



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ  
Εθνικόν και Καποδιστριακόν  
Πανεπιστήμιον Αθηνών

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΥΓΕΙΑΣ ΜΗΤΕΡΑΣ – ΠΑΙΔΙΟΥ  
Α' ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ Γ.Ν.Α. «ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ»  
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΛΟΥΤΡΑΔΗΣ

&

ΤΟΜΕΑΣ ΜΟΡΦΟΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ «ΦΥΣΙΟΛΟΓΕΙΟΝ»  
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΜΙΧΑΗΛ ΚΟΥΤΣΙΛΙΕΡΗΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΙΟΝΟΦΟΡΟΥ ΑΣΒΕΣΤΙΟΥ  
ΚΑΙ ΑΥΞΗΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ  
ΣΕ ΑΝΘΡΩΠΙΝΑ ΩΑΡΙΑ ΚΑΙ ΑΝΘΡΩΠΙΝΑ ΕΜΒΡΥΑ  
ΠΡΟΕΜΦΥΤΕΥΤΙΚΟΥ ΣΤΑΔΙΟΥ

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ Α. ΟΙΚΟΝΟΜΟΥ, MSc  
ΚΛΙΝΙΚΟΣ ΕΜΒΡΥΟΛΟΓΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2017



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ  
Εθνικόν και Καποδιστριακόν  
Πανεπιστήμιον Αθηνών

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΥΓΕΙΑΣ ΜΗΤΕΡΑΣ – ΠΑΙΔΙΟΥ  
Α' ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ Γ.Ν.Α. «ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ»  
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΛΟΥΤΡΑΔΗΣ

&

ΤΟΜΕΑΣ ΜΟΡΦΟΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ «ΦΥΣΙΟΛΟΓΕΙΟΝ»  
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΜΙΧΑΗΛ ΚΟΥΤΣΙΛΙΕΡΗΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΙΟΝΟΦΟΡΟΥ ΑΣΒΕΣΤΙΟΥ  
ΚΑΙ ΑΥΞΗΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ  
ΣΕ ΑΝΘΡΩΠΙΝΑ ΩΑΡΙΑ ΚΑΙ ΑΝΘΡΩΠΙΝΑ ΕΜΒΡΥΑ  
ΠΡΟΕΜΦΥΤΕΥΤΙΚΟΥ ΣΤΑΔΙΟΥ

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ Α. ΟΙΚΟΝΟΜΟΥ, MSc  
ΚΛΙΝΙΚΟΣ ΕΜΒΡΥΟΛΟΓΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2017



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ  
Εθνικόν και Καποδιστριακόν  
Πανεπιστήμιον Αθηνών

Στοιχεία Διδακτορικής Διατριβής

Τίτλος διδακτορικής διατριβής: .....	Μελέτη της επίδρασης του ιονοφόρου ασβεστίου και αυξητικού παράγοντα σε ανθρώπινα ωάρια και ανθρώπινα έμβρυα προεμφυτευτικού σταδίου
Υποψήφιος διδάκτωρ: .....	Κωνσταντίνος Οικονόμου του Αντωνίου
Ημερομηνία αιτήσεως του υποψηφίου: .....	18 Οκτωβρίου 2010
Ημερομηνία ορισμού της τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: .....	18 Μαρτίου 2011
Ημερομηνία τροποποίησης της τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: .....	25 Οκτωβρίου 2011
Ημερομηνία ορισμού του θέματος:	12 Δεκεμβρίου 2011
Μέλη της τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: .....	1. Δημήτριος Λουτράδης, Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας Τμήματος Ιατρικής ΕΚΠΑ (επιβλέπων) 2. Μιχαήλ Κουτσαλιέρης, Καθηγητής Φυσιολογίας Τμήματος Ιατρικής ΕΚΠΑ 3. Παναγούλα Αγγελολογιάννη, Επίκουρος Καθηγήτρια Φυσιολογίας Τμήματος Ιατρικής ΕΚΠΑ
Ημερομηνία κατάθεσης της διατριβής: .....	04 Ιανουαρίου 2017
Πρόεδρος του Τμήματος Ιατρικής ΕΚΠΑ: .....	Καθηγητής Πέτρος Π. Σφηκάκης
Μέλη της επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής: .....	1. Δημήτριος Λουτράδης, Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας Τμήματος Ιατρικής ΕΚΠΑ (επιβλέπων) 2. Μιχαήλ Κουτσαλιέρης, Καθηγητής Φυσιολογίας Τμήματος Ιατρικής ΕΚΠΑ 3. Παναγούλα Αγγελολογιάννη, Επίκουρη Καθηγήτρια Φυσιολογίας Τμήματος Ιατρικής ΕΚΠΑ 4. Κωνσταντίνος Καλλιανίδης, Αναπληρωτής Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας Τμήματος Ιατρικής ΕΚΠΑ 5. Νικόλαος Βλάχος, Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας Τμήματος Ιατρικής ΕΚΠΑ 6. Πέτρος Δρακάκης, Αναπληρωτής Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας Τμήματος Ιατρικής ΕΚΠΑ 7. Σταυρούλα Μιχαλά, Επίκουρος Καθηγήτρια Μαιευτικής-Γυναικολογίας Τμήματος Ιατρικής ΕΚΠΑ
Βαθμός με τον οποίο έγινε αποδεκτή η διατριβή: .....	ΑΡΙΣΤΑ



Ι Π Π Ο Κ Ρ Α Τ Ο Υ Σ  
Ο Ρ Κ Ο Σ  
Η Ι Ρ Ρ Ο C Ρ Α Τ Ι Σ  
I V S I V R A N D V M .



**Ο** ΜΝΥΜΙ Ἀπόλλωνα ἰατρῶν καὶ Ἀσκληπιόν· καὶ Ὑγίαν καὶ Πανάκλειαν, ἐξ ἧσιν πύξας καὶ πάσας, ἰσορῶν ποιόμηνος, ὅπι τελέα ποιήσῃ καὶ δυνάμει καὶ κρίσει ἐμῶν, ὄρκον τοῖσι ἐξυγγραφεύσι τούτοις. ἠγήσασθαι μὲν τὸ διδάξαντά με τὸ τέχνην ταύτην, ἴσα ἡμέτεροι ἐμοῖσιν, καὶ βίου κρινάσασθαι καὶ χρῆσθαι χρῆσθῆναι μετὰ δόσιν ποιήσασθαι. καὶ ἡγῆσθαι ὅτι ἐγώ τε, ἀδελφοῖσι ὅσοι ἔπι κρήνην ἄρρῃσι. καὶ διδάξῃ τὴν τέχνην ταύτην, ὡς χρῆσθαι μαθητῶν, ἀπὸ μαθού καὶ ἐξυγγραφεύς. ὅτι ἀρχιτέλης τε καὶ ἀκροπότος, καὶ τῆς λοιπῆς ἀπάσης μαθητός, μετὰ δόσιν ποιήσασθαι ὑποῖσι τε ἐμοῖσι, καὶ τοῖσι τῶν ἐμῶν διδάξασθαι. καὶ μαθητῶσι συγγραμμάτων τε, καὶ ἀρχιτέλεσι νόμοις τε καὶ ἄλλοις δὲ σὸσθῆναι. διατημασί τε χρῆσθαι, ἐπὶ ὠφελείῃ καμρόντων καὶ δυνάμει καὶ κρίσει ἐμῶν. ὅτι δὴ λήσῃ δὲ ἐξ ἀδικίᾳ εἰρήνην. ὡς δὲ δόσω δὲ σὸσθῆναι φάρμακον σὸσθῆναι αἰτητῆσι, θανάσιμοι. σὸσθῆναι ὑψηλὸν καὶ συμβουλίῃσι τοιούτοις. ὁμοίως δὲ σὸσθῆναι πᾶσι φθόρον δόσω. ἀγνάς δὲ καὶ ὁμοίως ἀφ᾽ ἑτέρου βίου τὸν ἐμὸν καὶ τέχνην τὴν ἐμῶν. οὐ τεμῶ δὲ σὸσθῆναι λιθιανθῶν. ὅτι ἀφ᾽ ἑτέρου δὲ ἐργάτησιν ἀδράσι φθόρος τῆς δὲ. εἰς οἰκίας δὲ ὀκράσας αἰεσίως, ἐπὶ δόσω ἐπὶ ὠφελείῃ καμρόντων, ὅτι ὅσον πᾶσι ἀδικίᾳ ἐκείσιν καὶ φθόρος τῆς τε ἄλλης καὶ ἀφ᾽ ὀκράσας ἐργῶν, ὅτι τε γυναικείων σωματῶν καὶ ἀδράων, ἐλευθέρων τε καὶ δούλων. ἀλλ᾽ αἰετὸν ἀφ᾽ ἑτέρου ἢ ἰδῶν, ἢ ἀκροπότος, ἢ καὶ ἀπὸ φαρμακείας καὶ βίου ἀφ᾽ ἑτέρου, ἀπὸ χρῆσθαι ὅτι ἀφ᾽ ἑτέρου ἐξω, σιγήσῃσι, ἀρρῃσθαι ἡγήσασθαι ἐπὶ τῶν ταύτων. ὄρκον μὲν οὖν τοῖσι τούτοις ὅπι τελέα ποιήσῃ, ἢ καὶ μὴ χρῆσθῆναι, εἴη ἐπαύρασθαι, καὶ βίου ἐξυγγραφεύς, δόσω ζυμῶν τῶν καὶ πᾶσι ἀφ᾽ ἑτέρου, εἰς τὸν αἰετὸν φθόρον καὶ ἀφ᾽ ἑτέρου, τῶν ταύτων ὅτι τε.



**E** R Apollinem Medicum, & Esculapium, Hygiamque & Panaceam iureiurando affirmo, & Deos Deasque omnes testor, me quantum viribus & iudicio valuerō, quod nunc iuro, & ex scripto spondeo planè observaturū. Præceptorem quidem qui me hanc artem edocuit, parentum loco habiturum, eiq̃e cum ad victum, tum etiam ad vltim necessaria, grato animo communicaturum & suppeditaturum. Eiusque posteros apud me eodem loco quo germanos fratres fore, eosque si hanc artem addiscere volent, absque mercede & syngrapha edociturum. Præceptionum quoque & auditionum, totiusque reliquæ disciplinæ, cum meos & eius qui me edocuit liberos, tum discipulos qui Medico iureiurando nomen fidemque dederint, participes facturum, aliorum præterea neminem. Vitæ quoque rationem, quantum facultate & iudicio consequi poterō, ægris vltim me præscripturnum, eosque ab omni noxia & iniuria vindicaturum. Neque cuiusquam precibus adductus, alicui medicamentum lethale propinabo, neque huius rei author ero. Neque simili ratione mulieri pessum subdititium ad fœtum cotrumpendum exhibebo: sed castam & ab omni scelere puram, tum vitam, tum ætatem meam perpetuò præstabo. Neque verò calculo laborantes fecabo, sed magistris eius artis peritis id muneris concedam. In quantumque autem domum ingressus fuero, ad ægrotantium salutem ingrediari, omnem iniuriæ inferendæ & corruptelæ suspicionem procul fugiens, tum vel maximè rerum venerarum cupiditatem, erga mulieres iuxta ac viros, tum ingenuos, tum seruos. Quæ verò inter curandum, aut etiam Medicinam minimè faciens, in communi hominum vita, vel videro, vel audiero, quæ minimè in vulgus efferri oporteat, ea arcana esse ratus, silebo. Hoc igitur iusiurandum si religiosè observaro, ac minimè irritum fecero, mihi liceat cum summa apud omnes existimatione perpetuò vitam felicem degere, & artis vberimum fructum percipere. Quòd si illud violauero & peierauerò, contraria mihi contingant.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

**Σκοπός:** Η ενεργοποίηση ωαρίων με τη βοήθεια ιονοφόρων διαύλων ασβεστίου και η ενίσχυση του αναπτυξιακού δυναμικού των εμβρύων με τον αυξητικό παράγοντα GM-CSF είναι γνωστές. Στην παρούσα μελέτη αξιολογήθηκε η συνεργιστική επίδραση της εφαρμογής των δύο αυτών μεθόδων σε μη γονιμοποιημένα ωάρια ανθρώπου έπειτα από μικρογονιμοποίηση (ICSI). Στη συνέχεια, τα έμβρυα καλλιεργήθηκαν μέχρι το στάδιο της βλαστοκύστης, και εξετάστηκαν για πιθανές χρωμοσωματικές ανωμαλίες, προκειμένου να προσδιοριστεί η ασφάλεια του πρωτοκόλλου.

**Μέθοδοι:** Ωάρια που δεν είχαν γονιμοποιηθεί 18 h μετά την ICSI υπέστησαν ενεργοποίηση, είτε με βραχυχρόνια εφαρμογή του ιονοφόρου ασβεστίου A23187 (ομάδα A) είτε με βραχυχρόνια εφαρμογή το ιονοφόρου ασβεστίου A23187 και επακόλουθη προσθήκη ανασυνδυσμένου ανθρώπινου GM-CSF (ομάδα B). Η ανάπτυξη των εμβρύων παρατηρήθηκε σε επωαστικό κλίβανο εφοδιασμένο με σύστημα μικροφωτογράφισης με χρονοδιολίσθηση και η πλοειδία τους αναλύθηκε με συγκριτικό γονιδιωματικό υβριδισμό σε μικροσυστοιχίες DNA (aCGH), έπειτα από ολική βιοψία και ενίσχυση του ολικού γονιδιώματος. Οι διαφορές μεταξύ των ωαρίων και των εμβρύων στις δύο ομάδες εκτιμήθηκαν στατιστικά.

**Αποτελέσματα:** Ωοκύτταρα που δεν γονιμοποιήθηκαν έπειτα από ICSI είναι δυνατόν να ενεργοποιηθούν με τη χρήση ιονοφόρου ασβεστίου A23187 και να εμφανίσουν δύο προπυρήνες και δύο πολικά σωμάτια. Η προσθήκη rhGM-CSF στο καλλιεργητικό μέσον ενισχύει το δυναμικό αυλάκωσης και δημιουργίας βλαστοκύστεων, οδηγώντας στην ανάπτυξη περισσότερων ευπλοειδών βλαστοκύστεων σε σύγκριση με καλλιεργητικό μέσον χωρίς προσθήκη αυξητικού παράγοντα.

**Συμπεράσματα:** Η έκθεση ανθρώπινων μη γονιμοποιημένων ωαρίων 18 h μετά την ICSI σε συνδυασμό ιονοφόρου ασβεστίου A23187 και κυτταροκίνη GM-CSF είναι δυνατόν να διασώσει τα ωάρια και να οδηγήσει στην ανάπτυξη ευπλοειδών βλαστοκύστεων καλής μορφολογίας, δυνητικά χρήσιμες για κλινική εφαρμογή.

**Λέξεις κλειδιά:** ιονοφόρος ασβεστίου A23187, GM-CSF, τεχνητή ενεργοποίηση ωοκυττάρου, aCGH, ICSI, αποτυχία γονιμοποίησης

## SUMMARY

**Purpose** Artificial oocyte activation using calcium ionophores and enhancement of embryonic developmental potential by the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) have already been reported. In this study, we evaluated the synergistic effect of these two methods on aged human unfertilized oocytes after intracytoplasmic sperm injection (ICSI). Then, we cultured the resulting embryos to the blastocyst stage and screened them for chromosomal abnormalities, to assess the safety of this protocol.

**Methods** Aged human oocytes deemed unfertilized after ICSI were activated, either by briefly applying the calcium ionophore A23187 alone (group A) or by briefly applying the ionophore and then supplementing the culture medium with recombinant human GM-CSF (rhGM-CSF) (group B). Next, embryo development was monitored in a time-lapse incubator system, and ploidy was analyzed by array comparative genomic hybridization (aCGH), after whole embryo biopsy and whole genome amplification. Differences between oocytes and resulting embryos in both groups were evaluated statistically.

**Results** Oocytes unfertilized after ICSI can be activated with the calcium ionophore A23187 to show two pronuclei and two polar bodies. Addition of rhGM-CSF in the culture medium of A23187-activated oocytes enhances their cleaving and blastulation potential and results in more euploid blastocysts compared to the culture medium alone.

**Conclusions** The exposure of human unfertilized oocytes 18 h after ICSI to a combination of calcium ionophore A23187 and the GM-CSF cytokine can safely salvage the oocytes, resulting in the development of good-morphology, euploid blastocysts, with potential clinical use.

**Keywords:** calcium ionophore A23187, GM-CSF, artificial oocyte activation, aCGH, ICSI, fertilization failure

## Αφιερώσεις

Στους γονείς μου, Αντώνιο και Αλεξάνδρα  
Στην αδερφή μου, Μάρβη

Στη σύζυγό μου, Ελένη  
και στον γιο μου, Αντώνιο

Στη μνήμη του Robert G. Edwards

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Ευχαριστίες .....	vii
Πρόλογος.....	x
Βιογραφικό Σημείωμα.....	xii
Πίνακας συντομογραφιών .....	xiv
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	1
1.1 ΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑ .....	1
1.1.1 Η αναπαραγωγή στον άνθρωπο .....	1
1.1.2 Η ανθρώπινη υπογονιμότητα .....	12
1.2 ΙΑΤΡΙΚΩΣ ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ .....	16
1.2.1 Ιστορική αναδρομή .....	16
1.2.2 Μέθοδοι ΙΥΑ .....	25
1.2.3 Επιμέρους τεχνικές.....	27
1.3 ΑΠΟΤΥΧΙΑ ΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗΣ .....	43
1.3.1 Το πρόβλημα της αποτυχίας γονιμοποίησης .....	43
1.3.2 Μηχανισμός της ενεργοποίησης του ωαρίου .....	44
1.3.3 Τεχνητή ενεργοποίηση του ωαρίου.....	46
1.3.4 Επιπτώσεις της αποτυχίας γονιμοποίησης στον ασθενή .....	50
1.4 ΑΥΞΗΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΣΤΗΝ IVF.....	51
1.4.1 Χρήση αυξητικών παραγόντων στα καλλιεργητικά μέσα.....	51
1.4.2 Ο παράγων GM-CSF και η χρήση του στην εξωσωματική γονιμοποίηση .....	52
1.5 ΩΡΙΜΑΣΗ ΩΑΡΙΩΝ <i>IN VITRO</i> .....	55
1.6 ΣΚΟΠΟΙ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ .....	56
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....	58
2.1 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	58
2.2 ΑΣΘΕΝΕΙΣ .....	59
2.2.1 Ενημέρωση.....	60
2.2.2 Έγγραφη συναίνεση .....	60
2.3 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑ.....	61
2.4 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	62
2.4.1 Εγκρίσεις του πρωτοκόλλου .....	62
2.4.2 Διέγερση της ωοθηκικής λειτουργίας .....	62
2.4.3 Διασφάλιση ποιότητας .....	63
2.4.4 Ωοληψία .....	64
2.4.5 Κατεργασία του σπέρματος .....	66
2.4.6 Απομόνωση σπερματοζωαρίων από υλικό βιοψίας όρχεως.....	70
2.4.7 Απογύμνωση των ωαρίων .....	72
2.4.8 Ωρίμαση ωαρίων <i>in vitro</i> .....	77
2.4.9 Μικρογονιμοποίηση .....	80



2.4.10	Καλλιέργεια και παρακολούθηση με απεικόνιση χρονοδιολίσθησης .....	84
2.4.11	Τεχνητή ενεργοποίηση ωαρίων από ωρίμαση <i>in vitro</i> με τον ιονοφόρο ασβεστίου A23187 .....	88
2.4.12	Τεχνητή ενεργοποίηση με τον ιονοφόρο ασβεστίου A23187, ωαρίων που δεν γονιμοποιήθηκαν ύστερα από ICSI.....	90
2.4.13	Καλλιέργεια ωαρίων με τον αυξητικό παράγοντα rhGM-CSF μετά την τεχνητή ενεργοποίησή τους με τον ιονοφόρο ασβεστίου A23187.....	91
2.4.14	Αξιολόγηση της γονιμοποίησης και των σταδίων της αυλάκωσης .....	93
2.4.15	Ολική βιοψία εμβρύων.....	97
2.4.16	Συγκριτικός γονιδιωματικός υβριδισμός σε μικροσυστοιχίες DNA .....	101
2.4.17	Τυχαιοποίηση.....	104
2.4.18	Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων με τη μέθοδο της δοκιμής ακριβείας κατά Fischer.....	104
3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	106
3.1	Τεχνητή ενεργοποίηση ωαρίων ύστερα από ωρίμαση <i>in vitro</i> .....	106
3.1.1	Ωρίμαση ωαρίων <i>in vitro</i> .....	106
3.1.2	Τεχνητή ενεργοποίηση ωαρίων με ιονοφόρο ασβεστίου A23187.....	108
3.2	Τεχνητή ενεργοποίηση ωαρίων με ιονοφόρο ασβεστίου A23187 ύστερα από αποτυχία γονιμοποίησης με ICSI.....	111
3.3	Καλλιέργεια με προσθήκη αυξητικού παράγοντα GM-CSF ύστερα από τεχνητή ενεργοποίηση με ιονοφόρο ασβεστίου A23187 .....	114
3.4	Σύγκριση της ενεργοποίησης στις ομάδες A και B .....	116
3.5	Ανάλυση της εξέλιξης των εμβρύων .....	117
3.5.1	Παρατηρήσεις από το σύστημα χρονοδιολίσθησης .....	117
3.6	Γενετική ανάλυση .....	127
3.6.1	Ολική βιοψία των εμβρύων 5 <sup>h</sup> ημέρας στις ομάδες A και B.....	127
3.6.2	Αποτελέσματα γενετικής ανάλυσης με aCGH .....	129
3.7	Φυσιολογικά έμβρυα στην ομάδα B .....	135
4.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	136
4.1	Συνοπτικά συμπεράσματα.....	136
4.2	Συζήτηση των ευρημάτων της μελέτης.....	136
4.3	Γενικά συμπεράσματα.....	144
4.4	Επίτευξη των σκοπών της μελέτης.....	145
4.5	Προοπτικές.....	145
4.6	Δημοσίευση των κυριότερων ευρημάτων της μελέτης στο περιοδικό <i>Journal of Assisted Reproduction and Genetics</i> .....	146
5.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	147
5.1	Παραπομπές σε ηλεκτρονικές διευθύνσεις (υποσέλιδες σημειώσεις).....	147
5.2	Έντυπη βιβλιογραφία .....	149

*“I’ll never get forget the day I looked down the microscope and saw something funny in the cultures. What I saw was a human blastocyst gazing up at me. I thought, ‘We’ve done it’. The most important thing in life is having a child.”*

*“Ποτέ δε θα ξεχάσω την ημέρα που κοίταξα στο μικροσκόπιο και παρατήρησα κάτι περίεργο στις καλλιέργειες. Αυτό που είδα ήταν μια ανθρώπινη βλαστοκύστη που με κοιτούσε. Τότε σκέφτηκα, «Τα καταφέραμε». Το πιο σημαντικό πράγμα στη ζωή, είναι να αποκτήσεις ένα παιδί.”*

**Sir Robert G. Edwards, PhD (1925–2013)**

Βραβείο Nobel Φυσιολογίας ή Ιατρικής 2010

*“για την ανάπτυξη της εξωσωματικής γονιμοποίησης”*

([http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/2010/](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2010/))

## Ευχαριστίες

Οφείλω να ευχαριστήσω πρώτους εκείνους που με έφεραν στη ζωή και μου έδωσαν τα εφόδια για να πορευτώ τον δύσκολο δρόμο της. Είναι οι ίδιοι άνθρωποι που πάντα με εμπυχώνουν να επιτύχω υψηλότερους στόχους, οι γονείς μου, Αντώνιος και Αλεξάνδρα. Ευχαριστώ την αδελφή μου Μάρβη για τη συμπαράσταση και στήριξή της καθ' όλη την πορεία της διατριβής.

Ένα απέραντο ευχαριστώ οφείλω στο άλλο μου μισό στη ζωή, τη σύζυγό μου Ελένη, για την εμπύχωση που μου παρείχε και την κατανόηση και υπομονή της στις δύσκολες στιγμές αυτής της πορείας. Στο λατρεμένο μου γιο Αντώνιο, οφείλω ευχαριστώ για το γλυκό του χαμόγελο που με αποφόρτιζε και εξαφάνιζε κάθε σύννεφο του νου μου.

Θα επιθυμούσα να ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητή μαιευτικής-γυναικολογίας της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ, διευθυντή της Α΄ Μαιευτικής και Γυναικολογικής κλινικής του Νοσοκομείου “Αλεξάνδρα” και επιβλέποντα αυτής της διδακτορικής διατριβής, Δημήτριο Λουτράδη, για τη βοήθεια, την υπομονή, τη μεταλαμπάδευση των γνώσεών του και τη στήριξη μέχρι την ολοκλήρωση της διατριβής. Τον ευχαριστώ για την έμπνευση που είχε να ασχοληθώ με την ενεργοποίηση ανθρώπινων ωαρίων, έχοντας ο ίδιος προηγούμενη εμπειρία από αυτή την τεχνολογία. Χωρίς τη συμβολή του δεν θα μπορούσα να ολοκληρώσω αυτό το πόνημα.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ αρμόζει στο μέλος της συμβουλευτικής επιτροπής, καθηγητή φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ και διευθυντή του εργαστηρίου Πειραματικής Φυσιολογίας, Μιχαήλ Κουτσιλιέρη, για την πολύτιμη βοήθειά του και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντάς μου τη διδακτορική αυτή διατριβή και επιτρέποντάς μου να εργαστώ στους χώρους του Εργαστηρίου για την επεξεργασία των κλινικών αποτελεσμάτων της μελέτης.

Ευχαριστώ θερμά την επίκουρο καθηγήτρια του τμήματος Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ και μέλος της συμβουλευτικής επιτροπής, Παναγούλα Αγγελογιάννη, για την στήριξη και τη συμπαράστασή της.

Ευχαριστώ τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς επιτροπής για την προθυμία τους να ελέγξουν την παρούσα εργασία, επενδύοντάς την έτσι με το σημαντικό επιστημονικό κύρος τους.

Ευχαριστώ θερμά τη γραμματέα του τμήματος Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ, Ελένη Τριάντου, και τις γραμματείς της Α΄ Μαιευτικής και Γυναικολογικής κλινικής του Νοσοκομείου “Αλεξάνδρα”, Σοφία Κυριακάκη και Μυρτιά Μποχρίνη, για την αποτελεσματική βοήθειά τους με τα διαδικαστικά θέματα που διαρκώς ανέκυπταν στην πορεία της διατριβής.

Από τα βάθη της καρδιάς μου θέλω να ευχαριστήσω τον κλινικό διευθυντή της ΜΙΥΑ “Εμβρυογένεσις”, μαιευτήρα-γυναικολόγο Μηνά Μαστρομηνά, για την καίρια συμβολή του στο έργο αυτό, αφού έθεσε στη διάθεσή μου για την παρούσα μελέτη το πιο πολύτιμο ανθρώπινο υλικό από τα κλινικά περιστατικά της ΜΙΥΑ “Εμβρυογένεσις”, αναλαμβάνοντας παράλληλα και την κάλυψη της δαπάνης των αναλωσίμων για τα πειράματα. Επίσης, τον ευχαριστώ θερμά για τη αμέριστη πρακτική βοήθειά του σε βάθος χρόνου, από την κλινική διαχείριση, την παρακολούθηση των περιστατικών και την ωληψία, έως τη συλλογή των αποτελεσμάτων, καθώς και για την γενικότερη ηθική του στήριξη και συμπαράσταση σε όλες τις φάσεις της διατριβής.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμότερα τις γενετίστριες της ΜΙΥΑ “Εμβρυογένεσις”, Δήμητρα Χριστόπικου και Ερικαίτη Τσορβά, για την πολύτιμη βοήθειά τους με την γενετική ανάλυση των ανθρώπινων εμβρύων που προέκυψαν από τις πειραματικές διαδικασίες. Χωρίς τη συμβολή τους, η πραγμάτωση αυτής της διατριβής θα ήταν ανέφικτη.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στους συναδέλφους μου κλινικούς εμβρυολόγους στη ΜΙΥΑ “Εμβρυογένεσις” και συγκεκριμένα στον επιστημονικό διευθυντή της, Stephen Davies, στη Μαρίνα Αργυρού, στην Παρασκευή Σίση και στη Χρύσα Πασχαλίδου, για τη συμπαράσταση και τη στήριξή τους. Ιδιαίτερος ευχαριστώ τις συναδέλφους κλινικούς εμβρυολόγους Ανδριανή Καραγιάννη και Χριστίνα Μεντώρου για τη βοήθεια που μου προσέφεραν, αποφορτίζοντάς με κάποιες φορές από τη ρουτίνα του καθημερινού έργου στο εργαστήριο, ώστε να επικεντρωθώ στα πειράματά μου. Ευχαριστώ επίσης θερμά και όλο το υπόλοιπο προσωπικό της Μονάδας γιατί όλοι τους συνέβαλαν, με το δικό τους λιθαράκι ο καθένας, στην επίτευξη του στόχου μου. Ευχαριστώ ακόμη τον εξωτερικό επιστημονικό συνεργάτη της Μονάδας και φίλο Χάρη Καζλαρή, κλινικό εμβρυολόγο και λέκτορα εμβρυολογίας, για τις χρήσιμες παρατηρήσεις και επισημάνσεις του κατά τη συγγραφή της διατριβής.

Οφείλω βεβαίως και ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλα εκείνα τα ζευγάρια που υποβλήθηκαν σε εξωσωματική γονιμοποίηση στη ΜΙΥΑ “Εμβρυογένεσις”, τα οποία, παρά τη δική τους αγωνία, συμμερίστηκαν την προσπάθειά μου και προσέφεραν τα ωάρια και τα έμβρυά τους για την παρούσα έρευνα.

Επίσης, σε αυτή τη σημαντική καμπή της επιστημονικής μου πορείας, πολλές ευχαριστίες αρμόζουν στον μέντορά μου, μαιευτήρα-γυναικολόγο Mohamed Taranissi, κλινικό διευθυντή της κλινικής *Assisted Reproduction and Gynaecology Centre* του Λονδίνου, στην οποία ειδικεύθηκα και εργάστηκα ως κλινικός εμβρυολόγος, γιατί αποτελεί για εμένα διαρκή πηγή έμπνευσης και επιστημονικής διέγερσης σε κάθε μου ταξίδι αναζήτησης στην κλινική εμβρυολογία, με απώτερο στόχο την βοήθεια των υπογόνιμων ζευγαριών.

Τέλος, ευχαριστώ τον αείμνηστο μεγάλο δάσκαλο όλων μας, χωρίς τον οποίο δεν θα μιλούσαμε σήμερα για εξωσωματική γονιμοποίηση: τον νομπελίστα βιολόγο-κλινικό εμβρυολόγο Sir Robert G. Edwards, οι προσπάθειες του οποίου, με τον Patrick Steptoe, οδήγησαν στη γέννηση του πρώτου παιδιού από εξωσωματική γονιμοποίηση, της Louise Brown, στις 25 Ιουλίου 1978 στην Αγγλία, και εκατομμυρίων παιδιών ανά τον κόσμο έκτοτε. Ο Edwards είχε πει: “Δεν υπάρχει πιο σημαντικό πράγμα στον κόσμο από το να αποκτήσεις ένα παιδί”.

## Πρόλογος

Η πραγμάτωση μιας διδακτορικής διατριβής αποτελεί προσωπικό μου στόχο από την έναρξη της πορείας μου ως κλινικού εμβρυολόγου στο Λονδίνο, το 2003. Η πίεση και τα ωάρια της κλινικής δουλειάς δεν μου επέτρεψαν να εκπληρώσω τον διακαή μου πόθο.

Με την επιστροφή μου από την Αγγλία στην Ελλάδα το 2009 και έπειτα από συζητήσεις για πιθανές ερευνητικές προοπτικές με τον διευθυντή της ΜΙΥΑ “Εμβρυογένεσις” Δρα Μηνά Μαστρομηνά, όπου και εργάζομαι, ανέτειλε ξανά μέσα μου η επιθυμία εκπόνησης της διδακτορικής διατριβής. Το τμήμα Μαιευτικής και Γυναικολογίας και το τμήμα Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ, και οι διευθυντές των τμημάτων αυτών, Καθηγητές Δημήτριος Λουτράδης και Μιχαήλ Κουτσιλιέρης, με βοήθησαν να επιλέξω το ερευνητικό θέμα: τελικά η διατριβή ξεκίνησε με τον ορισμό της αρχικής τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, στις 18 Μαρτίου 2011.

Ο ορισμός του θέματος της διατριβής δεν αποτέλεσε λιγότερο επίπονη διαδικασία. Τον πρώτο χρόνο ασχολήθηκα με το μεταβολικό προφίλ ανθρώπινων προεμφυτευτικών εμβρύων, με στόχο να προβλέψω ποια έμβρυα, με βάση το μεταβολικό τους προφίλ, θα οδηγούσαν σε εγκυμοσύνη και γέννηση παιδιών. Δυστυχώς, τα πειράματα αυτά δεν είχαν αποτέλεσμα.

Εγκαταλείποντας αυτή την ιδέα, μελέτησα την επίδραση αυξητικών παραγόντων και ορμονών σε ανθρώπινα ωάρια και σε ανθρώπινα προεμφυτευτικά έμβρυα. Ήρθα αντιμέτωπος με ένα πρόβλημα σχετικά με την πηγή των εμβρύων που θα χρησιμοποιούσα, αφού η δημιουργία υγιών ανθρώπινων εμβρύων για ερευνητικούς σκοπούς αντίκειται στις αρχές της βιοηθικής, στην εθνική νομοθεσία και στον κώδικα δεοντολογίας του κλινικού εμβρυολόγου. Ο επιβλέπων καθηγητής μου, κ. Λουτράδης, με ενημέρωσε για μια τεχνολογία ενεργοποίησης ανθρώπινων ωαρίων με ιονοφόρο διάλυο ασβεστίου A23187, την οποία ο ίδιος είχε χρησιμοποιήσει για τη δημιουργία εμβρύων, με στόχο την παραγωγή στελεχιαίων κυττάρων.

Αυτό το δεδομένο, σε συνδυασμό με το εύρημα ότι ο αυξητικός παράγων GM-CSF έχει ευεργετική επίδραση στα ανθρώπινα προεμφυτευτικά έμβρυα, μου έδωσαν την ιδέα της παρούσας διατριβής: να μελετήσω για πρώτη φορά την συνεργατική επίδραση αυτών των δύο παραγόντων, του ιονοφόρου ασβεστίου A23187 και του GM-CSF, σε μη γονιμοποιημένα ανθρώπινα ωάρια και στα παραγόμενα έμβρυα. Η εργασία θα

υποστηριζόταν με τη μορφολογική παρατήρηση και τη γενετική ανάλυση των ωαρίων και των εμβρύων με τις πλέον σύγχρονες διαθέσιμες τεχνολογίες της κλινικής εμβρυολογίας: την παρακολούθηση της καλλιέργειας με μικροφωτογράφιση χρονοδιολίσθησης (σύστημα Embryoscope®) και τη χρωμοσωματική ανάλυση με συγκριτικό γονιδιωματικό υβριδισμό σε μικροσυστοιχίες DNA (aCGH).

Το πειραματικό μέρος της παρούσας διδακτορικής διατριβής διενεργήθηκε σε συνεργασία μεταξύ του Εργαστηρίου Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ, του Μαιευτηρίου “Αλεξάνδρα” και της ΜΙΥΑ “Εμβρυογένεσις”, από όπου προήλθε το υλικό. Η “Εμβρυογένεσις” έχει να επιδείξει σημαντικό έργο, με συνολικά περισσότερες από 60.000 προσπάθειες εξωσωματικής γονιμοποίησης και περισσότερες από 20.000 γεννήσεις, καθώς και καθοριστικές καινοτομίες στην Ελλάδα, όπως η πρώτη κλινική εφαρμογή της προεμφυτευτικής γενετικής διάγνωσης (σε περιστατικό β-μεσογειακής αναιμίας, σε συνεργασία με το Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής του Πανεπιστημίου Αθηνών στο Χωρέμιο Ερευνητικό Εργαστήριο), η πρώτη εφαρμογή προεμφυτευτικής διάγνωσης από βιοψία πολικών σωματίων, η πρώτη εφαρμογή της μεθόδου aCGH και της μεθόδου παρακολούθησης της καλλιέργειας εμβρύων με μικροφωτογράφιση χρονοδιολίσθησης. Η κλινική αναλαμβάνει περί τους 3.000 κύκλους εξωσωματικής γονιμοποίησης ετησίως, γεγονός που θα διευκόλυνε πολύ την εξεύρεση του απαραίτητου υλικού (μη γονιμοποιημένων ωαρίων) για τα πειράματα.

Η ιδέα μιας εργασίας με αποτέλεσμα το οποίο θα είχε πιθανή κλινική εφαρμογή υπήρχε από την αρχή του σχεδιασμού της διατριβής. Προσπάθησα να αναπτύξω ένα πρωτόκολλο διάσωσης των περιστατικών, στα οποία παρατηρείται απροσδόκητα χαμηλό ποσοστό γονιμοποίησης ή απουσία γονιμοποίησης ύστερα από ICSI. Για τα ζευγάρια αυτά, η επανάληψη του κύκλου ήταν μέχρι τώρα μονόδρομος. Η αδήριτη ανάγκη να βοηθήσω αυτά τα ζευγάρια με οδήγησε στην επιλογή του θέματος της διατριβής.

Η διατριβή ολοκληρώθηκε το 2016 και η έκβασή της ήταν θετική. Αναπτύξαμε ένα πρωτόκολλο, το οποίο θα μπορούσε να εφαρμοσθεί κλινικά και να διασώσει τα περιστατικά με απροσδόκητα χαμηλό ποσοστό γονιμοποίησης ή απουσία γονιμοποίησης ύστερα από ICSI. Τα αποτελέσματα δημοσιεύθηκαν στο έγκριτο διεθνές επιστημονικό περιοδικό *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. Το επόμενο βήμα είναι η κλινική εφαρμογή του πρωτοκόλλου αυτού στη ΜΙΥΑ “Εμβρυογένεσις”.

Καταλήξαμε λοιπόν στον προορισμό, αλλά, όπως πάντα, *το ταξίδι είχε σημασία...*

## Βιογραφικό Σημείωμα



Γεννήθηκα στις 24 Σεπτεμβρίου 1979. Αποφοίτησα το 2002 από το **Τμήμα Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης** με βαθμό “Λίαν Καλώς” και εξειδίκευση στη Μοριακή Γενετική Ανθρώπου. Το 2003 απέκτησα τον μεταπτυχιακό τίτλο σπουδών “*M.Sc. in Prenatal Genetics and Fetal Medicine*” από το **University College London** του Λονδίνου, όπου εξειδικεύτηκα στην εμβρυολογία του ανθρώπου, στην κλινική εμβρυολογία, στην προεμφυτευτική γενετική διάγνωση, στην ιατρική του εμβρύου, στην προγεννητική διάγνωση και στη γενετική του ανθρώπου.

Από το 2003 έως το 2006 εργάσθηκα αρχικά ως ειδικευόμενος κλινικός εμβρυολόγος και στη συνέχεια ως senior κλινικός εμβρυολόγος και ειδικός βιοψίας εμβρύων στην ιδιωτική κλινική **London Fertility Centre** υπό την καθοδήγηση του καθηγητού Μαιευτικής-Γυναικολογίας **Ian L. Craft**, FRCS, FRCOG. Το 2004 απέκτησα την ειδική άδεια μικροχειρουργικής ωαρίων (**ICSI License**) του Ηνωμένου Βασιλείου, ενώ το 2006 την αντίστοιχη άδεια βιοψίας εμβρύων (**Embryo Biopsy License**). Το 2006 εκπλήρωσα την επίσημη εκπαίδευση κλινικών εμβρυολόγων του Ηνωμένου Βασιλείου και έλαβα την πιστοποίηση **Certificate in Clinical Embryology** από το Υπουργείο Υγείας της Αγγλίας.

Από το 2006 έως το 2008 εργάσθηκα ως Senior κλινικός εμβρυολόγος και ειδικός βιοψίας εμβρύων στην ιδιωτική κλινική **Assisted Reproduction and Gynaecology Centre** του Λονδίνου, υπό την καθοδήγηση του Μαιευτήρα-Γυναικολόγου Dr. **Mohamed Taranissi**, MRCOG, όπου και ειδικεύθηκα στη βιοψία πολικών σωματίων.

Από το 2008 έως το 2009 υπηρέτησα τη στρατιωτική μου θητεία στην Πολεμική Αεροπορία.

Από το 2009 έως σήμερα εργάζομαι ως Senior κλινικός εμβρυολόγος και ειδικός βιοψίας εμβρύων και πολικών σωματίων στη ΜΙΥΑ “*Εμβρυογένεσις*” στην Αθήνα, υπό την καθοδήγηση του Μαιευτήρα-Γυναικολόγου Μηνά Μαστρομηνά, MD-PhD.



Η κλινική μου εμπειρία περιλαμβάνει όλες τις σύγχρονες εργαστηριακές τεχνικές της κλινικής εμβρυολογίας και εργαστηριακής ανδρολογίας, ιδίως: απομόνωση ωαρίων, συμβατική εξωσωματική γονιμοποίηση (*in vitro* fertilisation, IVF), μικρογονιμοποίηση (ICSI), επιλογή εμβρύων και εμβρυομεταφορά, ενδοσαλπγγική μεταφορά γαμετών και ζυγωτών (GIFT/ZIFT), υποβοηθούμενη εκκόλαψη εμβρύων με χρήση laser (laser assisted hatching), προετοιμασία δειγμάτων σπέρματος για IVF, ICSI και σπερματέγχυση (IUI), προετοιμασία δειγμάτων σπέρματος από επιδιδυμίδα και βιοψία όρχεων (PESA/TESE), κατάψυξη εμβρύων, ωαρίων και σπέρματος, βιοψία πολικών σωματίων, βιοψία βλαστομεριδίων από έμβρυα στα στάδια αυλάκωσης, βιοψία βλαστοκύστης.

Από το έργο μου στη ΜΙΥΑ “Εμβρυογένεσις” γεννήθηκαν στην Ελλάδα με τη χρήση προεμφυτευτικής γενετικής διάγνωσης, τα πρώτα παιδιά έπειτα από βιοψία πολικών σωματίων, καθώς επίσης και το πρώτο παιδί κατόπιν βιοψίας βλαστοκύστης και γενετικής ανάλυσης του εμβρύου με τη μέθοδο της καρνοχαρτογράφησης (karyomapping).

Παράλληλα με τα κλινικά μου καθήκοντα, με ενδιαφέρουν ιδιαίτερα οι νέες πειραματικές τεχνικές της κλινικής εμβρυολογίας, όπως η ενεργοποίηση μη γονιμοποιημένων ωαρίων και η μεταμόσχευση προπυρήνων (pronuclear transfer, PNT).

## Πίνακας συντομογραφιών

**Σημείωση:** για όλες τις συντομογραφίες έχει επιλεγεί η γραφή χωρίς ενδιάμεσες στιγμές (π.χ. ΜΙΥΑ και όχι Μ.Ι.Υ.Α.) χάριν συντομίας και αναλογίας με τις συντομογραφίες των χημικών ενώσεων (π.χ. DNA και όχι D.N.A.). Εξαιρούνται οι συντομογραφίες της νεοελληνικής γραμματικής (π.χ., λ.χ., ό.π., κ.λπ.).

ΑΓΓΛΙΚΟΣ ΟΡΟΣ		ΕΛΛΗΝΙΚΟΣ ΟΡΟΣ
<b>ΔΜ</b>		διεθνείς μονάδες
<b>ΕΑΙΥΑ</b>		Εθνική Αρχή Ιατρικώς Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής
<b>ΕΚΠΑ</b>		Εθνικόν και Καποδιστριακόν Πανεπιστήμιον Αθηνών
<b>ΙΥΑ</b>		ιατρικώς υποβοηθούμενη αναπαραγωγή
<b>ΜΙΥΑ</b>		Μονάδα Ιατρικώς Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής
<b>ό.π.</b>		όπως παραπάνω
<b>aCGH</b>	array comparative genomic hybridization	συγκριτικός γονιδιωματικός υβριδισμός σε μικροσυστοιχίες DNA
<b>AMH</b>	antimüllerian hormone	αντιμυλλέρεια ορμόνη
<b>AOA</b>	artificial oocyte activation	τεχνητή ενεργοποίηση ωαρίων
<b>BDNF</b>	brain-derived neurotrophic factor	νευροτροφικός παράγων εγκεφαλικής προέλευσης
<b>COC</b>	cumulus-oocyte complex	σύμπλεγμα ωοκυττάρου-ωοφόρου λοφίσκου
<b>CTFR</b>	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator	ρυθμιστής διαμεμβρανικής αγωγιμότητας της κυστικής ίνωσης
<b>DAG</b>	diacylglycerol	διακυλογλυκερόλη
<b>DC</b>	direct cleavage	αυτόματη αυλάκωση
<b>DMSO</b>	dimethylsulfoxide	διμεθυλοσουλφοξείδιο
<b>DNA</b>	deoxyribonucleic acid	δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
<b>DPBS</b>	Dulbecco's phosphate-buffered saline	ρυθμιστικό αλατούχο διάλυμα φωσφορικών κατά Dulbecco
<b>E2</b>	estradiol	οιστραδιόλη
<b>EGF</b>	epidermal growth factor	επιδερμικός αυξητικός παράγων
<b>FISH</b>	fluorescence in situ hybridization	υβριδισμός φθορισμού in situ
<b>FSH</b>	follicle-stimulating hormone	θυλακιοτρόπος ορμόνη
<b>GM-CSF (rhGM-CSF)</b>	(recombinant human) granulocyte-macrophage colony stimulating factor	(ανθρώπινος ανασυνδυασμένος) διεγερτικός παράγων αποικιών κοκκιοκυττάρων-μακροφάγων
<b>GnRH</b>	gonadotropin-releasing hormone	ορμόνη απελευθέρωσης γοναδοτροπινών
<b>HB-EGF</b>	heparin-binding epidermal growth factor	δεσμευόμενος στην ηπαρίνη επιδερμικός αυξητικός παράγων
<b>β-HCG</b>	human chorionic gonadotropin (β-subunit)	ανθρώπινη χοριακή γοναδοτροπίνη (β-υπομονάδα)
<b>HFEA</b>	Human Fertilisation and Embryology Authority (UK)	Αρχή Ανθρώπινης Γονιμοποίησης και Εμβρυολογίας (στο Ηνωμένο Βασίλειο)
<b>HSA</b>	human serum albumin	ανθρώπινη οροαλβουμίνη
<b>ICM</b>	inner cell mass	έσω κυτταρική μάζα
<b>ICSI</b>	intra-cytoplasmic sperm injection	ενδοκυτταροπλασματική έγχυση σπερματοζωαρίου
<b>IGF-1</b>	insulin-like growth factor 1	ινσουλινοειδής αυξητικός παράγων 1
<b>IP3</b>	inositol triphosphate	τριφωσφορική ινοσιτόλη
<b>IU</b>	International Units	διεθνείς μονάδες

<b>IUI</b>	intrauterine insemination	ενδομητρική σπερματέγχυση (τεχνητή γονιμοποίηση)
<b>IVF</b>	<i>in vitro</i> fertilization	εξωσωματική γονιμοποίηση
<b>IVM</b>	<i>in vitro</i> maturation	<i>in vitro</i> ωρίμαση
<b>LH</b>	luteinizing hormone	ωχρινοποιητική ορμόνη
<b>LIF</b>	leukemia inhibitory factor	λευχαιμοανασταλτικός παράγων
<b>NGS</b>	next generation sequencing	αλληλούχηση επόμενης γενεάς
<b>OHSS</b>	ovarian hyperstimulation syndrome	σύνδρομο υπερδιέγερσης των ωοθηκών
<b>PAF</b>	platelet activation factor	παράγων ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων
<b>PCR</b>	polymerase chain reaction	αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
<b>PDGF</b>	platelet-derived growth factor	αιμοπεταλιακής προέλευσης αυξητικός παράγων
<b>PESA</b>	percutaneous epididymal sperm aspiration	διαδερματική αναρρόφηση σπερματοζωαρίων από την επιδιδυμίδα
<b>PGD</b>	pre-implantation genetic diagnosis	προεμφυτευτική γενετική διάγνωση
<b>PIP2</b>	phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate	4,5-διφωσφο-φωσφατιδυλο-ινοσιτόλη
<b>PK-C</b>	protein kinase-C	πρωτεϊνική κινάση C
<b>PLCζ</b>	phospholipase C zeta	ισομορφή ζ της φωσφολιπάσης C
<b>PRG</b>	progesterone	προγεστερόνη
<b>PRL</b>	prolactin	προλακτίνη
<b>PROG</b>	progesterone	προγεστερόνη
<b>RCT</b>	randomized controlled trial	τυχαιοποιημένη μελέτη
<b>rpm</b>	rotations per minute	στροφές ανά λεπτό
<b>SSC</b>	saline-sodium citrate	ρυθμιστικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου-κιτρικού νατρίου
<b>SSS</b>	serum substitute supplement	πρωτεϊνικό συμπλήρωμα υποκατάστασης ορού
<b>TE</b>	trophectoderm	τροφοεξώδερμα
<b>TESE</b>	testicular sperm extraction	εξελευκυσμός σπερματοζωαρίων από τον όρχι
<b>TSH</b>	thyroid-stimulating hormone	θυρεοειδοτρόπος ορμόνη
<b>WHO</b>	World Health Organization	Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας
<b>ZP</b>	zona pellucida	διαφανής ζώνη

# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 ΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑ

### 1.1.1 Η αναπαραγωγή στον άνθρωπο

Η αναπαραγωγή είναι το σύνολο των διεργασιών, διά των οποίων ένας άνδρας και μια γυναίκα δημιουργούν απογόνους. Στις βιοϊατρικές επιστήμες, η αναπαραγωγή αποτελεί αντικείμενο διαφόρων γνωστικών πεδίων, από τη μαιευτική-γυναικολογία και την ανδρολογία έως τη βιολογία της αναπαραγωγής, την εμβρυολογία και τη γενετική.

Η αναπαραγωγή επιτελείται από τα γυναικεία και ανδρικά **αναπαραγωγικά** (ή **γεννητικά**) **όργανα** της γυναίκας και του άνδρα (βλ. Carlson, 2016). Οι κυριότερες ανατομικές δομές του γεννητικού συστήματος είναι:

- Οι **αναπαραγωγικοί αδένες** ή **γονάδες** (ωοθήκη και όρχις), που αφ' ενός παράγουν τα ειδικά κύτταρα της αναπαραγωγής (γαμέτες), δηλαδή τα ωάρια στη γυναίκα και τα σπερματοζώαρια στον άνδρα και αφ' ετέρου εκκρίνουν ορμόνες, οι οποίες μεταξύ άλλων ρυθμίζουν τη λειτουργία του αναπαραγωγικού συστήματος.
- Στη γυναίκα οι **ωαγωγοί** (ή **σάλπιγγες**), που παραλαμβάνουν το ωάριο μετά την ωοθυλακιορρηξία, προκειμένου αυτό να γονιμοποιηθεί και να οδηγηθεί προς τη **μήτρα**, όπου εμφυτεύεται και αναπτύσσεται μέχρι τον τοκετό.
- Στον άνδρα, η **επιδιδυμίδα** και οι **σπερματοδόχοι κύστες**, όπου αποθηκεύονται τα σπερματοζώαρια, ο εκφορητικός πόρος και ο **προστάτης** αδένας.

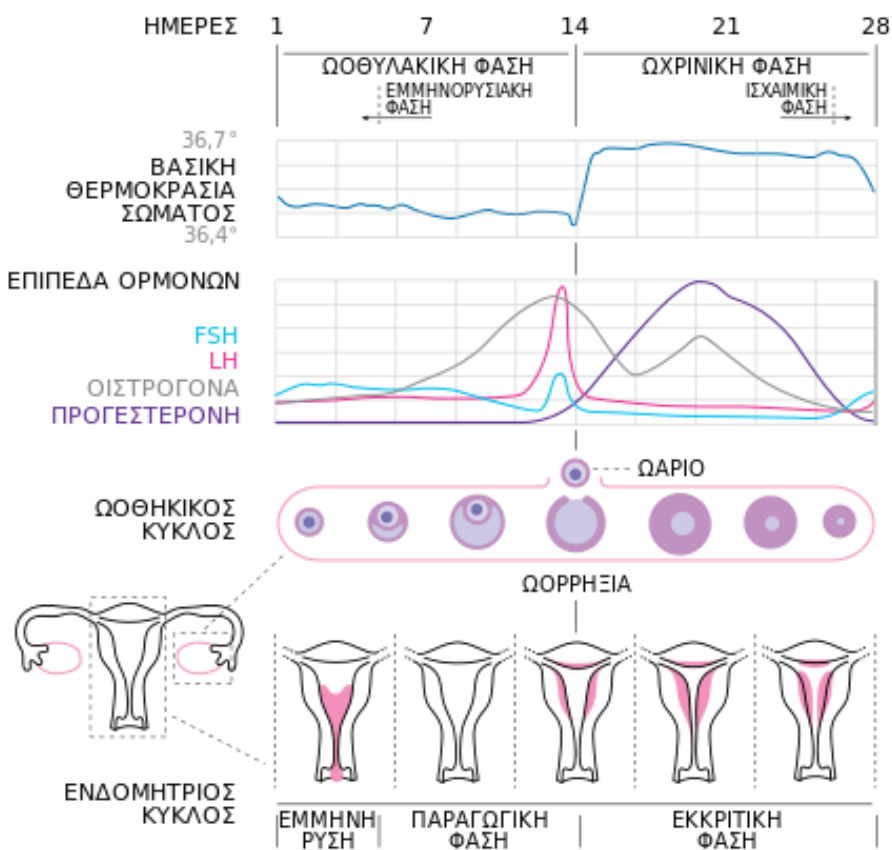
Ο άνθρωπος αναπαράγεται με ένα μέσο ποσοστό γονιμότητας της τάξης του 20% ανά καταμήνιο κύκλο.

#### 1.1.1.1 Ο γυναικείος γεννητικός κύκλος

Ως **γεννητικός** ή **καταμήνιος κύκλος** ορίζεται το διάστημα που μεσολαβεί από την πρώτη ημέρα της εμμηνου ρύσεως μέχρι την πρώτη ημέρα της επόμενης εμμηνου ρύσεως. Η διάρκειά του είναι συνήθως 28 ημέρες, αυτή όμως μπορεί να ποικίλλει από γυναίκα σε γυναίκα και από κύκλο σε κύκλο της ίδιας γυναίκας.

Σε έναν τυπικό καταμήνιο κύκλο παρατηρούνται δύο κύριες φάσεις: η παραγωγική και η εκκριτική φάση. Η **παραγωγική** ή **ωοθυλακική φάση** αρχίζει με την έμμηνο ρύση και διαρκεί τυπικά 14 ημέρες. Στο διάστημα αυτό, η ωθήκη παράγει ένα ωάριο με την ολοκλήρωση της διεργασίας της ωογένεσης, το δε ενδομήτριο προοδευτικά παχύνεται, προκειμένου να καταστεί δεκτικό για την εμφύτευση του εμβρύου. Ακολουθεί η **ωοθυλακιορρηξία**, με την οποία το ωάριο απελευθερώνεται από την ωθήκη. Τότε αρχίζει η **εκκριτική** ή **ωχρινική φάση**, κατά την οποία το ραγέν ωοθυλάκιο μετατρέπεται σε **ωχρό σωμάτιο**, που εκκρίνει προγεστερόνη ώστε να υποστηρίξει την ενδεχόμενη εμφύτευση του εμβρύου και την έναρξη της κύησης. Τυπικά, η εκκριτική φάση διαρκεί επίσης 14 ημέρες, εκ των οποίων οι 1-2 τελευταίες περιγράφονται ως **ισχαιμική φάση**, που σηματοδοτεί, εφόσον δεν έχει μεσολαβήσει εμφύτευση εμβρύου, την έναρξη της απόπτωσης του ενδομητρίου και το τέλος του κύκλου με τη νέα έμμηνο ρύση.

Ο καταμήνιος κύκλος συνοδεύεται από παράλληλες μεταβολές πολλών παραμέτρων, οι κυριότερες από τις οποίες συνοψίζονται στην **Εικόνα 1.1**.



**Εικόνα 1.1 Καταμήνιος αναπαραγωγικός κύκλος και μεταβολές που τον συνοδεύουν** (πηγή: Isometrik, Kaldari, Begoon, Mikael Häggström & Lyr1, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=23312709>)

### 1.1.1.2 Αρχές της ωογένεσης

Η διεργασία παραγωγής του ώριμου γυναικείου γαμέτη ονομάζεται **ωογένεση**. Στον άνθρωπο, η ωογένεση αρχίζει κατά την ενδομήτρια ζωή. **Αρχέγονα γεννητικά κύτταρα** εμφανίζονται περίπου κατά την 24<sup>η</sup> ημέρα της ανάπτυξης στο ενδόδερμα του λεκιθικού ασκού και μεταναστεύουν στις αρχέγονες γονάδες μέσω του ραχιαίου μεσεντερίου. Εκεί πολλαπλασιάζονται εντόνως (**ωογόνια**) από τον δεύτερο έως τον πέμπτο περίπου μήνα της κύησης: ο πληθυσμός των ωογονίων αυξάνεται μέχρι τα 7 εκατομμύρια περίπου, οπότε εισέρχονται στην πρώτη μειωτική διαίρεση και πλέον καλούνται πρωτοταγή ή πρωτογενή ωοκύτταρα. Στο στάδιο της διπλοταινίας επέρχεται η **πρώτη αναστολή της μείωσης** και τα πρωτοταγή ωοκύτταρα παραμένουν, περιβαλλόμενα από τροφικά κύτταρα (θήκη του πρωτοταγούς ωοθυλακίου). Παράλληλα, γύρω από το κάθε ωάριο σχηματίζεται ένας ημιδιαφανής μη κυτταρικός υμένας, η **διαφανής ζώνη**. Ο αριθμός τους μειώνεται σε 2 εκατομμύρια περίπου κατά τη γέννηση και σε 40.000 περίπου μέχρι την εφηβεία.

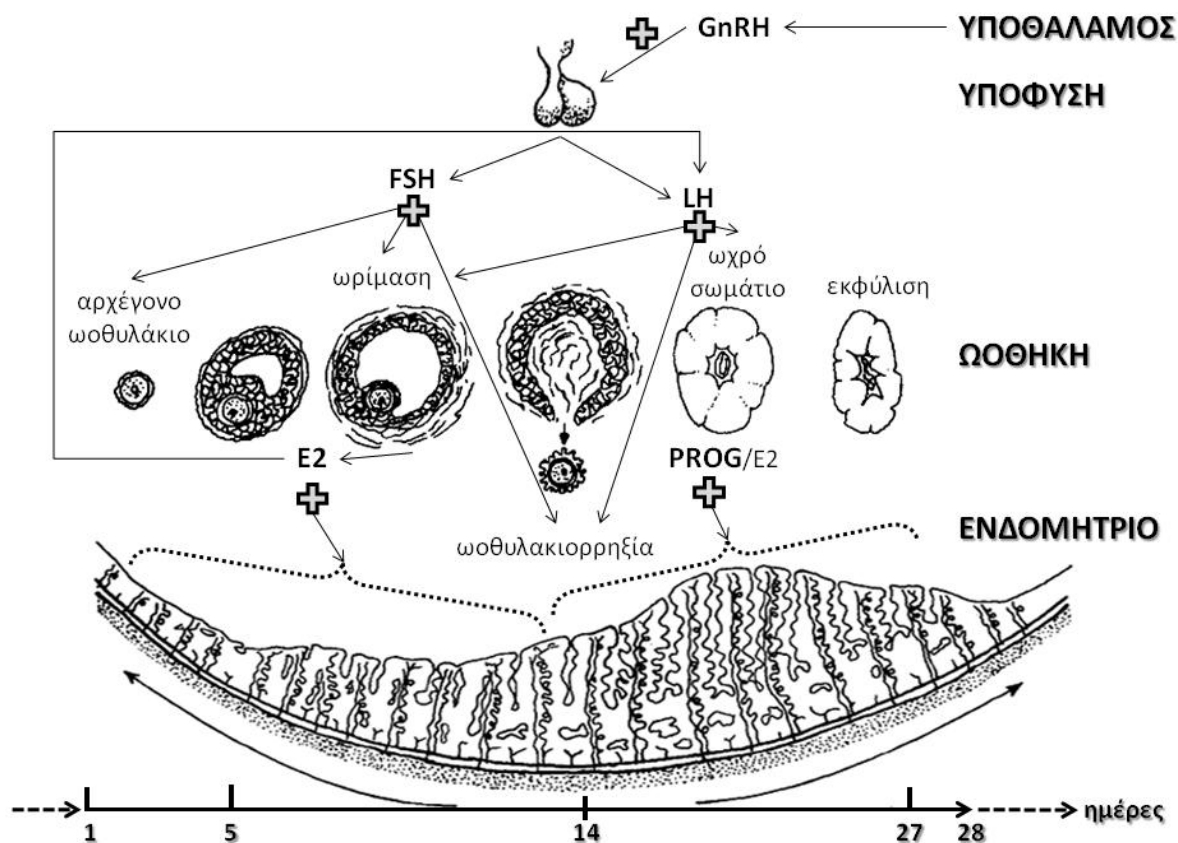
Η διεργασία της μείωσης συνεχίζεται μετά την εφηβεία: σε κάθε καταμήνιο κύκλο, η μείωση επανεκκινεί σε μικρό αριθμό **αρχέγονων ωοθυλακίων** (10-30) που περιβάλλονται από περισσότερες της μίας κυτταρικές στιβάδες και ονομάζονται δευτερογενή ή δευτεροταγή. Τα ωοκύτταρα ολοκληρώνουν την πρώτη μειωτική διαίρεση και σχηματίζουν δευτερογενή ή δευτεροταγή ωοκύτταρα. Τα περισσότερα δευτεροταγή ωοθυλάκια εκφυλίζονται μέσω του μηχανισμού της ατρησίας, αλλά το λεγόμενο **κυρίαρχο ωοθυλάκιο** αναπτύσσεται περαιτέρω και, υπό την επίδραση της υποφυσιακής FSH, διογκώνεται, σχηματίζοντας ένα **άντρο** γεμάτο με ωοθυλακικό υγρό. Τα κύτταρα των κοκκωδών στιβάδων που περιβάλλουν το ωοκύτταρο εκκρίνουν οιστρογόνα, ενώ εκφράζουν και υποδοχείς της υποφυσιακής LH. Προοδευτικά, το ωοθυλάκιο μετατρέπεται σε τριτοταγές ή **γρσαφιανό** και προβάλλει στην επιφάνεια της ωοθήκης: το άντρο περιέχει έναν μικρό λοφίσκο κυττάρων που περιβάλλουν το ωάριο, τον **ωοφόρο λοφίσκο**.

Τα ώριμα ωοκύτταρα περιβάλλονται από διαδοχικές στιβάδες κυττάρων: τα κύτταρα του **ακτινωτού στεφάνου**, τα οποία βρίσκονται σε άμεση επαφή με τη **διαφανή ζώνη** (ZP, zona pellucida) του ωαρίου, και τα υπόλοιπα κύτταρα του ωοφόρου λοφίσκου που περιβάλλουν τα πρώτα. Το παραπάνω σύμπλεγμα κυττάρων ονομάζεται **σύμπλεγμα ωοφόρου λοφίσκου-ωοκυττάρου** (COC, cumulus-oocyte complex).

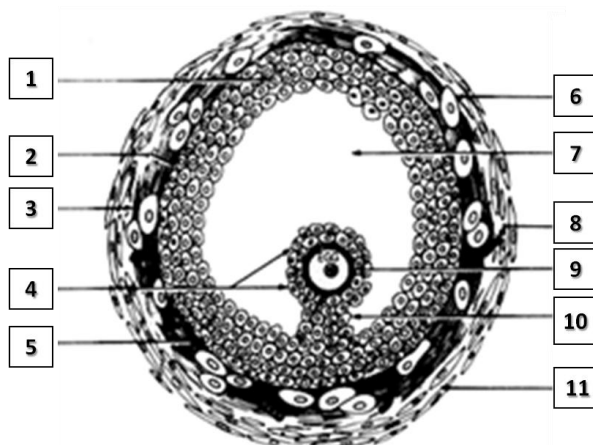
Περί το τέλος της παραγωγικής φάσης του κύκλου, τα αυξημένα επίπεδα οιστραδιόλης επιδρούν στον υποθαλαμοϋποφυσιακό άξονα και προκαλούν μια **αιχμή**

έκκρισης LH και FSH, η οποία αποτελεί το φυσιολογικό σήμα πρόκλησης της ωοθυλακιορρηξίας. Παράλληλα, το ωοκύτταρο ωριμάζει, εισέρχεται στη δεύτερη μειωτική διαίρεση και φθάνει μέχρι τη μετάφαση αυτής, οπότε εκβάλλει το **πρώτο πολικό σωματίο**. Ακολουθεί **δεύτερη αναστολή της μείωσης**, η οποία ολοκληρώνεται μετά τη γονιμοποίηση.

Οι πολύπλοκες ορμονικές επιδράσεις στον άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-γονάδων που συνολικά ρυθμίζουν την ωογένεση συνοψίζονται στην **Εικόνα 1.2**. Ανατομικές λεπτομέρειες της δομής του γραφαιανού ωοθυλακίου παρουσιάζονται στην **Εικόνα 1.3**.



**Εικόνα 1.2** Ο άξονας υποθάλαμος-υπόφυση-γονάδες: ορμονικές επιδράσεις κατά τη διάρκεια του γυναικείου γεννητικού κύκλου. GnRH: ορμόνη απελευθέρωσης γοναδοτροπινών, FSH: θυλακιοτρόπος ορμόνη, LH: ωχρινοποιητική ορμόνη, PROG: προγεστερόνη, E2: οιστραδιόλη. Ημέρες του κύκλου 1-5: εμμηνορρυσία, 1-14: παραγωγική φάση, 14: ωοθυλακιορρηξία, 14-28: εκκριτική φάση, 27-28: ισχαιμική φάση.



**Εικόνα 1.3** Σχηματική απεικόνιση της ιστολογικής δομής ώριμου γρααφιανού ωοθυλακίου. 1: κύτταρα του κοκκώδους υμένα, 2: έσω θήκη, 3: χαλαρός συνδετικός ιστός, 3: ακτινωτός στέφανος και κύτταρα της κοκκώδους στιβάδας, 5: βασικό πέταλο, 6: διάμεσα κύτταρα της θήκης, 7: άντρο (πλήρες ωοθυλακικού υγρού), 8: τριχοειδή αιμοφόρα αγγεία, 9: διαφανής ζώνη, 10: κοκκοειδή κύτταρα του ωοφόρου λοφίσκου, 11: έξω θήκη.

### 1.1.1.3 Αρχές της σπερματογένεσης

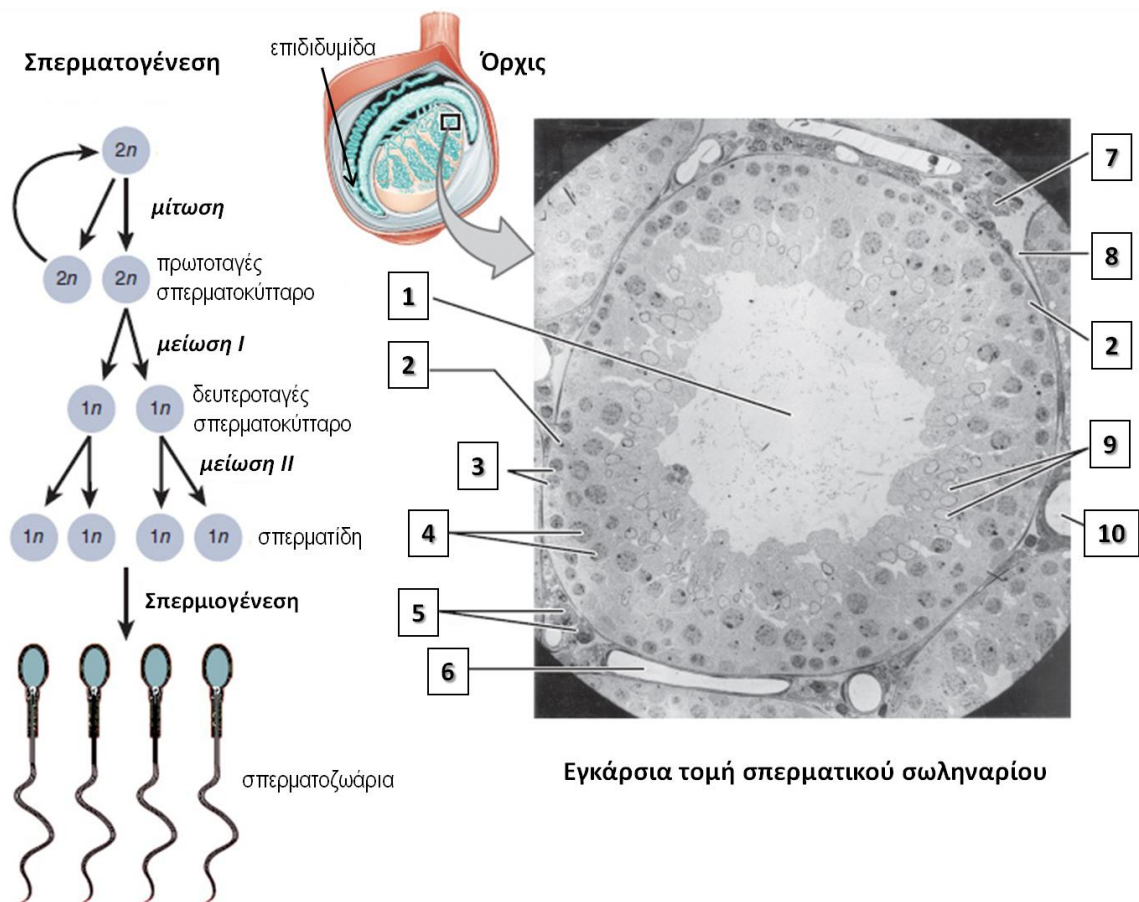
Στον άνδρα, τα ταχέως πολλαπλασιαζόμενα αρχέγονα γεννητικά κύτταρα, αντίστοιχα των ωογονίων, ονομάζονται **σπερματογόνια**. Οι μιτώσεις εκκινούν στον εμβρυϊκό όρχι, αλλά, σε αντίθεση με τα θήλεα γεννητικά κύτταρα, τα σπερματογόνια διατηρούν την ικανότητά τους να πολλαπλασιάζονται καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής.

Από την εφηβεία και μετά, ο βλαστικός πληθυσμός σπερματογονίων στο επιθήλιο των ορχικών σωληναρίων (**σπερματικό επιθήλιο**) ενεργοποιείται και ομάδες κυττάρων εισέρχονται στις μειωτικές διαιρέσεις διαρκώς. Ο κύκλος της σπερματογένεσης διαρκεί περίπου 64 ημέρες στον άνθρωπο: το σπερματογόνιο διπλασιάζει το DNA του και εξελίσσεται σε **πρωτοταγές** ή **πρωτογενές σπερματοκύτταρο**, το οποίο σε διάστημα εβδομάδων επιτελεί την πρώτη μειωτική διαίρεση και σχηματίζει δύο **δευτεροταγή σπερματοκύτταρα**. Αυτά εισέρχονται αμέσως στη δεύτερη μειωτική διαίρεση και μέσα σε λίγες ώρες σχηματίζουν τέσσερις απλοειδείς **σπερματίδες**. Κάθε σπερματίδη παραμένει συνδεδεμένη με τις γειτονικές της σπερματίδες.

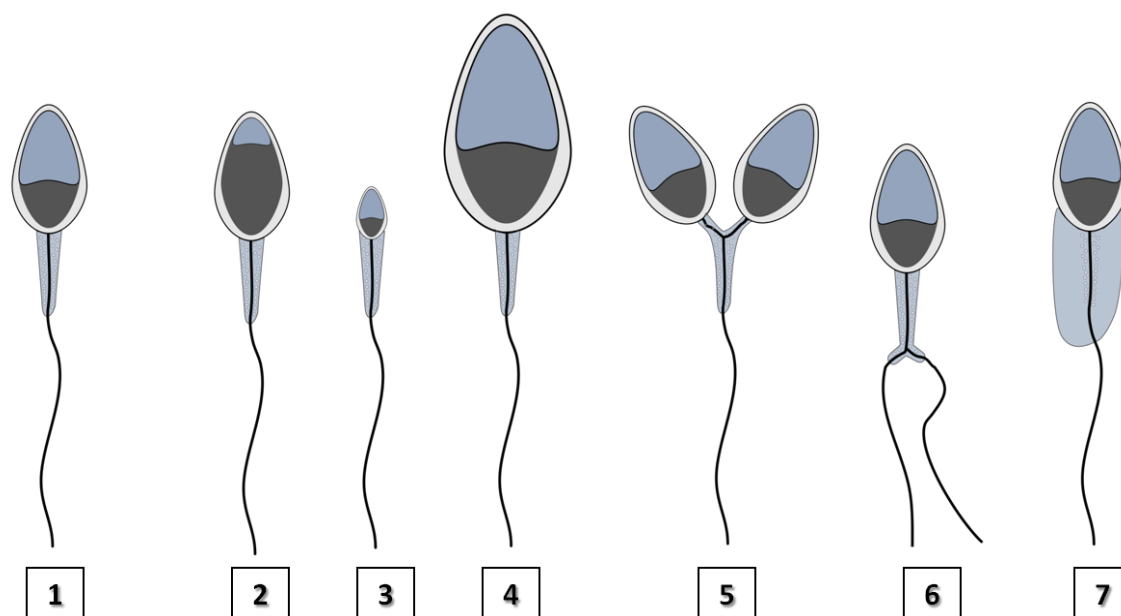
Ακολουθεί η διεργασία της **σπερμιογένεσης**, με την οποία οι άωρες σπερματίδες μεταμορφώνονται σε ώριμα **σπερματοζώαρια**. Η μεταμόρφωση στο πολύ ειδικό αυτό κύτταρο περιλαμβάνει:



- τη **συμπύκνωση του πυρήνα στην κεφαλή** του σπερματοζωαρίου (περιέλιξη του νηματίου DNA γύρω από πρωταμίνες, οι οποίες αντικαθιστούν τις ιστόνες των χρωμοσωμάτων),
- την απομάκρυνση του κυτταροπλάσματος και τη μετατροπή της συσκευής Golgi σε **ακρόσωμα** (μια ειδική δομή στην κορυφή της μελλοντικής κεφαλής του σπερματοζωαρίου, η οποία περιέχει πλήθος ενζύμων, απαραίτητων για τη γονιμοποίηση),
- τη συμπύκνωση των μιτοχονδρίων και τη σπειροειδή διευθέτησή τους, μαζί με τα κεντριόλια, στο **μεσαίο τμήμα**, καθώς και
- την ανάπτυξη του **μαστιγίου**, της δομής που προσδίδει στο κύτταρο τη χαρακτηριστική του **κινητικότητα**.



**Εικόνα 1.4 Σπερματογένεση στα ορχικά σπερματικά σωληνάρια.** Αριστερά: οι φάσεις της σπερματογένεσης και της σπερμιογένεσης, η μείωση και η πλοειδία των κυττάρων. Δεξιά: εγκάρσια τομή σπερματικού σωληναρίου. 1: αυλός, 2: κύτταρο Sertoli, 3: σπερματογόνια, 4: πρωτοταγή σπερματοκύτταρα, 5: διάμεσα κύτταρα Leydig, 6: τριχοειδές αιμοφόρο αγγείο, 7: διάμεσος ιστός, 8: τριχοειδές λεμφαγγείο, 9: πρώιμες σπερματίδες, 10: αρτηρίδιο.



**Εικόνα 1.5** Σχηματική απεικόνιση της μορφολογίας των σπερματοζωαρίων και των συνηθέστερων ατυπιών. 1: φυσιολογικό σπερματοζώαριο (2-7: άτυπες μορφές), 2: απουσία ή περιορισμός του ακροσώματος, 3: μικροκέφαλο (οξύαιχμο) σπερματοζώαριο, 4: πλατυκέφαλο σπερματοζώαριο, 5: διπλή κεφαλή, 6: διπλό μαστίγιο, 7: κυτταροπλασματικό υπόλειμμα στο μεσαίο τμήμα.

Η σπερμιογένεση είναι η διεργασία κατά την οποία δημιουργούνται οι περισσότερες **μορφολογικές ατυπίες** των σπερματοζωαρίων. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO, World Health Organization) έχει προτείνει κανόνες για την εξέταση της μορφολογίας των σπερματοζωαρίων (WHO, 2010), ενώ έχουν περιγραφεί και πιο εξειδικευμένες μέθοδοι εξέτασης της μορφολογίας, με τα λεγόμενα **αυστηρά κριτήρια** (Menkveld *et al.*, 1990), τα οποία έχουν μεγαλύτερη αξιοπιστία και διευκολύνουν την τυποποίηση της σύγκρισης μεταξύ δειγμάτων. Εντούτοις, ανεξαρτήτως των κριτηρίων, η μορφολογία των σπερματοζωαρίων συναρτάται ευθέως με τη γονιμοποιητική τους ικανότητα.

Η σπερματογένεση απεικονίζεται σχηματικά στην **Εικόνα 1.4** και οι συνηθέστερες μορφολογικές ατυπίες των σπερματοζωαρίων, σε σύγκριση με τη φυσιολογική μορφή, παρουσιάζονται σχηματικά στην **Εικόνα 1.5**.

#### 1.1.1.4 Γονιμοποίηση

Η γονιμοποίηση είναι η διεργασία αποκατάστασης του διπλοειδούς γονιδιώματος του εμβρύου. Παράλληλα, η γονιμοποίηση επιτυγχάνει:

- την **ενεργοποίηση του ωαρίου**, προκειμένου να ολοκληρωθεί η δεύτερη μειωτική διαίρεση,

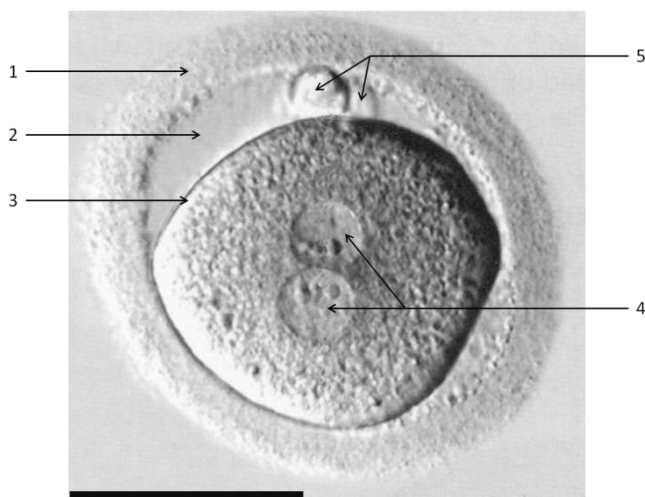
- τον **καθορισμό του φύλου** του νέου οργανισμού, αφού το σπερματοζωάριο συνεισφέρει το καθοριστικό φυλετικό χρωμόσωμα,
- τη **δημιουργία γενετικής ποικιλότητας**, αφού οι γαμέτες παραλαμβάνουν ανασυνδυασμένες εκδοχές των μισών μητρικής και πατρικής προέλευσης χρωμοσωμάτων,
- την ολοκλήρωση της προετοιμασίας, προκειμένου να ακολουθήσει η αυλάκωση, η ενεργοποίηση του γονιδιώματος του νέου οργανισμού και η έναρξη της εμβρυϊκής ανάπτυξης.

Τα ανθρώπινα σπερματοζωάρια, όπως εκβάλλονται κατά την **εκσπερμάτιση**, που φυσιολογικά αποτελεί την κορύφωση της συνουσίας, βρίσκονται στο παχύρρευστο σπερματικό πλάσμα και δεν είναι ακόμη ικανά για γονιμοποίηση. Μετά τη **ρευστοποίηση** του σπέρματος, τα σπερματοζωάρια απελευθερώνονται, εισέρχονται στην τραχηλική βλέννα και διασχίζουν διαδοχικά τον τράχηλο και το σώμα της μήτρας, προκειμένου να φθάσουν στο έξω τριτημόριο του ωαγωγού, όπου συναντούν το ωάριο. Υπό την επίδραση εκκρίσεων του ωαγωγού τα σπερματοζωάρια υφίστανται **ενεργοποίηση**, η οποία τα καθιστά ικανά για γονιμοποίηση. Στη συνέχεια, διεισδύουν στον ακτινωτό στέφανο, διασπώντας την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία με την υαλουρονιδάση που βρίσκεται στην επιφάνειά τους και με την υπερκινητικότητα, την οποία έχουν αποκτήσει μετά την ενεργοποίηση. Τέλος, προσδένονται στη διαφανή ζώνη, όπου υφίστανται την **ακροσωματική αντίδραση**: η απελευθέρωση των ενζύμων του ακροσώματος επιτρέπει την πέψη μιας διόδου στη διαφανή ζώνη, γεγονός που διευκολύνει τη διέλευση του σπερματοζωαρίου. Όταν η κεφαλή του σπερματοζωαρίου βρεθεί στον περιλεκιθικό χώρο, η μεμβράνη του εφάπτεται με την κυτταροπλασματική μεμβράνη του ωαρίου (ωόλημμα) και οι δύο μεμβράνες συντήκονται, γεγονός που διοχετεύει το περιεχόμενο της κεφαλής του σπερματοζωαρίου στο ωόπλασμα.

Ακολουθεί η **αναστολή της πολυσπερμίας** που περιλαμβάνει την εκπόλωση του ωολήμματος, την έκλυση ενδοκυτταρικών κυμάτων  $Ca^{2+}$ , τα οποία διεγείρουν την ολοκλήρωση της δεύτερης μειωτικής διαίρεσης του ωαρίου, καθώς και τη **φλοιώδη αντίδραση**, δηλαδή την απελευθέρωση των φλοιωδών κοκκίων που περιέχουν πολυσακχαρίτες και υδρολυτικά ένζυμα στον περιλεκιθικό χώρο. Η ενυδάτωση των εν λόγω πολυσακχαριτών προκαλεί διόγκωσή τους και αποκόλληση του ωολήμματος από τη διαφανή ζώνη, ενώ τα ένζυμα υδρολύουν τους υποδοχείς σπερματοζωαρίων (πρωτεΐνη

ZP<sub>3</sub>) εντός της ζώνης (**αντίδραση της ζώνης**), αποκλείοντας έτσι αποτελεσματικά τη διείσδυση και άλλων σπερματοζωαρίων στο ωάριο.

Η **ολοκλήρωση της μείωσης** προκαλεί την εκβολή του δεύτερου πολικού σωματίου στον περιλεκιθικό χώρο και τη συγκέντρωση των χρωμοσωμάτων του ωαρίου στον θήλυ προπυρήνα, ο οποίος σχηματίζεται κάτω από το σημείο εκβολής του δεύτερου πολικού σωματίου. Παράλληλα, η γλουταθειόνη του ωοπλάσματος ανάγει τους δισουλφιδικούς δεσμούς των πρωταμινών προς ελεύθερες σουλφυδρυλομάδες, με συνέπεια τη διάσπαση των πρωταμινών και την **αποσυμπύκνωση** του πυρήνα του σπερματοζωαρίου, προκειμένου να σχηματισθεί ο άρρην προπυρήνας. Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά γνωρίσματα της γονιμοποίησης είναι όλα ορατά στο μικροσκόπιο σε διάστημα 6-8 ωρών μετά τη γονιμοποίηση και παραμένουν ορατά επί 10-12 ώρες: η **παρουσία δύο προπυρήνων** και **δύο πολικών σωματίων** υποδηλώνει ότι η μείωση στο ωάριο και η γονιμοποίησή του έχουν ολοκληρωθεί επιτυχώς (**Εικόνα 1.6**).



**Εικόνα 1.6 Φυσιολογική γονιμοποίηση.** 1: διαφανής ζώνη, 2: περιλεκιθικός χώρος, 3: ωοκύτταρο, 4: δύο προπυρήνες, 5: δύο πολικά σωματίια. *Ράβδος: 100 μm.*

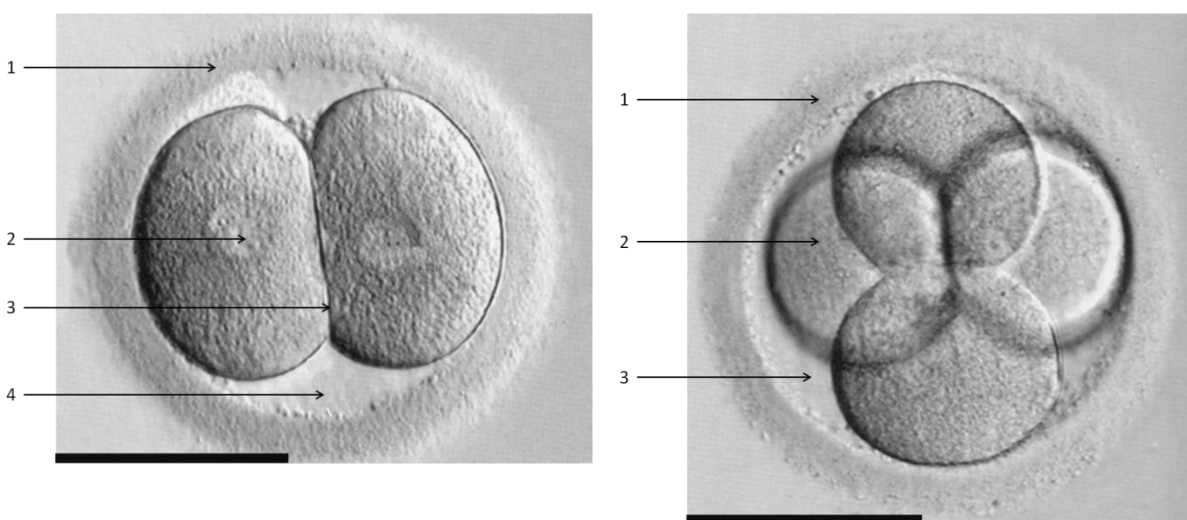
Η γονιμοποίηση ολοκληρώνεται με τη **συγγαμία**, δηλαδή τη συγχώνευση των δύο προπυρήνων, η οποία σηματοδοτεί το πέρας της διεργασίας και τη δημιουργία του **ζυγώτη**, του πρώτου διπλοειδούς κυττάρου του νέου οργανισμού.

#### **1.1.1.5 Αυλάκωση, ανάπτυξη βλαστοκύστης και εμφύτευση**

Η διεργασία της **αυλάκωσης** (**Εικόνες 1-7 έως 1-12**) διαρκεί 5-6 ημέρες και καταλήγει στην αποβολή της διαφανούς ζώνης, προκειμένου να καταστεί εφικτή η εμφύτευση του εμβρύου στο ενδομήτριο. Κατά το μεγαλύτερο μέρος της αυλάκωσης, το

έμβρυο παραμένει έγκλειστο στη διαφανή ζώνη του, ενώ φυσιολογικά μεταφέρεται προς την κοιλότητα της μήτρας διά μέσου του ωαγωγού.

Στην πορεία αυτή, το έμβρυο διανύει διαδοχικά τα αναπτυξιακά στάδια των 2, των 4, των 8 και των 16 **βλαστομεριδίων**. Στο στάδιο των 16-32 κυττάρων (**μοριδίο**, 4<sup>η</sup> ημέρα από τη γονιμοποίηση) τα βλαστομερίδια προοδευτικά συγχωνεύονται (**συνείληση** ή **σύμπηξη**) και το έμβρυο προσλαμβάνει όψη άμορφης μάζας, με ορατούς μόνο τους πυρήνες των βλαστομεριδίων. Την 5<sup>η</sup> ημέρα της ανάπτυξης εμφανίζεται μια κοιλότητα, το έμβρυο σχηματίζει τη **βλαστοκύστη**, αποβάλλει τη διαφανή ζώνη (**εκκόλαψη**) και εμφυτεύεται στον βλεννογόνο της μήτρας (**εμφώλευση**).

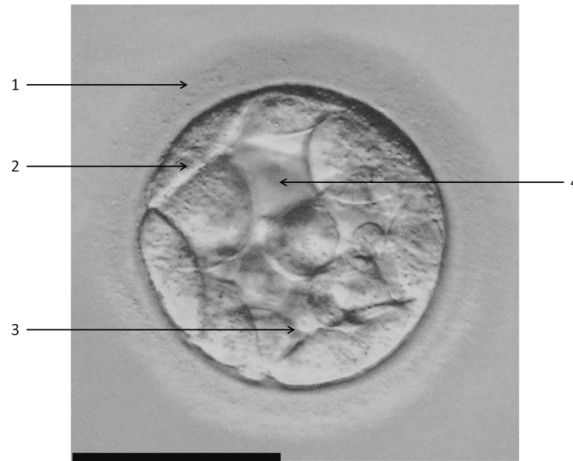


**Εικόνα 1.7 (αριστερά)** Αυλάκωση: **στάδιο των 2 βλαστομεριδίων**. 1: διαφανής ζώνη, 2: πυρήνας, 3: επίπεδο αυλάκωσης, 4: περιλεκιθικός χώρος. Τα πολικά σωματίδια δεν είναι εμφανή. *Ράβδος: 100 μm.*

**Εικόνα 1.8 (δεξιά)** Αυλάκωση: **στάδιο των 4 βλαστομεριδίων**. 1: διαφανής ζώνη, 2: βλαστομερίδιο, 3: περιλεκιθικός χώρος. *Ράβδος: 100 μm.*



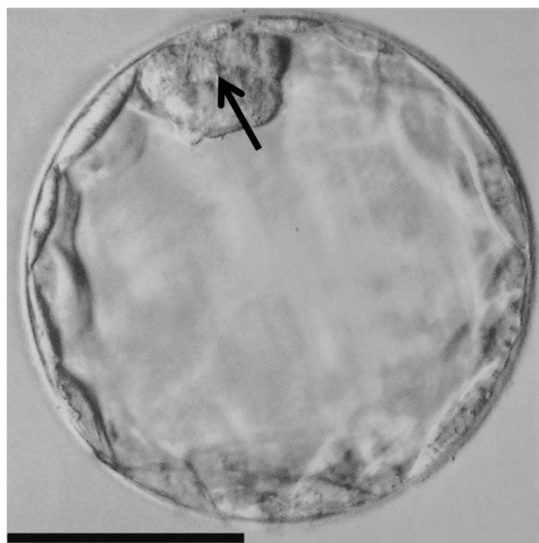
**Εικόνα 1.9** **Στάδιο του μοριδίου σε συνείληση**. Τα κυτταρικά περιγράμματα είναι ασαφή και το έμβρυο έχει όψη συγκυτίου. 1: διαφανής ζώνη, 2: περιλεκιθικός χώρος, 3: πολικό σωματίο, 4: πυρήνας, 5: ενιαίο περίγραμμα του μοριδίου, 6: έναρξη της δημιουργίας κοιλότητας. *Ράβδος: 100 μm.*



**Εικόνα 1.10** Στάδιο της βλαστοκύστης. 1: διαφανής ζώνη, 2: εξωτερική στιβάδα κυττάρων (τροφοεξώδερμα, που θα δημιουργήσει τους εξωεμβρυϊκούς υμένες), 3: έσω κυτταρική μάζα (κυρίως έμβρυο), 4: κοιλότητα της βλαστοκύστης. Ράβδος: 100  $\mu\text{m}$ .



**Εικόνα 1.11** Αρχόμενη εκκόλαψη της βλαστοκύστης. Η διαφανής ζώνη έχει λεπτύνει και ραγεί, το έμβρυο προβάλλει. Ράβδος: 100  $\mu\text{m}$ .



**Εικόνα 1.12** Πλήρης εκκόλαψη της βλαστοκύστης. Η βλαστοκύστη έχει διαταθεί πλήρως και έχει αποβάλει τη διαφανή ζώνη. Διακρίνεται ευκρινώς η μονήρης στιβάδα κυττάρων του τροφοεξωδέρματος και η έσω κυτταρική μάζα (μαύρο βέλος). Ράβδος: 100  $\mu\text{m}$ .

Τα στάδια της αυλάκωσης έχουν περιγραφεί λεπτομερώς σε επίπεδο μικροσκοπικής και υπέρλεπτης δομής στις αρχές της δεκαετίας του 1980, λίγο μετά την τελειοποίηση της εξωσωματικής γονιμοποίησης (Sathananthan, 1984), καθώς επίσης και μέχρι του σταδίου της βλαστοκύστης στις αρχές της δεκαετίας του 2000, αφού τελειοποιήθηκαν οι μέθοδοι καλλιέργειας βλαστοκύστεων στην εξωσωματική γονιμοποίηση (Veeck, 2003).

### 1.1.2 Η ανθρώπινη υπογονιμότητα

Σύμφωνα με τον ισχύοντα ορισμό, η *υγεία είναι μια κατάσταση πλήρους σωματικής, ψυχικής και κοινωνικής ευεξίας και όχι απλώς η απουσία νόσου ή αναπηρίας*: “*Health is a state of complete physical, mental and social well-being and not merely the absence of disease or infirmity*” (WHO, 1948). Υπό την έννοια αυτή, η ακούσια ατεκνία εντάσσεται στον ορισμό αυτό και αποτελεί διαταραχή της υγείας.

Ο κλινικός ορισμός της υπογονιμότητας έχει επίσης διατυπωθεί από τον WHO: “η **υπογονιμότητα** είναι μια πάθηση του αναπαραγωγικού συστήματος, η οποία ορίζεται ως η αδυναμία επίτευξης κλινικής κύησης έπειτα από 12 μήνες τακτικών σεξουαλικών επαφών χωρίς προφύλαξη” (Zegers-Hochschild *et al.*, 2009). Ένας παρόμοιος ορισμός περιλαμβάνεται στο εγχειρίδιο του WHO για την ανάλυση του σπέρματος (WHO, 2010): “υπογονιμότητα είναι η αδυναμία ενός ζευγαριού, σεξουαλικά ενεργού και χωρίς αντισυλληπτική προστασία, να επιτύχει κύηση σε διάστημα ενός έτους”.

Για μια γυναίκα αυτό σημαίνει είτε την αδυναμία επίτευξης εγκυμοσύνης, είτε την αδυναμία διατήρησης της κύησης, είτε την αδυναμία ολοκλήρωσης της κύησης με τη γέννηση ενός υγιούς τέκνου. Αντιστοίχως, στον άνδρα, σημαίνει αδυναμία να προκαλέσει τη σύλληψη τέκνου από τη σύντροφό του. Η υπογονιμότητα θεωρείται πολυπαραγοντική διαταραχή της υγείας, η οποία εκτιμάται ότι προσβάλλει περίπου το 25% των ζευγαριών αναπαραγωγικής ηλικίας (15-49 ετών). Θεωρείται δεδομένο ότι, ειδικά στις αναπτυσσόμενες χώρες, η ακριβής μέτρηση του ποσοστού υπογονιμότητας στον πληθυσμό είναι δυσχερέστατη (Rutstein *et al.*, 2004). Σύμφωνα με εκτιμήσεις του 2010, πάνω από 48 εκατομμύρια ζευγάρια παγκοσμίως αδυνατούν να φέρουν εις πέρας μια φυσιολογική εγκυμοσύνη (Mascarenhas, 2012). Από δημογραφικής πλευράς, ο WHO εκτιμά ότι υπογονιμότητα μπορεί να θεωρηθεί και η ακούσια ατεκνία για διάστημα μεγαλύτερο των 5 ετών με φυσιολογική σεξουαλική ζωή, απουσία αντισυλληπτικής προστασίας και εκτός

περιόδων γαλουχίας. Τούτο διότι το ποσοστό γονιμότητας για το κάθε δεδομένο ζευγάρι ποικίλλει και εξαρτάται από πολλούς παράγοντες.

Η υπογονιμότητα ορίζεται ως **πρωτοπαθής** όταν το ζευγάρι δεν έχει επιτύχει ποτέ εγκυμοσύνη στο παρελθόν και **δευτεροπαθής** όταν ένα τουλάχιστον μέλος του ζευγαριού έχει ήδη επιτύχει εγκυμοσύνη στο παρελθόν.

### 1.1.2.1 Αίτια υπογονιμότητας

Η υπογονιμότητα ενός ζευγαριού μπορεί να οφείλεται στη σύντροφο (περίπου κατά 30-40%), στον σύντροφο (περίπου κατά 35-40%), ή και στους δύο (μικτή αιτιολογία). Ο ακριβής επιδημιολογικός προσδιορισμός των αιτίων υπογονιμότητας ποικίλλει ανά πληθυσμό, χώρα και βιοτικό επίπεδο, με συνέπεια να μην έχει νόημα εδώ η παράθεση γενικών στοιχείων από άλλες χώρες. Στην Ελλάδα δεν υπάρχουν ακόμη πλήρη στατιστικά ή επιδημιολογικά στοιχεία, ειδικά για την υπογονιμότητα, αν και αυτό αναμένεται να καταστεί εφικτό στο μέλλον, μέσω της λειτουργίας της Εθνικής Αρχής ΙΥΑ, η οποία είναι ο αρμόδιος δημόσιος φορέας για την αδειοδότηση και την παρακολούθηση της δραστηριότητας των Μονάδων ΙΥΑ, επιφορτισμένος με τη συλλογή και δημοσίευση των αποτελεσμάτων της εφαρμογής των μεθόδων ΙΥΑ στη χώρα.

Συνήθη αίτια υπογονιμότητας είναι:

- Το **σπέρμα**: άτυπος αριθμός, κινητικότητα και μορφολογία σπερματοζωαρίων (αντιστοίχως **ολιγοσπερμία**, **ασθενοσπερμία** και **τερατοσπερμία**), παρουσία αντισπερματικών αντισωμάτων, αζωοσπερμία, γενετικές παθήσεις (όπως σύνδρομο Klinefelter, μικροελλείμματα του χρωμοσώματος Y, κατακερματισμός του DNA), διαταραχές της εκσπερμάτισης, λοιμώξεις και φλεγμονές, κ.λπ.
- Διάφορες **παθήσεις των σαλπίνγων**: απόφραξη, υδροσάλπιγγα, συμφύσεις, χλαμυδιακές και άλλες λοιμώξεις, φλεγμονές κ.λπ.
- **Ενδοκρινολογικά αίτια** που προκαλούν **διαταραχές της ωοθυλακιορρηξίας**: σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών, υπερπρολακτιναιμία, υπογοναδοτροπικός υπογοναδισμός, υπεργοναδοτροπικός υπογοναδισμός, ωχρινικές διαταραχές
- Διάφορες **παθήσεις του τραχήλου** και μη επιτρεπτική ανοσολογική λειτουργία της τραχηλικής βλέννας (παρουσία αντισπερματικών αντισωμάτων)
- Διάφορες **παθήσεις της μήτρας**: συγγενείς δυσπλασίες, ενδομητρικές συμφύσεις, πολύποδες, ινομύωματα, φλεγμονές, λοιμώξεις κ.λπ. και παθήσεις του ενδομητρίου



(ενδομητρίτιδα, εκτεταμένες ανατομικές βλάβες από προηγούμενες επεμβάσεις, π.χ. αμβλώσεις)

- Η ενδομητρίωση
- Η αυξημένη ηλικία της γυναίκας, πρόωρη εμμηνόπαυση, πτωχή απόκριση στις γοναδοτροπίνες
- Ο **τρόπος ζωής**: κάπνισμα, αλκοολισμός, χρήση εξαρτησιογόνων ουσιών, έκθεση σε τοξικό εργασιακό περιβάλλον
- Σπάνια γενετικά αίτια
- **Ανεξήγητη αιτιολογία (ιδιοπαθής υπογονιμότητα)**, σε σημαντικό ποσοστό (25-30%) των περιπτώσεων

### **1.1.2.2 Αρχές διερεύνησης και διάγνωσης**

Η διερεύνηση και η διάγνωση της υπογονιμότητας περιλαμβάνει τη λήψη ενός λεπτομερούς ιστορικού, την κλινική εξέταση αμφοτέρων των μελών του ζευγαριού και τη διενέργεια σειράς διαγνωστικών επεμβάσεων και εξετάσεων, προκειμένου να προσδιορισθεί, με τη μέγιστη δυνατή ακρίβεια, το αίτιο υπογονιμότητας. Από την ορθή διάγνωση εξαρτάται προφανώς και η ορθότητα της αντιμετώπισης που θα προταθεί.

Η διερεύνηση της γυναικείας υπογονιμότητας περιλαμβάνει:

- έλεγχο της ωοθυλακιορρηξίας με υπερηχογράφημα,
- εκτίμηση των ωοθηκικών εφεδρειών, συνήθως με προσδιορισμό του αριθμού καταβολών ωοθυλακίων στις αρχές του κύκλου και μέτρηση των επιπέδων της αντιμυλλέρειας ορμόνης (AMH) στον ορό,
- προσδιορισμό του ορμονικού προφίλ, με μετρήσεις των επιπέδων διαφόρων ορμονών του κύκλου στον ορό (συνήθως FSH, LH, E2, PRL, PRG), σε συνδυασμό με μια μέτρηση των επιπέδων των θυρεοειδικών ορμονών (συνήθως TSH), προκειμένου να αποκλεισθεί το ενδεχόμενο θυρεοειδοπάθειας, η οποία επηρεάζει τη γονιμότητα,
- έλεγχο θρομβοφιλίας, για το ενδεχόμενο μητροπλακουντιακής αγγειακής θρόμβωσης, η οποία μπορεί να ευθύνεται για αποβολές του πρώτου τριμήνου της κύησης,
- γενετικές εξετάσεις (ανίχνευση μεταλλάξεων) και καρυότυπο,

- ακτινολογικό έλεγχο της μορφολογίας της μήτρας και της διαβατότητας των ωαγωγών (υστεροσαλπινγογραφία),
- χειρουργικό ενδοσκοπικό έλεγχο του τραχήλου και της κοιλότητας της μήτρας (υστεροσκόπηση) για την ανίχνευση και αποκατάσταση βλαβών (π.χ. λύση συμφύσεων, πολυποδεκτομή),
- χειρουργικό ενδοσκοπικό έλεγχο της κάτω κοιλίας (λαπαροσκόπηση) για τη διάγνωση και θεραπεία της ενδομητρίωσης και άλλων καταστάσεων (αποκατάσταση της κινητικότητας των ωαγωγών, εξαίρεση κύστεων, κ.λπ.).

Η διερεύνηση της ανδρικής υπογονιμότητας περιλαμβάνει:

- σπερμοδιάγραμμα,
- καλλιέργεια σπέρματος για την ανίχνευση πιθανών λοιμώξεων,
- έλεγχο της παρουσίας αντισπερματικών αντισωμάτων,
- υπερηχογραφικό έλεγχο του οσχέου και του προστάτη αδένου,
- γενετικές εξετάσεις (ανίχνευση μεταλλάξεων) και καρυότυπο, εάν υπάρχουν υπόνοιες γενετικού συνδρόμου,
- ειδικές εξετάσεις, όπως έλεγχος του κατακερματισμού του DNA,
- ορμονικό προφίλ, για τη διερεύνηση σε βάθος των πιθανών ενδοκρινολογικών αιτίων σοβαρής ολιγοασθενοσπερμίας.

### **1.1.2.3 Αρχές αντιμετώπισης**

Ανάλογα με τα ευρήματα των διαγνωστικών εξετάσεων, η αντιμετώπιση μπορεί να ολοκληρωθεί με τη χειρουργική αποκατάσταση μιας ανατομικής βλάβης, ή με φαρμακευτική αγωγή για τη θεραπεία μιας νόσου που προκαλεί υπογονιμότητα, ή ακόμη με ορμονική θεραπεία υποκατάστασης, προκειμένου να ρυθμισθούν κατάλληλα οι ορμονικές ισορροπίες.

Σε περίπτωση που η θεραπεία δεν είναι εφικτή με τις παραπάνω μεθόδους, ή σε περιπτώσεις ανεξήγητης υπογονιμότητας, ενδείκνυται η εφαρμογή των μεθόδων και τεχνικών της ιατρικώς υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (IYA).

## 1.2 ΙΑΤΡΙΚΩΣ ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ

### 1.2.1 Ιστορική αναδρομή

Θεωρείται ότι η πρώτη γνωστή ανθρώπινη αναφορά στη γονιμότητα είναι η “*Αφροδίτη του Willendorf*”, το αρχαιότερο γνωστό αγαλματίδιο εγκύου γυναίκας, που βρέθηκε στο ομώνυμο χωριό της Αυστρίας το 1908 (χρονολογείται στην περίοδο 24.000-22.000 π.Χ.). Πολύ αργότερα συντάσσονται ιατρικά κείμενα, όπως ο πάπυρος Ebers (1.550 π.Χ.), που θεωρείται το πρώτο κείμενο με αναφορές στη γονιμότητα, αν και το κύριο αντικείμενό του είναι μάλλον φαρμακευτικό.

Στην αρχαιοελληνική περίοδο, ο ιατρός Ιπποκράτης ο Κώος (460-370 π.Χ.) διατυπώνει την αναγκαιότητα της επιστημονικής μεθοδολογίας και καταγράφει συστηματικές καθημερινές παρατηρήσεις των σταδίων της ανάπτυξης στην όρνιθα, ενώ ο μέγας φιλόσοφος Αριστοτέλης (384-322 π.Χ.) είναι ο πρώτος που συντάσσει συγγράμματα φυσικής ιστορίας και συγκριτικής αναπτυξιακής ανατομικής. Στα “*Φυσικά*” (350 π.Χ.) διατυπώνει κατ’ ουσίαν την επιγενετική θεωρία (σύμφωνα με την οποία το έμβρυο καθίσταται ολοένα και πιο πολύπλοκο καθώς διανύει τα αναπτυξιακά του στάδια), θεωρία που έμελλε να αποδειχθεί ορθή μόλις τον 18<sup>ο</sup> αιώνα από τον Wolf.

Στις αρχές της Αναγέννησης, ο μεγάλος φιλόσοφος, αρχιτέκτων και βιολόγος Leonardo da Vinci (1452-1519), που εύλογα θεωρείται ως ο τελευταίος “πανεπιστήμων”, διενεργεί τις πρώτες συστηματικές μετρήσεις της ανάπτυξης ανθρώπινων εμβρύων *in vivo*, δημοσιεύει μάλιστα και ανατομικούς πίνακες με ρεαλιστικές απεικονίσεις από 30 νεκροψίες που πραγματοποιεί ο ίδιος. Ο Ιταλός ανατόμος Gabriele Fallopio (1523-1562) περιγράφει τον ωαγωγό, που φέρει σήμερα το όνομά του στην αγγλοσαξονική βιβλιογραφία (“fallopian tube”). Με την αυξανόμενη αποδοχή και επιρροή της επιστήμης αρχίζουν και οι θεωρητικές διαμάχες και διαφωνίες ως προς την ερμηνεία των φυσικών φαινομένων. Ο Βρετανός ιατρός William Harvey (1578-1657), γνωστός για την περιγραφή της κυκλοφορίας του αίματος δημοσιεύει (1651) το σύγγραμμα “*Exertationes de Generatione Animalium*” (Πειραματισμοί περί της δημιουργίας των ζώων), στο οποίο διαπιστώνεται η αρχή ότι όλα τα ζώα προέρχονται από ωάρια (“*ex ovo omnia*” ή “*omne vivum ex ovo*”). Οι θεωρίες αυτές έρχονται σε αντίθεση με τον Αριστοτέλη, που πίστευε ότι τα υγρά της εμμήνου ρύσεως περιέχουν την ύλη του εμβρύου, στην οποία δίνει μορφή και ψυχή το σπέρμα. Στο σύγγραμμα αυτό, ο Harvey περιγράφει πρώτος το βλαστόδερμα,

μια περιοχή του ωαρίου της όρνιθας από την οποία αναπτύσσεται το έμβρυο. Την ίδια περίπου εποχή, ο Ολλανδός φυσιολόγος, ανατόμος και εμβρυολόγος Reinier de Graaf (1641-1673) περιγράφει το ωοθυλάκιο στο κουνέλι (1672).

Ο 17<sup>ος</sup> αιώνας είναι ο αιώνας σημαντικών επιστημονικών επιτευγμάτων. Ένας Ολλανδός έμπορος, ο Zacharias Jansen (1632-1723) μόλις έχει εφεύρει το μικροσκόπιο (1595), συσκευή την οποία τελειοποιεί ο Antonie van Leeuwenhoek (1632-1723), αυξάνοντας τη μεγεθυντική του ικανότητα ( $\times 300$ ) και εισάγοντας τον κοχλία εστιασμού. Ο Van Leeuwenhoek περιγράφει τα μικρόβια (1674) και μαζί με τον Hamm τα σπερματοζώαρια (1677-1678). Οι σύγχρονοί του “σπερματιστές” (όπως ο Nicolas Hartsoeker), οπαδοί της θεωρίας του προσχηματισμού, βλέπουν μέσα στα σπερματοζώαρια μικροσκοπικούς ανθρώπους, τα γνωστά *ανθρωπάκια* (“*homunculi*”). Ο Ιταλός ιατρός και βιολόγος Marcello Malpighi (1628-1694), μαθητής του Γαλιλαίου, δημοσιεύει (1672) την πρώτη μικροσκοπική μελέτη της εμβρυϊκής ανάπτυξης της όρνιθας (όπου περιγράφει τη νευρική αύλακα, τους σωμίτες, την κυκλοφορία του αίματος, κ.λπ.) και μια συγκριτική περιγραφή των εμβρύων των φυτών και των πτηνών (1674). Αρχίζει μεγάλη θεωρητική διαμάχη μεταξύ των οπαδών της επιγένεσης και των οπαδών του προσχηματισμού.

Κατά τον 18<sup>ο</sup> αιώνα, ο Ιταλός ιερωμένος και βιολόγος Lazzaro Spallanzani (1729-1799) αποδεικνύει ότι σπερματοζώαρια και ωάρια είναι εξ ίσου απαραίτητα με τα ωάρια για την αναπαραγωγή (1775) και επιλύει μερικώς τη διαμάχη μεταξύ “*ωαριστών*” (επιγενετική θεωρία) και “*σπερματιστών*” (θεωρία του προσχηματισμού), ενώ μάλιστα, με ένα καταλυτικό πείραμα (1776), θεμελιώνει την κρυοβιολογία: καταψύχει σπέρμα χρησιμοποιώντας χιόνι και παρατηρεί τη μείωση της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων στο ψύχος. Το 1780 πραγματοποιεί και την πρώτη τεχνητή γονιμοποίηση (σπερματέγχυση) στον σκύλο, τοποθετώντας σπέρμα στον κόλπο ενός θηλυκού πειραματοζώου. Μια δεκαετία αργότερα (1791), ο Βρετανός χειρουργός και ανατόμος John Hunter (1728-1793) πραγματοποιεί στο Λονδίνο την πρώτη επιτυχή ομόλογο σπερματέγχυση στον άνθρωπο.

Ο Γερμανός ανατόμος και βιολόγος Kaspar Friedrich Wolff (1733-1794) είναι ίσως ο πιο σημαντικός εμβρυολόγος μετά τον Αριστοτέλη, διότι αποδεικνύει την ορθότητα της επιγενετικής θεωρίας. Ο Wolff περιγράφει συστηματικά τα στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης στα πτηνά και διατυπώνει (1759) την ιδέα της θεωρίας των τριών δερμάτων για τα έμβρυα των σπονδυλωτών στην “*Theoria generationis*” (Θεωρία της δημιουργίας). Αποδεικνύει ότι τα αγγεία αναπτύσσονται εκ νέου σε κάθε έμβρυο και ότι το έντερο

σχηματίζεται από την πτύχωση ενός αρχικώς επίπεδου ιστού (1767): κατά συνέπεια, το αναπτυσσόμενο έμβρυο καθίσταται ολοένα και πιο πολύπλοκο.

Η μελέτη της εμβρυολογίας αρχίζει να γίνεται συστηματική. Ο Γερμανός ιατρός, φυσιολόγος και νευροανατόμος Karl Friedrich Burdach (1776-1847) εισάγει τον όρο “βιολογία” (1800). Ο Ελβετός βιολόγος Jean-Louis Prénost (1780-1850) και ο Γάλλος χημικός Jean-Baptiste Dumas (1800-1884) περιγράφουν (1824) την αυλάκωση σε έμβρυα βατράχου *Rana esculenta* και προτείνουν την άποψη ότι τα σπερματοζωάρια δεν είναι παράσιτα, αλλά χρήσιμοι παράγοντες για τη γονιμοποίηση. Ο Λετονός ανατόμος Christian Heinrich Pander (1794-1865) ανακαλύπτει τα τρία βλαστικά δέρματα στην όρνιθα (1817) καθώς και ότι τα τρία δέρματα δημιουργούν ιστούς αλληλεπιδρώντας μεταξύ τους (φαινόμενο που θα ονομασθεί αργότερα “επαγωγή”).

Πατέρας της σύγχρονης εμβρυολογίας θεωρείται ο Εσθονός εμβρυολόγος Karl Ernst von Baer (1792-1876), ο οποίος ανακαλύπτει τη νωτιαία χορδή, αποδεικνύει την ύπαρξη του ωαρίου στα θηλαστικά και ονομάζει τα κινούμενα κύτταρα του σπέρματος “σπερματοζωάρια”. Η κυτταρική θεωρία των Schwann, Dutrochet και Schleiden εδραιώνεται πειραματικά από τον Πρώσο ιατρό και ανθρωπολόγο Rudolf Virchow (1821-1902), ο οποίος αποδεικνύει ότι κάθε κύτταρο προέρχεται από ένα άλλο κύτταρο (“*omnis cellula e cellula*”). Ο Ελβετός ανατόμος και φυσιολόγος Rudolf Albert von Kölliker (1817-1905) ανακαλύπτει τα στάδια της σπερματογένεσης, ο Γερμανός βιολόγος Oskar Hertwig (1849-1922) ανακαλύπτει τους προπυρήνες στα γονιμοποιημένα ωάρια (1875), ενώ ο Ελβετός βιολόγος Herman Fol (1845-1892), ανεξάρτητα από τον Hertwig, παρατηρεί (1879) τη διείσδυση του σπερματοζωαρίου. Ο Βέλγος ζωολόγος Édouard van Beneden (1846-1910) και ο Γερμανός βιολόγος Theodor Boveri (1862-1915) περιγράφουν (1883) την πλοειδία και τα στάδια της μείωσης.

Στα τέλη του 19<sup>ου</sup> αιώνα οι ανακαλύψεις φαίνονται ανεξάντλητες: στον Ιταλό φυσιολόγο και ιστολόγο Enrico Sertoli (1842-1910) αποδίδεται η οριστική διατύπωση των φάσεων της σπερματογένεσης, ενώ ο Γερμανός ζωολόγος και συγκριτικός ανατόμος Franz von Leydig (1821-1908) περιγράφει το κύτταρο που φέρει το όνομά του και εκκρίνει τεστοστερόνη. Ο σημαντικός Γερμανός ανατόμος και εμβρυολόγος Wilhelm Roux (1850-1924) εισάγει την “παρεμβατική” ή “πειραματική” εμβρυολογία διεξάγοντας (1888) ένα σημαντικό πείραμα καταστροφής ενός από τα δύο πρώτα βλαστομερίδια εμβρύου βατράχου: παρατηρεί ότι αναπτύσσεται μόνον ένα ημι-έμβρυο και συμπεραίνει ότι υπάρχει προκαθορισμός των βλαστομεριδίων, ερμηνεία λανθασμένη, όπως αποδεικνύεται

από τον Jesse Francis McClendon το 1910 με ένα πείραμα διαχωρισμού των δύο βλαστομεριδίων, που οδηγεί σε πλήρη ανάπτυξη δύο χωριστών εμβρύων. Θεμελιωτές της πειραματικής εμβρυολογίας (της λεγόμενης “αναπτυξιακής μηχανικής”, *Entwicklungsmechanik*) θεωρούνται ο Roux και ο Γερμανός βιολόγος και μορφολόγος Hans Driesch (1867-1941). Ο Driesch, με ένα καθοριστικό πείραμα απομόνωσης των βλαστομεριδίων εμβρύου αχινού (1892), αποδεικνύει ότι κάθε βλαστομερίδιο αναπτύσσεται σε πλήρη προνύμφη, αν και μικρότερη της φυσιολογικής, γεγονός που αποδεικνύει ότι η ανάπτυξη υπόκειται σε ρύθμιση.

Η πειραματική εμβρυολογία φθάνει στο απόγειό της με το έργο του Γερμανού βιολόγου Hans Spemann (1869-1941) και της βοηθού του Hilde Proescholdt-Mangold (1898-1924). Ανακαλύπτεται η επαγωγή στο έμβρυο των αμφιβίων και διατυπώνεται η έννοια του οργανωτή (1924) με ένα κρίσιμο πείραμα μεταμόσχευσης ραχιαίου ιστού από ένα έμβρυο σαλαμάνδρας σε άλλο: η μεταμόσχευση προκαλεί την ανάπτυξη δεύτερου, σιαμαίου εμβρύου (Spemann & Mangold, 1924). Για την εργασία αυτή, ο Spemann βραβεύεται το 1935 με το βραβείο Nobel Φυσιολογίας ή Ιατρικής. Για λόγους ιστορικής ακρίβειας, σημειωτέον ότι η πρώτη απόδειξη της επαγωγής ανήκει στην Αμερικανίδα βιολόγο Ethel Browne Harvey (1885-1965), αλλά η μελέτη της αποσιωπήθηκε από τον Spemann (Lenhoff, 1991). Παρά τις σκοτεινές αυτές πτυχές της ιστορίας, ο Spemann προσέφερε στην εμβρυολογία αμέτρητες τεχνικές και εργαλεία εμβρυϊκής μικροχειρουργικής. Την περίοδο 1920-30, ο Spemann μεταφέρει τον πυρήνα ενός βλαστομεριδίου από έμβρυο 16 κυττάρων σε ένα εκτυρηνισμένο βλαστομερίδιο: η κατασκευή εξελίσσεται σε φυσιολογική σαλαμάνδρα (πρώτη πυρηνική κλωνοποίηση). Το 1936, στο βιβλίο του για την εμβρυϊκή ανάπτυξη και την επαγωγή (“*Experimentelle Beiträge zu einer Theorie der Entwicklung*”), ο Spemann προτείνει και το “φανταστικό” πείραμα της κλωνοποίησης ανώτερου οργανισμού από διαφοροποιημένο κύτταρο, ή ακόμη και από κύτταρο του ενήλικα. Η σχετική τεχνολογία δεν υπήρχε τότε, αλλά αυτό έκτοτε έχει επιτευχθεί από κύτταρο εμβρύου στον βάτραχο (Briggs & King, 1952) και σε ανώτερα θηλαστικά (τεχνητή διδυμοποίηση, Willadsen & Godke, 1984). Το πιο πρόσφατο σχετικό επίτευγμα είναι βεβαίως η κλωνοποίηση του προβάτου Dolly (Wilmut *et al.*, 1997).

Στις αρχές της δεκαετίας του 1930 ανακαλύπτονται οι ορμόνες του εμμήνου κύκλου και η σχέση τους με την ωοθυλακιορρηξία. Μεγάλο μέρος του έργου αυτού οφείλεται στον Γερμανό βιοχημικό Adolf Frederick Johann Butenandt (1903-1995), ο οποίος

περιγράφει τη χημική δομή και τη σύνθεση της οιστρονής (1929), της ανδροστερόνης (1931) και της τεστοστερόνης (1934) και βραβεύεται με το βραβείο Nobel Χημείας το 1939.

Ο 20<sup>ός</sup> αιώνας σημαδεύεται όμως και από ραγδαία εξέλιξη του τομέα της γενετικής. Ο Βρετανός βιολόγος και γενετιστής William Bateson (1861-1926) εισάγει τους όρους “γενετική”, “αλληλόμορφο”, “ζυγώτης” κ.ά. και θεωρείται θεμελιωτής της σύγχρονης γενετικής μαζί με τον Thomas Hunt Morgan (1866-1945), ο οποίος βραβεύεται το 1933 με το βραβείο Nobel Φυσιολογίας ή Ιατρικής για την ανακάλυψη του ρόλου των χρωμοσωμάτων στην κληρονομικότητα. Ο Αμερικανός μικροβιολόγος Oswald Theodore Avery (1877-1955) αποδεικνύει ότι το DNA είναι το γενετικό υλικό των κυττάρων (Avery *et al.*, 1944). Το 1953 προσδιορίζεται στο Cambridge από τους James Dewey Watson (1928-) και Francis Harry Compton Crick (1916-2004) η στερεοχημική δομή της διπλής έλικας του DNA (Watson & Crick, 1953), μια ανακάλυψη που θεωρείται ότι έχει τη σημασία της ανακάλυψης των νόμων της βαρύτητας και που βραβεύεται με το βραβείο Nobel Φυσιολογίας ή Ιατρικής το 1962. Μόλις μισό αιώνα αργότερα, είχε ήδη αναλυθεί ολόκληρο το ανθρώπινο γονιδίωμα, αλλά και το γονιδίωμα πολλών άλλων οργανισμών.

Από τη μεταπολεμική αυτή εποχή και μετά, πολλοί θεώρησαν ότι η εμβρυολογία έχει ενταχθεί και “ανήκει” πλέον στη γενετική. Η λανθασμένη αυτή άποψη έχει αλλάξει κυρίως με την επάνοδο στο προσκήνιο των μικροχειρισμών, που οδήγησαν στην ICSI και στις τεχνικές υποβοηθούμενης εκκόλαψης και βιοψίας εμβρύου για PGD. Στην πραγματικότητα, η ιδέα της εξωσωματικής γονιμοποίησης είναι πολύ παλαιότερη της σημερινής γενετικής. Πράγματι, πρώτος ο Schenk είχε αποπειραθεί να γονιμοποιήσει ωάρια *in vitro* (Schenk, 1880). Η καλλιέργεια εμβρύων διαφόρων πειραματοζώων δημιούργησε βάσιμες προσδοκίες για την επιτυχή εξωσωματική γονιμοποίηση ανθρώπινων ωαρίων (Pincus, 1939), αλλά οι προσπάθειες απέβησαν άκαρπες μέχρι το 1944, οπότε καταγράφεται η πρώτη επιτυχής εξωσωματική γονιμοποίηση και μίτωση σε 2 κύτταρα ανθρώπινου ωαρίου (Rock & Menkin, 1944). Από τη δεκαετία του 1950 και μετά, τα καλλιεργητικά μέσα βελτιώνονται διαρκώς. Μόλις το 1963 ο Brinster επιτυγχάνει την καλλιέργεια εμβρύων ποντικού (μέχρι του σταδίου της βλαστοκύστης), σε χημικώς καθορισμένο μέσον. Στη συνέχεια, αναπτύσσονται μέσα για την καλλιέργεια εμβρύων διαφόρων θηλαστικών από πολλούς ερευνητές. Ένας εξ αυτών, ο Robert G. Edwards, δημοσίευσε σειρά μελετών για την καλλιέργεια των εμβρύων *in vitro* (Edwards *et al.*, 1970, Edwards *et al.*, 1969) και έμελλε να γίνει ο πιο διάσημος βιολόγος της εποχής του

όταν, μαζί με τον χειρουργό μαιευτήρα Patrick Steptoe και τη μαία Jane Purdie είδαν τη γέννηση, στις 25 Ιουλίου του 1978 στην Αγγλία, της **Louise Brown**, του πρώτου “παιδιού του σωλήνα” (**Εικόνα 1.13**). Ακολούθησε μια ιστορική συνέντευξη τύπου (**Εικόνα 1.14**) και διθυραμβικά πρωτοσέλιδα στον τύπο (**Εικόνα 1.15**).



**Εικόνα 1.13** Γέννηση της **Louise Brown**, 25 Ιουλίου 1978, Oldham, Αγγλία. Από αριστερά: Robert Edwards, Louise Brown, Jane Purdie, Patrick Steptoe. Η φωτογραφία έχει ληφθεί στο χειρουργείο, αμέσως μετά τη γέννηση του πρώτου “παιδιού του σωλήνα” με καισαρική τομή. Το βίντεο της επέμβασης δόθηκε στη δημοσιότητα πολλά χρόνια αργότερα (<https://www.youtube.com/watch?v=rqu8Y4XGFK4>).



**Εικόνα 1.14** Πρώτη συνέντευξη τύπου για τη γέννηση της **Louise Brown**. Από αριστερά: Robert Edwards, Patrick Steptoe.





Εικόνα 1.15 Πρωτοσέλιδα εφημερίδων για τη γέννηση της Louise Brown.

Έκτοτε, οι εξελίξεις υπήρξαν ραγδαίες και τα επιτεύγματα πολλά. Τα κυριότερα εξ αυτών συνοψίζονται στον **Πίνακα 1-1**. (βλ. επίσης Kamel, 2013 και Biggers, 2012).

Σήμερα διαθέτουμε πανοπλία μεθόδων για την κλινική αντιμετώπιση της υπογονιμότητας, ενώ παράλληλα η βασική έρευνα στην εμβρυολογία και στα στελεχιαία κύτταρα, σε συνδυασμό με τις νέες μεθόδους της γενετικής (όπως το σύστημα CRISPR/Cas που επιτρέπει την “επιδιόρθωση” του DNA) αναμένεται να φέρει νέα επανάσταση στην ιατρική του 21<sup>ου</sup> αιώνα για τη θεραπεία δεκάδων παθήσεων, μέχρι σήμερα ανίατων, αλλά και για την αναδυόμενη αναγεννητική ιατρική (δηλαδή τη δημιουργία ιστών και οργάνων από στελεχιαία κύτταρα για αυτόλογη χρήση). Η εμβρυολογία, σε συνδυασμό με τη σύγχρονη γενετική και την αναπτυξιακή βιολογία, βρίσκεται σε μια ιστορική καμπή, αφού ενδέχεται να εξελιχθεί στο κεντρικό επιστημονικό υπόβαθρο της βιοϊατρικής του μέλλοντος.

#### ΠΙΝΑΚΑΣ 1-1 Σταθμοί και επιτεύγματα στην πρόσφατη ιστορία της ΙΥΑ

Έτος	Επίτευγμα	Παραπομπή
1878	IVF σε ωοκύτταρα κουνελιού και ινδικού χοιριδίου (ανακοίνωση 1880)	Schenk
1890	Πρώτη ετερόλογη εμβρυομεταφορά σε θηλαστικό (κουνέλι)	Heape
1909	Κύηση με σπέρμα τρίτου δότη (ανακοίνωση σπερματέγχυσης του 1884, Pancoast)	Hard
1944	Εξωσωματική γονιμοποίηση ανθρώπινου ωαρίου	Rock & Menkin

1959	Γέννηση θηλαστικού έπειτα από IVF (κουνέλι)	Chang
1961	Λαπαροσκοπική συλλογή ανθρώπινων ωαρίων	Klein & Palmer
1965	Συστηματικές προσπάθειες για εξωσωματική γονιμοποίηση ανθρώπινων ωαρίων	Edwards
1970	Λαπαροσκοπική συλλογή ανθρώπινου ωαρίου μετά τη χορήγηση γοναδοτροπίνης	Stephoe & Edwards
1973	Βιοχημική κύηση (παροδική αύξηση β-hCG) έπειτα από IVF στον άνθρωπο	de Kretser
1976	Εξωμήτριος κύηση έπειτα από IVF στον άνθρωπο	Stephoe & Edwards
	Ανάπτυξη του πρώτου καλλιεργητικού μέσου ειδικά για IVF (μέσον B2)	Ménézo
1978	Γέννηση τέκνου έπειτα από εξωσωματική γονιμοποίηση (25 Ιουλίου, Αγγλία)	Stephoe & Edwards
1979	Χρήση υπερηχογράφου για την παρακολούθηση της ανάπτυξης των ωοθυλακίων	Hackelöer
1980	Τελειόμηνη κύηση σε περίπτωση ανεξήγητης υπογονιμότητας	Lopata
1981	Κύηση IVF με διέγερση της ωοθηκικής λειτουργίας (κιτρική κλομιφένη)	Trounson
	Λαπαροσκοπική ωοληψία υπό υπερηχογραφική καθοδήγηση	Lenz
	Χρήση αντλίας αναρρόφησης για την ωοληψία	Wood
	Δοκιμή ανίχνευσης LH για τον προσδιορισμό του κατάλληλου χρόνου ωοληψίας	Testart
1982	Χρήση αναλόγων (συναγωνιστών) της GnRH για έλεγχο της ωοθυλακιορρηξίας	Fleming
	Διακοιλιακή ωοληψία υπό διακοιλιακή υπερηχογραφική καθοδήγηση	Lenz & Lauritsen
	Γέννηση έπειτα από μεταφορά γαμετών στη μήτρα	Craft
1983	Κύηση έπειτα από δωρεά εμβρύου και IVF	Trounson & Mohr
	Γέννηση έπειτα από κρυοσυντήρηση ανθρώπινου εμβρύου	Trounson
	Κύηση έπειτα από κρυοσυντήρηση εμβρύου 8 κυττάρων	Trounson
	Δωρεά ωαρίου και γονιμοποίηση <i>in vivo</i>	Buster
	Κυήσεις IVF σε ασθενείς με ενδομητρίωση	Mahadevan
	Κύηση IVF έπειτα από ωρίμαση ωαρίων <i>in vitro</i>	Veeck
	Διακολπική ωοληψία υπό διακοιλιακή υπερηχογραφική καθοδήγηση	Gleicher
1984	Ενδομήτρια σπερματέγχυση έπειτα από κατεργασία του σπέρματος	Kerin
	Κύηση έπειτα από δωρεά εμβρύου προερχόμενου από IVF	Lutjen
	Χρήση της IVF για την αντιμετώπιση της ανδρικής υπογονιμότητας	Cohen
	Θεραπεία με IVF σε περιστατικά ανδρικής υπογονιμότητας	Yovich
	Λαπαροσκοπική ενδοσαλπγγική μεταφορά γαμετών (GIFT)	Asch
	Χρήση αναλόγων (συναγωνιστών) της GnRH σε πρωτόκολλο διέγερσης	Porter
1985	Θεραπεία με IVF σε περιστατικά τραχηλικού παράγοντα	Hewett
	Γέννηση με χρήση παρένθετης μητέρας (κυοφόρου)	Utian
	Διακολπική ωοληψία υπό διακολπική υπερηχογραφική καθοδήγηση	Wikland
	Εμβρυομεταφορά με υπερηχογραφική καθοδήγηση	Strickler
	Γέννηση από κατεψυγμένη εκκολαπτόμενη βλαστοκύστη	Cohen
	Καλλιεργητικό μέσον που μιμείται το σαλπγγικό υγρό (HTF)	Quinn
1986	Γέννηση έπειτα από κρυοσυντήρηση ανθρώπινου ωαρίου	Chen
	Κύηση έπειτα από IVF με δωρεά ωαρίου	Rosenwaks
	Ενδοπεριτοναϊκή σπερματέγχυση	Forrler
	Λαπαροσκοπική ενδοσαλπγγική μεταφορά ζυγωτών (ZIFT)	Devroey
1987	Σαλπγγική μεταφορά γονιμοποιημένου ωαρίου στο στάδιο προπυρήνων	Yovich

	Εμβρυομεταφορά με διακολπικό καθετηριασμό του ωαγωγού	Jansen & Anderson
	Γονιμοποίηση με εναπόθεση σπερματοζωαρίου υπό τη διαφανή ζώνη (SUZI)	Laws-King
1988	Θάνατος του γυναικολόγου πρωτεργάτη της IVF, Patrick Steptoe	(Edwards, 1988)
	Κύηση έπειτα από SUZI	Ng
	IVF με σπέρμα προερχόμενο από την επιδιδυμίδα (MESA)	Silber
1989	Προεμφυτευτική γενετική διάγνωση (PGD)	Handyside
	Η υπερηχογραφική μέτρηση του ενδομητρίου είναι δείκτης επιτυχίας της IVF	Gonen
1990	Κύηση έπειτα από κρυσυντήρηση εμβρύου με υαλοποίηση	Gordts
	PGD για επιλογή του φύλου και αποφυγή μεταβίβασης φυλοσύνδετου νοσήματος	Handyside
	PGD έπειτα από βιοψία πολικού σωματίου	Verlinsky
1991	Χρήση υπερηχογραφικής παρακολούθησης του καθετήρα εμβρυομεταφοράς	Hurley
	Υποβοηθούμενη εκκόλαψη	Cohen
1992	Κύηση έπειτα από ενδοκυτταροπλασματική έγχυση σπερματοζωαρίου (ICSI)	Palermo
	Πρώτη χρήση ανασυνδυασμένης ανθρώπινης FSH σε πρωτόκολλο	Germond, Devroey
1993	IVF με σπέρμα προερχόμενο από βιοψία ορχικού ιστού (TESE)	Schoysman
	Γέννηση έπειτα από χρήση ανασυνδυασμένης FSH σε πρωτόκολλο διέγερσης	Devroey
1995	Χρήση σπερματίδων στη μικρογονιμοποίηση	Vanderzwalmen, Fishel
	Έλεγχος ανευπλοειδιών στο πολικό σωματίο πριν από την εμβρυομεταφορά	Munné
	ICSI με σπέρμα από TESE	Silber
1997	Δωρεά (μετάγγιση) ωοπλάσματος	Cohen
	Διακολπική GIFT	Porcu
1998	Πρώτη χρήση ανταγωνιστή της GnRH σε πρωτόκολλο διέγερσης	Itskovitz-Eldor
	Πρώτο καλλιέργητικό μέσον χωρίς ορό, πρώτο σειριακό μέσο καλλιέργειας	Gardner
	Γέννηση από κρυσυντηρημένα άωρα ωάρια που ωρίμασαν <i>in vitro</i>	Tucker
1999	Πρώτη κύηση από ωάριο κρυσυντηρημένο με υαλοποίηση	Kuleshova
2001	Γέννηση από σπέρμα κλινικά νεκρού άνδρα έπειτα από MESE και IVF	Belker
	Συνδυασμός PGD και ελέγχου ιστοσυμβατότητας HLA των εμβρύων	Verlinsky
2002	PGD έπειτα από βιοψία βλαστοκύστεων	de Boer
	PGD σε πολικά σωματίδια με a-CGH	Wells
2003	Γέννηση φυσιολογικού τέκνου έπειτα από αφαίρεση υπεράριθμου προπυρήνα	Kattera
2004	Γέννηση έπειτα από μεταμόσχευση κρυσυντηρημένου ωθηκικού ιστού	Donnez
	Πρώτη προοπτική τυχαιοποιημένη μελέτη της εμβρυομεταφοράς 1 βλαστοκύστης	Gardner
	Κρυσυντήρηση ωαρίων για ογκολογικούς ασθενείς	Porcu
2005	Συστηματική χρήση της βιοψίας βλαστοκύστεων για την PGD	McArthur
2007	Έννοια της “ήπιας” IVF	Heijnen
2009	Γέννηση έπειτα από έλεγχο της πλοειδίας πολικών σωματίων με a-CGH	Fishel
2010	Βραβείο Nobel Φυσιολογίας ή Ιατρικής στον Robert G. Edwards για την IVF	www.nobelprize.org
2011	Πρώτη γέννηση μέσω της τεχνολογίας απεικόνισης με χρονοδιόλιση	Meseguer
2012	Θάνατος της Lesley Brown, πρώτης μητέρας στον κόσμο που γέννησε με IVF	
	Καταγραφή 5 εκατομμυρίων τέκνων από IVF παγκοσμίως	
2013	Θάνατος του βιολόγου πρωτεργάτη της IVF, Sir Robert Edwards	(Winston, 2013)

## 1.2.2 Μέθοδοι ΙΥΑ

Η ιατρική υποβοήθηση της αναπαραγωγής περιλαμβάνει απλές παρεμβάσεις όπως η φαρμακευτική αγωγή για τη ρύθμιση ορμονικών ισορροπιών, χειρουργικές επεμβάσεις για την αποκατάσταση βλαβών του αναπαραγωγικού συστήματος, καθώς και συμβουλές για προγραμματισμένη επαφή των συντρόφων, με ή χωρίς τη χορήγηση φαρμακευτικής αγωγής για τη διέγερση της ωοθηκικής λειτουργίας και την πρόκληση της ωοθυλακιορρηξίας.

Εάν οι παρεμβάσεις αυτές δεν αποδώσουν, ή εάν το αίτιο υπογονιμότητας είναι τέτοιο που δεν επιτρέπει την τεκνοποίηση (π.χ. σε περίπτωση ολιγοασθenoσπερμίας ή απόφραξης των ωαγωγών), τότε ενδείκνυνται οι κυρίως **μέθοδοι ΙΥΑ**, που είναι η σπερματέγχυση και η εξωσωματική γονιμοποίηση.

### 1.2.2.1 Σπερματέγχυση

Η ενδομήτριος σπερματέγχυση (intra-uterine insemination, IUI), ή τεχνητή γονιμοποίηση (βλ. Ombelet & Van Robays, 2015) είναι η τοποθέτηση ενεργοποιημένου πληθυσμού σπερματοζωαρίων στην κοιλότητα της μήτρας με έγχυση. Το σπέρμα, εκτός από σπερματοζωάρια, περιέχει άλλα έμμορφα συστατικά (άωρα κύτταρα σπερματογένεσης, επιθηλιακά κύτταρα, ενδεχομένως πυοσφαίρια και μικρόβια), όλες τις εκκρίσεις του ανδρικού αναπαραγωγικού συστήματος (σπερματικό πλάσμα), καθώς και άμορφα συστατικά (όπως κρυστάλλους οξαλικού οξέος, κυτταρικά θραύσματα, κ.λπ.). Επίσης, τα περισσότερα σπερματοζωάρια εμφανίζουν μορφολογικές ατυπίες.

Στη φυσιολογική σύλληψη, όλα τα συστατικά του σπέρματος, εκτός από ολίγα, ενεργοποιημένα σπερματοζωάρια, παραμένουν στον κόλπο και δεν εισέρχονται στην κοιλότητα της μήτρας. Υπό συνθήκες ιατρικώς υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, όμως, είναι απαραίτητο τα συστατικά αυτά να αφαιρεθούν και μόνο ένα κεκαθαρισμένο παρασκεύασμα, κατά το δυνατόν μορφολογικώς τυπικών σπερματοζωαρίων, να εγχυθεί στη μητρική κοιλότητα. Σε αντίθετη περίπτωση, η έγχυση σπερματικού πλάσματος και άλλων συστατικών του σπέρματος απ' ευθείας στη μητρική κοιλότητα ενδέχεται να προκαλέσει φλεγμονώδη αντίδραση ή και ενεργό λοίμωξη στο περιτόναιο (αφού το υγρό μπορεί να διαρρεύσει ανάδρομα από τους διαβατούς ωαγωγούς προς την κοιλία), ή και ανοσοποίηση κατά των αντιγόνων του άνδρα.

Για τον σκοπό αυτό, η εργαστηριακή κατεργασία του σπέρματος πραγματοποιείται με δύο κυρίως τρόπους. Ο πρώτος είναι η τεχνική “swim-up” (βλ. Mahadevan, 1984), κατά την οποία το σπερματικό πλάσμα απομονώνεται με φυγοκέντρηση, το ίζημα υφίσταται μία ή δύο εκπλύσεις και στη συνέχεια αφήνεται να επωαστεί με καλλιεργητικό μέσον, οπότε τα κινητά σπερματοζωάρια “κολυμπούν και ανέρχονται” στο μέσον (εξ ου και η ονομασία της τεχνικής) και το υπερκείμενο χρησιμοποιείται για τη σπερματέγχυση. Ο δεύτερος είναι η απομόνωση των κινητών και μορφολογικώς βέλτιστων σπερματοζωαρίων μέσω μιας φυγοκέντρησης σε ασυνεχή κλίση πυκνότητας κολλοειδούς διαλύματος (για λεπτομέρειες, βλ. ενότητα 2.4.5.3 παρακάτω, Henkel, 2012 και Henkel & Schill, 2003).

Η σπερματέγχυση έχει ένα μέσο ποσοστό επιτυχίας 10-25% ανά κύκλο. Η επιτυχία της προϋποθέτει τη διαβατότητα ενός τουλάχιστον ωαγωγού, εξαρτάται δε από την ποιότητα του σπέρματος και την ηλικία της συντρόφου. Η εφαρμογή της είναι απλή και μπορεί να γίνει με ή χωρίς φαρμακευτική διέγερση της ωοθηκικής λειτουργίας.

### 1.2.2.2 Εξωσωματική γονιμοποίηση

Η εξωσωματική γονιμοποίηση (Stephoe & Edwards, 1978) ή γονιμοποίηση *in vitro* (*in vitro fertilization, IVF*), είναι η κατ’ εξοχήν μέθοδος ΙΥΑ που εφαρμόζεται σήμερα διεθνώς. Επειδή παρακάμπτεται ο ωαγωγός, δηλαδή το φυσικό “εργαστήριο” της γονιμοποίησης *in vivo*, η μέθοδος εφαρμόζοταν αρχικά σε περιπτώσεις απόφραξης των ωαγωγών. Γρήγορα φάνηκε ότι μπορεί να εφαρμοσθεί και σε ανδρολογικά περιστατικά (Cohen *et al.*, 1984), ενώ στη συνέχεια η εφαρμογή της επεκτάθηκε περαιτέρω.

Η εξωσωματική γονιμοποίηση πραγματοποιείται σε τέσσερα στάδια:

- φαρμακευτική διέγερση της ωοθηκικής λειτουργίας σύμφωνα με συγκεκριμένα πρωτόκολλα, προκειμένου να αναπτυχθούν πολλαπλά ωοθυλάκια,
- πρόκληση της ωοθυλακιορρηξίας και συλλογή των ωαρίων (ωοληψία),
- απομόνωση των ωαρίων από το ωοθυλακικό υγρό και καλλιέργειά τους με κατεργασμένο σπέρμα, προκειμένου να επέλθει γονιμοποίηση,
- έλεγχος της γονιμοποίησης και παρακολούθηση της καλλιέργειας κατά τα στάδια της αυλάκωσης (επί 2-5 ημέρες), ώστε να επιλεγούν έμβρυα για μεταφορά στην κοιλότητα της μήτρας (εμβρυομεταφορά).

Τα στάδια αυτά περιγράφονται με λεπτομέρειες στην ενότητα 3.4 παρακάτω. Μολονότι τα αποτελέσματα έχουν βελτιωθεί πολύ στην κλινική εφαρμογή της

εξωσωματικής γονιμοποίησης και αγγίζουν ποσοστά επιτυχίας αδιανόητα μέχρι και πριν μόλις μία δεκαετία, απομένει ακόμη πολύς δρόμος για να βελτιωθούν οι βασικές θεωρητικές γνώσεις μας σχετικά με τις λεπτομέρειες της ομαλής ενεργοποίησης και συγχώνευσης των γαμετών του ανθρώπου. Χαρακτηριστικά, έχει υπολογισθεί (Patrizio & Sakkas, 2009) ότι το ποσοστό “παιδιών στο σπίτι” δεν υπερβαίνει το 10% ανά συλλεγόμενο ωάριο, ακόμη και με ωάρια δότριας.

### **1.2.3 Επιμέρους τεχνικές**

Με την πάροδο των ετών, η αρχική τεχνική καλλιέργειας τροποποιήθηκε σημαντικά. Αντί των καλλιιεργειών σε δοκιμαστικά σωληνάρια, οι καλλιέργειες πραγματοποιούνται σε τρυβλία, συνήθως σε μικροσταγόνες επικαλυμμένες με έλαιο παραφίνης. Έχουν αναπτυχθεί πολλές παρελκόμενες τεχνικές, οι οποίες παρουσιάζονται συνοπτικά εδώ (η λεπτομερής περιγραφή τους βρίσκεται στην ενότητα 3.4 του πειραματικού μέρους).

#### **1.2.3.1 Ενδοκυτταροπλασματική έγχυση σπερματοζωαρίου**

Το πρόβλημα της σοβαρής ασθενοσπερμίας ή ολιγοασθενοσπερμίας παρέμενε για πολλά χρόνια άλυτο. Στην κλασική εξωσωματική γονιμοποίηση απαιτείται ένας ελάχιστος αριθμός 10-30.000 σπερματοζωαρίων ανά ωάριο, προκειμένου να διαβρωθούν οι συνδέσεις μεταξύ των κυττάρων του ωοφόρου λοφίσκου και τα σπερματοζωάρια να φθάσουν στη διαφανή ζώνη για να επέλθει γονιμοποίηση. Όταν υπάρχει επαρκής αριθμός σπερματοζωαρίων, τα ώριμα ωάρια γονιμοποιούνται σε υψηλό ποσοστό, της τάξης του 80% ή και περισσότερο. Όταν όμως ο αριθμός των σπερματοζωαρίων είναι πολύ περιορισμένος, η δε κινητικότητά τους τόσο χαμηλή που δεν επαρκεί για τη γονιμοποίηση, το εν λόγω ποσοστό μειώνεται σημαντικά ή και μηδενίζεται.

Η καλλιέργεια σε μικροσταγόνες, καθώς και η σύντομη έκθεση των ωαρίων σε πολύ αυξημένη συγκέντρωση σπερματοζωαρίων για σύντομο χρονικό διάστημα είναι δύο παραλλαγές της κλασικής καλλιέργειας που εφαρμόζονταν ήδη από τη δεκαετία του 1980. Εάν όμως και αυτές οι τεχνικές δεν έφεραν αποτέλεσμα, τα ωάρια παρέμεναν αγονιμοποίητα, η προσπάθεια αποτύγχανε και το ζευγάρι δεν είχε άλλη επιλογή από την επανάληψη της προσπάθειας, αυτή τη φορά με χρήση σπέρματος τρίτου δότη.

Η τεχνολογία που επιτρέπει την ενδοκυτταρική έγχυση διαφόρων ουσιών ήταν ήδη γνωστή και στα πρώτα χρόνια της εξωσωματικής γονιμοποίησης, μάλιστα μόλις είχε

αρχίσει διεθνώς η κατασκευή διαγονιδιακών πειραματοζώων με τεχνικές έγχυσης πλασμιδίων στους προπυρήνες (Gordon, 1980). Η ίδια τεχνολογία είχε εφαρμοσθεί και παλαιότερα για να διαπιστωθεί η ικανότητα άωρων σπερματοζωαρίων να αποσυμπιέσουν τον πυρήνα τους μέσα σε ωάρια κρικήτου (Uehara & Yanagimachi, 1977), ενώ το ίδιο πειραματικό σύστημα χρησιμοποιήθηκε για να αποδειχθεί ότι σπερματοζωάρια στερούμενα ακροσώματος είναι δυνατόν να δημιουργήσουν προπυρήνα σε ωάρια κρικήτου (Lanzendorf *et al.*, 1988a) και ανθρώπου (Lanzendorf *et al.*, 1988b).

Ένα επόμενο βήμα έγινε με την πειραματική έγχυση σπερματοζωαρίου υπό τη διαφανή ζώνη, τεχνική που ονομάστηκε “*sub-zonal (sperm) insertion*” (SUZI) και οδήγησε σε επιτυχή γονιμοποίηση (Laws-King *et al.*, 1987) και λίγο αργότερα σε κηύσεις (Ng, 1988).

Η πρώτη γονιμοποίηση με **ενδοκυτταροπλασματική έγχυση σπερματοζωαρίου** (ή **μικρογονιμοποίηση**), τεχνική που ονομάστηκε διεθνώς “*intra-cytoplasmic sperm injection*” (ICSI) ανακοινώθηκε το 1991 και ακολούθησαν οι πρώτες γεννήσεις (Palermo, 1992). Σύμφωνα με έναν από τους πρωτεργάτες της (Van Steirteghem, 2012), η τεχνική που εφαρμοζόταν τότε στο εργαστήριο ήταν η SUZI, αλλά ενίοτε αυτή για τεχνικούς λόγους αποτύγχανε και το σπερματοζωάριο κατέληγε στο ωόπλασμα. Τα ωάρια αυτά παρέμεναν σε καλλιέργεια για παρατήρηση, υπήρξαν όμως περιστατικά στα οποία ένα τέτοιο ωάριο “αποτυχημένης SUZI” ήταν το μοναδικό γονιμοποιημένο και διαθέσιμο προς εμβρυομεταφορά. Μία από αυτές τις εμβρυομεταφορές κατέληξε σε κηύση και στη γέννηση του πρώτου παιδιού της ICSI στις 14 Ιανουαρίου 1992.

Σήμερα, η τεχνική έχει οδηγήσει στη γέννηση τουλάχιστον 2,5 εκατομμυρίων παιδιών (Van Steirteghem, 2012), ενώ μέχρι στιγμής τα δεδομένα δείχνουν ότι η τεχνική ευθύνεται για μια μικρή, αμελητέα αύξηση των συγγενών ανωμαλιών στα παιδιά. Πολλές θεραπευτικές ομάδες διεθνώς χρησιμοποιούν αποκλειστικά την ICSI ως μέθοδο γονιμοποίησης, προκειμένου να αποφύγουν το ενδεχόμενο μειωμένου ποσοστού γονιμοποίησης, ή και πλήρους αποτυχίας της.

Στα χρόνια που ακολούθησαν, η τεχνική της μικρογονιμοποίησης εφαρμόστηκε με επιτυχία σε περιπτώσεις αποφρακτικής αζωοσπερμίας, αλλά και σε όλες τις άλλες περιπτώσεις υπογονιμότητας ανδρικής αιτιολογίας, με χρήση σπερματοζωαρίων ή και άωρων μορφών τους, έως και σπερματίδων.

### 1.2.3.2 Προεμφυτευτική γενετική διάγνωση

Η προεμφυτευτική γενετική διάγνωση (preimplantation genetic diagnosis, **PGD**) είναι μια μέθοδος ανίχνευσης γενετικών χαρακτηριστικών του ωαρίου πριν από τη γονιμοποίηση, ή του εμβρύου προτού αυτό μεταφερθεί στην κοιλότητα της μήτρας. Η μέθοδος αποσκοπεί στην ανίχνευση γενετικών νοσημάτων που οφείλονται σε γνωστές μεταλλάξεις γονιδίων, καθώς και στον εντοπισμό διαταραχών του αριθμού των χρωμοσωμάτων (**ανευπλοειδίων**) ή της δομής τους. Υπό την έννοια αυτή ισοδυναμεί με μια πρόωρη προγεννητική διάγνωση, εξαλείφοντας όμως την ανάγκη για τεχνητή διακοπή της κύησης εάν βρεθεί ότι το κύημα φέρει γενετικές ανωμαλίες. Η προεμφυτευτική γενετική διάγνωση ανιχνεύει τα προσβεβλημένα έμβρυα, εάν υπάρχει υπόνοια ότι ένας ή και οι δύο γονείς φέρουν μια επιβλαβή μετάλλαξη (για παράδειγμα, τη μετάλλαξη ΔF508 του γονιδίου CTFR, υπεύθυνη για την εκδήλωση της κυστικής ίνωσης, ή μία από τις μεταλλάξεις των γονιδίων της σφαιρίνης που ευθύνονται για την εκδήλωση β-μεσογειακής αναιμίας). Στις περιπτώσεις αυτές, στις οποίες το νόσημα μεταβιβάζεται με μεντελικό τρόπο, η μέθοδος επιτρέπει να διαχωρισθούν τα υγιή έμβρυα, τα ετεροζυγωτικά έμβρυα (που θα είναι υγιείς φορείς) και τα ομοζυγωτικά έμβρυα (που, εάν γεννηθούν, θα νοσήσουν). Ομοίως, δεδομένου ότι η μέθοδος επιτρέπει την ανάλυση των χρωμοσωμάτων του εμβρύου (καρυότυπο), αποκαλύπτει και το φύλο του εμβρύου. Η ιδιαιτερότητα αυτή παρέχει τη δυνατότητα αποφυγής της μετάδοσης φυλοσύνδετων νοσημάτων στο τέκνο, εάν υπάρχει γνωστή τέτοια υποψία στο οικογενειακό ιστορικό.

Πρακτικά, η τεχνική περιλαμβάνει τη διάνοιξη μιας οπής στη διαφανή ζώνη (συνήθως με laser ή με χημική διάβρωση), διά μέσου της οποίας ένα βλαστομερίδιο αναρροφάται και υποβάλλεται σε γενετική ανάλυση (βλ. ενότητα 1.2.3.6 παρακάτω).

Η μέθοδος είχε ήδη χρησιμοποιηθεί από τους πρωτεργάτες της εξωσωματικής γονιμοποίησης για την ανίχνευση και την επιλογή του φύλου σε πειραματόζωα (Edwards *et al.*, 1967), οι οποίοι είχαν προφανώς οραματισθεί τις πιθανές ευεργετικές της εφαρμογές στον άνθρωπο.

Οι προσπάθειες σε πειραματόζωα εντάθηκαν μετά την κλινική εφαρμογή της εξωσωματικής γονιμοποίησης και διαφάνηκαν σημαντικές τεχνικές δυσκολίες στην απομόνωση των βλαστομεριδίων (Nijs & Van Steirteghem, 1987). Ενδεικτικά, στην εισαγωγή του εν λόγω άρθρου, η Martine Nijs αναφέρει ότι “...*detection of genetic and metabolic defects prior to implantation might be possible in the future*” (“...η ανίχνευση



γενετικών και μεταβολικών ατελειών πριν από την εμφύτευση μπορεί να καταστεί εφικτή στο μέλλον”). Οι πρώτες πειραματικές μελέτες στον άνθρωπο ανακοινώθηκαν το 1989 (Coutelle *et al.*, 1989) και οι πρώτες κηύσεις σημειώθηκαν με περιστατικά ανίχνευσης του φύλου (Handyside *et al.*, 1990). Έκτοτε, η χρήση της προεμφυτευτικής γενετικής διάγνωσης έχει εξαπλωθεί σε πλήθος νοσημάτων και παθολογιών. Το 2002 ιδρύθηκε η παγκόσμια εταιρεία προεμφυτευτικής γενετικής διάγνωσης (*Preimplantation Genetic Diagnosis International Society*, βλ. [www.pdgis.org](http://www.pdgis.org))

Σε μια από τις πιο αμφισβητούμενες, από ηθικής απόψεως, παραλλαγές της, η προεμφυτευτική γενετική διάγνωση συνδυάστηκε με τυποποίηση της ιστοσυμβατότητας (ανίχνευση αντιγόνων HLA) των εμβρύων με προϋπάρχον τέκνο του ζευγαριού: στην περίπτωση αυτή, το δεύτερο τέκνο όχι μόνον δεν φέρει το γενετικό νόσημα του πρώτου, αλλά είναι και πιθανός δότης κυττάρων ή οργάνων για τη θεραπεία του (Verlinsky *et al.*, 2011). Η πιθανή εργαλειοποίηση του δεύτερου, αγέννητου ακόμη, τέκνου θεωρείται ηθικό κώλυμα στη συγκεκριμένη περίπτωση από τους πολέμιους της μεθόδου.

Η εφαρμογή της προεμφυτευτικής γενετικής διάγνωσης εγείρει και άλλα ηθικά και δεοντολογικά ζητήματα. Πρώτον, στην περίπτωση της ανίχνευσης μιας σημειακής αυτοσωματικής μετάλλαξης που μεταβιβάζεται μεντελικά, τίθεται το θέμα της τύχης (εμβρυομεταφοράς ή όχι) των “υγιών φορέων”, που θεωρητικά αποτελούν το 50% των εμβρύων. Συχνά, το κλινικό δίλημμα είναι δύσκολο, όταν λ.χ. υπάρχουν διαθέσιμα δύο άριστης ποιότητας έμβρυα υγιείς φορείς και ένα κακής ποιότητας απολύτως υγιές έμβρυο, περίπτωση κατά την οποία οι γονείς συνήθως επιλέγουν τη μεταφορά του υγιούς εμβρύου, γεγονός όμως που μειώνει την πιθανότητα εγκυμοσύνης. Δεύτερον, η τεχνική επιτρέπει την επιλογή του φύλου, συνακόλουθα δε την αποφυγή της εμβρυομεταφοράς και γέννησης τέκνων του συγκεκριμένου φύλου: αυτό σημαίνει ότι ένα γόνιμο ζευγάρι που έχει ήδη 2 ή 3 τέκνα ενός μόνο φύλου και επιθυμεί τη γέννηση ενός ακόμη τέκνου του άλλου φύλου, θα πρέπει να υποβληθεί σε εξωσωματική γονιμοποίηση και προεμφυτευτική γενετική διάγνωση μόνο και μόνο για να καλύψει αυτή την κοινωνική επιθυμία. Τρίτον, δεδομένου ότι η τεχνική παρέχει τη δυνατότητα επιλογής γενετικών χαρακτηριστικών, ορισμένοι εκφράζουν την επιφύλαξη ότι κινδυνεύει να χρησιμοποιηθεί για την “κατά παραγγελία” δημιουργία εμβρύων (“*designer babies*”), σχεδιασμένων όχι για να μην φέρουν επιβλαβή γενετικά χαρακτηριστικά, αλλά μάλλον για να φέρουν συγκεκριμένα ειδικά χαρακτηριστικά. Εάν τα γονίδια αυτών των χαρακτηριστικών γίνουν γνωστά στο μέλλον (σε συνδυασμό με την πλήρη αλληλούχηση του ανθρώπινου γονιδιώματος και με τις

εκπληκτικές δυνατότητες επεξεργασίας και διόρθωσης –“*editing*”– του DNA μέσω του συστήματος CRISPR/Cas), τα χαρακτηριστικά αυτά θα ήταν δυνατόν να επιλεγούν θετικά, ή να προστεθούν, ώστε να προσδώσουν μεγαλύτερες ικανότητες, ή ειδικές δεξιότητες, ή ακόμη και το επιθυμητό φυσικό κάλλος στα έμβρυα και στα τέκνα που θα γεννηθούν.

Οι προοπτικές αυτές έχουν οδηγήσει τον νομοθέτη σε πολλές χώρες, εξ ων και η Ελλάδα, στην απαγόρευση της εφαρμογής των μεθόδων προεμφυτευτικής γενετικής διάγνωσης για μη ιατρικούς λόγους, καθώς και σε αυστηρά πλαίσια εφαρμογής της, υπό δημόσιο έλεγχο.

### 1.2.3.3 Προεμφυτευτικός γενετικός έλεγχος

Μια μέθοδος που έχει αρχίσει να χρησιμοποιείται όλο και περισσότερο τα τελευταία χρόνια είναι η ανίχνευση γενετικών χαρακτηριστικών του ωαρίου πριν από τη γονιμοποίηση. Λόγω του μηχανισμού της μείωσης εικάζεται ότι εάν ένα πολικό σωματίο έχει φυσιολογικό αριθμό χρωμοσωμάτων, τότε και το υπόλοιπο μισό του γενετικού υλικού εντός του ωοκυττάρου θα πρέπει να είναι κι αυτό φυσιολογικό. Υπό την έννοια αυτή, ο **προεμφυτευτικός γενετικός έλεγχος** (preimplantation genetic screening, **PGS**) δεν αποτελεί στην κυριολεξία *διάγνωση*, όταν δεν αποσκοπεί στην ανίχνευση συγκεκριμένης γνωστής γενετικής παθολογίας, αλλά απλό *έλεγχο*, ο οποίος όμως προφανώς καταλήγει να καταδείξει διαγνωστικά την ύπαρξη μιας γενετικής ανωμαλίας.

Η μέθοδος έχει εφαρμοσθεί με ιδιαίτερη επιτυχία τα τελευταία χρόνια σε γυναίκες αυξημένης ηλικίας, για τις οποίες είναι γνωστό ότι έχουν περιορισμένες ωθητικές εφεδρείες και ότι τα περισσότερα ωάριά τους φέρουν χρωμοσωματικές ανωμαλίες. Παρομοίως, γυναίκες μικρότερης ηλικίας, αλλά με μεγάλο αριθμό ανεξήγητων αποτυχιών έπειτα από εξωσωματική γονιμοποίηση, ενδέχεται επίσης να αποτελούν στόχο της συγκεκριμένης μεθόδου.

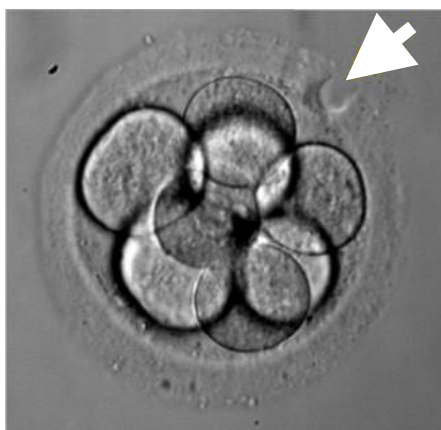
Όπως και στην περίπτωση της προεμφυτευτικής γενετικής διάγνωσης, απαιτείται διάνοιξη της διαφανούς ζώνης και βιοψία του πολικού σωματίου, το οποίο υποβάλλεται σε γενετική ανάλυση.

### 1.2.3.4 Βιοψία εμβρύου

Η διάνοιξη της διαφανούς ζώνης και η αφαίρεση πολικών σωματίων, ή ενός βλαστομεριδίου, ή 4-10 κυττάρων τροφοεξωδέρματος ονομάζεται συνολικά “βιοψία”. Η

τεχνική περιλαμβάνει, σε πρώτη φάση, τη διάτρηση της διαφανούς ζώνης, μια τεχνική υποβοηθούμενης εκκόλαψης, η οποία έχει προταθεί για κλινική χρήση σε επιλεγμένες ομάδες ασθενών (Liu *et al.*, 1993). Η διάνοιξη της ζώνης είναι δυνατόν να επιτευχθεί με διάφορους τρόπους:

- μηχανική διατομή της ζώνης (partial zona dissection, PZD), μια από τις πρώτες μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν ιστορικά (Malter & Cohen, 1989),
- διάτρηση της διαφανούς ζώνης (zona drilling) με τη βοήθεια όξινου διαλύματος του Tyrode (acid Tyrode's), το οποίο αφήνεται να διαβρώσει τους πολυσακχαρίτες της ζώνης και διανοίγει την οπή (Malter & Cohen, 1989),
- διάνοιξη σχισμής με τη βοήθεια μιας ακτίνας laser (**Εικόνα 1.16**), η οποία περνά μέσα από το οπτικό σύστημα του μικροσκοπίου και προσφέρει πολύ καλύτερο έλεγχο. Η τεχνική αυτή εφαρμόστηκε και η ασφάλειά της μελετήθηκε πρώτα σε πειραματόζωα (Rink, 1996).



**Εικόνα 1.16** Διάνοιξη σχισμής στη διαφανή ζώνη εμβρύου 8 κυττάρων με χρήση laser. Το σημείο της σχισμής επισημαίνεται με το λευκό βέλος.

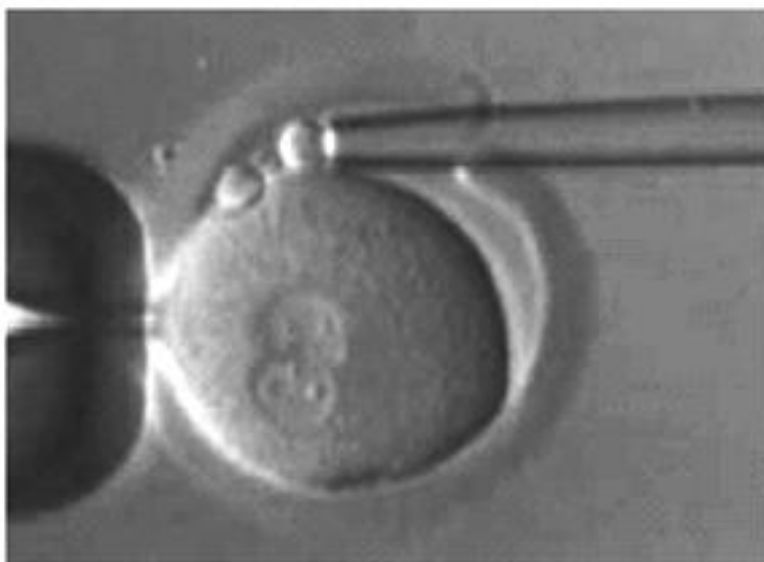
Μετά τη διάνοιξη της ζώνης, ακολουθεί η δεύτερη φάση, που είναι η αφαίρεση ενός ή περισσότερων κυττάρων για γενετική ή άλλη ανάλυση. Η αφαίρεση πραγματοποιείται με ένα τριχοειδές γυάλινο μικροσιφόνιο κατάλληλης εσωτερικής διαμέτρου, ώστε να μην προκληθεί λύση των αφαιρούμενων κυττάρων.

Σήμερα εφαρμόζονται βιοψίες κυτταρικού υλικού από όλα τα προεμφυτευτικά στάδια ανάπτυξης: πρώτο και δεύτερο πολικό σωματίο, βλαστομερίδιο μετά την ενεργοποίηση του γονιδιώματος του εμβρύου (στάδιο 8 κυττάρων ή μεταγενέστερο), τροφοεξώδερμα της βλαστοκύστης (διότι προφανώς δεν πρέπει να αφαιρεθεί τμήμα της έσω κυτταρικής μάζας από την οποία θα προέλθει το κυρίως έμβρυο), ενώ είναι δυνατόν

να πραγματοποιηθεί και ολική βιοψία σε περίπτωση που το έμβρυο δεν πρόκειται να χρησιμοποιηθεί κλινικά για την επίτευξη εγκυμοσύνης (αυτή είναι και η τεχνική που εφαρμόστηκε στην παρούσα μελέτη).

#### 1.2.3.4.1 Βιοψία πολικού σωματίου

Η βιοψία πολικού σωματίου πραγματοποιείται την ημέρα της ωοληψίας ή την πρώτη ημέρα καλλιέργειας (Verlinsky, 1990). Είναι δυνατόν να αφαιρεθούν προς ανάλυση το πρώτο, το δεύτερο ή και τα δύο πολικά σωματίδια. Ένα παράδειγμα βιοψίας πολικού σωματίου παρατίθεται στην **Εικόνα 1.17**.



**Εικόνα 1.17. Βιοψία πολικού σωματίου.** Το έμβρυο έχει ακινητοποιηθεί με αρνητική πίεση μέσω του μικροσιφωνίου συγκράτησης. Το τριχοειδές μικροσιφώνιο βιοψίας έχει εισαχθεί διά μέσου της οπής της διαφανούς ζώνης στον περιλεκιθικό χώρο και βρίσκεται σε επαφή με το προς αναρρόφηση πολικό σωματίο στη 12<sup>η</sup> ώρα (το άλλο πολικό σωματίο διακρίνεται στην 11<sup>η</sup> ώρα). Στο κυτταρόπλασμα του ζυγώτη διακρίνονται ευκρινώς οι δύο προπυρήνες.

Αυτός ο τύπος βιοψίας έχει το πλεονέκτημα ότι δεν επηρεάζει διόλου το ωοκύτταρο, επομένως θεωρείται ασφαλέστερος για το έμβρυο, δεδομένου ότι τα πολικά σωματίδια δεν απαιτούνται για τη γονιμοποίηση και για την περαιτέρω εξέλιξη του εμβρύου. Το δεύτερο πλεονέκτημά του είναι ότι η βιοψία πραγματοποιείται νωρίς, πριν από τη γονιμοποίηση, οπότε δίδεται αρκετός χρόνος για την ανάλυση του υλικού της βιοψίας.

Ταυτόχρονα όμως, έχει το μειονέκτημα ότι δεν επιτρέπει τον έλεγχο του ανδρικού γονιδιώματος, επειδή τα πολικά σωματίδια είναι παράγωγα του ωαρίου και επομένως η

ανάλυσή τους παρέχει πληροφορίες μόνο για το θήλυ γονιδίωμα (το οποίο, ωστόσο, ευθύνεται για μεγάλο μέρος των γενετικών ανωμαλιών των προεμφυτευτικών εμβρύων).

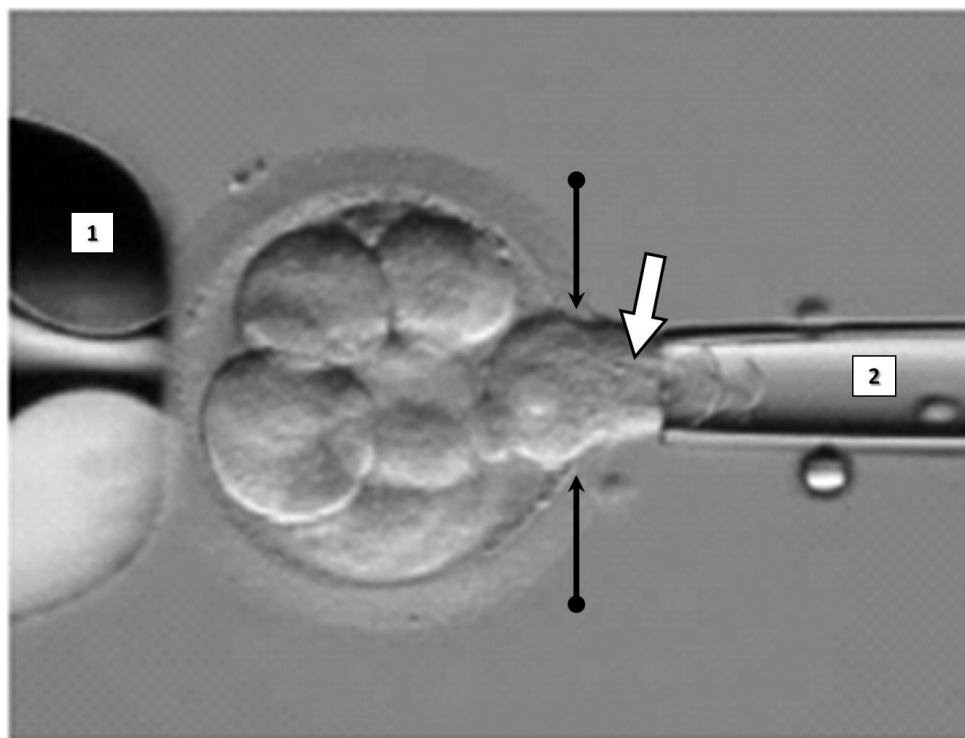
Επομένως, η βιοψία πολικών σωματίων επιτρέπει τη διάγνωση όλων των Χ-φυλοσύνδετων και των κυρίαρχων αυτοσωματικών νοσημάτων, καθώς και τη μερική διάγνωση των υπολειπόμενων αυτοσωματικών διαταραχών. Ένα τελευταίο μειονέκτημά της είναι ότι ενέχει αυξημένο κίνδυνο σφάλματος, διότι το γενετικό υλικό αυτού του μικρού κυττάρου είναι ουσιαστικά “απόβλητο” υλικό του ωοκυττάρου και είναι πιθανόν να περιέχει εκφυλισμένο ή κατεστραμμένο DNA, ή ακόμη και χρωμοσωματικούς ανασυνδυασμούς που δεν αντιστοιχούν στην πραγματικότητα της ομόλογης αλληλουχίας εντός του ωοκυττάρου.

#### 1.2.3.4.2 Βιοψία βλαστομεριδίου

Η βιοψία στο στάδιο της αυλάκωσης πραγματοποιείται τυπικά την 3<sup>η</sup> ημέρα καλλιέργειας στην εξωσωματική γονιμοποίηση, όταν το έμβρυο έχει φθάσει το στάδιο των 8 κυττάρων ή το έχει υπερβεί. Η τεχνική εφαρμόζεται στον άνθρωπο από το 1989 (Handyside, 1989· Coutelle, 1989). Περίπου το 94% των κύκλων PGD που καταγράφονται μέσω της ESHRE (De Rycke *et al.*, 2015) είναι κύκλοι βιοψίας βλαστομεριδίων, αν και το ποσοστό αυτό φθίνει, επειδή υπήρξαν μελέτες που θέτουν σε αμφισβήτηση την ασφάλεια της μεθόδου (βλ. παρακάτω). Η τεχνική απαιτεί τη χρήση μέσου χωρίς δισθενή κατιόντα ( $\text{Ca}^{2+}$  και  $\text{Mg}^{2+}$ ), διότι έχει αποδειχθεί ότι αυτό διευκολύνει την αποκόλληση των βλαστομεριδίων (**Εικόνα 1.18**), χωρίς να επηρεάζει την ανάπτυξη του εμβρύου (Dumoulin *et al.*, 1998).

Το μεγάλο πλεονέκτημα αυτής της τεχνικής σε σύγκριση με τη βιοψία πολικών σωματίων είναι ότι έχει μεσολαβήσει η γονιμοποίηση, ενώ έχει ήδη ενεργοποιηθεί και το γονιδίωμα του εμβρύου. Επομένως, η γενετική ανάλυση μπορεί να ανιχνεύσει όλες τις ανωμαλίες των αυτοσωμάτων και των φυλετικών χρωμοσωμάτων, καθώς και όλες τις γνωστές μεταλλάξεις (ομόζυγες ή ετερόζυγες). Αδιαμφισβήτητο πλεονέκτημα της βιοψίας 3<sup>ης</sup> ημέρας (όπως και της βιοψίας πολικών σωματίων) είναι και το γεγονός ότι επιτρέπει μεν να ολοκληρωθεί η ανάλυση και επιλογή των υγιών εμβρύων μέχρι την 5<sup>η</sup> ημέρα και να πραγματοποιηθεί η εμβρυομεταφορά των υγιών εμβρύων στον ίδιο κύκλο θεραπείας, χωρίς να μεσολαβήσει κατάψυξη και κρυοσυντήρηση, κάτι που όμως αποτελεί ταυτόχρονα και περιορισμό, διότι τίποτε δεν διασφαλίζει ότι τα επιλεγμένα υγιή έμβρυα θα φθάσουν όλα στο στάδιο της βλαστοκύστης.

Ως κύριο μειονέκτημα της τεχνικής θεωρείται η αδυναμία της να ελέγξει τις περιπτώσεις μωσαϊκισμού: είναι γνωστό ότι πολλά έμβρυα στα πρώτα αυτά στάδια της ανάπτυξης δεν έχουν σταθερή χρωμοσωματική σύσταση και επομένως η ανάλυση ενός ή ακόμη και δύο κυττάρων τους δεν οδηγεί σε βεβαιότητα ότι το ληφθέν γενετικό υλικό αντιπροσωπεύει όντως τη γενετική πραγματικότητα και των υπολοίπων βλαστομεριδίων.



**Εικόνα 1.18. Βιοψία βλαστομεριδίου από έμβρυο σταδίου 8 κυττάρων.** Το έμβρυο έχει ακινητοποιηθεί με αρνητική πίεση μέσω του μικροσιφωνίου συγκράτησης (1). Το τριχοειδές μικροσιφώνιο βιοψίας (2) παρασύρει ένα βλαστομερίδιο διά μέσου της οπής που έχει διανοιγεί στη διαφανή ζώνη (μαύρα βέλη). Διακρίνεται ευκρινώς ο πυρήνας του λαμβανόμενου κυττάρου (λευκό βέλος).

Επίσης, είναι γνωστό ότι η αφαίρεση ενός ή δύο κυττάρων του εμβρύου σταδίου 8 κυττάρων, ή η καταστροφή τους, σε περιπτώσεις κρυοσυντήρησης, δεν αναστέλλει την ανάπτυξη. Όμως, δεδομένου ότι τα ωάρια διαφόρων ειδών, πιθανώς και του ανθρώπου, διαθέτουν πολικότητα (για παράδειγμα, διαφορές κατανομής των RNA σε διάφορες περιοχές του ωαρίου, βλ. Houston, 2013), υπάρχει ενδεχόμενο η αφαίρεση συγκεκριμένων βλαστομεριδίων του ανθρώπινου εμβρύου να επηρεάζει δυσμενώς την ανάπτυξη. Ισχυρή ένδειξη προς αυτή την κατεύθυνση αποτελεί μια πρόσφατη ελεγχόμενη προοπτική μελέτη, τα συμπεράσματα της οποίας υποδηλώνουν ότι παρατηρείται σημαντική μείωση (περίπου κατά 40%) της ικανότητας του εμβρύου να εμφυτευθεί εξαιτίας της ίδιας της μεθόδου (Scott *et al.*, 2013). Οι εν λόγω ερευνητές, αν και επισημαίνουν ότι η βιοψία σε τόσο προχωρημένο στάδιο ανάπτυξης μπορεί να οδηγεί υποχρεωτικά σε αναβολή της

εμβρυομεταφοράς και σε κατάψυξη όλων των εμβρύων, προσθέτοντας στη διαδικασία ένα ακόμη βήμα με τα πιθανά μειονεκτήματά του, υποστηρίζουν όμως πειστικά ότι η βιοψία τροφοεξωδέρματος είναι αυτή που προκαλεί τις λιγότερες βλάβες στα έμβρυα.

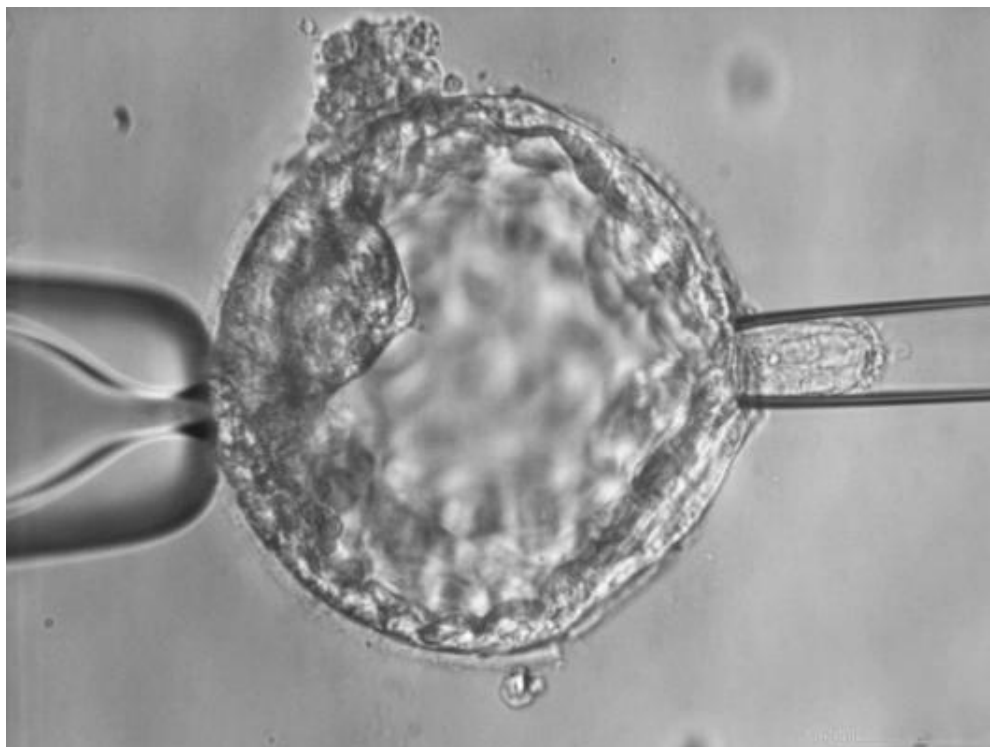
#### 1.2.3.4.3 Βιοψία τροφοεξωδέρματος

Η βιοψία πολικού σωματίου και η βιοψία βλαστομεριδίου είναι τεχνικές που αποδίδουν ελάχιστο DNA για γενετική ανάλυση. Επομένως, η διάγνωση γενετικών βλαβών σε μοριακό επίπεδο, όπως η ανίχνευση μεταλλάξεων, ή η ανίχνευση χρωμοσωματικών ανωμαλιών με τις σύγχρονες μεθόδους της γενετικής (aCGH ή NGS—next generation sequencing, αλληλούχηση επόμενης γενεάς) προϋποθέτει ικανές μεθόδους πολλαπλασιασμού της ποσότητας του DNA του μεμονωμένου κυττάρου (single-cell PCR). Η βιοψία τροφοεξωδέρματος αποτελεί μια λύση, διότι παρέχει πολλαπλάσια αρχική ποσότητα DNA για την ανάλυση. Προς τούτο, είναι δυνατόν να αφαιρεθούν 4-10 περίπου κύτταρα τροφοεξωδέρματος, χωρίς να επηρεασθεί η μετέπειτα εξέλιξη του εμβρύου (Εικόνα 1.19). Η τεχνική αυτή τυγχάνει ολοένα και ευρύτερης αποδοχής από τις μονάδες εξωσωματικής γονιμοποίησης και αναμένεται να καταστεί η κύρια μέθοδος βιοψίας στο μέλλον.

Από πλευράς τεχνικής, η διάνοιξη της διαφανούς ζώνης πραγματοποιείται την 3<sup>η</sup> ημέρα. Με τον τρόπο αυτό, όταν το έμβryo φθάσει στο στάδιο της βλαστοκύστης, κύτταρα του τροφοεξωδέρματος ήδη προβάλλουν από τη σχισμή, γεγονός που διευκολύνει τη βιοψία χωρίς να διαταράσσει το εσωτερικό της βλαστοκύστης (McArthur *et al.*, 2008).

Η τεχνική έχει δύο μειονεκτήματα: πρώτον, το μέσο ποσοστό δημιουργίας βλαστοκύστεων στην εξωσωματική γονιμοποίηση είναι της τάξεως του 50%, γεγονός που σημαίνει ότι αναμένεται τα μισά μόνον έμβρυα της προσπάθειας να είναι τελικά διαθέσιμα προς ανάλυση (αυτό περιορίζει πολύ την εφαρμογή της μεθόδου σε ομάδες πληθυσμού όπου η παραγωγή ωαρίων είναι περιορισμένη: γυναίκες αυξημένης ηλικίας, πτωχές αποκρίτριες κ.λπ.), περιορίζοντας την επιτυχία της PGD (McArthur *et al.*, 2005). Δεύτερον, ο διαθέσιμος χρόνος για τη γενετική ανάλυση είναι περιορισμένος, αφού ήδη το έμβryo βρίσκεται στην 5<sup>η</sup> ημέρα καλλιέργειας: αυτό σημαίνει ότι μπορεί να απαιτηθεί η κατάψυξη και κρυοσυντήρηση των εμβρύων και συνακόλουθα η αναβολή της εμβρυομεταφοράς για επόμενο κύκλο, με ό,τι αυτό μπορεί να συνεπάγεται.

Τέλος, δεν αποκλείεται και στην περίπτωση αυτή το σφάλμα διάγνωσης λόγω μωσαϊκισμού, αν και το ποσοστό μωσαϊκισμού στα κύτταρα του τροφοεξωδέρματος είναι πολύ μικρότερο από εκείνο των βλαστομεριδίων 3<sup>ης</sup> ημέρας. Όπως και προηγουμένως, απομένει μια μικρή, αλλά υπαρκτή, πιθανότητα η βιοψία να μην αντιπροσωπεύει απολύτως τη γενετική πραγματικότητα εντός του κυρίως εμβρύου.



**Εικόνα 1.19.** Βιοψία τροφοεξωδέρματος από έμβρυο στο στάδιο της βλαστοκύστης. Το έμβρυο έχει ακινητοποιηθεί με αρνητική πίεση μέσω του μικροσιφωνίου συγκράτησης όπως προηγουμένως (βλ. Εικόνα 1.18). Το τριχοειδές μικροσιφώνιο βιοψίας (δεξιά) χρησιμεύει για την αναρρόφηση μικρού αριθμού κυττάρων.

#### 1.2.3.4.4 Ολική βιοψία

Εάν το έμβρυο δεν προορίζεται για κλινική χρήση (εμβρυομεταφορά), η βιοψία μπορεί να είναι ολική, δηλαδή όλα τα κύτταρα του εμβρύου να χρησιμοποιηθούν για γενετική ανάλυση. Στην περίπτωση αυτή εξετάζεται η γενετική σύσταση όλων των κυττάρων του εμβρύου και το αποτέλεσμα είναι απολύτως αξιόπιστο.

Η συγκεκριμένη μέθοδος εφαρμόστηκε στην παρούσα μελέτη (βλ. ενότητα 3 “Αποτελέσματα”).



### 1.2.3.5 Παρακολούθηση με απεικόνιση χρονοδιολίσθησης

Ένα μεγάλο πρόβλημα στην εξωσωματική γονιμοποίηση είναι η επιλογή των εμβρύων προς εμβρυομεταφορά. Μέχρι πρόσφατα, μόνο η μορφολογία των εμβρύων επέτρεπε τις συγκρίσεις μεταξύ των εμβρύων. Όμως, η μορφολογική παρακολούθηση μιας καλλιέργειας ανά 24 ώρες δεν επαρκεί για να ανιχνεύσει παροδικά φαινόμενα, ούτε επιτρέπει τη μέτρηση παραμέτρων όπως ο χρόνος που μεσολαβεί μεταξύ των μιτώσεων του εμβρύου κατά την αυλάκωση. Ορισμένες εκδηλώσεις είναι ορατές μόνο για λίγες ώρες, με συνέπεια να είναι εύκολο να μην παρατηρηθούν εγκαίρως, ειδικά σε εργαστήρια όπου ο φόρτος εργασίας υποχρεώνει το προσωπικό να εκτελεί τις ενέργειες σε προγραμματισμένη ώρα, με ιδιαίτερος πειστικό χρονοδιάγραμμα.

Από την πλευρά τους, τα έμβρυα δεν εξελίσσονται πάντοτε συγχρονισμένα, με συνέπεια να είναι δυνατόν να χαθούν παρατηρήσεις συγκεκριμένων φευγαλέων σταδίων, όπως το στάδιο των προπυρήνων. Από σειρά μελετών προκύπτει ότι οι διάσπαρτες μορφολογικές παρατηρήσεις της καλλιέργειας ανά 24 ώρες δεν επαρκούν για να τεκμηριωθούν επαρκώς οι λεπτομέρειες του χρονισμού των μιτώσεων κατά την αυλάκωση (Meseguer *et al.*, 2011). Από παλαιότερες μελέτες είχε φανεί ότι υπάρχουν κινητικοί δείκτες της ποιότητας των εμβρύων, οι οποίοι μπορεί να ανιχνευθούν μόνο με φωτογραφική τεκμηρίωση (Lemmen *et al.*, 2008), προκειμένου να επιλεγούν για εμβρυομεταφορά τα έμβρυα εκείνα που έχουν το μεγαλύτερο δυναμικό εμφύτευσης.

Η κινηματογράφηση της καλλιέργειας θα αποτελούσε την οριστική λύση του προβλήματος αυτού, όπως είχε προταθεί ήδη από τις αρχές του 20<sup>ου</sup> αιώνα (Lewis & Gregory, 1929). Αυτό όμως, θα δημιουργούσε άλυτα προβλήματα: οι συνθήκες θερμοκρασίας, υγρασίας και αερίου περιβάλλοντος της καλλιέργειας δεν πρέπει να διαταραχθούν, το ισχυρό φως μπορεί να επηρεάσει τα έμβρυα, οι κάμερες μέχρι πρότινος ήταν ογκώδεις και δεν λειτουργούσαν σε συνθήκες απόλυτης υγρασίας, σαν αυτές που επικρατούν στον επωαστικό κλίβανο.

Η λύση που βρέθηκε είναι η **απεικόνιση χρονοδιολίσθησης** (time lapse imaging): κατασκευάστηκαν συστήματα όπως αυτό που απεικονίζεται παρακάτω (**Εικόνα 1.20**), το οποίο διαθέτει μια μονάδα (κλίβανο) επώασης με ενσωματωμένο μικροσκόπιο και ψηφιακή κάμερα. Το σύστημα φωτίζει και φωτογραφίζει αυτομάτως την καλλιέργεια ανά τακτά χρονικά διαστήματα. Ανάλογα με τον αριθμό δειγμάτων που έχουν τοποθετηθεί στη μονάδα επώασης, σε τρυβλία με ειδικά βοηθία (ένα έμβρυο ανά βοηθίο), η

μικροφωτογράφιση μπορεί να γίνεται π.χ. ανά 10 ή 20 min, χρόνος που επαρκεί πλήρως για να ανιχνευθούν παροδικά κυτταρικά φαινόμενα. Οι ψηφιακές εικόνες αποθηκεύονται σε μια ηλεκτρονική μνήμη και το σύστημα δημιουργεί και εξάγει ένα βίντεο για το κάθε έμβρυο. Μέσω ενός ειδικού λογισμικού, τα έμβρυα του κάθε ζευγαριού εμφανίζονται ομαδοποιημένα και ο εμβρυολόγος είναι δυνατόν να ελέγξει παράλληλα όλα τα στάδια της εξέλιξης όλων των εμβρύων μιας προσπάθειας, συγκρίνοντάς τα μεταξύ τους, από τη γονιμοποίηση έως και την εκκόλαψη της βλαστοκύστης, δηλαδή συνολικά 5-6 ημέρες. Η τεχνική δεν είναι παρεμβατική, η δε καλλιέργεια δεν διαταράσσεται από την παρατήρηση ή τις μετακινήσεις (το σύστημα λειτουργεί αυτόματα).

Ήδη, μέσα στην τελευταία πενταετία, η παρακολούθηση με συστήματα χρονοδιολίσθησης έχει ενταχθεί στην καθημερινή ρουτίνα πολλών εργαστηρίων εξωσωματικής γονιμοποίησης. Μολονότι τα δεδομένα είναι ακόμη λίγα, η ποιότητά τους δεν επιτρέπει την εξαγωγή γενικών συμπερασμάτων και δεν υπάρχουν ακόμη αρκετές προοπτικές τυχαιοποιημένες μελέτες (Armstrong *et al.*, 2015), τα συστήματα χρονοδιολίσθησης προσφέρουν στον εμβρυολόγο δυνατότητες παρατήρησης, καταγραφής και σύγκρισης, σε επίπεδα μέχρι τώρα αδιανόητα.



**Εικόνα 1.20** Σύστημα απεικόνισης με χρονοδιολίσθηση (Embryoscope®). Το σύστημα αποτελείται από τη μονάδα επώασης και μικροφωτογράφισης (αριστερά), τη μονάδα καταγραφής (στο κέντρο) και τη μονάδα ανάλυσης και επεξεργασίας της εικόνας (δεξιά).

### 1.2.3.6 Γενετική ανάλυση

Στην υποβοηθούμενη αναπαραγωγή, η γενετική ανάλυση βρίσκει εφαρμογή στις τεχνικές προεμφυτευτικής γενετικής διάγνωσης και ελέγχου (βλ. ενότητες 1.2.3.2 και 1.2.3.3 παραπάνω). Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται είναι κυρίως δύο: η ανάλυση με **υβριδισμό φθορισμού *in situ*** (fluorescence *in situ* hybridization, **FISH**), και μέθοδοι

πολλαπλασιασμού των υπό μελέτη αλληλουχιών DNA μέσω της **αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης** (polymerase chain reaction, **PCR**) μοναδιαίου κυττάρου (**single-cell PCR**).

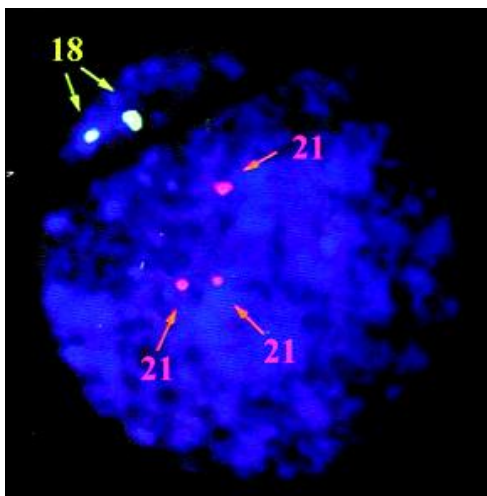
Στην πρώτη περίπτωση, το αποτέλεσμα είναι μια μικροφωτογραφική απεικόνιση του πυρήνα, με σήματα διαφόρων χρωμάτων, που αντιστοιχούν σε συγκεκριμένες αλληλουχίες. Στη δεύτερη περίπτωση, μετά την ενίσχυση και τον πολλαπλασιασμό του DNA, ακολουθεί ανάλυση είτε με ηλεκτροφόρηση για τον διαχωρισμό των προϊόντων της PCR, είτε ανάλυση με άλλες μεθόδους, όπως η μέθοδος του **συγκριτικού γονιδιωματικού υβριδισμού σε μικροσυστοιχίες DNA** (array-comparative genomic hybridization, **a-CGH**), που χρησιμοποιήθηκε εδώ.

#### 1.2.3.6.1 Μέθοδος FISH

Η μέθοδος FISH είναι μια κυτταρογενετική αναλυτική μέθοδος, κατά την οποία φθορίζοντες ανιχνευτές προσδένονται σε συγκεκριμένες συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στο DNA. Οι ανιχνευτές αυτοί είναι συνήθως συζευγμένοι με ένα αντιγόνο, το οποίο με τη σειρά του ανιχνεύεται από ειδικό του αντίσωμα που φέρει ένα φθορίζον μόριο. Με την κατάλληλη οπτική διάταξη στο μικροσκόπιο, το παρασκεύασμα φθορίζει στα σημεία πρόσδεσης της αλληλουχίας στόχου, αποκαλύπτοντας την παρουσία της. Η μέθοδος αναπτύχθηκε στις αρχές της δεκαετίας του 1980 και έκτοτε η χρήση της επεκτάθηκε σε διάφορους τομείς της ιατροβιολογικής έρευνας.

Στην ΙΥΑ, η FISH χρησιμεύει στην ανίχνευση αριθμητικών και δομικών ανωμαλιών των χρωμοσωμάτων (καρυότυπος) και στην ανίχνευση μεταλλάξεων στο πλαίσιο της

προεμφυτευτικής διάγνωσης, καθώς και στην εξέταση των χρωμοσωμάτων του σπερματοζωαρίου. Ένα παράδειγμα ανίχνευσης τρισωμίας 21 παρατίθεται ενδεικτικά στην **Εικόνα 1.21**.

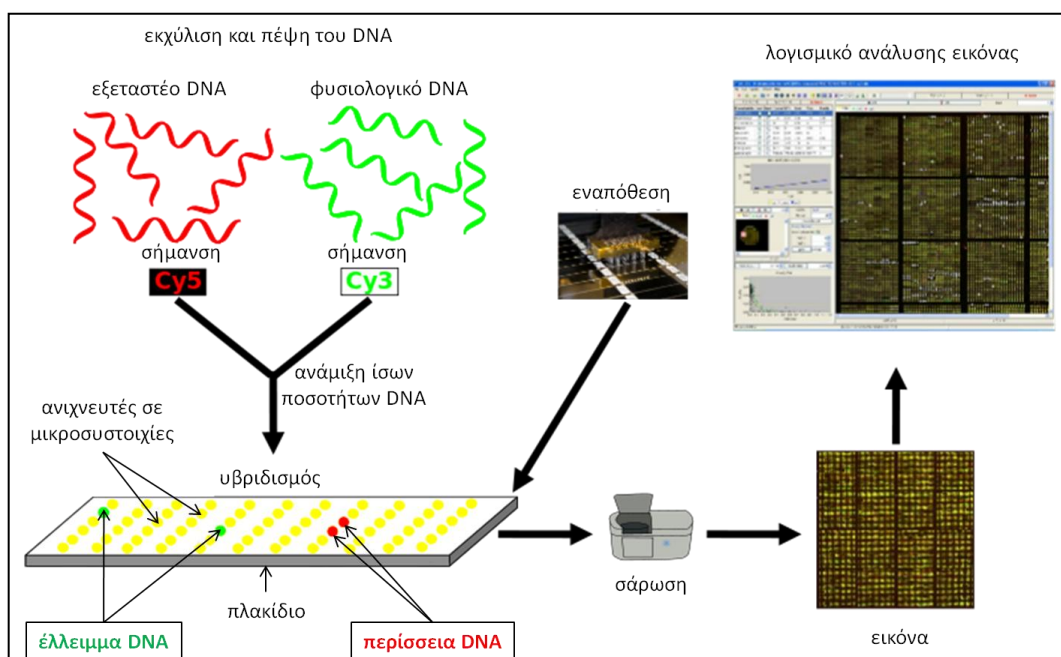


**Εικόνα 1.21** Υβριδισμός φθορισμού *in situ* (FISH). Βιοψία βλαστομεριδίου και προεμφυτευτική γενετική διάγνωση τρισωμίας 21. Απεικονίζονται τρία σήματα FISH για το χρωμόσωμα 21 (τρिसωμία) και δύο για το χρωμόσωμα 18 (φυσιολογική δισωμία).

### 1.2.3.6.2 Μέθοδος aCGH

Ο συγκριτικός γονιδιωματικός υβριδισμός είναι μια μοριακή μέθοδος γενετικής ανάλυσης που επιτρέπει την εξέταση του αριθμού αντιγράφων μιας αλληλουχίας DNA, άρα κατ' επέκταση και την πλοειδία. Η μέθοδος στοχεύει στην σύγκριση ολόκληρου του γονιδιώματος και οι διαφορές μεταξύ δειγμάτων ανιχνεύονται ως περίσσεια ή ως έλλειμμα γενετικού υλικού. Η μέθοδος επινοήθηκε για τη συγκριτική μελέτη των χρωμοσωμάτων μεταξύ συμπαγών όγκων και φυσιολογικού ιστού (Kallioniemi *et al.*, 1992). Πρόκειται για εξελιγμένη μορφή της FISH: ανιχνεύεται η ένταση του σήματος φθορισμού μέσω ειδικού λογισμικού και υπολογίζεται συγκριτικά εάν υπάρχει αύξηση του σήματος (δηλαδή κέρδος γενετικού υλικού) ή μείωση σήματος (δηλαδή απώλεια γενετικού υλικού).

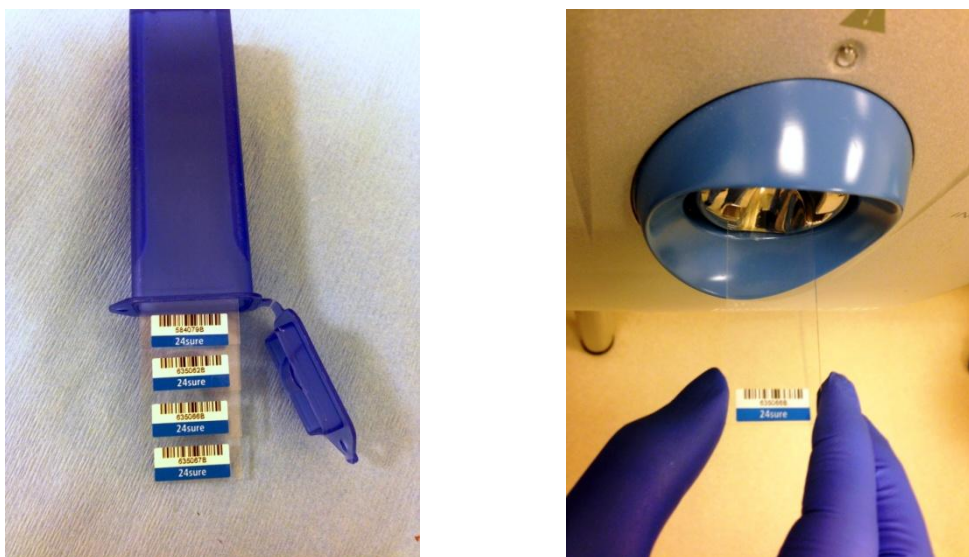
Παράλληλα, αναπτύχθηκε η τεχνολογία της ανάλυσης DNA σε μικροσυστοιχίες και η πρώτη εφαρμογή της στον συγκριτικό γονιδιωματικό υβριδισμό, αντί της κλασικής ανάλυσης μεταφασικών χρωμοσωμάτων (Solinas-Toldo *et al.*, 1997), σε καρκινικά κύτταρα. Η αρχή της μεθόδου απεικονίζεται σχηματικά στην **Εικόνα 1.22**.



**Εικόνα 1.22** Συγκριτικός γονιδιωματικός υβριδισμός σε μικροσυστοιχίες DNA (aCGH). Αρχή της μεθόδου (προσαρμοσμένη από Barillot *et al.*, 2012)

Στη συνέχεια, η τεχνολογία αυτή εφαρμόστηκε στο πλαίσιο της PGD για την ανίχνευση ανευπλοειδίας σε πολικά σώματα (Wells *et al.*, 2002), σε μοναδιαία κύτταρα (Hu *et al.*, 2004), σε ωάρια (Fragouli *et al.*, 2009) και σε βλαστοκύστες (Fragouli *et al.*, 2010). Ακολούθησε η πρώτη γέννηση τέκνου με τη μέθοδο aCGH για την ανίχνευση

ανευπλοειδίας σε πολικά σώματα (Fishel *et al.*, 2009), μέθοδος που βρίσκει εφαρμογή σε περιπτώσεις γυναικών ηλικίας άνω των 40 ετών (στις οποίες το ποσοστό εμφύτευσης των εμβρύων είναι περίπου 6%), ή σε περιστατικά επανειλημμένης ανεξήγητης αποτυχίας στην εξωσωματική γονιμοποίηση (για περισσότερες λεπτομέρειες βλ. Munné, 2012). Ο ειδικός εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκε για την παρούσα μελέτη απεικονίζεται στις **Εικόνες 1.23** και **1.24**.



**Εικόνα 1.23** Ειδικός εξοπλισμός για τον συγκριτικό γονιδιωματικό υβριδισμό σε μικροσυστοιχίες DNA (aCGH): πλακίδια μικροσυστοιχιών.



**Εικόνα 1.24** Ειδικός εξοπλισμός για τον συγκριτικό γονιδιωματικό υβριδισμό σε μικροσυστοιχίες DNA (aCGH). *Αριστερά:* θερμοκυκλοποιητής για PCR. *Δεξιά:* σαρωτής πλακιδίων και μονάδα επεξεργασίας των αποτελεσμάτων.

## 1.3 ΑΠΟΤΥΧΙΑ ΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗΣ

### 1.3.1 Το πρόβλημα της αποτυχίας γονιμοποίησης

Η αποτυχία γονιμοποίησης στην εξωσωματική γονιμοποίηση σημαίνει ότι μια προσπάθεια δεν αποδίδει έμβρυα για εμβρυομεταφορά, παρά το γεγονός ότι ο κύκλος έχει προχωρήσει ομαλά και δεν υπάρχει εμφανής λόγος που να μπορεί να αποδοθεί ευθέως στα ωάρια ή στα σπερματοζωάρια. Γενικώς, το μέσο ποσοστό γονιμοποίησης των ωαρίων στην απλή εξωσωματική γονιμοποίηση κυμαίνεται περί το 80%, ενώ στην ICSI είναι λίγο υψηλότερο, κάτι που μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι η κύρια ένδειξη για ICSI είναι η ολιγοασθενοσπερμία βαριάς μορφής, οπότε εικάζεται ότι τα ωάρια δεν αποτελούν την ουσία του προβλήματος.

Η γονιμοποίηση ενδέχεται να αποτύχει, παρά την ICSI, σε ποσοστό 1-3% των κύκλων (Moomjy *et al.*, 1998· Liu *et al.*, 1995). Η ολική αποτυχία γονιμοποίησης (total fertilization failure, TFF) έχει περιγραφεί σε διάφορες μελέτες, με ποσοστά που ποικίλλουν, είτε σε απλή εξωσωματική γονιμοποίηση (Barlow *et al.*, 1990· Ruiz *et al.*, 1997· Bhattacharya *et al.*, 2001), είτε σε ICSI (Liu *et al.*, 1995· Flaherty *et al.*, 1998· Bhattacharya *et al.*, 2001· Esfandiari *et al.*, 2005). Μια σύγκριση των παραπάνω μελετών και της επίπτωσης της TTF παρουσιάζεται στον **Πίνακα 1-2**.

<b>ΠΙΝΑΚΑΣ 1-2 Επίπτωση της ολικής αποτυχίας γονιμοποίησης</b>			
<b>Μέθοδος</b>	<b>Επίπτωση (αριθμός κύκλων)</b>	<b>Τύπος μελέτης / αίτια</b>	<b>Παραπομπή</b>
IVF	5% (206)	RCT, >20% γονιμοποίησης σε προηγούμενο κύκλο, εκτός ανδρικού παράγοντα	Bhattacharya <i>et al.</i> , 2001
IVF	11% (70)	Ανεξήγητη υπογονιμότητα, ενδομητρίωση	Ruiz <i>et al.</i> , 1997
IVF	16% (320)	Φυσιολογικό σπέρμα	Barlow <i>et al.</i> , 1990
ICSI	1,3% (1.779)	Διάφορα αίτια	Esfandiari <i>et al.</i> , 2005
ICSI	2% (209)	RCT, >20% γονιμοποίησης σε προηγούμενο κύκλο, εκτός ανδρικού παράγοντα	Bhattacharya <i>et al.</i> , 2001
ICSI	3% (1.343)	Διάφορα αίτια	Flaherty <i>et al.</i> , 1998
ICSI	3% (2.732)	Διάφορα αίτια	Liu <i>et al.</i> , 1995

RCT (randomized controlled trial): τυχαιοποιημένη μελέτη

Η ολική αποτυχία γονιμοποίησης είναι συχνά αδύνατον να προβλεφθεί, ενώ μπορεί να επανεμφανισθεί με επίπτωση της τάξης του 29% στην IVF (Barlow *et al.*, 1990) και 33% στην ICSI (Flaherty *et al.*, 1998). Σε κυτταρικό επίπεδο, εκδηλώνεται με ποικίλους τρόπους:

- κανένας προπυρήνας, ένα ή δύο πολικά σωματίδια,
- ένας προπυρήνας, ένα ή δύο πολικά σωματίδια,
- τρεις ή περισσότεροι προπυρήνες, ένα ή δύο πολικά σωματίδια,
- δύο προπυρήνες με δύο πολικά σωματίδια, αλλά χωρίς καρυογαμία.

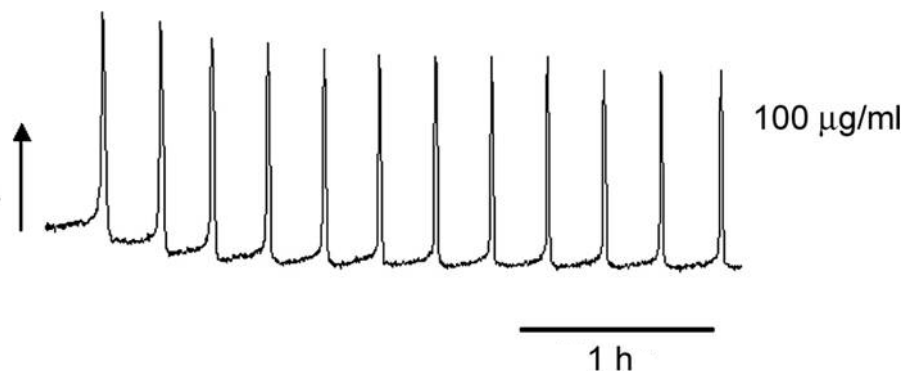
Το φαινόμενο μπορεί να έχει διάφορα αίτια (Asch *et al.*, 1995· Rawe *et al.*, 2000), από πιθανές διαταραχές του μοριακού μηχανισμού της μίτωσης, του σχηματισμού των προπυρήνων, του σχηματισμού του αστέρα από το κεντριόλιο του σπερματοζωαρίου, της αποσυμπύκνωσης του ανδρικού γενετικού υλικού, κυρίως όμως της ανεπάρκειας στη διείσδυση του σπερματοζωαρίου και της αδυναμίας ενεργοποίησης του ωαρίου. Προφανώς, στην ICSI δεν ισχύει το πρώτο από τα δύο αυτά κύρια αίτια, οπότε η αποτυχία ενεργοποίησης του ωαρίου παραμένει ο συνηθέστερος λόγος της αποτυχίας γονιμοποίησης στην περίπτωση αυτή (Vanden Meerschaut *et al.*, 2014).

Υπό φυσιολογικές συνθήκες γονιμοποίησης *in vivo*, ωστόσο, είναι πλέον αποδεκτό ότι ένας πρωτεϊνικός παράγων του σπερματοζωαρίου, η ισομορφή ζ της φωσφολιπάσης C (PLCζ, phospholipase C zeta), ευθύνεται για την εκκίνηση της βιοχημικής διεργασίας ενεργοποίησης του ωαρίου (Saunders *et al.*, 2002). Φαίνεται ότι η διαθέσιμη ποσότητα PLCζ διαδραματίζει σημαντικό ρόλο (Rogers *et al.*, 2004): για παράδειγμα, σε χαμηλή συγκέντρωση, η PLCζ προκαλεί παρθενογενετική ενεργοποίηση του ωαρίου. Η αποτυχία ενεργοποίησης και η αποτυχία γονιμοποίησης στον άνθρωπο έχουν συνδεθεί με ανωμαλίες της δομής, της έκφρασης και της χωροταξικής κατανομής της PLCζ στο σπερματοζωάριο (Amdani *et al.*, 2016).

### 1.3.2 Μηχανισμός της ενεργοποίησης του ωαρίου

Η ενεργοποίηση του ωαρίου είναι μια περίπλοκη, μη αναστρέψιμη διεργασία, η οποία εξελίσσεται χωροχρονικά εντός του ωαρίου μετά τη διείσδυση του σπερματοζωαρίου *in vivo*. Θεωρείται ότι το σήμα επαγωγής της όλης διεργασίας είναι μια σειρά ταλαντώσεων της συγκέντρωσης ασβεστίου στο ωόπλασμα (**Εικόνα 1.25**),

οφειλόμενες σε ρυθμική απελευθέρωση ποσοτήτων ασβεστίου από ενδοκυτταρικά διαμερίσματα αποθήκευσής του (κυρίως από το ενδοπλασματικό δίκτυο).



**Εικόνα 1.25** Ενδοκυτταρικές ταλαντώσεις  $[Ca^{2+}]$  σε ανθρώπινο ωάριο έπειτα από έγχυση PLCζ (τροποποιημένη από Rogers *et al.*, 2004).

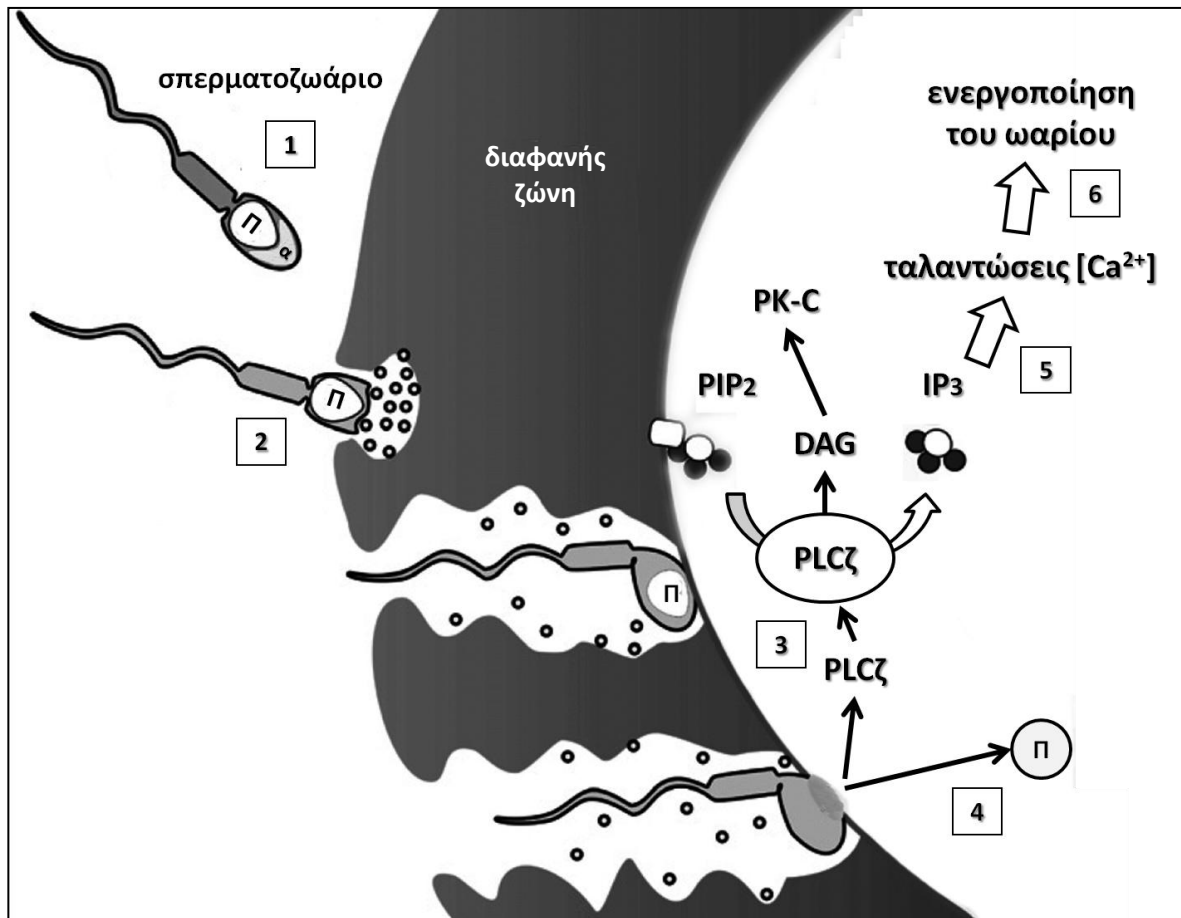
Το φαινόμενο αυτό αναλύθηκε εκτεταμένα στα πρώτα χρόνια εφαρμογής της ICSI (Tesarik *et al.*, 1994), υπόνοιες όμως για το γεγονός ότι το ασβέστιο διαδραματίζει καίριο ρόλο στην ενεργοποίηση των ωαρίων διαφόρων ειδών μετά τη γονιμοποίηση υπάρχουν εδώ και έναν αιώνα (Lillie, 1919 και Heilbrunn, 1928). Ο μοριακός μηχανισμός της συμμετοχής του ασβεστίου είναι γνωστός σε πλήθος βιολογικών ειδών (Santella *et al.*, 2004). Ωστόσο, η αναλυτική περιγραφή του υπερβαίνει το πλαίσιο της παρούσας μελέτης, (βλ. πλήρη ανασκόπηση: Whitaker, 2006).

Κατά την εξωσωματική γονιμοποίηση, θεωρείται ότι η πρώτη αύξηση της συγκέντρωσης ασβεστίου επέρχεται λίγα λεπτά μετά τη σύντηξη των μεμβρανών του ωαρίου και του σπερματοζωαρίου (Lawrence *et al.*, 1997), ενώ στην περίπτωση της ICSI οι ταλαντώσεις αρχίζουν αμέσως, λόγω της εισροής ασβεστίου από το καλλιεργητικό μέσον (Vanden Meerschaut *et al.*, 2014) και συνεχίζονται μέχρι τον σχηματισμό των προπυρήνων (Marangos *et al.*, 2003). Ο μοριακός μηχανισμός της ενεργοποίησης, ο οποίος χρησιμοποιεί τη σηματοδοτική οδό της τριφωσφορικής ινοσιτόλης  $IP_3$  (Berridge, 2009), έχει περιγραφεί εκτενώς (Nomikos, 2015) και συνοψίζεται σχηματικά στην **Εικόνα 1.26**.

Παρά τις πρόσφατες ανακαλύψεις, η αμοιβαία ενεργοποίηση των δύο γαμετών *in vivo* –του ωαρίου από το σπερματοζωάριο, αλλά και του σπερματοζωαρίου από το ωάριο (Tosti & Ménéz, 2016)– παραμένει ένα πεδίο για το οποίο οι γνώσεις μας σε μοριακό επίπεδο είναι ακόμη σχετικά ελλιπείς. Στα επόμενα χρόνια αναμένεται να προκύψουν πολλά νέα δεδομένα για τη μοριακή ρύθμιση των εν λόγω μηχανισμών, που θα έχουν



ενδεχομένως πολύ ευρύτερες κλινικές εφαρμογές, από την αντισύλληψη μέχρι τη βελτίωση της γονιμοποιητικής ικανότητας αυτών των ιδιαίτερων κυττάρων.



**Εικόνα 1.26** Μοριακός μηχανισμός της ενεργοποίησης του ωαρίου μέσω της PLCζ και της οδού της τριφωσφορικής ινοσιτόλης. Π: πυρήνας του σπερματοζωαρίου, α: ακρόσωμα, PLCζ: ισομορφή ζ της φωσφολιπάσης C, PIP<sub>2</sub>: 4,5-διφωσφο-φωσφατιδυλο-ινοσιτόλη, IP<sub>3</sub>: τριφωσφορική ινοσιτόλη, DAG: διακυκλο-γλυκερόλη, PK-C: πρωτεϊνική κινάση C. 1: το σπερματοζωάριο προσεγγίζει τη διαφανή ζώνη του ωαρίου, 2: η ακροσωματική αντίδραση απελευθερώνει τα ένζυμα του ακροσώματος, τα οποία πέπτουν τη διαφανή ζώνη. Μετά τη σύντηξη των μεμβρανών του σπερματοζωαρίου και του ωαρίου, απελευθερώνεται η PLCζ (3) στο ωόπλασμα και το πυρηνικό υλικό μπορεί να σχηματίσει τον άρρενα προπυρήνα (4). Η PLCζ καταλύει την υδρόλυση της PIP<sub>2</sub>, η οποία βρίσκεται δεσμευμένη στην ενδοκυτταρική όψη του ωολήμματος, προς τους δύο δευτέρους αγγελιαφόρους IP<sub>3</sub> και DAG. Η DAG προάγει την οδό της πρωτεϊνικής κινάσης C. 5: με τη σειρά της, η IP<sub>3</sub> προκαλεί την εκκίνηση των ταλαντώσεων [Ca<sup>2+</sup>], από τις οποίες εξαρτώνται άλλες διεργασίες ενεργοποίησης του ωοκυττάρου, όπως η απελευθέρωση των φλοιωδών κοκκίων για την αποτροπή της πολυσπερμίας, η ολοκλήρωση της μείωσης και η έναρξη των αναπτυξιακών μοριακών μηχανισμών (ανασχεδιασμένη από Berridge, 2009).

### 1.3.3 Τεχνητή ενεργοποίηση του ωαρίου

#### 1.3.3.1 Μέθοδοι τεχνητής ενεργοποίησης του ωαρίου

Διάφορες μέθοδοι έχουν προταθεί για την αντιμετώπιση της ολικής αποτυχίας γονιμοποίησης. Σε περιπτώσεις όπου αυτή οφείλεται στην αποτυχία ενεργοποίησης του

ωαρίου, έχουν επινοηθεί διάφορες μέθοδοι τεχνητής ενεργοποίησης (βλ. Sfontouris *et al.*, 2015), έτσι ώστε, ακόμη και με καθυστέρηση, να προκληθεί η σειρά ταλαντώσεων της συγκέντρωσης ασβεστίου εντός του ωοπλάσματος. Η **τεχνητή ενεργοποίηση ωαρίων (ΑΟΑ, artificial oocyte activation)** μπορεί να επιτευχθεί με μηχανικό τρόπο (Tesarik *et al.*, 2002· Ebner *et al.*, 2004), ή με ηλεκτρική (Yanagida *et al.*, 1999) ή χημική διέγερση (Borges *et al.*, 2009a· Borges *et al.*, 2009b· Kyono *et al.*, 2012). Εάν η αποτυχία γονιμοποίησης οφείλεται στο σπερματοζώαριο (π.χ. λόγω μετάλλαξης ή άλλου αιτίου που δεν επιτρέπει τη σύνθεση λειτουργικής PLCζ), είναι δυνατόν πειραματικά η ενεργοποίηση να προκληθεί με ένεση PLCζ εντός του ωοπλάσματος (Nomikos *et al.*, 2013).

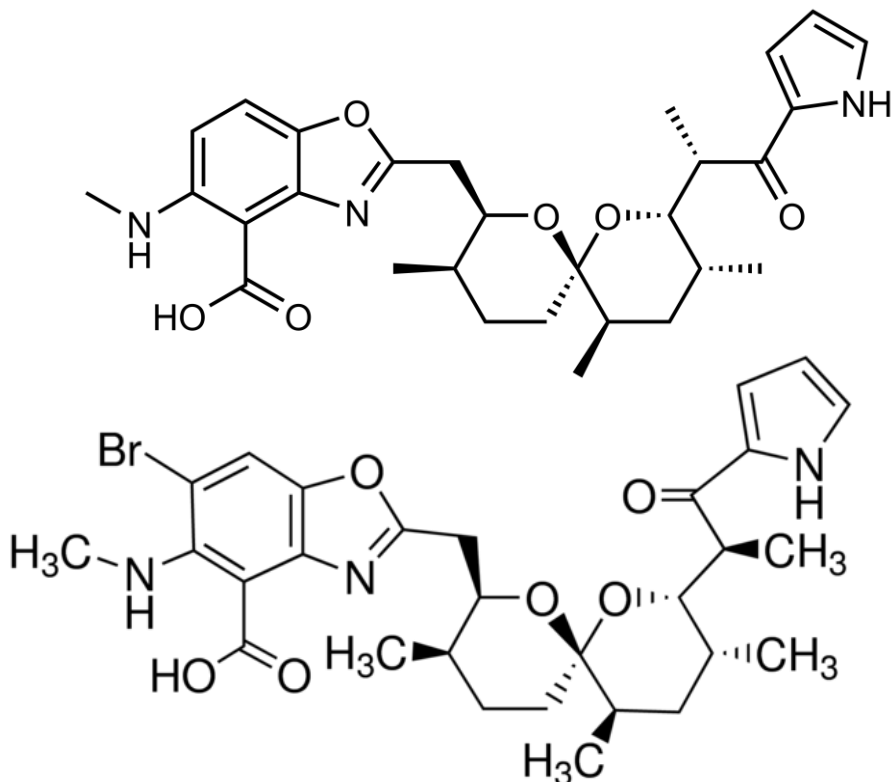
Οι μέθοδοι αυτές έχουν εφαρμοσθεί ιδιαίτερος μετά την αποτυχία γονιμοποίησης από ICSI (Ebner *et al.*, 2012· Heindryckx *et al.*, 2008· Montag *et al.*, 2012· Vanden Meerschaut *et al.*, 2012) και οδηγεί σε κλινικές κυήσεις (Kashir *et al.*, 2010), αλλά ο αριθμός περιστατικών και η επί μέρους μεθοδολογία παραμένει ανομοιογενής (Vanden Meerschaut *et al.*, 2014). Η ασφάλεια της κλινικής εφαρμογής τους απομένει να εδραιωθεί με μελέτες σε μεγαλύτερους αριθμούς ασθενών, διότι μέχρι τώρα δεν είναι δυνατόν να εξαχθούν αξιόπιστα συμπεράσματα (Sfontouris *et al.*, 2015).

### 1.3.3.2 **Ιονοφόρος διάυλος ασβεστίου**

Ο ιονοφόρος διάυλος ασβεστίου A23187 ανακαλύφθηκε και οι βασικές ιδιότητές του προσδιορίστηκαν κατά τη δεκαετία του 1970 από τον Reed (Reed, 1972· Pfeiffer *et al.*, 1974· Pressman, 1976). Χαρακτηρίστηκε αρχικά ως καρβοξυλικό αντιβιοτικό κατά των Gram θετικών βακτηρίων και των μυκήτων, το οποίο απομονώθηκε σε κρυσταλλική μορφή άλατος ασβεστίου και μαγνησίου από υπερκείμενο καλλιεργειών *Streptomyces chartreusensis*, με μοριακή μάζα 523 και στοιχειομετρικό χημικό τύπο  $C_{29}H_{37}N_3O_6$ . Ως αντιβιοτικό, δεσμεύει δισθενή κατιόντα σε pH 7,4, προκαλεί απόζευξη της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και αναστέλλει την υδρόλυση της ATP από ηπατικά μιτοχόνδρια επίμυος. Ο μηχανισμός αντιβιοτικής δράσης διαταράσσει την ενδοκυτταρική συγκέντρωση ασβεστίου και μαγνησίου στα βακτήρια, επομένως χαρακτηρίστηκε εξ αρχής (Reed, 1972) ως χρήσιμο νέο εργαλείο για τη μελέτη των δισθενών κατιόντων σε διάφορα βιολογικά συστήματα.

Το μόριο είναι γνωστό με τις εξής ονομασίες: καλσιμυκίνη (calcimycin), ιονοφόρος ασβεστίου (calcium ionophore), αντιβιοτικό A23187 (antibiotic A23187) και ιονοφόρος

ασβεστίου A23187 (calcium ionophore A23187). Ο στερεοχημικός τύπος του απεικονίζεται στην **Εικόνα 1.27**.



**Εικόνα 1.27** Ιονοφόρος διάλυλος ασβεστίου A23187. Άνω: το καρβοξυλικό οξύ. Κάτω: η 4-βρωμιούχος μορφή που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη.

Εκτός από την αντιβιοτική δράση του, ο ιονοφόρος A23187 λειτουργεί και ως διάλυλος δισθενών κατιόντων στην κυτταρική μεμβράνη, επιτρέποντας τη διέλευση των εν λόγω ιόντων, η οποία φυσιολογικά αποκλείεται. Η μέγιστη συγγένειά του είναι για το  $Mn^{2+}$ , και ακολουθούν το  $Ca^{2+}$  και το  $Mg^{2+}$  (και με πολύ περιορισμένη συγγένεια, το  $Sr^{2+}$  και το  $Ba^{2+}$ ).

Η συγκεκριμένη ιδιότητα του ιονοφόρου A23187 έχει τεθεί σε εφαρμογή στον τομέα της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής για να προκληθεί αύξηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων ασβεστίου και επομένως να επέλθουν οι ταλαντώσεις που οδηγούν το ωάριο στην ενεργοποίηση. Αρχικά, ο διάλυλος χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία παρθενογενετικών εμβρύων για ερευνητικούς σκοπούς (Rhoton-Vlasak, 1996). Μετέπειτα, χρησιμοποιήθηκε για την τεχνητή ενεργοποίηση ωαρίων σε περιπτώσεις αποτυχίας γονιμοποίησης, τουλάχιστον 18 h μετά την ICSI (Lu *et al.*, 2006), μέθοδος που επέτρεψε τη γέννηση ζώντος τέκνου λίγα χρόνια αργότερα (Lu *et al.*, 2012). Σε μια άλλη ενδιαφέρουσα μελέτη σε μη γονιμοποιημένα ωάρια τριών ημερών έπειτα από IVF ή ICSI

(Liu *et al.*, 2014) συγκρίθηκε η επίδραση του ιονοφόρου A23187 με την επίδραση του χλωριούχου στροντίου και προέκυψε ότι ο ιονοφόρος A23187 αποδίδει μεγαλύτερο ποσοστό ενεργοποίησης. Τα ευρήματα μιας πολυκεντρικής προοπτικής μελέτης (Ebner *et al.*, 2015a) υποδηλώνουν ότι η χρήση του ιονοφόρου A23187 μπορεί να έχει εφαρμογή σε περιπτώσεις εμβρύων με μειωμένο αναπτυξιακό δυναμικό, αφού από τη μελέτη προκύπτει ότι διάφορες παράμετροι βελτιώνονται όταν τα έμβρυα εκτίθενται σε ιονοφόρο A23187. Σε περιπτώσεις προηγούμενης αποτυχίας γονιμοποίησης, φαίνεται ότι η έκθεση στον ιονοφόρο A23187 για μικρό χρονικό διάστημα (15 min) μετά την ICSI αυξάνει θεαματικά το ποσοστό γονιμοποίησης και άλλες παραμέτρους του κύκλου (Ebner *et al.*, 2015b). Η χρήση του ιονοφόρου A23187 σε περίπτωση συνδρόμου Kartagener περιγράφηκε από την ίδια ομάδα (Ebner *et al.*, 2015c), ενώ σε μια άλλη μελέτη διαπιστώθηκε ότι βελτιώνει το ποσοστό αυλάκωσης σε περιπτώσεις προηγούμενης διακοπής της ανάπτυξης στο στάδιο των προπυρήνων (Darwish & Magdi, 2015).

Τέλος, ο ιονοφόρος A23187 χρησιμοποιήθηκε με επιτυχία σε περιπτώσεις γλοβοζωοσπερμίας, μιας σπάνιας πάθησης που χαρακτηρίζεται από την απουσία του ακροσώματος και τη συνακόλουθη αδυναμία του σπερματοζωαρίου να γονιμοποιήσει (Karaca *et al.*, 2015).

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε για την τεχνητή ενεργοποίηση των μη γονιμοποιημένων ωαρίων (βλ. Ενότητα 2.4.11) η βρωμιούχος μορφή του ιονοφόρου A23187 (4-βρωμο-ιονοφόρος ασβεστίου), με μοριακή μάζα 602,52 και στοιχειομετρικό τύπο  $C_{29}H_{36}BrN_3O_6$  (Εικόνα 1.27, κάτω).

### 1.3.3.3 Άλλες χρήσεις της τεχνητής ενεργοποίησης ωαρίων

Η τεχνητή ενεργοποίηση ωαρίων μπορεί να χρησιμεύσει, μεταξύ άλλων, σε τομείς διαφορετικούς από την κλινική εφαρμογή της εξωσωματικής γονιμοποίησης. Η εξεύρεση ανθρώπινων ωαρίων για πειραματικούς ή ερευνητικούς σκοπούς δυσχεραίνεται από τα σημαντικά ηθικά ζητήματα που εγείρονται, κυρίως ως προς τον ορατό κίνδυνο εμπορευματοποίησης ανθρώπινων ιστών και παραγώγων, καθώς και ως προς την πιθανή εργαλειοποίηση του σώματος των δοτριών ωαρίων.

Ένας τομέας από τον οποίο πολλοί έχουν ιδιαίτερες προσδοκίες είναι ο τομέας των στελεχιαίων κυττάρων και της αναγεννητικής ιατρικής γενικότερα. Η έρευνα στα στελεχιαία κύτταρα δημιουργεί βάσιμες ελπίδες για την κατανόηση βασικών μηχανισμών

της ανάπτυξης νοσημάτων που ταλανίζουν την ανθρωπότητα και, κυρίως, βάσιμες ελπίδες για νέες θεραπείες που θα εδράζονται στη χρήση φυσιολογικών ή διορθωμένων στελεχειαίων κυττάρων. Μία πιθανή πηγή ανθρώπινων στελεχειαίων κυττάρων είναι τα έμβρυα *in vitro*, η πιθανή χρήση των οποίων για την έρευνα, πόσο μάλλον η επί τούτου δημιουργία τους για ερευνητικούς σκοπούς, αποτελεί αντικείμενο σφοδρής θεωρητικής διαμάχης, αλλά και ιδιαίτερα περιοριστικής νομοθεσίας, σε ορισμένες χώρες.

Προφανώς, το ηθικό ζήτημα συνίσταται στον ορισμό της έναρξης της προσωπικότητας του ατόμου: εάν η χρήση των ωαρίων περιορίζεται στη δημιουργία σειρών από στελεχειαία κύτταρα λ.χ. για τη θεραπεία ενός εκφυλιστικού νοσήματος, οι πιθανές αντιρρήσεις θα ήταν ελάχιστες (Kiehl, 2005). Όμως, αφ' ης στιγμής το έμβρυο έχει αποκτήσει "προσωπικότητα", κάθε πειραματισμός επάνω του, καθώς και η χρήση των κυττάρων του για άλλους, εμπορικούς σκοπούς, όπως λ.χ. η μελέτη φαρμάκων ή η δημιουργία παραγώγων του, συνιστά παραβίαση των βασικών αρχών της βιοηθικής.

Η τεχνητή ενεργοποίηση μη γονιμοποιημένων ωαρίων παρέχει τη δυνατότητα παραγωγής εμβρύων από ωάρια, τα οποία άλλως θα είχαν καταστραφεί, με σκοπό την απομόνωση σειρών στελεχειαίων κυττάρων από τα έμβρυα αυτά, όταν φθάσουν στο στάδιο της βλαστοκύστης.

### **1.3.4 Επιπτώσεις της αποτυχίας γονιμοποίησης στον ασθενή**

Η επίπτωση της ολικής αποτυχίας γονιμοποίησης είναι καταστροφική για όλους και είναι μια από τις πλέον δυσάρεστες πιθανές εξελίξεις ενός κύκλου εξωσωματικής γονιμοποίησης.

Από την πλευρά του ζευγαριού, η αποτυχία γονιμοποίησης σημαίνει ότι ο κύκλος σταματά χωρίς εμβρυομεταφορά, με συνέπεια τη βιολογική καταπόνηση από τη διέγερση της ωοθηκικής λειτουργίας και την αντίστοιχη οικονομική επιβάρυνση του ζευγαριού, χωρίς αποτέλεσμα. Σημαίνει όμως και ισχυρό ψυχολογικό πλήγμα (de Klerk C *et al.*, 2007), που ενισχύεται από αίσθημα ανασφάλειας για το μέλλον, διότι η προσπάθεια πρέπει να επαναληφθεί, ενώ όμως έχει εγκατασταθεί η αμφιβολία, διότι ο κίνδυνος μιας νέας αποτυχίας ελλοχεύει.

Από την πλευρά της, η θεραπευτική ομάδα βρίσκεται προ απροόπτου, χωρίς δυνατότητα αντίδρασης. Αυτό οδηγεί πολλούς στην επιλογή της υποχρεωτικής εφαρμογής της ICSI σε όλα τα ωάρια, έστω κι αν δεν υπάρχει ένδειξη για ICSI, μια πρακτική που

εφαρμόζεται διεθνώς, αλλά που προκαλεί αντιδράσεις και δέχεται μεγάλη κριτική (Evers, 2016). Πράγματι, αποδεικνύεται επιδημιολογικά ότι η εφαρμογή της ICSI σε ζευγάρια χωρίς ανδρικό παράγοντα υπογονιμότητας οδηγεί σε λιγότερες κυήσεις σε σύγκριση με την απλή IVF (για παράδειγμα, SART, 2016), γεγονός που οδήγησε την Αμερικανική Εταιρεία Αναπαραγωγικής Ιατρικής να αναθέσει τη μελέτη του θέματος σε ειδική επιτροπή, η οποία κατέληξε σε σαφή δεοντολογική οδηγία κατά της εν λόγω πρακτικής (ASRM, 2012).

Επομένως, κρίνεται θεμιτή η προσπάθεια εκ των υστέρων διάσωσης των ωαρίων, δηλαδή μετά τη διαπίστωση της ολικής αποτυχίας γονιμοποίησης. Αυτό έχει ιδιαίτερη βαρύτητα σε περιστατικά όπου η αυξημένη ηλικία της συντρόφου καθιστά δυσχερή ή ανέφικτη μια νέα προσπάθεια, ή σε περιστατικά όπου η επανάληψη της φαρμακευτικής διέγερσης είναι δυσχερής ή πρέπει να αποφευχθεί για οικονομικούς ή ακόμη και για ιατρικούς λόγους.

## **1.4 ΑΥΞΗΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΣΤΗΝ IVF**

### **1.4.1 Χρήση αυξητικών παραγόντων στα καλλιεργητικά μέσα**

Η διαρκής προσπάθεια για βελτίωση των ποσοστών επιτυχίας κύησης με βλαστοκύστες στην εξωσωματική γονιμοποίηση έχει οδηγήσει αφ' ενός στην τυποποίηση και τελειοποίηση των καλλιεργητικών μέσων, αλλά και σε εντατικές έρευνες προκειμένου να ανακαλυφθούν τρόποι καλλιέργειας που θα βελτιώσουν ακόμη περισσότερο τα αποτελέσματα. Η ανάπτυξη βλαστοκύστεων, στα πρώτα χρόνια της εφαρμογής της εξωσωματικής γονιμοποίησης ήταν δυσχερής και η πρώτη επιτυχημένη στρατηγική για τη βελτίωσή της ήταν η συν-καλλιέργεια των εμβρύων σε στιβάδα τροφικών κυττάρων, όπως κύτταρα Vero (νεφρικά κύτταρα Αφρικανικού πράσινου πιθήκου) ή επιθηλιακά κύτταρα βόειου ωαγωγού (Wiemer *et al.*, 1993· Ménézoz *et al.*, 1992). Η μέθοδος της συν-καλλιέργειας αυξάνει σημαντικά τα ποσοστά σχηματισμού βλαστοκύστεων, έχει όμως δύο μεγάλα μειονεκτήματα: πρώτον, απαιτεί υψηλού επιπέδου τεχνογνωσία, κάτι που επιβαρύνει ιδιαίτερα το προσωπικό του εργαστηρίου, και δεύτερον, ενέχει μεγάλους κινδύνους μετάδοσης νοσημάτων λόγω της χρήσης ζωικών κυττάρων άλλων ειδών. Αντίστοιχο παράδειγμα είναι η προοδευτική κατάργηση της προσθήκης βόειου ορού ως πηγής πρωτεΐνης στα καλλιεργητικά μέσα από τη δεκαετία του 1990 και ένθεν, υπέρ της

χρήσης ανθρώπινης ανασυνδυασμένης οροαλβουμίνης, με αφορμή τη μεγάλη ανησυχία που προέκυψε από τη μετάδοση της σπογγώδους εγκεφαλοπάθειας των βοοειδών.

Η κατάργηση της χρήσης ορού από τα καλλιεργητικά μέσα έφερε στο προσκήνιο την ανάγκη αναπλήρωσης και άλλων συστατικών του, πέραν της πρωτεΐνης, συγκεκριμένα διαφόρων βιταμινών, αμινοξέων και αυξητικών παραγόντων (Gardner, 1994). Μελετήθηκαν διάφοροι αυξητικοί παράγοντες (βλ. Chronopoulou & Harper, 2015), όπως: EGF (epidermal growth factor, επιδερμικός αυξητικός παράγων), IGF-1 (insulin-like growth factor 1, ινσουλινοειδής αυξητικός παράγων 1), BDNF (brain-derived neurotrophic factor, νευροτροφικός παράγων εγκεφαλικής προέλευσης), LIF (leukemia inhibitory factor, λευχαιμιοανασταλτικός παράγων), PDGF (platelet-derived growth factor, αιμοπεταλιακής προέλευσης αυξητικός παράγων), HB-EGF (heparin-binding epidermal growth factor, δεσμευόμενος στην ηπαρίνη επιδερμικός αυξητικός παράγων), PAF (platelet activation factor, παράγων ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων) και GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, διεγερτικός παράγων αποικιών κοκκιοκυττάρων-μακροφάγων).

Η παρουσία αυξητικών παραγόντων στο καλλιεργητικό μέσον μιμείται φυσιολογικές διεργασίες, αφού τέτοιοι παράγοντες είναι παρόντες *in vivo*, δρουν σε επιφανειακούς υποδοχείς των εμβρύων, αυξάνουν την έκφραση διαφόρων μορίων από το έμβρυο (Liu *et al.*, 1999), ασκούν αντι-αποπτωτικές δράσεις και αυξάνουν τον ρυθμό ανάπτυξης (Chronopoulou & Harper, 2015).

#### **1.4.2 Ο παράγων GM-CSF και η χρήση του στην εξωσωματική γονιμοποίηση**

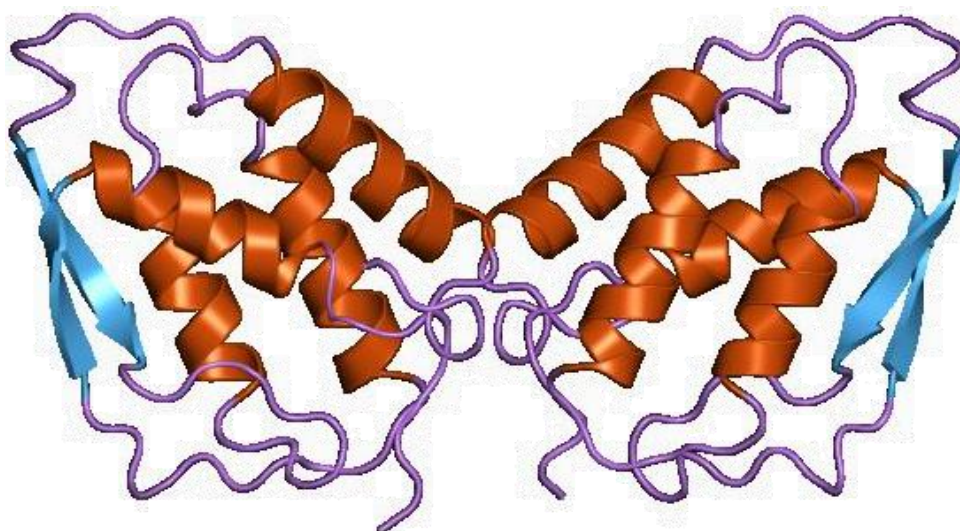
Ο GM-CSF (ή CSF 2, [www.nlm.nih.gov/cgi/mesh/2011/MB\\_cgi?mode=&index=15311](http://www.nlm.nih.gov/cgi/mesh/2011/MB_cgi?mode=&index=15311)) είναι ένα πρωτεϊνικό μονομερές μοριακού βάρους 14 kDa. Η ώριμη μορφή του είναι γλυκοζυλιωμένη, με μοριακό βάρος 23 kDa. Αρχικά χαρακτηρίστηκε ως αυξητικός παράγων ικανός να υποστηρίξει την ανάπτυξη αποικιών προγονικών κοκκιοκυττάρων και μακροφάγων *in vitro*. Φυσιολογικά δρα ως κυτταροκίνη *in vivo*, η οποία διεγείρει στελεχιαία κύτταρα το μυελού των οστών ώστε να παραγάγουν κοκκιοκύτταρα (ουδετερόφιλα, ηωσινόφιλα και βασεόφιλα) και μονοκύτταρα. Τα τελευταία μεταναστεύουν στους ιστούς και ωριμάζουν, μεταξύ άλλων, προς μακροφάγα, που συμμετέχουν στη φλεγμονώδη ανοσολογική απόκριση. Έχει επίσης δράση αυξητικού

παράγοντα για πρόδρομα κύτταρα της ερυθράς σειράς, των ηωσινοφίλων και των μεγακαρυοκυττάρων (βλ. Metcalf, 2008).

Ο GM-CSF παράγεται από πλήθος διαφορετικών κυττάρων, όπως λεμφοκύτταρα T και B, μακροφάγα, σιτευτικά κύτταρα, ενδοθηλιακά κύτταρα, ινοβλάστες, λιποκύτταρα κ.ά. ως απόκριση σε διέγερση από άλλες κυτταροκίνες ή σε περιπτώσεις φλεγμονής. Ο GM-CSF δρα ως παράγων επιβίωσης στα ώριμα αιμοποιητικά κύτταρα και ενεργοποιεί τη δράση κοκκιοκυττάρων, μονοκυττάρων/μακροφάγων και ηωσινόφιλων (Barreda *et al.*, 2004· Martinez-Moczygemba & Huston, 2003), ενώ προάγει την ανοσολογική απόκριση, την αγγειογένεση, την αλλεργική φλεγμονώδη αντίδραση και την ανάπτυξη αυτοανοσίας (Cao, 2007· Eksioglu *et al.*, 2007· Fleetwood *et al.*, 2007).

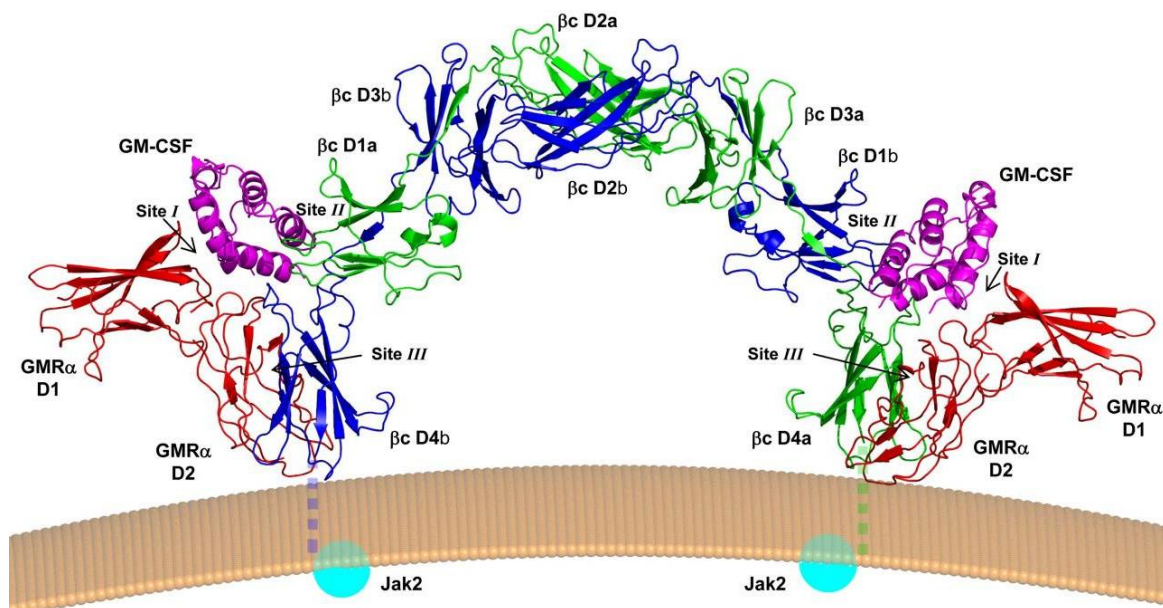
Στο γεννητικό σύστημα, ο GM-CSF παράγεται στον ωαγωγό και στο ενδομήτριο (Dudley *et al.*, 1990· de Moraes *et al.*, 1999). Στο ανθρώπινο έμβρυο, ο υποδοχέας του GM-CSF εκφράζεται από το στάδιο του γονιμοποιημένου ωαρίου έως και το στάδιο της βλαστοκύστης (Sjöblom *et al.*, 2002).

Η δομή του ανθρώπινου ανασυνδυασμένου GM-CSF (rhGM-CSF) είναι διμερής (απεικονίζεται στην **Εικόνα 1.28**). Ο υποδοχέας του GM-CSF ανακαλύφθηκε αρχικά σε πρόδρομα μονοκύτταρα (Walker & Burgess, 1985) και κλωνοποιήθηκε λίγο αργότερα (Gearing *et al.*, 1990). Είναι ένα ετεροδιμερές (McLure *et al.*, 2003), του οποίου η στερεοδομή (**Εικόνα 1.29**) αναλύθηκε σχετικά πρόσφατα (Hansen *et al.*, 2008).



**Εικόνα 1.28** Τρισδιάστατη δομή του διμερούς rhGM-CSF (πηγή: Jawahar Swaminathan, European Bioinformatics Institute <http://www.ebi.ac.uk>)





**Εικόνα 1.29** Τρισδιάστατη δομή του ετεροδιμερούς συμπλόκου που σχηματίζεται από τον GM-CSF και τον υποδοχέα του (πηγή: Hercus *et al.*, 2009).

Ο υποδοχέας του GM-CSF αποτελείται από μία αλυσίδα α και μία αλυσίδα β, η οποία είναι κοινή με τους υποδοχείς των ιντερλευκινών IL-3 και IL-5. Η υπομονάδα α περιλαμβάνει τη θέση πρόσδεσης του GM-CSF (μωβ χρώμα στην Εικόνα 1.29), ενώ η υπομονάδα β διασφαλίζει τη διαβίβαση του σήματος. Ο υποδοχέας ενεργοποιείται με την πρόσδεση των δύο υπομονάδων (για λεπτομέρειες σχετικά με τις πολλές μεταβολικές οδούς που εξαρτώνται από την ενεργοποίηση του υποδοχέα, βλ. Hercus *et al.*, 2012). *In vitro*, ο υποδοχέας εκφράζεται από το στάδιο του ζυγώτη μέχρι και το στάδιο της βλαστοκύστης (Sjöblom *et al.*, 2002).

Η επώαση ανθρώπινων εμβρύων προεμφυτευτικού σταδίου *in vitro* με 2 ng/ml rhGM-CSF επιταχύνει την εμβρυική ανάπτυξη, αυξάνει τον αριθμό των εμβρύων που εξελίσσονται σε βλαστοκύστες (Shapiro *et al.*, 2003), την επιβίωση βλαστομεριδίων ανά έμβρυο και τη βιωσιμότητα της έσω κυτταρικής μάζας, ενώ μειώνει την απόπτωση των πυρήνων των εμβρυϊκών κυττάρων, αυξάνει το ποσοστό εκκόλαψης *in vitro* και γενικά ενισχύει την ανάπτυξη των βλαστοκύστεων *in vitro* (Agerholm *et al.*, 2010· Sjöblom *et al.*, 2005· Sjöblom *et al.*, 2002· Sjöblom *et al.*, 1999). Φαίνεται ότι η έκθεση των εμβρύων στον GM-CSF δεν επηρεάζει αρνητικά τη γενετική τους σύσταση (Agerholm *et al.*, 2010), τουλάχιστον των 7 χρωμοσωμάτων (13, 16, 18, 21, 22, X και Y) που αναλύθηκαν με FISH.

Ο GM-CSF συγκαταλέγεται στους παράγοντες που χρησιμοποιήθηκαν σχετικά πρόσφατα στην εξωσωματική γονιμοποίηση (Ziebe *et al.*, 2013). Από τη συγκεκριμένη μελέτη (διπλή τυφλή προοπτική πολυκεντρική μελέτη 1300 περιστατικών) προκύπτει ότι η προσθήκη GM-CSF στο καλλιεργητικό μέσον αυξάνει σημαντικά το ποσοστό ζώντων νεογνών σε μια υπο-ομάδα ασθενών με μία τουλάχιστον προηγούμενη αποβολή. Το ίδιο εύρημα προέκυψε και από άλλη μία αναδρομική μελέτη ασθενών με προηγηθείσες αποβολές (Mignini Renzini *et al.*, 2013) ενώ έχει καταγραφεί βελτίωση των ποσοστών επιτυχίας κύησης σε γυναίκες με επανειλημμένες αποτυχημένες προσπάθειες εξωσωματικής γονιμοποίησης (Sfontouris *et al.*, 2013).

## 1.5 ΩΡΙΜΑΣΗ ΩΑΡΙΩΝ *IN VITRO*

Η ωρίμαση ωαρίων *in vitro* (*in vitro* maturation, IVM) είναι μια τεχνική που στοχεύει στην ωρίμαση ωοθυλακίων και των ωαρίων που αυτά περιέχουν, υπό συνθήκες καλλιέργειας *in vitro*. Με τις αρχικές προσπάθειες σε πειραματόζωο (κουνέλι), στις αρχές του 20<sup>ού</sup> αιώνα (Pincus & Enzmann, 1935), αποδείχθηκε ότι η ωρίμαση είναι δυνατόν να συμβεί εκτός του φυσιολογικού πλαισίου της ωοθήκης. Στη συνέχεια, ο RG Edwards συνέχισε και επεξέτεινε το έργο αυτό σε άλλα θηλαστικά (Edwards, 1965a & 1965b). Η πρώτη κλινική κύηση από IVF με ωάρια που είχαν ωριμάσει *in vitro* καταγράφηκε το 1991 (Cha, 1991), ενώ η εφαρμογή της μεθόδου και γέννηση τέκνου από ασθενή που εμφάνιζε σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών, το 1994 (Troupson, 1994).

Σήμερα, η τεχνική βρίσκει εφαρμογή σε ειδικές περιπτώσεις:

- όταν επιβάλλεται να μην χορηγηθούν μεγάλες δόσεις φαρμάκων για τη διέγερση των ωοθηκικής λειτουργίας, για παράδειγμα εάν υπάρχει κίνδυνος συνδρόμου υπερδιέγερσης, ή παρουσία συνδρόμου πολυκυστικών ωοθηκών, ή κίνδυνος υποτροπής οιστρογονο-εξαρτώμενου καρκίνου,
- όταν η εφαρμογή του τυπικού πρωτοκόλλου δεν αποδίδει, ή είναι ανέφικτη, για παράδειγμα, περιπτώσεις “αντίστασης της ωοθήκης” στην FSH ή επείγουσας ανάγκης κρυοσυντήρησης για τη διατήρηση της γονιμότητας εν όψει στείρωτικής θεραπείας (Oktay *et al.*, 2010· Fadini *et al.*, 2012).

Η μέθοδος είναι δυνατόν να εφαρμοσθεί σε άωρα αρχέγονα ωοθυλάκια πριν από την εμφάνιση του άντρου (Hardy *et al.*, 2000), αλλά η πλήρης IVM ωαρίων από ένα τόσο

πρώιμο στάδιο μέχρις ότου καταστούν γονιμοποιήσιμα *in vitro* απαιτεί πολλές ημέρες καλλιέργειας, με μεγάλες τεχνικές δυσκολίες στον τομέα των καλλιεργητικών μέσων, έχει δε τόσο χαμηλά ποσοστά επιτυχίας που η ευρεία κλινική χρήση της δεν είναι ακόμη εφικτή. Αντιθέτως, η IVM ωαρίων από το στάδιο του βλαστικού κυστιδίου έως τη μετάφαση II είναι πολύ πιο αποδοτική και είναι η τεχνική που εφαρμόζεται σήμερα ευρύτερα. Η ωοληψία πραγματοποιείται όταν το ωοθυλάκιο έχει διάμετρο περίπου 10 mm και τα ωάρια καλλιεργούνται σε τυποποιημένα καλλιεργητικά μέσα έως ότου εκβάλουν το πρώτο πολικό σωματίο.

Πρόσφατα ο αριθμός γεννήσεων εκτιμάται ότι ξεπέρασε τις 2.500 χωρίς να παρατηρείται αύξηση του ποσοστού συγγενών ανωμαλιών, ενώ το ποσοστό επιτυχίας της μεθόδου, ως ποσοστό ωρίμασης των ωαρίων, είναι υψηλό (περίπου 80%), το ποσοστό εμφύτευσης των εμβρύων είναι αποδεκτό (περίπου 18%) και τα ποσοστά κύησης σε ικανοποιητικά επίπεδα, συγκρίσιμα με εκείνα της ICSI σε πληθυσμούς ασθενών με σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών (Chang, 2014).

## 1.6 ΣΚΟΠΟΙ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή είχε πολλαπλούς σκοπούς, στο πλαίσιο κλινικών προσπαθειών εξωσωματικής γονιμοποίησης.

Ο πρώτος σκοπός ήταν να εξετασθεί το ενδεχόμενο της διάσωσης ωαρίων, τα οποία, ενώ είχαν υποβληθεί σε ενδοωαριακή έγχυση σπερματοζωαρίου (ICSI) δεν εμφάνιζαν χαρακτηριστικά γνωρίσματα της γονιμοποίησης 18 h μετά την έγχυση του σπερματοζωαρίου. Στόχος ήταν να αποκατασταθεί αυτή η αποτυχία γονιμοποίησης, με την εκ των υστέρων τεχνητή ενεργοποίηση των ωαρίων με βραχυχρόνια έκθεσή τους στον ιονοφόρο διάλυο ασβεστίου A23187, ο οποίος είναι γνωστό ότι προκαλεί τεχνητή ενεργοποίηση του ωαρίου.

Δεύτερος σκοπός ήταν η ενίσχυση του αναπτυξιακού δυναμικού των εμβρύων με τον αυξητικό παράγοντα GM-CSF, διότι είναι γνωστό ότι η προσθήκη του στο καλλιεργητικό μέσον των εμβρύων βελτιώνει διάφορες παραμέτρους της κλινικής προσπάθειας εξωσωματικής γονιμοποίησης, μεταξύ των οποίων το ποσοστό γέννησης ζώντων νεογνών.

Τρίτος σκοπός ήταν η αξιολόγηση της συνεργιστικής επίδρασης των δύο παραπάνω μεθόδων, ούτως ώστε να διαπιστωθεί κατά πόσον τα τεχνητώς ενεργοποιημένα ωάρια είναι δυνατόν να διανύσουν όλα τα φυσιολογικά αναπτυξιακά στάδια και να φθάσουν μέχρι το στάδιο της βλαστοκύστης, εκδηλώνοντας όμως φυσιολογικά μορφολογικά χαρακτηριστικά, τα οποία είναι πλέον δυνατόν να καταγραφούν πληρέστατα, μέσω της νέας απεικονιστικής τεχνολογίας με φωτογράφιση χρονοδιολίσθησης.

Τέταρτον, όσα έμβρυα καλλιεργήθηκαν μέχρι το στάδιο της βλαστοκύστης εξετάστηκαν για πιθανές χρωμοσωματικές ανωμαλίες με τη μέθοδο του συγκριτικού γονιδιωματικού υβριδισμού σε μικροσυστοιχίες DNA, ύστερα από ολική βιοψία, με σκοπό να προσδιορισθεί η χρωμοσωματική τους σύσταση και να εξαχθούν με τον τρόπο αυτό συμπεράσματα ως προς την ενδεχόμενη ασφάλεια του πρωτοκόλλου για κλινική χρήση.

## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Στόχος της μελέτης ήταν η διάσωση ωαρίων, τα οποία δεν γονιμοποιήθηκαν ύστερα από μικρογονιμοποίηση στο πλαίσιο ενός κλινικού προγράμματος εξωσωματικής γονιμοποίησης. Ως μέθοδος διάσωσης, επελέγη η **τεχνητή ενεργοποίηση των –μη γονιμοποιημένων– ωαρίων** (*artificial oocyte activation*, **AOA**) με χρήση του ιονοφόρου διαλύου ασβεστίου A23187.

Προκειμένου να διαπιστωθεί η επάρκεια του πρωτοκόλλου AOA και αυτό να τυποποιηθεί, διενεργήθηκε πρώτα μια πιλοτική μελέτη ενεργοποίησης ωαρίων από ωάρια που δεν ήταν δυνατόν να χρησιμοποιηθούν κλινικά: συνήθως, μικρός αριθμός ωαρίων που βρίσκονται στο στάδιο του βλαστικού κυστιδίου προκύπτει κατά την εφαρμογή πρωτοκόλλων διέγερσης της ωοθηκικής λειτουργίας και τα εν λόγω ωάρια κατά κανόνα απορρίπτονται. Σε ωάρια αυτής της κατηγορίας εφαρμόστηκε πρωτόκολλο **ωρίμασης *in vitro***, προκειμένου να προκύψουν ώριμα ωάρια για την τυποποίηση του πρωτοκόλλου AOA.

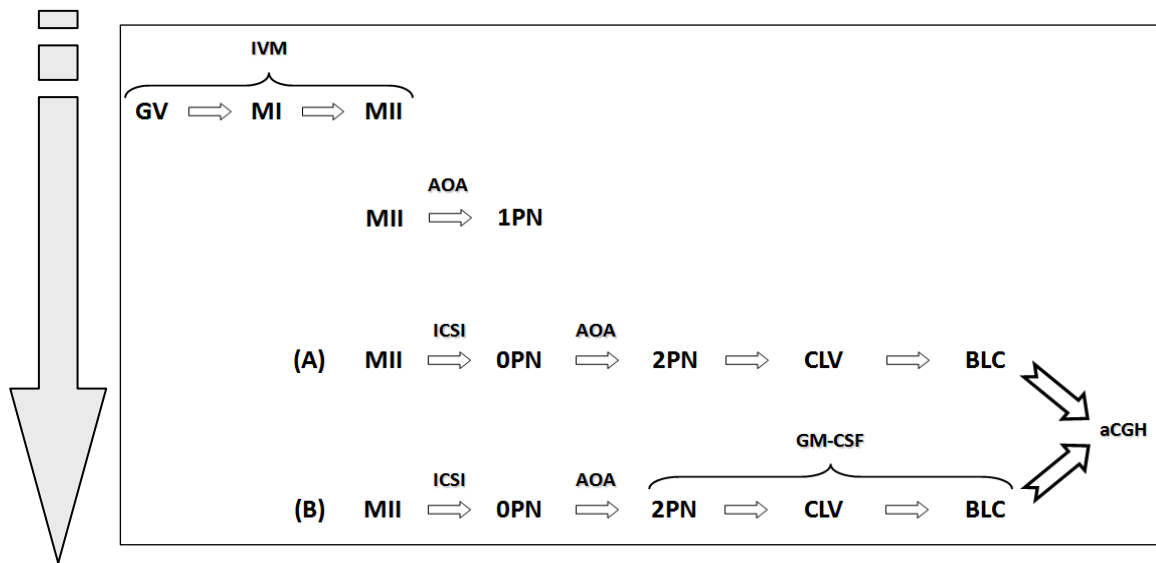
Στη συνέχεια, το πρωτόκολλο AOA εφαρμόστηκε σε μη γονιμοποιημένα ωάρια κλινικού προγράμματος IVF (ωάρια στην **πειραματική ομάδα Α**). Παρατηρήθηκε ότι είναι δυνατόν τα ωάρια να διασωθούν και να εκδηλώσουν τα χαρακτηριστικά γνωρίσματα της γονιμοποίησης: εκβολή του δεύτερου πολικού σωματίου και εμφάνιση δύο προπυρήνων. Παράλληλα, με σκοπό να διαπιστωθεί κατά πόσον τα ωάρια αυτά είναι δυνατόν να εξελιχθούν φυσιολογικά και να διανύσουν τα προεμφυτευτικά στάδια, καλλιεργήθηκε μια δεύτερη σειρά ωαρίων (**πειραματική ομάδα Β**). Στην ομάδα αυτή, τα ωάρια υποβλήθηκαν σε τεχνητή ενεργοποίηση με το πρωτόκολλο του ιονοφόρου ασβεστίου και προστέθηκε στο καλλιεργητικό μέσον μια κυτταροκίνη, συγκεκριμένα ο αυξητικός παράγοντας GM-CSF. Παρατηρήθηκε ότι η προσθήκη της κυτταροκίνης βελτίωσε την εξέλιξη των εμβρύων, γεγονός που τεκμηριώθηκε καταγράφοντας τα πρώτα στάδια της ανάπτυξης με τη βοήθεια του συστήματος χρονοδιολίσθησης.

Στη συνέχεια, προκειμένου να διαπιστωθεί εάν η χρωμοσωματική σύσταση των εμβρύων που προέκυψαν από τις παραπάνω διαδικασίες είναι φυσιολογική, τα έμβρυα που έφθασαν στο στάδιο της βλαστοκύστης υποβλήθηκαν σε ολική βιοψία και γενετική

ανάλυση με τη μέθοδο aCGH. Παρατηρήθηκε ότι όλα τα έμβρυα της ομάδας A έφεραν χρωμοσωματικές ανωμαλίες, ενώ στην ομάδα B υπήρξαν βλαστοκύστες με φυσιολογικό καρυότυπο.

Κατόπιν αυτών, διενεργήθηκε στατιστική ανάλυση για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων μεταξύ των δύο πειραματικών ομάδων, προκειμένου να εξαχθούν τα τελικά συμπεράσματα της μελέτης.

Ο σχεδιασμός της μελέτης συνοψίζεται σχηματικά στην **Εικόνα 2.1**.



**Εικόνα 2.1** Σχεδιασμός της μελέτης. IVM: ωρίμαση *in vitro*, GV: βλαστικό κυστίδιο, MI - MII: μετάφαση I & II, ICSI: μικρογονιμοποίηση, PN: προπυρήνας, AOA: τεχνητή ενεργοποίηση ωαρίου, CLV: αulάκωση, BLC: βλαστοκύστη, GM-CSF: διεγερτικός παράγων αποικιών κοκκιοκυττάρων-μακροφάγων, aCGH: συγκριτικός γονιδιωματικός υβριδισμός σε μικροσυστοιχίες DNA, (A): πειραματική ομάδα A, (B): πειραματική ομάδα B. Η αλληλουχία των φάσεων της μελέτης υποδηλώνεται από το κατακόρυφο βέλος αριστερά.

## 2.2 ΑΣΘΕΝΕΙΣ

Τα ανθρώπινα ωάρια και έμβρυα που υποβλήθηκαν στις πειραματικές διαδικασίες προήλθαν από ασθενείς που πραγματοποίησαν κύκλους εξωσωματικής γονιμοποίησης στην ΜΙΥΑ “Εμβρυογένεσις”. Όλα τα ζευγάρια που συμμετείχαν στο ερευνητικό πρόγραμμα, συμμετείχαν οικειοθελώς και κατόπιν έγγραφης συγκατάθεσης.

## 2.2.1 Ενημέρωση

Πριν από την έγγραφη συγκατάθεση των ζευγαριών είχε προηγηθεί εκτενής προφορική ενημέρωσή τους από τον γράφοντα για τους σκοπούς και τις μεθόδους της παρούσας διδακτορικής διατριβής, ώστε η απόφασή τους να συναινέσουν στην παραχώρηση των ωαρίων για τη μελέτη να έχει ληφθεί όπως ορίζει ο νόμος και οι κανόνες δεοντολογίας.

## 2.2.2 Έγγραφη συναίνεση

Στη συνέχεια, τα ζευγάρια κλήθηκαν να υπογράψουν το παρακάτω έγγραφο συναίνεσης (σύμφωνα με τις υποδείξεις της νομοθεσίας και της Εθνικής Αρχής ΙΥΑ):

**ΕΓΓΡΑΦΟ ΣΥΓΚΑΤΑΘΕΣΗΣ ΔΙΑΘΕΣΗΣ – ΔΩΡΕΑΣ ΜΗ ΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΩΑΡΙΩΝ  
ΣΕ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΤΗΣ ΜΟΝΑΔΑΣ ΙΑΤΡΙΚΩΣ ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗΣ  
ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ «ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΙΣ».**

Οι κάτωθι υπογεγραμμένοι σύζυγοι-σύντροφοι: α)..... και β) ..... κάτοικοι ..... δηλώνουμε, με την παρούσα, ότι συναινούμε να διαθέσουμε – δωρίσουμε τα **μη γονιμοποιημένα** ωάρια τα οποία προέρχονται από τον κύκλο εξωσωματικής γονιμοποίησης που έλαβε χώρα στην Μ.Ι.Υ.Α με την επωνυμία «ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΙΣ Μ.Ι.Υ.Α- ΙΔΙΩΤΙΚΟ ΙΑΤΡΕΙΟ ΑΝΩΝΥΜΗ ΙΑΤΡΙΚΗ ΕΤΑΙΡΕΙΑ» κατά την από.....(ημ/νία ωοληψίας), προκειμένου να διατεθούν σε ερευνητικό πρόγραμμα της μονάδας, που αφορά σε θέματα υπογονιμότητας. Η εν λόγω δυνατότητα παρέχεται από τις κείμενες διατάξεις του άρθρου 11 του Ν.3305/2005 (Έρευνα που δεν οδηγεί σε εγκυμοσύνη)

Το ερευνητικό αυτό πρόγραμμα διεξάγεται στα πλαίσια Διδακτορικής Διατριβής σε συνεργασία με το τμήμα Μαιευτικής και Γυναικολογίας και το τμήμα Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών και περιλαμβάνει την τεχνητή ενεργοποίηση (artificial oocyte activation – AOA) των **μη γονιμοποιημένων ωαρίων** είκοσι τέσσερις (24) ώρες μετά την αρχική διαδικασία μικρογονιμοποίησης (ICSI) και την ανάλυση της χρωμοσωματικής σύστασης των παραγόμενων εμβρύων.

Έχουμε δε λάβει γνώση για τις λεπτομέρειες του συγκεκριμένου ερευνητικού προγράμματος από το προσωπικό της μονάδας και είμαστε απολύτως σύμφωνοι στο να συμβάλλουμε στην πρόσodό του.

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ

Ο ΔΗΛΩΝ

Η ΔΗΛΟΥΣΑ

Τα υπογεγραμμένα έγγραφα συναίνεσης εντάχθηκαν στον ιατρικό φάκελο του κάθε ζευγαριού και παραμένουν αναπόσπαστο μέρος του.

## 2.3 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑ

Τα πειράματα και η συλλογή των αποτελεσμάτων έγιναν κατά τη χρονική περίοδο 2012–2016. Ο σχεδιασμός της μελέτης, η βιβλιογραφική έρευνα, η επεξεργασία των αποτελεσμάτων, η οργάνωση και η επίβλεψη της διατριβής πραγματοποιήθηκε στο Τμήμα Ιατρικής του ΕΚΠΑ (Εργαστήριο Πειραματικής Φυσιολογίας “Φυσιολογείον” και Α΄ Μαιευτική-Γυναικολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Αθηνών “Αλεξάνδρα”). Όλα τα ωάρια και έμβρυα προήλθαν από ασθενείς που υπεβλήθησαν σε εξωσωματική γονιμοποίηση στη ΜΙΥΑ “Εμβρυογένεσις” (Λεωφ. Κηφισίας 49 και Ζηρίδη, Αμαρούσιο).



Εικόνα 2.2 Μονάδα Ιατρικός Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής «Εμβρυογένεσις».



Εικόνα 2.3 Το εργαστήριο εμβρυολογίας της ΜΙΥΑ «Εμβρυογένεσις».



## 2.4 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

**Σημείωση:** σε όλο το πειραματικό μέρος, οι παραπομπές στις ιστοσελίδες των συσκευών, υλικών και ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν παρατίθενται σε αριθμημένες υποσέλιδες σημειώσεις. Όλοι οι εν λόγω σύνδεσμοι λειτουργούσαν στις 27 Νοεμβρίου 2016.

### 2.4.1 Εγκρίσεις του πρωτοκόλλου

Το πειραματικό πρωτόκολλο της διδακτορικής διατριβής κατατέθηκε, μελετήθηκε και εγκρίθηκε από τις παρακάτω αρχές, σύμφωνα με τα ισχύοντα βάσει του Κανονισμού διδακτορικών διατριβών της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ, καθώς επίσης και από την κείμενη νομοθεσία και συγκεκριμένα το **άρθρο 11 του Νόμου 3305/2005**<sup>1</sup> (“*Έρευνα που δεν οδηγεί σε εγκυμοσύνη*”):

1. την **επιτροπή βιοηθικής της Ιατρικής Σχολής** του ΕΚΠΑ,
2. την ολομέλεια του διοικητικού συμβουλίου και της **εσωτερικής επιτροπής δεοντολογίας της ΜΙΥΑ “Εμβρυογένεσις”**,
3. την **Εθνική Αρχή Ιατρικός Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής**<sup>2</sup>, από την οποία έλαβε τη νόμιμη **έγκριση με αριθμό πρωτοκόλλου 134**.

### 2.4.2 Διέγερση της ωοθηκικής λειτουργίας

Η συλλογή των ωαρίων πραγματοποιήθηκε κατόπιν διέγερσης της ωοθηκικής λειτουργίας των ασθενών που συμμετείχαν στο πρόγραμμα. Χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο ανταγωνιστή GnRH, το οποίο εφαρμόζεται κατά κανόνα στη ΜΙΥΑ “*Εμβρυογένεσις*” και που έχει εκτενώς περιγραφεί σε κλινικές μελέτες (Pacchiarotti *et al.*, 2016). Αναλυτικά, το πρωτόκολλο που ακολούθησαν οι ασθενείς έχει ως εξής:

- Της έναρξης της θεραπείας προηγείται αιματολογικός ορμονικός έλεγχος (2<sup>η</sup>-3<sup>η</sup> ημέρα κύκλου προηγούμενου κύκλου), όπου ελέγχονται τα επίπεδα E2, FSH, LH και AMH, και προσδιορίζεται υπερηχογραφικά ο αριθμός των αρχέγονων ωοθυλακίων.
- Κατά τον κύκλο θεραπείας πραγματοποιείται ένα διακολλικό υπερηχογράφημα ελέγχου την 1<sup>η</sup> ημέρα της περιόδου, το οποίο συνοδεύεται από αιματολογικό έλεγχο των επιπέδων της προγεστερόνης. Η θεραπεία άρχεται την 1<sup>η</sup> ημέρα της περιόδου.

<sup>1</sup> <http://eaiya.gov.gr/law-fek/>

<sup>2</sup> <http://eaiya.gov.gr/>

- Ανάλογα με το ορμονικό προφίλ και την υπερηχογραφική εικόνα, η ασθενής λαμβάνει υποδορίως 150-300 IU ανασυνδυασμένης FSH από την 1<sup>η</sup> ημέρα της περιόδου. Χρησιμοποιούνται τα σκευάσματα **Gonal-f** (Merck Serono<sup>3</sup>) ή **Puregon** (MSD<sup>4</sup>) που περιέχουν ανασυνδυασμένη ανθρώπινη FSH. Εάν η ασθενής είναι πτωχή αποκρίτρια, ή όταν τα επίπεδα της LH είναι χαμηλά, τότε χρησιμοποιούνται τα σκευάσματα **Menopur** (Ferring<sup>5</sup>) και **Merional** (IBSA<sup>6</sup>), τα οποία περιέχουν μίγμα γοναδοτροπινών. Η χορήγηση γίνεται από την ασθενή, σε σταθερή ώρα (περίπου 4-8 μμ) καθημερινά.
- Την 3<sup>η</sup> ημέρα της περιόδου, η ασθενής προσέρχεται στη ΜΙΥΑ για μέτρηση των επιπέδων προγεστερόνης και οιστραδιόλης στον ορό.
- Την 5<sup>η</sup> ημέρα της διέγερσης, χορηγείται στην ασθενή ο ανταγωνιστής της GnRH, δηλαδή 0,25 mg **Cetrotide** (EMD Serono<sup>7</sup>) ή **Orgalutran** (MSD<sup>8</sup>).
- Η χορήγηση όλων των σκευασμάτων συνεχίζεται καθημερινά επί 9-12 ημέρες.
- Ανάλογα με τα υπερηχογραφικά ευρήματα και όταν τρία ωοθυλάκια βρεθούν να έχουν διάμετρο  $\geq 18$  mm, η ασθενής λαμβάνει 5000 IU β-χοριακής γοναδοτροπίνης, η οποία μιμείται τη δράση της ενδογενούς LH, πυροδοτεί τα τελικά στάδια ωρίμασης των ωαρίων και προκαλεί την ωοθυλακιορρηξία εντός 38 h περίπου. Τα σκευάσματα είναι **Pregnyl** (Merck<sup>9</sup>) ή **Ovitrelle** (Merck Serono<sup>10</sup>). Περίπου 36 h μετά τη χορήγηση Pregnyl ή Ovitrelle η ασθενής προσέρχεται στη ΜΙΥΑ για την ωοληψία.
- Καθ' όλη τη διάρκεια της διέγερσης η ασθενής λαμβάνει καθημερινά ένα χάπι 5 mg φυλλικού οξέος **Filicine** (Adelco<sup>11</sup>).

### 2.4.3 Διασφάλιση ποιότητας

Μια ιδιαίτερος σημαντική διαδικασία στο εργαστήριο κλινικής εμβρυολογίας, που ακολουθείται σχολαστικά στην καθημερινή πρακτική, είναι η διαδικασία ταυτοποίησης των μελών του ζεύγους που υποβάλλεται σε εξωσωματική γονιμοποίηση. Στη ΜΙΥΑ

<sup>3</sup> <http://www.galinos.gr/web/drugs/main/drugs/gonal-f#content>

<sup>4</sup> <http://www.galinos.gr/web/drugs/main/drugs/puregon#content>

<sup>5</sup> <http://www.galinos.gr/web/drugs/main/drugs/menopur#content>

<sup>6</sup> <http://www.galinos.gr/web/drugs/main/drugs/merional#content>

<sup>7</sup> <http://www.galinos.gr/web/drugs/main/drugs/cetrotide#content>

<sup>8</sup> <http://www.galinos.gr/web/drugs/main/drugs/orgalutran#content>

<sup>9</sup> <http://www.galinos.gr/web/drugs/main/drugs/pregnyl#content>

<sup>10</sup> <http://www.galinos.gr/web/drugs/main/drugs/ovitrelle#content>

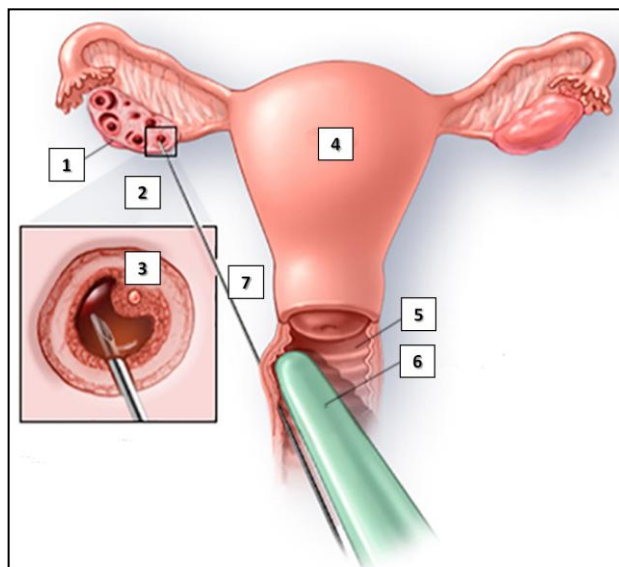
<sup>11</sup> <http://www.galinos.gr/web/drugs/main/drugs/filicine#content>

“Εμβρυογένεσις” η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει την χρήση ενός εξαψήφιου μοναδιαίου κωδικού, ο οποίος αποδίδεται ηλεκτρονικά, τόσο για τον άνδρα, όσο και για τη γυναίκα. Όλες οι διαδικασίες παρακολουθούνται από το σύστημα OmniArt 2015, ένα σύστημα ηλεκτρονικής ταυτοποίησης και καταγραφής των στοιχείων των ασθενών και των κλινικών διαδικασιών, στις οποίες αυτοί υποβάλλονται.

Επιπροσθέτως, όλα τα υλικά που χρησιμοποιούνται στο εργαστήριο (όπως δοκιμαστικά σωληνάκια, δοχεία συλλογής σπέρματος, τρυβλία κ.λπ.) φέρουν τον παραπάνω μοναδιαίο κωδικό και το ονοματεπώνυμο των δύο συντρόφων, ενώ στο κάθε ζεύγος αποδίδεται και διαφορετικός χρωματικός κωδικός. Σε όλες τις διαδικασίες, (ωοληψία, σπερματοληψία, κατεργασία σπέρματος, γονιμοποίηση, καλλιέργεια, εμβρυομεταφορά, κατάψυξη), τα μοναδιαία στοιχεία αναγνώρισης πιστοποιούνται παράλληλα από δύο εμβρυολόγους (“double witnessing”), οι οποίοι υπογράφουν σχετικό έγγραφο αναγνώρισης διαδικασιών που καταχωρίζεται στον ιατρικό φάκελο του ζεύγους, προκειμένου να ελαχιστοποιηθεί ο κίνδυνος ανθρώπινου σφάλματος στη χρήση των γαμετών και γενικότερα στις διαδικασίες του εμβρυολογικού εργαστηρίου.

#### 2.4.4 Ωοληψία

Η διαδικασία της ωοληψίας πραγματοποιείται στην ειδική αίθουσα χειρουργείου της ΜΙΥΑ υπό διακολπικό υπερηχογραφικό έλεγχο, όπως απεικονίζεται σχηματικά στην **Εικόνα 2.4**.



**Εικόνα 2.4** Σχηματική απεικόνιση της ωοληψίας υπό υπερηχογραφική καθοδήγηση. 1: ωοθήκη, 2: ωοθυλάκιο, 3: ωοφόρος λοφίσκος, 4: μήτρα, 5: κόλπος, 6: κολπικός ηχοβολέας, 7: βελόνη ωοληψίας.

Αναλυτικά, οι φάσεις της διαδικασίας είναι οι εξής:

- Το ωοθυλακικό υγρό αναρροφάται υπό την καθοδήγηση υπερηχοτομογράφου Philips HD 6 Diagnostic Ultrasound System (Bothell, Washington, USA) και διακολλικού ηχοβολέα εφοδιασμένου με βελόνα ωοληψίας διπλού αυλού Wallace<sup>®</sup> 17G, 33 cm<sup>12</sup> (Smiths Medical, Kent, UK). Χρησιμοποιείται αντλία αναρρόφησης IVF Ultra quiet, K-MAR-5100 (COOK, Australia).
- Εάν το σύμπλεγμα ωαρίου-ωοφόρου λοφίσκου δεν αποκολληθεί με την πρώτη αναρρόφηση του ωοθυλακικού υγρού, το ωοθυλάκιο εκπλύνεται με καλλιεργητικό μέσον πολλαπλών χρήσεων (MHM<sup>13</sup>, Irvine Scientific<sup>®</sup>, Santa Ana, CA, USA) με το οποίο τροφοδοτείται η βελόνη ωοληψίας.
- Το ωοθυλακικό υγρό και τα υγρά έκπλυσης συλλέγονται σε δοκιμαστικά σωληνάρια Falcon<sup>®</sup> 352051<sup>14</sup> (Corning Science, Tamaulipas, Mexico), οι οποίοι τοποθετούνται σε θερμαινόμενη συσκευή (VWR<sup>™</sup> Digital Heatblock, Henry Troemner, LLC, USA) στους 37°C, μέχρις ότου εξετασθούν.
- Στη συνέχεια, τα δοκιμαστικά σωληνάρια παραδίδονται στον κλινικό εμβρυολόγο, ο οποίος εξετάζει το ωοθυλακικό υγρό σε πλαστικά τρυβλία Falcon<sup>®</sup> 353037<sup>15</sup> (Becton Dickinson, NJ, USA), προκειμένου να αναγνωρίσει το σύμπλεγμα ωαρίου-ωοφόρου λοφίσκου και να το απομονώσει. Η διαδικασία αναγνώρισης και απομόνωσης των ωαρίων πραγματοποιείται σε θερμαινόμενο πάγκο εργασίας (37°C), με τη βοήθεια διοφθαλμικού στερεοσκοπίου Nikon SMZ-U<sup>16</sup> (Nikon, Japan).
- Η απομόνωση των ωαρίων πραγματοποιείται με γυάλινες αποστειρωμένες πιπέτες Pasteur (SteriPettes<sup>™</sup>, 1215D98<sup>17</sup>, Thomas Scientific, NJ, USA).
- Τα ωάρια συλλέγονται σε ειδικό καλλιεργητικό μέσον (MHM, ό.π.) το οποίο περιέχει 10% πρωτεϊνικό συμπλήρωμα υποκατάστασης ορού “SSS” (Serum Substitute Supplement<sup>18</sup>, Irvine Scientific<sup>®</sup>, Santa Ana, CA, USA).
- Αφού ολοκληρωθεί η ωοληψία, τα ωάρια της ασθενούς ξεπλένονται σε νέα ποσότητα του ίδιου καλλιεργητικού μέσου και μεταφέρονται σε καλλιεργητικό μέσον SAGE 1-Step<sup>™</sup> (Origio, Maløv, Denmark<sup>19</sup>).

<sup>12</sup> <https://www.smiths-medical.com/products/assisted-reproduction/oocyte-collection/wallace-dual-lumen-oocyte-recovery-systems>

<sup>13</sup> <http://www.irvinesci.com/products/90163-multipurpose-handling-medium-mhm?dpt=Assisted+Reproductive+Technology>

<sup>14</sup> [http://catalog2.corning.com/LifeSciences/en-GB/Shopping/ProductDetails.aspx?categoryname=&productid=352051\(Lifesciences\)](http://catalog2.corning.com/LifeSciences/en-GB/Shopping/ProductDetails.aspx?categoryname=&productid=352051(Lifesciences))

<sup>15</sup> [http://catalog2.corning.com/LifeSciences/en-GB/Shopping/ProductDetails.aspx?categoryname=&productid=353037\(Lifesciences\)](http://catalog2.corning.com/LifeSciences/en-GB/Shopping/ProductDetails.aspx?categoryname=&productid=353037(Lifesciences))

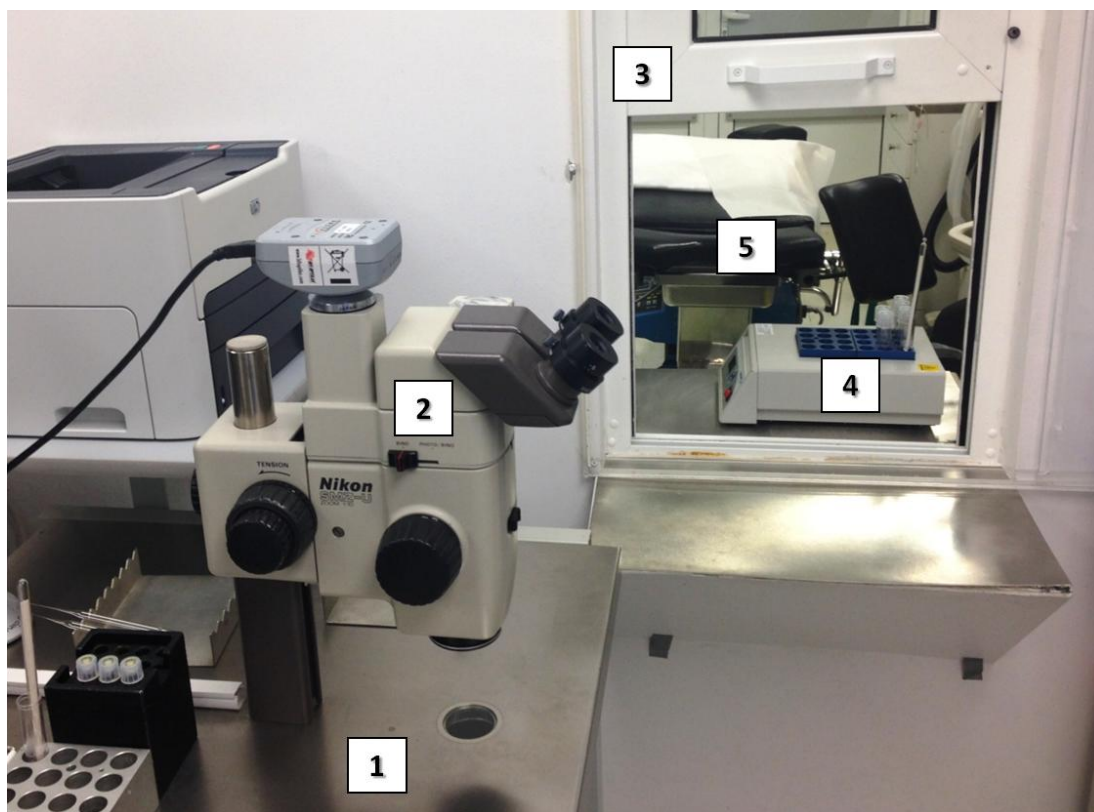
<sup>16</sup> [https://www.nikoninstruments.com/en\\_EU/content/search?SearchText=SMZ](https://www.nikoninstruments.com/en_EU/content/search?SearchText=SMZ)

<sup>17</sup> [https://www.thomassci.com/Laboratory-Supplies/Pasteur-Pipets/\\_/SteriPettes-Sterile-Pasteur-Pipettes](https://www.thomassci.com/Laboratory-Supplies/Pasteur-Pipets/_/SteriPettes-Sterile-Pasteur-Pipettes)

<sup>18</sup> <http://www.irvinesci.com/products/99193-serum-substitute-supplement?dpt=Assisted+Reproductive+Technology>

Τα ωάρια επωάζονται προσωρινά σε 1 ml καλλιεργητικού μέσου SAGE 1-Step™ σε δοκιμαστικά σωληνάρια Falcon® 352054<sup>20</sup> (Corning Science, Tamaulipas, Mexico) σε κλίβανο Heraeus (Heracell, Kendro Laboratory Products, Hanau, Germany), ο οποίος διατηρεί σταθερές συνθήκες επώασης: θερμοκρασία 37°C, 6% CO<sub>2</sub>, απόλυτη υγρασία.

Η θέση εργασίας για την ωοληψία απεικονίζεται στην **Εικόνα 2.5**.



**Εικόνα 2.5** Θέση εργασίας του εμβρυολόγου για την ωοληψία. 1: θερμαινόμενη τράπεζα εργασίας, 2: διοφθαλμικό στερεοσκοπικό μικροσκόπιο για την αναγνώριση και την απομόνωση των ωαρίων, 3: θυρίδα άμεσης επικοινωνίας με την αίθουσα ωοληψίας, 4: θερμαντικό στοιχείο για την προσωρινή εναπόθεση σωληναρίων με ωοθυλακικό υγρό που δεν έχουν ακόμη εξετασθεί στο εργαστήριο, 5: χειρουργική κλίνη ωοληψίας.

## 2.4.5 Κατεργασία του σπέρματος

Το σπέρμα του συντρόφου υποβάλλεται σε ειδική κατεργασία πριν από τη διαδικασία της μικρογονιμοποίησης (ICSI) που θα ακολουθήσει.

Η κατεργασία του δείγματος σπέρματος αποσκοπεί στην απομάκρυνση του σπερματικού πλάσματος, το οποίο αφενός έχει υψηλό ιζώδες και αφετέρου περιέχει διάφορα ανεπιθύμητα έμμορφα συστατικά του σπέρματος, όπως επιθηλιακά κύτταρα,

<sup>19</sup> <http://www.origio.com/products/sage-1-step/>

<sup>20</sup> [http://catalog2.corning.com/LifeSciences/en-GB/Shopping/ProductDetails.aspx?categoryname=&productid=352054\(Lifesciences\)](http://catalog2.corning.com/LifeSciences/en-GB/Shopping/ProductDetails.aspx?categoryname=&productid=352054(Lifesciences))

λευκά και ενίοτε ερυθρά αιμοσφαίρια. Επίσης, το σπέρμα μπορεί να περιέχει ανεπιθύμητες ουσίες όπως αντιοξειδωτικά ένζυμα, πεπτιδία, πρωτεΐνες, ένζυμα, ορμόνες, ιόντα, σάκχαρα και λιπίδια (Juyena & Stelletta, 2012). Τέλος, δεν είναι σπάνια και η παρουσία βακτηρίων όπως *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Ureaplasma urealyticum*, είδη *Micrococcus*, *Streptococcus* κ.ά., τα οποία προκαλούν αλλοιώσεις της ποιότητας του σπέρματος (Moretti *et al.*, 2009), με συνέπεια να επιβάλλεται ο διαχωρισμός και η αφαίρεσή τους.

Η κατεργασία του σπέρματος εξυπηρετεί και άλλον ένα σκοπό: μιμείται τη λειτουργία της τραχηλικής βλέννας και προκαλεί ενεργοποίηση των σπερματοζωαρίων.

#### **2.4.5.1 Διαδικασία συλλογής του σπέρματος**

Για την ορθή συλλογή του δείγματος συνιστάται να μην έχει μεσολαβήσει εκσπερμάτιση επί 3-4 ημέρες. Πριν από αυτή την αποχή, ο άνδρας θα πρέπει να εξασφαλίσει συχνή εκσπερμάτιση (2-3 φορές την εβδομάδα) για χρονικό διάστημα 2-3 εβδομάδων, ώστε να έχουν ομαλοποιηθεί οι παράμετροι του σπέρματος.

Ο κύκλος θεραπείας με εξωσωματική γονιμοποίηση αναβάλλεται σε περιπτώσεις όπου ο ασθενής έλαβε για μεγάλο χρονικό διάστημα αντιβιοτικά φάρμακα ή εμφάνισε υψηλό πυρετό μέσα στο τελευταίο τρίμηνο από την ημέρα συλλογής του δείγματος, δεδομένου ότι αυτές οι καταστάσεις επηρεάζουν αρνητικά τις παραμέτρους του σπέρματος (Hargreaves *et al.*, 1998 και Sergerie *et al.*, 2007).

Η συλλογή του δείγματος πραγματοποιείται στον ειδικά διαμορφωμένο χώρο της ΜΙΥΑ. Το δείγμα συλλέγεται σε ειδικό ατοξικό ουροσυλλέκτη, στον οποίο αναγράφονται τα στοιχεία του ασθενούς, ο μοναδιαίος κωδικός ταυτοποίησής του, ενώ ο ασθενής υπογράφει τον ουροσυλλέκτη που περιέχει το δείγμα κατά την παράδοσή του στον κλινικό εμβρυολόγο.

Την ημέρα πριν από την ωληνία προετοιμάζονται: 1 δοκιμαστικό σωληνάριο Falcon® 352054 (Corning Science, Tamaulipas, Mexico) με 2 ml καλλιεργητικού μέσου (MHM + 10% SSS), 1 δοκιμαστικό σωληνάριο με 1 ml καλλιεργητικού μέσου (MHM + 10% SSS) και ένα κενό δοκιμαστικό σωληνάριο. Τα δοκιμαστικά σωληνάρια (ένα σετ τριών σωληναρίων για κάθε δείγμα σπέρματος προς επεξεργασία) τοποθετούνται σε κλίβανο για προθέρμανση στους 37°C κατά τη διάρκεια της νύχτας.

Το πρωί της ωοληψίας, ο ουροσυλλέκτης που περιέχει το δείγμα σπέρματος προς κατεργασία, αφήνεται σε θερμαινόμενη επιφάνεια (Stuart Scientific<sup>21</sup>) στους 37°C επί 20 min ώστε να διευκολυνθεί η ρευστοποίηση του δείγματος.

#### **2.4.5.2 Εξέταση του δείγματος**

Ακολουθεί σπερμοδιάγραμμα, όπου αξιολογούνται οι μακροσκοπικές και φυσικοχημικές παράμετροι του δείγματος: όψη, χροιά, ιξώδες, όγκος, pH. Στη συνέχεια, το δείγμα εξετάζεται μικροσκοπικά και προσδιορίζεται η συγκέντρωση σπερματοζωαρίων (εκατομμύρια κύτταρα ανά ml), η ολική κινητικότητα, το ποσοστό προωθητικής κινητικότητας και το ποσοστό ανώμαλων μορφών σπερματοζωαρίων. Η ανάλυση πραγματοποιείται βάσει της πέμπτης έκδοσης του εγχειριδίου για την εξέταση και την κατεργασία του ανθρώπινου σπέρματος του WHO (Cao *et al.*, 2011 και World Health Organization, 2010). Η μέτρηση του αριθμού των σπερματοζωαρίων, της ολικής και της προωθητικής κινητικότητας πραγματοποιούνται σε κυψελίδα Makler<sup>®</sup> (Sefi Medical Instruments<sup>22</sup>) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Το ποσοστό ανώμαλων μορφών σπερματοζωαρίων προσδιορίζεται βάσει των κριτηρίων του WHO (World Health Organization, 2010).

Επίσης, το δείγμα εξετάζεται για την παρουσία αντισπερματικών αντισωμάτων (Scarselli G, 1985), με τη βοήθεια της δοκιμής MAR (SpermMar IgA Test, Fertipro<sup>23</sup>).

Οι αρχικές τιμές των παραπάνω παραμέτρων καταγράφονται στον φάκελο εργασίας του ασθενούς.

#### **2.4.5.3 Διαχωρισμός και απομόνωση των σπερματοζωαρίων**

Ο διαχωρισμός των σπερματοζωαρίων από τα υπόλοιπα συστατικά του σπερματικού πλάσματος, γίνεται με φυγοκέντρωση σε ασυνεχή κλίση πυκνότητας (**Εικόνα 2.6**). Χρησιμοποιείται το σύστημα κολλοειδούς διαλύματος ISolate<sup>®</sup> (Irvine Scientific<sup>24</sup>) δύο συγκεντρώσεων 40/80%, ως εξής:

---

<sup>21</sup> <http://www.stuart-equipment.com/product.asp?dsl=17>

<sup>22</sup> <http://www.sefimedical.com/makler1.htm>

<sup>23</sup> <http://www.fertipro.com/inserts/SpermMar.pdf>

<sup>24</sup> [www.irvinesci.com/products/99264-isolate?dpt=Assisted+Reproductive+Technology](http://www.irvinesci.com/products/99264-isolate?dpt=Assisted+Reproductive+Technology)

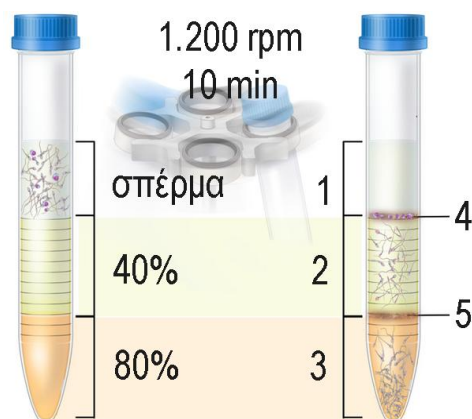
- Στο κενό δοκιμαστικό σωληνάριο, με τη βοήθεια ηλεκτρικής συσκευής αναρρόφησης (Accu-jet Pro<sup>®</sup>, BrandTech, Germany<sup>25</sup>) και αποστειρωμένου πλαστικού σιφωνίου των 10 ml μίας χρήσεως (Nunc<sup>™</sup>, ThermoFisher Scientific 170356<sup>26</sup>, Roskilde, Denmark), τοποθετείται 1 ml διαλύματος ISolate<sup>®</sup> 80%, το οποίο στη συνέχεια υπερκαλύπτεται με 1 ml διαλύματος ISolate<sup>®</sup> 40%. Η επικάλυψη πραγματοποιείται με μεγάλη προσοχή, ώστε οι δύο φάσεις του διαλύματος ISolate<sup>®</sup> να μην διαταραχθούν και να παραμείνουν διακριτές.
- Πάνω από τις δύο φάσεις ISolate<sup>®</sup> τοποθετούνται 2 ml του δείγματος σπέρματος. Κατόπιν, το δοκιμαστικό σωληνάριο φυγοκεντρείται (φυγόκεντρος Kubota 2420, Kubota Corporation, Tokyo, Japan) στις 1.200 rpm επί 10 min. Το ISolate<sup>®</sup> είναι κολλοειδές διάλυμα μικροσφαιριδίων σιλικόνης. Η ασυνεχής κλίση πυκνότητας που δημιουργείται από τις δύο φάσεις στο δοκιμαστικό σωληνάριο λειτουργεί ως υγρό μέσον διήθησης, το οποίο κατακρατά όλα τα στοιχεία του σπερματικού πλάσματος που πρέπει να απομονωθούν, καθώς και τα περισσότερα ακίνητα σπερματοζωάρια του δείγματος (Ng *et al.*, 1992), ενώ επιτρέπει τη διέλευση των κινητών και μορφολογικά τυπικών σπερματοζωαρίων, τα οποία καθιζάνουν σχηματίζοντας ένα ίζημα στον πυθμένα του σωληναρίου.
- Με τη βοήθεια γυάλινου σιφωνίου Pasteur αφαιρείται προσεκτικά το υπερκείμενο υγρό, έως ότου απομείνει περίπου 0,1 ml του ιζήματος.
- Το ίζημα επαναδιαλύεται στο εναπομείναν υγρό και το εναιώρημα που προκύπτει μεταφέρεται με τη βοήθεια γυάλινου σιφωνίου Pasteur στο δοκιμαστικό σωληνάριο που περιέχει 2 ml καλλιεργητικού μέσου για έκπλυση των σπερματοζωαρίων.
- Επαναλαμβάνεται η φυγοκέντρωση του δείγματος (1.200 rpm, 5 min).
- Το νέο ίζημα μεταφέρεται με τον ίδιο τρόπο και επαναδιαλύεται στο δοκιμαστικό σωληνάριο που περιέχει 1 ml καλλιεργητικού μέσου.
- Το εναιώρημα σπερματοζωαρίων που προκύπτει εξετάζεται για να προσδιορισθούν εκ νέου οι παράμετροι των σπερματοζωαρίων (συγκέντρωση, κινητικότητα) μετά την κατεργασία και οι νέες τιμές καταγράφονται στον φάκελο εργασίας του ασθενούς.
- Το τελικό αυτό εναιώρημα σπερματοζωαρίων τοποθετείται σε ειδική θέση σε κλίβανο στους 37°C μέχρι να χρησιμοποιηθεί.

---

<sup>25</sup> <https://www.brandtech.com/product/accu-jet-pro/>

<sup>26</sup> <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/170356>





**Εικόνα 2.6 Κατεργασία του σπέρματος με φυγοκέντρηση σε κλίση πυκνότητας κολλοειδούς.**

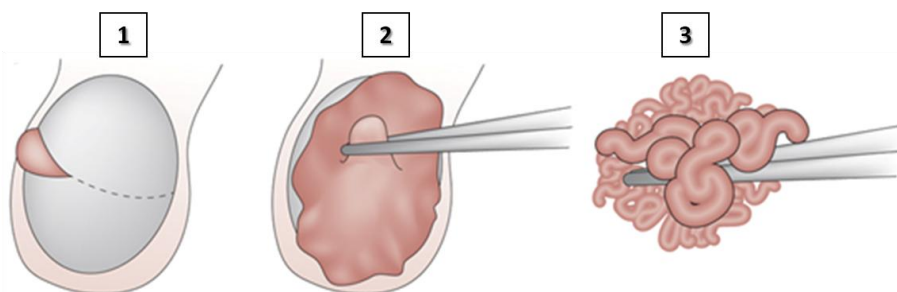
1. Σπερματικό πλάσμα, 2: κολλοειδές διάλυμα πυκνότητας 40% που περιέχει άτυπα και ακίνητα σπερματοζωάρια, 3: κολλοειδές διάλυμα πυκνότητας 80% που περιέχει τυπικά, ζώντα σπερματοζωάρια, 4: στιβάδα λευκών αιμοσφαιρίων και κυτταρικών θραυσμάτων, 5: ορατή διάφραση μεταξύ των δύο διαλυμάτων.

## 2.4.6 Απομόνωση σπερματοζωαρίων από υλικό βιοψίας όρχεως

Σε περιπτώσεις αζωοσπερμίας (απουσίας σπερματοζωαρίων στο υγρό της εκσπερμάτισης) καταβάλλεται προσπάθεια να συλλεγούν και να απομονωθούν σπερματοζωάρια από βιοψία όρχεως (τεχνική TESE), προκειμένου να χρησιμοποιηθούν για ICSI (Cetinkaya *et al.*, 2015a· Shin & Turek, 2013· Schulze *et al.*, 1999).

### 2.4.6.1 Χειρουργική λήψη

Υπό τοπική αναισθησία πραγματοποιείται μικροχειρουργική επέμβαση (**Εικόνα 2.7**) στον πιο ευμεγέθη όρχι του ασθενούς, ή και στους δύο, με σκοπό να ληφθεί βιοψία σπερματικών σωληναρίων. Χρησιμοποιείται νυστέρι (Aescular<sup>®</sup>, Aescular AG & Co., KG, Germany) για να αφαιρεθούν από τον όρχι 6-7 ιστοτεμάχια μεγέθους 1-2 cm.



**Εικόνα 2.7 Χειρουργική λήψη σπερματικών σωληναρίων από τον όρχι.** 1: τομή στο όσχεο και στον λευκό χιτώνα, 2: επιλογή σπερματικών σωληναρίων, 3: σπερματικό σωληνάριο μεγάλης διαμέτρου, που πιθανώς περιέχει σπερματοζωάρια.

#### **2.4.6.2 Αξιολόγηση και πλύση ιστοτεμαχίων**

Ακολουθεί αξιολόγηση του ιστού και των σπερματικών σωληναρίων, με τη βοήθεια στερεοσκοπικού μικροσκοπίου Nikon SMZ 1500<sup>27</sup> (Nikon, Japan).

Τα ιστοτεμάχια τοποθετούνται αρχικά σε δοκιμαστικό σωληνάριο Falcon<sup>®</sup> 352051 (Corning Science, Tamaulipas, Mexico) που περιέχει 5 ml καλλιεργητικού μέσου (MHM + 10% SSS). Στη συνέχεια, τα ιστοτεμάχια μεταφέρονται σε τρυβλίο Falcon<sup>®</sup> 353037 (Becton Dickinson, NJ, USA) το οποίο περιέχει 4 ml καλλιεργητικού μέσου (MHM + 10% SSS), όπου και πλένονται επιμελώς με τη βοήθεια γυάλινου σιφωνίου Pasteur, για την απομάκρυνση ιχνών αίματος, επιθηλιακού ιστού κ.λπ.

#### **2.4.6.3 Εξαγωγή και απομόνωση σπερματοζωαρίων**

Στη συνέχεια, τα ιστοτεμάχια μεταφέρονται κατά ομάδες των 2 ή 3 σε νέο τρυβλίο που περιέχει 1 ml του καλλιεργητικού μέσου, όπου με τη χρήση συρίγγων (1 ml 26GA×3/8 in, BD Plastipak<sup>™</sup>, Becton Dickinson, Madrid, Spain) ο ιστός υφίσταται ομοιογενοποίηση και καταβάλλεται προσπάθεια τα σπερματικά σωληνάρια να συμπιεστούν, ώστε το περιεχόμενό τους να εξαχθεί στο καλλιεργητικό μέσον.

Η διαδικασία επαναλαμβάνεται για όλα τα ιστοτεμάχια. Αφού ολοκληρωθεί, το καλλιεργητικό μέσον με το περιεχόμενο όλων των σπερματικών σωληναρίων της βιοψίας, συγκεντρώνεται σε ένα δοκιμαστικό σωληνάριο Falcon<sup>®</sup> 352054 (Corning Science, Tamaulipas, Mexico). Το σωληνάριο αφήνεται σε θερμαινόμενη επιφάνεια εργασίας (37°C, 5 min), ώστε τα βαρύτερα τμήματα των σπερματικών σωληναρίων να κατακρημνισθούν ως ίζημα. Το υπερκείμενο συλλέγεται σε νέο δοκιμαστικό σωληνάριο, το οποίο φυγοκεντρείται (800 rpm, 7 min, φυγόκεντρος Kubota 2420, Kubota Corporation, Tokyo, Japan).

Αφού αφαιρεθεί το υπερκείμενο διάλυμα, το ίζημα επαναδιαλύεται σε 0,1 ml καλλιεργητικού μέσου (MHM + 10% SSS). Ποσότητα 10 μl του τελευταίου διαλύματος εξετάζεται επιμελώς στο ανάστροφο αναλυτικό μικροσκόπιο (Diaphot 300, Nikon, Japan) για να διαπιστωθεί η παρουσία σπερματοζωαρίων. Το δείγμα, εφόσον περιέχει σπερματοζωάρια, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ICSI.

---

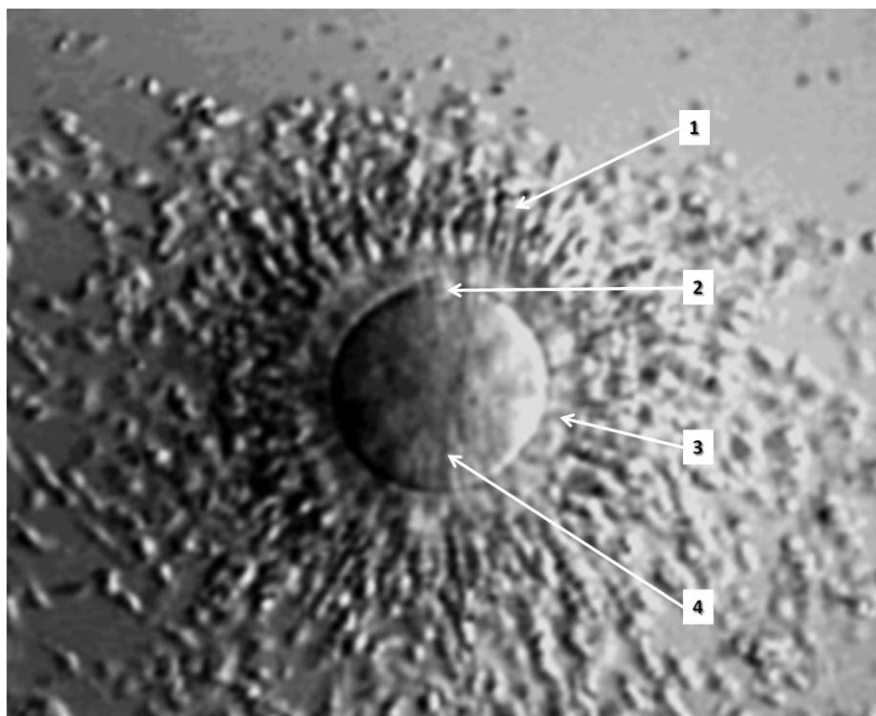
<sup>27</sup> [https://www.nikoninstruments.com/en\\_EU/content/search?SearchText=SMZ+1500](https://www.nikoninstruments.com/en_EU/content/search?SearchText=SMZ+1500)

Όλες οι παρατηρήσεις της διαδικασίας, καθώς και το αποτέλεσμα, καταγράφονται στον φάκελο εργασίας του ασθενούς.

## 2.4.7 Απογύμνωση των ωαρίων

Το σύμπλεγμα ωοφόρου λοφίσκου-ωοκυττάρου (COC) συλλέγεται από το ωοθυλάκιο κατά την ωοληγία (Εικόνα 2.8). Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η ενδοωαριακή έγχυση σπερματοζωαρίου (ICSI), οι στιβάδες αυτές πρέπει να αφαιρεθούν, για διαφόρους λόγους:

- πρώτον, είναι απαραίτητο να αξιολογηθεί η πυρηνική ωριμότητα του ωοκυττάρου: ωάρια σταδίου του βλαστικού κυστιδίου και μετάφασης I δεν είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν για ICSI,
- δεύτερον, για να αποφευχθεί η ανεπιθύμητη εισαγωγή άλλων κυττάρων και DNA στο ωάριο κατά την ICSI,
- τρίτον, για να διευκολυνθεί η ακινητοποίηση του ωαρίου κατά τον μικροχειρισμό για την ICSI, αφού το μικροσιφώνιο συγκράτησης λειτουργεί με τη δημιουργία αρνητικής πίεσης σε επαφή με τη διαφανή ζώνη.



**Εικόνα 2.8** Σύμπλεγμα ωοφόρου λοφίσκου-ωοκυττάρου (COC, cumulus-oocyte complex). Απεικονίζεται ωοκύτταρο που περιβάλλεται από τα κύτταρα του ακτινωτού στεφάνου και τα κύτταρα που αποτελούν την κοκκώδη στιβάδα. 1: ακτινωτός στέφανος, 2: πρώτο πολικό σωματίο, 3: διαφανής ζώνη, 4: ωοκύτταρο.

Η απογύμνωση των ωαρίων από τα περιβάλλοντα κύτταρα επιτυγχάνεται με έκθεση σε υαλουρονιδάση, η οποία πέπτει το υαλουρονικό οξύ της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας μεταξύ των κυττάρων του ωοφόρου λοφίσκου, καθώς και με μηχανική αποκόλληση των εν λόγω κυττάρων από τη διαφανή ζώνη.

#### 2.4.7.1 Υλικά

- Τρυβλίο επεξεργασίας ωαρίων Falcon<sup>®</sup> 353653<sup>28</sup> (Corning Incorporated Life Sciences, NC, USA).
- Καλλιεργητικό μέσον MHM + 10% SSS
- Καλλιεργητικό μέσον SAGE 1-Step<sup>™</sup>
- Δοκιμαστικά σωληνάρια Falcon<sup>®</sup> 352051
- Πλαστικά ογκομετρικά σιφώνια (Nunc<sup>™</sup>, ό.π.).
- Χειροκίνητη συσκευή (πιπέτα) απογύμνωσης ωαρίων COOK<sup>®</sup> The Stripper (Origio<sup>29</sup>).
- Πλαστικά ρύγχη απογύμνωσης ωαρίων σε διαμέτρους 275 μm, 175 μm, 150 μm (Stripper-Tips, MXL3, Origio Inc, VA, USA) και 145 μm (RI EZ-Tip<sup>™30</sup>, Research Instruments Ltd, Cornwall, UK).
- Υαλουρονιδάση (Irvine Scientific 90101<sup>31</sup>): το διάλυμα ενζύμου είναι έτοιμο προς χρήση σε φιαλίδια του 1 ml που περιέχουν 80 IU/ml υαλουρονιδάσης σε καλλιεργητικό μέσον HTF ρυθμιζόμενο με HEPES, το οποίο περιέχει 0,5% HSA και 10 μg/ml θειική γενταμικίνη ως αντιβιοτικό.
- Επωαστικός κλίβανος MINC<sup>™</sup>-1000<sup>32</sup> (Cook<sup>®</sup> Medical, Cook, Australia)
- Κλίβανος για προθέρμανση των υλικών στους 37°C (Mettler BE 200<sup>33</sup>, Memmert, Germany).
- Θάλαμος εργασίας σταθερής ροής CO<sub>2</sub> και θερμοκρασίας 37°C, emCell-S (GYNEMED Medizinprodukte GmbH & Co. KG)<sup>34</sup>.
- Γυάλινα σιφώνια Pasteur.

Οι κλίβανοι που χρησιμοποιούνται στο εργαστήριο απεικονίζονται στην **Εικόνα 2.9**.

<sup>28</sup> [http://catalog2.corning.com/LifeSciences/en-GB/Shopping/ProductDetails.aspx?categoryname=&productid=353653\(Lifesciences\)](http://catalog2.corning.com/LifeSciences/en-GB/Shopping/ProductDetails.aspx?categoryname=&productid=353653(Lifesciences))

<sup>29</sup> <http://www.origio.com/products/the-stripper/>

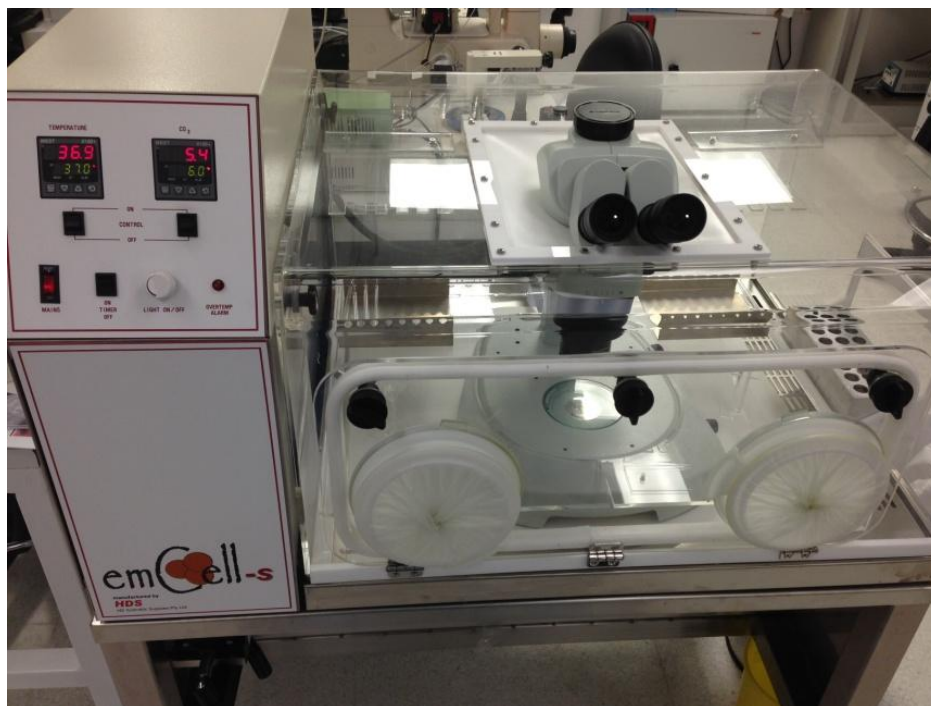
<sup>30</sup> <http://www.research-instruments.com/ez-tip/>

<sup>31</sup> <http://www.irvinesci.com/products/90101-hyaluronidase-solution?dpt=Assisted+Reproductive+Technology>

<sup>32</sup> [https://www.cookmedical.com/products/wh\\_minc\\_1000\\_webds/](https://www.cookmedical.com/products/wh_minc_1000_webds/)

<sup>33</sup> <https://www.memmert.com/search/?q=BE+200>

<sup>34</sup> <https://gynemed.de/index.php?id=537&L=1&type=98>



**Εικόνα 2.9** Επωαστικοί κλίβανοι. *Ανω:* θάλαμος εργασίας emCell-S. *Μέσον:* επιτραπέζιος κλίβανος Cook MINC™-1000. *Κάτω αριστερά:* επιτραπέζιος κλίβανος IKS Xilatrix. *Κάτω δεξιά:* κλίβανος προθέρμανσης Memmert.

### **2.4.7.2 Διαδικασία**

- Το φιαλίδιο υαλουρονιδάσης προθερμαίνεται σε κλίβανο στους 37°C για 3 h πριν τη χρήση του.
- Τα ωάρια απογυμνώνονται από τα περιβάλλοντα κύτταρά τους 2 h μετά την ωοληψία.
- Το περιεχόμενο του φιαλιδίου υαλουρονιδάσης αδειάζεται στο τρυβλίο επεξεργασίας των ωαρίων.
- Τα ωάρια μεταφέρονται από τον επωαστικό κλίβανο στον θάλαμο εργασίας προκειμένου να διασφαλιστεί ότι η απογύμνωση θα πραγματοποιηθεί σε σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας (37°C).
- Τα ωάρια μεταφέρονται στο τρυβλίο που περιέχει την υαλουρονιδάση με ένα γυάλινο σιφόνιο Pasteur και με ήπιες κινήσεις το COC αναρροφάται ώστε να αφαιρεθούν τα περισσότερα κύτταρα. Τα ωάρια δεν πρέπει να παραμείνουν στο διάλυμα του ενζύμου για περισσότερο από 30 δευτερόλεπτα.
- Με ένα ρύγχος απογύμνωσης διαμέτρου 275 μm τα ωάρια μεταφέρονται σε νωπό καλλιεργητικό μέσον (MHM + 10% SSS).
- Εφαρμόζοντας στη συσκευή απογύμνωσης στενότερα ρύγχη (διαμέτρου 175 μm, 150 μm) και αναρροφώντας το κάθε ωάριο με ήπιες κινήσεις, επιτυγχάνεται η πλήρης απογύμνωσή του από τα κύτταρα που το περιβάλλουν.
- Σε περιπτώσεις ωαρίων, στα οποία κάποια κύτταρα του ακτινωτού στεφάνου επιμένουν να μην αποκολλώνται, εφαρμόζεται η ίδια μηχανική κίνηση με ρύγχος της μικρότερης διαμέτρου (145 μm).
- Ακολουθεί μια έκπλυση των ωαρίων σε νωπό καλλιεργητικό μέσο SAGE 1-Step™, αξιολόγηση της ωριμότητάς τους και μεταφορά τους για επώαση σε 50 μl καλλιεργητικού μέσου SAGE 1-Step™ σε κλίβανο MINC™-1000 επί 1 h τουλάχιστον πριν την ICSI.

### **2.4.7.3 Αξιολόγηση ωριμότητας των ωαρίων**

Ανάλογα με την παρουσία ή όχι βλαστικού κυστιδίου ή πρώτου πολικού σωματίου, παρατηρούνται τα εξής τρία ενδεχόμενα μετά την απογύμνωση των ωαρίων:

- Άωρο ωοκύτταρο στη φάση του **βλαστικού κυστιδίου** (φάση **GV**, germinal vesicle). Το ωάριο περιέχει έναν ευδιάκριτο πυρήνα με έναν πυρηνίσκο (**Εικόνα 2.10A**).
- Άωρο ωάριο σε **μετάφαση της πρώτης μειωτικής διαίρεσης** (φάση **MI**). Στη φάση αυτή το ωάριο δεν έχει ακόμη εκβάλει το πρώτο πολικό σωματίο, είναι ακόμη διπλοειδές ( $n = 46$ ) και επομένως δεν περιέχει τον αριθμό χρωμοσωμάτων που αποτελεί προϋπόθεση για τη φυσιολογική γονιμοποίηση (**Εικόνα 2.10B**).
- Ωριμο ωάριο σε **μετάφαση της δεύτερης μειωτικής διαίρεσης** (φάση **MII**). Το ωάριο στη φάση αυτή περιέχει τον απλοειδή αριθμό χρωμοσωμάτων ( $n = 23$ ), ενώ η δεύτερη ομάδα 23 χρωμοσωμάτων έχει αποβληθεί από το ωοκύτταρο ως το **πρώτο πολικό σωματίο (PB, polar body)**, ένα μικρό κύτταρο που εμφανίζεται στον περιλεκιθικό χώρο του ωαρίου. Η εκβολή του πρώτου πολικού σωματίου σηματοδοτεί την πυρηνική ωρίμαση του ωαρίου. Μόνο ώριμα ωάρια σε φάση MII είναι δυνατόν να αξιοποιηθούν κλινικά και να υποβληθούν σε ICSI (**Εικόνα 2.10Γ**).



**Εικόνα 2.10A** (αριστερά) Άωρο ωοκύτταρο, στο στάδιο του βλαστικού κυστιδίου. Η διάμετρος της διαφανούς ζώνης είναι περίπου 130  $\mu\text{m}$ .

**Εικόνα 2.10B** (κέντρο) Ωοκύτταρο σε μετάφαση της πρώτης μειωτικής διαίρεσης – φάση MI (χωρίς πολικό σωματίο).

**Εικόνα 2.10Γ** (δεξιά) Ωριμο ωάριο σε μετάφαση της δεύτερης μειωτικής διαίρεσης – φάση MII (εκβολή του πρώτου πολικού σωματίου, μικρού κυττάρου ορατού στον περιλεκιθικό χώρο στην 12<sup>η</sup> ώρα).

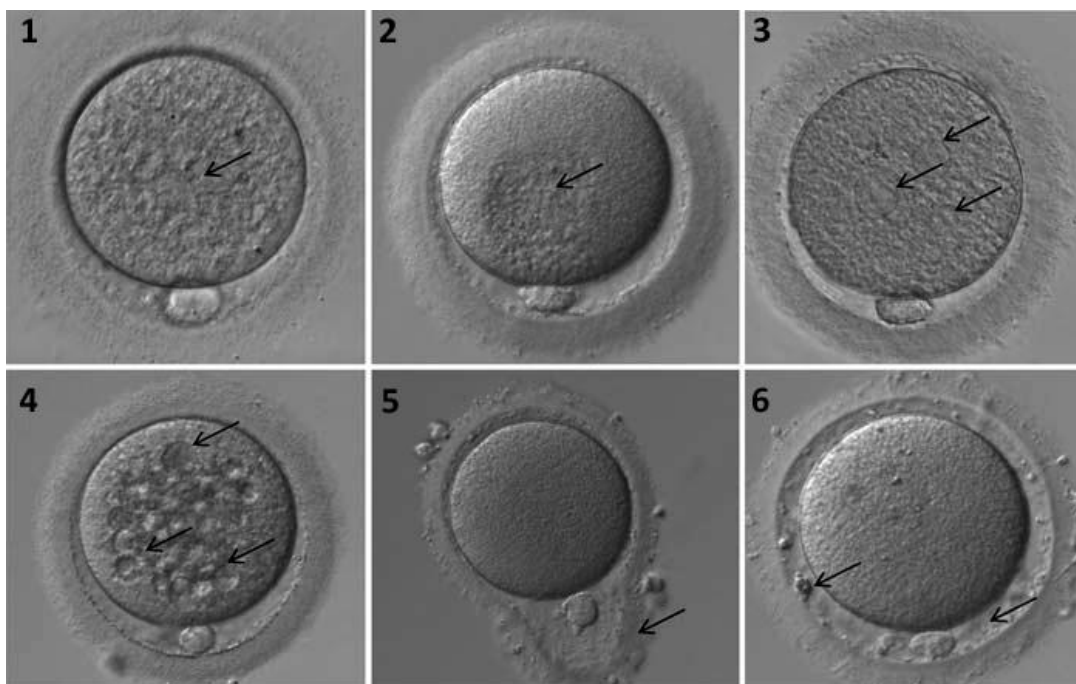
#### 2.4.7.4 Αξιολόγηση της ποιότητας των ωαρίων

Εκτός από την πυρηνική τους ωριμότητα, τα ωάρια ταξινομούνται ανάλογα με την ποιότητά τους σε τέσσερις κατηγορίες:

- Ποιότητα 1: λείο και ομοιογενές κυτταρόπλασμα, ακέραιο πολικό σωματίο, φυσιολογικό πάχος διαφανούς ζώνης.
- Ποιότητα 2: αδρό, ανομοιογενές κυτταρόπλασμα, θρυμματισμένο πολικό σωματίο, ελαττώματα της διαφανούς ζώνης.

- Ποιότητα 3: συνδυασμός δύο εκ των ανωτέρω χαρακτηριστικών ή έντονη παρουσία άλλων κυτταρικών βλαβών, όπως κυτταροπλασματικών κενотоπίων.
- Ποιότητα 4: συνύπαρξη στο ίδιο ωάριο 3 ή περισσότερων εκ των ανωτέρω χαρακτηριστικών.

Τα ωάρια είναι δυνατόν να εκδηλώνουν διάφορες μορφολογικές ατυπίες. Οι συνηθέστερες εξ αυτών συνοψίζονται στην **Εικόνα 2.11**.



**Εικόνα 2.11** Δομικές ατυπίες ωαρίων. 1: αδρή υφή κυτταροπλάσματος, 2: έντονη εστιακή αδρότητα κυτταροπλάσματος, 3: παρουσία στοιχείων λείου ενδοπλασματικού δικτύου (βέλη), 4: παρουσία κενотоπίων (βέλη), 5: ατυπία διαφανούς ζώνης, 6: κυτταρικά θραύσματα στον περιλεκιθικό χώρο (βέλη). Το πρώτο πολικό σώματιο είναι προσανατολισμένο στην 6<sup>η</sup> ώρα (τροποποιημένη από Rienzi *et al.*, 2011.).

## 2.4.8 Ωρίμαση ωαρίων *in vitro*

Η διαδικασία της *in vitro* ωρίμασης ωαρίων (*in vitro* maturation, IVM) περιλαμβάνει την μετάβαση των ωαρίων από την ανώριμη φάση σταδίου GV, στην ώριμη φάση μετάφασης II κατά την καλλιέργεια *in vitro*. Η τεχνική της IVM έχει περιγραφεί και χρησιμοποιηθεί κλινικά (Chang *et al.*, 2014). Στην παρούσα διατριβή η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για την διακρίβωση της τεχνικής της τεχνητής ενεργοποίησης των ωαρίων με τη χρήση ιονοφόρου ασβεστίου.

### 2.4.8.1 Υλικά

- Ηλεκτρική συσκευή αναρρόφησης Accu-jet<sup>®</sup> Pro.



- Δοκιμαστικό σωληνάριο 5 ml Falcon<sup>®</sup> 352054
- Τρυβλίο καλλιέργειας ωαρίων Falcon<sup>®</sup> 353653
- Τρυβλίο καλλιέργειας EmbryoSlide<sup>®35</sup> (Vitrolife, Göteborg, Sweden)
- Γυάλινα σιφώνια Pasteur
- Ογκομετρικά σιφώνια 10 ml (Nunc<sup>™</sup> 170356, ό.π.) και 5 ml (Nunc<sup>™</sup> 170355, ό.π.)
- Αυτόματη ογκομετρική πιπέτα (Transferpette<sup>®36</sup>, BrandTech Scientific, Germany)
- Αποστειρωμένα ρύγχη 200 µl (Graduated FilterTip<sup>37</sup>, Tip One, Starlab, UK)
- Συσκευή απογύμνωσης ωαρίων, ό.π.
- Πλαστικά ρύγχη απογύμνωσης ωαρίων διαμέτρου 175 µm, ό.π.
- Καλλιεργητικό σύστημα μέσων: ωρίµασης ωαρίων (SageMedia<sup>™</sup>, ART-1600<sup>38</sup>, Origio, Maløvn, Denmark), έκπλυσης ωαρίων (SageMedia<sup>™</sup>, ART-1600-<sup>A35</sup>) και ωρίµασης (SageMedia<sup>™</sup>, ART-1600-B<sup>35</sup>)
- Ρυθμιστικό αλατούχο διάλυμα φωσφορικών (DPBS, Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline) με MgCl<sub>2</sub> και CaCl<sub>2</sub> (D8662<sup>39</sup>, Sigma-Aldrich Inc. Saint Louis, Missouri, USA)
- Έλαιο παραφίνης Sage<sup>™</sup> Oil for Tissue Culture (Origio<sup>40</sup>)
- Κλίβανος για προθέρμανση των υλικών στους 37°C (Memmert).
- Επωαστικός κλίβανος (Xiltrix<sup>41</sup>) ο οποίος χρησιμοποιεί μείγμα αερίων (6% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>, 89% N<sub>2</sub>) και θερμοκρασία 37°C (IKS International)
- Μίγμα ανθρώπινων γοναδοτροπινών 75 IU rFSH-rLH (σκεύασμα Merional, ό.π.).
- Σύστημα επωαστικού κλιβάνου και κάμερας για φωτογράφιση χρονοδιολίσθησης Embryoscope<sup>®</sup> Time-Lapse System<sup>42</sup> (Vitrolife, Göteborg, Sweden)

#### 2.4.8.2 Διαδικασία

Ακολουθείται το πρωτόκολλο που περιγράφεται στο εγχειρίδιο του προϊόντος Sage IVM Media<sup>™</sup> (ό.π.). Η καλλιέργεια πραγματοποιείται στο σύστημα χρονοδιολίσθησης.

<sup>35</sup> <http://www.vitrolife.com/en/Products/EmbryoScope-Time-Lapse-System/EmbryoSlide-Culture-Dish/>

<sup>36</sup> <https://www.brandtech.com/product/transferpette/>

<sup>37</sup> <http://www.starlab.de/int/index.php?l=3&action=products&section=0&catalognode=56847#>

<sup>38</sup> <http://www.origio.com/products/sage-in-vitro-maturation-media-ivm/>

<sup>39</sup> [http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/d8662?lang=en&region=GR&gclid=Cj0KEQiAguXBBRCE\\_pbQ5reuq8MBEiQANji2LbENgcqgXpiPEdQg8\\_55B4kl6YC0AzMUhfvBBebJF0IaAuP48P8HAQ](http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/d8662?lang=en&region=GR&gclid=Cj0KEQiAguXBBRCE_pbQ5reuq8MBEiQANji2LbENgcqgXpiPEdQg8_55B4kl6YC0AzMUhfvBBebJF0IaAuP48P8HAQ)

<sup>40</sup> <http://www.origio.com/products/oil-for-tissue-culture/>

<sup>41</sup> <http://www.iksinternational.com/en/category/co-o-incubators/4>

<sup>42</sup> <http://www.vitrolife.com/en/Products/EmbryoScope-Time-Lapse-System/EmbryoScope-Time-Lapse-System/>

- Σε δοκιμαστικό σωληνάριο των 5 ml, με ογκομετρικό σιφόνιο των 5 ml και με τη βοήθεια ηλεκτρικής συσκευής αναρρόφησης, τοποθετούνται 2 ml καλλιεργητικού μέσου έκπλυσης ωαρίων (ART-1600-A). Το δοκιμαστικό σωληνάριο τοποθετείται στον κλίβανο προθέρμανσης Memmert για 1 h τουλάχιστον.
- Το περιεχόμενο του σωληναρίου των 75 IU rFSH/rLH μεταφέρεται σε δοκιμαστικό σωληνάριο των 10 ml, προστίθενται 10 ml DPBS και ακολουθεί ανάδευση μέχρι πλήρους διάλυσης της φαρμακευτικής κόνεως (διάλυμα Α).
- Στο δοκιμαστικό σωληνάριο των 5 ml τοποθετούνται 990 μl καλλιεργητικού μέσου ωρίμασης (ART-1600-B) και 10 μl διαλύματος Α, έτσι ώστε να προκύψει συγκέντρωση 75mIU FSH και 75mIU LH στο τελικό διάλυμα ωρίμασης (διάλυμα Β).
- Με τη βοήθεια της αυτόματης ογκομετρικής πιπέτας και με αποστειρωμένο ρύγχος τοποθετούνται 29,8 μl διαλύματος Β σε κάθε βοθρίο του τρυβλίου EmbryoSlide®.
- Αφού πληρωθούν και τα 12 βοθρία του τρυβλίου, το τρυβλίο επικαλύπτεται με 1,4 ml ελαίου παραφίνης.
- Το τρυβλίο τοποθετείται για τουλάχιστον 4 h στον επωαστικό κλίβανο Xiltrix.
- Το προθερμασμένο καλλιεργητικό μέσον έκπλυσης των ωαρίων μεταφέρεται με γυάλινο σιφόνιο Pasteur σε τρυβλίο επώασης ωαρίων.
- Τα απογυμνωμένα άωρα ωάρια σταδίου GV μεταφέρονται στο τρυβλίο που περιέχει το καλλιεργητικό μέσο έκπλυσης και πλένονται σχολαστικά σε 3-4 διαφορετικά σημεία του τρυβλίου.
- Στη συνέχεια, τα ωάρια τοποθετούνται με τη βοήθεια της συσκευής Stripper και αποστειρωμένο ρύγχος διαμέτρου 175μm στο τρυβλίο EmbryoSlide®, το οποίο βρίσκεται στον επωαστικό κλίβανο Xiltrix. Μεταφέρεται από ένα ωάριο σε κάθε ένα από τα 12 βοθρία του τρυβλίου και το τρυβλίο τοποθετείται στο σύστημα Embryoscope®.
- Μετά την πάροδο 24 h καλλιέργειας ελέγχεται η πορεία ωρίμασης των ωαρίων. Ωάρια που έχουν προχωρήσει σε φάση ΜΙ ή ΜΙΙ αναγνωρίζονται και καταγράφονται. Απώτερος στόχος είναι η ωρίμαση των ωαρίων μέχρι τη φάση ΜΙΙ, αναγνωρίσιμη από την παρουσία του πρώτου πολικού σωματίου.

## 2.4.9 Μικρογονιμοποίηση

Η εφαρμογή της μικρογονιμοποίησης κρίθηκε επιβεβλημένη σε όλα τα ωάρια της μελέτης για προφανείς λόγους ομοιομορφίας και επαναληψιμότητας, δεδομένου ότι υπήρχαν ζευγάρια που υποβλήθηκαν σε εξωσωματική γονιμοποίηση με ICSI λόγω ανδρικού παράγοντα υπογονιμότητας. Η διαδικασία του ICSI εφαρμόστηκε όπως έχει περιγραφεί (Palermo *et al.*, 1992).

### 2.4.9.1 Υλικά

- Γυάλινο μικροσιφώνιο συγκράτησης (Holding Pipette SHP-90-35<sup>43</sup>, Sunlight Medical, FL, USA).
- Γυάλινο μικροσιφώνιο έγχυσης (Injection Pipette SIC-45V-35L ό.π., Sunlight Medical, FL, USA).
- Τρυβλίο Nunc™ IVF ICSI Dish<sup>44</sup> (Thermo Scientific, Roskilde, Denmark)
- Τρυβλίο καλλιέργειας EmbryoSlide® (ό.π.)
- Ογκομετρικά σιφώνια 10 ml (Nunc™ 170356, ό.π.)
- Αποστειρωμένα ρύγχη (ό.π.)
- Συσκευή απογύμνωσης ωαρίων (ό.π.) με πλαστικά αποστειρωμένα ρύγχη απογύμνωσης ωαρίων διαμέτρου 175 μm.
- Ηλεκτρική συσκευή αναρρόφησης (ό.π.)
- Διάλυμα πολυβινυλοπυρρολιδόνης ιξώδους 7% (PVP<sup>45</sup>, Origio, Måløv, Denmark).
- Καλλιεργητικό μέσο SAGE 1-Step™.
- Έλαιο παραφίνης Sage™ Oil for Tissue Culture (Origio)
- Ανεστραμμένο αναλυτικό μικροσκόπιο Nikon Diaphot 300 (Nikon, Japan) εφοδιασμένο με μικροχειριστήρια Nikon Narishige MM188 (Nikon, Japan) και συστήματα μικροχειρισμού αέρος RI SAS™ (RI Ltd., Cornwall, UK).
- Θάλαμος εργασίας σταθερής ροής CO<sub>2</sub> και θερμοκρασίας 37°C, emCell-S (ό.π.).
- Κλίβανος προθέρμανσης υλικών στους 37°C (Memmert).
- Επωαστικός κλίβανος Xiltrix.
- Σύστημα Embryoscope® (ό.π.).

<sup>43</sup> <https://www.sunlight-medical.com/pipettecodes/>

<sup>44</sup> <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/150265>

<sup>45</sup> <http://www.origio.com/products/pvp-medium/>

#### 2.4.9.2 Διαδικασία

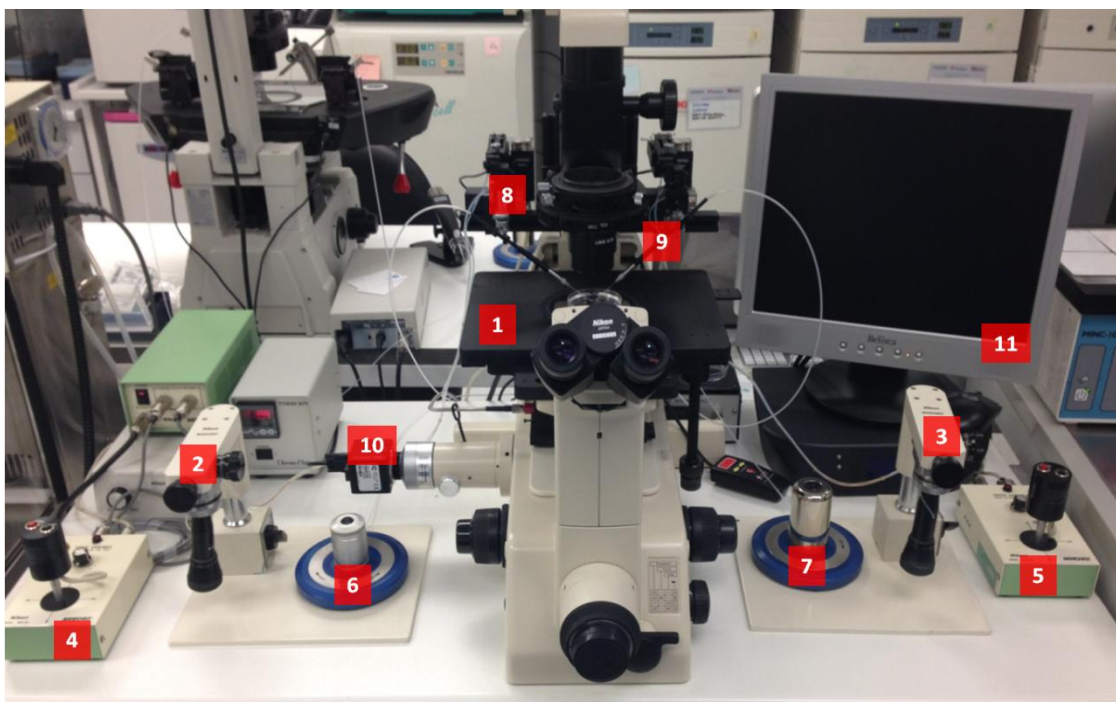
- Προετοιμάζεται ένα τρυβλίο καλλιέργειας εμβρύων EmbryoSlide<sup>®</sup>, όπως παραπάνω και τοποθετείται για τουλάχιστον 3-4 h προς επώαση στον κλίβανο Xiltrix.
- Προετοιμάζεται ένα τρυβλίο μικρογονιμοποίησης (ICSI), με μία μικροσταγόνα 30 µl PVP (το οποίο, λόγω του αυξημένου ιζώδους του μειώνει την ταχύτητα των σπερματοζωαρίων, διευκολύνοντας την επιλογή τους, βλ. Palermo *et al.*, 1993). Περιμετρικά της σταγόνας του PVP τοποθετούνται 4-6 μικροσταγόνες όγκου 20 µl καλλιεργητικού μέσου SAGE 1-Step<sup>™</sup>.
- Οι σταγόνες επικαλύπτονται με ικανή ποσότητα ελαίου παραφίνης.
- Το τρυβλίο προθερμαίνεται στον κλίβανο Memmert τουλάχιστον επί 2 h.
- Στον αριστερό βραχίονα του συστήματος μικροχειρισμών Narishige, προσαρμόζεται το γυάλινο μικροσιφόνιο συγκράτησης και στον δεξιό βραχίονα το μικροσιφόνιο έγχυσης. Σε μικρή μεγέθυνση, τα άκρα των δύο μικροσιφονίων ευθυγραμμίζονται.
- Στην επιφάνεια της σταγόνας του PVP τοποθετούνται 5-10 µl (ανάλογα με τη συγκέντρωση σπερματοζωαρίων) από το παρασκευασμένο δείγμα σπέρματος.
- Στη συνέχεια, σε κάθε μικροσταγόνα μέσου τοποθετείται από ένα απογυμνωμένο ώριμο ωάριο (φάσης MII) και το τρυβλίο ICSI μεταφέρεται στη θερμαινόμενη τράπεζα του ανεστραμμένου μικροσκοπίου.
- Με τη βοήθεια του μικροχειριστηρίου και σε μεγάλη μεγέθυνση, το μικροσιφόνιο έγχυσης βυθίζεται στη σταγόνα του PVP. Τα μορφολογικώς βέλτιστα σπερματοζωάρια κινούνται αργά στις παρυφές της σταγόνας. Ένα μορφολογικώς φυσιολογικό σπερματοζωάριο με καλή προωθητική κινητικότητα ακινητοποιείται με θραύση του μαστιγίου στο μέσον του, με το μικροσιφόνιο.
- Η ακινητοποίηση του σπερματοζωαρίου εξυπηρετεί δύο σκοπούς:

1 Πρώτον, η λύση της συνέχειας της κυτταροπλασματικής μεμβράνης του σπερματοζωαρίου επιτρέπει την αλληλεπίδρασή του με παράγοντες του ωοπλάσματος μετά την έγχυσή του: αυτό μιμείται τη φυσιολογική σύντηξη των μεμβρανών, που σηματοδοτεί την έναρξη της ενεργοποίησης του ωαρίου και της γονιμοποίησης (Dozortsev *et al.*, 1995 και Palermo *et al.*, 1996).

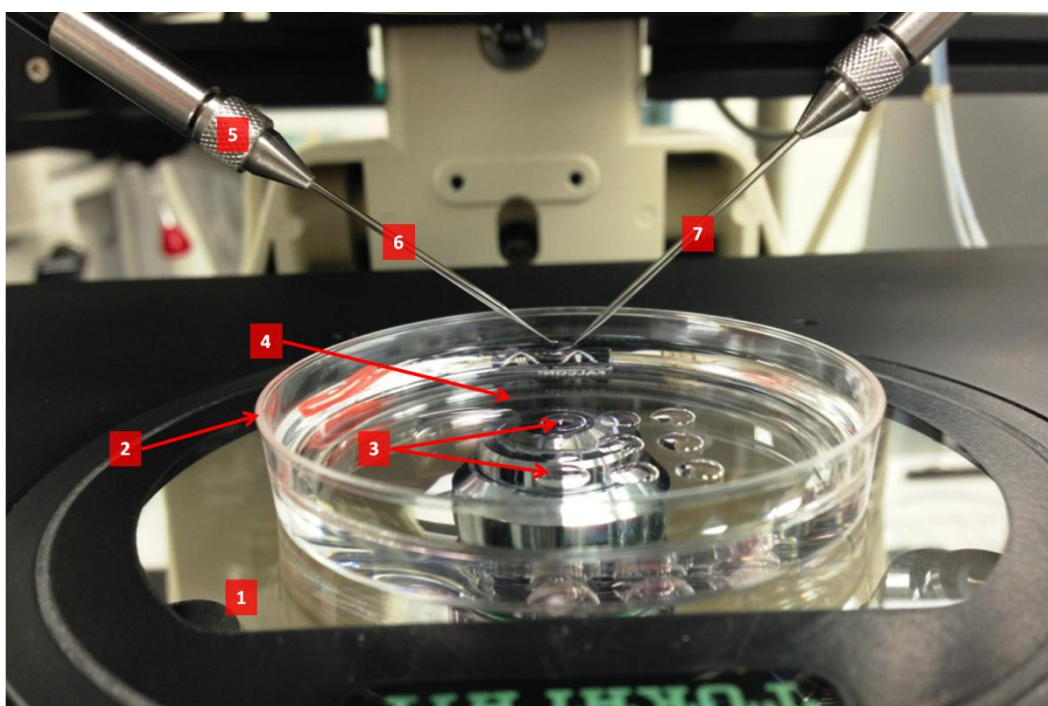
2 Δεύτερον, η θραύση του μαστιγίου αποτρέπει οριστικά οποιαδήποτε κίνηση του σπερματοζωαρίου μέσα στο ωόπλασμα και προλαμβάνει κάθε συνακόλουθη βλάβη στην εσωτερική οργάνωση του ωοκυττάρου (π.χ. στον κυτταροσκελετό).

- Με τη βοήθεια της μικροσύριγγας αναρρόφησης και ασκώντας ελάχιστη αρνητική πίεση αέρα, το σπερματοζώαριο αναρροφάται από το μαστίγιο στον αυλό του μικροσιφωνίου έγχυσης μαζί με ελάχιστο όγκο PVP και η θέση του ρυθμίζεται έτσι ώστε η κεφαλή να βρίσκεται πολύ κοντά στο άκρο του μικροσιφωνίου.
- Στη συνέχεια, το τρυβλίο μετακινείται, προκειμένου μια μικροσταγόνα που περιέχει ένα προς γονιμοποίηση ωάριο να φανεί στο οπτικό πεδίο.
- Με τη βοήθεια της μικροσύριγγας αναρρόφησης και ασκώντας ελάχιστη αρνητική πίεση αέρος, το ωάριο αναρροφάται και ακινητοποιείται πάνω στο μικροσιφώνιο συγκράτησης. Ο προσανατολισμός του διευθετείται έτσι ώστε το πρώτο πολικό σωματίο να βρίσκεται στη δωδεκάτη ώρα.
- Στη συνέχεια, το μικροσιφώνιο έγχυσης που περιέχει το σπερματοζώαριο φέρεται πλησίον του ακινητοποιημένου ωαρίου και σε επαφή με τη διαφανή ζώνη στην τρίτη ώρα. Μέσω της μικροσύριγγας έγχυσης, η κεφαλή μετακινείται στο άκρο του μικροσιφωνίου.
- Με τη βοήθεια του μικροχειριστηρίου, το μικροσιφώνιο έγχυσης ωθείται διαπερνώντας τη διαφανή ζώνη προς το ωόπλασμα, συμπαρασύροντας το ωόλημμα (που έχει μεγάλη ελαστικότητα και δεν ρήγνυται, αλλά απλώς παραμορφώνεται).
- Ασκώντας αρνητική πίεση μέσω του μικροσιφωνίου έγχυσης, προκαλείται ρήξη του ωολήμματος και αναρρόφηση μικρής ποσότητας ωοπλάσματος. Τότε, ασκείται σταδιακά θετική πίεση μέσω της μικροσύριγγας έγχυσης, μέχρις ότου η αναρροφηθείσα ποσότητα κυτταροπλάσματος και το ακινητοποιημένο σπερματοζώαριο να εγχυθούν περίπου στο μέσον του ωοπλάσματος.
- Τέλος, με προσεκτική και αργή κίνηση, το μικροσιφώνιο έγχυσης αποσύρεται και το ωάριο αποδεσμεύεται από το μικροσιφώνιο συγκράτησης ασκώντας ελαφρά θετική πίεση μέσω της μικροσύριγγας συγκράτησης.
- Η παραπάνω διαδικασία επαναλαμβάνεται για κάθε ώριμο ωάριο.
- Όταν ολοκληρωθεί η έγχυση σε όλα τα ωάρια, αυτά πλένονται σε καλλιεργητικό μέσον SAGE 1-Step™ και μεταφέρονται, ανά ένα, στα βοθρία του EmbryoSlide®.
- Το τρυβλίο τοποθετείται στο σύστημα Embryoscope® για παρακολούθηση.

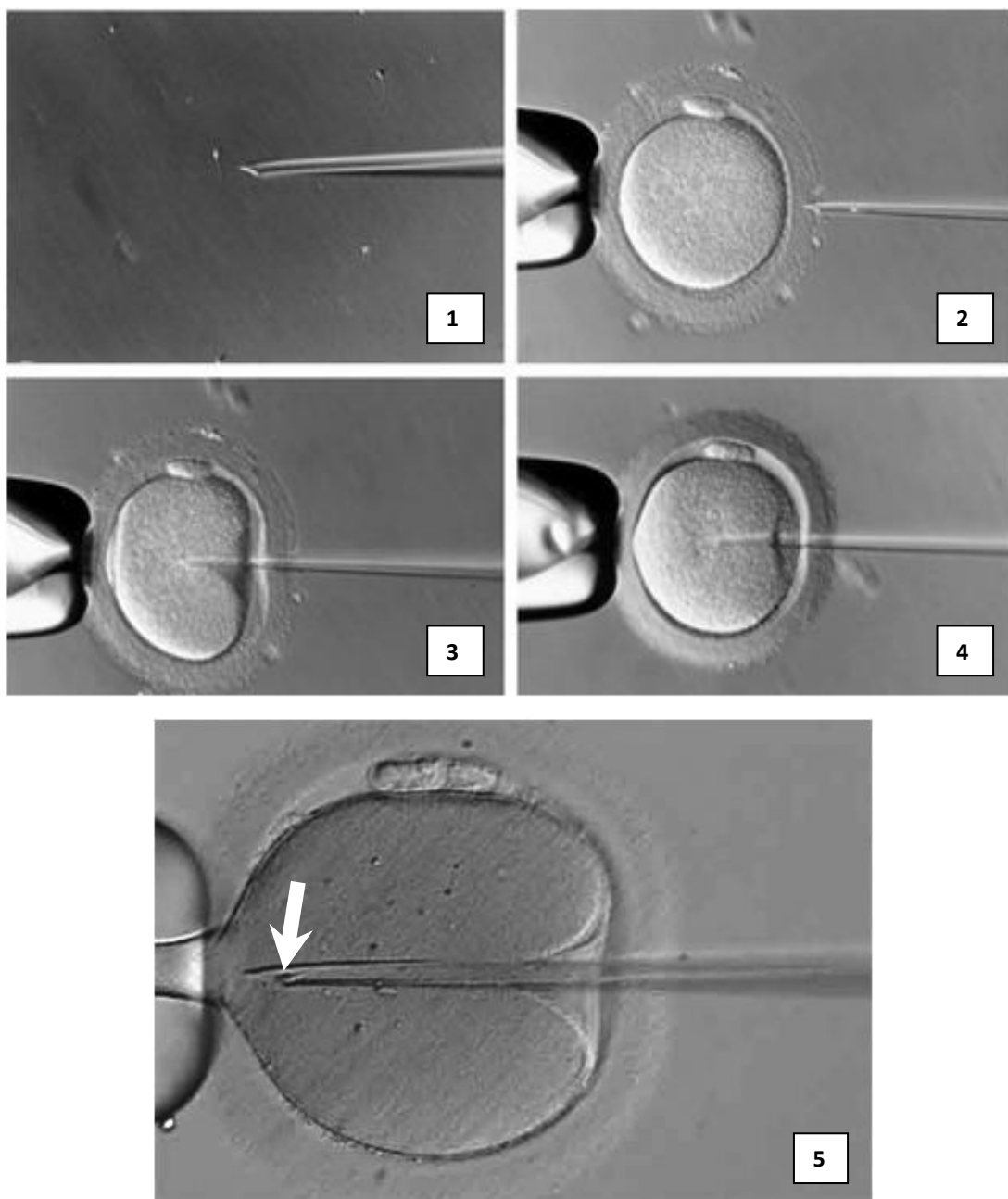
Η θέση εργασίας και η προετοιμασία για την ICSI απεικονίζονται αντίστοιχα στις **Εικόνες 2.12** και **2.13**. Η επιλογή και η έγχυση του σπερματοζωαρίου στην ICSI εκτελούνται από πιστοποιημένο κλινικό εμβρυολόγο. Οι φάσεις της διαδικασίας απεικονίζονται στην **Εικόνα 2.14**.



**Εικόνα 2.12 Θέση εργασίας για τη μικρογονιμοποίηση.** 1: ανεστραμμένο μικροσκόπιο με θερμαινόμενη τράπεζα, 2: υδραυλικό μικροχειριστήριο για τον λεπτό έλεγχο της κίνησης του μικροσιφωνίου συγκράτησης, 3: υδραυλικό μικροχειριστήριο για τον λεπτό έλεγχο της κίνησης του μικροσιφωνίου έγχυσης, 4: ηλεκτρομηχανικό χειριστήριο για τον αδρό έλεγχο της κίνησης του μικροσιφωνίου συγκράτησης, 5: ηλεκτρομηχανικό χειριστήριο για τον αδρό έλεγχο της κίνησης του μικροσιφωνίου έγχυσης, 6: μικροσύριγγα αέρος για τη λειτουργία του μικροσιφωνίου συγκράτησης, 7: μικροσύριγγα αέρος για τη λειτουργία του μικροσιφωνίου έγχυσης, 8: αρθρωτός κοχλίας ελέγχου της κίνησης 9: βραχίονας στήριξης μικροσιφωνίου, 10: ψηφιακή κάμερα, 11: οθόνη.



**Εικόνα 2.13 Προετοιμασία για τη μικρογονιμοποίηση.** 1: θερμαινόμενη τράπεζα, 2: τρυβλίο ICSI, 3: μικροσταγόνες καλλιεργητικού μέσου, 4: έλαιο παραφίνης, 5: βραχίονας στήριξης μικροσιφωνίου, 6: μικροσιφώνιο συγκράτησης του ωαρίου, 7: μικροσιφώνιο έγχυσης σπερματοζωαρίου.



**Εικόνα 2.14** Φάσεις της μικρογονιμοποίησης. 1: θραύση του μαστιγίου του σπερματοζωαρίου, 2: ακινητοποίηση του ωαρίου, 3: διάτρηση της διαφανούς ζώνης (το ωόλημμα παραμορφώνεται), 4: αναρρόφηση και θραύση του ωολήμματος (διακρίνεται η εκτόνωση της τάσης του). 5: έγχυση του σπερματοζωαρίου. Η κεφαλή διακρίνεται μέσα στο μικροσιφόνιο έγχυσης (λευκό βέλος).

#### 2.4.10 Καλλιέργεια και παρακολούθηση με απεικόνιση χρονοδιολίσθησης

Η τεχνολογία καλλιέργειας ωαρίων και εμβρύων στον επωαστικό κλίβανο χρονοδιολίσθησης Embryoscope<sup>®</sup>, στηρίζεται στην λήψη διαδοχικών φωτογραφιών σε τακτά χρονικά διαστήματα. Τα ωάρια ή τα έμβρυα επωάζονται σε διαφορετικά επίπεδα και

βάθη εστίασης. Προκειμένου να ληφθούν οι εικόνες, τα επωαζόμενα ωάρια ή έμβρυα φωτίζονται στιγμιαία με μονοχρωματικό ερυθρό φως LED μήκους κύματος 635 nm. Αισθητήρες της συσκευής διασφαλίζουν ότι η έκθεση των ωαρίων ή εμβρύων στο φως δεν είναι υπερβολική. Ο επωαστικός κλιβάνος του συστήματος Embryoscope® φέρει ενσωματωμένο μικροσκόπιο με αντικειμενικό φακό 20×0,4 LWD με διαμόρφωση Hoffman. Η καλλιέργεια πραγματοποιείται στα ειδικά τρυβλία EmbryoSlide® πολλαπλών βοθρίων (Εικόνα 2.15).



**Εικόνα 2.15** Ειδικό τρυβλίο EmbryoSlide® με 12 βοθρία καλλιέργειας.

Το σύστημα λαμβάνει μία εικόνα του επωαζόμενου ωαρίου ή εμβρύου ανά 10 min, η οποία ψηφιοποιείται και αποθηκεύεται. Η εικόνα λαμβάνεται σε 7 διαφορετικά εστιακά επίπεδα, τα οποία και την συνθέτουν. Με τον τρόπο αυτό προκύπτουν περίπου 1.000 εικόνες ανά ημέρα επώασης για το κάθε ωάριο ή έμβρυο. Το σύστημα Embryoscope® (Εικόνα 2.16) μπορεί να συλλέξει εικόνες από 72 ωάρια ή έμβρυα ταυτόχρονα. Ο συνολικός χρόνος έκθεσης στο ερυθρό φως είναι μόλις 31 s ημερησίως για κάθε ωάριο ή έμβρυο, πολύ μικρότερος του χρόνου έκθεσης στο φως του μικροσκοπίου κατά την παραδοσιακή εξέταση των εμβρύων, ενώ παράλληλα αποφεύγεται και η μετακίνηση του τρυβλίου εκτός του κλιβάνου, η οποία προφανώς προκαλεί μεταβολές της θερμοκρασίας της καλλιέργειας.

Το σύστημα χρησιμοποιεί ένα εξειδικευμένο λογισμικό, με το οποίο οι εικόνες που έχουν συλλεγεί από κάθε ωάριο ή έμβρυο συντίθενται και δημιουργούν ένα βίντεο χρονοδιολίσθησης, που παρουσιάζει όλα τα αναπτυξιακά στάδια, από τη γονιμοποίηση του



ωαρίου μέχρι και το στάδιο της βλαστοκύστης. Μάλιστα, οι εικόνες έχουν εξαιρετική ευκρίνεια και αντικατοπτρίζουν με ακρίβεια τα αναπτυξιακά γεγονότα.



**Εικόνα 2.16 Παρακολούθηση καλλιέργειών στο σύστημα χρονοδιολίσθησης Embryoscope®.** Αριστερά: το εγκατεστημένο σύστημα στο εργαστήριο. Δεξιά: έλεγχος της αναπτυξιακής πορείας.

Κατά την *in vitro* ωρίμαση ενός ωαρίου είναι δυνατόν να παρατηρηθεί η εκβολή του πρώτου πολικού σωματίου. Μετά την ICSI, παρατηρούνται όλες οι φάσεις της γονιμοποίησης, οι πρώτες μιτώσεις της αυλάκωσης, ο σχηματισμός του μοριδίου και της βλαστοκύστης.

Τέλος η τεχνολογία αυτή επιτρέπει, βάσει συγκεκριμένων αναπτυξιακών κριτηρίων και δεικτών που έχουν αξιολογηθεί πειραματικά, να επιλεγούν με μεγαλύτερη ασφάλεια τα έμβρυα που μπορεί να οδηγήσουν σε βιώσιμη εγκυμοσύνη (Cetinkaya *et al.*, 2015b).

#### 2.4.10.1 Υλικά

- Τρυβλίο καλλιέργειας EmbryoSlide® (ό.π.)
- Ογκομετρικά σιφόνια 10 ml (Nunc™ 170356, ό.π.)
- Αποστειρωμένα ρύγχη (ό.π.)
- Συσκευή απογύμνωσης ωαρίων (ό.π.) με πλαστικά αποστειρωμένα ρύγχη απογύμνωσης ωαρίων διαμέτρου 175 μm.
- Ηλεκτρική συσκευή αναρρόφησης (ό.π.)
- Αυτόματη ογκομετρική πιπέτα (ό.π.)
- Καλλιεργητικό μέσο SAGE 1-Step™.
- Έλαιο παραφίνης Sage™ Oil for Tissue Culture (Origio)
- Θάλαμος εργασίας σταθερής ροής CO<sub>2</sub> και θερμοκρασίας 37°C, emCell-S (ό.π.).

- Επωαστικός κλίβανος Xiltrix.
- Σύστημα Embryoscope<sup>®</sup> (ό.π.).

#### 2.4.10.2 Διαδικασία

- Με τη βοήθεια της αυτόματης ογκομετρικής πιπέτας και αποστειρωμένου ρύγχους τοποθετούνται 29,8 µl καλλιεργητικού μέσου SAGE 1-Step<sup>™</sup> σε καθένα από τα 12 βοθρία του τρυβλίου EmbryoSlide<sup>®</sup>.
- Το καλλιεργητικό μέσον επικαλύπτεται με 1,4 ml έλαιο παραφίνης με τη βοήθεια της ηλεκτρικής συσκευής αναρρόφησης και πλαστικού ογκομετρικού σιφωνίου 10 ml.
- Το τρυβλίο επωάζεται για 3-4 h στον επωαστικό κλίβανο Xiltrix προκειμένου να εξισορροπηθεί το pH και η θερμοκρασία του καλλιεργητικού μέσου.
- Το τρυβλίο μεταφέρεται στον επωαστικό θάλαμο επώασης emCell-S όπου διατηρούνται σταθερές συνθήκες CO<sub>2</sub> και θερμοκρασία 37°C.
- Με τη βοήθεια της συσκευής απογύμνωσης και αποστειρωμένο ρύγχος διαμέτρου 175 µm, ένα ωάριο ή έμβρυο τοποθετείται σε κάθε βοθρίο του τρυβλίου EmbryoSlide<sup>®</sup> και διευθετείται με μικρές κινήσεις της συσκευής απογύμνωσης στο κέντρο του βοθρίου.
- Το τρυβλίο EmbryoSlide<sup>®</sup> τοποθετείται στο σύστημα χρονοδιολίσθησης Embryoscope<sup>®</sup> σύμφωνα με το εγχειρίδιο του κατασκευαστή<sup>46</sup>.
- Ακολουθεί η διαδικασία εστιασμού του οπτικού συστήματος για κάθε βοθρίο.
- Η μονάδα καταγραφής αρχίζει να καταγράφει εικόνες ανά 10 min. Το πρώτο βίντεο είναι διαθέσιμο στη μονάδα ανάλυσης και επεξεργασίας της εικόνας 30 min αργότερα.
- Η καταγραφή των εικόνων λαμβάνει χώρα ως εξής:
  - 1 Τα ωάρια σταδίου GV τα οποία έχουν υποστεί ωρίμαση *in vitro*, επωάζονται 24 h.
  - 2 Τα ώριμα ωάρια φάσης MII που υφίστανται τεχνητή ενεργοποίηση με ιονοφόρο ασβεστίου επωάζονται περαιτέρω επί 18-24 h.
  - 3 Τα ωάρια των ασθενών επωάζονται επί 18-20 h μέχρι την αξιολόγηση της γονιμοποίησής τους.

---

<sup>46</sup> <https://pri.rn.dk/Assets/9416/User-manual-ES-D-vers-2-10.pdf>

4 Τα μη γονιμοποιημένα ωάρια από το κλινικό πρόγραμμα ICSI και τα οποία προορίζονται για τις πειραματικές ομάδες της μελέτης υφίστανται τεχνητή ενεργοποίηση με βραχυχρόνια έκθεση στον ιονοφόρο ασβεστίου και ύστερα επωάζονται επί 5 ημέρες.

Τα αποτελέσματα των παραπάνω διαδικασιών καταγράφονται ως βίντεο διάρκειας 3-5 min στον σκληρό δίσκο της μονάδας καταγραφής δεδομένων του συστήματος Embryoscope®.

## 2.4.11 Τεχνητή ενεργοποίηση ωαρίων από ωρίμαση *in vitro* με τον ιονοφόρο ασβεστίου A23187

### 2.4.11.1 Υλικά

- Τρυβλίο καλλιέργειας EmbryoSlide® (ό.π.)
- Τρυβλίο καλλιέργειας εμβρύων Falcon® 353037 (ό.π.).
- Ογκομετρικά σιφόνια 10 ml και 5 ml Nunc™ (ό.π.).
- Δοκιμαστικό σωληνάριο 5 ml (ό.π.)
- Ηλεκτρική συσκευή αναρρόφησης (ό.π.).
- Αυτόματη ογκομετρική πιπέτα (ό.π.) και αποστειρωμένα ρύγχη (ό.π.)
- Συσκευή απογύμνωσης ωαρίων (ό.π.) με πλαστικά αποστειρωμένα ρύγχη απογύμνωσης διαμέτρου 175 μm.
- Ιονοφόρος ασβεστίου A23187 1 mg (C7522<sup>47,48</sup>, Sigma-Aldrich Inc. Saint Louis, Missouri, USA).
- Διμεθυλοσουλφοξείδιο (D2650<sup>49,50</sup> DMSO-Dimethyl Sulfoxide (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO, Sigma-Aldrich Inc. Saint Louis, Missouri, USA).
- Καλλιεργητικό μέσο SAGE 1-Step™ (ό.π.).
- Έλαιο παραφίνης Sage™ Oil for Tissue Culture (Origio, ό.π.)
- Πρωτεϊνικό συμπλήρωμα υποκατάστασης ορού (SSS, Irvine Scientific, ό.π.).
- Καλλιεργητικό μέσο Human Tubal Fluid (HTF medium 90125<sup>51,52</sup>, Irvine Scientific, Santa Ana, CA, USA).

<sup>47</sup> <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/c7522?lang=en&region=GR>

<sup>48</sup> <http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Datasheet/3/c7522dat.pdf>

<sup>49</sup> <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/d2650?lang=en&region=GR>

<sup>50</sup> [http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product\\_Information\\_Sheet/d2650pis.pdf](http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/d2650pis.pdf)

<sup>51</sup> <http://www.irvinesci.com/products/90125-htf-medium-with-gentamicin?dpt=Assisted+Reproductive+Technology>

- Ηλεκτρονικό χρονόμετρο (Casio Computer Co Ltd, Japan).
- Κλίβανος προθέρμανσης υλικών 37°C Memmert.
- Επωαστικός κλίβανος MINC™-1000 (ό.π.).
- Επωαστικός κλίβανος Xiltrix (ό.π.).
- Θάλαμος εργασίας σταθερής ροής CO<sub>2</sub> και θερμοκρασίας 37°C, emCell-S (ό.π.).
- Σύστημα Embryoscope® (ό.π.).

#### 2.4.11.2 Διαδικασία

- Με τη βοήθεια της ηλεκτρικής συσκευής αναρρόφησης και ογκομετρικό σιφώνιο 5 ml, προστίθεται 1 ml DMSO στο φιαλίδιο που περιέχει 1 mg ιονοφόρου ασβεστίου, ώστε να επιτύχουμε τελική συγκέντρωση 1 mg/ml ιονοφόρου ασβεστίου σε DMSO (πυκνό διάλυμα, φυλάσσεται στους -20°C μέχρι 3 μήνες, προστατευμένο από το φως).
- Από το παραπάνω διάλυμα, ποσότητα 26 µl αραιώνεται σε δοκιμαστικό σωληνάριο των 10 ml με 9,974 ml μέσου HTF που περιέχει 10% SSS (διάλυμα εργασίας), ώστε να επιτύχουμε τελικό διάλυμα 5 µM ιονοφόρου.
- Σε τρυβλίο καλλιέργειας εμβρύων (τρυβλίο A) τοποθετούνται 6-7 μικροσταγόνες του διαλύματος εργασίας όγκου 50 µl με την αυτόματη πιπέτα ογκομέτρησης και αποστειρωμένο ρύγχος. Οι μικροσταγόνες υπερκαλύπτονται με 9 ml ελαίου παραφίνης, με τη βοήθεια της ηλεκτρικής συσκευής αναρρόφησης και πλαστικού ογκομετρικού σιφονίου των 10 ml.
- Προετοιμάζεται δεύτερο όμοιο τρυβλίο (τρυβλίο B) με μικροσταγόνες 50 µl καλλιεργητικού μέσου HTF + 10% SSS, χωρίς προσθήκη ιονοφόρου ασβεστίου.
- Τα τρυβλία A και B προθερμαίνονται στον κλίβανο Memmert στους 37°C επί 2 h.
- Ωάρια που έχουν ωριμάσει *in vitro* μεταφέρονται με τη βοήθεια της συσκευής απογύμνωσης με ρύγχος διαμέτρου 175 µm από τον κλίβανο MINC™-1000 σε μία μικροσταγόνα του τρυβλίου A.
- Τα ωάρια επωάζονται στον κλίβανο Memmert επί 10 min ακριβώς (χρονομέτρηση με το ηλεκτρονικό χρονόμετρο) και στη συνέχεια μεταφέρονται σε μια μικροσταγόνα του τρυβλίου B. Με ήπιες κινήσεις τα ωάρια πλένονται σε 2-3

---

<sup>52</sup> <http://gonagen.com/documents/9922-90125-90126-HTF-mHTF-medium-with-gentamicin.pdf>

διαφορετικά σημεία της μικροσταγόνας με τη βοήθεια της συσκευής απογύμνωσης. Η πλύση επαναλαμβάνεται 5-6 φορές σε διαφορετική μικροσταγόνα του τρυβλίου B.

Όλες οι κινήσεις μεταφοράς των ωαρίων πραγματοποιούνται στον θάλαμο εργασίας emCell-S. Με την ολοκλήρωση της διαδικασίας, τα ωάρια μεταφέρονται σε τρυβλίο EmbryoSlide<sup>®</sup> προκειμένου η εξέλιξή τους να καταγραφεί στο σύστημα χρονοδιολίσθησης, όπως περιγράφεται παραπάνω.

#### **2.4.12 Τεχνητή ενεργοποίηση με τον ιονοφόρο ασβεστίου A23187, ωαρίων που δεν γονιμοποιήθηκαν ύστερα από ICSI**

Η διαδικασία αυτή αποτέλεσε και τον κύριο όγκο εργασίας για την παρούσα διδακτορική διατριβή.

##### **2.4.12.1 Υλικά**

Χρησιμοποιούνται ίδια υλικά με εκείνα της προηγούμενης παραγράφου 2.4.11.1.

##### **2.4.12.2 Διαδικασία**

Σε όλα τα ωάρια των ζευγαριών που συμμετέχουν στην παρούσα μελέτη εφαρμόζεται ICSI και ακολουθεί επώαση στο σύστημα χρονοδιολίσθησης Embryoscope<sup>®</sup> όπως περιγράφεται παραπάνω. Το βίντεο των ωαρίων που έχει αποθηκευτεί στη μονάδα ανάλυσης και επεξεργασίας εικόνας του συστήματος Embryoscope<sup>®</sup> αναλύεται 18 h μετά την ICSI. Ως μη γονιμοποιημένα κατατάσσονται τα ωάρια των ασθενών τα οποία, κατά τον συγκεκριμένο χρόνο, εμφανίζουν ακόμη μόνον ένα πολικό σωματίο χωρίς προπυρήνα. Στα ωάρια αυτά εφαρμόζεται τεχνητή ενεργοποίηση με έκθεση στον ιονοφόρο ασβεστίου A23187. Όλες οι κινήσεις μεταφοράς των ωαρίων πραγματοποιούνται στον θάλαμο εργασίας emCell-S. Τα βήματα της διαδικασίας έχουν ως εξής:

- Το τρυβλίο EmbryoSlide<sup>®</sup> αφαιρείται από το σύστημα Embryoscope<sup>®</sup> και τα μη γονιμοποιημένα ωάρια συλλέγονται με τη συσκευή απογύμνωσης και ρύγχος διαμέτρου 175 μm.
- Τα ωάρια τοποθετούνται σε τρυβλίο με καλλιεργητικό μέσον που περιέχει ιονοφόρο ασβεστίου A23187 επί 10 min για την ενεργοποίησή τους, όπως περιγράφεται παραπάνω.

- Ακολουθεί πλύση των ωαρίων σε τρυβλίο με νωπό καλλιεργητικό μέσον και τα ωάρια μεταφέρονται σε νέο τρυβλίο EmbryoSlide<sup>®</sup> που περιέχει καλλιεργητικό μέσον SAGE 1-Step<sup>™</sup>.
- Το τρυβλίο τοποθετείται εκ νέου στον επωαστικό κλίβανο Embryoscope<sup>®</sup> για την περαιτέρω παρακολούθηση και καταγραφή της εξελικτικής πορείας της ενεργοποίησης των ωαρίων.

### **2.4.13 Καλλιέργεια ωαρίων με τον αυξητικό παράγοντα rhGM-CSF μετά την τεχνητή ενεργοποίησή τους με τον ιονοφόρο ασβεστίου A23187**

Η διαδικασία της προσθήκης και καλλιέργειας των τεχνητά ενεργοποιημένων ωαρίων με τον αυξητικό παράγοντα GM-CSF αποτελεί μία ακόμη κομβικής σημασίας πειραματική σειρά της παρούσας μελέτης. Η κυτταροκίνη που χρησιμοποιήθηκε ήταν ανασυνδυασμένος ανθρώπινος GM-CSF (rhGM-CSF).

#### **2.4.13.1 Υλικά**

- Τρυβλίο καλλιέργειας EmbryoSlide<sup>®</sup> (ό.π.)
- Τρυβλίο καλλιέργειας εμβρύων Falcon<sup>®</sup> 353037 (ό.π.).
- Ογκομετρικά σιφώνια 10 ml και 5 ml Nunc<sup>™</sup> (ό.π.).
- Δοκιμαστικό σωληνάριο 5 ml (ό.π.)
- Ηλεκτρική συσκευή αναρρόφησης (ό.π.).
- Αυτόματη ογκομετρική πιπέτα (ό.π.) και αποστειρωμένα ρύγχη (ό.π.)
- Συσκευή απογύμνωσης ωαρίων (ό.π.) με πλαστικά αποστειρωμένα ρύγχη απογύμνωσης διαμέτρου 175 μm.
- Καλλιεργητικό μέσο SAGE 1-Step<sup>™</sup> (ό.π.).
- Έλαιο παραφίνης Sage<sup>™</sup> Oil for Tissue Culture (Origio, ό.π.)
- Πρωτεϊνικό συμπλήρωμα υποκατάστασης ορού (SSS, Irvine Scientific, ό.π.).
- Ρυθμιστικό αλατούχο διάλυμα φωσφορικών (DPBS, ό.π.)
- Ανασυνδυασμένος ανθρώπινος GM-CSF 10 μg (rhGM-CSF-215-GM<sup>53</sup>) (R&D Systems Inc., MN, USA)

<sup>53</sup> [https://www.rndsystems.com/products/recombinant-human-gm-csf-protein\\_215-gm](https://www.rndsystems.com/products/recombinant-human-gm-csf-protein_215-gm)

- Κλίβανος προθέρμανσης υλικών 37°C Memmert.
- Επωαστικός κλίβανος MINCT™-1000 (ό.π.).
- Επωαστικός κλίβανος Xiltrix (ό.π.).
- Θάλαμος εργασίας σταθερής ροής CO<sub>2</sub> και θερμοκρασίας 37°C, emCell-S (ό.π.).
- Σύστημα Embryoscope® (ό.π.).

#### 2.4.13.2 Διαδικασία

- Σε 999 µl διαλύματος DPBS, προστίθεται 1 µl SSS, ώστε να παρασκευαστεί τελικό διάλυμα 1 ml DPBS-0,1% SSS (διάλυμα Α).
- Στον λυοφιλιωμένο rhGM-CSF (10 µg) προστίθενται 100 µl διαλύματος Α ώστε να παρασκευασθεί διάλυμα τελικής συγκέντρωσης 100 µg/ml GM-CSF σε DPBS. Αυτό το διάλυμα αποτελεί το διάλυμα αναφοράς (διάλυμα Β), το οποίο διατηρείται στους -20°C για διάστημα μέχρι 3 μηνών.
- Με τη βοήθεια της ηλεκτρικής συσκευής αναρρόφησης και αποστειρωμένο ρύγχος 20 µl διαλύματος Β μεταφέρονται σε 980 µl DPBS σε πλαστικό δοκιμαστικό σωληνάριο των 5 ml, ώστε να προκύψει διάλυμα 2 µg/ml GM-CSF σε DPBS, τελικού όγκου 1 ml (διάλυμα Γ).
- Η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνεται μεταφέροντας 20 µl διαλύματος Γ σε 980 µl DPBS, ώστε να προκύψει διάλυμα Δ όγκου 1 ml και συγκέντρωσης 40 ng/ml GM-CSF σε DPBS.
- Σε 950 µl καλλιεργητικού μέσου SAGE 1-Step™ προστίθενται 50 µl διαλύματος Γ και ακολουθεί ανάδευση. Το διάλυμα Ε που προκύπτει έχει όγκο 1 ml και την επιθυμητή συγκέντρωση 2 ng/ml GM-CSF/DPBS για την πραγματοποίηση των πειραμάτων.
- Όλα τα παραπάνω διαλύματα φυλάσσονται σε συνθήκες όμοιες με του μητρικού διαλύματος (διάλυμα Β).
- Χρησιμοποιώντας το διάλυμα Ε, προετοιμάζεται ένα τρυβλίο EmbryoSlide®, το οποίο επικαλύπτεται με έλαιο παραφίνης και επωάζεται επί τουλάχιστον 4 h στον κλίβανο Xiltrix.
- Τα ωάρια της ομάδας μελέτης που έχουν υποστεί τεχνητή ενεργοποίηση με ιονοφόρο ασβεστίου A23187 και πρόκειται να καλλιεργηθούν με τον GM-CSF, μεταφέρονται στον θάλαμο εργασίας em-Cell-S και τοποθετούνται στο τρυβλίο EmbryoSlide®. Το τρυβλίο τοποθετείται στον κλίβανο Embryoscope®.

- Η εξέλιξη και η αναπτυξιακή πορεία της ενεργοποίησης των ωαρίων και των εμβρύων που προκύπτουν μετά την ενεργοποίηση καταγράφεται στο σύστημα χρονοδιολίσθησης Embryoscope<sup>®</sup> και παράγεται βίντεο της πορείας αυτής.

#### **2.4.14 Αξιολόγηση της γονιμοποίησης και των σταδίων της αυλάκωσης**

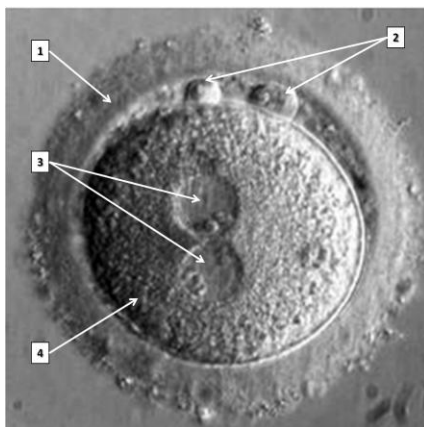
Τα μη γονιμοποιημένα ωάρια που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη δεν έχουν εκβάλλει το δεύτερο πολικό σωματίο και δεν εμφανίζουν προπυρήνα. Η μικροσκοπική τους εικόνα είναι εκείνη ενός ωαρίου στο στάδιο της μετάφασης II (πρβλ. Εικόνα 2.10Γ). Αντιθέτως, τα γονιμοποιημένα ωάρια αναμένεται να εμφανίσουν δύο ευδιάκριτους προπυρήνες (2PN), έναν πατρικής και έναν μητρικής προέλευσης, καθώς και δύο πολικά σωματία στον περιλεκιθικό χώρο (2PB).

Η παρουσία ενός μόνο προπυρήνα (1PN), 3 ή περισσότερων προπυρήνων (3PN, 4PN κ.λπ.), ή απευθείας μίτωση του ζυγώτη χωρίς προηγούμενη εμφάνιση προπυρήνων (“αυτόματη αυλάκωση”: DC, direct cleavage) αποτελούν ανωμαλίες της γονιμοποίησης.

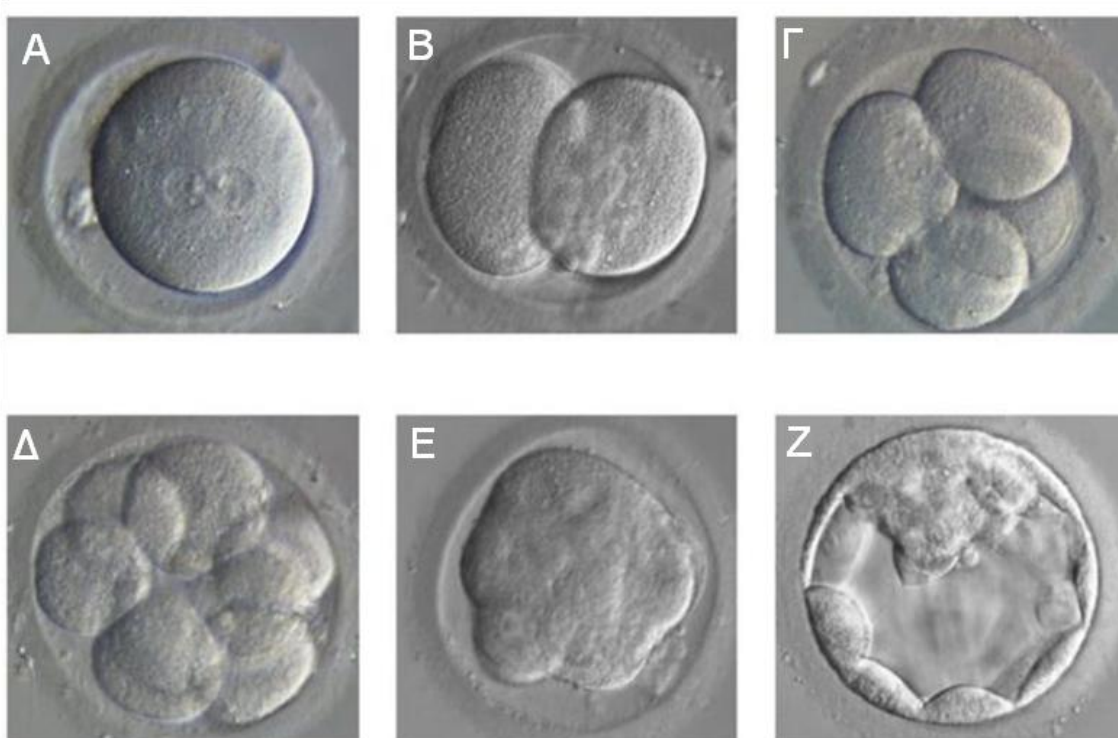
Η φυσιολογική εξέλιξη των γονιμοποιημένων ωαρίων και των παραγόμενων προεμφυτευτικών εμβρύων έχει περιγραφεί (Schoenwolf, 2014). Εάν η γονιμοποίηση έχει ολοκληρωθεί φυσιολογικά, τα ωάρια εμφανίζουν διαδοχικά όλα τα φυσιολογικά στάδια: οι προπυρήνες πλησιάζουν ο ένας τον άλλον και συγχωνεύονται (συγγαμία), λίγες ώρες αργότερα ο διπλοειδής πυρήνας εξαφανίζεται και ακολουθεί η πρώτη μίτωση του ζυγώτη. Ακολουθούν οι υπόλοιπες μιτώσεις των σταδίων της αυλάκωσης: θεωρητικά, την ημέρα 2 (ως ημέρα 0 θεωρείται η ημέρα της ICSI) το έμβρυο θα πρέπει να απαρτίζεται από 2-4 βλαστομερίδια. Την ημέρα 3 θα πρέπει να διακρίνονται 6-8 βλαστομερίδια, ενώ την ημέρα 4 τα βλαστομερίδια πρέπει να είναι περισσότερα από 16 και πρέπει να έχει αρχίσει η συνείληση του μοριδίου. Την ημέρα 5 πρέπει να έχει δημιουργηθεί βλαστοκύστη, η οποία χαρακτηρίζεται από την κοιλότητά της, μία εξωτερική μονήρη στιβάδα κυττάρων (τροφοεξώδερμα, από το οποίο θα προέλθουν ο πλακούντας και οι εξωεμβρυϊκοί υμένες) και μια μάζα κυττάρων σε έναν πόλο του εμβρύου, την έσω κυτταρική μάζα (από την οποία θα προέλθει το κυρίως έμβρυο).

Όλα τα παραπάνω αναπτυξιακά στάδια ήταν ορατά στα έμβρυα της μελέτης (Εικόνες 2.17 και 2.18).





**Εικόνα 2.17** Ομαλώς γονιμοποιημένο ωάριο. Η παρουσία δύο πολικών σωματίων (2PB) και δύο προπυρήνων (2PN) υποδηλώνει ομαλή γονιμοποίηση. 1: διαφανής ζώνη, 2: πολικά σωματία, 3: προπυρήνες, 4: ωοκύτταρο.



**Εικόνα 2.18** Αναπτυξιακά στάδια του προεμφυτευτικού εμβρύου *in vitro* από την αυλάκωση έως τη βλαστοκύστη. Α: γονιμοποιημένο ωάριο (ζυγώτης, περίπου 16-18 h μετά τη γονιμοποίηση), Β: στάδιο των 2 κυττάρων, Γ: στάδιο των 4 κυττάρων (αντιστοιχεί στη 2<sup>η</sup> ημέρα της ανάπτυξης), Δ: στάδιο των 8 κυττάρων (αντιστοιχεί στην 3<sup>η</sup> ημέρα της ανάπτυξης), Ε: στάδιο του συμπαγούς μοριδίου (μετά τη συνεύλιση, αντιστοιχεί στην 4<sup>η</sup> ημέρα της ανάπτυξης), Ζ: στάδιο της βλαστοκύστης (πριν από την εκκόλαψη, αντιστοιχεί στην 5<sup>η</sup> ημέρα της ανάπτυξης).

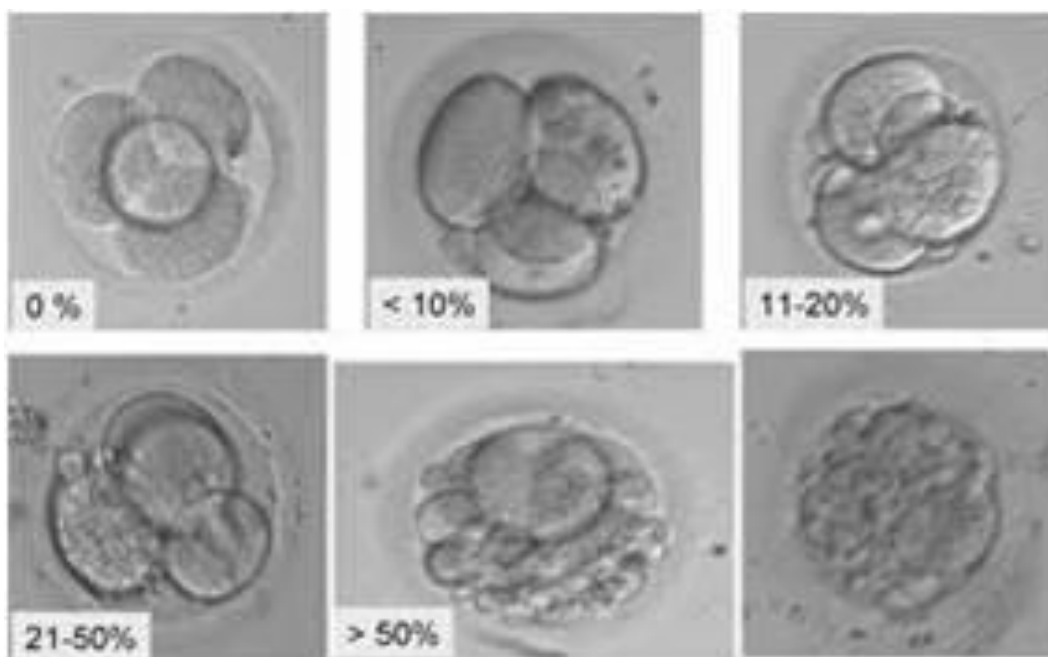
Στην παρούσα μελέτη:

– Τα ωάρια που προήλθαν από ωρίμαση *in vitro* και στη συνέχεια εκτέθηκαν στον ιονοφόρο ασβεστίου A23187, θεωρήθηκαν ενεργοποιημένα όταν 18 h μετά την έκθεσή τους στον ιονοφόρο εμφάνισαν τουλάχιστον έναν προπυρήνα (1PN).

– Τα μη γονιμοποιημένα ωάρια ύστερα από ICSI, τα οποία εκτέθηκαν στον ιονοφόρο ασβεστίου A23187, θεωρήθηκαν ως επιτυχώς ενεργοποιημένα όταν 18 h μετά την έκθεσή τους στον ιονοφόρο ασβεστίου εμφάνισαν: 1 προπυρήνα (1PN), 2 προπυρήνες (2PN), ή παρουσίασαν αυτόματη αυλάκωση (Lu *et al.*, 2006).

Την ημέρα 3, τα έμβρυα κατατάσσονται σε τέσσερις μορφολογικές κατηγορίες, ανάλογα με την ποιότητά τους, με κύριο κριτήριο το ποσοστό κυτταρικών θραυσμάτων που περιείχαν και την ομοιογένεια των βλαστομεριδίων τους, ως εξής (**Εικόνα 2.19**):

- 1<sup>ο</sup> βαθμού (I): απουσία κυτταρικών θραυσμάτων και ισομεγέθη βλαστομερίδια.
- 2<sup>ο</sup> βαθμού (II): <20% κυτταρικά θραύσματα, αλλά με ισομεγέθη βλαστομερίδια.
- 3<sup>ο</sup> βαθμού (III): 20-50% κυτταρικά θραύσματα και ανισομεγέθη βλαστομερίδια.
- 4<sup>ο</sup> βαθμού (IV): >50% κυτταρικά θραύσματα και ανισομεγέθη βλαστομερίδια.



**Εικόνα 2.19** Θρυμματισμός των βλαστομεριδίων και ποιότητα των προεμφυτευτικών εμβρύων στα στάδια της αυλάκωσης. Α: γονιμοποιημένο ωάριο (ζυγώτης, περίπου 16-18 h μετά τη γονιμοποίηση), Β: στάδιο των 2 κυττάρων, Γ: στάδιο των 4 κυττάρων (αντιστοιχεί στη 2<sup>η</sup> ημέρα της ανάπτυξης), Δ: στάδιο των 8 κυττάρων (αντιστοιχεί στην 3<sup>η</sup> ημέρα της ανάπτυξης), Ε: στάδιο του συμπαγούς μοριδίου (μετά τη συνεύληση, αντιστοιχεί στην 4<sup>η</sup> ημέρα της ανάπτυξης), Ζ: στάδιο της βλαστοκύστης (πριν από την εκκόλαψη, αντιστοιχεί στην 5<sup>η</sup> ημέρα της ανάπτυξης).

Έμβρυα τα οποία συνεχίζουν την ανάπτυξή τους και φθάνουν στο στάδιο της βλαστοκύστης επίσης κατατάσσονται μορφολογικώς σε κατηγορίες, σύμφωνα με το σύστημα των Gardner & Schoolcraft (Gardner DK, 1999) που ακολουθεί τους παρακάτω κανόνες.

Αρχικώς, η βλαστοκύστη χαρακτηρίζεται από ένα αριθμητικό ψηφίο από το 1 έως το 6, το οποίο εκφράζει τον βαθμό διάτασης της κοιλότητας της βλαστοκύστης, ως εξής:

- 1: Η κοιλότητα καταλαμβάνει λιγότερο από το μισό του όγκου του εμβρύου.
- 2: Η κοιλότητα καταλαμβάνει περισσότερο από το μισό όγκο του εμβρύου.
- 3: Πλήρης βλαστοκύστη, όπου η κοιλότητα καταλαμβάνει ολόκληρο το έμβρυο.
- 4: Διεσταλμένη βλαστοκύστη όπου η κοιλότητα καταλαμβάνει μεγαλύτερο όγκο από το έμβρυο με ταυτόχρονη μείωση του πάχους της διαφανούς ζώνης του εμβρύου.
- 5: Η βλαστοκύστη εκκολάπτεται από τη διαφανή ζώνη.
- 6: Η βλαστοκύστη έχει πλήρως εκκολαφθεί από τη διαφανή ζώνη.

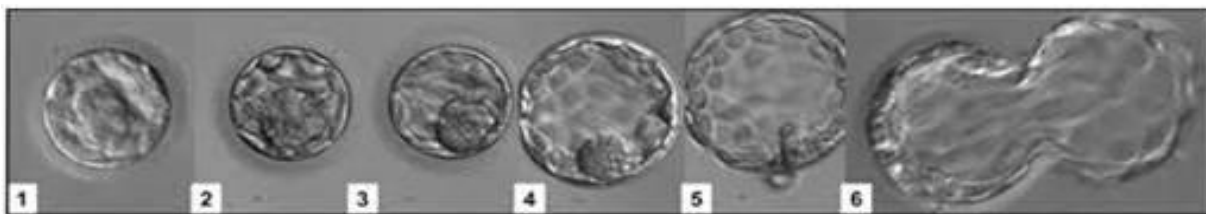
Στη συνέχεια, μετά το ψηφίο, η βλαστοκύστη χαρακτηρίζεται από ένα γράμμα που εκφράζει την ποιότητα της έσω κυτταρικής μάζας (**ICM**, inner cell mass), ως εξής:

- A: Η ICM αποτελείται από πολλά κύτταρα στενά συνδεδεμένα μεταξύ τους.
- B: Η ICM αποτελείται από αρκετά κύτταρα, αλλά σε χαλαρή σύνδεση μεταξύ τους.
- C: Η ICM αποτελείται από λίγα κύτταρα.

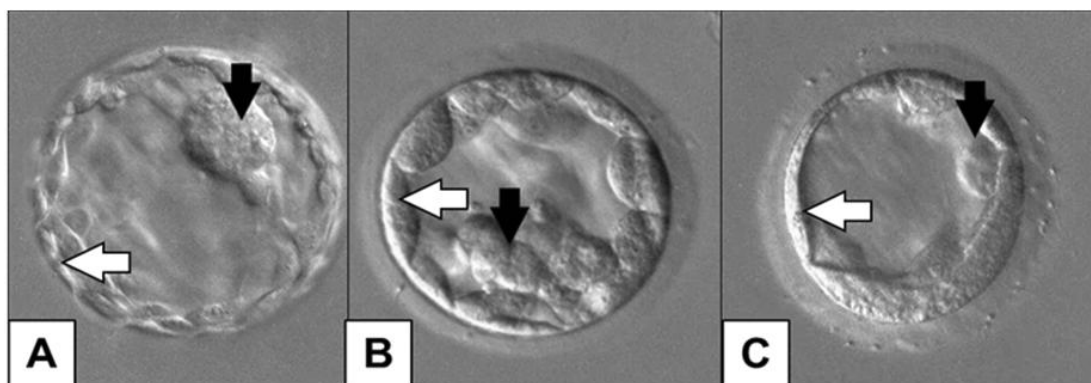
Στη συνέχεια, μετά το πρώτο γράμμα, η βλαστοκύστη χαρακτηρίζεται περαιτέρω από ένα δεύτερο γράμμα που εκφράζει την ποιότητα του τροφοεξωδέρματος (**TE**, trophoctoderm), ως εξής:

- A: Το TE αποτελείται από πολλά κύτταρα που δημιουργούν ένα συνεχές στρώμα.
- B: Το TE αποτελείται από λίγα κύτταρα που σχηματίζουν ένα χαλαρό επιθήλιο.
- C: Το TE αποτελείται από πολύ λίγα και μεγάλα κύτταρα.

Παραδείγματα ακολουθούν στις **Εικόνες 2.20** και **2.21**.



**Εικόνα 2.20** Βαθμολόγηση της διαστολής της κοιλότητας της βλαστοκύστης. Η διαστολή χαρακτηρίζεται από ένα ψηφίο (1-6), κατά Gardner & Schoolcraft (Vlaisavljević, 2012).



**Εικόνα 2.21** Βαθμολόγηση της ICM και του TE. Βαθμολογείται η έσω κυτταρική μάζα (ICM, μαύρα βέλη) και το τροφοεξώδερμα (TE, λευκά βέλη) – A: ποιότητα AA, B: ποιότητα BB, C: ποιότητα CC κατά Gardner & Schoolcraft (Vlaisavljević, 2012).

#### 2.4.15 Ολική βιοψία εμβρύων

Στο στάδιο αυτό του πειραματικού σκέλους, όλα τα έμβρυα σε στάδιο μοριδίου και βλαστοκύστης που προέκυπταν από τις πειραματικές διαδικασίες της τεχνητής ενεργοποίησης των ωαρίων με ιονοφόρο ασβεστίου ή/και της καλλιέργειας των παραγόμενων εμβρύων με τον GM-CSF, υποβλήθηκαν σε ολική βιοψία, δηλαδή αφαιρέθηκαν από τη διαφανή ζώνη τους, προκειμένου να ακολουθήσει η γενετική ανάλυση με συγκριτικό γονιδιωματικό υβριδισμό σε μικροσυστοιχίες DNA (aCGH). Η ολική βιοψία είναι απαραίτητη για να αποφευχθεί η επιμόλυνση των δειγμάτων από κυτταρικά κατάλοιπα των κυττάρων της κοκκώδους στιβάδας ή του ακτινωτού στεφάνου που μπορεί να έχουν παραμείνει προσκολλημένα στη διαφανή ζώνη.

Η διαδικασία της γενετικής ανάλυσης ακολουθεί το δημοσιευμένο πρωτόκολλο του εργαστηρίου (Christopikou *et al.*, 2013).

##### 2.4.15.1 Υλικά

- Στερεοσκόπιο Olympus SZX 10 (Olympus, Japan).
- Ανεστραμμένο μικροσκόπιο Nikon Diaphot 300 με μικροχειριστήρια Nikon Narishige MM188 και μικροσύριγγες αέρος RI SAS™ (ό.π.).
- Σύστημα Laser RI Saturn<sup>54</sup> (Research Instruments Ltd, Cornwall, UK), προσαρμοσμένο στο ανεστραμμένο μικροσκόπιο (**Εικόνα 2.22**).
- Τρυβλίο μικρογονιμοποίησης Nunc™ IVF ICSI Dish (Thermo Scientific, ό.π.).

<sup>54</sup> <http://www.ri-lifesciences.com/ls/products/hardware/saturn-5-active>

- Τρυβλίο καλλιέργειας EmbryoSlide<sup>®</sup> (ό.π.)
- Τρυβλίο καλλιέργειας εμβρύων Falcon<sup>®</sup> 353037 (ό.π.).
- Γυάλινο μικροσιφόνιο συγκράτησης (Holding Pipette SHP-90-35, Sunlight Medical, FL, USA).
- Γυάλινο μικροσιφόνιο βιοψίας (The Pipette Company, TPC Embryo Biopsy Pipette, LBC-OD35TA35, Thebarton, Australia).
- Αποστειρωμένα δοκιμαστικά σωληνάρια 0,2 ml (Flat-capped PCR tubes, Starlab, UK).
- Ογκομετρικά σιφόνια 10 ml και 5 ml Nunc<sup>™</sup> (ό.π.).
- Ηλεκτρική συσκευή αναρρόφησης (ό.π.).
- Αυτόματη ογκομετρική πιπέτα (ό.π.) και αποστειρωμένα ρύγχη (ό.π.)
- Συσκευή απογύμνωσης ωαρίων (ό.π.) με πλαστικά αποστειρωμένα ρύγχη απογύμνωσης διαμέτρων 275 και 150 μm.
- Χειρουργική μάσκα προσώπου (Foliodress<sup>®</sup> mask loop, Paul Hartmann AG, Germany).
- Αποστειρωμένα γάντια χωρίς πούδρα (Peha-Taft classic<sup>55</sup>, Paul Hartmann AG, Germany).
- Μαρκαδόρος ανεξίτηλης γραφής edding 140s (edding, Japan).
- Καλλιεργητικό μέσο SAGE 1-Step<sup>™</sup> (ό.π.).
- Έλαιο παραφίνης Sage<sup>™</sup> Oil for Tissue Culture (Origio, ό.π.)
- Κλίβανος προθέρμανσης υλικών 37°C Memmert.
- Επωαστικός κλίβανος MINC<sup>™</sup>-1000 (ό.π.).
- Επωαστικός κλίβανος Xiltrix (ό.π.).
- Θάλαμος εργασίας σταθερής ροής CO<sub>2</sub> και θερμοκρασίας 37°C, emCell-S (ό.π.).
- Σύστημα Embryoscope<sup>®</sup> (ό.π.).

#### **2.4.15.2 Διαδικασία**

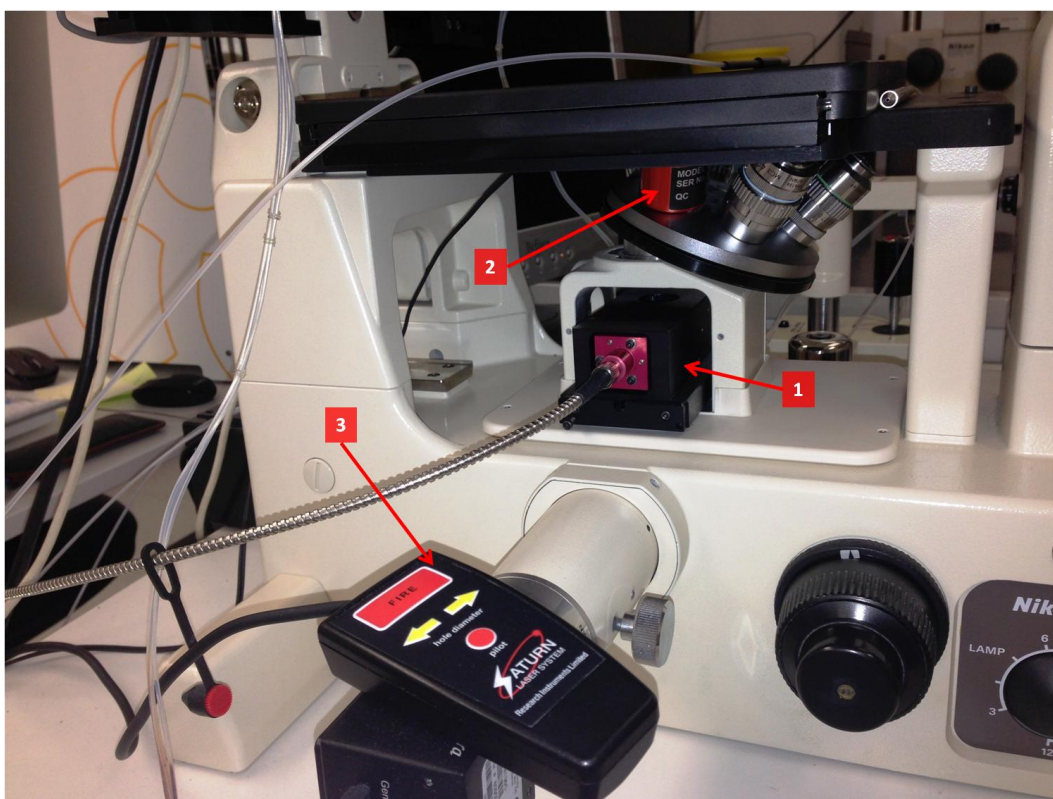
- Παρασκευάζεται ένα τρυβλίο απογύμνωσης παρόμοιο με εκείνο της διαδικασίας ICSI (βλ. ενότητα 2.4.9.2), αλλά χωρίς μικροσταγόνα PVP.
- Το τρυβλίο προθερμαίνεται στους 37°C επί 2 h τουλάχιστον.

<sup>55</sup> <https://hartmann.info/en-DX/our-products/Operating-Theater/Surgical-Gloves/Latex-and-powderfree-surgical-gloves/Peha-taft%C2%AE-classic-powderfree#products>

- Με τη βοήθεια της συσκευής απογύμνωσης και ρύγχος διαμέτρου 275  $\mu\text{m}$ , τα προς ολική βιοψία έμβρυα μεταφέρονται από το τρυβλίο EmbryoSlide® στις μικροσταγόνες του τρυβλίου απογύμνωσης. Σε κάθε μικροσταγόνα του τρυβλίου τοποθετείται ένα έμβρυο.
- Ένα γυάλινο μικροσιφώνιο συγκράτησης τοποθετείται στον αριστερό βραχίονα του συστήματος συγκράτησης στο ανεστραμμένο μικροσκόπιο και ένα γυάλινο μικροσιφώνιο βιοψίας στον δεξιό βραχίονα (στη θέση του χειριστηρίου έγχυσης).
- Το τρυβλίο με τα έμβρυα τοποθετείται στην τράπεζα του μικροσκοπίου και το έμβρυο ακινητοποιείται στο μικροσιφώνιο συγκράτησης με ελαφρά αρνητική πίεση αέρος (όπως περιγράφηκε για την ICSI στην ενότητα 2.4.9.2).
- Ο προσανατολισμός του εμβρύου κατά την ακινητοποίηση έχει καίρια σημασία, ιδιαίτερα για τα έμβρυα σταδίου βλαστοκύστης. Οι προς βιοψία βλαστοκύστες ακινητοποιούνται έτσι ώστε η έσω κυτταρική μάζα, προκειμένου να αποφευχθεί η αλλοίωση ή η καταστροφή της, να βρίσκεται όσο το δυνατόν μακρύτερα από το σημείο συγκράτησης, αλλά και από το βεληνεκές της ακτίνας laser που χρησιμοποιείται για τη διάνοιξη σχισμής στη διαφανή ζώνη.
- Με τη βοήθεια του μικροσιφωνίου συγκράτησης, το έμβρυο φέρεται στο βεληνεκές της ακτίνας laser, το οποίο έχει προηγουμένως ρυθμιστεί σε χρόνο ακτινοβολίας 1,1 ms.
- Με αλληπάλληλες ριπές ακτίνας laser, διάρκειας 1,10 ms έκαστη, η διαφανής ζώνη του προς βιοψία εμβρύου αφαιρείται κατά το ήμισυ: συγκεκριμένα αφαιρείται το τμήμα από τη 12<sup>η</sup> ώρα προς την 6<sup>η</sup> ώρα, κατά τη φορά των δεικτών του ρολογιού.
- Όταν αυτό το τμήμα της διαφανούς ζώνης έχει πλήρως αφαιρεθεί, το έμβρυο αναρροφάται με τη βοήθεια του μικροχειριστηρίου και του μικροσιφωνίου βιοψίας από την 3<sup>η</sup> ώρα.
- Με λεπτές κινήσεις, αφού πλέον η αντίσταση της διαφανούς ζώνης έχει εκλείψει, το έμβρυο αποκολλάται από την υπόλοιπη διαφανή ζώνη.
- Η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνεται για όλα τα έμβρυα του τρυβλίου.
- Το τρυβλίο μεταφέρεται στο στερεοσκόπιο, όπου με τη βοήθεια της συσκευής απογύμνωσης και ρύγχους διαμέτρου 150  $\mu\text{m}$ , τα έμβρυα μεταφέρονται ανά ένα σε ένα σωληνάριο aCGH.

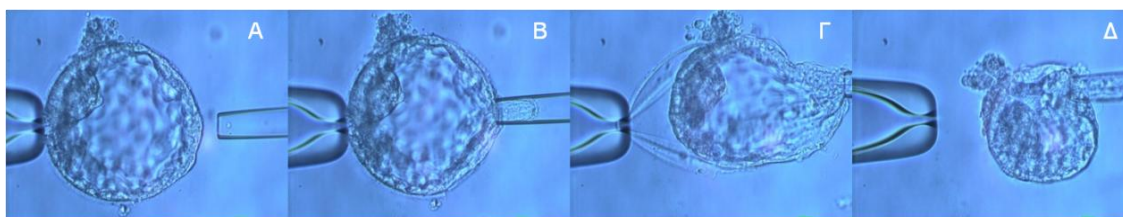
- Η διαδικασία πραγματοποιείται φορώντας μάσκα προσώπου και αποστειρωμένα γάντια και σε συνθήκες απόλυτης στείρωσης για την αποφυγή επιμόλυνσης των δειγμάτων.
- Τα σωληνάρια σηματοδοτούνται με τον κωδικό του απογυμνωθέντος εμβρύου και την ημερομηνία της διαδικασίας, με ανεξίτηλο μαρκαδόρο.
- Τα δείγματα των εμβρύων είναι έτοιμα για γενετική ανάλυση με τη μέθοδο aCGH.

Ο ειδικός πρόσθετος εξοπλισμός στο μικροσκόπιο απεικονίζεται στην **Εικόνα 2.22**.



**Εικόνα 2.22** Ειδικός πρόσθετος εξοπλισμός στο ανεστραμμένο μικροσκόπιο. 1: τροφοδοτικό συστήματος laser, 2: ειδικός φακός που μεταφέρει την ακτίνα laser στο οπτικό πεδίο, 3: διεπαφή ελέγχου της πυροδότησης.

Οι φάσεις της διαδικασίας απεικονίζονται στην **Εικόνα 2.23**.



**Εικόνα 2.23** Φάσεις της ολικής βιοψίας εμβρύου στο στάδιο της βλαστοκύστης. Α: αφαίρεση της ημίσειας διαφανούς ζώνης, Β: αναρρόφηση του εμβρύου με την πιπέτα βιοψίας, Γ: το έμβρυο αναρροφάται και αποκολλάται από τη διαφανή ζώνη, Δ: το έμβρυο έχει απαλλαγεί πλήρως από τη διαφανή ζώνη.

## 2.4.16 Συγκριτικός γονιδιωματικός υβριδισμός σε μικροσυστοιχίες DNA

Στόχος της χρωμοσωματικής ανάλυσης με τη μέθοδο του συγκριτικού γονιδιωματικού υβριδισμού σε μικροσυστοιχίες DNA είναι ο έλεγχος για διπλασιασμούς και ελλείψεις ολόκληρων χρωματοσωμάτων, ή τμημάτων τους.

Για την ανάλυση των 23 ζευγών χρωμοσωμάτων χρησιμοποιήθηκαν οι πλατφόρμες μικροσυστοιχιών DNA BAC 24Sure+ και 24Sure (BlueGnome Ltd, Cambridge, UK). Η γενετική ανάλυση διενεργήθηκε σε μικροσυστοιχίες DNA υψηλής ανάλυσης CytoChip 3.0 (BlueGnome). Οι εν λόγω μικροσυστοιχίες DNA καλύπτουν το ανθρώπινο γονιδίωμα ανά 2-5 Mbp (24Sure+) και ανά 10 Mbp (24Sure) συμπεριλαμβανομένων των υποτελομεριδιακών και περικεντρομεριδιακών περιοχών.

### 2.4.16.1 Υλικά

- Πλατφόρμες μικροσυστοιχιών DNA BAC 24Sure+ και 24Sure BlueGnome Ltd, Cambridge, UK.
- Μικροσυστοιχίες υψηλής ανάλυσης CytoChip 3.0, BlueGnome Ltd, Cambridge, UK.
- Αποδιατακτικό διάλυμα δεξτράνης.
- Φθορίζουσες χρωστικές Cy3 και Cy5, BlueGnome Ltd, Cambridge, UK.
- 2×SSC (ρυθμιστικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου-κιτρικού νατρίου) που περιέχει 0,05% Tween-20.
- Ρυθμιστικό διάλυμα 1×SSC.
- Ρυθμιστικό διάλυμα 0,1×SSC.
- Φυγόκεντρος κενού miVac duo Concentrator, Genevac, Ipswich, UK<sup>56</sup>
- Σαρωτής Innoscan710, Innopsys, France.
- Λογισμικό ανάλυσης εικόνων BlueFuse BlueGnome Ltd, Cambridge, UK.

---

<sup>56</sup> <http://www.spscientific.com/ProductDetail.aspx?id=3128>



## **2.4.16.2 Στάδια της διαδικασίας**

### **2.4.16.2.1 Ενίσχυση ολικού κυτταρικού DNA**

Αρχικά, πραγματοποιείται πολλαπλασιασμός ολόκληρου του γονιδιώματος με στόχο να δημιουργηθεί, από το ολικό γονιδίωμα ενός κυττάρου (6 pg DNA), επαρκής ποσότητα DNA για τον υβριδισμό σε μικροσυστοιχίες DNA. Η τεχνολογία αυτή βασίζεται σε τυχαίο κατακερματισμό του γονιδιωματικού DNA και ακολουθεί ενίσχυση των δειγμάτων DNA με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), με αποτέλεσμα τον πολλαπλασιασμό του ολικού γονιδιώματος (SurePlex, BlueGnome). Η συσκευή PCR που χρησιμοποιείται απεικονίζεται στην **Εικόνα 1.24**.

### **2.4.16.2.2 Σήμανση**

Από το προϊόν της PCR, περίπου 3 μg DNA δείγματος και μάρτυρα σημαίνονται επί 2 h με τις φθορίζουσες χρωστικές Cy3 και Cy5 αντιστοίχως, χρησιμοποιώντας το σύστημα σήμανσης φθορισμού (BlueGnome) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

### **2.4.16.2.3 Αποδιάταξη**

Ύστερα από τη σήμανση των δειγμάτων και του μάρτυρα ακολουθεί αποδιάταξη του DNA σε αποδιατακτικό διάλυμα δεξτράνης στους 75°C επί 10 min.

### **2.4.16.2.4 Υβριδισμός**

Το σημασμένο DNA δείγματος και του μάρτυρα εφαρμόζονται στη μικροσυστοιχία και συν-υβριδοποιούνται επί 16-20 h.

### **2.4.16.2.5 Πλύσεις**

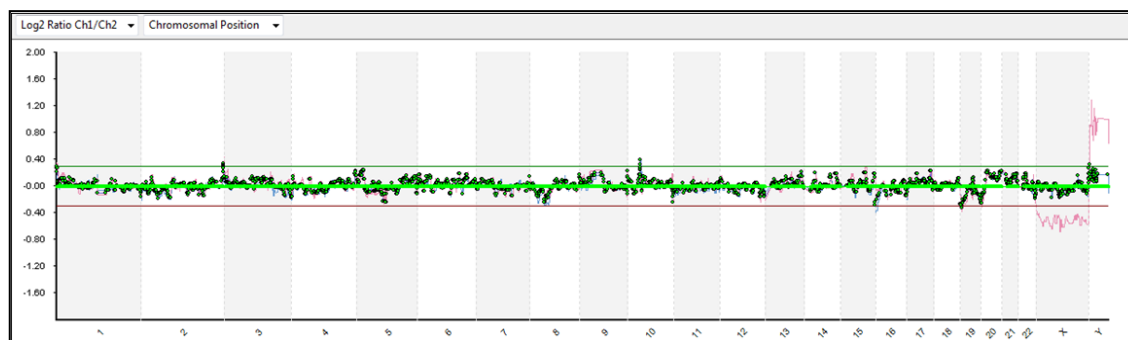
Στη συνέχεια, οι μικροσυστοιχίες πλένονται επί 10 min σε 2×SSC (ρυθμιστικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου-κιτρικού νατρίου) που περιέχει 0,05% Tween-20 και επί 10 min σε 1×SSC, σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθούν δύο ακόμη πλύσεις σε 0,1×SSC, μία επί 5 min στους 60°C και μία επί 1 min σε θερμοκρασία δωματίου. Οι μικροσυστοιχίες ξηραίνονται σε φυγόκεντρο κενού (3 min σε θερμοκρασία δωματίου και υψηλή ταχύτητα) και τοποθετούνται στον σαρωτή (Innoscan710, Innopsys, Γαλλία). Οι

εικόνες αναλύονται με το λογισμικό BlueFuse (BlueGnome). Αναφέρεται χρωμοσωματική ανωμαλία εάν 15 ή περισσότεροι ανιχνευτές εμφανίσουν απόκλιση από τα φυσιολογικά όρια της πλατφόρμας CytoChip 3.0. Η ακρίβεια της μεθόδου aCGH για το DNA βλαστομεριδίων είναι 98% (Wells *et al.*, 2011).

#### 2.4.16.2.6 Παραγωγή γραφημάτων

Κάθε φυσιολογικό βλαστομερίδιο φέρει διπλοειδή αριθμό αυτοσωμάτων και δύο φυλετικά χρωμοσώματα (XX ή XY). Θεωρητικά, το ποσοστό λογαριθμικής μετατόπισης, η οποία ορίζεται ως ο λογάριθμος του λόγου της έντασης των δύο χρωστικών σε γράφημα aCGH, για το φυλετικό χρωμόσωμα X, στην περίπτωση που ο μάρτυρας και το έμβρυο είναι άρρενες (XY) θα πρέπει να είναι  $\log_2(1/1)$  ή 1,0 και  $\log_2(2/1)$  ή 1,5 στην περίπτωση που το έμβρυο είναι θήλυ. Για κάθε αυτοσωματικό χρωμόσωμα επίσης το ποσοστό λογαριθμικής μετατόπισης θα είναι  $\log_2(2/2)$  ή 1.0 σε περίπτωση ευπλοειδίας. Αντίστοιχα για την τρισωμία αυτοσωματικού χρωμοσώματος οι αναλογίες αναμένεται να είναι 1 ή μεγαλύτερη του 1.

Στην **Εικόνα 2.24** παρουσιάζεται ένα τυπικό γράφημα που αντιστοιχεί σε φυσιολογικό άρρεν έμβρυο.



**Εικόνα 2.24:** Αποτέλεσμα ανάλυσης ενός εμβρύου με τη μεθοδολογία aCGH. Απεικονίζεται ένα χρωμοσωματικώς φυσιολογικό άρρεν ανθρώπινο έμβρυο προεμφυτευτικού σταδίου (23, XY).

#### 2.4.16.2.7 Ανάλυση και αξιολόγηση

Κάθε βλαστομερίδιο σε ένα χρωμοσωματικώς φυσιολογικό έμβρυο περιλαμβάνει το διπλοειδή αριθμό αυτοσωμάτων και ένα ζεύγος φυλετικών χρωμοσωμάτων. Κάθε κύτταρο

και κατ' επέκταση το έμβρυο θα πρέπει να περιλαμβάνει 22 ζεύγη αυτοσωμάτων και ένα ζεύγος φυλετικών χρωμοσωμάτων. Θα πρέπει δηλαδή να έχει χρωμοσωματικό τύπο 46,XX ή 46,XY.

Η παρουσία περισσότερων ή λιγότερων του διπλοειδούς αριθμού χρωμοσωμάτων σε ένα έμβρυο, χαρακτηρίζεται ως **ανευπλοειδία** και συνιστά αριθμητική χρωμοσωματική ανωμαλία του εμβρύου.

Η παρουσία ενός επιπλέον χρωμοσώματος χαρακτηρίζεται ως τρισωμία (Trisomy – Tri), ενώ η παρουσία ενός λιγότερου χρωμοσώματος από το διπλοειδή αριθμό χαρακτηρίζεται ως μονοσωμία (Monosomy – Mon). Η εξαιρετική σημασία της παρουσίας ανευπλοειδιών στα ανθρώπινα έμβρυα καθώς επίσης και ο μηχανισμός γενέσεώς τους, έχει περιγραφεί και μελετηθεί εκτενώς (βλ. Ambartsumyan & Clark, 2008· Franasiak *et al.*, 2014).

Στην ανάλυση των εμβρύων που ακολουθεί, έμβρυα τα οποία χαρακτηρίζονταν από 1-2 ανευπλοειδίες, κατατάσσονται ως χρωμοσωματικώς ανώμαλα με απλές ανευπλοειδίες. Η χρωμοσωματική σύσταση των εμβρύων εκείνων που εμφάνισαν από 2-4 ανευπλοειδίες, χαρακτηρίζεται ως σύμπλοκη (complex), ενώ αυτή των εμβρύων που περιείχαν περισσότερες των 4 ανευπλοειδιών χαρακτηρίζεται ως σύμπλοκη χαοτική (complex chaotic).

#### **2.4.17 Τυχαιοποίηση**

Η μέθοδος της ρίψης νομίσματος εφαρμόστηκε για την τυχαία κατανομή των ωαρίων στις πειραματικές ομάδες της κυρίως μελέτης. Πρόκειται για τις ομάδες (Α και Β, βλ. ενότητες 3.2 και 3.3 παρακάτω) ωαρίων που δεν γονιμοποιήθηκαν ύστερα από μικρογονιμοποίηση και που υποβλήθηκαν σε ενεργοποίηση με ιονοφόρο ασβεστίου A23187 και σε καλλιέργεια με GM-CSF.

#### **2.4.18 Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων με τη μέθοδο της δοκιμής ακριβείας κατά Fischer**

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από τις παραπάνω πειραματικές διαδικασίες κατά την διεξαγωγή της παρούσας μελέτης, όπως η σύγκριση ποσοστών γονιμοποίησης, ποιότητας εμβρύων, ποσοστών ενεργοποίησης ωαρίων,

ποσοστών εμβρύων που εξελίσσονται μέχρι την 5<sup>η</sup> αναπτυξιακή ημέρα, ποσοστών δημιουργία βλαστοκύστης κ.λπ. μεταξύ των ομάδων μελέτης, πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια ενός στατιστικού εργαλείου που ονομάζεται “ακριβές στατιστικό του Fischer” (*Fischer’s exact test*).

Το ακριβές στατιστικό του Fischer αποτελεί μια δοκιμή στατιστικής σημασίας, η οποία χρησιμοποιείται στην ανάλυση πινάκων ενδεχομένων που περιέχουν δεδομένα κατηγοριοποίησης. Για μεγαλύτερη ακρίβεια χρησιμοποιήθηκε η δοκιμή δύο σκελών (*two-tailed test*).

Το ακριβές στατιστικό του Fischer υπολογίστηκε για όλες τις ομάδες που συγκρίθηκαν, με βάση την “τιμή  $p$ ” (*p-value*). Η τιμή  $p$  εκφράζει τη στατιστική πιθανότητα το παρατηρούμενο αποτέλεσμα να μην σχετίζεται στατιστικά με το προς απόδειξη ζητούμενο. Η τιμή  $p$  έχει **στατιστική σημασία** όταν βρεθεί **< 0,05** από το ακριβές στατιστικό του Fischer 2 σκελών: δηλαδή, όταν από τη σύγκριση δύο ομάδων πειραματικών δεδομένων προκύπτει τιμή  $p < 0,05$ , τότε το υπό εξέταση χαρακτηριστικό μεταξύ των δύο ομάδων είναι στατιστικώς σημαντικό.

Ο τύπος της υπεργεωμετρικής κατανομής που χρησιμοποιείται στο ακριβές στατιστικό του Fisher είναι ο ακόλουθος:

$$p = \frac{\binom{A+C}{A} \binom{B+D}{B}}{\binom{N}{A+B}} = \frac{(A+B)!(C+D)!(A+C)!(B+D)!}{A! B! C! D! N!}$$

Όπου A, B, C, D είναι οι τιμές των μεταβλητών που ελέγχουμε, N το γενικό τους σύνολο, ενώ το σύμβολο “!” στην εξίσωση κατανομής αποτελεί τον παραγοντικό χειριστή.

Ο υπολογισμός των τιμών του στατιστικού επιπέδου σημαντικότητας  $p$  για όλα τα αποτελέσματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής, πραγματοποιήθηκε στο υπολογιστικό στατιστικό πρόγραμμα *SPSS Statistics* (Statistics Package for Social Sciences, version 17).

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 3.1 Τεχνητή ενεργοποίηση ωαρίων ύστερα από ωρίμαση *in vitro*

##### 3.1.1 Ωρίμαση ωαρίων *in vitro*

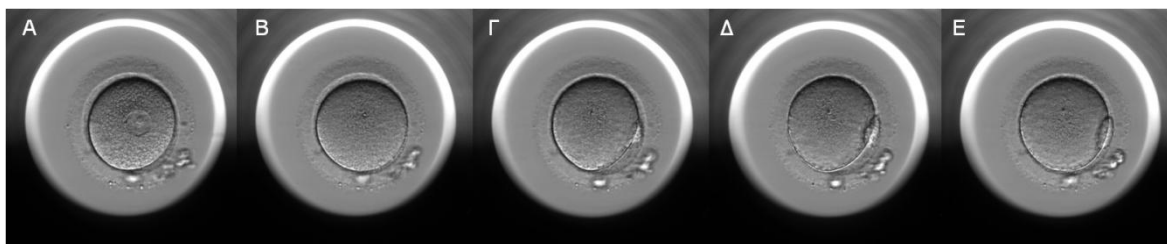
Για να μπορέσουμε να διερευνήσουμε την αρχή της ενεργοποίησης των ωαρίων με τη χρήση ιονοφόρου ασβεστίου, καταφύγαμε αρχικά στην ωρίμαση ωαρίων τα οποία είχαν δωρισθεί από ασθενείς και τα οποία, μετά την διαδικασία απογύμνωσής τους, βρέθηκαν να έχουν παραμείνει στο στάδιο του βλαστικού κυστιδίου (GV).

Εφαρμόζοντας το πρωτόκολλο της ωρίμασης *in vitro* που περιγράφεται παραπάνω, επιτύχαμε την ωρίμαση των ανώριμων ωαρίων φάσης GV, ώστε να προκύψουν, 24 h αργότερα, ώριμα ωάρια μετάφασης II (MII). Η διαδικασία της ωρίμασης καταγράφηκε από τη μικροκάμερα του κλιβάνου Embryoscope<sup>®</sup>, η δε εξέλιξη κάθε ωαρίου που ωρίμασε *in vitro* έχει τεκμηριωθεί με ένα βίντεο χρονοδιολίσθησης.

Συνολικά, στη διαδικασία της ωρίμασης των ωαρίων *in vitro*, χρησιμοποιήθηκαν άωρα ωάρια σταδίου GV από 12 ασθενείς. Οι ασθενείς είχαν μέσο όρο ηλικίας 33,83±3,38 έτη με μέση τιμή τα 34 έτη. Τα αίτια υπογονιμότητας στα 12 εν λόγω ζευγάρια συνοψίζονται στον Πίνακα 3-1.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3-1 Κατανομή αιτιών υπογονιμότητας στον πληθυσμό της μελέτης	
Αίτιο υπογονιμότητας	Αριθμός ζευγαριών
Ανδρικός παράγοντας	6
Σαλπινγγικός παράγοντας	3
Άγνωστη αιτιολογία	3
<b>Σύνολο:</b>	<b>12</b>

Η διαδικασία της ωρίμασης των ωαρίων *in vitro* και τα τρία διαδοχικά στάδια ωρίμασης (από GV σε MI και έπειτα σε MII), φαίνονται στις εικόνες που ακολουθούν και οι οποίες προέρχονται από τον επωαστικό κλίβανο χρονοδιολίσθησης Embryoscope<sup>®</sup>.



**Εικόνα 3.1** Ωρίμαση ανθρώπινων ωαρίων *in vitro*, όπως απεικονίζεται με μικροφωτογράφιση χρονοδιολίσθησης. Α: στάδιο GV, Β: άωρο ωάριο σταδίου MI (χωρίς πολικό σωματίο), Γ-Δ: εκβολή του πρώτου πολικού σωματίου, Ε: ώριμο ωάριο στο στάδιο MII.

Από τις ασθενείς αυτές συλλέχθηκαν συνολικά 225 ωάρια. Η ανάλυση της ωριμότητάς τους μετά την απογύμνωση συνοψίζεται στον Πίνακα 3-2.

<b>ΠΙΝΑΚΑΣ 3-2 Ωριμότητα των ωαρίων <i>in vitro</i> ανά ασθενή κατά την ωοληψία</b>						
<b>Ασθενής</b>	<b>Ηλικία (έτη)</b>	<b>Ωάρια</b>	<b>MII</b>	<b>MI</b>	<b>GV</b>	<b>ΚΔΖ</b>
1	41	31	25	3	3	0
2	36	33	29	1	2	1
3	31	8	5	2	1	0
4	34	24	16	5	2	1
5	34	17	5	4	8	0
6	34	18	11	4	2	1
7	32	33	20	4	8	1
8	34	4	2	1	1	0
9	28	12	6	4	2	0
10	36	3	0	0	3	0
11	30	19	13	1	2	3
12	36	23	14	3	3	3
<b>Σύνολα:</b>		<b>225</b>	<b>146</b>	<b>32</b>	<b>37</b>	<b>10</b>

MII: μετάφαση δεύτερης μειωτικής διαίρεσης, MI: μετάφαση πρώτης μειωτικής διαίρεσης, GV: στάδιο βλαστικού κυστιδίου, ΚΔΖ: κενή διαφανής ζώνη (εκφύλιση του ωαρίου).

Τα 37 ωάρια που βρέθηκαν σε στάδιο GV καλλιεργήθηκαν προκειμένου να ωριμάσουν *in vitro*, σύμφωνα με την προηγούμενη μέθοδο. Στον Πίνακα 3-3 συνοψίζεται η έκβαση και η απόδοση της ωρίμασης *in vitro* των εν λόγω ωαρίων, έπειτα από 24 h καλλιέργειας.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 3-3 Απόδοση της ωρίμασης των ωαρίων *in vitro***

Ωάρια	GV	MI	MII	Απόδοση (%)
37	9	5	23	23/37 (62,16)

GV: στάδιο βλαστικού κυστιδίου, MI: μετάφαση πρώτης μειωτικής διαίρεσης, MII: μετάφαση δεύτερης μειωτικής διαίρεσης

Συνάγεται ότι, από τα 37 ωάρια σταδίου GV που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτό το πειραματικό σκέλος, τα 23 ωρίμασαν και έφθασαν σε φάση MII μετά 24 h καλλιέργειας, έχοντας εκβάλει το πρώτο πολικό σωματίο, ενώ 5 έφθασαν μόνο μέχρι το στάδιο MI και 9 παρέμειναν στο στάδιο GV. Επομένως, η απόδοση της διαδικασίας ήταν 23/37 (62,16%).

### 3.1.2 Τεχνητή ενεργοποίηση ωαρίων με ιονοφόρο ασβεστίου A23187

Αφού πιστοποιήσαμε με τα προηγούμενα πειράματα το αξιόπιστο της διαδικασίας ωρίμασης των ωαρίων *in vitro*, και προτού η διαδικασία αυτή εφαρμοσθεί σε μη γονιμοποιημένα ωάρια ασθενών, σχεδιάστηκε και πραγματοποιήθηκε μια νέα σειρά πειραμάτων, προκειμένου να διαπιστωθεί η αξιοπιστία της διαδικασίας της τεχνητής ενεργοποίησης ωαρίων με τον ιονοφόρο ασβεστίου. Στα πειράματα αυτά, μια διαφορετική ομάδα άωρων ωαρίων σταδίου GV, που προήλθαν από διαφορετικές ασθενείς, υποβλήθηκαν αρχικά σε ωρίμαση *in vitro* και κατόπιν σε επεξεργασία με ιονοφόρο ασβεστίου A23187.

Σε αυτή τη σειρά πειραμάτων συμπεριελήφθησαν 7 ασθενείς. Ο μέσος όρος ηλικίας τους ήταν  $33 \pm 3$  έτη (μέση τιμή: 33 έτη). Τα αίτια υπογονιμότητας των εν λόγω ασθενών συνοψίζονται στον Πίνακα 3-4.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 3-4 Κατανομή αιτίων υπογονιμότητας στον πληθυσμό της μελέτης**

Αίτιο υπογονιμότητας	Αριθμός ζευγαριών
Ανδρικός παράγοντας	5
Σαλπγγικός παράγοντας	1
Ενδομητριάκος παράγοντας	1
<b>Σύνολο:</b>	<b>7</b>

Από αυτές τις 7 ασθενείς συλλέχθηκαν συνολικά 100 ωάρια. Η ανάλυση της ωριμότητάς τους μετά την απογύμνωση συνοψίζεται στον Πίνακα 3-5.

<b>ΠΙΝΑΚΑΣ 3-5 Έκβαση της ωρίμασης των ωαρίων <i>in vitro</i> ανά ασθενή</b>						
<b>Ασθενής</b>	<b>Ηλικία (έτη)</b>	<b>Ωάρια</b>	<b>MII</b>	<b>MI</b>	<b>GV</b>	<b>ΚΔΖ</b>
1	33	18	13	0	2	3
2	30	24	13	2	9	0
3	33	4	2	1	1	0
4	31	20	10	5	4	1
5	31	19	6	7	2	4
6	34	6	0	2	3	1
7	39	9	5	0	4	0
<b>Σύνολα:</b>		<b>100</b>	<b>49</b>	<b>17</b>	<b>25</b>	<b>9</b>

ΜΙΙ: μετάφαση δεύτερης μειωτικής διαίρεσης, ΜΙ: μετάφαση πρώτης μειωτικής διαίρεσης, GV: στάδιο βλαστικού κυστιδίου, ΚΔΖ: κενή διαφανής ζώνη (εκφύλιση του ωαρίου).

Τα 25 ωάρια που βρέθηκαν σε στάδιο GV καλλιεργήθηκαν προκειμένου να ωριμάσουν *in vitro*, όπως προηγουμένως. Στον Πίνακα 3-6 συνοψίζεται η έκβαση και η απόδοση της ωρίμασης *in vitro* των εν λόγω ωαρίων, έπειτα από 24 h καλλιέργειας.

<b>ΠΙΝΑΚΑΣ 3-6 Απόδοση της ωρίμασης των ωαρίων <i>in vitro</i></b>				
<b>Ωάρια (n)</b>	<b>GV (n)</b>	<b>MI (n)</b>	<b>MII (n)</b>	<b>Απόδοση (%)</b>
25	5	3	17	17/25 (68)

GV: στάδιο βλαστικού κυστιδίου, ΜΙ: μετάφαση πρώτης μειωτικής διαίρεσης, ΜΙΙ: μετάφαση δεύτερης μειωτικής διαίρεσης

Συνάγεται ότι, από τα 25 ωάρια σταδίου GV που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτό το πειραματικό σκέλος, τα 17 ωρίμασαν και έφθασαν σε φάση ΜΙΙ μετά 24 h καλλιέργειας, έχοντας εκβάλει το πρώτο πολικό σωματίο, ενώ 3 έφθασαν μόνο μέχρι το στάδιο ΜΙ και 5 παρέμειναν στο στάδιο GV. Επομένως, η απόδοση της διαδικασίας ήταν 17/25 (68,00%).

Στη συνέχεια, τα ώριμα (ΜΙΙ) ωάρια εκτέθηκαν στον ιονοφόρο ασβεστίου A23187 και κατόπιν επανατοποθετήθηκαν σε καλλιέργεια στο σύστημα χρονοδιόλιθσης Embryoscope<sup>®</sup>, προκειμένου να διαπιστωθεί η ενεργοποίησή τους, όπως περιγράφεται παραπάνω.



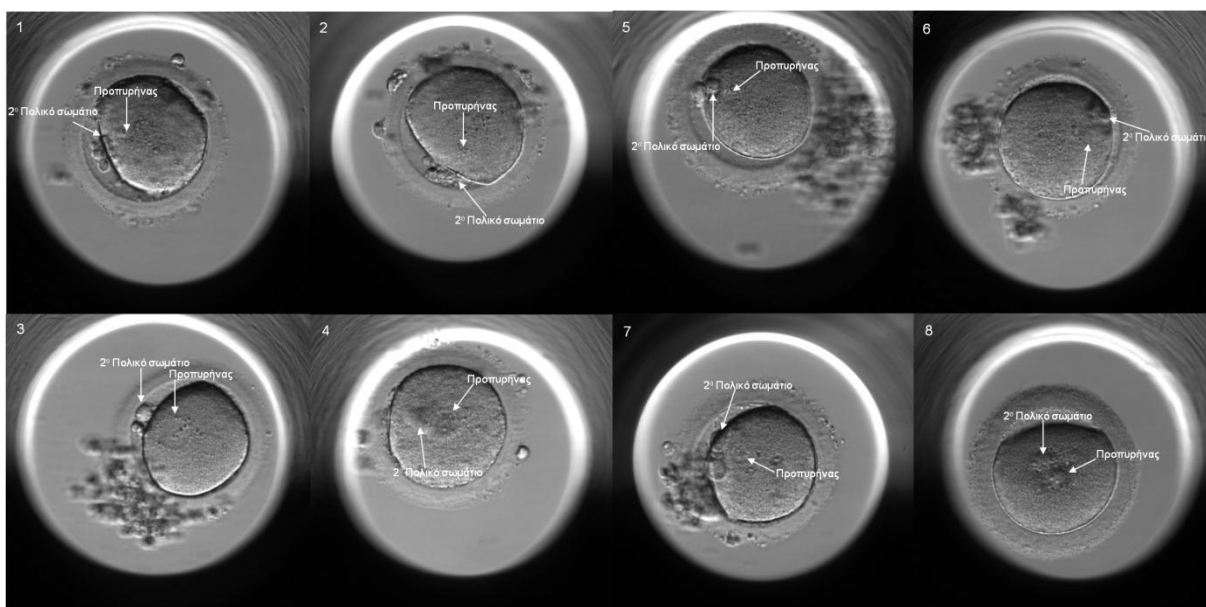
Τα αποτελέσματα της τεχνητής ενεργοποίησης καταγράφηκαν μετά την παρέλευση 18 ωρών από την έκθεση των ωαρίων σταδίου MII στον ιονοφόρο ασβεστίου A23187 και συνοψίζονται στον Πίνακα 3-7.

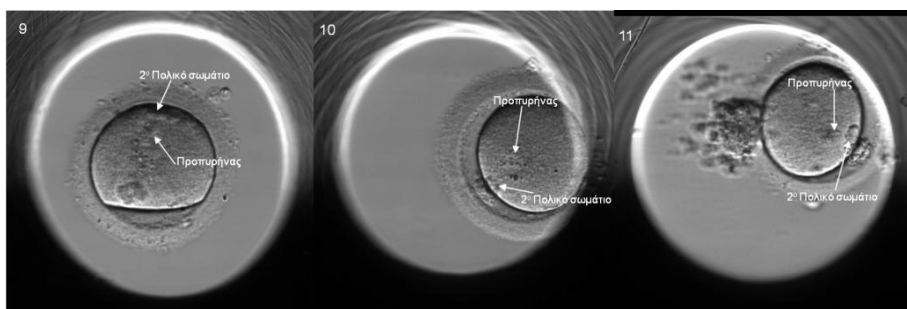
ΠΙΝΑΚΑΣ 3-7 Τεχνητή ενεργοποίηση ωαρίων με έκθεση σε ιονοφόρο ασβεστίου				
Ωάρια από IVM	Ενεργοποίηση (1PN/2PB)	Μη ενεργοποίηση (0PN/1PB)	Εκφύλιση	Απόδοση (%)
17	11	5	1	11/17 (64,70)

IVM: ωρίμαση *in vitro*, PN: προπυρήνας, PB: πολικό σωματίο

Συνάγεται ότι, από τα 17 ωάρια σταδίου MII, προερχόμενα από IVM, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν σε αυτό το πειραματικό σκέλος, τα 11 ενεργοποιήθηκαν εκβάλλοντας το δεύτερο πολικό σωματίο και εμφανίζοντας τον πρώτο προπυρήνα, ενώ 5 δεν εμφάνισαν προπυρήνα (άρα θεωρήθηκαν μη ενεργοποιημένα) και ένα εκφυλίσθηκε. Επομένως, η απόδοση της ενεργοποίησης ήταν 11/17 (64,70%).

Ένα άλλο σημαντικό εύρημα αυτής της πειραματικής σειράς είναι ότι και στα 11 ενεργοποιημένα ωάρια που προέκυψαν (1PN/2PB), ο θήλυς προπυρήνας σχηματίζεται στο σημείο εκβολής του 2<sup>ου</sup> πολικού σωματίου. Αυτό τεκμηριώνεται με τα μικροφωτογραφικά δεδομένα από το σύστημα χρονοδιολίσθησης. Ο εν λόγω προπυρήνας είναι αναγκαστικά μητρικής προελεύσεως, διότι τα ωάρια δεν ήρθαν σε επαφή με σπέρμα. Πρόκειται επομένως για φαινόμενο απλοειδούς παρθενογενετικής ενεργοποίησης (Bos-Mikich *et al.*, 2016; Rhoton-Vlasak *et al.*, 1996), γεγονός που επιβεβαιώνεται από την εκβολή του δεύτερου πολικού σωματίου (Εικόνα 3.2).





**Εικόνα 3.2** Μικροφωτογράφιση χρονοδιολίσθησης των 11 ενεργοποιημένων ωαρίων. Σε όλες τις περιπτώσεις, ο προπυρήνας σχηματίζεται στο σημείο εκβολής του 2<sup>ου</sup> πολικού σωματίου.

### 3.2 Τεχνητή ενεργοποίηση ωαρίων με ιονοφόρο ασβεστίου A23187 ύστερα από αποτυχία γονιμοποίησης με ICSI

Έχοντας πιστοποιήσει ότι η μέθοδος καλλιέργειας και η απόδοση είναι ικανοποιητικές, προχωρήσαμε στο κυρίως μέρος της μελέτης που αφορά ωάρια κλινικής εφαρμογής της ICSI, τα οποία κρίθηκαν μη γονιμοποιημένα ύστερα από παρατήρηση με το σύστημα χρονοδιολίσθησης.

Μη γονιμοποιημένα ωάρια από 30 ασθενείς (30 κύκλοι θεραπείας με εξωσωματική γονιμοποίηση) εντάχθηκαν στην **πειραματική ομάδα Α**. Οι ηλικίες των γυναικών κυμαίνονταν από 26 έως 46 έτη. Ο μέσος όρος της ηλικίας των γυναικών των ζευγαριών αυτών ήταν  $35,83 \pm 5,10$  έτη, με μέση τιμή τα 37 έτη.

Οι ηλικίες των ανδρών των ζευγαριών της ομάδας Α, κυμαίνονταν από 29 έως 47 έτη με μέσο όρο ηλικίας τα  $39,83 \pm 6,10$  έτη, με μέση τιμή τα 39,5 έτη.

Τα αίτια υπογονιμότητας των εν λόγω ζευγαριών συνοψίζονται στον Πίνακα 3-8.

<b>ΠΙΝΑΚΑΣ 3-8 Αίτια υπογονιμότητας των ζευγαριών της πειραματικής Ομάδας Α</b>	
<b>Αίτιο</b>	<b>Πλήθος</b>
Ασθενότερατοσπερμία	15
Ολιγοασθενότερατοσπερμία	11
Αποφρακτική αζωοσπερμία	2
Παρουσία αντισπερματικών αντισωμάτων	1
Ανεξήγητη υπογονιμότητα	1

Τα συγκεντρωτικά στοιχεία και τα ποιοτικά χαρακτηριστικά του κάθε κύκλου εξωσωματικής γονιμοποίησης για τα ζευγάρια της πειραματικής Ομάδας Α παρατίθενται στον Πίνακα 3-9.

<b>ΠΙΝΑΚΑΣ 3-9 Χαρακτηριστικά των κύκλων θεραπείας για τα ζευγάρια της πειραματικής Ομάδας Α</b>										
<b>α/α</b>	<b>H♀</b>	<b>H♂</b>	<b>Ω</b>	<b>ICSI</b>	<b>Γ</b>	<b>ΜΓ</b>	<b>[Σ]</b>	<b>Κιν%</b>	<b>Κιν.Α</b>	<b>ΑΜΦ</b>
1	32	33	15	11	7	4	40	40	30	98
2	32	31	21	15	10	1	80	70	25	95
3	34	39	15	13	2	9	5	4	0,5	97
4	37	47	8	6	3	2		AA (TESE)0		
5	34	36	31	29	14	4	50	50	20	97
6	38	39	14	9	6	3	4	10	3	95
7	23	39	23	19	15	2	0,7	15	5	100
8	38	41	7	6	3	2	8	10	5	98
9	46	45	14	12	8	3	35	40	20	95
10	39	42	27	12	7	5	50	50	40	95
11	39	40	8	4	3	1	100	70	60	95
12	38	36	12	8	6	2	0,01	0,01	0,01	98
13	37	45	21	9	6	3	80	70	30	95
14	38	36	7	7	4	2	20	25	15	97
15	43	43	7	6	3	3	25	35	20	90
16	34	36	14	12	9	2	50	70	35	99
17	36	52	17	14	13	2	60	60	30	97
†18	34	29	7	5	4	1	90	80	40	90
19	38	44	6	3	2	1	3	8	10	98
20	42	41	8	8	6	2	10	20	10	98
21	42	48	15	15	9	3	15	10	5	98
22	37	47	1	1	0	1	50	40	20	95
23	27	50	22	19	9	9	2	1	0	99
24	26	29	18	15	14	1	15	40	35	97
25	28	30	15	13	11	1	0,5	5	2	98
‡26	38	39	6	5	3	1	45	50	25	95
27	39	38	5	4	2	1	65	50	35	96
28	38	40	8	7	6	1		AA (TESE)		
29	32	35	16	14	11	2	0,2	20	7	98
30	36	45	15	9	4	1	80	65	30	98

α/α: αύξων αριθμός, H♀: ηλικία της συντρόφου, H♂: ηλικία του συντρόφου, Ω: αριθμός συλλεγέντων ωαρίων, ICSI: αριθμός ωαρίων που υπέστησαν μικρογονιμοποίηση, Γ: αριθμός ωαρίων που γονιμοποιήθηκαν, ΜΓ: αριθμός μη γονιμοποιημένων ωαρίων διαθέσιμων για τεχνητή ενεργοποίηση με τον ιονοφόρο ασβεστίου, [Σ]: συγκέντρωση σπερματοζωαρίων ( $10^6$ / ml), Κιν%: ολική κινητικότητα (%), Κιν.Α: προωθητική κινητικότητα (%), ΑΜΦ: ποσοστό ανώμαλων μορφών (%), †: ανεξήγητη υπογονιμότητα, ‡: παρουσία αντισπερματικών αντισωμάτων, AA: αποφρακτική αζωοσπερμία.

Ο δείκτης μάζας σώματος ήταν εντός των φυσιολογικών ορίων για όλα τα ζευγάρια αυτού του πειραματικού σκέλους. Η μορφολογία των σπερματοζωαρίων προσδιορίστηκε σύμφωνα με τις οδηγίες του εγχειριδίου του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (World Health Organization, 2010).

Από τις 30 ασθενείς συνελέγησαν συνολικά 403 ωάρια, εκ των οποίων 310 υποβλήθηκαν σε ICSI. Προέκυψαν 200 γονιμοποιημένα ωάρια (ποσοστό γονιμοποίησης 64,52%). Μετά την πάροδο 18 ωρών από τη μικρογονιμοποίηση παρατηρήθηκαν συνολικά 75 ωάρια με ένα πολικό σωματίο και απουσία προπυρήνων (0PN/1PB). Τα ωάρια αυτά χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη τεχνητής ενεργοποίησης με ιονοφόρο ασβεστίου A23187 (AOA), όπως περιγράψαμε στην §2.4.12.

Θεωρήθηκαν ομαλώς ενεργοποιημένα τα ωάρια τα οποία, 18 h μετά την έκθεση στον ιονοφόρο ασβεστίου A23187, εμφανίζουν (Lu *et al.*, 2006):

- 2 προπυρήνες και 2 πολικά σωματία (2PN/2PB)
- 1 προπυρήνα και 2 πολικά σωματία (1PN/2PB)
- Αυτόματη αυλάκωση (DC, direct cleavage): τα εν λόγω ωάρια περνούν απευθείας από τη φάση 0PN/1PB σε αυλάκωση, χωρίς να μεσολαβήσει η εκδήλωση άλλου χαρακτηριστικού της γονιμοποίησης (ιδίως, για παράδειγμα, η εμφάνιση προπυρήνων).

Από τα 75 ωάρια που υποβλήθηκαν σε AOA, 19 ενεργοποιήθηκαν και εμφάνισαν 2 προπυρήνες και 2 πολικά σωματία (2PN/2PB), 8 ενεργοποιήθηκαν και εμφάνισαν 1 προπυρήνα και 2 πολικά σωματία (1PN/2PB), ενώ 5 ενεργοποιήθηκαν με αυτόματη αυλάκωση. Τα υπόλοιπα ωάρια είτε εμφάνισαν άτυπη ενεργοποίηση με πολλαπλούς προπυρήνες, είτε δεν ενεργοποιήθηκαν: 8 εμφάνισαν 3 προπυρήνες (3PN), 10 εμφάνισαν 4 προπυρήνες (4PN), ενώ 25 ωάρια δεν εμφάνισαν προπυρήνα (0PN, απουσία ενεργοποίησης). Η απόδοση της AOA ήταν 32/75 (42,66%). Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον Πίνακα 3-10.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3-10 Έκβαση της AOA στην πειραματική ομάδα Α							
Ωάρια AOA	Ομαλώς ενεργοποιημένα ωάρια			Ατύπως/μη ενεργοποιημένα ωάρια			Απόδοση AOA
	2PN/2PB	1PN/2PB	DC	3PN	4PN	0PN	
75	19 (59,37%)	8 (25,00%)	5 (15,63%)	8 (18,60%)	10 (23,26%)	25 (58,14%)	32/75 (42,66%)

PN: προπυρήνας, PB: πολικό σωματίο, DC: αυτόματη αυλάκωση, AOA: τεχνητή ενεργοποίηση ωαρίου.

### 3.3 Καλλιέργεια με προσθήκη αυξητικού παράγοντα GM-CSF ύστερα από τεχνητή ενεργοποίηση με ιονοφόρο ασβεστίου A23187

Μη γονιμοποιημένα ωάρια από 36 ασθενείς (36 κύκλοι θεραπείας με εξωσωματική γονιμοποίηση) εντάχθηκαν στην **πειραματική ομάδα B**, στην οποία τα ωάρια ενεργοποιήθηκαν τεχνητά με ιονοφόρο ασβεστίου A23187 και στη συνέχεια καλλιεργήθηκαν σε μέσο που περιείχε τον αυξητικό παράγοντα rhGM-CSF. Η κατανομή των ωαρίων στην ομάδα B έγινε τυχαία και προοπτικά. Οι ηλικίες των γυναικών κυμαίνονταν από 28 έως 48 έτη. Ο μέσος όρος της ηλικίας των γυναικών των ζευγαριών αυτών ήταν  $36,61 \pm 4,75$  έτη, με μέση τιμή τα 37 έτη.

Οι ηλικίες των ανδρών των ζευγαριών της ομάδας A, κυμαίνονταν από 28 έως 50 έτη με μέσο όρο ηλικίας τα  $40,47 \pm 5,45$  έτη, με μέση τιμή τα 40 έτη.

Τα αίτια υπογονιμότητας των εν λόγω ζευγαριών συνοψίζονται στον Πίνακα 3-11.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3-11 Αίτια υπογονιμότητας των ζευγαριών της πειραματικής Ομάδας B	
Αίτιο	Πλήθος
Ασθενότερατοσπερμία	19
Ολιγοασθενότερατοσπερμία	17

Τα συγκεντρωτικά στοιχεία και τα ποιοτικά χαρακτηριστικά του κάθε κύκλου εξωσωματικής γονιμοποίησης για τα ζευγάρια της πειραματικής Ομάδας B παρατίθενται στον Πίνακα 3-12.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3-12 Χαρακτηριστικά των κύκλων θεραπείας για τα ζευγάρια της πειραματικής Ομάδας A										
α/α	H <sub>♀</sub>	H <sub>♂</sub>	Ω	ICSI	Γ	ΜΓ	[Σ]	Κιν%	Κιν.Α	ΑΜΦ
1	39	40	14	7	8	2	20	30	20	97
2	33	34	21	17	12	3	1	10	5	98
3	32	49	11	10	8	2	0,6	5	2	95
4	38	46	6	5	4	1	6	15	5	96
5	33	35	11	9	7	1	40	40	30	90
†6	37	44	23	11	7	3	50	50	35	98
†7	38	42	19	17	11	4	50	35	15	97
8	42	38	7	5	2	3	30	40	15	96
†9	32	37	18	15	9	6	14	45	15	97
10	37	40	13	12	8	1	30	30	15	98

11	41	48	3	3	2	1	15	45	15	97
12	37	42	6	6	4	1	80	70	60	95
13	31	28	18	17	14	1	5	10	5	97
14	41	40	1	1	0	1	15	35	15	96
15	39	38	9	6	3	3	10	20	10	96
16	44	47	15	13	8	4	60	50	40	95
17	48	47	1	1	0	1	15	30	25	95
18	41	46	1	1	0	1	25	40	20	95
19	35	38	18	14	12	1	50	50	30	95
20	40	47	9	7	5	2	15	10	5	96
21	38	34	20	16	13	1	3,5	20	10	99
22	38	46	5	4	3	1	25	40	15	98
23	37	32	9	5	4	1	0,8	30	15	98
24	44	42	7	5	4	1	45	50	15	97
25	32	33	25	16	11	3	15	40	20	95
26	36	44	14	9	7	2	18	45	15	99
27	29	36	18	9	2	3	6	40	15	96
28	31	34	10	9	7	1	25	45	15	97
29	44	43	4	3	2	1	22	45	15	97
30	35	50	18	13	11	1	3	3	1	98
□‡31	34	38	10	7	4	2	40	35	15	97
32	36	36	8	8	4	1	20	40	30	97
33	28	44	4	4	3	1	85	60	50	96
34	34	39	17	9	8	1	45	15	10	97
35	28	44	4	4	2	1	30	45	20	97
36	36	36	16	13	11	2	10	35	15	96

α/α: αύξων αριθμός, Η♀: ηλικία της συντρόφου, Η♂: ηλικία του συντρόφου, Ω: αριθμός συλλεγέντων ωαρίων, ICSI: αριθμός ωαρίων που υπέστησαν μικρογονιμοποίηση, Γ: αριθμός ωαρίων που γονιμοποιήθηκαν, ΜΓ: αριθμός μη γονιμοποιημένων ωαρίων διαθέσιμων για τεχνητή ενεργοποίηση με τον ιονοφόρο ασβεστίου, [Σ]: συγκέντρωση σπερματοζωαρίων ( $10^6$ / ml), Κιν%: ολική κινητικότητα (%), Κιν.Α: προωθητική κινητικότητα (%), ΑΜΦ: ποσοστό ανώμαλων μορφών (%), †: ανδρικός και σαλπινγικός παράγων υπογονιμότητας, ‡: παχυσαρκία.

Ο δείκτης μάζας σώματος ήταν εντός των φυσιολογικών ορίων για όλα τα ζευγάρια αυτού του πειραματικού σκέλους, εκτός από το ζευγάρι με αύξοντα αριθμό 31, στο οποίο η σύζυγος ήταν παχύσαρκη. Η μορφολογία των σπερματοζωαρίων προσδιορίστηκε όπως παραπάνω, σύμφωνα με τις οδηγίες του εγχειριδίου του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (World Health Organization, 2010).

Από τις 36 ασθενείς συνελέγησαν συνολικά 413 ωάρια, εκ των οποίων 311 υποβλήθηκαν σε ICSI. Προέκυψαν 220 γονιμοποιημένα ωάρια (ποσοστό γονιμοποίησης 70,74%). Μετά την πάροδο 18 ωρών από τη μικρογονιμοποίηση παρατηρήθηκαν

συνολικά 65 ωάρια με ένα πολικό σωματίο και απουσία προπουρήνων (0PN/1PB). Τα ωάρια αυτά χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη τεχνητής ενεργοποίησης με ιονοφόρο ασβεστίου A23187 (AOA) και καλλιέργεια σε μέσον που περιείχε, ως πρόσθετο, αυξητικό παράγοντα rhGM-CSF, όπως περιγράψαμε στην §2.4.13.

Όπως παραπάνω, η τεχνητή ενεργοποίηση των ωαρίων (AOA) μελετήθηκε με το σύστημα χρονοδιόλιθης. Από τα 65 ωάρια που υποβλήθηκαν σε AOA, 20 ενεργοποιήθηκαν και εμφάνισαν 2 προπουρήνες και 2 πολικά σωματία (2PN/2PB), 4 ενεργοποιήθηκαν και εμφάνισαν 1 προπουρήνα και 2 πολικά σωματία (1PN/2PB), ενώ 11 ενεργοποιήθηκαν με αυτόματη αυλάκωση. Από τα 20 εν λόγω ωάρια, 1 εμφάνισε 2 χαρακτηριστικούς ευμεγέθεις προπουρήνες και 3 δορυφορικούς πυρηνίσκους. Τα υπόλοιπα ωάρια είτε εμφάνισαν άτυπη ενεργοποίηση με πολλαπλούς προπουρήνες, είτε δεν ενεργοποιήθηκαν: 14 εμφάνισαν 3 προπουρήνες (3PN), 8 εμφάνισαν 4 προπουρήνες (4PN), ενώ 8 ωάρια δεν εμφάνισαν προπουρήνα (0PN, απουσία ενεργοποίησης). Η απόδοση της AOA ήταν 35/65 (53,84%). Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον Πίνακα 3-13.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 3-13 Έκβαση της AOA στην πειραματική ομάδα Β**

Ωάρια AOA	Ομαλώς ενεργοποιημένα ωάρια			Ατύπως/μη ενεργοποιημένα ωάρια			Απόδοση AOA
	2PN/2PB	1PN/2PB	DC	3PN	4PN	0PN	
65	20 (57,14%)	4 (11,43%)	11 (31,43%)	14 (46,67%)	8 (26,67%)	8 (26,66%)	35/65 (53,84%)

PN: προπουρήνας, PB: πολικό σωματίο, DC: αυτόματη αυλάκωση, AOA: τεχνητή ενεργοποίηση ωαρίου.

### 3.4 Σύγκριση της ενεργοποίησης στις ομάδες Α και Β

Στη συνέχεια, προκειμένου να διαπιστωθεί εάν η προσθήκη του αυξητικού παράγοντα GM-CSF στο καλλιεργητικό μέσον επέδρασε διαφορετικά στα ποιοτικά χαρακτηριστικά της AOA μεταξύ των ομάδων Α και Β, πραγματοποιήθηκε στατιστική σύγκριση των αποτελεσμάτων μεταξύ των δύο αυτών ομάδων.

Η σύγκριση έδειξε ότι:

- δεν υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων ως προς το ποσοστό εμφάνισης ενεργοποιημένων ωαρίων με 2 προπουρήνες και 2 πολικά σωματία ( $p = 1,0000$ ),

- ο αριθμός εμβρύων 1PN/2PB και DC δεν εμφανίζει στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων A και B, με τιμές  $p = 0,2056$  και  $p = 0,1592$  αντίστοιχα,
- από τη σύγκριση του συνολικού αριθμού ενεργοποιημένων ωαρίων στις δύο ομάδες προκύπτει ότι ο αυξητικός παράγων rhGM-CSF δεν επηρέασε την τεχνητή ενεργοποίηση ( $p = 0,2353$ ).

Οι αντίστοιχες τιμές  $p$  για τους πληθυσμούς των ωαρίων με 3PN, 4PN και 0PN ανάμεσα στις ομάδες A και B βρέθηκαν να είναι  $p = 0,0185$ ,  $p = 0,7871$  και  $p = 0,0094$  αντίστοιχα. Παρατηρήθηκε εδώ λοιπόν ότι ο αριθμός των ωαρίων που εμφάνισαν 3 προπυρήνες ήταν στατιστικά σημαντικά αυξημένος στην ομάδα B, δεν υπήρξε καμία σημαντική διαφορά στα ωάρια που εμφάνισαν 4 προπυρήνες ανάμεσα στις δύο ομάδες, ενώ τέλος σημαντικά αυξημένος ήταν ο αριθμός των ωαρίων εκείνων που δεν εμφάνισαν κανένα προπυρήνα μετά την εφαρμογή του πρωτοκόλλου AOA στην ομάδα A.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 3-14 Στατιστική σύγκριση των παραμέτρων AOA μεταξύ των ομάδων A και B**

	Ομαλώς ενεργοποιημένα ωάρια					Ατύπως/μη ενεργοποιημένα ωάρια		
	Ωάρια AOA	Ωάρια AOA +	2PN/2PB	1PN/2PB	DC	3PN	4PN	0PN
<b>Ομάδα A</b>	75	32	19	8	5	8	10	25
<b>Ομάδα B</b>	65	35	20	4	11	14	8	8
<i>p</i>		0,2353	1,0000	0,2056	0,1592	0,0185	0,7871	0,0094

PN: προπυρήνας, PB: πολικό σωματίο, DC: αυτόματη αulάκωση, Ωάρια AOA: ωάρια που υπεβλήθησαν σε τεχνητή ενεργοποίηση, AOA+: ωάρια που ενεργοποιήθηκαν με AOA, *p*: τιμή στατιστικής σημαντικότητας (< 0,05).

### 3.5 Ανάλυση της εξέλιξης των εμβρύων

#### 3.5.1 Παρατηρήσεις από το σύστημα χρονοδιολίσθησης

Η παρακολούθηση των ενεργοποιημένων ωαρίων των ομάδων A και B στον επωαστικό κλίβανο Embryoscope<sup>®</sup> παρατάθηκε μέχρι την 5<sup>η</sup> ημέρα μετά την ενεργοποίησή τους, δηλαδή μέχρι το αναπτυξιακό στάδιο της βλαστοκύστης.

Κατά τη διάρκεια αυτής της επώασης, τα αναπτυξιακά και ποιοτικά χαρακτηριστικά των παραγόμενων εμβρύων καταγράφηκαν από το σύστημα χρονοδιολίσθησης. Το βίντεο που προέκυψε αναλύθηκε ώστε να περιγραφούν χωριστά τα κύρια χαρακτηριστικά



ανάπτυξης και ποιότητας του κάθε εμβρύου. Αυτά παρατίθενται στους αναλυτικούς Πίνακες 3-15 και 3-16.

<b>ΠΙΝΑΚΑΣ 3-15 Χαρακτηριστικά των εμβρύων της ομάδας Α κατά την παρακολούθηση με χρονοδιολίσθηση</b>																				
Αυξων αριθμός εμβρύου	PN	Χρόνος εμφάνισης PN	Χρόνος εξοφάνισης PN	DC	1-3	2-4	MN-MS	Ανισομενέθη βλαστομερίδια	NC	Επαναράφηση	Αριθμός κυττάρων D2	Θρυμματισμός	Ποιότητα εμβρύου	Αριθμός κυττάρων D3	Θρυμματισμός	Ποιότητα εμβρύου	Αριθμός κυττάρων/στάδιο D5	Ποιότητα εμβρύου	Κατηγορία	Σχόλια
1	2	9,3	19,1	-	-	N	-	-	-	-	4	-	II	7	-	II,5	7	IV	B	DA D3
2	2	6,3	19,1	-	-	-	-	-	N	-										NC
3	2	6,8	22,3	-	-	N	-	-	-	-	4	2X	III,5	5	2X	IV			D	DA D2
4	2	6,8	30						N											NC
5	2	9,2	18,9	-	N	-	-	-	-	-	3	1X	II,5	4	1X	IV			D	DA D2
6	1	5,2	19,4	-	N	-	-	N	-	N	3	2X	IV	4	2X	IV			D	DA D2
7	1	2,3	8,7	-	-	-	-	-	-	N	4	2X	IV	4	2X	IV			D	DA D2
8	1	5,2	17,1	-	-	-	-	N	-	N	4	1X	III	5	2X	IV			D	DA D2
9	1	6	15,2	-	-	N	-	-	-	-	4	1X	III	6	1X	III	7	IV	C	DA D3
10	2	4,9	24,4	-	N	-	-	-	-	N	3	1X	III	6	1X	III	6	IV	C	DA D3
11	2	42	55						N											NC
12	2	7,8	23	-	N	-	-	N	-	-	5	-	II	5	-	III,5	7	IV	D	DA D2
13	2	4,8	9,7	-	N	-	-	-	-	N	4	2X	IV	5	2X	IV	5	IV	D	DA D2
14	1	7,2	26,5	-	-	-	-	-	-	N	7	2X	IV	8	2X	III,5	10	IV	D	DA D3
15	1	10	22	-	-	N	-	N	-	N	4	-	II	5	-	II,5	7	IV	C	DA D2
16	2	15,3	22,2	-	N	-	N	N	-	N	2	-	II,5	2	-	IV	2	IV	D	DA D2
17	1	8,5	26	-	-	-	N	-	-	-	2	-	II,5	2	-	IV	2	IV	D	DA D2
18	0			N	-	-	-	-	-	N	4	2X	III,5	5	2X	IV	5	IV	D	DC 5,7 h
19	2	5,6	20,2	-	N	-	-	-	-	-	5	1X	II,5	8	1X	II,5	Blk	4CC	B	DC 20,4 h
20	0			N	-	-	-	N	-	-	4	1X	III	7	1X	II,5	7	IV	C	DA D3
21	2	8,4	19,9	-	-	N	-	-	-	-	4	-	I	8	-	I	Mop		A	
22	2	8,4	22,4	-	-	N	-	-	-	-	4	-	II	8	-	II	Mop		A	
23	0			N	N	-	-	-	-	-	5	-	II,5	5	1X	IV	5	IV	D	DC 5,9h DA D2
24	2	6,3	21,8	-	-	-	-	N	-	N	3	2X	III,5	3	1X	IV	3	IV	D	DA D2
25	0			N	-	N	-	-	-	-	4	-	I	8	-	I	Blk	4BA	A	DC 1,3 h
26	1	7,8	17,6	-	-	N	-	-	-	-	4	1X	II	4	1X	IV	4	IV	D	DA D2 DC 0,5h
27	0			N	-	-	-	N	-	-	2	1X	II,5	4	1X	IV	4	IV	D	DA D2
28	2	7,4	22,6						N											NC
29	2	11,2	22,1	-	-	-	-	N	-	-	6	-	II,5	6	-	II,5	7	IV	C	DA D3
30	2	10,4	20,6	-	-	-	-	N	-	-	2	1X	III,5	2	2X	IV	2	IV	D	DA D2
31	2	5,5	19,9	-	N	-	-	N	-	-	5	-	II	7	-	II	7	IV	B	DA D3
32	2	11,4	23,8	-	N	-	-	N	-	-	7	-	II,5	7	1X	II,5	7	IV	C	DA D2

1-3: άμεση αλτάκωση από 1 σε 3 κύτταρα, 2-4: άμεση αλτάκωση από 2 σε 4 κύτταρα, DA: ανακοπή της ανάπτυξης (developmental arrest), DC: αυτόματη αλτάκωση (direct cleavage), D2: ημέρα 2 (day 2), D3: ημέρα 3 (day 3), MN-MS: παρουσία πολλαπλών πυρήνων (MN, multinucleation) ή μικροδορυφόρων (MS, microsatellites), NC: αποτυχία αλτάκωσης (no cleavage), PN: προπυρήνας, Blk: βλαστοκύστη, Mop: Μορίδιο, N: ναι.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 3-16 Χαρακτηριστικά των εμβρύων της ομάδας Β κατά την παρακολούθηση με χρονοδιολίσθηση**

Αύξων αριθμός εμβρύου	PN	Χρόνος εμφάνισης PN	Χρόνος εξαφάνισης PN	DC	Αυλάκωση 1-3			Αυλάκωση 2-4			MN-MS	Ανισομεγέθη βλαστομερίδια	NC	Επαναρρόφηση	Αριθμός κυττάρων D2	Θρυμματισμός	Ποιότητα εμβρύου	Αριθμός κυττάρων D3	Θρυμματισμός	Ποιότητα εμβρύου	Αριθμός κυττάρων/στάδιο D5	Ποιότητα εμβρύου	Κατηγορία	Σχόλια
					1-3	2-4	2-4	2-4	2-4	2-4														
1	2	5,7	19,8	-	-	N	-	-	-	-	-	-	-	5	-	1,5	9	-	1,5	Βλκ	3CC	A		
2	2	14	22,8	-	-	N	-	-	-	-	-	-	-	4	-	1,5	7	-	1,5	Μορ		A		
3	2	6,3	20,7	-	N	-	-	-	-	-	-	-	-	6	1X	11,5	8	-	11,5	8	IV	B	DA D3	
4	0			N	-	N	N	-	-	-	-	-	-	4	1X	II	9	-	II	Βλκ	4BB	A	DC 2,5 h	
5	2	9,5	19,2	-	N	-	-	N	-	-	-	-	-	3	2X	11,5	3	2X	IV	3	IV	D	DA D2	
6	0			N	-	N	N	-	-	-	-	-	-	4	-	1,5	8	-	II	Μορ		A		
7	2	5,9	19,4	-	N	-	-	-	-	-	-	-	-	3	1X	11,5	3	1X	IV	3	IV	D	DA D2	
8	2	7,5	17,5	-	-	N	-	-	-	-	-	-	-	5	-	IV	5	-	IV	5	IV	D	DA D2	
9	2	8	18,9	-	N	-	-	-	-	-	-	-	-	6	-	11,5	6	-	II	6	IV	C	DA D3	
10	2	36,9	48,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N										D	DA D1
11	2	7,4	19,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13	-	IV	13	-	IV	13	IV	D	DA D2	
12	2	11,5	21,6	-	-	N	-	-	-	-	-	-	-	4	-	II	7	-	II	Μορ		A		
13	2	4,6	17,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	1X	11,5	7	1X	11,5	Βλκ	4AB	A		
14	1	7,9	20	-	-	-	-	-	-	-	-	N	-											DA
15	0			N	N	-	-	-	-	-	-	N	-	5	1X	11,5	7	1X	11,5	7	IV	B	DA D3	
16	2	2,5	7	-	-	-	-	N	-	-	-	-	-	4	1X	III	6	1X	III	6	IV	C	DA D3	
17	0			N	-	N	-	-	-	-	-	-	-	4	-	1,5	8	-	1,5	Βλκ	4BA	A	DC 1,8 h	
18	2	6,8	23,6	-	N	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	II	8	-	1,5	8	IV	A	DA D3	
19	1	6,8	23,1	-	-	-	-	N	-	N	-	-	-	4	1X	11,5	6	1X	11,5	6	IV	B	DA D3	
20	1	9,6	14,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	1X	III	4	1X	III	4	IV	D	DA D2	
21	0			N	N	-	-	-	-	-	-	-	-	3	1X	11,5	7	1X	II	7	IV	B	DA D3	
22	0			N	-	N	-	-	-	-	-	-	-	4	-	II	8	-	II	Βλκ	3CB	A		
23	2	7,2	21,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	1X	11,5	2	1X	IV	2	IV	D	DA D2	
24	†	6	21,2	-	-	N	-	-	-	-	-	-	-	4	-	1,5	10	-	1,5	Βλκ	4AA	A	2PN+3MS	
25	1	4,8	18,8	-	N	-	-	N	-	-	-	-	-	5	2X	III	5	2X	IV	5	IV	D	DA D2	
26	2	5,3	20	-	-	-	-	N	-	-	-	-	-	4	2X	III	4	2X	IV	4	IV	D	DA D2	
27	2	5,5	23,2	-	-	N	-	-	-	-	-	-	-	4	-	1,5	8	-	1,5	Βλκ	4AA	A		
28	2	4,7	20,5	-	N	-	-	-	-	-	-	-	-	6	-	II	12	-	II	12	IV	B	DA D3	
29	2	9	16,5	-	-	N	-	N	-	N	-	N	-	4	1X	II	6	2X	11,5	Βλκ	4BB	B		
30	0			N	N	-	-	N	-	-	-	-	-	3	1X	11,5	3	1X	IV	3	0	D		DC 4,7 h DA D2 DC 7,3 h DA D2
31	0			N	-	-	-	N	-	-	-	-	-	2	2X	III	2	2X	IV	2	IV	D		DC 21 h DA D2
32	2	6,8	19,3	-	-	N	-	-	-	-	-	N	-	4	1X	II	8	1X	II	Βλκ	4BB	A		
33	0			N	-	N	-	-	-	-	-	-	-	4	-	I	8	-	I	Βλκ	5AA	A		DC 3,2 h
34	0			N	-	-	-	N	-	-	-	-	-	4	2X	III	5	2X	III,5	5	IV	D		DC 2,2 h
35	0			N	-	N	-	-	-	-	-	-	-	4	1X	1,5	8	1X	1,5	Βλκ	5AA	A		DC 2,2 h

1-3: άμεση αυλάκωση από 1 σε 3 κύτταρα, 2-4: άμεση αυλάκωση από 2 σε 4 κύτταρα, DA: ανακοπή της ανάπτυξης (developmental arrest), DC: αυτόματη αυλάκωση (direct cleavage), D2: ημέρα 2 (day 2), D3: ημέρα 3 (day 3), MN-MS: παρουσία πολλαπλών πυρήνων (MN, multinucleation) ή μικροδορυφόρων (MS, microsatellites), NC: αποτυχία αυλάκωσης (no cleavage), PN: προπυρήνας, Βλκ: βλαστοκύστη, Μορ: Μορίδιο, N: ναι, †: 2PN και 3 μικροδορυφόροι.

Στους πίνακες αυτούς καταγράφονται: ο αριθμός προπυρήνων που εμφανίστηκαν στα ωάρια μετά την ενεργοποίησή τους, ο χρόνος εμφάνισης και εξαφάνισης των

προπυρήνων, η ενδεχόμενη αυτόματη αυλάκωση των ωαρίων, η άμεση αυλάκωση από 1 σε 3 ή από 2 σε 4 κύτταρα, η παρουσία πολλαπλών πυρήνων ή μικροδορυφόρων στα βλαστομερίδια μετά την πρώτη κυτταρική διαίρεση, τα ανισομεγέθη βλαστομερίδια, η αποτυχία της αυλάκωσης, το φαινόμενο της επαναρρόφησης βλαστομεριδίων, ο αριθμός βλαστομεριδίων, η παρουσία κυτταρικών θραυσμάτων και η αξιολόγηση των εμβρύων 2<sup>ης</sup> και 3<sup>ης</sup> ημέρας, η αξιολόγηση των εμβρύων την 5<sup>η</sup> ημέρα και η αξιολόγηση των παραγόμενων βλαστοκύστεων. Επίσης, παρατίθεται μια γενική αξιολόγηση του εμβρύου μέχρι την τρίτη ή πέμπτη ημέρα (κατηγορίες A, B, C και D, όπου τα έμβρυα A και B κατηγορίας θεωρούνται υψηλής ποιότητας), καθώς και σχόλια σχετικά με την ανακοπή της ανάπτυξης και την ημέρα που αυτό συνέβη, τον χρόνο στον οποίο έλαβε χώρα η αυτόματη αυλάκωση, και την αποτυχία αυλάκωσης.

Παρατηρούμε ότι ορισμένα έμβρυα απέτυχαν να διαιρεθούν ομαλά, άλλα εξελίχθηκαν σε βλαστοκύστη ή μορίδιο την 5<sup>η</sup> ημέρα αφού εκκίνησαν την ανάπτυξή τους με αυτόματη αυλάκωση χωρίς να εμφανίσουν προπυρήνες, ενώ άλλα εμφάνισαν 2 προπυρήνες και εξελίχθηκαν μέχρι το στάδιο του μοριδίου ή της βλαστοκύστης την 5<sup>η</sup> ημέρα καλλιέργειας.

Στην ομάδα A, 6/32 (18,75%) ενεργοποιημένα ωάρια δημιούργησαν υψηλής ποιότητας έμβρυα, ενώ στην ομάδα B τα υψηλής ποιότητα έμβρυα ήταν 20/35 (57,14%). Η διαφορά αυτή βρέθηκε στατιστικά σημαντική υπέρ της ομάδας B ( $p = 0,0023$ ).

Στην ομάδα A, 5/6 (83,33%) υψηλής ποιότητας έμβρυα προήλθαν από ενεργοποιημένα ωάρια 2PN/2PB, ενώ 1/6 προήλθε από έμβρυο DC (16,66%). Στην ομάδα B, 11/20 (55,00%) υψηλής ποιότητας έμβρυα προήλθαν από έμβρυα 2PN/2PB, 8/20 (40,00%) προήλθαν από έμβρυα DC, ενώ 1/20 (5,00%) προήλθε από έμβρυο 1PN/2PB.

Στην ομάδα A, 2/32 (6,25%) παραγόμενα έμβρυα δημιούργησαν βλαστοκύστη την 5<sup>η</sup> ημέρα της ανάπτυξης, ενώ στην ομάδα B, 11/35 (31,42%) έμβρυα δημιούργησαν βλαστοκύστες την 5<sup>η</sup> ημέρα. Η διαφορά ποσοστού σχηματισμού βλαστοκύστεων βρέθηκε επίσης στατιστικά σημαντική υπέρ της ομάδας B ( $p = 0,0126$ ).

Στην ομάδα A, 4/32 (12,5%) έμβρυα ξεπέρασαν τον αναπτυξιακό σκόπελο της 3<sup>ης</sup> ημέρας και εξελίχθηκαν έως την 5<sup>η</sup> ημέρα (2 βλαστοκύστες και 2 μορίδια), ενώ στην ομάδα B, 14/35 (40,00%) έμβρυα εξελίχθηκαν έως την 5<sup>η</sup> ημέρα, δημιουργώντας 11 βλαστοκύστες και 3 μορίδια. Η διαφορά αυτή βρέθηκε στατιστικά σημαντική υπέρ της ομάδας B ( $p = 0,0139$ ).

Στην ομάδα A, 15/19 (78,94%) έμβρυα 2PN/2PB διαιρέθηκαν 24-48 h μετά την ενεργοποίηση, ενώ το αντίστοιχο ποσοστό για την ομάδα B ήταν 20/20 (100%). Τα έμβρυα της ομάδας B εμφάνισαν μεγαλύτερη δυναμική κατά την έναρξη της αυλάκωσης και η δυναμική αυτή ήταν στατιστικώς σημαντική ( $p = 0,0471$ ).

Αξίζει να σημειωθεί ότι μόνον 1 έμβρυο 2PN/2PB από την ομάδα A, το οποίο εμφάνισε άμεση αυλάκωση από 1 σε 3 κύτταρα, κατόρθωσε να εξελιχθεί μέχρι την 5<sup>η</sup> ημέρα και να δημιουργήσει μια βλαστοκύστη κατηγορίας 4CC. Η συγκεκριμένη βλαστοκύστη βρέθηκε γενετικώς ανώμαλη (βλ επόμενη ενότητα).

Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώνει άλλες μελέτες απεικόνισης της καλλιέργειας με χρονοδιολίσθηση, στις οποίες η άμεση αυλάκωση από 1 σε 3 κύτταρα χωρίς να παρεμβληθεί το στάδιο των 2 κυττάρων, γνωστή ως “τριχοτομική μίτωση” (trichotomous mitosis) οδηγεί στη δημιουργία εμβρύων που δεν εμφανίζουν δυναμικό εμφύτευσης και γέννησης υγιών νεογνών (Ahlstrom *et al.*, 2016; Ciray *et al.*, 2014; Rubio *et al.*, 2012).

Τα αποτελέσματα αυτά συνοψίζονται στον Πίνακα 3-17.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3-17 Ποιότητα των εμβρύων στις πειραματικές ομάδες A και B										
Ομάδα	Σύνολο	Ποιότητα Εμβρύων				NC	Υψηλής Ποιότητας Έμβρυα			
		Υψηλή		Χαμηλή			Σύνολο	Πρόελευση		
		A	B	C	D			2PN/ 2PB	1PN/ 2PB	DC
A	32	3	3	6	16	4	6	5/6 83,33%	0/6 0%	1/6 16,66%
B	35	14	6	2	12	1*	20	11/20 55,00%	1/20 5,00%	8/20 40,00%

PN: προπυρήνας, PB: πολικό σωματίο, DC (direct cleavage): αυτόματη αυλάκωση, NC (no cleavage): αποτυχία αυλάκωσης  
\*: το συγκεκριμένο έμβρυο της Ομάδας B προήλθε από ωάριο 1PN/2PB.

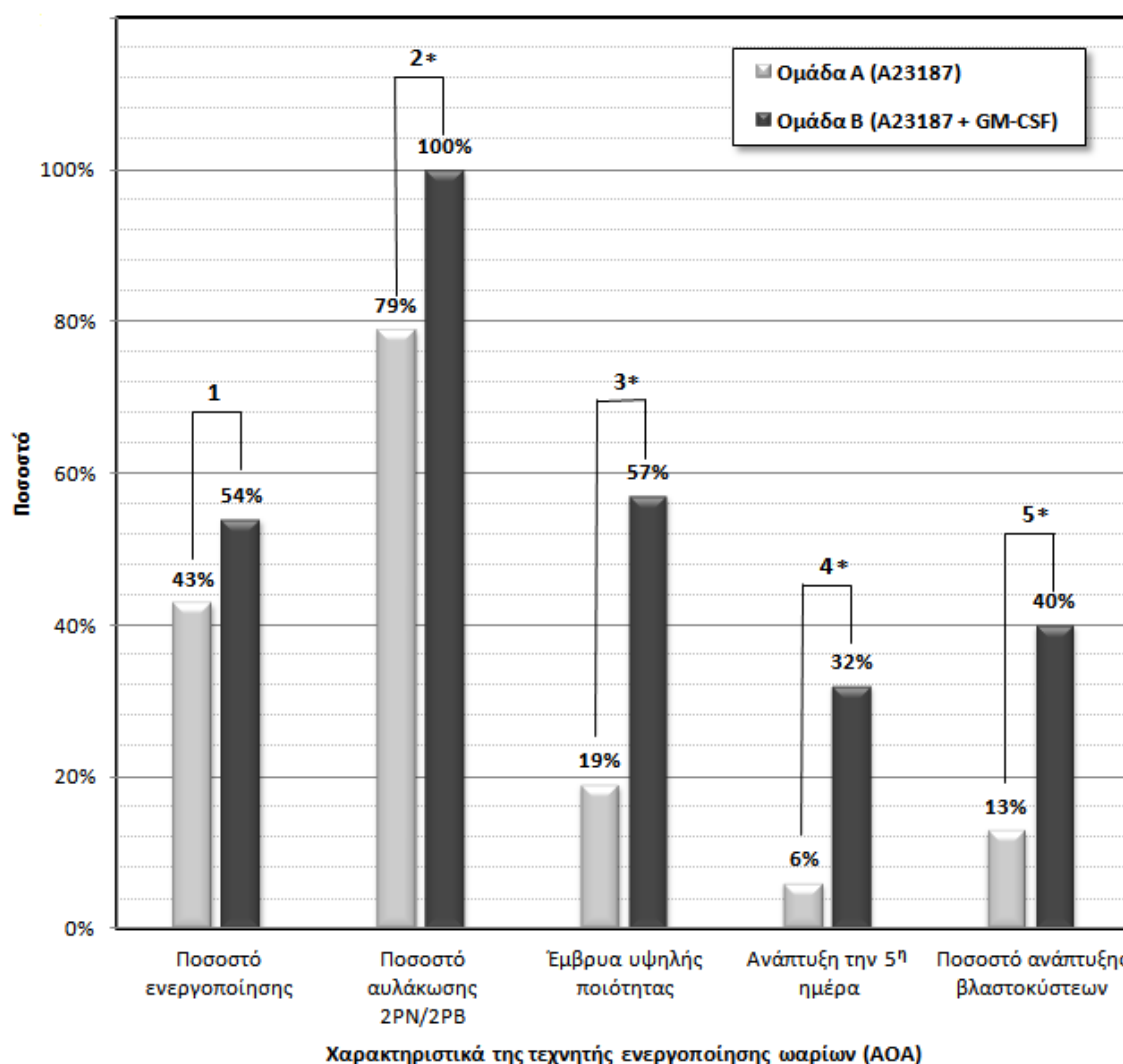
Από τα παραπάνω δεδομένα προκύπτει ότι, έπειτα από τεχνητή ενεργοποίηση μη γονιμοποιημένων ωαρίων με ιονοφόρο ασβεστίου A23187 (ομάδα A), η προσθήκη της κυτταροκίνης rhGM-CSF στο καλλιεργητικό μέσον (ομάδα B), αυξάνει:

- τον αριθμό των εμβρύων που αυλακώνονται,
- τον αριθμό των εμβρύων που εξελίσσονται έως την 5<sup>η</sup> ημέρα της ανάπτυξης,
- τον αριθμό των παραγόμενων εμβρύων υψηλής ποιότητας,
- τον αριθμό βλαστοκύστεων που σχηματίζονται την 5<sup>η</sup> ημέρα μετά την ενεργοποίηση.

Οι διαφορές αυτές είναι στατιστικώς σημαντικές, ενώ δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική διαφορά του ποσοστού ενεργοποίησης των ωαρίων, δηλαδή η προσθήκη της

κυτταροκίνης στο καλλιεργητικό μέσον δεν επηρεάζει την ενεργοποίηση των ωαρίων από τον ιονοφόρο ασβεστίου.

Οι στατιστική σύγκριση των παραμέτρων των δύο ομάδων συνοψίζεται στην **Εικόνα 3.3**.



**Εικόνα 3.3** Στατιστική σύγκριση των παραμέτρων της ενεργοποίησης μεταξύ των ομάδων A και B. Το ποσοστό ενεργοποίησης δεν διαφέρει σημαντικά ( $p > 0,05$ ). Οι στατιστικώς σημαντικές διαφορές ( $p < 0,05$ ) επισημαίνονται με αστερίσκο: (1)  $p = 0,2353$ , (2)  $p = 0,0471$ , (3)  $p = 0,0023$ , (4)  $p = 0,0139$ , (5)  $p = 0,0126$ . Τα ποσοστά έχουν στρογγυλοποιηθεί χωρίς δεκαδικά ψηφία για διευκόλυνση της απεικόνισης (οι λεπτομέρειες παρέχονται στο κείμενο).

Από τα προηγούμενα πειράματα προέκυψαν έμβρυα, τα οποία υπερέβησαν τον αναπτυξιακό σκόπελο της 3<sup>ης</sup> ημέρας και έφθασαν στα περαιτέρω στάδια ανάπτυξης (μορίδιο ή βλαστοκύστη). Από την ομάδα A προέκυψαν 4 τέτοια έμβρυα, τα οποία

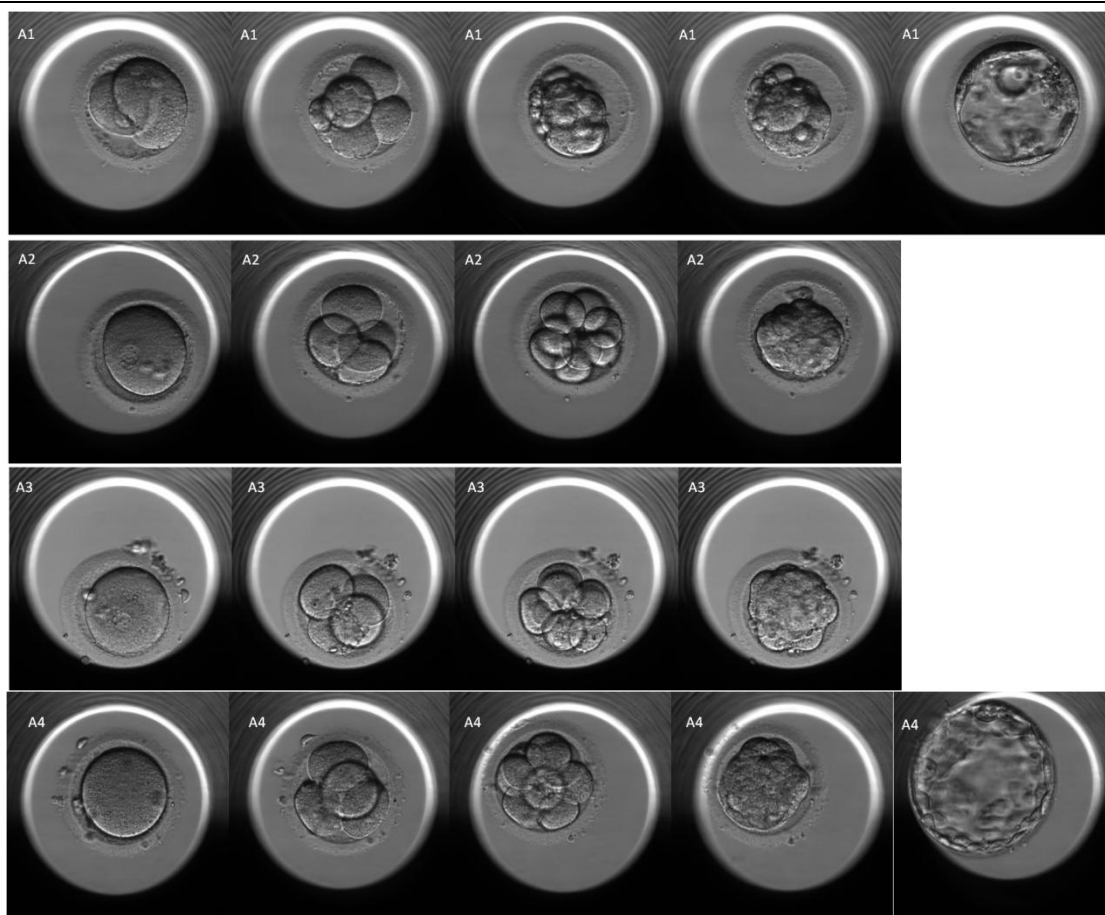
σημαίνονται A1 έως A4 (2 μορίδια και 2 βλαστοκύστες). Από την ομάδα B προέκυψαν 14 έμβρυα, τα οποία σημαίνονται B1 έως B14 (3 μορίδια και 11 βλαστοκύστες).

Η ταυτότητα και η ποιότητα των εν λόγω εμβρύων παρατίθεται στον Πίνακα 3-18.

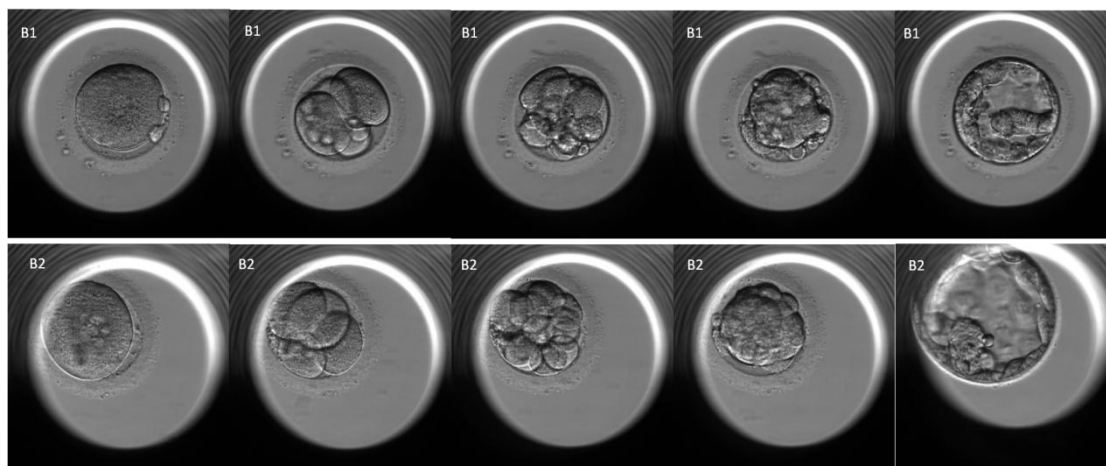
<b>ΠΙΝΑΚΑΣ 3-18 Ταυτότητα και ποιοτικά χαρακτηριστικά των εμβρύων 5<sup>ης</sup> ημέρας από τις ομάδες A και B</b>			
<b>Ομάδα</b>	<b>Ταυτότητα εμβρύου</b>	<b>Τρόπος ενεργοποίησης</b>	<b>Ποιότητα εμβρύου ταξινόμηση</b>
A	A1	2PN	Βλαστοκύστη – 4CC
A	A2	2PN	Μορίδιο
A	A3	2PN	Μορίδιο
A	A4	DC	Βλαστοκύστη – 4BA
B	B1	2PN	Βλαστοκύστη – 4AB
B	B2	† 2PN	Βλαστοκύστη – 4AA
B	B3	2PN	Βλαστοκύστη – 4AA
B	B4	2PN	Βλαστοκύστη – 4BB
B	B5	2PN	Βλαστοκύστη – 4BB
B	B6	2PN	Βλαστοκύστη – 3CC
B	B7	2PN	Μορίδιο
B	B8	2PN	Μορίδιο
B	B9	DC	Βλαστοκύστη – 4BB
B	B10	DC	Μορίδιο
B	B11	DC	Βλαστοκύστη – 4BA
B	B12	DC	Βλαστοκύστη – 3CB
B	B13	DC	Βλαστοκύστη – 5AA
B	B14	DC	Βλαστοκύστη – 5AA

PN: προπυρήνας, DC: αυτόματη αulάκωση (direct cleavage), †: το έμβρυο B2 εμφάνισε 2 ευδιάκριτους προπυρήνες και 3 δορυφορικούς πυρηνίσκους

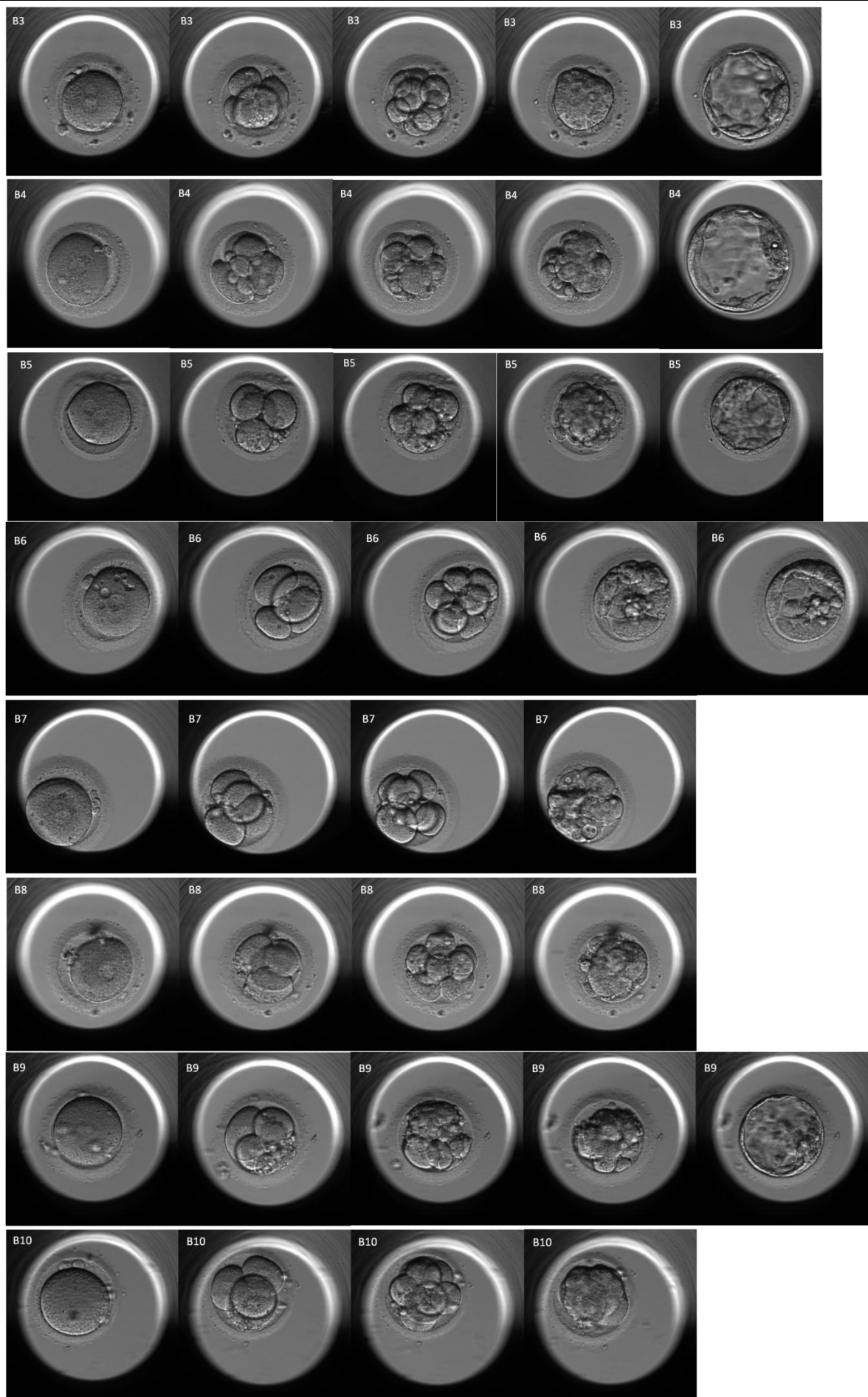
Η αναπτυξιακή πορεία των παραπάνω εμβρύων παρουσιάζεται στην **Εικόνα 3.4** (έμβρυα της Ομάδας A) και στην **Εικόνα 3.5** (έμβρυα της Ομάδας B). Οι φωτογραφίες των εμβρύων προέρχονται από το σύστημα χρονοδιολίσθησης.



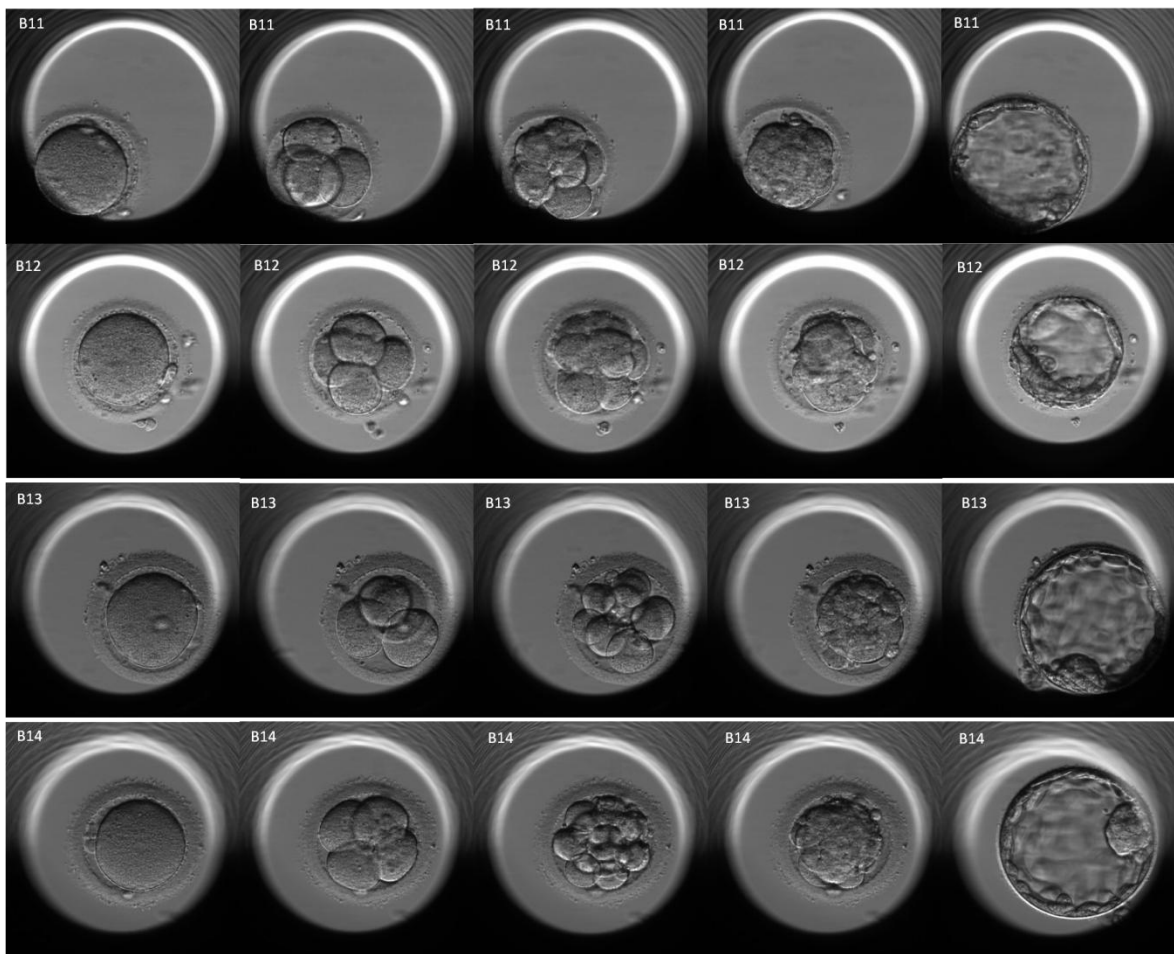
**Εικόνα 3.4** Εξέλιξη των εμβρύων A1 έως A4. Σε κάθε φωτογραφία αντιστοιχεί μία ημέρα καλλιέργειας για τα παρακάτω στάδια: ενεργοποίηση, στάδιο 4 κυττάρων, στάδιο 8 κυττάρων, μορίδιο, βλαστοκύστη.



**Εικόνα 3.5** Εξέλιξη των εμβρύων B1 έως B14. Σε κάθε φωτογραφία αντιστοιχεί μία ημέρα καλλιέργειας για τα παρακάτω στάδια: ενεργοποίηση, στάδιο 4 κυττάρων, στάδιο 8 κυττάρων, μορίδιο, βλαστοκύστη (η εικόνα συνεχίζεται στις επόμενες δύο σελίδες).





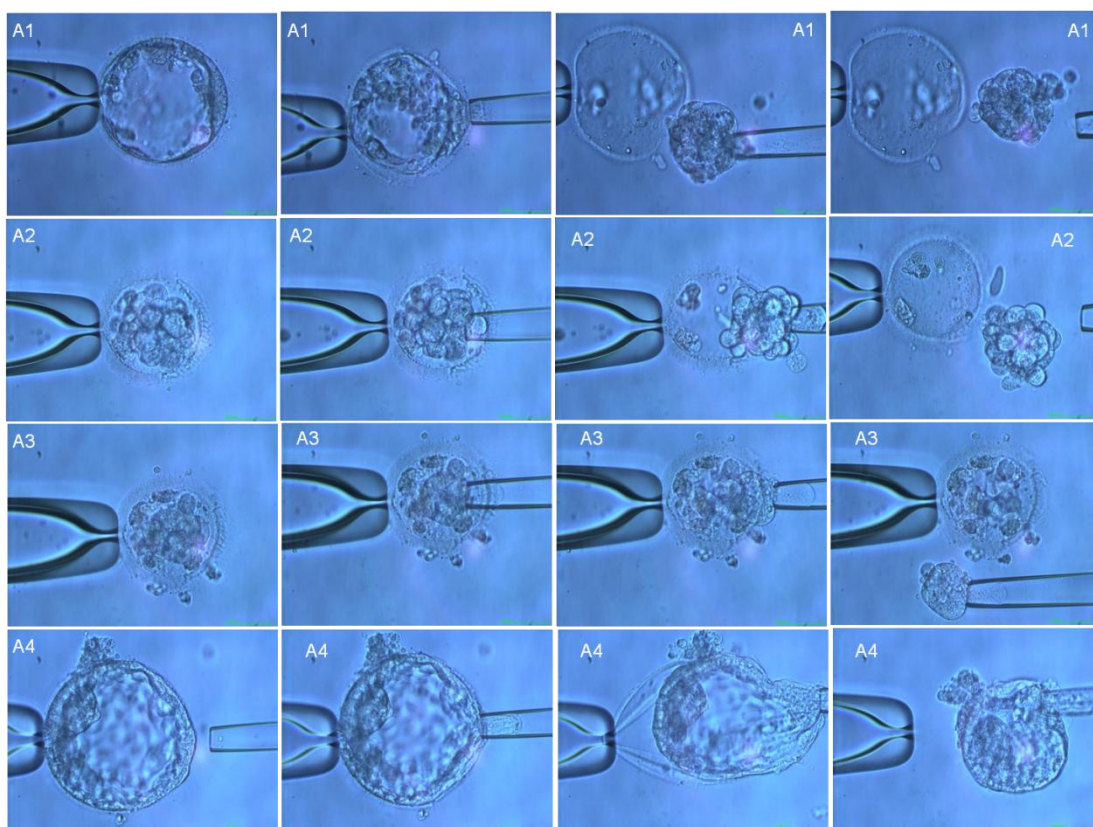


**Εικόνα 3.5** Εξέλιξη των εμβρύων B1 έως B14 (συνέχεια).

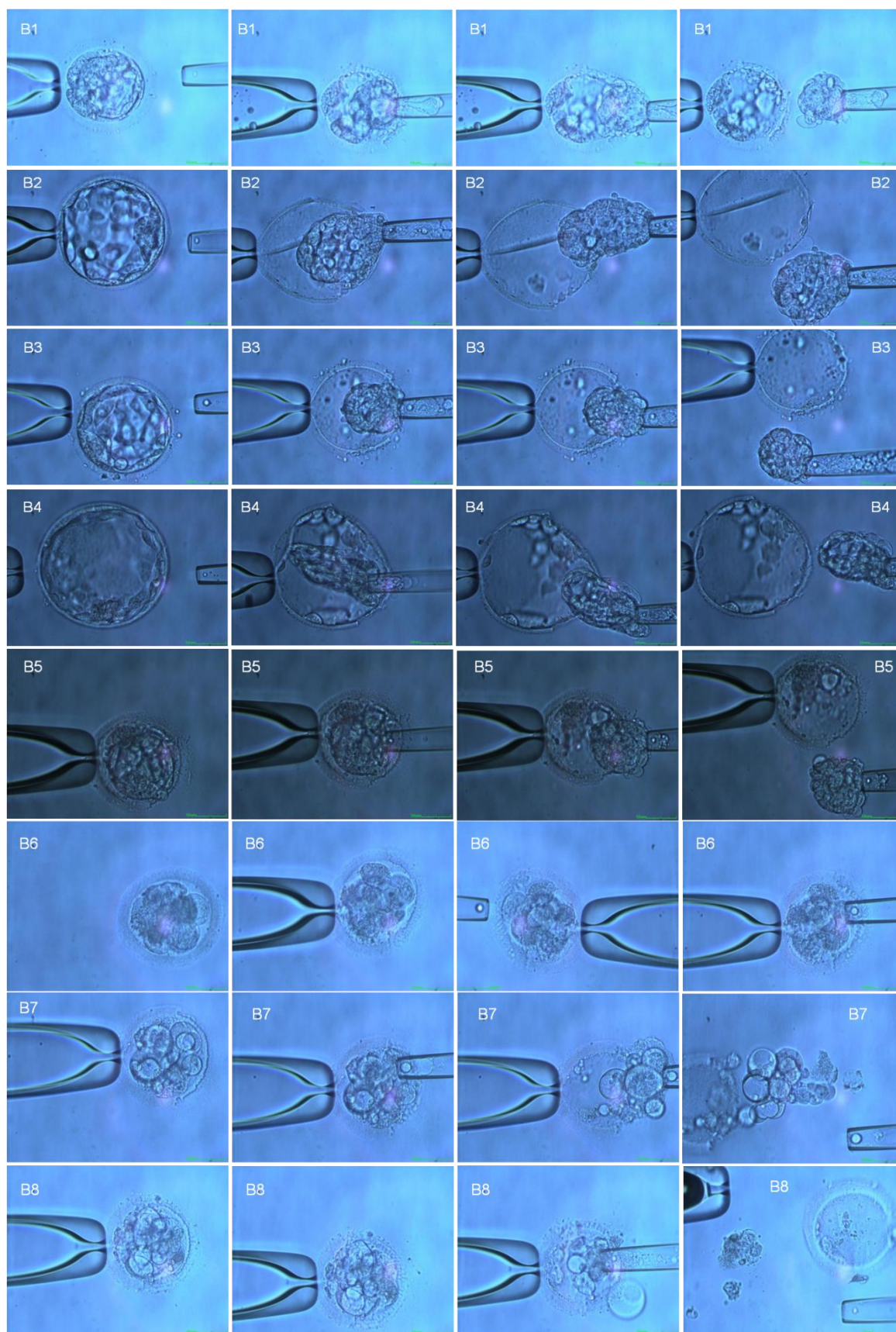
## 3.6 Γενετική ανάλυση

### 3.6.1 Ολική βιοψία των εμβρύων 5<sup>ης</sup> ημέρας στις ομάδες A και B

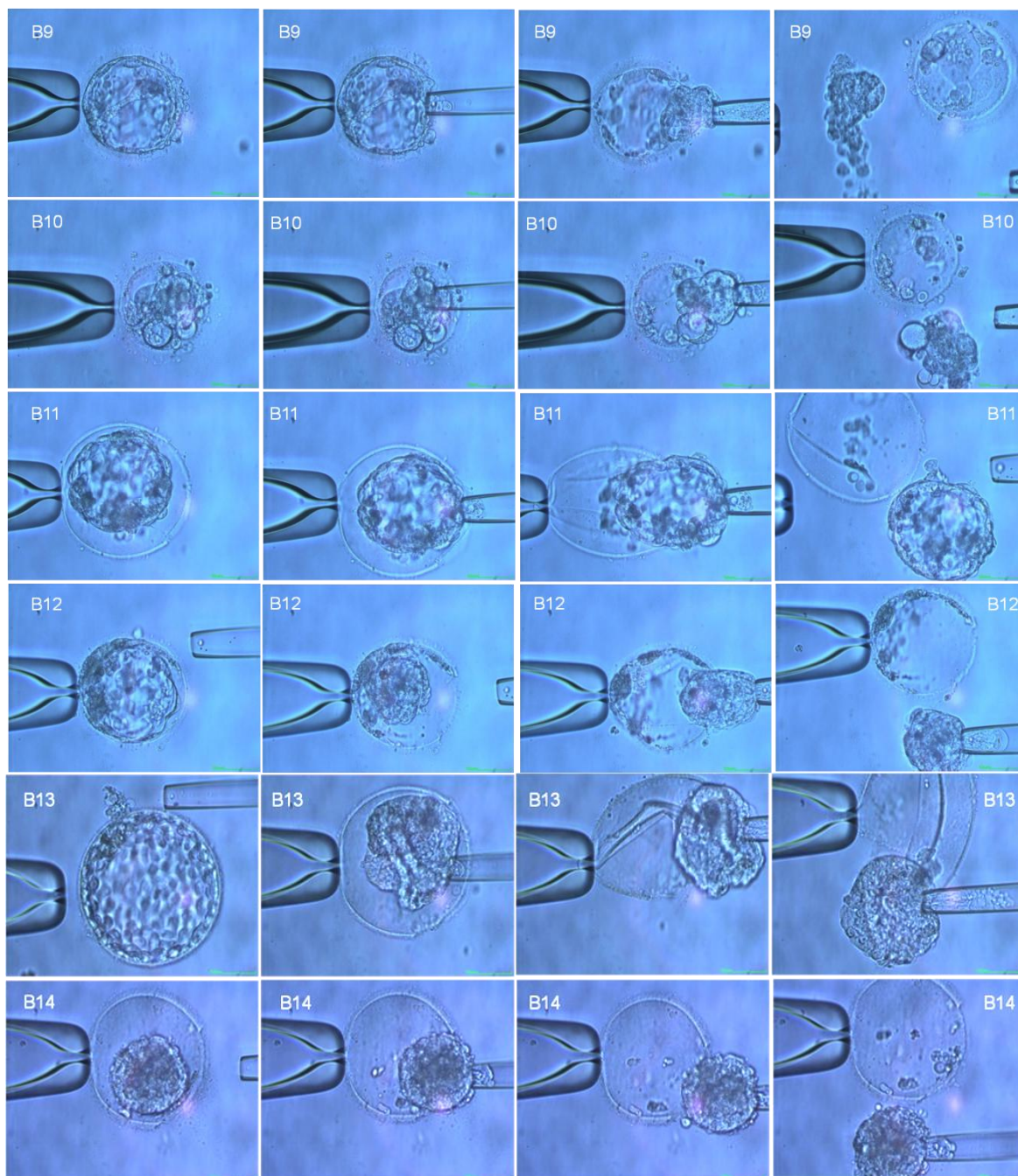
Τα έμβρυα A1-A4 και B1-B14 υποβλήθηκαν σε ολική βιοψία την 5<sup>η</sup> ημέρα μετά την ενεργοποίηση, προκειμένου να αναλυθεί η χρωμοσωματική τους σύσταση με τη μέθοδο του συγκριτικού γονιδιωματικού υβριδισμού σε μικροσυστοιχίες DNA (aCGH), όπως περιγράψαμε παραπάνω. Προς τούτο, το κάθε έμβρυο αποσπάστηκε από την περιβάλλουσα διαφανή ζώνη του, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 3.6** (έμβρυα A1-A4) και στην **Εικόνα 3.7** (έμβρυα B1-B14).



**Εικόνα 3.6** Ολική βιοψία των εμβρύων A1 έως A4. Απεικονίζονται οι διάφορες φάσεις της διαδικασίας.



**Εικόνα 3.7** Ολική βιοψία των εμβρύων B1 έως B14. Απεικονίζονται οι διάφορες φάσεις της διαδικασίας (η εικόνα συνεχίζεται στην επόμενη σελίδα).



Εικόνα 3.7 Ολική βιοψία των εμβρύων B1 έως B14 (συνέχεια από την προηγούμενη σελίδα).

### 3.6.2 Αποτελέσματα γενετικής ανάλυσης με aCGH

Από τη γενετική ανάλυση με aCGH προέκυψε ότι όλα τα έμβρυα της Ομάδας A (A1-A4) έφεραν χρωμοσωματικές ανωμαλίες. Συγκεκριμένα, δύο έμβρυα από 2PN εμφάνισαν διπλή ανευπλοειδία (χρωμοσώματα 7 και X), ενώ το τρίτο έμβρυο 2PN ήταν σύμπλοκο χαοτικό. Το έμβρυο A4, το οποίο προέκυψε από αυτόματη αυλάκωση, εμφάνισε τρισωμία (χρωμόσωμα 22). Η κατανομή του φύλου των εμβρύων A1-A4 ήταν: 1 άρρεν, 1

θήλυ και 2 με χρωμοσωματική ανωμαλία του φυλετικού χρωμοσώματος (1 σύνδρομο Turner και 1 σύνδρομο Klinefelter).

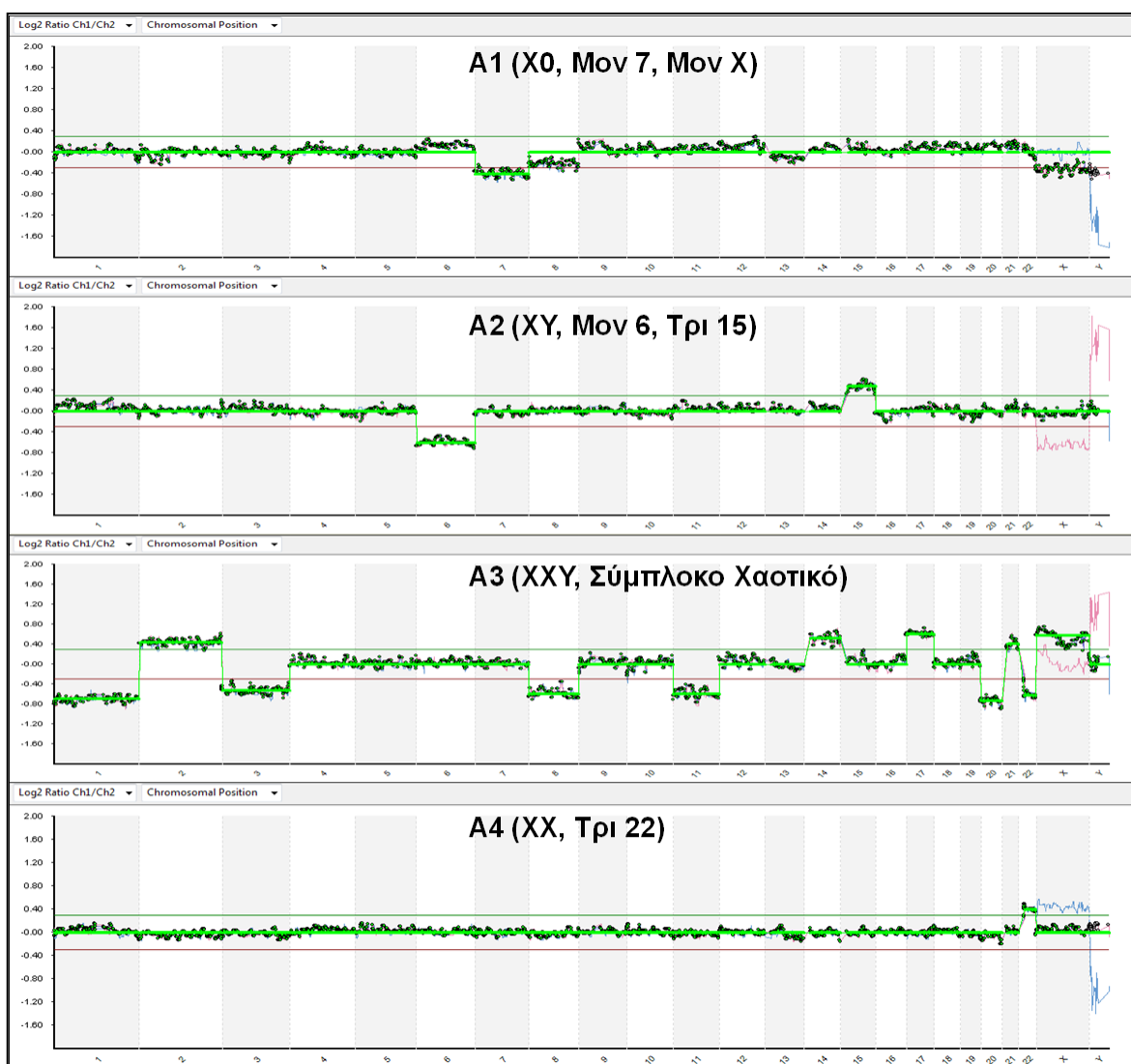
Στην ομάδα B, τα πρώτα 5 έμβρυα 5<sup>ης</sup> ημέρας που προήλθαν από ωάρια 2PN (έμβρυα B1-B5) βρέθηκαν χρωμοσωματικώς φυσιολογικά. Η κατανομή του φύλου ήταν: 3 άρρενα και 2 θήλεα έμβρυα. Από τα υπόλοιπα έμβρυα της ομάδας B, 1 εμφάνισε τρισωμία (χρωμόσωμα 20), ένα μονοσωμία (χρωμόσωμα 19), ένα μονοσωμία και τρισωμία (χρωμοσώματα 19 και 20 αντίστοιχα), 3 έμβρυα εμφάνισαν από 2 μονοσωμίες έκαστο (χρωμοσώματα 6 και 22, 8 και 10, 18 και 19 αντίστοιχα), 1 έμβρυο εμφάνισε σύμπλοκες ανωμαλίες και 2 έμβρυα εμφάνισαν σύμπλοκες χαστικές ανωμαλίες. Η κατανομή του φύλου ήταν: 5 θήλεα, 2 άρρενα και 2 με χρωμοσωματική ανωμαλία του φυλετικού χρωμοσώματος (1 σύνδρομο Turner και 1 σύνδρομο τριπλού X).

Τα αποτελέσματα αυτά συνοψίζονται στον Πίνακα 3-19 (για διευκόλυνση της σύγκρισης, τα στοιχεία ταυτότητας και ποιότητας των εμβρύων επαναλαμβάνονται).

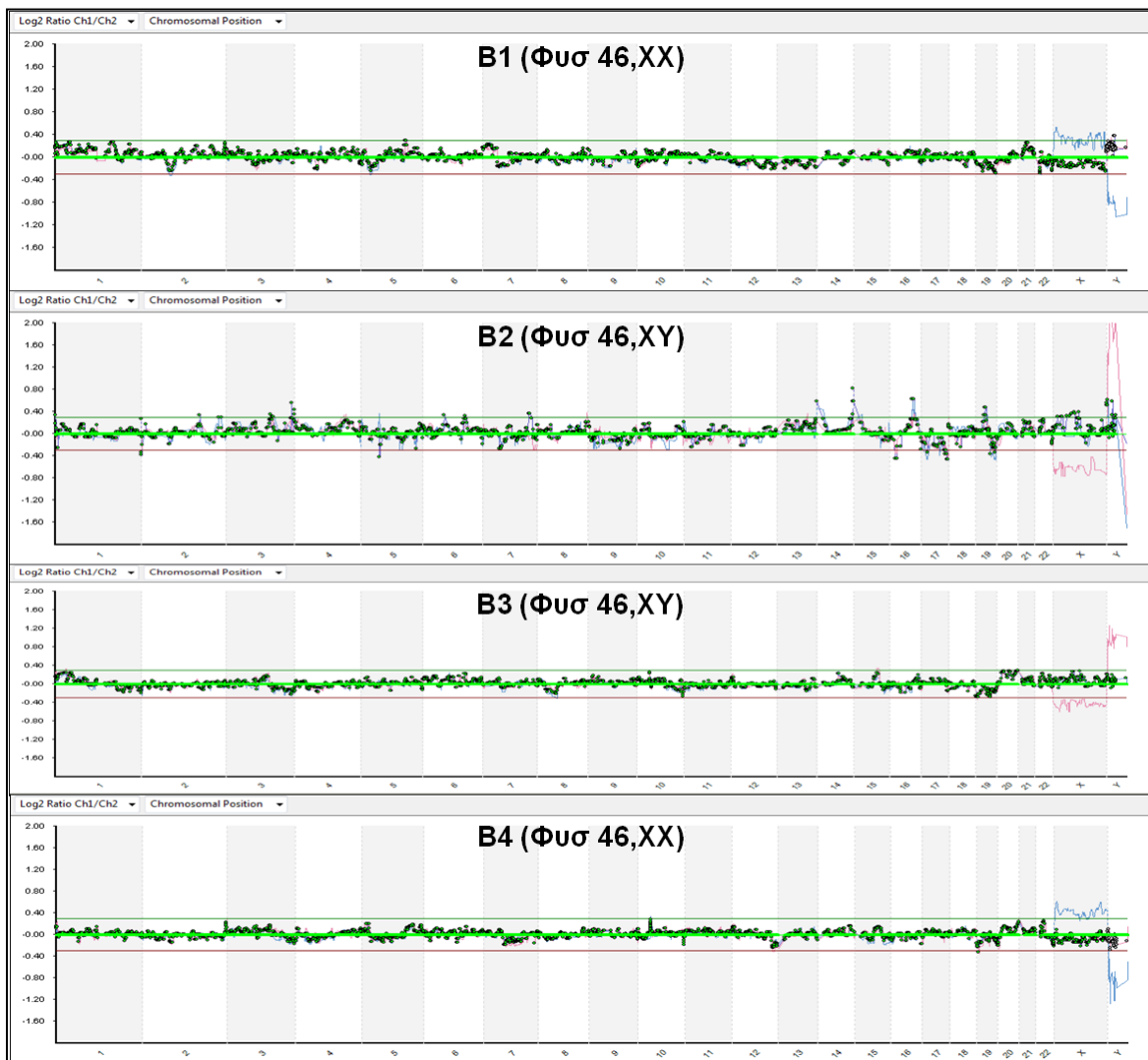
<b>ΠΙΝΑΚΑΣ 3-19 Ευρήματα από τη γενετική ανάλυση των εμβρύων 5<sup>ης</sup> ημέρας</b>				
<b>Ταυτότητα εμβρύου</b>	<b>Τρόπος ενεργοποίησης</b>	<b>Ποιότητα εμβρύου – ταξινόμηση</b>	<b>Φύλο (ανωμαλίες)</b>	<b>Ευρήματα aCGH, καρυότυπος, παρατηρήσεις</b>
A1	2PN	Βλαστοκύστη – 4CC	XO <sup>(1)</sup>	Mon 7, Mon X
A2	2PN	Μορίδιο	Άρρεν	Mon 6, Tri 15
A3	2PN	Μορίδιο	XXY <sup>(2)</sup>	CC
A4	DC	Βλαστοκύστη – 4BA	Θήλυ	Tri 22
B1	2PN	Βλαστοκύστη – 4AB	Θήλυ	46,XX
B2	† 2PN	Βλαστοκύστη – 4AA	Άρρεν	46,XY
B3	2PN	Βλαστοκύστη – 4AA	Άρρεν	46,XY
B4	2PN	Βλαστοκύστη – 4BB	Θήλυ	46,XX
B5	2PN	Βλαστοκύστη – 4BB	Άρρεν	46,XY
B6	2PN	Βλαστοκύστη – 3CC	XXX <sup>(3)</sup>	C
B7	2PN	Μορίδιο	Άρρεν	CC
B8	2PN	Μορίδιο	Θήλυ	Mon 6, Mon 22
B9	DC	Βλαστοκύστη – 4BB	XO <sup>(1)</sup>	Mon 8, Mon 10
B10	DC	Μορίδιο	Θήλυ	CC
B11	DC	Βλαστοκύστη – 4BA	Θήλυ	Mon 18, Mon 19
B12	DC	Βλαστοκύστη – 3CB	Άρρεν	Mon 19, Tri 20
B13	DC	Βλαστοκύστη – 5AA	Θήλυ	Mon 19
B14	DC	Βλαστοκύστη – 5AA	Θήλυ	Tri 20

PN: προπυρήνας, DC: αυτόματη αυλάκωση (direct cleavage), †: το έμβρυο B2 εμφάνισε 2 ευδιάκριτους προπυρήνες και 3 δορυφορικούς πυρηνίσκους, Mon: μονοσωμία, Tri: τρισωμία, C: χαστική χρωμοσωματική σύσταση (chaotic), CC: σύμπλοκη χαστική χρωμοσωματική σύσταση (complex chaotic), <sup>(1)</sup>: σύνδρομο Turner, <sup>(2)</sup>: σύνδρομο Klinefelter, <sup>(3)</sup>: σύνδρομο τριπλού X.

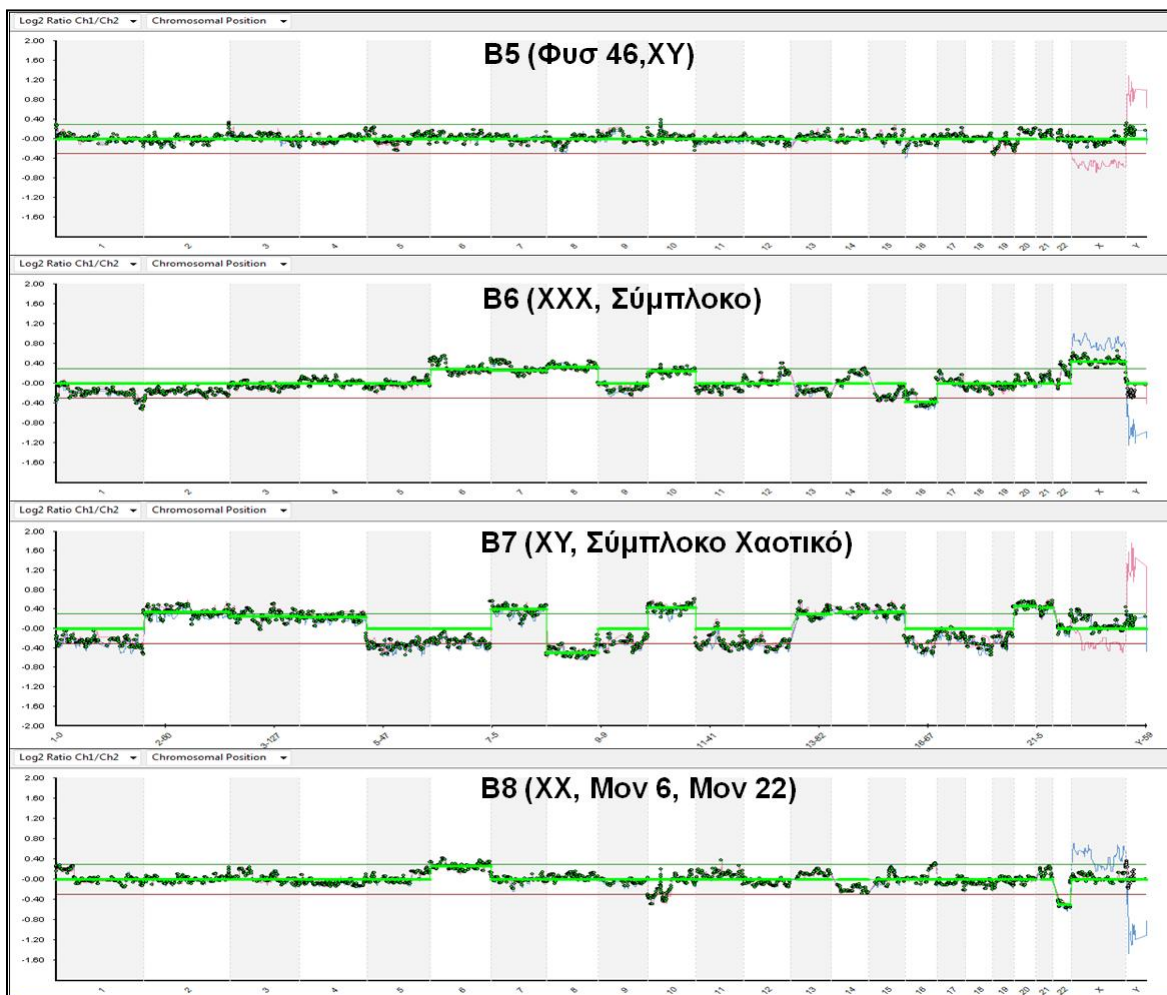
Τα γραφήματα της γενετικής ανάλυσης των εμβρύων παρατίθενται στην **Εικόνα 3.8** (έμβρυα της Ομάδας Α) και στην **Εικόνα 3.9** (έμβρυα της Ομάδας Β).



**Εικόνα 3.8** Γενετική ανάλυση των εμβρύων A1 έως A4 με συγκριτικό γονιδιωματικό υβριδισμό σε μικροσυστοιχίες DNA (aCGH). Η ταυτότητα του εμβρύου, ο καρυότυπος και τυχόν παρατηρήσεις αναγράφονται πάνω στο κάθε γράφημα. Μον: μονοσωμία, Τρι: τρισωμία..

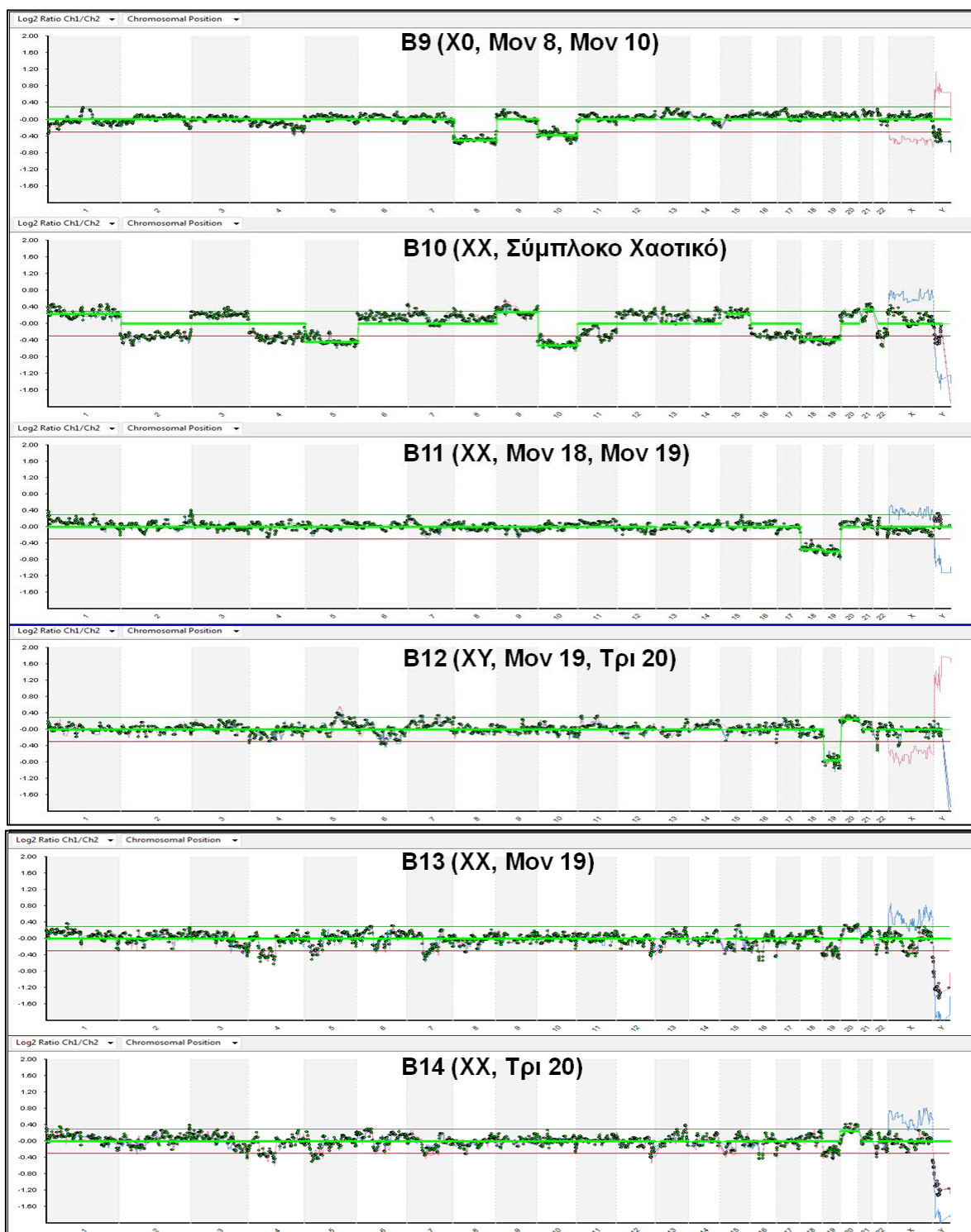


**Εικόνα 3.9** Γενετική ανάλυση των εμβρύων B1 έως B14 με συγκριτικό γονιδιωματικό υβριδισμό σε μικροσυστοιχίες DNA (aCGH). Η ταυτότητα του εμβρύου, ο καρύοτυπος και τυχόν παρατηρήσεις αναγράφονται πάνω στο κάθε γράφημα. Μον: μονοσωμία, Τρι: τρισωμία, Φυσ: φυσιολογικό (η εικόνα συνεχίζεται στην επόμενη σελίδα).



**Εικόνα 3.9** Γενετική ανάλυση των εμβρύων B1 έως B14 με συγκριτικό γονιδιωματικό υβριδισμό σε μικροσυστοιχίες DNA (aCGH). Η ταυτότητα του εμβρύου, ο καρυότυπος και τυχόν παρατηρήσεις αναγράφονται πάνω στο κάθε γράφημα. Μον: μονοσωμία, Τρι: τρισωμία, Φυσ: φυσιολογικό (συνέχεια από την προηγούμενη σελίδα).

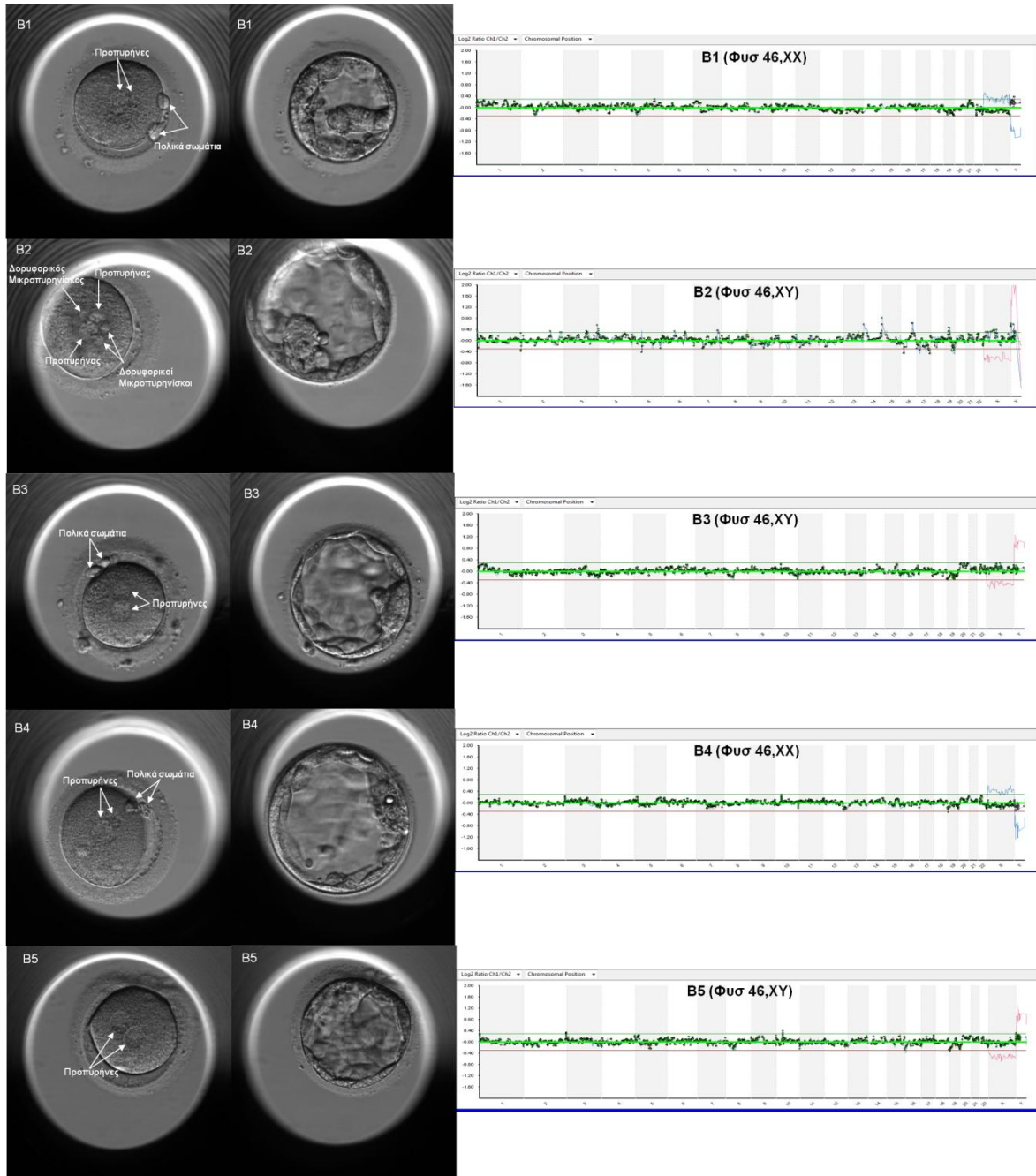




**Εικόνα 3.9** Γενετική ανάλυση των εμβρύων B1 έως B14 με συγκριτικό γονιδιωματικό υβριδισμό σε μικροσυστοιχίες DNA (aCGH). Η ταυτότητα του εμβρύου, ο καρύοτυπος και τυχόν παρατηρήσεις αναγράφονται πάνω στο κάθε γράφημα. Μον: μονοσωμία, Τρι: τρισωμία (συνέχεια από την προηγούμενη σελίδα).

### 3.7 Φυσιολογικά έμβρυα στην ομάδα Β

Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των εμβρύων με φυσιολογική χρωμοσωματική σύσταση της Ομάδας Β παρατίθενται στην **Εικόνα 3.10**.



**Εικόνα 3.10** Μορφολογία (προπτυρήνες και βλαστοκύστη) και χρωμοσωματική σύσταση των εμβρύων B1-B5 και γενετική ανάλυση αυτών με συγκριτικό γονιδιωματικό υβριδισμό σε μικροσυστοιχίες DNA (aCGH). Η ταυτότητα του εμβρύου, ο καρυότυπος και τυχόν παρατηρήσεις αναγράφονται πάνω στο κάθε γράφημα. Φυσ: φυσιολογικός καρυότυπος.

## 4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### 4.1 Συνοπτικά συμπεράσματα

Από τα παραπάνω αποτελέσματα συνάγουμε συνοπτικά τα εξής συμπεράσματα:

1. Ευπλοειδή έμβρυα και επομένως κατά τεκμήριο βιώσιμα για κλινική χρήση προέκυψαν από την ενεργοποίηση μη γονιμοποιημένων ωαρίων, 18 ώρες μετά την ICSI, μόνο από την ομάδα Β.
2. Τα φυσιολογικά αυτά έμβρυα προέκυψαν μόνο από ωάρια τα οποία ενεργοποιήθηκαν εμφανίζοντας δύο προπυρήνες και δύο πολικά σωμάτια (2PN/2PB).
3. Κανένα ευπλοειδές έμβρυο δεν προέκυψε από ωάρια τα οποία ενεργοποιήθηκαν εμφανίζοντας 1 ή περισσότερους των 2 προπυρήνων (1PN/2PB, >2PN/2PB), ή από έμβρυα που προέκυψαν από αυτόματη αυλάκωση των ενεργοποιημένων ωαρίων.
4. Η παρουσία αρρένων εμβρύων (με καρύοτυπο 46,XY) μεταξύ των φυσιολογικών εμβρύων (3/5, 60%) πιστοποιεί ότι το πρωτόκολλο ενεργοποίησης που χρησιμοποιήθηκε ενεργοποίησε και το πατρικό γονιδίωμα, αφού οι δύο προπυρήνες προέρχονται ο ένας από το σπερματοζωάριο και ο άλλος από το ωάριο (Lu *et al.*, 2006).
5. Από τα 5 ευπλοειδή έμβρυα που προέκυψαν, όλα σχημάτισαν εξαιρετικής ποιότητας βλαστοκύστες την 5<sup>η</sup> ημέρα της ανάπτυξης, γεγονός που δημιουργεί βάσιμες ελπίδες ότι η εμβρυομεταφορά τους θα μπορούσε να οδηγήσει σε βιώσιμη κύηση και γέννηση υγιούς τέκνου.
6. Το πρωτόκολλο ενεργοποίησης μη γονιμοποιημένων ωαρίων με ιονοφόρο διάλυο ασβεστίου A23187 και μετέπειτα καλλιέργεια των εμβρύων με την κυτταροκίνη GM-CSF μπορεί να διασώσει κλινικά περιστατικά απρόβλεπτης χαμηλής ή αποτυχημένης γονιμοποίησης σε κλινικό πρόγραμμα εξωσωματικής γονιμοποίησης.

### 4.2 Συζήτηση των ευρημάτων της μελέτης

Το απροσδόκητα χαμηλό ποσοστό γονιμοποίησης, ή η πλήρης αποτυχία γονιμοποίησης ύστερα από ICSI, είναι ίσως η χειρότερη πιθανή έκβαση για τα ζευγάρια

που υποβάλλονται σε πρωτόκολλα ιατρικώς υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Η ατυχία αυτή παρατηρείται σε σχετικά μικρό ποσοστό (1-3%) των περιστατικών, αλλά δεν παύει να προκαλεί μεγάλη ψυχική αναστάτωση στο ζευγάρι (βλ. Γενικό Μέρος).

Έχει ήδη προταθεί αποτελεσματική θεραπεία για τις περιπτώσεις προγενέστερης μερικής ή πλήρους αποτυχίας γονιμοποίησης με τη χρήση του ιονοφόρου ασβεστίου A23187 για την τεχνητή ενεργοποίηση των ωαρίων (Ebner *et al.*, 2015b). Στην εν λόγω πολυκεντρική μελέτη εφαρμόστηκε τεχνητή ενεργοποίηση ωαρίων με έκθεσή τους στον ιονοφόρο ασβεστίου A23187 επί 15 min, σε ασθενείς που είχαν εμφανίσει χαμηλό ποσοστό γονιμοποίησης (50% των ωαρίων ή λιγότερο) σε προγενέστερο κύκλο. Τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με τον εκάστοτε προηγούμενο κύκλο και βρέθηκε ότι το ποσοστό γονιμοποίησης σχεδόν διπλασιάστηκε, ο αριθμός ασθενών στις οποίες δεν πραγματοποιήθηκε εμβρυομεταφορά μειώθηκε, ενώ το ποσοστό γεννήσεων ανήλθε σε περίπου 28% (35 νεογνά σε 101 ασθενείς). Οι ερευνητές συμπέραναν ότι η τεχνητή ενεργοποίηση ωαρίων είναι αποτελεσματική μέθοδος για τα εν λόγω περιστατικά. Παρόμοια ευρήματα και γέννηση ζώντος τέκνου ανακοινώθηκε σε μια δεύτερη μελέτη, στο ίδιο τεύχος του ίδιου περιοδικού (Kim *et al.*, 2015).

Τις δύο συγκεκριμένες μελέτες συνοδεύει άρθρο των εκδοτών (van Blerkom *et al.*, 2015), στο οποίο επισημαίνεται ότι η τεχνική πρέπει να εφαρμόζεται με προσοχή και σε επιλεγμένα περιστατικά, διότι δεν είναι ευεργετική σε όλες τις περιπτώσεις, όπως είχε ήδη διαφανεί ωρύτερα (Vanden Meerschaut *et al.*, 2012· Montag *et al.*, 2012), προτείνεται δε να ακολουθούνται οι σχετικές συστάσεις της HFEA ([www.hfea.gov.uk/8857.html](http://www.hfea.gov.uk/8857.html)), η οποία σε συνέχεια αυτών θεώρησε χρήσιμο να διευκρινίσει περαιτέρω την πρακτική της με ειδική επιστολή προς τους εκδότες (Thompson, 2015). Κατόπιν αυτών, η μελέτη των Ebner *et al.* υπήρξε αντικείμενο κριτικής (Santella & Dale, 2015), με το επιχείρημα ότι η έκθεση στον ιονοφόρο διάλυο προκαλεί άτακτη εισροή ασβεστίου στο ωάριο, χωρίς τις χαρακτηριστικές ταλαντώσεις στον ενδοκυττάριο χώρο και χωρίς τη συγκεκριμένη χρονική αλληλουχία τους, όπως αυτή παρατηρείται στη φυσιολογική ενεργοποίηση. Κατά την άποψη των επικριτών της μεθόδου, αυτή η απότομη, μεγάλη αύξηση της συγκέντρωσης ασβεστίου, μπορεί μεν να προκαλεί την ενεργοποίηση του ωαρίου, δεν έχουν όμως μελετηθεί οι άλλες πιθανές επιπτώσεις της στην κυτταρική ομοίωση, ούτε στη γονιδιακή έκφραση σε βάθος χρόνου, γεγονός που μπορεί να επισύρει απρόβλεπτες επιγενετικές αλλοιώσεις στο κύημα, ορατές μόνο στις επόμενες γενεές.

Η παρούσα διατριβή δεν είχε σχεδιασθεί για να απαντήσει σε αυτό το ερώτημα: ωστόσο, τα ευρήματα από την πειραματική ομάδα A δείχνουν ότι η ενεργοποίηση με ιονοφόρο ασβεστίου A23187 μόνο δεν οδηγεί σε χρωμοσωματικώς φυσιολογικά έμβρυα (Πίνακας 3-19), αλλά αυτό μπορεί να οφείλεται στον περιορισμένο αριθμό εμβρύων της ομάδας A που αναλύθηκαν (μόνο 4 έμβρυα), ή στο γεγονός ότι η προσθήκη του GM-CSF είναι καθοριστική για την ανάκαμψη των εμβρύων, με μηχανισμούς που παραμένουν άγνωστοι. Το άρθρο των εκδοτών (van Blerkom *et al.*, 2015) καταλήγει με την παραίνεση οι μελέτες να συνοδεύονται από αναφορά όλων των εκβάσεων (όχι μόνο των γεννήσεων), συμπεριλαμβανομένων των αποβολών, των συγγενών ανωμαλιών (έστω και ήσσονος σημασίας), καθώς και της πλοειδίας (όπως στο πλαίσιο της παρούσας μελέτης). Η ανησυχία των Santella & Dale εγείρει όμως ένα γενικότερο ζήτημα βιοηθικής στον τομέα της ΙΥΑ, δηλαδή το κατά πόσον είναι θεμιτή η εφαρμογή επεμβατικών (μη φυσιολογικών) προσεγγίσεων, χωρίς να έχουν προηγουμένως μελετηθεί πειραματικά όσο το δυνατόν περισσότερες ελέγξιμες παράμετροι. Κάτι τέτοιο δυστυχώς δεν είναι πάντοτε εφικτό στην κλινική πρακτική, με καταλυτικό παράδειγμα την ίδια την ιστορία της ICSI, η οποία, ως γνωστόν, εφαρμόστηκε στον άνθρωπο χωρίς να έχει επαρκώς μελετηθεί σε πειραματόζωα (Van Steirteghem, 2012), σε σημείο μάλιστα να καταστεί εφικτή για ορισμένα είδη πολλά χρόνια μετά την εφαρμογή της στον άνθρωπο (Yanagimachi, 2005).

Γενικώς, έχει αναφερθεί ότι η τεχνητή ενεργοποίηση ωαρίων βελτιώνει τα ποσοστά γονιμοποίησης (Ebner *et al.*, 2012· Tesarik & Sousa, 1995) το αναπτυξιακό δυναμικό των εμβρύων (Ebner *et al.*, 2015a), το ποσοστό επιτυχίας κύησης (Chi *et al.*, 2004· Rybouchkin *et al.*, 1997) και το ποσοστό γεννήσεων (Ebner *et al.*, 2015b· Kim *et al.*, 2015· Eldar-Geva *et al.*, 2003). Ένα τεχνικό θέμα, το οποίο αξίζει να συζητηθεί, είναι το ενδεχόμενο απώλειας μέρους της βιοδιαθεσιμότητας του ιονοφόρου λόγω του συστήματος καλλιέργειας. Οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν στο σύστημα απεικόνισης με χρονοδιολίσθηση (Embryoscope<sup>®</sup>) με την τυποποιημένη μέθοδο, η οποία περιλαμβάνει επικάλυψη της καλλιέργειας με έλαιο παραφίνης. Δεδομένου ότι ο ιονοφόρος ασβεστίου είναι σε ένα ποσοστό λιποδιαλυτός, θα υπήρχε ενδεχόμενο μικρή ποσότητά του να διαρρέυσει από το καλλιεργητικό μέσον προς το έλαιο επικάλυψης, μειώνοντας με τον τρόπο αυτό τη βιοδιαθεσιμότητα. Η χρήση ελαίου έχει εισαχθεί στην τεχνική από τη δεκαετία του 1960 γενικώς για την επικάλυψη κυτταροκαλλιιεργειών (Gwatkin, 1963), καθώς και ειδικότερα για την επικάλυψη καλλιιεργειών εμβρύων προεμφυτευτικού σταδίου (Brinster, 1963· Kane *et al.*, 1987). Μάλιστα, η τεχνική καλλιιεργειας σε μικροσταγόνες

(Fukui *et al.*, 1996) έχει εδραιωθεί και εφαρμόζεται ευρύτατα επειδή μειώνει την εξάτμιση ύδατος από το καλλιεργητικό μέσον, τις ανταλλαγές αερίων και τη διακύμανση της θερμοκρασίας. Επίσης, έχει αποδειχθεί ότι η χρήση ελαίου διαφόρων προελεύσεων δεν επηρεάζει τις παραμέτρους της καλλιέργειας (Sifer *et al.*, 2009). Εξ άλλου, παρόμοιο σύστημα καλλιέργειας έχει εφαρμοσθεί σε άλλες μελέτες αντίστοιχες της παρούσας (Ebner *et al.*, 2015b· Liu *et al.*, 2014· Lu *et al.*, 2012), ο δε χρόνος επώασης των 10 min δεν επιτρέπει αντικειμενικά την εκτεταμένη διάχυση του ιονοφόρου στο έλαιο καλλιέργειας. Επομένως, η διαρροή ιονοφόρου στο έλαιο καλλιέργειας, αν και δεν είναι δυνατόν να αποκλεισθεί, πρέπει να θεωρείται αμελητέα.

Η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη στην οποία εξετάζεται η επίδραση της τεχνητής ενεργοποίησης ωαρίου μέσω του ιονοφόρου ασβεστίου A23187 σε μη γονιμοποιημένα ανθρώπινα ωάρια 18 h ύστερα από ICSI, σε συνδυασμό με την προσθήκη rhGM-CSF στην καλλιέργεια μέχρι την 5<sup>η</sup> ημέρα (Economou *et al.*, 2017). Προκειμένου να ελεγχθεί η ίδια η μέθοδος, πραγματοποιήθηκε αρχικώς μια σειρά πειραμάτων ωρίμασης ωαρίων *in vitro* και τεχνητή ενεργοποίησή τους με ιονοφόρο ασβεστίου A23187, όπως έχει περιγραφεί (Chang *et al.*, 2014). Στη συνέχεια, συγκρίθηκαν δύο πρωτόκολλα καλλιέργειας. Πρώτον, εφαρμογή της τεχνητής ενεργοποίησης σε μη γονιμοποιημένα ωάρια 18 h μετά την ICSI, με βραχυχρόνια έκθεση σε ιονοφόρο ασβεστίου A23187. Δεύτερον, ένα τροποποιημένο πρωτόκολλο τεχνητής ενεργοποίησης και καλλιέργειας των εμβρύων σε καλλιεργητικό μέσον που περιείχε πρόσθετο rhGM-CSF. Ο στόχος ήταν να συγκριθεί το τροποποιημένο αυτό πρωτόκολλο με το κλασικό πρωτόκολλο τεχνητής ενεργοποίησης χωρίς την προσθήκη του αυξητικού παράγοντα, το οποίο έχει οδηγήσει σε γεννήσεις (για παράδειγμα, Ebner *et al.*, 2015b).

Η σύγκριση των δύο ομάδων μελέτης A και B δεν έδειξε διαφορές του ποσοστού ενεργοποίησης των ωαρίων. Στατιστικώς σημαντική διαφορά παρατηρήθηκε, υπέρ της ομάδας B, στο ποσοστό αυλάκωσης των τεχνητώς ενεργοποιημένων ζυγωτών 2PN/2PB, στο ποσοστό σχηματισμού εμβρύων υψηλής ποιότητας, στο αναπτυξιακό δυναμικό των παραγόμενων εμβρύων (εξέλιξη της ανάπτυξης *in vitro* μέχρι την 5<sup>η</sup> ημέρα) και στο ποσοστό σχηματισμού βλαστοκύστεων. Τα αποτελέσματα αυτά καταδεικνύουν ότι η προσθήκη rhGM-CSF μπορεί να βελτιώσει σημαντικά το αναπτυξιακό δυναμικό όχι μόνο των εμβρύων που προέρχονται από συμβατική ICSI, αλλά και των εμβρύων που παράγονται με τεχνητή ενεργοποίηση μη γονιμοποιημένων ωαρίων 18 h μετά την ICSI, μέσω της έκθεσης σε ιονοφόρο ασβεστίου A23187. Παρ' όλα αυτά, το ποσοστό

ενεργοποίησης είναι χαμηλότερο από εκείνο που αναφέρεται σε προηγούμενη μελέτη (Lu *et al.*, 2006) για αμφότερες τις ομάδες. Αυτό θα μπορούσε να ερμηνευθεί από το γεγονός ότι η μέση ηλικία των ασθενών μας είναι υψηλότερη και από το γεγονός ότι στην προηγούμενη μελέτη είχε επίσης χρησιμοποιηθεί πουρομυκίνη, η οποία είναι γνωστό ότι επηρεάζει πλήθος βιοχημικών διεργασιών, μεταξύ των οποίων και η αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης (Vazquez, 1974).

Η παρούσα μελέτη είναι επίσης η πρώτη στην οποία διερευνάται η πλήρης χρωμοσωματική σύσταση των εμβρύων των πειραματικών ομάδων μετά την 5<sup>η</sup> ημέρα καλλιέργειας, με τη μέθοδο του συγκριτικού γονιδιωματικού υβριδισμού σε μικροσυστοιχίες DNA (aCGH). Στις μέχρι τώρα παρόμοιες μελέτες τεχνητής ενεργοποίησης ανθρώπινων ωαρίων, γενετική ανάλυση έχει πραγματοποιηθεί μόνο με FISH, μόνο σε μία μελέτη (Agerholm *et al.*, 2010) και μόνον για 7 χρωμοσώματα. Σε μια πολύ πρόσφατη μελέτη (Capalbo *et al.*, 2016) μελετήθηκε με aCGH η πλήρης χρωμοσωματική σύσταση ωαρίων που είχαν υποστεί τεχνητή ενεργοποίηση με ιονοφόρο ασβεστίου A23187 και δεν ανιχνεύθηκε σημαντική αρνητική επίδραση του ιονοφόρου στον διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων κατά την δεύτερη μειωτική διαίρεση που προκαλείται από την τεχνητή ενεργοποίηση. Όμως, το πρωτόκολλο αυτό ήταν πειραματικά πολύ διαφορετικό από εκείνο της παρούσας μελέτης: τα ωάρια προέρχονταν από κρυοσυντήρηση, δεν μεσολάβησε ICSI και γονιμοποίηση, ενώ δεν πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια (τα ωάρια αναλύθηκαν αμέσως μετά το πέρας της περιόδου ενεργοποίησης).

Η διαπίστωση της ασφάλειας του τροποποιημένου πρωτοκόλλου, όπως αυτό διαμορφώθηκε από την παρούσα μελέτη, έχει καίρια σημασία. Στην πλειονότητα των μελετών της τεχνητής ενεργοποίησης ωαρίων με ιονοφόρο ασβεστίου A23187 (Miller *et al.*, 2016· Ebner *et al.*, 2015b· Darwish & Magli, 2015· Ebner *et al.*, 2012· Vanden Meerschaut, 2014· Eldar-Geva *et al.*, 2003), ο ιονοφόρος εφαρμόζεται για λίγα λεπτά μετά την ICSI, σε περιπτώσεις γνωστής αποτυχίας γονιμοποίησης ύστερα από προηγηθείσα προσπάθεια εξωσωματικής γονιμοποίησης με ICSI. Όμως, όπως προαναφέρθηκε, οι μελέτες αυτές κατά κανόνα δεν επεκτείνονται σε εξακρίβωση τουλάχιστον της πλοειδίας, πόσο μάλλον των γενικότερων επιδράσεων του ιονοφόρου A23187 στον μεταβολισμό, στην έκφραση του γονιδιώματος και σε άλλες αναπτυξιακές διεργασίες του ωαρίου και του προκύπτοντος εμβρύου. Η αποτυχία γονιμοποίησης είναι δυνατόν να προβλεφθεί μόνο σε περιστατικά γνωστής ανεπάρκειας της PLCζ (Aghajanjpour *et al.*, 2011) ή και άλλων ενεργοποιητών του ωαρίου (Yeste *et al.*, 2016). Επομένως, στις υπόλοιπες περιπτώσεις,

που είναι και οι περισσότερες, η αποτυχία γονιμοποίησης είναι αδύνατον να προβλεφθεί. Στην κλινική πρακτική της εξωσωματικής γονιμοποίησης, αυτό σημαίνει ότι χρειάζεται ένα πρωτόκολλο ασφαλείας, το οποίο να μπορεί να εφαρμοσθεί εκ των υστέρων (Heindryckx *et al.*, 2005), μετά τη διαπίστωση της αποτυχίας γονιμοποίησης και να είναι όμως ασφαλές για το μελλοντικό κύημα. Δηλαδή, η ιδανική στρατηγική θα ήταν η εφαρμογή ενός πρωτοκόλλου “διάσωσης” των μη γονιμοποιημένων ωαρίων, πιθανώς δε και του κύκλου. Στο συγκεκριμένο σημείο, η βιοψία τροφοεξωδέρματος και η γενετική ανάλυση της βλαστοκύστης με aCGH μπορεί να αποτελέσει τη λύση στην κλινική εφαρμογή της μεθόδου. Απομένει βεβαίως να συνεκτιμηθούν και όλοι οι άλλοι παράγοντες της προσπάθειας (οι ωοθηκικές εφεδρείες και η δυνατότητα επανάληψης του κύκλου, το ηθικό ζήτημα της εφαρμογής τεχνικών προεμφυτευτικής γενετικής διάγνωσης σε ζευγάρια που δεν εμφανίζουν γενετικό ελάττωμα, η οικονομική διάσταση κ.λπ.).

Σε κάθε περίπτωση, ένα ασφαλές πρωτόκολλο, το οποίο θα ήταν δυνατόν να διασώσει μη γονιμοποιημένα ωάρια που θα κατέληγαν να απορριφθούν, συνιστά και μια ανεξάντλητη πηγή εμβρύων για την απομόνωση κυτταρικών σειρών στελεχειαίων κυττάρων για θεραπευτικούς σκοπούς, όπως ήδη έχει περιγραφεί (Trounson, 2001).

Την 5<sup>η</sup> ημέρα καλλιέργειας, ευπλοειδή έμβρυα προέκυψαν μόνο από την πειραματική ομάδα Β (τεχνητή ενεργοποίηση με A23187 + καλλιέργεια με προσθήκη GM-CSF), ενώ κανένα έμβρυο της ομάδας Α (τεχνητή ενεργοποίηση με A23187 μόνο) δεν ήταν ευπλοειδές. Είναι πιθανόν αυτό να οφείλεται στον μικρό αριθμό εμβρύων της ομάδας Α (μόνο 4 έμβρυα) που ικανοποίησαν τα αναπτυξιακά κριτήρια, να φθάσουν δηλαδή στο στάδιο μοριδίου ή βλαστοκύστης την 5<sup>η</sup> ημέρα για να αναλυθούν με aCGH. Με τη σειρά του, αυτός ο περιορισμένος αριθμός εμβρύων που φθάνουν στα απώτερα αναπτυξιακά στάδια, μπορεί να αντικατοπτρίζει το γεγονός ότι τα έμβρυα της ομάδας Β είχαν εκτεθεί στον rhGM-CSF, επομένως η ανάπτυξή τους ενδεχομένως ενισχύθηκε από τη θετική επίδραση του αυξητικού παράγοντα, κάτι που δεν συνέβη στα έμβρυα της ομάδας Α.

Είναι γνωστό ότι σφάλματα του διαχωρισμού των χρωμοσωμάτων κατά τη μίτωση αποτελούν πηγή της ανευπλοειδίας σε όλα τα προεμφυτευτικά αναπτυξιακά στάδια του ανθρώπινου εμβρύου (Mantikou *et al.*, 2012· Katz-Jaffe *et al.*, 2005· Katz-Jaffe *et al.*, 2004). Τα σφάλματα της κυτταροκίνησης είναι κοινή αιτία μιτωτικών ανευπλοειδιών (Bielanska *et al.*, 2002· Clouston *et al.*, 2002· Harrison *et al.*, 2000· Ruangvutilert *et al.*, 2000· Hardy & Winston, 1993). Η αποτυχημένη ή ασύμμετρη κυτταροκίνηση προκαλεί την εμφάνιση διπύρηνων κυττάρων, ή τετραπλοειδία, ή ανωμαλίες του πόλου της



μιτωτικής ατράκτου και χαοτική χρωμοσωματική σύσταση (Chatzimeletiou *et al.*, 2005). Η προσθήκη GM-CSF στο καλλιεργητικό μέσον μπορεί να αποτρέπει ή να περιορίζει αυτά τα σφάλματα, καθώς είναι γνωστό ότι η εν λόγω κυτταροκίνη προάγει την ορθή κυτταρική διαίρεση και την κυτταροκίνηση. Κατά συνέπεια, αναμένεται η ποιότητα των εμβρύων στην ομάδα B να είναι καλύτερη και τα σφάλματα του διαχωρισμού των χρωμοσωμάτων λιγότερα, άρα το ποσοστό ευπλοειδίας μεγαλύτερο, κάτι που διαπιστώσαμε πειραματικά. Είναι σημαντικό να διερευνηθούν περαιτέρω οι λεπτομέρειες του ρόλου που ο GM-CSF διαδραματίζει στην αποτροπή των σφαλμάτων διαχωρισμού των χρωμοσωμάτων.

Με τη βοήθεια του συστήματος χρονοδιολίσθησης, δεδομένου δε ότι όλη η διάρκεια της καλλιέργειας έχει καταγραφεί, είναι απολύτως εφικτή η ανίχνευση των ζυγωτών που εμφάνισαν δύο προπυρήνες (2PN) και η διάκρισή τους από τα ωάρια που υπέστησαν αυτόματη αυλάκωση χωρίς να εμφανίσουν προπυρήνες. Με τον τρόπο αυτό, ανιχνεύθηκε ότι το έμβρυο B2 (βλ. Πίνακα 3-18) εμφάνισε 2 ευδιάκριτους προπυρήνες και 3 δορυφορικούς πυρηνίσκους μετά την ενεργοποίηση. Παράλληλα, είναι γνωστό ότι η μέθοδος aCGH δεν έχει την ικανότητα να ανιχνεύσει πολυπλοειδίες (διότι στην ομοιόμορφη πολυπλοειδία δεν υπάρχει συγκριτική περίσσεια ή έλλειμμα χρωμοσωματικού υλικού) και επομένως εκτιμάται ότι δεν ανιχνεύει περίπου το 0,2% των ανωμαλιών (Lutz, 2012). Η παρουσία των δορυφορικών πυρηνίσκων στο έμβρυο B2 θα μπορούσε θεωρητικά να υποδηλώνει πολυπλοειδία. Το γεγονός όμως ότι το φύλο του εμβρύου είναι άρρεν, αποτελεί ισχυρό επιχείρημα υπέρ του ότι είναι ευπλοειδές, διότι άλλως το φυλετικό χρωμόσωμα Y θα έπρεπε να έχει διπλασιασθεί επιλεκτικά, κάτι που θα ήταν εντελώς απίθανο. Επομένως, το έμβρυο B2 περιέχει ένα μόνο χρωμόσωμα Y, άρα και ένα μόνο χρωμόσωμα X και εμφανίζει φυσιολογικό άρρενα καρυότυπο.

Στη θεωρητική περίπτωση όπου η τεχνητή ενεργοποίηση εφαρμόζεται πριν από την ICSI και παρατηρείται σχηματισμός ενός μόνο προπυρήνα μετά την εφαρμογή του ιονοφόρου ασβεστίου, ο προπυρήνας αυτός είναι αναγκαστικά μητρικής προέλευσης, δεδομένου ότι στα ωάρια δεν έχει γίνει έγχυση σπερματοζωαρίου (Bos-Mikich *et al.*, 2016· Rhoton-Vlasak *et al.*, 1996). Η εκβολή δε του δεύτερου πολικού σωματίου υποδηλώνει ότι πραγματοποιήθηκε απλοειδής παρθενογενετική ενεργοποίηση των ωαρίων (Bos-Mikich *et al.*, 2016). Στα μοντέλα αυτά επιβεβαιώνεται ότι ο μητρικός προπυρήνας ενός γονιμοποιημένου ωαρίου δημιουργείται πλησίον του σημείου εκβολής του δεύτερου πολικού σωματίου, κατά την ολοκλήρωση της γονιμοποίησης. Η παρατήρηση αυτή είναι εξαιρετικά χρήσιμη κατά την καλλιέργεια ωαρίων ύστερα από ICSI σε σύστημα

παρακολούθησης με χρονοδιολίσθηση. Στο σύστημα αυτό, η λεπτομερής μορφολογική παρατήρηση μετά την ICSI επιτρέπει να διαπιστωθεί, για παράδειγμα, ότι σε ένα ωάριο δημιουργείται μόνον ο ένας από τους δύο προπυρήνες. Εάν αυτός ο προπυρήνας προέρχεται από το σημείο εκβολής του 2<sup>ου</sup> πολικού σωματίου, είναι δυνατόν να υποστηριχθεί ότι η ανώμαλη γονιμοποίηση του συγκεκριμένου ωαρίου (1PN/2PB αντί για 2PN/2PB), οφείλεται στη μη δημιουργία του πατρικού προπυρήνα, ενώ ισχύει και το αντίστροφο. Στη παρούσα μελέτη το φαινόμενο αυτό επιβεβαιώθηκε στα 17 ωάρια που προήλθαν από IVM (βλ. ενότητα 3.1.2) και AOA: από τα ωάρια αυτά 11 ενεργοποιήθηκαν και εμφάνισαν έναν προπυρήνα και δύο πολικά σωματία μετά την παρθενογενετική ενεργοποίηση. Ο προπυρήνας αυτός εμφανίστηκε πλησίον του σημείου εκβολής του 2<sup>ου</sup> πολικού σωματίου.

Στην ομάδα B, μόνο τα έμβρυα που αναπτύχθηκαν από ζυγώτες με δύο προπυρήνες και δύο πολικά σωματία (2PN/2PB) βρέθηκαν χρωμοσωματικώς φυσιολογικά κατά την ανάλυση με aCGH. Από τα έμβρυα που αναπτύχθηκαν με αυτόματη αυλάκωση κανένα δεν βρέθηκε ευπλοειδές, παρά την καλή μορφολογία τους κατά την 5<sup>η</sup> ημέρα (Πίνακας 3-18). Υπάρχει ενδεχόμενο ορισμένα έμβρυα που εμφάνισαν αυτόματη αυλάκωση να προέκυψαν από την επίδραση του GM-CSF, ως κυτταροκίνης. Τα έμβρυα αυτά, που προέρχονται από αυτόματη αυλάκωση, έχουν ιδιαίτερα μειωμένο αναπτυξιακό δυναμικό. Πράγματι, σε μια μελέτη μορφολογικής παρατήρησης με σύστημα χρονοδιολίσθησης, που δεν περιελάμβανε τεχνητή ενεργοποίηση των ωαρίων, αλλά παρατηρήσεις 5.225 εμβρύων, εκ των οποίων 715 εμφάνισαν αυτόματη αυλάκωση (Rubio *et al.*, 2012), διαπιστώθηκε ότι το ποσοστό εμφύτευσης των τελευταίων ήταν σημαντικά μικρότερο του μέσου ποσοστού εμφύτευσης των εμβρύων με φυσιολογική καρυογαμία και αυλάκωση (1,2% έναντι 20,2% αντιστοίχως). Η παρούσα μελέτη ενισχύει αυτές τις μορφολογικές παρατηρήσεις, παρέχοντας, αν και με μικρότερους αριθμούς εμβρύων, το επιπρόσθετο στοιχείο της αποδεδειγμένης ευπλοειδίας.

Έχει σημασία να τονισθεί ότι από τα έμβρυα 5<sup>ης</sup> ημέρας που αναλύθηκαν στις δύο ομάδες ταυτοποιήθηκαν συνολικά 6 άρρενα έμβρυα, μεταξύ των οποίων τρία ευπλοειδή της ομάδας B, ενώ ένα (έμβρυο A3, Πίνακας 3-19) είχε χρωμοσωματικό τύπο XXY (σύνδρομο Klinefelter). Το γεγονός έχει σημασία διότι είναι ενδεικτικό της συμμετοχής των σπερματοζωαρίων στον σχηματισμό των προπυρήνων (Lu *et al.*, 2006).

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης αποδεικνύουν ότι η τεχνητή ενεργοποίηση μη γονιμοποιημένων ωαρίων με ιονοφόρο A23187, 18 h μετά την ICSI, σε συνδυασμό με

την παρουσία πρόσθετου αυξητικού παράγοντα GM-CSF στην καλλιέργεια, μπορεί να οδηγήσει σε ομαλή εξέλιξη των αναπτυξιακών διεργασιών μέχρι και στη δημιουργία ευπλοειδών βλαστοκύστεων άριστης μορφολογίας την 5<sup>η</sup> ημέρα καλλιέργειας.

Τα έμβρυα αυτά δεν χρησιμοποιήθηκαν για την επίτευξη εγκυμοσύνης, σύμφωνα με τον αρχικό σχεδιασμό της μελέτης και τη σχετική άδεια που είχε ληφθεί από την Εθνική Αρχή ΙΥΑ. Ωστόσο, υπό την προϋπόθεση ότι τα ευρήματα της παρούσας μελέτης θα επιβεβαιωθούν από περαιτέρω παρόμοιες έρευνες, ο δρόμος για την κλινική εφαρμογή μπορεί να ανοίξει, παρέχοντας μια λύση στο αδιέξοδο για τα ζευγάρια που αντιμετωπίζουν την οδυνηρή πραγματικότητα της ολικής ή μερικής αποτυχίας γονιμοποίησης σε πρόγραμμα ICSI.

### 4.3 Γενικά συμπεράσματα

Συμπερασματικά, εφαρμόστηκαν τρία πρωτόκολλα: η καλλιέργεια άωρων ωαρίων για την ωρίμασή τους *in vitro* και η τεχνητή ενεργοποίησή τους με ιονοφόρο ασβεστίου A23187, το τυποποιημένο πρωτόκολλο τεχνητής ενεργοποίησης μη γονιμοποιημένων ωαρίων με τη χρήση ιονοφόρου διαύλου ασβεστίου A23187 και ένα τροποποιημένο πρωτόκολλο καλλιέργειας των τεχνητώς ενεργοποιημένων ωαρίων με προσθήκη rhGM-CSF στο καλλιεργητικό μέσον.

Από το πρώτο πρωτόκολλο προέκυψε ότι η μέθοδος της ωρίμασης *in vitro* λειτουργεί αποδοτικά και παράγει ωάρια ικανά να ενεργοποιηθούν με έκθεσή τους στον ιονοφόρο ασβεστίου A23187. Μετά την εν λόγω παρθενογενετική τους ενεργοποίηση, είναι ικανά να εκβάλουν το δεύτερο πολικό σωματίο και να εμφανίσουν τον θήλυ προπυρήνα κάτω από το σημείο εκβολής του 2<sup>ου</sup> πολικού σωματίου.

Τα δύο άλλα πρωτόκολλα συγκρίθηκαν μεταξύ τους και αναλύθηκε, την 5<sup>η</sup> ημέρα καλλιέργειας, η χρωμοσωματική σύσταση των εμβρύων που εκδήλωσαν φυσιολογικά γνωρίσματα γονιμοποίησης (δύο πολικά σωματία και δύο προπυρήνες) ή αυτόματη αυλάκωση με τη μέθοδο του συγκριτικού γονιδιωματικού υβριδισμού σε μικροσυστοιχίες DNA ύστερα από ολική βιοψία. Η τεχνολογία παρακολούθησης με χρονοδιολίσθηση επέτρεψε να καταγραφούν λεπτομερώς τα μορφολογικά δεδομένα της καλλιέργειας.

Τα αποτελέσματα της μελέτης καταδεικνύουν ότι το τροποποιημένο πρωτόκολλο (A23187 και GM-CSF) μπορεί να αποδώσει μορφολογικώς άριστες και ευπλοειδείς

βλαστοκύστες 5<sup>ης</sup> ημέρας. Επομένως, η μέθοδος που αναπτύχθηκε στην παρούσα διατριβή θα μπορούσε να εφαρμοσθεί κλινικά, υπό την προϋπόθεση ότι η ασφάλειά της θα ελεγχθεί προηγουμένως με περαιτέρω μελέτες *in vitro* και με πιλοτικές κλινικές μελέτες *in vivo*.

#### 4.4 Επίτευξη των σκοπών της μελέτης

Πρώτος σκοπός ήταν να εξετασθεί το ενδεχόμενο της διάσωσης των μη γονιμοποιημένων ωαρίων, τα οποία δεν εμφάνιζαν χαρακτηριστικά της γονιμοποίησης 18 h μετά την ICSI. Με βραχυχρόνια έκθεσή τους στον ιονοφόρο διάλυο ασβεστίου A23187 αποκαταστάθηκε αυτή η αποτυχία γονιμοποίησης και τα ωάρια ενεργοποιήθηκαν.

Δεύτερος σκοπός ήταν η ενίσχυση του αναπτυξιακού δυναμικού των εμβρύων με τον αυξητικό παράγοντα GM-CSF. Τα ευρήματα της μελέτης επιβεβαιώνουν προηγούμενες παρατηρήσεις από τη βιβλιογραφία και βελτιώνουν τις αναπτυξιακές παραμέτρους των εμβρύων σε καλλιέργεια *in vitro*.

Τρίτος σκοπός ήταν η αξιολόγηση της συνεργιστικής επίδρασης των δύο παραπάνω μεθόδων. Από τα ευρήματα προκύπτει ότι τα τεχνητώς ενεργοποιημένα ωάρια είναι ικανά να διανύσουν όλα τα φυσιολογικά αναπτυξιακά στάδια και να φθάσουν μέχρι το στάδιο της βλαστοκύστης, εκδηλώνοντας φυσιολογικά μορφολογικά χαρακτηριστικά, που καταγράφονται από το σύστημα παρακολούθησης με φωτογράφιση χρονοδιόλισθησης.

Τέταρτος σκοπός ήταν να διαπιστωθεί, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο του συγκριτικού γονιδιωματικού υβριδισμού σε μικροσυστοιχίες DNA, εάν τα έμβρυα αυτά φέρουν χρωμοσωματικές ανωμαλίες. Το συμπέρασμα είναι ότι ικανός αριθμός εμβρύων που φθάνουν στο στάδιο της βλαστοκύστης με την παραπάνω διαδικασία έχουν φυσιολογική χρωμοσωματική σύσταση, επομένως το πρωτόκολλο θα μπορούσε να θεωρηθεί ασφαλές για κλινική χρήση.

Κατά συνέπεια, οι αρχικοί σκοποί της μελέτης έχουν επιτευχθεί πλήρως.

#### 4.5 Προοπτικές

Μεταξύ των συμπερασμάτων της μελέτης, εκείνο που έχει τη μεγαλύτερη κλινική σημασία είναι ότι η διάσωση των μη γονιμοποιημένων ωαρίων, 18 h μετά την ICSI, με

τεχνητή ενεργοποίηση μέσω ιονοφόρου ασβεστίου A23187 και καλλιέργεια σε μέσον που περιέχει GM-CSF μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη εμβρύων, τα οποία διανύουν όλα τα φυσιολογικά προεμφυτευτικά στάδια, μέχρι και εκείνο της βλαστοκύστης, έχουν δε φυσιολογική χρωμοσωματική σύσταση.

Με αυτά τα δεδομένα, έστω κι αν η συνολική απόδοση μπορεί να είναι μικρότερη από τον μέσο όρο της τυπικής εξωσωματικής γονιμοποίησης με ICSI, ένα επόμενο βήμα είναι προφανές: να μελετηθεί η συμπεριφορά των εμβρύων αυτών *in vivo* σε περιστατικά ασθενών που δεν έχουν άλλη ελπίδα τεκνοποίησης και να διαπιστωθεί κατά πόσον τα έμβρυα αυτά είναι ικανά να εμφυτευθούν και να παραγάγουν υγιή τέκνα.

Προς την κατεύθυνση αυτή, θα κατατεθεί σχετικό αίτημα προς την Εθνική Αρχή ΙΥΑ, προκειμένου να ληφθεί η απαραίτητη άδεια για έρευνα που οδηγεί σε εγκυμοσύνη, σύμφωνα με την ισχύουσα νομοθεσία. Η άδεια θα ζητηθεί με σκοπό την εκπόνηση πιλοτικής κλινικής μελέτης για την εφαρμογή του τροποποιημένου πρωτοκόλλου της παρούσας διατριβής αρχικώς σε επιλεγμένα περιστατικά ασθενών με γνωστή προηγούμενη ολική ή μερική αποτυχία γονιμοποίησης και, σε δεύτερο χρόνο, σε περιστατικά απροσδόκητης αποτυχίας γονιμοποίησης ύστερα από ICSI.

#### **4.6 Δημοσίευση των κυριότερων ευρημάτων της μελέτης στο περιοδικό *Journal of Assisted Reproduction and Genetics***

Τα κυριότερα ευρήματα της μελέτης παρουσιάσθηκαν προς δημοσίευση στο περιοδικό *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* τον Απρίλιο του 2016· η δημοσίευση εγκρίθηκε τον Σεπτέμβριο, συμπεριλαμβάνεται στο τεύχος του Ιανουαρίου 2017 του εν λόγω περιοδικού και είναι διαθέσιμη σε ηλεκτρονική μορφή (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) με τα εξής στοιχεία:

**Economou KA**, Christopikou D, Tsorva E, Davies S, Mastrominas M, Cazlaris H, Koutsilieris M, Angelogianni P, Loutradis D (2017). The combination of calcium ionophore A23187 and GM-CSF can safely salvage aged human unfertilized oocytes after ICSI. *J Assist Reprod Genet* **34**(1):33-41. [PMID: 27743290 – DOI: 10.1007/s10815-016-0823-0]

## 5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

### 5.1 Παραπομπές σε ηλεκτρονικές διευθύνσεις (υποσέλιδες σημειώσεις)

*Σημείωση: όλοι οι παρακάτω σύνδεσμοι λειτουργούσαν στις 26 Νοεμβρίου 2016.*

- 1 <http://eaiya.gov.gr/law-fek/>
- 2 <http://eaiya.gov.gr/>
- 3 <http://www.galinos.gr/web/drugs/main/drugs/gonal-f#content>
- 4 <http://www.galinos.gr/web/drugs/main/drugs/puregon#content>
- 5 <http://www.galinos.gr/web/drugs/main/drugs/menopur#content>
- 6 <http://www.galinos.gr/web/drugs/main/drugs/merional#content>
- 7 <http://www.galinos.gr/web/drugs/main/drugs/cetrotide#content>
- 8 <http://www.galinos.gr/web/drugs/main/drugs/orgalutran#content>
- 9 <http://www.galinos.gr/web/drugs/main/drugs/pregnyl#content>
- 10 <http://www.galinos.gr/web/drugs/main/drugs/ovitrelle#content>
- 11 <http://www.galinos.gr/web/drugs/main/drugs/filicine#content>
- 12 <https://www.smiths-medical.com/products/assisted-reproduction/oocyte-collection/wallace-dual-lumen-oocyte-recovery-systems>
- 13 <http://www.irvinesci.com/products/90163-multipurpose-handling-medium-mhm?dpt=Assisted+Reproductive+Technology>
- 14 [http://catalog2.corning.com/LifeSciences/en-GB/Shopping/ProductDetails.aspx?categoryname=&productid=352051\(Lifesciences\)](http://catalog2.corning.com/LifeSciences/en-GB/Shopping/ProductDetails.aspx?categoryname=&productid=352051(Lifesciences))
- 15 [http://catalog2.corning.com/LifeSciences/en-GB/Shopping/ProductDetails.aspx?categoryname=&productid=353037\(Lifesciences\)](http://catalog2.corning.com/LifeSciences/en-GB/Shopping/ProductDetails.aspx?categoryname=&productid=353037(Lifesciences))
- 16 [https://www.nikoninstruments.com/en\\_EU/content/search?SearchText=SMZ](https://www.nikoninstruments.com/en_EU/content/search?SearchText=SMZ)
- 17 [https://www.thomassci.com/Laboratory-Supplies/Pasteur-Pipets/\\_/SteriPettes-Sterile-Pasteur-Pipettes](https://www.thomassci.com/Laboratory-Supplies/Pasteur-Pipets/_/SteriPettes-Sterile-Pasteur-Pipettes)
- 18 <http://www.irvinesci.com/products/99193-serum-substitute-supplement?dpt=Assisted+Reproductive+Technology>
- 19 <http://www.origio.com/products/sage-1-step/>
- 20 [http://catalog2.corning.com/LifeSciences/en-GB/Shopping/ProductDetails.aspx?categoryname=&productid=352054\(Lifesciences\)](http://catalog2.corning.com/LifeSciences/en-GB/Shopping/ProductDetails.aspx?categoryname=&productid=352054(Lifesciences))
- 21 <http://www.stuart-equipment.com/product.asp?dsl=17>
- 22 <http://www.sefimedical.com/makler1.htm>
- 23 <http://www.fertipro.com/inserts/SpermMar.pdf>
- 24 [www.irvinesci.com/products/99264-isolate?dpt=Assisted+Reproductive+Technology](http://www.irvinesci.com/products/99264-isolate?dpt=Assisted+Reproductive+Technology)
- 25 <https://www.brandtech.com/product/accu-jet-pro/>
- 26 <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/170356>
- 27 [https://www.nikoninstruments.com/en\\_EU/content/search?SearchText=SMZ+1500](https://www.nikoninstruments.com/en_EU/content/search?SearchText=SMZ+1500)

- 28 [http://catalog2.corning.com/LifeSciences/en-GB/Shopping/ProductDetails.aspx?categoryname=&productid=353653\(Lifesciences\)](http://catalog2.corning.com/LifeSciences/en-GB/Shopping/ProductDetails.aspx?categoryname=&productid=353653(Lifesciences))
- 29 <http://www.origio.com/products/the-stripper/>
- 30 <http://www.research-instruments.com/ez-tip/>
- 31 <http://www.irvinesci.com/products/90101-hyaluronidase-solution?dpt=Assisted+Reproductive+Technology>
- 32 [https://www.cookmedical.com/products/wh\\_minc\\_1000\\_webds/](https://www.cookmedical.com/products/wh_minc_1000_webds/)
- 33 <https://www.memmert.com/search/?q=BE+200>
- 34 <https://gynemed.de/index.php?id=537&L=1&type=98>
- 35 <http://www.vitrolife.com/en/Products/EmbryoScope-Time-Lapse-System/EmbryoSlide-Culture-Dish/>
- 36 <https://www.brandtech.com/product/transferpette/>
- 37 <http://www.starlab.de/int/index.php?l=3&action=products&section=0&catalognode=56847#>
- 38 <http://www.origio.com/products/sage-in-vitro-maturation-media-ivm/>
- 39 [http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/d8662?lang=en&region=GR&gclid=Cj0KEQiAguXBBRCE\\_pbQ5reuq8MBEiQANji2LbENgcqgXpiPEdQg8\\_55B4kI6YC0AzMUhfvBBebJF0IaAuP48P8HAQ](http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/d8662?lang=en&region=GR&gclid=Cj0KEQiAguXBBRCE_pbQ5reuq8MBEiQANji2LbENgcqgXpiPEdQg8_55B4kI6YC0AzMUhfvBBebJF0IaAuP48P8HAQ)
- 40 <http://www.origio.com/products/oil-for-tissue-culture/>
- 41 <http://www.iksinternational.com/en/category/co-o-incubators/4>
- 42 <http://www.vitrolife.com/en/Products/EmbryoScope-Time-Lapse-System/EmbryoScope-Time-Lapse-System/>
- 43 <https://www.sunlight-medical.com/pipettecodes/>
- 44 <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/150265>
- 45 <http://www.origio.com/products/pvp-medium/>
- 46 <https://pri.rn.dk/Assets/9416/User-manual-ES-D-vers-2-10.pdf>
- 47 <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/c7522?lang=en&region=GR>
- 48 <http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Datasheet/3/c7522dat.pdf>
- 49 <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/d2650?lang=en&region=GR>
- 50 [http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product\\_Information\\_Sheet/d2650pis.pdf](http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/d2650pis.pdf)
- 51 <http://www.irvinesci.com/products/90125-htf-medium-with-gentamicin?dpt=Assisted+Reproductive+Technology>
- 52 <http://gonagen.com/documents/9922-90125-90126-HTF-mHTF-medium-with-gentamicin.pdf>
- 53 [https://www.rndsystems.com/products/recombinant-human-gm-csf-protein\\_215-gm](https://www.rndsystems.com/products/recombinant-human-gm-csf-protein_215-gm)
- 54 <http://www.ri-lifesciences.com/ls/products/hardware/saturn-5-active>
- 55 <https://hartmann.info/en-DX/our-products/Operating-Theater/Surgical-Gloves/Latex-and-powderfree-surgical-gloves/Peha-taft%C2%AE-classic-powderfree#products>
- 56 <http://www.spscientific.com/ProductDetail.aspx?id=3128>

## 5.2 Έντυπη βιβλιογραφία

**Σημείωση:** όλες οι παρακάτω παραπομπές ελέγχθηκαν και το περιεχόμενό τους συμφωνούσε με τα δεδομένα της βάσης PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) στις 26 Ιανουαρίου 2017. Σε ελάχιστες περιπτώσεις άρθρων που δεν εμφανίσθηκαν στην εν λόγω βάση κατά τον έλεγχο, η ορθότητα της παραπομπής ελέγχθηκε στα περιεχόμενα του περιοδικού στο διαδίκτυο και πάντως συμφωνεί με το ανά χείρας ανάτυπο (στις εν λόγω παραπομπές περιλαμβάνεται και ο αριθμός ταυτοποίησης DOI, όπου αυτός είναι διαθέσιμος). Τα ονόματα των περιοδικών αναγράφονται στη συντεταγμένη μορφή όπως αυτή εμφανίζεται στην παραπάνω βάση δεδομένων. Οι παραπομπές σε περιοδικά παρατίθενται πλήρεις, με την εξής σειρά: ονόματα συγγραφέων και αρχικά (χωρίς τελείες), έτος (σε παρένθεση), τίτλος εργασίας, όνομα περιοδικού (σε πλάγια γραφή), αριθμός τόμου, αριθμός τεύχους (σε παρένθεση, όπου υπάρχει), αριθμοί σελίδων. Οι παραπομπές σε βιβλία ή μονογραφίες περιλαμβάνουν το όνομα των συγγραφέων και των επιμελητών, τον τίτλο του κεφαλαίου, τον τίτλο του βιβλίου, τον εκδότη, την ημερομηνία και τον τόπο έκδοσης, και τους αριθμούς σελίδων.

Agerholm I, Loft A, Hald F, Lemmen JG, Munding B, Sørensen PD, Ziebe S (2010). Culture of human oocytes with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor has no effect on embryonic chromosomal constitution. *Reprod Biomed Online* **20**(4):477-84.

Aghajanzpour S, Ghaedi K, Salamian A, Deemeh MR, Tavalae M, Moshtaghian J, Parrington J, Nasr-Esfahani MH (2011). Quantitative expression of phospholipase C zeta, as an index to assess fertilization potential of a semen sample. *Hum Reprod* **26**(11):2950-6.

Ahlstrom A, Park H, Bergh C, Selleskog U, Lundin K (2016). Conventional morphology performs better than morphokinetics for prediction of live birth after day 2 transfer. *Reprod Biomed Online* **33**(1):61-70.

Ambartsumyan G, Clark AT (2008). Aneuploidy and early human embryo development. *Hum Mol Genet* **17**:R10-15.

Amdani SN, Yeste M, Jones C, Coward K (2016). Phospholipase C zeta (PLCζ) and male infertility: Clinical update and topical developments. *Adv Biol Regul* **61**:58-67.

Armstrong S, Arroll N, Cree LM, Jordan V, Farquhar C (2015). Time-lapse systems for embryo incubation and assessment in assisted reproduction. *Cochrane Database Syst Rev* **2**:1-48.

Asch RH, Ellsworth LR, Balmaceda JP, Wong PC (1984). Pregnancy after translaparoscopic gamete intrafallopian transfer. *Lancet* **2**(8410):1034-5.

Avery OT, Macleod CM, McCarty M (1944). Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types: induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from *Pneumococcus* type III. *J Exp Med* **79**(2):137-58.



- Baltaci V, Ayvaz OU, Unsal E, Aktaş Y, Baltaci A, Turhan F, Ozcan S, Sönmezer M (2010). The effectiveness of intracytoplasmic sperm injection combined with piezoelectric stimulation in infertile couples with total fertilization failure. *Fertil Steril* **94**(3):900-4.
- Barlow P, Englert Y, Puissant F, Lejeune B, Delvigne A, Van Rysselberge M, Leroy F (1990). Fertilization failure in IVF: why and what next? *Hum Reprod* **5**(4):451-6.
- Barreda DR, Hanington PC, Belosevic M (2004). Regulation of myeloid development and function by colony stimulating factors. *Dev Comp Immunol* **28**(5):509-54.
- Belker AM, Swanson ML, Cook CL, Carrillo AJ, Yoffe SC (2001). Live birth after sperm retrieval from a moribund man. *Fertil Steril* **76**(4):841-3.
- Berkowitz RS, Faris HM, Hill JA, Anderson DJ (1990). Localization of leukocytes and cytokines in chorionic villi of normal placentas and complete hydatidiform moles. *Gynecol Oncol* **37**(3):396-400.
- Berridge MJ (2009). Inositol trisphosphate and calcium signalling mechanisms. *Biochim Biophys Acta* **1793**(6): 933-40.
- Bhattacharya S, Hamilton MP, Shaaban M, Khalaf Y, Seddler M, Ghobara T, Braude P, Kennedy R, Rutherford A, Hartshorne G, Templeton A (2011). Conventional *in-vitro* fertilisation versus intracytoplasmic sperm injection for the treatment of non-male-factor infertility: a randomised controlled trial. *Lancet* **357**(9274):2075-9.
- Bielanska M, Tan SL, Ao A (2002). High rate of mixoploidy among human blastocysts cultured *in vitro*. *Fertil Steril* **78**(6):1248-53.
- Biggers JD (2012). IVF and embryo transfer: historical origin and development. *Reprod Biomed Online* **25**(2):118-27.
- Borges E Jr, de Almeida Ferreira Braga DP, de Sousa Bonetti TC, Iaconelli A Jr, Franco JG Jr. (2009a). Artificial oocyte activation using calcium ionophore in ICSI cycles with spermatozoa from different sources. *Reprod Biomed Online* **18**(1):45-52.
- Borges E Jr, de Almeida Ferreira Braga DP, de Sousa Bonetti TC, Iaconelli A Jr, Franco JG Jr. (2009b). Artificial oocyte activation with calcium ionophore A23187 in intracytoplasmic sperm injection cycles using surgically retrieved spermatozoa. *Fertil Steril* **92**(1):131-6.
- Borut Kovačič, Veljko Vlaisavljević (2012). Importance of blastocyst morphology in selection for transfer. In: *Advances in Embryo Transfer* (Bin Wu ed.), Ch. 11, pp 161-176. InTech, DOI: 10.5772/37891. (<http://www.intechopen.com/books/advances-in-embryo-transfer/importance-of-blastocyst-morphology-in-selection-for-transfer>)

- Bos-Mikich A, Bressan FF, Ruggeri RR, Watanabe Y, Meirelles FV (2016). Parthenogenesis and human assisted reproduction. *Stem Cells Int* **1970843**:1-8 (<http://dx.doi.org/10.1155/2016/1970843>).
- Briggs R, King TJ (1952). Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frogs' eggs. *Proc Natl Acad Sci USA* **38**(5):455-63.
- Brinster RL (1963). A method for *in vitro* cultivation of mouse ova from two-cell to blastocyst. *Exp Cell Res* **32**:205-8.
- Buster JE, Bustillo M, Thorneycroft IH, Simon JA, Boyers SP, Marshall JR, Louw JA, Seed RW, Seed RG (1983). Non-surgical transfer of *in vivo* fertilised donated ova to five infertile women: report of two pregnancies. *Lancet* **2**(8343):223-4.
- Caglar Aytac P, Kilicdag EB, Haydardedeoglu B, Simsek E, Cok T, Parlakgumus HA (2015). Can calcium ionophore "use" in patients with diminished ovarian reserve increase fertilization and pregnancy rates? A randomized, controlled study. *Fertil Steril* **104**(5):1168-74.
- Cao XW, Lin K, Li CY, Yuan CW (2011) [A review of WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen (5<sup>th</sup> edition)]. *Zhonghua nan ke xue = National journal of andrology* **17**:1059-63.
- Cao Y (2007). Angiogenesis modulates adipogenesis and obesity. *J Clin Invest* **117**(9):2362-8.
- Capalbo A, Ottolini CS, Griffin DK, Ubaldi FM, Handyside AH, Rienzi L (2016). Artificial oocyte activation with calcium ionophore does not cause a widespread increase in chromosome segregation errors in the second meiotic division of the oocyte. *Fertil Steril* **105**(3):807-14.
- Carlson B (2016). *Ανθρώπινη Εμβρυολογία και Αναπτυξιακή Βιολογία*, 5<sup>η</sup> έκδοση, Εκδ. Παρισιάνου, Αθήνα.
- Cetinkaya M, Onem K, Zorba OU, Ozkara H, Alici B (2015a). Evaluation of microdissection testicular sperm extraction results in patients with non-obstructive azoospermia: independent predictive factors and best cutoff values for sperm retrieval. *Urol J* **12**(6):2436-43.
- Cetinkaya M, Pirkevi C, Yelke H, Colakoglu YK, Atayurt Z, Kahraman S (2015b). Relative kinetic expressions defining cleavage synchronicity are better predictors of blastocyst formation and quality than absolute time points. *J Assist Reprod Genet* **32**(1):27-35.
- Cha KY, Koo JJ, Ko JJ, Choi DH, Han SY, Yoon TK (1991). Pregnancy after *in vitro* fertilization of human follicular oocytes collected from nonstimulated cycles, their culture *in vitro* and their transfer in a donor oocyte program. *Fertil Steril* **55**(1):109-13.
- Chang EM, Song HS, Lee DR, Lee WS, Yoon TK (2014). *In vitro* maturation of human oocytes: Its role in infertility treatment and new possibilities. *Clin Exp Reprod Med* **41**(2):41-6.

- Chang MC (1959). Fertilization of rabbit ova *in vitro*. *Nature* **184**(4684):466-7.
- Chatzimeletiou K, Morrison EE, Prapas N, Prapas Y, Handyside AH (2005). Spindle abnormalities in normally developing and arrested human preimplantation embryos *in vitro* identified by confocal laser scanning microscopy. *Hum Reprod* **20**(3):672-82.
- Check JH, Summers-Chase D, Cohen R, Brasile D (2010). Artificial oocyte activation with calcium ionophore allowed fertilization and pregnancy in a couple with long-term unexplained infertility where the female partner had diminished EGG reserve and failure to fertilize oocytes despite intracytoplasmic sperm injection. *Clin Exp Obstet Gynecol* **37**(4):263-5.
- Chen C (1986). Pregnancy after human oocyte cryopreservation. *Lancet* **1**(8486):884-6.
- Chi HJ, Koo JJ, Song SJ, Lee JY, Chang SS (2004). Successful fertilization and pregnancy after intracytoplasmic sperm injection and oocyte activation with calcium ionophore in a normozoospermic patient with extremely low fertilization rates in intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertil Steril* **82**(2):475-7.
- Christopikou D, Tsorva E, Economou K, Shelley P, Davies S, Mastrominas M, Handyside AH (2013). Polar body analysis by array comparative genomic hybridization accurately predicts aneuploidies of maternal meiotic origin in cleavage stage embryos of women of advanced maternal age. *Hum Reprod* **28**(5):1426-34.
- Chronopoulou E, Harper JC (2015). IVF culture media: past, present and future. *Hum Reprod Update* **21**(1):39-55.
- Ciray HN, Campbell A, Agerholm IE, Aguilar J, Chamayou S, Esbert M, Sayed S, Time-Lapse User Group (2014). Proposed guidelines on the nomenclature and annotation of dynamic human embryo monitoring by a time-lapse user group. *Hum Reprod* **29**(12):2650-60.
- Clouston HJ, Herbert M, Fenwick J, Murdoch AP, Wolstenholme J (2002). Cytogenetic analysis of human blastocysts. *Prenat Diagn* **22**(12):1143-52.
- Cohen J (1991). Assisted hatching of human embryos. *J In Vitro Fert Embryo Transf* **8**(4):179-90.
- Cohen J, Fehilly CB, Fishel SB, Edwards RG, Hewitt J, Rowland GF, Steptoe PC, Webster J (1984). Male infertility successfully treated by *in-vitro* fertilization. *Lancet* **1**(8388):1239-40.
- Cohen J, Scott R, Schimmel T, Levron J, Willadsen S (1997). Birth of infant after transfer of anucleate donor oocyte cytoplasm into recipient eggs. *Lancet* **350**(9072):186-7.

- Cohen J, Simons RF, Fehilly CB, Fishel SB, Edwards RG, Hewitt J, Rowland GF, Steptoe PC, Webster JM (1985). Birth after replacement of hatching blastocyst cryopreserved at expanded blastocyst stage. *Lancet* **1**(8429):647.
- Coutelle C, Williams C, Handyside A, Hardy K, Winston R, Williamson R (1989). Genetic analysis of DNA from single human oocytes: a model for preimplantation diagnosis of cystic fibrosis. *Brit Med J* **299**(6690):22-4.
- Craft I, McLeod F, Green S, Djahanbakhch O, Bernard A, Twigg H, Smith W (1982). Birth following oocyte and sperm transfer to the uterus. *Lancet* **2**(8301):773.
- Darwish E, Magdi Y (2015). A preliminary report of successful cleavage after calcium ionophore activation at ICSI in cases with previous arrest at the pronuclear stage. *Reprod Biomed Online* **31**(6):799-804.
- de Boer KA, McArthur SJ (2002). Pregnancies and live births after transfer of biopsied and cryopreserved blastocysts following PGD analysis on day 3. *21<sup>st</sup> Annual Scientific Meeting of the Fertility Society of Australia, Gold Coast, Queensland, October 23-26, 2002.*
- de Klerk C, Macklon NS, Heijnen EM, Eijkemans MJ, Fauser BC, Passchier J, Hunfeld JA (2007). The psychological impact of IVF failure after two or more cycles of IVF with a mild versus standard treatment strategy. *Hum Reprod* **22**(9):2554-8.
- de Kretser D, Dennis P, Hudson B, Leeton J, Lopata A, Talbot J, Wood C (1973). Transfer of a human zygote. *Lancet* **2**(7831):728-9.
- de Moraes AA, Paula-Lopes FF, Chegini N, Hansen PJ (1999). Localization of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the bovine reproductive tract. *J Reprod Immunol* **42**(2):135-45.
- de Rycke M, Belva F, Goossens V, Moutou C, SenGupta SB, Traeger-Synodinos J, Coonen E (2015). ESHRE PGD Consortium data collection XIII: cycles from January to December 2010 with pregnancy follow-up to October 2011. *Hum Reprod* **30**(8):1763-89.
- de Vos A, Van Landuyt L, Van Ranst H, Vandermonde A, D'Haese V, Sterckx J, Haentjens P, Devroey P, Van der Elst J (2008). Randomized sibling-oocyte study using recombinant human hyaluronidase versus bovine-derived Sigma hyaluronidase in ICSI patients. *Hum Reprod* **23**(8):1815-9.
- Devroey P, Braeckmans P, Smits J, Van Waesberghe L, Wisanto A, Van Steirteghem A, Heytens L, Camu F (1986). Pregnancy after translaparoscopic zygote intrafallopian transfer in a patient with sperm antibodies. *Lancet* **1**(8493):1329.
- Devroey P, Mannaerts B, Smits J, Coelingh Bennink H, Van Steirteghem A (1993). First established pregnancy and birth after ovarian stimulation with recombinant human follicle stimulating hormone (Org 32489). *Hum Reprod* **8**(6):863-5.

- Donnez J, Dolmans MM, Demylle D, Jadoul P, Pirard C, Squifflet J, Martinez-Madrid B, van Langendonck A (2004). Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet* **364**(9443):1405-10 (*erratum: Lancet* **364**(9450):2020).
- Dozortsev D, Rybouchkin A, De Sutter P, Dhont M (1995). Sperm plasma membrane damage prior to intracytoplasmic sperm injection: a necessary condition for sperm nucleus decondensation. *Hum Reprod* **10**(11):2960-4.
- Dudley DJ, Mitchell MD, Creighton K, Branch DW (1990). Lymphokine production during term human pregnancy: differences between peripheral leukocytes and decidual cells. *Am J Obstet Gynecol* **163**(6 Pt 1):1890-3.
- Dumoulin JC, Bras M, Coonen E, Dreesen J, Geraedts JP, Evers JL (1998). Effect of Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>-free medium on the biopsy procedure for preimplantation genetic diagnosis and further development of human embryos. *Hum Reprod* **13**(10):2880-3.
- Ebner T, Köster M, Shebl O, Moser M, Van der Ven H, Tews G, Montag M (2012). Application of a ready-to-use calcium ionophore increases rates of fertilization and pregnancy in severe male factor infertility. *Fertil Steril* **98**(6):1432-7.
- Ebner T, Maurer M, Oppelt P, Mayer RB, Duba HC, Costamoling W, Shebl O (2015c). Healthy twin live-birth after ionophore treatment in a case of theophylline-resistant Kartagener syndrome. *J Assist Reprod Genet* **32**(6):873-7.
- Ebner T, Montag M; Oocyte Activation Study Group, Montag M, Van der Ven K, Van der Ven H, Ebner T, Shebl O, Oppelt P, Hirchenhain J, Krüssel J, Maxrath B, Gnoth C, Friol K, Tigges J, Wunsch E, Luckhaus J, Beerkotte A, Weiss D, Grunwald K, Struller D, Etien C (2015b). Live birth after artificial oocyte activation using a ready-to-use ionophore: a prospective multicentre study. *Reprod Biomed Online* **30**(4):359-65.
- Ebner T, Moser M, Sommergruber M, Jesacher K, Tews G (2004). Complete oocyte activation failure after ICSI can be overcome by a modified injection technique. *Hum Reprod* **19**(8):1837-41.
- Ebner T, Oppelt P, Wöber M, Staples P, Mayer RB, Sonnleitner U, Bulfon-Vogl S, Gruber I, Haid AE, Shebl O (2015a). Treatment with Ca<sup>2+</sup> ionophore improves embryo development and outcome in cases with previous developmental problems: a prospective multicenter study. *Hum Reprod* **30**(1):97-102.
- Economou KA, Christopikou D, Tsorva E, Davies S, Mastrominas M, Cazlaris H, Koutsilieris M, Angelogianni P, Loutradis D (2017). The combination of calcium ionophore A23187 and GM-CSF can safely salvage aged human unfertilized oocytes after ICSI. *J Assist Reprod Genet* **34**(1):33-41.

- Edwards R (1988). Patrick Steptoe 1913-1988. *Hum Reprod* **3**(6):821-2.
- Edwards RG (1965a). Maturation *in vitro* of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. *Nature* **208**(5008):349-51.
- Edwards RG (1965b). Maturation *in vitro* of human ovarian oocytes. *Lancet* **2**(7419):926-9.
- Edwards RG, Bavister BD, Steptoe PC (1969). Early stages of fertilization *in vitro* of human oocytes matured *in vitro*. *Nature* **221**(5181):632-5.
- Edwards RG, Gardner RL (1967). Sexing of live rabbit blastocysts. *Nature* **214**(5088):576-7.
- Edwards RG, Steptoe PC, Purdy JM (1970). Fertilization and cleavage *in vitro* of preovulatory human oocytes. *Nature* **227**(5265):1307-9.
- Eksioglu EA, Mahmood SS, Chang M, Reddy V (2007). GM-CSF promotes differentiation of human dendritic cells and T lymphocytes toward a predominantly type 1 proinflammatory response. *Exp Hematol* **35**(8):1163-71.
- Eldar-Geva T, Brooks B, Margalioth EJ, Zylber-Haran E, Gal M, Silber SJ (2003). Successful pregnancy and delivery after calcium ionophore oocyte activation in a normozoospermic patient with previous repeated failed fertilization after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* **79**(S3):1656-8.
- Esfandiari N, Javed MH, Gotlieb L, Casper RF (2005). Complete failed fertilization after intracytoplasmic sperm injection – analysis of 10 years’ data. *Int J Fertil Womens Med* **50**(4):187-92.
- Fadini R, Dal Canto M, Mignini Renzini M, Milani R, Fruscio R, Cantù MG, Brambillasca F, Coticchio G (2012). Embryo transfer following *in vitro* maturation and cryopreservation of oocytes recovered from antral follicles during conservative surgery for ovarian cancer. *J Assist Reprod Genet* **29**(8):779-81.
- Fishel S, Gordon A, Lynch C, Dowell K, Ndukwe G, Kelada E, Thornton S, Jenner L, Cater E, Brown A, Garcia-Bernardo J (2010). Live birth after polar body array comparative genomic hybridization prediction of embryo ploidy – the future of IVF? *Fertil Steril* **93**(3):1006.e7-1006.e10.
- Fishel S, Green S, Bishop M, Thornton S, Hunter A, Fleming S, al-Hassan S (1995). Pregnancy after intracytoplasmic injection of spermatid. *Lancet* **345**(8965):1641-2.
- Flaherty SP, Payne D, Matthews CD (1998). Fertilization failures and abnormal fertilization after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* **13**(S1):155-64.

- Fleetwood AJ, Lawrence T, Hamilton JA, Cook AD (2007). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (CSF) and macrophage CSF-dependent macrophage phenotypes display differences in cytokine profiles and transcription factor activities: implications for CSF blockade in inflammation. *J Immunol* **178**(8):5245-52.
- Fleming R, Coutts JR (1982). LHRH analogues can be luteotrophic. *Clin Endocrinol (Oxf)* **17**(6):593-9.
- Forrler A, Dellenbach P, Nisand I, Moreau L, Cranz C, Clavert A, Rumpler Y (1986). Direct intraperitoneal insemination in unexplained and cervical infertility. *Lancet* **1**(8486):916-7.
- Franasiak JM, Forman EJ, Hong KH, Werner MD, Upham KM, Treff NR, Scott RT Jr (2014). The nature of aneuploidy with increasing age of the female partner: a review of 15,169 consecutive trophectoderm biopsies evaluated with comprehensive chromosomal screening. *Fertil Steril* **101**(3):656-63.
- Fukui Y, Lee ES, Araki N (1996). Effect of medium renewal during culture in two different culture systems on development to blastocysts from *in vitro* produced early bovine embryos. *J Anim Sci* **74**(11):2752-8.
- Gardner DK, Lane M (1998). Culture of viable human blastocysts in defined sequential serum-free media. *Hum Reprod Suppl* **3**:148-59.
- Gardner DK, Lane M, Spitzer A, Batt PA (1994). Enhanced rates of cleavage and development for sheep zygotes cultured to the blastocyst stage *in vitro* in the absence of serum and somatic cells: amino acids, vitamins and culturing embryos in groups stimulate development. *Biol Reprod* **50**(2):390-400.
- Gardner DK, Schoolcraft WB (1999). *In vitro* culture of human blastocysts. In: *Towards reproductive certainty: fertility and genetics beyond 1999: the plenary proceedings of the 11th World Congress in In Vitro Fertilization & Human Reproductive Genetics* (R Jansen, D Mortimer, K Coote eds.), pp 378-388, Parthenon Publ Group, New York.
- Gardner DK, Surrey E, Minjarez D, Leitz A, Stevens J, Schoolcraft WB (2004). Single blastocyst transfer: a prospective randomized trial. *Fertil Steril* **81**(3):551-5.
- Gearing DP, King JA, Gough NM, Nicola NA (1989). Expression cloning of a receptor for human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *EMBO J* **8**(12):3667-76.
- Germond M, Dessoie S, Senn A, Loumaye E, Howles C, Beltrami V (1992). Successful *in-vitro* fertilisation and embryo transfer after treatment with recombinant human FSH. *Lancet* **339**(8802):1170.
- Devroey P, van Steirteghem A, Mannaerts B, Bennink HC (1992). Successful *in-vitro* fertilisation and embryo transfer after treatment with recombinant human FSH. *Lancet* **339**(8802):1170-1.

- Giacomini G, Tabibzadeh SS, Satyaswaroop PG, Bonsi L, Vitale L, Bagnara GP, Strippoli P, Jasonni VM (1995). Epithelial cells are the major source of biologically active granulocyte macrophage colony-stimulating factor in human endometrium. *Hum Reprod* **10**(12):3259-63.
- Gleicher N, Friberg J, Fullan N, Giglia RV, Mayden K, Kesky T, Siegel I (1983). Egg retrieval for *in vitro* fertilisation by sonographically controlled vaginal culdocentesis. *Lancet* **2**(8348):508-9.
- Gonen Y, Casper RF, Jacobson W, Blankier J (1989). Endometrial thickness and growth during ovarian stimulation: a possible predictor of implantation in *in vitro* fertilization. *Fertil Steril* **52**(3):446-50.
- Gordon JW, Scangos GA, Plotkin DJ, Barbosa JA, Ruddle FH (1980). Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **77**(12):7380-4.
- Gordts S, Roziars P, Campo R, Noto V (1990). Survival and pregnancy outcome after ultrarapid freezing of human embryos. *Fertil Steril* **53**(3):469-72.
- Gwatkin RB (1963). Effect of viruses on early mammalian development. I. Action of mengo encephalitis virus on mouse ova cultivated *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* **50**(3):576-81.
- Hackelöer BJ, Fleming R, Robinson HP, Adam AH, Coutts JR (1979). Correlation of ultrasonic and endocrinologic assessment of human follicular development. *Am J Obstet Gynecol* **135**(1):122-8.
- Handyside AH, Kontogianni EH, Hardy K, Winston RM (1990). Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature* **344**(6268):768-70.
- Handyside AH, Pattinson JK, Penketh RJ, Delhanty JD, Winston RM, Tuddenham EG (1989). Biopsy of human preimplantation embryos and sexing by DNA amplification. *Lancet* **1**(8634):347-9.
- Hansen G, Hercus TR, McClure BJ, Stomski FC, Dottore M, Powell J, Ramshaw H, Woodcock JM, Xu Y, Guthridge M, McKinstry WJ, Lopez AF, Parker MW (2008). The structure of the GM-CSF receptor complex reveals a distinct mode of cytokine receptor activation. *Cell* **134**(3):496-507.
- Hard AD (1909). Artificial impregnation. *Med World* **27**:163-4.
- Hardy K, Winston RM, Handyside AH (1993). Binucleate blastomeres in preimplantation human embryos *in vitro*: failure of cytokinesis during early cleavage. *J Reprod Fertil* **98**(2):549-58.
- Hardy K, Wright CS, Franks S, Winston RM (2000). *In vitro* maturation of oocytes. *Br Med Bull* **56**(3):588-602.
- Hargreaves CA, Rogers S, Hills F, Rahman F, Howell RJ, Homa ST (1998). Effects of co-trimoxazole, erythromycin, amoxycillin, tetracycline and chloroquine on sperm function *in vitro*. *Hum Reprod* **13**(7):1878-86.



- Harrison RH, Kuo HC, Scriven PN, Handyside AH, Ogilvie CM (2000). Lack of cell cycle checkpoints in human cleavage stage embryos revealed by a clonal pattern of chromosomal mosaicism analysed by sequential multicolour FISH. *Zygote* **8**(3):217-24.
- Heape W (1890). Preliminary note on the transplantation and growth of mammalian ova within a uterine foster-mother. *Proc R Soc Lond* **48**:457-8.
- Heijnen EM, Eijkemans MJ, De Klerk C, Polinder S, Beckers NG, Klinkert ER, Broekmans FJ, Passchier J, Te Velde ER, Macklon NS, Fauser BC (2007). A mild treatment strategy for *in-vitro* fertilisation: a randomised non-inferiority trial. *Lancet* **369**(9563):743-9.
- Heilbrunn LV (1928). *The Colloid Chemistry of Protoplasm*, Verlag von Gebrüder Borntraeger, Berlin.
- Heindryckx B, De Gheselle S, Gerris J, Dhont M, De Sutter P (2008). Efficiency of assisted oocyte activation as a solution for failed intracytoplasmic sperm injection. *Reprod Biomed Online* **17**(5):662-8.
- Heindryckx B, Van der Elst J, De Sutter P, Dhont M (2005). Treatment option for sperm- or oocyte-related fertilization failure: assisted oocyte activation following diagnostic heterologous ICSI. *Hum Reprod* **20**(8):2237-41.
- Henkel R (2012). Sperm preparation: state-of-the-art - physiological aspects and application of advanced sperm preparation methods. *Asian J Androl* **14**(2):260-9.
- Henkel RR, Schill WB (2003). Sperm preparation for ART. *Reprod Biol Endocrinol* **1**:108.
- Hercus TR, Broughton SE, Ekert PG, Ramshaw HS, Perugini M, Grimbaldeston M, Woodcock JM, Thomas D, Pitson S, Hughes T, D'Andrea RJ, Parker MW, Lopez AF (2012). The GM-CSF receptor family: mechanism of activation and implications for disease. *Growth Factors* **30**(2):63-75.
- Hercus TR, Thomas D, Guthridge MA, Ekert PG, King-Scott J, Parker MW, Lopez AF (2009). The granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor: linking its structure to cell signaling and its role in disease. *Blood* **114**(7):1289-98.
- Hewitt J, Cohen J, Krishnaswamy V, Fehilly CB, Steptoe PC, Walters DE (1985). Treatment of idiopathic infertility, cervical mucus hostility, and male infertility: artificial insemination with husband's semen or *in vitro* fertilization? *Fertil Steril* **44**(3):350-5.
- Houston DW (2013). Regulation of cell polarity and RNA localization in vertebrate oocytes. *Int Rev Cell Mol Biol* **306**:127-85.
- Hurley VA, Osborn JC, Leoni MA, Leeton J (1991). Ultrasound-guided embryo transfer: a controlled trial *Fertil Steril* **55**(3):559-62.

- Itskovitz-Eldor J, Kol S, Mannaerts B, Coelingh Bennink H (1998). First established pregnancy after controlled ovarian hyperstimulation with recombinant follicle stimulating hormone and the gonadotrophin-releasing hormone antagonist ganirelix (Org 37462). *Hum Reprod* **13**(2):294-5.
- Jansen RP, Anderson JC (1987). Catheterisation of the fallopian tubes from the vagina. *Lancet* **2**(8554):309-10.
- Jasper MJ, Brannstrom M, Olofsson JI, Petrucco OM, Mason H, Robertson SA, Norman RJ (1996). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: presence in human follicular fluid, protein secretion and mRNA expression by ovarian cells. *Mol Hum Reprod* **2**(8):555-62.
- Juyena NS, Stelletta C (2012). Seminal plasma: an essential attribute to spermatozoa. *J Androl* **33**(4):536-551.
- Kamel RM (2013). Assisted Reproductive Technology after the Birth of Louise Brown. *J Reprod Infertil* **14**(3):96-109.
- Kane MT (1987). Culture media and culture of early embryos. *Theriogenology* **27**(1):49-57.
- Kang HJ, Lee SH, Park YS, Lim CK, Ko DS, Yang KM, Park DW (2015). Artificial oocyte activation in intracytoplasmic sperm injection cycles using testicular sperm in human *in vitro* fertilization. *Clin Exp Reprod Med* **42**(2):45-50.
- Karaca N, Akpak YK, Oral S, Durmus T, Yilmaz R (2015). A successful healthy childbirth in a case of total globozoospermia with oocyte activation by calcium ionophore. *J Reprod Infertil* **16**(2):116-20.
- Kashir J, Heindryckx B, Jones C, De Sutter P, Parrington J, Coward K (2010). Oocyte activation, phospholipase C zeta and human infertility. *Hum Reprod Update* **16**(6):690-703.
- Kashir J, Nomikos M, Swann K, Lai FA (2015). PLC $\zeta$  or PAWP: revisiting the putative mammalian sperm factor that triggers egg activation and embryogenesis. *Mol Hum Reprod* **21**(5):383-8.
- Kattera S, Chen C (2003). Normal birth after microsurgical enucleation of tripronuclear human zygotes: case report. *Hum Reprod* **18**(6):1319-22.
- Katz-Jaffe MG, Trounson AO, Cram DS (2004). Mitotic errors in chromosome 21 of human preimplantation embryos are associated with non-viability. *Mol Hum Reprod* **10**(2):143-7.
- Katz-Jaffe MG, Trounson AO, Cram DS (2005). Chromosome 21 mosaic human preimplantation embryos predominantly arise from diploid conceptions. *Fertil Steril* **84**(3):634-43.

- Kerin JF, Kirby C, Peek J, Jeffrey R, Warnes GM, Matthews CD, Cox LW (1984). Improved conception rate after intrauterine insemination of washed spermatozoa from men with poor quality semen. *Lancet* **1**(8376):533-5.
- Kiessling AA (2005). Eggs alone. *Nature* **434**(7030):145.
- Kim JW, Yang SH, Yoon SH, Kim SD, Jung JH, Lim JH (2015). Successful pregnancy and delivery after ICSI with artificial oocyte activation by calcium ionophore in in-vitro matured oocytes: a case report. *Reprod Biomed Online* **30**(4):373-7.
- Klein R, Palmer R (1961). Technique de prélèvement des ovules humains par ponction folliculaire sous cœlioscope. *C R Séances Soc Biol Fil* **155**:1919-21.
- Kuleshova L, Gianaroli L, Magli C, Ferraretti A, Trounson A (1999). Birth following vitrification of a small number of human oocytes: case report. *Hum Reprod* **14**(12):3077-9.
- Kyono K, Takisawa T, Nakajo Y, Doshida M, Toya M (2012). Birth and follow-up of babies born following ICSI with oocyte activation using strontium chloride or calcium ionophore A23187. *J Mamm Ova Res* **29**(1):35-40 (DOI:10.1274/jmor.29.35).
- Lanzendorf S, Maloney M, Ackerman S, Acosta A, Hodgen G (1988a). Fertilizing potential of acrosome-defective sperm following microsurgical injection into eggs. *Gamete Res* **19**(4):329-37.
- Lanzendorf SE, Maloney MK, Veeck LL, Slusser J, Hodgen GD, Rosenwaks Z (1988b). A preclinical evaluation of pronuclear formation by microinjection of human spermatozoa into human oocytes. *Fertil Steril* **49**(5):835-42.
- Lawrence Y, Whitaker M, Swann K (1997). Sperm-egg fusion is the prelude to the initial Ca<sup>2+</sup> increase at fertilization in the mouse. *Development* **124**(1):233-41.
- Laws-King A, Trounson A, Sathananthan H, Kola I (1987). Fertilization of human oocytes by microinjection of a single spermatozoon under the zona pellucida. *Fertil Steril* **48**(4):637-42.
- Lemmen JG, Agerholm I, Ziebe S (2008) Kinetic markers of human embryo quality using time-lapse recordings of IVF/ICSI-fertilized oocytes. *Reprod Biomed Online* **17**(3):385-391.
- Lenhoff, HM (1991). Ethel Browne, Hans Spemann, and the discovery of the organizer phenomenon. *Biol Bull* **181**(1):72-80 (DOI:10.2307/1542490).
- Lenz S, Lauritsen JG (1982). Ultrasonically guided percutaneous aspiration of human follicles under local anaesthesia: new method of collecting oocytes for *in vitro* fertilization. *Fertil Steril* **38**(6):673-7.

- Lenz S, Lauritsen JG, Kjellow M (1981). Collection of human oocytes for *in vitro* fertilisation by ultrasonically guided follicular puncture. *Lancet* **1**(8230):1163-4.
- Lewis WH, Gregory PW (1929). Cinematographs of living developing rabbit-eggs. *Science* **69**(1782):226-9.
- Lillie FR (1919). *Problems of Fertilization*. University of Chicago Press, Chicago, IL, USA.
- Liu HC, Cohen J, Alikani M, Noyes N, Rosenwaks Z (1993). Assisted hatching facilitates earlier implantation. *Fertil Steril* **60**(5):871-5.
- Liu HC, He ZY, Mele CA, Veeck LL, Davis O, Rosenwaks Z (1999). Human endometrial stromal cells improve embryo quality by enhancing the expression of insulin-like growth factors and their receptors in cocultured human preimplantation embryos. *Fertil Steril* **71**(2):361-7.
- Liu J, Nagy Z, Joris H, Tournaye H, Smits J, Camus M, Devroey P, Van Steirteghem A (1995). Analysis of 76 total fertilization failure cycles out of 2732 intracytoplasmic sperm injection cycles. *Hum Reprod* **10**(10):2630-6.
- Liu Y, Han XJ, Liu MH, Wang SY, Jia CW, Yu L, Ren G, Wang L, Li W (2014). Three-day-old human unfertilized oocytes after *in vitro* fertilization/intracytoplasmic sperm injection can be activated by calcium ionophore A23187 or strontium chloride and develop to blastocysts. *Cell Reprogram* **16**(4):276-80.
- Lopata A, Johnston IW, Hoult IJ, Speirs AI (1980). Pregnancy following intrauterine implantation of an embryo obtained by *in vitro* fertilization of a preovulatory egg. *Fertil Steril* **33**(2):117-20.
- Lopata A (1980). Successes and failures in human *in vitro* fertilization. *Nature* **288**(5792):642-3.
- Lu Q, Chen X, Li Y, Zhang XH, Liang R, Zhao YP, Wei LH, Shen H (2012). A live birth of activated one-day-old unfertilized oocyte for a patient who experienced repeatedly near-total fertilization failure after intracytoplasmic sperm injection. *Chin Med J (Engl)* **125**(3):546-8.
- Lu Q, Zhao Y, Gao X, Li Y, Ma S, Mullen S, Critser JK, Chen ZJ (2006). Combination of calcium ionophore A23187 with puromycin salvages human unfertilized oocytes after ICSI. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* **126**(1):72-6.
- Lutjen P, Trounson A, Leeton J, Findlay J, Wood C, Renou P (1984). The establishment and maintenance of pregnancy using *in vitro* fertilization and embryo donation in a patient with primary ovarian failure. *Nature* **307**(5947):174-5.
- Lutz EE (2012). Preimplantation genetic diagnosis (PGD) according to medical ethics and medical law. *J Turk Ger Gynecol Assoc* **13**(1):50-5.

- Mahadevan M, Baker G (1984). Assessment and preparation of semen for *in vitro* fertilization. In: *Clinical In Vitro Fertilization* (Wood C, Trounson A, eds.), pp 83-97, Springer-Verlag, Berlin.
- Mahadevan MM, Trounson AO, Leeton JF (1983). The relationship of tubal blockage, infertility of unknown cause, suspected male infertility, and endometriosis to success of *in vitro* fertilization and embryo transfer. *Fertil Steril* **40**(6):755-62.
- Malter HE, Cohen J (1989). Partial zona dissection of the human oocyte: a nontraumatic method using micromanipulation to assist zona pellucida penetration. *Fertil Steril* **51**(1):139-48.
- Mansour R, Fahmy I, Tawab NA, Kamal A, El-Demery Y, Aboulghar M, Serour G (2009). Electrical activation of oocytes after intracytoplasmic sperm injection: a controlled randomized study. *Fertil Steril* **91**(1):133-9.
- Mantikou E, Wong KM, Repping S, Mastenbroek S (2012). Molecular origin of mitotic aneuploidies in preimplantation embryos. *Biochim Biophys Acta* **1822**(12):1921-30.
- Marangos P, FitzHarris G, Carroll J (2003). Ca<sup>2+</sup> oscillations at fertilization in mammals are regulated by the formation of pronuclei. *Development* **130**(7):1461-72.
- Martinez-Moczygemba M, Huston DP (2003). Biology of common beta receptor-signaling cytokines:IL-3, IL-5, and GM-CSF. *J Allergy Clin Immunol* **112**(4):653-65.
- Mascarenhas MN, Flaxman SR, Boerma T, Vanderpoel S, Stevens GA (2012). National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys. *PloS Med* **9**(12):e1001356 (DOI:10.1371/journal.pmed.1001356).
- McArthur SJ, Leigh D, Marshall JT, de Boer KA, Jansen RP (2005). Pregnancies and live births after trophoctoderm biopsy and preimplantation genetic testing of human blastocysts. *Fertil Steril* **84**(6):1628-36.
- McArthur SJ, Leigh D, Marshall JT, Gee AJ, De Boer KA, Jansen RP (2008). Blastocyst trophoctoderm biopsy and preimplantation genetic diagnosis for familial monogenic disorders and chromosomal translocations. *Prenat Diagn* **28**(5):434-42.
- McClure BJ, Hercus TR, Cambareri BA, Woodcock JM, Bagley CJ, Howlett GJ, Lopez AF (2003). Molecular assembly of the ternary granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor complex. *Blood* **101**(4):1308-15.
- Ménézo Y (1976). Milieu synthétique pour la survie et la maturation des gamètes et pour la culture de l'œuf fécondé. *C R Acad Sci [D] (Paris)* **282**:1967-70.

- Ménézo Y, Hazout A, Dumont M, Herbaut N, Nicollet B (1992). Coculture of embryos on Vero cells and transfer of blastocysts in humans. *Hum Reprod* **7**(S1):101-6.
- Menkveld R, Stander FS, Kotze TJ, Kruger TF, van Zyl JA (1990). The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to stricter criteria. *Hum Reprod* **5**(5):586-92.
- Meseguer M, Herrero J, Tejera A, Hilligsøe KM, Ramsing NB, Remohí J (2011). The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. *Hum Reprod* **26**(10):2658-71.
- Metcalf D (2008). Hematopoietic cytokines. *Blood* **111**(2):485-91.
- Mignini Renzini M, Dal Canto M, Coticchio G, Comi R, Brigante C, Caliarì I, Brambillasca F, Merola M, Lain M, Turchi D (2013). Clinical efficiency and perinatal outcome of ART cycles following embryo culture in the presence of GM-CSF in patients with miscarriage or early pregnancy loss history. *Hum Reprod* **28**(S1):i160-i202.
- Miller N, Biron-Shental T, Sukenik-Halevy R, Klement AH, Sharony R, Berkovitz A (2016). Oocyte activation by calcium ionophore and congenital birth defects: a retrospective cohort study. *Fertil Steril* **106**(3):590-6.
- Montag M, Köster M, van der Ven K, Bohlen U, van der Ven H (2012). The benefit of artificial oocyte activation is dependent on the fertilization rate in a previous treatment cycle. *Reprod Biomed Online* **24**(5):521-6.
- Moomjy M, Sills ES, Rosenwaks Z, Palermo GD (1998). Implications of complete fertilization failure after intracytoplasmic sperm injection for subsequent fertilization and reproductive outcome. *Hum Reprod* **13**(8):2212-6.
- Moretti E, Capitani S, Figura N, Pammolli A, Federico MG, Giannerini V, Collodel G (2009). The presence of bacteria species in semen and sperm quality. *J Assist Reprod Genet* **26**(1):47-56.
- Munné S, Dailey T, Sultan KM, Grifo J, Cohen J (1995). The use of first polar bodies for preimplantation diagnosis of aneuploidy. *Hum Reprod* **10**(4):1014-20.
- Nasr-Esfahani MH, Deemeh MR, Tavalae M (2010). Artificial oocyte activation and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* **94**(2):520-6.
- Nasr-Esfahani MH, Razavi S, Javdan Z, Tavalae M (2008). Artificial oocyte activation in severe teratozoospermia undergoing intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* **90**(6):2231-7.
- Ng FL, Liu DY, Baker HW (1992). Comparison of Percoll, mini-Percoll and swim-up methods for sperm preparation from abnormal semen samples. *Hum Reprod* **7**(2):261-6.

- Ng SC, Bongso A, Ratnam SS, Sathananthan H, Chan CL, Wong PC, Hagglund L, Anandakumar C, Wong YC, Goh VH (1988). Pregnancy after transfer of sperm under zona. *Lancet* **2**(8614):790.
- Nikiforaki D, Vanden Meerschaut F, de Roo C, Lu Y, Ferrer-Buitrago M, de Sutter P, Heindryckx B (2016). Effect of two assisted oocyte activation protocols used to overcome fertilization failure on the activation potential and calcium releasing pattern. *Fertil Steril* **105**(3):798-806.
- Nomikos M (2015). Novel signalling mechanism and clinical applications of sperm-specific PLCζ. *Biochem Soc Trans* **43**(3):371-6.
- Nomikos M, Yu Y, Elgmati K, Theodoridou M, Campbell K, Vassilakopoulou V, Zikos C, Livaniou E, Amso N, Nounesis G, Swann K, Lai FA (2013). Phospholipase C ζ rescues failed oocyte activation in a prototype of male factor infertility. *Fertil Steril* **99**(1):76-85.
- Oktaç K, Büyük E, Rodriguez-Wallberg KA, Sahin G (2010) *In vitro* maturation improves oocyte or embryo cryopreservation outcome in breast cancer patients undergoing ovarian stimulation for fertility preservation. *Reprod Biomed Online* **20**(5):634-8.
- Ombelet W, Van Robays J (2015). Artificial insemination history: hurdles and milestones. *Facts Views Vis Obgyn* **7**(2):137-43.
- Onetto-Pothier N, Aumont N, Haman A, Bigras C, Wong GG, Clark SC, De Lean A, Hoang T (1990). Characterization of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor on the blast cells of acute myeloblastic leukemia. *Blood* **75**(1):59-66.
- Pacchiarotti A, Selman H, Valeri C, Napoletano S, Sbracia M, Antonini G, Biagiotti G, Pacchiarotti A (2016). Ovarian stimulation protocol in IVF: an up-to-date review of the literature. *Curr Pharm Biotechnol* **17**(4):303-15.
- Palermo G, Joris H, Derde MP, Camus M, Devroey P, Van Steirteghem A (1993). Sperm characteristics and outcome of human assisted fertilization by subzonal insemination and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* **59**(4):826-35.
- Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC (1992). Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* **340**(8810):17-8.
- Palermo GD, Schlegel PN, Colombero LT, Zaninovic N, Moy F, Rosenwaks Z (1996). Aggressive sperm immobilization prior to intracytoplasmic sperm injection with immature spermatozoa improves fertilization and pregnancy rates. *Hum Reprod* **11**(5):1023-9.
- Patrizio P, Sakkas D (2009). From oocyte to baby: a clinical evaluation of the biological efficiency of *in vitro* fertilization. *Fertil Steril* **91**(4):1061-6.

- Pfeiffer DR, Reed PW, Lardy HA (1974). Ultraviolet and fluorescent spectral properties of the divalent cation ionophore A23187 and its metal ion complexes. *Biochemistry* **13**(19):4007-14.
- Pincus G, Enzmann EV (1935). The comparative behavior of mammalian eggs *in vivo* and *in vitro*: i. The activation of ovarian eggs. *J Exp Med* **62**(5):665-75.
- Porcu E, Dal Prato L, Seracchioli R, Petracchi S, Fabbri R, Flamigni C (1997). Births after transcervical gamete intrafallopian transfer with a falloscopic delivery system. *Fertil Steril* **67**(6):1175-7.
- Porcu E, Fabbri R, Damiano G, Fratto R, Giunchi S, Venturoli S (2004). Oocyte cryopreservation in oncological patients. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* **113** Suppl 1:S14-6.
- Porter RN, Smith W, Craft IL, Abdulwahid NA, Jacobs HS (1984). Induction of ovulation for *in-vitro* fertilisation using busarelin and gonadotropins. *Lancet* **2**(8414):1284-5.
- Pressman BC (1976). Biological applications of ionophores. *Annu Rev Biochem* **45**:501-30.
- Quinn P, Kerin JF, Warnes GM (1985). Improved pregnancy rate in human *in vitro* fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid. *Fertil Steril* **44**(4):493-8.
- Rawe VY, Kopelman S, Nodar FN, Olmedo SB, Chillik CF (2002). Pronuclear abnormalities and cytoskeletal organization during assisted fertilization in a patient with multifollicular ovarian response. *J Assist Reprod Genet* **19**(3):152-7.
- Reed PW, Lardy HA (1972). A23187: a divalent cation ionophore. *J Biol Chem* **247**(21):6970-7.
- Rhoton-Vlasak A, Lu PY, Barud KM, Dewald GW, Hammitt DG (1996). Efficacy of calcium ionophore A23187 oocyte activation for generating parthenotes for human embryo research. *J Assist Reprod Genet* **13**(10):793-6.
- Rienzi L, Vajta G, Ubaldi F (2011). Predictive value of oocyte morphology in human IVF: a systematic review of the literature. *Hum Reprod Update* **17**(1):34-45.
- Rink K, Delacrétaz G, Salathé RP, Senn A, Nocera D, Germond M, De Grandi P, Fakan S (1996). Non-contact microdrilling of mouse zona pellucida with an objective-delivered 1.48-microns diode laser. *Lasers Surg Med* **18**(1):52-62.
- Robertson SA (2007). GM-CSF regulation of embryo development and pregnancy. *Cytokine Growth Factor Rev* **18**(3-4):287-98.
- Rock J, Menkin MF (1944). *In vitro* fertilization and cleavage in human ovarian eggs. *Science* **100**(2588):105-7.



- Rogers NT, Hobson E, Pickering S, Lai FA, Braude P, Swann K (2004). Phospholipase C zeta causes Ca<sup>2+</sup> oscillations and parthenogenetic activation of human oocytes. *Reproduction* **128**(6):697-702 (*erratum: Reproduction* **129**(1):128).
- Rosenwaks Z, Veeck LL, Liu HC (1986). Pregnancy following transfer of *in vitro* fertilized donated oocytes. *Fertil Steril* **45**(3):417-20.
- Ruangvutilert P, Delhanty JD, Serhal P, Simopoulou M, Rodeck CH, Harper JC (2000). FISH analysis on day 5 post-insemination of human arrested and blastocyst stage embryos. *Prenat Diagn* **20**(7):552-60.
- Rubio I, Kuhlmann R, Agerholm I, Kirk J, Herrero J, Escribá MJ, Bellver J, Meseguer M (2012). Limited implantation success of direct-cleaved human zygotes: a time-lapse study. *Fertil Steril* **98**(6):1458-63.
- Ruef C, Coleman DL (1990). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: pleiotropic cytokine with potential clinical usefulness. *Rev Infect Dis* **12**(1):41-62.
- Ruiz A, Remohí J, Minguez Y, Guanes PP, Simón C, Pellicer A (1997). The role of *in vitro* fertilization and intracytoplasmic sperm injection in couples with unexplained infertility after failed intrauterine insemination. *Fertil Steril* **68**(1):171-3.
- Rutstein SO, Shah IH (2004). *Infecundity, Infertility, and Childlessness in Developing Countries*. DHS Comparative Reports No. 9. Calverton, Maryland, USA:ORC Macro and the World Health Organization. (<http://www.who.int/reproductivehealth/topics/infertility/DHS-CR9.pdf?ua=1>).
- Rybouchkin AV, Van der Straeten F, Quatacker J, De Sutter P, Dhont M (1997). Fertilization and pregnancy after assisted oocyte activation and intracytoplasmic sperm injection in a case of round-headed sperm associated with deficient oocyte activation capacity. *Fertil Steril* **68**(6):1144-7.
- Santella L, Dale B (2015). Assisted yes, but where do we draw the line? *Reprod Biomed Online* **31**(4):476-8.
- Santella L, Lim D, Moccia F (2004). Calcium and fertilization: the beginning of life. *Trends Biochem Sci* **29**(8):400-8.
- Sathananthan AH (1984). Ultrastructural morphology of fertilization and early cleavage in the human. In: *In vitro Fertilization and Embryo* (Trousnon AO, Wood C eds.), pp 131-158. Churchill Livingstone, London.
- Saunders CM, Larman MG, Parrington J, Cox LJ, Royse J, Blayney LM, Swann K, Lai FA (2002). PLC zeta: a sperm-specific trigger of Ca<sup>2+</sup> oscillations in eggs and embryo development. *Development* **129**(15):3533-44.
- Scarselli G DPG, Chelo E, Noci I, Livi C (1985). The MAR test as immunologic screening of male infertility. *Acta Eur Fertil* **16**(3):187-90.

- Schenk S (1880). Das Säugetierei künstlich befruchtet außerhalb des Muttertieres. *Mitt Embr Inst KK Univ Wien* **1**:10.
- Schoysman R, Vanderzwalmen P, Nijs M, Segal L, Segal-Bertin G, Geerts L, van Roosendaal E, Schoysman D (1993). Pregnancy after fertilisation with human testicular spermatozoa. *Lancet* **342**(8881):1237.
- Schulze W, Thoms F, Knuth UA (1999). Testicular sperm extraction: comprehensive analysis with simultaneously performed histology in 1418 biopsies from 766 subfertile men. *Hum Reprod* **14**(S1):82-96.
- Scott RT Jr, Upham KM, Forman EJ, Zhao T, Treff NR (2013). Cleavage-stage biopsy significantly impairs human embryonic implantation potential while blastocyst biopsy does not: a randomized and paired clinical trial. *Fertil Steril* **100**(3):624-30.
- Sergerie M, Mieuisset R, Croute F, Daudin M, Bujan L (2007). High risk of temporary alteration of semen parameters after recent acute febrile illness. *Fertil Steril* **88**(4):970.e1-7.
- Sfontouris IA, Lainas GT, Anagnostara K, Kolibianakis EM, Lainas TG (2013). Effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) on pregnancy rates in patients with multiple unsuccessful IVF attempts. *Hum Reprod* **28**(S1):i60-i62.
- Sfontouris IA, Nastri CO, Lima ML, Tahmasbpourmarzouni E, Raine-Fenning N, Martins WP (2015). Artificial oocyte activation to improve reproductive outcomes in women with previous fertilization failure: a systematic review and meta-analysis of RCTs. *Hum Reprod* **30**(8):1831-41.
- Shapiro BS, Richter KS, Daneshmand ST, Quinn P, Behr B (2003). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor enhances human embryo development to the blastocyst stage: a randomized study. *Fertil Steril* **79**(S2):15-16.
- Shin DH, Turek PJ (2013). Sperm retrieval techniques. *Nat Rev Urol* **10**(12):723-30.
- Sifer C, Pont JC, Porcher R, Martin-Pont B, Benzacken B, Wolf JP (2009). A prospective randomized study to compare four different mineral oils used to culture human embryos in IVF/ICSI treatments. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* **147**(1):52-6.
- Silber SJ, Nagy Z, Liu J, Tournaye H, Lissens W, Ferec C, Liebaers I, Devroey P, Van Steirteghem AC (1995). The use of epididymal and testicular spermatozoa for intracytoplasmic sperm injection: the genetic implications for male infertility. *Hum Reprod* **10**(8):2031-43.
- Silber SJ, Balmaceda J, Borrero C, Ord T, Asch R (1988). Pregnancy with sperm aspiration from the proximal head of the epididymis: a new treatment for congenital absence of the vas deferens. *Fertil Steril* **50**(3):525-8.

- Sjöblom C, Roberts CT, Wikland M, Robertson SA (2005). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor alleviates adverse consequences of embryo culture on fetal growth trajectory and placental morphogenesis. *Endocrinology* **146**(5):2142-53.
- Sjöblom C, Wikland M, Robertson SA (1999). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promotes human blastocyst development *in vitro*. *Hum Reprod* **14**(12):3069-76.
- Sjöblom C, Wikland M, Robertson SA (2002). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) acts independently of the beta common subunit of the GM-CSF receptor to prevent inner cell mass apoptosis in human embryos. *Biol Reprod* **67**(6):1817-23.
- Spemann H, Mangold H (1924). Über Induktion von Embryonalanlagen durch Implantation artfremder Organisatoren. *Archiv Für Mikroskopische Anatomie Und Entwicklungsmechanik* **100**:599-638.
- Stephoe PC, Edwards RG (1970). Laparoscopic recovery of preovulatory human oocytes after priming of ovaries with gonadotrophins. *Lancet* **1**(7649):683-9.
- Stephoe PC, Edwards RG (1978). Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet* **2**(8085):366.
- Strickler RC, Christianson C, Crane JP, Curato A, Knight AB, Yang V (1985). Ultrasound guidance for human embryo transfer. *Fertil Steril* **43**(1):54-61.
- Tesarik J, Rienzi L, Ubaldi F, Mendoza C, Greco E (2002). Use of a modified intracytoplasmic sperm injection technique to overcome sperm-borne and oocyte-borne oocyte activation failures. *Fertil Steril* **78**(3):619-24.
- Tesarik J, Sousa M (1995). More than 90% fertilization rates after intracytoplasmic sperm injection and artificial induction of oocyte activation with calcium ionophore. *Fertil Steril* **63**(2):343-9.
- Tesarik J, Sousa M, Testart J (1994). Human oocyte activation after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* **9**(3):511-8 (*erratum*: *Hum Reprod* **9**(5):968).
- Testart J, Frydman R, Feinstein MC, Thibault A, Roger M, Scholler R (1981). Interpretation of plasma LH assay for the collection of mature oocytes from women; definition of an LH surge initiating rise (LH S.I.R.). *Fertil Steril* **36**(1):50-4.
- Tevkin S, Lokshin V, Shishimorova M, Polumiskov V (2014). The frequency of clinical pregnancy and implantation rate after cultivation of embryos in a medium with granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) in patients with preceding failed attempts of ART. *Gynecol Endocrinol* **30**(Suppl 1):9-12.
- Thompson P (2015). HFEA response to ‘A plea for caution and more research in the “experimental” use of ionophores in ICSI’. *Reprod Biomed Online* **31**(6):829-30.

- Tosti E, Ménézio Y (2016). Gamete activation: basic knowledge and clinical applications. *Hum Reprod Update* **22**(4):420-39.
- Trounson A, Leeton J, Besanko M, Wood C, Conti A (1983). Pregnancy established in an infertile patient after transfer of a donated embryo fertilized *in vitro*. *Br Med J (Clin Res Ed)* **286**(6368):835-8.
- Trounson A, Mohr L (1983). Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. *Nature* **305**(5936):707-9.
- Trounson A, Wood C, Kausche A (1994). *In vitro* maturation and the fertilization and developmental competence of oocytes recovered from untreated polycystic ovarian patients. *Fertil Steril* **62**(2):353-62.
- Trounson AO (2001). The derivation and potential use of human embryonic stem cells. *Reprod Fertil Dev* **13**(7-8):523-32.
- Trounson AO, Leeton JF, Wood C, Webb J, Wood J (1981). Pregnancies in humans by fertilization *in vitro* and embryo transfer in the controlled ovulatory cycle. *Science* **212**(4495):681-2.
- Tucker MJ, Wright G, Morton PC, Massey JB (1998). Birth after cryopreservation of immature oocytes with subsequent *in vitro* maturation. *Fertil Steril* **70**(3):578-9.
- Uehara T, Yanagimachi R (1977). Behavior of nuclei of testicular, caput and cauda epididymal spermatozoa injected into hamster eggs. *Biol Reprod* **16**(3):315-21.
- Utian WH, Sheean L, Goldfarb JM, Kiwi R (1985). Successful pregnancy after *in vitro* fertilization and embryo transfer from an infertile woman to a surrogate. *N Engl J Med* **313**(21):1351-2.
- Uzumaki H, Okabe T, Sasaki N, Hagiwara K, Takaku F, Tobita M, Yasukawa K, Ito S, Umezawa Y (1989). Identification and characterization of receptors for granulocyte colony-stimulating factor on human placenta and trophoblastic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**(23):9323-6.
- van Blerkom J, Cohen J, Johnson M (2015). A plea for caution and more research in the ‘experimental’ use of ionophores in ICSI. *Reprod Biomed Online* **30**(4):323-4.
- Van Steirteghem A (2012). Celebrating ICSI’s twentieth anniversary and the birth of more than 2.5 million children – the ‘how, why, when and where’. *Hum Reprod* **27**(1):1-2.
- Vanden Meerschaut F, D’Haeseleer E, Gysels H, Thienpont Y, Dewitte G, Heindryckx B, Oostra A, Roeyers H, Van Lierde K, De Sutter P (2014). Neonatal and neurodevelopmental outcome of children aged 3-10 years born following assisted oocyte activation. *Reprod Biomed Online* **28**(1):54-63.

- Vanden Meerschaut F, Nikiforaki D, De Gheselle S, Dullaerts V, Van den Abbeel E, Gerris J, Heindryckx B, De Sutter P (2012). Assisted oocyte activation is not beneficial for all patients with a suspected oocyte-related activation deficiency. *Hum Reprod* **27**(7):1977-84.
- Vanden Meerschaut F, Nikiforaki D, Heindryckx B, De Sutter P (2014). Assisted oocyte activation following ICSI fertilization failure. *Reprod Biomed Online* **28**(5):560-71.
- Vanderzwalmen P, Lejeune B, Nijs M, Segal-Bertin G, Vandamme B, Schoysman R (1995). Fertilization of an oocyte microinseminated with a spermatid in an *in-vitro* fertilization programme. *Hum Reprod* **10**(3):502-3.
- Vazquez D (1974). Inhibitors of protein synthesis. *FEBS Lett* **23**;40(0):suppl:S63-84.
- Veck LL, Wortham JW Jr, Witmyer J, Sandow BA, Acosta AA, Garcia JE, Jones GS, Jones HW Jr (1983). Maturation and fertilization of morphologically immature human oocytes in a program of *in vitro* fertilization. *Fertil Steril* **39**(5):594-602.
- Veck LL, Zaninovic N (2003). *An atlas of human blastocysts*. Parthenon Publishing Group, New York.
- Verlinsky Y, Ginsberg N, Lifchez A, Valle J, Moise J, Strom CM (1990). Analysis of the first polar body: preconception genetic diagnosis. *Hum Reprod* **5**(7):826-9.
- Verlinsky Y, Rechitsky S, Schoolcraft W, Strom C, Kuliev A (2001). Preimplantation diagnosis for Fanconi anemia combined with HLA matching. *JAMA* **285**(24):3130-3.
- Walker F, Burgess AW (1985). Specific binding of radioiodinated granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to hemopoietic cells. *EMBO J.* **4**(4):933-9.
- Watson JD, Crick FHC (1953). Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* **171**(4356):737-8.
- Wells D, Alfarawati S, Fragouli E (2011). A skewed sex ratio following blastocyst culture is a consequence of embryo grading systems that prioritise male embryos for transfer. *BJOG* **118**(3):381.
- Wells D, Escudero T, Levy B, Hirschhorn K, Delhanty JD, Munné S (2002). First clinical application of comparative genomic hybridization and polar body testing for preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *Fertil Steril* **78**(3):543-9.
- Whitaker M (2006). Calcium at fertilization and in early development. *Physiol Rev* **86**(1):25-88.
- Wiemer KE, Hoffman DI, Maxson WS, Eager S, Muhlberger B, Fiore I, Cuervo M (1993). Embryonic morphology and rate of implantation of human embryos following co-culture on bovine oviductal epithelial cells. *Hum Reprod* **8**(1):97-101.

- Wikland M, Enk L, Hamberger L (1985). Transvesical and transvaginal approaches for the aspiration of follicles by use of ultrasound. *Ann N Y Acad Sci* **442**:182-94.
- Willadsen SM, Godke RA (1984). A simple procedure for the production of identical sheep twins. *Vet Rec* **114**(10):240-3.
- Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* **385**(6619):810-3 (*erratum*: *Nature* **386**(6621):200).
- Winston R (2013). Sir Robert Edwards (1925-2013): Creator of the Greatest Happiness. *PLoS Biol* **11**(5): e1001582. doi:10.1371/journal.pbio.1001582
- Wood C, Leeton J, Talbot M, Trounson A (1981). Technique for collecting mature human oocytes for *in vitro* fertilization. *Br J Obstet Gynaecol* **88**(7):756-60.
- World Health Organization (1948). Preamble to the Constitution of WHO as adopted by the International Health Conference, New York, 19 June - 22 July 1946; signed on 22 July 1946 by the representatives of 61 States (Official Records of WHO, no. 2, p. 100) and entered into force on 7 April 1948.
- World Health Organization (2010). *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen* (5<sup>th</sup> edn.), World Health Organization, Geneva.
- Yanagida K, Katayose H, Yazawa H, Kimura Y, Sato A, Yanagimachi H, Yanagimachi R (1999). Successful fertilization and pregnancy following ICSI and electrical oocyte activation. *Hum Reprod* **14**(5):1307-11.
- Yanagimachi R (2005). Intracytoplasmic injection of spermatozoa and spermatogenic cells: its biology and applications in humans and animals. *Reprod Biomed Online* **10**(2):247-88.
- Yeste M, Jones C, Amdani SN, Patel S, Coward K (2016). Oocyte activation deficiency: a role for an oocyte contribution? *Hum Reprod Update* **22**(1):23-47.
- Yovich JL, Blackledge DG, Richardson PA, Matson PL, Turner SR, Draper R (1987). Pregnancies following pronuclear stage tubal transfer. *Fertil Steril* **48**(5):851-7.
- Yovich JL, Stanger JD, Yovich JM, Turner SR, Newman BD (1984). Treatment of male infertility by *in-vitro* fertilisation. *Lancet* **2**(8395):169-70.
- Zegers-Hochschild F, Adamson GD, de Mouzon J, Ishihara O, Mansour R, Nygren K, Sullivan E, van der Poel S; International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology; World Health Organization (2009). The International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) Revised Glossary on ART Terminology, 2009. *Hum Reprod* **24**(11):2683-7 – *Fertil Steril* **92**(5):1520-4.

Zhao Y, Chegini N (1999). The expression of granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) and receptors in human endometrium. *Am J Reprod Immunol* **42**(5):303-11.

Zhao Y, Rong H, Chegini N (1995). Expression and selective cellular localization of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and GM-CSF alpha and beta receptor messenger ribonucleic acid and protein in human ovarian tissue. *Biol Reprod* **53**(4):923-30.

Ziebe S, Loft A, Povlsen BB, Erb K, Agerholm I, Aasted M, Gabrielsen A, Hnida C, Zobel DP, Munding B, Bendz SH, Robertson SA (2013). A randomized clinical trial to evaluate the effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) in embryo culture medium for *in vitro* fertilization. *Fertil Steril* **99**(6):1600-9.