

ΚΑΤΑΨΥΞΗ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΩΝ «Προληπτική Κρυοσυντήρηση»

Δημήτριος Μπαλτογιάννης

Αναπλ. Καθηγητής Ουρολογίας

Ιατρική Σχολή Ιωαννίνων

Προστασία της ανδρικής γονιμότητας

Ο άνδρας έρχεται αντιμέτωπος με πολλούς παράγοντες που ενδέχεται να απειλούν την γονιμότητά του

- άγχος - μόλυνση περιβάλλοντος - συνθήκες εργασίας
- καθιστική στάση - παχυσαρκία - μη ισορροπημένη διατροφή
- κάπνισμα - κατανάλωση αλκοόλ
- ιατρικές παθήσεις

Η επίδραση του χρόνου είναι αρνητική. Σήμερα αρκετοί άνδρες αναβάλλουν την δημιουργία οικογένειας

Η βιοϊατρική δίνει τη δυνατότητα προστασίας της ανδρικής γονιμότητας ώστε όποτε αποφασίσει ο άνδρας να μπορεί να έχει τους δικούς του βιολογικά απογόνους μελλοντικά

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

Κρυοσυντήρηση Σπέρματος

Εφαρμόζεται στις περιπτώσεις ανδρών που

1. Πρόκειται να υποβληθούν σε ειδικές θεραπείες (χημειοθεραπείες, ακτινοβολίες)
2. Πρόκειται να υποβληθεί (το ζευγάρι) σε μεθόδους Ιατρικώς Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής αδυνατώντας να έχουν «έτοιμο» το δείγμα στην κατάλληλη στιγμή
3. Πρόκειται να υποβληθούν σε χειρουργική αποκατάσταση κισσοκήλης ή απολίνωσης του σπερματικού πόρου με συλλογή σπερματοζωαρίων από τον όρχι ή την επιδιδυμίδα
4. Εκτίθενται σε τοξικούς παράγοντες (χημικά, ακτινοβολίες, υψηλές θερμοκρασίες)
5. Θέλουν να γίνουν γονείς αργότερα
6. Σπανιότερα σε αλλαγή φύλου, επικίνδυνα επαγγέλματα

ΟΧΙ Κρυοσυντήρηση Σπέρματος

Τα αγόρια στην προεφηβική ηλικία **ΔΕΝ** μπορούν να δώσουν σπέρμα για κατάψυξη

Μία εναλλακτική λύση διασφάλισης της γονιμότητά τους είναι η **κατάψυξη ορχικού ιστού** με σκοπό κάποια στιγμή στο μέλλον να αναπτυχθούν οι κατάλληλες τεχνικές αξιοποίησης.

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

Δεδομένης της μικρής ποσότητας που μπορεί να παρθεί κατά την βιοψία του όρχι και του μικρού μεγέθους του όρχι στην παιδική ηλικία, η **ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΟΛΟΚΛΗΡΟΥ ΤΟΥ ΟΡΓΑΝΟΥ** μπορεί να θεωρηθεί μία πιο κατάλληλη θεραπευτική προσέγγιση με την προοπτική της αυτόλογης μεταμόσχευσης οργάνου σε δεύτερο χρόνο

Όλες οι τεχνικές είναι καθαρά πειραματικές και πρέπει ακόμα να εξελιχθούν

Ο ρόλος της κρυοσυντήρησης σπέρματος στον καρκίνο του όρχεος

Αφορά τη 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

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

Μείωση παραμέτρων του σπέρματος στον καρκίνο του όρχεος

Η υπογονιμότητα ενδεχομένως να συμβαίνει στα πλαίσια της ίδιας της νόσου:

Πιεστικά φαινόμενα - Πρωτοπαθής βλάβη του σπερματικού επιθηλίου - Τύπος του όγκου - Ανοσολογική αντίδραση στα σπερματοζωάρια - Ενδοκρινής δράση του όγκου - Θερμοκρασία - Άλλες ουσίες γοναδοτοξικές

Τα κυτταροτοξικά φάρμακα της χημειοθεραπείας έχουν αρνητική επίδραση στην σπερματογένεση, συνδυασμός μάλιστα αυτών, είναι πολλαπλάσια τοξικός:

Ιφοσφαμίδη - Πλατίνη - Καρβοπλατίνη - Ετοποσίδη - Μπλεομυκίνη - Βινκριστίνη- Βινπλαστίνη

Η ακτινοθεραπεία επίσης μπορεί να επηρεάσει αρνητικά την γονιμότητα. Οι όρχεις είναι εξαιρετικά ευαίσθητοι στη ακτινοβολία. Δόση άνω των 4 Gray μπορεί να προκαλέσει μόνιμη βλάβη των γονάδων

Η ψυχολογική πλευρά

Όταν το ζευγάρι υποψιάζεται ότι δεν μπορεί να κάνει παιδιά με τη "φυσιολογική οδό", επιβαρύνεται ψυχολογικά, βιώνοντας συναισθήματα ματαιώσης και αποτυχίας

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, τον φέρνει σταδιακά σε μια αυτο-χρέωση, ντρέπεται, νιώθει ευάλωτος, ανίσχυρος, εκτεθειμένος στο βλέμμα, την κριτική και την πιθανή περιφρόνηση των άλλων

Η χρήση των τεχνικών υποβοηθούμενης αναπαραγωγής και η προστασία των σπερματοζωαρίων λειτουργεί θετικά στην ψυχολογία του άνδρα και γενικότερα στην ψυχολογία των άτεκνων ζευγαριών.

Ιστορικά

Η απαρχή της ιδέας 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

Έως το **1938** ήταν πλέον γνωστή η δυνατότητα επιβίωσης των σπερματοζωαρίων σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες

Η χρήση υγρού αζώτου για τη διατήρηση του σπέρματος σε θερμοκρασία -196°C εισήχθη κατά τη δεκαετία του **1960**

Η πρώτη επιτυχής εγκυμοσύνη με χρήση κατεψυγμένου ανδρικού σπέρματος χρονολογείται το **1953** από τον Sherman

Οι πρώτες οργανωμένες τράπεζες σπέρματος δημιουργήθηκαν στις αρχές του **1970**

Η πρώτη γέννηση φυσιολογικού παιδιού με κρυοσυντηρημένο σπέρμα πραγματοποιήθηκε το **1973**

Η μέγιστη διάρκεια κρυοσυντήρησης σπέρματος μέχρι σήμερα πριν τη χρήση του με επιτυχή γέννηση είναι **21 χρόνια**

Ελληνικό Δίκαιο

N. 3089/2002 αναφέρεται:

στις γενικές προϋποθέσεις του επιτρεπτού των μεθόδων της ΥΑ

στις επιμέρους μεθόδους της ΥΑ

στις συναινέσεις των εμπλεκόμενων προσώπων, στην τύχη του γεννητικού υλικού και στην ανωνυμία των τρίτων δοτών

στις επιπτώσεις της εφαρμογής των μεθόδων της ΥΑ στο αστικό δίκαιο (οικογενειακό και κληρονομικό δίκαιο)

N. 3305/2005 έχει περισσότερο τεχνικό χαρακτήρα και συμπληρωματικό ρόλο, καθώς εξειδικεύει:

τις υποχρεώσεις του γιατρού κατά την εφαρμογή των μεθόδων ΥΑ

έρευνα στο γεννητικό υλικό

πρόβλεψη ποινικών και διοικητικών κυρώσεων για την παράβαση των διατάξεων

όροι ίδρυσης και λειτουργίας των μονάδων ΥΑ

τραπεζών κρυοσυντήρησης

τεχνητή σπερματέγχυση, εξωσωματική γονιμοποίηση in vitro

ίδρυση ανεξάρτητης Εθνικής Αρχής Ιατρικώς Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής

Λήψη δείγματος

Αν και η παραγωγή σπερματοζωαρίων στους όρχεις είναι μια διαδικασία δυναμική και συνεχής, απαιτείται κάποιο χρονικό διάστημα μετά από κάθε εκσπερμάτιση

Για να επιτευχθεί η μέγιστη δυνατή ποσότητα και ενδεχομένως καλύτερης ποιότητας σπέρματος, το δείγμα πρέπει να συλλεχθεί μετά από αποχή 2 έως 4 ημερών από προηγούμενη εκσπερμάτιση

Συνήθως συνιστάται η κρυοσυντήρηση πολλαπλών δειγμάτων

Λήψη δείγματος

Καλύτερα η λήψη να γίνεται στο χώρο του εργαστήριου ώστε να προφυλαχθεί η ποιότητα του δείγματος (χρόνος μεταφοράς, συνθήκες κατά τη συλλογή, τρόπος μεταφοράς)

Από την άλλη μεριά στο χώρο σου «είναι» καλύτερα

Η συλλογή πρέπει να πραγματοποιείται με αυνανισμό

Στοματική επαφή ή η συνουσία δεν συνιστάται (επιμόλυνση του δείγματος)

Έλεγχος πριν την κατάψυξη

Για σεξουαλικά μεταδιδόμενα νοσήματα (HIV I/II, HCV, HbsAg, VDRL)

Σε κάθε δείγμα γίνεται σε μια μικρή ποσότητα έλεγχος:

όγκου του σπέρματος

αριθμού των σπερματοζωαρίων ανά ml

ποσοστό κινητικότητας

διαβάθμιση κινητικότητας

Η εικόνα του σπέρματος πριν από την κατάψυξη δίνει μία γενική εικόνα της ποιότητας του δείγματος

Γενικά, όσο χαμηλότερη η ποιότητα του σπέρματος, τόσο περισσότερα τα δείγματα που πρέπει να ληφθούν για κατάψυξη

Τεχνικές προετοιμασίας

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

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

Τεχνικές κρυοσυντήρησης σπέρματος

«Αργή»

Η τεχνική της **αργής ψύξης** που προτάθηκε από τους Behrman & Sawada αφορά την προοδευτική 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

Ο ρυθμός ψύξης προγραμματίζεται με βάση συγκεκριμένο λογισμικό και είναι από τους 20°C έως τους -80°C 1,5°C/min και ακολούθως 6°C/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

«Ταχεία»

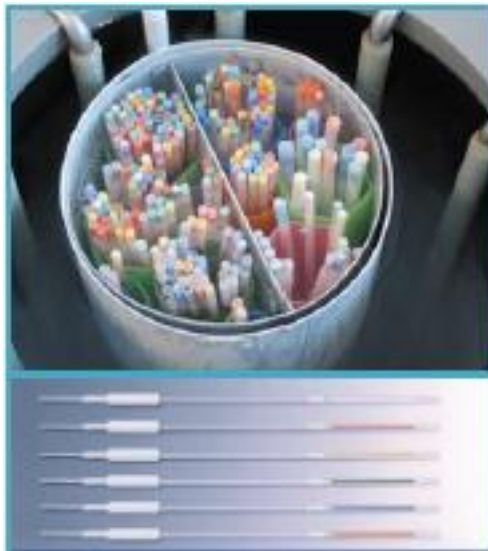
Τεχνική που προτάθηκε από τον Sherman αφορά την άμεση έκθεση του δείγματος σε περιβάλλον ατμών υγρού αζώτου για 8-10 min και μετά την τοποθέτηση του δείγματος σε υγρό άζωτο στους -196°C

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

Περιέκτες κρυοσυντήρησης

ΠΑΓΕΤΕΣ (STRAWS)



ΑΜΠΟΥΛΕΣ (VIALS)





«Υαλοποίηση»

Η υαλοποίηση είναι μια σύγχρονη τεχνική κατάψυξης, η οποία εφαρμόστηκε αρχικώς σε ωάρια και έμβρυα, με εξαιρετικά αποτελέσματα. Η τεχνική περιλαμβάνει μικρής ποσότητας σπέρματος ανά περιέκτη, σε ανοικτή ή κλειστή μορφή, με χρήση ή μη κρυοπροστατευτικού υλικού

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. 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 κρυοδακτυλίους (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

Τα κατεψυγμένα δείγματα μπορούν να κρυοσυντηρηθούν ακόμα και στους -80°C , χωρίς τη χρήση υγρού αζώτου, μειώνοντας το κόστος. Είναι σχετικά απλή, οικονομική και αποδοτική σε ό,τι αφορά στην επανάκτηση ζώντων σπερματοζωαρίων με λιγότερες βλάβες στο DNA

Μειονεκτεί, έναντι των συνήθων μεθόδων ως προς τον χαμηλό αριθμό των σπερματοζωαρίων που μπορούν να καταψυχθούν και τον περιορισμένο χρόνο κρυοσυντήρησης

«Άλλες μέθοδοι»

Ειδικά πρωτόκολλα

Πρόσφατες έρευνες κατέδειξαν εναλλακτικές μεθόδους κατάψυξης που δεν περιλαμβάνουν τη χρήση υγρού αζώτου

Η λυοφιλίωση προτάθηκε από τον 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

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, αραιώση στο ειδικό υλικό και ψύξη στους 4oC. Μειονέκτημά της αποτελεί η δυνατότητα μικρού χρονικού διαστήματος κρυοσυντήρησης, της τάξεως μερικών εβδομάδων. 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

Κατάψυξη χαμηλού αριθμού σπερματοζωαρίων

Η αποτελεσματική κρυοσυντήρηση δειγμάτων με χαμηλή περιεκτικότητα σπερματοζωαρίων, όπως σπερματοζωάρια που έχουν συλλεχθεί από επιδιδυμίδα ή όρχι με χειρουργικές μεθόδους, απαιτεί ειδικούς χειρισμούς. Οι τεχνικές αυτές περιλαμβάνουν τη χρήση ποικίλων περιεκτών βιολογικής ή μη βιολογικής προέλευσης. Έως σήμερα, δεν έχουν πραγματοποιηθεί τυχαίοποιημένες προοπτικές μελέτες μεγάλης κλίμακας για τη συγκριτική αξιολόγηση των μεθόδων

Μεθοδολογικές προσεγγίσεις για την κατάψυξη χαμηλού αριθμού σπερματοζωαρίων (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 κρουπροστατευτικού υλικού γίνεται χωρίς απώλειες σε σπερματοζωάρια	Κίνδυνος βιολογικής επιμόλυνσης
Μικροσταγόνες	Αποθήκευση σταγόνων μίγματος σπέρματος / κρουπροστατευτικού στην επιφάνεια ξηρού πάγου και άμεση βύθιση σε υγρό άζωτο	Αποφυγή απωλειών σπερματοζωαρίων μέσω επικόλλησης στο φορέα	Κίνδυνος επιμόλυνσεων μεταξύ δειγμάτων Το σχήμα και μέγεθος των φορέων δεν επιτρέπει τον εύκολο χειρισμό και αποθήκευση σε συνήθεις καταψύκτες και δοχεία υγρού αζώτου
Πιπέτα ICSI	Αποθήκευση σπερματοζωαρίων σεπιπέτα ICSI	Αποστειρωμένο, απλό και εύχρηστο σύστημα	Όχι πρακτικό για μακροχρόνια κρουσυντήρηση Ευθραυστότητα των πιπετών Κίνδυνος επιμόλυνσεων 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 κρουπροστατευτικό φιλμ που καλύπτει τον δακτύλιο του nylon και βυθίζονται σε υγρό άζωτο	Εξαιρετικός φορέας για υαλοποίηση Δεν απαιτεί επιπρόσθετη προετοιμασία	Ανοικτό σύστημα: κίνδυνος επιμόλυνσεων μεταξύ δειγμάτων
Μικροσφαίρες αγαρόζης	Αποθήκευση σπερματοζωαρίων που φορτώνονται σε μικροσφαίρες αγαρόζης	Μη βιολογικός φορέας	Η κλινική σημασία της μεθόδου δεν έχει αξιολογηθεί
Παγέτες	Τοποθέτηση μίγματος σπέρματος / κρουπροστατευτικού στην παγέτα μικρού όγκου	Αποστειρωμένο, απλό και εύχρηστο σύστημα	Όχι ιδανική για δείγματα ιδιαίτερα χαμηλής ποιότητας Απώλεια σπερματοζωαρίων λόγω επικόλλησης στο φορέα

Αν το δείγμα δεν είναι καλό

Είναι γνωστό ότι ένα ποσοστό μόνο των κυττάρων θα αντέξουν την διαδικασία της κατάψυξης και θα διατηρήσουν την βιωσιμότητά τους μετά την απόψυξη

Με τις νεότερες τεχνικές εξωσωματικής γονιμοποίησης, είναι δυνατόν να επιτευχθεί εγκυμοσύνη από έμβρυο που δημιουργείται με την έγχυση ενός και μόνο ζωντανού σπερματοζωαρίου σε ένα ωάριο

Σπέρμα με καλύτερη ποιότητα, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για επίτευξη εγκυμοσύνης με ενδομήτρια σπερματέγχυση

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

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

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 κλασική IVF

Επίδραση της κρυοσυντήρησης στις παραμέτρους του σπέρματος

Παρόλο που η κρυοκατάψυξη επηρεάζει την κινητικότητα και τη βιωσιμότητα των σπερματοζωαρίων, το πρόβλημα αυτό μπορεί να υπερκερασθεί με την επιλογή ζωηρά κινούμενων σπερματοζωαρίων μετά την απόψυξη, την κατάψυξη μαζί με σπερματικό υγρό, την προσθήκη αντιοξειδωτικών ουσιών στο υλικό, και τη χρήση ουσιών (πεντοξυφυλίνη, υαλουρινικό οξύ), που ενεργοποιούν την κινητικότητα των σπερματοζωαρίων μετά την απόψυξη

Με συνέπεια τα αποτελέσματα στα ποσοστά κήσης με υποβοηθούμενη αναπαραγωγή να μη διαφέρουν μεταξύ του φρέσκου και του αποψυγμένου σπέρματος

Κρυοπροστατευτικές ουσίες

Η πρόκληση 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 λύθηκε το 1949, όταν ο Polge παρατήρησε ότι η γλυκερόλη έχει προστατευτικό ρόλο για τα κύτταρα σε χαμηλές θερμοκρασίες

Τα κρυοπροστατευτικά, είναι χημικές ουσίες, μικρού ή μεγάλου μοριακού βάρους και υψηλής διαπερατότητας που προστατεύουν τα σπερματοζωάρια κατά την διαδικασία της ψύξης με την αποτροπή δημιουργίας κρυστάλλων εντός αυτών, 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

Χωρίς το κρυοπροστατευτικό και με υψηλούς ρυθμούς κατάψυξης, σχεδόν το σύνολο του όγκου του νερού παγώνει. Με την προσθήκη του, ο πάγος καταλαμβάνει μικρότερο μέρος του όγκου του διαλύματος και τα κύτταρα έτσι έχουν περισσότερο χώρο διαθέσιμο για να επιβιώσουν μεταξύ των κρυστάλλων

Γλυκόλες: αιθυλική γλυκόλη (Ethylene Glycol), προπυλενική γλυκόλη (1,2- propanediol), γλυκερόλη (Glycerol), DMSO (Dimethyl sulfoxide), Σουκρόζη, 2-μεθυλ-2,4-πεντανεδιόλη (MPD), Δεξτρόζη

Απόψυξη

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 κατόπιν 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 κρυοσυντητητικό μέσο με πλύση και φυγοκέντρωση

Πόσα δείγματα να κρυοσυντηρηθούν

Αν η ποσότητα και ποιότητα του σπέρματος είναι κατάλληλη για ενδομήτρια σπερματέγχυση, η πιθανότητα εγκυμοσύνης αυξάνεται όσο περισσότερα δείγματα υπάρχουν διαθέσιμα. Περισσότερα δείγματα επιτρέπουν περισσότερες προσπάθειες

Αν η μέθοδος θα είναι η εξωσωματική γονιμοποίηση, ακόμα και ένα δείγμα μπορεί να είναι αρκετό (καλύτερα όμως να είναι διαθέσιμα και άλλα δείγματα)

Συνήθως συνιστάται η κατάψυξη 3-6 δειγμάτων σπέρματος

Πιθανότητα επιμόλυνσης μεταξύ δειγμάτων

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

Πόσο χρόνο μπορεί να διαρκέσει

Σύμφωνα με το ισχύον νομοθετικό πλαίσιο, (αρ. 7 § 3 Ν. 3305/2005) στη χώρα μας ο χρόνος κρυοσυντήρησης ορίζεται στα **5 χρόνια**

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

Σύμφωνα με τα μέχρι σήμερα επιστημονικά δεδομένα, τα δείγματα σπέρματος δεν επιβαρύνονται ποιοτικώς ακόμα και μετά από πολλά χρόνια παραμονής σε βαθιά κατάψυξη

Η HFEA (Human Fertilization and Embryology Authority) στη Μ. Βρετανία αποφάσισε να παρατείνει τον επιτρεπόμενο χρόνο κρυοσυντήρησης του σπέρματος στα 55 χρόνια

Κίνδυνος για συγγενείς ανωμαλίες

Πάρα πολλά παιδιά έχουν ήδη γεννηθεί με γονιμοποίηση χρησιμοποιώντας κρυοσυντηρημένα σπερματοζωάρια

Η πιθανότητα εμφάνισης συγγενών ανωμαλιών δεν διαφέρει από αυτήν που έχουν τα παιδιά που γεννιούνται μετά από φυσιολογική σύλληψη

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

Τράπεζες Κρυοσυντήρησης Σπέρματος

Νόμοι: 3089/2002, 3305/2005

Εξειδικευμένο προσωπικό στις νεότερες τεχνικές κρυοσυντήρησης σπέρματος και απόψυξης σπέρματος υπό την επίβλεψη ειδικού επιστήμονα στα θέματα Κρυοβιολογίας

Οι φάσεις/στάδια της

συλλογής - παραλαβής - ταυτοποίησης - διενέργεια ελέγχων - κρυοσυντήρησης - απόψυξης

Θα πρέπει να τελούν υπό αυστηρό ποιοτικό έλεγχο με βάση τις προδιαγραφές ISO σύμφωνα με τον WHO και την ESHRE

Συμπεράσματα

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

Συμπεράσματα

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 Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής

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 χρησιμοποίηση του κρυοσυντηρημένου σπέρματος

ΕΥΧΑΡΙΣΤΩ

