

ΕΝΗΜΕΡΩΤΙΚΗ ΕΚΔΟΣΗ
ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΕΤΑΙΡΕΙΑ
ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗΣ
ΕΝΔΟΚΡΙΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΙΟΥΝΙΟΣ 2014

ΕΞΩΣΩΜΑΤΙΚΗ ΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ
ΣΥΓΧΡΟΝΕΣ ΕΞΕΛΙΞΕΙΣ ΚΑΙ ΝΕΩΤΕΡΑ
ΔΕΔΟΜΕΝΑ

ΕΥΑΓΓΕΛΟΣ ΜΑΚΡΑΚΗΣ
ΜΑΙΕΥΤΗΡΑΣ – ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΟΣ
ΔΙΔΑΚΤΩΡ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ



ΔΙΟΙΚΗΤΙΚΟ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟ
ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗΣ ΕΝΔΟΚΡΙΝΟΛΟΓΙΑΣ

Πρόεδρος: Ιωάννης Μεσσήνης
Αντιπρόεδρος: Οδυσσέας Γρηγορίου
Γενικός Γραμματέας: Νικόλαος Βιτωράτος
Ταμίας: Ευθύμιος Δεληγεώρογλου
Μέλη: Γεώργιος Ιατράκης
Νικόλαος Βλάχος
Ευτύχιος Τρακάκης

ΕΔΡΑ ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ

Γραφεία Ιατρικής Εταιρείας Αθηνών, Μαιάνδρου 23, 11528, Αθήνα

Website: www.hsge.gr

ΑΠΟΣΤΟΛΗ E-MAILS

Για την αποστολή e-mails προς την εταιρεία ηλεκτρολογείστε: **info@hsge.gr**

Για να επικοινωνήσετε με τα μέλη του Δ.Σ. προσωπικά, ηλεκτρολογείστε:

nikos@hsge.gr, Νικόλαος Βιτωράτος

edeligeo@aretaieio.uoa.gr, **makis@hsge.gr**, Ευθύμιος Δεληγεώρογλου

odysseas@hsge.gr, Οδυσσέας Γρηγορίου

georg@hsge.gr, Γεώργιος Ιατράκης

Αγαπητοί Συνάδελφοι,

Το 5^ο Πανελλήνιο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Γυναικολογικής Ενδοκρινολογίας, θα πραγματοποιηθεί στις 31 Ιανουαρίου-02 Φεβρουαρίου 2015, στο Ξενοδοχείο Royal Olympic, Αθήνα.

ΙΔΙΟΚΤΗΣΙΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ

Ελληνική Εταιρεία
Γυναικολογικής
Ενδοκρινολογίας

ΣΥΝΤ. ΤΙΤΛΟΣ

Ενημερωτική Έκδοση

ΕΚΔΟΤΗΣ

Ιωάννης Μεσσήνης

ΕΠΙΜΕΛΕΙΑ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΥ ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

Free Spirit

Εξαμηνιαία Έκδοση

Εκδίδεται σε 1.000 αντίτυπα

Τα δημοσιευμένα άρθρα είναι ιδιοκτησία του περιοδικού «Ενημερωτική Έκδοση» και απαγορεύεται μερική ή ολική αναδημοσίευσή τους χωρίς την έγγραφη συγκατάθεση του Διευθυντού Σύνταξης. Για την παραγωγή εικόνων, σχεδίων και πινάκων απαιτείται επίσης σχετική έγκριση και αναφορά της πηγής.

ΕΞΩΣΩΜΑΤΙΚΗ ΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ ΣΥΓΧΡΟΝΕΣ ΕΞΕΛΙΞΕΙΣ ΚΑΙ ΝΕΩΤΕΡΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

ΕΥΑΓΓΕΛΟΣ ΜΑΚΡΑΚΗΣ
ΜΑΙΕΥΤΗΡΑΣ – ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΟΣ
ΔΙΔΑΚΤΩΡ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ**ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑ****Ο ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΟΥ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΥ ΖΕΥΓΑΡΙΟΥ**

- A) Έλεγχος της Γυναίκας
- B) Έλεγχος του άνδρα

ΕΝΔΕΙΞΕΙΣ ΕΞΩΣΩΜΑΤΙΚΗΣ ΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗΣ**ΕΛΕΓΧΟΜΕΝΗ ΩΘΗΚΙΚΗ ΔΙΕΓΕΡΣΗ**

- A) Φαρμακευτικές ουσίες για πρωτόκολλα ωθηκικής διέγερσης
 - A1) Γοναδοτροπίνες
 - A2) Ανάλογα Εκλυτικής Ορμόνης Γοναδοτροπινών (GnRH)
 - A3) Κιτρική κλομιφαίνη
 - A4) Αναστολείς Αρωματάσης
- B) Πρωτόκολλα ελεγχόμενης ωθηκικής διέγερσης
 - B1) Πρωτόκολλα με GnRH αγωνιστή
 - B2) Πρωτόκολλα με GnRH ανταγωνιστή
- Γ) Δεδομένα από την κλινική εφαρμογή της ωθηκικής διέγερσης
- Δ) Παρακολούθηση της ελεγχόμενης ωθηκικής διέγερσης
- Ε) Πυροδότηση της τελικής ωρίμανσης των ωοθυλακίων

ΩΛΗΨΙΑ**ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΕΞΩΣΩΜΑΤΙΚΗΣ ΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗΣ****ΕΞΩΣΩΜΑΤΙΚΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΕΜΒΡΥΩΝ****ΕΜΒΡΥΟΜΕΤΑΦΟΡΑ**

- A) Τεχνική εμβρυομεταφοράς
- B) Στάδιο εμβρυομεταφοράς
- Γ) Υποβοηθούμενη εκκόλαψη

ΥΠΟΣΤΗΡΙΞΗ ΩΧΡΙΝΙΚΗΣ ΦΑΣΗΣ**ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΕΜΒΡΥΩΝ ΚΑΙ ΩΑΡΙΩΝ****ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΣΧΕΤΙΖΟΜΕΝΕΣ ΜΕ ΕΞΩΣΩΜΑΤΙΚΗ ΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ**

- A) Ενδοσαλπγγική Μεταφορά Γαμετών
- B) Ενδοσαλπγγική μεταφορά ζυγωτών
- Γ) Λήψη σπέρματος με 'χειρουργικές' τεχνικές
- Δ) In vitro ωρίμανση ωαρίων

**ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΕ ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ 'ΤΡΙΤΟΥ ΠΡΟΣΩΠΟΥ'
ΠΡΟΕΜΦΥΤΕΥΤΙΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ****ΕΠΙΠΛΟΚΕΣ ΚΥΚΛΩΝ ΕΞΩΣΩΜΑΤΙΚΗΣ ΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗΣ**

- A) Επιπλοκές ωοληψίας
- B) Σύνδρομο Υπερδιέγερσης Ωοθηκών
- Γ) Πολύδυμες κυήσεις
- Δ) Επιπτώσεις της εξωσωματικής γονιμοποίησης στην κύηση και στους απογόνους
- Ε) φάρμακα γονιμότητας και γυναικολογικός καρκίνος

ΙΔΙΑΙΤΕΡΕΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ

- A) Γυναίκες με ινομύματα μήτρας
- B) Γυναίκες με ενδομητρίωση
- Γ) Γυναίκες με υδροσάλπιγγες

ΖΕΥΓΑΡΙΑ ΜΕ ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΕΣ ΑΠΟΤΥΧΙΕΣ ΕΜΦΥΤΕΥΣΗΣ**ΤΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΗΣ ΕΞΩΣΩΜΑΤΙΚΗΣ ΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗΣ****ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η γέννηση του πρώτου παιδιού με εξωσωματική γονιμοποίηση τον Ιούλιο του 1978 σηματοδότησε την έναρξη μιας καινούργιας εποχής που άλλαξε τα δεδομένα για μια μεγάλη μερίδα τόσο της κοινωνίας όσο και της επιστημονικής κοινότητας: τα υπογόνιμα ζευγάρια, κάποια από τα οποία θεωρούνταν καταδικασμένα να μην γευτούν ποτέ την χαρά από την ολοκλήρωση της οικογένειάς τους, απέκτησαν όχι μόνο δικαίωμα στο όνειρο αλλά και την δυνατότητα να το πραγματοποιήσουν· οι κλινικοί ιατροί διεύρυναν τις δυνατότητές τους για προσφορά και γέυθηκαν την ηθική ικανοποίηση που μπορεί να τους δώσει η άσκηση του λειτουργημάτων τους· οι κλινικοί εμβρυολόγοι αναδείχθηκαν σε μια σημαντική, ιδιαίτερη και περιζήτητη επιστημονική ομάδα, με τεράστια συμβολή στην επιτυχία της Αναπαραγωγικής Ιατρικής· τέλος, οι ερευνητές απέκτησαν ένα νέο και αχανές πεδίο έρευνας, γεμάτο προκλήσεις και πρωτόγνωρα ενδιαφέροντα. Ο κοινωνικός και επιστημονικός αντίκτυπος όλων αυτών είναι τόσο μεγάλος, που άπαξ και έγινε η αρχή, η Υποβοηθούμενη Αναπαραγωγή, και ιδιαίτερα η εξωσωματική γονιμοποίηση ήταν 'καταδικασμένες' να επιτύχουν' το μέγεθος αυτής της επιτυχίας αντικατοπτρίζεται στις 35931 δημοσιεύσεις που εμφανίζονται αν πληκτρολογήσουμε σήμερα (Ιούνιος 2014) την φράση κλειδί 'in vitro fertilization' στην μηχανή αναζήτησης του PubMed, αλλά κυρίως στα περισσότερα από πέντε εκατομμύρια παιδιά που έχουν γεννηθεί σε όλο τον κόσμο στα 35 χρόνια που μεσολάβησαν από την γέννηση της Louise Brown.

Οι ρυθμοί των εξελίξεων στην εξωσωματική γονιμοποίηση ήταν και συνεχίζουν να είναι φρενήρεις απαιτώντας συστηματική παρακολούθηση για όποιον δραστηριοποιείται με συνέπεια στον τομέα αυτόν. Με δεδομένο ότι οι τελευταίες ενημερωτικές εκδόσεις της Ελληνικής Εταιρείας Γυναικολογικής Ενδοκρινολογίας πάνω στο θέμα τοποθετούνται στα έτη 1996 και 1997, ήταν αναγκαία και επιτακτική η ανανέωση της κατάθεσης των εξελίξεων. Το εγχείρημα βέβαια είναι δύσκολο αν αναλογιστούμε όχι μόνο τον όγκο των δεδομένων που έχουν προκύψει αλλά και την ταχύτητα με την οποία αυτά εμφανίζονται και αναθεωρούνται· ότι ήταν καινούργιο εχθές μπορεί να είναι ξεπερασμένο σήμερα. Έτσι, για την συγγραφή του παρόντος, προσπάθησα να εντοπίσω τα πεδία στα οποία παρατηρήθηκαν οι μεγαλύτερες εξελίξεις και να παραθέσω συμπεράσματα όπως αυτά προκύπτουν από συστηματικές ανασκοπήσεις, μεταanalύσεις, τυχαίοποιημένες μελέτες με μεγάλη ισχύ, και επίσημες κατευθυντήριες οδηγίες αναγνωρισμένων Εταιρειών. Γνωρίζοντας ότι σίγουρα θα υπάρξουν κενά και απορίες είμαι στην διάθεση των αναγνωστών για διευκρινήσεις και ενημέρωση ως προς τις πηγές που χρησιμοποίησα.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω το διοικητικό συμβούλιο της Εταιρείας, και ιδιαίτερω τον Καθηγητή κ. Μεσσίνη, τον Καθηγητή κ. Γρηγορίου, τον Καθηγητή κ. Βιτράτο και τον αν. Καθηγητή κ. Δελιγεώρογλου για την ανάθεση και αποδοχή του θέματος.

ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑ

Σύμφωνα με την πλέον πρόσφατη αναθεώρηση από την Αμερικανική Εταιρεία Αναπαραγωγικής Ιατρικής (American Society of Reproductive Medicine, ASRM), ως υπογονιμότητα ορίζεται 'η διαταραχή που χαρακτηρίζεται από την αποτυχία επίτευξης κύησης έπειτα από 12 ή περισσότερους μήνες τακτικών σεξουαλικών επαφών χωρίς προφύλαξη. Πρωιμότερη διερεύνηση ή/και θεραπεία μπορεί να αποφασιστούν με βάση δεδομένα από το ιατρικό ιστορικό ή/και την κλινική εξέταση του ζευγαριού, ενώ πρέπει να συστήνονται έπειτα από 6 μήνες προσπάθειών στις γυναίκες άνω των 35 ετών' ⁽¹⁾. Το χρονικό όριο των 12 μηνών έχει υιοθετηθεί διότι το 84-85% των ζευγαριών χωρίς πρόβλημα θα έχει επιτύχει κύηση στο διάστημα αυτό.

Υπολογίζεται πως παγκοσμίως, 1 στα 6 ζευγάρια θα αντιμετωπίσουν κάποιο πρόβλημα γονιμότητας κατά την διάρκεια της αναπαραγωγικής τους ηλικίας, ενώ ο επιπολασμός της υπογονιμότητας τοποθετείται στο 9% των γυναικών ηλικίας 20-44 ετών. Από τις περιπτώσεις υπογονιμότητας, το 20-30% αποδίδεται σε ανδρικό παράγοντα, το 20-35% σε γυναικείο παράγοντα, ενώ το 25-40% σε συνδυασμό ανδρικού και γυναικείου παράγοντα. Στο 10-20% των περιπτώσεων δεν ανευρίσκεται κάποιος συγκεκριμένος αιτιολογικός παράγοντας. Η υπογονιμότητα συσχετίζεται και με παράγοντες/συνθήκες τρόπου ζωής, όπως το κάπνισμα, το βάρος σώματος και το άγχος, ενώ στην εποχή μας, η προχωρημένη ηλικία της γυναίκας αποτελεί τον συχνότερο επιβαρυντικό παράγοντα ⁽²⁾. Το τελευταίο, φαίνεται ξεκάθαρα σε όλες τις επιδημιολογικές μελέτες παγκοσμίως' για παράδειγμα, σύμφωνα με το National Center for Health Statistics στις ΗΠΑ, το ποσοστό υπογονιμότητας στις ηλικίες 15-29, 30-34, 35-39, και 40-44 ετών, ήταν 7.2%, 10.9%, 10.5%, και 20.3%, αντίστοιχα ⁽³⁾.

Ο ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΟΥ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΥ ΖΕΥΓΑΡΙΟΥ

Λόγω της πολυπλοκότητας της ανθρώπινης αναπαραγωγής και της προόδου της επιστήμης, υπάρχει πληθώρα εξετάσεων και μεθόδων που απασκοπούν στην λεπτομερή διερεύνηση αιτιών και παραγόντων που πιθανώς σχετίζονται με την υπογονιμότητα. Επειδή όμως η θεωρητική διάπιση κάποιας παρέκκλισης όχι μόνο δεν συνεπάγεται και την πρακτική της αξία, αλλά μπορεί και να επιβαρύνει το ζευγάρι με πρόσθετο άγχος, επιβάλλεται να ακολουθείται μια τεκμηριωμένη στρατηγική στην διαγνωστική προσπάθεια της υπογονιμότητας που να περιλαμβάνει τα πρακτικώς απαραίτητα, τουλάχιστον σε πρώτη φάση. Ο κίνδυνος του να αναλωθούμε σε περιττές ή εξεζητημένες εξετάσεις οδήγησε πρόσφατα την ASRM στην δημοσίευση κατευθυντήριων οδηγιών για την διερεύνηση του υπογόνιμου ζευγαριού ^(4,5).

A) Έλεγχος της γυναίκας

Η τεκμηρίωση ομαλής ωοθυλακιορρηξίας αποτελεί πρωταρχικό βήμα στην διερεύνηση της υπογονιμης γυναίκας. Εάν ο κύκλος είναι ομαλά περιοδικός με διάρκεια 25-35 ημέρες, είναι σχεδόν

βέβαια και ωοθυλακιορρηκτικός· αντιθέτως, αν ο κύκλος είναι εμφανώς έντονα διαταραγμένος, δεν απαιτείται περαιτέρω έλεγχος για να αποδειχθεί η ανωοθυλακιορρηξία. Στις αμφίβολες περιπτώσεις θα πρέπει να συστήνεται μια αντικειμενική μέθοδος διαπίστωσης ωοθυλακιορρηξίας. Μεταξύ των διαφόρων τέτοιων μεθόδων, η πιο αξιόπιστη είναι η μέτρηση της προγεστερόνης ορού την κατάλληλη ημέρα του κύκλου: τιμές μεγαλύτερες των 3 ng/mL, 7 ημέρες πριν την αναμενόμενη έναρξη της περιόδου αποδεικνύει την επίτευξη πρόσφατης ωοθυλακιορρηξίας⁽⁶⁾.

Η διερεύνηση της βατότητας των σαλπίνγων αποτελεί απαραίτητο βήμα για την αξιολόγηση της υπογόνιμης γυναίκας, ιδιαίτερα μάλιστα έπειτα από την απόδειξη της δυσμενούς επίδρασης της παρουσίας υδροσαλπίνγων ακόμα και στα αποτελέσματα της εξωσωματικής γονιμοποίησης. Η υστεροσαλπιγγογραφία (ΥΣΓ) αποτελεί την παραδοσιακή και ευρύτερα διαδεδομένη μέθοδο, με θετική προγνωστική αξία 38% και αρνητική προγνωστική αξία 94%⁽⁷⁾. Η ΥΣΓ ίσως έχει και κάποια θεραπευτικά αποτελέσματα αφού αναφέρεται πως ένα 30% των γυναικών που εμφανίζουν φυσιολογικά ευρήματα θα συλλάβει εντός των επομένων 6 μηνών⁽⁸⁾. Τέλος, τονίζεται πως χρειάζεται προσοχή στην ερμηνεία ευρημάτων απόφραξης των εγγύς σαλπινγικών τμημάτων καθώς αυτό μπορεί να προκύψει από παροδικό σπασμό ή να σχετίζεται με την θέση του καθετήρα έγχυσης του σκιαγραφικού. Άλλες μέθοδοι διερεύνησης των σαλπίνγων είναι το υπερηχογράφημα με έγχυση φυσιολογικού ορού δια του τραχήλου (που όμως δεν μπορεί να διακρίνει αν η απόφραξη είναι ετερόπλευρη ή αμφοτερόπλευρη), και η λαπαροσκόπηση με έγχυση χρωστικής δια του τραχήλου (που όπως είναι ευνόητο παρέχει με την δυνατότητα ευρύτερου ελέγχου της πυέλου και πραγματοποίησης επεμβάσεων, αλλά γίνεται σε επίπεδο χειρουργείου). Η ΥΣΓ παρέχει επίσης το πλεονέκτημα της ταυτόχρονης αδρής διερεύνησης της ενδομητρικής κοιλότητας, τόσο για συγγενείς όσο και για επίκτητες ανατομικές διαταραχές. Θα πρέπει όμως να σημειωθεί ότι η εξέταση χαρακτηρίζεται από σχετικά χαμηλή ευαισθησία (50%) και θετική προγνωστική αξία (30%) για την διάγνωση πολυπόδων ενδομητρίου και υποβλεννογονίων ινομυωμάτων σε ασυμπτωματικές υπογόνιμες γυναίκες⁽⁹⁾. Επί θετικών ΥΣΓ ευρημάτων, ο έλεγχος θα πρέπει να συμπληρώνεται με την διενέργεια υπερηχο-υστερογραφίας (με έγχυση φυσιολογικού ορού) ή τελικά υστεροσκόπησης που αποτελεί την απόλυτη μέθοδο διερεύνησης και παρέχει την δυνατότητα ταυτόχρονης αντιμετώπισης προβλημάτων.

Σημαντικό βήμα για την αξιολόγηση της υπογόνιμης γυναίκας αποτελεί και η εκτίμηση των αποθεμάτων ωοθυλακίων στις ωοθήκες της. Η εκτίμηση αυτή αποκτά ιδιαίτερη προγνωστική αξία σε γυναίκες που: 1) είναι άνω των 35 ετών, 2) έχουν οικογενειακό ιστορικό πρόωρης εμμηνόπαυσης, 3) έχουν μία ωοθήκη, 4) έχουν ατομικό ιστορικό χειρουργικών επεμβάσεων στις ωοθήκες, χημειοθεραπείας ή πυελικής ακτινοθεραπείας, 5) παρουσιάζουν ανεξήγητου αιτιολογίας υπογονιμότητα, 6) είχαν πτωχή ανταπόκριση σε προηγούμενη φαρμακευτική ωοθηκική διέγερση, και 7) πρόκειται να υποβληθούν σε εξωσωματική γονιμοποίηση⁽¹⁰⁾. Για την εκτίμηση των ωοθηκικών αποθεμάτων σε ωοθυλάκια χρησιμοποιούνται οι ακόλουθες μέθοδοι:

α) Μέτρηση κατά την 2^η – 3^η ημέρα του κύκλου της FSH και της οιστραδιόλης: Υψηλές τιμές FSH (10-20 IU/L) παρουσιάζουν υψηλή ειδικότητα (83-100%) αλλά ποικίλη ευαισθησία (10-

80%) πρόβλεψης πτωχής ανταπόκρισης στην ωοθηκική διέγερση ⁽¹¹⁾. Επίσης, υψηλές τιμές οιστραδιόλης (>60-80 pg/mL) σε συνδυασμό με φυσιολογικές τιμές FSH ίσως να υποδεικνύουν παρόμοιο πρόβλημα ⁽¹²⁾.

β) Δοκιμασία κιτρικής κλομιφαίνης: Χορηγούνται 100 mg κλομιφαίνης από του στόματος ημερησίως από την 5^η έως και την 9^η ημέρα του κύκλου και μετράται η FSH την 3^η και 10^η ημέρα του κύκλου. Αυξημένη FSH 10^{ης} ημέρας υποδηλώνει μειωμένα ωοθηκικά αποθέματα, έχοντας μεγαλύτερη ευαισθησία αλλά μικρότερη ειδικότητα σε σχέση με την FSH 3^{ης} ημέρας.

γ) Αριθμός ορατών υπερηχογραφικά ωοθυλακίων με άντρο (antral follicle count, AFC) κατά την αρχόμενη παραγωγική φάση του κύκλου: μετρώνται τα ωοθυλάκια 2-10mm (ή 3-8mm κατά άλλους), και αν είναι λίγα (3-10 και στις δύο ωοθήκες) υποδηλώνουν προβλεπόμενη πτωχή ωοθηκική ανταπόκριση στα φάρμακα.

δ) Μέτρηση της αντιμυλλέριος ορμόνης (AMH) στον ορό: επειδή η AMH παράγεται από τα πρωτογενή ωοθυλάκια, οι τιμές της δεν παρουσιάζουν σημαντική διακύμανση εντός του ίδιου και μεταξύ διαδοχικών εμμηνορρυσιακών κύκλων της ίδιας γυναίκας. Συνεπώς η μέτρηση μπορεί να γίνει οποιαδήποτε ημέρα του κύκλου. Γενικά, χαμηλές τιμές AMH (<1 ng/mL) έχουν συσχετισθεί με πτωχή ωοθηκική απάντηση στα φάρμακα διέγερσης, πτωχή ποιότητα εμβρύων και πτωκά αποτελέσματα κύκλων εξωσωματικής γονιμοποίησης ⁽¹³⁻¹⁵⁾.

Τέλος, η λαπαροσκόπηση ως μέρος της διαγνωστικής διερεύνησης της υπογονιμης γυναίκας φαίνεται να έχει περιορισμένο ρόλο σύμφωνα με τη ASRM. Τούτο διότι, αφενός τα ουσιώδη ευρήματά της σε ασυμπτωματικές γυναίκες με φυσιολογικό απεικονιστικό έλεγχο είναι πτωχά, και αφετέρου η διάγνωση σε συμπτωματικές γυναίκες μπορεί να γίνει με βάση το ιστορικό ή τις λοιπές απεικονιστικές μεθόδους. Βέβαια κάθε περίπτωση θα πρέπει να εξατομικεύεται και ίσως οι βασικές παράμετροι για να αποφασίσουμε αν θα προβούμε σε διαγνωστική λαπαροσκόπηση είναι η ηλικία της γυναίκας (αν είναι μικρή) και η διάρκεια της υπογονιμότητας (αν είναι μεγάλη, π.χ. πάνω από 3 έτη) ⁽¹⁶⁾.

Δημοφιλείς διαγνωστικές μέθοδοι του παρελθόντος που δεν ενδείκνυνται πλέον σύμφωνα με την ASRM είναι η εξέταση της τραχηλικής βλέννας μετά από σεξουαλική επαφή (διότι είναι υποκειμενική στην ερμηνεία της, χαρακτηρίζεται από πτωχή αναπαραγωγή των αποτελεσμάτων, είναι άβολη για το ζευγάρι, σπανίως διαφοροποιεί την ενδεδειγμένη θεραπεία και δεν προβλέπει ουσιαστικά την αδυναμία σύλληψης ⁽¹⁷⁾), και η ιστολογική εξέταση του ενδομητρίου κατόπιν βιοψίας για τεκμηρίωση ωοθυλακιορρηξίας και επάρκειας της ωοθηκικής φάσης (διότι χαρακτηρίζεται από χαμηλή ευαισθησία και ακρίβεια ⁽¹⁸⁾ και γιατί δεν μπορεί να διαχωρίσει τις γόνιμες από τις υπογόνιμες γυναίκες ⁽¹⁹⁾).

B) Έλεγχος του άνδρα

Ο στοιχειώδης διαγνωστικός έλεγχος του άνδρα περιλαμβάνει την λήψη ενός πλήρους αναπαραγωγικού ιστορικού και την πραγματοποίηση ενός σπερμοδιαγράμματος· εάν το σπερμοδιά-

γραμμα είναι φυσιολογικό δεν απαιτείται επανάληψή του. Ο Πίνακας 1 περιλαμβάνει τις κατώτερες φυσιολογικές τιμές των παραμέτρων του σπερμοδιαγράμματος, σύμφωνα με την τελευταία αναθεώρηση από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας ⁽²⁰⁾.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1

| Κατώτερα αποδεκτά όρια παραμέτρων σπερμοδιαγράμματος | |
|---|--|
| Σε τουλάχιστον 2 δείγματα | Τιμές αναφοράς |
| Όγκος σπέρματος | 1.5 mL |
| pH | 7.2 |
| Συγκέντρωση σπερματοζωαρίων | 15 x 10 ⁶ σπερματοζωάρια/mL |
| Συνολικός αριθμός σπερματοζωαρίων | 39 x 10 ⁶ σπερματοζωάρια/εκσπερμάτιση |
| % κινητικότητα | 40% |
| Πρωθηπτική κινητικότητα | 32% |
| Συγκολλήσεις | απουσίες |
| Γλοιότητα | ≤2 cm μετά ρευστοποίηση |

Ορμονολογικός έλεγχος που περιλαμβάνει κατ' ελάχιστον την μέτρηση των συγκεντρώσεων τεστοστερόνης και FSH, ενδείκνυται σε άνδρες με: 1) μη φυσιολογικές παραμέτρους σπέρματος και ιδίως αν η συγκέντρωση των σπερματοζωαρίων είναι μικρότερη των 10 x 10⁶/mL, 2) διαταραγμένη σεξουαλική λειτουργία ή μειωμένη libido, ή 3) συνοδά ευρήματα που θέτουν υποψία ενδοκρινοπάθειας.

Καλλιέργεια σπέρματος ενδείκνυται επί παρουσίας άνω του 1 x 10⁶/mL πυοσφαιρίων στο σπέρμα.

Υπερηχογράφημα οσχέου ενδείκνυται στους άνδρες όπου η κλινική εξέταση κρίνεται δύσκολη ή ανεπαρκής ή όταν υπάρχει υποψία μάζας στους όρχεις. Δια-ορθικό υπερηχογράφημα για διάγνωση πλήρους ή μερικής απόφραξης των εκσπερματικών πόρων ενδείκνυται σε άνδρες με συνδυασμό αζωοσπερμίας/σοβαρής όλιγο-ασθενοσπερμίας, ψηλαφητών πόρων και χαμηλού όγκου σπέρματος.

Εξέταση ούρων μετά εκσπερμάτιση ενδείκνυται σε άνδρες με όγκο σπέρματος μικρότερο του 1.0 mL, εκτός και αν έχει τεθεί διάγνωση υπογοναδισμού ή συγγενούς αμφοτερόπλευρης απλασίας σπερματικών πόρων.

Άνδρες με μη αποφρακτική αζωοσπερμία ή σοβαρή όλιγοσπερμία (<5 x 10⁶) θα πρέπει να ελέγχονται με καρούτυπο και ανάλυση Υ χρωμοσώματος για μικροελλείψεις. Η πιθανότητα χρωμοσωμικής ανωμαλίας υπολογίζεται στο 10-15% των αζωοσπερμικών και στο 5% των σοβαρά όλιγοσπερμικών ανδρών ⁽²¹⁾, ενώ η παρουσία συγκεκριμένων τύπων Υ-μικροελλείψεων έχει προγνωστική σημασία για την πιθανότητα ανεύρεσης σπερματοζωαρίων σε βιοψία όρχεων ^(22,23).

Άνδρες με συγγενή αμφοτερόπλευρη απλασία σπερματικών πόρων θα πρέπει να ελέγχονται για μεταλλάξεις γονιδίων κυστικής ίνωσης ⁽²⁴⁾. Υπολογίζεται πως σχεδόν όλοι οι άνδρες με κλινική κυστική ίνωση παρουσιάζουν απλασία των πόρων, ενώ το 80% των ανδρών με απλασία πόρων παρουσιάζουν μεταλλάξεις κυστικής ίνωσης. Τονίζεται πως απαιτείται προσεκτική αξιολόγηση των αποτελεσμάτων για τις μεταλλάξεις της κυστικής ίνωσης καθώς το ποσοστό των ανιχνευόμενων μεταλλάξεων μπορεί να διαφέρει ανά εξέταση ή εργαστήριο.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει η κατά τα τελευταία χρόνια εφαρμοζόμενη αξιολόγηση του βαθμού της απόπτωσης του DNA σπερματοζωαρίων που είναι πλέον εφικτή με διάφορες μεθόδους (TUNEL, SCSA, COMET, SCD). Υπάρχουν μελέτες που συνδέουν τα αυξημένα ποσοστά απόπτωσης με υπογονιμότητα, μικρότερες πιθανότητες επιτυχίας σπερματεγχύσεων και εξωσωματικής γονιμοποίησης ⁽²⁵⁾ καθώς και αυξημένων αποβολών μετά φυσική σύλληψη ή εξωσωματική γονιμοποίηση ⁽²⁶⁾. Τονίζεται πάντως ότι η ASRM δημοσίευσε πολύ πρόσφατα κατευθυντήρια οδηγία σύμφωνα με την οποία δεν υπάρχουν επαρκή δεδομένα για τις ανωτέρω δυσμενείς επιδράσεις και συνεπώς προς το παρόν δεν συνιστάται η κατά ρουτίνα πραγματοποίηση της εξέτασης ⁽²⁷⁾. Ομοίως, η αξιολόγηση με FISH του ποσοστού των ανευπλοειδικών σπερματοζωαρίων, αν και είναι εργαστηριακά εφικτή ⁽²⁸⁾ και το αυξημένο ποσοστό αυτών έχει συνδεθεί με επανειλημμένες αποβολές ⁽²⁹⁾ και/ή αποτυχίες εξωσωματικής ⁽³⁰⁾, δεν συστήνεται ως εξέταση ρουτίνας λόγω τόσο του υψηλού κόστους της εξέτασης όσο και της αμφιλεγόμενης κλινικής αξίας της ερμηνείας των αποτελεσμάτων. Τέλος, η παρουσία αντιπερμικών αντισωμάτων ίσως αποτελεί ένα σπάνιο αίτιο υπογονιμότητας που αντιμετωπίζεται με την εφαρμογή ICSI, αλλά η κατά ρουτίνα εξέταση για αυτά δεν ενδείκνυται.

ΕΝΔΕΙΞΕΙΣ ΕΞΩΣΩΜΑΤΙΚΗΣ ΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗΣ

Η εξωσωματική γονιμοποίηση αποτελεί το τρίτο και πιο προχωρημένο επίπεδο παρέμβασης στην Υποβοηθούμενη Αναπαραγωγή, έπειτα από την πρόκληση ωοθυλακιορρηξίας και την ενδομήτριο σπερματέγχυση. Οι ενδείξεις εφαρμογής της παρουσιάζουν μια σχετική διαφοροποίηση ανάλογα με το σύστημα υγείας της εκάστοτε χώρας, η οποία έχει να κάνει κυρίως με το χρονικό διάστημα που θα επιτραπεί για σύλληψη με φυσική επαφή ή απλούστερους τρόπους υποβοήθησης, μέχρι το ζευγάρι να καταλήξει σε πρόγραμμα εξωσωματικής. Προφανώς, η αμφοτερόπλευρη έλλειψη βατότητας των σαλπίγγων, και οι σοβαρότατες διαταραχές του σπέρματος αποτελούν απόλυτες ενδείξεις για εξωσωματική γονιμοποίηση. Σύμφωνα με την ESHRE, άλλες ενδείξεις είναι η αμφίβολη βατότητα των σαλπίγγων, η ενδομητρίωση, οι διαταραχές του σπέρματος, η ανεξήγητη υπογονιμότητα, το ιστορικό πολλαπλών αποτυχιών πρόκλησης ωοθυλακιορρηξίας και/ή ενδομήτριων σπερματεγχύσεων' σε καμία περίπτωση οι προσπάθειες πρόκλησης ωοθυλακιορρηξίας με κιτρική κλομφαίνη δεν θα πρέπει να υπερβαίνουν τις 12 (ή τις 3-6 σύμφωνα με την ASRM ⁽¹⁶⁾), και οι σπερματεγχύσεις τις 9' η εξωσωματική γονιμοποίηση

θα πρέπει να είναι η πρώτη επιλογή για τις γυναίκες προχωρημένης ηλικίας, ανεξαρτήτως του αιτίου της υπογονιμότητας⁽³¹⁾.

Ένα τυπικό πρόγραμμα εξωσωματικής γονιμοποίησης περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια: ελεγχόμενη ωθηκική διέγερση, ωοληψία, εξωσωματική γονιμοποίηση, εξωσωματική καλλιέργεια εμβρύων, εμβρυομεταφορά και υποστήριξη της ωχρινικής φάσης. Ακολουθεί η αναλυτική περιγραφή των σταδίων αυτών.

ΕΛΕΓΧΟΜΕΝΗ ΩΘΗΚΙΚΗ ΔΙΕΓΕΡΣΗ

Η εισαγωγή της χρήσης των γοναδοτροπινών στην υποβοηθούμενη αναπαραγωγή για την ελεγχόμενη ωθηκική διέγερση βελτίωσε θεαματικά την απόδοση των κύκλων (συγκρινόμενη με την αντίστοιχη των φυσικών κύκλων ή κύκλων ήπιας διέγερσης με κιτρική κλομφαΐνη). Και πάλι όμως, το 30% των κύκλων επιπλεκόταν με εμφάνιση πρωίμων αιχμών LH καθιστώντας τον προγραμματισμό της ωοληψίας προβληματικό και οδηγώντας σε πολλές ακυρώσεις. Έτσι, η εισαγωγή της χρήσης των GnRH αγωνιστών το 1984, με την βοήθεια των οποίων ελαχιστοποιούνται οι πιθανότητες εμφάνισης πρωίμων αιχμών LH αποτέλεσε το επόμενο σημαντικό βήμα. Παράλληλα, οι εξελίξεις στην φαρμακολογία συνεχίστηκαν (και συνεχίζονται) και έτσι σήμερα έχουμε στην φαρέτρα μας μια μεγάλη ποικιλία φαρμάκων.

Α) Φαρμακευτικές ουσίες για πρωτόκολλα ωθηκικής διέγερσης

Η επιθυμητή, κατά τους κύκλους εξωσωματικής γονιμοποίησης, ελεγχόμενη ωθηκική διέγερση επιτυγχάνεται με την χορήγηση των κατωτέρω φαρμακευτικών ουσιών:

A1) Γοναδοτροπίνες

- α) Ανθρώπιος Μετεμμηνοπαυσιακή Γοναδοτροπίνη (hMG): περιέχει ισοδύναμο συνδυασμό FSH και LH in vivo βιοδραστικότητας. Χορηγείται σε καθημερινή βάση ως υποδόρια (ή ενδομυϊκή) ένεση.
- β) Ανθρώπιος Κεκαθαρισμένη Θυλακιοτρόπος Ορμόνη (pFSH και FSH-HP): προέρχεται από την hMG αφού εξαλειφθεί η LH δραστηριότητα. Τα σημερινά προϊόντα χαρακτηρίζονται από υψηλή (>95%) καθαρότητα. Χορηγούνται σε καθημερινή βάση ως υποδόρια ένεση.
- γ) Ανασυνδυασμένη Θυλακιοτρόπος Ορμόνη (rFSH): παράγεται με την σύγχρονη τεχνολογία ανασυνδυασμένου DNA και χαρακτηρίζεται από υψηλή και σταθερή FSH βιοδραστικότητα, καθώς από πλήρη απουσία άλλων προσμείξεων. Χορηγείται σε καθημερινή βάση ως υποδόρια ένεση.
- δ) Ανασυνδυασμένη Ωχρινοτρόπος Ορμόνη (rLH): παράγεται με τεχνολογία ανασυνδυασμένου DNA και χαρακτηρίζεται από υψηλή και σταθερή LH βιοδραστικότητα, καθώς και από πλήρη απουσία άλλων προσμείξεων. Χορηγείται ως υποδόρια ένεση είτε καθημερινά είτε κατά τις

τελευταίες ημέρες της ωοθηκικής διέγερσης, ανάλογα με το προτιμώμενο πρωτόκολλο.

- ε) Ανθρώπιος Χοριακή Γοναδοτροπίνη (HCG): λόγω των ομοιοτήτων στην δομή (σχεδόν ίδιες α-υπομονάδες) και κυρίως στην δράση (επαγωγή ωχρινοποίησης και υποστήριξη ωχρινοτρόπων κυττάρων) με την LH, χρησιμοποιείται στα προγράμματα ωοθηκικής διέγερσης για την τελική ωρίμανση των ωοθυλακίων/ωαρίων. Επίσης, χρησιμοποιείται (αν και σπανιότατα τελευταίως) για την υποστήριξη της ωχρινικής φάσης, μετά την ωοληψία. Χορηγείται ως υποδόρια ή ενδομυϊκή ένεση.
- στ) Ανασυνδασμένη Ανθρώπιος Χοριακή Γοναδοτροπίνη (rHCG): παράγεται με τεχνολογία ανασυνδασμένου DNA και παρέχει τα ίδια τουλάχιστον αποτελέσματα με την HCG. Χορηγείται ως υποδόρια ένεση και 250 μg rHCG ισοδυναμούν με 10000 IU HCG.
- ζ) Corifollitropin-a: είναι η νεώτερη φαρμακευτική ουσία και παράγεται με τεχνολογία ανασυνδασμένου DNA. Χορηγείται εφάπαξ υποδορίως κατά την έναρξη του πρωτοκόλλου και παρέχει επαρκή γοναδοτροπική δράση για 7 ημέρες.

A2) Ανάλογα Εκλυτικής Ορμόνης Γοναδοτροπινών (GnRH)

- α) GnRH αγωνιστές: πρόκειται για συνθετικά μόρια που η δομή τους προσομοιάζει μεν με εκείνη του GnRH, αλλά παρουσιάζει διαφοροποιήσεις που τροποποιούν την δράση τους. Η χορήγηση του αγωνιστή συνοδεύεται αρχικά από ευοδωτική δράση στην υπόφυση προκαλώντας αύξηση τόσο της FSH όσο και της LH (flare effect): η συνεχιζόμενη όμως χορήγηση οδηγεί έπειτα από κάποιες ημέρες σε μείωση του αριθμού των υποδοχέων και απευαισθητοποίηση των γοναδοτροπικών κυττάρων της υπόφυσης με αποτέλεσμα την αναστολή της έκλυσης FSH και LH και κυρίως την αποφυγή αιχμών LH. Οι GnRH αγωνιστές διατίθενται για καθημερινή ή sporadic χορήγηση και χορηγούνται υποδορίως, ενδομυϊκώς ή ως ρινικό spray. Οι αγωνιστές που χρησιμοποιούνται στα πρωτόκολλα διέγερσης είναι η τριπτορελίνη, η λευπροπελίνη και η βουσερελίνη.
- β) GnRH ανταγωνιστές: πρόκειται για νεώτερης γενιάς συνθετικά μόρια, ανάλογα του GnRH. Ανταγωνίζονται τους υποδοχείς GnRH, τους καταλαμβάνουν και οδηγούν σε άμεση αναστολή της έκλυσης FSH και LH. Απαιτείται χορήγηση ανά τακτά χρονικά διαστήματα γιατί η δράση τους είναι γρήγορα αντιστρεπτή⁽³²⁾. Η εφαρμογή τους στα πρωτόκολλα εξωσωματικής είναι πλέον πολύ δημοφιλής λόγω της ευχρηστίας τους και της εμπειρίας που έχει αποκτηθεί. Οι διαθέσιμοι ανταγωνιστές είναι η σετρορελίξη (cetrotorelix) και η γανιρελίξη (ganirelix).

A3) Κιτρική κλομφαΐνη

Πρόκειται για το παλαιότερο φάρμακο γονιμότητας το οποίο χρησιμοποιείται ευρέως για πρόκληση ωοθυλακιορρηξίας σε γυναίκες με ανωοθυλακιορρηκτικούς κύκλους. Είναι απλό στην χορήγηση (από του στόματος), αποτελεσματικό, ασφαλές και φθινό. Δρα διαταράσσοντας τους υποδοχείς οιστρογόνων στον υποθάλαμο και την υπόφυση, οπότε ο υποθάλαμος αντιδρά στην

ψευδο-υποοιστρογοναιμία με αύξηση του εύρους ή/και της συχνότητας έκλυσης GnRH και συνεπώς αντίστοιχη αύξηση έκλυσης ενδογενών γοναδοτροπινών από την υπόφυση. Στους κύκλους εξωσωματικής η κλομιφαίνη χρησιμοποιείται σπανίως σε πρωτόκολλα για πτωχές απαντήτριες.

A4) Αναστολείς Αρωματάσης

Χρησιμοποιούνται για πρόκληση ωοθυλακιωρρηξίας σε γυναίκες με ανωοθυλακιωρρηκτικούς κύκλους (αν και δεν έχουν επίσημη ένδειξη για αυτό). Δρουν μειώνοντας τα επιπέδα των οιστρογόνων στην περιφέρεια, οπότε μέσω του μηχανισμού παλίνδρομης αλληλορύθμισης αυξάνεται η έκλυση FSH. Ο ευρέως χρησιμοποιούμενος αναστολέας αρωματάσης είναι η λετροζόλη. Στους κύκλους εξωσωματικής η λετροζόλη εισήχθη πολύ πρόσφατα σε ειδικά πρωτόκολλα και συγκεκριμένα όταν θέλουμε να περιορίσουμε την αύξηση των επιπέδων οιστρογόνων κατά την φάση της ωοθηκικής διέγερσης.

B) Πρωτόκολλα ελεγχόμενης ωοθηκικής διέγερσης

Ο σκοπός της εφαρμογής των πρωτοκόλλων είναι η ανάπτυξη περισσότερων του ενός ωοθυλακίων στις ωοθήκες και η αποφυγή ενδογενούς αιχμής LH, ώστε να μπορέσουμε να συλλέξουμε τα ωάρια κατά την ωοληψία. Τα πρωτόκολλα διακρίνονται σε δύο κατηγορίες με βάση τον τύπο του GnRH αναλόγου που χρησιμοποιείται:

B1) Πρωτόκολλα με GnRH αγωνιστή

Διακρίνονται στα μακρά ή επιμήκη και στα βραχεία.

Στα μακρά πρωτόκολλα ξεκινάμε την χορήγηση αγωνιστή σε καθημερινή βάση από το μέσον της ωοθηκικής φάσης του προηγούμενου κύκλου (π.χ. την 21^η ημέρα σε κύκλους 28 ημερών) ή εναλλακτικά από την πρώιμη παραγωγική φάση (π.χ. με την έναρξη της περιόδου). Συνήθως απαιτούνται 10-15 ημέρες για την επίτευξη της καταστολής της υπόφυσης, η οποία καλό θα είναι να τεκμηριώνεται με μέτρηση της οιστραδιόλης (που θα πρέπει να βρεθεί σε χαμηλά επίπεδα). Η αρχική καθημερινή δόση του αγωνιστή είναι 1 mg λευπρορελίνης ή 0,1 mg τριπτορελίνης. Μετά την τεκμηρίωση της καταστολής και αφού έχει εμφανισθεί η περίοδος, ξεκινάμε την καθημερινή χορήγηση γοναδοτροπινών ενώ η χορήγηση αγωνιστή συνεχίζεται στην ίδια ή χαμηλότερη δοσολογία (ή και διακόπτεται μετά 4-5 ημέρες, χωρίς όμως αυτό να οδηγεί σε αξιολογίσιμη βελτίωση των αποτελεσμάτων, ενώ ενέχει τον κίνδυνο άρσης της καταστολής ιδίως σε κύκλους όπου θα απαιτηθούν πολλές ημέρες διέγερσης⁽³³⁾). Η καθημερινή χορήγηση γοναδοτροπινών και αγωνιστή συνεχίζεται μέχρι να εκπληρωθούν τα κριτήρια για τελική ωρίμανση. Η εναρκτήρια δόση των γοναδοτροπινών πρέπει να εξατομικεύεται παράγοντες που λαμβάνονται υπόψη για τον καθορισμό της δόσης είναι η ηλικία της γυναίκας, η αξιολόγηση των ωοθηκικών αποθεμάτων με βάση τις τιμές FSH, AMH, και AFC, η παρουσία παραγόντων κινδύνου για σύνδρομο υπερδιέγερσης ωοθηκών (όπως το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών),

το BMI, πληροφορίες από προηγούμενες προσπάθειες διέγερσης (αν υπάρχουν), και τέλος οι επιλογές του ιατρού ή/και της γυναίκας (αν π.χ. έχει προτιμηθεί η εφαρμογή ήπιας διέγερσης). Η εναρκτήρια δόση γοναδοτροπινών κυμαίνεται από 100 έως 450 IU και μπορεί να διατηρηθεί σταθερή ή να τροποποιηθεί. Έτσι προκύπτουν τα μακρά πρωτόκολλα σταθερών δόσεων, step-up, και step-down. Στο step-up πρωτόκολλο ξεκινούμε με χαμηλές δόσεις (75-150 IU) που αυξάνονται κατά 50% κάθε 3-5 ημέρες μέχρι να επιτύχουμε την επιθυμητή ωθηκική απόκριση· η τακτική αυτή είναι χρήσιμη σε περιπτώσεις κινδύνου συνδρόμου υπερδιέγερσης (π.χ. σύνδρομο πολυκυστικών ωθηκικών) όταν δεν γνωρίζουμε τον ουδό διέγερσης της συγκεκριμένης γυναίκας. Στο step-down πρωτόκολλο ενεργούμε αντίστροφα ξεκινώντας με υψηλότερες δόσεις που ακολούθως μειώνονται προοδευτικά· το σκεπτικό είναι ότι έτσι προσεγγίζουμε περισσότερο την 'φυσική' διακύμανση της FSH^(34,35) και εξασφαλίζουμε επαρκή διέγερση κατά την φάση της στρατολόγησης των ωοθυλακίων⁽³⁶⁾. Τέλος, εννοείται πως στα μακρά (όπως και στα λοιπά) πρωτόκολλα η δόση της FSH είναι δυνατόν να αναπροσαρμοσθεί ανάλογα με τα δεδομένα από την παρακολούθηση του κύκλου.

Ένα ανεπιθύμητο φαινόμενο που επιπλέκει τους κύκλους με μακρά πρωτόκολλα είναι η ανάπτυξη λειτουργικών κύστεων στις ωθήκες. Αν και η επίπτωσή τους στο τελικό αποτέλεσμα του κύκλου είναι αμφιλεγόμενη^(37,38), δημιουργούν τεχνικά τουλάχιστον προβλήματα. Η εμφάνισή τους περιορίζεται αν υιοθετηθεί η στρατηγική της προετοιμασίας με αντισυλληπτικά κατά τον προηγούμενο κύκλο⁽³⁹⁾. Η προετοιμασία αυτή έχει επιπλέον συνδεθεί με καλύτερα αποτελέσματα σε υπερ-απαντήτριες⁽⁴⁰⁾, επιτρέπει τον προγραμματισμό των κύκλων, ενώ απομακρύνει τον κίνδυνο να υπάρχει εγκυμοσύνη κατά την έναρξη του αγωνιστή (αν και αυτό δεν φαίνεται να έχει δυσμενείς επιπτώσεις στην κύηση).

Στα βραχεία πρωτόκολλα, ξεκινάμε την καθημερινή χορήγηση του αγωνιστή κατά την 2^η ημέρα του κύκλου και την χορήγηση των γοναδοτροπινών κατά την 3^η ημέρα (δηλαδή την επομένη ημέρα σε δόσεις που αποφασίζονται με τα κριτήρια που αναφέρθηκαν παραπάνω). Έτσι εκμεταλλευόμαστε την αρχική διεγερτική δράση του αγωνιστή (flare effect), αποσκοπώντας στην στρατολόγηση περισσότερων ωοθυλακίων. Στο κλασσικό βραχύ πρωτόκολλο η χορήγηση του αγωνιστή συνεχίζεται μέχρι να εκπληρωθούν τα κριτήρια τελικής ωρίμανσης, και άρα έχει δοθεί χρόνος για να επέλθει η καταστολή και να αποφευχθεί η αιχμή ενδογενούς LH. Παραλλαγή του βραχείου είναι το υπερβραχύ πρωτόκολλο, κατά το οποίο ο αγωνιστής χορηγείται για 3 μόνο ημέρες (2^η – 4^η ημέρα)⁽⁴¹⁾. Αν και η εφαρμογή βραχέων πρωτοκόλλων έχει συνδεθεί με την λήψη ωρίων πτωχότερης ποιότητας⁽⁴²⁾, τα πρωτόκολλα αυτά εξακολουθούν να κατέχουν σημαντική θέση στην αντιμετώπιση των πτωχών απαντητριών. Τέλος, πριν την έναρξη του αγωνιστή κατά την 2^η ημέρα, συνιστάται να τεκμηριώνεται η απουσία λειτουργικών κύστεων με υπερηχογράφημα και/ή μέτρηση της οιστραδιόλης ορού.

B2) Πρωτόκολλα με GnRH ανταγωνιστή

Η εισαγωγή των GnRH ανταγωνιστών στην κλινική πράξη αποτέλεσε έναν από τους σημαντικότερους νεωτερισμούς των τελευταίων χρόνων. Το γεγονός ότι η χορήγηση του ανταγωνιστή οδηγεί σε άμεση καταστολή της έκλυσης FSH και LH από την υπόφυση, επιτρέπει την έναρξη χορήγησής τους αργότερα κατά τον κύκλο διέγερσης (όταν αρχίζει πλέον να υφίσταται ο κίνδυνος εμφάνισης αιχμής LH). Έτσι, περιορίζεται ο συνολικός αριθμός των απαιτούμενων ενέσεων καθιστώντας τα πρωτόκολλα αυτά πιο φιλικά για την γυναίκα ^(43,44).

Στα πρωτόκολλα ανταγωνιστή η διέγερση ξεκινά με την χορήγηση γοναδοτροπινών κατά την 2^η ημέρα του κύκλου. Προ της έναρξής τους θα πρέπει να αποκλείουμε την παραμονή λειτουργικών κύστεων κάνοντας ένα υπερηχογράφημα και/ή μετρώντας την οιστραδιόλη ορού. Οι γοναδοτροπίνες συνεχίζονται καθημερινά και ακολούθως υπάρχουν οι εξής εναλλακτικές: α) πρωτόκολλο εφάπαξ δόσης, όπου χορηγούνται 3 mg cetrorelix ή ganirelix την 7^η ή 8^η ημέρα του κύκλου ⁽⁴⁵⁾ ή όταν το κυρίαρχο ωοθυλάκιο φτάσει τα 14 mm ⁽⁴⁶⁾, και η δόση επαναλαμβάνεται 72 ώρες μετά αν χρειασθεί (αν δηλαδή δεν έχουν εκπληρωθεί τα κριτήρια τελικής ωρίμανσης), β) πρωτόκολλο πολλαπλών καθημερινών δόσεων (0,25 mg cetrorelix ή ganirelix), ξεκινώντας ευέλκτα όταν το κυρίαρχο ωοθυλάκιο φθάσει τα 12-14 mm και/ή η οιστραδιόλη υπερβαίνει τα 150 pg/mL ή προκαθορισμένα κατά την 6^η ημέρα της διέγερσης. Τα πρωτόκολλα των πολλαπλών δόσεων φαίνεται να έχουν επικρατήσει. Σύμφωνα με πρόσφατη μετανάλυση των μελετών σύγκρισης του ευέλκτου με το προκαθορισμένο πρωτόκολλο, δεν υπάρχει μεταξύ τους στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς τα ποσοστά κύησης παρά μόνο μια τάση αύξησής τους επί εφαρμογής του προκαθορισμένου πρωτοκόλλου. Οριακή σημαντικότητα αυτής της αύξησης υπάρχει μόνο σε σύγκριση με κύκλους όπου η ευέλκτη έναρξη του ανταγωνιστή καθυστέρησε μετά την 8η ημέρα [odds ratio (OR): 0.7, 95% confidence interval (CI): 0.45-1.1]. Όπως αναμενόταν η εφαρμογή των ευέλκτων πρωτοκόλλων συνδέθηκε με στατιστικά σημαντική ελάττωση τόσο του αριθμού των ενέσεων ανταγωνιστή (OR: -1.2, 95%CI: -1.26 έως -1.15) όσο και της ποσότητας των γοναδοτροπινών που απαιτήθηκαν (OR: 95.5 IU, 95%CI: 74.8-116.1) ⁽⁴⁷⁾. Τέλος, στην πλέον πρόσφατη τυχαιοποιημένη προοπτική μελέτη, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στην συχνότητα εμφάνισης αυξημένων επιπέδων LH μεταξύ των δύο πρωτοκόλλων, ακόμα και στα ευέλκτα πρωτόκολλα που ο ανταγωνιστής χρειάστηκε να ξεκινήσει πολύ νωρίς, από την 3η ημέρα της διέγερσης ⁽⁴⁸⁾.

Στα πρωτόκολλα με corifollitropin-a, χορηγούνται εφάπαξ 100 μg (επί βάρους σώματος <60 kg) ή 150 μg (επί βάρους σώματος ≥60 kg) κατά την 2^η ημέρα του κύκλου, η χορήγηση του ανταγωνιστή ξεκινά σε καθημερινή βάση από την 6^η ημέρα του κύκλου, ενώ αν τα κριτήρια πυροδότησης της τελικής ωρίμανσης δεν έχουν εκπληρωθεί κατά την 8η ημέρα του κύκλου συνεχίζουμε με καθημερινή χορήγηση FSH μέχρι να εκπληρωθούν. Είναι προφανές πως η χρήση της corifollitropin-a περιορίζει τον αριθμό των απαιτούμενων ενέσεων για την διέγερση. Όσον αφορά τα αποτελέσματα, αυτά δεν φαίνεται να διαφέρουν από εκείνα της καθημερινής χορήγη-

σης FSH. Μάλιστα, σε πρόσφατη Cochrane ανασκόπηση (4 μελέτες, 2335 γυναίκες) ⁽⁴⁹⁾, η σύγκριση δεν ανέδειξε διαφορές ως προς το ποσοστό ζώντων γεννήσεων (Peto OR: 0.92, 95%CI: 0.76-1.10) ή την συχνότητα συνδρόμου υπερδιέγερσης (Peto OR: 1.12, 95%CI: 0.79-1.60)· η σύγκριση υποομάδων με βάση την δόση της corifollitropin-α ανέδειξε μικρότερο ποσοστό ζώντων γεννήσεων στις γυναίκες που έλαβαν μικρές δόσεις (60-120 µg) σε σύγκριση με την καθημερινή FSH (Peto OR: 0.60, 95%CI: 0.40-0.91), κάτι που δεν παρατηρήθηκε στις γυναίκες που έλαβαν μεσαία δόση (Peto OR: 1.03, 95%CI: 0.84-1.27)· τέλος, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές όσον αφορά τα ποσοστά κλινικών, συνεχιζόμενων, πολυδύμων, και έκτοπων κυήσεων καθώς και αποβολών. Τέλος, και σε πρόσφατη πιο στοχευμένη μετανάλυση ως προς το σύνδρομο υπερδιέγερσης, η corifollitropin-α δεν συνδυάστηκε με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης της επιπλοκής ⁽⁵⁰⁾.

Γ) Δεδομένα από την κλινική εφαρμογή της ωθηκικής διέγερσης

α) Σύγκριση διαφόρων τύπων γοναδοτροπινών: Η πιο πρόσφατη (έτος 2011) Cochrane ανασκόπηση περιέλαβε 42 μελέτες και 9606 ζευγάρια ⁽⁵¹⁾. Η σύγκριση των ανασυνδυασμένων FSH με όλες τις υπόλοιπες γοναδοτροπίνες δεν ανέδειξε σημαντική αύξηση των ποσοστών ζώντων γεννήσεων κατόπιν χρήσης τους (28 μελέτες, 7339 ζευγάρια, OR: 0.97, 95%CI: 0.87-1.08)· αυτό σημαίνει πως μια ομάδα γυναικών που είχε 25% ποσοστό ζώντων γεννήσεων με γοναδοτροπίνες ούρων, θα είχε αντίστοιχο ποσοστό 22.5-26.5% με ανασυνδυασμένες FSH. Μία οριακά στατιστικά σημαντική διαφορά διαπιστώθηκε μόνο για μία κατηγορία γοναδοτροπινών ούρων: γυναίκες που χρησιμοποίησαν ανασυνδυασμένη FSH είχαν οριακά μικρότερο ποσοστό ζώντων γεννήσεων σε σύγκριση με εκείνες που χρησιμοποίησαν hMG (11 μελέτες, 3197 ζευγάρια, OR: 0.84, 95%CI: 0.72-0.99). Τέλος, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές ως προς τη συχνότητα εμφάνισης συνδρόμου υπερδιέγερσης (32 μελέτες, 7740 ζευγάρια, OR: 1.18, 95%CI: 0.86-1.61)· αυτό σημαίνει πως για μια ομάδα με 2% κίνδυνο OHSS με γοναδοτροπίνες ούρων, ο κίνδυνος θα ήταν μεταξύ 1.7% και 3.2% χρησιμοποιώντας ανασυνδυασμένες μορφές. Συμπερασματικά, οι διαφορές στην κλινική αποτελεσματικότητα και στην ασφάλεια των διαφόρων γοναδοτροπινών είναι μικρές, και η επιλογή θα πρέπει να εξατομικεύεται ανάλογα με τα ζητούμενα (συμμόρφωση, ευκολία χορήγησης, κόστος).

β) Προσθήκη LH στα πρωτόκολλα ωθηκικής διέγερσης: Με δεδομένη την σημασία της LH για την ομαλή ανάπτυξη του ωοθυλακίου ⁽⁵²⁾, η καταστολή της ενδογενούς LH λόγω της δράσης των GnRH αγωνιστών ή ανταγωνιστών που χορηγούνται στα πρωτόκολλα ωθηκικής διέγερσης θέτει το ερώτημα για το αν η προσθήκη εξωγενούς LH στα πρωτόκολλα αυτά είναι απαραίτητη ή έστω ευεργετική. Αρκετά δημοφιλής υπήρξε η θεωρία των ουδών της LH, σύμφωνα με την οποία, αν τα επίπεδα της LH είναι χαμηλότερα ενός 'προς τα κάτω ουδού' έχουμε διαταραχή της ανάπτυξης των ωοθυλακίων, ανεπαρκή σύνθεση ανδρογόνων και οιστρογόνων και τελικά μη πλήρη ωρίμανση των ωαρίων, ενώ αν τα επίπεδα υπερβούν έναν 'προς τα άνω

ουδὸ' ἔχουμε καταστολή των κοκκιωδῶν κυττάρων, ατρησία των ωοθυλακίων, πρόωμη ωχρινοποίηση και διαταραχή της ανάπτυξης των ωαρίων' ἔτσι προτάθηκε η θεωρία του 'παράθυρου της LH' ὡστε να εξασφαλισθεῖ η ἰδανική ανάπτυξη των ωοθυλακίων και τα ἰδεατά επίπεδα LH τοποθετήθηκαν μεταξύ ≥ 1.2 IU/L και ≤ 1.6 IU/L ⁽⁵³⁾. Η επίδραση της προσθήκης LH στα πρωτόκολλα εἴτε από την αρχή της διέγερσης εἴτε από ἓνα σημείο και πέρα ⁽⁵⁴⁾ μελετήθηκε εκτενῶς σε πολλές κλινικές μελέτες· η Cochrane ανασκόπηση αὐτῶν (ἔτος 2007, 14 μελέτες, 2612 γυναίκες) ⁽⁵⁵⁾ ἀνέδειξε πὼς η προσθήκη LH σε κύκλους με GnRH αγωνιστὴ δεν συνδυάσθηκε με σημαντικές διαφορές στα ποσοστά ζώντων γεννήσεων (2 μελέτες, OR: 1.51, 95%CI: 0.79-2.87), κλινικῶν κύσεων (7 μελέτες, OR: 1.15, 95%CI: 0.91-1.45) και συνεχιζόμενων κύσεων (7 μελέτες, OR: 1.22, 95%CI: 0.95-1.56), ἐνὼ σε κύκλους GnRH ανταγωνιστὴ εἰσὶν δεν συνδυάσθηκε με σημαντικές διαφορές στα ποσοστά κλινικῶν κύσεων (μία μελέτη, OR: 0.79, 95%CI: 0.26-2.43) και συνεχιζόμενων κύσεων (δύο μελέτες, OR: 0.83, 95%CI: 0.39-1.80). Ὅμως, στην υποκατηγορία των γυναικῶν με πτωχὴ ἀναπόκριση στην διέγερση, η προσθήκη LH συνδυάσθηκε με σημαντικὴ αὐξηση των ποσοστῶν κύσης (τρεις μελέτες, OR: 1.85, 95%CI: 1.10-3.11). Μία ἄλλη υποκατηγορία που θεωρητικὰ τουλάχιστον θα ωφελοῦνταν ἀπὸ την προσθήκη LH, εἶναι οἱ γυναίκες προχωρημένης αναπαραγωγικῆς ηλικίας. Στην πιο πρόσφατη μετανάλυση (ἔτος 2012, 7 μελέτες, 902 κύκλοι) ἀνεδείχθη πράγματι, πὼς η προσθήκη LH στις γυναίκες ἄνω των 35 ἐτῶν συνδυάσθηκε με σημαντικὰ υψηλότερα ποσοστά, τόσο ἐμφύτευσης (OR: 1.36, 95%CI: 1.05-1.78), ὅσο και κλινικῶν κύσεων (OR: 1.37, 95%CI: 1.03-1.83)⁽⁵⁶⁾. Συμπερασματικὰ, η προσθήκη LH στα πρωτόκολλα ωθηκικῆς διέγερσης ἴσως εἶναι εὐεργετικὴ για συγκεκριμένες ομάδες γυναικῶν, ὅπως οἱ πτωχῆς ἀπαντήτριες, οἱ προχωρημένης ηλικίας και οἱ πάσχουσες ἀπὸ υπογοναδοτροφικὸ υπογοναδισμό⁽⁵⁷⁾.

γ) Σύγκριση των πρωτοκόλλων με GnRH αγωνιστὴ: Η πιο πρόσφατη (ἔτος 2011) Cochrane ανασκόπηση περιέλαβε 29 μελέτες στις οποίες ἐφαρμόσθηκαν ὅλοι οἱ τύποι πρωτοκόλλων με αγωνιστὴ ⁽⁵⁸⁾. Η ἐφαρμογὴ του μακροῦ πρωτοκόλλου συνδέθηκε με στατιστικὰ σημαντικὴ αὐξηση του ποσοστού κλινικῶν κύσεων σε σύγκριση με το βραχὺ πρωτόκολλο (OR: 1.50, 95%CI: 1.16-1.93)· αὐτὸ μεταφράζεται σε αὐξηση της πιθανότητας ἐπίτευξης κύσης κατὰ 50% με το μακρὺ πρωτόκολλο, ἀν και το εὖρος αὐτῆς της αὐξησης κυμάνθηκε μεταξύ 16% και 93%· τέλος, η διαφορά αὐτὴ δεν παρατηρήθηκε ὅταν η μετανάλυση περιορίσθηκε στις μελέτες με ἐπαρκὴ τυχαιοποίηση (OR: 1.38, 95%CI: 0.93-2.05). Σχετικὰ με τα ποσοστά ζώντων γεννήσεων δεν παρατηρήθηκαν σημαντικὲς διαφορές μεταξύ των διαφόρων πρωτοκόλλων, ἀν και μόνο 3 μελέτες περιέλαβαν τέτοια ποσοστά μεταξύ των αποτελεσμάτων τους. Σχετικὰ με των ἀριθμὸ των ληφθέντων ωαρίων, αὐτὸς βρέθηκε στατιστικῶς σημαντικὰ μεγαλύτερος ὅταν ἐφαρμόσθηκε το μακρὺ πρωτόκολλο (Μέση Διαφορά: 1.61, 95%CI: 0.18-3.04)· αὐτὸ μεταφράζεται σε αὐξηση κατὰ 60% του ἀριθμοῦ των ωαρίων, ἀν και το εὖρος της αὐξησης κυμάνθηκε μεταξύ 18% και 304% περισσότερα ὠάρια. Σχετικὰ με την ποσότητα των γοναδοτροπινῶν που ἀπαιτήθηκαν για την διέγερση, αὐτὴ βρέθηκε στατιστικῶς σημαντικὰ μεγαλύτερη

επί εφαρμογής των μακρών πρωτοκόλλων (Μέση Διαφορά φιαλιδίων: 12.90, 95%CI: 3.29-22.51)· αυτό μεταφράζεται σε κατανάλωση 12.9 περισσότερων φιαλιδίων γοναδοτροπίνης στα μακρά πρωτόκολλα, αν και το εύρος της διαφοράς κυμάνθηκε μεταξύ 3.29 και 22.51 περισσότερα φιαλίδια. Τέλος, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές σε κανένα από τα μετρήσιμα αποτελέσματα μεταξύ του μακρού πρωτοκόλλου με έναρξη του αγωνιστή κατά την ωχρινική φάση και του αντίστοιχου με έναρξη κατά την παραγωγική φάση, ούτε μεταξύ των μακρών πρωτοκόλλων με συνεχόμενη ή διακοπόμενη χορήγηση του αγωνιστή.

Μια πρόσφατη (έτος 2013) πιο στοχευμένη Cochrane ανασκόπηση πραγματοποίησε σύγκριση των μακρών πρωτοκόλλων με καθημερινή χορήγηση αγωνιστή με εκείνα όπου ο αγωνιστής χορηγείται σε depot μορφή⁽⁵⁹⁾. Στην ανασκόπηση συμπεριλήφθηκαν 12 μελέτες με 1366 γυναίκες. Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των 2 μορφών όσον αφορά τα ποσοστά ζώντων γεννήσεων/συνεχιζόμενων κύσεων (επτά μελέτες, 873 γυναίκες, OR: 0.95, 95%CI: 0.70-1.31) για μια γυναίκα με 24% πιθανότητα γέννησης/συνεχιζόμενης κύησης επί υιοθέτησης της καθημερινής χορήγησης αγωνιστή, η αντίστοιχη πιθανότητα επί υιοθέτησης της depot μορφής θα κυμαινόταν μεταξύ 18% και 29%. Επίσης, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των 2 μορφών όσον αφορά τα ποσοστά κλινικών κύσεων (11 μελέτες, 1259 γυναίκες, OR: 0.96, 95%CI: 0.75-1.23) για μια γυναίκα με 30% πιθανότητα κλινικής κύησης επί υιοθέτησης της καθημερινής χορήγησης αγωνιστή, η αντίστοιχη πιθανότητα επί υιοθέτησης της depot μορφής θα κυμαινόταν μεταξύ 25% και 35%. Τέλος, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο μορφών ως προς τη συχνότητα εμφάνισης σοβαρού συνδρόμου υπερδιέγερσης (5 μελέτες, 570 γυναίκες, OR: 0.84, 95%CI: 0.29-2.42), ενώ επί υιοθέτησης της depot μορφής αγωνιστή απαιτήθηκαν σημαντικά περισσότερες μονάδες γοναδοτροπίνης για την ωθηκική διέγερση (11 μελέτες, 1143 γυναίκες, Μέση Διαφορά: 0.26, 95%CI: 0.08-0.43) και μεγαλύτερη διάρκεια διέγερσης (10 μελέτες, 1033 γυναίκες, Μέση Διαφορά 0.65, 95%CI: 0.46-0.84). Συμπερασματικά, οι δύο μορφές χορήγησης του αγωνιστή δεν παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές ως προς την αποτελεσματικότητα, αλλά η υιοθέτηση των depot μορφών μάλλον συνοδεύεται από υψηλότερο κόστος.

δ) Σύγκριση πρωτοκόλλων GnRH αγωνιστή και ανταγωνιστή: η πιο πρόσφατη (έτος 2011) Cochrane ανασκόπηση περιέλαβε 45 τυχαίοποιημένες μελέτες με 7511 γυναίκες(60). Σε 9 από αυτές τις μελέτες (1515 γυναίκες) πραγματοποιήθηκε ανάλυση με βάση το ποσοστό ζώντων γεννήσεων το οποίο δεν βρέθηκε να διαφέρει σε στατιστικά σημαντικό βαθμό μεταξύ πρωτοκόλλων αγωνιστή και ανταγωνιστή (OR: 0.86, 95%CI: 0.69-1.08 και Σχετικός Κίνδυνος: 0.89, 95%CI: 0.76-1.04, P=0.14)· στα πρωτόκολλα αγωνιστή το μέσο ποσοστό ζώντων γεννήσεων ήταν 31.5% (95%CI: 24.3-39.7) ενώ σε εκείνα με ανταγωνιστή ήταν κατά μέσο όρο 1.5% χαμηλότερο (95%CI: 22.9-5.9). Σε 28 μελέτες (5014 γυναίκες) πραγματοποιήθηκε ανάλυση με βάση το ποσοστό των συνεχιζόμενων κύσεων το οποίο επίσης δεν βρέθηκε να διαφέρει σε στατιστικά σημαντικό βαθμό μεταξύ των δύο τύπων πρωτοκόλλων (OR: 0.87,

95%CI: 0.77-1.00 και Σχετικός Κίνδυνος: 0.91, 95%CI: 0.83-0.99, $P=0.03$) στα πρωτόκολλα αγωνιστή το μέσο ποσοστό ήταν 29.8% (95%CI: 25.4-34.6), ενώ σε εκείνα με ανταγωνιστή ήταν κατά μέσο όρο 2% χαμηλότερο (95%CI: 20.4-4.5). Σε 29 μελέτες (5417 γυναίκες) συμπεριλήφθηκαν στοιχεία για την συχνότητα εμφάνισης συνδρόμου υπερδιέγερσης ωθηκών η οποία βρέθηκε να είναι σε στατιστικά σημαντικό βαθμό χαμηλότερη στα πρωτόκολλα ανταγωνιστή (OR: 0.43, 95%CI: 0.33-0.57) η εν λόγω συχνότητα στα πρωτόκολλα αγωνιστή ήταν 6.4% (95%CI: 4.3-9.2), κυμαινόμενη από 0.8 έως 38.5%, ενώ στα πρωτόκολλα ανταγωνιστή ήταν κατά μέσο όρο 2.7% χαμηλότερη (95%CI: 0.9-4.5, $P=0.003$). Η σχετική πιθανότητα του συνδρόμου υπερδιέγερσης επί εφαρμογής ανταγωνιστή ήταν το 50% αυτής επί εφαρμογής αγωνιστή (95% CI: 37-66). Σε 8 μελέτες με 783 γυναίκες με σύνδρομο πολυκυστικών ωθηκών το ποσοστό του συνδρόμου υπερδιέγερσης επί εφαρμογής ανταγωνιστή ήταν 10% χαμηλότερο (95% CI: 7-14), ενώ η πιθανότητα ακύρωσης του κύκλου ή υιοθέτησης coasting λόγω υψηλού κινδύνου του συνδρόμου ήταν επί εφαρμογής ανταγωνιστή το 53% της αντίστοιχης πιθανότητας επί εφαρμογής αγωνιστή (95%CI: 36-78). Συμπερασματικά, τα πρωτόκολλα με ανταγωνιστή είναι ασφαλέστερα ως προς τον κίνδυνο εμφάνισης συνδρόμου υπερδιέγερσης ωθηκών (κάτι που έχει ιδιαίτερη αξία σε γυναίκες με σύνδρομο πολυκυστικών ωθηκών), χωρίς να υστερούν στα ποσοστά επιτυχίας ⁽⁶¹⁾.

ε) Εφαρμογή πρωτοκόλλων έπειτα από 'προετοιμασία' με ορμονικά σκευάσματα:

Θεωρητικά, η χορήγηση ορμονικών σκευασμάτων κατά τον προηγούμενο της διέγερσης κύκλο μπορεί να φανεί χρήσιμη και να έχει ευνοϊκά αποτελέσματα σε ορισμένες περιπτώσεις: σε γυναίκες με αμηνόρροια ή αραιομηνόρροια για να προετοιμασθεί το ενδομήτριο και να καθορισθεί η ημέρα έναρξης του αγωνιστή ή να επέλθει εμμηνορρυσία ώστε να ξεκινήσει το πρωτόκολλο ανταγωνιστή σε γυναίκες με υψηλά ενδογενή επίπεδα LH (π.χ. επί συνδρόμου πολυκυστικών ωθηκών) ώστε αυτά να μειωθούν πριν την έναρξη της διέγερσης για μείωση των ενδογενών FSH και LH πριν την έναρξη της διέγερσης ώστε αφενός να αποφευχθεί η ανάπτυξη ωθηκικών λειτουργικών κύστεων και αφετέρου να επιτευχθεί ομαλή στρατολόγηση περισσότερων ωοθυλακίων για προγραμματισμό/ομαδοποίηση των διεγέρσεων/ωοληψιών σε ιδιαίτερες περιστάσεις ή ανάγκες της Μονάδας, και ιδιαίτερα στα πρωτόκολλα ανταγωνιστή που ξεκινούν μετά την εμφάνιση της περιόδου. Οι ορμονικοί χειρισμοί 'προετοιμασίας' περιλαμβάνουν κατά περίπτωση: την χορήγηση συνδυασμένων αντισυλληπτικών δισκίων σε καθημερινή βάση για τουλάχιστον 14 ημέρες, την χορήγηση οιστραδιόλης σε καθημερινή βάση από το μέσον της ωχρινικής φάσης, και την χορήγηση προγεστερόνης από του στόματος ή κοιλιακά σε καθημερινή βάση για την πρόκληση αιμορραγίας εκ διακοπής.

Σύμφωνα με την πλέον πρόσφατη Cochrane ανασκόπηση ⁽⁶²⁾, όσον αφορά τις ζώντες γεννήσεις, δεν διαπιστώθηκε ουδεμία επίδραση οποιουδήποτε τύπου 'προετοιμασίας'. Όμως, η προετοιμασία με συνδυασμένο αντισυλληπτικό σε πρωτόκολλα ανταγωνιστή συγκρινόμενη με την απουσία προετοιμασίας, συνδυάσθηκε με λιγότερες κλινικές κυήσεις (Peto OR: 0.69,

$P=0.03$), περισσότερες ημέρες διέγερσης (Μέση Διαφορά: 1.44, $P<0.00001$), και κατανάλωση περισσότερων μονάδων γοναδοτροπινών (Μέση Διαφορά: 691.69, $P<0.00001$)· εδώ θα πρέπει να σημειωθεί ότι πιθανώς, για τα αποτελέσματα έχει σημασία και το πότε μετά την διακοπή του αντισυλληπτικού ξεκινά η διέγερση με τις γοναδοτροπίνες, και πιο συγκεκριμένα αν αυτή ξεκινά μετά την εμφάνιση της περιόδου ή πριν ⁽⁶³⁾. Επίσης, η 'προετοιμασία' με προγεστερόνη σε πρωτόκολλα αγωνιστή συγκρινόμενη με απουσία προετοιμασίας ή χορήγηση placebo, συνδυάστηκε με περισσότερες κλινικές κύσεις (Peto OR: 1.95, $P=0.007$) και μικρότερη συχνότητα εμφάνισης ωθηκικών κύσεων (Peto OR: 0.21, $P<0.00001$). Τέλος, η 'προετοιμασία' με οιστρογόνα σε πρωτόκολλα ανταγωνιστή συγκρινόμενη με απουσία 'προετοιμασίας' συνδυάστηκε με λήψη περισσότερων ωαρίων (Μέση Διαφορά: 2.01, $P<0.00001$), και με κατανάλωση περισσότερων μονάδων γοναδοτροπινών (Μέση Διαφορά: 207.08, $P<0.00001$). Για τα υπόλοιπα αποτελέσματα είτε δεν βρέθηκε καμία διαφορά, είτε δεν υπήρχαν επαρκείς μελέτες για εξαγωγή ισχυρών συμπερασμάτων.

στ) Γυναίκες με πτωχή ανταπόκριση στην ωθηκική διέγερση. Οι πτωχές απαντήτριες αποτελούν μια ιδιαίτερη κατηγορία γυναικών που η αντιμετώπισή τους παρουσιάζει δυσκολίες και προκλήσεις. Εκατοντάδες μελέτες έχουν δημοσιευθεί ως προς τους τύπους των πρωτοκόλλων και τους χειρισμούς που θα μπορούσαν να βελτιώσουν την πρόγνωση των γυναικών αυτών· η εξαγωγή ισχυρών συμπερασμάτων όμως είναι εξαιρετικά δύσκολη λόγω της μεγάλης ετερογένειας των μελετών ως προς βασικές παραμέτρους, με πρώτη και σημαντικότερη την μεγάλη ποικιλία των ορισμών της 'πτωχής απάντησης'. Το πρόβλημα οδήγησε την ESHRE στην αναζήτηση και δημοσίευση μιας επίσημης θέσης ⁽⁶⁴⁾, σύμφωνα με την οποία, για τον ορισμό της πτωχής απάντησης απαιτούνται τουλάχιστον δύο από τα ακόλουθα τρία κριτήρια: α) προχωρημένη αναπαραγωγική ηλικία της γυναίκας (≥ 40 έτη) ή παρουσία άλλου παράγοντα κινδύνου για πτωχή απάντηση, β) ιστορικό προηγούμενης πτωχής απάντησης (≤ 3 ωάρια κατόπιν εφαρμογής συμβατικού πρωτοκόλλου διέγερσης, και γ) παρουσία κάποιου δυσμενούς δείκτη ωθηκικής επάρκειας (π.χ. AFC: 5-7 ωοθυλάκια ή AMH: 0.5-1.1 ng/ml). Επιπλέον δύο επεισόδια πτωχής απάντησης έπειτα από εφαρμογή μέγιστης διέγερσης είναι αρκετά για να χαρακτηρίσουν την γυναίκα ως πτωχή απαντήτρια ανεξαρτήτως ηλικίας ή παρακλινικών δεικτών ⁽⁶⁵⁾. Αν σε μια γυναίκα υπάρχουν τα κριτήρια (α) και (γ), αλλά δεν έχει υποβληθεί σε διέγερση, θα πρέπει να χαρακτηρίζεται ως 'αναμενόμενη' πτωχή απαντήτρια.

Η πλέον πρόσφατη Cochrane ανασκόπηση των μελετών για τους χειρισμούς στις πτωχές απαντήτριες κατέληξε πως ο αριθμός των ληφθέντων ωαρίων ήταν σημαντικά μικρότερος και η συνολική δόση γοναδοτροπινών σημαντικά μεγαλύτερη όταν εφαρμόστηκε το παραδοσιακό μακρύ πρωτόκολλο σε σύγκριση τα αντίστοιχα έπειτα από την εφαρμογή πρωτοκόλλου ανταγωνιστή. Τα ποσοστά ακύρωσης κύκλων ήταν σημαντικά υψηλότερα όταν εφαρμόστηκε το βραχύ πρωτόκολλο αγωνιστή συγκρινόμενα με εκείνα έπειτα από το μακρύ πρωτόκολλο. Όλες οι υπόλοιπες συγκρίσεις δεν ανέδειξαν διαφορές, και το τελικό συμπέρασμα είναι πως δεν υπάρχουν επαρκείς

ενδείξεις για να υποστηριχθεί η κατά ρουτίνα εφαρμογή στις πτωχές απαντήτριες κάποιου συγκεκριμένου χειρισμού, είτε πρωτοκόλλου διέγερσης είτε συμπληρωματικής αγωγής⁽⁶⁶⁾.

Η χορήγηση αυξητικής ορμόνης στις πτωχές απαντήτριες φαίνεται σύμφωνα με πρόσφατη Cochrane ανασκόπηση να αποτελεί τον μόνο ίσως χειρισμό που μπορεί να βελτιώσει τα ποσοστά ζώντων γεννήσεων και κύσεων (OR: 5.39, 95%CI: 1.89-15.35 και OR: 3.28, 95%CI 1.74-6.20, αντίστοιχα), αλλά ο μικρός αριθμός μελετών επιβάλλει την επιφυλακτική εξαγωγή συμπερασμάτων⁽⁶⁷⁾. Επίσης, ένας άλλος χειρισμός για τον οποίον γράφτηκαν αρκετά τα τελευταία χρόνια, είναι η χορήγηση στις πτωχές απαντήτριες ανδρογόνων και ιδίως δεϋδροεπιandroστερόνης (DHEA). Τα ευεργετικά αποτελέσματα που έχουν αναφερθεί από συγκεκριμένες ομάδες ερευνητών, αμφισβητούνται έντονα ιδίως μετά την δημοσίευση της μετανάλυσης όλων των μελετών (2481 κύκλοι σε πτωχές απαντήτριες) που απέτυχε να αναδείξει κάποιο όφελος, ούτε ως προς τον αριθμό των ληφθέντων ωαρίων, ούτε ως προς τα ποσοστά κύησης/ζώντων γεννήσεων⁽⁶⁸⁾ από την χορήγηση ανδρογονικών παραγόντων.

Τέλος, οι περισσότεροι κλινικοί συμφωνούν πως δεν υπάρχει λόγος χορήγησης υψηλών δόσεων γοναδοτροπινών για την διέγερση των πτωχών απαντητριών, μια και τα ίδια ή και καλύτερα αποτελέσματα παρατηρούνται με πρωτόκολλα ήπιας ή 'ελάχιστης' διέγερσης.

Δ) Παρακολούθηση της ελεγχόμενης ωθηκικής διέγερσης

Η παρακολούθηση της ωθηκικής διέγερσης στα πλαίσια προγραμμάτων εξωσωματικής γίνεται με υπερηχογραφική μέτρηση των αναπτυσσομένων ωθυλακίων και με υπολογισμό των επιπέδων οιστραδιόλης στον ορό. Η παρακολούθηση θα πρέπει να προσαρμόζεται ανά περίπτωση και συνήθως πρέπει να γίνεται πιο συχνή καθώς προχωρούμε προς το τέλος της φάσης διέγερσης' το τελευταίο ισχύει ιδίως για τα πρωτόκολλα ανταγωνιστή στα οποία η τελική εξέλιξη μπορεί να είναι ταχύτατη. Σχετικά με το αν και κατά πόσο οι μετρήσεις των επιπέδων οιστραδιόλης είναι απαραίτητες, αξίζει να σημειωθούν τα αποτελέσματα μιας πρόσφατης (έτος 2008) Cochrane ανασκόπησης, κατά την οποία συγκρίθηκαν τα αποτελέσματα κύκλων έπειτα από παρακολούθηση μόνο με υπερηχογράφημα με τα αντίστοιχα έπειτα από παρακολούθηση με υπερηχογράφημα και μετρήσεις οιστραδιόλης' στην ανασκόπηση δεν παρατηρήθηκαν διαφορές ως προς τα ποσοστά κλινικών κύσεων (σχετικός κίνδυνος 1.07, 95%CI: 0.77-1.49), ως προς τον αριθμό των ληφθέντων ωαρίων (Σταθμισμένη Μέση Διαφορά: -0.55, 95% CI: -1.79-0.69), ούτε ως προς την συχνότητα εμφάνισης συνδρόμου υπερδιέγερσης (Σχετικός Κίνδυνος: 0.73, 95%CI: 0.30-1.78)' πάντως θα πρέπει να τονισθεί πως από τις 1119 υποψήφιες μελέτες, μόνο δύο συμπεριλήφθηκαν στην μετανάλυση, οπότε και τα αποτελέσματα θα πρέπει να ερμηνευθούν με επιφύλαξη⁽⁶⁹⁾. Τέλος, ενδιαφέρον παρουσιάζει η εισαγωγή της τρισδιάστατης υπερηχοτομογραφίας στην παρακολούθηση των κύκλων ελεγχόμενης ωθηκικής διέγερσης με την αυτοματοποιημένη μέτρηση των αναπτυσσομένων ωθυλακίων, η οποία φαίνεται πως όχι μόνο δεν

υστερεί της παραδοσιακής μέτρησης, αλλά επιτρέπει και την ταχύτερη εκτέλεση της εξέτασης καθώς και την εκτίμηση και άλλων παραμέτρων όπως είναι ο όγκος των ωθυλακίων⁽⁷⁰⁾.

Ε) Πυροδότηση της τελικής ωρίμανσης των ωθυλακίων

Στα πρωτόκολλα ωθηκικής διέγερσης η πυροδότηση της τελικής ωρίμανσης των ωθυλακίων πραγματοποιείται συνήθως με την χορήγηση χοριακής γοναδοτροπίνης (HCG), η οποία μιμείται την δράση της αιχμής LH, όταν εκπληρωθούν τα απαραίτητα κριτήρια. Στα μακρά πρωτόκολλα η πυροδότηση γίνεται όταν τα κυρίαρχα 2-3 ωθυλακία φθάσουν τουλάχιστον τα 18 mm σε διάμετρο με ικανοποιητική παραγωγή οιστραδιόλης (περίπου 200 pg/mL ανά ωθυλακίο άνω των 14 mm)· τα μακρά πρωτόκολλα παρέχουν μια σχετική ευελιξία, οπότε μπορούμε να περιμένουμε και έως τα 20-21 mm διαμέτρου, αν τα επίπεδα οιστραδιόλης δεν είναι ικανοποιητικά ή αν επιθυμούμε να δώσουμε χρόνο στα μικρότερα ωθυλακία. Στα βραχεία πρωτόκολλα και ιδίως στα πρωτόκολλα ανταγωνιστή η πυροδότηση θα πρέπει να γίνεται ελαφρώς νωρίτερα, στη διάμετρο των 17mm μια και η παράταση μπορεί να επηρεάσει τα αποτελέσματα. Η ωληψία θα πρέπει να προγραμματισθεί για να γίνει 34-36 ώρες μετά την χορήγηση της HCG, αν και μεγαλύτερο διάστημα, έως 39 ώρες θεωρείται ασφαλές⁽⁷¹⁾. Στο διάστημα αυτό πραγματοποιούνται κυτταροπλασματικές αλλαγές στο ωκύτταρο και ολοκληρώνεται η μείωση. Οι ενδοκυτταρικές κυτταροπλασματικές συνδέσεις μεταξύ των κοκκιωδών κυττάρων και του ωκυττάρου διακόπτονται. Η πρόφαση της 1^{ης} μειωτικής διαίρεσης ολοκληρώνεται και το ωκύτταρο προχωρεί στην μετάφαση της 2^{ης} μειωτικής διαίρεσης στην οποία και καθλώνεται, ενώ αποβάλλεται το πρώτο πολικό σώματιο. Σύμφωνα με πρόσφατη μετανάλυση, η καθυστέρηση της ωληψίας άνω των 36 ωρών συνδυάζεται με την λήψη περισσότερων ώριμων ωαρίων (Σχετικός Κίνδυνος: 0.67, 95%CI: 0.62-0.73), χωρίς όμως αυτό να συνοδεύεται από αύξηση των ποσοστών γονιμοποίησης (Σχετικός Κίνδυνος: 0.99, 95%CI: 0.94-1.04), ποσοστών εμφύτευσης (Σχετικός Κίνδυνος: 0.91, 95% CI: 0.40-2.04), ή ποσοστών κύησης (Σχετικός Κίνδυνος: 0.79, 95%CI: 0.58-1.08)⁽⁷²⁾.

Πλην της HCG ούρων που έχει ευρέως χρησιμοποιηθεί για την πυροδότηση της τελικής ωρίμανσης σε δόσεις 5000-10000 IU, για τον ίδιο σκοπό έχουν χρησιμοποιηθεί η ανασυνδυασμένη HCG (σε δόση 250 μg), η ανασυνδυασμένη LH και οι GnRH αγωνιστές (εφόσον έχει δοθεί πρωτόκολλο ανταγωνιστή). Σε πρόσφατη Cochrane ανασκόπηση (14 μελέτες, 2306 γυναίκες), δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ της ανασυνδυασμένης HCG και της HCG ούρων όσον αφορά τα ποσοστά συνεχιζόμενων κύσεων και ζώντων γεννήσεων (6 τυχαίοποιημένες μελέτες, OR: 1.04, 95%CI: 0.79-1.37, P=0.83), ούτε όσον αφορά την συχνότητα εμφάνισης του συνδρόμου υπερδιέγερσης ωθηκών (3 τυχαίοποιημένες μελέτες, OR: 1.5, 95%CI: 0.37-4.1, P=0.37)· παρομοίως, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ της ανασυνδυασμένης LH και της HCG ούρων όσον αφορά τα ποσοστά συνεχι-

ζόμενων κυήσεων και ζώντων γεννήσεων (OR: 0.94, 95%CI: 0.50-1.76) ούτε όσον αφορά την συχνότητα συνδρόμου υπερδιέγερσης (OR: 0.82, 95%CI: 0.39-1.69)⁽⁷³⁾.

Εξαιρετικά δλεαστική είναι η ιδέα της αντικατάστασης της HCG από GnRH αγωνιστή. Αυτά βέβαια μπορεί να γίνει μόνο σε πρωτόκολλα ανταγωνιστή. Ο αγωνιστής αντικαθιστά τον ανταγωνιστή στους GnRH υποδοχείς και εκδηλώνεται η αρχική διεγερτική δράση του με αποτέλεσμα την εμφάνιση αιχμής LH αλλά και την αύξηση της FSH (που ίσως ευοδώνει τους υποδοχείς LH στα ωχρινιοποιούμενα κοκκιώδη κύτταρα). Η εφαρμογή της τεχνικής αυτής έχει εξαιρετικά αποτελέσματα σε κύκλους διέγερσης δοτριών ωαρίων, εκμηδενίζοντας σχεδόν την πιθανότητα εμφάνισης συνδρόμου υπερδιέγερσης στις δότριες (λόγω του μικρότερου χρόνου ημισείας ζωής της ενδογενούς LH σε σύγκριση με την HCG) χωρίς να επηρεάζονται τα αποτελέσματα στις λήπτριες⁽⁷⁴⁾. Αντιθέτως, η εφαρμογή της στρατηγικής αυτής φαίνεται να είναι προβληματική αν ακολουθήσει εμβρυομεταφορά στον ίδιο κύκλο, λόγω της προκαλούμενης σημαντικής ανεπάρκειας της ωχρινικής φάσης (από αρνητική επίδραση στα ωχρά σώματα και στο ενδομήτριο)⁽⁷⁵⁾. Αυτό επιβεβαιώθηκε μετά την πρόσφατη Cochrane ανασκόπηση: η πυροδότηση με αγωνιστή σε σύγκριση με την αντίστοιχη με HCG οδήγησε ανά τυχαίοποιημένη γυναίκα σε σημαντικά λιγότερες γεννήσεις ζώντων (4 μελέτες, OR: 0.44, 95%CI: 0.29-0.68), σημαντικά λιγότερες συνεχιζόμενες κυήσεις (8 μελέτες, OR: 0.45, 95%CI: 0.31-0.65) και βέβαια, όπως αναμενόταν σε σημαντικά μικρότερη συχνότητα μέτριου/σοβαρού συνδρόμου υπερδιέγερσης (5 μελέτες, OR: 0.10, 95%CI: 0.01-0.82). Για μια ομάδα γυναικών με 30% ποσοστό ζώντων γεννήσεων και 3% συχνότητα συνδρόμου υπερδιέγερσης με χρήση HCG, τα αντίστοιχα ποσοστά με χρήση αγωνιστή θα ήταν 12-22% και 0-2,6%. Επίσης, η ανασκόπηση αυτή επιβεβαίωσε ότι αν η στρατηγική εφαρμόζεται σε κύκλους δωρεάς ωαρίων, τα αποτελέσματα στις λήπτριες δεν επηρεάζονται (OR: για γεννήσεις ζώντων 0.92, 95% CI: 0.53-1.61). Τρέχουσες κλινικές μελέτες προσπαθούν να λύσουν το πρόβλημα της ωχρινικής ανεπάρκειας με χορήγηση υψηλών δόσεων προγεστερόνης και οιστραδιόλης ή/και χορήγηση συμπληρωματικής δόσης HCG (1500 IU) 35 ώρες μετά την πυροδότηση⁽⁷⁶⁾.

ΩΟΛΗΨΙΑ

Κατά τα πρώτα χρόνια της εξωσωματικής γονιμοποίησης η ωοληψία γινόταν λαπαροσκοπικά. Σήμερα, πραγματοποιείται διακολπικά, υπό υπερηχογραφική καθοδήγηση, πλην σπανιότατων εξαιρέσεων όπου η τελευταία είναι αδύνατη (αν οι ωοθήκες δεν είναι προσπελάσιμες διακολπικά, λόγω π.χ. υψηλής ενδοπευελικής θέσης τους). Για την ωοληψία χρησιμοποιείται η διακολπική κεφαλή υπερηχοτομογράφου η οποία καλύπτεται με αποστειρωμένο κάλυμμα και στην οποία εφαρμόζεται ειδικός οδηγός δια του οποίου διέρχεται η βελόνη (συνήθως 17-gauge). Η βελόνη συνδέεται με σύστημα αναρρόφησης και η μέγιστη πίεση αναρρόφησης ρυθμίζεται σε $-(15-20)$ kPa ή $-(125-150)$ mmHg. Η διαδικασία γίνεται υπό ενδοφλέβιο αναλγησία

και/ή ελαφρά αναισθησία. Το ωοθυλακικό υγρό συλλέγεται σε σωληνάκια που τοποθετούνται σε θερμαινόμενη θήκη μέχρι να παραδοθούν στον κλινικό εμβρυολόγο. Υπάρχουν δύο τύποι βελόνας: η μονού και η διπλού αυλού. Όταν χρησιμοποιούμε την δεύτερη, και ο εμβρυολόγος δεν εντοπίσει το ωοκυτταρικό σύμπλεγμα (εφεξής για συντομία: ωάριο) στο πρώτο σωληνάριο που του δοθεί, εισάγουμε στο τρυπημένο ωοθυλάκιο ίσου όγκου υγρό (Earle's medium με ηπαρίνη 2 units/ml ή HEPES-buffered media ή ακόμα και ζεστό φυσιολογικό ορό με ηπαρίνη ⁽⁷⁷⁾), και ξανακάνουμε αναρρόφηση (flushing). Τα αποτελέσματα από την χρήση βελόνας μονού ή διπλού αυλού συγκρίθηκαν σε πρόσφατη (έτος 2010) Cochrane ανασκόπηση ⁽⁷⁸⁾: η πρακτική του flushing ωοθυλακίων με βελόνα διπλού αυλού δεν συνδέθηκε με βελτίωση των ποσοστών συνεχιζόμενων ή κλινικών κυήσεων ανά τυχαίοποιημένη γυναίκα (OR: 1.17, 95%CI: 0.57-2.38), και δεν οδήγησε σε σημαντική αύξηση του αριθμού των ληφθέντων ωαρίων· το flushing αν και δεν συνδέθηκε με περισσότερες επιπλοκές, παρέτεινε την διάρκεια της ωοληψίας κατά 3-15 λεπτά (3 μελέτες, $P<0.001$) ενώ αυξήθηκαν και οι ανάγκες σε πεθιδίνη (100 mg έναντι 50 mg, $P<0.00001$). Σε παρόμοια συμπεράσματα κατέληξε και η πλέον πρόσφατη μετανάλυση (6 μελέτες, 518 γυναίκες) ⁽⁷⁹⁾: η πραγματοποίηση flushing δεν οδήγησε σε σημαντικές διαφορές ούτε ως προς τον αριθμό των ληφθέντων ωαρίων (Σταθμισμένη Μέση Διαφορά: 0.07, 95% CI: -0.13 -0.29), ούτε ως προς την συγκομιδή ωαρίων ανά αναρροφηθέν ωοθυλάκιο (OR: 1.06, 95%CI: 0.95-1.18). Θα πρέπει πάντως να τονισθεί πως τα ανωτέρω αποτελέσματα αφορούν κυρίως γυναίκες με φυσιολογική ανταπόκριση στην ωοθηκική διέγερση· συγκεκριμένες ομάδες γυναικών όπως οι πτωχές απαντήτριες, και γυναίκες που ακολουθούν πρωτόκολλα ήπιας διέγερσης ή φυσικούς κύκλους, μπορεί να ωφεληθούν από την εφαρμογή flushing καθώς για αυτές 1 ή 2 ωάρια παραπάνω μπορούν να κάνουν την διαφορά.

Ο κλινικός εμβρυολόγος αδειάζει το σωληνάριο με το αναρροφηθέν ωοθυλακικό υγρό σε τρυβλία Petri, όπου εντοπίζεται, εφόσον υπάρχει εκεί, το ωάριο. Όλα τα ωάρια που θα συλλεχθούν με τον ίδιο τρόπο, καθαρίζονται από τυχόν μικροπήγματα αίματος και μεταφέρονται με τη βοήθεια γυάλινης πιπέτας Pasteur, σε κατάλληλο καλλιεργητικό υλικό μέχρι το πέρας της ωοληψίας. Εν συνεχεία, τα ωάρια μεταφέρονται σε τρυβλία με καθαρό καλλιεργητικό υλικό και φυλάσσονται σε επωαστικούς κλιβάνους στους 37°C με 6% CO₂ μέχρι την γονιμοποίησή τους. Τα ωάρια αναλόγως της 'ωριμότητάς' τους διακρίνονται στους εξής τύπους: Πολύ Ανώριμο (Germinal vesicle, GV), Ανώριμο (MI), Προωοθυλακορρηκτικό – Όριμο (MII), Υπερώριμο(MIII). Όλες οι εργασίες που σχετίζονται με τα ωάρια και τα σπερματοζωάρια εφεξής, πραγματοποιούνται στο εμβρυολογικό εργαστήριο με τη βοήθεια μικροσκοπίων.

ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΕΞΩΣΩΜΑΤΙΚΗΣ ΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗΣ

Υπάρχουν δύο βασικές μέθοδοι εξωσωματικής γονιμοποίησης των ωαρίων: Η απλή έγχυση των σπερματοζωαρίων (απλή IVF) και η ενδοκυτταροπλασματική έγχυση σπερματοζωαρίων ή μι-

κρογονιμοποίηση (Intracytoplasmic Sperm Injection, ICSI). Η γονιμοποίηση πραγματοποιείται 40 ώρες μετά την πυροδότηση της τελικής ωρίμανσης (με την χορήγηση συνήθως HCG, όπως περιγράφηκε παραπάνω). Εφόσον γίνει κατάλληλη επεξεργασία του σπέρματος, αυτό εμπλουτίζεται με το κατάλληλο καλλιεργητικό υλικό, και συλλέγονται τα κινητά σπερματοζωάρια. Όταν γίνεται απλή IVF, τα ωάρια που έχουν συλλεχθεί κατά την ωοληψία, εγχέονται με 100.000 κινητά σπερματοζωάρια ανά ml. Όταν γίνεται ICSI, ένα και μόνο σπερματοζωάριο εγχέεται σε κάθε ώριμο ωάριο (MI). Η διαπίστωση της επιτυχούς γονιμοποίησης γίνεται περίπου 16-19 ώρες μετά.

Η τεχνική ICSI ξεκίνησε να εφαρμόζεται το 1992 και αποτέλεσε μια τεράστια εξέλιξη στην Υποβοηθούμενη Αναπαραγωγή μιας και έδωσε αποτελεσματική λύση για την αντιμετώπιση των ζευγαριών με υπογονιμότητα λόγω ανδρικού παράγοντα. Στις περιπτώσεις στις οποίες πρόκειται να γίνει ICSI τα ωάρια τοποθετούνται αρχικά σε υλικό με κατάλληλο ένζυμο (υαλουρονιδάση) για περίπου 20 sec και στη συνέχεια απομακρύνονται μηχανικά τα συνοδά κύτταρα (cumulus cells) από το ωάριο. Ακολουθεί η αξιολόγηση της κατάστασης ωριμότητας των ωαρίων, και τα ώριμα ωάρια επιστρέφονται στον επωαστικό κλίβανο μέχρι την ώρα της γονιμοποίησης. Το ICSI πραγματοποιείται με τη χρήση ανάστροφου μικροσκοπίου υπό μεγέθυνση 400x και υδραυλικού συστήματος μικροχειριστρίων. Αρχικά γίνεται επιλογή ενός μορφολογικά ομαλού σπερματοζωαρίου το οποίο ακινητοποιείται και αναρροφάται σε μικροπιπέτα έγχυσης (injection). Ακολούθως, το ωάριο συγκρατείται σε μικροπιπέτα στήριξης (holding) και εισάγεται προσεκτικά σε αυτό το επιλεγμένο σπερματοζωάριο. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται μέχρι να τρυπηθούν όλα τα ωάρια. Τα 'γονιμοποιημένα' ωάρια επιστρέφονται στον επωαστικό κλίβανο τοποθετημένα σε καινούργιο καλλιεργητικό υλικό στα κατάλληλα τρυβλία. Εκεί θα παραμείνουν μέχρι την επόμενη ημέρα όπου θα γίνει η αξιολόγηση της γονιμοποίησης.

Οι ενδείξεις για την εφαρμογή του ICSI κατά την διάρκεια των ετών διευρύνθηκαν, άλλοτε συνετά και άλλοτε υπερβολικά, για να περιλάβουν και άλλες κατηγορίες υπογόνιμων ζευγαριών ή ακόμα και για να καλύψουν την ανασφάλεια κάποιων ιατρών ή/και εμβρυολόγων. Έτσι, προτεινόμενες ενδείξεις εφαρμογής ICSI (πλην βέβαια του ανδρικού παράγοντα) αποτελούν: η ανεξήγητη υπογονιμότητα, η διάθεση ωαρίων πτωχής ποιότητας, η διάθεση μικρού αριθμού ωαρίων, η προχωρημένη ηλικία της γυναίκας, η προηγούμενη αποτυχία γονιμοποίησης με την απλή τεχνική, και οι περιπτώσεις που θα ακολουθήσει Προεμφυτευτική Γενετική Διάγνωση. Γενικά, φαίνεται πως γίνεται κατάχρηση της εφαρμογής του ICSI και αυτό οδήγησε πρόσφατα την ASRM στην επίσημη δημοσίευση⁽⁸⁰⁾ της αποκρυσταλλωμένης γνώμης της: α) Το ICSI είναι μια ασφαλής και αποτελεσματική θεραπεία για την αντιμετώπιση της υπογονιμότητας λόγω ανδρικού παράγοντα. β) Το ICSI μπορεί να αυξήσει τα ποσοστά γονιμοποίησης όταν υπάρχει ιστορικό πτωχότερης (από την αναμενόμενη) ή αποτυχίας γονιμοποίησης με την απλή εξωσωματική. Σε μια ενδιαφέρουσα μελέτη, τα ωάρια των ίδιων των γυναικών που σε προηγούμενο κύκλο βίωσαν πλήρη αποτυχία γονιμοποίησης, γονιμοποιήθηκαν με ICSI ή απλή IVF και παρα-

τηρήθηκε γονιμοποίηση στο 11% των ωαρίων της απλής IVF και στο 48% των ωαρίων του ICSI⁽⁸¹⁾. γ) Η εφαρμογή ICSI σε περιπτώσεις ανεξήγητης αιτιολογίας υπογονιμότητας δεν βελτιώνει τα κλινικά αποτελέσματα (ποσοστά κύησης). δ) Η εφαρμογή ICSI ως ρουτίνα σε όλες τις περιπτώσεις δεν συστήνεται διότι υπάρχει μία και μόνο μελέτη⁽⁸²⁾ που σε αντίθεση με τις υπόλοιπες στην διεθνή βιβλιογραφία, αναφέρει υψηλότερα ποσοστά γονιμοποίησης με ICSI (58% έναντι 47%, $P < 0.0001$) και χαμηλότερα ποσοστά ολικής αποτυχίας γονιμοποίησης με ICSI (2% έναντι 5%)· αυτό σημαίνει πως θα πρέπει να γίνουν 33 αναπαιλόγητες εφαρμογές ICSI για να προληφθεί μια περίπτωση αποτυχίας γονιμοποίησης με απλή IVF, ενώ η ίδια μελέτη δεν αναφέρει διαφορές στα ποσοστά κλινικών κύσεων (Σχετικός Κίνδυνος: 1.27, 95% CI: 0.95-1.72). ε) Το ICSI, όταν εφαρμόζεται σε γυναίκες προχωρημένης ηλικίας και σε περιπτώσεις με λίγα ή πτωχώς ποιότητας ωάρια, δεν βελτιώνει καμία κλινική ή εργαστηριακή παράμετρο. Τέλος, στ) το ICSI φαίνεται να ενδείκνυται σε περιπτώσεις που θα ακολουθήσει προεμφυτευτική διάγνωση (για να εξασφαλίσει μονοσπερμική γονιμοποίηση και να περιορίσει πιθανή 'επιμόλυνση' από σπέρμα προσκολλημένο στην διαφανή ζώνη)⁽⁸³⁾, σε περιπτώσεις γονιμοποίησης κρυσσυντηρημένων ωαρίων (τα οποία έχουν 'καθαρισθεί' πριν την κρυσσυντήρηση και μπορεί να έχουν διαταραχές στην διαφανή ζώνη)⁽⁸⁴⁾, και τέλος σε περιπτώσεις in vitro ωρίμανσης ωαρίων (πάλι λόγω πιθανών διαταραχών της διαφανούς ζώνης)⁽⁸⁵⁾.

Πρόσφατα έχει καταστεί δυνατή η επιλογή των προς ενδοκυτταροπλασματική έγχυση σπερματοζωαρίων υπό πολύ μεγαλύτερη μεγέθυνση (6600-8400x) (Intracytoplasmic Morphologically Selected Insemination, IMSI) με βάση κριτήρια που περιλαμβάνουν την παρουσία ή μη κυστιδίων στην κεφαλή των σπερματοζωαρίων. Έτσι, έχουν περιγραφεί 4 κατηγορίες σπερματοζωαρίων: Κατηγορία 1: απουσία κυστιδίων, Κατηγορία 2: το πολύ δύο μικρά κυστίδια, Κατηγορία 3: πάνω από 2 μικρά κυστίδια ή τουλάχιστον 1 μεγάλο, και Κατηγορία 4: ανώμαλο σχήμα κεφαλής ή άλλες ανωμαλίες με ή χωρίς κυστίδια⁽⁸⁶⁾.

Η σύγκριση των αποτελεσμάτων έπειτα από εφαρμογή IMSI ή ICSI στο γενικό πληθυσμό ζευγαριών με ανδρικού παράγοντα υπογονιμότητα έχει αναδείξει τα εξής: Ως προς τα ποσοστά γονιμοποίησης, όλες οι μέχρι τώρα μελέτες δεν δείχνουν διαφορές μεταξύ των δύο τεχνικών. Επίσης οι περισσότερες μελέτες συμφωνούν για συγκρίσιμα ποσοστά ανάπτυξης καλής ποιότητας εμβρύων 2^{ης} και 3^{ης} ημέρας, με εξαίρεση μια μελέτη που ανέφερε σημαντικά υψηλότερα ποσοστά εμβρύων 1^{ης} βαθμίδος με το IMSI (37.2%) σε σύγκριση με το ICSI (26.8%)⁽⁸⁷⁾. Όσον αφορά την εξέλιξη των εμβρύων σε βλαστοκύστες, η μοναδική υπάρχουσα μελέτη αναφέρει ποσοστά 56.3% και 61.4% από σπερματοζωάρια κατηγορίας 1 και 2 αντίστοιχα, που είναι σημαντικά υψηλότερα συγκρινόμενα με εκείνα από σπερματοζωάρια κατηγορίας 3 και 4, (5.1% και 0% αντίστοιχα, $P < 0.0001$)⁽⁸⁸⁾. Ως προς την επίδραση της εφαρμογής IMSI στα ποσοστά κύησης, υπάρχουν 3 τυχαιοποιημένες μελέτες: Οι Antinori et al, ανέφεραν σημαντικά υψηλότερα ποσοστά κλινικών κύσεων (IMSI: 39.25% έναντι ICSI: 26.5%) σε υπογόνιμα ζευγάρια με σοβαρό ανδρικό παράγοντα, χωρίς να επηρεάζονται τα ποσοστά αποβολών⁽⁸⁹⁾· οι Balaban et al,

ανέφεραν σε παρόμοιο πληθυσμό (αν και με καλύτερες παραμέτρους σπέρματος) υψηλότερα ποσοστά κλινικών κυήσεων, όχι όμως σε στατιστικά σημαντικό βαθμό (IMSI: 54% έναντι ICSI: 44.4%)⁽⁹⁰⁾. Τέλος, οι Wilding et al, ανέφεραν σημαντικά βελτιωμένη ποιότητα εμβρύων και σημαντικά υψηλότερα ποσοστά κυήσεων (IMSI: 65.6% έναντι ICSI: 40%) και εμφύτευσης (IMSI: 24.2% έναντι ICSI: 14.8%) σε ζευγάρια με υπογονιμότητα 1-3 ετών και συγκεντρώσεις σπερματοζωαρίων 1-20 εκατ./ml⁽⁹⁷⁾. Μεταξύ των μη τυχαιοποιημένων μελετών, άλλες αναφέρουν υψηλότερα ποσοστά κυήσεων και ζώντων γεννήσεων και χαμηλότερα ποσοστά αποβολών ενώ άλλες δεν αναφέρουν διαφορές⁽⁹¹⁾. Η πρώτη μετανάλυση των αποτελεσμάτων της εφαρμογής IMSI σε σύγκριση με ICSI, ανέδειξε μη σημαντικές διαφορές στα ποσοστά γονιμοποίησης, στατιστικά σημαντική αύξηση (με IMSI) των ποσοστών εμφύτευσης (OR: 2.72; 95% CI: 1.50-4.95) και κύησης (OR: 3.12; 95% CI: 1.55-6.26) καθώς και στατιστικά σημαντική ελάττωση των ποσοστών αποβολών (OR: 0.42, 95%CI: 0.23-0.78)⁽⁹²⁾.

Ενδιαφέρον παρουσιάζουν επίσης τα αποτελέσματα από την εφαρμογή του IMSI σε πιο εξειδικευμένες κατηγορίες ζευγαριών. Έτσι, σε περιπτώσεις τερατοζωοσπερμίας, οι Khez et al, ανέφεραν ότι το IMSI οδήγησε σε σημαντικά υψηλότερα ποσοστά κύησης (IMSI: 48% έναντι ICSI: 24%, $P < 0.05$), ενώ η γονιμοποίηση με σπερματοζωάρια χωρίς κυστίδια κεφαλής οδήγησε σε υψηλότερα ποσοστά ομαλών ζυγωτών, υψηλότερα ποσοστά σχηματισμού βλαστοκύστεων και μικρότερο ποσοστό αναστολής ανάπτυξης εμβρύων⁽⁹³⁾. Σε παρόμοιο πληθυσμό (σπέρμα με τερατοζωοσπερμία και/ή αυξημένη DNA κατάτμηση) η ομάδα μας επίσης διαπίστωσε στατιστικά σημαντική αύξηση των εμβρύων άριστης ποιότητας (IMSI: 58.80% έναντι ICSI: 51.63%), και των ποσοστών συνεχιζόμενων κυήσεων (IMSI: 45.16% έναντι ICSI: 27.41%) και στατιστικά σημαντική μείωση των ποσοστών αποβολών (IMSI: 9.67% έναντι ICSI: 32.0%)⁽⁹⁴⁾.

Μια άλλη ενδιαφέρουσα κατηγορία ζευγαριών στην οποία έχει μελετηθεί η εφαρμογή του IMSI, είναι εκείνα που παρουσιάζουν επαναλαμβανόμενες αποτυχιές εξωσωματικής (2-3 ή περισσότερες): Οι Delaroch et al σε πρόσφατη (2013) προοπτική μελέτη αναφέρουν πως η εφαρμογή IMSI στον καινούργιο κύκλο, οδήγησε σε στατιστικά σημαντική αύξηση του ποσοστού εμβρύων άριστης ποιότητας (IMSI: 89.8% έναντι ICSI: 79.8%, $p = 0.009$) και του αριθμού των βλαστοκύστεων (IMSI: 1.5 ± 1.9 έναντι ICSI: 1.0 ± 1.2 , $p = 0.03$), καθώς και σε συγκριτικά υψηλότερα ποσοστά κλινικών κυήσεων και γεννήσεων. Η ομάδα μας επίσης διαπίστωσε τάση για αύξηση των εμβρύων άριστης ποιότητας (IMSI: 58.11% έναντι ICSI: 47.94%) και των ποσοστών συνεχιζόμενων κυήσεων (IMSI: 25.71% έναντι ICSI: 17.14%), καθώς και τάση για μείωση του ποσοστού αποβολών (IMSI: 10.0% έναντι ICSI: 25.0%)⁽⁹⁴⁾. Οι Oliveira et al, διαπίστωσαν επίσης τάση για μείωση των ποσοστών αποβολών (IMSI: 15.3% έναντι ICSI: 31.7%), καθώς και τάση για αύξηση των ποσοστών συνεχιζόμενων κυήσεων (IMSI: 22% έναντι ICSI: 13%) και ζώντων γεννήσεων (IMSI: 21% έναντι ICSI: 12%)⁽⁹⁵⁾. Τέλος, οι Klement et al, ανέφεραν στατιστικά σημαντική αύξηση των ποσοστών κύησης (IMSI: 56% έναντι ICSI: 38%) και γεννήσεων (IMSI: 28% έναντι ICSI: 18%) επί εφαρμογής IMSI έπειτα από έναν αποτυχημένο κύκλο ICSI⁽⁹⁶⁾.

Συμπερασματικά, η εφαρμογή του IMSI αποτελεί μια νεώτερη εξέλιξη στην υποβοηθούμενη αναπαραγωγή με ενδείξεις ότι μπορεί να βελτιώσει τα κλινικά αποτελέσματα, τουλάχιστον σε συγκεκριμένες περιπτώσεις. Είναι προφανές ότι απαιτούνται περισσότερες τυχαίοποιημένες μελέτες ώστε να ισχυροποιηθούν οι ενδείξεις αυτές.

ΕΞΩΣΩΜΑΤΙΚΗ ΚΑΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΕΜΒΡΥΩΝ

Η αξιολόγηση της γονιμοποίησης πραγματοποιείται το επόμενο πρωί, οπότε και αναζητούνται τα δύο προπυρηνία: η αξιολόγηση για το στάδιο των δύο προπυρηνίων πρέπει να γίνει 17-20 ώρες μετά την γονιμοποίηση. Ακολούθως οι ζυγώτες μεταφέρονται σε τρυβλία με φρέσκο καλλιεργητικό υλικό και τοποθετούνται στον επωαστικό κλίβανο.

Κατά την 2^η ημέρα (48-54 ώρες μετά την ωοληψία), τα έμβρυα αξιολογούνται όποτε και είναι δυνατή η επιλογή εκείνων που θα μεταφερθούν. Η καθιερωμένη επιλογή γίνεται με βάση μορφολογικά κριτήρια, αλλά είναι αποδεκτό πως η συσχέτισή τους με τις πιθανότητες εμφύτευσης κάθε άλλο παρά απόλυτη είναι. Τα καθιερωμένα μορφολογικά κριτήρια για τα έμβρυα πρωίμων διαιρέσεων περιλαμβάνουν τον αριθμό, μέγεθος, σχήμα, συμμετρία και κυτταροπλασματική εμφάνιση των βλαστομεριδίων καθώς και την παρουσία κυτταροπλασματικών θραυσμάτων ⁽⁹⁷⁾. Με βάση αυτά τα κριτήρια τα έμβρυα ταξινομούνται ως ακολούθως: Βαθμίδα 1, έμβρυα με ισομεγέθη, ομαλά, σφαιρικά βλαστομερίδια, μέτρια διαθλαστικότητα, ακέραια ζώνη και <10% θραύσματα. Βαθμίδα 2, έμβρυα με ανισομεγέθη ή ανώμαλα βλαστομερίδια, ήπια διαταραχή διαθλαστικότητας και <10% θραύσματα. Βαθμίδα 3, έμβρυα με θραύσματα σε <50% των βλαστομεριδίων, με τα υπόλοιπα βλαστομερίδια να είναι σε σχετικά καλή κατάσταση, και ακέραιη ζώνη. Βαθμίδα 4, έμβρυα με θραύσματα σε >50% των βλαστομεριδίων και ποικίλη διαθλαστικότητα, με τα υπόλοιπα βλαστομερίδια να φαίνονται βιώσιμα. Βαθμίδα 5, ζυγώτες στο στάδιο των 2 προπυρηνίων κατά την 2^η ημέρα. Βαθμίδα 6, μη βιώσιμα έμβρυα, που εμφανίζουν λύση και σκούρα βλαστομερίδια. Όσον αφορά τα θραύσματα, φαίνεται πως και οι επιμέρους τύποι αυτών (5 τύποι) συσχετίζονται με τις πιθανότητες εμφύτευσης ⁽⁹⁸⁾.

Για την αξιολόγηση των εμβρύων στο στάδιο της βλαστοκύστης λαμβάνονται υπόψη τα ακόλουθα: α) Μορφολογία/εξέλιξη: 1= Πρώιμη βλαστοκύστη (η κοιλότητα καταλαμβάνει λιγότερο του 50% του όγκου του εμβρύου, 2= Βλαστοκύστη (η κοιλότητα καταλαμβάνει \geq του 50% του εμβρύου, 3= Πλήρης βλαστοκύστη (η κοιλότητα καταλαμβάνει πλήρως το έμβρυο), και 4= Ανεπτυγμένη (Expanded) βλαστοκύστη (η κοιλότητα είναι μεγάλη και η ζώνη έχει αρχίσει να λεπτύνεται. β) Αξιολόγηση της έσω κυτταρικής μάζας: A= πολλά κύτταρα σε πυκνή συσσώρευση, B= αρκετά κύτταρα σε χαλαρή συσσώρευση, και C= πολύ λίγα κύτταρα. γ) Αξιολόγηση τροφεκτοδέρματος: A= πολλά κύτταρα που σχηματίζουν συνεκτικό επιθήλιο, B= λίγα κύτταρα που σχηματίζουν αραιό επιθήλιο, και C= πολύ λίγα μεγάλα κύτταρα ⁽⁹⁹⁾.

Σχηματικά, ένα 'καλό' έμβρυο θα πρέπει να ακολουθεί την εξής 'πορεία':

- 18-19 ώρες μετά την γονιμοποίηση: Στάδιο 2 προπυρηνίων
- 25-26 ώρες μετά την γονιμοποίηση: το έμβρυο πρέπει να είναι στο στάδιο 2 κυττάρων με ίσα

βλαστομερίδια και απουσία θραυσμάτων

- 42-44 ώρες μετά την γονιμοποίηση: το έμβρυο πρέπει να έχει 4 ή περισσότερα βλαστομερίδια, λιγότερο από 20% θραύσματα και απουσία πολυπυρηνικών βλαστομεριδίων.
- 66-68 ώρες μετά την γονιμοποίηση: το έμβρυο πρέπει να έχει 8 ή περισσότερα βλαστομερίδια, λιγότερο από 20% θραύσματα και απουσία πολυπυρηνικών βλαστομεριδίων.
- 106-108 ώρες μετά την γονιμοποίηση: η κοιλότητα της βλαστοκύστης πρέπει να είναι πλήρης, η έσω κυτταρική μάζα πρέπει να είναι κυτταροβριθής με πυκνή συσσώρευση και τα τροφεκτοδερμικά κύτταρα πρέπει να είναι πολλά και συνεκτικά.

Η σχετική δυσαρμονία μεταξύ των παραπάνω 'στατικών' μορφολογικών κριτηρίων αξιολόγησης των εμβρύων και της εμφυτευτικής τους ικανότητας, οδήγησε στην αναζήτηση άλλων μεθόδων αξιολόγησης με σκοπό την επιλογή του/των καλύτερων εμβρύων για μεταφορά.

Μια σχετικά καινούργια και πολλά υποσχόμενη μέθοδος, στηρίζεται στην παραδοχή ότι η αξιολόγηση του εμβρύου στις παραπάνω αναφερθείσες χρονικές στιγμές δεν μπορεί να αντικατοπτρίσει την δυναμική διαδικασία της εξέλιξής του: πρόσφατες παρατηρήσεις επιβεβαιώνουν ότι η βαθμολόγηση ενός εμβρύου μπορεί να μεταβληθεί σημαντικά μέσα σε λίγες μόνο ώρες ⁽¹⁰⁰⁾, ενώ αν θελήσουμε να παρακολουθούμε και να βαθμολογούμε συχνότερα τα έμβρυα θα πρέπει να ανοιγοκλείνουμε συχνότερα τον επωαστικό κλίβανο με αποτέλεσμα ανεπιθύμητες και ίσως καταστροφικές διαταραχές σε παραμέτρους όπως θερμοκρασία, υγρασία και σύσταση αερίου ⁽¹⁰¹⁾. Έτσι, αναπτύχθηκε η μέθοδος παρακολούθησης και καταγραφής της εξέλιξης του εμβρύου σε διαδοχικά προκαθορισμένα χρονικά σημεία μέσω ειδικής κάμερας που βρίσκεται εντός του επωαστικού κλιβάνου. Μια σειρά από χρονικές στιγμές και διάρκειες στην εξέλιξη του εμβρύου έχουν συσχετισθεί με την ικανότητα εμφύτευσης και την πιθανότητα κύησης, όπως: η 1η διαίρεση/χρονικό σημείο σταδίου 2 κυτάρων, η ταχεία και συγχρονισμένη επανεμφάνιση του πυρήνα μετά την 1η διαίρεση, η πρώιμη 2^η διαίρεση/χρονικό σημείο σταδίου 3 κυτάρων, η διάρκεια του σταδίου 2 κυτάρων, το διάστημα μεταξύ 2^{ης} και 3^{ης} διαίρεσης, το χρονικό σημείο σταδίου 4 κυτάρων, και το χρονικό σημείο σταδίου 5 κυτάρων ^(102,103). Επιπλέον, η μέθοδος της συνεχούς καταγραφής φαίνεται να είναι ασφαλής, παρά τους φόβους ότι η απαιτούμενη συχνή έκθεση σε φως θα μπορούσε να είναι βλαπτική για τα έμβρυα ⁽¹⁰⁴⁾. Οι μελέτες συνεχίζονται καθώς φαίνεται πως έμβρυα με υψηλή αναπτυξιακή δυναμική ακολουθούν συγκεκριμένο πλάνο χρονικής εξέλιξης, ενώ ο συνδυασμός των 'στατικών' με τα 'δυναμικά' κριτήρια ίσως έχει ακόμα μεγαλύτερη προγνωστική αξία ⁽¹⁰³⁾.

Τέλος, σε μια άλλη κατεύθυνση, η επιλογή των 'καλών' εμβρύων θα μπορούσε να βοηθηθεί και με την εφαρμογή άλλου τύπου τεχνολογιών. Αυτές περιλαμβάνουν την μέτρηση γλυκόζης, γαλακτικού, πυρουβικού ή αμινοξέων στο καλλιεργητικό υγρό των εμβρύων, την αξιολόγηση της κατανάλωσης οξυγόνου από το έμβρυο, το γονιδιακό και πρωτεομικό προφίλ του εμβρύου, καθώς και την αναλυτική εξέταση του μεταβολικού προφίλ του εμβρύου ⁽¹⁰⁵⁾. Το τελευταίο, είναι δυνατόν να εκτιμηθεί στο καλλιεργητικό υγρό των εμβρύων με χρήση οπτικής και μη οπτικής φασματοσκόπησης. Διάφοροι ερευνητές έχουν αναπτύξει αλγόριθμους για την επιλογή των

πιο 'ανταγωνιστικών' εμβρύων βασιζόμενοι στην μεταβολική δραστηριότητά τους όπως αυτή αποτυπώνεται στους μεταβολίτες που ανιχνεύονται στο υγρό όπου καλλιιεργήθηκαν τα έμβρυα αυτά ^(106,107). Σημειώνεται, πως η μέθοδος αυτή έχει συμπληρωματικό και μόνο ρόλο στην αξιολόγηση των εμβρύων, μια και προς το παρόν η αξιολόγηση με τα μορφολογικά κριτήρια και τις κυτταρικές διαιρέσεις εξακολουθεί να αποτελεί την κύρια μέθοδο επιλογής.

ΕΜΒΡΥΟΜΕΤΑΦΟΡΑ

Α) Τεχνική εμβρυομεταφοράς

Αν και η βασική τεχνική εμβρυομεταφοράς παραμένει η ίδια από την εποχή της πρώτης περιγραφής της από τους Edwards et al το 1984 ⁽¹⁰⁸⁾, η συσσωρευόμενη εμπειρία έχει αποδείξει πως το βήμα αυτό αποτελεί ίσως την πιο κρίσιμη κλινική πράξη που μπορεί να επηρεάσει ουσιαστικά τα αποτελέσματα της εξωσωματικής ⁽¹⁰⁹⁾. Σήμερα, υπάρχει μια μεγάλη ποικιλία καθετήρων εμβρυομεταφοράς, μαλακοί ή σκληροί, με ή χωρίς οδηγό, με ή χωρίς ειδική διαμόρφωση της κορυφής για απομάκρυνση της τραχηλικής βλέννας, με ή χωρίς επένδυση από υπερηχογενές υλικό. Επίσης, υπάρχουν διαφορετικές απόψεις για το αν η εμβρυομεταφορά θα πρέπει να γίνεται υπό υπερηχογραφική καθοδήγηση ή όχι, έπειτα από δοκιμαστική εμβρυομεταφορά στον προηγούμενο κύκλο ή όχι, σε ένα ή σε δύο βήματα (δηλαδή, αφού εξασφαλισθεί πρώτα η είσοδος στην ενδομητρική κοιλότητα, ακολούθως να ζητείται από τον εμβρυολόγο να φέρει τον καθετήρα με τα έμβρυα), και πολλές άλλες.

Η σύριγγα που χρησιμοποιείται για την μεταφορά θα πρέπει να είναι κατασκευασμένη από υλικό αποδεδειγμένα μη τοξικό για τα έμβρυα και ο εμβρυολόγος θα πρέπει να είναι γνώστης των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών της σύριγγας που χρησιμοποιεί (π.χ. υπάρχουν σύριγγες που απαιτούν προσεκτική και ελεγχόμενη άσκηση πίεσης ώστε τα έμβρυα να μην 'εκπιναθούν' απότομα). Η ποσότητα του υγρού της μεταφοράς δεν θα πρέπει να είναι μεγάλη γιατί τότε αυξάνεται η πιθανότητα τα έμβρυα να μετακινηθούν προς τον τράχηλο ή πέριξ του καθετήρα ⁽¹¹⁰⁾. Ποσότητα υγρού γύρω στα 30 μl θεωρείται ικανοποιητική με τα έμβρυα να περιλαμβάνονται στα τελευταία 10 μl προς την κορυφή του καθετήρα. Τέλος, η τεχνική εισαγωγής φυσαλίδων αέρα στον καθετήρα εμβρυομεταφοράς δεν φαίνεται να επηρεάζει τα αποτελέσματα: σε πρόσφατη μετανάλυση, η σύγκριση των δύο τεχνικών (με ή χωρίς φυσαλίδες αέρα) δεν ανέδειξε διαφορές ως προς τα ποσοστά ζώντων γεννήσεων (OR: 1.34, 95%CI: 0.59-3.07), συνεχιζόμενων κύσεων (OR: 1.34, 95%CI: 0.59-3.07), κλινικών κύσεων (OR: 1.13, 95% CI: 0.70-1.83), εμφύτευσης, πολυδύμων κύσεων, αποβολών, έκτοπων κύσεων και επιστρεφόμενων (στον καθετήρα) εμβρύων ⁽¹¹¹⁾.

Παράμετροι που σχετίζονται με την τεχνική της εμβρυομεταφοράς και επηρεάζουν τα αποτελέσματα είναι η ατραυματική τεχνική (θετικά), η τοποθέτηση των εμβρύων στην μεσότητα της κοιλότητας (θετικά), η ταυτόχρονη υπερηχογραφική καθοδήγηση (θετικά), η παρουσία αίματος

στην κορυφή του καθετήρα (αρνητικά), και η παραμονή των εμβρύων εντός του καθετήρα για πάνω από 2 λεπτά (αρνητικά). Παράμετροι που δεν φαίνεται να επηρεάζουν τα αποτελέσματα είναι η άμεση απομάκρυνση του καθετήρα μετά την μεταφορά, η παρατεταμένη κατάκλιση μετά την διαδικασία, η διπλή εμβρυομεταφορά, και η σεξουαλική επαφή κατά τις ημέρες μετά την διαδικασία ⁽¹¹²⁾.

Η πραγματοποίηση της εμβρυομεταφοράς υπό υπερηχογραφική καθοδήγηση παρέχει αρκετά πλεονεκτήματα: επιτρέπει την όσο το δυνατόν ατραυματική εισαγωγή του καθετήρα, επιτρέπει την πραγματοποίηση μικροχειρισμών αν η δίοδος δια του τραχήλου είναι δύσκολη, επιβεβαιώνει την είσοδο του άκρου του καθετήρα στην ενδομητρική κοιλότητα, επιτρέπει την τοποθέτηση των εμβρύων στην ιδεατή θέση εντός της κοιλότητας (1,5-2 cm από τον πυθμένα), ενώ η γεμάτη ουροδόχος κύστη βοηθά στον ευθυσισμό του άξονα τραχήλου-σώματος μήτρας.

Έτσι, μια μεγάλη μετανάλυση του 2007 ανέδειξε ότι η μεταφορά υπό υπερηχογραφική καθοδήγηση συγκρινόμενη με την αντίστοιχη με 'κλινική αίσθηση' συνδυάζεται με στατιστικώς σημαντική αύξηση των ποσοτών ζώντων γεννήσεων (OR: 1.78, 95%CI: 1.19-2.67), συνεχιζόμενων κύσεων (OR: 1.51, 95%CI: 1.31-1.74), κλινικών κύσεων (OR: 1.50, 95%CI: 1.34-1.67), εμφύτευσης (OR: 1.35, 95%CI: 1.22-1.50), και 'εύκολων' μεταφορών (OR: 0.68, 95%CI: 0.58-0.81), ενώ δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στα ποσοστά πολυδύμων κύσεων, αποβολών και έκτοπων κύσεων ⁽¹¹³⁾. Το ίδιο θέμα διερεύνησε και η πρόσφατη Cochrane ανασκόπηση ⁽¹¹⁴⁾, η οποία ανέδειξε στατιστικώς σημαντική αύξηση των συνεχιζόμενων κύσεων επί εμβρυομεταφοράς υπό υπερηχογραφική καθοδήγηση (OR: 1.38, 95%CI: 1.16-1.64, P<0.0003) ως προς τα ποσοστά ζώντων γεννήσεων δεν παρατηρήθηκαν διαφορές, αλλά αυτό θα πρέπει να αξιολογηθεί με προσοχή γιατί τα δεδομένα προήλθαν από μία μόνο μελέτη και άλλες δύο προφορικές επικοινωνίες, ενώ και η ετερογένεια των μελετών ήταν υψηλή (64%).

Η πραγματοποίηση εμβρυομεταφοράς με γεμάτη ουροδόχο κύστη ώστε να ευθείάζεται παθητικά ο τράχηλος, φαίνεται να βελτιώνει τα αποτελέσματα και ως ανεξάρτητη παράμετρος: σε πρόσφατη μετανάλυση η εμβρυομεταφορά με γεμάτη κύστη συσχετίστηκε με στατιστικώς σημαντική αύξηση της πιθανότητας για συνεχιζόμενη (OR: 1.44, 95% CI: 1.04-2.04) και κλινική κύηση (OR: 1.55, 95%CI: 1.16-2.08) και με σημαντικά μικρότερη πιθανότητα 'δύσκολης' εμβρυομεταφοράς και χρήσης μηχανικών εργαλείων σύλληψης και ευθυσισμού του τραχήλου ⁽¹¹⁵⁾. Πάντως, τονίζεται πως σε πρόσφατη Cochrane ανασκόπηση ⁽¹¹⁶⁾, η γεμάτη κύστη δεν φάνηκε να συσχετίζεται με βελτίωση των αποτελεσμάτων. Παρομοίως, στην ίδια ανασκόπηση, παράγοντες που δεν συνδυάστηκαν με βελτίωση των αποτελεσμάτων ήταν: η απομάκρυνση της τραχηλικής βλέννας, η έκπλυση του ενδοτραχήλου και της ενδομητρικής κοιλότητας πριν την μεταφορά, ενώ δεν υπάρχουν αξιολογήσιμες μελέτες για την σημασία της πραγματοποίησης δοκιμαστικής εμβρυομεταφοράς σε προηγούμενο κύκλο, της αλλαγής θέσης της γυναίκας και της χρήσης λαβίδας σύλληψης τραχήλου ⁽¹¹⁶⁾.

Η σημασία του σημείου τοποθέτησης των εμβρύων αναζητήθηκε σε πρόσφατη μετανάλυ-

ση κατά την οποία τα ποσοστά ζώντων γεννήσεων και συνεχιζόμενων κυήσεων παρουσίασαν τάση αύξησης όταν η μεταφορά έγινε στο κατώτερο ήμισυ της κοιλότητας, ενώ όταν τα έμβρυα τοποθετήθηκαν περίπου 20 mm από τον πυθμένα όλα τα ποσοστά κυήσεων ήταν σημαντικά υψηλότερα σε σύγκριση με εκείνα όταν τα έμβρυα τοποθετήθηκαν περίπου στα 10 mm από τον πυθμένα ⁽¹¹⁷⁾.

Ο εμπλουτισμός του υγρού εμβρυομεταφοράς με υλικά που θεωρητικά ευνοούν την προσκόλληση των εμβρύων έχει επίσης δοκιμασθεί. Σε πρόσφατη Cochrane ανασκόπηση αναλύθηκαν τα αποτελέσματα 16 τυχαίοποιημένων μελετών με 3698 γυναίκες, στις 15 εκ των οποίων χρησιμοποιήθηκε το υαλουρονικό οξύ. Ο εμπλουτισμός με υαλουρονικό, δεν βρέθηκε να βελτιώνει τα ποσοστά ζώντων γεννήσεων, βρέθηκε όμως να αυξάνει τα ποσοστά κλινικών κυήσεων (OR: 1.41, 95%CI: 1.22-1.63, P<0.00001) και τα ποσοστά των πολυδύμων κυήσεων (OR: 1.86, 95%CI: 1.49 -2.31, P<0.00001)· πλην των ανωτέρω, ουδεμία άλλη επίδραση δεν διαπιστώθηκε ⁽¹¹⁸⁾. Το θέμα εξακολουθεί να είναι αμφιλεγόμενο· μετά την Cochrane ανασκόπηση, μια μελέτη ανέφερε αύξηση των ποσοστών κύησης σε γυναίκες με ιστορικό πολλών αποτυχιών εξωσωματικής (σε κύκλους διέγερσης: 37.5% με προσθήκη υαλουρονικού έναντι 10.9% στην ομάδα ελέγχου) ⁽¹¹⁹⁾, μια άλλη μελέτη ανέφερε τα αντίθετα, μείωση δηλαδή των ποσοστών ζώντων γεννήσεων με την χρήση embryoGlue (14.3% έναντι 39.3%) ⁽¹²⁰⁾, ενώ μια τρίτη μελέτη σε κύκλους απόψυξης ανέφερε αυξημένα ποσοστά θετικών χοριακών με την χρήση υαλουρονικού (37.2% έναντι 25.2%) που όμως οδήγησαν σε αυξημένα ποσοστά βιοχημικών κυήσεων (28.4% έναντι 8.9%) και τελικά σε αμετάβλητα ποσοστά ζώντων γεννήσεων (21.6% έναντι 21.2%) ⁽¹²¹⁾.

B) Στάδιο εμβρυομεταφοράς

Η εμβρυομεταφορά πραγματοποιείται πλέον είτε στο στάδιο των πρώιμων διαιρέσεων (έμβρυα 2^{ης} ή 3^{ης} ημέρας) είτε στο στάδιο της βλαστοκύστης (5^η ή 6^η ημέρα).

Η μεταφορά εμβρύων 2^{ης} ή 3^{ης} ημέρας αποτελούσε την μοναδική επιλογή για πολλά χρόνια (μέχρι την ανάπτυξη των συστημάτων καλλιέργειας βλαστοκύστεων). Η επιλογή των προς μεταφορά εμβρύων γίνεται με βάση εμβρυολογικά κριτήρια που περιλαμβάνουν στοιχεία από την μορφολογία του εμβρύου και τον αριθμό των κυτταρικών διαιρέσεων (βλέπε παραπάνω). Η καταγεγραμμένη εμπειρία από την μεταφορά εμβρύων 2^{ης} ή 3^{ης} ημέρας συγκεντρώθηκε σε Cochrane ανασκόπηση του 2004 όπου συμπεριλήφθηκαν 10 μελέτες με 2027 γυναίκες. Η σύγκριση δεν ανέδειξε σημαντικές διαφορές ως προς τα ποσοστά ζώντων γεννήσεων (3 μελέτες, OR: 1.07, 95% CI: 0.84-1.37) και συνεχιζόμενων κυήσεων (4 μελέτες, OR: 1.05, 95% CI: 0.83-1.32). Ως προς τα ποσοστά κλινικών κυήσεων, ανεδείχθη μια οριακά σημαντική αύξηση επί μεταφορών 3^{ης} ημέρας (10 μελέτες, OR: 1.26, 95%CI: 1.06-1.51) που αφορούσε τις περιπτώσεις όπου εφαρμόσθηκε ICSI· η ευνοϊκή αυτή επίδραση συνδυάσθηκε όμως με αυξημένο

ποσοστό αποβολών, με τελικό αποτέλεσμα την τελική παρατήρηση παρομοίων ποσοστών ζώτων γεννήσεων για τις δύο συγκρινόμενες ομάδες.

Η παρασκευή κατάλληλων καλλιεργητικών υλικών, επέτρεψε την παρατεταμένη καλλιέργεια των εμβρύων έως το στάδιο της βλαστοκύστης. Υπάρχουν δύο κατηγορίες καλλιεργητικών υγρών. Αυτά που περιλαμβάνουν διαφορετικά διαδοχικά καλλιεργητικά (sequential culture media) ⁽¹²²⁾ και αυτά που έχουν μόνο ένα τύπο καλλιεργητικού υγρού (single step media) ⁽¹²³⁾. Η καλλιέργεια βλαστοκύστεων και η μεταφορά στο στάδιο αυτό έχει αρκετά θεωρητικά πλεονεκτήματα όπως την υψηλότερη εμφυτευτική ικανότητα των βλαστοκύστεων, την δυνατότητα μείωσης του αριθμού των μεταφερομένων εμβρύων, την δυνατότητα επιλογής των 'καλύτερων' εμβρύων για μεταφορά, τον καλύτερο συγχρονισμό εμβρύου – ενδομητρίου κατά την εμβρυομεταφορά, και την δυνατότητα 'καθυστέρησης' της εμβρυομεταφοράς σε περιπτώσεις π.χ. προεμφυτευτικής γενετικής διάγνωσης μέχρι να έχουμε τα αποτελέσματα της εξέτασης. Λόγω των παραπάνω θεωρητικών πλεονεκτημάτων, η καλλιέργεια και μεταφορά βλαστοκύστεων αποτέλεσε ένα από τα πιο αμφιλεγόμενα και αντικρουόμενα θέματα στον τομέα της εξωσωματικής κατά τα τελευταία 15 χρόνια, με φανατικούς υποστηρικτές και φανατικούς πολέμιους. Μετά από εκατοντάδες δημοσιεύσεις και ανακοινώσεις, η εμπειρία συμπυκνώνεται στις τελευταίες κατευθυντήριες οδηγίες που εξέδωσε η ASRM το 2008 καθώς και στην πλέον πρόσφατη (έτος 2012) Cochrane ανασκόπηση.

Σύμφωνα με την ASRM για την καλλιέργεια και μεταφορά βλαστοκύστεων ισχύουν τα ακόλουθα: Δεν υπάρχουν αξιόπιστα κριτήρια αναγνώρισης των εμβρύων που θα καταφέρουν να καλλιεργηθούν έως το στάδιο των βλαστοκύστεων. Σε κλινικές μελέτες επί του γενικού πληθυσμού των ζευγαριών που κάνουν εξωσωματική, η μεταφορά βλαστοκύστεων δεν φαίνεται να αυξάνει τα ποσοστά ζώτων γεννήσεων σε σύγκριση με την μεταφορά εμβρύων 2^{nc}-3^{nc} ημέρας. Σε κλινικές μελέτες επί ζευγαριών καλής πρόγνωσης η μεταφορά βλαστοκύστεων φαίνεται να οδηγεί σε υψηλότερα ποσοστά ζώτων γεννήσεων σε σύγκριση με την μεταφορά ίσου αριθμού εμβρύων 2^{nc}-3^{nc} ημέρας. Τα αθροιστικά ποσοστά ζώτων γεννήσεων που προκύπτουν από την μεταφορά όλων των 'φρέσκων' και κατεψυγμένων εμβρύων που προέκυψαν από έναν κύκλο διέγερσης δεν φαίνεται να διαφέρουν αν τα έμβρυα είναι 2^{nc}-3^{nc} ημέρας ή βλαστοκύστες, και αυτό γιατί η παρατεταμένη καλλιέργεια περιορίζει τον αριθμό των διαθέσιμων εμβρύων για κρυσυντήρηση. Σε κλινικές μελέτες επί ζευγαριών πτωχής πρόγνωσης (με βάση την ηλικία της γυναίκας, τον αριθμό και την ποιότητα των εμβρύων) η μεταφορά βλαστοκύστεων όχι μόνο δεν αυξάνει αλλά ίσως και ελαττώνει τα ποσοστά ζώτων γεννήσεων. Η μεταφορά πολλών βλαστοκύστεων οδηγεί σε σημαντική αύξηση των πολυδύμων κύσεων, οπότε συστήνεται η μεταφορά μιας και μόνο βλαστοκύστης, ιδίως σε γυναίκες καλής πρόγνωσης. Τα ζευγάρια θα πρέπει να ενημερώνονται ότι η μεταφορά βλαστοκύστεων πιθανώς αυξάνει τα ποσοστά μονοζυγωτικών διδύμων. Τέλος, η επιτυχία με χρήση κρυσυντηρημένων βλαστοκύστεων ποικίλει σημαντικά ανάλογα με το εκάστοτε πρόγραμμα κρυσυντήρησης ⁽¹²⁴⁾.

Σύμφωνα με την τελευταία Cochrane ανασκόπηση ⁽¹²⁵⁾, σε 12 τυχαίοποιημένες μελέτες που κατέγραψαν ποσοστά ζώντων γεννήσεων φαίνεται πως η μεταφορά βλαστοκύστεων οδήγησε σε στατιστικά σημαντική αύξησή τους (1510 γυναίκες, Peto OR: 1.40, 95% CI: 1.13-1.74) (έμβρυα 2^{nc}-3^{nc} ημέρας: 31% έναντι εμβρύων 5^{nc}-6^{nc} ημέρας: 38.8%). Αυτό σημαίνει πως αν με μεταφορά εμβρύων 2^{nc}-3^{nc} ημέρας το ποσοστό ήταν 31%, η μεταφορά βλαστοκύστεων θα το αύξανε στο 32-42%. Σε 23 τυχαίοποιημένες μελέτες που κατέγραψαν ποσοστά κλινικών κυήσεων δεν υπήρξε διαφορά μεταξύ μεταφοράς εμβρύων 2^{nc}-3^{nc} ημέρας και βλαστοκύστεων (Peto OR: 1.14, 95% CI: 0.99-1.32) (έμβρυα 2^{nc}-3^{nc} ημέρας: 38.6% έναντι εμβρύων 5^{nc}-6^{nc} ημέρας: 41.6%). Σε 13 τυχαίοποιημένες μελέτες που κατέγραψαν ποσοστά αποβολών, δεν υπήρξε διαφορά μεταξύ μεταφοράς εμβρύων 2^{nc}-3^{nc} ημέρας και βλαστοκύστεων (Peto OR: 1.18, 95% CI: 0.86-1.60). Σε 4 τυχαίοποιημένες μελέτες που κατέγραψαν αθροιστικά ποσοστά επιτυχίας (φρέσκος και επόμενοι κύκλοι απόψυξης εμβρύων μιας διέγερσης) η μεταφορά εμβρύων 2^{nc}-3^{nc} ημέρας οδήγησε σε στατιστικά σημαντικά καλύτερα αποτελέσματα (Peto OR: 1.58, 95% CI: 1.11-2.25) (έμβρυα 2^{nc}-3^{nc} ημέρας: 56.8% έναντι εμβρύων 5^{nc}-6^{nc} ημέρας: 46.3%). Τέλος, επί μεταφοράς εμβρύων 2^{nc}-3^{nc} ημέρας, τα ποσοστά κρυσουινήρησης εμβρύων ήταν σημαντικά υψηλότερα (11 μελέτες, 1729 γυναίκες, Peto OR: 2.88, 95% CI: 2.35-3.51) ενώ οι ακυρώσεις εμβρυομεταφοράς λόγω μη διαθεσίμων εμβρύων ήταν σημαντικά λιγότερες (16 μελέτες, 2459 γυναίκες, OR: 0.35, 95% CI: 0.24-0.51) (έμβρυα 2^{nc}-3^{nc} ημέρας: 3.4% έναντι εμβρύων 5^{nc}-6^{nc} ημέρας 8.9%). Συμπερασματικά, φαίνεται πως η μεταφορά βλαστοκύστεων στο σύνολο των γυναικών καλής πρόγνωσης που κάνουν εξωσωματική συσχετίζεται μια μικρή στατιστικά σημαντική αύξηση του ποσοστού ζώντων γεννήσεων που όμως δεν διατηρείται αν τα αποτελέσματα εκφραστούν σαν αθροιστικά ποσοστά συμπεριλαμβάνοντας και τους ακόλουθους κύκλους απόψυξης. Επομένως, η απόφαση για μεταφορά στο στάδιο της βλαστοκύστης θα πρέπει να είναι πλήρως εξατομικευμένη.

Γ) Υποβοηθούμενη Εκκόλαψη

Η εκκόλαψη του εμβρύου από την περιβάλλουσα ζώνη αποτελεί ένα κρίσιμο προσαρμοσμένο στάδιο για την επιτυχή εμφύτευσή του στο υποδοκτικό ενδομήτριο. Επομένως, η δυσκολία/αποτυχία εκκόλαψης θα μπορούσε θεωρητικά να επηρεάσει την αποτελεσματικότητα τόσο της φυσικής όσο και της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής ⁽¹²⁶⁾. Έτσι, έχει προταθεί πως η τεχνητή δημιουργία μιας οπής ή η λέπτυνση της ζώνης του εμβρύου πριν την μεταφορά του θα μπορούσε να διευκολύνει την διαδικασία της εκκόλαψης και να βοηθήσει την εμφύτευση. Η υποβοηθούμενη εκκόλαψη (ΥΕ) μπορεί να γίνει με μηχανικό τρόπο, με χημικά μέσα ή με την εφαρμογή laser ⁽¹²⁷⁾.

Η τελευταία κατευθυντήριος οδηγία από την ASRM εκδόθηκε το 2008 και αναφέρει πως τα δημοσιευθέντα δεδομένα δεν συνηγορούν υπέρ της εφαρμογής ΥΕ ως ρουτίνα στον γενικό πληθυσμό των ζευγαριών που κάνουν εξωσωματική. Η εφαρμογή της τεχνικής ίσως είναι κλινι-

κά ευνοϊκή για ζευγάρια πτωχής πρόγνωσης όπως, ζευγάρια με ≥ 2 προηγούμενες αποτυχίες, που έχουν έμβρυα κακής ποιότητας, ή που η ηλικία της γυναίκας είναι ≥ 38 έτη ⁽¹²⁸⁾.

Επίσης, το 2012 δημοσιεύθηκε και η πλέον πρόσφατη Cochrane ανασκόπηση της καταγεγραμμένης εμπειρίας από την εφαρμογή της ΥΕ, που περιέλαβε 31 μελέτες με 5278 γυναίκες και 1992 κλινικές κυήσεις ⁽¹²⁹⁾. Γενικά, δεν διαπιστώθηκε σημαντική διαφορά στις πιθανότητες ζώντων γεννήσεων μεταξύ των ομάδων ΥΕ και ελέγχου (9 τυχαιοποιημένες μελέτες, OR: 1.03, 95%CI: 0.85-1.26, μέτρια ποιότητα απόδειξης χωρίς σημαντική ετερογένεια μελετών), ενώ στις ίδιες αυτές μελέτες (που κατέγραψαν αποτελέσματα ζώντων γεννήσεων) δεν διαπιστώθηκε διαφορά ούτε στις πιθανότητες κλινικών κυήσεων (OR: 1.03, 95%CI: 0.85-1.25). Η ανάλυση των αποτελεσμάτων από όλες τις 31 μελέτες της ανασκόπησης ανέδειξε μια μικρή μόνο βελτίωση των ποσοστών κλινικών κυήσεων στην ΥΕ ομάδα με οριακή στατιστική σημαντικότητα (OR: 1.13, 95% CI: 1.01-1.27, μέτρια ποιότητα απόδειξης) που σκιάζεται από την συνύπαρξη στατιστικά σημαντικής ετερογένειας ($P=0.001$). Η ανάλυση υποομάδων ανέδειξε πως η εφαρμογή ΥΕ σε γυναίκες με προηγούμενη αποτυχημένη προσπάθεια IVF βελτίωσε τα ποσοστά κλινικών κυήσεων σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (9 τυχαιοποιημένες μελέτες, OR: 1.42, 95%CI: 1.11-1.81). Τέλος, τα ποσοστά αποβολών ήταν συγκρίσιμα μεταξύ των ομάδων ΥΕ και ελέγχου (14 τυχαιοποιημένες μελέτες, OR: 1.03, 95%CI: 0.69-1.54, $P=0.90$, μέτρια ποιότητα απόδειξης), ενώ τα ποσοστά πολυδύμων κυήσεων ήταν στατιστικά σημαντικά αυξημένα στην ομάδα ΥΕ (14 τυχαιοποιημένες μελέτες, 3447 γυναίκες, OR: 1.38, 95% CI: 1.11-1.70, $P=0.004$, χαμηλής ποιότητας απόδειξη).

Επομένως, έπειτα και από την παραπάνω ανασκόπηση, φαίνεται πως ακόμα και αν αποδεχθούμε την οριακή βελτίωση του ποσοστού κλινικών κυήσεων, η εφαρμογή της ΥΕ στον γενικό, τουλάχιστον, πληθυσμό των γυναικών που υποβάλλονται σε εξωσωματική, δεν αυξάνει τελικά την πιθανότητα γέννησης, που είναι και το απόλυτο ζητούμενο, ενώ μάλλον αυξάνει την πιθανότητα πολυδύμων κυήσεων και μάλιστα μονοζυγωτικών διδύμων ⁽¹³⁰⁾. Η εφαρμογή ΥΕ θα πρέπει να εφαρμόζεται με εξατομικευμένα κριτήρια και σε συγκεκριμένες ομάδες γυναικών, ενώ μεταξύ των διαφόρων τεχνικών, ίσως η ΥΕ με laser είναι ασφαλέστερη και αποδοτικότερη ⁽¹²⁷⁾.

ΥΠΟΣΤΗΡΙΞΗ ΩΧΡΙΝΙΚΗΣ ΦΑΣΗΣ

Η υποστήριξη της ωχρινικής φάσης είναι απαραίτητη στους κύκλους εξωσωματικής όπου έγινε ελεγχόμενη ωθητική διέγερση με πρωτόκολλα GnRH αγωνιστών ή ανταγωνιστών. Σε φυσικούς κύκλους το ωχρο σωματίο παράγει προγεστερόνη η οποία είναι απολύτως αναγκαία για την επίτευξη κύησης, ενώ η λειτουργία του ωχρού σωματίου βασίζεται στην δράση της υποφυσιακής LH ⁽¹³¹⁾. Επομένως, όταν έχει χορηγηθεί GnRH αγωνιστής για την αποφυγή αιχμών LH σε πρωτόκολλα διέγερσης και με δεδομένο ότι μετά την επίτευξή της η καταστολή της υπόφυσης μπορεί να διαρκέσει 2-3 εβδομάδες ⁽¹³²⁾, είναι προφανές ότι η λειτουργία των ωχρών σωματίων θα είναι μειονεκτική.

Επίσης, και η χορήγηση ανταγωνιστών, παρότι η ανασταλτική τους επίδραση είναι βραχύτερη, συνδεύεται από μειονεκτική λειτουργία των ωχρών σωματίων⁽¹³³⁾. Για την υποστήριξη της ωχρινικής φάσης στα προγράμματα εξωσωματικής κορηγείας προγεστερόνη (κολπικώς ως γέλη ή δισκία, από του στόματος, ή ενδομυϊκώς) ή/και ενέσιμη χοριακή γοναδοτροπίνη (HCG). Η χρήση της HCG έχει περιοριστεί σημαντικά λόγω του αυξημένου κινδύνου συνδρόμου υπερδιέγερσης ωθηκών στον οποίο προδιαθέτει. Η υποστήριξη με προγεστερόνη καλό θα είναι να συνεχίζεται μέχρι την 5^η εβδομάδα μετά την εμβρυομεταφορά, ενώ δεν χρειάζεται πέραν της 7^{ης} εβδομάδας μετά την εμβρυομεταφορά (δηλαδή μετά την 9^η εβδομάδα κύησης)⁽¹³⁴⁾. Η συνήθης δοσολογία της προγεστερόνης είναι 200 mg x 3 την ημέρα για τα κολπικά δισκία ή 90 mg x 1-2 την ημέρα για την κολπική γέλη 8% ή 50-100 mg x 1 ενδομυϊκώς· η έναρξη της χορήγησης ποικίλει στα διάφορα πρωτόκολλα από την ημέρα της ωοληψίας έως την ημέρα της εμβρυομεταφοράς. Πάντως, η ιδεατή ημέρα έναρξης της προγεστερόνης δεν έχει ακόμα καθορισθεί, καθώς λίγες τυχαίοποιημένες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί μέχρι σήμερα. Αν και μια παλαιότερη μελέτη έδειξε πως η έναρξη της προγεστερόνης κατά την ημέρα της ωοληψίας συνδυάζεται με λιγότερες συσπάσεις μήτρας κατά την εμβρυομεταφορά⁽¹³⁵⁾, επόμενες μελέτες δεν ανέδειξαν διαφορές ως προς τα ποσοστά κλινικών και συνεχιζόμενων κυήσεων ή ζώντων γεννήσεων^(136,137)· μία μόνο μελέτη ανέφερε μειωμένα ποσοστά κύησης όταν η χορήγηση ξεκίνησε 6 ημέρες μετά την ωοληψία⁽¹³⁸⁾. Εφόσον επιλεγεί η υποστήριξη με HCG χορηγούνται 1500 IU κάθε 3 ημέρες για 3-4 φορές.

Το 2011 δημοσιεύθηκε η πιο πρόσφατη Cochrane ανασκόπηση όλων των μελετών σχετικά με την φαρμακευτική υποστήριξη της ωχρινικής φάσης στους 'φρέσκους' κύκλους εξωσωματικής συμπεριλαμβάνοντας 69 μελέτες και 16327 γυναίκες⁽¹³⁹⁾. Σε 5 μελέτες (746 γυναίκες) έγινε σύγκριση υποστήριξης με ενέσις HCG έναντι placebo ή μη χορήγησης αγωγής· δεν παρατηρήθηκαν διαφορές, με εξαίρεση τα ποσοστά συνεχιζόμενων κυήσεων που ήταν σημαντικά αυξημένα επί χορήγησης HCG (Peto OR: 1.75, 95%CI: 1.09-2.81) και τα ποσοστά συνδρόμου υπερδιέγερσης που ως αναμενόμενα ήταν σημαντικά αυξημένα επί χορήγησης HCG (Peto OR: 3.62, 95%CI: 1.85-7.06). Σε 8 μελέτες (875 γυναίκες) έγινε σύγκριση υποστήριξης με προγεστερόνη έναντι placebo ή μη χορήγησης αγωγής· με την χορήγηση προγεστερόνης παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση των ποσοστών ζώντων γεννήσεων (1 μελέτη, Peto OR: 2.95, 95%CI: 1.02-8.56) καθώς και των ποσοστών κλινικών κυήσεων (7 μελέτες, Peto OR: 1.83, 95%CI: 1.29-2.61)· ως προς τις άλλες παραμέτρους δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές. Σε 15 μελέτες (2117 γυναίκες) έγινε σύγκριση υποστήριξης με προγεστερόνη έναντι υποστήριξης με HCG ή συνδυασμό HCG και προγεστερόνης: τα αποτελέσματα δεν έδειξαν ουδεμία διαφορά με εξαίρεση τα ποσοστά συνδρόμου υπερδιέγερσης, που όπως αναμενόμενα ήταν αυξημένα επί χορήγησης HCG· επίσης η σύγκριση των ομάδων προγεστερόνης έναντι προγεστερόνης και HCG ανέδειξε σημαντικό όφελος από την προγεστερόνη (Peto OR: 0.45, 95%CI: 0.26-0.79). Σε 9 μελέτες (1571 γυναίκες) έγινε σύγκριση υποστήριξης με προγεστερόνη έναντι συνδυασμού προγεστερόνης και οιστρογόνων, και τα αποτελέσματα αναλύθηκαν και με βάση την οδό χορήγησης: παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικά αυξημένα ποσοστά κλινικών κυήσεων στην ομάδα υποστήριξης με προγεστερόνη και

διαδερμικά οιστρογόνα σε σύγκριση με μόνο προγεστερόνη, ενώ δεν παρατηρήθηκαν διαφορές σε άλλες παραμέτρους. Σε 6 μελέτες (1646 γυναίκες) έγινε σύγκριση υποστήριξης με προγεστερόνη έναντι συνδυασμού προγεστερόνης και GnRH αγωνιστή (σε μία ή πολλαπλές δόσεις): στην ομάδα συνδυασμού παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικά αυξημένα ποσοστά ζώντων γεννήσεων (Peto OR: 2.44, 95%CI: 1.62-3.67), κλινικών κυήσεων (Peto OR: 1.36, 95%CI: 1.11-1.66) και συνεχιζόμενων κυήσεων (Peto OR: 1.31, 95%CI: 1.03-1.67) ως προς τα ποσοστά αποβολών και πολυδύμων κυήσεων δεν εντοπίστηκαν σημαντικές διαφορές. Σε 32 μελέτες (9839 γυναίκες) έγινε σύγκριση των διαφόρων οδών χορήγησης προγεστερόνης (ενδομυϊκή έναντι από το στόμα, ενδομυϊκή έναντι από τον κόλπο ή ορθό, από τον κόλπο ή ορθό έναντι από το στόμα, μικρή δόση κολπικώς έναντι μεγάλης δόσης κολπικώς, καθαρής έναντι συνθετικής προγεστερόνης): γενικώς δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές ως προς τα αποτελέσματα εκτός από μια σημαντική αύξηση των κλινικών κυήσεων επί χορήγησης συνθετικής έναντι καθαρής προγεστερόνης (Peto OR: 0.79, 95%CI: 0.65-0.96) και σημαντική μείωση των πολυδύμων κυήσεων επί χορήγησης από του στόματος έναντι ενδομυϊκής προγεστερόνης (Peto OR: 4.39, 95%CI: 1.28-15.01). Τα τελικά συμπεράσματα της ανασκόπησης, είναι πως αναδεικνύεται μια σαφής υπεροχή της υποστήριξης της ωχρινικής φάσης με προγεστερόνη και ιδίως της συνθετικής μορφής, ανεξαρτήτως οδού και διάρκειας χορήγησης. Επίσης, η προσθήκη ή μονοθεραπεία με HCG αυξάνει τον κίνδυνο συνδρόμου υπερδιέγερσης, ενώ η προσθήκη GnRH αγωνιστή φαίνεται να βελτιώνει τα αποτελέσματα.

Πλην των ανωτέρω, κατά την περίοδο μετά την ωοληψία και έως την διαπίστωση ή μη κύησης έχουν χρησιμοποιηθεί και άλλες φαρμακευτικές ουσίες. Η χορήγηση αντιβιοτικών έχει προταθεί για δύο λόγους: πρώτον, για την αποφυγή 'χειρουργικής' λοίμωξης μια και η ωοληψία αποτελεί μια μικροεπέμβαση που γίνεται διακολπικά και μάλιστα χωρίς να προηγηθεί αντισυψία του κόλπου, και δεύτερον για την αποστείρωση του ανώτερου γεννητικού συστήματος από πιθανό μικροβιακό αποικισμό. Όσον αφορά το πρώτο, συστήνεται από τους περισσότερους η εφάπαξ ενδοφλέβια χορήγηση κατά την ωοληψία ενός αντιβιοτικού ευρέος φάσματος ή η από του στόματος χορήγησή του για 4 ημέρες. Όσον αφορά το δεύτερο, δεν υπάρχει ομοφωνία. Κάποιοι υποστηρίζουν πως και η ίδια η πράξη της εμβρυομεταφοράς μπορεί να προδιαθέσει σε επιμόλυνση του ενδομητρίου από μικρόβια του ενδοτραχήλου που 'προωθούνται' με τον καθετήρα της εμβρυομεταφοράς προς τα άνω. Όπως είναι αντιληπτό, επί υιοθέτησης της παραπάνω άποψης, τα αντιβιοτικά θα πρέπει να χορηγηθούν και μετά την εμβρυομεταφορά. Το 2012 δημοσιεύθηκε μια Cochrane ανασκόπηση επί του θέματος κατά την οποία απομονώθηκαν 4 τυχαιοποιημένες μελέτες εκ των οποίων όμως οι 3 αποκλείστηκαν γιατί δεν πληρούσαν τα απαραίτητα κριτήρια: επομένως η ανασκόπηση στηρίχθηκε σε μια μόνο μελέτη κατά την οποία χορηγήθηκε αμοξυκιλλίνη και κλαβουλανικό οξύ και επί χορήγησης του συνδυασμού ενώ διαπιστώθηκε σημαντική μείωση του μικροβιακού αποικισμού (OR: 0.59, 95%CI: 0.37-0.95), δεν διαπιστώθηκε βελτίωση στα ποσοστά κλινικών κυήσεων σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου που δεν έλαβε αντιβιοτικά (36% έναντι 35.5%, OR: 1.02, 95%CI: 0.66-1.58). Επομένως, για την εξαγωγή αξιόπιστων συμπερασμάτων θα πρέπει να μελετηθεί αφενός η πιθανή επίδραση στα

ποσοστά ζώντων κυήσεων και αφετέρου η χορήγηση και άλλων τύπων αντιβιοτικών⁽¹⁴⁰⁾.

Ένας άλλος φαρμακευτικός χειρισμός που έχει χρησιμοποιηθεί στα πλαίσια της υποστήριξης της ωχρινικής φάσης, είναι η χορήγηση γλυκοκορτικοειδών. Το σκεπτικό είναι ότι τα γλυκοκορτικοειδή μπορούν θεωρητικά να βελτιώσουν το ενδομητρικό μικροπεριβάλλον δρώντας ανοσοτροποιοπικτικά ώστε, αφενός να μειωθούν να κύτταρα-φονείς και να ομαλοποιηθεί η έκφραση των κυτοκινών στο ενδομήτριο, και αφετέρου να κατασταλεί πιθανή φλεγμονώδης αντίδραση του ενδομητρίου. Η πιο πρόσφατη Cochrane ανασκόπηση επί του θέματος δημοσιεύθηκε το 2012 και περιέλαβε 14 μελέτες με 1879 ζευγάρια. Η χορήγηση γλυκοκορτικοειδών δεν συνδυάστηκε με σημαντική διαφορά στα ποσοστά ζώντων γεννήσεων (3 μελέτες, OR: 1.21, 95%CI: 0.67-2.19). Όσον αφορά τα ποσοστά κλινικών κυήσεων, ενώ στο σύνολο του πληθυσμού δεν παρατηρήθηκε καμία βελτίωση με τα γλυκοκορτικοειδή (13 μελέτες, OR: 1.16, 95%CI: 0.94-1.44), στην υποομάδα 650 γυναικών στις οποίες έγινε απλή εξωσωματική γονιμοποίηση (και όχι ICSI) παρατηρήθηκε μια οριακά σημαντική αύξηση των ποσοστών με την χορήγησή τους (6 μελέτες, OR: 1.50, 95%CI: 1.05-2.13). Τέλος, δεν παρατηρήθηκαν παρενέργειες από την χορήγησή τους, αν και η καταγραφή τους δεν ήταν συνεπής. Η ευεργετική επίδραση που παρατηρήθηκε παραπάνω θα πρέπει να ερμηνευθεί με προσοχή λόγω του οριακού της σημαντικότητας, ενώ θα πρέπει να σημειωθεί ότι τα ανωτέρω αφορούν την χορήγηση γλυκοκορτικοειδών στον γενικό πληθυσμό των γυναικών που κάνουν εξωσωματική και δεν θα πρέπει να γενικεύονται για άλλες υποκατηγορίες όπως γυναίκες με αυτοαντισώματα, ανεξήγητη υπογονιμότητα ή επαναλαμβανόμενες αποτυχιές εμφύτευσης⁽¹⁴¹⁾.

Η χορήγηση ασπιρίνης σε χαμηλές δόσεις αποτελεί έναν ακόμα εμπειρικό χειρισμό κατά την υποστήριξη της ωχρινικής φάσης, που έχει ευρέως υιοθετηθεί. Στην πρόσφατη Cochrane ανασκόπηση που περιέλαβε 13 μελέτες με 2653 γυναίκες, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στα αποτελέσματα μεταξύ των ομάδων χορήγησης ασπιρίνης και ελέγχου' πιο συγκεκριμένα διαπιστώθηκαν συγκρίσιμα ποσοστά ζώντων γεννήσεων (3 μελέτες, 1053 γυναίκες, Σχετικός Κίνδυνος: 0.91, 95%CI: 0.72-1.15), κλινικών κυήσεων (10 μελέτες, 2142 γυναίκες, Σχετικός Κίνδυνος: 1.03, 95%CI: 0.91-1.17), αποβολών (5 μελέτες, 1497 γυναίκες, Σχετικός Κίνδυνος: 1.10, 95%CI: 0.68-1.77), και έκτοπων κυήσεων (3 μελέτες, 1135 γυναίκες, Σχετικός Κίνδυνος: 1.86, 95% CI: 0.75-4.63)⁽¹⁴²⁾.

ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΕΜΒΡΥΩΝ ΚΑΙ ΩΑΡΙΩΝ

Η κρυοσυντήρηση των εμβρύων αποτελεί μια ευρέως εφαρμοζόμενη στρατηγική, που εξασφαλίζει πληθώρα πλεονεκτημάτων. Εφαρμόζεται για τα πλεονάζοντα έμβρυα καλής ποιότητας ενός 'φρέσκου' κύκλου, ή και για το σύνολο των παραθέντων εμβρύων σε περιπτώσεις που δεν ακολουθεί εμβρυομεταφορά, όπως π.χ. επί κινδύνου σοβαρής μορφής συνδρόμου υπερδιέγερσης. Η παλαιότερη και πλέον διαδεδομένη τεχνική κρυοσυντήρησης είναι αυτή της βραδείας κατάψυξης κατά την οποία τα έμβρυα αφού εκτεθούν σε προοδευτικά αυξανόμενες συγκεντρώσεις κρυοπροστατευτικού υλικού τοποθετούνται σε ειδικά καλαμάκια που ψύχονται

προοδευτικά (π.χ. με ρυθμό $-2.0^{\circ}\text{C}/\text{λεπτό}$ ως τους -7°C και στην συνέχεια με ρυθμό -0.3°C έως τους -30°C) και τελικά βυθίζονται στο υγρό άζωτο (-196°C). Όταν έρθει η ώρα της απόψυξης, τα καλαμάκια ζεσταίνονται σε υδατικό περιβάλλον περίπου 32°C για 60 δευτερόλεπτα και στη συνέχεια τα έμβρυα τοποθετούνται διαδοχικά σε υγρό με προοδευτικά ελαττωμένη συγκέντρωση κρυσταλλοπροστατευτικού υλικού. Για τις βλαστοκύστες η τεχνική είναι παρόμοια με κάποιες μικρές παραλλαγές. Γενικά, μια μονάδα εξωσωματικής που θέλει να έχει καλά αποτελέσματα, θα πρέπει να διαθέτει ένα αξιόπιστο και εύρυθμο πρόγραμμα κρυσταλλοπροστασίας.

Πιο πρόσφατα, αναπτύχθηκε και εφαρμόζεται η μέθοδος της υαλοποίησης (vitrification) κατά την οποία τα έμβρυα αφού εκτεθούν σε πυκνό διάλυμα κρυσταλλοπροστατευτικού ψύχονται ταχέως στο υγρό άζωτο. Υπάρχουν διάφορα εμπορικά συστήματα υαλοποίησης τα οποία είναι αποτελεσματικά για κατάψυξη ωαρίων, εμβρύων πρωίμων διαιρέσεων και βλαστοκύστεων. Τα περισσότερα συστήματα υαλοποίησης είναι 'ανοικτά', υπάρχει δηλαδή απευθείας έκθεση στο υγρό άζωτο αν και θεωρητικά υφίσταται κίνδυνος μετάδοσης παραγόντων από επιμολυσμένο άζωτο, τέτοιο συμβάν δεν έχει καταγραφεί. Γενικά, η μέθοδος της υαλοποίησης φαίνεται να υπερτερεί της βραδείας κατάψυξης γιατί οι τραυματισμοί λόγω σχηματισμού πάγου συμβαίνουν σπανιότερα, η επιβίωση των εμβρύων είναι καλύτερη εφόσον τηρηθούν σωστά τα πρωτόκολλα, ενώ ως τεχνική είναι απλούστερη, γρηγορότερη και δεν απαιτεί προγραμματιζόμενη συσκευή κατάψυξης.

Η μεταφορά των αποψυχθέντων εμβρύων μπορεί να γίνει σε φυσικό ή τεχνητό κύκλο. Στους φυσικούς κύκλους απόψυξης ο συγχρονισμός γίνεται με βάση στην αιχμή της LH και το στάδιο της κατάψυξης. Στους τεχνητούς κύκλους με ή χωρίς χορήγηση GnRH αγωνιστή (σε καθημερινή ή depot δόση), ο συγχρονισμός γίνεται με βάση την ημέρα έναρξης χορήγησης προγεστερόνης, αφού έχει προηγουμένως εξασφαλισθεί ενδομήτριο ικανού πάχους με χορήγηση οιστρογόνων από το στόμα ή διαδερμικώς. Πρόσφατη Cochrane ανασκόπηση μελετών ως προς τους τεχνητούς κύκλους, καταλήγει πως δεν φαίνεται να υπάρχει όφελος από την χρήση των GnRH αγωνιστών γενικώς, ούτε από την χρήση κάποιου συγκεκριμένου GnRH αγωνιστή ειδικότερα· επίσης δεν φαίνεται να υπάρχει σημαντική διαφορά από τις διαφορετικές οδούς χορήγησης προγεστερόνης (κολπικώς ή ενδομητρικώς), ούτε από την χορήγηση ή όχι ασπιρίνης, στεροειδών ή HCG⁽¹⁴³⁾.

Όσον αφορά τα κλινικά αποτελέσματα από την εφαρμογή των διαφόρων μεθόδων κρυσταλλοπροστασίας, πρόσφατη μετανάλυση 11 μελετών (πτωχής όμως ποιότητας), ανέδειξε ότι τα ποσοστά κλινικών κύσεων, συνεχιζόμενων κύσεων και εμφύτευσης ήταν σημαντικά υψηλότερα με την υαλοποίηση σε σύγκριση με την βραδεία κατάψυξη (OR: 1.55, 95%CI: 1.03-2.32 / OR: 1.82, 95%CI: 1.04-3.20 / OR: 1.49, 95%CI: 1.03-2.15, αντίστοιχα)⁽¹⁴⁴⁾. Σε άλλη πρόσφατη συστηματική ανάλυση των δημοσιευμένων μελετών, αναδείχθηκε πως η υαλοποίηση υπερτερεί της βραδείας κατάψυξης ως προς τα ποσοστά επιβίωσης κατά την απόψυξη τόσο των εμβρύων πρωίμων διαιρέσεων (OR: 6.35, 95%CI: 1.14-35.26) όσο και βλαστοκύστεων (OR: 4.09, 95%CI: 2.45-6.84), ενώ δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στα ποσοστά κλινικών κύσεων (OR: 1.66, 95%CI: 0.98-2.79)⁽¹⁴⁵⁾.

Ως προς την ασφάλεια των διαφόρων μεθόδων κρυσταλλοπροστασίας, πρόσφατη συστηματική

ανάλυση όλων των δημοσιευμένων μελετών κατέληξε πως για τα έμβρυα πρώιμων διαιρέσεων η μαιευτική έκβαση κύησης από κρυοσυντηρημένα έμβρυα ήταν καλύτερη ή τουλάχιστον η ίδια με εκείνη από 'φρέσκα' έμβρυα όσον αφορά τις πρόωρες γεννήσεις και τα χαμηλό βάρος γέννησης' παρόμοια ήταν επίσης και τα ποσοστά συγγενών ανωμαλιών. Για την βραδεία κατάψυξη βλαστοκύστεων καθώς και την υαλοποίηση εμβρύων, βλαστοκύστεων και ωαρίων τα δεδομένα ήταν ανεπαρκή για την έκφραση απόλυτων συμπερασμάτων ⁽¹⁴⁶⁾.

Η μέθοδος της υαλοποίησης δίνει εξαιρετικά αποτελέσματα και για την κρυοσυντήρηση ωαρίων τα οποία λόγω της υψηλής περιεκτικότητας του κυτταροπλάσματός τους σε ύδωρ είναι πιο ευάλωτα σε τραυματισμό από κρυστάλλους πάγου. Έτσι, η εμπειρία από την κρυοσυντήρηση-απόψυξη ωαρίων και την μετέπειτα γονιμοποίησή τους με ICSI συνεχώς μεγαλώνει και καθιστά την στρατηγική αυτή κορυφαίας σημασίας. Μάλιστα, η ASRM στην πλέον πρόσφατη κατευθυντήριο οδηγία της που εκδόθηκε το 2013 ⁽¹⁴⁷⁾, αφαιρέσει τον όρο 'πειραματική' από την τεχνική της κρυοσυντήρησης ωαρίων και ως ενδείξεις για την εφαρμογή της αναφέρει: α) ασθενείς που πρόκειται να λάβουν γοναδοτοξικές θεραπείες (χημειοθεραπεία ή/και ακτινοθεραπεία) στα πλαίσια αντιμετώπισης νεοπλασιών ή άλλων ασθενειών, β) ασθενείς που λόγω γενετικών διαταραχών επιβάλλεται να υποβληθούν σε ωθηκεκτομία (π.χ. BRCA μεταλλάξεις) ή προβλέπεται να εκδηλώσουν πρώιμη ωθηκική ανεπάρκεια (π.χ. σύνδρομο Turner ή προμεταλλάξεις ευθραύστου X), γ) ζευγάρια που δεν θέλουν ή δεν μπορούν να κρυοσυντηρήσουν έμβρυα, δ) περιπτώσεις που είναι αδύνατη η διάθεση σπέρματος την ημέρα της ωοληψίας, και ε) γυναίκες μέσης αναπαραγωγικής ηλικίας που επιθυμούν να καθυστερήσουν την τεκνοποίηση για κοινωνικούς λόγους. Στη μεγαλύτερη τυχαίοποιημένη μελέτη όπου συγκρίθηκε η χρήση φρέσκων έναντι υαλοποιημένων ωαρίων από δότριες σε 600 λίπτριες, αναφέρεται ποσοστό επιβίωσης ωαρίων κατά την απόψυξη 92.5%, και παρεμφερή ποσοστά γονιμοποίησης (74.2% έναντι 73.3% στα φρέσκα), ποσοστά εμφύτευσης (39.9% έναντι 40.9%), και ποσοστά κύησης ανά εμβρυομεταφορά (55.4% έναντι 55.6%) ⁽¹⁴⁸⁾. Επίσης, πρόσφατη μετανάλυση όλων των δημοσιευμένων μελετών δεν ανέδειξε διαφορές ως προς τα ποσοστά γονιμοποίησης και κύησης επί χρησιμοποίησης κρυοσυντηρημένων ωαρίων ⁽¹⁴⁹⁾. Βέβαια, με δεδομένο τον μικρό σχετικό αριθμό κύησης από κρυοσυντηρημένα ωάρια, θα πρέπει να διατηρηθεί μια επιφύλαξη για την ασφάλεια της μεθόδου, αν και θεωρείται απίθανο να προκύψουν προβλήματα.

ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΣΧΕΤΙΖΟΜΕΝΕΣ ΜΕ ΕΞΩΣΩΜΑΤΙΚΗ ΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ

A) Ενδοσαλπινγική Μεταφορά Γαμετών (Gamete Intrafallopian Transfer, GIFT)

Πρόκειται για τεχνική κατά την οποία η γυναίκα υποβάλλεται σε ελεγχόμενη ωθηκική διέγερση και ωοληψία, κατά τα συνήθη, εν συνεχεία όμως, την ίδια ημέρα της ωοληψίας υποβάλλεται σε λαπα-

ροσκόπηση, κατά την οποία εισάγεται στην περιτοναϊκή κοιλότητα ειδικός οδηγός δια του οποίου διέρχεται ο καθετήρας μεταφοράς των γαμετών. Οι γαμέτες αναρροφούνται σε σύριγγα που περιέχει καλλιερπητικό υλικό με σειρά σπερματοζωάρια- ωάρια- σπερματοζωάρια ή ωάρια-σπερματοζωάρια και διαμέσου του καθετήρα εισάγονται στον αυλό των σαλπίγγων, συνήθως αμφοτερόπλευρα. Μετά την εισαγωγή των γαμετών αποφεύγεται οποιαδήποτε περαιτέρω παρέμβαση στα πυελικά όργανα και η επέμβαση περατώνεται. Εννοείται πως για την εφαρμογή GIFT θα πρέπει να υφίσταται μία τουλάχιστον βαθιά σάλπιγγα και να μην υπάρχει σοβαρή oligospermia. Το GIFT ήταν αρκετά δημοφιλές τις δεκαετίες του '80 και '90⁽¹⁵⁰⁾, στις ημέρες μας όμως εφαρμόζεται σπανιότατα, λόγω των εξαιρετικών αποτελεσμάτων που επιτυγχάνονται πλέον με την τυπική εξωσωματική γονιμοποίηση. Ενδείξεις για GIFT υπήρξαν η ενδομητρίωση (αναφέρονταν καλύτερα αποτελέσματα), οι πολλαπλές αποτυχιές εξωσωματικής, η αδυναμία εμβρυομεταφοράς λόγω διαταραχών της ανατομίας του τραχήλου της μήτρας, και η αποφυγή της εξωσωματικής γονιμοποίησης για θρησκευτικούς ή ηθικούς λόγους εκ μέρους του ζευγαριού (οι δύο τελευταίες εξακολουθούν να ισχύουν).

B) Ενδοσαλπιγγική μεταφορά ζυγωτών (Zygote Intrafallopian Transfer, ZIFT)

Κατά την τεχνική αυτή, τα στάδια της ελεγχόμενης ωοθηκικής διέγερσης, ωοληψίας και εξωσωματικής γονιμοποίησης πραγματοποιούνται κατά τα συνήθη, ακολούθως όμως, 18-48 ώρες μετά την ωοληψία η γυναίκα υποβάλλεται σε λαπαροσκόπηση και τα έμβρυα σταδίου 2 προπουρνίων (1^{ης} ημέρας) ή 2^{ης} ημέρας τοποθετούνται στις σάλπιγγες⁽¹⁵¹⁾. Το ZIFT (όπως και το GIFT) πραγματοποιείται σπανιότατα στις ημέρες μας. Ενδείξεις για ZIFT αποτέλεσαν ζευγάρια με επαναλαμβανόμενες αποτυχιές εμφύτευσης με παραδοσιακή εξωσωματική, γυναίκες με δυσκολία ή αδυναμία εμβρυομεταφοράς λόγω ανατομικών ανωμαλιών του τραχήλου, γυναίκες προχωρημένης ηλικίας, και ζευγάρια υποψήφια για GIFT με συνοδό ανδρικό παράγοντα ώστε να γίνει η γονιμοποίηση με ICSI.

Γ) Λήψη σπέρματος με 'χειρουργικές' τεχνικές

Η εισαγωγή του ICSI στην εξωσωματική γονιμοποίηση άνοιξε νέους ορίζοντες και επέτρεψε την εφαρμογή νέων τεχνικών λήψης σπερματοζωαρίων σε άνδρες με αζωοσπερμία. Πρώτο βήμα αποτελεί η διάκριση μεταξύ αποφρακτικής ή μη αποφρακτικής αζωοσπερμίας. Στην πρώτη περίπτωση (αποφρακτική), σπερματοζωάρια μπορούν να ληφθούν με μικροχειρουργική αναρρόφηση επιδιδυμίδας (Microsurgical Epididymal Sperm Aspiration, MESA) ή με διαδερμική αναρρόφηση επιδιδυμίδας (Percutaneous Epididymal Sperm Aspiration, PESA)· η δεύτερη τεχνική είναι πιο απλή, μπορεί να γίνει υπό τοπική αναισθησία, έχει όμως συνδεθεί με αυξημένους κινδύνους τραυματισμού και ίνωσης της επιδιδυμίδας⁽¹⁵²⁾. Αν τα ανωτέρω αποτύχουν καθώς και σε περιπτώσεις μη αποφρακτικής αζωοσπερμίας, εφαρμόζονται οι τεχνικές λήψης από τον όρχι, και πιο συγκεκριμένα είτε η αναρρόφηση με βελόνα (λεπτή ή μεγαλύτερης δια-

μέτρου) (Testicular Sperm Aspiration, TESA), είτε η ανοικτή λήψη τεμαχιδίων ορχικού ιστού (Testicular Sperm Extraction, TESE), κατά προτίμηση υπό μικροσκοπική καθοδήγηση σε 40-60 μεγέθυνση, ώστε να ληφθούν τα πιο διατεταμένα σωληνάκια και να περιορισθεί η βλάβη στον όρχι ⁽¹⁵³⁾. Σημειώνεται πως η ανάγκη πραγματοποίησης πολλαπλών βιοψιών συνδέεται με πρόκληση εκτεταμένης ίνωσης ή/και μικροαγγειακής διαταραχής στον όρχι ⁽¹⁵⁴⁾, γι' αυτό και η υπό μικροσκοπικό έλεγχο TESE είναι η προτεινόμενη μέθοδος εκλογής. Επίσης, για τις περιπτώσεις μη αποφρακτικής αζωοσπερμίας, η εφαρμογή της αναρρόφησης με βελόνα συνδέεται με μικρότερες πιθανότητες ανεύρεσης σπερματοζωαρίων σε σχέση με την TESE ⁽¹⁵⁵⁾, ενώ αντενδείκνυται σε άνδρες με ιστορικό κρυπορχιάς καθώς αυτοί βρίσκονται σε αυξημένο κίνδυνο καρκινώματος *in situ* και θα πρέπει να υποβάλλονται σε βιοψία-ιστολογική εξέταση ⁽¹⁵⁶⁾. Ως προς την σύγκριση των παραπάνω τεχνικών ανάκτησης σπερματοζωαρίων η πλέον πρόσφατη Cochrane μετανάλυση κατέληξε πως δεν υπάρχουν επαρκείς ενδείξεις ώστε να προτιμηθεί κάποια συγκεκριμένη από αυτές' έτσι οι αναλυτές τονίζουν την ανάγκη πραγματοποίησης μεγάλων πολυκεντρικών μελετών ⁽¹⁵⁷⁾.

Σε περίπου 50% των ανδρών με μη αποφρακτική αζωοσπερμία, δεν καθίσταται δυνατή η ανάκτηση σπερματοζωαρίων με TESE και δυστυχώς δεν υπάρχουν αξιόπιστα κλινικά κριτήρια διαλογής τους ⁽¹⁵⁸⁾. Πρόσφατα, με την διάδοση των τεχνικών ελέγχου του Υ χρωμοσώματος, διαπιστώθηκε ότι αρνητική προγνωστική σημασία για εύρεση σπερματοζωαρίων ίσως έχουν οι ελλείψεις ολόκληρης της AZFb και της AZFa περιοχής ^(22,23). Ειδική υποκατηγορία ανδρών με μη αποφρακτική αζωοσπερμία αποτελούν και αυτοί με σύνδρομο Klinefelter' και οι άνδρες αυτοί έχουν 50% πιθανότητα ανεύρεσης σπερματοζωαρίων με TESE ⁽¹⁵⁹⁾ και είναι εφικτή η επίτευξη κύσεων ⁽¹⁶⁰⁾.

Όσον αφορά τα αποτελέσματα, στους άνδρες με φυσιολογική σπερματογένεση, τα ποσοστά κύησης έπεται από ICSI με σπερματοζωάρια από τους όρχεις είναι συγκρίσιμα με εκείνα έπεται από ICSI με σπερματοζωάρια από την επιδιδυμίδα. Όσον αφορά τα αποτελέσματα σε άνδρες με μη αποφρακτική αζωοσπερμία, υπάρχουν διαφορές μεταξύ των δημοσιευμένων μελετών' πάντως μια μεγάλη αναδρομική μελέτη όπου συγκρίθηκαν τα αποτελέσματα μεταξύ ανδρών με μη αποφρακτική και αποφρακτική αζωοσπερμία, αναφέρει σημαντικά χαμηλότερα ποσοστά γονιμοποίησης, εμφύτευσης και κύησης στους πρώτους ⁽¹⁶¹⁾.

Τέλος, η χειρουργική ανάκτηση σπερματοζωαρίων μπορεί να γίνει σε έναν χρόνο με τον κύκλο της εξωσωματικής (την ημέρα της ωοληψίας της γυναίκας) ή σε δυο χρόνους. Προφανώς, σε περίπτωση μη ανεύρεσης σπερματοζωαρίων η δεύτερη επιλογή παρέχει στο ζευγάρι χρόνο να σκεφθεί τι θα κάνει (αν δηλαδή θα προχωρήσει σε χρήση σπέρματος δότη ή όχι). Πάντως, η μεσολάβηση της κρυοσυντήρησης του υλικού δεν φαίνεται να επηρεάζει τα κλινικά αποτελέσματα σε σύγκριση με την χρήση φρέσκου υλικού ούτε στην αποφρακτική ⁽¹⁶²⁾ ούτε στην μη αποφρακτική αζωοσπερμία ⁽¹⁶³⁾.

Δ) In vitro ωρίμανση ωαρίων (in vitro oocyte maturation, IVM)

Το IVM αποτελεί μια ιδιαίτερη τεχνική κατά την οποία τα ωάρια λαμβάνονται σε ανώριμο στάδιο και η ωρίμανσή τους ολοκληρώνεται στο εργαστήριο. Στους τυπικούς IVM κύκλους δεν χορηγείται ουδεμία ωοθηκική διέγερση. Μετά την πραγματοποίηση ενός πρώτου υπερηχογραφήματος αμέσως μετά την αυτόματη ή προκλητή εμμηνορρυσία για τον αποκλεισμό ωοθηκικών κύστεων και την μέτρηση AFC, η γυναίκα καλείται για δεύτερο υπερηχογράφημα την 6^η-8^η ημέρα προς αξιολόγηση. Η ωοληψία επί ωοθυλακιορρηκτικών γυναικών πρέπει να γίνει πριν το κυρίαρχο ωοθυλάκιο φθάσει τα 14 mm, ενώ επί ανωοθυλακιορρηκτικών γυναικών μεταξύ των ημερών 8 και 16. Χορηγούνται 10000 IU HCG και η ωοληψία προγραμματίζεται να γίνει 35-40 ώρες μετά. Χρησιμοποιούνται συνήθως βελόνες 17 g με αναρρόφηση στα 85mmHg. Τα ωάρια επωάζονται σε ειδικό IVM καλλιεργητικό υγρό με προσθήκη 75 IU/L FSH και 75 IU/L LH για διάστημα που δεν υπερβαίνει τις 48 ώρες. Η γονιμοποίηση των ωρίμων ωαρίων γίνεται με ICSI. Παράλληλα, η γυναίκα ακολουθεί πρωτόκολλο υποστήριξης της ωχρινικής φάσης με χορήγηση προγεστερόνης (συνήθως από την επομένη της ωοληψίας) και οιστραδιόλης (συνήθως από την ημέρα της ωοληψίας), τα έμβρυα καλλιεργούνται στο εργαστήριο και ακολουθεί η εμβρυομεταφορά με έμβρυα 3^{ης} ημέρας ή βλαστοκύστες. Θα πρέπει τέλος να σημειωθεί πως έχουν περιγραφεί και άλλα πρωτόκολλα για IVM, όπως με αποφυγή χορήγησης HCG, ή και με χορήγηση FSH 150 IU καθημερινά από την 3η ημέρα του κύκλου για 3 ημέρες.

Η πρωταρχική και κύρια ένδειξη εφαρμογής IVM είναι οι γυναίκες με σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών, ώστε να αποφευχθεί η ωοθηκική διέγερση που εγκυμονεί τον κίνδυνο για σύνδρομο υπερδιέγερσης ωοθηκών. Πέραν αυτού, η μέθοδος θα μπορούσε να εφαρμοσθεί και σε ωοθυλακιορρηκτικές γυναίκες που επιθυμούν να αποφύγουν τα φάρμακα της ωοθηκικής διέγερσης καθώς και σαν εναλλακτική μέθοδος διατήρησης γονιμότητας (κρυοσυντήρηση ωαρίων ή εμβρύων) σε γυναίκες που θα λάβουν γοναδοτοξική θεραπεία ιδίως επί ορμονοεξαρτώμενων νεοπλασιών.

Όσον αφορά τα κλινικά αποτελέσματα κύκλων IVM, ενώ κάποιες παλαιότερες μελέτες ανέφεραν ποσοστά κύησης 30-35% (με μεταφορά όμως έως και 4-6 εμβρύων, κάτι που δεν είναι πλέον αποδεκτό)⁽¹⁶⁴⁾, νεώτερες μελέτες αναφέρουν σημαντικά χαμηλότερα ποσοστά γεννήσεων (15.9%-16.5%) σε σύγκριση με τους παραδοσιακούς κύκλους εξωσωματικής^(165,166). Αυτό μπορεί να οφείλεται σε μειωμένη αναπτυξιακή ικανότητα των IVM ωαρίων λόγω ανεπαρκών συνθηκών ωρίμανσης, αλλά και σε διαταραχή της υποδεκτικότητας του ενδομητρίου λόγω ανεπαρκούς προετοιμασίας του¹ το τελευταίο κατέστη προφανές σε μια πιλοτική μελέτη όπου η κατάψυξη των εμβρύων και η μεταφορά τους σε τεχνητούς κύκλους απόψυξης αύξησε τα ποσοστά κύησης από 9.4% σε 31.8%⁽¹⁶⁷⁾. Τέλος, κάποιες μελέτες αναφέρουν σημαντικά αυξημένα ποσοστά αποβολών ιδίως επί εφαρμογής του IVM σε γυναίκες με πολυκυστικές ωοθήκες⁽¹⁶⁸⁾. Όσον αφορά την ασφάλεια του IVM στην μεγαλύτερη μελέτη που έχει δημοσιευθεί έως τώρα με 196 νεογνά, αναφέρονται συγκρίσιμα ποσοστά επιπλοκών κύησης και νεογνικής νοσηρότητας καθώς και συγγενών ανωμαλιών με εκείνα της παραδοσιακής εξωσωματικής⁽¹⁶⁹⁾.

ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΕ ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΤΡΙΤΟΥ ΠΡΟΣΩΠΟΥ

Στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνονται:

α) Η χρήση ωαρίων από δότριες; αποτελεί την μοναδική διέξοδο για ολοένα και πιο πολλά ζευγάρια στις μέρες μας, κυρίως λόγω της μετατόπισης προς τα άνω της ηλικίας επιθυμίας για τεκνοποίηση. Στην Ελλάδα, η εν λόγω μέθοδος διέπεται από νομοθετημένους όρους, που έχουν να κάνουν με την ηλικία της δότριας (κάτω των 35 ετών), την ανωνυμία της (υποχρεωτική), την αποζημίωση που δικαιούται για μεταφορικά έξοδα και απώλεια ωρών εργασίας, τον υποχρεωτικό εργαστηριακό έλεγχο που υποβάλλεται και την υποχρεωτική υπογραφή ειδικών συγκαταθέσεων. Ενδείξεις για χρήση ωαρίων δότριας έχουν γυναίκες προχωρημένης αναπαραγωγικής ηλικίας με πτωχή ποιοτική και ποσοτική απόδοση ιδίων ωαρίων (στην Ελλάδα η εφαρμογή τεχνικών υποβοηθούμενης αναπαραγωγής επιτρέπεται για τις γυναίκες έως την ηλικία των 50 ετών), γυναίκες με πρόωμη ωοθηκική ανεπάρκεια, γυναίκες φορείς γενετικών διαταραχών που δεν επιθυμούν ή δεν γίνεται να υποβληθούν σε προεμφυτευτική γενετική διάγνωση ή ζευγάρια με εξαιρετικά πολλαπλές αποτυχίες εμφύτευσης για τις οποίες εικάζεται πως το αίτιο εντοπίζεται στην ποιότητα του ωαρίου. Η δότρια ακολουθεί τυπικό πρωτόκολλο ελεγχόμενης ωοθηκικής διέγερσης και υποβάλλεται στην ωοληψία προς αποφυγή της επιπλοκής του συνδρόμου υπερδιέγερσης προτείνεται η διέγερση με πρωτόκολλο ανταγωνιστή και η εν συνεχεία τελική πυροδότηση με χορήγηση GnRH αγωνιστή (βλέπε παρακάτω). Τα ωάρια της δότριας γονιμοποιούνται με το σπέρμα του συζύγου της λήπτριας και ακολούθως τα έμβρυα είτε ετοιμάζονται για μεταφορά στην λήπτρια (εφόσον είναι συγχρονισμένη και προετοιμασμένη) είτε τοποθετούνται στην κρυοσυντήρηση ώστε να τοποθετηθούν στην λήπτρια σε κύκλο απόψυξης. Εφόσον έχει επιλεγεί η σε ένα χρόνο μεταφορά, η λήπτρια προετοιμάζεται με έναν τεχνητό κύκλο όπως αυτός περιγράφηκε στην παράγραφο της κρυοσυντήρησης. Γενικά, είναι φρόνιμο να υπάρχει αρκετός χρόνος για την προετοιμασία του ενδομητρίου της λήπτριας ώστε να αποφεύγονται απρόοπτα (π.χ. να καθυστερεί η ανάπτυξη του ενδομητρίου της) προτείνεται η έναρξη του τεχνητού κύκλου της λήπτριας να προηγείται κατά μια τουλάχιστον εβδομάδα της έναρξης του κύκλου διέγερσης της δότριας και ο προγραμματισμός αμφοτέρων με αντισυλληπτικά δισκία αποτελεί μια πρακτική λύση. Επίσης, σύμφωνα με την πρόσφατη Cochrane ανασκόπηση, ειδικά για τους κύκλους συγχρονισμού, η έναρξη της χορήγησης προγεστερόνης στην λήπτρια κατά την ημέρα της ωοληψίας της δότριας ή μία ημέρα μετά, συνδυάζεται με σημαντικά υψηλότερα ποσοστά κύησης σε σύγκριση με την έναρξή της μια ημέρα πριν την ωοληψία (OR: 1.87, 95%CI: 1.13-3.08). Τέλος, εφόσον έχει επιλεγεί η μεταφορά με την μεσολάβηση κρυοσυντήρησης, η λήπτρια ακολουθεί τις εναλλακτικές κύκλων απόψυξης – εμβρυομεταφοράς που περιγράφηκαν παραπάνω. Γενικά, προγράμματα δωρεάς ωαρίων πρέπει να εφαρμόζονται σε καλά οργανωμένες μονάδες

εξωσωματικής, και τα στοιχεία των κύκλων να καταγράφονται και να φυλάσσονται σχολαστικά, λόγω της ιδιαιτερότητας των καταστάσεων.

- β) Η χρήση σπέρματος από δότη: εφαρμόζεται σε περιπτώσεις αζωοσπερμίας, όπου ο σύζυγος είτε δεν επιθυμεί να υποβληθεί σε χειρουργική λήψη σπερματοζωαρίων, είτε έχει υποβληθεί αλλά η προσπάθεια απέβη άκαρπη, σε περιπτώσεις σοβαρότατης διαταραχής σπέρματος που συνδυάζεται με πολλαπλές αποτυχίες εξωσωματικής, και σε περιπτώσεις σοβαρής γενετικής διαταραχής εφόσον το ζευγάρι δεν επιθυμεί ή δεν είναι εφικτό να ακολουθήσει πρόγραμμα προεμφυτευτικής γενετικής διάγνωσης. Επίσης, σπέρμα δότη δικαιούται να χρησιμοποιήσει και μία άγαμη γυναίκα, εφόσον έχει αποδεχθεί και συναινέσει με συμβολαιογραφική πράξη. Το σπέρμα δότη διατίθεται από ειδικά αδειοδοτημένες τράπεζες σπέρματος, ώστε να εξασφαλίζεται ο έλεγχος των δοτών για λοιμώδη και άλλα νοσήματα αλλά και ο αριθμός των κλινικών κύσεων που επιτρέπεται να επιτευχθούν ανά δότη. Το σπέρμα δότη μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε για ενδομήτρια σπερματέγχυση, είτε για εξωσωματική γονιμοποίηση.
- γ) Η κύηση με παρένθετη μήτρα: αποτελεί την ύστατη επιλογή για γυναίκες που κρίνεται πως αδυνατούν να κυοφορήσουν και να περατώσουν την κύηση με επιτυχία. Εδώ υπάγονται γυναίκες με σοβαρές βλάβες (π.χ. μη διορθώσιμες ενδομήτριες συμφύσεις) ή και απουσία μήτρας (π.χ. γυναίκες με σύνδρομο Rokitansky) ή γυναίκες με υπερβολικά μεγάλο αριθμό αποβολών ή αποτυχιών εμφύτευσης. Τόσο η παρένθετη όσο και η γενετική μητέρα θα πρέπει να υποβληθούν σε πλήρη προγεννητικό έλεγχο· επίσης, οι εμπλεκόμενοι θα πρέπει να υποβληθούν σε συνέντευξη από ψυχολόγο προς ενημέρωση αλλά και διερεύνηση της ικανότητάς τους να υποβληθούν στην διαδικασία. Για την πραγματοποίηση κύκλων παρένθετης μήτρας απαιτείται η έκδοση δικαστικής απόφασης έπειτα από ακρόαση των ιατρικών λόγων που επιβάλουν την εφαρμογή τους, του ενδιαφερόμενου ζεύγους, και της γυναίκας που θα λειτουργήσει ως παρένθετη. Ο συγχρονισμός των δύο γυναικών γίνεται με τους τρόπους που περιγράφηκαν παραπάνω για τους κύκλους δωρεάς ωαρίων.

ΠΡΟΕΜΦΥΤΕΥΤΙΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Το 1990 πραγματοποιήθηκε η πρώτη καταγραφή επιτυχούς εφαρμογής Προεμφυτευτικής Γενετικής Διάγνωσης (Preimplantation Genetic Diagnosis, PGD) για την αποφυγή φυλοσύνδετης νόσου από τους Handyside et al ⁽¹⁷⁰⁾· από τότε, η μέθοδος αυτή αναπτύχθηκε ραγδαία, διευρύνθηκε, εφαρμόζεται ευρέως σε πολλά κέντρα εξωσωματικής γονιμοποίησης/γενετικής, και εξακολουθεί να αποτελεί πεδίο έρευνας και εξελίξεων. Το PGD εφαρμόζεται σε ζευγάρια που έχουν αυξημένο κίνδυνο μεταβίβασης κάποιας γενετικής διαταραχής στους απογόνους τους όπως είναι οι μονογονιδιακές διαταραχές (αυτόσωμες επικρατούντες ή υπολειπόμενες και φυλοσύνδετες) και οι ισοζυγισμένες μεταθέσεις (που συνδέονται με αυξημένο κίνδυνο καθ' έξιν αποβολών και αποτυχιών εμφύτευσης). Επίσης, Προεμφυτευτική Γενετική Διαλογής

(Preimplantation Genetic Screening, PGS), εφαρμόζεται σε ζευγάρια με φυσιολογικούς καρπούς για την ανίχνευση αριθμητικών χρωμοσωμικών διαταραχών στα έμβρυά τους, με αναφερθείσες ενδείξεις την προχωρημένη ηλικία της γυναίκας, τις επαναλαμβανόμενες αποτυχίες εμφύτευσης, τις καθ' ἑξιν αποβολές και την παρουσία σοβαρότατου ανδρικού παράγοντα υπογονιμότητας.

Η μέθοδος PGD/PGS περιλαμβάνει την λήψη εμβρυϊκού γενετικού υλικού (βιοψία εμβρύου) και την εν συνεχεία γενετική ανάλυσή του.

Η βιοψία του εμβρύου μπορεί να πραγματοποιηθεί με τρεις τρόπους: λήψη ενός ή δύο πολικών σωματίων, λήψη ενός ή δύο βλαστομεριδίων στο στάδιο των πρώιμων διαιρέσεων (έμβρυα 3^{ης} ημέρας), ή λήψη περισσότερων τροφεκτοδερμικών κυττάρων στο στάδιο της βλαστοκύστης. Ο κάθε ένας από τους παραπάνω τρόπους έχει πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα.

α) λήψη πολικού σωματίου: Το πρώτο πολικό σωματίο μπορεί να ληφθεί από το ωάριο την ημέρα της ωοληψίας, 36-42 ώρες μετά την ένεση της HCG. Και τα δύο πολικά σωματία μπορούν να ληφθούν ταυτόχρονα από τον ζυγώτη, 9-22 ώρες μετά την γονιμοποίηση, όμως στις 22 ώρες το 1^ο πολικό σωματίο μπορεί να έχει εκφυλισθεί ⁽¹⁷¹⁾. Διαδοχική λήψη των δύο πολικών σωματίων (το 1^ο την ημέρα-0 και το 2^ο την ημέρα-1) είναι αποδεκτή και συνιστάται για PCR αναλύσεις προς καθορισμό ανασυνδυασμών μεταξύ των δύο πολικών σωματίων ⁽¹⁷²⁾. Η ταυτόχρονη λήψη των δύο πολικών σωματίων είναι αποδεκτή για FISH αναλύσεις καθώς παρέχουν διακριτά αποτελέσματα. Πλεονεκτήματα της τεχνικής αυτής είναι η αποφυγή του φαινομένου του μωσαϊκισμού, και η αποφυγή χειρισμών στο έμβρυο αυτό καθαυτό, ενώ το βασικό μειονέκτημα είναι το ότι επιτρέπει τον έλεγχο μεταλλάξεων και ανευπλοειδίων αποκλειστικά μητρικής προέλευσης. Τέλος, είναι δυνατόν να απαιτηθεί και βιοψία 3ης ημέρας για πιστοποίηση των αποτελεσμάτων ⁽¹⁷³⁾.

β) λήψη βλαστομεριδίων: πραγματοποιείται το πρωί της 3^{ης} ημέρας μετά την γονιμοποίηση σε έμβρυα καλής ποιότητας με βάση την μορφολογία και τις διαιρέσεις τους. Αφαιρείται συνήθως ένα βλαστομερίδιο (αν και μπορεί να αφαιρεθούν και δύο). Πλεονέκτημα της τεχνικής αυτής είναι η δυνατότητα ελέγχου μεταλλάξεων και ανευπλοειδίων τόσο μητρικής όσο και πατρικής προέλευσης. Μειονεκτήματα της τεχνικής είναι η πιθανώς τραυματική επίδραση της βιοψίας στο έμβρυο που αντανακλά σε πτωχότερα κλινικά αποτελέσματα, και το φαινόμενο του μωσαϊκισμού (υπολογίζεται πως το 40-60% των εμβρύων είναι μωσαϊκά, περιέχουν δηλαδή περισσότερες από μία κυτταρικές σειρές) που έχει σαν συνέπεια το προς ανάλυση κύτταρο να μην αντιπροσωπεύει το προς ανάλυση έμβρυο και να έχουμε ψευδώς θετικά ή αρνητικά αποτελέσματα ⁽¹⁷⁴⁾.

γ) λήψη τροφεκτοδερμικών κυττάρων: έχουν περιγραφεί διάφορες τεχνικές λήψης, από τις οποίες η επικρατέστερη είναι η σε ένα χρόνο διάνοιξη της ζώνης και αφαίρεση τροφεκτοδερμικών κυττάρων κατά την 5^η ημέρα μετά την γονιμοποίηση ⁽¹⁷⁵⁾. Πλεονεκτήματα της τεχνικής είναι η σχετική ευκολία της, η δυνατότητα ελέγχου μεταλλάξεων και ανευπλοειδίων

τόσο μητρικής όσο και πατρικής προέλευσης, η λήψη τροφεκτοδερμικών κυττάρων τα οποία δεν συμβάλλουν στην ανάπτυξη εμβρυικών δομών, και η δυνατότητα λήψης πολλών κυττάρων οπότε και περιορίζεται δραστικά το φαινόμενο του μωσαϊκισμού. Μειονεκτήματα της τεχνικής, είναι ο πιθανός περιορισμός των διαθεσίμων εμβρύων προς βιοψία (αφού δεν εξελίσσονται όλα τα έμβρυα σε βλαστοκύστες *in vitro*), και τα στενά χρονικά περιθώρια που έχουμε για να πραγματοποιήσουμε την εμβρυομεταφορά. Ως προς το τελευταίο, η ευρέως ακολουθούμενη στρατηγική είναι η κρυοσυντήρηση των βλαστοκύστεων μετά την βιοψία, η αναμονή των αποτελεσμάτων και η μεταφορά των υγιών εμβρύων σε ακόλουθο κύκλο απόψυξης. Η επίδραση της κρυοσυντήρησης στις βλαστοκύστες που έχουν υποστεί βιοψία αποτελεί ένα θέμα, και τα δεδομένα είναι αντικρουόμενα, με κάποιους να δίνουν χαμηλότερα ποσοστά απόψυξης, ενώ φαίνεται πως η μέθοδος της υαλοποίησης υπερτερεί της βραδείας κατάψυξης⁽¹⁷⁶⁾. Πρόσφατα, υποστηρίζεται πως εφόσον το χρονικό διάστημα για να έχουμε το αποτέλεσμα της γενετικής ανάλυσης είναι δυνατόν να περιορισθεί σε λίγες ώρες, μπορούμε να προχωρούμε σε εμβρυομεταφορά κατά τον ίδιο κύκλο, με την προϋπόθεση αυτή να γίνεται πριν το μεσημέρι της 6^{ης} ημέρας· μερικοί μάλιστα προτείνουν την πραγματοποίηση ή μη της εμβρυομεταφοράς στον ίδιο κύκλο με βάση την τιμή της προγεστερόνης κατά την ημέρα χορήγησης της HCG (αν είναι υψηλή, να μην προχωράμε).

Μετά την λήψη της βιοψίας, η ανίχνευση μονογονιδιακών διαταραχών πραγματοποιείται με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), ενώ για την ανίχνευση των ανευλοειδιών και των δομικών χρωμοσωμικών διαταραχών εφαρμόζονται οι τεχνικές FISH, array comparative genomic hybridization (array CGH), ή single nucleotide polymorphisms (SNPs). Με την τεχνική PCR είναι δυνατή η ανίχνευση στο προς εξέταση δείγμα γνωστών αλληλουχιών μεταλλάξεων. Η μικρή διαθέσιμη ποσότητα του προς εξέταση υλικού στο PGD αποτελεί ένα σχετικό μειονέκτημα, και για τον λόγο αυτό η βιοψία βλαστοκύστεων υπερτερεί εκείνης της 3^{ης} ημέρας. Αποτυχία πολλαπλασιασμού του DNA μπορεί να παρατηρηθεί σε έως και 10% των βλαστομεριδίων. Ο κίνδυνος 'επιμόλυνσης' αποτελεί ένα άλλο πρόβλημα, και πηγή μπορεί να είναι η 'πατρική' επιμόλυνση από σπερματοζωάρια προσκολλημένα στην ζώνη⁽¹⁷⁷⁾ (για τον λόγο αυτό η γονιμοποίηση στο PGD συνιστάται να γίνεται πάντα με ICSI), υλικό από ωοθυλακικά κύτταρα, υλικό από εμβρυολόγους ή από προηγούμενες PCR. Τέλος, το φαινόμενο της απόρριψης αλληλίου (allele drop-out, ADO), αποτελεί ένα άλλο τεχνικό πρόβλημα· πρόκειται για τον μη πολλαπλασιασμό ενός από τα δύο αλληλία, με αποτέλεσμα να οδηγούμαστε σε λανθασμένη διάγνωση, κάτι που είναι αφενός αρκετά συχνό (υπολογίζεται σε 5-33% γονιδιακών αλληλουχιών⁽¹⁷⁸⁾) και αφετέρου ιδιαίτερος επικίνδυνος για νοσήματα που μεταβιβάζονται με τον επικρατούμενο τύπο κληρονομικότητας. Για τον περιορισμό των εγγενών αυτών μειονεξιών της τεχνικής PCR, χρησιμοποιούνται δείκτες πολυμορφισμού (short tandem repeats ή single nucleotide polymorphisms) που εντοπίζονται πλησίον του προς εξέταση γονιδίου ώστε να ισχυ-

ροποιείται το αποτέλεσμα ⁽¹⁷⁹⁾, ενώ προφανώς προτιμάται η διάθεση άφθονου γενετικού υλικού προς εξέταση.

Η τεχνική FISH (Fluorescent In Situ Hybridization) χρησιμοποιείται για την αριθμητική και δομική ανάλυση των χρωμοσωμάτων. Με την χρήση ειδικά σημασμένων φθορίζοντων 'κεφαλών' που υβριδίζονται με το DNA (συνήθως του κεντρομεριδίου) των υπό μελέτη χρωμοσωμάτων, είναι δυνατή η ανίχνευση, οπτική παρατήρηση και καταμέτρηση των χρωμοσωμάτων στα κύτταρα της βιοψίας. Το βασικό μειονέκτημα της τεχνικής είναι ο περιορισμός στον αριθμό των χρωμοσωμάτων που μπορούν να εξετασθούν ταυτόχρονα λόγω της αλληλοεπικάλυψης των 'σημάτων' των κεφαλών. Ο αριθμός αυτός στην καλύτερη περίπτωση είναι 9-12 χρωμοσώματα' συνήθως πρόκειται για τα χρωμοσώματα X, Y, 8, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 21, 22, και η επιλογή αυτή στηρίζεται στο ότι σε αυτά παρατηρείται η συντριπτική πλειοψηφία των αριθμητικών/δομικών ανωμαλιών. Πάντως, ακόμα και για αυτόν τον περιορισμένο αριθμό, απαιτούνται συνήθως 2-3 κύκλοι υβριδισμού και τελικώς ανιχνεύεται το 80-90% των ανευπλοειδιών. Ο περιορισμός αυτός εξηγεί εν μέρει (μαζί με τα φαινόμενα του μωσαϊκισμού και της αυτοδιόρθωσης) τα πτωκά κλινικά αποτελέσματα του PGS.

Η τεχνική array-CGH επιτρέπει την ταυτόχρονη εκτίμηση όλων των χρωμοσωμάτων. Το γένωμα από το προς εξέταση δείγμα πολλαπλασιάζεται μέσω της τεχνικής Whole Genome Amplification (WGA) και σημαίνεται με ένα χρώμα, ενώ ένα φυσιολογικό δείγμα αναφοράς επίσης πολλαπλασιάζεται και σημαίνεται με άλλο χρώμα. Τα δείγματα αυτά χρησιμοποιούνται σαν κεφαλές, υβριδίζονται, και με την χρήση κατάλληλου software οπτικοποιούνται τα αποτελέσματα και διαγιγνώσκονται ανευπλοειδίες και μη ισοζυγισμένες δομικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων ελέγχου και αναφοράς ⁽¹⁸⁰⁾. Με τις πρόσφατες εξελίξεις της τεχνικής, το αποτέλεσμα είναι και ακριβές και γρήγορα διαθέσιμο, επιτρέποντας την εμβρυομεταφορά στον ίδιο κύκλο (επί βιοψίας 3^{ης} ημέρας πραγματοποιείται εμβρυομεταφορά την 5^η ημέρα) ⁽¹⁸¹⁾.

Η τεχνική Single Nucleotide Polymorphism (SNP) microarray, στηρίζεται στην παρουσία συγκεκριμένων SNPs σε περιοχές του DNA που παρατηρούνται σε συχνότητα άνω του 1% στον πληθυσμό. Υπάρχουν πάνω από 10 εκατομμύρια SNPs στο ανθρώπινο γένωμα καθιστώντας τα ιδιαίτερος ευαίσθητους και ειδικούς δείκτες. Η μικροσυστοιχία (microarray) είναι ένα chip που περιλαμβάνει τις αλληλουχίες νουκλεοτιδίων που είναι συμπληρωματικές στις SNP περιοχές που μας ενδιαφέρουν, οπότε το δείγμα DNA από την βιοψία πολλαπλασιάζεται και υβριδίζεται στο chip. Με την τεχνική αυτή είναι δυνατή η διάγνωση ανευπλοειδιών όλων των χρωμοσωμάτων, η διάκριση μεταξύ φυσιολογικών και ισοζυγισμένων χρωμοσωμάτων σε έμβρυα από φορείς μεταθέσεων, και η παροχή πληροφοριών απλοτύπων ⁽¹⁸²⁾.

Η εφαρμογή του PGS ήταν πολλά υποσχόμενη με το σκεπτικό ότι αναγνωρίζοντας τα έμβρυα με σοβαρές ανευπλοειδίες και μεταφέροντας μόνο εκείνα που ήταν χρωμοσωμικά άρτια, θα επιτυχάναμε βελτίωση των ποσοστών επιτυχίας, τουλάχιστον στις υποομάδες ζευγαριών για τις οποίες προτάθηκε και αναφέρθηκαν παραπάνω. Όμως, η αρχική αισιοδοξία επισκιάσθηκε από

την δημοσίευση 11 τυχαιοποιημένων μελετών που απέτυχαν να επιδείξουν θετική επίδραση στα ποσοστά κυήσεων και ζώντων γεννήσεων. Το φαινόμενο του μωσαϊκισμού σε συνδυασμό με τον περιορισμό στον αριθμό των υπό έλεγχο χρωμοσωμάτων με την τεχνική FISH, δίνουν μια πιθανή εξήγηση για τα πτωχά κλινικά οφέλη του PGS. Έτσι, η πρόσφατη επίσημη θέση του PGD consortium της ESHRE είναι η εξής: υπάρχει πλέον επαρκής ένδειξη πως το PGS με βιοψία στο στάδιο πρωίμων διαιρέσεων και έλεγχο χρωμοσωμάτων με FISH δεν αποτελεί αξιόλογη μέθοδο για γυναίκες προχωρημένης ηλικίας, και θα πρέπει να αντικατασταθεί από άλλες προσεγγίσεις' μέχρι να έχουμε αποτελέσματα από τυχαιοποιημένες μελέτες στις οποίες η βιοψία έγινε σε άλλο στάδιο και η ανάλυση έγινε με μικροσυστοιχίες, η κατά ρουτίνα εφαρμογή PGS σε γυναίκες προχωρημένης ηλικίας ΔΕΝ ενδείκνυται' τέλος, δεν υπάρχουν επαρκή επιστημονικά δεδομένα για την εφαρμογή PGS σε περιπτώσεις καθ' έξιν αποβολών, επαναλαμβανόμενων αποτυχιών εμφύτευσης και σοβαρού ανδρικού παράγοντα και επομένως απαιτείται η διενέργεια τυχαιοποιημένων μελετών και για τις ενδείξεις αυτές ⁽¹⁸³⁾. Στο ίδιο μήκος κύματος βρίσκεται και η επίσημη άποψη της ASRM: το PGS δεν βελτιώνει τα ποσοστά ζώντων γεννήσεων σε καμία από τις παραπάνω κατηγορίες ζευγαριών ⁽¹⁸⁴⁾.

Η εφαρμογή του PGD έχει αποδώσει εξαιρετικά αποτελέσματα και πρέπει να προτείνεται σε όλα τα υποψήφια ζευγάρια (δηλαδή, εκείνα που φέρουν γνωστή κληρονομώμενη γενετική διαταραχή) αφού προηγηθεί επαρκής γενετική συμβουλευτική για τις δυνατότητες αλλά και τους περιορισμούς της τεχνικής. Επίσης, επί επίτευξης κύησης θα πρέπει να συστήνεται προγεννητικός έλεγχος για επιβεβαίωση και αποφυγή ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων ⁽¹⁸⁴⁾. Ως προς τα αποτελέσματα, σύμφωνα με την επίσημη καταγραφή από την ESHRE ⁽¹⁸⁵⁾, η εφαρμογή PGD για μονογονιδιακές διαταραχές συνδέεται με τα υψηλότερα ποσοστά κυήσεων (23% ανά ωοληψία, 29% ανά εμβρυομεταφορά), ενώ η εφαρμογή του για χρωμοσωμικές διαταραχές με τα χαμηλότερα (17% και 26%, αντίστοιχα). Η παρατήρηση αυτή είναι συμβατή με το γεγονός ότι τα ζευγάρια που κάνουν PGD για μονογονιδιακή διαταραχή δεν έχουν συνήθως προβλήματα γονιμότητας, σε αντίθεση με τα ζευγάρια φορείς χρωμοσωμικών διαταραχών' τονίζεται επίσης πως σε αυτά τα τελευταία ζευγάρια, μόνο 10-15% των εμβρύων αναμένεται να είναι μεταφέρσιμα. Μεταξύ των διαφόρων τύπων χρωμοσωμικών διαταραχών, οι ρομπερτσόνιες μεταθέσεις φαίνεται να συνδέονται με μεγαλύτερο ποσοστό υγιών/ισοζυγισμένων εμβρύων προς μεταφορά και συνεπώς με μεγαλύτερο ποσοστό επιτυχίας, ενώ δεν φαίνεται να υπάρχουν διαφορές αν ο φορέας είναι ο άνδρας ή η γυναίκα.

Οι συννηθέστερες ενδείξεις PGD στην Ευρώπη είναι: κυστική ίνωση, β-θαλασσαιμία, δρεπανοκυτταρική αναιμία, νωτιαία μυϊκή ατροφία, αιμορροφιλία A, σύνδρομο εύθραυστου X, μυοτοκική δυστροφία, μυϊκή δυστροφία Duchenne και Becker, και HLA ταυτοποίηση. Επισημαίνεται επίσης πως τελευταίως, PGD εφαρμόζεται ολοένα και συχνότερα με 'ιδιαιτέρως' ενδείξεις, όπως: νευροεκφυλιστικές διαταραχές καθυστερημένης εκδήλωσης (π.χ. νόσος Huntington, νωτιαία-παρεγκεφαλιδική αταξία τύπου 1, 3, και 7), διαταραχές που προδιαθέτουν σε νεοπλα-

σίες (π.χ. νευροϊνωμάτωση τύπου 1, ρετινοβλάστωμα, οικογενής αδενωματώδης πολυποδίαση εντέρου), παρουσία γονιδίων που προδιαθέτουν σε νεοπλασίες (π.χ. BRCA1), νευροπάθεια Charcot Marie Tooth, συγγενή βαρηκοΐα, μιτοχονδριακές διαταραχές (MELAS μεταλλάξεις). Τέλος, ως προς την ασφάλεια του PGD, τα μέχρι τώρα αποτελέσματα από την ESHRE υποδεικνύουν ότι τόσο οι επιπλοκές των κύψεων όσο και η υγεία των απογόνων μετά την εφαρμογή της μεθόδου είναι παρόμοια με τα αντίστοιχα έπειτα από εφαρμογή ICSI (χωρίς PGD)· σε 4021 νεογέννητα διαπιστώθηκαν 157 συγγενείς διαταραχές, εκ των οποίων 84 (2%) ήταν μείζονες, ενώ νεογνικές επιπλοκές παρατηρήθηκαν σε 402 από 3917 νεογνά (10%).

ΕΠΙΠΛΟΚΕΣ ΚΥΚΛΩΝ ΕΞΩΣΩΜΑΤΙΚΗΣ ΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗΣ

A) Επιπλοκές ωοληψίας

Η υπό υπερηχογραφική καθοδήγηση διακολπική λήψη των ωαρίων αποτελεί την ευρέως εφαρμοζόμενη και αποδεκτή τεχνική στις μέρες μας, που αν και χαρακτηρίζεται από μεγάλη ασφάλεια ενέχει κάποιους κινδύνους και πρέπει να πραγματοποιείται από εκπαιδευμένους ιατρούς. Η αιμορραγία από τους κολπικούς θύλους λόγω των διόδων της βελόνης αποτελεί τη συχνότερη επιπλοκή, με αναφερόμενη συχνότητα που ποικίλει ευρέως από 1.4-18.4%⁽¹⁸⁶⁾· σχεδόν πάντα η αιμορραγία σταματά αυτόματα ή κατόπιν εφαρμογής σταθερής πίεσης για λίγα λεπτά, ενώ σπάνια απαιτείται η συρραφή με ράμμα. Αντιθέτως, πιο σοβαρή επιπλοκή αλλά ευτυχώς πιο σπάνια (0.1-1.3%⁽¹⁸⁷⁾) είναι η ενδοκοιλιακή αιμορραγία που προκύπτει είτε από τον άμεσο τραυματισμό πυελικών αγγείων με την βελόνα (η ωοθήκη είναι κινητή, και χρειάζεται μεγάλη προσοχή κατά την παρακέντηση των ωοθυλακίων), είτε από τις πολλαπλές παρακέντησεις λόγω του πυκνού αγγειακού δικτύου των διεγερμένων ωοθηκών· οι γυναίκες θα πρέπει να παρακολουθούνται για κάποιο διάστημα μετά το πέρας της ωοληψίας, και επί εμφάνισης σημείων αιμοδυναμικής αστάθειας σε συνδυασμό με απεικόνιση επιδεινούμενης συλλογής αίματος θα πρέπει να γίνεται λαπαροσκόπηση και άμεσος έλεγχος της αιμορραγίας (ίσως και με λαπαροτομία). Τέλος, η πυελική φλεγμονή, συχνά με την ανάπτυξη σαλιγγο-ωοθηκικών ή πυελικών αποστημάτων, αποτελεί μια άλλη επιπλοκή με αναφερόμενη συχνότητα 0.2-0.5% ανά κύκλο⁽¹⁸⁸⁾, που αποδίδεται στην μεταφορά κολλοτραχηλικών μικροοργανισμών στην περιτοναϊκή κοιλότητα με την βελόνα της ωοληψίας. Επιπλέον παράγοντες κινδύνου είναι η κατά την ωοληψία παρουσία και ιδίως παρακέντηση υδροσαλιγγών καθώς και η παρακέντηση ενδομητριομμάτων. Η αντιμετώπιση είναι εξατομικευμένη και αναλόγως περιλαμβάνει την χορήγηση αντιβιοτικών ευρέως φάσματος, την παροχέτευση των αποστημάτων (ιδίως αν είναι >8 cm) ή και τον χειρουργικό καθαρισμό με λαπαροσκόπηση ή λαπαροτομία. Για την πρόληψη τέτοιων καταστάσεων συνιστάται από τους περισσότερους η προφυλακτική χορήγηση αντιβιοτικών κατά την ωοληψία.

B) Σύνδρομο Υπερδιέγερσης Ωοθηκών (Ovarian Hyperstimulation Syndrome, OHSS)

Το OHSS αποτελεί την σημαντικότερη ιατρογενή επιπλοκή της φαρμακευτικής ωοθηκικής διέγερσης. Διακρίνεται αναλόγως της βαρύτητάς του (κλασική ταξινόμηση κατά Golan) σε: ήπιο (Βαθμός 1: ωοθήκες ≤ 5 cm, κοιλιακή διάταση), μέτριο (Βαθμός 2: ωοθήκες 5-12 cm, ναυτία, έμετος, ίσως διάρροια / Βαθμός 3: ως άνω + ασκитικό υγρό (υπερηχογραφικώς), και σοβαρό (Βαθμός 4: ωοθήκες ≥ 12 cm+ ασκитικό υγρό (κλινικώς) \pm υδροθώρακας με δυσκολία αναπνοής / Βαθμός 5: ως άνω + υποογκαιμία, αιμοσυμπύκνωση, διαταραχές ηπικτικότητας, ολιγουρία, επηρεασμένη νεφρική λειτουργία) ⁽¹⁸⁹⁾. Σοβαρό OHSS εμφανίζεται στο 1,4% των κύκλων εξωσωματικής, ή αλλιώς σε 6020 ασθενείς ανά έτος στην Ευρώπη και τις ΗΠΑ, ενώ η θνησιμότητα από αυτό υπολογίζεται σε 1/450000-500000 περιπτώσεις ⁽¹⁹⁰⁾.

Το OHSS χαρακτηρίζεται από μετακίνηση υγρού πλούσιου σε πρωτεΐνες από τον ενδοαγγειακό στον 'τρίτο' χώρο, λόγω αυξημένης αγγειακής διαπερατότητας που πυροδοτείται από την εξωγενή χορήγηση της χοριακής γοναδοτροπίνης (πρώιμο OHSS) και διατηρείται ή επιδεινώνεται από την ενδογενή χοριακή που παράγεται σε περίπτωση κύησης (όψιμο OHSS). Αν και στην αιτιολογία του συνδρόμου εμπλέκονται διάφοροι παράγοντες, όπως οι προσταγλανδίνες, η ινχιμπίνη, το σύστημα ρενίνης-αγγειοτενσίνης-αλδοστερόνης, και φλεγμονώδεις διαμεσολαβητές, ο βασικός αιτιολογικός παράγοντας φαίνεται πως είναι ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγων (vascular endothelial growth factor, VEGF)· η έκφραση VEGF και VEGF υποδοχέα-2 (VEGFR-2) mRNA αυξάνεται σημαντικά σε απάντηση στην HCG και τα μέγιστα επίπεδα συμπίπτουν με την μέγιστη αγγειακή διαπερατότητα ^(191,192).

Πρωταρχικό μέλημα για την αποφυγή του OHSS είναι η αναγνώριση των γυναικών εκείνων που βρίσκονται σε υψηλό κίνδυνο να το αναπτύξουν, έτσι ώστε η φαρμακευτική ωοθηκική διέγερση να γίνει προσεκτικά και εξατομικευμένα. Πρωτογενείς παράγοντες κινδύνου είναι: μικρή ηλικία (<33 έτη), υψηλή AMH (>3.36 ng/mL), ιστορικό μετρίου ή σοβαρού OHSS, πολυκυστικές ωοθήκες (άθροισμα AFC και στις δύο ωοθήκες >24). Δευτερογενείς παράγοντες κινδύνου είναι: μεγάλος αριθμός μεσαίου/μεγάλου μεγέθους ωοθυλακίων (≥ 13 ωοθυλάκια ≥ 11 mm), υψηλά επίπεδα ή ταχέως αυξανόμενα επίπεδα οιστραδιόλης σε συνδυασμό με μεγάλο αριθμό ωοθυλακίων (E2 5,000 ng/L και ≥ 18 follicles), μεγάλος αριθμός ληφθέντων ωαρίων κατά την ωοληψία, υψηλά επίπεδα ινχιμπίνης-B κατά την 5^η ημέρα της διέγερσης και κατά την ωοληψία, υψηλά επίπεδα VEGF, χορήγηση HCG για υποστήριξη ωχρινικής φάσης, και κύηση. Επίσης, μελέτες έχουν υποδείξει αυξημένο κίνδυνο OHSS σε γυναίκες με ανοσολογική υπερευαισθησία και αλλεργίες. Τέλος, σε μοριακό επίπεδο, μεταλλάξεις στα γονίδια υποδοχέα FSH (FSHR) και της bone morphogenic protein-15 (BMP-15), έχουν συνδεθεί με αυξημένη προδιάθεση για OHSS ⁽¹⁹³⁾.

Η πρόληψη του OHSS αποτελεί το δεύτερο (μετά την πρόβλεψη) ζητούμενο και περιλαμβάνει πληθώρα χειρισμών με άλλοτε άλλη απόδοση.

- α) αναστολή χορήγησης χοριακής γοναδοτροπίνης: αποτελεί τον πιο αποδοτικό χειρισμό (μια και είναι η HCG η οποία πυροδοτεί το σύνδρομο), με βαρύ τίμημα βέβαια την ακύρωση του κύκλου ⁽¹⁹⁴⁾. Προτείνεται για τις εξαιρετικά επικίνδυνες περιπτώσεις που ο κύκλος φαίνεται να έχει ξεφύγει εκτός ελέγχου.
- β) αναστολή χορήγησης γοναδοτροπινών και καθυστέρηση πυροδότησης της τελικής ωρίμανσης (Coasting): αποτελεί ευρέως διαδεδομένο χειρισμό. Οι γοναδοτροπίνες διακόπτονται όταν τα επίπεδα οιστραδιόλης υπερβούν τα 3500-5000 pg/nL (δεν υπάρχει απόλυτη ομοφωνία για τα ακριβή επίπεδα έναρξης του coasting, ενώ από πολλούς προτείνεται και η συνεκτίμηση του μεγέθους των κυρίαρχων ωοθυλακίων, να είναι δηλαδή >15-17 mm), εν συνεχεία τα επίπεδα παρακολουθούνται καθημερινά (γιατί η πτώση τους μπορεί να είναι απότομη), και η πυροδότηση με HCG γίνεται όταν πέσουν σε ασφαλέστερα επίπεδα (≤ 3000 pg/nL). Αν και αρκετές μη τυχαιοποιημένες μελέτες έχουν δείξει καλά αποτελέσματα, η πρόσφατη Cochrane ανασκόπηση δεν απέδειξε κανένα όφελος από την υιοθέτηση του coasting (4 τυχαιοποιημένες μελέτες, συχνότητα μέτριου/σοβαρού OHSS: OR: 0.53, 95%CI: 0.23-1.23, ποσοστά ζώντων γεννήσεων: OR: 0.48, 95%CI: 0.14-1.62, ποσοστά κλινικών κύσεων: OR: 0.69, 95%CI: 0.44-1.08) σε σύγκριση με γυναίκες στις οποίες εφαρμόστηκε άλλος ή κανένας χειρισμός ⁽¹⁹⁵⁾. Τέλος, η συνέχιση του coasting για περισσότερες από 3-4 ημέρες, φαίνεται να επηρεάζει δυσμενώς τα ποσοστά εμφύτευσης και κύησης ⁽¹⁹⁶⁾.
- γ) τροποποίηση της χορήγησης HCG: αντί της συνήθους δόσης των 10000IU έχει προταθεί η χορήγηση χαμηλότερων δόσεων (5000 IU, 3300 IU ή και 2500 IU): το όφελος είναι αμφισβητήσιμο καθώς δεν υπάρχουν επαρκείς μελέτες επί του θέματος. Επίσης, σύμφωνα με την πρόσφατη Cochrane ανασκόπηση, ούτε η χορήγηση ανασυνδυσασμένης (αντί ούρων) HCG έχει συνδεθεί με μείωση της συχνότητας OHSS ⁽⁷³⁾. Επίσης, εννοείται πως η χορήγηση HCG στα πλαίσια της υποστήριξης της ωχρινικής φάσης θα πρέπει να αποφεύγεται. Τέλος, η ανάπτυξη της μεθόδου της in vitro ωρίμανσης ωαρίων (IVM), οδήγησε και σε μια άλλη δυναμική προσέγγιση, κατά την οποία η HCG χορηγείται όταν τα κυρίαρχα ωοθυλάκια είναι 12-14 mm, γίνεται η ωοληψία, και ακολουθεί το IVM: μια τουλάχιστον μελέτη αναφέρει καλά αποτελέσματα ⁽¹⁹⁷⁾, πλην όμως το IVM δεν εφαρμόζεται ευρέως και ανήκει στις τεχνικές που θεωρούνται ακόμα 'πειραματικές'.
- δ) Πυροδότηση της τελικής ωρίμανσης με GnRH αγωνιστή: ο χειρισμός αυτός (που είναι δυνατόν να εφαρμοσθεί μόνο στα πρωτόκολλα ανταγωνιστή), είναι εξαιρετικά αποδοτικός, εκπαιδευόμενος ουσιαστικά την πιθανότητα εμφάνισης OHSS, όπως φάνηκε και στην πρόσφατη Cochrane ανάλυση. Το πρόβλημα που προκύπτει από τον χειρισμό αυτό είναι η έντονη ανεπάρκεια της ωχρινικής φάσης με αποτέλεσμα να επηρεάζονται τα ποσοστά κύησης, τουλάχιστον όταν ακολουθείται η παραδοσιακή υποστήριξη. Έτσι, προτείνεται η κρυσταλλοποίηση όλων των εμβρύων και η τοποθέτησή τους σε επόμενο τεχνητό ή φυσικό κύκλο. Εναλλακτικά, ερευνάται και έχει δοκιμασθεί ειδική υποστήριξη ωχρινικής φάσης με μεγάλες δόσεις

προγενερότερης και/η μικρή δόση HCG, με ικανοποιητικά αποτελέσματα· η πρόσφατη μετανάλυση 6 τυχαίοποιημένων μελετών όπου ακολουθήθηκε ενισχυμένη υποστήριξη έδειξε μη σημαντικές διαφορές στα ποσοστά ζώντων γεννήσεων ⁽¹⁷⁷⁾.

- ε) Κρυσσυντήρηση των εμβρύων και ματαίωση της εμβρυομεταφοράς: πρόκειται για ευρέως εφαρμοζόμενη στρατηγική που περιορίζει αλλά δεν εκμηδενίζει τον κίνδυνο για OHSS, εφόσον έχει ήδη χορηγηθεί η HCG για την τελική ωρίμανση ⁽¹⁹⁸⁾. Το όφελος από τον χειρισμό είναι η αποφυγή της περαιτέρω έκθεσης σε HCG σε περίπτωση κύησης. Με δεδομένα τα εξαιρετικά αποτελέσματα της κρυσσυντήρησης και της επακόλουθης εμβρυομεταφοράς σε κύκλους απόψυξης ⁽¹⁹⁹⁾, αποτελεί υπολογίσιμη εναλλακτική, θα πρέπει όμως να τονισθεί πως και οι δύο μέχρι τώρα δημοσιευμένες Cochrane ανασκοπήσεις καταλήγουν στο συμπέρασμα πως δεν υπάρχουν επαρκείς αποδείξεις για την κατά ρουτίνα υιοθέτηση του χειρισμού ^(200,201).
- στ) Χορήγηση ενδοφλεβίων υγρών: για την πρόληψη του OHSS έχει προταθεί η χορήγηση αλβουμίνης και υδροξυαιθυλικού αμύλου κατά και μετά την ωοληψία. Σύμφωνα με την πλέον πρόσφατη Cochrane ανασκόπηση, παρατηρείται μια οριακά στατιστικά σημαντική μείωση της συχνότητας σοβαρού OHSS με την χορήγηση αλβουμίνης (8 τυχαίοποιημένες μελέτες, OR: 0.67, 95%CI: 0.45-0.99), καθώς και μια στατιστικά σημαντική μείωση με την χορήγηση υδροξυαιθυλικού αμύλου (3 τυχαίοποιημένες μελέτες, OR: 0.12, 95%CI: 0.04-0.40). Και οι δύο χειρισμοί δεν επηρέασαν τα ποσοστά κύησης
- ε) Χορήγηση αγωνιστών ντοπαμίνης: η χορήγηση καρβεγολίνης ή γουιναγολίδης από την ημέρα της HCG πυροδότησης έχει πρόσφατα προταθεί για την πρόληψη του OHSS, με το σκεπτικό ότι οι ουσίες αυτές αναστέλλουν την φωσφορυλίωση του VEGFR-2. Σύμφωνα με την πρόσφατη Cochrane ανασκόπηση (2 τυχαίοποιημένες μελέτες, 230 γυναίκες) ⁽²⁰²⁾, η χορήγηση από του στόματος 0.5mg καρβεγολίνης ημερησίως, συνδυάστηκε με μια στατιστικά σημαντική μείωση του OHSS συνολικά (OR: 0.40, 95% CI: 0.20-0.77)· η σημαντικότητα αφορούσε τα μέτριας βαρύτητας σύνδρομα (OR: 0.38, 95% CI: 0.19-0.78) όχι όμως και τα σοβαράς βαρύτητας (OR: 0.77, 95% CI: 0.24-2.45). Τέλος, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στα ποσοστά κλινικών κύσεων (OR: 0.94, 95% CI: 0.56-1.59), αποβολών (OR: 0.31, 95% CI: 0.033-0.7) ή άλλων παρενεργειών (OR: 2.07, 95% CI: 0.56-7.70). Ενδιαφέρουσες παρατηρήσεις είναι ότι η καρβεγολίνη είναι λιγότερο αποτελεσματική στις γυναίκες με σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών, ενώ δεν είναι καθόλου αποτελεσματική για την πρόληψη του όψιμου OHSS ⁽²⁰³⁾.

Η αντιμετώπιση των ήπιας/μέτριας βαρύτητας OHSS δεν απαιτεί συνήθως νοσηλεία και περιλαμβάνει την παρακολούθηση του σωματικού βάρους και της διούρησης καθώς και την λήψη ισοτονικών ροφημάτων με ηλεκτρολύτες. Αν η κατάσταση επιδεινωθεί ή εξαρχής έχουμε βαρύ σύνδρομο απαιτείται νοσηλεία με τήρηση ισοζυγίου υγρών και ενδελεχή εργαστηριακό έλεγχο νεφρικής και ηπατικής λειτουργίας. Γίνεται διόρθωση κυκλοφορικών και ηλεκτρολυτι-

κών διαταραχών με κρυσταλοειδή διαλύματα ($\text{NaCl} \pm \text{Dextrose}$), χορήγηση λευκωματίνης (25% 50-100 gr iv κάθε 2-12 ώρες), χορήγηση διουρητικών (όπως φουροσεμίδη 10-20 mg όταν η ολιγουρία επιμένει και εφόσον δεν υπάρχει αιμοσυμπύκνωση), χορήγηση ντοπαμίνης (όταν η ολιγουρία επιμένει παράλληλα με μη διορθώσιμη αιμοσυμπύκνωση), και χορήγηση αντιπηκτικής αγωγής. Παράλληλα, εφαρμόζεται από τους περισσότερους και παρακέντηση (συνήθως διακολπικώς) για αποσυμφόρηση του ασκίτη· ο χειρισμός αυτός, εκτός του ότι ανακουφίζει την ασθενή, ίσως προλαμβάνει την εξέλιξη σε βαρύτερη κατάσταση(204), και μάλλον περιορίζει τον απαιτούμενο χρόνο νοσηλείας⁽²⁰⁵⁾.

Γ) Πολύδυμες κύσεις

Οι πολύδυμες κύσεις εμφανίζονται με αυξημένη συχνότητα έπειτα από εφαρμογή μεθόδων υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, και θεωρούνται ως η κυριότερη επιπλοκή αυτών. Είναι προφανές πως στις περιπτώσεις εξωσωματικής γονιμοποίησης, προκύπτουν από την μεταφορά περισσότερων του ενός εμβρύων· θα πρέπει όμως να τονισθεί πως προκύπτουν και από την μη σωστά ελεγχόμενη διέγερση σε κύκλους πρόκλησης ωοθυλακιορρηξίας με ή χωρίς σπερματέγχυση. Οι πολύδυμες κύσεις θεωρούνται υψηλού κινδύνου και συνδέονται με αυξημένο κίνδυνο επιπλοκών όπως αποβολής, συγγενών ανωμαλιών, προεκλαμψίας/εκλαμψίας, διαβήτη κύησης και πρόωρου τοκετού, ενώ ο κίνδυνος για τα ανωτέρω επιτείνεται περαιτέρω αν συνυπολογίσουμε ότι πληθώρα κύσεων εξωσωματικής αφορούν γυναίκες προχωρημένης αναπαραγωγικής ηλικίας⁽²⁰⁶⁾. Ο πιο σοβαρός κίνδυνος είναι εκείνος της προωρότητας· νεογνά τριδύμων κύσεων υπολογίζεται πως έχουν 20% πιθανότητα μείζονος αναπηρίας, 17 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα νευρολογικών διαταραχών, και 20 φορές αυξημένη θνησιμότητα κατά τον πρώτο χρόνο της ζωής τους (συγκρινόμενα με νεογνά μονήρων κύσεων)⁽²⁰⁷⁾. Σύμφωνα με την πιο πρόσφατη καταγραφή δεδομένων από την ESHRE⁽²⁰⁸⁾, το 2008 παρατηρήθηκε μια οριακή μείωση της συχνότητας γέννησης πολυδύμων (διδύμων και τριδύμων) σε σύγκριση με το 2007 (21.7% έναντι 22.3%), αλλά η συχνότητα εξακολουθεί να είναι αυξημένη σε σύγκριση με το 2006 (20.8%). Σημαντική μείωση των γεννήσεων τριδύμων εξακολουθεί να παρατηρείται σε σχέση με τα παλαιότερα χρόνια (3.6% το 1997 και 1% το 2008), αλλά δεν παρατηρούνται αξιόλογες περαιτέρω μειώσεις από το 2005. Βέβαια, θα πρέπει να σημειωθεί πως το αληθινό ποσοστό τριδύμων και άνω κύσεων (και όχι γεννήσεων) είναι υψηλότερο αφού στις περισσότερες από αυτές πραγματοποιείται 'μείωση' του αριθμού των εμβρύων· το 2008 καταγράφηκαν 394 'μειώσεις' αλλά ο πραγματικός αριθμός πρέπει να είναι μεγαλύτερος, αφού μεγάλες χώρες όπως η Γερμανία και η Γαλλία δεν τις καταγράφουν επισήμως. Τέλος, θα πρέπει να σημειωθεί πως η εξωσωματική γονιμοποίηση φαίνεται να συνδέεται και με αύξηση της συχνότητας μονοζυγωπικών διδύμων. Πολλές μελέτες αναφέρουν ότι η συχνότητα είναι 2-12 φορές μεγαλύτερη από την αντίστοιχη 0.4% των φυσικών συλλήψεων, ενώ η σοβαρότερη επιπλοκή των κύσεων

αυτών είναι το σύνδρομο εμβρυϊκής μετάγγισης (twin to twin transfusion syndrome) που εμφανίζεται στο 10-20% των περιπτώσεων. Ειδικοί παράγοντες σχετιζόμενοι με την εξωσωματική που έχουν ενοχοποιηθεί για την αύξηση της συχνότητας αυτής είναι η καλλιέργεια και μεταφορά των εμβρύων στο στάδιο της βλαστοκύστης και οι τεχνικές που περιλαμβάνουν 'χειρισμούς ζώνης', όπως το ICSI και η υποβοηθούμενη εκκόλαση^(209,210).

Όπως είναι ευνόητο, ο περιορισμός των μεταφερομένων εμβρύων αποτελεί το απόλυτο μέτρο περιορισμού της ιατρογενούς επιπλοκής των πολυδύμων κύσεων. Στην Ελλάδα σύμφωνα με την πρόσφατη νομοθεσία, ο ανώτερος επιτρεπόμενος αριθμός μεταφερομένων εμβρύων ορίζεται στα 3 έως την ηλικία των 40 ετών, και στα 4 για ηλικίες άνω των 40. Από πολλούς μάλιστα υποστηρίζεται ότι ο ορισμός της 'επιτυχίας' μετά την εφαρμογή τεχνικών υποβοηθούμενης αναπαραγωγής θα πρέπει να αλλάξει από τις ζώντες γεννήσεις γενικώς, στις ζώντες γεννήσεις μονήρων κύσεων⁽²¹¹⁾.

Δ) Επιπτώσεις της εξωσωματικής γονιμοποίησης στην κύηση και στους απογόνους

Το χαμηλό βάρος γέννησης (ΧΒΓ) αποτελεί ένα σταθερό εύρημα στις κύσεις από εξωσωματική, που σε μεγάλο βαθμό αποδίδεται στην ταυτόχρονα αυξημένη συχνότητα των πολυδύμων κύσεων. Πάντως, κάποιες μελέτες αναφέρουν ότι και οι μονήρεις κύσεις εξωσωματικής παρουσιάζουν αυξημένο κίνδυνο για ΧΒΓ, ακόμα και σε τελειόμηνια, ενώ άλλες δεν βρίσκουν διαφορές. Επίσης, αρκετές μελέτες αναφέρουν ότι οι κύσεις από εξωσωματική επιπλέκονται συχνότερα από πρόωρο τοκετό και προεκλαμψία, ενώ άλλες δεν βρίσκουν διαφορές⁽²¹²⁾.

Οι πιθανές επιπτώσεις στα 'παιδιά' της εξωσωματικής έχουν αποτελέσει αντικείμενο πολλών συζητήσεων και σχολίων. Όσον αφορά τις συγγενείς ανωμαλίες, τα μέχρι τώρα δεδομένα συνηγορούν υπέρ μιας σχετικής αύξησής τους. Σε μια από τις αρτιότερες συστηματικές ανασκοπήσεις αναφέρεται αύξηση με OR: 1.40, 95%CI: 1.28-1.53⁽²¹³⁾. Στην τελευταία επίσημη θέση της ESHRE αναφέρεται πως τα παιδιά από εξωσωματική έχουν 40-50% αυξημένο κίνδυνο για συγγενείς ανωμαλίες, αλλά παρόμοια αυξημένο κίνδυνο έχουν και τα παιδιά από φυσικές συλλήψεις σε υπογόνιμα ζευγάρια και συνεπώς μάλλον ευθύνονται γονικοί παράγοντες, και όχι η ίδια η μέθοδος. Εξηγώντας τους κινδύνους στα ζευγάρια, είναι σωστό να επισημαίνουμε ότι στον γενικό πληθυσμό η συχνότητα των συγγενών ανωμαλιών είναι 2-3%, και ο κίνδυνος γίνεται 3-4% στα παιδιά από εξωσωματική. Δεν παρατηρούνται διαφορές μεταξύ ICSI και απλής εξωσωματικής, ενώ αντικρουόμενα είναι τα αποτελέσματα για επιμέρους διαφορές στην εμφάνιση ανωμαλιών από συγκεκριμένα συστήματα (π.χ. κάποιες μελέτες αναφέρουν αυξημένη συχνότητα ανωμαλιών από την καρδιά και το γαστρεντερικό⁽²¹⁴⁾ και άλλες από το ουροποιητικό και το μυοσκελετικό⁽²¹⁵⁾). Όσον αφορά τις νευροαναπτυξιακές διαταραχές, μεγάλη αναστάτωση προκλήθηκε από μια μεγάλη μελέτη που ανέφερε σχεδόν τετραπλασιασμό της συχνότητας

αναπτυξιακής καθυστέρησης στα παιδιά της εξωσωματικής· όμως κατέστη σαφές ότι αυτό συνδεόταν με την προωρότητα και τις πολύδυμες κυήσεις ⁽²¹⁶⁾. Η συντριπτική πλειοψηφία των μελετών υποδεικνύει φυσιολογική ανάπτυξη έως και την ηλικία των 18 ετών, αυτό όμως δεν σημαίνει καθυστασμό και οι μελέτες θα πρέπει να συνεχισθούν ⁽²¹⁷⁾. Όσον αφορά τον κίνδυνο καρδιομεταβολικών διαταραχών στα παιδιά της εξωσωματικής, η συντριπτική πλειοψηφία των μελετών που αξιολογούν ύψος, βάρος και BMI δεν αναφέρουν διαφορές από τα παιδιά φυσικών συλλήψεων ⁽²¹⁸⁾. Υπάρχουν κάποιες μελέτες που αναφέρουν διαφορές στην κατανομή του λίπους (π.χ. αυξημένο ολικό και περιφερικό λίπος ⁽²¹⁹⁾), και κάποιες ακόμα λιγότερες που αναφέρουν αυξημένα επίπεδα γλυκόζης και τριγλυκεριδίων ⁽²²⁰⁾, αυξημένη αρτηριακή πίεση ⁽²²⁰⁾ και αγγειακή δυσλειτουργία ⁽²²¹⁾. Θεωρητικά, επιγενετικές διαταραχές που ίσως προκαλούνται από διάφορους παράγοντες της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, όπως η φαρμακευτική ωθητική διέγερση, η εξωσωματική καλλιέργεια, οι χειρισμοί στο σπέρμα και άλλοι, θα μπορούσαν μέσω επιδράσεων στην ανάπτυξη του εμβρύου και του πλακούντα να οδηγήσουν αργότερα σε καρδιομεταβολικές διαταραχές, και για το λόγο αυτό η έρευνα δεν πρέπει να σταματήσει.

Τέλος, μεγάλη δημοσιότητα έλαβαν μελέτες σχετικά με την επίπτωση των διαταραχών 'αποτύπωσης' (imprinting) στα παιδιά της εξωσωματικής. Από το 2002 και μετά δημοσιεύθηκαν αρκετές αναφορές περιστατικών τέτοιων διαταραχών μετά εξωσωματική. Οι περισσότερες από τις μελέτες αυτές εξέτασαν τις διαταραχές μεθυλίωσης του DNA και κατέληξαν σε αντικρουόμενα αποτελέσματα. Πάντως, υπάρχουν αρκετές αναφορές που συνδέουν την εξωσωματική για αυξημένο κίνδυνο για σύνδρομα Beckwith-Wiedemann και Angelman, αλλά αφενός τα απόλυτα νούμερα είναι εξαιρετικά μικρά λόγω της σπανιότητας των συνδρόμων αυτών (<1/15000) και αφετέρου απαιτούνται μεγαλύτερες μελέτες για την εξαγωγή ισχυρών συμπερασμάτων ⁽²²²⁾.

E) Φάρμακα γονιμότητας και γυναικολογικός καρκίνος

Η πιθανή συσχέτιση μεταξύ των φαρμάκων γονιμότητας και καρκίνου αποτελεί μια από τις σοβαρότερες ανησυχίες των ζευγαριών που ξεκινούν προγράμματα εξωσωματικής και αποτελεί σταθερή ερώτηση προς τον ιατρό κατά την πρώτη ενημέρωση (και όχι μόνο). Το θέμα έχει διερευνηθεί και αναλυθεί σε προηγούμενη έκδοση της ΕΕΓΕ και υπενθυμίζουμε τα συμπεράσματα.

Η σχέση μεταξύ φαρμάκων γονιμότητας και καρκίνου του μαστού, έχει διερευνηθεί σε δώδεκα αξιόπιστες μελέτες (εννέα πληθυσμιακές και τρεις ασθενών-μαρτύρων). Στις εννέα εξ αυτών δεν αποδείχθηκε καμία στατιστικώς σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στην λήψη φαρμάκων γονιμότητας και τον κίνδυνο για καρκίνο του μαστού, σε μία εξ αυτών παρατηρήθηκε αύξηση του κινδύνου στον υπογόνιμο γενικά πληθυσμό, ανεξάρτητα από την λήψη ή μη φαρμάκων, σε μία εξ αυτών παρατηρήθηκε μια παροδική μόνο αύξηση του συχνότητας του καρκίνου (για τον πρώτο χρόνο από την λήψη των φαρμάκων) που αποδόθηκε σε ανάπτυξη προϋπαρχόντων όγκων, ενώ σε μία εξ αυτών (που ήταν μελέτη ελεγχόμενων περιστατικών) παρατηρήθηκε αύ-

ξηση της συχνότητας του καρκίνου, μόνο σε γυναίκες που έκαναν χρήση των φαρμάκων για πάνω από έξι κύκλους θεραπείας. Τέλος, η πλέον πρόσφατη μετανάλυση επί του θέματος ⁽²²³⁾ περιέλαβε 15 πληθυσμιακές μελέτες και 8 μελέτες ελεγχόμενων περιπτώσεων και κατέληξε στο συμπέρασμα ότι τα μέχρι τώρα δεδομένα δεν υποδεικνύουν υψηλότερο κίνδυνο για καρκίνο του μαστού στις γυναίκες που έλαβαν φάρμακα γονιμότητας, αλλά θα πρέπει να σημειωθεί ότι σε αρκετές από αυτές το χρονικό διάστημα παρακολούθησης δεν ήταν μακρύ.

Η σχέση μεταξύ φαρμάκων γονιμότητας και καρκίνου του ενδομητρίου, έχει διερευνηθεί σε έξι πληθυσμιακές μελέτες. Στις δύο μεγαλύτερες εξ αυτών δεν ανευρέθηκε αύξηση των περιπτώσεων καρκίνου στις γυναίκες που έκαναν χρήση των εν λόγω φαρμάκων. Εκ των υπολοίπων τεσσάρων μελετών, στις δύο και πάλι δεν ανευρέθηκε ουδεμία συσχέτιση, στην μία παρατηρήθηκε αύξηση του κινδύνου στον υπογόνιμο πληθυσμό ανεξαρτήτως της λήψης ή μη φαρμάκων, και στην τελευταία παρατηρήθηκε μια μη στατιστικώς σημαντική αύξηση του κινδύνου επί χρήσης κλομιφαίνης που απέκτησε σημαντικότητα μόνο στις άτοκες και τις παχύσαρκες γυναίκες. Η χρήση των φαρμάκων γονιμότητας δεν φαίνεται να αυξάνει το κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του τραχήλου της μήτρας.

Τέλος, παρομοίως καθησυχαστικά είναι και τα αποτελέσματα της συντριπτικής πλειοψηφίας των αξιόπιστων μελετών που διερεύνησαν την συσχέτιση των φαρμάκων γονιμότητας με τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου των ωοθηκών. Φαίνεται πως ενώ οι υπογόνιμες γυναίκες βρίσκονται σε υψηλότερο κίνδυνο για καρκίνο των ωοθηκών λόγω παραγόντων υπογονιμότητας, ο κίνδυνος αυτός δεν αυξάνεται περαιτέρω από την χρήση των φαρμάκων ^(224,225).

ΙΔΙΑΙΤΕΡΕΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ

Α) Γυναίκες με ινομύωματα μήτρας

Τα ινομύωματα αποτελούν συχνότατη γυναικολογική διαταραχή και εμφανίζονται στο 20%-50% των γυναικών αναπαραγωγικής ηλικίας. Αν και οι περισσότερες γυναίκες με ινομύωματα είναι γόνιμες, η παρουσία τους έχει συνδεθεί με προβλήματα γονιμότητας δευτερογενώς, λόγω ανατομικών διαταραχών ή επιδράσεων στο περιβάλλον της μήτρας. Επίσης, αναπόφευκτα πολλές από τις γυναίκες που ακολουθούν προγράμματα εξωσωματικής για διάφορους λόγους παρουσιάζουν ταυτόχρονα και ινομύωματα' συχνά λοιπόν, και ιδίως επί αποτυχιών των προσπαθειών, ανακύπτει το ερώτημα κατά πόσον η παρουσία τους επηρεάζει τα αποτελέσματα. Όσον αφορά τα υποβλεννογόνια ινομύωματα και εκείνα από τα ενδοτοικωματικά που προβάλλουν εντός της ενδομητρικής κοιλότητας, έχει αποδειχθεί πως η παρουσία τους επηρεάζει δυσμενώς τα ποσοστά εμφύτευσης και κύησης μετά από εξωσωματική, και πως η αφαίρεσή τους βελτιώνει τα εν λόγω ποσοστά ⁽²²⁶⁻²²⁸⁾. Για τα υπόλοιπα, εκείνα δηλαδή που δεν προβάλλουν ή δεν παραμορφώνουν την ενδομητρική κοιλότητα, τα αποτελέσματα των μελετών είναι αντικρουόμενα. Πρό-

σφατα δημοσιεύθηκε μια συστηματική ανασκόπηση και μετανάλυση όλων των επί του θέματος δημοσιευμένων μελετών (19 μελέτες παρατήρησης, 6087 κύκλοι εξωσωματικής)⁽²²⁹⁾ όπου ανεδείχθη σημαντική ελάττωση των ποσοστών γεννήσεων (Σχετικός Κίνδυνος: 0.79, 95%CI: 0.70-0.88, $P<0.0001$) και κλινικών κήσεων (Σχετικός Κίνδυνος: 0.85, 95% CI: 0.77-0.94, $P=0.002$) έπειτα από εξωσωματική στις γυναίκες με ινομυώματα που δεν παραμορφώνουν την κοιλότητα σε σύγκριση με εκείνες χωρίς ινομυώματα. Με διαφορετικά λόγια, η παρουσία των ινομυωμάτων αυτών μειώνει τα ποσοστά γεννήσεων κατά 21% και τα ποσοστά κλινικών κήσεων κατά 15%. η επιπλέον δυσμενής επίδραση στα ποσοστά γεννήσεων αποδίδεται στις επιπλοκές κύησης που αποδεδειγμένα προκαλούνται από τα ινομυώματα. Οι μηχανισμοί μέσω των οποίων τα ινομυώματα επηρεάζουν τα αποτελέσματα της εξωσωματικής εικάζεται ότι είναι διαταραχές της αιμάτωσης, αυξημένη μυομητρική συσταλτικότητα, διαταραχές στην λειτουργία του ενδομητρίου, ή και τροποποιημένη έκφραση γονιδίων. Τα αποτελέσματα της μετανάλυσης θα πρέπει βέβαια να αξιολογηθούν προσεκτικά δεδομένης της μεγάλης ετερογένειας των επιμέρους μελετών ως προς πολλούς παράγοντες, όπως ο αριθμός των προσπαθειών, οι μέθοδοι που εφαρμόστηκαν για να διαπιστωθεί πιθανή παραμόρφωση της ενδομητρικής κοιλότητας, το μέγεθος και ο αριθμός των ινομυωμάτων κλπ, αλλά και λόγω του ότι όλες ήταν απλές μελέτες παρατήρησης. Πάντως, δυσμενής επίπτωση διαπιστώθηκε και στις επιμέρους μετανάλυσεις, όπως σε γυναίκες <37 ετών, σε γυναίκες που έκαναν τον πρώτο τους κύκλο, καθώς και στις προοπτικές μόνο εκ των μελετών. Επίσης, μια άλλη σημαντική λεπτομέρεια είναι πως η μετανάλυση αυτή δεν παρέχει δεδομένα για το τι θα συμβεί ή τι συνέβη σε προσπάθειες εξωσωματικής που έγιναν στις γυναίκες αυτές μετά την χειρουργική αφαίρεση των ινομυωμάτων, αν δηλαδή τα αποτελέσματα πράγματι βελτιώθηκαν. Η αφαίρεση των ινομυωμάτων μπορεί πλέον να γίνεται σε πολλές περιπτώσεις λαπαροσκοπικά, αλλά ανεξαρτήτως τεχνικής δεν θα πρέπει να ξεχνάμε ότι μετά το χειρουργείο θα πρέπει να μεσολαβήσει ικανό χρονικό διάστημα έως ότου η γυναίκα να μείνει έγκυος με ασφάλεια⁽²³⁰⁾, και η παράμετρος αυτή αποκτά ιδιαίτερη σημασία για τον πληθυσμό που ακολουθεί προγράμματα εξωσωματικής λόγω της μεγάλης αναλογίας γυναικών μέσης και προχωρημένης αναπαραγωγικής ηλικίας. Από τα ανωτέρω συνάγεται το συμπέρασμα πως ο χειρισμός των γυναικών με ινομυώματα που δεν παραμορφώνουν την ενδομητρική κοιλότητα και κάνουν εξωσωματική θα πρέπει να εξατομικεύεται.

B) Γυναίκες με ενδομητρίωση

Η ενδομητρίωση αποτελεί μια συχνή γυναικολογική διαταραχή που έχει συσχετισθεί με υπογονιμότητα. Η πραγματική συχνότητα της διαταραχής είναι δύσκολο να εκτιμηθεί καθώς διάφορες μελέτες δίνουν ποικίλα δεδομένα. Πάντως, κλασσικές μελέτες αναφέρουν πως 25-50% των υπογόνιμων γυναικών έχουν ενδομητρίωση και πως 30-50% των γυναικών με ενδομητρίωση είναι υπογόνιμες⁽²³¹⁾. Η υπόθεση ότι η ενδομητρίωση προκαλεί υπογονιμότητα ή ελαττώνει την

γονιμότητα παραμένει συζητήσιμη, καθώς ενώ υπάρχουν πολλά δεδομένα που υποδεικνύουν την συσχέτιση αυτή, δεν έχει αποδειχθεί κάποιος ακριβής αιτιολογικός παράγων, με εξαίρεση τις περιπτώσεις που η διαταραχή έχει προκαλέσει σοβαρή διαταραχή στην πυελική ανατομία, όπως π.χ. συμφύσεις. Η πιθανότητα σύλληψης ανά μήνα σε φυσιολογικά ζευγάρια υπολογίζεται σε 15-20%, ενώ επί ενδομητρίωσης η αναφερόμενη πιθανότητα κυμαίνεται ευρέως από 2-10% ⁽²³²⁾. Αν η ενδομητρίωση προκαλεί υπογονιμότητα, η κατασταλτική φαρμακευτική θεραπεία θα έπρεπε να βελτιώνει τις πιθανότητες σύλληψης, αλλά δυστυχώς κάτι τέτοιο έχει αποδειχθεί πως δεν συμβαίνει. Έτσι, οι τελευταίες κατευθυντήριες οδηγίες από την ASRM περιλαμβάνουν τα ακόλουθα: Το όφελος από την λαπαροσκοπική θεραπεία της ήπιας ή μέτριας ενδομητρίωσης δεν είναι επαρκές ώστε να προτείνεται η λαπαροσκόπηση μόνο και μόνο για να αυξηθούν οι πιθανότητες κύησης. Εννοείται πως αν η λαπαροσκόπηση πραγματοποιείται για άλλο λόγο συστήνεται η καταστροφή ή αφαίρεση των ενδομητρωσικών εστιών που ανευρέθηκαν τυχαία. Στις γυναίκες μικρότερης ηλικίας (<35 έτη) με υπογονιμότητα σχετιζόμενη με ενδομητρίωση σταδίου I/II οι επιλογές πρώτης γραμμής είναι συνέχιση των προσπαθειών και παρακολούθηση ή ενδομήτριος σπερματέγχυση με ήπια ωοθηκική διέγερση. Στις γυναίκες μεγαλύτερης ηλικίας (>35 έτη) με υπογονιμότητα σχετιζόμενη με ενδομητρίωση σταδίου I/II συστήνεται πιο επιθετική αντιμετώπιση με ωοθηκική διέγερση και ενδομήτριο σπερματέγχυση ή εξωσωματική γονιμοποίηση. Στις γυναίκες με υπογονιμότητα σχετιζόμενη με ενδομητρίωση σταδίου III/IV, η συντηρητική χειρουργική αντιμετώπιση της διαταραχής μπορεί να είναι ωφέλιμη αν δεν επιτευχθεί κύηση μετά το χειρουργείο ή αν η ηλικία της γυναίκας είναι προχωρημένη, συστήνεται η εξωσωματική γονιμοποίηση ⁽²³³⁾.

Όσον αφορά τα αποτελέσματα της εξωσωματικής στις γυναίκες με ενδομητρίωση, μια πρόσφατη μετανάλυση των δημοσιευμένων μελετών παρατήρησης αναφέρει πως οι γυναίκες αυτές είχαν σημαντικά χαμηλότερα ποσοστά κύησης μετά IVF σε σύγκριση με γυναίκες που έκαναν IVF λόγω σαλπιγγικού παράγοντα (OR: 0.56, 95%CI: 0.44-0.70), σημαντικά χαμηλότερα ποσοστά γονιμοποίησης και εμφύτευσης, και σημαντικά μικρότερο αριθμό ληφθέντων ωαρίων· επιπλέον, τα ποσοστά κύησης στις γυναίκες με σοβαρή ενδομητρίωση ήταν σημαντικά χαμηλότερα σε σύγκριση με εκείνα σε γυναίκες με ήπια νόσο (OR: 0.60, 95% CI: 0.42-0.87) ⁽²¹²⁾. Σε αντίθεση με τα παραπάνω, αν ανατρέξουμε σε πρόσφατα αποτελέσματα από την επίσημη καταγραφή στις ΗΠΑ ⁽²³⁴⁾, θα διαπιστώσουμε πως το μέσο ποσοστό γεννήσεων ανά ωοληψία για όλες τις ενδείξεις ήταν το 2010 33.2% ενώ το αντίστοιχο σε γυναίκες με ενδομητρίωση ήταν 39.1%! Σίγουρα, η εξαγωγή συμπερασμάτων από δεδομένα καταγραφής θα πρέπει να είναι προσεκτική μια και μπορεί να υπάρχουν μη σταθμισμένες παράμετροι (π.χ. οι γυναίκες με ενδομητρίωση να ήταν μικρότερης ηλικίας), αλλά όπως και να έχει, και κυρίως λόγω του μεγάλου αριθμού των κύκλων στην εν λόγω βάση δεδομένων, έρχονται σε σχετική αντίθεση με τα συμπεράσματα της μετανάλυσης, διατηρώντας το ζήτημα σε αμφιβολία. Πάντως, ενώ η ενδομητρίωση ίσως επηρεάζει τα αποτελέσματα της IVF, η IVF φαίνεται πως μεγιστοποιεί την

ανά κύκλο πιθανότητα σύλληψης στις γυναίκες με ενδομητρίωση και ιδίως σε αυτές με διαταραχή της πυελικής ανατομίας λόγω μέτριας ή σοβαρής μορφής της νόσου· υπάρχουν λίγες μελέτες που συγκρίνουν την εφαρμογή IVF με την αναμονή για σύλληψη/παρακολούθηση, και σε μία από αυτές αναφέρονται ποσοστά κύησης 33% έναντι 0% (διαφορά που όμως δεν ήταν σημαντική λόγω του μικρού αριθμού των γυναικών) ⁽²³⁵⁾.

Η επίπτωση της παρουσίας ενδομητριωμάτων στα αποτελέσματα της εξωσωματικής παραμένει αμφιλεγόμενη, κυρίως λόγω της έλλειψης τυχαιοποιημένων μελετών. Δύο μελέτες με 189 γυναίκες η μία, και 171 η άλλη, δεν ανέδειξαν βελτίωση των ποσοστών κύησης στην προσπάθεια IVF έπειτα από αφαίρεση ή αναρρόφηση των ενδομητριωμάτων ^(236,237). Στο ίδιο συμπέρασμα κατέληξαν και οι αναλυτές της πρόσφατης Cochrane ανασκόπησης επί του θέματος ⁽²³⁸⁾. Πάντως, καλό θα είναι κάθε περίπτωση να εξατομικεύεται, μια και υπάρχουν πιθανά οφέλη από την αφαίρεση των ενδομητριωμάτων, και ιδίως των μεγάλων (>4 cm, για τα οποία σημειώνεται πως δεν υπάρχουν ειδικές μελέτες), όπως η αποφυγή ρήξης τους κατά την ωοληψία, η διευκόλυνση της ωοληψίας, η αποφυγή πρόσμειξης του ωοθυλακικού υγρού με περιεχόμενο του ενδομητρίου, ενώ δεν πρέπει να ξεχνούμε τον κίνδυνο ανάπτυξης νεοπλασίας επί ύπαρξης ενδομητριωμάτων, όπως αναφέρεται σε πολύ πρόσφατη μελέτη ⁽²³⁹⁾.

Όσον αφορά τον τύπο του πρωτοκόλλου που πιθανώς θα δώσει καλύτερα αποτελέσματα σε γυναίκες με ενδομητρίωση, πρόσφατη Cochrane ανασκόπηση (3 τυχαιοποιημένες μελέτες, 165 γυναίκες) αναφέρει πως η καταστολή με GnRH αγωνιστές για διάστημα 3-6 μηνών πριν την εξωσωματική στις γυναίκες αυτές, αυξάνει τις πιθανότητες για κλινική κύηση (OR: 4.28, 95%CI: 2.00-9.15) ⁽²⁴⁰⁾. Επισημαίνεται πάντως πως τα ασυνήθιστα υψηλά ποσοστά κύησης που αναφέρονται στις 2 από τις 3 αυτές μελέτες (75% και 80%) καθιστούν αμφισβητήσιμη την γενίκευση των συμπερασμάτων για τον γενικό πληθυσμό των γυναικών που κάνει εξωσωματική. Τέλος, δεν καθίσταται σαφές αν μια τέτοια αγωγή ωφελεί γυναίκες με ήπια ή σοβαρή νόσο.

Γ) Γυναίκες με υδροσάλπιγγες

Ενώ ο σαλπιγγικός παράγοντας αποτελεί κύρια ένδειξη εφαρμογής εξωσωματικής γονιμοποίησης, ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα είναι η παρατήρηση πως γυναίκες που υποβάλλονται σε εξωσωματική έχοντας υδροσάλπιγγες παρουσιάζουν σημαντικά χαμηλότερα ποσοστά εμφύτευσης και κύησης σε σχέση με τα αναμενόμενα ⁽²⁴¹⁾. Αυτό αποδίδεται στις πιθανές δυσμενείς επιδράσεις του υγρού που περιέχουν οι υδροσάλπιγγες· στο υγρό αυτό απομονώνονται κυτοκίνες, προσταγλανδίνες και άλλα φλεγμονώδη συστατικά, τα οποία εισερχόμενα στην ενδομητρική κοιλότητα μπορεί να ασκούν άμεση τοξική δράση στα μεταφερόμενα έμβρυα, να επηρεάζουν την υποδεκτικότητα του ενδομητρίου, ή τέλος να παρασύρουν μηχανικά τα έμβρυα εμποδίζοντας την προσκόλληση και εμφύτευσή τους. Όπως ήταν λογικό, τέθηκε το ερώτημα αν η αφαίρεση των υδροσάλπιγγων θα αναιρούσε τις δυσμενείς αυτές επιδράσεις, βελτιώνοντας τα αποτελέσματα

της εξωσωματικής. Πράγματι, όλες οι μεγάλες τυχαίοποιημένες μελέτες δικάωσαν τους θιασώτες της 'προφυλακτικής' σαλπινγεκτομίας, ενώ ισοδύναμα ευεργετικά αποτελέσματα φάνηκε να παρέχει και η πιο απλή τεχνικώς απολίνωση των υδροσαλπίγγων ώστε να διακόπεται η ροή του υγρού εντός της ενδομητρικής κοιλότητας⁽²⁴²⁾. Έτσι, στην πλέον πρόσφατη Cochrane ανασκόπηση (5 τυχαίοποιημένες μελέτες, 646 γυναίκες) αναφέρεται πως: η πραγματοποίηση λαπαροσκοπικής σαλπινγεκτομίας πριν τον κύκλο IVF αυξάνει σημαντικά τα ποσοστά συνεχιζόμενων (Peto OR: 2.14, 95%CI: 1.23-3.73) και κλινικών κυήσεων (Peto OR: 2.31, 95%CI: 1.48-3.62)· η λαπαροσκοπική απολίνωση των υδροσαλπίγγων πριν τον κύκλο IVF αυξάνει σε μη σημαντικό βαθμό τις συνεχιζόμενες κυήσεις (Peto OR: 7.24, 95%CI: 0.87-59.57) και σε στατιστικά σημαντικό βαθμό τις κλινικές κυήσεις (Peto OR: 4.66, 95%CI: 2.47-10.01)· η μεταξύ των δύο τεχνικών σύγκριση (σαλπινγεκτομία έναντι απολίνωσης) δεν ανέδειξε κάποιο σημαντικό πλεονέκτημα της μιας ή της άλλης όσον αφορά τα ποσοστά συνεχιζόμενων (Peto OR: 1.65, 95%CI: 0.74-3.71 και κλινικών κυήσεων (Peto OR: 1.28, 95%CI: 0,76-2.14)· σε μια μόνο από τις μελέτες εφαρμόστηκε απλή αναρρόφηση του υγρού των υδροδαλπίγγων υπό υπερηχογραφική καθοδήγηση και δεν διαπιστώθηκε βελτίωση των ποσοστών κλινικών κυήσεων (Peto OR: 1.97, 95%CI: 0.62-6.29). Το τελικό συμπέρασμα της ανασκόπησης είναι πως η χειρουργική αντιμετώπιση είτε ως σαλπινγεκτομία είτε ως απολίνωση θα πρέπει να προσφέρεται σε όλες τις γυναίκες με υδροσάλπιγγες πριν ξεκινήσουν την προσπάθεια εξωσωματικής⁽²⁴³⁾. Τέλος, την παραπάνω προσέγγιση προτείνει και η ASRM στις πλέον πρόσφατες (2012) κατευθυντήριες οδηγίες της⁽²⁴⁴⁾.

ΖΕΥΓΑΡΙΑ ΜΕ ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΕΣ ΑΠΟΤΥΧΙΕΣ ΕΜΦΥΤΕΥΣΗΣ

Οι Επαναλαμβανόμενες Αποτυχίες Εμφύτευσης (ΕΑΕ) μετά την εφαρμογή εξωσωματικής αποτελούν όπως είναι ευνόητο μια δυσάρεστη κατάσταση, που αφενός δεν γίνεται εύκολα αποδεκτή από το ζευγάρι και αφετέρου φέρνει ιατρούς και εμβρυολόγους σε δύσκολη θέση. Η αληθής συχνότητα της κατάστασης είναι δύσκολο να εκτιμηθεί, καθώς δεν υπάρχει προς το παρόν ομοφωνία ούτε ως προς τον ορισμό της· κάποιοι απλά θεωρούν ως ΕΑΕ την αδυναμία επίτευξης κύησης έπειτα από τρεις κύκλους εξωσωματικής γονιμοποίησης κατά τους οποίους μεταφέρθηκαν έμβρυα καλής ποιότητας, κάποιοι άλλοι την αδυναμία επίτευξης κύησης έπειτα από 2-6 κύκλους κατά τους οποίους μεταφέρθηκαν πάνω από 10 έμβρυα αρίστης ποιότητας, και τέλος κάποιοι άλλοι την μη επίτευξη κύησης έπειτα από την αθροιστική μεταφορά οκτώ ή περισσότερων εμβρύων οκτώ κυτάρων ή πέντε ή περισσότερων εμβρύων στο στάδιο της βλαστοκύστης⁽²⁴⁵⁾. Πληθώρα παραγόντων έχουν συνδεθεί με τις ΕΑΕ και σχηματικά, θα μπορούσαμε να τους ταξινομήσουμε ως εξής:

α) παράγοντες που αφορούν τους γαμέτες και τα έμβρυα: **Χρωμοσωμικές διαταραχές των μεταφερομένων εμβρύων** οδηγούν σε αποτυχίες κύησης, είτε ως αποτυχία της προ-

σπάθειας, είτε ως βιοχημικές ή παλίνδρομες κυήσεις. Αν και οι διαταραχές αυτές είναι στην συντριπτική πλειοψηφία τους de novo, διάφοροι ερευνητές αναφέρουν αυξημένη συχνότητα ανεύρεσης χρωμοσωμικών διαταραχών στον καρύοτυπο γυναικών με πολύ μεγάλο αριθμό αποτυχημένων εμφυτεύσεων, όπως μεταθέσεις, αναστροφές, μωσαϊκά, ή ελλείψεις⁽²⁴⁶⁾, ενώ άλλοι αναφέρουν και αυξημένη συχνότητα χρωμοσωμικών ανωμαλιών στα σπερματοζωάρια ανδρών με φυσιολογικό καρύοτυπο που παρουσιάζουν EAE⁽²⁴⁷⁾. Η εξέλιξη της προεμφυτευτικής γενετικής διαλογής (PGS) έδωσε αρχικώς ελπίδες για την βελτίωση των αποτελεσμάτων στα ζευγάρια αυτά, ελπίδες που όμως δεν δικαιώθηκαν στον αναμενόμενο βαθμό. Η μετακίνηση από την τεχνική FISH στην array CGH ίσως οδηγήσει σε νέα δεδομένα (βλ. ειδική παράγραφο). Μέχρι τότε, στα ζευγάρια με EAE πρέπει να συστήνεται ο χρωμοσωμικός έλεγχος του ζευγαριού προς αποκλεισμό προφανώς μη αναστρέψιμων διαταραχών, ενώ το PGS θα πρέπει να εφαρμόζεται μόνο υπό το πρίσμα της παροχής γενετικής συμβουλής, αν διαπιστωθεί πως το εν λόγω ζευγάρι παράγει μόνο ή κατά συντριπτική αναλογία χρωμοσωμικώς ανώμαλα έμβρυα⁽²⁴⁸⁾. Η αδυναμία της εμβρυϊκής διαφανούς ζώνης να ραγεί (μια διαδικασία που καλείται εκκόλαψη, οπότε και μιλάμε για **διαταραχές εκκόλαψης**) κάτι που είναι απαραίτητο για να επακολουθήσει η εμφύτευση του εμβρύου στο ενδομήτριο, μπορεί θεωρητικά να οδηγήσει σε EAE. Η αύξηση του πάχους της διαφανούς ζώνης έχει συνδεθεί με χαμηλότερα ποσοστά εμφύτευσης, ενώ η σκλήρυνσή της προκαλούμενη από τις συνθήκες της εξωσωματικής καλλιέργειας ή από την προχωρημένη ηλικία της γυναίκας έχει συνδεθεί με αποτυχία της εκκόλαψης⁽²⁴⁹⁾. Επομένως, η τεχνική της υποβοηθούμενης εκκόλαψης ίσως βοηθήσει κάποια από τα ζευγάρια με EAE. **Διαταραχές των σπερματοζωαρίων**, όπως αυξημένα επίπεδα DNA κατάπτωσης καθώς και αυξημένα ποσοστά ανωμάτων μορφών, έχουν συνδεθεί με χαμηλότερα ποσοστά κλινικών και κυρίως συνεχιζόμενων κυήσεων σε αρκετές μελέτες⁽²⁶⁾. Η εφαρμογή IMSI για την εξωσωματική γονιμοποίηση στις παραπάνω περιπτώσεις αλλά ίσως και σε όλα τα ζευγάρια με EAE έχει συνδεθεί με καλύτερα αποτελέσματα, όπως περιγράφεται αναλυτικά σε προηγούμενη παράγραφο. Η παρατεταμένη καλλιέργεια των εμβρύων και η μεταφορά τους στο στάδιο των βλαστοκύστεων παρέχει τα πλεονεκτήματα της καλύτερης διαλογής των μεταφερομένων εμβρύων και ενός αρτιότερου και πιο 'φυσικού' **συγχρονισμού ενδομητρίου-εμβρύου** και ως εκ τούτου έχει προταθεί για τα ζευγάρια με EAE. Πράγματι, δύο τουλάχιστον μελέτες υποδεικνύουν αυξημένα ποσοστά εμφύτευσης και ζώντων γεννήσεων με την υιοθέτηση της στρατηγικής αυτής^(250,251). Με παρόμοιο σκεπτικό για φυσικότερο συγχρονισμό (αλλά και για περιπτώσεις με εξαιρετικά δύσκολες εμβρυομεταφορές), είχαν προταθεί στο παρελθόν και οι μέθοδοι GIFT και ZIFT, που όμως, όπως αναφέρθηκε και στην σχετική παράγραφο, τείνουν πλέον να εγκαταλειφθούν. Οι ιδεατές **συνθήκες καλλιέργειας των εμβρύων** στο εργαστήριο αποτελούν μια άλλη παράμετρο που ίσως αποκτά ακόμα μεγαλύτερη βαρύτητα για τα ζευγάρια με EAE. Πλην της προφανούς ανάγκης για εξασφάλιση των ιδανικών συνθηκών λειτουργίας στο εμβρυολογικό εργαστήριο και της εφαρμογής συστηματικών και αυστηρών ποιοτικών ελέγχων, για τα ζευγά-

ρια αυτά έχει προταθεί και η μέθοδος συστημάτων συγκαλλιέργειας (coculture systems) Τα θεωρητικά πλεονεκτήματα των συστημάτων αυτών περιλαμβάνουν την έκκριση εμβρυοτροφικών παραγόντων, όπως αυξητικοί παράγοντες, κυτοκίνες και θρεπτικά συστατικά, καθώς και την απενεργοποίηση ελευθέρων ριζών και άλλων βλαπτικών παραγόντων⁽²⁵²⁾. Αν και πολλοί τύποι κυττάρων έχουν χρησιμοποιηθεί για συγκαλλιέργεια, το πιο υποσχόμενο σύστημα είναι αυτό που περιλαμβάνει ομόλογα ενδομητρικά κύτταρα. Αν και δύο τουλάχιστον μελέτες σε ζευγάρια με ΕΑΕ υποδεικνύουν θεαματικά αποτελέσματα (π.χ. ποσοστά κύησης 21% έναντι 8%)^(253,254), η πολυπλοκότητα της μεθόδου, η έλλειψη ισχυρών μελετών για την αξιολόγησή της καθώς και η συνεχής εξέλιξη των σύγχρονων καλλιεργητικών υλικών, δεν συμβάλλουν στην ευρεία υιοθέτησή της. Σύμφωνα με κάποιους ερευνητές, μερικές περιπτώσεις ΕΑΕ θα μπορούσε να οφείλονται σε **διαταραχές ωοπλασματικών παραγόντων**, και συνεπώς, η εισαγωγή μιας μικρής ποσότητας κυτταροπλάσματος από ένα ωάριο δότριας ή από άλλο ζυγόπιθα θα μπορούσε να τροποποιήσει την λειτουργία των 'ανεπαρκών' ωοκυττάρων, διορθώνοντας διαταραχές στην ισορροπία αντι- και προ- αποπτωτικών παραγόντων και/ή μειονεξίες στις μιτοχονδριακές μεμβράνες⁽²⁵⁵⁾. Αν και με την τεχνική αυτή έχουν γεννηθεί υγιή παιδιά⁽²⁵⁶⁾, θα πρέπει να έχουμε υπόψη πως το μεταφερόμενο κυτταρόπλασμα μπορεί να περιέχει mRNAs, πρωτεΐνες, μιτοχόνδρια, οργανίδια ή και άλλους παράγοντες, οι επιδράσεις των οποίων στο αναπτυσσόμενο έμβryo παραμένουν άγνωστες. Ως εκ τούτου η τεχνική αυτή θεωρείται ακόμα πειραματική.

β) παράγοντες που αφορούν την γυναίκα: στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνονται ανατομικοί παράγοντες, παράγοντες λειτουργικότητας του ενδομητρίου, ανοσολογικοί παράγοντες και θρομβοφιλικόί παράγοντες.

Η **ανατομική ακεραιότητα της ενδομητρικής κοιλότητας** πρέπει να διερευνάται στα ζευγάρια με ΕΑΕ και η 'απόλυτη' εξέταση για αυτό είναι η υστεροσκόπηση. Αναζητούμενες διαταραχές είναι: ενδομητρικοί πολύποδες για τους υπάρχει τυχαίοποιημένη μελέτη που τους συνδέει με χαμηλότερα ποσοστά κύησης μετά σπερματέγχυση και οι κατευθυντήρια οδηγία από την AAGL είναι να αφαιρούνται επί υπογονιμότητας⁽²⁵⁷⁾, ινομύωματα που παραμορφώνουν την ενδομητρική κοιλότητα και τα οποία μειώνουν τα ποσοστά εμφύτευσης και κύησης μετά IVF, αυξάνουν τα ποσοστά αποβολών ενώ η αφαίρεσή τους βελτιώνει τα αποτελέσματα⁽²⁵⁸⁾, ενδομητρικές συμφύσεις – σύνδρομο Asherman που επηρεάζουν δυσμενώς και την σύλληψη αλλά και την εξέλιξη της κύησης, διαφράγματα μήτρας τα οποία έχουν συνδεθεί με αυξημένα ποσοστά αποβολών, και η διόρθωσή τους προτείνεται από πολλούς πριν την εξωσωματική⁽²⁵⁹⁾ και τέλος, τοξοειδής διαμόρφωση του πυθμένα της μήτρας, όπου αν η προβολή δεν υπερβαίνει το 1cm μάλλον είναι μη κλινικής σημασίας. Επίσης, με την υστεροσκόπηση είναι εφικτή η διάγνωση και εκτίμηση περιπτώσεων χρόνιας ενδομητρίτιδας που μπορεί να επηρεάζει την εμφύτευση λόγω επιδράσεων διαφόρων μικροβιακών προϊόντων στην υποδεκτικότητα του ενδομητρίου' για παράδειγμα, ενδοτοξίνες από gram αρνητικά μικρόβια προάγουν την παραγωγή προ-φλεγμονοδών κυτοκινών με TH1 απάντηση (όπως TNF-a και IL-1b) προκαλώντας βλάβη

στο έμβρυο, αποτυχία εμφύτευσης ή και αποβολή.

Εξαιρετικά ενδιαφέρουσα είναι η παρατήρηση πως η συχνότητα ανεύρεσης μη αναμενόμενων από υπερηχογράφημα ή υστεροσαλπιγγογραφία παθολογικών ευρημάτων στις γυναίκες με ΕΑΕ είναι απρόσμενα υψηλή, κυμαινόμενη από 18-27% σε πρόσφατα δημοσιευμένη μελέτη από την προσωπική εμπειρία που περιλαμβάνει τον μεγαλύτερο αριθμό υστεροσκοπήσεων ($n=1475$) από τον ίδιο ερευνητή (Ε.Μ.) η συχνότητα αυτή ανήλθε στο 22.2% ενώ η διόρθωσή τους βελτίωσε σε στατιστικά σημαντικό βαθμό τα ποσοστά των κλινικών κυήσεων (37.2% έναντι 32.2% στις γυναίκες χωρίς ανωμαλία, $P=0.04$, 95%CI: 1.01-1.55) ⁽²⁶⁰⁾.

Τέλος, στους ανατομικούς παράγοντες που θα πρέπει να αξιολογηθούν επί ΕΑΕ, περιλαμβάνονται τα ινομύωμα που δεν παραμορφώνουν την ενδομητρική κοιλότητα, οι υδροσάλπιγγες και τα ενδομητρίωματα για τους παράγοντες αυτούς γίνεται αναφορά σε προηγούμενη παράγραφο.

Παράγοντες που αφορούν το **πάχος και λειτουργικότητα του ενδομητρίου** έχουν συσχετισθεί με ΕΑΕ. Η υπερηχογραφική μέτρηση του πάχους του ενδομητρίου περιλαμβάνεται πάντα στην παρακολούθηση των κύκλων εξωσωματικής γονιμοποίησης. Αν και είναι δυνατόν να παρατηρηθούν κυήσεις σε λεπτό ενδομήτριο, τα δεδομένα συνηγορούν υπέρ ενός επιθυμητού στόχου επίτευξης ενδομητρίου άνω των 7 mm με χαρακτηριστική εμφάνιση 3 γραμμών ⁽²⁶¹⁾· πάχος μικρότερο των 6 mm συνδυάζεται με μειωμένη πιθανότητα τελειόμηνης κύησης, ενώ πάχος 9-10 mm με σημαντικά αυξημένα ποσοστά εμφύτευσης, κλινικής και συνεχιζόμενης κύησης ⁽²⁶²⁾. Για τις γυναίκες με ΕΑΕ που υποβάλλονται σε εξωσωματική και δεν καταφέρνουν να αναπτύξουν ένα ικανοποιητικό ενδομήτριο έχουν περιγραφεί διάφοροι χειρισμοί με αμφίβολη αποτελεσματικότητα όπως, η χορήγηση χαμηλής δόσης ασπιρίνης ⁽²⁶³⁾ και η κολλική χορήγηση σιλδεναφίλης ⁽²⁶⁴⁾ με σκοπό την βελτίωση της αιματικής ροής στην μήτρα που θα μπορούσε θεωρητικά να ευοδώσει την ανάπτυξη του ενδομητρίου, η κολλική χορήγηση οιστρογόνων ώστε να μεγιστοποιηθεί η οιστρογονική επίδραση στο ενδομήτριο ⁽²⁶⁵⁾ ή η αγωγή με πεντοξυφιλίνη και υψηλές δόσεις βιταμίνης Ε ⁽²⁶⁶⁾. Εάν το λεπτό ενδομήτριο παρατηρείται σε φρέσκους κύκλους διέγερσης μια εύλογη στρατηγική είναι η ματαίωση της εμβρυομεταφοράς, η κρυσταλλική απομάκρυνση των εμβρύων και η μεταφορά τους σε επόμενο τεχνητό κύκλο απόψυξης όπου, με την εξωγενή χορήγηση υψηλών δόσεων οιστρογόνων, ίσως επιτύχουμε την ανάπτυξη ενδομητρίου με ικανοποιητικό πάχος.

Περιπτώσεις ΕΑΕ έχουν συνδεθεί από κάποιους ερευνητές με μια τοπική διαταραχή της έκφρασης ή της δράσης ποικίλων κυτοκινών στο ενδομήτριο. Αύξηση των ενδομητρικών κυττάρων φονέων (natural killers-NK), διαταραχές των ιντερλευκινών 12, 15 και 18, υψηλά επίπεδα ιντερλευκίνης 1β, υψηλά επίπεδα αρωματάσης p450 mRNA και μεταλλοπρωτεϊνών και χαμηλά επίπεδα ιντερφερόνης-γ και ιντερλευκίνης 10 έχουν αναφερθεί σε γυναίκες με ΕΑΕ. Απουσία της ιντεγκρίνης ανβ3 στο ενδομήτριο κατά την περίοδο της εμφύτευσης έχει επίσης συνδεθεί με αποτυχιές εμφύτευσης. Για την ευδωση της εμφύτευσης κάποιοι ερευνητές

έχουν δοκιμάσει την συστηματική χορήγηση Leukemia Inhibitory Factor (που όμως δεν φαίνεται να βελτιώνει τα ποσοστά εμφύτευσης και κύησης ⁽²⁶⁷⁾) καθώς και τη τοπική ή και συστηματική χορήγηση Granulocyte Colony-Stimulating Factor που όμως θεωρείται ακόμα εντελώς πειραματική ⁽²⁶⁸⁾.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η παρατήρηση πως σε γυναίκες με ΕΑΕ, η μηχανική διέγερση του ενδομητρίου στον προηγούμενο της εμβρυομεταφοράς κύκλο ίσως αυξάνει τις πιθανότητες επιτυχίας. Πρόκειται για την σύγχρονη εφαρμογή της παλαιάς 'θεωρίας του τραύματος' σύμφωνα με την οποία με τον τραυματισμό επάγεται μια 'φλεγμονώδης' απάντηση που διευκολύνει την προετοιμασία του ενδομητρίου για εμφύτευση. Ο τραυματισμός αυτός μπορεί να επιτευχθεί με κοινούς καθετήρες βιοψίας (και όχι με απόξεση όπως συνηθιζόταν παλαιότερα) και πρόσφατη Cochrane ανασκόπηση της δημοσιευμένης εμπειρίας (5 κλινικές μελέτες, 591 γυναίκες) κατέληξε πως ο χειρισμός αυτός οδήγησε σε σημαντική αύξηση των πιθανοτήτων για γέννηση (OR: 2.46, 95%CI: 1.28-4.72) και για κλινική κύηση (OR: 2.61, 95%CI: 1.71-3.97)⁽²⁶⁹⁾. Παρόμοιος τραυματισμός μπορεί να επιτευχθεί και με την υστεροσκόπηση, είτε μέσω της διάταξης της κοιλότητας με το χορηγούμενο υγρό (φυσιολογικός ορός) είτε μέσω τραυματισμών με μικροψαλίδι στον πυθμένα της μήτρας' αυτό εξηγεί την παρατηρηθείσα στην μελέτη μας αύξηση των ποσοστών επιτυχίας στον επόμενο της υστεροσκόπησης κύκλο εξωσωματικής ανεξάρτητα του αν ανευρέθηκε και διορθώθηκε παθολογία ή όχι ⁽²⁶⁰⁾, γεγονός που ενισχύει την σημασία πραγματοποίησης της επέμβασης στις γυναίκες με ΕΑΕ.

Η διαδικασία της επιτυχούς εμφύτευσης προϋποθέτει τον συγχρονισμό της βλαστοκύστης με το υποδεκτικό ενδομήτριο, κατά το επονομαζόμενο 'παράθυρο της εμφύτευσης', που χρονικά υπολογίζεται μεταξύ της 19^{ης} και 21^{ης} ημέρας του κύκλου. Το ενδομήτριο αποκτά τα χαρακτηριστικά της υποδεκτικότητας υπό την επίδραση των στεροειδών ορμονών του κύκλου και διαταραχές είτε ποιοτικές είτε χρονικές της διαδικασίας θα μπορούσαν να ενοχοποιηθούν για αποτυχιές εμφύτευσης γενικώς και ιδιαιτέρως για ΕΑΕ^(270,271). Ο προσδιορισμός και αξιολόγηση του παραθύρου της εμφύτευσης έχει δοκιμασθεί στο παρελθόν με την αναζήτηση ιστολογικών δεικτών (κριτήρια Noyes), μορφολογικών χαρακτηριστικών στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (πινοπόδια), βιοχημικών δεικτών, ορμονικών υποδοχέων, και ανοσοιστοχημικών βιοδεικτών. Η σύγχρονη ανάπτυξη της τεχνολογίας των μικροσυστοιχιών άνοιξε νέους ορίζοντες και στο κεφάλαιο αυτό, και έτσι τα γονιδιακά πλέον χαρακτηριστικά της εμφύτευσης ξεκίνησαν να μελετώνται σε κύκλους φυσικούς, ωθηκικής διέγερσης και τεχνητούς ⁽²⁷²⁾. Έτσι, γίνονται προσπάθειες ανάπτυξης 'εργαλείων' αναγνώρισης της υποδεκτικότητας του ενδομητρίου ώστε να είναι επικτική η διάγνωση πιθανών διαταραχών' ένα από αυτά τα 'εργαλεία' περιλαμβάνει 238 γονίδια που αναζητούνται σε υλικό βιοψιών ενδομητρίου και μπορεί να διακρίνει μεταξύ υποδεκτικού, προ-υποδεκτικού και μετα-υποδεκτικού ενδομητρίου με σημαντική ειδικότητα (0.1571) και ευαισθησία (0.995) ⁽²⁷³⁾.

Με αφορμή την συσχέτιση ανοσολογικών και θρομβοφιλικών παραγόντων με τις καθ' ἑξιν

αποβολές, η αναζήτηση μιας αντίστοιχης συσχέτισης των παραγόντων αυτών με τις ΕΑΕ, έχει αποτελέσει θέμα αρκετών μελετών. Σχετικά με τους **ανοσολογικούς παράγοντες**, αν και κάποιες παλαιότερες μελέτες έδειξαν συσχέτιση παρουσίας αντιφωσφολιπιδικών και άλλων αυτοαντισωμάτων με εκδήλωση ΕΑΕ, οι πλέον πρόσφατες, μεγάλες και προοπτικές μελέτες απέτυχαν να αποδείξουν κάτι τέτοιο ^(274,275). Ανάμεσα στους παράγοντες που έχουν ενοχοποιηθεί είναι αντισώματα καρδιολιπίνης, αντισώματα β2-γλυκοπρωτεΐνης-Ι, αντισώματα έναντι της αννεξίνης-V, η οποία δρα σαν αναστολέας της φωσφολιπιδο-εξαρτώμενης ηκτικότητας και ίσως είναι απαραίτητη για την διαφοροποίηση της τροφολάστης, και αυξημένη έκφραση T-helper -1 και -2 κυτοκινών στα περιφερικά λεμφοκύτταρα ⁽²⁷⁶⁾. Η συσχέτιση μεταξύ περιφερικών NK κυττάρων και ΕΑΕ υποστηρίχθηκε σε αρκετές μελέτες παρατήρησης, αλλά μια πρόσφατη ανασκόπηση όλων των δημοσιευμένων στοιχείων κατέληξε στο συμπέρασμα πως δεν υπάρχει ισχυρή επιστημονική βάση για να τεκμηριωθεί μια τέτοια συσχέτιση ⁽²⁷⁷⁾. Τέλος, μια αρκετά δημοφιλής θεωρία περασμένων δεκαετιών ήταν εκείνη της απουσίας αντιπατρικών αντισωμάτων στον ορό της γυναίκας, που θα μπορούσε να οφείλεται στην ύπαρξη κοινών HLA αλληλίων κλάσης I και II, και να αυξάνει τον κίνδυνο για ΕΑΕ και επαναλαμβανόμενες βιοχημικές κηύσεις. Έτσι, προτάθηκε η ανοσοθεραπεία με την χρησιμοποίηση πατρικών λευκοκυττάρων, που όμως δεν αποδείχθηκε ικανή να μεταβάλλει την πρόγνωση γυναικών με ΕΑΕ ⁽²⁷⁸⁾, καθώς και χορήγηση ενδοφλέβιας ανοσοσφαιρίνης (IVIG) ως προς την τελευταία, αν και προκαταρκτικές μελέτες ανέφεραν θετικά αποτελέσματα, αυτά δεν τεκμηριώθηκαν σε διπλή τυφλή τυχαιοποιημένη μελέτη που περιέλαβε 51 ζευγάρια με ΕΑΕ ⁽²⁷⁹⁾ και κατέληξε ότι η χορήγηση IVIG δεν βελτίωσε την πιθανότητα γέννησης τέκνου. Συνεπώς η αξία της χορήγησης IVIG σε ζευγάρια με ΕΑΕ τελεί υπό έντονη αμφισβήτηση. Η συνδυασμένη αγωγή με γλυκοκορτικοειδή και ασπιρίνη σε γυναίκες οροθετικές για αυτοαντισώματα που εκδηλώνουν ΕΑΕ έχει αναφερθεί ότι μπορεί να αυξήσει τις πιθανότητες κύησης ⁽²⁸⁰⁾. Τέλος, επί διάγνωσης αντιφωσφολιπιδικού συνδρόμου, η προτεινόμενη από πολλούς θεραπεία είναι ο συνδυασμός ηπαρίνης χαμηλού μοριακού βάρους και χαμηλών δόσεων ασπιρίνης ⁽²⁸¹⁾.

Όσον αφορά την συσχέτιση κληρονομικών **θρομβοφιλικών παραγόντων** και ΕΑΕ, τα δεδομένα στην βιβλιογραφία είναι αντικρουόμενα. Κάποιες μελέτες αναφέρουν αυξημένη συχνότητα θρομβοφιλικών γονιδίων σε γυναίκες με ΕΑΕ ενώ άλλες όχι. Συνεπώς η σημασία του σχετικού ελέγχου χρήζει περαιτέρω διερεύνησης, ενώ η χορήγηση ηπαρίνης χαμηλού μοριακού βάρους θα μπορούσε να ωφελήσει σημαντικά τις γυναίκες αυτές. Πλην των επιδράσεων της στην ηκτικότητα, η ηπαρίνη εικάζεται ότι έχει και άλλες ευνοϊκές επιδράσεις, συμβάλλοντας τόσο στην προσκόλληση της βλαστοκύστης στο ενδομητρικό επιθήλιο όσο και στην μετέπειτα διείσδυση ⁽²⁸²⁾.

Μετά την παράθεση των ανωτέρω δεδομένων, γίνεται αντιληπτό πως το πρόβλημα των ΕΑΕ είναι εξαιρετικά πολυσύνθετο. Εκατοντάδες μελέτες έχουν ασχοληθεί με το θέμα, προβάλλοντας διάφορους παράγοντες ως αιτιολογικούς και προτείνοντας ποικίλους τρόπους αντιμε-

τώπισης' δυστυχώς όμως, πολλές από τις μελέτες αυτές στερούνται σημαντικής στατιστικής ισχύος είτε λόγω του περιορισμένου αριθμού των περιπτώσεων είτε λόγω του σχεδιασμού τους (αναδρομικές, μη τυχαιοποιημένες). Συνεπώς, για τους περισσότερους από τους θεωρητικά υπεύθυνους για ΕΑΕ παράγοντες καθώς και για τους τρόπους αντιμετώπισης τους, τα δεδομένα είτε είναι ακόμα ανεπαρκή είτε είναι αντικρουόμενα. Προφανώς, η εμπειρική ή θεωρητική εφαρμογή θεραπειών, μπορεί μεν να μην βλάπτει την υγεία της γυναίκας, δεν σημαίνει όμως ότι είναι τεκμηριωμένα αποτελεσματική και δόκιμη ⁽²⁸³⁾.

ΤΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΗΣ ΕΞΩΣΩΜΑΤΙΚΗΣ ΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗΣ

Οι μεγάλες και πολύπλευρες εξελίξεις της τελευταίας 15ετίας στον τομέα της Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής είχαν σαν αποτέλεσμα την σημαντική βελτίωση των ποσοστών επιτυχίας έπειτα από την εφαρμογή της εξωσωματικής γονιμοποίησης. Παράλληλα, η βελτιωμένη αποδοτικότητα των μεθόδων σε συνδυασμό με την διευρυνση και απλούστευση της εφαρμογής τους στα ζευγάρια οδήγησε στη σημαντική αύξηση των κύκλων εξωσωματικής παγκοσμίως. Ο συνδυασμός των ραγδαίων εξελίξεων με την αυξημένη ζήτηση έχει σαν αποτέλεσμα την μεγάλη ανταγωνιστικότητα που χαρακτηρίζει τον τομέα της εξωσωματικής γονιμοποίησης, η οποία επιτείνεται από την υποχρεωτική καταγραφή και δημοσιοποίηση των αποτελεσμάτων κάθε Μονάδας Εξωσωματικής σε προηγμένες χώρες, όπως οι ΗΠΑ. Έτσι, αν κάποιος θέλει να ενημερωθεί σωστά και να αξιολογήσει κριτικά τα ποσοστά επιτυχίας της εξωσωματικής θα πρέπει: α) να ανατρέχει στα επίσημα ετήσια αποτελέσματα που καταγράφονται από επίσημους φορείς όπως π.χ. η ESHRE για την Ευρώπη και το CDC ή η ASRM για τις ΗΠΑ, ώστε να διαμορφώνει άποψη και να έχει ένα αξιόπιστο μέτρο σύγκρισης, και β) να είναι προσεκτικός στην ανάγνωση των αποτελεσμάτων που εκφράζονται ως ποσοστά, δεδομένου ότι το ίδιο αποτέλεσμα μπορεί να εκφραστεί με ποικίλους τρόπους' π.χ. η επιτυχία μπορεί να εκφραστεί σαν θετική δοκιμασία κύησης, κλινική κύηση, συνεχιζόμενη κύηση ή γέννηση ζώντος νεογνού, ενώ τα ποσοστά κύησης μπορεί να εκφραστούν ανά γυναίκα, ανά κύκλο που ξεκινά, ανά ωοληψία ή ανά εμβρυομεταφορά καταλήγοντας σε διαφορετικό, λιγότερο ή περισσότερο εντυπωσιακό αριθμό. Γενικά, θεωρείται πως το πιο σωστό είναι τα ποσοστά να αναφέρονται σε ζώντες γεννήσεις, κάτι όμως που είναι αρκετά δύσκολο γιατί προϋποθέτει μια συνέχεια στην παρακολούθηση της γυναίκας και μετά την επιτυχία στην Μονάδα και απαιτεί ένα αυστηρό σύστημα καταγραφής δεδομένων.

Η ESHRE δημοσίευσε το 2012 τα επεξεργασμένα αποτελέσματα του έτους 2008 ⁽²⁰⁸⁾. Δεδομένα συλλέχθηκαν από 36 χώρες συνολικά. Στις 19 από αυτές η καταγραφή είναι υποχρεωτική και περιλαμβάνει το σύνολο των Μονάδων που λειτουργούν στην χώρα' σε αυτές τις 19 χώρες, πραγματοποιήθηκαν 350143 κύκλοι επί πληθυσμού 369.8 εκατομμυρίων, δηλαδή 947 κύκλοι ανά εκατομμύριο κατοίκων. Στο σύνολο των 36 χωρών, καταγράφηκαν 532260 κύκλοι, 39076 περισσότεροι από το 2007 (+7.9%). Στους κύκλους που εφαρμόστηκε απλή εξωσω-

ματική γονιμοποίηση (IVF) τα ποσοστά κλινικών κύσεων ήταν 28.5% ανά ωοληψία και 32.5% ανά εμβρυομεταφορά. Στους κύκλους που εφαρμόστηκε ICSI τα ποσοστά ήταν 28.7% ανά ωοληψία και 31.9% ανά εμβρυομεταφορά. Στους κύκλους απόψυξης τα ποσοστά κύησης ήταν 19.3% ανά απόψυξη. Όσον αφορά τον αριθμό των μεταφερομένων εμβρύων, στο 22.4% των IVF και ICSI κύκλων μεταφέρθηκε 1 έμβryo, στο 53.2% μεταφέρθηκαν 2 έμβρυα, στο 22.3% μεταφέρθηκαν 3 έμβρυα, και στο 2.1% μεταφέρθηκαν 4 ή περισσότερα έμβρυα· τονίζεται ιδιαίτερω πως για την Ελλάδα τα αντίστοιχα ποσοστά ήταν 19%, 25.5%, 46.9% και 8.5%, γεγονός που υποδεικνύει ότι εξακολουθούμε να μεταφέρουμε περισσότερα έμβρυα κατέχοντας την έβδομη θέση μετά από χώρες όπως η Αλβανία, η Λιθουανία, τα Σκόπια, το Μοντενέγκρο, η Τουρκία, και η Ιταλία. Η αναλογία τοκετών μονήρων, διδύμων και τριδύμων κύσεων έπειτα από IVF και ICSI ήταν 78.3%, 20.7% και 1% αντίστοιχα· η αναλογία τοκετών πολυδύμων κύσεων ήταν 21.7% (προς σύγκριση η αναλογία ήταν 22.3% το 2007, 20.8% το 2006 και 21.8% το 2005). Στους κύκλους απόψυξης, η αναλογία των πολυδύμων κύσεων ήταν 13.7% (13.4% δίδυμα και 0.3% τρίδυμα). Σε σύγκριση με τα προηγούμενα χρόνια παρατηρήθηκε αύξηση των κύκλων ART στην Ευρώπη, αλλά για πρώτη φορά στα τελευταία 5 χρόνια τα ποσοστά κύησης δεν παρουσίασαν αύξηση. Ειδική μνεία γίνεται από την ESHRE για τον απογοητευτικά μικρό αριθμό Μονάδων από την Ελλάδα που έστειλαν τα αποτελέσματά τους (6 από τις 50 Μονάδες). Στο 69% των 'φρέσκων' κύκλων η γονιμοποίηση έγινε με ICSI, ποσοστό που εξακολούθησε να αυξάνεται σε σύγκριση με τα προηγούμενα χρόνια (49% το 2004, 66.5% το 2006, 68% το 2007 και 69% το 2008)· η αύξηση αυτή παρατηρείται σε όλον τον κόσμο, και δεν αντικατοπτρίζει αύξηση των περιπτώσεων ανδρικού παράγοντα, αλλά πιο ελαστική εφαρμογή της τεχνικής σε περιπτώσεις ανεξήγητου υπογονιμότητας ή ηπιότατου ανδρικού παράγοντα. Η αναλογία κύκλων με μεταφορά ενός εμβρύου (single embryo transfer, SET) ανήλθε το 2008 στο 22.4% πλησιάζοντας (μετά από μια παρατηρηθείσα πτώση στα ενδιάμεσα χρόνια) τα ποσοστά του 2006· οι αντίστοιχες αναλογίες ήταν 11.9% στις ΗΠΑ και 63.9% στην Αυστραλία/Νέα Ζηλανδία. Τα ποσοστά γεννήσεων ανά ωοληψία στην Ευρώπη ήταν 21.2% μετά IVF και 20.4% μετά ICSI και παρέμειναν και το 2008 χαμηλότερα από τα αντίστοιχα στις ΗΠΑ (ποσοστά γεννήσεων ανά ωοληψία 34.2% μετά IVF και 33.6% μετά ICSI) αλλά παρεμφερή με τα αντίστοιχα στην Αυστραλία και Νέα Ζηλανδία (19.8% ανά ωοληψία (AIHW, 2010)).

Οι παράγοντες που δυναμικά επηρεάζουν τα ποσοστά επιτυχίας της εξωσωματικής είναι πολλοί και σύνθετοι. Σχηματικά, θα μπορούσαν να διακριθούν σε εκείνους που σχετίζονται με την κλινική εφαρμογή των μεθόδων, σε εκείνους που σχετίζονται με το εμβρυολογικό εργαστήριο και τέλος, σε ιδιοσυστασιακούς παράγοντες του ζευγαριού. Κλινικοί παράγοντες μεγάλης σημασίας για την έκβαση της προσπάθειας θεωρούνται πρωταρχικά η πραγματοποίηση της εμβρυομεταφοράς με τον καλύτερο δυνατό τρόπο (και με βάση όσα αναφέρθηκαν στην σχετική παράγραφο), και ακολούθως η επιλογή του κατάλληλου πρωτοκόλλου ωοθηκικής διέγερσης και η σωστή παρακολούθηση της εφαρμογής του. Όσον αφορά τους εμβρυολογικούς παράγοντες,

η εύρυθμη και σχολαστική λειτουργία ενός πλήρως εξοπλισμένου εργαστηρίου από έμπειρους, εκπαιδευμένους και ενημερωμένους εμβρυολόγους αποτελεί το απόλυτο προαπαιτούμενο για την επίτευξη ικανοποιητικών αποτελεσμάτων. Αξίζει να σημειωθεί πως η ESHRE έχει εκδώσει επίσημες κατευθυντήριες οδηγίες για την καλή λειτουργία ενός εμβρυολογικού εργαστηρίου, όπου περιγράφονται με σχολαστικό τρόπο όλες οι διαδικασίες και οι απαιτήσεις ⁽²⁸⁴⁾. Ιδιαίτερη μνεία γίνεται για τον συνεχή ποιοτικό έλεγχο που επιβάλλεται να πραγματοποιείται σε κάθε εργαστήριο. Μεταξύ άλλων αναφέρονται η δημιουργία και τήρηση γραπτών πρωτοκόλλων για κάθε πράξη και διαδικασία, η καταγραφή κινδύνων και ατυχημάτων, ο έλεγχος των καλλιεργητικών υγρών, αντιδραστηρίων και αναλωσίμων, η πιστοποίηση τήρησης των προδιαγραφών, και η συντήρηση και ρύθμιση του εξοπλισμού σε περιοδική βάση (ημερήσια, εβδομαδιαία, μηνιαία ή ετήσια, αναλόγως του εξοπλισμού). Ως δείκτες ποιοτικού ελέγχου θα πρέπει σε περιοδική και συστηματική βάση να συλλέγονται, αναλύονται και συζητούνται τα ακόλουθα: αριθμοί/συχνότητες λαθών και ανεπιθύμητων συμβάντων, ποσοστά ομαλής γονιμοποίησης, ποσοστά διαιρέσεων εμβρυϊκών κυττάρων, αναλογία εμβρύων καλής ποιότητας, αναλογία ασθενών με πλήρη αποτυχία γονιμοποίησης, ποσοστά συνεχιζόμενων κυήσεων, ποσοστά πολυδύμων κυήσεων, ποσοστά εμφύτευσης και ποσοστά επιβίωσης εμβρύων και ζυγωτών μετά από απόψυξη. Οι δείκτες αυτοί θα πρέπει να συζητούνται με τους κλινικούς ιατρούς της Μονάδας ώστε να βγαίνουν ολοκληρωμένα συμπεράσματα, ενώ ενθαρρύνεται η ανταλλαγή απόψεων με άλλα εργαστήρια. Ανάλογες οδηγίες έχουν εκδοθεί και από την ASRM ⁽²⁸⁵⁾.

Ιδιοσυστασιακοί παράγοντες από το κάθε ζευγάρι προφανώς επηρεάζουν τα ποσοστά επιτυχίας. Η ανάπτυξη μοντέλων πρόβλεψης της πιθανότητας επιτυχίας αποτέλεσε μια μαθηματική πρόκληση με χαρακτηριστικό παράδειγμα το κατά Templeton μοντέλο που δημοσιεύθηκε το 1996 ⁽²⁸⁶⁾, και έχει ως εξής: $P = 1/(1 + e^{-L})$, όπου

- P = πιθανότητα επιτυχίας
- $\text{logit } L = -2.028 + [0.00551 \times (\text{ηλικία}-16)^2] - [0.00028 \times (\text{ηλικία} - 16)^3] + [\text{DIF} - 0.0690 \text{ NFC}] - [0.0711 \text{ Tbl}] + [0.7587 \text{ ILB}] + [0.2986 \text{ INB}] + [0.2277 \text{ NLB}] + [0.1117 \times \text{NNB}]$
- $e = 2.71$
- DIF = 0.2163, 20.089, 20.1036, 20.4179 ανάλογα με το αν η διάρκεια της υπογονιμότητας είναι ≤ 3 έτη, 4–6 έτη, 7–12 έτη ή ≥ 13 έτη, αντίστοιχα
- NFC = αριθμός προηγούμενων αποτυχημένων κύκλων
- Tbl = παρουσία σαλπινγικού παράγοντα
- ILB = αριθμός προηγούμενων IVF κυήσεων που οδήγησαν σε γέννηση
- INB = αριθμός προηγούμενων IVF κυήσεων που δεν οδήγησαν σε γέννηση
- NLB = αριθμός προηγούμενων κυήσεων χωρίς IVF που οδήγησαν σε γέννηση
- NNB = αριθμός προηγούμενων κυήσεων χωρίς IVF που δεν οδήγησαν σε γέννηση

Το μοντέλο αυτό θεωρείται πλέον περιορισμένης ισχύος, μια και έχουν σημειωθεί τεράστι-

ες εξελίξεις στην εξωσωματική γονιμοποίηση από τότε, λαμβάνει υπόψη μόνο κλινικά στοιχεία ιστορικού, δεν περιλαμβάνει παράγοντες που έχουν να κάνουν με τις ιδιαιτερότητες κάθε κέντρου, ενώ προϋποθέτει την ύπαρξη ενός αυστηρού και αξιόπιστου συστήματος καταγραφής δεδομένων. Έκτοτε, έχουν δημοσιευθεί περί τα 17 μοντέλα πρόβλεψης με προσθήκη διαφόρων επιπλέον μεταβλητών με πιο πρόσφατο το κατά Arnis τροποποιημένο μοντέλο που στηρίζεται στο κλασικό κατά Templeton μοντέλο εισάγοντας επιπλέον μια προσαρμοστική μεταβλητή χαρακτηριστική για κάθε Μονάδα στην οποία εφαρμόζεται καθώς και μεταβλητές από τη γυναίκα, όπως το BMI (αν 18-25 kg/m²: 25% μεγαλύτερη πιθανότητα γέννησης), τα επίπεδα FSH κατά τις πρώτες ημέρες του κύκλου (αν <10: x2 πιθανότητα γέννησης), και το κάπνισμα (αν ναι: 29% μικρότερη πιθανότητα γέννησης) ⁽²⁸⁷⁾.

Ανεξαρτήτως μοντέλων πρόγνωσης, η ηλικία της γυναίκας αποτελεί τον ισχυρότερο προγνωστικό παράγοντα επιτυχίας. Αυξανόμενη της ηλικίας επιβαρύνονται δραματικά όλες οι παράμετροι της αναπαραγωγής, όπως η ικανότητα σύλληψης, τα ποσοστά επιτυχίας της εξωσωματικής και τα ποσοστά αποβολών. Για τους λόγους αυτούς η ASRM έχει εκδώσει κατευθυντήριο οδηγία ώστε στις γυναίκες άνω των 35 ετών που προσπαθούν να συλλάβουν ο διαγνωστικός έλεγχος της υπογονιμότητας και η αντιμετώπιση πιθανών προβλημάτων θα πρέπει να γίνεται νωρίτερα, στους 6 μήνες ανεπιτυχών προσπαθειών ⁽²⁸⁸⁾. Για τους ίδιους λόγους, η καταγραφή των ανά ηλικία αποτελεσμάτων υποβοηθούμενης αναπαραγωγής στις ΗΠΑ γίνεται πλέον ως εξής: <35, 35-37, 38-40, 41-42, 43-44, και >45 έτη· τα ποσοστά ζώντων γεννήσεων ανά 'φρέσκο' κύκλο εξωσωματικής στις ηλικιακές αυτές ομάδες για το έτος 2009 ήταν 41.2%, 31.6%, 22.3%, 12.4%, 4.9% και 1.5%, αντίστοιχα, υποδεικνύοντας την τρομακτική επίδραση της ηλικίας.

Το κάπνισμα, αποτελεί έναν άλλο προγνωστικό παράγοντα που φαίνεται να σχετίζεται άμεσα με τα ποσοστά επιτυχίας της εξωσωματικής και οποίος συχνά υποτιμάται ιδίως στην Ελλάδα, όπου με βάση δεδομένα από την WHO έχουμε το υψηλότερο ποσοστό καπνιστών σε σύγκριση με τις δυτικοευρωπαϊκές χώρες (46.8% μεταξύ των ανδρών έναντι 34% και 29% μεταξύ των γυναικών έναντι 25%). Σύμφωνα με πρόσφατη μετανάλυση 17 μελετών ⁽²⁸⁹⁾, η συνήθεια του καπνίσματος συνδέεται με σημαντικά χαμηλότερα ποσοστά γεννήσεων ανά κύκλο (OR: 0.54, 95%CI: 0.30-0.99), καθώς και με σημαντικά υψηλότερα ποσοστά αποβολών ανά κύκλο (OR: 2.65, 95%CI: 1.33-5.30)· οι καπνίστριες έχουν κατά το ήμισυ μειωμένες πιθανότητες να γεννήσουν και κατά 265% αυξημένες πιθανότητες να αποβάλουν! Το κάπνισμα συσχετίζεται με πληθώρα δυσμενών παρατηρήσεων, όπως αυξημένες απαιτήσεις γοναδοτροπινών, χαμηλότερα κορυφαία επίπεδα οιστραδιόλης, υψηλά επίπεδα τεστοστερόνης, λήψη λιγότερων ωαρίων, περισσότερες ακυρώσεις κύκλων, περισσότεροι κύκλοι με αποτυχία γονιμοποίησης, πάχυνση της ζώνης των εμβρύων και χαμηλότερα ποσοστά εμφύτευσης. Οι δυσμενείς επιδράσεις του καπνίσματος γίνονται ακόμα πιο έντονες στις γυναίκες μέσης και προχωρημένης αναπαραγωγικής ηλικίας. Επίσης, σύμφωνα με την πρόσφατη επίσημη τοποθέτηση της ASRM οι καπνίστριες

χρειάζονται 2πλάσιες προσπάθειες εξωσωματικής για να πετύχουν σε σύγκριση με τις μη καπνίστριες⁽²⁹⁰⁾. Τέλος, και το παθητικό κάπνισμα φαίνεται να έχει δυσμενείς επιδράσεις. Σύμφωνα με πρόσφατη μελέτη 3270 κύκλων IVF σε 1909 μη ενεργά, αλλά παθητικά καπνίστριες όπου μετρήθηκε ένας μεταβολίτης της νικοτίνης, η κοτινίνη στο ωοθυλακικό υγρό, διαπιστώθηκε πως οι παθητικά καπνίστριες είχαν κατά 52% αυξημένη πιθανότητα αποτυχίας εμφύτευσης και κατά 25% χαμηλότερη πιθανότητα να γεννήσουν⁽²⁹¹⁾.

Οι διαταραχές του BMI (Body Mass Index) φαίνεται να αποτελούν έναν άλλο προγνωστικό παράγοντα επιτυχίας της εξωσωματικής που αποκτά ιδιαίτερη σημασία λόγω του συχνότητάς του. Η παχυσαρκία αποτελεί την νέα μεγάλη επιδημία αφού υπολογίζεται πως στις ΗΠΑ αλλά και στις περισσότερες Ευρωπαϊκές χώρες, το 60% των γυναικών είναι υπέρβαρες (BMI ≥ 25 kg/m²), εκ των οποίων 30% είναι παχύσαρκες (BMI ≥ 30 kg/m²) και 6% είναι νοσογόνα παχύσαρκες (BMI ≥ 40 kg/m²). Η παχυσαρκία μπορεί να είναι πρωτογενής, δευτερογενής ή συνδός παράγων υπογονιμότητας, και όπως και να έχει ολόένα περισσότερες υπέρβαρες και παχύσαρκες γυναίκες ακολουθούν προγράμματα IVF. Η πρώτη μετανάλυση των μελετών για τις επιδράσεις των διαταραχών BMI στα αποτελέσματα της εξωσωματικής⁽²⁹²⁾ απέδειξε πως γυναίκες με BMI ≥ 25 kg/m² παρουσίασαν στατιστικώς σημαντικά χαμηλότερα ποσοστά κλινικών κυήσεων (OR: 1.24, 95%CI: 1.02-1.50) και στατιστικώς σημαντικά υψηλότερα ποσοστά αποβολών (OR: 1.33, 95%CI: 1.06-1.63) σε σύγκριση με γυναίκες με BMI < 25 kg/m². Επιπλέον, οι υπέρβαρες και παχύσαρκες γυναίκες χρειάστηκαν σημαντικά υψηλότερες δόσεις γοναδοτροπινών για την ωοθηκική διέγερση, έδωσαν σημαντικά μικρότερο αριθμό ωαρίων ανά κύκλο, είχαν περισσότερες ακυρώσεις κύκλων και εμφάνισαν συχνότερα σύνδρομο υπερδιέγερσης ωοθηκών σε σχέση με τις γυναίκες φυσιολογικού BMI. Πρόσφατα δημοσιεύθηκε και νεώτερη μετανάλυση⁽²⁹³⁾ όπου απεδείχθη επίσης πως οι γυναίκες με BMI ≥ 25 kg/m² παρουσίασαν στατιστικώς σημαντικά χαμηλότερα ποσοστά γεννήσεων (OR: 0.90, 95%CI: 0.82-1.00) και συγκριτικά χαμηλότερα ποσοστά κλινικών κυήσεων (0.97, 95%CI: 0.59-1.6) σε σχέση με τις γυναίκες με BMI < 25 kg/m². Σε άλλη μεγάλη μελέτη επί 152500 κύκλων εξωσωματικής από τα δεδομένα της ASRM, τόσο τα ποσοστά κλινικών κυήσεων, όσο και τα ποσοστά γεννήσεων μειώνονται σε στατιστικώς σημαντικό βαθμό καθώς το BMI αυξάνεται πάνω από τα 25 kg/m²⁽²⁹⁴⁾. Οι μηχανισμοί μέσω των οποίων η παχυσαρκία επηρεάζει τα αποτελέσματα της εξωσωματικής φαίνονται πολλοί και πολύπλοκοι, όπως: ανάπτυξη ενός είδους 'αντίστασης' στις γοναδοτροπίνες με αποτέλεσμα να απαιτούνται μεγαλύτερες δόσεις φαρμάκων και να αναπτύσσονται λιγότερα ωοθυλάκια· διαταραχή της ποιότητας των ωαρίων με αποτέλεσμα πτωχά ποσοστά γονιμοποίησης και δημιουργία εμβρύων πτωχότερης ποιότητας· τεχνικές δυσκολίες εμβρυομεταφοράς· διαταραχή της υποδεκτικότητας του ενδομητρίου πιθανώς λόγω της υπεριοιστρογοναιμίας, της αρνητικής επίδρασης στους υποδοχείς οιστρογόνων και προγεστερόνης καθώς και στον leukemia inhibitor factor, της υπερινσουλιναϊμίας που συνδέεται με χαμηλά επίπεδα γλυκοδελίνης και IGF δεσμευτικής πρωτεΐνης στο ενδομήτριο, της αντίστασης

στη λεπτίνη, και τέλος, της αυξημένης παραγωγής διαφόρων κυτοκινών και πρωτεϊνών οξείας φάσης από τον λιπώδη ιστό, όπως IL-6, PAI-1, TNF- α , που επιδρούν αρνητικά στην εμφύτευση και την πρώιμη εμβρυονική ανάπτυξη. Η δυσμενής επίδραση της παχυσαρκίας στο ενδομήτριο αποδεικνύεται και σε μελέτες κύκλων δωρεάς ωαρίων όπου οποιαδήποτε συσχέτιση BMI των λήπτριών και ποσοστών κύησης θα οφείλεται αμιγώς σε επιδράσεις στο ενδομήτριο, αφού τα ωάρια προέρχονται από δότριες μικρής ηλικίας· πράγματι μεγάλη μονοκεντρική μελέτη υπέδειξε μια τάση για χαμηλότερα ποσοστά εμφύτευσης και κύησης καθώς αυξάνεται το BMI της λήπτριας, η οποία αποκτά στατιστική σημαντικότητα για τις συνεχιζόμενες κυήσεις⁽²⁹⁵⁾. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί πως παρόμοια δυσμενή επίδραση στα αποτελέσματα της εξωσωματικής φαίνεται να ασκούν και οι προς τα κάτω διαταραχές του BMI (θεωρία ανεστραμμένου U): λιπόσαρκες γυναίκες παρουσιάζουν (παρομοίως με τις παχύσαρκες) χαμηλότερα ποσοστά κύησης· επειδή μάλιστα η παρατήρηση αυτή δεν αφορά τους κύκλους ωαρίων δότριας, εικάζεται πως ο μηχανισμός της δυσμενούς επίδρασης του χαμηλού BMI περιλαμβάνει αμιγώς ωοθηκικούς παράγοντες, και όχι παράγοντες ενδομητρίου.

Αντί Επιλόγου: Η εξωσωματική γονιμοποίηση αποτελεί αναμφίβολα μια τεράστια επιστημονική επιτυχία που εξελίσσεται δυναμικά και ασταμάτητα. Είναι σίγουρο πως από όλα όσα αναφέρθηκαν παραπάνω, κάποια θα εξακολουθήσουν να ισχύουν ως έχουν, ενώ άλλα θα αναθεωρηθούν, θα τροποποιηθούν, θα βελτιωθούν ή και θα εγκαταλειφθούν στο μέλλον. Η δυναμική αυτή αποτελεί και το μεγάλο δέλεαρ για όλους εμάς που ασχολούμαστε με τον ευαίσθητο τομέα της Αναπαραγωγικής Ιατρικής. Θεμελιώδεις προϋποθέσεις για την σωστή άσκηση του λειτουργήματός μας αποτελούν η συνεχής επιστημονική ενημέρωση, η ανταλλαγή απόψεων, οι γόνιμες συνεργασίες, η προσήλωση στους κανόνες παράλληλα με την διαρκή αναζήτηση νεωτερισμών, η πλήρης εξατομίκευση κάθε εφαρμοζόμενης αγωγής, η ακλόνητη Ηθική και πάνω από όλα ο σεβασμός στην Ανθρώπινη Φύση. Η τήρηση των ανωτέρω θα μας επιτρέψει στο εγγύς μέλλον να βοηθήσουμε ακόμα περισσότερα ζευγάρια στην πραγματοποίηση του ονείρου τους.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. The Practice Committee, ASRM. Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril* 2008;89:1603.
2. ESHRE 2008: <http://www.eshre.eu/ESHRE/English/Guidelines-Legal/page.aspx/16>.
3. CDC. Fertility, family planning and reproductive health of US women: data from the 2002 National Survey of Family Growth. 2005: <http://www.cdc.gov/nhcs/products/pubs/pubd/ad/200-151/200-151.htm>.
4. ASRM. Diagnostic evaluation of the infertile male: a committee opinion. *Fertil Steril* 2012;98:294-301.
5. ASRM. Diagnostic evaluation of the infertile female: a committee opinion. *Fertil Steril* 2012;98:302-7.
6. Wathen NC, Perry L, Lilford RJ et al. Interpretation of single progesterone measurement in diagnosis of anovulation and defective luteal phase: observations on analysis of the normal range. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1984;288:7-9.
7. Coppus SF, Ormeier BC, Logan S et al. The predictive value of medical history taking and Chlamydia IgG ELISA antibody testing (CAT) in the selection of subfertile women for diagnostic laparoscopy: a clinical prediction model approach. *Hum Reprod* 2007;22:1353-8.
8. Alper MM, Garner PR, Spence JE et al. Pregnancy rates after hysterosalpingography with oil- and water-soluble contrast media. *Obstet Gynecol* 1986;68:6-9.
9. Soares SR, Barbosa dos Reis MM, Camargos AF. Diagnostic accuracy of sonohysterography, transvaginal sonography, and hysterosalpingography in patients with uterine cavity diseases. *Fertil Steril* 2000;73:406-11.
10. Sharara FI, Scott RT, Jr., Seifer DB. The detection of diminished ovarian reserve in infertile women. *Am J Obstet Gynecol* 1998;179:804-12.
11. Broekmans FJ, Kwee J, Hendriks DJ et al. A systematic review of tests predicting ovarian reserve and IVF outcome. *Hum Reprod Update* 2006;12:685-718.
12. Evers JL, Slaats P, Land JA et al. Elevated levels of basal estradiol-17beta predict poor response in patients with normal basal levels of follicle-stimulating hormone undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1998;69:1010-4.
13. Ebner T, Sommergruber M, Moser M et al. Basal level of anti-Mullerian hormone is associated with oocyte quality in stimulated cycles. *Hum Reprod* 2006;21:2022-6.
14. Muttukrishna S, Suharjono H, McGarrigle H et al. Inhibin B and anti-Mullerian hormone: markers of ovarian response in IVF/ICSI patients? *BJOG* 2004;111:1248-53.
15. Silberstein T, MacLaughlin DT, Shai I et al. Mullerian inhibiting substance levels at the time of HCG administration in IVF cycles predict both ovarian reserve and embryo morphology. *Hum Reprod* 2006;21:159-63.
16. The Practice Committee, ASRM. Diagnostic evaluation of the infertile female: a committee opinion. *Fertil Steril* 2012;98:302-7.
17. Oei SG, Helmerhorst FM, Bloemenkamp KW et al. Effectiveness of the postcoital test: randomised controlled trial. *BMJ* 1998;317:502-5.
18. Murray MJ, Meyer WR, Zaino RJ et al. A critical analysis of the accuracy, reproducibility, and clinical utility of histological endometrial dating in fertile women. *Fertil Steril* 2004;81:1333-43.
19. Coutifaris C, Myers ER, Guzick DS et al. Histological dating of timed endometrial biopsy tissue is not related to fertility status. *Fertil Steril* 2004;82:1264-72.
20. WHO. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen 2010: Available at: <http://www.who.int/reproductivehealth/publications/infertility/9789241547789/en/index.html>.
21. Ravel C, Berthaut I, Bresson JL et al. Prevalence of chromosomal abnormalities in phenotypically

- normal and fertile adult males: large-scale survey of over 10,000 sperm donor karyotypes. *Hum Reprod* 2006;21:1484-9.
22. Brandell RA, Mielnik A, Liotta D et al. AZFb deletions predict the absence of spermatozoa with testicular sperm extraction: preliminary report of a prognostic genetic test. *Hum Reprod* 1998;13:2812-5.
 23. Krausz C, Quintana-Murci L, McElreavey K. Prognostic value of Y deletion analysis: what is the clinical prognostic value of Y chromosome microdeletion analysis? *Hum Reprod* 2000;15:1431-4.
 24. Anguiano A, Oates RD, Amos JA et al. Congenital bilateral absence of the vas deferens. A primarily genital form of cystic fibrosis. *JAMA* 1992;267:1794-7.
 25. Collins JA, Barnhart KT, Schlegel PN. Do sperm DNA integrity tests predict pregnancy with in vitro fertilization? *Fertil Steril* 2008;89:823-31.
 26. Zini A, Boman JM, Belzile E et al. Sperm DNA damage is associated with an increased risk of pregnancy loss after IVF and ICSI: systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod* 2008;23:2663-8.
 27. ASRM. The clinical utility of sperm DNA integrity testing: a guideline. *Fertil Steril* 2013;in press.
 28. Carrell DT. The clinical implementation of sperm chromosome aneuploidy testing: pitfalls and promises. *J Androl* 2008;29:124-33.
 29. Carrell DT, Wilcox AL, Lowy L et al. Elevated sperm chromosome aneuploidy and apoptosis in patients with unexplained recurrent pregnancy loss. *Obstet Gynecol* 2003;101:1229-35.
 30. Petit FM, Frydman N, Benkhalifa M et al. Could sperm aneuploidy rate determination be used as a predictive test before intracytoplasmic sperm injection? *J Androl* 2005;26:235-41.
 31. ESHRE2008: http://www.eshre.eu/binarydata.aspx?type=doc&sessionId=ityggp45e0tjxmuu3gghf55/Good_Clinical_treatment_in_Assisted_Reproduction_ENGLISH.pdf
 32. Messinis IE, Loutradis D, Domali E et al. Alternate day and daily administration of GnRH antagonist may prevent premature luteinization to a similar extent during FSH treatment. *Hum Reprod* 2005;20:3192-7.
 33. Fujii S, Sagara M, Kudo H et al. A prospective randomized comparison between long and discontinuous-long protocols of gonadotropin-releasing hormone agonist for in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1997;67:1166-8.
 34. Fauser BC, Van Heusden AM. Manipulation of human ovarian function: physiological concepts and clinical consequences. *Endocr Rev* 1997;18:71-106.
 35. van Santbrink EJ, Fauser BC. Urinary follicle-stimulating hormone for normogonadotropic clomiphene-resistant anovulatory infertility: prospective, randomized comparison between low dose step-up and step-down dose regimens. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:3597-602.
 36. Messinis IE, Templeton AA. The importance of follicle-stimulating hormone increase for folliculogenesis. *Hum Reprod* 1990;5:153-6.
 37. Feldberg D, Ashkenazi J, Dicker D et al. Ovarian cyst formation: a complication of gonadotropin-releasing hormone agonist therapy. *Fertil Steril* 1989;51:42-5.
 38. Keltz MD, Jones EE, Duleba AJ et al. Baseline cyst formation after luteal phase gonadotropin-releasing hormone agonist administration is linked to poor in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril* 1995;64:568-72.
 39. Biljan MM, Mahutte NG, Dean N et al. Pretreatment with an oral contraceptive is effective in reducing the incidence of functional ovarian cyst formation during pituitary suppression by gonadotropin-releasing hormone analogues. *J Assist Reprod Genet* 1998;15:599-604.
 40. Damarico MA, Barmat L, Liu HC et al. Dual suppression with oral contraceptives and gonadotrophin releasing-hormone agonists improves in-vitro fertilization outcome in high responder patients. *Hum Reprod* 1997;12:2359-65.
 41. Surrey ES, Bower J, Hill DM et al. Clinical and endocrine effects of a microdose GnRH agonist flare regimen administered to poor responders who are undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1998;69:419-24.

42. Loumaye E, Coen G, Pampfer S et al. Use of a gonadotropin-releasing hormone agonist during ovarian stimulation leads to significant concentrations of peptide in follicular fluids. *Fertil Steril* 1989;52:256-63.
43. Tarlatzis BC, Bili HN. Gonadotropin-releasing hormone antagonists: impact of IVF practice and potential non-assisted reproductive technology applications. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2003;15:259-64.
44. Tarlatzis BC, Fauser BC, Kolibianakis EM et al. GnRH antagonists in ovarian stimulation for IVF. *Hum Reprod Update* 2006;12:333-40.
45. Olivennes F, Fanchin R, Bouchard P et al. Scheduled administration of a gonadotrophin-releasing hormone antagonist (Cetrorelix) on day 8 of in-vitro fertilization cycles: a pilot study. *Hum Reprod* 1995;10:1382-6.
46. Olivennes F, Fanchin R, Bouchard P et al. The single or dual administration of the gonadotropin-releasing hormone antagonist Cetrorelix in an in vitro fertilization-embryo transfer program. *Fertil Steril* 1994;62:468-76.
47. Al-Inany H, Aboulghar MA, Mansour RT et al. Optimizing GnRH antagonist administration: meta-analysis of fixed versus flexible protocol. *Reprod Biomed Online* 2005;10:567-70.
48. Kolibianakis EM, Venetis CA, Kalogeropoulou L et al. Fixed versus flexible gonadotropin-releasing hormone antagonist administration in in vitro fertilization: a randomized controlled trial. *Fertil Steril*;95:558-62.
49. Pouwer AW, Farquhar C, Kremer JA. Long-acting FSH versus daily FSH for women undergoing assisted reproduction. *Cochrane Database Syst Rev* 2012;6:CD009577.
50. Tarlatzis BC, Griesinger G, Leader A et al. Comparative incidence of ovarian hyperstimulation syndrome following ovarian stimulation with corifollitropin alfa or recombinant FSH. *Reprod Biomed Online* 2012;24:410-9.
51. van Wely M, Kwan I, Burt AL et al. Recombinant versus urinary gonadotrophin for ovarian stimulation in assisted reproductive technology cycles. *Cochrane Database Syst Rev*:CD005354.
52. Messinis IE, Messini CI, Dafopoulos K. The role of gonadotropins in the follicular phase. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2010;1205:5-11.
53. O'Dea L, O'Brien F, Currie K et al. Follicular development induced by recombinant luteinizing hormone (LH) and follicle-stimulating hormone (FSH) in anovulatory women with LH and FSH deficiency: evidence of a threshold effect. *Curr Med Res Opin* 2008;24:2785-93.
54. Tarlatzis B, Tavmergen E, Szamatowicz M et al. The use of recombinant human LH (lutropin alfa) in the late stimulation phase of assisted reproduction cycles: a double-blind, randomized, prospective study. *Hum Reprod* 2006;21:90-4.
55. Mochtar MH, Van der V, Ziech M et al. Recombinant Luteinizing Hormone (rLH) for controlled ovarian hyperstimulation in assisted reproductive cycles. *Cochrane Database Syst Rev* 2007:CD005070.
56. Hill MJ, Levens ED, Levy G et al. The use of recombinant luteinizing hormone in patients undergoing assisted reproductive techniques with advanced reproductive age: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril* 2012;97:1108-14 e1.
57. Messinis IE. Ovulation induction: a mini review. *Hum Reprod* 2005;20:2688-97.
58. Maheshwari A, Gibree A, Siristatidis CS et al. Gonadotropin-releasing hormone agonist protocols for pituitary suppression in assisted reproduction. *Cochrane Database Syst Rev* 2011:CD006919.
59. Albuquerque LE, Tso LO, Saconato H et al. Depot versus daily administration of gonadotropin-releasing hormone agonist protocols for pituitary down regulation in assisted reproduction cycles. *Cochrane Database Syst Rev* 2013;1:CD002808.
60. Al-Inany HG, Youssef MA, Aboulghar M et al. Gonadotrophin-releasing hormone antagonists for assisted reproductive technology. *Cochrane Database Syst Rev* 2011:CD001750.
61. Tarlatzis BC, Kolibianakis EM. GnRH agonists vs antagonists. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2007;21:57-65.

62. Smulders B, van Oirschot SM, Farquhar C et al. Oral contraceptive pill, progestogen or estrogen pre-treatment for ovarian stimulation protocols for women undergoing assisted reproductive techniques. *Cochrane Database Syst Rev*:CD006109.
63. Griesinger G, Venetis CA, Marx T et al. Oral contraceptive pill pretreatment in ovarian stimulation with GnRH antagonists for IVF: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril* 2008;90:1055-63.
64. Ferraretti AP, La Marca A, Fauser BC et al. ESHRE consensus on the definition of 'poor response' to ovarian stimulation for in vitro fertilization: the Bologna criteria. *Hum Reprod* 2011;26:1616-24.
65. Baka S, Makrakis E, Tzanakaki D et al. Poor responders in IVF: cancellation of a first cycle is not predictive of a subsequent failure. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2006;1092:418-25.
66. Pandian Z, McTavish AR, Aucott L et al. Interventions for 'poor responders' to controlled ovarian hyper stimulation (COH) in in-vitro fertilisation (IVF). *Cochrane Database Syst Rev* 2010:CD004379.
67. Duffy JM, Ahmad G, Mohiyiddeen L et al. Growth hormone for in vitro fertilization. *Cochrane Database Syst Rev* 2010:CD000099.
68. Sunkara SK, Pundir J, Khalaf Y. Effect of androgen supplementation or modulation on ovarian stimulation outcome in poor responders: a meta-analysis. *Reprod Biomed Online* 2011;22:545-55.
69. Kwan I, Bhattacharya S, McNeil A et al. Monitoring of stimulated cycles in assisted reproduction (IVF and ICSI). *Cochrane Database Syst Rev* 2008:CD005289.
70. Ata B, Seyhan A, Reinblatt SL et al. Comparison of automated and manual follicle monitoring in an unrestricted population of 100 women undergoing controlled ovarian stimulation for IVF. *Hum Reprod* 2011;26:127-33.
71. Jamieson ME, Fleming R, Kader S et al. In vivo and in vitro maturation of human oocytes: effects on embryo development and polyspermic fertilization. *Fertil Steril* 1991;56:93-7.
72. Wang W, Zhang XH, Wang WH et al. The time interval between hCG priming and oocyte retrieval in ART program: a meta-analysis. *J Assist Reprod Genet* 2011;28:901-10.
73. Youssef MA, Al-Inany HG, Aboulghar M et al. Recombinant versus urinary human chorionic gonadotrophin for final oocyte maturation triggering in IVF and ICSI cycles. *Cochrane Database Syst Rev* 2011:CD003719.
74. Bodri D, Guillen JJ, Galindo A et al. Triggering with human chorionic gonadotropin or a gonadotropin-releasing hormone agonist in gonadotropin-releasing hormone antagonist-treated oocyte donor cycles: findings of a large retrospective cohort study. *Fertil Steril* 2009;91:365-71.
75. Kolibianakis EM, Schultze-Mosgau A, Schroer A et al. A lower ongoing pregnancy rate can be expected when GnRH agonist is used for triggering final oocyte maturation instead of HCG in patients undergoing IVF with GnRH antagonists. *Hum Reprod* 2005;20:2887-92.
76. Humaidan P, Papanikolaou EG, Tarlatzis BC. GnRHa to trigger final oocyte maturation: a time to reconsider. *Hum Reprod* 2009;24:2389-94.
77. Biljan MM, Dean N, Hemmings R et al. Prospective randomized trial of the effect of two flushing media on oocyte collection and fertilization rates after in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1997;68:1132-4.
78. Wongtra-Ngan S, Vutyavanich T, Brown J. Follicular flushing during oocyte retrieval in assisted reproductive techniques. *Cochrane Database Syst Rev* 2010:CD004634.
79. Levy G, Hill MJ, Ramirez CI et al. The use of follicle flushing during oocyte retrieval in assisted reproductive technologies: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod* 2012;27:2373-9.
80. Practice Committees of the American Society for Reproductive M, Society for Assisted Reproductive T. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) for non-male factor infertility: a committee opinion. *Fertil Steril* 2012;98:1395-9.
81. van der Westerlaken L, Helmerhorst F, Dieben S et al. Intracytoplasmic sperm injection as a treatment for unexplained total fertilization failure or low fertilization after conventional in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2005;83:612-7.

82. Bhattacharya S, Hamilton MP, Shaaban M et al. Conventional in-vitro fertilisation versus intracytoplasmic sperm injection for the treatment of non-male-factor infertility: a randomised controlled trial. *Lancet* 2001;357:2075-9.
83. Thornhill AR, deDie-Smulders CE, Geraedts JP et al. ESHRE PGD Consortium 'Best practice guidelines for clinical preimplantation genetic diagnosis (PGD) and preimplantation genetic screening (PGS)'. *Hum Reprod* 2005;20:35-48.
84. Gook DA, Edgar DH. Human oocyte cryopreservation. *Hum Reprod Update* 2007;13:591-605.
85. Hwang JL, Lin YH, Tsai YL. In vitro maturation and fertilization of immature oocytes: a comparative study of fertilization techniques. *J Assist Reprod Genet* 2000;17:39-43.
86. Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F et al. Pregnancy rates are higher with intracytoplasmic morphologically selected sperm injection than with conventional intracytoplasmic injection. *Fertil Steril* 2003;80:1413-9.
87. Wilding M, Coppola G, di Matteo L et al. Intracytoplasmic injection of morphologically selected spermatozoa (IMSI) improves outcome after assisted reproduction by deselecting physiologically poor quality spermatozoa. *J Assist Reprod Genet* 2011;28:253-62.
88. Vanderzwalmen P, Hiemer A, Rubner P et al. Blastocyst development after sperm selection at high magnification is associated with size and number of nuclear vacuoles. *Reprod Biomed Online* 2008;17:617-27.
89. Antinori M, Licata E, Dani G et al. Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection: a prospective randomized trial. *Reprod Biomed Online* 2008;16:835-41.
90. Balaban B, Yakin K, Alatas C et al. Clinical outcome of intracytoplasmic injection of spermatozoa morphologically selected under high magnification: a prospective randomized study. *Reprod Biomed Online* 2011.
91. De Vos A, Van de Velde H, Bocken G et al. Does intracytoplasmic morphologically selected sperm injection improve embryo development? A randomized sibling-oocyte study. *Hum Reprod* 2013;28:617-26.
92. Souza Setti A, Ferreira RC, Paes de Almeida Ferreira Braga D et al. Intracytoplasmic sperm injection outcome versus intracytoplasmic morphologically selected sperm injection outcome: a meta-analysis. *Reprod Biomed Online* 2010;21:450-5.
93. Knez K, Tomazevic T, Zorn B et al. Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection improves development and quality of preimplantation embryos in teratozoospermia patients. *Reprod Biomed Online* 2012;25:168-79.
94. Agapitou K, Makrakis E, Liarmakopoulou S et al. Application of IMSI in selected cases: A matched control study. In: 28th Annual Meeting of ESHRE. *Istanbul, Turkey, 2012*.
95. Oliveira JB, Cavagna M, Petersen CG et al. Pregnancy outcomes in women with repeated implantation failures after intracytoplasmic morphologically selected sperm injection (IMSI). *Reprod Biol Endocrinol* 2011;9:99.
96. Klement AH, Koren-Morag N, Itsykson P et al. Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection versus intracytoplasmic sperm injection: a step toward a clinical algorithm. *Fertil Steril* 2013;99:1290-3.
97. Sakkas D, Percival G, D'Arcy Y et al. Assessment of early cleaving in vitro fertilized human embryos at the 2-cell stage before transfer improves embryo selection. *Fertil Steril* 2001;76:1150-6.
98. Alikani M, Cohen J, Tomkin G et al. Human embryo fragmentation in vitro and its implications for pregnancy and implantation. *Fertil Steril* 1999;71:836-42.
99. Gardner DK, Lane M, Stevens J et al. Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer. *Fertil Steril* 2000;73:1155-8.
100. Montag M, Liebenthron J, Koster M. Which morphological scoring system is relevant in human

embryo development? *Placenta* 2011;32 Suppl 3:S252-6.

101. Zhang JQ, Li XL, Peng Y et al. Reduction in exposure of human embryos outside the incubator enhances embryo quality and blastulation rate. *Reprod Biomed Online* 2010;20:510-5.
102. Wong CC, Loewke KE, Bossert NL et al. Non-invasive imaging of human embryos before embryonic genome activation predicts development to the blastocyst stage. *Nat Biotechnol* 2010;28:1115-21.
103. Meseguer M, Herrero J, Tejera A et al. The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. *Hum Reprod* 2011;26:2658-71.
104. Kirkegaard K, Agerholm IE, Ingerslev HJ. Time-lapse monitoring as a tool for clinical embryo assessment. *Hum Reprod* 2012;27:1277-85.
105. Sakkas D, Gardner DK. Noninvasive methods to assess embryo quality. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2005;17:283-8.
106. Seli E, Sakkas D, Scott R et al. Noninvasive metabolomic profiling of embryo culture media using Raman and near-infrared spectroscopy correlates with reproductive potential of embryos in women undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2007;88:1350-7.
107. Vergouw CG, Botros LL, Roos P et al. Metabolomic profiling by near-infrared spectroscopy as a tool to assess embryo viability: a novel, non-invasive method for embryo selection. *Hum Reprod* 2008;23:1499-504.
108. Edwards RG, Fishel SB, Cohen J et al. Factors influencing the success of in vitro fertilization for alleviating human infertility. *J In Vitro Fert Embryo Transf* 1984;1:3-23.
109. Meldrum DR, Chetkowski R, Steingold KA et al. Evolution of a highly successful in vitro fertilization-embryo transfer program. *Fertil Steril* 1987;48:86-93.
110. Poindexter AN, 3rd, Thompson DJ, Gibbons WE et al. Residual embryos in failed embryo transfer. *Fertil Steril* 1986;46:262-7.
111. Abou-Setta AM. Air fluid versus fluid-only models of embryo catheter loading: a systematic review and meta-analysis. *Reprod Biomed Online* 2007;14:80-4.
112. Sallam HN. Embryo transfer: factors involved in optimizing the success. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2005;17:289-98.
113. Abou-Setta AM, Mansour RT, Al-Inany HG et al. Among women undergoing embryo transfer, is the probability of pregnancy and live birth improved with ultrasound guidance over clinical touch alone? A systemic review and meta-analysis of prospective randomized trials. *Fertil Steril* 2007;88:333-41.
114. Brown J, Buckingham K, Abou-Setta AM et al. Ultrasound versus 'clinical touch' for catheter guidance during embryo transfer in women. *Cochrane Database Syst Rev* 2010:CD006107.
115. Abou-Setta AM. Effect of passive uterine straightening during embryo transfer: a systematic review and meta-analysis. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2007;86:516-22.
116. Derks RS, Farquhar C, Mol BW et al. Techniques for preparation prior to embryo transfer. *Cochrane Database Syst Rev* 2009:CD007682.
117. Abou-Setta AM. What is the best site for embryo deposition? A systematic review and meta-analysis using direct and adjusted indirect comparisons. *Reprod Biomed Online* 2007;14:611-9.
118. Bontekoe S, Blake D, Heineman MJ et al. Adherence compounds in embryo transfer media for assisted reproductive technologies. *Cochrane Database Syst Rev* 2010:CD007421.
119. Nakagawa K, Takahashi C, Nishi Y et al. Hyaluronan-enriched transfer medium improves outcome in patients with multiple embryo transfer failures. *J Assist Reprod Genet* 2012;29:679-85.
120. Check JH, Summers-Chase D, Yuan W et al. «Embryo glue» does not seem to improve chances of subsequent pregnancy in refractory in vitro fertilization cases. *Clin Exp Obstet Gynecol* 2012;39:11-2.
121. Hambiliki F, Ljunger E, Karlstrom PO et al. Hyaluronan-enriched transfer medium in cleavage-stage

- frozen-thawed embryo transfers increases implantation rate without improvement of delivery rate. *Fertil Steril* 2010;94:1669-73.
122. Gardner DK, Lane M. Culture and selection of viable blastocysts: a feasible proposition for human IVF? *Hum Reprod Update* 1997;3:367-82.
123. Biggers JD, Racowsky C. The development of fertilized human ova to the blastocyst stage in KSOM(AA) medium: is a two-step protocol necessary? *Reprod Biomed Online* 2002;5:133-40.
124. Practice Committee of American Society for Reproductive M, Practice Committee of Society for Assisted Reproductive T. Blastocyst culture and transfer in clinical-assisted reproduction. *Fertil Steril* 2008;90:S174-7.
125. Glujovsky D, Blake D, Farquhar C et al. Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted reproductive technology. *Cochrane Database Syst Rev* 2012;7:CD002118.
126. Liu HC, Cohen J, Alikani M et al. Assisted hatching facilitates earlier implantation. *Fertil Steril* 1993;60:871-5.
127. Makrakis E, Angeli I, Agapitou K et al. Laser versus mechanical assisted hatching: a prospective study of clinical outcomes. *Fertil Steril* 2006;86:1596-600.
128. Practice Committee of Society for Assisted Reproductive T, Practice Committee of American Society for Reproductive M. The role of assisted hatching in in vitro fertilization: a review of the literature. A Committee opinion. *Fertil Steril* 2008;90:S196-8.
129. Carney SK, Das S, Blake D et al. Assisted hatching on assisted conception (in vitro fertilisation (IVF) and intracytoplasmic sperm injection (ICSI)). *Cochrane Database Syst Rev* 2012;12:CD001894.
130. Schieve LA, Meikle SF, Peterson HB et al. Does assisted hatching pose a risk for monozygotic twinning in pregnancies conceived through in vitro fertilization? *Fertil Steril* 2000;74:288-94.
131. Messinis IE, Messini CI, Dafopoulos K. Luteal-phase endocrinology. *Reprod Biomed Online* 2009;19 Suppl 4:4314.
132. Smitz J, Erard P, Camus M et al. Pituitary gonadotrophin secretory capacity during the luteal phase in superovulation using GnRH-agonists and HMG in a desensitization or flare-up protocol. *Hum Reprod* 1992;7:1225-9.
133. Beckers NG, Macklon NS, Eijkemans MJ et al. Nonsupplemented luteal phase characteristics after the administration of recombinant human chorionic gonadotropin, recombinant luteinizing hormone, or gonadotropin-releasing hormone (GnRH) agonist to induce final oocyte maturation in in vitro fertilization patients after ovarian stimulation with recombinant follicle-stimulating hormone and GnRH antagonist cotreatment. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:4186-92.
134. Practice Committee of the American Society for Reproductive M. Progesterone supplementation during the luteal phase and in early pregnancy in the treatment of infertility: an educational bulletin. *Fertil Steril* 2008;89:789-92.
135. Fanchin R, Righini C, de Ziegler D et al. Effects of vaginal progesterone administration on uterine contractility at the time of embryo transfer. *Fertil Steril* 2001;75:1136-40.
136. Baruffi R, Mauri AL, Petersen CG et al. Effects of vaginal progesterone administration starting on the day of oocyte retrieval on pregnancy rates. *J Assist Reprod Genet* 2003;20:517-20.
137. Mochtar MH, Van Wely M, Van der Veen F. Timing luteal phase support in GnRH agonist down-regulated IVF/embryo transfer cycles. *Hum Reprod* 2006;21:905-8.
138. Williams SC, Oehninger S, Gibbons WE et al. Delaying the initiation of progesterone supplementation results in decreased pregnancy rates after in vitro fertilization: a randomized, prospective study. *Fertil Steril* 2001;76:1140-3.
139. van der Linden M, Buckingham K, Farquhar C et al. Luteal phase support for assisted reproduction cycles. *Cochrane Database Syst Rev* 2011:CD009154.

140. Kroon B, Hart RJ, Wong BM et al. Antibiotics prior to embryo transfer in ART. *Cochrane Database Syst Rev* 2012;3:CD008995.
141. Boomsma CM, Keay SD, Macklon NS. Peri-implantation glucocorticoid administration for assisted reproductive technology cycles. *Cochrane Database Syst Rev* 2012;6:CD005996.
142. Siristatidis CS, Dodd SR, Drakeley AJ. Aspirin for in vitro fertilisation. *Cochrane Database Syst Rev* 2011:CD004832.
143. Glujovsky D, Pesce R, Fiszbajn G et al. Endometrial preparation for women undergoing embryo transfer with frozen embryos or embryos derived from donor oocytes. *Cochrane Database Syst Rev* 2010:CD006359.
144. AbdelHafez FF, Desai N, Abou-Setta AM et al. Slow freezing, vitrification and ultra-rapid freezing of human embryos: a systematic review and meta-analysis. *Reprod Biomed Online* 2010;20:209-22.
145. Kolibianakis EM, Venetis CA, Tarlatzis BC. Cryopreservation of human embryos by vitrification or slow freezing: which one is better? *Curr Opin Obstet Gynecol* 2009;21:270-4.
146. Wennerholm UB, Soderstrom-Anttila V, Bergh C et al. Children born after cryopreservation of embryos or oocytes: a systematic review of outcome data. *Hum Reprod* 2009;24:2158-72.
147. Practice Committees of American Society for Reproductive M, Society for Assisted Reproductive T. Mature oocyte cryopreservation: a guideline. *Fertil Steril* 2013;99:37-43.
148. Cobo A, Meseguer M, Remohi J et al. Use of cryo-banked oocytes in an ovum donation programme: a prospective, randomized, controlled, clinical trial. *Hum Reprod* 2010;25:2239-46.
149. Cobo A, Diaz C. Clinical application of oocyte vitrification: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Fertil Steril* 2011;96:277-85.
150. Asch RH, Ellsworth LR, Balmaceda JP et al. Pregnancy after translaparoscopic gamete intrafallopian transfer. *Lancet* 1984;2:1034-5.
151. Devroey P, Braeckmans P, Smits J et al. Pregnancy after translaparoscopic zygote intrafallopian transfer in a patient with sperm antibodies. *Lancet* 1986;1:1329.
152. Girardi SK, Schlegel PN. Microsurgical epididymal sperm aspiration: review of techniques, preoperative considerations, and results. *J Androl* 1996;17:5-9.
153. Schlegel PN, Li PS. Microdissection TESE: sperm retrieval in non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod Update* 1998;4:439.
154. Schlegel PN, Su LM. Physiological consequences of testicular sperm extraction. *Hum Reprod* 1997;12:1688-92.
155. Friedler S, Raziel A, Strassburger D et al. Testicular sperm retrieval by percutaneous fine needle sperm aspiration compared with testicular sperm extraction by open biopsy in men with non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 1997;12:1488-93.
156. Novero V, Jr., Goossens A, Tournaye H et al. Seminoma discovered in two males undergoing successful testicular sperm extraction for intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1996;65:1051-4.
157. Van Peperstraten A, Proctor ML, Johnson NP et al. Techniques for surgical retrieval of sperm prior to intra-cytoplasmic sperm injection (ICSI) for azoospermia. *Cochrane Database Syst Rev* 2008:CD002807.
158. Tournaye H, Verheyen G, Nagy P et al. Are there any predictive factors for successful testicular sperm recovery in azoospermic patients? *Hum Reprod* 1997;12:80-6.
159. Tournaye H, Staessen C, Liebaers I et al. Testicular sperm recovery in nine 47,XXY Klinefelter patients. *Hum Reprod* 1996;11:1644-9.
160. Palermo GD, Schlegel PN, Sills ES et al. Births after intracytoplasmic injection of sperm obtained by testicular extraction from men with nonmosaic Klinefelter's syndrome. *N Engl J Med* 1998;338:588-90.

161. Vermaeve V, Tournaeye H, Osmanagaoglu K et al. Intracytoplasmic sperm injection with testicular spermatozoa is less successful in men with nonobstructive azoospermia than in men with obstructive azoospermia. *Fertil Steril* 2003;79:529-33.
162. Park YS, Lee SH, Song SJ et al. Influence of motility on the outcome of in vitro fertilization/ intracytoplasmic sperm injection with fresh vs. frozen testicular sperm from men with obstructive azoospermia. *Fertil Steril* 2003;80:526-30.
163. Habermann H, Seo R, Cieslak J et al. In vitro fertilization outcomes after intracytoplasmic sperm injection with fresh or frozen-thawed testicular spermatozoa. *Fertil Steril* 2000;73:955-60.
164. Chian RC. In-vitro maturation of immature oocytes for infertile women with PCOS. *Reprod Biomed Online* 2004;8:547-52.
165. Child TJ, Abdul-Jalil AK, Gulekli B et al. In vitro maturation and fertilization of oocytes from unstimulated normal ovaries, polycystic ovaries, and women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2001;76:936-42.
166. Gremeau AS, Andreadis N, Fatum M et al. In vitro maturation or in vitro fertilization for women with polycystic ovaries? A case-control study of 194 treatment cycles. *Fertil Steril* 2012;98:355-60.
167. De Vos M, Ortega-Hrepich C, Albuz FK et al. Clinical outcome of non-hCG-primed oocyte in vitro maturation treatment in patients with polycystic ovaries and polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2011;96:860-4.
168. Buckett WM, Chian RC, Dean NL et al. Pregnancy loss in pregnancies conceived after in vitro oocyte maturation, conventional in vitro fertilization, and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2008;90:546-50.
169. Fadini R, Mignini Renzini M, Guarnieri T et al. Comparison of the obstetric and perinatal outcomes of children conceived from in vitro or in vivo matured oocytes in in vitro maturation treatments with births from conventional ICSI cycles. *Hum Reprod* 2012;27:3601-8.
170. Handside AH, Kontogianni EH, Hardy K et al. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature* 1990;344:768-70.
171. Verlinsky Y, Rechitsky S, Cieslak J et al. Preimplantation diagnosis of single gene disorders by two-step oocyte genetic analysis using first and second polar body. *Biochem Mol Med* 1997;62:182-7.
172. Strom CM, Ginsberg N, Rechitsky S et al. Three births after preimplantation genetic diagnosis for cystic fibrosis with sequential first and second polar body analysis. *Am J Obstet Gynecol* 1998;178:1298-306.
173. Magli MC, Gianaroli L, Ferraretti AP et al. The combination of polar body and embryo biopsy does not affect embryo viability. *Hum Reprod* 2004;19:1163-9.
174. Hanson C, Hardarson T, Lundin K et al. Re-analysis of 166 embryos not transferred after PGS with advanced reproductive maternal age as indication. *Hum Reprod* 2009;24:2960-4.
175. Kokkali G, Traeger-Synodinos J, Vrettou C et al. Blastocyst biopsy versus cleavage stage biopsy and blastocyst transfer for preimplantation genetic diagnosis of beta-thalassaemia: a pilot study. *Hum Reprod* 2007;22:1443-9.
176. Keskinetepe L, Sher G, Machnicka A et al. Vitrification of human embryos subjected to blastomere biopsy for pre-implantation genetic screening produces higher survival and pregnancy rates than slow freezing. *J Assist Reprod Genet* 2009;26:629-35.
177. Harton GL, Magli MC, Lundin K et al. ESHRE PGD Consortium/Embryology Special Interest Group-best practice guidelines for polar body and embryo biopsy for preimplantation genetic diagnosis/screening (PGD/PGS). *Hum Reprod* 2011;26:41-6.
178. Piyamongkol W, Bermudez MG, Harper JC et al. Detailed investigation of factors influencing amplification efficiency and allele drop-out in single cell PCR: implications for preimplantation genetic diagnosis. *Mol Hum Reprod* 2003;9:411-20.

179. Gutierrez-Mateo C, Sanchez-Garcia JF, Fischer J et al. Preimplantation genetic diagnosis of single-gene disorders: experience with more than 200 cycles conducted by a reference laboratory in the United States. *Fertil Steril* 2009;92:1544-56.
180. Wilton L. Preimplantation genetic diagnosis and chromosome analysis of blastomeres using comparative genomic hybridization. *Hum Reprod Update* 2005;11:33-41.
181. Fiorentino F, Spizzichino L, Bono S et al. PGD for reciprocal and Robertsonian translocations using array comparative genomic hybridization. *Hum Reprod* 2011;26:1925-35.
182. Ling J, Zhuang G, Tazon-Vega B et al. Evaluation of genome coverage and fidelity of multiple displacement amplification from single cells by SNP array. *Mol Hum Reprod* 2009;15:739-47.
183. Harper J, Coonen E, De Rycke M et al. What next for preimplantation genetic screening (PGS)? A position statement from the ESHRE PGD Consortium Steering Committee. *Hum Reprod* 2010;25:821-3.
184. Practice Committee of Society for Assisted Reproductive T, Practice Committee of American Society for Reproductive M. Preimplantation genetic testing: a Practice Committee opinion. *Fertil Steril* 2008;90:S136-43.
185. Harper JC, Wilton L, Traeger-Synodinos J et al. The ESHRE PGD Consortium: 10 years of data collection. *Hum Reprod Update* 2012;18:234-47.
186. Tureck RW, Garcia CR, Blasco L et al. Perioperative complications arising after transvaginal oocyte retrieval. *Obstet Gynecol* 1993;81:590-3.
187. Dicker D, Ashkenazi J, Feldberg D et al. Severe abdominal complications after transvaginal ultrasonographically guided retrieval of oocytes for in vitro fertilization and embryo transfer. *Fertil Steril* 1993;59:1313-5.
188. Howe RS, Wheeler C, Mastroianni L, Jr. et al. Pelvic infection after transvaginal ultrasound-guided ovum retrieval. *Fertil Steril* 1988;49:726-8.
189. Golan A, Ron-el R, Herman A et al. Ovarian hyperstimulation syndrome: an update review. *Obstet Gynecol Surv* 1989;44:430-40.
190. Klemetti R, Sevón T, Gissler M et al. Complications of IVF and ovulation induction. *Hum Reprod* 2005;20:3293-300.
191. Gomez R, Soares SR, Busso C et al. Physiology and pathology of ovarian hyperstimulation syndrome. *Semin Reprod Med* 2010;28:448-57.
192. Salamalekis E, Makrakis E, Vitoratos N et al. Insulin levels, insulin resistance, and leptin levels are not associated with the development of ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril* 2004;82:244-6.
193. Rizk B. Symposium: Update on prediction and management of OHSS. Genetics of ovarian hyperstimulation syndrome. *Reprod Biomed Online* 2009;19:14-27.
194. Delvigne A, Rozenberg S. Epidemiology and prevention of ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS): a review. *Hum Reprod Update* 2002;8:559-77.
195. D'Angelo A, Brown J, Amso NN. Coasting (withholding gonadotrophins) for preventing ovarian hyperstimulation syndrome. *Cochrane Database Syst Rev* 2011:CD002811.
196. Abdallah R, Kligman I, Davis O et al. Withholding gonadotropins until human chorionic gonadotropin administration. *Semin Reprod Med* 2010;28:486-92.
197. Lim K, Lee W, Lim J. IVM after interruption of COH for the prevention of OHSS. *Fertil Steril* 2005;84:S84-S5.
198. Braat DD, Schutte JM, Bernardus RE et al. Maternal death related to IVF in the Netherlands 1984-2008. *Hum Reprod* 2010;25:1782-6.
199. Herrero L, Martinez M, Garcia-Velasco JA. Current status of human oocyte and embryo cryopreservation. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2011;23:245-50.

200. D'Angelo A, Amso N. Embryo freezing for preventing Ovarian Hyperstimulation Syndrome. *Cochrane Database Syst Rev* 2002;CD002806.
201. D'Angelo A, Amso N. Embryo freezing for preventing ovarian hyperstimulation syndrome. *Cochrane Database Syst Rev* 2007;CD002806.
202. Tang H, Hunter T, Hu Y et al. Cabergoline for preventing ovarian hyperstimulation syndrome. *Cochrane Database Syst Rev* 2012;2:CD008605.
203. Gomez R, Ferrero H, Delgado-Rosas F et al. Evidences for the existence of a low dopaminergic tone in polycystic ovarian syndrome: implications for OHSS development and treatment. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96:2484-92.
204. Grossman LC, Michalakis KG, Browne H et al. The pathophysiology of ovarian hyperstimulation syndrome: an unrecognized compartment syndrome. *Fertil Steril* 2010;94:1392-8.
205. Joint Society of Obstetricians and Gynaecologists of Canada-Canadian Fertility Andrology Society Clinical Practice Guidelines Committee; Reproductive Endocrinology and Infertility Committee of the SOGC; Executive and Council of the Society of Obstetricians; Gynaecologists of Canada; Board of the Canadian Fertility and Andrology Society, Shmorgun D, Claman P. The diagnosis and management of ovarian hyperstimulation syndrome. *J Obstet Gynaecol Can* 2011; 33(11):1156-62.
206. Makrakis E, Grammatidis M, Vitoratos N et al. Triplet pregnancy after oocyte donation in women 46 years of age and older: three case reports. *Clin Exp Obstet Gynecol* 2003;30:257-8.
207. ACOG. Clinical Management Guideline for Obstetricians and Gynecologists. Multiple Gestation: complicated twin, triplet and high order multifetal pregnancy. *ACOG Practice Bulletin*. In, 2004.
208. Ferraretti AP, Goossens V, de Mouzon J et al. Assisted reproductive technology in Europe, 2008: results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod* 2012;27:2571-84.
209. Aston KI, Peterson CM, Carrell DT. Monozygotic twinning associated with assisted reproductive technologies: a review. *Reproduction* 2008;136:377-86.
210. Makrakis E, Papagianni V, Deligeoroglou E. A unique case of trichorionic quadruplet pregnancy after oocyte donation in a patient with Turner's syndrome. *Gynecol Endocrinol* 2009;25:460-3.
211. Messinis IE, Domali E. What is the most relevant standard of success in assisted reproduction? Should BESSST really be the primary endpoint for assisted reproduction? *Hum Reprod* 2004;19:1933-5.
212. Barnhart KT. Assisted reproductive technologies and perinatal morbidity: interrogating the association. *Fertil Steril* 2013;99:299-302.
213. Hansen M, Bower C, Milne E et al. Assisted reproductive technologies and the risk of birth defects--a systematic review. *Hum Reprod* 2005;20:328-38.
214. Reefhuis J, Honein MA, Schieve LA et al. Assisted reproductive technology and major structural birth defects in the United States. *Hum Reprod* 2009;24:360-6.
215. Klemetti R, Gissler M, Sevon T et al. Children born after assisted fertilization have an increased rate of major congenital anomalies. *Fertil Steril* 2005;84:1300-7.
216. Stromberg B, Dahlquist G, Ericson A et al. Neurological sequelae in children born after in-vitro fertilisation: a population-based study. *Lancet* 2002;359:461-5.
217. Hediger ML, Bell EM, Druschel CM et al. Assisted reproductive technologies and children's neurodevelopmental outcomes. *Fertil Steril* 2013;99:311-7.
218. Yeung EH, Druschel C. Cardiometabolic health of children conceived by assisted reproductive technologies. *Fertil Steril* 2013;99:318-26.
219. Belva F, Painter R, Bonduelle M et al. Are ICSI adolescents at risk for increased adiposity? *Hum Reprod* 2012;27:257-64.
220. Ceelen M, van Weissenbruch MM, Vermeiden JP et al. Cardiometabolic differences in children born after in vitro fertilization: follow-up study. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:1682-8.

221. Scherrer U, Rimoldi SF, Rexhaj E et al. Systemic and pulmonary vascular dysfunction in children conceived by assisted reproductive technologies. *Circulation* 2012;125:1890-6.
222. Odom LN, Segars J. Imprinting disorders and assisted reproductive technology. *Curr Opin Endocrinol Diabetes* 2010;17:517-22.
223. Zreik TG, Mazloom A, Chen Y et al. Fertility drugs and the risk of breast cancer: a meta-analysis and review. *Breast Cancer Res Treat* 2010;124:13-26.
224. Brinton LA, Moghissi KS, Scoccia B et al. Ovulation induction and cancer risk. *Fertil Steril* 2005;83:261-74; quiz 525-6.
225. Jensen A, Sharif H, Frederiksen K et al. Use of fertility drugs and risk of ovarian cancer: Danish Population Based Cohort Study. *Bmj* 2009;338:b249.
226. Farhi J, Ashkenazi J, Feldberg D et al. Effect of uterine leiomyomata on the results of in-vitro fertilization treatment. *Hum Reprod* 1995;10:2576-8.
227. Hart R, Khalaf Y, Yeong CT et al. A prospective controlled study of the effect of intramural uterine fibroids on the outcome of assisted conception. *Hum Reprod* 2001;16:2411-7.
228. Surrey ES, Minjarez DA, Stevens JM et al. Effect of myomectomy on the outcome of assisted reproductive technologies. *Fertil Steril* 2005;83:1473-9.
229. Sunkara SK, Khairy M, El-Toukhy T et al. The effect of intramural fibroids without uterine cavity involvement on the outcome of IVF treatment: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod* 2010;25:418-29.
230. Pistofidis G, Makrakis E, Balinakos P et al. Report of 7 uterine rupture cases after laparoscopic myomectomy: update of the literature. *J Minim Invasive Gynecol* 2012;19:762-7.
231. Missmer SA, Hankinson SE, Spiegelman D et al. Incidence of laparoscopically confirmed endometriosis by demographic, anthropometric, and lifestyle factors. *Am J Epidemiol* 2004;160:784-96.
232. Hughes EG, Fedorkow DM, Collins JA. A quantitative overview of controlled trials in endometriosis-associated infertility. *Fertil Steril* 1993;59:963-70.
233. Practice Committee of the American Society for Reproductive M. Endometriosis and infertility: a committee opinion. *Fertil Steril* 2012;98:591-8.
234. Society for Assisted Reproductive Technology the American Society for Reproductive Medicine. Assisted reproductive technology in the United States: 2010 results generated from the American Society for Reproductive Medicine/Society for Assisted Reproduction registry. *www.sart.org* 2010.
235. Soliman S, Daya S, Collins J et al. A randomized trial of in vitro fertilization versus conventional treatment for infertility. *Fertil Steril* 1993;59:1239-44.
236. Garcia-Velasco JA, Mahutte NG, Corona J et al. Removal of endometriomas before in vitro fertilization does not improve fertility outcomes: a matched, case-control study. *Fertil Steril* 2004;81:1194-7.
237. Garcia-Velasco JA, Somigliana E. Management of endometriomas in women requiring IVF: to touch or not to touch. *Hum Reprod* 2009;24:496-501.
238. Benschop L, Farquhar C, van der Poel N et al. Interventions for women with endometrioma prior to assisted reproductive technology. *Cochrane Database Syst Rev* 2010:CD008571.
239. Pearce CL, Templeman C, Rossing MA et al. Association between endometriosis and risk of histological subtypes of ovarian cancer: a pooled analysis of case-control studies. *The lancet oncology* 2012;13:385-94.
240. Sallam HN, Garcia-Velasco JA, Dias S et al. Long-term pituitary down-regulation before in vitro fertilization (IVF) for women with endometriosis. *Cochrane Database Syst Rev* 2006:CD004635.
241. Zeyneloglu HB, Arici A, Olive DL. Adverse effects of hydrosalpinx on pregnancy rates after in vitro fertilization-embryo transfer. *Fertil Steril* 1998;70:492-9.

242. Kontoravdis A, Makrakis E, Pantos K et al. Proximal tubal occlusion and salpingectomy result in similar improvement in in vitro fertilization outcome in patients with hydrosalpinx. *Fertil Steril* 2006;86:1642-9.
243. Johnson N, van Voorst S, Sowter MC et al. Surgical treatment for tubal disease in women due to undergo in vitro fertilisation. *Cochrane Database Syst Rev* 2010;CD002125.
244. Practice Committee of the American Society for Reproductive M. Committee opinion: role of tubal surgery in the era of assisted reproductive technology. *Fertil Steril* 2012;97:539-45.
245. Rinehart J. Recurrent implantation failure: definition. *J Assist Reprod Genet* 2007;24:284-7.
246. Tarlatzis BC, Toncheva DI, Vatev IT. Significance of chromosomal aberrations for the unsuccessful procedures of assisted reproduction. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2000;88:181-7.
247. Rubio C, Gil-Salom M, Simon C et al. Incidence of sperm chromosomal abnormalities in a risk population: relationship with sperm quality and ICSI outcome. *Hum Reprod* 2001;16:2084-92.
248. Caglar GS, Asimakopoulos B, Nikolettos N et al. Preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in repeated implantation failure. *Reprod Biomed Online* 2005;10:381-8.
249. De Vos A, Van Steirteghem A. Zona hardening, zona drilling and assisted hatching: new achievements in assisted reproduction. *Cells, tissues, organs* 2000;166:220-7.
250. Guerif F, Bidault R, Gasnier O et al. Efficacy of blastocyst transfer after implantation failure. *Reprod Biomed Online* 2004;9:630-6.
251. Levitas E, Lunenfeld E, Har-Vardi I et al. Blastocyst-stage embryo transfer in patients who failed to conceive in three or more day 2-3 embryo transfer cycles: a prospective, randomized study. *Fertil Steril* 2004;81:567-71.
252. Simon C, Mercader A, Garcia-Velasco J et al. Coculture of human embryos with autologous human endometrial epithelial cells in patients with implantation failure. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:2638-46.
253. Jayot S, Parneix I, Verdaguer S et al. Coculture of embryos on homologous endometrial cells in patients with repeated failures of implantation. *Fertil Steril* 1995;63:109-14.
254. Spandorfer SD, Pascal P, Parks J et al. Autologous endometrial coculture in patients with IVF failure: outcome of the first 1,030 cases. *J Reprod Med* 2004;49:463-7.
255. Levy R, Elder K, Menezo Y. Cytoplasmic transfer in oocytes: biochemical aspects. *Hum Reprod Update* 2004;10:241-50.
256. Barritt J, Willadsen S, Brenner C et al. Cytoplasmic transfer in assisted reproduction. *Hum Reprod Update* 2001;7:428-35.
257. American Association of Gynecologic L. AAGL practice report: practice guidelines for the diagnosis and management of endometrial polyps. *J Minim Invasive Gynecol* 2012;19:3-10.
258. Pritts EA, Parker WH, Olive DL. Fibroids and infertility: an updated systematic review of the evidence. *Fertil Steril* 2009;91:1215-23.
259. Ozgur K, Isikoglu M, Donmez L et al. Is hysteroscopic correction of an incomplete uterine septum justified prior to IVF? *Reprod Biomed Online* 2007;14:335-40.
260. Makrakis E, Hassiakos D, Stathis D et al. Hysteroscopy in women with implantation failures after in vitro fertilization: findings and effect on subsequent pregnancy rates. *J Minim Invasive Gynecol* 2009;16:181-7.
261. Chen SL, Wu FR, Luo C et al. Combined analysis of endometrial thickness and pattern in predicting outcome of in vitro fertilization and embryo transfer: a retrospective cohort study. *Reprod Biol Endocrinol* 2010;8:30.
262. Richter KS, Bugge KR, Bromer JG et al. Relationship between endometrial thickness and embryo implantation, based on 1,294 cycles of in vitro fertilization with transfer of two blastocyst-stage

embryos. *Fertil Steril* 2007;87:53-9.

263. Weckstein LN, Jacobson A, Galen D et al. Low-dose aspirin for oocyte donation recipients with a thin endometrium: prospective, randomized study. *Fertil Steril* 1997;68:927-30.
264. Sher G, Fisch JD. Effect of vaginal sildenafil on the outcome of in vitro fertilization (IVF) after multiple IVF failures attributed to poor endometrial development. *Fertil Steril* 2002;78:1073-6.
265. Tourgeman DE, Slater CC, Stanczyk FZ et al. Endocrine and clinical effects of micronized estradiol administered vaginally or orally. *Fertil Steril* 2001;75:200-2.
266. Ledee-Bataille N, Olivennes F, Lefaix JL et al. Combined treatment by pentoxifylline and tocopherol for recipient women with a thin endometrium enrolled in an oocyte donation programme. *Hum Reprod* 2002;17:1249-53.
267. Brinsden PR, Alam V, de Moustier B et al. Recombinant human leukemia inhibitory factor does not improve implantation and pregnancy outcomes after assisted reproductive techniques in women with recurrent unexplained implantation failure. *Fertil Steril* 2009;91:1445-7.
268. Wurfel W, Santjohanser C, Hirv K et al. High pregnancy rates with administration of granulocyte colony-stimulating factor in ART-patients with repetitive implantation failure and lacking killer-cell immunoglobulin-like receptors. *Hum Reprod* 2010;25:2151-2; author reply 2.
269. Nastri CO, Gibreel A, Raine-Fenning N et al. Endometrial injury in women undergoing assisted reproductive techniques. *Cochrane Database Syst Rev* 2012;7:CD009517.
270. Makrigiannakis A, Minas V. Mechanisms of implantation. *Reprod Biomed Online* 2007;14:102-9.
271. Makrigiannakis A, Zoumakis E, Kalantaridou S et al. Endometrial and placental CRH as regulators of human embryo implantation. *J Reprod Immunol* 2004;62:53-9.
272. Horcajadas JA, Pellicer A, Simon C. Wide genomic analysis of human endometrial receptivity: new times, new opportunities. *Hum Reprod Update* 2007;13:77-86.
273. Diaz-Gimeno P, Horcajadas JA, Martinez-Conejero JA et al. A genomic diagnostic tool for human endometrial receptivity based on the transcriptomic signature. *Fertil Steril* 2011;95:50-60, e1-15.
274. Denis AL, Guido M, Adler RD et al. Antiphospholipid antibodies and pregnancy rates and outcome in in vitro fertilization patients. *Fertil Steril* 1997;67:1084-90.
275. Eldar-Geva T, Wood C, Lolatgis N et al. Cumulative pregnancy and live birth rates in women with antiphospholipid antibodies undergoing assisted reproduction. *Hum Reprod* 1999;14:1461-6.
276. Makrigiannakis A, Petsas G, Toth B et al. Recent advances in understanding immunology of reproductive failure. *J Reprod Immunol* 2011;90:96-104.
277. Rai R, Sacks G, Trew G. Natural killer cells and reproductive failure--theory, practice and prejudice. *Hum Reprod* 2005;20:1123-6.
278. Carp HJ, Toder V, Mashiach S et al. Effect of paternal leukocyte immunization on implantation after biochemical pregnancies and repeated failure of embryo transfer. *Am J Reprod Immunol* 1994;31:112-5.
279. Stephenson MD, Fluker MR. Treatment of repeated unexplained in vitro fertilization failure with intravenous immunoglobulin: a randomized, placebo-controlled Canadian trial. *Fertil Steril* 2000;74:1108-13.
280. Geva E, Amit A, Lerner-Geva L et al. Prednisone and aspirin improve pregnancy rate in patients with reproductive failure and autoimmune antibodies: a prospective study. *Am J Reprod Immunol* 2000;43:36-40.
281. Dendrinis S, Sakkas E, Makrakis E. Low-molecular-weight heparin versus intravenous immunoglobulin for recurrent abortion associated with antiphospholipid antibody syndrome. *Int J Gynecol Obstet* 2009;104:223-5.
282. Fiedler K, Wurfel W. Effectivity of heparin in assisted reproduction. *Eur J Med Res* 2004;9:207-14.

283. Μακράκης Ε. Επαναλαμβανόμενες αποτυχίες εμφύτευσης μετά την εφαρμογή εξωσωματικής γονιμοποίησης. *Θέματα Μαιευτικής-Γυναικολογίας* 2007;4:320-9.
284. Magli MC, Van den Abbeel E, Lundin K et al. Revised guidelines for good practice in IVF laboratories. *Hum Reprod* 2008;23:1253-62.
285. Practice Committee of Society for Assisted Reproductive T, Practice Committee of American Society for Reproductive M. Revised minimum standards for practices offering assisted reproductive technologies. *Fertil Steril* 2008;90:S165-8.
286. Templeton A, Morris JK, Parslow W. Factors that affect outcome of in-vitro fertilisation treatment. *Lancet* 1996;348:1402-6.
287. Arvis P, Lehert P, Guivarc'h-Leveque A. Simple adaptations to the Templeton model for IVF outcome prediction make it current and clinically useful. *Hum Reprod* 2012;27:2971-8.
288. Committee on Gynecologic Practice of American College of O, Gynecologists, Practice Committee of American Society for Reproductive M. Age-related fertility decline: a committee opinion. *Fertil Steril* 2008;90:486-7.
289. Waylen AL, Metwally M, Jones GL et al. Effects of cigarette smoking upon clinical outcomes of assisted reproduction: a meta-analysis. *Hum Reprod Update* 2009;15:31-44.
290. Practice Committee of the American Society for Reproductive M. Smoking and infertility: a committee opinion. *Fertil Steril* 2012;98:1400-6.
291. Benedict MD, Missmer SA, Vahratian A et al. Secondhand tobacco smoke exposure is associated with increased risk of failed implantation and reduced IVF success. *Hum Reprod* 2011;26:2525-31.
292. Maheshwari A, Stofberg L, Bhattacharya S. Effect of overweight and obesity on assisted reproductive technology--a systematic review. *Hum Reprod Update* 2007;13:433-44.
293. Koning AM, Mutsaerts MA, Kuchenbecker WK et al. Complications and outcome of assisted reproduction technologies in overweight and obese women. *Hum Reprod* 2012;27:457-67.
294. Luke B, Brown MB, Stern JE et al. Female obesity adversely affects assisted reproductive technology (ART) pregnancy and live birth rates. *Hum Reprod* 2011;26:245-52.
295. Bellver J, Melo MA, Bosch E et al. Obesity and poor reproductive outcome: the potential role of the endometrium. *Fertil Steril* 2007;88:446-51.

