

# Είναι η υαλοποίηση (vitrification) η λύση στα προβλήματα της κρυοσυντήρησης των γαμετών και των εμβρύων; Πρώτη επιτυχής έκβαση κηύσεων στην Ελλάδα-αποτελέσματα

**Β. Παλαπέλας, Π. Πετρόπουλος, Α. Δανηλίδης, ΑΙ Hasani\*, Ε. Μπουσιάνη, Ν. Παΐσιος, Β. Καραγιάννης**

Γ' Μαιευτική και Γυναικολογική Κλινική, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης \* Μαιευτική και Γυναικολογική Κλινική, Πανεπιστήμιο του Lübeck, Germany

Αλληλογραφία: Β. Παλαπέλας, Γ' Μαιευτική-Γυναικολογική Κλινική Α.Π.Θ., Γ.Ν.Θ., Ιπποκράτειο, Κωνσταντινουπόλεως 49-54642 Θεσσαλονίκη, Τηλ.: 2310892120, Fax: 2310992950  
E-mail: nat@kie.gr

## Περίληψη

Η πρακτική εφαρμογή των τεχνολογιών αναπαραγωγής διευκολύνεται και αρκετά συχνά εξαρτάται από το βαθμό επιτυχίας της κρυοσυντήρησης των γαμετών και των εμβρύων. Αρκετά συχνά παρουσιάζονται δυσκολίες και περιορισμοί στην επιτυχία συντήρησης των γαμετών και των εμβρύων γεγονός που επιδρά αρνητικά στα ποσοστά γονιμοποίησης. Κατά καιρούς έχουν επινοηθεί διάφορες μέθοδοι για τη βελτίωση της κρυοσυντήρησης των ωαρίων και των εμβρύων, τόσο σε πειραματικό επίπεδο, σε ζώα όσο και στους ανθρώπους. Σήμερα η βραδεία κατάψυξη, παρά τους περιορισμούς και τα μειονεκτήματα της έχει καταστεί η πιο διαδεδομένη μέθοδος. Οι πιο σύγχρονες συσκευές προγραμματισμένης κρυοσυντήρησης παρέχουν παραμέτρους και λογισμικά μεγάλης ακρίβειας για την επιτυχημένη κατάψυξη.

Εντούτοις, τα τελευταία χρόνια υπάρχουν ενδείξεις κάποιων θεμελιωδών αλλαγών στη φιλοσοφία της συντήρησης των γαμετών και εμβρύων. Σε αντίθεση με την κατεστημένη έως σήμερα αντίληψη η πιο πρόσφατη βιβλιογραφία καταδεικνύει ότι η μέθοδος της βραδείας κατάψυξης θα αποτελέσει σύντομα παρελθόν στον τομέα της εμβρυολογίας. Ο στόχος του άρθρου αυτού είναι να καταστήσει σαφή τα νέα δεδομένα, όσον αφορά την υαλοποίηση, αλλά και να ορίσει τις μελλοντικές προοπτικές. Από τις αρχές του 2006 που ξεκινήσαμε τη μέθοδο αυτή σε 14 ασθενείς, μετά την απόψυξη των εμβρύων τους επετεύχθησαν έξι κηύσεις, ποσοστό 42,8%, εκ των οποίων πέντε κλινικές κηύσεις και μία αποβολή. Η μία γέννησε ήδη στην κλινική μας στην 36η εβδομάδα ένα υγιές κοριτσάκι βάρους 2190gr. στις 29-11-2006 και η δεύτερη γέννησε στις 22-01-2007 ένα υγιές αγοράκι βάρους 3750gr.

Λέξεις κλειδιά: εξωσωματική γονιμοποίηση, ενδοωαριακή σπερματέγχυση, υπογονιμότητα, κρυοσυντήρηση

## Εισαγωγή

Οι πρώτες επιτυχίες στην κρυοσυντήρηση εμβρύου του 1970, οι πρώτες ανθρώπινες εγκυμοσύνες ήταν θηλαστικού επιτεύχθηκαν στις αρχές τις δεκαετίας γεγονός το 1983, ενώ το 2001 πραγματοποιήθηκε η

εμβρυομεταφορά κατεψυγμένου εμβρύου.<sup>1</sup> Στις δύο τελευταίες δεκαετίες διακρίνονται δύο κύριες ομάδες μεθόδων. Η πρώτη είναι η βραδεία κατάψυξη και η δεύτερη είναι η υαλοποίηση. Η αποθήκευση, απόψυξη και ενυδάτωση διαφέρει πολύ λίγο ανάμεσα στις δύο τεχνικές. Η κύρια διαφορά βρίσκεται στην προσθήκη των κρυοπροστατευτικών και στην κατάψυξη.

Η βραδεία κατάψυξη μπορεί να ερμηνευθεί σαν μία προσπάθεια να δημιουργηθεί μία ευαίσθητη ισορροπία μεταξύ διαφόρων επικίνδυνων παραγόντων όπως ο σχηματισμός κρυστάλλων, η ρήξη, η τοξική και οσμωτική βλάβη. Δημιουργείται μία ισορροπία για τα έμβρυα και τα ωκύτταρα σε διαλύματα διαπερατών και μη διαπερατών κρυοπροστατευτικών 1-2 mol/l και στη συνέχεια τοποθετούνται σε straws 0.25mls. Στη συνέχεια πραγματοποιείται ταχεία κατάψυξη στους  $-6^{\circ}\text{C}$ , με ρυθμιζόμενο ρυθμό κατάψυξης. Στους  $-6^{\circ}\text{C}$  προκαλείται δημιουργία κρυστάλλων στο διαλύτη, μακριά από το έμβryo και το ωάριο. Τα υπόλοιπα βήματα πραγματοποιούνται από τη συσκευή. Ο ρυθμός κατάψυξης στη συνέχεια είναι συνήθως 0.3 και  $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . Στη βραδεία κατάψυξη, οι τοξικές και οσμωτικές βλάβες που προκαλούνται από τους κρυοπροστατευτικούς διαλύτες μπορεί να μην είναι τόσο σοβαρές. Εντούτοις αυτές οι συγκεντρώσεις δεν επαρκούν στο να εμποδίσουν εντελώς το σχηματισμό μικροκρυστάλλων και γι' αυτό το λόγο απαιτούνται μικροχειρισμοί, για την αποφυγή δημιουργίας μικροκρυστάλλων. Η βραδεία κατάψυξη είναι αυτή που βοηθά στην ελεγχόμενη και περιορισμένη ανάπτυξη του πάγου. Ο βραδύς ρυθμός της διαδικασίας επιτρέπει την ανταλλαγή μεταξύ ενδοκυττάρων και εξωκυττάρων υγρών, χωρίς σοβαρές οσμωτικές διαταραχές και παραμόρφωση των κυττάρων.<sup>2</sup> Με την υαλοποίηση εξαλείφονται πλήρως οι μικροκρύσταλλοι, μία από τις κύριες αιτίες βλαβών των κυττάρων. Γι' αυτό η μέθοδος μπορεί να θεωρηθεί σαν μία ριζοσπαστική προσέγγιση. Για να επιτευχθεί η υαλοποίηση των διαλυτών απαιτείται ραγδαία αύξηση των ρυθμών κατάψυξης και των συγκεντρώσεων των κρυοπροστατευτικών. Όσο ταχύτερη είναι η κατάψυξη τόσο μικρότερη είναι η απαιτούμενη συγκέντρωση των κρυοπροστατευτικών και αντίθετα. Ο στόχος κατά την υαλοποίηση είναι αφενός η επίτευξη ενός ασφαλούς συστήματος ταχύτητας και αξιόπιστης κατάψυξης και απόψυξης, αποφεύγοντας συγχρόνως τις ρήξεις της διαφανούς ζώνης ή των κυττάρων και αφετέρου η ελαχιστοποίηση των τοξικών και οσμωτικών βλαβών των κρυοπροστατευτικών. Η συρρίκνωση των

κυττάρων προκαλείται από τα μη διαπερατά κρυοπροστατευτικά και την ατελή διείσδυση των διαπερατών και μπορεί να οδηγήσει σε σχετική αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης των μακρομορίων, κάτι που είναι υπεραρκετό να εμποδίσει τον ενδοκυττάριο σχηματισμό κρυστάλλων.<sup>3, 4</sup>

### **Βλάβες, πρόληψη και επιδιόρθωση κατά τη διαδικασία της κρυοσυντήρησης**

Η θερμοκρασία του σώματος στα περισσότερα θηλαστικά και φυσικά στον άνθρωπο είναι αυστηρά ρυθμιζόμενη. Η κατάψυξη σε θερμοκρασίες κάτω από το μηδέν δεν συμβαίνει ποτέ σε φυσιολογικές συνθήκες στον άνθρωπο. Βλάβες μπορεί να προκληθούν σε όλες τις φάσεις της διαδικασίας της κρυοσυντήρησης. Η κατανόηση των μηχανισμών και των αιτιών των βλαβών αυτών μπορεί να βοηθήσει στη δημιουργία τεχνικών ικανών να τις προλαμβάνουν στο μέγιστο δυνατό βαθμό.

Κατά τη διάρκεια της κατάψυξης μπορεί να προκληθούν τρεις τύποι βλαβών ανάλογα με τα επίπεδα θερμοκρασίας εντός του κυττάρου. Σε σχετικά υψηλές θερμοκρασίες μεταξύ  $+15^{\circ}$  και  $-5^{\circ}\text{C}$ , μπορεί να προκληθούν βλάβες κυρίως στα κυτταροπλασματικά λιπίδια και μικροσωληνάρια συμπεριλαμβανομένης της μειωτικής ατράκτου.<sup>5,6,7</sup> Ενώ η τελευταία βλάβη μπορεί να είναι αναστρέψιμη, η πρώτη είναι πάντα μη αναστρέψιμη και οδηγεί στο θάνατο των κρυοδιατηρημένων, πλούσιων σε λιπίδια ωαρίων και εμβρύων. Μεταξύ των  $-5$  και  $-80^{\circ}\text{C}$ , ο εξωκυττάριος ή κατά κύριο λόγο ο ενδοκυττάριος σχηματισμός κρυστάλλων πάγου είναι η κύρια αιτία τραυματισμών, ενώ μεταξύ  $-50$  και  $-150^{\circ}\text{C}$  συμβαίνουν βλάβες ρήξης στη διαφανή ζώνη ή το κυτταρόπλασμα<sup>8</sup>, παρόλο που ο ακριβής μηχανισμός δεν είναι απόλυτα γνωστός. Εντούτοις είναι απίθανο να συμβεί ρήξη της διαφανούς ζώνης, μόνο σαν επακόλουθο του οσμωτικού στρες, όπως αρχικά πιστευόταν.<sup>9</sup>

Η συντήρηση των ωαρίων ή των εμβρύων γίνεται στους  $-196^{\circ}\text{C}$ , συνήθως σε υγρό άζωτο. Είναι πιθανόν η λιγότερο επικίνδυνη φάση της διαδικασίας κρυοσυντήρησης. Συνήθως η κατά λάθος αύξηση της θερμοκρασίας είναι η κυριότερη αιτία βλάβης στη φάση αυτή, ενώ η ακτινοβολία φαίνεται πως παίζει δευτερεύοντα ρόλο.<sup>1</sup> Εντούτοις υπάρχει αυξημένος σκεπτικισμός όσον αφορά την πιθανότητα μετάδοσης ασθενειών μεταξύ των αποθηκευμένων δειγμάτων, μέσω του υγρού αζώτου. Κατά τη διαδικασία απόψυξης μπορεί να προκληθούν ίδιου τύπου βλάβες με τη διαδικασία κατάψυξης.

Όλα τα ωάρια και έμβρυα μπορεί να υποστούν ση-

μαντικές βλάβες κατά την κατάψυξη και απόψυξη. Ευτυχώς αυτές οι βλάβες είναι τις περισσότερες φορές αναστρέψιμες από τα ίδια τα κύτταρα. Ο στόχος της κρυοσυντήρησης είναι ακριβώς ο ίδιος με αυτόν της ιατρικής, δηλαδή να ελαχιστοποιηθεί η βλάβη και να βοηθήσει στην αναγέννηση. Σχεδόν όλες οι στρατηγικές κρυοσυντήρησης στηρίζονται σε δύο παράγοντες: στους κρυοπροστατευτικούς και στους ρυθμούς κατάψυξης-απόψυξης. Στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνονται πολλά υλικά χαμηλού μοριακού βάρους όπως η αιθανόλη, αλλά και σύνθετα υλικά όπως ο ορός ή ο λεκιθικός ασκός. Τα υλικά αυτά μπορεί είτε να εισχωρήσουν στο κύτταρο (διαπερατά) ή να παραμείνουν εκτός του κυττάρου (μη διαπερατά). Ο κύριος ρόλος των προστατευτικών αυτών υλικών είναι να ελαχιστοποιήσουν το σχηματισμό κρυστάλλων. Ένας παρόμοιος μηχανισμός όπως η οσμωτική αφυδάτωση μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο στην προστατευτική δράση των μη διαπερατών κυτταροπροστατευτικών. Επιπλέον και οι δύο τύποι κυτταροπροστατευτικών μπορεί να έχουν επιπλέον προστατευτικούς μηχανισμούς, όπως για παράδειγμα η σταθεροποίηση των ενδοκυττάρων δομών και της κυτταρικής μεμβράνης. Δυστυχώς τα σταθεροποιητικά έχουν κάποιες αρνητικές επιπτώσεις, όπως τοξικότητα και οσμωτικές βλάβες.

Ο ρυθμός κατάψυξης εξαρτάται από τη χρησιμοποιούμενη μέθοδο, από μέτρια ή κατά βήμα κατάψυξη μεταξύ της φυσιολογικής θερμοκρασίας στους  $-4^{\circ}\text{C}$ , αυστηρά ελεγχόμενοι ρυθμοί κατάψυξης στους  $-40^{\circ}\text{C}$  ή  $-80^{\circ}\text{C}$  και στη συνέχεια έγχυση του υγρού αζώτου, είτε με ταχύ ρυθμό (γύρω στους  $200^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ) ή με υπερταχύ ρυθμό (έως και  $20.000-100.000^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ) για ολοκληρωτο εύρος των θερμοκρασιών.<sup>1,3</sup> Επίσης, η απόψυξη μπορεί να πραγματοποιηθεί σταδιακά, είτε με ελεγχόμενη σταδιακή αύξηση της θερμοκρασίας, ή με ταχεία αύξηση με τους ρυθμούς που προαναφέρθηκαν.

Δεν είναι πλήρως κατανοητοί οι μηχανισμοί με τους οποίους προκαλούνται οι βλάβες κατά την κρυοσυντήρηση, αλλά ούτε και πως δρουν τα διάφορα κρυοπροστατευτικά. Είναι πολύ δύσκολο να πραγματοποιηθούν μορφολογικές αναλύσεις των ενδοκυττάρων δομών, κατά τη διάρκεια της διαδικασίας κατάψυξης σε θερμοκρασίες κάτω από το μηδέν. Οι πιο συνηθισμένες μέθοδοι στηρίζονται στην παρατήρηση της επίδρασης των κρυοπροστατευτικών, χωρίς όμως να υπάρχουν συνθήκες κατάψυξης ή απόψυξης, ή κάνοντας αναδρομικές υποθέσεις στηριζόμενοι στις βλάβες που προκαλούνται μετά την απόψυξη. Λόγω όλων αυτών των αμφιβο-

λιών και αβεβαιοτήτων δεν προκαλεί καμία εντύπωση το γεγονός ότι οι υπάρχουσες τεχνικές κρυοσυντήρησης στηρίχθηκαν κατά κύριο λόγο σε εμπειρικές μεθόδους, σε μελέτες που έγιναν με το στερεομικροσκόπιο και που επιβεβαιώθηκαν από το αποτέλεσμα (in vitro και in vivo επιβίωση).

Οι διάφοροι μηχανισμοί εξηγήθηκαν αργότερα με υποθέσεις, που στηρίχθηκαν σε αναλογικά μοντέλα και υπολογισμούς. Παραδόξως, σε μερικές περιπτώσεις, ακόμη και αυτές οι υποθέσεις δεν μπορούν να αποκαλύψουν τη λογική εξήγηση και υπάρχουν ακόμη περιπτώσεις όπου ωοκύτταρα και έμβρυα επιβιώνουν στην κρυοσυντήρηση και αναπτύσσονται αργότερα, ακόμη και όταν οι βλάβες που προκαλούνται λόγω της χρησιμοποιούμενης τεχνικής θα έπρεπε να τα είχε θανατώσει, όπως συμβαίνει στην υπερταχεία κρυοσυντήρηση.

### Κρυοπροστατευτικά στην υαλοποίηση

Σε γενικές γραμμές στην υαλοποίηση χρησιμοποιούνται τα ίδια κρυοπροστατευτικά με τις μεθόδους βραδείας κατάψυξης. Εντούτοις διαφέρουν οι συγκεντρώσεις τους. Καθώς απαιτούνται μεγάλες συγκεντρώσεις κρυοπροστατευτικών θα πρέπει να αποφευχθεί όσο το δυνατό ο κίνδυνος τοξικής ή οσμωτικής βλάβης. Έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορα σχήματα, ώστε να βρεθεί το λιγότερο τοξικό. Συνήθως χρησιμοποιείται συνδυασμός δύο ή και τριών κρυοπροστατευτικών από τα οποία τουλάχιστον το ένα είναι διαπερατό. Διάφορα διαπερατά κρυοπροστατευτικά έχουν δοκιμαστεί όπως η προπυλενική γλυκόλη, η ακεταμίδη, η γλυκερόλη, η ραφινόζη και η αιθυλενική γλυκόλη. Η τελευταία φαίνεται πως είναι η καλύτερη επιλογή όσον αφορά την τοξικότητα, αλλά και την διαπερατότητα του μείγματος.<sup>9,10</sup> Όσον αφορά τα μη διαπερατά κρυοπροστατευτικά χρησιμοποιήθηκαν μόνο οι πολυσακχαρίτες, όπως η σουκρόζη, η τρεχαλόζη, η γλυκόζη και η γαλακτόζη.<sup>11</sup> Η σουκρόζη χρησιμοποιείται κατά κύριο λόγο σαν συστατικό των μειγμάτων των κρυοπροστατευτικών για την υαλοποίηση.

Η σουκρόζη, όπως και τα υπόλοιπα σάκχαρα μπορεί να μην έχουν τοξικές επιδράσεις σε χαμηλές θερμοκρασίες, αλλά μπορεί όταν προστίθενται να προκαλέσουν διόγκωση του κυττάρου, κάτι που μπορεί να έχει αρνητικές συνέπειες στη βιωσιμότητά του.<sup>12</sup> Πρόσφατα, μία διαφορετική προσέγγιση με ενδοκυττάρια έγχυση τρεχαλόζης οδήγησε σε βελτιωμένη επιβίωση μετά την κρυοσυντήρηση.

Η τρεχαλόζη εξουδετερώνεται άμεσα από το κυτταρόπλασμα και δε φαίνεται να εμποδίζει την ανά-

Ασθενείς	Εμβρυομεταφορές	Ποσοστό επιβίωσης	Κυήσεις	Αποβολές
14	14	100%	6 (42,8%)	1 (16,7%)

πτυξη των κυττάρων.<sup>13,14</sup> Παρά το γεγονός ότι έχουν προταθεί διάφορα πολυμερίδια όπως το πολυβινύλιο, η πολυαιθυλενική γλυκόλη, το φουκόλ, η δεξτρόνη και η πολυβιλική αλκοόλη, το φουκόλ είναι αυτό που χρησιμοποιείται συνήθως σε μείγματα με σουκρόζη και αιθυλενική γλυκόλη.<sup>15,16</sup> Τα τελευταία χρόνια έχουν δημοσιευθεί διάφορες αναφορές για τις θετικές επιδράσεις των αντιψυκτικών πρωτεϊνών, που απομονώνονται από αρκτικά ζώα ή αναλογικά συνθετικά και τα οποία έχουν την ικανότητα να μειώνουν το σχηματισμό κρυστάλλων.<sup>17</sup>

### Κίνδυνος μετάδοσης ασθενειών κατά την υαλοποίηση

Ίσως το σπουδαιότερο επιχείρημα ενάντια στη χρήση της υαλοποίησης είναι η πιθανότητα μετάδοσης ασθενειών μέσω του υγρού αζώτου. Ο κίνδυνος όμως αυτός ουσιαστικά υπάρχει και στη συμβατική μέθοδο κρυοσυντήρησης. Η συλλογή του σπέρματος αλλά και του ωαρίου, καθώς και τα πρωτόκολλα κρυοσυντήρησης δεν γίνονται υπό άσηπτες συνθήκες.<sup>18</sup> Επίσης στην πλειονότητα των εργαστηρίων δεν υπάρχει συστηματικός και συχνός καθαρισμός των δειγμάτων και των συσκευών.

Τεχνικά άλλωστε είναι πολύ δύσκολο. Η μόλυνση μπορεί να συμβεί διαμέσου πόρων του πλαστικού αλλά και λόγω ατελούς σύγκλισης. Άρα οι αποθηκευτικές συσκευές υγρού αζώτου μπορεί να περιέχουν έναν αριθμό από πιθανά παθογόνα μικρόβια και μικροοργανισμούς.

Δεν υπάρχουν μέχρι σήμερα αναφορές μετάδοσης ασθενειών μέσω υγρού αζώτου, σε περιπτώσεις εμβρυομεταφοράς. Ίσως η μήτρα έχει ένα αμυντικό σύστημα που εξουδετερώνει τους λοιμογόνους παράγοντες. Επίσης θα πρέπει να τονισθεί πως οι πρόσφατες μέθοδοι υαλοποίησης παρέχουν υψηλότατο βαθμό αντισηψίας των δειγμάτων, σε σχέση με τις απλές διαδικασίες κρυοσυντήρησης. Σε κάποιες από τις πρόσφατες τεχνικές υαλοποίησης δεν υπάρχει η ανάγκη ούτε για απευθείας επαφή με υγρό άζωτο. Η μέθοδος CryoLoop μπορεί να πραγματοποιηθεί με επιτυχία με κατάψυξη στους ατμούς του υγρού αζώτου<sup>19</sup>, ενώ οι τεχνικές CPS (Closed- Pulled Straw) και Cryotip είναι κλειστά συστήματα και τα δείγματα δεν εκτίθενται στις μεθόδους, που χρησιμοποιούν μετα-

λικές επιφάνειες για κατάψυξη, όπως CMV.

### Τεχνικές υαλοποίησης

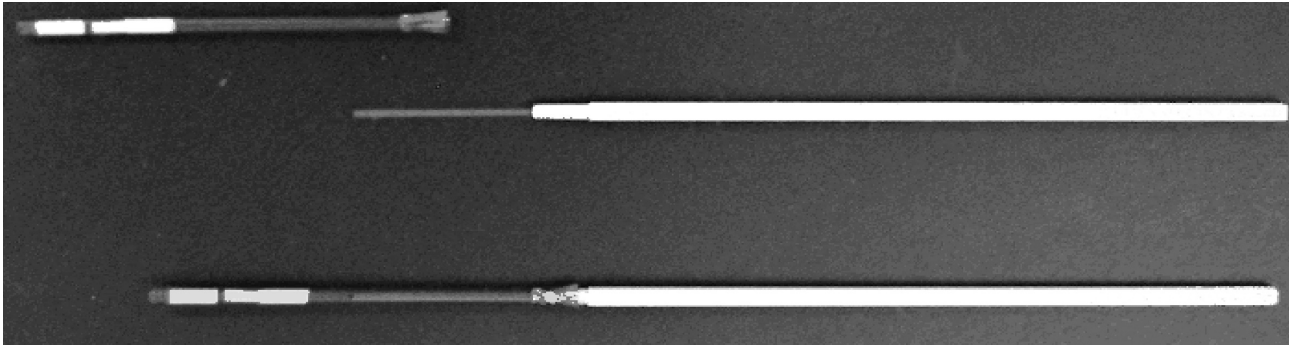
Η πρώτη μέθοδος, που πλήρως χρησιμοποιήθηκε η δυνατότητα της απευθείας επαφής μικρού δείγματος ήταν η χρησιμοποίηση ηλεκτρονικών μικροσκοπικών χάλκινων grids για το δείγμα. Σε αυτή τη μέθοδο το μέγεθος της σταγόνας που περιβάλλει το δείγμα είναι πολύ μικρή. Επίσης το χάλκινο περιτύλιγμα επιταχύνει την κατάψυξη και απόψυξη. Η αποθήκευση μπορεί να γίνει σε μικροφιαλλίδια γεμάτα με υγρό άζωτο.<sup>20,21</sup>

Η μέθοδος OPS (Open-Pulled Straw) αποτελεί μία απλή τεχνική εφαρμογή. Ο στόχος είναι η μείωση του απαιτούμενου όγκου του δείγματος με ελάττωση της διαμέτρου του σωλήνα έγχυσης στο μισό του αρχικού.<sup>22</sup> Έτσι και η απαιτούμενη ποσότητα διαλύματος μειώνεται από 5μl σε λιγότερο από 1μl. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση κατά 10 φορές της ταχύτητας κατάψυξης, επιτυγχάνοντας έτσι μείωση κατά 30% της συγκέντρωσης του κρυοπροστατευτικού, που χρειάζεται για ασφαλή υαλοποίηση.

Η μέθοδος CryoLoop είναι η τρίτη μέθοδος, όπου χρησιμοποιείται η αρχή της απευθείας επαφής για κρυοσυντήρηση ωαρίου ή εμβρύου.<sup>19, 23</sup> Χρησιμοποιείται ειδικό εργαλείο από ένα loop από νάυλον, ελάχιστη ποσότητα διαλύματος και ταχύτητες κατάψυξης έως και 700.000°C/min.

Η Cryotop είναι η πιο πρόσφατη μέθοδος υαλοποίησης. Με την τελευταία, τα ωάρια και έμβρυα τοποθετούνται σε ειδικό φιλμ, που στερεώνεται σε πλαστικό σωλήνα. Το διάλυμα αφαιρείται σχεδόν όλο με αναρρόφηση, ενώ το δείγμα τοποθετείται σε υγρό άζωτο.<sup>24,25</sup> Οι ταχύτητες που επιτυγχάνονται είναι ακόμη μεγαλύτερες. (Εικόνα 1,2)

Μετά την υαλοποίηση ακολουθεί η απόψυξη η οποία πραγματοποιείται κατά τον ίδιο τρόπο με την παραδοσιακή βραδεία απόψυξη. Τα κλειστά συστήματα συνήθως βυθίζονται σε υδατόλουτρο, ενώ τα ανοιχτά καταδύονται απευθείας στο μέσο, ώστε η απόψυξη και η πρώτη αραίωση πραγματοποιούνται ταυτόχρονα. Στα πρωτόκολλα απόψυξης των υαλοποιημένων ωοκυττάρων και εμβρύων, η αραίωση είναι διαδικασία πολλών σταδίων, με μείωση της συγκέντρωσης των οσμωτικών buffers ώστε να αποφευχθεί η διόγκωση των κυττάρων από τα διαπερατά κρυοπροστατευτικά, που φεύγουν



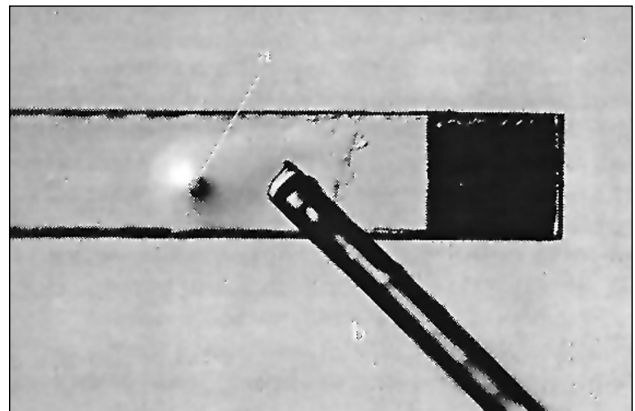
**Εικόνα 1:** Συσκευή Cryotop.

αργά από τα κύτταρα.<sup>26,27</sup>

### **Αποτελέσματα της υαλοποίησης**

Παρά το γεγονός πως 20 χρόνια πριν γεννήθηκε το πρώτο παιδί με κρυοσυντήρηση ωαρίου<sup>28</sup>, μέχρι πρόσφατα η αποτελεσματικότητα της κρυοσυντήρησης παραμένει σχετικά χαμηλή. Υπάρχουν διάφοροι μηχανισμοί που μπορεί να επηρεάσουν αρνητικά τα αποτελέσματα, όπως το μέγεθος των ωοκυττάρων, η μικρή διαπερατότητα στο νερό, η ευαισθησία της διαφανούς ζώνης, καθώς και βλάβες στην άτρακτο και στα μιτοχόνδρια.<sup>11,29</sup> Από την άλλη η οσμωτική επίδραση δε φαίνεται να είναι τόσο σοβαρή, ούτε και έχουν αναφερθεί χρωμοσωμικές βλάβες.<sup>30</sup> Το γεγονός ότι κατά την υαλοποίηση αποφεύγεται η έκθεση του ωαρίου σε μη φυσιολογικές θερμοκρασίες αποτελεί πλεονέκτημα, όσον αφορά την αποφυγή βλαβών της ατράκτου.<sup>31</sup> Πρόσφατα, εντούτοις, έχει επιτευχθεί μία μεγάλη καινοτομία με τη μέθοδο Cryotop. Με τη μέθοδο αυτή το 50% των υαλοποιημένων ωοκυττάρων ωρίμασαν σε βλαστοκύστες, μετά από ενδοκυτταρική έγχυση και από 29 συνολικά εμβρυομεταφορές επιτεύχθηκαν 12 εγκυμοσύνες και 10 γεννήσεις υγιών νεογνών.<sup>24</sup> Η επιτυχία μπορεί να οφείλεται ίσως και στον εξαιρετικά υψηλό ρυθμό κατάψυξης και απόψυξης, που επιτυγχάνεται λόγω του ελάχιστου όγκου του κρυοπροστατευτικού, όπως και λόγω των προσεκτικά επιλεγμένων παραμέτρων, που μειώνουν τα τοξικά και οσμωτικά φαινόμενα.<sup>7, 32</sup> Τα ποσοστά εγκυμοσύνης μετά από εμβρυομεταφορά με βραδεία κρυοσυντήρηση είναι τα δύο τρίτα αυτών που επιτυγχάνονται, μετά από εμβρυομεταφορά μη κατεψυγμένων εμβρύων.<sup>33</sup> Το 2005, δημοσιεύθηκαν τρεις συγκριτικές μελέτες και όλες κατέληξαν ότι η υαλοποίηση είναι καταλληλότερη μέθοδος κρυοσυντήρησης ανθρώπινων εμβρύων, σε

σχέση με τη βραδεία κατάψυξη. Ο Zheng και συνεργάτες<sup>34</sup> συνέκριναν την υαλοποίηση με τρεις διαφορετικές μεθόδους βραδείας κατάψυξης και κατέληξαν ότι τα ποσοστά επιβίωσης ήταν υψηλότερα με την πρώτη. Μία άλλη μελέτη σύγκρινε την υαλοποίηση Cryotop με τη βραδεία κρυοσυντήρηση και παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στον αριθμό κήσεων, μετά από 44 εμβρυομεταφορές (50% έναντι 16.75 αντίστοιχα).<sup>35</sup> Η μεγαλύτερη συγκριτική μελέτη μεταξύ της βραδείας κρυοσυντήρησης και της υαλοποίησης στηρίχθηκε στην κρυοσυντήρηση περισσότερων από 16.000 ανθρώπινων εμβρύων.<sup>25</sup> Η υαλοποίηση Cryotop βρέθηκε να υπερτερεί για την κρυοσυντήρηση εμβρύων στην επιβίωση, διαίρεση των κυττάρων και ανάπτυξη. Επίσης παρατηρήθηκαν αυξημένα ποσοστά επιβίωσης στο στάδιο των 4 κυττάρων και στο στάδιο της βλαστοκύστης των ανθρώπινων εμβρύων με την υαλοποίηση, σε σχέση με την βραδεία κατάψυξη. Φαίνεται λοιπόν πως η υαλοποίηση είναι κάτι παραπάνω από αποτελεσματική, όταν χρησιμοποιείται κάτω



**Εικόνα 2:** Τοποθέτηση ωαρίων-εμβρύων στο Cryotop.

από σωστές συνθήκες.<sup>36</sup>

Εμείς ξεκινήσαμε στις αρχές του 2006 με την υαλοποίηση. Σε 14 ασθενείς αποψύχθηκαν 61 έμβρυα και έγιναν 14 εμβρυομεταφορές. Το ποσοστό επιβίωσης των εμβρύων ήταν 100%. Επίσης η ποιότητά τους δεν διέφερε σημαντικά από αυτή των μη κατεψυγμένων εμβρύων. Επιτεύχθηκαν έξι κηύσεις 42,8%, ποσοστό αρκετά υψηλό. Στο πρώτο τρίμηνο είχαμε μία αποβολή ενώ οι τέσσερις κηύσεις είναι αρκετά προχωρημένες. Στις 29-11-2006 η μία γέννησε στην κλινική μας στην 36η εβδομάδα ένα υγιές κοριτσάκι βάρους 2190gr και η δεύτερη γέννησε στις 22-01-2007 ένα υγιές αγοράκι βάρους 3750gr.

### Συμπέρασμα

Τα τελευταία χρόνια φαίνεται πως υπάρχουν αρκετά ενθαρρυντικά αποτελέσματα από μελέτες όσον αφορά την υαλοποίηση. Όλο και περισσότεροι ερευνητές δείχνουν να εμπιστεύονται και να κατανοούν τα πλεονεκτήματα της μεθόδου, όσον αφορά τη συντήρηση των γαμετών και εμβρύων αλλά και την επιτυχημένη γονιμοποίηση. Ίσως η υαλοποίηση να αποτελέσει τη λύση στα προβλήματα, που αντιμετωπίζονται κατά τη διαδικασία της βραδείας κατάψυξης. Σίγουρα θα πρέπει να αναπτυχθούν διεθνώς περισσότερα πρωτόκολλα, τα οποία να είναι βελτιωμένα, προσεκτικά ελεγμένα και ευρύτερα αποδεκτά.

Ο αριθμός των δικών μας περιστατικών είναι μικρός επειδή πρόκειται για πρόδρομη ανακοίνωση. Ωστόσο το ποσοστό των κλινικών κηύσεων ήταν 42,8%, δηλαδή είναι αρκετά υψηλό και συγκρίσιμο με τα διεθνή πρότυπα. Θα ακολουθήσει στο μέλλον νέα ανακοίνωση με περισσότερα περιστατικά, έτσι ώστε τα στατιστικά στοιχεία να είναι πιο αξιόπιστα.

## Can Vitrification become the solution to the drawbacks of slow freezing of gametes and embryos? Review article

Palapelas V., Petropoulos P., Daniilidis A., Hasani Al. S.\*, Bousiaki E., Paisios N., Karagiannis V.

3rd Obstetric and Gynecologic Clinic, Aristotle University of Thessaloniki  
Department of Obstetrics and Gynecology, Medical University of Lübeck, Germany

Correspondence: Palapelas V, 3rd Department of Obstetrics and Gynecology, Aristotle University of Thessaloniki, Konstantinoupoleos 49-54642 Thessaloniki. Tel.: 2310892120, fax: 2310992950.

### Summary

The widespread practical application of reproductive technologies is facilitated and depends a lot of times on the success rate of cryopreservation of both gametes and embryos. Very often, difficulties and restrictions on the ability to store gametes and embryos have a negative effect on the success rates of in vitro fertilization (IVF). Considerable efforts have been expended in gamete and embryo cryopreservation, both in animal and human field. Nowadays, slow freezing, in spite of its well known limitations, has become highly standardized and available internationally. Programmable freezers are offered with precisely determined parameters and ready made media for freezing. Recently, however, signs of fundamental changes in the philosophy and strategy of freezing of gametes and embryos can be detected. In contrast with the usual current policy, the more recent scientific evidence shows that slow freezing has very little if any future in the field of embryology. This article attempts to summarize the main features of this progress in vitrification and to outline future perspectives.

*Key words:* IVF, ICSI, infertility, slow freezing.

### Βιβλιογραφία

1. Rall WF. Cryopreservation of mammalian embryos, gametes and ovarian tissues. Current issues in progress. In: Wolf DP, Zelinski- Wooten M (eds) Assisted Fertilization and Nuclear Transfer in Mammals. Humana Press, Totowa NJ 173-187 2001.
2. Mazur P. Equilibrium, quasi-equilibrium, and nonequilibrium freezing of mammalian embryos. Cell Biophysics 17: 53-92 1990.
3. Smith GD, Silva CASE. Developmental consequences of cryopreservation of mammalian oocytes and embryos. Reproductive BioMedicine Online 9: 171-178 2004.
4. Feichtinger W, Hochfellner C, Ferstl U. Clinical experience with ultrarapid freezing of embryos. Human Reproduction 6:735-736 1991.
5. Aman RR, Parks JE. Effects of cooling and rewarming of the meiotic spindle and chromosomes of in vitro ma-

- tured bovine oocytes. *Biology of Reproduction* 50:103-110 1994.
6. Leibo SP, Martino A, Kobayashi S, Pollard JW. Stage-dependent sensitivity of oocytes and embryos to low temperatures. *Animal Reproduction Science* 42: 45-53 1996.
  7. Zenzes MT, Bielecki R, Casper RF et al. Effects of chilling to 0o C on the morphology of meiotic spindles in human metaphase II oocytes. *Fertility and Sterility* 75: 769-777 2001.
  8. Rall WF, Meyer TK. Zona fracture damage and its avoidance during the cryopreservation of mammalian embryos. *Theriogenology* 31: 683-692 1989.
  9. Kasai M, Mukaida T. Cryopreservation of animal and human embryos by vitrification. *Reproductive BioMedicine Online* 9:164-170 2004.
  10. dela Pena EC, Takahashi Y, Atabay EC et al. Vitrification of mouse oocytes in ethylene glycol-raffinose solution: effects of preexposure to ethylene glycol or raffinose on oocyte viability. *Cryobiology* 42: 103-111 2001.
  11. Wright DL, Eroglu A, Toner M et al. Use of sugars in cryopreserving human oocytes. *Reproductive BioMedicine Online* 9:179-186 2004.
  12. Kuleshova LL, MacFarlane DR, Trounson AO et al. Sugars exert a major influence on the vitrification properties of ethylene glycol-based solutions and have a low toxicity to embryos and oocytes. *Cryobiology* 38:119-130 1999.
  13. Eroglu A, Toner M, Toth TL. Beneficial effect of microinjected trehalose on the cryosurvival of human oocytes. *Fertility and Sterility* 77: 152-158 2002.
  14. Eroglu A, Elliot G, Wright DL et al. Progressive elimination of microinjected trehalose during mouse embryonic development. *Reproductive BioMedicine Online* 10: 503-510 2005.
  15. Kulesova LL, Shaw JM, Trounson AO. Studies on replacing most of the penetrating cryoprotectant by polymers for embryo cryopreservation. *Cryobiology* 43: 21-31 2001.
  16. Asada M, Ishibashi S, Ikumi S et al. Effect of polyvinyl alcohol (PVA) concentration during vitrification of in vitro matured bovine oocytes. *Theriogenology* 58: 1199-1208 2002.
  17. Wowk B, Leitl E, Rasch CM et al. Vitrification enhancement by synthetic ice blocking agents. *Cryobiology* 40: 228- 236 2000.
  18. Bielanski A, Bergeron H, Lau PCK et al. Microbial contaminating of embryos and semen during long-term banking in liquid nitrogen. *Cryobiology* 46: 146-152 2003.
  19. Larman MG, Sheenan CB, Gardner D. Vitrification of mouse pronuclear oocytes with no direct liquid nitrogen contact. *Reproductive Biomedicine Online* 12:66-69 2006.
  20. Cho HJ, Son WY, Yoon SH et al. An improved protocol for dilution of cryoprotectants from vitrified human blastocysts. *Human Reproduction* 17: 2419- 2422 2002.
  21. Son WY, Lee SY, Chang MJ, Yoon SH, Chian RC, Lim JH. Pregnancy resulting from transfer of repeat vitrified blastocysts produced by in vitro matured oocytes in patient with polycystic ovary syndrome. *Reproductive BioMedicine Online* 10:398-401 2005.
  22. Isachenko V, Selman H, Isachenko E et al. Modified vitrification of human pronuclear oocytes: efficacy and effect on ultrastructure. *Reproductive BioMedicine Online* 7: 211- 216 2003.
  23. Isachenko E, Isachenko V, Katkov IL et al. Vitrification of mammalian spermatozoa in the absence of cryoprotectants: from past partial difficulties to present success. *Reproductive Biomedicine Online* 6: 191-200 2003.
  24. Kuwayama M, Vajta G, Kato O et al. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reproductive BioMedicine Online* 11: 300- 308 2005.
  25. Kuwayama M, Vajta G, Ieda S, Kato O. Vitrification of human embryos using the CryoTip method. *Reproductive BioMedicine Online* 11: 608- 614 2005.
  26. Cuello C, Gili MA, Parrila I et al. In vitro development following one-step dilution of OPS vitrified porcine blastocysts. *Theriogenology* 62:1144- 1152 2004.
  27. Tecirlioglu RT, French AJ, Lewis IM et al. Birth of cloned calf derived from vitrified cloned embryo. *Reproduction, Fertility and Development* 15: 361- 366 2004.
  28. Chen C. Pregnancy after human oocyte cryopreservation. *Lancet* 1: 884- 886 1986.
  29. Stachecki JJ, Munne S, Cohen J et al. Spindle organization after cryopreservation of mouse, human and bovine oocytes. *Reproductive BioMedicine Online* 8: 664-672 2004.
  30. Stachecki JJ, Cohen J. An overview of oocyte cryopreservation. *Reproductive BioMedicine Online* 9: 152-163 2004.
  31. Rienzi L, Martinez F, Ubaldi F et al. PolScope analysis of meiotic spindle changes in living metaphase II human oocytes during the freezing and thawing procedures. *Human Reproduction* 19: 655- 659 2004.
  32. Liebermann, Tucker MJ. Vitrifying and warming of human oocytes, embryos and blastocysts: vitrification procedures as an alternative of conventional cryopreservation. *Methods in Molecular Biology* 254: 345- 364 2004.
  33. Check JH, Choe JK, Nazari A et al. Fresh embryo transfer is more effective than frozen for donor oocyte recipients but not for donors. *Human Reproduction* 16: 1403- 1408 2001.
  34. Zheng WT, Zhuang GL, Zhou CQ et al. Comparison

- of the survival of human biopsied embryos after cryopreservation with four different methods using non-transferable embryos. *Human reproduction* 20: 1615-1618 2005.
35. Stehlik E, Steklik J, Katayama KP et al. Vitrification demonstrates significant improvement versus slow freezing of human blastocysts. *Reproductive BioMedicine Online* 11: 53- 57 2005.
36. Li R, Lai L, Wax D et al. Cryopreservation of porcine embryos derived from somatic cell nuclear transfer. *Reproduction, Fertility and Development* 18: 159 2006.