

# Προέγγιση στην Υπογονιμότητα Άγνωστης Αιτιολογίας

Κλασσικά και νεότερα δεδομένα

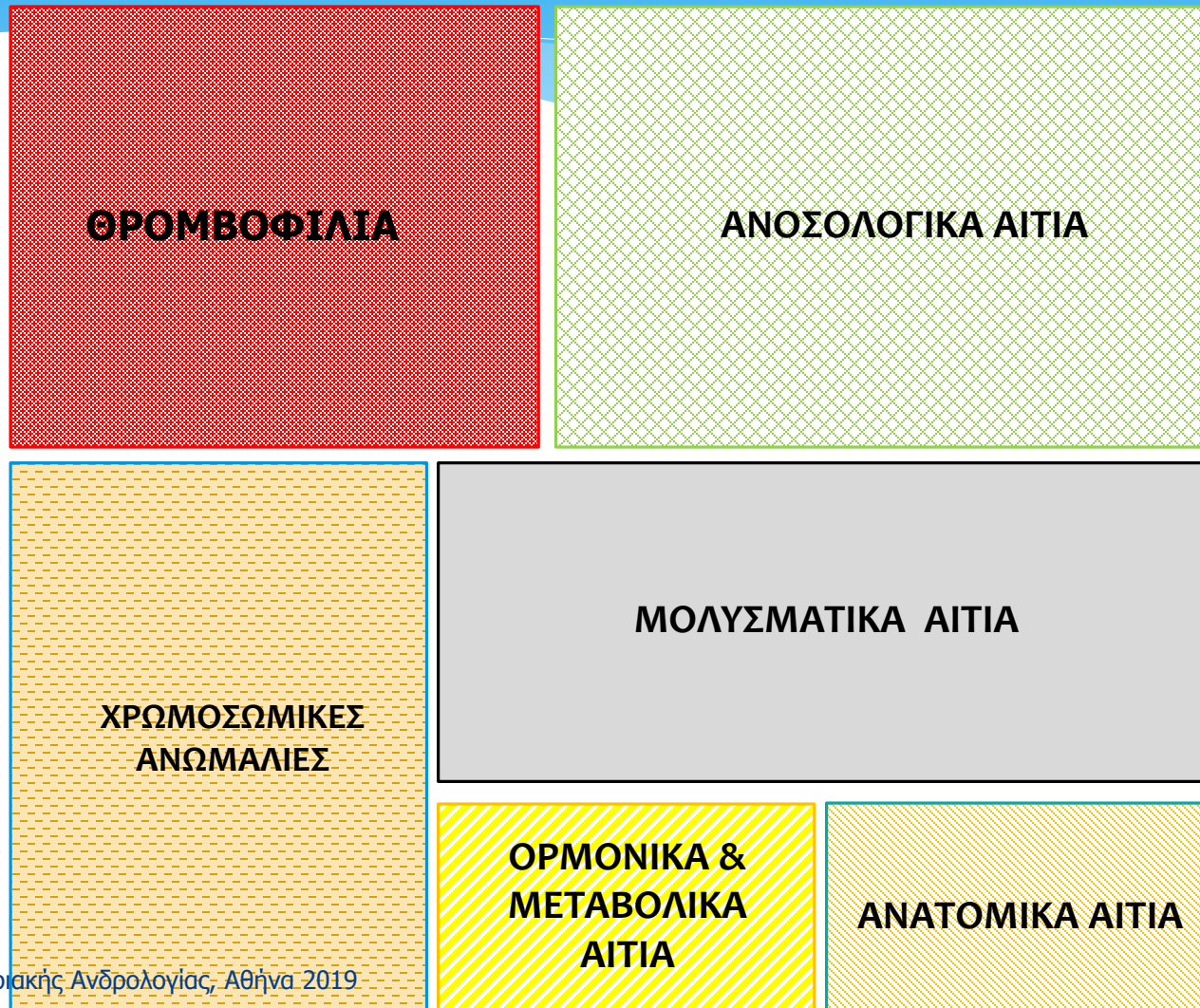
**Βασίλης Τσιλιβάκος MD, PhD**  
**Περιγεννητικός**  
**Ανοσολόγος και Ιστοπαθολόγος**

Εργαστήριο Κυτταρικής Βιολογίας & Ανοσολογίας,  
Πολυϊατρείο Locus Medicus

# Υπογονιμότητα: Ένα πολυπαραγοντικό πρόβλημα



# Υπογονιμότητα: Ένα πολυπαραγοντικό πρόβλημα



# Προσέγγιση στη Διερεύνηση της Υπογονιμότητας

Σκοπός η επιτυχία με τη μικρότερη κατανάλωση

Φαρμάκων, Ψυχής, Χρήματος και Χρόνου

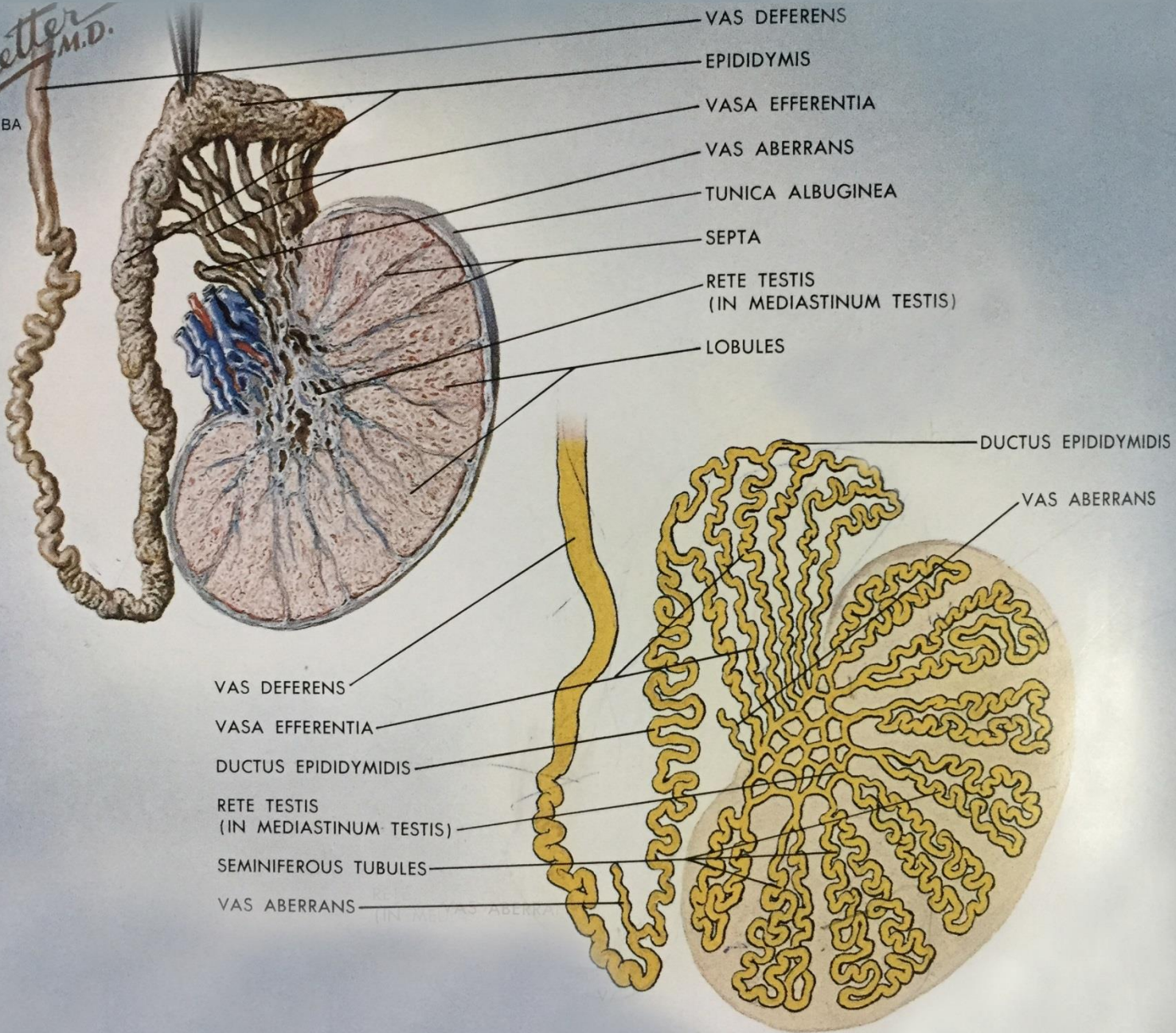
# Προσέγγιση στη Διερεύνηση της Υπογονιμότητας Άγνωστης Αιτιολογίας

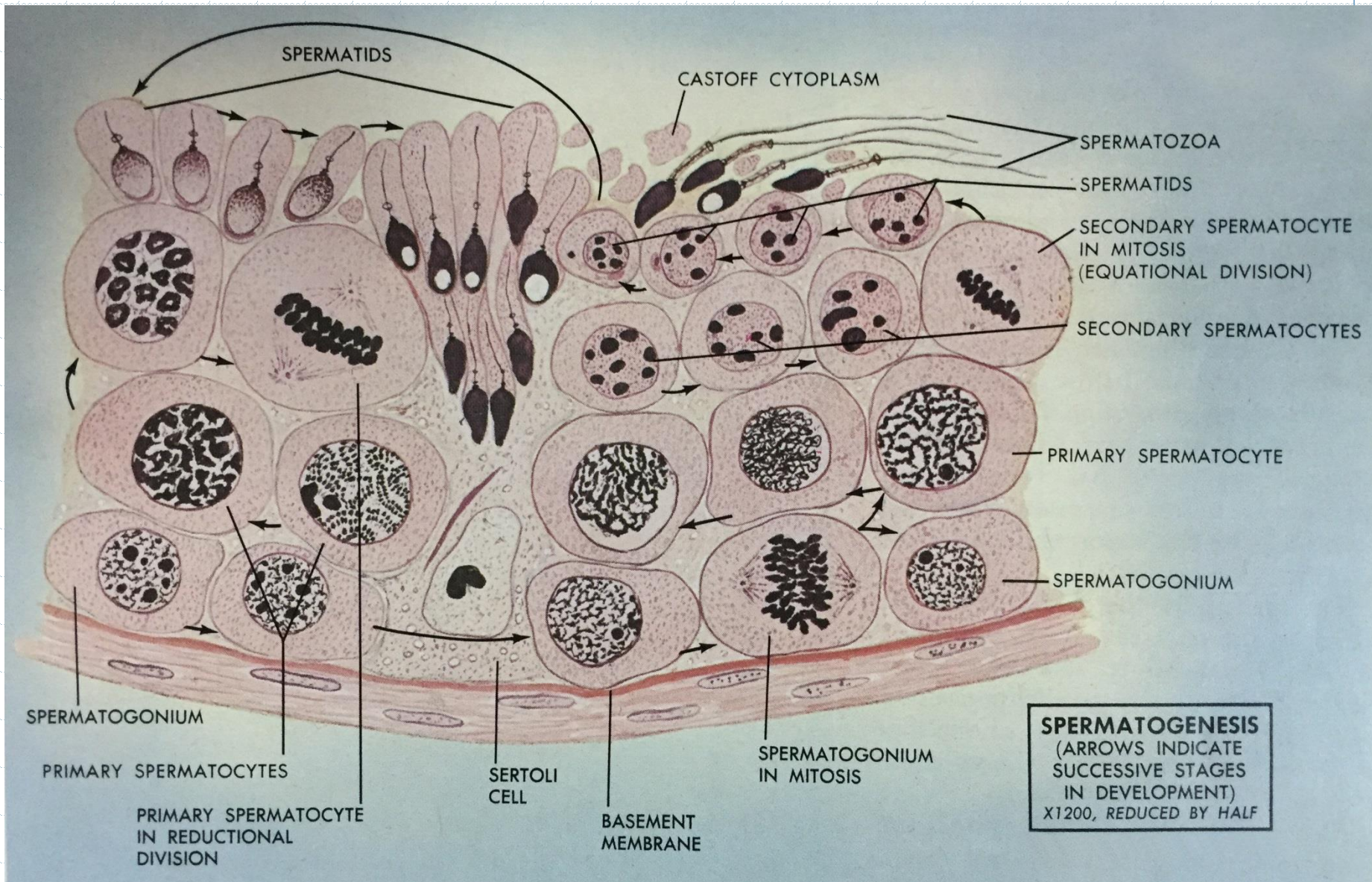
## 3 ανεξάρτητα πεδία:

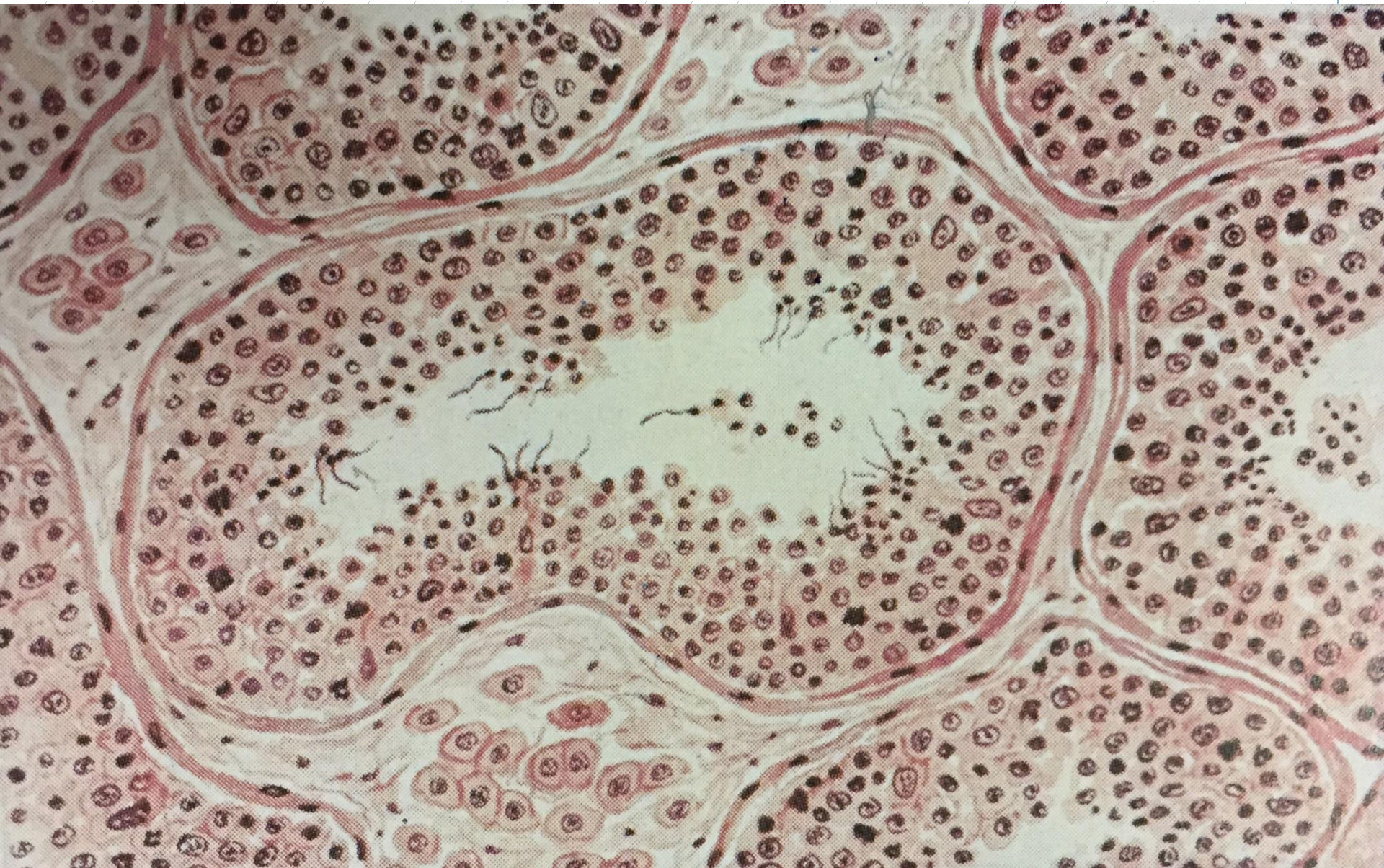
- Ωάρια
- Σπέρμα
- Ενδομήτριο

F. Netter M.D.

© CIBA









Spermatogonia

*Core Histone Acetylation*

Primary  
Spermatocyte

*Core Histone Deacetylation*

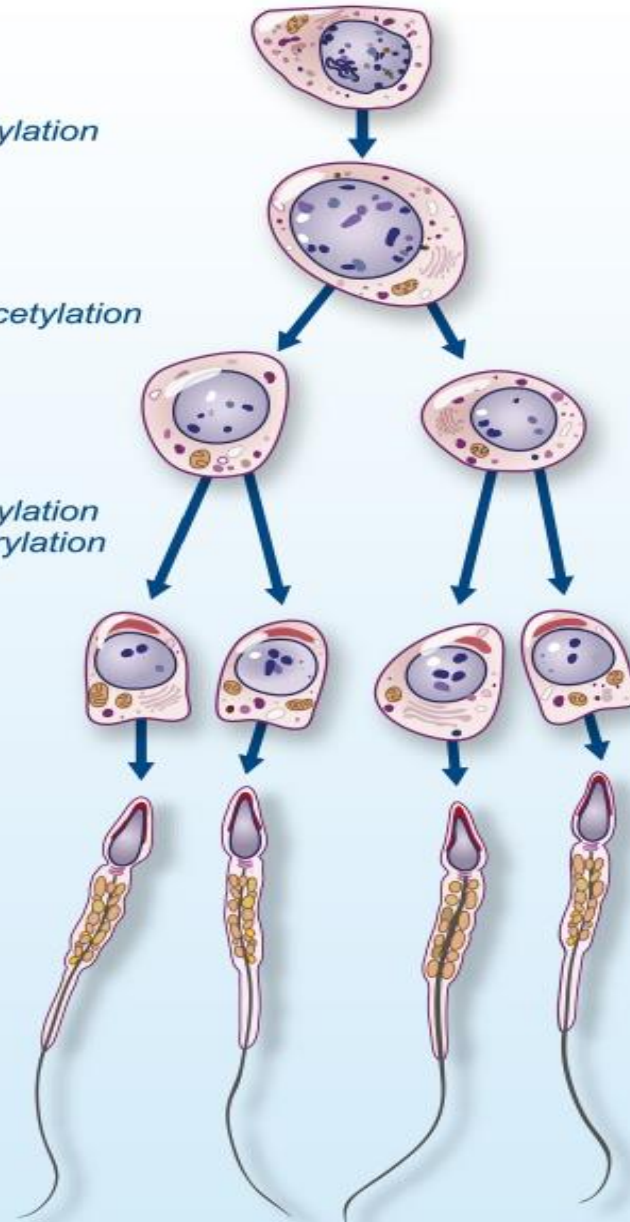
Secondary  
Spermatocytes

*Core Histone Acetylation  
Protein Phosphorylation*

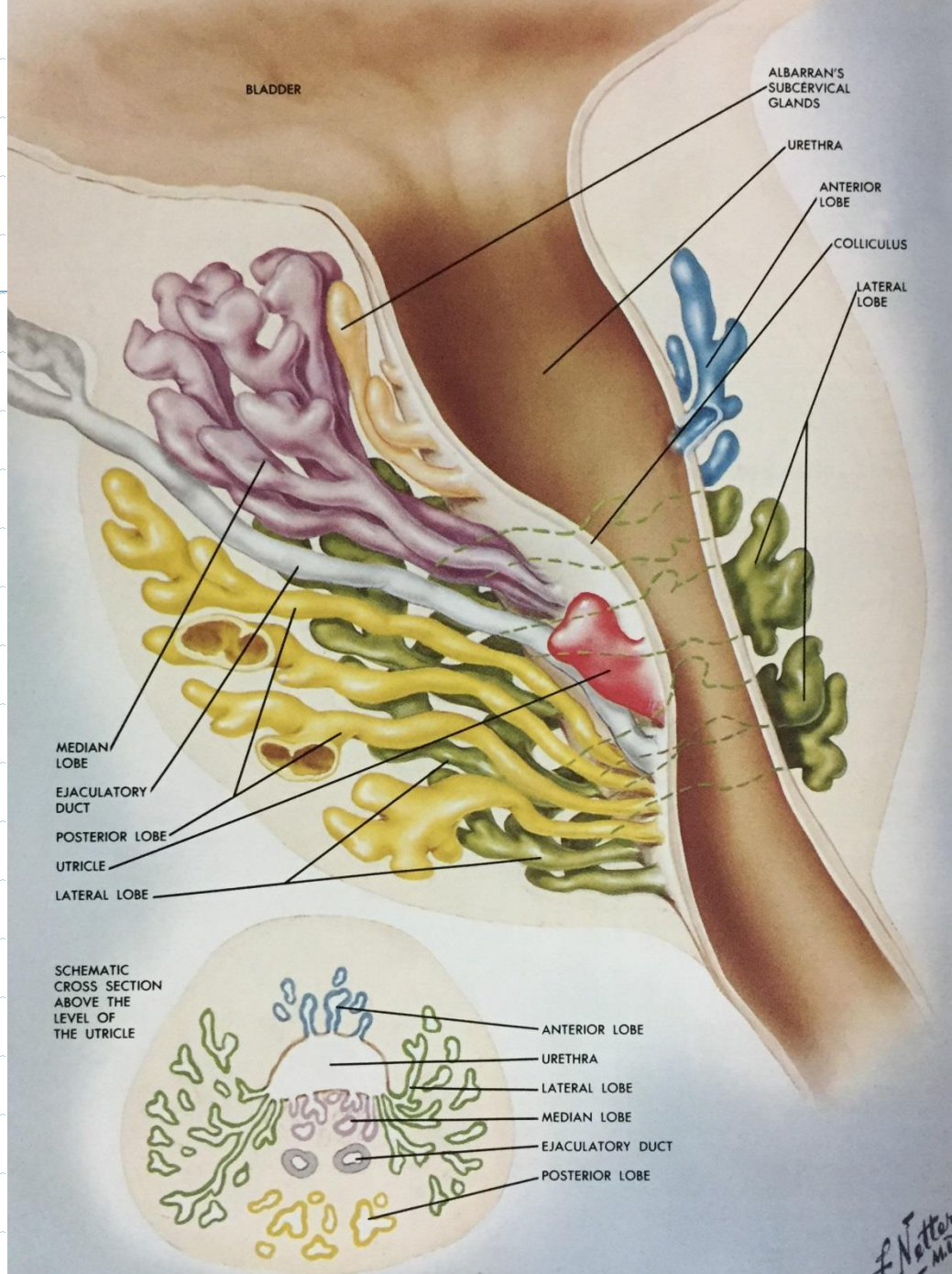
Round  
Spermatids

*Protamine  
Disulfide Bond*

Elongated  
Sperm



©CCF 2010



BLADDER

ALBARRAN'S  
SUBCERVICAL  
GLANDS

URETHRA

ANTERIOR  
LOBE

COLLICULUS

LATERAL  
LOBE

MEDIAN  
LOBE

EJACULATORY  
DUCT

POSTERIOR LOBE

UTRICLE

LATERAL LOBE

SCHEMATIC  
CROSS SECTION  
ABOVE THE  
LEVEL OF  
THE UTRICLE

ANTERIOR LOBE

URETHRA

LATERAL LOBE

MEDIAN LOBE

EJACULATORY DUCT

POSTERIOR LOBE

*F. Netter  
M.D.*  
© CIBA

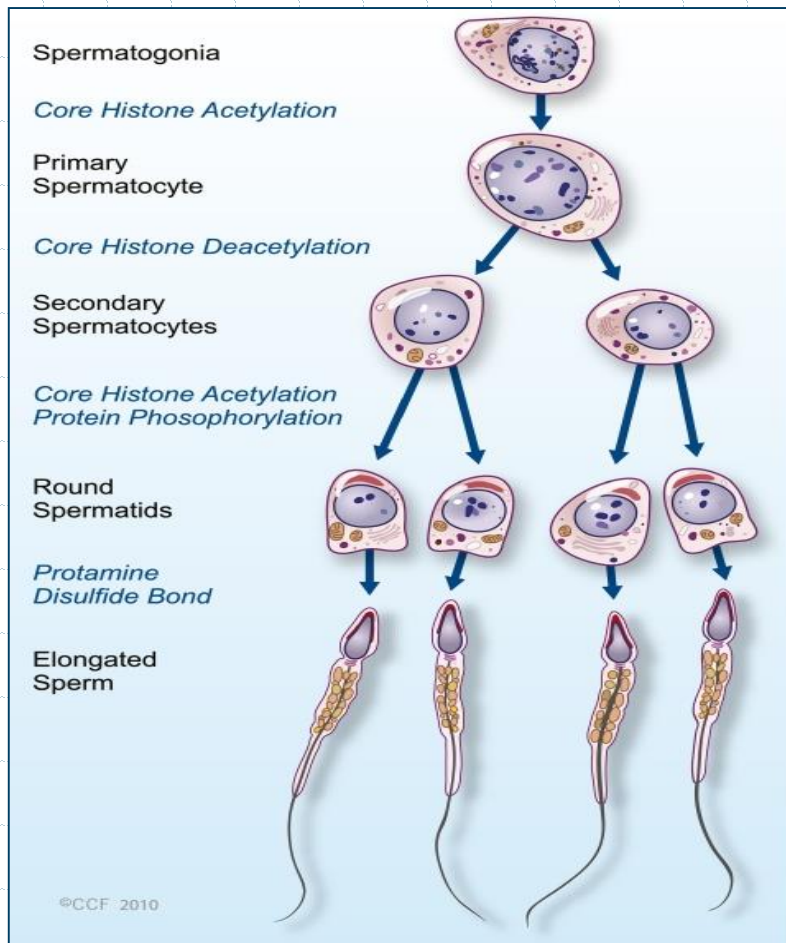
# Κατ' όγκου σύσταση του σπέρματος

- **5% από τους όρχεις.**
- **35% από τον προστάτη.**
- **60% από τις σπερματοδόχες κύστεις.**

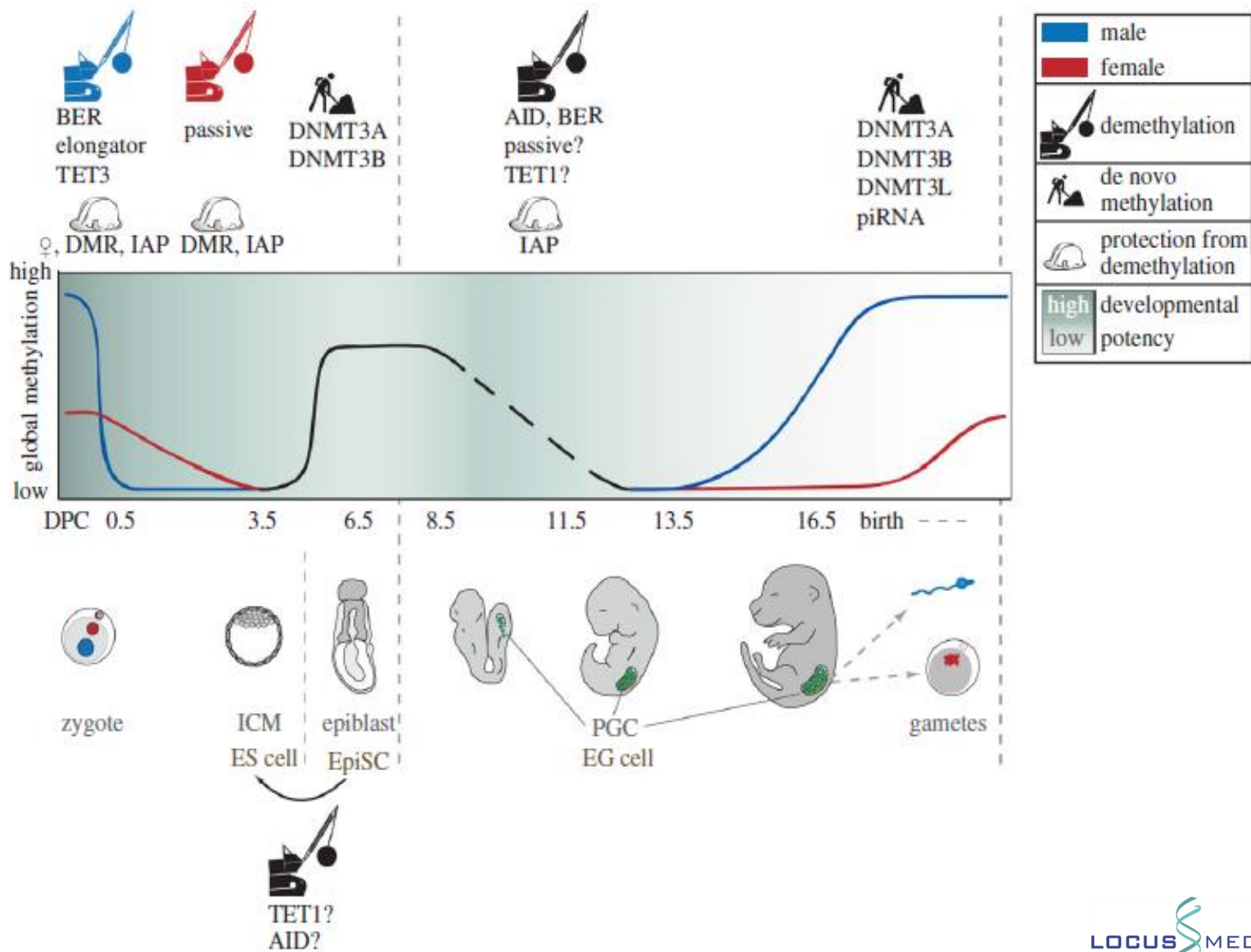
# Προσέγγιση στη Διερεύνηση της Υπογονιμότητας

## Άγνωστης Αιτιολογίας: Σπέρμα

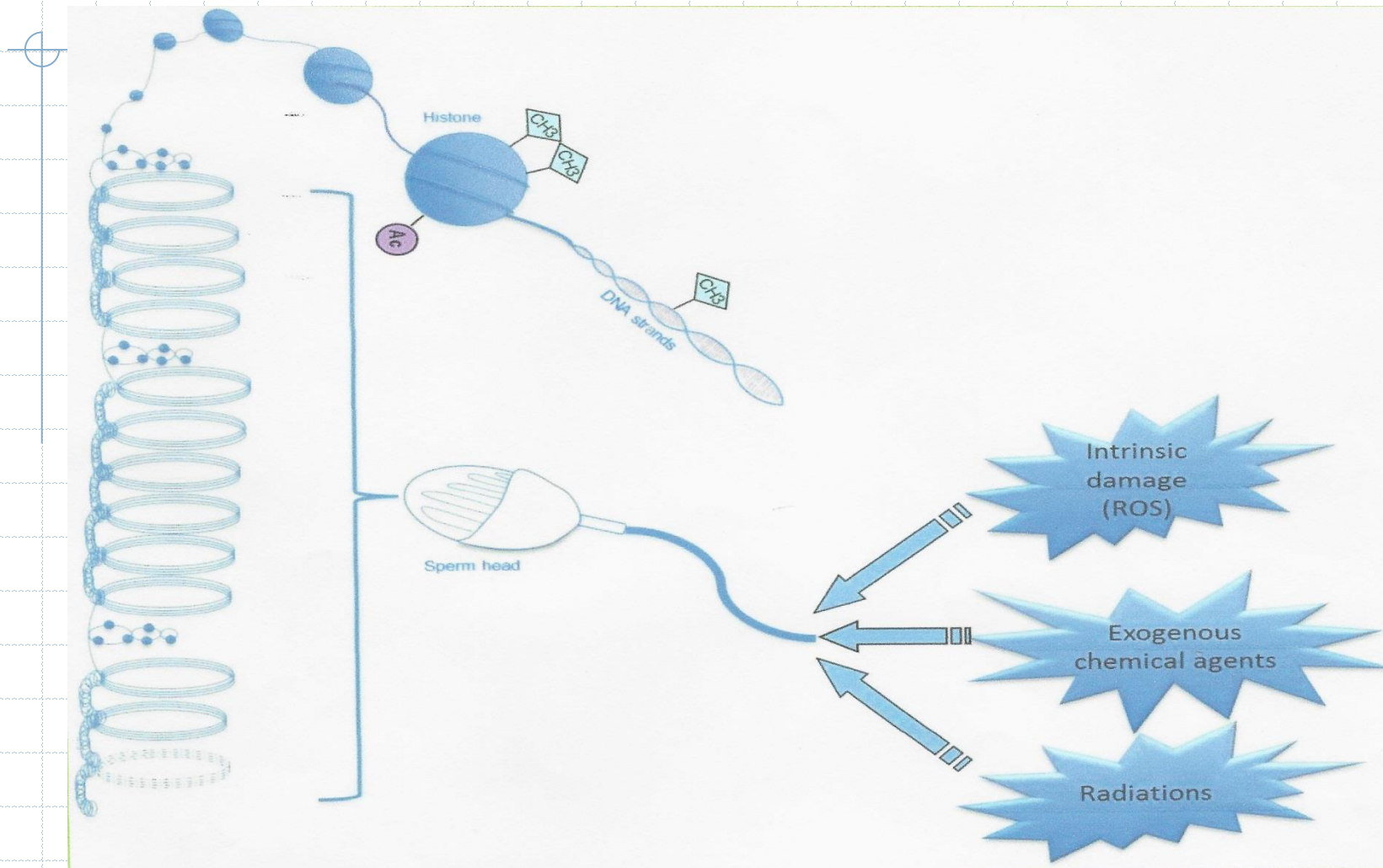
Στάδια πρόκλησης βλαβών στο DNA των σπερματοζωαρίων



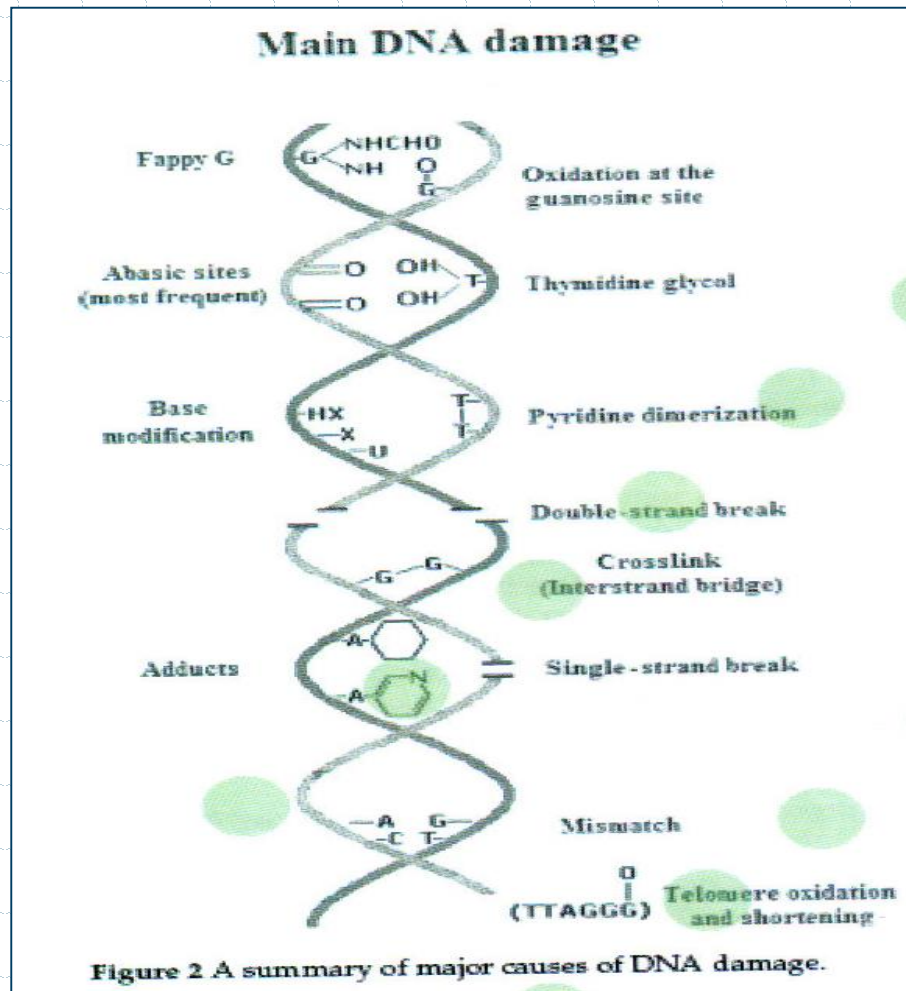
- Ορχικά σωληνάρια: Θεωρία εκτροπικής απόπτωσης
- Στάδιο σπερματίδων: Θεωρία ελαττωματικής ωρίμανσης
- Επιδιδυμίδα (και συνέχεια;): Οξειδωτικό στρες



# Κύριοι βλαπτικοί παράγοντες που επηρεάζουν τη σταθερότητα του γονιδιώματος



# Προσέγγιση στη Διερεύνηση της Υπογονιμότητας Άγνωστης Αιτιολογίας: Σπέρμα



# Προσέγγιση στη Διερεύνηση της Υπογονιμότητας Άγνωστης Αιτιολογίας: Σπέρμα

## Κάπνισμα

- Αύξηση πυοσφαιρίων
- Αύξηση παραγωγής ROS
- Αύξηση DFI
- Μείωση δραστηριότητας αντιοξειδωτικών ενζύμων
- Μείωση ποιοτικών χαρακτηριστικών σπέρματος



# Προσέγγιση στη Διερεύνηση της Υπογονιμότητας Άγνωστης Αιτιολογίας: Σπέρμα

## Ηλικία

**Στους μεγαλύτερους άνδρες παρατηρείται:**

- Ελάττωση των διθειικών δεσμών των πρωταμινών με αποτέλεσμα την χαλάρωση της χρωματίνης και μεγαλύτερη ευαισθησία στις οξειδώσεις.
- Μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε ιστόνες.

# Προσέγγιση στη Διερεύνηση της Υπογονιμότητας Άγνωστης Αιτιολογίας: Σπέρμα

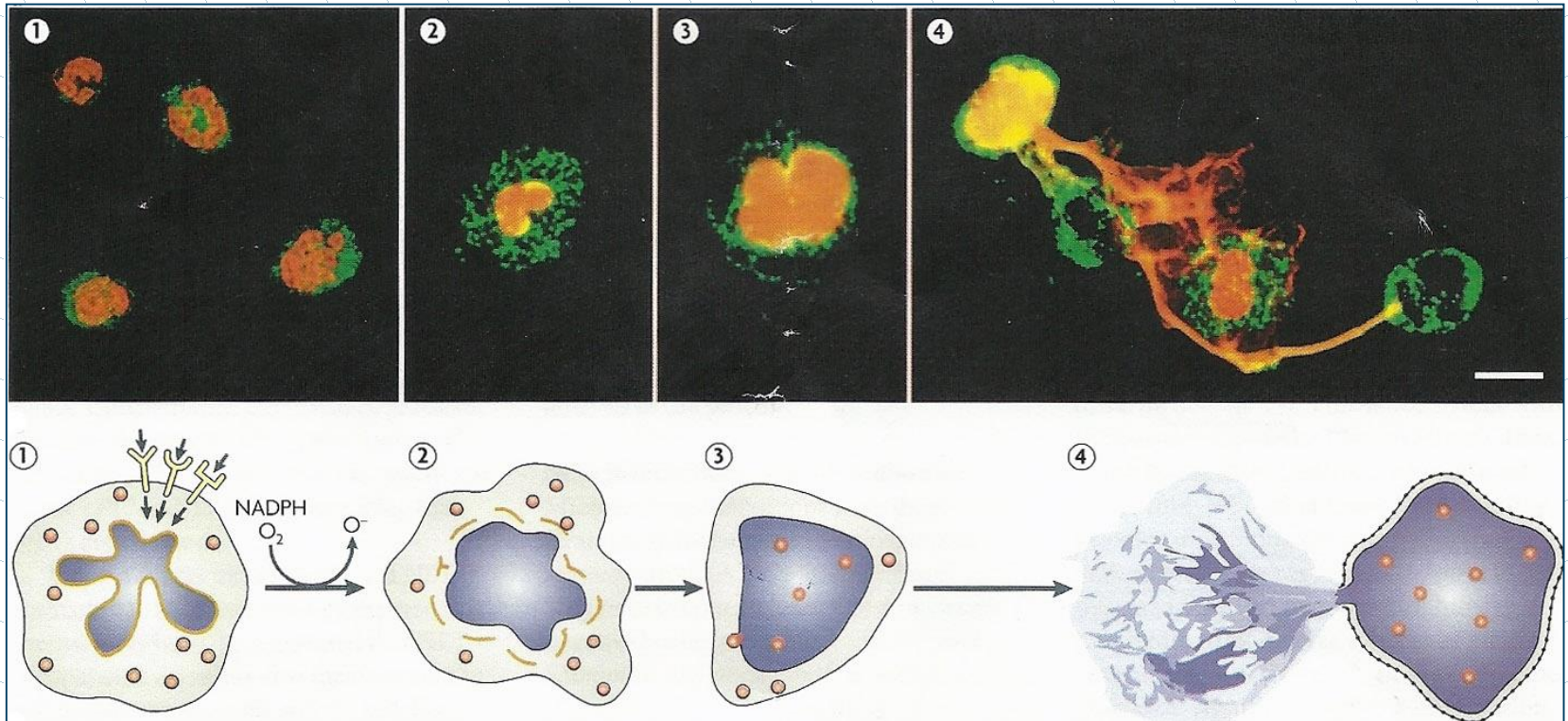
## Κατάψυξη σπέρματος

1. Αύξηση/εξωτερίκευση φωσφατιδυλ-σερίνης.
2. Επαγωγή των κασπασών.
3. Δεν αναφέρεται τίποτα για ROS ή DFI

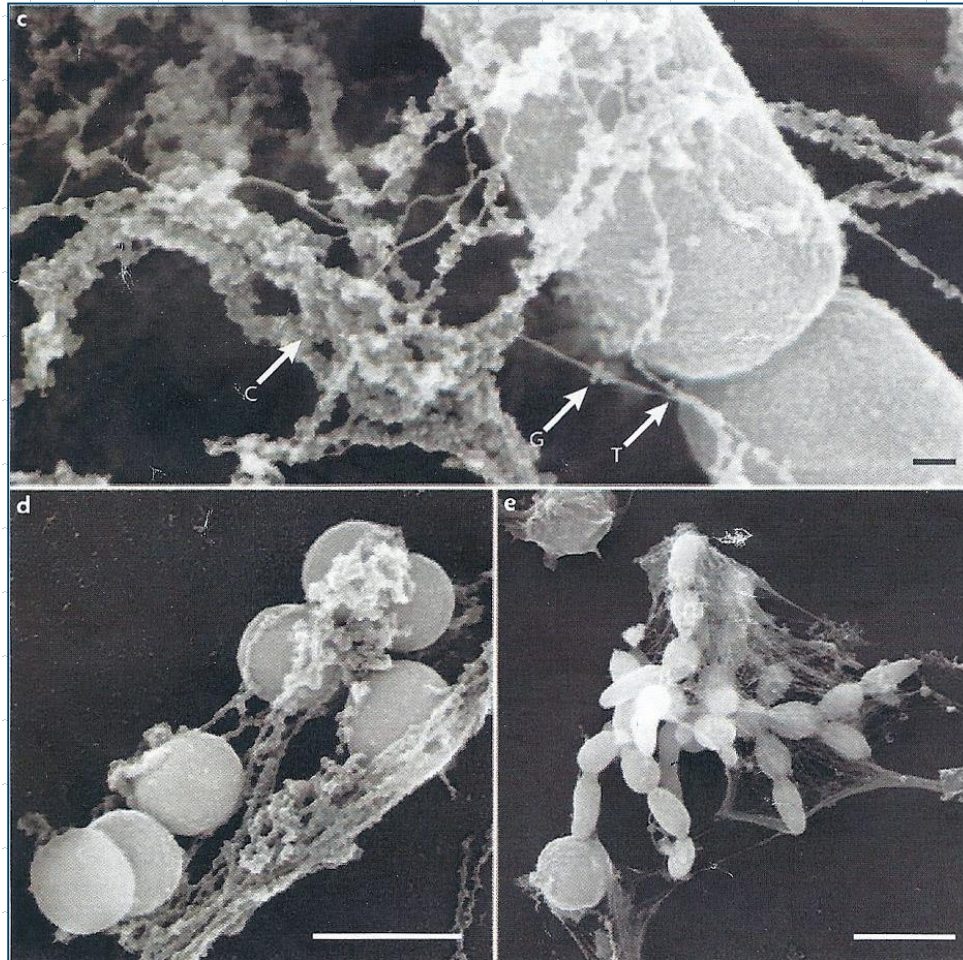
# Αυξημένο ιξώδες σπέρματος

- Συχνότητα 12-29%
- Κακή ποιότητα σπέρματος
- Μειωμένη κινητικότητα και χαμηλή απόδοση στις προσπάθειες υποβοηθούμενης αναπαραγωγής
- Συμβάλλει στην ανδρική υπογονιμότητα
- Ενδεχομένως, η παρεμπόδιση των σπερματοζωαρίων στο υπεριξώδες σπερματικό πλάσμα, να οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή των ROS (Reactive Oxygen Species - Ενεργές Ρίζες Οξυγόνου).

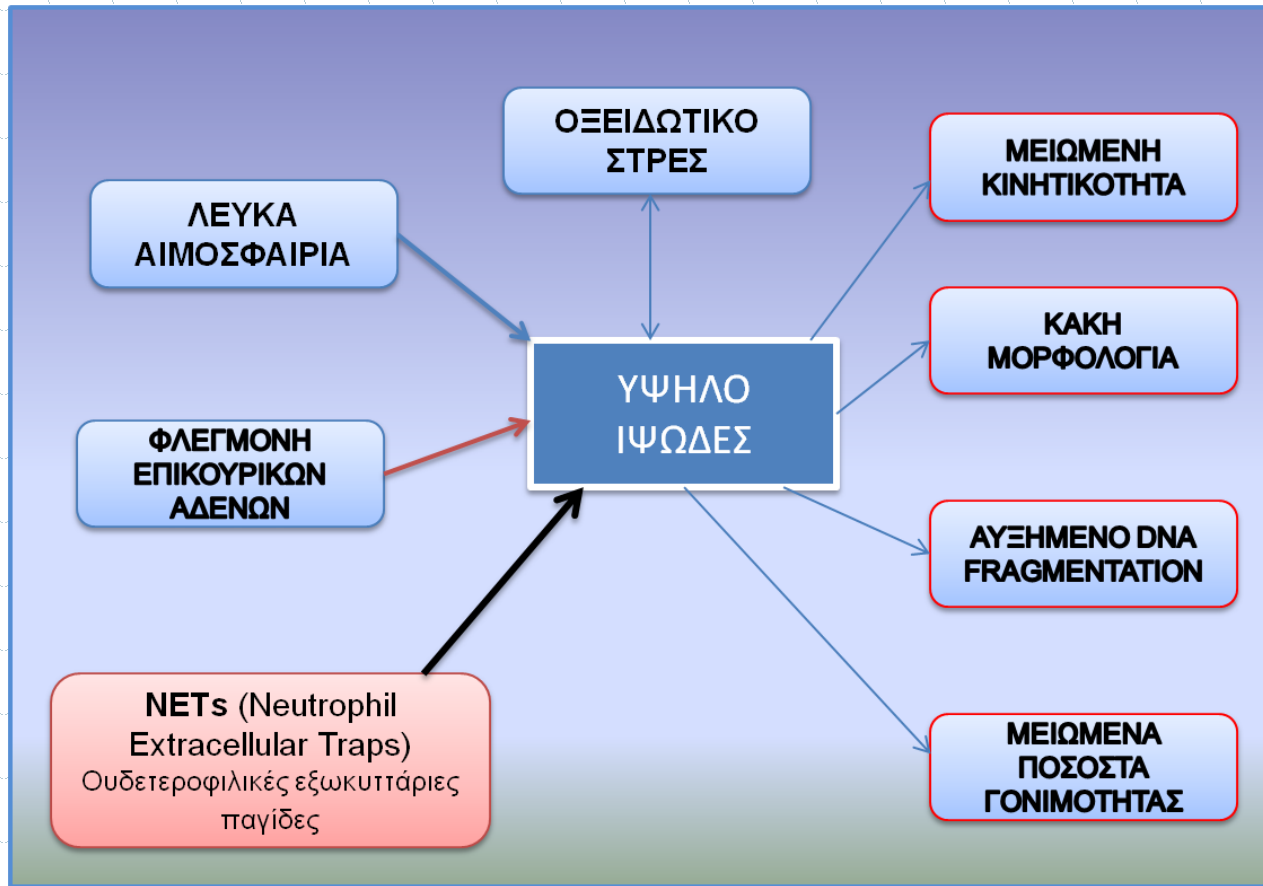
# Ουδετεροφιλικές εξωκυττάριες παγίδες (NETS)



# Ουδετεροφιλικές εξωκυττάρειες παγίδες (NETS)



# Αίτια και αποτελέσματα υψηλού ιξώδους



# Ουδετεροφιλικές εξωκυττάρια παγίδες (NETS)

- Συχνότητα 12-29%
- Κακή ποιότητα σπέρματος
- Μειωμένη κινητικότητα και χαμηλή απόδοση στις προσπάθειες υποβοηθούμενης αναπαραγωγής
- Συμβάλλει στην ανδρική υπογονιμότητα
- Ενδεχομένως, η παρεμπόδιση των σπερματοζωαρίων στο υπερξώδες σπερματικό πλάσμα, να οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή των ROS (Reactive Oxygen Species - Ενεργές Ρίζες Οξυγόνου).

# Ερωτήματα υπό διερεύνηση

- ✓ Η παρουσία των NETs στο σπερματικό πλάσμα συμβάλλει στη δημιουργία υψηλού ιξώδους?
- ✓ Αιτιολογική αντιμετώπιση του υψηλού ιξώδους?

## Σκοπός :

- Υποθέτοντας ότι το εξωκυττάριο DNA που περιέχεται στις ουδετεροφιλικές εξωκυττάριας παγίδες (NETS) συμβάλλει στη δημιουργία υψηλού ιξώδους στο σπέρμα, διερευνήθηκε η ενζυμική πέψη με DNάση I, στοχεύοντας στη βελτίωση των ποιοτικών χαρακτηριστικών των σπερματοζωαρίων.

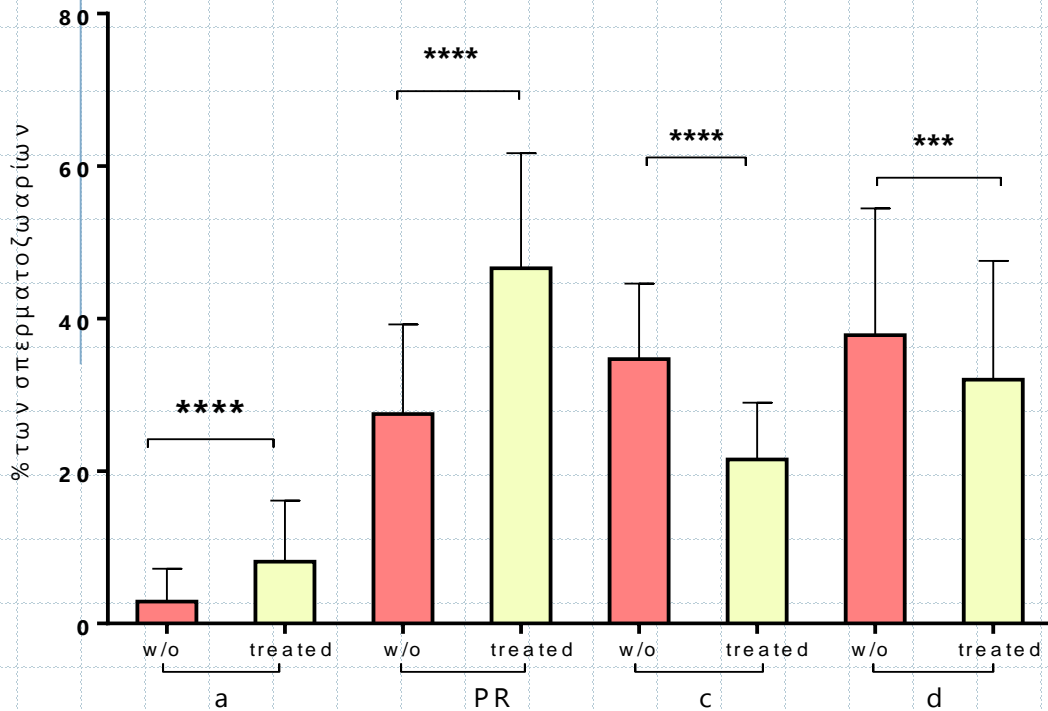


# Υλικό - Μέθοδος

- 24 δείγματα σπέρματος υψηλού και 10 φυσιολογικού ιξώδους επωάστηκαν για 15 min με DNAση I στους 37°C.
- 26 δείγματα σπέρματος υψηλού και 52 φυσιολογικού ιξώδους επεξεργάστηκαν με την τεχνική της φυγοκέντρωσης διαβαθμισμένης πυκνότητας (ΦΔΠ)
- 19 δείγματα σπέρματος υψηλού ιξώδους επεξεργάστηκαν με το συνδυασμό αυτών
- Έγινε μέτρηση της κινητικότητας και της μορφολογίας κατά Tygerberg πριν και μετά την επεξεργασία σύμφωνα με τις οδηγίες WHO, αμέσως μετά τη ρευστοποίηση των δειγμάτων.
- Οι δότες είχαν ιστορικό υπογονιμότητας

# Αποτελέσματα

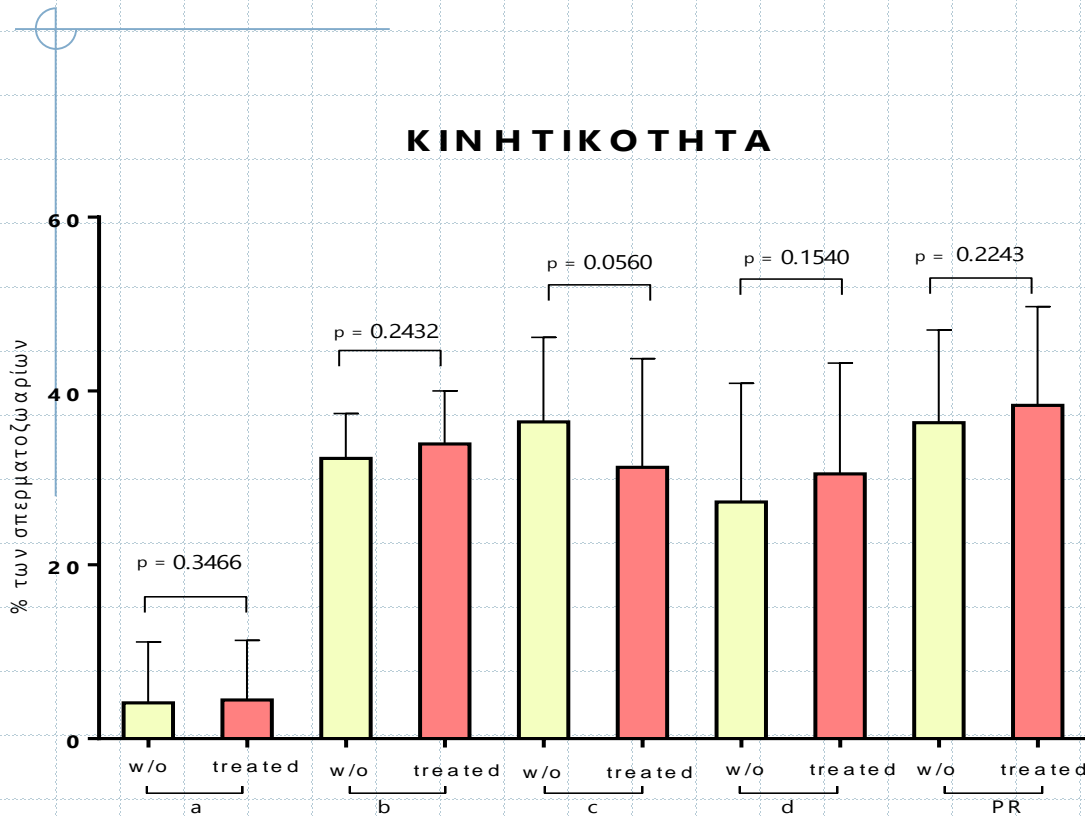
## ΚΙΝΗΤΙΚΟΤΗΤΑ



Διαπιστώθηκε αύξηση σε ποσοστό 83% των εξεταζόμενων τόσο της ταχείας (a), όσο και της προωθητικής (a+b, PR) κινητικότητας ( $p < 0.0001$ ,  $p < 0.0001$ ).

15 min κατεργασίας με DNAση I  
δειγμάτων υψηλού ιξώδους

# Αποτελέσματα

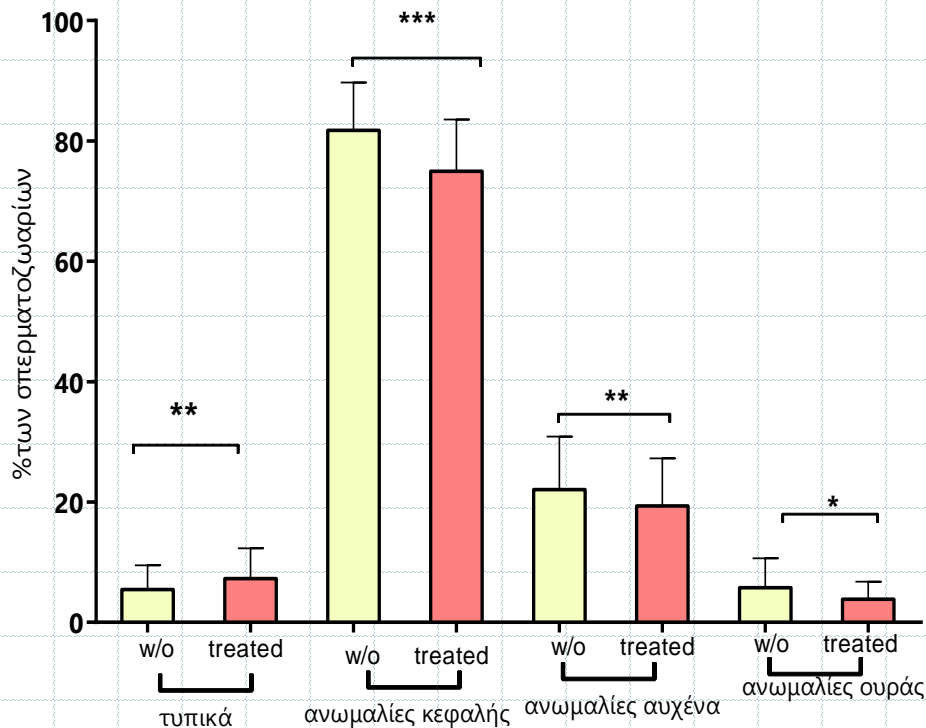


15 min κατεργασία με DNase I  
σε δείγματα φυσιολογικού ιξώδους

- Η χρήση DNάσης δεν προκάλεσε καμία μεταβολή της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων στο σπέρμα των ανδρών με φυσιολογικό ιξώδες.

- *Η δράση αυτή της DNάσης παρατηρείται αποκλειστικά και μόνο σε σπέρματα υψηλού ιξώδους...*

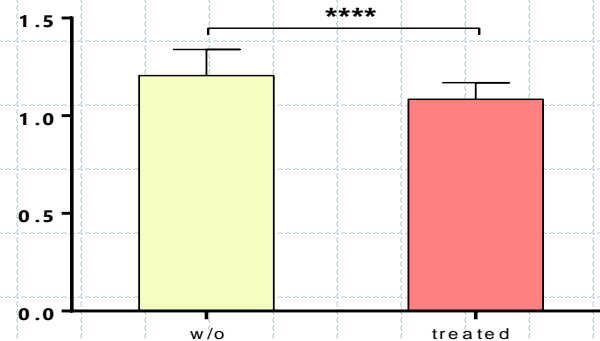
## ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΒΥ TYGERBERG



15 min κατεργασία με DNάση I  
σε δείγματα υψηλού ιξώδους

Αυξάνονται οι φυσιολογικές μορφές ( $p=0.0076$ ), ενώ ταυτόχρονα μειώνονται οι ανωμαλίες κεφαλής και ουράς ( $p=0.0001$  και  $p=0.0066$  αντίστοιχα), καθώς και ο ΤΖΙ ( $p<0.0001$ ).

### ΔΕΙΚΤΗΣ ΤΕΡΑΤΟΣΠΕΡΜΙΑΣ (ΤΖΙ)

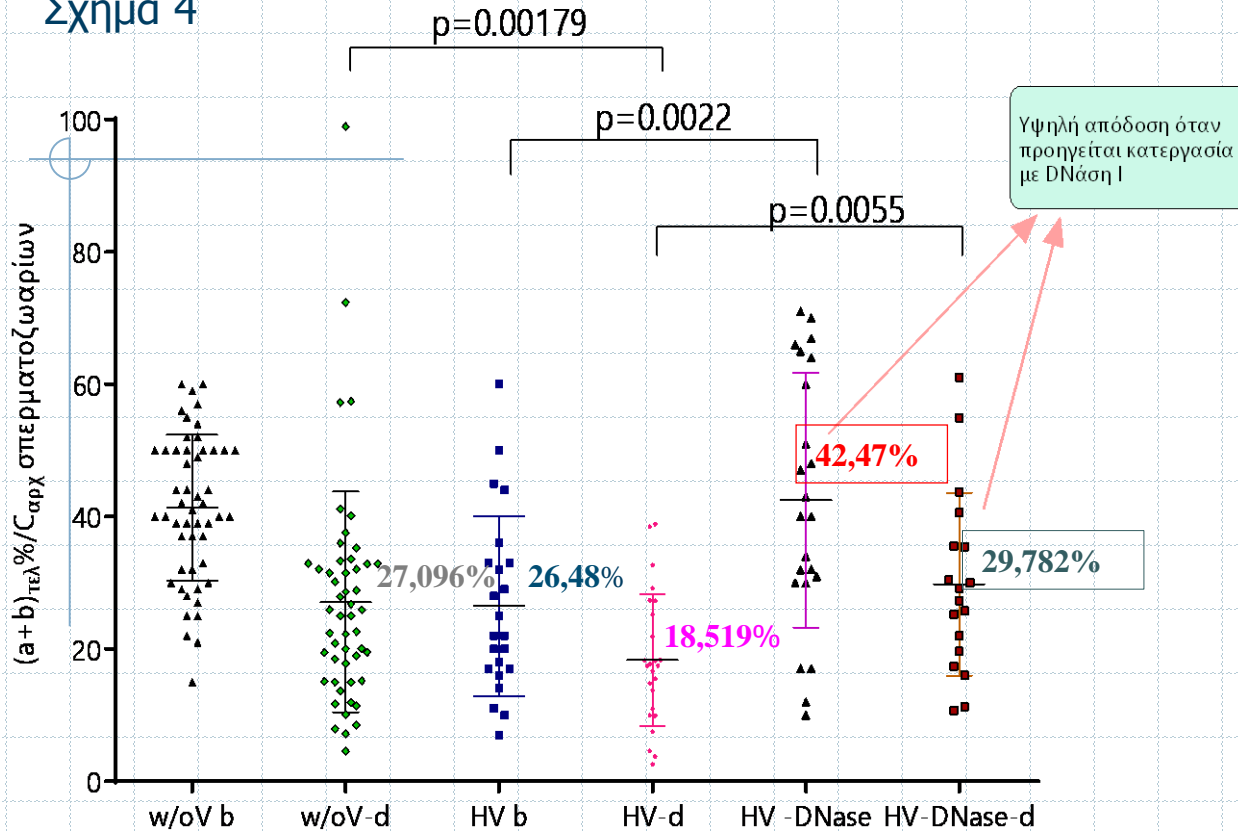


15 min κατεργασία με DNase I  
σε δείγματα υψηλού ιξώδους

Σχήμα 5

# Απόδοση μεθόδων

Σχήμα 4



- w/oV-b:** σπέρματα χωρίς ιξώδες πριν τη φυγοκέντρηση με βαθμιδωτή πυκνότητα.
- w/oV-d:** σπέρματα χωρίς ιξώδες μετά τη φυγοκέντρηση με βαθμιδωτή πυκνότητα.
- HV b:** σπέρματα υψηλού ιξώδους πριν τη φυγοκέντρηση με βαθμιδωτή πυκνότητα.
- HV-d:** σπέρματα υψηλού ιξώδους μετά τη φυγοκέντρηση με βαθμιδωτή πυκνότητα.
- HV-DNase:** σπέρματα υψηλού ιξώδους μετά την κατεργασία με DNάση και
- HV-DNase-d:** σπέρματα υψηλού ιξώδους μετά την κατεργασία με DNάση και ακόλουθη φυγοκέντρηση βαθμιδωτής πυκνότητας.

Επί του συνόλου των σπερματοζωαρίων της εκσπερμάτισης ύστερα από εμπλουτισμό, η απόδοση των σπερματοζωαρίων με PR κίνηση σε σπέρματα φυσιολογικού ιξώδους είναι 27,096%, ενώ η αντίστοιχη απόδοση σε σπέρματα υψηλού ιξώδους είναι 18,519% (p=0,00179). Μετά από κατεργασία με DNάση I σπερμάτων υψηλού ιξώδους, παρατηρήθηκε αύξηση της απόδοσης από 26,48% πριν, σε 42,47% (p=0,0022). Ο συνδυασμός των δύο, στα σπέρματα υψηλού ιξώδους έχει ως αποτέλεσμα απόδοση ίση με 29,782%, διαφέροντας σημαντικά από το 18,519% (p=0,0055) όπου δεν είχε προηγηθεί κατεργασία με DNάση. Έτσι, πλησιάζεται η απόδοση της απλής διαδικασίας εμπλουτισμού στα σπέρματα με φυσιολογικό ιξώδες (27,096%)

# ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Με βάση την εργασία αυτή το υψηλό ιξώδες στο σπέρμα αποδίδεται στην παρουσία των NETs.

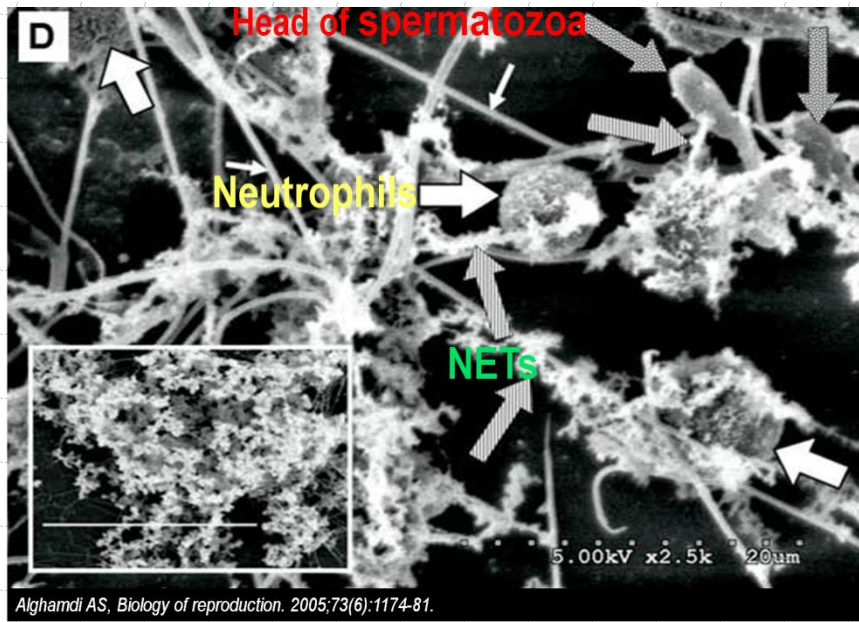
Η κατεργασία των σπερμάτων υψηλού ιξώδους με DNάση, βελτιώνει σημαντικά την κινητικότητα και τη μορφολογία των σπερματοζωαρίων.

Πρόκειται για την πρώτη μελέτη παγκοσμίως που αποδίδει το τόσο σημαντικό πρόβλημα του ιξώδους στην παρουσία των NETs και προτείνει σαφή αιτιολογική αντιμετώπιση\*.

\*ΚΑΤΑΘΕΣΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΥΡΕΣΙΤΕΧΝΙΑΣ ΜΕ ΑΡ. ΑΙΤΗΣΗΣ:  
ΔΕ 20140100297/23.052014

# Συζήτηση

- Η δράση της DNάσης επί των NETs είναι γνωστή βιβλιογραφικά αλλά και προφανής αφού το κύριο συστατικό τους είναι το DNA.
- Η χρήση της DNάσης I εφαρμόζεται ήδη, κυρίως μέσω εισπνοών στην αντιμετώπιση της κυστικής ίνωσης (*Marcin Zawrotniak et al,2013*).
- Το ένζυμο αυτό αποτελεί φυσιολογικό συστατικό του σπερματικού πλάσματος και η απουσία ή ελαττωμένη δραστηριότητα της DNάσης, σχετίζεται με δυσμενή αποτελέσματα επί των σπερματεγχύσεων σε άλλα ανώτερα θηλαστικά (*Alghamdi et al.2005,2010*).
- Από το 2005 έχει προταθεί ότι η ενδογενής DNάση του σπέρματος βοηθά στον απεγκλωβισμό των σπερματοζωαρίων από τα NETs που δημιουργούνται στον κόλπο της γυναίκας ως συνέπεια των εκεί φλεγμονών (*Alghamdi et al,2005*).



Η έλλειψη ή ελαττωμένη δραστηριότητα της DNάσης στο σπερματικό πλάσμα μπορεί να συμμετέχει στη δημιουργία του ιξώδους με δυσμενή επίπτωση στην αντρική γονιμότητα.

# Προσέγγιση στη Διερεύνηση της Υπογονιμότητας Άγνωστης Αιτιολογίας: Σπέρμα

- Σπερμοδιάγραμμα
- Εκτίμηση ζωτικότητας - Αποπτωτική κατάσταση
- Κατάτμηση DNA
- Εκτίμηση υπεροξειδωσης
- Καλλιέργεια
- Ενδοκυττάριοι μικροοργανισμοί
- Βιοχημικοί δείκτες
- Ορμονικοί δείκτες
- Καρυότυπος



# Προσέγγιση στη Διερεύνηση της Υπογονιμότητας

## Άγνωστης Αιτιολογίας: Σπέρμα

Εξέταση απόπτωσης με τη μέθοδο Ανεξίνης-Φωσφατίδουλοσερίνης

Τα αποτελέσματα εκ του συνόλου των σπερματοζωαρίων έχουν ως εξής:

- Ζωντανά, Μη αποπτωτικά [Annexin(-), Μembrάνη μη διαπερατή]: **48,88%**
- Πρώιμα αποπτωτικά [Annexin(+), Μembrάνη μη διαπερατή]: **25,20%**
- Όψιμα αποπτωτικά [Annexin(+), Μembrάνη διαπερατή]: 20,42%
- Λοιπά Νεκρά [Annexin(-), Μembrάνη διαπερατή]: 5,50%

*\*Με την εφαρμοζόμενη μέθοδο όλες οι κατηγορίες, πλην της πρώτης, βρίσκονται σε μη αντιστρεπτή διαδικασία υποστροφής.*



# Επιγενετικά γεγονότα στο ζυγωτό

Από το σπερματοζωάριο:

**90% του DNA σε πρωταμίνες**

**10% του DNA σε διατηρημένες ιστόνες με δομικές τροποποιήσεις**

Από τα ωάρια :

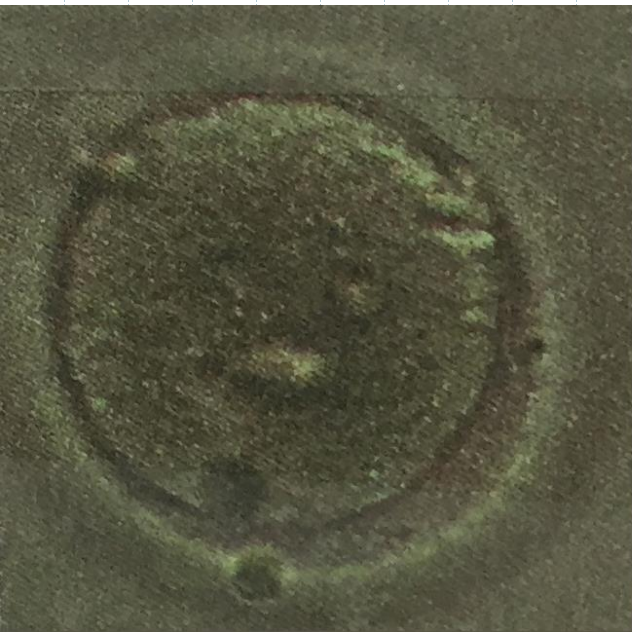
**Μεθυλιωμένο DNA σε ιστόνες**

# Επιγενετικά γεγονότα στο ζυγωτό

Άμεση διάλυση πρωταμινών και αντικατάστασή τους από ακετυλιωμένες ιστόνες H<sub>3</sub> και H<sub>4</sub>.

Απομεθυλίωση του πατρικού γενώματος στην G και S φάση με τα ένζυμα TET.

Δημιουργούνται σπασίματα στο ζυγωτό που πρέπει να διορθωθούν πριν τη μίτωση.



- Τα κύτταρα που θα γίνουν ωάρια δημιουργούνται από την εμβρυϊκή ζωή και φτάνουν στο maximum στον 7<sup>ο</sup> μήνα της κύησης δηλαδή δύο μήνες πριν να γεννηθεί η καινούρια «γυναίκα».

- **Συνεχής πτώση των ωαρίων μέχρι την εμμηνόπαυση.**





# Προσέγγιση στη Διερεύνηση της Υπογονιμότητας Άγνωστης Αιτιολογίας: **Ωάρια**

- Ποιότητα ωορρηξίας και ωαρίων
- Εκτίμηση αναπαραγωγικού υπολοίπου
- Καρυότυπος

# Αντιοξειδωτικοί παράγοντες που προστατεύουν το ωάριο.

## Ωοθυλακικό υγρό

SOD Mn

SOD Cu Zn

υπεροξειδάση γλουταθειόνης

RRXs

Όχι καταλάση

## Σαλπινγικό υγρό

υποταυρίνη

ταυρίνη

SOD

υπεροξειδάση γλουταθειόνης

καταλάση

# Καταστάσεις που επηρεάζουν την ποιότητα του ωαρίου.

Πολυκυστικές ωοθήκες

Σάκχαρο - Παχυσαρκία

Ενδομητρίωση

Μακροχρόνιο καθημερινό στρες

Ηλικία

# Προσέγγιση στη Διερεύνηση της Υπογονιμότητας Άγνωστης Αιτιολογίας: Ωάρια

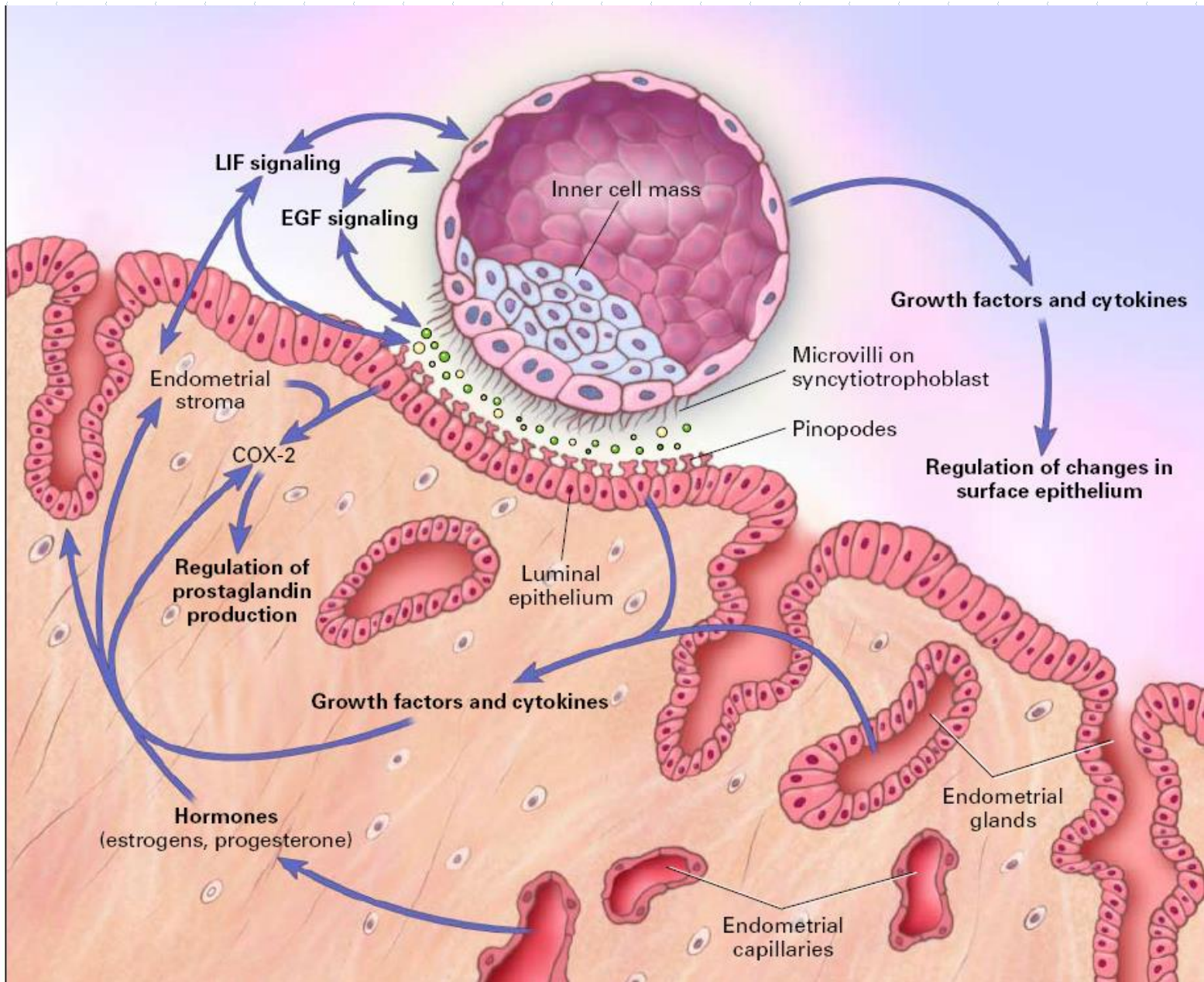
- Ποιότητα ωορρηξίας
- Εκτίμηση αναπαραγωγικού υπολοίπου
- Καρυότυπος

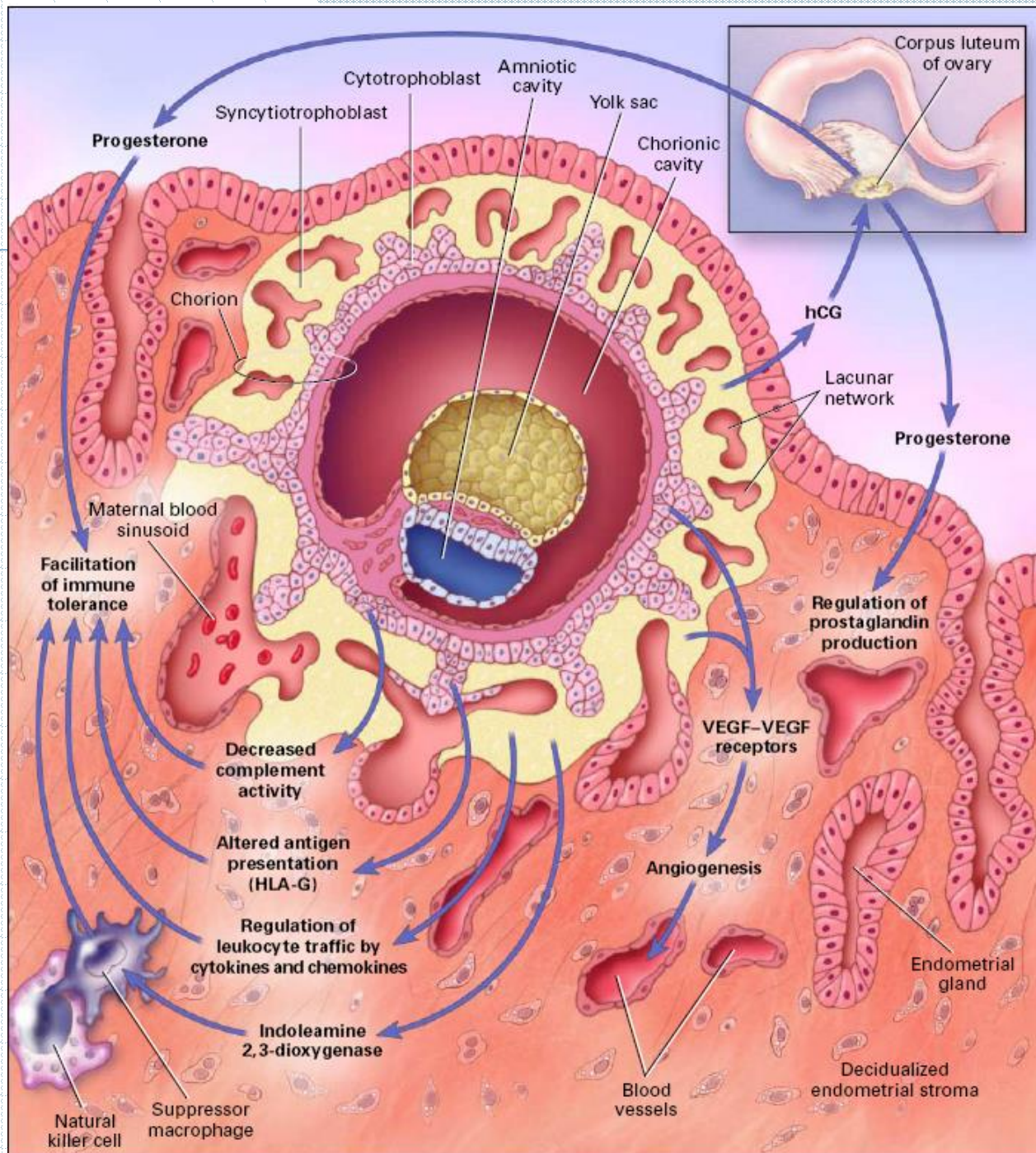


23 09 2012 07 23

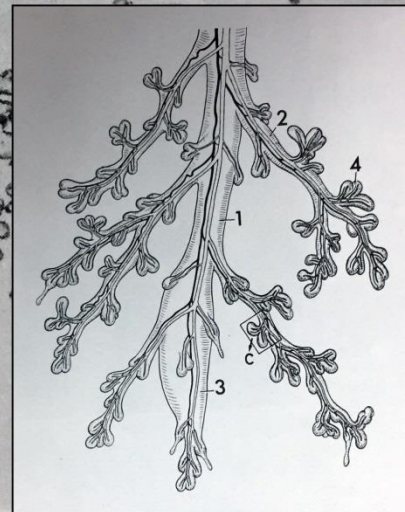
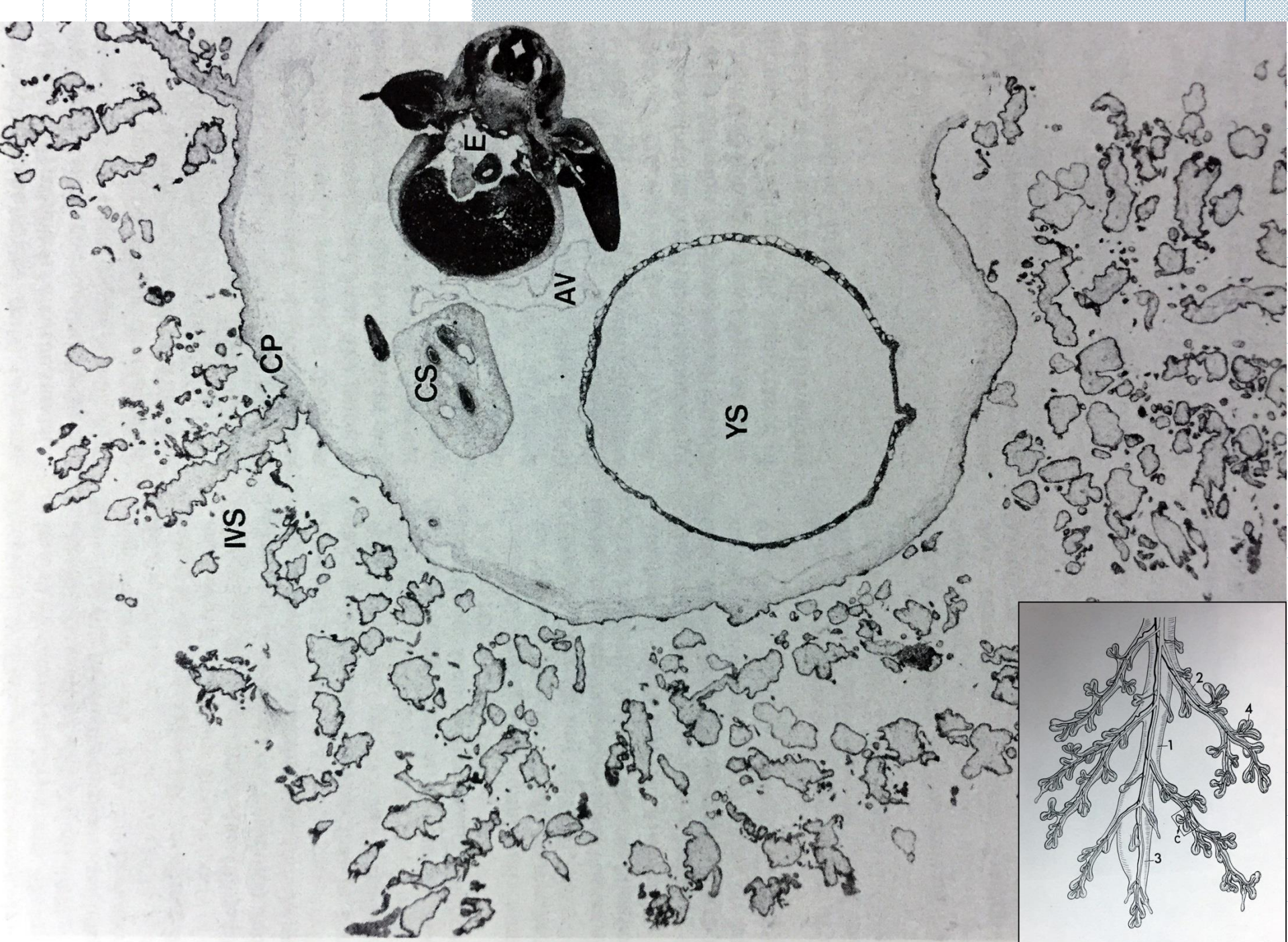
# Προσέγγιση στη Διερεύνηση της Υπογονιμότητας Άγνωστης Αιτιολογίας: **Ενδομήτριο**

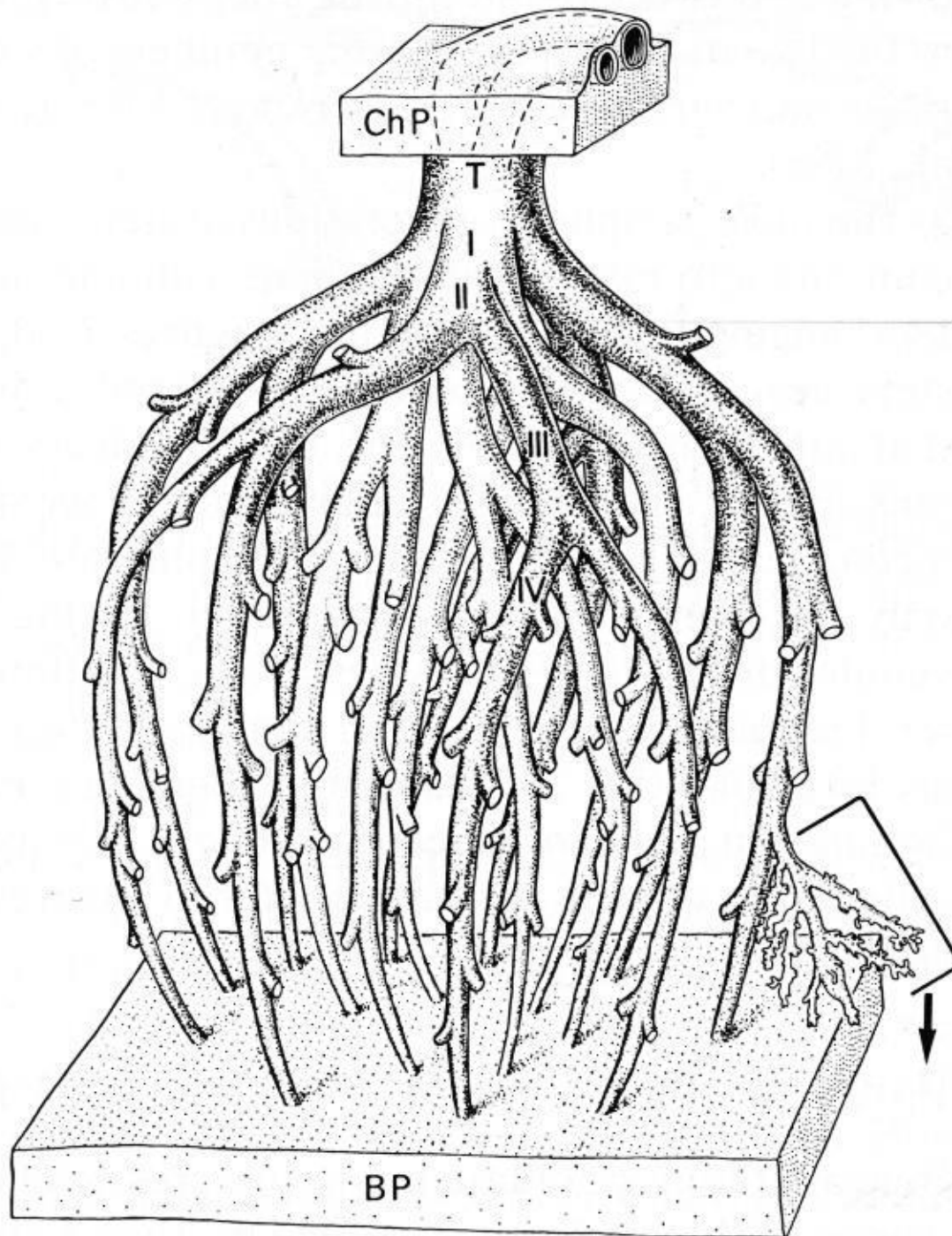
- **Θρομβοφιλικός παράγων**
  - Γενετική προδιάθεση
  - Φωσφολιπιδικό σύνδρομο
- **Μολυσματικός παράγων**
  - Άμεση μικροσκόπηση κολπικού/τραχηλικού
  - Μικροβιακή κατάσταση κόλπου/τραχήλου
  - Χλαμύδια τραχηλικού με κυτταρομετρία ροής
  - Χλαμύδια ιστού περιόδου®
  - Διερεύνηση καλλιέργειας ενδομητρικού υγρού (αν χρειάζεται)
- **Ανοσολογικός παράγων**
  - NK λεμφοκύτταρα

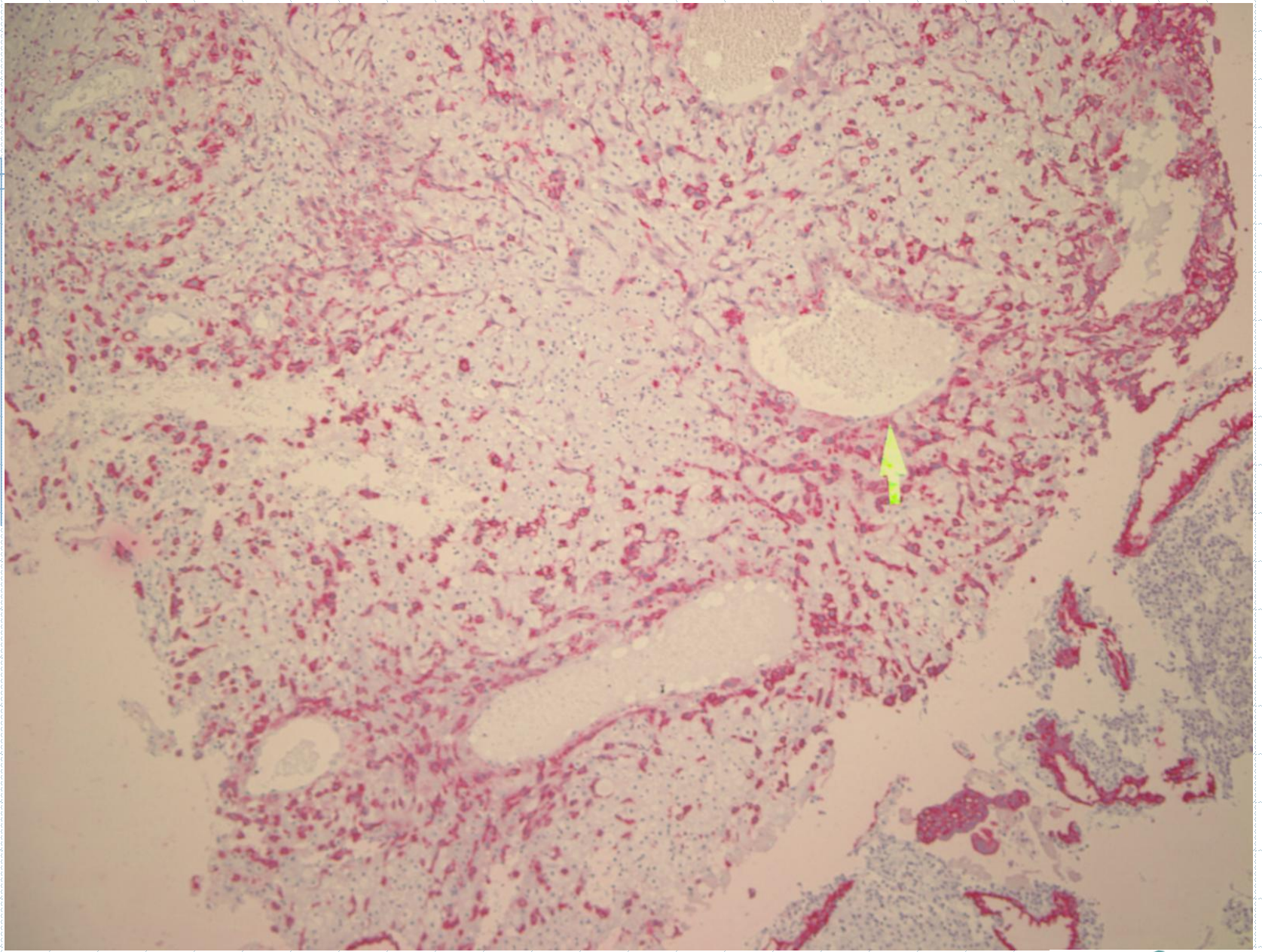




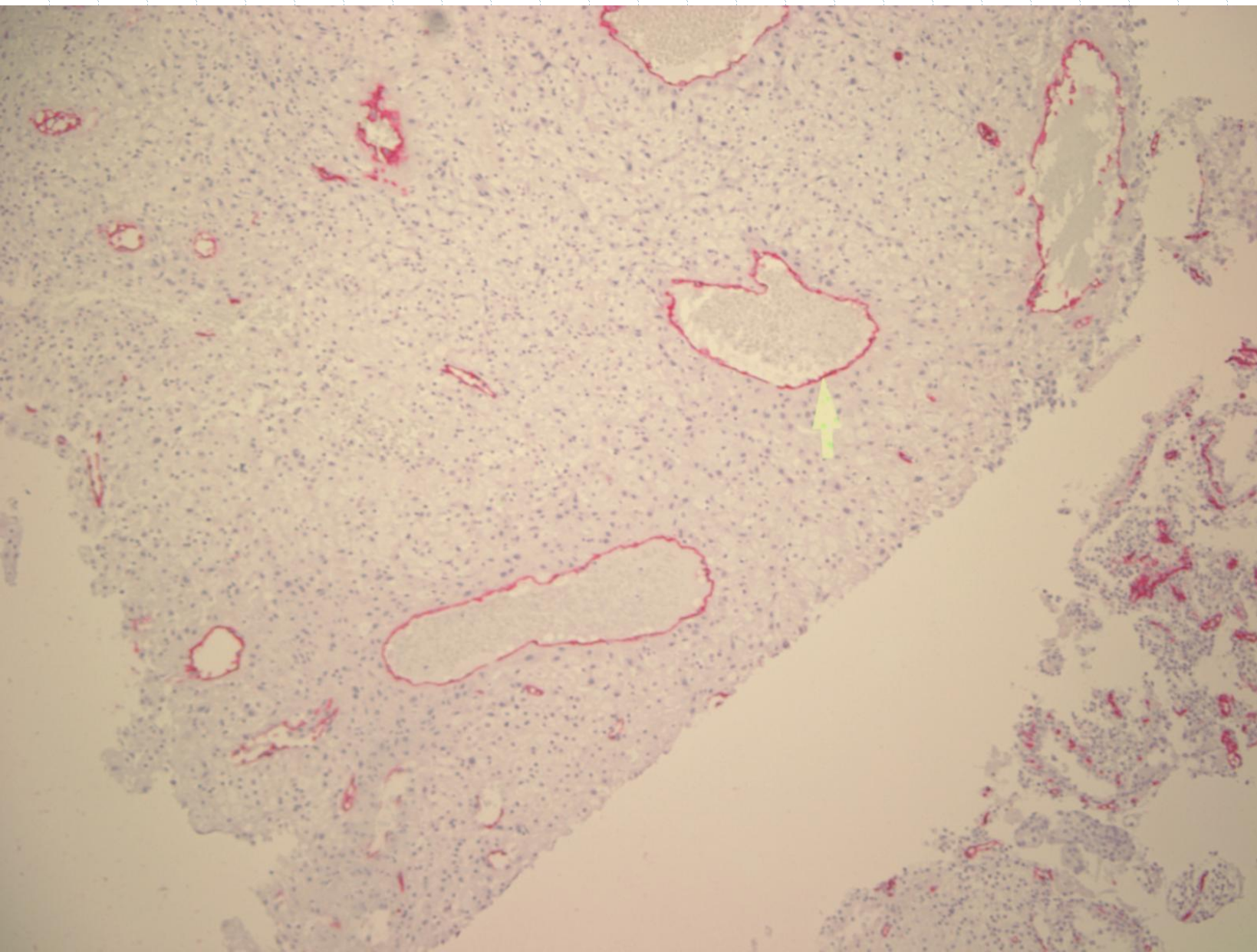




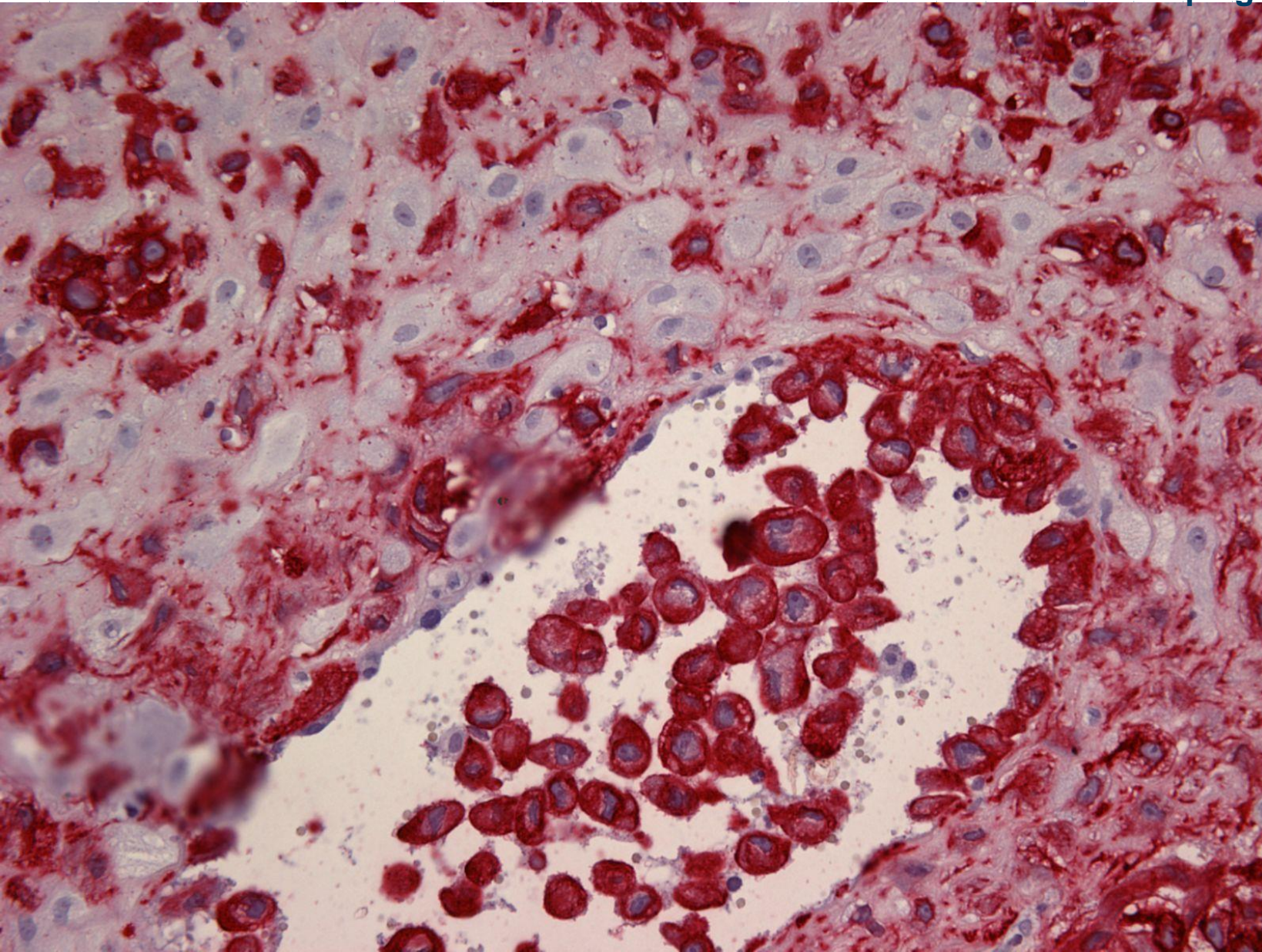




**Χρώση ενδοθηλιακών κυττάρων. Αντι-CD34, ανοσοαλκαλική φωσφατάση x 40.**



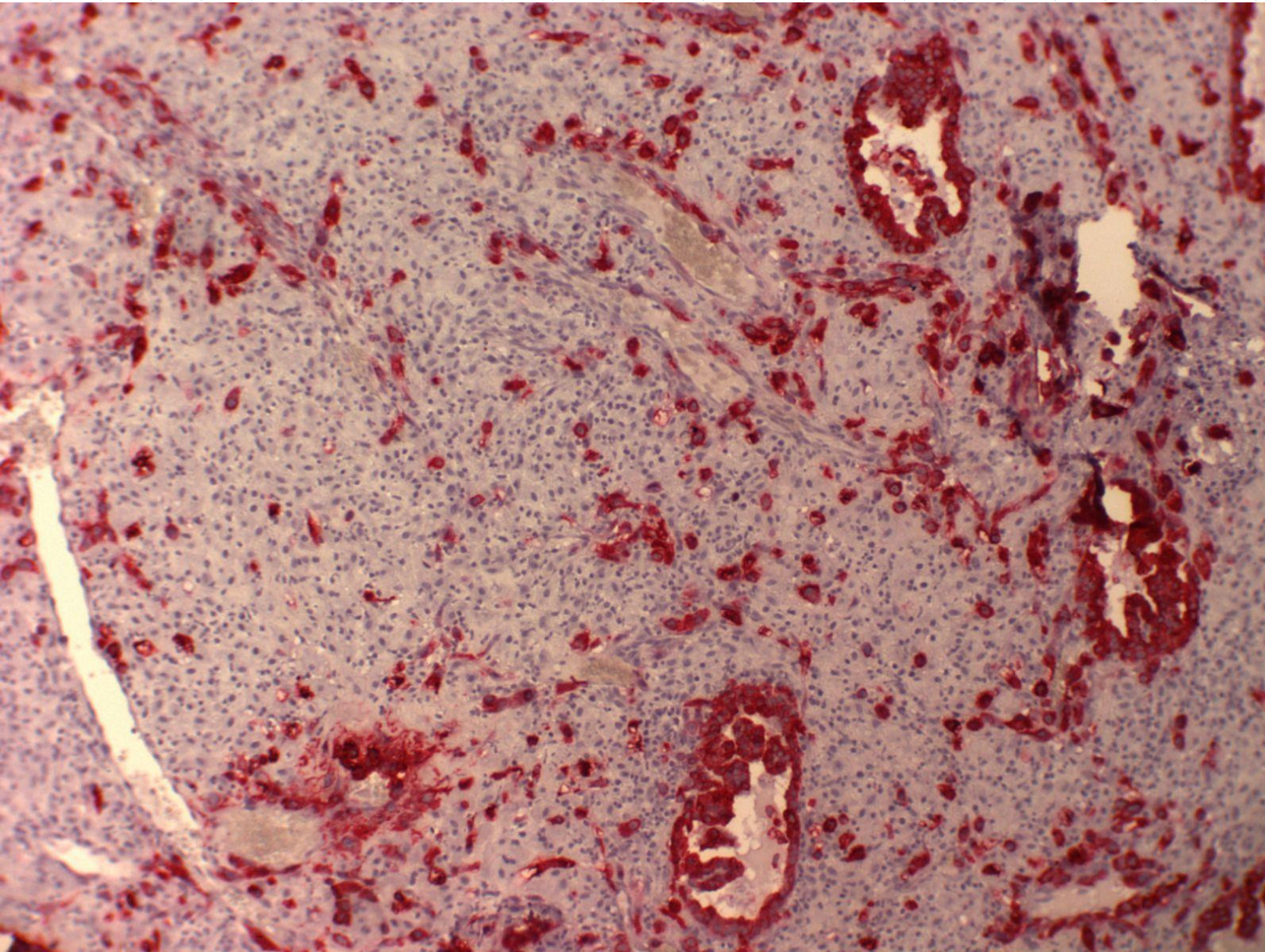
**Intermediate trophoblast invasion of the stroma and vessels .  
Anti-cytokeratin 8-18 immunoalkaline phosphatase x 40.  
Initiation of plug formation.**



# Ανοσολογικός παράγων: ΝΚ λεμφοκύτταρα

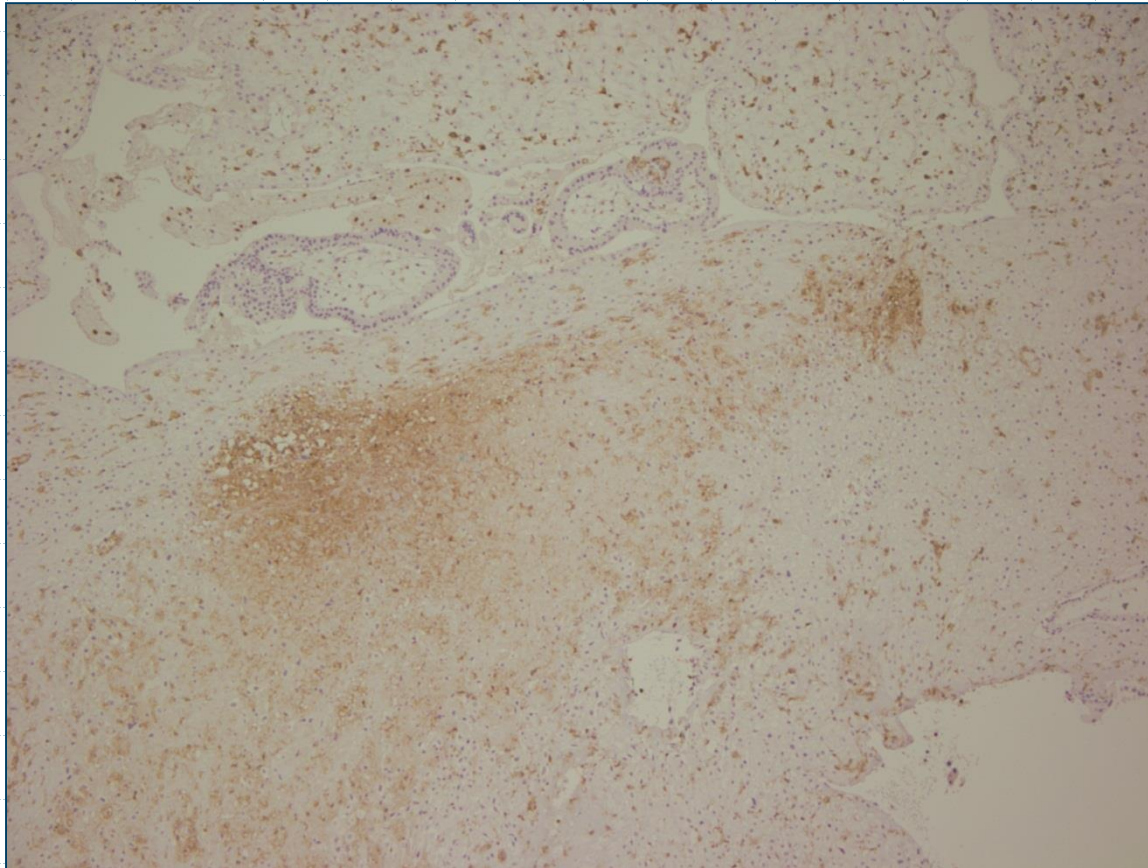
**Intermediate trophoblast invasion of the stroma and vessels.**

**Anti-cytokeratin 8-18 immunoalkaline phosphatase x 40. Initiation of plug formation.**



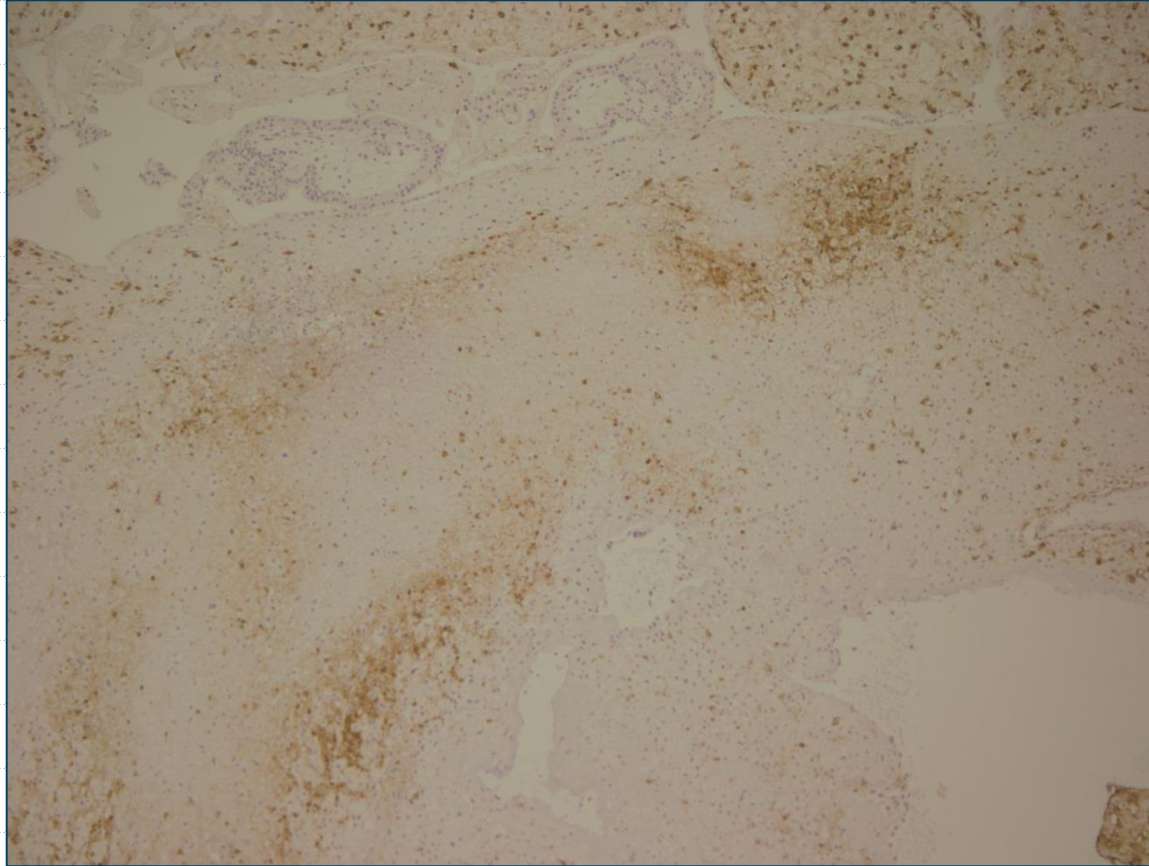
# Ανοσολογικός παράγων: NK λεμφοκύτταρα

Νέκρωση φθαρού. Κύτταρα NK με CD16<sup>+</sup> ανοσοφαινότυπο. Ανοσοϋπεροξειδάση x100.



# Ανοσολογικός παράγων: NK λεμφοκύτταρα

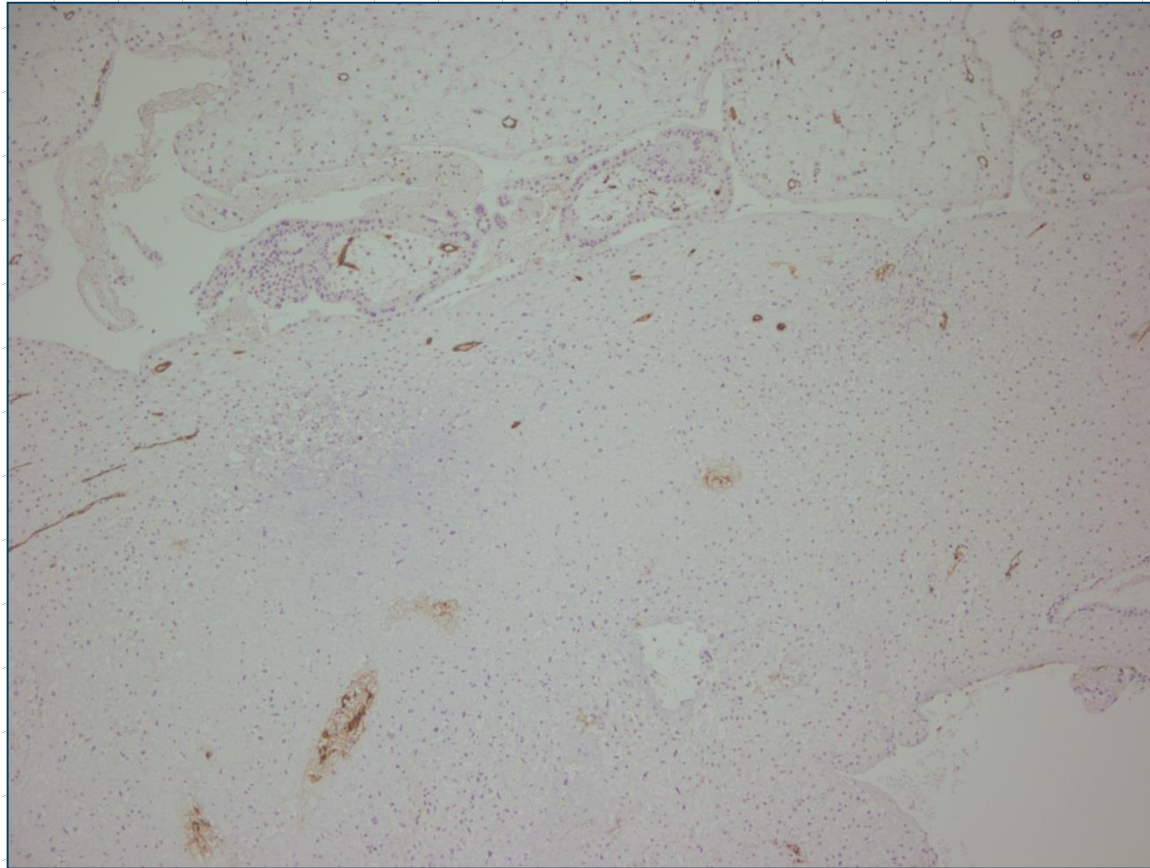
Νέκρωση φθαρού. Κύτταρα NK με CD56<sup>+</sup> ανοσοφαινότυπο. Ανοσοϋπεροξειδάση x100.





# Ανοσολογικός παράγων: NK λεμφοκύτταρα

Νέκρωση φθαρού. Ενδοθήλια με CD34<sup>+</sup> ανοσοφαινότυπο μέσα στη νέκρωση.  
Ανοσοϋπεροξειδάση x100.



Εμπλέκεται ο κίνδυνος από τον ανοσολογικό με αυτόν του αγγειακού παράγοντα;

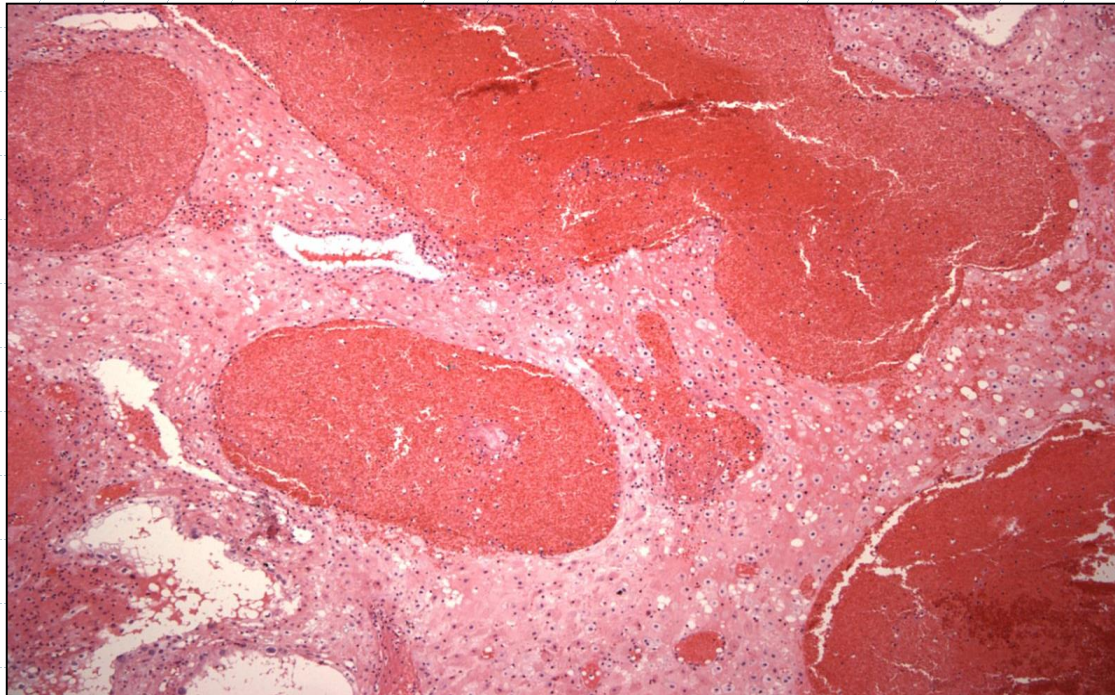
# Προσέγγιση στη Διερεύνηση της Υπογονιμότητας Άγνωστης Αιτιολογίας: Ενδομήτριο

- Θρομβοφιλικός παράγων: Αυξημένη πίεση μέσα στα σπειροειδή αρτηρίδια και λοιπά αγγεία
- Ανοσολογικός παράγων: Σαθρής σύστασης αλλοίωση γύρω από τα αγγεία
- Συνδυαστικό αποτέλεσμα: Ρήξη τοιχώματος αγγείων  
Αιμορραγία  
Αποκόλληση

# Προσέγγιση στη Διερεύνηση της Υπογονιμότητας Άγνωστης Αιτιολογίας: **Ενδομήτριο**

## Θρομβοφιλικός παράγων

- Γενετική προδιάθεση
- Φωσφολιπιδικό σύνδρομο



# Προσέγγιση στη Διερεύνηση της Υπογονιμότητας Άγνωστης Αιτιολογίας: **Ενδομήτριο**

## Θρομβοφιλικός παράγων **Συχνότητα γενετικών νόσων**

- Ετεροζυγωτία V-Leiden: 6,88% (52 από τους 756)
- Ετεροζυγωτία G20210: 2-5%

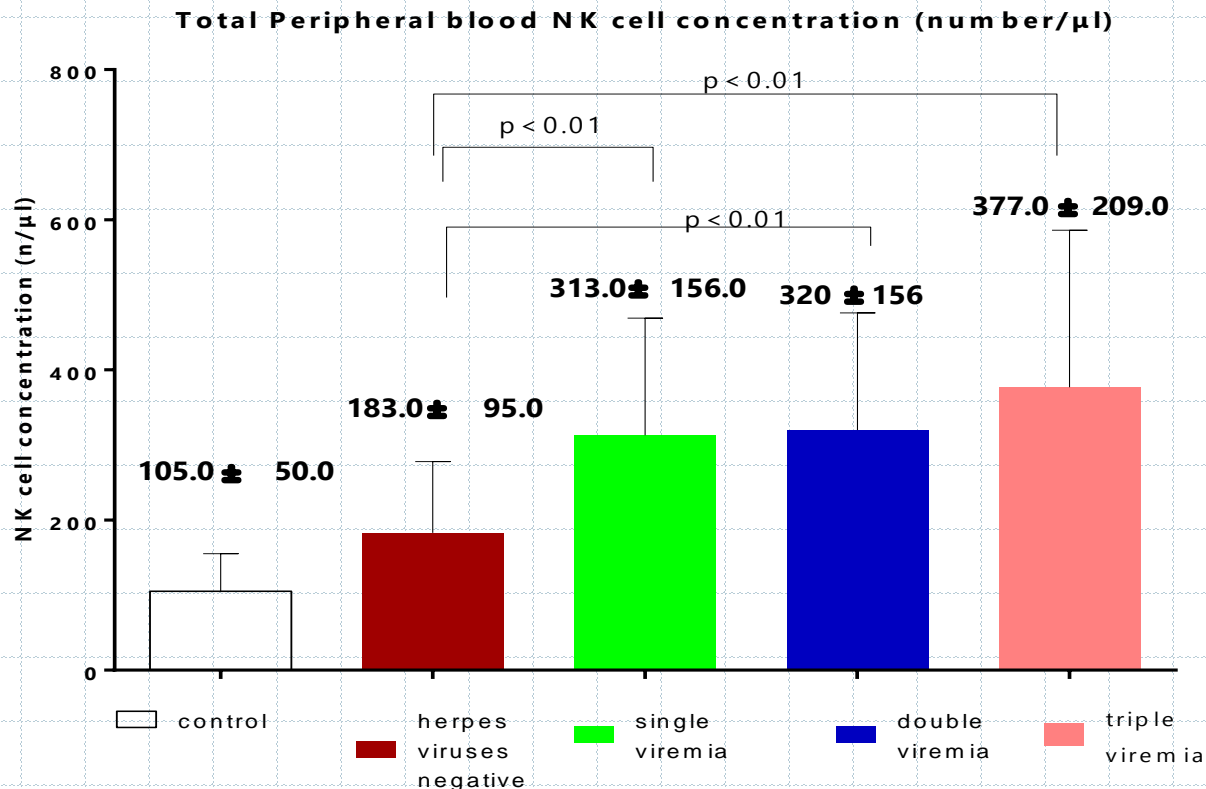
**ΟΜΟΖΥΓΩΤΙΑ G20210: 0%**

**ΟΜΟΖΥΓΩΤΙΑ V-Leiden: ??**

*Ετεροζυγωτία β θαλασσαιμίας: ≈10%*  
*Ετεροζυγωτία Κυστικής Ίνωσης: 4,5%*

- **Ποιο είναι το αίτιο για την αύξηση των NK κυττάρων στο περιφερικό αίμα των γυναικών με ιστορικό υπογονιμότητας;**
- **Είναι μικροβιακές λοιμώξεις?**
- **Είναι υποκλινικές ιαιμίες?**

# Προσέγγιση στη Διερεύνηση της Υπογονιμότητας Άγνωστης Αιτιολογίας



**Στη γυναίκα έχει συσχετισθεί η αυξημένη συγκέντρωση των NK (CD3<sup>-</sup>/CD16<sup>+</sup>/CD56<sup>+</sup>) λεμφοκυττάρων με υποκλινικές ερπητοϊκές ιαιμίες (HSV 1/2, EBV, CMV, HHV6 και HHV7). *al. 2005***

# ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ ΠΟΥ ΟΔΗΓΗΣΑΝ ΣΤΗΝ ΣΥΛΛΗΨΗ ΤΗΣ ΙΔΕΑΣ

## Καθημερινές παρατηρήσεις στο ιατρείο υπογονιμότητας

- Οι αποβολές είναι πιο συχνές τον χειμώνα.
- Γυναίκες που ανήκουν σε επαγγελματικές ομάδες που αλληλεπιδρούν με πληθώρα ανθρώπων έχουν δεσπόζουσα θέση στις ομάδα υπογόνιμων

## Δεδομένα από τη βιβλιογραφία

- Αύξηση των ποσοστών των of NK κυττάρων στο περιφερικό αίμα των γυναικών με υπογονιμότητα (Coulam *et al.* 1995).
- Ο βασικός πληθυσμός των κυττάρων που εμφυτεύονται είναι δυνητικά στόχος των NK αφού στερούνται την έκφραση MHC-I.
- Τα NK είναι η πρώτη γραμμή άμυνας εναντίον των μολυσμένων με ιούς κυττάρων.

# Προσέγγιση στη Διερεύνηση της Υπογονιμότητας Άγνωστης Αιτιολογίας

## Ενδοκυττάριοι παθογόνοι μικροοργανισμοί

- Ο ρόλος των ιογενών λοιμώξεων ως παράγοντας ανδρικής υπογονιμότητας δεν έχει διερευνηθεί αρκετά.
- Στη γυναίκα, υπάρχει αύξηση των NK κυττάρων στο περιφερικό αίμα γυναικών με ιστορικό αποβολών α' τριμήνου (Coulam et al., 1995).
- Τα κύτταρα διάμεσης τροφοβλάστης είναι στόχος των NK κυττάρων, λόγω του ότι δεν εκφράζουν MHC-I μόρια.
- Τα NK κύτταρα είναι η πρώτη γραμμή άμυνας κατά κυττάρων μολυσμένων με ιούς, εξαιτίας της πτώσης της έκφρασης των MHC-I μορίων.



# Προσέγγιση στη Διερεύνηση της Υπογονιμότητας Άγνωστης Αιτιολογίας

Ιστολογική αξιολόγηση των αποβολών Α' τριμήνου της κύησης

- Αρκετά συχνά όμως παρατηρείται NK διήθηση στον βασικό φθαρτό παλίνδρομων κυήσεων 1<sup>ου</sup> τριμήνου, **χωρίς υποχρεωτικά συνοδό αύξηση των NK του αίματος.**



# Προσέγγιση στη Διερεύνηση της Υπογονιμότητας Άγνωστης Αιτιολογίας: Σπέρμα

Ζευγάρι	HSV 1-2			EBV			CMV		
1	+	-	+	+	-	+	+	-	+
2	+	-	+	-	-	-	+	-	+
3	+	+	-	-	+	+	-	+	-
4	-	-	+	-	-	+	+	-	+
5	-	-	+	-	-	+	+	-	+
6	-	+	-	-	-	-	+	+	+
7	-	-	-	-	-	-	+	+	+

**Κίτρινο:** Θέση εμφύτευσης ή και λάχνες

**Κόκκινο:** Γνήσιος φθαρτός ή ιστός περιόδου

**Πράσινο:** Πλυμένα σπερματοζωάρια

# Προσέγγιση στη Διερεύνηση της Υπογονιμότητας Άγνωστης Αιτιολογίας: Σπέρμα

## Άμεση Ανίχνευση των Ιών Στο Σπέρμα

- Παρουσία ιών στο σπέρμα.
- Οι ιοί εξακολουθούν να υπάρχουν ακόμα και μετά τον εμπλουτισμό του σπερματος.
  - *Liarmakopoulou M. (2004), "The presence of herpes viruses in the semen of infertile couple, following two density gradient method" Masters, University of Leeds, (DISTINCTION, Financial award)*
  - *Michou et al., ANDROLOGIA 2012*
- Όσον αφορά τον εντοπισμό των παθογόνων, η PCR δεν μπορεί να ξεχωρίσει μεταξύ του σπερματικού πλάσματος και των σπερματοζωαρίων ή να ανιχνεύσει τα μολυσμένα κύτταρα.

# Προσέγγιση στη Διερεύνηση της Υπογονιμότητας Άγνωστης Αιτιολογίας: Σπέρμα

## Άμεση Ανίχνευση των Ιών Στο Σπέρμα

- Το γεγονός αυτό είναι πολύ σημαντικό καθώς **το εσωτερικό των σπερματοζωαρίων** και όχι η μεμβράνη εισχωρεί μέσα στο ωάριο.
- Επομένως, **μια άμεση και υψηλής απόδοσης δοκιμασία** είναι απαραίτητη, όπως για παράδειγμα HBV έχει ήδη ανιχνευθεί σε κύτταρα σπέρματος με FISH (Huang et al., 2003).

# Προσέγγιση στη Διερεύνηση της Υπογονιμότητας Άγνωστης Αιτιολογίας: Σπέρμα

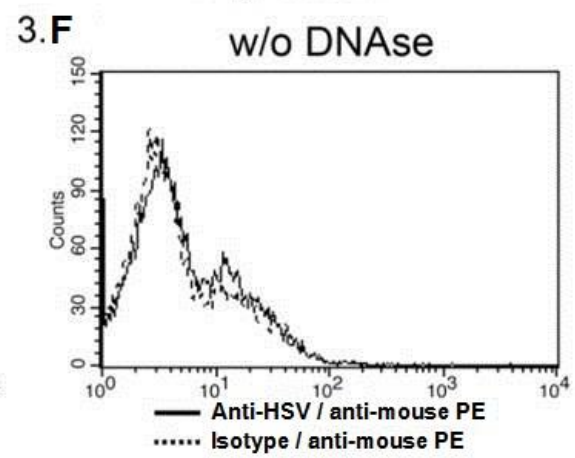
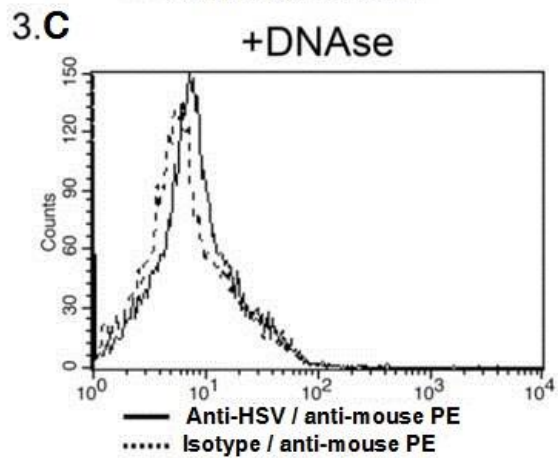
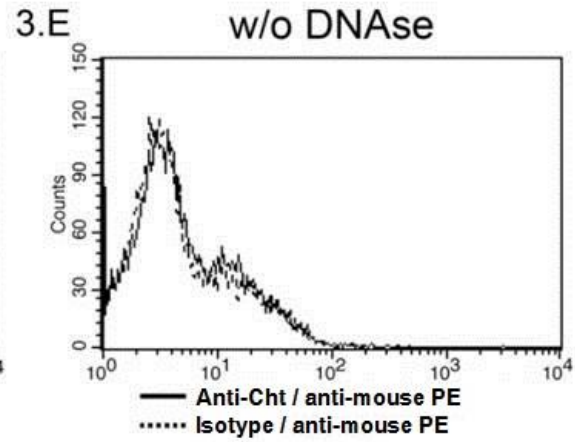
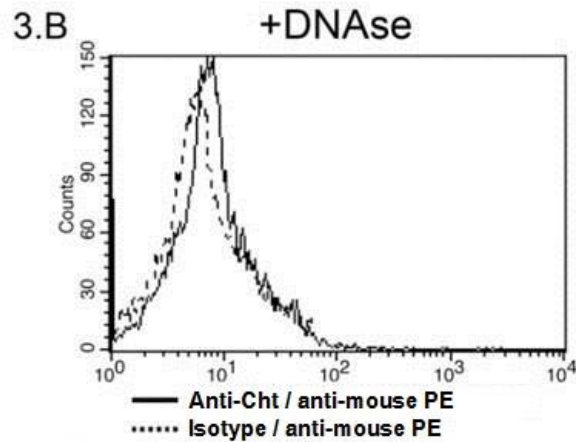
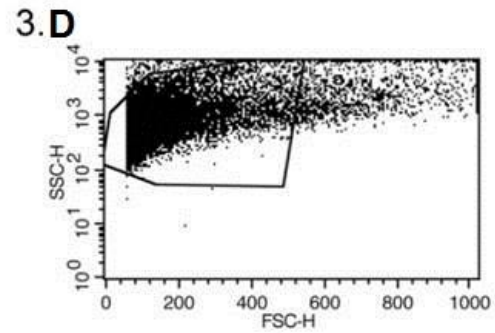
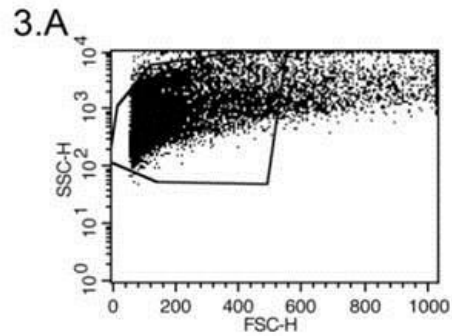
Ανάπτυξη μεθόδου ανίχνευσης ενδοκυττάρων  
παθογόνων μικροοργανισμών (ιών ή μικροβίων) μέσα  
στα σπερματοζωάρια.

# Ανάπτυξη μεθόδου ανίχνευσης ενδοκυττάριων παθογόνων μικροοργανισμών μέσα στα σπερματοζωάρια.

## Πρωτόκολλο Κυτταρομετρίας Ροής

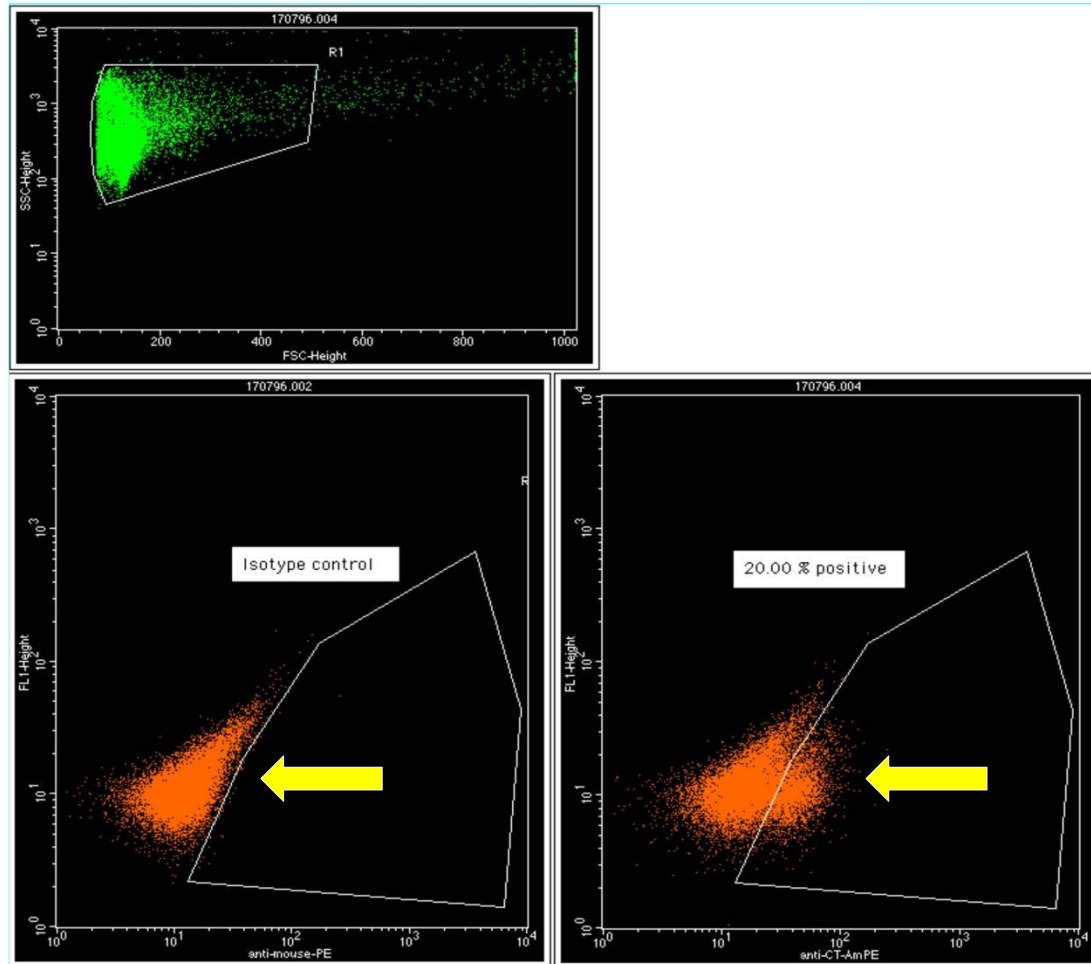
- Τα κύτταρα επωάζονται μετά με μονοκλωνικά αντισώματα για κάθε ενδοκυττάριο παθογόνο μικροοργανισμό (i.e. Chlamydia trachomatis, Herpes Simplex Virus–HSV 1/2, Cytomegalovirus–CMV, Human Papilloma Virus–HPV) και μετά με φθορίζον αντι-αντίσωμα .
- Η ενδοκυττάρια έκφραση των μικροοργανισμών αναλύεται και αξιολογείται με κυτταρομετρία ροής.

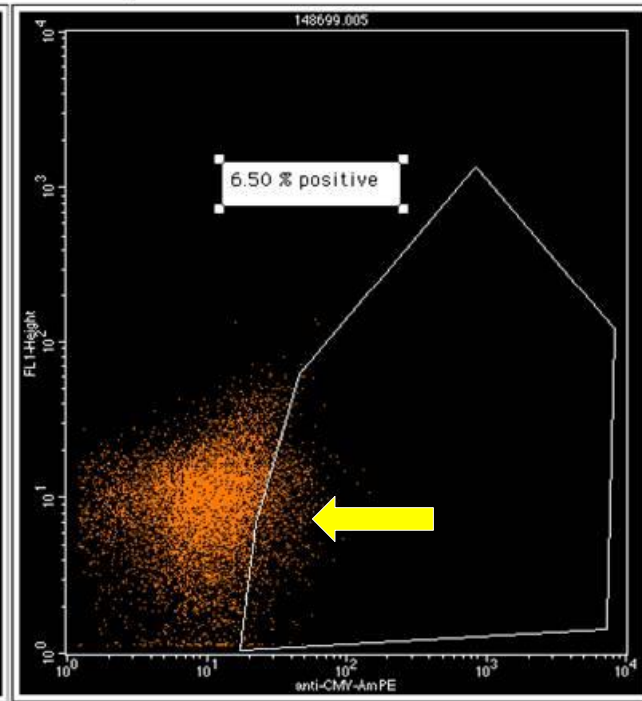
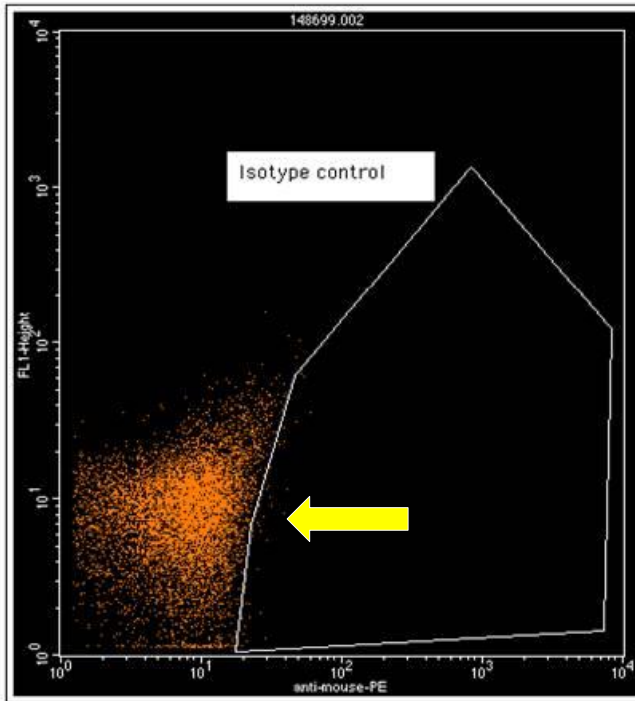
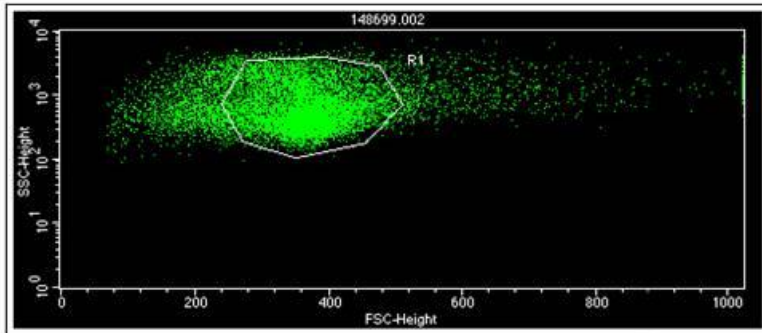


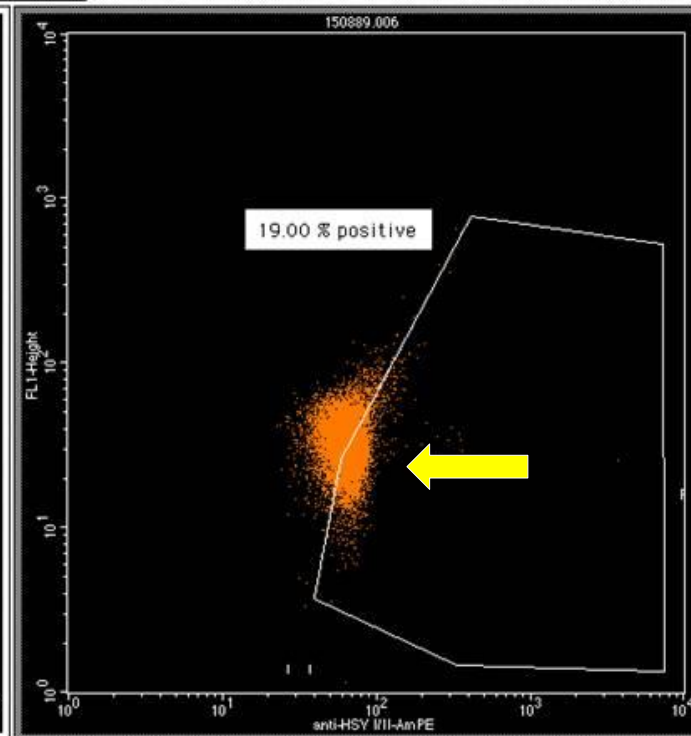
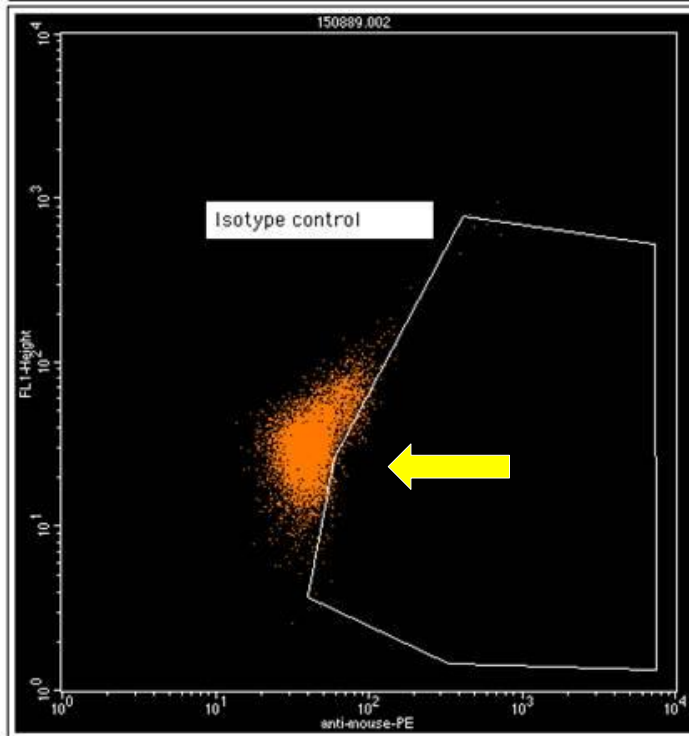
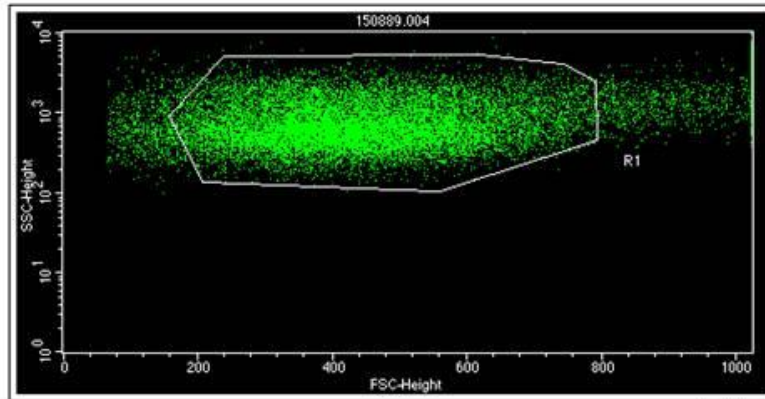


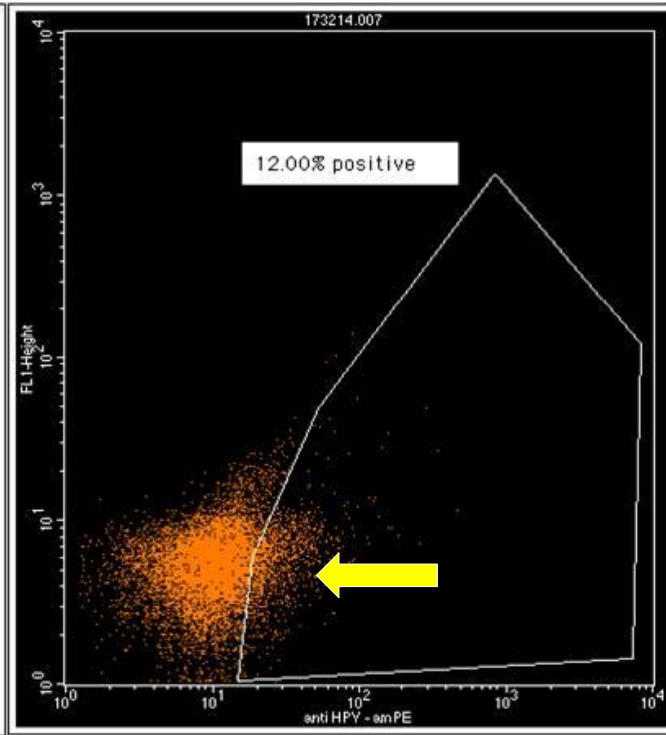
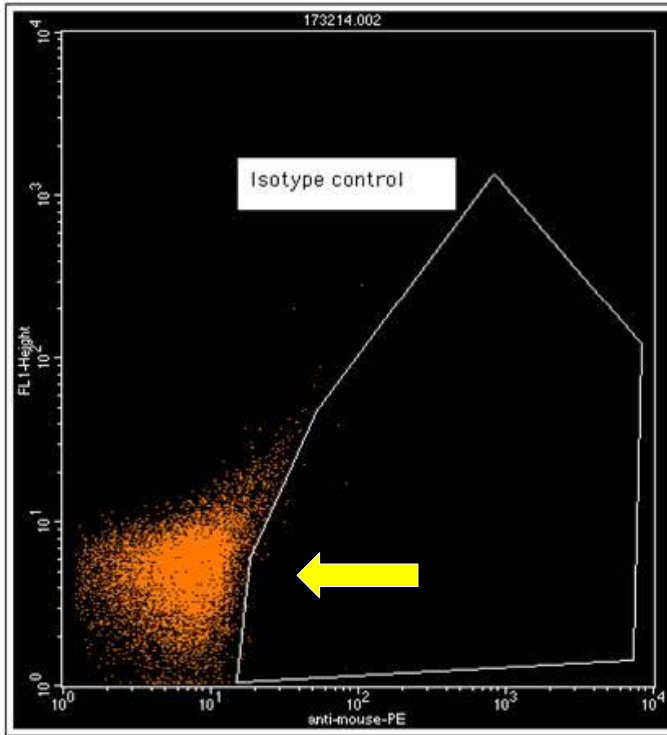
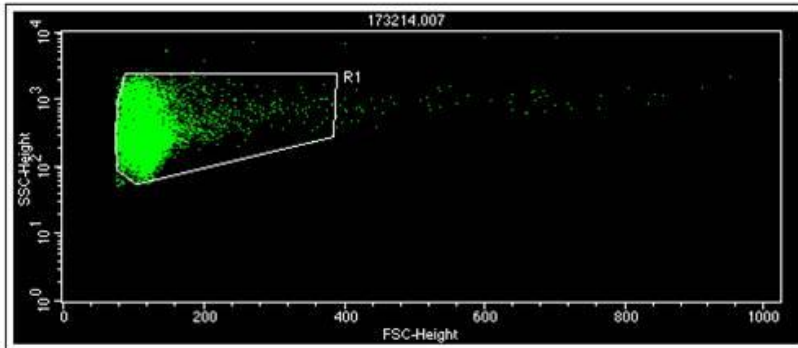


**Κυτταρομετρική ανάλυση σπερματοζωαρίων για την ενδοκυττάρια ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών.** Πάνω : SSC vs FSC διάγραμμα. Αριστερά: Ισοτυπικό control (αρνητικός μάρτυρας). Δεξιά: Εξεταζόμενο δείγμα. Το βέλος υποδεικνύει σπερματοζώαρια θετικά για το *Chlamydia trachomatis*.





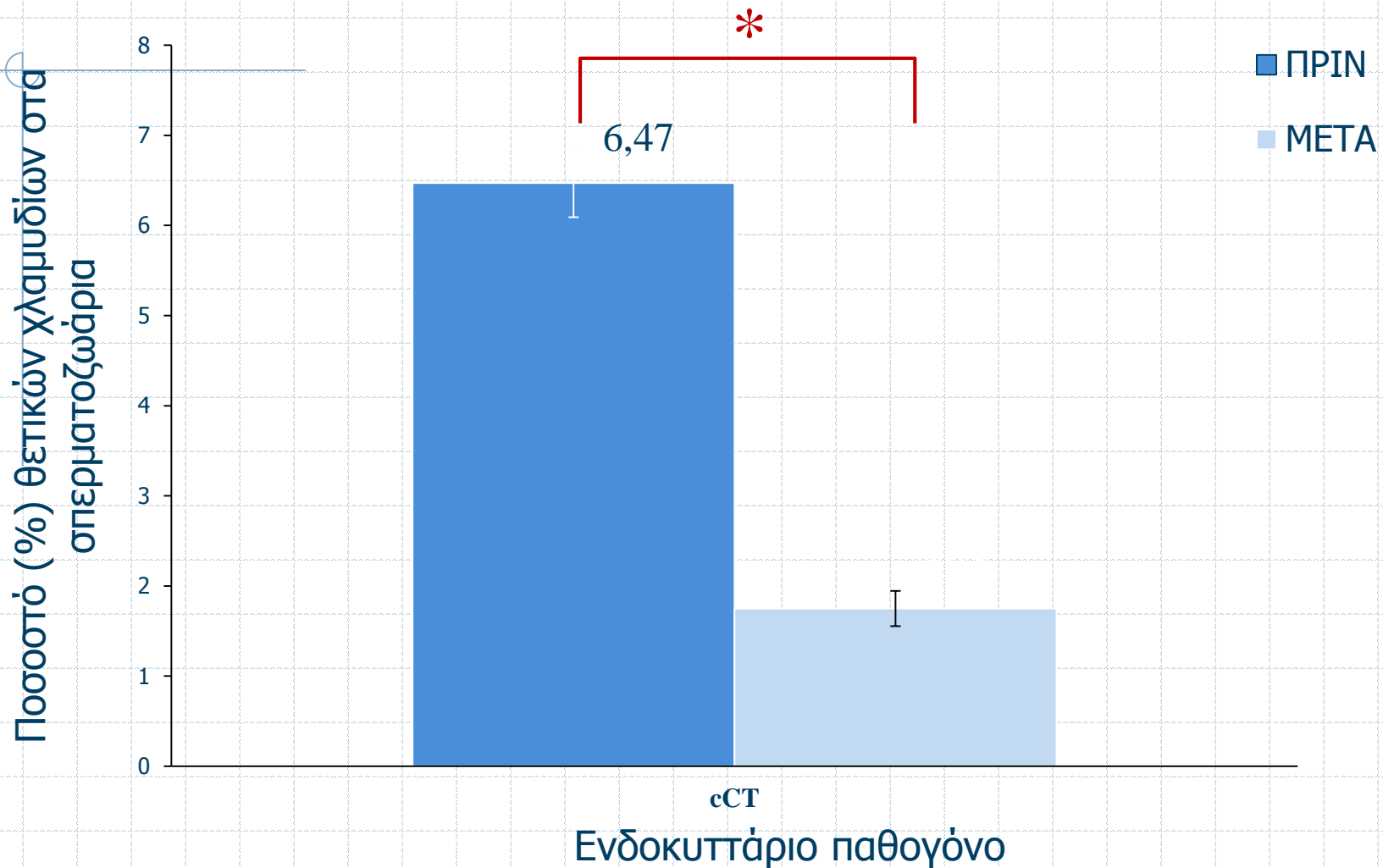




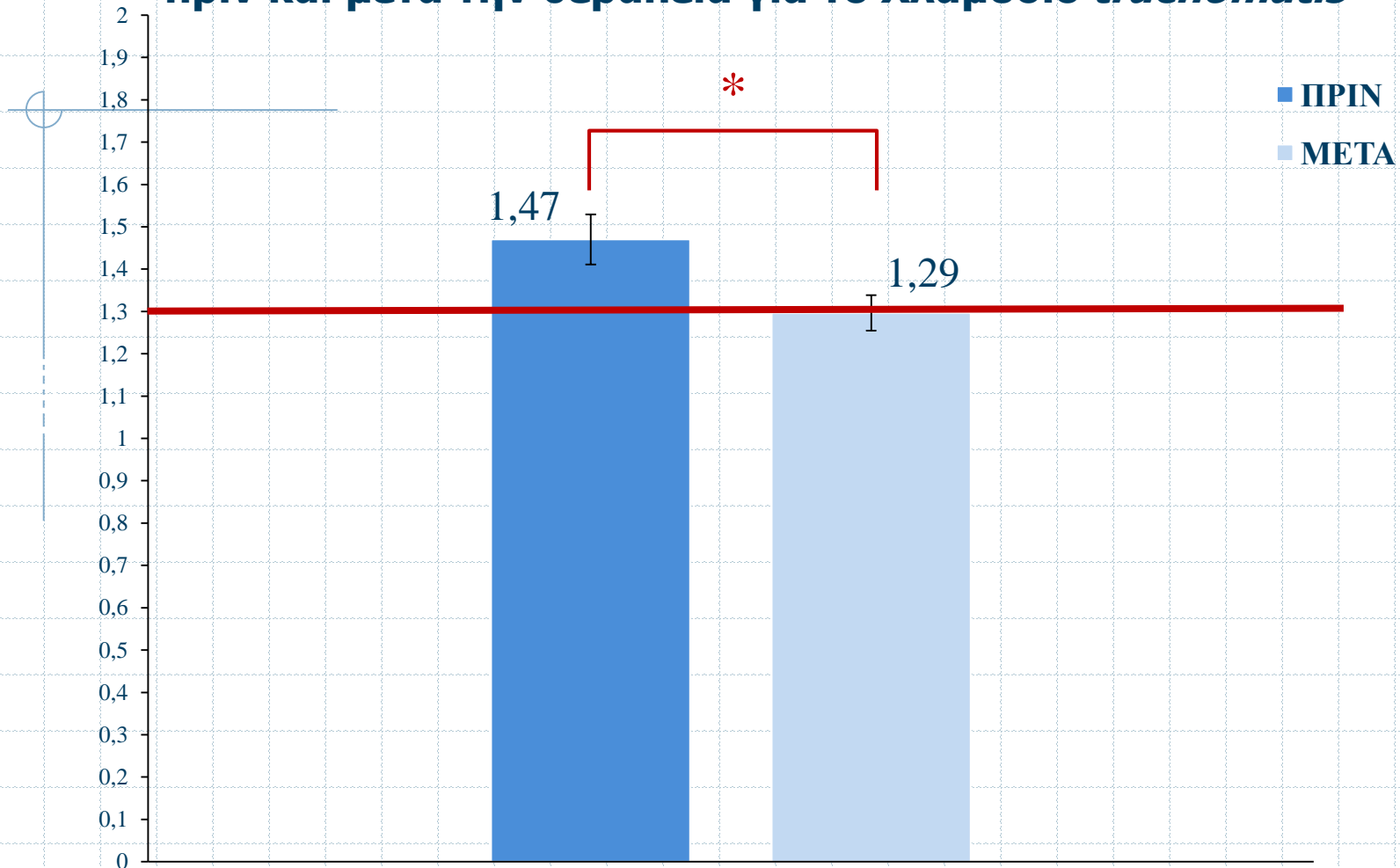
## Ανάπτυξη μεθόδου ανίχνευσης ενδοκυττάρων παθογόνων μικροοργανισμών μέσα στα σπερματοζωάρια.

- 2α. Στους άντρες με θετικά Χλαμύδια (επί τον ολικό αριθμό των σπερματοζωαρίων), το μικροβιακό φορτίο μειώθηκε μετά από αντιβιοτική αγωγή ( $p=0.028$ ) από **6.47% σε 1.75%**. Επιπλέον, ο μικροοργανισμός μειώθηκε σε ποσοστό **67.74%** των περιπτώσεων (δεν ανιχνεύθηκε σε ποσοστό **54.00%** μετά την πρώτη επανεξέταση).
- β. Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του σπερμοδιαγράμματος βελτιώθηκαν και μάλιστα υπήρχε στατιστικά σημαντική βελτίωση στις ανωμαλίες μέσου τμήματος ( $p=0.025$ ), οι οποίες μειώθηκαν από 39.75% σε 28.00% ύστερα από την αντι-χλαμυδιακή αγωγή. Επίσης, ο δείκτης τερατοσπερμίας (TZI) βελτιώθηκε ( $p=0.029$ ) από 1.47 σε 1.29.



## Μέση τιμή (S.E.M.) των % θετικών χλαμυδίων σε σπερματοζωάρια, πριν και μετά την θεραπεία



## Μέση τιμή (S.E.M) της παραμέτρου ΤΖΙ, πριν και μετά την θεραπεία για το Χλαμύδιο *trachomatis*



# Ανοσοφαινοτυπική μέθοδος ενδοκυττάριας ανίχνευσης μολυσματικών παραγόντων στα σπερματοζώαρια

 **ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΙΔΙΟΚΤΗΣΙΑΣ** 

**ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΥΡΕΣΙΤΕΧΝΙΑΣ**

Αριθμός **1008033**

Έχοντας υπόψη :

α) το άρθρο 8 παρ. 11 του νόμου 1733/87 "Μεταφορά τεχνολογίας, εφευρέσεις, τεχνολογική καινοτομία και σύσταση Επιτροπής Ατομικής Ενέργειας"  
β) την υπ' αρ. 15928/ΕΦΑ/1253 απόφαση του Υπουργού Βιομηχανίας, Ενέργειας και Τεχνολογίας "Κατάθεση αίτησης για χορήγηση Διπλώματος Ευρεσιτεχνίας ή Πιστοποιητικού Υποδείγματος Χρησιμότητας στον ΟΒΙ και τήρηση βιβλίων"  
γ) την αίτηση που κατέθεσε ο ενδιαφερόμενος στον Ο.Β.Ι. στις **29-3-2012** με αριθμό **20120100185** και την καταβολή στις **6-11-2013** του τέλους χορήγησης.

**Απονέμουμε**

Δίπλωμα Ευρεσιτεχνίας με θεωρημένα όλα τα κατά νόμον επισυναπτόμενα σχετικά έγγραφα, στους:


- 1. ΤΣΙΛΙΒΑΚΟ ΒΑΣΙΛΕΙΟ**  
Σοφίας Σλήμαν 4  
11525 ΑΘΗΝΑ (ΑΤΤΙΚΗΣ)
- 2. ΓΚΡΙΤΖΑΠΗ ΑΓΓΕΛΟ**  
Σοφίας Σλήμαν 4  
11525 ΑΘΗΝΑ (ΑΤΤΙΚΗΣ)

**ΤΙΤΛΟΣ : "ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣ ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΩΝ ΜΟΛΥΣΜΑΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΟΥ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ"**

ΕΦΕΥΡΕΤΗΣ(ΕΣ):  
1. ΤΣΙΛΙΒΑΚΟΣ ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ  
2. ΓΚΡΙΤΖΑΠΗΣ ΑΓΓΕΛΟΣ

ΔΙΕΘΝΗΣ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ (INT.Α.\*): C12Q 1/70, G01N 33/569.

Το Δίπλωμα Ευρεσιτεχνίας αυτό, ισχύει μέχρι: **30-3-2032**

Αθήνα 18/11/2013  
Ο Γενικός Διευθυντής  
  
**ΙΩΑΝΝΗΣ ΖΑΦΡΑΚΑΣ**

**SPI<sup>©</sup> Test**  
*Sperm Pathogen Immunophenotyping<sup>®</sup>*



Ανίχνευση ενδοκυττάριας δυνητικά παθογόνων μικροοργανισμών στα σπερματοζώαρια  
Νέος τρόπος προσέγγισης των αποβολών και της υπογονιμότητας ζεύγους  
Αποφυγή συγγενών παθήσεων

## Εφαρμογές:

- \* HSV
- \* CMV
- \* HPV
- \* *Chlamydia trachomatis*
- \* ΚΤΛ



# SPI Test™

## Ανίχνευση ενδοκυττάρων παθογόνων στα σπερματοζωάρια με κυτταρομετρία ροής

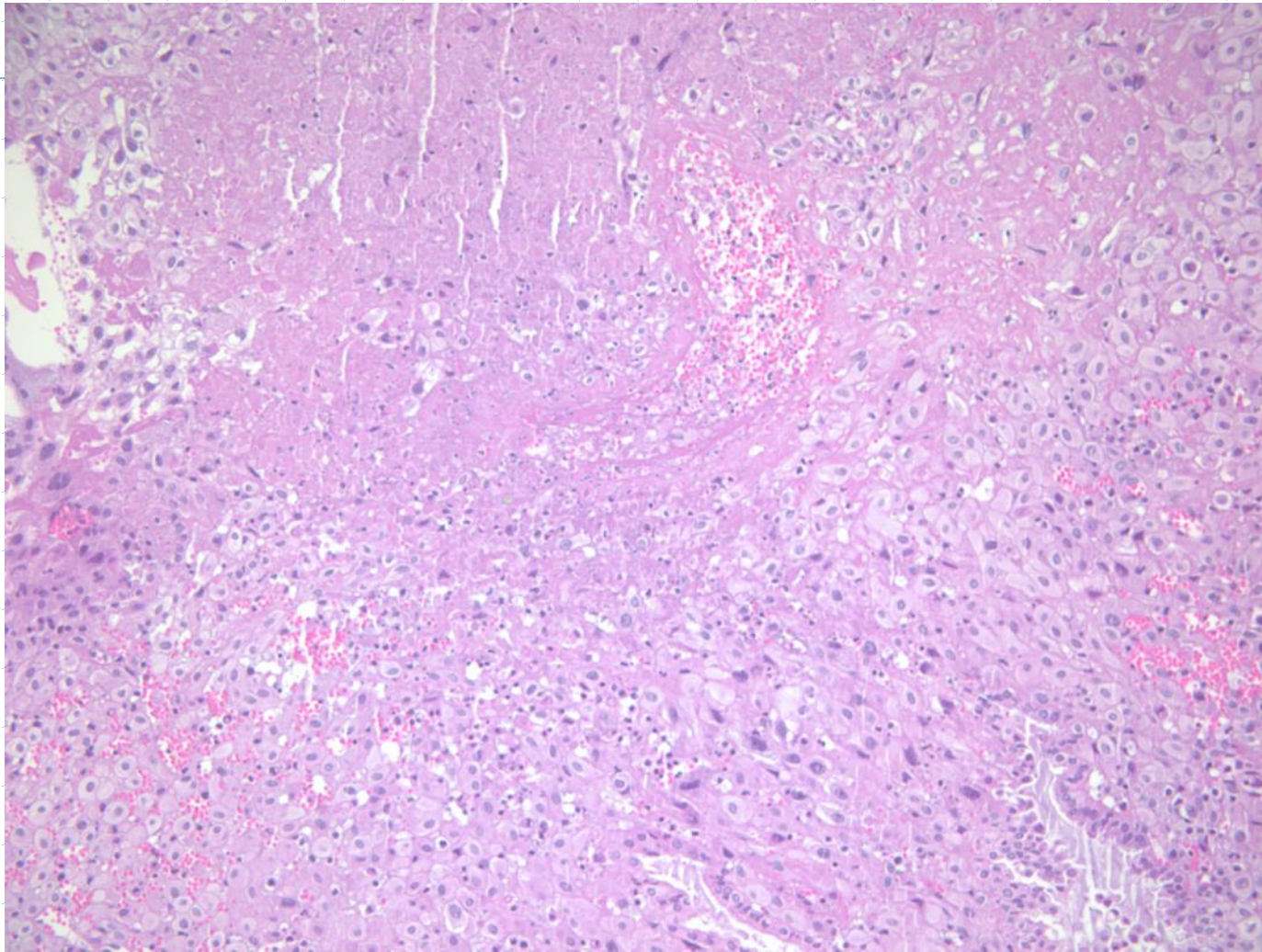
- Σε μεγάλο ποσοστό υπογόνιμων αντρών μπορέσαμε να **ταυτοποιήσουμε** και να **αξιολογήσουμε** τα ενδοκυττάρια παθογόνα, τα οποία μπορεί να εμπλέκονται στην υπογονιμότητα.
- Πλεονεκτήματα της κυτταρομετρίας ροής έναντι της PCR.
  - **Αξιολόγηση της παρουσίας των ενδοκυττάρων παθογόνων.**
  - **Μεγαλύτερη ευαισθησία**, εξαιτίας της ύπαρξης πιθανών αναστολέων της Taq πολυμεράσης (Garolla *et al.*, 2013) στη PCR. Αυτό μπορεί να εξηγήσει και τις διαφορές που εμφανίζονται μεταξύ των δύο μεθόδων.
  - **Πληροφορίες για την ταυτότητα των μολυσμένων κυττάρων.**
  - **Χαμηλό κόστος.**

# SPI Test™

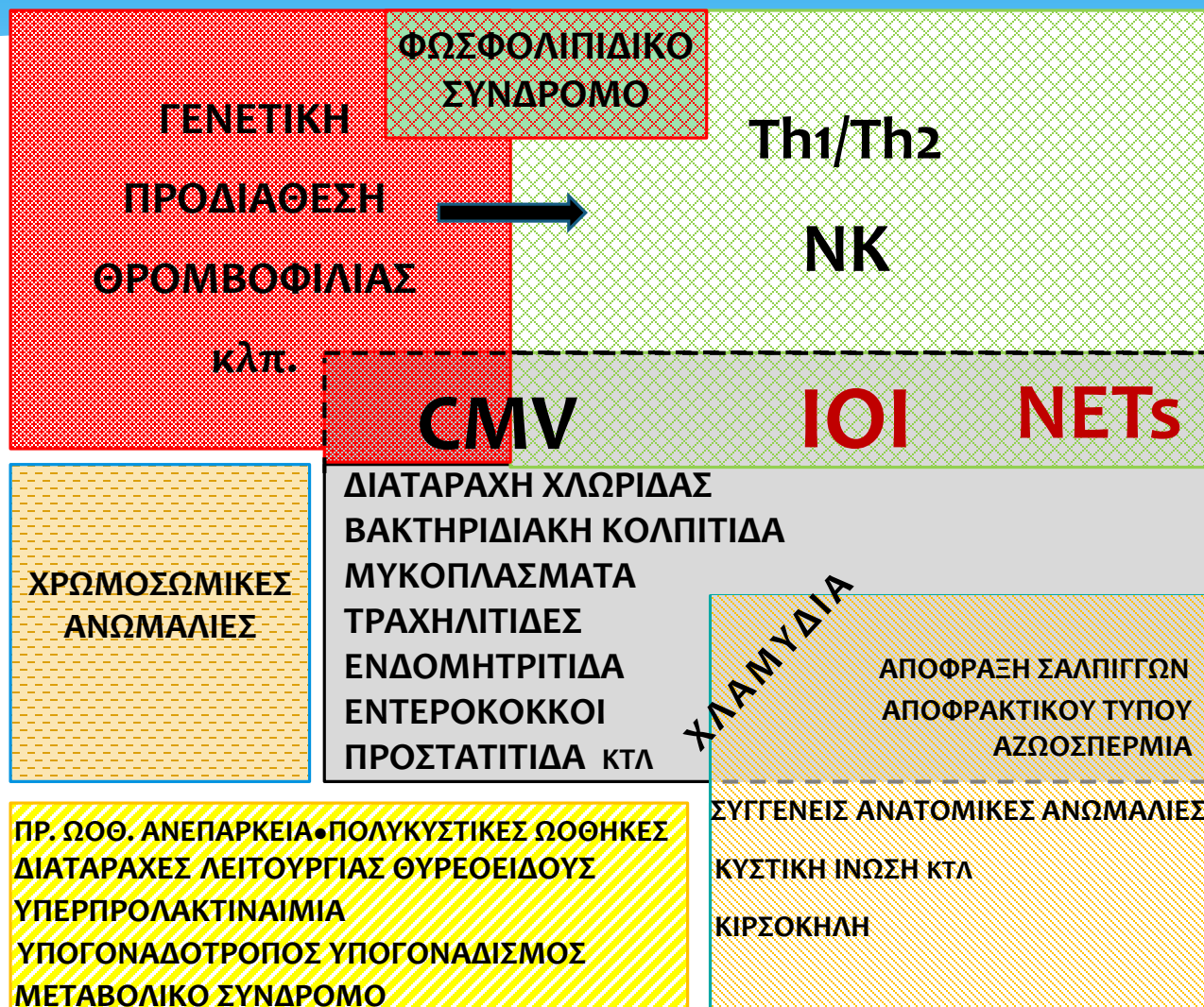
## Ανίχνευση ενδοκυττάρων παθογόνων στα σπερματοζωάρια με κυτταρομετρία ροής

- Θα μπορούσε επίσης να δώσει εξηγήσεις για τις συγγενείς ανωμαλίες που προκύπτουν από τις νευροτροπικές ιδιότητες των ερπητοϊών.
- Σε περίπτωση επιβίωσης του εμβρύου, λόγω μη ανάπτυξης της λειτουργίας του θύμου μπορεί να επέλθει ανοσοανοχή (**self-tolerance**) απέναντι στους ιούς, που χαρακτηρίζει το άτομο στο υπόλοιπο της ζωής του.
- Το γεγονός ότι οι αποβολές μπορεί να οφείλονται στην ενδοκυττάρια παρουσία ιών, καθιστά την ανίχνευσή τους σε τράπεζες σπέρματος απαραίτητη.

- Τελικά τί είναι η ανοσολογική αιτιολογία;



# Υπογονιμότητα: Σύνθεση ενός πολυπαραγοντικού προβλήματος





23.09.2012 07:17