

Τ.Ε.Ι ΠΑΤΡΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΣΕΥΠ
ΤΜΗΜΑ ΝΟΣΗΛΕΥΤΙΚΗΣ



ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΕΞΩΣΩΜΑΤΙΚΗ ΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ



ΕΙΣΗΓΗΤΗΣ:
ΔΡ. ΑΜΠΕΤ ΧΑΣΜΑΝ

ΣΠΟΥΔΑΣΤΡΙΕΣ:
ΚΟΥΦΑΚΗ ΠΑΝΑΓΙΩΤΑ
ΚΑΚΟΥ ΑΦΡΟΔΙΤΗ

ΠΑΤΡΑ, 2002

ΑΡΙΘΜΟΣ ΕΙΣΑΓΩΓΗΣ	4017
----------------------	------

Ευχαριστίες

Ευχαριστούμε θερμά τον επιστήμονα και άνθρωπο Δρ. Άμπετ Χασμάν και το Κέντρο Εξωσωματικές Γονιμοποίησης "Βιογένεση" για την πολύτιμη βοήθειά τους, χωρίς την οποία δεν θα ήταν δυνατή η εκπόνηση της εργασίας αυτής.

Περιεχόμενα

Μέρος I

- * Εισαγωγή.....4
- Γενική περιγραφή της μεθόδου και η σημασία της στην σημερινή εποχή.
 - Ιστορική αναδρομή.
 - Πρόσφατες εξελίξεις
 - Ηθικοκοινωνική διάσταση

Μέρος II

- * Αίτια υπογονιμότητας σε άνδρες και γυναίκες17
1. Γυναικεία υπογονιμότητα
 - Προβλήματα ωοθυλακιορρηξίας
 - Ενδομητρίωση
 - Σαλπγγική βλάβη
 - Δυσλειτουργία τραχηλικής βλέννης
 - Ανεξήγητη στειρότητα
 2. Ανδρική υπογονιμότητα

Μέρος III

- * Περιγραφή της μεθόδου IVF
- 1) Προεμφυτευτική διαδικασία
 - a. Ωοθηκική διέγερση26
 - i. Βασικές αρχές της φυσιολογίας της ωοθυλακιορρηξίας ...26
 - ii. Πρόκληση ωοθυλακιορρηξίας32

1. Ωοθηκική διέγερση με γοναδοτροπίνες σε συνδυασμό με GnRH ανάλογα	
2. Εξωγενείς γοναδοτροπίνες	
3. Χορήγηση HCG	
4. Πρωτόκολλα θεραπειών με GnRH αναλογα	
4.1. Παρατεταμένο πρωτόκολλο χρήσης GnRH αναλόγων	
4.2. Βραχύ πρωτόκολλο χρήσης GnRH αναλόγων	
b. Περιγραφή πρωτοκόλλου ωοληψίας	42
1. Διακολπική αναρρόφηση ωοθυλακίων	
2. Αναγνώριση των ωοκυττάρων	
c. Επεξεργασία του σπέρματος	51
d. In vitro γονιμοποίηση του ωαρίου	58
e. Διαπίστωση και εκτίμηση της γονιμοποίησης 17 με 19 ώρες μετά την προσθήκη σπέρματος	61
2) <u>Διαδικασία εμφύτευσης</u>	65
a. Η φυσιολογία της εμφύτευσης και οι διαταραχές της ωχρινικής φάσης.	
b. Η διαδικασία της εμβρυομεταφοράς	

Μέρος IV

* Συζήτηση	73
• Τελικά συμπεράσματα - Ανάλυση ποσοστού επιτυχία της μεθόδου	
• Πολύδυμη κύηση	

<u>Βιβλιογραφία</u>	80
---------------------------	----

Μέρος Ι

Εισαγωγή

1. Γενική περιγραφή της μεθόδου, και η σημασία της στην σημερινή εποχή

Η πλειοψηφία των ανθρώπων θεωρεί την αναπαραγωγή ως ένα θεμελιώδες ανθρώπινο δικαίωμα. Πράγματι, σύμφωνα με το άρθρο 16.1 του Καταστατικού Χάρτη των Ηνωμένων Εθνών, περί ανθρωπίνων δικαιωμάτων, αναγνωρίζεται ότι : "όλοι, άνδρες και γυναίκες της ώριμης ηλικίας, χωρίς φυλετικούς, εθνικούς ή θρησκευτικούς περιορισμούς διατηρούν το δικαίωμα του γάμου και της δημιουργίας οικογένειας" (United Nations, 1978).

Τι γίνεται όμως με τα ζευγάρια εκείνα τα οποία αντιμετωπίζουν προβλήματα υπογονιμότητας; Ποια είναι η ψυχολογική κατάσταση αυτών των ζευγαριών, και πως μπορούν να βοηθηθούν; Χωρίς αμφιβολία, η ανεπιθύμητη ατεκνία απειλεί να θίξει κάθε πλευρά της ζωής του ατόμου, επηρεάζοντας ουσιαστικά την σκέψη του στο παρόν, αλλά και τις αποφάσεις του στο μέλλον.

Ζευγάρια τα οποία αντιμετωπίζουν προβλήματα τεκνοποίησης με την φυσιολογική σεξουαλική πράξη, αρχικά δυσκολεύονται να αποδεχθούν το γεγονός. Βασιζόμενοι στην σκέψη "κάτι τέτοιο δεν μπορεί να συμβαίνει σε μένα" ή ακόμα και επηρεασμένοι από την απαίτηση της τοπικής κοινωνίας να αποδείξουν πόσο "γόνιμοι" είναι, αρνούνται να δουν το πρόβλημα στην πραγματική του διάσταση και να επισκεφθούν ένα γυναικολόγο, πιστεύοντας πως είναι κάτι τυχαίο, και πως στο σύντομο μέλλον θα μπορέσουν να αποκτήσουν παιδί με τον φυσιολογικό τρόπο.

Έτσι, άθελά τους, πολλά ζευγάρια διανύουν μία περίοδο έντονης ψυχολογικής πίεσης, η οποία συνήθως δημιουργεί συναισθήματα οργής, αδικίας, ενοχής και λύπης, η οποία είναι δυνατόν να εξελιχθεί ακόμα και σε βαθμό πένθους, για την "απώλεια" του παιδιού που ... ποτέ δεν γεννήθηκε.

Όταν όμως αποφασίσουν να δεχθούν το γεγονός και να απευθυνθούν σε ένα γιατρό, παρουσιάζεται μπροστά τους μία έξοδος από το πρόβλημα, μέσω της Εξωσωματικής Γονιμοποίησης.

Όπως το υπονοεί ο τίτλος, η εξωσωματική γονιμοποίηση είναι μια τεχνική υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, όπου το σπέρμα του άνδρα και το ωάριο της γυναίκας έρχονται σε επαφή και γίνεται η γονιμοποίηση εκτός σώματος. Τα έμβρυα που προκύπτουν τοποθετούνται μετά από 2-3 μέρες στη μήτρα, όπου υπάρχει ελπίδα ότι θα εμφυτευτούν.

Αρχικά η εξωσωματική γονιμοποίηση εφαρμόστηκε σε περιπτώσεις όπου οι σάλπιγγες ήταν κλειστές ή απουσίαζαν (σαλπιγγικός παράγοντας). Αργότερα διαπιστώθηκε ότι η Εξωσωματική Γονιμοποίηση μπορεί να δώσει λύση και σε περιπτώσεις ανδρικού παράγοντα (μικρός αριθμός σπερματοζωαρίων, φτωχή ποιότητα σπερματοζωαρίων), ενδομητρίωσης, ανοσοβιολογικών παραγόντων ή τέλος ανεξήγητης υπογονιμότητας.

Τα κύρια βήματα στην εξωσωματική γονιμοποίηση είναι :

- 1) καταστολή του φυσικού κύκλου της γυναίκας και πρόληψη της ωοθυλακιορρηξίας,
- 2) χορήγηση ενέσιμου φαρμάκου για διέγερση των ωοθηκών και ανάπτυξη πολλών ωοθυλακίων,
- 3) λήψη των ωαρίων και ανάμιξή τους με το ανδρικό σπέρμα,
- 4) μεταφορά ορισμένου αριθμού εμβρύων στη μήτρα.

Μεταξύ των διαφόρων εναλλακτικών μεθόδων της κλασικής Εξωσωματικής Γονιμοποίησης (In Vitro Fertilization - IVF), είναι η ενδοσαλπιγγική μεταφορά γαμετών (GIFT, Gamete Intra-Fallopian Transfer) ή ζυγωτού (ZIFT, Zygote Intra-Fallopian Transfer) με λαπαροσκοπική (1986) ή διακολπική προσπέλαση (1989).

Τα ζευγάρια που ακολουθούν μία τέτοια θεραπεία, έχουν κατανοήσει πως με την in vitro "συνένωση των γαμετών", θα μπορέσουν να αποκτήσουν παιδί. Παράλληλα όμως, θα πρέπει ο θεράπων ιατρός να υποστηρίζει ψυχολογικά τους ασθενείς του, να τους βοηθάει

να αποβάλλων αρνητικά συναισθήματα, για να μπορέσει να πετύχει μια καλύτερη συνεργασία, που στα τελευταία χρόνια κρίνεται περισσότερο απαραίτητη, επειδή οι θεραπευτικές μέθοδοι που εφαρμόζονται είναι ιδιαίτερα περίπλοκες αλλά και ψυχοφθόρες. Δεν πρέπει να αγνοούμε το γεγονός πως η Εξωσωματική Γονιμοποίηση, είναι μια κατ'εξοχή στρεσογόνο διαδικασία, και πως δίχως την ψυχολογική υποστήριξη των γιατρών, τυχόν αποτυχημένες προσπάθειες τεχνητής γονιμοποίησης αποτελούν αίτια για την εμφάνιση συναισθηματικής διαταραχής στην γυναίκα, στον άνδρα αλλά και στις σχέσεις του ζευγαριού.

Ακόμα και αν ο τελικός σκοπός, η κύηση, δεν επιτευχθεί, το ζευγάρι θα είναι περισσότερο έτοιμο να το αποδεχθεί, αρκεί να έχει την αίσθηση πως όλοι, με πνεύμα καλοπροαίρετης συνεργασίας, έπραξαν το καθήκον τους, και ότι τους παρασχέθηκε η καλύτερη δυνατή ιατρική φροντίδα και συμπαράσταση.

Μετά την γέννηση της Luise Brown το 1978 - το πρώτο παιδί μετά από Εξωσωματική Γονιμοποίηση, στο Bourn Hall της Αγγλίας - επακολούθησε μια ραγδαία εξέλιξη νέων μεθόδων και τεχνικών, η οποία ήταν αποτέλεσμα της συσσώρευσης νέων γνώσεων από την *in vitro* μελέτη της διαδικασίας της γονιμοποίησης. Οι διάφορες προσεγγίσεις και στρατηγικές στην επιστήμη της ανθρώπινης αναπαραγωγής έχουν βελτιωθεί, με αποτέλεσμα την τελευταία 10ετία η μέθοδος της Εξωσωματικής Γονιμοποίησης να έχει μεγάλο ποσοστό επιτυχίας, αλλά και την ανάπτυξη νέων τεχνικών, όπως η κρυοσυντήρηση εμβρύων και ωαρίων, και η προεμφυτευτική διάγνωση γενετικών παθήσεων.

2. Ιστορική αναδρομή

Η μέθοδος της Εξωσωματικής Γονιμοποίησης στηρίζεται πάνω στις γνώσεις που έχουν αποκτηθεί από τις αρχές του προηγούμενου αιώνα, χάρις στα πειράματα πολλών επιστημόνων, ο αριθμός των οποίων είναι τεράστιος, και η επιμέρους αναφορά δεν είναι δυνατή. Είναι απαραίτητη όμως η αναφορά σε κάποιες ερευνητικές ομάδες, οι οποίες συνέβαλαν σημαντικά στην κατανόηση των περίπλοκων βιολογικών μηχανισμών της αναπαραγωγής.



Οι Patrick Steptoe και Robert Edwards ανακοινώνουν την γέννηση του πρώτου παιδιού με τη μέθοδο αυτή (1978).

Από τις πρώτες προσπάθειες κατανόησης του "μυστηρίου" της αναπαραγωγής, αξίζει να αναφέρουμε τα πειράματα του Walter Heape το 1890, ο οποίος μετέφερε επιτυχώς έμβρυα από ένα είδος κουνελιού σε ένα άλλο είδος. Ο Heape, μετά από απόπλυση των ωαγών, πήρε 2 έμβρυα από ένα κουνέλι και τα μετέφερε σε ένα θηλυκό κουνέλι διαφορετικού είδους, το οποίο είχε ζευγαρώσει λίγες ώρες πριν. Το αποτέλεσμα ήταν να γεννηθούν 6 μικρά, από τα οποία τα 2 ανήκαν στο είδος της μητέρας δότης, ενώ τα 4 στο είδος της μητέρας φορέας.

Τα πειράματα του Heape κέντρισαν το ενδιαφέρον των ερευνητών για την κατανόηση της διαδικασίας της ανθρώπινης αναπαραγωγής. Αναμφίβολα, οι αρχικές παρατηρήσεις της ερευνητικής ομάδας του Pincus είχαν καταλυτική επίδραση για τις εξελίξεις που επακολούθησαν. Ήταν οι πρώτες που αναφέρονται στον τρόπο ωρίμανσης και στην γονιμοποίηση των ωαρίων των θηλαστικών *in vitro* (Pincus and Saunders, 1939).

Το 1959, η ερευνητική ομάδα του Chang, συνδυάζοντας τις τεχνικές *in vitro* γονιμοποίησης ωαρίων, με την τεχνική εμβρυομεταφοράς του Heape, πέτυχε την πρώτη Εξωσωματική Γονιμοποίηση σε κουνέλια. Η επιτυχία του Chang ήταν τεράστια, καθώς

πρόσφερε στην επιστημονική κοινότητα ένα επιτυχές πρωτόκολλο, το οποίο περιελάμβανε τεχνικές όπως:

- Συγκέντρωση και επεξεργασία σπερματοζωαρίων.
- Συλλογή των ώριμων ωαρίων με απόπλυση των ωαγωγών.
- In vitro γονιμοποίηση.
- Μεταφορά εμβρύου στη μήτρα.

Το επόμενο βήμα ήταν η εφαρμογή αυτών των τεχνικών και στον άνθρωπο, κάτι το οποίο θα είχε τεράστια χρησιμότητα. Καταλύτης σε αυτήν την προσπάθεια ήταν και η καλύτερη κατανόηση του ρόλου της υπόφυσης και των γοναδοτροπινών στη φυσιολογία της αναπαραγωγής. Έτσι, μετά από πολύχρονες μελέτες, κατέστη εφικτή η παραλαβή προ-ωοθυλακιορρηκτικών ώριμων ωαρίων από γυναίκες με ή χωρίς φυσιολογικό εμμηνορυσιακό κύκλο, ύστερα από χορήγηση HMG (Human Menopausal Gonadotropins - ανθρώπινες εμμηνοπαυσιακές γοναδοτροπίνες) (Lunenfeld, 1969).

Στη φάση αυτή, η εισαγωγή της τεχνικής της λαπαροσκόπησης, οδήγησε στην προσπέλαση των ωοθηκών με τη λιγότερο δυνατή χειρουργική επιβάρυνση. Επιπλέον, με τη βοήθεια ειδικών συσκευών αναρρόφησης των πολλαπλών ωοθυλακίων, κατέστη δυνατή η λήψη των ωαρίων σε αριθμό συχνά διψήφιο.

Παρά το μεγάλο αριθμό εμβρυομεταφορών στη μήτρα γυναικών, το πρόβλημα της επιτυχούς εμφύτευσης και της περαιτέρω ενδομήτριας ανάπτυξης των εμβρύων, ορθώθηκε ανυπέβλητο, καταστέλλοντας έτσι τον ενθουσιασμό που εν τω μεταξύ είχε εκδηλωθεί. Για την προσπέλαση αυτού του προβλήματος, άρχισε να καταβάλλεται προσπάθεια για την υποστήριξη της ωχρινικής φάσης. Η χορήγηση προγεστερόνης μέχρις ότου ο πλακούντας αναλάβει την πλήρη ενδοκρινική του δράση, κρίθηκε σκόπιμη.

Η επίμονη ερευνητική προσπάθεια των Robert Edwards και Partick Steptoe, στέφθηκε με απόλυτη επιτυχία το 1978. Γεννήθηκε η Luise Brown, το πρώτο παιδί μετά από Εξωσωματική Γονιμοποίηση, στην κλινική Bourn Hall στο χωριό Bourn της Αγγλίας.



Η Luise Brown νεογέννητη (αριστερά) και σε ηλικία 10 ετών (δεξιά).

Από το 1978 και μετά, ένας μεγάλος αριθμός ερευνητών προσπάθησαν να αυξήσουν την αποτελεσματικότητα αλλά και να εισάγουν νέες τεχνικές οι οποίες θα απλοποιούσαν την μέθοδο της Εξωσωματικής Γονιμοποίησης. Για παράδειγμα, η εφαρμογή των υπερήχων για την λήψη ωαρίων με διακολλική προσπέλαση, κατέστησε περιττή τη λαπαροσκόπηση και την γενική νάρκωση, επιτρέποντας έτσι την εφαρμογή της χωρίς την εισαγωγή της ασθενούς σε νοσοκομείο.

Εντυπωσιακή τεχνική - παράλληλα όμως και θέμα αντιδικίας για την ηθική της διάσταση - είναι και η κατάψυξη ανθρωπίνων εμβρύων, η οποία τελειοποιήθηκε από την ομάδα του βιολόγου Alan Trounson στο Πανεπιστήμιο Monash της Μελβούρνης, το 1982. Ωστόσο, ο πρώτος ο οποίος πέτυχε την γέννηση βιώσιμου παιδιού ύστερα από βαθιά κατάψυξη και απόψυξη εμβρύου, ήταν ο Zeilmaker το 1984 στην Ολλανδία.

Η εφαρμογή ειδικών μικροχειρισμών στους γαμέτες, όπως η διάτρηση, ρήξη ή διατομή της διαφανούς ζώνης με σκοπό την διευκόλυνση της εισόδου των σπερματοζωαρίων, και ιδιαίτερα η κατ' ευθείαν ένεση σπερματοζωαρίων (ICSI - Intra Cytoplasm Sperm Injection), αποτέλεσαν σταθμό στην αντιμετώπιση της ανδρικής και γυναικείας υπογονιμότητας και χρησιμοποιούνται ευρέως τα τελευταία 15 χρόνια.



*ICSI - Intra Cytoplasm Sperm Injection
Ενδοκυτταροπλασματική ένεση
σπερματοζωαρίων*

Η εντυπωσιακότερη όμως εξέλιξη στον χώρο της Εξωσωματικής Γονιμοποίησης, είναι η ικανότητα επιλογής του φύλου αλλά και η διάγνωση κληρονομικών μεταδιδόμενων νοσημάτων στο έμβρυο, πριν ακόμα εμφυτευτεί στη μήτρα.

Η τεχνική αυτή στηρίζεται στην αφαίρεση ενός ή περισσότερων βλαστομεριδίων, τα οποία υποβάλλονται σε DNA ανάλυση (PCR). Έτσι είναι δυνατός ο εντοπισμός του χρωμοσώματος Y αλλά και ο εντοπισμός γενετικών περιοχών που αντιστοιχούν σε συγκεκριμένα νοσήματα. Η τεχνική αυτή επινοήθηκε από τον Handyside (1992) και από τους Gosden and West (1993), οι οποίοι στηρίχθηκαν στην παρατήρηση πως όλα τα βλαστομερίδια δεν είναι απαραίτητα για την περαιτέρω φυσιολογική εξέλιξη του εμβρύου και πως η αφαίρεση ενός ή περισσότερων βλαστομεριδίων αποκαθίσταται αυτόματα, χωρίς να εμποδίζει την ασφαλή μεταφορά του εμβρύου στη μήτρα.

Στη χώρα μας, το πρώτο παιδί μετά από Εξωσωματική Γονιμοποίηση γεννήθηκε το 1983. Σήμερα, οι ειδικοί εκτιμούν ότι στην Ελλάδα περίπου 300.000 ζευγάρια δεν μπορούν να αποκτήσουν παιδί, εξαιτίας των προβλημάτων γονιμότητας που αντιμετωπίζουν.

Η μεγάλη πρόκληση στον τομέα της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής παραμένει και συνίσταται στην περαιτέρω βελτίωση των τεχνικών και μεθόδων που ήδη υπάρχουν και χρησιμοποιούνται.



*Η κροφορία ωστόσο παραμένει ... αποκλειστικό
προνόμιο των γυναικών!*

3. Πρόσφατες εξελίξεις

Έχουν περάσει ήδη 20 χρόνια από τότε που η Εξωσωματική Γονιμοποίηση εισήλθε ως "μοναδική λύση" στη ζωή των ζευγαριών με προβλήματα υπογεννητικότητας. Στα χρόνια που μεσολάβησαν, η μέθοδος ενισχύθηκε σημαντικά, ενώ τα τελευταία 5 χρόνια επινοήθηκαν τεχνικές οι οποίες μπορούσαν να αντιμετωπίσουν πιο δύσκολα και περίπλοκα προβλήματα.

Η παραδοσιακή μέθοδος της Εξωσωματικής Γονιμοποίησης (λήψη ωαρίων, γονιμοποίηση και μεταφορά εμβρύου) έχει εφαρμοστεί με επιτυχία σε ζευγάρια με συγκεκριμένα προβλήματα υπογεννητικότητας, ενώ αδυνατεί να αντιμετωπίσει σοβαρά αίτια στειρότητας. Οι ερευνητικές προσπάθειες των τελευταίων ετών, προσανατολίζονται προς αυτήν την κατεύθυνση, έχοντας να παρουσιάσουν ήδη εντυπωσιακά αποτελέσματα.

Ένα από τα σημαντικότερα εμπόδια στην εφαρμογή της μεθόδου, ήταν και η αντιμετώπιση της ανδρικής στειρότητας που οφείλεται στην έλλειψη σπερματοζωαρίων. Άνδρες με πλήρη αζωοσπερμία ήταν αδύνατο να θεραπευτούν.

Ωστόσο, το 1995 ο Vanderwalden και οι συνεργάτες του, κατάφεραν να γονιμοποιήσουν ένα ωάριο με λήψη σπερματίδων. Με την βοήθεια εξελιγμένων τεχνικών, πήραν κύτταρα και τον όρχη του άνδρα, τα οποία υποβλήθηκαν σε ειδική εργαστηριακή επεξεργασία, με αποτέλεσμα να μετατραπούν σε ώριμα και αρκετά ικανά για γονιμοποίηση σπερματοζωάρια. Πριν την εξέλιξη αυτή, ζευγάρια στα οποία ο άνδρας είχε ανάλογο πρόβλημα, δεν μπορούσαν να αποκτήσουν παιδιά, παρά μόνο με σπέρμα από δότη. Στην Ελλάδα, η μέθοδος αυτή εφαρμόστηκε για πρώτη φορά το 1997, και στέφθηκε με απόλυτη επιτυχία.

Μία άλλη καινοτόμος μέθοδος για την αντιμετώπιση της στειρότητας, είναι η κατάψυξη και μεταμόσχευση ωοθηκικού και αρχικού ιστού, κάτι που αποσκοπεί στην προφύλαξη της αναπαραγωγικής ικανότητας, σε περιπτώσεις όπου οι ασθενείς πρόκειται να ακολουθήσουν θεραπεία κατά του καρκίνου. Τέτοιες θεραπείες, όπως η ακτινοθεραπεία

και η χημειοθεραπεία, έχουν αρνητικές επιδράσεις στην γονιμότητα επηρεάζοντας την λειτουργία των όρχεων και των ωοθηκών.

Στο Cornell Medical Center της Νέας Υόρκης γίνονται έρευνες τα τελευταία 2 χρόνια, πάνω στην αφαίρεση τμήματος όρχεως ή ωοθήκης, στην κατάψυξη αυτού και στην επιτυχή μεταμόσχευσή του. Σε άτομα που πρόκειται να ακολουθήσουν χημειοθεραπεία ή ακτινοθεραπεία, γίνεται αφαίρεση τμήματος ιστού, και μετά την λήξη της θεραπείας γίνεται η μεταμόσχευση του ιστού. Στις αρχές του 2000, η μεταμόσχευση ωοθήκης σε μία γυναίκα 34 ετών, είχε ως αποτέλεσμα την επαναφορά του κύκλου της, και ο δρόμος για την τεκνοποίηση είχε ανοίξει.

4. Ηθική και κοινωνική διάσταση

Η τεράστια εξέλιξη στο χώρο της Εξωσωματικής Γονιμοποίησης τα τελευταία 30 χρόνια, οδήγησε την επιστημονική κοινότητα σε σκεπτικισμό, σχετικά με τα ηθικά διλήμματα τα οποία αναπόφευκτα προκύπτουν, αλλά και σχετικά με τις μελλοντικές εφαρμογές της μεθόδου αυτής. Οι τοποθετήσεις πάνω σε αυτά τα ζητήματα πολλές, αξίζει όμως να αναφέρουμε τις κυριότερες.

Μία από τις δυνατότητες της μεθόδου είναι επιλογή του φύλου, πριν την εμφύτευση του εμβρύου στην μήτρα, για την ικανοποίηση της επιθυμίας των γονέων, όσον αφορά το φύλο των παιδιών τους. Κάτι τέτοιο κρίνεται ανεπίτρεπτο και μεταξύ άλλων μπορεί να οδηγήσει σε δημογραφική παραμόρφωση, διαταράσσοντας τη φυσική μέχρι τώρα ισορροπία μεταξύ των δύο φύλων. Εξάλλου, το φύλο εκτός από τις περιπτώσεις φυλοσύνδετων νοσημάτων, δεν μπορεί να θεωρηθεί αιτία νόσου, με αποτέλεσμα να μην εμπίπτει στα καθήκοντα του ιατρού, ο οποίος έχει την υποχρέωση να προστατεύει την υγεία των ασθενών του και όχι να ικανοποιεί τις όποιες άλλες επιθυμίες τους.

Πέρα όμως από την "απλή" επιλογή του φύλου, η τεράστια εξέλιξη στο χώρο της Γενετικής, μπορεί να προσφέρει μελλοντικά ένα ευρύτερο πεδίο χαρακτηριστικών προς επιλογή. Η αξιοποίηση των πληροφοριών της αποκρυπτογράφησης του ανθρωπίνου γενετικού κώδικα, είναι δυνατόν να οδηγήσει στην απόρριψη κάποιων γαμετών λόγω του ότι φέρουν κάποιες γενετικές μεταλλάξεις αλλά και στην επιλογή κάποιων άλλων εξαιτίας των ιδιοτήτων που προσδίδουν στο άτομο. Χαρακτηριστικά όπως ομορφιά, υψηλός δείκτης νοημοσύνης, δύναμη, θα είναι περισσότερο "επιθυμητά" οδηγώντας έτσι στην εξάλειψη της ποικιλομορφίας, ενός από τους κυριότερους παράγοντες επιβίωσης και επικράτησης των θηλαστικών στη γη.

Κάθε μια μέθοδος, μπορεί να εφαρμοστεί με πολλούς τρόπους και σε διάφορα επίπεδα. Εξαρτάται από το ποιο "χέρι" την χρησιμοποιεί και για ποιους σκοπούς. Στην ιστορία της ανθρωπότητας έχουν καταγραφεί κατά καιρούς δεκάδες ονόματα τρελών

επιστημόνων, εκκεντρικών εκατομμυριούχων και παρανοϊκών ηγεμόνων που ήταν έτοιμοι να κάνουν τα πάντα για να εξασφαλίσουν την κυριαρχία τους ή την υστεροφημία τους. Οι τελευταίες εξελίξεις πάντως, ξαναφέρνουν στην επιφάνεια το φάντασμα του ναζιστή γιατρού Μέγκελε και το όραμα του Χίτλερ για την δημιουργία της Άριας φυλής.

Μια σημαντική αντίθεση στην εφαρμογή της μεθόδου της Εξωσωματικής Γονιμοποίησης, έρχεται από αυτούς που πιστεύουν πως από την στιγμή που το ωάριο και το σπερματοζωάριο θα ενωθούν, προκύπτει ένα νέο ανθρώπινο ον. Στηρίζοντας την άποψή τους, θεωρούν απαραίτητο να αντιμετωπίζεται το έμβρυο (ακόμα και στα αρχικά στάδιά του) με τον ίδιο σεβασμό, όπως θα αντιμετωπιζόταν ένα ώριμο άτομο. Κάτι το οποίο δεν γίνεται (σύμφωνα πάντα με την άποψή τους) κατά τη διάρκεια της μεθόδου της Εξωσωματικής Γονιμοποίησης, αφού δημιουργείται ένας αριθμός εμβρύων, επιλέγονται κάποια από αυτά, και τα υπόλοιπα καταστρέφονται. Το τελευταίο μάλιστα, μπορεί να ταυτιστεί με την αφαίρεση της ζωής ενός ώριμου ατόμου, μιας και η φυσιολογική δυναμική ενός εμβρύου είναι να εξελιχθεί σε ώριμο άτομο.

Στον αντίποδα αυτής της θέσης, βρίσκεται η άποψη πως το έμβρυο πριν την εμφύτευσή του στη μήτρα, αποτελείται μόνο από λίγα κύτταρα και επομένως δεν μπορεί να θεωρηθεί ως "άτομο". Η δημιουργία περισσότερων εμβρύων, εάν πρόκειται να αυξήσει την πιθανότητα για επιτυχημένη κύηση σε μία γυναίκα που αντιμετωπίζει προβλήματα υπογονιμότητας, θεωρείται σκόπιμη και (σύμφωνα πάντα με την άποψή τους) ηθικά αποδεκτή.

Τεράστια ηθικά και κοινωνικά διλήμματα τίθενται μετά τις τελευταίες εξελίξεις στο χώρο της Εξωσωματικής Γονιμοποίησης. Για παράδειγμα, πριν 4 χρόνια στην Αγγλία, μια γυναίκα ζήτησε να χρησιμοποιήσει το σπέρμα του πρώην συζύγου της, που ήδη έχει πεθάνει, για να μείνει έγκυος. Με τη νομοθεσία της εποχής εκείνης αυτό δεν μπορούσε να γίνει. Η γυναίκα πήγε στο Ευρωπαϊκό Δικαστήριο και τελικά της δόθηκε η δυνατότητα να χρησιμοποιήσει το σπέρμα αυτό στο Βέλγιο. Η ανάγκη για τη δημιουργία νομικών

δικλείδων, είναι περισσότερο εμφανής από ποτέ, προκειμένου να αποφευχθούν ακραίες χρήσεις της μεθόδου αλλά και να αντιμετωπιστούν διάφορες περιπτώσεις που προκύπτουν.

Μέρος II

Αίτια υπογονιμότητας σε άνδρες και γυναίκες

Η υπογονιμότητα τα τελευταία χρόνια, εμφανίζει ένα μεγάλο και διαρκώς αυξανόμενο ποσοστό, παίρνοντας διαστάσεις σοβαρού κοινωνικού προβλήματος. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, ένα στα 10 ζευγάρια αντιμετωπίζει πρόβλημα υπογονιμότητας, που σημαίνει πως παγκοσμίως υπάρχουν 50 με 80 εκατομμύρια υπογόνιμα ζευγάρια, ενώ στην Ελλάδα ο αριθμός αυτός υπολογίζεται στις 300.000 ζευγάρια.

Ως αιτία της αύξησης του αριθμού των υπογόνιμων ζευγαριών, έχει ενοχοποιηθεί από πολύ νωρίς το τοξικό περιβάλλον στο οποίο ζούμε, το οποίο επηρεάζει την γονιμότητα κυρίως του άνδρα. Στην βιβλιογραφία μάλιστα, συζητείται έντονα πως τα τελευταία χρόνια παρατηρείται μια μείωση του μέσου όρου του αριθμού των σπερματοζωαρίων.

Αλλά και ο σύγχρονος τρόπος ζωής έχει συμβάλλει στην αύξηση της υπογονιμότητας. Σήμερα, παρ' όλο που οι γυναίκες θεωρούνται πολύ νεότερες στην ηλικία των 30 από ότι στο παρελθόν, δεν παύει ο χρόνος να έχει αποφασιστική σημασία στα ζητήματα γονιμότητας, με αποτέλεσμα λόγω των κοινωνικών και επαγγελματικών υποχρεώσεων, οι περισσότερες γυναίκες να αργούν να παντρευτούν, να αργούν να αποφασίσουν να κάνουν παιδιά, φθάνοντας στην ηλικία των 30 και πολλές φορές πάνω από τα 35. Εν τω μεταξύ, στατιστικά, μετά τα 35 αρχίζει να πέφτει η γονιμότητα και μετά τα 40 ακόμα πιο πολύ.

Θα πρέπει να τονισθεί πως η μέση συχνότητα σύλληψης σε ζευγάρια αποδεδειγμένης γονιμότητας, κυμαίνεται περίπου στο 20% ανά εμμηνορυσιακό κύκλο. Μόνο το 90% των γόνιμων ζευγαριών επιτυγχάνει κύηση στον πρώτο χρόνο και το 95% στη διετία. Έτσι, ένα ζευγάρι χαρακτηρίζεται ως υπογόνιμο, εάν δεν επιτευχθεί εγκυμοσύνη σε διάστημα μεγαλύτερο των δύο ετών, μετά από συστηματικές επαφές.

Οι παράγοντες, σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (ΠΟΥ), στους οποίους οφείλεται η υπογονιμότητα, συνοψίζονται στον πίνακα 1. Το άθροισμα των ποσοστών υπερβαίνει το 100% επειδή στο 15% των ζευγαριών η αιτία είναι πολυπαραγοντική.

- Προβλήματα ωοθηλακιορρηξίας	21%
- Σαλπινγική βλάβη	14%
- Ενδομητρίωση	6%
- Τραχηλικός Παράγων	3%
- Δυσμορφία / δυσλειτουργία σπέρματος	24%
- Άλλες μορφές ανδρικής στειρότητας	2%
- Ανεξήγητη στειρότητα	28%
- Άλλα	11%

Πιν. 1 - Αιτία υπογονιμότητας (ΠΟΥ 1985)

Ο πίνακας αυτός, είναι το αποτέλεσμα μιας πολυεθνικής μελέτης του ΠΟΥ, από την οποία εξάγεται το συμπέρασμα πως ο ανδρικός παράγοντας υπεισέρχεται στο 30% των υπογόνιμων ζευγαριών, ο γυναικείος στο 40% ενώ υπάρχει και ένα 30% το οποίο αναφέρεται ως ανεξήγητη στειρότητα.

Γυναικεία Υπογονιμότητα

Το πρώτο βήμα στην θεραπεία της υπογονιμότητας είναι να βρεθεί το αίτιό της. Δεν είναι διάγνωση το ότι μια γυναίκα δεν κάνει ωοθυλακιορρηξία. Αυτό είναι το σύμπτωμα. Θα πρέπει να ακολουθηθεί μια διαγνωστική μεθοδολογία, όπου θα αναζητηθούν το ή τα αίτια που προκαλούν την όποια διαταραχή στον φυσιολογικό κύκλο και στην γονιμότητα μιας γυναίκας. Τα αίτια υπογονιμότητας στην γυναίκα είναι τα εξής :

- Διαταραχές της ωοθυλακιορρηξίας
- Σαλπινγική (ωαγωγοί) βλάβη
- Ενδομητρίωση
- Τραχηλικός παράγοντας
- Πολυκυστικές ωοθήκες
- Ανεξήγητη στειρότητα

Διαταραχές της ωοθυλακιορρηξίας

Το θηλυκό αναπαραγωγικό σύστημα βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο του άξονα υποθάλαμος - υπόφυση - ωοθήκη. Εάν ο άξονας αυτός παρουσιάζει διαταραχές στην λειτουργία του, θα υπάρξουν επιπτώσεις στον ομαλό κύκλο της ανάπτυξης των ωοθυλακίων και της ωορρηξίας. Οι κυριότερες από αυτές είναι :

- η παντελής έλλειψη ωορρηξίας (ανωορρηξία)
- η άρρυθμη ή σπάνια ωορρηξία

Οι δύο αυτές καταστάσεις εμφανίζονται σε γυναίκες που εκδηλώνουν αμηνόρροια (μη εμφάνιση της εμμήνου ρύσεως) και oligομηνόρροια (άρρυθμη εμφάνιση της εμμήνου ρύσεως). Αυτό όμως δεν αποτελεί κανόνα, μιας και σε γυναίκες με φυσιολογική εμφάνιση της περιόδου έχει διαγνωστεί ανωορρηξία.

Οι διαταραχές της ωοθυλακιωρρηξίας οφείλονται στην έκλυση των γοναδοτροπίνων LH και FSH σε επίπεδα διαφορετικά από τα φυσιολογικά. Για παράδειγμα υπάρχουν γυναίκες που εμφανίζουν μια κατάσταση γνωστή ως υπογοναδοτροπικός υπογοναδισμός, όπου παρατηρείται μια σημαντική μείωση στην έκλυση της GnRH εξαιτίας της μειωμένης υποθαλαμικής δραστηριότητας. Ως αποτέλεσμα, οι γυναίκες αυτές, παρουσιάζουν χαμηλά επίπεδα FSH και LH, τα οποία δεν είναι ικανά να επάγουν την ωρίμανση των ωοθυλακίων και των ωορρηξία.

Μια ακόμη περίπτωση όπου παρατηρείται ακανόνιστη έκλυση γοναδοτροπινών, είναι και αυτή του συνδρόμου των πολυκυστικών ωοθηκών (Polycystic Ovary - PCO). Μια εξέταση αίματος σε αυτή την περίπτωση, δείχνει αλλαγές στα επίπεδα των ορμονών. Το κυριότερο χαρακτηριστικό είναι τα ελαττωμένα επίπεδα της FSH και τα αυξημένα επίπεδα της LH και των ανδρογόνων.

Οι πολυκυστικές ωοθήκες περιέχουν πολλαπλές μικρές κύστες. Μερικές από αυτές περιέχουν ωάρια, άλλες είναι αδρανείς, ενώ άλλες μπορεί να απελευθερώσουν ωοκύτταρα. Η αιτία του συνδρόμου αυτού δεν είναι γνωστή.

Ενδομητρίωση

Εκτιμάται ότι η ενδομητρίωση ευθύνεται για το 6% περίπου του συνόλου των άτεκνων ζευγαριών. Πρόκειται για μια κατάσταση, κατά την οποία κύτταρα του ενδομητρίου αναπτύσσονται έξω από την μήτρα, προσκολλημένα στις ωοθήκες ή άλλα όργανα. Έτσι δημιουργούνται συμφύσεις οι οποίες όταν βρίσκονται στις ωοθήκες εμποδίζουν την απελευθέρωση των ωαρίων, ενώ όταν βρίσκονται στις σάλπιγγες εμποδίζουν την διάβαση των σπερματοζωαρίων. Και στις δύο περιπτώσεις αποτρέπει η γονιμοποίηση. Αναλυτικές μελέτες έδειξαν ότι και μικρού βαθμού ενδομητρίωση σχετίζεται με ουσιαστική μείωση της γονιμότητας. (Jansen 1986, Matottas 1996).

Υπογονιμότητα σαλπινγικής αιτιολογίας

Η σάλπιγγα αποτελεί ένα άκρως περίπλοκο όργανο. Καθοδηγεί τους γαμέτες με αντίστροφη κατεύθυνση στο σημείο της συνάντησης και παρέχει το κατάλληλο μεταβολικό περιβάλλον για τη γονιμοποίηση και για τις πρώτες ώρες της ζωής του εμβρύου. Καταστάσεις που έχουν ως αποτέλεσμα την μερική ή ολική απόφραξη της σάλπιγγας αποτρέπουν την παραπάνω κίνηση των γαμετών με αποτέλεσμα να μην επιτελείται γονιμοποίηση.

Αυτή η ελάττωση της διαβατότητας των σαλπινγών, μπορεί να προκληθεί είτε από την παρουσία συμφύσεων, είτε από κάποια φλεγμονή που προκλήθηκε από μόλυνση. Τέτοιες περιπτώσεις μπορούν να θεραπευτούν χειρουργικά. Προτιμάται όμως η μέθοδος της Εξωσωματικής Γονιμοποίησης, όπου με το στάδιο της ωοληψίας και την γονιμοποίηση in vitro, παρακάμπτεται ο ρόλος της σάλπιγγας.

Διαταραχές ή δυσλειτουργία της τραχηλικής βλέννης

Πριν το στάδιο της ωοθυλακιορρηξίας, η τραχηλική βλέννη έχει συγκεκριμένη σύνθεση, διαμορφώνοντας ένα όξινο περιβάλλον το οποίο σκοτώνει τα βακτήρια, αποτρέποντας έτσι τη μόλυνση της μήτρας. Τα σπερματοζωάρια δεν επιζούν για μεγάλο χρονικό διάστημα σε ένα τέτοιο περιβάλλον. Γι' αυτό τον λόγο, η βλέννη, ανταποκρινόμενη στα αυξανόμενα επίπεδα οιστραδιόλης, αλλάζει την σύστασή της επιτρέποντας την γρήγορη κίνηση των σπερματοζωαρίων.

Εάν η σύνθεση της βλέννης, τόσο ποιοτικά όσο και ποσοτικά, δεν είναι η απαιτούμενη, θα εμποδιστεί η κίνηση των σπερματοζωαρίων και η συνάντησή τους με το ωάριο.

Επιπλέον, σε σπάνιες περιπτώσεις, παρατηρούνται στην βλέννη αντισώματα έναντι των σπερματοζωαρίων.

Ανεξήγητη στειρότητα

Η αιτία της υπογονιμότητας ενός ζευγαριού, μπορεί να μην βρεθεί ακόμα και αν πραγματοποιηθούν λεπτομερείς εξετάσεις. Ο όρος «ανεξήγητη στειρότητα» αποδίδεται σε ζευγάρια που δεν πέτυχαν εγκυμοσύνη μετά από διετή προσπάθεια και στα οποία δεν έχει διαπιστωθεί διαταραχή ή ανωμαλία στο αναπαραγωγικό σύστημα. Εκτιμάται όπως το 28% περίπου των ασθενών με ιστορικό υπογονιμότητας ανήκει στην κατηγορία αυτή. Στην πραγματικότητα, στα ζευγάρια αυτά διαπιστώνεται ότι υπάρχουν παθολογικές καταστάσεις που δεν εντοπίζονται εύκολα. Τέτοιες είναι ανεπαίσθητες διαταραχές της ωοθυλακιορρηξίας, δυσχέρεια παραλαβής των ωαρίων και προβλήματα μεταφοράς των γαμετών.

Ανδρική υπογονιμότητα

Παρά το γεγονός ότι ο ανδρικός παράγοντας υπεισέρχεται στο μεγαλύτερο ποσοστό ζευγαριών που επιζητούν λύση στο πρόβλημα της ατεκνίας, και παρ' ότι ο βασικός έλεγχος του άνδρα είναι απλός, φθηνός και γρήγορος, σε αρκετά κέντρα γονιμότητας ο παράγων αυτός συνεχίζει να υποτιμάται. Η ύπαρξη φυσιολογικού σπερμοδιαγράμματος αποτελεί ένδειξη για την γονιμοποιητική ικανότητα του σπέρματος. Σύμφωνα με τον παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας τα κριτήρια φυσιολογικού σπέρματος είναι τα εξής :

- Όγκος 2 κ.ε.
- pH 7,2 - 8

- Αρ. σπερματοζωαρίων $>20 \times 10^6$ / κ.ε.
- Κινητικότητα $>50\%$
- Μορφολογία $>30\%$ φυσιολογικά
- Ζωτικότητα $>75\%$ ζωντανά

Σε γενικές γραμμές, η λογική σειρά στην προσπάθεια διερεύνησης της αναπαραγωγικής ικανότητας του άνδρα, είναι η λήψη του ιστορικού, η φυσική εξέταση και σε μια σειρά εργαστηριακών εξετάσεων. Η διάγνωση στηρίζεται συνήθως στο σπερμοδιάγραμμα, με κύρια αναφορά στον αριθμό, την κινητικότητα και την μορφολογία των σπερματοζωαρίων. Στην πραγματικότητα όμως η μέθοδος αυτή έχει αποδειχθεί ότι αποτελεί μια όχι πάντα αξιόπιστη διαγνωστική παράμετρο για την εκτίμηση της γονιμότητας. Υπάρχουν περιπτώσεις με «φυσιολογικό» αριθμό σπερματοζωαρίων που δεν επιτυγχάνουν γονιμοποίηση, ενώ αντίθετα άνδρες με μικρό αριθμό σπερματοζωαρίων δεν αποκλείεται να είναι γόνιμοι.

Η ανδρική υπογονιμότητα οφείλεται κυρίως σε προβλήματα που σχετίζονται με την παραγωγή και ωρίμανση των σπερματοζωαρίων. Όταν ο αριθμός τους είναι χαμηλός, τότε μειώνονται και οι πιθανότητες για τουλάχιστον ένα από αυτά να συναντήσει το ωάριο και επομένως μειώνονται οι πιθανότητες επιτυχούς γονιμοποίησης. Ακόμα και όταν τα σπερματοζωάρια παράγονται σε ικανοποιητικό αριθμό, μπορεί να μην έχουμε γονιμοποίηση είτε γιατί είναι ανώριμα, είτε γιατί δεν έχουν φυσιολογική μορφολογία και τέλος γιατί δεν έχουν προωθητική ικανότητα.

Η μείωση της ποιότητας και της ποσότητας των σπερματοζωαρίων οφείλεται σε ορισμένους παράγοντες :

- Μολυσματικές ασθένειες. Η βλεννόρροια και τα χλαμύδια είναι γνωστό πως προκαλούν φλεγμονές και προκαλούν καταστροφή των σπερματικών πόρων.
- Ανεπαρκή παραγωγή των γοναδοτροπινών FSH και LH. Αποτελεί τον κυριότερο παράγοντα.

- Παρουσία αντισπερματικών αντισωμάτων στο σπερματικό υγρό.
- Έκθεση σε ακτινοβολίες.

Η Εξωσωματική Γονιμοποίηση αποτελεί την μόνη λύση, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις με ολιγοσπερμία, όπου πυκνότητες μέχρι και $2 \times 10^6/\text{ml}$, με καλή όμως προωθητική ικανότητα θεωρούνται αποδεκτές. Αντίθετα η ύπαρξη δυσλειτουργίας στο σπέρμα (ασθενοσπερμία) συνοδεύεται από απογοητευτικά αποτελέσματα. Η θεραπεία του σπέρματος με δυσλειτουργικές ανωμαλίες δεν είναι αποτελεσματική και δεν προβλέπεται να βελτιωθεί, έως ότου κατανοηθούν καλύτερα οι βασικοί μηχανισμοί που τις προκαλούν. Σε περιπτώσεις σοβαρού βαθμού ανδρικής υπογονιμότητας, η προσοχή επικεντρώνεται σε μηχανικές μεθόδους, όπως η ενδοκυτταροπλασματική ένεση σπερματοζωαρίου (ICSI).

Μέρος III

1. Προεμφυτευτική διαδικασία

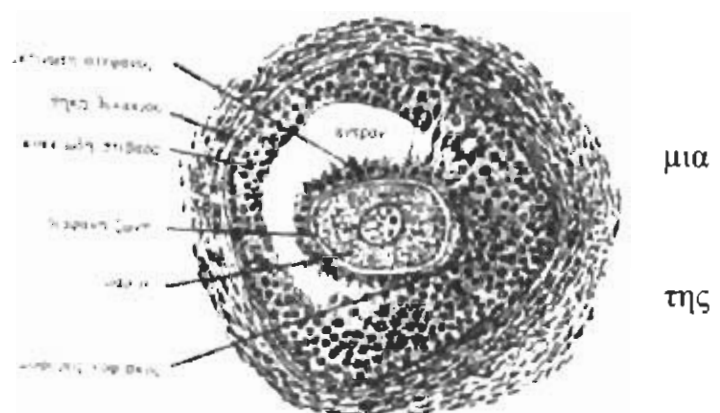
A Οαθηκική διένεση

i. Βασικές αρχές της φυσιολογίας της ωοθηλακιορρηξίας

Ο εμμηνορροϊσσιακός κύκλος μιας φυσιολογικής γυναίκας υπόκειται στον οριστικό και ευαίσθητο έλεγχο του άξονα υποθάλαμος - υπόφυση ο οποίος έχει ως τελικό στόχο την ωοθήκη. Ορμονικά μηνύματα αποστέλλονται και προς τις δύο κατευθύνσεις, τροποποιώντας έτσι την έκλυση των γοναδοτροπινών και των οιστρογόνων στα διάφορα στάδια του κύκλου, κάτι το οποίο είναι εξαιρετικά σημαντικό, μιας και η απόκτηση μιας συγκεκριμένης αναλογίας ορμονών είναι η κινητήρια δύναμη για την διεκπεραίωση μιας συγκεκριμένης λειτουργίας σε ένα συγκεκριμένο στάδιο. Τα πρώτα εμπειρικά δεδομένα που υποστήριξαν το ρόλο της υπόφυσης στη ρύθμιση των γονάδων προήλθαν από τους Crow, Cushing και Homans, οι οποίοι απ' το 1909 έδειξαν ότι σε σκυλιά η υποφυσεκτομία οδήγησε σε ατροφία των γεννητικών οργάνων.

Κάτω από τον έλεγχο λοιπόν των ορμονών, επιτυγχάνονται δυο λειτουργίες. Πρώτον, αυξάνει σε μέγεθος το ωοθυλάκιο, με τελικό σκοπό την απελευθέρωση του ωαρίου, και δεύτερον εφ' όσον γονιμοποιηθεί το ωάριο, προετοιμάζονται τα τοιχώματα της μήτρας για την εμφύτευση του εμβρύου.

Ένα θηλυκό άτομο, με την γέννησή του, φέρει περίπου ένα εκατομμύριο ωοκύτταρα, όλα στο στάδιο του ωοκυττάρου 1ης τάξης. Κάθε τέτοιο ωοκύτταρο (σχ. 1) περιβάλλεται από στοιβάδα από θυλακιακά κύτταρα τα οποία προέρχονται από το επιθήλιο ωοθήκης και ολόκληρος ο σχηματισμός αυτός ονομάζεται



Σχ. 1. Ωοθυλάκιο - σχηματική παράσταση

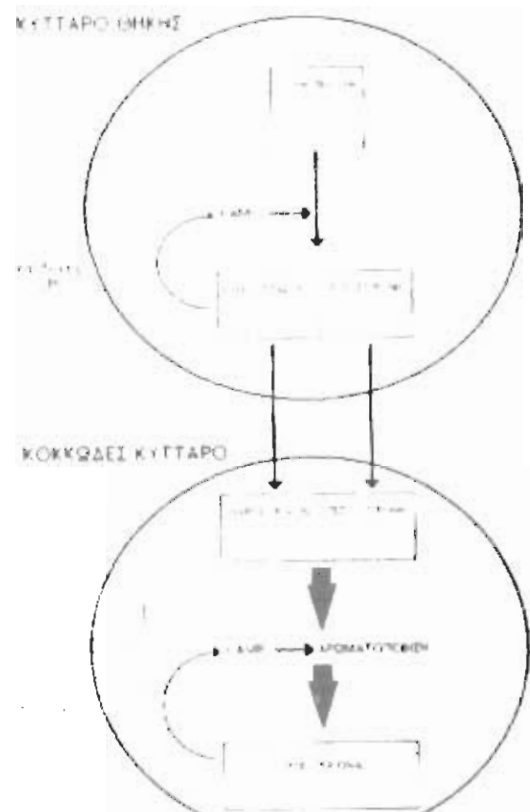
θυλάκιο. Κάθε θυλάκιο περικλείεται από έναν άλλο σχηματισμό κυττάρων της ωοθήκης, την θήκη του θυλακίου.

Σε ένα φυσιολογικό κύκλο, ένα ωοθυλάκιο ανταποκρίνεται στις εκλύσεις των γοναδοτροπινών από την υπόφυση, ενώ το ίδιο αρχίζει να εκκρίνει οιστρογόνα. Κατ' αυτόν τον τρόπο αρχίζει η ωρίμανση του ωοθυλακίου που συνίσταται στον πολλαπλασιασμό των θυλακιακών κυττάρων, στον σχηματισμό μιας κοιλότητας (άντρον) και στην ωρίμανση του ωοκυττάρου.

Αναλυτικότερα, όταν το θηλυκό άτομο φτάνει τη σεξουαλική του ωρίμανση ελευθερώνει φυσιολογικά ένα ωάριο τη 14η ημέρα του εμμηνορυσιακού κύκλου, ο οποίος είναι διάρκειας 28 ημερών. Ο υποθάλαμος εκκρίνει την GnRH (Gonadotropin Releasing Hormone), η οποία αντιδρά με τους αντίστοιχους υποδοχείς της υπόφυσης και ενεργοποιεί μια σειρά άλλων αντιδράσεων που οδηγούν στην κατά ώσεις απελευθέρωση των γοναδοτροπινών FSH (Follicle Stimulating Hormone - θυλακιοτρόπος ορμόνη) και LH (Luteinizing Hormone - Ωχρινοτρόπος ορμόνη) από την υπόφυση (Levine, 1985).

Προς το τέλος της ωχρινικής φάσης του προηγούμενου κύκλου, ένας αριθμός πρωτόγονων ωοθυλακίων ανταποκρίνεται στην μικρή αύξηση της FSH και αρχίζει η ωρίμανσή τους. Η "στρατολόγηση" και ωρίμανση των ωοθυλακίων συνεχίζεται τις 4 πρώτες ημέρες του νέου κύκλου και τα ωοθυλάκια έχουν διάμετρο 200 μm (Vermesh and Kletzky, 1987).

Στο στάδιο αυτό, τα κύτταρα της θήκης των θυλακίων, προσλαμβάνουν την



Σχ. 2 - Οι διαφορετικοί στόχοι των δύο γοναδοτροπινών

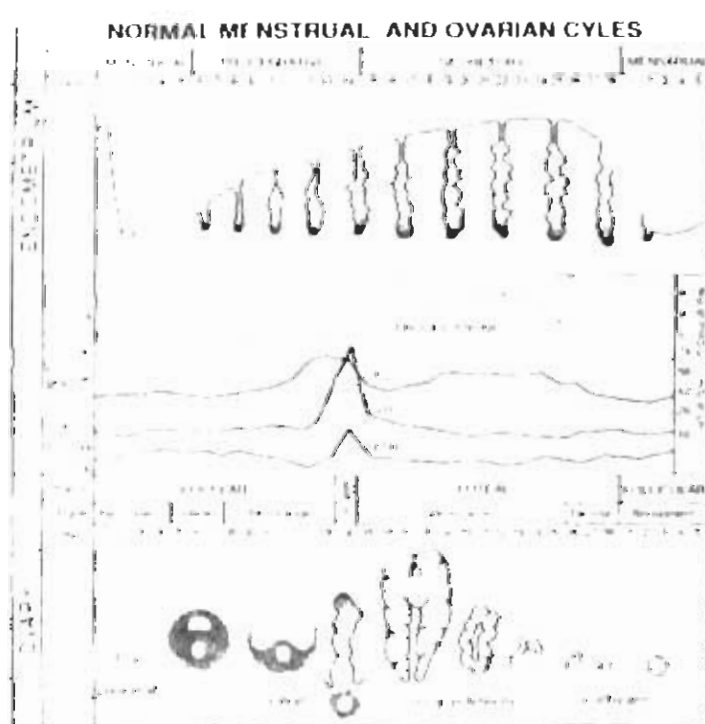
LH και κάτω από την επίδρασή της παράγουν ανδρογόνα. Τα θυλακιακά κύτταρα,

προσλαμβάνουν την FSH, με αποτέλεσμα τον πολλαπλασιασμό τους αλλά και την αύξηση των υποδοχέων της FSH σε κάθε θυλακιακό κύτταρο (1500). Επίσης, κάτω από την επίδραση της FSH, τα θυλακιακά κύτταρα παράγουν οιστρογόνα (οιστραδιόλη-E2), μέσω της αρωματοποίησης και μετατροπής των ανδρογόνων που προέρχονται από τα κύτταρα της θήκης.

Η παραγωγή των οιστρογόνων από τα θυλακιακά κύτταρα σχετίζεται άμεσα με την ποσότητα των ανδρογόνων που διατίθενται από τα κύτταρα της θήκης, κατά συνέπεια είναι συνάρτηση συνδυασμένης δράσης της FSH και LH, δηλαδή τόσο της θήκης όσο και των θυλακιακών κυττάρων. Στην φάση αυτή έχει αρχίσει να σχηματίζεται το άντρον στο ωοθυλάκιο, του οποίου η διάμετρος είναι 500 μm .

Από την 5η έως την 7η ημέρα του κύκλου γίνεται η επιλογή του κυρίαρχου ωοθυλακίου (σχ. 3), και τα υπόλοιπα υφίστανται ατρησία. Στην φάση αυτή τα επίπεδα της

FSH είναι πολύ χαμηλά εξαιτίας των υψηλών επιπέδων της E2, η οποία δρα στην υπόφυση ελαττώνοντας την απελευθέρωση της FSH. Η επιλογή του κυρίαρχου ωοθυλακίου γίνεται με βάση την ικανότητά του να αναπτυχθεί παρά τα χαμηλά επίπεδα FSH. Η ικανότητα αυτή οφείλεται στα υψηλά επίπεδα οιστρογόνων, μέσα στο αναπτυσσόμενο κυρίαρχο ωοθυλάκιο, τα οποία εντείνουν την διεγερτική επίδραση της FSH.



Σχ. 3. - Η ανάπτυξη του ωοθυλακίου και τα επίπεδα των ορμονών κατά την διάρκεια του φυσιολογικού κύκλου

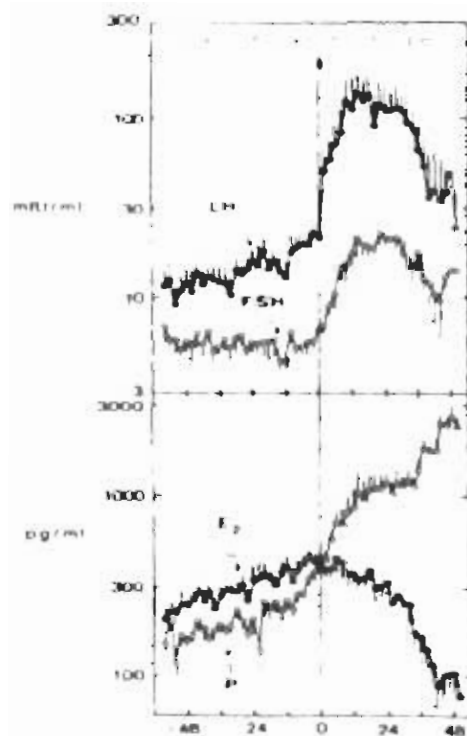
Κάτω από την επίδραση της FSH, τα θυλακιακά κύτταρα εκκρίνουν τον παράγοντα IGF-1 (Insulin - like Growth Factor), ο οποίος επαυξάνει την έκλυση της αρωματάσης, του ενζύμου υπεύθυνου για την μετατροπή των ανδρογόνων σε οιστρογόνα. Ο παράγοντας αυτός ασκεί αυτοκρινική και παρακρινική δράση (Adashi, 1985).

Τα θυλακιακά κύτταρα επίσης εκκρίνουν inhibin, η οποία σε συνεργασία με τη LH έχει την ικανότητα να διεγείρει την παραγωγή ανδρογόνων από τα κύτταρα της θήκης αλλά και να μειώνει την παραγωγή της FSH από την υπόφυση (Hillier, 1991).

Από την 8η έως την 13η ημέρα του κύκλου, έχουμε την αύξηση του κυρίαρχου ωοθυλακίου. Σε αυτό το στάδιο σχηματίζεται πλήρως το άντρον, και το ωοκύτταρο επικάθεται σε ένα "λοφίσκο" από κύτταρα του θυλακίου, τον ωοφόρο λοφίσκο. Τελικώς, το ώριμο ωάριο, περιβάλλεται από τη διάφανη ζώνη και από την ακτινωτή στέφανο.

Επιπλέον, στην φάση αυτή το ωοθυλάκιο συνεχίζει να εκκρίνει οιστρογόνα, με αποτέλεσμα να διατηρείται η παραγωγή της FSH σε χαμηλά επίπεδα (σχ. 3). Ακόμη, καθώς το ωοθυλάκιο πλησιάζει στην ωοθυλακιορρηξία, αρχίζουν να εμφανίζονται υποδοχείς της LH στα θυλακιακά κύτταρα, τα οποία έως τώρα ήταν κάτω από τον έλεγχο της FSH για την παραγωγή οιστρογόνων. Με την εμφάνιση όμως υποδοχέων της LH, τα θυλακιακά κύτταρα, μετά την ωορρηξία (δηλαδή στην ωχρινική φάση) είναι κάτω από τον έλεγχο της LH για την παραγωγή οιστρογόνων αλλά και προγεστερόνης (P).

Στο στάδιο αυτό, η συνεχιζόμενη παραγωγή οιστρογόνων οδηγεί στην κορύφωση της συγκέντρωσης της οιστραδιόλης (E2) την 13η ημέρα του κύκλου (σχ. 3). Η κορύφωση αυτή ενεργοποιεί την απελευθέρωση της GnRH, η οποία με την σειρά της διεγείρει την αιχμιακή έκλυση της LH 14-24 ώρες αργότερα. Παράλληλα, αμέσως πριν από την κορύφωση της LH, συμβαίνει μια μεταστροφή στη στεροειδογένεση από τη παραγωγή οιστρογόνων στην παραγωγή



Σχ. 4 - Επίπεδα FSH, LH, E2 και προγεστερόνης (P) στην φάση της αιχμιακής έκλυσης της LH.

προγεστερόνης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα μια πτώση των επιπέδων της E2.

Συνοψίζοντας, βλέπουμε πως η συγκέντρωση της E2 μετά την κορύφωσή της, μειώνεται αμέσως αφού έδωσε το σήμα για την αιμιακή έκλυση της LH και για την έναρξη παραγωγής προγεστερόνης (σχ. 4).

Η προ-ωοθυλακιορρηκτική εκκριτική αιχμή της LH, αποτελεί το πρωταρχικό ενδοκρινικό "έναυσμα" για την ωχρινοποίηση των θυλακιακών κυττάρων και για μια σειρά γεγονότων στα οποία συμπεριλαμβάνονται :

- Η αποβολή του 1ου πολικού σωματίου, του ωοκυττάρου, το οποίο είναι πλέον στο στάδιο του ωοκυττάρου 2ης τάξης.
- Παραγωγή ιντερλευκίνων (IL1 και IL-3) προσταγλαδινών, κολλαγονάσης και της πρωτεάσης plasminogen activator (ωοκύτταρο).

Η ωορρηξία λαμβάνει χώρα 24 με 36 ώρες αργότερα, όταν το ωοθυλάκιο έχει διάμετρο περίπου 20mm (σχ. 3).

Μετά την απελευθέρωση του ωαρίου, τόσο τα θυλακιακά κύτταρα, όσο και τα κύτταρα της θήκης υφίστανται ωχρινοποίηση, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό του ωχρού σωματίου, το οποίο παράγει προγεστερόνη, οιστρογόνα και inhibin, καταστέλλοντας την ωρίμανση νέων ωοθυλακίων στις ωοθήκες.

Η προγεστερόνη δρα στα τοιχώματα της μήτρας και επάγει την ανάπτυξη αδένων του τοιχώματος και ευαισθητοποίηση της αντίδρασης της μήτρας κατά την επαφή της με το πρώιμο έμβρυο.

Σε αυτό το στάδιο είναι καθοριστικής σημασίας η αναλογία οιστραδιόλης προς την προγεστερόνη (E2/P). Χαμηλό πηλίκο E2/P σχετίζεται με σύλληψη (Gidley - Baird, 1985 - Lejeune, 1986). Δηλαδή είναι απαραίτητη η αύξηση παραγωγής της προγεστερόνης, προκειμένου να προετοιμαστεί η μήτρα να δεχθεί το έμβρυο. Το "ταξίδι" του πρώιμου εμβρύου από τις σάλπιγγες στην μήτρα διαρκεί 3 με 4 ημέρες. Την 5η ή 6η ημέρα, το έμβρυο πέπτει τη διάφανη ζώνη και "δραυτευτεί". Το έμβρυο βρίσκεται στο στάδιο της

βλαστοκύστης. Η τροφοβλάστη αρχίζει στην συνέχεια να εισβάλει στο ενδομήτριο έως ότου εμβυθισθεί μέσα σε αυτό, κάτι το οποίο γίνεται την 10η ημέρα περίπου.

Η τροφοβλάστη σε όλη αυτή την πορεία, εκκρίνει την HCG (Human Chorionic Gonadotropin) η οποία συντηρεί το ωχρό σωματίο να συνεχίσει να εκκρίνει προγεστερόνη. Ο πλακούντας ύστερα από 5 εβδομάδες περίπου εκκρίνει προγεστερόνη και έτσι συντηρείται η εγκυμοσύνη.

Εάν δεν υπάρξει εγκυμοσύνη, τότε δεν έχουμε έκλυση της HCG, με αποτέλεσμα το ωχρό σωματίο να εκφυλιστεί. Κάτι τέτοιο συνεπάγεται την πτώση των επιπέδων παραγωγής των οιστρογόνων και της inhibin, επιτρέποντας έτσι την αύξηση της FSH σε κάποια επίπεδα απαραίτητα για την εκκίνηση ενός νέου κύκλου.

ii. Πρόκληση ωοθυλακιορρηξίας

Η πρώτη εγκυμοσύνη μετά από IVF προέκυψε από την γονιμοποίηση ενός ωαρίου που είχε παραληφθεί από ένα φυσιολογικό εμμηνορρυσιακό κύκλο, χωρίς ωοθηκική διέγερση. Σήμερα όμως, είναι γενικά αποδεκτό ότι η ωοθηκική διέγερση, με σκοπό την πολλαπλή ανάπτυξη ωοθυλακίων, αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την ικανοποιητική λειτουργία ενός προγράμματος εξωσωματικής γονιμοποίησης. Η παραλαβή ικανού αριθμού ωαρίων, παρέχει τη δυνατότητα αυξημένου αριθμού γονιμοποιημένων ωαρίων και επιλογής των καλύτερων από αυτά για μεταφορά.

Η διέγερση βέβαια των ωοθηκών απαιτεί φαρμακολογική παρέμβαση με επιπτώσεις στην ωοθηκική λειτουργία, αλλά και στην λειτουργία της υπόφυσης και του ενδομητρίου, με αρνητικά ενίοτε αποτελέσματα τόσο για την εμφύτευση, όσο και για την μετέπειτα πορεία της εγκυμοσύνης.

Τα διάφορα θεραπευτικά σχήματα που εφαρμόζονται ποικίλλουν ευρύτατα μεταξύ των διαφόρων κέντρων.

Οι στόχοι σε ένα θεραπευτικό πρόγραμμα είναι:

- Η λήψη μεγάλου αριθμού ωοκυττάρων
- Η αποφυγή της πρόωρης ωοθυλακιορρηξίας και του συνδρόμου της υπερδιέγερσης.

Μελετώντας κανείς την φυσιολογία της ωοθυλακιορρηξίας, συμπεραίνει πως ο πρώτος στόχος μπορεί να επιτευχθεί με την χορήγηση εξωγενούς FSH στην αρχή του κύκλου, κατά το στάδιο της στρατολόγησης, όπου τα επίπεδα της FSH είναι χαμηλά, διασώζοντας έτσι ένα μέρος των ωοθυλακίων από ατρησία.

Ο δεύτερος στόχος, δηλαδή η αποφυγή της πρόωρης ωοθυλακιορρηξίας, μπορεί να καταστεί δυνατός μέσω της καταστολής της έκλυσης της LH, εμποδίζοντας έτσι την εχμιακή έκλυσή της.

Και οι δύο αυτές παρεμβάσεις είναι εφικτές με την χρησιμοποίηση φαρμακευτικών πρωτοκόλλων, τα οποία αποσκοπούν στην ωοθηκική διέγερση, με την εξασφάλιση ταυτόχρονα του ιδανικότερου ορμονικού περιβάλλοντος για την εμφύτευση και περαιτέρω διατήρηση της εγκυμοσύνης.

1. Ωοθηκική διέγερση με γοναδοτροπίνες σε συνδυασμό με GnRH- ανάλογα.

Μετά την ανακάλυψη της GnRH, περισσότερα από 2000 ανάλογά της έχουν παρασκευαστεί. Τα ανάλογα αυτά (GnRH-A), αντιδρούν όπως και η φυσιολογική GnRH με τους αντίστοιχους υποδοχείς της υπόφυσης, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση των FSH και LH.

Μία παρατεταμένη όμως χορήγηση GnRH αναλόγων προκαλεί αύξηση των GnRH υποδοχέων με παράλληλη αύξηση της απελευθέρωσης γοναδοτροπινών (flare - up effect). Λόγω της μεγαλύτερης συγγένειάς τους προς τους GnRH υποδοχείς, η δράση των αναλόγων είναι 100-200 φορές ισχυρότερη από εκείνη της φυσικής GnRH (Jinnah and Conn, 1986). Στη συνέχεια όμως η μείωση του αριθμού και της ευαισθησίας των ομολόγων υποδοχέων (down-regulation) οδηγεί στην απευαισθητοποίηση της υπόφυσης (Conn et al, 1987).

Τελικό αποτέλεσμα είναι η καταστολή των FSH και LH και η δημιουργία έτσι μιας "φαρμακευτικής εμμηνόπαυσης". Θέτοντας τον φυσιολογικό κύκλο μιας γυναίκας σε "καταστολή", μπορούμε στην συνέχεια να προκαλέσουμε ωοθηκική διέγερση με εξωγενείς γοναδοτροπίνες στις οποίες μπορούμε να τροποποιήσουμε το δοσολογικό σχήμα, ούτως ώστε να πετύχουμε τον καλύτερο συγχρονισμό της ανάπτυξης των ωοθυλακίων και να αποτρέψουμε την εκδήλωση αρνητικών φαινομένων, όπως η πρόωρη ωχρινοποίηση και η πρόωμη ωοθηλακιορρηξία. Στην περίπτωση της πρόωμης ωχρινοποίησης, η πρόωρη

παραγωγή προγεστερόνης μπορεί να επηρεάσει αρνητικά την ωρίμανση του ενδομητρίου, οδηγώντας σε ασυγχρονισμό σε σχέση με τον ωοθηκικό κύκλο.

Ένα τέτοιο φαρμακευτικό πρωτόκολλο, επιτυγχάνει φυσιολογικά επίπεδα ορμονών, κάτι το οποίο ήταν ανέφικτο σε διάφορες περιπτώσεις υπογόνιμων γυναικών, όπως :

- Ασθενείς με υπογοναδοτροπικό υπογοναδισμό, που χαρακτηρίζονται από μειωμένη υποθαλαμική ή υποφυσιακή δραστηριότητα.
- Ασθενείς με ασύγχρονη παραγωγή γοναδοτροπινών και οιστρογόνων. Με αποτέλεσμα να εμφανίζουν ποικιλία διαταραχών που κυμαίνονται από κανονικούς αλλά ανωορρηκτικούς κύκλους μέχρι ολίγο- και αμηνόρροια.

Μετά την χορήγηση GnRH αναλόγων, ακολουθεί η θεραπεία με εξωγενείς γοναδοτροπίνες εφ' όσον βέβαια έχει επιβεβαιωθεί η καταστολή της υπόφυσης (καταστολή επιπέδων LH και E2).

Το σκεπτικό που οδήγησε στην εφαρμογή των GnRH-A ήταν πως η ανάπτυξη και ωρίμανση των ωοθυλακίων είναι ομαλότερη χωρίς την παρεμβολή της LH. Δηλαδή η επίτευξη της "φαρμακευτικής εμμηνόπαυσης" έχει ως κύριο σκοπό την καταστολή παραγωγής LH και όχι της FSH. Έτσι, αποτρέπεται η πρόωρη εχμιακή έκλυση της LH, που αποτελεί έναν από τους κυριότερους τύπους εμμηνορρυσιακών διαταραχών και που οδηγεί στην αναστολή της ανάπτυξης των ωοθυλακίων, πριν αυτά φθάσουν τη διάμετρο των 15 mm.

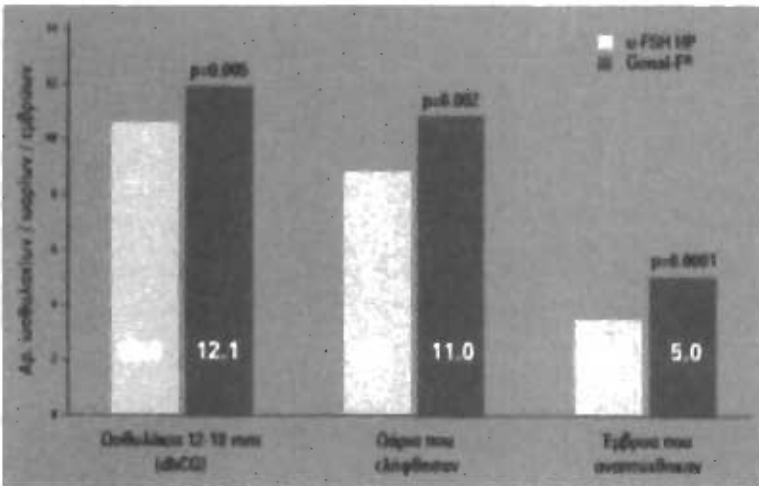
Τα GnRH ανάλογα χρησιμοποιούνται και σε ασθενείς που εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα LH. Σε μία τέτοια περίπτωση υπερδιεγείρονται τα κύτταρα της θήκης και οδηγούν στην υπερπαραγωγή ανδρογόνων τα οποία με την σειρά τους, ασκούν τοξική επίδραση τόσο στα κοκκώδη κύτταρα του αναπτυσσόμενου ωοθυλακίου, όσο και στο ίδιο το ωάριο προκαλώντας συχνά την ατρησία (Erickson, 1985).

2. Εξωγενείς γοναδοτροπίνες

Για την διέγερση των ωοθηκών γενικά, ιδιαίτερα στο παρελθόν, χρησιμοποιήθηκαν σκευάσματα που εμπεριείχαν κυρίως HMG (Human Menopausal Gonadotropin - ανθρώπινες εμμηνοπαυσιακές γοναδοτροπίνες), από ούρα μετα-εμμηνοπαυσιακών γυναικών. Τέτοια σκευάσματα (hMG) όμως έχουν μόνο 5% καθαρότητα σε FSH και LH, και εμπεριέχουν μεγάλες ποσότητες πρωτεϊνών των ούρων, συμπεριλαμβανομένων των αυξητικών παραγόντων, ειδικών ανοσοποιητικών σφαιρινών και ενζύμων. Επιπλέον, η αναλογία FSH : LH ήταν περίπου 1:1.

Από το 1980 και μετά ξεκίνησε η προσπάθεια για απόκτηση υψηλής καθαρότητας FSH, μιας και τα επίπεδα της LH είχαν ήδη ενοχοποιηθεί ως αιτία πολλών διαταραχών. Αρχικά παρασκευάστηκε υψηλής καθαρότητας FSH (u-FSH, καθαρότητα 61%), με μια τεχνική, όπου η παραλαβή της FSH από το μείγμα της hMG γινόταν με την βοήθεια μονοκλωνικών αντισωμάτων, όπου οι μη FSH-πρωτεΐνες απομακρύνονταν με μια διαδικασία υψηλής απόδοσης υγρής χρωματογραφίας (HPLC).

Από το 1990 χρησιμοποιήθηκε η τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA για την Παρασκευή ανασυνδυασμένης (recombinant) FSH (r-FSH → Gonal-F), η οποία στα σκευάσματα έχει καθαρότητα που πλησίαζε το 100%. Επιπλέον, κλινικές μελέτες απέδειξαν πως η rFSH υπερέχει αισθητά σε αποτελεσματικότητα έναντι της u-FSH. (σχήματα 1, 2, 3).

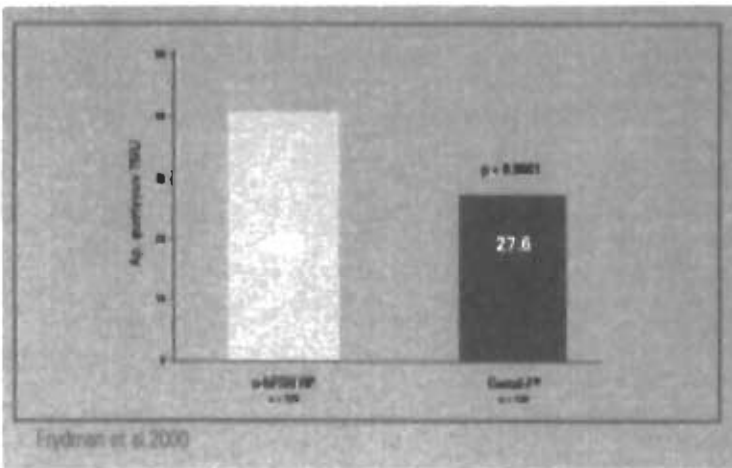


Σχ. 1 - Η χρήση της rFSH έχει ως αποτέλεσμα μεγαλύτερο αριθμό ωοθυλακίων, ωαρίων και εμβρύων.

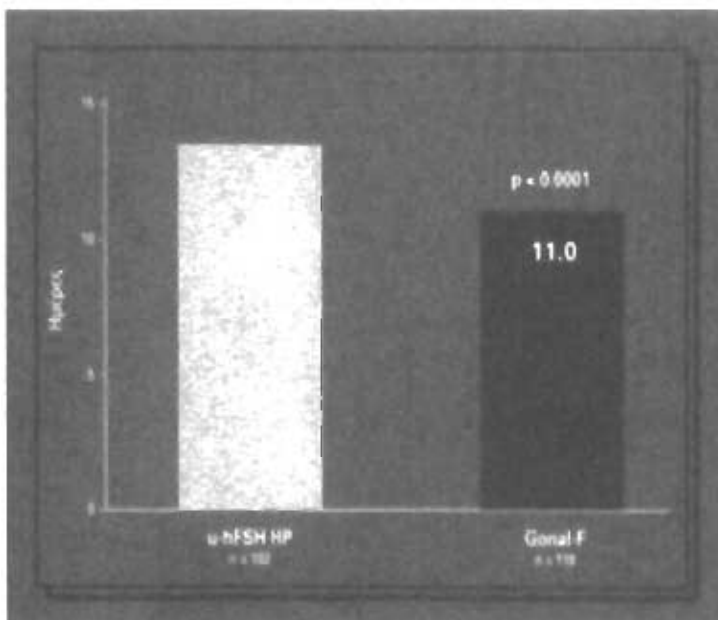
Ασθενείς στην ομάδα της rFSH (Gonal-F), n=139

Ασθενείς στην ομάδα της uFSH, n=139

Όλοι οι ασθενείς έλαβαν 150IU ανά ημέρα για 6 ημέρες.



Σχ. 2 - Ο αριθμός των φουσιγγων 75 IU που χρησιμοποιήθηκαν ανά κύκλο είναι μικρότερος στην ομάδα rFSH (Gonal-F) σε σχέση με την uFSH.



Σχ. 3 - Ο αριθμός των ημερών διέγερσης είναι μικρότερος στην ομάδα της rFSH.

Έτσι με την χορήγηση GnRH- αναλόγων, η χορήγηση r-FSH μπορούσε να επιφέρει την ωοθυλακική διέγερση σε μεγαλύτερο ποσοστό ασθενών.

Ένα ερώτημα το οποίο προέκυψε με την χρήση της ανασυνδυασμένης FSH, ήταν εάν είναι απαραίτητη η χορήγηση LH, και κατά πόσο η μη χορήγησή της επηρεάζει την ανάπτυξη των ωοθυλακίων.

Απάντηση στο ερώτημα αυτό, ήρθε από πρόσφατες μελέτες πάνω σε υποφουσεκτομηθέντα πειραματόζωα. Σε τέτοια πειραματόζωα (χωρίς ενδογενή LH) η διέγερση με r-FSH (πλήρης έλλειψη LH) είχε ως αποτέλεσμα την ωρίμανση πολλαπλών ωοθυλακίων (Fisch et al, 1995). Για την ρήξη βέβαια του ωοθυλακίου απαιτείται εξωγενής LH.

Δηλαδή, η rFSH από μόνη της μπορεί να πετύχει διέγερση των ωοθυλακίων, όχι όμως και στεροειδογένεση, αφού αυτή είναι LH εξαρτώμενη.

Από πειραματικά δεδομένα διαπιστώθηκε πως ελάχιστες ποσότητες LH είναι απαραίτητες για την ανάπτυξη των ωοθυλακίων. Σε κύκλους που προηγείται καταστολή της υπόφυσης με GnRH ανάλογα, η εξάλειψη της ενδογενούς LH δεν είναι παντελής. Οι ελάχιστες ποσότητες LH που συνεχίζουν να παράγονται επαρκούν για την διέγερση των κυττάρων της θήκης για επαρκή στεροειδογένεση. Και αυτό γιατί, λόγω της δράσης της FSH, παράγεται από τα κοκκώδη κύτταρα ο IGF-1 και η inhibin, που μεταφέρονται στα κύτταρα της θήκης και ενισχύουν το ρόλο της LH στην παραγωγή ανδρογόνων.

Συνοψίζοντας, παρατηρούμε πως σε ένα τέτοιο φαρμακευτικό πρωτόκολλο, η χορήγηση εξωγενούς FSH και οι ελάχιστες ποσότητες LH που παράγοντα παρά τη δράση των GnRH αναλόγων, επιτρέπουν την στρατολόγηση και ανάπτυξη περισσότερων του ενός ωοθυλακίων καθώς και φυσιολογική στεροειδογένεση.

3. Χορήγηση HCG

Σε ασθενείς που ακολουθούν συνδυασμένη θεραπεία με GnRH ανάλογα και γοναδοτροπίνες, υπάρχει μια μεγάλη πιθανότητα να παρατηρηθεί το φαινόμενο της ωχρινικής ανεπάρκειας, εξ' αιτίας της καταστολής της ενδογενούς έκλυσης LH από το ανάλογο. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα διαταραχές στην παραγωγή προγεστερόνης και την δημιουργία υψηλής σχέσης E2/P (οιστρογόνων / προγεστερόνης) η οποία διαταράσσει την φυσιολογική ανταπόκριση του ενδομητρίου και παρεμποδίζει την εμφύτευση.

Η χορήγηση όμως εξωγενούς χοριακής γοναδοτροπίνης (hCG), έχει ως αποτέλεσμα την ανταπόκριση των κοκκωδών κυττάρων του ωοθυλακίου και την δημιουργία ενός φυσιολογικού ωχρού σωματίου.

Η HCG (ανθρώπινη χοριακή γοναδοτροπίνη) φυσιολογικά εκκρίνεται από την τροφοβλάστη όταν το έμβρυο εμφυτευτεί στα τοιχώματα της μήτρας, και συντηρεί το ωχρό σωματίο να παράγει προγεστερόνη.

Έτσι σε κύκλους με GnRH ανάλογα, η χορήγηση της hCG δημιουργεί το κατάλληλο "έναυσμα" για την παραγωγή προγεστερόνης και την δημιουργία ενός χαμηλόπηλικου E2/P στις πρώτες μέρες της ωχρινικής φάσης κάτι το οποίο σχετίζεται με σύλληψη.

4. Πρωτόκολλα θεραπειών με GnRH ανάλογα

Τα GnRH ανάλογα χρησιμοποιούνται στα κέντρα εξωσωματικής γονιμοποίησης κυρίως μέσω δύο φαρμακευτικών πρωτοκόλλων. Το παρατεταμένο και το βραχύ πρωτόκολλο. Και στα δύο αυτά πρωτόκολλα, η αντίδραση της ωοθήκης ελέγχεται με επαναλαμβανόμενους προσδιορισμούς των επιπέδων οιστραδιόλης (E₂) και

υπερηχογραφικές εξετάσεις, έτσι ώστε ο θεράπων ιατρός να προλάβει ανεπιθύμητες αντιδράσεις τροποποιώντας το δοσολογικό σχήμα των γοναδοτροπινών.

4.1. Παρατεταμένο πρωτόκολλο χρήσης GnRH αναλόγων

Το πρωτόκολλο αυτό αποτελεί την πρώτη επιλογή στα κέντρα εξωσωματικής γονιμοποίησης.

Τα στάδιά του έχουν ως εξής :

- Η έναρξη της θεραπευτικής αγωγής γίνεται την 21η ημέρα του προηγούμενου κύκλου, και χορηγείται μόνο GnRH ανάλογο σε καθημερινές δόσεις (σχ. 4).
- Το υπερηχογράφημα και η μέτρηση οιστραδιόλης γίνονται την 2η μέρα του επόμενου κύκλου.

α- το επίπεδο της E_2 είναι <20 pgr/ml, και

β- το υπερηχογράφημα δείχνει ανενεργείς ωοθήκες

τότε

έχουμε καταστολή της υπόφυσης και αρχίζει η θεραπεία με γοναδοτροπίνες (rFSH), χωρίς όμως να σταματήσει η χορήγηση του GnTRH αναλόγου. Η συνήθης δοσολογία περιλαμβάνει τη χορήγηση 150-225 IU rFSH ημερησίως.

- Την 7η ημέρα του κύκλου γίνεται μέτρηση E_2 και εάν :
 - i) $1.000 > E_2 > 4500$ pmol/L, τότε συνεχίζουμε με την ίδια δόση rFSH
 - ii) $E_2 < 1000$ pmol/L, τότε αυξάνουμε την δόση rFSH
 - iii) $E_2 > 4500$ pmol/L, τότε μειώνουμε την δόση rFSH.

Σε αυτό το στάδιο είμαστε στην στρατολόγηση των ωοθυλακίων, και η σωστή δόση rFSH είναι απαραίτητη για να μην έχουμε ανεπαρκή αλλά ούτε και υπερβολική ανταπόκριση.

- Την 9η ημέρα πραγματοποιούμε υπερηχογράφημα και μέτρηση E_2

αν

α- το υπερηχογράφημα δείξει τουλάχιστον 3 ωοθυλάκια με διάμετρο $>17\text{ mm}$ και

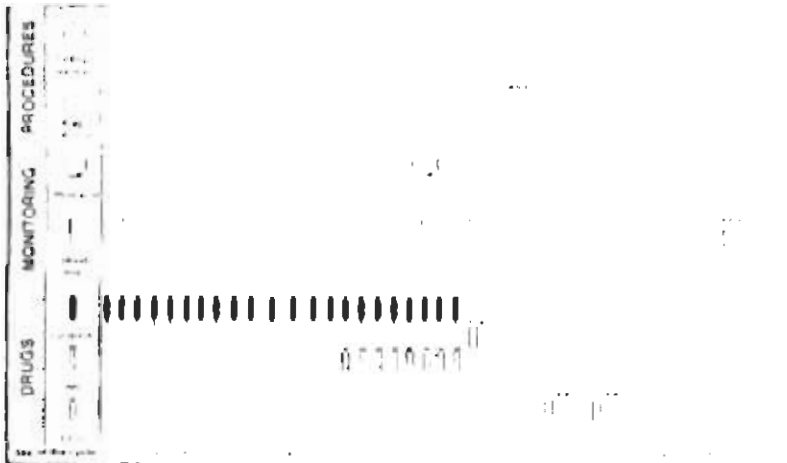
β- η E_2 είναι $150-200\text{ pgr/ml}$ ανά ωοθυλάκιο

τότε

κοντά στα μεσάνυχτα της ίδιας ημέρας, χορηγούμε hCG. Με την χορήγησή της σταματάει η θεραπεία με τα ανάλογα και τις γοναδοτροπίνες, και περίπου 30-36 ώρες μετά γίνεται η ωοληψία.

Εάν τα παραπάνω κριτήρια για την χορήγηση της hCG δεν έχουν επιτευχθεί, συνεχίζουμε την προηγούμενη δοσολογία και ένας τρίτος έλεγχος επιπέδου E_2 γίνεται δύο μέρες αργότερα. Εάν τα αποτελέσματα είναι τα αναμενόμενα, χορηγούμε hCG.

- Για την υποστήριξη της ωχρινικής φάσης, χορηγούμε 2 επιπλέον δόσεις hCG δύο και τέσσερις μέρες αντίστοιχα μετά τη χορήγηση της πρώτης δόσης hCG. Εάν τα επίπεδα προγεστερόνης είναι χαμηλά, τότε είναι απαραίτητη η χορήγηση εξωγενούς προγεστερόνης.



Σχ. 4 - Παρατεταμένο πρωτόκολλο GnRH αναλόγων:

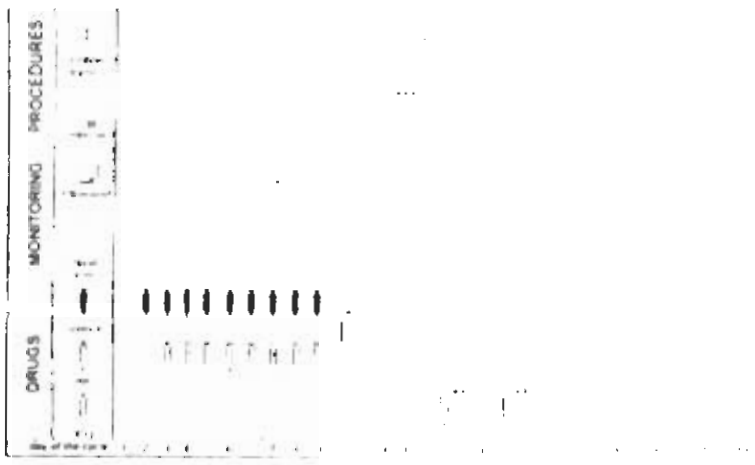
- * Πρώτη δόση hCG
- ** Επιπλέον δόσεις hCG
- *** Ωοληψία

4.2. Βραχύ πρωτόκολλο χρήσης GnRH αναλόγων

Το πρωτόκολλο αυτό αντιμετωπίζει περιπτώσεις ασθενών, οι οποίες χαρακτηρίζονται ως γυναίκες με φτωχή ανταπόκριση στις γοναδοτροπίνες. Τέτοιες είναι οι γυναίκες προχωρημένης ηλικίας (>38), όπου οι απαιτήσεις σε γοναδοτροπίνες είναι αυξημένες.

Σε ένα τέτοιο πρωτόκολλο, η χορήγηση του GnRH ξεκινάει την 2η ημέρα του κύκλου, ενώ η χορήγηση της rFSH την 3η. Κατά αυτόν τον τρόπο, εκμεταλλευόμαστε την άμεση διεγερτική επίδραση του αναλόγου (Flare-up effect) για να καλύψουμε την αυξημένη ανάγκη των γυναικών αυτών για FSH, ενώ παράλληλα χορηγούμε εξωγενή FSH.

Τα κριτήρια χορήγησης hCG είναι τα ίδια με το παρατεταμένο πρωτόκολλο.



*Σχ. 5 - Βραχύ πρωτόκολλο
GnRH αναλόγων*

** Πρώτη δόση hCG*

*** Επιπλέον δόσεις hCG*

**** Ωοληψία*

B. Περιγραφή πρωτοκόλλου ωοληψίας

Η χορήγηση της hCG γίνεται όπως είπαμε για να μιμηθούμε την εχμιακή έκλυση της ενδογενούς LH, και να προκαλέσουμε ωορρηξία, η οποία υπολογίζεται πως συμβαίνει 37-38 ώρες αργότερα. Στο διάστημα αυτό πραγματοποιούνται αλλαγές στο ωοκύτταρο, όπως ολοκλήρωση της πρώτης διαίρεσης της μείωσης, αποβολή του 1ου πολικού σωματίου και τελικά σταματά στην μετάφαση της δεύτερης διαίρεσης της μείωσης.

Προκειμένου να προλάβουμε την φυσιολογική ωορρηξία, πραγματοποιούμε την ωοληψία 33-34 ώρες μετά την χορήγηση hCG.

Στα κέντρα εξωσωματικής γονιμοποίησης το στάδιο της ωοληψίας περιλαμβάνει δύο επιμέρους στάδια :

- 1) την διακολλική αναρρόφηση ωοθυλακίων υπό υπερηχογραφική καθοδήγηση
- 2) την αναγνώριση των ωοκυττάρων στο αναρροφούμενο ωοθυλακικό υγρό, και την επεξεργασία τους.

Οι χώροι όπου πραγματοποιούνται τα δύο αυτά στάδια δεν θα πρέπει να απέχουν πολύ μεταξύ τους και επίσης είναι εξαιρετικά σημαντικό να γίνεται η αναγνώριση των ωοκυττάρων αμέσως μετά την παρακέντηση. Σε διαφορετική περίπτωση, η παρουσία αίματος στο ωοθυλακιακό υγρό, οδηγεί στην δημιουργία πηγμάτων τα οποία δυσχεραίνουν την ανεύρεση του ωαρίου.

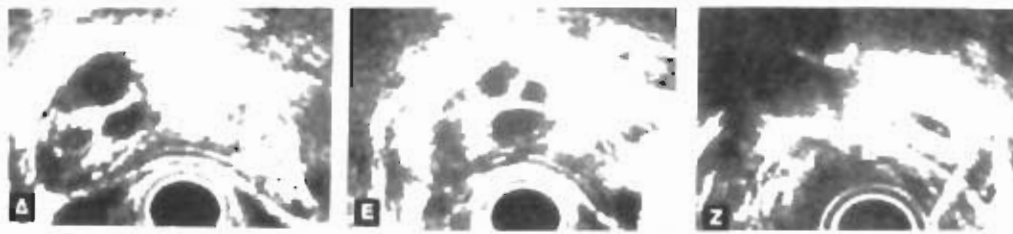
Και στα δυο αυτά στάδια, θα πρέπει να αποφεύγεται η έκθεση του ωοθυλακιακού υγρού σε θερμοκρασία δωματίου για μεγάλο χρονικό διάστημα και αυτό γιατί μια τέτοια έκθεση για περίπου 10 λεπτά οδηγεί σε αποδιοργάνωση των μικροσωληνίσκων των κυτταρικών δομών του ωοκυττάρου (Staigmiller, Moor, 1984).

1) Διακολπική αναρρόφηση ωοθυλακίων υπό υπερηχογραφική καθοδήγηση

Με σκοπό την Εξωσωματική Γονιμοποίηση η λήψη ωαρίων έχει επιτευχθεί με διάφορες μεθόδους. Η λαπαροσκοπική μέθοδος, που πρώτοι οι Edwards και Steptoe (1970) χρησιμοποίησαν κυριάρχησε για αρκετά χρόνια και έδωσε μια πραγματική ώθηση στην εφαρμογή της.



Σχ. 1 Λαπαροσκοπική παρακέντηση ωοθυλακίων



Σχ. 2 Διακολπική παρακέντηση ωοθυλακίων

Όμως η χειρουργική της διαδικασία με την απαραίτητη γενική νάρκωση και το υψηλό κόστος της, αποτέλεσαν ουσιαστικά μειονεκτήματα. Η μέθοδος αυτή σταδιακά αντικαταστάθηκε από τεχνικές ωοληψίας υπό υπερηχογραφική καθοδήγηση, κοιλιακά ή διακολπικά.

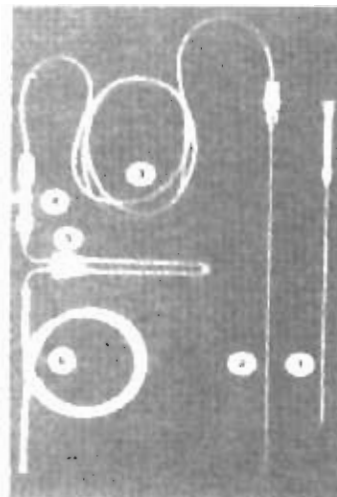
Σήμερα, στα κέντρα Εξωσωματικής Γονιμοποίησης χρησιμοποιείται η μέθοδος της διακολπικής ωοληψίας υπό κοιλιακή υπερηχογραφική καθοδήγηση. Η όλη διαδικασία είναι απλούστερη και ταχύτερη της λαπαροσκόπησης, απασχολεί λιγότερο προσωπικό και δεν

απαιτεί εισαγωγή της ασθενούς. Δεν απαιτεί επίσης γενική αναισθησία και συνθήκες χειρουργείου.

Αντιθέτως, προτιμάται η ήπια καταστολή, ενώ η όλη διαδικασία δεν διαρκεί παραπάνω από 10-15 λεπτά, ελαχιστοποιώντας έτσι την έκθεση σε αναισθητικούς παράγοντες, οι οποίοι έχουν μια τάση να συσσωρεύονται γρήγορα στο ωοθυλακιακό υγρό (Soussis, Boud, 1995).

Όργανα και Σκεύη

- συσκευή υπερήχων για κοιλιακή υπερηχογραφική καθοδήγηση, με κοιλιακή κεφαλή (probe)
- σύστημα βελόνης παρακέντησης ωοθυλακίων (σχ. 3)
 1. Οδηγός βελόνης
 2. Βελόνη παρακέντησης (γυάλινη - εσωτερική διάμετρος 1,4 mm)
 3. Πλαστικός σωλήνας για διέλευση του υγρού
 4. Συνδετική βαλβίδα
 5. Φιαλίδιο συλλογής ωοθυλακιακού υγρού
 6. Συνδετικός σωλήνας επικοινωνίας με την σύριγγα αναρρόφησης.



Σχ. 3 - Σύστημα λαπαροσκοπικής παρακέντησης ωοθυλακίων

Μια παραλλαγή του παραπάνω συστήματος (σχ. 3), είναι η προσθήκη μίας σύριγγας (θέση 4 στο παραπάνω σχήμα) η οποία ωθεί ειδικό υγρό προς τα ωοθυλάκια, με σκοπό την έκπλυση αυτών. Σχεδόν πάντα όμως, προτιμάται να αποφεύγεται η διαδικασία αυτή, καθώς μπορεί να προξενήσει βλάβες στα κύτταρα του ωοθυλακίου.

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Η κοιλική κεφαλή εισέρχεται στον κόλπο (σχ. 4), δίνοντας μέσω των υπερήχων, μια εικόνα της θέσης των ωοθυλακίων (σχ. 5 Α, Β, Γ).

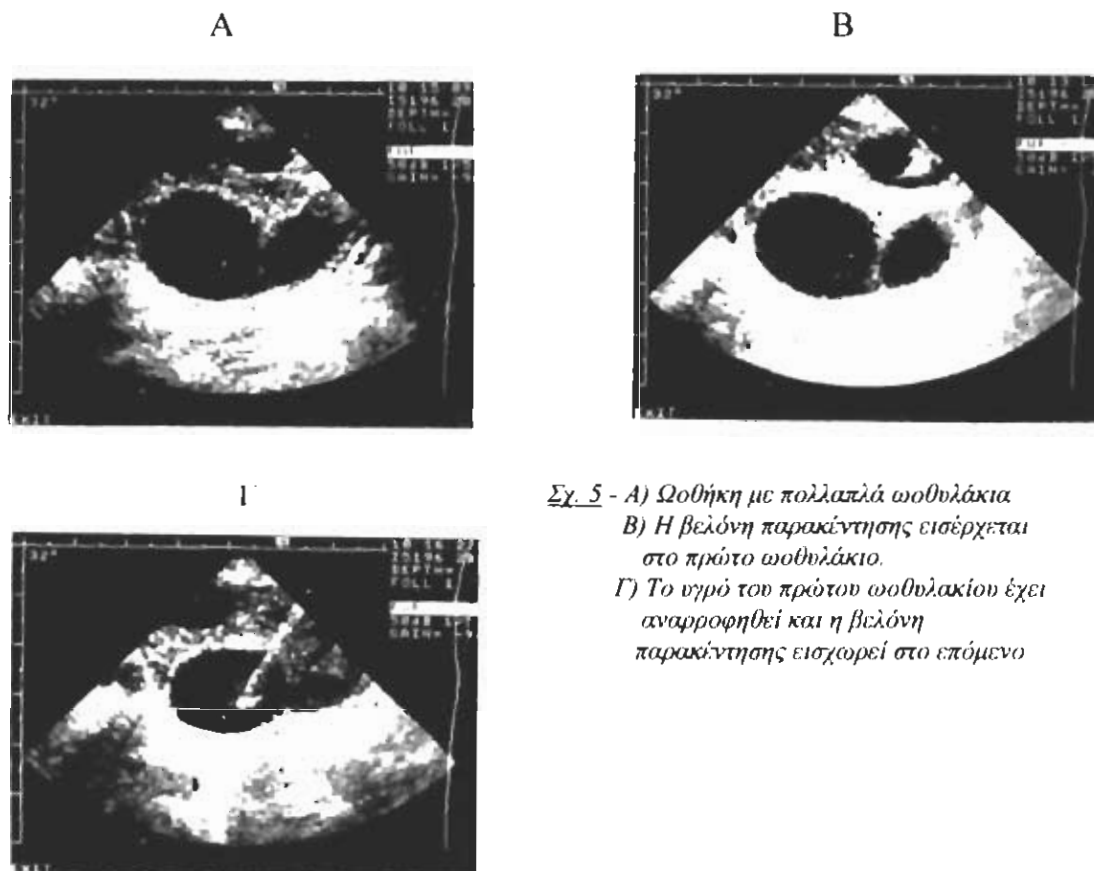


Σχ. 4 - Κοιλική κεφαλή

Στη συνέχεια εισέρχεται ο οδηγός της βελόνης, ο οποίος πλησιάζει τα ωοθυλάκια. Με περιστροφές της κοιλικής κεφαλής, ο ιατρός διακρίνει την λαγόνιο φλέβα, ούτως ώστε να μην την χτυπήσει με τον οδηγό της βελόνης.

Η βελόνη παρακέντησης εισέρχεται (σχ. 5 Β) στον οδηγό και με την καθοδήγηση των υπερήχων, εισχωρεί στο ωοθυλάκιο και με την σύριγγα, γίνεται η αναρρόφηση του ωοθυλακιακού υγρού. Στην συνέχεια, το ωοθυλακιακό υγρό συλλέγεται στο φιαλίδιο και

μεταφέρεται στον εμβρυολόγο για εξέταση, ενώ ένα νέο φιαλίδιο τοποθετείται στο σύστημα για την αναρρόφηση ενός νέου ωοθυλακίου.



*Σχ. 5 - Α) Ωοθήκη με πολλαπλά ωοθυλάκια
 Β) Η βελόνη παρακέντησης εισέρχεται
 στο πρώτο ωοθυλάκιο.
 Γ) Το υγρό του πρώτου ωοθυλακίου έχει
 αναρροφηθεί και η βελόνη
 παρακέντησης εισχωρεί στο επόμενο*

Με την ολοκλήρωση της παρακέντησης όλων των ωοθυλακίων, η ασθενής παραμένει ξαπλωμένη για 2-3 ώρες περίπου, έως ότου περάσει η επίδραση του αναισθητικού και μετά είναι ελεύθερη να φύγει από την κλινική και να συνεχίσει κανονικά τις δραστηριότητές της.

2) Αναγνώριση των ωοκυττάρων στο αναρροφούμενο ωοθυλακιακό υγρό και επεξεργασία αυτών.

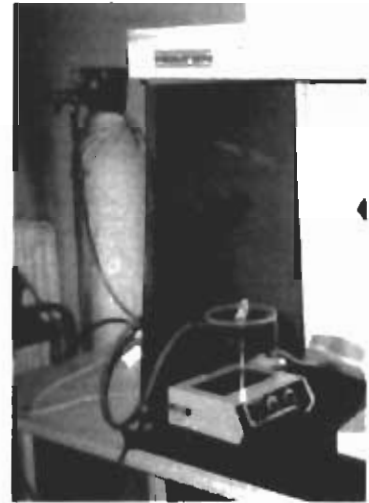
Υλικά και Σκεύη

- Laminar flow cabinet (Θάλαμος οριζόντιας ροής φιλτραρισμένου αέρα) (Σχ. 6).
- Πλαστικοί δοκιμαστικοί σωλήνες.

- Ανεστραμμένο μικροσκόπιο με θερμαινόμενη πλάκα.
- Στερεοσκόπιο.
- Στατό με θερμαινόμενη πλάκα και γυάλινο κυλινδρικό κάλυμμα παροχής CO₂ (σχ. 7).
- Επωαστικός κλίβανος (30⁰ C, 5% CO₂).
- Πιπέτες Pasteur.
- Σιφώνια του 1 ml και 5 ml.
- Τρυβλία Petri 92x21 mm
- Βελόνη ένεσης 25 gr
- IVF medium.



Σχ. 6 - Θάλαμος οριζόντιας ροής φιλτραρισμένου αέρα.



Σχ. 7 - Στατό με θερμαινόμενη πλάκα

Όλα τα υλικά και τα σκεύη προθερμαίνονται σε θερμοκρασία 37⁰ C πριν την χρήση του. Θα πρέπει να τηρούνται όλες οι διαδικασίες ούτως ώστε να αποφεύγεται η επιμόλυνση των υλικών αλλά και του ωαρίου. Στην προσπάθεια αυτή σημαντική είναι η συμμετοχή του πάγκου εργασίας (laminar flow cabinet) ο οποίος ουσιαστικά είναι ένας θάλαμος οριζόντιας ροής φιλτραρισμένου αέρα.

ΜΕΘΟΛΟΓΙΑ

Αμέσως μετά την ωληψία, το φιαλίδιο που περιέχει το ωοθυλακιακό υγρό παραδίδεται στον εμβρυολόγο, ο οποίος το εξετάζει αμέσως. Όπως συνήθως συμβαίνει, πριν ολοκληρωθεί η εξέταση του πρώτου φιαλιδίου, παραδίδονται και τα φιαλίδια που περιέχουν το υγρό και των επόμενων ωοθυλακίων. Τα φιαλίδια αυτά τοποθετούνται στο στατό έως ότου εξεταστούν. Η θερμαινόμενη πλάκα του στατό, ρυθμίζει την θερμοκρασία στους 37⁰ C και έτσι αποτρέπεται η αρνητική έκθεση του ωοκυττάρου σε θερμοκρασία δωματίου.

Το περιεχόμενο κάθε ωοθυλακίου έχει όγκο περίπου 2,5 - 3,5 cm² και μεταφέρεται από το φιαλίδιο τμηματικά σε μικρές ποσότητες σε τρύβλιο petri. Κάθε ποσότητα εξετάζεται κάτω από το μικροσκόπιο για την ύπαρξη ή όχι του ωοκυττάρου. Η τελευταία ποσότητα υγρού στο φιαλίδιο, αναταράσσεται ούτως ώστε να παρασύρει το ωοκύτταρο στην περίπτωση που αυτό έχει κολλήσει στα τοιχώματα του φιαλιδίου.

Η παρουσία πηγμάτων αίματος, δυσχεραίνει την ανεύρεση του ωοκυττάρου. Έτσι χρησιμοποιείται η βελόνη ένεσης για την ανακίνηση των πηγμάτων και τον διαχωρισμό τους με σκοπό την ανεύρεση του ωαρίου.

Κατά την διάρκεια της εξέτασης κάτω από το μικροσκόπιο, η θερμαινόμενη πλάκα που έχει εφαρμοσθεί σε αυτό, διατηρεί την θερμοκρασία στους 37⁰ C.

Με την ανεύρεσή του, το ωοκύτταρο μεταφέρεται με μια πιπέτα Pasteur σε τρυβλίο petri, στο οποίο προηγουμένως έχουμε προσθέσει 3-4 ml υγρού καλλιέργειας (IVF medium). Αφού μεταφερθούν και τα υπόλοιπα ωάρια, το τρυβλίο petri τοποθετείται στον θάλαμο επώασης, όπου και αφήνεται εκεί για αρκετή ώρα ούτως ώστε να ωριμάσουν τα ωάρια. Συνήθως σε κάθε τρυβλίο τοποθετούνται έως και 8 ωάρια, ενώ στην περίπτωση που η θεραπεία με γοναδοτροπίνες έχει αποτέλεσμα την παραλαβή περισσότερων των 10 ωοκυττάρων, αυτά μοιράζονται σε δύο τρυβλία petri.

Πριν τα ωάρια τοποθετηθούν στον επωαστικό θάλαμο, θα πρέπει να υπολογιστεί ο χρόνος επώασής τους καθώς αυτός ποικίλει, ανάλογα με την ωριμότητα των ωοκυττάρων κατά την παραλαβή τους. Ωριμα ωάρια, δηλαδή αυτά που είναι στην μετάφαση της δεύτερης μείωσης και που έχουν αποβάλει το πρώτο πολικό σωματίο, επωάζονται για 5 ώρες περίπου.

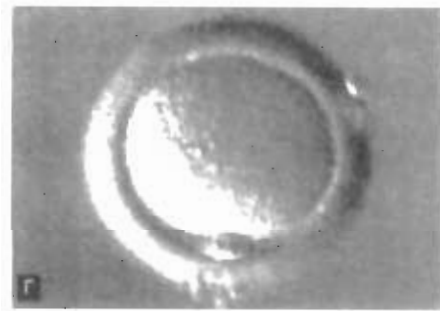
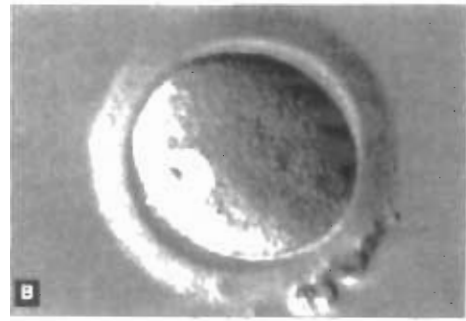
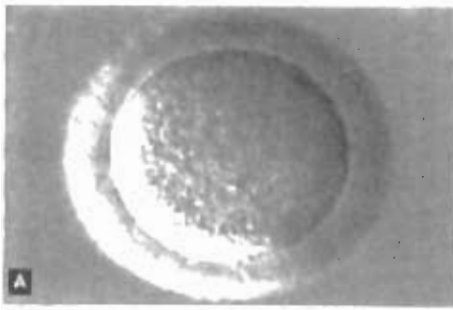
Η εκτίμηση της ωριμότητας του ωοκυττάρου γίνεται με κριτήρια που στηρίζονται στην παρουσία όχι του δεύτερου πολικού σωματίου (το δεύτερο πολικό σωματίο εμφανίζεται μετά την είσοδο του σπερματοζωαρίου στο ωοκύτταρο), στον όγκο, την πυκνότητα και την κατάσταση των κυττάρων που το περιβάλλουν δηλαδή της ακτινωτής στεφάνου και του ωοφόρου δίσκου.

Με βάση αυτά τα κριτήρια, τα ωάρια ταξινομούνται ως εξής :

1. **Βλαστικό κυστίδιο** - είναι το πλέον ανώριμο στάδιο. Περιβάλλεται από κύτταρα σε συμπαγή διάταξη. Ο πυρήνας (germinal vesicle) είναι εμφανής. Ωάρια αυτού του σταδίου σπανίως ωριμάζουν (σχ. 8 Β).
2. **Ανώριμα ωάρια** - περιβάλλονται από συμπαγές στρώμα κυττάρων του ακτινωτού στεφάνου και του ωοφόρου δίσκου. Επωάζονται για 12-16 ώρες (σχ. 8 Α).
3. **Ωριμα ωάρια** - βρίσκονται στο ευνοϊκότερο στάδιο ανάπτυξης για επιτυχή γονιμοποίηση. Το ένα πολικό σωματίο έχει αποβληθεί. Τα κύτταρα της ακτινωτής στεφάνου είναι πιο απομακρυσμένα από το ωάριο (συγκριτικά με τα κύτταρα των ανώριμων ωαρίων). Ο ωοφόρος δίσκος βρίσκεται υπό μορφή χαλαρής μάζας η οποία μπορεί και να έχει αποσπασθεί (σχ. 8 Γ).
4. **Υπερώριμα ωάρια** - εμφανίζονται ιδιαίτερα άχρα. Ο ωοφόρος δίσκος εμφανίζεται διασπασμένος. Η επώασή τους διαρκεί 2-3 ώρες.



5. **Ατρητικά ωάρια** - ο ωοφόρος δίσκος, όταν υπάρχει είναι κατακερματισμένος. Η ακτινωτή στέφανος εμφανίζεται ακανόνιστη, ενώ το ωάριο είναι ιδιαίτερα σκούρο.



Σχ. 8 Α - Ωοκύτταρο στη μετάφαση I

(*germinal vesicle*) είναι εμφανής.
 Γ - Ωοκύτταρο στην μετάφαση II.
 Η ακτινωτή κυκλική σωματίου έχει
 αποβληθεί.

Ο υπολογισμός του χρόνου επώασης είναι πολύ σημαντικός ιδιαίτερα σε περιπτώσεις παραλαβής μικρού αριθμού ανώριμων ωοκυττάρων. Το ευνοϊκότερο στάδιο για γονιμοποίηση είναι όταν το ωάριο είναι στην μετάφαση της δεύτερης μείωσης. Τα ωάρια μικροί να εκδηλώσουν σημεία γονιμοποίησης ακόμα και εάν τα σπερματοζώαρια προστεθούν πριν από την αποβολή του πρώτου πολικού σωματίου, η περαιτέρω ανάπτυξή τους όμως έχει συνήθως αρνητική εξέλιξη.

C. Επεξεργασία του σπέρματος

Το πρωί της προγραμματισμένης ωοληψίας, ο άνδρας που θα συνεισφέρει στην γονιμοποίηση θα πρέπει να δώσει ένα φρέσκο δείγμα σπέρματος, ύστερα από σεξουαλική αποχή τουλάχιστον 2 ημερών.

Το δείγμα αυτό επεξεργάζεται από τον εμβρυολόγο, με σκοπό την αύξηση της πιθανότητας για επιτυχή γονιμοποίηση του ωαρίου. Η επεξεργασία αυτή περιλαμβάνει δύο στάδια :

- 1) Απομάκρυνση του σπερματικού υγρού (seminal plasma)
- 2) Αύξηση της περιεκτικότητας σε ευκίνητα σπερματοζωάρια, με την χρήση του διαλύματος Percoll.

Τα σπερματοζωάρια μετά την επεξεργασία, μεταφέρονται σε υγρό καλλιέργειας IVF medium και τοποθετούνται στον κλίβανο (37°C , 5% CO_2), για 5-6 ώρες, έως ότου ολοκληρωθεί η ωρίμανση των ωαρίων.

Σε αυτό το χρονικό διάστημα, τα σπερματοζωάρια μέσα στο υγρό καλλιέργειας υφίστανται το τελικό στάδιο ωρίμανσής τους (capacitation), το οποίο φυσιολογικά συμβαίνει ύστερα από επαφή τους με ιστούς και υγρά του κόλπου. Η τελική αυτή ωρίμανση είναι απαραίτητη για να έχουμε επιτυχή γονιμοποίηση, και περιλαμβάνει τροποποιήσεις μορίων του ακροσώματος, αλλαγή γλυκοπρωτεϊνών της κυτταρικής επιφάνειας και αύξηση της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων.

1) Απομάκρυνση του σπερματικού υγρού

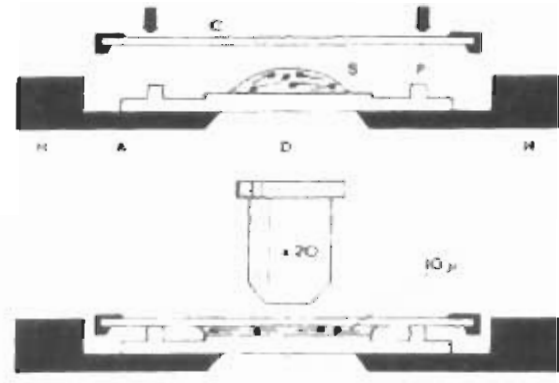
Η διαδικασία αυτή αποσκοπεί στην απομάκρυνση του σπερματικού υγρού, συνεπώς και όλων των μακρομορίων που αυτό περιέχει, όπως για παράδειγμα προσταγλαδίνες, ύστερα από φυγοκέντρηση.

Το ίζημα το οποίο σχηματίζεται αποτελείται από σπερματοζωάρια (φυσιολογικά και μη), νεκρά σπερματοζωάρια αλλά και λευκοκύτταρα, που φυσιολογικά υπάρχουν στο σπερματικό υγρό και καθιζάνουν κατά την παραπάνω φυγοκέντρωση. Η απομόνωση των ευκίνητων σπερματοζωαρίων γίνεται κατά το δεύτερο στάδιο επεξεργασίας.

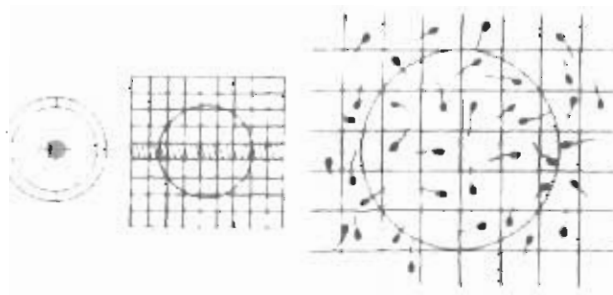
Απαραίτητη προϋπόθεση για την επιτυχία τόσο αυτού του σταδίου όσο και του επομένου, είναι η διατήρηση της θερμοκρασίας του δείγματος στους 37°C και η προτίμηση ταχυτήτων φυγοκέντρωσης όσο το δυνατόν χαμηλότερες ικανών να προκαλέσουν την καθίζηση των σπερματοζωαρίων χωρίς όμως να τους προκαλέσουν ζημιές.



Α



Β



Γ

Σχ. 1- Κυττόμετρο Makler

Υλικά και σκεύη

- συσκευή φυγοκέντρωσης
- μικροσκόπιο
- κυττόμετρο (Makler)
- πιπέτες Pasteur
- σιφώνια 1 ml και 5 ml
- επωαστικός κλίβανος
- υγρό καλλιέργειας (Ham's 10)
- πλαστικοί δοκιμαστικοί σωλήνες.

Το κυττόμετρο Makler (σχ. 1 Α, Β), είναι μια συσκευή μικρού μεγέθους, η οποία έχει κατασκευαστεί ειδικά για την μέτρηση του αριθμού των σπερματοζωαρίων αλλά και για την εκτίμηση του ποσοστού των φυσιολογικών και μη. Αποτελείται από την καλυπτρίδα (C στο σχ. 1 Β) και την βάση. Η βάση φέρει τον δίσκο (D) στον οποίο τοποθετείται το δείγμα (S). Στην περιφέρεια του δίσκου υπάρχουν εξοχές (P), οι οποίες ανυψώνονται κατά 10 microns.

Όταν τοποθετηθεί η ακλυπτρίδα στη θέση της, ο όγκος μιας σειράς τετραγώνων (σχ. 1 Γ - 10 τετράγωνα) είναι ίσος με 10^{-3} mm^3 . Έτσι μετρώντας τον αριθμό των σπερματοζωαρίων σε μία μόνο σειρά και πολλαπλασιάζοντας τον αριθμό αυτό με 10^6 , βρίσκουμε την περιεκτικότητα των σπερματοζωαρίων σε 1 ml.

Η επιλογή του καθορισμού της περιεκτικότητας ανά ml, δεν είναι τυχαία. Με το τέλος της επεξεργασίας τους, ο συνολικός όγκος του δείγματος των σπερματοζωαρίων είναι 1 ml.

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

1. Με την παραλαβή του φρέσκου δείγματος σπέρματος, γίνεται αρχικά μια εκτίμηση της ποιότητας και του αριθμού των σπερματοζωαρίων με το κυττόμετρο Makler.
2. Στη συνέχεια το δείγμα μεταφέρεται με πιπέτες Pasteur σε έναν πλαστικό δοκιμαστικό σωλήνα.
3. Προσθέτουμε όγκο υγρού καλλιέργειας Ham's ίσο με τον όγκο του δείγματος του σπέρματος.
4. Πραγματοποιούμε φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 1.800 στροφές.
5. Αφαιρούμε το υπερκείμενο υγρό και τοποθετούμε το δοκιμαστικό σωλήνα με το ίζημα στο στατό, προκειμένου να περάσουμε στο επόμενο στάδιο επεξεργασίας. Το ίζημα αποτελείται από σπερματοζωάρια (φυσιολογικά και μη), νεκρά σπερματοζωάρια και λευκοκύτταρα.

Ο συνολικός όγκος που παραμένει στο δοκιμαστικό σωλήνα μετά την απομάκρυνση του υπερκείμενου είναι 0,3 ml έως 0,5 ml, ανάλογα με την αρχική ποσότητα του φρέσκου δείγματος σπέρματος.

2) *Αύξηση της περιεκτικότητας σε ευκίνητα σπερματοζωάρια, με την χρήση του διαλύματος Percoll.*

Το δεύτερο αυτό στάδιο επεξεργασίας του σπέρματος, αποσκοπεί στον διαχωρισμό και στην λήψη μόνο των ευκίνητων και φυσιολογικών μορφολογικά σπερματοζωαρίων. Μην ξεχνάμε πως σε ένα φυσιολογικό δείγμα σπέρματος, το 50% των σπερματοζωαρίων παρουσιάζουν έντονη κινητικότητα, το 75% είναι ζωντανά, το 30% με 40% έχουν φυσιολογική μορφολογία. Σε άνδρες με ποσοστά συχνά αρκετά μικρότερα των παραπάνω,

η λήψη των ευκίνητων και φυσιολογικών σπερματοζωαρίων είναι αναγκαία για να αυξήσουμε την πιθανότητα επιτυχούς γονιμοποίησης του ωαρίου.

Ένας ακόμα λόγος, για τον οποίο κρίνεται απαραίτητο αυτό το στάδιο, είναι και η απομάκρυνση των λευκοκυττάρων. Τα λευκοκύτταρα αλλά και τα μη φυσιολογικά σπερματοζωάρια, είναι δυνατόν να απελευθερώσουν οξειδωτικές ουσίες, οι οποίες δημιουργούν βλάβες στα φυσιολογικά σπερματοζωάρια. Στο σπερματικό υγρό, υπάρχουν αντιοξειδωτικές ουσίες που φυλάσσουν έτσι τα σπερματοζωάρια. Με την απομάκρυνσή του όμως κατά το πρώτο στάδιο της επεξεργασίας, τα σπερματοζωάρια είναι εκτεθειμένα, και έτσι κρίνεται απαραίτητη και η απομάκρυνση των λευκοκυττάρων. (Aitken, Clarkson, 1988).

Υλικά και σκεύη

- συσκευή φυγοκέντρωσης
- σωληνάρια φυγοκέντρωσης
- σύριγγες των 3 ml, με βελόνη 21 gr
- διάλυμα Percoll των 45% και 90% (discontinuous Percoll gradient)
- υγρό καλλιέργειας Hams F-10
- επωαστικός θάλαμος

Το διάλυμα Percoll αποτελείται από silane-coated colloidal silica particles (σφαιρίδια που περιέχουν άλατα πυριτίου).

Η μέθοδος στηρίζεται στην χρησιμοποίηση δύο διαλυμάτων Percoll διαφορετικής πυκνότητας (45% και 90%), τα οποία δημιουργούν δύο ζώνες στο σωληνάριο και κατά την φυγοκέντρωση επιτρέπουν μόνο στα ευκίνητα σπερματοζωάρια να κινηθούν προς τον πυθμένα του σωληναρίου, ενώ τα ακίνητα σπερματοζωάρια και τα λευκοκύτταρα εγκλωβίζονται στους "διαδρόμους" που δημιουργούνται ανάμεσα στα σφαιρίδια.

Η επιτυχία στην λήψη όσο το δυνατόν μεγαλύτερου αριθμού ευκίνητων σπερματοζωαρίων, είναι αποτέλεσμα της συνεργασίας 5 παραγόντων : της διαφορετικής

πυκνότητας και ιξώδους των δύο διαλυμάτων, το μέγεθος των σφαιριδίων, της δύναμης που ασκείται κατά την φυγοκέντρωση αλλά και τη χρονική διάρκεια αυτής.

Τα κέντρα Εξωσωματικής Γονιμοποίησης, προμηθεύονται τα διαλύματα έτοιμα σε διαφορετικές πυκνότητες, από τις παρασκευάστριες εταιρείες, μειώνοντας έτσι αισθητά τον χρόνο της όλης διαδικασίας.

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

1. Όλα τα υλικά και διαλύματα προθερμαίνονται στους 37⁰ C.
2. Με τη σύριγγα μεταφέρεται 1 ml διαλύματος Percoll 45% στο σωληνάριο. Το διάλυμα αυτό θα αποτελέσει την ανώτερη ζώνη.
3. Με μια άλλη σύριγγα μεταφέρουμε 1 ml διαλύματος Percoll 90% στο σωληνάριο. Το διάλυμα αυτό, το οποίο θα αποτελέσει την κατώτερη ζώνη, μεταφέρεται ως εξής :
Η βελόνη της σύριγγας περνάει την ανώτερη ζώνη (45% Percoll) και από την άκρη της βελόνης ρέει το διάλυμα 90%, πιέζοντας το έμβολο της σύριγγας με μικρή ταχύτητα. Η μικρή αυτή ταχύτητα είναι απαραίτητη, ούτως ώστε η εναπόθεση του δευτέρου διαλύματος να δημιουργήσει την δεύτερη ευδιάκριτη ζώνη. Σε αντίθετη περίπτωση θα έχουμε ανάμιξη των δύο διαλυμάτων.
4. Το δείγμα σπέρματος που έχει περάσει το πρώτο στάδιο επεξεργασίας, μεταφέρεται με μια πιπέτα Pasteur στην κορυφή του διαλύματος με τον εξής τρόπο :
Η άκρη της πιπέτας ακουμπάει τα τοιχώματα του σωληναρίου πάνω από το διάλυμα. Η ροή των σπερματοζωαρίων γίνεται με μικρή ταχύτητα.
5. Φυγοκεντρούμε για 15 λεπτά στις 1500 στροφές.
6. Με μία πιπέτα Pasteur αφαιρούμε την ανώτερη ζώνη και το μεγαλύτερο μέρος της κατώτερης ζώνης, αφήνοντας περίπου 0,3 έως 0,4 ml διαλύματος και το ίζημα, το οποίο αποτελείται από τα ευκίνητα σπερματοζωάρια.

7. Με μία πιπέτα Pasteur μεταφέρουμε το ίζημα σε σωληνάριο φυγοκέντρωσης που περιέχει 2 ml Ham's.
8. Φυγοκεντρούμε για 5 λεπτά στις 1200 στροφές για να απομακρύνουμε το διάλυμα Percoll.
9. Αφαιρούμε το υπερκείμενο, προσθέτουμε 2 ml Hams και πραγματοποιούμε νέα φυγοκέντρωση στις 1200 στροφές για 5 λεπτά.
10. Αφαιρούμε το υπερκείμενο. Προσθέτουμε υγρό καλλιέργειας IVF medium στο ίζημα έως την ένδειξη του 1 ml.
11. Τοποθετούμε το σωληνάριο στον επωαστικό κλίβανο, έως την ώρα της γονιμοποίησης.

Το υγρό καλλιέργειας IVF Medium πιο ακριβό από το Ham's. Γι' αυτό και το Ham's χρησιμοποιείται σε όλα τα βήματα εκτός από 10, μιας και το κόστος των υλικών στα κέντρα Εξωσωματικής Γονιμοποίησης είναι σημαντικός παράγοντας.

Όπου κρίνεται σωστό, χρησιμοποιούνται υλικά φθηνότερης αξίας σε μία προσπάθεια μείωσης του συνολικού κόστους θεραπείας.

Πριν τοποθετήσουμε τα σπερματοζωάρια στον επωαστικό κλίβανο, παίρνουμε ένα μικρό δείγμα, και με το κυττόμετρο Makler υπολογίζουμε τον συνολικό αριθμό των σπερματοζωαρίων. Το στάδιο αυτό θεωρείται επιτυχές όταν τα ευκίνητα σπερματοζωάρια αποτελούν περίπου το 70% με 80% του δείγματος (θυμίζω πως στο φρέσκο δείγμα κατά την παραλαβή του ο αριθμός των ευκίνητων σπερματοζωαρίων είναι κάτω του 50%).

D. In vitro γονιμοποίηση του ωαρίου

Η προσθήκη των σπερματοζωαρίων για την γονιμοποίηση του ωαρίου in vitro, γίνεται όταν το ωάριο έχει ολοκληρώσει την ωρίμανσή του στον επωαστικό κλίβανο. Ο χρόνος επώασης του ωαρίου καθορίζεται όπως έχουμε πει, ύστερα από εκτίμηση της ωριμότητάς του κατά την ωοληψία, και προτιμούνται για την γονιμοποίηση αυτά που θεωρούνται πιο ώριμα μιας και έχουν τις περισσότερες πιθανότητες για επιτυχή γονιμοποίηση.

Σε ένα κύκλο θεραπείας, προσθέτουμε σπερματοζωάρια σε όλα τα ωάρια, σε διαφορετικές χρονικές στιγμές εάν ο χρόνος ωρίμανσής τους στον κλίβανο το απαιτεί, και αυτό γιατί υπάρχει η περίπτωση, καλής ποιότητας ωάρια (μετάφαση της 2ης μειωτικής διαίρεσης κατά την ωοληψία), να μην εκδηλώσουν σημάδια γονιμοποίησης, ενώ λιγότερο ώριμα ωάρια να εκδηλώσουν. Επομένως κανένα ωάριο δεν θεωρείται εκ των προτέρων μη γονιμοποιήσιμο. Οι πιθανότητες όμως για επιτυχή εμβρυομεταφορά και περαιτέρω κύηση είναι μεγαλύτερες όταν γονιμοποιούνται καλής ποιότητας ωάρια.

Υλικά και Σκεύη

- Στερεοσκόπιο
- Ανεστραμμένο μικροσκόπιο
- Πιπέτες Pasteur
- Σιφόνια 1 ml και 5 ml
- Τρύβλια καλλιέργειας 60 x 15 mm με 1 πηγάδι (1-well dish)
- Υγρό καλλιέργειας IVF medium
- Υγρό καλλιέργειας Ham's
- Επωαστικός κλίβανος (37⁰ C, 5% CO₂)
- Laminar flow cabinet
- Στατό με θερμαινόμενη πλάκα και γυάλινο κυλινδρικό κάλυμμα παροχής CO₂.

Το τρύβλιο καλλιέργειας φέρει κεντρικά ένα πηγάδι (well), το οποίο περιβάλλεται από ένα αυλάκι. Μέσα στο αυλάκι προσθέτουμε Hams, για να διατηρήσουμε την υγρασία στο τρύβλιο και να αποτρέψουμε έτσι την εξάτμιση του υγρού καλλιέργειας IVF medium.

Όλα τα σκεύη πρέπει να είναι αποστειρωμένα και θα πρέπει να αποφεύγεται η έκθεση των ωαρίων και των σπερματοζωαρίων σε θερμοκρασία δωματίου για μεγάλο χρονικό διάστημα.

Επίσης είναι πολύ σημαντικό η προσθήκη του σπέρματος να γίνεται την χρονική στιγμή που έχουμε υπολογίσει κατά την ωοληψία (ανάλογα με τον βαθμό ωριμότητας των ωαρίων) και όχι αργότερα, καθώς η περαιτέρω ωρίμανση των ωαρίων μειώνει τις πιθανότητες για επιτυχή γονιμοποίηση.

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

1. Προσθέτουμε υγρό καλλιέργειας Ham's στο αυλάκι του τρυβλίου καλλιέργειας, έως ότου καλυφθεί το μισό ύψος.
2. Προσθέτουμε 0,6 έως 0,7 ml IVF medium στο πηγάδι του τρυβλίου και το τοποθετούμε στο στατό.
3. Απομακρύνουμε τον δοκιμαστικό σωλήνα με τα σπερματοζωάρια (1 ml) από τον ελαστικό κλίβανο και τον τοποθετούμε στο στατό. Με το υγρό καλλιέργειας IVF medium πραγματοποιούμε κατάλληλες αραιώσεις, ούτως ώστε να μεταφέρουμε 0,1 ml δείγματος το οποίο να περιέχει 200.000 με 250.000 ευκίνητα σπερματοζωάρια ...
4. Προσθέτουμε το δείγμα σπέρματος στο πηγάδι του τρυβλίου και το τοποθετούμε στο στατό.
5. Απομακρύνουμε το τρύβλιο petri με τα ωοκύτταρα που παρελήφθησαν κατά την ωοληψία από τον ελαστικό κλίβανο και το τοποθετούμε στο στεροσκόπιο. Μεταφέρουμε ένα ωάριο (το οποίο βρίσκεται στη μετάφαση της 2ης μειωτικής διαίρεσης) με μια πιπέτα Pasteur στο πηγάδι του τρυβλίου καλλιέργειας που έχουμε

προσθέσει το σπέρμα. Η αναρρόφηση του ωαρίου γίνεται με τέτοιο τρόπο ούτως ώστε μαζί με το ωάριο να αναρροφάται και όσο το δυνατόν λιγότερο θρεπτικό υλικό από το τρυβλίο petri.

6. Στο ίδιο πηγάδι του τρυβλίου καλλιέργειας προσθέτουμε 2 ακόμα ωάρια. Συνολικά σε ένα πηγάδι θα πρέπει να υπάρχουν 3 ωάρια (όλα στην μετάφαση της 2ης μειωτικής διαίρεσης) 200.000 με 250.000 ευκίνητα σπερματοζώαρια και ο συνολικός όγκος δεν πρέπει να ξεπερνάει το 1 ml (αλλιώς θα έχουμε υπερχειλίση).
7. Το τρυβλίο τοποθετείται στον επωαστικό κλίβανο (37°C , 5% CO_2).
8. Εάν έχουμε περισσότερα από 3 ωάρια πραγματοποιούμε τα παραπάνω βήματα σε ένα άλλο τρυβλίο καλλιέργειας με πηγάδι. Πάντα όμως, προσθέτουμε το πολύ 3 ωάρια.

Τα τρυβλία καλλιέργειας παραμένουν στον επωαστικό κλίβανο και μετά από 18 ώρες πραγματοποιούμε έλεγχο και εκτίμηση της γονιμοποίησης.

Ε. Διαπίστωση και εκτίμηση της γονιμοποίησης 17 με 19 ώρες
μετά την προσθήκη του σπέρματος

Η προσθήκη των σπερματοζωαρίων στο τρυβλίο καλλιέργειας με το ωάριο, αποτελεί το πρώτο βήμα και ταυτόχρονα την μόνη ανθρώπινη παρέμβαση στην γονιμοποίηση των ωαρίων *in vitro*. Ακολουθεί μια "μπαταρία" αλληλένδετων γεγονότων, των οποίων η πορεία εξαρτάται από την φυσιολογία του ωαρίου και του σπερματοζωαρίου.



Σχ. 1 - Γονιμοποιημένα ωάρια με δύο προπυρήνες και δύο πολικά σωμάτια.

Η μεγάλη καθυστέρηση στην εμφάνιση των δύο προπυρήνων (σε σχέση με άλλα είδη οργανισμών π.χ. στον αχινό, εμφανίζονται σε λιγότερο από μια ώρα), οφείλεται στο γεγονός ότι ο πυρήνας του ωαρίου βρίσκεται στην μετάφαση της 2ης μειωτικής διαίρεσης κατά την είσοδο του σπερματοζωαρίου. Με την είσοδό του όμως, ο πυρήνας του ωαρίου ολοκληρώνει την διαίρεσή του και αποβάλλει το 2ο πολικό σωμάτιο.

Βασιζόμενοι στην παραπάνω αλληλουχία γεγονότων της φυσιολογικής γονιμοποίησης, πραγματοποιούμε μια εκτίμηση της γονιμοποίησης των ωαρίων της ασθενούς 17 με 19 ώρες μετά την προσθήκη των σπερματοζωαρίων. Η επιτυχής γονιμοποίηση επιβεβαιώνεται με την εμφάνιση δύο ευκρινών προπυρήνων και των δύο πολικών σωμάτων, τα οποία ενδέχεται να είναι συντηγμένα (σχ. 1).

Η μη εμφάνιση των προπυρήνων υποδηλώνει ότι το ωάριο δεν έχει γονιμοποιηθεί, ενώ η παρουσία τριών ή περισσότερων είναι ενδεικτικό πολυσπερμίας (σχ. 2) και τέτοια έμβρυα δεν είναι κατάλληλα για εμφύτευση.



Σχ. 2 - Γονιμοποιημένο ωάριο με τρεις προπυρήνες

Η ύπαρξη ενός μόνο προπυρήνα μπορεί να οφείλεται είτε σε ασυγχρονισμό του σχηματισμού των δύο προπυρήνων είτε σε σχηματισμό μόνο του αρσενικού προπυρήνα χωρίς τον σχηματισμό του θηλυκού. Στην τελευταία περίπτωση ο πυρήνας του ωαρίου δεν μπορεί να ολοκληρώσει την 2η μειωτική διαίρεση και δεν αποβάλλεται το 2ο πολικό σωματίο.

Τα ωάρια που έχουν εκδηλώσει σημάδια γονιμοποίησης "καθαρίζονται" από τα υπολείμματα του ακτινωτού στεφάνου και του ωοφόρου δίσκου και στην συνέχεια τοποθετούνται στον επωαστικό κλίβανο για 24 ώρες.

Υλικά και Σκεύη

- Laminar flow cabinet
- Στατο με θερμαινόμενη πλάκα και γυάλινο κυλινδρικό κάλυμμα παροχής CO₂.
- Τρυβλία Petri
- Επωαστικός κλίβανος

- Ανεστραμμένο μικροσκόπιο
- IVF medium
- Λάδι παραφίνης

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

1. Αρχικά ετοιμάζουμε το τρυβλίο Petri στο οποίο θα τοποθετήσουμε τα γονιμοποιημένα ωάρια. Στη περιφέρεια του τρυβλίου τοποθετούμε σε απόσταση μεταξύ τους τρεις μικροσταγόνες υγρού καλλιέργειας IVF medium. Προσθέτουμε λάδι παραφίνης (συμμετέχει στην διατήρηση του pH και στην αποφυγή της εξάτμισης του θρεπτικού υλικού) έως ότου καλυφθούν οι σταγόνες του υγρού καλλιέργειας.
2. Τοποθετούμε το τρυβλίο Petri στο στατό.
3. Με την βοήθεια του ανεστραμμένου μικροσκοπίου, παρατηρούμε τα ωάρια και διαπιστώνουμε ποία έχουν γονιμοποιηθεί.
4. Κάθε ένα γονιμοποιημένο ωάριο ξεχωριστά παραλαμβάνεται με μια πιπέτα Pasteur. Με πολλαπλή αναρρόφηση του ωαρίου (μέσα και έξω) στην πιπέτα αυτή, επιτυγχάνουμε την απομάκρυνση των υπολειμμάτων του ακτινωτού στεφάνου και του ωοφόρου δίσκου, εξαιτίας της τριβής με τα τοιχώματα της πιπέτας. Το στάδιο αυτό θα πρέπει να πραγματοποιείται με ιδιαίτερη προσοχή, ούτως ώστε να αποτρέπεται ο τραυματισμός της διαφανούς ζώνης ή του ωαρίου γενικά είτε από νυγμό ή από υπερβολική έλξη. Στην συνέχεια, το "καθαρισμένο" γονιμοποιημένο ωάριο μεταφέρεται στην πρώτη σταγόνα του τρυβλίου Petri που έχουμε ετοιμάσει προηγουμένως.
5. Στην ίδια σταγόνα, του ίδιου τρυβλίου Petri, μεταφέρουμε άλλα δύο γονιμοποιημένα ωάρια, στα οποία έχουμε επαναλάβει το βήμα 4.
6. Τοποθετούμε το τρυβλίο Petri στον επωαστικό κλίβανο (37°C , 5% CO_2) για 24 ώρες.

7. Εάν έχουμε περισσότερα από τρία γονιμοποιημένα ωάρια, τότε ετοιμάζουμε επιπλέον τρυβλία Petri (βήμα 1), τοποθετώντας πάντα έως τρία γονιμοποιημένα ωάρια στην πρώτη σταγόνα.

2) Διαδικασία εμφύτευσης

A. Η φυσιολογία της εμφύτευσης και οι διαταραχές της ωχρινικής φάσης

(luteal phase)

Η ενδοκρινική ισορροπία της ωχρινικής φάσης παρά την μεγάλη σπουδαιότητά της, είναι συγκριτικά λιγότερο κατανοητή. Θεωρείται όμως βέβαιο, ότι τόσο η ποιότητα των ωαρίων, όσο και η φυσιολογική λειτουργία της ωχρινικής φάσης εξαρτώνται άμεσα από την ενδοκρινική ισορροπία της ωοθυλακικής φάσης.

Στην ωχρινική φάση λαμβάνει χώρα το μείζον γεγονός της εμφύτευσης που δεν αποτελεί ένα μεμονωμένο σημερινό αλλά μια ολόκληρη διαδικασία, που στον άνθρωπο διαρκεί περίπου μια βδομάδα. Η διάφανη ζώνη περίπου 5 με 6 μέρες μετά την ωοθυλακιορρηξία εξαφανίζεται, και το έμβρυο προσκολλάται στο ενδομήτριο. Η διαδικασία της εμφύτευσης δρομολογείται πλέον όταν η τροφοβλάστη αρχίζει να "εισχωρεί" στο ενδομήτριο και να διηθεί στο στρώμα. Στο στάδιο αυτό, τα πρώτα κύτταρα της τροφοβλάστης που εισβάλλουν στη μήτρα, απαρτίζουν την συγκυτιοτροφοβλάστη, ενώ η υπόλοιπη τροφοβλάστη ονομάζεται κυττατροτροφοβλάστη. Μέχρι την 12η ημέρα η βλαστοκύστη έχει εμβυθιστεί μέσα στο στρώμα, οπότε το ενδομήτριο επεκτείνεται και την υπερκαλύπτει (σχ. 1).



Σχ. 1 - Τα αρχικά στάδια ανάπτυξης του εμβρύου και η διαδικασία της εμφύτευσης.

- A. Η ανάπτυξη του εμβρύου στην σάλπιγγα και στην μητριαία κοιλότητα.
- B. Προσκόλληση της βλαστοκύστης στο ενδομήτριο και αρχόμενη εμφύτευση.
- Γ. Η έσω κυτταρική μάζα αρχίζει να διαφοροποιείται σε έμβρυο.

Η επιτυχία ή όχι της εμφύτευσης εξαρτάται από την επιδεκτικότητα του ενδομητρίου. Η επιδεκτικότητα αυτή όμως, είναι άμεσα εξαρτώμενη από την δημιουργία ενός φυσιολογικού ωχρού σωματίου και την παραγωγή υψηλών ποσοτήτων προγεστερόνης, η οποία εξουδετερώνει την επίδραση της υψηλής στάθμης των οιστρογόνων. Όπως έδειξαν διάφοροι ερευνητές, χαμηλό E₂/P πηλίκο στις πρώτες ημέρες της ωχρινικής φάσης, μεταξύ ωοληψίας και εμφύτευσης, σχετίζεται με σύλληψη (Gidley - Baird 1985 - Lejeune 1986).

Η πρόωρη υποστροφή του ωχρού σωματίου και η βράχυνση της ωχρονικής φάσης, συνοδεύουν χαρακτηριστικά τη χορήγηση GnRH αναλόγων σε κύκλους θεραπείας στα κέντρα Εξωσωματικής Γονιμοποίησης και έχει ως αποτέλεσμα την μειωμένη παραγωγή προγεστερόνης. Η δημιουργία όμως ενός υψηλού πηλίκου E₂/P δεν οδηγεί σε κύηση.

Για αυτό το λόγο, σε κύκλους θεραπείας με GnRH ανάλογα, είναι απαραίτητη η υποστήριξη της ωχρινικής φάσης με την εξωγενή χορήγηση σκευασμάτων προγεστερόνης ή με την πρόκληση της ενδογενούς παραγωγής της χορηγώντας hCG.

Η χορήγηση προγεστερόνης γίνεται σε ημερήσια βάση (ενδομυϊκή ένεση 25 mg) αρχίζοντας την παραμονή της εμβρυομεταφοράς.

Η εναλλακτική μέθοδος με χορήγηση hCG, εκτός από την προγεστερόνη, μπορεί να διεγείρει συγχρόνως την παραγωγή οιστραδιόλης (E₂). Κατά συνέπεια, στην προσπάθεια επιλογής της μιας από τις δύο μεθόδους υποστήριξης της ωχρινικής φάσης, είναι σκόπιμο να λαμβάνονται υπ' όψιν τα επίπεδα E₂ πριν των ωοληψία. Όταν αυτά είναι υπερβολικά αυξημένα, δικαιολογείται η χορήγηση της προγεστερόνης και αντίστροφα.

Συγχρονισμός μεταξύ ενδομητρίου και εμβρύου στην περίοδο της εμφύτευσης

Ο τρόπος με τον οποίο οι διάφοροι φυσιολογικοί μηχανισμοί εμπλέκονται και ελέγχουν την διαδικασία της εμφύτευσης στον άνθρωπο, είναι εξαιρετικά πολύπλοκος. Οι

γνώσεις μας πάνω σε αυτό το κομμάτι δεν είναι αρκετές, εξαιτίας του ηθικού διλήμματος για τον σχεδιασμό πειραμάτων που περιλαμβάνουν λήψη δειγμάτων ενδομητρίου από την μήτρα γυναίκας, η οποία περιέχει έμβρυα στο στάδιο της εμφύτευσης. Επιπλέον, οι τεράστιες διαφορές από είδος σε είδος στον τρόπο με τον οποίο το πρώιμο έμβρυο έρχεται σε επαφή με το ενδομήτριο, δυσκολεύει ακόμα περισσότερο τα πράγματα όσον αφορά τις γνώσεις μας πάνω στην διαδικασία της εμφύτευσης.

Είναι γεγονός ότι η εμβρυομεταφορά αποτελεί ένα εύκολο σχετικά στάδιο στην όλη διαδικασία της Εξωσωματικής Γονιμοποίησης, ενώ η εμφύτευση του πρώιμου εμβρύου αποτελεί την λιγότερο κατανοητή φάση. Έτσι, ενώ η πρόοδος στις τεχνικές διεγέρσεις των ωοθηκών και ωοληψίας εξασφαλίζουν υψηλά ποσοστά επιτυχίας (επιτυχούς ωοληψίας >90% και γονιμοποίησης >75%), η εμβρυομεταφορά συνοδεύεται από ένα ποσοστό κύησης που κυμαίνεται συνήθως στο 25-35%.

Η άποψη που επικρατεί σήμερα και η οποία διαμορφώθηκε ύστερα από μελέτες πάνω σε τρωκτικά (Humphrey 1969, Sherman 1976) είναι πως η εμφύτευση είναι εφικτή στα πλαίσια μιας βραχείας μόνο χρονικής περιόδου (παράθυρο εμφύτευσης - implantation window), η οποία αποκαθίσταται από την συνεργιστική δράση της προγεστερόνης και της οιστραδιόλης. Το παράθυρο εμφύτευσης ορίζεται ως η χρονική περίοδος κατά την οποία η μήτρα είναι επιδεκτική στην εμφύτευση της βλαστοκύστης. Το ενδομήτριο περιβάλλον αμέσως μετά καθίσταται τοξικό και προκαλεί εκφύλιση σε τυχόν μη εμφυτευθέντα έμβρυα.

Έτσι, είναι απαραίτητος ο συγχρονισμός μεταξύ της μητέρας και του εμβρύου στις πρώτες μέρες της ζωής του. Η φάση εξέλιξης του εμβρύου θα πρέπει να μην υπολείπεται εκείνης του ενδομητρίου ή μπορεί και να προηγείται. Σε αντίθετη περίπτωση, όπως διαπιστώνεται σε βραδέως εξελισσόμενα *in vitro* γονιμοποιημένα ωάρια, οι πιθανότητες εμφύτευσης είναι περιορισμένες.

Στο ανθρώπινο είδος, υπολογίζεται πως το παράθυρο εμφύτευσης διαρκεί 3,5 ημέρες (Rogers, Murphy 1989).

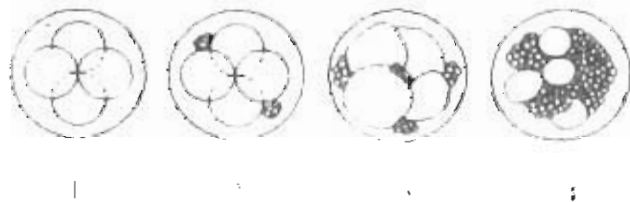
Πολύ σημαντικές κατά την περίοδο της εμφύτευσης, είναι οι παρακάτω διαδικασίες :

- Απελευθέρωση του εμβρύου από την διάφανη ζώνη
- Προσκόλληση του εμβρύου στα τοιχώματα του ενδομητρίου με αλληλεπιδράσεις ειδικών μορφορυθμιστικών μορίων (π.χ. ιντεγκρίνες)
- Έκκριση μεταλλοπρωτεϊνών από το έμβρυο και αποικοδόμηση μεσοκυττάρων ουσιών του ενδομητρίου, και έτσι εισβολή εμβρύου και εμφύτευσή του.

B. Η διαδικασία της εμβρυομεταφοράς
στην Εξωσωματική Γονιμοποίηση

Η μεταφορά των εμβρύων στην κοιλότητα της μήτρας, γίνεται 45 με 50 ώρες μετά την ωοληψία. Αποτελεί μια σχετικά εύκολη διαδικασία, που προϋποθέτει όμως χρησιμοποίηση αποστειρωμένων υλικών και τον επιμελή καθαρισμό του κόλπου και του τραχήλου με φυσιολογικό ορό.

Αρχικά γίνεται μια αξιολόγηση των εμβρύων, τα οποία ταξινομούνται ανάλογα με τον αριθμό των κυττάρων και τη μορφολογική τους εμφάνιση. Η ταξινόμηση αυτή γίνεται ως εξής (σχ. 1) :



Σχ. 1 - Ταξινόμηση εμβρύων των 4 κυττάρων

- Βαθμός 1** - Εμφανίζουν ομαλά σφαιρικά βλαστομερίδια με ενδιάμεσου βαθμού διαθλαστικότητα και ανέπαφη την διαφανή ζώνη.
- Βαθμός 2** - Τα βλαστομερίδια εμφανίζονται ανισομεγέθη με ακανόνιστο σχήμα και με κάποια απόκλιση στην διαθλαστικότητα.
- Βαθμός 3** - Στην κατηγορία αυτή το 50% των βλαστομεριδίων εμφανίζουν κυτταροπλασματικά αποπτωτικά απύρνηνα στοιχεία. Τα υπόλοιπα βλαστομερίδια πρέπει να εμφανίζονται σε ικανοποιητική κατάσταση (όπως στο 2ο βαθμό).
- Βαθμός 4** - Περισσότερο από 50% των βλαστομεριδίων εμφανίζουν απύρνηνα κυτταροπλασματικά στοιχεία και η διαθλαστικότητά τους ποικίλει ευρύτατα.

Για την μεταφορά επιλέγονται τα έμβρυα 1ου και 2ου βαθμού (σχ. 2), ενώ τα έμβρυα 3ου και 4ου βαθμού μεταφέρονται όταν δεν διατίθενται καλύτερα ή για να συμπληρωθεί ο επιθυμητός αριθμός.



Σχ. 2 - Έμβρυα στο στάδιο των 2 έως 4 κυττάρων

Ο συνήθης αριθμός μεταφερομένων εμβρύων είναι τρία. Μεγαλύτερος αριθμός εμβρύων αυξάνει μεν τις πιθανότητες κύησης, συνοδεύεται όμως από αντίστοιχα αυξημένα ποσοστά πολύδυμης κύησης, με το δίλημμα της εκλεκτικής μείωσης εμβρύων και τα προβλήματα αποβολών.

Υλικά και Σκεύη

- ανεστραμμένο μικροσκόπιο
- τρυβλία καλλιέργειας με πηγάδι
- υγρό μέσο μεταφοράς των εμβρύων (25% IVF medium + 75% ορός αίματος της ασθενούς)
- πλαστικός καθετήρας (Teflon) με σύριγγα ινσουλίνης
- πιπέτες Pasteur
- επωαστικός κλίβανος
- σιφόνια 1 ml.

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

1. Σε ένα τρυβλίο καλλιέργειας με πηγάδι, προσθέτουμε 0,7 ml υγρού μεταφοράς των εμβρύων.
2. Απομακρύνουμε τα τρυβλία ρεϊτί με τα έμβρυα, από τον θάλαμο επώασης και εξετάζουμε αυτά που βρίσκονται στην δεύτερη σταγόνα. Μεταφέρουμε με μια πιπέτα Pasteur τα καλύτερα από αυτά στο τρυβλίο με το υγρό μεταφοράς.
3. Επιλέγουμε τα 3 καλύτερα έμβρυα, τα οποία αναρροφώνται στον καθετήρα με 20 ml υγρού μεταφοράς. Το ήμισυ της ποσότητας αυτής του υγρού μεταφοράς προηγείται και το υπόλοιπο έπεται της αναρρόφησης των εμβρύων, ούτως ώστε να γνωρίζουμε την θέση τους στον καθετήρα.
4. Ο καθετήρας με τα έμβρυα μεταφέρεται στην αίθουσα εμβρυομεταφοράς, όπου η ασθενής έχει τοποθετηθεί σε θέση λιθοτομίας (γυναικολογική) και ο οδηγός του καθετήρα έχει προωθηθεί διά του τραχήλου στο κατάλληλο βάθος της κοιλότητας της μήτρας.
5. Ο καθετήρας προωθείται διά του οδηγού του και πιέζοντας το έμβολο της σύριγγας, τα έμβρυα εναποτίθενται κοντά στον πυθμένα της μήτρας.
6. Ο καθετήρας με τον οδηγό απομακρύνονται προσεκτικά με ήπιες περιστροφικές κινήσεις και στην συνέχεια ο καθετήρας ελέγχεται ώστε να αποκλεισθεί η τυχόν παραμονή των εμβρύων σε αυτόν.
7. Η ασθενής παραμένει κλινήρης επί 4 ώρες.

Δυο βδομάδες μετά την εμβρυομεταφορά, γίνεται έλεγχος κύησης. Εάν το αποτέλεσμα είναι θετικό, πραγματοποιείται υπερηχογράφημα μια βδομάδα αργότερα, το οποίο δίνει πληροφορίες σχετικά με τον αριθμό των εμβρύων αλλά και την σωστή εμφύτευση αυτών.

Μέρος IV

Συζήτηση

Στα πρώτα χρόνια εφαρμογής της Εξωσωματικής Γονιμοποίησης, δηλαδή πριν από περίπου 15 χρόνια, τα ποσοστά κύησης κυμάνθηκαν στο 12-20%. Παρά το ικανοποιητικό όμως αυτό ξεκίνημα, η βελτίωση των αποτελεσμάτων που σημειώθηκε έκτοτε δεν ήταν η αναμενόμενη και αυτή που θα αναλογούσε στην βελτίωση των διαφόρων μεθόδων και στην ποσότητα της έρευνας που έχουν επενδυθεί προς την κατεύθυνση αυτή. Πράγματι η πιθανότητα απόκτησης βιώσιμου παιδιού παραμένει γύρω στο 20% ανά κύκλο θεραπείας.

Ωστόσο, όταν αναφερόμαστε στα ποσοστά επιτυχίας των διαφόρων μεθόδων αντιμετώπισης της υπογονιμότητας, δεν θα πρέπει να ξεχνάμε πως η μέση συχνότητα σύλληψης in vivo κυμαίνεται περίπου στο 20% κατά εμμηνορρυσιακό κύκλο και πως το 90% των ζευγαριών επιτυγχάνει κύηση στον πρώτο χρόνο.

Ποια είναι όμως τα αίτια του χαμηλού ποσοστού επιτυχίας της Εξωσωματικής Γονιμοποίησης; Αναλύοντας τα ποσοστά επιτυχίας των επιμέρους σταδίων της θεραπείας, παρατηρούμε πως το ποσοστό της επιτυχούς ωοληψίας κυμαίνεται στο 90% και της επιτυχούς γονιμοποίησης στο 70-80%. Έτσι καταλήγουμε στο συμπέρασμα πως το μεγάλο ποσοστό αποτυχίας οφείλεται στο στάδιο της εμβρυομεταφοράς και της εμφύτευσης.

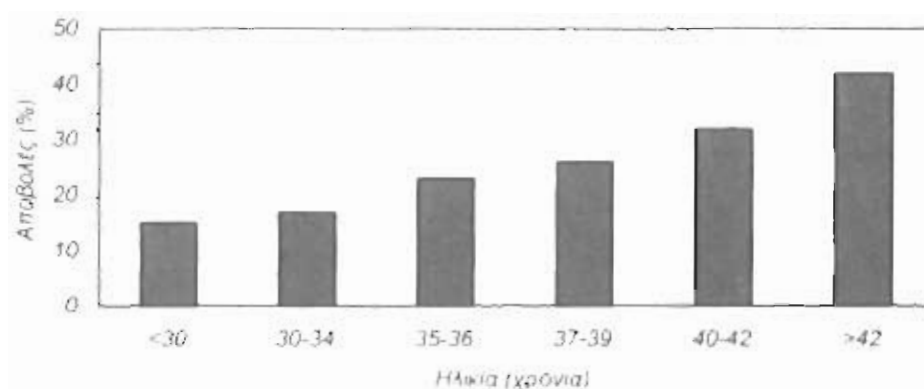
Οι γνώσεις μας πάνω στην φυσιολογία της εμφύτευσης είναι αρκετές, όχι όμως τόσες ούτως ώστε να μας επιτρέψουν να επέμβουμε αποτελεσματικά και να αυξήσουμε το ποσοστό επιτυχίας του σταδίου αυτού.

Ωστόσο, ένα από τα πρώτα συμπεράσματα που εξαχθηκε, ήταν πως μια επιτυχής εγκυμοσύνη είναι σε άμεση εξάρτηση από την ηλικία της ασθενούς. Γυναίκες άνω των 35 ετών παρουσιάζουν μια κάμψη στην γονιμότητά τους.

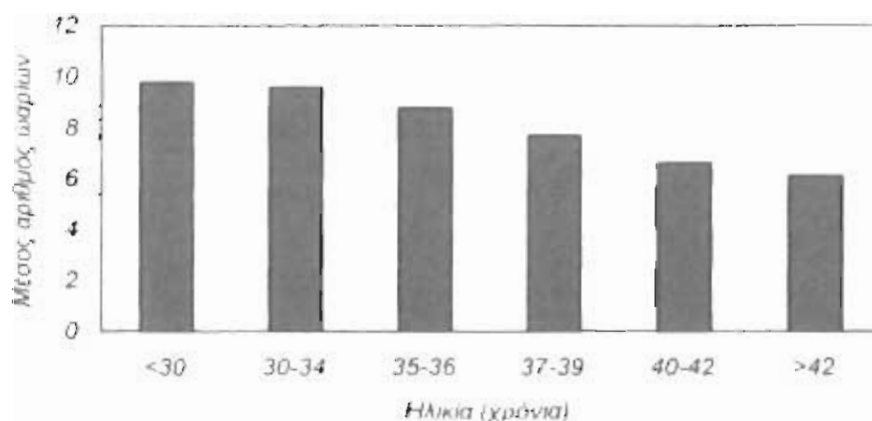
Στο κέντρο Εξωσωματικής Γονιμοποίησης του Πανεπιστημίου Monash στην Αυστραλία, η ανάλυση των αποτελεσμάτων σε 4.012 κύκλους θεραπείας (1994-1995) έδωσε τα στοιχεία που παρουσιάζονται στα διαγράμματα 1, 2, 3 και 4.

Από τα στοιχεία αυτά βλέπουμε πως :

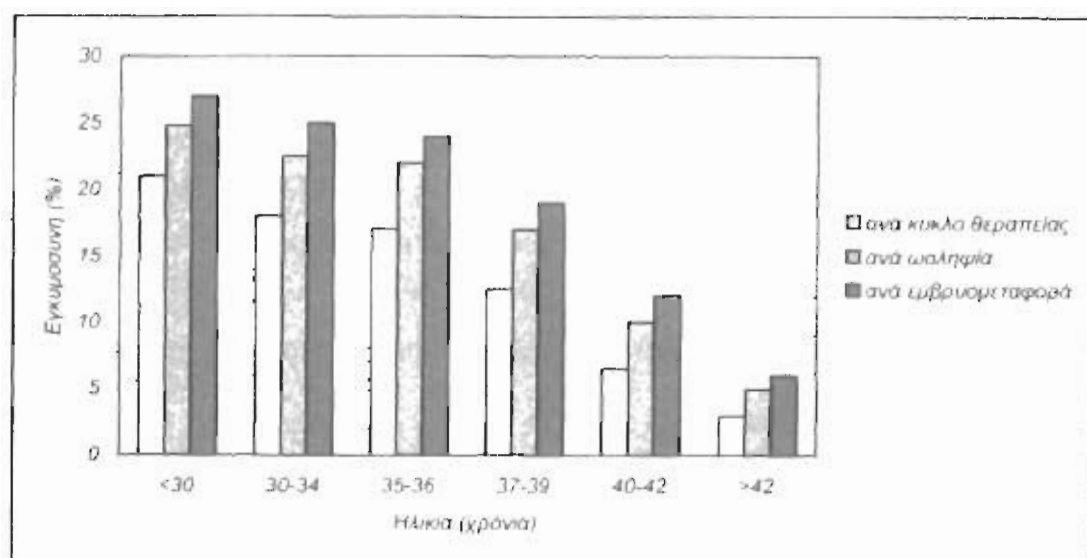
- α. το ποσοστό αποβολών μεγαλώνει με την αύξηση της ηλικίας της γυναίκας (διαγρ. 1)
- β. ο μέσος αριθμός ωαρίων ύστερα από ωοθηκική διέγερση, είναι μεγαλύτερος σε γυναίκες μικρότερης ηλικίας (διαγρ. 2)
- γ. τα ποσοστά εγκυμοσύνης, αλλά και τα ποσοστά γεννήσεων μειώνονται σε γυναίκες μεγαλύτερης ηλικίας (διαγρ. 3, 4).



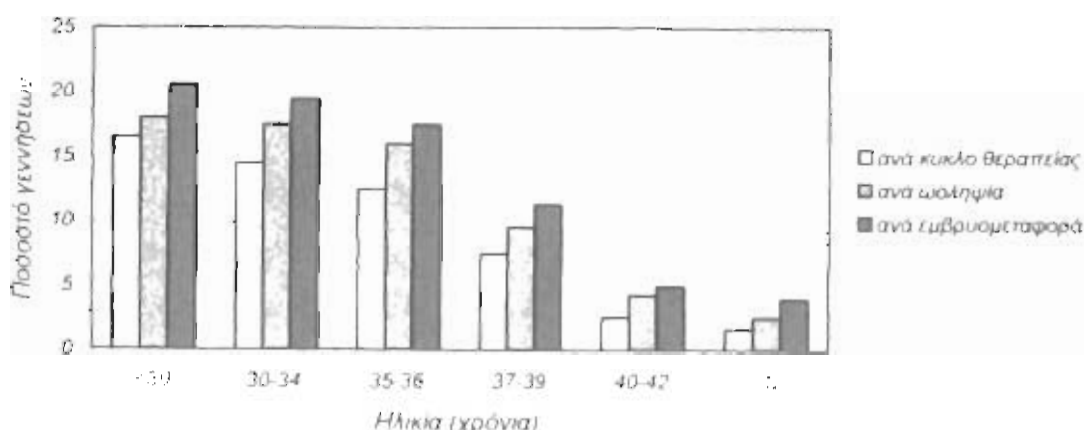
Διαγρ. 1. Ποσοστό αποβολών σε κύκλους θεραπείας, σε σχέση με την ηλικία των ασθενών.



Διαγρ. 2. Μέσος αριθμός παραληφθέντων ωαρίων ανά ασθενή, σε σχέση με την ηλικία τους.



Διάγρ. 3: Ποσοστό εγκυμοσύνης ανά κύκλο θεραπείας (□), ανά ωοληψία (■) και ανά εμβρυομεταφορά (■) σε σχέση με την ηλικία του ασθενούς.



Διάγρ. 4: Ποσοστό γεννήσεων ανά κύκλο θεραπείας (□), ανά ωοληψία (■) και ανά εμβρυομεταφορά (■) σε σχέση με την ηλικία του ασθενούς.

Μία άποψη που επικρατεί, είναι πως η κύρια αιτία της μείωσης των παραπάνω ποσοστών είναι η μείωση της ποιότητας των ωαρίων με την αύξηση της ηλικίας (American Society for Reproductive Medicine, 1995).

Εάν η ποιότητα των ωαρίων αποτελεί μοναδικό παράγοντα που καθορίζει την έκβαση της εμφύτευσης και της εγκυμοσύνης, θα περιμέναμε σε κύκλους θεραπείας που

περιλαμβάνουν λήψη ωαρίων από άλλη γυναίκα (λόγω ανεπαρκούς ωοθηκικής λειτουργίας της ασθενούς), η ηλικία της δότριας να παίζει τον καθοριστικό ρόλο, αντί για την ηλικία της αποδέκτου.

Στην παραπάνω υπόθεση στηρίχθηκαν αρκετές έρευνες. Σε μια από αυτές (Adhalla, 1990) παρατηρούμε πως όταν ωάρια από γυναίκες νεαρής ηλικίας, γονιμοποιούνται in vitro και μεταφέρονται στις αποδέκτες, τα ποσοστά εγκυμοσύνης στην ομάδα των αποδεκτών ηλικίας 25-29 χρονών είναι 50%, ενώ στην ομάδα ηλικίας 45 έως 49 είναι 9,7%.

Συμπεραίνουμε λοιπόν πως η αύξηση της ηλικίας, εκτός από την μείωση στην ποιότητα των ωαρίων, προκαλεί και μείωση της αποδεκτικότητας του ενδομητρίου, καθώς και αύξηση των αποβολών. Οι παράγοντες αυτοί δρουν ανεξάρτητα μεταξύ τους επηρεάζοντας την έκβαση της θεραπείας και όπως φαίνεται ένα έμβρυο δεν επηρεάζει την πιθανότητα εμφύτευσης των υπολοίπων.

Πολύδυμη κύηση

Η μεταφορά περισσότερων του ενός εμβρύου είναι γεγονός πως αυξάνει τις πιθανότητες για μια εγκυμοσύνη. Σήμερα, αποτελεί μια πάγια τακτική στα περισσότερα κέντρα Εξωσωματικής Γονιμοποίησης, η μεταφορά το πολύ έως τριών εμβρύων.

Με αυτό τον τρόπο όμως, η προσπάθειά μας να εξασφαλίσουμε την εμφύτευση τουλάχιστον ενός εμβρύου, μπορεί να μας οδηγήσει σε μια πολύδυμη κύηση, μιας και όλα τα έμβρυα που μεταφέρονται, θεωρητικά έχουν την ίδια πιθανότητα να εμφυτευθούν και η εμφύτευση του ενός δεν επηρεάζει την εμφύτευση του άλλου.

Πράγματι, έχει παρατηρηθεί πως το 20% των κύσεων περιλαμβάνει δίδυμες κύσεις, ενώ το 2-3% τρίδυμες.

Μία πολύδυμη κύηση όμως, σε μερικές περιπτώσεις (ιδιαίτερα σε γυναίκες μεγάλης ηλικίας) μπορεί να λειτουργήσει αρνητικά στην περαιτέρω εξέλιξη της εγκυμοσύνης, αλλά και στην ίδια τη ζωή της μητέρας.

Το σοβαρό επομένως δίλημμα που ορθώνεται μπροστά στο θεράποντα ιατρό αλλά και στο ίδιο το ζευγάρι είναι πασιφανές. Σε περίπτωση μη επέμβασης είναι πολύ πιθανό ότι η εγκυμοσύνη θα αποβληθεί στο σύνολό της. Εάν όμως επιτευχθεί στάδιο εμβρυϊκής βιωσιμότητας, η σοβαρή διανοητική και φυσική βλάβη των εμβρύων είναι επίσης πολύ πιθανή.

Η εκλεκτική μείωση του αριθμού των εμβρύων εφαρμόζεται σε εγκυμοσύνες οι οποίες θεωρούνται μεγάλης επικινδυνότητας και αποτελεί μονόδρομο σωτηρίας για τη μητέρα. Ωστόσο, ορισμένα ζευγάρια αρνούνται κάτι τέτοιο βασιζόμενοι σε θρησκευτικούς ή ηθικούς λόγους.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- **Adballa H.I., Baber R., Kirkland A., Leonard T., Power M., (1990)** A report on 100 cycles of oocyte donation. Factors affecting the outcome. Hum Reprod.
- **Aitken, R.J., Clarksn, J.S., Hargreave, T.B., Irvine, D.S. (1989)**
Analysis of the relationship between defective function and the generation of reactive oxygen species in case of oligospermia. J. Androl.
- **American Society for Reproductive Medicine (1995)**, Guideline for practice. «Age related infertility».
- **Bergh C., Howles CM, Borg K. (1997)** Recombinant human follicle stimulating hormone (r-FSH) versus highly purified urinary FSH : results of a randomized comparative study in women undergoing assisted reproductive techniques. Hum. Reprod.
- **Bouchard P., Caraty A., Pavlou S.N., (1993)** GnRH, GnRH analogs, gonadotropins and gonadal peptides. Parthenon Publishing.
- **Conn, P.M., Huckle, W.R., Andrews, W.V., McArdle, C.A. (1987)** The molecular mechanism of action of gonadotropin releasing hormone (GnRH) in the pituitary. Rec. Progr. Hormone. Res. 43:29-61.
- **Erickson, G.F., Magoffin, D.A., Dyer, C.A., Hofeditz, C. (1985)** The ovarian androgen producing cells: a review of structure / function relationships. Endocrine Rev. 6:371-399.
- **Ζάγκρης Ν. (1998)** Αναπτυξιακή βιολογία. Εκδόσεις Πανεπιστημίου Πατρών.
- **Fisch, B., Avrech, O.M., Pinkas, H., Neri, A. (1995)** Superovulation before IVF by recombinant versus urinary human FSH: A comparative study. J. of Assist. Reprod. And Genetics, 12:26-31.

- **Feichtinger, W., Kemeter, P (1982)** Transvaginal sector scansonography for needle guided transvaginal follicular aspiration or other applications in gynecologic routine and research. *Fertil. Steril.* 38:673-678.
- **Gidley - Baird A. O' Neil C., Sinisich M.J., Porter R.N., Pike I.L., (1985)** Failure of implantation in human in vitro fertilization and embryo transfer patients: the effect of altered progesterone / estrogen ratios in human and in mice. *Fertil. Steril.* 45:69-74.
- **Guerin, J.F., Mathieu, C., Lornage, J. (1989)** Improvement of survival and fertilizing capacity of human spermatozoa in an IVF program by selection on discontinuous Percoll gradients. *Hum. Reprod.* 4:798.
- **Hillier, S.G., (1994)** Current concepts of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone in folliculogenesis. *Hum. Reprod.* 9:188-191.
- **Howles, C.M., Lounaye, E., Groud, D., Luyer, G. (1994)** Multiple follicular development and ovarian steroidogenesis following subcutaneous administration of a highly purified urinary FSH preparation in pituitary desensitized women undergoing IVF: A multicentre European phase III study. *Hum. Reprod.* 9:424-430.
- **Jansen R.P.S.,** Minimal endometriosis and reduced fecundability: prospective evidence from an artificial insemination by donor program. *Fertil. Steril.* 155:480-487.
- **Lejeune, B., Camus, M., Deschact, J. (1984)** Differences in the luteal phases after failed or successful in vitro fertilization and embryo development. *J. in Vitro Fert. Embryo Transfer.*
- **Lunenfeld, B. (1969)** The use of human menopausal gonadotropins in gonadal pathology. In: Inguilla W., Greenblatt R.B., eds. *The ovary*, Springfield. Ch 15.
- **Ord, T. Partizio, P., Mareello, E. (1990)** Mini Percoll: A new method of semen preparation for IVF in severe male factor infertility. *Hum. Reprod.* 5:980.

- **Rogers P., Murphy C.R., (1989)** Uterine receptivity for implantation: human in blastocyst implantation. Yoshinaga K., Serono Symposia, Adams Publishing Group, Boston 231.
- **Sherman M.I., Wudl L.R. (1976)** The implanting mouse blastocyst. Cell Surf. Rev.
- **Soussis, I., Boyd O., Paraschos t. Duffy S., Bower s., (1995)** Follicular fluid levels during transvaginal oocyte retrieval. Fertil. Steril.
- **Staigmiller, R.B., Moor, R.M. (1984)** Effect of follicle cells on the maturation and development competence of ovine oocytes matured outside the follicle. Gametes Res.
- **Stephoe, P.C., Edwards, R.G., Purde, J.M. (1971)** Human blastocysts grown in culture. Nature.
- **Trounson A., Gardner D., (2000)** Handbook of In Vitro Fertilization, CRC Press.
- **Τζαφέττας I.M. (1996)** Εξωσωματική Γονιμοποίηση και συναφείς μέθοδοι στην υποβοηθούμενη αναπαραγωγή.
- **United Nations University Declaration of Human Rights Art. (1978)** 16 (1). New York - United States.
- **World Helth Organization (1973)** Agents stimulating gonadal function in the human. Technical report series. No 153, p15, Geneva.