



SPERM KRİYOPREZERVASYONU (Sperm hücresinin dondurularak saklanması)

BİO.ERKİN KENT
GÜRGAN CLINIC KADIN SAĞLIĞI , İNFERTİLİTE VE TÜP
BEBEK MERKEZİ
ANKARA , 2014



İÇERİK

- DONDURMANIN TANIMI
- ENDİKASYONLARI
- TARİHÇESİ
- YÖNTEMLERİ
- YENİLİKLER?





Kriyoprezervasyon (dondurarak saklama)

- Hücrelerin ve dokuların sıfır derecenin altındaki ısılara kadar soğutularak, bütün biyolojik aktivitelerinin durdurulması ve gelecekte kullanılması amacıyla saklanmasını ifade eder (ASRM 2012).

Gamet ve embriyo kriyoprezervasyonunun genel prensibi;

- ***Materyalin kriyoprotektanla dengelendikten sonra soğutulması, sıvı nitrojen içinde -196° C'de depolanması ve çözülürken de kriyoprotektanların uzaklaştırılarak gamet ve embriyoların canlılıklarını koruyabilecekleri fizyolojik ortamlara geçirilmesidir***





Kriyoprezervasyon endikasyonları

- **1. Fertilitenin korunması**

- * **Kemoterapi, radyoterapi** gibi spermatogenezi kalıcı olarak bozabilen tedavilerin öncesinde (testis tümörleri, lösemi, lenfoma gibi).

- * **Testis cerrahisi öncesinde;** total ya da parsiyel orşiektomi, vazo-vazostomi, vazo-epididimostomi, varikoselektomi.



Kriyoprezervasyon endikasyonları

***Vazektomi öncesi;** ileride evlilik durumunda değişiklik olduğunda ya da daha fazla çocuk istendiğinde kullanılmak üzere,

***Erkek partnerin ölümünden** sonra gebeliğin kabul edilebilir olduğu ülkelerdeki tehlikeli mesleklerde (askerlik gibi) aktif görev alanlarda,



Kriyoprezervasyon endikasyonları

***Spinal kord hasarı, seksüel disfonksiyon, gibi ejakülasyon bozukluklarında elektrooejekülatör ile sperm elde edilmişse,**

***Spermatogenezi bozmakla suçlanan ilaçların (Nitrofurantoin, simetidin, sulfasalazin, alkol, nikotin, kafein gibi) zorunlu kullanımı söz konusu ise**



Kriyoprezervasyon endikasyonları

2. infertilite tedavisi

- *Testiküler ya da epididimal yoldan sperm elde edilen özellikle nonobstrüktif azospermik olgularda
- *Ağır oligozoospermi veya semende aralıklı olarak hareketli spermlerin varlığında ardışık örneklerin dondurulup saklanması ile ICSI'ye destek olarak
- *Hipotalamo-hipofizer hipogonadizm için gonadotropin tedavisi veya kalıcı olmayabilen genital trakt obstrüksiyonu cerrahisi gibi infertilite tedavisi için,



Kriyoprezervasyon endikasyonları

*ART prosedürü sırasında sperm veremeyen hastalar

*Spinal kord travması geçiren hastalarda, yardımcı ejakülasyon için veya retrograd ejakülasyonla idrardan veya cerrahi girişimle genital yoldan alınan spermler

Kriyoprezervasyonun Tarihçesi



- ***1776 da Spallanzani'nin soğğun semen üzerindeki etkileri-> spermlerin motilitelerini bir miktar koruyabildikleri***
- ***1886'da Montegazza ilk kez insan spermini dondurarak saklama fikrini ortaya atmıştır.***
- ***1940'larda gliserolün spermleri dondurmanın zararlı etkilerinden koruyabildiğinin tesadüfen keşfi,***
- ***1949'da Polge ve arkadaşları tarafından gliserol kullanılarak ilk kez insan spermi dondurma işlemi***

Kriyopreservasyonun Tarihçesi



- ***1953’de ise Bunge ve Sherman tarafından dondurulmuş çözülmüş donör sperminden elde edilen ilk fertilizasyon ve embriyo gelişimi yayınlanmıştır.***
- ***1960-70’li yıllar kriyoprotektanların özellikleri ve dondurulacak materyale olan olası etkilerinin incelendiği, daha sonra da kriyobiyojinin prensiplerinin oluşturulduğu dönem olmuştur.***
- ***1964 yılında insan sperm örneğinin gliserol ile dondurulup sıvı nitrojen ile saklanması sonrası ilk canlı doğum gerçekleşmiştir.***
- ***1972 yılında İlk canlı hücre dondurma bankası kurulmuştur.***
- ***1973 yılında bir yıldan fazla süre ile dondurulup bekletilmiş ve çözülmüş sperm ile doğan ilk sağlıklı bebek dünyaya gelmiş,***
- ***1998 yılında da 20 yıldan fazla süredir saklanan sperm ile canlı bebek doğmuştur***

Sperm kriyoprezervasyonunun kilometre taşları:



- ***1953: Dondurulmuş ejakule sperm'den ilk doğum(Bunge ve Sherman),***
- ***1995: Dondurulmuş epididimal sperm'den ilk doğum(Devmey ve ark.),***
- ***1996: Dondurulmuş testiküler sperm'den ilk doğum(Gil-Salmon ve ark.)***

Lewis S. E. M. Freeze Your Future: Cryopreservation of Semen and Surgically Retrieved Sperm, Reproductive Medicine Queen's University Belfast s.e.lewis@qub.ac.uk 05.06.2013, EAA ESHRE Brussels Nov 2007



KRİYOBİYOLOJİ

Kriyobiyojide amaç; hücre dondurulurken

- *izotonik bir ortam olması,*
- *Ortamın osmolaritesinin artması*
- *Oluşan hipertonic ortamda hücrenin su kaybetmesi sonucu hücrede dehidrasyon olmasıdır.*



KRİYOBİYOLOJİ

Dehidrasyon hızı hücrenin canlılığının devamı için önemlidir.

Dehidrasyon hızını belirleyen parametreler:

- *Suya karşı plazma membran geçirgenliğinin yeterliliği*
- *kriyo-koruyucunun tipi*

Wetzels AMM. Bras M. Lens JW. Piederiet MH. Rijnders PM. Zeilmaker GH. Laboratory aspects of in vitro fertilization. Cryopreservation/ Theory 1996; 229-244.



SPERM KRİYOPRESERVASYONU

Kriyoprezervasyon prosedüründe beş önemli aşama vardır:

- **1. Su kristalizasyonundan kaynaklanabilecek hücresel hasarı azaltan kriyoprotektanlarla ilk etkileşim,**
- **2. Sıfır derecenin altındaki sıcaklıklara kadar dondurma,**
- **3. Saklama,**
- **4. Çözme,**
- **5. Dilüsyon ve kriyoprotektanların ortamdan uzaklaştırılması, fizyolojik mikroçevreye geri dönüş ve ileri gelişim**





SPERM KRİYOPREZERVASYONU

Dondurma işleminde, damla damla kriyo-koruyucu eklenmiş sperm - 5°C ile - 15°C arasında soğutulduklarında, aşağıdaki sırayı izleyen bir dizi olay gerçekleşir:

- 1. Önce hücrenin içinde bulunduğu ortamdaki su donar.***
- 2. Hücre dışında buz kristalleri oluşarak sitoplazmayı soğutur.***
- 3. Bu sırada, eklenen kriyo-koruyucu madde sebebiyle hücre dışında osmolarite daha yüksektir, bu nedenle hücreden dış ortama su geçişi başlar, (hızlı su kaybı-dehidratasyon)ve hücre önce büzülür (bu sırada sitoplazmanın kimyasal potansiyeli hücre dışından fazladır).***
- 4. Hücre dışına çıkan su donar (dehidratasyona bağlı olarak hücre içi ile dışı arasındaki kimyasal potansiyel farkı giderek azalır).***
- 5. Böylece, hücre harabiyetinin esas sebebi olabilecek, hücre içinde buz kristalleri oluşmadan önce suyun büyük bölümü dışarı çıkmış olur. Böylece, hücre harabiyetine neden olabilecek hücre içi kristal oluşumu en aza indirilmiş olur***





DONDURMA HASARLARI

- *Dondurulma esnasında hücrelerin maruz kaldığı iki temel ve fiziksel stres kategorisi mevcuttur:*
 - 1. Düşük sıcaklığın doğrudan etkileri*
 - 2. Buz oluşumuna bağlı fiziksel değişiklikler*
- *Dondurma hasarının sebepleri:*
 - 1. Hücre içi buz kristallerinin oluşumu*
 - 2. Yoğun dehidratasyon*
 - 3. pH değişiklikleri*



DONDURMA HASARLARI

Ayrıca;

- ***Ortam ısısı,***
- ***Hücre zarı geçirgenliği,***
- ***Konsantrasyon farkı,***
- ***Hücre yüzeyinin hücre hacmine oranı,***
- ***Kriyoprotektanın niteliği,***
- ***Hücre zarının yapısı***

Kriyoprotektan maddelerin hücre içine geçişlerini düzenleyeceği için dondurma hasarında etkili faktörlerdir.



Kriyo-koruyucu maddeler

- işlemler sırasında hücreyi dondurulma hasarından koruduğu düşünülmektedir, ancak kendileri hücreler için toksik maddelerdir. Yüksek oranda H₂ bağlama kapasitesine sahiptirler.***
- Kriyo-koruyucuların koruyucu etkilerini göstermek için her zaman hücre içine girmelerine gerek yoktur. Çünkü hücre zarı, harabiyetin en yoğun ve hızlı geçtiği yerdir.***



Kriyo-koruyucu maddeler

HÜCRE İÇİNE GİREBİLEN KORUYUCU MADDELER

- *Gliserol,*
 - *DMSO(Dimetil sülfoksit),*
 - *ProH (Propilen glikol)*
 - *Etilen glikol*
-

******Bunlar intrasellüler buz kristalleri oluşumunu -40°C'a kadar düşürürler. Ayrıca hücreyi solüsyonun toksik etkilerinden korurlar***

HÜCRE DIŞINDA KALAN KORUYUCU MADDELER

- *Monosakkaritler (glukoz, hekzoz),*
 - *Disakkaritler (sükroz) ve*
 - *Trisakkaritler (raffinoz)*
-

****** Bunlar hücre zarını osmotik basınç değişikliğine karşı korurlar ve hücrenin çözündürme işlemi sırasında aşırı şişmesini önlerler***



SPERM DONDURMA SOLÜSYONLARI

- ***Intrasellüler ajan olarak % 5-15'lik gliserol tercih edilmesine karşın en verimli sonuçlar etilen glikol ile alınmaktadır.***
- ***Ekstrasellüler ajan olarak sükroz tercih edilmektedir. Sükroz büyük bir moleküldür ve hücre zarından geçemez. Bu nedenle soğutma işlemi sırasında osmotik olarak dehidratasyonu başlattığı gibi, çözme işlemi sırasında da hücrenin lizisini önler, konsantrasyon farkı ile intrasellüler kriyoprotektanın hücre içinden uzaklaşmasını sağlar.***



Kriyoprezervasyon yöntemleri

* YAVAŞ (GELENEKSEL DONDURMA)

- SPERM :DONDURMA SOLÜSYONU (GLİSEROL+EGG YOLK)1:2
- 10 DAK. ODA SICAKLIĞINDA DENGELENME
- STRAWLARA ÇEKME VE SIVI NİTROJENİN SEVİYESİNİN 10 CM ÜZERİNDE BUHARDA BEKLETME
- SIVI NİTROJENE ALMA

• HIZLI(VİTRİFİKASYON)

- SPERM:DONDURMA SOLÜSYONU(0,5M SUCROSE)(1:1)
- STRAWLARA ÇEKME
- DİREK SIVI NİTROJENE ALMA



HEDEF?

- CANLI SPERM SAYISINI ARTIRMAK
- SPERM YAŞAMA SÜRESİNİ ARTIRMAK

NASIL?

- En iyi kriyo-koruyucuyu seçmek
- Kriyo-koruyucu konsantrasyonunu düşürmek
- Kriyo-koruyucudan uzaklaştırmak için gerekli metodları geliştirmek



VİTRİFİKASYON

- Cam haline getirme
- Eğer solüsyonlar yeteri kadar hızlı soğutuluyorsa buz kristalleri oluşturmazlar.
- Solüsyonlar yüksek kriyo-koruyucu konsantrasyonu içerdiğinden spermiler yaşayamayabilirler.
- Fakat , vitrifikasyon birtakım kriyo-koruyucular kullanmadan da yapılabilir!!!



SONUÇ

- NEDEN? Hücre içine girebilen kriyokoruyucular kullanmadan yapılan vitrifikasyon;
 - 1) Toksik etki düşer
 - 2) Hızlı
 - 3) Uygulaması kolay
 - 4) Hücreyi dondurma hasarlarından korur
 - 5) Düşük maliyet

Hangi metod kullanılmalı? Yenilikler Neler?

- Sperm hücre zarı bütünlüğü

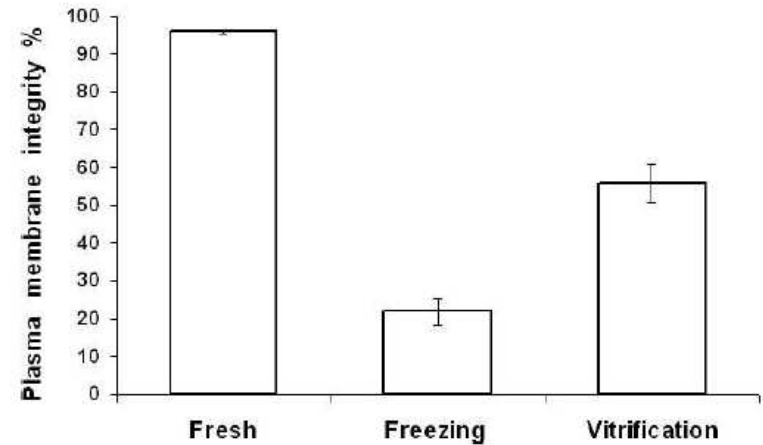


Figure 3. Plasma membrane integrity of spermatozoa after conventional freezing and vitrification. All rates in respective groups are significantly different ($P < .05$).

Isachenko V, Maettner R, Petrunkina AM, Sterzik K, Mallmann P, Rahimi G, et al. (2012) Vitrification of Human ICSI/IVF Spermatozoa Without Cryoprotectants: New Capillary Technology. *Journal of Andrology* 33: 462-468.

Hangi metod kullanılmalı? Yenilikler Neler?

- Sperm akrozom bütünlüğü

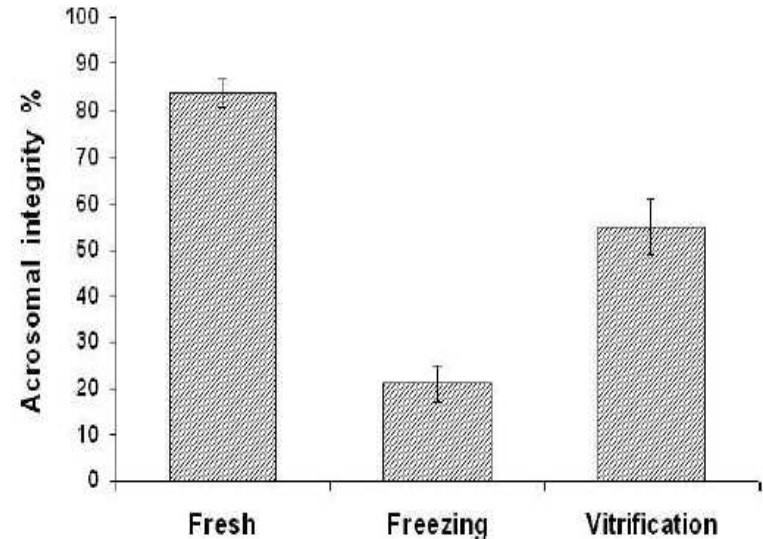


Figure 4. Acrosomal integrity of spermatozoa after conventional freezing and vitrification. All rates in respective groups are significantly different ($P < .05$).

Isachenko V, Maettner R, Petrunkina AM, Sterzik K, Mallmann P, Rahimi G, et al. (2012) Vitrification of Human ICSI/IVF Spermatozoa Without Cryoprotectants: New Capillary Technology. *Journal of Andrology* 33: 462-468

Hangi metod kullanılmalı? Yenilikler Neler?

- Sperm motilitesi (hareketliliği)

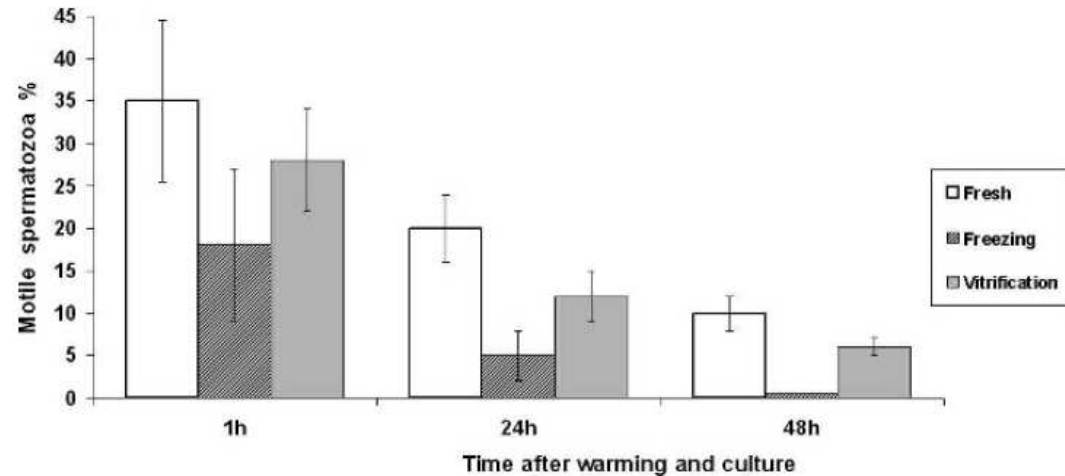


Figure 2. Motility of spermatozoa after conventional freezing and vitrification. All rates in respective groups are significantly different ($P < .05$).

Isachenko V, Maettner R, Petrunkina AM, Sterzik K, Mallmann P, Rahimi G, et al. (2012) Vitrification of Human ICSI/IVF Spermatozoa Without Cryoprotectants: New Capillary Technology. *Journal of Andrology* 33: 462-468.

TEŞEKKÜRLER

HERKESE MUTLU YILLAR

