

ΗΜΕΡΙΔΑ

**ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗ ΗΜΕΡΙΔΑ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
«30 ΧΡΟΝΙΑ ΕΞΩΣΩΜΑΤΙΚΗ ΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ (IVF) -
ΤΙ ΘΑ ΔΟΥΜΕ ΣΤΟ ΜΕΛΛΟΝ;»**

Η Ένωση Μαιευτήρων-Γυναικολόγων Ελλάδος πραγματοποίησε, το Σάββατο, 24 Μαΐου 2008, στο ξενοδοχείο King George Palace, στην Πλατεία Συντάγματος, στην Αθήνα, Επιστημονική Ημερίδα Αναπαραγωγής με τίτλο «30 χρόνια εξωσωματική γονιμοποίηση (IVF). Τι θα δούμε στο μέλλον;». Πρόεδρος της Οργανωτικής επιτροπής ήταν ο Δρ Λουκάς Κλέντζερης, M.D. FRCOG, Μαιευτήρας-Χειρουργός-Γυναικολόγος, Διδάκτωρ Πανεπιστημίου Sheffield Αγγλίας, Ακόλουθος Βρετανικού Βασιλικού Κολεγίου Μαιευτήρων-Γυναικολόγων, Διευθυντής Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου CARDIFF-UK, Μονάδα Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής Μαιευτικής και Γυναικολογικής κλινικής «ΜΗΤΕΡΑ».

Όπως τόνισε και ο Πρόεδρος, Δρ Λουκάς Κλέντζερης, από το 1978 μέχρι σήμερα, σε όλον τον κόσμο, έχουν γεννηθεί πάνω από ένα εκατομμύριο παιδιά με τη βοήθεια των επαναστατικών μεθόδων θεραπείας υπογονιμότητας, όπως η κλασική εξωσωματική γονιμοποίηση, η μικρογονιμοποίηση, τα δανεικά ωάρια και η παρένθετη μήτρα.

Αυτόν το χρόνο συμπληρώνονται 30 χρόνια από τη γέννηση του πρώτου παιδιού, η σύλληψη του οποίου πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια της εξωσωματικής γονιμοποίησης. Το επίτευγμα αυτό ήταν το αποκορύφωμα μιας μακροχρόνιας και ευφυούς συνεργασίας μεταξύ εξειδικευμένων κλινικών ιατρών και βασικών επιστημόνων, εξειδικευμένων στην ανθρώπινη αναπαραγωγή. Αποτελεί δε, σταθμό στην ιστορία, όχι μόνο της ιατρικής, αλλά και ολόκληρης της ανθρωπότητας.

Με το πέρασμα 30 χρόνων και μετά από τόσο σημαντικές ανακαλύψεις, θα έλεγε κανείς ότι η εξωσωματική γονιμοποίηση έχει «ημερομηνία λήξης». Αντιθέτως, τα πιο ενδιαφέροντα βήματα για την εισαγωγή νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων που αφορούν στην υπογονιμότητα και στη βελτίωση των αποτελεσμάτων των υπαρχόντων θεραπειών μόλις ξεκινούν να γίνονται. Τα επιστημονικά δεδομένα και οι γνώσεις που έχουμε αποκτήσει θα μας βοηθήσουν να σχεδιάσουμε νέες θεραπείες για τα υπογόνιμα ζευγάρια.

Η Ημερίδα Αναπαραγωγής, που πραγματοποιήθηκε στις 24 Μαΐου στο ξενοδοχείο King George Palace στην Αθήνα και στην οποία συμμετείχαν διακεκριμένοι Έλληνες και ξένοι ομιλητές, είχε σα στόχο να παρουσιάσει τα πιο σημαντικά θέματα που θα μας απασχολήσουν τα επόμενα χρόνια, στο χώρο της Εξωσωματικής Γονιμοποίησης και της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής σε επίπεδο κλινικό, εργαστηριακό και ερευνητικό.

Ο Πρόεδρος του συνεδρίου, Δρ. Λουκάς Κλέντζερης παρουσιάζει τα συμπεράσματα του συνεδρίου, υπό μορφή ερωτήσεων και απαντήσεων.

1. Πώς θα μπορούσαμε να βελτιώσουμε τα ποσοστά επιτυχίας της Εξωσωματικής Γονιμοποίησης (IVF);

Η απάντηση βρίσκεται σε δυο επίπεδα:

- Μεταφορά στη μήτρα της γυναίκας των ποιοτικά καλύτερων εμβρύων.
- Καλύτερη υποδεκτικότητα του ενδομητρίου (βλεννογόνος της μήτρας) για την εμφύτευση των εμβρύων.



Ομιλητές από την Αμερική παρουσίασαν νέες πρωτοποριακές μεθόδους για την επιλογή των πιο «υγιών» εμβρύων ώστε να μεταφερθούν στη μήτρα. Οι μέθοδοι βασίζονται στην ανάλυση του γενετικού “profile” του εμβρύου και στην ανίχνευση πρωτεϊνών και μεταβολικών ουσιών που παράγουν τα έμβρυα, λίγο πριν την εμφύτευσή τους στη μήτρα.

Επιστήμονες από τη χώρα μας αναφέρθηκαν στους παράγοντες του ενδομητρίου που επηρεάζουν την εμφύτευση των εμβρύων. Ένας από τους πιο σημαντικούς παράγοντες φαίνεται να είναι ο Corticotrophin Releasing Factor (CRF), η ύπαρξη του οποίου στο ενδομήτριο ενεργοποιεί μια αλυσίδα μοριακών και βιοχημικών αντιδράσεων, ο τελικός σκοπός των οποίων είναι να καταστήσουν το περιβάλλον της μήτρας πιο «φιλικό», για να υποδεχθεί και να κρατήσει τα έμβρυα, ώστε να έχουμε επιτυχημένη εγκυμοσύνη.

Αν τα αποτελέσματα των αρχικών παρατηρήσεων επιβεβαιωθούν με μεγαλύτερες μελέτες, θα είναι δυνατό να βοηθήσουμε δυο κατηγορίες γυναικών, εκείνες που χάνουν τις εγκυμοσύνες τους τη μία μετά την άλλη (καθ’ ἑξιν αποβολές) και τις γυναίκες που έχουν επανειλημμένη αποτυχία εμφύτευσης των εμβρύων μετά από εξωσωματική γονιμοποίηση.

2. Πώς θα μπορούσαμε να ελαττώσουμε τη συχνότητα των δυο κυριότερων επιπλοκών (Σύνδρομο υπερδιεγέρσεως ωοθηκών και Πολύδημη κύηση) που εμφανίζονται σε γυναίκες, σε έναν κύκλο IVF;

Έλληνες, Άγγλοι και Δανοί επιστήμονες αναφέρθηκαν σε νέους τρόπους παραγωγής ωαρίων, όπως διέγερση των ωοθηκών με φάρμακα, βασιζόμενη στο γενετικό “profile” της ασθενούς. Επίσης, συλλογή ανώριμων ωαρίων από τις ωοθήκες, χωρίς τη χρήση φαρμάκων, ωρίμανση “in vitro” (εκτός του σώματος), γονιμοποίηση των ωαρίων, δημιουργία εμβρύων in vitro και ακολούθως μεταφορά των εμβρύων στη μήτρα.

Η ύπαρξη αξιόπιστων κριτηρίων για την επιλογή των καλύτερων εμβρύων, όπως αναφέρθηκε ανωτέρω, σημαίνει τη μεταφορά ενός ή το πολύ δυο εμβρύων στη μήτρα, αντί για τρία ή τέσσερα. Έτσι, θα εξλειφθεί η εμφάνιση τριδύμων ή τετραδύμων κήσεων, οι οποίες έχουν σοβαρές επιπλοκές για τη μητέρα και τα έμβρυα.

3. Νέες εξελίξεις στον τομέα της κρυοβιολογίας και κρυοσυντήρησης γενετικού υλικού, ωαρίων, εμβρύων και ωοθηκικού ιστού.

Ιταλοί επιστήμονες παρουσίασαν μια καινούρια μέθοδο για την κατάψυξη γενετικού υλικού, ωαρίων, εμβρύων και ωοθηκικού ιστού. Η μέθοδος ονομάζεται “Vitrification” (Υαλοποίηση). Με την τεχνική vitrification είναι δυνατό γυναίκες που θα υποστούν χημειοθεραπεία ή ακτινοθεραπεία για κακοήθεια να κρατήσουν τα ωάρια τους ή τις ωοθήκες τους για μελλοντική χρήση. Επίσης, γυναίκες θα μπορούσαν να καταψύξουν τα ωάρια τους σε ηλικία 25 ετών και να τα χρησιμοποιήσουν για τεκνοποίηση όταν φτάσουν 40 ετών!!!

4. Φάρμακα υπογονιμότητας και καρκίνος.

Τέλος, καθησυχαστική ήταν η απάντηση στην ερώτηση, αν τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται στην εξωσωματική γονιμοποίηση προκαλούν καρκίνο. Το συμπέρασμα ήταν ότι, με εξαίρεση των «οριακών» (borderline) όγκων των ωοθηκών, γυναίκες που λαμβάνουν φάρμακα για IVF δεν έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα να αναπτύξουν κακοήθεια, συγκρινόμενες με γυναίκες που πάσχουν από υπογονιμότητα και δε λαμβάνουν φάρμακα. Τονίστηκε, όμως, η ανάγκη για προσεκτική χορήγηση των φαρμάκων, μακροχρόνια παρακολούθηση των ασθενών και σχεδιασμός νέων μελετών με μεγαλύτερο αριθμό γυναικών.

Την ημερίδα παρακολούθησαν Μαιευτήρες-Γυναικολόγοι, Ενδοκρινολόγοι, Εμβρυολόγοι και Μαίες από όλη την Ελλάδα. Στη συνέχεια ακολουθούν εκτεταμένες περιλήψεις ορισμένων από τις επιστημονικές διαλέξεις που έλαβαν χώρα στο Συνέδριο.

NEW APPROACHES TO ASSESSING EMBRYO QUALITY: THE “OMICS”

Denny Sakkas

IVF is largely governed by two opposing results (Failure and Success). Failure is observed in up to 85% of the embryos we transfer, while success is sometimes paid dearly by the high multiple pregnancy rates caused by in-vitro fertilization (IVF). Both these outcomes cost the individual patient immensely.

To overcome the dangers of multiple births, many countries have already mandated single embryo transfer in IVF. Therefore, the aim is to develop a more efficient strategy to predict which embryo to transfer and improve the probability of successful implantation and pregnancy.

The commonly accepted clinical practice and standard of care for assessing embryo viability in IVF is based on the developing embryo's morphological characteristics. Cleavage rates and morphology have been used since the earliest days of IVF but it still falls short of being a highly accurate method for successfully identifying embryos, capable of sustaining an ongoing pregnancy. It is however the only tool available to embryologists today for the assessment of embryo quality.

As a result, new embryo assessment tools, based on either invasive or non-invasive techniques have been sought-after by IVF clinics in order to overcome this problem. Numerous animal and human studies in the past have shown that the embryo changes its surrounding culture media in a manner which can be used to predict if that embryo will implant. The problem for clinical IVF has always been:

- The ability to measure the change without damaging the embryo.
- The ability to measure the change quickly.
- The ability to measure the change consistently and accurately.

The emerging technologies available to predict these changes center on the use of the OMICS (genomics, transcriptomics, proteomics and metabolomics). One new technique is based on a non-invasive metabolomic assessment of embryo culture media and has the ability to fulfill all 3 of the above criteria. This technique involves non-invasive metabolomic profiling of the embryos surrounding culture media. The technique involves the use of Near Infrared (NIR) spectroscopy to profile biomarkers of oxidative and energy metabolism, giving us more advanced diagnostic capabilities to accurately identify embryos with reproductive potential in IVF (Seli et al. 2007; Scott et al. 2008; Vergouw et al. 2008). Data of the use of this technology in more than 1,000 single and multiple embryo transfer scenarios show that, in all cases, it was able to predict, more accurately, the outcome of the embryo transfer.

In the near future this metabolomic based non-invasive technology will definitely be used in conjunction with current clinical practices (e.g. morphology) to aid the identification of viable embryos and improve patient outcomes.

REFERENCES:

1. Seli E, Sakkas D, Scott R, Kwok SC, Rosendahl SM, Burns DH. Non-invasive metabolomic profiling of embryo culture media using Raman and near-infrared spectroscopy correlates with reproductive potential of embryos in women undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 2007 Nov; 88(5):1350-7.
2. Scott R, Seli E, Miller K, Sakkas D, Scott K, Burns DH. Non-invasive metabolomic profiling of human embryo culture media using Raman spectroscopy predicts embryonic reproductive potential: a prospective blinded pilot study. *Fertil Steril.* 2008 Feb 15.
3. Vergouw CG, Botros LL, Roos P, Lens JW, Schats R, Hompes PG, Burns DH, Lambalk CB. Metabolomic profiling by near-infrared spectroscopy as a tool to assess embryo viability: a novel, non-invasive method for embryo selection. *Hum Reprod.* 2008 Jul; 23(7):1499-504.

D Sakkas PhD, Department of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Sciences,
Yale University School of Medicine, New Haven CT 06511
Molecular Biometrics LLC, 123 York St, New Haven CT 06511

ΜΗ ΕΠΕΜΒΑΤΙΚΗ ΠΡΟΓΕΝΝΗΤΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΙΚΩΝ ΑΝΩΜΑΛΙΩΝ ΤΟΥ ΕΜΒΡΥΟΥ

Β. Βελισσαρίου

Είναι γνωστό εδώ και πολλά έτη ότι κύτταρα του εμβρύου κυκλοφορούν στο αίμα της εγκύου. Παρ' όλα αυτά, οι διάφοροι τύποι εμβρυϊκών κυττάρων στο αίμα της εγκύου χαρακτηρίστηκαν τη δεκαετία του '70.

Πρώτοι οι Bianchi και συν. μελέτησαν, το 1992, τη δυνατότητα προγεννητικής διάγνωσης γενετικών νοσημάτων σε εμπύρηνα εμβρυϊκά ερυθροκύτταρα, κυρίως γιατί είναι μονοπύρηνα, ανιχνεύονται στο αίμα της εγκύου κατά το πρώτο τρίμηνο της κύησης, είναι σχετικά καλά διαφοροποιημένα και έχουν περιορισμένο χρόνο ζωής. Τα εμπύρηνα εμβρυϊκά ερυθροκύτταρα απομονώνονται με ειδικές μεθόδους και εφαρμόζεται η τεχνική FISH προκειμένου να διαγνωσθούν οι συχνότερες αριθμητικές χρωμοσωματικές ανευπλοειδίες, όπως έχει ήδη περιγραφεί παραπάνω.

Παρ' όλο που αρχικά η χρήση αυτών των κυττάρων φαινόταν να υπόσχεται πολλά για την προγεννητική διάγνωση, στην πορεία αποκαλύφθηκαν σοβαρά προβλήματα. Τα κυριότερα φαίνεται να είναι ο εξαιρετικά μικρός αριθμός τους στο μητρικό αίμα, καθώς και η ανακάλυψη ότι, στην πλειοψηφία τους, τα εμπύρηνα ερυθροκύτταρα στο αίμα της εγκύου είναι μητρικής προέλευσης. Επίσης, ένα σοβαρό πρόβλημα είναι η κακή ποιότητα των πυρήνων αυτών των κυττάρων, η οποία δεν επιτρέπει πάντα την επιτυχή εφαρμογή της FISH. Σημαντική έρευνα στον τομέα αυτόν έχει γίνει και από ερευνητικές ομάδες της χώρας μας.

Η ανακάλυψη εξωκυτταρικού εμβρυϊκού DNA (cff-DNA: cell free fetal DNA) από τους Lo και συν., το 1997, υπήρξε σημαντικότατο βήμα στην μη επεμβατική προγεννητική διάγνωση. Έχει επιτευχθεί επιτυχής διάγνωση στο αίμα της εγκύου με cff-DNA για γονιδιακά νοσήματα, όπως στη χορεία του Huntington, όπου η μεταλλαγή είναι πατρικής προέλευσης, ενώ είναι απύουσα στη μητέρα. Και σε αυτήν την περίπτωση όμως, η συνύπαρξη μεγάλης ποσότητας μητρικού DNA καθιστά την προσέγγιση αυτή ανέφικτη σε περιπτώσεις μονογονιδιακών νοσημάτων, όπου και οι δύο γονείς είναι φορείς κάποιας μεταλλαγής.

Στην κλινική πράξη, οι παραπάνω μεθοδολογίες έχουν αποδειχθεί χρήσιμες στην επιτυχή διάγνωση του φύλου του εμβρύου σε περιπτώσεις φυλοσύνδετου νοσήματος, καθώς και στον παράγοντα rhesus (RhD) του εμβρύου σε περιπτώσεις RhD(-) εγκύων γυναικών.

Η πλέον υποσχόμενη προσέγγιση φαίνεται να είναι η ανίχνευση DNA αλληλουχιών με την τεχνολογία των μικρο-συστοιχιών (microarray) που παρουσιάζουν διαφορετική μεθυλίωση στο DNA στο αίμα της μητέρας, από αυτή στο DNA του εμβρύου. Λεπτομερής ανάλυση DNA αλληλουχιών των χρωμοσωμάτων 18 και 21 αποκάλυψε 42 περιοχές στο χρωμόσωμα 18 και 34 στο χρωμόσωμα 21, οι οποίες παρουσιάζουν διαφορετική μεθυλίωση μεταξύ μητρικού αίματος και πλακούντα.

Επίσης, πολύ πρόσφατα αναφέρεται ότι είναι πιθανό να χρησιμοποιηθεί το εξωκυτταρικό εμβρυϊκό RNA (cff-RNA: cell free fetal RNA) για τη μη επεμβατική διάγνωση των εμβρύων με τρισωμία 21. Απ' ότι φαίνεται το ccf-RNA έχει δύο βασικά πλεονεκτήματα σε σχέση με το cff-DNA. Απ' ενός είναι δυνατό να απομονωθούν RNA μόρια που εκφράζονται μόνο στον πλακούντα και σε κανένα μητρικό ιστό και, απ' ετέρου, τα διάφορα είδη cff-RNA βρίσκονται σε πολύ μεγαλύτερες ποσότητες από το cff-DNA των αντίστοιχων τόπων. Ήδη έχει περιγραφεί το προϊόν μεταγραφής PLAC4 που εκφράζεται μόνο στον πλακούντα, ενώ το αντίστοιχο γονίδιο χαρτογραφείται στο χρωμόσωμα 21. Φαίνεται λοιπόν λογικό η ποσοτικοποίησή του να είναι δυνατό να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση των αριθμών αντιγράφων του χρωμοσώματος 21.

Τις επιστημονικές ομάδες που ασχολούνται με την ανάπτυξη των παραπάνω μεθόδων, καθώς και τη συλλογή των δειγμάτων συντονίζει το δίκτυο SAFE (The Special Non-Invasive Advances in Fetal and Neonatal Evaluation Network) που στηρίζεται από το Έκτο Πρόγραμμα Στήριξης της Ευρωπαϊκής Ένωσης, με στόχο την εφαρμογή της μη επεμβατικής προγεννητικής διάγνωσης σε επίπεδο ρουτίνας.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Προσδοκούμε ότι, με τις νέες εξελίξεις στον τομέα της μη επεμβατικής προγεννητικής διάγνωσης, είναι πιθανό η τελευταία, ακόμη και μέσα στα επόμενα 5 έτη, να καταστήσει εφικτή αρχικά τη διάγνωση των συχνότερων αριθμητικών ανωμαλιών στο αίμα της εγκύου και στη συνέχεια τη διάγνωση όλων των χρωμοσωματικών ανωμαλιών με το μοριακό καρυότυπο.

Προς το παρόν, η αποτελεσματικότερη προσέγγιση για την προγεννητική διάγνωση των χρωμοσωματικών ανωμαλιών του εμβρύου παραμένει η εξαγωγή ενός πρώτου αποτελέσματος, σε χοριονικές λάχνες ή αμνιακό υγρό, με

την τεχνική ταχείας προγεννητικής διάγνωσης QF-PCR για τις συχνότερες τρισωμίες (13, 18, 21), σε 24-48 ώρες και στη συνέχεια ολοκλήρωση της εξέτασης με το συμβατικό καρυότυπο μετά από καλλιέργεια.

Η εφαρμογή τεχνικών, όπως της MLPA για τη διάγνωση συνδρόμων μικροελλειμμάτων ή μικροδιπλασιασμών ή του μοριακού καρυότυπου συνιστώνται σε ειδικές περιπτώσεις όπου παρατηρούνται, είτε υπερηχογραφικές ανωμαλίες του εμβρύου, είτε de novo χρωμοσωματικές ανακατατάξεις που δεν ανιχνεύονται στους γονείς. Σε κάθε περίπτωση όμως, δε θα πρέπει να ξεχνάμε ότι για πάνω από 30 έτη ο συμβατικός προγεννητικός καρυότυπος έχει αποτελέσει το πλέον χρήσιμο εργαλείο στη διάγνωση των χρωμοσωματικών ανωμαλιών του εμβρύου. Μέχρι να αποδειχθεί ότι οι νέες μεθοδολογίες είναι εξίσου αποτελεσματικές, οφείλουμε να είμαστε ιδιαίτερα προσεκτικοί προκειμένου να μη διακοπούν κηύσεις υγιών εμβρύων ή να γεννηθούν νεογνά με χρωμοσωματικές ανωμαλίες.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

1. Bianchi DW, Klínger KW. Prenatal diagnosis through the analysis of fetal cells in the maternal circulation. En: *Genetics disorders and the fetus*. Milunski A (ed.) The John Hopkins University Press, Baltimore. 1992; 759-770.
2. Slunga-Tallberg A, El-Rifai W, Keindnen M, Ylinen K, Kurki T, Klínger K, et al. Maternal origin of nucleated erythrocytes in peripheral venous blood of pregnant women. *Hum Genet*. 1995; 96:53-57.
3. Troeger C, Zhong XY, Burgemeister R, Múnderer S, Tercanli S, Holzgreve W, et.al. Approximately half of the erythroblasts in maternal blood are of fetal origin. *Mol Human Reprod*. 1999; 5(2):1162-1165.
4. Mavrou A, Kouwidi E, Antsaklis A, Souka A, Kitsiou Tzeli S, Kolialexi A. Indefication of nucleated red blood cells in maternal circulation: a second step in screening for fetal aneuploidies and pregnancy complications. *Prenat Diagn*. 2007; 27(2):150-3.
5. Dennis Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, RaiV, Sargent IL, Redman CW, et.al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet*. 1997; 350(9076):485-487.
6. Maron JL, Bianchi DW. Prenatal diagnosis using cell-free nucleic acids in maternal body fluids: a decade of progress. *AmJ Med Genet C Semin Med Genet*. 15 2007; 145(1):5-17.
7. Hahn S, Zhong X, Holzgreve W. Non-invasive prenatal diagnosis of Down's syndrome. *Lancet*. 16 2007; 369(9578):1997-8.
8. Dennis Lo YM, Chiu RW. Prenatal diagnosis: progress through plasma nucleic acids. *Nat Rev Genet*. 2007; 8(1):71-7.

CHALLENGES FACING THE HUMAN IVF LABORATORY IN 2008

Catherine Racowsky

The first successful IVF birth was achieved in 1978, following more than one hundred attempts. Despite the considerable increased efficiency of clinical IVF during the last thirty years, considerable challenges continue to face the human IVF laboratory. In this lecture, we discussed these challenges under the following three broad categories:

- Challenges related to the IVF system per se
- Challenges related to maximizing the pregnancy rate
- Challenges related to adverse outcomes in IVF

1. Challenges related to the IVF system per se

There are multiple challenges pertaining to the culture systems used in the IVF laboratory. These relate to the type of culture dishes used, the composition of the gas phase employed, which culture medium might be optimum and which day the embryos should be transferred. Of all these variables, perhaps the type of culture media is one of the most contentious. Each laboratory should perform carefully controlled trials when assessing culture media. In addition, it is important to remember not only that multiple variables influence culture medium performance, but also that the human embryo has remarkably adaptive capabilities. Furthermore, evaluation of any variable is only worthwhile if the laboratory has active quality control and quality assurance programs in place, so that performance is stable and optimal at all times.

There are many commercially available media, ranging from those containing relatively few components to those that are complex, containing upwards of 20 components. However, it is unlikely that any medium contains optimal concentrations of all constituents; moreover, medium performance is typically measured by live birth rate, and not by health of the offspring (see Section 3, below). Moreover, the optimum day of transfer remains controversial. While extending culture to day 5 offers the opportunity to identify the more robust embryos that are capable of development to the blastocyst stage, there is an increased risk of monozygotic twinning following day 5 transfer, and recent data indicate that transfer at the blastocyst stage should only be performed in select, good prognosis patients.

2. Challenges related to maximizing the pregnancy rate

The biggest challenge relating to maximizing the pregnancy rates is to minimize the multiple rates, thereby maximizing the likelihood that every couple will have a single baby. Since ovarian stimulation typically results in retrieval of a large number of oocytes, normally, more embryos are obtained than should be transferred. Different countries have adopted different strategies to address this situation. In Italy, only a maximum of three oocytes can be inseminated, while in Germany no more than three zygotes can be kept in culture after the fertilization check. All remaining countries focus on the number of embryos to transfer which are either enforced by strict regulations (e.g. United Kingdom, Norway, Sweden and Greece) or by guidelines (e.g. United States). Regardless, selection of the most developmentally competent embryo(s) in any cohort is required. Therefore, considerable effort is being focused on improving embryo selection techniques. In addition to the traditional techniques based on morphological assessment, new approaches are currently being developed that involve non-invasive biomarker assays using, for example, near infra-red spectroscopy or mass spectroscopy. Regardless of which selection technique is employed, it must fulfill basic requirements such as to minimize risk to the embryo, minimize turnaround time to avoid embryo freezing, minimize cost and maximize efficiency and efficacy.

3. Challenges related to adverse outcomes in IVF

The success of an ART procedure is typically measured by the baby take-home rate, whether this is defined as the number of deliveries according to the number of cycles initiated, the number of egg retrievals or the number of embryo transfers. However, mounting evidence indicates that critical attention should be paid not only to this outcome measure, but also to the health of the children born. While most ART neonates appear normal, several recent studies emphasize an increased risk for adverse pregnancy outcomes compared with those of non-ART conceived pregnancies. Particular

attention was focused on the increased rates of perinatal complications of singleton pregnancies, including small for gestational age infants, preterm delivery and perinatal mortality, in addition to maternal complications. Evidence is also accumulating that there are increased risks of syndromes involving epigenetic alterations in children born from ART. Interestingly, although multiple gestations are responsible for most of the adverse outcomes associated with ART, when controlling for the number of fetuses, the risks of most of these adverse outcomes generally disappear. In fact, ART twins fare no worse than twins conceived either from gonadotropin-IUI or naturally.

The etiologies underlying the increased risks to ART pregnancies are unknown but may include ovarian stimulation-related effects, culture-induced phenomena and unidentified contributions from the parents of gamete origin. Controlled ovarian stimulation rescues oocytes that would otherwise undergo atresia, raising questions regarding the developmental competency of these oocytes compared with those ovulated from the dominant follicle during the natural cycle. Possible culture-induced effects encompass a wide variety of variables, including the culture system itself (e.g. dishes, gas phase, embryo density and co-culture with granulosa cells), and the type of culture medium used. Also, known inheritable genetic abnormalities (e.g. aneuploid oocytes or sperm, translocations and cystic fibrosis mutations etc) clearly impact ART outcomes.

A wide range of challenges exists when trying to identify whether adverse outcomes are associated with ART and what the underlying causes may be. These challenges relate to study design issues involving the type of study (prospective, retrospective, multi-center or meta-analyses), the unit of analysis (e.g. the woman, the man, the couple etc. and whether singletons, twins or triplets were assessed) and the effect of the analytical unit on outcome (e.g. a woman with one adverse outcome is twice as likely to repeat such an outcome than a woman with a healthy outcome). In addition, separating possible influences of underlying reproductive pathologies inherent to the infertile couple, from effects associated with the pharmaceutical agents used for ovarian stimulation and/or the in vitro technologies per se is critically important. The etiologies of many of the adverse outcomes in ART remain to be resolved. It is critical to tease out the relative contributions of infertility versus treatment-related issues (e.g. ART for tubal ligation versus for disease-related reasons). Furthermore, it is critical to link lab technology data with perinatal and birth, infant and child health outcome data. Indeed, it is relevant to extrapolate the Barker Hypothesis back to the moment of fertilization and then through pre-implantation development in vitro in order to decipher what role, if any, the ART technologies may play in any adverse outcomes associated with ART.

ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΝΟΣΩΝ: Η ΠΡΟΕΜΦΥΤΕΥΤΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ

J. Traeger-Συνοδινού, Χ. Βρεττού, Α. Δεστούνη, Ε. Καναβάκης

Η ΠΓΔ είναι μια μέθοδος η οποία προσφέρει τη δυνατότητα γενετικής διάγνωσης και μεταφοράς στη μήτρα μόνο των υγιών από τα έμβρυα που προέκυψαν από εξωσωματική γονιμοποίηση (in-vitro fertilization-IVF). Η όλη διαδικασία είναι σήμερα εφικτή, λόγω της εξέλιξης τριών διαφορετικών τομέων της βιοτεχνολογίας: της εξωσωματικής γονιμοποίησης, της εμβρυολογίας και της γενετικής διάγνωσης.

Προϋποθέσεις για την εφαρμογή ΠΓΔ σε κάποιο ζευγάρι είναι να αντιμετωπίζει τον κίνδυνο να μεταβιβάσει στους απογόνους του ένα σοβαρό γενετικό νόσημα και παράλληλα:

- να είναι υποχρεωμένο να καταφύγει σε μεθόδους υποβοηθούμενης αναπαραγωγής λόγω υπογονιμότητας ή
- να έχει ιστορικό πολλαπλών διακοπών κύσεων μετά από προγεννητική διάγνωση ή
- να πάσχει η σύζυγος από χρόνια νοσήματα (π.χ. μεσογειακή αναιμία) και να υπάρχει κίνδυνος επιβάρυνσης της γενικής της κατάστασης από διακοπή μιας κύησης ή
- να προβάλλονται ηθικοί-θρησκευτικοί ενδοιασμοί για διακοπή μιας κύησης.

Η μεθοδολογία που συνήθως εφαρμόζεται από τα περισσότερα κέντρα που προσφέρουν ΠΓΔ περιλαμβάνει:

- Απομόνωση-βιοψία, ενός (ή δύο) βλαστοκυττάρων από έμβρυα που βρίσκονται στο στάδιο των 6-8 κυττάρων (3ο εικοσιτετράωρο μετά τη γονιμοποίηση) (εικόνα 1) ή κυττάρων από την εξωτερική κυτταρική στοιβάδα βλαστοκύστεων, δηλαδή εμβρύων στο στάδιο των 100-150 κυττάρων (5ο εικοσιτετράωρο μετά τη γονιμοποίηση).
- Γενετική διάγνωση του νοσήματος στο ή στα κύτταρα που λαμβάνονται από τα έμβρυα.
- Μεταφορά για εμφύτευση μόνο των υγιών εμβρύων κατά τη διάρκεια του πέμπτου εικοσιτετράωρου μετά τη γονιμοποίηση.

Το στάδιο της εξωσωματικής γονιμοποίησης, καθώς και η εμβρυομεταφορά γίνονται σε κέντρο υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, ενώ για τη γενετική διάγνωση απαιτείται ο εξοπλισμός και η τεχνογνωσία ενός εργαστηρίου μοριακής γενετικής.

Στην περίπτωση των μονογονιδιακών νοσημάτων, η γενετική διάγνωση βασίζεται στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR). Για να χρησιμοποιηθεί ένα πρωτόκολλο ΠΓΔ στην κλινική πράξη θα πρέπει να έχει εξασφαλιστεί ικανοποιητικός πολλαπλασιασμός της περιοχής ή των περιοχών του γονιδίου όπου εντοπίζονται οι μεταλλάξεις που ευθύνονται για το νόσημα. Επίσης, θα πρέπει να έχει επιλεγεί και προτυποποιηθεί η μέθοδος ανίχνευσης των μεταλλάξεων, ώστε να εξασφαλίζεται η αξιοπιστία της γενετικής διάγνωσης. Σήμερα συστήνεται, παράλληλα με το γονίδιο που ευθύνεται για το νόσημα, να γίνεται και έλεγχος πολυμορφικών μικροδορυφορικών αλληλουχιών ή σημειακών αλλαγών που βρίσκονται κοντά ή και μέσα στο γονίδιο αυτό, με σκοπό την έμμεση γενετική διάγνωση μέσω ανάλυσης σύνδεσης (linkage analysis). Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται μείωση της πιθανότητας λανθασμένης διάγνωσης, αντιμετωπίζεται το πρόβλημα του μη πολλαπλασιασμού από το ένα αλληλόμορφο (ADO), ελέγχεται η πιθανότητα επιμόλυνσης από ξένο DNA σε κάθε ένα έμβρυο ξεχωριστά, ενώ αυξάνεται ο αριθμός των εμβρύων που μπορούν να μεταφερθούν για εμφύτευση. Η παραπάνω διαδικασία είναι εφικτή με την εφαρμογή πολλαπλού PCR (multiplex PCR) που επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό ταυτόχρονα πολλών τμημάτων DNA.

Η ΠΓΔ των χρωμοσωμικών ανωμαλιών γίνεται με έλεγχο των χρωμοσωμάτων σε μεσοφασικούς πυρήνες μεμονωμένων κυττάρων, με ανιχνευτές σημασιμένους με φθορίζουσες ομάδες με τη μέθοδο Fluorescence In Situ Hybridization (FISH). Η μέθοδος εφαρμόζεται κυρίως για την αποφυγή χρωμοσωμικών ανωμαλιών που υπάρχουν στην οικογένεια, όπως αμοιβαίες μεταθέσεις (reciprocal translocations) που είναι μοναδικές σε κάθε οικογένεια ή μεταθέσεις ακροκεντρικών χρωμοσωμάτων 13, 14, 15, 21 και 22 (robertsonian translocations).

Στο διάστημα των 10 ετών που προσφέρουμε ΠΓΔ σχεδιάστηκαν, προτυποποιήθηκαν και εφαρμόζονται πρωτόκολλα ΠΓΔ για τα δύο πιο συχνά μονογονιδιακά νοσήματα στην Ελλάδα, την Κυστική Ίνωση (KI) (5% του πληθυσμού φορείς) και τα μεσογειακά σύνδρομα που στον ελληνικό πληθυσμό αφορούν κυρίως τη β μεσογειακή και τη δρεπανοκυτταρική αναιμία (7% του πληθυσμού φορείς β μεσογειακής αναιμίας και 1% φορείς δρεπανοκυτταρικής). Τα δύο αυτά νοσήματα επελέγησαν λόγω της μεγάλης συχνότητάς τους στον Ελληνικό πληθυσμό, της βαρύτερης κλινικής εικόνας τους και των δυσκολιών κατά τη θεραπευτική τους αντιμετώπιση. Ένας επιπλέον λόγος για την επιλογή της KI είναι η συσχέτισή της με την ανδρική υπογονιμότητα και την αναγκαιότητα εφαρμογής μεθόδων υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Στον Ελληνικό πληθυσμό, άνδρες με συγγενή έλλειψη σπερματικού πόρου είναι κατά τουλάχιστον 70% φορείς της νόσου, ενώ άνδρες με αποφρακτική αζωοσπερμία κατά 30%. Παράλληλα, έχουν σχεδιαστεί και

εφαρμόζονται πρωτόκολλα ΠΓΔ για φυλοσύνδετα και φυλοεξαρτώμενα νοσήματα, καθώς και για σπάνια μονογονιδιακά νοσήματα με γνωστή μοριακή διαταραχή. Όλες οι μέθοδοι που εφαρμόζονται είναι πρωτότυπες στο σχεδιασμό τους, σχετικά απλές και μπορούν να ελέγξουν την πιθανότητα επιμόλυνσης από ξένο DNA σε κάθε ένα μεμονωμένο κύτταρο που εξετάζεται, εξασφαλίζοντας αξιόπιστη γενετική διάγνωση.

Στο διάστημα των 10 ετών έως και τον Ιούνιο του 2008, ενδιαφέρθηκαν και ενημερώθηκαν για τη μέθοδο της ΠΓΔ περισσότερα από 350 ζευγάρια φορείς διαφόρων γενετικών νοσημάτων, όπως η μεσογειακή και η δρεπανοκυτταρική αναιμία, η Κυστική Ίνωση, η μυϊκή δυστροφία Duchenne, η λιποειδής υπερπλασία των επινεφριδίων, η νοτιαία μυϊκή ατροφία SMA, η γλυκογονίαση, η συγγενής αιμαύρωση Leber, το σύνδρομο Marfan, η αιμοροφιλία A και ο επικρατητικός τύπος της κληρονομικής παραπληγίας. Από αυτά, 250 ζευγάρια μπήκαν στην διαδικασία να ξεκινήσουν τουλάχιστον έναν κύκλο ΠΓΔ. Στο στάδιο της εμβρυομεταφοράς έφτασαν συνολικά 308 κύκλοι και μέχρι τον Ιούνιο του 2008 είχαν γεννηθεί 97 φυσιολογικά νεογνά από 79 εγκυμοσύνες ενώ 16 εγκυμοσύνες βρισκόνταν ακόμα σε εξέλιξη.

Η ΠΓΔ αποτελεί μια πολύπλοκη διαδικασία από επιμέρους στάδια που απαιτούν λεπτότατους χειρισμούς σε ειδικά διαμορφωμένους χώρους από απόλυτα εξειδικευμένο επιστημονικό προσωπικό. Η επιτυχία του κάθε σταδίου χωριστά είναι καθοριστική για την έκβαση του συνολικού εγχειρήματος. Με βάση μελέτες που έχουν γίνει μέχρι σήμερα διεθνώς, αλλά και από την εμπειρία του εργαστηρίου Ιατρικής Γενετικής φαίνεται ότι το 30% περίπου των ΠΓΔ που ολοκληρώνονται έχουν σαν αποτέλεσμα τη γέννηση υγιούς παιδιού.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. EIM & ESHRE Results. *Hum. Reprod.* 2001; 16:384-391.
2. Findlay et al., *Hum. Reprod.* 1995; 1:1609-1618.
3. Handyside AH et al., *Nature* 1990; 344:769-770.
4. Harper JC et al., *Hum. Reprod.* 2006; 21:3-21.
5. Kanavakis E et al., *Mol. Hum. Reprod.* 1997; 3:523-528.
6. Kanavakis E et al., *Mol. Hum. Reprod.* 1998; 4:333-337.
7. Kanavakis E et al., *J. Med. Genet.* 2002; 39:6-11.
8. King DS. *J. Med. Ethics.* 1999; 25:176-182.
9. Kokkali G. et al., *Hum. Reprod.* 2005; 20:1855-9.
10. Kokkali G. et al., *Hum. Reprod.* 2007; 22:1443-9.
11. Losekoot M. et al., *Brit. J. Haematol.* 1990; 76:269-274.
12. Mastenbroek S, et al., *Fertil. Steril.* 2006; 85:534-5, author reply 535-6.
13. Munne S, et al., *Fertility and Sterility* 2005; 84:1328-1334.
14. Ogilvie CM, et al., *J. Histochem. Cytochem.* 2005; 53:255-60.
15. Pembrey ME, *Eur. J. Hum. Genet.* 1998; 6:4-11.
16. Shahine LK and Cedars MI, *Fertility and Sterility.* 2006; 85:51-56.
17. Traeger-Synodinos J, et al., *Hemoglobin* 1998; 22:89-94.
18. Twisk M et al., *Cochrane Database Syst Rev Cochrane Library, J. Wiley.* 2006; 25(1).
19. Tzetis M, et al., *Hum. Genet.* 1997; 99:121-125.
20. Tzetis M, et al., *Hum. Genet.* 2000; 108:216-221.
21. Van Steirteghem AC et al., *Hum. Reprod.* 1993; 8:1061-1066.
22. Vrettou C et al., *Prenatal Diagnosis* 1999; 19:1209-1216.
23. Vrettou C, et al., *Mol. Hum. Reprod.* 2002; 8:880-886.
24. Vrettou C, et al., *Clinical Chemistry.* 2003; 49:769-776.
25. Wells D and Delhanty JD, *Mol. Hum. Reprod.* 2000; 6:1055-1062.