

Andrologie

Soňa Kloudová

sona.kloudova@med.muni.cz

23.4.2024

Historie

- 1776- Lazaro Spallanzani – pokus o uchování spermatu ve sněhu 😊
- **1949 - Ernst John Christopher Polge** – kryoprotektivní vlastnosti **glycerolu**
- 1951 – první potomek z kryokonzervovaného ejakulátu –skot
- **1953 – první dítě** z kryokonzervovaného ejakulátu (suchý led)
- 70. léta 20. století – vznik lidské kryobanky
- Rozvoj inseminací u zvířat
- Důležitý pokrok v oblasti technik asistované reprodukce u lidí



Využití kryokonzervovaných spermií

- U zvířat- inseminace – „genetické zlepšení“
- Metoda k řízení a uchování plodnosti
 - medicínské důvody – chirurgická léčba, chemoterapie, radioterapie, hormonální terapie
 - před pubertou – odběr tkáně z varlete, kryokonzervace spermatogoniálních kmenových buněk nebo testikulární tkáně
 - transgender osoby
 - social freezing – např. nebezpečné povolání, vasktomie
- Léčba neplodnosti – nemožnost odběru v den OPU, komplikovaný odběr, těžké oligozoospermie, vzorky (extrakce spermií z varlete-TESE nebo aspirace spermií z nadvarlete -MESA), dárcovství spermií
 - využití pro IUI, IVF, ICSI

Patient Condition	Sperm Collection Method	What Makes Them Eligible for Sperm Banking?
Adult cancer	Frequent ejaculation	Cancer and related therapies damage the gonads and impair spermatogenesis
Adolescent cancer	Frequent ejaculation (when they are sexually mature), penile vibratory stimulation, and electroejaculation	Same as above
Cancer in prepubescent males	Testicular tissue freezing	Cancer treatment negatively affects spermatogenesis; testicular tissue extraction is a promising experimental procedure
Preoperative surgical procedure to treat or induce infertility	Frequent ejaculation	Bilateral varicocele ligation, prior to vasectomy
Non-malignant disease	Frequent ejaculation	Systemic stress may impair spermatogenesis; gonadotoxic therapies affect semen quality
Occupational risk	Frequent ejaculation	Exposure to harmful chemicals may decrease fertility or cause chromosomal damage in the germ cells; facing hazardous situations that may result in an accident that causes infertility
Posthumous sperm cryopreservation	Electroejaculation surgical removal of testes and epididymides	Performed at the time of brain death based upon the patient's will or family request
Sex change/ gender reassignment	Frequent ejaculation removal of testicular tissue	Hormone therapy damages spermatogenesis, and gender reassignment surgery sterilizes the male

Cryopreservation of Sperm: A Review

Biologie kryokonzervace spermií

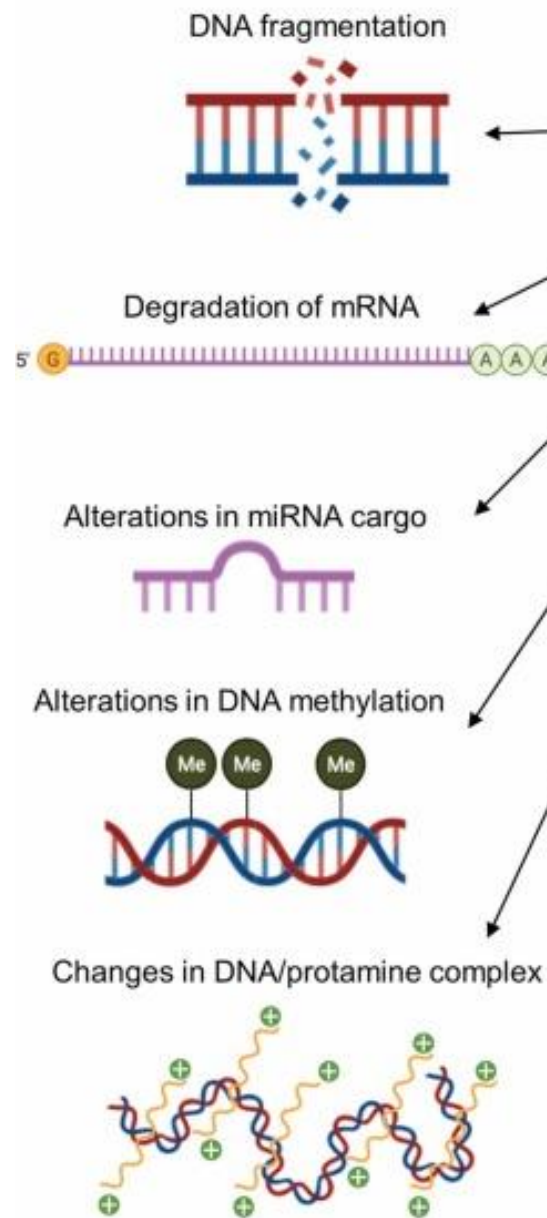
- **malá buňky s velkým povrchem** → vliv na viskozitu a teplotu skelného přechodu cytosolu - menší náchylnost k poškození
- v nepřítomnosti kryoprotektiv – **šok chladem + tvorba krystalů** → destrukce buněčných organel
- Principem úspěchu je minimalizace tvorby krystalů
- nutnost přidavku **kryoprotektiv a látek stabilizujících membrány**
- kryotoleranci a chladovou toleranci ovlivňuje **lipidové složení membrán** –mezidruhové rozdíly (rozdíly v profilu mastných kyselin a v poměru omega3 /omega 6 mastných kyselin), rozdílná velikost i tvar spermií
- Na přežití spermií po kryokonzervaci má vliv také funkční kvalita spermií před zamrazením – asthenozoospermické vzorky jsou náchylnější k poškození mrazem, dochází ke snížení fertilizační schopnosti

Ultrastrukturální změny během kryokonzervace

- Rozpad akrozomu, částečné odnětí vnější akrozomální membrány- důsledek tvorby krystalů extracelulárních roztoků
- osmotické změny vedoucí k poškození lipidových membrán (změny napětí v membránových kanálech, úniky iontů)→ morfologické změny
- Poškození proteinů cytoskeletu (např. aktin, vimentin) – zvrásnění cytoplasmy, bobtnání subakrosomální oblasti, ztráta obsahu akrosomu, vesikulovitý vzhled, zvýšený podíl volných hlaviček a defektů bičíku
- Poškození mitochondrií a jejich funkcí
- Oxidační stres
- rychlejší mrazení redukuje ultrastrukturální změny a chrání integritu spermií v porovnání s pomalým mrazením
- Nejlepší ochranné vlastnosti pro spermie má **glycerol**
- **glycerol** v kombinaci s **vaječným žloutkem** nejlépe chrání apikální část akrozom a mitochondrie

- během kryokonzervace dochází k **ovlivnění exprese genů a proteinů, stability mRNA a k určitým změnám na epigenetické úrovni (metylace DNA)**
- Změny v expresi klíčových genů vztahujících se k plodnosti – u kance dochází po kryokonzervaci ke změně v expresi 41 genů
- změny v expresi AKAP3, SOD 1 nebo HSP90 (hraje roli v motilitě)
- změny v proteinech vztahujících se k motilitě, vitalitě a integritě akrozómu (mitochondriální akonitát hydratáza, tektin 1, alfa-enoláza, vimentin), změny v hladině fosforylace tyrosinu, změna v proteinech ovlivňujících metabolismus spermií
- po kryokonzervaci dochází ke snížení motility, funkčnosti plasmatické membrány, integrity akrozómu, viability
- Mechanismy nejsou zcela objasněny - změna osmolarity, intracelulární tvorba krystalů
- **zvýšená produkce ROS** a snížená antioxidační kapacita enzymů → **oxidace DNA** → zlomy
- do kryokonzervačních médií se často přidávají antioxidanty
- korelace mezi snížením motility a defekty mitochondrií po rozmrazení

Molecular alterations



Structural alterations

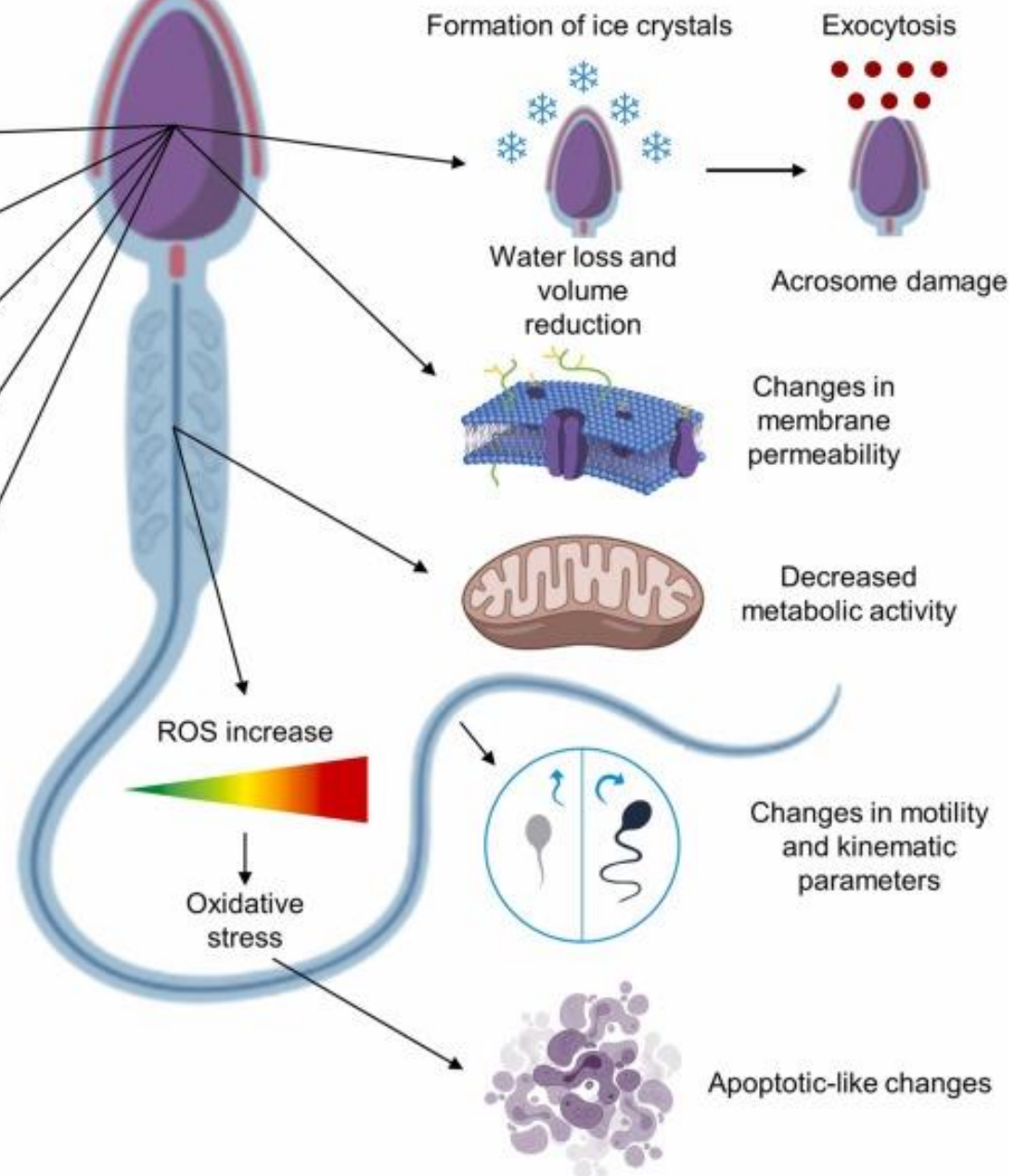


Table 1. Freezability markers identified in cattle, pig, sheep and horse sperm.

Marker	Effects	Species	Reference
Sperm proteins			
proAKAP4	Could help predict factors underlying cryogenic damage, such as oxidative stress	Horse	(Blommaert et al., 2019)
		Pig	(Perez-Patino et al., 2019a)
		Sheep	(Riesco et al., 2020)
Heat shock protein 90AA1 (HSP90AA1)	Maintain metabolic and structural integrity of cells under stress conditions	Cattle	(Zhang et al., 2015)
		Pig	(Casas et al., 2010)
Heat shock protein 8 (HSPA8)		Cattle	(Holt et al., 2015)
Aquaporin 7 (AQP7)	Involved in the permeability of the plasma membrane to water and permeable cryoprotectants	Cattle	(Prieto-Martínez et al., 2017b)
Aquaporin 3 (AQP3)		Pig	(Prieto-Martínez et al., 2017a)
Voltage-dependent anion channel 2 (VDAC2)	Allows the transport of ions	Pig	(Vilagran et al., 2014)
Glutathione S-transferase Mu 3 (GSTM3)	Involved in cellular protection against oxidative stress	Pig	(Llavanera et al., 2019)
SP proteins			
Fibronectin-1 (FN1)	Could help predict factors underlying cryogenic damage, such as oxidative stress	Pig	(Vilagran et al., 2015)
26 S proteasome and CCT complex		Sheep	(Rickard et al., 2015)
Acid seminal fluid proteins (aSFP)		Cattle	(Einspanier et al., 1994)

Proces kryokonzervace

- Kryoprotektanty permeabilní : **Glycerol**, DMSO
 - průnik do buňky, zábrana tvorby krystalů
- Kryoprotektanty nepermeabilní: albuminy, dextrany, **vaječný žloutek** (lipoproteiny)
 - ochrana membrány na povrchu buňky
- Prepubescentní odběr tkáně z varlete- DMSO a sacharóza
- Lidské spermie jsou relativně tolerantní k teplotnímu šoku (rychlé ochlazení/oteplení) – pravděpodobně díky vysoké fluiditě membrán (**nízký podíl nenasycených vs. nasycených mastných kyseliny**), nízkému obsahu vody (50%)
- Přesto pokles motility spermií o 30- 50 %
- Cooling rate- klíčový parametr, rychlost ochlazení (i zahřívání-warming rate) musí být kontrolována
- **Klasická kryokonzervace** – delší mrazící procedura, vyšší objemy dávky
- **Vitrifikace** – rychlejší procedura –vysoký rychlost chlazení, malé objemy spermií, přímý kontakt s tekutým dusíkem (riziko kroskontaminace)

- Na počátku byla kryokonzervační média připravována přímo v laboratoři
- Dnes komerčně dostupná s vhodnou certifikací
- Metoda mrazení podle doporučení výrobce (ejakulát nebo promytá suspenze spermií se s mísí v určitém poměru s mrazícím médiem, umístí se do nosiče a zamrazí)
- Často se využívá umístění dávek do par tekutého dusíku, mnohdy v kombinaci s preekvilibrací v chladničce
- Nutnost kvalitního značení dávek!!!!
- Nutnost dobré kontroly –dvojitá kontrola nebo matcher systém
- Dokumentace: souhlas se zamrazením a souhlas s případnou likvidací!



- Složení kryokonzervačních média: glycerol, TRIS, cukry (fruktóza, sacharóza, threalóza), vaječný žloutek, antibiotika (gentamicin), antioxidanty (vit C a E, glutathion, SOD, kataláza...)
- Mrazící protokoly: rychlé mrazení v **parách dusíku (-167°C)** -nejčastější
vitrifikace (přímo do **tekutého dusíku: -196°C**)-zřídka
manuální pomalé mrazení
programované pomalé mrazení –skoro se již nepoužívá
- Příklady způsobu rozmrazení: rychlé při 37°C
5 minut v pokojové teplotě a následné ponoření do 37°C
rychlé rozmrazení při 40°C
rozmrazení při pokojové teplotě

Improving strategies

Pre-cryopreservation
selection of motile
spermatozoa

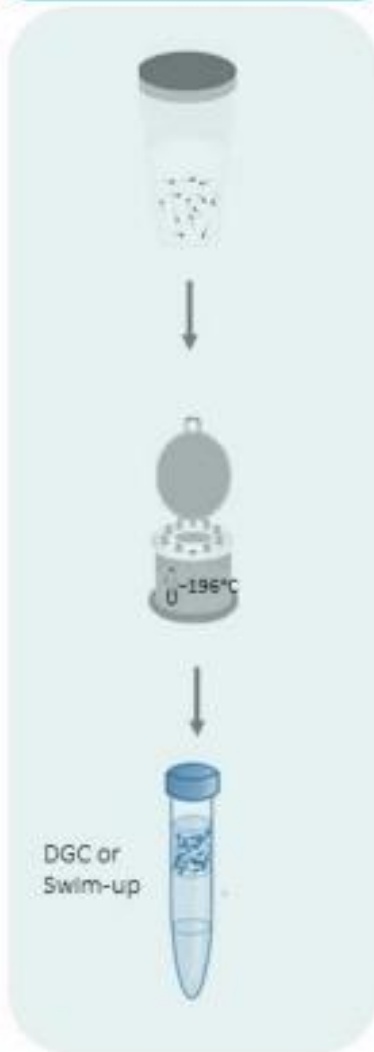
Post-thawing sperm
selection

Addition of
antioxidants to
cryoprotectants

Addition of growth
factors or platelet-rich
plasma

Sperm lyophilization

Use of alternative
devices for low sperm
number





SPERM VITRIFICATION DEVICE

PRODUCT INFORMATION

Categories: Andrology, Andrology Cryo.

The ability to cryopreserve a small number of human spermatozoa is essential in cases of severe male infertility, especially for patients requiring surgical sperm retrieval.

Možno vložit přímo na ICSI miskú

Video: <https://youtu.be/nDyvr2Z6jKs>



tavička



straw



goblety



ampule



Kryobanka

- Otevřený systém – dříve častý
- Uzavřený systém – těsný svár, nyní preferenčně
- Autologní / alogení (dárcovská)
- Uložení v tekutém dusíku nebo v parách dusíku (zabránění kroskontaminace)
- Procesy zpracování, uložení a uchování buněk musí být bezpečné s ohledem na prevenci přenosu infekčních chorob a na udržení kvality – čidla na monitoring teploty
- SARS-CoV-2 –v ejakulátu byl virus prokázán pouze zřídka, ale asociace onemocněním a sníženou kvalitou ejakulátu
- Bylo prokázáno narození dítě **28 let** po zamrazení ejakulátu



- Při kryokonzervaci ejakulátu/spermií je důležité dodržovat **bezpečnost!!**
- **Zásady práce s tekutým dusíkem**
- Ochranný oděv, rukavice, štít/brýle, s dávkami manipulujeme pinzetou
- Systémy detekce kyslíku -**alarm**



Preservation of Mammalian Sperm by Freeze-Drying

Levent Keskinetepe ^{1 2}, Ali Eroglu ^{3 4}

Affiliations + expand

PMID: 32797445 DOI: [10.1007/978-1-0716-0783-1_39](#)

Abstract

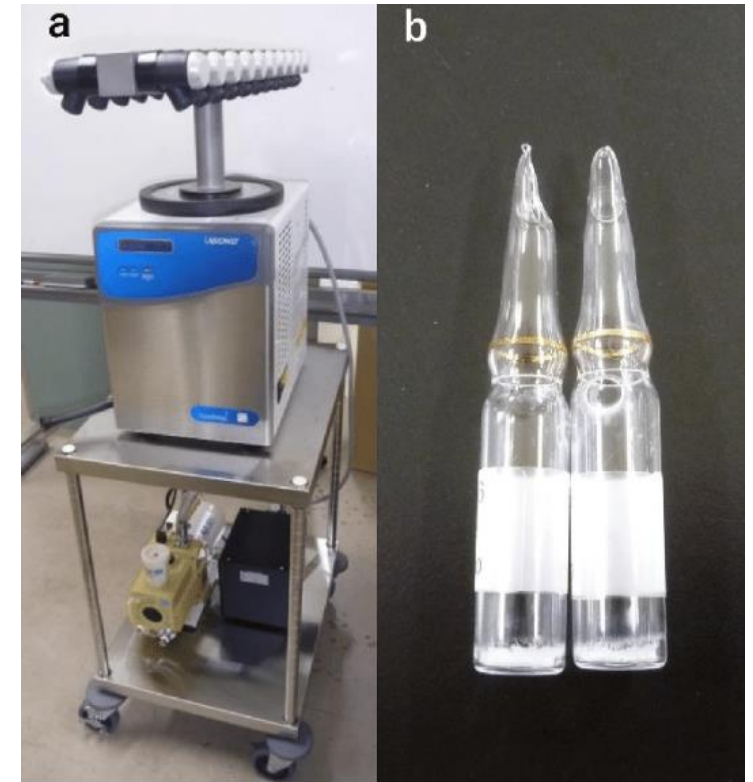
Long-term preservation of mammalian sperm at suprazero temperatures is desired to save storage and space costs, as well as to facilitate transport of preserved samples. This can be accomplished by the freeze-drying of sperm samples. Although freeze-drying results in immotile and membrane-compromised sperm, intracytoplasmic sperm injection (ICSI) can be used to introduce such an immotile sperm into an oocyte and thus start the fertilization process. So far, it has been shown that improved freeze-drying protocols preserve chromosomal integrity and oocyte-activating factor(s) in rodent and mammalian species at 4 °C for several years and at ambient temperature for up to 1 year depending on species, which permits shipping freeze-dried samples at ambient temperature. This chapter concisely reviews freeze-drying of mammalian sperm first and then presents a simple freeze-drying protocol.

Keywords: Cryopreservation; Cryoprotectant; EDTA; EGTA; Freeze-drying; Freezing; ICSI; Intracytoplasmic sperm injection; Long-term storage; Rosmarinic acid; Sperm; Spermatozoa; Trehalose.

[PubMed Disclaimer](#)

Similar articles

[Freeze-drying of mammalian sperm.](#)



Trehalose Attenuates Detrimental Effects of Freeze-Drying on Human Sperm Parameters

Elaheh Shahmoradi ¹, Nafiseh Baheiraei ², Iman Halvaei ¹

Affiliations + expand

PMID: 34042510 DOI: [10.1089/bio.2020.0167](https://doi.org/10.1089/bio.2020.0167)

Abstract

Freeze-drying is one of the sperm preservation methods leading to the long-term preservation of sperm genetic material. Our main goal of this study was to evaluate the effect of the trehalose freeze-drying method on sperm motility, viability, morphology, acrosome, and DNA integrity compared with a standard protocol without trehalose. Twenty-five normozoospermic samples were included in this prospective study. Direct swim-up was used for sperm preparation. An experiment was performed on freeze-dried samples containing trehalose (0.2 M), and the results were compared to that without trehalose. The sperm parameters, including count, motility, morphology, viability, acrosome reaction, DNA denaturation, and DNA fragmentation, were evaluated before and after freeze-drying in both groups. The spermatozoa were totally immotile after freeze-drying in both groups. Sperm viability, acrosome integrity, and nondenatured sperm DNA were significantly higher in the trehalose group in comparison with that of without trehalose group. Nonfragmented sperm DNA showed an increasing trend in the trehalose group compared to the group without trehalose. While freeze-drying significantly reduced normal morphology, the addition of trehalose did not affect this parameter. The results of this study showed that trehalose can attenuate the detrimental effects of freeze-drying on human sperm parameters.

Keywords: DNA integrity; cryodesiccation; freeze-drying; lyophilization; sperm; trehalose.

Dárcovství spermií

- Mladý zdravý muž
- V ČR do 40 let, anonymní
- Normální výsledek vyšetření spermiogramu
- Vyšetření **Hepatitida B a C, HIV, Syphylis, Chlamydie**
- 180 dnů karanténa → uvolnění do darovacího procesu
- Genetické vyšetření – **karyotyp, CFTR, SMA, GJB 2**
- Výběr podle krevní skupiny a charakteristických rysů



E U R O P E A N
S P E R M • B A N K

📍 tř. Kosmonautů 1338/1a,
Olomouc



Filtrovat podle:

Oči ▾

Typ vlasů ▾

Barva vlasů ▾

Vzdělání ▾

Krev ▾

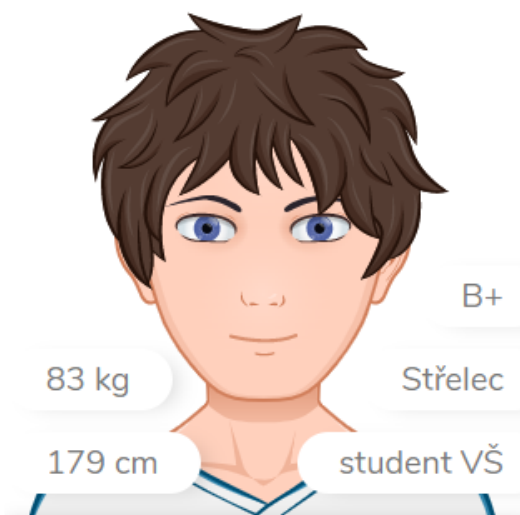
RH faktor ▾

Astrologické znamení ▾

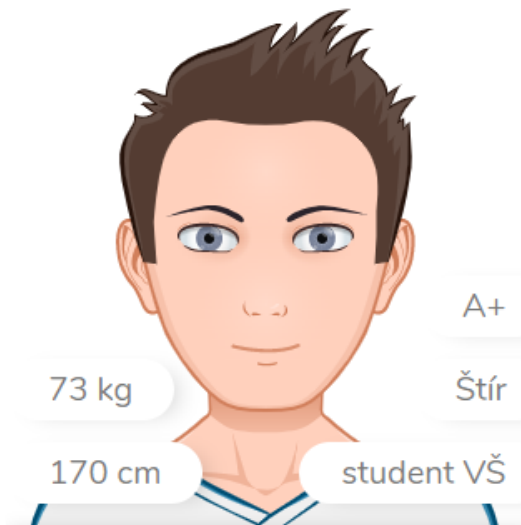
Použití ▾

Výška ▾

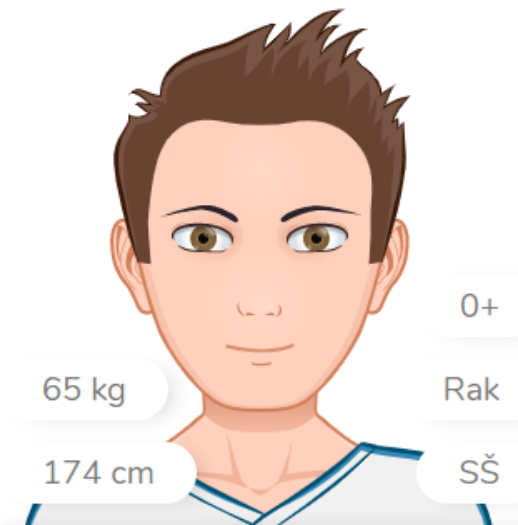
Váha ▾



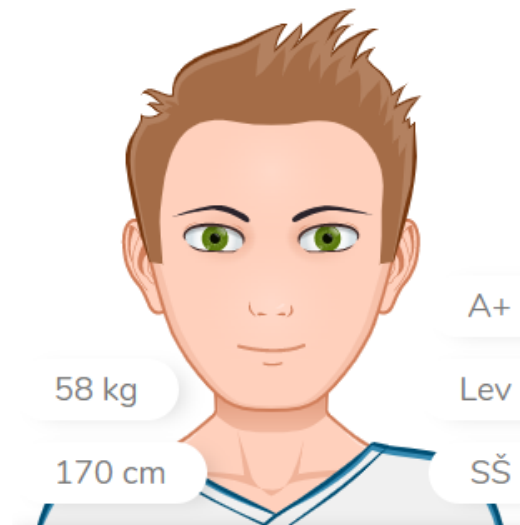
Aken



Alex



Algiz



Ares