



Σχολή Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας
Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών
Κατεύθυνση Ιατρικών εργαστηρίων



Εργαστήριο Μοριακής Μικροβιολογίας και Ανοσολογίας Ε.Μ.Μ.Α

Προπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Η συμβολή της κρυοσυντήρησης γαμετοκυττάρων ζωικών προτύπων και της *in vitro* γονιμοποίησης στην εφαρμογή της αρχής των 3R's



Όνομα Φοιτήτριας:

Δήμητρα Τραγάρη 19678310

Επιβλέποντες:

Χρυσάνθη Βογιατζάκη

Επίκουρη Καθηγήτρια

Βιοϊατρικών Επιστημών

Πανεπιστήμιο Δυτική Αττικής

Λέσλυ Πρόμππερτ

Διευθύντρια Ερευνών

Τομέας Ανοσολογίας

Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ

Αθήνα 2024



Faculty of Health and Caring Professions
Department of Biomedical Sciences
Division Medical Laboratories Science



Laboratory of Molecular Microbiology and Immunology
GRADUATE THESIS

The contribution of lab animal gametocyte cryopreservation and in vitro fertilization to the application of the 3Rs principle



Name of student:

Dimitra Tragari 19678310

Supervisors:

Chrysanthi Vogiatzaki

Assistant Professor

Biomedical Sciences

University of West Attica

Lesley Probert

Research Director

Department of Immunology

Hellenic Pasteur Institute

Athens 2024

Μέλη Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής

Χρυσάνθη Βογιατζάκη

Λέσλυ Πρόμπερτ

Δημήτριος Χανιώτης

Δήλωση συγγραφέα προπτυχιακής διπλωματικής εργασίας

Η κάτωθι υπογεγραμμένη Δήμητρα Τραγάρη του Εμμανουήλ, με αριθμό μητρώου 19678310 φοιτήτρια του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών της Σχολής Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, δηλώνω ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της πτυχιακής/διπλωματικής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο του Ιδρύματος και του Εργαστηρίου Διαγονιδιακής Τεχνολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ. Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Υπογραφή φοιτήτριας

Ευχαριστίες

Η παρούσα ερευνητική πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ στο εργαστήριο Διαγονιδιακής Τεχνολογίας.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Επίκουρη Καθηγήτρια του τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής κυρία Βογιατζάκη Χρυσάνθη επιβλέπουσα της παρούσας εργασίας για την ευκαιρία και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθώς και για την στήριξη όλο αυτό το διάστημα.

Επίσης οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στον κύριο Μπαντούνα Φώτιο (Ειδικός Τεχνικός Επιστήμονας του Εργαστηρίου Διαγονιδιακής Τεχνολογίας του ΕΙΠ) για την άψογη συνεργασία και την συνεχή βοήθεια που συνέβαλαν στην πραγματοποίηση και ολοκλήρωση της εργασίας. Επιπλέον ένα μεγάλο ευχαριστώ στο Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ και την Διευθύντρια Ερευνών Lesley Probert που μου έδωσαν την δυνατότητα να μάθω περισσότερες πληροφορίες σχετικά με την διαχείριση και χρήση των ζώων στις πειραματικές διαδικασίες μέσω σεμιναρίων και πιστοποιήσεων καθώς και για το υπέροχο κλίμα καθ' όλη την διάρκεια απασχόλησής μου στο Ινστιτούτο.

Περιεχόμενα

Μέλη Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής.....	i
Δήλωση συγγραφέα προπτυχιακής διπλωματικής εργασίας.....	ii
Ευχαριστίες.....	iii
Περίληψη.....	vii
Abstract.....	viii
Συνομογραφίες.....	ix
Εισαγωγή.....	1
A. Γενικό Μέρος.....	3
1. Η ηθική της χρήσης ζώων εργαστηρίου.....	3
1.1 Ιστορική αναδρομή.....	3
1.1.1 Πειραματισμός σε ζωικά μοντέλα στο παρελθόν.....	3
1.1.2 Η χρήση των ζώων στην σύγχρονη Βιοϊατρική Έρευνα.....	3
1.2 Η αρχή των 3Rs.....	5
1.2.1 Αντικατάσταση-Replacement.....	6
1.2.2 Μείωση-Reduction.....	6
1.2.3 Βελτίωση-Refinement.....	7
1.2.3.1 Εργαστηριακές πρακτικές.....	7
1.2.3.2 Διαβίωση-Εμπλουτισμός.....	8
1.3 Σημεία ασυμβατότητας και ασάφειας των 3 εννοιών.....	8
1.4 Η κρίση επαναληψιμότητας και η αρχή των 3V's.....	10
1.4.1 Εγκυρότητα Σχεδιασμού (Construct Validity).....	10
1.4.2 Εσωτερική Εγκυρότητα (Internal Validity).....	10
1.4.3 Εξωτερική Εγκυρότητα External Validity.....	10
1.5 Ανάλυση Κόστους-Οφέλους (Harm-Benefit Analysis).....	11
1.6 Κατευθυντήριες γραμμές για την χρήση ζώων εργαστηρίου.....	11
1.6.1 Arrive.....	12
1.6.2 Prepare.....	15
2. Αρχές και εφαρμογές κρυοβιολογίας.....	18
2.1 Κρυοβιολογία και Κρυοσυντήρηση.....	18
2.2 Η ανάπτυξη του κλάδου της κρυοβιολογίας.....	18
2.3 Βασικές αρχές Κρυοβιολογίας.....	19
2.4 Διαδικασία κρυοσυντήρησης.....	21

2.5 Κρυοπροστατευτικές Ουσίες (CPAs).....	22
2.5.1 Γλυκερόλη.....	22
2.5.2 DMSO (Dimethyl sulfoxide- Διμεθυλοσουλφοξείδιο).....	22
2.5.3 Πολυμερή.....	23
2.5.4 Πρωτεΐνες (Antifreeze protein AFP).....	23
2.6 Slow freezing και Vitrification.....	24
2.7 Απόψυξη.....	25
2.8 Βλάβες του κυττάρου κατά την κρυοσυντήρηση.....	25
2.9 Εφαρμογές της κρυοσυντήρησης στην διατήρηση διαγονιδιακών σειρών.....	26
3. Στοιχεία ανατομίας γεννητικού συστήματος ποντικίου.....	30
3.1 Από το ωοκύτταρο μέχρι τον σχηματισμό των γονάδων.....	30
3.1.1 Ανάπτυξη ωοθηλακίων.....	30
3.1.2 Γονιμοποίηση.....	31
3.1.3 Ανάπτυξη της βλαστοκύστης.....	32
3.2 Αρχέγονα γεννητικά κύτταρα -PGCs.....	34
3.3 Γεννητικά κύτταρα- GCs.....	36
3.3.1 Απόπτωση.....	37
3.3.2 Απενεργοποίηση του χρωμοσώματος Χ.....	37
3.4 Γεννητικό σύστημα θηλυκού ποντικίου.....	38
3.4.1 Ωοθήκες.....	38
3.4.2 Ωαγωγοί.....	38
3.4.3 Μήτρα.....	38
3.4.4 Κόλπος.....	38
3.5 Γεννητικό σύστημα αρσενικού ποντικού.....	39
3.5.1 Όρχεις.....	39
3.5.2 Επιδιδυμίδα.....	40
3.5.3 Ουρήθρα.....	40
3.5.4 Πέος.....	40
3.5.5 Σπερματικές αποθήκες.....	40
3.5.6 Προστάτης.....	40
3.6 Σπερματογένεση.....	41
3.7 Οιστρικός κύκλος.....	42
3.7.1 Η δράση των ορμονών του οιστρικού κύκλου.....	42

3.7.2 Οι φάσεις του οιστρικού κύκλου.....	42
B. Ειδικό Μέρος.....	44
4. Κρυοσυντήρηση και In vitro γονιμοποίηση γαμετοκυττάρων.....	44
4.1 Σκοπός.....	44
4.2 Υλικά και Μέθοδοι.....	44
4.2.1 Ζωικά μοντέλα.....	44
4.2.2 Παρασκευή αντιδραστηρίων.....	46
4.2.3 Ανασύσταση ορμονών.....	48
4.2.4 Ανάλυση συστατικών.....	49
4.2.5 Συνθήκες καλλιέργειας.....	53
4.2.4 Συλλογή και κρυοσυντήρηση σπέρματος.....	54
4.2.5 In vitro γονιμοποίηση.....	58
4.2.6 Κρυοσυντήρηση εμβρύων.....	62
4.2.7 Αποτελέσματα.....	64
4.2.7.1 Κρυοσυντήρηση σπέρματος.....	64
4.2.7.2 Υπερωορρηξία.....	64
4.2.7.3 Απόψυξη σπέρματος.....	65
4.2.7.4 In vitro γονιμοποίηση.....	65
4.3 Συζήτηση- Συμπεράσματα.....	67
5.8 Αναφορές.....	70
6. Παράρτημα Β.....	77
6.1 Κατάλογος εικόνων.....	77

Περίληψη

Από αρχαιοτάτων χρόνων η χρήση ζώων έχει συνεισφέρει στην επιστήμη ως ένα πολύ χρήσιμο αντικείμενο πειραματισμού. Η επιστήμη των ζώων εργαστηρίου έχει συμβάλει σε πολλές ανακαλύψεις και έχει εφαρμογές σε πολλούς διαφορετικούς κλάδους της επιστήμης. Η ευρεία επιλογή των ποντικών για την διεξαγωγή πειραμάτων οφείλεται στις μεγάλες ομοιότητες που υπάρχουν στο γενετικό υλικό τους με τον άνθρωπο. Το γεγονός αυτό έχει οδηγήσει στη δημιουργία πολλών πειραματικών μοντέλων που προσομοιάζουν ανθρώπινες ασθένειες, και αντιπροσωπεύουν βασικά ερευνητικά εργαλεία στην ανάπτυξη πειραματικών θεραπευτικών προσεγγίσεων. Ωστόσο η χρήση ζώων εργαστηρίου εγείρει εύλογους ηθικούς προβληματισμούς που κυρίως αφορούν την δυσφορία που νιώθουν τα ζώα κατά την διάρκεια των πειραματικών διαδικασιών καθώς και τον τρόπο διαβίωσής τους κάτω από συγκεκριμένες εργαστηριακές συνθήκες. Για αυτό τον λόγο έχουν καθιερωθεί κανόνες και κατευθυντήριες οδηγίες που καλύπτουν όλο το φάσμα του πειραματισμού από την οργάνωση και την διεξαγωγή μέχρι και την δημοσίευση των αποτελεσμάτων. Ένα τυπικό παράδειγμα που συνδυάζει την χρήση ζώων εργαστηρίου με ηθικές εργαστηριακές πρακτικές είναι η κρυοσυντήρηση γαμετοκυττάρων και εμβρύων διαγονιδιακών σειρών ποντικών. Η παραγωγή διαγονιδιακών σειρών αποτέλεσε σταθμό στην πορεία της επιστήμης με εφαρμογές τόσο την μελέτη ασθενειών όσο και στην βιοτεχνολογική εξέλιξη. Η κρυοσυντήρηση μίας διαγονιδιακής σειράς εκτός του πρωταρχικού ρόλου της διατήρησης της επιθυμητής σειράς συνεισφέρει επίσης και στην μείωση του αριθμού των ζώων εντός της εργαστηριακής εγκατάστασης.

Λέξεις κλειδιά

Αρχή 3Rs, Αρχή 3Vs, Harm-Benefit Analysis, Διαχείριση Ζώων Εργαστηρίου, κρυοβιολογία, κρυοσυντήρηση, In vitro γονιμοποίηση, διαγονιδιακά ζώα.

Abstract

Since ancient times animals have contributed in science as very useful experimental models. Laboratory Animal Science has contributed many discoveries and applications in many different fields of science. Animal models of human diseases represent essential research tools for understanding pathogenic mechanisms and for the successful translation of experimental therapies into human patients. However, the use of laboratory animals raises reasonable ethical concerns, mainly about the discomfort they feel during the experimental procedures as well as their way of living under specific laboratory environmental conditions. Laws and guidelines have been established that cover the entire spectrum of experimentation from planning and conducting, to the publication of the results. A typical example that combines the use of laboratory animals under ethical laboratory practice is cryopreservation of both gametocytes and embryos of transgenic mouse strains. The development of transgenic mouse strains has been a milestone in the course of science with applications in both the study of diseases and biotechnological development. Cryopreservation of a transgenic mouse strain in addition to the primary role of maintaining the desired strain also helps to reduce the number of animals required in a laboratory facility.

Key words

3Rs Principle, 3Vs Principle, Harm-Benefit Analysis, laboratory animal management, cryobiology, cryopreservation, In vitro fertilization, transgenic animals.

Συντομογραφίες

UFAW	Universities Federation for Animal Welfare	Πανεπιστημιακή Ομοσπονδία για την Προστασία των Ζώων
3Rs	3 R Principle	Αρχή των 3 Rs
3Vs	3 V Principle	Αρχή των 3 Vs
NC3Rs	National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research	Εθνικό κέντρο Replacement, Refinement and Reduction για την έρευνα με ζώα
NATs	Non- animals technologies	Τεχνολογίες που δεν χρησιμοποιούν ζώα
MRI	Magnetic resonance imaging	Μαγνητική τομογραφία
PET	Positron Emmission Tomography	Τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων
Arrive	Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments	Κατευθυντήρια οδηγία για την σύνταξη της αναφοράς των αποτελεσμάτων
Prepare	Planning Research and Experimental Procedures on Animals: Recommendations for Excellence	Κατευθυντήρια οδηγία για τον σχεδιασμό και διεξαγωγή των πειραμάτων
NORECOPA	Norway's National Consensus Platform for the advancement of "the 3 Rs"	Εθνικό κέντρο εξέλιξης των 3Rs της Νορβηγίας
CPAs	Cryoprotective agents	Κρυοπροστατευτικές ουσίες
AFP	Antifreeze protein	Αντιψυκτική πρωτεΐνη
IVF	In vitro fertilization	In vitro γονιμοποίηση
DNA	Deoxyribonucleic Acid	Δεοξυριβονουκλεϊκό Οξύ
ART	Assisted reproduction techniques	Τεχνικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής
GC	Germ cells	Γεννητικά κύτταρα
ZP1-3	Zona Pellucida Glycoproteins	Γλυκοπρωτεΐνες διαφανούς ζώνης
ICM	Inner cell mass	Εσωτερική κυτταρική μάζα βλαστοκύστης
EPI	Epiblast	Επιβλάστης
PE	Primitive endoderm	Πρωταρχικό ενδόδερμα
PGCs	Primordial Germ Cell	Αρχέγονα γεννητικά κύτταρα
dpc	Days post coitum	Μέρες μετά την γονιμοποίηση
TNAP	Tissue-nonspecific Alkaline Phosphatase	Μη ιστικά ειδική αλκαλική φωσφατάση
TGF-β	Transforming growth factor beta	Μεταμορφωτικός αυξητικός παράγοντα-β
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormone	Εκλυτική ορμόνη των γοναδοτροπινών
FSH	Follicle stimulation hormone	Θυλακιοτρόπος ορμόνη
LH	Luteinizing Hormone	Ωχρινοτρόπος ορμόνη
LDL	Low-density lipoprotein	Λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας
E2	Estradiol	Οιστραδιόλη
DHEA	Dehydroepiandrosterone	Δεϋδροεπιανδροστερόνη
ASD	androstenedione	Ανδροστενεδιόνη

Εισαγωγή

Η βιοϊατρική επιστήμη έχει εξελιχθεί ραγδαία τα τελευταία χρόνια με νέες γνώσεις και δεδομένα να προκύπτουν σε καθημερινή βάση. Η ανάπτυξη της βιοϊατρικής τεχνολογίας έχει συμβάλει σε τεράστιο βαθμό στην ανακάλυψη καινούριων τεχνικών και επιστημονικών μέσων σε κάθε κλάδο, συμπεριλαμβανομένης της Επιστήμης Ζώων Εργαστηρίου. Ιδιαίτερα έπειτα από την δημιουργία των πρώτων διαγονιδιακών ζώων στα τέλη του 20ου αιώνα, η χρήση ζώων εργαστηρίου αυξήθηκε κατακόρυφα καθώς η χρήση τους αποτέλεσε ισχυρό εργαλείο έρευνας του ρόλου συγκεκριμένων γονιδίων σε βιολογικά μονοπάτια και συστήματα. Ο πειραματισμός με διαγονιδιακά ζώα οδήγησε στην κατανόηση βιολογικών αλληλεπιδράσεων και στην ανάπτυξη, στοχευμένων και πιο κοντά στον άνθρωπο, ερευνητικών προσεγγίσεων.

Σύμφωνα με τον ορισμό ως διαγονιδιακό ζώο ορίζεται το ζώο το οποίο έχει υποστεί γονιδιακή τροποποίηση με την εισαγωγή ενός ξένου γονιδίου (Costantini 2001). Η ανάπτυξη της Γενετικής Μηχανικής οδήγησε στην δημιουργία πληθώρας διαγονιδιακών και γενετικά τροποποιημένων ζωικών σειρών με εφαρμογή στην βιοτεχνολογία, στην ανάπτυξη φαρμάκων, στην ιατρική, στην μελέτη ασθενειών και σε πολλούς άλλους τομείς.

Ωστόσο η χρήση ζώων στην έρευνα έχει αποτελέσει ένα μεγάλο αντικείμενο προβληματισμού τόσο στην επιστημονική κοινότητα όσο και στην κοινή γνώμη. Οι προβληματισμοί αυτοί εκδηλώθηκαν από τα πρώτα στάδια της ανάπτυξης του επιστημονικού κλάδου των ζώων εργαστηρίου και αφορούν την ευζωία των ζώων στις εργαστηριακές εγκαταστάσεις καθώς και την δυσφορία που υπόκεινται τα ζώα κατά την διάρκεια των επιστημονικών διαδικασιών. Ο προβληματισμός οξύνεται και από την μερική έλλειψη αναπαραγωγιμότητας αποτελεσμάτων από μελέτες με χρήση ζώων εργαστηρίου που οφείλεται κυρίως σε λάθη κατά τον σχεδιασμό των πειραμάτων αυτών αλλά και στον ελλιπή και ανομοιογενή τρόπο δημοσίευσής τους.

Με σκοπό την επίλυση των παραπάνω προβλημάτων και την διασφάλιση της ευζωίας των ζώων, με την προτροπή των ίδιων των επιστημόνων, έχουν θεσπιστεί νόμοι, κανονισμοί αλλά και κατευθυντήριες οδηγίες. Η τελευταία ενημέρωση του νομικού πλαισίου περιλαμβάνει την Ευρωπαϊκή οδηγία European Directive 2010/63/EU στην οποία αναφέρεται η εφαρμογή της αρχής των 3Rs (replacement, reduction, refinement) κατά τον σχεδιασμό και την διεξαγωγή πειραμάτων με ζώα. Τις δύο πιο γνωστές κατευθυντήριες γραμμές αποτελούν το Arrive και το Prepare. Και οι δύο περιλαμβάνουν οδηγίες που αφορούν τις διαδικασίες που πρέπει να ακολουθηθούν για τον σωστό σχεδιασμό του πειράματος και την διεξαγωγή ποιοτικού ελέγχου για την αποφυγή ή αποκατάσταση αδυναμιών και την ορθή δημοσίευση των δεδομένων μίας έρευνας. Όλα τα στάδια που περιλαμβάνουν τον σχεδιασμό ενός πειράματος με ζώα εργαστηρίου αποτελούν μια ανάλυση κόστους-οφέλους (Harm-Benefit Analysis). Στην Ελλάδα η προστασία των ζώων που χρησιμοποιούνται για επιστημονικούς σκοπούς καθορίζεται μέσω του Προεδρικού Διατάγματος 56/2013.

Μία σημαντική τεχνική που βρίσκει εφαρμογή στην διαχείριση των ζώων εργαστηρίου είναι η κρυοσυντήρηση. Η χρήση της κρυοβιολογίας ξεκινάει από τα αρχαία χρόνια με εφαρμογές στην ιατρική και την διατήρηση της γονιμότητας. Η κρυοσυντήρηση περιλαμβάνει την χρήση κρυογονικών θερμοκρασιών με σκοπό την διατήρηση κυττάρων, ιστών και οργάνων. Στην Επιστήμη των ζώων εργαστηρίου εφαρμόζεται για την διατήρηση διαγονιδιακών σειρών κλινικής σημασίας τόσο για πρακτικούς όσο και για ηθικούς λόγους. Η διαδικασία περιλαμβάνει την συλλογή γαμετοκυττάρων, εμβρύων ή ιστών από αρσενικά ή θηλυκά διαγονιδιακά ποντίκια, την χρήση κρυοπροστατευτικών ουσιών για την αποφυγή ωσμωτικών ή μηχανικών βλαβών και την διατήρηση του βιολογικού υλικού σε κρυογονικές συνθήκες (π.χ. -196°C). Με την κρυοσυντήρηση διατηρούνται τα γενετικά και φαινοτυπικά χαρακτηριστικά της σειράς τα οποία είναι απαραίτητα για τον πειραματισμό, μειώνεται ο αριθμός των ζωντανών ζώων εντός των εγκαταστάσεων (εφαρμογή της αρχής της μείωσης, **reduction**) και προστατεύεται η σειρά από γενετική εκφύλιση, ανθρώπινα σφάλματα εκτροφής και εξωτερικούς παράγοντες ή καταστροφές. Επίσης εξασφαλίζει την εύκολη μεταφορά από το ένα εργαστήριο στο άλλο μειώνοντας με αυτό τον τρόπο τον αριθμό των ζωντανών ζώων που πρέπει να μεταφερθούν (αποφυγή δυσφορίας, ατυχήματος και ανάπτυξη ασθένειας) (εφαρμογή της αρχής της βελτίωσης, **refinement**).

A. Γενικό Μέρος

1. Η ηθική της χρήσης ζώων εργαστηρίου

1.1 Ιστορική αναδρομή

1.1.1 Πειραματισμός σε ζωικά μοντέλα στο παρελθόν

Από αρχαιοτάτων χρόνων τα ζώα είχαν σημαντικό ρόλο στην καθημερινότητα των ανθρώπων. Η εξοικείωση του ανθρώπου με τα ζώα του διασφάλισε την επιβίωσή του με την χρήση τους ως πηγή τροφής, διευκόλυνε άλλες πτυχές της ζωής του όπως την μεταφορά και την άμυνά του, χρησίμευσε στην έκφραση των θρησκευτικών του πιστεύω αλλά και του πρόσφερε μία καινούργια συντροφιά.(Ericsson et al.,2013) Με την πάροδο του χρόνου και με την παράλληλη ανάπτυξη της σκέψης και της επιθυμίας του ανθρώπου να εξηγήσει τον κόσμο γύρω του, τα ζώα γρήγορα χρησιμοποιήθηκαν και σαν πηγή γνώσεων και πειραματισμού. Η κύρια ιδέα ήταν ότι η γνώση που προκύπτει από την μελέτη των ζώων μπορεί να εφαρμοστεί και στον άνθρωπο. Μέσω της παρατήρησης έγινε προσπάθεια ερμηνείας της ανθρώπινης οντογένεσης, ανατομίας και φυσιολογίας με την χρήση των ζώων να γίνεται όλο και πιο συχνή από πολλούς διαφορετικούς λαούς.(Baumans 2005)

Από τις πρώτες χρονολογικά αναφορές χρήσης των ζώων ως πηγή γνώσης αποτελεί η μελέτη του Αλκμαίων του Κροτωνιάτη τον 6^ο αιώνα π.Χ., ο οποίος με την χρήση εγκεφάλων σκύλων απέδειξε ότι ο εγκέφαλος αποτελεί την έδρα της νοημοσύνης. Δύο αιώνες αργότερα ο Αριστοτέλης μελέτησε την οντογένεση και την εμβρυογένεση χρησιμοποιώντας όρνιθες ενώ ο Ερασίστρατος τον 3^ο αιώνα π.Χ. εξετάζοντας το κυκλοφορικό σύστημα ζωντανών ζώων παρατήρησε ότι η καρδιά λειτουργεί ως αντλία. Προσπάθειες περιγραφής της ανθρώπινης ανατομίας και φυσιολογίας έγιναν και από τον Γαληνό της Περγάμου τον 2^ο αιώνα μ.Χ. ο οποίος μελέτησε εκτενώς το καρδιαγγειακό σύστημα και την νευροανατομία με την χρήση ζωικών μοντέλων όπως χοίρους, μαϊμούδες και σκύλους προσφέροντας την βάση της ιατρικής πρακτικής για τους επόμενους αιώνες. (Ericsson et al.,2013)

1.1.2 Η χρήση των ζώων στην σύγχρονη Βιοϊατρική Έρευνα

Με την εμφάνιση της Καρτεσιανής φιλοσοφίας τον 17^ο αιώνα ο πειραματισμός σε ζώα άρχισε να υπόκειται σε ηθική αξιολόγηση. Η άποψη του φιλοσόφου Ρενέ Ντεκάρτ (1596-1650) ότι τα ζώα δεν είναι ικανά να βιώσουν πόνο λόγω έλλειψης επίγνωσης και λογικής, δικαιολογώντας την χρήση τους ως ασυναίσθητες μηχανές, βρήκε αντίθετο τον φιλόσοφο Τζέρεμι Μπένθαμ (1789) ο οποίος δήλωσε ότι : 'The question is not, Can they reason? nor, Can they talk? but Can they suffer?'.(Baumans 2005)

Κατά την διάρκεια του 19^{ου} αιώνα η ηθική της χρήσης των ζώων ως πειραματικά μοντέλα άρχισε να εμφανίζεται όλο και περισσότερο στην ερευνητική βιβλιογραφία. Ο Marshal Hall (1831 και 1847), φυσιολόγος της

εποχής, είναι από τους πρώτους που πρότεινε 5 αρχές με τις οποίες μπορεί να πραγματοποιηθεί ηθική αξιολόγηση αναφέροντας ότι :

- Δεν πρέπει να επιλέγεται η διεξαγωγή πειράματος όταν το αποτέλεσμα μπορεί να προκύψει μόνο με την παρατήρηση
- Δεν πρέπει να πραγματοποιηθεί πείραμα χωρίς κάποιο συγκεκριμένο σκοπό και αναμενόμενο αποτέλεσμα το οποίο μπορεί να επιτευχθεί από τις επιλεγόμενες διαδικασίες
- Δεν πρέπει να επαναλαμβάνονται τα πειράματα που έχουν πραγματοποιηθεί
- Οι διαδικασίες που πραγματοποιούνται θα πρέπει να γίνονται με τον λιγότερο δυνατό πόνο και ταλαιπωρία
- Το πείραμα θα πρέπει να γίνεται κάτω από συγκεκριμένες ελεγχόμενες συνθήκες οι οποίες θα αποτρέπουν την ανάγκη επανάληψής του

Η άποψη ότι η χρήση των ζώων πρέπει να αποφευχθεί, μία άποψη που θα επικρατήσει ως αντικατάσταση των ζώων από εναλλακτικές μεθόδους μεταγενέστερα, πρωτοεμφανίστηκε σε άρθρο σε επιστημονικό περιοδικό της εποχής 'London Medical Gazette' το 1839. Αργότερα το 1871 αναπτύχθηκαν αρχές που αποσκοπούσαν στην μείωση της βλάβης κατά την διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας με την ανάπτυξη της αναλγησίας και την διεξαγωγή των πειραμάτων από πεπειραμένο προσωπικό υπό κατάλληλους κανονισμούς. (Hubrecht and Carter, 2019) Από τα πρώτα νομοθετικά πλαίσια που θεσπίστηκαν για την διαχείριση των ζώων εργαστηρίου ήταν το 'Cruelty to Animals Act' του Ηνωμένου Βασιλείου το 1876 με το οποίο αναγνωρίστηκε στα ζώα η ικανότητα να υποφέρουν. (Richmond 2000)

Το 1926 ιδρύθηκε από τον Charles Hume ο οργανισμός UFAW (Universities Federation for Animal Welfare) του οποίου κύριος σκοπός ήταν -και εξακολουθεί να είναι -η ενημέρωση για την ευημερία των ζώων βασιζόμενος τόσο στην εκτροφή όσο και στη χρήση τους ως πειραματικά μοντέλα. Υπό την αιγίδα του συγκεκριμένου οργανισμού δημοσιεύτηκε και το πρώτο στο είδος του εγχειρίδιο με τίτλο 'The Care and Management of Laboratory Animals' το 1947. Σκοπός του εγχειριδίου ήταν η ευζωία των ζώων εργαστηρίου με την βελτίωση της φροντίδας και της υγείας τους αυξάνοντας παράλληλα την αξιοπιστία των πληροφοριών που λαμβάνονται από τον πειραματισμό. Ο Hume πρωτοστάτησε επίσης και στον έλεγχο των πειραμάτων σε ζώα περιορίζοντας πειραματικές πρακτικές που προκαλούσαν υπερβολικό πόνο και ταλαιπωρία με την θέσπιση κανόνων εστιάζοντας την προσοχή στο είδος του πόνου και στην ηθική αξιολόγηση. Πρότεινε την κατηγοριοποίηση των πειραμάτων με βάση τον βαθμό της σοβαρότητάς της βλάβης και προώθησε τις πρακτικές της αναισθησίας και της ευθανασίας για την επίτευξη ενός πιο αποτελεσματικού και ανθρώπινου πειραματικού σχεδιασμού.

Το 1954 ο UFAW απευθύνθηκε στους William Russell (ζωολόγος) και Rex Burch (μικροβιολόγος) με σκοπό να ερευνήσουν την πρόοδο της ένταξης πιο ανθρώπινων μεθόδων στην βιοϊατρική έρευνα. Έτσι το 1959 δημοσίευσαν το βιβλίο τους 'The Principles of Humane Experimental Technique' όπου για πρώτη

φορά αναφέρονται ξεκάθαρα οι τρεις αρχές που διέπουν την ηθική χρήση των ζώων στον πειραματισμό. Η χρήση των όρων ‘ανθρώπινες’ και ‘μη ανθρώπινες’, που χρησιμοποίησαν στο βιβλίο τους, απευθύνονται σε εργαστηριακές πρακτικές που μπορεί να χρησιμοποιηθούν στα ζώα κατά την διάρκεια του πειράματος και δεν αντικατοπτρίζουν τις συμπεριφορές ή τις προθέσεις των ατόμων που τα χειρίζονται. Ιδιαίτερη σημασία δόθηκε στο γεγονός ότι κάποια περισσότερο εξελιγμένα ζώα έχουν την δυνατότητα της συνείδησης. Το συγκεκριμένο χαρακτηριστικό επηρεάζει αρκετά βιολογικά συστήματα κάτω από συνθήκες στρες επηρεάζοντας τα αποτελέσματα που λαμβάνονται. Στο ίδιο βιβλίο προτάθηκε ένας τρόπος μέτρησης και βαθμολόγησης της βλάβης που μπορεί να γίνει στα ζώα και επίσης για πρώτη φορά γίνεται αναφορά στις έννοιες ‘**replacement**’, ‘**reduction**’ και ‘**refinement**’ (αντικατάσταση, μείωση, βελτίωση) των οποίων η σημασία επεξηγήθηκε με παραδείγματα. Κύριος σκοπός του έργου των William Russell και Rex Burch ήταν η ευρεία έκκληση για αλλαγή.

Το βιβλίο παρά τις πρωτοποριακές ιδέες που προώθησε για την εποχή έθεσε τα θεμέλια για την μεταγενέστερη νομοθεσία. Τον Νοέμβριο του 1986 η Ευρωπαϊκή Κοινότητα θέσπισε οδηγία (European Directive 86/609/EEC) στην οποία δεν αναφέρεται ευθέως στην εφαρμογή των 3R’s όμως απαιτεί από τα μέλη της να εφαρμόσουν εθνική νομοθεσία στην οποία περιλαμβάνονται πολλά από τα στοιχεία της αρχής. Κατά την διάρκεια των επόμενων δεκαετιών η επιστημονική κοινότητα άρχισε να αναζητά και εναλλακτικά μοντέλα πειραματισμού ενώ το 2010 η Ευρωπαϊκή οδηγία του 1986 ανανεώθηκε (European Directive 2010/63/EU) και τέθηκε σε πλήρη ισχύ το 2013. Το καινούριο πλαίσιο αναφέρει ξεκάθαρα την αρχή των 3R’s και επισημαίνει την χρήση εναλλακτικών μεθόδων, την ανάλυση κόστους-οφέλους (harm-benefit analysis) και ηθικές αναθεωρήσεις. (Hubrecht and Carter, 2019)

1.2 Η αρχή των 3Rs

Το έργο των William Russell και Rex Burch βασίστηκε στον ηθικό σκοπό που είχε τεθεί από τον UFAW για την προώθηση μιας πιο ανθρώπινης συμπεριφοράς απέναντι στα ζώα καθώς και στην μείωση του πόνου και φόβου που προκαλούνται σε αυτά από τον άνθρωπο κατά τον πειραματισμό. Για τον σκοπό αυτό στο βιβλίο τους ‘The Principles of Humane Experimental Technique’ (Russell and Burch, 1959) οι δύο επιστήμονες χρησιμοποιούν τους όρους Humane και Inhumane για να περιγράψουν τις διαδικασίες που χρησιμοποιούνται στα ζώα εργαστηρίου χωρίς οι δύο αυτές έννοιες να αντανakλούν τις συμπεριφορές ή τις προθέσεις των χειριστών όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα. Οι τρεις έννοιες που ανέπτυξαν (reduction, replacement, refinement) έχουν ως σκοπό την επίτευξη του humanity με την παράλληλη μείωση ή αν είναι δυνατόν και την εξάλειψη του inhumanity. Με την έννοια του inhumanity στην πραγματικότητα περιγράφεται η έννοια της δυσφορίας (distress) κάτω από την οποία συμπεριλαμβάνονται ο πόνος, ο φόβος, η ταλαιπωρία και οποιαδήποτε άλλο δυσάρεστο ψυχικό ή σωματικό συναίσθημα που θα μπορούσαν να βιώσουν τα ζώα. Είναι σημαντικό να γίνει αντιληπτή η κάθε έννοια της αρχής των 3Rs σε συνδυασμό με την ανάγκη για μείωση της δυσφορίας των ζώων και όχι για απώτερους σκοπούς που αφορούν

οικονομικούς παράγοντες που μπορεί να διέπουν το πείραμα ή λόγους ευκολίας κατά την διάρκεια της εργασίας του ερευνητή.(Tannenbaum and Bennett, 2015)

1.2.1 Αντικατάσταση-Replacement

Στο βιβλίο τους οι Russell και Burch ορίζουν την έννοια replacement ως μέθοδο αντικατάστασης των ενσυνείδητων σπονδυλωτών ζώων από οργανισμούς στους οποίους δεν είναι αναπτυγμένο το νευρικό και αισθητηριακό σύστημα, όπως είναι τα φυτά και μικροοργανισμοί όπως τα μετάζωα ή τα ενδοπαράσιτα. (Russell and Burch, 1959). Στον συγκεκριμένο ορισμό γίνεται αντιληπτό ότι η έννοια replacement δεν περιλαμβάνει την αντικατάσταση των ζώων από εναλλακτικές μεθόδους στις οποίες δεν χρησιμοποιείται κάποιος ζωντανός οργανισμός αλλά δίνεται έμφαση στην ύπαρξη ή όχι συνείδησης στον οργανισμό που χρησιμοποιείται. Αυτό συμβαίνει διότι η ανάπτυξη της έννοιας replacement πραγματοποιήθηκε με σκοπό την μείωση της δυσφορίας που υπόκειται το ζώο κατά την διάρκεια της πειραματικής πρακτικής. Έτσι φαίνεται ότι οι Russell και Burch δεν αποκλείουν την χρήση εναλλακτικών μεθόδων που θα αντικαταστήσουν τα ζώα αλλά θεωρούν την απόλυτη αντικατάσταση, κατά την οποία δεν θα χρειαστεί κάποιο ζώο να βιώσει δυσφορία, ως ιδανική. Με άλλα λόγια ο πρωταρχικός στόχος της αντικατάστασης είναι η μείωση της δυσφορίας και όχι η εξάλειψη της χρήσης των ζώων στην έρευνα.(Tannenbaum and Bennett, 2015). Αξίζει να σημειωθεί ότι η ανάπτυξη της τεχνολογίας τα τελευταία έτη έχει προσφέρει νέους τρόπους πειραματισμού που δεν ήταν διαθέσιμοι την εποχή που ανέπτυξαν τη θεωρία των 3R's.

Σύμφωνα με νεότερους ορισμούς η έννοια replacement ορίζεται ως η αποφυγή ή η αντικατάσταση των ζώων εργαστηρίου σε εργαστηριακές πρακτικές καθώς και η ανάπτυξη και χρήση εναλλακτικών μοντέλων και εργαλείων βασισμένα σε νέες τεχνολογίες για την μελέτη του επιστημονικού ερωτήματος. Το NC3R's το χωρίζει σε δύο υποκατηγορίες:

- Την πλήρη αντικατάσταση: περιλαμβάνει μεθόδους που δεν είναι απαραίτητη η χρήση των ζώων στην έρευνα και στις δοκιμές. Οι μέθοδοι αυτοί μπορεί να περιέχουν την χρήση ιστών ή κυτταροκαλλιεργειών, μαθηματικών προγραμμάτων και υπολογιστικών μοντέλων γνωστά ως NATs (non-animals technologies).
- Την μερική αντικατάσταση: περιλαμβάνει την χρήση οργανισμών οι οποίοι υποστηρίζεται ότι δεν είναι ικανοί να βιώσουν δυσφορία. Τέτοιοι οργανισμοί είναι η *Drosophila*, νηματοειδείς σκώληκες, πρωτόζωα και ανώριμες μορφές σπονδυλωτών. Κάτω από την ίδια κατηγορία συμπεριλαμβάνονται και κύτταρα ή ιστοί που έχουν συλλεχθεί από ζώα που θυσιάστηκαν για αυτό τον σκοπό (χωρίς να έχουν υποστεί διαδικασίες οι οποίες θα μπορούσαν να τους προκαλέσουν δυσφορία).

1.2.2 Μείωση-Reduction

Ο ορισμός της λέξης reduction στην αρχή των 3R's είναι: η μείωση του αριθμού των ζώων που χρησιμοποιούνται κατά τον πειραματισμό σε τέτοιο

βαθμό ώστε να μπορεί να επιτευχθεί ο σκοπός του πειράματος και να προκύψουν επαρκή στατιστικά αποτελέσματα. Σύμφωνα με τον πιο πρόσφατο ορισμό από το NC3R's (National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research) η έννοια reduction περιλαμβάνει επίσης μεθόδους που μπορούν να αποφέρουν περισσότερες πληροφορίες από ένα μεμονωμένο ζώο (χωρίς αυτό να σημαίνει την αύξηση του πόνου και της κακουχίας) μειώνοντας με αυτό τον τρόπο τον αριθμό των ζώων που μπορεί να χρησιμοποιηθούν σε άλλα πειράματα. (NC3R's)

Ο σκοπός της μείωσης όπως αποδεικνύεται από τον ορισμό δεν είναι ακριβώς η ελάττωση στο ελάχιστο ή και απολύτως του αριθμού των ζώων που χρησιμοποιούνται αλλά η χρήση κατάλληλου αριθμού ζώων που να μπορούν να παράγουν ένα στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα. Η μείωση στο ελάχιστο των ζώων κατά τον πειραματισμό έχει αρνητικά αποτελέσματα τόσο στην παραγόμενη πληροφορία όσο και στα ίδια τα ζώα. Εκτός του γεγονότος ότι η πληροφορία που λαμβάνεται κρίνεται ελλιπής ή μη έγκυρη στατιστικά, υπάρχει περίπτωση λιγότερα ζώα να υποστούν περισσότερο πόνο ή δυσφορία. Μεγάλη σημασία σε αυτό το σημείο, καθώς και στις υπόλοιπες έννοιες της αρχής, έχει ο σωστός σχεδιασμός του πειράματος με τον οποίο μπορούν να αποφευχθούν τέτοιου είδους προβλήματα. (Tannenbaum and Bennett, 2015)

1.2.3 Βελτίωση-Refinement

Ως βελτίωση (refinement) ορίζεται η ελαχιστοποίηση του πόνου, του στρες ή μόνιμων βλαβών που μπορεί να βιώσουν τα εργαστηριακά ζώα καθώς και η βελτίωση της διαβίωσής τους η οποία έχει μεγάλο αντίκτυπο στα επιστημονικά αποτελέσματα. (NC3R's) Με την εφαρμογή πρακτικών που προωθούν την έννοια refinement επιτυγχάνεται η διασφάλιση της υγιούς βιολογικής λειτουργίας και συμπεριφοράς του ζώου σε σχέση με χειρισμούς αλλά και διαβίωσής του με τα υπόλοιπα ζώα που συναναστρέφεται. Τέτοιου είδους πρακτικές περιλαμβάνουν την μείωση της επεμβατικότητας των εργαστηριακών πρακτικών καθώς και του πόνου που εκείνες προκαλούν, την βελτίωση της στέγασης αλλά και της εκτροφής. Η προσέγγιση της λέξης refinement οφείλει να γίνεται δίνοντας ιδιαίτερη έμφαση στις διαφορές των ειδών ή ακόμη και των σειρών που χρησιμοποιούνται κατά τον πειραματισμό προσαρμόζοντας τις μεθόδους και τις τεχνικές στην κάθε περίπτωση.

1.2.3.1 Εργαστηριακές πρακτικές

Μία από τις πρώτες προσεγγίσεις των τεχνικών refinement θα μπορούσε να είναι μία πολύ απλή πρακτική όπως ο τρόπος χειρισμού του ζώου από τον επιστήμονα. Με την αποφυγή ακινητοποίησης και μεταφοράς του ζώου με τον παραδοσιακό τρόπο του πιασίματος της ουράς και με την ενθάρρυνσή του να πλησιάσει οικειοθελώς ή να εισχωρήσει σε κάποιο μέσο μεταφοράς ενισχύεται η εμπιστοσύνη και η άνεση μεταξύ ζώου και χειριστή αλλά παράλληλα μειώνεται το στρες και η αγωνία του ζώου. Άλλες πρακτικές που περιλαμβάνουν την ευθανασία του ζώου για την ανάλυση των αποτελεσμάτων μπορούν να αποφευχθούν με την χρήση απεικονιστικών μεθόδων, όπως MRI, PET/CT, U/S υπερηχογράφημα και άλλες. Με αυτό τον τρόπο μετατοπίζοντας χρονικά ή εξαλείφοντας το τελικό σημείο ευθανασίας το κάθε ζώο μπορεί να

χρησιμοποιηθεί για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα χωρίς να υπόκειται σε διαδικασίες που προκαλούν δυσφορία, ενώ ταυτόχρονα μειώνεται και ο απαιτούμενος αριθμός ζώων για την ολοκλήρωση του πειράματος.

Είναι πολύ σημαντικό επίσης να αναφερθεί και η σημασία της διασφάλισης της υγείας του ζώου τόσο κατά την διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας όσο και μετέπειτα. Διάφορα φάρμακα όπως αναλγητικά και αναισθητικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την μείωση ή ανακούφιση του πόνου ακόμη και η ευθανασία αν το επίπεδο της βλάβης κρίνεται βαριάς δριμύτητας (end point). Ο χειριστής θα πρέπει να είναι επαρκώς εκπαιδευμένος ώστε να είναι σε θέση να αντιληφθεί και να αναγνωρίσει τα μη βάνουσα καταληκτικά σημεία (humane endpoints) (κλινικά, συμπεριφορικά, παθοφυσιολογικά, βιοχημικά) και να προχωρά σε ενέργειες εξάλειψης ή ελαχιστοποίησής τους.

1.2.3.2 Διαβίωση-Εμπλουτισμός

Τα ζώα αποτελούν κοινωνικές μορφές ζωής. Σε περιπτώσεις απομόνωσης τους για μεγάλο χρονικό διάστημα υποβαθμίζεται η ποιότητα ζωής τους και μπορεί να αναπτύξουν μη φυσιολογικές συμπεριφορές. Είναι σημαντικό λοιπόν κατά την στέγαση να τοποθετούνται παραπάνω του ενός ζώα μαζί. Εξίσου υψίστης σημασίας είναι και ο εμπλουτισμός του χώρου στέγασης με αντικείμενα απασχόλησης, μέσα απομόνωσης και κρυψίματος καθώς και άλλα υλικά που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν από τα ζώα (όπως βαμβάκι για την κατασκευή φωλιάς). Η τροφή που παρέχεται θα πρέπει να προσφέρει τα κατάλληλα στοιχεία για την σωστή ανάπτυξη του ζώου ενώ παράλληλα είναι αναγκαία η συχνή αξιολόγηση της υγείας του με την βοήθεια ειδικού προσωπικού.

Η υιοθέτηση πρακτικών που ενισχύουν την ευζωία των ζώων εργαστηρίου και η εφαρμογή τους με βάση τις ανάγκες του κάθε είδους ή της κάθε σειράς έχει τεράστια οφέλη επηρεάζοντας θετικά συμπεριφορικές, ψυχολογικές και σωματικές μεταβλητές οι οποίες μπορούν να επιδράσουν στο αποτέλεσμα του πειράματος. (Sneddon, Halsey, and Bury 2017)

1.3 Σημεία ασυμβατότητας και ασάφειας των 3 εννοιών

Στην ανάλυση των αρχών των 3R's και την ηθική χρήση ζώων εργαστηρίου γίνεται αναφορά στην ύπαρξη ενδοενοσιολογικών συγκρούσεων μεταξύ των τριών εννοιών που παραθέτει η αρχή και σημείων όπου υπάρχουν αμφιλεγόμενα ηθικά ζητήματα που επηρεάζουν την εφαρμογή της. Οι παρανοήσεις και οι συγκρούσεις συμβαίνουν κυρίως λόγω της διαφορετικής ηθικής προσέγγισης και ερμηνείας της αρχής από την επιστημονική κοινότητα αλλά και από κακό σχεδιασμό της πειραματικής διαδικασίας.

Η έννοια replacement καθώς και οι δύο κατηγορίες στις οποίες χωρίζεται εγείρουν ηθικές ανησυχίες που αφορούν κυρίως τον τρόπο με τον οποίο υπολογίζεται το επίπεδο συνείδησης του ζώου που χρησιμοποιείται αλλά επίσης και στην σημασία που έχει η χρήση ζώων εργαστηρίου στην προώθηση της βιοϊατρικής έρευνας.

Ο ορισμός της λέξης replacement ήταν ο πρώτος που αναλύθηκε στο βιβλίο των Russell και Burch προβάλλοντας την μεγάλη σημασία του στην επίτευξη της ευζωίας των ζώων. Ωστόσο στην επιστημονική κοινότητα έχουν δημιουργηθεί δύο πόλοι σκέψης. Πολλοί επιστήμονες υποστηρίζουν την αντικατάσταση των ζώων με εναλλακτικές μεθόδους επικαλούμενοι την ανάπτυξη της τεχνολογίας ενώ ένα εξίσου μεγάλο ποσοστό θεωρεί την χρήση των ζώων αναπόσπαστο κομμάτι της έρευνας επισημαίνοντας την δυσκολία αντικατάστασής τους. Σύμφωνα με την πρώτη άποψη γίνεται αντιληπτό ότι από την στιγμή που δεν χρειάζεται να χρησιμοποιηθούν ζώα για την διεξαγωγή των πειραμάτων δεν κρίνεται παράλληλα αναγκαία η ανάπτυξη και των υπολοίπων R's, εφόσον δεν υπάρχει κάποιο ζώο που υπόκειται δυσφορία και με αυτό τον τρόπο η αρχή χάνει την ισχύ της. Η άλλη άποψη με την υποστήριξη της χρήσης των ζώων προωθεί την ανάγκη για ανάπτυξη των υπολοίπων R's.

Ηθικό πρόβλημα προκύπτει ακόμη και στην επιλογή του είδους του ζώου που θα χρησιμοποιηθεί εφόσον γίνεται χρήση της μερικής αντικατάστασης. Σύμφωνα με τον ορισμό της μερικής αντικατάστασης, που παρατίθεται ανωτέρω, είναι δυνατή η επιλογή ενός κατώτερου συνειδησιακά ζώου κάτι το οποίο θα μπορέσει να αποκλείσει την πρόκληση υπερβολικής δυσφορίας προωθώντας έτσι τόσο την έννοια replacement όσο και την έννοια refinement. Όμως κάτι τέτοιο προϋποθέτει την ύπαρξη ενός τρόπου υπολογισμού της δυνατότητας ενός ζώου να βιώνει πόνο, στρες ή δυσφορία. Παρ' όλες τις προσπάθειες που έχουν πραγματοποιηθεί γι' αυτόν το σκοπό τα αποτελέσματα είναι αμφιλεγόμενα. Έτσι στην εφαρμογή πρακτικών replacement το επίπεδο της συνείδησης είναι σημαντικό αν η προσέγγιση γίνει από αναπτυξιακής άποψης ενώ αν δοθεί περισσότερο σημασία στην ευζωία των ζώων ο συγκεκριμένος παράγοντας δεν έχει βαρύτητα.(Olsson et al., 2012)

Σχετικά με τον όρο reduction ο νέος ορισμός από το NC3R's επικεντρώνεται περισσότερο στην ανάπτυξη μεθόδων που μεγιστοποιούν το ποσό των πληροφοριών που συλλέγονται από κάθε ζώο. Η συγκεκριμένη προέκταση του ορισμού φαίνεται ιδιαίτερα βοηθητική καθώς αυξάνει το όφελος με την συγκέντρωση περισσότερων δεδομένων μειώνοντας παράλληλα τον αριθμό των ζώων που χρησιμοποιούνται σε άλλα πειράματα. Παρά τα θετικά αποτελέσματα που προσφέρει η συγκεκριμένη προσθήκη γίνονται αντιληπτά μερικά σημεία ασυμβατότητας τα οποία αφορούν την συνάφεια μεταξύ reduction και refinement. Το ηθικό ζήτημα που προκύπτει είναι ότι η επαναχρησιμοποίηση (reuse) των ζώων σε νέα πειράματα δεν μπορεί να εξασφαλίσει απαραίτητα την αποφυγή πρόκλησης επιπλέον πόνου που μπορεί να προέρχεται από επανειλημμένες ή πολλαπλές διαδικασίες κατά τον πειραματισμό κάτι το οποίο προσπαθούν να αποκλείσουν οι πρακτικές refinement. (Eggel and Würbel 2021) Από την άλλη πλευρά αποτελεί εξίσου ηθικό ζήτημα το αν θεωρείται σωστή η χρήση περισσότερων ζώων εφόσον έχουν εφαρμοστεί πρακτικές refinement. Κριτήριο στην προκειμένη αποτελεί αν η προτεραιότητα θα δοθεί στον αριθμό των ζώων που θα χρησιμοποιηθούν ή σε κάθε ζώο μεμονωμένα.(Olsson et al., 2012)

1.4 Η κρίση επαναληψιμότητας και η αρχή των 3V's

Η εφαρμογή των 3R's είναι υψίστης σημασίας για την διεξαγωγή μιας έρευνας με χρήση ζώων εργαστηρίου. Ωστόσο δεν είναι επαρκής διότι αν η έρευνα δεν παράγει έγκυρα και αναπαραγώγιμα αποτελέσματα, τα ζώα θα έχουν σπαταληθεί ανεξάρτητα από το ποσό της δυσφορίας που θα έχουν βιώσει. Η αναφερόμενη ως 'κρίση επαναληψιμότητας' που επικρατεί στην επιστημονική κοινότητα φαίνεται να είναι αποτέλεσμα λαθών και σφαλμάτων κατά τον σχεδιασμό, την διεξαγωγή, την ανάλυση και αναφορά του πειράματος. Η αρχή των 3V's έρχεται να συμπληρώσει τις προϋποθέσεις για τον σωστό σχεδιασμό της πειραματικής διαδικασίας με τις έννοιες εγκυρότητα σχεδιασμού (construct validity), εσωτερική εγκυρότητα (internal validity) και εξωτερική εγκυρότητα (external validity) με τις οποίες γίνεται μία προσπάθεια μείωσης της αβεβαιότητας και αύξησης της εγκυρότητας των δεδομένων του πειραματισμού.

1.4.1 Εγκυρότητα Σχεδιασμού (Construct Validity)

Η έννοια construct validity αναφέρεται στην αξιολόγηση του επιπέδου της συμφωνίας μεταξύ του ζωικού μοντέλου που επιλέγεται και του αναμενόμενου αποτελέσματος καθώς και στην ποιότητά του. Αποτελεί μια θεωρητική συσχέτιση μεταξύ των μηχανισμών που οδηγούν στην ανάπτυξη ενός φαινοτύπου στα ζωικά πρότυπα και στους αντίστοιχους αιτιολογικούς παράγοντες ανάπτυξης μιας νόσου ή ενός φαινοτύπου στον άνθρωπο. Η προσέγγιση της έννοιας construct validity δεν μπορεί να γίνει με κάποιο μαθηματικό τρόπο οπότε αποτελεί εντελώς θέμα της κρίσης του επιστήμονα.

1.4.2 Εσωτερική Εγκυρότητα (Internal Validity)

Με την εσωτερική εγκυρότητα γίνεται η αξιολόγηση της εγκυρότητας των παραγόμενων αποτελεσμάτων. Πραγματοποιείται με διαδικασίες όπως τη χρήση ομάδων ελέγχου (control groups), τον εκ των προτέρων προσδιορισμό των μεταβλητών και τη στατιστική ανάλυσή τους, τον προσδιορισμό του απαραίτητου αριθμού ζώων, την τυχαία επιλογή του δείγματος και την χρήση τεχνικών που μειώνουν την εμφάνιση σφαλμάτων. Όπως και η έννοια construct validity έτσι και η έννοια internal validity τίθεται στην κρίση του επιστήμονα.

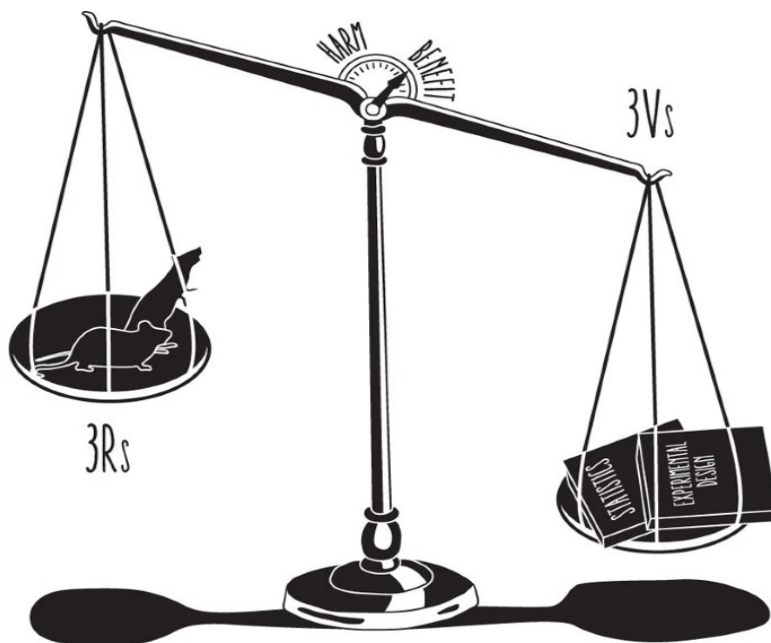
1.4.3 Εξωτερική Εγκυρότητα External Validity

Η εξωτερική εγκυρότητα (external validity) αφορά τον βαθμό στον οποίο τα αποτελέσματα της έρευνας γίνεται να χρησιμοποιηθούν και σε άλλα πειράματα, σε διαφορετικές συνθήκες και παραμέτρους ή ακόμη και σε διαφορετικό είδος οργανισμού (όπως στον άνθρωπο). Αναφέρεται δηλαδή στην γενίκευση του αποτελέσματος. Απαραίτητες προϋποθέσεις για την επίτευξη της ανάλυσης external validity είναι η ποικιλία των συνθηκών κάτω από τις οποίες διεξάγεται το πείραμα καθώς και η ποικιλομορφία των χαρακτηριστικών που φέρουν τα ζώα που χρησιμοποιούνται. Το πείραμα μπορεί να χωριστεί σε τμήματα με ομάδες ατόμων ίδιων χαρακτηριστικών που διαφέρουν από ομάδα σε ομάδα ή ακόμη το πείραμα να γίνει σε πολλά διαφορετικά εργαστήρια ταυτόχρονα. Με αυτό τον τρόπο γίνεται εφαρμογή διαφορετικών μεταβλητών έχοντας ως αποτέλεσμα την αύξηση της εγκυρότητας των αποτελεσμάτων. (Eggel and Würbel 2021) (Würbel 2017)

1.5 Ανάλυση Κόστους-Οφέλους (Harm-Benefit Analysis)

Η αρχή των 3R's και η αρχή των 3V's αποτελούν δύο ανεξάρτητες αρχές οι οποίες συναντώνται και αλληλοσυμπληρώνονται στην φάση σχεδιασμού του πειράματος. Και οι δύο προωθούν την καλή εργαστηριακή πρακτική και αποτελούν την βάση για την αξιολόγηση ενός πειράματος που περιλαμβάνει ζώα εργαστηρίου. Η διαδικασία της αξιολόγησης αποτελείται από τρία στάδια. Αρχικά κρίνεται η καταλληλότητα του πειράματος με βάση την αρχή των 3V's. Δηλαδή εξετάζεται αν με το πρωτόκολλο μπορεί να επιτευχθεί ο στόχος της μελέτης. Σε περίπτωση που η επίτευξη του στόχου κρίνεται εφικτή στο επόμενο στάδιο γίνεται αξιολόγηση με βάση την αρχή των 3R's. Έπειτα από την εφαρμογή της αρχής αν η χρήση των ζώων και η βλάβη που μπορεί να υποστούν κριθεί αναγκαία, η διαδικασία μπορεί να συνεχιστεί και να φτάσει στο τελευταίο στάδιο, την ανάλυση κόστους-οφέλους(harm-benefit analysis). Στο συγκεκριμένο στάδιο μελετάται αν το πείραμα παρέχει οφέλη με θετικό ισοζύγιο συγκριτικά με την βλάβη που υπόκεινται τα ζώα. Ολόκληρη η διαδικασία αποτελεί εφαρμογή της αρχής της αναλογικότητας.

Η ανάλυση κόστους-οφέλους θα μπορούσε να παρουσιαστεί σχηματικά ως ζυγός στον οποίο από την μία πλευρά βρίσκεται το κόστος (βλάβη) με την αρχή των 3Rs και από την άλλη πλευρά το όφελος με την αρχή των 3Vs. Για να μπορέσει να πραγματοποιηθεί ένα εργαστηριακό πρωτόκολλο θα πρέπει ο ζυγός να είναι ισορροπημένος. (Eggel and Würbel 2021)



Εικόνα 1. Σχεδιασμός του πειράματος βασισμένος στην ανάλυση κόστους-οφέλους. (Würbel 2017)

1.6 Κατευθυντήριες γραμμές για την χρήση ζώων εργαστηρίου

Παρά την καθιέρωση των αρχών των 3R's και 3V's στον πειραματισμό με ζώα εργαστηρίου, εξακολουθούν να υπάρχουν προβληματισμοί τόσο από το ευρύ κοινό όσο και από την επιστημονική κοινότητα, σχετικά με την αξιοπιστία

των ερευνών με την κρίση επαναληψιμότητας να υπάρχει σε ένα μεγάλο ποσοστό της βιβλιογραφίας. Η κατάσταση αυτή οφείλεται στο λανθασμένο σχεδιασμό κάποιων πειραμάτων αλλά σε δεύτερο στάδιο και στον τρόπο με τον οποίο η νέα πληροφορία προβάλλεται μέσα από τα επιστημονικά άρθρα. Σε μία προσπάθεια μεγιστοποίησης της αξίας της παραγόμενης πληροφορίας έχουν δημιουργηθεί από πολλούς οργανισμούς κατευθυντήριες γραμμές που βοηθούν τον ερευνητή τόσο κατά την οργάνωση και διεξαγωγή του πειράματος αλλά και στην αναφορά του μετά το πέρας της διαδικασίας. Οι κατευθυντήριες γραμμές προσαρμόζονται κάθε φορά στο είδος της έρευνας που διεξάγεται ή στα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του κάθε πειράματος αλλά προσφέρουν παράλληλα και κάποιες βασικές αρχές.

1.6.1 Arrive

Το Arrive (Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments) αποτελεί κατευθυντήρια γραμμή που δημοσιεύτηκε για πρώτη φορά το 2010. Η οδηγία ανανεώθηκε με το ARRIVE guidelines 2.0 και δημοσιεύτηκε τον Ιούλιο του 2020 στο περιοδικό PLOS Biology. (Arriveguidelines.org) Αποτελείται από μία λίστα 20 παραγόντων που είναι η ελάχιστη πληροφορία που πρέπει να συμπεριληφθεί σε ένα άρθρο που αφορά πειραματισμό σε ζώα εργαστηρίου. Στους συγκεκριμένους παράγοντες περιλαμβάνονται ο αριθμός των ζώων καθώς και ιδιαίτερα χαρακτηριστικά που μπορεί να φέρουν, λεπτομέρειες που αφορούν την στέγαση και την εκτροφή των ζώων, τα στατιστικά δεδομένα του πειράματος αλλά και την ανάλυση των μεθόδων που χρησιμοποιούνται. Στην ανανεωμένη έκδοση του Arrive το υλικό έχει ενημερωθεί, επεκταθεί και αναδιοργανωθεί με σκοπό να διασφαλιστεί η πιο εύκολη αξιολόγηση της παραγόμενης πληροφορίας από τους επιστήμονες, τους εκδότες και τους κριτές. Πιο συγκεκριμένα έχει βελτιωθεί η σαφήνεια των οδηγιών, έχει δοθεί προτεραιότητα σε συγκεκριμένα σημεία, έχουν προστεθεί καινούριοι παράγοντες και τέλος έχει δημιουργηθεί συνοδευτικό έγγραφο που επεξηγεί τον κάθε παράγοντα. Σημαντική αλλαγή αποτελεί η κατηγοριοποίηση των οδηγιών σε δύο ομάδες. Η μία ομάδα αναφέρει τις βασικές πληροφορίες που πρέπει να συμπεριληφθούν στην αναφορά και η δεύτερη επιπλέον πληροφορίες που θα μπορούσαν να αναφερθούν και αφορούν δήλωση ηθικής συμμόρφωσης, δήλωση σύγκρουσης συμφερόντων, περιγραφή του πρωτοκόλλου αλλά και περισσότερες πληροφορίες όσον αφορά την μεθοδολογία.

The ARRIVE Essential 10

These items are the basic minimum to include in a manuscript. Without this information, readers and reviewers cannot assess the reliability of the findings.

Study design	1	For each experiment, provide brief details of study design including: <ol style="list-style-type: none"> The groups being compared, including control groups. If no control group has been used, the rationale should be stated. The experimental unit (e.g. a single animal, litter, or cage of animals).
Sample size	2	<ol style="list-style-type: none"> Specify the exact number of experimental units allocated to each group, and the total number in each experiment. Also indicate the total number of animals used. Explain how the sample size was decided. Provide details of any <i>a priori</i> sample size calculation, if done.
Inclusion and exclusion criteria	3	<ol style="list-style-type: none"> Describe any criteria used for including and excluding animals (or experimental units) during the experiment, and data points during the analysis. Specify if these criteria were established <i>a priori</i>. If no criteria were set, state this explicitly. For each experimental group, report any animals, experimental units or data points not included in the analysis and explain why. If there were no exclusions, state so. For each analysis, report the exact value of <i>n</i> in each experimental group.
Randomisation	4	<ol style="list-style-type: none"> State whether randomisation was used to allocate experimental units to control and treatment groups. If done, provide the method used to generate the randomisation sequence. Describe the strategy used to minimise potential confounders such as the order of treatments and measurements, or animal/cage location. If confounders were not controlled, state this explicitly.
Blinding	5	Describe who was aware of the group allocation at the different stages of the experiment (during the allocation, the conduct of the experiment, the outcome assessment, and the data analysis).
Outcome measures	6	<ol style="list-style-type: none"> Clearly define all outcome measures assessed (e.g. cell death, molecular markers, or behavioural changes). For hypothesis-testing studies, specify the primary outcome measure, i.e. the outcome measure that was used to determine the sample size.
Statistical methods	7	<ol style="list-style-type: none"> Provide details of the statistical methods used for each analysis, including software used. Describe any methods used to assess whether the data met the assumptions of the statistical approach, and what was done if the assumptions were not met.
Experimental animals	8	<ol style="list-style-type: none"> Provide species-appropriate details of the animals used, including species, strain and substrain, sex, age or developmental stage, and, if relevant, weight. Provide further relevant information on the provenance of animals, health/immune status, genetic modification status, genotype, and any previous procedures.
Experimental procedures	9	For each experimental group, including controls, describe the procedures in enough detail to allow others to replicate them, including: <ol style="list-style-type: none"> What was done, how it was done and what was used. When and how often. Where (including detail of any acclimatisation periods). Why (provide rationale for procedures).
Results	10	For each experiment conducted, including independent replications, report: <ol style="list-style-type: none"> Summary/descriptive statistics for each experimental group, with a measure of variability where applicable (e.g. mean and SD, or median and range). If applicable, the effect size with a confidence interval.

Εικόνα 2. Λίστα με τους απαραίτητους παράγοντες που πρέπει να συμπεριληφθούν στην αναφορά ώστε να επιτευχθεί η αξιοπιστία των ευρημάτων. (ARRIVE guidelines 2.0, 2020)

The Recommended Set

These items complement the Essential 10 and add important context to the study. Reporting the items in both sets represents best practice.

Abstract	11	Provide an accurate summary of the research objectives, animal species, strain and sex, key methods, principal findings, and study conclusions.
Background	12	a. Include sufficient scientific background to understand the rationale and context for the study, and explain the experimental approach. b. Explain how the animal species and model used address the scientific objectives and, where appropriate, the relevance to human biology.
Objectives	13	Clearly describe the research question, research objectives and, where appropriate, specific hypotheses being tested.
Ethical statement	14	Provide the name of the ethical review committee or equivalent that has approved the use of animals in this study, and any relevant licence or protocol numbers (if applicable). If ethical approval was not sought or granted, provide a justification.
Housing and husbandry	15	Provide details of housing and husbandry conditions, including any environmental enrichment.
Animal care and monitoring	16	a. Describe any interventions or steps taken in the experimental protocols to reduce pain, suffering and distress. b. Report any expected or unexpected adverse events. c. Describe the humane endpoints established for the study, the signs that were monitored and the frequency of monitoring. If the study did not have humane endpoints, state this.
Interpretation/ scientific implications	17	a. Interpret the results, taking into account the study objectives and hypotheses, current theory and other relevant studies in the literature. b. Comment on the study limitations including potential sources of bias, limitations of the animal model, and imprecision associated with the results.
Generalisability/ translation	18	Comment on whether, and how, the findings of this study are likely to generalise to other species or experimental conditions, including any relevance to human biology (where appropriate).
Protocol registration	19	Provide a statement indicating whether a protocol (including the research question, key design features, and analysis plan) was prepared before the study, and if and where this protocol was registered.
Data access	20	Provide a statement describing if and where study data are available.
Declaration of interests	21	a. Declare any potential conflicts of interest, including financial and non-financial. If none exist, this should be stated. b. List all funding sources (including grant identifier) and the role of the funder(s) in the design, analysis and reporting of the study.

Εικόνα 3. Λίστα με επιπλέον χρήσιμους παράγοντες που μπορούν να συμπεριληφθούν στην αναφορά. (ARRIVE guidelines 2.0, 2020)

Η οδηγία Arrive μπορεί να εφαρμοστεί σε κάθε κλάδο της βιοϊατρικής έρευνας που χρησιμοποιούνται ζώα εργαστηρίου. Ωστόσο οι κατευθυντήριες γραμμές δεν προωθούνται ως υποχρεωτικές ούτε επιθυμούν να τυποποιήσουν την δομή της αναφοράς. Δημιουργούν όμως γερά θεμέλια πάνω στα οποία η ερευνητική ομάδα θα καταφέρει να δημοσιοποιήσει έγκυρη πληροφορία. Καλύπτουν ένα μεγάλο κομμάτι του πειραματισμού το οποίο αν δεν αναφερθεί θα προκύψουν θέματα αξιοπιστίας. Ειδικά στον αμφιλεγόμενο τομέα του πειραματισμού σε ζώα είναι πολύ σημαντικό κάθε νέα γνώση να περιγράφεται σωστά και να στηρίζεται σε έγκυρα δεδομένα ώστε να γίνεται δυνατή η διασφάλιση της ποιότητας, της πληρότητας και της διαφάνειας. Με αυτό τον τρόπο αποφεύγεται η ανάγκη επανάληψης των πειραμάτων καθώς τα ήδη

υπάρχοντα δεδομένα μπορούν να χρησιμοποιηθούν αυτούσια σε νέους κύκλους ερευνών ή μετα-ανάλυσης αλλά επίσης δίνεται και μία λύση στην κρίση επαναληψιμότητας. Είναι επίσης σημαντικό να αναφερθεί το γεγονός ότι στην εφαρμογή του Arrive καθοριστικό ρόλο διαδραματίζουν οι εκδότες των επιστημονικών περιοδικών οι οποίοι θα πρέπει να προωθούν την χρήση του στους ερευνητές που επιθυμούν να δημοσιεύσουν την δουλειά τους αλλά και να ενημερώνουν την επιστημονική κοινότητα σχετικά με τις συνέπειες της ελλιπούς αναφοράς στην προώθηση καινούριας γνώσης. (Kilkenny et al.,2010) (Percie et al.,2020)

1.6.2 Prepare

Ο τρόπος με τον οποίο πρέπει να δομείται μία αναφορά καθώς και το περιεχόμενό της αποτελούν σημαντικούς παράγοντες που αποδεικνύουν την αξιοπιστία της εργασίας όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα. Ωστόσο η ορθότερη αναφορά ενός πειράματος που έχει ήδη πραγματοποιηθεί δεν μπορεί να αλλάξει την ποιότητά του. Για αυτό τον λόγο σε πρώτο στάδιο πρέπει να δίνεται μεγαλύτερη σημασία στην οργάνωση και διεξαγωγή του πειράματος.

Το Prepare (Planning Research and Experimental Procedures on Animals: Recommendations for Excellence) αποτελεί κατευθυντήρια οδηγία που δημιουργήθηκε από μια ομάδα βρετανών και νορβηγών ειδικών υπό την αιγίδα της NORECOPA (Norway's National Consensus Platform for the advancement of "the 3 R's"). Περιέχει 15 ενότητες που αφορούν τον σχεδιασμό του πειράματος, τον ποιοτικό έλεγχο καθώς και την επικοινωνία μεταξύ της ερευνητικής ομάδας και της εγκατάστασης των ζώων. Εφαρμόζοντας την οδηγία Prepare γίνεται πιο εύκολος και γρήγορος ο εντοπισμός αδυναμιών του πρωτοκόλλου δίνοντας παράλληλα την δυνατότητα έγκαιρων αλλαγών. Ιδιαίτερη προσοχή δίνεται σε πιο πρακτικές λεπτομέρειες της πειραματικής διαδικασίας οι οποίες περιλαμβάνουν: την επάρκεια της εγκατάστασης, την ανάγκη για εκπαίδευση καθώς και την αξιολόγηση όλων των παραγόντων που αφορούν την ευζωία των ζώων. Όπως και το Arrive το Prepare δεν είναι υποχρεωτική οδηγία όμως έχει σχεδιαστεί για να παρέχει την βάση που θα στηριχθεί ο επιστήμονας για να αποφύγει προβλήματα που μπορεί να επηρεάσουν το τελικό αποτέλεσμα και να καταστήσουν την εργασία του μη αξιόπιστη. Με αυτό τον τρόπο προωθείται η καλή εργαστηριακή πρακτική αλλά και αξιοποιούνται παράλληλα με τον καλύτερο τρόπο τα ζώα μέσα από το πείραμα. (Smith, 2020) (Smith et al.,2018)

Topic	Recommendation
(A) Formulation of the study	
1. Literature searches	<input type="checkbox"/> Form a clear hypothesis, with primary and secondary outcomes. <input type="checkbox"/> Consider the use of systematic reviews. <input type="checkbox"/> Decide upon databases and information specialists to be consulted, and construct search terms. <input type="checkbox"/> Assess the relevance of the species to be used, its biology and suitability to answer the experimental questions with the least suffering, and its welfare needs. <input type="checkbox"/> Assess the reproducibility and translatability of the project.
2. Legal issues	<input type="checkbox"/> Consider how the research is affected by relevant legislation for animal research and other areas, e.g. animal transport, occupational health and safety. <input type="checkbox"/> Locate relevant guidance documents (e.g. EU guidance on project evaluation).
3. Ethical issues, harm-benefit assessment and humane endpoints	<input type="checkbox"/> Construct a lay summary. <input type="checkbox"/> In dialogue with ethics committees, consider whether statements about this type of research have already been produced. <input type="checkbox"/> Address the 3Rs (replacement, reduction, refinement) and the 3Ss (good science, good sense, good sensibilities). <input type="checkbox"/> Consider pre-registration and the publication of negative results. <input type="checkbox"/> Perform a harm-benefit assessment and justify any likely animal harm. <input type="checkbox"/> Discuss the learning objectives, if the animal use is for educational or training purposes. <input type="checkbox"/> Allocate a severity classification to the project. <input type="checkbox"/> Define objective, easily measurable and unequivocal humane endpoints. <input type="checkbox"/> Discuss the justification, if any, for death as an end-point.
4. Experimental design and statistical analysis	<input type="checkbox"/> Consider pilot studies, statistical power and significance levels. <input type="checkbox"/> Define the experimental unit and decide upon animal numbers. <input type="checkbox"/> Choose methods of randomisation, prevent observer bias, and decide upon inclusion and exclusion criteria.

Topic	Recommendation
(B) Dialogue between scientists and the animal facility	
5. Objectives and timescale, funding and division of labour	<input type="checkbox"/> Arrange meetings with all relevant staff when early plans for the project exist. <input type="checkbox"/> Construct an approximate timescale for the project, indicating the need for assistance with preparation, animal care, procedures and waste disposal/decontamination. <input type="checkbox"/> Discuss and disclose all expected and potential costs. <input type="checkbox"/> Construct a detailed plan for division of labour and expenses at all stages of the study.
6. Facility evaluation	<input type="checkbox"/> Conduct a physical inspection of the facilities, to evaluate building and equipment standards and needs. <input type="checkbox"/> Discuss staffing levels at times of extra risk.
7. Education and training	<input type="checkbox"/> Assess the current competence of staff members and the need for further education or training prior to the study.
8. Health risks, waste disposal and decontamination	<input type="checkbox"/> Perform a risk assessment, in collaboration with the animal facility, for all persons and animals affected directly or indirectly by the study. <input type="checkbox"/> Assess, and if necessary produce, specific guidance for all stages of the project. <input type="checkbox"/> Discuss means for containment, decontamination, and disposal of all items in the study.
(C) Quality control of the components in the study	
9. Test substances and procedures	<input type="checkbox"/> Provide as much information as possible about test substances. <input type="checkbox"/> Consider the feasibility and validity of test procedures and the skills needed to perform them.
10. Experimental animals	<input type="checkbox"/> Decide upon the characteristics of the animals that are essential for the study and for reporting. <input type="checkbox"/> Avoid generation of surplus animals.
11. Quarantine and health monitoring	<input type="checkbox"/> Discuss the animals' likely health status, any needs for transport, quarantine and isolation, health monitoring and consequences for the personnel.
12. Housing and husbandry	<input type="checkbox"/> Attend to the animals' specific instincts and needs, in collaboration with expert staff. <input type="checkbox"/> Discuss acclimatization, optimal housing conditions and procedures, environmental factors and any experimental limitations on these (e.g. food deprivation, solitary housing).
13. Experimental procedures	<input type="checkbox"/> Develop refined procedures for capture, immobilisation, marking, and release or rehoming. <input type="checkbox"/> Develop refined procedures for substance administration, sampling, sedation and anaesthesia, surgery and other techniques.
14. Humane killing, release, reuse or rehoming	<input type="checkbox"/> Consult relevant legislation and guidelines well in advance of the study. <input type="checkbox"/> Define primary and emergency methods for humane killing. <input type="checkbox"/> Assess the competence of those who may have to perform these tasks.
15. Necropsy	<input type="checkbox"/> Construct a systematic plan for all stages of necropsy, including location, and identification of all animals and samples.

Εικόνα 4. Η λίστα οδηγιών Prepare (NORECOPA)

2. Αρχές και εφαρμογές κρυοβιολογίας

2.1 Κρυοβιολογία και Κρυοσυντήρηση

Η Κρυοβιολογία αποτελεί κλάδο της βιολογίας με αντικείμενο μελέτης την κρυοσυντήρηση κυττάρων, ιστών και οργάνων, την μελέτη προσαρμογής ζώντων οργανισμών σε χαμηλές θερμοκρασίες, τη διατήρηση της γονιμότητας αλλά και την διατήρηση χρήσιμων κλινικά διαγνοδιακών σειρών όσον αφορά την επιστήμη ζώων εργαστηρίου.

Σύμφωνα με τον ορισμό ως Κρυοβιολογία ορίζεται ο κλάδος της Βιολογίας ο οποίος μελετά της επίδραση των χαμηλών θερμοκρασιών στους ζωντανούς οργανισμούς. Ένα μεγάλο κομμάτι της Κρυοβιολογίας αποτελεί η Κρυοσυντήρηση με την οποία πραγματοποιείται η διατήρηση κυτταρικών σειρών, ιστών και οργάνων με την βοήθεια προστατευτικών ουσιών σε κρυογονικές θερμοκρασίες όπως εκείνες του ξηρού πάγου (-80°C) και του υγρού αζώτου (-196°C). Ο τομέας της Κρυοβιολογίας αποτελεί συνδυαστικό κλάδο που περιλαμβάνει τόσο αρχές βιολογίας όσο και χημείας, φυσικής και προγραμματισμού.

Σε πάρα πολύ χαμηλές θερμοκρασίες τα βιολογικά υλικά έχουν την δυνατότητα να μειώσουν κάθε βιολογική τους δραστηριότητα και είναι ικανά να επανέλθουν στην αρχική τους κατάσταση με ελάχιστες διαφορές όταν επέλθει ξανά φυσιολογική θερμοκρασία σώματος. Το χαρακτηριστικό αυτό παρατηρείται σε πολλά ζώα τα οποία σε ακραίες συνθήκες χαμηλών θερμοκρασιών τροποποιούν τα βιοχημικά τους χαρακτηριστικά αποφεύγοντας την επίδραση του παγετού. Στα ζώα αυτά ισχύει ότι για κάθε 10°C μείωσης της θερμοκρασίας υπάρχει παράλληλη μείωση της κατανάλωσης οξυγόνου κατά 50%. Επίσης έχει παρατηρηθεί ότι στα ζώα σε χειμερία νάρκη υπάρχει μηχανισμός αναστολής της αντλίας νατρίου με στόχο να αποτραπεί η οξειδωση που συνδέεται με την υποθερμία. (Abtahi et al.,2023) (Yang and Tiersch 2020)

2.2 Η ανάπτυξη του κλάδου της κρυοβιολογίας

Η χρήση πρακτικών κρυοβιολογίας πραγματοποιείται εδώ και χιλιάδες χρόνια. Από τις πρώτες αναφορές είναι η χρήση χαμηλών θερμοκρασιών για ιατρικούς σκοπούς στην Αίγυπτο το 2500 π.Χ. Αργότερα ο Ιπποκράτης χρησιμοποίησε πάγο σε τραύματα με σκοπό την αποφυγή της αιμορραγίας και του οιδήματος.

Ωστόσο το πρώτο επιστημονικό κείμενο που αναφέρεται στην χρήση κρυοβιολογίας δημοσιεύτηκε από τον Robert Boyle τον 17^ο αιώνα ο οποίος μελέτησε την επίδραση της θερμοκρασίας σε ζώα. (Abtahi et al.,2023) Έπειτα από την ανακάλυψη του μικροσκοπίου η μελέτη της κρυοβιολογίας μετατοπίστηκε στον μικρόκοσμο με μία από τις πρώτες μελέτες να αποτελούν την εργασία του Spallanzani (1776) κατά την οποία παρατήρησε ότι το σπέρμα έχει την δυνατότητα να διατηρήσει την κινητικότητα του ακόμη και αν έχει εκτεθεί σε χαμηλές θερμοκρασίες. Η κρυοσυντήρηση αναπτύχθηκε σε μεγάλο βαθμό τον 19^ο αιώνα όταν και έγινε προσπάθεια διατήρησης και αποθήκευσης

σπερματοζωαρίων και ερυθρών αιμοσφαιρίων. Το εγχείρημα αυτό δεν ήταν αποτελεσματικό καθώς παρατηρήθηκαν αδυναμίες στις μεθόδους και μεγάλο ποσοστό υπογονιμότητας που οφειλόταν σε πρώιμο εμβρικό θάνατο. Επεξήγηση της αδυναμίας της μεθόδου δόθηκε με την ανακάλυψη του James Lovelock το 1950 ο οποίος αναφέρει ότι με την απότομη κατάψυξη του κυττάρου, στο εσωτερικό του δημιουργούνται κρύσταλλοι, προκαλώντας μηχανικές βλάβες με αποτέλεσμα το κύτταρο να μην μπορεί να επιβιώσει. Το συγκεκριμένο φαινόμενο μελετήθηκε περαιτέρω από τον Mazur το 1963 ο οποίος και περιέγραψε την διαδικασία της ώσμωσης και των μεταβολών του νερού υπό την επίδραση χαμηλών θερμοκρασιών. Η βλάβη που παρατηρείται στο κύτταρο υπό την επίδραση κρυστάλλων πάγου οδήγησε στην ανακάλυψη ουσιών που διαθέτουν κρυστοπροστατευτική ιδιότητα. Μεταξύ των πολλών διαφορετικών κρυστοπροστατευτικών ουσιών η πρώτη που χρησιμοποιήθηκε ήταν η γλυκερόλη, η οποία προστατεύει από την εμφάνιση ενδοκυττάρων κρυστάλλων και αποδείχθηκε ότι αυξάνει την επιβίωση των σπερματοζωαρίων με ταυτόχρονη χαμηλή τοξικότητα. Ο επόμενος σημαντικός σταθμός στην ανάπτυξη της κρυσταλλοπροστατευτικής αποτελεί η ανακάλυψη ότι με την εφαρμογή σταδιακής-βαθμιαίας μείωσης της θερμοκρασίας κατά την κατάψυξη και σταδιακής αύξησης της θερμοκρασίας κατά την απόψυξη αποφεύγεται η ανάπτυξη κρυστάλλων και κατά συνέπεια βλαβών στο κύτταρο. (Whaley et al., 2021) Το 1964 ιδρύθηκε η εταιρία κρυοβιολογίας στην οποία συμμετείχαν επιστήμονες από κλάδους της βιολογίας, της ιατρικής και της φυσικής με κοινό ενδιαφέρον την μελέτη της επίδρασης των χαμηλών θερμοκρασιών στα βιολογικά συστήματα. Επίσης ένα χρόνο αργότερα γίνεται αναφορά από τον Stanley Leibo για την διαφοροποίηση του πρωτοκόλλου κατάψυξης ανάλογα με τα χαρακτηριστικά και τις ανάγκες του είδους του κυττάρου που πρέπει να κρυσταλλοπροστατευθεί. (Betsy and Kumar 2020)

Σημαντική πρόοδος σημειώθηκε και κατά την εφαρμογή των μεθόδων κρυσταλλοπροστατευτικής στην επιστήμη ζώων εργαστηρίου. Το 1972 ο Whittingham κατάφερε την παραγωγή νεογέννητων ποντικών έπειτα από την απόψυξη κρυσταλλοπροστατευμένων εμβρύων τα οποία διατηρήθηκαν σε υγρό άζωτο (-196°C) για 8 ημέρες. Τέσσερα χρόνια αργότερα το 1976 ο Parkening πραγματοποίησε με επιτυχία την απόψυξη, επιβίωση, γονιμοποίηση και ανάπτυξη κρυσταλλοπροστατευμένων ωαρίων ποντικών ενώ το 1985 ο Rall χρησιμοποίησε την τεχνική του vitrification για να κρυσταλλοπροστατεύσει έμβρυα σε υγρό άζωτο. Τέλος το 1990 πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά επιτυχημένη κρυσταλλοπροστατευτική σπέρματος ποντικού από τον Tada. (Yang and Tiersch 2020)

2.3 Βασικές αρχές Κρυοβιολογίας

Πριν την ανακάλυψη και χρήση της γλυκερόλης ως κρυστοπροστατευτικής ουσία οι πειραματισμοί βασίζονταν σε εμπειρικές παρατηρήσεις που αφορούσαν την αντίδραση του κυττάρου ή του ιστού κάτω από συνθήκες χαμηλών θερμοκρασιών. Η έκθεση των κυττάρων σε κρυογονικές θερμοκρασίες χωρίς την χρήση προστατευτικών ουσιών οδηγούν τυπικά στον κυτταρικό θάνατο. Καθώς το νερό αποτελεί το 80% της κυτταρικής μάζας, θερμοκρασίες υπό του 0°C προκαλούν την παραγωγή κρυστάλλων τόσο στο εξωτερικό όσο και στο

εσωτερικό χώρο του κυττάρου. (Abtahi et al.,2023) Κύριος σκοπός της κρυοπροστατευτικής τεχνολογίας είναι ο προσδιορισμός των βιολογικών, χημικών και βιοφυσικών αλλαγών που υπόκειται το κύτταρο κατά την διάρκεια της ψύξης και της απόψυξης. Πιο συγκεκριμένα πρέπει να ληφθούν υπ' όψιν οι παρακάτω παράγοντες:

- Κίνηση νερού, κρυοπροστατευτικού και ιόντων μέσα από την κυτταρική μεμβράνη
- Το μέγεθος του κυττάρου και οι δομικές αλλαγές
- Εξωκυττάρια και ενδοκυττάρια αλλαγές με την προσθήκη ή αφαίρεση του κρυοπροστατευτικού παράγοντα
- Εξωκυττάρια και ενδοκυττάρια σχηματισμός κρυστάλλων πάγου
- Επιρροή της ταχύτητας ψύξης και απόψυξης

Πάνω στην μελέτη των συγκεκριμένων παραγόντων βασίστηκε και προτάθηκε μία αρχή η οποία στην πορεία αναγνωρίστηκε ως η βάση για την κατανόηση της δυναμικής της κρυοβιολογίας. Σύμφωνα με την θεωρία κατά την διάρκεια της σταδιακής ψύξης το νερό αποβάλλεται από το κύτταρο ενώ παράλληλα αυξάνεται η ενδοκυτταρική συγκέντρωση των ουσιών που παραμένουν σε αυτό με αποτέλεσμα το κύτταρο να μην μπορεί να επιβιώσει (“solute effect”). Σε αντίθετη περίπτωση με την χρήση γρήγορης ψύξης το νερό δεν έχει την δυνατότητα να αποβληθεί από το κύτταρο και με αυτό τον τρόπο δημιουργούνται ενδοκυττάρια κρύσταλλοι που διαταράσσουν μηχανικά την συνέχεια των κυτταρικών μεμβρανών καθιστώντας αδύνατη την ανάκτηση δομικά άθικτων κυττάρων κατά την απόψυξη (“intracellular ice formation”). (Yang and Tiersch 2020) (Whaley et al., 2021) Η επιβίωση του κυττάρου είναι άκρως συνδεδεμένη με την διατήρηση άθικτης κυτταρικής μεμβράνης που εξακολουθεί να συντηρεί το χαρακτηριστικό της ημιδιαπερατότητας. Ωστόσο η επιβίωση της κυτταρικής μεμβράνης δεν συνεπάγεται απαραίτητα και την επιβίωση των εσωτερικών δομών του κυττάρου. (Jang et al., 2017)

Τα παραπάνω προβλήματα επιλύονται με την εφαρμογή ενδιάμεσου ρυθμού ψύξης που ελαχιστοποιεί τις βλάβες που υπόκειται το κύτταρο και αυξάνει την πιθανότητα επιβίωσής του.

Η μέθοδος της υαλοποίησης (vitrification), κατά την οποία το υλικό κρυοσυντήρησης φτάνει σε κρυογονικές θερμοκρασίες απότομα χωρίς να δημιουργούνται κρύσταλλοι αλλά δομές όμοιες με την δομή του γυαλιού, αποτελεί την πιο σύγχρονη και ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδο κρυοσυντήρησης με τα μεγαλύτερα ποσοστά επιτυχίας.

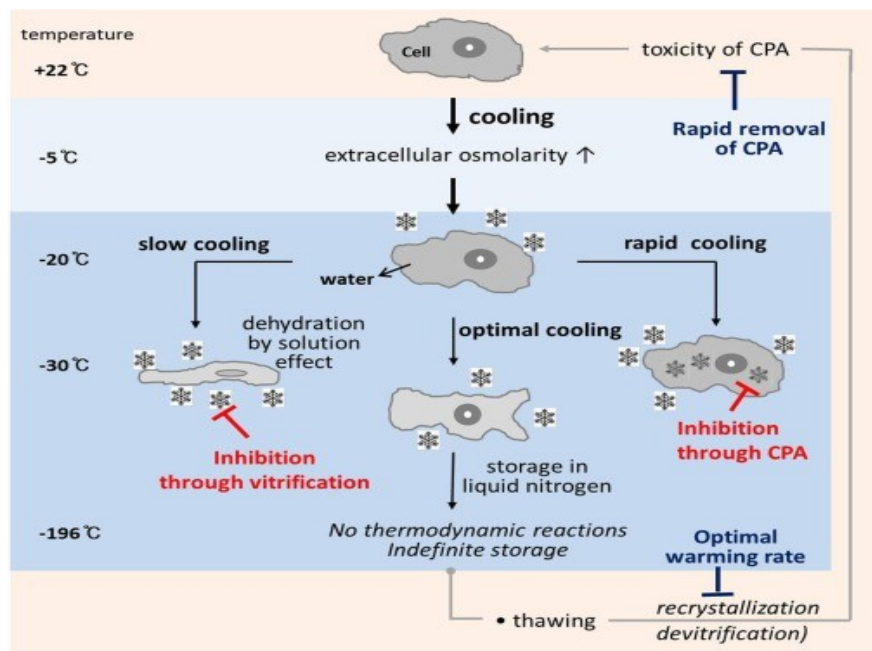
Εκτός από το solute effect και την δημιουργία κρυστάλλων άλλοι παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν την επιβίωση του κυττάρου κατά την κρυοσυντήρηση είναι η τοξικότητα του κρυοπροστατευτικού παράγοντα (ιδιαίτερα αν το κύτταρο εκτεθεί σε αυτό για πολύ ώρα), έντονες ωσμωτικές αλλαγές, δομικές αλλαγές που οφείλονται στην αλλαγή της θερμοκρασίας καθώς και ο ρυθμός απόψυξης. (Yang and Tiersch 2020) (Whaley et al., 2021)

2.4 Διαδικασία κρυοσυντήρησης

Η κρυοσυντήρηση αποτελεί μία διαδικασία η οποία προσαρμόζεται στις ανάγκες και τα ιδιαίτερα βιολογικά χαρακτηριστικά του κάθε είδους κυττάρου που πρόκειται να διατηρηθεί. Το γεγονός αυτό συνεπάγεται κάποιες διαφορές στην συμπεριφορά κάθε κυτταρικής σειράς κατά την εφαρμογή της κρυοσυντήρησης αλλά και στην επιβίωση έπειτα από την ψύξη ή την απόψυξη. Κατά την πορεία εξέλιξης της τεχνολογίας κρυοσυντήρησης διαμορφώθηκαν τέσσερα διαφορετικά πρωτόκολλα:

- Το slow freezing με την σταδιακή μείωση της θερμοκρασίας
- Το vitrification που περιλαμβάνει την στερεοποίηση/υαλοποίηση της υγρής φάσης του κυττάρου με παράλληλη αποφυγή της ανάπτυξης κρυστάλλων
- Την αποθήκευση σε θερμοκρασίες υπό του μηδενός
- Την διατήρηση σε ξηρή κατάσταση μία διαδικασία που δεν χρησιμοποιείται συχνά στην φύλαξη κυτταρικών σειρών

Τα στάδια της κρυοσυντήρησης περιλαμβάνουν αρχικά την ανάμειξη των κυττάρων με κάποιο κρυοπροστατευτικό υλικό (αφυδάτωση), την ψύξη των κυττάρων σε κρυογονικές θερμοκρασίες και την φύλαξή τους σε ειδικά δοχεία, την απόψυξη έπειτα από μία χρονική περίοδο διατήρησής τους καθώς και την απομάκρυνση του κρυοπροστατευτικού υλικού. Η επιλογή και χρήση του κατάλληλου κάθε φορά κρυοπροστατευτικού παράγοντα είναι ζωτικής σημασίας για την επιτυχία της κρυοσυντήρησης καθώς επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό την επιβίωση του κυττάρου. (Jang et al., 2017)



Εικόνα 5. Απεικόνιση των σταδίων της κρυοσυντήρησης και των βλαβών που προκύπτουν από το ωσμωτικό σοκ και την ενδοκυττάρια και εξωκυττάρια ανάπτυξη κρυστάλλων. (Jang et al., 2017)

2.5 Κρυοπροστατευτικές Ουσίες (CPAs)

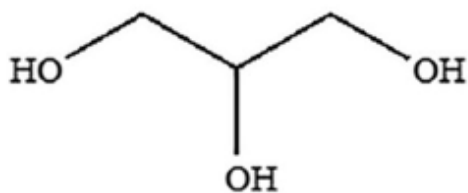
Με την εξέλιξη της κρυοβιολογίας αναπτύχθηκε παράλληλα και η παραγωγή καινούριων κρυοπροστατευτικών ουσιών. Τα CPAs (cryoprotective agents) είναι ουσίες που προστατεύουν το κύτταρο από το ωσμωτικό σοκ καθώς και από τις μηχανικές βλάβες κατά την διάρκεια της κρυοσυντήρησης. Είναι διαλυτές στο νερό σε χαμηλές θερμοκρασίες, ιδανικά με μικρό ποσοστό τοξικότητας και έχουν μικρό μέγεθος (μικρότερο από 100 daltons) χαρακτηριστικό το οποίο τους επιτρέπει να διέρχονται εύκολα από την κυτταρική μεμβράνη. Αντιδρούν ισχυρά με το νερό με τον σχηματισμό δεσμών υδρογόνου κατεβάζοντας το σημείο πήξης του με αποτέλεσμα λιγότερα μόρια νερού να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους αποφεύγοντας τον σχηματισμό εστιών για την παραγωγή κρυστάλλων. Το μεγάλο πλήθος κρυοπροστατευτικών που υπάρχει μπορεί να ταξινομηθεί σε δύο μεγάλες κατηγορίες ανάλογα με τον χώρο δράσης τους σε σχέση με το κύτταρο. Έτσι έχουν αναπτυχθεί κρυοπροστατευτικά που δρουν στο εσωτερικό του κυττάρου και κρυοπροστατευτικά που δρουν στο εξωτερικό του κυττάρου. Επίσης έκτος από τα συνθετικά χημικά υπάρχουν και τα βιοχημικά κρυοπροστατευτικά όπως ορισμένες πρωτεΐνες. (Whaley et al., 2021) (Jang et al., 2017) Μερικά από τα πιο συχνώς χρησιμοποιούμενα κρυοπροστατευτικά αναλύονται παρακάτω.

2.5.1 Γλυκερόλη

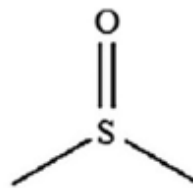
Η γλυκερόλη ήταν το πρώτο κρυοπροστατευτικό που ανακαλύφθηκε καθώς και ένα από τα πιο αποτελεσματικά που χρησιμοποιείται από το 1949 μέχρι και σήμερα. Αποτελεί φυσικό μεταβολίτη του σώματος και έχει αποδειχθεί ότι με την συσσώρευσή του προστατεύει από τον παγετό. Είναι μία μη ηλεκτρολυτική ουσία που μειώνει την συγκέντρωση των ηλεκτρολυτών μέσα και γύρω από το κύτταρο. Παρόλο όμως που αποτελεί φυσικό προϊόν η χρήση της σε υψηλές συγκεντρώσεις δεν ενδείκνυται για την κρυοσυντήρηση ωαρίων όπου καλύτερη επιλογή αποδεικνύεται το DMSO. (Gosden 2011) (Jang et al., 2017)

2.5.2 DMSO (Dimethyl sulfoxide- Διμεθυλοσουλφοξείδιο)

Η σύνθεση του DMSO έγινε από τον Alexander Zaytsev το 1866 αλλά η κρυοπροστατευτική του ιδιότητα αποδείχθηκε το 1959 από τους Lovelock και Bishop. Η χρήση του είναι αρκετά συχνή καθώς αποτελεί φτηνό κρυοπροστατευτικό με χαμηλό βαθμό τοξικότητας. Δρα κατά τον ίδιο τρόπο με την γλυκερόλη ωστόσο έχει παρατηρηθεί μείωση της κυτταρικής επιβίωσης και διαφοροποίησης που οφείλονται στην μεθυλίωση του DNA και την τροποποίηση των ιστονών. Σαν κρυοπροστατευτικό έχει δοσοεξαρτώμενη δράση. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις (5% και συνήθως 10%) μειώνει το πάχος της κυτταρικής μεμβράνης και αυξάνει την διαπερατότητά της δημιουργώντας πόρους στην επιφάνειά της. Οι συγκεκριμένοι πόροι συμβάλουν στην αποβολή του νερού και στην εύκολη αντικατάσταση του από τον κρυοπροστατευτικό παράγοντα. Σε υψηλές συγκεντρώσεις η λιπιδική διπλοστιβάδα αρχίζει και αποσυντίθεται οδηγώντας στον θάνατο του κυττάρου. (Whaley et al., 2021) (Jang et al., 2017)



Glycerol



Dimethyl sulfoxide

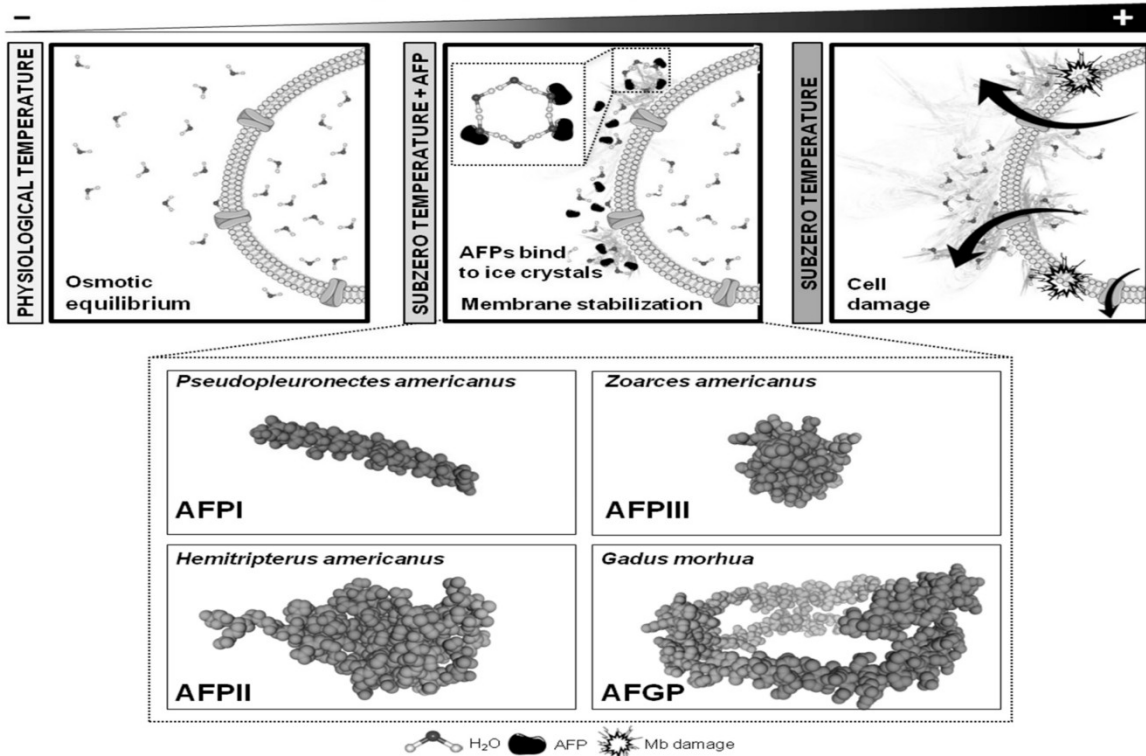
Εικόνα 6. Συχνώς χρησιμοποιούμενες κρυοπροστατευτικές ουσίες. (Whaley et al., 2021)

2.5.3 Πολυμερή

Τα συγκεκριμένα κρυοπροστατευτικά μπορεί να είναι πολυμερή, διμερή ή και τριμερή. Έχουν την ίδια δράση με τα προηγούμενα κρυοπροστατευτικά αλλά είναι μεγαλύτερες ενώσεις και ανήκουν στην κατηγορία των CPAs που δρουν στο εξωτερικό των κυττάρων. Παραδείγματα πολυμερών κρυοπροστατευτικών είναι: η πολυαιθυλενική γλυκόλη (PEG), η ποβιδόνη (PVP), η ραφινόζη, η σουκρόζη, και η τρεχαλόζη. (Whaley et al., 2021)

2.5.4 Πρωτεΐνες (Antifreeze protein AFP)

Σε πολλά ζωικά είδη έχει παρατηρηθεί μηχανισμός προστασίας έναντι των χαμηλών θερμοκρασιών που βασίζεται στην παραγωγή πρωτεϊνών με κρυοπροστατευτική ιδιότητα. Το γεγονός αυτό έχει αξιοποιηθεί στον κλάδο της κρυοβιολογίας με την ένταξη των συγκεκριμένων πρωτεϊνών στα πρωτόκολλα κρυοσυντήρησης. Η φυσική τους προέλευση και η δυνατότητά τους να αντιδρούν με την κυτταρική μεμβράνη τα καθιστά χρήσιμα υλικά καθώς χαρακτηρίζονται από μειωμένη τοξικότητα αυξάνοντας την αποδοτικότητα και την ασφάλεια της μεθόδου. Η αποδοτικότητά τους ωστόσο εξαρτάται από ορισμένους παράγοντες όπως: το είδος από το οποίο προέρχεται η πρωτεΐνη, το είδος του κυττάρου, το στάδιο ανάπτυξης όσον αφορά τα έμβρυα, τον τύπο της πρωτεΐνης, την συγκέντρωση της πρωτεΐνης καθώς και το ίδιο το πρωτόκολλο της κρυοσυντήρησης. Ο τρόπος δράσης των πρωτεϊνών περιλαμβάνει την ένωση με τους αναπτυσσόμενους κρυστάλλους του κυττάρου και την σταθεροποίηση της κυτταρικής μεμβράνης. (Robles et al., 2019)



Εικόνα 7. Τρόπος δράσης κρυοπροστατευτικών πρωτεϊνών και οι πιο συχνώς χρησιμοποιούμενες. (Robles et al., 2019)

2.6 Slow freezing και Vitrification

Οι δύο πιο συχνές διαδικασίες που χρησιμοποιούνται κατά βάση στην κρυοσυντήρηση είναι η σταδιακή-βαθμιαία ψύξη (slow freezing) και η υαλοποίηση (vitrification). Οι κύριες διαφορές ανάμεσα στα δύο πρωτόκολλα αφορούν την συγκέντρωση των κρυοπροστατευτικών ουσιών και τον ρυθμό ψύξης.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί και παραπάνω κατά την διάρκεια του slow freezing δίνεται η δυνατότητα στο νερό να αποχωρήσει από το εσωτερικό του κυττάρου και στην θέση του να εισχωρήσει ποσότητα CPA. Ένα τυπικό πρωτόκολλο βαθμιαίας ψύξης περιλαμβάνει την μείωση της θερμοκρασίας κατά 1°C/ min, την χρήση κρυοπροστατευτικού με συγκέντρωση μικρότερη του 1M καθώς και την χρήση ειδικών συσκευών στις οποίες μπορεί να προσαρμοστεί ο ρυθμός μείωσης της θερμοκρασίας. Αντίθετα κατά την διάρκεια της υαλοποίησης το εσωτερικό του κυττάρου περνά κατευθείαν από την υγρή στην υαλοποιημένη φάση με την έκθεσή του σε υγρό άζωτο. Η ψύξη πραγματοποιείται με ταχύτατο ρυθμό μείωσης της θερμοκρασίας και με την χρήση υψηλής συγκέντρωσης CPA για την αποφυγή σχηματισμού κρυστάλλων.

Με την εφαρμογή σταδιακής ψύξης έχει αποδειχθεί ότι ελαχιστοποιείται η πιθανότητα ανάπτυξης μικροοργανισμών και επιμόλυνσης του υλικού κρυοσυντήρησης ενώ το αντίθετο ισχύει για την υαλοποίηση στην οποία κρίνεται απαραίτητη η καλή εργαστηριακή πρακτική. Από την άλλη πλευρά ωστόσο κατά

την βαθμιαία ψύξη υπάρχει μεγαλύτερη πιθανότητα βλάβης του κυττάρου από τον σχηματισμό εξωκυττάρων κρυστάλλων κάτι το οποίο αποκλείει η τεχνική του vitrification. (Jang et al., 2017)

Και στα δύο πρωτόκολλα πρέπει να γίνει σωστός σχεδιασμός και επιλογή κατάλληλων υλικών σύμφωνα με τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του κυττάρου. Η κρυστοπροστατευτική ουσία που θα επιλεγθεί πρέπει να χαρακτηρίζεται από όσο το δυνατόν λιγότερη τοξικότητα για το κύτταρο. Για την ελάττωση της τοξικότητας δύναται η χρήση CPA που δρα στο εξωτερικό του κυττάρου, καθώς δρα με τον ίδιο τρόπο όπως και τα υπόλοιπα CPA που εισχωρούν στο κύτταρο αλλά με λιγότερη τοξικότητα. Άλλη εξίσου καλή επιλογή είναι η χρήση πολλαπλών CPA σε μικρότερες συγκεντρώσεις. Επίσης είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η επαφή του κυττάρου με τις κρυστοπροστατευτικές ουσίες πρέπει να γίνεται για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα πέραν του οποίου αυξάνεται η πιθανότητα ανάπτυξης βλαβών και κατ' επέκταση κυτταρικού θανάτου.

Το επόμενο σημείο στην προσαρμογή του πρωτοκόλλου είναι ο ρυθμός της ψύξης. Το νερό αποχωρεί από το κύτταρο όσο η θερμοκρασία μειώνεται. Ωστόσο η κίνηση του νερού οφείλεται και σε άλλους παράγοντες όπως την αναλογία επιφάνειας/όγκου του κυττάρου και την διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης. Όλοι οι παραπάνω παράγοντες πρέπει να ληφθούν υπ' όψιν κατά τον σχεδιασμό της διαδικασίας ώστε να εξασφαλιστεί όσο το δυνατόν περισσότερο η επιβίωση των κυττάρων. (Whaley et al., 2021)

2.7 Απόψυξη

Το στάδιο της απόψυξης κρίνεται τόσο σημαντικό όσο το στάδιο της ψύξης καθώς επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό την επιβίωση του κυττάρου. Με βάση την θερμοδυναμική έχει προταθεί η ταχεία απόψυξη των κρυσοσυντηρημένων υλικών καθώς με αυτό τον τρόπο το υψηλής ενέργειας υαλοποιημένο νερό περνά κατευθείαν στην υγρή φάση αποφεύγοντας τον σχηματισμό κρυστάλλων. Έτσι προτείνεται η μεταφορά του αποθηκευτικού μέσου σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37°C για 90-120 δευτερόλεπτα για την επίτευξη μέγιστης επιβίωσης. Τα συγκεκριμένα δεδομένα συνεπάγονται μια αύξηση της θερμοκρασίας του δείγματος κατά 45-70°C/min. Σύμφωνα με καινούρια στοιχεία αποδεικνύεται ότι η απόψυξη των δειγμάτων μπορεί να πραγματοποιηθεί και με πιο αργούς ρυθμούς όσο και με ρυθμούς αερογενούς απόψυξης χωρίς να παρατηρείται σημαντική μείωση στην επιβίωση του υλικού. Το εύρημα αυτό έχει τεράστια σημασία καθώς με την αερογενή μέθοδο απόψυξης μειώνεται η πιθανότητα επιμόλυνσης των κυττάρων από μικροοργανισμούς όπως μπορεί να συμβεί στην περίπτωση χρήσης υδατόλουτρου. (Whaley et al., 2021)

2.8 Βλάβες του κυττάρου κατά την κρυσοσυντήρηση

Συχνές κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιούνται στην κρυσοσυντήρηση αποτελούν τα γεννητικά κύτταρα καθώς και τα έμβρυα. Το ενδιαφέρον για τις συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές έγκειται στην ανάγκη επίτευξης και διατήρησης της γονιμότητας τόσο των ανθρώπων όσο και των ζώων. Κατά την διάρκεια της

κρυοσυντήρησης εκτός από την πιθανή διακοπή της συνέχειας της κυτταρικής τους μεμβράνης λόγω σχηματισμού κρυστάλλων πάγου υπάρχει και η περίπτωση πρόκλησης εσωτερικών βλαβών που αφορούν τα κυτταρικά οργανίδια, τη δομή του κυττάρου καθώς και την ποιότητα του γενετικού υλικού. Πιο συγκεκριμένα έχει αποδειχθεί ότι η χρήση κρυοσυντηρημένων σπερματοζωαρίων προκαλεί την μείωση του ποσοστού γονιμότητας καθώς και την καθυστέρηση στον σχηματισμό του προπυρήνα κατά την γονιμοποίηση. Το γεγονός αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να παρατηρείται μειωμένο ποσοστό γονιμοποιημένων ωαρίων που φτάνουν στο στάδιο των δύο κυττάρων. Ως κύρια αιτία πρόκλησης των παραπάνω δεδομένων κρίνεται η βλάβη σημαντικών οργανιδίων που συμμετέχουν στην γονιμοποίηση όπως του ακροσώματος και των μιτοχονδρίων (αλλαγές στην παραγωγή ATP και μείωση της επιβίωσης και κινητικότητας του σπερματοζωαρίου) αλλά και η συσσώρευση επιγενετικών αλλαγών στο DNA με σημαντικότερη την μεθυλίωση του γενετικού υλικού του πατρικού πυρήνα η οποία επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό την ανάπτυξη του εμβρύου.(Abtahi et al.,2023) (Jia et al., 2015)

Όσον αφορά την κυτταρική σειρά των ωαρίων μελέτες δείχνουν ότι η παρουσία της διάφανης ζώνης (zona pellucida) αποτελεί προστατευτικό παράγοντα έναντι των μηχανικών βλαβών από την ανάπτυξη κρυστάλλων. Η διάφανη ζώνη καλύπτει το κυτταρόπλασμα και την κυτταρική μεμβράνη του ωαρίου προστατεύοντάς το από μηχανικές βλάβες που μπορεί να προκύψουν από την κρυοσυντήρηση. Πιο συγκεκριμένα έχει αποδειχθεί ότι ωάρια που φέρουν άθικτη διάφανη ζώνη παρουσιάζουν μεγαλύτερο ποσοστό επιβίωσης μετά την απόψυξη σε σχέση με ωάρια χωρίς διάφανη ζώνη. Επίσης παρατηρήθηκε ότι δεν υπάρχουν διαφορές στην ανάπτυξη του σχηματισμένου εμβρύου είτε χρησιμοποιηθούν φρέσκα ωάρια είτε κρυοσυντηρημένα που φέρουν διάφανη ζώνη κατά την πραγματοποίηση εξωσωματικής γονιμοποίησης (IVF). Το συγκεκριμένο χαρακτηριστικό έδωσε το έναυσμα για την εφαρμογή τεχνικών ενθυσάλωσης διάφορων κυττάρων που προορίζονται για κρυοσυντήρηση με δομές παρόμοιες της διάφανης ζώνης με σκοπό την μεγιστοποίηση της επιβίωσης έπειτα από υαλοποίηση. (Choi et al., 2015)

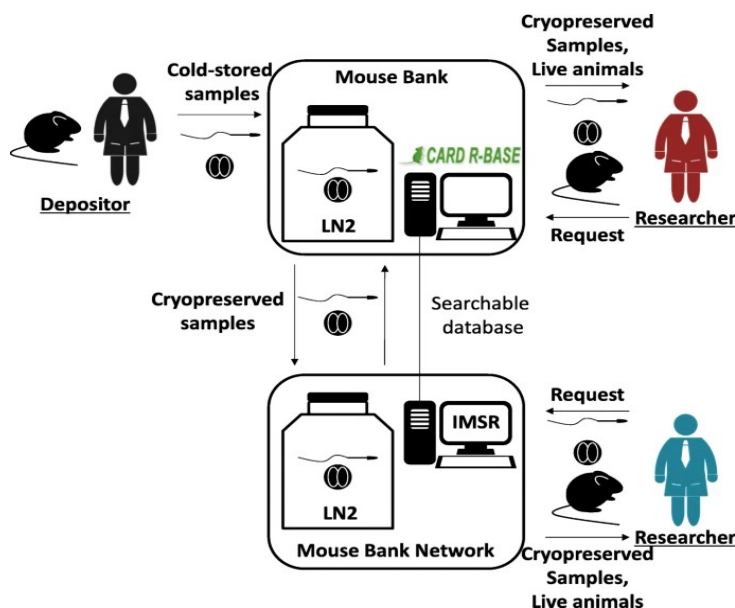
2.9 Εφαρμογές της κρυοσυντήρησης στην διατήρηση διαγονιδιακών σειρών

Η διαγονιδιακή τεχνολογία έχει σημειώσει ιδιαίτερη άνθιση τις τελευταίες δεκαετίες με τους επιστήμονες να χρησιμοποιούν όλο και περισσότερο διαγονιδιακά ζώα για την μελέτη βιολογικών μηχανισμών, αλλά και πολλών ανθρώπινων και ζωικών ασθενειών. Από την πρώτη εμφάνιση του συγκεκριμένου κλάδου στις αρχές του 20ου αιώνα το κυριότερο ζώο επιλογής αποτέλεσε το ποντίκι (*Mus musculus*). Η επιλογή του ποντικίου ως *in vivo* σύστημα πειραματισμού βασίστηκε σε ορισμένα χαρακτηριστικά του είδους όπως: την χρωμοσωμική ομοιότητα μεταξύ του ποντικού και του ανθρώπου, την εύκολη εκτροφή και την εύκολη διαθεσιμότητα διαφόρων σειρών. Η εκτροφή γενετικά τροποποιημένων ποντικίων ξεκίνησε με την επιλογή συγκεκριμένων ζώων που έφεραν τυχαίες μεταλλάξεις. Ωστόσο λόγω της μικρής πιθανότητας

ανάπτυξης μεταλλάξεων με κλινικό ενδιαφέρον έγιναν προσπάθειες σχεδιασμού καινούριων τεχνικών. Η παραγωγή διαγονιδιακών ζώων γίνεται με την εισαγωγή ξένου γενετικού υλικού σε ένα άλλο γενετικό υπόβαθρο στο οποίο η νέα πληροφορία μπορεί να εμφανιστεί και να μελετηθεί φαινοτυπικά. (Wight και Wagner 1994) (Hickman-Davis και Davis 2006)

Μέχρι σήμερα έχουν καταγραφεί πάνω από 60.000 σειρές διαγονιδιακών ποντικίων και ο αριθμός αυτός εξακολουθεί να αυξάνεται. Οι διαγονιδιακές σειρές έχουν τεράστια κλινική σημασία, ενεργό ρόλο στην μελέτη διάφορων βιολογικών φαινομένων (μελέτη βιολογικού μονοπατιού *in vivo*) και αποτελούν πολύ χρήσιμο εργαστηριακό εργαλείο. Είναι πολύ σημαντικό για την διεξαγωγή πειραμάτων να υπάρχει πρόγραμμα διατήρησης ορισμένων διαγονιδιακών σειρών. Η ανάγκη αυτή έχει τόσο πρακτικές όσο και ηθικές πλευρές.

Η διατήρηση χρήσιμων διαγονιδιακών σειρών πραγματοποιείται με τεχνικές κρυοσυντήρησης γαμετοκυττάρων, εμβρύων ή ακόμη και ιστών. Η ανάπτυξη της κρυοσυντήρησης προώθησε την ίδρυση πολλών τραπεζών διαγονιδιακών κυττάρων παγκοσμίως καθιστώντας την διαθεσιμότητα των σειρών εύκολη, οικονομική και γρήγορη. Η μεταφορά ζωντανών διαγονιδιακών ζώων από εργαστήριο σε εργαστήριο αντικαταστάθηκε από την μεταφορά κρυοσυντηρημένων γεννητικών κυττάρων μειώνοντας με αυτό τον τρόπο τόσο τον αριθμό τους (*reduction*) όσο και την ταλαιπωρία που βιώνουν κατά την μεταφορά (*refinement*). Επίσης με την μεταφορά κρυοσυντηρημένου γεννητικού υλικού αποφεύγεται η ανάπτυξη ασθενειών ή η πρόκληση τραυματισμού ζωντανών ζώων ενώ παράλληλα ελαχιστοποιείται η πιθανότητα επιμόλυνσης του υλικού. Γίνεται εφικτή η διεξαγωγή πειραμάτων εκτός του αρχικού χώρου φύλαξης με δυνατότητα χρονικής επιλογής και παραγωγής μεγάλου αριθμού απογόνων για τον σχηματισμό των ομάδων πειραματισμού. (Takeo et al., 2020)



Εικόνα 8. Χρήση τραπεζών για την μεταφορά επιθυμητών σειρών. (Takeo et al., 2020)

Η κρυοσυντήρηση έχει πρακτικές εφαρμογές και εντός του ίδιου του εργαστηρίου. Με την διατήρηση μίας διαγονιδιακής σειράς διατηρούνται παράλληλα αναλλοίωτα και όλα τα γενετικά και φαινοτυπικά χαρακτηριστικά της. Το γεγονός αυτό έχει μεγάλη σημασία στην διεξαγωγή των πειραμάτων όπου γενετικές αλλαγές (όπως μεταλλάξεις κ.ά. genetic drift) ή ανθρώπινα λάθη (κατά την εκτροφή και έλεγχο της σειράς) μπορεί να επηρεάσουν το τελικό αποτέλεσμα. Δηλαδή μία κρυοσυντηρημένη σειρά μπορεί να ανακτηθεί και να χρησιμοποιηθεί για πειραματισμό ή να διασωθεί αν εμφανίζει χαμηλή αναπαραγωγική ικανότητα.

Επίσης η διατήρηση μίας διαγονιδιακής σειράς στις εγκαταστάσεις χρειάζεται αρκετά μεγάλο κεφάλαιο που περιλαμβάνει τα έξοδα εκτροφής μεγάλου αριθμού ζώων, του χώρου και των εργατωρών ενώ ενέχεται ο κίνδυνος απώλειας λόγω μεταλλάξεων ή καταστροφών (όπως πυρκαγιάς, πλημμύρας και σεισμού). Η τεχνική της κρυοσυντήρησης για την διατήρηση των σειρών δίνει λύση στα παραπάνω προβλήματα καθιστώντας εύκολη τόσο την ασφάλειά τους όσο και την ανάκτησή τους όποτε αυτό κρίνεται απαραίτητο. Έτσι ο αριθμός των ζωντανών ζώων είναι μειωμένος στα απολύτως απαραίτητα για την διεξαγωγή των πειραμάτων (reduction και refinement). (Takahashi και Liu 2010) (Eto et al., 2015)

Οι πιο συχνώς χρησιμοποιούμενες τεχνικές κρυοσυντήρησης είναι η κρυοσυντήρηση εμβρύων και η κρυοσυντήρηση σπέρματος. Η κρυοσυντήρηση εμβρύων αποτελεί αξιόπιστη και αποτελεσματική τεχνική ωστόσο για να θεωρείται σίγουρη η διατήρηση της σειράς πρέπει να συλλεχθεί μεγάλος αριθμός εμβρύων (μερικές εκατοντάδες). Η συγκεκριμένη διαδικασία είναι δύσκολο εγχείρημα καθώς για την συλλογή των εμβρύων απαιτείται εκτροφή μεγάλου αριθμού θηλυκών ποντικών. Πιο αποτελεσματικά πρωτόκολλα (όπως τα πρωτόκολλα υπερωορρηξίας) αναπτύσσονται ώστε να μειωθεί τόσο ο οικονομικός αντίκτυπος στα εργαστήρια όσο και ο αριθμός των ζώων που είναι απαραίτητος για την συλλογή των ωαρίων (reduction). Πρωτόκολλα υπερωορρηξίας έχουν περιγραφεί όπου από ένα θηλυκό είναι δυνατή η συλλογή 100 περίπου ωαρίων. Προβληματισμοί όσον αφορά τις πρακτικές refinement της διαδικασίας εγείρονται στο γεγονός του πιθανού πόνου που νιώθει το ζώο κατά την διαδικασία αυτή.

Η επιλογή κρυοσυντήρησης σπέρματος ή γονιμοποιημένων ωαρίων ή ζυγωτών καθορίζεται από το είδος της διαγονιδιακής σειράς. Διαγονιδιακές σειρές που πρέπει να διατηρηθούν σε ομοζυγωτία κρυοσυντηρούνται μέσω της κρυοσυντήρησης ζυγωτών ενώ σειρές που μπορεί να διατηρηθούν σε ετεροζυγωτία στρατηγικές κρυοσυντήρησης σπέρματος θεωρούνται πιο αποτελεσματικές και λιγότερο χρονοβόρες.

Στην κρυοσυντήρηση σπέρματος μικρός αριθμός αρσενικών ποντικών μπορεί να παρέχει μεγαλύτερο αριθμό απογόνων. Παρά όμως τα πλεονεκτήματα τις διαδικασίας ως πιο φτηνής, απλής και γρήγορης τα σπερματοζωάρια αποτελούν απλοειδή κύτταρα και συνεισφέρουν στο μισό γενετικό υλικό του απογόνου. Η κρυοσυντήρηση σπέρματος συνεχίζει να είναι η

τεχνική πρώτης επιλογής γεγονός που ενισχύθηκε από την ανάπτυξη και βελτίωση των τεχνικών υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (ART-assisted reproduction techniques). (Takahashi και Liu 2010)

3. Στοιχεία ανατομίας γεννητικού συστήματος ποντικού

3.1 Από το ωκύτταρο μέχρι τον σχηματισμό των γονάδων

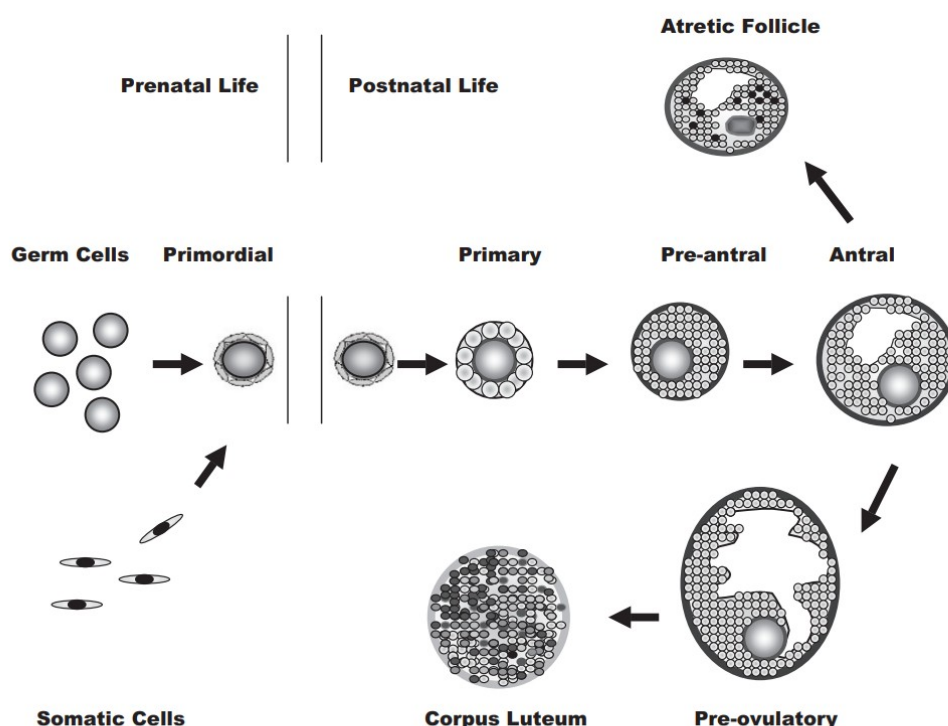
3.1.1 Ανάπτυξη ωθηλακίων

Τα γεννητικά κύτταρα (GCs) με την άφιξή τους κατά την εμβρυική ζωή στη περιοχή των αναπτυσσόμενων γονάδων αποκαλούνται πλέον ως ωγόνια. Τα ωγόνια διακόπτουν τον πολλαπλασιασμό τους, ο οποίος πραγματοποιείται για την αύξηση του αριθμού τους στις γονάδες, κατά την 13,5 dpc (day post-coitum) και εισέρχονται στον πρώτο κύκλο της μείωσης όπου και σταματούν στο στάδιο της πρόφασης. Περιέχουν τετραπλή ποσότητα απλοειδούς γεννητικού υλικού και σχηματίζουν τα ωκύτταρα τα οποία δομούνται σε αθροίσεις που ονομάζονται GCs nests. Τα GCs nests διασπώνται από την γέννηση και μετά ώστε να σχηματιστούν τα αρχέγονα ωθηλάκια τα οποία αποτελούν και το πρώτο στάδιο ανάπτυξης των ωθηλακίων. Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει την απόπτωση ενός αριθμού ωκυττάρων μέσα στην άθροιση και την έγκλιση των υπόλοιπων κυττάρων που επιβίωσαν ανάμεσα στα σωματικά κύτταρα της ωθήκης. Κάποια από τα αρχέγονα ωθηλάκια θα ξεκινήσουν να αναπτύσσονται ενώ η πλειοψηφία θα παραμείνει αδρανής μέχρι να λάβουν ορμονική διέγερση. Το τέλος της αναπαραγωγικής λειτουργίας καθορίζεται από την εξάντληση των αποθεμάτων των αρχέγονων ωθηλακίων είτε λόγω απόπτωσης είτε λόγω ανάπτυξης, ωορρηξίας και/ή ατρησίας.

Στο επόμενο στάδιο ανάπτυξης το αρχέγονο ωθηλάκιο αυξάνεται σε μέγεθος λόγω της αλλαγής του μεγέθους του ωκυττάρου και της αλλαγής των πλακωδών κοκκιωδών κυττάρων που το περιβάλλουν σε κυβοειδή κοκκιώδη κύτταρα. Το ωκύτταρο περιβάλλεται από μία διαφανή ζώνη η οποία ονομάζεται zona pellucida και διατηρείται καθ' όλη την διάρκεια της ανάπτυξης του ωκυττάρου μέχρι και την ωορρηξία. Το σχηματισμένο πρωταρχικό πλέον ωθηλάκιο περνά στο επόμενο στάδιο ανάπτυξης με το οποίο προκύπτει το πρώιμο ωθηλάκιο χωρίς άντρο. Στο συγκεκριμένο στάδιο τα κοκκιώδη κύτταρα πολλαπλασιάζονται και σχηματίζουν πολλά επίπεδα περικλείοντας το ωκύτταρο ενώ εξωτερικά του ωθηλακίου σχηματίζεται μία στρώση από κύτταρα της θήκης (theca cells). Τα κοκκιώδη κύτταρα δημιουργούν ένα δίκτυο μεταξύ τους το οποίο αποτελείται από συνδέσεις. Το δίκτυο αυτό επιτρέπει την επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων καθώς και την μεταφορά θρεπτικών ουσιών, ιόντων και μεταβολιτών. Το στάδιο του άντρου χαρακτηρίζεται από την ολοκλήρωση της πρώτης μειωτικής διαίρεσης που έχει σαν αποτέλεσμα τον σχηματισμό του πρώτου πολικού σωματίου και από τον σχηματισμό της κοιλότητας του άντρου η οποία γεμίζει με μία υγρή ουσία που περιέχει νερό, ηλεκτρολύτες, πρωτεΐνες ορού και αυξημένες συγκεντρώσεις στεροειδών ορμονών που εκκρίνονται από τα κοκκιώδη κύτταρα. Στο σημείο αυτό τα περισσότερα ωθηλάκια θα υποστούν ατρησία ενώ εκείνα που θα επιβιώσουν θα μπορέσουν να αναπτυχθούν μέχρι και την ωορρηξία.

Μόνο κατά το στάδιο της ωορρηξίας το ωθηλάκιο δύναται να απελευθερώσει το ωκύτταρο ώστε να γίνει η γονιμοποίηση. Η βάση του

ωθηλακίου σπάει, το ώριμο πλέον ωκύτταρο απελευθερώνεται και τα κοκκιώδη κύτταρα και κύτταρα της θήκης του ωθηλακίου διαφοροποιούνται σε μία δομή που ονομάζεται ωχρο σωματίο. (Barnett et al., 2006)

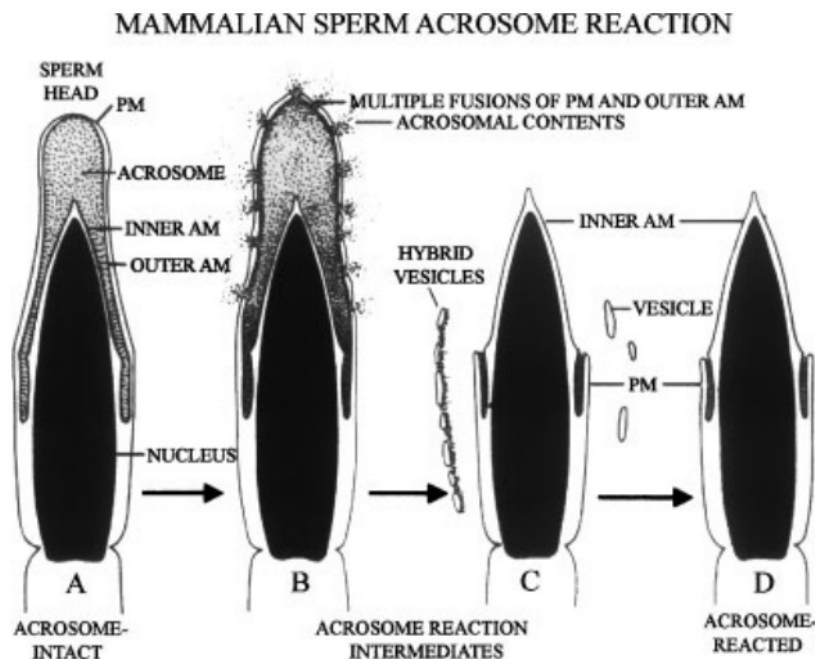


Εικόνα 9. Ανάπτυξη ωθηλακίων από τα αρχέγονα ωθηλάκια μέχρι και την ωορρηξία. (Barnett et al., 2006)

3.1.2 Γονιμοποίηση

Τον κυριότερο ρόλο στην γονιμοποίηση διαδραματίζει η διαφανής ζώνη ή zona pellucida η οποία όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα εμφανίζεται για πρώτη φορά στο στάδιο του πρώιμου ωθηλακίου και καλύπτει εξωτερικά την πλασματική μεμβράνη του ωκυττάρου. Αποτελεί δηλαδή ένα εξωκυττάριο πυκνό κάλυμμα που αυξάνεται σε πάχος καθώς αναπτύσσεται το ωκύτταρο και είναι επίσης το σημείο στο οποίο θα ενωθεί το σπερματοζωάριο ώστε να πραγματοποιηθεί η γονιμοποίηση. Η διαφανής ζώνη παράγεται από το αναπτυσσόμενο ωκύτταρο και συντίθεται από τρεις γλυκοπρωτεΐνες. Οι γλυκοπρωτεΐνες αυτές είναι οι: ZP1, ZP2 και ZP3. Σε περίπτωση έλλειψης είτε της ZP2 είτε της ZP3 η διαφανής ζώνη δεν μπορεί να σχηματιστεί και το ωάριο δεν μπορεί να γονιμοποιηθεί. Επίσης σε περίπτωση ετεροζυγίας για την μία ή και για τις δύο γλυκοπρωτεΐνες έχει αποδειχτεί ότι σχηματίζεται διαφανής ζώνη ωστόσο το πάχος της δεν είναι φυσιολογικό χωρίς αυτό να επηρεάζει την γονιμότητα του ωαρίου. Με την σεξουαλική επαφή σπερματοζωάρια φτάνουν μέχρι την σάλπιγγα όπου βρίσκεται το ώριμο ωάριο. Πολλά από αυτά θα προσπαθήσουν να διαπεράσουν την διαφανή ζώνη όμως μόνο ένα θα καταφέρει να προσκολληθεί. Η διαδικασία αυτή αναφέρεται ως αντίδραση του σπερματικού ακροσώματος μία μορφή κυτταρικής εξωκύττωσης. Ένα σπερματοζωάριο με άθικτο ακρόσωμα ενώνεται με την ZP3 της διαφανής ζώνης η οποία λειτουργεί ως υποδοχέας και ξεκινά η αντίδραση του ακροσώματος. Η

εκτεθειμένη εσωτερική ακροσωμική μεμβράνη ενώνεται με την ZP2 και αρχίζει να διεισδύει στην διαφανή ζώνη. Όταν φτάσει στο όριο ανάμεσα στην διαφανή ζώνη και την πλασματική μεμβράνη του ωαρίου συντήκεται με την πλασματική μεμβράνη. Λιγά λεπτά μετά την γονιμοποίηση και την εισχώρηση του αρσενικού πυρήνα μέσα στο ωάριο οι δύο γλυκοπρωτεΐνες τροποποιούνται ώστε να μην μπορέσει άλλο σπερματοζωάριο να εισχωρήσει στην διαφανή ζώνη. Ο πυρήνας του ωαρίου ολοκληρώνει τον δεύτερο κύκλο της μειωτικής διαίρεσης και σχηματίζει το δεύτερο πολικό σωματίο και έπειτα ο αρσενικός απλοειδής πυρήνας συντήκεται με τον θηλυκό απλοειδή πυρήνα δημιουργώντας το ζυγωτό. (Wassarman,2005)



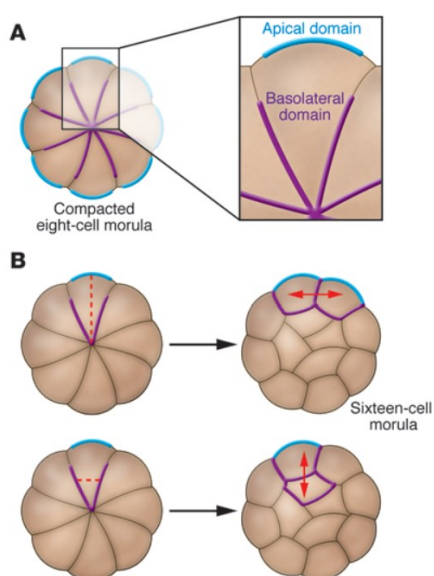
Εικόνα 10. Διάγραμμα παρουσίασης της αντίδρασης ακροσώματος. (Wassarman,2005)

3.1.3 Ανάπτυξη της βλαστοκύστης

Από την γονιμοποίηση του ωαρίου και μετά το ζυγωτό υφίσταται μία σειρά από διαδοχικές διαιρέσεις παράγοντας έναν αυξανόμενο αριθμό μικρότερων κυττάρων που ονομάζονται βλαστοκύτταρα χωρίς αυτό να επηρεάζει το μέγεθος του αναπτυσσόμενου εμβρύου. Έπειτα από τις πρώτες τρεις διαδοχικές μιτωτικές διαιρέσεις το έμβryo αποτελείται από 2, 4 και 8 κύτταρα αντίστοιχα. Στο στάδιο των 8 κυττάρων τα κύτταρα σχηματίζουν συνδέσεις και συμπυκνώνονται μεταξύ τους. Αυτές οι διακυτταρικές ενώσεις θα συμβάλλουν στην πορεία σε μορφογεννητικές τροποποιήσεις που πρέπει να υποστεί το έμβryo ώστε να προκύψουν οι πρώτες κυτταρικές σειρές. Η αύξηση των κυττάρων γίνεται προς το εξωτερικό μέρος του εμβρύου δημιουργώντας με αυτό τον τρόπο έναν νοητό άξονα συμμετρία στο εσωτερικό και πιο συγκεκριμένα στο σημείο που υπάρχουν οι διασυνδέσεις. Μαζί με την αλλαγή στην διάταξη των κυττάρων του εμβρύου πραγματοποιείται και αλλαγή στην εσωτερική δόμηση του κάθε κυττάρου. Πιο συγκεκριμένα ο πυρήνας μετακινείται προς την βάση του κυττάρου (δηλαδή προς τον άξονα συμμετρίας) ενώ τα

ενδοσώματα, ένα μεγάλο ποσοστό ακτίνης καθώς και οι μικρολάχνες στοιχίζονται στην κορυφή του κυττάρου.

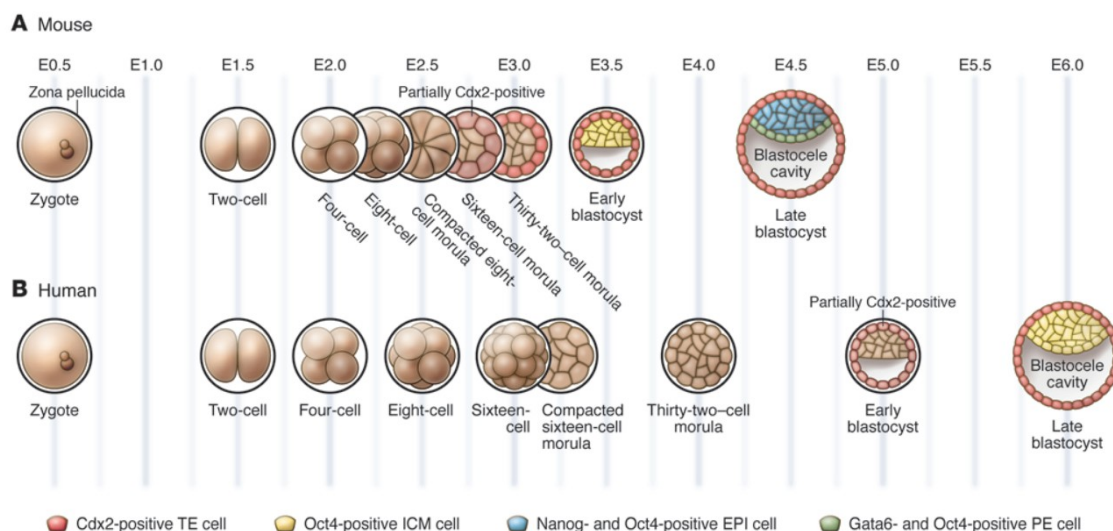
Από την στιγμή που θα αποκατασταθεί η πολικότητα συνεχίζονται οι διαιρέσεις και το έμβρυο περνά στο στάδιο των 16 και 32 κυττάρων. Ωστόσο σε αυτές τις διαιρέσεις υπάρχουν δύο τύποι πολικότητας που ακολουθούνται από τους απογόνους. Αν η διαίρεση γίνει κάθετα στον άξονα συμμετρίας και οι δύο απόγονοι θα βρίσκονται στο εξωτερικό του εμβρύου ενώ αν η διαίρεση γίνει παράλληλα στον άξονα συμμετρίας ένας απόγονος θα βρίσκεται στο εξωτερικό και ο άλλος στο εσωτερικό του εμβρύου. Σε αυτή την δομή συμβάλει σε μεγάλο βαθμό η πολικότητα που είχε επιτευχθεί στο στάδιο των 8 κυττάρων. Το αποτέλεσμα είναι ο σχηματισμός δύο ξεχωριστών κυτταρικών ομάδων με την μία να βρίσκεται στην περιφέρεια και την άλλη στο κέντρο. (Cockburn and Rossant,2010). Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι ο ακριβής αριθμός των κυττάρων που συγκεντρώνονται στο κέντρο του εμβρύου μπορεί να διαφέρει από έμβρυο σε έμβρυο και αυτή η διαφοροποίηση μπορεί να αποτελεί προϊόν ρυθμιστικών μηχανισμών.



Εικόνα 11. Περιγραφή της πολικότητας κατά τις πρώτες μιτωτικές διαιρέσεις του εμβρύου. (Cockburn and Rossant,2010)

Μετά το στάδιο των 32 κυττάρων οι δύο ξεχωριστές ομάδες κυττάρων έχουν διαφορετικές αναπτυξιακές πορείες. Η εξωτερική ομάδα δημιουργεί τα κύτταρα της τροφοβλάστης τα οποία θα σχηματίσουν τον πλακούντα και η εσωτερική ομάδα σχηματίζει τα κύτταρα της εσωτερικής κυτταρικής μάζας (inner cell mass) που δίνουν γέννηση σε ολόκληρο το έμβρυο, στο αμνιακό σάκο, στην άλλαντο καθώς και σε ένα κομμάτι του πλακούντα. (Pedersen, Wu and Balakier, 1986) Παράγοντες που ρυθμίζουν την μοίρα της κάθε κυτταρικής σειράς είναι η θέση, η πολικότητά τους αλλά επίσης και μεταγραφικοί παράγοντες. Στο στάδιο των 32 κυττάρων επίσης αρχίζει να δημιουργείται μία κοιλότητα στο εσωτερικό της πρώιμης βλαστοκύστης που ονομάζεται βλαστοκήλη και είναι σημαντική για την ανάπτυξη των κυττάρων ICM. Με τον σχηματισμό της

βλαστοκλήλης την 3.5 dpc το έμβρυο θεωρείται πλέον ώριμη βλαστοκύστη. Μετά από 24 ώρες ανάπτυξης (δηλαδή την 4,5 dpc) η βλαστοκύστη φτάνει στην μήτρα και είναι έτοιμη για εμφύτευση. Αξίζει να σημειωθεί ότι κατά την διάρκεια των πρώτων διαιρέσεων το έμβρυο είναι ευέλικτο και εύκολα προσαρμόσιμο σε αλλαγές όπως η αφαίρεση, η πρόσθεση και η ανακατάταξη των κυττάρων του. Τα κύτταρα ICM σε δεύτερο στάδιο χωρίζονται στα κύτταρα του επιβλάστη (EPI) και στα κύτταρα του πλευρικού ενδοδέρματος (PE). Τα κύτταρα PE σχηματίζουν μία μονή στιβάδα που χωρίζει τα κύτταρα του επιβλάστη από την βλαστοκλήλη. (Cockburn and Rossant,2010)

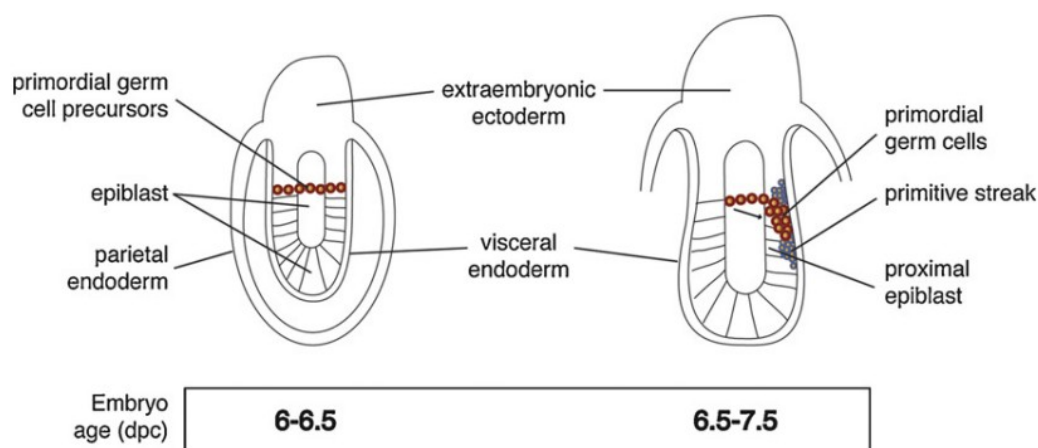


Εικόνα 12. Στάδια ανάπτυξης της βλαστοκύστης και διαφορές ανάμεσα στον ποντίκι και τον άνθρωπο. (Cockburn and Rossant,2010)

3.2 Αρχέγονα γεννητικά κύτταρα -PGCs

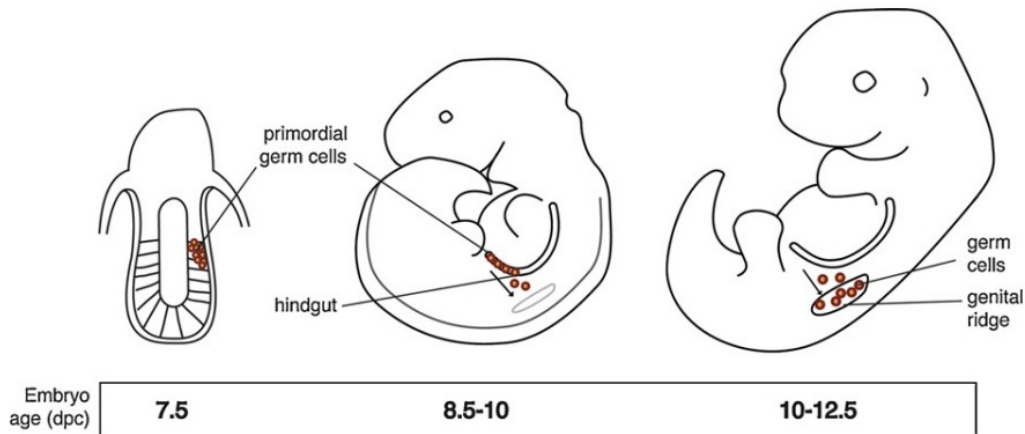
Τα αρχέγονα γεννητικά κύτταρα είναι μία μικρή ομάδα 40-75 περίπου κυττάρων που προέρχονται από τον επιβλάστη της βλαστοκύστης. (Saitou and Yamaji,2012) Τα επιβλαστικά κύτταρα δεν είναι προγραμματισμένα να προωθήσουν το μοριακό μονοπάτι προς τον σχηματισμό των PGCs οπότε διαφοροποιούνται τόσο σε PGCs όσο και σε σωματικά κύτταρα. Αυτό σημαίνει ότι κατά τον καθορισμό των PGCs θα πρέπει να γίνουν ενέργειες περιορισμού του σωματικού μονοπατιού στους προγόνους των κυττάρων αυτών. (Ewen and Koorman,2010). Από μοριακής σκοπιάς ο μεταγραφικός παράγοντας Blimp1 φαίνεται να είναι ο υπαίτιος για την διαφοροποίηση των κυττάρων σε PGCs καθώς και για την αναστολή του σωματικού μονοπατιού. Έχει αποδειχθεί ότι σε περίπτωση απουσίας του παράγοντα Blimp1 τα PGCs δημιουργούν συνάθροιση αλλά αδυνατούν να πολλαπλασιαστούν παρουσιάζοντας παράλληλα μειωμένη δυνατότητα μετανάστευσης. (Saga,2008) Μετά τον διαχωρισμό τους από τα σωματικά κύτταρα τα PGCs κατανέμονται στο προερχόμενο από τον επιβλάστη εξωεμβρυϊκό μεσόδερμα με τα κύτταρα να καταβάλουν την περιοχή κοντά στον βλαστό της αλλάντου πλησίον του προερχόμενου από τον τροφοβλάστη εξωεμβρυϊκού εξωδέρματος. Ο προσδιορισμός των PGCs γίνεται σε δύο στάδια. Αρχικά τα επιβλαστικά κύτταρα πιο κοντά στο εξωεμβρυϊκό εξώδερμα αποκτούν

την ικανότητα να γίνουν PGCs κατά την 6,5 dpc. Σε δεύτερο στάδιο μία υποομάδα αυτών των κυττάρων διαφοροποιείται ως PGCs μέχρι την 7,5 dpc. (Ewen and Koopman,2010) Μετά την διαφοροποίησή τους σταματούν τις μεταγραφικές τους διαδικασίες (κατά την 8,5 dpc) και υπόκεινται σε εκτεταμένο επαναπρογραμματισμό του γονιδιώματός τους, ο οποίος περιλαμβάνει τροποποιήσεις των ιστονών, αύξηση του μεγέθους του πυρήνα και μείωση της μεθυλίωσης του DNA. (Saga,2008) Εργαστηριακά μπορεί να παρατηρηθεί η πορεία των PGCs με την βοήθεια της TNAP που μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν δείκτης.



Εικόνα 13. Διαφοροποίηση αρχέγονων γεννητικών κυττάρων.(Ewen and Koopman,2010)

24 ώρες μετά από την δημιουργία των γεννητικών κυττάρων (δηλαδή την 8,5 dpc) το άθροισμά τους αρχίζει να διαλύεται, αρχίζουν να πολλαπλασιάζονται (κάθε 16 ώρες) και μεταφέρονται μαζί με τα κύτταρα του ενδοδέρματος στο σχηματιζόμενο μεσεντέριο. Καθώς ο αυλός επεκτείνεται τα PGCs τοποθετούνται κατά μήκος του. Από την κοιλιακή περιοχή του εντερικού τοιχώματος τα PGCs κινούνται ραχιαία και μέσα στο σωματικό τοίχωμα προς την νωτιαία χορδή και αορτή, γύρω από τις κοιλοτικές περιοχές αμφοτερόπλευρα και μέσα στις δύο αναπτυσσόμενες γενετικές κορυφές. Όσα κύτταρα δεν κατάφεραν να φτάσουν στις γονάδες και έμειναν πίσω σε ενδιάμεσες θέσεις ή στο μεσεντέριο υποβάλλονται σε απόπτωση. (McLaren,2003) . Ένα σημαντικό γονίδιο που συμβάλει με την έκφρασή του στην προστασία των κυττάρων κατά την μετανάστευση από την απόπτωση είναι το Nanos3. Η έκφρασή του ξεκινά από την 7,5 dpc και συνεχίζει μέχρι και το τέλος της μετακίνησης. (Saga,2008) Η μετακίνηση των κυττάρων από την βάση της αλλάντου μέχρι και τις γονάδες δεν αποτελεί αυτόνομη απάντηση των κυττάρων αυτών αλλά προκαλείται από μεγάλο αριθμό σημάτων που παράγονται από τα σωματικά κύτταρα. Κατά την διάρκεια της πορείας τους από το μεσεντέριο μέχρι τις γενετικές κορυφές τα PGCs δημιουργούν συνδέσεις μεταξύ τους σχηματίζοντας ένα δίκτυο. Η διαδικασία σταματά μέχρι την 11,5 dpc αλλά τα κύτταρα παραμένουν κοντά σε αθροίσματα. Οι γονάδες προσφέρουν το κατάλληλο περιβάλλον για τα PGCs ώστε να συνεχίσουν την ανάπτυξη και την διαφοροποίησή τους. (Ewen and Koopman,2010)

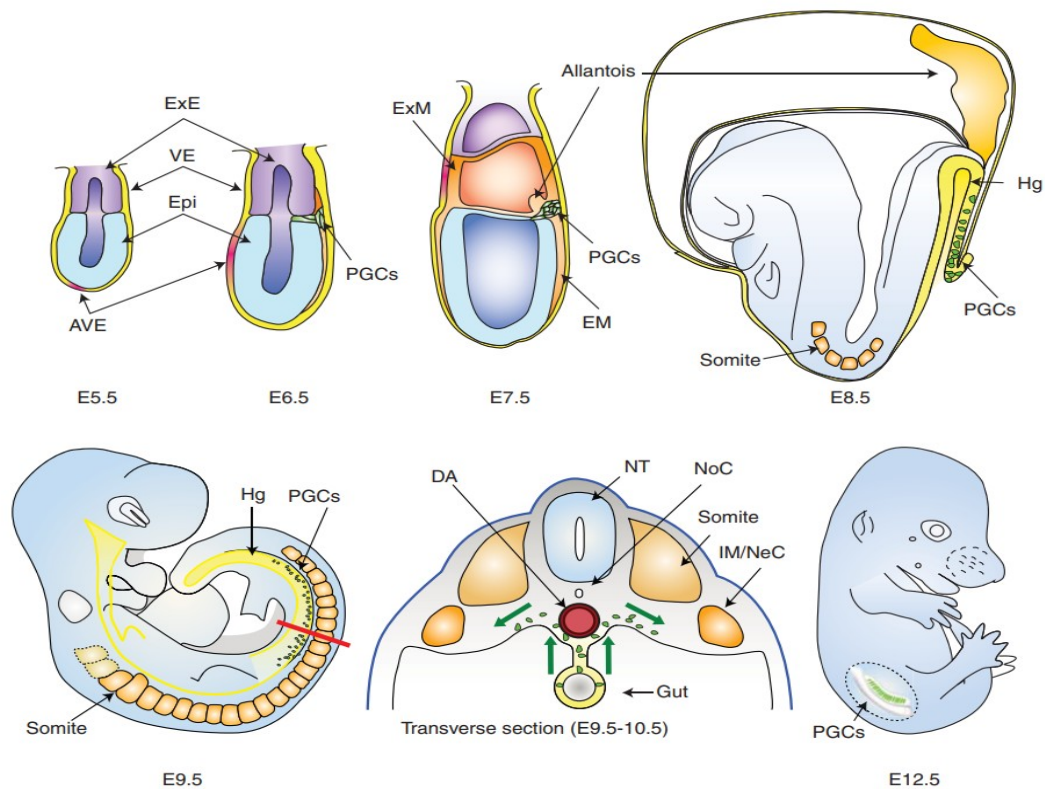


Εικόνα 14. Μετακίνηση αρχέγονων γεννητικών κυττάρων.(Ewen and Koopman,2010)

3.3 Γεννητικά κύτταρα- GCs

Τα PGCs εισέρχονται στις γονάδες οι οποίες προέρχονται από το κοελωμικό επιθήλιο της ουρογεννητικής κορυφής και πλέον αναφέρονται ως γεννητικά κύτταρα (GCs) ή γονοκύτταρα. Έχουν τελικό αριθμό περίπου τα 25.000 κύτταρα και υπόκεινται τόσο σε μορφολογικές όσο και σε γονιδιακές αλλαγές. Γίνονται μεγαλύτερα και πιο στρογγυλά ενώ παράλληλα χάνουν την ικανότητα της μετακίνησης. (Ewen and Koopman,2010) Πριν τον αποικισμό των γονάδων τα GCs είναι διδυναμικά. Η σεξουαλική τους διαφοροποίηση αρχίζει στις γονάδες και έχει αποδειχθεί ότι οφείλεται σε παράγοντες όπως το ρετινοϊκό οξύ που προκαλεί την έναρξη της μείωσης στις γονάδες του θηλυκού και ο παράγοντας *Cyr26b1* ο οποίος βρίσκεται σε μεγάλη ποσότητα στις αρσενικές γονάδες και λειτουργεί ως αναστολέας στην δράση του ρετινοϊκού οξέος. (Saga,2008). Τα GCs σταδιακά υπόκεινται σε κατάλληλες επιγενετικές τροποποιήσεις οι οποίες είναι συναφείς με την εμβρυική ανάπτυξη καθώς και με το αναπτυσσόμενο φύλο. Διαγράφουν πληροφορίες που έχουν κληρονομηθεί από τις προηγούμενες κυτταρικές σειρές με πιο αξιοσημείωτο τρόπο την απομεθυλίωση του DNA χωρίς αυτό να επηρεάζει την ιδιότητα της πολυδυναμίας. (Saitou and Yamaji,2012)

Τα γονοκύτταρα, όπως έχει αναφερθεί και νωρίτερα, αποκτούν κατάλληλο περιβάλλον στην περιοχή των γονάδων ώστε να αναπτυχθούν και να επιβιώσουν. Ωστόσο έχει αποδειχθεί ότι και οι γονάδες επηρεάζονται από την ύπαρξη των γονοκυττάρων με πιο χαρακτηριστικό παράδειγμα την οργανογένεση της ωοθήκης. Τα θηλυκά γονοκύτταρα συμβάλλουν στην αρχική οργάνωση της ωοθήκης με τον σχηματισμό των χαρακτηριστικών ωοθηλακίων. Επίσης έχει αποδειχθεί ότι η ύπαρξη γονοκυττάρων στην θηλυκή γονάδα δεν ενισχύει μόνο το ωοθητικό μονοπάτι αλλά ανταγωνίζεται την επικράτηση του ορχικού μονοπατιού. (Ewen and Koopman,2010)



Εικόνα 15. Σχηματική απεικόνιση της πορείας των αρχέγονων γεννητικών κυττάρων από την βάση της αλλάντου έως τις γονάδες. (Saitou and Yamaji,2012)

3.3.1 Απόπτωση

Εκτός από τα ενδιάμεσα στάδια της μετακίνησης των κυττάρων απόπτωση συμβαίνει και στον χώρο των γονάδων. Στο αρσενικό το πρώτο κύμα απόπτωσης συμβαίνει κατά την 13 dpc με 17 pdc και ο δεύτερος κυτταρικός θάνατος συμβαίνει κοντά στην στιγμή της γέννας με μόνο το 25% των γονοκυττάρων να επιβιώνει. Στο θηλυκό γίνεται πρώτα την 13,5 dpc, έπειτα την 15,5 dpc και μετά στην γέννα. Τα περισσότερα θηλυκά γονοκύτταρα πεθαίνουν αμέσως μετά την γέννα με το 70% αυτών να είναι προγραμματισμένα να υποστούν απόπτωση. Η απόπτωση πραγματοποιείται ώστε να επιβεβαιωθεί η ποιότητα της γενετικής πληροφορίας που θα περάσει σε επόμενες γενιές. (Ewen and Koorman,2010)

3.3.2 Απενεργοποίηση του χρωμοσώματος X

Κατά την 7,5 dpc περίπου το 15% των PGCs έχει αρχίσει να αδρανοποιεί το ένα από τα 2 χρωμοσώματα X όπως γίνεται και στα σωματικά κύτταρα. Η αδρανοποίηση ολοκληρώνεται κατά την μετακίνηση από το μεσεντέριο στις γεννητικές κορυφές. Η ενεργοποίηση ξανά του χρωμοσώματος γίνεται στο διάστημα 11,5-13,5 dpc και ολοκληρώνεται πριν την έναρξη της μείωσης. Η διαδικασία αυτή γίνεται ώστε να αποκατασταθεί η σωστή ποσότητα X χρωμοσώματος προερχόμενων γονιδίων στα θηλυκά γονοκύτταρα.

3.4 Γεννητικό σύστημα θηλυκού ποντικίου

Οι πόροι Müllerian αποτελούν την εμβρυική δομή από την οποία προέρχονται τα όργανα του θηλυκού γεννητικού συστήματος δηλαδή οι ωothήκες, οι σάλπιγγες ή ωαγωγοί, η δύο μήτρες, ο τράχηλος, ο κόλπος ή κολεός και το αιδοίο. Στα ποντίκια οι δύο αμφίπλευροι πόροι Müllerian παραμένουν διαχωρισμένοι (χωρίς σύντηξη) και δίνουν γέννηση στα δύο κέρατα της μήτρας και στις δύο ωothήκες. Κατά την διάρκεια της ανάπτυξης του αναπαραγωγικού οι πόροι συγχωνεύονται με το επιθήλιο του ουρογεννητικού κόλπου. Η ανατομική θέση που λαμβάνει η συγχώνευση εξαρτάται από την στιγμή και την χρονική διάρκεια δράσης των ανδρογόνων κατά την διάρκεια της εμβρυικής ζωής. Στα θηλυκά άτομα η θέση αυτή βρίσκεται περισσότερο ουραία σε σχέση με τα αρσενικά καθώς η επίδραση των ανδρογόνων είναι μειωμένη. Οι ωothήκες σχηματίζονται από την κρανιακή περιοχή των πόρων, η οποία δεν είναι συγχωνευμένη, ενώ ο τράχηλος, ο εξωτράχηλος και ο κόλπος προέρχονται από την ουραία περιοχή (Cunha et al.,2019). Πιο αναλυτικά:

3.4.1 Ωothήκες

Αποτελούν ένα ζευγάρι μικρών σφαιρικών οργάνων αμφόπλευρα του γεννητικού συστήματος τα οποία παράγουν τον θηλυκό γαμέτη (ωάρια) καθώς και ορμόνες όπως τα οιστρογόνα και η προγεστερόνη. Η επιφάνεια των ωothικών είναι λεία στα προεφηβικά θηλυκά ωστόσο κατά την σεξουαλική ωριμότητα μετατρέπεται σε οζώδης λόγω της παρουσίας ωothηλακίων και ωχρών σωματίων γεγονός που επηρεάζει και το μέγεθος των οργάνων.

3.4.2 Ωαγωγοί

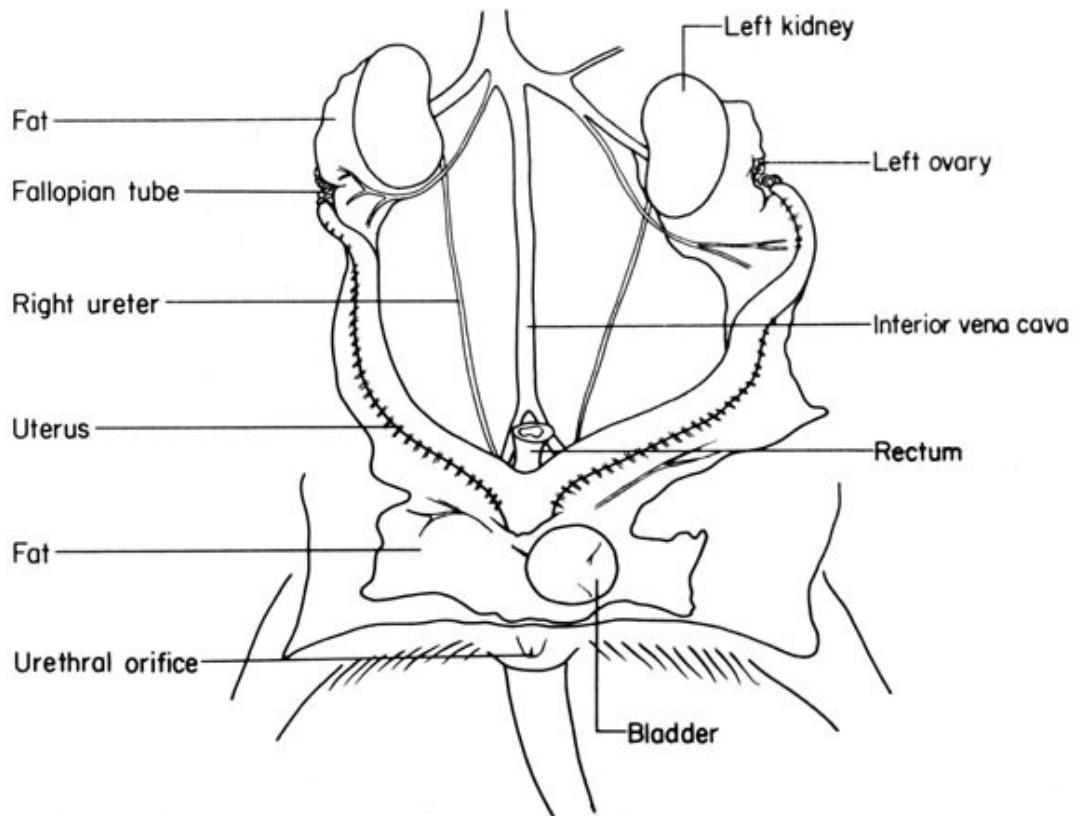
Ο ωαγωγός ή σάλπιγγα είναι ένας μακρύς στενός σπειροειδής σωλήνας, 11 πτυχών, που συνδέει τον περιωθητικό χώρο με το κέρασ της μήτρας. Ο ωαγωγός χωρίζεται σε τρεις περιοχές: την άμπουλα που είναι διευρυμένο μέρος κοντά στον θύλακα των ωothικών, ένα μακρύ, στενό και σφιχτά κουλουριασμένο ισθμό καθώς και το εσωτερικό τμήμα που ενώνεται με το πάνω μέρος του κέρατος της μήτρας. Η άμπουλα ανοίγει από την πλευρά της ωothήκης και το συγκεκριμένο άνοιγμα το περιβάλλουν δομές που μοιάζουν με κροσσούς που εκτείνονται στον περιωθητικό χώρο.

3.4.3 Μήτρα

Η μήτρα αποτελεί ένα όργανο σε σχήμα Υ το οποίο περιλαμβάνει δύο κοιλότητες (τα πλευρικά κέρατα) οι οποίες ενώνονται σε ένα ενδιάμεσο αδιαίρετο τμήμα που είναι ο τράχηλος. Ο τράχηλος στην πορεία καταλήγει στον κόλπο.

3.4.4 Κόλπος

Κοντό, παχύ, μυώδη τμήμα που εκτείνεται από τον τράχηλο μέχρι το αιδοίο (Hummel et al.,1966)



Εικόνα 16. Ουρογεννητικό σύστημα θηλυκού ποντικίου 'The Anatomy of the Laboratory Mouse' Margaret J. Cook, 1965

3.5 Γεννητικό σύστημα αρσενικού ποντικού

Το γεννητικό σύστημα του αρσενικού ποντικού περιλαμβάνει: τους όρχεις, την σπερματοθήκη, τον προστάτη, την επιδιδυμίδα, την ουρήθρα και το πέος.

Οι τρεις κύριοι κυτταρικοί τύποι που αποτελούν την σωματική βάση των αρσενικών γονάδων είναι : τα κύτταρα Sertoli, τα κύτταρα Leydig και ο συνδετικός ιστός. Από τις συγκεκριμένες κατηγορίες κυττάρων τα κύτταρα Sertoli φαίνεται να είναι υπαίτια για την έναρξη του καθορισμού των όρχεων καθώς είναι από τα πρώτα που διαφοροποιούνται. Στην διαφοροποίηση των όρχεων συμβάλλουν επίσης και κύτταρα που προέρχονται από την πλησίον μεσονεφρική περιοχή τα οποία βοηθούν στην σωστή ανάπτυξη των ορχικών σωληναρίων. Η τεστοστερόνη που παράγεται από τα κύτταρα του Leydig εξασφαλίζει την επιβίωση και την διαφοροποίηση του πόρου Wolffian στους σπερματικούς πόρους, τις σπερματικές αποθήκες καθώς και την επιδιδυμίδα. Στην διαφοροποίηση των αρσενικών γονάδων συμβάλλει και η αντι-Mullerian ορμόνη η οποία αποτελεί από τα πρώτα προϊόντα των κυττάρων Sertoli καθώς και μέλος των TGF- β επηρεάζοντας τον εκφυλισμό του πόρου Mullerian. (Hogan et al., 1994)

3.5.1 Όρχεις

Οι όρχεις είναι ωοειδή όργανα που αποτελούνται από περιελιγμένα σωληνάκια που συγκρατούνται μεταξύ τους από συνδετικό ιστό και καλύπτονται από χιτώνα. Βρίσκονται εντός του οσχέου το οποίο αποτελεί επέκταση της σωματικής κοιλότητας εκτός του σώματος. Σαν αδένες έχει τόσο ενδοκρινή όσο και εξωκρινή δράση παράγοντας και εκκρίνοντας ανδρογόνα κατευθείαν στην ροή του αίματος καθώς και τους αρσενικούς γαμέτες (σπερματοζωάρια) που χρησιμοποιούνται στην γονιμοποίηση.

3.5.2 Επιδιδυμίδα

Η επιδιδυμίδα αποτελεί απεκκριτικό πόρο και χωρίζεται στην κεφαλή, το σώμα και την ουρά. Στο συγκεκριμένο όργανο ωριμάζουν τα σπερματοζωάρια και είναι το σημείο ένωσης του όρχεος με στον σπερματικό πόρο. Βρίσκεται στο πάνω και πίσω μέρος του κάθε όρχεος.

3.5.3 Ουρήθρα

Η ουρήθρα είναι ένας μακρύς πόρος που εκτείνεται από την ουροδόχο κύστη μέχρι την άκρη του πέους. Το σημείο της ουρήθρας που εισχωρεί μέσα στο πέος περιβάλλεται από στυτικό, μυϊκό, ινώδη ιστό.

3.5.4 Πέος

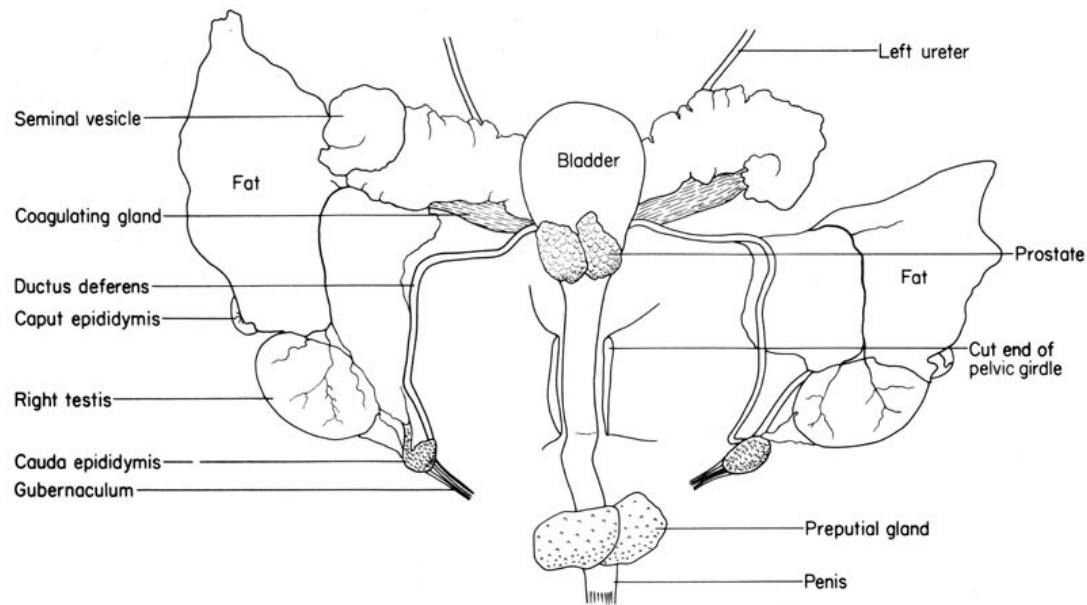
Το σώμα του πέους αποτελείται από τρεις μάζες στυτικού ιστού μέσα σε μεμβράνες συνδετικού ιστού που αξιοποιούνται επίσης και για την προσάρτηση του πέους στην πυελική ζώνη (Hummel et al.,1966). Το αρσενικό ποντίκι έχει δύο ακροποσθίες: μία εξωτερική η οποία καλύπτεται από τριχοφυΐα και μία εσωτερική η οποία καλύπτει την άκρη του πέους (Cunha et al.,2019).

3.5.5 Σπερματικές αποθήκες

Είναι ένα ζευγάρι μεγάλων, επιμήκων και καμπυλωτών αδένων. Ο κάθε ένας από τους δύο αδένες έχει έναν πόρο με τον οποίο ενώνεται με την ουρήθρα. Σπάνια οι πόροι των σπερματικών αποθηκών μπορούν να ενωθούν από την μία ή και από τις δύο πλευρές της ουρήθρας με τους σπερματικούς πόρους (Hummel et al.,1966).

3.5.6 Προστάτης

Ο προστάτης αποτελείται από τέσσερις λοβούς: τον πρόσθιο, τον κοιλιακό, τον ραχιαίο και τον πλάγιο. Οι λοβοί είναι επιμήκεις, αδιαφανείς, και σωληνωειδείς, περιβάλλονται χωριστά από λεπτή μεμβράνη και περικλείουν το προστατικό μέρος της ουρήθρας κοντά στην βάση της ουροδόχου κύστεως. Ο προστάτης επικοινωνεί με την ουρήθρα μέσω πόρων (Cunha et al.,2019).



Εικόνα 17. Αναπαραγωγικό σύστημα αρσενικού ποντικίου 'The Anatomy of the Laboratory Mouse' Margaret J. Cook, 1965

3.6 Σπερματογένεση

Η σπερματογένεση είναι μια διαδικασία συνεχιζόμενης, συγχρονισμένης και χωροταξικά οργανωμένης διαφοροποίησης. Από την βάση έως την επιφάνεια του σπερματοφόρου σωληναρίου υπάρχει μία σειρά από κύτταρα σε διαφορετικό στάδιο διαφοροποίησης και με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται η σπερματογένεση σε ώσεις. Η διαδικασία βασίζεται σε μία ποσότητα βλαστοκυττάρων τα οποία έχουν την ιδιότητα του πολλαπλασιασμού αλλά παράλληλα και την ιδιότητα της διαφοροποίησης. Τα βλαστοκύτταρα είναι απόγονοι των αρχέγονων γεννητικών κυττάρων και αποκαλούνται τύπου-A σπερματογόνια. Κάποια από τα τύπου-A σπερματογόνια διαφοροποιούνται και δίνουν γέννηση στα ενδιάμεσα σπερματογόνια και τα τελευταία με την σειρά τους στα τύπου-B σπερματογόνια. Τα τύπου-B σπερματογόνια είναι πιο μικρά κύτταρα, λειτουργούν ως μεταβατικός τύπος και είναι περισσότερα σε αριθμό από τα τύπου-A. Ενώ κατευθύνονται προς την επιφάνεια του σπερματοφόρου σωληναρίου αυξάνονται σε μέγεθος και μετατρέπονται σε πρωτογενή σπερματοκύτταρα.

Στο στάδιο των πρωτογενών σπερματοκυττάρων ξεκινά και η διαδικασία της μείωσης. Κατά την πρώτη μειωτική διαίρεση προκύπτουν τα δευτερογενή σπερματοκύτταρα τα οποία στον πυρήνα περιέχουν 20 χρωμοσώματα αποτελούμενα από 2 αδελφές χρωματίδες. Κατά την δεύτερη μειωτική διαίρεση αποχωρίζονται οι 2 αδελφές χρωματίδες και σχηματίζονται οι σπερματίδες οι οποίες περιέχουν απλοειδές γεννητικό υλικό. Έπειτα από επιπλέον διαφοροποίηση δημιουργούνται τα σπερματοζωάρια στην επιφάνεια των σπερματικών σωληναρίων. Οι απόγονοι των τύπου-B κυττάρων μέχρι και τις σπερματίδες είναι ενωμένοι με κυτταροπλασματικές γέφυρες. Με αυτόν τον τρόπο διευκολύνεται η διαφοροποίηση των κυττάρων καθώς για την επίτευξη της χρειάζονται προϊόντα του διπλοειδούς γονιδιώματος. Τα γονίδια που

συμβάλουν τόσο στην διαφοροποίηση των γονάδων όσο και στην σπερματογένεση βρίσκονται στο Y χρωμόσωμα.(Hogan et al.,1994)

3.7 Οιστρικός κύκλος

3.7.1 Η δράση των ορμονών του οιστρικού κύκλου.

Τις διαδικασίες του οιστρικού κύκλου ελέγχουν ορμόνες οι οποίες εκφράζονται τόσο από τον άξονα Υποθάλαμος-Υπόφυση όσο και από τις ίδιες τις γονάδες (ωθήκες). Η εκλυτική ορμόνη των γοναδοτροπινών (GnRH) εκφράζεται από τον υποθάλαμο και φτάνει στο πρόσθιο μέρος της υπόφυσης διεγείροντας την έκκριση της θυλακιοτρόπου (ή ωθυλακιοτρόπου) ορμόνης (FSH) και της ωχρινοτρόπου ορμόνης (LH). Η FSH συμβάλλει στην ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των κοκκιωδών κυττάρων, στην μετατροπή των ανδρογόνων σε οιστρογόνα (αρωματοποίηση) καθώς και στην έκφραση υποδοχέων για την LH. Η LH προάγει την ανάπτυξη των κοκκιωδών κυττάρων κυρίως στα μεταγενέστερα στάδια και προκαλεί την ωορρηξία. Και οι δύο γοναδοτροπίνες προκαλούν την έκκριση των οιστρογόνων τα οποία χρειάζονται για την σωστή εκτέλεση της ανάπτυξης του ωθηλακίου αλλά επίσης και για την διατήρηση των δευτερεύοντων χαρακτηριστικών του φύλλου και του αναπαραγωγικού κύκλου.(Croy et al.,2013)

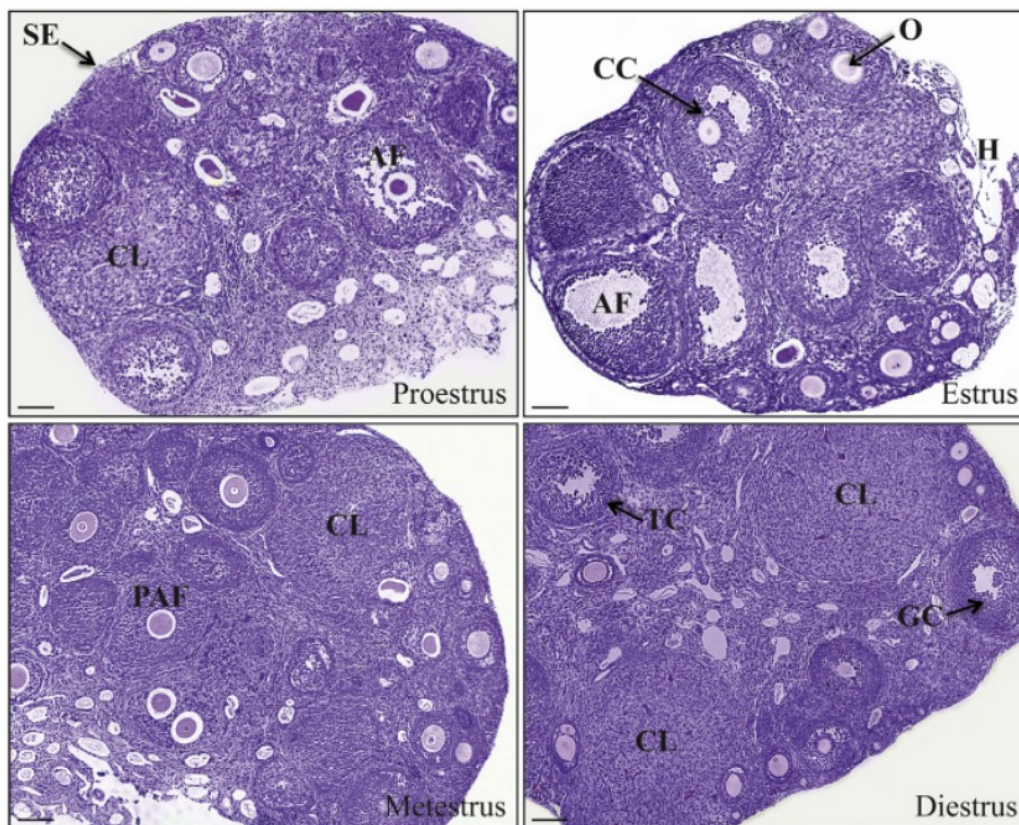
Η ωθήκη παράγει στεροειδής ορμόνες όπως η προγεστερόνη, τα ανδρογόνα και τα οιστρογόνα από τα κοκκιώδη και τα κύτταρα θήκης των ωθηλακίων. Η στεροειδογένεση ξεκινά με την σύνδεση της χοληστερόλης με τους υποδοχείς των LDL πάνω στην επιφάνεια της πλασματικής μεμβράνης των κοκκιωδών κυττάρων. Μεταφέρεται στο εσωτερικό των μιτοχονδρίων όπου και υπόκεινται ενζυματική τροποποίηση παράγοντας πρεγνενολόνη. Η πρεγνενολόνη μετατρέπεται σε οιστραδιόλη (E2) με δύο τρόπους. Το πρώτο μονοπάτι περιλαμβάνει την μετατροπή της πρεγνενολόνης σε δεϋδροεπιανδροστερόνη (DHEA) και την μετατροπή της DHEA σε ανδροστενδιόνη (ASD). Το δεύτερο μονοπάτι περιλαμβάνει την μετατροπή της πρεγνενολόνης σε προγεστερόνη και έπειτα την μετατροπή της προγεστερόνης σε ανδροστενεδιόνη. Τα δύο μονοπάτια συγκλίνουν και η σχηματισμένη ASD παράγει τεστοστερόνη. Τέλος η τεστοστερόνη με την βοήθεια της αρωμάτισης σχηματίζει την οιστραδιόλη. Η οιστραδιόλη συμβάλλει στην ανάπτυξη των ωθηλακίων με την ενίσχυση του πολλαπλασιασμού των κοκκιωδών κυττάρων. (Barnett et al.,2006)

3.7.2 Οι φάσεις του οιστρικού κύκλου

Το θηλυκό ποντίκι φτάνει στην σεξουαλική ωριμότητα περίπου κατά την 6 εβδομάδα μετά την γέννηση. Η σεξουαλική ωρίμανση ωστόσο εξαρτάται από την κάθε σειρά αλλά και από περιβαλλοντικούς παράγοντες. Μέχρι εκείνη την στιγμή κάθε ωθήκη περιέχει 10^4 ωκύτταρα σε διαφορετικά στάδια ωριμότητας. (Hogan et al.,1994) Ο οιστρικός κύκλος του εργαστηριακού ποντικίου διαρκεί συνήθως 4 ημέρες αλλά η χρονική περίοδος είναι μία παράμετρος που διαφέρει από σειρά σε σειρά και μπορεί να φτάσει μέχρι και τις 6 ημέρες.

Ο οιστρικός κύκλος του θηλυκού ποντικίου αποτελείται από τέσσερις φάσεις: τον προοίστρο, τον οίστρο, τον μετροίστρο και τον διοίστρο.

Κατά την διάρκεια του προοίστρου τα ωθηλάκια που φέρουν άντρο αναπτύσσονται κάτω από την επιρροή της FSH. Η FSH σε συνεργασία με την LH προκαλούν σε μεγάλο βαθμό την μετατροπή των ανδρογόνων που προέρχονται από τα κύτταρα θήκης σε οιστρογόνα και πιο συγκεκριμένα σε οιστραδιόλη 17β. Χαρακτηριστικό σημείο του προοίστρου αποτελεί η επιρροή του υποθαλάμου από την οιστραδιόλη με αποτέλεσμα τόσο την αύξηση της οιστραδιόλης όσο και την κορύφωση της LH η οποία προκαλεί την ωορρηξία. Σε αυτό το στάδιο το θηλυκό θα επιτρέψει να συμβεί και το ζευγάρισμα. Κατά την ωχρινική φάση του κύκλου, όπου ανήκει ο μέτοιστρος και ο διοίστρος, σχηματίζεται το ωχρο σωματίο, η έκκριση της LH διακόπτεται και η κύρια ορμόνη είναι η προγεστερόνη αποτρέποντας άλλη ωορρηξία. Η λειτουργική διακοπή του ωχρού σωματίου κοντά στο τέλος του μέτοιστρου έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της σύνθεσης προγεστερόνης. Η μείωση της προγεστερόνης ελευθερώνει την αναστολή της LH και με αυτό τον τρόπο επέρχεται ξανά η φάση του προοίστρου. (Croy et al.,2013)



Εικόνα 18. Ο οιστρικός κύκλος ιστολογικά. SE: επιφάνεια επιθηλίου, CL: ωχρο σωματίο AF: ωκύτταρο με άντρο GC: κοκκιώδη κύτταρα O: ωκύτταρο PAF: ωθηλάκιο χωρίς άντρο TC: κύτταρα theca (Croy et al.,2013)

B. Ειδικό Μέρος

4. Κρυοσυντήρηση και In vitro γονιμοποίηση γαμετοκυττάρων

4.1 Σκοπός

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η εφαρμογή της τεχνικής της in vitro γονιμοποίησης και της κρυοσυντήρησης γαμετών για την διατήρηση διαγονιδιακών σειρών κλινικής σημασίας συμβάλλοντας με αυτό τον τρόπο στην εφαρμογή των 3R's. Πιο συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκε κρυοσυντήρηση σπέρματος που λήφθηκε από σειρές με γενετικό υπόβαθρο C57bl/6 και μελετήθηκε η δυνατότητα ανάκτησης της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων έπειτα από απόψυξη. Έπειτα προσδιορίστηκε η αποτελεσματικότητα της ορμονικής διέγερσης και σε επόμενο στάδιο υπολογίστηκε το ποσοστό γονιμοποίησης έπειτα από την εφαρμογή της in vitro γονιμοποίησης με την χρήση τόσο φρέσκου όσο και κρυοσυντηρημένου σπέρματος.

4.2 Υλικά και Μέθοδοι

4.2.1 Ζωικά μοντέλα

Για την πραγματοποίηση της πειραματικής διαδικασίας χρησιμοποιήθηκε η σειρά ποντικών P55ko η οποία έχει γενετικό υπόβαθρο C57bl/6. Η συγκεκριμένη σειρά αποτελείται από knock out ποντίκια ως προς τον υποδοχέα TNFR-1 (ή P55 receptor) του παράγοντα νέκρωσης όγκων (TNFα). Ο TNFα είναι μία προ-φλεγμονώδη κυτταροκίνη η οποία εκκρίνεται από τα φλεγμονώδη κύτταρα της ανοσίας και κυρίως από τα μακροφάγα. Στο ποντίκι το γονίδιο του TNFα βρίσκεται στο χρωμόσωμα 17, σε ένα αντίγραφο και με μήκος 3kb. Με την έκφραση του γονιδίου δημιουργείται η μεμβρανική μορφή της κυτταροκίνης (mTNFα) και με την διαμεσολάβηση του ενζύμου TACE (TNFα converting enzyme) μετατρέπεται στην διαλυτή μορφή (sTNFα). (Chu 2013) Η δράση του TNFα επιτυγχάνεται έπειτα από την σύνδεσή του με τους κατάλληλους κυτταρικούς υποδοχείς και με την συμμετοχή του σε σηματοδοτικά μονοπάτια (NK-κB και JNK). Ανάλογα με το μονοπάτι στο οποίο συμμετέχει ο παράγοντας TNFα μπορεί να προκαλέσει νέκρωση και απόπτωση, συμβάλει στην κυτταρική επιβίωση, πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση, στην ανάπτυξη του εμβρύου και αποτελεί σημαντικό μηχανισμό έναντι λοιμώξεων. Συμμετέχει επίσης ενεργά στην οξεία και χρόνια φλεγμονή ενώ έχει αποδειχτεί και η διαμεσολάβησή του στην ογκογένεση, στην ανάπτυξη του όγκου, στην διείσδυση και στην μετάσταση καθώς και η συμμετοχή του σε αυτοάνοσα νοσήματα. (Wang and Lin 2008) (Chu 2013) Ο υποδοχέας TNFR-1 εκφράζεται από όλα τα κύτταρα και αποτελείται από ένα εξωκυττάριο, ένα διαμεμβρανικό και ένα ενδοκυττάριο μέρος. Είναι μέλος της οικογένειας των death receptors και προκαλεί απόπτωση. (Wang and Lin 2008)

Η σειρά C57bl/6 αποτελεί μία από τις πιο διαδεδομένες ομοκινικές σειρές και χρησιμοποιείται σε μεγάλο βαθμό λόγω της γενετικής ομοιομορφίας που

προσφέρει ως αποτέλεσμα επανειλημμένων διασταυρώσεων ποντικών της ίδιας γενιάς. Τα C57bl/6 είναι αποτέλεσμα διασταύρωσης της σειράς 57 που δημιουργήθηκε από την εκτροφέα Abbie E. C. Lathrop. Ο γενετιστής Clarence Cook Little και ιδρυτής των Jackson Laboratory χρησιμοποίησε το strain 57 και δημιούργησε την σειρά C57bl/6J της οποίας το γονιδίωμα αλληλουχήθηκε πλήρως το 2002. (Steensma, Kyle and Shampo 2010)(The Jackson Laboratory website)

Τα ζώα που χρησιμοποιήθηκαν τόσο τα αρσενικά όσο και τα θηλυκά ποντίκια ήταν 3-4 εβδομάδων. Η εκτροφή έγινε σε Specific Pathogen Free (SPF) συνθήκες με κύκλο ημέρας-νύχτας 12L:12D (μέρα από τις 7:00 π.μ. έως τις 7:00 μ.μ.), με υγρασία 50-60% και συνεχόμενη παροχή φαγητού και νερού. Το πρωτόκολλο πειραματισμού αξιολογήθηκε από την Επιτροπή Αξιολόγησης Πρωτοκόλλων (ΕΑΠ) του ΕΙΠ και εγκρίθηκε από την Περιφερειακή Κτηνιατρική Αρχή του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Οικονομίας με αριθμό πρωτοκόλλου 64292. Όλες οι διαδικασίες συμβαδίζουν με τις διατάξεις του Π.Δ 56/2013 και της Ευρωπαϊκής Ένωσης (Οδηγία 2010/630/EU), τις αρχές ορθής και ηθικής χρήσης ζώων εργαστηρίου 3+1R: Replacement, Reduction, Refinement και Reminder και τις αρχές που αφορούν στο Animal Research: Reporting in vivo experiments (ARRIVEs).

Έγινε συλλογή ωαρίων από τα θηλυκά ποντίκια μετά από υπερωορρηξία (superovulation) και συλλογή σπερματοζωαρίων από τα αρσενικά ποντίκια για άμεση χρήση (φρέσκο σπέρμα) ή για κρυοσυντήρηση. Τα αρσενικά ποντίκια διατηρήθηκαν μόνα τους για μία εβδομάδα πριν την συλλογή του σπέρματος. Στην περίπτωση συλλογής ωαρίων έχει προηγηθεί η ορμονική διέγερση του θηλυκού ποντικίου. Κατά την είσοδο στον χώρο εκτροφής λαμβάνονται όλα τα απαραίτητα ατομικά μέτρα προστασίας και εφαρμόζονται οι κανόνες που αφορούν την προστασία των ζώων που στεγάζονται από εξωτερικούς παράγοντες. Τα κλουβιά με τα επιθυμητά ζώα μεταφέρονται σε ειδικά διαμορφωμένο χώρο σε ξεχωριστό κτήριο του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ και πιο συγκεκριμένα στο εργαστήριο Διαγονιδιακής Τεχνολογίας όπου υπάρχουν τα απαραίτητα μέσα για την συλλογή. Η συλλογή πραγματοποιείται κάτω από στείρες συνθήκες έπειτα από την θυσία και την διάνοιξη της κοιλιακής κοιλότητας του ζώου.

4.2.2 Παρασκευή αντιδραστηρίων

Πίνακας 1. Capacitation διάλυμα ΤΥΗ με 0,75 mM MBCD (methyl- β -cyclodextrin)

Component	Sigma-Aldrich catalog no.	Molecular weight	Final concentration (mM)	Final concentration (mg/100mL)
NaCl	S5886	58.44	119.37	697.6
KCl	P5405	74.55	4.78	35.6
MgSO ₄ ·7H ₂ O	M7774	246.5	1.19	29.3
KH ₂ PO ₄	P5655	136.09	1.19	16.2
NaHCO ₃	S5761	84.01	25.07	210.6
Na pyruvate	P4562	110	0.5	5.5
Glucose	G6152	180.16	5.56	100.0
CaCl ₂ ·2H ₂ O	C7902	147	1.71	25.1
Penicillin G	P4687	372.5		7.5
Streptomycin	S1277	1457.4		5.0
Methyl- β -cyclodextrin	C4555	1320	0.75	98.3
Polyvinylalcohol (PVA)	P8136	30-70,000		100.0

Διαδικασία παρασκευής

- Με την χρήση ογκομετρικού σωλήνα μετριέται όγκος ίσος με 90ml υπερκάθαρου νερού (water for injection) και μεταφέρεται σε φιάλη των 500ml.
- Με την χρήση ηλεκτρονικού ζυγού ακριβείας ζυγίζονται οι απαραίτητες ποσότητες των παραπάνω υλικών εκτός των PVA και CaCl₂. Έπειτα προστίθενται στην φιάλη.
- Ζυγίζονται και οι απαραίτητες ποσότητες των PVA και CaCl₂ και διαλύονται ξεχωριστά σε falcon που περιέχει 10ml υπερκάθαρου νερού (water for injection). Το περιεχόμενο του falcon μεταφέρεται στην φιάλη.
- Η φιάλη ανακινείται
- Εντός θαλάμου βιολογικής ασφάλειας το διάλυμα φιλτράρεται με την χρήση φίλτρου 0,22 μ m και μοιράζεται σε 10 erpendorfs. Η υπόλοιπη ποσότητα μοιράζεται σε falcons.
- Η φύλαξη του αντιδραστηρίου γίνεται σε θερμοκρασία 4°C έως και 3 μήνες.

Πίνακας 2. Κρυοπροστατευτικό διάλυμα με 100 mM L-Glutamine (gCPA)

Reagent	Source	mg/10ml	mg/40ml	Concentration
D ⁺ Raffinose pentahydrate	Sigma-Aldrich R7630	1800	7200	18%
Dehydrated skim milk	BD Diagnostics, Difco 232100	300	1200	3%
L- Glutamine	Sigma-Aldrich G8540	146	584	100mM
Cell culture grade water	Invitrogen 15230-238	10ml	40ml	

Διαδικασία παρασκευής

- Με την χρήση ογκομετρικού σωλήνα μετριέται όγκος ίσος με 20ml υπερκάθαρου νερού (water for injection) και μεταφέρεται σε ένα falcon.
- Με την χρήση ηλεκτρονικού ζυγού ακριβείας ζυγίζεται η απαραίτητη ποσότητα γλουταμίνης και προστίθεται στο νερό. Ακολουθεί ανακίνηση του διαλύματος και vortex για 3 λεπτά.
- Το falcon τοποθετείται σε υδατόλουτρο ρυθμισμένο της 60°C.
- Ζυγίζονται και οι απαραίτητες ποσότητες ραφινόζης και skim milk και προστίθενται στο falcon. Ακολουθεί ανακίνηση του διαλύματος και vortex για 3 λεπτά.
- Το falcon τοποθετείται ξανά στο υδατόλουτρο για επώαση 90 λεπτών με ενδιάμεση ανακίνηση με vortex για 3 λεπτά κάθε 30 λεπτά.
- Μετά την επώαση επιβεβαιώνεται η απουσία υπολειμμάτων και το διάλυμα μοιράζεται σε 20 erpendorfs. Ακολουθεί φυγοκέντρηση των erpendorfs της 11.800 στροφές για 60 λεπτά. Η φυγοκέντρηση μπορεί να παραταθεί αν το υπερκείμενο δεν είναι διαυγές.
- Μετά το τέλος της φυγοκέντρησης πραγματοποιείται η συλλογή του υπερκειμένου εντός θαλάμου βιολογικής ασφάλειας και το φιλτράρισμά του με την χρήση φίλτρου 0,22 μm.
- Το διάλυμα αποθηκεύεται σε erpendorfs και μέχρι 3 μήνες σε θερμοκρασία δωματίου.

Πίνακας 3. Human Tubal Fluid Medium με 5,14mM Ασβεστίου (HTF^{Ca})

Reagent	Sigma-Aldrich catalog no.	Molecular weight	Final concentration (mM)	Final concentration (mg/100mL)
NaCl	S5886	58.44	101.6	593.8
KCl	P5405	74.55	4.69	35.0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	M7774	246.5	0.20	4.9
KH ₂ PO ₄	P5655	136.09	0.37	5.4
CaCl ₂	C5670	110.98	5.14	57.0
NaHCO ₃	S5761	84.01	25.0	210.0
Glucose	G6152	180.16	2.78	50.0
Na pyruvate	P4562	110	0.33	3.7
Penicillin G	P4687			7.5
Streptomycin	S1277			5.0
Na lactate (60% syrup)	L7900	112.1	21.4	0.34 mL
Phenol Red (0,5% solution)	P0290			0.04 mL
BSA embryo-tested lot	A3311			400.0

Διαδικασία παρασκευής

- Με την χρήση ογκομετρικού σωλήνα μετριέται όγκος ίσος με 90ml υπερκάθαρου νερού (water for injection) και μεταφέρεται σε φιάλη των 500ml.
- Με την χρήση ηλεκτρονικού ζυγού ακριβείας ζυγίζονται οι απαραίτητες ποσότητες των παραπάνω υλικών και προστίθενται στην φιάλη εκτός από το CaCl₂ και το BSA.

- Η ποσότητα του CaCl_2 διαλύεται ξεχωριστά σε falcon στο οποίο υπάρχουν 10ml υπερκάθαρου νερού (water for injection) και προστίθεται στην φιάλη.
- Προστίθεται στην φιάλη και το BSA και αφήνεται να διαλυθεί χωρίς ανακίνηση.
- Εντός θαλάμου βιολογικής ασφάλειας το διάλυμα φιλτράρεται με την χρήση φίλτρου 0,22 μm και μοιράζεται σε falcons (5ml σε κάθε falcon).
- Η φύλαξη του αντιδραστηρίου γίνεται σε θερμοκρασία 4°C έως και 3 μήνες.

Πίνακας 4. Potassium Simplex Optimized Medium με αμινοξέα (KSOM-AA)

Reagent	mg/100ml
NaCl	555
KCl	19
KH_2PO_4	5
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5
Glucose	4
Penicillin G	6
Streptomycin	5
Na Lactate	112
NaHCO_3	210
Phenol red	10 μl
Na Pyruvate	2
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	25
EDTA	0,4
L-glutamine	14,6
Bovine Serum Albumin	100
Essential Acids	1ml
Nonessential Acids	0,5ml

Διαδικασία παρασκευής

- Με την χρήση ογκομετρικού σωλήνα μετριέται όγκος ίσος με 90ml υπερκάθαρου νερού (water for injection) και μεταφέρεται σε φιάλη των 500ml.
- Με την χρήση ηλεκτρονικού ζυγού ακριβείας ζυγίζονται οι απαραίτητες ποσότητες των παραπάνω υλικών και προστίθενται στην φιάλη.
- Εντός θαλάμου βιολογικής ασφάλειας προστίθενται η ποσότητα του Phenol Red.
- Το διάλυμα μοιράζεται σε δύο falcons των 50ml και στο ένα από τα δύο προστίθενται και οι όγκοι των Essential Acids και Nonessential Acids.
- Έτσι δημιουργούνται δύο διαλύματα ένα KSOM και ένα KSOM-AA.
- Τα δύο διαλύματα φιλτράρονται με την χρήση φίλτρου 0,22 μm και μοιράζονται σε 10 erpendorfs. Η υπόλοιπη ποσότητα μοιράζεται σε falcons.
- Η φύλαξη του αντιδραστηρίου γίνεται στους 4°C για 1-2 εβδομάδες.

4.2.3 Ανασύσταση ορμονών

Intrergonan 1000IU Pregnant Mare Serum Gonadotropin. Ο όγκος που χορηγείται σε κάθε θηλυκό ποντίκι είναι 100μl ανασυσταμένης ορμόνης των 10 IU.

Αντιδραστήρια:

Φιαλίδια (5ml) Serum Gonadotrophin σε λυοφιλοποιημένη σκόνη

Φιαλίδια (5ml) Solvent

Διαδικασία ανασύστασης

- Εντός θαλάμου βιολογικής ασφάλειας και με την χρήση συστήματος σύριγγας- βελόνας μεταφέρεται ο όγκος των 5ml από το φιαλίδιο του buffer στο φιαλίδιο με την λυοφιλοποιημένη σκόνη της ορμόνης.
- Το φιαλίδιο ανακινείται και μοιράζονται από 200μl ενέσιμου διαλύματος erpendorfs.
- Σε κάθε ένα από τα erpendorfs προστίθενται ακόμη 200μl solvent ώστε το τελικό διάλυμα να έχει όγκο 400μl και συγκέντρωση 40IU.
- Σε κάθε ποντίκι χορηγούνται 100μl με 10IU οπότε ο όγκος στο κάθε erpendorf αρκεί για 4 ποντίκια.

Chorulon 1500IU Human Chorionic Gonadotrophin. Ο όγκος που χορηγείται σε κάθε θηλυκό ποντίκι είναι 100μl ανασυσταμένης ορμόνης των 10 IU.

Αντιδραστήρια:

Φιαλίδιο (5ml) Human Chorionic Gonadotrophin σε λυοφιλοποιημένη σκόνη

Φιαλίδιο (5ml) Solvent

Διαδικασία ανασύστασης

- Εντός θαλάμου βιολογικής ασφάλειας και με την χρήση συστήματος σύριγγας- βελόνας μεταφέρεται ο όγκος των 5ml από το φιαλίδιο του buffer στο φιαλίδιο με την λυοφιλοποιημένη σκόνη της ορμόνης.
- Το φιαλίδιο ανακινείται και μοιράζονται από 200μl ενέσιμου διαλύματος erpendorfs.
- Σε κάθε ένα από τα erpendorfs προστίθενται ακόμη 400μl solvent ώστε το τελικό διάλυμα να έχει όγκο 600μl και συγκέντρωση 60IU.
- Σε κάθε ποντίκι χορηγούνται 100μl με 10IU οπότε ο όγκος στο κάθε erpendorf αρκεί για 6 ποντίκια.

4.2.4 Ανάλυση συστατικών

Νερό

Το νερό αποτελεί το κύριο διαλύτη για την παρασκευή των διαλυμάτων τόσο της κρουοσυντήρησης όσο και της in vitro γονιμοποίησης. Η χρήση νερού απαλλαγμένο από ιόντα, οργανική ύλη, παθογόνα και πυρογενή λειτουργεί

ευεργετικά συμβάλλοντας στην σωστή ανάπτυξη των εμβρύων κατά την διάρκεια της καλλιέργειας. Ο καθαρισμός του νερού μπορεί να πραγματοποιηθεί με πολλούς τρόπους όπως με την απόσταξη, τον απιονισμό, την διήθηση, την αντίστροφη ώσμωση, την προσρόφηση και την υπερδιήθηση. (Loutradis et al.,2000) Μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί σχετικά με τον ρόλο του νερού στην διαδικασία της *in vitro* γονιμοποίησης και την καλλιέργειας των εμβρύων αποδεικνύουν ότι η ανάπτυξη του εμβρύου επηρεάζεται σημαντικά από την ποιότητα του νερού που θα χρησιμοποιηθεί για την παρασκευή των διαλυμάτων ειδικότερα σε αντιδραστήρια στα οποία απουσιάζουν χηλικοί παράγοντες όπως πρωτεΐνες (όπως το BSA), αμινοξέα και το αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (EDTA). Οι συγκεκριμένοι παράγοντες εξαλείφουν την επίδραση ενδοτοξίνων και ιόντων που μπορεί να παρευρίσκονται στα αντιδραστήρια. (Elsheikh et al.,2003) (Fukuda et al.,1987)

Οσμωτικότητα

Η οσμωτικότητα είναι ένας παράγοντας που επηρεάζεται τόσο από την χημική σύνθεση του αντιδραστηρίου όσο και από τους χειρισμούς που γίνονται κατά την διάρκεια του πειράματος. Αλλαγές στην οσμωτικότητα έχουν σημαντική επίπτωση στον όγκο του εμβρύου, στην σταθερότητα των μεμβρανών και κατά επέκταση στην ανάπτυξή του. Πιο συγκεκριμένα η αυξημένη οσμωτικότητα προκαλεί και το φαινόμενο του “two-cell block” που παρατηρείται σε πολλές μελέτες. Επιλογή μεγαλύτερου όγκου αντιδραστηρίου σε συνδυασμό με την κάλυψη των σταγόνων με έλαιο βοηθά ώστε να μην γίνει εξάτμιση του διαλύτη και να αποφευχθεί η αύξηση της οσμωτικότητας κατά την διάρκεια της δουλειάς που πραγματοποιείται στον πάγκο ή στο μικροσκόπιο (παρασκευή των τρυβλίων, επώαση στην θερμοαντική πλάκα, κίνηση του αέρα εντός του εργαστηρίου ή του θαλάμου βιολογικής ασφάλειας). Το έμβρυο, ειδικά στα πρώτα στάδια της ανάπτυξής του, είναι πολύ ευαίσθητο στις αλλαγές της οσμωτικότητας και η διαμόρφωση σταθερού περιβάλλοντος είναι σημαντική για την περαιτέρω ανάπτυξή του. (Sciorio and Rinaudo 2023) (Swain 2019)

MBCD

Ένα μεγάλο ποσοστό των κρυοσυντηρημένων σπερματοζωαρίων της σειράς C57bl/6 χάνει την κινητικότητά του έπειτα από την απόψυξη. Τα εναπομείναντα σπερματοζωάρια που παρουσιάζουν προωθητική κινητικότητα είναι ικανά να ενωθούν με την διάφανη ζώνη (*zona pellucida*) ωστόσο εμφανίζουν αδυναμία να εισχωρήσουν σε εκείνη. Πριν από την χρήση του σπέρματος στην γονιμοποίηση πρέπει τα σπερματοζωάρια να υποβληθούν σε μία επεξεργασία που ονομάζεται *capacitation*. Κατά το *capacitation* παρατηρείται μείωση της χοληστερόλης από την πλασματική μεμβράνη που πραγματοποιείται με την βοήθεια μορίων όπως το BSA και το MBCD. Το MBCD είναι ένας κυκλικός επτασακχαρίτης με α -(1-4)γλυκοπυρανόζες. Φέρει μία υδρόφιλη εξωτερική επιφάνεια και μία λιποφιλική κοιλότητα στο κέντρο η οποία έχει την δυνατότητα να δημιουργεί σύμπλεγμα με την χοληστερόλη και να προκαλεί ένα φαινόμενο που ονομάζεται *cholesterol efflux*. Με την αλλαγή της διάταξης και της σταθερότητας των λιπιδίων στην μεμβράνη ξεκινά ένα σηματοδοτικό μονοπάτι με το οποίο προκαλείται

φωσφορυλίωση της τυροσίνης και μετακίνηση ιόντων Ca^{2+} .(Takeo et al.,2008)
(Takeo and Nakagata 2010)

Ραφινόζη

Η ραφινόζη είναι ένας τρισακχαρίτης που αποτελείται από γαλακτόζη, φρουκτόζη και γλυκόζη. Λειτουργεί ως προστατευτικός παράγοντας του σπέρματος κατά την κρυοσυντήρηση και την απόψυξη.(Takeo and Nakagata 2010)

Skim milk

Το skim milk είναι το υδάτινο μέρος του πλήρους γάλακτος έπειτα από φυγοκέντρηση και αφαίρεση της στερεάς φάσης. Περιέχει έως και 0,2% λιπαρά και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο ως εξωκυττάριο κρυοπροστατευτικό έναντι του σοκ που προκαλείται στα κύτταρα από την κρυοσυντήρηση.(Abinawanto et al., 2016) Η καζεΐνη είναι μία πρωτεΐνη που συναντάται στο skim milk και έχει προστατευτική ικανότητα κατά την διάρκεια της αποθήκευσης του σπέρματος στις δεξαμενές κρυοσυντήρησης. Αποτρέπει το cholesterol efflux που ξεκινά κατά την επαφή του σπέρματος με το BSA ή το MBCD. Η συγκεκριμένη λειτουργία έχει προκαλέσει προβληματισμό σχετικά με την χρήση του skim milk στο κρυοπροστατευτικό R18S3 (18% ραφινόζη και 3% skim milk) καθώς υπάρχει περίπτωση να λειτουργεί ως αναστολέας του capacitation στο IVF. (Takeo et al.,2008)

L-γλουταμίνη

Η L-γλουταμίνη είναι ένα αμινοξύ που συναντάται άφθονο στο πλάσμα και του ιστούς. Το συγκεκριμένο αμινοξύ προστατεύει την λιπιδική πλασματική μεμβράνη έπειτα από αλληλεπίδραση με την θετικά φορτισμένη αμινική ομάδα των αμινοξέων και το αρνητικά φορτισμένο φωσφολιπίδιο. Τα αμινοξέα, και περισσότερο η L-γλουταμίνη, είναι σημαντικά για την διατήρηση της γονιμότητας των κρυοσυντηρημένων σπερματοζωαρίων της σειράς C57bl/6. (Takeo and Nakagata 2010)

Πολυβινυλική αλκοόλη PVA

Το PVA είναι ένα συνθετικό πολυμερές που μπορεί να διατηρήσει την κινητικότητα των σπερματοζωαρίων αλλά δεν μπορεί από μόνο του να προκαλέσει την αντίδραση του ακροσώματος. Για αυτό τον λόγο η χρήση του πρέπει να γίνεται σε συνδυασμό με κάποιο υποδοχέα χοληστερόλης όπως το BSA και το MBCD. Η προστατευτική του ικανότητα φαίνεται να έγκειται στην επιρροή του πάνω στην επιφανειακή τάση του κυττάρου. Ανάμεσα στα πλεονεκτήματα χρήσης του PVA περιλαμβάνονται η σταθερότητά του σε θερμοκρασία δωματίου, η άμεση διαθεσιμότητά του και το χαμηλό κόστος του. (Bavister 1981) Μπορεί να χρησιμοποιηθεί και στην καλλιέργεια εμβρύων ωστόσο το PVA δεν έχει την δυνατότητα να διατηρήσει την φυσιολογία και τον μεταβολισμό του εμβρύου δίνοντας μειωμένο ποσοστό εμβρύων που φτάνουν στο στάδιο της βλαστοκύστης. (Nowshari and Brem 2000) (Garder and Lane

2004) Επίσης με την χρήση του σε πρωτόκολλα κρυοσυντήρησης δίνει την δυνατότητα αντικατάστασης βιολογικών μακρομορίων τα οποία μπορεί να φέρουν λοιμογόνους παράγοντες.(Nowshari and Brem 2000)

Bovine Serum Albumin

Η αλβουμίνη βρίσκεται σε μεγάλο ποσοστό στην σάλπιγγα και είναι το πιο συχνώς χρησιμοποιούμενο μακρομόριο στην καλλιέργεια εμβρύων. Η χρήση της έχει τόσο φυσιολογικές όσο και πρακτικές εφαρμογές. Αποτελεί πηγή αζώτου, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως pH buffer και ως σταθεροποιητής του κυτταροσκελετού των κυττάρων κατά την απόψυξη. Προσφέρει αμινοξέα στο διάλυμα και έχει προστατευτική ικανότητα έναντι βαρέων μετάλλων και τοξικών ουσιών που μπορεί να περιέχονται στο νερό ή στο έλαιο που χρησιμοποιείται για την παρασκευή των τρυβλίων καλλιέργειας με την λειτουργία του ως χηλικός παράγοντας. (Sciorio and Rinaudo 2023) (Gardner and Lane 2004) (Duque et al.,2003) (Nowshari and Brem 2000) Από πρακτικής άποψης η αλβουμίνη συμβάλει στον πιο εύκολο μικροχειρισμό των γαμετών αποτρέποντας την προσκολλησή τους στα μέσα καλλιέργειας (Gardner and Lane 2004) (Sciorio and Rinaudo 2023) Στα καλλιεργητικά υλικά του σπέρματος η αλβουμίνη έχει δύο ρόλους: διατηρεί την ζωτικότητα των σπερματοζωαρίων (ειδικά την κινητικότητά τους) και διεγείρει την αντίδραση του ακροσώματος. (Bavister 1981) Παρόλο ωστόσο την προστατευτική της ιδιότητα η αλβουμίνη παρουσιάζει διαφοροποιήσεις από παρτίδα σε παρτίδα και μπορεί να φέρει παθογόνα και βακτηριακές ενδοτοξίνες αυξάνοντας τον κίνδυνο επιμόλυνσης. (Duque et al.,2003) (Nowshari and Brem 2000)

Αμινοξέα

Τα αμινοξέα ως εμπλουτιστικό υλικό στα αντιδραστήρια χρησιμεύουν ως πηγές ενέργειας ενώ παράλληλα διατηρούν και την ομοιόσταση του κυττάρου ρυθμίζοντας το pH και την οσμωτικότητα. Επίσης λειτουργούν ως μεταβολίτες, αντιοξειδωτικά και χηλικοί παράγοντες βαρέων μετάλλων.(Swain 2019)(Sciorio and Rinaudo 2023) Τα ενδοκυτταρικά αμινοξέα που υπάρχουν στο μη γονιμοποιημένο ωάριο έχουν τις ίδιες ιδιότητες (ρυθμιστές της ομοιόστασης, μεταβολίτες και προστατευτικοί παράγοντες) ενώ έχει αποδειχθεί ότι αμινοξέα υπάρχουν και εντός της ampulla όπου πραγματοποιείται φυσιολογικά η γονιμοποίηση. Επιπλέον έχει αποδειχθεί ότι τα αμινοξέα συμβάλουν στην μείωση του σοκ στο οποίο εισέρχονται τα ωάρια έπειτα από την μεταφορά τους από την σάλπιγγα στο καλλιεργητικό υλικό. (Summers et al.,2000) Ωστόσο ανησυχία προκαλεί η παραγωγή αμμωνίας κατά την διάσπαση των αμινοξέων (και πιο έντονα της γλουταμίνης) έπειτα από την επώαση του αντιδραστηρίου στους 37°C. Η αμμωνία είναι τοξική για τα έμβρυα και επηρεάζει την ανάπτυξή τους. Η επιρροή της αυξάνεται όταν η καλλιέργεια πραγματοποιείται κάτω από συνθήκες 20% οξυγόνου. Για αυτό τον λόγο μπορεί να γίνει χρήση διπεπτιδίων τα οποία είναι σταθερά κάτω από τις συγκεκριμένες συνθήκες όμως υπάρχει περίπτωση να μην χρησιμοποιηθούν σε τέτοιο βαθμό όσο τα αμινοξέα από τα έμβρυα.(Swain 2019)(Sciorio and Rinaudo 2023)

Γλυκόζη, Γαλακτικό οξύ (Lactate) και Πυροσταφυλικό οξύ (Pyruvate)

Και οι τρεις ενώσεις χρησιμοποιούνται ως πηγές υδατάνθρακα για τα κύτταρα. Η γλυκόζη είναι σημαντική για την γλυκόλυση αλλά και για την σύνθεση βιομορίων όπως λιπίδια, φωσφολιπίδια, σύνθετοι υδατάνθρακες, γλυκοπρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα.(Sciorio and Rinaudo 2023) Κυρίως υποστηρίζει την ανάπτυξη του εμβρύου στο στάδιο της βλαστοκύστης. Στα αρχικά στάδια της ανάπτυξης του εμβρύου κύριες πηγές ενέργειας αποτελούν το γαλακτικό οξύ και το πυροσταφυλικό οξύ. Το γαλακτικό οξύ χρησιμοποιείται για την ανάπτυξη του εμβρύου μέχρι και το στάδιο των δύο κυττάρων ενώ το πυροσταφυλικό οξύ χρησιμοποιείται από την πρώτη κυτταρική διαίρεση μέχρι και το στάδιο της βλαστοκύστης. Το γαλακτικό οξύ μπορεί να μετατραπεί αναστρέψιμα σε πυροσταφυλικό οξύ από την γαλακτική αφυδρογονάση .(Swain 2019) (Loutradis et al.,2000)

Phenol red

Το phenol red είναι δείκτης με τον οποίο μπορεί να παρακολουθηθεί οπτικά το pH του αντιδραστηρίου. Με αυτό τον τρόπο μπορεί επίσης να αξιολογηθεί η ηλικία του αντιδραστηρίου αλλά και η σωστή λειτουργία του κλιβάνου. Η πιθανή του οιστρογονική επιρροή και παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) έπειτα από την έκθεσή του στο φως το έχουν οδηγήσει σε αποκλεισμό από κάποια αντιδραστήρια.(Swain 2019)

Έλαια

Η κάλυψη των σταγόνων της καλλιέργειας με έλαιο συμβάλλει στην διατήρηση της ωσμωτικότητας και στην αποφυγή της απώλειας CO₂ που οδηγεί στην αύξηση του pH.(Garder and Lane 2004) Το έλαιο παραβάλεται ανάμεσα στο καλλιεργητικό υλικό και τον ατμοσφαιρικό αέρα και αποτρέπει την εξάτμιση του, διατηρεί την θερμοκρασία και το προστατεύει από τοξικές ουσίες και μικροοργανισμούς που μπορεί να παρευρίσκονται στον αέρα. Τα έλαια που χρησιμοποιούνται συνήθως είναι το paraffin oil και το mineral oil. Τα έλαια αυτά όμως μπορεί να φέρουν τοξικούς παράγοντες όπως ακόρεστους/αρωματικούς υδρογονάνθρακες, οργανικές ενώσεις και ψευδάργυρο που μπορεί να έχουν αρνητική επιρροή στην ανάπτυξη του εμβρύου. Επίσης η λανθασμένη αποθήκευση του ελαίου και η έκθεσή του σε UV φως μπορεί να οδηγήσει σε υπεροξειδωση και αύξηση της τοξικότητας.(Sciorio and Rinaudo 2023)

4.2.5 Συνθήκες καλλιέργειας

pH

Κατά την επιλογή του ιδανικού pH για την πραγματοποίηση της καλλιέργειας πρέπει να ληφθούν υπ' όψιν τόσο το pH του αντιδραστηρίου (pH_e) όσο και το pH του κυττάρου (pH_i). Ως παράμετρος το pH υπολογίζεται με την μέτρηση των ιόντων υδρογόνου και μπορεί να επηρεαστεί από πληθώρα παραγόντων όπως το ποσοστό του CO₂ εντός του κλιβάνου, την συγκέντρωση των διττανθρακικών, την τοποθεσία του εργαστηρίου και τα συστατικά του αντιδραστηρίου.(Swain

2019)(Garder and Lane 2004)(Sciorio and Rinaudo 2023) Συστατικά όπως το γαλακτικό και πυροσταφιλικό οξύ μειώνουν το pH ενώ η χρήση αμινοξέων βοηθά στην ρύθμισή του.(Swain 2019)(Garder and Lane 2004) Τα ωάρια και τα έμβρυα διαθέτουν μηχανισμούς που τους παρέχουν την δυνατότητα να προσαρμόζονται στις εναλλαγές του pH. Τα ωάρια ρυθμίζουν το pH τους με την βοήθεια των cumulus cell που τα περιβάλλουν και κληρονομούν την συγκεκριμένη ιδιότητα τρεις ώρες μετά την γονιμοποίηση. Τα έμβρυα στο στάδιο των πρώτων μιτωτικών διαιρέσεων είναι αρκετά ευαίσθητα σε τιμές pH εκτός του ιδανικού εύρους ενώ τα έμβρυα στο στάδιο της βλαστοκύστης φαίνεται να είναι πιο ανεκτικά. Η επιλογή του ιδανικού εύρους pH του αντιδραστηρίου γίνεται ανάλογα με τις ανάγκες της κάθε σειράς. Συνήθως επιλέγεται τιμή pHε ελαφρώς πιο αλκαλική σε σχέση με το pHί ώστε να μπορούν να εξουδετερωθούν οξέα που προκύπτουν από τις κυτταρικές μεταβολικές διεργασίες. Οπότε επιλέγεται ένα εύρος του 7,2-7,4. Ωστόσο το κάθε στάδιο ανάπτυξης του εμβρύου χρειάζεται διαφορετική τιμή pH. Πιο συγκεκριμένα η γονιμοποίηση πραγματοποιείται σε πιο αλκαλικό pH, η καλλιέργεια των εμβρύων στις αρχικές διαιρέσεις σε πιο όξινο και η καλλιέργεια των εμβρύων των σταδίων της morula και της βλαστοκύστης σε πιο αλκαλικό pH.(Swain 2019)

Επίπεδα οξυγόνου

Τα επίπεδα οξυγόνου στα οποία εκτίθενται τα έμβρυα in vivo είναι πολύ πιο χαμηλά από εκείνα του ατμοσφαιρικού αέρα (20%). Επίσης υπάρχει διαφοροποίηση ανάμεσα στο ποσοστό οξυγόνου που επικρατεί στην σάλπιγγα και σε εκείνο που επικρατεί στην μήτρα. Το προτεινόμενο ποσοστό οξυγόνου για την επώαση της καλλιέργειας στον κλίβανο είναι το 5%.(Garder and Lane 2004) (Sciorio and Rinaudo 2023) Το οξυγόνο είναι σημαντικό για τον μεταβολισμό και την ανάπτυξη του εμβρύου. Η παρατεταμένη επαφή της καλλιέργειας με τον ατμοσφαιρικό αέρα μπορεί να προκαλέσει την αυξημένη παραγωγή ROS. Οι δραστικές μορφές οξυγόνου έχουν αρνητική επιρροή στον μεταβολισμό του εμβρύου, την γενετική του ακεραιότητα, το επιγένωμα καθώς και την ζωτικότητα του. Προκαλούν βλάβες σε πολλά οργανίδια, καταστρέφουν τα λιπίδια, κατακερματίζουν το DNA και αλλάζουν το πρωτέωμα. Επίσης έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζονται και τα μιτοχόνδρια λόγω του οξειδωτικού στρες με τα έμβρυα να παρουσιάζουν χαμηλό αριθμό μιτοχονδρίων που εμφανίζονται με ανωμαλίες. (Sciorio and Rinaudo 2023)

Θερμοκρασία

Η πραγματοποίηση της καλλιέργειας σε θερμοκρασίες υπό της θερμοκρασίας σώματος επηρεάζει σημαντικά την φυσιολογία των γαμετών και των εμβρύων και περισσότερο την λειτουργία του κυτταροσκελετού. (Garder and Lane 2004) (Sciorio and Rinaudo 2023) Η μιτωτική άτρακτος έχει αποδειχθεί ότι αρχίζει να αποπολυμερίζεται στους 33°C και κάτω ενώ έκθεση σε μη ιδανική θερμοκρασία για 10 λεπτά οδηγεί στην αποσυναρμολόγησή της. Η προτεινόμενη θερμοκρασία καλλιέργειας είναι η θερμοκρασία σώματος δηλαδή οι 37°C. Η θερμοκρασία αυτή πρέπει να διατηρείται καθ'όλη την διάρκεια του πειράματος κάτι το οποίο μπορεί

να γίνει με την χρήση θερμαντικής πλάκας και την προθέρμανση των υλικών και την αντιδραστηρίων. (Garder and Lane 2004)

4.2.4 Συλλογή και κρυοσυντήρηση σπέρματος

A) Εξοπλισμός

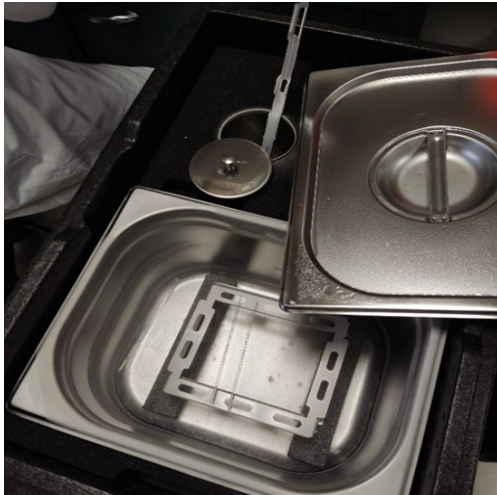
- Μικρά πλαστικά καλλιεργητικά τρυβλία
- Πιπέτα
- Tips
- Θερμαινόμενη πλάκα ρυθμισμένη στους 37° C
- Φορητό δοχείο κρυοσυντήρησης
- Λαβίδες, ειδικά ψαλίδια, βελόνες
- Σύριγγα αναρρόφησης
- Αποθηκευτικά σωληνάρια σπέρματος
- Σύστημα κρυοσυντήρησης (πλαστικός σωλήνας αποθήκευσης, μεταλλική βάση)
- Δεξαμενή κρυοσυντήρησης με υγρό άζωτο

B) Αντιδραστήρια

- TYH medium + 0.75 mM MBCD (methyl- β -cyclodextrin)
- mHTF
- Υγρή παραφίνη

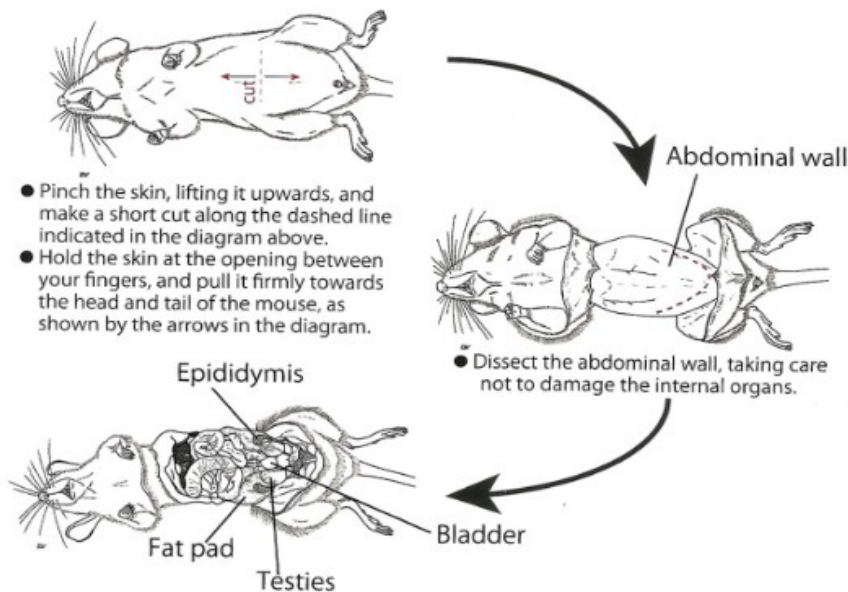
Γ) Πειραματική Διαδικασία

1. Αρχικά πραγματοποιείται η προετοιμασία των τρυβλίων. Στην άκρη ενός τρυβλίου τοποθετείται μία σταγόνα των 60 μ l διαλύματος TYH medium + 0.75 mM MBCD και πάνω στην ίδια σταγόνα προστίθενται άλλα 60 μ l ώστε να γίνει πιο ψηλή και ημισφαιρική.
2. Η σταγόνα καλύπτεται από υγρή παραφίνη.
3. Ο αριθμός των τρυβλίων που πρέπει να προετοιμαστούν εξαρτάται από τον αριθμό των αρσενικών ποντικών που θα χρησιμοποιηθούν. Προετοιμάζεται ένα για κάθε άτομο και διατηρούνται στους 37° C καθ' όλη την διάρκεια της διαδικασίας.
4. Το τρυβλίο πρέπει να μείνει εντός του κλιβάνου για τουλάχιστον 30 λεπτά πριν την συλλογή του σπέρματος.
5. Για την προετοιμασία των σωληνάρων αποθήκευσης του δείγματος πάνω στο σωληνάριο με την βοήθεια ενός χάρακα και ενός μαρκαδόρου γίνονται δύο σημάδια στα 2,3 και 4,5 εκατοστά. Στο σωληνάριο αναγράφονται επίσης και τα στοιχεία του δείγματος.
6. Το σωληνάριο συνδέεται με μία σύριγγα αναρρόφησης.
7. Για την προετοιμασία του συστήματος κρυοσυντήρησης χρησιμοποιείται μεταλλική βάση στην οποία στερεώνεται πλαστικός σωλήνας αποθήκευσης όπου και αναγράφονται τα στοιχεία του δείγματος όπως η σειρά του ζώου και η ημερομηνία.



Εικόνα 19. Φορητό σύστημα κρυοσυντήρησης.

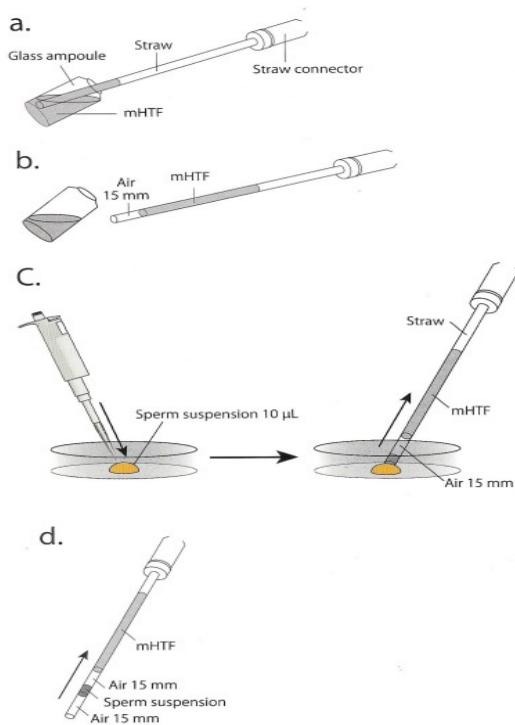
8. Το κλουβί με τα αρσενικά ποντίκια μεταφέρεται στον χώρο του εργαστηρίου και θυσιάζεται ένα κάθε φορά. Επιλέγονται αρσενικά ηλικίας από 3 έως 6 μηνών, γνωστής αναπαραγωγικής ικανότητας.
9. Έπειτα από την διάνοιξη της κοιλιακής κοιλότητας αφαιρούνται οι επιδιδυμίδες από το πάνω μέρος του κάθε όρχεως αποφεύγοντας όσο το δυνατόν περισσότερο μεταφορά λίπους, αίματος ή σωματικών υγρών.



Εικόνα 20. Διαδικασία διάνοιξης της κοιλιακής κοιλότητας. (Nakagata 2015)

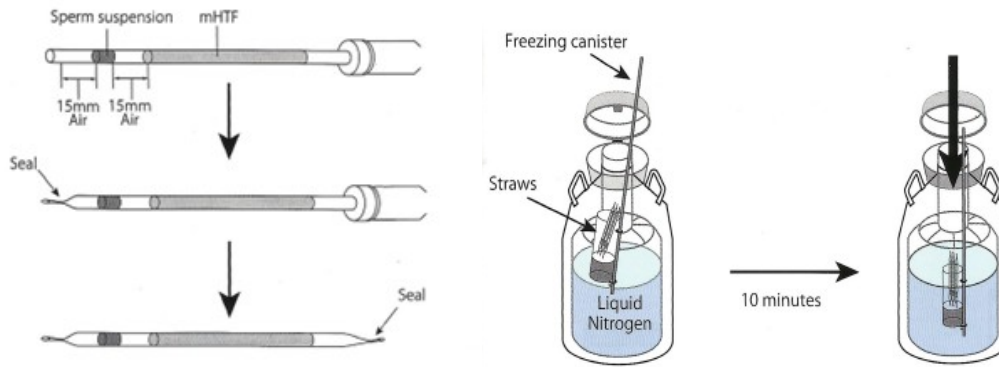
10. Οι επιδιδυμίδες μεταφέρονται στο τρυβλίο στον κενό χώρο που καλύπτεται από την υγρή παραφίνη.
11. Με την βοήθεια ειδικών ψαλιδιών γίνονται τομές στο σώμα της επιδιδυμίδας και με μία βελόνα πιέζεται η επιφάνειά της με σκοπό την απελευθέρωση του σπέρματος.

12. Με την ίδια βελόνα σπρώχνουμε το σπέρμα μέσα στην σταγόνα του διαλύματος TYH medium + MBCD και αφαιρούνται οι επιδιδυμίδες από το τρυβλίο.
13. Το τρυβλίο παραμένει πάνω σε θερμαντική πλάκα που έχει ρυθμιστεί στους 37° C για 3 λεπτά με μικρή ανάδευση κάθε 1 λεπτό.
14. Μεταφέρονται σταγόνες των 10 μl σε καινούργιο τρυβλίο από την περιφέρεια της μεγάλης σταγόνας όπου βρίσκονται τα σπερματοζωάρια με την καλύτερη κινητικότητα.
15. Στο σωληνάριο αποθήκευσης με την βοήθεια της σύριγγας δημιουργούνται οι παρακάτω φάσεις:
 - 100 μl mHTF
 - 15 mm αέρα
 - 10 μl δείγματος
 - Επιπλέον 15 mm αέρα



Εικόνα 21. Σχηματική αναπαράσταση της συλλογής του σπέρματος σε σωληνάριο. (Nakagata 2015)

16. Μετά την ολοκλήρωση της μεταφοράς σφραγίζονται οι δύο άκρες.
17. Τα σωληνάρια τοποθετούνται σε ατμούς υγρού αζώτου πάνω από την επιφάνεια υγρού αζώτου στο δοχείο κρυοσυντήρησης.
18. Μετά από δέκα λεπτά εμβαπτίζονται στο υγρό άζωτο της συσκευής κρυοσυντήρησης και έπειτα μεταφέρονται σε δεξαμενή με υγρό άζωτο για την διατήρησή τους. (Nakagata 2015)



Εικόνα 22. Σφράγιση σωληνάρων σπέρματος και κρυοσυντήρησής τους σε δοχείο με υγρό άζωτο. (Nakagata 2015)

4.2.5 In vitro γονιμοποίηση

A) Εξοπλισμός

- Λαβίδες, υποδερμικές βελόνες, ψαλίδια
- Κλίβανος ρυθμισμένος σε 37°C (5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂)
- Tips
- Πιπέτες (P1000, P200, P20)
- Στερεοσκόπιο
- Σύριγγα αναρρόφησης
- Χρονόμετρο
- Καλλιεργητικά τρυβλία 35mm
- Πιπέτα στόματος με παγίδα
- Υδάτινο μπάνιο σε θερμοκρασία 37° C

B) Αντιδραστήρια

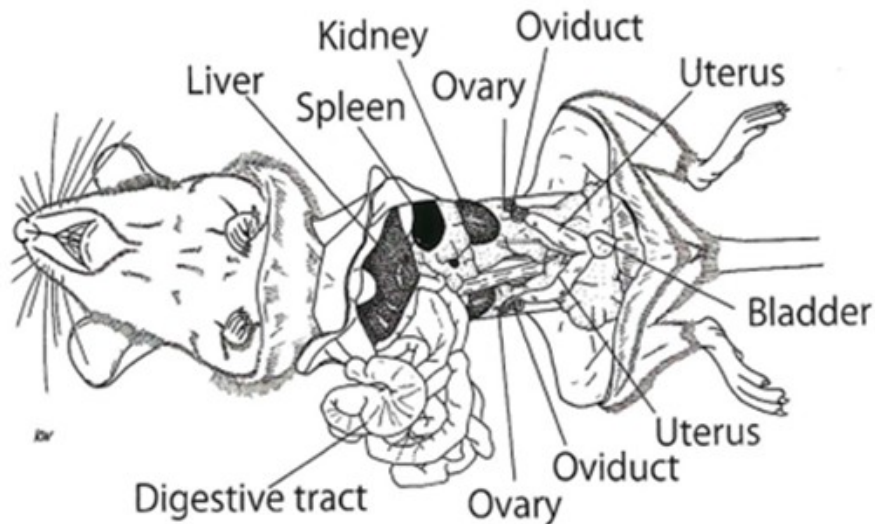
- Glutathione (GSH)
- hCG (Human chorionic gonadotropin)
- PMSG (Pregnant mare serum gonadotropin)
- HTF (Human tubal fluid medium +5,14 mM Ca) → Ενίσχυση με 1mM GSH για χρήση κρυοσυντηρημένου σπέρματος ή 0,25mM GSH για χρήση φρέσκου σπέρματος.
- KSOM medium
- Υγρή παραφίνη
- Preincubation medium → TYH medium με 0,75mM MBCD (methyl-β-cyclodextrin)

Γ) Πειραματική διαδικασία

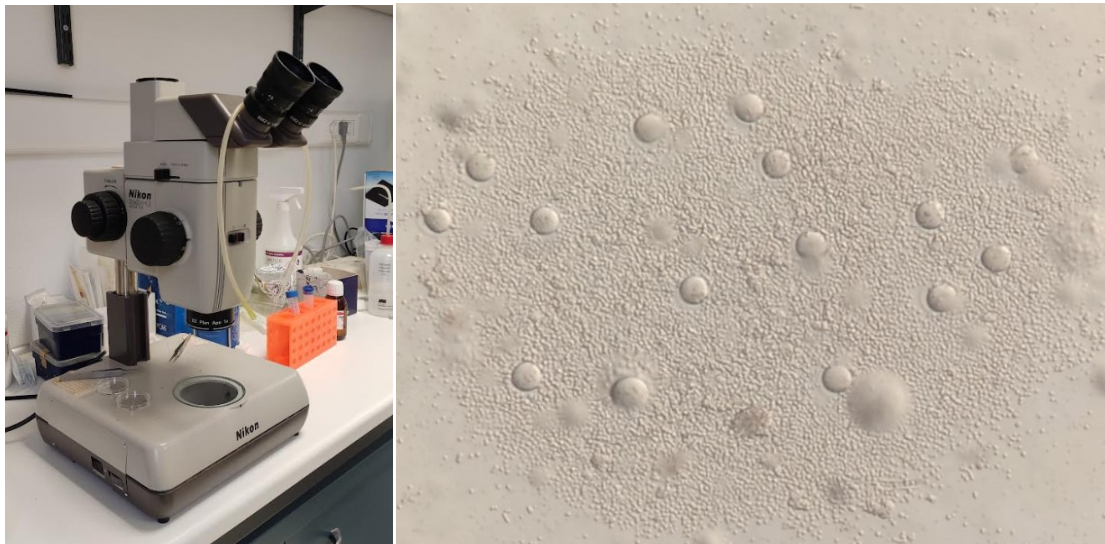
1. Στο χώρο εκτροφής πραγματοποιείται i.p. έγχυση 10 IU PMSG / θηλυκό ποντίκι μεταξύ 14:00 και 16:00 το απόγευμα της πρώτης μέρας.

2. Έπειτα από 46-48 ώρες πραγματοποιείται i.p. έγχυση 10 IU hCG /θηλυκό ποντίκι. Η επιλογή των ωρών στις οποίες θα πραγματοποιηθούν οι εμβολιασμοί αποφασίζονται με βάση την ώρα που έχει προγραμματιστεί να γίνει η συλλογή των ωαρίων και με βάση τις ανάγκες της σειράς.
3. Για την προετοιμασία του τρυβλίου για την συλλογή του σπέρματος τοποθετείται στην άκρη του μία σταγόνα TYH+ 0,75Mm MBCD (100μl αν χρησιμοποιηθεί φρέσκο σπέρμα και 90μl αν χρησιμοποιηθεί κρυσταλλωμένο σπέρμα).
4. Ο αριθμός των τρυβλίων που θα παρασκευαστούν είναι ανάλογος του αριθμού των αρσενικών ποντικιών που θα χρησιμοποιηθούν ή των αριθμό των σωληνάριων κρυσταλλωμένου σπέρματος που θα αποψυχθούν.
5. Η σταγόνα καλύπτεται από υγρή παραφίνη.
6. Ο αριθμός των τρυβλίων γονιμοποίησης είναι ανάλογος του αριθμού των θηλυκών δοτών ωαρίων. Παρασκευάζεται ένα τρυβλίο για κάθε δύο με τρία θηλυκά.
 - Σε ένα τρυβλίο τοποθετούνται δύο σταγόνες διαλύματος HTF^{Ca}. Για φρέσκο σπέρμα χρησιμοποιούνται σταγόνες των 200μl ενώ για κρυσταλλωμένο σπέρμα των 90μl.
 - Οι σταγόνες καλύπτονται από υγρή παραφίνη και το τρυβλίο τοποθετείται στον κλίβανο για τουλάχιστον 30 λεπτά.
7. Ο αριθμός των τρυβλίων πλύσης είναι ανάλογος του αριθμού των τρυβλίων γονιμοποίησης. Παρασκευάζεται ένα τρυβλίο πλύσης για κάθε τρυβλίο γονιμοποίησης.
 - Στο τρυβλίο πλύσης τοποθετούνται τέσσερις σταγόνες διαλύματος HTF^{Ca} των 80-100μl για πλύση μετά την επώαση με το δείγμα του σπέρματος.
 - Οι σταγόνες καλύπτονται με υγρή παραφίνη και διατηρούνται στον κλίβανο για τουλάχιστον 30 λεπτά.
8. Για την συλλογή του σπέρματος:
 - Το τρυβλίο συλλογής σπέρματος αφαιρείται από τον κλίβανο και διατηρείται στους 37°C.
 - Το αρσενικό θυσιάζεται και κάτω από άσηπτες συνθήκες αφαιρούνται οι επιδιδυμίδες αποφεύγοντας περιττό λίπος, αίμα και υγρά.
 - Οι επιδιδυμίδες τοποθετούνται σε απορροφητικό χαρτί και καθαρίζονται από υπολείμματα
 - Μεταφέρονται στο τρυβλίο στον κενό χώρο που καλύπτεται από την υγρή παραφίνη.
 - Με την βοήθεια ειδικών ψαλιδιών γίνονται τομές στο σώμα της επιδιδυμίδας και με μία βελόνα πιέζεται η επιφάνειά της με σκοπό την απελευθέρωση του σπέρματος.
 - Με την ίδια βελόνα σπρώχνουμε το σπέρμα μέσα στην σταγόνα του διαλύματος TYH medium + MBCD και αφαιρούνται οι επιδιδυμίδες από το τρυβλίο.
 - Το τρυβλίο με το σπέρμα διατηρείται στον κλίβανο για επώαση για 60 λεπτά.

9. Σε περίπτωση χρήσης κρυοσυντηρημένου σπέρματος:
- Αφαιρούνται από την δεξαμενή κρυοσυντήρησης ο επιθυμητός αριθμός σωληνάρων αποθήκευσης σπέρματος με την χρήση προψυγμένης λαβίδας.
 - Προετοιμάζεται υδατικό μπάνιο με νερό θερμοκρασίας 37°C.
 - Το κάθε σωληνάριο κρατείται στον αέρα για 5 δευτερόλεπτα και τοποθετείται κατευθείαν στο υδατικό μπάνιο καλύπτοντας όλη την επιφάνεια του σωληναρίου που περιέχει το δείγμα για 10 λεπτά ώστε να ανακτηθεί η κινητικότητα των σπερματοζωαρίων.
 - Το τρυβλίο για την συλλογή του σπέρματος αφαιρείται από τον κλίβανο και διατηρείται σε θερμαντική πλάκα στους 37°C.
 - Το σωληνάριο απομακρύνεται από το νερό και σκουπίζεται με ένα απορροφητικό χαρτί.
 - Το σωληνάριο κρατείται σε οριζόντια θέση και αποκόβεται η σφραγισμένη του άκρη.
 - Τα 10μl δείγματος που περιέχει προστίθενται στην σταγόνα των 90μl preincubation TYH+MBCD και το τρυβλίο επιστρέφει στον κλίβανο για επώαση 30 λεπτών.
10. Κατά την διάρκεια επώασης του σπέρματος (φρέσκου ή κρυοσυντηρημένου) γίνεται και η συλλογή των ωαρίων.
11. Για την συλλογή των ωαρίων:
- Το τρυβλίο γονιμοποίησης μεταφέρεται από τον κλίβανο στον στερεοσκόπιο και διατηρείται συνεχώς στους 37°C.
 - Θυσιάζεται ένα θηλυκό κάθε φορά και αφαιρούνται οι σάλπιγγες αποφεύγοντας περιττό λίπος, αίμα και υγρά.
 - Οι σάλπιγγες τοποθετούνται εντός της πρώτης σταγόνας του τρυβλίου γονιμοποίησης.
 - Με την χρήση λαβίδων και βελόνων γίνεται σχισμή στην άμπουλα της σάλπιγγας και απελευθερώνεται η συνάθροιση των ωαρίων και των κοκκιωδών κυττάρων.
 - Με την πιπέτα στόματος η συνάθροιση μεταφέρεται στην δεύτερη σταγόνα του τρυβλίου γονιμοποίησης και το τρυβλίο μεταφέρεται στον κλίβανο.



Εικόνα 23. Ανατομία θηλυκού ποντικού. (Nakagata 2015)



Εικόνα 24. Στερεοσκόπιο και συνάθροιση ωαρίων-κοκκιωδών κυττάρων πριν την προσθήκη υαλουρονιδάσης.

12. Μετά το τέλος της επώασης του σπέρματος ακολουθεί η γονιμοποίηση:

- Το τρυβλίο με το δείγμα σπέρματος και το τρυβλίο γονιμοποίησης βγαίνουν από τον κλίβανο και διατηρούνται συνεχώς στους 37°C.
- Από το τρυβλίο σπέρματος και με την χρήση πιπέτας λαμβάνονται 3-4μl φρέσκου ή 10μl κρυσουνητημένου σπέρματος από την περιφέρεια της σταγόνας όπου και υπάρχουν τα σπερματοζώαρια με την καλύτερη κινητικότητα.
- Η ποσότητα σπέρματος μεταφέρεται στην σταγόνα γονιμοποίησης όπου υπάρχει η συνάθροιση κοκκιωδών κυττάρων και ωαρίων και το τρυβλίο επιστρέφει στον κλίβανο.
- Η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνεται για κάθε τρυβλίο γονιμοποίησης.

- Μετά την προετοιμασία όλων των τρυβλίων γονιμοποίησης ελέγχεται σε ένα από αυτά η κινητικότητα των σπερματοζωαρίων. Αν η κινητικότητα είναι μειωμένη μπορεί να γίνει προσαρμογή της συγκέντρωσης του σπέρματος προσθέτοντας παραπάνω ποσότητα. Για το κρυοσυντηρημένο σπέρμα μπορούν να προστεθούν μέχρι και 15-20μl επιπλέον.
 - Η επώαση των τρυβλίων διαρκεί από 3 έως 4 ώρες.
13. Το επόμενο στάδιο περιλαμβάνει την πλύση των ωαρίων:
- Τα τρυβλία γονιμοποίησης και πλύσης αφαιρούνται από τον κλίβανο.
 - Δουλεύοντας με ένα τρυβλίο γονιμοποίησης κάθε φορά τα ωάρια αφαιρούνται από την σταγόνα γονιμοποίησης και ξεπλένονται με την μεταφορά τους από όλες στις σταγόνες του τρυβλίου πλύσης για την απομάκρυνση υπολειμμάτων, εκφυλισμένων ωαρίων και νεκρών σπερματοζωαρίων. Η θερμοκρασία του τρυβλίου διατηρείται στους 37°C συνεχώς.
 - Μετά την μεταφορά των ωαρίων στην τελευταία σταγόνα το τρυβλίο επιστρέφει στον κλίβανο για ολονύκτια επώαση.
 - Την επόμενη μέρα διαχωρίζονται τα γονιμοποιημένα ωάρια που έχουν φτάσει στο στάδιο των δύο κυττάρων από τα μη γονιμοποιημένα ή εκείνα που έχουν υποστεί κατακερματισμό ή λύση.
 - Τα φυσιολογικά έμβρυα περνούν από μία σειρά πλύσεων με διάλυμα KSOM.
 - Γίνεται υπολογισμός του ποσοστού γονιμοποίησης με την μέτρηση των ωαρίων στο στάδιο των δύο κυττάρων προς τον συνολικό αριθμό ωαρίων.



Εικόνα 25. Έμβρυα πριν και μετά την ολονύκτια επώαση στον κλίβανο. Ένα ποσοστό των εμβρύων φτάνει στο στάδιο των δύο κυττάρων.

14. Τέλος τα έμβρυα που συλλέχθηκαν μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε πολλές διαδικασίες όπως εμβρυομεταφορά σε θετή μητέρα με ψευδοεγκυμοσύνη, κρυοσυντήρηση ή και συνέχεια της καλλιέργειας σε KSOM ως και το στάδιο της βλαστοκύστης. (Takeo and Nakagata 2018)

4.2.6 Κρυοσυντήρηση εμβρύων

A) Εξοπλισμός

- Tips για western blot
- Πιπέτα
- Tips
- Πιπέτα μεταφοράς
- Μικρά πλαστικά καλλιερρητικά τρυβλία
- Στερεοσκόπιο
- Σύστημα κρυοσυντήρησης (canister, μεταλλική βάση και σωληνάριο αποθήκευσης/ goblet, δεξαμενή με υγρό άζωτο)
- Φορητή συσκευή κρυοσυντήρησης
- Δεξαμενή κρυοσυντήρησης με υγρό άζωτο
- Κλίβανος ρυθμισμένος σε 37°C (5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂)

B) Αντιδραστήρια

- Pre vitrification solution: 80μl M2, 10μl Ethylene glycol., 10μl DMSO
- Vitrification solution: 60μl Ficoll, 10μl M2, 15μl DMSO, 15μl Ethylene glycol.

Γ) Πειραματική διαδικασία

1. Αρχικά πραγματοποιείται η προετοιμασία του συστήματος κρυοσυντήρησης με την αναγραφή των στοιχείων του δείγματος στο εξωτερικό των σωληναρίων ή συσκευών αποθήκευσης (vials-spatula).
2. Όλα τα εξαρτήματα της κρυοσυντήρησης ψύχονται εξ' αρχής στην φορητή συσκευή κρυοσυντήρησης η οποία περιέχει υγρό άζωτο.
3. Έπειτα πραγματοποιείται η παρασκευή των απαραίτητων αντιδραστηρίων
4. Σε ένα τρυβλίο με την βοήθεια μίας πιπέτας δημιουργούνται τρεις σταγόνες των 50μl M2, 20μl pre vitrification και 20 μl vitrification.
5. Ο αριθμός των τρυβλίων που θα χρειαστούν εξαρτάται από τον αριθμό των σταγόνων που χρησιμοποιήθηκαν στο τελευταίο στάδιο της συλλογής των ωαρίων ή των εμβρύων. Χρειάζεται να υπάρχει ένα τρυβλίο για κάθε σταγόνα.
6. Για την κατασκευή της σπάτουλας πάνω στην οποία θα τοποθετηθούν τα κύτταρα πριν την κρυοσυντήρηση αξιοποιούνται tips για western blot έπειτα από πεπλατυσμό της άκρης της.
7. Από τον κλίβανο μεταφέρεται το τρυβλίο το οποίο περιέχει τα ωάρια ή τα έμβρυα στο χώρο του στερεοσκοπίου.
8. Με την πιπέτα στόματος μεταφέρονται τα ωάρια από μία σταγόνα στο καινούριο τρυβλίο και πιο συγκεκριμένα στην σταγόνα με το διάλυμα M2 για να ξεπλυθούν.
9. Η πιπέτα ξεπλένεται με το επόμενο διάλυμα που θα χρησιμοποιηθεί το οποίο είναι το pre vitrification.

10. Πραγματοποιείται μεταφορά των ωαρίων από το διάλυμα M2 στο διάλυμα του pre vitrification.

11. Η μεταφορά συνεχίζεται σε πολύ μικρό χρονικό διάστημα στο διάλυμα του vitrification (αφού πρώτα ξεπλυθεί η πιπέτα με διάλυμα vitrification). Ο μέγιστος χρόνος παραμονής χωρίς την ανάπτυξη βλαβών είναι 20 δευτερόλεπτα.

12. Πριν το πέρας των 20 δευτερολέπτων και με ελάχιστη ποσότητα διαλύματος στην πιπέτα τα ωάρια απλώνονται πάνω στην σπάτουλα που κατασκευάστηκε και βυθίζεται κατευθείαν στο υγρό άζωτο.

13. Για την διατήρηση του δείγματος η σπάτουλα εισέρχεται στο vial που φέρει τα στοιχεία και εκείνο έπειτα σε goblet που αναγράφει τα στοιχεία του δείγματος.

14. Το σύστημα στερεώνεται στην μεταλλική βάση και τοποθετείται στη δεξαμενή του υγρού αζώτου για αποθήκευση.

4.2.7 Αποτελέσματα

4.2.7.1 Κρυοσυντήρηση σπέρματος

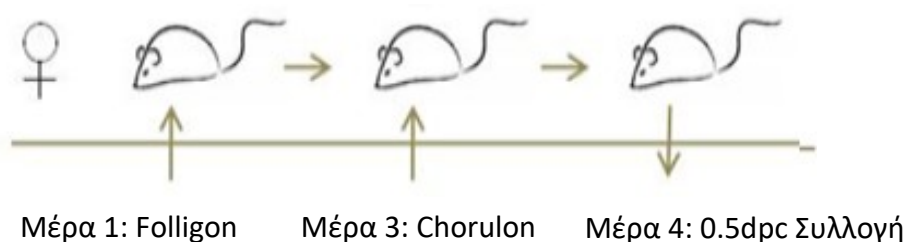
Πραγματοποιήθηκαν 5 κύκλοι κρυοσυντήρησης σπέρματος κατά την διάρκεια των οποίων χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 5 αρσενικά ποντίκια p55KO/C57bl/6. Στα πρώτα 3 αρσενικά έγινε κρυοσυντήρηση σπέρματος στο δείγμα και των 2 επιδιδυμίδων ενώ στα επόμενα 2 αρσενικά η μία επιδιδυμίδα χρησιμοποιήθηκε για την κρυοσυντήρηση και η άλλη για ένα κύκλο in vitro γονιμοποίησης. Η διαφορά στον αριθμό των straws που παρασκευάστηκαν στον κάθε κύκλο οφείλεται σε τεχνικά προβλήματα όπως είναι: η διάλυση της σταγόνας εντός του ελαίου και η αναρρόφηση ελαίου ή διαλύματος HTF^{Ca} μαζί με το δείγμα. Σε κάθε κύκλο in vitro γονιμοποίησης έγινε απόψυξη ενός straw ώστε να χρησιμοποιηθεί στο τρυβλίο γονιμοποίησης με κρυοσυντηρημένο σπέρμα. Μεγαλύτερος αριθμός straws χρησιμοποιήθηκε μερικές φορές λόγω βλάβης και απόρριψης του περιέκτη μετά την αφαίρεσή του από την δεξαμενή κρυοσυντήρησης. Το γεγονός αυτό αποδίδεται στην απότομη μεταβολή της θερμοκρασίας, στους χειρισμούς και στην εισαγωγή υγρού αζώτου στον περιέκτη.

Κύκλος κρυοσυντήρησης	Αριθμός αρσενικών ποντικών	Επιδιδυμίδες	Αποθηκευτικά straws
1η	1	2	6
2η	1	2	8
3η	1	2	8
4η	1	1	7
5η	1	1	8
Σύνολο	5	8	37

4.2.7.2 Υπερωορρηξία

Πραγματοποιήθηκαν 7 κύκλοι υπερωορρηξίας κατά τους οποίους χρησιμοποιήθηκαν 16 θηλυκά ποντίκια p55KO/C57bl/6. Η διαδικασία της υπερωορρηξίας ξεκινά με ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση 0.1 ml Pregnant Mare Serum Gonadotropin (Folligon) 10IU/ποντίκι την ημέρα 1. Έπειτα από 46-48 ώρες έγινε η ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση 0.1 ml Human Chorionic Gonadotrophin (Chorulon) 10IU/ποντίκι. Την επόμενη μέρα πραγματοποιήθηκε η συλλογή των ωαρίων. Ο αριθμός των ωαρίων που συγκεντρώθηκαν από κάθε κύκλο υπερωορρηξίας αντιστοιχεί στον αριθμό των ωαρίων από όλες τις σάλπιγγες που απομονώθηκαν. Η σημαντική διαφορά ανάμεσα στον αριθμό των απομονωμένων ωαρίων σε ορισμένους κύκλους υπερωορρηξίας αποδίδεται στην ηλικία των ζώων που χρησιμοποιήθηκαν λόγω διαθεσιμότητάς τους. Άλλοι σημαντικοί παράγοντες αποτελούν η ανατομία και τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του κάθε ζώου οι οποίοι επηρεάζουν τόσο την επιτυχία της ορμονικής διέγερσης όσο και την ποιότητα των ωαρίων. Ο αριθμός των ωαρίων που απομονώθηκαν σε κάθε κύκλο ήταν κατά μέσο όρο 54 με τον αντίστοιχο αριθμό ανά ζώο να είναι ίσο με 24 ωάρια.

Σχηματικό πρωτόκολλο Υπερωορρηξίας



Κύκλος ωορρηξίας	Αριθμός θηλυκών ποντικών	Αριθμός ωαρίων ανά κύκλο ωορρηξίας	Μέσος όρος
1ος	2	45	23
2ος	2	72	36
3ος	2	62	31
4ος	3	13	4
5ος	2	44	22
6ος	2	43	22
7ος	3	97	32
Μέσος όρος		54	24

4.2.7.3 Απόψυξη σπέρματος

Κατά την διάρκεια διεξαγωγής των πειραμάτων της *in vitro* γονιμοποίησης έγινε απόψυξη και χρήση 3 αποθηκευτικών straws σπέρματος με σκοπό να χρησιμοποιηθεί το δείγμα για την γονιμοποίηση των ωαρίων στο τρυβλίο γονιμοποίησης για το κρουσυντηρημένο σπέρμα. Έπειτα από την αφαίρεση του κάθε straw από το σύστημα κρουσυντήρησης και την επώασή του σε υδατόλουτρο των 37°C για 10 λεπτά το δείγμα μεταφέρθηκε στην σταγόνα του TYH+MBCD. Μετά το πέρας των 30 λεπτών επώασης για την επίτευξη της ενεργοποίησης (capacitation) ελέγχθηκε η ανάκτηση της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων και η απαραίτητη ποσότητα δείγματος μεταφέρθηκε στην σταγόνα των ωαρίων. Τα κρουσυντηρημένα δείγματα σπέρματος εμφάνισαν μειωμένη κινητικότητα μετά την απόψυξή τους σε σχέση με το φρέσκο σπέρμα. Με την πάροδο του χρόνου η κινητικότητα των σπερματοζωαρίων εξακολουθούσε να εξασθενεί.

4.2.7.4 *In vitro* γονιμοποίηση

Συνολικά πραγματοποιήθηκαν 7 κύκλοι *in vitro* γονιμοποίησης. Ωστόσο στην συγκεκριμένη ενότητα παρατίθενται τρεις από τους κύκλους καθώς στους υπόλοιπους τεχνικά προβλήματα είχαν ως αποτέλεσμα χαμηλά έως μηδαμινά ποσοστά γονιμοποίησης. Πιο συγκεκριμένα η χρήση mineral oil σε ορισμένους κύκλους οδήγησε σε καταστροφή των ωαρίων από τα πρώτα στάδια της καλλιέργειας. Επίσης η αποτυχία σε κάποιους κύκλους να επιτευχθεί το capacitation στα δείγματα του σπέρματος τόσο του φρέσκου όσο και του κρουσυντηρημένου κατέστησε αδύνατη την πραγματοποίηση της γονιμοποίησης. Και στις δύο περιπτώσεις η χρήση του ελαίου θεωρήθηκε υπεύθυνη και έγινε αντικατάστασή του. Με την αντικατάσταση των τοξικών για τα έμβρυα υλικών και την ανανέωση των αντιδραστηρίων οι μεταγενέστεροι κύκλοι άρχισαν να δίνουν πιο έγκυρα αποτελέσματα. Από την επεξεργασία των δεδομένων που προέκυψαν από τους επιτυχείς κύκλους IVF συμπεραίνεται ότι η *in vitro* γονιμοποίηση με την χρήση κρουσυντηρημένου σπέρματος μπορεί να προσφέρει εξίσου καλά αποτελέσματα με την χρήση φρέσκου σπέρματος.

Κύκλος IVF	Αριθμός υγιών ωαρίων	Γονιμοποίηση με φρέσκο σπέρμα	Αριθμός 2-cell από φρέσκο σπέρμα	Γονιμοποίηση με κρουσυντηρημένο σπέρμα	Αριθμός 2-cell από κρουσυντηρημένο σπέρμα
1ος	44	22	5	22	5
2ος	43	5	0	38	10
3ος	82	41	33	41	28
Σύνολο	169	68	38	101	43

McNemar's test			
	1- CELL(-)	2- CELL(+)	Row Totals
IVF Fresh sperm(-)	38	30	68
IVF Cryo-Thawed sperm(+)	58	43	101
Column Totals	96	73	169(Grand Total)
Chi-Squared = .198 , p-value = .6567 no significant for p < .05			

Ποσοστό γονιμοποίησης με φρέσκο σπέρμα	Ποσοστό γονιμοποίησης με κρυοσυντηρημένο σπέρμα
55,8%	42,57%

4.3 Συζήτηση- Συμπεράσματα

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία μελετήθηκε η ικανότητα επαναφοράς της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων μετά την απόψυξη, η αποτελεσματικότητα του πρωτόκολου ορμονικής διέγερσης και το ποσοστό γονιμοποίησης ωαρίων της σειράς C57bl/6 από σπερματοζωάρια της σειράς p55.

Έπειτα από την σύγκριση μεταξύ του φρέσκου και του κρυοσυντηρημένου σπέρματος μετά από απόψυξη παρατηρήθηκε μειωμένος αριθμός σπερματοζωαρίων με προωθητική κινητικότητα καθώς και ένα μεγάλο ποσοστό νεκρών σπερματοζωαρίων και κυτταρικών υπολειμμάτων στο κρυοσυντηρημένο σπέρμα. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία η σειρά C57bl/6 εμφανίζει μειωμένη αναβίωση των σπερματοζωαρίων μετά την απόψυξη γεγονός το οποίο οφείλεται τόσο στα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά της σειράς (ομομικτική σειρά) όσο και σε βλάβες που συμβαίνουν στα σπερματοζωάρια κατά την διάρκεια της κρυοσυντήρησης και της απόψυξης. (Takeo and Nakagata 2010) (Sztein et al., 2000)

Κατά την διεξαγωγή της in vitro γονιμοποίησης χρησιμοποιήθηκε τόσο φρέσκο όσο και αποψυγμένο σπέρμα από την συγκεκριμένη σειρά. Τα ποσοστά γονιμοποίησης που υπολογίστηκαν ήταν χαμηλά και στις δύο περιπτώσεις. Μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί πάνω στην εφαρμογή IVF με την χρήση της σειράς C57bl/6 αναφέρουν χαμηλά ποσοστά γονιμοποίησης. Η χαμηλή ικανότητα γονιμοποίησης είναι ένα στοιχείο που χαρακτηρίζει την συγκεκριμένη σειρά και ειδικά στην περίπτωση χρήσης κρυοσυντηρημένου σπέρματος. Επίσης έχει αποδειχθεί ότι η αύξηση της συγκέντρωσης του δείγματος σπέρματος που μεταφέρεται στην σταγόνα γονιμοποίησης δεν βοηθά στην λύση του προβλήματος. (Sztein et al., 2000) Τεχνικές που έχουν ελεγχθεί και αυξάνουν το ποσοστό γονιμοποίησης είναι τεχνικές απομόνωσης των σπερματοζωαρίων

με προωθητική κινητικότητα. Με την απομάκρυνση κυτταρικών υπολειμμάτων όπως τα μη κινητά σπερματοζωάρια, τα υπολείμματα επιδιδυμικού ιστού και τα συσσωματώματα επιτυγχάνεται η μεταφορά μόνο των υγιών και κινητών σπερματοζωαρίων στην σταγόνα γονιμοποίησης.(Takeo et al.,2008)(Bath 2003) Άλλη επεξήγηση του χαμηλού ποσοστού γονιμοποίησης με την χρήση κρυοσυντηρημένου σπέρματος αποτελεί η μειωμένη ικανότητα των σπερματοζωαρίων μετά την απόψυξη να υποστούν cholesterol efflux. Το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα να μην ολοκληρώνεται το capacitation και να καθίσταται δύσκολη η γονιμοποίηση.(Takeo et al.,2008)

Με τον έλεγχο της ορμονικής διέγερσης των θηλυκών αποδείχθηκε η συμβολή της ηλικίας του ζώου στον αριθμό αλλά και στην ποιότητα των ωαρίων που συλλέγονται. Σε ορισμένους κύκλους superovulation χρησιμοποιήθηκαν θηλυκά ζώα μεγαλύτερης ηλικίας τα οποία παρήγαγαν στην πορεία μικρότερο αριθμό ωαρίων. Το συγκεκριμένο γεγονός επιβεβαιώνεται από την σχετική βιβλιογραφία στην οποία αναφέρεται επίσης ότι τα ωάρια που συλλέγονται από θηλυκά ποντίκια μεγαλύτερης ηλικίας παρουσιάζουν και μειωμένη ικανότητα γονιμοποίησης. Πιο συγκεκριμένα ζώα ηλικίας 21-32 ημερών παρουσιάζουν το μεγαλύτερο αριθμό ωαρίων καθώς και το μεγαλύτερο ποσοστό γονιμοποίησης με φρέσκο σπέρμα. Με την χρήση κρυοσυντηρημένου σπέρματος ωστόσο τα δεδομένα αλλάζουν και το εύρος της ιδανικής ηλικίας μειώνεται. Μεγαλύτερο ποσοστό γονιμοποίησης στην προκειμένη εμφανίζουν ζώα ηλικίας 21-24 ημερών ενώ με την αύξηση της ηλικίας το ποσοστό μειώνεται αισθητά.(Kolbe et al.,2015)

Όσο πιο όσον αφορά την ανάπτυξη των εμβρύων μέχρι το στάδιο των 2 κυττάρων μεγαλύτερη επιρροή εμφανίζει η τεχνική του IVF παρά η ορμονική διέγερση. Από πειράματα που έγιναν πάνω στην ανάπτυξη εμβρύων που δημιουργήθηκαν in vivo και in vitro αποδείχθηκε ότι η καλλιέργεια εμβρύων που έχουν παραχθεί in vivo εμφανίζει μεγαλύτερα ποσοστά 2-cell σε σχέση με την τεχνική του IVF κάτι το οποίο δείχνει ότι οι συνθήκες καλλιέργειας κατά την δημιουργία του ζυγωτού και κατά τις πρώτες κυτταρικές διαιρέσεις επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό την μετέπειτα ανάπτυξη του εμβρύου.(Chen et al., 2019)

Το τελικό ποσοστό γονιμοποίησης μπορεί να καθοριστεί και από παράγοντες όπως ,τα γενετικά χαρακτηριστικά του ζώου, οι χρόνοι χορήγησης και η συγκέντρωση των ορμονών κατά την ορμονική υπερδιέγερση, τους χρόνους διεξαγωγής της πειραματικής διαδικασίας και τις τεχνικές χειρισμού. (Kolbe et al.,2015)

Η ποιότητα και ο αριθμός των ωαρίων αξιολογείται κατά την συλλογή τους από το θηλυκό ποντίκι, κατά τον καθαρισμό τους, έπειτα από την γονιμοποίηση και σε όλα τα στάδια ανάπτυξης. Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά αποτελούν το πρώτο κριτήριο ενός ποιοτικού ελέγχου. Κατά την επεξεργασία των ωαρίων βλάβες στα ωάρια προκύπτουν είτε λόγω τεχνικών σφαλμάτων είτε λόγω ύπαρξης τοξικής ουσίας στα αντιδραστήρια που έχουν χρησιμοποιηθεί. Είναι σημαντικό να μελετηθεί η αντίστοιχη βιβλιογραφία καθώς και να γίνουν οι

απαραίτητοι έλεγχοι για την αποφυγή ή ελαχιστοποίηση του συγκεκριμένου προβλήματος. (Takeo and Nakagata 2018)

Η κρυσυντήρηση αποτελεί μια σημαντική τεχνική στη διαχείριση, εγκαθίδρυση και διατήρηση σημαντικών διαγονιδιακών σειρών ποντικών σε ένα εργαστήριο, όπως στη Μονάδα διαγονιδιακής τεχνολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ. Μέσω της τεχνικής αυτής βρίσκουν εφαρμογή όλες οι αρχές που περιγράφονται στη θεωρία των 3R's και βελτιστοποιούν τις συνθήκες προγραμματισμού και πειραματισμού με ζώα εργαστηρίου. Συγκεκριμένα οφέλη είναι αρχικά η μείωση του αριθμού των ζώων που απαιτούνται για την διατήρηση των διαγονιδιακών σειρών. Ταυτόχρονα, δημιουργείται ένα αποθετήριο-τράπεζα διαγονιδιακών σειρών του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ με ταυτόχρονη προστασία τους από γενετική εκφύλιση. Με την ανάπτυξη της τεχνικής είναι δυνατή η εγκατάσταση νέων διαγονιδιακών σειρών στην εκτροφή μετά από παραλαβή κρυσυντηρημένων γαμετών ή εμβρύων και όχι ζωντανών ζώων και ταυτόχρονα δημιουργείται η δυνατότητα αποστολής διαγονιδιακών σειρών με την μορφή κρυσυντηρημένων γαμετών ή εμβρύων και όχι ζωντανών ζώων σε άλλα εργαστήρια ή Ινστιτούτα. Η συνολική εκτροφή προστατεύεται από ασθένειες (δημιουργία SOPF (specific opportunistic pathogen free) animals FELASA) κατά την μεταφορά ή την εκτροφή των ζώων και ταυτόχρονα αποτελεί ένα μέσω διάσωσης σειρών που εμφανίζουν χαμηλή αναπαραγωγική ικανότητα. Η ίδρυση ή μεταφορά νέων σειρών γίνεται μέσω εμβρυομεταφοράς, διαδικασία που καθιστά δυνατή την χρήση τους σε μελλοντικά πειράματα βασικής και μεταφραστικής έρευνας. Τα οφέλη της κρυσυντήρησης έχουν εφαρμογή και στο πρωτόκολλο της in vivo γονιμοποίησης καθώς η ύπαρξη ενός αποθετηρίου με την επιθυμητή σειρά μπορεί να μειώσει σε μεγάλο βαθμό τον χρόνο προετοιμασία της πειραματικής διαδικασίας (κρυσυντηρημένα έμβρυα ή γαμέτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν άμεσα και να δώσουν απογόνους). Επιπλέον η κρυσυντήρηση καθιστά πιο αποτελεσματική & ηθική τη χρήση και διατήρηση διαγονιδιακών σειρών που χρησιμοποιούνται με μικρή συχνότητα, ενώ δίνει την δυνατότητα μιας πιο στοχευμένης και γρήγορης ανάκτησης των σειρών αλλά και δημιουργίας ομάδων πειραματισμού σύμφωνα με τον ερευνητικό προγραμματισμό. Η προστασία και διατήρηση ζωικών ειδών σε περιπτώσεις κρίσης ή φυσικών καταστροφών, καθώς και η εξοικονόμηση χώρου και κόστους στέγασης μεγιστοποιούν τα οφέλη. Διασφαλίζουν το παραχθέν επιστημονικό έργο τόσο από άποψη οικονομίας και πόρων, όσο και ηθικής. Επιπλέον το εκτιμώμενο επίπεδο δριμύτητας των διαδικασιών είναι μέτριο για το σύνολο των τεχνικών και η αξιολόγηση της επιτυχίας συνίσταται στον τρόπο και την μεθοδολογία της ίδιας της τεχνικής στην κρυσυντήρηση των διαγονιδιακών σειρών.

5.8 Αναφορές

Abinawanto, A., Zuraida, Z., & Lestari, R. (2016). The effect of skim milk combined with 5% of methanol on motility, viability, and abnormality of Java barb, *Barbonymus gonionotus* spermatozoa after 24 hours freezing. *AAFL Bioflux*, 9(2), 326-333.

[2016.326-333.pdf \(bioflux.com.ro\)](https://bioflux.com.ro/2016.326-333.pdf)

Abtahi, N. S., Ghezelayagh, Z., Nemati, I., Eivazkhani, F., Farzaneh, P., Shahverdi, A., ... & Fathi, R. (2023). Cryobiology and fertility preservation: A perspective on past, current and future studies. *CryoLetters*, 44(4), 185-196.

[Cryobiology and fertility preservation: A perspective on past, cu...: Ingenta Connect](#)

ARRIVE Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments

[Home | ARRIVE Guidelines](#)

Barnett, K. R., Schilling, C., Greenfeld, C. R., Tomic, D., & Flaws, J. A. (2006). Ovarian follicle development and transgenic mouse models. *Human Reproduction Update*, 12(5), 537-555.

<https://academic.oup.com/humupd/article/12/5/537/777313>

Bath, M. L. (2003). Simple and efficient in vitro fertilization with cryopreserved C57BL/6J mouse sperm. *Biology of reproduction*, 68(1), 19-23.

[Simple and Efficient In Vitro Fertilization with Cryopreserved C57BL/6J Mouse Sperm1 | Biology of Reproduction | Oxford Academic \(oup.com\)](#)

Baumans, V. (2005). Science-based assessment of animal welfare: laboratory animals. *Revue scientifique et technique-office international des epizooties*, 24(2), 503.

[baumans503-514 \(wur.nl\)](https://wur.nl/baumans503-514)

Bavister B. D. (1981). Substitution of a synthetic polymer for protein in a mammalian gamete culture system. *The Journal of experimental zoology*, 217(1), 45-51.

<https://doi.org/10.1002/jez.1402170106>

Betsy, J., & Kumar, S. (2020). Cryopreservation: History and development. *Cryopreservation of Fish Gametes*, 135-149.

[Cryopreservation: History and Development | SpringerLink](#)

Chen, M., Wong, S. L., Wu, L. L., Gordon, Y. E., Heilbronn, L. K., & Robker, R. L. (2019). Differential impacts of gonadotrophins, IVF and embryo culture on mouse blastocyst development. *Reproductive BioMedicine Online*, 39(3), 372-382.

[Differential impacts of gonadotrophins, IVF and embryo culture on mouse blastocyst development - ScienceDirect](#)

Choi, J. K., Yue, T., Huang, H., Zhao, G., Zhang, M., & He, X. (2015). The crucial role of zona pellucida in cryopreservation of oocytes by vitrification.

Cryobiology, 71(2), 350-355.

[The crucial role of zona pellucida in cryopreservation of oocytes by vitrification - ScienceDirect](#)

Chu W. M. (2013). Tumor necrosis factor. *Cancer letters*, 328(2), 222–225.

<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.10.014>

Cockburn, K., & Rossant, J. (2010). Making the blastocyst: lessons from the mouse. *The Journal of clinical investigation*, 120(4), 995-1003.

[JCI - Making the blastocyst: lessons from the mouse](#)

Croy, B. A., Yamada, A. T., DeMayo, F. J., & Adamson, S. L. (Eds.). (2013). The guide to investigation of mouse pregnancy.

[The Guide to Investigation of Mouse Pregnancy - Google Books](#)

Cunha, G. R., Sinclair, A., Ricke, W. A., Robboy, S. J., Cao, M., & Baskin, L. S. (2019). Reproductive tract biology: Of mice and men. *Differentiation; research in biological diversity*, 110, 49–63. <https://doi.org/10.1016/j.diff.2019.07.004>

Duque, P., Hidalgo, C. O., Gómez, E., Pintado, B., Facal, N., & Díez, C. (2003). Macromolecular source as dependent on osmotic pressure and water source: effects on bovine in vitro embryo development and quality. *Reproduction Nutrition Development*, 43(6), 487-496.

[RND6-2003_2.pdf \(edpsciences.org\)](#)

Eggel, M., & Würbel, H. (2021). Internal consistency and compatibility of the 3Rs and 3Vs principles for project evaluation of animal research. *Laboratory animals*, 55(3), 233-243.

[Internal consistency and compatibility of the 3Rs and 3Vs principles for project evaluation of animal research - Matthias Eggel, Hanno Würbel, 2021 \(sagepub.com\)](#)

Elsheikh, A. S., Takahashi, Y., Nagano, M., & Kanagawa, H. (2003).

Manipulated mouse embryos as bioassay system for water quality control.

Reproduction in Domestic Animals, 38(3), 204-208.

[Manipulated Mouse Embryos as Bioassay System for Water Quality Control - Elsheikh - 2003 - Reproduction in Domestic Animals - Wiley Online Library](#)

Ericsson, A. C., Crim, M. J., & Franklin, C. L. (2013). A brief history of animal modeling. *Missouri medicine*, 110(3), 201–205.

[A Brief History of Animal Modeling - PMC \(nih.gov\)](#)

Eto, T., Takahashi, R., & Kamisako, T. (2015). Strain preservation of experimental animals: vitrification of two-cell stage embryos for multiple mouse strains. *Cryobiology*, 70(2), 150-155.

[Strain preservation of experimental animals: Vitrification of two-cell stage embryos for multiple mouse strains - ScienceDirect](#)

Ewen, K. A., & Koopman, P. (2010). Mouse germ cell development: from specification to sex determination. *Molecular and cellular endocrinology*, 323(1), 76-93.

[Mouse germ cell development: From specification to sex determination - ScienceDirect](#)

F. Costantini, (2001). Transgenic Animals. Encyclopedia of Genetics, p1990-1998. Academic Press

[Transgenic Animals - ScienceDirect](#)

Fukuda, A., Noda, Y., Tsukui, S., Matsumoto, H., Yano, J., & Mori, T. (1987). Influence of water quality on in vitro fertilization and embryo development for the mouse. Journal of in vitro fertilization and embryo transfer, 4, 40-45.

[Influence of water quality on in vitro fertilization and embryo development for the mouse | Journal of Assisted Reproduction and Genetics \(springer.com\)](#)

Gardner, D. K., & Lane, M. (2004). Culture of the mammalian preimplantation embryo. A laboratory guide to the mammalian embryo, 41-61.

[A Laboratory Guide to the Mammalian Embryo - Google Books](#)

Gosden, R. (2011). Cryopreservation: a cold look at technology for fertility preservation. Fertility and sterility, 96(2), 264-268.

[Cryopreservation: a cold look at technology for fertility preservation - ScienceDirect](#)

Hickman-Davis, J. M., & Davis, I. C. (2006). Transgenic mice. Paediatric respiratory reviews, 7(1), 49-53.

[Transgenic mice - ScienceDirect](#)

Hogan B., Beddington R., Constantini F., Lacy E. (1994). Manipulating the Mouse Embryo.

http://web.mit.edu/7.31/restricted/pdfs/lab_man_all.pdf

Hubrecht RC, Carter E. The 3Rs and Humane Experimental Technique: Implementing Change. Animals. 2019; 9(10):754.

<https://doi.org/10.3390/ani9100754>

Jang, T. H., Park, S. C., Yang, J. H., Kim, J. Y., Seok, J. H., Park, U. S., ... & Han, J. (2017). Cryopreservation and its clinical applications. Integrative medicine research, 6(1), 12-18.

[Cryopreservation and its clinical applications - ScienceDirect](#)

Jia, G., Fu, X., Cheng, K., Yue, M., Jia, B., Hou, Y., & Zhu, S. (2015). Spermatozoa cryopreservation alters pronuclear formation and zygotic DNA demethylation in mice. Theriogenology, 83(6), 1000-1006.

[Spermatozoa cryopreservation alters pronuclear formation and zygotic DNA demethylation in mice - ScienceDirect](#)

Katherine P. Hummel, Flavia L. Richardson, and Elizabeth Fekete (1966). Biology of the Laboratory Mouse

<https://www.informatics.jax.org/greenbook/index.shtml>

Kilkenny, C., Browne, W. J., Cuthill, I. C., Emerson, M., & Altman, D. G. (2010). Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics, 1(2), 94-

99.

[Improving Bioscience Research Reporting: The ARRIVE Guidelines for Reporting Animal Research | PLOS Biology](#)

Kolbe, T., Landsberger, A., Manz, S., Na, E., Urban, I., & Michel, G. (2015). Productivity of superovulated C57BL/6J oocyte donors at different ages. *Lab Animal*, 44(9), 346-349.

[Productivity of superovulated C57BL/6J oocyte donors at different ages | Lab Animal \(nature.com\)](#)

Loutradis, D., Drakakis, P., Kallianidis, K., Sofikitis, N., Kallipolitis, G., Milingos, S., ... & Michalas, S. (2000). Biological factors in culture media affecting in vitro fertilization, preimplantation embryo development, and implantation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 900(1), 325-335.

[Biological Factors in Culture Media Affecting in Vitro Fertilization, Preimplantation Embryo Development, and Implantation - LOUTRADIS - 2000 - Annals of the New York Academy of Sciences - Wiley Online Library](#)

McLaren, A. (2003). Primordial germ cells in the mouse. *Developmental biology*, 262(1), 1-15.

[doi:10.1016/S0012-1606\(03\)00214-8 \(core.ac.uk\)](#)

Nakagata, N. (2015). *Reproductive engineering techniques in mice: Technical manual*.

NC3Rs National Center of the Replacement Refinement and Reduction of Animals in Research

[The 3Rs | NC3Rs](#)

NORECOPA Norway's National Consensus Platform for the advancement of "the 3 Rs"

[PREPARE checklist \(norecopa.no\)](#)

Nowshari, M. A., & Brem, G. (2000). The protective action of polyvinyl alcohol during rapid-freezing of mouse embryos. *Theriogenology*, 53(5), 1157-1166.

[The protective action of polyvinyl alcohol during rapid-freezing of mouse embryos - ScienceDirect](#)

Olsson, I. A. S., Franco, N. H., Weary, D. M., & Sandøe, P. (2012). The 3Rs principle—mind the ethical gap. *ALTEX*, 1, 333-336.

[269226052.pdf \(core.ac.uk\)](#)

Pedersen, R. A., Wu, K., & Bałakier, H. (1986). Origin of the inner cell mass in mouse embryos: cell lineage analysis by microinjection. *Developmental biology*, 117(2), 581-595.

[Origin of the inner cell mass in mouse embryos: Cell lineage analysis by microinjection - ScienceDirect](#)

Percie du Sert, N., Hurst, V., Ahluwalia, A., Alam, S., Avey, M. T., Baker, M., ... & Würbel, H. (2020). The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 40(9),

1769-1777.

[The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research | PLOS Biology](#)

Richmond, J. (2000). The 3Rs-Past, present and future. *Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science*, 27(2), 84-92.

[The 3Rs - Past, Present and Future | Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science \(utlib.ee\)](#)

Russell, W. M. S., & Burch, R. L. (1959). *The principles of humane experimental technique*. Methuen.

Robles, V., G. Valcarce, D., & F. Riesco, M. (2019). The use of antifreeze proteins in the cryopreservation of gametes and embryos. *Biomolecules*, 9(5), 181.

[Biomolecules | Free Full-Text | The Use of Antifreeze Proteins in the Cryopreservation of Gametes and Embryos \(mdpi.com\)](#)

Saga, Y. (2008). Mouse germ cell development during embryogenesis. *Current opinion in genetics & development*, 18(4), 337-341.

[Mouse germ cell development during embryogenesis - ScienceDirect](#)

Saitou, M., & Yamaji, M. (2012). Primordial germ cells in mice. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 4(11), a008375.

[Primordial Germ Cells in Mice \(cshlp.org\)](#)

Sciorio, R., & Rinaudo, P. (2023). Culture conditions in the IVF laboratory: state of the ART and possible new directions. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 40(11), 2591-2607.

[Culture conditions in the IVF laboratory: state of the ART and possible new directions | Journal of Assisted Reproduction and Genetics \(springer.com\)](#)

Smith, A. J. (2020). Guidelines for planning and conducting high-quality research and testing on animals. *Laboratory Animal Research*, 36(1), 1-6.

[Guidelines for planning and conducting high-quality research and testing on animals | Laboratory Animal Research | Full Text \(biomedcentral.com\)](#)

Smith, A. J., Clutton, R. E., Lilley, E., Hansen, K. E. A., & Brattelid, T. (2018). PREPARE: guidelines for planning animal research and testing. *Laboratory animals*, 52(2), 135-141.

[PREPARE: guidelines for planning animal research and testing - Adrian J Smith, R Eddie Clutton, Elliot Lilley, Kristine E Aa Hansen, Trond Brattelid, 2018 \(sagepub.com\)](#)

Sneddon, L. U., Halsey, L. G., & Bury, N. R. (2017). Considering aspects of the 3Rs principles within experimental animal biology. *Journal of Experimental Biology*, 220(17), 3007-3016.

[Considering aspects of the 3Rs principles within experimental animal biology | Journal of Experimental Biology | The Company of Biologists](#)

Steensma, D. P., Kyle, R. A., & Shampo, M. A. (2010). Abbie Lathrop, the "mouse woman of Granby": rodent fancier and accidental genetics pioneer. *Mayo Clinic proceedings*, 85(11), e83.
<https://doi.org/10.4065/mcp.2010.0647>

Summers, M. C., McGinnis, L. K., Lawitts, J. A., Raffin, M., & Biggers, J. D. (2000). IVF of mouse ova in a simplex optimized medium supplemented with amino acids. *Human reproduction*, 15(8), 1791-1801.
[151791.pdf \(archive.org\)](#)

Swain, J. E. (2019). Culture media in IVF: Decisions for the laboratory. In *In Vitro Fertilization: A Textbook of Current and Emerging Methods and Devices*, 105-119.
[Culture Media in IVF: Decisions for the Laboratory | SpringerLink](#)

Takahashi, H., & Liu, C. (2010). Archiving and distributing mouse lines by sperm cryopreservation, IVF, and embryo transfer. In *Methods in enzymology* (Vol. 476, pp. 53-69). Academic Press.
[Archiving and Distributing Mouse Lines by Sperm Cryopreservation, IVF, and Embryo Transfer - ScienceDirect](#)

Takeo, T., & Nakagata, N. (2010). Combination medium of cryoprotective agents containing L-glutamine and methyl- β -cyclodextrin in a preincubation medium yields a high fertilization rate for cryopreserved C57BL/6J mouse sperm. *Laboratory animals*, 44(2), 132-137.
[Combination medium of cryoprotective agents containing l-glutamine and methyl- \$\beta\$ -cyclodextrin in a preincubation medium yields a high fertilization rate for cryopreserved C57BL/6J mouse sperm - T Takeo, N Nakagata, 2010 \(sagepub.com\)](#)

Takeo, T., & Nakagata, N. (2010). Mouse sperm cryopreservation and effective embryo production using cryopreserved C57BL/6 mouse sperm. *Journal of Mammalian Ova Research*, 27(3), 70-78.
[Mouse Sperm Cryopreservation and Effective Embryo Production Using Cryopreserved C57BL/6 Mouse Sperm \(jst.go.jp\)](#)

Takeo, T., & Nakagata, N. (2018). *In Vitro Fertilization in Mice*. Cold Spring Harbor Protocols, 2018(6).
[In Vitro Fertilization in Mice. - Abstract - Europe PMC](#)

Sztejn, J. M., Farley, J. S., & Mobraaten, L. E. (2000). In vitro fertilization with cryopreserved inbred mouse sperm. *Biology of reproduction*, 63(6), 1774-1780.
[In Vitro Fertilization with Cryopreserved Inbred Mouse Sperm1 | Biology of Reproduction | Oxford Academic \(oup.com\)](#)

Takeo, T., Hoshii, T., Kondo, Y., Toyodome, H., Arima, H., Yamamura, K. I., ... & Nakagata, N. (2008). Methyl-beta-cyclodextrin improves fertilizing ability of C57BL/6 mouse sperm after freezing and thawing by facilitating cholesterol efflux from the cells. *Biology of reproduction*, 78(3), 546-551.
[Methyl-Beta-Cyclodextrin Improves Fertilizing Ability of C57BL/6 Mouse Sperm](#)

[after Freezing and Thawing by Facilitating Cholesterol Efflux from the Cells1 | Biology of Reproduction | Oxford Academic \(oup.com\)](#)

Takeo, T., Nakao, S., Nakagawa, Y., Sztejn, J. M., & Nakagata, N. (2020). Cryopreservation of mouse resources. *Laboratory Animal Research*, 36(1), 1-6. [Cryopreservation of mouse resources | Laboratory Animal Research | Full Text \(biomedcentral.com\)](#)

Tannenbaum, J., & Bennett, B. T. (2015). Russell and Burch's 3Rs then and now: the need for clarity in definition and purpose. *Journal of the American association for laboratory animal science*, 54(2), 120-132. [Russell and Burch's 3Rs Then and Now: The Need for Clarity in Def...: Ingenta Connect](#)

The Jackson Laboratory [The Jackson Laboratory \(jax.org\)](#)

Wang, X., & Lin, Y. (2008). Tumor necrosis factor and cancer, buddies or foes?. *Acta pharmacologica Sinica*, 29(11), 1275–1288. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7254.2008.00889.x>

Wassarman, P. M. (2005). Contribution of mouse egg zona pellucida glycoproteins to gamete recognition during fertilization. *Journal of cellular physiology*, 204(2), 388-391. [Journal of Cellular Physiology | Cell Biology Journal | Wiley Online Library](#)

Whaley, D., Damyar, K., Witek, R. P., Mendoza, A., Alexander, M., & Lakey, J. R. (2021). Cryopreservation: an overview of principles and cell-specific considerations. *Cell Transplantation*, 30, 0963689721999617. [Cryopreservation: An Overview of Principles and Cell-Specific Considerations - David Whaley, Kimia Damyar, Rafal P. Witek, Alan Mendoza, Michael Alexander, Jonathan RT Lakey, 2021 \(sagepub.com\)](#)

Wight, D. C., & Wagner, T. E. (1994). Transgenic mice: a decade of progress in technology and research. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 307(2), 429-440. [Transgenic mice: a decade of progress in technology and research - ScienceDirect](#)

Würbel, H. (2017). More than 3Rs: the importance of scientific validity for harm-benefit analysis of animal research. *Lab animal*, 46(4), 164-166. [More than 3Rs: the importance of scientific validity for harm-benefit analysis of animal research | Lab Animal \(nature.com\)](#)

Yang, H., & Tiersch, T. R. (2020). Concepts, History, Principles, and Application of Germplasm Cryopreservation Technology: FA223, 4/2020. *EDIS*, 2020(5), 10-10. [dihagan,+FA22300.pdf](#)

6. Παράρτημα Β

6.1 Κατάλογος εικόνων

Εικόνα 1.	Σχεδιασμός του πειράματος βασισμένος στην ανάλυση κόστους οφέλους.
Εικόνα 2.	Λίστα με τους απαραίτητους παράγοντες που πρέπει να συμπεριληφθούν στην αναφορά ώστε να επιτευχθεί η αξιοπιστία των ευρημάτων- Arrive.
Εικόνα 3.	Λίστα με επιπλέον χρήσιμους παράγοντες που μπορούν να συμπεριληφθούν στην αναφορά-Arrive.
Εικόνα 4.	Η λίστα οδηγιών Prepare.
Εικόνα 5.	Απεικόνιση των σταδίων της κρυοσυντήρησης και των βλαβών που προκύπτουν από το ωσμωτικό σοκ και την ενδοκυτταρική ανάπτυξη κρυστάλλων.
Εικόνα 6.	Συχνώς χρησιμοποιούμενες κρυοπροστατευτικές ουσίες.
Εικόνα 7.	Τρόπος δράσης κρυοπροστατευτικών πρωτεϊνών και οι πιο συχνώς χρησιμοποιούμενες.
Εικόνα 8.	Χρήση τραπεζών για την μεταφορά επιθυμητών σειρών.
Εικόνα 9.	Ανάπτυξη ωθηλακίων από τα αρχέγονα ωθηλάκια μέχρι και την ωορρηξία.
Εικόνα 10.	Διάγραμμα παρουσίασης της αντίδρασης ακροσώματος.
Εικόνα 11.	Περιγραφή της πολικότητας κατά τις πρώτες μιτωτικές διαιρέσεις του εμβρύου.
Εικόνα 12.	Στάδια ανάπτυξης της βλαστοκύστης και διαφορές ανάμεσα στο ποντίκι και τον άνθρωπο.
Εικόνα 13.	Διαφοροποίηση αρχέγονων γεννητικών κυττάρων.
Εικόνα 14.	Μετακίνηση αρχέγονων γεννητικών κυττάρων.
Εικόνα 15.	Σχηματική απεικόνιση της πορείας των αρχέγονων γεννητικών κυττάρων από την βάση της αλλάντου έως τις γονάδες.
Εικόνα 16.	Ουρογεννητικό σύστημα θηλυκού ποντικίου.
Εικόνα 17.	Αναπαραγωγικό σύστημα αρσενικού ποντικίου.
Εικόνα 18.	Ο οιστρικός κύκλος ιστολογικά. SE: επιφάνεια επιθηλίου, CL: ωχρό σωματίο AF: ωκύτταρο με άντρο GC: κοκκιώδη κύτταρα O: ωκύτταρο PAF: ωθηλάκιο χωρίς άντρο TC: κύτταρα theca.
Εικόνα 19.	Ανατομία θηλυκού ποντικίου.
Εικόνα 20.	Στερεοσκόπιο και συνάθροιση ωαρίων-κοκκιωδών κυττάρων πριν την προσθήκη υαλουρονιδάσης.
Εικόνα 21.	Έμβρυα πριν και μετά την ολονύκτια επώαση στον κλίβανο. Ένα ποσοστό των εμβρύων φτάνει στο στάδιο των δύο κυττάρων.
Εικόνα 22.	Φορητό σύστημα κρυοσυντήρησης.
Εικόνα 23.	Διαδικασία διάνοιξης της κοιλιακής κοιλότητας.
Εικόνα 24.	Σχηματική αναπαράσταση της συλλογής του σπέρματος σε σωληνάκια.
Εικόνα 25.	Σφράγιση σωληναρίων σπέρματος και κρυοσυντήρησής τους σε δοχείο με υγρό άζωτο.