



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**Μελέτη της επίδρασης της υαλοποίησης (VITRIFICATION) ανθρώπινων
ανώριμων (GV) ωαρίων από διεγερμένους κύκλους σε συνδυασμό με τη
μέθοδο in vitro ωρίμανσης ωαρίων (IVM) στην ανάπτυξη εμβρύων μέχρι
το στάδιο της βλαστοκύστης**

Καραγιάννη Μαίρη

Διπλωματική εργασία
μεταπτυχιακού προγράμματος
«Αναπαραγωγική – αναγεννητική ιατρική»

Αθήνα 2017

Στην οικογένειά μου:

Νικόλαος, Βασιλική

Εμμανουήλ, Αναστασία

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή μαιευτικής-γυναικολογίας της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ, διευθυντή της Α΄ Μαιευτικής και Γυναικολογικής κλινικής του Νοσοκομείου “Αλεξάνδρα” και υπεύθυνο του μεταπτυχιακού προγράμματος «Αναπαραγωγική – Αναγεννητική Ιατρική», Δημήτριο Λουτράδη, και τον αναπληρωτή καθηγητή μαιευτικής-γυναικολογίας τμήματος Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ για την ευκαιρία που μου έδωσαν ώστε να ασχοληθώ με το συγκεκριμένο θέμα μελέτης. Όπως επίσης, ευχαριστώ την κυρία Μαυρογιάννη Ντέπυ, καθηγήτρια του μεταπτυχιακού προγράμματος «Αναπαραγωγική – Αναγεννητική Ιατρική» και υπεύθυνη επιβλέπουσα της παρούσας μελέτης για την αμέριστη συμπαράσταση κατά τη διάρκεια της συγγραφής της παρούσας μελέτης.

Συνεχίζοντας θα ήθελα να ευχαριστήσω τους καθηγητές Μαιευτικής & Γυναικολογίας του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, Πράπα Ιωάννη και Πράπα Νικόλαο, οι οποίοι έχουν υπάρξει καθοδηγητές και συμπαραστάτες μου καθ’ όλη την πορεία μου στον χώρο της κλινικής εμβρυολογίας.

Ένα ιδιαίτερο ευχαριστώ ανήκει στους βιολόγους Dr. Vanderzwalmen Pierre και Dr. Παπαθεοδώρου Αχιλλέα, οι οποίοι υπήρξαν μέντορές μου στον τομέα της κρυοβιολογίας και με περισσή ευχαρίστηση μοιράζονται τις γνώσεις τους μαζί μου.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω το «ΙΑΚΕΝΤΡΟ ΑΘΗΝΩΝ», όπου και πραγματοποιήθηκε το κλινικό μέρος της παρούσας μελέτης. Ξεχωριστές ευχαριστίες ανήκουν στη συνάδελφό μου, Θηβαίου Λουκία, η συμβολή της οποίας ήταν καταλυτική τόσο κατά το πειραματικό μέρος, όσο και κατά τη συγγραφή της παρούσας μελέτης. Η στήριξή της ήταν πολύτιμη τόσο συναδελφικά, όσο και ψυχολογικά.

Το μεγαλύτερο ευχαριστώ όλων φυσικά ανήκει στην οικογένειά μου, οι οποίοι με στηρίζουν και είναι δίπλα μου σε κάθε απόφαση και όνειρό μου και που χωρίς εκείνους δεν θα είχα καταφέρει τίποτα.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η κρυοσυντήρηση ωαρίων κερδίζει ολοένα και περισσότερο έδαφος και μάλιστα η χρήση κλειστού συστήματος με τη μέθοδο της υαλοποίησης αποδεικνύεται ιδιαίτερα αποτελεσματική. Η κρυοσυντήρηση ωαρίων βέβαια αναφέρεται συνήθως στα ώριμα MII ωάρια, ενώ τα ανώριμα GV απορρίπτονται λόγω της μη συγχρονισμένης ωρίμανσής τους. Τα GV ωάρια, όμως, θα μπορούσαν να φανούν κι αυτά αξιοποιήσιμα καθώς με τη μέθοδο της *in vitro* ωρίμανσης ωαρίων, έχουμε πλέον τη δυνατότητα να προσφέρουμε στα ανώριμα ωάρια τις κατάλληλες συνθήκες για να ωριμάσουν και να γίνουν ικανά για γονιμοποίηση. Με αυτό τον τρόπο αυξάνεται ο αριθμός των διαθέσιμων ωαρίων και κατ' επέκταση ο αριθμός των διαθέσιμων εμβρύων προς εμβρυομεταφορά.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε η επίδραση της υαλοποίησης στα ανώριμα GV ωάρια και η αναπτυξιακή τους εξέλιξη μέχρι το στάδιο της βλαστοκύστης μετά από *in vitro* ωρίμανση τους. Για το σκοπό αυτό ερευνήσαμε το αν και κατά πόσο τα διασωθέντα ανώριμα ωάρια από γυναίκες δότριες που έχουν υποστεί διέγερση ωοθηκών, μπορούν να επιβιώσουν στην κρυοσυντήρηση με τη μέθοδο της υαλοποίησης, να ωριμάσουν και να αξιοποιηθούν σε πρόγραμμα υποβοηθούμενης αναπαραγωγής.

Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται δείχνουν να είναι συγκρίσιμα και στατιστικά σημαντικά με άλλες παρόμοιες μελέτες και οι προοπτικές εξέλιξης της συγκεκριμένης μεθόδου μαζί με κατάλληλες τροποποιήσεις μπορούν να αυξήσουν τον αριθμό των διαθέσιμων εμβρύων ζευγαριών που υπόκεινται σε μεθόδους υποβοηθούμενης αναπαραγωγής.

ABSTRACT

«Vitrification of immature human oocytes (GV stage) from stimulated cycles and In vitro maturation: influence on the survival, fertilization, and blastocyst stage»

In the last decade, cryopreservation of oocytes started to be gaining further ground with the use of closed system vitrification method which is proven to be particularly effective. Cryopreservation of oocytes is being mostly referred to mature (MII) oocytes, while immature GV oocytes are being discharged because of their non-synchronized maturation. However, it is very interesting the fact that by using the method of *in vitro* maturation in combination with suitable conditions, the GV oocytes have the potential to reach maturation and be capable of fertilization. In this way, the number of available oocytes would increase and, thus, would the number of competent embryos for embryo transfer (ET).

In this thesis, the effect of vitrification with closed system on the immature GV oocytes and their developmental progress to the blastocyst stage, after their *in vitro* maturation, has been investigated. For this purpose, rescued immature (GV) oocytes from donor women, who have undergone ovarian stimulation, were examined in relation to whether and how they can survive of the cryopreservation - using the vitrification method – mature, and be exploited in assisted reproduction techniques.

The demonstrated results are comparable and statistically significant among other correlated studies. This specific method could support the increase of the available number of embryos number for couples who undergo the procedure of assisted reproduction with appropriate, future modifications.

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	4
ABSTRACT	5
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
1.1 ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑ – ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ	9
1.1.1 ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑ.....	9
1.1.2. ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ.....	10
1.2 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ ΚΡΥΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ	10
1.3 ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΚΡΥΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ – ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗΣ	13
1.3.1 ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΝΕΡΟΥ	14
1.4 ΚΡΥΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΑ	17
1.4.1 ΔΙΕΙΣΔΥΤΙΚΑ ΚΡΥΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΑ.....	18
1.4.2 ΜΗ ΔΙΕΙΣΔΥΤΙΚΑ ΚΡΥΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΑ.....	21
1.4.3 ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΚΡΥΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΩΝ	24
1.4.4 ΑΠΟΦΥΓΗ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΚΡΥΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΩΝ	26
1.5 ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗ	27
1.5.1 ΒΡΑΔΕΙΑ ΚΑΤΑΨΥΞΗ – SLOW FREEZING	27
1.5.1.1 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ ΒΡΑΔΕΙΑΣ ΚΑΤΑΨΥΞΗΣ ΩΑΡΙΩΝ.....	29
1.5.2 ΥΑΛΟΠΟΙΗΣΗ – VITRIFICATION.....	32
1.5.2.1 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ ΥΑΛΟΠΟΙΗΣΗΣ ΩΑΡΙΩΝ	34
1.5.3 ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΩΡΙΜΩΝ VS ΑΝΩΡΙΜΩΝ ΩΑΡΙΩΝ	36
1.6 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗΣ ΩΑΡΙΩΝ	39
1.6.1 ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΩΑΡΙΩΝ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΚΑΡΚΙΝΟ	39
1.6.2 ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΩΑΡΙΩΝ ΓΙΑ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟΥΣ – ΘΡΗΣΚΕΥΤΙΚΟΥΣ ΛΟΓΟΥΣ.....	40
1.6.3 ΤΡΑΠΕΖΑ ΔΩΡΕΑΣ ΩΑΡΙΩΝ	40
1.7 IN VITRO MATURATION - IVM	42
1.7.1 ΩΡΙΜΑΝΣΗ ΩΑΡΙΩΝ.....	42
1.7.2 ΜΕΘΟΔΟΣ IVM – ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ.....	45
1.7.3 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ IVM	48
1.7.3.1 ΓΥΝΑΙΚΕΣ ΜΕ ΠΟΛΥΚΥΣΤΙΚΕΣ ΩΟΘΗΚΕΣ / ΣΥΝΔΡΟΜΟ ΠΟΛΥΚΥΣΤΙΚΩΝ ΩΟΘΗΚΩΝ	48
1.7.3.2 ΓΥΝΑΙΚΕΣ ΜΕ / ΠΡΟΔΙΑΘΕΣΗ ΓΙΑ ΟΡΜΟΝΟΕΞΑΡΤΩΜΕΝΟ ΚΑΡΚΙΝΟ	48
1.7.3.3 ΓΥΝΑΙΚΕΣ ΠΟΥ ΕΠΙΘΥΜΟΥΝ ΤΗ ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ ΤΗΣ ΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑΣ	49
1.7.3.4 ΜΕΙΩΣΗ ΚΟΣΤΟΥΣ – ΜΗ ΛΗΨΗ ΓΟΝΑΔΟΤΡΟΠΙΝΩΝ	49

1.7.3.5 ΓΥΝΑΙΚΕΣ ΥΨΗΛΗΣ ΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑΣ (HIGH RESPONDER)	49
1.7.3.6 ΦΤΩΧΕΣ ΑΠΑΝΤΗΤΡΙΕΣ (POOR RESPONDERS).....	50
1.7.3.7 ΕΠΕΚΤΑΣΗ ΤΡΑΠΕΖΩΝ ΔΩΡΕΑΣ ΩΑΡΙΩΝ	50
2. ΣΚΟΠΟΣ ΚΑΙ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	51
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	52
3.1 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΔΟΤΡΙΩΝ	53
3.1.2 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΔΟΤΩΝ	53
3.2 ΔΙΕΓΕΡΣΗ ΩΟΘΗΚΩΝ.....	53
3.3 ΛΗΨΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΩΑΡΙΩΝ	54
3.4 ΜΕΘΟΔΟΣ ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗΣ ΩΑΡΙΩΝ	55
3.4.1 ΚΛΕΙΣΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗΣ	55
3.5 ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΠΟΨΥΞΗΣ ΩΑΡΙΩΝ	56
3.6 ΜΕΘΟΔΟΣ IVM	58
3.7 ΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΕΞΕΛΙΞΗ ΕΜΒΡΥΩΝ	59
3.8 ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ	59
3.9 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	59
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	61
4.1 ΓΕΝΙΚΑ – ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ GV ΩΑΡΙΩΝ	61
4.2 ΩΡΕΣ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ.....	63
4.3 ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΩΝ – GV ΩΑΡΙΑ.....	64
4.3.1 GV ΩΑΡΙΑ (before vitrification).....	64
4.3.2 ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΟΣ 1 (arrested embryo)	66
4.3.3 ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΟΣ 2 (arrested embryo)	67
4.3.4 ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΟΣ 3 (degenerated embryo)	68
4.3.4 ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΟΣ 4 (BL2bb)	69
4.3.5 ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΟΣ 5 (BL2ac).....	70
4.4 ΓΕΝΙΚΑ – ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ MII ΩΑΡΙΩΝ.....	72
4.5 ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΩΝ – MII ΩΑΡΙΑ	74
4.5.1 ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΟΣ 1.....	74
4.5.2 ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΟΣ 2.....	76
4.5.3 ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΟΣ 3.....	78
4.5.4 ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΟΣ 4.....	79
4.5.5 ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΟΣ 5.....	82
4.6 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ GV-MII	85

4.7 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΜΕ ΑΛΛΕΣ ΕΡΓΑΣΙΕΣ	86
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	89
5.1 ΕΠΙΒΙΩΣΗ GV ΩΑΡΙΩΝ	90
5.2 ΩΡΙΜΑΝΣΗ GV ΩΑΡΙΩΝ	93
5.3 ΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΕΞΕΛΙΞΗ ΕΜΒΡΥΩΝ	100
6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	105
7. ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ	106
8. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΤΙΚΑ.....	109
9. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	111

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑ – ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ

1.1.1 ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑ

Σύμφωνα με τον παγκόσμιο οργανισμό υγείας (WHO-world health organization) η υπογονιμότητα έχει διάφορους ορισμούς, ανάλογα με το αν αυτός είναι κλινικός, δημογραφικός ή επιδημιολογικός. Πιο συγκεκριμένα, στον κλινικό ορισμό, υπογονιμότητα είναι μια ασθένεια του αναπαραγωγικού συστήματος και ορίζεται από την αποτυχία κλινικής εγκυμοσύνης μετά το πέρασμα 12 μηνών με τακτικές σεξουαλικές επαφές χωρίς αντισύλληψη. Συνεχίζοντας, στον δημογραφικό ορισμό, υπογονιμότητα είναι η αποτυχία επίτευξης και διατήρησης εγκυμοσύνης στην αναπαραγωγική ηλικία (15-49 ετών) σε διάστημα 5 χρόνων, με τακτικές σεξουαλικές επαφές χωρίς αντισύλληψη. Και τέλος, σύμφωνα με τον επιδημιολογικό ορισμό, υπογονιμότητα είναι η μη επίτευξη εγκυμοσύνης σε γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας (15-49 ετών), σεξουαλικά ενεργές και χωρίς αντισύλληψη μετά το πέρασμα 2 ετών. **(145)** Οι διαφορές που φαίνονται στους ορισμούς οφείλονται στο γεγονός ότι κατά την κλινική πράξη είναι σημαντικότερο να ξεκινήσει η θεραπεία αντιμετώπισης όσο το δυνατόν συντομότερα, ενώ σε δημογραφικό ή σε επιδημιολογικό επίπεδο, είναι σημαντικό να μειωθεί ο αριθμός των ψευδών θετικών.

Η υπογονιμότητα χωρίζεται σε πρωτογενή και δευτερογενή. Πρωτογενής είναι η αδυναμία απόκτησης παιδιού, είτε λόγω αδυναμίας ύπαρξης εγκυμοσύνης είτε λόγω αδυναμίας διατήρησης της εγκυμοσύνης, ενώ η δευτερογενής είναι η αδυναμία

απόκτησης παιδιού μετά από προηγούμενη ύπαρξη εγκυμοσύνης ή προηγούμενη γέννηση παιδιού.(146)

1.1.2. ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ

Ως υποβοηθούμενη αναπαραγωγή (ART-Assisted Reproductive Technology) ορίζεται οποιαδήποτε θεραπεία ή διαδικασία περιλαμβάνει in vitro χειρισμό ανθρώπινων ωαρίων, σπερματοζωαρίων και εμβρύων με σκοπό την επίτευξη εγκυμοσύνης, όπως κλασική γονιμοποίηση, μικρογονιμοποίηση, εμβρυομεταφορά, κρυοσυντήρηση, δωρεά γαμετών κλπ.(147)

Τον τελευταίο αιώνα έχουμε γίνει μάρτυρες πολλών σημαντικών εξελίξεων στον τομέα της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Σημείο αναφοράς αποτελεί η γέννηση του 1^{ου} παιδιού με μέθοδο υποβοηθούμενης αναπαραγωγής τον Ιούλιο του 1978, από τον βιολόγο Edwards R. G. και τον γυναικολόγο Steptoe P. C. (148) Από τότε οι τεχνικές της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής αποτελούν ρουτίνα και είναι ευρέως αποδεχτές για την αντιμετώπιση της υπογονιμότητας.

Μια από αυτές είναι και η κρυοσυντήρηση ωαρίων, η οποία και θα αναλυθεί στη συνέχεια και είναι και το θέμα της παρούσας μελέτης.

1.2 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ ΚΡΥΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Το 1949, ο Christopher Polge, ως μεταπτυχιακός φοιτητής και καθώς δούλευε με σπερματοζωάρια κόκορα, έκανε μία τυχαία ανακάλυψη. Εάν πρόσθετε μικρή ποσότητα γλυκερόλης σε εναιώρημα σπερματοζωαρίων κόκορα και μετά τα κατέψυχε στους -

80°C, σχεδόν όλα τα σπερματοζωάρια παρουσίαζαν φυσιολογική κινητικότητα μετά την απόψυξή τους. **(1)** Λίγο αργότερα, το 1950, οι Smith and Polge, ανέφεραν ότι η γλυκερόλη προστατεύει και τα σπερματοζωάρια των θηλαστικών **(2)** και ο Polge, μάλιστα, το 1952, παρουσίασε ότι τα σπερματοζωάρια του ταύρου που έχουν κρυοσυντηρηθεί / αποψυχθεί έχουν τη δυνατότητα να γονιμοποιήσουν ωάρια όταν χρησιμοποιούνται ιατρικώς υποβοηθούμενες μέθοδοι. Παρατήρησε μάλιστα πως αν στη γλυκερόλη, προσέθετε και αιθυλενική γλυκόλη, η προστασία των σπερματοζωαρίων ήταν μεγαλύτερη. **(3)** Η παρατήρηση αυτή ήταν σταθμός γιατί ήταν η αρχή για τη συνδυαστική χρήση κρυοπροστατευτικών. Τον επόμενο χρόνο οι Bunge and Sherman εφάρμοσαν την ίδια μέθοδο σε ανθρώπινα σπερματοζωάρια και ανακοίνωσαν τέσσερις εγκυμοσύνες σε γυναίκες στις οποίες είχε γίνει σπερματέγχυση με κρυοσυντηρημένο / αποψυγμένο δείγμα σπέρματος. **(4)** Ακολούθησαν πολλές έρευνες και πολλοί ερευνητές που απέδειξαν ότι υπάρχουν κι άλλες ενώσεις που προστατεύουν τα κύτταρα από καταστροφικές βλάβες λόγω παγώματος. **(5, 6, 7)**

Μετά τα σπερματοζωάρια, σειρά είχαν τα ωάρια, με τους Sherman and Lin το 1959 να κρυοσυντηρούν ωάρια ποντικών **(8)** και τους Averil and Rowson την ίδια χρονιά να κρυοσυντηρούν ωάρια προβάτου **(9)** , με μικρή όμως επιτυχία. Ο μεγαλύτερος ίσως σταθμός στην ιστορία της κρυοβιολογίας ήταν η μελέτη του Mazur το 1970, ο οποίος μελέτησε τη φυσιολογία της κίνησης του νερού στα κύτταρα και τη στερεοποίηση του υγρού νερού, θέτοντας έτσι τα θεμέλια για το μέλλον της κρυοβιολογίας. **(10)** Το 1972 ο Mazur συνεργάστηκε με τους Whittingham και Leibo και μελέτησαν την κρυοσυντήρηση γονιμοποιημένων ωαρίων ποντικών στους -196°C και στους -269°C με επιτυχία. **(11)** Ο Whittingham στη συνέχεια το 1977 πρότεινε πως η κρυοσυντήρηση

ωαρίων ποντικιών έχει ίσως περισσότερα πλεονεκτήματα από τα γονιμοποιημένα
ωάρια, παραθέτοντας τα πολύ θετικά αποτελέσματα του ως προς την επιβίωση, τη
γονιμοποίηση και τα ποσοστά γεννήσεων. **(12)** Μετά από αυτά τα θετικά
αποτελέσματα, ακολούθησαν έρευνες ακολουθώντας την ίδια διαδικασία σε ωάρια
άλλων ζώων όπως ο αρουραίος **(13)** , το χάμστερ **(14)** , το κουνέλι **(15)** , και ο πίθηκος
(16) .

1.3 ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΚΡΥΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ – ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗΣ

Κρυοβιολογία είναι ο κλάδος της βιολογίας που αφορά τη μελέτη των επιπτώσεων των χαμηλών θερμοκρασιών στους οργανισμούς (τις περισσότερες φορές με σκοπό την επίτευξη της κρυοσυντήρησης). **(17)**

Κρυοσυντήρηση είναι η διαδικασία κατά την οποία τα κύτταρα τοποθετούνται σε διάλυμα αλάτων και χαμηλού μοριακού βάρους οργανικών ενώσεων, ψύχονται σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες φυλάσσονται για κάποιο διάστημα και κάποια στιγμή αποψύχονται επανέρχόμενα στην αρχική τους φυσιολογική λειτουργία. **(18)**

Για τη διατήρηση της βιωσιμότητας μετά από μακροχρόνια φύλαξη ζωντανών κυττάρων, αυτά θα πρέπει να είναι σε κατάσταση ανασταλμένης ζωτικότητας, στην οποία μπορούν να παραμείνουν για απεριόριστο χρόνο, μετά το πέρας του οποίου θα μπορεί η ζωτικότητά τους να επανέλθει. Η θερμοκρασία που χρησιμοποιείται για τη φύλαξη των κυττάρων των θηλαστικών είναι -196°C , δηλαδή η θερμοκρασία του υγρού αζώτου, αν και δεν είναι γνωστό το ακριβές εύρος θερμοκρασιών. Το υγρό άζωτο μπορεί είτε να καταστρέψει τους ζωντανούς ιστούς μέσα σε δευτερόλεπτα ή να τους διατηρήσει για χρόνια, και ίσως και αιώνες με σχεδόν καθόλου ανιχνεύσιμη βιοχημική δραστηριότητα. **(17)**

1.3.1 ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΝΕΡΟΥ

Για να κατανοήσουμε την κρυοβιολογία και κατ' επέκταση την κρυοσυντήρηση, θα πρέπει πρώτα να κατανοήσουμε τη φυσιολογία του νερού και τις ιδιότητές του σε διάφορες θερμοκρασίες.

Το νερό είναι το θεμελιώδες μόριο της ζωής και σε ένα περιβάλλον χωρίς νερό, δεν θα υπήρχε ζωή. Είναι σημαντικό τόσο ως διαλύτης σε πολλές από τις διαλυμένες ουσίες του σώματος αλλά παίρνει και μέρος σε πολλές από μεταβολικές διεργασίες του σώματος. Οι μεταβολικές διεργασίες με τη σειρά τους επηρεάζονται από τη θερμοκρασία, και συνεπώς όταν η θερμοκρασία πέφτει, τα κύτταρα μειώνουν ή σταματούν τη μεταβολική διαδικασία και σε ακραίες θερμοκρασίες μπορεί να προκληθεί και κυτταρικός θάνατος.

Πολλά κύτταρα που ξεπερνούν το αρχικό θερμικό σοκ του παγώματος, πεθαίνουν με τον καιρό σε θερμοκρασίες πάνω από -80°C . Αυτό εξαρτάται από τη θερμοκρασία, το είδος, τον τύπο κυττάρου και τη σύνθεση του υλικού που χρησιμοποιείται για το πάγωμα. Από την άλλη, κάτω από τους -130°C , δεν λαμβάνει χώρα καμία θερμικά οδηγούμενη αντίδραση σε υδατικά συστήματα. Το νερό σε υγρή μορφή δεν υπάρχει σε θερμοκρασίες κάτω από -130°C , αντίθετα στερεοποιείται, κρυσταλλοποιείται και υαλοποιείται. Ελάχιστες μη υδατικές αντιδράσεις μπορούν να συμβούν στους -196°C , από τις υδατικές, οι μόνες αντιδράσεις που μπορούν να συμβούν στους -196°C , είναι φωτοφυσικές, όπως ο σχηματισμός ελεύθερων ριζών και η παραγωγή μακρομορίων ως άμεσο αποτέλεσμα των «χτυπημάτων» από ιονίζουσα ακτινοβολία ή υψηλής ενέργειας σωματίδια του υπόβαθρου. Αυτή η άμεση ακτινοβολία μπορεί μετά από πολύ μεγάλα

διαστήματα να προκαλέσει σπασίματα ή άλλη καταστροφή του DNA και να είναι επιβλαβή μετά το ξεπάγωμα σε φυσιολογικές θερμοκρασίες, ειδικά από τη στιγμή που η ενζυματική επιδιόρθωση δεν μπορεί να συμβεί σε αυτές τις θερμοκρασίες. Η δόση της ιονίζουσας ακτινοβολίας στην επιφάνεια της γης, όμως, είναι 0,1 cGy/y, δόση στην οποία τα κύτταρα των θηλαστικών μπορούν να επιβιώσουν για εκατοντάδες ή χιλιάδες χρόνια. **(19)**

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, το νερό όταν βρεθεί κάτω από το σημείο ψύξης του, στερεοποιείται σε κρυσταλλική δομή, γνωστή ως πάγος. Επειδή ο πάγος είναι λιγότερο πυκνός από το υγρό νερό, οι κρύσταλλοι του πάγου καταλαμβάνουν μεγαλύτερο όγκο από το νερό σε υγρή μορφή από όπου και δημιουργήθηκε. Καθώς ο όγκος του υγρού νερού σε ένα κύτταρο στερεοποιείται, η μετατροπή του σε πάγο προκαλεί πίεση και δυνάμεις διάτμησης στα ενδοκυτταρικά οργανίδια, τα οποία κινδυνεύουν από σημαντική βλάβη. Γι' αυτό και η αποφυγή δημιουργίας κρυστάλλων είναι ένας από τους σημαντικότερους στόχους για μια πετυχημένη διαδικασία κρυοσυντήρησης.

Καθώς το νερό μετατρέπεται από υγρό σε στερεό, κάθε διαλυμένη ουσία σε υγρή φάση εξαιρείται από το στερεό. Αυτό χαμηλώνει το σημείο παγώματος (freezing point) του εναπομείναντος μη παγωμένου διαλύματος. Καθώς η θερμοκρασία πέφτει και η στερεά μορφή πολλαπλασιάζεται, η συγκέντρωση των ηλεκτρολυτών και των διαλυμένων ουσιών μπορούν να φτάσουν σε υψηλά επίπεδα. Αυτές οι συγκεντρώσεις μπορούν να γίνουν τοξικές για τις ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες και γι' αυτό η αποφυγή αυτών των φαινομένων είναι ο δεύτερος σημαντικότερος στόχος για μια πετυχημένη διαδικασία κρυοσυντήρησης. **(7)**

Ο τρίτος σημαντικότερος στόχος είναι η αποφυγή του οσμωτικού σοκ. Κατά τη διάρκεια της απόψυξης, ο στερεός πάγος λιώνει και απελευθερώνει ελεύθερο νερό το οποίο έχει σαν αποτέλεσμα τη μείωση της οσμωτικότητας των γύρω διαλυμάτων. Όταν η απόψυξη είναι αργή, υπάρχει ο κίνδυνος το ελεύθερο νερό να παγώσει και επανακρυσταλλοποιηθεί, κάτι που μπορεί να προκαλέσει περαιτέρω καταστροφή του κυττάρου. Από την άλλη, η ταχεία απόψυξη προκαλεί οσμωτικό σοκ, δηλαδή ξαφνική πτώση της εξωκυττάριας οσμωτικής πίεσης, η οποία αυξάνει την ταχεία μετατόπιση του ελεύθερου νερού γύρω και μέσα στο κύτταρο, που οδηγεί σε φούσκωμα και καταστροφή του κυττάρου.

Το συμπέρασμα που προκύπτει από τα παραπάνω είναι ότι η απλή βύθιση των ωαρίων σε υγρό άζωτο δεν είναι ο ενδεδειγμένος και αποτελεσματικός τρόπος κρυοσυντήρησης καθώς αυτά που πρέπει να αποφεύγονται είναι η δημιουργία κρυστάλλων, η υψηλή συγκέντρωση διαλυμένων ουσιών και το οσμωτικό σοκ. Γι' αυτό το λόγο, στη διαδικασία της κρυοσυντήρησης παίρνουν μέρος κάποια χημικά υλικά, τα κρυοπροστατευτικά, τα οποία προστατεύουν το κύτταρο από την καταστροφή.

1.4 ΚΡΥΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΑ

Μετά την ανακάλυψη του Polge το 1952 σχετικά με τη δράση της γλυκερόλης στην κρυοσυντήρηση, ακολούθησαν πολλές έρευνες σχετικά με την αύξηση των ποσοστών επιβίωσης μετά από κρυοσυντήρηση κυττάρων με τη χρήση διάφορων κρυοπροστατευτικών. Ο ρόλος των κρυοπροστατευτικών ουσιαστικά είναι να μειώνουν το σημείο πήξης και να μειώνουν ή και να αποφεύγουν τη δημιουργία κρυστάλλων σε υδάτινα διαλύματα.

Τα κρυοπροστατευτικά που χρησιμοποιούνται στο χώρο της κρυοσυντήρησης είναι πολλά και διαφέρουν στο ρυθμό διαπέρασης της μεμβράνης, ο οποίος εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως το ιξώδες, τη θερμοκρασία κ.α. Από την άλλη βέβαια, μεγάλο ρόλο παίζει και η διαπερατότητα της μεμβράνης του κυττάρου, η οποία διαφέρει ανάμεσα σε διαφορετικούς οργανισμούς αλλά και ανάμεσα σε διαφορετικούς τύπους κυττάρου του ίδιου οργανισμού. **(20, 21, 22, 23, 24)**

Τα κρυοπροστατευτικά χωρίζονται σε 2 κατηγορίες, τα διεισδυτικά και τα μη-διεισδυτικά.

1.4.1 ΔΙΕΙΣΔΥΤΙΚΑ ΚΡΥΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΑ

Τα διεισδυτικά κρυοπροστατευτικά είναι μη ιονικά, μικρά μόρια τα οποία μπορούν να διαπεράσουν τη μεμβράνη των κυττάρων και να αντικαταστήσουν μεγάλο μέρος του ενδοκυτταρικού νερού. Δημιουργούν υδρογονικούς δεσμούς με τα μόρια του νερού και αποφεύγουν την δημιουργία κρυστάλλων.

Σε χαμηλές συγκεντρώσεις σε νερό, μειώνουν την θερμοκρασία παγώματος του τελικού μείγματος. Σε μεγάλες συγκεντρώσεις, όμως, αναστέλλουν τη δημιουργία κρυστάλλων και δημιουργούν μια στέρα μορφή, η οποία ονομάζεται υαλοποιημένη μορφή, κατά την οποία το νερό στερεοποιείται αλλά δεν διαστέλλεται. Χάρη σε αυτή την ιδιότητα, τα διεισδυτικά κρυοπροστατευτικά, ικανοποιούν τον πρώτο στόχο μιας πετυχημένης διαδικασίας κρυοσυντήρησης.

Τα διεισδυτικά κρυοπροστατευτικά παίζουν ακόμα έναν σημαντικό ρόλο και αυτός είναι η διαλυτοποίηση των ηλεκτρολυτών και των διαλυμένων ουσιών, προστατεύοντας έτσι το κύτταρο. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται «κανόνας φάσεων», αποτελείται από δύο φάσεις, τη φάση του υγρού νερού και τη φάση του πάγου σε συγκεκριμένη πίεση και κατά την οποία η τελική συγκέντρωση του διαλύματος είναι σταθερή σε συγκεκριμένη θερμοκρασία. Συνεπώς, καθώς το ελεύθερο νερό μετατρέπεται από υγρό σε στερεό, το εναπομείναν διάλυμα θα περιέχει προοδευτικά μεγαλύτερη συγκέντρωση κρυοπροστατευτικού και ηλεκτρολυτών. Και επειδή η συνολική συγκέντρωσή τους θα πρέπει να είναι σταθερή, όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του κρυοπροστατευτικού, τόσο μειώνεται η συγκέντρωση των ηλεκτρολυτών, και κατ' επέκταση η τοξικότητα του κυττάρου.

Τα πιο γνωστά διεισδυτικά κρυοπροστατευτικά είναι η γλυκερόλη, το διμέθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) και η αιθυνελική γλυκόλη.

ΓΛΥΚΕΡΟΛΗ

Η γλυκερόλη είναι μια αλκοόλη σακχάρου, η οποία είναι άχρωμη, άοσμη, με μεγάλο ιξώδες, με γλυκιά γεύση, είναι διαλυτή στο νερό και έχει χαμηλή τοξικότητα. Αποτελείται από τρία μόρια άνθρακα, με μία υδροξυλική ομάδα σε κάθε άνθρακα. Οι υδροξυλικές ομάδες είναι υπεύθυνες για την ιδιότητα της γλυκερόλης να είναι εύκολα διαλυτή στο νερό και να είναι υγροσκοπική, δηλαδή να ελκύει και να δεσμεύει μόρια νερού από τον περιβάλλοντα χώρο. Το σημείο τήξης της είναι στους 18°C και το σημείο βρασμού στους 290°C. Παρουσιάζει ένα ευρύ φάσμα χρήσεων, ενώ στο χώρο της κρυοβιολογίας ήταν το πρώτο κρυοπροστατευτικό που χρησιμοποιήθηκε με θετικά αποτελέσματα σε σπερματοζώαρια (2) , ωάρια (25) , αλλά και έμβρυα (26).

ΔΙΜΕΘΥΛΟΣΟΥΛΦΟΞΕΙΔΙΟ (DMSO)

Το διμέθυλοσουλφοξείδιο είναι ένα άχρωμο, ελαφρά ιξώδες και εξαιρετικά υγροσκοπικό υγρό. Το θείο του DMSO είναι πυρηνόφιλο ως προς τα «μαλακά» ηλεκτρονιόφιλα και το οξυγόνο του είναι πυρηνόφιλο ως προς τα «σκληρά» ηλεκτρονιόφιλα. Τα μεθύλια του είναι ελάχιστα όξινα ($pK_{HA}=35$) εξαιτίας της σταθεροποίησης του προκύπτοντος καρβονιόντος από την ομάδα S(O)R, και η απόσπαση του πρωτονίου γίνεται μόνο με ισχυρές βάσεις, όπως το διισοπροπυλαμιδολίδιο και το υδρίδιο του νατρίου. Αποτελεί έναν σημαντικό διαλύτη και διαλύει τόσο πολικές αλλά και μη πολικές ενώσεις και μπορεί να αναμιχθεί με ένα ευρύ φάσμα οργανικών ενώσεων, συμπεριλαμβανομένου και του νερού. Το σημείο

τήξης της είναι στους 18.5°C και το σημείο βρασμού στους 189°C . **(17)**. Το σημείο τήξης αναφέρεται στην καθαρή του μορφή, καθώς σε υγρά διαλύματα το σημείο τήξης είναι χαμηλότερο από τους -60°C , επιτρέποντας τα υγρά που περιέχουν DMSO να παραμένουν σε υγρή μορφή ακόμα και σε θερμοκρασίες χαμηλότερες των 0°C , μια ιδιότητα που το καθιστά πολύ χρήσιμο κρυοπροστατευτικό μέσο. **(18)** Στο χώρο της κρυοβιολογίας έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως τόσο για πάγωμα ωαρίων **(27)** , όσο και εμβρύων **(28)**.

ΑΙΘΥΛΕΝΙΚΗ ΓΛΥΚΟΛΗ (EG)

Η αιθυλενική γλυκόλη είναι μια αλκοόλη, άχρωμη, άοσμη, τοξική και η δομή της περιλαμβάνει δυο υδροξυλικές ομάδες. Το σημείο τήξης της είναι στους $-12,9^{\circ}\text{C}$ και το σημείο βρασμού στους $197,3^{\circ}\text{C}$. Λόγω του χαμηλού σημείου χρησιμοποιείται ως ψυκτικό κλιματιστικών και αυτοκινήτων αλλά και αεροπολάνων. Στην κρυοβιολογία χρησιμοποιείται σε πολλά πρωτόκολλα κυρίως σε πάγωμα ωαρίων **(29)** και εμβρύων **(30)**.

1.4.2 ΜΗ ΔΙΕΙΣΔΥΤΙΚΑ ΚΡΥΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΑ

Σε αντίθεση με τα διεισδυτικά κρυοπροστατευτικά, τα μη διεισδυτικά μένουν στον εξωκυττάριο χώρο. Δρουν προσελκύοντας το ελεύθερο νερό από το εσωτερικό του κυττάρου, λόγω της αύξησης της οσμωτικότητας, με αποτέλεσμα την αφυδάτωση του ενδοκυττάριου χώρου. Γι' αυτό το λόγο χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με τα διεισδυτικά κρυοπροστατευτικά, ώστε να αυξηθεί η καθαρή συγκέντρωση των διεισδυτικών κρυοπροστατευτικών στον ενδοκυττάριο χώρο, κάτι που βοηθάει ακόμα περισσότερο στην αποφυγή δημιουργίας κρυστάλλων

Τα μη διεισδυτικά κρυοπροστατευτικά παίζουν σημαντικό ρόλο κατά την διάρκεια της απόψυξης. Κατά τη διάρκεια του ξεπαγώματος, το νερό που παράγεται από την υγροποίηση του πάγου προκαλεί ταχεία μείωση της εξωκυττάρια οσμωτικής πίεσης. Αν τα κρυοπροστατευτικά δεν διαχυθούν άμεσα έξω από το κύτταρο ώστε να αποφευχθεί η υπερβολική εισροή νερού στον ενδοκυττάριο χώρο, τότε το κύτταρο μπορεί να διογκωθεί και τελικά να προκληθεί λύση του. Γι' αυτό το λόγο τα περισσότερα πρωτόκολλα κρυοσυντήρησης και απόψυξης περιλαμβάνουν τόσο διεισδυτικά, όσο και μη διεισδυτικά κρυοπροστατευτικά. **(31)**

Τα πιο γνωστά μη διεισδυτικά κρυοπροστατευτικά είναι η σουκρόζη, η φικόλη και η τρεχαλόζη, τα οποία είναι σάκχαρα. Μια ευρεία ποικιλία οργανισμών, όπως οι αρκτικοί βάτραχοι, οι σαλαμάνδρες, τα έντομα και οι μύκητες, έχουν την ικανότητα να επιβιώνουν σε ακραίες θερμοκρασίες χάρη στη συσσώρευση μεγάλων ποσοτήτων ενδοκυτταρικών σακχάρων γι' αυτό και δεν είναι τυχαίο το γεγονός πως χρησιμοποιούνται και στον χώρο της κρυοσυντήρησης. **(32, 33)**

ΣΟΥΚΡΟΖΗ

Η σουκρόζη είναι ένας δισακχαρίτης και είναι ιδιαίτερα δημοφιλής τόσο σε πρωτόκολλα κρυοσυντήρησης, όσο και σε πρωτόκολλα απόψυξης εμβρύων, ωαρίων και σπερματοζωαρίων. Πρώτη φορά χρησιμοποιήθηκε σε πρωτόκολλα κρυοσυντήρησης σπερματοζωαρίων βατράχου **(34)** και αρκετά χρόνια αργότερα χρησιμοποιήθηκε και στην κρυοσυντήρηση εμβρύων με θετικά αποτελέσματα. **(35)**

ΦΙΚΟΛΗ

Η φικόλη είναι ένας ουδέτερος, κλαδωτός, υδρόφιλος πολυσακχαρίτης, ο οποίος διαλύεται εύκολα σε υδατικά διαλύματα. Το 1994 ο Dumoulin J. μελέτησε την επίδραση πολυμερών (Dextran, PVP και Ficoll) στην κρυοσυντήρηση ωαρίων και εμβρύων ανθρώπου και ποντικού. Αυτό που έδειξε είναι ότι η ύπαρξη πολυμερών προστατεύει τα έμβρυα από τον κυτταρικό τραυματισμό που μπορεί να συμβεί κατά τη διαδικασία της κρυοσυντήρησης. **(36)**

ΤΡΕΧΑΛΟΖΗ

Ένα ακόμα σάκχαρο, η τρεχαλόζη, χρησιμοποιείται και αυτή σαν κρυοπροστατευτικό στην κρυοσυντήρηση ωαρίων. Η τρεχαλόζη είναι ένας άλφα-συνδεδεμένος δισακχαρίτης που σχηματίζεται από ένα α, α-1,1- γλυκοζίτη δεσμό μεταξύ δύο μονάδων α-γλυκόζης. Έχει δυνατότητες κατακράτησης νερού, και σχηματίζει μια γέλη, καθώς τα κύτταρα αφυδατώνονται με αποτέλεσμα να αποτρέπεται η διάσπαση του εσωτερικού των οργανιδίων του κυττάρου. Ο Eroglu et al., μάλιστα, μελέτησε και κατέγραψε τη δράση της έκχυσης τρεχαλόζης σε ωάρια στη διαδικασία της

κρυοσυντήρησης ωαρίων τόσο σε ανθρώπινα ωάρια **(37, 38)** , όσο και ωάρια ποντικίου **(39)**.

1.4.3 ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΚΡΥΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΩΝ

Τα κρυοπροστατευτικά είναι ουσίες οι οποίες χρησιμοποιούνται για να μειώσουν τον τραυματισμό του κυττάρου κατά τη διάρκεια της ψύξης και απόψυξης των κυττάρων. Τα κρυοπροστατευτικά γενικά δεν είναι τοξικά για το κύτταρο. Μπορούν να γίνουν, όμως, αν δεν τηρούνται οι τρεις βασικοί κανόνες χρήσης τους που έχουν να κάνουν με τη συγκέντρωσή τους, το χρόνο έκθεσης του κυττάρου σε αυτά και η θερμοκρασία τους. Πιο συγκεκριμένα, η μεγάλη χρονικά έκθεση ή η έκθεση σε μεγάλη συγκέντρωση κρυοπροστατευτικού, μπορούν να επηρεάσουν τους κρυοπροστατευτικούς παράγοντες και αυτοί με τη σειρά τους να αποδιοργανώσουν την κυτταρική λειτουργία και ίσως και να επηρεάσουν τη βιωσιμότητα του κυττάρου. **(40)** Για παράδειγμα, στα ωάρια το DMSO και η PROH μπορούν να προκαλέσουν αποπολυμερισμό της σωλινίνης και δυσμορφία της μειωτικής ατράκτου. **(41, 42, 43, 44)** Σε περίπτωση παρατεταμένης έκθεσης σε DMSO, παρατηρούνται επιβλαβείς και μη αναστρέψιμες επιπτώσεις στην άτρακτο **(45)** , ενώ η παρατεταμένη έκθεση σε PROH οδηγεί σε εκφυλισμό και παρθενογενετική ενεργοποίηση. **(46, 44)** Όσο για τη θερμοκρασία, έχει αναφερθεί πως έκθεση στους 37 °C διαταράσσει τη διευθέτηση των μικρονηματίων ακτίνης στους μικροσωλινίσκους ωαρίων τρωκτικών, κάτι που δεν συμβαίνει σε χαμηλή θερμοκρασία. **(47)** Έχει, επίσης, αναφερθεί πως η χρήση DMSO σε ωάρια στους 37 °C οδηγεί σε αρνητικές επιπτώσεις στη μετέπειτα γονιμοποίηση τους, ενώ στους 4 °C δεν σημειώνεται κάτι αντίστοιχο. **(48)** Σε περιπτώσεις σαν αυτές, η μείωση της θερμοκρασίας κατά την έκθεση στο κρυοπροστατευτικό, δείχνει μείωση στην πρόσληψη και το μεταβολισμό τοξικών παραγόντων. Αντίθετα, όμως, όταν χρησιμοποιούνται κρυοπροστατευτικά με μεγαλύτερο ιξώδες, οι υψηλότερες

θερμοκρασίες ίσως δρουν πλεονεκτικά. Το 2007, ο Larman ανέφερε πως η έκθεση ωαρίων σε κρυοπροστατευτικά που χρησιμοποιούνται για ταχεία υαλοποίηση στους 37 °C, οδήγησε στη συντήρηση της μειωτικής ατράκτου ωαρίων ποντικού σε σύγκριση με ωάρια που εκτέθηκαν σε κρυοπροστατευτικά διαλύματα στους 24 °C. **(49)** Επειδή η έκθεση γαμετών και εμβρύων σε διαπερατά κρυοπροστατευτικά σε υψηλότερες θερμοκρασίες οδηγεί σε γρηγορότερη διαπέραση, η πρακτική αυτή πιθανόν απαιτεί ακόμη μικρότερο χρόνο επώασης σε σύγκριση με αυτόν που χρειάζεται σε χαμηλότερες θερμοκρασίες και κάτι τέτοιο μπορεί να δρα αντισταθμιστικά.

1.4.4 ΑΠΟΦΥΓΗ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΚΡΥΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΩΝ

Λαμβάνοντας υπόψη τους παραπάνω κανόνες χρήσης των κρυοπροστατευτικών, καταλήγουμε στο συμπέρασμα πως η επιλογή των κατάλληλων κρυοπροστατευτικών, η βελτιστοποίηση της συγκέντρωσής τους, καθώς και η παρακολούθηση του χρόνου και της θερμοκρασίας έκθεσης των κυττάρων σε αυτά παίζουν σημαντικό ρόλο στην ύπαρξη κυτταρικής βλάβης εξαιτίας των κρυοπροστατευτικών. Ένας γενικευμένος κανόνας για τη μείωση της τοξικότητας των κρυοπροστατευτικών είναι ο συνδυασμός διάφορων κρυοπροστατευτικών, τόσο διεισδυτικά, όσο και μη διεισδυτικά, μειώνοντας έτσι τις επιμέρους συγκεντρώσεις τους. Με τον τρόπο αυτό μειώνεται στο ελάχιστον η πιθανότητα βλάβης ενώ ταυτόχρονα διατηρούνται οι προστατευτικές δράσεις τους. **(50)** Μάλιστα, με το συνδυασμό κρυοπροστατευτικών, όχι μόνο μειώνεται η πιθανότητα βλάβης, αλλά και η τοξικότητα, καθώς έχει δεχθεί ότι με αυτό τον τρόπο το ένα προστατευτικό αντισταθμίζει τις αρνητικές επιπτώσεις κάποιου άλλου. **(51)** Τέλος, η σταδιακή αύξηση των κρυοπροστατευτικών ή η σταδιακή αύξηση της συγκέντρωσής τους, είναι ακόμα ένας τρόπος μείωσης της τοξικότητας. Αξίζει να σημειωθεί ότι αντίστοιχα με την σταδιακή προσθήκη κρυοπροστατευτικών, θετικό αποτέλεσμα έχει και η σταδιακή αφαίρεση αυτών κατά την απόψυξη, καθώς ελαχιστοποιούνται οι πιθανότητες οσμωτικού στρες.

1.5 ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗ

1.5.1 ΒΡΑΔΕΙΑ ΚΑΤΑΨΥΞΗ – SLOW FREEZING

Η μέθοδος βραδείας κατάψυξης βασίζεται στην ύπαρξη χαμηλών αρχικών συγκεντρώσεων κρυοπροστατευτικών, κάτι που σχετίζεται με χαμηλή τοξικότητα, ενώ τα ωάρια είναι σε θερμοκρασία που συνεχίζουν να μεταβολίζονται. Επειδή ο κυτταρικός μεταβολισμός θεωρείται ότι μειώνεται σχεδόν κατά 50% για κάθε 10 °C πτώση της θερμοκρασίας, η τοξικότητα περιορίζεται με το να αυξάνονται οι συγκεντρώσεις των κρυοπροστατευτικών και των άλλων διαλυμάτων, μόνο αφού το κύτταρο έχει φτάσει σε θερμοκρασία όπου ο μεταβολικός του ρυθμός είναι αρκετά αργός. Τα κρυοπροστατευτικά προστίθενται σε θερμοκρασία δωματίου, ο φορέας με το διάλυμα και τα ωάρια τοποθετούνται σε straw και αυτό τοποθετείται σε ειδικό μηχανήμα για κρυοσυντήρηση βραδείας κατάψυξης. Στη συνέχεια η θερμοκρασία πέφτει σταδιακά, σχεδόν 2 °C ανά λεπτό μέχρι τους -6 °C. Σε όλη την παραπάνω ώρα όλα τα διαλύματα είναι ακόμα υγρά. Σε αυτή τη φάση ο μεταβολικός ρυθμός του ωαρίου είναι 1/16 από ότι ήταν στους 37 °C. Στη θερμοκρασία των -6 °C δημιουργείται στο εξωκυτταρικό διάλυμα ο «σπόρος» των κρυστάλλων πάγου με σκοπό όλο και περισσότερα μόρια νερού να μετατραπούν σε κρυστάλλους πάγου. Ο σχηματισμός κρυστάλλων πάγου που προκύπτει έχει σαν αποτέλεσμα την απελευθέρωση ενέργειας, γνωστή ως θερμότητα τήξης. Στη θερμοκρασία αυτή, τα ωάρια θα πρέπει να μείνουν για αρκετό διάστημα (10-30 λεπτά) μέχρι να επιτευχθεί εξισορρόπηση. Μετά την εξισορρόπηση, η θερμοκρασία πέφτει σταδιακά έως την τελική θερμοκρασία των -32 °C. Στη διάρκεια αυτής της σταδιακής πτώσης της θερμοκρασίας, συνεχίζεται η «διάδοση» των κρυστάλλων στον εξωκυττάριο χώρο. Η αυξανόμενη δημιουργία

κρυστάλλων έχει σαν αποτέλεσμα την σταδιακή αύξηση της ωσμωμοριακότητας του διαλύματος και αυτό με τη σειρά του έχει σαν αποτέλεσμα την σταδιακή εξόδου νερού από το κύτταρο. Παράλληλα αυξάνεται η συγκέντρωση των κρυοπροστατευτικών κυρίως στον ενδοκυτταρικό χώρο, ο οποίος αφυδατώνεται περαιτέρω με τη χρήση μη διεισδυτικών κρυοπροστατευτικών. Ο πολύ αργός ρυθμός ψύξης ($0,33^{\circ}$ ανά λεπτό) επιτρέπει τη σταδιακή διάχυση πρόσθετων διεισδυτικών κρυοπροστατευτικών στο εσωτερικό του ωαρίου ενώ παράλληλα διατηρείται εξισορρόπηση με τον εξωκυττάριο χώρο. Ο μεταβολικός ρυθμός του ωαρίου πλέον είναι αρκετά αργός, με αποτέλεσμα να περιορίζεται κι άλλο η τοξικότητα των αυξανόμενων συγκεντρώσεων των κρυοπροστατευτικών. Τέλος, το straw βυθίζεται σε υγρό άζωτο με αποτέλεσμα την υαλοποίηση του διαλύματος και των ωαρίων.

Κατά τη διάρκεια της απόψυξης ωαρίων που έχουν κρυοσυντηρηθεί με τη μέθοδο της βραδείας κατάψυξης, προτιμάται απότομη μετάβαση θερμοκρασίας με σκοπό την αποφυγή κυτταρικής βλάβης λόγω επανακρυσταλλοποίησης. Λόγω της αυξημένης συγκέντρωσης των διεισδυτικών κρυοπροστατευτικών στο ωάριο, υπάρχει κίνδυνος οσμωτικού σοκ, γι' αυτό και κατά την απόψυξη χρησιμοποιείται μη διεισδυτικό κρυοπροστατευτικό. Έτσι, καθώς το διεισδυτικό κρυοπροστατευτικό διαχέεται σταδιακά έξω από το κύτταρο, η συγκέντρωση του μη διεισδυτικού κρυοπροστατευτικού σταδιακά μειώνεται, έως ότου το ωάριο τοποθετηθεί σε καλλιεργητικό υλικό. **(31)**

1.5.1.1 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ ΒΡΑΔΕΙΑΣ ΚΑΤΑΨΥΞΗΣ ΩΑΡΙΩΝ

Ο Porcu et al. και το Fabbri το 2000 και το 2001 δούλεψαν σαν ομάδα και παρουσίασαν τη μεγαλύτερη κλινική εμπειρία στην κρυοσυντήρηση ωαρίων με τη μέθοδο της βραδείας κατάψυξης και την απόψυξη αυτών με τη μέθοδο της ταχείας απόψυξης. Τα κρυοπροστατευτικά που χρησιμοποίησαν ήταν τόσο διεισδυτικά, όσο και μη διεισδυτικά, και αυτά ήταν 1,5M PROH και 0,2M σουκρόζη αντίστοιχα. Τα ωάρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν χωρίς κοκκώδη κύτταρα και αφού εξισσοροπήθηκαν, φορτώθηκαν σε παγιέτες οι οποίες τοποθετήθηκαν σε κλίβανο βραδείας κατάψυξης ο οποίος ήταν σε θερμοκρασία 23 °C. Η θερμοκρασία άρχισε σταδιακά να πέφτει από τους 20 °C στους -8 °C με ρυθμό -2 °C/λεπτό. Ο σχηματισμός κρυστάλλων πάγου έγινε με τη μέθοδο της «σποράς» και η θερμοκρασία μειωνόταν σταδιακά με ρυθμό -0,3 °C/λεπτό έως τους -30 °C και μετά απότομα στους -150 °C. 10 λεπτά μετά την εξισορρόπηση σε αυτή τη θερμοκρασία, οι παγιέτες τοποθετούνταν σε υγρό άζωτο, όπου και φυλάσσονταν. Κατά την απόψυξη των ωαρίων, οι παγιέτες τοποθετούνταν σε θερμοκρασία δωματίου για 30 s και σε υδατόλουτρο 30 °C για 40 s. Στην συνέχεια ακολουθούσε σταδιακή μείωση των κροπροστατευτικών από τα ωάρια με τη χρήση 1M και 0,5 M PROH για και 0,2M σουκρόζης στη συνέχεια και άλλα 10 λεπτά σε PBS, με τελικό προορισμό το καλλιεργητικό υλικό. Από τα 338 ωάρια (από 23 γυναίκες με σαλπινγικό παράγοντα υπογονιμότητας) που παγώθηκαν με την παραπάνω μέθοδο, το 59,5% επιβίωσαν και το 64,4% γονιμοποιήθηκαν. Μετά από εμβρυομεταφορά με $3,1 \pm 1,3$ έμβρυα ανά ασθενή, παρατηρήθηκαν 3 εγκυμοσύνες και 1 γέννηση. **(52)** Μία χρονιά αργότερα, η ίδια ομάδα, παρουσίασε μια μεγαλύτερη σε αριθμό εργασία, η οποία περιελάμβανε 1769 κρυοσυντηρημένα ωάρια από 96 ασθενείς. Από αυτά,

αποψύχθηκαν 1502 με 54,1% ποσοστό επιβίωσης και 57,7% ποσοστό γονιμοποίησης. 16 εγκυμοσύνες επιτεύχθηκαν εκ των οποίων 9 έφτασαν σε γέννηση υγιών παιδιών. Αξίζει να σημειωθεί πως παρατηρήθηκαν μεγαλύτερα ποσοστά στα ωάρια των οποίων η κρυοσυντήρηση περιελάμβανε 0,3 mol/L σουκρόζη έναντι αυτών που περιείχαν 0,2 mol/L και με χρονικά μεγαλύτερη έκθεση στο κρυοπροστατευτικό (15 λεπτά, έναντι των 10,5). **(53)** Ακολούθησαν πολλές εργασίες με πρωτόκολλα βραδείας ψύξης με παρόμοια ποσοστά επιβίωσης και γονιμοποίησης αλλά με μεγαλύτερα ποσοστά εμφύτευσης. Το 2005 Chen et al. δημοσίευσε τα αποτελέσματα του μετά από κρυοσυντήρηση και απόψυξη ωαρίων σε 43 ζευγάρια. Το αποτέλεσμα κλινικών εγκυμοσυνών ήταν στο 33%. **(54)** Το 2006 ο Borini et al., χρησιμοποιώντας 1,5 mol/L PROH και 0,3 mol/L σουκρόζη είχε 74,1% ποσοστό επιβίωσης και 76% ποσοστό γονιμοποίησης, αλλά μόλις 5,2% ποσοστό εμφύτευσης, κάτι που τον οδήγησε στο συμπέρασμα πως μπορεί η μεγάλη συγκέντρωση σε σουκρόζη να βοηθάει στη επιβίωση και γονιμοποίηση των ωαρίων που προέρχονται από κρυοσυντήρηση με τη μέθοδο της βραδείας κατάψυξης, δεν φαίνεται όμως να είναι αρκετό για αντίστοιχα μεγάλα ποσοστά εμφύτευσης. **(55)** Παράλληλα με τα πετυχημένα αποτελέσματα σε ομόλογα περιστατικά, υπήρχαν και τα πετυχημένα αποτελέσματα σε ετερόλογα περιστατικά, με δωρεά ωαρίων. Το 2002 ο Yang et al. κρυοσυντήρησε 222 ωάρια από 12 δότριες ωαρίων. Το ποσοστό επιβίωσης ήταν 70,9%, το ποσοστό γονιμοποίησης 86,4%, το ποσοστό εμφύτευσης 25,3% και το ποσοστό κλινικών εγκυμοσυνών 45,8%, με 14 παιδιά τελικά να γεννιούνται. **(56)** Το 2007 ο Allen et al. συνέκρινε αποτελέσματα μεταξύ ομόλογων ($34,7 \pm 0,7$ χρονών) και ετερόλογων ($25,1 \pm 0,9$ χρονών) περιστατικών μετά από την κρυοσυντήρηση ωαρίων με τη μέθοδο της βραδείας κατάψυξης. Η

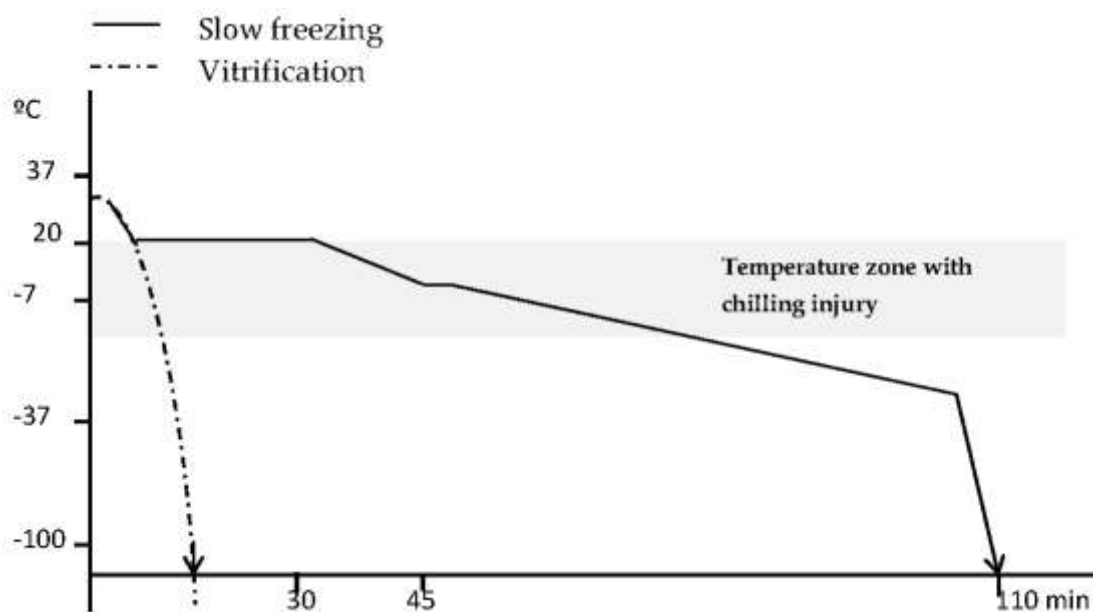
σύγκριση αυτή έδειξε πως τα αποτελέσματα δεν διέφεραν σημαντικά όταν η ηλικία είναι κάτω των 35. **(57)**

1.5.2 ΥΑΛΟΠΟΙΗΣΗ – VITRIFICATION

Ο όρος «υαλοποίηση» αναφέρεται σε οποιαδήποτε διεργασία έχει σαν αποτέλεσμα τη «δημιουργία γυαλιού», τη μετατροπή ενός υγρού σε στερεό, απουσία κρυσταλλοποίησης. **(58)**

Κατά τη διάρκεια της υαλοποίησης απαιτείται τόσο μείωση της περιεκτικότητας νερού στο κύτταρο όσο και η αύξηση του ιξώδους στο κυτταρόπλασμα. **(59)** Τα κρυοπροστατευτικά που χρησιμοποιούνται είναι υψηλή συγκέντρωση διεισδυτικών κρυοπροστατευτικών και μη διεισδυτικών, σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να επιτευχθεί συρρίκνωση του κυττάρου. Επειδή η τοξικότητα των υψηλών συγκεντρώσεων διεισδυτικών κρυοπροστατευτικών είναι ουσιαστικής σημασίας, το wάριο δεν μπορεί να παραμείνει σε αυτή τη θερμοκρασία για μεγάλο χρονικό διάστημα γι' αυτό και χρόνος παραμονής τους σε αυτά είναι μικρότερος από 1 λεπτό. **(60)** Συμπληρωματικά, επειδή η υψηλή συγκέντρωση ενός μόνο διεισδυτικού κρυοπροστατευτικού μπορεί να προκαλέσει ανεπανόρθωτες ζημιές στο wάριο, **(61)** χρησιμοποιείται συνδυασμός κρυοπροστατευτικών. **(62)** Η υψηλή οσμωτικότητα του διαλύματος υαλοποίησης αφυδατώνει το wάριο και η βύθιση σε υγρό άζωτο στερεοποιεί το κύτταρο και έτσι το εναπομένει ενδοκυτταρικό νερό να μην προλάβει να δημιουργήσει καταστροφικούς κρυστάλλους πάγου. **(63)** Η βύθιση των wαρίων στο υγρό άζωτο μπορεί να γίνει, είτε με ανοιχτό σύστημα, δηλαδή με απευθείας βύθιση του φορέα που περιλαμβάνει τα wάρια με μικρή ποσότητα κρυοπροστατευτικών **(64,** **65)** , είτε με κλειστό σύστημα, δηλαδή με τοποθέτηση του φορέα στην παγιέτα, σφράγιση αυτής και βύθιση της παγιέτας στο υγρό άζωτο. **(66)**

Κατά την απόψυξη, απαιτείται και πάλι η μέθοδος της ταχείας απόψυξης, με απότομη αλλαγή της θερμοκρασίας (απευθείας βύθιση του φορέα σε υλικό που βρίσκεται στους 37 °C) όπως αναφέρθηκε και στην απόψυξη μετά από κρυοσυντήρηση με τη μέθοδο της βραδείας κατάψυξης, με σκοπό την αποφυγή κυτταρικής βλάβης λόγω επανακρυσταλλοποίησης. (31)



Εικόνα 1: Ρυθμός ψύξης βραδείας κατάψυξης vs υαλοποίησης

1.5.2.1 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ ΥΑΛΟΠΟΙΗΣΗΣ ΩΑΡΙΩΝ

Το 1999 ο Kuleshova et al. ανέφερε την πρώτη γέννηση παιδιού από 17 κρυοσυντηρημένα ωάρια χρησιμοποιώντας αιθυλενική γλυκόλη (40%) και 0,5 M/L σουκρόζη σε ανοιχτό σύστημα. **(67)** Το 2003 έγινε η πρώτη δημοσίευση μεγάλης σειράς ωαρίων από την ομάδα του Yoon. Κρυοσυντήρησαν 474 ωάρια με τα κοκκώδη κύτταρά τους (ώριμα και ανώριμα) με τη μέθοδο της υαλοποίησης χρησιμοποιώντας σαν κρυοπροστατευτικά 5,5 M αιθυλενική γλυκόλη και 1 M σουκρόζη. Για να επιταχύνουν τον ρυθμό ψύξης τα ωάρια φορτώθηκαν σε πλέγμα ηλεκτρονικού μικροσκοπίου. Οι επιστήμονες ανακοίνωσαν ποσοστό επιβίωσης 68,7%, ποσοστό γονιμοποίησης 71,7%, ποσοστό εμφύτευσης 6,4% και κλινική εγκυμοσύνη και γέννηση ανά εμβρυομεταφορά 21,4%(6/21). **(68)** Ακολούθησε ο Chian et al το 2005, ο οποίος χρησιμοποίησε αιθυλενική γλυκόλη, PROH και σουκρόζη και κρυοσυντήρησε 180 ωάρια χρησιμοποιώντας το Cryoleaf. Τα αποτελέσματα που ανακοίνωσε ήταν 93,9% ποσοστό επιβίωσης, 74,6% ποσοστό γονιμοποίησης, 20,4% ποσοστό εμφύτευσης και 46,7% ποσοστό κλινικών εγκυμοσυνών ανά ασθενή (7/15). Βέβαια, να σημειωθεί πως ο αριθμός μεταφερόμενων εμβρύων ανά ασθενή ήταν αρκετά μεγάλος ($3,6 \pm 3,7$) και η ηλικία των ασθενών μικρή ($31,7 \pm 3,7$). **(69)** Την ίδια χρονιά ο Kuwayama et al. έκανε και αυτός δημοσίευση με τα δικά του αποτελέσματα 64 κρυοσυντηρημένων ωαρίων, χρησιμοποιώντας αιθυλενική γλυκόλη και σουκρόζη. Είχε 90,8% ποσοστό επιβίωσης, 89,6% ποσοστό γονιμοποίησης, 41,4% ποσοστό κλινικής εγκυμοσύνης ανά εμβρυομεταφορά και 34,5% ποσοστό εγκυμοσυνών σε εξέλιξη έχοντας μέσο αριθμό μεταφερόμενων εμβρύων τα 2,2. **(70)** Την επόμενη χρονιά ο Lucena et al., χρησιμοποίησε την ίδια μέθοδο με τον Kuwayama και ανέφερε ποσοστό εγκυμοσύνης

56,5%. Τα ποσοστά του ήταν υψηλότερα από τον Kuwayama και αυτό ίσως οφείλεται στο γεγονός ότι η πλειοψηφία των εμβρυομεταφορών έγιναν χρησιμοποιώντας ωάρια δοτριών, και στον αριθμό των μεταφερόμενων εμβρύων (μέσος όρος 4,5 έμβρυα). **(71)**

1.5.3 ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΩΡΙΜΩΝ VS ΑΝΩΡΙΜΩΝ ΩΑΡΙΩΝ

Κρυοσυντήρηση και χαρακτηριστικά δομής των ανθρώπινων ώριμων ωαρίων (MII oocytes)

Τα ανθρώπινα MII ωάρια παρουσιάζουν ιδιαίτερη ευαισθησία στο πάγωμα/ξεπάγωμα και είναι επιρρεπή σε βλάβες κυρίως στη μειωτική άτρακτο και την αστάθεια των δεσμών μεταξύ χρωμοσωμάτων, **(114)** στα μικρονημάτια που είναι πολύ σημαντικά για την εξώθηση του πολικού σωματίου, τη μετανάστευση των προπυρήνων και τις κυτοκίνηση, στη διαφανή ζώνη και τα φλοιώδη κοκκία.

Επιπτώσεις στη μειωτική άτρακτο

Η μειωτική άτρακτος είναι μία προσωρινή και δυναμική δομή μικροσωληνίσκων που αποτελείται από ετεροδιμερή μονάδες α και β τουμπουλίνης. Παρατηρούνται δυο είδη μικροσωληνίσκων, αυτοί που κινούνται από πόλο σε πόλο ανάμεσα από τα χρωμοσώματα και αυτοί που είναι προσκολλημένοι στον κινητοχόρο των χρωμοσωμάτων. **(115)** Συμπερασματικά, ανωμαλίες που μπορεί να προκαλέσει η κρυοσυντήρηση MII ωαρίων στην μειωτική άτρακτο, μπορούν να οδηγήσουν σε ανωμαλίες στο διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων μετά τη γονιμοποίηση με αποτέλεσμα τη δημιουργία εμβρύων με ανευπλοειδίες. **(116, 117)**

Επιπτώσεις στα μικρονημάτια

Εκτός από τους μικροσωληνίσκους, τα μικρονημάτια, το άλλο κύριο συστατικό του κυτοσκελετού, είναι και αυτά ουσιαστικής σημασίας για την περιστροφή της ατράκτου, την εξώθηση του πολικού σωματίου, τη μετανάστευση των προπυρήνων και την κυτοκίνηση. **(118)** Αποτελούνται από πολυμερισμένη ακτίνη, (F-actin) σε δυναμικό

ισορροπημένο συνδυασμό με ελεύθερη ακτίνη, μια κατάσταση που είναι επιρρεπής σε οσμωτικές και θερμοκρασιακές μεταβολές που συμβαίνουν κατά τη διάρκεια της κρυοσυντήρησης. **(119)** Γι' αυτό και η βλάβη ή η καταστροφή τους κατά τη διαδικασία της κρυοσυντήρησης, μπορεί να επιφέρει ανεπανόρθωτες ζημιές στις λειτουργίες που παίρνουν μέρος.

Επιπτώσεις στη διάφανη ζώνη και στα φλοιώδη κοκκία

Οι κύριες λειτουργίες της διαφανούς ζώνης, δηλαδή της στιβάδας των γλυκοπρωτεϊνών που περιβάλλουν το ωάριο, είναι η παρουσίαση των υποδοχέων του σπέρματος, την επαγωγή της αντίδρασης της ζώνης, όπου λόγω της απελευθέρωσης των φλοιωδών κοκκίων του ωοκυττάρου, τα οποία περιέχουν λυσοσωματικά ένζυμα, η μεμβράνη του ωοκυττάρου καθίσταται αδιαπέραστη για άλλα σπερματοζωάρια και η διαφανής ζώνη αλλάζει τη δομή και τη σύστασή της και αποφεύγεται η πολυσπερμία, και την προστασία του εμβρύου. **(119)** Το 1991 ο Pickering et al. ανέφερε ότι η έκθεση του ωαρίου σε κρυοπροστατευτικά όπως το DMSO προκαλεί την απελευθέρωση των φλοιωδών κοκκίων και την αντίδραση της ζώνης. **(48)** Γι' αυτό και το 2005 προτάθηκε η χρήση του ICSI αντί του κλασικού IVF. **(120)** Παρ' όλα αυτά, η διαπέραση της διαφανούς ζώνης με τη χρήση του ICSI δεν σημαίνει απαραίτητα και την αποκατάσταση του ποσοστού γονιμοποίησης, κάτι που μας δείχνει πως μάλλον έχει συμβεί μεγαλύτερη βλάβη κατά τη διαδικασία της κρυοσυντήρησης. **(121)**

Επιπτώσεις κρυοσυντήρησης σε ανώριμα ωάρια (GV oocytes)

Έχει διατυπωθεί πως τα ανώριμα ωάρια που προέρχονται από ωοθήκες που έχουν υποστεί ή όχι διέγερση, μπορεί να είναι μειωμένης ποιότητας και να παρουσιάζουν

χαμηλά ποσοστά εγκυμοσύνης μετά από ωρίμανση αυτών στο εργαστήριο (IVM). Παρ' όλα αυτά, η κρυοσυντήρησή τους μπορεί να προσφέρει μια εναλλακτική προσέγγιση παρακάμπτοντας τις βλαβερές επιδράσεις της ψύξης/απόψυξης στη βιολογική και δομική ακεραιότητα. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι στα ανώριμα ωάρια, η μείωση είναι σταματημένη στο στάδιο της πρόφασης Ι, τα χρωμοσώματα είναι προστατευμένα εσωτερικά του βλαστικού κυστιδίου και δεν έχουν δημιουργηθεί ακόμα οι δομές των μικροσωληνίσκων. **(122, 123)**

1.6 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗΣ ΩΑΡΙΩΝ

1.6.1 ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΩΑΡΙΩΝ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΚΑΡΚΙΝΟ

Αδιαμφισβήτητα αυτή η ομάδα γυναικών είναι η πιο ξεκάθαρα ενδεδειγμένη ομάδα για κρυοσυντήρηση ωαρίων. Βάση της Αμερικανικής ένωσης καρκίνου, το 2015, περίπου το 5,4% των γυναικών που παρουσίασαν καρκίνο ήταν κάτω από 49 ετών. **(72)** Τα τελευταία 25 χρόνια, το προσδόκιμο επιβίωσης μετά από αντιμετώπιση κάποιας μορφής καρκίνου έχει αυξηθεί και αυξάνεται συνεχώς χάρη στην πρόωρη διάγνωση και στη βελτιστοποίηση των θεραπειών. Μάλιστα είναι πολλές οι γυναίκες που κάποιο διάστημα μετά τη θεραπεία επιθυμούν την απόκτηση παιδιού. Η χημειοθεραπεία και η ραδιοθεραπεία που χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση του καρκίνου, όμως, μπορούν να προκαλέσουν ωοθηκική ανεπάρκεια **(73)** ή βλάβη των ωαρίων σε μοριακό επίπεδο. Γι' αυτό και η προληπτική διατήρηση της γονιμότητας αποτελεί σημαντική και χρήσιμη λύση για τέτοιου είδους περιπτώσεις. Όταν η ομάδα ογκολόγων κρίνουν ότι υπάρχει διαθέσιμος χρόνος για ωοθηκική διέγερση, πριν την έναρξη των κατάλληλων θεραπειών, τότε τα ωάρια συλλέγονται μετά την ωοθηκική διέγερση. Αν είναι δυνατόν, η διαδικασία αυτή μπορεί να γίνει περισσότερες από μία φορές. Εάν, όμως, δεν υπάρχει χρόνος και πρέπει να επισπεύσουμε τη συλλογή ωαρίων, μπορεί η λήψη να γίνει στο στάδιο βλαστικού κυστιδίου (germinal vesicle stage – GV), όπου τα χρωμοσώματα είναι προστατευμένα μέσα στην πυρηνική μεμβράνη και η άτρακτος δεν έχει ακόμα δημιουργηθεί. **(74, 75, 76)**

1.6.2 ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΩΑΡΙΩΝ ΓΙΑ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟΥΣ –

ΘΡΗΣΚΕΥΤΙΚΟΥΣ ΛΟΓΟΥΣ

Στις μέρες μας, οι γυναίκες καθυστερούν όλο και περισσότερο τη μητρότητα. Υπάρχουν κοινωνικοί, εκπαιδευτικοί και οικονομικοί λόγοι που δεν τους επιτρέπουν να προχωρήσουν σε δημιουργία οικογένειας πριν τα 30 τους έτη. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα, όταν πλέον αποφασίσουν να αποκτήσουν απογόνους, να αντιμετωπίζουν προβλήματα σύλληψης λόγω ηλικιακής υπογονιμότητας. **(77, 78, 79)**

Υπάρχουν, επίσης, χώρες με νομικό πλαίσιο που δεν επιτρέπει τη γονιμοποίηση ωαρίων πάνω από έναν συγκεκριμένο αριθμό, με σκοπό να μένουν ωάρια ανεκμετάλλευτα. **(80)**

Ακόμη, υπάρχουν ζευγάρια που για δικούς τους προσωπικούς και θρησκευτικούς λόγους δεν επιθυμούν την κρυοσυντήρηση εμβρύων τους αλλά δεν θέλουν να μην αξιοποιήσουν όλα τα διαθέσιμα ωάρια της προσπάθειας με κάποιο τρόπο.

Για τους παραπάνω λόγους, λοιπόν, η κρυοσυντήρηση ωαρίων αποτελεί μια πολύ χρήσιμη εναλλακτική και μπορεί να εξυπηρετήσει γυναίκες και ζευγάρια που για κοινωνικούς / θρησκευτικούς λόγους επιθυμούν να κρυοσυντήρηση του γενετικού τους υλικού.

1.6.3 ΤΡΑΠΕΖΑ ΔΩΡΕΑΣ ΩΑΡΙΩΝ

Η δωρεά ωαρίων πλέον είναι μια μέθοδος που έχει βοηθήσει χιλιάδες ζευγάρια να αποκτήσουν παιδί. Οι κυριότερες ενδείξεις για δωρεά ωαρίων είναι η πρόωρη ωοθηκική ανεπάρκεια, οι κληρονομήσιμες γενετικές ασθένειες μητρικής προέλευσης, η

προεμμηνόπαυση, η εμμηνόπαυση, η φτωχή απάντηση ωοθηκών και η προχωρημένη ηλικία των γυναικών που αποτελεί και τον πιο συχνό λόγο χρήσης της μεθόδου δωρεάς ωαρίων. Η δωρεά ωαρίων σε τέτοιες περιπτώσεις δίνει πολύ υψηλά ποσοστά κλινικών εγκυμοσυνών, κυρίως λόγω των ωαρίων που προέρχονται από νεαρές, υγιείς κοπέλες, αποδεδειγμένης γονιμότητας.

Η μέθοδος της δωρεάς ωαρίων απαιτεί τον συγχρονισμό της έμμηνου ρύσης της δότριας και της λήπτριας. Για την επίτευξη αυτού του συγχρονισμού απαιτούνται μεγάλη υπολογιστική προσπάθεια και δύσκολος προγραμματισμός. Αυτές οι απαιτήσεις, όμως, μπορούν να εξυπηρετηθούν με την ύπαρξη τράπεζας κρυοσυντηρημένων ωαρίων με σκοπό να μην απαιτείται κανένας συγχρονισμός και να υπάρχουν πάντα διαθέσιμα ωάρια χωρίς να υπάρχει ο κίνδυνος ακύρωσης της προσπάθειας σε περίπτωση μη σωστού συγχρονισμού.

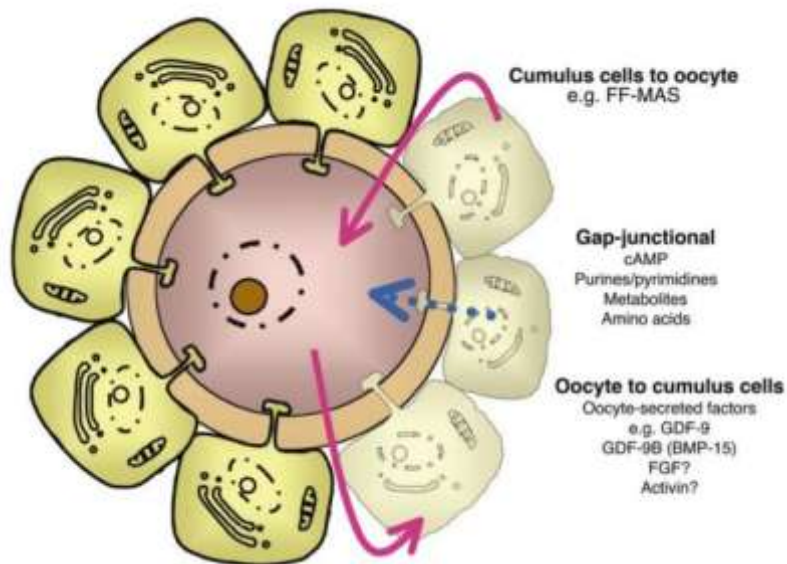
1.7 IN VITRO MATURATION - IVM

1.7.1 ΩΡΙΜΑΝΣΗ ΩΑΡΙΩΝ

Η ωρίμανση των ωαρίων είναι μια σύνθετη διαδικασία που περιλαμβάνει την πυρινική και την κυτταροπλασματική ωρίμανση. Στα πρώτα στάδια της ανάπτυξης στη μήτρα, τα γαμετικά κύτταρα, ονομάζονται ωογόνια και υπόκεινται σε πολλαπλές μιτωτικές διαιρέσεις κατά τους τρεις πρώτους μήνες μετά τη σύλληψη. Τα γαμετικά κύτταρα, δηλαδή, αναπαράγονται μόνο αυτούς τους τρεις πρώτους μήνες. Κατά τη γέννηση, ένα θηλυκό άτομο, περιέχει στις ωοθήκες του περίπου 2-4 εκατομμύρια ωάρια, και δεν προστίθενται καινούργια στη συνέχεια της ζωής τους. Από αυτά περίπου τα 400 προορίζονται για ωορρηξία, ενώ τα υπόλοιπα εκφυλίζονται. Μετά τη γέννηση, τα ωάρια παραμένουν στην πρόφαση I της μειωτικής διαίρεσης (πρωτογενή ωοκύτταρα) μέχρι τη στιγμή που οι γοναδοτροπίνες θα τα διεγείρουν ώστε να συνεχίσουν τη μειωτική διαίρεση και να επιτευχθεί η ωορρηξία. Η πυρινική ωρίμανση αναφέρεται στην επανέναρξη της μειωτικής διαίρεσης και την εξέλιξη από το στάδιο του βλαστικού κυστιδίου (germinal vesicle breakdown – GVBD) στη μετάφαση II (MII). Η κυτταροπλασματική ωρίμανση αναφέρεται στην προετοιμασία του κυτταροπλάσματος του ωαρίου για γονιμοποίηση και εμβρυική ανάπτυξη. **(81)**

Το GVBD επάγεται από την το προωρρηκτικό κύμα της ορμόνης LH, με έμμεση δράση μέσω των κοκκωδών κυττάρων (cumulus cells). Το ωάριο και τα κοκκώδη κύτταρα ενώνονται με χασμοσυνδέσμους. Ανασταλτικοί παράγοντες μεταφέρονται από τα κοκκώδη κύτταρα στο ωάριο και διατηρείται η μειωτική παύση των ωαρίων. **(82)** Θεωρείται πως η LH προκαλεί διαχωρισμό των κοκκωδών κυττάρων από το ωάριο και

έτσι τερματίζεται η μεταφορά ανασταλτικών παραγόντων της μειωτικής διαίρεσης. **(81)** Υπάρχει, όμως, και η θεωρία πως η LH διεγείρει την παραγωγή σήματος για το GVBD στα κοκκώδη κύτταρα που στη συνέχεια μεταφέρονται στο ωάριο μέσω των χασμοσυνδέσμων. **(83)** Τα κυτταρολογικά γεγονότα που λαμβάνουν χώρα τη στιγμή που το ωάριο συνεχίζει τη διαδικασία της μείωσης, περιλαμβάνουν αναδιανομή οργανιδίων, και αλλαγές στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ του ωαρίου και των κοκκωδών κυττάρων. Το βλαστικό κυστίδιο διασπάται και το πρώτο πολικό σωμάτιο, το οποίο περιλαμβάνει το ένα ζεύγος χρωμοσωμάτων, κάνει την εμφάνισή του. **(84)**



Εικόνα 2: Επικοινωνία μεταξύ ωαρίου και κοκκωδών κυττάρων

Η κυτταροπλασματική ωρίμανση περιλαμβάνει πολύπλοκες διαδικασίες που προετοιμάζουν το ωάριο για ενεργοποίηση, γονιμοποίηση και ανάπτυξη. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας γίνεται η μετάβαση από μητρικό σε εμβρυακό έλεγχο της ανάπτυξης και το έμβρυο συνθέτει το δικό του mRNA και πρωτεΐνες που δεν στηρίζονται μόνο σε αυτές που κληροδοτήθηκαν από τη μητέρα στο ωάριο. **(85)** Να σημειωθεί, βέβαια, πως απουσία της κατάλληλης ενεργοποίησης και κατάλληλης

διατήρησης της εμβρυακής γονιδιακής έκφρασης, το έμβρυο δεν θα καταφέρει να αναπτυχθεί πέρα από τις αρχικές του διαιρέσεις **(86)** , ο ανδρικός προπυρήνας δεν θα καταφέρει να σχηματιστεί και αυξάνονται και χρωμοσωμικές ανωμαλίες μετά τη γονιμοποίηση. **(87)**

1.7.2 ΜΕΘΟΔΟΣ IVM – ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Το 1935, ο Pincus et al., ανέφεραν ότι ανώριμα ωάρια κουνελιού που αφαιρέθηκαν από τις ωοθήκες τους ήταν ικανά να ωριμάσουν και να γονιμοποιηθούν στο εργαστήριο. **(88)** 30 χρόνια αργότερα, ο Edwards et al., ήταν ο πρώτος που έκανε την ίδια παρατήρηση σε ανθρώπινα πλέον ωάρια. **(89)** Έχοντας αυτή τη γνώση, οι επιστήμονες προσπάθησαν να χρησιμοποιήσουν αυτή την τεχνικά για τη διάσωση ανώριμων ωαρίων σε κύκλους εξωσωματικής γονιμοποίησης μετά από διέγερση ωοθηκών. Το 1983, ο Veck et al., παρατήρησε πως τα ανθρώπινα ανώριμα ωάρια τα οποία εξέθεσε σε γοναδοτροπίνες εργαστηριακά, όχι μόνο είχαν τη δυνατότητα να ωριμάσουν και να γονιμοποιηθούν, αλλά μπορούσαν να αναπτυχθούν περαιτέρω και να δώσουν ανάπτυξη, κλινική εγκυμοσύνη και γέννηση παιδιού. **(90)** Να αναφερθεί φυσικά, πως όταν μιλάμε για «διάσωση» ωαρίων, αυτό σημαίνει πως τα ωάρια που πρόκειται να διασωθούν δεν περιβάλλονται πλέον από τα κοκκώδη κύτταρα τους, μιας και πρέπει να αφαιρεθούν για να γίνει η αξιολόγηση τους. Αυτό σημαίνει πως η έκθεση στις γοναδοτροπίνες γίνεται χωρίς την παρουσία κοκκωδών κυττάρων. Και όπως έχουν δείξει μελέτες, η «διάσωση» ωαρίων μπορεί έχει μειωμένα ποσοστά γονιμοποίησης και/ή έμβρυα με ανώμαλη διαίρεση. **(91)** Αυτή η μη ενδεδειγμένη ανάπτυξη των εμβρύων, όμως, είναι αναμενόμενη αν σκεφτούμε πως τα ανώριμα ωάρια που χρησιμοποιούνται δεν κατάφεραν να ωριμάσουν in vivo παρά τη χορήγηση υψηλών δόσεων εξωγενών γοναδοτροπινών και χρειάζονται περαιτέρω έκθεση σε γοναδοτροπίνες εργαστηριακά. Προφανώς αυτός είναι και ο λόγος για τα υψηλά ποσοστά ανευποειδίας σε έμβρυα που προέρχονται από διασωθέντα ανώριμα ωάρια **(92, 93)** Γι' αυτό και τα επόμενα χρόνια, οι επιστήμονες επικεντρώθηκαν στην

ωρίμανση ωαρίων μετά από ωοληψία σε νωρίτερο στάδιο από την ωορρηξία χωρίς διέγερση ή με μικρή συντηρητική διέγερση ωοθηκών και έτσι γνωρίζοντας εκ των πραγμάτων ότι τα ωάρια θα ήταν ανώριμα, δεν χρειαζόταν η απομάκρυνση των κοκκωδών κυττάρων για αξιολόγηση, αλλά μπορούσαν να προχωρήσουν στην έκθεσή τους σε γοναδοτριπίνες μαζί με τα κοκκώδη κύτταρα. Το 1991, ο Cha et al., ήταν ο πρώτος που ανέφερε επιτυχές περιστατικό ωρίμανση ανώριμων ωαρίων τα οποία είχαν αναρροφηθεί από ανώριμα ωοθυλάκια σε πρόγραμμα δωρεάς ωαρίων **(94)** και το 1994 ο Trouson et al., ήταν ο πρώτος που δημοσίευσε γέννηση παιδιού μετά από ωρίμανση ωαρίων από γυναίκα με πολυκυστικές ωοθήκες από ανώριμα ωοθυλάκια. **(95)**

Είναι πολύ σημαντικό να αναφερθεί πως επειδή τα ανώριμα μπορούν να προχωρήσουν στη μετάφαση II, δεν σημαίνει και πως έχει επιτευχθεί και η επάρκειά τους, δηλαδή η επίτευξη τόσο της πυρηνικής όσο και της κυτταροπλασματικής ωρίμανσης. Γι' αυτό και ο σημαντικότερος σκοπός του IVM είναι η επάρκεια όσο το δυνατόν περισσότερων ωαρίων.

Η στρατηγική του IVM είναι να αναρροφηθούν τα ανώριμα ωάρια πριν επηρεαστούν αρνητικά από τις ενδικρινείς και παρακρινείς επιρροές του κυρίαρχου ωοθυλακίου. **(96)** Ιδανικά, λοιπόν, η ωοληψία τους πρέπει να συμβεί τη στιγμή της επιλογής του κυρίαρχου ωοθυλακίου και όχι μετά από αυτή. Πρακτικά αυτό συμβαίνει όταν τα ωοθυλάκια έχουν διάμετρο 8-12 mm. **(97)** Αν και υπάρχουν εργασίες που μιλάνε για 4-5 mm. **(98)** Αν και το μονοπάτι που διεγείρει την ωρίμανση των ωαρίων, η ταυτόχρονη ενεργοποίηση της πυρηνικής και της κυτταροπλασματικής ωρίμανσης φαίνεται να είναι άμεσα εξαρτώμενη από το μέγεθος των ωοθυλακίων. **(97)**

Η διαδικασία που ακολουθεί το εργαστήριο κατά τη διαδικασία του IVM διαφέρει από αυτές της κλασικής εξωσωματικής γονιμοποίησης και είναι πιο χρονοβόρα. Μετά την ωοληψία, τα ανώριμα ωάρια με τα κοκκώδη κύτταρα του τοποθετούνται σε ειδικό καλλιεργητικό υλικό για 24-48 ώρες. Ο Son et al. έχει αναφέρει πως τα GV ωάρια που ωριμάζουν μέσα σε 30 ώρες είναι αναπτυξιακά πιο επαρκή από τα ωάρια που χρειάζονται περισσότερο χρόνο. **(99)** Τα καλλιεργητικά υλικά που χρησιμοποιούνται στο IVM συνήθως περιλαμβάνουν ανασυνδυασμένη FSH και hCG, και υπάρχουν και πολλές μελέτες που αναφέρουν τη θετική επίδραση εξωγενούς πρωτεϊνικής πηγής από τον ορρό του ασθενή ή το ωοθυλακικό υγρό. **(100, 101, 102, 103, 104)** Η ύπαρξη πρόσθετων ενώσεων του ορού και του ωοθυλακικού υγρού όπως αυξητικοί παράγοντες, λιπίδια, γλυκοπρωτεΐνες, στεροειδείς ορμόνες, κυτοκίνες και άλλοι παράγοντες ίσως είναι πιο αποτελεσματικοί από υποκατάστατα ορού ή ανθρώπινης αλβουμίνης. Μετά την επώαση των ωαρίων στο εξειδικευμένο υλικό του IVM και την ωρίμανση τους, τα ωάρια μπορούν να τοποθετηθούν σε συμβατικό υλικό όπου θα ακολουθήσει η γονιμοποίηση τους και η επώαση τους με σκοπό την ανάπτυξη των εμβρύων.

1.7.3 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ IVM

Περά από την κατάλληλη προετοιμασία των ωοθυλακίων, τη σωστή μέρα και ώρα ωολήψιας και τους σωστότερους χειρισμούς των εμβριολόγων, ένας πολύ σημαντικός παράγοντας επίτευξης του IVM είναι η επιλογή των ασθενών για τη χρήση αυτής της μεθόδου.

1.7.3.1 ΓΥΝΑΙΚΕΣ ΜΕ ΠΟΛΥΚΥΣΤΙΚΕΣ ΩΟΘΗΚΕΣ / ΣΥΝΔΡΟΜΟ

ΠΟΛΥΚΥΣΤΙΚΩΝ ΩΟΘΗΚΩΝ

Αυτή η ομάδα είναι η πλέον κατάλληλη για την εφαρμογή της μεθόδου IVM με πολλές εργασίες να το υποστηρίζουν. **(100, 101, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111)** Ο προφανής λόγος επιλογής αυτής της ομάδας γυναικών είναι ο μεγάλος αριθμός ωοθυλακίων σε κάθε ωοθήκη. Επίσης, επειδή οι γυναίκες με πολυκυστικές ωοθήκες / σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών έχουν μεγάλη πιθανότητα υπερδιέγερσης ωοθηκών, η μέθοδος IVM αποτελεί ακόμα ένα σημαντικό λόγο επιλογής για αυτή την ομάδα γυναικών.

1.7.3.2 ΓΥΝΑΙΚΕΣ ΜΕ / ΠΡΟΔΙΑΘΕΣΗ ΓΙΑ ΟΡΜΟΝΟΕΞΑΡΤΩΜΕΝΟ

ΚΑΡΚΙΝΟ

Οι γυναίκες που ανήκουν σε αυτή την κατηγορία, προτιμάται να καταφεύγουν στη μέθοδο IVM παρά στις συμβατικές μεθόδους εξωσωματική γονιμοποίησης, μιας και η μεγάλης ποσότητας εξωγενούς λήψης γοναδοτροπινών δεν ενδείκνυται στην περίπτωση τους. Εναλλακτικά, οι γυναίκες αυτής της ομάδας μπορούν να

χρησιμοποιήσουν τη μέθοδο του φυσικού κύκλου αλλά η μέθοδος IVM θα του παρέχει μεγαλύτερο αριθμό διαθέσιμων ωαρίων.

1.7.3.3 ΓΥΝΑΙΚΕΣ ΠΟΥ ΕΠΙΘΥΜΟΥΝ ΤΗ ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ ΤΗΣ ΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑΣ

Αναφέρεται σε γυναίκες με καρκίνο και σε νεαρές γυναίκες που δεν επιθυμούν να τεκνοποιήσουν άμεσα. Η κρυοσυντήρηση ανώριμων ωαρίων μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ύστατη λύση ανάγκης.

1.7.3.4 ΜΕΙΩΣΗ ΚΟΣΤΟΥΣ – ΜΗ ΛΗΨΗ ΓΟΝΑΔΟΤΡΟΠΙΝΩΝ

Ένας ακόμα λόγος επιλογής της μεθόδου IVM είναι η μείωση του κόστους καθώς η μέθοδος αυτή δεν απαιτεί τη λήψη γοναδοτροπινών, ειδικά εάν ο λόγος υπογονιμότητας είναι αντρικού παράγοντα. Όπως επίσης, είναι πολλές οι γυναίκες που δεν επιθυμούν τη λήψη γοναδοτροπινών για προσωπικούς τους λόγους. Σε αυτές, λοιπόν, μπορεί να εφαρμοστεί η συγκεκριμένη μέθοδος αρκεί να πληροί τα κριτήρια επιλογής. Να σημειωθεί ότι τα κριτήρια μη έναρξης προσπάθειας με τη μέθοδο IVM είναι (αναφέρονται στις μετρήσεις της 3^{ης} μέρας του κύκλου): <3 ωοθυλάκια 2-5 mm, ωοθηκική κύστη >20 mm , επίπεδα οιστραδιόλης >0,2 nmol/L ή 54 pg/ml και πάχος ενδομητρίου >4 mm.

1.7.3.5 ΓΥΝΑΙΚΕΣ ΥΨΗΛΗΣ ΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑΣ (HIGH RESPONDER)

Η κατηγορία αυτή περιλαμβάνει γυναίκες με υψηλή γονιμότητα (AMH: 4.0-6.8 ng/ml, ηλικία <32, φυσιολογική εικόνα ωοθηκών κατά τον υπερηχογραφικό έλεγχο κλπ), οι

οποίες λόγω της υψηλής τους γονιμότητας, κινδυνεύουν να πάθουν υπερδιέγερση ωοθηκών σε περίπτωση φαρμακευτικής αγωγής για τη διέγερση των ωοθηκών.

1.7.3.6 ΦΤΩΧΕΣ ΑΠΑΝΤΗΤΡΙΕΣ (POOR RESPONDERS)

Τελευταίες έρευνες έδειξαν ότι στις φτωχές απαντήτριες τα ωάρια που προκύπτουν χωρίς ορμονική διέγερση είναι καλύτερης ποιότητας σε σχέση με αυτά από κλασική IVF. (112, 113)

1.7.3.7 ΕΠΕΚΤΑΣΗ ΤΡΑΠΕΖΩΝ ΔΩΡΕΑΣ ΩΑΡΙΩΝ

Μια μελλοντική εφαρμογή της μεθόδου IVM θα μπορούσε να είναι η επέκταση των τραπεζών δωρεάς ωαρίων. Στο ενδεχόμενο βελτιστοποίησης της μεθόδου, οι δότριες, οι οποίες είναι νεαρές γυναίκες με υψηλή γονιμότητα, θα μπορούσαν να μην υπόκεινται στη διαδικασία λήψης γοναδοτροπινών αλλά να ακολουθούν την σχεδόν αναίμακτη μέθοδο του IVM. Με αυτό τον τρόπο θα αυξηθεί ο αριθμός των γυναικών που γίνονται δότριες, καθώς είναι πολλές εκείνες που ενώ το επιθυμούν, το αποφεύγουν λόγω φόβου για τη λήψη μεγάλων ποσοτήτων φαρμακευτικών σκευασμάτων.

2. ΣΚΟΠΟΣ ΚΑΙ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, έχουν γίνει πολλές μελέτες σχετικά με την υαλοποίηση και την ωρίμανση ωαρίων στο εργαστήριο και έχουν αναφερθεί τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα της κρυοσυντήρησης ώριμων ή ανώριμων ωαρίων. Σκοπός αυτής της μελέτης ήταν το κατά πόσο μπορούν τα ανώριμα ωάρια από γυναίκες-δότες που έχουν υποστεί διέγερση ωοθηκών, μπορούν να κρυοσυντηρηθούν, να επιβιώσουν και να αξιοποιηθούν σε προγράμματα υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Για το σκοπό αυτό ακολουθήθηκαν τα παρακάτω βήματα:

- Διέγερση ωοθηκών σε δότες ωαρίων
- Ωοληψία/ καθαρισμός ωαρίων
- Κρυοσυντήρηση ανώριμων ωαρίων
- Κρυοσυντήρηση ώριμων ωαρίων από το πρόγραμμα δωρεάς ωαρίων μετά από αίτηση των ζευγαριών-ληπτριών με σκοπό τη γονιμοποίηση τους σε μεταγενέστερο χρόνο.
- Απόψυξη ανώριμων/ώριμων ωαρίων
- Ωρίμανση ανώριμων ωαρίων
- Γονιμοποίηση ώριμων ωαρίων (μετά από ωρίμανση) με σπέρμα δότη και γονιμοποίηση ώριμων ωαρίων με το δείγμα σπέρματος του συζύγου που επιθυμούσαν τη χρήση κρυοσυντηρημένων ώριμων ωαρίων
- Παρακολούθηση ανάπτυξης εμβρύων έως το στάδιο της βλαστοκύστης

Ταυτόχρονα, από μερικές από τις ωοληψίες από όπου προήλθαν τα GV ωάρια για τη συγκεκριμένη μελέτη, κρυοσυντηρήθηκαν ύστερα από επιθυμία των ζευγαριών ώριμα

(MII) ωάρια για μελλοντική χρήση. Τα ζευγάρια αυτά για διάφορους λόγους δεν ήταν σε θέση να προχωρήσουν την διαδικασία την ημέρα της ωοληψίας των ωαρίων, γι' αυτό και κρυοσυντηρήθηκαν και αποψύχθηκαν όταν πλέον ήταν σε θέση να προχωρήσουν τη διαδικασία. Οι λόγοι που τα ζευγάρια επιθυμούσαν τη χρήση κρυοσυντηρημένων ωαρίων, ήταν η αδυναμία λήψης δείγματος σπέρματος από τον σύζυγο, η μη επίτευξη σωστής προετοιμασίας του ενδομητρίου της συζύγου με αποτέλεσμα τη μη λήψη δείγματος σπέρματος, η επιθυμία του ζευγαριού να κρυοσυντηρηθεί μέρος των ωαρίων και να μην γονιμοποιηθούν όλα για προσωπικούς/θρησκευτικούς λόγους, καθώς και η ακύρωση του κύκλου για άλλους λόγους (ακύρωση πτήσης για ζευγάρια εκτός Αθηνών ή άλλοι προσωπικοί λόγοι που δεν επέτρεψαν στα ζευγάρια να είναι στην κλινική την ημέρα της ωοληψίας των ωαρίων).

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Τα πειράματα έλαβαν χώρα στο «ΙΑΚΕΝΤΡΟ ΑΘΗΝΩΝ- Αντωνίου Κωνσταντίνος» κατά την περίοδο Μάιος 2015-Δεκέμβριος 2016. Τα ωάρια που χρησιμοποιήθηκαν για ερευνητικούς λόγους προήλθαν από το πρόγραμμα δωρεάς ωαρίων. Οι γυναίκες που πήραν μέρος ήταν ενημερωμένες και συναίνεσαν εγγράφως στη χρήση των ανώριμων ωαρίων τους στην συγκεκριμένη μελέτη.

Η χρήση ωαρίων από δότριες ωαρίων μας δίνει το πλεονέκτημα ότι το γενετικό υλικό που χρησιμοποιείται είναι άριστης ποιότητας καθώς αναρροφώνται από γυναίκες νέες, υγιείς και με αποδεδειγμένη γονιμότητα.

3.1 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΔΟΤΡΙΩΝ

Οι δότριες ωαρίων ήταν ≤ 32 χρονών, δείκτη μάζας σώματος $< 30 \text{ kg/m}^2$, καταμήνιο κύκλο 25-35 ημερών, 2 φυσιολογικές ωοθήκες βάση υπερηχογραφικού ελέγχου, χωρίς σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών, χωρίς ενδομητρίωση, χωρίς άλλες ιατρικές ανωμαλίες, και συναινούσαν στη δωρεά των ωαρίων τους ανώνυμα και για αλτρουιστικούς λόγους. Σε όλες τις δότριες είχε γίνει εξέταση αίματος για καρυότυπο, θαλασσαιμία, κυστική ίνωση και ηπατίτιδα Β, ηπατίτιδα C, HIV I & II, και σύφιλη.

3.1.2 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΔΟΤΩΝ

Οι δότες σπέρματος ήταν ≤ 32 χρονών, με φυσιολογικό δείγμα σπέρματος ως προς τη συγκέντρωση, την κινητικότητα και τη μορφολογία, χωρίς κάποια ιατρική ανωμαλία και συναινούσαν στη δωρεά των σπερματοζωαρίων τους ανώνυμα και για αλτρουιστικούς λόγους. Σε όλους τους δότες είχε γίνει εξέταση αίματος για καρυότυπο, θαλασσαιμία, κυστική ίνωση και ηπατίτιδα Β, ηπατίτιδα C, HIV I & II, και σύφιλη.

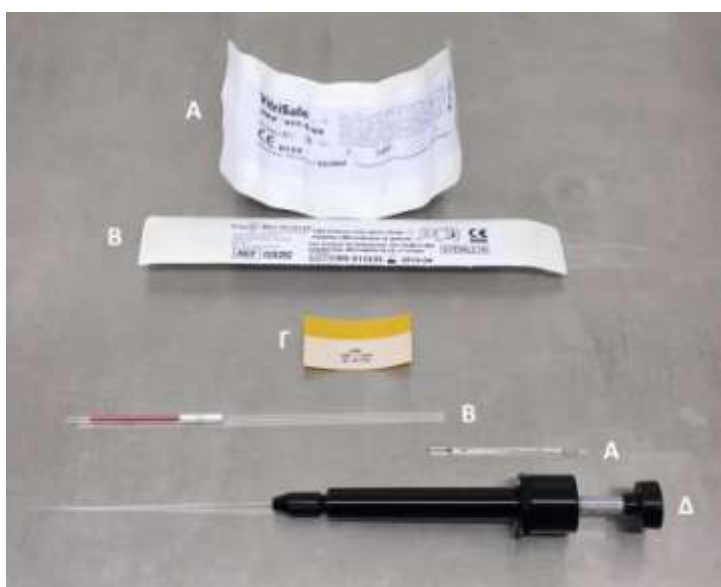
3.2 ΔΙΕΓΕΡΣΗ ΩΟΘΗΚΩΝ

Η διέγερση των ωοθηκών των δοτριών ξεκινούσε τη 2η μέρα του κύκλου τους με τη χορήγηση 300 IU ανασυνδυασμένης FSH. Η παρακολούθηση της εξέλιξης της διέγερσης γινόταν με υπερηχογραφική καταγραφή και μέτρηση των επιπέδων της οιστραδιόλης, κάθε 3 μέρες. Η ημερήσια δόση της rFSH προσαρμοζόταν ανάλογα με την απόκριση των ωοθηκών, βάση των επιπέδων οιστραδιόλης σε συνδυασμό με το μέγεθος των ωοθηλακίων. Για την αποφυγή της πρόωρης αύξησης της LH, χορηγούνταν GnRH ανταγωνιστής, αρχίζοντας από την 6η- 7η μέρα διέγερσης. Όταν η διάμετρος των

ωοθηλακίων ήταν $>17\text{mm}$ και τα επίπεδα οιστραδιόλης ήταν $>1500\text{pg/ml}$, τότε χορηγούνταν 5000 IU hCG. Στις δότριες που υπήρχε πιθανότητα υπερδιέγερσης, χορηγούνταν διπλή δόση (πρωί και απόγευμα) του ανταγωνιστή την προηγούμενη μέρα από αυτή της χορήγησης της hCG (124).

3.3 ΛΗΨΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΩΑΡΙΩΝ

Τα ωάρια μετά την αναρρόφηση των ωοθηλακίων τοποθετούνταν σε καλλιεργητικό μέσο εξισορρόπησης (Quinn's Advantage™ Fertilization (HTF) Medium, Sage IVF Inc.) για 2 ώρες και στη συνέχεια ακολουθούσε ενζυμικός καθαρισμός με τη χρήση υαλουρονιδάσης (Hyaluronidase 80 U/mL in HEPES-HTF, Sage IVF Inc.). Τα ωάρια παρατηρούνταν κάτω από στερεοσκόπιο και εκείνα που βρισκόταν στο στάδιο του βλαστικού κυστιδίου (GV), τοποθετούνται σε διαφορετικό τριβλίο και έπαιρναν μέρος στη μελέτη. Σε διαφορετικό τριβλίο τοποθετούνταν και όσα από τα ώριμα (MII) ωάρια θα κρυσυντηρούνταν ύστερα από επιθυμία του ζευγαριού.



Εικόνα 3: Α-φορείς ωαρίων VitriMed, Β-παγιέτα CryoBioSystem, Γ-ετικέτα στοιχείων, Δ-πιπέτα Stripper Origio



Εικόνα 3: Σφράγισμα της παγιέτας με τη συσκευή συγκόλλησης



Εικόνα 5: Εισαγωγή του φορέα στην παγιέτα

3.4 ΜΕΘΟΔΟΣ ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗΣ ΩΑΡΙΩΝ

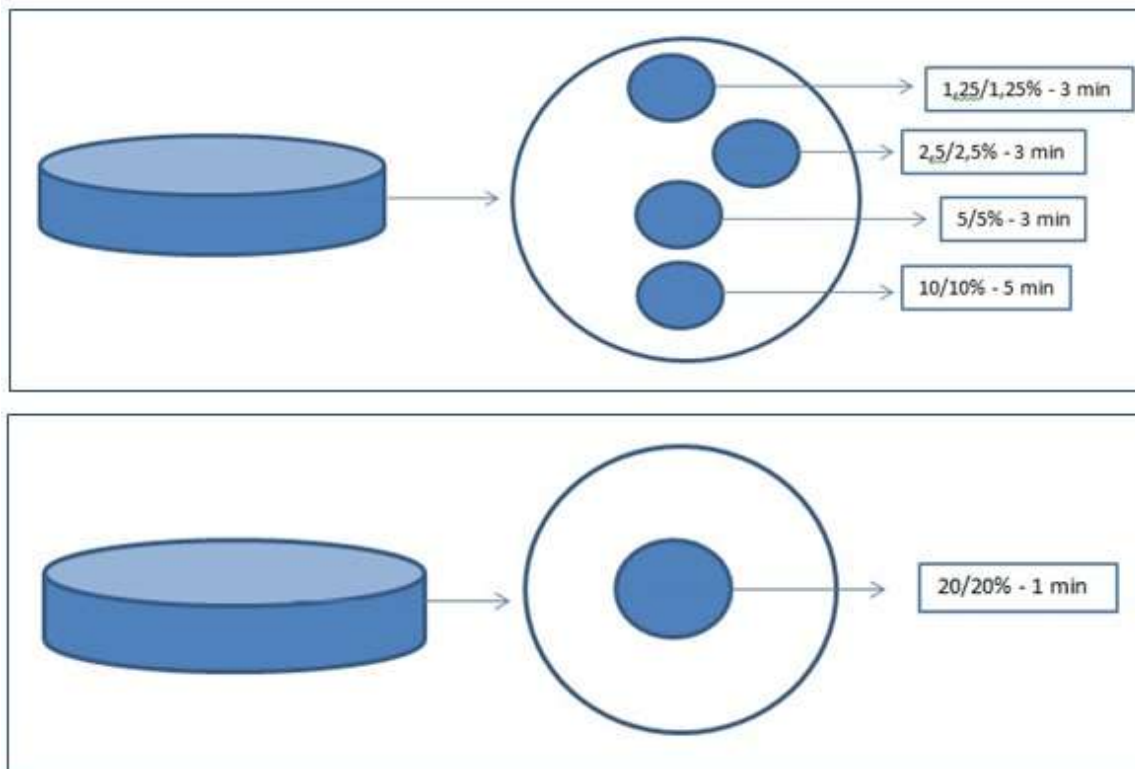
Η συσκευή που χρησιμοποιήθηκε είναι η της Vitrisafe **(125)**, η οποία αποτελείται από ένα φορέα (VitriMed, Austria) και μια παγιέτα (CryoBioSystem, France). Κατά τη διάρκεια της κρυοσυντήρησης, κάθε παγιέτα έφερε διαφορετικό χρώμα και μια μοναδική ετικέτα που ανέφερε τα στοιχεία των κρυοσυντηρημένων ωαρίων. Ο φορέας τοποθετούνταν στην παγιέτα, η οποία έχει προστατευτικό ρόλο και στη συνέχεια σφραγιζόταν με ειδική συσκευή συγκόλλησης.

Όλα τα διαλύματα παρασκευάστηκαν στο εργαστήριο. Η βάση όλων των διαλυμάτων ήταν το θρεπτικό διάλυμα Quinns Advantage Medium with HEPES με προσθήκη 20% αλβουμίνης ανθρώπινου ορού (Human Serum Albumin, HAS, Sage).

3.4.1 ΚΛΕΙΣΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗΣ

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για την κρυοσυντήρηση και την απόψυξη των ωαρίων είναι μια παραλλαγή των πρωτοκόλλων των Vanderzwalmen **(125)**, Paratheodorou **(126, 127)** και Panagiotidis **(128)**. Κατά την υαλοποίηση, τα διαλύματα εξισορρόπησης (equilibration solution – ES) αποτελούνταν από DMSO και EG 1,25/1,25%, 2,5/2,5%, 5/5%, 10/10% στους 25 °C και το διάλυμα κρυοσυντήρησης από DMSO και EG 20/20% συν 0,7 mol/L σουκρόζη και 10 mg/ml φικόλη στους 2-8 °C. Τα ωάρια τοποθετούνταν για 3 λεπτά στα διαλύματα 1,25/1,25%, 2,5/2,5% και 5/5%, 5 λεπτά στο 10/10% και 1 λεπτό στο 20/20%. Στη συνέχεια μια μικρή σταγόνα τοποθετούνταν στον φορέα και αυτός στην παγιέτα, η οποία σφραγιζόταν και αποθηκευόταν σε υγρό άζωτο. Με αυτό τον τρόπο, ο ρυθμός ψύξης των ωαρίων είναι 2000 °C/λεπτό.

Διάλυμα	1,25/1,25%	2,5/2,5%	5/5%	10/10%	20/20%
Λεπτά	3	3	3	5	1



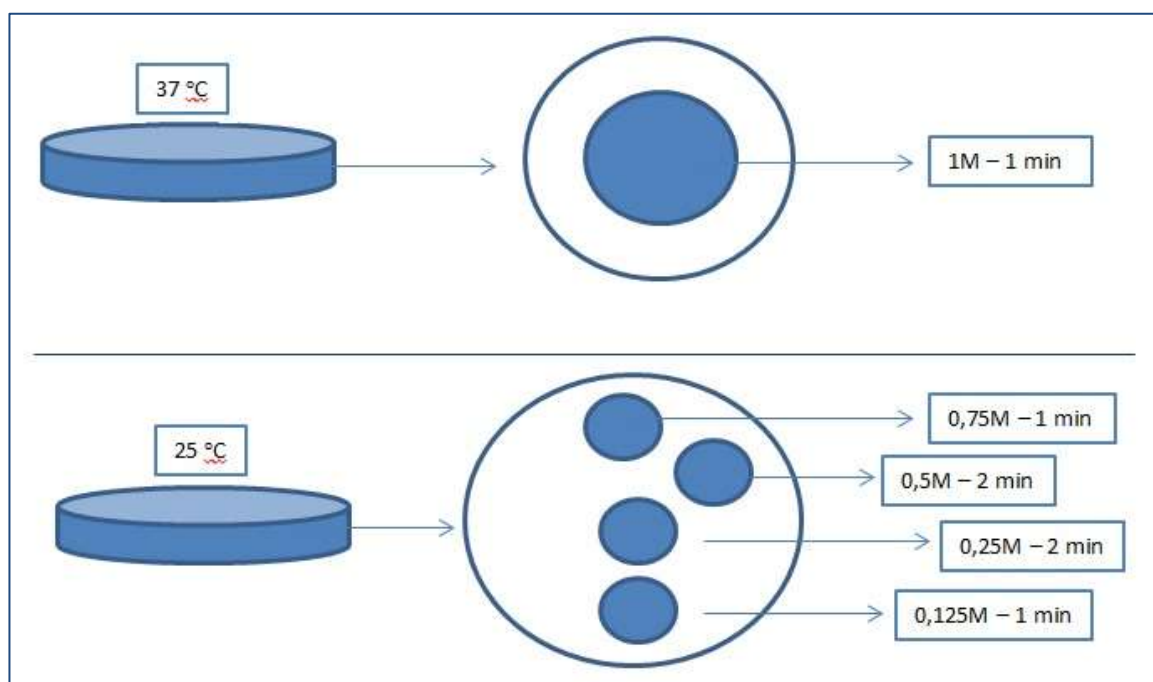
Εικόνα 6: Στάδια κρυοσυντήρησης

3.5 ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΠΟΨΥΞΗΣ ΩΑΡΙΩΝ

Κατά τη διαδικασία της απόψυξης, ο ρυθμός αναθέρμανσης που επιτυγχάνεται ξεπερνάει τους 20.000°C/ λεπτό. Τα διαλύματα που χρησιμοποιούνταν ήταν διαλύματα σουκρόζης 1M, 0,75M, 0,5M, 0,25M και 0,125M. Αφού αφαιρούνταν ο φορέας από την παγιέτα, η οποία βρισκόταν εντός αζώτου, και χωρίς να έρθει σε άμεση επαφή με το

άζωτο, το ρύγχος του φορέα βυθιζόταν στο διάλυμα σουκρόζης 1M το οποίο βρισκόταν στους 37 °C και στη συνέχεια μεταφέρονταν διαδοχικά στα επόμενα διαλύματα για 1, 2, 2, και 1 λεπτά αντίστοιχα στους 25 °C. Τέλος, ακολουθούσε ξέπλυμα σε θρεπτικό διάλυμα Quinns Advantage Medium with HEPES με προσθήκη 20% αλβουμίνης ανθρώπινου ορού (Human Serum Albumin, HAS, Sage) για 1-2 λεπτά και τοποθέτηση των GV ωαρίων στο διάλυμα του IVM.

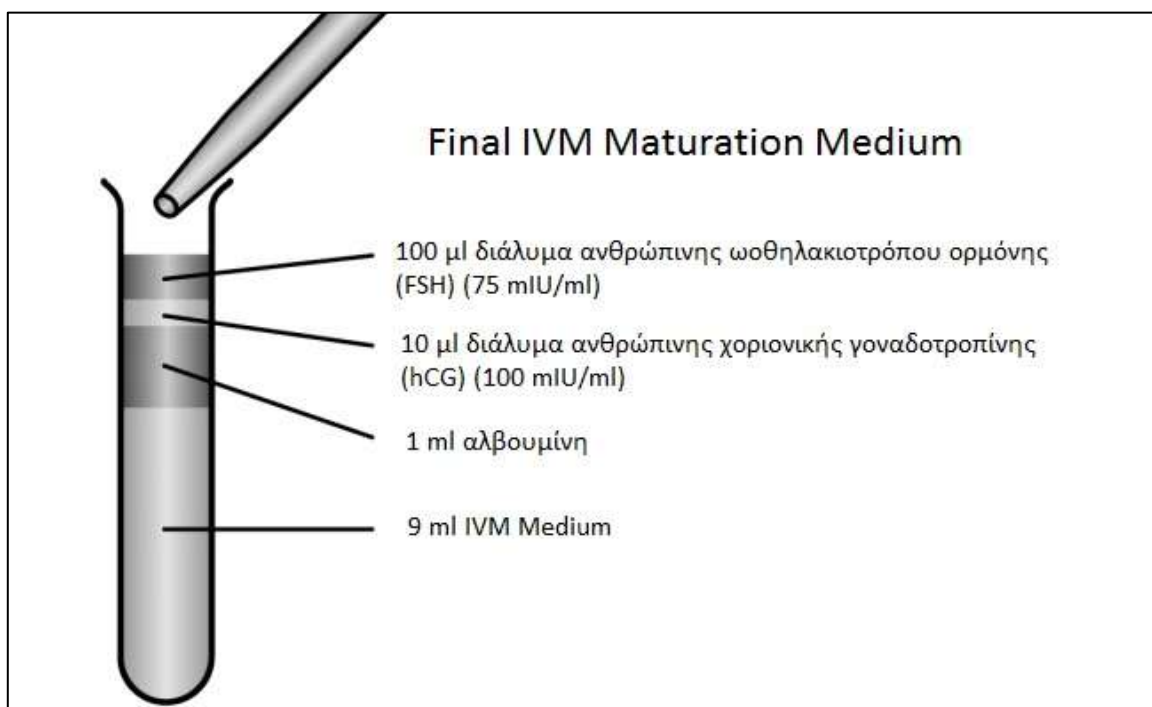
Διάλυμα	1M	0,75M	0,5M	0,25M	0,125M	Θρεπτικό διάλυμα με 20% αλβουμίνης
Λεπτά	1	1	2	2	1	1-2



Εικόνα 7: Στάδια απόψυξης

3.6 ΜΕΘΟΔΟΣ IVM

Η διαδικασία του IVM έγινε με τα υλικά MediCult IVM System της Origio και είναι όπως προτείνεται από την Origio, δηλαδή μετά την απόψυξη των GV ωαρίων, αυτά τοποθετούνταν στο τελικό IVM Maturation Medium. Το διάλυμα αυτό αποτελούνταν από 9 ml IVM Medium, 1 ml αλβουμίνη, 10 μ l διάλυμα ανθρώπινης χοριονικής γοναδοτροπίνης (hCG) (100 mIU/ml) και 100 μ l διάλυμα ανθρώπινης ωοθηλακιοτρόπου ορμόνης (FSH) (75 mIU/ml).



Εικόνα 8: Τελικά διάλυμα ωρίμανσης ωαρίων IVM

3.7 ΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΕΞΕΛΙΞΗ ΕΜΒΡΥΩΝ

Όλα τα ωάρια παρατηρούνταν μετά από 18 ώρες και κάθε 0,5 ώρα για έλεγχο ωρίμανσης και όσα από αυτά έφταναν στη δεύτερη φάση της μειωτικής διαίρεσης, γονιμοποιούνταν με σπέρμα δότη με τη μέθοδο της μικρογονιμοποίησης. Μετά τη μικρογονιμοποίηση, τα ωάρια τοποθετούνταν σε καλλιεργητικό μέσο Sage 1-step και αξιολογούνταν τη μέρα ελέγχου γονιμοποίησης, τη 2^η ή 3^η μέρα και την 5^η.

Στην περίπτωση των ώριμων (MII) ωαρίων, η γονιμοποίηση γινόταν με το εκάστοτε δείγμα σπέρματος του συζύγου μετά από 2-3 ώρες μετά την απόψυξη των ωαρίων και τοποθετούνταν και αυτά μετά τη γονιμοποίηση σε καλλιεργητικό μέσο Sage 1-step και αξιολογούνταν τη μέρα ελέγχου γονιμοποίησης, τη 2^η ή 3^η μέρα και την 5^η.

3.8 ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ

Οι πρωτεύουσες παράμετροι έκβασης της μελέτης ήταν το ποσοστό επιβίωσης των ωαρίων, το ποσοστό ωρίμανσης καθώς και το ποσοστό βλαστοκύστεων, ενώ οι δευτερεύουσες παράμετροι έκβασης ήταν το ποσοστό γονιμοποίησης και το ποσοστό ανάπτυξης 2^{ης} – 3^{ης} μέρας.

3.9 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Οι συνεχείς μεταβλητές εκφράστηκαν ως μέση τιμή $\pm$ τυπική απόκλιση (SD) ενώ οι κατηγορικές μεταβλητές ως ποσοστά επί τοις εκατό. Η στατιστική επεξεργασία πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος Minitab version 17.0. Χρησιμοποιήθηκε το κριτήριο Independent Samples t-test για τις συγκρίσεις συνεχών

δεδομένων με κανονική κατανομή και το κριτήριο Mann-Whitney σε περιπτώσεις δεδομένων με μη κανονική κατανομή. Η σύγκριση μεταξύ κατηγορικών δεδομένων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του χ^2 exact test. Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε σε τιμές $P < 0.05$.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

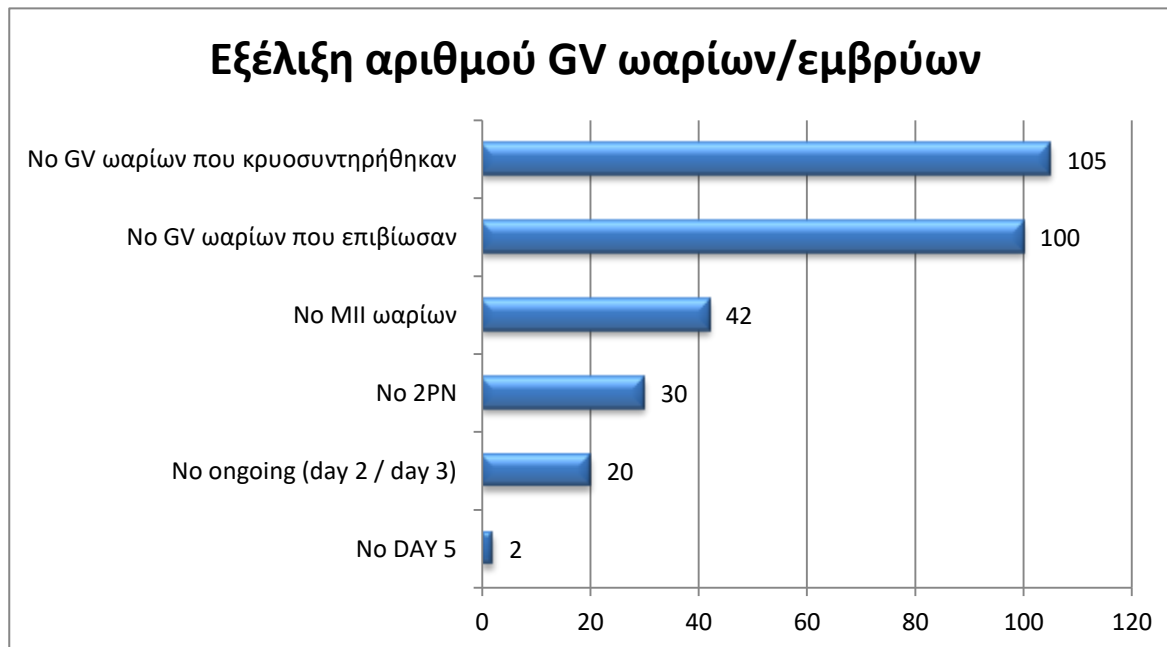
4.1 ΓΕΝΙΚΑ – ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ GV ΩΑΡΙΩΝ

Η μελέτη περιελάμβανε ανώριμα ωάρια από 30 ωοληψίες, από δότριες ηλικίας $27,4 \pm 0,7$, με πάχος ενδομητρίου κατά την ωοληψία $11,39 \text{ mm} \pm 0,38$. Ο συνολικός αριθμός ωαρίων που λήφθησαν κατά τις ωοληψίες ήταν 649 ($21,63 \pm 1,89$), ενώ ο αριθμός των GV ωαρίων ήταν 105 ($3,5 \pm 0,73$). Ο χρόνος ανάμεσα στην ώρα ωοληψίας και καθαρισμός ωαρίων ήταν $133,33 \text{ min} \pm 3,9$, ο αριθμός ανάμεσα στον καθαρισμό ωαρίων και την υαλοποίηση αυτών ήταν $83,26 \text{ min} \pm 8,37$ και ο χρόνος μεταξύ απόψυξης και ωρίμανσης GV ωαρίων ήταν $23,42 \text{ hours} \pm 1,18$. Τέλος, η συγκέντρωση του σπέρματος των δοτών ήταν $55,68 \cdot 10^6/\text{ml} \pm 2,03$, η συνολική κινητικότητα $60,68\% \pm 1,24$, η πρόσθια κινητικότητα $47,47\% \pm 1,77$ και η μορφολογία $15,23\% \pm 2,48$.

Αριθμός ωοληψιών	30
Ηλικία δοτριών	$27,4 \pm 0,7$
Πάχος ενδομητρίου τη μέρα της ωοληψίας (mm)	$11,39 \pm 0,38$
Αριθμός ωαρίων κατά την ωοληψία	649 ($21,63 \pm 1,89$)
Αριθμός GV ωαρίων	105 ($3,5 \pm 0,73$)
Λεπτά ανάμεσα σε ωοληψία – καθαρισμό ωαρίων	$133,33 \pm 3,9$
Λεπτά ανάμεσα σε καθαρισμό ωαρίων – υαλοποίηση ωαρίων	$83,26 \pm 8,37$
Ώρες ανάμεσα σε απόψυξη – ωρίμανση GV ωαρίων	$23,42 \pm 1,18$
Συγκέντρωση σπέρματος	$55,68 \cdot 10^6/\text{ml} \pm 2,03$
Συνολική κινητικότητα	$60,68\% \pm 1,24$
Πρόσθια κινητικότητα	$47,47\% \pm 1,77$
Μορφολογία σπέρματος	$15,23\% \pm 2,48$

Το ποσοστό επιβίωσης ήταν 95,23%, το ποσοστό ωρίμανσης 43%, το ποσοστό γονιμοποίησης 72,1%, το ποσοστό εμβρύων ongoing (day 2 / day 3) 66,67% και το ποσοστό βλαστοκύστεων day 5 6.5%

	GV ωάρια
Ποσοστό επιβίωσης	95,23%
Ποσοστό ωρίμανσης	43%
Ποσοστό γονιμοποίησης	72,1%
Ποσοστό ongoing (day 2 / day 3)	66,67%
Ποσοστό Day 5	6,5%



Εικόνα 4: Εξέλιξη αριθμού GV ωαρίων/εμβρύων

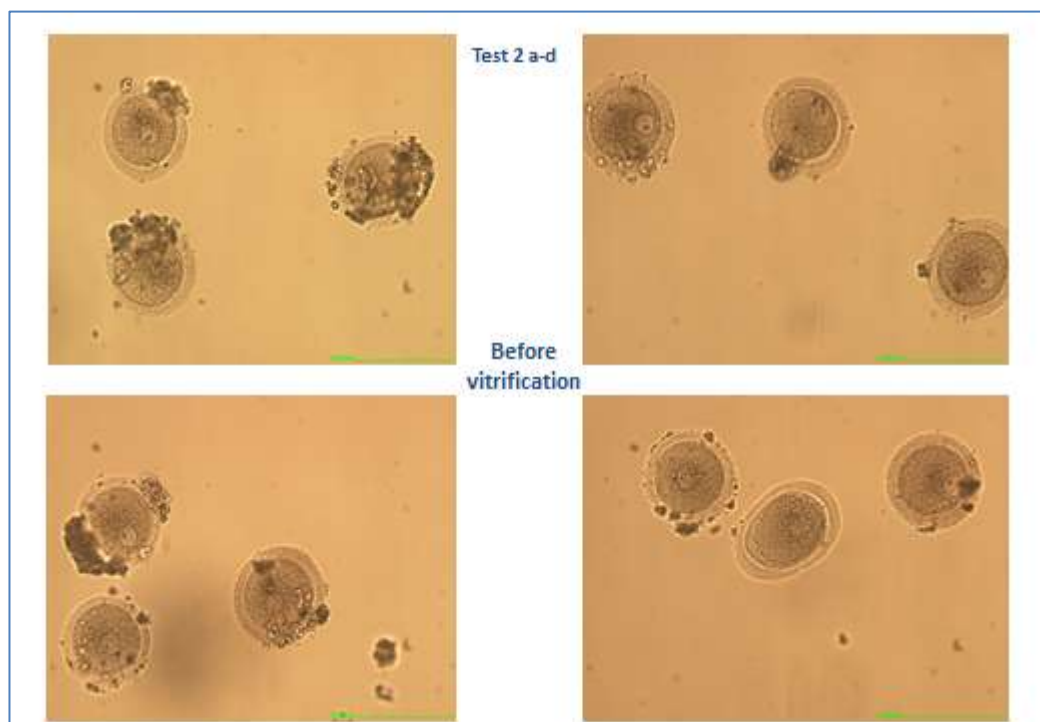
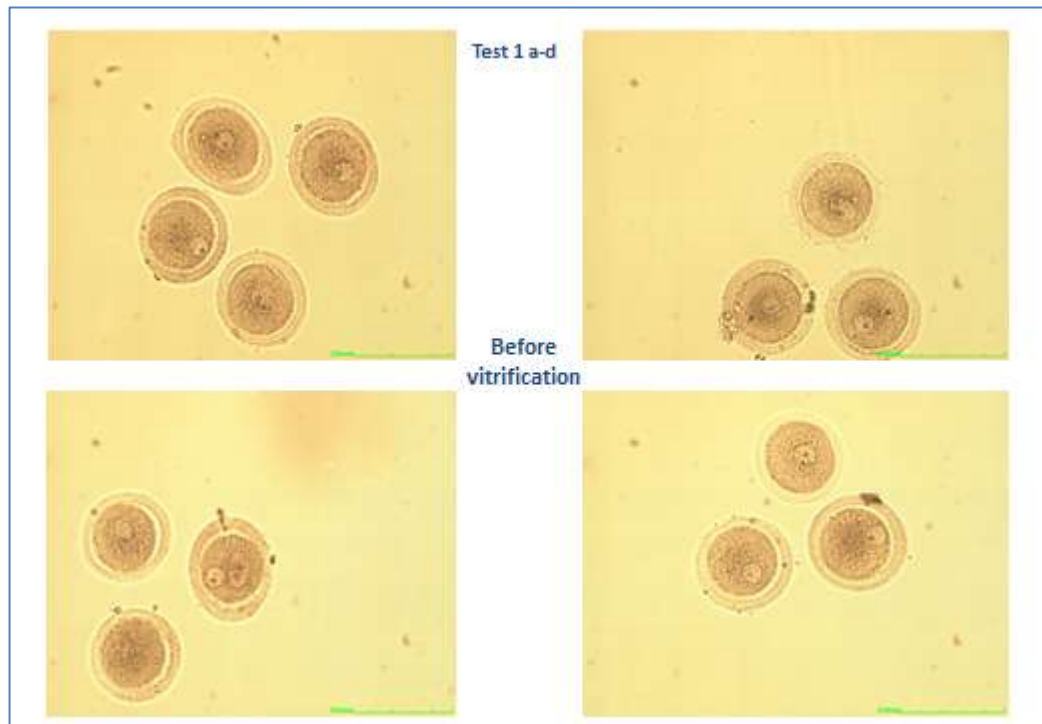
4.2 ΩΡΕΣ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ

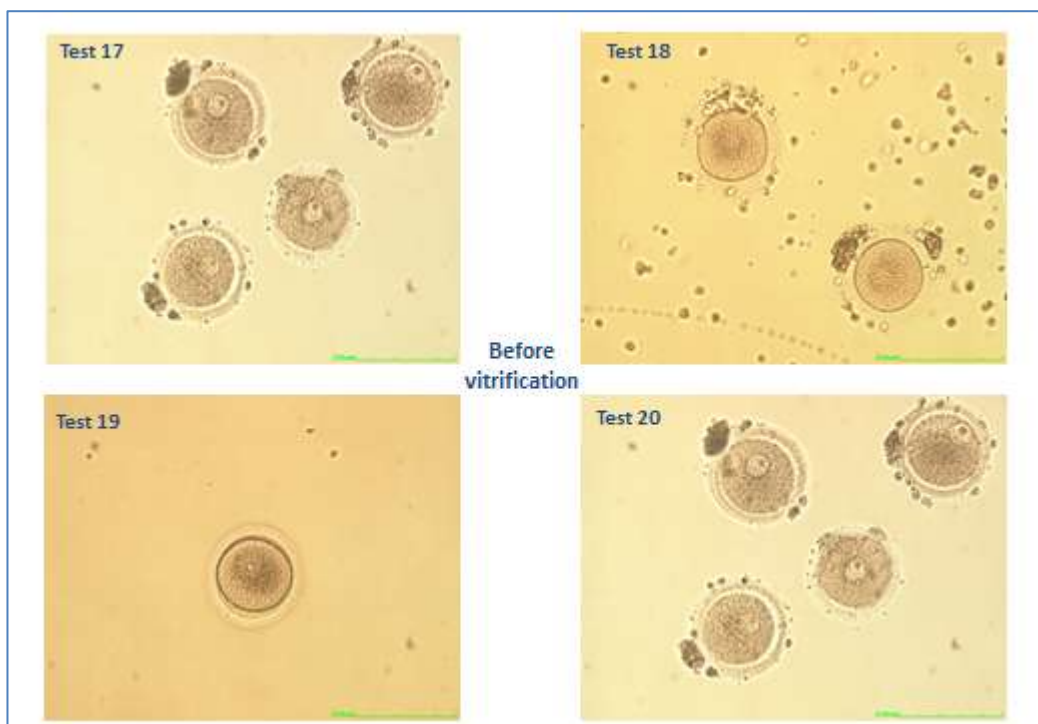
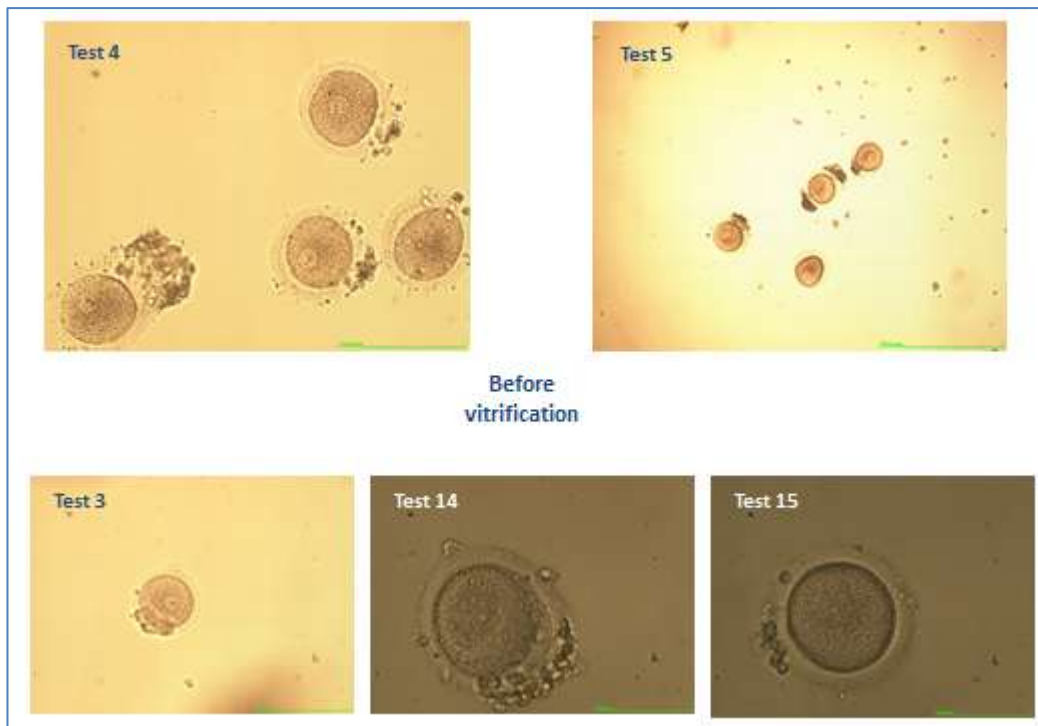
Συγκριτικά με τις ώρες ωρίμανσης των GV ωαρίων και την εξέλιξή τους, ωρίμασε το 42%, εκ των οποίων το 21,42% ωρίμασε μεταξύ 20-21,5 ώρες, το 40,47% στις 22-23,5 ώρες, το 21,42% στις 23-24,5 ώρες, το 9,52% στις 25-26,5 ώρες και το 9,52% σε περισσότερες από 27 ώρες. Από τα ωάρια που υπέστησαν τη μέθοδο της μικρογονιμοποίησης, γονιμοποιήθηκε το 71,42%, εκ των οποίων το 16,67% είχε ωριμάσει στις 20-21,5 ώρες, το 40% στις 22-23,5 ώρες, το 20% στις 23-24,5 ώρες, το 10% στις 25-26,5 ώρες και το 13,33% σε περισσότερες από 27 ώρες. Από τα γονιμοποιημένα ωάρια το 33,33% ήταν έμβρυα που έδειξαν να προχωράνε έως την 3^η μέρα, εκ των οποίων το 20% είχε ωριμάσει στις 20-21,5 ώρες, το 45% στις 22-23,5 ώρες, το 10% στις 23-24,5 ώρες, το 15% στις 25-26,5 ώρες, και το 10% σε περισσότερες από 27 ώρες. Τέλος, μέχρι το στάδιο της βλαστοκύστης, έφτασαν μόνο 2 έμβρυα, ένα από ωάριο που ωρίμασε στις 20 ώρες και ένα στις 24,5 ώρες.

ΩΡΕΣ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ	ΩΑΡΙΑ MII (42%) (n=42)	ΕΜΒΡΥΑ DAY 1 (71,42%) (n=30)	ΕΜΒΡΥΑ DAY 2 / DAY 3 (33,33%) (n=10)	ΕΜΒΡΥΑ DAY 5 (20%) (n=2)
20-21,5	21,42% (9)	16.67% (5)	20% (4)	50% (1)
22-23,5	40,47% (17)	40% (12)	45% (9)	-
23-24,5	21,42% (9)	20% (6)	10% (2)	50% (1)
25-26,5	9,52% (4)	10% (3)	15% (3)	-
>27	9,52% (4)	13.33% (4)	10% (2)	-

4.3 ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΩΝ – GV ΩΑΡΙΑ

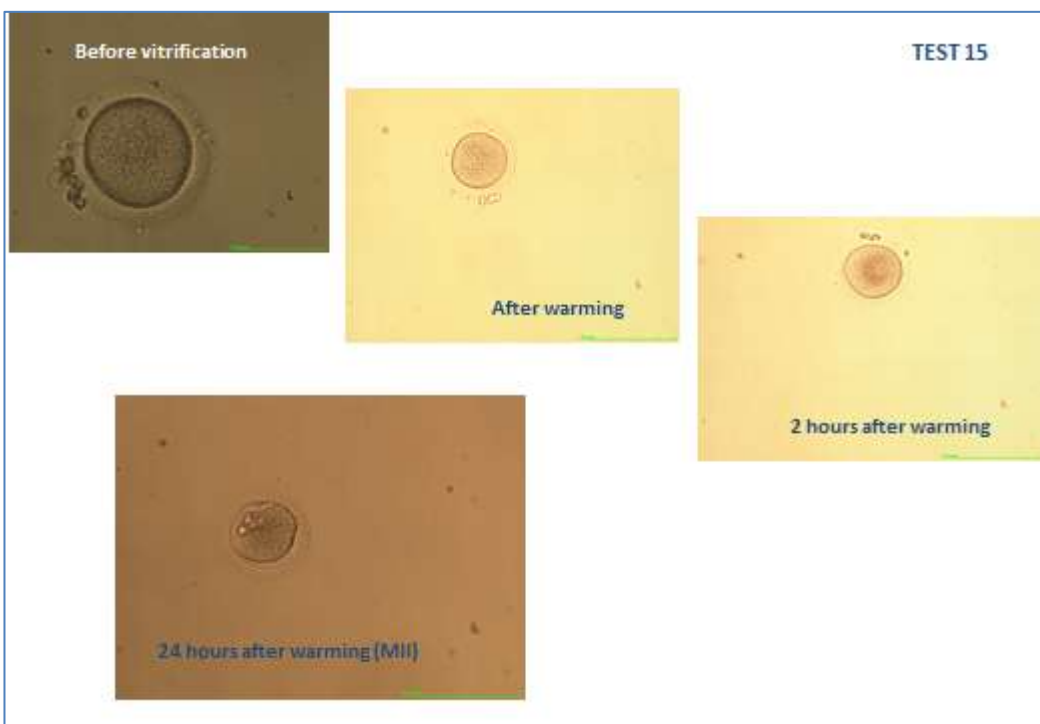
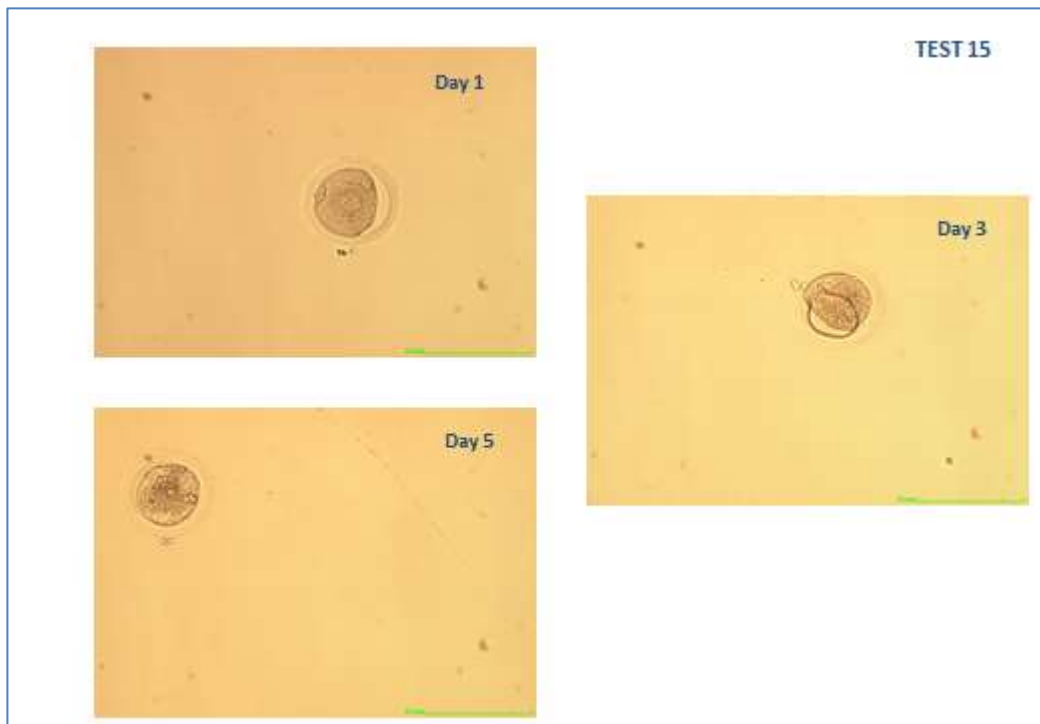
4.3.1 GV ΩΑΡΙΑ (before vitrification)





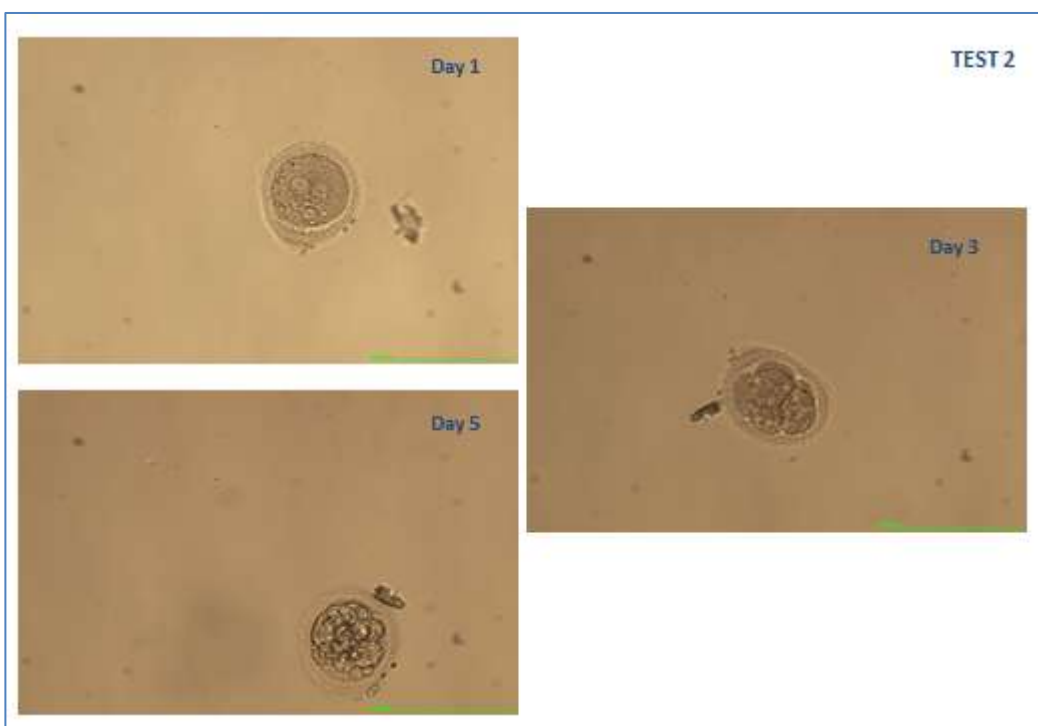
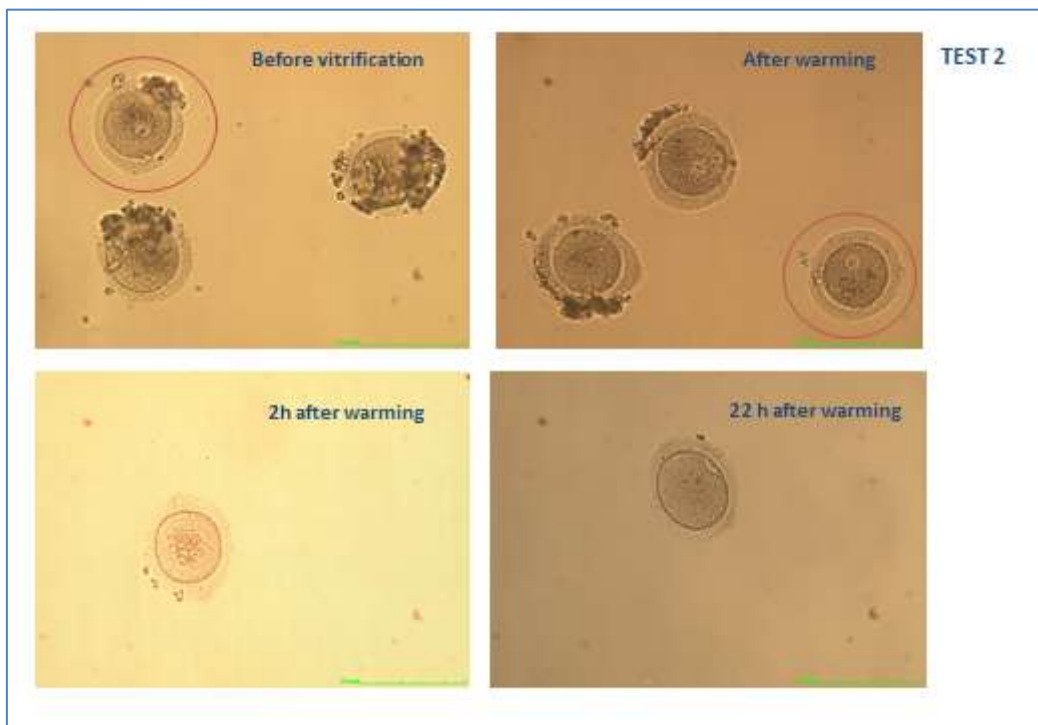
Παραπάνω παρατηρούμε μερικά από τα GV ωάρια που κρυοσυντηρήθηκαν για την επίτευξη της μελέτης ανά ωοληψία. Αυτό που παρατηρούμε είναι όλα έχουν την κλασική μορφή που χαρακτηρίζει ένα GV ωάριο, δηλαδή την εμφανή ύπαρξη βλαστικού κυστιδίου.

4.3.2 ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΟΣ 1 (arrested embryo)



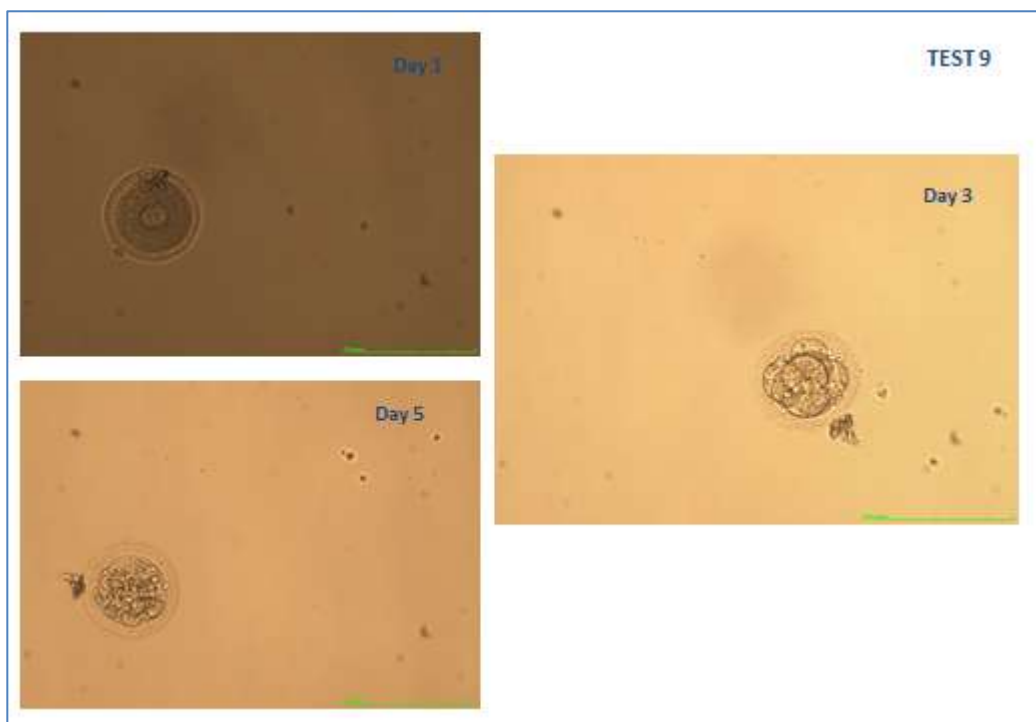
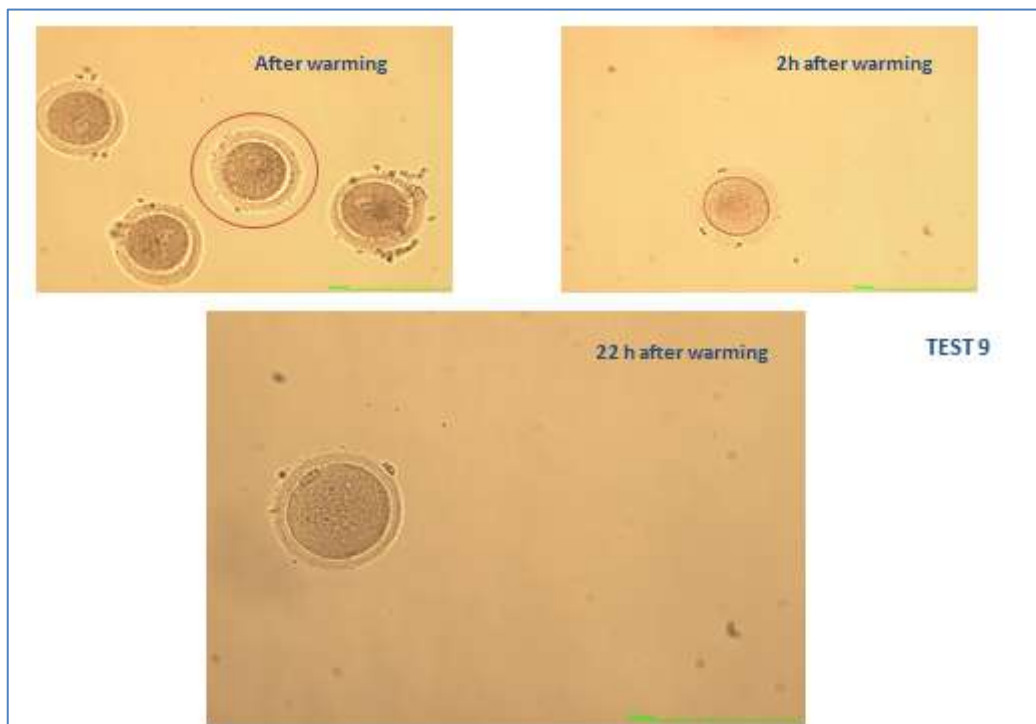
Σ' αυτή την περίπτωση, στο τεστ 15, το ανώριμο ωάριο επιβίωσε μετά την κρυοσυντήρηση/απόψυξη, ωρίμασε μετά από 24 ώρες, την επόμενη μέρα έδειξε γονιμοποίηση αλλά η εξέλιξη σταμάτησε εκεί και δεν προχώρησε σε διαίρεση και ανάπτυξη.

4.3.3 ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΟΣ 2 (arrested embryo)



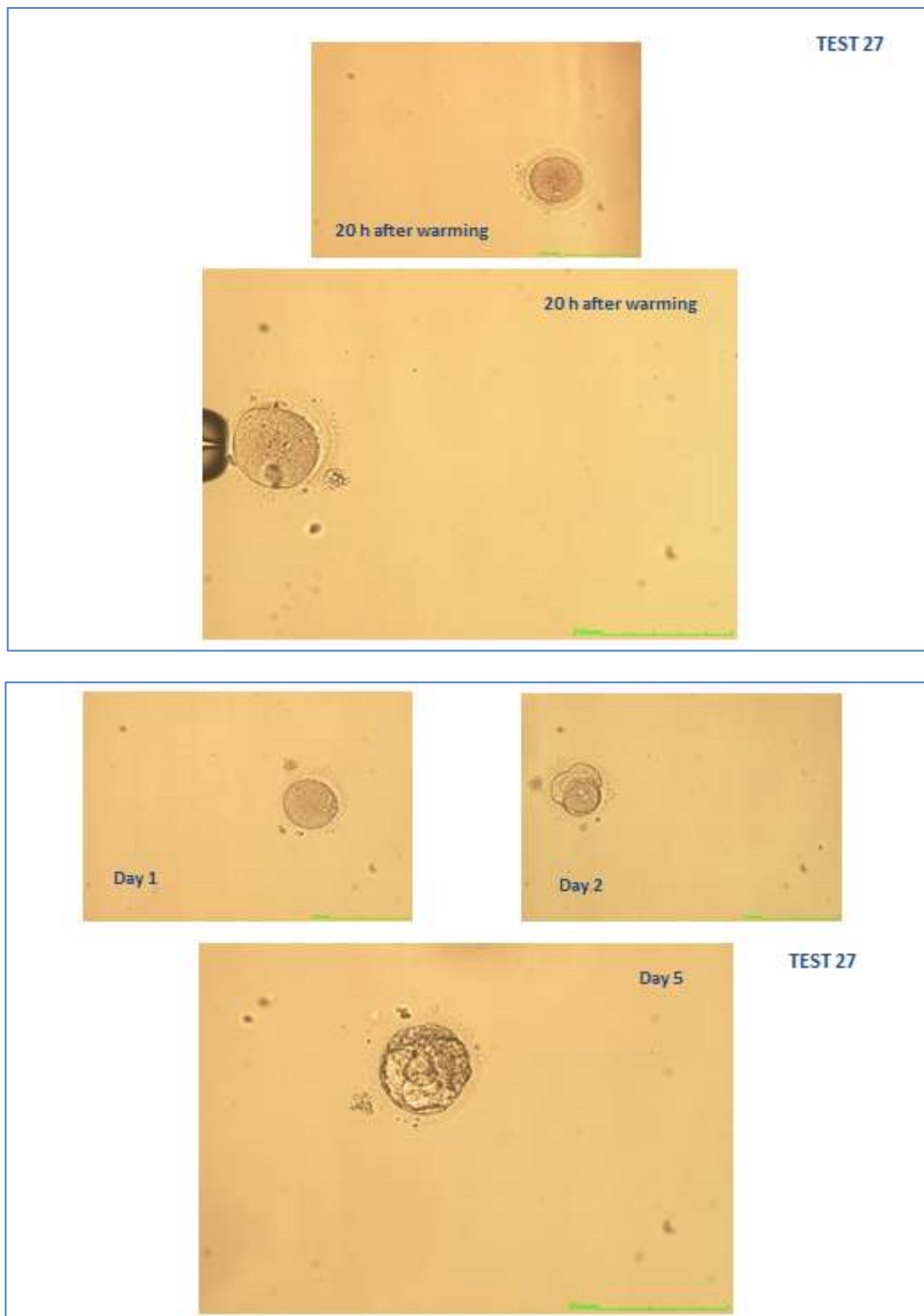
Στο τεστ 2, το ανώριμο ωάριο επιβίωσε μετά την κρυοσυντήρηση/απόψυξη, ωρίμασε μετά από 22 ώρες και την επόμενη μέρα έδειξε γονιμοποίηση. Μάλιστα η ανάπτυξη προχώρησε μέχρι την 3^η μέρα και στη συνέχεια η ανάπτυξη σταμάτησε (arrested) ενώ παράλληλα αυξήθηκαν τα σπασίματα (fragmentations).

4.3.4 ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΟΣ 3 (degenerated embryo)



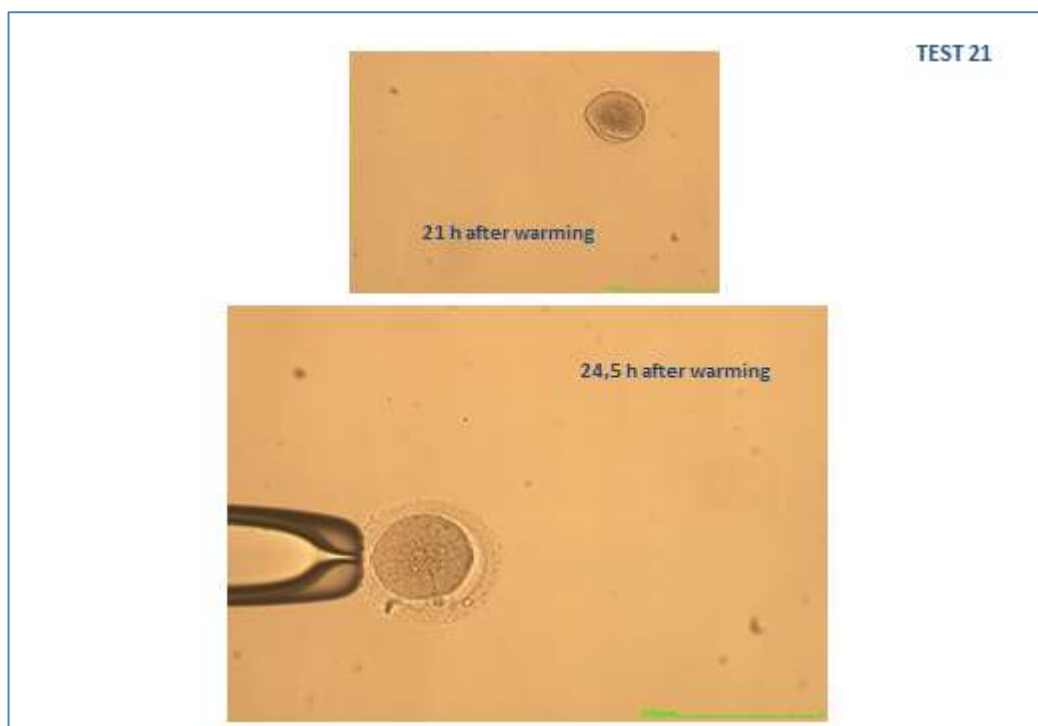
Παρομοίως, στο τεστ 9, το ανώριμο ωάριο επιβίωσε μετά την κρυοσυντήρηση/απόψυξη, ωρίμασε κι αυτό μετά από 22 ώρες και την επόμενη μέρα έδειξε γονιμοποίηση. Η ανάπτυξή προχώρησε μέχρι την 3^η μέρα και στη συνέχεια η ανάπτυξη σταμάτησε και άρχισε ο εκφυλισμός του (degeneration).

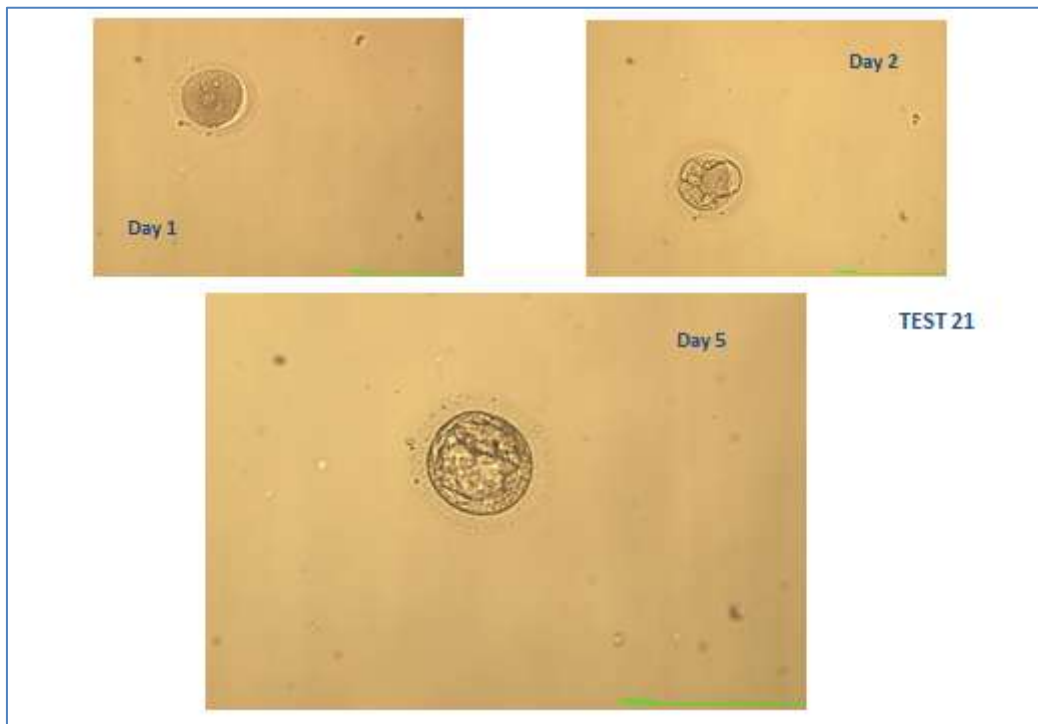
4.3.4 ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΟΣ 4 (BL2bb)



Σε αυτό το παράδειγμα, στο τεστ 27, το GV ωάριο επιβίωσε μετά την κρυοσυντήρηση/απόψυξη, ωρίμασε μετά από 20 ώρες και την επόμενη μέρα έδειξε γονιμοποίηση. Η ανάπτυξή του προχωρούσε ιδανικά και τη 2^η μέρα με ένα έμβρυο 4A1 και έφτασε μέχρι και το στάδιο της βλαστοκύστης. Η βλαστοκύστη βέβαια δεν ήταν καλής ποιότητας (BL2bb) παρ' όλα αυτά ήταν το πρώτο έμβρυο που κατάφερε να προχωρήσει μετά την 3^η μέρα.

4.3.5 ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΟΣ 5 (BL2ac)





Σε αυτό το παράδειγμα, στο τεστ 21, το GV ωάριο επιβίωσε μετά την κρυοσυντήρηση/απόψυξη, ωρίμασε μετά από 24,5 ώρες και την επόμενη μέρα έδειξε γονιμοποίηση. Η ανάπτυξή του προχωρούσε και τη 2^η μέρα με ένα έμβρυο μέτριας ποιότητας 4B1.2 και έφτασε μέχρι και το στάδιο της βλαστοκύστης. Η βλαστοκύστη δεν ήταν άριστης ποιότητας (BL2ac), είχε όμως άριστη εσωτερική κυτταρική μάζα, αν και το τροφοεξώδερμα δεν ήταν καλής ποιότητας.

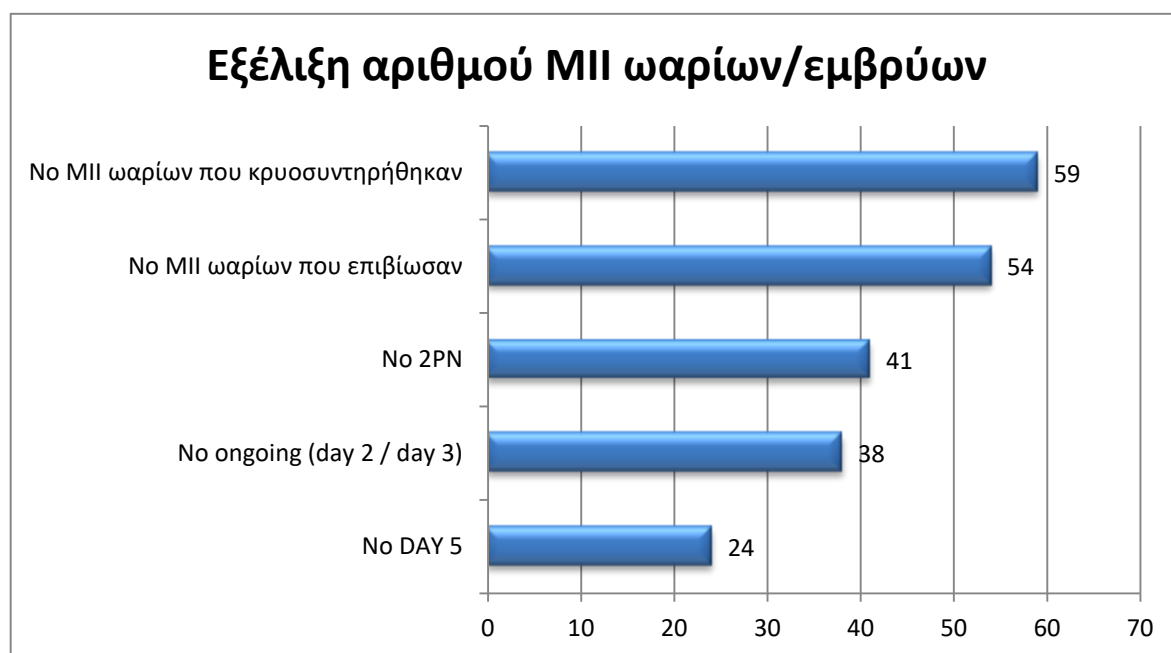
4.4 ΓΕΝΙΚΑ – ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ MII ΩΑΡΙΩΝ

Η μελέτη περιελάμβανε ανώριμα ωάρια από 7 ωοληψίες, από δότριες ηλικίας $26,7 \pm 0,89$, με πάχος ενδομητρίου κατά την ωοληψία $10,6\text{mm} \pm 0,45$. Ο συνολικός αριθμός ωαρίων που λήφθηκαν κατά τις ωοληψίες ήταν 236 ($33,7 \pm 3,55$), ο αριθμός των MII ωαρίων ήταν 199 ($28,4 \pm 2,81$) και ο αριθμός των MII ωαρίων που κρυοσυντηρήθηκαν ήταν 59 ($8,42 \pm 0,57$). Ο χρόνος ανάμεσα στην ώρα ωοληψίας και καθαρισμός ωαρίων ήταν $26,7\text{min} \pm 0,89$, ο αριθμός ανάμεσα στον καθαρισμό ωαρίων και την υαλοποίηση αυτών ήταν $36,6\text{min} \pm 4,77$ και ο χρόνος μεταξύ απόψυξης και γονιμοποίησης ωαρίων ήταν $187,85 \pm 7,54$. Τέλος, η συγκέντρωση του σπέρματος των συζύγων ήταν $34,71 \times 10^6/\text{ml} \pm 9,09$, η συνολική κινητικότητα $44,57\% \pm 6,18$, η πρόσθια κινητικότητα $26,85\% \pm 6,83$ και η μορφολογία $13,14\% \pm 2,35$.

Αριθμός ωοληψιών	7
Ηλικία δοτριών	$26,7 \pm 0,89$
Πάχος ενδομητρίου τη μέρα της ωοληψίας (mm)	$10,6 \pm 0,45$
Αριθμός ωαρίων κατά την ωοληψία	$236 (33,7 \pm 3,55)$
Αριθμός MII ωαρίων	$199 (28,4 \pm 2,81)$
Αριθμός MII ωαρίων που κρυοσυντηρήθηκαν	$59 (8,42 \pm 0,57)$
Λεπτά ανάμεσα σε ωοληψία – καθαρισμό ωαρίων	$26,7 \pm 0,89$
Λεπτά ανάμεσα σε καθαρισμό ωαρίων – υαλοποίηση ωαρίων	$36,6 \pm 4,77$
Ώρες ανάμεσα σε απόψυξη – γονιμοποίηση ωαρίων	$187,85 \pm 7,54$
Συγκέντρωση σπέρματος	$34,71 \times 10^6/\text{ml} \pm 9,09$
Συνολική κινητικότητα	$44,57\% \pm 6,18$
Πρόσθια κινητικότητα	$26,85\% \pm 6,83$
Μορφολογία σπέρματος	$13,14\% \pm 2,35$

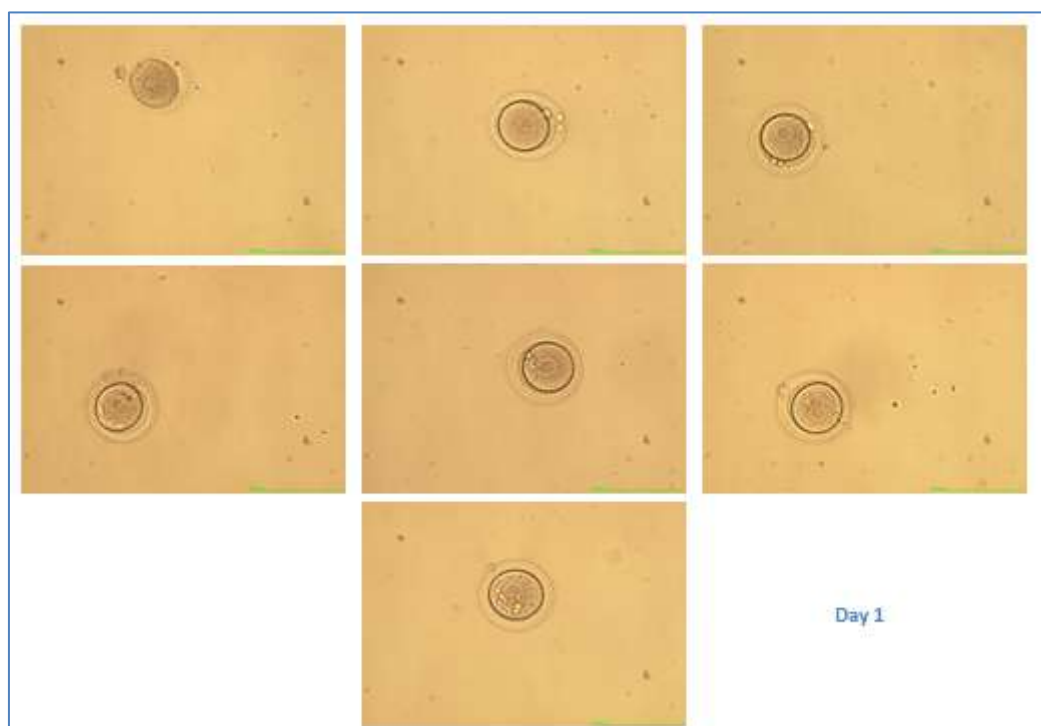
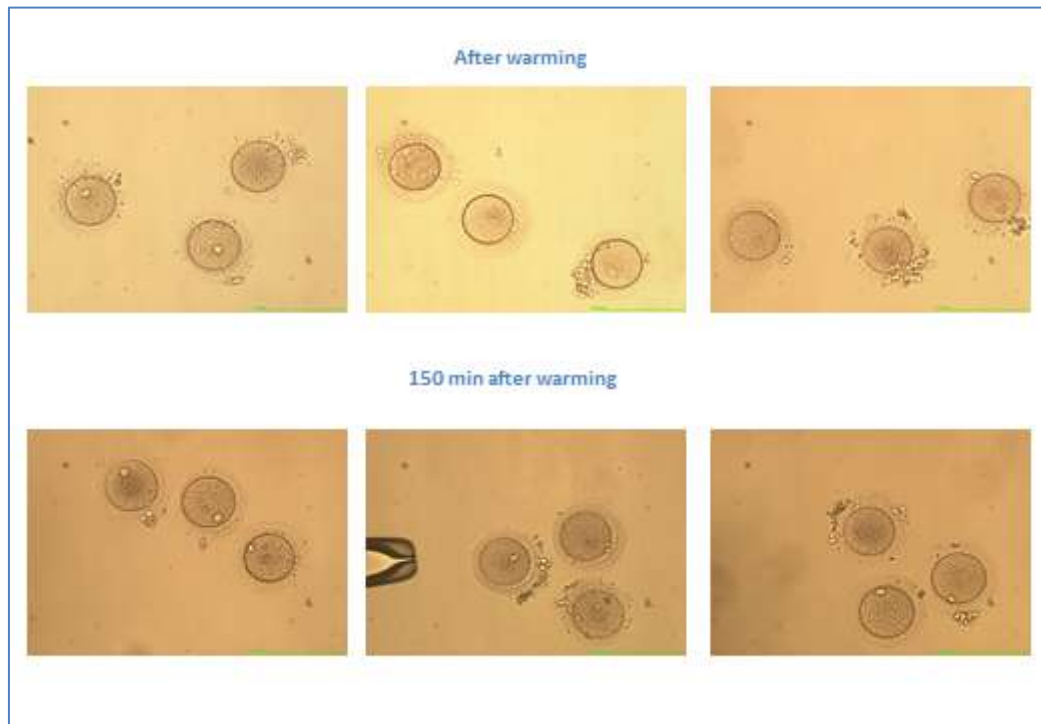
Το ποσοστό επιβίωσης ήταν 91,52%, το ποσοστό γονιμοποίησης 75,92%, το ποσοστό εμβρύων ongoing (day 2 / day 3) 92,68% και το ποσοστό βλαστοκύστεων day 5 58,53%.

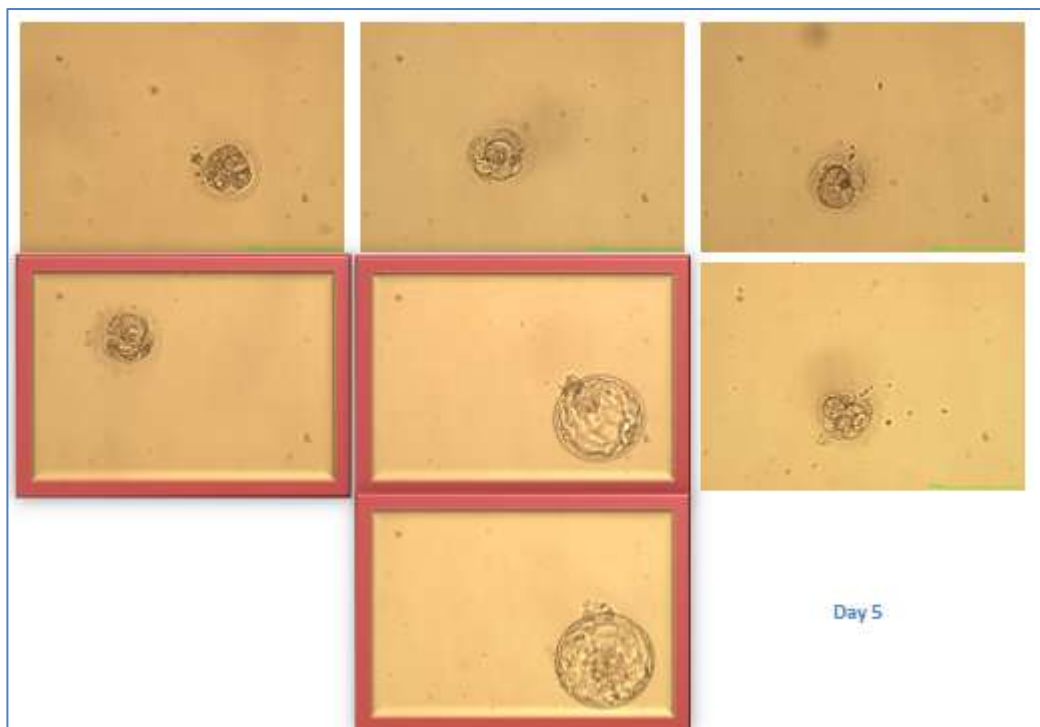
	MII ωάρια
Ποσοστό επιβίωσης	91,52% (54)
Ποσοστό γονιμοποίησης	75,92% (41)
Ποσοστό ongoing (day 2 / day 3)	92,68% (38)
Ποσοστό Day 5	58,53% (24)



4.5 ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΩΝ – ΜΠΙ ΩΑΡΙΑ

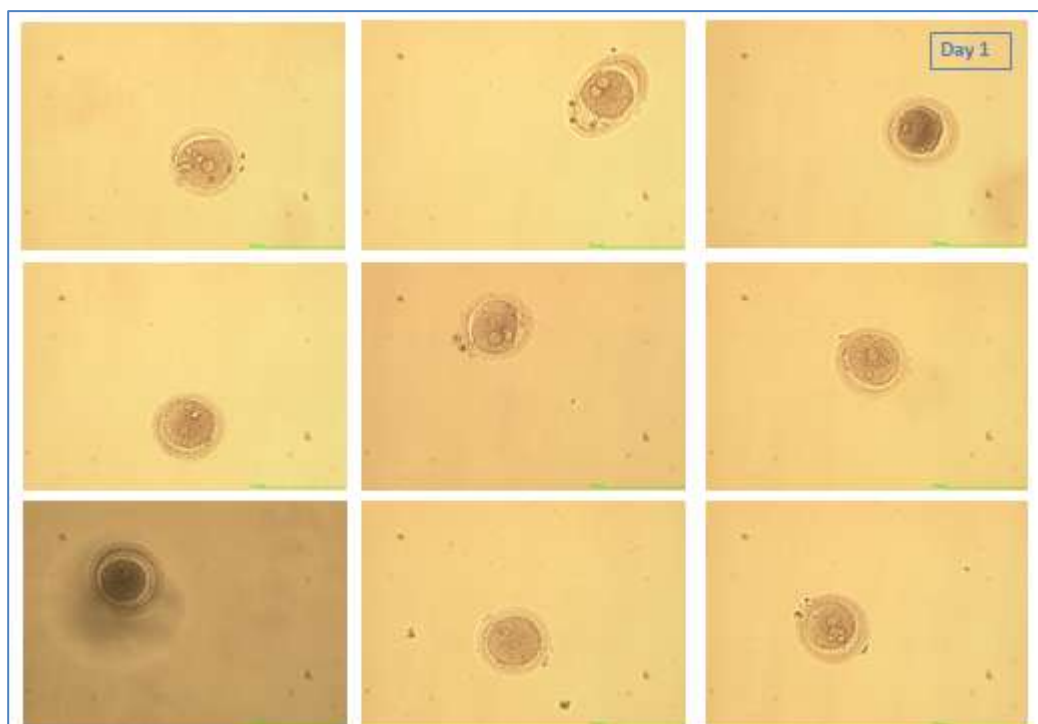
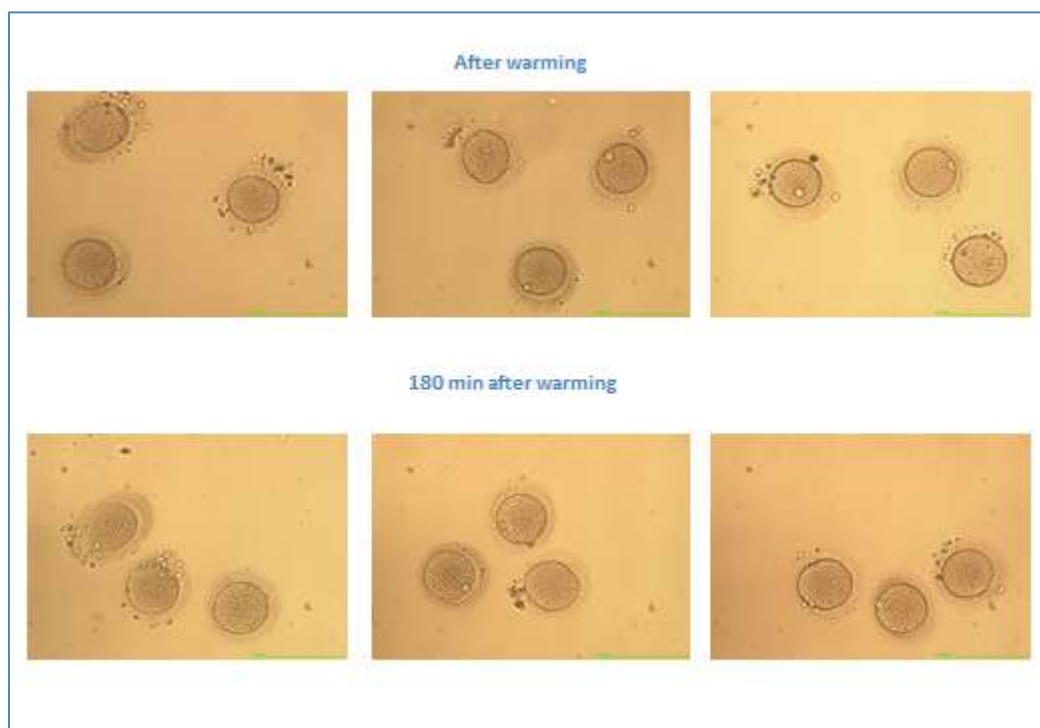
4.5.1 ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΟΣ 1

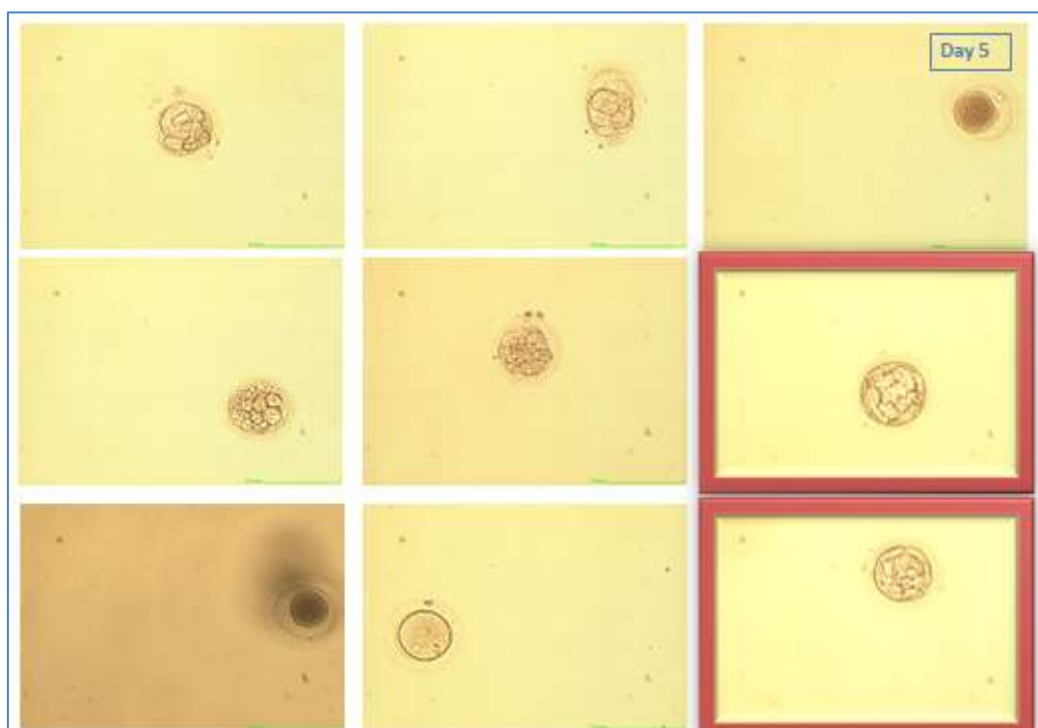
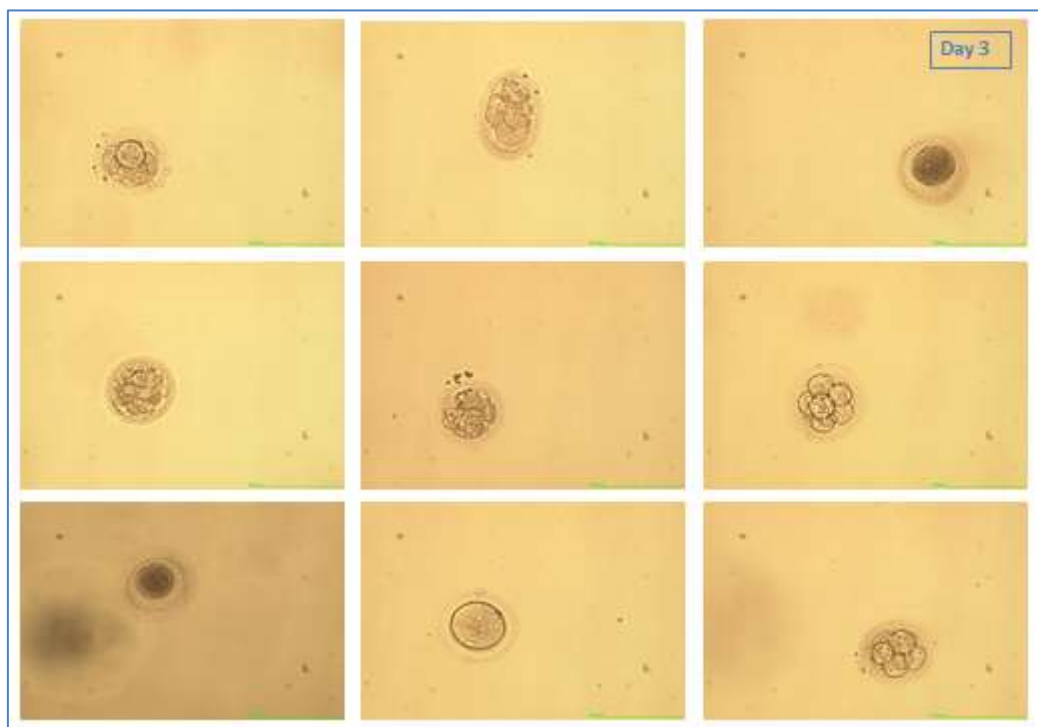




Σ' αυτό το παράδειγμα, αποψύχθηκαν 9 ωάρια, εκ των οποίων επιβίωσαν τα 7, τα οποία και γονιμοποιήθηκαν με δείγμα σπέρματος με οριακά φυσιολογικές τιμές ($15 \times 10^6/\text{ml}$, 45% κινούμενα, 15% ταχέως κινούμενα και 13% φυσιολογική морφολογία). Την 1^η μέρα έδειξαν γονιμοποίηση και τα 7 και την 5^η μέρα παρατηρήθηκαν 3 βλαστοκύστες, μια νεαρή βλαστοκύστη μέτριας ποιότητας και 2 βλαστοκύστες σε εκκόλαψη (Hatching blastocysts).

4.5.2 ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΟΣ 2

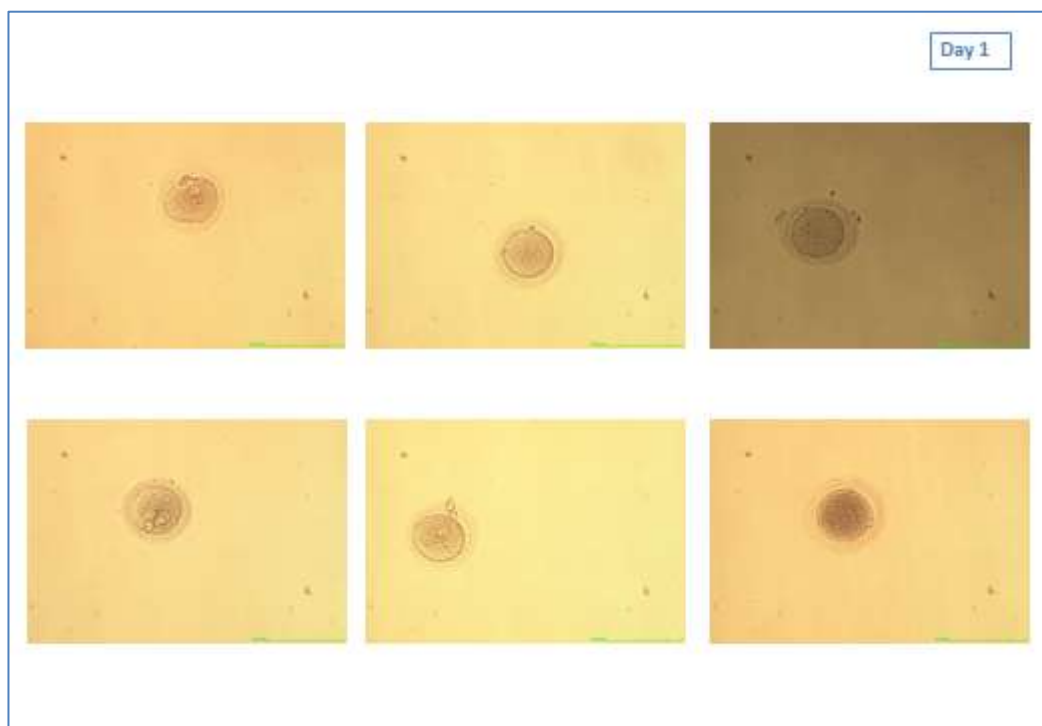
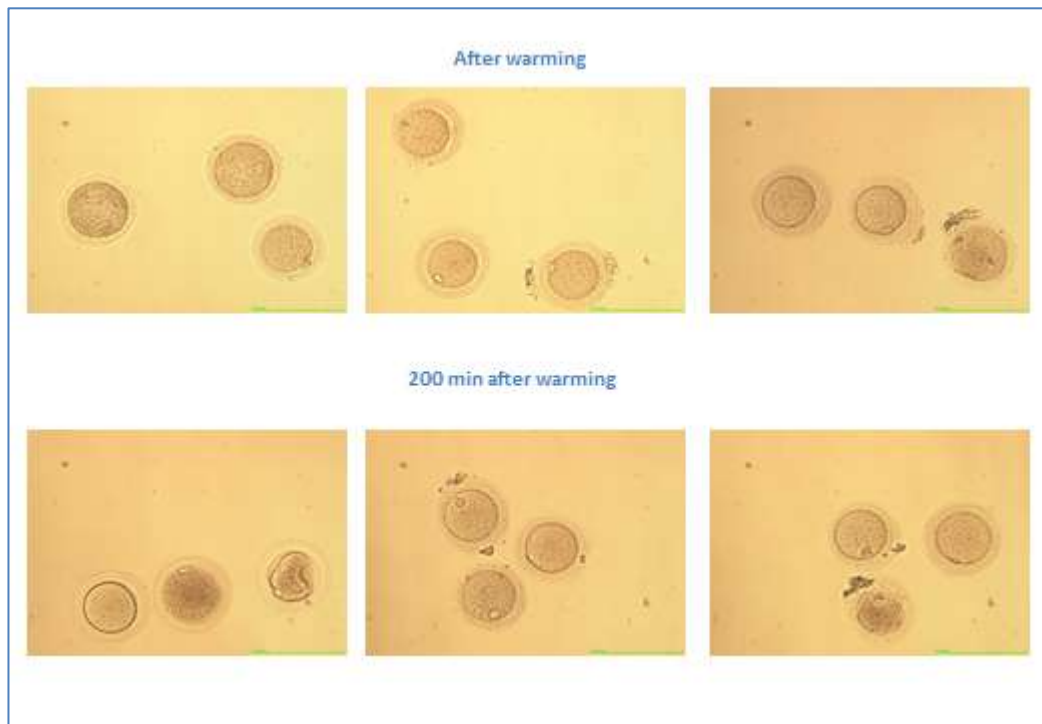


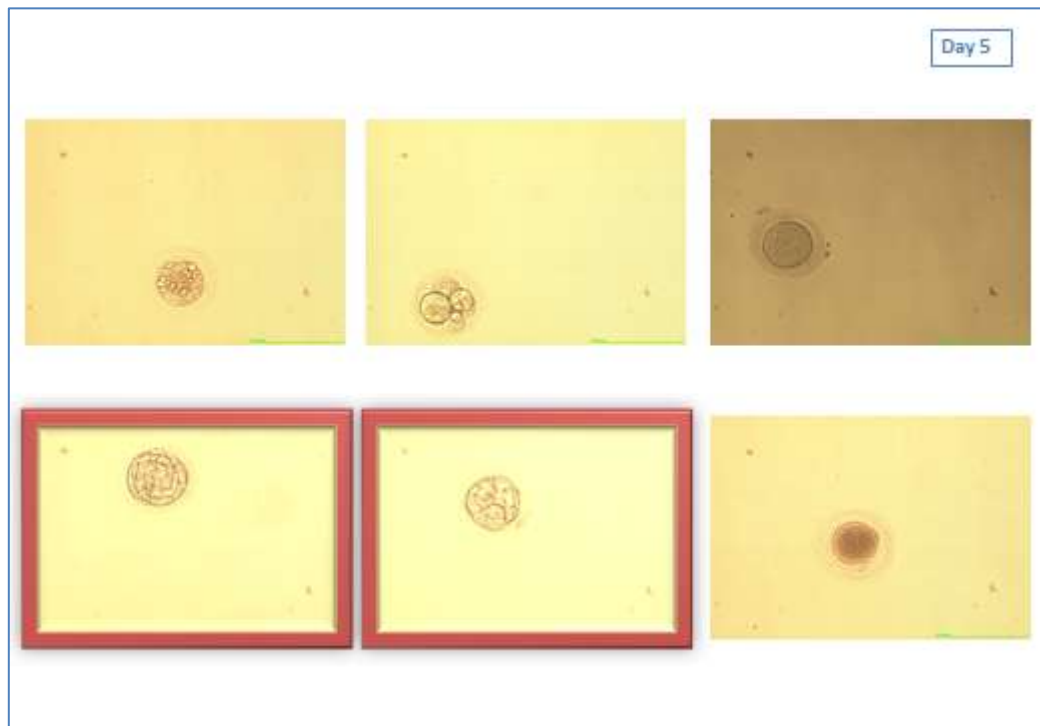


Σ' αυτό το παράδειγμα, αποψύχθηκαν επίσης 9 ωάρια, εκ των οποίων επιβίωσαν και τα 9, τα οποία και γονιμοποιήθηκαν με δείγμα σπέρματος με τιμές κάτω του φυσιολογικού ($7 \times 10^6/\text{ml}$, 30% κινούμενα, 10% ταχέως κινούμενα και 2% φυσιολογική

μορφολογία). Την 1^η μέρα έδειξαν γονιμοποίηση τα 5, την 3^η μέρα προχωρούσαν 6 έμβρυα και την 5^η μέρα παρατηρήθηκαν 2 βλαστοκύστες BL3aa και BL3ba.

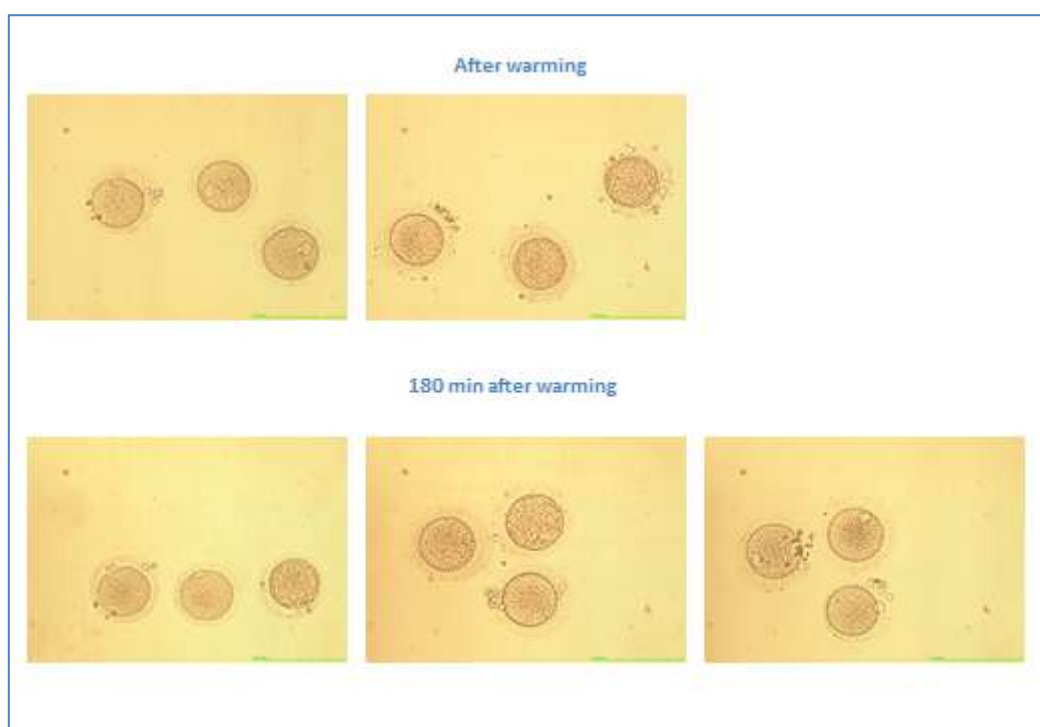
4.5.3 ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΟΣ 3

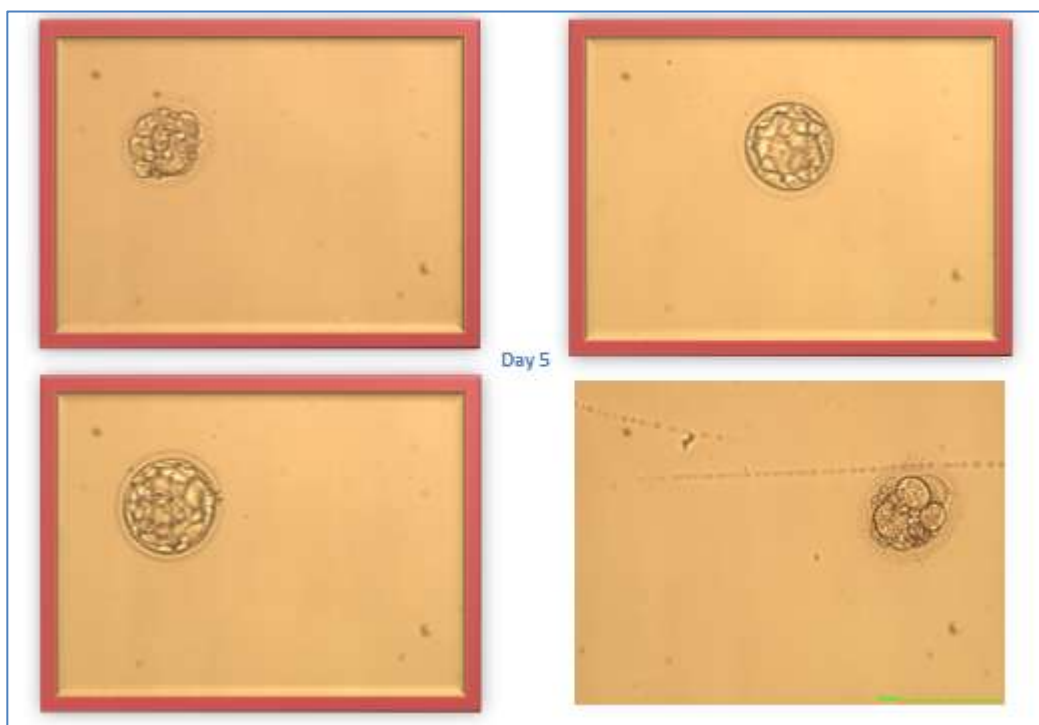
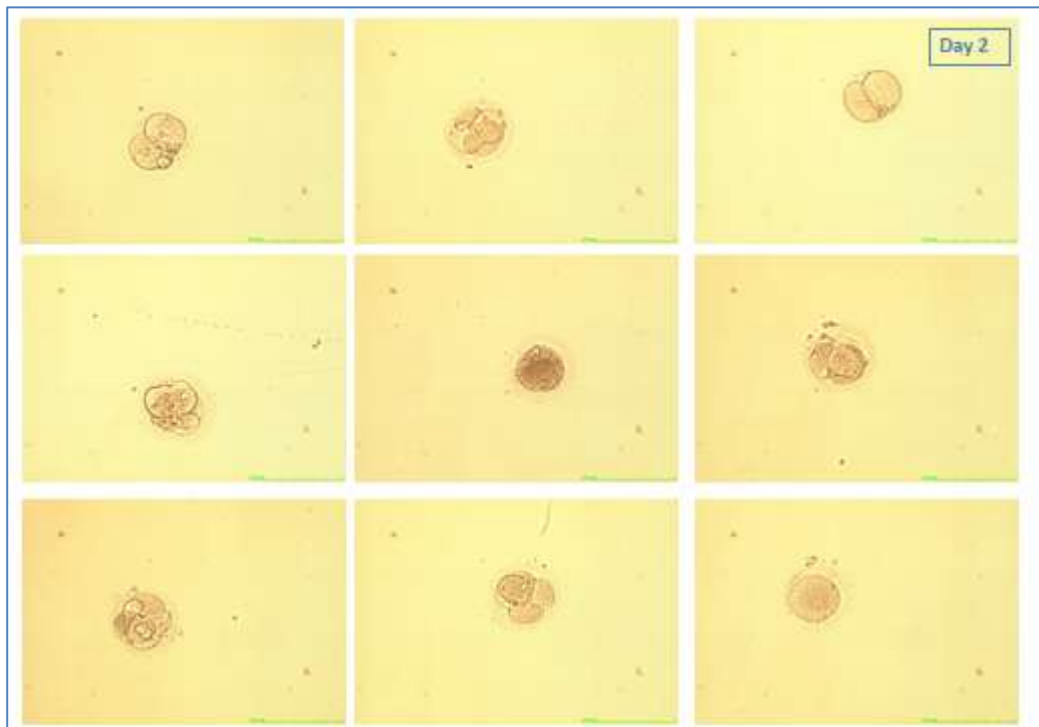


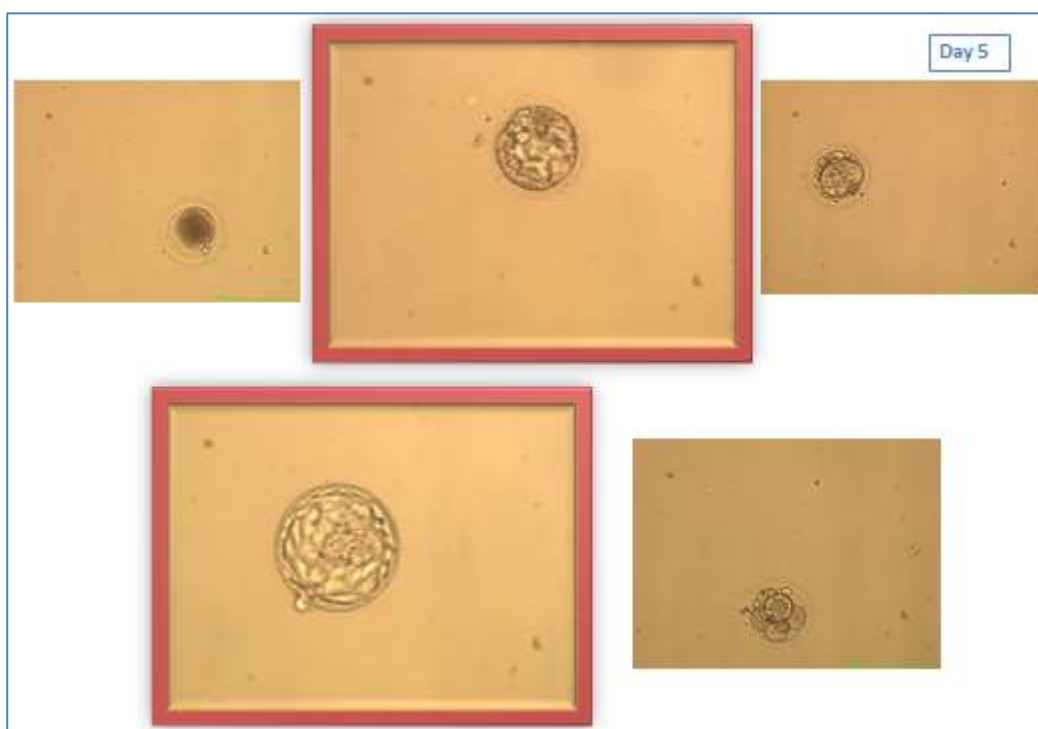


Σ' αυτό το παράδειγμα, αποψύχθηκαν επίσης 9 ωάρια, εκ των οποίων επιβίωσαν τα 6, τα οποία και γονιμοποιήθηκαν με δείγμα σπέρματος με φυσιολογικές τιμές ($40 \times 10^6/\text{ml}$, 60% κινούμενα, 40% ταχέως κινούμενα και 15% φυσιολογική μορφολογία). Την 1^η μέρα έδειξαν γονιμοποίηση τα 4 και την 5^η μέρα παρατηρήθηκαν 2 βλαστοκύστες BL3aa και BL3aa.

4.5.4 ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΟΣ 4

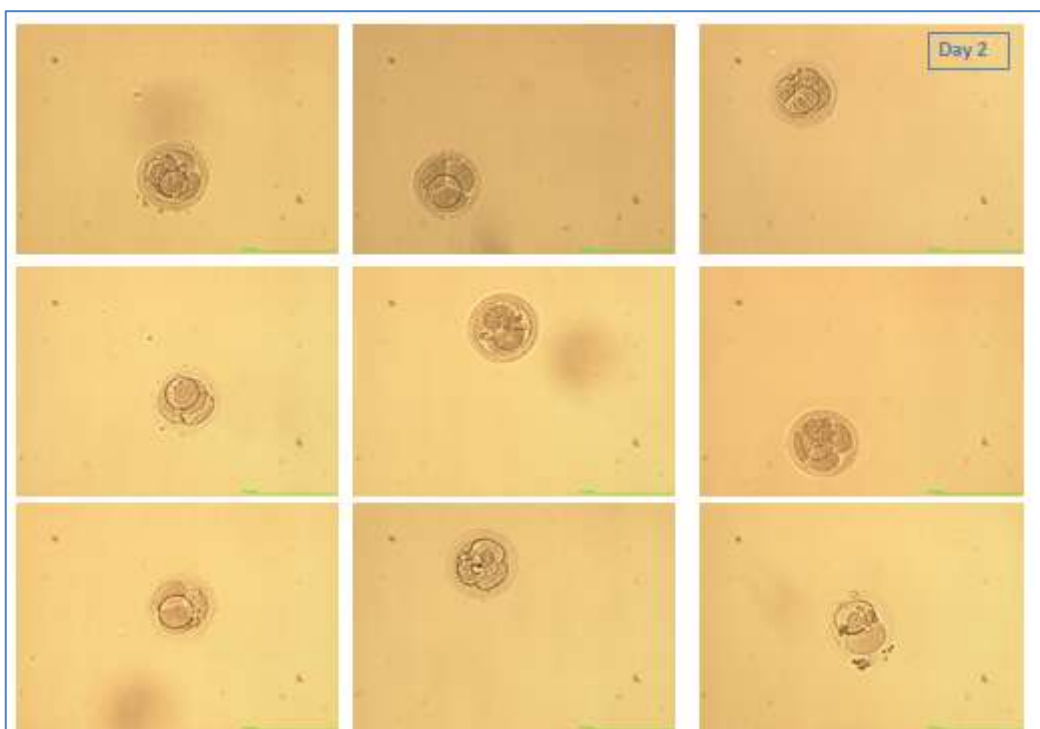
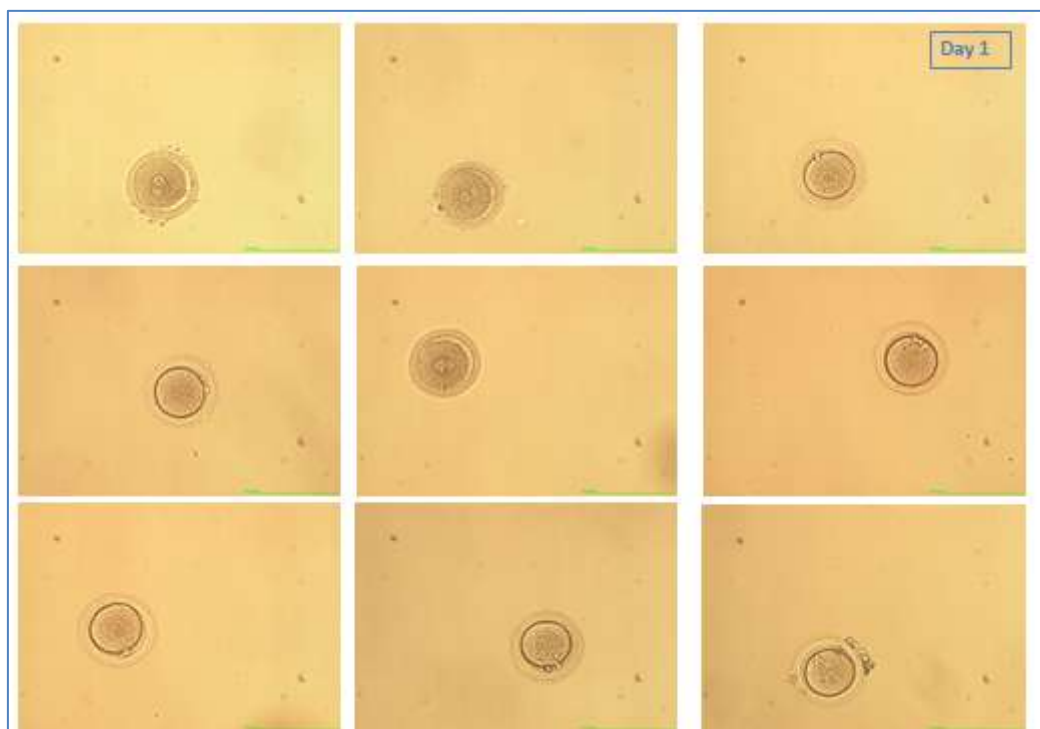


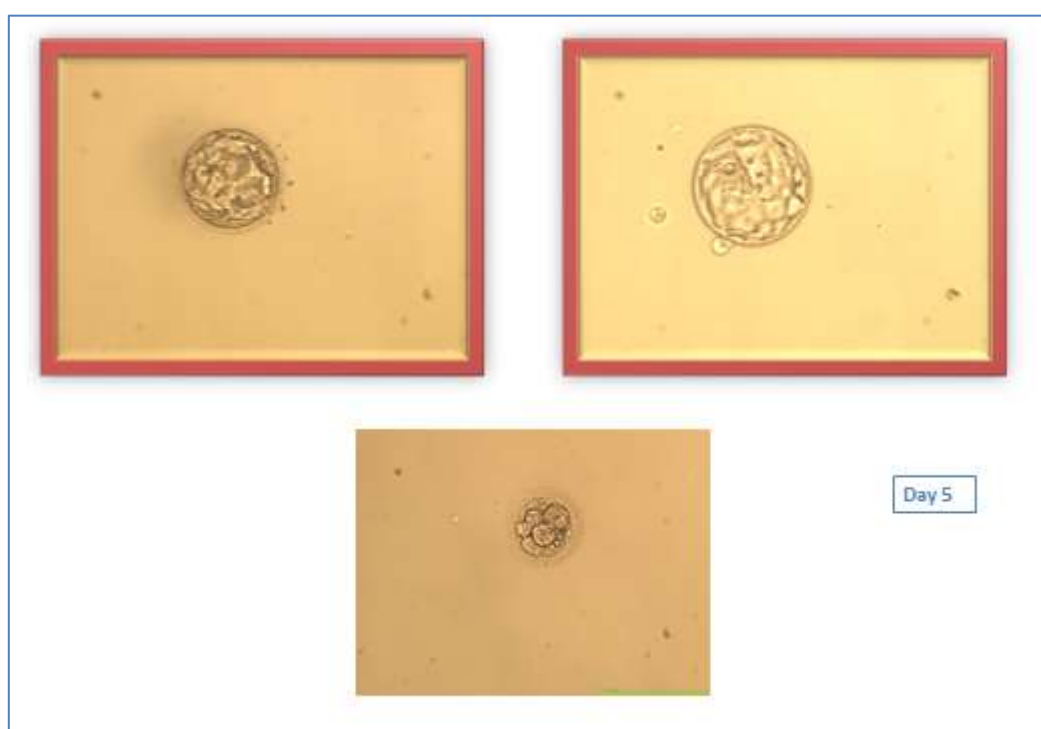
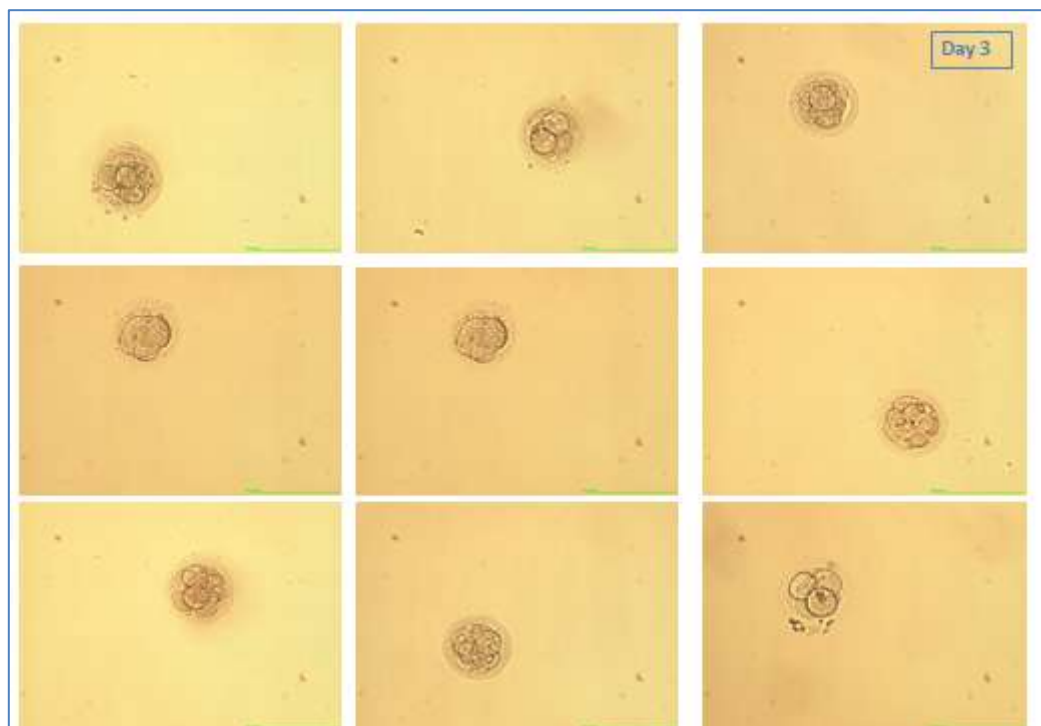




Σ' αυτό το παράδειγμα, αποψύχθηκαν επίσης 9 ωάρια, εκ των οποίων επιβίωσαν και τα 9, τα οποία και γονιμοποιήθηκαν με δείγμα σπέρματος με φυσιολογικές τιμές ($40 \times 10^6/\text{ml}$, 50% κινούμενα, 30% ταχέως κινούμενα και 15% φυσιολογική μορφολογία). Την 1^η μέρα έδειξαν γονιμοποίηση τα 7, τα οποία και προχωρούσαν την ανάπτυξή τους και την 3^η μέρα και την 5^η μέρα παρατηρήθηκαν 5 βλαστοκύστες, YBLab, BL3aa, BL2aa, BL2ba και HingBL.

4.5.5 ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΟΣ 5



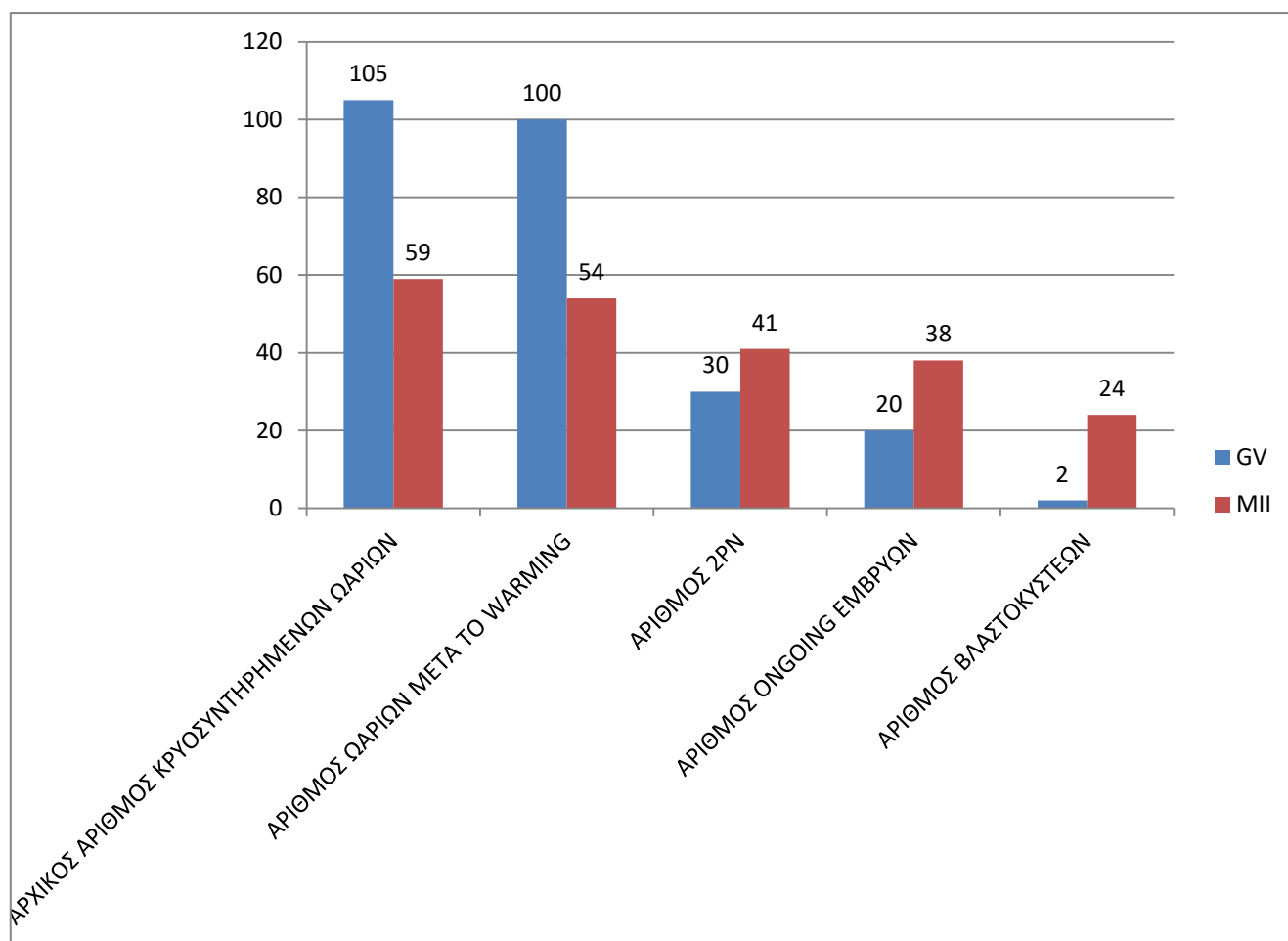




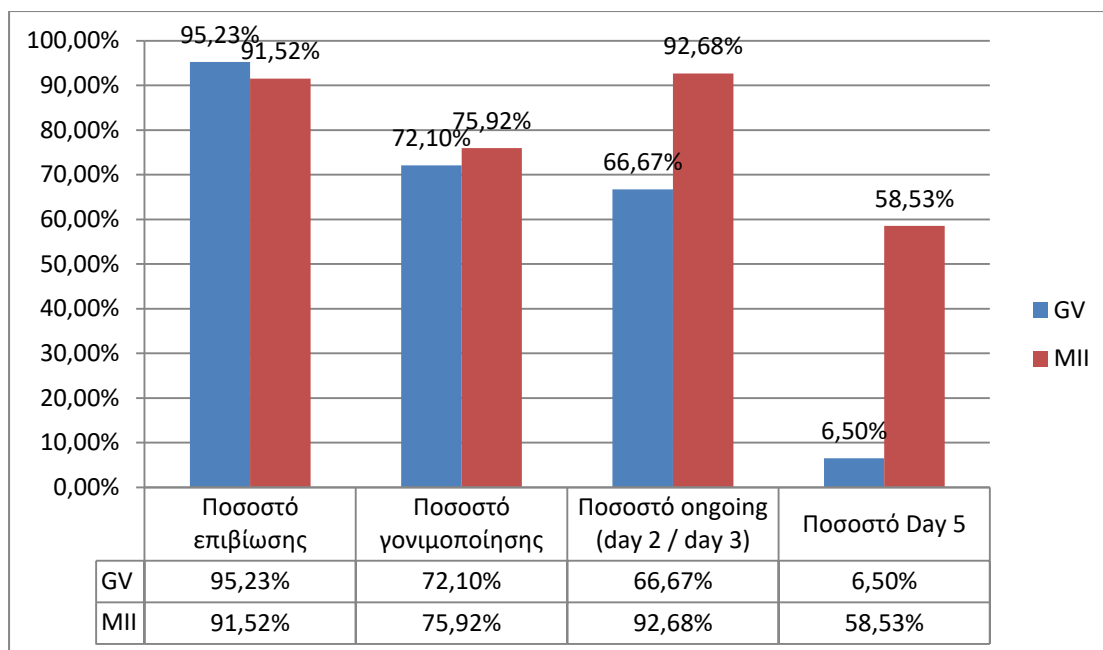
Σ' αυτό το παράδειγμα, αποψύχθηκαν επίσης 9 ωάρια, εκ των οποίων επιβίωσαν και τα 9, τα οποία και γονιμοποιήθηκαν με δείγμα σπέρματος με φυσιολογικές τιμές ($78 \times 10^6/\text{ml}$, 67% κινούμενα, 58% ταχέως κινούμενα και 18% φυσιολογική μορφολογία). Την 1^η μέρα έδειξαν γονιμοποίηση τα και τα 9, τα οποία και προχωρούσαν την ανάπτυξή τους και την 2^η και την 3^η μέρα και την 5^η μέρα παρατηρήθηκαν 7 βλαστοκύστες, BL3bb, HingBL, HingBL, BL2ba, BL5ba, BL2aa και BL3aa.

4.6 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ GV-MII

	GV ώρια	MII ώρια	p value
Ποσοστό επιβίωσης	95.23% (100)	91.52% (54)	0.3424
Ποσοστό ωρίμανσης	43% (42)	-	
Ποσοστό γονιμοποίησης	72.1% (30)	75.92% (41)	0.6727
Ποσοστό ongoing (day 2 / day 3)	66.67% (20)	92.68% (38)	0.0054
Ποσοστό Day 5	6.5% (2)	58.53% (24)	0.0001



Εικόνα 10: Αριθμητική σύγκριση μεταξύ GV και MII ωαρίων



Εικόνα 11: Ποσοστιαία σύγκριση μεταξύ GV και MII ωαρίων

4.7 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΜΕ ΑΛΛΕΣ ΕΡΓΑΣΙΕΣ

Ακολουθούν 2 πίνακες στους οποίους φαίνεται η σύγκριση των αποτελεσμάτων μεταξύ αντίστοιχων εργασιών με την παρούσα και η ύπαρξη ή μη στατιστικής σημαντικότητας στα διάφορα στάδια, τα οποία θα αναλυθούν στο κεφάλαιο της συζήτησης.

ΣΥΓΓΡΑΦΕΑΣ	n	ΠΟΣΟΣΤΟ ΕΠΙΒΙΩΣΗΣ	n	ΠΟΣΟΣΤΟ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ	n	ΠΟΣΟΣΤΟ 2PN	n	ΠΟΣΟΣΤΟ DAY2/DAY3	n	ΠΟΣΟΣΤΟ DAY 5	n	ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗΣ	ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ IVM	ΔΙΑΣΩΘΕΝΤΑ ΩΑΡΙΑ
Karagianni 2017	105	95,23%	100	43%	42	72.1%	30	66.67%	20	6.5%	2	Υαλοποίηση Closed system	Medicult (αλβουμίνη αντί ορού)	NAI
Cao Y 2009 (131)	219	85,4%	187	50,8%	95	62,1%	59	69,5%	41	0%	0	Medicult	TCM-199	OXI
Al-Khtib 2011 (134)	184	55.4%	102	41,8%	77	/	/	/	/	/	/	Medicult	Medicult	
Goud 2000 (132)	63	57.1%	36	33,3%	12	58,3%	7	42,8%	3	-	-	Slow freezing	IVM medium + επιδερμικός αυξητικός παράγοντας	OXI
	64	48.4%	31	61,3%	19	57,9%	11	90,9%	10	-	-	Slow freezing – low-Na media		
Boiso 2002 (144)	90	73,3%	66	72,7%	48	/	/	/	/	/	/	Slow freezing 1.5M PROH + 0.2M sucrose	Vitrolife	NAI
Sereni 2000 (130)	82	80.5%	66	66.6%	44	52.3%	23	-	-	-	-	1.5M PROH + 0.1M sucrose	TCM-199	NAI
Isachenko 2006 (133)	80	/	/	71%	56	/	/	/	/	/	/	Ανοιχτό σύστημα- ύπαρξη DMSO	Vitrolife	OXI
	60	/	/	51%	30	/	/	/	/	/	/	Κλειστό σύστημα- no DMSO-long		
	90	/	/	68%	52	/	/	/	/	/	/	Κλειστό σύστημα- with DMSO+EG- long		
	90	/	/	72%	64	/	/	/	/	/	/	Κλειστό σύστημα- no DMSO-short		
Escrch 2012 (135)	99	/	/	88,9%	88	/	/	/	/	/	/	/	Vitrolife	NAI
Reichman 2010 (137)	185	/	/	35,1%	65	60%	39	-	-	-	-	/	Sage ivm	NAI
Chian 2002 (138)	107	/	/	75.7%	81	86,4%	70	58,6%%	41	12,9%	9	/	IVM-medium (homemade)	NAI
	106	/	/	55.7%	59	78%	46	40,9%%	18	0%	0		TCM-199	
Kim 2000 (91)	168	/	/	66,7%	112	51,8%	58	69%	40	-	-	/	Παραλλαγή Tyrode + προσθήκη ωοθυλακιακού υγρού	NAI

ΣΥΓΓΡΑΦΕΑΣ	ΕΠΙΒΙΩΣΗ p value	ΩΡΙΜΑΝΣΗ p value	ΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ p value	ONGOING p value	BLASTOCYSTS p value
Cao Y 2009 (131)	0.0093	0.2084	0.2591	0.7870	0.1017
Al-Khtib 2011 (134)	<0.0001	0.8633	/	/	/
Goud 2000 (132)	<0.0001	0.3110	0.3663	0.2475	/
	<0.0001	0.0757	0.2761	0.1254	/
Boiso 2002 (144)	<0.0001	0.0002	/	/	/
Sereni 2000 (130)	0.0016	0.0030	0.0602	/	/
Isachenko 2006 (133)	/	0.0002	/	/	/
	/	0.3272	/	/	/
	/	0.0006	/	/	/
	/	0.0001	/	/	/
Escrch 2012 (135)	/	<0.0001	/	/	/
Reichman 2010 (137)	/	0.1902	0.2029	/	/
Chian 2002 (138)	/	<0.0001	0.0537	0.4506	0.4534
	/	0.0691	0.4987	0.0291	0.2774
Kim 2000 (91)	/	0.0001	0.0238	/	/

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σκοπός της συγκεκριμένης διπλωματικής ήταν η μελέτη της κρυοσυντήρησης και της ωρίμασης των διασωθέντων GV ωαρίων από δότριες ωαρίων με διεγερμένες ωοθήκες, σε σύγκριση με κρυοσυντηρημένα MII ωάρια από τις ίδιες ωοληψίες. Το ερώτημα που εξετάστηκε ήταν κατά πόσο αξίζει να κρυοσυντηρούνται και τα GV ωάρια με σκοπό να αυξάνεται και ο αριθμός των διαθέσιμων ωαρίων και κατ' επέκταση ο αριθμός των διαθέσιμων εμβρύων σε μια προσπάθεια υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Για το σκοπό αυτό επιλέχθηκαν ωάρια από το πρόγραμμα δωρεάς ωαρίων ώστε να έχουμε το πλεονέκτημα χρήσης άριστου γενετικού υλικού λόγω του νεαρού της ηλικίας και της αποδεδειγμένης γονιμότητας. Για τον ίδιο λόγο, επιλέχθηκαν δότες σπέρματος για τη γονιμοποίηση των GV ωαρίων που τελικά ωρίμασαν με τη μέθοδο του IVM.

Η κρυοσυντήρηση των ωαρίων είναι μια μέθοδος που χρησιμοποιείται ευρύτατα τα τελευταία χρόνια με κάποια εργαστήρια να έχουν πολύ ελπιδοφόρα ποσοστά επιβίωσης, γονιμοποίησης, εμφύτευσης και γέννησης υγιών παιδιών. Στη συγκεκριμένη μελέτη η κρυοσυντήρηση τόσο των GV ωαρίων όσο και των MII ωαρίων έγινε με τη μέθοδο της υαλοποίησης με τη χρήση κλειστού συστήματος. Αν και υπάρχουν πολλές μελέτες για την χρήση παρόμοιων πρωτοκόλλων, στη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκε παραλλαγή αντίστοιχων πρωτοκόλλων και τη δημιουργία αυτοσχέδιων (homemade) υλικών κρυοσυντήρησης και απόψυξης.

5.1 ΕΠΙΒΙΩΣΗ GV ΩΑΡΙΩΝ

Το ποσοστό επιβίωσης των GV ωαρίων ήταν 95,23% σε δείγμα 105 GV ωαρίων. Το μεγάλο αυτό ποσοστό επιβίωσης οφείλεται στη χρήση κατάλληλου πρωτοκόλλου, δηλαδή τη χρήση της μεθόδου της υαλοποίησης, τα κρυοπροστατευτικά, τους χρόνους έκθεσης σε αυτά, καθώς και τον τρόπο και ρυθμό απόψυξης των ωαρίων. Το ποσοστό αυτό είναι επίσης μεγάλο και στο control group όπου το ποσοστό ήταν 91,52% σε δείγμα 59 ωαρίων και μάλιστα το p value μεταξύ της παρούσας μελέτης και του control group αυτής είναι 0,3424, κάτι που μας δείχνει πως το πρωτόκολλο κρυοσυντήρησης λειτούργησε το ίδιο σωστά και για τα GV και για τα MII ωάρια, χωρίς στατιστική διαφορά, αποδεικνύοντας έτσι την αποτελεσματικότητα του πρωτοκόλλου κρυοσυντήρησης και απόψυξης της παρούσας μελέτης. Ακολουθεί σύγκριση της παρούσας μελέτης με παρόμοιες βιβλιογραφικές αναφορές ως προς τη στατιστική σημαντικότητα.

Το 2009 η Yunxia Cao (**131**) μελέτησε την επίδραση της υαλοποίησης σε ανθρώπινα GV ωάρια, και παρουσίασε ποσοστά επιβίωσης 85,4% σε δείγμα 219 ωαρίων. Η Cao δεν μελέτησε διασωθέντα GV ωάρια, αλλά GV ωάρια που προορίζονταν εξ αρχής για τη μέθοδο του IVM σε γυναίκες με πολυκυστικές ωοθήκες. Το ποσοστό, αν και αφορά μεγαλύτερο αριθμό ωαρίων είναι μικρότερο από την παρούσα μελέτη (95,3%) και αυτό οφείλεται στη χρήση διαφορετικού πρωτοκόλλου τόσο υαλοποίησης όσο και απόψυξης. Σε αντίθεση με τη χρήση DMSO, EG, σουκρόζης και φικόλης, η Cao χρησιμοποίησε το πρωτόκολλο της MediCult, το οποίο περιέχει 1,2 προπανοδιόλη, EG και σουκρόζη. Επίσης, κατά την απόψυξη των ωαρίων, αν και έγινε και στις δυο περιπτώσεις με τη χρήση σουκρόζης σε διάφορες συγκεντρώσεις, στην παρούσα

μελέτη περιλαμβανόταν η χρήση ενός παραπάνω σταδίου, αυτό της συγκέντρωσης 0,75M, καθώς και διαφορετικούς χρόνους από την Cao. Το p value μεταξύ της Cao και της παρούσας μελέτης είναι 0,0093, κάτι που μας δείχνει τη στατιστική διαφορά και επιβεβαιώνει τη χρήση καταλληλότερου πρωτοκόλλου κατά την παρούσα μελέτη, εφόσον δείχνει μεγαλύτερα ποσοστά σε σχέση με την Cao.

Το 2011 ο Al-Khtib **(134)** μελέτησε την επίδραση της υαλοποίησης των ωαρίων στο στάδιο του βλαστικού κυστιδίου και παρουσίασε ποσοστό επιβίωσης 55,4% σε δείγμα 184 ανθρώπινων GV ωαρίων. Ο Al-Khtib χρησιμοποίησε το πρωτόκολλο κρυοσυντήρησης/απόψυξης της MediCult, όπως και η Cao **(131)** παραπάνω με αρκετά χαμηλότερα ποσοστά επιβίωσης και από την Cao αλλά και από την παρούσα μελέτη (55,4%, 85,4%, και 95,23% αντίστοιχα). Το p value, το οποίο είναι <0,0001, μας αποδεικνύει και πάλι τη χρήση καταλληλότερου πρωτοκόλλου κρυοσυντήρησης/απόψυξης κατά την παρούσα μελέτη, μιας και τα ποσοστά είναι μεγαλύτερα από αυτά του Al-Khtib.

Το 2000 ακόμα μια ομάδα επιστημόνων, ο Goud et al **(132)** έκανε μια παρόμοια μελέτη μεταξύ GV και MII ωαρίων και παρουσίασε ποσοστά επιβίωσης 57,1% και 48,4%, σε δείγμα 63 και 64 GV ωαρίων, αντίστοιχα, με τη μέθοδο της αργής ψύξης (slow freezing) χρησιμοποιώντας δυο διαφορετικά πρωτόκολλα PROH και σουκρόζης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Σ' αυτή την περίπτωση, η διαφορά στα ποσοστά επιβίωσης είναι αρκετά μεγαλύτερη κατά 38,13% και 46,83% αντίστοιχα και αυτό λόγω κυρίως της χρήσης υαλοποίησης και κατ' επέκταση των κρυοπροστατευτικών που χρησιμοποιήθηκαν. Η μεγάλη διαφορά στα ποσοστά μεταξύ της παρούσας μελέτης και της έρευνας του Goud επιβεβαιώνεται και από τη στατιστική ανάλυση, όπου το p value,

το οποίο είναι $<0,0001$ και μας δείχνει τη στατιστική σημαντικότητα του πρωτοκόλλου και συνεπώς την αποτελεσματικότητα της χρήσης του πρωτοκόλλου κρυοσυντήρησης/απόψυξης της παρούσας μελέτης έναντι αυτού του Goud.

Το 2000 ο Sereni E. et al **(130)** παρουσίασε τη μελέτη κρυοσυντήρησης GV ωαρίων με ποσοστό επιβίωσης 80,5% σε ένα δείγμα 82 ανθρώπινων GV ωαρίων και συγκρίνοντας το με αυτό της παρούσας μελέτης το p value είναι 0.0014. Τόσο στη μελέτη του Sereni όσο και στη παρούσα, τα GV ωάρια ήταν διασωθέντα από κύκλους με διέγερση. Η διαφορά του ήταν στο πρωτόκολλο κρυοσυντήρησης καθώς ο Sereni χρησιμοποίησε 1,5M PROH συν 0,1M σουκρόζης σε PBS, ενώ κατά την απόψυξη οι παγιέτες περνούσαν σε θερμοκρασία δωματίου, μετά στους 30°C και τα υλικά που χρησιμοποιούνταν είχαν μειωμένες συγκεντρώσεις PROH και σουκρόζης. Ο Sereni έκανε μία μελέτη με ίδια στρατηγική σε σχέση με την παρούσα μελέτη αλλά χρήση διαφορετικού πρωτοκόλλου κρυοσυντήρησης και απόψυξης, και οι διαφορές αυτές είναι που ανέδειξαν τα ποσοστά επιβίωσης των GV ωαρίων της παρούσας μελέτης ως προς τις υπόλοιπες, όπως αποδεικνύεται και από τη στατιστική ανάλυση, όπου και πάλι τα ποσοστά της παρούσας μελέτης είναι στατιστικά σημαντικότερα.

Η Boiso το 2002 **(144)** μελέτησε 90 GV διασωθέντα ωάρια τα οποία κρυοσυντήρησε με τη μέθοδο της αργής κατάψυξης (slow freezing) με 1,5M PROH συν 0,2M σουκρόζης και τα συνέκρινε με αντίστοιχα MII ωάρια. Το ποσοστό επιβίωσης που παρουσίασε στα GV ωάρια ήταν 73,3%, αρκετά χαμηλότερα από το ποσοστό αυτής της μελέτης (95,23%) και το p value είναι $<0,0001$. Η στατιστική αυτή διαφορά οφείλεται και πάλι στη χρήση διαφορετικού πρωτοκόλλου, με αυτό της παρούσας μελέτης να είναι πιο αποτελεσματικό.

Το γενικότερο συμπέρασμα που προκύπτει είναι πως η χρήση της μεθόδου της υαλοποίησης και μάλιστα με τις συγκεντρώσεις και τους χρόνους που προτείνει η παρούσα μελέτη είναι πλήρως αποτελεσματική και μπορεί να ανοίξει το δρόμο στην αποτελεσματική κρυοσυντήρηση, τόσο ώριμων, όσο και ανώριμων ωαρίων, και μάλιστα και διασωθέντων και μη διασωθέντων GV ωαρίων.

5.2 ΩΡΙΜΑΝΣΗ GV ΩΑΡΙΩΝ

Δεύτερο κρίσιμο στάδιο της παρούσας μελέτης ήταν η ωρίμανση των GV ωαρίων που επιβίωσαν από την υαλοποίηση, και το ποσοστό ήταν 43%, προέκυψαν δηλαδή 42 MII ωάρια. Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε στην ωρίμανση των διασωθέντων, καθαρισμένων GV ωαρίων ήταν της Medicult, με τη διαφορά όμως ότι αντί για ορό του ασθενή, προστίθεντο 10% αλβουμίνη (Sage, HSA).

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι τα ωκύτταρα των θηλαστικών περιβάλλονται από στρώματα συμπαγών κυττάρων cumulus κατά τη διάρκεια της ωοθηλακιογένεσης. Τα κύτταρα cumulus ανταποκρίνονται στις γοναδοτροπίνες και εκκρίνουν διάφορες ουσίες. Οι ευεργετικές επιδράσεις των κυττάρων cumulus έχουν αναφερθεί στο κουνέλι **(139, 140)**, στο ποντίκι **(141)**, στον αρουραίο **(142)** και στον άνθρωπο **(143)**. Κάποιες από τις πιο σημαντικές αλλαγές που συμβαίνουν κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης συμπεριλαμβάνουν τη μεταγραφή, τη σύνθεση και τη μετα-μεταφραστική τροποποίηση των πρωτεϊνών, το μεταβολισμό της ενέργειας, την μεμβρανική μεταφορά και την κυτταρική συνεργασία. Παρ' όλα αυτά, η παρούσα μελέτη αποδεικνύει πως τα ανώριμα ωάρια χωρίς κύτταρα cumulus μπορούν επίσης να υποστηρίξουν την πρώιμη εμβρυική ανάπτυξη ακολουθώντας IVM σε κατάλληλο μέσο καλλιέργειας και κατάλληλο πρωτόκολλο, σε χαμηλά όμως ποσοστά, όπως αντίστοιχα

και σε άλλες βιβλιογραφικές αναφορές. Ακολουθεί σύγκριση της παρούσας μελέτης με παρόμοιες βιβλιογραφικές αναφορές ως προς τη στατιστική σημαντικότητα.

Κατ' επέκταση, ενώ σε αντίστοιχες μελέτες το ποσοστό παραμένει χαμηλό, σε κάποιες είναι υψηλότερο από αυτό που παρατηρήθηκε στην παρούσα μελέτη. Για παράδειγμα, στη μελέτη της Cao **(131)**, το ποσοστό ωρίμανσης ύστερα από την απόψυξη των κρυοσυντηρημένων ωαρίων ήταν μεγαλύτερο από την παρούσα μελέτη (43%) με ποσοστό 50,8% (95 MII ωάρια). Οι δυο βασικές διαφορές ανάμεσα στις 2 μελέτες ήταν πρώτον ότι στην περίπτωση αυτής της μελέτης τα ωάρια ήταν διασωθέντα, ενώ στην περίπτωση της Cao τα ωάρια προορίζονταν εξ αρχής για τη μέθοδο του IVM σε γυναίκες με πολυκυστικές ωοθήκες οπότε ακολούθησαν διαφορετικό πρωτόκολλο διέγερσης, και δεύτερον η χρήση διαφορετικού πρωτοκόλλου (TCM-199 στη μελέτη της Cao και Medicult στην παρούσα μελέτη) . Παρ' όλα αυτά, το p value συγκρίνοντας τη μελέτη της Cao με την παρούσα μελέτη είναι 0,2084, κάτι που σημαίνει πως η διαφορά αυτή δεν είναι στατιστικά σημαντική. Συμπερασματικά, τα ωάρια που είναι διασωθέντα μπορούν εξίσου να ωριμάσουν ακολουθώντας το πρωτόκολλο της παρούσας μελέτης.

Αντίστοιχα με τη μελέτη της Cao, ο Al-Khtib **(134)** παρουσίασε ποσοστό ωρίμανσης 41,8%. Το ποσοστό αυτό είναι μικρότερο από αυτό της παρούσας μελέτης κατά 1,2% αν και χρησιμοποίησε κι αυτός ωάρια για IVM όπως η Cao. Ο Al-Khtib χρησιμοποίησε διαφορετικό πρωτόκολλο ωρίμανσης από την Cao αλλά ίδιο με αυτό της παρούσας μελέτης (Medicult), με βασική διαφορά την προσθήκη ορού του ασθενή. Η διαφορά είναι μικρή, με το p value να υπολογίζεται 0,8633, άρα στατιστικά κρίνεται μη σημαντική. Ο πιθανός λόγος αυτής της μικρής διαφοράς ίσως είναι η διαφορετική πηγή ωαρίων, καθώς στην περίπτωσή της παρούσας μελέτης η πηγή ήταν από δότριες

ηλικίας $27,4 \pm 0,7$, ενώ στην περίπτωση του Al-Khtib ήταν γυναίκες που υπόκειντο σε υποβοηθούμενη αναπαραγωγή άρα υποβόσκει κάποια μορφή υπογονιμότητας και η ηλικία τους ήταν $32,2 \pm 4,1$. Συνεπώς, η ηλικία θα μπορούσε να είναι ένας σημαντικός παράγοντας για την ωρίμανση των ωαρίων. Τα σημαντικότερα συμπεράσματα που προκύπτουν, όμως, είναι ότι το συγκεκριμένο πρωτόκολλο ωρίμανσης ίσως να μην είναι τόσο αποτελεσματικό όσο άλλα πρωτόκολλα ωρίμανσης ωαρίων, καθώς επίσης και ότι η προσθήκη ή μη ανθρώπινου ορού ίσως και να μην είναι κρίσιμη διαφορά ώστε να παρουσιαστεί στατιστικά σημαντική διαφορά, όπως προκύπτει από τη σύγκριση της μελέτης του Al-Khtib με την παρούσα μελέτη.

Στην περίπτωση του Goud et al (**132**) το ποσοστό ωρίμανσης ήταν 33,3% και 61,3% για τα δυο γκρουπ που εξετάστηκαν στη μελέτη της ομάδας του με τα διαφορετικά πρωτόκολλα κρυοσυντήρησης. Το πολύ χαμηλό πρώτο ποσοστό πιθανών να οφείλεται σε καταστροφή των μηχανισμών ωρίμανσης των ωαρίων κατά την κρυοσυντήρηση, αν και με p value 0,3110, η διαφορά αυτή δεν είναι στατιστικά σημαντική. Στο δεύτερο γκρουπ του Goud η ύπαρξη κυττάρων cumulus στα GV ωάρια, σε αντίθεση με την μη ύπαρξη κυττάρων cumulus στα GV ωάρια της παρούσας μελέτης στην οποία τα ωάρια κρυοσυντηρούνταν μετά τον καθαρισμό με υαλουρονιδάση, πιθανόν να είναι ο λόγος για τα μεγαλύτερα ποσοστά ωρίμανσης, με διαφορά 18,3% από αυτά της παρούσας μελέτης. Το p value στη δεύτερη περίπτωση είναι 0,0757, οριακά στατιστικά σημαντικό, κάτι που μας αποδεικνύει πως η ύπαρξη των κυττάρων cumulus ενδεχομένως να είναι απαραίτητα για την ωρίμανση των GV ωαρίων.

Στη μελέτη της Boiso (**144**), τα ωάρια που τελικά ωρίμασαν ήταν 48, το ποσοστό ωρίμανσης δηλαδή ήταν 72,7% χρησιμοποιώντας το πρωτόκολλο της Vitrolife. Η μελέτη

της Boiso έδειξε πως το ποσοστό ωρίμανσης δεν επηρεάζεται από την κρυοσυντήρηση καθώς τα ποσοστά ήταν τα ίδια με αυτά του control της ίδιας. Η διαφορά που υπάρχει στο ποσοστό ωρίμανσης, η οποία είναι 29,7% συγκριτικά με αυτό της παρούσας μελέτης φαίνεται να οφείλεται και πάλι στο πρωτόκολλο ωρίμανσης, κάτι που επιβεβαιώνει και το p value, το οποίο είναι 0,0002, και το πρωτόκολλο του Boiso αποδεικνύεται στατιστικά αποτελεσματικότερο από αυτό της παρούσας μελέτης.

Το 2006 ο Isachenko V. **(133)** δοκίμασε διαφορετικά πρωτόκολλα κρυοσυντήρησης με τη χρήση DMSO, EG και σουκρόζης σε διάφορες συνδυασμούς, συγκεντρώσεις και χρόνους, καθώς και τη χρήση τόσο κλειστού όσο και ανοιχτού συστήματος, και τα ποσοστά ωρίμανσης που παρουσίασε ήταν 71% (ανοιχτό σύστημα-ύπαρξη DMSO), 68% (κλειστό σύστημα-απουσία DMSO-μακρύ πρωτόκολλο) και 72% (κλειστό σύστημα-απουσία DMSO-σύντομο πρωτόκολλο), σε δείγμα 350 συνολικά ανθρώπινων GV διασωθέντων ωαρίων από κύκλους με διέγερση σε υπογόνιμα ζευγάρια. Η μελέτη του Isachenko διέφερε σε πολλά σημεία με την παρούσα, όπως στις συγκεντρώσεις των κρυοπροστατευτικών, τους χρόνους έκθεσης σε αυτά και το πρωτόκολλο IVM. Στη μελέτη του Isachenko όλα τα GV ωάρια τοποθετούνταν μετά την απόψυξη τους σε καλλιεργητικό της Vitrolife. Τα μεγαλύτερα ποσοστά ωρίμανσης παρατηρήθηκαν στο πρωτόκολλο όπου χρησιμοποίησε κλειστό σύστημα, κάτι που επιβεβαιώνει και η παρούσα μελέτη. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί πως στην παρούσα μελέτη κατά την υαλοποίηση, στο τελευταίο στάδιο του 20% περιλαμβανόταν η χρήση φικόλης, σε αντίθεση με την Isachenko. Τα παραπάνω επιβεβαιώνουν και τα p value , τα οποία είναι 0,0002, 0,3272, 0,0006 και 0,0001, αντίστοιχα, αναδεικνύοντας στατιστικά σημαντική τη διαφορά, με τα αποτελέσματα του Isachenko να φαίνονται πιο

αποτελεσματικά. Στη μελέτη του Isachenko, όμως, δεν αναφέρεται το ποσοστό επιβίωσης των κρυοσυντηρημένων GV ωαρίων, γι' αυτό και δεν μπορούμε να κρίνουμε αν το πρωτόκολλο κρυοσυντήρησης ή το πρωτόκολλο ωρίμανσης είναι υπεύθυνο για τα υψηλότερα ποσοστά ωρίμανσης του Isachenko έναντι της παρούσας μελέτης. Ένα γενικό συμπέρασμα που θα μπορούσε να προκύψει, παρ' όλα αυτά, είναι ότι χρησιμοποιώντας υαλοποίηση (vitrification) ως μέθοδο κρυοσυντήρησης είναι αποτελεσματικότερος τρόπος από αυτή της αργής κατάψυξης (slow freezing), κάτι που αποδεικνύεται και από τη μελέτη του Isachenko και την παρούσα μελέτη, καθώς και από το control group της παρούσας μελέτης.

Ο Sereni **(130)** παρουσίασε ποσοστά ωρίμανσης 66,6%, ωριμάζοντας 44 ωάρια από τα 66 που επιβίωσαν της κρυοσυντήρησης και p value 0,0030 χρησιμοποιώντας το TCM-199 συν 0,5% HAS, 0.05 mg/ml penicillin, 0.075 mg/ml streptomycin, 0.037 g/l sodium pyruvate και 0.1 g/l L-Glutamine για την ωρίμανση των διασωθέντων ανώριμων ωαρίων που είχαν επιβιώσει από την κρυοσυντήρηση. Τα ωάρια που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη του Sereni ήταν και αυτά χωρίς κύτταρα cumulus γι' αυτό και το στατιστικά σημαντικό υψηλότερο ποσοστό ωρίμανσης, ενδεχομένως να οφείλεται στο διαφορετικό και προφανώς αποτελεσματικότερο πρωτόκολλο ωρίμανσης ωαρίων από αυτό της παρούσας μελέτης το οποίο έδωσε ποσοστό ωρίμανσης 43%.

Όταν η σύγκριση γίνεται με μελέτες τα GV ωάρια των οποίων είναι μεν διασωθέντα αλλά δεν έχουν υποστεί τη διαδικασία της κρυοσυντήρησης, τα ποσοστά αλλάζουν.

Ξεκινώντας, το 2012 η Escrich et al **(135)** παρουσίασε 88,9% ωρίμανση ωαρίων, σε δείγμα 99 ανώριμων ωαρίων, χρησιμοποιώντας το πρωτόκολλο της Vitrolife (CCM). Τα κοινά σημεία με την Escrich ήταν ο καθαρισμός των ωαρίων και η ωρίμανσή τους χωρίς

την ύπαρξη των κυττάρων cumulus. Η κρυοσυντήρηση και η χρήση διαφορετικού πρωτοκόλλου IVM όμως, ενδέχεται να επηρέασε τα ποσοστά της παρούσας μελέτης, με αποτέλεσμα, το p value να είναι $<0,0001$, και τα αποτελέσματα της Escrich να είναι και στατιστικά σημαντικά. Συμπερασματικά, η κρυοσυντήρηση ωαρίων θα μπορούσε να επιβαρύνει τα ωάρια και να μην τους επιτρέψει να ωριμάσουν μετά τη χρήση της μεθόδου IVM.

Το 2010 ο Reichman **(137)** μελέτησε 185 διασωθέντα GV ωάρια από κύκλους με διέγερση, κάνοντας IVM στα GV ωάρια που προέκυπταν μετά των καθαρισμό με υαλουρονιδάση. Το πρωτόκολλο που επιλέχθηκε από τον Reichman για την ωρίμανση των GV ωαρίων ήταν το SAGE IVM (CooperSurgica, Trumbull, CT) χωρίς έξτρα προσθήκη συμπληρώματος πρωτεΐνης. Τα ποσοστά ωρίμανσης που παρουσίασε ήταν 35,1%. Όπως στην περίπτωση του Reichman, έτσι και στην παρούσα, τα χαμηλά ποσοστά ωρίμανσης ενδεχομένως να οφείλονται στον καθαρισμό των ωαρίων με υαλουρονιδάση και τη μη προσθήκη ορού του ασθενή στο ίδιο πρωτόκολλο ωρίμανσης ωαρίων που χρησιμοποιήθηκε. Το συμπέρασμα αυτό αποδεικνύεται και από το p value, το οποίο είναι 0,1902, καθιστώντας τις διαφορές μεταξύ των δυο εργασιών, μη στατιστικά σημαντικές. Αν και μη στατιστικά σημαντική, η διαφορά της τάξεως του 8,9% μεταξύ της μελέτης του Reichman και της παρούσας μελέτης, με την παρούσα μελέτη να υπερισχύει το οποίο πιθανώς να οφείλεται στο γεγονός ότι στην παρούσα μελέτη έγινε προσθήκη συμπληρώματος πρωτεΐνης, ενώ στην περίπτωση του Reichman δεν έγινε.

Μια ακόμα μελέτη που επιβεβαιώνει πως το κατάλληλο πρωτόκολλο ωρίμανσης δίνει μεγαλύτερα ποσοστά ωρίμανσης, είναι αυτή του Chian **(138)**, ο οποίος το 2002

μελέτησε την ωρίμανση 213 διασωθέντων και καθαρισμένων GV ωαρίων ακολουθώντας και συγκρίνοντας 2 πρωτόκολλα και παρουσίασε ποσοστά ωρίμανσης 75,7% και 55,7% με τη χρήση του IVM-medium ("homemade") και TCM-199 (Gibco) αντίστοιχα. Τα *p* value μάλιστα, τα οποία είναι <0,0001 και 0,0691 αντίστοιχα αναδεικνύουν τη χρήση αποτελεσματικότερου πρωτοκόλλου από τον Chian, έναντι της παρούσας μελέτης όπου το ποσοστό ωρίμανσης ήταν 43% χρησιμοποιώντας το πρωτόκολλο της Medicult.

Μια πολύ σημαντική μελέτη, έγινε το 2000 από τον Kim **(91)** ο οποίος μελέτησε την ωρίμανση 168 διασωθέντων GV ωαρίων από κύκλους με διέγερση και παρουσίασε ποσοστό ωρίμανσης 66,7%. Το πρωτόκολλο ωρίμανσης που χρησιμοποίησε ήταν μια παραλλαγή του πρωτοκόλλου του Tyrode **(136)**, με σημαντική διαφορά την προσθήκη υγρού από τα ωοθυλάκια. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η φυγοκέντρωση των tubes με το ωοθυλακικό υγρό στους 300 g για 10 λεπτά για να αφαιρεθούν τα αιμοποιητικά και κοκκώδη κύτταρα, η αδρανοποίηση του υπερκειμένου στους 56° C για 30 λεπτά, το φιλτράρισμα του υγρού και η αποθήκευσή του στους 20° C. Στη μελέτη του Kim χρησιμοποιήθηκαν GV ωάρια με κύτταρα cumulus και χωρίς, και το συμπέρασμα ήταν ότι το ποσοστό ωρίμανσης δεν σχετιζόταν με την ύπαρξη ή μη των κυττάρων cumulus. Στην παρούσα μελέτη, βέβαια, δεν υπήρξε σύγκριση με GV ωάρια με και χωρίς cumulus οπότε και δεν ήταν δυνατόν να βεβαιωθεί αν το χαμηλό ποσοστό ωρίμανσης οφείλεται στην έλλειψη κυττάρων cumulus. Το *p* value παρ' όλα αυτά είναι 0,0001, κάτι που σημαίνει πως το πρωτόκολλο του Kim είναι και αυτό πιο αποτελεσματικό από αυτό της παρούσας μελέτης.

Το συμπέρασμα που προκύπτει είναι ότι τα ανώριμα GV ωάρια μπορούν να συνεχίσουν την ωρίμανσή τους ακόμα και χωρίς την ύπαρξη των κυττάρων cumulus και ακόμα και αν προέρχονται από διεγερμένους κύκλους υποβοηθούμενης αναπαραγωγής και έχουν περάσει και τη διαδικασία της υαλοποίησης. Με κάποιες διαφοροποιήσεις του πρωτοκόλλου ωρίμανσης, τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης θα ήταν ακόμα μεγαλύτερα. Οι διαφοροποιήσεις αυτές, χρησιμοποιώντας και πάλι το πρωτόκολλο της Medicult, θα μπορούσαν να είναι η προσθήκη ορού στα υλικά ωρίμανσης και φυσικά η ύπαρξη κυττάρων cumulus όσο αυτό είναι δυνατό για τη σωστή αξιολόγησή τους.

5.3 ΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΕΞΕΛΙΞΗ ΕΜΒΡΥΩΝ

Τα αποτελέσματα που αφορούν τη γονιμοποίηση και την εξέλιξη των εμβρύων έως και την 5^η μέρα, μέχρι δηλαδή το στάδιο της βλαστοκύστης, είναι 72.1% στη γονιμοποίηση, 66.67% για τα έμβρυα που συνέχιζαν την ανάπτυξή τους έως την 2^η-3^η μέρα και 6.5% για τα έμβρυα που έφτασαν μέχρι το στάδιο της βλαστοκύστης, δηλαδή 2 βλαστοκύστες μέτριας μορφολογίας. Η γονιμοποίηση έγινε με δείγμα σπέρματος dotών με φυσιολογικές παραμέτρους ως προς τη συγκέντρωση, τη γενική κινητικότητα, την πρόσθια κινητικότητα και τη μορφολογία, με τη μέθοδο της μικρογονιμοποίησης. Τα γονιμοποιημένα ωάρια τοποθετούνταν σε καλλιεργητικό υλικό Sage-1-step και ελέγχονταν την 1^η, τη 2^η/3^η και την 5^η μέρα ανάπτυξής τους. Τα ποσοστά που παρατηρήθηκαν είναι ελπιδοφόρα και μας δείχνουν πως τελικά τα ανώριμα GV ωάρια μπορούν να είναι αξιοποιήσιμα, να γονιμοποιηθούν και να αναπτυχθούν μέχρι και το στάδιο της βλαστοκύστης.

Όταν η σύγκριση ξεκινάει με το control group, όπου τα αποτελέσματα είναι 75,92%, 92,68% και 58,53% για τη γονιμοποίηση, την εξέλιξη και την κατάληξη σε βλαστοκύστες

αντίστοιχα, τα συμπεράσματα χρήζουν ανάλυσης και αναζήτησης βελτίωσης του πρωτοκόλλου ωρίμανσης που χρησιμοποιήθηκε στα GV ωάρια κατά την παρούσα μελέτη. Πιο συγκεκριμένα, αναλύοντας τα P value, τα οποία είναι 0.6727, 0.0054, και 0.0001 αντίστοιχα, παρατηρούμε ότι μπορεί μέχρι και το στάδιο της γονιμοποίησης, τα δυο γκρουπ να έχουν παρόμοια ποσοστά, στη συνέχεια όμως η διαφορά γίνεται στατιστικά σημαντική τόσο κατά το στάδιο 2^{ης}/3^{ης} μέρας, όσο και κατά το στάδιο της βλαστοκύστης. Τα αποτελέσματα αυτά, όμως είναι αναμενόμενα, καθώς τα GV ωάρια ήταν διασωθέντα από διεγερμένους κύκλους, κάτι που συνεπάγεται την χαμηλότερη ποιότητα σε σχέση με τα αντίστοιχα MII ωάρια. Με ένα πιο αποτελεσματικό πρωτόκολλο ωρίμανσης των ανώριμων ωαρίων, όμως, ίσως η διαφορά να μην ήταν τόσο στατιστικά σημαντική. Γι' αυτό και η βελτίωση του πρωτοκόλλου είναι ο πρώτος στόχος των επόμενων αντίστοιχων μελετών.

Όταν φτάνουμε στο σημείο της σύγκρισης με άλλες μελέτες, υπάρχει σύγκριση με διασωθέντα ανώριμα GV ωάρια που έχουν ωριμάσει και γονιμοποιηθεί αλλά δεν έχουν κρυοσυντηρηθεί, με μη διασωθέντα ανώριμα GV ωάρια που έχουν κρυοσυντηρηθεί, ωριμάσει και γονιμοποιηθεί και με διασωθέντα κρυοσυντηρημένα ανώριμα GV ωάρια που έχουν ωριμάσει και υποστεί τη διαδικασία της γονιμοποίησης αλλά μόνο μέχρι το στάδιο της γονιμοποίησης.

Πιο συγκεκριμένα, η Cao **(131)**, χρησιμοποιώντας μη διασωθέντα ωάρια, το ποσοστό που παρουσίασε για τη γονιμοποίηση των ανώριμων ωαρίων που κρυοσυντηρήθηκαν και ωρίμασαν ήταν 62,1%, 69,5% για τα έμβρυα που συνέχισαν την ανάπτυξή τους έως την 3^η μέρα και 0% για τα έμβρυα 5^η μέρας. Τα p value, τα οποία είναι 0.2531, 0.7870 και 0.1017 αντίστοιχα, δείχνουν πως οι διαφορές αυτές δεν είναι στατιστικά

σημαντικές. Οι μικρές διαφορές που φαίνονται στη γονιμοποίηση και την ανάπτυξη των εμβρύων, παρ' όλα αυτά, πιθανώς να οφείλονται σε χειρισμούς κατά τη διάρκεια της μικρογονιμοποίησης, ποιότητα των δειγμάτων σπέρματος και στο υλικό καλλιέργειας όπου τοποθετούνταν τα έμβρυα μετά τη γονιμοποίηση, τα οποία στην παρούσα μελέτη ήταν Sage-1-step, ενώ στη μελέτη της Cao ήταν υλικά της Vitrolife-sequential media.

Στην περίπτωση του Goud **(132)**, τα ποσοστά γονιμοποίησης στα μη διασωθέντα, κρυοσυντηρημένα ανώριμα ωάρια που ωρίμασαν μετά από IVM, ήταν 58,3% και 57,9% για τις δυο ομάδες με διαφορετικό πρωτόκολλο κρυοσυντήρησης αντίστοιχα. Από αυτά, το 42,8% και το 90,9% έφτασαν μέχρι και την 3^η μέρα ανάπτυξης, όπου και σταμάτησε η παρατήρησή τους, καθώς η μελέτη δεν έφτασε μέχρι την 5^η μέρα. Τα ποσοστά γονιμοποίησης είναι παρόμοια μεταξύ τους αλλά χαμηλότερα από αυτά της παρούσας μελέτης, χωρίς όμως να είναι στατιστικά σημαντικά (p value=0.3663/0.2761 για τη γονιμοποίηση και 0.2475/0.1254 για τα έμβρυα 3^{ης} μέρας) δείχνοντας και πάλι πως η μικρή διαφορά πιθανό να οφείλεται και πάλι σε χειρισμούς κατά τη διάρκεια της μικρογονιμοποίησης, την ποιότητα των δειγμάτων σπέρματος και στο υλικό καλλιέργειας όπου τοποθετούνταν τα έμβρυα μετά τη γονιμοποίηση. Βασική διαφορά στις δύο μελέτες είναι πως τα δείγματα σπέρματος στην μελέτη του Goud έμεναν στον κλίβανο σε καλλιεργητικό υλικό για 24-48 ώρες μέχρι την ωρίμανση των ωαρίων, ενώ στην παρούσα μελέτη, τα δείγματα σπέρματος προέρχονταν από δότες σπέρματος και τα οποία αποψύχονταν την ίδια μέρα με την ωρίμανση των ωαρίων.

Στην περίπτωση των διασωθέντων ωαρίων, ο Reicherman **(137)** μελετώντας ανώριμα GV ωάρια τα οποία δεν είχαν υποστεί τη διαδικασία της κρυοσυντήρησης, και ωριμάζοντας με τον ίδιο καλλιεργητικό μέσο με αυτό της παρούσας μελέτης,

παρουσίασε ποσοστά γονιμοποίησης 60%. Το p value είναι 0.2029 κάτι που μας δείχνει πως δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων του Reichman και της παρούσας μελέτης. Η μελέτη δεν προχώρησε την παρατήρηση της ανάπτυξης των γονιμοποιημένων ωαρίων, οπότε η σύγκριση που μπορεί να υπάρξει είναι μέχρι το στάδιο της γονιμοποίησης, όπου η παρούσα μελέτη παρουσιάζει μεγαλύτερο ποσοστό, και ο λόγος πέραν του διαφορετικού καλλιεργητικού υλικού (Vitrolife) είναι και πάλι η χρήση δειγμάτων σπέρματος τα οποία έμεναν στον κλίβανο σε καλλιεργητικό υλικό για 24-48 ώρες μέχρι την ωρίμανση των ωαρίων, σε αντίθεση με τα αποψυχθέντα την ίδια μέρα δείγματα σπέρματος δοτών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη.

Συνεχίζοντας με τα διασωθέντα ανώριμα GV ώρια, στη μελέτη του Chian **(138)**, τα ποσοστά γονιμοποίησης, ανάπτυξης μέχρι την 3^η μέρα και ανάπτυξης μέχρι της 5^η μέρα είναι 86,4%/78%, 58,6%/40,9% και 12,9%/0% αντίστοιχα για τις δύο ομάδες ωαρίων που μελέτησε. Οι διαφορές μεταξύ των δυο ομάδων προφανώς οφείλονται στη χρήση διαφορετικού πρωτοκόλλου IVM, και πιθανών αυτός να είναι και ο λόγος ύπαρξης της μικρής μεν αλλά αποσπασματικά στατιστικά σημαντικής διαφοράς μεταξύ των ποσοστών του Chian και της παρούσας μελέτης. Πιο συγκεκριμένα, τα σημεία όπου υπάρχει στατιστική σημαντικότητα είναι στο στάδιο της γονιμοποίησης του 1^{ου} γκρουπ του Chian, όπου τα ποσοστά του είναι μεγαλύτερα, και στο στάδιο της εξέλιξης των εμβρύων 2^{ης}/3^{ης} μέρας όπου το ποσοστό της παρούσας μελέτης είναι μεγαλύτερο με στατιστική σημαντικότητα από αυτά του Chian. Επειδή, όμως, η διαφορά στα ποσοστά βλαστοκύστεων δεν είναι στατιστικά σημαντική, ενδέχεται οι παραπάνω διαφορές να είναι μεν στατιστικά σημαντικές, αλλά όχι εργαστηριακά σημαντικές μιας και οι

διαφορές στα ποσοστά των βλαστοκύστεων δεν φαίνονται να είναι στατιστικά σημαντικές. Οι οποιεσδήποτε διαφορές που υπάρχουν παρ' όλα αυτά είναι πιθανό να οφείλονται σε χειρισμούς κατά τη διάρκεια της μικρογονιμοποίησης, την ποιότητα των δειγμάτων σπέρματος καθώς και στο υλικό καλλιέργειας όπου τοποθετούνταν τα έμβρυα μετά τη γονιμοποίηση.

Τέλος, στη μελέτη του Sereni **(130)**, ο οποίος μελέτησε διασωθέντα ανώριμα GV ωάρια, τα οποία κρυσυντήρησε και ωρίμασε με τη χρήση της μεθόδου IVM, τα ποσοστά γονιμοποίησης που παρουσίασε ήταν 60%. Η μελέτη δεν συνεχίστηκε πέραν της μέρας του ελέγχου της γονιμοποίησης και οι ερευνητές δεν αναφέρουν την ποιότητα των δειγμάτων σπέρματος, γι' αυτό και η σύγκριση είναι δύσκολη, αν και πιθανών οι διαφορές στα ποσοστά γονιμοποίησης να οφείλονται και πάλι σε χειρισμούς κατά τη διάρκεια της μικρογονιμοποίησης, την ποιότητα των δειγμάτων σπέρματος και στο υλικό καλλιέργειας όπου τοποθετούνταν τα έμβρυα μετά τη γονιμοποίηση. Η παραπάνω διαφορά, αν και στατιστικά σημαντική (p value=0.0602) δεν είναι αρκετή για να αποδείξει την χρήση αποτελεσματικότερου πρωτοκόλλου κατά την παρούσα μελέτη, μιας και δεν υπάρχουν δεδομένα για την εξέλιξη των γονιμοποιημένων ωαρίων της μελέτης του Sereni.

Συμπερασματικά, με την βοήθεια της παρούσας μελέτης αποδεικνύεται πως τα διασωθέντα GV ωάρια μπορούν τόσο να κρυσυντηρηθούν, όσο και να ωριμάσουν με τη χρήση IVM αλλά και να γονιμοποιηθούν με επιτυχία και να φτάσουν μέχρι και το στάδιο της βλαστοκύστης. Τα ποσοστά που παρουσιάζονται στην παρούσα μελέτη αλλά και σε άλλες μελέτες της βιβλιογραφίας δείχνουν πως τα πρωτόκολλα ωρίμανσης χρήζουν βελτίωσης ώστε τόσο το ποσοστό όσο και η ποιότητα των βλαστοκύστεων να

αυξηθεί, κάτι που είναι και το βασικότερο μέλημα σε μια προσπάθεια ιατρικώς υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, ώστε να επιτευχθεί εμβρυομεταφορά, εγκυμοσύνη και γέννηση υγιούς παιδιού.

6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Οι τεχνικές της κρυοσυντήρησης ωαρίων έχουν βελτιωθεί πολύ τα τελευταία χρόνια και γίνονται συνεχώς μελέτες για την περαιτέρω βελτίωσή τους. Για το σκοπό αυτό γίνονται μελέτες τόσο σε ώριμα MII ωάρια όσο και σε GV ωάρια με τελικό σκοπό την αύξηση των διαθέσιμων ωαρίων σε προγράμματα ιατρικώς υποβοηθούμενης αναπαραγωγής.

Μία από αυτές τις μελέτες είναι και η παρούσα, στην οποία χρησιμοποιήθηκαν διασωθέντα ανώριμα GV ωάρια από το πρόγραμμα δωρεάς ωαρίων. Από τα ανώριμα GV ωάρια που προέκυψαν από τις ωοληψίες μετά από ορμονική διέγερση, αφαιρέθηκαν τα κύτταρα cumulus και κρυοσυντηρήθηκαν με την μέθοδο της υαλοποίησης με τη χρήση κλειστού συστήματος. Στη συνέχεια, ακολούθησε η απόψυξή τους και η ωρίμανσή τους σε καλλιεργητικό μέσο της Medicult, με την προσθήκη 10% αλβουμίνης αντί ορού του ασθενή. Όσα ωάρια έφτασαν το στάδιο MII γονιμοποιήθηκαν με σπέρμα δότη, τοποθετήθηκαν σε καλλιεργητικό μέσο Sage 1-step και ακολούθησε παρατήρηση της γονιμοποίησης τους, καθώς και της εξέλιξης των εμβρύων που προέκυψαν μέχρι το στάδιο της βλαστοκύστης. Τα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν ήταν 95,23% για το ποσοστό επιβίωσης, 43% για το ποσοστό ωρίμανσης, 72,1% για το ποσοστό γονιμοποίησης, 66,67% για το ποσοστό εξέλιξης μέχρι 2^η/3^η μέρα και 6,5% για το ποσοστό των βλαστοκύστεων. Τόσο βάση της

σύγκρισης αυτών των αποτελεσμάτων με το control group, το οποίο περιλάμβανε ώριμα MII ωάρια τα οποία υπέστησαν κι αυτά τη διαδικασία της κρυοσυντήρησης και γονιμοποιήθηκαν με το εκάστοτε σπέρμα του συζύγου των ληπτριών, όσο και με μελέτες της βιβλιογραφίας, τα συμπεράσματα που προκύπτουν είναι ελπιδοφόρα ως προς τη χρήση των πρωτοκόλλων της παρούσας μελέτης. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε πως το πρωτόκολλο κρυοσυντήρησης αποδείχθηκε αποτελεσματικότερο από οποιαδήποτε άλλη μελέτη της βιβλιογραφίας, καθιστώντας την χρήση κλειστού συστήματος υαλοποίησης με το πρωτόκολλο της παρούσας μελέτης τη βέλτιστη επιλογή για την κρυοσυντήρηση τόσο MII όσο και GV ωαρίων. Στη συνέχεια παρατηρήθηκε πως το πρωτόκολλο ωρίμανσης των ωαρίων αν και ήταν αποσπασματικά αποτελεσματικό, δεν φαίνεται να είναι το καταλληλότερο για την ωρίμανση των διασωθέντων GV ωαρίων και χρήζει βελτιώσεις. Επίσης, παρατηρήθηκε πως η αντικατάσταση του ορού ασθενή με αλβουμίνη στο πρωτόκολλο ωρίμανσης ίσως και να είναι ένας από τους λόγους για τα χαμηλότερα ποσοστά ωρίμανσης συγκριτικά με αυτά της βιβλιογραφίας. Μια τελευταία παρατήρηση αφορά την έλλειψη κυττάρων cumulus στα διασωθέντα GV ωάρια που μελετήθηκαν στην παρούσα μελέτη και πιο συγκεκριμένα το ενδεχόμενο η έλλειψη αυτή να είναι καθοριστικής σημασίας για την ωρίμανση των GV ωαρίων και το ενδεχόμενο αυτός να είναι ο λόγος των συγκριτικά χαμηλότερων ποσοστών ωρίμανσης.

7. ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ – ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

Ο χώρος της κρυοσυντήρησης ωαρίων αποτελεί φλέγον θέμα μελέτης γι' αυτό και οι προοπτικές εξέλιξης της παρούσας μελέτης κρίνονται απαραίτητες ώστε να εξελιχθούν οι μέθοδοι που παρουσιάζονται στην παρούσα μελέτη και να μπορούν πλέον να

κρυοσυντηρούνται αλλά και να ωριμάζουν τα διασωθέντα GV ωάρια και να είναι και αυτά αξιοποιήσιμα σε προγράμματα ιατρικώς υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Όσον αφορά τη μέθοδο κρυοσυντήρησης, η παρούσα μελέτη απέδειξε πως το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε είναι απόλυτα αξιόπιστο και αποτελεσματικό και προτείνεται για χρήση σε προγράμματα ιατρικώς υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Επίσης, προτείνεται η χρήση καλύτερου πρωτοκόλλου ωρίμανσης ωαρίων και συγκεκριμένα χρήση ορού του ασθενούς στα καλλιεργητικά υλικά, η οποία ίσως να είναι υπεύθυνη για υψηλότερα ποσοστά ωρίμανσης από αυτά της παρούσας μελέτης. Κυρίως, όμως, όσον αφορά το πρωτόκολλο ωρίμανσης, προτείνεται η ύπαρξη κυττάρων cumulus, καθώς χάρη σε αυτά μπορεί επίσης να επιτευχθεί μεγαλύτερο ποσοστό ωρίμανσης. Για αυτούς τους δυο παραπάνω λόγους, θα ήταν πολύ χρήσιμο να ακολουθήσουν μελέτες που θα συγκρίνουν την αποτελεσματικότητα τόσο της ύπαρξης ορού στα καλλιεργητικά, όσο και της ύπαρξης κυττάρων cumulus στα ανώριμα GV ωάρια. Όπως επίσης, η ύπαρξη ενός νέου, πιο αποτελεσματικού και πιο εύχρηστου πρωτοκόλλου ωρίμανσης θα ήταν αρκούντως χρήσιμο και ευεργετικό. Μάλιστα, θα ήταν πιο εποικοδομητικό, οι μελλοντικές εργασίες με παρόμοιο θέμα να μην μένουν στο στάδιο της ωρίμανσης, αλλά να προχωράνε σε γονιμοποίηση και εξέλιξη μέχρι το στάδιο της βλαστοκύστης. Βέλτιστο θα ήταν να υπάρξουν μελέτες που θα αναλύσουν γενετικά τις βλαστοκύστες που θα προκύψουν για να ελεγχθεί και το γενετικό τους προφίλ. Τέλος, θα πρέπει να ακολουθήσουν περισσότερες μελέτες στις οποίες θα γίνει εμβρυομεταφορά εμβρύων που θα προέρχονται από διασωθέντα ανώριμα GV ωάρια μετά από κρυοσυντήρηση και ωρίμανση αυτών, με σκοπό την ουσιαστική διερεύνηση της χρησιμότητας των ανώριμων GV ωαρίων. Σε περίπτωση που υπάρξει ένα αισιόδοξο αποτέλεσμα κλινικών εγκυμοσυνών και γεννήσεων υγιών παιδιών με τη χρήση τέτοιων

ωαρίων, τότε ο αριθμός των διαθέσιμων ωαρίων σε κάθε προσπάθεια υποβοηθούμενης αναπαραγωγής θα είναι μεγαλύτερος, κάτι που συνεπάγεται μεγαλύτερο αριθμό εμβρύων και μεγαλύτερες πιθανότητες για κλινική εγκυμοσύνη και γέννηση παιδιού.

8. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΤΙΚΑ

- Τα διασωθέντα GV ωάρια είναι ικανά να κρυοσυντηρηθούν και να επιβιώσουν από την κρυοσυντήρηση
- Τα διασωθέντα GV ωάρια μπορούν να ωριμάσουν σε ώριμα MII ωάρια
- Τα διασωθέντα GV ωάρια είναι ικανά να αναπτυχθούν σε έμβρυα και μάλιστα μέχρι το στάδιο της βλαστοκύστης
- Το πρωτόκολλο υαλοποίησης που χρησιμοποιήθηκε είναι αποτελεσματικό και μπορεί να χρησιμοποιηθεί τόσο για την κρυοσυντήρηση ανώριμων, αλλά και ώριμων ωαρίων με πολύ υψηλά ποσοστά επιβίωσης
- Το πρωτόκολλο ωρίμανσης που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη κρίνεται μερικώς αποτελεσματικό
- Το πρωτόκολλο ωρίμανσης θα έπρεπε να περιλαμβάνει χρήση ορού ασθενούς καθώς και κύτταρα cumulus στα ωάρια, με σκοπό υψηλότερα ποσοστά ωρίμανσης χρησιμοποιώντας το πρωτόκολλο της Medicult
- Σε περίπτωση βελτιστοποίησης του πρωτοκόλλου, ο αριθμός των διαθέσιμων ωαρίων σε κάθε προσπάθεια υποβοηθούμενης αναπαραγωγής θα είναι μεγαλύτερος, κάτι που συνεπάγεται μεγαλύτερο αριθμό εμβρύων και μεγαλύτερες πιθανότητες για κλινική εγκυμοσύνη και γέννηση παιδιού
- Προτείνονται μελλοντικές μελέτες για την αποτελεσματικότητα των κυττάρων cumulus
- Προτείνεται η μελέτη ενός πιο εύχρηστου υλικού ωρίμανσης
- Προτείνονται μελλοντικές μελέτες στις οποίες οι βλαστοκύστες που θα προκύψουν θα αναλυθούν γενετικά

- Προτείνονται μελλοντικές μελέτες, οι οποίες θα καταλήξουν σε εμβρυομεταφορά των βλαστοκύστεων που θα προκύψουν

9. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Polge C, Smith AU, Parkes AS. **Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures.** Nature 1949; 164: 666
2. Smith AU, Polge C. **Survival of spermatozoa at low temperatures.** Nature 1950; 166: 668–669
3. Polge C. **Fertilizing capacity of bull spermatozoa after freezing at 79 degrees C.** Nature 1952; 169: 626–627
4. Bunge RG, Sherman JK. **Fertilizing capacity of frozen human spermatozoa.** Nature 1953; 172: 767–768
5. Sherman JK, Lin TP. **Survival of unfertilized mouse eggs during freezing and thawing.** Proc Soc Exp Biol Med 1958; 98: 902–905
6. Smith AU. **Behaviour of fertilized rabbit eggs exposed to glycerol and to low temperatures.** Nature 1952; 170: 374–375
7. Lovelock J. **The protective action of neutral solutes against haemolysis by freezing and thawing.** Biochem J 1954; 56: 265–270
8. Averill, R.L.W., Rowson, L.E.A. **Attempts at storage of sheep ova at low temperatures. J. Agric. Sci. 1959; 52: 392–395e eggs.** Fertil. Steril. 1959; 10: 384–387
9. Averill, R.L.W., Rowson, L.E.A. **Attempts at storage of sheep ova at low temperatures.** J. Agric. Sci. 1959; 52: 392–395
10. Mazur, P. **Cryobiology: the freezing of biological systems.** Science 1970; 168: 939–949

11. Whittingham, D.G., Leibo, S.P., Mazur, P. **Survival of mouse embryos frozen to 196 degrees and 269 degrees** C. Science 1972; 178: 411–414
12. Whittingham, D.G. **Fertilization in vitro and development to term of unfertilized mouse oocytes previously stored at 196 degrees** C. J. Reprod. Fertil. 1977; 49: 89–94
13. Kasai, M., Iritani, A., Chang, M.C. **Fertilization in vitro of rat ovarian oocytes after freezing and thawing.** Biol. Reprod. 1979; 21: 839–844
14. Critser, J.K., Arneson, B.W., Aaker, D.V., Ball, G.D. **Cryopreservation of hamster oocytes: effects of vitrification or freezing on human sperm penetration of zona-free hamster oocytes.** Fertil. Steril. 1986; 46: 277–284
15. Diedrich, K., Al-Hasani, S., Van der Ven, H., Krebs, D. **Successful in vitro fertilisation of frozen–thawed rabbit and human oocytes.** J. IVF. ET. 1986; 3: 65
16. DeMayo, F.J., Rawlins, R.G., Dukelow, W.R. **Xenogenous and in vitro fertilization of frozen/thawed primate oocytes and blastomere separation of embryos.** Fertil. Steril. 1985; 43, 295–300
17. Ri-Cheng Chian & Patrick Quinn, **Fertility Cryopreservation.** Cambridge University Press. 2010; 1-9
18. Leibo S. P., Thomas B. Pool. **The principal variables of cryopreservation: solutions, temperatures, and rate changes.** Fertility and Sterility. 2011; 96: 269-276
19. Mazur P. **Limits to life at low temperatures and at reduced water contents and water activities.** Orig Life 1980; 10: 137–159
20. Karlsson, Jens O M, Abdelmoneim I Younis, Anthony W S Chan, Kenneth G Gould, and Ali Eroglu. **Permeability of the Rhesus Monkey Oocyte Membrane to Water**

- and Common Cryoprotectants.** Molecular Reproduction and Development 2009; 76: 321–333
21. Agca, Y, J Liu, A T Peter, E S Critser, and J K Critser. **Effect of Developmental Stage on Bovine Oocyte Plasma Membrane Water and Cryoprotectant Permeability Characteristics.** Molecular Reproduction and Development 1998; 49: 408–415
22. Benson, C T, and J K Critser. **Variation of Water Permeability (Lp) and Its Activation Energy (Ea) Among Unfertilized Golden Hamster and ICR Murine Oocytes.** Cryobiology 1994; 31: 215–223.
23. Seki, Akiteru, Seiji Miyauchi, Saori Hayashi, Takashi Kikukawa, Megumi Kubo, Makoto Demura, Vadivel Ganapathy, and Naoki Kamo **Heterologous Expression of Pharaonis Halorhodopsin in Xenopus Laevis Oocytes and Electrophysiological Characterization of Its Light-driven Cl⁻ Pump Activity.** Biophysical Journal 2007; 92: 2559–2569
24. Benson, C T, and J K Critser. **Variation of Water Permeability (Lp) and Its Activation Energy (Ea) Among Unfertilized Golden Hamster and ICR Murine Oocytes.** Cryobiology 1994; 31: 215–223
25. Lin, Teh Ping, J. K. Sherman, and E. L. Willett. **Survival of Unfertilized Mouse Eggs in Media Containing Glycerol and Glycine.** Journal of Experimental Zoology 1957; 134: 275–291
26. Whittingham, D G. **Survival of Rat Embryos after Freezing and Thawing.** Journal of Reproduction and Fertility 1975; 43: 575–578
27. Chen, C. **Pregnancy after Human Oocyte Cryopreservation.** Lancet 1986; 1: 884–886

28. Trounson, A, and L Mohr. **Human Pregnancy Following Cryopreservation, Thawing and Transfer of an Eight-cell Embryo.** Nature 1983; 305: 707–709
29. Steven F. Mullen. **Human oocyte vitrification: the permeability of metaphase II oocytes to water and ethylene glycol and the appliance toward vitrification.** Fertil Steril 2008; 89: 1812-1825
30. Selman H., Angelini A., Barnocchi N. **Ongoing pregnancies after vitrification of human oocytes using a combined solution of ethylene glycol and dimethyl sulfoxide.** Fertil Steril 2006; 26: 997-1000
31. Jain K. John, Paulson J. Richard. **Oocyte cryopreservation.** Fertil Steril 2006; 86: 1037-1046
32. Crowe JH, Hoekstra FA, Crowe LM. **Anhydrobiosis.** Annu Rev Physiol 1992; 54: 579 –599
33. Potts M. **Desiccation tolerance of prokaryotes.** Microbiol Rev 1994; 58:755–805
34. Luyet, Basile J., and Eugene L. Hodapp. **Revival of Frog’s Spermatozoa Vitrified in Liquid Air. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine.** Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.) 1938; 39: 433–434
35. Testart, J., B. Lassalle, J. Belaisch-Allart, A. Hazout, R. Forman, J. D. Rainhorn, and R. Frydman. **High Pregnancy Rate after Early Human Embryo Freezing.** Fertility and Sterility 1986; 46: 268
36. Dumoulin J., Bergers-Janssen M., Pieters M., Engelsu E., Geraedts J., Evers J. **The protective effects of polymers in the cryopreservation of human and mouse zonae pellucidae and embryos.** Fertility and Sterility 1994; 62: 793-798

37. Eroglu A, Toner M, Toth TL. **Beneficial effect of microinjected trehalose on the cryosurvival of human oocytes.** Fertil Steril 2002; 77: 152–158
38. Burgess C. M., W. B. Wang, D. Powers, M. Alper, M. Toner, T. L. Toth **The survival of human failed to fertilize MII-stage oocytes cryopreserved by microinjection of trehalose.** 2004; O292: S117
39. Eroglu A, Lawitts JA, Toner M, Toth TL. **Quantitative microinjection of trehalose into mouse oocytes and zygotes, and its effect on development.** Cryobiology 2003; 46: 121–134
40. Karran G, Legge M. **Non-enzymatic formation of formaldehyde in mouse oocyte freezing mixtures.** Hum Reprod Oxf Engl. 1996; 12: 2681–2686
41. George, M. A., S. J. Pickering, P. R. Braude, and M. H. Johnson. **The Distribution of Alpha- and Gamma-tubulin in Fresh and Aged Human and Mouse Oocytes Exposed to Cryoprotectant.** Molecular Human Reproduction 1996; 2: 445–456
42. Vincent, C, V Garnier, Y Heyman, and J P Renard. **Solvent Effects on Cytoskeletal Organization and In-vivo Survival after Freezing of Rabbit Oocytes.** Journal of Reproduction and Fertility 1989; 87: 809–820
43. Van der Elst, J, S Nerinckx, and A C Van Steirteghem. **In Vitro Maturation of Mouse Germinal Vesicle-stage Oocytes Following Cooling, Exposure to Cryoprotectants and Ultrarapid Freezing: Limited Effect on the Morphology of the Second Meiotic Spindle.** Human Reproduction (Oxford, England) 1992; 7: 1440–1446
44. Van der Elst, J, E Van den Abbeel, S Nerinckx, and A Van Steirteghem. **Parthenogenetic Activation Pattern and Microtubular Organization of the**

- Mouse Oocyte after Exposure to 1,2-propanediol.** Cryobiology 1992; 29: 549–562
45. Johnson, Martin H., and Susan J. Pickering. **The Effect of Dimethylsulphoxide on the Microtubular System of the Mouse Oocyte.** Development 1987; 100: 313–324
46. Shaw, J. M., and G. M. Jones. **Terminology Associated with Vitrification and Other Cryopreservation Procedures for Oocytes and Embryos.** Human Reproduction Update 2003; 9: 583–605
47. Vincent, C., S. J. Pickering, M. H. Johnson, and S. J. Quick. **Dimethylsulphoxide Affects the Organisation of Microfilaments in the Mouse Oocyte.** Molecular Reproduction and Development 1990; 26: 227–235
48. Pickering, S J, P R Braude, and M H Johnson. **Cryoprotection of Human Oocytes: Inappropriate Exposure to DMSO Reduces Fertilization Rates.** Human Reproduction (Oxford, England) 1991; 6: 142–143
49. Larman MG., Minasi MG, Rienzi L, Gardner DK. **Maintenance of the meiotic spindle during vitrification in human and mouse oocytes** Reprod Biomed Online. 2007; 15: 692-700
50. Wilmut, I. **The Effect of Cooling Rate, Warming Rate, Cryoprotective Agent and Stage of Development on Survival of Mouse Embryos During Freezing and Thawing.** Life Sciences. Pt. 2: Biochemistry, General and Molecular Biology 1972; 11: 1071–1079
51. Fahy GM, Lilley TH, Linsdell H, Douglas MS, Meryman HT. **Cryoprotectant toxicity and cryoprotectant toxicity reduction: in search of molecular mechanisms.** Cryobiology. 1990; 27: 247–268

52. E. Porcu , R. Fabbri, G. Damiano, S. Giunchi, R. Fratto, PM. Ciotti, S. Venturoli, C. Flamigni **Clinical experience and applications of oocyte cryopreservation.** Molecular and Cellular Endocrinology, 2000; 169: 33-37
53. Fabbri R., Porcu E., Marsella T., Rochetta G., Venturoli S., Flamigni C. **Humman oocyte cryopreservation: new perspectives regarding oocyte survival.** Human Reproduction 2001; 16: 411-416
54. Shee-Uan Chen, Yih-Ron Lien, Hsin-Fu Chen, Li-Jung Chang, Yi-Yi Tsai, Yu-Shih Yang. **Observational clinical follow-up of oocyte cryopreservation using a slow-freezing method with 1,2-propanediol plus sucrose followed by ICSI.** Human Reproduction 2005; 20:1975-1980
55. Borini A., Sciajno R., Bianchi V., Sereni E., Flamigni C., Coticchio G. **Clinical outcome of oocyte cryopreservation after slow cooling with a protocol utilizing a high sucrose concentration** Human Reproduction 2006; 21: 512-517
56. Dunsong Yang, Kevin L. Winslow, Patrick L. Blohm, Samuel E. Brown, Kevin Nguyen, Cindy Brubaker **Oocyte donation using cryopreserved donor oocytes.** Fertility and sterility. 2002; 78(suppl 1):S14-15
57. Allen R. B., Francis M. M., Chung K., Fogle R. H., Kalan M. J., Paulson R. J. **Oocyte cryopreservation (OC): comparison of outcomes using autologous vs donor oocytes.** Fertility and sterility. 2007; 88(suppl 1):S352
58. Commission on genetic resources for food and agriculture **Cryoconservation of animal genetic resources** Food and agriculture organization of the United Nations 2012; section7: 85-94
59. Rall WF, Fahy GM. **Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 degrees C by vitrification.** Nature. 1985; 313: 573–575

60. Shaw PW, Bernard AG, Fuller BJ, Hunter JH, Shaw RW. **Vitrification of mouse oocytes using short cryoprotectant exposure: effects of varying exposure times on survival.** Mol Reprod Dev. 1992; 33: 210–214
61. Ali J, Shelton JN. **Design of vitrification solutions for the cryopreservation of embryos.** J Reprod Fertil. 1993; 99: 471–477
62. Rall WF, Wood MJ, Kirby C, Whittingham DG. **Development of mouse embryos cryopreserved by vitrification.** J Reprod Fertil. 1987; 80: 499–504
63. Park SP, Kim EY, Oh JH, Nam HK, Lee KS, Park SY, et al. **Ultra-rapid freezing of human multipronuclear zygotes using electron microscope grids.** Hum Reprod 2000; 15: 1787–1790
64. Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Jacobsen H, Greve T, et al. **Open pulled straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos.** Mol Reprod Dev 1998; 51: 53– 58
65. Pinasco M., Hickman T., Russell H., Rashiv B. **Oocyte Vitrification Freeze/Thaw Survival Rates Using an Open Versus a Closed System.** Fertility Sterility 2012; (suppl 3)97: S18
66. Achilleas Papatheodorou, Pierre Vanderzwalmen, Yannis Panagiotidis, Stamatios Petousis, Giuseppe Gullo, Evangelia Kasapi, Maria Goudakou, Nikos Prapas, Kostas Zikopoulos, Ioannis Georgiou, Yannis Prapas **How does closed system vitrification of human oocytes affect the clinical outcome? A prospective, observational, cohort, noninferiority trial in an oocyte donation program.** Fertility Sterility 2016; 106: 1348-1355

67. Kuleshova L, Gianaroli L, Magli C, Ferraretti A, Trounson A. **Birth following vitrification of a small number of human oocytes: case report.** Hum Reprod 1999; 14: 3077–3079
68. Yoon TK, Kim TJ, Park SE, Hong SW, Ko JJ, Chung HM, et al. **Live births after vitrification of oocytes in a stimulated in vitro fertilization embryo transfer program.** Fertil Steril 2003; 79: 1323– 1326
69. Chian RC, Son WY, Huang JY, Cui SJ, Buckett WM, Tan SL. **High survival rates and pregnancies of human oocytes following vitrification: preliminary report [abstract].** Fertil Steril 2005; 84(Suppl 1):S36
70. Kuwayama M, Vajita G, Kato O, Leibo SP. **Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes.** Reprod Biomed Online 2005; 11:300–308
71. Lucena E, Bernal DP, Lucena C, Rojas A, Moran A, Lucena A. **Successful ongoing pregnancies after vitrification of oocytes.** Fertil Steril 2006; 85: 108 –11
72. American Cancer Society. **Cancer facts and figures–2015.** Atlanta, GA: American Cancer Society, 2015
73. Meirow D, Nugent D. **The effects of radiotherapy and chemotherapy on female reproduction.** Hum Reprod Update 2001; 7: 535– 543
74. Kim SS. **Fertility preservation in female cancer patients: current developments and future directions.** Fertil Steril 2006; 85: 1–11
75. Baka SG, Toth TL, Veeck LL, Jones HW Jr, Muasher SJ, Lanzendorf SE. **Evaluation of the spindle apparatus of in-vitro matured human oocytes following cryopreservation.** Hum Reprod 1995; 10: 1816 –1820
76. Sonmezer M, Oktay K. **Fertility preservation in female patients.** Hum Reprod Update 2004;10:251– 266

77. Maroulis GB. **Effect of aging on fertility and pregnancy.** Semin Reprod Endocrinol 1991; 9: 165–175
78. Menken J, Trussell J, Larsen U. **Age and infertility.** Science 1986; 233: 1389 – 1394
79. Stolwijk AM, Zielhuis GA, Sauer MV, Hamilton CJCM, Paulson RJ. **The impact of the woman's age on the success of standard and donor in vitro fertilization.** Fertil Steril 1997; 67: 702–710
80. Manna C, Nardo LG. **Italian law on assisted conception: clinical and research implications.** Reprod Biomed Online 2005; 11: 532– 534
81. Cha KY, Chian RC. **Maturation in vitro of immature human oocytes for clinical use.** Hum Reprod Update 1998; 4: 103–120
82. Downs SM. **Factors affecting the resumption of meiotic maturation in mammalian oocytes.** Theriogenology 1993; 39: 65–79
83. Downs SM, Daniel SA, Eppig JJ. **Induction of maturation in cumulus cell-enclosed mouse oocytes by follicle-stimulating hormone and epidermal growth factor: evidence for a positive stimulus of somatic cell origin.** J Exp Zool 1988; 245: 86–96
84. Kate Hardy, Catherine S Wright, Stephen Franks, Robert M L Winston **In vitro maturation of oocytes British Medical Bulletin** 2000; 56: 588-602
85. De Sousa P.A., Caveney A., Westhusin M. E., Watson A. J. **Temporal patterns of embryonic gene expression and their dependence oogenetic factors.** Thenogenology 1998; 49: 115-128)
86. Schultz RM. **Regulation of zygotic gene activation in the mouse.** BioEssays 1993; 15: 531-538

87. Thibault C, Gerard M, Menezo Y. **Preovulatory and ovulatory mechanisms in oocyte maturation.** J Reprod Fertil 1975; 45: 605–610
88. Pincus G, Enzmann EV. **Comparative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro.** J Exp Med 1935; 62: 665–678
89. Edwards RG. **Maturation in vitro of human ovarian oocytes.** Lancet 1965; 2: 926–929
90. Veeck LL, Wortham JW Jr, Witmyer J, Sandow BA, Acosta AA, Garcia JE, et al. **Maturation and fertilization of morphologically immature human oocytes in a program of in vitro fertilization.** Fertil Steril 1983; 39: 594–602
91. Kim BK, Lee SC, Kim KJ, Han CH, Kim JH. **In vitro maturation, fertilization, and development of human germinal vesicle oocytes collected from stimulated cycles.** Fertil Steril 2000; 74: 1153–1158
92. DeScisciolo C, Wright DL, Mayer JF, Gibbons W, Muasher SJ, Lanzendorf SE. **Human embryos derived from in vitro and in vivo matured oocytes: analysis for chromosomal abnormalities and nuclear morphology.** J Assist Reprod Genet 2000; 17: 284–292
93. Emery BR, Wilcox AL, Aoki VW, Peterson CM, Carrell DT. **In vitro oocyte maturation and subsequent delayed fertilization is associated with increased embryo aneuploidy.** Fertil Steril 2005; 84: 1027–1029
94. KwangYul Cha, Jung Jin Koo, Jung Jae Ko, Dong Hee Choi, Sei Yul Han, Tae Ki Yoon **Pregnancy after in vitro fertilization of human follicular oocytes collected from nonstimulated cycles, their culture in vitro and their transfer in a donor oocyte program** Fert Ster 1991; 51: 109-113

95. Alan Trounson, Carl Wood, Annette Kausche **In vitro maturation and the fertilization and developmental competence of oocytes recovered from untreated polycystic ovarian patients** Fert Ster 1994; 62: 353-362
96. Baker SJ, Spears N. **The role of intra-ovarian interactions in the regulation of follicle dominance.** Hum Reprod Update 1999; 5: 153–165
97. Marcus W. Jurema, Daniela Nogueira **In vitro maturation of human oocytes for assisted reproduction** Fert Ster 2006; 86: 1277-1291
98. Wynn P, Picton HM, Krapez JA, Rutherford AJ, Balen AH, Gosden RG. **Pretreatment with follicle stimulating hormone promotes the numbers of human oocytes reaching metaphase II by in-vitro maturation.** Hum Reprod 1998; 13: 3132–3138
99. Son WY, Park SJ, Hyun CS, Lee WD, Yoon SH, Lim JH. **Successful birth after transfer of blastocysts derived from oocytes of unstimulated woman with regular menstrual cycle after IVM approach.** J Assist Reprod Genet 2002; 19: 541–543
100. Chian RC, Buckett WM, Tulandi T, Tan SL. **Prospective randomized study of human chorionic gonadotrophin priming before immature oocyte retrieval from unstimulated women with polycystic ovarian syndrome.** Hum Reprod 2000; 15: 165–170
101. Child TJ, Phillips SJ, Abdul-Jalil AK, Gulekli B, Tan SL. **A comparison of in vitro maturation and in vitro fertilization for women with polycystic ovaries.** Obstet Gynecol 2002; 100: 665–670

102. Mikkelsen AL, Smith S, Lindenberg S. **Impact of oestradiol and inhibin A concentrations on pregnancy rate in in-vitro oocyte maturation.** Hum Reprod 2000; 15: 1685–1690
103. Kyono K, Fukunaga N, Haigo K, Chiba S, Ohira C, Nakajo Y, et al. **Successful delivery following cryopreservation of zygotes produced by in vitro matured oocytes retrieved from a woman with polycystic ovarian syndrome-like disease: a case report.** J Assist Reprod Genet 2002;19:390–393
104. Yoon SJ, Chung HM, Cha KY, Kim NH, Lee KA. **Identification of differential gene expression in germinal vesicle vs. metaphase II mouse oocytes by using annealing control primers.** Fertil Steril 2005; 83(Suppl 1): 1293–1296
105. Le Du A, Kadoch IJ, Bourcigaux N, Doumerc S, Bourrier MC, Chevalier N, et al. **In vitro oocyte maturation for the treatment of infertility associated with polycystic ovarian syndrome: the French experience.** Hum Reprod 2005; 20: 420–424
106. Soderstrom-Anttila V, Makinen S, Tuuri T, Suikkari AM. **Favourable pregnancy results with insemination of in vitro matured oocytes from unstimulated patients.** Hum Reprod 2005; 20: 1534–1540
107. Child TJ, Abdul-Jalil AK, Gulekli B, Tan SL. **In vitro maturation and fertilization of oocytes from unstimulated normal ovaries, polycystic ovaries, and women with polycystic ovary syndrome.** Fertil Steril 2001; 76: 936–942
108. Mikkelsen AL, Lindenberg S. **Benefit of FSH priming of women with PCOS to the in vitro maturation procedure and the outcome: a randomized prospective study.** Reproduction 2001; 122: 587–592
109. Cha KY, Han SY, Chung HM, Choi DH, Lim JM, Lee WS, et al. **Pregnancies and deliveries after in vitro maturation culture followed by in vitro fertilization and**

embryo transfer without stimulation in women with polycystic ovary syndrome.

Fertil Steril 2000; 73: 978– 983

110. Dahan M., Hatirnaz E., Tan S., Ata B., Ozer A., Kanat-Pektas M., Hatirnaz S.

Predictors of pregnancy outcomes in women with polycystic ovary syndrome who performed in-vitro maturation (IVM) of oocytes. Fertil Steril 2016; P386: e251

111. Hatirnaz S., Hatirnaz E. S., Tan S. L., Ata B., Kanat pektas M., Ozer A., Dahan M.

Outcomes of single vs double embryo transfer in in-vitro maturation cycles done in women with polycystic ovary syndrome. Fertil Steril 2016; 106(suppl. 3): e258

112. Liu J, Lu G, Qian Y, Mao Y, Ding W. **Pregnancies and births achieved from in vitro matured oocytes retrieved from poor responders undergoing stimulation in in vitro fertilization cycles.** Fertil Steril 2003; 80: 447–449

113. Jianhua Li, Ye Xu,corresponding, Guoping Zhou, Junhong Guo, Nan Xin **Natural cycle IVF/IVM may be more desirable for poor responder patients after failure of stimulated cycles** J Assist Reprod Genet. 2011; 28: 791–795

114. Gook D, Osborn S, Johnston W 1993 **Cryopreservation of mouse and human oocytes using 1,2 propanediol and the configuration of the meiotic spindle.** Human Reproduction 1993;8: 1101–1109

115. Mandelbaum J., Anastasiou O., Levy R. et al. **Effects of cryopreservation on the meiotic spindle of human oocytes.** European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology 2004; 113S: S17–S23

116. Sathananthan AH, Kirby C., Trounson A. et al. **The effects of cooling mouse oocytes.** Journal of Assisted Reproduction and Genetics 1992; 9: 139–148

117. Van der Elst J., Van den Abbeel E., Nerinckx S., Van Stierteghem A.
Parthenogenetic activation pattern and microtubular organization of the mouse oocyte after exposure to 1,2 propanediol. Cryobiology 1992; 29: 549–562
118. Vincent C., Johnson M. **Cooling cryoprotectants and the cytoskeleton of the mammalian oocytes.** Oxford Reviews of Reproductive Biology 1992; 14: 73–100
119. Bernard A., Fuller B. **Cryopreservation of human oocytes: a review of current problems and perspectives.** Human Reproduction Update 1996; 2: 193–207
120. Mavrides A., Morroll D. **Bypassing the effect of zona pellucida changes on embryo formation following cryopreservation of bovine oocytes.** European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology 2005; 10: 66–70
121. Borini A., Bonu M., Coticchio G. et al. **Pregnancies and births after oocyte cryopreservation.** Fertility and Sterility 2004; 82: 601–605
122. Battaglia D.E., Klein N.A., Soules M.R. **Changes in centrosomal domains during meiotic maturation in the human oocyte.** Molecular Human Reproduction 1996; 2: 845–851
123. Kim N., Chung H., Cha K., Chung K. **Microtubule and microfilament organization in maturing human oocytes.** Human Reproduction 1998; 13: 2217–2222
124. Prapas Y., Panagiotidis I., Kalogiannidis I., Gjata E., Papatheodorou A., Prapa S, et al.
Double GnRH-antagonist dose before HCG administration may prevent OHSS in oocyte-donor cycles: a pilot study. Reprod Biomed Online. 2010; 21: 159–165
125. Vanderzwalmen P., Zech N., Prapas Y., Panagiotidis Y., Papatheodorou A., Lejeune B., Jareno D., Vanderzwalmen S., Ectors F. **Closed carrier device: A reality to vitrify oocytes and embryos in aseptic conditions** Gynecologie Obstetrique & Fertilité. 2010; 38: 541–546

126. Papatheodorou A., Vanderzwalmen P., Panagiotidis Y., Prapas N., Zikopoulos K., Georgiou I., Prapas Y. **Open versus closed oocyte vitrification system: a prospective randomized sibling-oocyte study** Reprod Biomed Online 2013; 26: 595-602
127. Papatheodorou A., Vanderzwalmen P., Panagiotidis Y., Petousis S., Gullo G., Kasapi E., Goudakou M., Prapas N., Zikopoulos K., Georgiou I., Prapas Y. **How does closed system vitrification of human oocytes affect the clinical outcome? A prospective, observational, cohort, noninferiority trial in an oocyte donation program** Fertil Steril 2016; 106: 1348-1355
128. Panagiotidis Y., Vanderzwalmen P., Prapas Y., Kasapi E., Goudakou M., Papatheodorou A., Passadaki T., Petousis S., Nikolettos N., Veletza S., Prapas N., Maroulis G. **Open versus closed vitrification of blastocysts from an oocyte-donation programme: a prospective randomized study** Reprod Biomed Online 2013; 26: 470-476
129. Jung-won K., Weon-Young S., San-Hyun Y., Yong K., Jin-Ho L. **The GV-stage is more effective for mouse ovum bank** Fertil Steril 2003; 80S3: S266-S267
130. Sereni E., Bonu M. A., Borini A., Sciajino R., Trevisi M. R., Flamigni C. **High survival rate after cryopreservation of human prophase I oocytes (germinal vesicle)** Fertil Steril 2000; 74S: S161
131. Yunxia Cao , Qiong Xing, Zhi-Guo Zhang, Zhao-Lian Wei, Ping Zhou, Lin Cong **Cryopreservation of immature and in-vitro matured human oocytes by vitrification** Reprod Biomed Online 2009; 19: 369-373
132. Goud A., Goud P., Qian C., Van der Elst J., Van Maele G., Dhont M. **Cryopreservation of human germinal vesicle stage and in vitro matured M II**

oocytes: influence of cryopreservation media on the survival, fertilization, and early cleavage divisions Feril Steril 2000; 74: 487-494

133. Isachenko V., Montag M., Isachenko E., Dessole S., Nawroth F., Hans van der Ven
Aseptic vitrification of human germinal vesicle oocytes using dimethyl sulfoxide as a cryoprotectant Feril Steril 2006; 85: 741-747

134. Al-Khtib M., Perret A., Khoueiry R., Ibala-Romdhane S., Blachère T., Greze C., Lornage J., Lefèvre A. **Vitrification at the germinal vesicle stage does not affect the methylation profile of H19 and KCNQ1OT1 imprinting centers in human oocytes subsequently matured in vitro** Fertil Steril 2011; 95: 1955-1960

135. Escrich L., Grau N., Jose de los Santos M., Romero J.L., Pellicer A., Escib M.J. **The dynamics of in vitro maturation of germinal vesicle oocytes** Fertil Steril 2012; 98: 1147-1151

136. Kim JH, Niwa K, Lim JM, Okuda K. **Effects of phosphate, energy substrates, and amino acids on development of in vitro-matured, in vitro-fertilized bovine oocytes in a chemically defined, protein-free culture medium** Biol Reprod 1993; 48: 1320–1325

137. Reichman D., Politch J., Ginsburg E., Racowsky C. **Extended in vitro maturation of immature oocytes from stimulated cycles: an analysis of fertilization potential, embryo development, and reproductive outcomes** Assist Reprod 201; 21:347-356

138. Chian RC, Tan SL. **Maturation and developmental competence of cumulus-free immature human oocytes derived from stimulated and intracytoplasmic sperm injection cycle.** Reprod Biomed Online. 2002; 5: 125–132

139. Van Blerkom J, McGaughey RW **Molecular differentiation of the rabbit ovum. 1. During oocyte maturation in vivo and in vitro** Developmental Biology 1978; 63: 139–150.
140. Van Blerkom J, McGaughey RW **Molecular differentiation of the rabbit ovum. 2. During oocyte maturation in vivo and in vitro** Developmental Biology 1978; 63: 151–164
141. Cross PC, Brinster RL **In vitro development of mouse oocytes** Biology of Reproduction 1970; 3: 298–307
142. Vanderhyden BC, Armstrong DT **Role of cumulus cells and serum on the in vitro maturation, fertilization, and subsequent development of rat oocytes.** Biology of Reproduction 1989; 40: 720–728
143. Kennedy J, Donahue RP **Human oocyte: maturation in chemically defined media** Science 1969; 164: 1292–1293
144. Boiso I., Martí M., Santalo J., Ponsa M., Barri P., Veiga A. **A confocal microscopy analysis of the spindle and chromosome configurations of human oocytes cryopreserved at the germinal vesicle and metaphase II stage** Human Reproduction 2002; 17: 1885–1891
145. Rowe P.J., Comhaire F.H., Hargreave T.B., Mellows H.J. **WHO manual for the standardized investigation and diagnosis of the infertile couple** Cambridge: Cambridge University Press, 1993
146. Rowe P.J., Comhaire F.H., Hargreave T.B., Mellows H.J. **WHO manual for the standardized investigation and diagnosis of the infertile couple** Cambridge: Cambridge University Press, 1993

147. Vayena E., Rowe P.J., Griffin D. **Medical, Ethical and Social Aspects of Assisted Reproduction** World Health Organization 2002: 1-404
148. Steptoe P.C., Edwards R.G. **Birth after the reimplantation of a human embryo.** Lancet 1978; 2: 366
- 149.