

Κρυοσυντήρηση γεννητικού υλικού: τεχνικές δυνατότητες και ηθικοί προβληματισμοί



Κατερίνα Χατζημελετίου B.Sc, M.Sc, Ph.D
Αν. Καθηγήτρια Εμβρυολογίας- Γενετικής Α.Π.Θ

Υπεύθυνη Εργαστηρίου Εξωσωματικής Γονιμοποίησης
και Τράπεζας Κρυοσύντηρησης Γαμετών και Εμβρύων



Α' Μ/Γ Κλινική Α.Π.Θ, Γενικό Νοσοκομείο 'Παπαγεωργίου'

Οι ραγδαίες εξελίξεις στον τομέα της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής κατέστησαν δυνατή την κρυοσυντήρηση και φύλαξη γεννητικού υλικού τόσο στον άνδρα όσο και στην γυναίκα.

Για τον άνδρα

Δείγμα σπέρματος σε περιπτώσεις ολιγοασθενοσπερμίας, υποψίας φθίνουσας πορείας της αναπαραγωγικής ικανότητας ή δυσκολίας κατά την παραγωγή σπέρματος.

Τμήματα ορχικού ιστού μετά από βιοψία όρχεων, σε περιπτώσεις αζωοσπερμίας

Δείγματα σπέρματος σε περιπτώσεις που ο άνδρας ή ο έφηβος πρόκειται να υποβληθεί σε ογκολογική θεραπεία

Δείγματα σπέρματος δότη

Για τη γυναίκα

Μη γονιμοποιημένα ωάρια, για τη διατήρηση της γονιμότητάς της γυναίκας είτε για ιατρικούς είτε για κοινωνικούς λόγους.

Τμήματα ωοθηκικού ιστού, όταν πρόκειται να υποβληθεί σε ογκολογική θεραπεία

Ωάρια δότριας

Για το ζευγάρι

Μπορούν να κρυοσυντηρηθούν έμβρυα που έχουν προκύψει από διαδικασία εξωσωματικής γονιμοποίησης

ΠΑΓΩΝΟΝΤΑΣ ΤΟΝ ΧΡΟΝΟ



ΒΡΑΔΕΙΑ ΚΑΤΑΨΥΞΗ

Χαμηλές συγκεντρώσεις
Κρυοπροστατευτικών Μέσων
Σταδιακή μείωση θερμοκρασίας
στους -196°C

ΥΑΛΟΠΟΙΗΣΗ

Υψηλές συγκεντρώσεις
Κρυοπροστατευτικών Μέσων
Ταχεία μείωση θερμοκρασίας
στους -196°C



ΥΑΛΟΠΟΙΗΣΗ

Η ταχύτερη μετατροπή ενός υλικού σε μια υαλώδη μορφή χωρίς τη δημιουργία κρυσταλλικής δομής με τη χρήση υψηλών συγκεντρώσεων κρυοπροστατευτικού μέσου και ταυτόχρονη πολύ γρήγορη μείωση της θερμοκρασίας

Διατήρηση Γονιμότητας



- A) σε γυναίκες με καρκίνο
- B) για κοινωνικούς λόγους

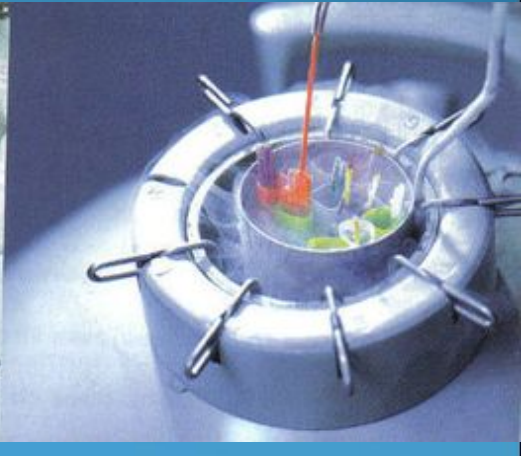
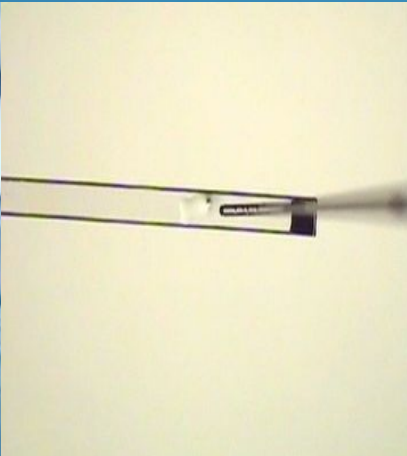
ΥΑΛΟΠΟΙΗΣΗ ΩΑΡΙΩΝ



Ορμονική Διέγερση Ωοθηκών



ΥΑΛΟΠΟΙΗΣΗ ΩΑΡΙΩΝ



Oocyte, embryo and blastocyst cryopreservation in ART: systematic review and meta-analysis comparing slow-freezing versus vitrification to produce evidence for the development of global guidance

[Rienzi et al.](#), Rienzi et al., 2016 [Hum Reprod Update](#).

A Medline search was performed from 1966 to 1 August. RCTs and cohort studies were considered eligible if they reported cryosurvival rate, clinical pregnancy rate (CPR), live-birth rate (LBR) or delivery rate for slow-frozen or vitrified human oocytes or embryos. A meta-analysis was performed using a random effects model to calculate relative risk ratios (RR) and 95% CI.

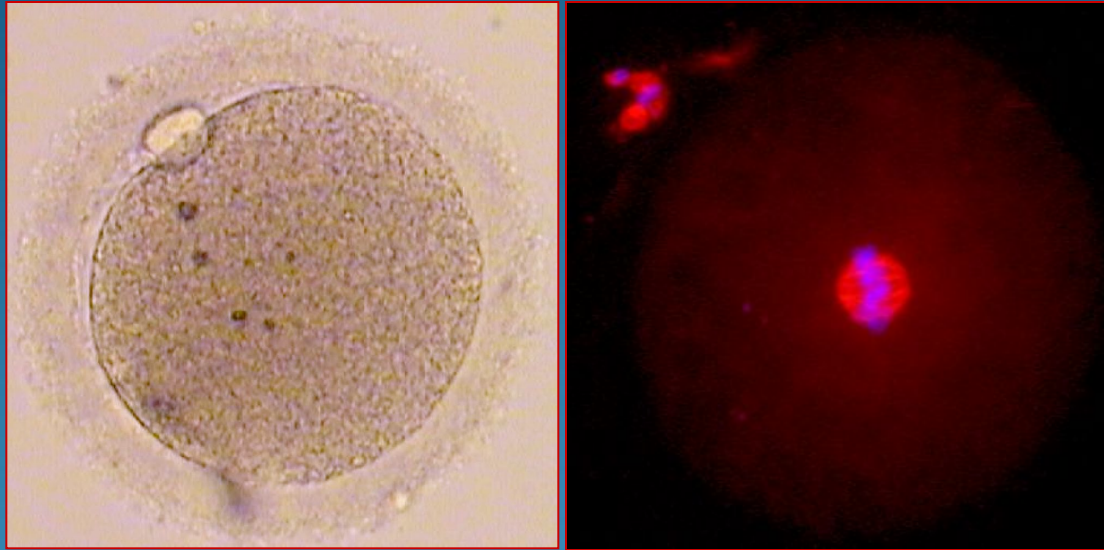
Fresh versus Vitrified oocytes

No evidence for a difference in ongoing CPR per randomized woman (RR = 1.03, 95% CI: 0.87-1.21; P = 0.744, 300 women in each group), per cycle (RR = 1.01, 95% CI: 0.86-1.18; P = 0.934; 267 versus 259 cycles) and per oocyte utilized (RR = 1.02, 95% CI: 0.82-1.26; P = 0.873; 3286 versus 3185 oocytes) was reported in vitrified and fresh cycles, respectively.

Slow-freezing versus Vitrification of Oocytes

Vitrification was associated with increased ongoing CPR per cycle (RR = 2.81, 95% CI: 1.05-7.51; P = 0.039; 48 and 30 cycles, respectively), per transfer (RR = 1.81, 95% CI 0.71-4.67; P = 0.214; 47 and 19 transfers) and per warmed/thawed oocyte (RR = 1.14, 95% CI: 1.02-1.28; P = 0.018; 260 and 238 oocytes).

Μορφολογία και Κυτταροσκελετός ώριμων MII ωαρίων



ΥΑΛΟΠΟΙΗΣΗ: Vitrification process



Before freezing

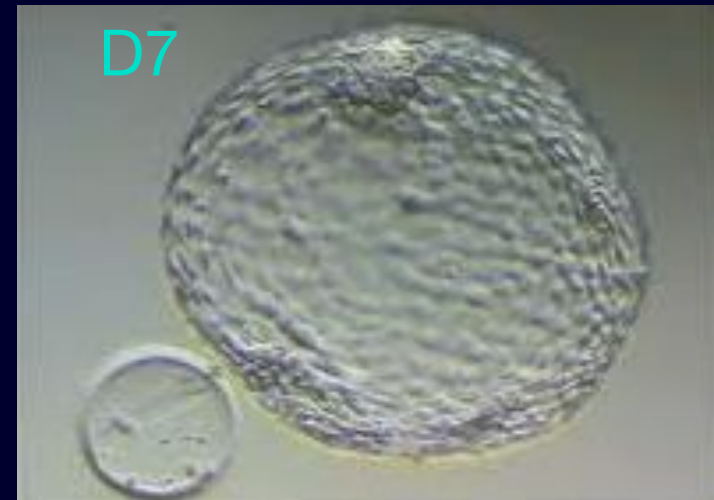


Equilibration solution



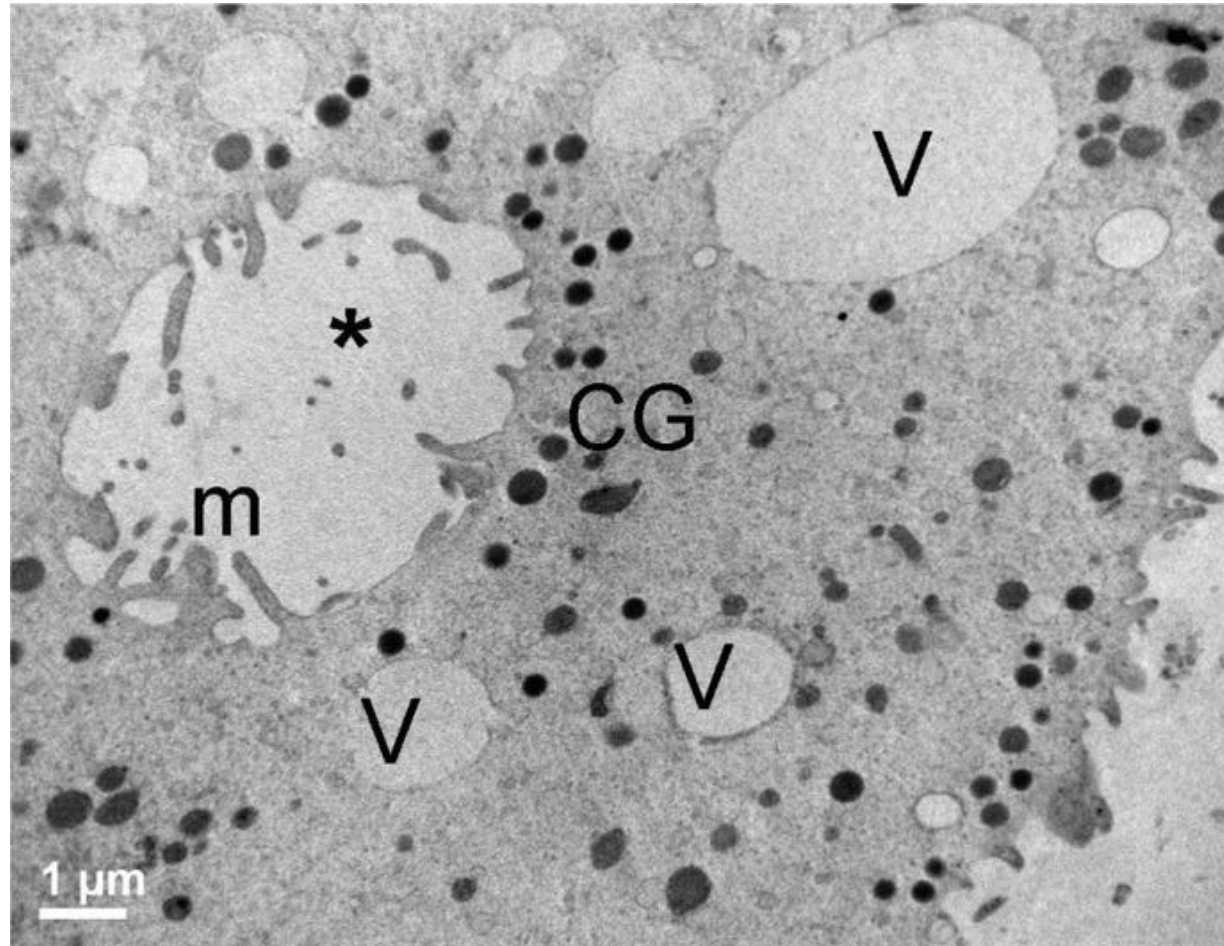
Vitrification solution

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΩΑΡΙΩΝ/ ΕΜΒΡΥΩΝ



Ultrastructure of immature and mature human oocytes after cryotop vitrification

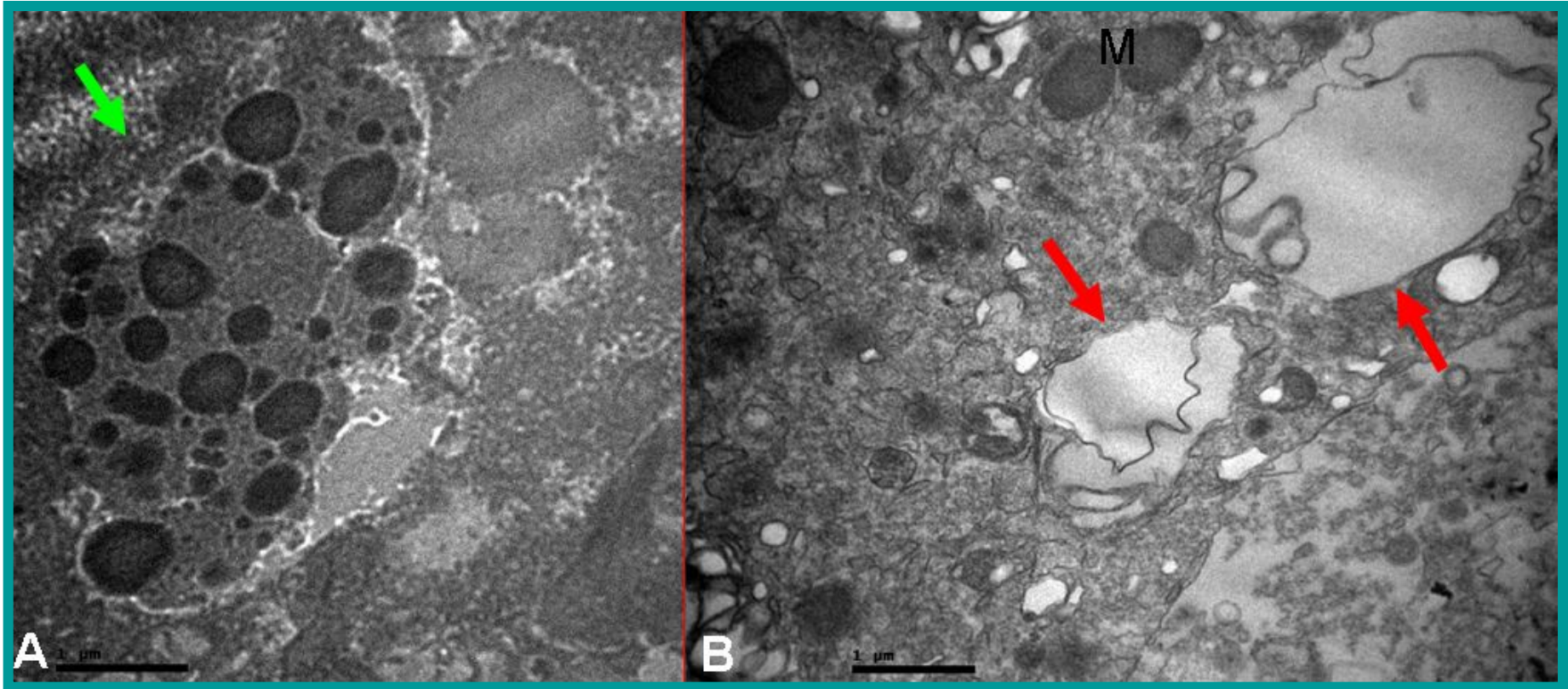
Palmerini et al., 2014 [J Reprod Dev.](#) 60(6): 411–420



Ooplasmic pouch in mature human oocytes vitrified by the Cryotop method. An “ooplasmic pouch” (*) in a MIIv oocyte, as seen by TEM. Note the presence of microvilli (m) in the inner vesicular membrane and of several cortical granules (CG) around it. V = vacuoles.

Cytoskeletal analysis by Confocal Laser Scanning Microscopy, ultrastructure assessment by Transmission Electron Microscopy and sister chromatid exchange rate in vitrified and fresh human embryos

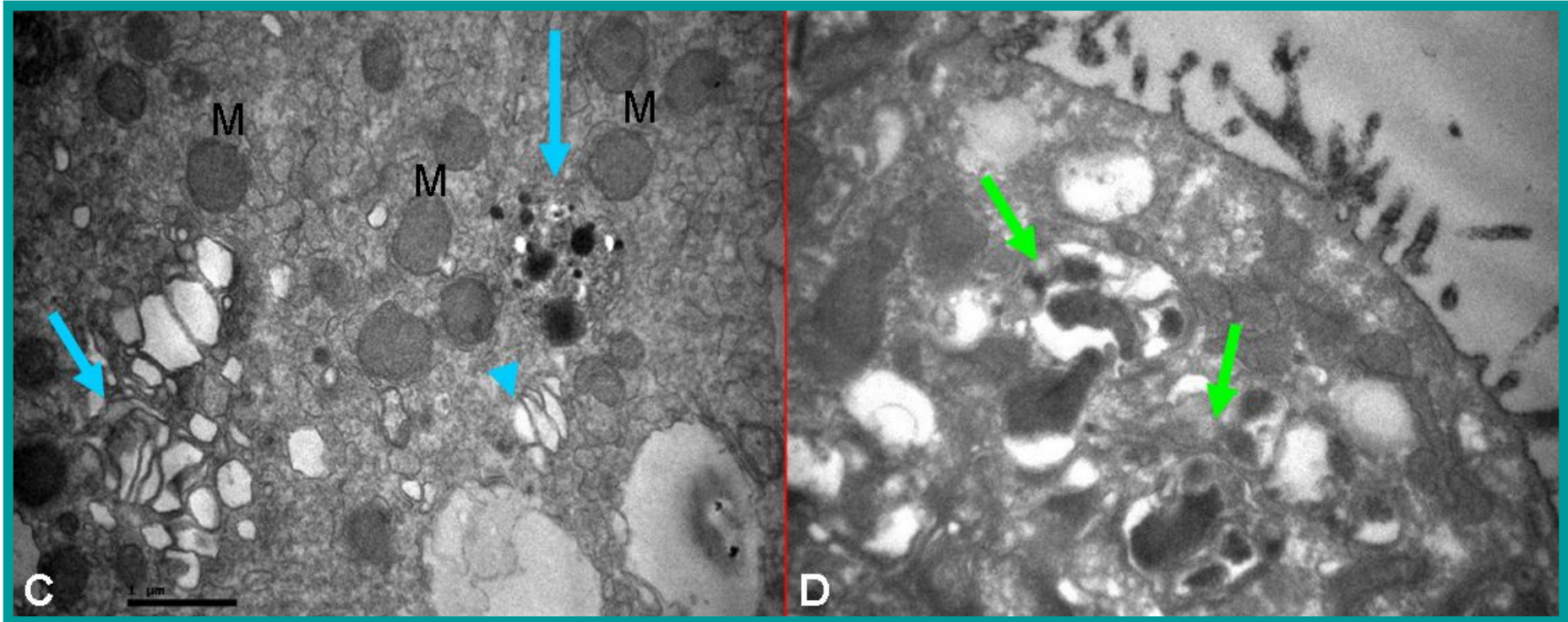
Chatzimeletiou et al., 2015 ESHRE, Lisbon



Electron transmission microscopic (TEM) sections of trophoctoderm cells from vitrified blastocysts showing a lipofuscin (arrow in A), autophagic vacuoles (arrows in B), Mitochondria (M).

Cytoskeletal analysis by Confocal Laser Scanning Microscopy, ultrastructure assessment by Transmission Electron Microscopy and sister chromatid exchange rate in vitrified and fresh human embryos

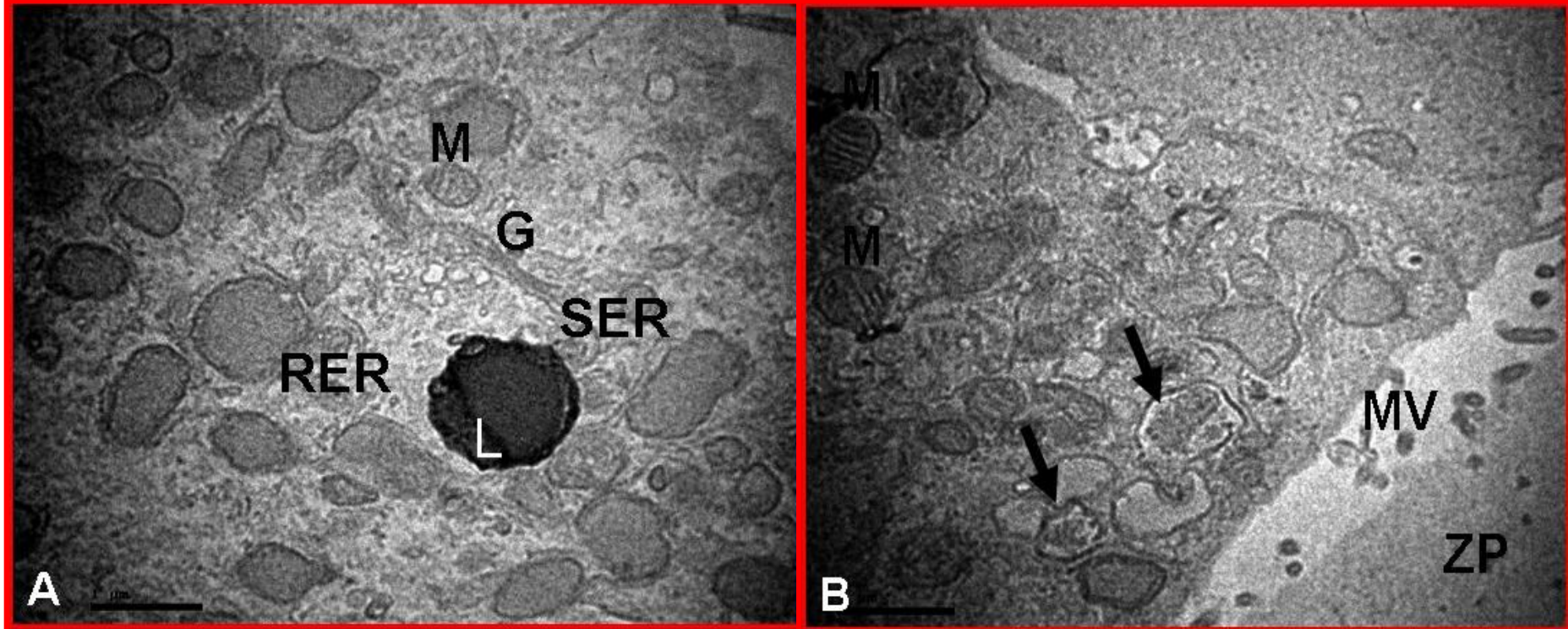
Chatzimeletiou et al., 2015 ESHRE, Lisbon



Electron transmission microscopic (TEM) sections of trophoctoderm cells from vitrified blastocysts showing Golgi complex (short arrow in C) residual body (long arrow in C), Smooth Endoplasmic Reticulum (arrow head in C), autophagic vacuoles (arrows in D), Mitochondria (M). Also note the microvilli in D.

Cytoskeletal analysis by Confocal Laser Scanning Microscopy, ultrastructure assessment by Transmission Electron Microscopy and sister chromatid exchange rate in vitrified and fresh human embryos

Chatzimeletiou et al., 2015 ESHRE, Lisbon



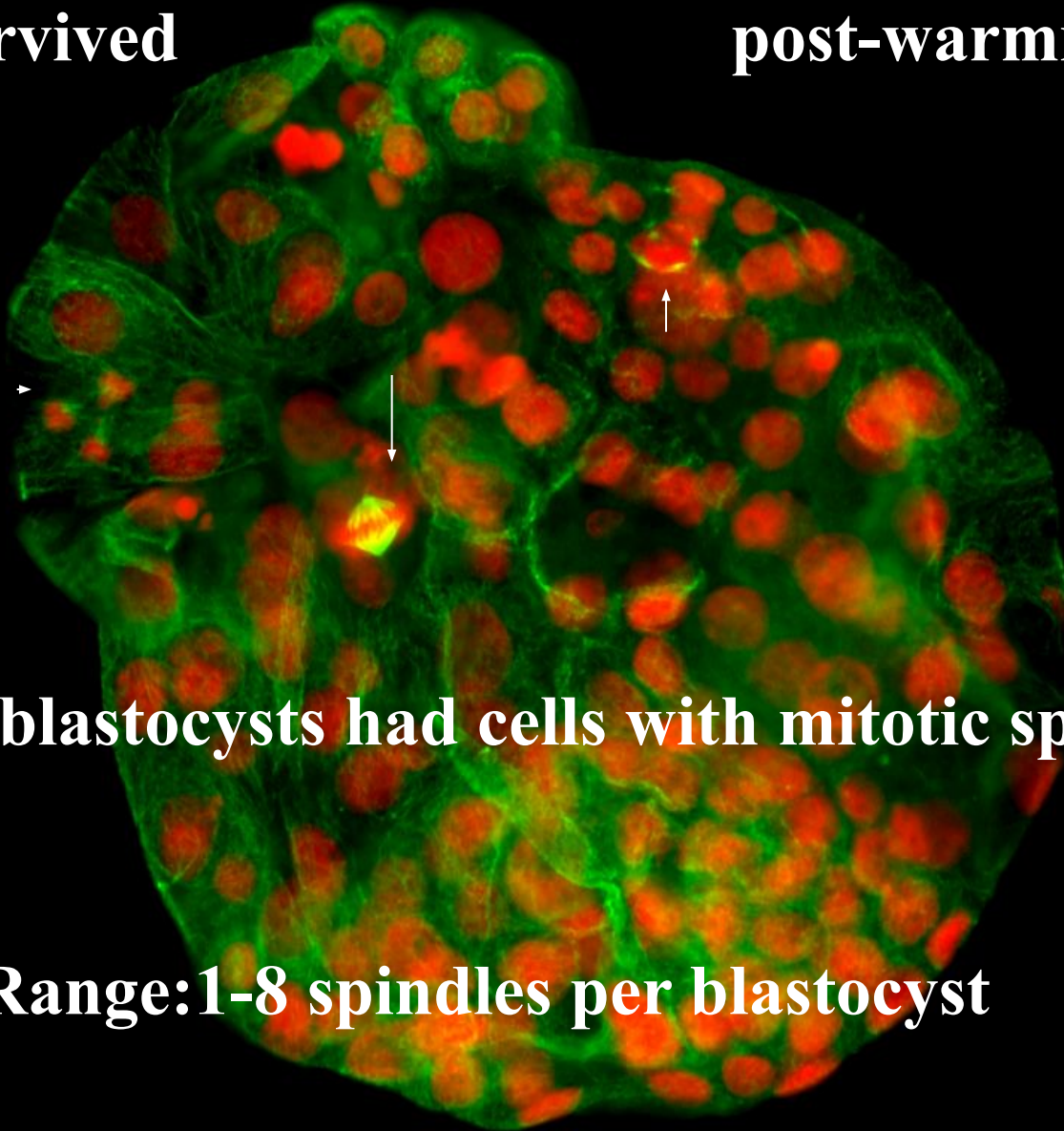
Transmission electron microscopic sections (TEM) of trophocto-derm cells from a fresh blastocyst show-ing A) mature mito-chondria with cister-nae (M), imature mito-chondria, Golgi (G), Smooth & Rough en-doplasmic Reticulum, Lysosome (L) and B) mature (M) & imature mitochondria and few autophagic vacuoles (arrows). Also note the zona (ZP) and microvilli (MV).

Τι αποκαλύπτει η κυτταροσκελετική ανάλυση για την ασφάλεια των μεθόδων βιοψίας και υαλοποίησης;

Spindle and chromosome configuration analysis of human biopsied vs unbiopsied embryos by confocal laser scanning microscopy following vitrification

(Chatzimeletiou et al., 2019 Zygote 27(3):153-159)

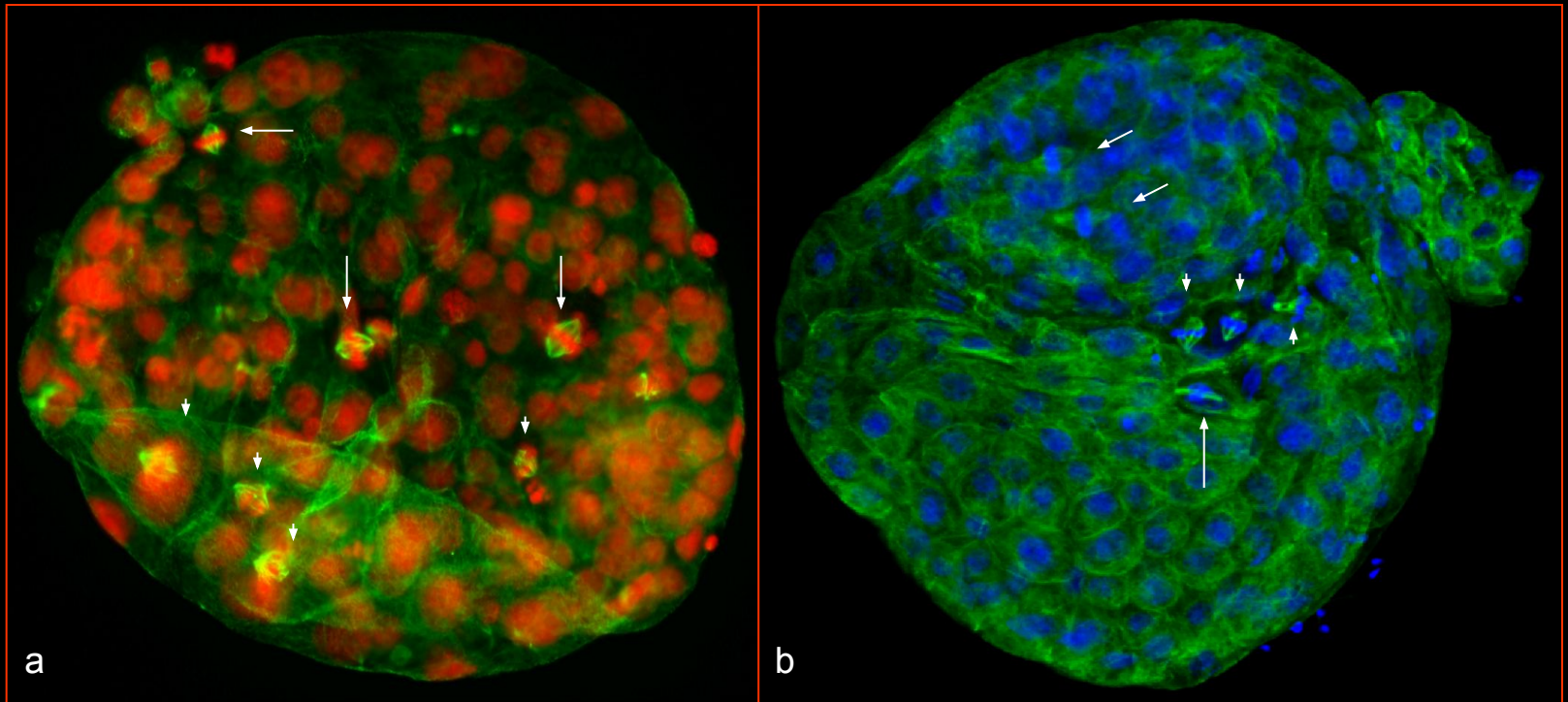
40/48 (83.3%) vitrified biopsied blastocysts survived post-warming



37/40 blastocysts had cells with mitotic spindles

Range: 1-8 spindles per blastocyst

**46/50 (92%) vitrified unbiopsied blastocysts
survived post-warming**



**40/46 blastocysts had cells with mitotic spindles
Range: 1-8 spindles per blastocyst**

(Chatzimeletiou et al., 2019 Zygote 27(3):153-159)

Spindle and chromosome configuration analysis of human biopsied vs unbiopsied embryos by confocal laser scanning microscopy following vitrification

(Chatzimeletiou et al., 2019 Zygote 27(3):153-159)

Day of analysis: 6 (24h post warming)		Mean Cell No \pm SE	No of Embryos analysed	No of Embryos with abnormal Spindles (%)		Total No of Spindles analysed	Normal Spindles (%)	Abnormal Spindles (%)		
				0	≥ 1			Abnormal Shape	Multi- polar	Mono- polar
Unbiopsied/ Vitrified on D5	Grade A	197 \pm 10.0	12	5	7	55	39(70.9)	13(23.6)	3(5.4)	0
	Grade B	127 \pm 7.8	26	10	16	71	47 (66.2)	19(26.8)	3(4.2)	2(2.8)
	Grade C	76 \pm 6.6	2	0	2	6	0	6(100)	0	0
Total Unbiopsied			40	15(37.5)	25(62.5)	132	86(65.2)*	38(28.8) †	6(4.5) ‡	2(1.5) §
Biopsied on D3/ Vitrified on D5	Grade A	149 \pm 11.6	11	5	6	42	29(69.1)	10(23.8)	3(7.1)	0
	Grade B	108 \pm 4.9	22	7	15	75	45(60.0)	26(34.7)	3(4.0)	1(1.3)
	Grade C	69 \pm 4.4	4	0	4	8	0	8(100)	0	0
Total Biopsied			37	12(32.4)	25(67.6)	125	74(59.2)*	44(35.2) †	6(4.8) ‡	1(0.8) §

(Blastocyst classification - Grade A: Top quality with well defined ICM and TE, Grade B: Medium quality, Grade C: poor quality).

There was no significant difference in the incidence of normal and abnormal spindle chromosome configurations between the vitrified unbiopsied and the vitrified biopsied embryos *†‡§ (p>0.05)

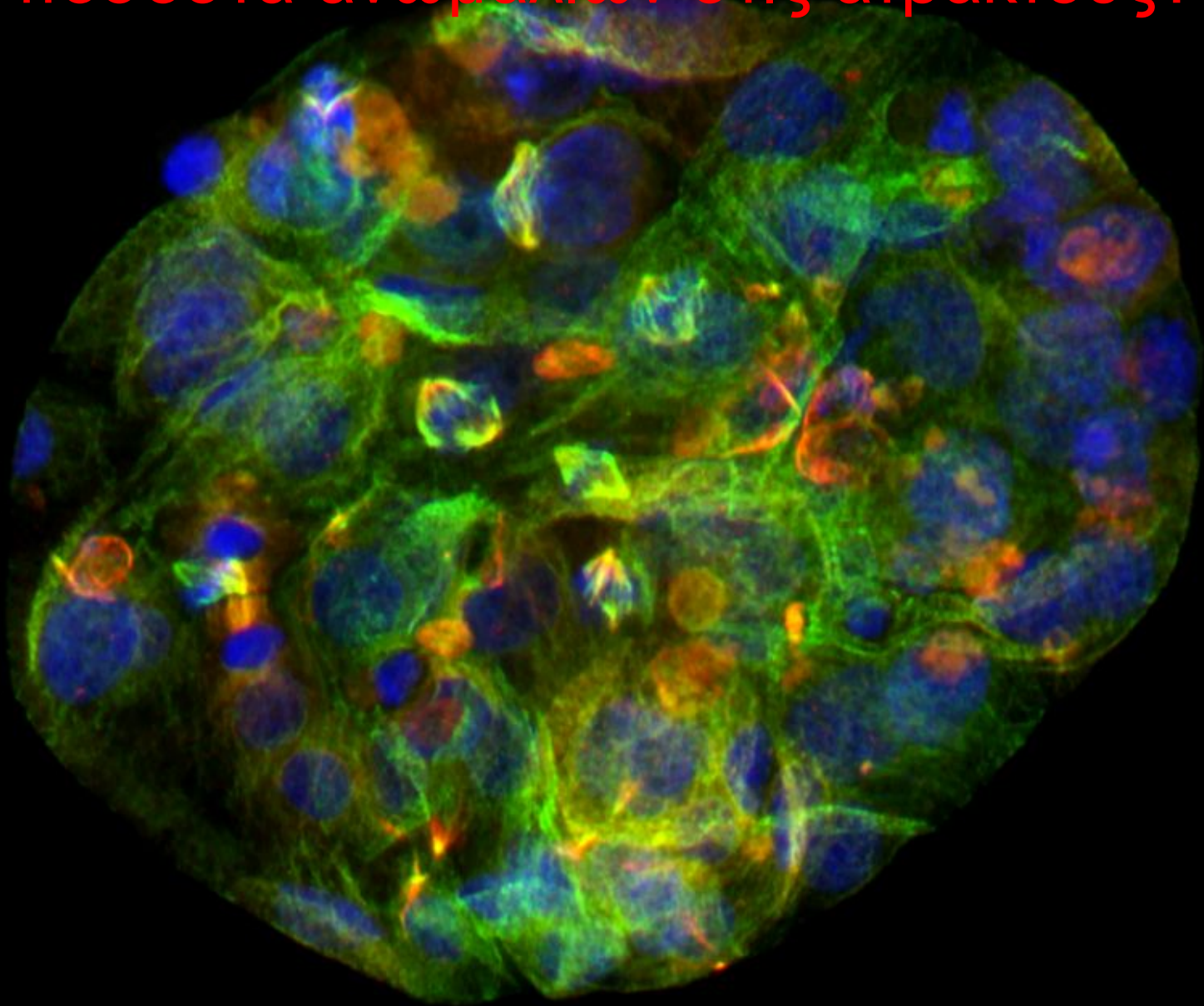
Spindle abnormalities in human biopsied and unbiopsied embryos following vitrification on day 5 with the DMSO/EG or the DMSO free kit.

(Chatzimeletiou et al., 2019 Zygote 27(3):153-159)

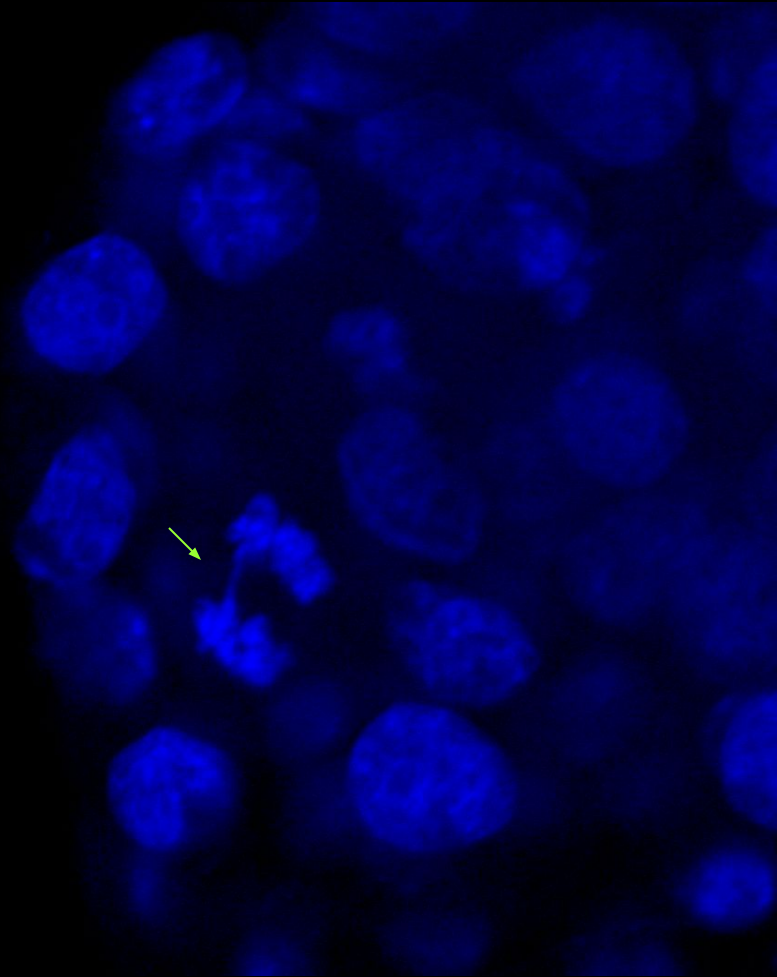
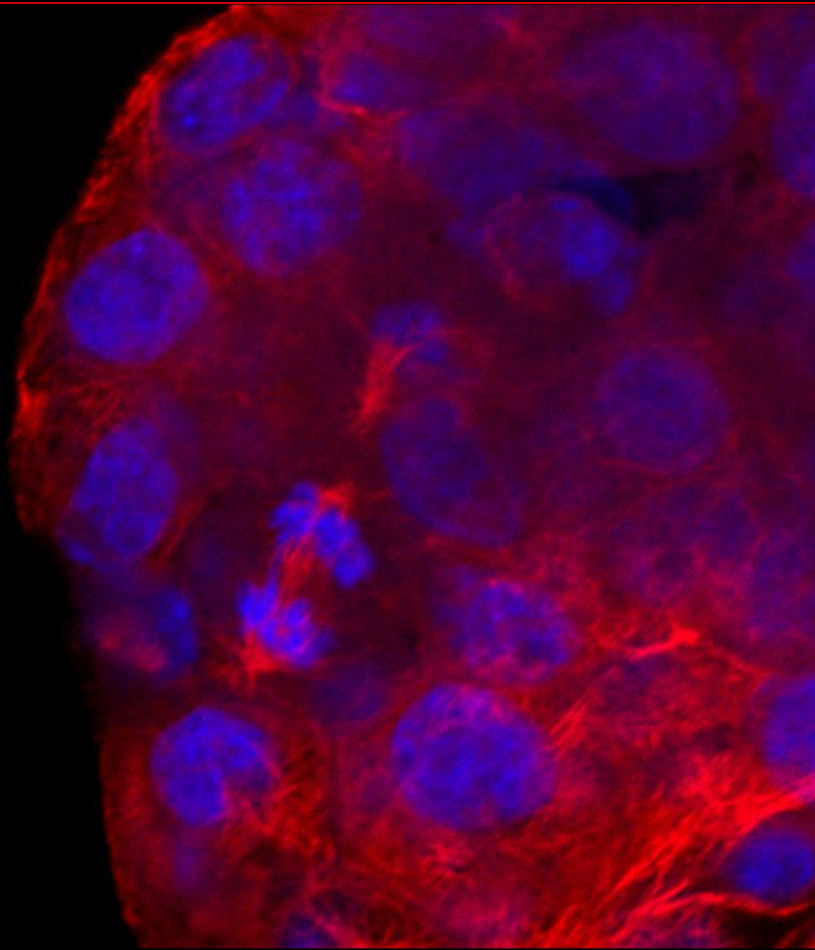
Day of analysis: 6 (24h post warming)		Survival rate	No of Embryos analysed with spindles	Total No of Spindles analysed	Normal Spindles (%)	Abnormal Spindles (%)		
						Abnormal Shape	Multi-polar	Mono-polar
Unbiopsied/ Vitrified on D5	DMSO/EG	24/26	19	78	53 (67.9)	21 (26.9)	2(2.6)	2(2.6)
	DMSO free	22/24	21	54	33 (61.1)	17 (31.5)	4 (7.4)	
	Total	46/50	40	132	86(65.2)	38(28.8)	6(4.5)	2(1.5)
Biopsied on D3/ Vitrified on D5	DMSO/EG	21/25	19	72	32 (60.4)	19 (35.8)	1(1.9)	1 (1.9)
	DMSO free	19/23	18	53	42(58.3)	25(34.7)	5 (6.9)	
	Total	40/48	37	125	74(59.2)	44(35.2)	6(4.8)	1(0.8)

There was no significant difference in the survival rates and the incidence of normal and abnormal spindle chromosome configurations between the DMSO/EG and the DMSO free vitrified embryos (p>0.05)

Γιατί τα υαλοποιημένα έμβρυα έχουν υψηλότερα ποσοστά ανωμαλιών στις ατράκτους?

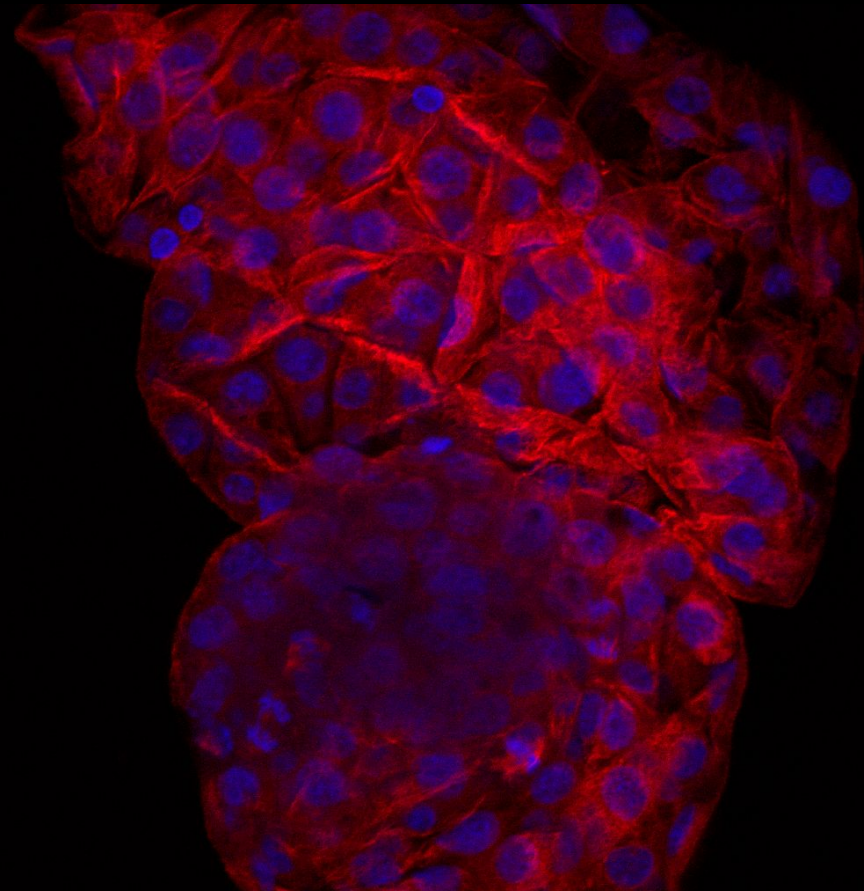


Confocal section of a human vitrified blastocyst showing an
anaphase spindle with chromosome bridging



ΒΡΑΒΕΙΟ ΑΡΙΣΤΕΙΑΣ Α.Π.Θ

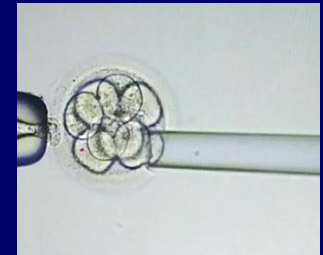
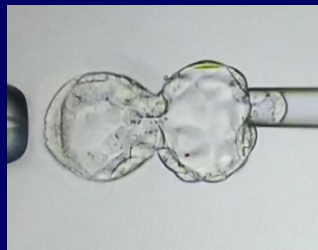
Βραβείο Αριστείας Κλινικο-εργαστηριακού Έργου και Εφαρμογής Καινοτόμων Μεθόδων και Τεχνικών στην **Αικατερίνη Χατζημελετίου** Επικ. Καθηγήτρια Εμβρυολογίας-Γενετικής στην Υποβοηθούμενη Αναπαραγωγή του Τμήματος Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του ΑΠΘ, για την **πρώτη παγκοσμίως κυτταροσκελετική ανάλυση ανθρώπινων εμβρύων, μετά από κατάψυξη, με τη μέθοδο της υαλοποίησης.**



Η μελέτη επιβεβαίωσε την ασφάλεια της μεθόδου της υαλοποίησης.

Η υαλοποίηση εμβρύων εφαρμόζεται:

- σε πλεονάζοντα έμβρυα μετά την ολοκλήρωση ενός φρέσκου θεραπευτικού κύκλου εξωσωματικής γονιμοποίησης με εμβρυομεταφορά
- σε όλα τα έμβρυα όταν η γυναίκα παρουσιάσει σύνδρομο υπερδιέγερσης ωοθηκών και για τη δική της ασφάλεια αποφεύγεται η εμβρυομεταφορά στον φρέσκο κύκλο
- σε όλα τα έμβρυα όταν το ενδομήτριο δεν είναι δεκτικό
- σε πλεονάζοντα έμβρυα που έχουν διαγνωστεί ως φυσιολογικά μετά από βιοψία και προεμφυτευτική διάγνωση στο στάδιο της αυλάκωσης (Ημέρα 3 μετά τη γονιμοποίηση) και αφού έχει ολοκληρωθεί η εμβρυομεταφορά 1-2 φυσιολογικών εμβρύων στον φρέσκο κύκλο, ώστε να είναι διαθέσιμα στο ζευγάρι για μελλοντική εμβρυομεταφορά, εφόσον τα χρειαστεί.
- σε όλα τα έμβρυα μετά από βιοψία και προεμφυτευτική διάγνωση στο στάδιο της βλαστοκύστης (Ημέρα 5)



Next generation sequencing (NGS) for preimplantation genetic screening (PGS) improves pregnancy outcomes compared with array comparative genomic hybridization in single thawed euploid embryo transfer (STEET) cycles

Friedenthal Friedenthal et al (2018) Fertil Steril. 109(4):627-632

548 STEET cycles using NGS vs 368 STEET cycles using array-CGH

The implantation rate was significantly higher in the NGS group compared with the aCGH group (71.6% vs. 64.6%). The OP/LBR was also significantly higher in the NGS group (62% vs. 54.4%), and there were significantly more biochemical pregnancies in the aCGH group compared with the NGS group (15.1% vs. 8.7%).

340 PATIENTS DIAGNOSED WITH CANCER

97.4% επέλεξαν υαλοποίηση ωαρίων vs κατάψυξη ωοθηκικού ιστού

Breast Cancer	(67%)
Non-Hodgkin Lymphoma	(5%)
Hodgkin Lymphoma	(11%)
Gastrointestinal Tumors	(3.5%)

939 MII oocytes were vitrified (8.5 ± 6.4 per patient).

Is vitrification of oocytes useful for fertility preservation for age-related fertility decline and in cancer patients?

Fertility and Sterility® Vol. 99, No. 6, May 2013

Ana Cobo, Ph.D.,^a Juan A. Garcia-Velasco, M.D.,^b Javier Domingo, M.D.,^c José Remohí, M.D.,^a and Antonio Pellicer, M.D.^a

^a IVI Valencia, Valencia; ^b IVI Madrid, Madrid; and ^c IVI Las Palmas, Las Palmas, Spain

Clinical outcomes and live births reported in cancer patients who preserved fertility through oocyte cryopreservation (slow freezing and vitrification).

	Yang et al., 2007 (158)	Porcu et al., 2008 (159)	Sánchez Serrano et al., 2009 (160)
Type of malignancy	Hodgkin lymphoma	Borderline ovarian tumor	Breast cancer
Cryopreservation technique	Slow freezing	Slow freezing	Combined OTC-SF + OV (Cryotop)
Age at FP, y	27	26	36
No. of cryopreserved oocytes	13	7	16
Storage time (y)	6	4	2
Twin or single pregnancy	Single ^a	Twin	Twin
No. of live births	1	2	2
Weeks of gestation	37	38	34
Weight of baby, g	3,062	2,100 and 2,400	1,650 and 1,830
Sex of baby	Male	Females	Males

Clinical outcomes and live births reported in cancer patients who preserved fertility through oocyte cryopreservation (slow freezing and vitrification).

	Kim et al., 2011 (161)	García-Velasco, 2013 (120)
Type of malignancy	Chronic myeloid leukemia	Non-Hodgkin lymphoma
Cryopreservation technique	Vitrification (EMG)	Vitrification (Cryotop)
Age at FP, y	22	31
No. of cryopreserved oocytes	7	4
Storage time (y)	9	2
Twin or single pregnancy	Single	Single
No. of live births	1	1
Weeks of gestation	35 + 3 d	39
Weight of baby, g	2,410	3,440
Sex of baby	Male	Male

120. Garcia-Velasco JA, Domingo J, Cobo A, Martinez M, Carmona L, Pellicer A. 5-years experience employing oocyte vitrification to preserve fertility for medical and nonmedical indications. *Fertil Steril* 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.02.050>.

158. Yang D, Brown SE, Nguyen K, Reddy V, Brubaker C, Winslow KL. Live birth after the transfer of human embryos developed from cryopreserved oocytes harvested before cancer treatment. *Fertil Steril* 2007;87:1469.e1–4.

159. Porcu E, Venturoli S, Damiano G, Ciotti PM, Notarangelo L, Paradisi R, et al. Healthy twins delivered after oocyte cryopreservation and bilateral ovariectomy for ovarian cancer. *Reprod Biomed Online* 2008;17:265–7.

160. Sanchez-Serrano M, Crespo J, Mirabet V, Cobo AC, Escriba MJ, Simon C, et al. Twins born after transplantation of ovarian cortical tissue and oocyte vitrification. *Fertil Steril* 2010;93:268.e11–3.

161. Kim MK, Lee DR, Han JE, Kim YS, Lee WS, Won HJ, et al. Live birth with vitrified-warmed oocytes of a chronic myeloid leukemia patient nine years after allogeneic bone marrow transplantation. *J Assist Reprod Genet* 2011;28:1167–70.

PGD for hereditary breast and ovarian cancer: the route to universal tests for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers

Drüsedau Drüsedau et al., 2013 Eur J Hum Genet.
21(12):1361-8.

**Preimplantation genetic diagnosis for BRCA1 exon
13 duplication mutation using linked polymorphic
markers resulting in a live birth**

Jasper et al., 2008 Prenat Diagn. 28(4):292-8

Hereditary breast and ovarian cancer and reproduction: an observational study on the suitability of preimplantation genetic diagnosis for both asymptomatic carriers and breast cancer survivors

70 couples - 145 PGD cycles

59.2 % female BRCA1/2 carriers, 14.3 % → breast cancer prior PGD.

720 embryos biopsied/analysed
294 (40.8 %) BRCA-negative

Derks-Smeets et al., 2014 Breast Cancer Res Treat. 145(3):673-81.

Το χρονικό διάστημα που μπορούν να διατηρηθούν τα κρυοσυντηρημένα έμβρυα είναι 10 έτη.

Βιοηθικοί προβληματισμοί προκύπτουν αν

Το ζευγάρι έχει πετύχει εγκυμοσύνη και δεν θέλει επιπλέον παιδιά

Το ζευγάρι έχει χωρίσει

Το ένα από τα δύο άτομα έχει αποβιώσει

Χρήση γενετικού υλικού από σύντροφο του ατόμου που απεβίωσε

Βιοηθικοί προβληματισμοί μετά από Προεμφυτευτική Γενετική Διάγνωση



Prof. Robert Winston
Obstetrician-Gynaecologist



Prof. Alan Handyside
Embryologist-Geneticist

Imperial College Medical School
University of London, Hammersmith Hospital
London, U.K

1990: 1st Pregnancy after Cleavage stage biopsy



Handyside et al (1990) Nature 19;344(6268):768-70

Indications

1. Aneuploidy
2. Single gene disorders
3. Chromosomal Translocations
4. X-linked Conditions
5. Late onset Diseases (BARCA1,2)
6. HLA-typing

(Savior Siblings)



The clinical utility of PGD with HLA matching: a collaborative multi-centre ESHRE study.

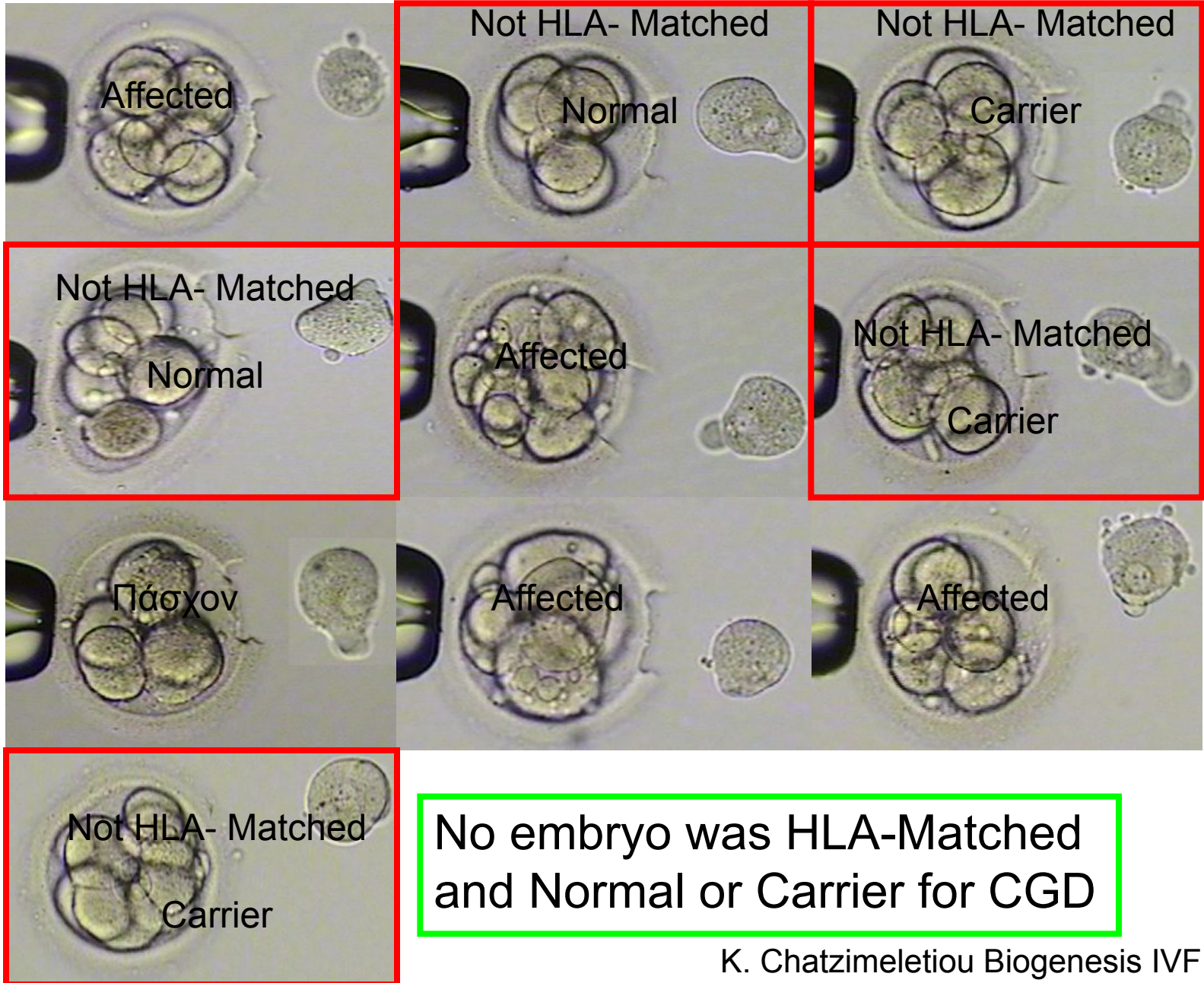
Kakourou Kakourou et al 2018 Hum Reprod.

704 HLA-PGD cycles. Mean maternal age 33.5 years.
9751 oocytes (13.9/cycle) 5532 embryos biopsied (7.9/cycle).

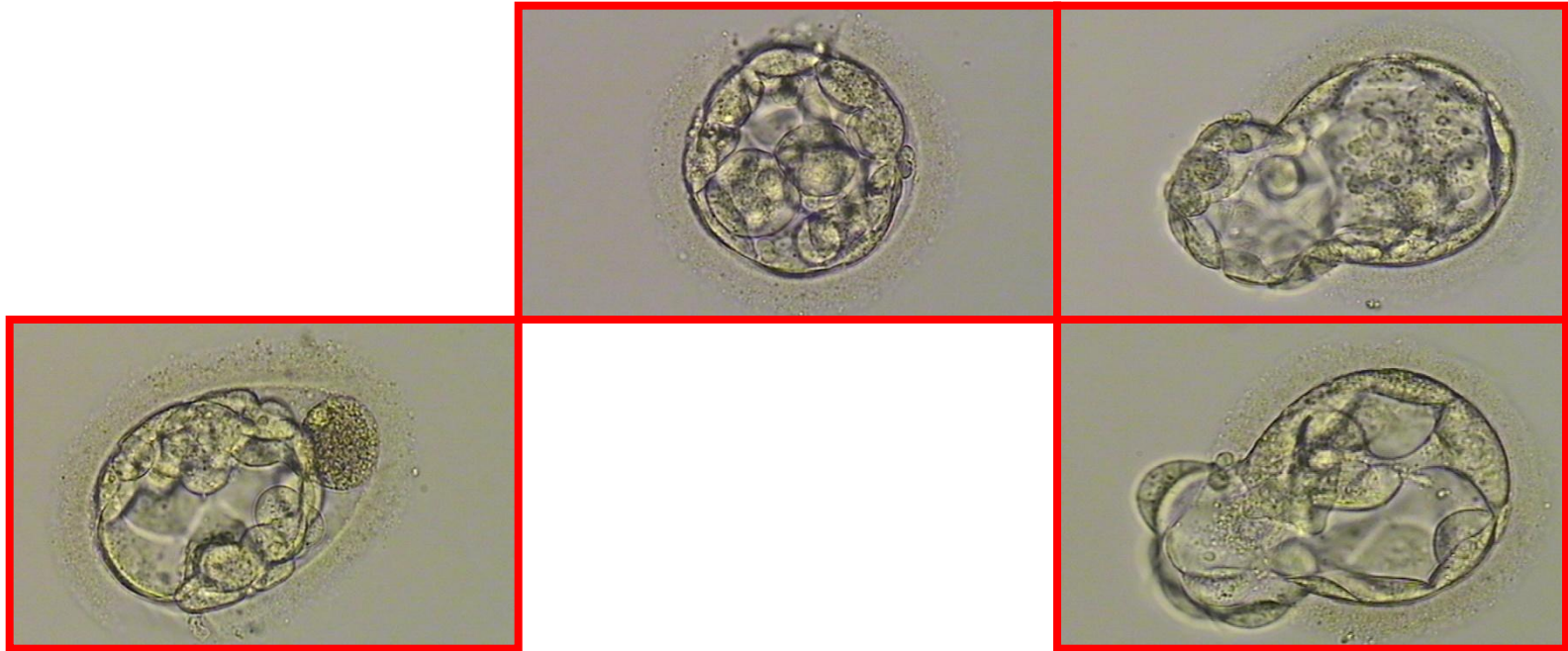
Of 4343 embryos diagnosed 677 were genetically suitable.
Of the 364 couples, 56.6% achieved an embryo transfer (ET) and 598 embryos were transferred in 382 cycles, leading to 164 HCG-positive pregnancies (pregnancy rate/ET 41.3%, pregnancy rate/initiated cycle 23.3%) and 136 babies born (live birth rate/ET 34.3%, live birth rate/initiated cycle 19.3%) to 113 couples.

H SCT was reported for 57 cases, of which 64.9% involved combined umbilical cord-blood and bone marrow transplantation from the HLA-identical sibling donor; 77.3% of transplants reported no complications.

Preimplantation Genetic Diagnosis with HLA- Matching
For Chronic Granulomatous Disease (Mutation c.674+4A>T in gene CYBB Chr. X)



Preimplantation Genetic Diagnosis with HLA- Matching
For Chronic Granulomatous Disease (Mutation c.674+4A>T in gene CYBB Chr. X



Vitrification of non- HLA-Matched
Normal and Carrier embryos

Preimplantation Genetic Diagnosis with HLA- Matching For Chronic Granulomatous Disease (Mutation c.674+4A>T in gene CYBB Chr. X)



2nd IVF Cycle

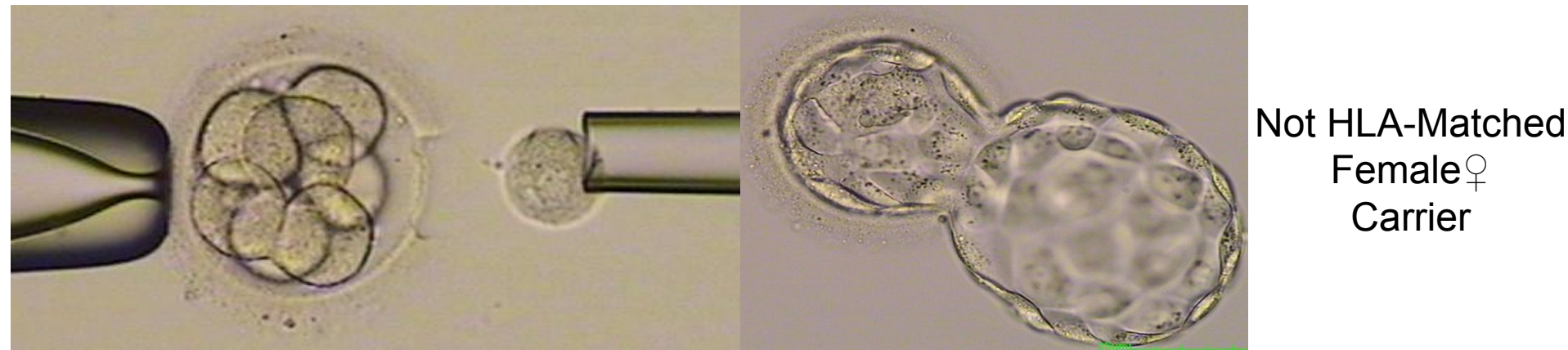
14 embryos were biopsied

- 4 HLA-Matched, Normal
- 2 HLA-Matched, Carriers
- 5 Not HLA-Matched, Carriers
- 3 Not HLA-Matched, Affected

Birth of a healthy baby girl

with subsequent
cord blood stem cells
transplantation and bone
marrow stem cells
transplantation
to her affected brother

Preimplantation Genetic Diagnosis with HLA- Matching
For Chronic Granulomatous Disease (Mutation c.674+4A>T in gene CYBB Chr. X)



ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Οι τεχνικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής παρουσιάζουν σήμερα αλματώδη εξελικτική πορεία, που οδηγεί όμως στην ανάδυση νέων ηθικών και νομικών ζητημάτων

Στον τομέα της κρυοσυντήρησης γεννητικού υλικού

Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ως προς το ποσοστό εμφύτευσης και εγκυμοσύνης μεταξύ φρέσκων και υαλοποιημένων ωαρίων και εβρύων και τα παιδιά που έχουν γεννηθεί μετά από κατάψυξη είναι υγιή.



Οι σημαντικότεροι ηθικοί προβληματισμοί

Η μετατόπιση του χρόνου επίτευξης εγκυμοσύνης όταν η γυναίκα καταψύχει τα ωάρια της για κοινωνικούς λόγους
10 έτη ή περισσότερα???

Η δυνατότητα που ανοίγεται με τη δωρεά ωαρίων στις τράπεζες κρυοσυντήρησης και η επίτευξη εγκυμοσύνης σε προχωρημένη ηλικία



Ινδή γυναίκα απέκτησε το 1^ο της παιδί στα 70

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Οι σημαντικότεροι ηθικοί προβληματισμοί

Η 'Τύχη' των κατεψυγμένων εμβρύων όταν το ζευγάρι δεν τα επιθυμεί πλέον για κλινικούς σκοπούς





Σας Ευχαριστώ!

Κατερίνα Χατζημελείου B.Sc, M.Sc, Ph.D
Αν. Καθηγήτρια Εμβρυολογίας- Γενετικής Α.Π.Θ
Υπεύθυνη Εργαστηρίου Εξωσωματικής Γονιμοποίησης και Τράπεζας
Σπέρματος, Εμβρύων και Εμβρυολογίας
Α' Μ/Γ Κλινική Α.Π.Θ, Γενικό Νοσοκομείο 'Παπαγεωργίου

