

Kryokonzervace spermií a testikulární tkáně

doc. Ing. Michal Jeřeta, Ph.D.

Gynekologicko-porodnická klinika, LF MU a FN Brno

Mražení spermií

-od té doby, co byla úspěšně představena technika *in vitro* fertilizace, se ukázalo vhodné používat kryoprezervované sperma

-u dárců výhradně mražení - pro příjemkyni je tak zaručena minimalizace rizik přenosu infekcí a virových nákaz jako je žloutenka typu B nebo C

Během let byly rozvinuty rozmanité metody pro kryoprezervaci spermatu:

kontrolované pomalorychlostní mražení

- mrazení v suchém ledu
- mrazení v páře tekutého dusíku
- vitifikace

celý proces kryoprezervace spermatu se spoléhá na efektivní metody ředění spermatu kryoprotektivy, vlastní mrazící proceduru a bezpečné uskladnění kryoprezervovaného materiálu

každý krok závisí na přesném použití specifického vybavení a materiálu dle manuálu výrobce

Mražení spermií - indikace

1. před léčbou maligních onemocnění (chemoterapie, radioterapie)
2. pro skladování spermií dárce
3. před vasektomií či chirurgickou léčbou neplodnosti
4. u azoospermických pacientů, kdy byly získány spermie po MESA/TESE
5. po vibrostimulaci při poruše ejakulace (invalidé po poranění páteře)
6. před léčbou IVF, kdy se nemůže pán dostavit v den OPU nebo má problémy s odběrem na klinice - z logistických důvodů je potřeba provést odběr spermií dříve než v den odběru oocytů
7. pokud z důvodu poruchy kvality spermatu či rizika selhání odběru je indikována preventivní kryokonzervace
8. u mužů s progresivním zhoršováním kvality spermatu, které je způsobeno onemocněním spojeným s rizikem následného vzniku neplodnosti (Klinefertův syndrom)
9. social freezing (u mužů pracujících v rizikovém prostředí, kde jsou toxické látky, které mohou ovlivnit spermatogenezi)



Russian State to Fund Sperm Freezing for Mobilized Soldiers

The Moscow Times

HOME > MILITARY & DEFENSE

A fertility clinic is offering Ukrainian soldiers free sperm freezing in case they are killed or suffer severe injuries while fighting

Joshua Zitser Mar 13, 2023, 6:40 PM SEČ



Advertisement

IDF will offer soldiers the option of 'harvesting' their sperm in case of death

This was decided by the Knesset Health Committee on Monday in preparation of the law for using the sperm of a deceased person for procreation.

ISRAEL, MIDDLE EAST, PALESTINE, VIDEOS & PHOTO STORIES

Israel freezing sperm of soldiers killed in Gaza

Between 7 October to 15 November Israel has retrieved the sperm of 39 soldiers killed in its war on Gaza. Posthumous sperm retrieval is a controversial issue and a number of countries ban the practice, but recent event in Israel have seen the Health Ministry ease rules to make it quicker to carry out.

Podmínky uchovávání



- podmínkou dlouhodobého uschování vzorků v tekutém dusíku je vyšetření infekcí přenosných krví a pohlavním stykem (hepatitidy B a C, HIV, syfilis...) v době odběru spermií a uložení séra k případným dalším vyšetřením
- dokud není prokázána negativita těchto infekcí, musí být vzorky skladovány v **karanténě** odděleně od vyšetřených vzorků
- v případě pozitivního výsledku některého z testů musí být vzorky uloženy v **nádobě určené pro infekční vzorky** (samostatné nádoby – hep B, hep C, HIV...)

Slow-freezing (SF)

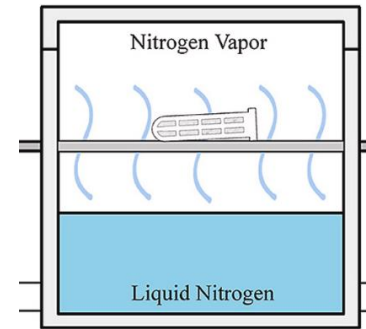


- optimální počáteční rychlost ochlazení vzorku z pokojové teploty na 5 °C je 0,5–1 °C/min
- vzorek se poté zmrazí z 5 °C na -80 °C rychlostí 1–10 °C/min, následně se ponoří do kapalného dusíku při teplotě -196 °C
- programovatelné zmrazovače, které během 60 min vzorek zamrazí
- konvenční pomalé zmrazování, někdy způsobuje rozsáhlé chemicko-fyzikální poškození spermií, pravděpodobně kvůli ledovým krystalům

Vitrifikace spermií

- velký objem kapaliny – špatné skokové zamrazení
- riziko kontaminace, otevřený systém
- práce s malými objemy 20ul (pro cooling rate 2000-10000 °C/min)

Rapid-freezing (RF)



- **nejprve se smíchá** po kapkách se stejným objemem kryoprotektiva za studena; směs se naplní do slávek (0,25 ml) a nechá se 4 min inkubovat při 10 °C
- slámky se pak umístí na 15 minut do vzdálenosti 1-3 cm nad hladinu kapalného dusíku (**páry kapalného dusíku** -80 °C)
- po této fázi jsou slámky ponořeny do kapalného dusíku
- během chlazení je vhodnější umístit slámky **do vodorovné polohy**, aby se minimalizoval tepelný rozdíl mezi oběma konci
- oproti SF lepší motilita a přežití spermií, stejná morfologie a DNA integrita

Kryoprotektiva



- existují 4 známá kryoprotektiva pro spermie: glycerol, ethylenglykol, DMSO a 1,2-propandiol
- snižují bod tuhnutí, snižují množství solí a látek přítomných v kapalně fázi vzorku a snižují tvorbu ledu ve spermiích
- **glycerol** je permeabilní kryoprotektivum, které působí na membrány, propustnost a stabilitu lipidové dvojvrstvy, asociaci povrchových proteinů a buněčný metabolismus
- dále se používá ještě **DMSO** (škodlivé účinky při vyšších teplotách)
- **1,2-propandiol** a **ethylenglykol** se pro kryo spermií používají zřídka

Kryoprotektiva



- v současných postupech mrazení spermií se používají pouze 2 typy zřed'ovacích medií:
- a) **žloutkový citrát** v glycerolu
- b) modifikované **Tyrodovo medium** obsahující glycerol a sacharozu

Preferovány jsou preparáty založené především na Tyrodově mediu + přidávají se glycin cholesterol a další látky

Kryoprotektivní činidla jsou obvykle přidávána k ejakulátu při pokojové teplotě, pomalu a při konstantním víření směsi.

- to se provádí z toho důvodu, aby se zabránilo potencionálnímu poškození spermií při změně jeho objemu nebo vlivem samotného kryoprotektiva

- směs se nechá vířit 10 minut, čímž se získá přiměřený **čas pro pronikající** kryoprotektiva ke vstupu do buněk a pro dokončení změn v objemu spermií

Kryokonzervace spermií

- kryokonzervace v původním ejakulátu nebo po promytí
- po promytí větší reprodukovatelnost a odstranění balastních látek
- nejprve nechat ejakulát zkapalnit
- po smíchání s kryoprotektivy, rozplníme do pejet a 500 ul a zatavíme
- vhodné v zatavených pejetách umožňující těsné uzavření
- kryotuby se šroubovacím uzávěrem – nutné opatřit zatavitelným obalem

SpermFreeze - mražení

– ekvilibrace při RT, 2h

Freezing



1. Assess the semen sample

Ensure that both liquified semen and SpermFreeze Solution are at

ambient temp

Measure the total volume of semen and carry out semen analysis as required.



2. Add SpermFreeze Solution

Dilute with equal volume of semen and SpermFreeze Solution. Add SpermFreeze Solution slowly and dropwise to the semen and then carefully tilt after each drop added. Close the lid tightly and turn the tube upside down 20 times, being careful not to create bubbles.



3. Leave in room temperature

> 10 min

4. Load vials

Mark cryovials with patient ID and load the semen mixture into cryovials. Do not fill cryovials completely to allow for expansion.



5. Freezing

Place the cryovials upright on a 1-3 cm Styrofoam board in a liquid nitrogen bath. Leave for

30 min



Optional, this step can be performed using a slow-freeze machine programmed for sperm freezing.*



6. Store in N₂(l)

Transfer the cryovials quickly into the liquid nitrogen and store at

-196 °C

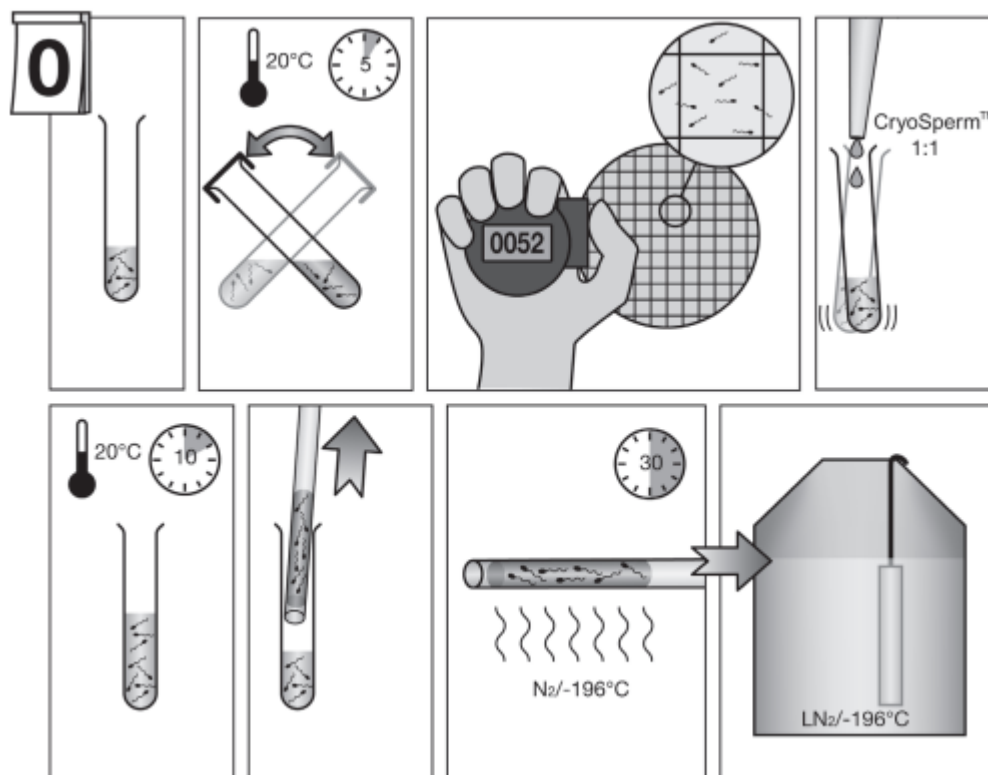
CryoSperm



Pokyny pro použití

Zamrazování:

1. Předehříváte přípravek CryoSperm™ minimálně **2 hodiny** při pokojové teplotě.
2. Po zkapalnění změřte celkový objem ejakulátu a podle potřeby proveďte analýzu.
3. Vzorek spermatu a přípravku CryoSperm™ musí mít pokojovou teplotu. Dále naředíte sperma přípravkem CryoSperm™ v poměru 1:1 (obj./obj.). Médium je třeba do spermatu přidávat kapku po kapce a směs se musí po každém přidavku opatrně zamíchat.
4. Ponechte směs minimálně **10 minut** při pokojové teplotě.
5. Naplňte naředěné semeno do pejet nebo do kryoskopických zkumavek a utěsněte podle doporučení jejich výrobce.
Je důležité ponechat ve spodní části tyčinky volný prostor pro utěsnění a umožnit expanzi roztoku během zmrazování.
6. Ponechte tyčinky **30 minut** v horizontální poloze těsně nad povrchem kapalného dusíku (LN₂). Zkumavky pro hluboké zmrazování je třeba připojit k trubici a ponechat na stejnou dobu nad povrchem LN₂.
7. Na závěr přeneste tyčinky nebo kryoskopické zkumavky do LN₂ a uskladněte při -196 °C.



Evidence vzorků – popis zkumavky

Štítek (samolepící) zahrnující:

- jméno a příjmení
- rodné číslo
- pracoviště
- datum
- doba expirace (v ČR 28 let)
- SEC kód u dárců
- Že se jedná o spermie



- Na kryozkumavky často barevné markery, pejety barevně odlišené
- **Informované souhlasy**: obsahují upozornění jak bude se vzorky nakládáno v případě neuhrazení skladování
- **Onkologičtí pacienti** skladování 10 let hradí pojišťovna – povinnost pacientů doložit zahájení onkologické terapie

Evidence vzorků – kryoprotokol

Kryoprotokol zahrnující:

- jméno a příjmení
- rodné číslo
- pracoviště
- datum
- doba expirace
- doba uhrazení skladování
- SEC kód u dárců
- výsledky serologií – HIV Ag/Ah, HBsAg, aHBc, antiHCV, SYPH (RRR)

u dárců navíc: TPHA (Syph), chlamidie (moč), Connexin, CFTR, karyotyp...

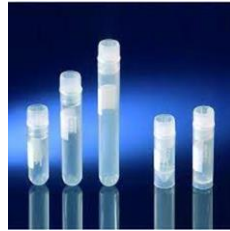
- uložení vzorků
- šarže kryo média
- karanténa-přesun z karatény
- Kontaktní údaje !!! mail i telefon, čím více tím lépe



Materiály pro uchovávání směsi ejakulátu a spermíí

- obvykle jsou používány pouze dva typy obalů při kryoprezervaci lidského spermatu:

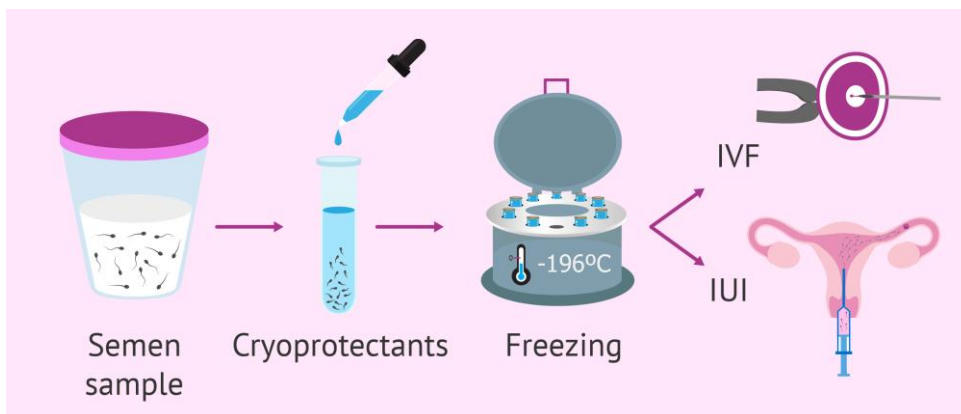
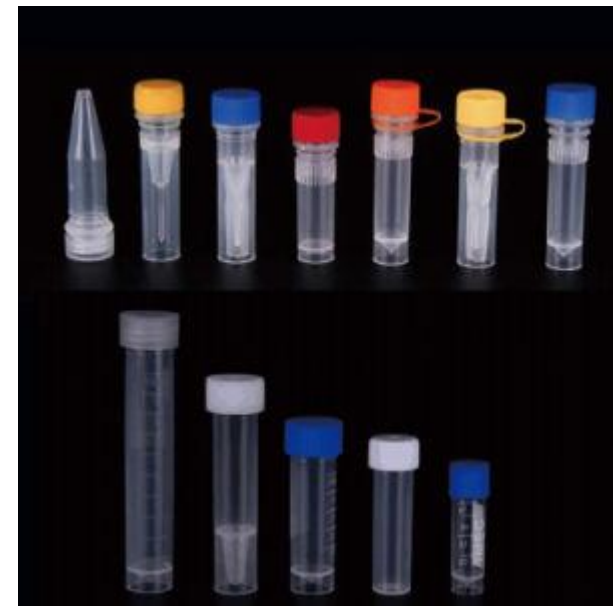
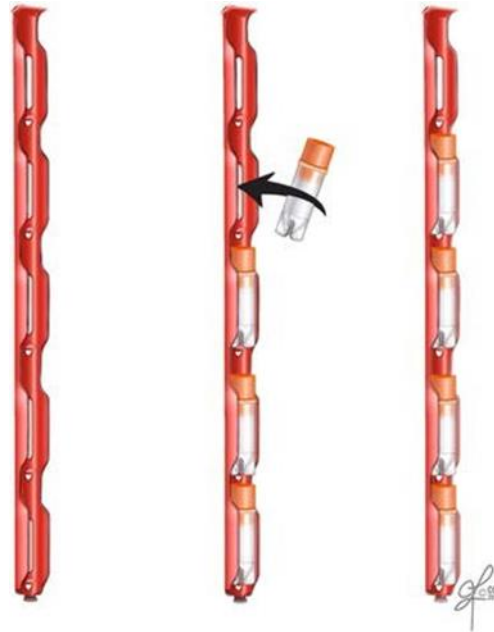
- kryozkumavky
- pejety



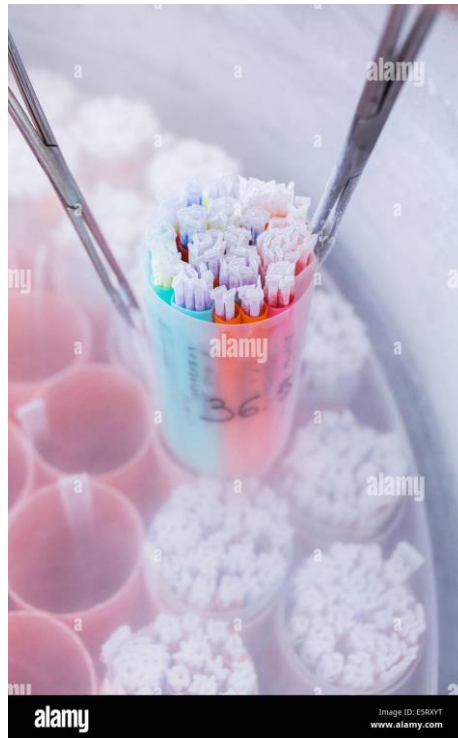
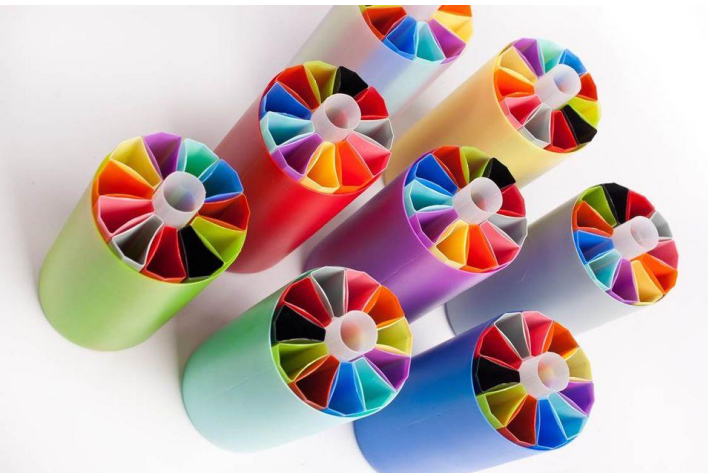
- kryozkumavky lze lehce sterilně naplnit a udrží 1,0 ml -1,5 ml směsi spermatu s kryoprotektivou
- šroubovací zkumavky nemají příliš těsné uzávěry **tekutý dusík proniká** do nádob a během ohřívání hrozí roztržení buněk
- pejety 0,25-0,5 ml - uskladnění v nádržích s kapalným dusíkem je objemné a tato technika se dá provést pouze s částí spermatu

Kryozkumavky

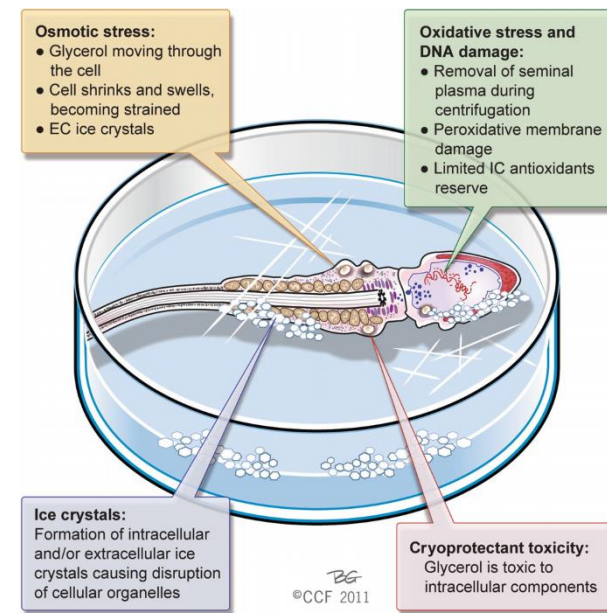
šroubovací - zatavitelné



Kryopejety – malý objem



Kryokonzervace spermií - poškození



- přestože mají spermie ideální tvar na mražení tak jejich kryoprotekce **není příliš efektivní co do počtu buněk (50-90% přežívá)**
- poškození struktury buněčné membrány, buněčný metabolismus a mitochondriální bioenergetické procesy
- po rozmrazení často **degradace proteinů**

- tyto změny mají vliv na parametry spermií: **snížení pohyblivosti** nebo změna morfologie
- mitochondriální poškození, zhoršení motility, morfologie a může být během kryokonzervace ovlivněna i integrita DNA spermií

Rozmražování spermií

Existuje několik technik:

1. rozmrazování při pokojové teplotě po dobu 10 minut a následný průchod termostatem při 37 °C po dobu dalších 10 minut
2. rozmrazování v termostatu a vodní lázni při teplotě 37 °C po dobu 10 minut
3. rozmrazování při pokojové teplotě po dobu 15 minut

- jakmile je sperma rozmrazeno, oddělí se od kryokonzervačního média promytím v kultivačním médiu a odstředění

Kryokonzervace spermií- romražení

- bezprostředně po roztátí obsah zpracujeme
- pejetu dezinfikujeme a sterilními nůžkami odstříhneme oba konce
- pokud jsou spermie kryokonzervovány v kryotubě, tubu vybavíme z obalu a otevřeme
- směs spermií a kryoprotektiva zředíme promývacím roztokem a centrifugujeme
- vniklá peleta spermií může být buď resuspendována nebo podrobena swim-up

SpermFreeze - rozmrazení

1. Remove cryovials from N2(l)

Remove cryovials from -196 °C and place them in a water bath at

35 ± 2 °C 10 min

Wipe the cryovials dry with a clean paper towel.



2. Dilute with G-IVF PLUS

Transfer semen mixture to clean test tubes and dilute with equal amount of equilibrated G-IVF PLUS. G-IVF PLUS should be added dropwise to the semen mixture and the solution carefully mixed after each addition.



3. Gradient separation

Continue with gradient separation according to the G-Series manual.



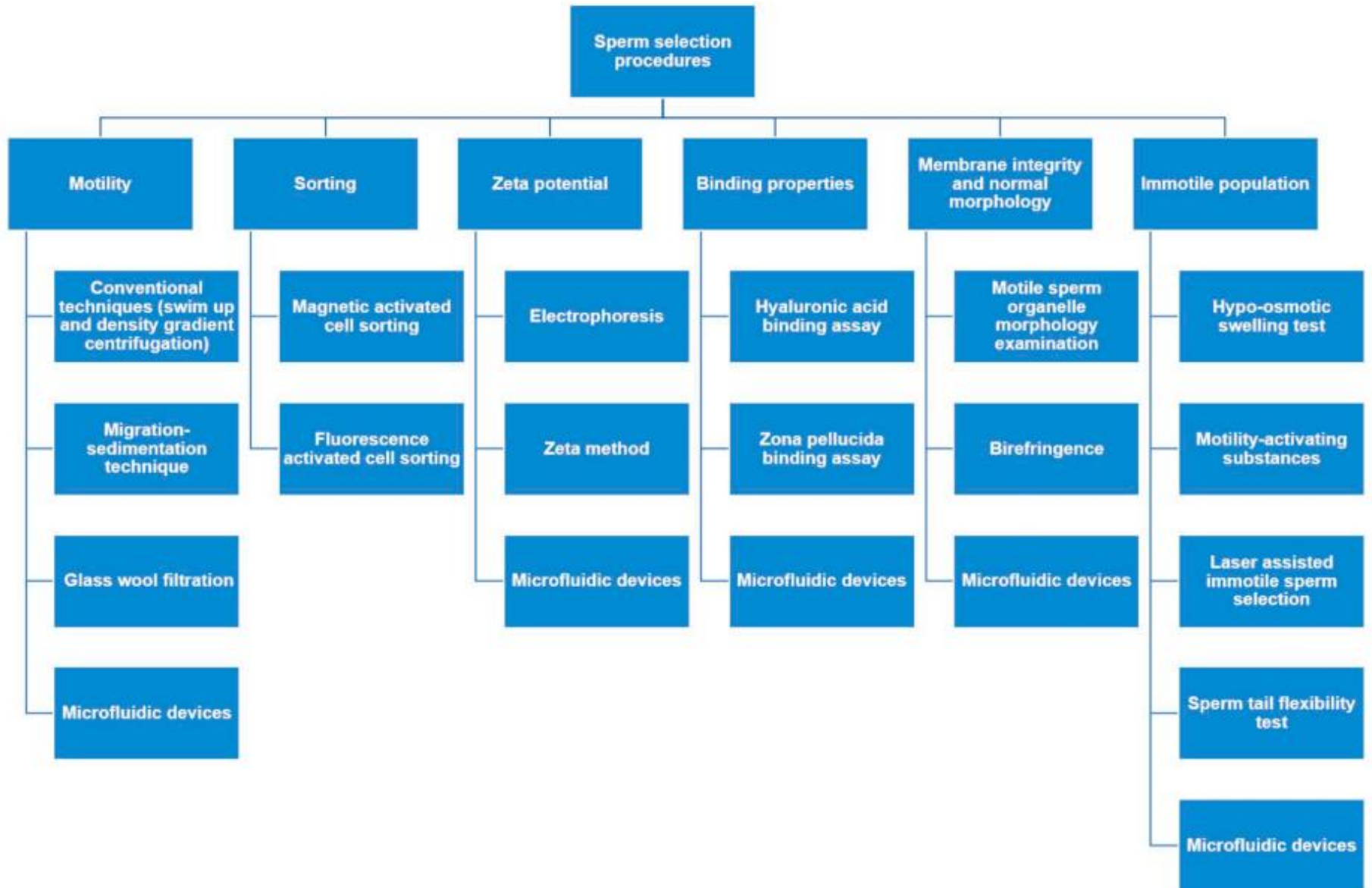
SpermGrad™



G-IVF PLUS
or



SpermGrad RTU



Základní separační techniky spermií

- původně vyvinuty pro klasické IVF ne pro ICSI
- u kryokonzervovaných spermií poloviční koncentrace a nízký objem

Základní separace motilních spermií

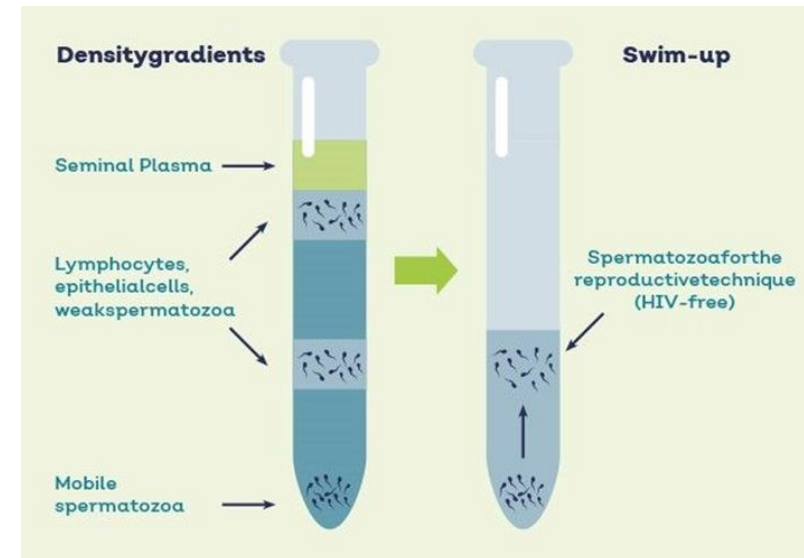
swim-up – klasický

- direct swim-up

hustotní gradient (DGC)

sekundární swim-up

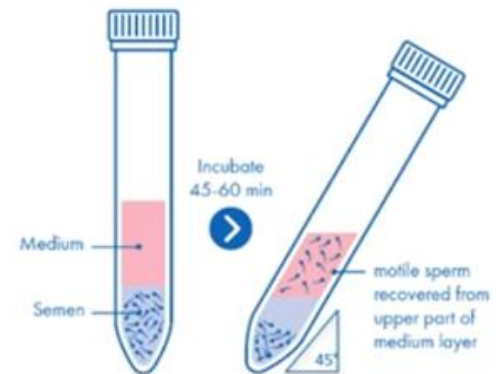
- selekce vitálních a progresivních spermií
- swim-up oproti DGC výrazněji snižuje počet spermií s poškozenou DNA ve vzorku



<https://europe-ivf-life.com/how-is-life-created-in-an-ivf-lab/>

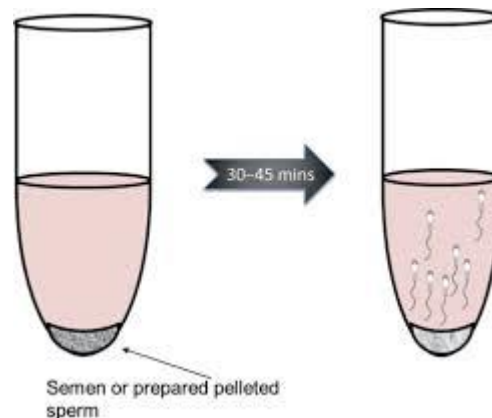
Swim – up (konvenční)

- na promytí používat izotonické roztoky
- swim-up médium, do kterého spermie vycestují je vhodné používat fertilizační médium obsahující **glukózu**, **Ca ionty** a další látky podporující motilitu spermií
- poškození spermií **po kryo nejčastěji přes ROS**
- centrifugace neoddělí od sebe **dobré či špatné spermie a leukocyty navzájem**, po posledním promytí peletu opatrně převrstvíme fertilizačním médiem – vhodné sledovat dobu swim-up
 - pokud příliš krátce – málo spermií
 - pokud příliš dlouho – vysoká koncentrace, ale horší motilita
- vhodné je šikmé uložení zkumavek v inkubátoru



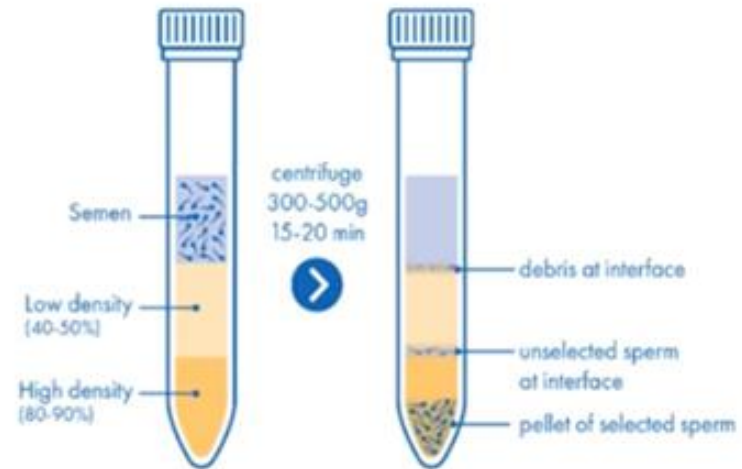
Direct swim-up (primární swim-up)

- přímý swim-up - bez centrifugace
- lze ejakulát podvrstvit po fertilizační medium nebo vrstvu ejakulátu opatrně převrstvit fertilizačním médiem
- poté v inkubátoru 37 °C, 5% CO₂, 1h
- prodloužení času nad 1h **nevhodné** – postupné stárnutí spermií
- spermie stáhneme pouze ze svrchní vrstvy
- do oplození necháme suspenzi v popsané zazátkované zkumavce
- potřeba dobrá koncentrace – **nepříliš vhodné pro kryo spermie**



Hustotní gradient (denzitní gradient)

- nejčastěji dvouvrstevný gradient
- oddělení spermií od bakterií, plísní a částečně virů
- vhodná u pozitivních pacientů
- **doporučováno po kryo - Vitrolife**

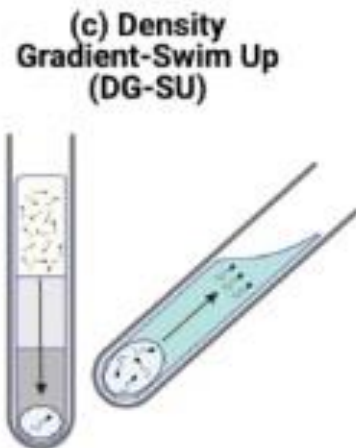


Příklad: do centrifugační zkumavky napipetujeme 1 ml hustšího roztoku (např. 80 %) na něj opatrně navrstvíme 1 ml řidšího roztoku (např. 40 %) a nahoru navrstvíme 1 ml ejakulátu

- centrifugujeme 15-20 min při 400g

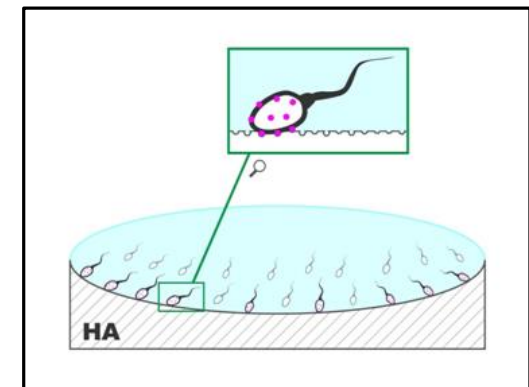
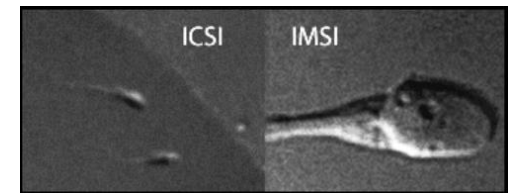
Sekundární swim-up

- kombinace klasického swim-up a hustotního gradientu
- výhody obou přístupů – odstranění patogenů a pečlivý výběr pouze živých spermií
- po centrifugaci připravíme získanou suspenzi pro swim-up jako u swim-up a necháme 1h v inkubátoru
- opatrně stáhneme svrchní vrstvu
- doba swim-up by se neměla prodlužovat déle než 60 min
- **po kryo problém u nízké koncentrace**



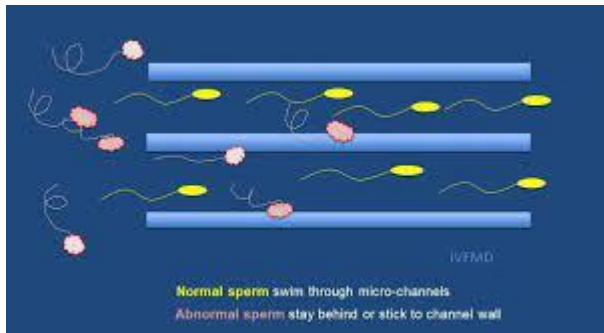
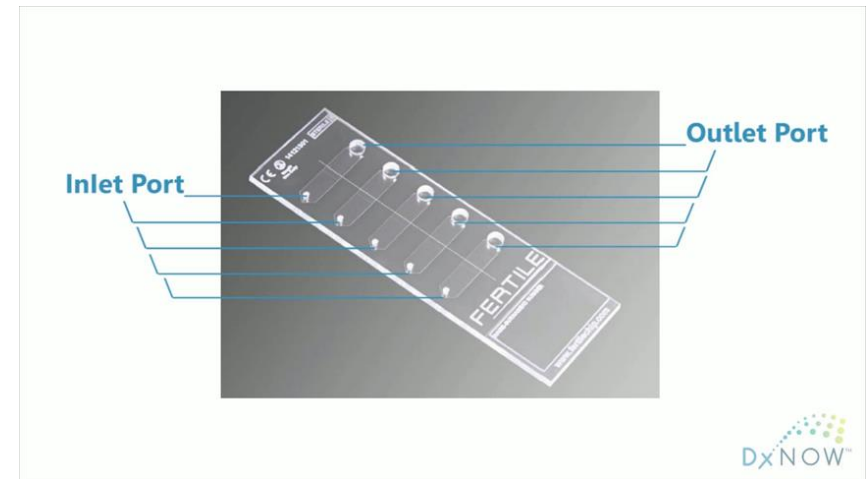
Pokročilé separační metody

- separace morfologická – **IMSI** (*náročné, drahé, pouze morfologické parametry*) už se příliš nepoužívá nejefektivnější u OAT
- pozitivní selekce pomocí vazby na hyaluronan – **PICSI** (*spojené s redukcí aneuploidních spermií*)
 - jedna z nejrozšířenějších metod výběru spermií
 - spermie s vysokou afinitou k hyaluronanu jsou zralejší vhodnější pro fertilizaci
 - HFEA Human Fertilisation and Embryology Authority (2019) – klasifikace red



Mikrofluidní chipy: Zymot (Fertile)

- 5 kanálků
- délka 15 mm
- hloubka 50 μm
- objem 15 μl
- simulace cervikálního hleny

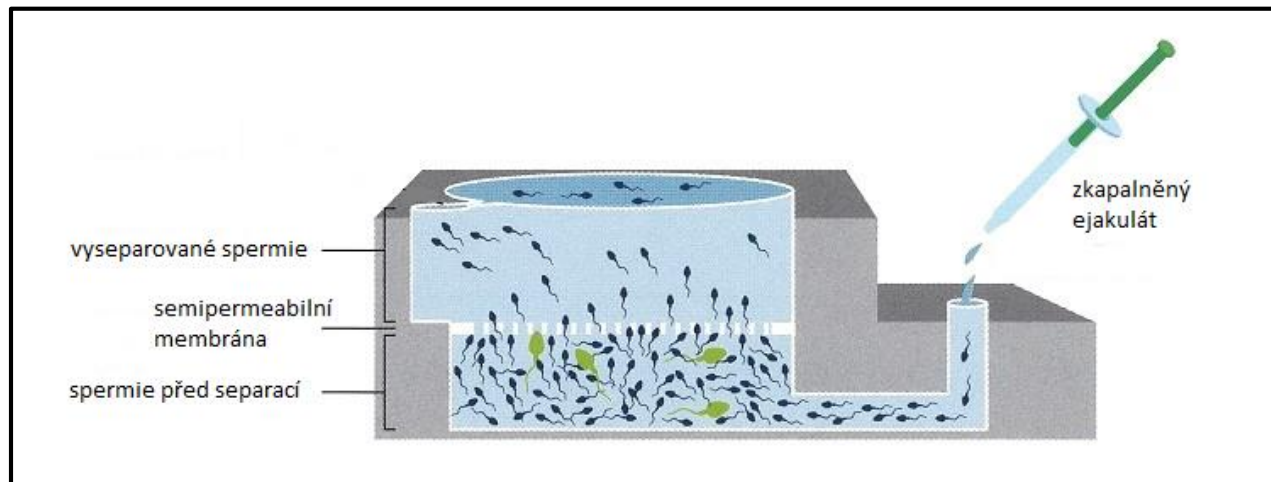
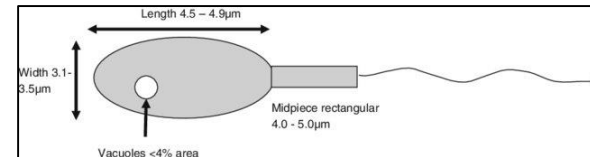


tunel vysoký 5 m a dlouhý 1,5 km



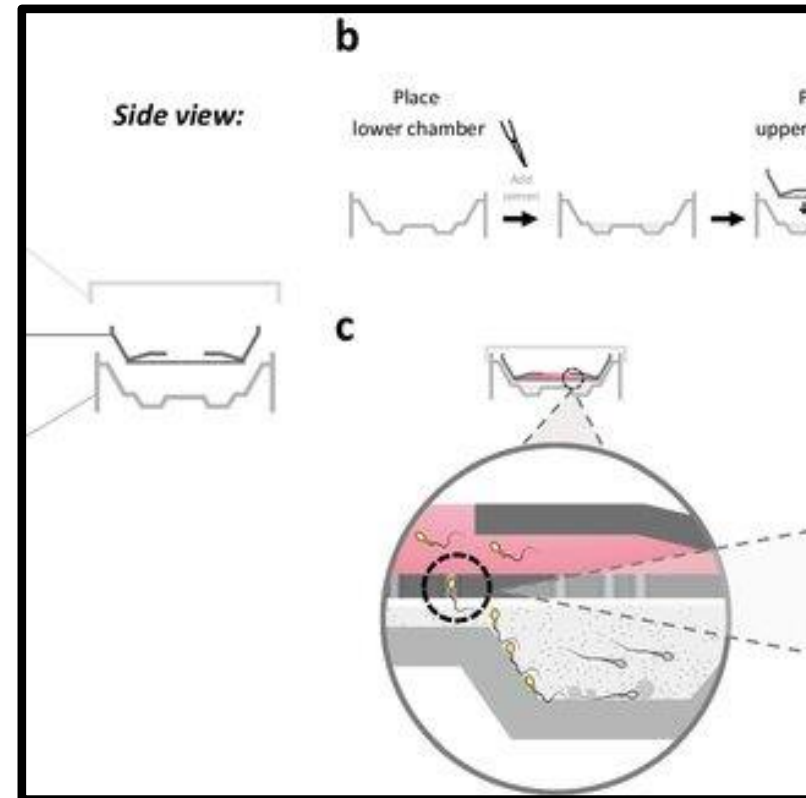
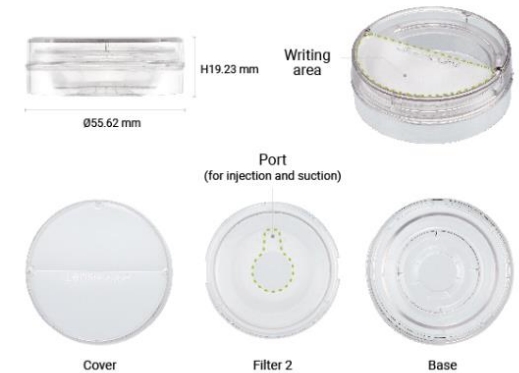
Mikrofluidní chipy: Zymot Multi (Fertile Plus)

- semipermeabilní membrána o velikosti pórů $8 \mu\text{m}$
- objem 0,85 ml ejakulátu
- $37 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 30 minut
- u kryo vhodné a efektivní
- u oligo může být problém



Mikrofluidní chipy CA0/CA1

- firma LENSHOOK
- polykarbonátová membrána s póry 5 μm rozděluje prostředí na 2 kompartmenty
- snadná manipulace
- bez centrifugace
- objem 1 ml ejakulátu

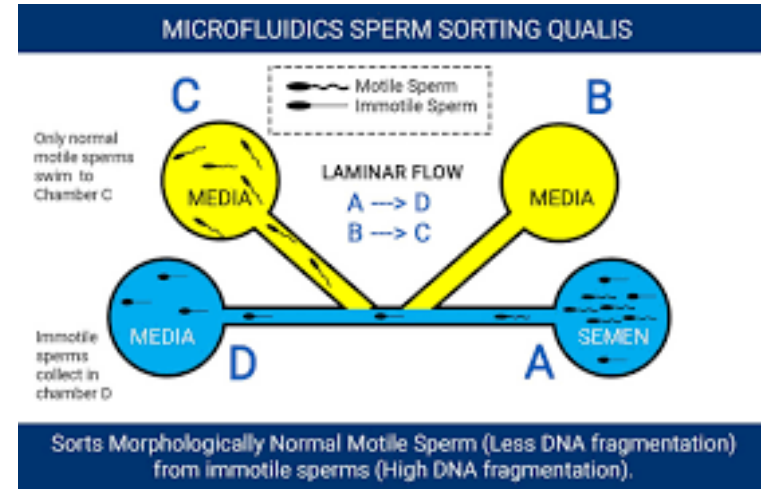


Selekce spermií: lab-on chip

průchod speciální komůrkou
vybrány jsou nejpohyblivější spermie

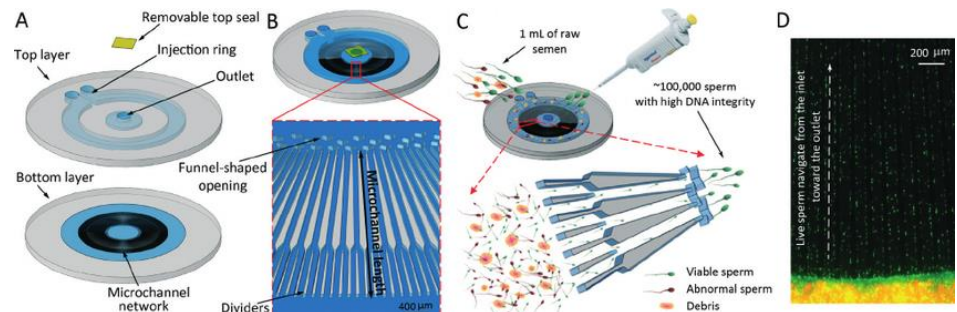
Separáční čip využívající průtok média

- krátká manipulace
- eliminace poškození spermií
- pouze 65 ul ejakulátu, dobré DFI
- výborná motilita a morfologie



Separáční čip McGill

- 500 radiálních mikrokanálek, viskozní médium, selekce 10 - 20 min
- šířka 100 μm, spermie s nízkou mírou poškození DNA – nejrychlejší



Srovnání DGC x CA0 x Zymot

+ lepší motilita, morfologie

+ nižší DFI

Journal of Assisted Reproduction and Genetics (2023) 40:1855–1864
<https://doi.org/10.1007/s10815-023-02838-4>

GAMETE BIOLOGY



Live motile sperm sorting device for enhanced sperm-fertilization competency: comparative analysis with density-gradient centrifugation and microfluidic sperm sorting

Cheng-Teng Hsu¹ · Chun-I. Lee^{2,3,4,5} · Fong-Sian Lin¹ · Fang-Zong Wang¹ · Hui-Chen Chang¹ · Tse-En Wang¹ · Chun-Chia Huang^{2,5} · Hui-Mei Tsao² · Maw-Sheng Lee^{2,3,4,5} · Ashok Agarwal^{6,7,8}

		Normozoospermic (n=34)			
Parameters		Neat	DGC	Zymot	CA0
Concentration	Median (IQR) (M/mL)	38.5 (27.0-56.7)	6.5 (3.1-14.1) ^a	4.8 (2.4-8.5) ^{ab}	5.7 (2.5-8.3) ^c
	Change to neat (%)	-	-85.0 ^a	-89.2 ^b	-87.6 ^b
Total motility	Median (IQR) (%)	56.2 (51.6-68.7)	85.8 (78.7-91.2) ^a	90.7 (76.9-95.5) ^{ab}	94.0 (91.3-95.9) ^c
	Change to neat (%)	-	+40.0 ^a	+46.4 ^a	+57.6 ^c
Motile sperm count	Median (IQR) (M)	24.2 (14.6-34.8)	5.4 (2.4-13.3) ^a	2.2 (0.9-3.6) ^{ab}	2.8 (1.2-3.9) ^b
	Change to neat (%)	-	-79.9 ^a	-92.8 ^b	-90.2 ^b
Progressive motility	Median (IQR) (%)	47.4 (39.5-55.9)	80.6 (69.2-86.4) ^a	85.6 (73.9-92.7) ^{ab}	90.8 (86.7-93.9) ^c
	Change to neat (%)	-	+50.5 ^a	+64.8 ^b	+85.3 ^c
Rapid progressive motility	Median (IQR) (%)	35.7 (25.8-46.7)	75.8 (65.8-82.3) ^a	77.7 (64.5-85.1) ^a	83.6 (77.9-87.5) ^b
	Change to neat (%)	-	+87.6 ^a	+97.7 ^a	+125.3 ^b
Slow progressive motility	Median (IQR) (%)	10.9 (8.7-13.8)	4.4 (3.1-5.4) ^a	7.1 (4.1-8.9) ^{ab}	7.1 (4.8-9.7) ^b
	Change to neat (%)	-	-64.4 ^a	-49.9 ^b	-38.4 ^b
Normal morphology rate	Median (IQR) (%)	5.5 (4.5-8.0)	8.1 (5.6-10.9) ^a	8.1 (7.0-12.0) ^{ab}	10.3 (7.6-14.5) ^c
	Change to neat (%)	-	+22.5 ^a	+47.7 ^b	+57.7 ^c
DFI	Median (IQR) (%)	18.5 (10.5-22.8)	11.8 (6.9-19.8) ^a	3.7 (2.3-6.1) ^{ab}	2.4 (1.6-3.4) ^c
	Change to neat (%)	-	-22.0 ^a	-76.1 ^b	-86.2 ^c
AR	Median (IQR) (%)	13.2 (9.3-17.9)	13.4 (8.0-18.4) ^a	6.5 (4.0-9.0) ^{ab}	4.7 (2.5-6.8) ^c
	Change to neat (%)	-	-7.0 ^a	-51.6 ^b	-62.0 ^c
VCL	Median (IQR) (µm/s)	55.3 (42.6-58.5)	94.3 (79.1-108.0) ^a	86.3 (80.0-92.2) ^{ab}	80.2 (75.3-98.5) ^b
	Change to neat (%)	-	+78.1 ^a	+59.6 ^b	+67.9 ^b
ALH	Median (IQR) (µm)	4.5 (3.8-5.0)	6.2 (5.1-7.1) ^a	6.2 (5.5-6.6) ^a	5.5 (5.1-6.9) ^a
	Change to neat (%)	-	+41.2 ^a	+40.7 ^a	+37.6 ^a
LIN	Median (IQR) (%)	42.8 (41.1-47.3)	35.5 (30.4-41.2) ^a	34.5 (31.5-37.9) ^a	32.5 (29.3-38.7) ^a
	Change to neat (%)	-	-23.2 ^a	-22.6 ^a	-26.5 ^a

		Non-normozoospermic (n=85)			
Parameters		Neat	DGC	Zymot	CA0
Concentration	Median (IQR) (M/mL)	15.5 (10.2-30.3)	2.5 (1.4-6.6) ^a	1.7 (1.0-3.6) ^{ab}	1.3 (0.7-3.0) ^c
	Change to neat (%)	-	-79.3 ^a	-88.5 ^b	-92.0 ^c
Total motility	Median (IQR) (%)	40.0 (32.3-52.6)	66.8 (38.7-79.7) ^a	78.8 (67.8-89.1) ^{ab}	89.2 (80.9-93.8) ^c
	Change to neat (%)	-	+47.5 ^a	+88.8 ^b	+115.8 ^c
Motile sperm count	Median (IQR) (M)	6.2 (3-12.7)	1.29 (0.57-3.91) ^a	0.61 (0.34-1.44) ^{ab}	0.57 (0.28-1.38) ^c
	Change to neat (%)	-	-70.7 ^a	-88.0 ^b	-89.9 ^c
Progressive motility	Median (IQR) (%)	33.1 (23.8-43.4)	55.3 (28.4-71.7) ^a	70.3 (54.1-84.2) ^{ab}	80.4 (70.6-87.1) ^c
	Change to neat (%)	-	+45.5 ^a	+99.2 ^b	+131.0 ^c
Rapid progressive motility	Median (IQR) (%)	22.8 (13.8-33.0)	50.3 (25.6-66.2) ^a	62.9 (48.8-78.7) ^{ab}	74.2 (63.8-82.0) ^{bc}
	Change to neat (%)	-	+84.2 ^a	+157.9 ^b	+205.1 ^c
Slow progressive motility	Median (IQR) (%)	9.2 (6.1-11.1)	2.3 (0.5-3) ^a	4.1 (0.9) ^{ab}	4.6 (0.9-8) ^c
	Change to neat (%)	-	-79.5 ^a	-55.7 ^b	-43.9 ^c
Normal morphology rate	Median (IQR) (%)	3.0 (2.0-4.5)	5.1 (3.0-7.0) ^a	6.3 (4.0-8.5) ^{ab}	8.5 (6.0-10.8) ^{bc}
	Change to neat (%)	-	+45.9 ^a	+75 ^b	+111.7 ^c
DFI	Median (IQR) (%)	13.9 (9.4-21.2)	18.2 (9.5-35.9) ^a	6.2 (3.0-13.5) ^{ab}	4.0 (2.0-7.4) ^c
	Change to neat (%)	-	+22.3 ^a	-52.9 ^b	-73.0 ^c
AR	Median (IQR) (%)	9.5 (6.5-14.5)	8.5 (5.5-17.5) ^a	5 (3.0-8.5) ^{ab}	4 (2.5-6.0) ^c
	Change to neat (%)	-	-5.4 ^a	-50 ^b	-60 ^c
VCL	Median (IQR) (µm/s)	45.5 (38.7-56.0)	77.9 (66.4-93.4) ^a	75.9 (64.9-90.2) ^{ab}	76.8 (66.0-88.6) ^{ab}
	Change to neat (%)	-	+63.3 ^a	+66.7 ^a	+64.4 ^a
ALH	Median (IQR) (µm)	3.9 (3.2-4.7)	5.2 (4.4-5.9) ^a	5.4 (4.6-6.6) ^{ab}	5.3 (4.7-6.3) ^{ab}
	Change to neat (%)	-	+34.0 ^a	+45.7 ^b	+38.7 ^b
LIN	Median (IQR) (%)	42.2 (39.2-46.8)	35.3 (31.4-40.6) ^a	35.6 (32.4-39.9) ^a	33.7 (29.1-38.2) ^{ab}
	Change to neat (%)	-	-16.3 ^a	-16.4 ^a	-22.6 ^b

Srovnání swim-up/CA0

- výsledky naší laboratoře
- z hlediska **koncentrace** (vzestup na 113%) ani motility (pokles na 95 %) **nebyl zjištěn** statisticky významný rozdíl
- z hlediska **integrity DNA** byl zjištěn statisticky významný rozdíl při srovnání relativních hodnot **pokles** ze 100% na 72,09% (hladina P 0,0017)

Koncentrace		DFI index		Motilita	
Swim-up	CA0	Swim-up	CA0	Swim-up	CA0
100	90.0	100	65.6	100	94.7
100	89.3	100	42.9	100	100
100	58.5	100	37.5	100	102.2
100	77.7	100	91.9	100	88.9
100	125.3	100	60.5	100	105.5
100	50.0	100	106.2	100	88,9
100	154.7	100	49.4	100	105.5
100	124.5	100	92.9	100	88.9
100	106.6	100	90.2	100	94.1
100	257.1	100	83.8	100	89.4

Označení vzorku	Integrity DNA – DFI index		
	před zpracováním	po zpracování	
		Swim-up	CA0
CA01	18	12.5	8.2
CA02	18	15.6	6.7
CA03	8.7	16.8	6.3
CA04	23	11.2	10.3
CA05	21	15.2	9.2
CA06	16	11.3	12.0
CA07	20	15.8	7.8
CA08	16	14.2	13.2
CA09	35	18.4	16.6
CA10	14.5	7.4	6.2

Výhody a nevýhody metody mikrofluidních metod při separaci po kryokonzervaci

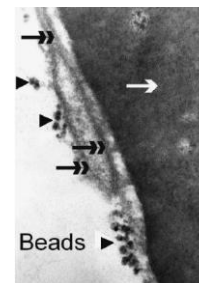
Výhody

- rychlé a jednoduché, opakovatelné
- bez centrifugace
- konzistentní výsledky, dobrá čistota vzorku
- malý podíl spermií s fragmentací DNA
- spermie s normální stavbou akrozomu

Nevýhody

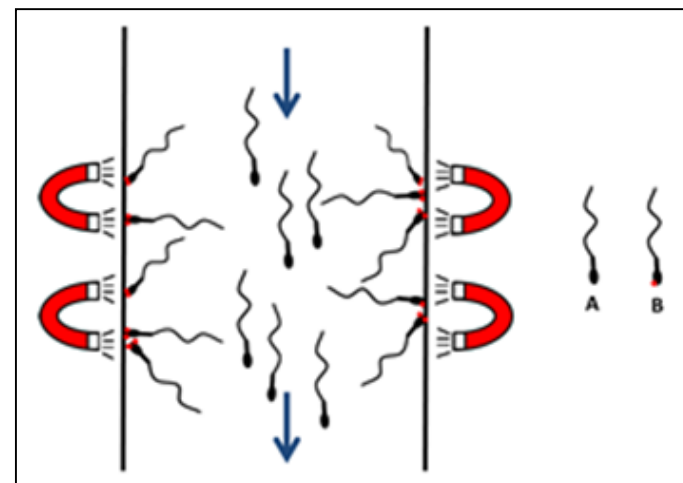
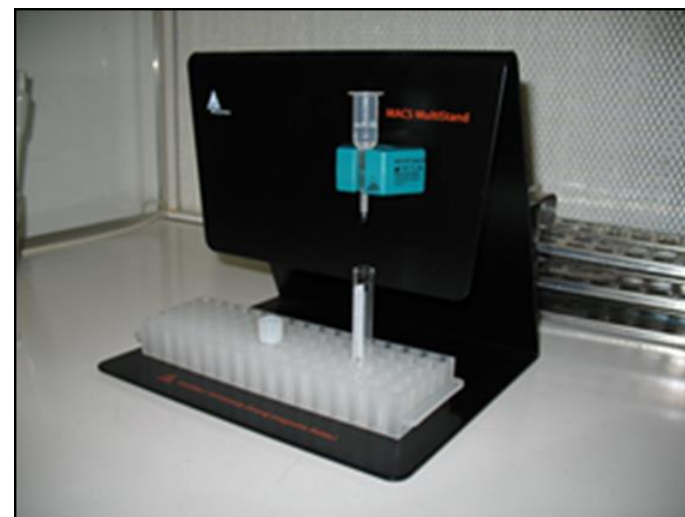
- snižují množství použitelných spermií (malé objemy)
- zpravidla nevhodný před klasickým IVF či IUI
- nevhodné pro pacienty s těžkou oligozoospermií
- vysoké náklady na materiál

MACS – Magnetic Activated Cell Sorting

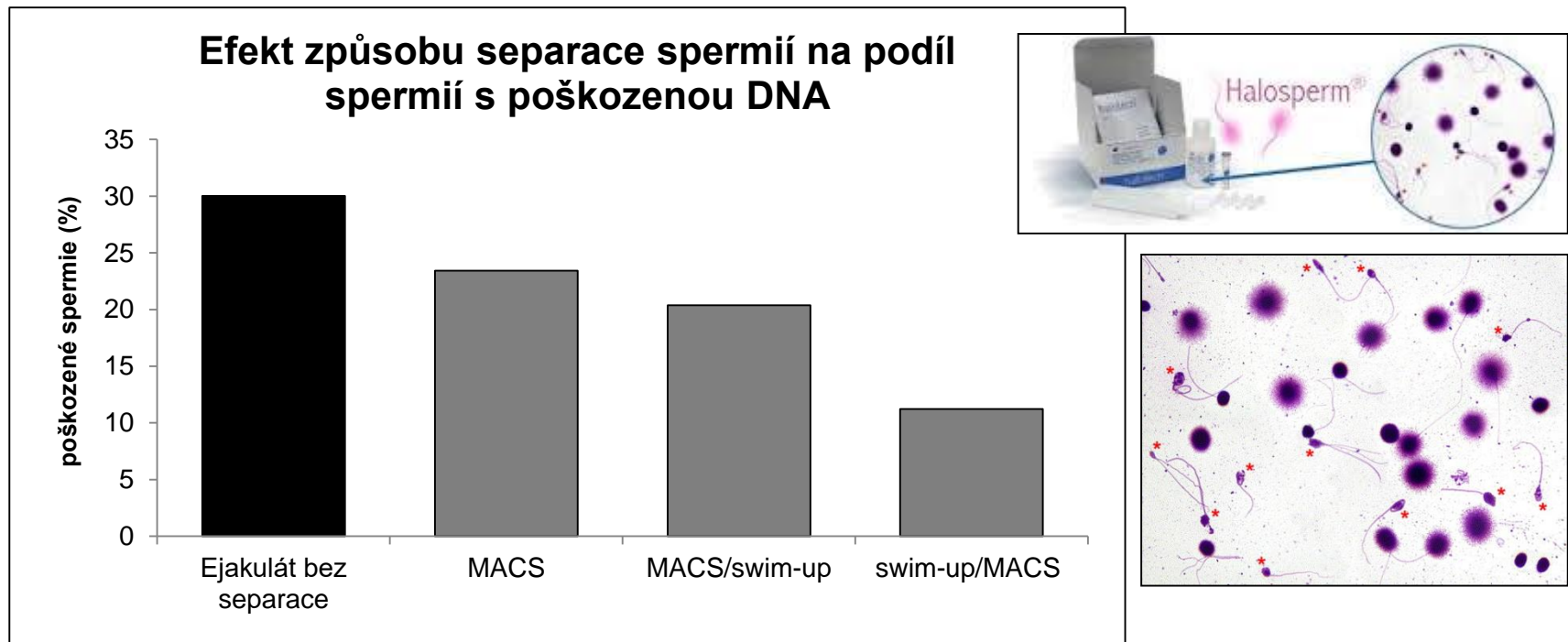


Paasch et al., 2003)

- spermie s poškozenou DNA vstupují do **apoptózy**
- vazba magnetických partikulí (50 nm) (díky Annexinu V) na fosfatidylserin, který je u apoptotických spermií na povrchu
- selekce pomocí speciálního **magnetu**
- lze kombinovat s dalšími metodami selekce spermií
- velice dobré výsledky u spermií po kryokonzervaci
- neoznačují se neapoptotické spermie !!
- u vzorků po kryo snižuje podíl spermií s fragmentací DNA – vhodné po kryo



Naše zkušenosti s metodou MACS

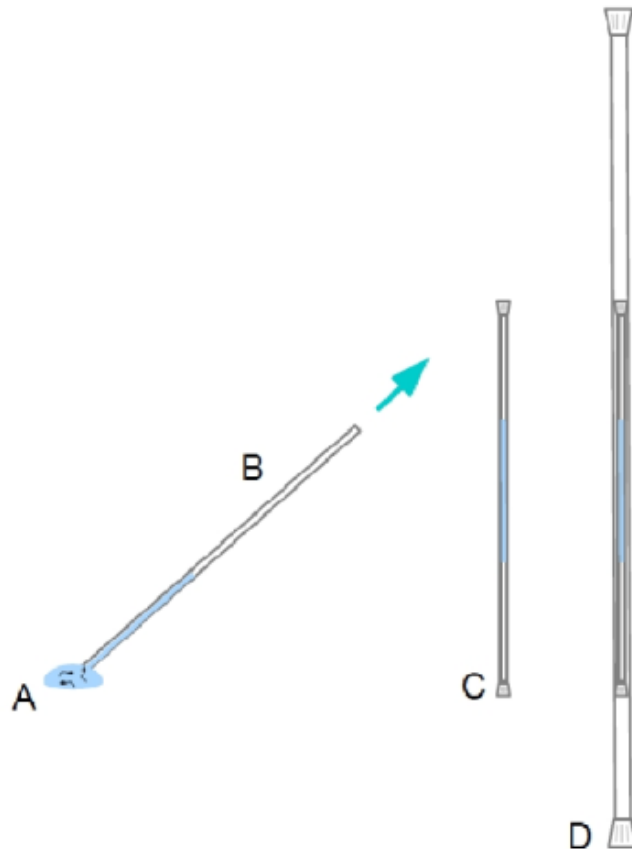


- spermie každého pacienta (n = 16) separovány 3 způsoby
- použití MACS snížilo podíl poškozených spermií ve vzorku
- nejefektivnější způsob je použití metody MACS na odseparované spermie (ověřeno metodou HALOSPERM)

Kryokonzervace materiálu z varlete a nadvarlete

- kryokonzervace materiálu získaného po punkci nadvarlete nebo varlete je nedílnou součástí postupů u azoospermie
- synchronizace odběrů oocytů a spermií přináší logistické problémy a použití kryokonzervovaných spermií přináší velmi dobré výsledky
- vlastní kryokonzervace je stejná jako u spermií
- pokud přímo izolované spermie, tak je vhodné použít modifikované kryokonzervace malého množství
- ke kapce spermií přidáme stejnou kapku kryo roztoku a zamícháme poté nasajeme do malé pejety průměr 1 mm dlouhé 10-20 mm a zatavíme
- to zatavíme do normální pejety

Kryoprezervace materiálu z varlete a nadvarlete



Kryokonzervace malého množství materiálu

- A - kapka směsi spermií a roztoku kryoprotektiva
- B - tenká plastová pipeta
- C - zatavená pipeta se sloupečkem kryoprotektiva obsahujícího spermie
- D - Pejeta se zatavenou pipetou

Kryoprezervace testikulární tkáně

- během posledních několika desetiletí se stále **zvyšuje počet dětí**, které přežívají zhoubný nádor
- pozdějšími zdravotními následky léčby, nejzávažnější je **neplodnost**
- k léčbě zhoubných nádorů se často používají **gonadotoxické** terapie
- kryoprezervace testikulární tkáně je pravděpodobně **jediné možné východisko** pro prepubertální chlapce, s tímto typem léčby
- spermatogeneze (spermarche) začíná až v pubertálním věku nejdříve od 12 let
- nemají sperma ani zralé spermie pro kryoprezervaci
- podobně lze postupovat v případech pokud se nepodaří ani vibroejakulací či elektroejakulací získat spermie

Chirurgické získání spermií

TESA (testicular sperm aspiration) – lokální A, málo používaný přístup biopsie varlat

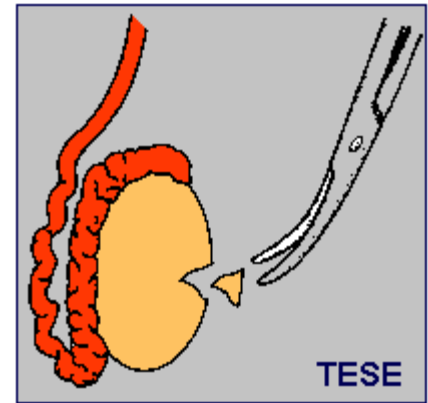
PESA (percutaneous epididymal sperm aspiration) lokální A, nejméně invazivní u mužů, kde je obstrukční azoospermie

MESA (microsurgery epididymal sperm aspiration) celková A

- aspirát dáme do sterilní misky a zkontrolujeme přítomnost spermií
- pokud jich je málo, tak se vyberou pipetou do kapky fertilizačního média
- pokud jich je hodně, tak se použije centrifugace v hustotním gradientu
- pokud nejsou, tak se dělá TESE

Chirurgické získání spermií

TESE (testicular sperm extraction)

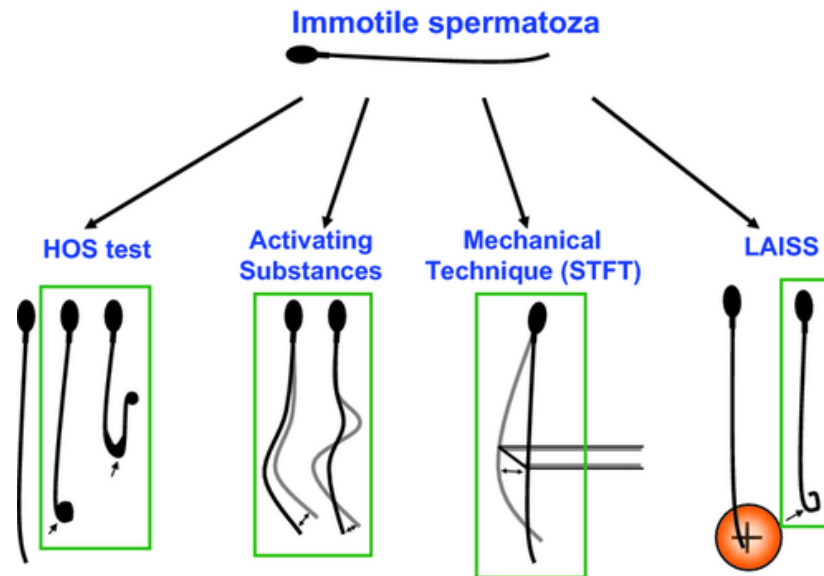


tkáň propláchneme v promývacím roztoku a dáme do sterilní misky tak aby byla tkáň pod hladinou media

Ize nyní izolovat spermie z varletní tkáně 3 způsoby:

- pomocí zahnutých sterilních jehel
- pomocí sítky třenky
- desintegrace tkáně pomocí kolagenázy (může dojít k poškození spermatid)
- poté hledáme spermie pod mikroskopem
- pokud jich je málo, tak je vybereme pipetou, pokud hodně, tak lze použít separační techniku
- varletní tkáň lze uchovávat v mediu až 3 dny při 4C

Selekce nepohyblivých spermíí



-získané spermie mohou být nepohyblivé a je důležité rozlišit nepohyblivé živé a mrtvé

- použití Theofilinu (aktivátor spermíí) – u hlodavců detekováno narušení vývoje, nutné promytí spermíí
- mechanická technika (STFT) – sperm tail flexibility test – náročná, pouze pro zkušené, nevhodná po rozmražení

LAISS – laser assisted immotile sperm selection

- velice efektivní metoda
- pozitivní selekce viabilních spermií laserem
- vhodná jak pro pacienty po TESE, tak i pro pacienty s primární ciliární diskinezí/Kartegenerovým syndromem – kteří mají pouze nepohyblivé spermie
- nezbytné je mít invertovaný mikroskop s laserem



Kryoprezervace testikulární tkáně



- pečlivě zvážit, zda léčba opravdu způsobí neplodnost
- až bude chtít založit rodinu, tato tkáň bude rozmrazena a zárodečné buňky zpětně implantovány do pacientových varlat, kde by pokračovalo jejich zrání
- *in vitro* zrání implantovaných buněk - pro ICSI nebo pro implantaci zpět do varlat

v oblasti kryoprezervace testikulární tkáně byl proveden významný pokrok ve zvířecím výzkumu

Kryokonzervace testikulární tkáně



Kyle Orwig, Ph.D.



Grady, the first primate baby born using cryopreserved tissue from immature testes, at two weeks old. OHSU

- tato technika je **považována za experimentální**, dosud nebylo možné produkovat zralé spermie (s reprodukčním potenciálem) z lidských spermatogonií
- narození samice makaka (2019) po autotransplantaci **kryokonzervované nezralé** tkáně varlat představuje významný krok k podpoře konzervace testikulární tkáně u prepubertálních a dospívajících chlapců

Technika mražení

- kryokonzervaci lze provádět **pomocí různých protokolů**, včetně pomalého zmrazování nebo vitrifikace (častěji slow freezing)
- protokoly jsou však stále ve vývoji, aby se optimalizovaly výsledky
- na myším modelu je kryokonzervace testikulární tkáně účinnější než kryokonzervace testikulární buněčné suspenze
- obnovení spermatogeneze u lidí (a nepochybně i u nehumánních modelových systémů) je stále náročná a životaschopní potomci byli dosud popsáni **pouze v systémech zvířecích modelů**

Kryoprotektivní média

– složena z roztoku HSA nebo séra (použití séra může vést ke křížové kontaminaci)

CPA: DMSO nebo Glycerol

- jako kryoprotektivní činidlo se používá nejčastěji DMSO o koncentraci 0,7 mol/l, doplněný sacharozou o koncentraci 0,1 mol/l a lidským sérovým albuminem o koncentraci 10 mg/ml
- kousky tkáně jsou umístěny v 1 ml mrazícího media při 4 °C ve 2 ml mrazících ampulkách, mrazení se provádí v programovatelném mrazícím zařízení

Kryokonzervace testikulární tkáně - case report



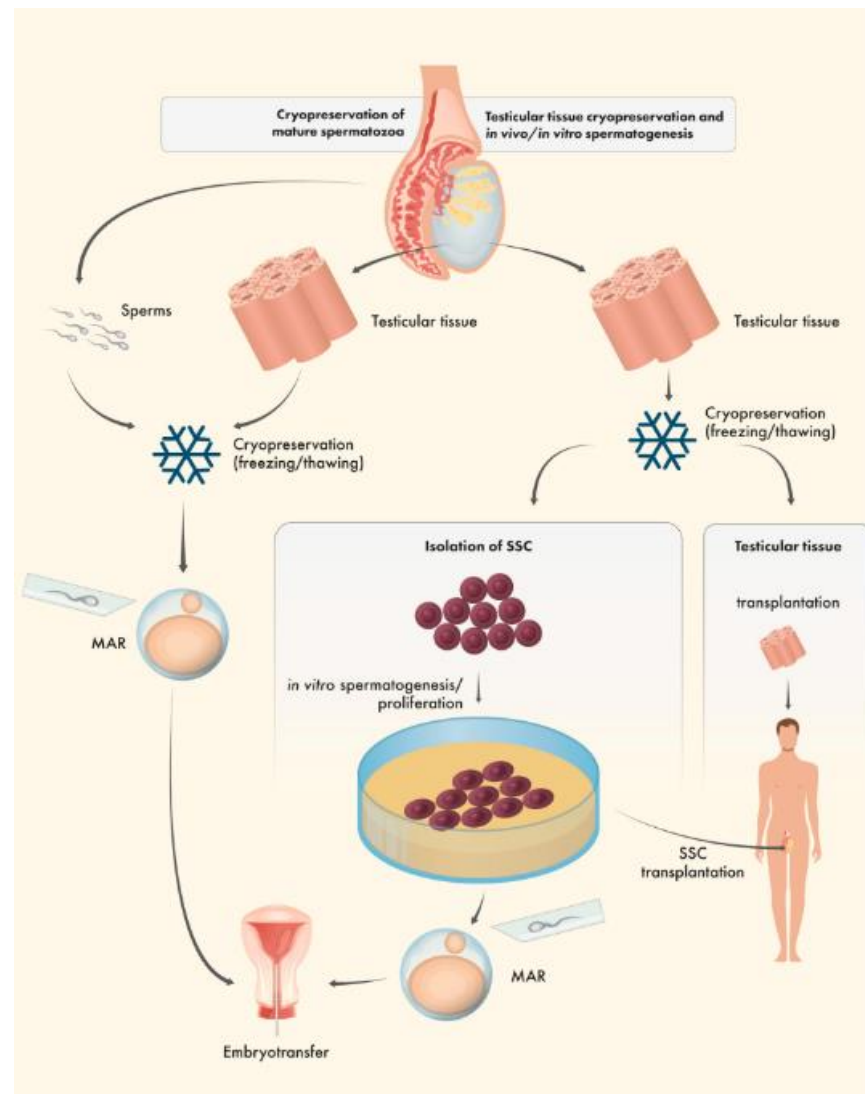
- po příjezdu do laboratoře (do 10 minut), byla biopsie přenesena do Petriho misky umístěné na ledu (4 °C)
- byla rozdělena na 1–2 mm³ fragmenty, které byly poté umístěny do kryozkumavek obsahujících 1 ml roztoku kryoprotektiva (sacharóza 0,1 ml/l, DMSO 0,7 mol/l, HSA10 mg/ml)
- jakmile byly kryozkumavky zapečetěny (SYMS III, CBS), bylo provedeno pomalé zmrazování pomocí programovatelného mrazicího boxu (FREEZAL, Air Liquide, Carbagas, Suisse)
- na konci mrazicího programu byly kryotrubice skladovány při teplotě –196 °C v kapalném dusíku

Kryokonzervace testikulární tkáně - postup

- metoda kryokonzervace podle protokolu Katolické univerzity v Lovani: pokud byly pozorovány haploidní buňky, polovina vzorku byla kryokonzervována **podle protokolu o zmrazení zralé tkáně** varlat a druhá polovina podle **protokolu o zmrazení nezralé testikulární tkáně**, aby se zvýšila šance na následné obnovení plodnosti
- fragment extrahované tkáně na histologické vyšetření
- imunohistochemické barvení – detekce přítomnosti spermatogonií pomocí specifických markerů (SALL4 a CD117) a k detekci nádorových buněk (protilátky podle základního onemocnění)

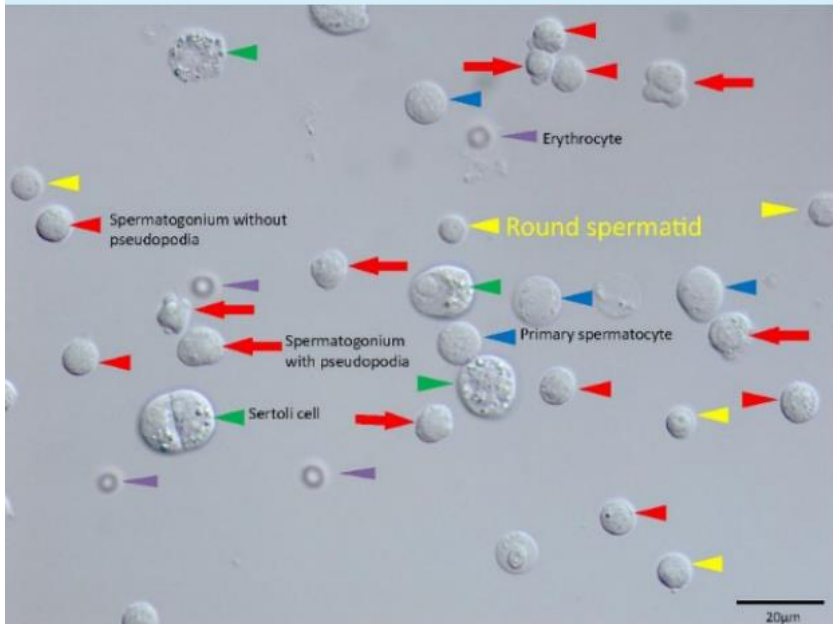


- v USA za 8 let na 14 univerzitách 189 pacientů (2019)
- kryokonzervace testikulární tkáně s následnou *in vivo* nebo *in vitro* spermatogenezí
- tkáňové fragmenty nebo spermatogoniální kmenové buňky (SSC)
- po izolaci spermatogoniálních kmenových buněk po kryokonzervaci - *in vitro* proliferaci/spermatogenezi, transplantaci SSC nebo techniky IVF (ROSI)

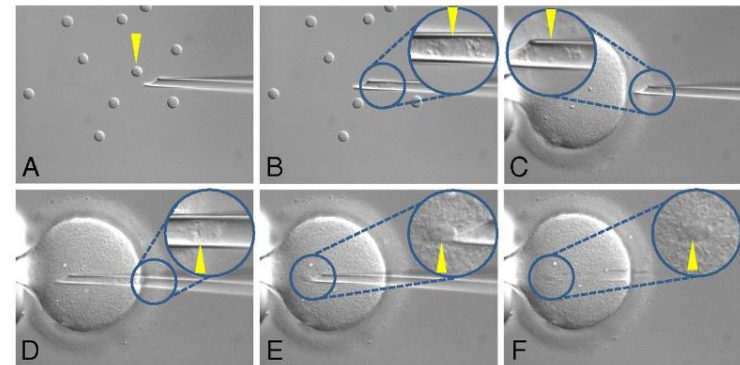


ROSI – injekce kulatých spermatid do oocytu

Fig 1: Testicular cells after treatment Sertoli cell (green arrows); round spermatids (yellow arrows); spermatogonia with or without pseudopodia (red arrows), and primary spermatocytes (blue arrows), erythrocytes (purple arrow).

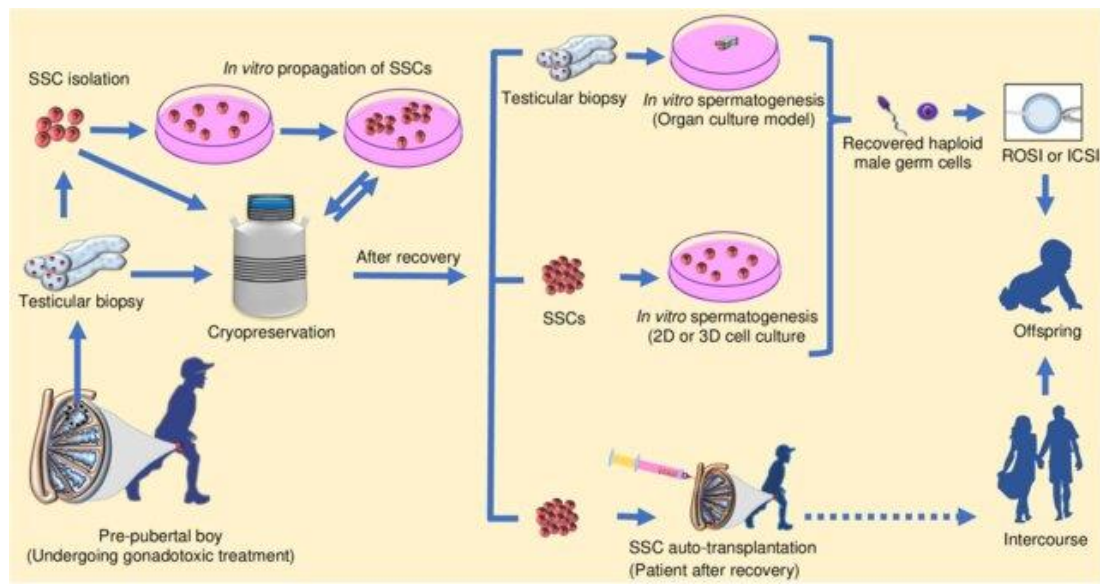


	Spermatogonium	Primary spermatocyte	Round Spermatid
A			
B			
C			



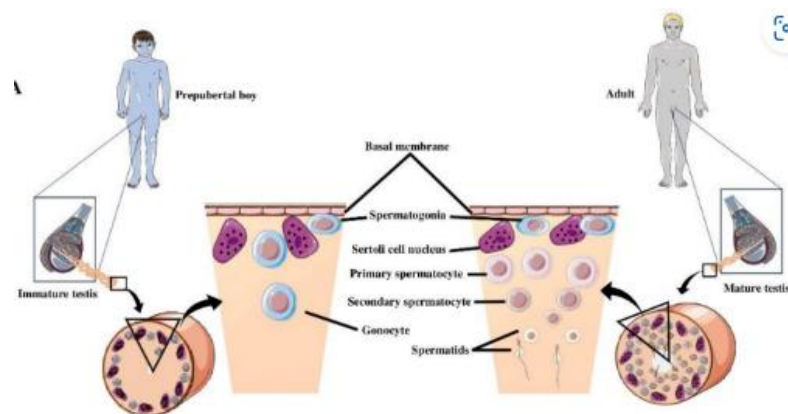
The procedure of ROSI. (A) Immediately before picking up one spermatid. (B) A spermatid aspirated into the injection pipette, the plasma membrane being broken. The white arrowhead indicates the spermatid nucleus. (C-F) Oocytes before, during and after injection of spermatid. Arrowhead indicates the spermatid nucleus. (Magnification: A-F, 400x.)

1. **biopsie** tkáně varlat prepubertálními chlapci před zahájením gonadotoxické léčby
2. mrazení SSC nebo testikulární tkáně
3. po rozmražení organ model, 3D model nebo *in vivo* model
4. metody ***in vitro* spermatogeneze** k indukci spermatogeneze pomocí orgánové/tkáňové kultury nebo 2D nebo 3D systému buněčných kultur (před i po rozmražení)
5. získávání biopsií varlat je nabízena **jako experimentální možnost** v některých onkologických/reprodukčních centrech



Autotransplantace fragmentů tkáně varlat

- do varlete, šourku, či ektopicky pod kůži
- zatím pouze u myší, králíků, makaků
- u pacientů s maligním onemocněním je vyšetření tkáně molekulárními technikami **povinné, aby se vyloučilo opětovné zavedení maligních** buněk, zatímco u nemaligních onemocnění, jako jsou Klinefert. syndrom či CF toto riziko nehrozí
- normálního vývoje bylo dosaženo po ICSI se spermiemi prasečích a opičích xenoštěpů

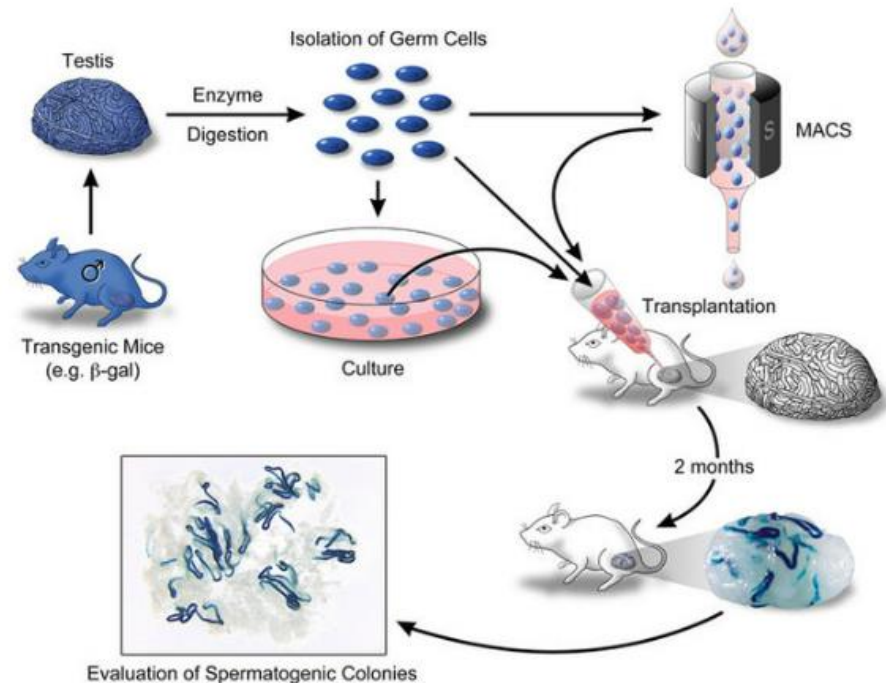


Spermatogonial stem cells

- uchování spermatogoniálních kmenových buněk (SSC) a **obnovení gametogeneze**, ať už *in vivo* nebo *in vitro*, pro pozdější léčbu
- transplantace nebo kultivace izolovaného SSC by **mohla zabránit remisi** maligních buněk a byla by lepší volbou pro pacienty s metastazujícími malignitami nebo hematologickým karcinomem
- autotransplantace SSC navíc umožňuje (zatím pouze v systémech zvířecích modelů) **obnovení spermatogeneze *in vivo*** (včetně přirozeného početí **bez nutnosti technik IVF**)
- na rozdíl od tkáňového štěpování vyžaduje izolace SSC **enzymatické štěpení** pomocí kolagenázy a trypsinu nebo mechanickou dezagregaci buněk

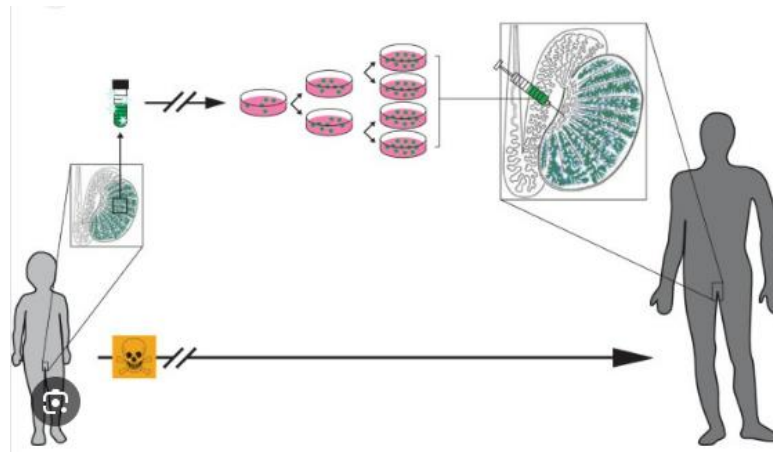
Transplantace zárodečných buněk u myši

- zdrojem dárcovských buněk je testikulární buněčná suspenze, *in vitro* kultivované buňky obohacené o **spermatogoniální kmenové buňky** nebo buňky frakcionované magneticky aktivovaným tříděním buněk (MACS)
- **markerový gen** pro vizualizaci (např. β -galaktosidázu, která se v přítomnosti substrátu X-gal barví modře)
- 8 týdnů po transplantaci lze spermatogenezi získanou od dárce snadno detekovat ve varlatech příjemce jako modré kolonie



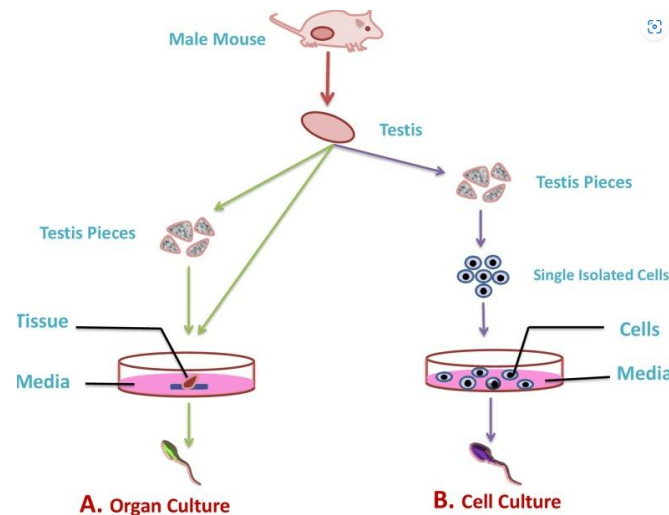
Autotransplantace SSC

- **injekce SSC** (do rete testis) je považována za nejslibnější nástroj pro obnovení plodnosti
- je potřeba **SSC izolovat** a *in vitro* proliferovat (cca 5% buněk vede k tvorbě kolonií)
- lidské prepubertální SSC byly ***in vitro* kultivovány**
- **myši** byli po transplantaci schopné plodit živá mláďata
- **2012** prokázána funkční spermatogeneze u Makaků po transplantaci



In vitro spermatogeneze

- zabrání riziku přenosu maligní tkáně
- produkce spermií *in vitro* je předmětem intenzivního výzkumu, který v posledních letech úspěšně realizoval několik kroků
- probíhá výzkum s cílem vyhodnotit ideální kultivační médium a podmínky nezbytné k dosažení trvalé architektury a funkce varlat
- 3D kultura – zárodečné buňky disociovány od somatických buněk, v médiu s 35 a 50% agaru – kokultivace se somatickými buňkami
- v roce 2018 byla prokázána proveditelnost generování haploidních zárodečných buněk z nezralé tkáně varlat
- orgánová kultura – štěp neporušen a navrstven na vrstvu agaru



MUNI
MED

Děkuji Vám za pozornost !

