό ζήτημα, Αρμ 2000, 710
- Το δικαίωμα στην αναπαραγωγή- Ανάμεσα στην ελευθερία της φυσικής αναπαραγωγής και το νομοθετημένο δικαίωμα της τεχνητής αναπαραγωγής, Γενέθλιον Απόστολου Γεωργιάδη Ι (2006), 395
- Κουμάντος Γ.,** Προβλήματα βιοηθικής (2003)
- Κουμουτζής Ν.,** Μεταθανάτια τεχνητή γονιμοποίηση με χρήση ξένου γεννητικού υλικού, ΧρΙΔ 2005, 668 επ
- Η ίδρυση της συγγένειας με τον πατέρα μετά το ν. 3089/2002, ΧρΙΔ 2003, 498
- Κουνουγέρη-Μανωλεδάκη Ε.,** Οικογενειακό Δίκαιο, 4^η έκδοση (2008)
- Τεχνητή γονιμοποίηση και οικογενειακό δίκαιο. Η ειδική ελληνική νομοθεσία: νόμοι 3089/2002 και 3305/2005 (2005)
- Ο νέος ν. 3305/2005 για την «εφαρμογή των μεθόδων της ιατρικώς υποβοηθούμενης αναπαραγωγής»: ζητήματα από το συσχετισμό των διατάξεων μεταξύ τους και με τις ρυθμίσεις του ν. 3089/2002, Αρμ 2005, 5
- Σπέρμα, ωάριο και γονιμοποιημένο ωάριο που βρίσκονται έξω από το ανθρώπινο σώμα- Η νομική τους φύση και μεταχείριση κατά το αστικό δίκαιο, Αρμ 1999, 465
- Εξωσωματική γονιμοποίηση με ξένο γεννητικό υλικό. Ζητήματα Βιοηθικής και Αστικού Δικαίου, ΚριΕ 1/2001, 21= Ιατρική Υποβοήθηση στην Ανθρώπινη Αναπαραγωγή, 35 επ.
- Υποβοηθούμενη αναπαραγωγή με κρυοσυντηρημένο γεννητικό υλικό, ΧρΙΔ 2001, 769

- Μεταθανάτια τεχνητή γονιμοποίηση και πρόωρη γέννηση: η ίδρυση της συγγένειας, ΧρίΔ 2005, 97

- Το δίκαιο ως εργαλείο κοινωνικού ελέγχου της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, περιοδικό Ίνδικτος, τεύχος 14, 2001, 145

-(επιμ.), Τεχνητή γονιμοποίηση και γενετική τεχνολογία: Η ηθικονομική διάσταση, Δημοσιεύματα Εταιρίας Νομικών Βορείου Ελλάδος 48 (2003) (παραπέμπεται ως ΕΝΟΒΕ 48)

- Τεχνητή γονιμοποίηση και Αστικό Δίκαιο: Το Σχέδιο Νόμου για την «Ιατρική υποβοήθηση στην ανθρώπινη αναπαραγωγή», Αρμ 2002, 1417

- Οι φορείς του AIDS και το δικαίωμά τους στην απόκτηση απογόνων: Η πρώτη απόφαση (αριθμ. 1/2006) της Εθνικής Αρχής Ιατρικώς Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής, Δημοσιεύματα Ιατρικού Δικαίου και Βιοηθικής 2: Ζητήματα βιοτεχνολογίας- κλωνοποίηση (Biotechnology issues-Cloning) (2006), 31

Κουτσουμπίνης Σ., Συνταγματικά προλεγόμενα σε ένα ζήτημα βιοηθικής, Διδικ 1994, 1089

Μαρκεζίνη Κ., Η έννοια της συγκατάθεσης ως έκφραση αυτονομίας του ασθενούς, Επιστήμη και Κοινωνία, τεύχος 8-9 (άνοιξη-φθινόπωρο)/ 2002, 63

Μηλαπιδίου Μ., Παρατηρήσεις επί του νέου νόμου για την εφαρμογή της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, ΠοινΔνη 2/2005, 137

-Ο Ν. 3305/2005 «Για την εφαρμογή των μεθόδων της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής»: ποινικές κυρώσεις, Δημοσιεύματα Ιατρικού Δικαίου και Βιοηθικής 2: Ζητήματα βιοτεχνολογίας- κλωνοποίηση (Biotechnology issues-Cloning) (2006), 93

Νικολόπουλος Π., Ζητήματα από τη νομική φύση των κρυοσυντηρημένων γαμετών και

γονιμοποιημένων ωαρίων και από τη δημιουργία μονογονεϊκής οικογένειας με υποβοηθούμενη αναπαραγωγή, Γενέθλιον Απόστολου Γεωργιάδη Ι (2006), 557

Παντελίδου Κ., Παρατηρήσεις στο Σχέδιο Νόμου για την ιατρική υποβοήθηση στην ανθρώπινη αναπαραγωγή, ΧρίΔ 2002, 586

Παπαδοπούλου-Κλαμαρή Δ., Η συγκατάθεση του τεκμαιρόμενου πατέρα στην τεχνητή γονιμοποίηση, σε Ιατρική Υποβοήθηση στην Ανθρώπινη Αναπαραγωγή, 63

Παπαχρίστου Θ., Η τεχνητή αναπαραγωγή στον Αστικό Κώδικα (2003)

- Τεχνητή σπερματέγχυση post mortem, ΝΟΜΟΣ 4-Αφίερωμα στο Ν. Παπαντωνίου (1996), 645

Ρεθυμνωτάκη Ε., Ρύθμιση ή αυτορρύθμιση; Το παράδειγμα της ιατρικά υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (2003)

Σπυριδάκης, Η νέα ρύθμιση της τεχνητής γονιμοποίησης και της συγγένειας (2003)

Ταρλατζής Β., Τεχνικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής: Ιατρικοί και δεοντολογικοί προβληματισμοί, ΕΝΟΒΕ 48, 17

Τροκάνας Θ., Ανθρώπινη Αναπαραγωγή. Η ιδιωτική αυτονομία και τα όριά της (2011)

Φουντεδάκη Κ., Αστική ιατρική ευθύνη. Γενική εισαγωγή, Δογματική και Δικαιοπολιτική θεώρηση, Θεμελιώδεις έννοιες (2003)

- Ανθρώπινη αναπαραγωγή και αστική ιατρική ευθύνη (2007)

- Η πληροφόρηση του παιδιού που γεννήθηκε με ετερόλογη τεχνητή γονιμοποίηση για την καταγωγή του, ΕΝΟΒΕ 48, 131

ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΟΡΧΙΚΟΥ ΙΣΤΟΥ: Η ΨΥΧΟΛΟΓΙΚΗ ΠΛΕΥΡΑ

Κ. Χατζηλάκου¹, Μ. Μαυρίδου², Α. Μητσογιάννη³

¹ MSc, Κοινωνική και Κλινική Ψυχολόγος, Ψυχοθεραπεύτρια, Εκπαιδευτρια και Επόπτρια Gestalt, Μέλος EAGT και ΣΕΨ, Ιδρυτικό μέλος Κέντρου Ψυχοθεραπείας και Εκπαίδευσης Gestalt Foundation, ² ΒΑ Ψυχολογίας, Ψυχοθεραπεύτρια και Επόπτρια Gestalt, ³ Κλινική Ψυχολόγος, Ψυχοθεραπεύτρια

Το κείμενο αποτελεί συνοπτική παρουσίαση της θεωρητικής εισήγησης της ψυχολόγου Κάτιας Χατζηλάκου που πραγματοποιήθηκε στο πλαίσιο των μετεκπαιδευτικών συναντήσεων «Μαθήματα Ανδρολογίας» στο Νοσοκομείο – Μαιευτήριο «Έλενα Βενιζέλου», στις 17/5/2011.

Είναι γεγονός πως η αλματώδης πρόοδος της ιατρικής επιστήμης έχει αυξήσει σημαντικά, όχι μόνο το προσδόκιμο ζωής, αλλά και το προσδόκιμο της αναπαραγωγής, τη στιγμή που οι συνθήκες του σύγχρονου βίου έχουν μειώσει την αναπαραγωγική ικανότητα σε μεγάλο αριθμό ζευγαριών. Μέθοδοι που επιμηκύνουν την δυνατότητα αναπαραγωγής του άντρα και βοηθούν τεχνικά την αναπαραγωγή είναι η κρυοσυντήρηση σπέρματος και ορχικού ιστού.

Με την κρυοσυντήρηση του σπέρματος, τα σπερματοζωάρια έχουν την δυνατότητα να διατηρήσουν τη ζωτικότητα τους για μεγάλο χρονικό διάστημα, επιτρέποντας τη χρήση του σπέρματος σε διάφορες τεχνικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (σπερματέγχυση, εξωσωματική γονιμοποίηση, μικρογονιμοποίηση) σε μεταγενέστερο χρόνο από την ημέρα που λαμβάνεται το δείγμα, με σκοπό την επίτευξη της εγκυμοσύνης. Η μέθοδος αυτή συνίσταται σε περιπτώσεις που ένας άνδρας έχει ολιγοσπερμία ή που παρουσιάζει διαφοροποίηση στις παραμέτρους του σπέρματος κατά τη διαδρομή μιας χρονικής περιόδου ή σε περίπτωση που υπάρχει δυσκολία παραγωγής σπέρματος. Ακόμη, η μέθοδος αυτή έχει βοηθήσει και τους άνδρες που υποφέρουν από καρκίνο ή άλλες παθήσεις, των οποίων η θεραπεία (ακτινοθεραπεία, χημειοθεραπεία, επικήμενη επέμβαση) ενδέχεται να οδηγήσει στη στειρότητα, να αποκοούν τελικά δικά τους παιδιά. Είναι ενδιαφέρον ότι, ακόμη και σε περιπτώσεις αζωοσπερμίας (απουσία σπερματοζωαρίων από την εκσπερμάτιση), εφαρμόζεται αντίστοιχη μέθοδος, αυτή της κρυοσυντήρησης ορχικού ιστού. Σε περιπτώσεις αζωοσπερμίας, η λήψη των σπερματοζωαρίων απαιτείται να γίνει απευθείας από την επιδιδυμίδα ή τον όρχι. Τα σπερματοζωάρια που απομονώνονται από την επιδιδυμίδα με μικροχειρουργική αναρρόφηση (MESA) ή από τον όρχι με βιοψία (TESE) κρυοσυντηρούνται μέχρι να χρησιμοποιηθούν για γονιμοποίηση. Η κρυοσυντήρηση σε αυτές τις περιπτώσεις επιβάλλεται, προκειμένου να μην υποστεί ο σύζυγος εκ νέου υποβολή σε μικροχειρουργική επέμβαση για κάθε νέο κύκλο εξωσωματικής γονιμοποίησης, που με την λήψη βιοψίας ορχικού ιστού επιβεβαιώνεται η παρουσία ή μη σπερματοζωαρίων ή η πιθανότητα κακοήθειας και λαμβάνονται σπερματοζωάρια εφόσον υπάρχουν.

Η χρήση των προαναφερθεισών τεχνικών λειτουργεί θετικά στην ψυχολογία του άνδρα και γενικότερα στην ψυχολογία των άτεκνων ζευγαριών. Το στρες μειώνεται σημαντικά, καθώς αυξάνεται ο χρόνος που έχουν στη διάθεσή τους για τεκνοποίηση, και το δείγμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μελλοντικές προσπάθειες εξωσωματικής. Ακόμη, ελαχιστοποιείται

το ρίσκο που μπορεί να έχει μια επέμβαση ως προς την προοπτική της πρόκλησης στειρότητας στον άντρα. Επιπρόσθετα, ο διαθέσιμος αυτός χρόνος, που προσφέρει η συγκεκριμένη επιστημονική μέθοδος, μπορεί να χρησιμοποιηθεί από το ζευγάρι ως ευκαιρία να επεξεργαστεί θέματα που έχουν προκύψει μέσα στη σχέση, όπως σεξουαλικά προβλήματα, δυσαρέσκεια του ενός για το πρόβλημα που αντιμετωπίζουν, ζητήματα επικοινωνίας και συναισθηματικής απομάκρυνσης.

Ωστόσο, από τη στιγμή που οι δυο σύντροφοι αρχίσουν να υποψιάζονται ότι δεν μπορούν να κάνουν παιδιά με τη "φυσιολογική οδό", ξεκινάει η αναζήτηση της λύσης της υπογονιμότητας σε ειδικούς, μέσω διαφόρων εξετάσεων, γεγονός που ήδη μπορεί να επιβαρύνει ψυχολογικά, σε μια πρώτη φάση. Περαιτέρω, η ίδια η στειρότητα, είτε ως κλινικά αποδεδειγμένη περίπτωση είτε ως μια εν δυνάμει κατάσταση, ενδέχεται να προκαλέσει βαθύτερες ψυχολογικές επιπτώσεις στο ζευγάρι. Είναι καλά τεκμηριωμένο ότι στην ανακάλυψη της στειρότητάς τους, τα ζευγάρια περνούν μία κρίση αρνητικών ψυχολογικών αντιδράσεων (Rosenfeld & Mitchell 1979, Menning 1980, Dennerstein & Morse 1985, Daniluk 1988, Wright et al. 1991, Nachtigall et al. 1992, Tarlatzis et al. 1993, van Balen & Trimbos-Kemper 1993). Ένα ζευγάρι που έρχεται αντιμέτωπο μ' αυτό το πρόβλημα, μπορεί να βιώσει συναισθήματα ματαίωσης και αποτυχίας. Αποτέλεσμα αυτών των αρνητικών ψυχολογικών αντιδράσεων αποτελεί η αύξηση των επιπέδων στρες του ζευγαριού, που προκύπτει από την αδυναμία να πετύχουν τις προσδοκίες της ζωής τους ή αυτές που η κοινωνία απαιτεί από αυτούς. (Elstein 1975, Seibel & Taymor 1982, Daniluk 1988, Wright et al. 1991, Schenker et al. 1992). - *Sexual and Marital Therapy, Vol. 11, No. 3 (1996)*. Κάτι τέτοιο μπορεί να κλονίσει τη σχέση όταν αυτή δεν έχει γερή βάση αγάπης και αλληλοϋποστήριξης. Έτσι, είναι πιθανό να φέρει τους δυο συντρόφους αντιμέτωπους, με την τάση να αλληλοκατηγορούνται για το ποιος «φταίει», πληγώνοντας ο ένας τον άλλον και δημιουργώντας σεξουαλικά προβλήματα, όπως μειωμένη σεξουαλική επιθυμία και στους δύο συντρόφους, ειδικότερα δε στον άνδρα διαταραχή στύσης, ανεσταλμένη εκσπερμάτιση. Ερευνητικά δεδομένα δείχνουν ότι η αγωνία για τη στειρότητα έχει άμεση συσχέτιση με στυτικές δυσλειτουργίες (Rieker et al. 1985), ενώ σε άλλη έρευνα, οι άνδρες αναφέρονταν στη συνουσία ως «άσφαιρες προσπάθειες» (Seibel & Taymor 1982). Συχνά αναπτύσσονται συζυγικές διαφωνίες μεταξύ "στείρων" ζευγαριών, ιδίως όταν πρέπει να πάρουν υπό πίεση κάποια ιατρική απόφαση.

Πιο συγκεκριμένα, ο άνδρας, παρόλο που υπόκειται σε λιγότερες και πιο απλές εξετάσεις σε σχέση με τη γυναίκα, αντιμετωπίζει μεγαλύτερη ψυχολογική πίεση. Η κοινωνική αναφορά και οι κοινωνικά βιωμένες «εγγραφές» σε σχέση με τον εαυτό του και τον σεξουαλικό του ρόλο, διασυνδέονται με τον δικό του, υποκειμενικό τρόπο αντίληψης της ανδρικής του υπόστασης. Βιώνει το φόβο της απαξίωσης από τη σύντροφό του και της απώλειας της "εξουσίας" του

μέσα στην οικογένεια, σε περίπτωση που αποδειχτεί ότι έχει πρόβλημα γονιμότητας. Οι μέθοδοι κρυσσυντήρησης σπέρματος και ορχικού ιστού, έρχονται να λύσουν το πρόβλημα της τεκνοποίησης, αφαιρούν όμως από τον ίδιο το *ολοκληρωμένο βίωμα* της τεκνοποίησης, αφού επιτυγχάνεται με υποβοηθούμενο, τεχνικό τρόπο. Άλλωστε, καθώς καταγράφεται ένα αίσθημα «ελαττωματικότητας» που προκύπτει ως αποτέλεσμα της στειρότητας, ώστε τα άτομα αρχίζουν να θεωρούν τους εαυτούς τους κοινωνικά ή σεξουαλικά μη ελκυστικούς ή θελκτικούς (Keye 1984, Rosenfeld & Mitchell 1979), μπορούνε αναλογικά να επεκτείνουμε τη σχετική παρατήρηση και στην θέση αυτή. Η στειρότητα ως πιθανή ή ως κλινικά αποδεδειγμένη περίπτωση (και άρα η χρησιμοποίηση των εν λόγω τεχνικών) μπορεί να εγκλωβίσει τον άντρα στη σκέψη ότι είναι ανίκανος και ανήμπορος να εκπληρώσει αυτό που η φύση και η κοινωνία προστάζουν, την συνέχιση της υπαρξής του από την απόκτηση ενός παιδιού με φυσικό τρόπο. Η αδυναμία αυτής της προσδοκίας μπορεί να καθηλώσει τον άντρα στο αίσθημα ότι χάνει το νόημα της υπαρξής του.

Η αρχική αντίδραση είναι σοκ και δυσπιστία, τα οποία εξελίσσονται σε άρνηση, θυμό, απομόνωση, ενοχή, θλίψη και πένθος. (Keye 1984, Tarlatzis et al. 1993). Αρνείται να δεχτεί ουσιαστικά μια πραγματικότητα, αναλώνεται σε μια διαδικασία επανειλημμένων διαγνωστικών εξετάσεων προσφεύγοντας σε περισσότερους ειδικούς και, κατά κάποιο τρόπο, τελικά «σύρεται» καταναγκαστικά, εξωθείται στην δεδομένη επιλογή, από τον «καλλιεργούμενο» φόβο της αδυναμίας τεκνοποίησης ή ρητά από την σύντροφό του. Βιώνει έντονο στρες που προκύπτει από εσωτερικές ψυχικές συγκρούσεις που καθορίζουν τον βαθμό απαίτησης και στόχευσης της «επιτυχίας» του, προκαλώντας στον ίδιο θυμό για τον εαυτό του και κατ' επέκταση γίνεται επιρρεπής σε συγκρούσεις με τη σύντρόφό του. Κάποιες φορές μάλιστα, μπορεί να ελαχιστοποιεί κάθε θετικό σχόλιο που μπορεί να του κάνουν, ενώ αντίθετα δίνει σημασία σε οποιαδήποτε νύξη σχετικά με σφάλματα και αδυναμίες του (*αίσθημα μειονεξίας*).

Ένα συνηθισμένο μοτίβο σύγκρουσης ανάμεσα στο ζευγάρι, μετά τη διάγνωση ανδρικής στειρότητας, είναι μια περίοδος αίσθησης ανικανότητας και κατάθλιψης, διάθεσης απόσυρσης από τον άνδρα και εχθρότητα και ενοχή από την πλευρά της γυναίκας (Berger 1980). Σταδιακά μπορεί να απομονώνεται σεξουαλικά με αραίωση των επαφών, χάνοντας το σεξουαλικό του ενδιαφέρον ή την ικανοποίηση από την ερωτική πράξη, φοβούμενος να έρθει αντιμέτωπος με το πρόβλημα και την «υπενθύμιση» του, αφού η ίδια η σεξουαλική επαφή είναι άμεσα συνδεδεμένη με την τεκνοποίηση. Δεν μπορούμε όμως να παραλείψουμε τη στάση της γυναίκας απέναντι στο ενδεχόμενο ενός προβλήματος ανδρικής υπογονιμότητας και μιας επίλυσής του με την χρησιμοποίηση τεχνικών όπως αυτήν της κρυσσυντήρησης σπέρματος και ορχικού ιστού. Όταν η γυναίκα χρεώνει τον άντρα και θίγει με κάποιον τρόπο τον ανδρισμό του, εκείνος βυθίζεται όλο και περισσότερο μέσα στην απελπισία διακατεχόμενος από ένα αίσθημα ανημπόριας. Η κριτική αυτή στάση της (έστω με την παρεμβολή αμφιθυμικών διαλειμμάτων) διογκώνει και συντηρεί μια προβληματική δυναμική, με αποτέλεσμα ο άντρας να νιώθει ευνοχισμένος και ανεπαρκής. Κυριαρχεί η ενοχική σκέψη αλλά και μια «αντίστροφη» απορριπτική ψυχική στάση προς τη σύντρόφό του, την οποία καταλήγει ενδεχομένως να αποφεύγει (σε επίπεδο επικοινωνίας όσο και σαρκικής επαφής) για να μην εισπράξει και πάλι την δυσφορία της ότι

υποβάλλεται σε τεχνικές μεθόδους γονιμοποίησης. Κάποιες φορές, πραγματοποιώντας την ψυχική αυτή στάση, ο άντρας μπορεί να οδηγηθεί σε εξωσυζυγικές σχέσεις, στην προσπάθειά να αποκαταστήσει την σεξουαλική του αυτοεκτίμηση.

Ιδιαίτερη είναι, μάλιστα, η περίπτωση ανεσταλαμμένης εκσπερμάτισης του άντρα όταν μπορεί δευτερογενώς να αναχθεί σε πρόβλημα υπογονιμότητας, με την γυναίκα να «απαιτεί» την απόκτηση παιδιού, αφού τότε είναι πιθανό να σημειώνεται αδυναμία εκσπερμάτισης εντός του κόλπου (μέσα από μια πιο πολύπλοκη υποσυνείδητη ψυχολογική διεργασία) και η εκσπερμάτιση να επιτυγχάνεται με τον αυνανισμό: η εκσπερμάτιση συμβολίζει ουσιαστικά την ψυχική και συναισθηματική ολοκλήρωση του άντρα και το μοίρασμα αυτής με τη σύντρόφό του. Ο άντρας που δεν αισθάνεται ικανός για την γονιμοποίηση, στέκεται διστακτικά απέναντι σ αυτό το μοίρασμα, ανήμπορος να χαρίσει στην σύντρόφό του την «ολοκλήρωση», αίσθημα που αποσυμβολίζεται στην αναστολή της εκσπερμάτισης, ιδίως εντός του φυσικού της προορισμού, του κόλπου. Εξάλλου, *«η εκσπερμάτιση σηματοδοτεί την αναπαραγωγική ικανότητα του άντρα και την ετοιμότητά του να γίνει γονιός»* (Σεξουαλική Υγεία, Θ. Ασκητής και Συνεργάτες, 2008).

Επιπρόσθετα, η συνειδητοποίηση της δυσκολίας απόκτησης παιδιού με φυσικό τρόπο τον φέρνει σταδιακά σε μια αυτο-χρέωση. Ντρέπεται, αφού εκτίθεται στη σύντρόφό του, αντιμέτωπος με την αναξιοσύνη και ανεπάρκεια ως προς τον ανδρισμό του. Νιώθει ευάλωτος, ανίσχυρος και εκτεθειμένος στο βλέμμα, την κριτική και την πιθανή περιφρόνηση των άλλων. Αυτός ο αυτο-εγκλωβισμός τον βυθίζει όλο και πιο πολύ σε σκέψεις μελαγχολικές που μπορεί να χαράξουν μια καταθλιπτική και μοναχική πορεία. Πενθεί για τον εαυτό του – τον ανδρισμό του, αφού με αυτό τον τρόπο ο ίδιος ακυρώνει την σεξουαλικότητά του, γενικεύοντας και μεταφέροντας έτσι την «τραγικότητα» σε όλους τους τομείς της ζωής του, «μικραίνοντας» όλο και περισσότερο τον εαυτό του και τις ανάγκες του.

Συμπερασματικά, θα λέγαμε ότι η ψυχολογική ατζέντα ενός άτεκνου ζευγαριού που προσπαθεί να τεκνοποιήσει έχει πολλά ζητήματα που αξίζει να διερευνηθούν προκειμένου οι δυο υποψήφιοι γονείς να υποστηριχθούν τόσο ιατρικά, όσο και ψυχολογικά στη διαδρομή προς το ευτυχές γεγονός. Είναι σημαντικό το ζευγάρι να υποστηριχθεί, μπαίνοντας σε μια διαδικασία «θεραπεία ζεύγους», όπου ο ψυχολόγος-ψυχοθεραπευτής μπορεί να το βοηθήσει στην επίλυση των προβλημάτων που απορρέουν από την κατάσταση την οποία βιώνει το ζευγάρι εξαιτίας της υπογονιμότητας ή της διαδικασίας της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής.

Έτσι, στην κατακλείδα της ψυχολογικής παραμέτρου μιας προβληματικής επικεντρωμένης στο ενδεχόμενο κρυσσυντήρησης σπέρματος και ορχικού ιστού, όπως είναι συνδεδεμένη τόσο με την βιούμενη υπογονιμότητα αλλά και την βιούμενη επέμβαση στην αναπαραγωγική διαδικασία, είναι σκόπιμο και αναγκαίο να συστήνεται στο ζευγάρι ή στον άνδρα ατομικά η θεραπεία ζεύγους ή η ατομική ψυχοθεραπεία, αντίστοιχα, για την στήριξη, την διαχείριση ενός, όπως φάνηκε, πιο πολύπλοκου θέματος και την «διέλευση» μέσα από την φάση αυτή. Και τούτο τόσο περισσότερο, όσο πρέπει να συνειδητοποιείται η ανάγκη προετοιμασίας και των δύο συντρόφων απέναντι στο ενδεχόμενο μη επιτυχούς έκβασης και αυτής της συζητούμενης μεθόδου, η οποία δεν θα μπορούσε να αποκλεισθεί.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- **Bly, R.** (1994). Αναζητώντας τον άνδρα ή τι σημαίνει να είσαι άνδρας. Αθήνα: Λύχνος
- **Boivin, J. & Kentenich, H.** (Eds) (2002). Guidelines for Counseling in Infertility. ESHRE Monographs: Oxford University Press
- **Covington, S.** (2004). Η ενσωμάτωση της Συμβουλευτικής της υπογονιμότητας στην κλινική πρακτική, Τόμος Β' στο: L. Burns & S. Covington (Eds), Συμβουλευτική στην Υπογονιμότητα, Τόμος Β', (Ξ. Βότση, μετάφραση, Ζ. Παπαληγούρα, Επιστ. Επιμέλεια). Αθήνα: Παπαζήσης.
- **Dobbyn, S.** (2009). Διατροφή και γονιμότητα. Αθήνα: Διόπτρα
- **Fullick, A.** (2004). Εξωσωματική γονιμοποίηση. Αθήνα: Σαββάλας
- **Gadner, D., Weissman, A., Howles, C. & Shoham, Z.** (eds), (2001). Textbook of Assisted Reproductive Techniques – Laboratory and Clinical Perspectives. London: Dunitz, M.
- **Greene, A.R., Tarkan, L.** (2008) Γονιμότητα. Ένας κατατοπιστικός οδηγός για την επίτευξη εγκυμοσύνης. Αθήνα: Διόπτρα.
- **Hammer Burns, L.** (2004). Υπογονιμότητα. Αθήνα: Παπαζήσης.
- **Horst, P.** (2003). Μεγαλώνοντας Χωρίς Πατέρα. Αθήνα: Θυμάρι.
- **Jean, M.** (2008). Ο απόλυτος οδηγός της εξωσωματικής γονιμοποίησης. Αθήνα: Πατάκης.
- **Merari D., Chetrit, A. & Modan, B.** (2002). Emotional reactions and attitudes prior to in vitro fertilization: An inter-spouse study. Psychology and Health, 17, 629-640
- **Meth, L. R., Pasick, S.R.** (2000). Αθήνα: Ελληνικά Γράμματα.
- **Pittman, F.** (1998). Ο άνδρας σε κρίση. Αθήνα: Ελληνικά Γράμματα.
- **Raphael – Lee, J.** (2003). Eros and Art, Στο: Inconceivable Conceptions. Psychological Aspects of Infertility and reproductive Technology. Jane Hynes & Huliet Miller (Eds.), Sussex: Brunner – Routledge.
- **Roussillon, R.** (2004). La "réalité externe", sa construction et sa composition psychique. In Chouvier, B. & Roussillon, R. (eds) La réalité psychique. Paris: Dunod.
- **Schmidt, L., Holstein, B.E., Boivin, J., Sangren, H., Thomsen, T.T., Blaabjerg, J., Hald, F., Andersen, A.N. & Rasmussen, P.E.** (2003). Patients' attitudes to medical and psychological aspects of care in fertility clinics: Findings from the Copenhagen Multi-center Psychosocial Infertility (COMPI) Research Program. Hum Reprod 18:628-37.
- **Strauss, B.** (ed) (2002). Involuntary Childlessness. Psychological Assessment, Counseling and Psychotherapy. Seattle. Hogrefe & Huber.
- **Winston, M.L.R.** (1998). Στεριρότητα. Μια φιλική αντιμετώπιση. Αθήνα: Ψυχογίος.
- **Αμπατζόγλου, Γ., Μανωλόπουλος, Σ., Παπαληγούρα, Ζ., Σκουλικά, Α.** (2006). Προσεγγίσεις της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Θεσσαλονίκη: University Studio Press.
- **Ασκητής, Θ. & Συνεργάτες.** (2008). Σεξουαλική Υγεία. Αθήνα: Λιβάνη.
- **Ασλάνης, Π.** (1990). Ανδρική στειρότητα και θεραπεία. Αθήνα: Παρισιάνου Α.Ε.
- **Ευγενή, Λ.** (2010). Η λειτουργία του ανδρικού σπέρματος. Αθήνα: Βήτα Ιατρικές Εκδόσεις.
- **Νόμος 3305** (2005). Εφαρμογή της Ιατρικώς Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής.
- **Παναγιωτίδου - Πράπα, Α., Πράπας, Ν.** (2006). Οδηγός Γονιμότητας. Αθήνα: Φερενίκη.
- **Παπαληγούρα, Ζ.** (1999). Πόσο ψυχολογικά επιβαρυντικές είναι οι τεχνικές της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής; Ελληνική Μαιευτική & Γυναικολογία, 11(3), 294-8.
- **Παπαληγούρα, Ζ.** (2000). Οι Ψυχοκοινωνικές Επιπτώσεις της ατεκνίας. Στο: Τασούλα Κουσιδού (Επ.) Υιοθεσία, Τάσεις, Πολιτική και Πρακτική, Εθνικός Οργανισμός Κοινωνικής Φροντίδας, Κέντρο Βρεφών «Η ΜΗΤΕΡΑ», Αθήνα, Γρηγόρης.
- **Παπαληγούρα, Ζ.** (2002). Υπογονιμότητα (Συμβουλευτική). Τόμος Α'. Αθήνα: Παπαζήσης.
- **Ταρλατζής, Β.Κ.** (2001). Εξωσωματική Γονιμοποίηση (σελ.85-95). Σημειώσεις Ανθρώπινης Αναπαραγωγής, Κλινικό Επιλεγόμενο Μάθημα: Α' Μαιευτική – Γυναικολογική Κλινική Α.Π.Θ., Τμήμα Ιατρικής, Τομέας Χειρουργικής.
- **Ταρλατζής, Β.Κ.** (2002). Τεχνικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής: ιατρικοί και δεοντολογικοί προβληματισμοί. Περιοδικό της Εταιρείας Νομικών Βορείου Ελλάδος, 48, 15-32.
- **Φανάρας, Γ.Β.** (2004). Υποβοηθούμενη αναπαραγωγή. Αθήνα: Το Παλίμψηστον
- **Χρυσικόπουλος, Α.** (2002). Υπογονιμότητα – στειρώση. Αθήνα: Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης.