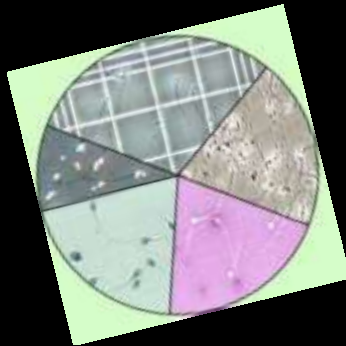


Εργαστηριακή διερεύνηση ανδρικής υπογονιμότητας - Εργαστηριακές τεχνικές στην υποβοηθούμενη αναπαραγωγή



Δέσποινα Τζανακάκη

Βιολόγος – Κλινική Εμβρυολόγος

Υπεύθυνη Εργαστηρίων Εμβρυολογίας & Ανδρολογίας

Τμήμα Εξωσωματικής Γονιμοποίησης - Β' Μαιευτική & Γυναικολογική Κλινική

Πανεπιστήμιο Αθήνας - Αρεταίειο Νοσοκομείο

Εργαστήριο εξωσωματικής

IUI

IVF

PGT

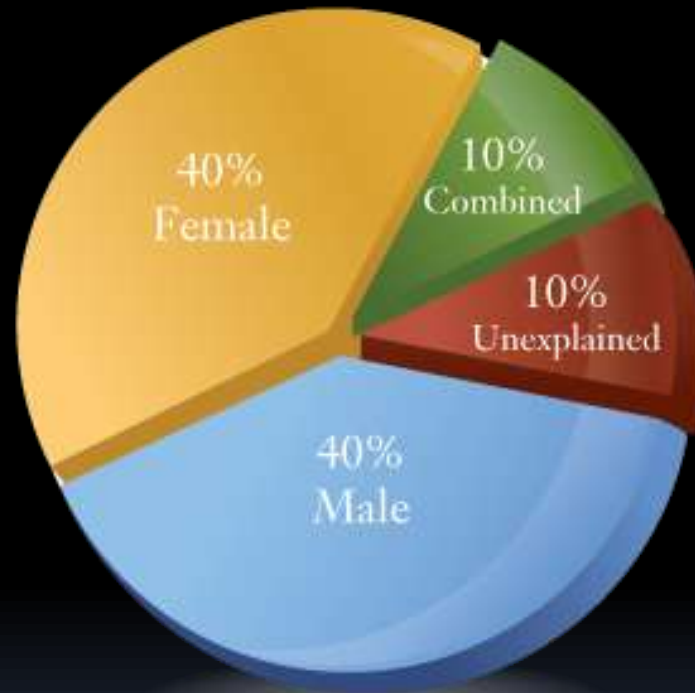
ICSI

ΣΠΕΡΜΟΔΙΑΓΡΑΜΜΑ

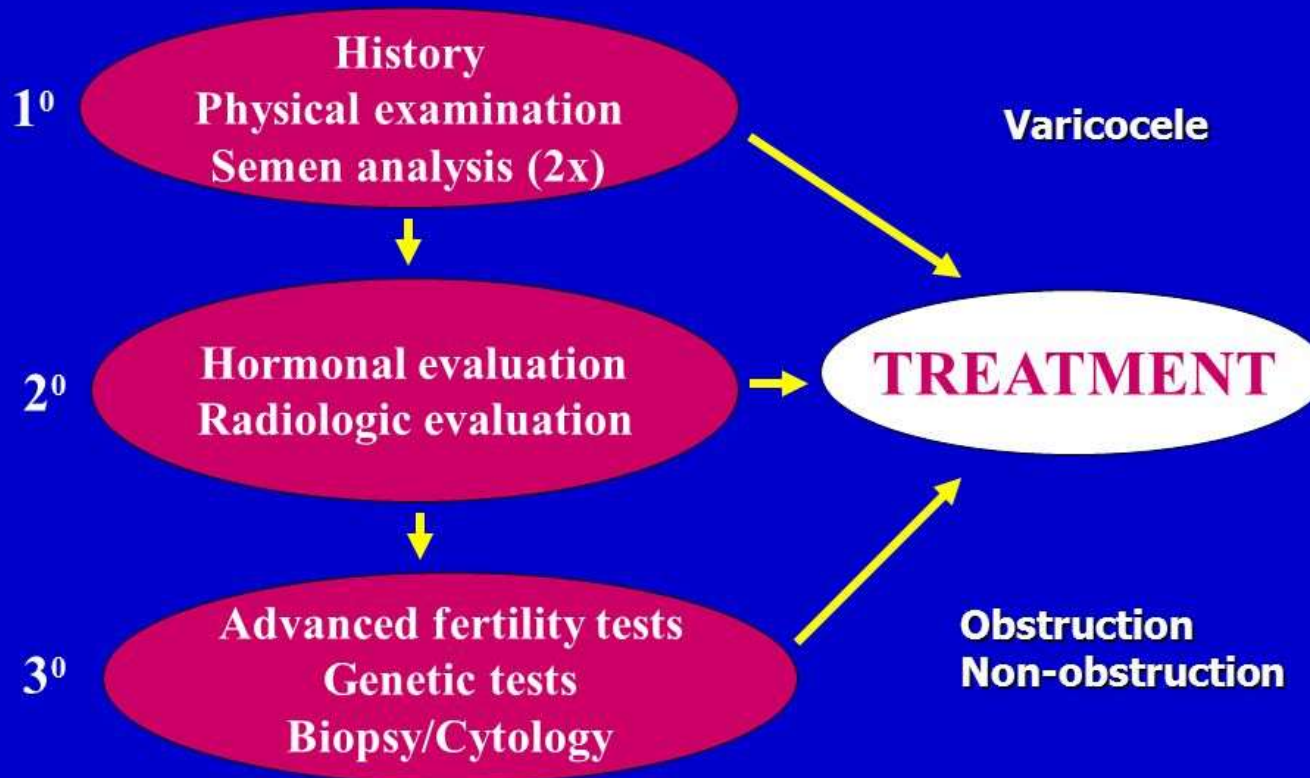
ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ

ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗ

ΑΙΤΙΕΣ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑΣ



Evaluation of Infertile Man



ΑΙΤΙΑ ΑΝΔΡΙΚΗΣ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑΣ ΣΧΕΤΙΖΟΜΕΝΑ ΜΕ ΤΟΝ ΤΡΟΠΟ ΖΩΗΣ

A. ΣΥΝΗΘΕΙΕΣ - ΤΡΟΠΟΣ ΖΩΗΣ

Κάπνισμα

Αλκοόλ

Παχυσαρκία

Στρες

Υπέρμετρη σωματική

αύξηση

Υπερθερμία όρχεων

Φάρμακα (5-ASA, MTX) - Κάνναβη - Κοκαΐνη

Στεροειδή αναβολικά

Ακτινοβολία κινητών τηλεφώνων



Γ. ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ

Ατμοσφαιρική ρύπανση

Αυξημένα επίπεδα όζοντος

Χημικές ουσίες - Φυτοφάρμακα

Γενετικές αιτίες ανδρικής υπογονιμότητας

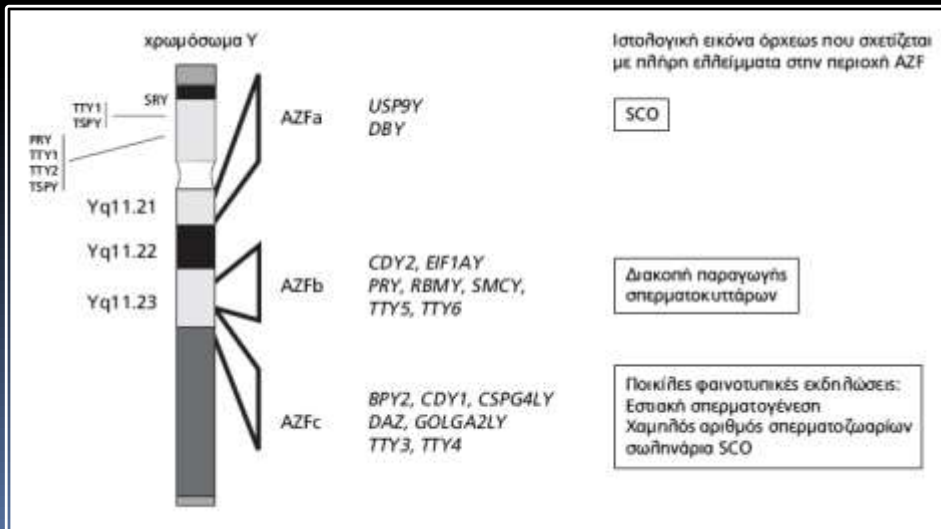
■ Μονογονιδιακές γενετικές βλάβες

(Συγγενής αμφοτερόπλευρη απουσία του σπερματικού πόρου (ΣΑΑΣΠ), Πρωτοπαθής δυσκινησία των μαστιγίων (κροσσών) ή σύνδρομο ακινήτων μαστιγίων, Νόσος του Kennedy ή νωτιαία μυϊκή ατροφία).

■ Δομικές και αριθμητικές ανωμαλίες χρωμοσωμάτων

(Μεταθέσεις αυτοσωματικών χρωμοσωμάτων, μεταθέσεις κατά Robertson, σύνδρομο Klinefelter: 47,XXY, σύνδρομο XYY: 47, XYY, δομικές ανωμαλίες του χρωμοσώματος X, αναστροφές χρωμοσωμάτων).

■ Μικροελλείμματα στο χρωμόσωμα Y

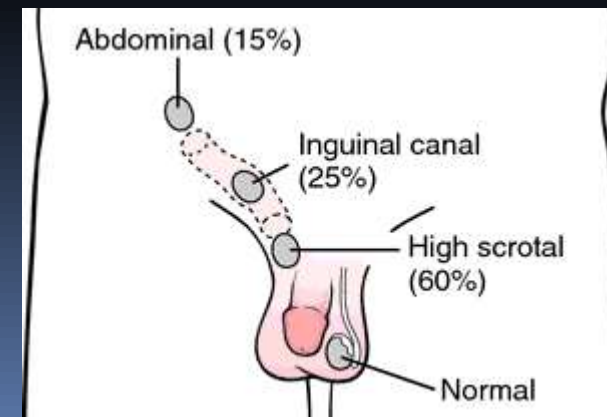
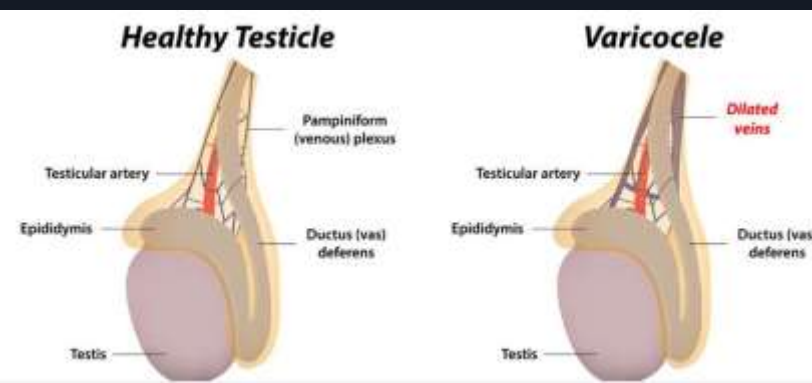


Ενδοκρिनολογικές και ανδρική υπογονιμότητα

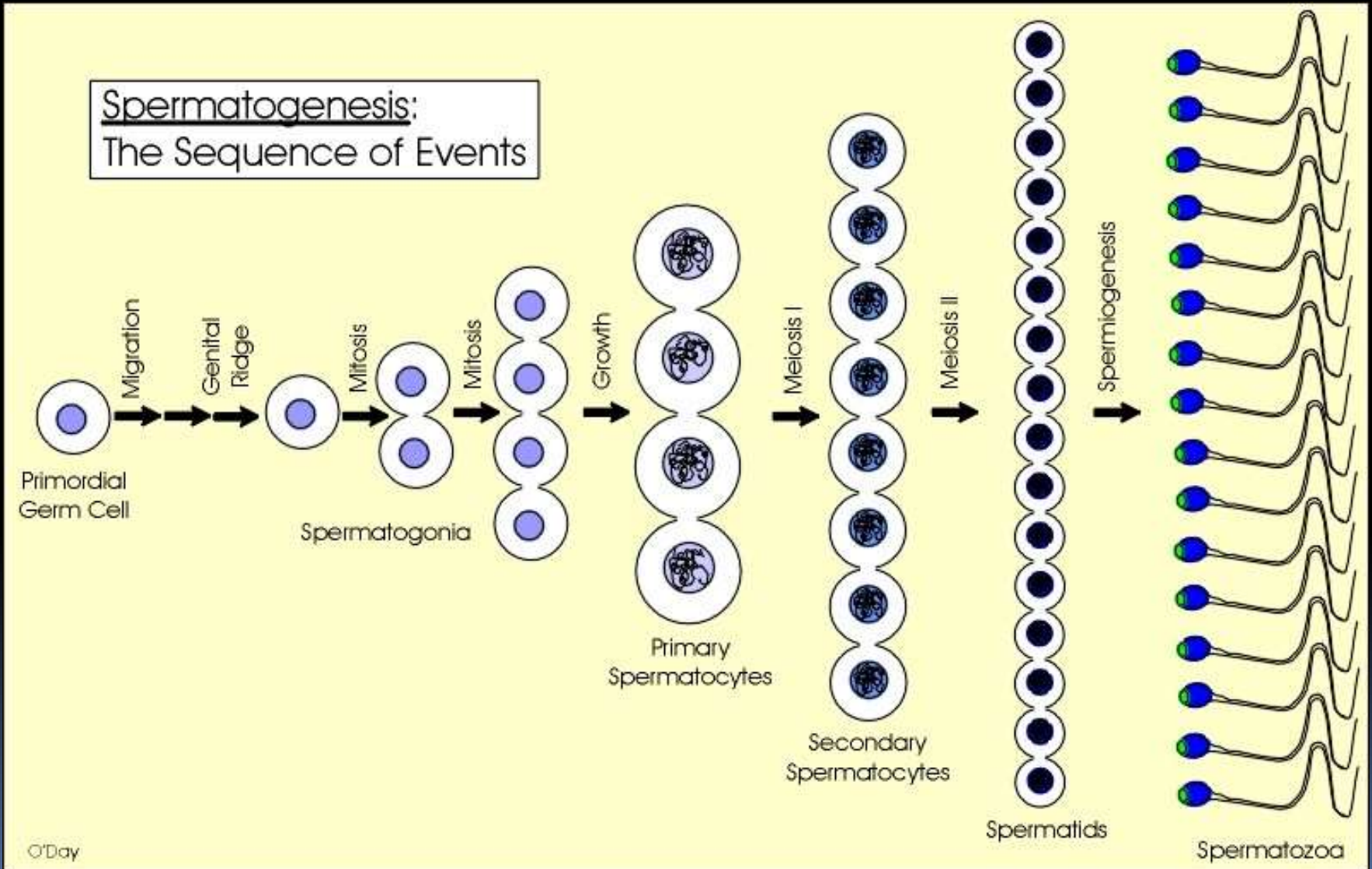
- **Σύνδρομο Kallman** και **ιδιοπαθής υπογοναδοτροπικός υπογοναδισμός** (υπεύθυνα γονίδια KAL, FGFR1, DAX1 \Rightarrow ανεπάρκεια GnRH, ανοσμία).
- **Υπερπρολακτιναιμία** (προλακτίνωμα, φάρμακα, υποθυρεοειδισμός, νεφρική ανεπάρκεια \Rightarrow μείωση libido, υπογονιμότητα).
- **Σύνδρομο Prader - Willi** (γονίδια στο 15p \Rightarrow υποπλασία γεννητικών οργάνων).
- **Συγγενής υπερπλασία επινεφριδίων** (αυτοσωμικά γονίδια \Rightarrow ανεπάρκεια ενζύμων).
- **Σύνδρομο αντίστασης στα ανδρογόνα (μετάλλαξη γονιδίου υποδοχέα ανδρογόνων (Xq) \Rightarrow μη ανάπτυξη IIγενών ανδρικών χαρακτηριστικών, ποικιλία φαινοτύπων).**

Ουρολογικά προβλήματα σχετιζόμενα με ανδρική υπογονιμότητα

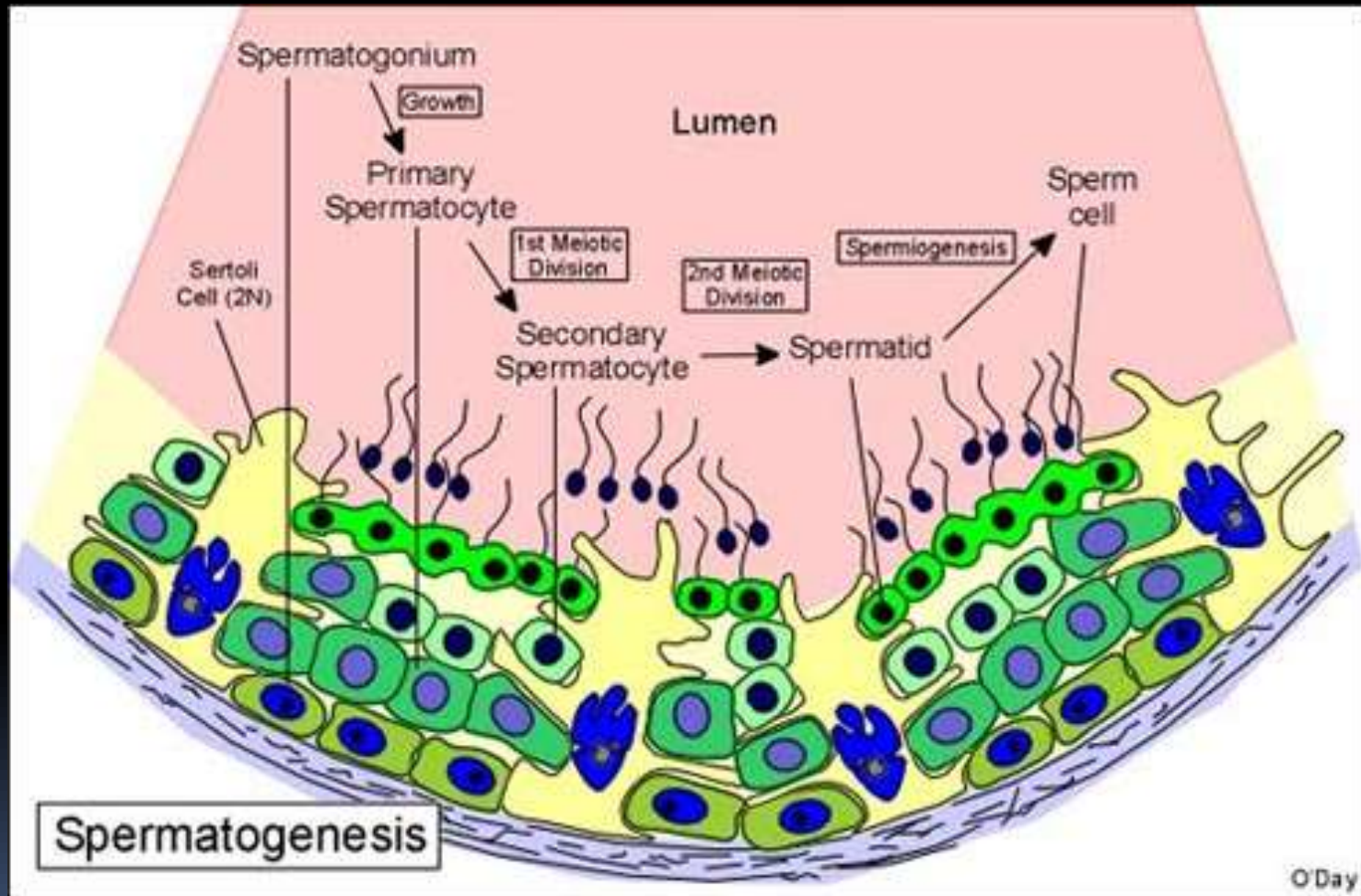
- **Κιρσοκήλη** (συνήθως μείωση κινητικότητας σπ/ρίων).
- **Συστροφή όρχεως**
- **Κρυφορχία**
- **Ανορχία**
- **Καρκίνος των όρχεων**
- **Λοιμώξεις** (ορχίτιδα, επιδιδυμίτιδα, φλεγμονή των σπερματοδόχων κύστεων, προστατίτιδα, ουρηθρίτιδα, σεξουαλικά μεταδιδόμενες νόσοι).



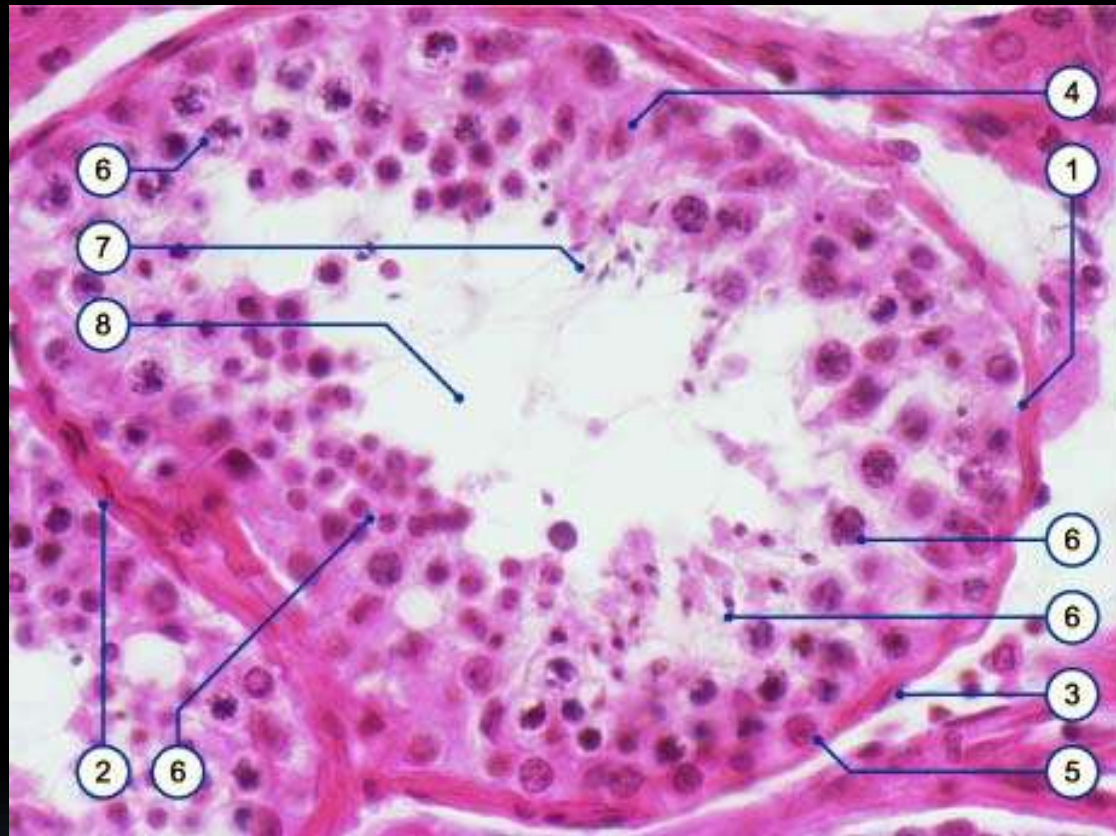
Σπερματογένεση



Σπερματογένεση



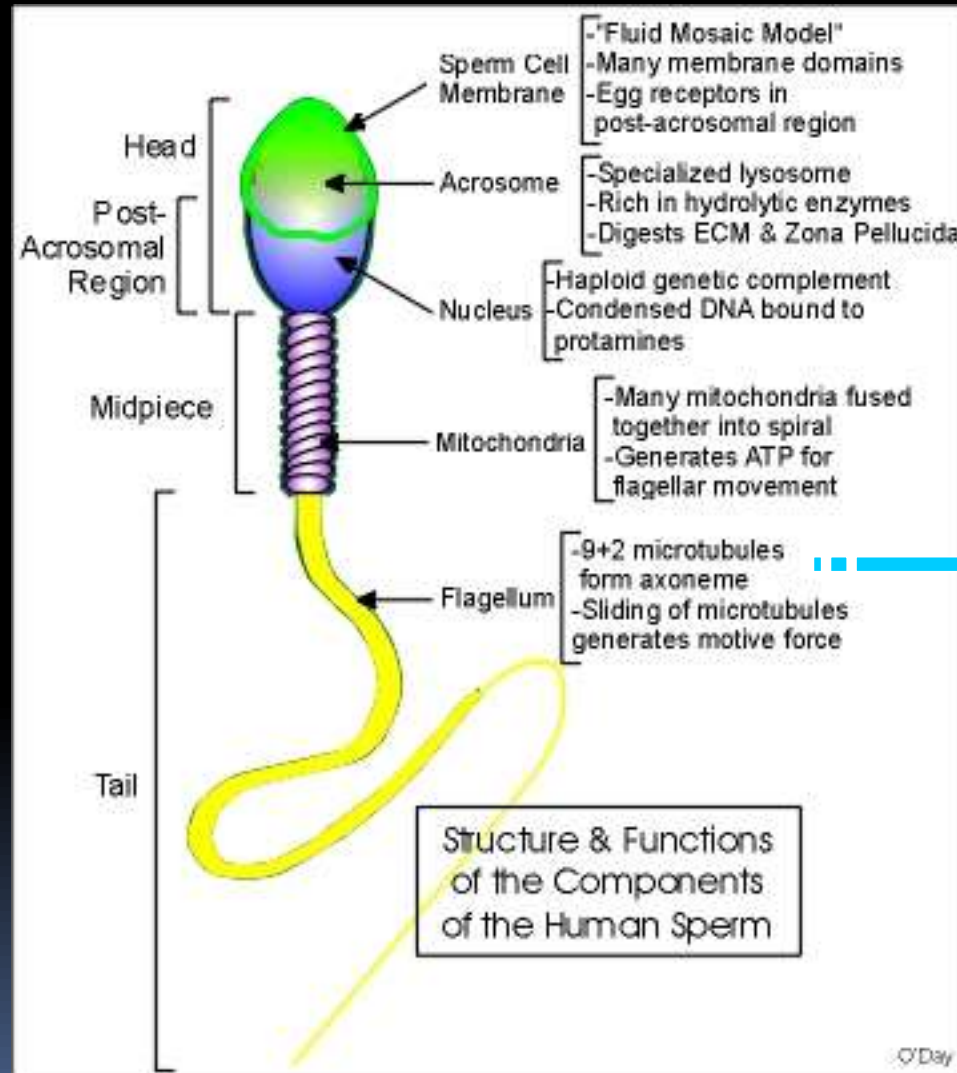
Τομή ορχικού σωληναρίου



1. Basal lamina (membrane) (not recognizable)
2. Myofibroblast
3. Fibrocyte
4. Sertoli's cell
5. Spermatogonia

6. Various stages of the germ cells during spermatogenesis
7. Spermatozoon
8. Lumen

Δομές σπερματοζωαρίου



Οδηγίες συλλογής δείγματος σπέρματος για σπερμοδιάγραμμα

- 📄 Αποχή από σεξουαλικές επαφές από 2 έως 7 ημέρες.
- 📄 Συλλογή ολόκληρης της ποσότητας του δείγματος σε αποστειρωμένο δοχείο (π.χ. δοχείο συλλογής ούρων).



- 📄 Παράδοση του δείγματος στο εργαστήριο σε λιγότερο από 1 ώρα από τη στιγμή της συλλογής (διατήρηση δείγματος σε θερμοκρασία $\sim 37^{\circ} \text{C}$) ή συλλογή του δείγματος σε χώρο κοντά στο εργαστήριο.
- 📄 Όταν δεν είναι δυνατή η συλλογή δείγματος με αυνανισμό, χρησιμοποιούνται μόνο ειδικά προφυλακτικά (μη τοξικά για τα σπ/ρια).

ΣΠΕΡΜΟΔΙΑΓΡΑΜΜΑ

Μακροσκοπική εξέταση

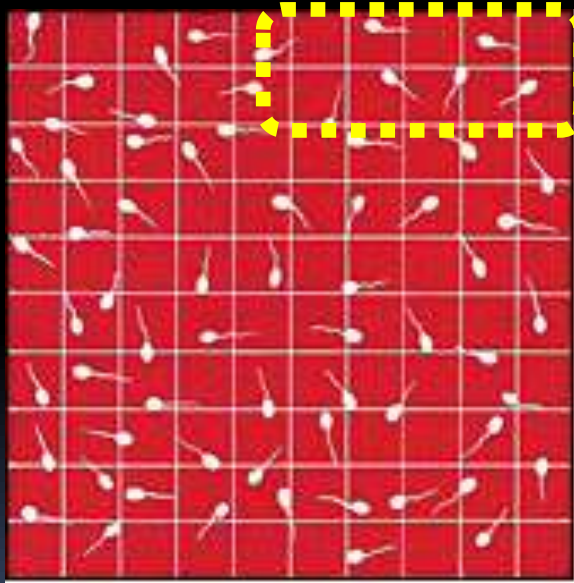
- Ρευστοποίηση
- Εμφάνιση
- Όγκος
- Ιξώδες
- pH

Μικροσκοπική διερεύνηση

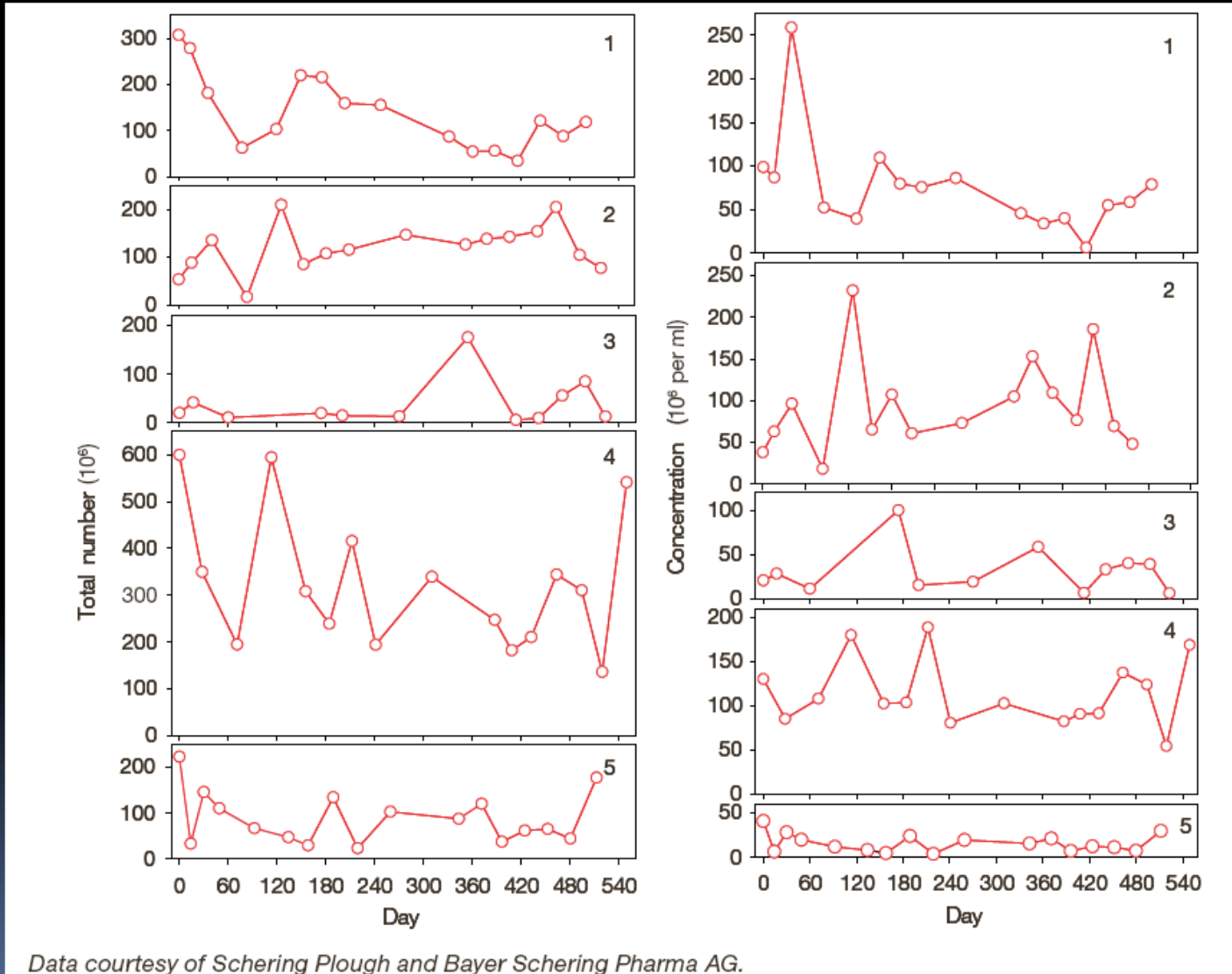
- Συγκέντρωση σπερματοζωαρίων
- Κινητικότητα
- Μορφολογία
- Παρουσία άλλων κυτταρικών στοιχείων
- Συγκολλήσεις

ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΩΝ

- Μετρώνται τα σπερματοζωάρια σε εκατομμύρια σπ/ρίων / ml (συγκέντρωση σπ/ρίων).



Διακυμάνσεις στη συγκέντρωση των σπερματοζωαρίων 5 ανδρών στη διάρκεια 1,5 έτους



Data courtesy of Schering Plough and Bayer Schering Pharma AG.

ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΚΙΝΗΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΩΝ

• Τα σπερματοζώαρια κατατάσσονται στις εξής κατηγορίες:

A : Ταχεία προωθητική κίνηση (≥ 5 μήκη κεφαλής
σπ/ρίου / sec).

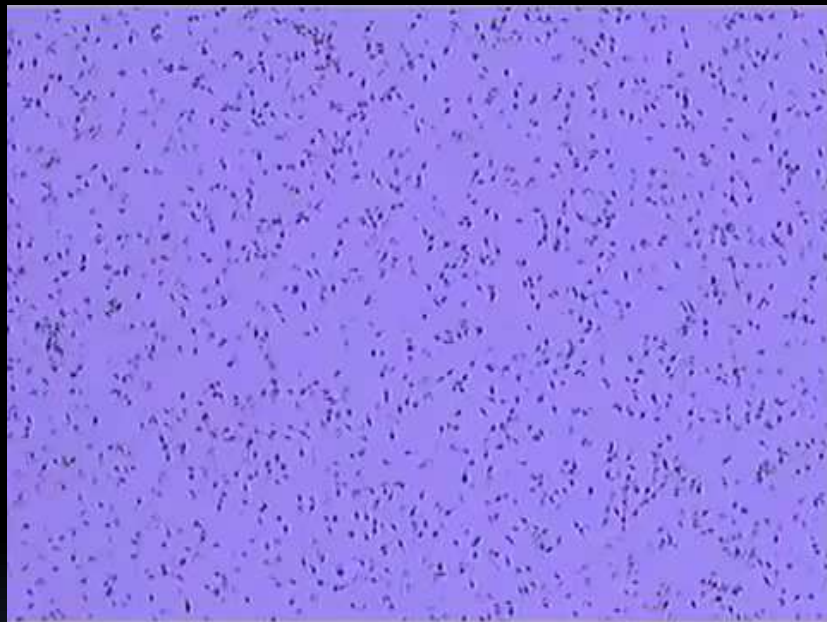
B : Βραδεία προωθητική κίνηση

Γ : Νωθρή επιτόπια κίνηση

Δ : Ακίνησια



• Έκφραση των τεσσάρων κατηγοριών κινητικότητας σε ποσοστά %.







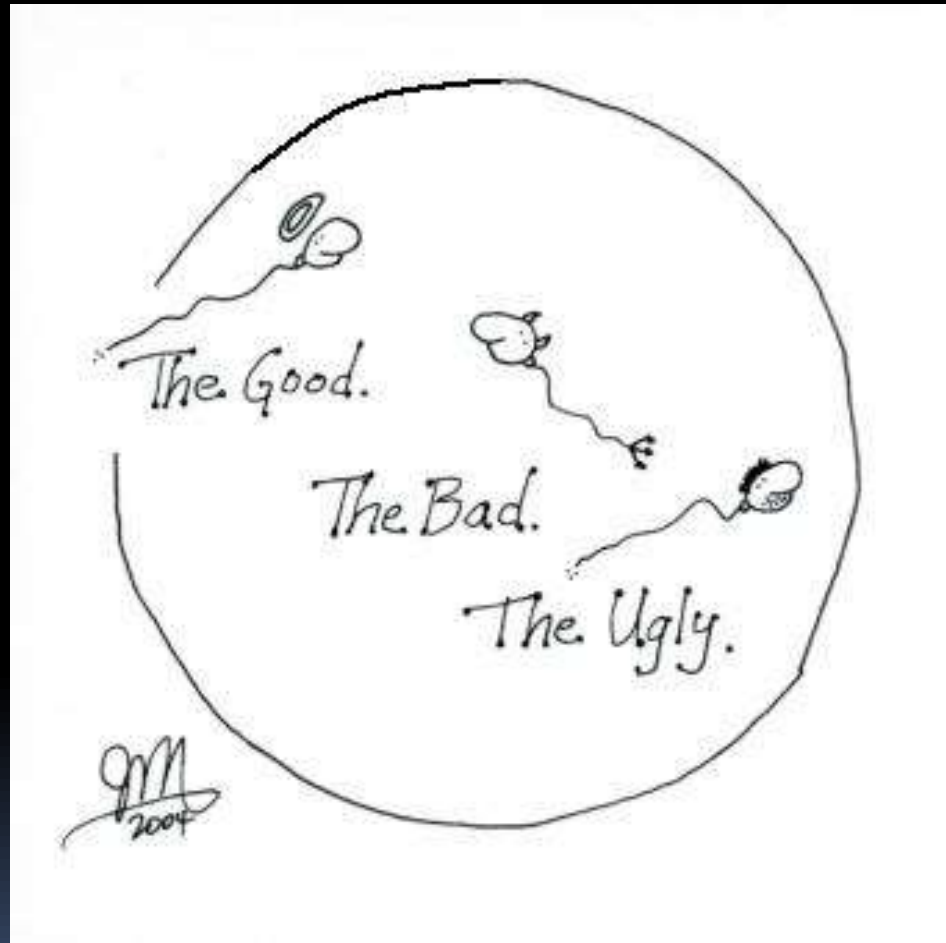
- Οι μετρήσεις των ποσοστών κινητικότητας σπ/ρίων πραγματοποιούνται αμέσως μετά τη ρευστοποίηση του δείγματος και επαναλαμβάνονται 3 και 24 ώρες μετά.

Παράδειγμα

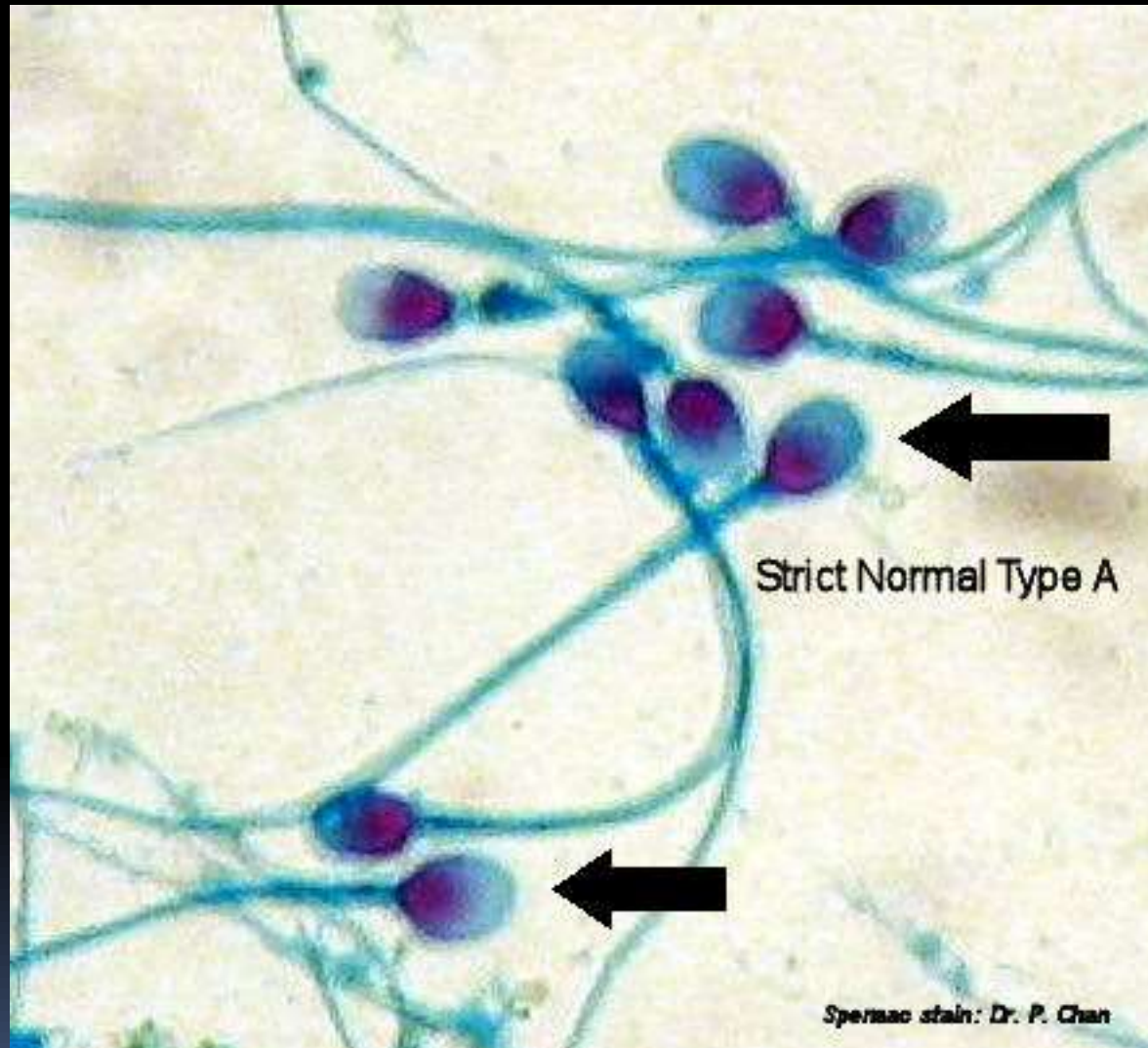
ΩΡΑ	% ΚΙΝΗΤΑ	ΕΚ ΤΩΝ ΚΙΝΗΤΩΝ			% ΑΚΙΝΗΤΑ
		% ΤΑΧΕΙΑ ΠΡΩΘΗΤΙΚΗ ΚΙΝΗΣΗ	% ΒΡΑΔΕΙΑ ΠΡΩΘΗΤΙΚΗ ΚΙΝΗΣΗ	% ΝΩΘΗ ΕΠΙΤΟΠΙΑ ΚΙΝΗΣΗ	
1 ^η	89	33	44	12	11
3 ^η	60	22	38	9	31
24 ^η	12	1	8	3	88

Τ.Α.: $\geq 32\%$ με ταχεία και βραδεία προωθητική κίνηση ή $\geq 40\%$ με συνολική κινητικότητα την 1η ώρα.

ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΩΝ

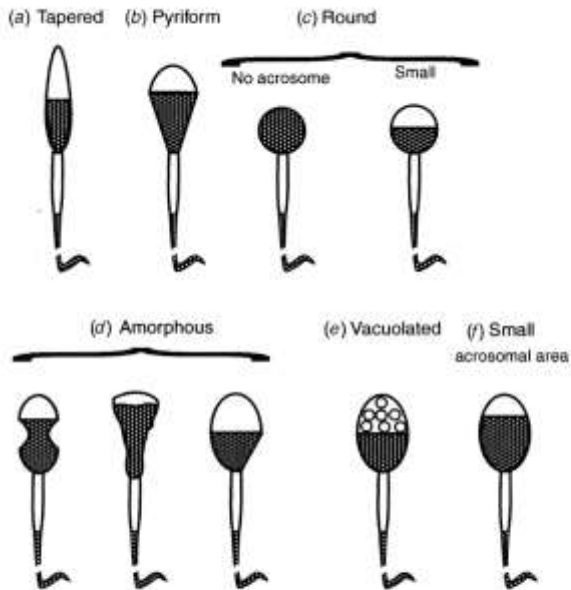


Φυσιολογικό σπερματοζωάριο

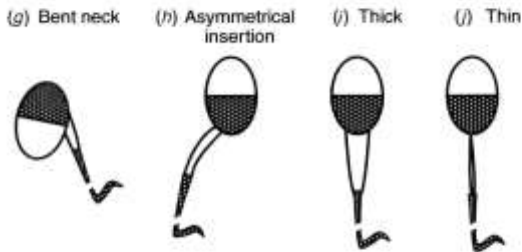


ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΕΣ ΑΝΩΜΑΛΙΕΣ

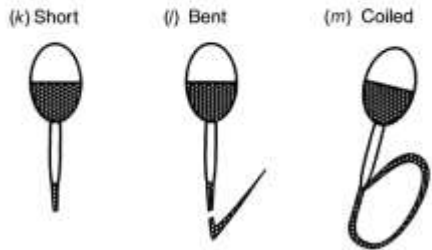
A. Head defects



B. Neck and midpiece defects



C. Tail defects



D. Cytoplasmic droplet



Κεφαλής

(Μακροκέφαλα, μικροκέφαλα, στρογγυλές, επιμήκεις, πολλαπλές κεφαλές κλπ).



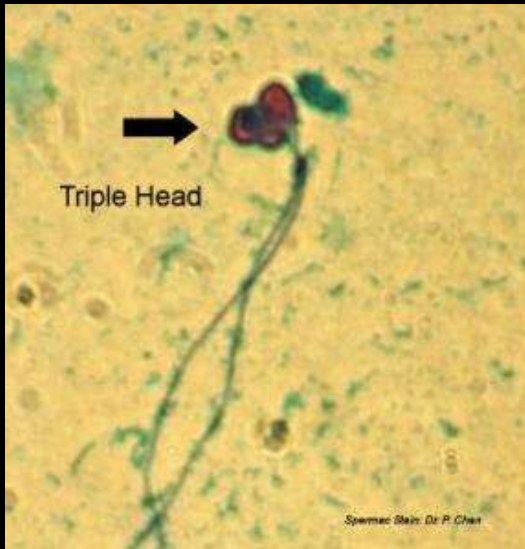
Αυχένα

(Παρουσία κυτταροπλαστικών υπολειμμάτων, έλλειψη μέσου τμήματος, παχύς ή λεπτός αυχέννας κλπ).

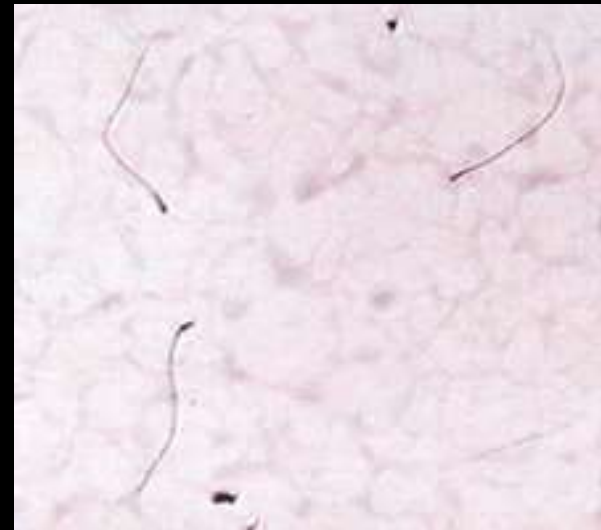


Ουράς

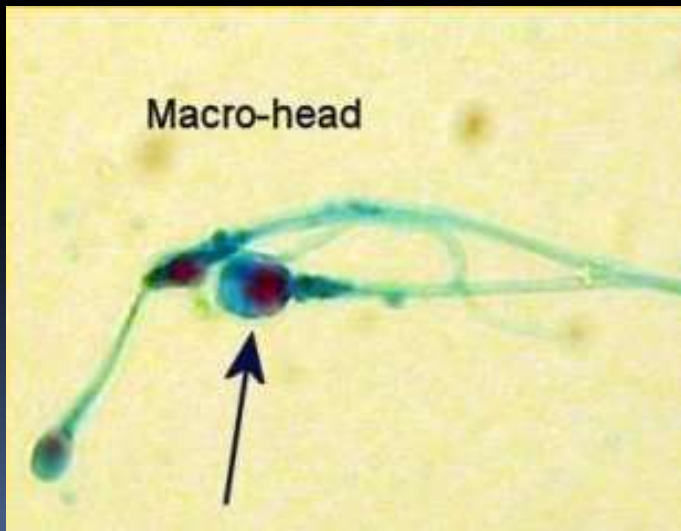
(Πολλαπλές, γωνιώδεις, βραχείες, σπειροειδείς, σπασμένες ουρές κλπ).



Triple Head



Pinheads

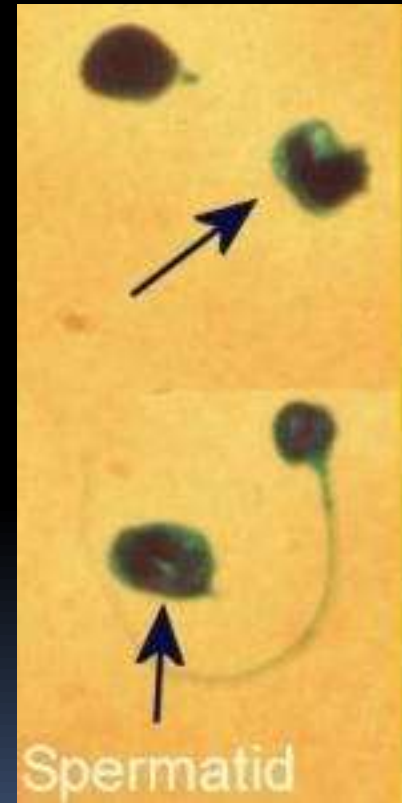


Macro-head



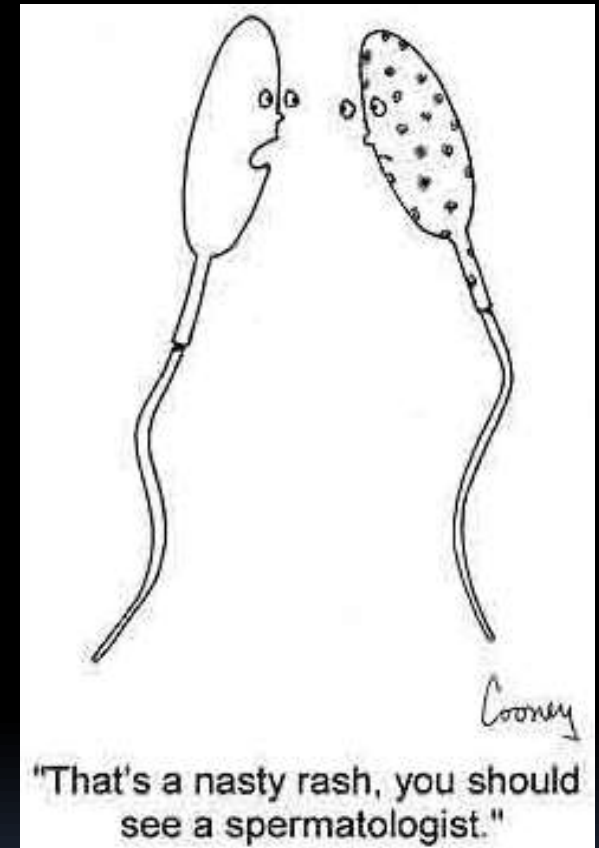
Globozoospermia

Σπερματίδες



Παράδειγμα

% ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ	8
% ΑΝΩΜΑΛΕΣ ΜΟΡΦΕΣ	92
% ΑΝΩΜΑΛΙΕΣ ΚΕΦΑΛΗΣ Μακροκέφαλα, μικροκέφαλα, στρογγυλές, επιμήκεις, πολλαπλές	88
% ΑΝΩΜΑΛΙΕΣ ΜΕΣΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ Παρουσία κυτταροπλασματικών υπολειμμάτων, έλλειψη μέσου τμήματος	6
% ΑΝΩΜΑΛΙΕΣ ΟΥΡΑΣ Πολλαπλές, γωνιώδεις, βραχείες, σπειροειδείς ουρές	17



Τ.Α.: φυσιολογικές μορφές ≥ 4 %

Παρουσία άλλων κυτταρικών στοιχείων

- Επιθηλιακά κύτταρα
 - Κύτταρα προστάτη
 - Κύτταρα σπερματογένεσης *
 - Λευκοκύτταρα **
 - Ερυθροκύτταρα
- Round cells

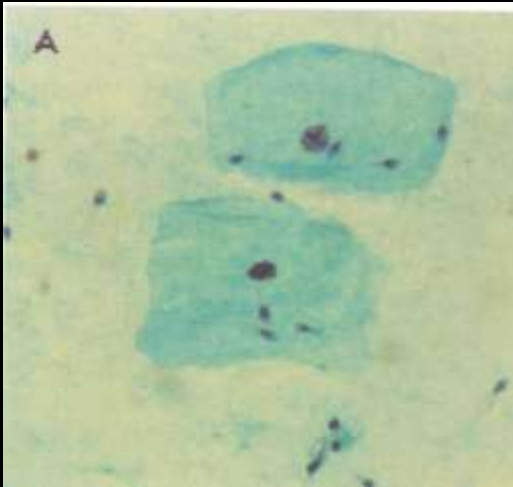
* Αυξημένες ανώριμες μορφές σπ/ρίων ⇒ Πιθανή διαταραχή σπερματογένεσης

** Αυξημένα λευκοκύτταρα ($> 1 \times 10^6 / \text{ml}$)

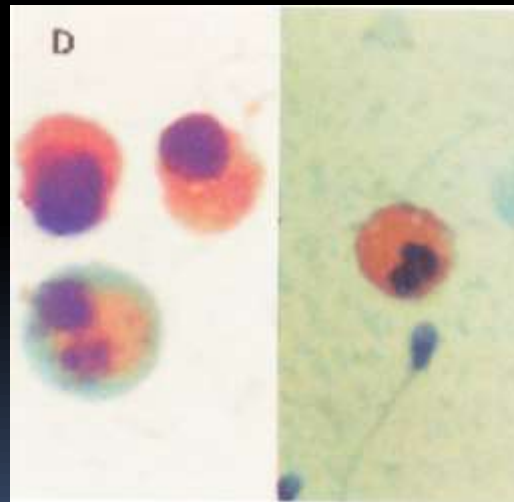
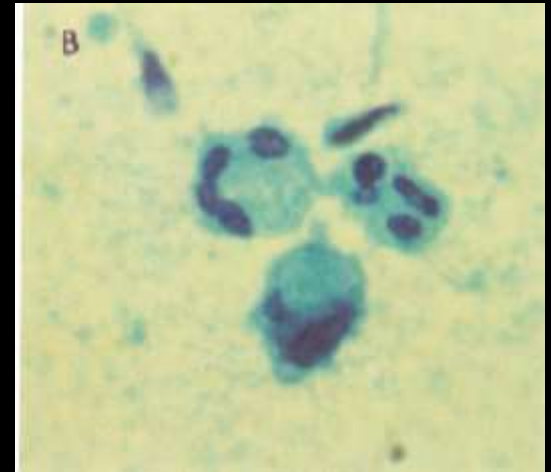


Πιθανή φλεγμονή (απαιτούνται μικροβιολογικές εξετάσεις).

Πλακώδη επιθηλιακά κύτταρα



Λευκοκύτταρα



Σπερματίδες

Συγκολλήσεις σπερματοζωαρίων

- Συγκολλήσεις κεφαλής-κεφαλής.
- Συγκολλήσεις ουράς-ουράς.
- Μεικτές συγκολλήσεις (ουράς-κεφαλής).

Όλες αυτές οι συγκολλήσεις πρέπει να αφορούν κινητά σπερματοζωάρια, για να αξιολογηθούν.

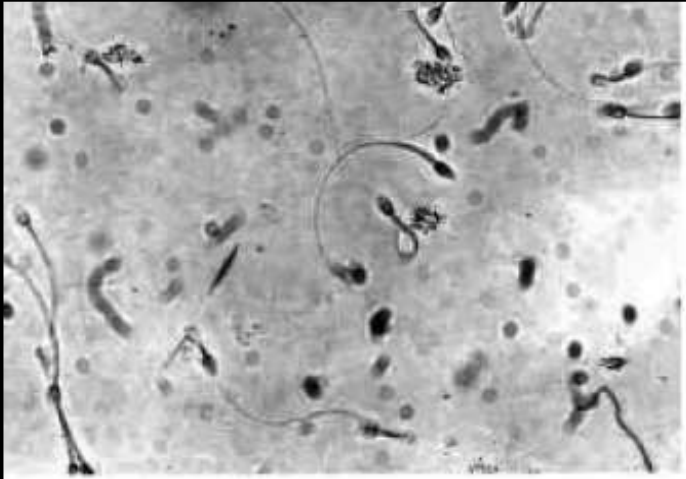


Πιθανά ανοσολογικά αίτια υπογονιμότητας

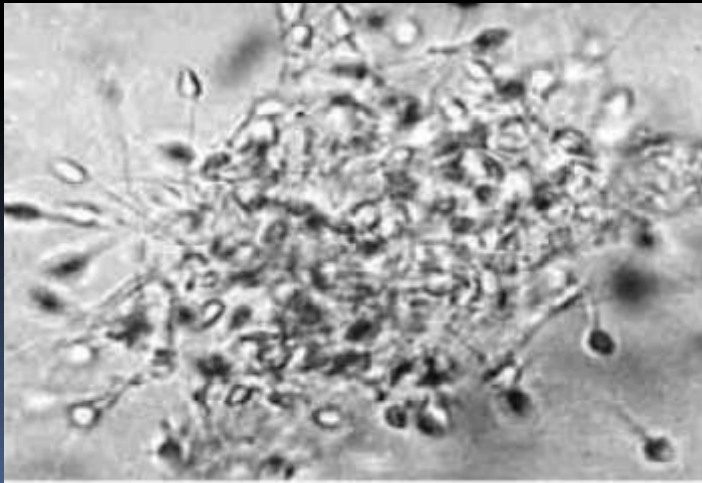
Στο σπερμοδιάγραμμα, αναφέρεται ο τύπος των συγκολλήσεων κεφαλή/ουρά κλπ και βαθμολογούνται από Grade 1 ως 4 (σποραδικές μέχρι 10 σπ/ρια - πολλά σπ/ρια).

Σχηματικό διάγραμμα συγκολλήσεων

Φυσιολογικό δείγμα



Με συγκολλήσεις



Degree of agglutination

Parts involved

1. Isolated (<10 sperm/agglutinate, many free sperm)

2. Moderate (10-50 sperm/agglutinate, free sperm)

3. Large (agglutinates >50 sperm, some sperm still free)

4. Gross (all sperm agglutinated, and agglutinates interconnected)

A. Head-to-head



B. Tail-to-tail (heads are seen to be free and move clear of agglutinates)



C. Tail-tip-to-tail-tip



D. Mixed (clear head-to-head and tail-to-tail agglutinations)



E. Tangle (heads and tails enmeshed. Heads are not clear of agglutinates as they are in tail-to-tail agglutination)



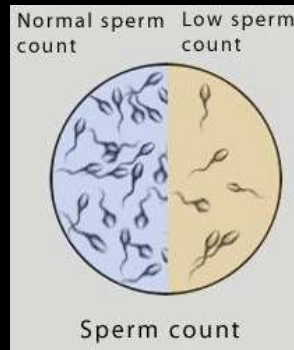
ΤΙΜΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ ΣΠΕΡΜΟΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΟΣ (WHO 2010)

Table A1.1 Lower reference limits (5th centiles and their 95% confidence intervals) for semen characteristics

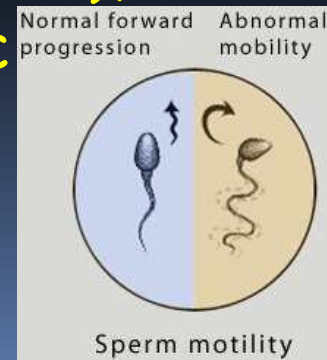
Parameter	Lower reference limit
Semen volume (ml)	1.5 (1.4–1.7)
Total sperm number (10^6 per ejaculate)	39 (33–46)
Sperm concentration (10^6 per ml)	15 (12–16)
Total motility (PR + NP, %)	40 (38–42)
Progressive motility (PR, %)	32 (31–34)
Vitality (live spermatozoa, %)	58 (55–63)
Sperm morphology (normal forms, %)	4 (3.0–4.0)
<i>Other consensus threshold values</i>	
pH	≥7.2
Peroxidase-positive leukocytes (10^6 per ml)	<1.0
MAR test (motile spermatozoa with bound particles, %)	<50
Immunobead test (motile spermatozoa with bound beads, %)	<50
Seminal zinc (μmol /ejaculate)	≥2.4
Seminal fructose (μmol /ejaculate)	≥13
Seminal neutral glucosidase (mU/ejaculate)	≥20

ΟΡΙΣΜΟΙ ΔΙΑΤΑΡΑΧΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ

Ολιγοζωοσπερμία: Μειωμένος αριθμός σπερματοζωαρίων, κάτω από 15×10^6 /ml ή κάτω από 39×10^6 στο συνολικό όγκο του δείγματος.

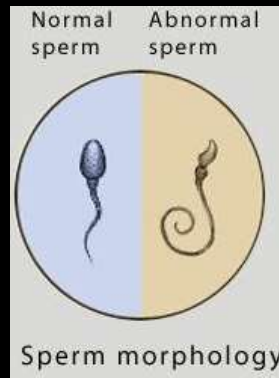


Ασθενοζωοσπερμία: Ασθενής κινητικότητα σπερματοζωαρίων (από την 1η ώρα των παρατηρήσεων), δηλαδή λιγότερο από 40% των σπερματοζωαρίων με κίνηση, εκτός αν περισσότερο από 32% των σπερματοζωαρίων έχουν προωθητική κίνηση.



ΟΡΙΣΜΟΙ ΔΙΑΤΑΡΑΧΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ

Τερατοζωοσπερμία: Ποσοστό σπερματοζωαρίων με φυσιολογική μορφολογία (αυστηρά κριτήρια Kruger) μικρότερο του 4 %.



Ολιγοασθενοτερατοζωοσπερμία: Συνύπαρξη μειωμένου αριθμού, ασθενούς κινητικότητας και αυξημένων μορφολογικών ανωμαλιών των σπερματοζωαρίων.

Αζωοσπερμία: Δεν παρατηρούνται σπερματοζωάρια στο δείγμα (ακόμα και μετά από φυγοκέντρηση του δείγματος και επανέλεγχο του ιζήματος).

Διακρίνεται σε αποφρακτική και μη αποφρακτική.

Αποφρακτική

Οφείλεται σε επίκτητη απόφραξη αμφότερων των εκφορητικών σπερματικών οδών (λόγω φλεγμονής ή τραυματισμού), σε συγγενή απλασία ή δυσπλασία τους, σε συγγενή αμφοτερόπλευρη έλλειψη των σπερματικών πόρων.

Μη αποφρακτική

Έλλειψη παραγωγής σπερματοζωαρίων, η οποία μπορεί να είναι ιδιοπαθής ή να οφείλεται σε χρωμοσωμικές ανωμαλίες, λοιμώξεις (πχ. παρωτίτιδα σε μεγάλη ηλικία) και φλεγμονές, κρυσορχία, τραυματισμούς, ακτινοβολία, χημειοθεραπεία, ενδοκρινικά, μεταβολικά ή περιβαλλοντικά αίτια.

Ασπερμία: Απουσία εκσπερμάτισης.

(ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ) ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ

- Σκοπός:
- Απομόνωση σπερματοζωαρίων από λευκοκύτταρα, επιθηλιακά κύτταρα, ακίνητα/μορφολογικά ανώμαλα/ανώριμα σπερματοζωάρια, αντισώματα σπερματοζωαρίων, μικροοργανισμούς, τοξικά μόρια.
 - Απόκτηση πληθυσμού σπερματοζωαρίων που είναι :ζωντανά, με προωθητική κίνηση και φυσιολογική μορφολογία.

- Επιλογή μεθόδου ανάλογα με :
- Κινητικότητα
 - Συγκέντρωση
 - Παρουσία άλλων κυτταρικών στοιχείων

ΣΥΝΗΘΕΙΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ

SWIM-UP

- Για σπέρματα με σχετικά καλή κινητικότητα, ακατάλληλη για σπέρματα με έντονη παρουσία άλλων κυτταρικών στοιχείων

ΜΕΘΟΔΟΣ ΚΛΑΣΜΑΤΩΝ ΔΙΑΒΑΘΜΙΣΜΕΝΗΣ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑΣ (Density gradient centrifugation)

- Βασίζεται στην πυκνότητα και όχι στην κινητικότητα των σπερματοζωαρίων. Κατάλληλη για δείγματα με αντισπερμικά αντισώματα και έντονη παρουσία κυτταρικών στοιχείων.

Ενδομήτρια Σπερματέγχυση (IUI)

- **Ενεργοποίηση σπέρματος**

Στόχος:

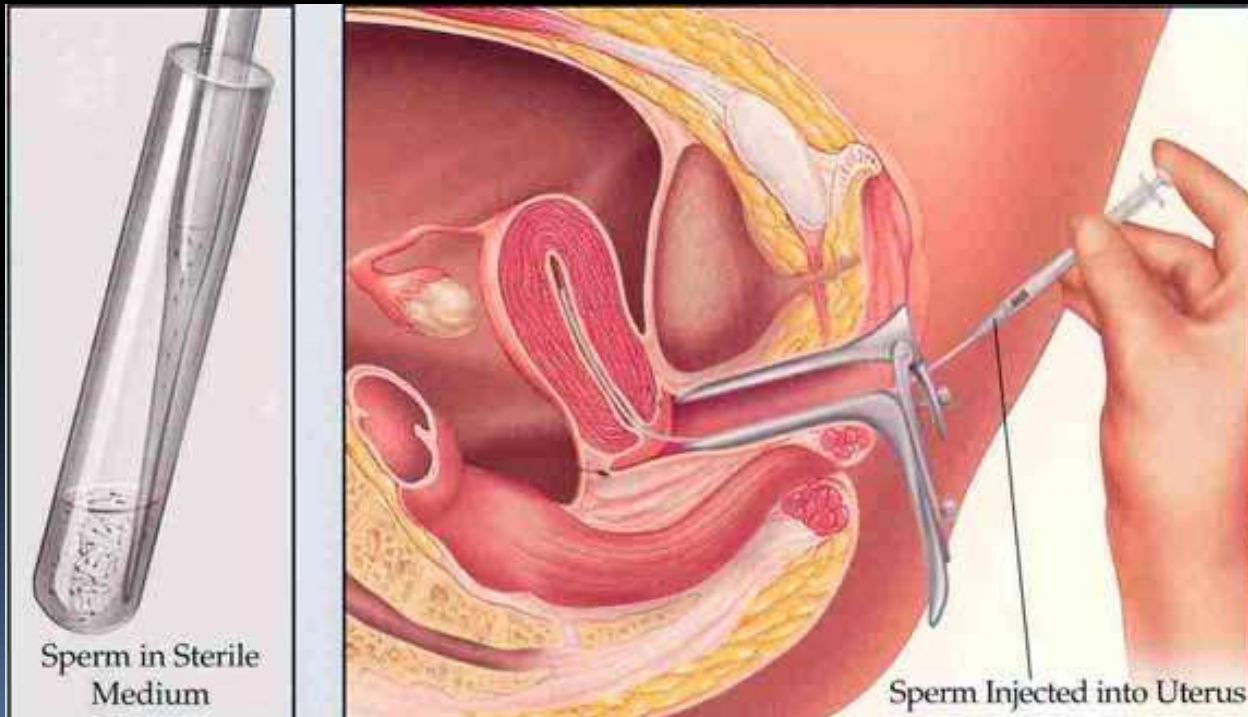
Απομόνωση σπερματοζωαρίων από λευκοκύτταρα, επιθηλιακά κύτταρα, ακίνητα/μορφολογικά ανώμαλα/ανώριμα σπερματοζωάρια, αντισώματα σπερματοζωαρίων, μικροοργανισμούς, τοξικά μόρια.

Απόκτηση πληθυσμού σπερματοζωαρίων που είναι : ζωντανά, με προωθητική κίνηση και φυσιολογική μορφολογία.

- **Πρόκληση πολλαπλής ωοθυλακιορρηξίας με GnRH-ανάλογα ή κιτρική κλομιφαίνη ή γοναδοτροπίνες (και ένεση hCG)**
- **Σπερματέγχυση αμέσως πριν την ωοθυλακιορρηξία (~36 ώρες μετά hCG)**

ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΑ ΣΠΕΡΜΑΤΕΓΧΥΣΗ

- Λιγότερο επεμβατική μέθοδος.
- Για σπέρματα με συγκέντρωση $> 10 \text{ M/ml}$ (οριακά από 5 M/ml) $\leftarrow [\text{TMS} > 5 \times 10^6]$
- $0.25 - 0.4 \text{ ml}$ ενεργοποιημένου σπέρματος εισάγονται σε σύριγγα και μέσω ειδικού καθετήρα στη μήτρα.



Ενδείξεις Σπερματέγχυσης

Ομόλογη

- ήπιου βαθμού ολιγοασθενοσπερμία ή τερατοζωοσπερμία
- πρόωρη εκσπερμάτιση ή διαταραχές στύσης
- παλίνδρομη εκσπερμάτιση
- αντισώματα στο σπερματικό πλάσμα
- ανεπιτυχής προσπάθεια σύλληψης μετά από επαγωγή ωοθυλακιορρηξίας
- γυναίκες με παθολογικό τραχηλικό παράγοντα
- ζευγάρια με ανεξήγητη στειρότητα

Ετερόλογη

- αζωοσπερμία
- κίνδυνος μετάδοσης κληρονομούμενων γενετικών νοσημάτων
- σεξουαλική ανικανότητα
- παραπληγία
- ανεπιτυχείς ενδοκυτταροπλασματικές εγχύσεις σπερματοζωαρίου (ICSI)
- ζευγάρια που επιθυμούν μια πιο απλή και λιγότερο επεμβατική μέθοδο από την ICSI
- γυναίκες που επιθυμούν εγκυμοσύνη χωρίς σύντροφο

Εξωσωματική Γονιμοποίηση



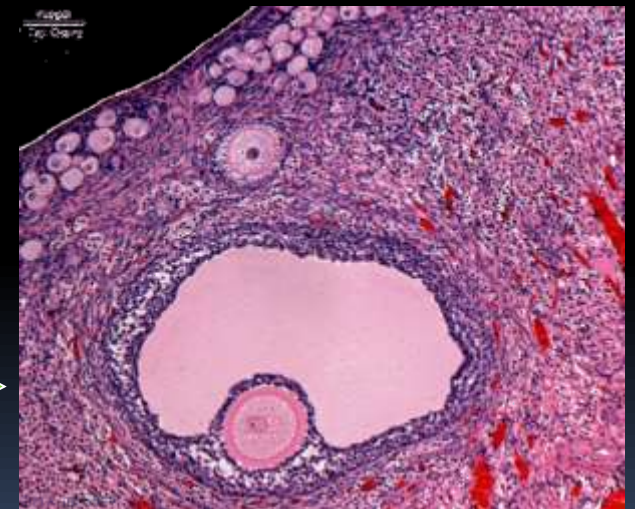
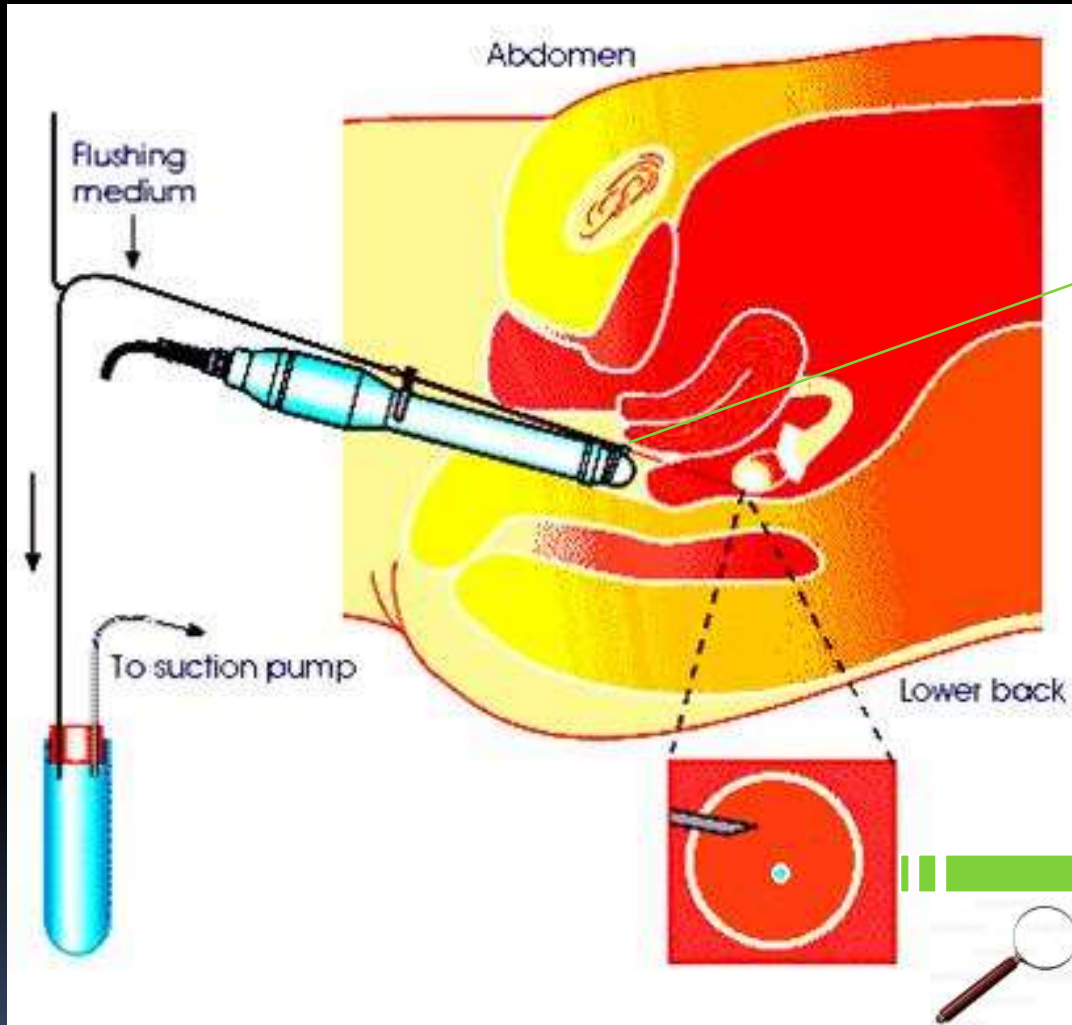
Πρόκληση ωοθυλακιορρηξίας

Φαρμακευτικές ουσίες

- Κιτρική κλομιφαίνη.
- Γοναδοτροπίνες (FSH, LH).
- Ανάλογα υποθαλαμικής ορμόνης (αγωνιστές, ανταγωνιστές).
- Χοριακή γοναδοτροπίνη.

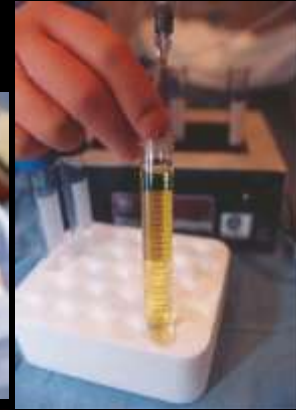
📄 Διάφορα πρωτόκολλα ελεγχόμενης διέγερσης ωοθηκών (μακρύ, βραχύ, πρωτόκολλο ανταγωνιστή κλπ.).

ΩΟΛΗΨΙΑ



ΔΙΑΛΟΓΗ ΩΑΡΙΩΝ

- Συλλογή ωοθυλακικού υγρού σε δοκιμαστικούς σωλήνες κατά την ωληψία.



- Μεταφορά του υγρού σε τρυβλία και αναζήτηση ωαρίων κάτω από στερεοσκόπιο.



- Εντοπισμός και «ξέπλυμα» ωαρίων.

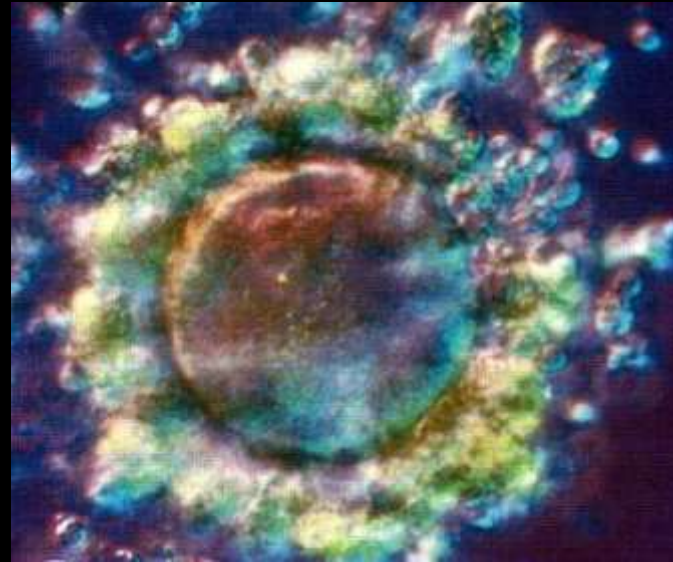
- Μεταφορά ωαρίων σε μικροσταγόνες καλλιεργητικού μέσου.



- Παραμονή για ~ 3 ώρες σε επωαστή (37 ° C, 5 ή 6 % CO₂).

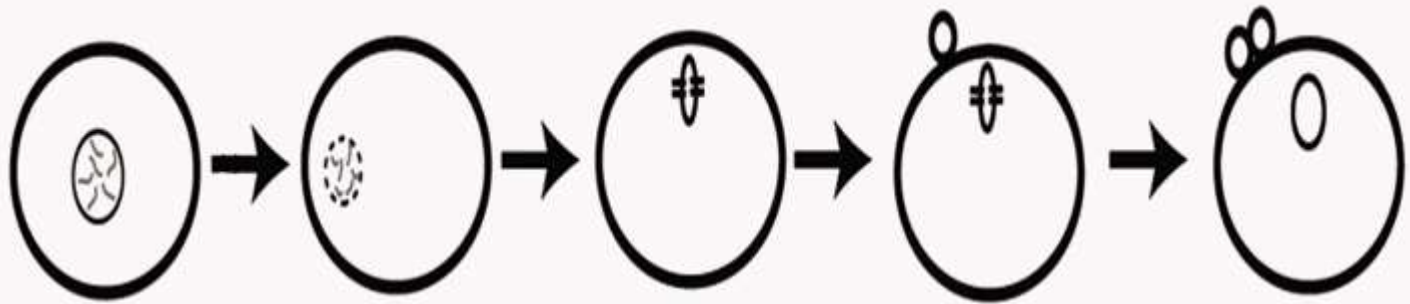


ΟΟCΥΤΕ CUMULUS COMPLEX



Ωάριο μέσα σε σύμπλεγμα θυλακιακών κυττάρων, μετά την ωληψία.





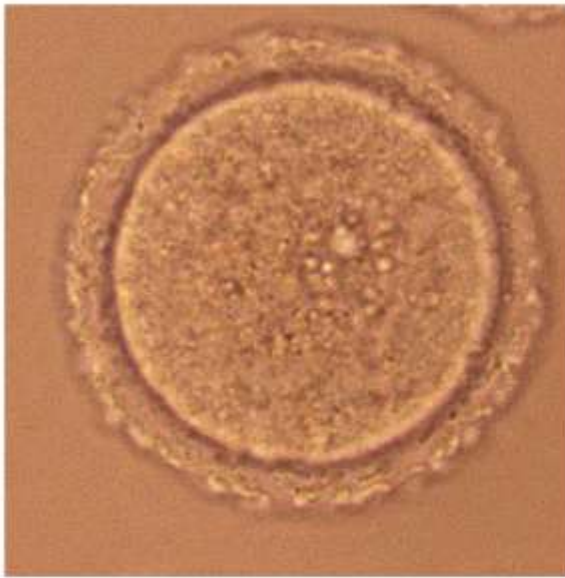
Germinal
Vesicle
(GV)

GVBD

metaphase I

metaphase II

pronucleus

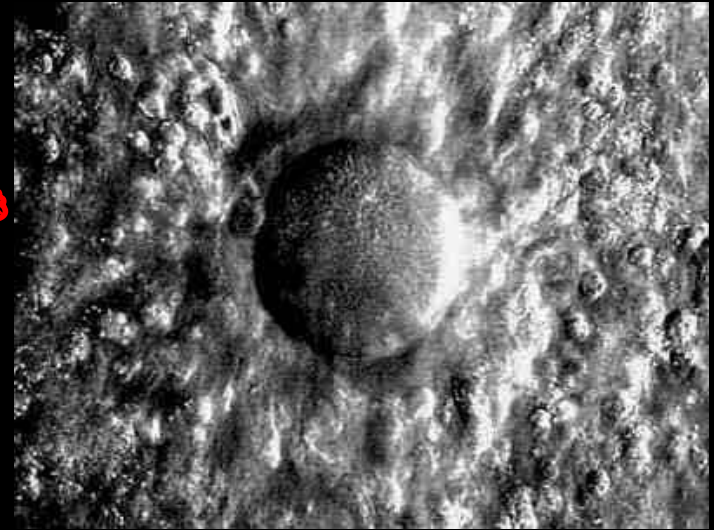
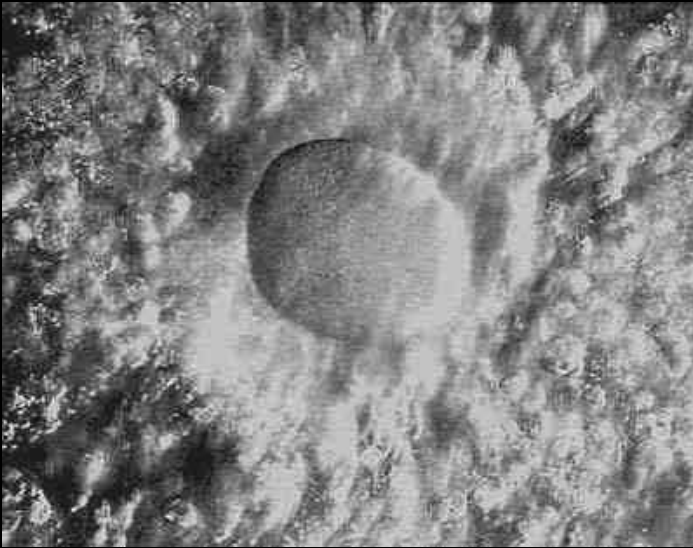


immature oocyte



mature oocyte

ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΩΑΡΙΩΝ



Παράγοντες που επηρεάζουν την ποιότητα των ωαρίων

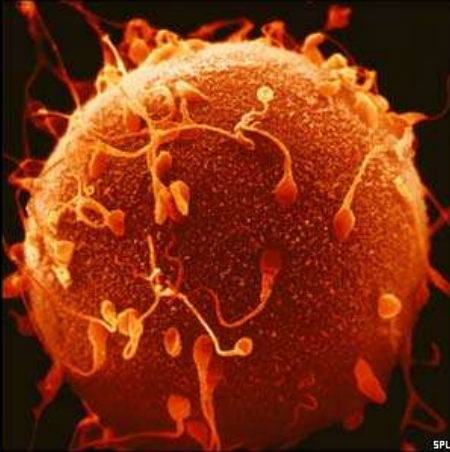
✓ Ηλικία γυναίκας



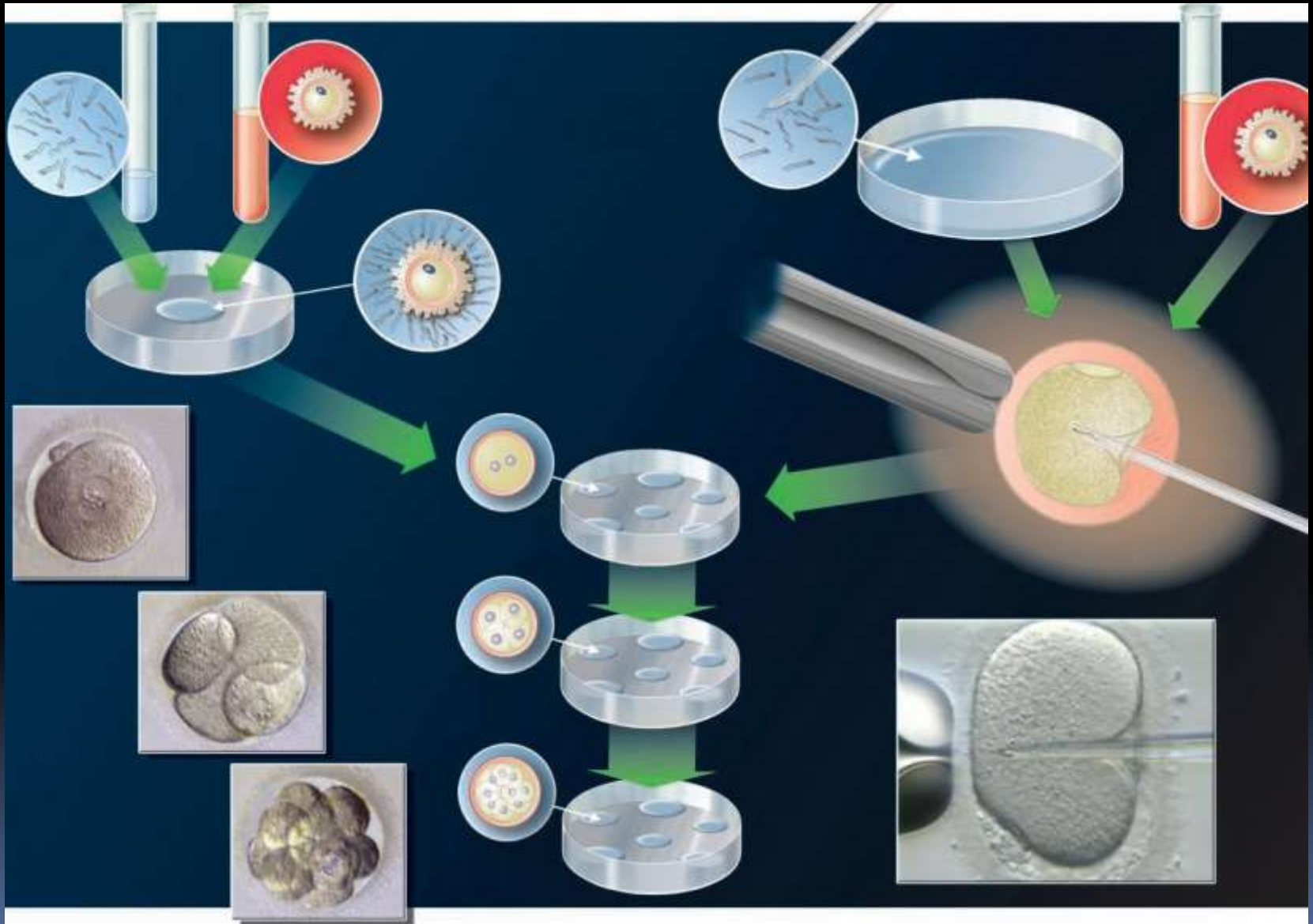
✓ Πρωτόκολλο διέγερσης



IVF ή ICSI (Μικρογονιμοποίηση) :



IVF ή ICSI (Μικρογονιμοποίηση) :



IVF ή ICSI (Μικρογονιμοποίηση) :

Ενδείξεις για ICSI :

- «Φτωχό» σπέρμα :

< 5×10^6 σπ/ρια /ml

< 30% προωθητικά κινούμενα σπ/ρια.

< 4% φυσιολογικές μορφές (αυστηρά κριτήρια)

- Αποτυχημένες/ μικρά ποσοστά γονιμοποίησης

σε προηγούμενες IVF.

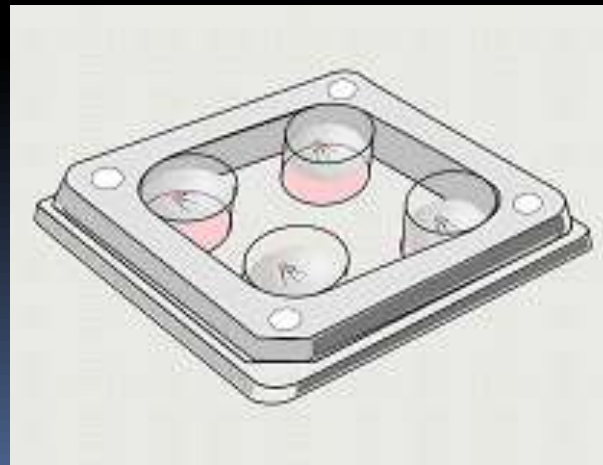
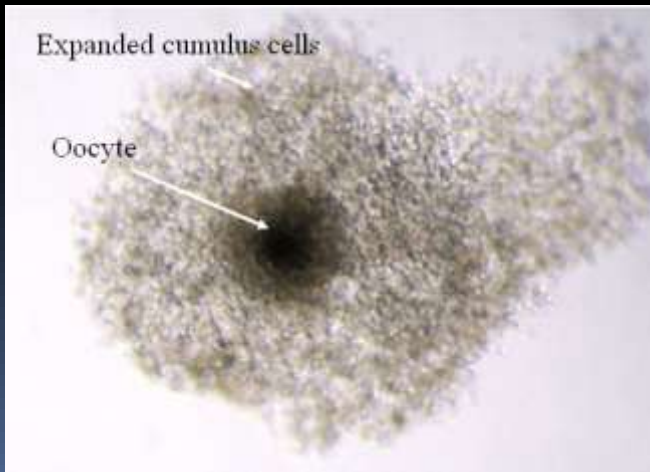
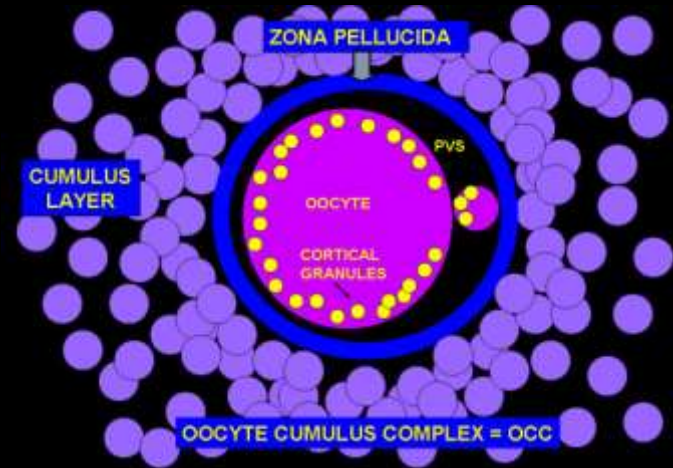
- Υψηλές συγκεντρώσεις αντισπερμικών αντισωμάτων.

- Απουσία σπ/ρίων στο σπέρμα (MESA/PESA, TESA/TESE).

- PGT (προεμφυτευτικό γενετικό τεστ).

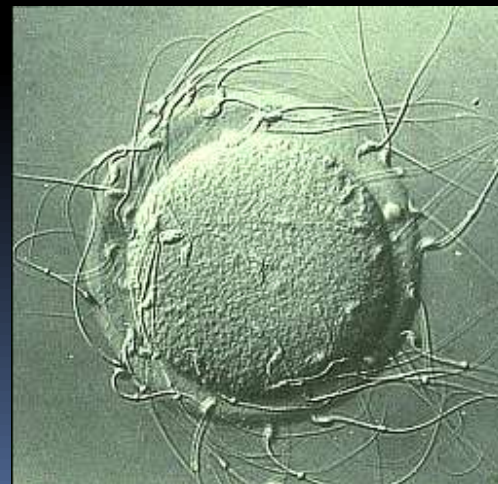
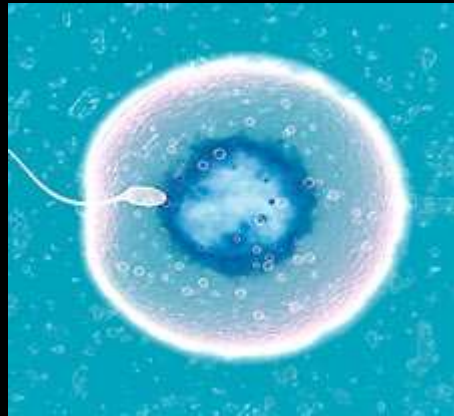
IVF

- Εντοπισμός και μεταφορά COCs (Cumulus Oocyte Complexes) σε καλλιεργητικό υλικό.



IVF

Ενεργοποίηση σπέρματος και σπερματέγχυση ωαρίων
(~ 100.000 σπερματοζωάρια/ ml).



IVF

Παραμονή σε επωαστή για 1 ώρα (ή όλη νύχτα), (37°C , 5 ή 6 % CO_2).



ΗΜΕΡΑ 1η (Έλεγχος γονιμοποίησης)

👉 2 PN \Rightarrow συνέχιση καλλιέργειας

2 PN



3 PN

1 PN

ΗΜΕΡΑ 2η

- Αξιολόγηση εμβρύων

- Αριθμός βλαστομεριδίων

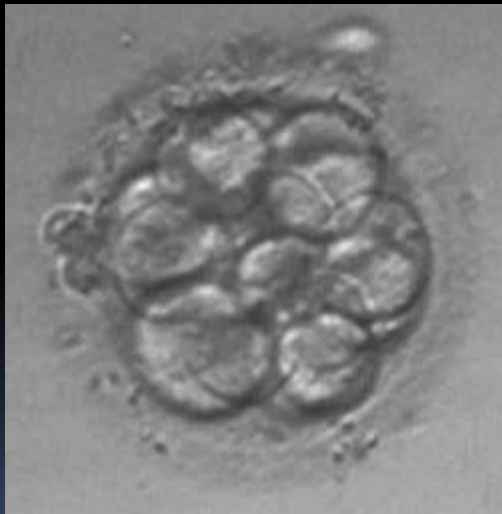
- Μορφολογία (σχήμα, μέγεθος βλαστομεριδίων, θραύσματα)

- Επιλογή καλύτερων εμβρύων για εμβρυομεταφορά

** Εναλλακτικά : Περαιτέρω καλλιέργεια εμβρύων ως το στάδιο της βλαστοκύστης και ET την 5η ημέρα.*



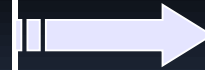
2η ημέρα



**4η ημέρα (μορίδιο) → 4η ημέρα (μορίδιο) → 5η ημέρα (βλαστοκύστη)
compaction**

Αξιολόγηση εμβρύων 2ης-3ης ημέρας

Grade	Εμφάνιση βλαστομεριδίων και ποσοστό θραυσμάτων
1	Ομοιόμορφο σχήμα, ισομεγέθη βλαστομερίδια, μικρό PVS, ομοιόμορφο κυττ/σμα και θραύσματα <5%
2	Μικρές παραμορφώσεις ή ελαφρώς ανισομεγέθη βλαστομερίδια με θραύσματα <5% ή ισομεγέθη βλαστομερίδια με θραύσματα 5-20%
3	Ανισομεγέθη ή παραμορφωμένα βλαστομερίδια και θραύσματα 5-20% ή ομοιόμορφα βλαστομερίδια και θραύσματα 20-50%
4	Θραύσματα >50%

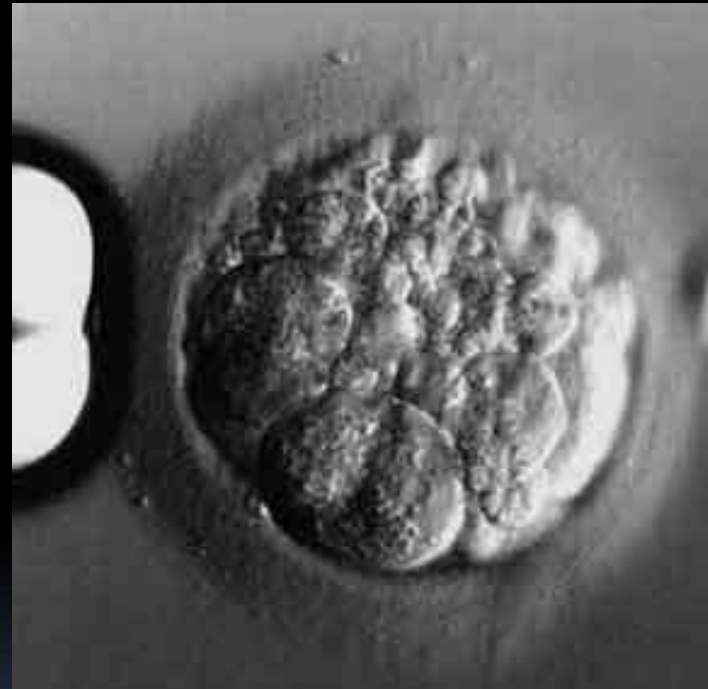


Έμβρυα 4 κυττάρων

(2η ημέρα)



Grade 1



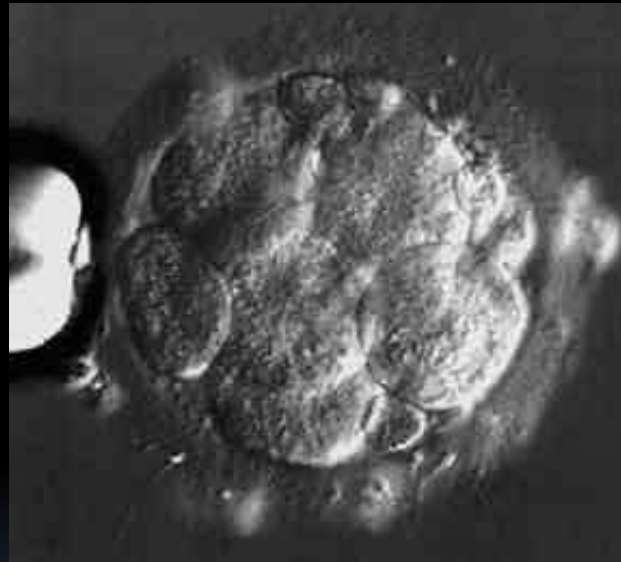
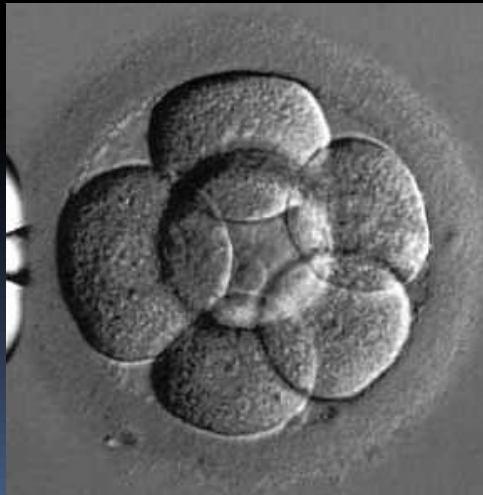
Grade 4

Έμβρυα 8 κυττάρων

(3η ημέρα)



Grade 1









Grade 3

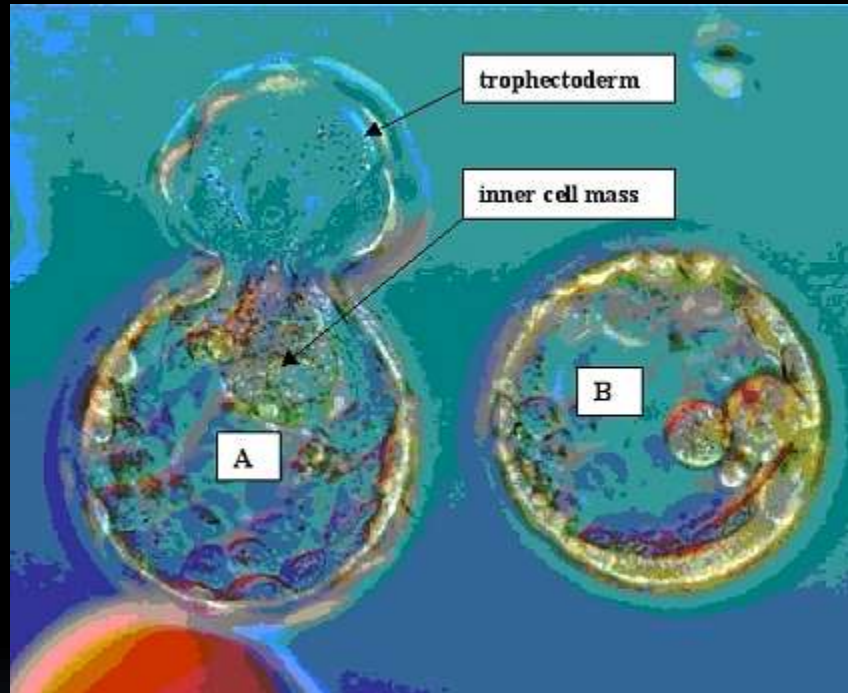


Grade 4

Αξιολόγηση βλαστοκύστης

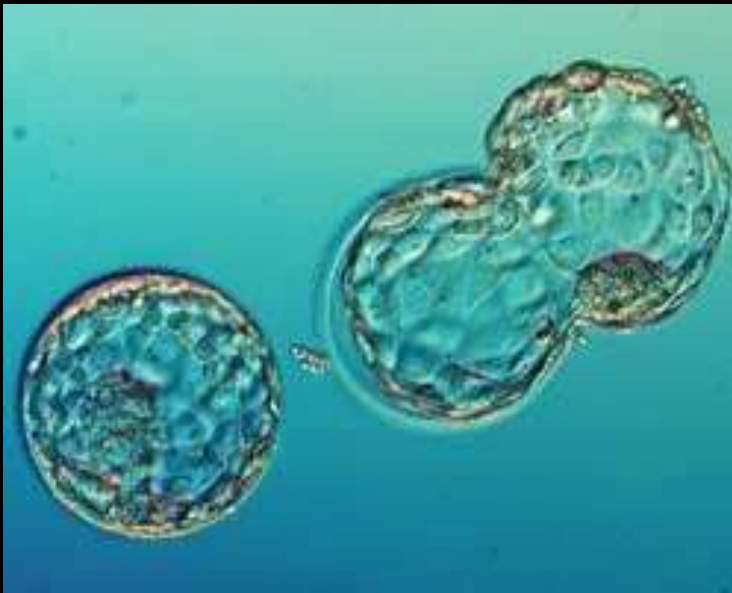
<p>1</p> <p>Early blastocyst</p> <p><i>Blastocoel less than half of the blastocyst</i></p>	 <p>1AA</p>		
<p>2</p> <p>Blastocyst</p> <p><i>Blastocoel more than half of the blastocyst</i></p>	 <p>2AA</p>		
<p>3</p> <p>Blastocyst</p> <p><i>Blastocoel fills the blastocyst</i></p>	 <p>3AA</p>		
<p>4</p> <p>Expanded blastocyst</p> <p><i>The embryo is large and the zona is thin</i></p>	 <p>4AA</p>	 <p>4BB</p>	 <p>4CC</p>
<p>Inner cell mass</p>	<p>A</p> <p><i>Numerous and tightly packed cells</i></p>	<p>B</p> <p><i>Several and loosely packed cells</i></p>	<p>C</p> <p><i>Few cells</i></p>
<p>Trophoectoderm</p>	<p>A</p> <p><i>Many cells organized in epithelium</i></p>	<p>B</p> <p><i>Several cells organized in loose epithelium</i></p>	<p>C</p> <p><i>Few cells</i></p>

Βλαστοκύστες (6η ημέρα ανάπτυξης)



- A: Εκκολαπτόμενη βλαστοκύστη με καλή μορφολογία
B: Βλαστοκύστη με κακή μορφολογία

5η ημέρα (βλαστοκύστη) - hatching



Μορφολογικά κριτήρια επιλογής εμβρύων για εμβρυομεταφορά

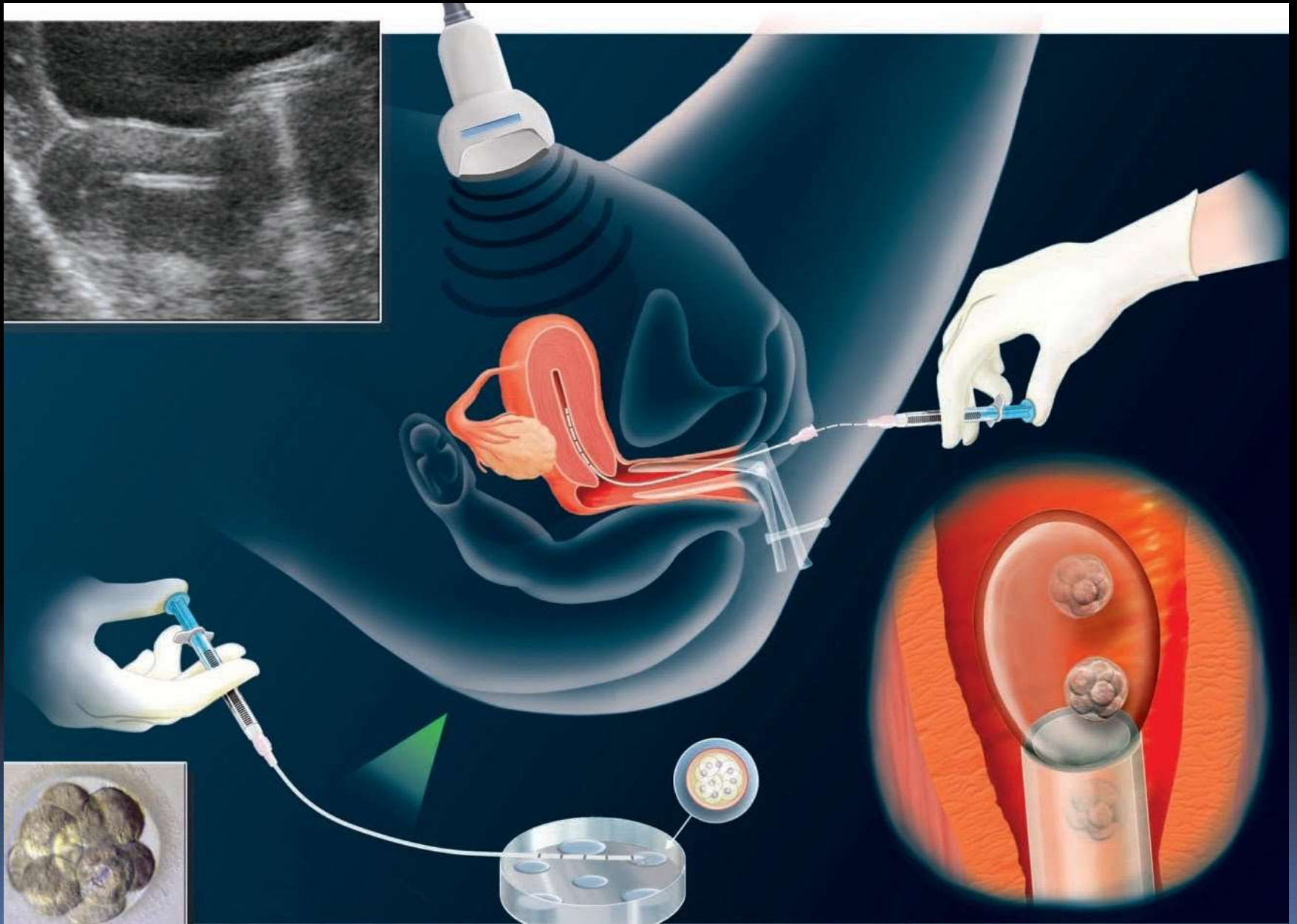
- ✓ Αριθμός βλαστομεριδίων
- ✓ Μέγεθος και σχήμα βλαστομεριδίων
- ✓ Ποσοστό θραυσμάτων

Αριθμός εμβρύων που μεταφέρονται στη μήτρα

ΝΟΜΟΣ ΥΠ' ΑΡΙΘ. 3305/2005 & ΦΕΚ Β 2589/29-9-2014, απόφαση υπ/αρ. 47)

- Γυναίκες ηλικίας έως 35 ετών: 1 ή 2 έμβρυα.
- Γυναίκες ηλικίας άνω των 35 ετών και κάτω των 40: μέχρι 2 έμβρυα στον 1^ο και 2^ο κύκλο και μέχρι 3 έμβρυα στον 3^ο κύκλο και σε κάθε επόμενο.
- Γυναίκες 40 ετών: Μέχρι 3 έμβρυα
- Γυναίκες ηλικίας άνω των 40 ετών: Μέχρι 4 έμβρυα.
- Για έμβρυα που προέρχονται από δωρεά ωαρίων: Μέχρι 2 έμβρυα.

Εμβρυομεταφορά

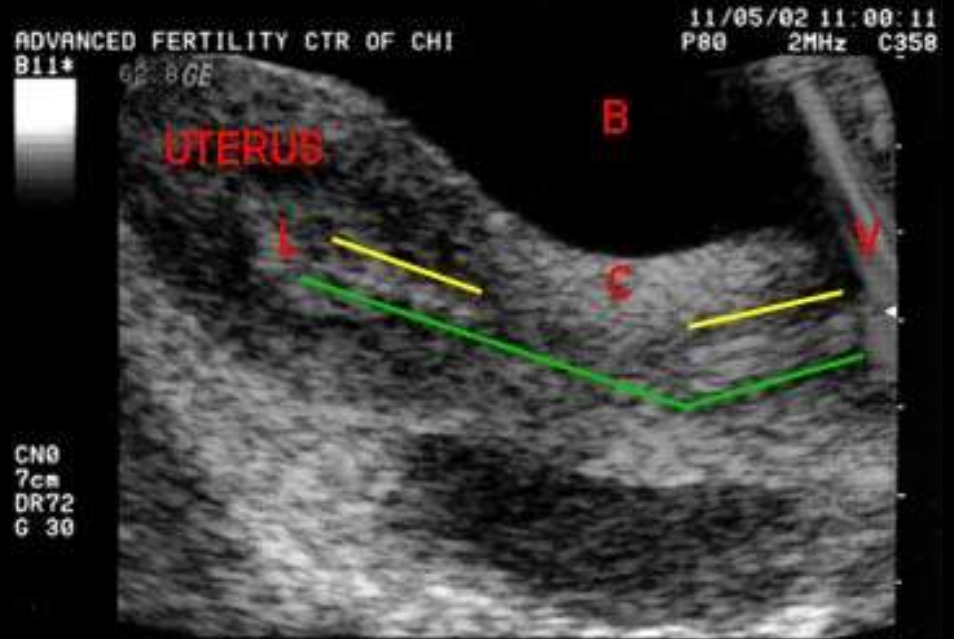
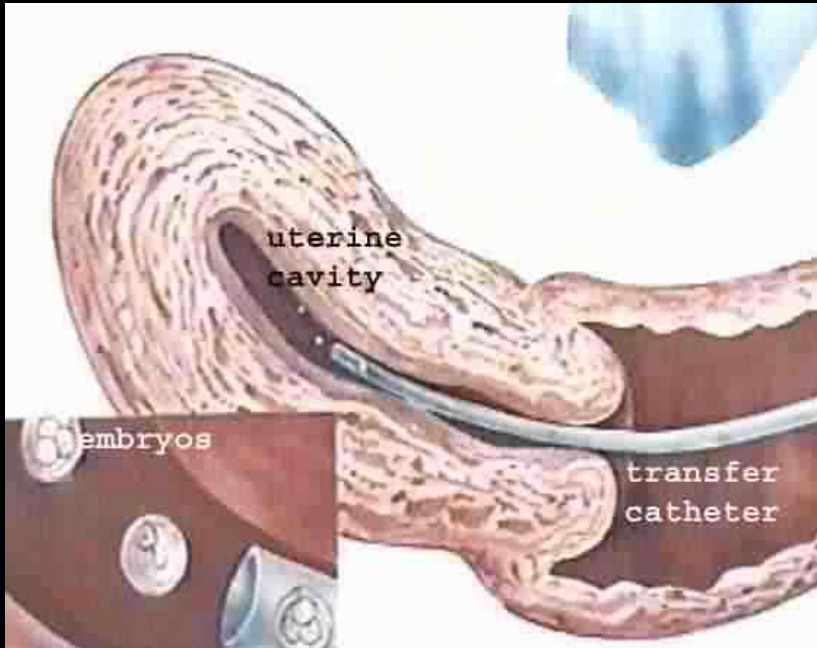


Εμβρυομεταφορά

Καθετήρας εμβρυομεταφοράς



Εμβρυομεταφορά



Cervix = C
Bladder = B
Lining = L
Vagina = V

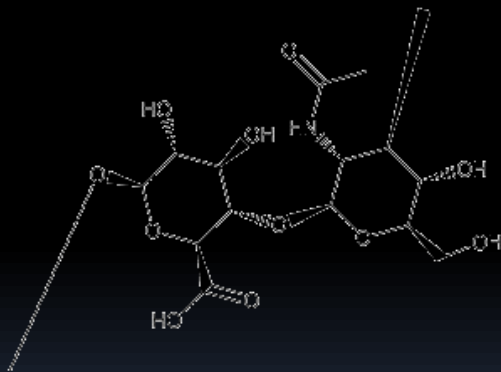
ICSI

Ωάριο πριν και μετά από την απομάκρυνση των θυλακιακών κυττάρων (stripping) κατά την προετοιμασία για ICSI.



ICSI

Απομάκρυνση θυλακιακών κυττάρων και κυττάρων ακτινωτής στεφάνου με τη βοήθεια υαλουρονιδάσης και μηχανικής τριβής.



Υαλουρονιδάση



Βελόνες μικροχειρισμών ωαρίων-εμβρύων

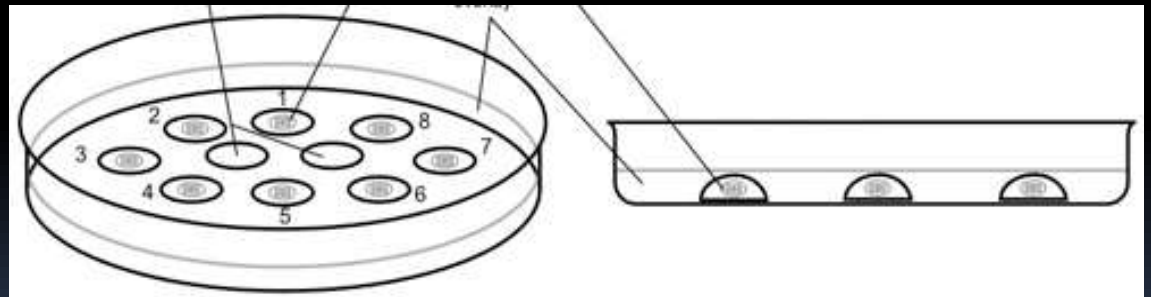
ICSI

- Εντοπισμός ώριμων ωαρίων (M II), εντοπισμός πολικού σωματίου.
- Τοποθέτησή τους σε μικροσταγόνες τρυβλίου μικρογονιμοποίησης.



Ενεργοποιημένο
σπέρμα + PVP

Λάδι Ωάριο

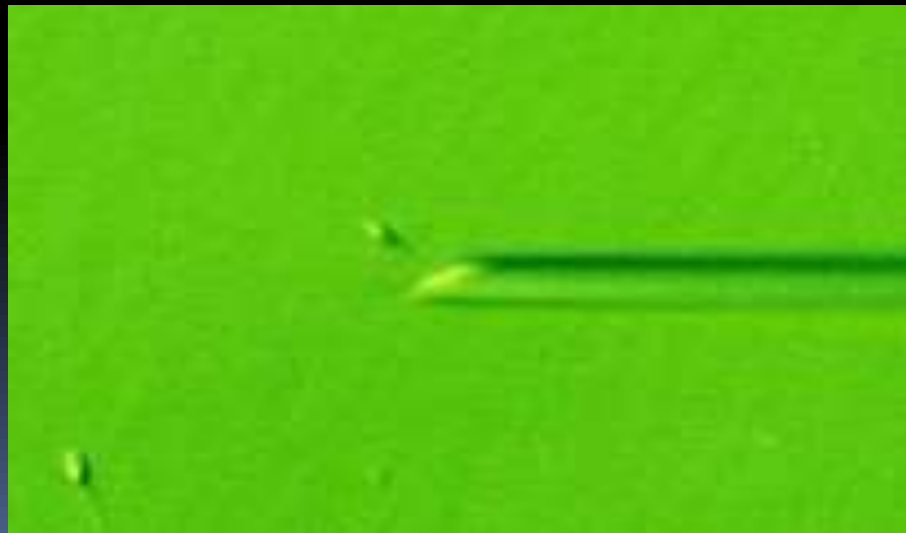
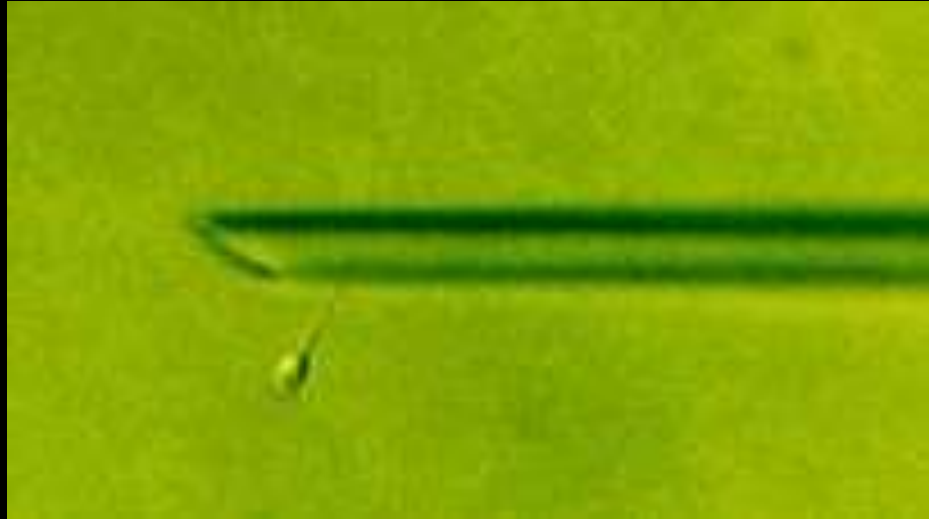


ICSI dish

ΑΝΕΣΤΡΑΜΜΕΝΟ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ ΜΕ ΜΙΚΡΟΧΕΙΡΙΣΤΗΡΙΑ ΓΙΑ ΙCSI



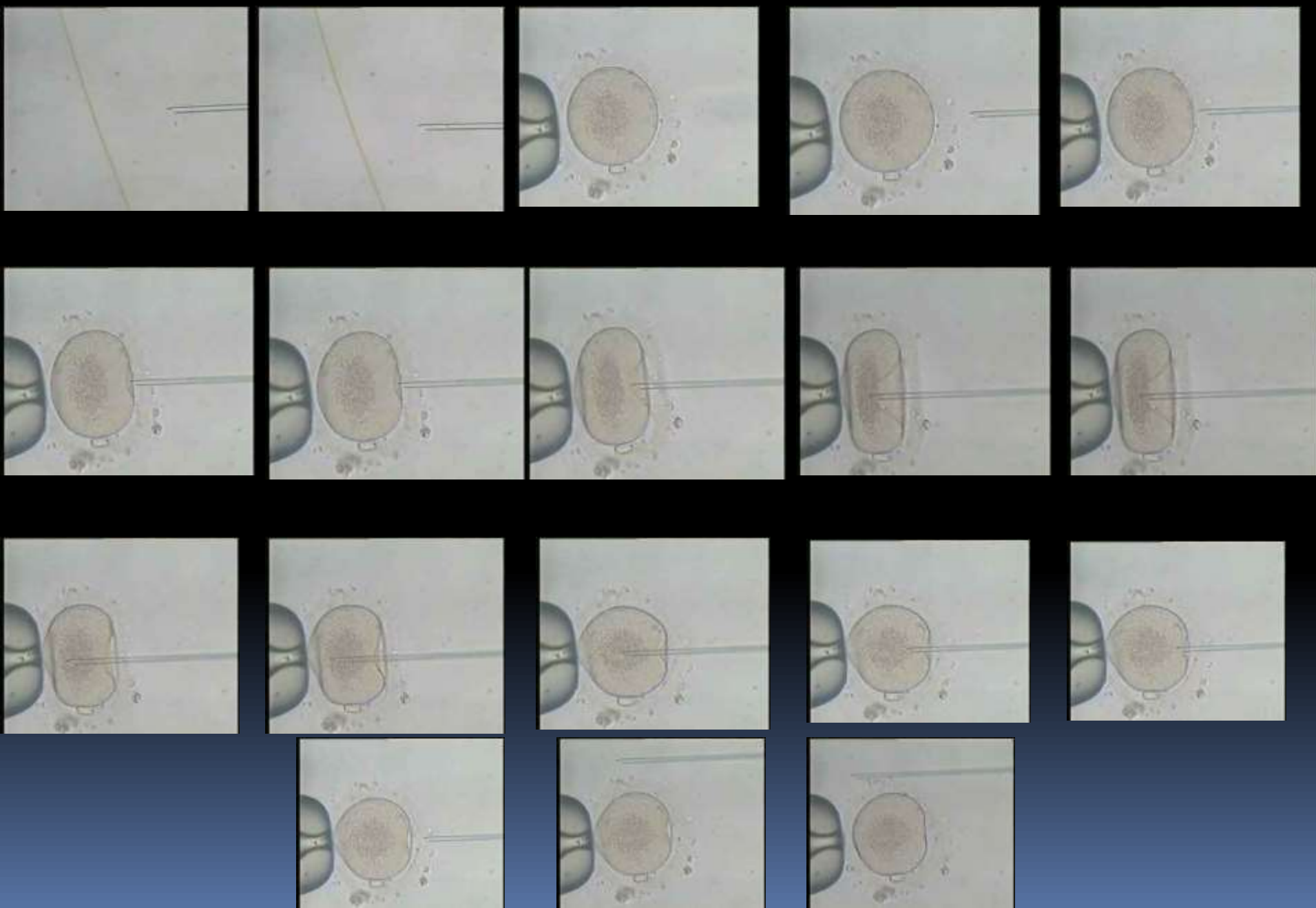
Ακίνητοποίηση σπερματοζωαρίου



Μικρογονιμοποίηση (ICSI)



ICSI



ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗ ΕΚΚΟΛΑΨΗ

Τι είναι ;

Μικρή εκτομή της διάφανης ζώνης με μηχανικό, χημικό τρόπο ή με laser, συνήθως την 3η ημέρα μετά τη γονιμοποίηση.

Ενδείξεις:

- πάχος διάφανης ζώνης
- ηλικία γυναίκας (>38 ετών)
- επαναλαμβανόμενες αποτυχίες εμφύτευσης
- κρυοσυντηρημένα έμβρυα/ωάρια
- in vitro ωρίμανση
- «διάσωση» εμβρύων με καθυστερημένη ανάπτυξη ή «παγιδευμένων» βλαστοκύστεων



ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗ

Ορισμός

Η διατήρηση κυττάρων (π.χ. γαμετών), ιστών (π.χ. εμβρύων τεμαχίων όρχεως ή ωοθήκης) ή ακατέργαστου βιολογικού υλικού (π.χ. σπέρματος) σε πολύ χαμηλή θερμοκρασία, με σκοπό τη χρήση τους σε μεταγενέστερη χρονική στιγμή.

Μέσο κρυοσυντήρησης

Υγρό άζωτο - θερμοκρασία -196°C .



ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗ (περίληψη)

Τι κρυσυντηρούμε και γιατί;

- **Σπέρμα** (προσωρινή απουσία συζύγου, συγκέντρωση πολλών ολιγοζωοσπερμικών δειγμάτων, δότες, διατήρηση γονιμότητας πριν από επικείμενη χημειοθεραπεία ή χειρουργική επέμβαση).
- **Έμβρυα** (χρησιμοποίηση υπεράριθμων εμβρύων σε επόμενη προσπάθεια, δωρεά, περισσότερος χρόνος για PGD, καθυστέρηση εμβρυομεταφοράς λόγω υπερδιέγερσης ωοθηκών).
- **Ωάρια** (δωρεά, διατήρηση γονιμότητας σε επικείμενη απώλεια ωοθηκικής λειτουργίας ή σε γυναίκες που επιθυμούν να αποκτήσουν παιδιά σε μεγαλύτερη ηλικία, χρησιμοποίηση υπεράριθμων ωαρίων σε επόμενους κύκλους).
- **Ωοθηκικό ιστό**
- **Ορχικό ιστό**



ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΕΜΒΡΥΩΝ

Χρησιμότητα:

- Πλεονάζοντα έμβρυα καλή ποιότητας μετά από IVF.
- Αναβολή εμβρυομεταφοράς λόγω OHSS ή ανεπαρκούς ανάπτυξης ενδομητρίου.
- Διαφύλαξη αναπαραγωγικού δυναμικού γυναίκας που θα υποβληθεί σε χημ/πεία, ακτ/πεία, αφαίρεση ωοθηκών (προϋπόθεση η ύπαρξη συντρόφου).

Πότε;

- 1η ημέρα μετά την ωοληψία (στάδιο προπυρήνων).
- 2η ή 3η ημέρα μετά την ωοληψία (4-8 κύτταρα).
- 5η ή 6η ημέρα (στάδιο βλαστοκύστης).

ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΕΜΒΡΥΩΝ

Πώς;

- i. *Slow freezing* (προγραμματιζόμενη σταδιακή κατάψυξη).
- ii. *Vitrification* (υαλοποίηση).

ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΜΕΝΩΝ ΕΜΒΡΥΩΝ



Canister



Tank

ΕΠΙΒΙΩΣΗ ΕΜΒΡΥΩΝ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗ

- Όλα τα έμβρυα δεν έχουν ίδια ικανότητα επιβίωσης.
- Έως 20 - 30 % κυττάρων καταστρέφονται.
- Ορισμένα έμβρυα δεν επιβιώνουν ή μπορεί να απολέσουν κάποιο/α βλαστομερίδιο/α.
- Απώλεια 1-2 βλαστομεριδίων δεν εμποδίζει την επιτυχή εμφύτευση (ολοδύναμα κύτταρα).



Έμβρυο μετά από κρυοσυντήρηση και απόψυξη

ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΩΑΡΙΩΝ



ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗ

Για πόσο ;

ΝΟΜΟΣ ΥΠ' ΑΡΙΘ. 4272 (ΦΕΚ Α 145/11-7-2014)

α. Σπέρμα και ορχικός ιστός:, μέχρι δέκα (10) έτη (από τρίτο δότη), ενώ μέχρι πέντε (5) έτη (για μελλοντική προσωπική χρήση στο πλαίσιο εφαρμογής μεθόδων Ι.Υ.Α.).

β. Ωάρια και ωοθηκικός ιστός: πέντε (5) έτη.

γ. Ζυγώτες και γονιμοποιημένα ωάρια: πέντε (5) έτη (δυνατότητα παράτασης μόνο για άλλα 5).

[Στις παραπάνω περιπτώσεις, η διάρκεια κρυοσυντήρησης μπορεί να παραταθεί για άλλα 5 έτη, με έγγραφη αίτηση των δικαιουμένων προς την Τράπεζα Κρυοσυντήρησης].

Μετά την πάροδο των παραπάνω προθεσμιών κρυοσυντηρημένο υλικό που δεν έχει χρησιμοποιηθεί είτε διατίθενται για ερευνητικούς και θεραπευτικούς σκοπούς είτε καταστρέφονται.

ΠΡΟΕΜΦΥΤΕΥΤΙΚΟ ΓΕΝΕΤΙΚΟ ΤΕΣΤ

Ο έλεγχος του πυρήνα βλαστομεριδίου (-ων) για γονιδιακές μεταλλάξεις ή ανευπλοειδίες, που πραγματοποιείται όσο τα έμβρυα αναπτύσσονται σε συνθήκες καλλιέργειας στο εργαστήριο, πριν την εμβρυομεταφορά ή ο έλεγχος πολικού σωματίου ωαρίου.

PGT-M

Preimplantation genetic testing
for monogenic/single gene
diseases

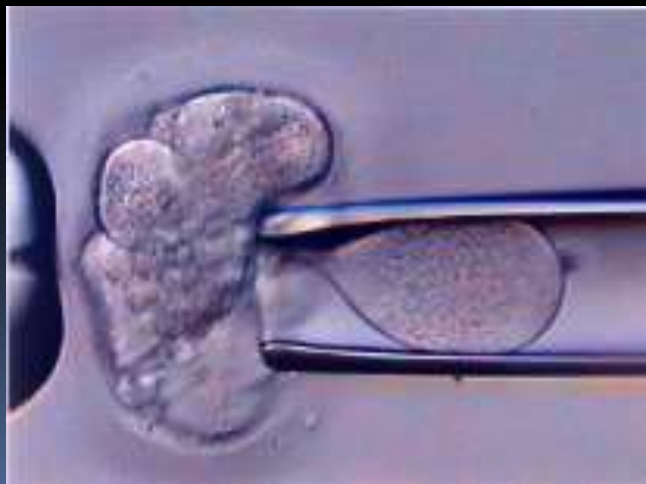
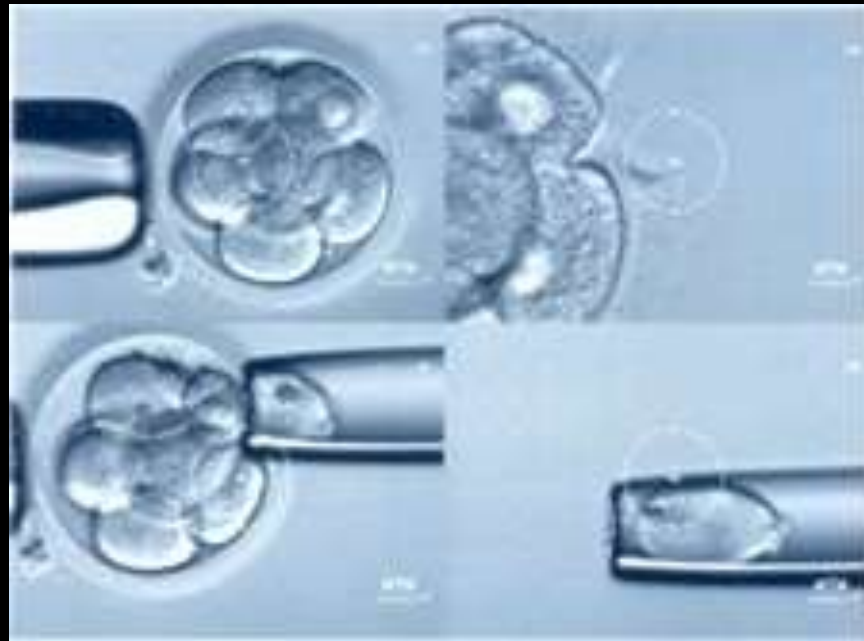


PGT-A

Preimplantation genetic
testing for aneuploidy

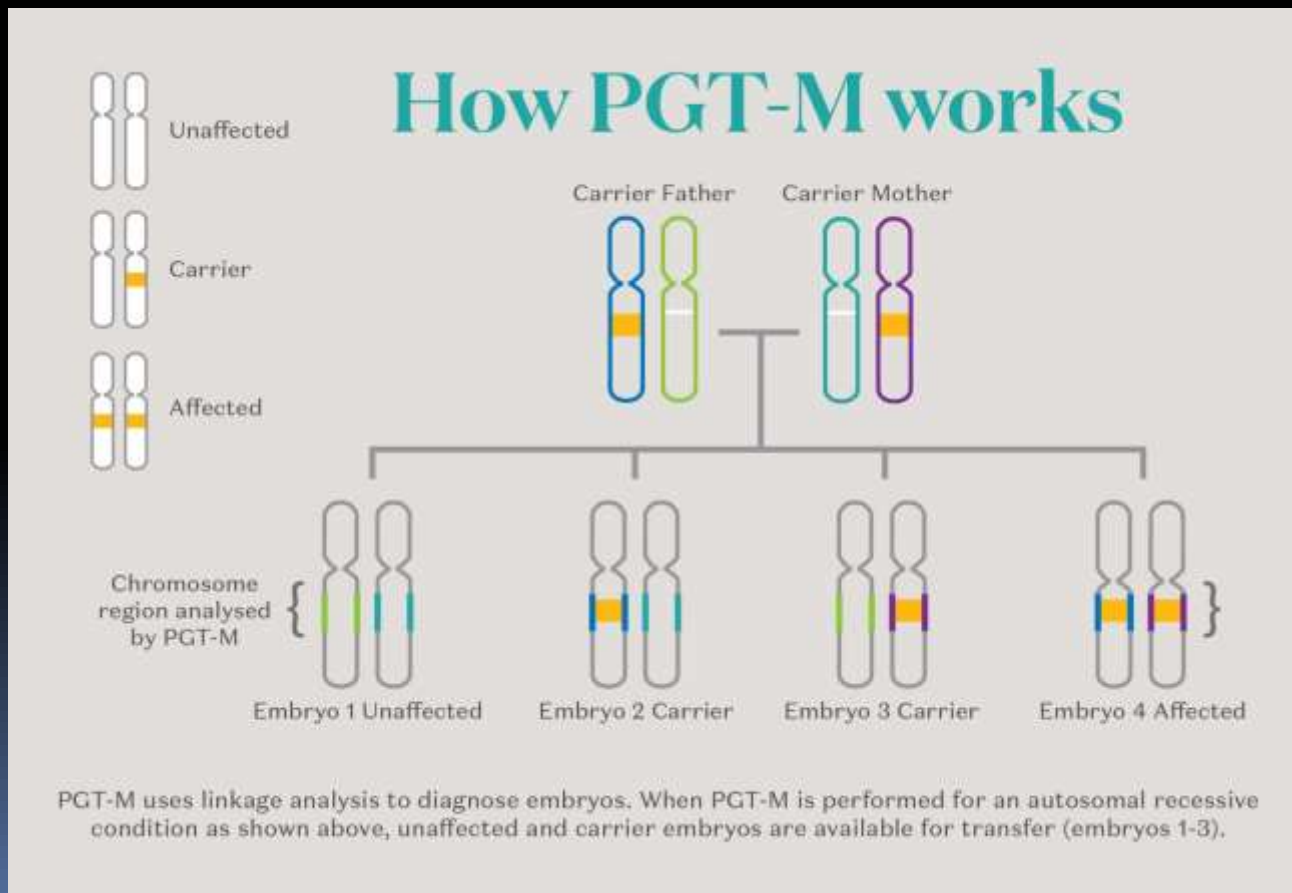


ΒΙΟΨΙΑ ΕΜΒΡΥΟΥ ΓΙΑ ΠΡΟΕΜΦΥΤΕΥΤΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ



ΠΡΟΕΜΦΥΤΕΥΤΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ (PGT-M)

Όταν ο ένας ή και οι δύο γονείς είναι φορείς μιας γονιδιακής μετάλλαξης ή μιας χρωσωμικής ανωμαλίας και ο έλεγχος πραγματοποιείται για να επιβεβαιώσει αν η μετάλλαξη ή ανωμαλία έχει μεταφερθεί στο ωάριο ή στο έμβρυο.



PGT-A (Preimplantation genetic testing for aneuploidy)

Όταν τα έμβρυα γονέων που θεωρούνται χρωμοσωμικά φυσιολογικοί, ελέγχονται για ανευπλοειδίες.

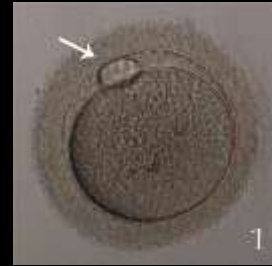
Ενδείξεις:

- Γυναίκες προχωρημένης ηλικίας.
- Ιστορικό καθ' έξιν αποβολών.
- Επαναλαμβανόμενες αποτυχίες IVF.
- Ανδρική υπογονιμότητα σοβαρού βαθμού.
- Επιλογή φύλου.

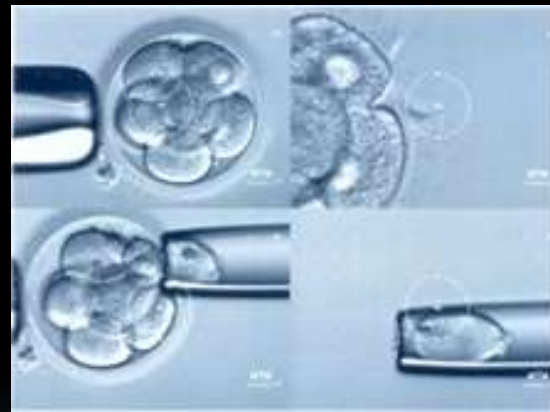
PGT-M / PGT-A

Πώς γίνονται ;

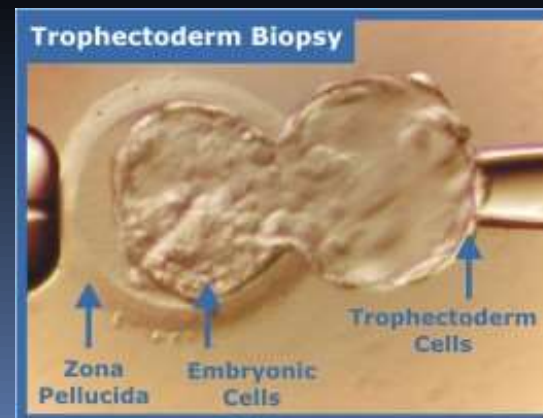
- Βιοψία πολικού σωματίου



- Βιοψία βλαστομεριδίου



- Βιοψία τροφοεξωδέρματος



ΜΕΘΟΔΟΙ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

- PCR (Polymerase Chain Reaction), για να πολλαπλασιασθεί το τμήμα του γονιδιώματος που περιέχει το συγκεκριμένο γονίδιο.
- FISH (Fluorescence In Situ Hybridization), DNA probes σημαίνονται με διαφορετικές χρωστικές φθορισμού, που συνδέονται με συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA, μοναδικές για κάθε χρωμόσωμα. Η FISH χρησιμοποιείται για να εντοπίσει ελλείψεις ή προσθήκες χρωμοσωμικού υλικού σε ωάρια, έμβρυα ή ασθενείς που φέρουν χρωμοσωμική μετατόπιση ή άλλη δομική ανωμαλία.
- Array-CGH (Comparative Genomic Hybridization - συγκριτικός γονιδιωματικός υβριδισμός σε μικροσυστοιχίες). Το σημασμένο με φθορίζουσα χρωστική DNA υβριδοποιείται πάνω σε ολιγονουκλεοτίδια ακινητοποιημένα πάνω σε ειδική αντικειμενοφόρο πλάκα. Κάθε ολιγονουκλεοτίδιο έχει καθορισμένη θέση πάνω στην πλάκα και είναι συμπληρωματικό για μια συγκεκριμένη περιοχή στο γονιδίωμα. Μεταγενέστερη τεχνική, αναλύει όλα τα χρωμοσώματα.
- Next Generation Sequencing (NGS). Ανίχνευση ανευπλοειδιών και των 24 χρωμοσωμάτων καθώς και των μη ισοζυγισμένων παραγώγων των φορέων χρωμοσωμικών ανακατατάξεων.

Βιοψία εμβρύου 3^{ης} μέρας

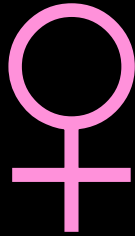
Βιοψία βλαστοκύστης (5^{ης} μέρας)

Is the hypothesis of preimplantation genetic screening (PGS) still supportable? A review

Norbert Gleicher and Raoul Orvieto

The aforementioned improved outcome was based on 5 essential assumptions: (i) Most IVF cycles fail because of aneuploid embryos. (ii) Their elimination prior to embryo transfer will improve IVF outcomes. (iii) A single trophectoderm biopsy (TEB) at blastocyst stage is representative of the whole TE. (iv) TE ploidy reliably represents the inner cell mass (ICM). (v) Ploidy does not change (i.e., self-correct) downstream from blastocyst stage. We aim to offer a review of the aforementioned assumptions and challenge the general hypothesis of PGS. We reviewed 455 publications, which as of January 20, 2017 were listed in PubMed under the search phrase < preimplantation genetic screening (PGS) for aneuploidy >. The literature review was performed by both authors who agreed on the final 55 references. Various reports over the last 18 months have raised significant questions not only about the basic clinical utility of PGS but the biological underpinnings of the hypothesis, the technical ability of a single trophectoderm (TE) biopsy to accurately assess an embryo's ploidy, and suggested that PGS actually negatively affects IVF outcomes while not affecting miscarriage rates. Moreover, due to high rates of false positive diagnoses as a consequence of high mosaicism rates in TE, PGS leads to the discarding of large numbers of normal embryos with potential for normal euploid pregnancies if transferred rather than disposed of. We found all 5 basic assumptions underlying the hypothesis of PGS to be unsupported: (i) The **association of embryo aneuploidy with IVF failure** has to be reevaluated in view how much more common TE **mosaic** is than has until recently been appreciated. (ii) Reliable elimination of presumed aneuploid embryos prior to embryo transfer appears unrealistic. (iii) Mathematical models demonstrate that a single **TEB cannot provide reliable information about the whole TE**. (iv) **TE does not reliably reflect the ICM**. (v) **Embryos**, likely, still have strong innate **ability to self-correct downstream from blastocyst stage, with ICM doing so better than TE**. **The hypothesis of PGS, therefore, no longer appears supportable. With all 5 basic assumptions underlying the hypothesis of PGS demonstrated to have been mistaken, the hypothesis of PGS, itself, appears to be discredited. Clinical use of PGS for the purpose of IVF outcome improvements should, therefore, going forward be restricted to research studies.**

PGT-A για επιλογή φύλου ;



- Επιτρέπεται μόνο για ιατρικούς λόγους (π.χ. νόσος με φυλοσύνδετη κληρονομικότητα).

ΠΡΟΕΜΦΥΤΕΥΤΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Κατάλληλη για:

- Μονογονιδιακές παθήσεις
- Χρωμοσωμικές ανωμαλίες
- Επιλογή φύλου (π.χ. περιπτώσεις με φυλοσύνδετα γονίδια)

Εντοπίζει:

- Κυστική ίνωση
- Σύνδρομο εύθραυστου Χ
- Σύνδρομο Lesch-Nyhan
- Νόσος Charcot-Marie-Tooth
- Σύνδρομο Down
- Νόσος Tay-Sachs
- Μυϊκή δυστροφία Duchenne
- Αιμορροφιλία
- Σύνδρομο Turner
- Β-θαλασσαιμία
- Δρεπανοκυτταρική αναιμία
- Retinitis pigmentosa

...κ.ά.

Ευχαριστώ πολύ!

