

**ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΧΡΗΣΗΣ ΚΡΟΚΟΥ ΛΥΓΟΥ ΣΤΗΝ
ΚΑΤΑΨΥΞΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ ΜΕ ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΕΣ ΤΙΜΕΣ**



**ΝΑΤΑΛΙΑ ΜΑΚΧΖΟΥΜΗ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ
ΠΜΣ “ΕΡΕΥΝΑ ΣΤΗ ΓΥΝΑΙΚΕΙΑ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ”
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ ΑΘΗΝΩΝ**

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Κο Γ. Μαστοράκο, Αναπληρωτή καθηγητή Ενδοκρινολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών και όλη την επιτροπή του μεταπτυχιακού προγράμματος «Έρευνα στη Γυναικεία Αναπαραγωγή» για την ευκαιρία, που μου έδωσαν να συμμετάσχω στο πρόγραμμα αυτό.

Στη συνέχεια θα ήθελα, να ευχαριστήσω την τριμελή επιτροπή αξιολόγησης μου για το χρόνο που μου διαθέτουν και η οποία απαρτίζεται από τους Κα Σ. Μπάκα Σταυρούλα, Επίκουρη καθηγήτρια Μικροβιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών, Κο Χασιάκο Δημήτριο, Αναπληρωτή καθηγητή Μαιευτικής και Γυναικολογίας της Ιατρικής σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών και τον Δρ. Μαντζαβίνο Θεμιστοκλή, μαιευτήρα γυναικολόγο, πρώην μέλος ΔΕΠ της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών και επικεφαλής της μονάδας υποβοηθούμενης αναπαραγωγής “Embryoland”.

Ένα επιπλέον «ευχαριστώ» οφείλω, να αποδώσω στον Κο Μαντζαβίνο Θεμιστοκλή, ο οποίος με δέχθηκε στη μονάδα υποβοηθούμενης αναπαραγωγής της οποίας ηγείται, για να εκπονήσω την εργασία αυτή.

Στη συνέχεια θα ήθελα, να ευχαριστήσω από καρδιάς της δύο εμβρυολόγους της μονάδας, Κα Αρβανίτη Κατερίνα και Κα Βουτσινά Κατερίνα, για την πολύτιμη βοήθειά τους, την υπομονή τους όλο αυτό το διάστημα, που με φιλοξένησαν στο εργαστήριο, καθώς και όλο το προσωπικό.

Επιπλέον θα ήθελα, να ευχαριστήσω τον Δρ. Χριστόπουλο Παναγιώτη, μαιευτήρα γυναικολόγο και επιστημονικό συνεργάτη του Πανεπιστημίου Αθηνών, για τη βοήθεια και τη στήριξή του.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω πάρα πολύ τη γραμματέα του μεταπτυχιακού προγράμματος, Κα Ρήγα Μαρία, για την πολύτιμη βοήθειά της και το γεγονός, ότι πάντα ήταν παρούσα σε όποια απορία ή ανάγκη προέκυπτε.

Περίληψη

ΣΚΟΠΟΣ: Ο προσδιορισμός της αποτελεσματικότητας, της χρήσης κρόκου αυγού - με τη χρήση δύο διαφορετικών κρυοπροστατευτικών υλικών (SpermFreeze από την Fertipro και Freezing Medium από την Irvine Scientific)- στην διατήρηση της κινητικότητας φυσιολογικών δειγμάτων σπέρματος, μετά από κρυοσυντήρηση.

ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ: Προοπτική μελέτη

ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ: “Embryoland” – Μονάδα Ιατρικώς Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής

ΔΕΙΓΜΑ: Σαράντα δύο άνδρες, ελληνικής καταγωγής (25-45 ετών) με τιμές σπερμοδιαγράμματος εντός των αναμενόμενων ορίων. Από κάθε δείγμα, χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 2 ml, ένα για κάθε κρυοκαταψυκτικό υλικό.

ΒΑΣΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ: Καλή προωθητική, μέτρια προωθητική, επιτόπια και συνολική κίνηση σπερματοζωαρίων πριν και μετά τη διαδικασία κατάψυξης-απόψυξης.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ: Στατιστικά σημαντική διαφορά μόνο στην καλή προωθητική κίνηση ($p < 0.05$). Μετά τη σύγκριση της μέτριας προωθητικής κίνησης μετά την κατάψυξη με τα δύο υλικά ($p = 0.318$), της επιτόπιας κίνησης μετά την κατάψυξη με τα δύο υλικά ($p = 0.095$) και της ολικής κινητικότητας μετά την κατάψυξη με τα δύο υλικά ($p = 0.448$) δε βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ: Συγκρίνοντας τις μέσες τιμές των μετρήσεων, φαίνεται ότι και τα δύο υλικά επηρεάζουν στατιστικά σημαντικά την κινητικότητα των σπερματοζωαρίων. Με βάση τα αποτελέσματα, ενώ όλα τα είδη κίνησης επηρεάζονται και από τα δύο υλικά, φαίνεται ότι το υλικό 1 ευνοεί την καλή προωθητική κίνηση.

Abstract

OBJECTIVE: To determine the effectiveness of egg yolk, using two different sperm cryopreservation media (SpermFreeze by FertiPro-Medium 1 and Freezing Medium by Irvine Scientific-Medium 2), in preserving motility, after cryopreserving normozoospermic semen samples.

DESIGN: Experimental prospective study.

SETTING: “Embryoland” – Private Assisted Reproduction Unit.

PATIENT(S): Forty two men of greek nationality (age 25-45 years) with normozoospermic sperm parameters. From each sample, 2 ml were used, one for each cryopreservation medium.

RESULT(S): Statistically significant difference was observed only when good forward progression was compared ($p < 0.05$). When fair forward progression after freezing with medium 1 and 2 ($p = 0.318$), twitching spermatozoa after freezing with medium 1 and 2 ($p = 0.095$) and total motility after freezing with medium 1 ($p = 0.448$) were compared, no statistically significant difference was found.

CONCLUSION(S): After comparing the means of each category, it seems that both media affect sperm motility significantly. Based on the results, although all types of motility are affected by both media, good forward progression seems to be favoured by medium 1.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΛΙΓΑ ΛΟΓΙΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΙΣΤΟΡΙΑ ΤΗΣ ΚΡΥΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Η επιστήμη της Κρυοβιολογίας ξεκίνησε ουσιαστικά τη δεκαετία του 1940, λίγο μετά το Δεύτερο Παγκόσμιο Πόλεμο. Ο όρος αυτός χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από τον Sir Alan Parkes, ο οποίος την όρισε ως την επιστήμη, που μελετά την “παγωμένη” ζωή. Στο πρώτο τεύχος του επιστημονικού περιοδικού “Cryobiology”, ο Parkes (1964) περιγράφει την καταγωγή της λέξης, “Cryobiology, the study of frosty life” και δίνει την ερμηνεία “ η μελέτη των βιολογικών επιδράσεων των χαμηλών θερμοκρασιών, ένα πεδίο παλιό σε σκέψη, αλλά νέο σε δραστήρια εξέλιξη τις τελευταίες δύο δεκαετίες”. Σύμφωνα με τον Parkes (1964), οι άμεσοι συνεργάτες του, James Lovelock και Audey Smith, ήταν αντίθετοι σε αυτές τις εκφράσεις. Μέσα σε λίγα χρόνια, ακόμη και η Smith υποστήριξε τη χρήση της λέξης και έδωσε στο μονόγραμμα της τον τίτλο “Current trends in Cryobiology”.

Πριν από αυτό, η έρευνα κάτω από τις θερμοκρασίες ψήξης ήταν κατά βάση πεδίο της Φυσικής, με επιστήμονες όπως ο Bridgeman και ο Kammerling-Ones, να ξετυλίγουν τη φυσική και τα χαρακτηριστικά του πάγου. Η Βιολογία, σαν κλάδος, μόλις ξέφευγε από την ασχολία της με την ταξινόμηση των ειδών. Η ιστολογία και η φυσιολογία εκτεινόταν μόνο στα πλαίσια της απλής μικροσκοπίας και της απαρχής της μοντέρνας βιοχημείας. Λόγω αυτών των δεδομένων, ακόμη δεν υπήρχε η αντίληψη και η κατανόηση, πως τα διάφορα μόρια χαρακτηρίζονται από σχήματα και συγκεκριμένη κατανομή φορτίων, γεγονότα που επιτρέπουν όχι μόνο την κατανόηση των χημικών αντιδράσεων, αλλά και την πρόβλεψή τους.

Γνωρίζοντας αυτά, δεν προκαλεί έκπληξη το γεγονός, ότι η Βιολογία και η Φυσική δεν είχαν ακόμη πολλά κοινά σημεία. Δεν ήταν παρά στη μέση της δεκαετίας του 1950, που η Βιοφυσική αναγνωρίστηκε ευρέως ως ειδικότητα. Ακόμη και τότε, ο αριθμός των βιοφυσικών ήταν διψήφιος και απαρτιζόταν κυρίως από φυσικούς, οι οποίοι ανακάλυπταν την ανατρεπτική και ασταθή πολυπλοκότητα των ζώντων οργανισμών.

Σ’ αυτό το αντίξοο περιβάλλον (στοιχειώδες ή και πρωτόγονο συγκριτικά με την επιστήμη του εικοστού πρώτου αιώνα) η Κρυοβιολογία πάλευε, να βγει από τη νηπιακή ηλικία. Στη συνολική βιβλιογραφία του Luyet “*Life and Death at Low Temperature*” (Luyet and Gehenio, 1940), το πρώτο βιβλίο αφιερωμένο στη βιολογία των χαμηλών θερμοκρασιών, υπάρχουν μόνο 97 αναφορές σε βιολογική ψύξη πριν το 1900. Σχεδόν όλες αφορούσαν ανέκδοτες παρατηρήσεις επιβίωσης ή θανάτου. Ακόμη και το 1940, οι πολλές υποθέσεις που αφορούσαν τη φύση της καταπόνησης και τον τραυματισμό από την ψύξη, δεν υποστηρίζονταν από πειραματικές αποδείξεις και περιελάμβαναν ακόμη και μυστηριώδη φαινόμενα όπως “η άμεση δράση του κρύου”.

Υπήρχαν, ωστόσο, κάποιοι πρωτοπόροι στο είδος, όπως ο Sir William Hardy στο Low Temperature Institute στο Πανεπιστήμιο του Cambridge. Χαρακτηριστικά, ακόμη και ο πρόλογος του βιβλίου “Cryobiology” (Meryman, 1966), αναφέρει πως “οι ερευνητές, που ασχολούνται, πρωτευόντως, με τη φύση του τραυματισμού από την ψύξη, μπορούν ακόμη, να μετρηθούν στα δάκτυλα των δύο χεριών”.

Κάτω από αυτές τις συνθήκες, δεν είναι παράξενο το ότι οι πρώτες απόπειρες εισχώρησης στον τομέα της κρυοβιολογίας ήταν κατά βάση περιγραφικές και δεν είχαν την αυστηρότητα της Φυσικής. Ο Luyet, γνωστός και ως “Πατέρας της Κρυοβιολογίας”, συγκεντρώθηκε κυρίως στην παρατήρηση, στην περιγραφή και στην κατηγοριοποίηση, αφήνοντας το μεγαλύτερο μέρος της πειραματικής διαδικασίας, που ήταν κατά βάση εμπειρική, στους μαθητές και τους συναδέλφους του.

Οι πρώτοι επιστήμονες, που ασχολήθηκαν με τον τομέα της Κρυοβιολογίας, δεν ήταν εκπαιδευμένοι στο ευρύ φάσμα των φυσικών επιστημών. Για παράδειγμα, η Audrey Smith ήταν κλασική βιολόγος, ενώ ο Ronald Greaves, δεύτερος πρόεδρος της “Cryobiology Society” και πρωτοπόρος στην κατάψυξη-αφυδάτωση ζωντανών οργανισμών, ήταν παθολόγος με μία έφεση στη μηχανική.

Τα πειράματα του Luyet βασίστηκαν στο γεγονός, ότι η ταχεία ψύξη και απόψυξη, μπορεί να προστατεύσει από τον τραυματισμό. Οι ταχύτητες, όμως, που απαιτούνται -με απουσία διαλυμένων ουσιών που προκαλούν δημιουργία ύαλου- ήταν και είναι πολύ υψηλές. Η κρίσιμη εξέλιξη, που έβαλε το ανερχόμενο πεδίο της Κρυοβιολογίας στο χάρτη ήταν η αναφορά του Polge (Polge et al., 1949), της κρυοπροστασίας σπέρματος πτηνού με τη χρήση γλυκερόλης. Τα σπερματοζώαρια ήταν τα πρώτα κύτταρα θηλαστικών, που καταψύχθηκαν επιτυχώς. Αυτή η επιτυχία οφείλεται στην τυχαία ανακάλυψη από τον Polge και τους συνεργάτες του, της κρυοπροστατευτικής δράσης της γλυκερόλης και ένα χρόνο αργότερα, η επαλήθευση από την Audrey Smith (Smith, 1950), της αποτελεσματικότητας της γλυκερόλης στην κατάψυξη ερυθροκυττάρων. Χωρίς ουσιαστική επίγνωση της φύσης του τραυματισμού από την ψύξη, η ανακάλυψη του προστατευτικού ρόλου της γλυκερόλης ήταν, βασικά, εμπειρική. Εξίσου εμπειρική ήταν η ανακάλυψη της συντήρησης ερυθροκυττάρων με τη μέθοδο του spray-freezing σε υγρό άζωτο (Meryman and Kafig, 1955), που ήταν αποτέλεσμα της παρατήρησης ανέπαφων ερυθροκυττάρων μέσω ηλεκτρονικής μικροσκοπίας, χρησιμοποιώντας μία τεχνική για αντιγραφή ενυδατωμένων δειγμάτων σε θερμοκρασία υγρού αζώτου. Τα κρυοπροστατευτικά χαρακτηριστικά των πολυμερών αποτελούν άλλη μία περίπτωση ανακάλυψης, μέσω ενισταμένης παρατήρησης. Αυτή ήταν αποτέλεσμα της έρευνας και σύγκρισης μεταξύ πολλών πρόσθετων ομάδων από τον Arthur Rinfret και τους συναδέλφους του (Doebbler et al., 1966) στον τομέα Linde του Union Carbide, ως μέρος της προσπάθειάς τους να σχεδιάσουν τη γρήγορη ψύξη ερυθροκυττάρων, ώστε να είναι εφαρμόσιμη.

Ο Jim Lovelock ήταν ο πρώτος, αμιγώς, κρυοβιολόγος, με πραγματική βιοφυσική ιδιότητα και η ανακάλυψη του δι-μεθυλ- σουλφοξειδίου (dimethyl sulfoxide, Me_2SO) από τον ίδιο και τον Bishop (1959) βασίστηκε σε ορθολογική πρόβλεψη. Ο Peter Mazur, από την άλλη μεριά, έφερε μαθηματικές και φυσικές επιδεξιότητες στο πεδίο της Κρυοβιολογίας, καθώς και νέα, πιο αυστηρά κριτήρια, τα οποία αντικατέστησαν το μεγάλο όγκο ανέκδοτων και ανεξέλεγκτων πειραματικών διεργασιών των προηγούμενων ετών, κάτι που υποκίνησε ένα ξέσπασμα σπουδαίων προσπαθειών προς την κατανόηση της ψύξης και των επιπτώσεών της.

Ο Lovelock είχε προτείνει, αρχικά, πως οι κυτταρικές βλάβες εξαιτίας της ψύξης οφείλονται στη μετουσίωση, λόγω της υψηλής συγκέντρωσης αλάτων, κατά τη διάρκειά της (Lovelock, 1953). Η υπόθεση δύο παραγόντων του Mazur (Mazur, 1965) –μηχανική βλάβη από ενδοκυτταρικό σχηματισμό πάγου κατά την ταχεία ψύξη και βλάβη από αφυδάτωση, λόγω εξωκυτταρικό σχηματισμό πάγου κατά την αργή ψύξη- ήταν σημείο ορόσημο, αλλά παρ’όλ’αυτά ο ακριβής μηχανισμός βλάβης από την αργή ψύξη παρέμενε άγνωστος. Ο Mazur πρότεινε, μεταγενέστερα (1966), ότι η στιγμή που πραγματοποιείται η βλάβη συμπίπτει με τη θερμοκρασία, στην οποία η ακτίνα της καμπυλότητας ενός εξωκυττάρου σχηματιζόμενου παγοκρυστάλλου προσεγγίζει την ακτίνα των πόρων της μεμβράνης, τροφοδοτώντας το ενδοκυττάριο διάλυμα με καταστροφικό για το κύτταρο πάγο. Ο Meryman (1968) πρότεινε τη θεωρία του συμπιεστικού στρες της μεμβράνης από ωσμωτική σμίκρυνση του κυττάρου, που οδηγούσε σε απροσδιόριστη μηχανική βλάβη της. Η υπόθεση αυτή αναφέρεται ως η “Υπόθεση ελάχιστου όγκου”. Ο Bob Williams (Williams et al., 1975), απέδειξε πως τα κύτταρα Karkhov (σίτος), όπως πολλά ακόμη φυτικά

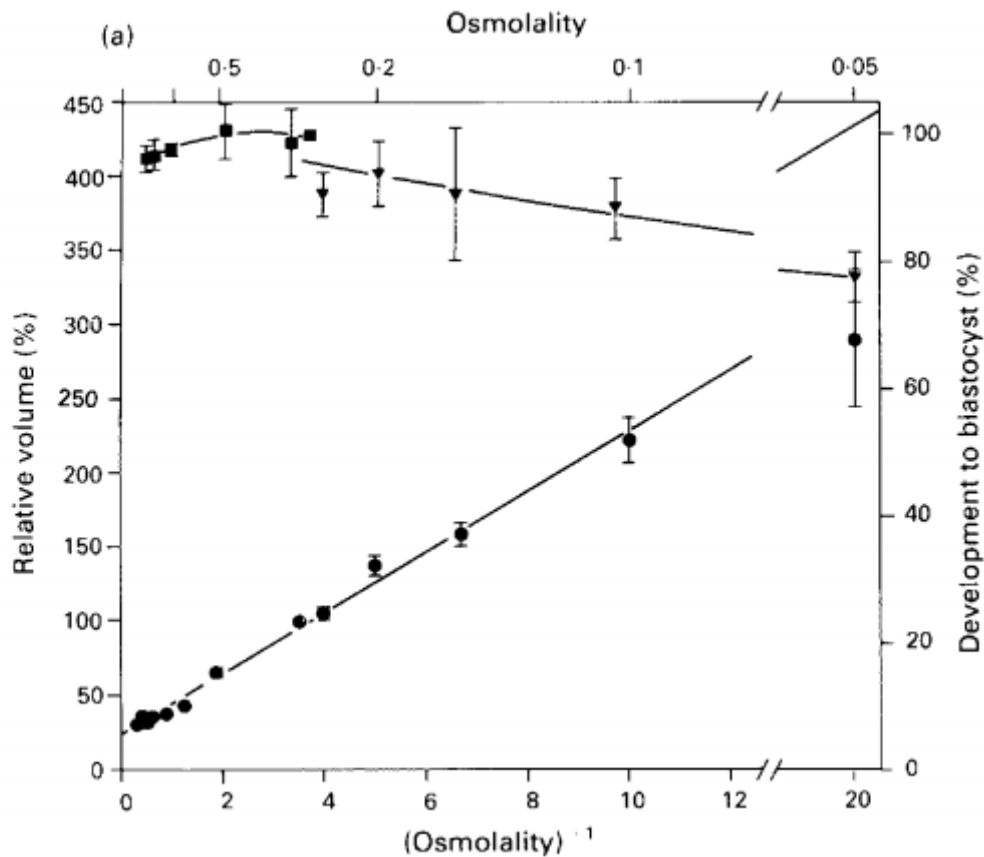
κύτταρα, χάνουν μέρος του μεμβρανικού τους υλικού κάτω από υπερτονικό στρες, αλλά καταφέρνουν να αποκτήσουν ανθεκτικότητα, μόλις επιστρέψουν σε ισοτονικές συνθήκες και το ανακτήσουν.

Οι πιο πρόσφατες μελέτες της μεμβρανικής αφυδάτωσης από τον Crowe (Crowe et al., 2001) έχουν συνεισφέρει σημαντικά στην κατανόηση της βλάβης από αφυδάτωση και της ανοχής, που αποτελεί, σίγουρα, έναν από τους πολλούς παράγοντες, οι οποίοι παίζουν ρόλο κατά την κατάψυξη κυττάρων και ιστών. Η μετουσίωση των πρωτεϊνών, εξαιτίας της χαμηλής θερμοκρασίας προβλέφθηκε αρχικά από τον Brandts (Brandts, 1964) και επιβεβαιώθηκε αργότερα από τους Tsonev και Hirsh (Tsonev and Hirsh, 2000). Αν και κάποιες ή και όλες αυτές οι ιδέες έχουν σχέση –με τον έναν ή τον άλλο τρόπο- με τις βλάβες, που προκαλεί η κατάψυξη και με την αναγνώριση ότι αυτή η διαδικασία είναι πολύπλοκη, έκπληξη προκαλεί το πόσο μικρή προσπάθεια έχει γίνει τα τελευταία σαράντα χρόνια για την οικοδόμηση μιας πλήρους εικόνας αυτού του πολύ σημαντικού βιολογικού φαινομένου.

Τα τελευταία 30 χρόνια η Κρυβιολογία έχει αναπτυχθεί σε μία ώριμη επιστήμη, με πολυάριθμους ερευνητές, που διεξάγουν έρευνα παγκοσμίως, με πολλούς συλλόγους να οργανώνουν τακτικά συνέδρια και την ύπαρξη τουλάχιστον πέντε επιστημονικών περιοδικών αφιερωμένων αποκλειστικά σε αυτό το θέμα. Σε αυτά ανήκουν τα: Cryobiology και Cell Preservation Technology (Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής), Cryo-Letters (Ηνωμένο Βασίλειο), Problems of Cryobiology (Ουκρανία) και Low Temperature Medicine (Ιαπωνία). Φυσικά, άρθρα που περιγράφουν πειράματα και ανασκοπήσεις πάνω σε διάφορες εκφάνσεις της Κρυοβιολογίας δημοσιεύονται σε διάφορα άλλα περιοδικά και περιλαμβάνονται σε πολυάριθμα βιβλία. Η επιστήμη της Κρυοβιολογίας βασίζεται πλέον σε μαθηματικά συστήματα και μία αναπτυσσόμενη μηχανιστική ανάλυση των βλαβών από την ψύξη, καθώς και της κατανόησης της δράσης των κρυοπροστατευτικών παραγόντων.

ΣΥΝΤΟΜΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΤΗΣ ΚΡΥΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΓΑΜΕΤΩΝ

Η επιπτώσεις των χαμηλών θερμοκρασιών σε ζωντανούς οργανισμούς ελκύουν τους επιστήμονες εδώ και αιώνες. Σχεδόν 320 χρόνια πριν, ο *Robert Boyle*, όπως αναφέρεται από τον Parks (1957), δημοσίευσε ένα μονόγραμμα με τίτλο “New Experiments and Observations Touching Cold”. Ο Boyle διατύπωσε την αρχή, που φέρει το όνομά του: Ο όγκος ενός ιδανικού αερίου σε μία σταθερή θερμοκρασία είναι αντιστρόφως ανάλογη με την πίεση που του ασκείται. Η σχέση του νόμου του Boyle με την ανάλυση της κυτταρικής περιεκτικότητας σε νερό και της βιολογίας σε χαμηλές θερμοκρασίες, δύσκολα μπορεί, να υποβαθμιστεί. Πάνω από 60 χρόνια πριν, ο *Lucké* (1940) παρουσίασε μία γραφική αναπαράσταση της οσμωτικής απόκρισης ωαρίων θαλάσσιων ασπόνδυλων, όταν εκτίθονταν σε υπερτονικά διαλύματα, που περιείχαν διαπεραστικές ή μη ουσίες, όπως επίσης και τη συρρίκνωση και τη διόγκωση των ωαρίων σε αιθυλική γλυκόλη. Ακόμη και μέχρι σήμερα, μετρήσεις σχετικά με τον όγκο των κυττάρων που εκτίθενται σε υπερτονικά διαλύματα παρουσιάζονται ως γραφικές παραστάσεις “Boyle-Van’t Hoff”, στις οποίες ο όγκος ενός κυττάρου απεικονίζεται ως συνάρτηση της οσμωτικής πίεσης του διαλύματος στο οποίο βρίσκεται το κύτταρο. Ένα παράδειγμα φαίνεται στο σχήμα 1, για γονιμοποιημένα ωάρια ποντικού, που προέκυψε από δεδομένα που περιγράφηκαν από τον Oda et al. (1992).



Σχήμα 1: Γραφική παράσταση Boyle-van't Hoff για γονιμοποιημένα ωάρια ποντικού. (Oda et al., 1992)

Αυτό το παράδειγμα δείχνει, πως ο μη οσμωτικός όγκος των ζυγωτών ποντικού, που προκύπτει από το σημείο της γραφικής παράστασης, στο οποίο το διάλυμα είναι απεριόριστα συμπυκνωμένο είναι περίπου 20%. Το πόρισμα, που βγαίνει από αυτό το δεδομένο είναι, ότι το 80% των ζυγωτών ποντικού, όπως και των περισσότερων ωαρίων και εμβρύων θηλαστικών, είναι νερό. Άλλα παραδείγματα γραφικών παραστάσεων Boyle-Van't Hoff, ως μέρος κρυοβιολογικής ανάλυσης έχουν δημοσιευθεί για σπερματοζώαρια ποντικού (Willoughby et al., 1996) και για ωάρια πίθηκου Rhesus (Songsasen et al., 2002).

Όπως έχει προαναφερθεί, στο κλασικό μονόγραμμα από τους Luyet και Gehenio (1940) με τίτλο “Life and Death at Low Temperatures”, η βιβλιογραφία αναφέρει τέσσερις πραγματείες, που αφορούν τις χαμηλές θερμοκρασίες και δημοσιεύτηκαν το 18^ο αιώνα και άλλες 89 δημοσιεύσεις από τον 19^ο αιώνα. Στη διάρκεια των πρώτων δεκαετιών του εικοστού αιώνα, πραγματοποιήθηκαν όλο και περισσότερες παρατηρήσεις που αφορούσαν τις επιδράσεις του κρύου και των χαμηλών θερμοκρασιών σε ιούς, μικροοργανισμούς και διάφορα είδη φυτών και ζώων. Περίπου 70 χρόνια πριν, άρχισε να εφαρμόζεται ένας συστημικός φορμαλισμός στις μελέτες αυτού του είδους, καθώς η λογική ανάλυση της επίδρασης των χαμηλών θερμοκρασιών άρχισε να γίνεται ευρύτερη και να συγκαλούνται συναντήσεις, με σκοπό τη συζήτηση ευρυμάτων και παρατηρήσεων της επίδρασης αυτής σε διάφορα

είδη φυτών και ζώων. Τα πρακτικά πολλών από αυτές τις συναντήσεις δημοσιεύτηκαν, ώστε οι συζητήσεις και οι απόψεις πολλών συμμετεχόντων μπορούν, να μελετηθούν μέχρι και σήμερα (Harris, 1954; Wolstenholme and Cameron, 1954). Το 1957, πραγματοποιήθηκε ένα συμπόσιο με τίτλο “A Discussion on Viability of Mammalian Cells and Tissues after Freezing” κάτω από την καθοδήγηση του Alan S. Parkes, που διηύθηγε τότε το Εθνικό Ινστιτούτο Ιατρικής Έρευνας στο Mill Hill του Λονδίνου. Ήταν το ενδιαφέρον του Parkes για την βιολογία των χαμηλών θερμοκρασιών, που τον οδήγησε να γαλουχήσει μερικούς από τους επιστήμονες του πεδίου, που αργότερα θα συνέβαλαν ουσιαστικά στην ανάπτυξη της Κρυοβιολογίας, όπως και σε άλλους τομείς.

Σε κάποιους τομείς, κύριως στην υποβοηθούμενη αναπαραγωγή –ανθρώπων και ζώων- η κρυοσυντήρηση γαμετών και αναπαραγωγικών ιστών έχει εξελιχθεί σε απαραίτητο πρόσθετο της επιστήμης. Κάθε χρόνο, πάνω από 25 εκατομμύρια αγελάδες υπόκεινται σπερματέγχυση με αποψυγμένο σπέρμα τάυρων (Foote, 1981; Iritani, 1980). Επιπλέον, την τελευταία δεκαετία, εκατοντάδες χιλιάδες βοοειδή έχουν γεννηθεί, μετά από μεταφορά αποψυγμένων έμβρυων σε αγελάδες (Thibier, 2002). Τελικά, σύμφωνα με καταμέτρηση, που πραγματοποιήθηκε από τις οργανώσεις European Society for Human Reproduction and Embryology (ESHRE – Nygen and Andersen, 2002) και Society for Assisted Reproduction Technologies (SART, 2002), κυριολεκτικά χιλιάδες ανθρώπινα μωρά έχουν γεννηθεί, μέσω μεταφοράς κρυοσυντηρημένων εμβρύων. Ο μεγάλος αριθμός απογόνων (ανθρώπων και ζώων) που έχουν προκύψει από κρυοσυντηρημένους γαμέτες και έμβρυα αποδεικνύει την επίδραση της Κρυοβιολογίας στην κοινωνία του 21^{ου} αιώνα.

ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ **ΑΝΑΚΑΛΥΨΗ ΤΟΥ ΘΕΡΜΟΜΕΤΡΟΥ**

Παρ' ότι οι άνθρωποι, προφανώς, πάντα ήταν ικανοί να αντιλαμβάνονται την αίσθηση της θερμότητας ή της απουσίας της, δεν ήταν παρά με την ανακάλυψη του θερμόμετρου, η ικανότητα να αποδοθούν συγκεκριμένες τιμές σε βαθμούς κρύου ή ζέστης. Σύμφωνα με μία πρώιμη περιγραφή από τον Bolton (1900) της ανακάλυψης του θερμόμετρου, μία από τις πρώτες απόπειρες κατασκευής μίας συσκευής, που θα μετρούσε τη θερμοκρασία ανήκει στον Galileo Galilei, στις αρχές του 17^{ου} αιώνα. Τα πρώτα ακριβή θερμόμετρα εφευρέθηκαν το 1714 από το Γερμανό φυσικό, Gabriel Fahrenheit, ο οποίος εισήγαγε τη χρήση υδράργυρου μέσα σε γυαλί για τη θερμομετρία. Τα θερμόμετρα αυτά μεταπονήθηκαν αργότερα από το Γάλλο φυσικό René Réaumur, το 1731. Η θερμομετρική κλίμακα, που δηλώνει το “τριπλό σημείο” του νερού (η θερμοκρασία και η πίεση στην οποία το νερό υφίσταται ως υγρό, πάγος και ατμός) ως 0.01° και το σημείο βρασμού του νερού ως 100° προτάθηκε αρχικά από το Σουηδό αστρονόμο Anders Celsius. Έκτοτε, η μέτρηση της θερμοκρασίας έχει γίνει πολύ εύκολη, πολύ πιο ακριβής και μπορεί, να πραγματοποιηθεί με ποικιλία οργάνων ακόμη και σε μικρή ποσότητα δείγματος.

Όπως αναφέρει η Smith (1961), παράλληλα με την ανακάλυψη μεθόδων μέτρησης της θερμοκρασίας με ακρίβεια, σημαντικό ρόλο στη διέγερση της έρευνας πάνω στη βιολογία των χαμηλών θερμοκρασιών ήταν και η γενικότερη πρόοδος της Φυσικής και της Χημείας κατά το δεύτερο μισό του 19^{ου} αιώνα. Κατά την περίοδο αυτή έρευνες επικεντρώθηκαν στις ιδιότητες των διαλυμάτων, π.χ. όσμωση (Jacobus van't Hoff). Το ίδιο διάστημα μελετήθηκε και η υγροποίηση του οξυγόνου, του υδρογόνου και του αζώτου από τον Γάλλο φυσικό Louis-Paul Cailletet (1877). Η παραγωγή

υγροποιημένου αέρα πραγματοποιήθηκε το 1895 από τον Linde και η υγροποίηση του υδρογόνου από τον James Dewar, το 1898. Με άλλα λόγια, κατέστη δυνατή η χρήση υγροποιημένων αερίων ως ψυκτικά μέσα για την κατάψυξη δειγμάτων σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Όταν κύτταρα ή κυτταρικά συστήματα (ιστοί) εκτίθενται στο σχηματισμό πάγου, ο οποίος συνοδεύει την έκθεση σε χαμηλότερες του μηδενός θερμοκρασίες, υποβάλλονται σε σοβαρές αλλαγές της φυσικής κατάστασης και των χημικών ιδιοτήτων του περιβάλλοντός τους και τα ίδια τα κύτταρα χαρακτηρίζονται από έντονες φυσικές αποκρίσεις στις αλλαγές αυτές. Το νερό παίζει ουσιαστικό ρόλο στη δομή και τη λειτουργία των ζώντων συστημάτων και η πιο προφανής αλλαγή, που είναι συνέπεια της κατάψυξης, είναι ότι η ποσότητα του υγρού αυτού μειώνεται σταδιακά και τελικά μηδενίζεται.

Ακόμη κι αν δεν επηρεαζόταν η αλληλεπίδραση νερό-μακρομόρια-κυτταρική δομή από την κατάψυξη, μόνο η μείωση του υγρού δημιουργεί τεράστιες ωσμωτικές ανισορροπίες, στις οποίες τα κύτταρα πρέπει, να αποκριθούν.

Γραφήματα, που έχουν προκύψει από μελέτες και συγκρίνουν κυτταρική επιβίωση και ρυθμό ψύξης, παρουσιάζουν μορφή ανεστραμμένου U, η οποία θα περιγραφεί παρακάτω. Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν, ότι οι κυτταρικές βλάβες από ψύξη ταχέως ρυθμού έχουν διαφορετική αφετερία, από αυτές που δημιουργούνται κατά τη βραδεία ψύξη. Η ταχεία ψύξη δημιουργεί μία ωσμωτική ανισορροπία μεταξύ ενός κυττάρου και του περιβάλλοντός του και οδηγεί στη μεγάλη μείωση της θερμοκρασίας του ενδοκυττάριου νερού, ανάλογη του ρυθμού κατάψυξης και αντιστρόφως ανάλογη της διαπερατότητας της μεμβράνης στο νερό. Αυτή η μείωση της θερμοκρασίας δεν μπορεί, να διατηρηθεί και τελικά το ενδοκυττάριο νερό θα παγώσει εσωτερικά με θανατηφόρες, συνήθως, συνέπειες για το κύτταρο. Το γεγονός ότι ένα κύτταρο μπορεί, να μειώσει τη θερμοκρασία του σε οποιοδήποτε βαθμό, παρά την παρουσία εξωκυττάριου πάγου σημαίνει, ότι τουλάχιστον αρχικά, η πλασματική μεμβράνη αποτελεί φραγμό στο σχηματισμό πάγου από το εξωτερικό προς το εσωτερικό, εντούτοις ο ενδοκυττάριος σχηματισμός πάγου εξαρτάται από την ύπαρξη πάγου στο εξωτερικό.

Κατά τη βραδεία ψύξη τα κύτταρα δεν υφίστανται ενδοκυτταρική ψύξη, αλλά παρ'όλ'αυτά βλάπτονται, γενικά, αν καταψυχθούν πολύ αργά κι αν δεν είναι παρόντες κρυοπροστατευτικοί παράγοντες κατάλληλου τύπου και συγκέντρωσης. Το μεγαλύτερο μέρος των ερωτημάτων, που προκύπτουν από τα δεδομένα αυτά, αφορούν τις θεωρίες τόσο της βλάβης από την ψύξη, αλλά και της προστασίας από αυτήν. Αυτές περιλαμβάνουν θεωρίες που προτείνουν, πως η βλάβη σχετίζεται είτε με την αύξηση της συγκέντρωσης διαλυμένων ουσιών (κυρίως ηλεκτρολύτες), που ακολουθεί το σχηματισμό πάγου, είτε με την αντίστροφη κατάσταση που δημιουργείται, δηλαδή τη χαμηλότερη συγκέντρωσή τους στο τμήμα του διαλύματος, που δεν έχει καταψυχθεί. Οι θεωρίες αυτές υποστηρίζουν, πως η κρυοπροστασία σχετίζεται με την ικανότητα ορισμένων διαπεραστικών μη-τοξικών, μη-ηλεκτρολυτών, όπως η γλυκερόλη, να μειώνουν τις συγκεντρώσεις καταστροφικών διαλυμένων ουσιών και να αυξάνουν την έκταση του μη ψυγμένου τμήματος σε συγκεκριμένη θερμοκρασία χαμηλότερη του μηδενός. Μερικοί ερευνητές, ωστόσο, πιστεύουν πως η βλάβη κατά τη βραδεία ψύξη είναι άμεσο αποτέλεσμα της

αφυδάτωσης της κυτταρικής μεμβράνης και η προστασία προκύπτει από την ικανότητα των κρυοπροστατευτικών παραγόντων, να υποκαθιστούν το νερό ή αλλιώς να προστατεύουν έναντι της βλάβης, που προκαλεί η διατάραξη ή απομάκρυνση της υδάτινης στρώσης των κυτταρικών μεμβρανών.

Τελικά, η κατάψυξη αποτελεί το ήμισυ της ιστορίας. Για να λειτουργήσει, ένα καταψυγμένο κύτταρο πρέπει να επανέλθει σε κανονικές θερμοκρασίες και να επιβιώσει αυτήν την άυξηση θερμοκρασίας καθώς και την τήξη του πάγου. Στην περίπτωση της βραδείας ψύξης, τα γεγονότα, που λαμβάνουν χώρα κατά την επιστροφή στην ατμοσφαιρική θερμοκρασία είναι αντίστροφα αυτών της κατάψυξης. Αυτό, όμως, δε συμβαίνει στα κύτταρα, που έχουν καταψυχθεί με ταχεία ψύξη. Συνήθως, τα κύτταρα αυτά, αντιδρούν αρκετά καλύτερα αν η επακόλουθη αύξηση θερμοκρασίας είναι κι αυτή ταχεία. Αυτό το πλεονέκτημα εξηγείται από το μέγεθος των κρυστάλλων πάγου, που δημιουργούνται κατά την αρχική ψύξη και την επίδραση του ρυθμού απόψυξης στο μέγεθος αυτό. Οι μεγαλύτεροι ρυθμοί κατάψυξης δημιουργούν μικρότερους εσωτερικούς κρυστάλλους πάγου και όσο μικρότεροι είναι οι κρύσταλλοι αυτοί, τόσο μικρότερη καταστροφή προκαλούν. Παρ'όλ'αυτά, αν η αύξηση της θερμοκρασίας στα κύτταρα ταχείας ψύξης γίνει αργά, τότε οι κρύσταλλοι αυτοί μπορεί να μεγεθυνθούν σε καταστροφικά για το κύτταρο μεγέθη, με τη διαδικασία της επανακρυσταλλοποίησης. Μία άλλη πιθανότητα, που μπορεί, να σχετίζεται είναι, ότι ακόμη και σε χαμηλούς ρυθμούς ψύξης, δεν παγώνει όλη η ποσότητα νερού του κυττάρου. Ένα κλάσμα της ποσότητας αυτής, μπορεί να υαλοποιηθεί (vitrification). Αν η επακόλουθη αύξηση της θερμοκρασίας είναι αργή, αυτό το υαλοποιημένο νερό, μπορεί να μετατραπεί σε πάγο με καταστρεπτικά αποτελέσματα. Στόχος είναι η μεγιστοποίηση αυτής της υαλοποίησης στην κρυοσυντήρηση ιστών και οργάνων, συστήματα δηλαδή, που βλάπτονται από τόσο από εξωκυτταρικό, όσο και από εσωκυτταρικό σχηματισμό πάγου. Όλες αυτές οι έννοιες αναλύονται παρακάτω. Ας ξεκινήσουμε, όμως, από κάποιες βασικές βιολογικές αρχές για την καλύτερη κατανόηση των διεργασιών, που πραγματοποιούνται κατά την κατάψυξη και απόψυξη.

ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΒΙΟΦΥΣΙΚΗΣ ΚΑΙ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΚΥΤΤΑΡΟΥ

ΝΕΡΟ

Το νερό παίζει κεντρικό ρόλο στην Κρυοβιολογία και, βασικά, κεντρικό ρόλο στη βιολογία. Διάφορες πλευρές της τελευταίας και η εξάρτησή τους από τις μοναδικές ιδιότητες της υγρής κατάστασης του νερού περιγράφηκαν έναν αιώνα πριν από τον L. J. Henderson (1913). Οι ασυνήθιστες ιδιότητές του μπορούν, να γίνουν διακριτές, όταν συγκριθεί με το ανάλογο του στον περιοδικό πίνακα: το σουλφίδιο του υδρογόνου. Για παράδειγμα το σημείο βρασμού είναι στους 100° και στους -60°C αντίστοιχα, το σημείο τήξης είναι οι 0° και οι -86°C, η θερμότητες εξαέρωσης είναι 10,7 και 4,5 kcal/mole και η διηλεκτρική σταθερά είναι 78 και 9 αντίστοιχα (Lide 1992; Nemethy and Scheraga, 1964). Αυτές οι ιδιότητες προκύπτουν από τη δομή του μορίου του νερού και τη διανομή του φορτίου, που το χαρακτηρίζει. Μέσω υπέρυθρης και φασματοφωτομετρίας έχει δειχθεί, πως το μόριο του νερού έχει το

σχήμα ενός Αυστραλιανού μπουμεράνγκ (ή ενός ισοσκελούς τριγώνου). Το οξυγόνο βρίσκεται στο κέντρο, ενώ τα δύο υδρογόνα στις άκρες. Η απόσταση μεταξύ του οξυγόνου και του κάθε υδρογόνου είναι 0,97 Å, ενώ η απόσταση μεταξύ των δύο υδρογόνων (δηλαδή η διάμετρος του μορίου του νερού) είναι 1,54 Å (Robinson and Stokes, 1959, p. 2).

Το άτομο του οξυγόνου έχει έξι ηλεκτρόνια στην εξωτερική του στιβάδα. Δύο απ' αυτά συνδυάζονται με τα μοναδικά ηλεκτρόνια στην εξωτερική στιβάδα δύο ατόμων υδρογόνου, ώστε να δημιουργηθούν οι δύο O-H ομοιοπολικοί δεσμοί. Οι δεσμοί αυτοί (οι δύο ίσες πλευρές του ισοσκελούς τριγώνου, που σχηματίζει το μόριο του νερού) βρίσκονται σε γωνία 105°, που είναι πολύ κοντά στις 109° μεταξύ του κέντρου ενός τετράεδρου και των κορυφών του (Eisenberg and Kauzmann, 1969, p.4; Robinson and Stokes 1959, p.2). Τα υδρογόνα φέρουν ένα καθαρό θετικό φορτίο, με τα ατομικά φορτία τους, να κατευθύνονται προς τις δύο κορυφές ενός τετράεδρου. Τα εναπομείναντα τέσσερα ηλεκτρόνια αναφέρονται ως μονήρη. Τα δύο μονήρη ηλεκτρόνια προσδίδουν ένα καθαρό αρνητικό φορτίο στη μεριά του μορίου του νερού με το οξυγόνο και αυτά τα φορτία κατευθύνονται προς τις άλλες δύο κορυφές του τετράεδρου. Μία σημαντική συνέπεια της παραπάνω δομής είναι, ότι τα δύο θετικά φορτία στην πλευρά του υδρογόνου ενός δεδομένου μορίου νερού έλκονται ηλεκτροστατικά από τα μονήρη ηλεκτρόνια στην πλευρά του οξυγόνου δύο άλλων μορίων νερού. Επίσης, τα δύο κέντρα αρνητικού φορτίου στην πλευρά του οξυγόνου ενός δεδομένου μορίου νερού έλκονται ηλεκτροστατικά από τα πρωτόνια δύο άλλων μορίων νερού. Με άλλα λόγια, ένα δεδομένο μόριο νερού μπορεί να έλκεται από τέσσερα άλλα μόρια νερού, που βρίσκονται στις κορυφές του τετράεδρου. Δύο από αυτά τα περιβάλλοντα μόρια νερού έχουν τα οξυγόνα τους προς το κεντρικό μόριο και τα άλλα δύο έχουν τα υδρογόνα τους προς το κέντρο.

Η βασική ηλεκτροστατική έλξη μεταξύ των πρωτονίων και των οξυγόνων, αναφέρεται ως υδρογονικός δεσμός. Οι υδρογονικοί δεσμοί είναι ασθενείς (6 έως 8 kcal/mole; Eisenberg and Kauzmann, 1969, p.139) συγκριτικά, για παράδειγμα, με τους δεσμούς μεταξύ ατόμων άνθρακα (145 kcal/mole). Παρ'όλ'αυτά, λόγω της εκτεταμένης παρουσίας τους στα βιολογικά συστήματα, οι δεσμοί αυτοί παίζουν ζωτικό ρόλο. Σ'αυτούς τους υδρογονικούς δεσμούς οφείλεται το ασυνήθιστα υψηλό σημείο βρασμού και σημείο τήξης του νερού, καθώς και για την ασυνήθιστα υψηλή θερμοχωρητικότητά του.

Ένα ακόμη σημαντικό χαρακτηριστικό του μορίου του νερού είναι, ότι τα κέντρα βάρους των δύο αρνητικών και των δύο θετικών φορτίων του δε συμπίπτουν. Αυτό δίνει στο μόριο του νερού μία σημαντική διπολική ιδιαιτερότητα, καθιστώντας το διπολικό μόριο (Robinson and Stokes, 1959, p.2). Επιπλέον, αν το μόριο του νερού είναι ελεύθερο να περιστραφεί, διαθέτει μία μεγάλη διηλεκτρική σταθερά (78). Η σταθερά αυτή σημαίνει, ότι μπορεί το μόριο αυτό να περιορίσει το ηλεκτρικό πεδίο μεταξύ δύο άλλων φορτισμένων στρώσεων ή μορίων, όπως ιόντα, σε μικρότερη ένταση, όπως θα ήταν σε περίπτωση μη πολικού διαλύτη.

Η ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΠΑΓΟΥ

Η δομή του πάγου (κοινώς Πάγος Ι) αντιπροσωπεύει τη φυσική πραγματικότητα της παραπάνω θεωρίας. Πιο αναλυτικά, στον πάγο, κάθε κεντρικό μόριο νερού περιβάλλεται από -και δεσμεύεται με υδρογονικούς δεσμούς- με τέσσερα άλλα μόρια νερού, τοποθετημένα στις υποθετικές κορυφές ενός τετράεδρου. Η απόσταση O-O είναι 2,76 Å (Eisenberg and Kauzmann, 1969, p.71). Αυτή η δομή επαναλαμβάνεται

αόριστα. Η ανοιχτή δομή του πάγου είναι υπεύθυνη για την πυκνότητά του, που είναι πολύ μικρότερη από από την πυκνότητα των περισσότερων στερεών. Τα υψηλά σημεία τήξης και εξάχνωσης οφείλονται στην εκτεταμένη παρουσία υδρογονικών δεσμών. Η θερμότητα στο σημείο εξάχνωσης είναι 12,2 kcal/mole και αντιπροσωπεύει την απαραίτητη θερμότητα για τη διάσπαση κατά μέσο όρο δύο υδρογονικών δεσμών ανά μόριο.

ΝΕΡΟ ΣΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Η λειτουργία των μακρομορίων και των σύνθετων κυτταρικών δομών, όπως κυτταρικές μεμβράνες, που περιέχουν μακρομόρια, εξαρτάται άμεσα από τη δομή τους. Η δομή θα είναι αυτή, που περιορίζει την ελεύθερη ενέργεια και το νερό παίζει σημαντικό ρόλο στον περιορισμό αυτό.

Το νερό αποτελεί το 60-85% των κυττάρων. Επειδή τα κύτταρα περιέχουν πολύπλοκα μείγματα πρωτεϊνών, νουκλεϊκών οξέων, λιπιδίων και άλλων διαλυμένων ουσιών, δεν αποτελεί έκπληξη το γεγονός, ότι ένα ποσοστό του νερού είναι ενσωματωμένο ή δεσμευμένο πάνω στις ουσίες αυτές. Η ποσότητα του έχει προσμετρηθεί με μεθόδους παρόμοιες με αυτές, που έχουν χρησιμοποιηθεί σε καθαρά συστατικά και τα αποτελέσματα είναι συγκρίσιμα. Για παράδειγμα, ο Sun (1999) χρησιμοποίησε Διαφορική Σπινθηρογραφική Θερμιδομέτρηση (Differential Scanning Calorimetry) για να υπολογίσει την ποσότητα του νερού σε βελανίδια, που είναι ικανή να παγώσει. Η διαδικασία, που ακολούθησε ήταν η εξής: Αφυδάτωσε τα βελανίδια, ώστε να έχουν γνωστή περιεκτικότητα νερού και στη συνέχεια προσδιόρισε με DSC πόση θερμότητα εκλυόταν από τα βελανίδια κατά την ψύξη και, αντίστοιχα, πόση θερμότητα απορροφόταν κατά τη θέρμανσή τους. Καθώς μειώνει την περιεκτικότητα των βελανιδιών σε νερό, η θερμότητα μειωνόταν αναλογικά, μέχρις ότου η περιεκτικότητα σε νερό έφτασε τα 0,2 g ανά γραμμάριο ξηρού βάρους, σημείο στο οποίο δεν απλευθερώνονταν περαιτέρω θερμότητα μετά από κατάψυξη του δείγματος και δεν απορροφόταν θερμότητα κατά τη θέρμανσή του. Με άλλα λόγια, αυτή η ποσότητα νερού (0,2 g) δεν ήταν ικανή, να καταψυχθεί. Παρόμοια αποτελέσματα ελήφθησαν από τους Wood και Rosenberg (1957), 40 χρόνια νωρίτερα, αφορώντας κύτταρα ζύμης, χρησιμοποιώντας διαφορετική μέθοδο θερμιδομέτρησης. Περίπου το 10% του νερού (~0,25 g H₂O) στα κύτταρα αυτά δεν ήταν ικανό να καταψυχθεί (νερό ενυδάτωσης). Παρόμοια πειράματα διεξήχθησαν και από άλλες ομάδες (Koga et al. 1966, Schreuders et al. 1996) και με διάφορες μεθόδους. Τα αποτελέσματα αυτά -της ποσότητας του νερού στο εσωτερικό των κυττάρων- και ειδικά τα αποτελέσματα που ελήφθησαν από τις θερμιδομετρήσεις έχουν μεγάλη σημασία, όσον αφορά την κρυοβιολογία. Η κατάψυξη είναι ένας τρόπος απομάκρυνσης νερού μετατρέποντας το σε πάγο είτε μέσα στο κύτταρο, είτε μετά από μεταφορά του στο εξωκυτταρικό περιβάλλον. Οι θερμιδικές μετρήσεις δείχνουν πως, κατάψυξη σε θερμοκρασίες υπό του μηδενός, θα οδηγήσει στην μετατροπή του 90% του νερού σε παγό, με μία από τις δύο προαναφερθείσες διαδικασίες, αλλά όχι το εναπομείναν 10%. Αυτό φαίνεται, να μεταφράζεται στο ότι η κατάψυξη επηράζει την ποσότητα του ελεύθερου νερού στα κύτταρα, αλλά όχι την ποσότητα, που μάλλον χρησιμοποιείται στην ενυδάτωση μορίων.

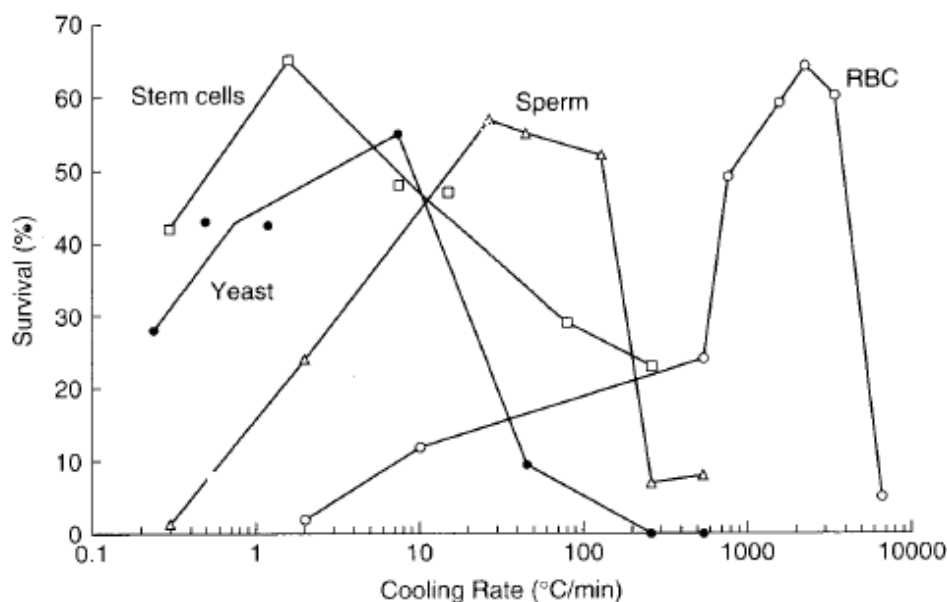
Υπάρχουν τρόποι, να απομακρυνθεί και αυτή η ποσότητα του νερού (π.χ. αφυδάτωση μέσω κενού), αλλά έρευνες έχουν δείξει, ότι ενώ τα κύτταρα μπορούν να επιβιώσουν ικανοποιητικά με την απομάκρυνση του 90% του ύδατος, αφαίρεση της παραμένουσας ποσότητας μπορεί, να οδηγήσει σε ανεπανόρθωτη βλάβη (Sun, 1999).

Δεν αποτελεί έκπληξη το γεγονός, ότι η απομάκρυνση του νερού ενυδάτωσης προκαλεί δυσάρεστες συνέπειες στο κύτταρο, αφού οι αλληλεπιδράσεις του με τα μακρομόρια παίζουν σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση των μορίων αυτών. Ακόμη δεν έχει διαλευκανθεί αν η περαιτέρω ψύξη, αυτή καθ'αυτή, επηρεάζει το νερό ενυδάτωσης των κυτταρικών μεμβρανών και κατά πόσο αυτό έχει τραυματικές επιπτώσεις.

ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΚΡΥΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗΣ

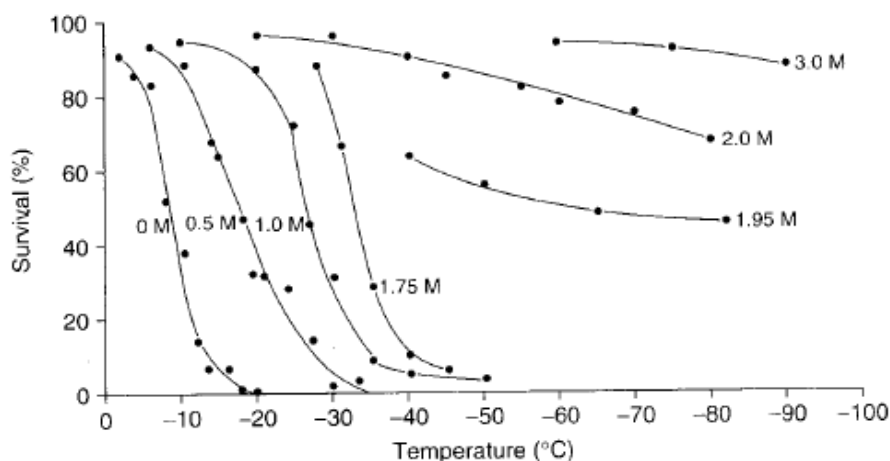
Το ανεστραμμένο U

Ένας σπουδαίος παράγοντας, για το αν θα επιβιώσει ένα κύτταρο μετά από κατάψυξη σε θερμοκρασίες υπό του μηδενός, είναι ο ρυθμός με τον οποίο θα καταψυχθεί. Όπως έχει προαναφερθεί, συνήθως τα διαγράμματα, που απεικονίζουν την επιβίωση σε σχέση με το ρυθμό ψύξης, παίρνουν τη μορφή ενός ανεστραμμένου U, όπως φαίνεται και στο σχήμα 2 (Sel 22). Η βέλτιστη επιβίωση επιτυγχάνεται σε ενδιάμεσο ρυθμό. Λιγότερα κύτταρα επιβιώνουν αν η κατάψυξη γίνει πολύ αργά και ακόμη λιγότερα αν γίνει πολύ γρήγορα. Υπάρχουν άφθονα παραδείγματα, όπως ανθρώπινοι ινοβλάστες (Böhmer et al., 1973), βλαστοκύτταρα από μυελό των οστών ποντικού (Leibo et al., 1970), V79 κύτταρα ιστού χάμστερ (Mazur et al., 1972), ανθρώπινα λεμφοκύτταρα (Scheiwe and Körber, 1983; Taylor et al., 1987), σπέρμα θηλαστικών (Henry et al., 1993; Koshimoto and Mazur, 2002; Woelders et al., 1997), ζύμη (Lepock et al., 1984) και Chlamydomonas (Morris, 1979).



Σχήμα 2: Επιβίωση βλαστοκυττάρων ποντικού, ζύμης, σπερματοζωαρίων ποντικού και ανθρώπινων ερυθροκυττάρων ως συνάρτηση του ρυθμού κατάψυξης. Τα δεδομένα για τα σπερματοζωάρια είναι από τους Koshimoto και Mazur (2002). Τα υπόλοιπα γραφήματα είναι από τις εργασίες του Mazur (1970).

Η γραφική παράσταση του ανεστραμμένου U μπορεί, να εξηγηθεί από τη δράση δύο αντίθετων βλαπτικών παραγόντων. Ο ένας τείνει, να προκαλεί βλάβες σε υψηλούς ρυθμούς κατάψυξης, ενώ ο άλλος σε χαμηλούς. Ένας πρώτος στόχος είναι, να εξηγηθεί ποιοι παράγοντες μπορεί, να είναι αυτοί. Ένας άλλος στόχος είναι να ερμηνευθεί το γεγονός, ότι ο βέλτιστος ρυθμός κατάψυξης ποικίλλει μεταξύ των διαφορετικών ειδών κυττάρων. Όπως φαίνεται στο σχήμα 2, ο ρυθμός αυτός είναι 1°C/min για τα βλαστοκύτταρα ποντικού και πάνω από 1000°C/min για ανθρώπινα ερυθροκύτταρα. Για άλλα είδη κυττάρων (π.χ. έμβρυα ποντικού) ο ρυθμός αυτός μπορεί, να είναι κάτω από 1°C/min (Whittingham et al., 1972). Δύο ακόμη παράγοντες πρέπει, να ερμηνευθούν. Ο ένας είναι, ότι τα δύο άκρα του U τείνουν να συμπεριφέρονται διαφορετικά –όσον αφορά την επιβίωση των κυττάρων- σε σχέση με το ρυθμό θέρμανσης των δειγμάτων, αλλά και σε σχέση με το είδος και τη συγκέντρωση των κρυοπροστατευτικών παραγόντων (Cryoprotective Agents - CPA). Γενικά, κύτταρα που έχουν καταψυχθεί με ρυθμό μεγαλύτερο από το βέλτιστο, τείνουν να έχουν καλύτερη επιβίωση όταν θερμαίνονται ταχέως. Τα κύτταρα, που έχουν καταψυχθεί με ρυθμό μικρότερο από το βέλτιστο αντιδρούν αντίθετα ή και δεν επηρεάζονται καθόλου από το ρυθμό θέρμανσης. Οι επιπτώσεις από τη χρήση κρυοπροστατευτικών παραγόντων είναι επίσης ασύμμετρες. Οι παράγοντες αυτοί τείνουν, να προστατεύουν κύτταρα με αργό ρυθμό ψύξης –αναλογικά και με τη συγκέντρωσή τους- σχήμα 3- αλλά συνήθως δεν προσφέρουν προστασία σε κύτταρα που ψύχονται με μεγαλύτερο ρυθμό από το βέλτιστο (Wellman and Pendyala, 1979) ή ακόμη και να προκαλούν βλάβες σε ρυθμούς λίγο μεγαλύτερους από το βέλτιστο, σε σχέση με τις βλάβες που προκαλούνται εν τη απουσία τους (Diller, 1979).



Σχήμα 3: Επιβίωση (ποσοστό μη αιμολυμένων κυττάρων) ανθρώπινων ερυθροκυττάρων μετά από διαδικασία κατάψυξης-απόψυξης ως συνάρτηση της συγκέντρωσης γλυκερόλης σε ισοτονικό αλατούχο διάλυμα, καθώς και ως συνάρτηση της θερμοκρασίας στην οποία διατηρήθηκαν. Η κατάψυξη ήταν αργή (1,7 °C/min), ενώ η απόψυξη ταχεία (Souzu and Mazur, 1978).

Έκτοτε ποικίλλες μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί για διάφορους τύπους κυττάρων, ιστών και οργάνων. Μεγάλο μέρος της προόδου στον τομέα αυτό οφείλεται σε εμπειρικές γνώσεις, αλλά και στη βασική Κρυοβιολογία. Η βαθύτερη κατανόηση των αιτιών της βλάβης, που προκαλεί η κατάψυξη βοήθησε στη βελτίωση των μεθόδων

κρυοσυντήρησης. Η συνεχής έρευνα στις βασικές αρχές της Κρυοβιολογίας έχει προσφέρει τη βάση για νέες μεθόδους κατάψυξης, όπως είναι η “υαλοποίηση” ή αλλιώς vitrification.

Οι δύο πιο κοινές μέθοδοι κατάψυξης γαμετών είναι δύο. Η αργή κατάψυξη (slow freezing) και η υαλοποίηση-ταχεία κατάψυξη (vitrification).

Αυτές οι μέθοδοι είναι αρκετά διαφορετικές μεταξύ τους, αλλά σχετίζονται με τις ίδιες φυσικο-χημικές σχέσεις και περιγράφονται παρακάτω.

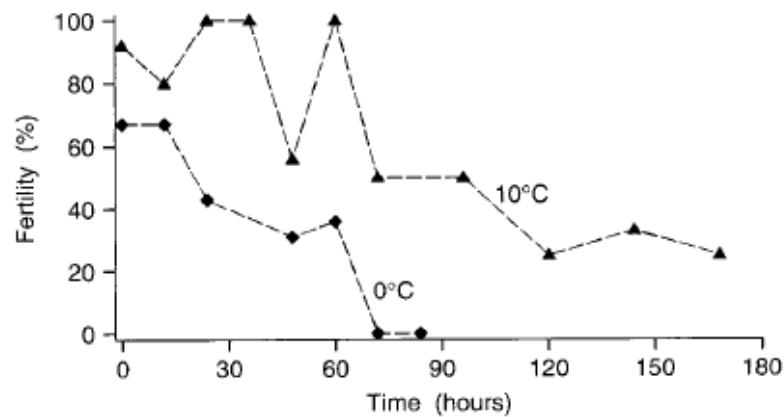
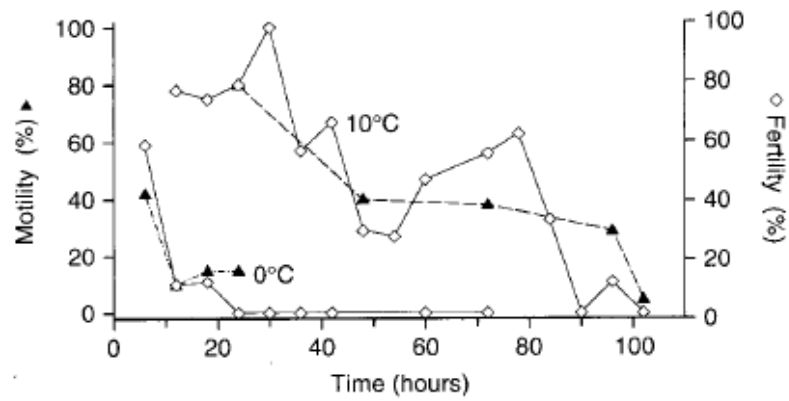
ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΓΑΜΕΤΩΝ

Για την κατανόηση και την εκτίμηση της κρυοβιολογίας των γαμετών και των εμβρύων είναι απαραίτητη η μελέτη της εξέλιξης της επιστήμης της εμβρυολογίας και της αναπαραγωγικής βιολογίας. Στη τρίτη έκδοση του βιβλίου, με τίτλο “Physiology of Reproduction” (1960), ο Parkes περιγράφει ό,τι ήταν τότε γνωστό για την επίδραση των χαμηλών θερμοκρασιών στα σπερματοζώαρια. Η τέταρτη έκδοση περιλαμβάνει μία αναλυτική σύνοψη από τον Watson (1990), ο οποίος παρέχει λεπτομερή συζήτηση της κρυοβιολογίας των σπερματοζωαρίων. Είναι διδακτικό και διαφωτιστικό, να αναφερθούμε στην αρχική περιγραφή της αναπαραγωγικής βιολογίας. Ο Lillie το 1916 συνοψίζει την “ιστορία του προβλήματος της γονιμοποίησης” ξεκινώντας από τις παρατηρήσεις του Αριστοτέλη, όσον αφορά την καθημερινή καταγραφή της ανάπτυξης του εμβρύου κότας. Σύμφωνα με τον Lillie, η βελτίωση του μικροσκοπίου και η χρήση του στη μελέτη της αναπαραγωγής απέφερε την πρώτη βασική πρόοδο στη θεωρία της αναπαραγωγής, με κυριότερη την ανακάλυψη του σπερματοζωαρίου από τον Δανό μικροσκοπιστή, *Anton van Leeuwenhoek*, το 1677. Το επόμενο σημείο-σταθμός είναι η περιγραφή, το 1785, από τον Ιταλό φυσιολόγο και ανατομιστή *Lazzaro Spallanzani*, των τότε δεδομένων θεωριών για τη γονιμοποίηση. Ήταν ο πρώτος, που υποστήριξε, ότι στο βάτραχο, η γονιμοποίηση λαμβάνει μέρος εκτός του σώματος και παρέθεσε πειραματικές αποδείξεις, που κατέρριπταν τη θεωρία της αυθόρμητης δημιουργίας. Ήταν επίσης ο πρώτος, που πραγματοποίησε σπερματέγχυση σε σκύλους, άρα όπως αναφέρει ο Lillie “έθεσε τα θεμέλια για τη διάδοση της σπερματέγχυσης και σε άλλα είδη ζώων”. Αργότερα, οι Prévost και Dumas, που επίσης μελέτησαν τη γονιμοποίηση στο βάτραχο, κατέληξαν στο συμπέρασμα, ότι το σπερματοζώαριο εισέρχεται στο ωάριο και αυτό αποτελεί την αρχή δημιουργίας του εμβρύου. Αργότερα ο Prévost (1840), περιγράφει περαιτέρω πειράματα, στα οποία παρατήρησε, πως τα σπερματοζώαρια ήταν ικανά, να υποστούν ψύξη έως και -8°C υπό του μηδενός, χωρίς να χάσουν μόνιμα την κινητικότητα τους. Ανέφερε επίσης, ότι είχε καταψύξει όρχεις βατράχου και κατάφερε μετά την απόψυξη, να ανακτήσει κινούμενα σπερματοζώαρια. Πέρα από αυτές τις παρατηρήσεις, το δεύτερο μισό του 19^{ου} λίγα προσέφερε στην κατανόηση της γονιμοποίησης. Παρ’όλ’αυτά, το 1873, ο Γερμανός ζωολόγος *Otto Bütschli* παρατήρησε σε ωάρια νηματοειδών, αυτό που σήμερα είναι γνωστό ως οι προπυρήνες του ωαρίου και του σπερματοζωαρίου. Ο Lillie συνόψισε επίσης και τους πιθανούς εξωγενείς παράγοντες, που μπορεί να επιδράσουν στην γονιμοποίηση, η οποία όπως σημείωσε λαμβάνει χώρα σε συγκεκριμένο εύρος θερμοκρασιών. Αν η θερμοκρασία είναι εκτός του εύρους αυτού, η γονιμοποίηση είναι αδύνατη.

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΧΑΜΗΛΩΝ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΩΝ ΣΕ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑ ΚΟΥΝΕΛΙΟΥ

Όπως είναι γνωστό η θερμοκρασία έχει πολύ σοβαρή επίδραση στα βιολογικά συστήματα. Δύο ερευνητές, που δούλευαν παράλληλα και σε συνεργασία -Hammond και Walton (1930)- διεξήγαν πειράματα για να αποκαλύψουν τις επιδράσεις διαφόρων θερμοκρασιών από τους 0°C έως τους 45°C σε σπερματοζώαρια κουνελιού. Ο Hammond μελέτησε δείγματα από εκσπερμάτηση και ο Walton δείγματα, που ελήφθησαν από το σπερματικό πόρο. Παρ'ότι διεξήγαν την έρευνα τους πολύ πριν την ανακάλυψη των μεθόδων εξωσωματικής γονιμοποίησης, κατάφεραν, να ποσοτικοποιήσουν τη λειτουργικότητα των επεξεργασμένων δειγμάτων σπέρματος, χρησιμοποιώντας δείγμα από αρσενικά μίας ράτσας κουνελιών, για να γονιμοποιήσουν τα θηλυκά, που ανήκαν σε μία άλλη. Έτσι η πατρότητα των απογόνων θα μπορούσε, να ταυτοποιηθεί. Με αυτόν τον τρόπο, κατάφεραν να μελετήσουν τα επεξεργασμένα δείγματα σπέρματος, μέσω της γονιμοποιητικής τους ικανότητας, αφού τα δείγματα από το σπερματικό πόρο δεν έχουν αποκτήσει ακόμη κινητικότητα. Επιπλέον, ο Hammond και ο Walton διεξήγαν τα πειράματά τους παράλληλα, έτσι ώστε να είναι δυνατή η σύγκριση της επίδρασης των διαφόρων θερμοκρασιών στα δύο είδη δειγμάτων σπέρματος (εκσπερμάτησης και σπερματικού πόρου). Μία πτυχή των πειραμάτων του Walton έχει πολύ ενδιαφέρον. Ο ερευνητής θεώρησε, πως αφού τα σπερματοζώαρια θα ληφθούν από το σπερματικό πόρο, θα πρέπει να είναι "προστατευμένα" από τις οξειδωτικές επιδράσεις του ατμοσφαιρικού αέρα, οπότε θα ήταν προτιμότερο να αποφευχθεί η έκθεση των κυττάρων στον αέρα, πριν την έκθεσή τους στις διάφορες θερμοκρασίες. Έτσι συνέλεξε τα σπερματοζώαρια από την αναπαραγωγική οδό κατευθείαν σε απαερισμένο θρεπτικό υλικό, καλυμμένο με λάδι.

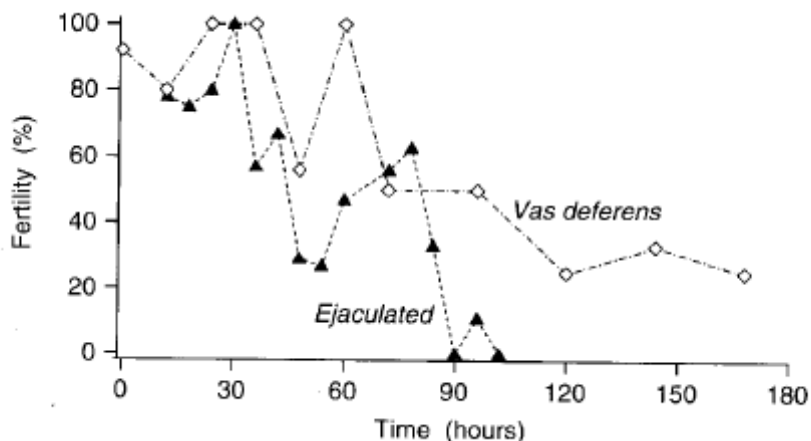
Για να διευκρινιστούν κάποιες από τις επιδράσεις των χαμηλών θερμοκρασιών στους γαμέτες, κάποια από τα αποτελέσματα των Hammond και Walton φαίνονται στα σχήματα 4 και 5 (σελ. 352-353). Ο Hammond κατέληξε στο συμπέρασμα, ότι περίπου 40-50% των σπερματοζωαρίων από εκσπερμάτηση διατηρούν την κινητικότητα και τη γονιμοποιητική τους ικανότητα, μέχρι και 72 ώρες στους 10°C, αλλά έχασαν σχεδόν όλη τους τη λειτουργικότητα μετά από περίπου 90 ώρες στη θερμοκρασία αυτή. Αν ψυχθούν και διατηρηθούν στους 0°C, τα σπερματοζώαρια από εκσπερμάτηση χάνουν την κινητικότητα και την ικανότητα, να γονιμοποιήσουν μέσα σε 12 έως 24 ώρες (πρώτο σχήμα). Σε αντίθεση, ο Walton παρατήρησε, ότι τα σπερματοζώαρια από το σπερματικό πόρο ήταν πολύ πιο ανθεκτικά (δεύτερο σχήμα). Μέτα από 175 ώρες στους 10°C, σπερματοζώαρια από αυτά τα δείγματα ήταν ικανά, να γονιμοποιήσουν ωάρια σε θηλυκά, που είχαν υποστεί διέγερση ωοθηκών. Ακόμη και όταν τα δείγματα αυτά παρέμειναν για 60 ώρες στους 0°C, 30% των θηλυκών που υπέστησαν σπερματέγχυση με τα ψυγμένα σπερματοζώαρια πέτυχαν εγκυμοσύνη και είχαν ζωντανό απόγονο.



Σχήμα 4 (επάνω): Επίδραση της θερμοκρασίας σε σπερματοζώαρια κουνελιού από εκσπερμάτιση. Δεδομένα από τον Hammond, 1930.

Σχήμα 5 (κάτω): Επίδραση της θερμοκρασίας σε σπερματοζώαρια κουνελιού από τον σπερματικό πόρο. Δεδομένα από τον Walton, 1930.

Τα συγκριτικά αποτελέσματα μεταξύ δειγμάτων από εκσπερμάτιση και σπερματικού πόρου, όσον αφορά τη σχετική γονιμοποιητική ικανότητα και μετά από διατήρηση στους 10°C, για διάφορα χρονικά διαστήματα, φαίνονται στο Σχήμα 6.



Σχήμα 6: Εγκυμοσύνη σε θυληκά λαγού, μετά από έγχυση με σπέρμα κουνελιού. Δεδομένα από τους Walton και Hammond, 1930.

Είναι προφανές, ότι η εκσπερμάτιση των σπερματοζωαρίων και η έκθεσή τους στο σπερματικό υγρό, τα καθιστά πολύ πιο ευαίσθητα στην ψύξη απ'ότι αυτά που δεν εκτίθενται. Έκτοτε, πολλοί ερευνητές έχουν αναφέρει παρόμοια αποτελέσματα για διάφορα είδη. Πλέον, είναι γνωστό, ότι η έκθεση των σπερματοζωαρίων στο πολύπλοκο σύστημα ορμονών και άλλων συστατικών των εκκρίσεων του προστάτη και των βολβουρηθραίων αδένων αλλοιώνουν τις ιδιότητες της επιφάνειάς τους. Απ'ότι φαίνεται αυτές οι μοριακές αλλαγές επηρεάζουν τη μεμβράνη των σπερματοζωαρίων κι έτσι τα καθιστούν λιγότερο ανθεκτικά στις βλάβες από τις χαμηλές θερμοκρασίες. Ένα πρακτικό συμπέρασμα από αυτή τη διαφορά στην ανθεκτικότητα των δύο ειδών δειγμάτων είναι, ότι εφόσον τα σπερματοζωάρια από την αναπαραγωγική οδό είναι πιο ανθεκτικά στις υπό του μηδενός θερμοκρασίες, θα είναι δυνατή η κρυοσυντήρηση ορχικού ιστού από είδη που απειλούνται με εξαφάνιση, όπως έχει ήδη γίνει για το σκύλο (Marks et al., 1994) και για το ποντίκι (Songsasen et al., 1998).

ΠΡΩΤΕΣ ΠΡΟΣΠΑΘΕΙΕΣ ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗΣ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΩΝ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

Είναι εντυπωσιακό το γεγονός, ότι η πρώτη αναφορά εμπειρικής κατάψυξης σπέρματος χρονολογείται στα τέλη του 16^{ου} αιώνα, αλλά –όπως περιγράφεται παρακάτω- ήταν η ανακάλυψη από τους Bernstein και Petropavlovski, ότι η γλυκερόλη μπορεί, να βοηθά τα σπερματοζωάρια να επιβιώνουν μεγάλες χρονικές περιόδους σε κατάψυξη, που η κατάψυξη σπέρματος έγινε πρακτική και ενέπνευσε την περαιτέρω έρευνα και επιτυχή εφαρμογή στον άνθρωπο.

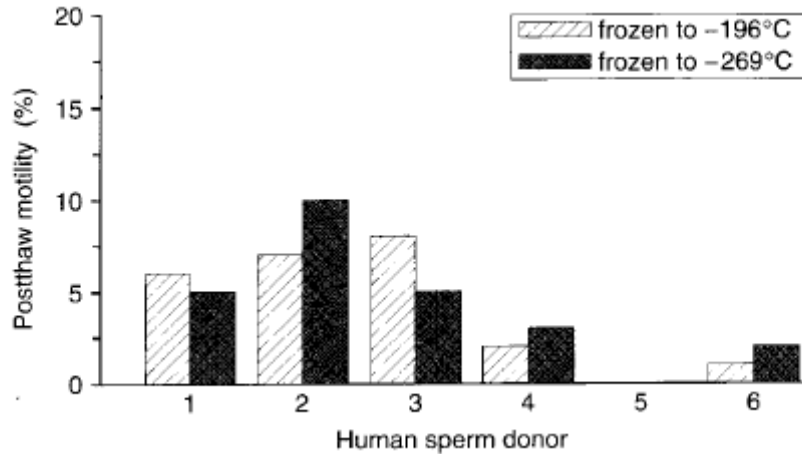
Έχει αναφερθεί πολλές φορές κατά τον απολογισμό της αρχής της βιολογίας των χαμηλών θερμοκρασιών, η παρατήρηση του Ιταλού στρατιωτικού φυσικού P. Mantegazza (1866), πως τα ανθρώπινα σπερματοζωάρια χάνουν την κινητικότητα τους, όταν ψυχθούν σε χιόνι. Είναι λοιπόν προφανές για ακόμη μία φορά, ότι το ενδιαφέρον των επιστημόνων για τον έλεγχο της αναπαραγωγής, με τη χρήση χαμηλών θερμοκρασιών υπάρχει από πολύ παλιά.

Στην αναλυτική του ανασκόπηση στο θέμα της συντήρησης των σπερματοζωαρίων, ο Watson (1990) αναφέρεται στην σπερματέγχυση, σημειώνοντας ότι οι απαρχές αυτής της τεχνικής δεν είναι πλέον εντοπίσιμες, αλλά σίγουρα βρίσκονται κάπου στις αρχές της πρώτης χιλιετίας. Ο Watson αναφέρει, ότι μέχρι την αρχή του 20^{ου} αιώνα η έγχυση αλόγων, σκύλων, κουνελιών, γουρουνιών αλλά και ανθρώπων ήταν μια ρουτίνα. Λίγο αργότερα ο E. Ivanoff και οι Ρώσοι συνεργάτες του κατάφεραν, να πραγματοποιήσουν επιτυχή έγχυση αγελάδας, προβάτων και ζέβρας. Γύρω στο 1930, η σπερματέγχυση άρχισε να χρησιμοποιείται για εμπορικό ζευγάρισμα διαφόρων ειδών ζώων και σύντομα έγινε κατανοητό, ότι η πλήρης εφαρμογή αυτής της μεθόδου απαιτούσε τη λύση του προβλήματος της συντήρησης σπέρματος.

Το 1938, με έναυσμα τις παρατηρήσεις που έκανε κατά την ψύξη της σπειροχαίτης που προκαλεί σύφιλη (*Treponema pallidum*), ο Jahnel (1938) προσπάθησε, να καταψύξει ανυρώπινα σπερματοζωάρια. Παρόλο που τα αποτελέσματα δεν ήταν επαναλήψιμα, ανέφερε πως κατάφερε να ανακτήσει κινούμενα σπερματοζωάρια. Αρχικά, τοποθέτησε μικρούς όγκους σπέρματος σε γυάλινους σωλήνες, τους οποίους βύθισε σε υγρό άζωτο. Στη συνέχεια, τοποθέτησε τους γυάλινους σωλήνες μέσα σε μεταλλικούς έτσι ώστε να εξασφαλίσει το αεροστεγές κλείσιμο τους. Έπειτα, οι σωλήνες ψύχθηκαν με υγρό ήλιο στους -269°C . Μετά από περίπου 5 ώρες, οι σωλήνες θερμάνθηκαν στους -196°C , οι μεταλλικοί σωλήνες άνοιξαν και τελικά οι γυάλινοι σωλήνες θερμάνθηκαν ταχέως. Με μικροσκοπική παρατήρηση, παρ'ότι τα περισσότερα σπερματοζωάρια ήταν ακίνητα, κάποια παρουσίασαν έντονη κινητικότητα, η οποία μπορούσε να συγκριθεί με αυτή ενός φρέσκου δείγματος. Όπως ο Jahnel αναφέρει στη δημοσίευσή του, ένα από τα σημεία-κλειδιά ήταν η δυνατότητα χρησιμοποίησης υγροποιημένων αερίων. Το ερώτημα που προέκυψε από τα πειράματα του Jahnel ήταν, αν αυτά τα σπερματοζωάρια θα μπορούσαν να γονιμοποιήσουν επιτυχώς.

Την ίδια χρονιά (1938) οι Luyet και Hodapp δημοσίευσαν ένα σύντομο άρθρο, στο οποίο περιέγραφαν τις προσπάθειές τους να καταψύξουν σπερματοζωάρια βατράχου. Βύθισαν τα σπερματοζωάρια σε διαλύματα σουκρόζης 1 ή 2 M μέσα σε διάλυμα Ringer (ισοτονικό διάλυμα) και στη συνέχεια τοποθέτησαν λεπτές διαφάνειες με εναιωρήματα σπέρματος μεταξύ πολύ λεπτών φύλλων μίκα (πέτρωμα σε μορφή ελάσματος) τα οποία στη συνέχεια εμβαπτίστηκαν σε υγροποιημένο αέρα. Παρόλο που περίπου 40% των σπερματοζωαρίων έχασαν την κινητικότητά τους στα 2 M σουκρόζης, οι ερευνητές ανέφεραν, πως το 100% των σπερματοζωαρίων, που επιβίωσαν την έκθεση στη σουκρόζη, επιβίωσαν και την κατάψυξη σε υγροποιημένο αέρα (50 πειράματα). Ανέφεραν επίσης πως τα σπερματοζωάρια, που θερμάνθηκαν, διατήρησαν την κινητικότητά τους όσο και η ομάδα ελέγχου, εκτός από μία περίπτωση που παρέμειναν κινητά για 12 ώρες μετά την επεξεργασία.

Λίγο αργότερα, δημοσιεύθηκε μία μελέτη, που περιέγραφε την επιβίωση σπερματοζωαρίων ανθρώπου μετά την ψύξη δειγμάτων πολύ μικρού όγκου, με ταχύ ρυθμό ψύξης. Στην έρευνα αυτή, ο Shettles (1940) έψυξε δείγματα σπέρματος από έξι άνδρες, βυθίζοντας μικρά φιαλίδια που περιείχαν σπερματοζωάρια απ'ευθείας σε δοχεία με υγρό άζωτο στους -196°C ή με υγρό ήλιο στους -269°C . Κάποια από τα δείγματα θερμάνθηκαν αμέσως και κάποια άλλα διατηρήθηκαν στην κατάψυξη για περιόδους έως και μία εβδομάδα. Κάποια από τα αποτελέσματα φαίνονται στο σχήμα 7 (σελίδα 354).

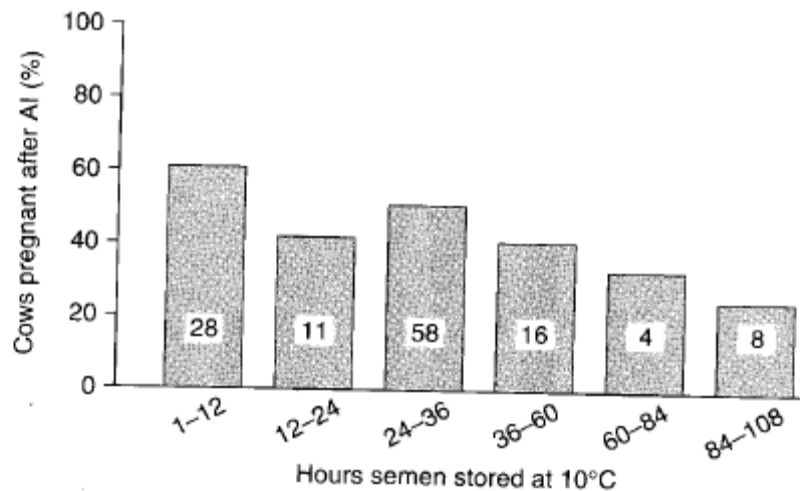


Σχήμα 7: Επιβίωση ανθρώπινων σπερματοζωαρίων μετά από κατάψυξη-απόψυξη. Δεδομένα από Shettles, 1940.

Παρά το γεγονός, ότι η μέγιστη κινητικότητα μετά την απόψυξη ήταν 10%, τα αποτελέσματα είναι αξιοσημείωτα για δύο λόγους. Πρώτον γιατί ο Shettles κατάφερε, να επιτύχει την επιβίωση κινητών σπερματοζωαρίων μετά από ταχεία ψύξη. Δεύτερον, υπήρχε σημαντική διαφορά στην κινητικότητα μετά την απόψυξη μεταξύ των διαφόρων δειγμάτων. Σε αυτό το σημείο πρέπει, να σημειωθεί, πως η δημοσίευση μιας σχετικά πρόσφατης μελέτης αποδεικνύει, πως ανθρώπινα σπερματοζωάρια επιβιώνουν και είναι διατηρούν τη γονιμοποιητική τους ικανότητα μετά από ταχεία κατάψυξη και χωρίς την προσθήκη προστατευτικού συστατικού (Nawroth et al., 2002). Αξίζει επίσης, να σημειωθεί, ότι ο Shettles, ο οποίος ήταν φυσικός στο πανεπιστήμιο Columbia κατακρίθηκε περίπου 30 χρόνια αργότερα για την προσπάθειά του να γονιμοποιήσει τεχνητά ανθρώπινα ωάρια. Φοβούμενος πολιτικές και νομικές συνέπειες, ο επικεφαλής του ακαδημαϊκού τμήματος του Shettles τερμάτισε κάθε πειραματική διαδικασία. Επίσης, πρέπει να αναφερθεί πως ο Shettles (1979) ανέφερε, ότι είχε πραγματοποιήσει πυρηνική μεταφορά από διπλοειδή σπερματογόνια σε αποπυρηνωμένα ανώρινα ωάρια, πολλά χρόνια πριν ξεσπάσει η παραφορά με τις ανακοινώσεις περί γέννησης ανθρώπινων “κλώνων” στο τέλος του 2002.

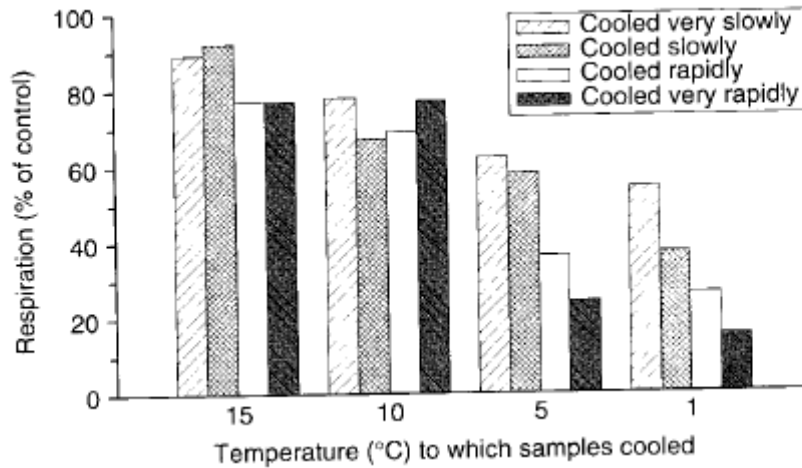
Την ίδια χρονιά μετά πειράματα του Shettles, οι Phillips και Lardy (1940) ανέφεραν, ότι ένα διάλυμα με κρόκο αυγού ήταν πολύ αποτελεσματικό στη διατήρηση σπερματοζωαρίων τάυρου για περιόδους έως και 100 ώρες, όταν τα δείγματα διατηρούνταν στους 10°C. Το διάλυμα αυτό, το οποίο φτιαχνόταν από κρόκους αυγών κότας, ήταν πολύ αποτελεσματικό στη διατήρηση όχι μόνο της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων, αλλά και της γονιμοποιητικής τους ικανότητας. Οι δύο ερευνητές χρησιμοποίησαν σπέρμα αποθηκευμένο στους 10°C, σε αυτό το διάλυμα για διάφορα χρονικά διαστήματα έως και 180 ώρες (περίπου 7 ημέρες) και στη συνέχεια πραγματοποίησαν έγχυση σε αγελάδες. Από τις 127 αγελάδες, που υπέστησαν τη διαδικασία με το αποθηκευμένο σπέρμα, 38 τελικά διαγνώστηκαν ξεκάθαρα ως εγκυμονούσες, ενώ σε 36 ακόμη δεν επανήλθε η έμμηνος ρύση, οπότε θεωρήκαν έγκυες. Κάποια από τα αποτελέματά τους, που δείχνουν τα ποσοστά των αγελάδων που έμειναν έγκυες με τα δείγματα σπέρματος αποθηκευμένα στο υλικό αυτό, με βάση των κρόκο αυγού, φαίνονται στο σχήμα 8. Αυτό το άρθρο είναι

αξιοσημείωτο, γιατί είναι η πρώτη περιγραφή της αποδεδειγμένης γονιμοποιητικής ικανότητας αποψυγμένων σπερματοζωαρίων και επειδή περιγράφει ένα διάλυμα από κρόκο αυγού, το οποίο χρησιμοποιείται ακόμη και σήμερα ως διαλύτης ή πρόσθετο για την προστασία των σπερματοζωαρίων πολλών ειδών κατά την κατάψυξη.



Σχήμα 8: Συντήρηση σπέρματος τάυρου με φρέσκο κρόκο αυγού σε φωσφορούχο διάλυμα (pH=6,8). Δεδομένα από τους Phillips και Lardy, 1940.

Η πνευματική και επιστημονική κληρονομιά της βιολογίας χαμηλών θερμοκρασιών, αλλά και της αναπαραγωγικής βιολογίας, φαίνονται και από ένα ακόμη πείραμα, το οποίο διεξήχθη πάνω από 60 χρόνια πριν. Ο Min-Chueh Chang ξεκίνησε τις έρευνές του χρησιμοποιώντας σπερματοζωάρια κριαριού. Συνεχίζοντας τις προηγούμενες έρευνες των Hammond και Walton, που περιγράφηκαν παραπάνω, οι Chang και Walton (1940) μελέτησαν στην κυτταρική αναπνοή σπερματοζωαρίων κριαριού, τα οποία εξετέθησαν σε χαμηλές θερμοκρασίες από 15°C έως 1°C και πως ο ρυθμός κατάψυξης την επηρέαζε. Όπως φαίνεται και στο σχήμα 9, η κυτταρική αναπνοή μειώθηκε στο 60% της αρχικής, όταν τα σπερματοζωάρια ψύχθηκαν στους 10°C ή χαμηλότερα και η βλάβη, που προκλήθηκε από την ψύξη ήταν σημαντικά σοβαρότερη, όταν τα σπερματοζωάρια ψύχθηκαν ταχέως σε χαμηλή θερμοκρασία, παρά με χαμηλότερους ρυθμούς ψύξης. Αξίζει, να αναφερθεί, ότι 36 χρόνια αργότερα ο Chang ήταν ο επιμελητής άρθρων, που ανέφεραν την πρώτη επιτυχή κατάψυξη θηλυκών γαμετών (Tsunoda et al., 1976; Parkening et al., 1976).



Σχήμα 9: Επίδραση της κατάψυξης στην κυτταρική αναπνοή σπερματοζωαρίων κουνελιού. Δεδομένα από τους Chang και Walton. 1940.

Ο επόμενος σημαντικός σταθμός στην εξέλιξη της κατάψυξης ανθρώπινων σπερματοζωαρίων ήταν τα πειράματα των Hoagland και Pincus (1942). Χρησιμοποιώντας μία λεπτή βακτηριολογική θηλιά, περίπου 2 mm σε διάμετρο, για να στηρίζει διαφάνειες, κατέψυξαν δείγματα από κουνέλι, βοοειδές και άνθρωπο σε διάφορες συνθήκες. Σε πολλές περιπτώσεις, πριν την εμβάπτιση των δειγμάτων στο υγρό άζωτο, ανάγκαζαν τα κύτταρα σε πλασμólυση με το προσθέτουν διαλύματα διαφόρων σακχάρων ή υπερτονικών διαλυμάτων, όπως γλυκερόλη και βουτυρικό οξύ. Αν και η επιβίωση των σπερματοζωαρίων -με κριτήριο την κινητικότητα μετά την απόψυξη- ποίκιλε, σε μερικές περιπτώσεις οι Hoagland και Pincus παρατήρησαν, πως κάποια διαλύματα εμφάνιζαν κινητικότητα μέχρι και 50% αφού είχαν βυθιστεί στο άζωτο και στη συνέχεια αποψυχθεί. Σημείωσαν επίσης, πως και ο χρόνος μεταξύ εκσπερμάτωσης και κατάψυξης, επηρέασε την κινητικότητα μετά την απόψυξη. Την ίδια περίοδο, ο Easley και οι συνεργάτες του (1942) ξεκίνησαν, να μελετούν την επίδραση διαφόρων διαλυτών, του ρυθμού ψύξης και της θερμοκρασίας συντήρησης στην κινητικότητα και την ακεραιότητα της μεμβράνης σε σπερματοζωάρια βοοειδών. Παρατήρησαν, ότι η οσμωτική πίεση και το pH του διαλύτη επηρέαζαν την επιβίωση σπερματοζωαρίων, που διατηρήθηκαν στους 10°C για διάφορα χρονικά διαστήματα, έως και 72 ώρες. Με το να καταψύχουν με αργό ρυθμό (stepwise manner) κατάφεραν, να ανακτήσουν σπερματοζωάρια με ανέπαφη κυτταρική μεμβράνη, ακόμη κι όταν είχαν παραμείνει στους 0°C για παραπάνω από 216 ώρες. Παρατήρησαν, επίσης, κινητά σπερματοζωάρια και σε δείγματα που παρέμειναν στους 0°C για 24 ώρες.

Το 1945, βασισμένος στις προηγηθείσες παρατηρήσεις, ο Parkes προσπάθησε, να καταψύξει σπερματοζωάρια ανθρώπου με υψηλούς ρυθμούς στους -79°C ή στους -196°C. Όταν τα δείγματα αποψύχονταν ταχέως, με τη χρήση υδατόλουτρου στους 37°C παρατήρησε άμεση αναβίωση των σπερματοζωαρίων, ακόμη κι αν είχαν παραμείνει στο υγρό άζωτο για 5 ώρες. Στη συνέχεια πιστοποίησε, ότι μπορούσε, να διατηρήσει δείγματα σπέρματος στους -79°C ακόμη και για 8 ημέρες. Στα συμπεράσματά του, ο Parkes, προβλέποντας ότι η σπερματέγχυση θα γινόταν ρουτίνα, αναφέρει: “Η εδραίωση μιας μεθόδου, που θα επιτρέπει τη συντήρηση

σπέρματος για μακρά διάρκεια και μεταφορά, χωρίς να επηρεάζει τις γενετικές πληροφορίες των σπερματοζωαρίων, θα δημιουργούσε αξιοσημείωτες δυνατότητες”.

Η ΑΝΑΚΑΛΥΨΗ ΤΗΣ ΓΛΥΚΕΡΟΛΗΣ

Στην ανασκόπησή τους, όσον αφορά την κρυοσυντήρηση σπερματοζωαρίων κριαριού, οι Salamon και Maxwell (1995) επισημαίνουν, πως η πρώτη δημοσιευμένη αναφορά της χρήσης της γλυκερόλης ως κρυοπροστατευτικό παράγοντα ήταν για την κατάψυξη φυτικών κυττάρων και ιστών από τον N.A. Maximov το 1908.

Επικαλούμενοι ένα ρωσικό άρθρο, γραμμένο από τους A.D Bernstein και V.W. Petropavlovsky το 1937, με τίτλο “Επίδραση μη ηλεκτρολυτών στην επιβίωση των σπερματοζωαρίων”, οι Salamon και Maxwell αναφέρουν επίσης, ότι οι Ρώσοι ερευνητές χρησιμοποίησαν γλυκερόλη 9% και συντήρησαν επιτυχώς σπερματοζωάρια κουνελιού, γουρουνιού, ταύρου, κριαριού και πάπιας στους -21°C . Λίγα χρόνια αργότερα, ο Jean Rostand (1946) χρησιμοποιώντας σπερματοζωάρια από δύο είδη βατράχου –*Rana temporaria* και *Rana esculenta*- ως πειραματικό υλικό, παρατήρησε ότι η προσθήκη γλυκερόλης σε ποσοστά 10, 15 και 20% σε δείγματα σπέρματος καθιστούσε τα σπερματοζωάρια ανθεκτικά στις επιδράσεις της κατάψυξης σε θερμοκρασίες από -4°C έως -6°C . Ο Rostand δεν αναφέρθηκε στη γονιμοποιητική ικανότητα των σπερματοζωαρίων αυτών.

Το 1947, ανατέθηκε στον Christopher Polge το θέμα της ανάπτυξης τεχνικών σπερματέγχυσης σε πτηνά και πιο συγκεκριμένα, η κρυοσυντήρηση σπέρματος πουλερικών. Σε σημειώσεις του αργότερα (1968) ανέφερε, πως λίγο μετά το τέλος του Δεύτερου Παγκοσμίου πολέμου, ήταν δύσκολο και πολύ ακριβό, να προμηθευτεί κάποιος καθαρές χημικές ουσίες. Μετά από μήνες αποτυχημένων πειραμάτων με το συνάδελφό του Audrey Smith στο Εθνικό Ίδρυμα Ιατρικής Έρευνας στο Mill Hill, ο Polge έβαλε στην άκρη την έρευνά του για έξι μήνες. Μετά από αυτό μετακόμισε στα εργαστήρια, που βρίσκονταν στις φάρμες στο Mill Hill, για να είναι κοντά στο σημείο που στεγάζονταν τα πουλερικά. Κατά τη διαδικασία της μετακόμισης, μετέφερε όλα τα χημικά που χρησιμοποιούσε στο παλιό του εργαστήριο, στις καινούριες εγκαταστάσεις. Αυτή τη φορά, χρησιμοποιώντας -αυτό που θεωρούσε, ότι ήταν- διαλύματα φρουκτόζης για να καταψύξει σπέρμα πουλερικών, αντί τα σπερματοζωάρια, να μην επιβιώνουν την ψύξη, τα περισσότερα ήταν κινητά, όταν αποψύχονταν. Σύμφωνα με τον Polge, πραγματοποίησε έγχυση σε μεγάλο αριθμό πουλερικών με σπέρμα, που είχε καταψυχθεί και στη συνέχεια αποψυχθεί. Από εκατοντάδες αυγά, που συλλέχθηκαν από τις κότες αυτές και τοποθετήθηκαν σε κλίβανο, προήλθε ένας απόγονος. Παρόλο που ένας απόγονος δεν αποδεικνύει τίποτα, ο Polge επέμεινε, να επαναλαμβάνει τα πειράματά του. Όπως ήταν φυσικό, το αρχικό διάλυμα που χρησιμοποιούσε ως κρυοπροστατευτικό, τελείωσε. Όταν έφτιαξε νέο διάλυμα φρουκτόζης, καθώς αυτό θεωρούσε, ότι χρησιμοποιούσε και το πρόσθεσε στα προς κατάψυξη δείγματα, κανένα σπερματοζωάριο δεν επιβίωσε. Αυτό φυσικά προβληματίσε τον ερευνητή, ο οποίος έστειλε τα τελευταία ml του αρχικού διαλύματος στο χημικό Dr. D. F. Elliott για ανάλυση. Η ανάλυση αυτή αποκάλυψε, ότι το διάλυμα, με το οποίο ο Polge είχε επιτύχει επιβίωση σπερματοζωαρίων, χωρίς σάκχαρα, αλλά σημαντική ποσότητα γλυκερόλης και κάποια πρωτεΐνη. Αν και κανείς δε θα μάθει τι πραγματικά συνέβη, ο Polge υπέθεσε, πως η ετικέτα από το δοχείο του διαλύματος φρουκτόζης είχε αποκολληθεί και είχε κολλήσει σ’ ένα δοχείο με διάλυμα Meyers, το οποίο είναι ένα μείγμα γλυκερόλης και αλβουμίνης σε ισοτικό αλατούχο διάλυμα, το οποίο χρησιμοποιούνταν για την προετοιμασία ρουτίνας ιστολογικών δειγμάτων.

Τα πρώτα δειλά βήματα στη διαμόρφωση μιας τεχνικής για την κρυοσυντήρηση σπερματοζωαρίων δημοσιεύθηκαν σε ένα σύντομο άρθρο από τον Polge, το 1949. Σε αυτό ανέφερε, ότι η επιβίωση των σπερματοζωαρίων ήταν αμελητέα, όταν αυτά καταψύχονταν με προσθήκη φρουκτόζης μόνο, αλλά όταν καταψύχονταν με διάλυμα 20% γλυκερόλης, τα σπερματοζωάρια επιδείκνυαν κανονική κίνηση μετά την απόψυξη. Επίσης, οι ερευνητές ανέφεραν ότι κατάφεραν, να αφαιρέσουν το νερό από τα καταψυγμένα δείγματα. Όταν τα αφυδατωμένα δείγματα επανακτούσαν το νερό, οι ερευνητές παρατηρούσαν μεγάλο ποσοστό κινητών σπερματοζωαρίων. Τα ίδια αποτελέσματα ανέφεραν, ότι με την προπυλική και αιθυλική γλυκόλη και σημείωσαν την πεποίθησή τους, ότι από δείγματα ανθρώπινων σπερματοζωαρίων στα οποία είχε προστεθεί γλυκερόλη, θα λαμβάνονταν μεγαλύτερα ποσοστά κινητών σπερματοζωαρίων.

Συνεχίζοντας τα πειράματά τους, οι Smith και Polge (1950 a,b) δημοσίευσαν τις παρατηρήσεις τους όσον αφορά την επίδραση των χαμηλών θερμοκρασιών και της κατάψυξης σπερματοζωαρίων αγελάδας και κατσίκας. Στο άρθρο τους στο "Nature" (1950 b) αναφέρουν: «Ο Luyet πιστεύει, ότι η διατήρηση της ζωής σε χαμηλές θερμοκρασίες βασίζεται στην αποτροπή της δημιουργίας άγνου ενδοκυτταρικά, είτε αφυδατώνοντας τα κύτταρα πριν την ψύξη, είτε με την πολύ ταχεία κατάψυξη και ανάλογη απόψυξη.» Οι περισσότεροι ειδικοί στην κρυοβιολογία το 2002 θα συμφωνούσαν με αυτήν την άποψη. Οι Smith και Polge ανέφεραν επίσης, ότι κατάφεραν, να ανακτήσουν μεγάλα ποσοστά κινητών σπερματοζωαρίων ταύρου και κατσίκας, μετά από αναδιάλυση των δειγμάτων σε διάλυμα 15% γλυκερόλης και ψύχοντάς τα αργά στους -79°C . Παρατήρησαν επίσης, ότι σπερματοζωάρια γουρουνιού, μετά από προσθήκη διαλύματος 15% γλυκερόλης πριν την κατάψυξη, επιδείκνυαν μέχρι και 75% κινητικότητα μετά την απόψυξη, αλλά τα ακροσώματα είχαν υποστεί οξείες βλάβες.

Έχοντας δοκιμάσει πολλά συστατικά, κατέληξαν στο συμπέρασμα, ότι 15 ή 20% αιθυλική ή προπυλική γλυκόλη προσέφεραν προστασία παρόμοια με αυτή της γλυκερόλης.

Στο άρθρο, που δημοσίευσαν σε συνεργασία, οι Smith και Polge αναφέρουν πως η αφαίρεση του 90% του νερού από δείγματα σπέρματος προς κατάψυξη με απόσταξη κενού, ισοδυναμεί με την επανάκτηση του μεγαλύτερου ποσοστού της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων, μόλις τα δείγματα ενυδατώνονταν. Σήμερα, πάνω από 50 χρόνια μετά, αρκετές ερευνητικές ομάδες έχουν προσπαθήσει να αφυδατώσουν δείγματα σπέρματος αγελάδας και ποντικού και έχουν πραγματοποιήσει μικρογονιμοποίηση (ICSI) για την δημιουργία εμβρύων και τελικά απογόνων. Για παράδειγμα, οι Wakayama και Yanagimachi (1998) και οι συνάδελφοί τους (Kusakabe et al., 2001) κατέψυξαν σπέρμα ποντικού χρησιμοποιώντας αφυδάτωση και στη συνέχεια προχωρώντας σε ICSI, κατάφεραν να τη γέννηση απογόνου. Επιπλέον ο Keskinetepe et al. (2002) έχει χρησιμοποιήσει παρόμοια μέθοδο για τη δημιουργία εμβρύων μέσα ICSI σε βοοειδή. Ακόμη πιο πρόσφατα, ο Bhowmick et al. (2003) πέτυχαν τη δημιουργία φυσιολογικών εμβρύων ποντικών, μετά από μικρογονιμοποίηση με κατάψυξη-αφυδάτωση σπέρματος, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Το πιο σημαντικό ερώτημα παρέμενε φυσικά, το αν αυτά τα σπερματοζωάρια διατηρούσαν τη γονιμοποιητική τους ικανότητα μετά την απόψυξη. Το 1951, ο Stewart ανέφερε, ότι πραγματοποίησε σπερματέγχυση σε 5 αγελάδες, χρησιμοποιώντας σπέρμα ταύρου, το οποίο είχε καταψυχθεί και διατηρηθεί στους -79°C για διάφορα χρονικά διαστήματα. Από τα πέντε θηλυκά, το ένα έμεινε έγκυος και γέννησε υγιή απόγονο. Ο Stewart ήταν λεπτομερής και πρόσθεσε, πως δεν ήταν

δυνατό η εγκυμοσύνη, να είχε προέλθει από σεξουαλική επαφή, καθώς τα ζώα που συμμετείχαν στο πείραμα ήταν απομονωμένα. Αυτό το πείραμα επαναλήφθηκε σε μεγαλύτερο αριθμό αγελάδων αυτή τη φορά. Συνολικά, πραγματοποιήθηκε έγχυση σε 38 αγελάδες με δείγμα σπέρματος, που είχε καταψυχθεί στους -79°C . Από αυτές 30 έμειναν έγκυες και γεννήθηκαν 27 φυσιολογικοί απόγονοι (Polge and Rowson, 1952 a,b). Μεταγενέστερα πειράματα έδειξαν, ότι από 208 αγελάδες, στις οποίες πραγματοποιήθηκε έγχυση με δείγμα σπέρματος, που είχε διατηρηθεί στην κατάψυξη έως και 52 εβδομάδες, 65% έμειναν έγκυες. Αργότερα αποδείχθηκε, ότι ακόμη κι όταν χρησιμοποιήθηκε σπέρμα, το οποίο διατηρήθηκε στους -79°C για 4,5 χρόνια, 67% των θηλυκών στα οποία πραγματοποιήθηκε έγχυση, πέτυχαν εγκυμοσύνη (Polge, 1957). Μέσα στα επόμενα χρόνια, παρόμοιες μέθοδοι άρχισαν να χρησιμοποιούνται για την κρυοσυντήρηση δειγμάτων σπέρματος από διάφορα είδη, όπως κουνέλι, πρόβατο (Emmens and Blackshaw, 1950,1955) καθώς και κατσίκια (Dauzier, 1956). Ένα αξιοσημείωτο πείραμα, που θυμίζει τις παρατηρήσεις του Walton (1930) ήταν η επίδειξη, πως σπερματοζωάρια επιδιδιμίδας από άλογο, μπορούν επιτυχώς να καταψυχθούν και να διατηρήσουν τη γονιμοποιητική τους ικανότητα, όπως αποδείχθηκε με τη γέννηση απογόνου (Barker and Gandier, 1957). Οι συγγραφείς αναφέρουν, πως αυτή η μέθοδος μπορεί, να χρησιμοποιηθεί για την κατάψυξη σπερματοζωαρίων, που λαμβάνονται ακόμη και μετά το θάνατο και να φυλάσσονται για μελλοντική χρήση. Άλλα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν είχαν ως σκοπό, να μελετήσουν την επίδραση διαφόρων παραγόντων, όπως η συγκέντρωση του δείγματος ή του σακχαρίτη που προσέθεταν στο δείγμα στην τελική γονιμοποιητική ικανότητα των κατεψυγμένων δειγμάτων σπέρματος τούρου (Martin and Emmens, 1958). Η πρώτη επιτυχής κρυοσυντήρηση σπέρματος κουνελιού με αποδεδειγμένη γονιμοποιητική ικανότητα πραγματοποιήθηκε από τον Fox (1961), που ανέφερε τη γέννηση τριών απογόνων μετά την έγχυση θηλυκών, χρησιμοποιώντας δείγματα σπέρματος, που είχαν διατηρηθεί στους -90°C για 24 ώρες. Λίγα χρόνια αργότερα, οι Sawada και Chang (1964) πραγματοποίησαν έγχυση σε 37 θηλυκά κουνέλια, χρησιμοποιώντας δείγμα σπέρματος στο οποίο είχε προστεθεί 17,5% DMSO και καταψυχθεί στους -79°C . Από τα θηλυκά αυτά, 14 (38%) πέτυχαν εγκυμοσύνη. Αρκετά χρόνια αργότερα, πραγματοποιήθηκε μία πολύ αναλυτική καταγραφή της διεθνούς χρήσης κρυοσυντηρημένων δειγμάτων σπέρματος σε διάφορα είδη ζώων από τον Iritani (1980).

ΟΙ ΕΞΙΣΩΣΕΙΣ ΤΟΥ MAZUR

Παράλληλα με τη διεξαγωγή όλων αυτών των πειραμάτων, που είχαν ως σκοπό την εδραίωση μιας μεθόδου για την κρυοσυντήρηση γαμετών από θηλαστικά (και έμβρυα αργότερα), διεξάγονταν και μελέτες για τη διεκρίνηση των αιτιών, που προκαλούνται βλάβες στα κύτταρα, όταν αυτά εκτίθενται σε χαμηλές –υπό του μηδενός- θερμοκρασίες. Αξιοσημείωτη, μεταξύ των ερευνών αυτών, είναι οι παρατηρήσεις του Peter Mazur. Από το 1957 έως το 1963, ο Mazur διεξήγαγε πολλά πειράματα, σχεδιασμένα με σκοπό να διαφωτίσουν τους μηχανισμούς βλαβών, που προκαλούνταν στους μικροοργανισμούς, κατά την κατάψυξη και την απόψυξη. Αυτά τα πειράματα κορυφώθηκαν, όταν ο Mazur δημιούργησε ένα μαθηματικό μοντέλο, που περιγράφει τη θεωρητική απόκριση των κυττάρων, όταν εκτίθενται σε κρυοπροστατευτικούς παράγοντες και χαμηλές θερμοκρασίες. (Mazur, 1963). Εννέα χρόνια αργότερα, ο Mazur χρησιμοποίησε αυτό το μαθηματικό μοντέλο, για να υπολογίσει το ρυθμό κατάψυξης, που θα ήταν κατάλληλος για την κρυοσυντήρηση

εμβρύων ποντικού. Αυτή η εφαρμογή έπαιξε σπουδαίο ρόλο στα πειράματα του Whittingham et. al (1972) στις προσπάθειές του, να καταψύξει έμβρυα ποντικού. Τα τελευταία 40 χρόνια, η θεωρητική ανάλυση του Mazur έχει πιστοποιηθεί από πολλούς ερευνητές και έχει φανεί, ότι αντιπροσωπεύει με την ίδια ακρίβεια ένα μεγάλο εύρος τύπων κυττάρων, όπως μικροοργανισμούς, φυτικά κύτταρα και ζωικά κύτταρα. Αν και έχουν γίνει μικρές αλλαγές στην αρχική εξίσωση, η βάση και η ακρίβεια παραμένουν αναμφισβήτητες.

ΕΓΚΥΜΟΣΥΝΗ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ ΑΠΟ ΕΓΧΥΣΗ ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΜΕΝΟΥ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ

Η ευρεία χρήση της σπερματέγχυσης σε διάφορα είδη ζώων και ειδικά προς όφελος της γαλακτοβιομηχανίας, οδήγησε στην περαιτέρω έρευνα στον τομέα. Λίγο μετά την εφαρμογή των πρακτικών αυτών στα ζώα, αναφέρθηκαν οι πρώτες εγκυμοσύνες στον άνθρωπο με την έγχυση κρυοσυντηρημένου δείγματος σπέρματος.

Παρατηρώντας τη σύντομη αναφορά στα σπερματοζωάρια ανθρώπου, στο αρχικό άρθρο του Polge et al., (1949), οι Sherman και Bunge (1953) επεξεργάστηκαν δείγματα σπέρματος με 10% γλυκερόλη και τα κατέψυξαν σε ξηρό πάγο. Βρήκαν, ότι κατά μέσο όρο, 67% των σπερματοζωαρίων από πέντε άνδρες επιδείκνυαν διατήρηση της κινητικότητας. Λίγο αργότερα, ανέφεραν πως είχαν πετύχει εγκυμοσύνη σε τρεις γυναίκες μετά από έγχυση αποψυγμένων δειγμάτων σπέρματος (Bunge and Sherman, 1953). Τον επόμενο χρόνο, ο Bunge και οι συνεργάτες του (1954) περιέγραψαν περεταίρω πειράματα, που πραγματοποίησαν ώστε να διευκρινίσουν τις επιδράσεις τεσσάρων μεθόδων κατάψυξης στην επιβίωση ανθρώπινων σπερματοζωαρίων.

Προσέφεραν και επιπλέον κλινικές πληροφορίες, που αφορούσαν τέσσερις εγκυμοσύνες, που προήλθαν από έγχυση αποψυγμένων δειγμάτων σπέρματος. Άλλοι γιατροί ξεκίνησαν, να χρησιμοποιούν τις μεθόδους των Bunge και Sherman, ώστε να επιτύχουν εγκυμοσύνες μέσω αποψυγμένου σπέρματος (Iizuka and Sawada, 1958). Ο Sherman συνέχισε, να ερευνά την επίδραση διαφόρων παραγόντων στη επιβίωση των σπερματοζωαρίων (Sherman 1954, 1963). Μεταξύ άλλων, βρήκε ότι μπορούσε επιτυχώς, να καταψύξει σπερματοζωάρια σε υγρό άζωτο κι ότι η συντήρηση των δειγμάτων στους -196°C ήταν πολύ πιο αποτελεσματική από αυτή στους -75°C (Sherman, 1963). Στη θερμοκρασία αυτή παρατήρησε, ότι τα σπερματοζωάρια διατηρούσαν την κινητικότητα τους ακόμη και μετά από 12 μήνες, σε αντίθεση με αυτά, που είχαν διατηρηθεί στους -75°C . Στη συνέχεια, ο Perloff και οι συνεργάτες του (1964) ανέφεραν τέσσερις πλήρεις εγκυμοσύνες σε γυναίκες, στις οποίες είχαν εγχύσει αποψυγμένα δείγματα σπέρματος, που είχαν διατηρηθεί σε υγρό άζωτο για 1 έως 5,5 μήνες. Δύο επιπλέον εγκυμοσύνες επιτεύχθηκαν, αλλά οι γυναίκες απέβαλαν κατά τον τέταρτο μήνα της κύησης. Στην σύνοψή του όσον αφορά την κρυοσυντήρηση σπέρματος, ο Sherman αναφέρεται στις μελλοντικές κλινικές εφαρμογές, όπως ανάπτυξη τραπεζών σπέρματος. Έκτοτε, αν και είναι δύσκολη η απογραφή, αναμφισβήτητα εκατοντάδες παιδιά έχουν γεννηθεί ως αποτέλεσμα της έγχυσης αποψυγμένου σπέρματος.

ΣΥΓΧΡΟΝΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΤΑΨΥΞΗΣ

ΑΡΓΗ ΚΑΤΑΨΥΞΗ (SLOW FREEZING)

Κατά την αργή κατάψυξη, χαμηλώνεται η θερμοκρασία των κυττάρων, που βρίσκονται μέσα σε υλικό, κάτω από το σημείο ψύξης. Σε κάποιο σημείο, αρχίζουν και δημιουργούνται μάζες πάγου που περιέχουν καθαρό κρυσταλλικό νερό. Αυτό που παραμένει ενδιάμεσα του πάγου, που αναπτύσσεται ονομάζεται μη-καταψυγμένο κλάσμα, μέσα στο οποίο όλοι οι διαλύτες και τα κύτταρα είναι περιορισμένα. Οι συγκεντρώσεις σακχάρων, αλάτων και κρυσταλλικών παραγόντων (π.χ. γλυκερόλη) αυξάνονται όσο ο όγκος του κλάσματος αυτού μειώνεται. Η αύξηση της οσμωτικής πίεσης έχει ως αποτέλεσμα την έξοδο νερού από τα κύτταρα. Ο αργός ρυθμός κατάψυξης είναι απαραίτητος για να εξασφαλιστεί η αναγκαία έξοδος νερού. Καθώς συνεχίζεται η κατάψυξη, το ιξώδες του μη-κατεψυγμένου κλάσματος, τελικά γίνεται τόσο μεγάλο, που δεν επιτρέπει περαιτέρω κρυσταλλοποίηση. Το εναπομείναν μη-κατεψυγμένο κλάσμα μετατρέπεται σε ένα άμορφο στερεό, που δεν περιέχει κρυστάλλους πάγου.

ΤΡΑΥΜΑΤΙΣΜΟΣ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΑΡΓΗ ΚΑΤΑΨΥΞΗ

Η πρώτη πρόκληση όσον αφορά την κρυσυντήρηση κυττάρων από ομοιόθερμα είδη έγκειται στην αναγκαστική έκθεση των κυττάρων αυτών σε χαμηλότερη θερμοκρασία από αυτή του σώματος. Τα κύτταρα μπορεί, να βλαφθούν από την πολύ γρήγορη κατάψυξη (cold shock) ή να καταστραφούν από αυτή καθ'αυτή τη χαμηλή θερμοκρασία (chilling injury).

Αν και οι ρυθμοί ψύξης, που είναι αρκετά χαμηλοί, ώστε να αποτρέπουν τον ενδοκυτταρικό σχηματισμό πάγου είναι απαραίτητοι για την επιβίωση, δεν είναι αρκετοί. Όπως είδαμε και από το αριστερό άκρο του “ανεστραμμένου U”, η αργή κατάψυξη αυτή καθ'αυτή, μπορεί να επιφέρει τραυματισμό. Ως ρυθμός αργής κατάψυξης μπορεί, να οριστεί οποιοσδήποτε ρυθμός που επιτρέπει αρκετή ποσότητα νερού, να διαφύγει από το κύτταρο, διατηρώντας το παραμένον νερό σε χημικό ισορροπία με το εξωκυτταρικό νερό και πάγο κατά τη διάρκεια της ψύξης. Επειδή ο μόνος σχηματισμός πάγου σε αυτήν την περίπτωση, θα είναι εξωκυτταρικός, όποιος τραυματισμός παρατηρηθεί θα πρέπει, να προέρχεται από την άμεση δράση αυτού του πάγου, από την αύξηση της αναλογίας πάγου και εξωκυτταρίου υγρού ή από την αύξηση της συγκέντρωσης των διαλυμένων ουσιών στο εξωκυτταρικό διάλυμα, που δημιουργείται από την μετατροπή του νερού σε πάγο. Όσον αφορά το τελευταίο, εφόσον τα κύτταρα θεωρούνται, ότι βρίσκονται σε χημική ισορροπία με το εξωκυτταρικό υγρό και πάγο, τα κύτταρα θα αφυδατωθούν και οι συγκεντρώσεις των ενδοκυτταρίων ουσιών θα αυξηθούν. Τραυματισμός μπορεί, να προκληθεί από την αυξημένη συγκέντρωση ουσιών είτε στο εσωτερικό, είτε στο εξωτερικό των κυττάρων. Λαμβάνοντας υπ'όψιν τη φυσική πορεία την οποία ακολουθούν τα κύτταρα για να διατηρήσουν τη χημική ισορροπία με το περιβάλλον υγρό, βγαίνει το εξής συμπέρασμα: η χημική ισορροπία διατηρείται βασικά από την εκροή νερού κατά την ψύξη και την εισροή νερού κατά την απόψυξη και όχι από την κίνηση των πρόσθετων κρυσταλλικών παραγόντων ή τη δημιουργία “ανοιγμάτων” για άλλα ενδοκυτταρικά ή εξωκυτταρικά συστατικά (κυρίως ηλεκτρολύτες) από τα οποία τα κύτταρα είναι συνήθως μη διαπερατά. Η βάση για τα συμπεράσματα, που αφορούν τη δράση των κρυσταλλικών παραγόντων είναι, ότι η διαπερότητα της κυτταρικής μεμβράνης είναι –σχεδόν πάντα- τουλάχιστον 100 έως 1000 φορές χαμηλότερη σε

σχέση με τη διαπερατότητα του νερού και άρα δεν έχουν την τάση, να εισέλθουν στο κύτταρο. Όσον αφορά τα προαναφερθέντα “ανοίγματα” για άλλους ηλεκτρολύτες, θεωρούνται παθολογική συνέπεια της διαδικασίας εξισορρόπησης και όχι μία φυσιολογική εναλλακτική πορεία.

Καθώς, λοιπόν, σχηματίζεται πάγος στο εξωκυττάριο περιβάλλον, σταδιακά αποσπά καθαρό νερό από το διάλυμα και αναγκάζει τη συγκέντρωση των διαλυμένων ουσιών, να πάρει πολύ μεγάλες τιμές. Αν τα κύτταρα καταψύχονται σε ισοτονικά διαλύματα, όπως NaCl ή PBS (ρυθμικό διάλυμα φωσφορικών/άλατος), τότε οι ουσίες των οποίων η συγκέντρωση αυξάνεται είναι ηλεκτρολύτες. Ο Lovelock, το 1953 (a) υποστήριξε, ότι είναι αυτή η συγκέντρωση ηλεκτρολυτών, που ευθύνεται για τις βλάβες κατά την αργή ψύξη. Η πειραματική βάση για το συμπέρασμά του, ήταν όταν υπολόγισε τη συγκέντρωση NaCl σε μερικώς καταψυγμένα διαλύματα στα οποία ανθρώπινα ερυθροκύτταρα είχαν αρχίσει την διαδικασία της αιμόλυσης, έλαβε παρεμφερή αποτελέσματα όσον αφορά την έκταση της αιμόλυσης σε διαλύματα που είχαν εκτεθεί στην ίδια συγκέντρωση NaCl, αλλά δεν ήταν στο στάδιο της κατάψυξης (στους 0°C). Επίσης, η συμπεριφορά και η λειτουργία των λιπιδίων της μεμβράνης και των πρωτεϊνών μπορεί να επηρεαστούν από την θερμοκρασία. Για παράδειγμα, τα λιπίδια της μεμβράνης, που είναι φυσιολογικά σε μία υγρή κρυσταλλική κατάσταση, μπορεί να στερεοποιηθούν σε μη φυσιολογικές θερμοκρασίες, κάτι που μπορεί να επηρεάσει τη λειτουργικότητά τους. Άλλη μία παρατήρηση είναι, ότι μπορεί η κατάψυξη να αποτελέσει αιτία, να ξεκινήσουν διαδικασίες όπως ενεργοποίηση των σπερματοζωαρίων και παραγωγή ελεύθερων ριζών, που μπορεί να προκαλέσουν βλάβες στις μεμβράνες. Χαμηλώνοντας τη θερμοκρασία μπορεί να προκληθεί ανισορροπία στις κυτταρικές διεργασίες, καθώς ο ρυθμός μίας διεργασίας μπορεί, να επηρεαστεί περισσότερο από το ρυθμό μιας άλλης. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η αποσύνθεση της ατράκτου κατά τη μετάφαση, που προκαλείται από αλλαγή στη δυναμική ισορροπία της οργάνωσης κι αποδιοργάνωσης των μικροσωληνίσκων τουμπουλίνης.

Ο ίδιος ο Lovelock και άλλοι την ίδια εποχή γνώριζαν, ότι οι βλάβες λόγω της ψύξης περιορίζονταν από την χρήση CPA, όπως η γλυκερόλη. Όσον αφορά τα ερυθροκύτταρα, η προστατευτική δράση της γλυκερόλης είναι δραματική, όπως έχει προαναφερθεί (σχήμα 1). Σύμφωνα με τον Lovelock και πάλι 1953 (b) η προστασία έγκειται στο ότι οι κρυοπροστατευτικοί παράγοντες καταστέλλουν φυσικοχημικά τη συγκέντρωση των βλαβερών ηλεκτρολυτών σε μία δεδομένη θερμοκρασία υπό του μηδενός.

Supercooling

Στις μεθόδους αργής κατάψυξης τα κύτταρα μεταφέρονται σ'ένα κατάλληλο υλικό κατάψυξης και η ψύξη συνεχίζεται υπό του σημείου ψύξης του υλικού. Ο σχηματισμός πάγου δεν ξεκινά απαραίτητα όταν η θερμοκρασία φτάσει στο σημείο ψύξης. Οι μικροί κρύσταλλοι πάγου έχουν χαμηλότερο σημείο ψύξης/τήξης από μεγαλύτερα τμήματα πάγου, λόγω της μεγάλης επιφανειακής τους πίεσης.

Αυθόρμητη δημιουργία πάγου θα αρχίσει, στις περισσότερες περιπτώσεις, μετά την ψύξη του διαλύματος σε θερμοκρασία μεταξύ -5°C και -15°C. Από το σημείο αυτό και μετά, πάγος θα αναπτυχθεί προς όλες τις κατευθύνσεις και η απελευθέρωση της θερμότητας σύντηξης, θα οδηγήσει στην απότομη θέρμανση μέχρι η θερμοκρασία του δείγματος να φτάσει τη θερμοκρασία ψύξης του διαλύματος (δηλαδή του

εναπομείναντος μη καταψυγμένου κλάσματος). Στο σημείο αυτό, ο σχηματισμός πάγου θα σταματήσει ή θα ορίζεται από το ρυθμό με τον οποίο η θερμότητα σύντηξης μεταφέρεται από το δείγμα. Τελικά το δείγμα θα αποκτήσει την ίδια χαμηλή θερμοκρασία στη συσκευή κρυοσυντήρησης. Από πρακτική άποψη, αυτό σημαίνει πως τα κύτταρα που υφίστανται κατάψυξη σε ένα τυπικό “καλαμάκι” (straw) σπέρματος, πρέπει να υποστούν μία σειρά μεγάλων και απότομων αλλαγών στη θερμοκρασία.

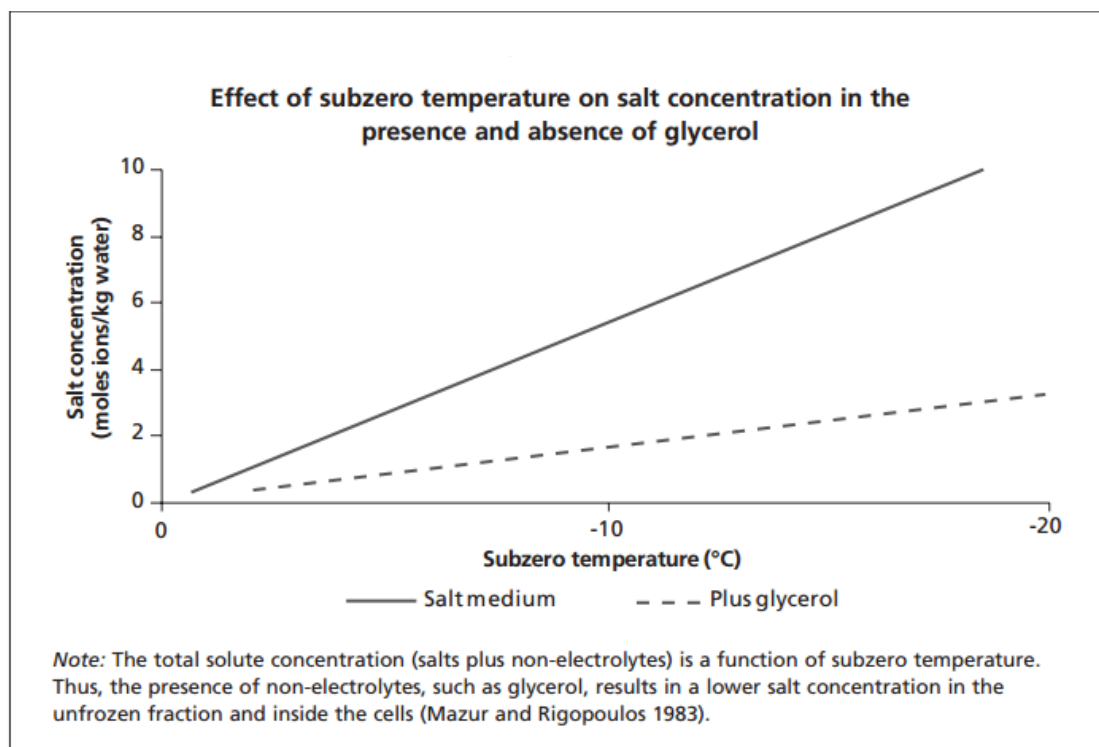
ΜΗ ΚΑΤΑΨΥΓΜΕΝΟ ΚΛΑΣΜΑ

Τα κύτταρα αντιμετωπίζουν πολύ υψηλές συγκεντρώσεις ουσιών στο μη καταψυγμένο κλάσμα. Αφυδάτωση και υψηλή συγκέντρωση αλάτων, μπορεί να οδηγήσει στην απώλεια της σταθερότητας των μεμβρανών ή στην μετουσίωση των πρωτεϊνών (Tanford, 1980; Crowe and Crowe, 1984; Hvidt and Westh, 1992, Lovelock, 1953). Επίσης, υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων μπορεί να έχουν ως αποτέλεσμα την είσοδο των εξωκυττάρων αλάτων μέσα στα κύτταρα, μία διαδικασία που είναι γνωστή ως “solute loading” (Daw et al., 1973; Griffiths et al., 1979). Η απότομη έξοδος νερού έχει ως αποτέλεσμα την ταχεία μείωση του όγκου των κυττάρων στο περίπου 50% του αρχικού τους όγκου. Αυτό οδηγεί σε δομική παραμόρφωση των κυττάρων. Περαιτέρω μηχανική βλάβη μπορεί να προκληθεί από το γεγονός ότι τα κύτταρα βρίσκονται σε πολύ στενά σημεία του μη καταψυγμένου κλάσματος και πιέζονται επίσης από τους αυξανόμενους όγκους πάγου (Rapatz and Luyet, 1960).

Η επίδραση των κρυοπροστατευτικών

Σε όλους τους ρυθμούς κατάψυξης, η συνολική συγκέντρωση των διαλυμένων ουσιών (η οποία μετράται σε moles ανά Kg νερού) καθορίζεται μόνο από την υπό του μηδενός θερμοκρασία (Σχημα 10). Όταν το αρχικό καταψυκτικό υλικό περιέχει μόνο άλατα (ηλεκτρολύτες), οι συγκέντρωση των αλάτων αυτών στο μη καταψυγμένο κλάσμα θα φτάσουν σε πολύ υψηλές τιμές, όσο η θερμοκρασία μειώνεται. Αντίθετα, σε ένα διάλυμα που περιέχει μεγάλη ποσότητα μη ηλεκτρολυτών, η συνολική συγκέντρωση διαλυμένων ουσιών σε οποιαδήποτε υπό του μηδενός θερμοκρασία θα είναι η ίδια με αυτή που θα είχε ένα διάλυμα μόνο με ηλεκτρολύτες, με τη διαφορά ότι η συγκέντρωση αλάτων θα είναι πολύ μικρότερη. Διάφορα σάκχαρα μπορούν, να χρησιμοποιηθούν ως μη ηλεκτρολύτες, αλλά επηρεάζουν μόνο την εξωκυτταρική συγκέντρωση αλάτων. Επίσης, οι υψηλές συγκεντρώσεις ουσιών που δε διαπερνούν τη μεμβράνη επιβάλλουν οσμωτικό στρες στα κύτταρα ακόμη και πριν τη διαδικασία της κατάψυξης. Αυτό μπορεί, να αποφευχθεί αν χρησιμοποιηθεί μια ουσία η οποία διαπερνά τη μεμβράνη, όπως η γλυκερόλη. Όταν τα κύτταρα μεταφέρονται σε ένα υπερτονικό διάλυμα γλυκερόλης, ποσότητα νερού θα εξέλθει από τα κύτταρα λόγω της διαφοράς στην οσμωτική πίεση. Παρ’ όλ’ αυτά, ταυτόχρονα με την έξοδο νερού, η γλυκερόλη θα εισέλθει στα κύτταρα. Μετά από ένα σύντομο χρονικό διάστημα εξισορρόπησης, τα κύτταρα αποκτούν ξανά τον αρχικό τους όγκο. Έτσι είναι προφανές, ότι το οσμωτικό στρες που υφίστανται τα κύτταρα από ένα υπερτονικό διάλυμα γλυκερόλης είναι πολύ μικρότερο από αυτό που προκαλείται από ένα υπερτονικό διάλυμα σακχάρων. Συνεπώς, η γλυκερόλη μπορεί να χρησιμοποιείται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, χωρίς να βλάπτει τα κύτταρα. Μία σημαντική αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης στο διάλυμα σημαίνει, ότι μέρος του ενδο- και εξωκυτταρικού νερού αντικαθίσταται από

τη γλυκερόλη. Άρα, η ποσότητα του πάγου που δημιουργείται είναι μικρότερη, το μη καταψυγμένο κλάσμα είναι μεγαλύτερο, ο βαθμός συρρίκνωσης των κυττάρων περιορίζεται και η συγκέντρωση ηλεκτρολυτών στο μη καταψυγμένο κλάσμα και στα κύτταρα θα παραμείνει σχετικά χαμηλή.



Σχήμα 10: Συγκέντρωση αλάτων ως συνάρτηση της θερμοκρασίας

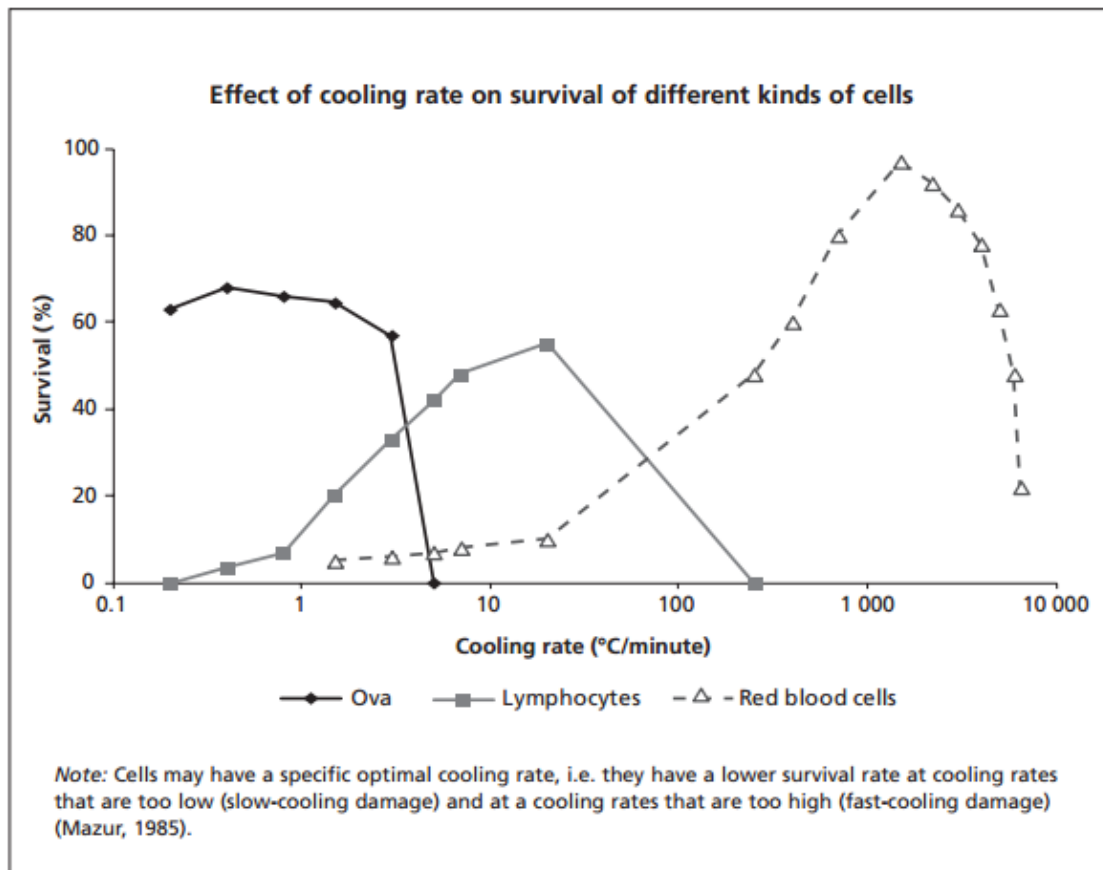
Οι μηχανισμοί με τους οποίους δρουν κι άλλες ουσίες που διαπερνούν τη μεμβράνη, όπως η αιθυλική γλυκόλη και το διμεθυλ-σουλφοξείδιο (DMSO), προσφέροντας προστασία είναι παρόμοιοι με αυτούς της δράσης της γλυκερόλης. Υπάρχουν κι άλλοι μηχανισμοί μέσω των οποίων διάφορα πολυόλια, όπως η γλυκερόλη και άλλα σάκχαρα, προσφέρουν κρυοπροστασία. Αυτές οι ουσίες μπορούν να σταθεροποιήσουν τις λιπιδικές μεμβράνες, αφού δημιουργούν δεσμούς υδρογόνου με το πολικό τμήμα των μεμβρανών (Crowe and Crowe 1984; Crowe et al., 1985), γεγονός που είναι πολύ σημαντικό, ειδικά κάτω από συνθήκες σφοδρής αφυδάτωσης. Επιπλέον, οι ουσίες αυτές μπορεί, να επηρεάσουν τις μηχανικές ιδιότητες του μη καταψυγμένου κλάσματος και ειδικά το ιξώδες και την τάση υαλοποίησης. Ο βαθμός στον οποίο τα κύτταρα συρρικνώνονται και επανέρχονται μετά την προσθήκη μιας κρυοπροστατευτικής ουσίας που διαπερνά τη μεμβράνη, εξαρτάται από τη συγκέντρωση της ίδιας της ουσίας και τη σχετική περατότητα της μεμβράνης στο νερό και στη συγκεκριμένη ουσία (KLeinhans, 1998). Για παράδειγμα, σπερματοζώαρια ταύρου συρρικνώνονται πολύ λίγο, όταν μεταφέρονται σε καταψυκτικό διάλυμα με γλυκερόλη (Chaveiro et al., 2006), ενώ αντίθετα έμβρυα βοοειδών αντιδρούν πολύ πιο έντονα.

Η επίδραση του ρυθμού κατάψυξης

Μία γενική παρατήρηση, όσον αφορά την κρυσυντήρηση κυττάρων και άλλων βιολογικών συστημάτων, είναι ότι κάθε σύστημα έχει ένα συγκεκριμένο βέλτιστο ρυθμό κατάψυξης και παρουσιάζει μειωμένη επιβίωση, αν καταψυχθεί με πολύ αργό (slow-cooling damage) ή πολύ ταχύ (fast-cooling damage) ρυθμό (Mazur et al., 1972). Η δημιουργία πάγου είναι μια ταχεία διαδικασία, αλλά η μετακίνηση νερού διαμέσου της μεμβράνης είναι σχετικά αργή, γιατί η μεμβράνη προβάλλει αντίσταση στη διεργασία αυτή. Συνεπώς, όσο συνεχίζεται η κατάψυξη και ο σχηματισμός πάγου εξωκυτταρικά, το υγρό νερό του μη καταψυγμένου κλάσματος παραμένει σε ισορροπία με το πάγο, αλλά το ενδοκυτταρικό νερό υστερεί. Αυτό σημαίνει, πως η συγκέντρωση του νερού (δηλαδή το χημικό δυναμικό του νερού) είναι πολύ υψηλό για να επιτευχθεί θερμοδυναμική ισορροπία κι έτσι υπάρχει ο κίνδυνος του σχηματισμού πάγου ενδοκυτταρικά. Ο βέλτιστος ρυθμός ψύξης είναι αυτός που δεν είναι ούτε πολύ αργός, αλλά ούτε και πολύ γρήγορος (Σχημα 11).

Αν τα κύτταρα καταψύχονται πολύ αργά, το ενδοκυτταρικό νερό υστερεί πολύ λίγο στο ρυθμό εξόδου κι έτσι ο κίνδυνος, να σχηματιστεί πάγος ενδοκυτταρικά είναι ελάχιστος. Ταυτόχρονα, όμως, σημαίνει κι ότι η αφυδάτωση των κυττάρων είναι μέγιστη, κάτι που δεν είναι επιθυμητό. Σε μεγαλύτερους ρυθμούς κατάψυξης, η αφυδάτωση, η ενδοκυτταρική συγκέντρωση ουσιών και η συρρίκνωση είναι λιγότερο έντονες. Επίσης, τα κύτταρα εκτίθενται σε αυτές τις δυσμενείς συνθήκες για πολύ μικρότερο χρονικό διάστημα. Το αρνητικό σε αυτήν την περίπτωση είναι, πως σε ταχείς ρυθμούς κατάψυξης η αφυδάτωση μπορεί, να μην είναι αρκετά γρήγορη ώστε να αποφευχθεί ο σχηματισμός πάγου ενδοκυτταρικά (Mazur, 1963, 1985; Mazur et al., 1972). Οι βλάβες από πολύ ταχύ ρυθμό ψύξης μπορεί, να προκληθούν κι από άλλους παράγοντες. Έχει δειχθεί, ότι πολύ γρήγορη διακίνηση νερού διαμέσου των μεμβρανικών πόρων, μπορεί να οδηγήσει σε άνιση κατανομή πίεσης στη μεμβράνη (Muldrew and McGann, 1993, 1994). Η ξαφνική κι απότομη εκροή νερού μπορεί, επίσης, να προκαλέσει αλλαγές στο μέγεθος, σχήμα και δομή των κυττάρων, κάτι που θα βλάψει τη λειτουργικότητά τους (Woelders et al., 1997).

Διαφορετικά είδη κυττάρων ή βιολογικών υλικών (έμβρυα, τμήματα ιστών) μπορεί, να χαρακτηρίζονται από διαφορετικούς βέλτιστους ρυθμούς κατάψυξης. Ο βέλτιστος, αυτός, ρυθμός καθορίζεται γενικά από το μέγεθος των κυττάρων και την επιφάνειά τους (όγκος/επιφάνεια), καθώς κι από τη διαπερατότητα της μεμβράνης στο νερό και τον κρυοπροστατευτικό παράγοντα.



Σχήμα 11: Ποσοστό επιβίωσης διαφορετικών ειδών κυττάρων ως συνάρτηση του ρυθμού κατάψυξης.

Αλληλεπίδραση ρυθμού κατάψυξης με το ρυθμό απόψυξης και τη συγκέντρωση κρυοπροστατευτικού.

Ο βέλτιστος ρυθμός κατάψυξης εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως η συγκέντρωση του κρυοπροστατευτικού και ο ρυθμός απόψυξης. Έχει παρατηρηθεί σε δείγματα σπέρματος από διάφορα είδη, ότι ο συνδυασμός ταχείας κατάψυξης και αργής απόψυξης είναι ιδιαίτερα καταστροφικός (Rodriguez et al., 1975; Fisher, 1991; Henry et al., 1993; Woelders and Malva, 1998). Αν ο ενδοκυτταρικός σχηματισμός πάγου ξεκινήσει σε χαμηλή θερμοκρασία και η κατάψυξη συνεχίσει με υψηλό ρυθμό, μπορεί να είναι το ότι το κυτταρόπλασμα υαλοποιείται, πριν οι κρύσταλλοι πάγου φτάσουν σε μεγάλο μέγεθος κι έτσι δεν προκαλούν μεγάλες βλάβες. Αν, όμως, ακολουθήσει αργή απόψυξη οι μικροί αυτοί κρύσταλλοι μπορεί, να μεγαλώσουν και να προκαλέσουν, τελικά, βλάβες (Rall et al., 1984).

Επίσης, τα κύτταρα μπορεί, αν τραυματιστούν κι από την εξωκυτταρική αναδιάρθρωση μαζών πάγου, μία διαδικασία που είναι γνωστή ως επανακρυσταλλοποίηση (Bank, 1973).

Προγραμματιζόμενα ή μη προγραμματιζόμενα καταψυκτικά συστήματα.

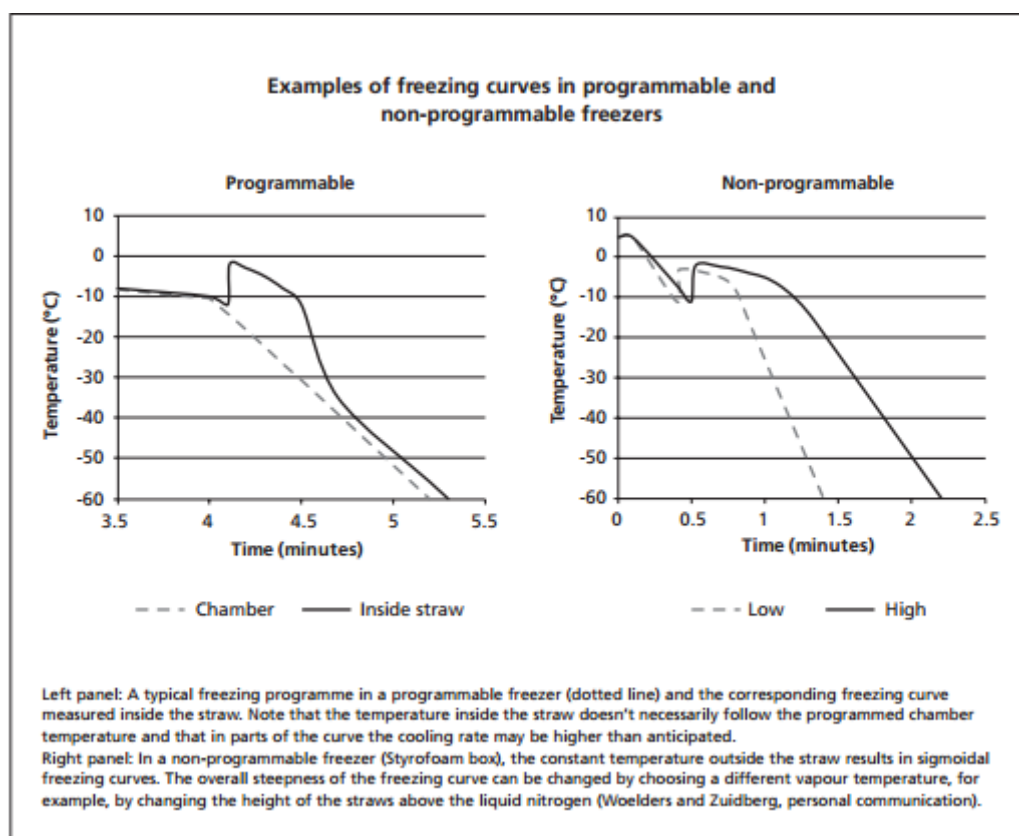
Βιολογικό υλικό μπορεί, να καταψυχθεί χρησιμοποιώντας σχετικά απλά, μη προγραμματιζόμενα συστήματα ή πιο περίπλοκους, προγραμματιζόμενους καταψύκτες (Σχήμα 12).



Σχήμα 12: Παράδειγμα προγραμματιζόμενου καταψύκτη.

Αν και οι προγραμματιζόμενοι καταψύκτες είναι πιο ακριβοί, δε σημαίνει, ότι προσφέρουν καλύτερα αποτελέσματα, ειδικά όταν χρησιμοποιούνται από έμπειρους τεχνικούς και κρυοβιολόγους. Άρα η επιλογή του τύπου του μηχανήματος θα εξαρτηθεί από τις οικονομικές δυνατότητες και την εμπειρία του χειριστή. Σε κάποιες περιπτώσεις, ακόμη και οι πιο έμπειροι τεχνικοί προτιμούν την ευκολία και την απλότητα των προγραμματιζόμενων μοντέλων. Στα περισσότερα μηχανήματα αυτού του είδους, τα “καλαμάκια” ή τα φιαλίδια καταψύχονται από ατμούς αζώτου. Η θερμοκρασία μέσα στο θάλαμο μπορεί, να ελεγχθεί με μεγάλη ακρίβεια και ο χρόνος τον οποίο θα παραμείνει σε αυτήν τη θερμοκρασία, μπορεί, να προγραμματιστεί. Παρ’όλ’αυτά, το χρονικό διάστημα που τα δείγματα παραμένουν πραγματικά σε αυτή τη θερμοκρασία μπορεί, να διαφέρει λόγω της θερμότητας σύντηξης, που αναπτύσσεται.

Στα μη προγραμματιζόμενα συστήματα, η θερμοκρασία των δειγμάτων μπορεί, να μειωθεί με την έκθεσή τους σε αμμούς ή σε μία κρύα επιφάνεια, κάτω από μία σταθερά χαμηλή θερμοκρασία. Ένα παράδειγμα ενός απλού συστήματος είναι δείγματα τοποθετημένα πάνω σε βάση μέσα σε ένα κουτί από φελιζόλ, μερικώς γεμισμένο με υγρό άζωτο, χωρίς εξαερισμό. Το ύψος στο οποίο είναι τοποθετημένα τα δείγματα πάνω από το υγρό άζωτο, καθορίζει το ρυθμό ανταλλαγής θερμότητας. Εναλλακτικά, τα δείγματα μπορούν, να τοποθετηθούν πάνω σε ένα κομμάτι φελιζόλ, το οποίο επιπλέει πάνω σε υγρό άζωτο (Dong et al., 2009). Σε αυτή την περίπτωση, η ανταλλαγή θερμότητας καθορίζεται από το πάχος του κομματιού φελιζόλ. Γενικά σε αυτά τα συστήματα, ο ρυθμός ανταλλαγής θερμότητας καθορίζεται από τη διαφορά στη θερμοκρασία μεταξύ του εσωτερικού και του εξωτερικού του δείγματος και την έκταση της θερμικής αγωγιμότητας. Η θερμική αγωγιμότητα βασίζεται στο κλάσμα όγκος/επιφάνεια της συσκευής, που χρησιμοποιείται για την κατάψυξη (καλαμάκι ή φιαλίδιο) και το ρυθμό του εξαερισμού. Έτσι είναι δύσκολο, να συγκριθούν διάφοροι τύποι μη προγραμματιζόμενων μηχανημάτων ή να εξακριβωθεί ο ρυθμός κατάψυξης, σε οποιοδήποτε τέτοιο καταψύκτη. Οι βέλτιστες συνθήκες, πρέπει να καθοριστούν πειραματικά. Οι μη προγραμματιζόμενοι καταψύκτες έχουν ένα πλεονέκτημα. Η καμπύλη ψύξης (το χρονικό διάστημα μεταξύ ψύξης και κατάψυξης) είναι θεωρητικά βέλτιστη κατά την αργή ψύξη (Woelders and Chaveiro, 2004), με σχετικά χαμηλότερο ρυθμό ψύξης αμέσως μετά την έναρξη σχηματισμού πάγου και υψηλότερο ρυθμό αργότερα. (Σχημα 13).



Σχήμα 13: Σύγκριση της καμπύλης ψύξης σε προγραμματιζόμενα και μη προγραμματιζόμενα συστήματα.

Το μεγαλύτερο μέρος του πάγου σχηματίζεται σε θερμοκρασίες μεταξύ του σημείου ψύξης και -10°C και συνεπώς, το μεγαλύτερο μέρος του νερού εξέρχεται από τα κύτταρα σε αυτό το εύρος θερμοκρασιών. Έτσι, η θερμοκρασία σύντηξης, που απελευθερώνεται κατά το σχηματισμό πάγου, καθυστερεί την ψύξη ακριβώς τη χρονική στιγμή που τα κύτταρα χρειάζονται περισσότερο χρόνο για να εξάγουν το ενδοκυτταρικό νερό. Η συνολική κλίση της καμπύλης κατάψυξης, μπορεί, να προσαρμοστεί στα μη προγραμματιζόμενα συστήματα, με την επιλογή του ύψους που τοποθετούνται τα δείγματα πάνω από το υγρό άζωτο, που είναι ανάλογο με τη θερμοκρασία των ατμών γύρω από τα δείγματα. Σε πιο εξελιγμένα συστήματα με εξαερισμό και προκαθορισμένες τιμές για τη θερμοκρασία των ατμών, ο ρυθμός ανταλλαγής θερμότητας μπορεί, να προσαρμοστεί με την επιλογή συγκεκριμένης θερμοκρασίας.

VITRIFICATION (Υαλοποίηση)

Ο όρος “υαλοποίηση” αναφέρεται σε οποιαδήποτε διαδικασία οδηγεί στη δημιουργία “υάλου”, τη μετατροπή δηλαδή ενός υγρού σε στερεό χωρίς κρυσταλλοποίηση. Σύμφωνα με αυτόν τον ορισμό, τα κύτταρα που καταψύχονται αργά μεν, αλλά σωστά, μπορούμε να πούμε, ότι υαλοποιούνται.

Εφόσον, λοιπόν, οι αργές μέθοδοι κατάψυξης μπορούν, να οδηγήσουν σε υαλοποιημένα κύτταρα, που έγκειται η διαφορά μεταξύ των δύο μεθόδων; Οι μέθοδοι υαλοποίησης περιλαμβάνουν τη χρήση ενός αρχικού διαλύματος που έχει υψηλή συγκέντρωση διαλυμένων ουσιών. Έτσι δεν μπορεί, να σχηματιστεί πάγος σε κανένα σημείο του δείγματος. Αφού δε σχηματίζεται πάγος, δε χρειάζεται η κατάψυξη να είναι αργή. Στην πραγματικότητα, είναι λιγότερο επιβλαβής ο ταχύς ρυθμός κατάψυξης. Η κατάσταση υαλοποίησης και οι φυσικο-χημικές συνθήκες, που επικρατούν κατά την κατάψυξη είναι ως ένα βαθμό κοινές στις δύο μεθόδους, αλλά ο τρόπος που αποκτώνται είναι διαφορετικός.

ΤΑ ΑΙΤΙΑ ΤΗΣ ΘΝΗΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΥΨΗΛΟΥΣ ΡΥΘΜΟΥΣ ΚΑΤΑΨΥΞΗΣ

Το θερμοδυναμικό σημείο ψύξης των περισσότερων κυττάρων (ήτοι, η υψηλότερη θερμοκρασία στην οποία ο πάγος μπορεί, να συνυπάρχει με το κυτταρόπλασμα) είναι περίπου $-0,5^{\circ}\text{C}$, αλλά τα κύτταρα δεν καταψύχονται ακόμη και με την παρουσία εξωκυτταρίου πάγου, πριν η θερμοκρασία πέσει από 5 έως 40°C υπό αυτή τη θερμοκρασία. Εξ ορισμού, μία ποσότητα νερού κάτω από το σημείο ψύξης χαρακτηρίζεται από μεγαλύτερη πίεση ατμών, δραστηριότητα και χημικό δυναμικό σε μια οποιαδήποτε θερμοκρασία υπό του μηδενός από ότι έχει ο πάγος ή από ένα διάλυμα που περιέχει νερό και πάγο σε ισορροπία. Το αποτέλεσμα είναι, ότι όσο το κύτταρο περιέχει νερό σε θερμοκρασία χαμηλότερη από το σημείο ψύξης, η διαφορά στην πίεση και στο χημικό δυναμικό θα εξασφαλίζει μία δύναμη, που θα οδηγεί το ενδοκυτταρικό υγρό, εκτός του κυττάρου και την άμεση ψύξη του εξωκυτταρικά. Με άλλα λόγια το κύτταρο θα έχει την τάση, να αφυδατώνεται ενώ ψύχεται. Ο ρυθμός και η έκταση αυτής της αφυδάτωσης εξαρτώνται αρχικά από δύο μεταβλητές. Η πρώτη είναι η έμφυτη περατότητα του κυττάρου από το νερό, η οποία

είναι γνωστή ως υδραυλική αγωγιμότητα (L_p) και η δεύτερη είναι ο ρυθμός ψύξης. Για ένα κύτταρο με δεδομένη υδραυλική αγωγιμότητα, όσο πιο αργά ψύχεται, τόσο πιο ικανό είναι να χάσει αρκετή ποσότητα νερού, ώστε να παραμείνει σε χημική ισορροπία με τον εξωκυττάριο πάγο και, αντίστοιχα, όσο πιο γρήγορα ψύχεται τόσο λιγότερο ικανό είναι, να αφυδατωθεί κι έτσι η ποσότητα νερού, που περιέχει δε θα καταψύχεται όσο η θερμοκρασία πέφτει.

Βλάβες από τη χαμηλή θερμοκρασία (chilling injury) και cold shock

Όπως και στην περίπτωση της αργής κατάψυξης, η υαλοποίηση μπορεί, να βλάψει τα κύτταρα ή τους ιστούς. Ανάλογα με το υλικό και το πρωτόκολλο που χρησιμοποιείται, τα κύτταρα μπορούν να καταψυχθούν άμεσα, ξεκινώντας από μία θερμοκρασία, που δεν τους προκαλεί shock (θερμοκρασία δωματίου). Υπερβολικά υψηλοί ρυθμοί κατάψυξης από αυτή τη θερμοκρασία στην κατάσταση υαλοποίησης, έχειδειχθεί ότι παρακάμπτει το shock. Για παράδειγμα, οι μέθοδοι υαλοποίησης φαίνεται, ότι αποτρέπουν την αποσύνθεση της μιτωτικής ατράκτου των ωαρίων.

Κρυοπροστατευτικοί παράγοντες

Στις μεθόδους υαλοποίησης, τα κύτταρα μεταφέρονται σε ένα διάλυμα με πολύ υψηλή συγκέντρωση κρυοπροστατευτικών παραγόντων. Αν η συγκέντρωση των ουσιών αυτών είναι αρκετά υψηλή, τα διαλύματα υαλοποίησης στερεοποιούνται σε μορφή ύαλου, χωρίς κανένα κίνδυνο σχηματισμού πάγου ενδοκυτταρικά ή εξωκυτταρικά, κατά την κατάψυξη ή την απόψυξη άσχετα με το ρυθμό των διαδικασιών αυτών. Παρ'όλ'αυτά, οι πολύ υψηλές συγκεντρώσεις κρυοπροστατευτικών, που είναι απαραίτητα για την υαλοποίηση μπορεί, να προκαλέσουν βλάβες εξαιτίας της απότομης αλλαγής στην οσμωτική πίεση, της αφυδάτωσης ή της χημικής τοξικότητας. Γενικά, τα πρωτόκολλα της υαλοποίησης (για παράδειγμα εμβρύων) βασίζονται στη χρήση διαλυμάτων με βαθμιαία αυξημένη συγκέντρωση κρυοπροστατευτικών παραγόντων, τη γρήγορη τοποθέτηση στην εκάστοτε συσκευή κατάψυξης (συνήθως καλαμάκια) και μεταφορά τους στο υγρό άζωτο. Αυτή η βαθμιαία αύξηση στη συγκέντρωση των κρυοπροστατευτικών μειώνει τις επιδράσεις του οσμωτικού στρες, ενώ η χαμηλή θερμοκρασία και η γρήγορη μεταφορά βοηθούν στην αποφυγή της χημικής τοξικότητας. Άλλος ένας τρόπος να μειωθεί η πιθανότητα χημικής τοξικότητας είναι η χρήση μείγματος ουσιών, που διαπερνούν τη μεμβράνη, αλλά και η προσθήκη μη διαπεραστικών κρυοπροστατευτικών, όπως 60 g/L πολυαιθυλική γλυκόλη (Rall, 1987) ή 60 g/L αλβουμίνη ορού βοοειδών –BSA- (van Wagtenonk-de Leeuw et al., 1997).

Μείωση της συγκέντρωσης κρυοπροστατευτικών σε υψηλούς ρυθμούς κατάψυξης.

Διαλύματα τα οποία έχουν χαμηλή συγκέντρωση ουσιών, χαρακτηρίζονται και από χαμηλότερο σημείο ψύξης, γεγονός που οδηγεί στον αυξημένο κίνδυνο σχηματισμού πάγου. Όταν όμως το διάλυμα ψύχεται πολύ γρήγορα, δεν υπάρχει χρόνος να συμβεί αυτό. Κάτω από μία συγκεκριμένη θερμοκρασία, το ιξώδες του διαλύματος αυξάνεται τόσο πολύ, που ο σχηματισμός πάγου είναι αδύνατος και το διάλυμα μετατρέπεται σε μετασταθή ύαλο. Η συγκέντρωση των κρυοπροστατευτικών που απαιτείται γι' αυτήν τη μετατροπή μειώνεται, ως αποτέλεσμα του αυξανόμενου ρυθμού κατάψυξης. Έτσι,

οι πιο σύγχρονες μέθοδοι υαλοποίησης εκμεταλλεύονται τους υψηλούς ρυθμούς κατάψυξης, ώστε να μειώσουν τη συγκέντρωση κρυοπροστατευτικών και συνεπώς μειώνουν την πιθανότητα βλάβης από οσμωτικό στρες ή χημική τοξικότητα. Ο ρυθμός κατάψυξης μπορεί, να αυξηθεί με διάφορους τρόπους. Αρχικά μπορεί να μειωθεί ο όγκος του δείγματος προς κατάψυξη. Ένα παράδειγμα μιας πρώτης προσέγγισης είναι η μέθοδος open pulled straw (OPS) (Vaita et.al, 1998, 200 a,b). Ακόμη μικρότερος όγκος δείγματος έχουν επιτευχθεί με άλλα πιο σύγχρονα συστήματα όπως hemi straws, cryoloops και straws πολυπροπυλενίου (Cryotop® - Kitazato).

Ένας άλλος τρόπος να επιτευχθεί ταχύς ρυθμός κατάψυξης είναι η μεταφορά σε ένα υγρό, που δεν είναι στο σημείο βρασμού. Πιο αναλυτικά, το υγρό άζωτο στο σημείο βρασμού (-196°C) δημιουργεί ατμούς, όταν απορροφά θερμότητα. Έτσι δημιουργείται ένα στρώμα ατμού, το οποίο απομονώνει το δείγμα από το υγρό άζωτο. Το υγρό άζωτο, που βρίσκεται στο σημείο ψύξης (nitrogen slush) δεν έχει αυτό το μειονέκτημα. Υπάρχει δυνατότητα παρασκευής αζώτου στο σημείο ψύξης με ειδική συσκευή (Arav et al., 2002).

Στις μεθόδους υαλοποίησης είναι σημαντικό και η θέρμανση (απόψυξη) των δειγμάτων, να γίνεται εξίσου ταχέως. Αν η απόψυξη γίνει αργά, είναι πολύ πιθανό να δημιουργηθούν κρύσταλλοι όσο το δείγμα βρίσκεται μεταξύ της θερμοκρασίας υαλοποίησης και του σημείου ψύξης του διαλύματος.

Τα πιο πρόσφατα πρωτόκολλα υαλοποίησης χρησιμοποιούν, συνήθως, γρήγορες ταχύτητες και χαμηλότερες συγκεντρώσεις κρυοπροστατευτικών.

Τα υπάρχοντα διαλύματα που χρησιμοποιούνται στις μεθόδους αυτές (Liu et al., 2008; Morató et al., 2008) χαρακτηρίζονται από πολύ χαμηλότερες συγκεντρώσεις κρυοπροστατευτικών σε σχέση με τα παλαιότερα διαλύματα (για παράδειγμα VS3, Rall, 1987).

Με αυτές τις μεθόδους έχουν ληφθεί πολύ ικανοποιητικά αποτελέσματα όσον αφορά την κατάψυξη πολλών ειδών δειγμάτων, όπως γαμέτες και έμβρυα.

ΣΥΓΧΡΟΝΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΤΑΨΥΞΗΣ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ ΣΤΗΝ ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ

Η κρυοσυντήρηση σπέρματος χρησιμοποιείται ευρέως σε συνδυασμό με τις τεχνικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής όπως IUI, IVF και ICSI. Παρά τις εκτεταμένες έρευνες και την ανακάλυψη νέων κρυοπροστατευτικών παραγόντων, σημαντικό ποσοστό των σπερματοζωαρίων δε θα επιβιώσει την κατάψυξη (Morris, 1999). Η διαδικασία της κατάψυξης, αλλά και της απόψυξης, μπορούν να προκαλέσουν ανεπανόρθωτες βλάβες σε ένα μέρος του δείγματος, που χαρακτηρίζεται από σημαντική αύξηση κάποιων αποπτωτικών δεικτών (Giraud et al., 2000).

Η λιπιδική υπεροξειδωση που προκαλείται μπορεί, να οδηγήσει σε μείωση της ταχύτητας, της κινητικότητας, της επιβίωσης αλλά και της μιτοχονδριακής δραστηριότητας των σπερματοζωαρίων (Mossad et al., 1994; O'Connell et al., 2002). Το ποσοστό των ανέπαφων σπερματοζωαρίων εξαρτάται άμεσα από την ποιότητα το δείγματος πριν την κατάψυξη (de Paula et al., 2006). Χαμηλής ποιότητας δείγματα μπορεί, να είναι πιο επιρρεπή σε βλάβες του DNA και κυτταρικό θάνατο μετά την κατάψυξη, απ'ό,τι δείγματα με φυσιολογικές τιμές και, συνεπώς, μειωμένη ικανότητα γονιμοποίησης (Borges et al., 2007).

Έχει δειχθεί, ότι η παραγωγή ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS) επιδρά στη δομή της μεμβράνης και στην ανάκτηση κινητών σπερματοζωαρίων μετά την κατάψυξη.

Επίσης, η διαδικασία της κρυοσυντήρησης μπορεί, να μειώσει την αντιοξειδωτική δράση του σπερματικού υγρού καθιστώντας τα σπερματοζωάρια ακόμη πιο ευάλωτα στις βλάβες από τις ενεργές μορφές οξυγόνου (Lasso et al., 1994).

Η εμφάνιση βλαβών στο DNA των σπερματοζωαρίων μπορεί, να σχετίζεται επίσης με τη διαδικασία της απόψυξης. Έχει παρατηρηθεί μία ταχεία αύξηση κατακερματισμού του DNA αναλογικά με το χρόνο, με το μεγαλύτερο ρυθμό κατά τις τέσσερις πρώτες ώρες μετά την απόψυξη (Gosalvez et al., 2009).

Δείγματα σπέρματος με φυσιολογικές τιμές φαίνεται, ότι είναι πιο ανθεκτικά στις βλάβες που προκαλούνται από την κατάψυξη και την ακόλουθη απόψυξη σε σχέση με oligoζωοσπερμικά ή ασθενοζωοσπερμικά δείγματα. Έχει αναφερθεί, ότι είναι δυνατή η ανάκτηση κινητών σπερματοζωαρίων μετά από πέντε διαδοχικούς κύκλους κατάψυξης-απόψυξης σε δείγματα με αναμενόμενες τιμές, αλλά μόνο μετά από δύο ανάλογους κύκλους σε oligoζωοσπερμικά δείγματα (Verza et al., 2009).

Σπερματοζωάρια από υπογόνιμους άνδρες έχουν, επίσης, βρεθεί να είναι λιγότερο ανθεκτικά στις βλάβες από την κατάψυξη σε σχέση με φυσιολογικά δείγματα (Donnelly et al., 2001). Η βελτιστοποίηση των κρυοπροστατευτικών παραγόντων και των πρωτοκόλλων κατάψυξης θα μεγιστοποιήσουν την επιβίωση των σπερματοζωαρίων και, συνεπώς, τα αποτελέσματα των διαφόρων μεθόδων υποβοηθούμενης αναπαραγωγής.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί πιο πάνω, οι δύο μέθοδοι αργής κατάψυξης (προγραμματιζόμενοι καταψύκτες ή μη προγραμματιζόμενα συστήματα) και η “υαλοποίηση” μπορούν, να χρησιμοποιηθούν για την κατάψυξη σπέρματος.

Όλες οι μέθοδοι έχουν πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα.

Όσον αφορά τα μη προγραμματιζόμενα συστήματα, έχει παρατηρηθεί ότι χαρακτηρίζονται από υψηλότερο ποσοστό κινητών σπερματοζωαρίων μετά τη διαδικασία κατάψυξης-απόψυξης (καλύτερη διατήρηση της κινητικότητας). Άλλο ένα σημαντικό χαρακτηριστικό είναι, ότι τα μη προγραμματιζόμενα πρωτόκολλα είναι γρήγορες διαδικασίες, οι οποίες εφαρμόζονται εύκολα στην καθημερινή ρουτίνα του εργαστηρίου. Από την άλλη μεριά, λόγω της μη προγραμματιζόμενης φύσης τους και του ότι η καμπύλη πτώσης της θερμοκρασίας δεν μπορεί, να ελεγχθεί, οι θερμοκρασίες κατάψυξης μπορεί να ποικίλλουν από -70 έως -99°C. Ο ρυθμός πτώσης της θερμοκρασίας μπορεί επίσης, να ποικίλλει καθ' όλη την έκταση του δείγματος. Επίσης, οι μέθοδοι αυτές, φαίνεται πως έχουν καλύτερο αποτέλεσμα, όταν ο όγκος του δείγματος που καταψύχεται είναι μικρός, κάτι που μπορεί να μην είναι τόσο πρακτικό στη χρήση. Άλλο ένα μειονέκτημα είναι, ότι τα υλικά που χρησιμοποιούνται σε αυτές τις μεθόδους, χαρακτηρίζονται από υψηλές συγκεντρώσεις κρυοπροστατευτικών παραγόντων.

Οι προγραμματιζόμενοι καταψύκτες έχουν δύο βασικά πλεονεκτήματα. Είναι ασφαλέστεροι στη χρήση και εξασφαλίζουν την ομοιόμορφη κατάψυξη των δειγμάτων. Τα μειονεκτήματά τους είναι το γεγονός, ότι μπορεί να προκληθεί εκτενής φυσικοχημική βλάβη στο δείγμα, λόγω δημιουργίας κρυστάλλων και φυσικά η χρονοβόρα διαδικασία.

Η “υαλοποίηση” δειγμάτων σπέρματος είναι δυνατή, αλλά δεν εφαρμόζεται ευρέως. Κατορθώθηκε πρώτα από την ομάδα Isachenko (Nawroth et al., 2002; E. Isachenko et al., 2003) και βασίζεται στη χρήση πολύ μικρών όγκων δείγματος, ταχείς ρυθμούς κατάψυξης/απόψυξης και χρήση διαλυμάτων με πολυσακχαρίτες και πρωτεΐνες ως κρυοπροστατευτικούς παράγοντες. Η διαδικασία αυτή δε θα αναλυθεί περαιτέρω καθώς δεν χρησιμοποιείται πολύ και δε σχετίζεται με την πειραματική διαδικασία της παρούσας εργασίας.

ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ (“ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑ”) ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΚΑΤΑΨΥΞΗΣ

Τα προς κατάψυξη δείγματα σπέρματος πρέπει, να αποθηκεύονται σε κατάλληλα συσκευές και σε βέλτιστη θερμοκρασία, έτσι ώστε να εξασφαλιστεί η μακροχρόνια επιτυχής κρυοσυντήρηση. Οι συσκευές αυτές πρέπει, να πληρούν αρκετά κριτήρια:

1. Πρέπει να διατηρούν τις χαμηλές θερμοκρασίες χωρίς να εμφανίζουν ρωγμές ή διαρροές.
2. Να χαρακτηρίζονται από μεγάλη επιφάνεια, ώστε να εξασφαλίζουν όσο το δυνατό πιο ομοιόμορφη κατάψυξη των δειγμάτων.
3. Να έχουν κατάλληλες ιδιότητες ανταλλαγής θερμοκρασίας.
4. Να είναι εύκολη η επιγραφή τους και να σφραγίζουν ασφαλώς.
5. Να είναι διαθέσιμα ως σχετικά μικρές, αποστειρωμένες μονάδες.

Όταν επιλέγεται ένα μέσο αποθήκευσης, πρέπει να λαμβάνεται υπ’οψιν και η πιθανότητα βακτηριακής ή ιικής μόλυνσης. Η συσκευή συνήθως επιλέγεται με βάση το πρωτόκολλο κατάψυξης και λιγότερο συχνά με βάση την ποιότητα του δείγματος. Στην κλασική αργή κατάψυξη, οι δύο πιο διαδεδομένες συσκευές είναι πλαστικά φιαλίδια με βιδωτό καπάκι ή “καλαμάκια”. Τα φιαλίδια μπορεί, να είναι φτιαγμένα από τερεφθαλική πολυαιθυλική γλυκόλη (PETG) ή ιονομερική ρητίνη.

Πειραματικά, έχουν γίνει προσπάθειες κατάψυξης μικρών αριθμών σπερματοζωαρίων σε κενές *zonae pellucida* ανθρώπου ή ζώων, σφαίρες από *Volvox globator* (είδος χλωρόφυτου) και πιπέττες μικρογονιμοποίησης (Abdel-Hafez et al., 2009; Herrler et al., 2006; Isaev et al., 2007; Just et al., 2004; Walmsley et al., 1998).

Όπως και οι διάφορες μέθοδοι κατάψυξης, έτσι και τα διάφορα μέσα αποθήκευσης έχουν πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα. Τα φιαλίδια είναι μεγαλύτερα από τα “καλαμάκια” κι έτσι σαφώς πιο εύκολα στο χειρισμό τους. Λόγω του μεγαλύτερου όγκου δείγματος είναι λιγότερο κρίσιμος ο χρόνος μεταφοράς τους (για να προληφθεί η μη επιθυμητή θέρμανση του δείγματος). Επίσης, η ανάγνωση της ετικέτας είναι πολύ πιο εύκολη και θεωρείται, ότι η συσκευασία δειγμάτων σπέρματος σε φιαλίδια εξασφαλίζει καλύτερα το χειρισμό σε συνθήκες αποστείρωσης. Από την άλλη μεριά, τα φιαλίδια χρειάζονται σαφώς μεγαλύτερο χώρο για αποθήκευση και πολύ περισσότερο χρόνο για απόψυξη. Έχει παρατηρηθεί, ότι είναι πιθανό, να χαθεί μεγαλύτερη ποσότητα δείγματος κι επίσης, αν τα φιαλίδια δεν έχουν σφραγιστεί σωστά, μπορεί να “σκάσουν” κατά την απόψυξη θέτοντας σε κίνδυνο τις συνθήκες αποστείρωσης.

Τα “καλαμάκια” χαρακτηρίζονται από καλή ανάκτηση κινητών σπερματοζωαρίων μετά την απόψυξη. Αυτό μπορεί, να οφείλεται εν μέρη στην ικανότητα τους να εξασφαλίζουν ομοιόμορφη κατάψυξη του δείγματος. Είναι πιο εύκολη η συλλογή όλου του δείγματος για επεξεργασία κι ο χρόνος απόψυξης είναι πολύ μικρότερος από αυτόν που χρειάζονται τα δείγματα σε φιαλίδια. Χρειάζονται λιγότερο χώρο για αποθήκευση, είναι πιο οικονομικά και δεν υπάρχει ο κίνδυνος να “σκάσουν”. Από την άλλη μεριά, είναι πολύ πιο κρίσιμος ο χρόνος μεταφοράς τους, γιατί είναι πολύ εύκολο να αποψυχθούν, η ανάγνωση των –μικρών συνήθως- ετικετών είναι δύσκολη και είναι πιο περίπλοκος ο χειρισμός τους για την επεξεργασία του δείγματος. Μπορεί, να μη χαρακτηρίζονται από τον κίνδυνο, να “σκάσουν”, παρ’όλ’αυτά αν δεν είναι καλής ποιότητας ένα από δύο άκρα μπορεί να χωριστεί στα δύο ή να ανοίξει.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Όπως έχει αναφερθεί εκτενώς παραπάνω, για την πραγματοποίηση της κατάψυξης, λόγω της φύλαξης σε υγρό άζωτο (-196°C), είναι απαραίτητη η χρήση κρυοκαταψυκτικών μέσων, που σκοπό έχουν, την επιτυχή κατάψυξη του δείγματος, όπως για παράδειγμα την αποφυγή δημιουργίας κρυστάλλων, αλλά και την αύξηση της πιθανότητας επιβίωσης των σπερματοζωαρίων σε μια τόσο χαμηλή θερμοκρασία. Αν και τα μέσα αυτά περιέχουν κρυοπροστατευτικούς παράγοντες, δεν παύουν να επηρεάζουν το σπέρμα έχοντας μικρότερη ή μεγαλύτερη επίδραση στην ποιότητα του δείγματος μετά την κατάψυξη. Στο εμπόριο υπάρχουν πολυάριθμοι κρυοκαταψυκτικοί παράγοντες, με ποικίλλα συστατικά. Τα περισσότερα υλικά έχουν ως βάση τη γλυκερόλη, αλλά κάποια έχουν πρόσθετους παράγοντες που θεωρητικά βοηθούν στην καλύτερη συντήρηση του σπέρματος, όπως για παράδειγμα ο κρόκος αυγού. Η εργασία αυτή στοχεύει στην εξαγωγή συμπεράσματος, όσον αφορά την αποτελεσματικότητα της χρήσης κρόκου αυγού, στην καλύτερη διατήρηση των δειγμάτων σπέρματος με φυσιολογικές παραμέτρους που θα μελετηθούν, ως καταλληλότερου κρυοκαταψυκτικού μέσου (μεταξύ των δύο που συγκρίνονται). Στη συγκεκριμένη εργασία, τα δύο μέσα που συγκρίνονται είναι αυτά της Irvine Scientific και της FertiPro. Οι δύο αυτοί καταψυκτικοί παράγοντες έχουν ως βάση τη γλυκερόλη, αλλά ο πρώτος περιέχει κρόκο αυγού.

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Υλικά

A. Δείγμα

Το δείγμα αποτελείται από 42 άνδρες 25-45 ετών, ελληνικής καταγωγής και με φυσιολογικές παραμέτρους σπέρματος (normozoospermic), σύμφωνα με τις τελευταίες οδηγίες της Π.Ο.Υ (WHO 2010).

Οι παράμετροι, με βάση τις οποίες αξιολογείται ένα δείγμα σπέρματος, είναι:

- Όγκος σπέρματος
- Συνολικός αριθμός σπερματοζωαρίων
- Συγκέντρωση σπερματοζωαρίων
- Κινητικότητα σπερματοζωαρίων με προωθητική ικανότητα (κατηγορίες α+β)
- Ολική κινητικότητα σπερματοζωαρίων (κατηγορίες α+β+γ)
- Φυσιολογική μορφολογία (κατά Kruger)

Οι αναμενόμενες τιμές για τις παραπάνω παραμέτρους είναι οι ακόλουθες:

Όγκος $\geq 1,5$ ml

Συνολικός αριθμός σπερματοζωαρίων $\geq 39 \times 10^6$

- Συγκέντρωση σπερματοζωαρίων $\geq 15 \times 10^6$
- Κινητικότητα σπερματοζωαρίων με προωθητική ικανότητα $\geq 32\%$
- Ολική κινητικότητα σπερματοζωαρίων $\geq 40\%$
- Φυσιολογική μορφολογία $\geq 4\%$ (Κατά Kruger)

Τα δείγματα ελήφθησαν μετά απο αυνανισμό και δύο με τρεις ημέρες σεξουαλικής αποχής. Κάθε δείγμα, το οποίο έχει τιμές εκτός των αναμενόμενων ορίων στις παραπάνω παραμέτρους, με βάση τα δεδομένα της Π.Ο.Υ., αποκλείστηκε από τη μελέτη. Αν και η μορφολογία των σπερματοζωαρίων είναι παράμετρος που ανήκει στο σπερμοδιάγραμμα, λόγω έλλειψης κατάλληλων μέσων (αντικειμενοφόρων με χρωστική για τον ακριβή προσδιορισμό του ποσοστού των μη φυσιολογικών μορφών) οι παρατηρήσεις θεωρήθηκε, ότι δεν μπορούν, να συμπεριληφθούν στη μελέτη.

B. Κρυοκαταψυκτικά υλικά

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, τα δύο υλικά που συγκρίνονται είναι το *SpermFreeze* της FertiPro (Υλικό 1) και το *Freezing Medium* της Irvine Scientific (Υλικό 2).

SpermFreeze (FertiPro):

- 20% v/v Γλυκερόλη
- 0,4% Ανθρώπινη Αλβουμίνη ορού
- Σουκρόζη

Freezing Medium (Irvine Scientific):

- 12% v/v Γλυκερόλη
- 20% κρόκος αυγού (from USDA certified SPF (Virus Free) laying flocks, heat inactivated at 56° C for 30 minutes)
- 10μg/mL Θευική Γενταμυκίνη
- Φρουκτόζη

Μέθοδος

Τα δείγματα παρελήφθησαν μέσα σε μία ώρα το πολύ, μετά την εκσπερμάτιση. Μετά από ρευστοποίηση, σε θερμή πλάκα, καταγράφηκαν οι βασικές τιμές σπερμοδιαγράμματος, οι οποίες είναι ο όγκος, η συγκέντρωση των σπερματοζωαρίων, η κινητικότητα ($\alpha+\beta+\gamma$) και η μορφολογία (τα δεδομένα αυτά δεν εμφανίζονται στην παρούσα μελέτη) χρησιμοποιώντας θερμή αντικειμενοφόρο Makler (Makler counting chamber). Στη συνέχεια, μετά τη ρευστοποίηση, το κάθε δείγμα χωρίστηκε σε δύο μέρη με τον ίδιο όγκο. Χρησιμοποιώντας διαφορετικό υλικό στο καθένα, τα δύο μέρη του κάθε δείγματος καταψύχθηκαν με το ίδιο πρωτόκολλο. Το πρωτοκολλο αυτό περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

Κατάψυξη

- Οι διαδικασίες της κατάψυξης απαιτεί θερμοκρασία δωματίου (κλειστή θερμαινόμενη πλάκα).
- Σε δύο ξεχωριστούς σωλήνες φυγοκέντρου προστίθενται 1 ml δείγματος στον καθένα.

- Σταδιακή προσθήκη 0,7 ml κρυοκαταψυκτικού (0,7 ml υλικού/ml δείγματος) χρησιμοποιώντας γυάλινη πιπέττα.
- Μετά την προσθήκη όλης της ποσότητας του κρυοκαταψυκτικού, το δείγμα αναδεύεται καλά πάλι με τη χρήση της πιπέττας.
- Στη συνέχεια το δείγμα παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου (~27°C) για 10 λεπτά. Στο διάστημα αυτό, τα δύο ξεχωριστά πλέον δείγματα μεταφέρονται από τους σωλήνες φυγοκέντρου στα φιαλίδια αποθήκευσης (χρησιμοποιήθηκαν φιαλίδια με βιδωτό καπάκι)
- Έπειτα τα δείγματα αφήνονται σε ατμούς αζώτου για 15 λεπτά. Αυτό επιτυγχάνεται με την τοποθέτησή τους στην κορυφή ενός κάδου αποθήκευσης ήδη γεμάτο με υγρό άζωτο. Τα δείγματα τοποθετούνται έτσι ώστε να έχουν ισουπή απόσταση από τους ατμούς αζώτου.
- Στη συνέχεια, τα δείγματα εμβαπτίζονται στο υγρό άζωτο (-196°C), στο οποίο θα παραμείνουν για το ίδιο χρονικό διάστημα.

Η διαδικασία αυτή ακολουθείται και για τα δύο υλικά κατάψυξης.

Απόψυξη

Τα δύο φιαλίδια καταψυγμένου δείγματος που προήλθαν από το ίδιο δείγμα αποψύχονται παράλληλα.

- Τα φιαλίδια απομακρύνονται από το υγρό άζωτο ταυτόχρονα και τοποθετούνται σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.
- Στη συνέχεια, τοποθετούνται πάνω σε θερμαινόμενη πλάκα (~37°C) για άλλα 10 λεπτά.
- Μόλις το δείγμα έχει ρευστοποιηθεί εντελώς και θερμανθεί, αναδεύεται με γυάλινη πιπέττα και καταγράφονται εκ νέου οι βασικές τιμές του σπερμοδιαγράμματος.

Η διαδικασία αυτή ακολουθείται και για τα δύο υλικά κατάψυξης.

Μετά την απόψυξη, συγκρίθηκαν μεταξύ τους, αλλά και με τις αρχικές τιμές προ κατάψυξης.

Με την παραπάνω διαδικασία συγκρίθηκαν οι τιμές της κινητικότητας πριν την κατάψυξη με τις τιμές της κινητικότητας μετά την κατάψυξη και με τα δύο υλικά. Επίσης συγκρίθηκαν οι τιμές όλων των τύπων της κινητικότητας (καλή προωθητική, μέτρια προωθητική, επιτόπια) μεταξύ των δύο καταψυκτικών υλικών.

ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

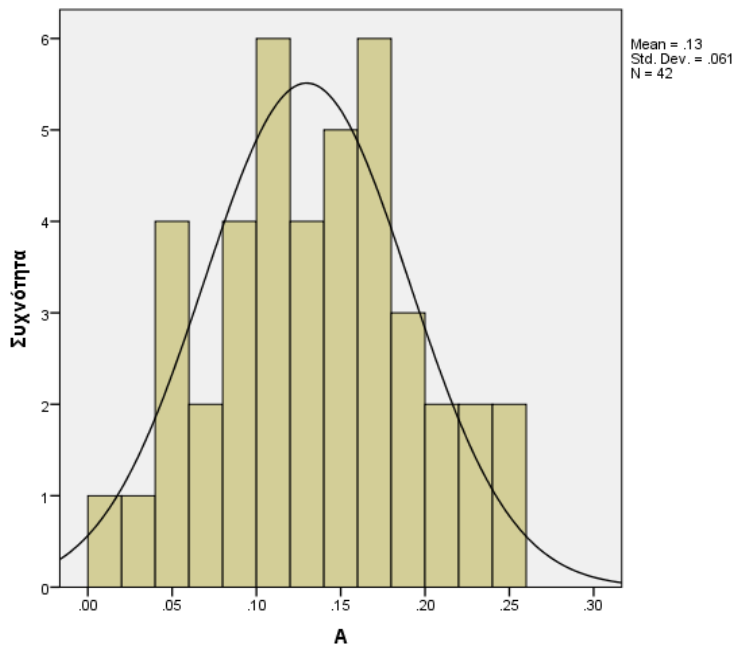
Τα δεδομένα αναλύθηκαν με τη χρήση του προγράμματος στατιστικού προγράμματος SPSS (IBM SPSS Statistics, v.20). Πιο συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε το t-test για εξαρτώμενα δείγματα, αφού τα δείγματα υπό μελέτη και σύγκριση προέρχονται από το ίδιο άτομο με όριο στατιστικής σημαντικότητας 0.05 ($p < 0.05$).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

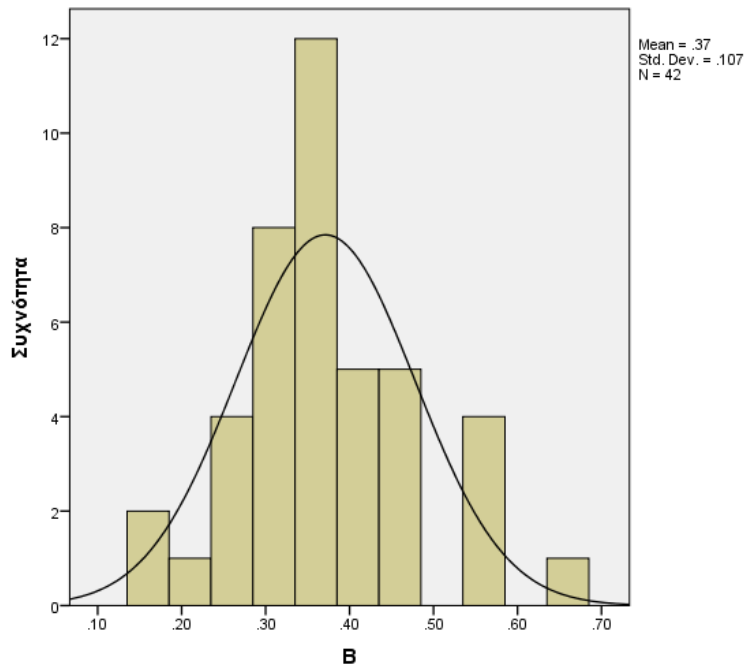
Ακολουθούν οι πίνακες των δεδομένων πριν την κατάψυξη, καθώς και τα αποτελέσματα, που ελήφθησαν μετά τη διαδικασία κατάψυξης-απόψυξης, καθώς και τα γραφήματα των ομαδοποιημένων δεδομένων πριν την κατάψυξη.

Πίνακας 1: Τιμές των παραμέτρων πριν την κατάψυξη. A: Καλή προωθητική κίνηση πριν την κατάψυξη, B: Μέτρια προωθητική κίνηση πριν την κατάψυξη, C: Επιτόπια κίνηση πριν την κατάψυξη. Τα δεδομένα έχουν εκφραστεί $\pm SD$.

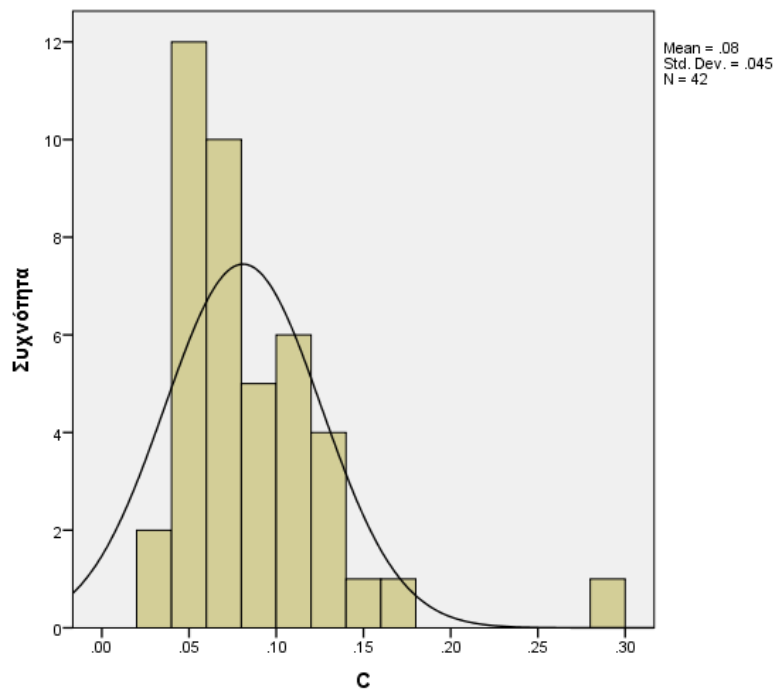
Ηλικία (έτη)	36.31 \pm 6.86
Όγκος δείγματος (ml)	3.66 \pm 1.42
Σύγκεντρωση (10^6 /ml)	66.65 \pm 33.74
A (%)	12.98 \pm 6.07
B (%)	37.12 \pm 10.67
C (%)	8.10 \pm 4.49
Ολική κίνηση πριν την κατάψυξη (%)	58.19 \pm 13.74



Γράφημα 1: Καλή προωθητική κίνηση πριν την κατάψυξη.



Γράφημα 2: Μέτρια προωθητική κίνηση πριν την κατάψυξη.



Γράφημα 3: Επιτόπια κίνηση πριν την κατάψυξη.

Πίνακας 2: Τιμές των παραμέτρων μετά την κατάψυξη-απόψυξη με το υλικό 1.

A': Καλή προωθητική κίνηση μετά την κατάψυξη με το υλικό 1, B': Μέτρια προωθητική κίνηση μετά την κατάψυξη με το υλικό 1, C': Επιτόπια κίνηση μετά την κατάψυξη με το υλικό 1. Τα δεδομένα έχουν εκφραστεί $\pm SD$.

A' (%)	4.93 \pm 2.97
B' (%)	19.24 \pm 8.54
C' (%)	5.05 \pm 2.34
Ολική κίνηση μετά την κατάψυξη με το υλικό 1 (%)	29.21 \pm 10.28

Πίνακας 3: Τιμές των παραμέτρων μετά την κατάψυξη-απόψυξη με το υλικό 2.

A'': Καλή προωθητική κίνηση μετά την κατάψυξη με το υλικό 2, B'': Μέτρια προωθητική κίνηση μετά την κατάψυξη με το υλικό 2, C'': Επιτόπια κίνηση μετά την κατάψυξη με το υλικό 2. Τα δεδομένα έχουν εκφραστεί $\pm SD$.

A'' (%)	4.26 \pm 2.91
B'' (%)	18.31 \pm 8.29
C'' (%)	5.83 \pm 2.83
Ολική κίνηση μετά την κατάψυξη με το υλικό 2 (%)	28.40 \pm 10.08

Συγκρίσεις

Πίνακας 4: Σύγκριση παραμέτρων πριν την κατάψυξη και μετά την κατάψυξη με το Υλικό 1.

ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΣ	Πριν την κατάψυξη	Υλικό 1	p
Καλή προωθητική κίνηση	12.98 \pm 6.07	4.93 \pm 2.97	<0.05
Μέτρια προωθητική κίνηση	37.12 \pm 10.67	19.24 \pm 8.54	<0.05
Επιτόπια κίνηση	8.10 \pm 4.49	5.05 \pm 2.34	<0.05
Ολική κίνηση	58.19 \pm 13.74	29.21 \pm 10.28	<0.05

Πίνακας 5: Σύγκριση παραμέτρων πριν την κατάψυξη και μετά την κατάψυξη με το Υλικό 2.

ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΣ	Πριν την κατάψυξη	Υλικό 2	p
Καλή προωθητική κίνηση	12.98 \pm 6.07	4.26 \pm 2.91	<0.01
Μέτρια προωθητική κίνηση	37.12 \pm 10.67	18.31 \pm 8.29	<0.01
Επιτόπια κίνηση	8.10 \pm 4.49	5.83 \pm 2.83	0.06
Ολική κίνηση	58.19 \pm 13.74	28.40 \pm 10.08	<0.01

Πίνακας 6: Σύγκριση παραμέτρων μετά την χρήση του Υλικού 1 και του Υλικού 2.

ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΣ	Υλικό 1	Υλικό 2	p
Καλή προωθητική κίνηση	4.93±2.97	4.26±2.91	<0.05
Μέτρια προωθητική κίνηση	19.24±8.54	18.31±8.29	0.318
Επιτόπια κίνηση	5.05±2.34	5.83±2.83	0.095
Ολική κίνηση	29.21±10.28	28.40±10.08	0.448

- Από τα παραπάνω, συμπεραίνουμε, ότι και τα δύο υλικά επηρεάζουν στατιστικά σημαντικά την κινητικότητα των σπερματοζωαρίων, σε σχέση με τα ποσοστά κινητικότητας πριν την κατάψυξη. Πιο συγκεκριμένα το Υλικό 1 επηρεάζει στατιστικά σημαντικά όλες τις μορφές κίνησης των σπερματοζωαρίων (καλή, μέτρια προωθητική και επιτόπια), ενώ το Υλικό 2 φαίνεται να επηρεάζει στατιστικά σημαντικά τα δύο είδη προωθητικής και κίνησης και μη στατιστικά σημαντικά την επιτόπια κίνηση.
- Όσον αφορά τη σύγκριση των δύο υλικών, φαίνεται να υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μόνο στην καλή προωθητική κίνηση, η οποία (απ'ότι φαίνεται από τις μέσες τιμές των μετρήσεων) ευνοείται από το Υλικό 1. Τα άλλα δύο είδη κινήσεων δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ των δύο υλικών.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η επίδραση της σύστασης του κρυοπροστατευτικού παράγοντα στην επιβίωση σπερματοζωαρίων (και κυττάρων γενικά) μετά τη διαδικασία κατάψυξης-απόψυξης έχει μελετηθεί εκτενώς σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία. Η γλυκερόλη είναι από τα βασικά συστατικά των κρυοπροστατευτικών παραγόντων και, κατά συνέπεια, έχει ερευνηθεί κατά κόρον. Άλλες μελέτες έχουν εστιάσει στη συμπεριφορά των κυττάρων παρουσία/απουσία της (Diller, 1979) και άλλες στις επιπτώσεις που έχουν οι διαφορετικές συγκεντρώσεις της στα κύτταρα που καταψύχονται σε συνδυασμό με το ρυθμό κατάψυξης (Chaveiro et al. 2006).

Πιο συγκεκριμένα, όσον αφορά την κατάψυξη ανθρώπινων σπερματοζωαρίων, διάφορες μελέτες έχουν ασχοληθεί με την επίδραση του ρυθμού κατάψυξης (Henry et al., 1993), την επιβίωση τους χωρίς τη χρήση κανενός κρυοπροστατευτικού παράγοντα (Nawroth et al., 2002) αλλά και με τη σύγκριση κρυοπροστατευτικών παραγόντων με διαφορετικά συστατικά, όπως χρήση γλυκερόλης μόνο ή προσθήκη κρόκου αυγού

Έχει αναφερθεί, ότι κρυοπροστατευτικά υλικά με κρόκο αυγού ευνοούν στατιστικά σημαντικά την κινητικότητα των σπερματοζωαρίων (Hallak et al., 2000; Nalleka et al., 2004). Οι δύο αυτές μελέτες, όμως, χαρακτηρίζονται από μικρό αριθμό δείγματος (10 συνολικά στην πρώτη και 10 με αναμενόμενες τιμές στη δεύτερη. Μια παλαιότερη μελέτη (Centola et al., 1992) αναφέρει πως συγκρίνοντας την επιβίωση των σπερματοζωαρίων μετά την κατάψυξη, παρατηρήθηκε καλύτερη διατήρηση όλων των παραμέτρων με τη χρήση HSPM (υλικό που περιέχει μόνο γλυκερόλη και

αλβουμίνη) συγκριτικά με τη χρήση υλικού με κρόκο αυγού και τη χρήση υλικού μόνο με γλυκερόλη. Μεγαλύτερες μελέτες αναφέρουν, πως η χρήση κρόκου αυγού ευνοεί τη διατήρηση της φυσιολογικής μορφολογίας των σπερματοζωαρίων, καθώς και τη διατήρηση της ακαιρεότητας της μεμβράνης τους, χωρίς να εστιάσουν στην κινητικότητα (Hammadeh et al., 2001; Evenson et al., 1994; Evenson et al., 1999). Όλες οι δημοσιευμένες μελέτες συγκρίνουν διαφορετικά υλικά και σε πληθυσμούς με διαφορετικά δημογραφικά στοιχεία.

Η αποτελεσματικότητα της χρήσης κρόκου αυγού πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω με μελέτες μεγαλύτερων δειγμάτων και με τη σύγκριση διαφόρων υλικών.

Από την παρούσα μελέτη η χρήση κρόκου αυγού δε φαίνεται να υπερισχύει του υλικού μόνο γλυκερόλη.

Πρέπει επίσης, να σημειωθεί, πως η χρήση κρόκου αυγού πάντα περικλείει τον κίνδυνο μετάδοσης μικροοργανισμών, αφού είναι ζωικής προέλευσης. (Stacey G., 2004).

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abdel-hafez, N.A., Mohamed, A.M., Amr, A.E. and Abdalla, M.M. (2009), Antiarrhythmic Activities of some newly synthesized tricyclic and tetracyclic thienopyridine derivatives, *Scientia Pharmaceutica*, 77, 539- 553.
- Arav, N., Korista, K.T., De Kool, M., On the column density of AGN outflows: The case of NGC 5548, *The Astrophysical Journal*, 566, 699-704.
- Barker, C.A.V. and Gandier, J.C.C. (1957) Pregnancy in a mare resulting from frozen epididymal spermatozoa, *Can. J. Comp. Med.*, 21, 47-51.
- Bolton, H.C. (1900) Early History of the thermometer, Chemical Publishing, Easton, PA.
- Böhmer, H.V., Wöhler, W., Wendel, U., Passarge, E., and Rüdiger, H.W. (1973) Studies on optimal cooling rate for freezing human diploid fibroblasts, *Exp. Cell Res.*, 79, 496-498.
- Bunge, R.G., Keettel, W.C., and Sherman, J.K. (1954) Clinical use of frozen semen. Report of four cases, *Fertil. Steril.*, 5, 520-529.
- Chang, M.,-C and Walton, A. (1940) The effects of low temperature and acclimatization on the respiratory activity and survival of ram spermatozoa, *Proc. R. Soc.* 129B, 517-527.
- Chaveiro, A., Liu, J., Mullen, S., Woelders, H., Critser, J.K., Determination of bull sperm membrane permeability to water and cryoprotectants using a concentration-dependent self-quenching fluorophore, *Cryobiology*, 48, 72-80.
- Chaveiro, A., Machzdo, L., Frijters, A., Engel, B., Woeldres, H. (2006) Improvement of parameters of freezing medium and freezing protocol for bull sperm using two osmotic supports, *Theriogenology*, 65, 1875-1890.
- Crowe, J.H., Crowe, L.M., Oliver, A.E., Tsvetkova, N., Wolkers, W., and Tablin, F. (2001) The trehalose myth revisited: Introduction to a symposium on stabilization of cells in the dry state, *Cryobiology*, 43, 89-105.
- Dauzier, L. (1956) Quelques resultants sur l'insémination artificielle des brébis et des chèvres en France. *Proceedings III International congress of Artificial Reproduction*, Cambridge. Section 3, pp.12-14
- Diller, K.R. (1979) Intracellular freezing in glycerolized cells, *Cryobiology*, 16, 125-131.
- Doebbler, g. F., Sakaida, R.R., Cowley, C.W., and Rinfret, A.P. (1966) Cryogenic preservation of whole blood for transfusion: In vitro study of a process using rapid freezing, thawing and protection by polyvinylpyrrolidone, *Tranfusion*, 6, 104-111.
- Easley, G.T., Mayer, D.T., and Bogart, R. (1942) Influence of diluters, rate of cooling and storage temperatures on survival of bull sperm, *Am. J. Vet. Res.*, 3, 358-363.
- Eisenberg, D. and Kauzmann, W. (1969) *The structure and Properties of Water*, Oxford University Press, Oxford.
- Emmens, C.W. and Blackshaw, A.W. (1955) The fertility of frozen ram and bull semen, *Aust. Vet. J.*, 31, 79-79.
- Foote, R. (1981) The artificial insemination industry, in *New Technologies in Animal Breeding*, Brackett, B.G., Seidel, G.E. Jr., Seidel, S.M., Eds, Academic Press, New York, pp.13-39.
- Fox, R.R. (1961) Preservation of rabbit spermatozoa: fertility results from frozen semen, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 108, 663-665.
- Hammond, J. (1930) The effect of temperature on the survival in vitro of rabbit spermatozoa obtained from the vagina, *J. Exp. Biol.*, 7, 175-191.

- Harris, R.J.C., Ed. (1954) *Biological Applications of Freezing and Drying*, Academic Press, New York.
- Henry, M., Noiles, E.E., Gao, D., Mazur, P., and Critser, J.K. (1993) Cryopreservation of human spermatozoa. IV. The effects of cooling rate and warming rate on the maintenance of motility, plasma membrane integrity and mitochondrial function, *Fertil. Steril.*, 60, 911-918.
- Henderson, L.J. (1913) *The fitness of the Environment*, Beacon Press, Boston.
- Herrler, A., Eisner, S., Bach, V., Weissenborn, U., Beier, H.M. (2006), Cryopreservation of spermatozoa in alginic acid capsules, *Fertil. Steril.*, 85, 208–213.
- Hoagland, H. and Pincus, G. (1942) Revival of mammalian sperm after immersion in liquid nitrogen, *J. Gen. Physiol.*, 25, 337-344.
- Iizuka, R., and Sawada, Y. (1958) Successful inseminations with frozen human sperm, *Jpn. J. Fertil. Steril.*, 3, 333-337.
- Iritani, A., (1980) Problems of freezing spermatozoa of different species. IX International Congress of Animal Reproduction, Madrid, pp. 115-132.
- Isachenko, V., Isachenko, E., Rahimi, G., Krivokharchenko, A., Alabart, J.L., and Nawroth, F. (2002), Cryopreservation of human ovarian tissue by direct plunging into liquid nitrogen: Negative effect of disaccharides in rapid freezing solution, *Cryo Letters*, 23, 333-344.
- Isachenko, V., Isachenko, E., Rahimi, G., and Nawroth, F. (2003), Cryopreservation of human ovarian tissue by direct plunging into liquid nitrogen, *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, 108, 186-193.
- Isaev, D., Isaeva, E., Shatskih, T., Zhao, Q., Smits, N.C., Shworak, N.W., Khazipov, R., Holmes G.L. (2007), Role of extracellular sialic acid in regulation of neuronal and network excitability in the rat hippocampus, *J. Neurosci.*, 27, 11587–11594.
- Jahnel, F. (1938) Über die Widerslendfähigkeit von menschlichen Spermatozoen gegenüber starker Kälte, *Klinische Wochenschrift*, 17, 1273-1274.
- Keskintepe, L., Pacholczyk, G., Machnicka, A., Norris, K., Curuk, M.A., Khan, I., and Brackett, B.G. (2002) Bovine blastocyst development from oocytes injected with freeze-dried spermatozoa, *Biol. Reprod.*, 67, 409-415.
- Koga, S., Eshigo, A., and Nunomura, K. (1966) Physical properties of cell water in partially dried *Saccharomyces cerevisiae*, *Biophysical J.*, 6, 665-674.
- Koshimoto, C., and Mazur, P. (2002) Effects of cooling and warming rate to and from -70°C and effects of cooling from -70°C to -196°C on the motility of mouse spermatozoa, *Biol. Reprod.*, 66, 1477-1484.
- Kusakabe, H., Szczygiel, M.A., Whittingham, D.G. and Yanagimachi, R. (2001) Maintenance of genetic integrity in frozen and freeze-dried mouse spermatozoa, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 13501-13506.
- Leibo, S.P., Farrant, J., Mazur, P., Hanna, M.G., Jr., and Smith, L.H. (1970) Effects of freezing on marrow-stem cell suspensions: Interactions of cooling and warming rates in the presence of PVP, sucrose, or glycerol, *Cryobiology*, 6, 315-332.
- Lepock, J.R., Keith, A.D., and Kruuv, J. (1984) Permeability changes in yeast after freeze-thaw damage; comparison to reproductive survival, *Cryo-Letters*, 5, 277-280.
- Lide, D.R., Ed. (1992) *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, CRC Press, Boca Raton, FL.
- Lillie, F. (1916) The history of the fertilization problem, *Science*, 43, 39-53.
- Liu, Q., Li, M.Z., Leibham, D., Cortez, D., Elledge, S.J., The univector plasmid-fusion system, a method for construction of recombinant DNA without restriction enzymes, *Curr. Biol.*, 34, 1300-1309.

- Lovelock, J.E. (1953) The mechanism of the protective effect of glycerol against hemolysis by freezing and thawing, *Biochim. Biophys. Acta*, 11, 28-36.
- Lovelock, J.E. and Bishop M.W.H. (1959) Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide, *Nature (Lond.)*, 183, 1394-1395.
- Lucké, B. (1940) The living cell as an osmotic system and its permeability to water, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 8, 123-132.
- Luyet, B.J., and Hodapp, E.L. (1938) Revival of frog's spermatozoa vitrified in liquid air, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 39, 433-434
- Luyet, B.J. and Gehenio, P.M. (1940) *Life and Death at Low Temperatures*, Biodynamica, Normandy, MO.
- Marks, S.L., Dupuis, J., Mickelsen, W.D., Memon, M.A., and Platz, C.C. (1994) Conception by use of post-mortem epididymal semen extraction in a dog, *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 204, 1639-1640.
- Martin, I. and Emmens, C.W. (1958) Factors affecting the fertility and other characteristics of deep-frozen bull semen, *J. Endocrinol.*, 17, 449-455.
- Mazur, P. (1963) Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing, *J. Gen. Physiol.*, 47, 347-369.
- Mazur, P. (1965) Causes of injury in frozen and thawed cells, *Fed. Proc.*, 24, S175-S182.
- Mazur, P. (1966) Physical and chemical basis of injury in single-celled organisms subjected to freezing and thawing, in Meryman, H.T., Ed. *Cryobiology*, Academic Press, London.
- Mazur, P. (1968) A modified model for the mechanism of modified freezing injury in erythrocytes, *Nature*, 218, 333-336.
- Mazur, P. (1996) The characterization of intraembryonic freezing in *Anopheles gambiae* embryos, *Cryobiology*, 33, 487-501.
- Mazur, P., Leibo, S.P., and Chu E.H.Y. (1972) A two-factor hypothesis of freezing injury – evidence from Chinese hamster tissue culture cells, *Exp. Cell Res.*, 71, 345-355.
- Meryman, H.T., Ed. (1966) *Cryobiology*, Academic Press, London.
- Meryman, H.T. and Kafig, E. (1955) The freezing and thawing of whole blood, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 90, 587-589.
- Morato, T.M., Sola, E., Gros, M.P., Menezes, G., and Pinho, M.R. (1998) Trophic relationships and feeding habits of demersal fishes from the Azores: importance to multispecies assessment, *ICES*, 7, p. 34.
- Morris, G.J. (1979) The cryopreservation of *Chlamydomonas*, *Cryobiology*, 16, 401-410.
- Muldrew, K. and McGann, L.E. (1994) The osmotic rapture hypothesis of intracellular freezing injury, *Biophysical J.*, 66, 532-541.
- Nawroth, F., Isachenko, V., Dessole, S., Rahimi, G., Farina, M., Vargiu, N., Mallman, P., Dattena, M., Capobianco, G., Peters, D., Orth, I., and Isachenko, E. (2002) Vitrification of human spermatozoa without cryoprotectants, *Cryo-Letters*, 23, 93-102.
- Nemethy, G. and Scheraga, H.A. (1964) Structure of water and hydrophobic bonding in proteins. IV. The thermodynamic properties of liquid deuterium oxide, *J. Chem. Phys.*, 48, 99-109.
- Oda, K., gibbons, W.E, and Leibo, S.P. (1992) Osmotic shock of fertilized mouse ova, *J. Reprod. Fertil.*, 95, 737-747.

- Parkening, A.A., Tsunoda, Y., and Chang, M.C. (1976) Effects of various low temperatures, cryoprotective agents and cooling rates on the survival, fertilizability and development of frozen-thawed mouse eggs, *J. Exp. Zool.*, 197, 369-374.
- Parkes, A.S. (1945) Preservation of human spermatozoa at low temperatures, *Br. Med. J.*, 2, 212-213.
- Parkes, A.S. (1960) *Marshall's Physiology of Reproduction*, 3rd edition, Longmans, London.
- Perloff, W.H., Steinberger, E., and Sherman, J.K. (1964) Conception with human spermatozoa frozen by nitrogen vapour technic, *Fertil. Steril.*, 15, 501-504.
- Phillips, P.H., Lardy, H.A. (1940) A yolk-buffer pabulum for the preservation of bull semen, *J. Dairy Sci.*, 23, 399-404.
- Polge, C. (1957) Low-temperature storage of mammalian spermatozoa, *Proc. R. Soc.*, 147B, 498-508.
- Polge, C., (1968) Frozen semen and the A.I. programme in Great Britain, in *Proceedings of the 2nd Technical Conference on Artificial Insemination and Reproduction*, National Association of Artificial Breeders, Chicago, IL, pp. 46-51.
- Polge, C., and Rowson, L.E.A. (1952a) Fertilizing capacity of bull spermatozoa after freezing at -79°C, *Nature* 169, 626.
- Polge, C., and Rowson, L.E.A., (1952b) Results with bull spermatozoa stored at -79°C, *Vet. Rec.*, 64, 851.
- Polge, C., Smith, A.U., and Parkes, A.S., (1949) Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures, *Nature (Lond.)*, 164, 666.
- Prévost, M. (1840) *Récherches sur les animalcules spermatiques*, *CR Acad. Sci.*, 11, 907-908.
- Rall, W.F. (1987) Factors affecting survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification, *Cryobiology*, 24, 387-402.
- Robinson, R.A and Stokes, R.H. (1959) *Electrolyte Solutions*, Academic Press, New York.
- Rostand, J. (1946) Glycérine et résistance du sperme aux basses températures, *CR Acad. Sci.*, 222, 1524-1525.
- Salamon, S., and Maxwell, W.M.C. (1995) Frozen storage of ram semen, *Anim. Reprod. Sci.*, 37, 185-259.
- Sawada, Y. and Chang, M.C. (1964) Motility and fertilizing capacity of rabbit spermatozoa after freezing in a medium containing dimethyl sulfoxide, *Fertil. Steril.*, 15, 222-229.
- Schreuders, P.D., Smith, E.D., Cole, K.W., Valencia, M.-P., Laughinghouse, A., and Scheiwe, M.W. and Körber, C. (1983) Basic investigations on the freezing of human lymphocytes, *Cryobiology*, 20, 257-273.
- Sherman, J.K. (1963) Improved methods of preservation of human spermatozoa by freezing and freeze-drying, *Fertil. Steril.*, 14, 49-64.
- Sherman, J.K. and Bunge, R.G. (1953) Observations on preservation of human spermatozoa of low temperatures, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 82, 686.
- Shettles, L.B. (1940) The respiration of human spermatozoa and their response to various gases and low temperatures, *Am. J. Physiol.*, 128, 408-415.
- Smith, A. U. (1950) Prevention of hemolysis during freezing and thawing of red blood cells, *Lancet*, 2, 910-911.
- Smith, A.U. (1961) *Biological effects of Freezing and Supercooling*, Williams & Wilkins, Baltimore, MD.
- Smith, A.U. and Polge, C. (1950a) Storage of bull spermatozoa at low temperatures, *Vet. Rec.*, 62, 115-116.

Smith, A.U., and Polge, C., (1950b) Survival of spermatozoa at low temperatures, *Nature*, 166, 668-669.

Songsasen, N., Ratterree, M.S., VandeVoort, C.A., Pegg, D.E., and Leibo, S.P. (2002) Permeability characteristics and osmotic sensitivity of rhesus monkey (*Macaca mullatta*) oocytes, *Hum. Reprod.*, 17, 1875-1884.

Songsasen, N., Tong, J., Leibo, S.P. (1998) Birth of live mice derived by in vitro fertilization with spermatozoa retrieved up to 24 hours after death, *J. Exp. Zool.*, 280, 189-196.

Sun, W.Q. (1999) State and phase transition behaviors of *Quercus rubra* seeds axes and cotyledonary tissues; relevance to the desiccation sensitivity and cryopreservation of recalcitrant seeds, *Cryobiology*, 38, 372-385.

Tanford, C. (1980) *the Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes*, 2nd Ed.

Taylor, M.J., Bank, H.L., and Benton, M.J. (1987) Selective destruction of leucocytes by freezing as a potential means of modulating tissue immunogenicity: membrane integrity of lymphocytes and macrophages, *Cryobiology*, 24, 91-102.

Thibier, M., (2002) The IETS statistics of embryo transfers in livestock in the world for the year 1999: a new record for bovine in vivo-derived embryos transferred, *Embryo Trans. Newsletter*, 18, 24-28.

Tsonev, L.I. and Hirsh, A.G. (2000) Fluorescence ration intrinsic basis states analysis: A novel approach to monitor and analyse protein unfolding by fluorescence, *J. Biochem. Biophys. Methods*, 45, 1-21.

Tsunoda, Y., Parkening, T.A., and Chang M.C. (1976) In vitro fertilization of mouse and hamster eggs after freezing and thawing, *Experientia*, 32, 223-224.

Wakayama, T., and Yanagimachi, R. (1998) Development of normal mice from oocytes injected with freeze-dried spermatozoa, *Nat. Biotechnol.*, 16, 639-641.

Walton, A. (1930) The effect of temperature on the survival in vitro of rabbit spermatozoa obtained from the vas deferens, *J. Exp. Biol.*, 7, 201-219.

Watson, P.F. (1990) Artificial insemination and the preservation of semen, in *Marshall's Physiology of Reproduction*, 4th edition, Vol.2, Lamming, G.E., Ed., Churchill Livingstone, Edinburgh, Scotland, pp. 747-869.

Wellman, A.M., and Pendyala, L. (1979) Permeability changes in membranes of *Neurospora crassa* after freezing and thawing, *Cryobiology*, 16, 184-195.

Whittingham, D.G., Leibo, S.P., and Mazur, P. (1972) Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -269°C, *Science*, 178, 411-414.

Williams, R.J., Hope, H.J., and Willemot, C. (1975) Membrane collapse as a cause of osmotic injury and its reversibility in a hardy wheat, *Cryobiology*, 12, 554-55.

Willoughby, C.E., Mazur, P., Peter, A.T., and Critser, J.K. (1996) Osmotic tolerance limits and properties of murine spermatozoa, *Biol. Reprod.*, 55, 715-727.

Woelders, H., Matthijs, A., and engel, B. (1997) Effects of trehalose and sucrose, osmolarity of the freezing medium and colling rate on viability and intactness of bull sperm after freezing and thawing, *Cryobiology*, 39, 103-129.

Wolstenholme, G.E.W., and Cameron, M.P., Eds. (1954) *Preservation and Transplantation of Normal Tissues*. Ciba Foundation Symposium, Churchill, London.

Wood, T.H. and Rosenberg, A.M., (1957) Freezing in yeast cells, *Biochem. Biophys. Acta*, 25, 78-87.

Van Wagtenonk-de Leeuw, A.M., den Daas, J.H.G., Rall, W.F. (1997), Field trial to compare pregnancy rates of bovine embryo cryopreservation methods: vitrification and one step dilution versus slow freezing and three-step dilution, *Theriogenology*, 48, 1071-1084.

