

Κρυοσυντήρηση σπέρματος



Κρυοσυντήρηση σπέρματος- Ορισμός

Η διατήρηση της βιωσιμότητας των σπερματοζωαρίων στο υγρό άζωτο στους -196°C , σε ειδικά δοχεία για πολλά χρόνια (αναστέλεται η βιολογική δραστηριότητα στους -135°C)

“FUNDAMENTAL CRYOBIOLOGY” = η επιστήμη που μελετάει την επίδραση των χαμηλών θερμοκρασιών στα κύτταρα.

Ιστορικά στοιχεία

1776 → Lazzaro Spallazani

1866 → Montegazza

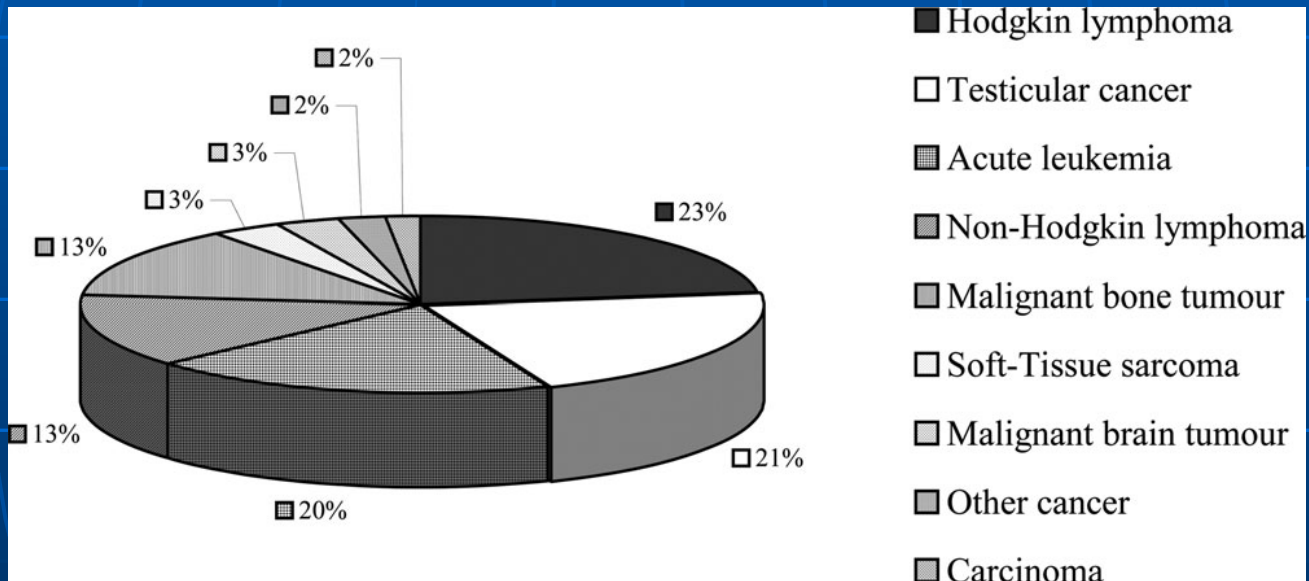
Κατάψυξη σε ξηρό πάγο : -75°C

Κατάψυξη στο υγρό άζωτο : -196°C

Σημαντικές ημερομηνίες

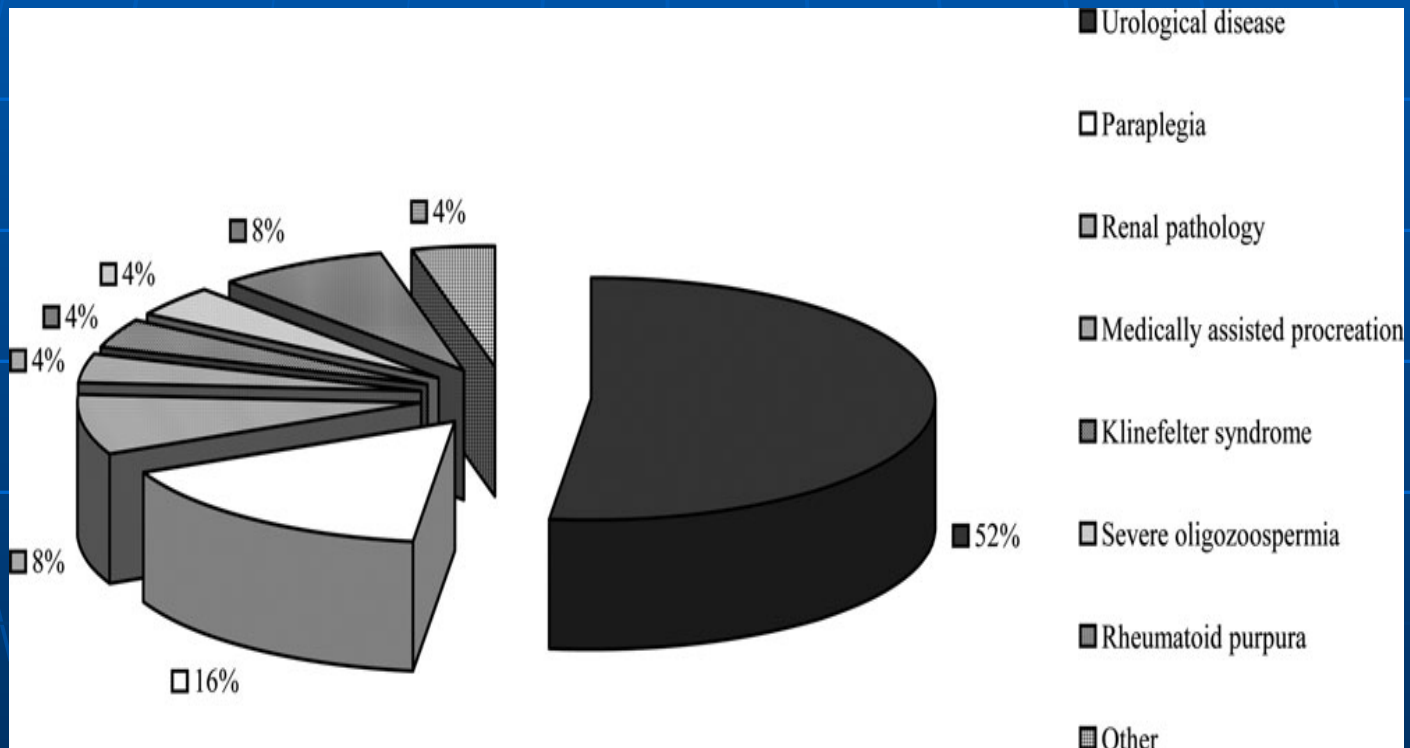
- 1953 πρώτη εγκυμοσύνη
(Sherman and Bunge, 1953)
- 1963 θεωρητικά μοντέλα
(Mazur, 1963)
- 1970 πρώτες τράπεζες σπέρματος
- 1973 πρώτη γέννηση παιδιού

Νεοπλάσματα



- *Menon S. et al, Hum Reprod, Vol.24, 37 – 44, 2009*

Άλλες παθήσεις



- *Menon S. et al, Hum Reprod, Vol.24, 37 – 44, 2009*

Επίδραση του καρκίνου στην γονιμότητα πριν την θεραπεία

- increased catabolic state
- malnutrition
- hypothalamic dysfunction *Vigersky et al 1977*
- stress hormone secretion *Schenker et al 1992*
- testicular dysfunction *Fitoussi et al 2000*

Επίδραση της Θεραπείας για τον καρκίνο στην γονιμότητα

Table 1 The impact of radiation therapy or systemic chemotherapy agents on spermatogenesis in patients with cancer

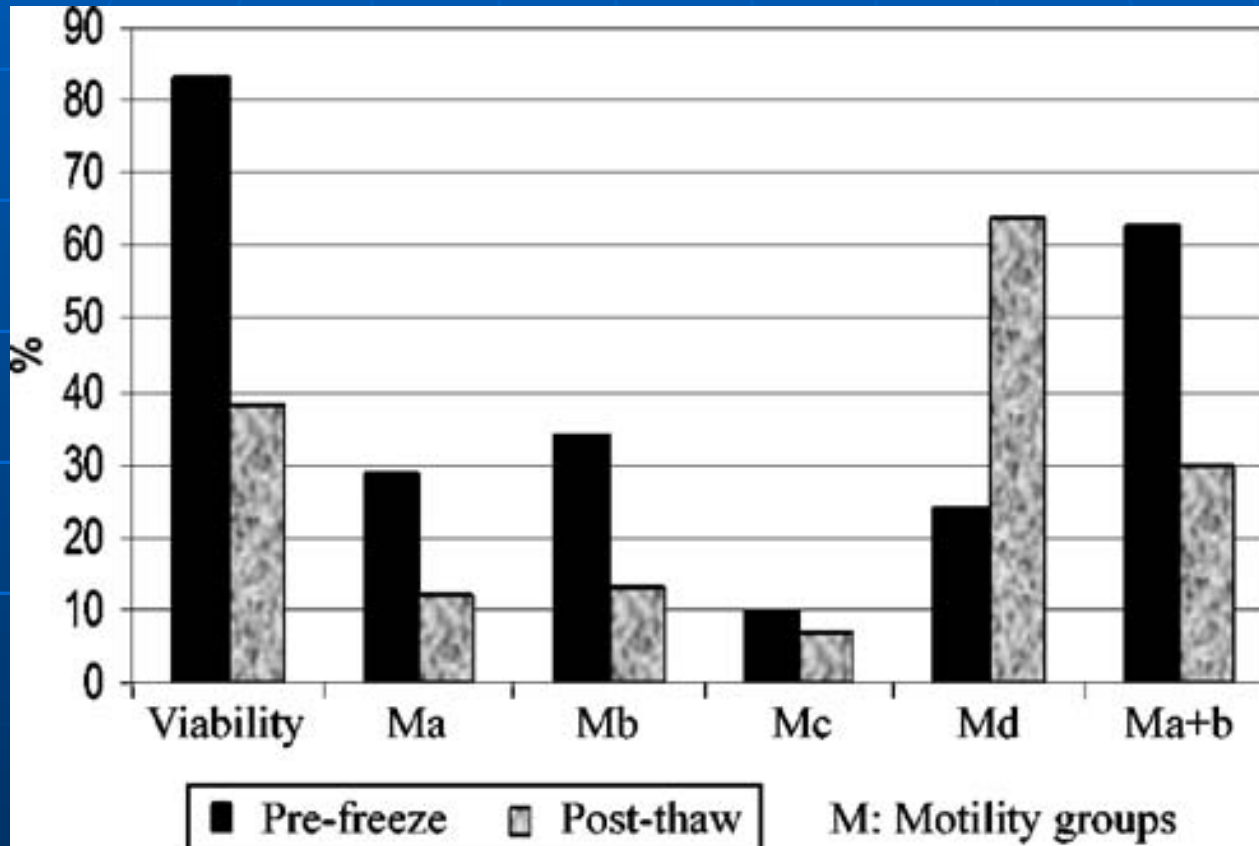
Agent	Cumulative dose	Azoospermia	Additive effect with other chemotherapy drugs	Comments
<i>Radiation</i>				
Gonads	2.5 Gy/0.6 Gy	Permanent/temporary	Yes	3 to 7 weeks courses worse than single dose. 0.15 Gy decrease count
Total body	8 Gy Single 12 Gy fract.	Permanent	Yes	
<i>Chemotherapy</i>				
Cyclophosphamide	19 gm/m ²	Yes		
Chlorambucil	1.4 g/m ²	Yes		
Cisplatin	500 mg/m ²	Yes		
Procarbazine	4 g/m ²	Yes		
Carboplatin	>2 g/m ²	Likely		
Nitrosoureas				
Busulfan	>600 mg/kg	Likely		
Ifosfamide	>30 g/m ²	Likely	+cyclophosphamide	
Carmustine	1 g/m ²	Likely		
Lomustine	500 mg/m ²	Likely		
Nitrogen mustard		Unknown		Used with other highly gonadotoxic agents
Malphalan		Unknown		Same
Actinomycin D		Unknown		Same
Doxorubicin	770 mg/m ²	Temp oligo (alone)	Yes	Azoo in combo
Cytosine arabinoside	1 g/m ²	Temp oligo (alone)	Yes	Azoo in combo
Vinblastine	50 g/m ²	Temp oligo (alone)	Yes	Azoo in combo
Vincristine	8 g/m ²	Temp oligo (alone)	Yes	Azoo in combo; Less toxic than vinblastine
Paclitaxel		Unknown		
Docetaxel		Unknown		
Gemcitabine		Unknown		
Trastuzumab		Unknown		
Irinotecan		Unknown		
Oxaliplatin		Unknown		

Abbreviations: Azoo = azoospermia, Combo = combination, Oligo = oligospermia, Temp = temporary.

Η σημασία της κρυοσυντήρησης

- Διατήρηση της γονιμότητας
(Agarwal et al 2004)
- Διατήρηση της γενετικής ποικιλομορφίας των ειδών
(Critser & Russell, 2000)
- Διατήρηση γενετικά τροποποιημένων ειδών
(Knight & Abbott, 2002)

Επίδραση της κατάψυξης στην ΚΙΝΗΤΙΚΟΤΗΤΑ



- *Ozkavukcu et al, J Assist Reprod Genet (2008) 25:403–411*

Η επίδραση της κατάψυξης στις

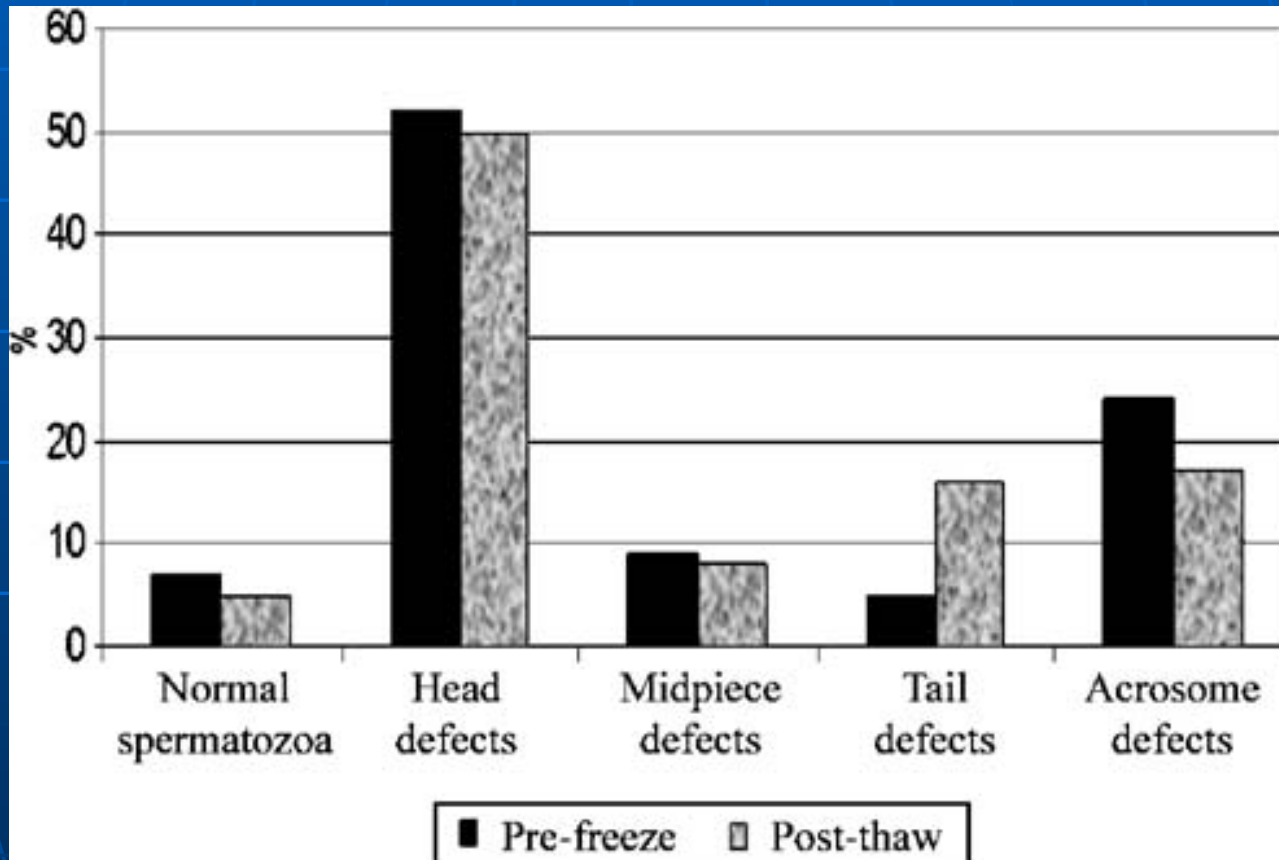
Table II Pre-freeze and post-thaw forward motility (mean \pm SEM)

	Pre-freeze forward motility (A: %)	Post-thaw forward motility (B: %)	Variation of forward motility (C: %)	Comparison (P-value)
HL	29.30 \pm 2.50	10.94 \pm 1.73	66.66	P < 0.0001
TC	35.70 \pm 2.38	13.31 \pm 1.78	62.72	P < 0.0001
AL	23.30 \pm 1.66	8.80 \pm 2.00	62.23	P = 0.0015
NHL	33.45 \pm 1.70	16.33 \pm 2.09	51.18	P = 0.0006
MBT	31.79 \pm 4.55	15.47 \pm 2.66	51.34	P = 0.002
All patients (n = 156)	29.88 \pm 1.15	12.41 \pm 0.79	58.46	P < 0.0001

HL, Hodgkin's lymphoma; TC, testicular cancer; AL, acute leukaemia; NHL, non-Hodgkin's lymphoma; MBT, malignant bone tumour; Non-cancer, 'non-cancer' group; C, $[(A - B)/A] \times 100$; n, number of patients.

- Menon S et al, *Hum Reprod*, Vol.24, 37 – 44, 2009

Επίδραση της κατάψυξης στην μορφολογία



- *Ozkavukcu et al, J Assist Reprod Genet (2008) 25:403–411*

Επίδραση της κρυοσυντήρησης...

... στην χρωματίνη

- chromatin condensation (*Hammadeh et al 1999*)
- chromatin structure assay (*Spano et al 1999*)

... στις κυτταρικές μεμβράνες

- lipid peroxidation of unsaturated fatty acids by free radicals
(*Bell et al., 1993*)
- acrosome (*Esteves et al, 2000*)

Επίδραση της κρυοσυντήρησης...

... στα χρωμοσώματα

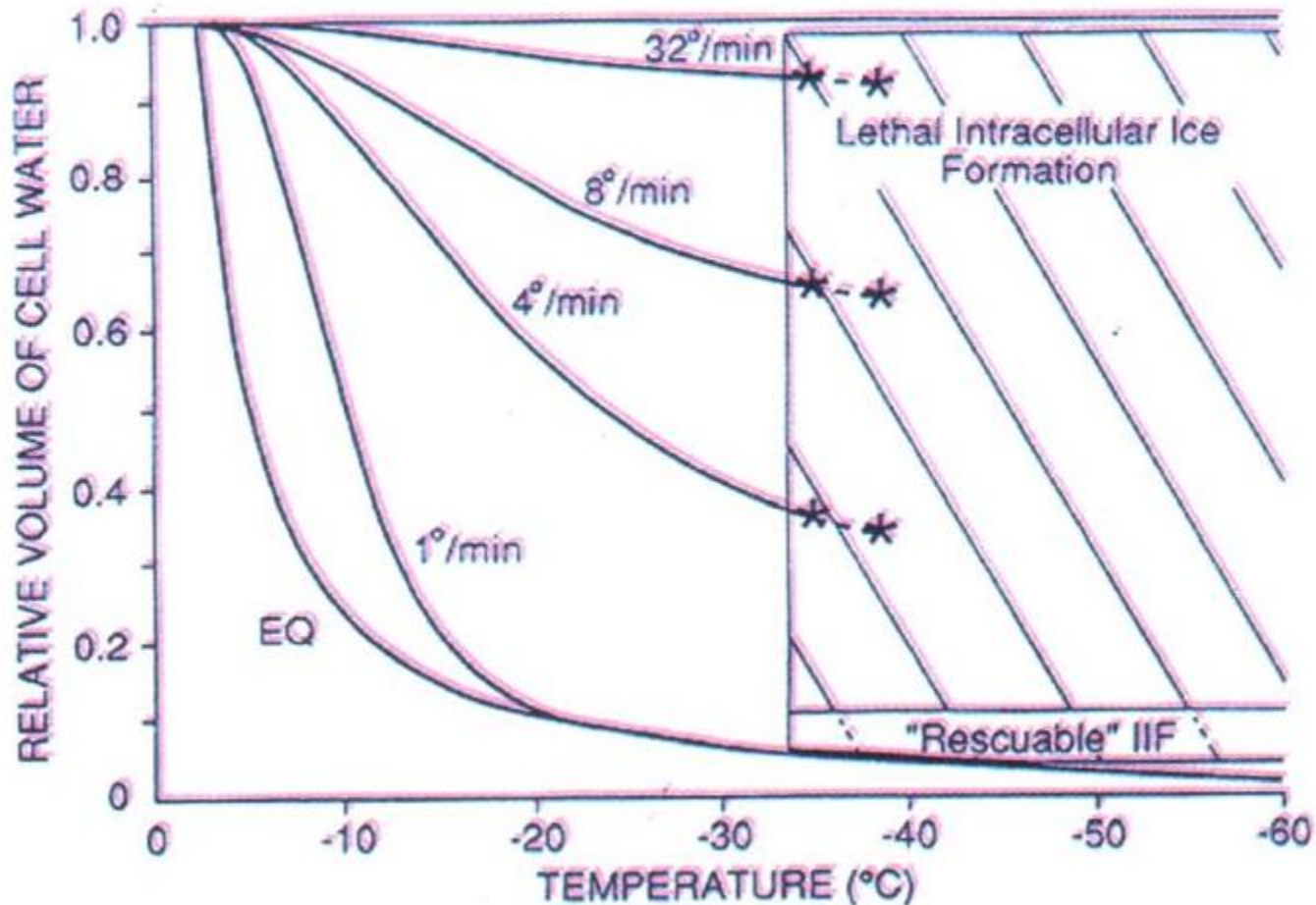
“ no alteration in the frequency of chromosomal abnormalities or sex ratio in human spermatozoa after freezing ”

(Chernos and Martin 1989, Martin et al., 1991)

Αλλαγές κατά την κατάψυξη

- Πυρήνες πάγου εξωκυτταρικά
- Αύξηση της συγκέντρωσης των διαλυμένων ουσιών
- Μετακίνηση νερού – αφυδάτωση κυττάρων

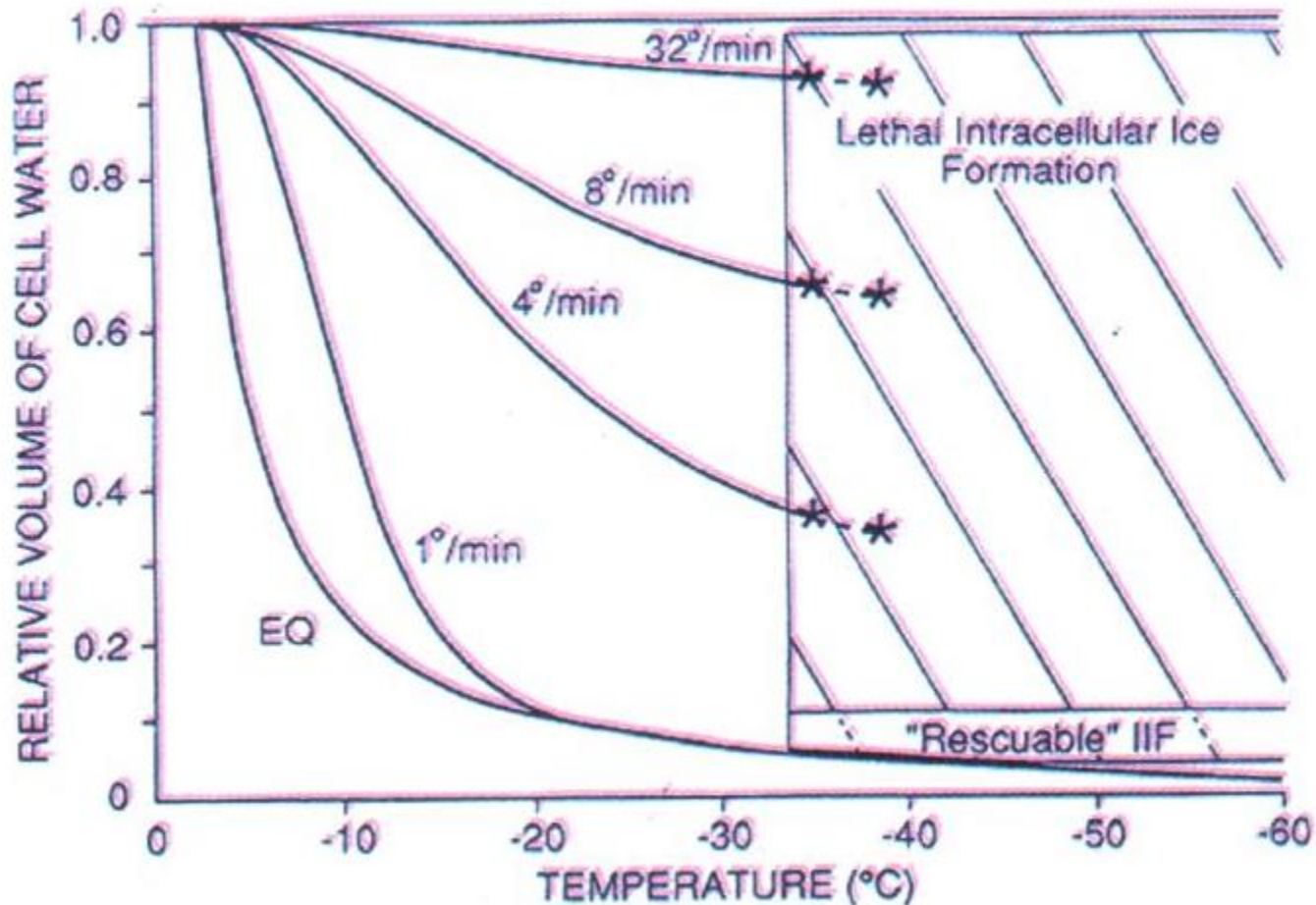
Fuller and Paynter, 2004



Υψηλός ρυθμός ψύξης

- Το νερό εγκλωβίζεται
- Δημιουργούνται κρύσταλλοι
- Καταστρέφεται η κυτταρική λειτουργία

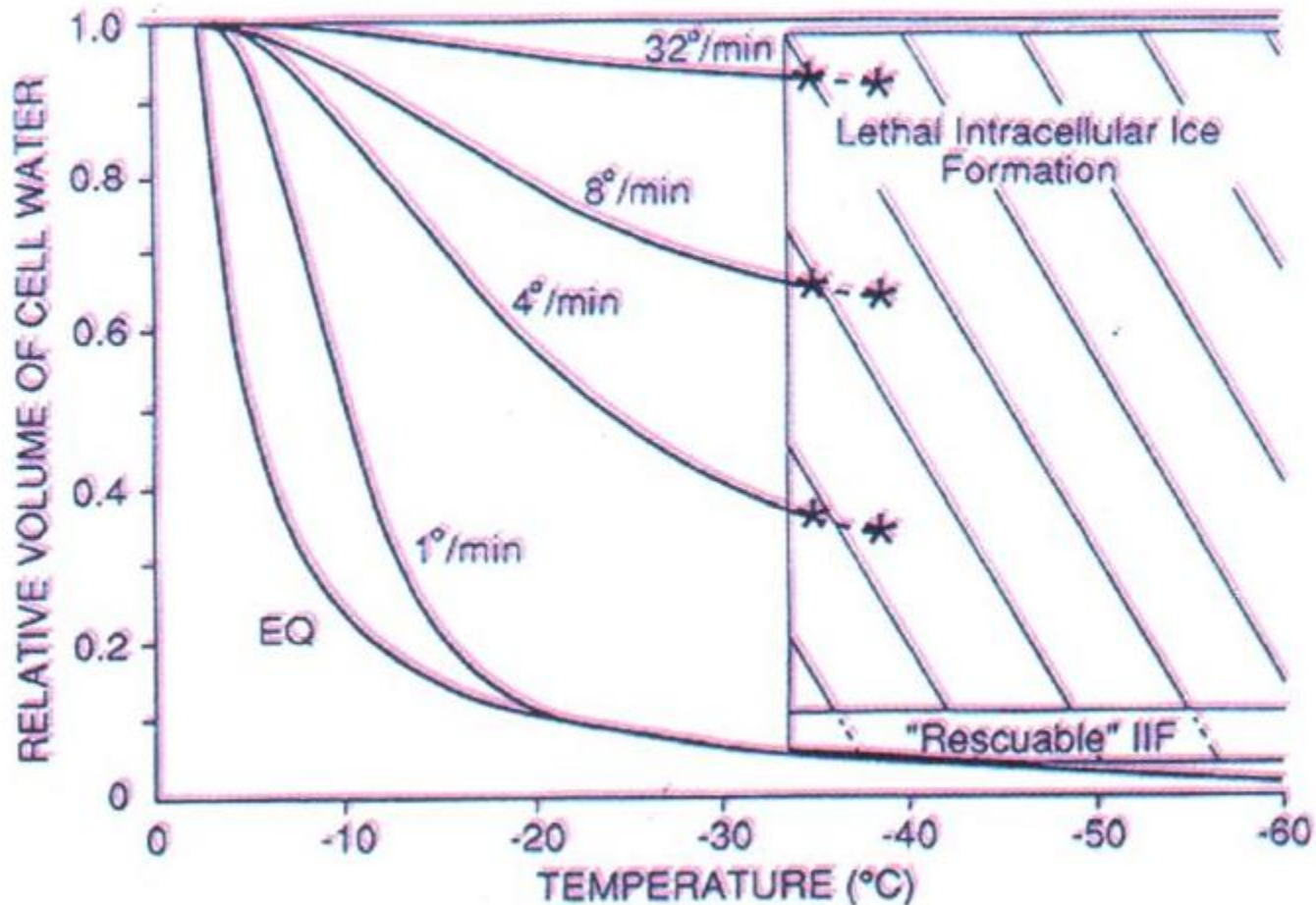
Fuller and Paynter, 2004



Χαμηλός ρυθμός ψύξης

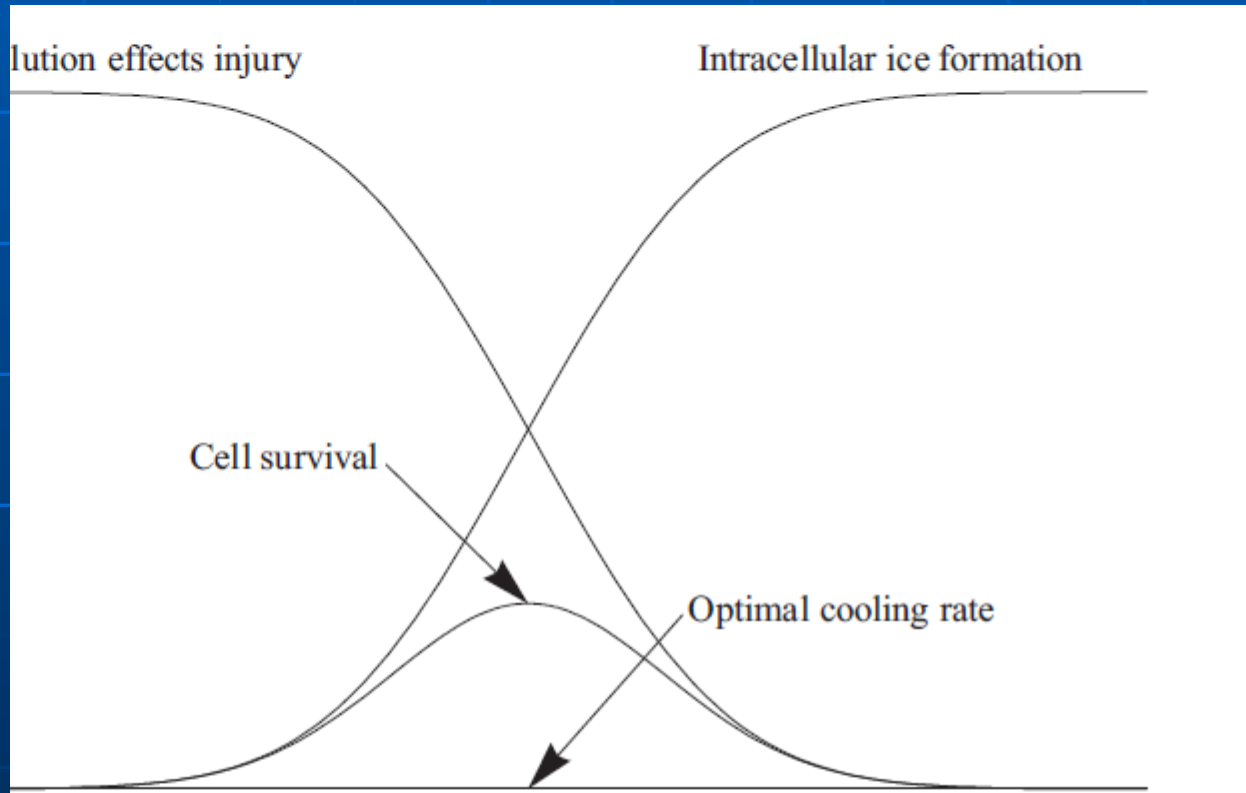
- Το νερό μετακινείται στον εξωκυττάριο χώρο
- Αύξηση της συγκέντρωσης των διαλυμένων ουσιών ενδοκυτταρικά
- Καταστροφή της μεμβράνης του κυττάρου

Fuller and Paynter, 2004

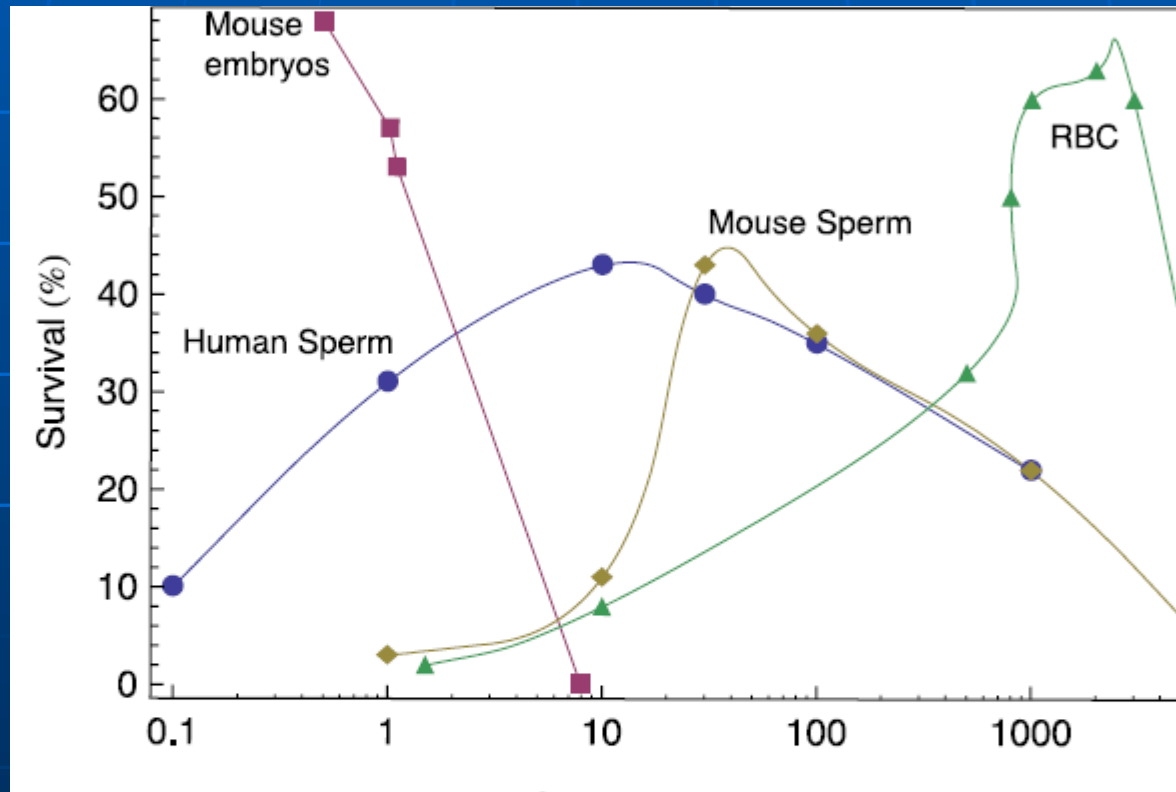


Two-factor hypothesis

Mazur et al, 1972



Ρυθμός ψύξης + βιωσιμότητα



Κρυοπροστατευτικά

- **Γλυκερόλη**

Polge C et al Nature 164 (1949) 666–676

- **DMSO (Dimethyl Sulfoxide)**

Lovelock J.E. and Bishop M., Nature 183 (1959) 1394–1395

- Άλλα...

Κρυοπροστατευτικά

- Ουσίες μικρού ή μεγάλου μοριακού βάρους που χαμηλώνουν το σημείο τήξης του διαλύματος
- Ο πάγος καταλαμβάνει μικρότερο μέρος του διαλύματος άρα περισσότερος χώρος διαθέσιμος για τα κύτταρα

Κρυοπροστατευτικά



– διεισδυτικά

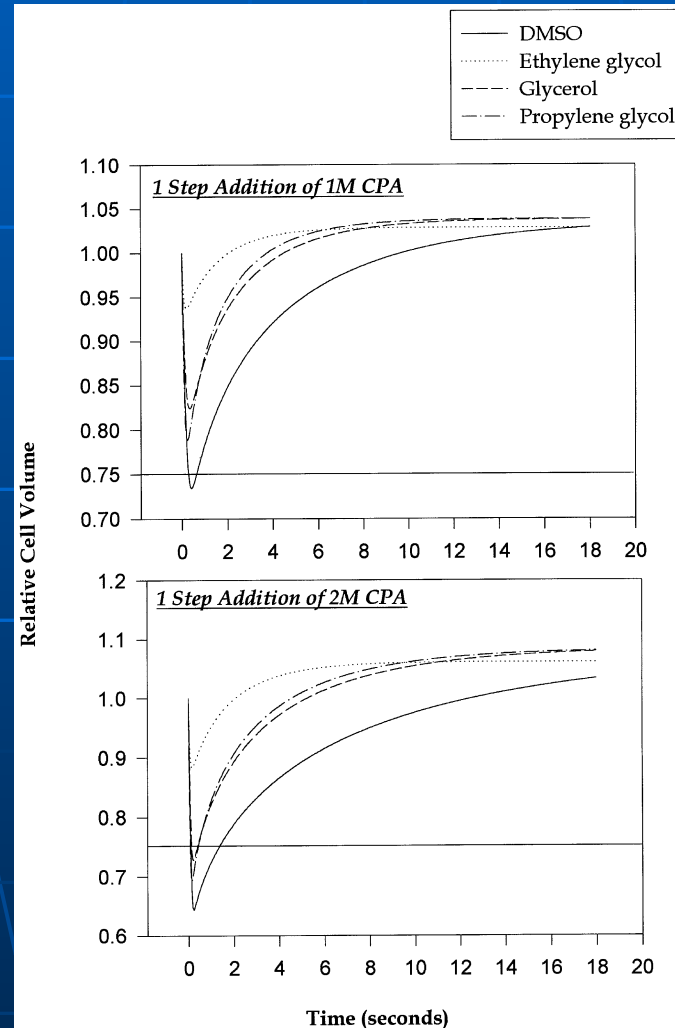
- προκαλούν αφυδάτωση

Κρυοπροστατευτικά

Άλλες ουσίες όπως

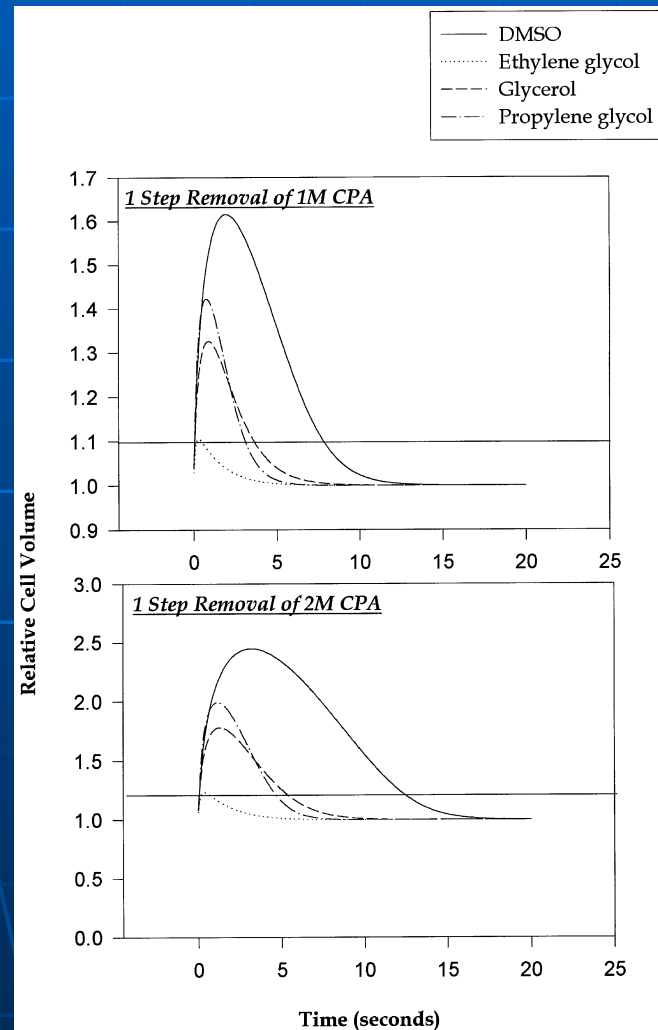
- παράγοντες που σταθεροποιούν την μεμβράνη,
- EDTA για δέσμευση του ασβεστίου,
- ρυθμιστικά διαλύματα για το pH

Η επίδραση της πρόσθεσης κρυοπροστατευτικού στα κύτταρα



Gilmore J.A. et al Hum Reprod, vol 12, 112-118, 1997

Η επίδραση της αφαίρεσης κρυοπροστατευτικού από τα κύτταρα



J.A.Gilmore et al Hum Reprod, 1.12, 112-118, 1997

Διατήρηση των κυττάρων



Κατάψυξη σπερματοζωαρίων

- Ο ιδανικός ρυθμός κατάψυξης των σπερματοζωαρίων υπολογίζεται κοντά στους 17 ο C/min

(Devismita et al, 2012)

- Στην πράξη η θερμοκρασία πέφτει από την θερμοκρασία περιβάλλοντος στους 5 ο C με ρυθμό 0,5 - 1,0 ο C/min, κατόπιν το δείγμα καταψύχεται από τους 5 ο C στους -80 ο C με ρυθμό 1 - 10 ο C/min και μετά τοποθετείται στο υγρό άζωτο

(Di Santo et al, 2012)

Διατήρηση των κυττάρων



Διατήρηση των κυττάρων



Κατάψυξη μικρού αριθμού σπερμ/ων

- Διαφανείς ζώνες (*Walmsley et al., 1998; Fusi et al., 2001*)
- Μικροσταγόνες (*Gil-Salom et al., 2000*)
- Παγέτες (*Koscinski et al., 2007*)
- Cryoloops (*Nawroth et al., 2002; Schuster et al., 2003; Isachenko et al., 2004b, 2005*)

Υαλοποίηση

Με την υαλοποίηση επιτυγχάνεται η κρυοσυντήρηση των σπερματοζωαρίων, όπως και άλλων κυττάρων ή εμβρύων, χωρίς την χρήση των κρυοπροστατευτικών ουσιών. Η κατάψυξη και η απόψυξη γίνονται με εξαιρετικά γρήγορους ρυθμούς και έτσι επιτυγχάνεται υψηλή βιωσιμότητα και λειτουργικότητα των σπερματοζωαρίων, χωρίς την αρνητική επίδραση του κρυοπροστατευτικού

Επιβίωση των μικρο-οργανισμών

- Αερόβιοι
- Chlamydia
- Ureaplasma urealyticum and Mycoplasma hominis
- Μύκητες
- Κυτταρομεγαλοιός κ.α.

Ατμοί υγρού αζώτου

- **PROS**

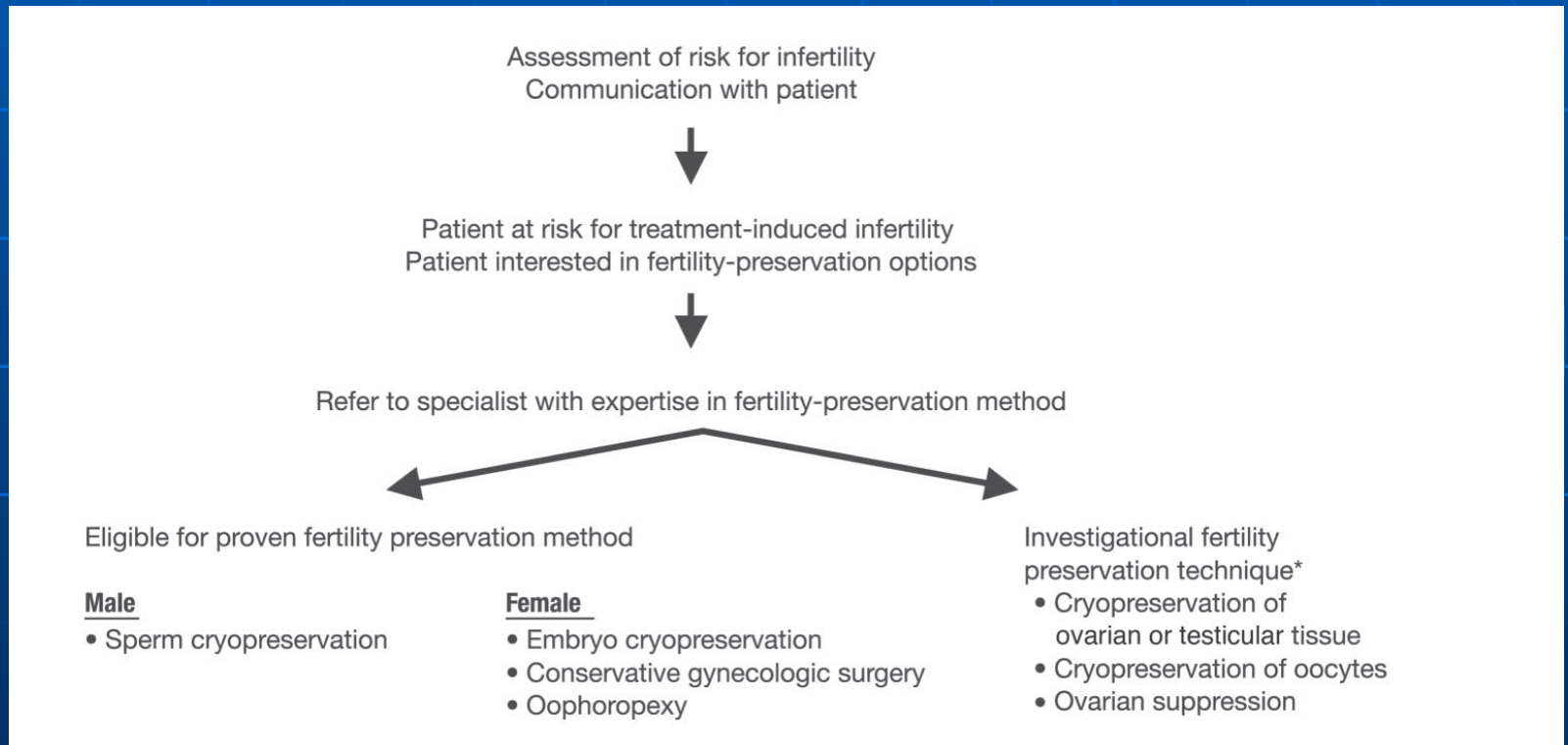
Ασφάλεια ως προς την μετάδοση μικρο-οργανισμών

- **CONS**

Διακυμάνσεις στην θερμοκρασία διατήρησης των δειγμάτων

Κόστος του υγρού αζώτου

American Society of Clinical Oncology Οδηγίες για την διατήρηση της γονιμότητας



Stephanie J. Lee et al, J Clin Oncol vol 24 (18) 2006

Hover et al 2002

...only about 50% of physicians
offered cryopreservation ...

Attitudes of Physicians and Parents Towards Discussing Infertility Risks and Semen Cryopreservation With Male Adolescents Diagnosed With Cancer

...because of the private character of sexuality and the potentially inadequate maturity assessment by parents, semen cryopreservation should be discussed separately with adolescent and parents...

Διατήρηση της γονιμότητας

- Κατάψυξη σπέρματος
- Κατάψυξη ορχικού ιστού
- Κατάψυξη βλαστοκυττάρων του όρχι

Κατάψυξη ορχικού ιστού

- Διαμερισματοποίηση του ιστού
- Διαφορές ανάμεσα στα διάφορα κύτταρα (π.χ. Leydig, Sertoli, κύτταρα της σπερματικής σειράς)
- Αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυττάρων

Picton H.M et al, Br. Med. Bull. 56 (2000) 603–615.

Res U., et al , Hum. Reprod. 15 (2000) 861–864.

Κατάψυξη βλαστοκυττάρων του όρχι

- Απομόνωση των κυττάρων
- Ωρίμανση και αύξηση του πληθυσμού in vitro

Avarbock M.R. et al, Nat. Med. 2 (1996) 693–696.

- Tissue drafting

Schlatt S. et al , Biol. Reprod. 68 (2003) 2331–2335.

Honaramooz A, et al Nature 15 (2002) 778–781.

Ευχαριστώ !

