

11^ο ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ ΑΝΔΡΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ
ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑΣ
ΤΟΥ ΑΝΔΡΑ

Διοργάνωση



10-11 Μαΐου 2019

ΣΤΟΑ ΒΙΒΛΙΟΥ
ΑΙΘΟΥΣΑ ΤΟΥ ΛΟΓΟΥ
Πεσμαζόγλου 5 & Σταδίου, Αθήνα

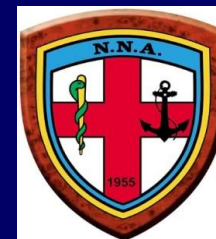
Η εκδήλωση αξιολογείται από τον Πανελλήνιο Ιατρικό Σύλλογο
με δεκαέξι (16) μόρια Συνεχιζόμενης Ιατρικής Εκπαίδευσης
(CME-CPD credits)



Οργάνωση - Γραμματεία



Θεσσαλονίκης 12, 153 44 Γέρακας, Αθήνα
Τηλ.: 210 6046205, Fax: 210 6047497
E-mail: info@free-spirit.gr
www.free-spirit.gr



Αξιολόγηση & διαχείριση των σπερματοζωαρίων στην Υποβοηθούμενη Αναπαραγωγή

Μαρία Φίλιππα, MSc

Senior Κλινικός Εμβρυολόγος ESHRE Cert

**Διευθύντρια Εργαστηρίων &
Τράπεζας Κρυοσυντήρησης**

M.I.Y.A Ναυτικό Νοσοκομείο Αθηνών

Ιατρικώς Υποβοηθούμενη Αναπαραγωγή- ΙΥΑ M.I.Y.A & E.A.I.Y.A

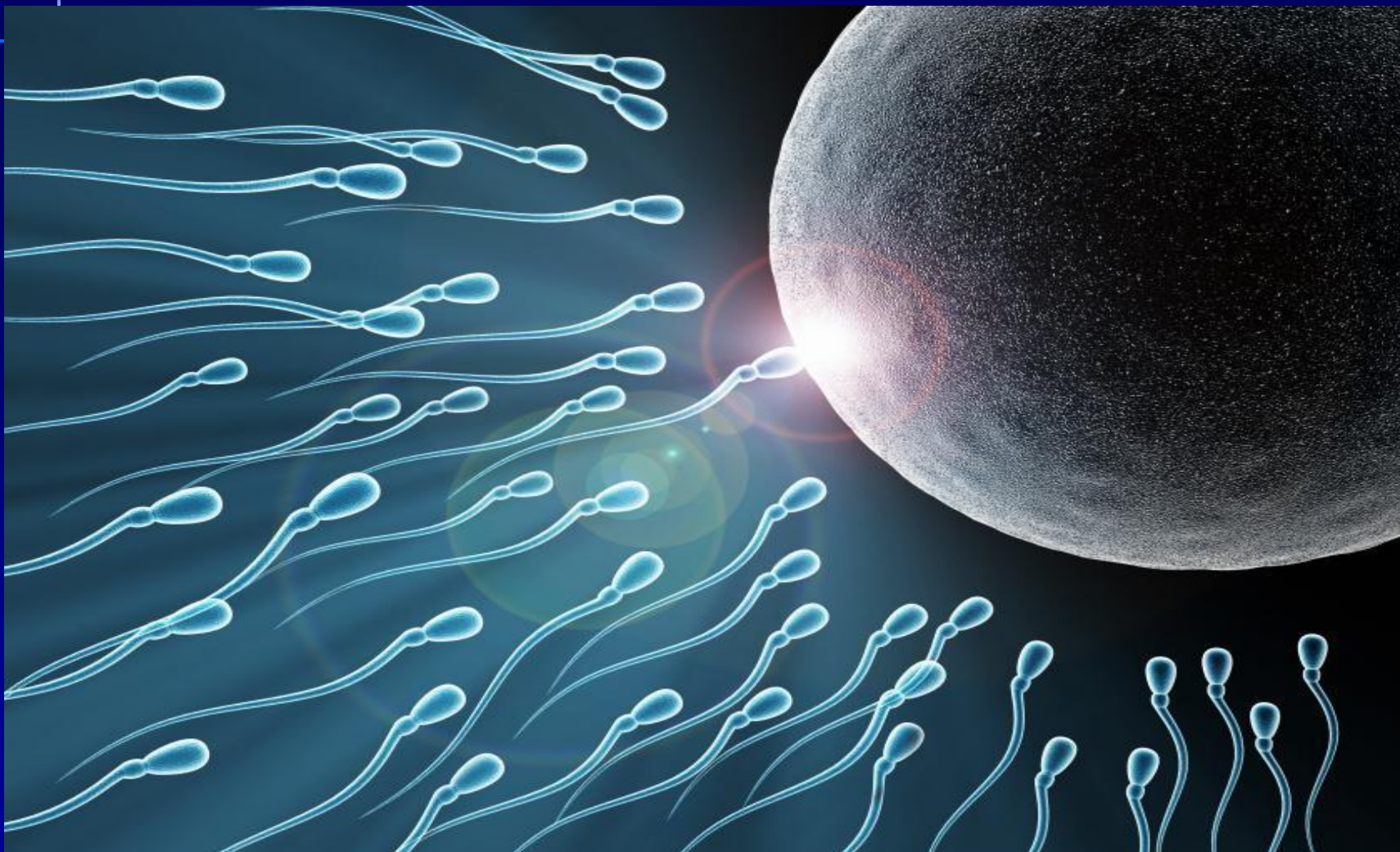
- **ΙΥΑ :** Όλες οι θεραπείες ή διαδικασίες που περιλαμβάνουν την **in vitro** διαχείριση μαζί των ανθρωπίνων ωαρίων και σπέρματος ή εμβρύων με σκοπό την δημιουργία εγκυμοσύνης σε ζευγάρια που προσπαθούν να κυοφορήσουν άνω του ενός έτους χωρίς επιτυχία
- Οι **Μονάδες Ιατρικώς Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής M.I.Y.A** είναι ειδικά οργανωμένες μονάδες με αντικείμενο την κυοφορία και τεκνοποίηση που επιτυγχάνεται με μεθόδους άλλες πλην της φυσιολογικής ένωσης άνδρα και γυναίκας
- Οι **M.I.Y.A.** ιδρύονται και λειτουργούν με άδεια της **Εθνικής Αρχής Ιατρικώς Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής E.A.I.Y.A,** που ελέγχει αν πληρούνται οι νόμιμες προϋποθέσεις εθνικών & παγκοσμίων κατευθυντηρίων σωστής- ασφαλούς πρακτικής

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑ ΜΙΥΑ- ΚΛΙΝΙΚΟΣ ΕΜΒΡΥΟΛΟΓΟΣ

Κλινικός Εμβρυολόγος

- Πτυχιούχος επιστήμονας βιοιατρικών επιστημών, με εξειδίκευση, εμπειρία και σωστή πρακτική στις εργαστηριακές τεχνικές καλλιέργειας ΙΥΑ
- Ικανός να κατανοεί, να χειρίζεται, να μεθοδεύει, να ελέγχει και να αξιολογεί όλες τις παραμέτρους που εμπλέκονται, υιοθετώντας νέες τεχνολογίες όπου είναι απαραίτητο.
- Μιμείται τις in vivo συνθήκες αναπαραγωγής in vitro
- **Π.Ε.Κ.Ε** Πανελλήνια Ένωση Κλινικών Εμβρυολόγων www.peke.gr
- European Society for Human Reproduction and Embryology **ESHRE** www.eshre.com
Certification for Embryologists
- **Alpha Scientists in Reproductive Medicine**
www.alphascientists.com

Δημιουργία νέας ζωής το ζωογόνο σπέρμα προκαλεί
την αρχή με την διείσδυση του στο ωάριο



Επιδημιολογία Ανδρικής Υπογονιμότητας

- 8-15% ζευγαριών όχι τεκνοποίηση με > 1 έτος απροστάτευτη, συχνή συνουσία
- ∞20% ευθύνη αποκλειστική άνδρα
- 30-40% συνδυαστική ευθύνη άνδρα & γυναίκας
- 15-30% ανεξήγητη υπογονιμότητα

Διαγνωστικός έλεγχος ανδρικής υπογονιμότητας

- Σπερμοδιάγραμμα
- Ιστορικό
- Ανατομία
- Ορμονολογικός
- Μικροβιολογικός
- Βιοχημικός
- Ανοσολογικός
- Εξειδικευμένος λειτουργικός έλεγχος
- Κατακερματισμός DNA σπερματοζωαρίων
- Γενετικός

Απαραίτητες εξετάσεις συμμετοχής σε ΥΙΑ

Ανοσολογικές εξετάσεις

- HIV I - II
- HBs Ag (Αυστραλιανό αντιγόνο)
- anti - HCV / ολικό
- RPR

Σπερμοδιάγραμμα &

Καλλιέργεια σπέρματος για

- Αερόβια-αναερόβια βακτήρια
- Σεξουαλικά μεταδιδόμενα μικρόβια με μοριακές τεχνικές
- Mycoplasma
- Ureoplasma
- Chlamydia

Βιοχημικοί δείκτες σπέρματος

- α- γλυκοσιδάση
- όξινη φωσφατάση
- κιτρικό οξύ
- ψευδάργυρος
- φρουκτόζη

Αντισπερματικά αντισώματα

Γόνιμα όρια αναλύσεων παραμέτρων σπέρματος

Όρια σπέρματος για επιλογή μεθόδου ΙΥΑ

Αποχή 3-7 ημέρες Ανάλυση εντός 1 ώρας Σε θερμοκρασία 20-40°C

WHO ΚΡΙΤΗΡΙΑ 2010 σε πλήρες δείγμα

- Όγκος Φ.Τ $\geq 1,5$ mL pH $\geq 7,2$
- Αριθμός σπερματοζωαρίων $\geq 15.000.000/\text{mL}$
- Συνολικός αριθμός σπερματοζωαρίων $\geq 39.000.000$
- Κινητικότητα συνολική 40%
- Σύνολο προωθητικής κινητικότητας 32%
- Μορφολογία Φ.Τ $\geq 4\%$ Δείκτης τερατοσπερμίας $>1.5 = \text{ICSI}$

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ

- Κατώτατο όριο για IUI $5.000.000/\text{mL}$ με $\geq 50\%$ προωθητική κίνηση
- Κατώτατο όριο για IVF $1.000.000/\text{mL}$ με $\geq 50\%$ προωθητική κίνηση
- Κατώτατο όριο για ICSI $1.000.000/\text{mL}$ με $\leq 50\%$ προωθητική κίνηση

Γόνιμα όρια κατάτμησης DNA σπερματοζωαρίων

Δείγμα σπέρματος

% σπερματοζωάρια με
κατακερματισμό DNA

Γόνιμα

16.3 ± 6.0

Νορμοζωοσπερμικά

27.3 ± 11.7

Ολιγοασθενοσπερμικά

47.3 ± 17.3

- Προγνωστική μέθοδος αξιολόγησης σπερματοζωαρίων
- **Δείκτης DNA** **25-30% IVF/ICSI**
 > 30% ICSI
- Βάσει αποτελεσμάτων χορήγηση αντιοξειδωτικών και επιλογή εξειδικευμένων τεχνικών επιλογής σπερματοζωαρίων στο IVF lab

Εξειδικευμένα τεστ ανάλυσης σπέρματος

- Λευκά αιμοσφαίρια $< 1 \times 10^6$
- Άωρα κύτταρα $< 1 \times 10^6$
- Συγκολλήσεις
- Αντισπερμικά αντισώματα
- Βιωσιμότητα σπερματοζωαρίων
- Οξειδωτικό στρες
- Γενετικός έλεγχος – Κυστική ίνωση, καρυότυπος, μικροελλείψεις του Υ, γονιδιακός έλεγχος
- Ανευπλοειδισμός χρωμοσωμάτων σπερματοζωαρίων
- Πρόσδεση σε υαλουρονικό
- Polarized light μικροσκόπηση
- Μεγέθυνση σπερματοζωαρίων IMSI
- Αναζήτηση Annexin V ως δείκτη ακεραιότητας χρωματίνης

Διαχείριση Ολιγοασθενοσπερμίας

- Σε τουλάχιστον 2 σπερμοδιαγράμματα, με διαφορά > 28 ημέρες, με την ίδια αποχή, στο ίδιο εργαστήριο, οι τιμές τους κάτω των ορίων αναφοράς κατά WHO 2010
- Χορήγηση επιπλέον εξετάσεων ανατομικών, ορμονολογικών, μικροβιολογικών, βιοχημικών και ειδικών λειτουργικών τεστ
- Ενίσχυση της φυσιολογίας του άνδρα με φαρμακευτικά, ορμονικά ή αντιοξειδωτικά σκευάσματα ανάλογα αποτελεσμάτων εξετάσεων
- Συμβουλές σωστής υγιεινής και σεξουαλικής πρακτικής

Διαχείριση αζωοσπερμίας

- Σε τουλάχιστον 2 σπερμοδιαγράμματα, με διαφορά > 28 ημέρες, με την ίδια αποχή, στο ίδιο εργαστήριο, η απουσία διακριτών, ώριμων, κινούμενων σπερματοζωαρίων
- 1-2% ανδρικού πληθυσμού, 10-20% υπογόνιμων ανδρών
- Έλεγχος παλίνδρομης εκσπερμάτισης βάσει κριτηρίων
- Χορήγηση επιπλέον εξετάσεων ανατομικών, ορμονολογικών, μικροβιολογικών, βιοχημικών και γενετικών
- Διαχωρισμός σε αποφρακτική με καλή πρόγνωση & μη αποφρακτικού τύπου συγγενής, αναπτυξιακής ή επίκτητης αιτίας
- Διερεύνηση μέσω παρακέντησης επιδιδυμίδας MESA ή και βιοψία όρχεως TESE/ Micro TESE, με ιστολογική για επιβεβαίωση ευρημάτων
- Χρησιμοποίηση σπέρματος δότη, όπου χρειάζεται

Επιλογή μεθόδου ΥΙΑ

- **Ηλικία της συντρόφου**
- **Αίτιο υπογονιμότητας**- Σαλπιγγικός IVF, Ανδρικός ICSI
- **Παράμετροι σπέρματος – Αντιοξειδωτική θεραπεία**
καθοριστικοί στην επιλογή θεραπείας στην ανεξήγητη ή
γυναικεία υπογονιμότητα εκτός σαλπιγγικής
- **Έως 35 ετών κυρία** καλό σπέρμα IUI x 3-6 και IVF έπειτα
- **35-39 ετών κυρία** καλό σπέρμα IUI x 3 και IVF έπειτα
- **40 & άνω ετών κυρία** καλό σπέρμα IVF άμεσα
- Όπου υπάρχει ξεκάθαρη **σοβαρή ολιγοασθενοσπερμία ICSI**
ανεξαρτήτου ηλικίας κυρίας

Τεχνικές επεξεργασίας σπέρματος ΙΥΑ

Ταυτοποίηση – Ιχνηλασιμότητα- Ασηψία

- 1. Ογκομέτρηση, υφή, pH, αριθμός, κινητικότητα, μορφολογία και επιλογή μεθόδου επεξεργασίας

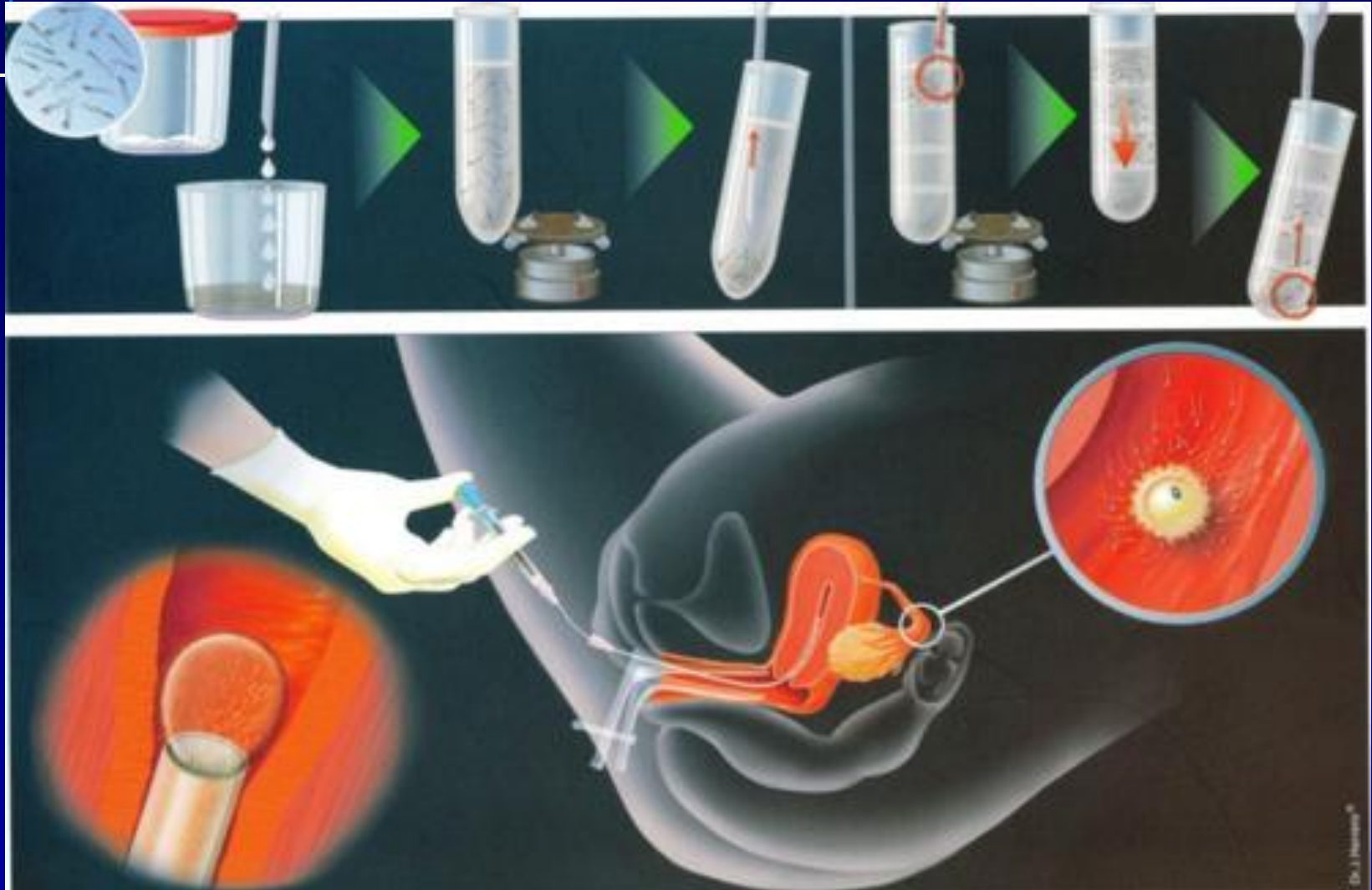
SWIM-UP

- 2. Εναπόθεση στο νωπό ή φυγοκεντρίμενο με ΚΥ ίζημα σπέρμα ~0,5 – 1,0 mL φρέσκου επωασμένου ΚΥ
- 3. Επώαση δείγματος πλάγια κλίση 37°C 30-45 min- 1 hour
- 4. Συλλογή υπερκειμένου ~0,4- 0,5 mL αξιολόγηση και IUI/IVF/ICSI

ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΑΒΑΘΜΙΣΜΕΝΗΣ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑΣ

- 2^Α. Ετοιμασία διαλυμάτων 90-80%, 50-40% και/ή 70% σε 2-3 στοιβάδες 0,3 ή 0,5 ή 1,0 mL ανάλογα
- 3^Α. Εναπόθεση νωπού ή ιζήματος σπέρματος στις στοιβάδες- φυγοκέντρηση 20-30 mins στα 250-300g
- 4^Α. Αφαίρεση υπερκειμένων ζωνών έως 90-80% ίζημα-ανάμιξη με 2-3mL ΚΥ - φυγοκέντρηση 10 mins στα 300g
- 5. Αφαίρεση υπερκειμένου- συλλογή ιζήματος ~0,4- 0,5 mL αξιολόγηση και IUI/IVF/ICSI

Η τεχνική της ενδομήτριας σπερματέγχυσης IUI intra uterine insemination



Εξωσωματική Γονιμοποίηση- IVF- ICSI day 0

ΚΛΑΣΙΚΗ ΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ IVF (IN VITRO FERTILIZATION)

- Ωάρια σε ομάδες σε τρυβλία ή σωληνάρια επωάζονται μετά ωοληψία
- Σπέρμα επεξεργασμένο με αριθμό άνω 1.000.000/mL με $\geq 50\%$ προωθητική κίνηση ώστε να έχουμε 30.000-50.000 σπερματοζωάρια ανά ωάριο

ΜΙΚΡΟΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ ICSI (INTRA CYTOPLASMIC SPERM INJECTION)

- Σπέρμα επεξεργασμένο με αριθμό 1.000.000/mL με $\leq 50\%$ προωθητική κίνηση
- Μετά την ωοληψία τα ωάρια καθαρίζονται με ένζυμο και μηχανικά από περιβάλλοντα κοκκιώδη κύτταρα
- Με χρήση ειδικών μικροχειριστηρίων σε ανάστροφο μικροσκόπιο και χρησιμοποίηση κατάλληλων μικροπιπεττών συγκράτησης ωαρίων και έγχυσης σπερματοζωαρίων επιτυγχάνεται η μικρογονιμοποίηση

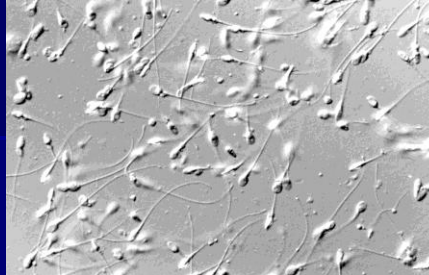
Στις περιπτώσεις ανεξήγητου αιτίου υπογονιμότητας IVF και ICSI

Η πορεία της *in vitro* γονιμοποίησης.



Ωάριο

Γαμέτες



Σπερματοζώαρια

Γενικά οι ανώμαλοι γαμέτες δεν παράγουν φυσιολογικά έμβρυα.

Οι παράμετροι των εμβρύων αναφέρονται στους γαμέτες απ' όπου προήλθαν.



Γονιμοποίηση Ημέρα 1η



Ημέρα
2η



Η περαιτέρω ανάπτυξη αντικατοπτρίζει την έκφραση των γονιδίων, την διαφοροποίηση και τον αναπτυξιακό έλεγχο.

Διαφοροποίηση



Ημέρα
5η

Ημέρα
3η



Τα στάδια της in vivo γονιμοποίησης

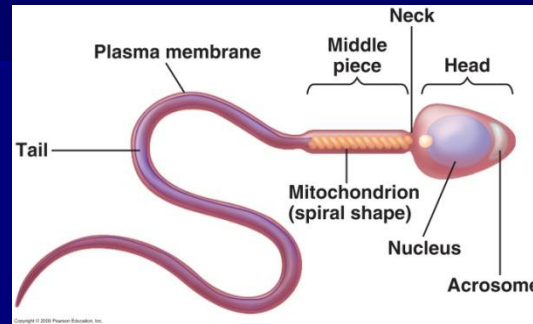
1. Η προετοιμασία των σπερματοζωαρίων μέσω ενεργοποίησης και αντίδρασης ακροσώματος, δεικτών ωρίμανσης των σπερματοζωαρίων, ενώ προτεολυτικά ένζυμα βοηθούν στην υπερενεργοποίηση των σπερματοζωαρίων
2. Η πρόσδεση και ένωση μεταξύ ωαρίου σπερματοζωαρίου στην κατάλληλη περιοχή της πλασματικής μεμβράνης του ωαρίου, μετά την ακροσωμική εξωκυττάρωση του σπέρματος
3. Η κορτικοειδή αντίδραση του ωαρίου ενεργοποιείται μετά την είσοδο του σπέρματος, ώστε να αποφευχθεί η πολυσπερμία

Ποικίλα μόρια και μοριακοί μηχανισμοί εμπλέκονται στα στάδια αυτά και καλείται η ΙΥΑ να μιμηθεί και ελέγξει in vitro

Τεχνολογίες για επιλογή σπερματοζωαρίων με υψηλή δομή πυρήνα, χαμηλό δείκτη κατάτμησης DNA, ολοκληρωμένη ακροσωμική αντίδραση

Αναζήτηση του ιδανικού μέσω

- Μορφολογίας head , midpiece, tail
- Κινητικότητας /ζωτικότητας
- DNA Integrity
- Mitochondrial function
- Chromosomal complement
- Activation capacity



Αξιολόγηση μέσω

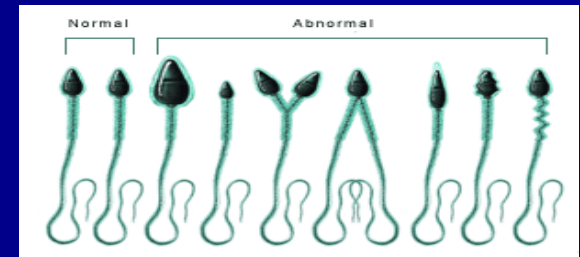
Sperm Binding Ability PICS1/ Sperm slow

Sperm Head Birefringence

Magnetic Activated Cell Sorting for Sperm Preparation

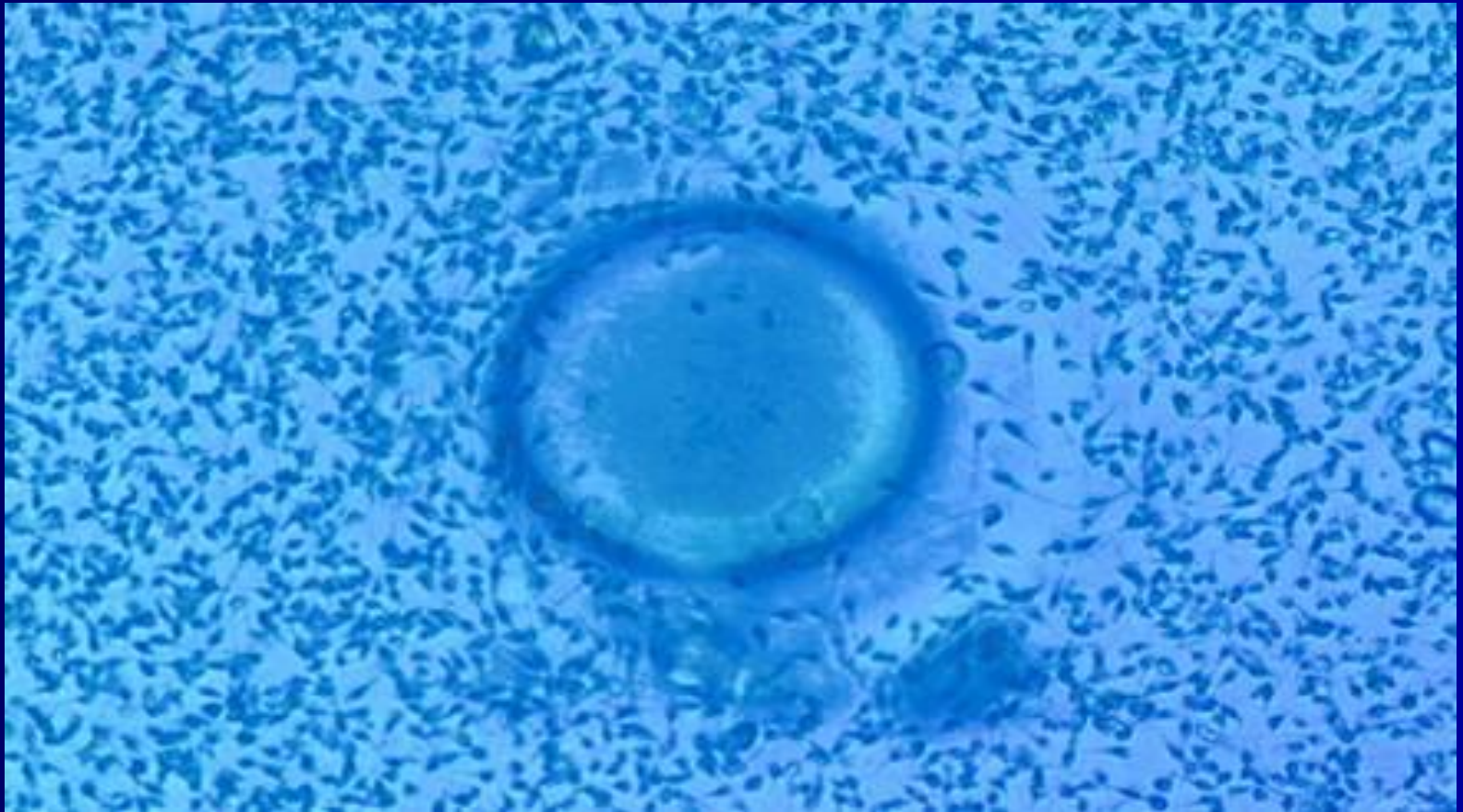
Sperm DNA Molecular Targetting

Real-Time Fine Sperm Morphology (IMSI)



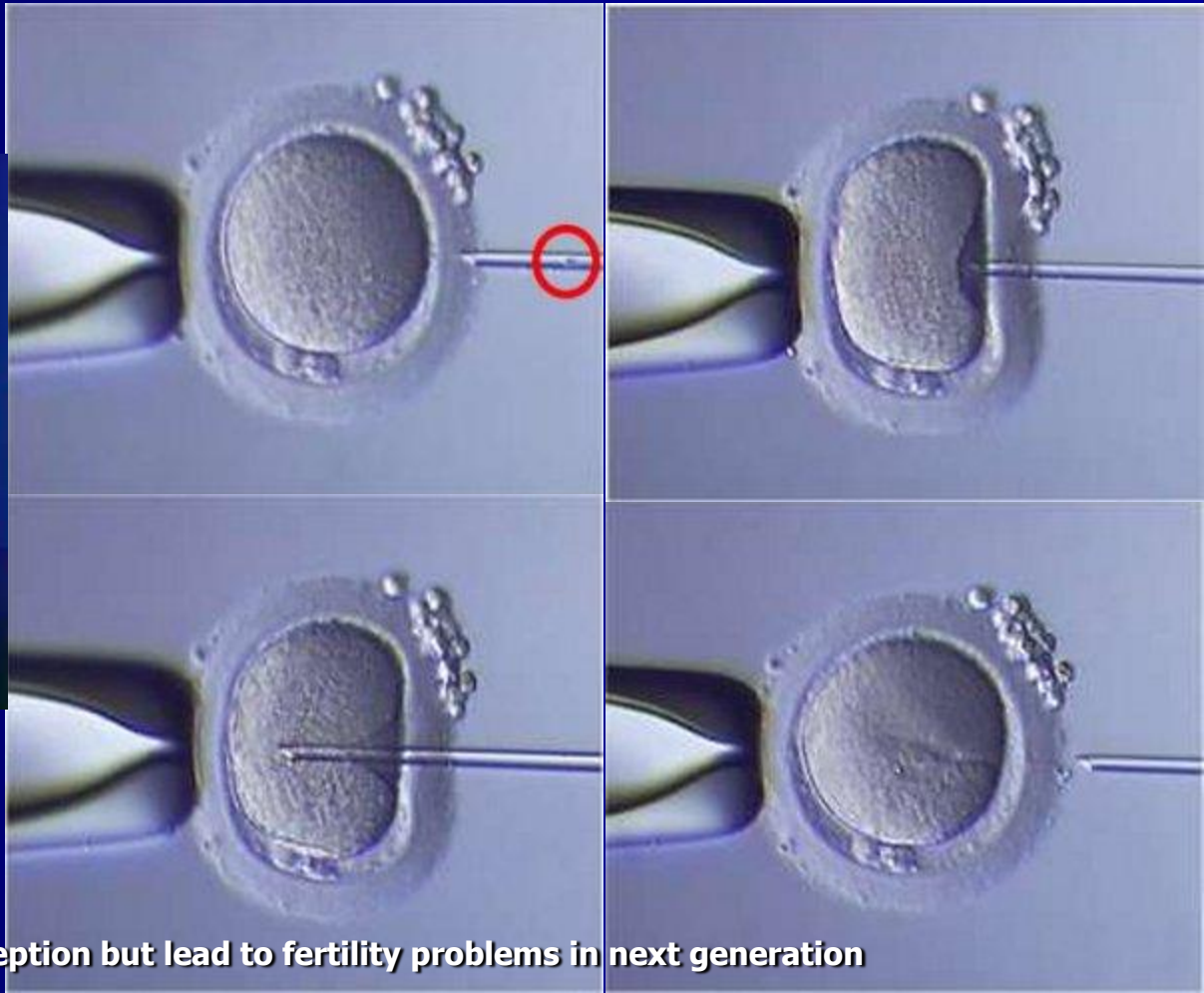
ΚΛΑΣΣΙΚΗ ΕΞΩΣΩΜΑΤΙΚΗ ΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ

IVF IN VITRO FERTILIZATION



ICSI –INTRACYTOPLASMIC SPERM INJECTION ΜΙΚΡΟΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ επιλογή
ενός καλά μορφολογικά κινητού σπερματοζωαρίου, η ακινητοποίηση του και η
αναρρόφηση - έγχυση του στο κυτταρόπλασμα ενός ωρίμου MII ωαρίου
Αποσκοπεί σε υψηλά ποσοστά γονιμοποίησης, ποιότητας εμβρύων, εμφύτευσης
Η πιο επαναστατική καινοτομία στην Υποβοηθούμενη Αναπαραγωγή

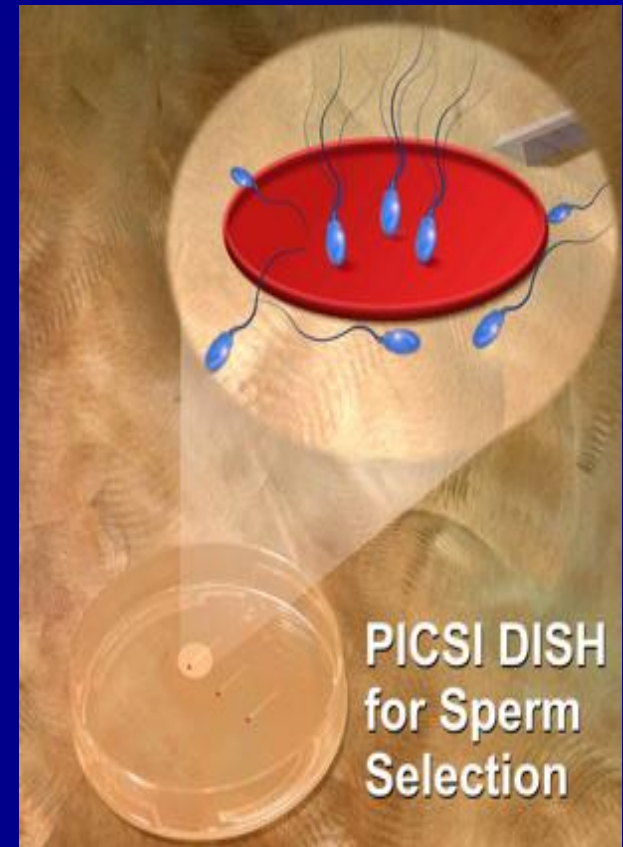
ICSI for non male factor infertility: a committee opinion ASRM 2012



Injecting sperm may raise chances of conception but lead to fertility problems in next generation

Τεχνολογίες για επιλογή σπερματοζωαρίων

Selection of HA-bound spermatozoa: PICSi
Show normal nucleus improving embryo
quality & development
Parmegiani et al ,2009
Spermslow - PCSI dish



Intracytoplasmic Morphologically Selected Sperm Injection (IMSI) uses high resolution microscopy (6,000-8,000x) to select sperm according to specific morphology

Χρονοβόρο στην εφαρμογή-Αμφιλεγόμενα αποτελέσματα



Improves fertilization, pregnancy rates, reduces miscarriage rates

Setti et al, Reprod Biom Online 2010

Magnetic Cell Sorting Sperm MACS

Find the fittest - MACS ART Annexin V System

Εύκολο, γρήγορο με εξειδικευμένη αφαίρεση των ανεπιθύμητων αποπτωτικών σπερματοζωαρίων

Επεξεργασμένο σπέρμα επωάζεται με AV-conjugated MicroBeads για να συλληθούν τα annexin-αρνητικά για χρήση, ενώ τα αποπτωτικά παραμένουν συγκρατημένα στο μαγνητικό πεδίο

Αυξάνει ποσοστά γονιμοποίησης, εγκυμοσύνης, μειώνει τις αποβολές.



Αζωοσπερμία ICSI μέσω MESA/ TESE/ROSI

- Διάγνωση αποφρακτικής ή μη αποφρακτικής αιτιολογίας
- Προτιμάται συγχρονισμός βιοψίας με την ωοληψία
- Ενδείκνυται την προηγούμενη ημέρα ή το πρωί πριν την ωοληψία η βιοψία στην μη αποφρακτική αζωοσπερμία
- Micro TESE δίνει δυνατότητα εύρεσης σπερματοζωαρίων και στα πιο κακής πρόγνωσης περιστατικά
- Η επιβίωση των σπερματοζωαρίων μετά από κρυοσυντήρηση εξαρτάται από την ποιότητα του υλικού στην νωπή του μορφή
- ICSI ROSI μικρογονιμοποίηση με στρόγγυλες σπερματίδες χρειάζεται ενεργοποίηση του ωαρίου με ηλεκτρικά ή χημικά μέσα, έχει δώσει γεννήσεις αλλά θεωρείται πειραματική

Επιπλέον Τεχνικές βελτίωσης ICSI- Αναζήτηση ζωντανού σπερματοζωαρίου

- ❖ **HOST** Hypo-osmotic swelling test χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό ακεραιότητας χρωματίνης και ξεχωρίζει τα ζωντανά και λειτουργικά ακίνητα σπερματοζωάρια
- ❖ Χρήση **pentoxifylline** & **theophylline** προκαλούν κίνηση ακίνητων σπερματοζωαρίων επιταχύνουν χρόνο ICSI
- ❖ **ATP/MgSO4** για αναγνώριση ζωντανών σπερματοζωαρίων
- ❖ **LAISS** Laser assisted immotile sperm selection μονή ώση ακτίνας laser 1,48 μm diode χτυπά κοντά στην άκρη της ουράς του σπερματοζωαρίου & κάνει αγκύλη αν ζωντανό
- ❖ Χρήση **Myoinositol** ρυθμίζει επίπεδα Ca^{2+} ενδοκυτταρικά ενισχύουν κινητικότητα

Η ταχύτητα και η ασφάλεια της ICSI είναι που καθορίζουν την μέθοδο επιλογής ζωντανών λειτουργικών σπερματοζωαρίων

Κρυοσυντήρηση σπέρματος- ορχικού ιστού

- Υπάρχουν διαφορετικές τεχνικές και πρωτόκολλα ανάλογα το είδος του γενετικού υλικού που κρυοσυντηρείται
- Σκοπός είναι η διατήρηση της μορφολογίας-φυσιολογίας και εξελικτικής δυναμικότητας του γενετικού υλικού
- Σπερματοζωάρια-Ορχικός ιστός πιο ανθεκτικά χρήζουν βραχεία κρυοσυντήρηση συνήθης μέθοδος– ταχεία υαλοποίηση, χρήζει μελέτες
- Τα κρυοπροστατευτικά επιλογής για μέγιστη επιβίωση και γονιμοποιητική ικανότητα είναι με glycerol και egg yolk
- Η ποσότητα κρυοσυντήρησης συνιστάται σε φιαλίδια/ σωληνάκια 100-1000μL για μέγιστη επιβίωση

Human Sperm Cryopreservation a review Advances in Urology 2012

Cryopreservation of testicular and epididymal sperm: techniques and clinical outcomes of assisted conception Review 2013 Clinics

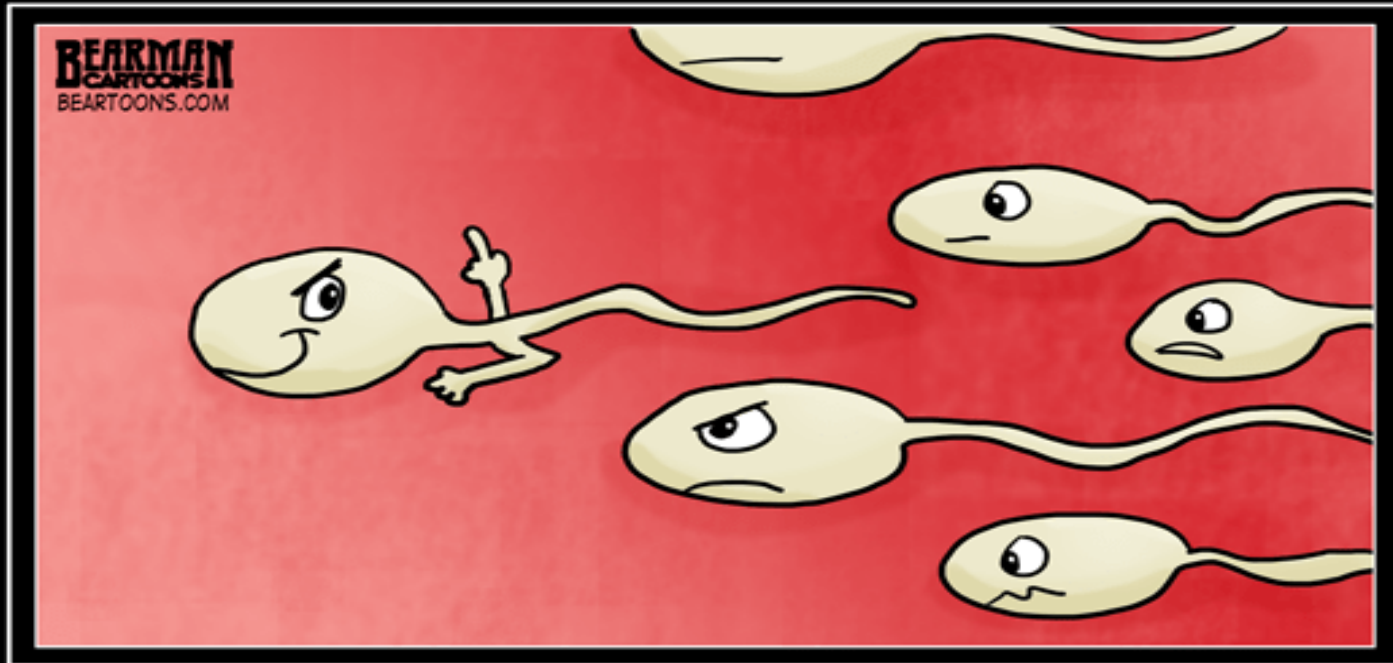
Stem cell derived sperm cells

Τι επιφυλάσσει το μέλλον;

Σπερματοζωάρια από συγκεκριμένου ατόμου σωματικά κύτταρα, από τα οποία έχουν δημιουργηθεί πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα και στην συνέχεια έχουν καλλιεργηθεί in vitro ώστε να δημιουργηθούν ανθρώπινα αρχέγονα κύτταρα γονάδων ;

Θα δείξει!

Το σπερματοζωάριο όχι να υποτιμάται, λόγω απλής συλλογής & πολυάριθμου πληθυσμού καθώς είναι ο ενεργοποιητής της γονιμοποίησης, της σύλληψης & της γέννησης



BELIEVE IN YOURSELF

Don't ever let someone tell you that you're not good enough. Never forget that you were the fastest sperm.



Σας ευχαριστώ

