

**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΑΘΗΝΩΝ ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**

**ΕΡΕΥΝΑ ΣΤΗ ΓΥΝΑΙΚΕΙΑ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ**

**Θέμα: « Ο λόγος των ουδετεροφίλων προς τα λεμφοκύτταρα σαν παράγοντας έκβασης της εγκυμοσύνης μετά από αυτόματη σύλληψη και μετά από εξωσωματική γονιμοποίηση. Μια αναδρομική ανάλυση».**

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**ΒΙΚΤΩΡΙΑ Ε. ΧΡΙΣΤΟΦΟΡΑΚΗ**



**Γ' Μαιευτική και Γυναικολογική Κλινική Πανεπιστημίου Αθηνών**

**Διευθυντής: Παπαντωνίου Εμμανουήλ**

**Μαιευτική και Γυναικολογική Κλινική Γενικό Νοσοκομείο Αγίου Νικολάου**

**Διευθυντής: Κατάσος Θεόδωρος**

**ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2018**

Στους γονείς μου, Ειρηναίο και Ευθυμία,

Στην αδερφή μου Μαίρη

Στο σύζυγό μου Ζαφείρη

στους υιούς μου Γιώργο και Ειρηναίο

**Χαράλαμπος Συριστατίδης**

**Αναπληρωτής Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας**

(επιβλέπων καθηγητής)

**Μαστοράκος Γεώργιος**

**Καθηγητής Ενδοκρινολογίας**

(Μέλος Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής και υπεύθυνος του μεταπτυχιακού προγράμματος)

**Σαλαμαλέκης Γεώργιος**

**Διδάκτωρ Μαιευτικής-Γυναικολογίας**

(Μέλος Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής)

## **Πρόλογος**

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος “Ερευνα στη γυναικεία αναπαραγωγή” που οργανώνεται από την Ιατρική Σχολή του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον αναπληρωτή καθηγητή της Μαιευτικής-Γυναικολογίας της Γ' Μαιευτικής Γυναικολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών κ. Συριστατίδη Χαράλαμπο, τον καθηγητή Ενδοκρινολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών κ. Μαστοράκο, τον καθηγητή της Μαιευτικής-Γυναικολογίας της Γ' Μαιευτικής Γυναικολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών κ. Σαλαμαλέκη για την καθοδήγησή τους και την πολύτιμη βοήθειά τους στην εκπόνηση της παρούσας εργασίας. Ακόμα να ευχαριστήσω το προσωπικό της μονάδας εξωσωματικής γονιμοποίησης του Αττικού Νοσοκομείου και ιδιαίτερα τις εμβρυολόγους του για την τεχνική και επιστημονική τους καθοδήγηση στη συλλογή του δείγματος από το τμήμα αυτό.

Θα ήθελα επίσης να εκφράσω την απεριόριστη εκτίμηση μου στο Διευθυντή της Μαιευτικής και Γυναικολογικής κλινικής του Γενικού Νοσοκομείου Αγίου Νικολάου κ. Κατάσο Θεόδωρο για την πολύτιμη βοήθειά του στη συλλογή του δείγματος, καθώς να ευχαριστήσω και όλες τις μαίες και το προσωπικό της κλινικής για τη συμπαράσταση και την αρωγή στη διαδικασία αυτή.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμότερες ευχαριστίες μου στους γονείς μου και την αδελφή μου, όπως επίσης και το σύζυγό μου Ζαφείρη Ζαφειρίου για την κατανόηση και την αμέριστη συμπαράστασή τους στη διάρκεια της εκπόνησης της παρούσης μελέτης.

## **Περιεχόμενα**

1	Εισαγωγή.....	7
2	Γενικό Μέρος.....	14
2.1	Αποβολή στο πρώτο τρίμηνο της κύησης.....	14
2.1.1	Ορισμός.....	14
2.1.2	Επίπτωση.....	14
2.1.3	Αιτιολογία και παράγοντες κινδύνου.....	14
2.1.4	Διάγνωση .....	14
2.1.5	Θεραπευτική προσέγγιση για την αυτόματη αποβολή.....	16
2.1.6	Συμβουλευτική οικογενειακού προγραμματισμού.....	21
2.1.7	Αντισύλληψη μετά από αυτόματη αποβολή .....	21
2.1.8	Ισοανοσοποίηση μετά από αυτόματη αποβολή .....	22
2.1.9	Περαιτέρω έλεγχος μετά από αυτόματη αποβολή .....	22
2.1.10	Συμπεράσματα .....	22
2.2	Υπογονιμότητα .....	22
2.2.1	Ορισμός υπογονιμότητας.....	22
2.2.2	Επίπτωση υπογονιμότητας.....	23
2.2.3	Είδη υπογονιμότητας .....	23
2.2.4	Γυναικεία υπογονιμότητα .....	23
2.2.5	Υπογονιμότητα που οφείλεται σε ανδρικό παράγοντα .....	26
2.2.6	Παράγοντες υπογονιμότητας και στα δύο φύλα .....	28
2.2.7	Περαιτέρω έλεγχος σε επιλεγμένα υπογόνιμα ζευγάρια.....	29
2.2.8	Υστεροσκόπηση.....	30
2.2.9	Έλεγχος τραχηλικής βλέννης.....	30
2.2.10	Έλεγχος για υπογονιμότητα ωθηκικού παράγοντα .....	30
2.2.11	Μέτρηση της ωθηκικής εφεδρείας.....	30
2.3	Αντιμετώπιση της υπογονιμότητας.....	31
2.4	Ιατρικώς Υποβοηθούμενη Αναπαραγωγή (MAR).....	32
2.5	Τεχνικές της ιατρικώς υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (MAR) .....	32
2.5.1	Ενδομήτρια σπερματέγχυση .....	32
2.5.2	Εξωσωματική γονιμοποίηση .....	32
2.6	Βιολογικοί δείκτες στην κύηση.....	39
2.7	Το NLR ως δείκτης φλεγμονής.....	39
2.7.1	Συσχέτιση του NLR με τη διείσδυση της τροφοβλάστης .....	40
2.7.2	Η αξιολόγηση του NLR στην κύηση .....	41
2.7.3	Η μελέτη του NLR σε παθολογικές καταστάσεις κύησης .....	41

2.7.4	Προγνωστικοί δείκτες στην υποβοηθούμενη αναπαραγωγή .....	42
3	Ειδικό Μέρος .....	44
3.1	Μελέτη Α: Ο λόγος των ουδετεροφύλων προς τα λεμφοκύτταρα (NLR) και η έκβαση της εγκυμοσύνης σε φυσική σύλληψη. ....	44
3.1.1	Σκοπός της μελέτης.....	44
3.1.2	Μεθοδολογία.....	44
3.1.3	Καταληκτικά σημεία.....	46
3.1.4	Αποτελέσματα.....	46
3.1.5	Συζήτηση.....	47
3.2	Μελέτη Β: Ο λόγος των ουδετεροφύλων προς τα λεμφοκύτταρα (NLR) και η έκβαση της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Μια μελέτη ασθενούς-μάρτυρα .....	55
3.2.1	Σκοπός της μελέτης.....	55
3.2.2	Μεθοδολογία.....	55
3.2.3	Αποτελέσματα.....	56
3.2.4	Συζήτηση.....	58
4	Βιβλιογραφία .....	66

## 1 Εισαγωγή

Τα τελευταία χρόνια διενεργείται εκτεταμένη έρευνα για την ανεύρεση βιοδεικτών προκειμένου να εντοπιστούν και να διαγνωστούν ιατρικά σύνδρομα και γενετικές ανωμαλίες στο έμβρυο. Ωστόσο, δεν υπάρχουν δείκτες που να μπορούν να προβλέψουν με ακρίβεια την έκβαση της κύησης. Η πρόβλεψη νωρίς στην κύηση της έκβασης της θα μπορούσε να βοηθήσει στην εντόπιση κυήσεων υψηλού κινδύνου και να διευκολύνει πρώιμη παρέμβαση και εξατομίκευση της θεραπείας έτσι ώστε να προλαμβάνεται η απώλεια κατά τα άλλα υγειών εμβρύων. Επίσης στην υποβοηθούμενη αναπαραγωγή, όπου υπάρχει μεγάλη συναισθηματική και σωματική καταπόνηση των γυναικών είναι επιτακτική η ανάγκη της εύρεσης προγνωστικών δεικτών με σκοπό να προβλεφθεί τόσο η πιθανότητα σύλληψης όσο και η έκβαση της κύησης μετά από ιατρικώς υποβοηθούμενες τεχνικές. Ο λόγος των ουδετεροφύλων προς τα λεμφοκύτταρα (Neutrophil to Lymphocyte Ratio - NLR) φαίνεται ότι εμπεριέχει κάποια κλινική-βιολογική πληροφορία που αντικατοπτρίζει υποκείμενες διεργασίες του ανοσοποιητικού. Έχει διερευνηθεί εκτενώς ως βιοδείκτης σε διάφορες κλινικές καταστάσεις αλλά δεν φαίνεται να υπάρχουν δεδομένα σχετικά με τον ρόλο που θα μπορούσε να έχει στην κύηση ή την υποβοηθούμενη αναπαραγωγή.

Η παρούσα αναδρομική μελέτη έχει ως σκοπό να εξετάσει την πιθανή συσχέτιση του NLR, που είναι ο λόγος του απόλυτου αριθμού των λευκοκυττάρων προς τα ουδετερόφιλα, με δύο διαφορετικά συμβάντα: α) την αυτόματη αποβολή μετά από φυσιολογική σύλληψη β) την επιτυχή σύλληψη στην υποβοηθούμενη αναπαραγωγή. Σε περίπτωση σημαντικής συσχέτισης θα μπορούσε το NLR να χρησιμοποιηθεί σαν προγνωστικός δείκτης για να αναγνωρίσει γυναίκες που βρίσκονται σε αυξημένο κίνδυνο για πρόωρη αποβολή ή για να αναγνωρίσει γυναίκες με χαμηλή πιθανότητα επιτυχίας στην υποβοηθούμενη αναπαραγωγή και ενδεχομένως να οδηγήσει σε τροποποιημένες προσεγγίσεις από ότι στον υπόλοιπο πληθυσμό.

Η μελέτη απαρτίζεται από δύο επιμέρους μελέτες από τις οποίες η μία εξετάζει το NLR ως δείκτη αυτόματης αποβολής σε φυσική σύλληψη και διεξάχθηκε στο Γενικό Νοσοκομείο Αγίου Νικολάου στην Κρήτη. Η άλλη μελέτη εξετάζει το NLR ως δείκτη επιτυχίας της σύλληψης και της έκβασης της κύησης μετά από εξωσωματική γονιμοποίηση (IVF) και διεξάχθηκε στη μονάδα εξωσωματικής γονιμοποίησης, στη Γ' Μαιευτική και Γυναικολογική κλινική του Πανεπιστημίου Αθηνών, στο Αττικό Νοσοκομείο. Και οι δύο μελέτες έχουν λάβει έγκριση από τις αντίστοιχες Επιτροπές Ηθικής των Νοσοκομείων. Σύμφωνα με όσα

γνωρίζουμε ως τώρα, η παρούσα πρωτότυπη μελέτη είναι η πρώτη που μελέτα το NLR ως προγνωστικό δείκτη για την αυτόματη αποβολή σε φυσική σύλληψη αλλά και την επίτευξη σύλληψης και επιτυχούς έκβασης της κύησης μετά από IVF.

Το NLR είναι ένας δείκτης που λαμβάνεται εύκολα από μια γενική αίματος, άμεσα και οικονομικά και είναι διαθέσιμο σε οποιαδήποτε νοσοκομείο ή εργαστήριο.

## **First Trimester Neutrophil to Lymphocyte Ratio (NLR) and Pregnancy Outcomes in natural conception: a case-control study.**

### **Abstract**

**Background/aim:** In early pregnancy, spontaneous abortion is the most common complication. The early identification of women at high risk for miscarriage could improve pregnancy outcomes. We investigated whether the first trimester neutrophil to lymphocyte ratio (NLR) could be used as a prognostic marker for spontaneous abortion in pregnancies after spontaneous conception.

**Patients and Methods:** We retrospectively identified 129 pregnant women who had a first trimester full blood count available and known pregnancy outcome. First trimester NLR was calculated for each woman and mean NLR was compared between women with uncomplicated pregnancies/live births and those with spontaneous abortion.

**Results:** NLR was not found significantly different between the two groups ( $2.5 \pm 1.0$  vs.  $2.9 \pm 1.5$ ,  $p=0.167$ ) and did not affect pregnancy outcome. NLR values  $>5.8$  were exclusively associated with spontaneous abortion ( $p=0.028$ ).

**Conclusion:** First trimester NLR values are similar between women with live birth or spontaneous abortion, after natural conception. Values of NLR higher than 5.8 have been associated with spontaneous abortion.

**Ο λόγος των ουδετεροφίλων προς τα λεμφοκύτταρα (NLR) και έκβαση της εγκυμοσύνης σε φυσική σύλληψη. Μια μελέτη ασθενούς-μάρτυρα.**

**Σκοπός:** Στην αρχή της κύησης η συχνότερη επιπλοκή είναι η αυτόματη αποβολή. Η πρώιμη αναγνώριση εγκύων υψηλού κινδύνου για αυτόματη αποβολή θα μπορούσε να βελτιώσει την έκβαση της εγκυμοσύνης. Εξετάσαμε αν ο λόγος των ουδετεροφίλων προς τα λεμφοκύτταρα (NLR) θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως προγνωστικός δείκτης για αυτόματη αποβολή σε κυήσεις με φυσική σύλληψη.

**Μέθοδοι:** Εντοπίσαμε αναδρομικά 129 έγκυες γυναίκες που είχαν διαθέσιμες γενικές αίματος πρώτου τριμήνου και γνωστή έκβαση εγκυμοσύνης. Το NLR του πρώτου τριμήνου υπολογίστηκε για κάθε γυναίκα και έγινε σύγκριση του μέσου NLR μεταξύ γυναικών με ανεπίπλεκτες εγκυμοσύνες / ζώντα νεογνά (uncomplicated pregnancies/live births) και γυναίκες με αυτόματες αποβολές.

**Αποτελέσματα:** Το NLR δεν βρέθηκε στατιστικώς σημαντικό μεταξύ των δύο ομάδων ( $2.5 \pm 1.0$  vs.  $2.9 \pm 1.5$ ,  $p=0.167$ ) και δεν σχετίζοταν με την έκβαση της κύησης. Τιμές του NLR  $>5.8$  συσχετίστηκαν αποκλειστικά με αυτόματη αποβολή ( $p=0.028$ ).

**Συμπέρασμα:** Τιμές του NLR στο πρώτο τρίμηνο της κύησης είναι όμοιες μεταξύ γυναικών με ζων νεογνό και εκείνων με αυτόματη αποβολή. Τιμές του NLR μεγαλύτερες από 5.8 συσχετίστηκαν με αυτόματη αποβολή.

# **First Trimester Neutrophil to Lymphocyte Ratio (NLR) and Pregnancy Outcomes in medically assisted reproduction (MAR): a case-control study.**

## **ABSTRACT**

**Introduction:** The success rates of in vitro fertilization (IVF) treatments have improved dramatically over the recent years and depend on different parameters such as the cause of infertility, maternal age, the reproductive and medical history of the participants, lifestyle factors, the physician's capacity to make correct diagnosis, the laboratory methods used and several technical issues. Several markers have been proposed to predict IVF outcome in an attempt to save time, money, physical and emotional effort. Measuring haematological parameters such as the neutrophil to lymphocyte ratio (NLR) might help predict IVF outcome.

**Objective:** To evaluate whether NLR as a biomarker for systemic inflammation could be used as a reliable marker for IVF success

**Materials and Methods:** We identified infertile women who underwent IVF between November 2004 and February 2017 in the University Hospital of Athens, Greece. From the patients' records we extracted full blood counts at the time of the oocyte retrieval. NLR was calculated and demographic, clinical and haematological parameters were compared between women who failed and those who succeeded in conceiving.

**Results:** We identified 66 women who underwent IVF; of them 35 failed to conceive and 31 had viable pregnancies. There was no statistically significant difference between the two groups in demographic, clinical and IVF parameters. Higher OR's of IVF success were detected only at higher NLR ratios, when NLR is divided into quartiles and only in the 4<sup>th</sup> quartile (OR: 4.33 (95%CI: 1.02-10.79)). A tendency for IVF success was revealed in women of age group 35-38 with an OR of 9.00 ((0.99-81.93) ( $p=0.051$ )) in comparison to the younger women's group ( $\leq 29$  years old). This tendency might be attributed to positive correlation between NLR and age ( $r=0.310$ ,  $p=0.011$  and  $rs=0.363$ ,  $p=0.033$ ).

**Ο λόγος των ουδετεροφύλων προς τα λεμφοκύτταρα (NLR) και έκβαση της εγκυμοσύνης στην ιατρικώς υποβοηθούμενη αναπαραγωγή (MAR). Μια μελέτη ασθενούς-μάρτυρα.**

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

**Εισαγωγή:** Τα ποσοστά επιτυχίας των μεθόδων υποβοηθούμενης παραγωγής έχουν βελτιωθεί δραματικά τα τελευταία χρόνια και εξαρτώνται από διαφορετικούς παραμέτρους όπως ή αιτία της υπογονιμότητας, η ηλικία της μητέρας, το αναπαραγωγικό και ιατρικό ιστορικό των συμμετεχόντων, οι καθημερινές συνήθειες, η ικανότητα του γιατρού να κάνει τη σωστή διάγνωση, οι εργαστηριακές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται και διάφορα τεχνικά ζητήματα. Διάφοροι προγνωστικοί δείκτες έχουν προταθεί για τις μεθόδους υποβοηθούμενης αναπαραγωγής σε μια προσπάθεια να διασωθεί χρόνος, χρήματα, φυσικός και ψυχικός κόπος. Μετρώντας αιματολογικές παραμέτρους όπως ο λόγος ουδετερόφιλων προς τα λεμφοκύτταρα (NLR) μπορεί να βοηθήσει στην πρόβλεψη της έκβασης της εξωσωματικής γονιμοποίησης.

**Σκοπός:** Να αξιολογηθεί αν το NLR ως δείκτης συστηματικής φλεγμονής θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως αξιόπιστος δείκτης για την επιτυχία της εξωσωματικής γονιμοποίησης.

**Υλικά και μέθοδοι:** Αναγνωρίστηκαν υπογόνιμες γυναίκες που έκαναν εξωσωματική γονιμοποίηση στο διάστημα από το Νοέμβριο του 2014 έως το Φεβρουάριο του 2017 στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο της Αθήνας, στην Ελλάδα. Από τους φακέλους των ασθενών εξήχθησαν οι γενικές αίματος τη στιγμή της ωοληψίας. Υπολογίστηκε το NLR και συγκρίθηκαν οι δημογραφικοί, κλινικοί και αιματολογικές παράμετροι μεταξύ των γυναικών που συνέλαβαν και αυτών που δεν κατάφεραν να συλλάβουν.

**Αποτελέσματα:** Αναγνωρίστηκαν 66 γυναίκες που έκαναν εξωσωματική γονιμοποίηση. Από αυτές, 35 απέτυχαν να συλλάβουν και 31 είχαν βιώσιμες εγκυμοσύνες. Δεν υπήρχε στατιστική σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο υπό μελέτη ομάδων σε δημογραφικές κλινικές παραμέτρους και παραμέτρους εξωσωματικής γονιμοποίησης. Υψηλά OR's επιτυχίας της εξωσωματικής γονιμοποίησης εντοπίστηκαν μόνο σε υψηλές τιμές NLR, όταν το NLR διαχωρίζεται σε τεταρτημόρια και μόνο στο 4<sup>ο</sup> τεταρτημόριο (OR: 4.33 (95%CI: 1.02-10.79)). Μια τάση για επιτυχία στην εξωσωματική γονιμοποίηση ανιχνεύτηκε σε γυναίκες της ομάδας 35-38 με OR της τάξεως του 9.00 ((0.99-81.93) (p=0.051) σε σύγκριση

με την νεότερη ομάδα γυναικών (<=29 ετών). Αυτή η τάση μπορεί να αποδίδεται στην θετική συσχέτιση ανάμεσα στο NLR και την ηλικία ( $r=0.310$ ,  $p=0.011$  και  $rs=0.363$ ,  $p=0.033$ ).

## 2 Γενικό Μέρος

### 2.1 Αποβολή στο πρώτο τρίμηνο της κύησης

Στο πρώτο τρίμηνο της κύησης η αυτόματη αποβολή της ενδομήτριας κύησης είναι επιπλοκή που συναντάται συχνά στην καθημερινή κλινική πράξη και συνοδεύεται από μεγάλο ψυχικό και σωματικό στρες. Είναι καθοριστικής σημασίας η διαφορική διάγνωση από τους θεράποντες ιατρούς μεταξύ βιώσιμης και μη βιώσιμης κύησης με τη χρήση καθιερωμένων διαγνωστικών εργαλείων. Μετά με τη διάγνωση εξίσου σημαντική είναι και η εφαρμογή της κατάλληλης θεραπευτικής αντιμετώπισης που περιλαμβάνει τρεις επιλογές: τη στάση αναμονής, τη φαρμακευτική και τη χειρουργική αντιμετώπιση.

#### 2.1.1 Ορισμός

Η αυτόματη αποβολή ορίζεται από τον παγκόσμιο οργανισμό υγείας (WHO) ως η αποβολή ενός μη βιώσιμου εμβρύου πριν τις 20 εβδομάδες κύησης το οποίο ζυγίζει 500 gr ή λιγότερο.

#### 2.1.2 Επίπτωση

Η αυτόματη αποβολή αφορά το 10 % όλων των κυήσεων που αναγνωρίζονται κλινικά. Αναφέρεται ως η συχνότερη επιπλοκή στο 1<sup>ο</sup> τρίμηνο της κύησης καθώς περίπου το 80% όλων των περιπτώσεων αυτόματων αποβολών συμβαίνουν στο πρώτο τρίμηνο (1-2).

#### 2.1.3 Αιτιολογία και παράγοντες κινδύνου

Σχεδόν οι μισές περιπτώσεις όλων των περιπτώσεων αυτόματων αποβολών έχουν ως αιτιολογία της χρωμοσωμικές ανωμαλίες του εμβρύου (3, 4). Ο πιο συχνοί παράγοντες κινδύνου για αυτόματη αποβολή είναι η προχωρημένη ηλικία της γυναίκας και το ιστορικό προηγούμενης αυτόματης αποβολής (5, 6). Η συχνότητα αυτόματης αποβολής ποικίλλει ανάλογα με την ηλικία. Στην ηλικία 20-30 ετών το ποσοστό είναι 9–17%, 20% στην ηλικία των 35, 40% στις γυναίκες 40 ετών και αυξάνεται δραματικά στο 80% στις γυναίκες 45 ετών (6).

#### 2.1.4 Διάγνωση

Η διαφορική διάγνωση μεταξύ της αυτόματης αποβολής και άλλων επιπλοκών της κύησης στο πρώτο τρίμηνο είναι καθοριστικής σημασίας για την έκβαση της κύησης. Επιπλοκές της κύησης όπως η υδατιδώδης μύλη ή η έκτοπη κύηση έχουν ίδια συμπτώματα όπως η

φυσιολογική κύηση: κράμπες της μήτρας και κολπική αιμόρροια. Η μη ακριβής διάγνωση και ακολούθως η λανθασμένη θεραπεία μπορεί να έχει καταστροφικές συνέπειες όπως ο τερματισμός μιας φυσιολογικής κύησης, ανωμαλίες διάπλασης ή επιπλοκές στην κύηση (7). Κατά συνέπεια, είναι αναγκαίο το ιστορικό και η φυσική εξέταση που μαζί με το υπερηχογράφημα και τη μέτρηση της β-HCG θα οδηγήσουν σε ασφαλέστερη διάγνωση.

Ο καλύτερος τρόπος για να διαπιστωθεί η παρουσία μιας ενδομήτριας κύησης είναι η υπερηχοτομογραφία. Υπάρχουν περιπτώσεις που η διάγνωση της αυτόματης αποβολής είναι προφανής και δεν χρειάζεται περαιτέρω έλεγχος με απεικόνιση ή εξετάσεις αίματος. Σε πολλές άλλες περιπτώσεις η διάγνωση είναι αμφίβολη και απαιτούνται περαιτέρω μετρήσεις της β-HCG ή εξέταση με διακολπικό υπέρηχο με σκοπό να επιβεβαιωθεί η διάγνωση η μη της αυτόματης αποβολής.

Με σκοπό να τεθεί με μεγαλύτερη ασφάλεια η διάγνωση της αυτόματης αποβολής είχαν τεθεί υπερηχογραφικά κριτήρια ήδη από τις αρχές της δεκαετίας του '90 που είχε αρχίσει να διαδίδεται ο διακολπικός υπέρηχος. Κεφαλοουριαίο μήκος του εμβρύου (CRL)  $\geq 5$  mm χωρίς καρδιακή λειτουργία ή μέση διάμετρος του εμβρυικού σάκου κύησης  $\geq 16$  mm χρησιμοποιήθηκαν ως διαγνωστικά κριτήρια για να επιβεβαιώσουν της αυτόματη αποβολή (8).

Πρόσφατα, νέες οδηγίες για τη διάγνωση της αυτόματης αποβολής στο πρώτο τρίμηνο και τον αποκλεισμό βιώσιμης κύησης δημιουργήθηκαν στην Επιτροπή Υπερήχων της Εταιρείας Ακτινολόγων (Πίνακας 1). Οι οδηγίες αυτές είναι πιο συντηρητικές από τις παλαιότερες που χρησιμοποιήθηκαν.

Είναι ιδιαίτερα σημαντικό σε κάθε περίπτωση να εξατομικεύονται τα παραπάνω κριτήρια και να συμπεριλαμβάνεται η ασθενής τόσο στη διαγνωστική όσο και στη θεραπευτική διαδικασία. Ο ιδιαίτερος ψυχισμός της ασθενούς την περίοδο αυτή επιτάσσει τη λήψη αποφάσεων λαμβάνοντας υπ' όψιν και την παράμετρο αυτή. Για παράδειγμα μπορεί να προτιμηθεί η αναβολή κάθε παρέμβασης αν η ασθενής το επιθυμεί για να υπάρχει η διάγνωση της εμβρυικής απώλειας σε ποσοστό 100% ή ακόμα και η άμεση χειρουργική παρέμβαση για γυναίκες που επιθυμούν αμεσότερα αποτελέσματα θεωρώντας την παραμικρή αναμονή ψυχοφθόρα.

Τα κριτήρια που προτείνονται για την αυτόματη αποβολή φαίνονται στον πίνακα (9). Επίσης, ευρήματα όπως ο χαμηλός εμβρυικός καρδιακός ρυθμός (λιγότεροι από 100 παλμοί το λεπτό

στις 5–7 εβδομάδες κύησης) (10) και υποχοριονική αιμορραγία έχουν βρεθεί να σχετίζονται με αυτόματη αποβολή χωρίς ωστόσο να πρέπει να χρησιμοποιούνται για να τεθεί μια καθοριστική διάγνωση (11). Απαιτείται επανεξέταση σε 7–10 ημέρες από τα παραπάνω ευρήματα (9). Οι διαδοχικές μετρήσεις της β-hCG και οι υπερηχογραφικοί επανέλεγχοι απαιτούνται σε περιπτώσεις με αβέβαιη διάγνωση με σκοπό να αποκλειστεί η έκτοπος κύηση και να δοθεί η ενδεδειγμένη θεραπεία.

### 2.1.5 Θεραπευτική προσέγγιση για την αυτόματη αποβολή

Αποδεκτές θεραπευτικές επιλογές για την αυτόματη αποβολή είναι η στάση αναμονής, η φαρμακευτική αγωγή και η χειρουργική θεραπεία. Παρά το γεγονός ότι οι παραπάνω θεραπείες έχουν εντελώς διαφορετική διαδικασία, είναι αποδεκτές από τους ασθενείς και είναι αποτελεσματικές σε ικανοποιητικό βαθμό. Οι ασθενείς θα πρέπει να πληροφορούνται για τους κινδύνους και τα οφέλη καθεμιάς μεθόδου ξεχωριστά. Σε ασυμπτωματικές γυναίκες μπορούμε ακολουθήσουμε τις επιθυμίες της ασθενούς καθώς δεν υπάρχουν δεδομένα που να υποστηρίζουν διαφορετική έκβαση μακροπρόθεσμα.

**Πίνακας 1 Υπερηχογραφικά κριτήρια για τη διάγνωση με διακολπικό υπερηχογράφημα της εμβρυικής απώλειας ωρίς στην κύηση από την Ένωση Ακτινολόγων**

Ευρήματα διαγνωστικά της εμβρυικής απώλειας ωρίς στην κύηση	Ευρήματα ενδεικτικά, αλλά όχι διαγνωστικά της εμβρυικής απώλειας ωρίς στην κύηση
Κεφαλουραίο μήκος 7 mm ή μεγαλύτερο, χωρίς καρδιακή λειτουργία.	Κεφαλουραίο μήκος μικρότερο από 7 mm, χωρίς καρδιακή λειτουργία.
Μέση διάμετρος σάκου 25 mm ή μεγαλύτερη χωρίς έμβρυο.	Μέση διάμετρος σάκου 16–24 mm χωρίς έμβρυο.
Απουσία εμβρύου με καρδιακή λειτουργία 2 εβδομάδες ή περισσότερο μετά από υπερηχογράφημα που έδειξε εμβρυικό σάκο κύησης χωρίς λεκιθικό ασκό.	Απουσία εμβρύου με καρδιακή λειτουργία 7–13 ημέρες μετά από υπερηχογράφημα που έδειξε εμβρυικό σάκο κύησης χωρίς λεκιθικό ασκό.
Απουσία εμβρύου με καρδιακή λειτουργία 11 μέρες ή περισσότερο μετά από υπερηχογράφημα που έδειξε εμβρυικό ==h bdswae7hg5q1 wcsάκο κύησης με λεκιθικό ασκό.	Απουσία εμβρύου με καρδιακή λειτουργία 7–10 μέρες μετά από υπερηχογράφημα που έδειξε εμβρυικό σάκο κύησης με λεκιθικό ασκό.
	Απουσία εμβρύου για 6 βδομάδες ή περισσότερο μετά

	την τελευταία περίοδο.
	Κενό άμνιο (άμνιο που φαίνεται να γειτνιάζει με το λεκιθικό ασκό, χωρίς ορατό έμβρυο)
	Διογκωμένος λεκιθικός ασκός (μεγαλύτερος από 7 mm)
	Μικρός εμβρυικός σάκος κύησης σε σχέση με το μέγεθος του εμβρύου (λιγότερο από 5 mm διαφορά μεταξύ της μέση διαμέτρου του σάκου και του κεφαλουραίου μήκους)

\*Τα κριτήρια είναι από την Εταιρία Ακτινολόγων όπως διατυπώθηκαν στη σύσκεψη για τη διάγνωση νωρίς στο πρώτο τρίμηνο της αποβολής και για τον αποκλεισμό της βιώσιμης ενδομήτριας κύησης, τον Οκτώβριο του 2012.

<sup>†</sup>Είναι μόνο ακτινολογικά κριτήρια και δεν αντικαθιστούν την κλινική κρίση.

<sup>‡</sup>Οταν υπάρχουν συμπτώματα όποτε για εμβρυική απώλεια νωρίς στην κύηση, η παρακολούθηση με υπερηχογραφία στις 7–10 days με σκοπό να εξετάζεται βιώσιμότητα στην κύηση είναι γενικά αποδεκτό.

Επανατυπώθηκε από τους Doubilet PM, Benson CB, Bourne T, Blaivas M, Barnhart KT, Benacerraf BR, et al. Diagnostic criteria for nonviable pregnancy early in the first trimester. Society of Radiologists in Ultrasound Multispecialty Panel on Early First Trimester Diagnosis of Miscarriage and Exclusion of a Viable Intrauterine Pregnancy. *N Engl J Med* 2013;369:1443–51.

#### 4.1.1.1 Στάση αναμονής

Καθώς υπάρχουν περιορισμένες μελέτες για την ασφαλή χρήση της μισοπροστόλης όσον αφορά την αιμορραγία στο δεύτερο τρίμηνο, η θεραπεία αναμονής πρέπει να εφαρμόζεται αποκλειστικά στο πρώτο τρίμηνο και σε επιλεγμένες κυήσεις.

Η αντιμετώπιση με αναμονή διάρκειας 8 εβδομάδων είναι επιτυχής στην πλήρη εκκένωση της μήτρας περίπου στο 80 % των γυναικών (12). Επιπλέον, υπάρχουν μελέτες που δείχνουν μεγαλύτερη επιτυχία της μεθόδου της αναμονής σε γυναίκες με ατελή εκβολή σε σχέση με εκείνες που είχαν παλίνδρομο ή ανεμβρυονική κύηση (13).

Ασθενείς που επιλέγουν ως θεραπεία την αναμονή ενδέχεται να αντιμετωπίσουν διαφόρου βαθμού αιμορραγίες-μετρίου ακόμη και σοβαρού βαθμού-και συσπάσεις της μήτρας. Είναι σημαντικό να υπάρχει η κατάλληλη συμβουλευτική στις γυναίκες αυτές και να τονίζεται η πιθανότητα χειρουργικής παρέμβασης σε περίπτωση αποτυχίας στην έξοδο των προϊόντων κύησης. Δεν υπάρχει συμφωνία στη βιβλιογραφία ποιο πάχος ενδομητρίου είναι αποδεκτό προκειμένου να θεωρηθεί ότι υπάρχει πλήρης εκκένωση των προϊόντων της κύησης από τη μήτρα. Σε ασυμπτωματικές γυναίκες με πεπαχυσμένο ενδομητριο μετά από θεραπεία για αυτόματη αποβολή δεν απαιτείται διαστολή και απόξεση.

#### **4.1.1.2 Θεραπεία με φάρμακα**

Η μισοπροστόλη είναι ένα E1 ανάλογο της προσταγλανδίνης και χρησιμοποιείται συχνά με σκοπό να προκληθεί νωρίτερα η έξοδος των προϊόντων αποβολής της κύησης. Ωστόσο υπάρχουν περιορισμοί στη χρήση της όπως είναι η αλλεργία στη φαρμακευτική ουσία και τα έκδοχα της. Η μισοπροστόλη έχει εκτενώς χρησιμοποιηθεί στην εμβρυική απώλεια νωρίς στην κύηση και δείχνει να μειώνει την πιθανότητα για εκκενωτική απόξεση έως και 60% καθώς επίσης μειώνει το χρόνο της πλήρους εκκένωσης της μήτρας όταν συγκρίθηκε με placebo (14).

Επίσης, όσον αφορά την οδό χορήγησης της μισοπροστόλης, θεωρείται πιο αποτελεσματική η κολπική ή υπογλώσσια χορήγηση από την από του στόματος χορήγηση. Αξίζει να σημειωθεί ωστόσο ότι η υπογλώσσια χορήγηση σχετίζεται με αυξημένα ποσοστά διαρροιών (14). Σύμφωνα με τα τελευταία δεδομένα, σε γυναίκες που αντιμετωπίζονται φαρμακευτικά, γενικά συνίσταται αρχική δόση με κολπική μισοπροστόλη με μια επαναλαμβανόμενη δόση αν χρειάζεται ( Πίνακας 2).

Η χορήγηση ενός ανταγωνιστή των υποδοχέων της προγεστερόνης όπως η μιφεπριστόνη, σε συνδυασμό με τη χρήση μισοπροστόλης στην αντιμετώπιση της αυτόματης αποβολής δεν φαίνεται να υπερτερεί σε σχέση με τη χρήση μισοπροστόλης ως μονοθεραπείας(14). Γενικότερα, η χρήση της μιφεπριστόνης ως μέθοδος ρουτίνας στην αυτόματη αποβολή δεν προτείνεται.

Το 2013 μια ανασκόπηση από το Cochrane κατέληξε στο ότι η χρήση μισοπροστόλης σε γυναίκες με μη ολοκληρωμένη αποβολή προϊόντων κύησης δεν έχει σημαντικά υψηλότερα ποσοστά ολοκληρωμένης εκκένωσης της μήτρας σε σχέση με τη στάση αναμονής (τα αποτελέσματα σε 7-10 ημέρες ήταν 80-81% έναντι 52-85%, αντίστοιχα (15). Κατά συνέπεια,

δεν υπάρχουν σαφή δεδομένα για τη χρήση της μισοπροστόλης σε γυναίκες που δεν έχουν αποβάλλει εξ ολοκλήρου τα υπολείμματα της κύησης από τη μήτρα.

Όπως και με τις άλλες δύο μεθόδους αντιμετώπισης της αυτόματης αποβολής, είναι σημαντικό σε μια γυναίκα που αντιμετωπίζεται φαρμακευτικά, να ενημερώνεται πλήρως για το τι να περιμένει κατά την έξοδο των υπολειμμάτων κύησης, το ποσό της αιμορραγίας που ενδέχεται να έχει και τι θεωρείται αποδεκτή αιμορραγία καθώς επίσης πότε και που μπορεί να απευθυνθεί για βοήθεια. Ακολούθως πρέπει να τονιστεί και το ενδεχόμενο χειρουργικής αντιμετώπισης σε περίπτωση αποτυχίας της φαρμακευτικής θεραπείας για τέλεια εκκένωση της μήτρας.

Για την παρακολούθηση προτείνεται το υπερηχογράφημα και όταν δεν είναι διαθέσιμο προτείνεται να γίνονται διαδοχικές μετρήσεις της β-hCG προκειμένου να επιβεβαιωθεί η πλήρης εκκένωση της μήτρας από τα προϊόντα κύησης.

#### **Πίνακας 2. Δείγμα από πρωτόκολλο για την αντιμετώπιση της αυτόματης αποβολής**

- **Η συνιστώμενη αρχική δόση μισοπροστόλης είναι 800 μικρογραμμάρια κολπικά. Μια επαναλαμβανόμενη δόση μπορεί να χορηγηθεί αν χρειάζεται, όχι νωρίτερα από 3 ώρες μετά την αρχική δόση και τυπικά μέσα σε 7 ημέρες αν δεν υπάρχει ανταπόκριση στην αρχική δόση. Αναλγητικά πρέπει να συγχορηγούνται.**
- **Οι γυναίκες που είναι Rh(D) αρνητικές και μη ευαισθητοποιημένες πρέπει να λάβουν Rh(D)-υπεράνοση σφαιρίνη μέσα σε 72 ώρες από την αρχική χορήγηση της μισοπροστόλης.**
- **Παρακολούθηση με καταγραφή της πλήρους εκκενώσεως της μήτρας έτσι όπως μπορεί να απεικονιστεί με το υπερηχογράφημα, τυπικά μέσα σε 7–14 ημέρες. Σε περίπτωση που δεν υπάρχει διαθέσιμος υπέρηχος μπορούν να γίνουν διαδοχικές μετρήσεις της β-hCG. Θα πρέπει επίσης να λαμβάνονται υπ' όψιν τα συμπτώματα της ασθενούς στο να καθοριστεί πότε συνέβη η πλήρης αποβολή των προϊόντων κύησης.**

• Αν η μισοπροστόλη αποτύχει, η ασθενείς μπορεί να ακολουθήσει στάση αναμονής για διάρκεια που θα καθοριστεί από εκείνη και τον γυναικολόγο της, ή να προχωρήσει σε εκκενωτική απόξεση

\*Δεδομένα από τους Zhang J, Gilles JM, Barnhart K, Creinin MD, Westhoff C, Frederick MM. A comparison of medical management with misoprostol and surgical management for early pregnancy failure. National Institute of Child Health Human Development (NICHD) Management of Early Pregnancy Failure Trial. N Engl J Med 2005;353:761–9.

#### **4.1.1.3 Χειρουργική θεραπεία**

Η διαστολή και απόξεση με σκοπό την εκκενωτική απόξεση παραμένει η παραδοσιακή μέθοδος σε γυναίκες με αυτόματη αποβολή και υπολείμματα προϊόντων κύησης. Η χειρουργική αυτή μέθοδος εκτελείται σε επείγουσα βάση σε περίπτωση που η έγκυος είναι ασταθής αιμοδυναμικά, έχει αιμορραγία ή παρουσιάζει σημεία λοίμωξης. Σε χρόνιες νόσους όπως σε καρδιαγγειακή νόσο, διαταραχές της πήξης, αιμορροφιλία ή βαριά αναιμία, η ενδεδειγμένη θεραπευτική μέθοδος είναι η χειρουργική. Συχνά, η εκκενωτική απόξεση αποτελεί θεραπεία εκλογής σε σχέση με τις άλλες δύο θεραπευτικές επιλογές σε γυναίκες που επιθυμούν αμεσότερα αποτελέσματα.

Συγκρίνοντας τις μεθόδους αντιμετώπισης, και οι τρεις-η χειρουργική, η φαρμακευτική και η στάση αναμονής-φαίνεται να έχουν σαν αποτέλεσμα την εκκένωση της μήτρας από τα προϊόντα σύλληψης στις περισσότερες ασθενείς και έχουν ελάχιστες σοβαρές επιπλοκές. Ωστόσο, η χειρουργική αντιμετώπιση φαίνεται να υπερτερεί στο ότι δίνει πιο άμεσα αποτελέσματα και έχει ως αποτέλεσμα την επιτυχή εκκένωση της μήτρας σε ποσοστό έως και 99% (13). Σπάνια επιπλοκή μετά από χειρουργική αντιμετώπιση με διαστολή και απόξεση είναι η δημιουργία συμφύσεων. Η λοίμωξη και η αιμορραγία μπορεί να συμβεί με οποιαδήποτε άλλη θεραπευτική επιλογή. Είναι γεγονός ότι η νοσηλεία για αιμορραγία είναι το ίδιο πιθανή οποιαδήποτε μέθοδο αντιμετώπισης και αν επιλεγεί (0.5–1%) (16). Σε μια συστηματική μελέτη ανασκόπησης υποστηρίχτηκε η άποψη ότι οι ασθενείς θα πρέπει να είναι εκείνοι που τελικά θα πρέπει να αποφασίζουν τη μέθοδο της αντιμετώπισης καθώς τα συνολικά ποσοστά λοίμωξης είναι χαμηλά (1–2%) τόσο στις γυναίκες που επιλέγουν τη στάση αναμονής όσο και σε εκείνες που αντιμετωπίζονται χειρουργικά (16).

#### **4.1.2 Συμβουλευτική οικογενειακό προγραμματισμό**

Υπάρχουν ελλιπή δεδομένα που να στηρίζουν την αναβολή στην επόμενη σύλληψη μετά από αυτόματη αποβολή. Με σκοπό να μειωθεί ο κίνδυνος λοίμωξης, κρίνεται σκόπιμη η σεξουαλική αποχή διάρκειας 1-2 εβδομάδων μετά από την ολοκληρωτική εκκένωση της μήτρας.

#### **4.1.3 Αντισύλληψη μετά από αυτόματη αποβολή**

Οι γυναίκες μετά από αυτόματη αποβολή είναι δυνατόν να ξεκινήσουν άμεσα οποιαδήποτε μέθοδο αντισύλληψης εφόσον δεν αντενδείκνυνται σύμφωνα με το ιατρικό τους ιστορικό (17). Ένδειξη υπάρχει και για άμεση τοποθέτηση σπειράματος μετά την χειρουργική

θεραπεία της αυτόματης αποβολής με την προϋπόθεση ότι δεν υπάρχει υποψία για σηπτική αποβολή (17).

#### 4.1.4 Ισοανοσοποίηση μετά από αυτόματη αποβολή

Γυναίκες Rhesus αρνητικές που δεν έχουν ευαισθητοποιηθεί πρέπει να λάβουν 50 μικρογραμμάρια ανοσοσφαιρίνης (ή μία δόση 300 μικρογραμμαρίων αν είναι πιο άμεσα διαθέσιμη) αμέσως μετά τη χειρουργική θεραπεία της αυτόματης αποβολής ή μέσα σε 72 ώρες από τη διάγνωση της αυτόματης αποβολής στο πρώτο τρίμηνο έχοντας πλάνο για φαρμακευτική αντιμετώπιση ή τήρηση στάσεως αναμονής (18).

#### 4.1.5 Περαιτέρω έλεγχος μετά από αυτόματη αποβολή

Γενικά δεν προτείνεται περαιτέρω έλεγχος μετά από τη δεύτερη διαδοχικά αυτόματη αποβολή πρώτου τριμήνου (6). Μητρικός ή χρωμοσωμικός έλεγχος για κληρονομούμενες θρομβοφιλίες δεν προτείνεται να γίνεται σαν ρουτίνα μετά από μια αυτόματη αποβολή, αν και η θρομβοφιλία θεωρείται αίτιο αυτόματης αποβολής χωρίς να έχει επιβεβαιωθεί στατιστικά. Μόνο το αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο σταθερά έχει δειχθεί να σχετίζεται με την αυτόματη αποβολή με στατιστικώς σημαντική διαφορά (19). Η χρήση ασπιρίνης ή/και αντιπηκτικών έχει βρεθεί να μειώνει τον κίνδυνο αυτόματης αποβολής σε γυναίκες με αντιφωσφωλιπιδικό σύνδρομο, χωρίς να ισχύει το ίδιο για γυναίκες που πάσχουν από θρομβοφιλία (19).

#### 4.1.6 Συμπεράσματα

Σε ασθενείς που η φαρμακευτική αντιμετώπιση έχει ένδειξη, συνίσταται αρχική θεραπεία με λήψη 800 μικρογραμμαρίων μισοπροστόλης ενδοκολπικά, με μια επαναλαμβανόμενη δόση αν χρειάζεται. Η χρήση αντιπηκτικών ή/και ασπιρίνης έχει δείξει να μειώνει τον κίνδυνο για αυτόματη αποβολή μόνο σε γυναίκες με αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο ενώ οι γυναίκες με θρομβοφιλία δεν φαίνεται να ωφελούνται.

### 4.2 Υπογονιμότητα

#### 4.2.1 Ορισμός υπογονιμότητας

Υπάρχουν διαφορετικοί ορισμοί της υπογονιμότητας ανάλογα με την ηλικία της γυναίκας. Για ζευγάρια που η ηλικία της γυναίκας είναι κάτω των 35 ετών η υπογονιμότητα ορίζεται ως η αποτυχία σύλληψης μετά από 1 έτος σεξουαλικών επαφών κατά τις οποίες δεν

χρησιμοποιείται κανένα είδος αντισύλληψης. Για τα ζευγάρια όπου η γυναίκα είναι πάνω από 35 ετών τότε ως υπογονιμότητα ορίζεται η αποτυχία σύλληψης μετά από σεξουαλικες επαφές διάρκειας έως 6 μηνών (20-21).

#### 4.2.2 Επίπτωση υπογονιμότητας

Η επίπτωση της υπογονιμότητας είναι υψηλή και αφορά 1 στα 6 ζευγάρια παγκοσμίως. Στην Ευρώπη μόνο 25 εκατομμύρια άνθρωποι προσβάλλονται από υπογονιμότητα (22).

#### 4.2.3 Είδη υπογονιμότητας

##### 4.2.3.1 Πρωτοπαθής υπογονιμότητα

Σύμφωνα με τον παγκόσμιο οργανισμό υγείας, μια γυναίκα λέγεται ότι έχει πρωτοπαθή υπογονιμότητα όταν δεν έχει γεννήσει ποτέ είτε επειδή δεν μπόρεσε ποτέ να μείνει έγκυος είτε επειδή δεν μπόρεσε να κρατήσει μια κύηση μέχρι το σημείο που να είναι βιώσιμη. Έτσι, γυναίκες που είχαν αυτόματη αποβολή ή γυναίκες που η κύηση τους οδήγησε σε γέννηση θνητιγενούς εμβρύου, χωρίς ποτέ να έχουν γέννηση ζώντος νεογνού κατατάσσονται στην κατηγορία αυτή.

##### 4.2.3.2 Δευτεροπαθής υπογονιμότητα

Ορίζοντας τη δευτεροπαθή υπογονιμότητα, ο παγκόσμιος οργανισμός υγείας κατατάσσει της στην ομάδα αυτή γυναίκες που δεν μπορούν να γεννήσουν παιδί γιατί δεν μπορούν να μείνουν έγκυες μετά από μια προηγούμενη κύηση με γέννηση ζώντος νεογνού. Έτσι οι γυναίκες που είχαν στο παρελθόν επιτυχή κύηση με γέννηση ζώντος νεογνού και έχουν καθ' έξιν αποβολές ή όταν η κύηση έχει ως αποτέλεσμα τη γέννηση θνητιγενούς εμβρύου πάσχουν από δευτεροπαθή υπογονιμότητα.

#### 4.2.4 Γυναικεία υπογονιμότητα

##### 4.2.4.1 Τραχηλικός παράγοντας

Αφορά το 5-10% των περιπτώσεων υπογονιμότητας και σχετίζεται είτε με στένωση του τραχηλικού στομίου με συνεπακόλουθη αδυναμία εισόδου του σπέρματος στη μήτρα, είτε αφορά δυσλειτουργία στην αλληλεπίδραση τραχηλικής βλέννης και σπέρματος (21).

##### 4.2.4.2 Παράγοντες από τη μήτρα

Οι παράγοντες υπογονιμότητας από τη μήτρα έχουν να κάνουν με εκ γενετής καταστάσεις όπως δυσμιορφίες και ανωμαλίες του γυναικείου γεννητικού συστήματος που έχουν να κάνουν με τους μυλλεριανούς πόρους και επίκτητες καταστάσεις που μπορεί να έχουν ως

αίτια φάρμακα, χειρουργικές επεμβάσεις, φλεγμονές και λειομυώματα. Σύνδρομα που συμπεριλαμβάνουν στο φαινότυπο τους απλασία μήτρας και κόλπου όπως το Σ.Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser ακόμα και δυσπλασίες στη μήτρα όπως η τοξοειδής μήτρα και η διαφραγματοφόρος μήτρα, συμπεριλαμβάνονται στις επίκτητες καταστάσεις που προκαλούν υπογονιμότητα. Ακόμα στις επίκτητες καταστάσεις που προκαλούν υπογονιμότητα συμπεριλαμβάνονται το σύνδρομο Asherman με τις ενδομήτριες συμφύσεις εξαιτίας διαστολής και απόξεσης και οι δυσμορφίες στη μήτρα, τον τράχηλο και τον κόλπο που προκαλεί η χρήση διαιθυντικού βεστρόλης (DES). Ως επίκτητα αίτια θεωρούνται και τα λειομυώματα κυρίως τα υποβλεννογόνια που μπορούν να προκαλέσουν είτε παραμόρφωση της ενδομήτριας κοιλότητας είτε παρεκτόπιση ανατομικών δομών όπως ο τράχηλος και με αυτό τον τρόπο να προκαλέσουν υπογονιμότητα. Επιπλέον, φλεγμονές στην ενδομήτρια κοιλότητα όπως η ενδομητρίτιδα από φυματίωση μπορεί να αποτελούν επίκτητο αίτιο υπογονιμότητας (21).

#### 4.2.4.3 Ωοθηκικός παράγοντας

Η Ωοθηκική δυσλειτουργία ως παράγοντας υπογονιμότητας σχετίζεται με την διαταραχή στην ωορρηξία. Η ανωθυλακιορρηξία η οποία θεωρείται μια από τις κύριες αιτίες υπογονιμότητας σχετίζεται με ολιγομηνόρροια ή αμηνόρροια η οποία μπορεί να είναι πρωτοπαθής ή δευτεροπαθής. Στις γυναίκες προχωρημένης ηλικίας η ανωθυλακιορρηξία μπορεί να σχετίζεται με τη μείωση της ωοθηκικής εφεδρείας (21).

Ο παγκόσμιος οργανισμός υγείας (WHO) διακρίνει τρεις ομάδες διαταραχών ωοθηλακιορρηξίας:

- Ομάδα I (υπογοναδοτροπικός υπογοναδισμός): Αφορούν διαταραχές που σχετίζονται με μη λειτουργία του υποθαλάμου/ υπόφυσης και απαντούν στο 10% των διαταραχών ωοθηλακιορρηξίας. Παρουσιάζονται με χαμηλά επίπεδα γοναδοτροπινών και οιστρογόνων. Αθλήτριες με χαμηλό BMI, γυναίκες με νευρική ανορεξία και στρες ανήκουν στην κατηγορία αυτή.
- Ομάδα II: Το 85% των γυναικών με διαταραχές ωοθηλακιορρηξίας ανήκουν στην κατηγορία αυτή. Η υπερπρολακτιναιμική αμηνόρροια και το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών (PCOS) περιλαμβάνονται σε αυτόν τον πληθυσμό. Το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών που είναι το πιο χαρακτηριστικό σύνδρομο που προκαλεί διαταραχή στην ωορρηξία και το οποίο απαντάται συχνά στο γενικό πληθυσμό (10% των γυναικών αναπαραγωγικής ηλικίας) προκαλεί χρόνια

ανωθυλακιορρηξία και ολιγομηνόρροια με συνοδό υπερανδρογονισμό. Εκτός από την υπογονιμότητα που συνεπάγεται από τα παραπάνω, προκαλεί και μεταβολικές διαταραχές όπως αντίσταση στην ινσουλίνη, κεντρικού τύπου παχυσαρκία και διαταραχές των λιπιδίων (23).

- Ομάδα III (υπεργοναδοτροπικός υπογοναδισμός): Η ομάδα αυτή περιλαμβάνει διαταραχές που προκαλούν ωθηκική ανεπάρκεια με επακόλουθα υψηλά επίπεδα γοναδοτροπινών και μειωμένα επίπεδα οιστρογόνων.

#### 4.2.4.4 Σαλπιγγικός παράγοντας

Οποιαδήποτε απόφραξη ή καταστροφή των σαλπίγγων ή ακόμα και δυσμορφία ή ανωμαλία τους, μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα ανώμαλη εμφύτευση, έκτοπο κύηση ή υπογονιμότητα. Η απόφραξη των σαλπίγγων μπορεί να είναι απότοκος ενδομητρίωσης, πυελικής φυματίωσης, οζώδης ισθμικής σαλπιγγίτιδας και φλεγμονής συνηθέστερα από γονόκοκκο και χλαμύδια που κάνουν ουλώδη ιστό και αποφράσσουν τους ωαγωγούς. Επίσης, η πυελική φλεγμονή από χλαμυδιακή ή γονοκοκκική λοίμωξη προκαλεί περιτοναϊκές συμφύσεις με μείωση της κινητικότητας των σαλπίγγων. Ακολούθως, αυτή η μείωση της κινητικότητας των σαλπίγγων προκαλεί κατακράτηση του σαλπιγγικού υγρού στο απότερο άκρο του ωαγωγού με επακόλουθη καταστροφή των κροσσών και υδροσάλπιγγα. Επιπλέον η δημιουργία συμφύσεων και ουλώδους ιστού από κοιλιακές επεμβάσεις ή η απολίνωση των σαλπίγγων και η σαλπιγγοτομή για έκτοπο κύηση μπορεί να έχουν ως αποτέλεσμα απόφραξη των ωαγωγών και υπογονιμότητα (21,23).

#### 4.2.4.5 Περιτοναϊκός παράγοντας

Ο σημαντικότερος παράγοντας που προκαλεί περιτοναϊκές συμφύσεις και μειώνει τη γονιμότητα είναι η ενδομητρίωση. Η ενδομητρίωση, η ασθένεια που σχετίζεται με την ανάπτυξη έκτοπου ενδομητρικού ιστού εκτός της ενδομητρικής κοιλότητας προκαλεί υπογονιμότητα με δύο τρόπους. Πρώτον, η έκπτωση του έκτοπου ενδομητρικού ιστού την περίοδο της εμμήνου ρύσεως και η επακόλουθη αιμορραγία προκαλεί συμφύσεις και ακολούθως υπογονιμότητα. Επιπροσθέτως η ενδομητρίωση έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία και κυκλοφορία κυτταροκινών που ασκούν τοξική δράση στο σπέρμα και εμποδίζουν την γονιμοποίηση και την εμφύτευση του εμβρύου (25).

Οι αλλοιώσεις που προκαλεί η ενδομητρίωση μπορεί να είναι μικροσκοπικές ή μακροσκοπικές. Αντιστοίχως, η ενδομητρίωση έχει τέσσερα στάδια και ταξινομείται από

ήπια έως μέτρια και βαριά. Ωστόσο η αντιμετώπιση της ενδομητρίωσης για τη βελτίωση της υπογονιμότητας φαίνεται πως έχει νόημα μόνο στη μέτρια με σοβαρή μορφή της ενδομητρίωσης η οποία πρέπει να αντιμετωπίζεται χειρουργικά (26).

#### 4.2.4.6 Ανεξήγητη υπογονιμότητα

Όταν δεν ανευρίσκεται αίτιο υπογονιμότητας τότε η υπογονιμότητα χαρακτηρίζεται ανεξήγητη ή ιδιοπαθής. Θεωρείται ότι υπάρχει κάποια δυσλειτουργία που προκαλεί υπογονιμότητα αλλά δεν μπορεί να εντοπιστεί με τις διαθέσιμες διαγνωστικές μεθόδους. Ωατόσο, η πρόγνωση θεωρείται ότι είναι καλύτερη στα ζευγάρια με ανεξήγητη υπογονιμότητα σε σχέση με τα ζευγάρια που έχουν διαγνώσει τη δυσλειτουργία που αποτελεί αίτιο υπογονιμότητας (27).

#### 4.2.5 Υπογονιμότητα που οφείλεται σε ανδρικό παράγοντα

Η υπογονιμότητα ανδρικού παράγοντα ευθύνεται για το 30% των περιπτώσεων υπογονιμότητας και αποδίδεται είτε σε σεξουαλική δυσλειτουργία, είτε σε διαταραχές της ποιότητας του σπέρματος. Για τη διάγνωση είναι σημαντικό το ιατρικό ιστορικό, το σεξουαλικό, οικογενειακό και κοινωνικό ιστορικό καθώς και το ιστορικό πρόσληψης φαρμάκων όπως αναβολικά στεροειδή, σπιρονολακτόνη, αναστολείς ιόντων ασβεστίου και χημειοθεραπευτικά φάρμακα που επηρεάζουν την ποιότητα του σπέρματος. Στο ιατρικό ιστορικό περιλαμβάνονται συστηματικά νοσήματα που προκαλούν υπογονιμότητα όπως ο σακχαρώδης διαβήτης, η ηπατική και νεφρική ανεπάρκεια και η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια. Οποιαδήποτε συστηματική νόσος καθώς επίσης ιστορικό καρκίνου με ακτινοθεραπεία και χημειοθεραπεία πρέπει να καταγράφεται. Το σεξουαλικό ιστορικό είναι σημαντικό και θα πρέπει να εστιάζεται σε ερωτήσεις που αφορούν την σεξουαλική λειτουργία όπως η δυσλειτουργία στύσης, αλλαγές στην λίμπιντο, σεξουαλική ανικανότητα και η παρουσία ή μη νυχτερινών και πρωινών στύσεων. Επίσης οποιοδήποτε ιστορικό τραυματισμού, παρουσίας συμπτωμάτων από το ουροποιητικό (π.χ. δυσουρία) και έκθεση σε τοξικούς παράγοντες και ακτινοβολία θα πρέπει να καταγράφονται (28, 29).

Η φυσική εξέταση περιλαμβάνει την επισκόπηση για δευτερεύοντα χαρακτηριστικά του φύλου, υπερτρίχωση και γυναικομαστία όπως επίσης ψηλάφηση του οσχέου, των όρχεων, της επιδιδυμίδας, του σπερματικού τόνου και πόρου και του πέους (28, 29)..

Ο κυριότερος διαγνωστικός έλεγχος για την ανδρική υπογονιμότητα είναι το σπερμοδιάγραμμα. Οι παράμετροι του σπέρματος που εξετάζονται είναι: ο όγκος, η συγκέντρωση, ο ολικός αριθμός σπέρματος, η μορφολογία, η κινητικότητα και η ζωτικότητα

(29). Σε περίπτωση διαταραχών στο σπερμοδιάγραμμα συνίσταται επανάληψη του σε 3 μήνες καθ' ότι η σπερματογένεση διαρκεί περίπου 72 μέρες. Σε περίπτωση υποψίας υπογοναδισμού συστήνεται η μέτρηση πρωινών τιμών ολικής και ελεύθερης τεστοστερόνης, LH και FSH. Εφ' όσον διαπιστωθεί υπογοναδισμός, μπορεί να αντιμετωπιστεί με επιτυχία με φαρμακευτική υποκατάσταση. Η δοκιμασία διεισδυτικότητας του σπέρματος δεν συνίσταται να γίνεται σαν έλεγχος ρουτίνας καθώς δεν επηρεάζει την αντιμετώπιση (20).

Καρυότυπος στον άντρα συνίσταται σε περίπτωση σοβαρής ολιγοσπερμίας, και στα δύο φύλα σε περίπτωση καθ' έξιν αποβολών και στη γυναίκα σε περίπτωση πρώιμης ωθητικής ανεπάρκειας. Επίσης σύμφωνα με τις οδηγίες από την Αμερικάνικη Γυναικολογική Εταιρία ο έλεγχος για κυστική ίνωση θα πρέπει να γίνεται σε όλα τα ζευγάρια που επιθυμούν προγεννητικό έλεγχο ανεξαρτήτως ιστορικού.

Στην αντιμετώπιση της υπογονιμότητας που οφείλεται σε ανδρικό παράγοντα η θεραπεία βασίζεται στο αίτιο της υπογονιμότητας. Προτείνεται διακοπή του καπνίσματος και μείωση της πρόσληψης αλκοόλ καθώς επίσης αποφυγή αύξησης της θερμοκρασίας στους όρχεις από ζεστά ντουζ και σάουνα. Ορμονική θεραπεία με GnRH ή ανθρώπινες ανασυνδυασμένες γοναδοτροπίνες χρησιμοποιούνται με επιτυχία σε υπογοναδοτροπικό υπογοναδισμό (29). Χειρουργική θεραπεία συστήνεται σε συγκεκριμένες καταστάσεις όπως σε απόφραξη των σπερματικών πόρων, στην κρυψορχία και στην κιρσοκήλη (28-29). Όταν ανευρίσκονται αντισπερμικά αντισώματα συστήνεται εξωσωματική γονιμοποίηση ή ICSI. Η φαρμακευτική θεραπεία με ταμοξιφένη, γοναδοτροπίνες, κιτρική κλομιφαίνη και στεροειδή δεν φαίνεται είναι αποτελεσματική στο να βελτιώνει την ποιότητα του σπέρματος ή να βελτιώνει τα ποσοστά των κυήσεων (30). Δεν υπάρχουν επαρκή δεδομένα που να στηρίζουν την άποψη ότι η πρόσληψη αντιοξειδωτικών βελτιώνει τα ποσοστά γέννησης ζώντος νεογνού (31). Η χορήγηση ουμπικινόλης έχει παρατηρηθεί ότι βελτιώνει παραμέτρους του σπέρματος όπως η κινητικότητα και η μορφολογία (32). Επίσης, σε περιπτώσεις δυσλειτουργίας στύσεως χρησιμοποιούνται αναστολείς της φωσφοδιεστεράσης τύπου 5 (29). Όταν υπάρχει αποτυχία στύσεως, προτείνεται ενδομήτρια σπερματέγχυση, εξωσωματική γονιμοποίηση ή ISCI (28-29). Σε πρωτοπαθή δυσλειτουργία των όρχεων και αποφρακτική αζωοσπερμία, προτείνονται επίσης θεραπείες υποβοηθούμενης αναπαραγωγής όπως οι παραπάνω και επιπλέον έκπλυση σπέρματος και μεταφορά γαμετών διαμέσου σαλπίγγων (20,33).

## 4.2.6 Παράγοντες υπογονιμότητας και στα δύο φύλα

### 4.2.6.1 Διαιτητικοί παράγοντες

Τόσο η μεγάλη απώλεια βάρους που σχετίζεται με νευρική ανορεξία όσο και η μεγάλη πρόσληψη βάρους που σχετίζεται με βουλιμία προκαλούν υπογονιμότητα αφού ασκούν ανασταλτική δράση στον υποθάλαμο με ανωθυλακιορρηξία και ολιγομηνόρροια ή αμηνόρροια. Επιπλέον, η παχυσαρκία έχει συσχετιστεί με χαμηλή ποιότητα σπέρματος (21).

### 4.2.6.2 Άσκηση

Η υπερβολική άσκηση ή και ο πρωταθλητισμός μπορεί να προκαλέσει υποθαλαμικού τύπου αμηνόρροια με ανωθυλακιορρηξία (21).

### 4.2.6.3 Κάπνισμα και χρήση ουσιών

Ο χρόνιος αλκοολισμός στους άνδρες παρεμποδίζει τη σύνθεση της τεστοστερόνης και έχει επιπτώσεις στη συγκέντρωση σπέρματος ενώ στις γυναίκες προκαλεί διαταραχές της ωθυλακιορρηξίας με αποτέλεσμα υπογονιμότητα (34). Η χρήση ουσιών όπως η ηρωίνη, η κοκαΐνη και η μαριχουάνα ασκούν ανασταλτική δράση στην υπόφυση στις γυναίκες προκαλώντας έτσι ωθητική δυσλειτουργία (34). Το κάπνισμα φαίνεται ότι προκαλεί υπογονιμότητα και στα δύο φύλα. Στις γυναίκες, οι χημικές ουσίες του καπνού ασκούν τοξική δράση στους κροσσούς των ωαγωγών και εμποδίζουν τη μεταφορά σπέρματος διαμέσου τους (35). Στους άνδρες τα χημικά συστατικά του καπνού παρεμποδίζουν τη σπερματογένεση (35).

### 4.2.6.4 Διερεύνηση της υπογονιμότητας

Η φυσική εξέταση και το ιστορικό παραμένει ο ακρογωνιαίος λίθος για τη διάγνωση της υπογονιμότητας. Το ιατρικό ιστορικό, το μαιευτικό και γυναικολογικό ιστορικό, το σεξουαλικό και οικογενειακό ιστορικό καθώς και οι καθημερινές συνήθειες είναι εξαιρετικά σημαντικοί παράγοντες που κατευθύνουν σε ένα μεγάλο ποσοστό τη διάγνωση κα τη σωστή αντιμετώπιση. Παράγοντες καθοριστικοί για τη διάγνωση και την αντιμετώπιση της υπογονιμότητας είναι η ηλικία της γυναίκας, το είδος της υπογονιμότητας-πρωτοπαθής ή δευτεροπαθής-και η διάρκεια της υπογονιμότητας.

### 4.2.6.5 Διαγνωστικές εξετάσεις

Για την αρχική διερεύνηση του υπογόνιμου ζευγαριού είναι απαραίτητο να γίνουν οι ακόλουθες εξετάσεις:

- Το ιστορικό της εμμήνου ρύσεως και συγκεκριμένα: τα επίπεδα της προγεστερόνης την 21<sup>η</sup> ημέρα του κύκλου και η εξέταση στα ούρα για την αιχμή της LH πριν την

ωορρηξία προκειμένου να εξεταστεί η λειτουργία των ωοθηκών και η δεκτικότητα του ενδομητρίου για την εμφύτευση.

- Τα επίπεδα της FSH και της LH την 3<sup>η</sup> ημέρα του κύκλου για ελεγχθούν οι ωοθηκικές εφεδρείες. Αυτή η εξέταση μπορεί να γίνει μετά από διέγερση με κιτρική κλομιφένη.
  - Υστεροσαλπιγγογραφία για τον έλεγχο της βατότητας των ωαγωγών
  - Σπερμοδιάγραμμα (για τον ανδρικό παράγοντα υπογονιμότητας)
- (NICE GUIDELINES 2013)

#### 4.2.7 Περαιτέρω έλεγχος σε επιλεγμένα υπογόνιμα ζευγάρια

Το διακολπικό και διακοιλιακό υπερηχογράφημα χρησιμοποιείται για να αποκαλύψει παθολογία από τη μήτρα ή τις ωοθήκες όπως λειομυώματα ή κύστεις. Επίσης γίνεται έλεγχος για αντισώματα για χλαμύδια, που είναι μια απλή και φθηνή μέθοδος η οποία είναι προγνωστική για νόσο στις σάλπιγγες (20). Σε υποψία παθολογίας από τη μήτρα προτείνεται η υστεροηχογραφία. Πρόκειται για μια εξέταση με την οποία γίνεται έγχυση φυσιολογικού υγρού διαμέσου ενός καθετήρα στην ενδομητρια κοιλότητα και ακλουθεί απεικόνιση της ενδομητριας κοιλότητας με υπέρηχο (36). Επιπλέον, η φαλλοσκόπηση είναι μια νέα μέθοδος διακολπικής ενδοσκόπησης με την οποία εκτελείται άμεση ενδοσκόπηση της κοιλότητας των σαλπίγγων κατά την οποία είναι δυνατόν να διενεργηθεί και διάνοιξη των σαλπίγγων (TFTD) με ενθαρρυντικά αποτελέσματα σε υπογονιμότητα σαλπιγγικού παράγοντα (37).

##### 4.2.7.1 Λαπαροσκόπηση

Η λαπαροσκόπηση που μπορεί να είναι διαγνωστική και θεραπευτική, εκτελείται για τη διάγνωση παθολογίας του περιτοναίου όπως η ενδομητρίωση (38) . Κατά τη λαπαροσκόπηση είναι δυνατή η επισκόπηση της επιφάνειας της μήτρας, του χώρου του Retzius, του δουγλασείου και των εξαρτημάτων. Με τη χορήγηση δια του τραχηλικού στομίου σκιαγραφικού είναι δυνατόν να ελεγχθεί η βατότητα των σαλπίγγων οπότε και δεν είναι απαραίτητη η διεξαγωγή υστεροσαλπιγγογραφίας. Θεωρείται μέθοδος εκλογής για τον έλεγχο της βατότητας των σαλπίγγων (38, 39) . Επίσης, είναι μέθοδος διάγνωσης και θεραπείας της ενδομητρίωσης καθώς επίσης δίνει τη δυνατότητα για λύση συμφύσεων και ουλώδους ιστού βελτιώνοντας με αυτό τον τρόπο τη γονιμότητα (38-40).

#### **4.2.8 Υστεροσκόπηση**

Η υστεροσκόπηση είναι μια μέθοδος που επιτρέπει τον έλεγχο υπό άμεση όραση της ενδομήτριας κοιλότητας και μπορεί να είναι διαγνωστική αλλά και θεραπευτική (21). Με την υστεροσκόπηση είναι δυνατόν να ελεγχθούν τα στόμια των σαλπίγγων και να αναδειχθεί παθολογία στην ενδομήτρια κοιλότητα όπως συμφύσεις (σ. Asherman), ενδομήτριοι πολύποδες και υποβλεννογόνια ινομυώματα τα οποία παρεμποδίζουν την εμφύτευση (21). Η διάγνωση και ακολούθως η αφαίρεσή τους υστεροσκοπικά βελτιώνει σημαντικά τη γονιμότητα (41).

#### **4.2.9 Έλεγχος τραχηλικής βλέννης**

Ο έλεγχος τραχηλικής βλέννης (post-coital test), είναι μια μέθοδος ελέγχου του τραχηλικού παράγοντα υπογονιμότητας η οποία σύμφωνα με τις οδηγίες του NICE δεν συνίσταται πλέον να συμπεριλαμβάνεται στον έλεγχο της γονιμότητας καθώς δεν φαίνεται να μπορεί να προβλέψει τα ποσοστά της εγκυμοσύνης.

#### **4.2.10 Έλεγχος για υπογονιμότητα ωοθηκικού παράγοντα**

Για τον έλεγχο του ωοθηκικού παράγοντα υπογονιμότητας υπάρχουν διαθέσιμες εξετάσεις που έχουν ως σκοπό να ελέγξουν τις ωοθηκιές εφεδρείες τόσο σε ποιότητα όσο και σε ποσότητα. Η ηλικία της γυναίκας είναι καθοριστικός παράγοντας για την ωοθηκική λειτουργία (42). Με την πάροδο της ηλικίας υπάρχει μείωση των ωοθηκιών εφεδρειών. Ωστόσο, για τον έλεγχο της ωοθηκικής εφεδρείας υπάρχει πλήθος από διαθέσιμα τεστ, χωρίς να είναι κανένα από αυτά ιδανικό.

#### **4.2.11 Μέτρηση της ωοθηκικής εφεδρείας**

Προκειμένου να αξιολογηθεί η ωοθηκική εφεδρεία προτείνονται οι παρακάτω δοκιμασίες ιδιαίτερα σε γυνάικες άνω των 35 ετών (20, 43, 44):

- Μέτρηση της αντιμυλλέρειου ορμόνης (AMH)
- Μέτρηση της FSH και της ινχιμπίνης B την 3<sup>η</sup> ημέρα της περιόδου
- Μέτρηση της προγεστερόνης την 21<sup>η</sup> ημέρα του κύκλου για να διαπιστωθεί η ωορρηξία
- Διακολπικό υπερηχογράφημα για τη μέτρηση του αριθμού των ωοθηλακίων με άντρο (AFC) και για να διαπιστωθεί η ωορρηξία (σε διαδοχικά υπερηχογραφήματα)
- Όγκος των ωοθηκών. Η μείωση των ωοθηκιών εφεδρειών σχετίζεται με μείωση του όγκου των ωοθηκών.

- Έλεγχος μετά από διέγερση με κιτρική κλομιφαίνη
- Έλεγχος θυρεοειδικής λειτουργίας

### 4.3 Αντιμετώπιση της υπογονιμότητας

Η αντιμετώπιση της υπογονιμότητας πρέπει να εξατομικεύεται και να γίνεται βάσει θεραπευτικού πλάνου ανάλογα με την ηλικία της γυναίκας και τα ευρήματα από τον κλινικοεργαστηριακό έλεγχο και τη φυσική εξέταση. Βάσει των παραπάνω, η θεραπεία πρέπει να περιλαμβάνει τα εξής:

- Άλλαγή των καθημερινών συνηθειών, διακοπή του καπνίσματος και της λήψης αλκοόλ, υγιεινός τρόπος διατροφής με προσαρμογή του BMI στο 20-25 (20).
- Σεξουαλικές επαφές 2-3 φορές την εβδομάδα (20).
- Σε ανδρικό παράγοντα υπογονιμότητας προτείνεται απευθείας ως θεραπεία η εξωσωματική γονιμοποίηση (29).
- Θεραπεία τραχηλίτιδος με αντιβιοτική αγωγή και ενδομήτρια σπερματέγχυση είναι η ενδεδειγμένη θεραπεία εφόσον υπάρχει τραχηλικός παράγοντας υπογονιμότητας (20).
- Σε υπογονιμότητα που οφείλεται σε παθολογία μήτρας προτείνεται αιτιολογική αντιμετώπιση όπως για παράδειγμα υστεροσκοπική συμφυσιόλυση σε σ. Asherman, αφαίρεση υποβλεννογονίου ινομυώματος και χειρουργική θεραπεία για ανωμαλίες μήτρας όπως η διαφραγματοφόρος μήτρα (20).
- Υπάρχει πλήθος επεμβατικών θεραπειών για την αντιμετώπιση του σαλπιγγικού παράγοντα υπογονιμότητας. Η λαπαροσκόπηση με την εκτέλεση διαφόρων τεχνικών όπως ο ηλεκτροκαυτηριασμός και το laser για τη λύση συμφύσεων και την αφαίρεση ενδομητριωσικών εστιών στο περιόναιο χρησιμοποιείται ευρέως για την αντιμετώπιση αυτού του τύπου της υπογονιμότητας. Για περιπτώσεις που η απόφραξη είναι στο εγγύς τμήμα των ωαγωγών συστήνεται η εκλεκτική σαλπιγγογραφία με καθετηριασμό των ωαγωγών. Εναλλακτικά ο καθετηριασμός των ωαγωγών μπορεί να γίνει υστεροσκοπικά. Σε απόφραξη των ωαγωγών που αφορά το άπω τμήμα συστήνεται πλαστική των κροσσών και νεοσαλπιγοστομία που αφορά πλαστική των σαλπίγγων δημιουργώντας νέο άνοιγμα των σαλπίγγων στο απότερο τους σημείο (45).
- Για υπογονιμότητα που οφείλεται σε παράγοντες από τις ωοθήκες υπάρχουν διαφορετικοί τρόποι αντιμετώπισης ανάλογα με το αίτιο. Σε σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών προτείνεται καταρχήν απώλεια βάρους, δίαιτα με χαμηλό γλυκαιμικό

δείκτη, ευαισθητοποιητές της ινσουλίνης (glucophage), διέγερση ωοθηκών με κιτρική κλομιφαίνη, GnRH ανάλογα και hMGs καθώς επίσης χειρουργική αντιμετώπιση (ovarian drilling) (20, 46). Σε περίπτωση αποτυχίας των παραπάνω μεθόδων προτείνεται η ως θεραπευτική επιλογή η εξωσωματική γονιμοποίηση (20, 46).

#### 4.4 Ιατρικώς Υποβοηθούμενη Αναπαραγωγή (MAR)

Στην ιατρικώς υποβοηθούμενη αναπαραγωγή (MAR) εφαρμόζονται πλήθος από τεχνικές που σκοπό έχουν να βοηθήσουν το υπογόνιμο ζευγάρι στην αγωνιώδη του προσπάθεια να δημιουργήσει απογόνους. Τεχνικές όπως η εξωσωματική γονιμοποίηση που εφαρμόστηκε για πρώτη φορά το 1978 και η νεότερη σπερματέγχυση με την προεμφυτευτική διάγνωση και screening έχουν συμβάλλει σημαντικά στην καταπολέμηση της υπογονιμότητας. Άλλες μέθοδοι όπως η δωρεά γαμετών ή εμβρύων καθώς επίσης και η παρένθετη μητρότητα έχουν κερδίσει αρκετό έδαφος στην αντιμετώπιση της υπογονιμότητας τα τελευταία χρόνια.

Υπάρχουν διαφορετικές τεχνικές διαθέσιμες και διαφορετική νομοθεσία σε κάθε χώρα με κανόνες άλλοτε αυστηρούς και άλλοτε λιγότερα αυστηρούς. Ένας από τους λόγους που έχει αναπτυχθεί ιατρικός τουρισμός στον τομέα της ιατρικώς υποβοηθούμενης αναπαραγωγής είναι η ευνοϊκότερη νομοθεσία σε μεθόδους όπως η κατάψυξη ωαρίων ή ο αριθμός των εμβρύων που πρόκειται να τοποθετηθούν.

#### 4.5 Τεχνικές της ιατρικώς υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (MAR)

##### 4.5.1 Ενδομήτρια σπερματέγχυση

Η ενδομήτρια σπερματέγχυση είναι η έγχυση διαμέσου του τραχήλου σπέρματος χρησιμοποιώντας καθετήρα μικρής διαμέτρου. Προτείνεται σε ζευγάρια όπου η γυναίκα πάσχει από υπογονιμότητα τραχηλικού παράγοντα, σε μετρίου βαθμού ανδρική υπογονιμότητα, σε διαταραχές ωοθυλακιορρηξίας, σε μετρίου ή σοβαρού βαθμού ενδομητρίωση και σε ανεξήγητη υπογονιμότητα (46). Επίσης σε ομόφυλα ζευγάρια και σε ζευγάρια που υπάρχει φυσική ή ψυχική ανικανότητα για συνεύρεση (20).

##### 4.5.2 Εξωσωματική γονιμοποίηση

###### 4.5.2.1 *Oρισμός-στάδια*

Η εξωσωματική γονιμοποίηση ως μέθοδος ιατρικώς υποβοηθούμενης αναπαραγωγής έχει εισαχθεί από το 1978 και από τότε είναι όλο και πιο δημοφιλής ανάμεσα στα υπογόνιμα ζευγάρια με εκατομμύρια παιδιών να έρχονται στον κόσμο με εγκυμοσύνες μετά από IVF κάθε χρόνο. Παρά τις τεράστιες εξελίξεις από τη σύλληψή του, τόσο κλινικά όσο και

εργαστηριακά, η εξωσωματική γονιμοποίηση ακόμα συνδέεται με σημαντικό συναισθηματικό, φυσικό και οικονομικό φορτίο για τα εμπλεκόμενα ζευγάρια και οι συνεχιζόμενες προσπάθειες της επιστημονικής έρευνας έχουν ως σκοπό να βελτιώσουν την τεχνική της IVF και να αυξήσουν τα ποσοστά επιτυχίας, τα οποία παραμένουν στάσιμα και περιορισμένα. Τα τελευταία χρόνια η έρευνα έχει επικεντρωθεί στην ανεύρεση δεικτών που να μπορούν να προβλέψουν την έκβαση της κύησης με σκοπό να διαχωρίσουν τα ζευγάρια σε αυτά με υψηλές και σε εκείνα με χαμηλές πιθανότητες για επιτυχείς κυήσεις, έτσι ώστε να είναι εφικτές εξατομικευμένες θεραπείες.

Η εξωσωματική γονιμοποίηση είναι η γονιμοποίηση έξω από τη μήτρα ωαρίων που λαμβάνονται από τις ωοθήκες μετά από διέγερση με σπερματοζωάρια στο εργαστήριο και μεταφορά του εμβρύου στην ενδομήτρια κοιλότητα για να εμφυτευθεί. Εμπεριέχει τα εξής στάδια (NICE GUIDELINES 2013):

- Ωοθηκική διέγερση
- Οωληψία
- Κατηγοριοποίηση των ωοκυττάρων
- Προετοιμασία του σπέρματος
- Γονιμοποίηση του ωαρίου
- Καλλιεργεία του εμβρύου
- Εμβρυομεταφορά

#### **4.5.2.2 Ενδείξεις για εξωσωματική γονιμοποίηση**

Οι ενδείξεις προκειμένου να υποβληθεί ένα ζευγάρι σε εξωσωματική γονιμοποίηση είναι (20, 21):

- Υπογόνιμότητα που έχει σαν αίτιο το σαλπιγγικό παράγοντα
- Αμφοτερόπλευρη σαλπιγγεκτομή (έκτοπος κύηση)
- Σε αγενεσία ή τραυματισμό των ωαγωγών
- Ανατομικές ανωμαλίες της μήτρας (μονόκερως μήτρα)
- Υπογονιμότητα που οφείλεται σε παράγοντα από τη μήτρα (σύνδρομο Asherman)
- Περιτοναϊκός παράγοντας (συμφύσεις στην πύελο, σοβαρού βαθμού ενδομητρίωση μη ανταποκρινόμενη στη φαρμακευτική ή χειρουργική αγωγή)
- Πρόωρη ωοθηκική ανεπάρκεια ή μειωμένες ωοθηκικές εφεδρείες
- Ωοθηκική ανεπάρκεια μετά από ακτινοβολία ή χημειοθεραπεία

- Αμφοτερόπλευρη ωοθηκεκτομή
- Σε διάφορα σύνδρομα που έχουν σαν αποτέλεσμα γοναδική δυσγενεσία
- Υπογονιμότητα που έχει σαν αίτιο παράγοντες ανοωθυλακιορηξίας
- Ανεξήγητη υπογονιμότητα
- Υπογονιμότητα ανδρικού παράγοντα

#### **4.5.2.3 Διέγερση ωοθηκών**

Στην επιτυχία της εξωσωματικής γονιμοποίησης έχει σημασία η ηλικία της γυναίκας και ο αριθμός των ωαρίων που εμφυτεύονται στη μήτρα. Σε κάθε κύκλο ωορρηξίας ρήγνυται μόνο ένα ωάριο για αυτό και συνήθως οι κλινικοί γιατροί επιλέγουν μεθόδους διέγερσης των ωοθηκών προκειμένου να έχουν στη διάθεση τους περισσότερα του ενός ωάρια για εμφύτευση έχοντας με αυτό τον τρόπο μεγαλύτερες πιθανότητες επιτυχίας.

Τα πρωτόκολλα διέγερσης στην εξωσωματική γονιμοποίηση περιλαμβάνουν τρία κυρίως στάδια (20, 48):

1. Την πρόληψη της αιχμής της LH με τη χρήση GnRH αγωνιστών και GnRH ανταγωνιστών
2. Τη διέγερση της ανάπτυξης πολλών ωαρίων με εξωγενή χορήγηση προϊόντων της FSH ή με τη χορήγηση κιτρικής κλομιφαίνης +/- με πρωτόκολλο χορήγησης hMG ή ταμοξιφαίνης.
3. Έναρξη της ωορρηξίας με τη χρήση ανθρώπινης χοριακής γοναδοτροπίνης με σκοπό την τελική ωρίμανση των ωοθυλακίων και την ωορρηξία.

Ο εξατομικευμένος σχεδιασμός της εξωσωματικής γονιμοποίησης εγγυάται καλύτερα αποτελέσματα αλλά και με μεγαλύτερη ασφάλεια για τον ασθενή (49).

#### **4.5.2.4 Πρωτόκολλα διέγερσης**

##### **4.5.2.4.1 Βραχέα Πρωτόκολλα**

Στα βραχέα πρωτόκολλα η χορήγηση των φαρμάκων αρχίζει στην αρχή της εμμήνου ρύσεως. Για τη διέγερση χρησιμοποιείται FSH ή hMG ενώ για την απευαισθητοποίηση της υπόφυσης χρησιμοποιούνται GnRH αγωνιστές ή GnRH ανταγωνιστές οι οποίοι μπλοκάρουν άμεσα τον άξονα της υπόφυσης για αυτό και προτιμώνται στο βραχύ πρωτόκολλο (48).

#### 4.5.2.4.2 Μακρά πρωτόκολλα

Στα μακρά πρωτόκολλα η χορήγηση των φαρμάκων αρχίζει στην αρχή της εμμήνου ρύσεως πριν τον κύκλο της IVF, Χορηγούνται GnRH αγωνιστές ή GnRH ανταγωνιστές ή αντισυλληπτικά δισκία (48).

#### 4.5.2.4.3 Ασθενείς με φτωχή ανταπόκριση στα πρωτόκολλα διέγερσης των ωοθηκών

Ασθενείς με φτωχή ανταπόκριση στα πρωτόκολλα διέγερσης είναι ασθενείς που αποτυγχάνουν να παράγουν τον καλύτερο δυνατό αριθμό ωαρίων (μεγαλύτερο ίσο των τριών ωαρίων με διάμετρο μεγαλύτερο ίσο των 18 mm). Με βάση τα κριτήρια της Μπολόνια τα οποία καθορίστηκαν από την ESHRE, για το χαρακτηρισμό μιας ασθενούς ως φτωχής ανταποκρίτριας θα πρέπει να ισχύουν 2 από τα τρία παρακάτω κριτήρια: α. προχωρημένη ηλικία της γυναίκας β. ιστορικό φτωχής ανταπόκρισης γ. μη φυσιολογικό τεστ ωοθηκικής εφεδρείας (50).

#### 4.5.2.4.4 Ωοληψία

Η ωοληψία πραγματοποιείται 34-36 ώρες μετά τη χορήγηση της hCG. Σήμερα, η ωοληψία γίνεται διακολπικά με τη βιόθεια υπερήχου στα περισσότερα προγράμματα εξωσωματικής γονιμοποίησης. Μετά τη λήψη του ωοθηκικού υγρού το υλικό αποστέλλεται άμεσα στο εργαστήριο (51).

#### 4.5.2.4.5 Κατηγοριοποίηση των ωοκυττάρων

Με τη μεταφορά των ωοκυττάρων στο εργαστήριο είναι δυνατή η κατηγοριοποίησή τους σε εκείνα που είναι στην πρόφαση (με βλαστικό κυστίδιο) ή στη μετάφαση II (με πολικό σωμάτιο), οπότε και καθορίζεται ο χρόνος της επώασης. Τα ωοκύτταρα που βρίσκονται σε ατρησία θα πρέπει να είναι λιγότερο από 15% του δείγματος των ωοκυττάρων που συλλέγεται (51).

#### 4.5.2.4.6 Προετοιμασία του σπέρματος-γονιμοποίηση του ωαρίου

Το σπέρμα συλλέγεται λίγο πριν την ωοληψία (μετά από 5 ημέρες σεξουαλικής αποχής) και υπόκειται σε επεξεργασία αφαιρώντας μερικά συστατικά της εκσπερμάτισης όπως σπερματικό υγρό και λευκοκύτταρα. Στη συνέχεια το δείγμα φυγοκεντρείται και γίνεται επώαση σε ατμόσφαιρα διοξειδίου του άνθρακα 5% για μια ώρα. Για την εξωσωματική γονιμοποίηση, απαιτείται συνολικός αριθμός 200000 σπέρματος σε καλλιεργητικό μέσο μαζί με τα ωάρια (52).

#### 4.5.2.4.7 Καλλιέργεια του εμβρύου

Η επώαση των γονιμοποιημένων ωαρίων γίνεται σε ατμόσφαιρα διοξειδίου του άνθρακα 5% σε αέρα με 98% υγρασία. Δεκαοκτώ ώρες μετά την ένωση του ωαρίου με το σπέρμα επιβεβαιώνεται η γονιμοποίηση με την παρουσία μέσα στο ζυγώτη δύο προπυρήνων και την εξώθηση του δεύτερου πολικού σωματίου. Στη συνέχεια μεταφέρονται τα γονιμοποιημένα έμβρυα σε καλλιεργητικό μέσο και μετά σε επωαστή. Οποιαδήποτε αξιολόγηση γίνεται 24 ώρες μετά. Σε 36-48 ώρες μετά τη γονιμοποίηση δημιουργείται το προέμβρυο 4-8 κυττάρων. Τα βλαστομερίδια διαιρούνται κάθε 12-14 ώρες, οπότε και το έμβρυο 8 κυττάρων δημιουργείται 72 ώρες μετά τη γονιμοποίηση. Τα έμβρυα που βρίσκονται στο στάδιο της αυλάκωσης (cleavage stage) είναι τα έμβρυα που είναι μεταξύ 2 και 4 ημερών. Το στάδιο της βλαστοκύστης γίνεται τη 5<sup>η</sup> ημέρα μετά τη γονιμοποίηση και η εμφύτευση αναμένεται να γίνει την 7<sup>η</sup> ημέρα (20, 53).

Η μέθοδος “hatching” αναφέρεται στη διαδικασία κατά την οποία γίνεται χημική ή μηχανική σχάση της διαφανούς ζώνης στο έμβρυο 3<sup>ης</sup> ημέρας ούτως ώστε να βοηθήσει το έμβρυο να εκκολαφθεί από τη ζώνη και να εμφυτευθεί στο ενδομήτριο και μιμείται τη φυσική διαδικασία της εκκόλαψης. Σύμφωνα με τις οδηγίες NICE 2013 δεν προτείνεται καθώς δεν φαίνεται να αυξάνει τα ποσοστά κυήσεων.

#### 4.5.2.4.8 Εμβρυομεταφορά

Όταν το έμβρυο φτάσει στο στάδιο 8-16 κυττάρων, δηλαδή 72 ώρες μετά τη γονιμοποίηση στο στάδιο της αυλάκωσης πραγματοποιείται η εμβρυομεταφορά. Επίσης η εμβρυομεταφορά μπορεί να πραγματοποιηθεί και στο στάδιο της βλαστοκύστης, την 5<sup>η</sup> ημέρα κατά την οποία μπορεί να γίνει προεμφυτευτική γενετική διάγνωση ή μεταφορά μιας βλαστοκύστης προκειμένου να αποφευχθεί η πολύδυμη κύηση. Η εμβρυομεταφορά γίνεται με τη βοήθεια υπερήχου δια του τραχήλου. Το πάχος του ενδομητρίου θα πρέπει να είναι 5 mm και το έμβρυο ή τα έμβρυα τοποθετούνται στο μέσο της κοιλότητας του ενδομητρίου, 1-2 cm μακριά από το θόλο της μήτρας (54, 55). Ο αριθμός των εμβρύων που μεταφέρονται είναι ανάλογος της ηλικίας της γυναίκας, του αριθμού των εμβρύων από την ωληψία και της διαθεσιμότητας των εμβρύων για κρυοσυντήρηση (56). Λαμβάνοντας υπ' όψιν τις πιθανότητες για πολύδυμη κύηση, η μεταφορά των εμβρύων από τα περισσότερα κέντρα περιορίζεται στα δύο έμβρυα, υψηλής ποιότητας (20,56).

#### 4.5.2.4.9 Κρυοσυντήρηση εμβρύων

Παραπάνω έμβρυα που λαμβάνονται μπορούν να κρυοσυντηρηθούν για μελλοντική χρήση (20). Μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την κρυοσυντήρηση είναι η μέθοδος της αργής ψύξης και η υαλοποίηση οι οποίες φαίνεται να είναι αποτελεσματικοί και ασφαλείς μέθοδοι (57).

#### 4.5.2.4.10 Χειρισμός της ωχρινικής φάσεως

Προκειμένου να επιτευχθεί η μέγιστη δεκτικότητα του ενδομητρίου για εμφύτευση είναι απαραίτητη η χορήγηση προγεστερόνης για την προετοιμασία του ενδομητρίου και την υποστήριξη της ωχρινικής φάσης. Υπάρχουν διάφορες μορφές χορήγησης της προγεστερόνης όπως η ενδομυϊκή, η μορφή γέλης, η μορφή κάψουλας για από του στόματος ή για κολπική χορήγηση και η μορφή υπόθετου για ενδοκολπική χορήγηση. Σε περίπτωση κύησης, η χορήγηση προγεστερόνης θα πρέπει να συνεχίζεται μέχρι τη 12<sup>η</sup> εβδομάδα της κύησης (58). Δεν θα πρέπει να χορηγείται hCG για την υποστήριξη της ωχρινικής φάσεως λόγω του κινδύνου για σύνδρομο υπερδιέγερσης ωθηκών (58).

#### 4.5.2.4.11 Επιπλοκές της εξωσωματικής γονιμοποίησης

Οι επιπλοκές μετά από εξωσωματική γονιμοποίηση περιλαμβάνουν (59):

- Την πολύδυμο κύηση

Με τη διάδοση της εξωσωματικής γονιμοποίησης τις τελευταίες δεκαετίες αυξήθηκαν οι ιατρωγενώς πολύδυμες κυήσεις οι οποίες είναι υψηλού ρίσκου κυήσεις τόσο για τη μητέρα, όσο για τα έμβρυα. Στις πολύδυμες κυήσεις υπάρχει αυξημένη επίπτωση για συγγενείς ανωμαλίες, υπολειπόμενη ανάπτυξη, πρόωρος τοκετός και αυτόματη αποβολή αυξάνοντας την περιγεννητική νοσηρότητα. Η μητέρα μπορεί να παρουσιάσει επιπλοκές όπως προεκλαμψία, μαιευτική αιμορραγία, αναιμία και δυσκολίες στον τοκετό. Για την αποφυγή αυτών των επιπλοκών γίνεται προσπάθεια για εμβρυομεταφορά λιγότερων εμβρύων στο ενδομήτριο.

- Την έκτοπο κύηση

Η επίπτωση της εκτόπου κυήσεως στην εξωσωματική γονιμοποίηση είναι της τάξεως του 1-3%. Η απουσία ενδομήτριας κύησης και ο μη διπλασιασμός της β-HCG ανά 48 ώρες μπορεί να θέσει την υποψία για έκτοπο κύηση.

- Το σύνδρομο υπερδιέγερσης ωθηκών

Πρόκειται για ένα σύνδρομο που είναι ιατρογενής επιπλοκή της εξωσωματικής γονιμοποίησης και η επίπτωσή του είναι από 0.1-30%. Προκαλείται από διέγερση των ωθηκών η οποία μπορεί να είναι ελεγχόμενη μετά από χορήγηση hMG. Η

μείωση του ενδοαγγειακού όγκου και η μαζική συγκέντρωση υγρού στον εξωκυττάριο χώρο ως επιπλοκή από τη διαδικασία αυτή έχει σοβαρές συνέπειες όπως ηλεκτρολυτικές διαταραχές, αιμοσυμπύκνωση, ασκίτη, υδροθώρακα, διαταραχές πήξης, νεφρική ανεπάρκεια και μπορεί να οδηγήσει και στο θάνατο.

#### **4.5.2.5 Άλλες τεχνικές ιατρικώς υποβοηθούμενης αναπαραγωγής**

Εκτός από την εξωσωματική γονιμοποίηση υπάρχουν και άλλες μέθοδοι λιγότερο διαδεδομένοι όπως η λαπαροσκοπικά υποβοηθούμενη μεταφορά γαμετών (GIFT) ή ζυγώτη (ZIFT) στη σάλπιγγα που είναι όμως επεμβατικές μέθοδοι με χαμηλά ποσοστά επιτυχίας για αυτό και δεν χρησιμοποιούνται (60). Άλλες τεχνικές είναι η μέθοδος της υποβοηθούμενης εκκόλαψης (AH), η υποζωνική τοποθέτηση σπέρματοζωαρίου (SUZI) και η μερική ανατομή της ζώνης (PZD) ενώ η μέθοδος που χρησιμοποιείται περισσότερο είναι η ένεση ενός σπέρματος μέσα στο ωάριο (ICSI) (60). Η ICSI χρησιμοποιείται κυρίως σε υπογονιμότητα ανδρικού παράγοντα όπως σε αζωοσπερμία και σε χαμηλή ποιότητα σπέρματος. Παραλλαγή της μεθόδου είναι η IMSI που είναι η μορφολογικώς επιλεγμένη ένεση του σπέρματος στο ωοκύτταρο και χρησιμοποιείται σε σοβαρές μορφές ανδρικού παράγοντα υπογονιμότητας (61).

Μια νέα τεχνική που τελευταία εισήχθη στις τεχνικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής είναι η *in vitro* ωρίμανση (*in vitro* maturation IVM). Στη μέθοδο αυτή γίνεται ωοληψία ανώριμων ωοκυττάρων και γίνεται ωρίμανσή τους στο εργαστήριο οπότε και συνδυάζει λιγότερες πιθανότητες συνδρόμου υπερδιέγερσης ωοθηκών με χαμηλότερο κόστος (62). Το FET (frozen embryo transfer) είναι μια άλλη μέθοδος ιατρικώς υποβοηθούμενης αναπαραγωγής κατά την οποία πραγματοποιείται εμβρυομεταφορά αποψυγμένων εμβρύων από προηγούμενο κύκλο εξωσωματικής (21). Επιπλέον, μπορεί να γίνει εξωσωματική γονιμοποίηση με δωρεά γαμετών ή εμβρύων σε περιπτώσεις πρόωρης ωοθηκικής ανεπάρκειας, σε περιπτώσεις μειωμένων ωοθηκικών εφεδρειών, σε ασπερμία, σε ανεξήγητη υπογονιμότητα ή σε επαναλαμβανόμενες αποτυχίες εμφύτευσης (21). Η επιλογή της παρένθετης μητρότητας προτιμάται σε περιπτώσεις ανατομικών ανωμαλιών της μήτρας, υστερεκτομής ή λόγω ιατρικών ενδείξεων (21).

## 4.6 Βιολογικοί δείκτες στην κύηση

Τα τελευταία χρόνια διερευνώνται και χρησιμοποιούνται όλο και περισσότεροι βιολογικοί δείκτες που έχουν σκοπό να εντοπίζουν και να διαγνωσκούν γενετικές ανωμαλίες και σύνδρομα στα έμβρυα. Η αυξανόμενη ανάγκη για βελτίωση παροχής υπηρεσιών στην εγκυμοσύνη έχει ως αποτέλεσμα την αναζήτηση διαγνωστικών και προγνωστικών δεικτών που να είναι όσο το δυνατόν αξιόπιστοι, άμεσοι και φθηνοί. Βιοχημικοί δείκτες που έχουν χρησιμοποιηθεί με σκοπό να προβλέψουν την έκβαση της εγκυμοσύνης περιλαμβάνουν τους βιοχημικούς δείκτες στο πρώτο τρίμηνο, όπως είναι η ελεύθερη β-υπομονάδα της χοριακής γοναδοτροπίνης και η σχετιζόμενη με την κύηση πρωτεΐνη A (PAPP-A) Συνδυαζόμενοι, οι δύο παραπάνω δείκτες θεωρούνται προγνωστικοί για την αυτόματη αποβολή με ευαισθησία 83.1 %, ειδικότητα 78.7 % και θετική προγνωστική αξία 77.1 % (63). Άλλοι βιοχημικοί δείκτες που φαίνονται χρήσιμοι στο να προβλέπουν την περιγεννητική έκβαση είναι ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (Vascular endothelial growth factor - VEGF), ο πλακουντιακός αυξητικός παράγοντας και η διαλυτή ενδογλίνη [64]. Οι παραπάνω πρωτεΐνες έχουν δείξει ότι είναι ευαίσθητοι δείκτες στο να προβλέπουν την απώλεια του εμβρύου σε επίτοκες με απειλούμενη έκτρωση. Επίσης, η αντιμυλλέρειος ορμόνη που μετράται στο αίμα της μητέρας θεωρείται ότι είναι από τους σημαντικούς βιοχημικούς δείκτες με προγνωστική αξία για την κλινική εγκυμοσύνη και για την απώλεια του εμβρύου στο πρώτο τρίμηνο της κύησης (65). Στην πρόβλεψη της περιγεννητικής έκβασης είναι χρήσιμοι και ανοσολογικοί δείκτες, όπως τα ποσοστά κυττάρων φονέων (66)].

## 4.7 Το NLR ως δείκτης φλεγμονής

Ο λόγος των ουδετεροφύλων προς τα λεμφοκύτταρα (NLR) είναι ένας βιολογικός δείκτης που αντικατοπτρίζει στον οργανισμό ένα είδος χρόνιας φλεγμονής «χαμηλής βαθμίδας» (67). Έχοντας μελετηθεί σε διάφορες νόσους, όπως οι κακοήθειες και τα καρδιαγγειακά νοσήματα, η αύξησή του δηλώνει ότι ο οργανισμός βρίσκεται σε μια κατάσταση συστηματικής χρόνιας φλεγμονής κατά την οποία στρατολογούνται και αυξάνονται ελαφρώς κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος τα οποία προκαλούν μια σειρά από γεγονότα σε φαινομενικά υγιή άτομα χωρίς ένδειξη νόσου (67). Έτσι, ασθένειες που αυξάνουν τα επίπεδα των προφλεγμονώδων πρωτεΐνών και μετρίως ανεβάζουν το άθροισμα των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος αυξάνουν και το NLR το οποίο και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης «ενεργότητας» και προόδου των νόσων αυτών (67). Ως διαγνωστικό και προγνωστικό εργαλείο το NLR είναι απλό, άμεσα διαθέσιμο από μια απλή γενική αίματος

που μπορεί να γίνει από ένα οποιοδήποτε αιματολογικό εργαστήριο, είναι χαμηλού κόστους και κυρίως μη επεμβατικό. Ο υπολογισμός του γίνεται με τη διαίρεση του απόλυτου αριθμού των ουδετεροφύλων με τον απόλυτο αριθμό των λεμφοκυττάρων στο περιφερικό αίμα. Η αύξηση του NLR ως δείκτη χρόνιας συστηματικής φλεγμονής χαμηλού βαθμού φαίνεται από επιδημιολογικές μελέτες ότι παίζει ρόλο σε χρόνιες νόσους, όπως το μεταβολικό σύνδρομο, ο σακχαρώδης διαβήτης, η υπέρταση και η παχυσαρκία. Γενικά ο δείκτης αυτός δείχνει να σχετίζεται με τη δυσλειτουργία του ενδοθηλίου. Ειδικότερα, η αύξησή του στα καρδιαγγειακά νοσήματα, ως προγνωστικός δείκτης προόδου της αθηροσκληρωτικής νόσου, φαίνεται ότι προβλέπει την πρόοδο της στεφανιαίας νόσου, το έμφραγμα, ακόμα και το θάνατο του ασθενή (68, 69). Στις κακοήθειες, το αυξημένο NLR έχει δείξει να σχετίζεται με δυσμενή πρόγνωση σε μια ποικιλία από διαφορετικούς συμπαγείς όγκους όπως στον καρκίνο μαστού και στον καρκίνο παχέος εντέρου (70-77). Στη γυναικολογία, το NLR έχει βρεθεί να είναι αυξημένο στην πρόωρη ωοθηκική ανεπάρκεια και φαίνεται να έχει αρνητική συσχέτιση με την AMH και θετική συσχέτιση με την FSH και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πρώιμος προγνωστικός δείκτης του συνδρόμου (78).

Στη Μαιευτική, η δυσλειτουργία του ενδοθηλίου που παρατηρείται σε επιπλοκές και νόσους της κύησης όπως η προεκλαμψία, αποτυπώνεται με την αύξηση του NLR ως ενεργοποίηση της φλεγμονώδους διαδικασίας και διαδικασίας πήξης στον οργανισμό [79]. Ειδικότερα, επιπλοκές της κύησης όπως ο σακχαρώδης διαβήτης της κύησης, η ενδοηπατική χολόσταση της κύησης, η υπερέμεση της κύησης, το σύνδρομο υπερδιέγερσης των ωοθηκών ακόμα και ο πρόωρος τοκετός, αυξάνουν το NLR και σχετίζονται με την αύξηση του φλεγμονώδους status του οργανισμού εγκύων που πάσχουν από τις νόσους αυτές (80-86).

#### 4.7.1 Συσχέτιση του NLR με τη διείσδυση της τροφοβλάστης

Το NLR ως δείκτης περιγεννητικής έκβασης έχει μελετηθεί σε διάφορες νόσους και επιπλοκές που επηρεάζουν την έκβαση της κύησης. Ως κοινός μηχανισμός για διάφορες ασθένειες και νόσους που επηρεάζουν την περιγεννητική έκβαση και στις οποίες παρατηρείται αύξηση του NLR, θεωρείται η ανεπαρκής πλακουντοποίηση κυρίως στο πρώτο τρίμηνο της κύησης. Η δυσλειτουργία του πλακούντα που αρχίζει με την «προβληματική» εμφύτευση, έχει σαν συνέπεια διάφορες επιπλοκές, από την απώλεια του εμβρύου πολύ νωρίς στην κύηση έως τον ενδομήτριο θάνατο πολύ αργότερα ή και άλλες επιπλοκές που είναι κρίσιμες στο περιγεννητικό αποτέλεσμα, όπως για παράδειγμα η προεκλαμψία και η ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης. Στις παραπάνω περιπτώσεις μία παθολογική

απάντηση ξεκινά με την ελλειμματική εμφύτευση του εμβρύου και έχει ως αποτέλεσμα την υποξία και ισχαιμία. Σαν συνέπεια, ξεκινά η ενεργοποίηση του συμπληρώματος, το οποίο προκαλεί τη στρατολόγηση των ουδετερόφιλων κυττάρων, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα την έκκριση προφλεγμονώδων κυτοκινών όπως ο TNF-a, οι οποίες με τη σειρά τους μειώνουν τον VEGF, ένα αγγειογεννητικό παράγοντα απαραίτητο για τη διείσδυση της τροφοβλάστης (87). Το NLR ενδεχομένως αντανακλά αυτή την στρατολόγηση και ενεργοποίηση των ουδετεροφίλων τα οποία πυροδοτούν τα παραπάνω φαινόμενα και έχουν ως αποτέλεσμα ανεπιθύμητη έκβαση στην εγκυμοσύνη, όπως αυτόματη αποβολή, ενδομήτριο θάνατο ή ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης.

#### 4.7.2 Η αξιολόγηση του NLR στην κύηση

Η σπουδαιότητα του NLR ως διαγνωστικό και προληπτικό μέσο βρίσκεται σε αυτό ακριβώς το σημείο: την εντόπιση των γυναικών υψηλού κινδύνου για μαιευτικά συμβάματα και επιπλοκές της κύησης, καθώς μπορεί να ανιχνεύει στον οργανισμό αυτού του είδους τη φλεγμονή χαμηλού βαθμού. Αυτή η φλεγμονή αν ανιχνευτεί νωρίς, ενδεχομένως με τη λήψη μέτρων, να αποφευχθούν κρίσιμα για την έκβαση της κύησης γεγονότα. Στην κύηση, η οποία έχει χαρακτηριστεί ως μία κατάσταση «ελεγχόμενης φλεγμονής», παρατηρείται μια φυσιολογική λευκοκυττάρωση, ιδιαίτερα αύξηση των ουδετερόφιλων. Σημειώτεον, ο απόλυτος αριθμός των λεμφοκυττάρων μειώνεται στο πρώτο και το δεύτερο τρίμηνο, ενώ αυξάνεται στο τρίτο τρίμηνο (88). Από την άλλη μεριά, η αύξηση του NLR που συμβαίνει σε καταστάσεις συστηματικής φλεγμονής στον οργανισμό φαίνεται ότι και στην κύηση μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως προγνωστικός δείκτης για την περιγεννητική έκβαση.

#### 4.7.3 Η μελέτη του NLR σε παθολογικές καταστάσεις κύησης

Η αύξηση του NLR στην κύηση έχει μελετηθεί κυρίως στην προεκλαμψία και ιδιαίτερα στη σοβαρή προεκλαμψία (79). Προτείνεται έτσι το αυξημένο NLR να χρησιμοποιηθεί ως πρώιμος δείκτης προεκλαμψίας στο πρώτο τρίμηνο της κύησης (83). Επίσης, το υψηλό NLR φαίνεται να μπορεί να χρησιμοποιηθεί στον πρόωρο τοκετό και στο σύνδρομο υπερδιέγερσης των ωθηκών ως πρώιμος προγνωστικός δείκτης (82,83). Υψηλό NLR παρατηρείται και στο σακχαρώδη διαβήτη της κύησης γεγονός που ενδεχομένως σχετίζεται με την αύξηση του οξειδωτικού stress που προκαλεί η συγκεκριμένη νόσος (80). Επιπλέον, αυξημένο NLR έχει παρατηρηθεί στην υπερέμεση της κύησης, όπου φαίνεται να σχετίζεται με τη σοβαρότητα της (84). Σε μια προοπτική μελέτη για την ενδοηπατική χολόσταση της κύησης, το NLR λόγω της υψηλής ειδικότητάς του, προτείνεται να χρησιμοποιείται ως δείκτης προληπτικού

ελέγχου για τη νόσο αυτή (81). Ακόμα, στην τροφοβλαστική νόσο της κύησης, το NLR δείχνει να έχει προγνωστικό ρόλο για τη διείσδυση στη συγκεκριμένη νόσο (86). Τέλος, στην οξεία σκωληκοειδίτιδα στην κύηση το NLR συνδυαζόμενο με άλλο ένα δείκτη μπορεί να διαγνώσει τη νόσο με 90,4% ακρίβεια ενώ στην οξεία παγκρεατίτιδα στην κύηση το NLR μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν πρώιμος δείκτης της νόσου (89,90).

#### 4.7.4 Προγνωστικοί δείκτες στην υποβοηθούμενη αναπαραγωγή

Η υποβοηθούμενη αναπαραγωγή, παρά τις αλματώδεις εξελίξεις από την αρχή της σύλληψής του, συσχετίζεται ακόμα με σημαντικό συναισθηματικό, σωματικό και οικονομικό φορτίο για τα ζευγάρια που το επιχειρούν. Για αυτό το λόγο, η συνεχιζόμενη έρευνα στον τομέα αυτό εστιάζεται στη βελτίωση των τεχνικών υποβοηθούμενης αναπαραγωγής και ποσοστών επιτυχίας. Επίσης υπάρχει όλο και μεγαλύτερη ανάγκη ανεύρεσης προγνωστικών δεικτών για την έκβαση της κύησης έτσι ώστε να γίνει διακριθούν τα ζευγάρια σε εκείνα με υψηλά και σε εκείνα με χαμηλά ποσοστά επιτυχίας της εγκυμοσύνης με σκοπό να ανοίξουν το δρόμο για εξατομικευμένες θεραπευτικές προσεγγίσεις.

Στην εξωσωματική γονιμοποίηση οι προγνωστικοί δείκτες μπορούν να διακριθούν σε εκείνους που αφορούν ιστούς και σε εκείνους που έχουν να κάνουν με τον ορό. Ανάμεσα στους ιστικούς δείκτες που έχουν μελετηθεί είναι η δυσμορφολογία της διαφανής ζώνης των οωκυττάρων γεγονός που έχει συσχετιστεί με φτωχή έκβαση της εξωσωματικής γονιμοποίησης. Άλλοι δείκτες που έχουν συσχετιστεί με επιτυχείς κυήσεις είναι τα επίπεδα στο θυλακικό υγρό του ινωδογόνου, της 1-αντιθρυψίνης, της οιστραδιόλης, του κυκλικού AMP (91), την έκφραση του HLA-G καθώς και την παρουσία των μητρικών φυσικών κυττάρων φονέων CD56+ στο ενδομήτριο (92).

Όσον αφορά τους δείκτες στον ορό, η β-HCG την 11<sup>η</sup>-12<sup>η</sup> ημέρα μετά την εμβρυομεταφορά φαίνεται να μπορεί να διακρίνει τις βιώσιμες κυήσεις από τις μη βιώσιμες (93-96) έχοντας καλύτερα αποτελέσματα από την οιστραδιόλη και την ινχιμπίνη όταν μετρώνται στην ίδια φάση. Σε άλλη μελέτη, ο συνδυασμός οιστραδιόλης και λεπτίνης έδειξε ότι και οι δύο δείκτες σχετίζονται με την ποιότητα του εμβρύου και με τα ποσοστά της εμφύτευσης (97).

Η αντιμυλλέρειος ορμόνη (AMH), ο καθρέπτης της ωοθηκικής επάρκειας, όταν μετράται μόνος ή μαζί με το άθροισμα των ωοθυλακίων του άντρου, έχει δειχθεί ότι μπορεί να προβλέψει με παρόμοιο βαθμό ακρίβειας τα ποσοστά κυήσεων και τα ποσοστά γέννησης

ζώντος νεογνού μετά από κυήσεις από IVF (98-103). Κατά συνέπεια, το NLR είναι ένας ελκυστικός υποψήφιος προγνωστικός δείκτης για επιτυχημένες κυήσεις μετά από IVF.

## 5 Ειδικό Μέρος

Η παρούσα μελέτη απαρτίζεται από δύο επιμέρους μελέτες που έχουν ως σκοπό να αξιολογήσουν το NLR η μια μελέτη ως δείκτη πρόγνωσης για αυτόματη αποβολή σε γυναίκες με αυτόματη σύλληψη και η άλλη μελέτη ως δείκτη πρόγνωσης μετά από ιατρικώς υποβοηθούμενη αναπαραγωγή.

### 5.1 Μελέτη Α: Ο λόγος των ουδετεροφίλων προς τα λεμφοκύτταρα (NLR) και η έκβαση της εγκυμοσύνης σε φυσική σύλληψη.

#### 5.1.1 Σκοπός της μελέτης

Σκοπός της μελέτης ήταν να διευκρινιστεί αν οι τιμές του NLR στο πρώτο τρίμηνο της κύησης σχετίζονται με την έκβαση της κύησης σε υγιείς έγκυες μετά από αυτόματη σύλληψη.

#### 5.1.2 Μεθοδολογία

Η παρούσα μελέτη παρατήρησης πραγματοποιήθηκε στο Γενικό Νοσοκομείο Αγίου Νικολάου Κρήτης την περίοδο από τον Ιανουάριο 2014 έως τον Ιούλιο του 2016. Το πρωτόκολλο της μελέτης επικυρώθηκε από το επιστημονικό συμβούλιο του Νοσοκομείου (1991/3-2-17).

Τα κριτήρια εισαγωγής του υπό μελέτη πληθυσμού (ηλικίας 18-35) ήταν έγκυες γυναίκες που με επιτυχία γέννησαν ζων νεογνό σε ηλικία κύησης  $\geq 37$  εβδομάδες και γυναίκες που είχαν αυτόματη αποβολή, όπως αυτό ορίζεται με βάση τα κριτήρια της επιστημονικής κοινότητας των ακτινολόγων για την απώλεια του εμβρύου νωρίς στην κύηση (102).

Τα κριτήρια αποκλεισμού από τη μελέτη ήταν: γυναίκες με ελλιπή στοιχεία στο ιστορικό τους, με ιστορικό υπογονιμότητας ή καθ'έξιν αποβολών, με ενδομητρίωση σταδίου 3-4, με πολύδυμη κύηση, με ανωμαλίες του γυναικείου γεννητικού συστήματος, με ατομικό αναμνηστικό μεταβολικής ή χρόνιας συστηματικής νόσου, με επιπλοκές της κύησης (σακχαρώδης διαβήτης κύησης, προεκλαμψία, υπερέμεση κύησης) και με ιστορικό πρόσληψης αλκοόλ ή καπνίσματος στη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Η μελέτη επίσης αποκλείει έγκυες γυναίκες με θετικά IgM αντισώματα για κυταρομεγαλοί, ερυθρά ή τοξόπλασμα, καθώς επίσης γυναίκες που είχαν έμβρυα με χρωμοσωμικές ή μορφολογικές ανωμαλίες που είχαν είτε επιβεβαιωθεί είτε υπήρχε υποψία για τις ανωμαλίες αυτές.

Με σκοπό να αποφευχθούν περαιτέρω σφάλματα επιλογής, συμπεριλάβαμε δεδομένα από συμμετέχοντες που παραπέμφθηκαν στο νοσοκομείο διαδοχικά με τη σειρά που νοσηλεύτηκαν. Από τους φακέλους των συμμετεχόντων στη μελέτη εξήγησαν τα παρακάτω

δεδομένα: ηλικία, σωματικό βάρος, αριθμός εγκυμοσύνων, αριθμός τοκετών, ηλικία κύησης στον τοκετό, ατομικό ιστορικό προηγούμενων αποβολών ή ενδομήτριων θανάτων.

Καταγράφηκαν τα ουδετερόφιλα, τα λεμφοκύτταρα και τα επίπεδα αιμοσφαιρίνης από τις γενικές αίματος. Το NLR υπολογίστηκε διαιρώντας τον απόλυτο αριθμό ουδετεροφίλων με τον απόλυτο αριθμό λεμφοκυττάρων. Όλες οι μετρήσεις στις γενικές αίματος έχουν γίνει από το ίδιο μηχάνημα στο αιματολογικό εργαστήριο του Γενικού Νοσοκομείου Αγίου Νικολάου, στην Κρήτη, χρησιμοποιώντας τον ίδιο αναλυτή αίματος (Cell-Dyn 3700, Abbot).

Ο υπολογισμός του μεγέθους του δείγματος βασίστηκε σε προηγούμενη μελέτη που αξιολογούσε το NLR σε πληθυσμούς εγκύων που έπασχαν ή δεν έπασχαν από προεκλαμψία (67). Συμφωνήθηκε να υπάρχει μια να αναμενόμενη διαφορά της τάξης του 25% ανάμεσα στην ομάδα με τη γέννηση ζώντος νεογνού και στην ομάδα με την αυτόματη αποβολή. Προκειμένου να ανιχνευθεί μια διαφορά της τάξης του 0,77 (24%) μεταξύ των ομάδων με στατιστική ισχύ 80% και σε επίπεδο σημαντικότητας (άλφα) της τάξης του 0,05, το μέγεθος του δείγματος που απαιτείται είναι το λιγότερο 64 άτομα (ασθενείς και μάρτυρες).

Οι συνεχείς μεταβλητές στις διάφορες ομάδες περιγράφηκαν με τη μορφή του μέσου όρου +/- SD (σταθερή απόκλιση) ενώ οι διακριτές και κατηγορικές μεταβλητές με τη μορφή ποσοστών. Οι περισσότερες από τις συσχετίσεις μελετήθηκαν με βάση την επιρροή στη δυαδική έκβαση (π.χ. αποβολή ή γέννηση ζώντος νεογνού) με την εφαρμογή μοντέλων απλής και πολλαπλής λογαριθμικής παλινδρόμησης και εκφράστηκαν με τη μορφή odds ratios με 95% διαστήματα εμπιστοσύνης (OR με 95% CI). Διαφορές στις μέσες τιμές ανάμεσα σε δύο ομάδες έγινε με το t-test για ανεξάρτητα δείγματα ενώ για περισσότερες από δύο ομάδες μελετήθηκαν χρησιμοποιώντας ANOVA μονής κατεύθυνσης. Θηκογράμματα (Box and Whiskers plots) χρησιμοποιήθηκαν για τη γραφική αναπαράσταση των συνεχών μεταβλητών. Για την ανάλυση συσχετίσεων μεταξύ ποιοτικών μεταβλητών χρησιμοποιήθηκε ο συντελεστής γραμμικής συσχέτισης του Pearson (r). Για μεταβλητές που δεν είχαν κανονική κατανομή οι συγκρίσεις έγιναν ή επιβεβαιώθηκαν με μη παραμετρικές μεθόδους (Kruskall-Wallis H-test or Mann-Whitney U-test). Το Fisher's exact χρησιμοποιήθηκε για να συγκρίνει την έκβαση μεταξύ των δύο ομάδων. Για τη στατιστική ανάλυση των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πακέτο IBM SPSS Statistics 22.0. Οι διαφορές θεωρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές όταν η μηδενική υπόθεση απορρίπτονταν με διάστημα εμπιστοσύνης >95% ( $p<0.05$ ).

### **5.1.3 Καταληκτικά σημεία**

Το πρωτεύον καταληκτικό σημείο ήταν η έκβαση της κύησης που χαρακτηρίζεται ως γέννηση ζώντος νεογνού ή αυτόματη αποβολή. Ως γέννηση ζώντος νεογνού ορίστηκε ως η γέννηση ζώντος νεογνού μετά από 20 συμπληρωμένες εβδομάδες της κύησης (WHO). Η αυτόματη αποβολή ορίστηκε σύμφωνα με τα διαγνωστικά κριτήρια για την απώλεια του εμβρύου νωρίς στην κύηση (102).

### **5.1.4 Αποτελέσματα**

Στη διάρκεια της μελέτης (από τον Ιανουάριο του 2014 έως τον Ιούλιο του 2016) 860 έγκυες γυναίκες που συνέλαβαν αυτόματα παρακολουθήθηκαν από το γενικό νοσοκομείο Αγίου Νικολάου Κρήτης. Από αυτές, 524 γυναίκες είχαν ανεπίπλεκτη εγκυμοσύνη με γέννηση ζώντος νεογνού σε εβδομάδα κύησης ίση ή μεγαλύτερη από την 37<sup>η</sup> αλλά μόνο οι 65 ικανοποιούσαν τα κριτήρια για να συμπεριληφθούν στη μελέτη. Αυτές ταξινομήθηκαν στην ομάδα με επιτυχή έκβαση εγκυμοσύνης και γέννηση ζώντος νεογνού. Επιπλέον, εντοπίστηκαν 64 γυναίκες που είχαν αυτόματη αποβολή και πληρούσαν τα κριτήρια εισαγωγής στη μελέτη οπότε τοποθετήθηκαν στην ομάδα με τις αποβολές. Τα χαρακτηριστικά των ασθενών παρουσιάζονται στον Πίνακα 1. Όλα τα χαρακτηριστικά των ασθενών που μελετήθηκαν ήταν συγκρίσιμα μεταξύ των δύο ομάδων, εκτός από τον αριθμό των τόκων που είχε κάθε γυναίκα, το οποίο ήταν στατιστικώς σημαντικά υψηλό στην ομάδα με επιτυχή γέννηση ζώντος νεογνού. ( $1.6 \pm 0.6$  έναντι  $0.8 \pm 1.0$ , αντίστοιχα,  $p < 0.001$ ).

Δεν υπήρχε καμία διαφορά όσον αφορά τις τιμές του NLR ( $2.9 \pm 1.5$  vs.  $2.5 \pm 1.0$   $p = 0.167$ ) ανάμεσα στις δύο ομάδες. Η ανάλυση με απλή γραμμική παλινδρόμηση δεν έδειξε καμιά συσχέτιση του NLR με τη γέννηση ζώντος νεογνού (OR για αυτόματη αποβολή για κάθε μονάδα αύξησης του NLR  $0.82$ , 95%CI:  $0.66-1.28$ ,  $p = 0.633$

Επιπλέον, όλες οι αιματολογικές μεταβλητές που μελετήθηκαν (λευκά αιμοσφαίρια, ουδετερόφιλα, λεμφοκύτταρα) είχαν OR περίπου 1.00 ως προς την επίδρασή τους στο πρωτεύον καταληκτικό σημείο (Πίνακας 2). Ακόμη, το NLR δεν βρέθηκε να έχει στατιστικώς σημαντική διαφορά ανάμεσα στις γυναίκες που είχαν ή δεν είχαν προηγούμενες αποβολές ( $p = 0.935$ ) (πίνακας 3).

Για να εξετάσουμε τη σχέση του NLR με άλλες μεταβλητές, αιματολογικές (λευκά αιμοσφαίρια, ουδετερόφιλα, λεμφοκύτταρα) και κλινικές (βάρος γέννησης, αριθμός τοκετών, αριθμός εγκυμοσύνων) υπολογίσαμε τον συντελεστή γραμμικής συσχέτισης του Pearson ( $r$ ).

Όπως αναμένονταν, το NLR συσχετίστηκε θετικά με τον απόλυτο αριθμό των ουδετεροφίλων ( $r_s=0.596$ ,  $p<0.001$ ) και των λευκών αιμοσφαιρίων ( $r_s =0.295$ ,  $p=0.001$ ) και είχε αρνητική συσχέτιση με τον απόλυτο αριθμό των λεμφοκυττάρων ( $r_s =-0.652$ ,  $p<0.001$ ) (Πίνακας 4).

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι ο αριθμός των γεννήσεων που είχε κάθε γυναίκα φαίνεται να συσχετίζεται αρνητικά με το NLR ( $r_s=-0.181$ ,  $p=0.040$ ) (Εικόνα 1) και ήταν ο μοναδικός παράγοντας που στατιστικά σημαντικά επηρέασε την έκβαση της κύησης (OR: 3.39, 95%CI: 1.99-5.78,  $p<0.001$ ).

Όπως φαίνεται από την παραπάνω στατιστική ανάλυση η κατανομή του NLR στις γυναίκες με γέννηση ζώντος νεογνού και στις γυναίκες που είχαν αποβολές ήταν παρόμοια: και οι δύο κατανομές είχαν θετική ασυμμετρία και συγκρίσιμες μέσες τιμές, με την πλειονότητα των γυναικών να έχουν συγκρίσιμα NLR ασχέτως σε ποια ομάδα ανήκαν (εικόνα 2). Ωστόσο, ακραίες τιμές του NLR  $>5.8$  (με εύρος 5.9-9.0), παρατηρήθηκαν μόνο στην ομάδα με την αυτόματη αποβολή. To Fisher's exact test επιβεβαίωσε ότι η διαφορά στη συχνότητα γέννησης ζώντος νεογνού στις γυναίκες με NLR  $> 5.8$  ήταν στατιστικά σημαντική ( $p=0.028$ ): καμία γέννηση ζώντος νεογνών από τις 5 (0%) έναντι 65 γεννήσεων ζώντων στις 124 με τιμές NLR  $\leq 5.8$  (52.4%).

### 5.1.5 Συζήτηση

Σε αυτή τη μελέτη ασθενών-μαρτύρων, συγκρίθηκε το NLR εγκύων γυναικών πρώτου τριμήνου που είχαν γέννηση ζώντος νεογνού σε ηλικία κύησης  $\geq 37$  βδομάδες με το NLR γυναικών που η εγκυμοσύνη τους κατέληξε σε αυτόματη αποβολή. Βρήκαμε ότι το NLR δεν είχε διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων, με τιμές  $2.5\pm 1.0$  και  $2.9\pm 1.5$  σε κάθε ομάδα αντίστοιχα. Ωστόσο, οι τιμές NLR  $>5.8$  βρέθηκαν αποκλειστικά στην ομάδα που είχαν αυτόματη αποβολή, εύρημα που αν αξιολογηθεί μπορεί να έχει κλινική χρησιμότητα.

Το NLR είναι ένας απλός δείκτης που μπορεί να υπολογιστεί από μια γενική αίματος και έχει περιγραφεί σε επιπλοκές της εγκυμοσύνης όπως η προεκλαμψία, ο σακχαρώδης διαβήτης

κύησης, η ενδοηπατική χολόσταση της κύησης και η υπερέμεση κύησης (67, 81, 82,84). Έως τώρα δεν υπάρχει αξιολόγηση του μητρικού NLR σε σχέση με την αυτόματη αποβολή σε υγιείς έγκυες γυναίκες και από όσο γνωρίζουμε η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη που μελετά αυτή τη σχέση.

Προσπαθήσαμε να περιορίσουμε όλους τους πιθανούς παράγοντες που θα μπορούσαν να επηρεάσουν το αποτέλεσμα (συγχυτικοί παράμετροι -confounding factor) με το να αποκλείσουμε από τη μελέτη γυναίκες με χρόνιες συστηματικές νόσους, ανωμαλίες του γυναικείου γεννητικού συστήματος και ανωμαλίες του εμβρύου. Γι αυτό, δεν εκπλήσσει το γεγονός ότι παρατηρήθηκαν σχετικά χαμηλές μέσες τιμές του NLR, συγκρινόμενες με τους υγιείς υποπληθυσμούς σε άλλες μελέτες. Για παράδειγμα, μέσες τιμές του NLR της τάξεως του 3.9, 4.8 και 6.5 έχουν αναφερθεί σε υγιείς κυήσεις και κυήσεις που επιπλέονται με μέτρια και σοβαρή προεκλαμψία, αντιστοίχως (67). Σε άλλη μελέτη, μέσες τιμές του NLR στο πρώτο τρίμηνο ήταν 3.1 και 3.8 σε γυναίκες με φυσιολογική αρτηριακή πίεση και σε γυναίκες με προεκλαμψία αντίστοιχα (83).

Επιπλέον, στην παρούσα κοχόρτη, ο αριθμός των προηγούμενων γεννήσεων που είχε κάθε γυναίκα συσχετίστηκε με τη γέννηση ζώντος νεογνού σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες (103), με μια αύξηση του OR της τάξεως του 350% για κάθε προηγούμενο παιδί. Είναι ενδιαφέρον το ότι ο αριθμός των γεννήσεων που είχε κάθε γυναίκα είχε επίσης αρνητική συσχέτιση με το NLR.

Κατά συνέπεια, οι γυναίκες που έχουν γεννήσει εμφανίζονται να είναι πιο πιθανόν να έχουν καλύτερη έκβαση κύησης και χαμηλότερο NLR πρώτου τριμήνου σε σχέση με άτοκες γυναίκες. Η γέννηση ζώντος νεογνού από την άλλη μεριά δεν συσχετίστηκε με χαμηλότερο NLR.

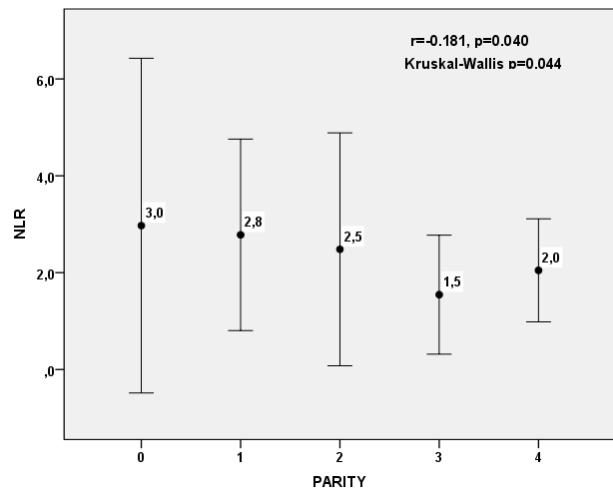
Στη μελέτη μας, οι τιμές NLR κατανεμήθηκαν με παρόμοιο τρόπο ανάμεσα στις συμμετέχοντες με επιτυχημένες και μη εγκυμοσύνες και δεν μπορεί να επιλεχθεί μιας τιμή NLR που να μπορεί να διαχωρίσει τις επιτυχημένες από τις αποτυχημένες εγκυμοσύνες με ικανοποιητική ευαισθησία και ειδικότητα. Αυτό που θα ήταν κλινικά χρήσιμο θα ήταν ο προσδιορισμός ενός εύρους τιμών NLR που θα μπορούσε να επιλέξει έναν πληθυσμό με δυσμενή πρόγνωση. Εξ' ορισμού, αυτό το εύρος θα έπρεπε στην καλύτερη περίπτωση να βρίσκεται επί τα εκτός του εύρους του υγιούς μάρτυρα πληθυσμού και να έχει μια υψηλή θετική προγνωστική αξία χρήσιμη για τη λήψη κλινικών αποφάσεων. Είναι αξιοσημείωτο ότι

ένα μικρό μέρος των γυναικών, περίπου το 4% της ολικής κοχόρτης και 8% των γυναικών με αυτόματη αποβολή, είχαν τιμές NLR ψηλότερες από 5.8 και αυτές οι γυναίκες βρέθηκαν αποκλειστικά στην ομάδα που είχαν αυτόματη αποβολή. Όπως αναμενόταν, η διαφορά στην έκβαση της κύησης σε αυτή την ομάδα σε σύγκριση με τις υπόλοιπες γυναίκες με τιμή NLR πρώτου τριμήνου  $\leq 5.8$  ήταν στατιστικώς σημαντική. Στην παρούσα κοχόρτη NLR  $>5.8$  προσδίδει θετική προγνωστική αξία για δυσμενή έκβαση που είναι πρακτικά της τάξεως του 100%.

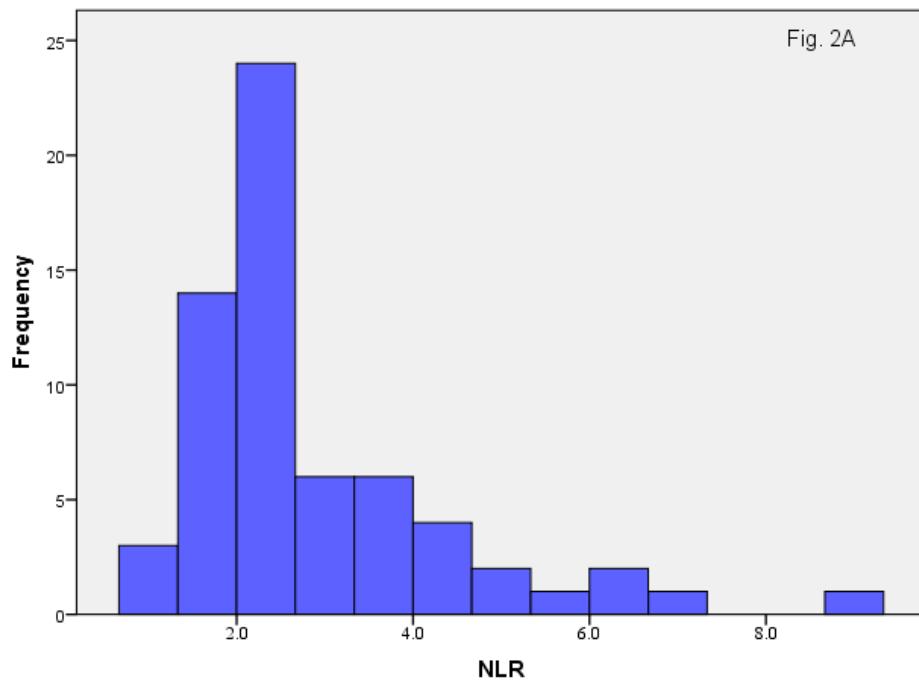
Αυτό το όριο των 5.8 είναι υψηλότερο από επίπεδο του 3.08 που επιλέχθηκε από τον Gezer et al. (83) για το διαχωρισμό γυναικών υψηλού ρίσκου για προεκλαμψία-με θετική προγνωστική αξία της τάξεως του 70%- ενώ ο Kirbas et al. χρησιμοποιεί ως όριο το 4.01 για να προβλέψει την προεκλαμψία με θετική προγνωστική αξία της τάξεως του 73.6% (67). Είναι ενδιαφέρων το γεγονός ότι σε μια μελέτη 413 υγειών -αντρών και γυναικών- το ανώτερο όριο φυσιολογικού NLR ήταν περίπου στο 4 (80). Δεν είναι ξεκάθαρο στην κοχόρτη μας αν γυναίκες με τιμές NLR  $>5.8$  ανέπτυξαν μια δευτεροπαθή παθολογική κατάσταση στη διάρκεια της κύησης τους, η οποία οδήγησε στην αυτόματη αποβολή και αυτή η κατάσταση από μόνη της σχετίστηκε με αυξημένο NLR. Σε αυτή την περίπτωση, το ακραίο NLR θα μπορούσε να είναι προάγγελος μιας λανθάνουσας κατάστασης, καθώς τη στιγμή της λήψης του αίματος δεν υπήρχε κλινικώς εμφανές παθολογικό σημείο, αφού όλες οι γυναίκες με γνωστές δευτεροπαθείς καταστάσεις ή επιπλοκές είχαν εξαιρεθεί από τη μελέτη. Θα ήταν επίσης δυνατόν, οι ακραίες τιμές του NLR να υποδηλώνουν έναν κοινό μηχανισμό για ένα μικρό υποπληθυσμό γυναικών με αυτόματη αποβολή - πιθανώς με ανοσολογική συμμετοχή. Περαιτέρω προοπτικές μελέτες θα μπορούσαν να βοηθήσουν στο να καθοριστούν οι παθολογικές εκείνες καταστάσεις στις οποίες οι γυναίκες έχουν υψηλές τιμές NLR και επίσης να καθοριστεί το διάστημα από τη στιγμή του εντοπισμού μιας υψηλής τιμής NLR στο πρώτο τρίμηνο έως τη στιγμή που θα εκδηλωθούν τα πρώτα κλινικά σημεία και η αποβολή.

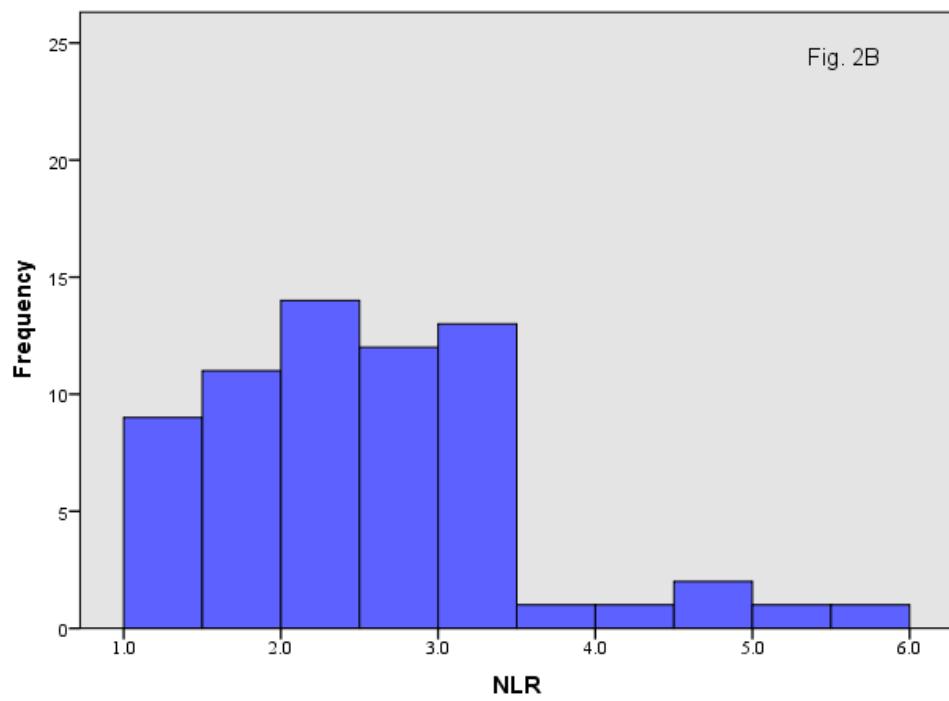
Στην παρούσα μελέτη φαίνεται ότι οι ακραίες τιμές του NLR είναι ένας πιθανά χρήσιμος προγνωστικός δείκτης για την έκβαση της κύησης σε ένα μικρό πληθυσμό γυναικών. Παρά το στατιστικώς σημαντικό αποτέλεσμα ο μικρός αριθμός των ατόμων με τέτοιες υψηλές τιμές NLR στη μελέτη αυτή αφήνει περιθώρια αμφιβολίας για την εγκυρότητα της παρατήρησης αυτής. Μια ξεχωριστή κοχόρτη θα ήταν απαραίτητη για να επαληθεύσει αυτή την παρατήρηση.

**Εικόνα 1.** Συσχέτιση αριθμού τόκων (Parity) και NLR.



**Εικόνα 2.** Κατανομή του NLR πρώτου τριμήνου στις γυναίκες με αυτόματη αποβολή (Fig. 2A) και στις γυναίκες με επιτυχή γέννηση ζώντος νεογνού (Fig.2B). Τιμές  $NLR > 5.8$  παρατηρούνται μόνο σε γυναίκες με αυτόματη αποβολή.





**Πίνακας 1.** Βασικές κλινικές παράμετροι και η επίδρασή τους στην έκβαση της εγκυμοσύνης όπως εκφράζεται με τη μορφή odd's ratios (OR) με διαστήματα εμπιστοσύνης 95% .

		Αποβολή (n=64)		Ζων νεογνό (n=65)		p	OR (95%CI)
		N	%	N	%		
<b>Ηλικία</b>	<b>&lt;25</b>	13	52.0	12	48.0	0.602	1.00
	<b>25-30</b>	24	44.4	30	55.6	0.532	1.35 (0.52-3.50)
	<b>&gt;30</b>	27	54.0	23	46.0	0.870	0.92 (0.35-2.41)
<b>Προηγούμενη αποβολή</b>	<b>0</b>	54	48.2	58	51.8	0.415	0.65 (0.52-1.83)
	<b>≥1</b>	10	58.8	7	41.2		
		Μέση τιμή	SD	Μέση τιμή	SD	p	OR (95%CI)
<b>Αριθμός των κυήσεων (gravidity) (n)</b>		2.2	1.5	1.8	0.8	0.061	0.74 (0.54-1.02)
<b>Αριθμός τόκων (parity) (n)</b>		0.8	1.0	1.6	0.6	<0.001	3.46 (2.04-5.86)

**Table 2.** Αιματολογικές παράμετροι σε γυναίκες με αυτόματη αποβολή και στις γυναίκες με επιτυχή γέννηση ζώντος νεογνού.

	Αποβολή (n=64)		Ζων νεογνό (n=65)		OR (95%CI)	
	Mean	SD	Mean	SD	P	OR (95%CI)
<b>WBC</b>	8.3	2.2	7.7	1.9	0.144	0.88 (0.73-1.05)
<b>Ουδετερόφιλα</b>	5.4	1.8	4.9	1.6	0.151	0.86 (0.69-1.06)
<b>Λεμφοκύτταρα</b>	2.1	.8	2.1	0.5	0.505	0.84 (0.51-1.39)
<b>NLR</b>	2.9	1.5	2.5	1.0	0.167	0.82 (0.61-1.09)
<b>Hb</b>	13.0	1.1	13.1	0.9	0.891	1.03 (0.72-1.47)

**Πίνακας 3.** Διαφορές του NLR στις διάφορες ηλικιακές ομάδες και σε γυναίκες με προηγούμενες αποβολές.

		NLR			
		Μέσος	SD	P	
<b>Ηλικία</b>	<b>&lt;25</b>	2.6	1.0	0.935	
	<b>25-30</b>	2.7	1.3		
	<b>&gt;30</b>	2.7	1.4		
<b>Προηγούμενη αποβολή</b>	<b>0</b>	2.7	1.3	0.459	
	<b>≥1</b>	2.5	1.2		

**Table 4.** Συσχέτιση NLR με διάφορες αιματολογικές και κλινικές μεταβλητές.

	NLR	
	Spearman's	p
	Rho	
<b>WBC</b>	0.295	0.001
<b>Ουδετερόφιλα</b>	0.596	<0.001
<b>Λεμφοκύτταρα</b>	-0.652	<0.001
<b>Αιμοσφαιρίνη</b>	-0.007	0.938
<b>Ht</b>	-0.061	0.498
<b>Βάρος</b>	0.034	0.715
<b>Αριθμός των κυήσεων (gravity) (n)</b>	-0.128	0.147
<b>Τόκος (Parity)</b>	-0.181	0.040

## **5.2 Μελέτη Β: Ο λόγος των ουδετεροφύλων προς τα λεμφοκύτταρα (NLR) και η έκβαση της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Μια μελέτη ασθενούς-μάρτυρα.**

### **5.2.1 Σκοπός της μελέτης**

Η παρούσα αναδρομική μελέτη έχει ως σκοπό να μελετήσει αν το NLR σχετίζεται με επιτυχείς κυνήσεις σε γυναίκες που υπεβλήθησαν σε IVF.

### **5.2.2 Μεθοδολογία**

Η παρούσα αναδρομική μελέτη επικυρώθηκε από το επιστημονικό συμβούλιο της Γ' Μαιευτικής-Γυναικολογικής Κλινικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, στην Ελλάδα.

Εξετάστηκαν αναδρομικά οι φάκελοι υπογόνιμων γυναικών που υπεβλήθησαν σε IVF το διάστημα μεταξύ Νοεμβρίου 2004 και Φεβρουαρίου 2017 στη μονάδα εξωσωματικής γονιμοποίησης του Αττικού Νοσοκομείου, στο Πανεπιστήμιο Αθηνών, στην Ελλάδα. Έχοντας υπ' όψιν ότι συγκεκριμένες ιατρικές καταστάσεις μπορεί να επηρεάσουν την ενεργοποίηση των λευκοκυττάρων και λεμφοκυττάρων, αποκλείσαμε από τη μελέτη γυναίκες με οποιοδήποτε ιστορικό ασθένειας ή κατάστασης που είναι γνωστό να σχετίζεται με την αύξηση του NLR όπως οποιαδήποτε ενδοκρινολογική, γαστρεντερολογική, αιματολογική, ογκολογική, μεταβολική, ανοσολογική, μολυσματική, καρδιακή, νεφρική νόσο ή νόσος του ουροποιητικού ή του γεννητικού. Επίσης γυναίκες με ιστορικό ενδομητρίωσης ή καθ' έξιν αποβολών δεν πήραν μέρος στη μελέτη.

Από τους φακέλους των ασθενών συλλέξαμε δημογραφικά και κλινικά δεδομένα, όπως επίσης και γενικές αίματος που ελήφθησαν τη στιγμή της ωληψίας και υπολογίσαμε το NLR. Ακολούθως συγκρίθηκε το NLR ανάμεσα στις γυναίκες που είχαν επιτυχή σύλληψη και σε αυτές που δεν είχαν. Επίσης άλλες κλινικές παράμετροι συγκρίθηκαν ανάμεσα στις δύο αυτές ομάδες.

Οι συνεχείς μεταβλητές εκφράστηκαν με τη μορφή του μέσου  $\pm$  SD (σταθερή απόκλιση) ενώ οι διακριτές και κατηγορικές μεταβλητές εκφράστηκαν με τη μορφή ποσοστών.

Οι συσχετίσεις των υπό μελέτη μεταβλητών με το πρωτεύον καταληκτικό σημείο (π.χ. επιτυχής σύλληψη ή όχι) εξετάστηκαν με απλή και πολλαπλή λογιστική παλινδρόμηση. Οι διαφορές στις μέσες τιμές εξετάστηκαν χρησιμοποιώντας ανεξάρτητα t-test για δύο ομάδες και ANOVA μονής κατεύθυνσης για περισσότερες των δύο ομάδων. Οι συσχετίσεις

εκφράστηκαν ως odd's ratios με 95% διαστήματα εμπιστοσύνης (OR). Θηκογράμματα χρησιμοποιήθηκαν για τη γραφική αναπαράσταση των συνεχών μεταβλητών. Για τη στατιστική ανάλυση των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πακέτο IBM SPSS Statistics 22.0 και το όριο του 0.05 ορίστηκε ως το αποδεκτό όριο απόρριψης της μηδενικής υπόθεσης.

### 5.2.3 Αποτελέσματα

Στη μελέτη μετείχαν 66 γυναίκες που πληρούσαν τα κριτήρια εισαγωγής. Από αυτές 31 γυναίκες είχαν γέννηση ζώντος νεογνού και 35 απέτυχαν να συλλάβουν μετά από IVF. Η μέση ηλικία των γυναικών που συμμετείχαν στη μελέτη ήταν  $33.4 \pm 3.4$  ετών με τις ηλικίες να κυμαίνονται από 24 έως 38.

Η μέση τιμή του BMI στις γυναίκες ήταν  $23.0 \pm 3.3$  (διακύμανση από 18.3-32.7) και οι καπνίστριες ήταν 44.6% του δείγματος (29 γυναίκες). Οι περισσότερες από τις γυναίκες ( $n=61$ , 92.4%) ήταν άτοκες. Η πλειονότητα-σχεδόν τα  $\frac{3}{4}$ - των γυναικών είχαν ακολουθήσει το μακρύ πρωτόκολλο της εξωσωματικής γονιμοποίησης (49 γυναίκες, 74.2%). Η μέση τιμή των ληφθέντων ωοκυττάρων ήταν  $10.1 \pm 5.3$  (διακύμανση από 2-23) ενώ η μέση τιμή των ωοκυττάρων που βρίσκονταν στη μετάφαση II ήταν  $7.4 \pm 4.6$ . Επίσης, η μέση τιμή των γονιμοποιημένων ωαρίων ήταν  $6.9 \pm 4.3$ .

Ο αριθμός των εμβρύων που βρίσκονται στο στάδιο πρώιμης διάσπασης και των μεταφερόμενων εμβρύων ήταν  $4.6 \pm 3.0$  και  $2.3 \pm 0.5$  αντίστοιχα. Η ολική δόση των γοναδοτροπινών κυμάνθηκε από 1050mg έως 4800mg με μέση τιμή  $2312.1 \text{ mg} \pm 820.9 \text{ mg}$ . Η αιτιολογία της υπογονιμότητας αποδόθηκε σε αντρικό παράγοντα υπογονιμότητας στις 34 περιπτώσεις (51.5%), ενώ το 30,3 % του δείγματος αφορά ανεξήγητη υπογονιμότητα.

Οι αιματολογικές παράμετροι των γυναικών που υπεβλήθησαν σε IVF φαίνονται στον πίνακα 3. Το NLR έχει μέση τιμή  $2.0 \pm 1.1$  με διακύμανση από 0.03-6.1. Η αιμοσφαιρίνη και ο αιματοκρίτης είχαν μέσες τιμές της τάξεως του  $13.3 \pm 3.7$  και  $38.3 \pm 4.0$  αντίστοιχα. Οι διαφορές στις τιμές του NLR φαίνονται στον πίνακα 8. Σχεδόν όλες οι δημογραφικοί, κλινικοί και IVF παράμετροι είναι συγκρίσιμοι και ανάμεσα στις δύο ομάδες και δεν υπάρχει καμιά στατιστικώς σημαντική διαφορά ( $p > 0.05$ ). Μόνο οι γυναίκες με υπογονιμότητα ωθητικού παράγοντα έδειξαν να έχουν χαμηλότερες τιμές NLR  $1.3 \pm 0.8$  σε σύγκριση με αυτές που δεν είχαν αυτό τον τύπο της υπογονιμότητας  $2.2 \pm 1.1$  ( $p = 0.026$ ). Μια τάση για στατιστικώς σημαντική διαφορά ( $0.072$ ) ανευρέθηκε σε γυναίκες με δευτεροπαθή

υπογονιμότητα ( $1.7 \pm 0.8$ ) σε σχέση με εκείνες που παρουσιάζονται με πρωτοπαθή υπογονιμότητα ( $2.2 \pm 1.3$ ).

Η επίδραση της ηλικίας της γυναίκας στο NLR παρουσιάζεται με τη μορφή διαγράμματος διασποράς (εικόνα 1). Επισημαίνεται ότι και το rho του Pearson και του Spearman έδειξε θετική συσχέτιση μεταξύ του NLR και της ηλικίας της γυναίκας ( $r=0.310$ ,  $p=0.011$  και  $rs=0.363$ ,  $p=0.033$ ). Η επίδραση των αιματολογικών παραμέτρων στην έκβαση του IVF φαίνεται στον Πίνακα 6. Καμία εξεταζόμενη παράμετρος δεν έδειξε θετική ή αρνητική συσχέτιση ( $OR \approx 1$ ). Μόνο τα επίπεδα της αιμοσφαιρίνης έδειξαν μια τάση για στατιστικώς σημαντική συσχέτιση  $p=0.096$  με εκτιμώμενο OR: 0.61 (0.31-1.10).

Οι τιμές του NLR διαχωρίστηκαν σε 4 ομάδες (τεταρτημόρια). Το πρώτο τεταρτημόριο συμπεριλαμβάνει τιμές από τη μικρότερη έως το 1.42, το δεύτερο τεταρτημόριο κυμαίνεται από 1.43 έως 1.75 (διάμεσο), το τρίτο από 1.76-2.49 και το τέταρτο από 2.50-6.14 (το μεγαλύτερο). Τα εκτιμώμενα OR's για την επιτυχία του IVF ήταν υψηλότερα μόνο στο 4<sup>o</sup> τεταρτημόριο (OR: 4.33 (95%CI: 1.02-10.79)). Όλα τα υπόλοιπα τεταρτημόρια δεν συσχετίστηκαν με επιτυχή έκβαση του IVF. (2<sup>o</sup> ή 3<sup>o</sup> τεταρτημόριο του NLR (OR: 2.60 (0.63-10.79)) (Εικόνα 2).

Δεν ανευρέθηκαν στατιστικώς σημαντικές συσχετίσεις ανάμεσα στις παραμέτρους του IVF και την επιτυχία του IVF ( $OR \approx 1.00$ ) (Πίνακας 7).

Επίσης, δεν υπήρχε συσχέτιση μεταξύ του πρωτοκόλλου του IVF που χρησιμοποιήθηκε και της επιτυχίας του IVF (OR: 2.71, 95%CI: 0.83-8.87) (Εικόνα 3).

Τελικά εφαρμόσαμε ένα μοντέλο πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης όπου η εξαρτημένη μεταβλητή ήταν η επιτυχία της IVF και οι επεξεγηματικές μεταβλητές (expalnatory) ορίστηκαν: ηλικιακή ομάδα ( $\leq 29$  ετών, 30-34 ετών and 35-38 ετών), ολική δόση γοναδοτροπινών (mg), NLR τιμές σε τεταρτημόρια, η αιμοσφαιρίνη και ο τύπος του πρωτοκόλλου IVF που χρησιμοποιήθηκε (μακρύ, άλλο).

Τα αποτελέσματα που διαφαίνονται στον Πίνακα 8 δεν αποκαλύπτουν καμία στατιστικώς σημαντική σχέση. Στον Πίνακα 9 φαίνεται το προφίλ των γυναικών που υπεβλήθησαν σε IVF ανά ηλικία. Φαίνεται ότι καμία από τις γυναίκες δεν έχει γεννήσει στην ηλικία των 35+ και όλες οι γυναίκες είχαν τον ίδιο αριθμό κυήσεων στο ιστορικό τους. Τα ποσοστά της υπογονιμότητας ωθητικού τύπου ήταν χαμηλότερα στην ηλικία των 35+ (6.3%) σε σχέση με αυτά των άλλων ηλικιακών ομάδων ( $p=0.009$ ).

## 5.2.4 Συζήτηση

Η παρούσα μελέτη είναι μάλλον η πρώτη που διερευνά την πιθανή σχέση ανάμεσα στο NLR και την επιτυχία της εξωσωματικής γονιμοποίησης. Με το διαχωρισμό του NLR σε τεταρτημόρια, φάνηκε ότι το 4<sup>ο</sup> τεταρτημόριο (OR: 4.33 (95%CI: 1.02-10.79)) είχε θετική συσχέτιση με την επιτυχία της εξωσωματικής γονιμοποίησης. Καθώς το NLR έχει συσχετιστεί με την ηλικία ( $r=0.310$ ,  $p=0.011$  και  $rs=0.363$ ,  $p=0.033$ ), βρέθηκε μια τάση για επιτυχή έκβαση της κύησης σε γυναίκες στη μεγαλύτερη ηλικιακή ομάδα (35-38) με OR στο 9.00 ((0.99-81.93) ( $p=0.051$ ) συγκριτικά με τις γυναίκες στη νεότερη ηλικιακή ομάδα ( $\leq 29$  years old). Από την άλλη, ανάλυση με πολλαπλή παλινδρόμηση δεν επιβεβαίωσε τη θετική συσχέτιση του NLR και της έκβασης της IVF και για αυτό δεν θα ήταν ασφαλές να διεξαχθούν οριστικά συμπεράσματα για αυτή τη σχέση.

Επιπλέον, άλλο ενδιαφέρων σημείο για την υπογονιμότητα που αποκάλυψε αυτή η μελέτη είναι ότι οι γυναίκες που πάσχουν από υπογονιμότητα ωθητικού παράγοντα βρέθηκαν να έχουν μικρότερες τιμές NLR  $1.3 \pm 0.8$  συγκριτικά με εκείνες που δεν είχαν ωθητική δυσλειτουργία  $2.2 \pm 1.1$  ( $p=0.026$ ). Εάν αυτή η συσχέτιση επιβεβαιωθεί, το NLR θα μπορούσε επίσης να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης ωθητικής δυσλειτουργίας.

Στην IVF, ποικίλες μελέτες αναφέρουν ότι η προχωρημένη ηλικία έχει αρνητική συσχέτιση με την επιτυχία της κύησης και είναι ένας από τους πιο σημαντικούς παράγοντες για την αποτυχία της IVF (104). Γυναίκες ηλικίας μεγαλύτερης των 35 ετών έχουν αναφερθεί να έχουν χαμηλότερες πιθανότητες για επιτυχία της IVF συγκριτικά με τις γυναίκες νεότερης ηλικίας (105).

Στην παρούσα μελέτη η ηλικιακή ομάδα από 35-38 ετών είχε τα υψηλότερα ποσοστά επιτυχίας της IVF με OR στο 9.0 (0.99-81.93,  $p=0.051$ ) σε σύγκριση με την ηλικιακή ομάδα που ήταν  $\leq 29$  ετών. Και οι δύο ηλικιακές ομάδες ήταν άτοκες και με συγκρίσιμο αριθμό εγκυμοσύνων. Η μοναδική στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ηλικιακών ομάδων νεότερης και μεγαλύτερης ηλικίας ήταν το χαμηλότερο ποσοστό υπογονιμότητας ωθητικού παράγοντα (6.3%,  $p=0.009$ ) στην ομάδα με τις γυναίκες μεγαλύτερης ηλικίας. Είναι αξιοσημείωτο όμως ότι οι προηγούμενες μελέτες που διερεύνησαν την ηλικία και την έκβαση της IVF δεν περιέλαβαν γυναίκες με ωθητική υπογονιμότητα (106-108). Με βάση τα δεδομένα μας, υποθέσαμε ότι η παρουσία του ωθητικού παράγοντα υπογονιμότητας συσχετίζεται με χαμηλότερες πιθανότητες για κύηση. Οι γυναίκες με υπογονιμότητα ωθητικού παράγοντα φαίνεται ότι αναζητούν νωρίτερα βοήθεια για την υπογονιμότητά τους

και γι αυτό παρουσιάζουν μικρότερο NLR εξαιτίας του νεαρού της ηλικίας, καθώς το NLR εξαρτάται από την ηλικία (109).

Συμπερασματικά, η μελέτη αυτή είναι η πρώτη από όσο γνωρίζουμε που αξιολογεί το ρόλο του NLR και της έκβασης του IVF. Καθώς η ισχύ της παρούσας μελέτης είναι περιορισμένη λόγω του μικρού αριθμού των περιπτώσεων που συμπεριελήφθησαν, περεταίρω μεγαλύτερου μεγέθους δείγμα απαιτείται προκειμένου να διερευνηθεί αν το NLR μπορεί να είναι ένας αξιόπιστος δείκτης για την επιτυχία της IVF.

Πίνακας 1. Χαρακτηριστικά των γυναικών που υπεβλήθησαν σε IVF

<i>a)</i>	N	%	<i>β)</i>	N	%		
<b>Ηλικιακές ομάδες</b>	≤ 29	8	12,1	<b>Κάπνισμα</b>	No	36	55,4
	30 - 34	26	39,4		Yes	29	44,6
	35+	32	48,5	<b>BMI (Μέσος ± SD)</b>	Range	23,0 ± 3,3	18,3-32,7
<b>Αριθμός κυήσεων (Gravidity)</b>	0	46	69,7	<b>Τόκος (Parity)</b>	0	61	92,4
	1	16	24,2		>1	5	7,6
	2	2	3,0	<b>Αποβολές (n)</b>	0	61	92,4
	4	1	1,5		>1	5	7,6
	5	1	1,5	<b>Ενδομήτριοι θανατοι</b>	0	66	100,0

Πίνακας 2. Παράμετροι IVF

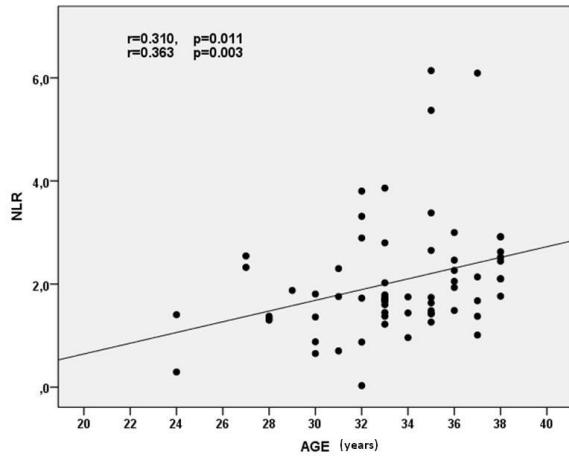
		Mέσος	SD	Διάμεσος	Min	Max
Ωοκύτταρα	Ανακτημένα	10,1	5,3	9,0	2,0	23,0
Έμβρυα	Στη Μετάφαση II	7,4	4,6	7,0	1,0	21,0
	Γονιμοποιημένα	6,9	4,3	7,0	1,0	21,0
	Στο στάδιο αυλάκωσης	4,6	3,0	3,0	1,0	14,0
	Μεταφερόμενα	2,3	0,5	2,0	1,0	3,0
Γοναδοτροφίνες	Συνολική δόση (mg)	2312,1	820,9	2100,0	1050,0	4800,0
	n	%		n	%	
Υπογονιμότητα	Πρωτοπαθής	44	66,7	Ανδρική	34	51,5
	Δευτεροπαθής	22	33,3	και τα δύο	12	18,2
Γυναικεία υπογονιμότητα	Ωοθηκικού παράγοντα	10	15,2	Σαλπιγγικού παράγοντα	13	19,7
	Ανεξήγητη	20	30,3			
Πρωτόκολλο διέγερσης	Μακρύ	49	74,2	Άλλο	17	25,7

Πίνακας 3. Αιματολογικές παράμετροι σε γυναίκες που υπεβλήθησαν σε IVF

	Μέσος	SD	Διάμεσος	Min	Max
WBC ( $10^9$ count/L)	7,7	2,4	7,0	3,7	13,8
Ουδετερόφιλα	4,5	2,2	4,0	0,4	11,2
Λεμφοκύτταρα	2,5	1,9	2,2	1,1	16,7
NLR	2,0	1,1	1,7	0,03	6,1
HGB	13,3	3,7	12,8	10,2	41,1
HCT	38,3	4,0	38,8	13,9	45,4

Πίνακας 4. Σύγκριση του NLR στις διάφορες υποκατηγορίες γυναικών που υπεβλήθησαν σε IVF βάσει δημογραφικών και IVF παραμέτρων

		NLR Μέσος ± SD	P
Δημογραφικές παράμετροι			
Αριθμός κυνήσεων (Gravidity)	0	2,2 ± 1,3	0,266
	1	1,6 ± 0,6	
	>=2	2,0 ± 0,9	
Τόκος (Parity)	0	2,0 ± 1,2	0,893
	1	2,0 ± 0,5	
Κάπνισμα	Όχι	1,9 ± 1,0	0,290
	Ναι	2,2 ± 1,3	
Προηγούμενες Αποβολές (n)	Όχι	2,1 ± 1,2	0,278
	Ναι	1,5 ± 0,7	
Παράμετροι IVF			
Υπογονιμότητα	Πρωτοπαθής	2,2 ± 1,3	0,072
	Δευτεροπαθής	1,7 ± 0,8	
Σαλπιγγικός παράγοντας	Όχι	2,0 ± 1,2	0,989
	Ναι	2,0 ± 0,8	
Ωοθηκικός παράγοντας	Όχι	2,2 ± 1,1	0,026
	Ναι	1,3 ± 0,8	
Πρωτόκολλο Διέγερσης	Άλλο	1,8 ± 1,3	0,260
	Μακρύ	2,1 ± 1,1	



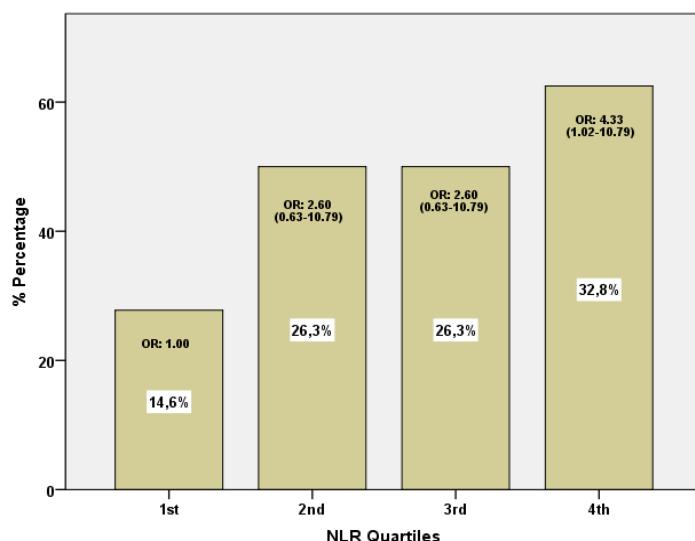
Εικόνα 1. Συσχέτιση NLR και ηλικίας

Πίνακας 5. Διάφορες κλινικές ή δημογραφικές παράμετροι σε γυναίκες με αποτυχημένη και επιτυχή έκβαση IVF.

	ΑΠΟΤΥΧΗΜΕΝΕΣ (n=35)	ΕΠΙΤΥΧΗΜΕΝΕΣ (n=31)	P	OR (95%CI)
	Μέσος ± SD	Μέσος ± SD		
BMI (Kg/m <sup>2</sup> )	22.2 ± 3.0	23.5 ± 3.5	0.23	1.10 (0.94-1.28)
ΑΡΙΘΜΟΣ ΚΥΗΣΕΩΝ (GRAVIDITY)	0.40 ± 0.60	0.48 ± 1.15	0.70	1.11 (0.64-1.92)
ΤΟΚΟΣ (PARITY)	0.11 ± 0.404	0.06 ± 0.25	0.55	0.63 (0.13-2.95)
ΑΠΟΒΟΛΕΣ	0.06 ± 0.236	0.13 ± 0.43	0.40	1.95 (0.41- 9.34)
	n (%)	n (%)	p	OR (95%CI)
ΚΑΠΝΙΣΜΑ (Current)	16 (55.2)	13 (44.8)	0.847	0.91 (0.34-2.42)
ΗΛΙΚΙΑΚΕΣ ΟΜΑΔΕΣ	32.4 ± 3.5	34.6 ± 2.8		
≤29	7 (87.5)	1 (12.5)	0.140	
30 - 34	14 (53.8)	12 (46.2)	0.116	6.00 (0.64-55.95)
35+	14 (43.8)	18 (56.3)	0.051	9.00 (0.99-81.93)

ΠΙΝΑΚΑΣ 6. Διάφορες αιματολογικές παράμετροι ανάλογα με την έκβαση του IVF

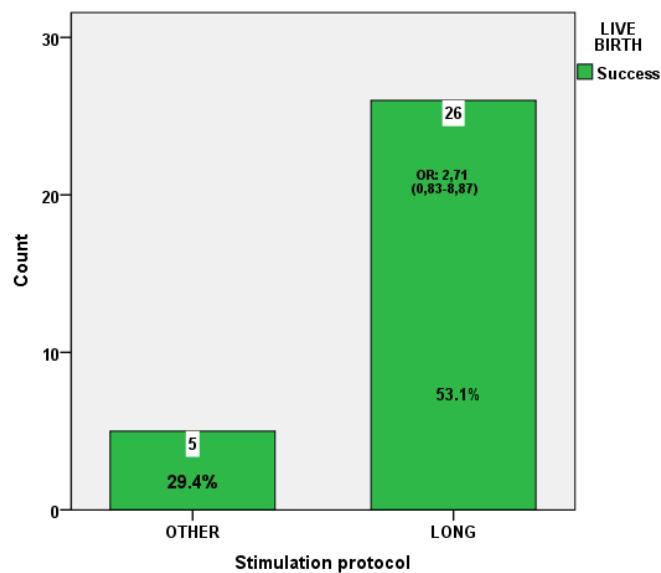
	ΑΙΠΟΤΥΧΗΜΕΝΕΣ IVF (n=35)	ΕΠΙΤΥΧΗΜΕΝΕΣ IVF (n=31)	P	OR (95%CI)
	Μέσος ± SD	Μέσος ± SD		
WBC (K/ $\mu$ l)	7.62 ± 2.54	7.71 ± 2.16	0.869	1.02 (0.83-1.25)
Ουδετερόφιλα (K/ $\mu$ l)	4.07 ± 2.20	4.88 ± 2.04	0.133	1.20 (0.95-1.53)
Λεμφοκύτταρα (K/ $\mu$ l)	2.75 ± 2.55	2.19 ± 0.43	0.320	0.68 (0.32-1.45)
HGB (g/dl)	13.82 ± 4.81	12.62 ± 1.03	0.096	0.61 (0.34-1.10)



Εικόνα 2. Ποσοστά επιτυχίας της IVF -μαζί με ORs και 95%CI- ανάλογα με το τεταρτημόρια του NLR.

Πίνακας 7. Σύγκριση των παραμέτρων IVF ανάλογα με την έκβαση της IVF.

		ΑΠΟΤΥΧΗΜΕΝΕΣ IVF (n=35)	ΕΠΙΤΥΧΗΜΕΝΕΣ IVF (n=31)	P	OR (95%CI)
		Μέσος ± SD	Μέσος ± SD		
Ωοκύτταρα	Ανακτημένα	11.06 ± 5.95	8.94 ± 4.15	0.106	0.92 (0.83-1.02)
	Μετάφασης II	8.12 ± 5.06	6.71 ± 4.03	0.222	0.93 (0.83-1.04)
	Γονιμοποιημένα	7.47 ± 4.43	6.23 ± 4.1	0.246	0.93 (0.83-1.05)
Εμβρυα	Στο στάδιο αυλάκωσης	4.79 ± 3.24	4.45 ± 2.87	0.649	0.96 (0.82-1.13)
	Μεταφερθέντα	2.31 ± 0.58	2.26 ± 0.44	0.659	0.81 (0.32-2.08)
	Συνολική δόση γοναδοτροπίνης (mg)	2155.69 ± 606.84	2500.86 ± 1000.84	0.099	1.00 (1.00-1.01)



Εικόνα 3. Επιτυχία της IVF ανάλογα με το πρωτόκολλο διέγερσης

ΠΙΝΑΚΑΣ 9

Ηλικιακό προφίλ των γυναικών που  
υπεβλήθησαν σε IVF

		Ηλικιακές ομάδες						
		<= 29		30 – 34		35+		
		n	%	n	%	N	%	P
<b>Τόκος (Parity)</b>	<b>Ναι</b>	0	0.0%	5	19.2%	0	0.0%	0.016
<b>Αριθμός κυήσεων (Gravidity)</b>	<b>0</b>	7	87.5%	15	57.7%	24	75.0%	0.374
	<b>1</b>	1	12.5%	8	30.8%	7	21.9%	
	<b>&gt;=2</b>	0	0.0%	3	11.5%	1	3.1%	
<b>Υπογονιμότητα</b>	<b>Πρωτοπαθής</b>	7	87.5%	14	53.8%	23	71.9%	0.144
	<b>Δευτεροπαθής</b>	1	12.5%	12	46.2%	9	28.1%	
	<b>Ανδρικός</b>	4	50.0%	16	61.5%	14	43.8%	0.401
	<b>Σαλπιγγικός</b>	0	0.0%	5	19.2%	8	25.0%	0.282
	<b>Ωοθηκικός</b>	4	50.0%	4	15.4%	2	6.3%	0.009
	<b>Ανεξήγητη</b>	2	25.0%	7	26.9%	11	34.4%	0.779
<b>Πρωτόκολλο IVF</b>	<b>Μακρύ</b>	6	75.0%	19	73.1%	24	75.0%	0.985

## **6 Βιβλιογραφία**

1. Wilcox AJ, Weinberg CR, O'Connor JF, Baird DD, Schlatterer JP, Canfield RE, et al. Incidence of early loss of pregnancy. *N Engl J Med* 1988;319:189–94.
2. Zinaman MJ, Clegg ED, Brown CC, O'Connor J, Selevan SG. Estimates of human fertility and pregnancy loss. *Fertil Steril* 1996;65:503–9.
3. Alijotas-Reig J, Garrido-Gimenez C. Current concepts and new trends in the diagnosis and management of recurrent miscarriage. *Obstet Gynecol Surv* 2013;68:445–66.
4. Stephenson MD, Awartani KA, Robinson WP. Cytogenetic analysis of miscarriages from couples with recurrent miscarriage: a case-control study. *Hum Reprod* 2002;17:446–51.
5. Nybo Andersen AM, Wohlfahrt J, Christens P, Olsen J, Melbye M. Maternal age and fetal loss: population based register linkage study. *BMJ* 2000;320:1708–12
6. Evaluation and treatment of recurrent pregnancy loss: a committee opinion. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. *Fertil Steril* 2012;98:1103–11
7. National Institute for Health and Clinical Excellence. Ectopic pregnancy and miscarriage: diagnosis and initial management in early pregnancy of ectopic pregnancy and miscarriage. NICE Clinical Guideline 154. Manchester (UK): NICE; 2012.
8. Brown DL, Emerson DS, Felker RE, Cartier MS, Smith WC. Diagnosis of early embryonic demise by endovaginal sonography. *J Ultrasound Med* 1990;9:631–6.
9. Doubilet PM, Benson CB, Bourne T, Blaivas M, Barnhart KT, Benacerraf BR, et al. Diagnostic criteria for nonviable pregnancy early in the first trimester. Society of Radiologists in Ultrasound Multispecialty Panel on Early First Trimester Diagnosis of Miscarriage and Exclusion of a Viable Intrauterine Pregnancy. *N Engl J Med* 2013;369:1443–51.
10. Doubilet PM, Benson CB, Chow JS. Long-term prognosis of pregnancies complicated by slow embryonic heart rates in the early first trimester. *J Ultrasound Med* 1999;18:537–41.
11. Tuuli MG, Norman SM, Odibo AO, Macones GA, Cahill AG. Perinatal outcomes in women with subchorionic hematoma: a systematic review and meta-analysis. *Obstet Gynecol* 2011;117:1205–12.

12. Luise C, Jermy K, May C, Costello G, Collins WP, Bourne TH. Outcome of expectant management of spontaneous first trimester miscarriage: observational study. *BMJ* 2002;324:873–5.
13. Sotiriadis A, Makrydimas G, Papatheodorou S, Ioannidis JP. Expectant, medical, or surgical management of first-trimester miscarriage: a meta-analysis. *Obstet Gynecol* 2005;105:1104–13.
14. Neilson JP, Hickey M, Vazquez JC. Medical treatment for early fetal death (less than 24 weeks). *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2006, Issue 3. Art. No.: CD002253.
15. Neilson JP, Gyte GM, Hickey M, Vazquez JC, Dou L. Medical treatments for incomplete miscarriage. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2013, Issue 3. Art. No.: CD007223.
16. Nanda K, Lopez LM, Grimes DA, Peloggia A, Nanda G. Expectant care versus surgical treatment for miscarriage. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2012, Issue 3.
17. U.S. Medical Eligibility Criteria for Contraceptive Use, 2010. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *MMWR Recomm Rep* 2010;59(RR-4):1–86.
18. American College of Obstetricians and Gynecologists. Prevention of Rh D alloimmunization. *ACOG Practice Bulletin* 4. Washington, DC: ACOG; 1999.
19. McNamee K, Dawood F, Farquharson RG. Thrombophilia and early pregnancy loss. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2012;26:91–102
20. National Institute for Health and Care Excellence Nice. Fertility problems: assessment and treatment. NICE clinical guidelines (CG156). London: NICE; 2013.
21. Speroff L, Fritz M. *Clinical Gynaecologic Endocrinology and Infertility*, 7<sup>th</sup> edition. Baltimore, MD: Lippincot Williams and Wikins; 2004: 547-71
22. Boivin J, Bunting L, Collins JA, Nygren KG. International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. *Hum Reprod*. 2007 Jun;22(6):1506-12.
23. Franks S, Stark J, Hardy K. Follicle dynamics and anovulation in polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod Update*. 2008 Jul-Aug;14(4):367-78. doi: 10.1093/humupd/dmn015. Epub 2008 May 22. Review. Erratum in: *Hum Reprod Update*. 2008 Sep-Oct; 14(5):539.

24. Tanbo T, Fedorcsak P. Endometriosis-associated infertility: aspects of pathophysiological mechanisms and treatment options. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2017 Jun;96(6):659-667.
25. Macer ML, Taylor HS. Endometriosis and infertility: a review of the pathogenesis and treatment of endometriosis-associated infertility. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 2012 Dec; 39(4):535-49.
26. Roman H. Endometriosis surgery and preservation of fertility, what surgeons should know. *J Visc Surg*. 2018 Apr 27.
27. Quaas A, Dokras A. Diagnosis and Treatment of Unexplained Infertility. *Reviews in Obstetrics and Gynecology*. 2008;1(2):69-76.
28. Rowe, Patrick J, Comhaire, Frank H, Hargreave, Timothy B, Mahmoud, Ahmed M. WHO manual for the standardized investigation, diagnosis and management of the infertile male. Cambridge, UK. Cambridge University Press;2000.
29. Hirsh A. Male subfertility. *BMJ*. 2003 Sep 20;327(7416):669-72.
30. Vandekerckhove P, Lilford R, Vail A, Hughes E. Clomiphene or tamoxifen for idiopathic oligo/asthenospermia. *Cochrane Database Syst Rev*. 2000;(2)
31. Showell MG, Mackenzie-Proctor R, Brown J, Yazdani A, Stankiewicz MT, Hart RJ. Antioxidants for male subfertility. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014;(12):
32. Balercia G, Mancini A, Paggi F, Tiano L, Pontecorvi A, Boscaro M, Lenzi A, Littarru GP. Coenzyme Q10 and male infertility. *J Endocrinol Invest*. 2009 Jul;32(7):626-32.
33. Wosnitzer MS, Goldstein M. Obstructive azoospermia. *Urol Clin North Am*. 2014 Feb;41(1):83-95
34. Younglai EV, Holloway AC, Foster WG. Environmental and occupational factors affecting infertility and ivf success. *Hum Reprod Update* 2005;11(1): 43-57
35. Phillips WR, Cramer DW, Shiff I, Belisle S, Stillman R, Albrecht B, et al. The association between smoking and female infertility as influenced by cause of the infertility. *Fertil. Steril.* 1987;48(3): 377-82.

36. van Rijswijk J, van Welie N, Dreyer K, van Hooff MHA, de Bruin JP, Verhoeve HR, Mol F, Kleiman-Broeze KA, Traas MAF, Muijsers GJHM, Manger AP, Gianotten J, de Koning CH, Koning AMH, Bayram N, van der Ham DP, Vrouenraets FPJM, Kalafusova M, van de Laar BIG, Kaijser J, van Oostwaard MF, Meijer WJ, Broekmans FJM, Valkenburg O, van der Voet LF, van Disseldorp J, Lambers MJ, Peters HE, Lier MCI, Lambalk CB, van Wely M, Bossuyt PMM, Stoker J, van der Veen F, Mol BWJ, Mijatovic V. The FOAM study: is Hysterosalpingo foam sonography (HyFoSy) a cost-effective alternative for hysterosalpingography (HSG) in assessing tubal patency in subfertile women? Study protocol for a randomized controlled trial. *BMC Womens Health.* 2018 May 9;18(1):64.
37. Kuzmin A, Linde V. Diagnostic and remedial capability of transcervical falloposcopy in conjunction with laparoscopy. *Gynecol Endocrinol.* 2014 Oct;30 Suppl 1:17-9.
38. National Institute for Health and Care Excellence Nice. Endometriosis: diagnosis and management. NICE clinical guidelines (NG73). London: NICE; 2017.
39. Ngowa JD, Kasia JM, Georges NT, Nkongo V, Sone C, Fongang E. Comparison of hysterosalpingograms with laparoscopy in the diagnostic of tubal factor of female infertility at the Yaoundé General Hospital, Cameroon. *Pan Afr Med J.* 2015 Nov 19;22:264.
40. Mahran A, Abdelraheim AR, Eissa A, Gadelrab M. Does laparoscopy still has a role in modern fertility practice? *Int J Reprod Biomed (Yazd).* 2017 Dec;15(12):787-794.
41. Cholkeri-Singh A, Sasaki KJ. Hysteroscopy for infertile women: a review. *J Minim Invasive Gynecol.* 2015 Mar-Apr;22(3):353-62.
42. Female age-related fertility decline. Committee opinion No. 589. American College of Obstetricians and Gynaecologists. *Obstet. Gynecol.* 2014;123:719-21
43. Balen AH, Rutherford AJ. Management of infertility. *BMJ.* 2007;335-608.
44. Johnson NP, Bagrie EM, Coomarasamy A, Bhattacharya S, Shelling AN, Jessop S, et al. Ovarian Reserve tests for predicting fertility outcomes for assisted reproductive technology. The International Systematic Collaboration of Ovarian Reserve Evaluation protocol for a systematic review of ovarian reserve test accuracy. *BJOG.* 2006;113(12):1472-80.

45. Johnson N, van Voorst S, Sowter MC, Strandell A, Mol BW. Surgical treatment for tubal disease in women due to undergo in vitro fertilisation. Cochrane Database Syst Rev. 2010 Jan 20;(1)
46. Braam SC, de Bruin JP, Buisman ETIA, Brandes M, Nelen WLDM, Smeenk JMJ, van der Steeg JW, Mol BWJ, Hamilton CJCM. Treatment strategies and cumulative live birth rates in WHO-II ovulation disorders. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2018 Jun;225:84-89.
47. Merviel P, Cabry R, Lourdel E, Barbier F, Scheffler F, Mansouri N, Devaux A, Benkhalifa M, Copin H. [Intrauterine insemination]. Rev Prat. 2014 Jan;64(1):87-9
48. Jungheim ES, Meyer MF, Broughton DE. Best practices for controlled ovarian stimulation in in vitro fertilization. Semin Reprod Med. 2015 Mar;33(2):77-82.
49. La Marca A, Sunkara SK. Individualization of controlled ovarian stimulation in IVF using ovarian reserve markers: from theory to practice. Hum Reprod Update. 2014 Jan-Feb;20(1):124-40.
50. Ferraretti AP, La Marca A, Fauser BC, Tarlatzis B, Nargund G, Gianaroli L; ESHRE working group on Poor Ovarian Response Definition.. ESHRE consensus on the definition of 'poor response' to ovarian stimulation for in vitro fertilization: the Bologna criteria.Hum Reprod. 2011 Jul;26(7):1616-24.
51. Rose BI. Approaches to oocyte retrieval for advanced reproductive technology cycles planning to utilize in vitro maturation: a review of the many choices to be made. Journal of Assisted Reproduction and Genetics. 2014;31(11):1409-1419.
52. Shin DH, Turek PJ. Sperm retrieval techniques. Nat Rev Urol. 2013 Dec;10(12):723-30.
53. Mahadevan MM. Optimization of culture conditions for human in vitro fertilization and embryo transfer. Semin Reprod Endocrinol. 1998;16(3):197-208.
54. Mains L, Van Voorhis BJ. Optimizing the technique of embryo transfer. Fertil Steril. 2010 Aug;94(3):785-90
55. Tiras B, Cenksoy PO. Practice of embryo transfer: recommendations during and after.Semin Reprod Med. 2014 Jul;32(4):291-6. doi: 10.1055/s-0034-1375181. Epub 2014 Jun 11

56. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine.; Practice Committee of the Society for Assisted Reproductive Technology.. Guidelines on number of embryos transferred. *Fertil Steril*. 2009 Nov;92(5):1518-9.
57. ESHRE Guideline Group on Good Practice in IVF Labs., De los Santos MJ, Apter S, Coticchio G, Debrick S, Lundin K, Plancha CE, Prados F, Rienzi L, Verheyen G, Woodward B, Vermeulen N. Revised guidelines for good practice in IVF laboratories (2015). *Hum Reprod*. 2016 Apr;31(4):685-6.
58. van der Linden M, Buckingham K, Farquhar C, Kremer JA, Metwally M. Luteal phase support for assisted reproduction cycles. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015 Jul 7;(7)
59. Schenker JG, Ezra Y. Complications of assisted reproductive techniques. *Fertil Steril*. 1994 Mar;61(3):411-22.
60. Halvaei I, Ghazali S, Nottola SA, Khalili MA. Cleavage-stage embryo micromanipulation in the clinical setting. *Syst Biol Reprod Med*. 2018 Jun;64(3):157-168.
61. Shalom-Paz E, Anabusi S, Michaeli M, Karchovsky-Shoshan E, Rothfarb N, Shavit T, Ellenbogen A. Can intra cytoplasmatic morphologically selected sperm injection (IMSI) technique improve outcome in patients with repeated IVF-ICSI failure? a comparative study. *Gynecol Endocrinol*. 2015 Mar;31(3):247-51.
62. De Vos A, Polyzos NP, Verheyen G, Tournaye H. Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection (IMSI): a critical and evidence-based review. *Basic Clin Androl*. 2013 Nov 8;23:10.
63. Valbuena H, Ramis J, Sagalá J, Sánchez MÁ, Aulesa C. First-trimester screening biochemical markers (free beta-subunit human chorionic gonadotropin, pregnancy-associated plasma protein-A) and risk of early fetal loss. *J Obstet Gynaecol Res*. 2015 Jan;41(1):69-76.
64. Muttukrishna S, Swer M, Suri S, Jamil A, Calleja-Agius J, Ganguly S, Ludlow H, Jurkovic D, Jauniaux E. Soluble Flt-1 and PIGF: new markers of early pregnancy loss? *PLoS One*. 2011 Mar 23;6(3):e18041.

65. Shim SH, Ha HI, Jung YW, Shim SS, Cho YK, Kim JY, Lee KJ, Cha DH, Kim SH, Park HJ. Maternal antimullerian hormone as a predictor of fetal aneuploidy occurring in an early pregnancy loss. *Obstet Gynecol Sci.* 2015 Nov;58(6):494-500.
66. Lee SK, Na BJ, Kim JY, Hur SE, Lee M, Gilman-Sachs A, Kwak-Kim J. Determination of clinical cellular immune markers in women with recurrent pregnancy loss. *Am J Reprod Immunol.* 2013 Nov;70(5):398-411.
67. Kirbas A, Ersoy AO, Daglar K, Dikici T, Biberoglu EH, Kirbas O, Danisman N. Prediction of Preeclampsia by First Trimester Combined Test and Simple Complete Blood Count Parameters. *J Clin Diagn Res.* 2015 Nov;9(11):QC20-3.
68. Wasilewski J, Pyka Ł, Hawranek M, Osadnik T, Kurek A, Skrzypek M, Niedziela J, Desperak P, Kułaczkowska Z, Brzezina M, Krawczyk M, Gąsior M. Prognostic value of neutrophil-to-lymphocyte ratio in predicting long-term mortality in patients with ischemic and nonischemic heart failure. *Pol Arch Med Wewn.* 2016;126(3):166-
69. Balta S, Celik T, Mikhailidis DP, Ozturk C, Demirkol S, Aparci M, Iyisoy A. The Relation Between Atherosclerosis and the Neutrophil-Lymphocyte Ratio. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2016;22(5):405-11.
70. Tang X, Du P, Yang Y. The clinical use of neutrophil-to-lymphocyte ratio in bladder cancer patients: a systematic review and meta-analysis. *Int J Clin Oncol.* 2017;22(5):817-825.
71. Nayak A, McDowell DT, Kellie SJ, Karpelowsky J. Elevated Preoperative Neutrophil-Lymphocyte Ratio is Predictive of a Poorer Prognosis for Pediatric Patients with Solid Tumors. *Ann Surg Oncol.* 2017.
72. Iwase T, Sangai T, Sakakibara M, Sakakibara J, Ishigami E, Hayama S, Nakagawa A, Masuda T, Tabe S, Nagashima T. An increased neutrophil-to-lymphocyte ratio predicts poorer survival following recurrence for patients with breast cancer. *Mol Clin Oncol.* 2017;6(2):266-270.
73. Akinci Ozyurek B, Sahin Ozdemirel T, Buyukyaylaci Ozden S, Erdogan Y, Kaplan.B, Kaplan T. Prognostic Value of the Neutrophil to Lymphocyte Ratio (NLR) in Lung Cancer Cases. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2017;18(5):1417-1421.

74. Huang QT, Zhou L, Zeng WJ, Ma QQ, Wang W, Zhong M, Yu YH. Prognostic Significance of Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio in Ovarian Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis of Observational Studies. *Cell Physiol Biochem*. 2017;41(6):2411-2418.
75. Li MX, Liu XM, Zhang XF, Zhang JF, Wang WL, Zhu Y, Dong J, Cheng JW, Liu ZW, Ma L, Lv Y. Prognostic role of neutrophil-to-lymphocyte ratio in colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Int J Cancer*. 2014;134(10):2403-13.
76. Piciucchi M, Stigliano S, Archibugi L, Zerbini G, Signoretti M, Barucca V, Valente R, Fave GD, Capurso G. The Neutrophil/Lymphocyte Ratio at Diagnosis Is Significantly Associated with Survival in Metastatic Pancreatic Cancer Patients. *Int J Mol Sci*. 2017;18(4).
77. Davis JL, Langan RC, Panageas KS, Zheng J, Postow MA, Brady MS, Ariyan C, Coit DG. Elevated Blood Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio: A Readily Available Biomarker Associated with Death due to Disease in High Risk Nonmetastatic Melanoma. *Ann Surg Oncol*. 2017;24(7):1989-1996.
78. Ilhan G, Atmaca FFV, Altan E, Zebitay AG, Sozen H, Akyol H, Kurek Eken M. Evaluation of Neutrophil-Lymphocyte Ratio, Platelet-Lymphocyte Ratio and Red Blood Cell Distribution Width-Platelet Ratio for Diagnosis of Premature Ovarian Insufficiency. *J Family Reprod Health*. 2016;10(4):211-216.
79. Serin S, Avcı F, Ercan O, Köstü B, Bakacak M, Kiran H. Is neutrophil/lymphocyte ratio a useful marker to predict the severity of pre-eclampsia? *Pregnancy Hypertens*. 2016 Jan;6(1):22-5.
80. Yilmaz H, Celik HT, Namuslu M, Inan O, Onaran Y, Karakurt F, Ayyildiz A, Bilgic MA, Bavbek N, Akcay A. Benefits of the neutrophil-to-lymphocyte ratio for the prediction of gestational diabetes mellitus in pregnant women. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2014 Jan;122(1):39-43.
81. Kirbas A, Biberoglu E, Daglar K, İskender C, Erkaya S, Dede H, Uygur D, Danisman N. Neutrophil-to-lymphocyte ratio as a diagnostic marker of intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2014 Sep;180:12-5.
82. Kim MA, Lee YS, Seo K. Assessment of predictive markers for placental inflammatory response in preterm births. *PLoS One*. 2014 Oct 7;9(10):e107880.

83. Gezer C, Ekin A, Ertas IE, Ozeren M, Solmaz U, Mat E, Taner CE. High first-trimester neutrophil-to-lymphocyte and platelet-to-lymphocyte ratios are indicators for early diagnosis of preeclampsia. Ginekol Pol. 2016;87(6):431-5.
84. Caglayan EK, Engin-Ustun Y, Gocmen AY, Sari N, Seckin L, Kara M, Polat MF. Is there any relationship between serum sirtuin-1 level and neutrophil-lymphocyte ratio in hyperemesis gravidarum? J Perinat Med. 2016 Apr;44(3):315-20.
85. Verit FF, Cetin O, Yildirim O, Keskin S, Yucel O, Yalcinkaya S. Neutrophil to lymphocyte ratio is superior to platelet to lymphocyte ratio as an early predictor of moderate/severe ovarian hyperstimulation syndrome. J Obstet Gynaecol. 2014 Oct;34(7):639-43.
86. Guzel AI, Kokanali MK, Erkilinc S, Topcu HO, Oz M, Ozgu E, Erkaya S, Gungor T. Predictive role of the neutrophil lymphocyte ratio for invasion with gestational trophoblastic disease. Asian Pac J Cancer Prev. 2014;15(10):4203-6.
87. Gelber SE, Brent E, Redecha P, Perino G, Tomlinson S, Davisson RL, Salmon JE. Prevention of Defective Placentation and Pregnancy Loss by Blocking Innate Immune Pathways in a Syngeneic Model of Placental Insufficiency. J Immunol. 2015 Aug 1;195(3):1129-38.
88. Chandra S, Tripathi AK, Mishra S, Amzarul M, Vaish AK. Physiological Changes in Hematological Parameters During Pregnancy. Indian Journal of Hematology & Blood Transfusion. 2012;28(3):144-146.
89. Yazar FM, Bakacak M, Emre A, Urfalioglu A, Serin S, Cengiz E, Bülbüloglu E. Predictive role of neutrophil-to-lymphocyte and platelet-to-lymphocyte ratios for diagnosis of acute appendicitis during pregnancy. Kaohsiung J Med Sci. 2015 Nov;31(11):591-6.
90. İlhan M, İlhan G, Gök AF, Bademler S, Verit Atmaca F, Ertekin C. Evaluation of neutrophil-lymphocyte ratio, platelet-lymphocyte ratio and red blood cell distribution width-platelet ratio as early predictor of acute pancreatitis in pregnancy. J Matern Fetal Neonatal Med. 2016;29(9):1476-80.
91. Pellicer A, Diamond MP, DeCherney AH, Naftolin F. Intraovarian markers of follicular and oocyte maturation. J In Vitro Fert Embryo Transf. 1987;4(4):205-17.

92. Kofod L, Lindhard A, Bzorek M, Eriksen JO, Larsen LG, Hviid TVF. Endometrial immune markers are potential predictors of normal fertility and pregnancy after in vitro fertilization. *Am J Reprod Immunol.* 2017;78(3).
93. Poikkeus P, Hiilesmaa V, Tiitinen A. Serum HCG 12 days after embryo transfer in predicting pregnancy outcome. *Hum Reprod.* 2002 Jul;17(7):1901-5.
94. Carmona F, Balasch J, Creus M, Fábregues F, Casamitjana R, Cívico S, Vidal E, C. Early hormonal markers of pregnancy outcome after in vitro fertilization and embryo transfer. *J Assist Reprod Genet.* 2003;20(12):521-6.
95. Hauzman E, Murber A, Fancsovits P, Papp Z, Urbancsek J. [Use of biochemical markers to predict the outcome of pregnancies conceived by in vitro fertilization]. *Orv Hetil.* 2006;147(30):1409-20.
96. Kim JH, Shin MS, Yi G, Jee BC, Lee JR, Suh CS, Kim SH. Serum biomarkers for predicting pregnancy outcome in women undergoing IVF: human chorionic gonadotropin, progesterone, and inhibin A level at 11 days post-ET. *Clin Exp Reprod Med.* 2012;39(1):28-32.
97. Anifandis G, Koutsolini E, Louridas K, Liakopoulos V, Leivaditis K, Mantzavinos T, Sioutopoulou D, Vamvakopoulos N. Estradiol and leptin as conditional prognostic IVF markers. *Reproduction.* 2005;129(4):531-4.
98. Broer SL, Mol BW, Hendriks D, Broekmans FJ. The role of antimüllerian hormone in prediction of outcome after IVF: comparison with the antral follicle count. *Fertil Steril.* 2009;91(3):705-14.
99. Hazout A, Bouchard P, Seifer DB, Aussage P, Junca AM, Cohen-Bacrie P. Serum antimüllerian hormone/müllerian-inhibiting substance appears to be a more discriminatory marker of assisted reproductive technology outcome than follicle-stimulating hormone, inhibin B, or estradiol. *Fertil Steril.* 2004;82(5):1323-9.
100. Keane K, Cruzat VF, Wagle S, Chaudhary N, Newsholme P, Yovich J. Specific ranges of anti-Mullerian hormone and antral follicle count correlate to provide a prognostic indicator for IVF outcome. *Reprod Biol.* 2017;17(1):51-59.

101. La Marca A, Nelson SM, Sighinolfi G, Manno M, Baraldi E, Roli L, Xella S, Marsella T, Tagliasacchi D, D'Amico R, Volpe A. Anti-Müllerian hormone-based prediction model for a live birth in assisted reproduction. Reprod Biomed Online. 2011;22(4):341-9.
102. Doubilet PM, Benson CB, Bourne T, Blaivas M; Society of Radiologists in Ultrasound Multispecialty Panel on Early First Trimester Diagnosis of Miscarriage and Exclusion of a Viable Intrauterine Pregnancy. Diagnostic criteria for nonviable pregnancy early in the first trimester. Ultrasound Q. 2014 Mar;30(1):3-9.
103. Bai J, Wong FW, Bauman A, Mohsin M. Parity and pregnancy outcomes. Am J Obstet Gynecol. 2002 Feb;186(2):274-8.
104. Sharma V, Allgar V, Rajkhowa M. Factors influencing the cumulative conception rate and discontinuation of in vitro fertilization treatment for infertility. Fertil Steril. 2002 Jul;78(1):40-6.
105. van Loendersloot LL, van Wely M, Limpens J, Bossuyt PM, Repping S, van der Veen F. Predictive factors in in vitro fertilization (IVF): a systematic review and meta-analysis. Hum Reprod Update. 2010;16(6):577-89.
106. Bancsi LF, Huijs AM, den Ouden CT, Broekmans FJ, Loosman CW, Blankenstein MA, te Velde ER. Basal follicle-stimulating hormone levels are of limited value in predicting ongoing pregnancy rates after in vitro fertilization. Fertil Steril. 2000;73(3):552-7.
107. Sabatini L, Zosmer A, Hennessy EM, Tozer A, Al-Shawaf T. Relevance of basal serum FSH to IVF outcome varies with patient age. Reprod Biomed Online. 2008;17(1):10-9.
108. Syrop CH, Dawson JD, Husman KJ, Sparks AE, Van Voorhis BJ. Ovarian volume may predict assisted reproductive outcomes better than follicle stimulating hormone concentration on day 3. Hum Reprod. 1999;14(7):1752-6.
109. Li J, Chen Q, Luo X, Hong J, Pan K, Lin X, Liu X, Zhou L, Wang H, Xu Y, Li H, Duan C. Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio Positively Correlates to Age in Healthy Population. J Clin Lab Anal. 2015;29(6):437-43.



