

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΣΥΓΚΡΙΣΗ VITRIFICATION ΩΑΡΙΩΝ
ΜΕ ΑΛΛΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ ΚΑΤΑΨΥΞΗΣ

ΔΕΣΠΟΙΝΑ ΜΑΔΕΜΤΖΟΓΛΟΥ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΛΑΡΙΣΑ

Σεπτέμβριος 2011

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟΣ ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΙΩΑΝΝΗΣ Ε. ΜΕΣΣΗΝΗΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπων: Δρ. Γεώργιος- Σπυρίδων Ανυφαντής

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Καθ. Ιωάννης Ε. Μεσσήνης

Επικ. Καθ. Κωνσταντίνος Νταφόπουλος

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη	2
Abstract	3
1. Υποβοηθούμενη αναπαραγωγή.....	4
2. Vitrification.....	5
2.1. Ορισμός.....	5
2.2. Εφαρμογές.....	5
2.3. Εκτέλεση	6
2.4. Δημοσιευμένες μελέτες.....	8
2.5. Συμπέρασμα	14
3. Σύγκριση vitrification και αργής κατάψυξης.....	16
3.1. Θεωρητικό υπόβαθρο	16
3.2. Μελέτες σύγκρισης των δύο τεχνικών	17
3.3. Συμπέρασμα	30
4. Βιβλιογραφία.....	31

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στα πλαίσια της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, η κρυοσυντήρηση έχει εφαρμοστεί για την αποθήκευση βιολογικού υλικού αναπαραγωγικής λειτουργίας, με τα έμβρυα και τα σπερματοζώαρια να κατέχουν εξέχουσα θέση. Πρόσφατα, η κρυοσυντήρηση επεκτάθηκε και στα ωάρια για να καλύψει μια σειρά ηθικών, νομικών, πρακτικών, ιατρικών και οικονομικών αναγκών. Παρόλο που ως τεχνική η κρυοσυντήρηση ωαρίων παραμένει μια ερευνητική πρόκληση λόγω της σύνθετης δομής και της ευαισθησίας των θηλυκών γαμετών, οι τελευταίες εξελίξεις του κλάδου είναι ενθαρρυντικές. Οι δύο βασικές μέθοδοι που δεσπόζουν στο πεδίο είναι η αργή κατάψυξη (slow freezing), της οποίας η ανάπτυξη προηγείται χρονικά, και η υαλοποίηση (vitrification), η οποία αποτελεί μια πιο σύγχρονη προσέγγιση δημιουργώντας μια ελκυστική εναλλακτική στα καθιερωμένα πρωτόκολλα της αργής κατάψυξης.

Όσον αφορά την υαλοποίηση, θα πρέπει να σημειωθεί ότι κάνοντας χρήση εξαιρετικά υψηλών ρυθμών κατάψυξης επιτυγχάνει μια υαλόμορφη στερεοποίηση. Με αυτό τον τρόπο, αποφεύγεται σχεδόν ολοκληρωτικά ο σχηματισμός κρυστάλλων πάγου, οι οποίοι δύνανται να αποβούν επιζήμιοι για το ωάριο. Συνεπώς, η υαλοποίηση προσπερνά αρκετές από τις δυσμενείς ενέργειες της αργής κατάψυξης. Ωστόσο, όπως είναι αναμενόμενο εισάγει νέα προβλήματα, αν και οι τροποποιήσεις των βασικών πρωτοκόλλων «εξουδετερώνουν» αυτές τις αρνητικές επιδράσεις. Εκτός από τον -επιβλαβή για το ωάριο- σχηματισμό πάγου, περαιτέρω μειονεκτήματα της αργής κατάψυξης αποτελούν τόσο η ανάγκη για σύνθετο και υψηλού κόστους εξοπλισμό όσο και το γεγονός ότι πρόκειται για μια χρονοβόρα διαδικασία. Συγκριτικές μελέτες της μεθόδου αυτής με την υαλοποίηση έδειξαν υπεροχή της δεύτερης όσον αφορά την επιβίωση των ωαρίων μετά την απόψυξη, το ποσοστό γονιμοποίησης, το αναπτυξιακό δυναμικό των παραγόμενων εμβρύων και το ποσοστό κλινικών κυήσεων. Σποραδικές αναφορές αντίθετων αποτελεσμάτων πιθανόν να οφείλονται στην χρήση κατώτερων πρωτοκόλλων υαλοποίησης.

Συνοψίζοντας, η υαλοποίηση φαίνεται να είναι πιο αποδοτική και πρακτική μέθοδος για την κρυοσυντήρηση ωαρίων. Ωστόσο, δεδομένου του μικρού αριθμού συγκριτικών μελετών των δύο μεθόδων, η εξαγωγή πάγιων συμπερασμάτων είναι δύσκολη. Η ανωτερότητα της μίας από τις δύο μεθόδους αναμένεται να διασαφηνιστεί έπειτα από την διεξαγωγή επιπρόσθετων μελετών, αν και η υαλοποίηση φαίνεται να είναι μια ιδιαίτερα ελπιδοφόρα μέθοδος.

ABSTRACT

In the context of human assisted reproduction, cryopreservation has been used for decades to store different materials of reproductive function, mainly embryos at various developmental stages and spermatozoa. In recent times, the realm of cryopreservation has been expanded to also include unfertilized oocytes, since a series of ethical, legal, practical, medicinal and economical reasons make this an imperative need. Although oocyte cryopreservation remains challenging due to the complex structure and sensitivity of the female gamete, it is encouraging to witness a considerable improvement of the methods applied in recent years. The basic techniques that rule the field of oocyte cryopreservation are slow freezing, which is the mainstream conventional method, and vitrification which is a more novel approach that consists an attractive alternative to the standard slow freezing protocols.

As far as vitrification is concerned, it should be noted that by using extremely high cooling rates it achieves a glass-like solidification. Consequently, it almost completely avoids ice crystal formation, which could prove detrimental to the oocyte. Thus, vitrification has circumvented many of the inconveniences of slow-freezing. However, as expected, it has introduced its own set of problems, but modifications to the standard protocols counteract such unfavorable effects. Apart from the ice crystal formation, further disadvantages of the slow freezing method include the need for sophisticated and expensive equipment and the fact that it is a time consuming procedure. Comparative studies of the two methods have generally shown supremacy of vitrification in terms of post-warm oocyte survival, fertilization rate, developmental competence of the produced embryos and clinical pregnancy rate. Sporadic reports of the opposite results could be attributed to the comparison of inferior vitrification protocols with the state-of-the art slow freezing procedures.

As an overall judgement, it could be claimed that vitrification seems to be a more efficient and practicable method for oocyte cryopreservation. However, solid conclusions are not easy to be drawn since sufficient consistency and reproducibility of results are still to be achieved. The performance of more studies is expected to elucidate soon the unequivocal superiority of one technique and lead to a general consensus among researchers. Hopefully, in the near future the particularly promising oocyte vitrification will be recognized as an established technique and oocyte cryopreservation will routinely be applied in infertility programmes.

1. ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ

Τα προβλήματα υπογονιμότητας κάνουν την υποβοηθούμενη αναπαραγωγή να κερδίζει ολοένα περισσότερο έδαφος στις σύγχρονες κοινωνίες. Η πλέον διαδεδομένη εκ των μεθόδων της είναι η εξωσωματική γονιμοποίηση κατά την οποία συλλέγονται ωάρια και σπερματοζωάρια και πραγματοποιείται η γονιμοποίηση εκτός του γυναικείου σώματος είτε με επώαση των θηλυκών και αρσενικών γαμετών (κλασική IVF) είτε με ενδοκυτταροπλασματική έγχυση του σπερματοζωαρίου στο ωάριο (ICSI). Τα δημιουργούμενα έμβρυα αναπτύσσονται στο εργαστήριο και μεταφέρονται στην μήτρα μεταξύ της δεύτερης έως πέμπτης ημέρας μετά την γονιμοποίηση. Η επιτυχία της μεθόδου έγκειται στην εμφύτευση των εμβρύων, στην επίτευξη κύησης και στην γέννηση ζώντων νεογνών. Δεδομένου ότι δεν επιβιώνουν, ή δεν αναπτύσσονται, εκτός του σώματος όλα τα ωάρια που έχουν συλλεχθεί ή τα έμβρυα που έχουν δημιουργηθεί συνήθως πραγματοποιείται διέγερση των ωοθηκών ώστε να είναι διαθέσιμα αρκετά ωάρια ανά κύκλο για τους περαιτέρω χειρισμούς.

Καθώς η νομοθεσία διαφόρων χωρών επιτρέπει την γονιμοποίηση περιορισμένου αριθμού ωαρίων ή την ενδομητρική μεταφορά αυστηρά καθορισμένου και μικρού αριθμού εμβρύων, ανακύπτει το πρόβλημα της διαχείρισης των πλεοναζόντων ωαρίων ή εμβρύων. Η πιο ευρέως ακολουθούμενη πορεία είναι η κρυοσυντήρηση. Ενώ η κρυοσυντήρηση των εμβρύων είναι μια καλά εγκαθιδρυμένη τεχνική, αυτή των ωαρίων δεν έχει φτάσει στο ίδιο επίπεδο, ενώ συχνά υποστηρίζεται ότι βρίσκεται σε πειραματικό στάδιο. Οι λόγοι της μειωμένης επιτυχίας και αποδοχής της κρυοσυντήρησης ωαρίων έγκεινται στα χαμηλά ποσοστά επιβίωσης μετά την απόψυξη, στα χαμηλά ποσοστά γονιμοποίησης έπειτα από κλασική IVF, στα υψηλά ποσοστά πολυπλοειδιών και στο πτωχό αναπτυξιακό δυναμικό των εμβρύων^[1]. Παρ' όλ' αυτά, τα τελευταία χρόνια έχει σημειωθεί πρόοδος στον τομέα αυτό και έχουν βελτιωθεί πολλές παράμετροι εξασφαλίζοντας καλύτερα αποτελέσματα. Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιείται μια παρουσίαση και -τελικά- αξιολόγηση της βιβλιογραφίας των τελευταίων επτά ετών αναφορικά με την κρυοσυντήρηση των ωαρίων. Πιο συγκεκριμένα, αναλύεται η πλέον σύγχρονη μέθοδος, αυτή της υαλοποίησης ή vitrification, και ακολούθως συγκρίνεται με άλλες μεθόδους κατάψυξης των ωαρίων.

2. VITRIFICATION

2.1. Ορισμός

Το vitrification είναι μια διαδικασία που προκαλεί υαλόμορφη στερεοποίηση ζωντανών κυττάρων σε χαμηλές θερμοκρασίες. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω εξαιρετικής αύξησης του ιξώδους, γεγονός που παρακάμπτει τον σχηματισμό κρυστάλλων πάγου είτε κατά την ψύξη είτε κατά την απόψυξη ^[2,3]. Κάτι τέτοιο είναι δυνατό χάρη στους υψηλότερους ρυθμούς ψύξης, της τάξεως των 15000-30000° C/λεπτό ^[4].

2.2. Εφαρμογές

Η δυνατότητα επιτυχούς κρυσυντήρησης ωαρίων επιφέρει πλήθος νομικών, ηθικών, πρακτικών, ερευνητικών και οικονομικών πλεονεκτημάτων. Ευρέως αναγνωρισμένη είναι η αξιοποίησή της ως εναλλακτική στην κρυσυντήρηση πλεοναζόντων εμβρύων που αποφεύγεται για νομικούς ή θρησκευτικούς λόγους ^[1]. Δεν είναι τυχαίο ότι μεγάλη πρόοδος στον τομέα της κρυσυντήρησης ωαρίων έχει προέλθει από κέντρα της Ιταλίας, στην οποία απαγορεύεται η κρυσυντήρηση εμβρύων, ενώ επιτρέπεται η κρυσυντήρηση ωαρίων. Εξίσου σημαντική είναι η κρυσυντήρηση ωαρίων ατόμων που πρόκειται να λάβουν γοναδοτοξικές θεραπείες ^[1,5-7]. Περισσότερο αμφισβητήσιμη είναι η αναβολή της γονιμότητας για προσωπικούς ή επαγγελματικούς λόγους ^[1,8].

Αναμφίβολα, η κρυσυντήρηση αυξάνει την ευελιξία των προγραμμάτων αντιμετώπισης της υπογονιμότητας. Κυρίως αυτό ισχύει για περιπτώσεις ακύρωσης του αρχικού κύκλου λόγω απροσδόκητων παραγόντων (π.χ. σύνδρομο υπερδιέγερσης ωοθηκών, αδυναμία λήψης σπέρματος) ^[5]. Επιπλέον, η χρήση πλεοναζόντων ωαρίων σε επόμενο κύκλο μειώνει τις πολύδυμες κήσεις. Ακόμα, η κρυσυντήρηση ωαρίων διευκολύνει τα προγράμματα δωρεάς ωαρίων ^[5,8]. Τέλος, όχι μόνο μειώνει το κόστος της θεραπείας της υπογονιμότητας ^[8] αλλά παρέχει μια δυνατότητα ανάπτυξης οικογένειας σε άτομα που επί του παρόντος δεν έχουν τα οικονομικά μέσα να αντιμετωπίσουν την υπογονιμότητά τους.

Άμεση απόρροια των παραπάνω είναι ότι η κρυσυντήρηση ωαρίων αποτελεί ένα διεθνή επιστημονικό σκοπό, με τις προσπάθειες να εστιάζονται στην ανάπτυξη του πιο κατάλληλου πρωτοκόλλου για την επιτυχή και αποτελεσματική κρυσυντήρηση των γυναικείων γαμετικών κυττάρων.

2.3. Εκτέλεση

Αναπόσπαστο κομμάτι της υαλοποίησης είναι η χρήση κρυοπροστατευτικών ουσιών. Αυτές βοηθούν στην επίτευξη των τριών βασικών αρχών της επιτυχούς κρυοσυντήρησης (Πίνακας 1) αλλά δύνανται να αποβούν τοξικές σε μεγάλες ποσότητες.

Πίνακας 1. Αρχές της επιτυχούς κρυοσυντήρησης ^[5].

Αρχή	Επεξήγηση
Αποφυγή του solution effect	Το solution effect οφείλεται στο γεγονός ότι με την πτώση της θερμοκρασίας, την στερεοποίηση και την μείωση των υγρών, οι συγκεντρώσεις των διαλυμένων ουσιών αυξάνονται και μπορεί να αποβούν τοξικές για τις ενδοκυττάρια πρωτεΐνες
Αποφυγή ωσμωτικού σοκ	Το ωσμωτικό σοκ παρατηρείται κατά την απόψυξη όταν ο στερεός πάγος λιώνει, ελευθερώνει νερό, μειώνεται η ωσμωτικότητα του εξωκυττάρου διαλύματος, το νερό εισέρχεται στο κύτταρο και προκαλεί διαστολή και κυτταρικές βλάβες
Αποφυγή σχηματισμού πάγου	Με την πτώση της θερμοκρασίας δημιουργούνται κρύσταλλοι πάγου. Αν και αυτό το φαινόμενο να μειώνεται εξαιρετικά με το vitrification, δεν εκμηδενίζεται

Πάγια αντίληψη αποτελεί το γεγονός ότι είναι πολύ αποτελεσματική μια σταδιακή διαδικασία εξισορρόπησης, κατά την οποία αυξάνεται βαθμιαία η ποσότητα των διαπερατών κρυοπροστατευτικών, δηλαδή αυτών που εισέρχονται στο κύτταρο. Εξίσου σημαντική είναι η πρόληψη της υπερβολικής διαστολής των κυττάρων ή της παρατεταμένης αφυδάτωσής τους ^[2]. Λαμβάνοντας τα παραπάνω υπόψη έχει διαμορφωθεί ένα γενικό μοντέλο για το vitrification, το οποίο υφίσταται τροποποιήσεις με την πάροδο του χρόνου για την αύξηση της αποτελεσματικότητας.

Κατά την ψύξη συνήθως ακολουθείται μια στρατηγική δύο βημάτων. Ένα αρχικό διάλυμα χρησιμοποιείται για την «εξισορρόπηση» (equilibration solution) και περιέχει 20-50% των συγκεντρώσεων του διαλύματος υαλοποίησης (vitrification solution). Όταν τα ωάρια τοποθετούνται στο διάλυμα εξισορρόπησης, αρχικά συρρικνώνονται αλλά σταδιακά επαναδιαστέλλονται έως τον αρχικό όγκο, γεγονός που σηματοδοτεί την είσοδο των διαπερατών κρυοπροστατευτικών στο ωάριο. Το βήμα αυτό μειώνει τον χρόνο που απαιτείται για την επώαση στο διάλυμα υαλοποίησης, το οποίο είναι πιο τοξικό λόγω των υψηλότερων συγκεντρώσεων κρυοπροστατευτικών ουσιών ^[9]. Η έκθεση στα δύο διαλύματα μπορεί να γίνει είτε σε

θερμοκρασία δωματίου είτε στους 35-37°C. Λαμβάνοντας υπόψη ότι με την άνοδο της θερμοκρασίας διευκολύνεται η είσοδος των διαπερατών κρυοπροστατευτικών αλλά αυξάνεται η τοξικότητα, οι επώσεις στους 35-37°C πραγματοποιούνται για μικρότερα χρονικά διαστήματα ^[9]. Κατά την απόψυξη, επωάζονται τα ωάρια σε διαλύματα μειούμενης συγκέντρωσης μη διαπερατού κρυοπροστατευτικού, συνήθως σουκρόζης, το οποίο δρα προλαμβάνοντας την υπερβολική διαστολή κατά την απομάκρυνση των διαπερατών κρυοπροστατευτικών ^[9].

Με βάση το είδος του «φορέα» των ωαρίων διακρίνονται τα ανοιχτά και τα κλειστά συστήματα που επιτρέπουν ή όχι την επαφή με το υγρό άζωτο, στο οποίο γίνεται η αποθήκευση των κρυοσυντηρούμενων υλικών. Στην πρώτη κατηγορία συγκαταλέγονται το πλέγμα ηλεκτρονικού μικροσκοπίου (electron microscope grid, EMG), τα open pulled straws (OPS), το cryoloop, το cryoleaf και το cryotop, ενώ εκπρόσωποι των κλειστών συστημάτων είναι το cryotip και το cryolock ^[9]. Κάποια από τα παραπάνω είναι συστήματα ελάχιστου όγκου, τα οποία επιτρέπουν την αύξηση των ρυθμών ψύξης και απόψυξης ^[10] και, συνεπώς, την μείωση των συγκεντρώσεων των κρυοπροστατευτικών.

Στις περισσότερες περιπτώσεις γίνεται κρυοσυντήρηση ώριμων ωαρίων (MII oocytes), δηλαδή εκείνων που έχουν ολοκληρώσει την πρώτη μειωτική διαίρεση και βρίσκονται στην δεύτερη μετάφαση. Σε αυτό το στάδιο έχει εμφανιστεί η μιτωτική άτρακτος, μια δομή με κρίσιμο ρόλο για τα γεγονότα που έπονται της γονιμοποίησης ^[9]. Καθώς η δομή αυτή είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη στις χαμηλές θερμοκρασίες έχει προταθεί η κρυοσυντήρηση ανώριμων ωαρίων (GV oocytes), που δεν διαθέτουν μιτωτική άτρακτο. Βέβαια, προηγείται *in vitro* ωρίμανση των ωαρίων αυτών, η οποία παραμένει αναξιόπιστη ^[11]. Επιπλέον, κάποιες μελέτες της δεκαετίας του '90 έδειξαν μια αυξημένη ευαισθησία των ανώριμων ωαρίων στην κρυοσυντήρηση σε σχέση με τα ώριμα πιθανόν λόγω παραγόντων που σχετίζονται με την μεμβράνη, τον κυτταρικό σκελετό ή την επικοινωνία με τα κοκκώδη κύτταρα κατά την ωρίμανση ^[1].

Ένα τελευταίο πρόβλημα που σχετίζεται με την κρυοσυντήρηση, άρα και με το vitrification, είναι η σκλήρυνση της διάφανης ζώνης (zona pellucida hardening) λόγω της πρόωρης εξωκύτωσης του περιεχομένου των κυτταροπλασματικά κοκκία ^[12]. Ως αποτέλεσμα, παρεμποδίζεται η διείσδυση των σπερματοζωαρίων και η απελευθέρωση του εμβρύου για την εμφύτευση. Βέβαια, το ICSI και η υποβοηθούμενη εκκόλαψη έχουν βοηθήσει στην παράκαμψη των εμποδίων αυτών ^[1].

2.4. Δημοσιευμένες μελέτες

Ένας σημαντικός αριθμός κέντρων έχει ασχοληθεί με την εφαρμογή του vitrification, την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητάς του και την προσπάθεια βελτίωσης της μεθόδου. Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα, η επεξήγηση και τα συμπεράσματα κάποιων αντιπροσωπευτικών μελετών των τελευταίων επτά ετών με χρονολογική σειρά. Οι μελέτες αυτές αποτελούν ένα υποσύνολο της βιβλιογραφίας και η επιλογή έγινε με βασικά κριτήρια την δημοσίευση σε έγκυρα περιοδικά, την υαλοποίηση ενός σεβαστού αριθμού ωαρίων και το vitrification ωαρίων ανθρώπου -κατά προτεραιότητα- ή άλλων θηλαστικών.

Μια εργασία σταθμός είναι αυτή των Kuwayama et al.^[13], που εισάγει το cryotop στην εργαλειοθήκη του vitrification ανθρώπινων ωαρίων. Έπειτα από κατάψυξη ώριμων ανθρώπινων ωαρίων με cryotop σημειώθηκαν ποσοστά επιτυχίας που σίγουρα είναι εντός των αποδεκτών ορίων. Η επιβίωση άγγιξε το 95%, ενώ πάνω από 90% ήταν και το ποσοστό γονιμοποίησης (Πίνακας 2). Ακόμα, επιτεύχθηκε κύηση στο 41% των περιπτώσεων με σχετικά μικρό αριθμό μεταφερόμενων εμβρύων (μ.ο. 2,2 ανά ασθενή). Επιπλέον, επιλεκτική ανάλυση βλαστοκύστεων με φθορίζων in situ υβριδισμό (FISH) έδειξε φυσιολογικά διπλοειδή έμβρυα. Εκτιμώντας συνολικά τα αποτελέσματά τους οι συγγραφείς συμπεραίνουν ότι η μέθοδος αυτή είναι η πιο αποτελεσματική για την κρυοσυντήρηση ανθρώπινων ωαρίων. Πολλοί ερευνητές αργότερα αναφέρονται σε αυτή την εργασία ή εφαρμόζουν το συγκεκριμένο πρωτόκολλο ενώ παράλληλα πρωτοπόροι του κλάδου έχουν συνεργαστεί με τον Kuwayama για την εισαγωγή του πρωτοκόλλου του στο κέντρο τους (π.χ. Cobo et al.^[4]). Το μόνο «ελάττωμα» που θα μπορούσε να καταλογιστεί στη μεθοδολογία του cryotop είναι ότι ανήκει στα ανοιχτά συστήματα, κάτι που δημιουργεί φόβο για πιθανή μετάδοση παθογόνων παραγόντων μέσω του υγρού αζώτου. Βέβαια, ο κίνδυνος αυτός είναι μάλλον υπερεκτιμημένος, μιας και παρά τους τεράστιους αριθμούς δειγμάτων αποθηκευμένων στο υγρό άζωτο, δεν έχει αναφερθεί μετάδοση ασθένειας με αυτό τον μηχανισμό^[10]. Πιθανόν αυτό να οφείλεται στο γεγονός ότι οι περισσότεροι παθογόνοι παράγοντες δεν μπορούν να διαπεράσουν την διάφανη ζώνη και να μολύνουν τα εμβρυϊκά κύτταρα, με αποτέλεσμα να απομακρύνονται από την διάφανη ζώνη με τα ξεπλύματα που έπονται της απόψυξης^[4].

Οι Chian et al.^[14] υαλοποίησαν με cryoleaf 180 ωάρια που συνέλεξαν από γυναίκες που είχαν προετοιμαστεί για ενδομήτρια σπερματέγχυση και υποβλήθηκαν

σε ακύρωση του κύκλου λόγω κινδύνου πολύδυμων κήσεων. Τα ανώριμα ωάρια υποβλήθηκαν σε *in vitro* ωρίμανση πριν το vitrification. Η επιβίωση μετά την απόψυξη ήταν ιδιαίτερα υψηλή (93,9%), κάτι που ισχύει και για το ποσοστό κ (Πίνακας 2), αν και δεν πρέπει να παραβλέπεται το γεγονός ότι μεταφέρθηκαν μ.ο. 3,6 έμβρυα ανά ασθενή, ενώ σε μετέπειτα μελέτες μεταφέρονται αισθητά λιγότερα έμβρυα, κάτι που μπορεί να επηρεάζει αρνητικά το ποσοστό κύησης. Παρ' όλ' αυτά, δεν θα πρέπει να υποεκτιμώνται τα αποτελέσματα των Chian et al. ^[14], οι οποίοι συμπεραίνουν ότι η μέθοδος του vitrification φαίνεται να μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την κρυοσυντήρηση ανθρώπινων ωαρίων με μεγάλη αποτελεσματικότητα.

Σε μία μελέτη υαλοποίησης ωριμασμένων ωαρίων βουβαλιού με cryoloop ^[15] αν και παρατηρήθηκε υψηλό ποσοστό επιβίωσης, δεν συνέβη το ίδιο για την διαίρεση και την ανάπτυξη βλαστοκύστης (Πίνακας 2). Όταν τα ωάρια καταψύχθηκαν εγκλεισμένα σε στρώμα κοκκωδών κυττάρων, το ποσοστό διαίρεσης ήταν στατιστικά σημαντικά μικρότερο σε σχέση με τον αντίστοιχο μάρτυρα. Όταν καταψύχθηκαν 155 απογυμνωμένα ωάρια, δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά αλλά και πάλι το ποσοστό διαίρεσης ήταν μειωμένο. Η ανάπτυξη βλαστοκύστης παρουσίαζε στατιστικά σημαντική διαφορά σε όλες τις κρυοσυντηρημένες ομάδες σε σύγκριση με τον μάρτυρα. Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι το vitrification επηρεάζει την αναπτυξιακή ικανότητα των συγκεκριμένων ωαρίων, κάτι που δεν συνάδει με τα αποτελέσματα σε άλλα είδη. Αυτό, βέβαια, δεν προκαλεί έκπληξη καθώς τα ωάρια βουβαλιού έχουν υψηλό λιπιδικό περιεχόμενο, γεγονός που έχει συσχετιστεί με μεγαλύτερη ευαισθησία σε βλάβες σε θερμοκρασίες υπό του μηδενός (chilling injury). Όσον αφορά την στιβάδα των κοκκωδών κυττάρων προτείνεται η υαλοποίηση απογυμνωμένων ωαρίων και η γονιμοποίηση σε μονοστιβάδα κοκκωδών κυττάρων.

Στο πρόγραμμα δωρεάς ωαρίων του Ινστιτούτου Υπογονιμότητας της Βαλένθια, η κρυοσυντήρηση πραγματοποιήθηκε με vitrification με cryotop ^[4]. Το 96,9% των 231 αποψυγμένων ωαρίων επιβίωσε και μεγάλο ποσοστό εξ' αυτών γονιμοποιήθηκε φυσιολογικά (Πίνακας 2). Το ποσοστό διαίρεσης την δεύτερη ημέρα, ο αριθμός κυττάρων και η ποιότητα εμβρύων κατά την τρίτη ημέρα ήταν παρόμοια μεταξύ υαλοποιημένων και φρέσκων ωαρίων ενώ η ανάπτυξη βλαστοκύστης δεν είχε σημαντική διαφορά. Η εμβρυϊκή ανάπτυξη και τα κλινικά αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης κάνουν τους συγγραφείς να προτείνουν την μέθοδο του cryotop στην εγκατάσταση τραπεζών ωαρίων. Η άμεση επαφή με το υγρό άζωτο και

η χρήση συστήματος ελαχίστου όγκου αυξάνουν ραγδαία τον ρυθμό ψύξης και ελαχιστοποιούν το chilling injury. Επιπλέον, με την μείωση των διαπερατών κρυοπροστατευτικών στο 30%, περιορίζονται οι πιθανές τοξικές δράσεις τους. Απόρροια των δύο παραπάνω παραγόντων είναι τα υψηλά ποσοστά επιτυχίας, τα οποία συμφωνούν με άλλες μελέτες που έχουν εφαρμόσει την συγκεκριμένη μεθοδολογία. Οι παράμετροι των εμβρύων της τρίτης και πέμπτης ημέρας στα κρυσυντηρημένα και όχι ωάρια δεν παρουσιάζουν διαφορά. Το μόνο σημείο στο οποίο φαίνεται να είναι επιφυλακτικοί οι συγγραφείς είναι το γεγονός ότι στην συγκεκριμένη μελέτη υαλοποιήθηκαν ωάρια από δότριες, δηλαδή από έναν πληθυσμό νεαρών και γόνιμων γυναικών. Ως αποτέλεσμα, προτείνεται η εκπόνηση παραπάνω μελετών που να περιλαμβάνουν άλλες κλινικές ενδείξεις με στόχο την περαιτέρω εξερεύνηση του δυναμικού της υαλοποίησης με cryotop. Ωστόσο, δεν παραβλέπεται το γεγονός ότι με το cryotop έχουν επιτυγχάνονται πάντα υψηλά ποσοστά, τα οποία μάλιστα είναι υψηλότερα από άλλες μεθόδους κρυσυντήρησης ωαρίων.

Ιδιαίτερα καλά ήταν και τα αποτελέσματα των Wang et al. ^[16] όταν πραγματοποίησαν υαλοποίηση ωαρίων ποντικού με cryoloop. Δεν σημειώθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στα ποσοστά επιβίωσης, γονιμοποίησης και ανάπτυξης βλαστοκύστης μεταξύ της ομάδας με υαλοποίηση και του μάρτυρα. Επιπλέον, οι τυχόν διαφορές στον αριθμό ωαρίων με φυσιολογική μιτωτική άτρακτο ή με βλάβες στο DNA δεν παρουσίασαν στατιστική σημαντικότητα. Οι μόνες περιπτώσεις στις οποίες οι παραπάνω παράγοντες ήταν σημαντικά επηρεασμένοι ήταν όταν υπήρχε παραπάνω όγκος θρεπτικού στο cryoloop και όταν τα ωάρια εκτέθηκαν για μεγάλο χρονικό διάστημα στο διάλυμα υαλοποίησης. Συμπεραίνεται, λοιπόν, ότι η υαλοποίηση με cryoloop είναι αποτελεσματική και ασφαλής μέθοδος με την προϋπόθεση ότι πραγματοποιείται σωστά. Υπάρχει συμφωνία με προηγούμενες μελέτες ως προς το ποσοστό επιβίωσης αλλά διαφωνία ως προς την βλάβη στο DNA, κάτι που αποδίδεται είτε στην υαλοποίηση ωαρίων διαφορετικού είδους είτε στην μη χρήση τεχνικής ελαχίστου όγκου. Σχετικά με την γονιμοποίηση δεν παρατηρήθηκαν μειωμένα ποσοστά, παρόλο που δεν ακολουθήθηκαν διαδικασίες που προσπερνούν την σκλήρυνση της διάφανης ζώνης, όπως το τρύπημα, η προσθήκη FBS (fetal bovine serum) ή η γονιμοποίηση με ICSI. Φαίνεται, λοιπόν, ότι με το κατάλληλο πρωτόκολλο υαλοποίησης είναι δυνατόν να παρακαμφθεί το πρόβλημα της σκλήρυνσης της διάφανης ζώνης.

Η υαλοποίηση 124 ανθρώπινων ωαρίων με cryotop από τους Rienzi et al. ^[17] έδωσε πολύ καλά αποτελέσματα γονιμοποίησης, ανάπτυξης και ποιότητας εμβρύων, τα οποία μάλιστα δεν διέφεραν στατιστικά σημαντικά από τα αντίστοιχα δεδομένα για τους κύκλους με φρέσκα ωάρια των ίδιων ασθενών. Με μεταφορά μ.ο. 2,3 εμβρύων ανά ασθενή επιτεύχθηκε κλινική κύηση στο 37,5% των κύκλων. Οι συγγραφείς αναφέρουν μεγάλη συσχέτιση των αποτελεσμάτων με την συγκεκριμένη μέθοδο υαλοποίησης, καθώς άλλες προσεγγίσεις που δοκιμάστηκαν ήταν λιγότερο αποτελεσματικές. Επισημαίνεται ότι η γενική ιδέα της μελέτης ήταν η ελαχιστοποίηση στρεσογόνων παραγόντων όπως η μακροχρόνια έκθεση σε θερμοκρασιακό υλικό υπό αμφίβολο θερμοκρασιακό καθεστώς, η παρατεταμένη καλλιέργεια ωαρίων *in vitro* χωρίς την προστασία των κοκκωδών κυττάρων και η γήρανση των ωαρίων. Κατ' αυτό τον τρόπο, η μόνη διαφορά μεταξύ των φρέσκων και των κρυοσυντηρημένων ωαρίων εναπόκειται στην υποβολή των τελευταίων σε υαλοποίηση. Αξιολογώντας, λοιπόν, τα αποκτηθέντα αποτελέσματα οι ερευνητές συμπεραίνουν ότι ο ίδιος αριθμός ωαρίων απαιτείται σε κύκλους με φρέσκα και σε κύκλους με υαλοποιημένα ωάρια για την εξασφάλιση της ίδιας επιτυχίας. Αυτό θα ήταν ιδιαίτερα χρήσιμο σε προγράμματα δωρεάς όπου ο διαθέσιμος αριθμός ωαρίων ανά λήπτρια είναι περιορισμένος.

Ακολουθώντας την ίδια μέθοδο υαλοποίησης οι Ubaldi et al. ^[18] κατέψυξαν και απέψυξαν 487 ανθρώπινα ωάρια. Τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με μια ομάδα 511 ωαρίων που δεν υαλοποιήθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρας. Η επιβίωση μετά την απόψυξη σχεδόν άγγιξε το 90%. Η γονιμοποίηση και τα άριστης ποιότητας έμβρυα δεύτερης ημέρας δεν παρουσίασαν σημαντικές διαφορές σε σύγκριση με τον μάρτυρα. Η διαφορά στην κύηση που βρίσκεται σε εξέλιξη άγγιξε οριακά την στατιστική σημαντικότητα ($p=0,05$), με την ομάδα της κρυοσυντήρησης να έχει μικρότερο ποσοστό. Βέβαια, πιθανόν η σύγκριση με τον μάρτυρα να μην επιτρέπεται καθώς στην ομάδα του μάρτυρα συμμετείχαν όλοι οι ασθενείς ενώ στο κρυοσυντηρημένο μόνο όσοι δεν είχαν επιτύχει κύηση με τον φρέσκο κύκλο. Επιπλέον, ενώ στον φρέσκο κύκλο πραγματοποιήθηκε ωθητική διέγερση, η μεταφορά εμβρύων που προήλθαν από αποψυγμένα ωάρια πραγματοποιήθηκε σε φυσικό κύκλο. Μια άλλη παρατήρηση της μελέτης των Ubaldi et al. ^[18] ήταν η επιβεβαίωση του γενικά αναγνωρισμένου φαινομένου της πτωτικής τάσης της εγκαθίδρυσης κύησης με την αύξηση της ηλικίας. Αντίθετα, η στατιστική ανάλυση έδειξε ότι οι παράγοντες υπογονιμότητας, τα βασικά επίπεδα ωοθυλακιοτρόπου

ορμόνης (FSH), το πρωτόκολλο διέγερσης, ο αριθμός ληφθέντων ωοθυλακίων και ώριμων ωαρίων, η ποιότητα του σπέρματος και η επώαση των ωαρίων δεν επηρέασαν το ποσοστό της κύησης που βρίσκεται σε εξέλιξη. Η έλλειψη συσχέτισης με την ποιότητα του σπέρματος πιθανόν οφείλεται στην αποκλειστική χρήση του ICSI για την γονιμοποίηση φρέσκων και κρυοσυντηρημένων ωαρίων. Η έλλειψη συσχέτισης με τον χρόνο επώασης των ωαρίων αντιτίθεται στα αποτελέσματα προηγούμενης μελέτης, κάτι που αποδίδεται είτε στο γεγονός ότι τώρα ακολουθήθηκε διαφορετική μέθοδος κρυοσυντήρησης είτε στην επώαση συμπλεγμάτων ωαρίων-κοκκωδών κυττάρων έως το vitrification. Ως γενικό συμπέρασμα από την μελέτη τους, ο Ubaldi και οι συνεργάτες του παρατηρούν ότι υψηλά αθροιστικά ποσοστά κύησης επιτυγχάνονται σε ένα στάνταρ πρόγραμμα υπογονιμότητας με την μεταφορά εμβρύων από φρέσκα και έπειτα από υαλοποιημένα ωάρια.

Καθώς στην πλειοψηφία των περιπτώσεων χρησιμοποιούνται για κατάψυξη τα πλεονάζοντα ωάρια που δεν αξιοποιήθηκαν στον φρέσκο κύκλο, πιθανόν αυτά να μην είναι τόσο καλής ποιότητας και να επηρεάζουν αρνητικά τα αποτελέσματα της κρυοσυντήρησης. Γι' αυτό τον λόγο, οι Kim et al.^[19] σχεδίασαν μια μελέτη στην οποία υαλοποιήθηκαν καλής ποιότητας ωάρια για μελλοντική χρήση. Τα 483 ωάρια προήλθαν από νεαρές ($31,7 \pm 3$ έτη) γυναίκες. Τα ωάρια «φορτώθηκαν» σε πλέγματα ηλεκτρονικού μικροσκοπίου (EMG) από χρυσό, ένα σύστημα με υψηλό συντελεστή θερμικής αγωγής και σταθερότητα κάτω από το υγρό άζωτο. Έπειτα από μεταφορά μ.ο. 2,7 εμβρύων ανά ασθενή επιτεύχθηκε κύηση στο 80% των κύκλων. Σημειώθηκε εντυπωσιακή βελτίωση στο ποσοστό κύησης και εμφύτευσης σε σχέση με μια άλλη μελέτη της ίδια ομάδας στην οποία υαλοποιήθηκαν πλεονάζοντα ωάρια, επιβεβαιώνοντας την αρχική υπόθεση των ερευνητών για μεγαλύτερη δυναμική της μεθόδου όταν υαλοποιούνται καλής ποιότητας γαμετικά κύτταρα. Συνολικά, η μελέτη δείχνει ότι ωάρια που υαλοποιούνται με EG και πλέγμα από χρυσό διαθέτουν εξαιρετικό αναπτυξιακό δυναμικό μετά την απόψυξη, οδηγώντας σε υψηλό ποσοστό κύησης χωρίς επιπλοκές και περιγεννητικά προβλήματα. Η διατήρηση υψηλής αναπτυξιακής ικανότητας επιτρέπει την μείωση του αριθμού των μεταφερόμενων βλαστοκύστεων προς αποφυγή των πολύδυμων κυήσεων.

Οι Almodin et al.^[20] υαλοποίησαν και απέψυξαν 252 ωάρια με ένα σύστημα που ονομάζεται Vitri-ingá και μοιάζει με το cryotop. Επιτρέπει πολύ υψηλούς ρυθμούς πτώσης και ανόδου της θερμοκρασίας, είναι σύστημα ελαχίστου όγκου και παρέχει την δυνατότητα αφαίρεσης του πλεονάζοντος όγκου θρεπτικού υλικού πριν

την υαλοποίηση. Η σύγκριση με την ομάδα των μη υαλοποιημένων ωαρίων έδειξε ότι δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην γονιμοποίηση, την αναλογία καλής ποιότητας εμβρύων, την εμφύτευση και την επίτευξη κύησης. Η μόνη σημαντική διαφορά εντοπίστηκε στον αριθμό βλαστομεριδίων την τρίτη ημέρα αλλά η περαιτέρω αναπτυξιακή πορεία έδειξε ότι αυτό δεν είχε κλινική σημασία. Παρόλο που έγινε προσπάθεια ελαχιστοποίησης των διαφορών μεταξύ των δύο ομάδων, οι ερευνητές δεν παραλείπουν να αναφέρουν ότι αυτό δεν είναι πάντα εφικτό. Έτσι, η ομάδα του μάρτυρα «ευνοήθηκε» από το γεγονός ότι τα ζευγάρια ήταν στην πρώτη προσπάθεια επίτευξης κύησης, χωρίς προηγούμενη αποτυχία. Από την άλλη μεριά, η ομάδα της υαλοποίησης ήταν «ευνοημένη» καθώς έγινε εμβρυομεταφορά σε φυσικό κύκλο, χωρίς ωθητική διέγερση, η οποία πιθανόν επιδρά αρνητικά στην εμφύτευση. Παρόλο που αυτές οι διαφορές κάνουν την σύγκριση των δύο ομάδων μη ιδανική, τα αποτελέσματα είναι σημαντικά καθώς αντικατοπτρίζουν τις πραγματικές κλινικές συνθήκες. Ένα άλλο ενδιαφέρον σημείο της έρευνας ήταν ότι παρά την μεταφορά ίδιου αριθμού εμβρύων στις δύο ομάδες, οι πολύδυμες κυήσεις ήταν αυξημένες στην ομάδα του μάρτυρα, κάτι που χρήζει περαιτέρω διερεύνησης. Συμπερασματικά, αποδεικνύεται ότι η υαλοποίηση με Vitri-ingά είναι μια αποτελεσματική μέθοδος και η μόνη κριτική εναντίον της θα ήταν ότι ως ανοιχτό σύστημα ενέχει τον κίνδυνο μετάδοσης παθογόνων παραγόντων μέσω του υγρού αζώτου.

Μια διαφορετική κατηγορία μελετών περιλαμβάνει αυτές που ελέγχουν την μοριακή σταθερότητα έπειτα από την κρυοσυντήρηση. Οι Di Pietro et al.^[21] ήλεγξαν για διαφορές μεταξύ υαλοποιημένων και φρέσκων ωαρίων όσον αφορά το μοριακό προφίλ επιλέγοντας μια ποικιλία γονιδίων που θεώρησαν αντιπροσωπευτικούς μοριακούς δείκτες της ποιότητας του ωαρίου. Πιο συγκεκριμένα, συμπεριέλαβαν στην ανάλυσή τους τόσο house-keeping γονίδια, όσο και γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες απαραίτητες για την ανάπτυξη του ωαρίου και ειδικές λειτουργίες του. Η υαλοποίηση των ώριμων απογυμνωμένων ωαρίων πραγματοποιήθηκε με 15% EG, 15% DMSO, 0,5M σουκρόζη και χρησιμοποιώντας κλειστό σύστημα υαλοποίησης. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων δεν έδειξε διαφορές μεταξύ κρυοσυντηρημένων και μη ωαρίων, αποδεικνύοντας για πρώτη φορά, όπως αναφέρεται από τους συγγραφείς, ότι το πρωτόκολλο υαλοποίησης διατηρεί αναλλοίωτο το μοριακό προφίλ και δεν προκαλεί αποικοδόμηση αγγελιοφόρου RNA (mRNA). Το συμπέρασμα αυτό σε συνδυασμό με δημοσιευμένα αποτελέσματα πάνω

στην επιβίωση, γονιμοποίηση και κύηση, επιβεβαιώνει ότι το vitrification είναι μια χρήσιμη μέθοδος για την διατήρηση της γυναικείας γονιμότητας ^[21].

2.5. Συμπέρασμα

Με βάση τα δεδομένα των παραπάνω μελετών θα μπορούσε να υποστηριχθεί ότι το vitrification είναι μια μέθοδος κρυοσυντήρησης ωαρίων με μεγάλη αποτελεσματικότητα όταν χρησιμοποιούνται τα κατάλληλα πρωτόκολλα και εφαρμόζονται με ακρίβεια και προσοχή οι διαδικασίες. Μπορεί τα ποσοστά γονιμοποίησης και εμβρυϊκής ανάπτυξης να μην φτάνουν το 100%, αλλά σε όσες περιπτώσεις έγινε σύγκριση με τα αντίστοιχα ποσοστά κάποιας ομάδας φρέσκων ωαρίων δεν σημειώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά των δύο ομάδων. Επομένως, το vitrification είναι μια πολλά υποσχόμενη τεχνική που παρά την απλή και ταχεία εκτέλεσή της εγγυάται αποδεκτά αποτελέσματα. Η χρήση του σε ένα πρόγραμμα υπογονιμότητας δεν αποτελεί παρακινδυνευμένη ενέργεια καθώς η εμπειρία των τελευταίων ετών δείχνει ότι μπορεί να εξασφαλίσει ικανοποιητικό ποσοστό επιτυχιών. Βέβαια, δεν θα πρέπει να παραβλέπεται το γεγονός ότι αποτελεί μια νέα μέθοδο και απαιτείται περαιτέρω επαλήθευση των έως τώρα αποτελεσμάτων με πιο μεγάλες, καλά σχεδιασμένες, με ομάδα μάρτυρα μελέτες που θα επικεντρώνονται σε διαφορετικές ομάδες του πληθυσμού, συμπεριλαμβάνοντας ποικίλους παράγοντες υπογονιμότητας ή ακόμα και γόνιμες περιπτώσεις (π.χ. δότριες ωαρίων ή ασθενείς με ογκολογικά ή αυτοάνοσα νοσήματα). Έτσι θα υπάρχει η δυνατότητα μιας πιο ολοκληρωμένης αξιολόγησης της μεθόδου και η επιλογή του πιο κατάλληλου πρωτοκόλλου για την κάθε περίπτωση. Συνοψίζοντας, η μέχρι τώρα εμπειρία δείχνει ότι μπορεί να πραγματοποιηθεί επιτυχώς κρυοσυντήρηση ωαρίων με vitrification αλλά αυτό δεν σημαίνει ότι δεν είναι αναγκαία περαιτέρω έρευνα σε αυτόν τον τομέα για την βελτιστοποίηση των υπάρχοντων πρωτοκόλλων ή την εξέλιξη νέων.

Πίνακας 2. Πρωτόκολλο vitrification και αποτελέσματα από μελέτες εφαρμογής της υαλοποίησης ως μεθόδου κατάψυξης.

ΘΔ: θερμοκρασία δωματίου, DMSO: διμεθυλοσουλφοξείδιο, EG: αιθυλενογλυκόλη, PROH: 1,2-προπανεδιόλη

Διαλύματα			Ποσοστό (%)						Βιβλιογραφία
εξισορρόπησης	υαλοποίησης	απόψυξης	επιβίωσης	γονιμοποίησης	διαίρεσης	ανάπτυξης βλαστοκύστης	εμφύτευσης	κύησης	
7,5% EG + 7,5% DMSO (15', ΘΔ)	15% EG + 15% DMSO + 0,5M σουκρόζη (60'', ΘΔ)	1. σουκρόζη 1M (1', 37° C) 2. σουκρόζη 0,5M (3', ΘΔ)	91,0	89,6	81,0	50,0	18,7	41,3 (12/29)	Kuwayama et al. [13]
7,5% EG + 7,5% PROH (5', ΘΔ)	15% EG + 15% PROH + 0,5M σουκρόζη (45-60'', ΘΔ)	1. σουκρόζη 1M (1', 37° C) 2. σουκρόζη 0,5M (3', 37° C) 3. σουκρόζη 0,25 M(3', 37° C)	93,9	74,6			20,4	46,7 (7/15)	Chian et al. [14]
7,5% EG + 7,5% DMSO (3', ΘΔ)	16,5% EG + 16,5% DMSO+ 0,5M σουκρόζη (25'', ΘΔ)	1. σουκρόζη 1,25M (1') 2. σουκρόζη 0,62M, 0,42M, 0,31M (30'' σε κάθε διάλυμα)	81,4		45,4	2,8			Gasparrini et al. [15]
7,5% EG + 7,5% DMSO (15', ΘΔ)	15% EG + 15% DMSO + 0,5M σουκρόζη (60'', ΘΔ)	1. σουκρόζη 1M (1', 37° C) 2. σουκρόζη 0,5M (3', ΘΔ)	96,9	76,3	94,2	48,7	40,8	65,2 (15/23)	Cobo et al. [4]
7,5% EG + 7,5% DMSO (2', ΘΔ)	15% EG + 15% DMSO + 5,8 mg/ml Ficoll 400 + 0,58M σουκρόζη (<60'', ΘΔ)	1. σουκρόζη 1M (1', ΘΔ) 2. σουκρόζη 0,5M (3', ΘΔ) 3. σουκρόζη 0,28M (2', ΘΔ) 4. σουκρόζη 0,17M (3', ΘΔ)	98,2	81,3		76,1			Wang et al. [16]
7,5% EG + 7,5% DMSO (12-15', ΘΔ)	15% EG + 15% DMSO + 0,5M σουκρόζη (60'', ΘΔ)	1. σουκρόζη 1M (1', 37° C) 2. σουκρόζη 0,5M (3', 37° C)	96,7	79,2	97,9		20,4	37,5 (15/40)	Rienzi et al. [17]
7,5% EG + 7,5% DMSO (12-15', ΘΔ)	15% EG + 15% DMSO + 0,5M σουκρόζη (60'', ΘΔ)	1. σουκρόζη 1M (1', 37° C) 2. σουκρόζη 0,5M (3', 37° C)	89,7	85,4			16,1	30,4 (35/115)	Ubaldi et al. [18]
1,5M EG (2,5', 37° C)	5,5M EG + 1M σουκρόζη (20'', 37° C)	1. σουκρόζη 1M (2,5', 37° C) 2. σουκρόζη 0,5M (2,5', 37° C) 3. σουκρόζη 0,25M (2,5', 37° C) 4. σουκρόζη 0,125M (2,5', 37° C)	81,0	72,3	89,8		45,3	80,0 (16/20)	Kim et al. [19]
7,5% EG + 7,5% DMSO (5-15', ΘΔ)	15% EG + 15% DMSO + 0,5M σουκρόζη (3 περάσματα, ΘΔ)	1. σουκρόζη 1M (1', 37° C) 2. σουκρόζη 0,5M (3', 37° C)	84,9	80,8			14,9	45,6 (21/46)	Almodin et al. [20]

3. ΣΥΓΚΡΙΣΗ VITRIFICATION ΚΑΙ ΑΡΓΗΣ ΚΑΤΑΨΥΞΗΣ

3.1. Θεωρητικό υπόβαθρο

Δύο βασικές τεχνικές δεσπόζουν στο πεδίο της κρυοσυντήρησης των ωαρίων: το vitrification και η αργή κατάψυξη ^[8,22-24]. Η πρώτη που αναπτύχθηκε ήταν η αργή κατάψυξη. Σε αυτήν τα ωάρια εκτίθενται σταδιακά σε σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις κρυοπροστατευτικών, φορτώνονται σε ταινίες, ψύχονται έως τους -7° C, διατηρούνται εκεί για εξισορρόπηση, επάγεται εξωτερικά η έναρξη της κρυσταλλοποίησης (seeding), ψύχονται αργά μέχρι τους -30 έως -65° C και τέλος τοποθετούνται στο υγρό άζωτο ^[24]. Ακολουθώντας αυτή τη διαδικασία με την κρυσταλλοποίηση του εξωκυττάριου διαλύματος και τον χαμηλό ρυθμό ψύξης, εξασφαλίζεται ότι το «πάγωμα» ξεκινάει εκτός του ωαρίου, οδηγώντας σε μια προς τα έξω κίνηση του ωσμωτικά ενεργού νερού και σταδιακή αφυδάτωση του ωαρίου μέχρι την θερμοκρασία στην οποία το ενδοκυττάριο υλικό υαλοποιείται ^[24]. Ενώ οι αρχικές επώσεις με τα διαλύματα των κρυοπροστατευτικών πραγματοποιούνται από τον κλινικό εμβρυολόγο, τα επόμενα στάδια αναλαμβάνονται από εξειδικευμένο μηχάνημα, κάτι που από τη μια μεριά συνεπάγεται την αυτοματοποίηση της διαδικασίας και την μη απαίτηση για ιδιαίτερα εξειδικευμένο προσωπικό, από την άλλη όμως προϋποθέτει ακριβό εξοπλισμό και καταναλώνει περισσότερο χρόνο συγκριτικά με το vitrification. Πριν αναλυθούν τα κλινικά αποτελέσματα που έχουν επιτευχθεί με τις δύο μεθόδους, γίνεται μια συνοπτική παρουσίαση των διαφορών που έχουν ως διαδικασίες (Πίνακας 3).

Πίνακας 3. Διαφορές του vitrification και της αργής κατάψυξης ^[2,25].

Χαρακτηριστικό	Vitrification	Αργή κατάψυξη
Δυνατότητα παρατήρησης	ναι	όχι
Έλεγχος της διείσδυσης διαλυτών	ναι	όχι
Χρονική διάρκεια εκτός του επωαστήρα	~ 10 λεπτά	~ 3 ώρες
Παρατεταμένο θερμοκρασιακό σοκ	όχι	ναι
Θραύση της διάφανης ζώνης	όχι	πιθανή
Κρύσταλλοι πάγου	υαλόμορφη κατάσταση χωρίς πάγο	παρουσία πάγου
Ρυθμός ψύξης και απόψυξης	υψηλότερος	χαμηλός

Καθώς ο σχηματισμός κρυστάλλων πάγου είναι από τις βασικότερες διαφορές των δύο μεθόδων από την σκοπιά της φυσικής, θα εξηγηθεί πιο εκτενώς η παρουσία πάγου κατά την ψύξη των κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων και των ωαρίων. Ένα απροστάτευτο κύτταρο θα σχηματίσει πάγο ενδοκυτταρικά καθώς ψύχεται σε χαμηλές, υπό του μηδενός θερμοκρασίες. Ο πάγος υπόκειται σε μη ελέγξιμη ανάπτυξη και δημιουργεί μεγάλους κρυστάλλους που προκαλούν τον θάνατο του κυττάρου. Η αργή κατάψυξη μειώνει την πιθανότητα αυτού του ενδεχόμενου επιτρέποντας τον εξωκυττάριο πάγο να τραβήξει νερό εκτός του κυττάρου έως ότου τόσο λίγο ελεύθερο νερό να έχει μείνει εντός του κυττάρου ώστε μόνο μικροί, μη θανάσιμοι πυρήνες πάγου να είναι δυνατόν να σχηματιστούν. Αυτός ο τρόπος αφυδάτωσης μπορεί να συμβεί μόνο αν ο πάγος είναι παρών στο εξωκυττάριο διάλυμα και δεν σχηματίζεται εντός του κυττάρου. Για να διασφαλιστεί ότι ο εξωκυττάριος σχηματισμός πάγου θα προηγηθεί του ενδοκυττάρου, αυτές οι διαδικασίες κατάψυξης στηρίζονται στην διαφορά στην θερμοκρασία σχηματισμού πυρήνων πάγου μεταξύ του κυττάρου και του περιβάλλοντος διαλύματος. Τα κύτταρα περιέχουν περισσότερες διαλυμένες ουσίες και λιγότερο ελεύθερο νερό από τα περισσότερα διαλύματα στα οποία φυλάσσονται ^[25]. Το ξεπάγωμα θα προξενήσει περαιτέρω βλάβες κυρίως αν υπάρχουν μεγάλοι κρύσταλλοι πάγου καθώς ο πάγος θα λιώνει παράγοντας περιοχές καθαρού νερού, οι οποίες δύνανται να προκαλέσουν ωσμωτικό σοκ ^[25].

3.2. Μελέτες σύγκρισης των δύο τεχνικών

Το vitrification και η αργή κατάψυξη στηρίζονται σε διαφορετικούς μηχανισμούς για την κατάψυξη των κυττάρων. Όπως ήταν αναμενόμενο, λοιπόν, προέκυψε το ερευνητικό ερώτημα «ποια από τις δύο μεθόδους είναι ανώτερη για την κρυσοσυντήρηση των ωαρίων». Η ανωτερότητα της μίας ή της άλλης μεθόδου σαφώς υπαινίσσεται καλύτερα κλινικά αποτελέσματα αλλά και λιγότερες δυσμενείς επιδράσεις στην φυσιολογία του ωαρίου. Σχεδιάστηκαν μελέτες για την διευθέτηση του προβλήματος και τα ερευνητικά αποτελέσματα των τελευταίων ετών παρουσιάζονται στη συνέχεια, ξεκινώντας από πιο πρώιμες εργασίες και καταλήγοντας σε πιο πρόσφατες.

Οι Paffoni et al. ^[26] συνέκριναν το αναπτυξιακό δυναμικό ωαρίων που είχαν καταψυχθεί με την μία ή την άλλη μέθοδο και τα οποία μετά την απόψυξη

ενεργοποιήθηκαν παρθενογενετικά. Ανάμεσα στα πλεονεκτήματα αυτής της μεθόδου είναι, όπως αναφέρουν οι ερευνητές, η μίμηση της εμβρυονικής ανάπτυξης ανεξάρτητα από την πατρική συνεισφορά στην γονιμοποίηση με αποτέλεσμα να εξάγονται συμπεράσματα που βασίζονται εξ' ολοκλήρου στην ποιότητα των ωαρίων. Επιπλέον, αποφεύγεται η εφαρμογή στην κλινική πράξη διαδικασιών που δεν είναι πλήρως εγκαθιδρυμένες. Στην περίπτωση της αργής κατάψυξης εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο με την αυξημένη συγκέντρωση σουκρόζης (Πίνακας 4), που έχει κριθεί περισσότερο αποτελεσματικό. Το vitrification έγινε με ένα διαδεδομένο πρωτόκολλο ως προς το είδος και τις συγκεντρώσεις των κρυοπροστατευτικών ουσιών και με χρήση κλειστού συστήματος (cryotip, Πίνακας 4). Το απαιτούμενο μέγεθος δείγματος υπολογίστηκε σε 90 ώρια ανά ομάδα. Σημειώθηκε καλύτερη επιβίωση με το vitrification (74% έναντι 68%), αλλά η ενεργοποίηση και η ανάπτυξη κατά την δεύτερη ημέρα ήταν βελτιωμένες στην ομάδα της αργής κατάψυξης (Πίνακας 5). Παρ' όλ' αυτά, στατιστικά σημαντικές διαφορές δεν σημειώθηκαν έως την τρίτη ημέρα, με την ομάδα της αργής κατάψυξης να διαιρείται σε ποσοστό 42,2% επί του συνόλου των ωαρίων, ενώ μόλις 26,7% των υαλοποιημένων ωαρίων ήταν στο ίδιο στάδιο την συγκεκριμένη μέρα. Οι ερευνητές συμπεραίνουν ότι το πρωτόκολλο υαλοποίησης που χρησιμοποιήθηκε δεν δείχνει να είναι ικανό να βελτιώσει την αποτελεσματικότητα της κρυοσυντήρησης ωαρίων αν και επί του παρόντος δεν είναι ξεκάθαρο εάν τα αποτελέσματα αντικατοπτρίζουν εγγενείς διαφορές της αποτελεσματικότητας των δύο μεθόδων ή εάν εξαρτώνται από το γεγονός ότι οι διαδικασίες υαλοποίησης είναι λιγότερο τυποποιημένες.

Μια ακόμα μελέτη με παρθενογενετική ενεργοποίηση των αποψυθέντων ωαρίων είχε τα ίδια αποτελέσματα ^[27]. Πιο συγκεκριμένα, η επιβίωση ήταν καλύτερη όταν είχε εφαρμοστεί υαλοποίηση αλλά όλες οι υπόλοιπες παράμετροι (ενεργοποίηση, διαίρεση την δεύτερη ημέρα, διαίρεση την τρίτη ημέρα) ήταν καλύτερες στην ομάδα ωαρίων που είχε καταψυχθεί με αργή κατάψυξη (Πίνακας 5). Μάλιστα η διαφορά στην διαίρεση κατά την τρίτη ημέρα (70% έπειτα από αργή κατάψυξη έναντι 46,7% έπειτα από vitrification) άγγιξε την στατιστική σημαντικότητα. Έτσι, συμπεραίνεται ότι ενώ το vitrification είναι μια πιο γρήγορη και χαμηλού κόστους τεχνική, παρουσιάζει μικρότερο αναπτυξιακό δυναμικό, όπως αυτό φαίνεται από την παρθενογένεση, η οποία έχει δειχθεί ότι αναπαριστά την αναπτυξιακή ικανότητα των γονιμοποιημένων ωαρίων. Βέβαια, δεν θα πρέπει να παραβλέπεται το γεγονός ότι και στις δύο αυτές μελέτες χρησιμοποιήθηκε ένα

κλειστό σύστημα για την υαλοποίηση, κάτι που πιθανόν να επηρεάζει αρνητικά την αποτελεσματικότητα της μεθόδου μιας και συγκριτικές μελέτες κλειστών και ανοιχτών συστημάτων έχουν δείξει βελτιωμένη αποτελεσματικότητα με την χρήση των δευτέρων ^[28,29].

Οι Garcia et al. ^[30] κρυσυντήρησαν έναν αρκετά μεγάλο αριθμό ωαρίων και συνέκριναν το ποσοστό επιβίωσης, γονιμοποίησης και κλινικών κήσεων. Τόσο το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε για το vitrification όσο και εκείνο για την αργή κατάψυξη (Πίνακας 4) έχουν αποδειχθεί ιδιαίτερα αποτελεσματικά και χρησιμοποιούνται ευρέως τα τελευταία χρόνια. Παρατηρήθηκαν σχετικά υψηλά ποσοστά επιβίωσης (περίπου 90%), γονιμοποίησης (πάνω από 60%) και κήσης ανά κύκλο (31% με το vitrification, 25% με την αργή κατάψυξη). Τα παραπάνω σε συνδυασμό με την έλλειψη στατιστικά σημαντικών διαφορών ανάμεσα στις δύο ομάδες (Πίνακας 5) οδηγούν τους συγγραφείς στο συμπέρασμα ότι και οι δύο μέθοδοι είναι αποτελεσματικές για την κρυσυντήρηση ανθρώπινων ωαρίων και ότι η παρούσα προκαταρκτική μελέτη απέτυχε να δείξει ανωτερότητα της μίας μεθόδου, αν και το vitrification είναι πιο απλό και γρήγορο στην εκτέλεσή του και είχε ελαφρώς αυξημένα ποσοστά σε όλες τις παραμέτρους που καταγράφηκαν.

Οι Fadini et al. ^[22] επίσης συνέκριναν την αποτελεσματικότητα των δύο μεθόδων κρυσυντήρησης ωαρίων. Η τριετής εμπειρία με την μέθοδο της αργής κατάψυξης θεωρείται αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα για να έχει ξεπεραστεί η περίοδος εκμάθησης της τεχνικής και να θεωρούνται αντιπροσωπευτικά τα αποτελέσματα που αποκτώνται. Παρ' όλ' αυτά, τα ποσοστά επιβίωσης, γονιμοποίησης, διαίρεσης και κλινικής κήσης ήταν στατιστικά σημαντικά αυξημένα στην ομάδα που είχε πραγματοποιηθεί vitrification (Πίνακας 5), το οποίο μάλιστα είχε εφαρμοστεί ως διαδικασία στο συγκεκριμένο κέντρο για λίγους μόνο μήνες. Συμπεραίνεται, λοιπόν, ότι οι διαφορές που παρατηρήθηκαν οφείλονται στις διαφορετικές μεθόδους κρυσυντήρησης και όχι σε άλλους παράγοντες. Βελτιωμένα ήταν με το vitrification και τα ποσοστά καλής ποιότητας εμβρύων (29,6% grade 1 έναντι 22%, $p < 0,05$) και αποβολών (20% έναντι 29,4%), ενώ συγκρίσιμες ήταν οι αναλογίες ανώμαλης γονιμοποίησης. Η αντιπαραβολή των αποτελεσμάτων για τις κλινικές κήσεις με αποτελέσματα άλλων μελετών είναι δύσκολη, μιας και η συγκεκριμένη μελέτη έλαβε χώρα στην Ιταλία, όπου η νομοθεσία είναι πολύ περιοριστική, απαγορεύοντας την παραγωγή περισσότερων των τριών εμβρύων ή την επιλογή εμβρύων για εμβρυομεταφορά. Εν συγκρίσει με τα αποτελέσματα άλλων

μελετών από την Ιταλία πάνω στις δύο μεθόδους, η συγκεκριμένη φαίνεται να έχει μικρότερη επιτυχία κάτι που αποδίδεται στην εφαρμογή ήπιας ωοθηκικής διέγερσης στο συγκεκριμένο κέντρο ή σε πιθανή επιλογή ασθενών σε άλλα κέντρα. Όπως όμως φαίνεται από εκείνες τις μελέτες, έτσι και στην παρούσα, το vitrification είναι καλύτερος τρόπος για την κατάψυξη των ωαρίων έναντι της αργής κατάψυξης. Η δυνατότητα εξατομίκευσης για το κάθε ωάριο τόσο της διαδικασίας στο σύνολό της όσο και των χρονικών διαστημάτων επώασης στα διαλύματα κρυοπροστατευτικών πιθανόν να έχει θετικό αντίκτυπο στο αποτέλεσμα. Επιπλέον, σε ένα υπερδραστήριο εργαστήριο όπου πολλά δείγματα θα πρέπει να καταψύχονται ταυτόχρονα με την αργή κατάψυξη, η διαδικασία συχνά ξεκινάει καθυστερημένα ώστε να έχει ολοκληρωθεί και η τελευταία ωοληψία. Ως αποτέλεσμα, τα αρχικά συλλεχθέντα ωάρια υφίστανται «γήρανση» και παρεμποδίζεται η μελλοντική ανάπτυξή τους. Απεναντίας, το vitrification μπορεί να πραγματοποιηθεί άμεσα έπειτα από κάθε ωοληψία, χωρίς καθυστέρηση.

Οι Cao et al. ^[33] συνέκριναν την αργή κατάψυξη και το vitrification με cryoleaf (Πίνακας 4) ως προς την επιβίωση των ωαρίων, την γονιμοποίηση, τα καλής ποιότητας έμβρυα, την ανάπτυξη έως το στάδιο της βλαστοκύστης και την επίδραση στην μιτωτική άτρακτο και την οργάνωση των χρωμοσωμάτων. Στατιστικά σημαντικές διαφορές υπέρ του vitrification βρέθηκαν σε όλες τις περιπτώσεις εκτός της γονιμοποίησης (Πίνακας 5). Επιπλέον, δεν υπήρχε σημαντική διαφορά στο ποσοστό των ανωμαλιών μεταξύ της ομάδας του vitrification και του μάρτυρα, παρέχοντας έμμεση απόδειξη ότι το ποσοστό κύησης με έμβρυα από υαλοποιημένα ωάρια είναι συγκρίσιμο του ποσοστού κύησης από φρέσκα ωάρια. Το γεγονός ότι δεν εκτέθηκαν τα ωάρια για μεγάλα χρονικά διαστήματα σε υψηλές συγκεντρώσεις κρυοπροστατευτικών πιθανόν αιτιολογεί την μη διασπορά των χρωμοσωμάτων, την επίτευξη φυσιολογικής γονιμοποίησης και την μη παρεμπόδιση της ολοκλήρωσης της εμβρυονικής ανάπτυξης, καθώς όλα αυτά τα φαινόμενα σχετίζονται με την παρατεταμένη έκθεση σε υψηλές δόσεις κρυοπροστατευτικών ουσιών. Τέλος, δεδομένου ότι οι υποκυτταρικές αλλοιώσεις συγκεκριμένων ωοκυτταρικών δομών έχουν συσχετιστεί με μειωμένο αναπτυξιακό δυναμικό, είναι πιθανόν η μειωμένη εμβρυονική ανάπτυξη -όταν αυτή παρατηρήθηκε- να οφείλεται σε τέτοιες ανωμαλίες. Συμπερασματικά, οι συγγραφείς αναφέρουν ότι το vitrification είναι ανώτερο της αργής κατάψυξης, οδηγώντας σε αυξημένο ποσοστό επιβίωσης, γονιμοποίησης και in vitro εμβρυϊκής ανάπτυξης.

Σε μια τετραετή μελέτη οι Smith et al. ^[8] συνέκριναν τα αποτελέσματα του vitrification με αυτά της αργής κατάψυξης, εφαρμόζοντας την μέθοδο του cryotip στην πρώτη περίπτωση και το βελτιωμένο πρωτόκολλο με 0,3M σουκρόζη στην δεύτερη (Πίνακας 4). Τα δεδομένα για την ηλικία των γυναικών, την υπερδιέγερση των ωοθηκών, τα συλλεχθέντα ωάρια, τον αριθμό αποψυχθέντων ωαρίων ανά κύκλο και τις παραμέτρους του σπέρματος δεν παρουσίαζαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις ομάδες του vitrification και της αργής κατάψυξης. Η απόψυξη 349 ωαρίων που είχαν καταψυχθεί με vitrification και 238 από αργή κατάψυξης έδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές στο ποσοστό επιβίωσης, γονιμοποίησης, διαίρεσης, βιοχημικής και κλινικής κύησης (Πίνακας 5), με την μέθοδο του vitrification να εμφανίζεται πιο αποτελεσματική. Τα υψηλότερα ποσοστά διαίρεσης και ποιότητας εμβρύων τις τρεις πρώτες ημέρες στην περίπτωση του vitrification υποδηλώνουν μια καλύτερη αναπτυξιακή πορεία, γεγονός που προτείνει ότι οι μηχανικοί, χημικοί και θερμικοί στρεσογόνοι παράγοντες της κρυοσυντήρησης ελαχιστοποιούνται με το vitrification. Επιπλέον, τονίζεται ότι ενώ στις δύο μεθόδους αποψύχθηκε ο ίδιος αριθμός ωαρίων ανά κύκλο, η χαμηλότερη αποδοτικότητα της αργής κατάψυξης όσον αφορά στην επιβίωση, στην γονιμοποίηση και στην διαίρεση οδήγησε στην ακύρωση 11 εκ των 30 κύκλων της, ενώ το αντίστοιχο κλάσμα για το vitrification είναι μόλις 1/48. Επιπλέον υπολογίστηκε ότι απαιτούνται 33 κρυοσυντηρημένα με την αργή μέθοδο ωάρια για την εγκαθίδρυση μιας κύησης, τη στιγμή που ο αντίστοιχος αριθμός υαλοποιημένων ωαρίων είναι μόνο 16,5. Μια εναλλακτική έκφραση αυτών των κλασμάτων αποτελεί ο υπολογισμός ότι η κλινική κύηση ανά αποψυγμένο ωάριο είναι 1.7% στην αργή κατάψυξη έναντι 5.2% στο vitrification. Αν και έχει αναφερθεί υψηλότερο ποσοστό με εφαρμογή διαφορετικού πρωτοκόλλου αργής κατάψυξης, κρίθηκε σκόπιμο από τους συγγραφείς να συνεχιστεί η μελέτη με την μέθοδο που είχε αποδειχθεί πιο αποτελεσματική κατά την έναρξη της μελέτης, το 2005. Παρ' όλ' αυτά αναγνωρίζεται η ανάγκη για περαιτέρω συγκρίσεις αποτελεσματικότητας των δύο μεθόδων με βάση τα νέα δεδομένα για την αργή κατάψυξη. Βέβαια, θα πρέπει να σημειωθεί, αν και δεν αναφέρεται από τους συγγραφείς, ότι και η μέθοδος που ακολουθήθηκε για το vitrification υστερεί έναντι άλλων μεθόδων vitrification και κυρίως αυτών που χρησιμοποιούν ανοιχτά συστήματα ^[28,29]. Συνολικά, αναγνωρίζεται η ανωτερότητα του vitrification ως προς την αποτελεσματικότητα αν και δεν παραλείπεται η αναφορά στην μεγαλύτερη

εμπειρία και τεχνική εξειδίκευση που απαιτούνται για την σωστή εφαρμογή του vitrification και την επίτευξη των βέλτιστων δυνατών αποτελεσμάτων.

Στην μελέτη των Grifo&Noyes ^[34] πραγματοποιείται κρυοσυντήρηση ωαρίων ανθρώπου είτε με την αργή μέθοδο με το βελτιωμένο πρωτόκολλο (0,3M σουκρόζη) είτε με vitrification με κλειστό σύστημα και ιδιάζον πρωτόκολλο (Πίνακας 4). Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά όσον αφορά την επιβίωση μετά την απόψυξη, με υψηλά ποσοστά να καταγράφονται και για τις δύο τεχνικές (95% με το vitrification, 88% με την αργή κατάψυξη). Αντίθετα, η αργή κατάψυξη φαίνεται ανώτερη όσον αφορά την γονιμοποίηση και την ανάπτυξη βλαστοκύστης ($p < 0,05$). Δυνατότητα σύγκρισης της επίτευξης κύησης δεν υπάρχει καθώς σε κάθε ζευγάρι επιλέχθηκαν για μεταφορά τα καλύτερα έμβρυα ανεξάρτητα από την μέθοδο κρυοσυντήρησης που είχε εφαρμοσθεί. Άλλωστε οι ερευνητές εστιάζουν στην σύγκριση της κρυοσυντήρησης με την χρήση φρέσκων ωαρίων και συνεπώς η σύγκριση των δύο μεθόδων μεταξύ τους δεν συμπεριλαμβάνεται στα πρωτεύοντα ερευνητικά τους ευρήματα.

Μια αναδρομική μελέτη των Noyes et al. ^[35] έδειξε στατιστικά σημαντικά καλύτερο ποσοστό γονιμοποίησης έπειτα από αργή κατάψυξη ωαρίων σε σχέση με το vitrification με κλειστό σύστημα (cryotip ή cryolock) αν και δεν σημειώθηκε σημαντική διαφορά στην επιβίωση και στην ανάπτυξη βλαστοκύστης (Πίνακας 5). Για την εμφύτευση δεν μπορεί να βγει καθολικό συμπέρασμα γιατί στο ένα τρίτο των γυναικών μεταφέρθηκαν έμβρυα που προέρχονταν από απόψυξη είτε αργά κατεψυγμένων ωαρίων είτε υαλοποιημένων. Τέλος, όσον αφορά την εκτίμηση της μιτωτικής ατράκτου, αυτή ήταν παρούσα στο 82% και 83% των αργά κατεψυγμένων και υαλοποιημένων αντίστοιχα ωαρίων πριν την κατάψυξη, με τα ποσοστά αυτά να αυξάνονται σε 93% και 88% αντίστοιχα μετά την απόψυξη. Επομένως, συμπεραίνεται ότι με το κατάλληλο πρωτόκολλο είναι δυνατόν να αποφευχθούν οι βλάβες στην μιτωτική άτρακτο, που είναι μια παράμετρος που προβληματίζει έντονα τους ερευνητές που ασχολούνται με την κρυοσυντήρηση ωαρίων. Η διατήρηση ή ανάκτηση αυτής της δομής επιτρέπει στα ωάρια μετά την γονιμοποίηση να δώσουν ένα βιώσιμο έμβρυο και ένα ζωντανό νεογνό.

Μία διαφορετική από τις προηγούμενες μελέτη πραγματοποιήθηκε από τους Salvetti et al. ^[36], οι οποίοι ήλεγξαν την επίδραση της αργής κατάψυξης και της υαλοποίησης σε ωάρια κουνελιού, χρησιμοποιώντας ένα διαφορετικό πρωτόκολλο υαλοποίησης (πίνακας 4) και πραγματοποιώντας την ενεργοποίηση του ωαρίου όχι με

γονιμοποίηση με σπέρμα αλλά παρθενογενετικά. Όπως αναφέρουν, η παρθενογένεση φαίνεται να είναι ένα χαμηλού κόστους και αποτελεσματικό εργαλείο για την αξιολόγηση της ανάπτυξης έως το στάδιο της βλαστοκύστης σε προκαταρκτικές μελέτες, όπου τα ποσοστά κύησης δεν χρειάζονται. Επιπλέον, όχι μόνο υπάρχει μεγαλύτερη σταθερότητα στα αποτελέσματα καθώς δεν εμπλέκεται ο αντρικός παράγοντας αλλά αποφεύγεται και η παραγωγή ζυγωτών, η οποία επιφέρει ηθικά διλήμματα. Σύμφωνα με αυτή την μελέτη, το ποσοστό ωαρίων με φυσιολογική μιτωτική άτρακτο, οργάνωση χρωμοσωμάτων και διανομή μικροϊνιδίων ακτίνης μειωνόταν σημαντικά έπειτα από την κατάψυξη, με την αργή κατάψυξη να δίνει καλύτερα αποτελέσματα από την υαλοποίηση. Το περιεχόμενο των ωαρίων σε ATP είναι επίσης μειωμένο έπειτα από την κρυοσυντήρηση αν και είναι στατιστικά σημαντικά υψηλότερο στην ομάδα του vitrification έναντι της αργής κατάψυξης. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στην ανάπτυξη κρυστάλλων πάγου κατά την αργή κατάψυξη με αποτέλεσμα να βλάπτονται τα μιτοχόνδρια και να απελευθερώνεται ATP από το ωάριο. Η ανάπτυξη ήταν μια ακόμα παράμετρος που επηρεάστηκε στατιστικά σημαντικά από την κρυοσυντήρηση, χωρίς όμως να είναι στατιστικά σημαντικές οι διαφορές μεταξύ των δύο μεθόδων. Είναι φανερό ότι η κρυοσυντήρηση δυσχεραίνει έντονα την φυσιολογία και ανάπτυξη των ωαρίων, όπως είχε ήδη δειχθεί στο ίδιο ή άλλα είδη. Η συγκεκριμένη μελέτη είναι από τις λίγες που δείχνουν καλύτερα αποτελέσματα έπειτα από εφαρμογή αργής κατάψυξης αν και τρεις παράγοντες προκαλούν σκέψεις. Πρώτον, παρόλο που αναγνωρίζεται από τους συγγραφείς ότι τα ωάρια κουνελιού είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα σε υψηλές συγκεντρώσεις κρυοπροστατευτικών, κατά την υαλοποίηση χρησιμοποιήθηκαν 40% EG+DMSO, ενώ στα περισσότερα πρωτόκολλα το αντίστοιχο ποσοστό είναι 30%. Δεύτερον, η παρθενογενετική ενεργοποίηση ίσως να μην είναι αντιπροσωπευτική εναλλακτική της φυσιολογικής γονιμοποίησης. Όπως αναφέρεται και από τους συγγραφείς, σε μια άλλη μελέτη, στην οποία υαλοποιήθηκαν και γονιμοποιήθηκαν με ICSI ωάρια κουνελιού, παρατηρήθηκαν υψηλοί ρυθμοί ανάπτυξης. Τρίτον, το σύστημα που χρησιμοποιήθηκε για το vitrification ήταν το OPS, το οποίο έχει βρεθεί να έχει την χαμηλότερη απόδοση σε μελέτες μεταφοράς θερμότητας και φαίνεται να μην είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικό για την ταχεία μείωση της θερμοκρασίας^[37].

Αν και η πλειοψηφία των ερευνητών εστιάζει στα κλινικά αποτελέσματα των δύο μεθόδων, μια πρόσφατη μελέτη των Martínez-Burgos et al.^[38] συνέκρινε την επίδραση του vitrification και της αργής κατάψυξης στην μορφολογική εμφάνιση, την

διαμόρφωση της μειωτικής ατράκτου και τις βλάβες στο DNA των ωαρίων. Από δότριες ωαρίων εξασφαλίστηκαν 53 ώρια για την ομάδα του vitrification (με τη μέθοδο του cryotop όπως περιγράφηκε από τους Kuwayama et al. ^[13]) και 50 για της αργής κατάψυξης (με χρήση εμπορικού kit, Cook Medical, Bloomington, IN, USA) ενώ επιπλέον 21 ώρια χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες, εφόσον δεν κρυσωτηρήθηκαν. Το ποσοστό επιβίωσης των αποψυγμένων ωαρίων των δύο μεθόδων ήταν στατιστικά σημαντικά διαφορετικό (86,8% με το vitrification έναντι 50% με αργή κατάψυξη). Ο όγκος των κρυσωτηρημένων ωαρίων μειώθηκε στο μισό αλλά επανακτήθηκε, χωρίς στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις δύο διαφορετικά κρυσωτηρημένες ομάδες (95,7% στο vitrification έναντι 85,7% στην αργή κατάψυξη, $p>0,05$). Βέβαια, αυτό έγινε πιο άμεσα στην ομάδα του vitrification. Αν και η γρήγορη επανάκτηση του όγκου πιθανόν να μην σχετίζεται με τη μελλοντική βιωσιμότητα, υποδηλώνει περισσότερο υγιές κυτταρόπλασμα και μεμβράνες. Μη σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν στην κυτταροπλασματική εμφάνιση και στο πάχος της διάφανης ζώνης έπειτα από την κρυσωτηρήση. Ακόμα, διαπιστώθηκε έλλειψη θρυμματισμού του γενετικού υλικού σε οποιοδήποτε από τις τρεις ομάδες (κατάψυξη με vitrification, κατάψυξη με αργή κατάψυξη, μάρτυρας). Αντίθετα, τα δεδομένα που αφορούν την μιτωτική άτρακτο παρουσίαζαν στατιστικά σημαντικές διαφορές, ευνοώντας την ομάδα του vitrification. Η μιτωτική άτρακτος ήταν παρούσα στο 93,5% των υαλοποιημένων ωαρίων τρεις ώρες έπειτα από την απόψυξη, ενώ μόνο 72% των αργά κατεψυγμένων ωαρίων εμφάνιζαν μειωτική άτρακτο στις τρεις ώρες επώασης ($p=0,0128$), χρονικό διάστημα που έχει προταθεί ως απαραίτητο για την επαναφορά της μιτωτικής ατράκτου. Βέβαια, έπειτα από την υαλοποίηση το πολικό σωματίο ήταν σε μεγαλύτερη γωνία από την μειωτική άτρακτο, κάτι που δεν παρατηρήθηκε στην αργή κατάψυξη και που πιθανόν να οφείλεται στις γρήγορες αλλαγές όγκου με το vitrification. Ωστόσο το γεγονός αυτό δεν φαίνεται να έχει ιδιαίτερη σημασία καθώς οι συγγραφείς αξιολογούν ότι με βάση τα αποτελέσματά τους, το vitrification φαίνεται να έχει μικρότερο αντίκτυπο στην κυτταρική βιωσιμότητα του ωαρίου, καθώς επιτρέπει την γρηγορότερη επανάκτηση του αρχικού όγκου και διατηρεί καλύτερα την μιτωτική άτρακτο. Επιπλέον, παρατηρείται ότι το vitrification ελαχιστοποιεί τις βλάβες που συνδέονται με την παραδοσιακή αργή κατάψυξη, όπως ο σχηματισμός πάγου, οι τραυματισμοί σε υπό του μηδενός θερμοκρασίες, το ωσμωτικό σοκ και η επιρροή της αφυδάτωσης στις

κυτταροπλασματικές μεμβράνες, κάτι που μπορεί να είναι υπεύθυνο για τα καλύτερα αποτελέσματα στην συγκεκριμένη μελέτη.

Τα δεδομένα μετααναλύσεων ή ανασκοπήσεων της βιβλιογραφίας κατά κύριο λόγο ευνοούν το vitrification. Το 2007 οι Gardner et al. ^[39] πραγματοποίησαν μια επισκόπηση της υπάρχουσας βιβλιογραφίας για την εκτίμηση της επίδρασης των δύο μεθόδων στο επίπεδο της φυσιολογίας. Παρόλο που και οι δύο μέθοδοι οδήγησαν σε μείωση στην αξιοποίηση των θρεπτικών συστατικών από το ωάριο σε σχέση με τους μη κρυοσυντηρημένους μάρτυρες, η μείωση αυτή ήταν στατιστικά μικρότερη έπειτα από το vitrification σε σύγκριση με την αργή κατάψυξη. Καθώς ο επαρκής μεταβολισμός ενέργειας είναι θεμελιώδης για πολυάριθμες κυτταρικές διεργασίες, οι συγγραφείς υποστηρίζουν ότι δεν θα ήταν συνετό να επιλεγεί μια διαδικασία με αρνητική επίδραση σε αυτόν. Το vitrification έχει μικρότερο αντίκτυπο και στην απελευθέρωση LDL στο θρεπτικό υλικό, κάτι που είναι δείκτης ακεραιότητας της μεμβράνης και που συνεπάγεται μικρότερη βλάβη στην κυτταρική φυσιολογία. Ακόμα, έπειτα από αργή κατάψυξη έχουν ανιχνευθεί περισσότερες εκφυλισμένες ή αρνητικά επηρεασμένες υποκυτταρικές δομές, οι οποίες είχαν διατηρηθεί σε ωάρια που κρυοσυντηρήθηκαν με vitrification. Η υαλοποίηση, λοιπόν, φαίνεται να έχει μικρότερη επίδραση την φυσιολογία των ωαρίων, κάτι που υποστηρίζει την χρήση της για την κρυοσυντήρηση αυτών των γαμετών.

Μελέτες που επικεντρώθηκαν σε κλινικά δεδομένα, επίσης δείχνουν μια τάση βελτίωσης των αποτελεσμάτων όταν εφαρμόζεται vitrification. Οι Porcu et al. ^[7] εξετάζοντας τις έως το 2008 δημοσιευμένες εργασίες στις οποίες οι τεχνικές και κλινικές λεπτομέρειες ήταν διαθέσιμες, υπολόγισαν τον ρυθμό γεννήσεων ανά κρυοσυντηρημένο ωάριο σε 5% στην αργή κατάψυξη και 6% στο vitrification. Όπως αναφέρουν οι Tao et al. ^[1], σύμφωνα με την γνωμοδότηση της αμερικανικής κοινότητας για την αναπαραγωγική ιατρική (American Society for Reproductive Medicine), ένα ζωντανό νεογνό είναι το αποτέλεσμα της κρυοσυντήρησης 25 ώριμων ωαρίων με το vitrification ή 50 ώριμων ωαρίων με την αργή κατάψυξη. Μια μεταανάλυση των Cil et al. ^[40] έδειξε στατιστικά σημαντικά αυξημένα ποσοστά γονιμοποίησης, εμφύτευσης, κλινικής κύησης και ζωντανών νεογνών έπειτα από vitrification. Βέβαια, αναφέρεται ότι σε κύκλους με vitrification μεταφέρθηκαν μ.ο. 2,7 έμβρυα, ενώ στους κύκλους με αργή κατάψυξη ο αντίστοιχος αριθμός ήταν μ.ο. 2,2. Ένας επιπρόσθετος επιβαρυντικός παράγοντας στην περίπτωση της αργής κρυοσυντήρησης ήταν η κατά 2 έτη μεγαλύτερη μέση ηλικία των γυναικών.

Πίνακας 4. Πρωτόκολλα κρυοσυντήρησης με την μέθοδο της αργής κατάψυξης και του vitrification σε μελέτες σύγκρισης των δύο μεθόδων.

ΘΔ: θερμοκρασία δωματίου, DMSO: διμεθυλοσουλφοξείδιο, EG: αιθυλενογλυκόλη, PROH: 1,2-προπανεδιόλη, TR: τρεχαλόζη.

Αργή κατάψυξη			Vitrification				Βιβλιογραφία
διάλυμα εξισορρόπησης	διάλυμα κατάψυξης	διαλύματα απόψυξης	διάλυμα εξισορρόπησης	διάλυμα vitrification	διαλύματα απόψυξης	φορέας	
1,5M PROH (10')	1,5M PROH + 0,3M σουκρόζη (10-15')	1. 1,0M PROH + 0,3M σουκρόζη (5', ΘΔ) 2. 0,5M PROH + 0,3M σουκρόζη (5', ΘΔ) 3. 0,3M σουκρόζη (10', ΘΔ)	7,5% EG + 7,5% DMSO (7', ΘΔ)	15% EG + 15% DMSO + 0,5M σουκρόζη (60'', ΘΔ)	1. σουκρόζη 1M (2', 37° C) 2. σουκρόζη 0,5M (5', ΘΔ)	cryotip	Paffoni et al. ^[26]
1,5M PROH (10')	1,5M PROH + 0,3M σουκρόζη (10-15')	1. 1,0M PROH + 0,3M σουκρόζη (5', 22° C) 2. 0,5M PROH + 0,3M σουκρόζη (5', 22° C) 3. 0,3M σουκρόζη (10', ΘΔ)	7,5% EG + 7,5% DMSO (7', ΘΔ)	15% EG + 15% DMSO + 0,5M σουκρόζη (60'', ΘΔ)	1. σουκρόζη 1M (2', 37° C) 2. σουκρόζη 0,5M (5', ΘΔ)	cryotip	Ragni et al. ^[27]
Διαφορετικές συγκεντρώσεις σουκρόζης κατά την κατάψυξη (0,2M) και την απόψυξη (0,3M) σύμφωνα με τους Bianchi et al. ^[31]			7,5% EG + 7,5% DMSO (15', ΘΔ)	15% EG + 15% DMSO + 0,5M σουκρόζη (60'', ΘΔ)	1. σουκρόζη 1M (1', 37° C) 2. σουκρόζη 0,5M (3', ΘΔ)	cryotop	Garcia et al. ^[30]

Πίνακας 4. Συνέχεια

Αργή κατάψυξη			Vitrification				Βιβλιογραφία	
διάλυμα εξισορρόπησης	διάλυμα κατάψυξης	διαλύματα απόψυξης	διάλυμα εξισορρόπησης	διάλυμα vitrification	διαλύματα απόψυξης	φορέας		
PROH + 0,3 M σουκρόζη (κατά τους Fabbri et al. [32])			EG + PROH + σουκρόζη				cryoleaf	Fadini et al. [22]
1,5M PROH (10')	1,5M PROH+ 0,3M σουκρόζη (10')	1. 1M PROH+ 0,3M σουκρόζη (5') 2. 0,5M PROH + 0,3M σουκρόζη (5') 3. 0,2M PROH + 0,3M σουκρόζη (5') 4. 0,2M PROH + 0,1M σουκρόζη (5') 5. 0,1M PROH + 0,1M σουκρόζη (5')	7,5% EG + 7,5% PROH (5', ΘΔ)	15% EG + 15% PROH+ 0,5M σουκρόζη (45-60'', ΘΔ)	1. σουκρόζη 1M (1', 37° C) 2. σουκρόζη 0,5M (3', 37° C) 3. σουκρόζη 0,25 M (3', 37° C)	cryoleaf	Cao et al. [33]	
1,5M PROH (10', ΘΔ)	1,5M PROH + 0,3M σουκρόζη (5', ΘΔ)	1. 1,0M PROH + 0,3M σουκρόζη (5', ΘΔ) 2. 0,5M PROH + 0,3M σουκρόζη (5', ΘΔ) 3. 0,3M σουκρόζη (10', ΘΔ)	7,5% EG + 7,5% DMSO (2', 2', 3', ΘΔ)	15% EG + 15% DMSO + 0,5M σουκρόζη (5'', 5'', 10'', 90'', ΘΔ)	1. 1M σουκρόζη (1', 1', ΘΔ) 2. 0,5M σουκρόζη (2', 2', ΘΔ)	cryotip	Smith et al. [8]	

Πίνακας 4. Συνέχεια

Αργή κατάψυξη			Vitrification				Βιβλιογραφία
διάλυμα εξισορρόπησης	διάλυμα κατάψυξης	διαλύματα απόψυξης	διάλυμα εξισορρόπησης	διάλυμα vitrification	διαλύματα απόψυξης	φορέας	
1,5M PROH (10')	1,5M PROH+ 0,3M σουκρόζη (10')	1. 1M PROH+ 0,3M σουκρόζη (5') 2. 0,5M PROH+ 0,3M σουκρόζη (5') 3. 0,3M σουκρόζη (5')	5 διαδοχικά διαλύματα με 0,3-1,35M EG + 0,55-1,1M DMSO (0,5-1' ανά διάλυμα)	2,7M EG+ 2,1M DMSO+ 0,5M (110'')	διαδοχικές πλύσεις σε διαλύματα μειούμενης συγκέντρωσης σουκρόζης 0,5-0M (0,5-2' ανά διάλυμα)	cryotip	Grifo&Noyes ^[34]
1,5M PROH (10')	1,5M PROH+ 0,3M σουκρόζη (10')	διαδοχικές πλύσεις σε διαλύματα μειούμενης συγκέντρωσης σουκρόζης	EG και DMSO σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις (0,5-1' ανά διάλυμα)	EG, DMSO και σουκρόζη (110'')	διαδοχικές πλύσεις σε διαλύματα μειούμενης συγκέντρωσης σουκρόζης (0,5-2' ανά διάλυμα)	cryotip ή cryolock	Noyes et al. ^[35]
1,5 M PROH (15', 37° C)	1,5M PROH + 0,2M TR (10', 37° C)	1. 1M PROH +0,2M TR (5', 37° C) 2. 0,5M PROH +0,2M TR (5', 37° C) 3. 0,2 M TR (5', 37° C)	10% EG + 10% DMSO (2', 37° C)	20% EG + 20% DMSO + 0,65M TR + 10 mg/ml Ficoll70 (35'', 37° C)		OPS	Salveti et al. ^[36]

Πίνακας 5. Αποτελέσματα μελετών σύγκρισης του vitrification (A) με την αργή κατάψυξη (B).

a: στατιστικά σημαντική βελτίωση με τη μέθοδο του vitrification ($p < 0,05$), b: στατιστικά σημαντική βελτίωση με τη μέθοδο της αργής κατάψυξης ($p < 0,05$).

Μέθοδος	Αριθμός αποψυγμένων ωαρίων	Επιβίωση (%)	Γονιμοποίηση/Ενεργοποίηση (%)	Διαίρεση (2 ^η ημέρα) (%)	Βλαστοκύστες (%)	Κύηση (%)		Βιβλιογραφία
						ανά κύκλο	ανά ωάριο	
A	90	74	54,4	37,8				Paffoni et al. [26]
B	90	68	57,8	47,8				
A	85	81,2	65,2	71,1				Ragni et al. [27]
B	84	75,0	79,4	82,0				
A	84	92	68			31		Garcia et al. [30]
B	134	88	62			25		
A	285	78,9 ^a	72,8 ^a	91,5 ^a		18,2 ^a	23,3 ^a	Fadini et al. [22]
B	1348	57,9 ^a	64,6 ^a	82,1 ^a		7,6 ^a	10,6 ^a	
A	292	91,8 ^a	67,9	78,0 ^a	33,1 ^a			Cao et al. [33]
B	123	61,0 ^a	61,3	54,4 ^a	12,0 ^a			
A	349	81 ^a	77 ^a	84 ^a		38 ^a	5,2 ^a	Smith et al. [8]
B	238	67 ^a	67 ^a	71 ^a		13 ^a	1,7 ^a	
A	163	95,0	75,0 ^b		35,0 ^b			Grifo&Noyes [34]
B	159	88	84 ^b		52 ^b			
A	167	88	77 ^b		37			Noyes et al. [35]
B	148	85	90 ^b		45			
A	71	22,9 ^b		31,0	4,2			Salveti et al. [36]
B	75	56,3 ^b		41,3	1,3			
A	53	86,8 ^a						Martínez-Burgos et al. [38]
B	50	50 ^a						

3.3. Συμπέρασμα

Στα πλαίσια της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής η κρυοσυντήρηση των ωαρίων είναι ένας νέος κλάδος. Ως αποτέλεσμα, δεν υπάρχει μια γενικά αποδεκτή μέθοδος για την πραγματοποίησή της και αποτελεί ένα πεδίο έντονων αντιπαραθέσεων. Έχουν σχεδιαστεί ορισμένες μελέτες για την διευθέτηση του προβλήματος εύρεσης της πιο κατάλληλης μεθόδου, με το βασικό ερώτημα να έγκειται στο εάν είναι αποτελεσματικότερο το vitrification ή η αργή κατάψυξη. Οι συγκριτικές μελέτες έχουν δείξει αντικρουόμενα αποτελέσματα που ευνοούν είτε την μία είτε την άλλη μέθοδο. Κατά κύριο λόγο, οι μελέτες που χρησιμοποιούν την παρθενογενετική ενεργοποίηση των ανθρώπινων ωαρίων είχαν καλύτερα αποτελέσματα με την αργή κατάψυξη ενώ οι μελέτες στις οποίες πραγματοποιήθηκε γονιμοποίηση με σπερματοζώαρια ευνοούν το vitrification. Οι πιο πρόσφατες και καλά οργανωμένες εργασίες δείχνουν μια τάση βελτίωσης των αποτελεσμάτων έπειτα από εφαρμογή του vitrification, το οποίο επιπλέον φαίνεται να διατηρεί καλύτερα την φυσιολογία και την υποκυτταρική δομή του ωαρίου. Επιπροσθέτως, πρόκειται για μια τεχνική απλή, γρήγορη και χαμηλότερου κόστους από την αργή κατάψυξη. Σε καμία περίπτωση, βέβαια, δεν θα υποστηριχθεί ότι επί του παρόντος δεν υπάρχει ανάγκη για περαιτέρω αξιολόγηση του vitrification ή για την εισαγωγή νέων τροποποιήσεων και βελτιώσεων των υπαρχόντων πρωτοκόλλων. Επιπλέον, κρίνεται απαραίτητο να εμπλουτιστούν τα υπάρχοντα δεδομένα για την συγκριτική αποτελεσματικότητα του vitrification και της αργής κατάψυξης.

Εν κατακλείδι, αν και υπάρχουν ακόμη θέματα που πρέπει να διευθετηθούν, είναι αναμφισβήτητο ότι η υαλοποίηση των ωαρίων είναι μια ιδιαίτερα ελπιδοφόρα τεχνική. Με βάση τα υπάρχοντα δεδομένα, θα μπορούσε να εισαχθεί στην καθημερινή πρακτική προγραμμάτων υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Η πιο αποτελεσματική μέθοδος φαίνεται να είναι αυτή που αναπτύχθηκε από τους Kuwayama et al. ^[13], που εγγυάται υψηλά και αναπαραγωγίμα ποσοστά με τη χρήση σχετικά χαμηλών συγκεντρώσεων κρυοπροστατευτικών ουσιών. Για την παράκαμψη του μοναδικού εμποδίου, δηλαδή της πιθανής μετάδοσης παθογόνων μικροοργανισμών μέσω του ανοιχτού συστήματος του cryotop, προτείνεται η χρήση εργοστασιακού υγρού αζώτου κατά την ψύξη το οποίο μπορεί να φιλτραρισθεί ή να εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία για επιπλέον ασφάλεια.

4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Tao T., Zhang W., Del Valle A. Human oocyte cryopreservation. *Curr Opin Obstet Gynecol* **2009**; 21: 247-252.
2. Kuleshova L.L., Lopata A. Vitrification can be more favorable than slow cooling. *Fertil Steril* **2002**; 78 (3): 449-454.
3. Elnahas A., Alcolak E., Marar E.A., Elnahas T., Elnahas K., Palapelas V., Diedrich K., Al-Hasani S. Vitrification of human oocytes and different developmental stages of embryos: An overview. *Middle East Fertil. Soc. J.* **2010**; 15: 2-9.
4. Cobo A., Kuwayama M., Pérez S., Ruiz A., Pellicer A., Remohí J. Comparison of concomitant outcome achieved with fresh and cryopreserved donor oocytes vitrified by the Cryotop method. *Fertil. Steril.* **2008**; 89 (6): 1657-1664.
5. Jain J.K., Paulson R.J. Oocyte cryopreservation. *Fertil Steril* **2006**; 86 (3): 1037-1046.
6. Gidoni Y., Holzer H., Tulandi T., Tan S.L. Fertility preservation in patients with non-oncological conditions. *Reprod. Biomed. Online.* **2008**; 16 (6): 792-800.
7. Porcu E., Bazzocchi A., Notarangelo L., Paradisi R., Landolfo C., Venturoli S. Human oocyte cryopreservation in infertility and oncology. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* **2008**; 15 (6): 529-531.
8. Smith G.D., Serafini P.C., Fioravanti J., Yadid I., Coslovsky M., Hassum P., Alegretti J.R., Motta E.L. Prospective randomized comparison of human oocyte cryopreservation with slow-rate freezing or vitrification. *Fertil. Steril.* **2010**; 94 (6): 2088-2095.
9. Chen S.-U., Yang Y.-S. Slow freezing or vitrification of oocytes: their effects on survival and meiotic spindles, and the time schedule for clinical practice. *Taiwan J. Obstet. Gynecol.* **2009**; 48 (1): 15-22.
10. Kuwayama M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: The Cryotop method. *Theriogenol.* **2007**; 67: 73-80.

11. Lornage J., Salle B. Ovarian and oocyte cryopreservation. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* **2007**; 19: 390-394.
12. Gosden R.G. Prospects for oocyte banking and in vitro maturation. *J. Nat. Cancer Ins. Monogr.* **2005**; 34: 60-63.
13. Kuwayama M., Vajta G., Kato O., Leibo S.P. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reprod. Biomed. Online.* **2005**; 11: 300-308.
14. Chian R.C., Son W.Y., Huang J.Y., Cui S.J., Buckett W.M., Tan S.L. High survival rates and pregnancies of human oocytes following vitrification: Preliminary report. *Fertil. Steril.* **2005**; 84 (Suppl 1): 36.
15. Gasparrini B., Attanasio L., De Rosa A., Monaco E., Di Palo R., Campanile G. Cryopreservation of in vitro matured buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes by minimum volumes vitrification methods. *Anim. Reprod. Sci.* **2007**; 98: 335-342.
16. Wang Z., Sun Z., Chen Y., He F. A modified cryoloop vitrification protocol in the cryopreservation of mature mouse oocytes. *Zygote.* **2009**; 17: 217-224.
17. Rienzi L., Romano S., Albricci L., Maggiulli R., Capalbo A., Baroni E., Colamaria S., Sapienza F., Ubaldi F. Embryo development of fresh 'versus' vitrified metaphase II oocytes after ICSI: a prospective randomized sibling-oocyte study. *Hum. Reprod.* **2009**; 25 (1): 66-73.
18. Ubaldi F., Anniballo R., Romano S., Baroni E., Albricci L., Colamaria S., Capalbo A., Sapienza F., Vajta G., Rienzi L. Cumulative ongoing pregnancy rate achieved with oocyte vitrification and cleavage stage transfer without embryo selection in a standard infertility program. *Hum. Reprod.* **2010**; 25 (5): 1199-1205.
19. Kim T., Laufer L.R., Hong S.W. Vitrification of oocytes produces high pregnancy rates when carried out in fertile women. *Fertil. Steril.* **2010**; 93 (2): 467-474.
20. Almodin C.G., Minguetti-Camara V.C., Paixao C.L., Pereira P.C. Embryo development and gestation using fresh and vitrified oocytes. *Hum. Reprod.* **2010**; 25 (5): 1192-1198.

21. Di Pietro C., Vento C., Guglielmino M.R., Borzí P., Santonocito M., Ragusa M., Barbagallo D., Duro L.R., Majorana A., De Palma A., Garofalo M.R., Minutolo E., Scollo P., Purrello M. Molecular profiling of human oocytes after vitrification strongly suggests that they are biologically comparable with freshly isolated gametes. *Fertil. Steril.* **2010**; 94 (7): 2804-2807.
22. Fadini R., Brambillasca F., Mignini Renzini M., Merola M., Comi R. De Ponti E., Dal Canto M.B. Human oocyte cryopreservation: comparison between slow and ultrarapid methods. *Reprod. Biomed. Online.* **2009**; 19 (2): 171-180.
23. Vajita G., Nagy Z.P., Cobo A., Conceicao J., Yovich J. Vitrification in assisted reproduction: myths, mistakes, disbeliefs and confusion. *Reprod. Biomed. Online* **2009**; 19 (3): 1-7.
24. Saragusty J., Arav A. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. *Reproduction* **2011**; 141 (1): 1-19.
25. Shaw J.M., Jones G.M. Terminology associated with vitrification and other cryopreservation procedures for oocytes and embryos. *Hum. Reprod. Update* **2003**; 9 (6): 583-605.
26. Paffoni A., Alagna F., Somigliana E., Restelli L., Brevini T.A.L., Gandolfi F., Ragni G. Developmental potential of human oocytes after slow freezing or vitrification: a randomized in vitro study based on parthenogenesis. *Reprod. Sci.* **2008**; 15 (10): 1027-1033.
27. Ragni G., Paffoni A., Alagna F., Restelli L., Somigliana E. Reduced developmental potential of human oocytes after vitrification compared to slow freezing. *Fertil. Steril.* **2007**; 88 (Suppl. 1): 345.
28. Paffoni A., Guarneri C., Ferrari S., Restelli L., Nicolosi A.E., Scarduelli C., Ragni G. Effects of two vitrification protocols on the developmental potential of human mature oocytes. *Reprod Biomed Online.* **2011**; 22 (3): 292-298.
29. Bonetti A., Cervi M., Tomei F., Marchini M., Ortolani F., Manno M. Ultrastructural evaluation of human metaphase II oocytes after vitrification: closed versus open devices. *Fertil. Steril.* **2011**; 95 (3): 928-935.

30. Garcia G., Santos R., Arenas M.-L. Gonzalez O., Ramirez P., Patrizio P. Comparative study of human oocyte cryopreservation by vitrification or slow freezing. *Fertil. Steril.* **2008**; 90 (Suppl. 1): 291-292.
31. Bianchi V., Coticchio G., Distratis V., Di Giusto N., Flamigni C., Borini A. Differential sucrose concentration during dehydration (0.2 mol/l) and rehydration (0.3 mol/l) increases the implantation rate of frozen human oocytes. *Reprod Biomed Online* **2007**; 14: 64-71.
32. Fabbri R., Porcu E., Marsella T., Rocchetta G., Venturoli S., Flamigni C. Human oocyte cryopreservation : new perspectives regarding oocyte survival. *Hum. Reprod.* **2001**; 16 (3): 411-416.
33. Cao Y.X., Xing Q., Cong L., Zhang Z.G., Wei Z.L., Zhou P. Comparison of survival and embryonic development in human oocytes cryopreserved by slow-freezing and vitrification. *Fertil. Steril.* **2009**; 92 (4): 1306-1311.
34. Grifo J.A., Noyes N. Delivery rate using cryopreserved oocytes is comparable to conventional in vitro fertilization using fresh oocytes: potential fertility preservation for female cancer patients. *Fertil. Steril.* **2010**; 93 (2): 391-396.
35. Noyes N., Knopman J., Labella P., McCaffrey C., Clark-Williams M., Grifo J. Oocyte cryopreservation outcomes including pre-cryopreservation and post-thaw meiotic spindle evaluation following slow-freezing and vitrification of human oocytes. *Fertil. Steril.* **2010**; 94 (6): 2078-2082.
36. Salvetti P., Buff S., Afanassieff M., Daniel N., Guérin P., Joly T. Structural, metabolic and developmental evaluation of ovulated rabbit oocytes before and after cryopreservation by vitrification and slow freezing. *Theriogenol.* **2010**; 74: 847-855.
37. Sansisena M., Santos M.V., Zaritzky N., Chirife J. Numerical simulation of cooling rates in vitrification systems used for oocyte cryopreservation. *Cryobiol.* **2011**; 63: 32-37.
38. Martínez-Burgos M., Herrero L., Megías D., Salvanes R., Montoya M.C., Cobo A.C., García-Velasco J.A. Vitrification versus slow-freezing of oocytes: effects on

morphologic appearance, meiotic spindle configuration, and DNA damage. *Fertil. Steril.* **2011**; 95 (1): 374-377.

39. Gardner D.K., Sheehan C.B., Rienzi L., Katz-Jaffe M., Larman M.G. Analysis of oocyte physiology to improve cryopreservation procedures. *Theriogenol.* **2007**; 67: 64-72.

40. Cil A.P., Oktem O., Oktay K. A meta-analytic comparison of oocyte vitrification to slow-freezing: time trends and the current state of the technology. *Fertil. Steril.* **2008**; 90 (Suppl. 1): 269-270.