

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«IVF ή ICSI; Νεότερα δεδομένα.»

ΒΑΣΙΛΙΚΗ ΠΑΡΑΣΚΕΥΑ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΛΑΡΙΣΑ

Σεπτέμβριος 2010

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟΣ ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΙΩΑΝΝΗΣ Ε. ΜΕΣΣΗΝΗΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπων: Γεώργιος-Σπυρίδων Ανυφαντής (Κλινικός Εμβρυολόγος)

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Γεώργιος-Σπυρίδων Ανυφαντής (Κλινικός Εμβρυολόγος)

Νικόλαος Βαμβακόπουλος (Καθηγητής Βιολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας)

Κων/νος Νταφόπουλος (Επίκουρος Καθηγητής Μαιευτικής και Γυναικολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας)

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

| | |
|---|----|
| Περίληψη..... | 1 |
| 1. Εισαγωγή..... | 3 |
| 1.1 Τεχνολογία υποβοηθούμενης αναπαραγωγής και υπογονιμότητα..... | 3 |
| 1.2 Μέθοδος IVF..... | 4 |
| 1.3 IVF με υψηλή συγκέντρωση σπερματοζωαρίων (HIC-IVF)..... | 6 |
| 1.4 Μέθοδοι μικροχειρισμού γαμετών..... | 8 |
| 1.5 Μέθοδος ICSI..... | 10 |
| 2. Σύγκριση IVF και ICSI σε συγκεκριμένα περιστατικά..... | 13 |
| 2.1 Σαλπινγικός παράγοντας..... | 13 |
| 2.2 Ανεξήγητη υπογονιμότητα..... | 14 |
| 2.3 Ανδρικός παράγοντας..... | 17 |
| 2.4 Μη ανδρικός παράγοντας..... | 19 |
| 2.5 Προηγούμενη αποτυχία γονιμοποίησης με IVF..... | 21 |
| 2.6 Μικρός αριθμός ωαρίων σε κύκλους ωοληψίας..... | 25 |
| 2.7 Πτωχή ποιότητα ωαρίων..... | 26 |
| 2.8 Ανδρικός-Ανοσολογικός παράγοντας υπογονιμότητας..... | 28 |
| 2.9 Απουσία ακροσώματος..... | 29 |
| 2.10 Σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών..... | 30 |
| 3. Οι νέες τάσεις στην εφαρμογή των μεθόδων ICSI και IVF..... | 31 |
| 4. Γενετικές επιπτώσεις και επιπλοκές της τεχνικής ICSI έναντι της κλασικής IVF..... | 35 |
| 5. ICSI έναντι IVF ως προς τα χαρακτηριστικά της εγκυμοσύνης και τα περιγεννητικά αποτελέσματα..... | 40 |
| 6. ICSI έναντι IVF ως προς την αναπτυξιακή πορεία των εμβρύων in vitro..... | 43 |
| 7. Συμπεράσματα..... | 44 |
| 8. Βιβλιογραφία..... | 48 |

Περίληψη

Η τεχνική IVF σχεδιάστηκε αρχικά για να θεραπεύσει τη γυναικεία υπογονιμότητα και είχε μεγάλη επιτυχία κυρίως στο σαλπιγγικό παράγοντα. Για πάνω από μία δεκαετία είχε ευρεία εφαρμογή ακόμα και σε ζευγάρια που υπέφεραν από ανδρική υπογονιμότητα δίνοντας όμως χαμηλά ποσοστά γονιμοποίησης. Στην πορεία εφαρμόστηκαν διάφορες άλλες μέθοδοι μικροχειρισμού γαμετών, όπως οι τεχνικές ZD, PZD και SUZI, οι οποίες είχαν αρκετά μειονεκτήματα. Έτσι, το πρόβλημα του σοβαρού ανδρικού παράγοντα παρέμενε άλυτο μέχρι το 1992, όπου εφαρμόστηκε η τεχνική ICSI και επιτεύχθηκε η πρώτη κύηση.

Έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές μελέτες που συγκρίνουν τις τεχνικές IVF και ICSI προκειμένου να αναδειχθεί το καλύτερο μοντέλο γονιμοποίησης σε κάθε αιτία υπογονιμότητας. Με βάση τα αποτελέσματα αυτών των μελετών και κυρίως με βάση το ποσοστό γονιμοποίησης, οι ενδείξεις για την κλασική IVF είναι ο σαλπιγγικός παράγοντας, η ανεξήγητη υπογονιμότητα, ο ήπιος ανδρικός παράγοντας και ο μη ανδρικός παράγοντας. Αντιθέτως, οι ενδείξεις για την τεχνική ICSI είναι ο σοβαρός ανδρικός παράγοντας, όπως αζωοσπερμία, σοβαρή OTA, παρουσία αντισπερματικών αντισωμάτων και απουσία ακροσώματος. Επίσης ενδείκνυται σε περιπτώσεις όπου έχει προηγηθεί αποτυχία γονιμοποίησης με την κλασική IVF ή όταν υπάρχει μικρός αριθμός ωαρίων ή χαμηλής ποιότητας ωάρια. Επιπλέον, προκειμένου να μειωθεί το ποσοστό αποτυχίας γονιμοποίησης με την IVF σε περιπτώσεις ήπιας OTA και ανεξήγητης υπογονιμότητας προτείνεται η εφαρμογή της διαδικασίας split IVF/ICSI.

Σύμφωνα με τα δεδομένα που συγκεντρώνει η ESHRE, τα τελευταία χρόνια οι κύκλοι με ICSI έχουν αυξηθεί ραγδαία ενώ οι κύκλοι με IVF παραμένουν σε σχετικά σταθερά επίπεδα. Η ολοένα και μεγαλύτερη εφαρμογή της μεθόδου ICSI έχει αυξήσει τις ανησυχίες καθώς με την τεχνική αυτή παρακάμπτεται η διαδικασία της φυσικής επιλογής και μ' αυτόν τον τρόπο μπορούν να μεταβιβαστούν στις επόμενες γενιές διάφορες χρωμοσωμικές ανωμαλίες. Επιπλέον έχει υψηλό κόστος, είναι επεμβατική, χρονοβόρα και απαιτεί ειδικό εξοπλισμό. Γι' αυτούς τους λόγους και όσο υφίστανται θέματα ασφάλειας δεν μπορεί να αντικαταστήσει την κλασική IVF.

Abstract

Conventional IVF was originally designed to treat female infertility and had great success mainly in tubal factor. For over a decade, was widely applied even in couples suffering from male infertility, however, giving low fertilization rate. Since then, a number of different other gamete micromanipulation methods have been applied, such as ZD, PZD and SUZI, which had several drawbacks. The problem of severe male factor infertility remained unsolved until 1992, when ICSI was applied and the first pregnancy was achieved.

Several studies have been done comparing IVF and ICSI techniques in order to bring out the best fertilization model in each cause of infertility. Based on the results of these studies and mainly on the fertilization rate, the indications for IVF are tubal factor, unexplained infertility, mild male factor and non-male factor infertility. Instead, the indications for ICSI technique are severe male factor infertility, such as azoospermia, severe oligo-astheno-teratozoospermia, antisperm antibodies and globozoospermia. Also indicated in case of previous fertilization failure with IVF or when there is a small number or low quality oocytes. In addition, to reduce the danger of fertilization failure with IVF in cases of mild oligo-astheno-teratozoospermia and unexplained infertility, it is proposed the method of split insemination of oocytes by IVF and ICSI.

According to data collected by the ESHRE, in recent years the cycles with ICSI have been increased rapidly while the cycles of IVF remain stable. The increasing application of ICSI has raised concerns as the technique bypasses the process of natural selection and in this way various chromosomal abnormalities can be passed on to future generations. Furthermore, ICSI is an expensive, invasive and time consuming technique that requires special equipment. For these reasons and as there are many security issues, ICSI can not replace conventional IVF.

1. Εισαγωγή

1.1 Τεχνολογία υποβοηθούμενης αναπαραγωγής και υπογονιμότητα

Καθώς τις τελευταίες δεκαετίες όλο και περισσότερα υπογόνιμα ζευγάρια καταφεύγουν στις μεθόδους υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, οι επιστήμονες έχουν προσπαθήσει να βελτιώσουν της θεραπευτικές επιλογές που προσφέρονται στους ασθενείς. Λόγω της σημαντικής προόδου στη φαρμακολογία, στη γενετική και στην κυτταρική βιολογία έχει επιτευχθεί μεγαλύτερος έλεγχος στην όλη διαδικασία της σύλληψης (Vela *et al.* 2009).

Έχει βελτιωθεί η ωρίμανση, η ποιότητα και η ποσότητα των γαμετών και κατ'αυτόν τον τρόπο έχει επιτραπεί η γονιμοποίηση σε ένα ελεγχόμενο περιβάλλον. Παράλληλα δίνεται η δυνατότητα της επιλογής των καλύτερων εμβρύων και της βελτίωσης των ποσοστών κύησης με ταυτόχρονη μείωση του αριθμού των πολλαπλών και γενετικά ανώμαλων κύσεων. Καθώς η ανάπτυξη νέων εργαλείων καθιστά την υποβοηθούμενη αναπαραγωγή αποτελεσματικότερη και ασφαλέστερη, η εξωσωματική γονιμοποίηση έχει γίνει η επιλογή θεραπείας για πολλές αιτίες υπογονιμότητας (Vela *et al.* 2009).

Η τεχνολογία της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (ART) είναι ένας όρος που χρησιμοποιείται όταν αναφερόμαστε στο χειρισμό των γαμετών με στόχο την επίτευξη εγκυμοσύνης (Vela *et al.* 2009). Σε γενικές γραμμές, οι τεχνικές της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής περιλαμβάνουν χειρουργική αναρρόφηση των ωοκυττάρων μετά από ελεγχόμενη διέγερση των ωοθηκών (COH), επεξεργασία των γαμετών στο εργαστήριο και μεταφορά των γονιμοποιημένων ωαρίων στη μήτρα της γυναίκας (Vela *et al.* 2009).

Υπάρχουν πολλαπλές επιλογές στην υποβοηθούμενη αναπαραγωγή. Μια από αυτές είναι η ενδομήτρια σπερματέγχυση (IUI) κατά την οποία το σπέρμα υφίσταται ειδική επεξεργασία και εισάγεται στην κοιλότητα της μήτρας μετά από ελεγχόμενη υπερδιέγερση των ωοθηκών.

Με τη μέθοδο της ενδοσαλπινγικής μεταφοράς γαμετών (GIFT) εισάγονται με λαπαροσκόπηση μη γονιμοποιημένα ωάρια και ειδικά επεξεργασμένο σπέρμα στις σάλπιγγες. Στην κλασική εξωσωματική γονιμοποίηση (IVF) λαμβάνονται τα ωάρια

από τις ωοθήκες και στη συνέχεια γονιμοποιούνται στο εργαστήριο. Παραδοσιακά τα έμβρυα μεταφέρονται διακολπικά διαμέσου του τραχήλου στη μήτρα (ET), αλλά αν οι σάλπιγγες είναι διαβατές μπορούν να μεταφερθούν απευθείας σε αυτές (ZIFT).

Η μικρογονιμοποίηση ή αλλιώς ενδοκυτταροπλασματική έγχυση σπερματοζωαρίου (ICSI) αποτελεί μια καινούργια τεχνική υποβοηθούμενης αναπαραγωγής κατά την οποία ένα και μόνο σπερματοζωάριο εγχύεται μέσα στο ωάριο χρησιμοποιώντας ειδικό εξοπλισμό μικροχειριστηρίων.

Στις μέρες μας ένας αυξανόμενος αριθμός ζευγαριών χρειάζεται τις τεχνικές της ανθρώπινης υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, όπως τη μέθοδο IVF και ICSI ούτως ώστε να τεκνοποιήσουν (Wen *et al.* 2010).

1.2 Μέθοδος IVF

Αν και η εποχή της εξωσωματικής γονιμοποίησης ξεκίνησε το 1978 με τη γέννηση της Λουίζ Μπράουν, το ιστορικό αυτής της επιτυχίας είχε αρχίσει 10 χρόνια νωρίτερα όταν ο Steptoe και ο Edwards ξεκίνησαν την ιστορική τους συνεργασία το 1968 (Inge *et al.* 2005).

Ο Steptoe ήταν πρωτοπόρος στην τεχνική της λαπαροσκοπικής ωοληψίας και ο Edwards ερευνούσε τις συνθήκες και τις προϋποθέσεις για την ανθρώπινη εξωσωματική γονιμοποίηση (Inge *et al.* 2005). Η πρώτη εμβρυομεταφορά επιχειρήθηκε το 1972 (Inge *et al.* 2005).

Οι πρώτες επιτυχείς εγκυμοσύνες ήταν αποτέλεσμα ενός φυσικού κύκλου εξωσωματικής γονιμοποίησης και αυτές ακολουθήθηκαν από πρωτόκολλα που συνδύαζαν την κλομιφένη και την hCG, οι οποίες έχουν πλέον αντικατασταθεί από τη χρήση των GnRH αγωνιστών ή ανταγωνιστών και από υψηλής καθαρότητας ή ανασυνδυασμένες γοναδοτροφίνες (Inge *et al.* 2005).

Αρχικά, η μέθοδος IVF σχεδιάστηκε ώστε να ξεπεραστεί το πρόβλημα υπογονιμότητας που οφείλονταν σε βλάβη στις σάλπιγγες και εφαρμόστηκε με μεγάλη επιτυχία με ποσοστό εγκυμοσύνης ανά κύκλο 28-30% (Irvine 1994). Πλέον αποτελεί μια αποτελεσματική θεραπεία υπογονιμότητας που μπορεί να οφείλεται και

σε άλλους παράγοντες (Bhattacharya *et al.* 2001) και ενδείκνυται στις περισσότερες περιπτώσεις γυναικείας υπογονιμότητας (Jaroudi 2003).

Πιο συγκεκριμένα, η απλή εξωσωματική γονιμοποίηση (IVF) ενδείκνυται για τη θεραπεία της υπογονιμότητας σε όλες της γυναίκες εφόσον ο ανδρικός παράγοντας είναι φυσιολογικός ή στον ήπιο ανδρικό παράγοντα, στο σαλπινγικό παράγοντα υπογονιμότητας, όταν υπάρχει ανεξήγητη υπογονιμότητα που δεν ξεπερνιέται με τη βοήθεια των σπερματεγχύσεων (2-4), όταν υπάρχουν σοβαρές ανατομικές βλάβες στην πύελο της γυναίκας (συμφύσεις) και τέλος όταν η ηλικία της γυναίκας είναι μικρότερη από 36 ετών.

Πάνω από μία δεκαετία είχε ευρεία εφαρμογή ακόμα και σε ζευγάρια που αντιμετώπιζαν ανδρική υπογονιμότητα. Ένας σημαντικός αριθμός ζευγαριών με σοβαρό ανδρικό παράγοντα υπογονιμότητας δεν μπορούσαν να βοηθηθούν με την κλασική εξωσωματική γονιμοποίηση, διότι όλα ή περισσότερο από 95% των ωαρίων αποτύγχαναν να γονιμοποιηθούν με κινητά σπερματοζώαρια. Μερικά ζευγάρια, όπου ο συνολικός αριθμός σπερματοζωαρίων μετά από εκσπερμάτιση είναι κάτω από ένα συγκεκριμένο όριο (π.χ. 500.000/εκσπερμάτιση), αδυνατούν να θεραπευτούν με τη μέθοδο IVF (Van Steirteghem 1994).

Έχει τεκμηριωθεί ότι τα αποτελέσματα του IVF στην ανδρική υπογονιμότητα δεν είναι τόσο καλά όσο σε ασθενείς με φυσιολογικό σπέρμα (Van Steirteghem 1994, Svalander 1994). Σύγκριση μεταξύ 175 ζευγαριών με ανδρικό παράγοντα υπογονιμότητας (ολιγο-ασθενο-τερατοζωοσπερμία) και 480 ζευγαριών με σαλπινγικό παράγοντα και φυσιολογικό σπέρμα, η κλασική IVF οδήγησε σε χαμηλότερο ποσοστό γονιμοποίησης (23% στον ανδρικό παράγοντα έναντι 67.9% στο σαλπινγικό παράγοντα), λιγότερες εμβρυομεταφορές και χαμηλότερο ποσοστό εγκυμοσύνης ανά κύκλο στα ζευγάρια με μη φυσιολογικό σπέρμα (Tournaye *et. al* 1992).

Στη μέθοδο IVF, 50.000-100000/ml κινητά σπερματοζώαρια τοποθετούνται σε μικρή απόσταση από το ωάριο. Αυτά θα πρέπει να είναι σε θέση να συνδεθούν με τη διαφανή ζώνη, να επιτελέσουν ακροσωμική αντίδραση, να εμφανίσουν υπερκινητικότητα και να διεισδύσουν στη διαφανή ζώνη. Έπειτα, θα πρέπει να μπορούν να ενωθούν με την πλασματική μεμβράνη του ωαρίου, να εισέλθουν στο ωόπλασμα και να σχηματίσουν προπυρήνα, ώστε να επιτευχθεί γονιμοποίηση.

Οποιοδήποτε από αυτά τα στάδια ή και όλα μπορούν να αποτύχουν εάν το σπερματοζωάριο είναι δυσλειτουργικό (Irvine 1994).

Τα ωάρια εκτιμώνται 18-20 ώρες μετά τη γονιμοποίηση με IVF κάτω από ανάστροφο μικροσκόπιο. Ελέγχεται η παρουσία δύο προπυρήνων και δύο πολικών σωματίων. Από 25-26 ώρες μετά τη γονιμοποίηση (στάδιο 2 κυττάρων) έως και την εμβρυομεταφορά εκτιμάται η ποιότητα των εμβρύων με βάση τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά (βλαστομερίδια και κατατμήσεις).

1.3 IVF με υψηλή συγκέντρωση σπερματοζωαρίων (HIC-IVF)

Η καλλιέργεια σπερματοζωαρίων-ωαρίων *in vitro* βελτιστοποιεί τη διαδικασία της γονιμοποίησης. Αντιμετωπίζονται οι εγγενείς δυσκολίες που παρουσιάζονται στα σπερματοζωάρια κατά την πορεία τους μέσα στο γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα προς αναζήτηση των ωαρίων, με αύξηση της εγγύτητας των ωαρίων και σπερματοζωαρίων στο τριβλίο (Cowan *et al.* 1996).

Ωστόσο, υπάρχουν κάποια όρια στην αποτελεσματικότητα της κλασικής IVF ως προς την αντιμετώπιση συγκεκριμένων αιτιών υπογονιμότητας. Τα όρια αυτά μπορεί να σχετίζονται με χαμηλό αριθμό σπερματοζωαρίων ή με χαμηλή κινητικότητα και ποιότητα μορφολογίας σπερματοζωαρίων, ή με βιοχημικές δυσλειτουργίες (Hall *et al.* 1995).

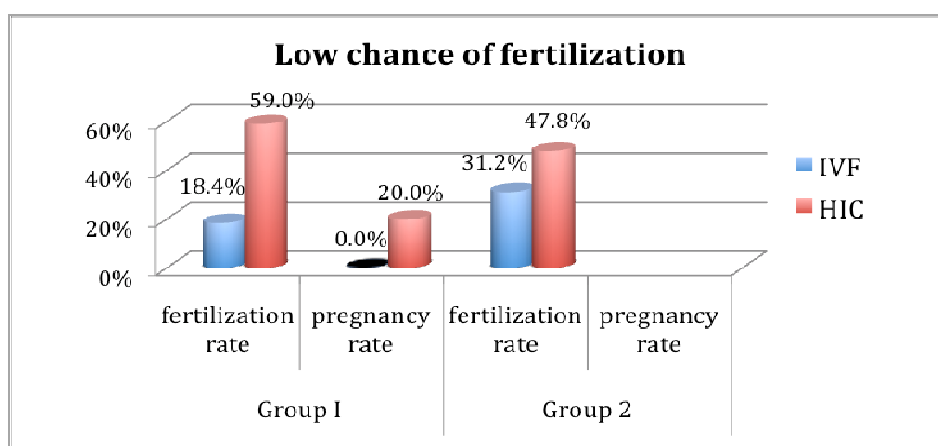
Υπάρχει ένα αποδεκτό εύρος συγκεντρώσεων σπερματοζωαρίων για την επίτευξη του μέγιστου ποσοστού γονιμοποίησης *in vitro*, ενώ η περαιτέρω αύξηση της συγκέντρωσής τους μπορεί να οδηγήσει σε πολυπλοειδία (Cowan *et al.* 1996). Στην τεχνική IVF με υψηλή συγκέντρωση σπερματοζωαρίων (high insemination concentration IVF) τα ωάρια καλλιεργούνται ατομικά σε 50-100 μ l σταγόνες καλλιεργητικού υλικού και καλύπτονται από 1 ml λάδι. Τα σπερματοζωάρια προστίθενται με συγκέντρωση $0.5-5 \times 10^6/\text{ml}$.

Η μελέτη του Cowan και άλλων προτείνει στις περιπτώσεις όπου οι παράμετροι του σπέρματος δεν ενδείκνυνται για την εφαρμογή της απλής IVF ή όταν υπάρχει προηγούμενη αποτυχία γονιμοποίησης με απλή IVF, η τεχνική IVF-HIC

μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως υποκατάστατο της κλασικής IVF χωρίς κατ' ανάγκη να καταφεύγουν οι ασθενείς στην επεμβατική μέθοδο ICSI (Cowan *et al.* 1996).

Στη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκαν 49 ζευγάρια που είτε είχαν χαμηλό ποσοστό γονιμοποίησης σε προηγούμενη προσπάθεια IVF (Group 1) είτε είχαν μειωμένη πιθανότητα γονιμοποίησης με IVF με βάση την αξιολόγηση του σπέρματος (Group 2) (Cowan *et al.* 1996).

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η μέθοδος IVF-HIC συγκρινόμενη με την κλασική IVF αύξησε τα ποσοστά γονιμοποίησης για το Group 1 (59% έναντι 18.4% αντίστοιχα) και για το Group 2 (47.8% έναντι 31.2% αντίστοιχα), όπως φαίνεται στην Εικόνα 1. Επιπλέον, αύξησε τα ποσοστά εγκυμοσύνης ανά εμβρυομεταφορά από 0% με την κλασική IVF σε 20% στους ασθενείς του Group 1. Μόνο μία εγκυμοσύνη προέκυψε από την εμβρυομεταφορά 2 εμβρύων HIC και 1 εμβρύου IVF στο Group 2. Παρόλο που τα ποσοστά εγκυμοσύνης ήταν εμφανώς υψηλότερα με την τεχνική HIC συγκριτικά με την απλή IVF στα Groups 1 και 2, η συχνότητα της πολυπλοειδίας ήταν παρόμοια και στις δύο θεραπείες.



Εικόνα 1. Σύγκριση μεταξύ των τεχνικών IVF και HIC-IVF σε ασθενείς με χαμηλό ποσοστό γονιμοποίησης σε προηγούμενη IVF και σε ασθενείς με χαμηλές παραμέτρους σπέρματος (τροποποίηση από Cowan *et al.* 1996).

Η προσφυγή στην τεχνική ICSI προτείνεται μόνο όταν έχουν προηγηθεί θεραπείες με IVF-HIC και απέτυχαν ή όταν ο αριθμός των κινητών σπερματοζωαρίων είναι $<1 \times 10^6$ /εκσπερμάτιση και ο κίνδυνος αποτυχίας γονιμοποίησης είναι μεγάλος. Στο συμπέρασμα αυτό κατέληξε η μελέτη του Kastrop και άλλων στην προσπάθειά του να εκτιμήσει εάν τα ζευγάρια που είχαν τουλάχιστον μία προηγούμενη αποτυχία γονιμοποίησης με IVF-HIC θα έπρεπε να υποβληθούν σε μια επιπλέον θεραπεία IVF-HIC με ακόμη μεγαλύτερη συγκέντρωση

σπερματοζωαρίων ή σε ενδοπλασματική έγχυση σπερματοζωαρίου-ICSI (Kastrop *et al.* 1999).

Στη μελέτη αυτή συμμετείχαν 23 ζευγάρια, των οποίων τα μισά ωάρια υπεβλήθησαν στην τεχνική ICSI και τα άλλα μισά σε IVF-HIC (με συγκέντρωση κινητών σπερματοζωαρίων έως $1 \times 10^7/\text{ml}$). Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης έδειξαν ότι το ποσοστό γονιμοποίησης μεταξύ IVF-HIC και ICSI ήταν 0% έναντι 62.9% αντίστοιχα. Το ποσοστό εγκυμοσύνης και γέννησης ζώντος νεογνού με ICSI ήταν 35% και 18.8% αντίστοιχα (Kastrop *et al.* 1999).

Επιπλέον σε περιπτώσεις ασθενών με σοβαρή τερατοζωοσπερμία η τεχνική HIC-IVF συγκρινόμενη με την τεχνική ICSI εμφανίζει υψηλότερα ποσοστά γονιμοποίησης (67% έναντι 59%), χωρίς όμως να καταγράφεται κάποια σημαντική διαφορά στα ποσοστά εμφύτευσης και εγκυμοσύνης (Hall *et al.* 1995).

1.4 Μέθοδοι μικροχειρισμού γαμετών

Τα σπερματοζωάρια σε πολλές περιπτώσεις ανδρικής υπογονιμότητας αδυνατούν να γονιμοποιήσουν το ωάριο και για το λόγο αυτό αναπτύχθηκαν συμπληρωματικές τεχνικές που αναφέρονται ως μέθοδοι μικροχειρισμού (micromanipulation) γαμετών (Veck 1999). Οι τεχνικές αυτές στόχευαν στο να ξεπεραστεί το εμπόδιο της πρόσβασης του σπερματοζωαρίου στο κυτταρόπλασμα του ωαρίου, δηλαδή η διαφανής ζώνη και η κυτταρική μεμβράνη (Van Steirteghem 1994) και έβρισκαν εφαρμογή όταν η συγκέντρωση του σπέρματος, η κινητικότητα ή η μορφολογία του ήταν ανεπαρκής (Veck 1999). Η πρακτική εφαρμογή των τεχνικών μικροχειρισμού έγινε στα μέσα της δεκαετίας του 1980.

Οι τεχνικές αυτές είναι οι εξής: α) διάνοιξη της διαφανούς ζώνης με διάλυμα Τυροδίου και δημιουργία μιας μικρής τρύπας πάνω σε αυτήν (ZD-zona drilling), β) μηχανική διάνοιξη της διαφανούς ζώνης με γυάλινη μικροπιπέτα (PZD-partial zona dissection) και γ) αναρρόφηση αρκετών σπερματοζωαρίων σε γυάλινη μικροπιπέτα και έγχυση αυτών στον περιλεκιθικό χώρο του ωαρίου (SUZI-subzonal insemination) (Van Steirteghem 1994).

Οι ενδείξεις για την χρήση των παραπάνω τεχνικών είναι οι εξής: α) προηγούμενη αποτυχία επίτευξης γονιμοποίησης μετά από αρκετές επαναλαμβανόμενες προσπάθειες με τη μέθοδο IVF, β) χαμηλή συγκέντρωση σπερματοζωαρίων (<50.000/εκσπερμάτιση) και γ) ύπαρξη ήπιου ανδρικού παράγοντα υπογονιμότητας (Fishel *et al.* 1994).

Για την πλήρη αποτυχία γονιμοποίησης ή τα χαμηλά ποσοστά γονιμοποίησης στα προγράμματα IVF ευθύνεται συνήθως κάποιος ανδρικός παράγοντας υπογονιμότητας. Ειδικότερα σχετίζονται με εξαιρετικά χαμηλό αριθμό σπερματοζωαρίων, πολύ χαμηλή κινητικότητα, ελλιπή λειτουργικότητα (ανεπάρκεια ακροσωμικής αντίδρασης), ανώμαλη μορφολογία, παρουσία αντισπερματικών αντισωμάτων και αζωοσπερμία που απαιτεί αναρρόφηση σπερματοζωαρίων από την επιδιδυμίδα (Edirisinghe *et al.* 1995).

Η μέθοδος ZD αναφέρθηκε για πρώτη φορά από τους Gordon και Talansky το 1986 και περιελάμβανε τη δημιουργία ενός οριοθετημένου ανοίγματος στη διαφανή ζώνη με την εφαρμογή του διαλύματος acid Tyrode's (pH 2.35) χρησιμοποιώντας μια γυάλινη μικροπιπέτα. Τα μειονεκτήματα αυτής της μεθόδου είναι ότι συχνά περισσότερα του ενός σπερματοζωάρια εισέρχονται από την διάτρητη ζώνη και επιπλέον το διάλυμα έχει δηλητηριώδη αποτελέσματα στο ωάριο (Veeck 1999). Η τεχνική ZD έχει αρνητικές συνέπειες για το ωάριο, οι οποίες εκδηλώνονται με αλλαγές στην τοπογραφία της επιφάνειάς του, κακή επιβίωση *in vitro* των εμβρύων που προκύπτουν από την τεχνική ZD, κακή μορφολογία και χαμηλό ρυθμό διαίρεσης (Payne 1994).

Η τεχνική PZD χρησιμοποιήθηκε ευρέως σε αρκετές περιπτώσεις αποτυχίας γονιμοποίησης και περιελάμβανε τρύπημα της διαφανούς ζώνης με γυάλινη πιπέτα λίγο πριν την επώαση των ωαρίων με τα σπερματοζωάρια (Veeck 1999). Σε αυτές τις δύο τεχνικές, ZD και PZD, τα σπερματοζωάρια έπρεπε να κινούνται και να έχουν υποβληθεί ή τουλάχιστον να διαθέτουν το δυναμικό για ακροσωμική αντίδραση. Επιπλέον αυτές οι μέθοδοι ενέχουν τον κίνδυνο να τραυματίσουν τα ωάρια με την ανάγκη να δημιουργήσουν ένα άνοιγμα συγκεκριμένου μεγέθους πάνω στη διαφανή ζώνη (Veeck 1999). Τέλος, σχετίζονται με σημαντικό ποσοστό πολυσπερμίας (Veeck 1999, Fishel *et al.* 1994).

Η μηχανική έγχυση σπερματοζωαρίου απευθείας στον περιλεκιθικό χώρο (SUZI), ήρθε να ξεπεράσει τη χαμηλή συγκέντρωση σπερματοζωαρίων και την κινητικότητα τους και αποδείχθηκε πιο αποτελεσματική σε σχέση με τις δύο προηγούμενες μεθόδους. Ωστόσο η μέθοδος SUZI απαιτούσε φυσιολογικά σπερματοζωάρια, με ικανότητα γονιμοποίησης, να είναι ενεργοποιημένα ή να έχουν κάνει ακροσωμική αντίδραση.

Η τεχνική αυτή δεν μπόρεσε να ξεπεράσει τις ανωμαλίες του ακροσώματος ή την αποτυχία σύντηξης σπερματοζωαρίου και πλασματικής μεμβράνης του ωαρίου και αυτό είχε ως αποτέλεσμα χαμηλά ποσοστά γονιμοποίησης (Veek 1999). Ωστόσο, είχε χαμηλότερα ποσοστά πολυσπερμίας συγκριτικά με τη μέθοδο PZD, αύξησε την πιθανότητα εμφύτευσης στις περιπτώσεις σοβαρής τερατοζωοσπερμίας, αύξησε το ποσοστό γονιμοποίησης ανά ασθενή και ανά ωάριο σε περιπτώσεις που υπήρχαν προηγούμενες αποτυχίες με τη μέθοδο IVF, όπως επίσης και τα ποσοστά γονιμοποίησης όταν υπήρχαν πολύ λίγα σπερματοζωάρια διαθέσιμα (Fishel *et al.* 1994). Αντιθέτως, η τεχνική αυτή αύξησε τις επιπτώσεις στις κυτταροπλασματικές κατατμήσεις (Fishel *et al.* 1994).

1.5 Μέθοδος ICSI

Παρά την ποικίλη επιτυχία που είχαν όλες οι προηγούμενες μέθοδοι μικροχειρισμού γαμετών (ZD, PZD, SUZI και HIC-IVF) στη θεραπεία του ανδρικού παράγοντα όλες υπέφεραν από αρκετά σοβαρά μειονεκτήματα: 1) είναι δύσκολο να προβλεφθεί εκ των προτέρων ποια τεχνική θα είναι η ιδανικότερη για τον κάθε ασθενή, 2) τα ποσοστά γονιμοποίησης και πολυσπερμίας ποικίλουν και είναι απρόβλεπτα και 3) κάποιοι ασθενείς εξακολουθούν να παραμένουν αθεράπευτοι σε όλες αυτές τις μεθόδους θεραπείας (Payne *et al.* 1994).

Η ενδοπλασματική έγχυση σπερματοζωαρίου (ICSI) αντικατέστησε σταδιακά όλες τις άλλες μεθόδους μικροχειρισμού γαμετών, ώστε να ξεπεράσει τον σοβαρό ανδρικό παράγοντα υπογονιμότητας και αναδείχθηκε σε σύντομο χρονικό διάστημα μία διαδικασία ρουτίνας σε πολλά προγράμματα εξωσωματικής γονιμοποίησης (Kastrop *et al.* 1999). Η πρώτη αναφορά για επίτευξη εγκυμοσύνης σε ανθρώπους με την τεχνική ICSI έγινε από τον Palermo το 1992. Έκτοτε η τεχνική αυτή εφαρμόζεται

παγκοσμίως και έχει αποδειχθεί ότι εξασφαλίζει υψηλά ποσοστά γονιμοποίησης και εγκυμοσύνης (Kastrop *et al.* 1999).

Η τεχνική ICSI αποτελεί την επόμενη γραμμή θεραπείας για ασθενείς που είχαν πλήρη αποτυχία γονιμοποίησης (Aboulghar *et al.* 1996b) μετά από την εφαρμογή IVF ή άλλων τεχνικών υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, όπως ZD, PZD ή SUZI και αποτελεί επαναστατική θεραπεία για την υπογονιμότητα που οφείλεται σε ανδρικό παράγοντα (Joris *et al.* 1998). Με τη μέθοδο αυτή ένα σπερματοζώαριο εγχύεται μέσα σε ένα ωάριο μετάφασης II με τη βοήθεια μικροπιπέττας.

Παρόλο που η τεχνική της μικρογονιμοποίησης μπορεί να ξεπεράσει την αποτυχία γονιμοποίησης που οφείλεται σε σοβαρό ανδρικό παράγοντα, παραμένει αμφιλεγόμενο αν είναι αποτελεσματική όταν η αποτυχία προκύπτει από βλάβες του ωαρίου (Benadiva *et al.* 1999).

Στην τεχνική ICSI, μετά την ωοληψία, τα ωάρια καθαρίζονται από τα κοκκώδη κύτταρα με τη βοήθεια του ενζύμου υαλουρονιδάση και μετά από δύο ώρες παραμονής τους στον κλίβανο γονιμοποιούνται μόνο τα MII ωάρια. Με τη χρήση της πιπέττας holding συγκρατείται το ωάριο και με τη μικροπιπέττα ICSI, αφού ακινητοποιηθεί ένα σπερματοζώαριο, αναρροφάται και εγχύεται μέσα στο κυτταρόπλασμα του ωαρίου. Η παρουσία δύο προπυρήνων και δύο πολικών σωματίων ελέγχεται 16-18 ώρες μετά τη γονιμοποίηση.

Κατ' αυτόν τον τρόπο, η τεχνική της μικρογονιμοποίησης παρακάμπτει όλα τα στάδια της γονιμοποιητικής διαδικασίας, όπως για παράδειγμα την πρόσδεση του σπερματοζωαρίου στη διάφανη ζώνη και τη διείσδυσή του στο εσωτερικό του ωαρίου (Palermo *et al.* 1992). Ωστόσο, θα μπορούσε να προκαλέσει μηχανική καταστροφή του ωαρίου ή ακόμα να επηρεάσει την αναπτυξιακή πορεία των γονιμοποιημένων ωαρίων (Palermo *et al.* 1992).

Από τις πλέον βασικές εξετάσεις που γίνονται για τον έλεγχο της γονιμότητας του άνδρα αποτελεί η εξέταση σπέρματος. Μια τυπική ανάλυση σπέρματος περιλαμβάνει την εκτίμηση συγκεκριμένων παραμέτρων, όπως συγκέντρωση, όγκο, κινητικότητα, μορφολογία, ρευστότητα-ιξώδες, καθώς και ποσοτικοποίηση και αναγνώριση μη σπερματικών κυττάρων και ανίχνευση αντισπερματικών αντισωμάτων. Στον Πίνακα 1 που ακολουθεί καταγράφονται οι τιμές αναφοράς

(reference values) των παραμέτρων ενός δείγματος σπέρματος σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας.

Πίνακας 1. Φυσιολογικές τιμές των παραμέτρων του σπέρματος σύμφωνα με τον ΠΟΥ.

| Παράμετροι | Φυσιολογικές τιμές |
|------------------------------|-----------------------|
| Όγκος | >2ml<6ml |
| Ρευστοποίηση | 15-60 λεπτά |
| pH | 7.2-8 |
| Συγκέντρωση | >20εκ/ml |
| Ολικός αριθμός | >40εκ/εκσπερμάτιση |
| Ταχεία προωθητική κίνηση (a) | a>25% ή (a+b)>50% |
| Λευκά αιμοσφαίρια | <1εκ/ml |
| Φυσιολογική μορφολογία | >30% |
| Ζωντανά | >75% |
| Συγκολλήσεις | <20% |
| α-γλυκοσιδάση | >20mU/εκσπερμάτιση |
| Φρουκτόζη | >13μmole/εκσπερμάτιση |

Με βάση τις τιμές των παραμέτρων ενός δείγματος, το σπέρμα μπορεί να χαρακτηριστεί ως εξής:

- Φυσιολογικό όταν οι τιμές των παραμέτρων κυμαίνονται εντός των φυσιολογικών ορίων σύμφωνα με τον ΠΟΥ
- Ολιγοζωοσπερμία όταν η συγκέντρωση είναι μικρότερη από 20εκ/ml
- Ασθενοζωοσπερμία όταν η ταχεία προωθητική και βραδεία κίνηση (a+b) είναι μικρότερη από 50%
- Τερατοζωοσπερμία όταν η φυσιολογική μορφολογία των σπερματοζωαρίων είναι χαμηλότερη από 30%
- ΟΤΑ (ολιγο-τερατο-ασθενοζωοσπερμία) όταν συντρέχουν και οι τρεις παραπάνω παράγοντες
- Αζωοσπερμία στην περίπτωση ανυπαρξίας σπερματοζωαρίων στο σπερματικό πλάσμα
- Ασπερμία στην περίπτωση ανυπαρξίας σπερματικού πλάσματος (υποψία παλίνδρομης εκσπερμάτισης)

2. Σύγκριση IVF και ICSI σε συγκεκριμένα περιστατικά

2.1 Σαλπινγικός παράγοντας

Στο 30-50% των γυναικών με πρόβλημα στειρότητας ο έλεγχος τελικά αποδεικνύει βλάβη στις σάλπιγγες. Οι βασικές αιτίες της σαλπινγικής βλάβης είναι οι εξής:

- φλεγμονή των γεννητικών οργάνων (σεξουαλικά μεταδιδόμενα νοσήματα, σηπτική έκτρωση, ρήξη σκωληκοειδούς σε φλεγμονή, ενδομητρικό σπείραμα, αριθμός σεξουαλικών συντρόφων)
- χειρουργικές επεμβάσεις στην πύελο
- ενδομητρίωση
- κάπνισμα

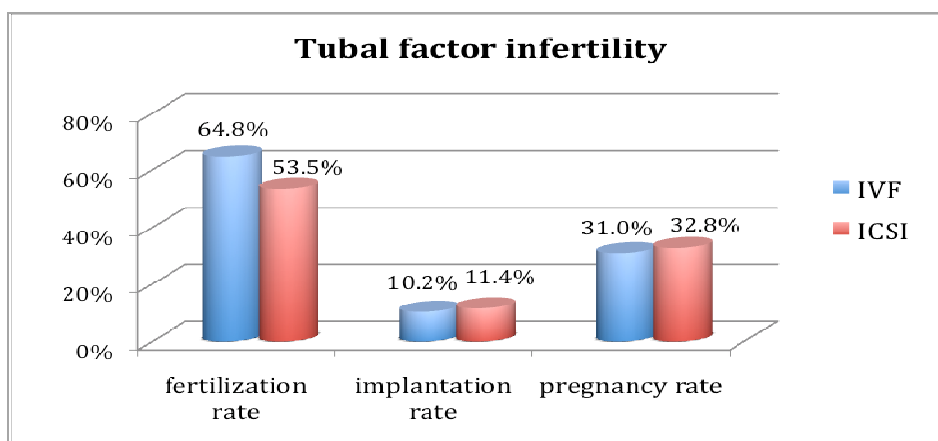
Αποτέλεσμα των παραπάνω μπορεί να είναι η απόφραξη ή διαταραχή της λειτουργικότητας των σαλπίγγων είτε λόγω συμφύσεων είτε λόγω πάχυνσης του τοιχώματος ή και καταστροφής του επιθηλίου τους.

Η μέθοδος IVF προσφέρεται ως πρώτη γραμμή θεραπείας σε πολλά ζευγάρια που υποφέρουν από σαλπινγικό παράγοντα υπογονιμότητας όταν το σπέρμα είναι φυσιολογικό. Αυτό έχει επιβεβαιωθεί με αρκετές μελέτες μία εκ των οποίων είναι αυτή του Aboulghar και άλλων, στην οποία συμμετείχαν 116 ασθενείς με σαλπινγικό παράγοντα υπογονιμότητας και φυσιολογικές παραμέτρους σπέρματος (Aboulghar *et al.* 1996a). Οι ασθενείς χωρίστηκαν τυχαία σε δύο ομάδες. Η πρώτη ομάδα ασθενών υποβλήθηκε στην τεχνική της απλής IVF και η δεύτερη στη μέθοδο ICSI.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το ποσοστό γονιμοποίησης ήταν σημαντικά υψηλότερο στην ομάδα IVF (64.8%) σε σχέση με το αντίστοιχο ποσοστό της ομάδας ICSI (53.5%), όπως φαίνεται στην Εικόνα 2. Μία πιθανή εξήγηση για το χαμηλότερο ποσοστό γονιμοποίησης στην τεχνική ICSI αποτελεί το γεγονός ότι στη μικρογονιμοποίηση τα ωάρια καθαρίζονται από τα κύτταρα της κοκκώδους στοιβάδας και μόνο αυτά τα οποία βρίσκονται στη Μετάφαση II υποβάλλονται στη διαδικασία. Στην κλασική IVF δεν προηγείται καθαρισμός των ωαρίων, αλλά αφήνονται στην καλλιέργεια για φυσιολογική γονιμοποίηση και είναι πιθανό ότι ένα

ποσοστό Μετάφασης I ωαρίων να ωριμάσουν σε Μετάφαση II ωάρια και να γονιμοποιηθούν.

Αντιθέτως, δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά στο ποσοστό εμφύτευσης, εγκυμοσύνης και αποβολής μεταξύ των δύο ομάδων. Για τους λόγους αυτούς δεν προτείνεται η εφαρμογή της επεμβατικής τεχνικής ICSI σε περιπτώσεις ασθενών με φυσιολογικό σπέρμα και σαλπινγικό παράγοντα υπογονιμότητας.



Εικόνα 2. Ποσοστά γονιμοποίησης, εμφύτευσης και εγκυμοσύνης μετά από IVF και ICSI σε ασθενείς με σαλπινγικό παράγοντα υπογονιμότητας και φυσιολογικό σπέρμα (τροποποίηση από Aboulghar *et al.* 1996a).

2.2 Ανεξήγητη υπογονιμότητα

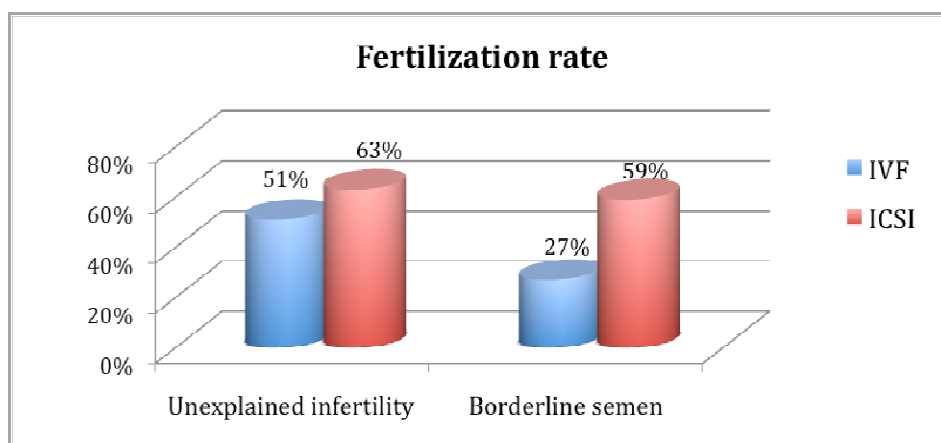
Η ανεξήγητη υπογονιμότητα δίνεται σε όλα τα ζευγάρια των οποίων η αιτιολογία της υπογονιμότητας παραμένει άγνωστη. Έχει αποδοθεί σε τρεις βασικούς αιτιολογικούς παράγοντες: υποβόσκουσα ανδρική υπογονιμότητα (π.χ. φυσιολογικό σπέρμα μετά από ανάλυση αλλά αδυναμία γονιμοποίησης ωαρίου), ωαρικός παράγοντας (π.χ. χοντρή διαφανής ζώνη ή προβλήματα που σχετίζονται με τα μιτοχόνδρια ή με το σχηματισμό μιτωτικής ατράκτου) ή δυσλειτουργία του ενδομητρίου (π.χ. υποδεκτικότητα του ενδομητρίου) (Shveiky *et al.* 2006).

Η διάγνωση της ανεξήγητης υπογονιμότητας τίθεται εξ' αποκλεισμού. Πιο συγκεκριμένα, βασίζεται σε μία φυσιολογική ανάλυση σπέρματος με βάση τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, ύπαρξη τακτικής εμμήνου ρύσεως (μέτρηση προγεστερόνης την 21^η μέρα του κύκλου), φυσιολογική μήτρα και σάλπιγγες μετά από υστεροσαλπιγγογραφία και λαπαροσκόπηση και απουσία ανοσολογικού παράγοντα.

Πρώτη γραμμή θεραπείας για την ανεξήγητη υπογονιμότητα χρησιμοποιείται η κλασική IVF, καθώς δεν έχει διαπιστωθεί μέσα από μελέτες η υπεροχή της τεχνικής της μικρογονιμοποίησης ως προς τα ποσοστά γονιμοποίησης.

Στην προοπτική μελέτη του Aboulghar και άλλων συγκρίθηκαν οι τεχνικές IVF και ICSI σε δύο κατηγορίες ασθενών: ομάδα Α (22 ασθενείς) με ανεξήγητη υπογονιμότητα και ομάδα Β (24 ασθενείς) με οριακές τιμές παραμέτρων σπέρματος (Aboulghar *et al.* 1996b). Και στις δύο κατηγορίες, τα μισά ωάρια των ασθενών υπεβλήθησαν στην τεχνική ICSI και τα άλλα μισά στην απλή IVF.

Στην ομάδα των ασθενών με ανεξήγητη υπογονιμότητα δεν βρέθηκε σημαντική διαφορά στο ποσοστό γονιμοποίησης (ICSI 63% έναντι IVF 51%), ενώ στην ομάδα με οριακές τιμές παραμέτρων σπέρματος καταγράφηκε σημαντική διαφορά μεταξύ του ποσοστού γονιμοποίησης ωαρίων με ICSI (59%) και IVF (27%), όπως φαίνεται και στην Εικόνα 3 που ακολουθεί. Αυτή η μελέτη έδειξε ότι το 23% των ασθενών με ανεξήγητη υπογονιμότητα και το 46% με μη φυσιολογικό σπέρμα θα είχαν χάσει τελείως την πιθανότητα εμβρυομεταφοράς εξαιτίας της αποτυχίας γονιμοποίησης αν η τεχνική ICSI δεν είχε εφαρμοστεί σε ορισμένα ωάρια αυτού του κύκλου.



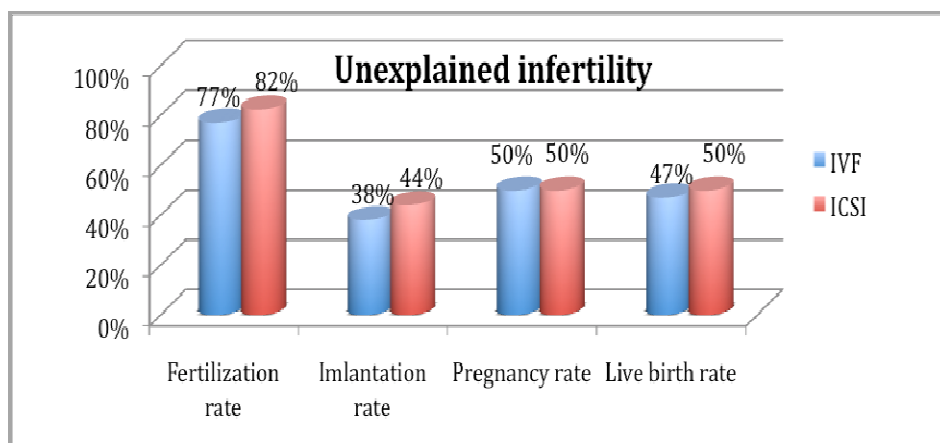
Εικόνα 3. Ποσοστό γονιμοποίησης με ICSI και IVF στην ανεξήγητη υπογονιμότητα και στο μη φυσιολογικό σπέρμα (τροποποίηση από Aboulghar *et al.* 1996b).

Ωστόσο, η εφαρμογή της τεχνικής ICSI έχει ορισμένα μειονεκτήματα. Συμπεριλαμβάνει υψηλότερο κόστος, περισσότερες τεχνικές δυσκολίες, μη διαθεσιμότητα της τεχνικής σε κάποια κέντρα εξωσωματικής, ενέχει πιθανώς μακροπρόθεσμες επιπλοκές και σε ορισμένες περιπτώσεις αποτελεί μία μη απαραίτητη επεμβατική τεχνική (Aboulghar *et al.* 1996b).

Σε παρόμοια αποτελέσματα κατέληξε και η έρευνα των Jaroudi και άλλων που σύγκριναν τα ποσοστά γονιμοποίησης στην ανεξήγητη υπογονιμότητα μεταξύ των τεχνικών ICSI και κλασικής IVF σε 199 ασθενείς (Jaroudi *et al.* 2003). Όταν υπήρχαν τουλάχιστον 6 ωάρια σε κάθε κύκλο, τότε τα μισά από αυτά υποβάλλονταν στην τεχνική IVF και τα άλλα μισά στην τεχνική ICSI (splitting). Το ποσοστό γονιμοποίησης που καταγράφηκε ήταν παρόμοιο και για τις δύο τεχνικές (62% με την ICSI και 61% με IVF).

Παρόλα αυτά, η ίδια μελέτη προτείνει την εφαρμογή της ICSI σε επίπεδο ρουτίνας όταν συνυπάρχει ανεξήγητη υπογονιμότητα με πτωχή απόκριση ωοθηκών. Προκειμένου να διαπιστωθεί αυτό στην ίδια έρευνα, όταν υπήρχαν λιγότερα από 6 ωάρια διαθέσιμα ανά κύκλο (poor responders), τότε αυτά υποβάλλονταν σε μία μόνο από τις δύο τεχνικές. Τα αποτελέσματα στις πτωχές απαντήτριες έδειξαν ότι η κλασική IVF κατέληξε σε ένα αποδεκτό ποσοστό γονιμοποίησης (53%) έναντι 61% με ICSI, αλλά υπήρχε 34% ποσοστό πλήρους αποτυχίας γονιμοποίησης. Επιπλέον τα ποσοστά εγκυμοσύνης ήταν καλύτερα στους κύκλους ICSI.

Αντίστοιχη μελέτη το 2006 (Short Communication 2006) πραγματοποιήθηκε σε 60 ασθενείς με ανεξήγητη υπογονιμότητα και τυχαιοποιημένα ισομοιράστηκαν μεταξύ των δύο μεθόδων, IVF και ICSI. Καμία στατιστική διαφορά δεν παρατηρήθηκε ως προς το ποσοστό γονιμοποίησης, εμφύτευσης, κλινικής εγκυμοσύνης, ή ως προς το ποσοστό γέννησης ζώντος νεογνού (Εικόνα 4). Επιπλέον δεν υπήρχε σημαντική διαφορά στην ποιότητα των εμβρύων μεταξύ των δύο ομάδων. Ωστόσο, υπήρχαν 2 περιπτώσεις αποτυχίας γονιμοποίησης με τη μέθοδο IVF (6.7%) και καμία αποτυχία γονιμοποίησης στην ομάδα του ICSI.



Εικόνα 4. Ποσοστά γονιμοποίησης, εμφύτευσης, κλινικής εγκυμοσύνης και γέννησης ζώντος νεογνού μετά από IVF και ICSI (τροποποίηση από Short Communication 2006).

2.3 Ανδρικός παράγοντας

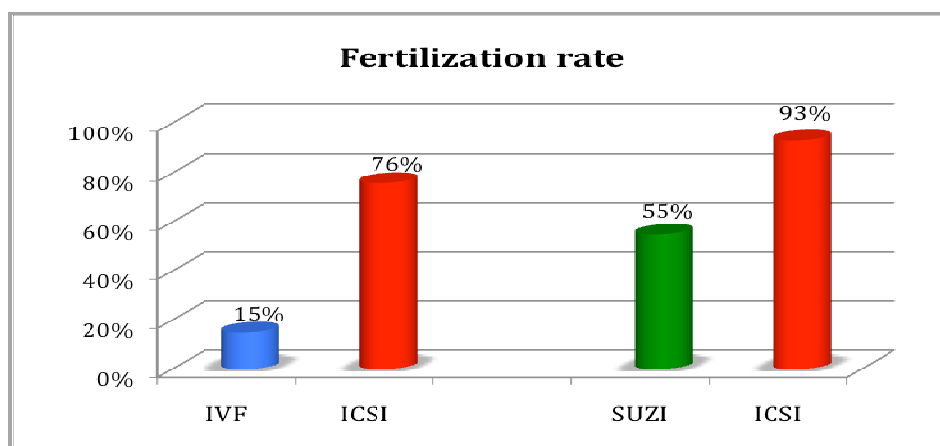
Πολλά ζευγάρια που πάσχουν από ανδρικό παράγοντα υπογονιμότητας δεν θα μπορούσαν να βοηθηθούν με την κλασική IVF, ακόμη και μετά από γονιμοποίηση με υψηλό αριθμό κινητών σπερματοζωαρίων HIC-IVF (Calderón *et al.* 1995). Όταν τα ζευγάρια αποτυγχάνουν να γονιμοποιηθούν επανειλημμένα με την κλασική IVF, τότε η τελευταία εναλλακτική για αυτά τα ζευγάρια είναι η υιοθεσία ενός παιδιού ή η χρήση της τεχνολογίας υποβοηθούμενης αναπαραγωγής με σπέρμα δότη. Στις περιπτώσεις αυτές η τεχνική ICSI φαίνεται να αποτελεί την καλύτερη θεραπεία αντιμετώπισης του ανδρικού παράγοντα (Calderón *et al.* 1995).

Στα προγράμματα υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, η επιλογή της μεθόδου θεραπείας (IVF ή ICSI) γίνεται έπειτα από εκτίμηση του ανδρικού παράγοντα υπογονιμότητας ή λαμβάνοντας υπόψιν τα αποτελέσματα των προηγούμενων προσπαθειών με IVF (Plachot *et al.* 2002). Δεν υπάρχουν ευρέως αποδεκτά κριτήρια, γι' αυτό οι αποφάσεις για τα ζευγάρια με ανδρική υπογονιμότητα είναι συνήθως εμπειρικές και μπορεί να οδηγήσουν σε πλήρη αποτυχία γονιμοποίησης μετά από IVF, ή στη μη απαραίτητη χρήση της ICSI (Plachot *et al.* 2002). Επιπλέον η τεχνική της μικρογονιμοποίησης είναι χρονοβόρα, ακριβή και η ασφάλειά της είναι ακόμα υπό διερεύνηση (Plachot *et al.* 2002).

Η αναγκαιότητα της εφαρμογής της τεχνικής ICSI στις περιπτώσεις ανδρικού παράγοντα υπογονιμότητας έχει διαπιστωθεί με μια σειρά μελετών που συγκρίνουν την τεχνική της μικρογονιμοποίησης με τις τεχνικές SUZI και IVF, με την τεχνική ICSI να δίνει εμφανώς υψηλότερα ποσοστά γονιμοποίησης.

Πιο συγκεκριμένα η μελέτη του Payne και άλλων έδειξε καθαρά την υπεροχή της τεχνικής ICSI έναντι της τεχνικής IVF και SUZI στον σοβαρό ανδρικό παράγοντα υπογονιμότητας (Payne *et al.* 1994). Τα μισά ζευγάρια από 18 ασθενείς με <20% φυσιολογική μορφολογία σπερματοζωαρίων, υπεβλήθησαν στην ενδοωαρική έγχυση σπερματοζωαρίου και τα άλλα μισά στην κλασική εξωσωματική (split). Το ποσοστό γονιμοποίησης με την τεχνική ICSI ήταν 76% έναντι 15% με την κλασική IVF (Εικόνα 5), υποδεικνύοντας ότι η τεχνική ICSI μπορεί να χρησιμοποιηθεί επιτυχώς στο 50% των ζευγαριών όταν αναμένεται αποτυχία γονιμοποίησης με την κλασική εξωσωματική.

Παρομοίως, 43 ασθενείς που δεν πέτυχαν εγκυμοσύνη με την τεχνική SUZI μετά από 55 κύκλους, είχαν εξαιρετικά αποτελέσματα μετά την εφαρμογή της ICSI. Το ποσοστό γονιμοποίησης με την τεχνική της μικρογονιμοποίησης ήταν 93% έναντι 55% με την τεχνική SUZI.



Εικόνα 5. Ποσοστό γονιμοποίησης σε ασθενείς με σοβαρό ανδρικό παράγοντα υπογονιμότητας μετά από IVF, SUZI και ICSI (τροποποίηση από Payne *et al.* 1994).

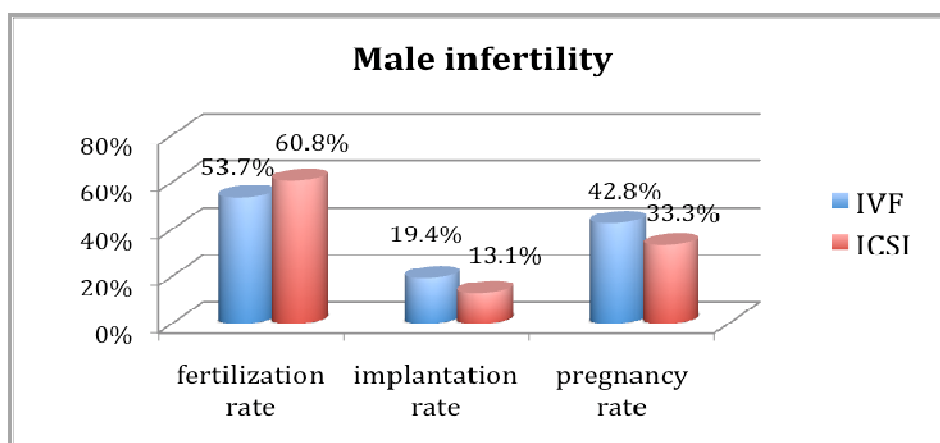
Επίσης, έχει αποδειχθεί το όφελος της τεχνικής της μικρογονιμοποίησης σε ζευγάρια που υποφέρουν από ανδρικό παράγοντα υπογονιμότητας σε σύγκριση με την κλασική IVF (Calderón *et al.* 1995). Σ' αυτήν την προοπτική και τυχαιοποιημένη μελέτη τα μισά ωάρια των 34 ασθενών που συμμετείχαν, υπεβλήθησαν στην απλή IVF και τα άλλα μισά στην τεχνική ICSI (split). Το συνολικό ποσοστό γονιμοποίησης με ICSI (49.5%) ήταν υψηλότερο από το αντίστοιχο ποσοστό με IVF (19.5%).

Επιπλέον, η τεχνική ICSI αποτελεί τη μέθοδο επιλογής στις περιπτώσεις ήπιας oligo-ασθενο-τερατοζωοσπερμίας, ενώ η γυναικεία υπογονιμότητα φαίνεται ορισμένες φορές να είναι ο περιοριστικός παράγοντας για την εμφύτευση του εμβρύου και την περαιτέρω ανάπτυξή του (Plachot *et al.* 2002). Ακόμη, έχει προταθεί η εφαρμογή της IVF και της ICSI σε ισοκατανεμημένα ωάρια (splitting oocytes) στον πρώτο κύκλο των ζευγαριών με μέτρια ποιότητα σπερματοζωαρίων, καθώς μειώνεται ο κίνδυνος ακύρωσης εμβρυομεταφοράς σε σχέση με την εφαρμογή μόνο της IVF, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε πλήρη αποτυχία γονιμοποίησης (Plachot *et al.* 2002).

Αυτό διαπιστώθηκε, όταν τα μισά ωάρια των 58 ζευγαριών με ανδρική υπογονιμότητα και ήπια oligo-ασθενο-τερατοζωοσπερμία υπεβλήθησαν σε κλασική IVF και τα άλλα μισά σε ICSI (Plachot *et al.* 2002). Το 32.8% των πρώτων κύκλων IVF/ICSI κατέληξε σε γονιμοποίηση μόνο με την τεχνική ICSI ενώ κανένα ωάριο δεν

γονιμοποιήθηκε με την τεχνική IVF. Το ποσοστό γονιμοποίησης με ICSI ήταν 61.5% και το ποσοστό εγκυμοσύνης 42.1%. Οι μεταγενέστεροι κύκλοι που ακολούθησαν τα ζευγάρια αυτά ήταν με την μέθοδο της μικρογονιμοποίησης.

Στο 67.2% των πρώτων κύκλων εξωσωματικής επιτεύχθηκε γονιμοποίηση και με τις δύο τεχνικές (IVF και ICSI). Σε αυτήν την περίπτωση ο αριθμός των σπερματοζωαρίων και η κινητικότητα τους ήταν λίγο καλύτερη συγκριτικά με την ομάδα των ζευγαριών που πέτυχε γονιμοποίηση μόνο με την τεχνική ICSI, αλλά η διαφορά αυτή δεν ήταν σημαντική. Συνολικά, καμία σημαντική διαφορά δεν παρατηρήθηκε μεταξύ των δύο τεχνικών ως προς το ποσοστό γονιμοποίησης, εμφύτευσης και εγκυμοσύνης (Εικόνα 6). Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε στους μεταγενέστερους κύκλους (IVF ή ICSI) επιλέχθηκε με βάση τα αποτελέσματα του πρώτου κύκλου, λαμβάνοντας υπόψιν τα συνήθη κριτήρια: αριθμός γονιμοποιημένων ωαρίων, μορφολογία εμβρύου, αριθμός βλαστομεριδίων και ποιότητα σπέρματος την ημέρα της ωοληψίας.



Εικόνα 6. Ποσοστά γονιμοποίησης, εμφύτευσης και εγκυμοσύνης μετά την εφαρμογή IVF και ICSI σε ζευγάρια με ανδρική υπογονιμότητα (τροποποίηση από Plachot *et al.* 2002).

2.4 Μη ανδρικός παράγοντας

Η θεραπεία του μη ανδρικού παράγοντα με την τεχνική IVF μπορεί να εξαρτάται από την αιτία της υπογονιμότητας, καταλήγοντας σε γονιμοποίηση από 50 έως 70% των ωαρίων (Omland *et al.* 2006). Οι μελέτες που συγκρίνουν τις δύο τεχνικές, IVF και ICSI, ως προς τον συγκεκριμένο παράγοντα καταλήγουν σε διφορούμενα αποτελέσματα.

Από τη μία πλευρά, υποστηρίζεται ότι η τεχνική ICSI δεν προσφέρει κανένα πλεονέκτημα έναντι της απλής IVF όσον αφορά στα κλινικά αποτελέσματα, στις περιπτώσεις μη ανδρικού παράγοντα. Επιπλέον, λόγω της επεμβατικότητας που ενέχει η τεχνική της μικρογονιμοποίησης, ενδείκνυται μόνο για προβλήματα που οφείλονται σε σοβαρό ανδρικό παράγοντα, ενώ η τεχνική IVF είναι λιγότερο απαιτητική όσον αφορά στην εξειδίκευση και στον εξοπλισμό και πιο οικονομική ως προς τον χρόνο του εργαστηρίου (Bhattacharya *et al.* 2001).

Αντιθέτως, κάποιοι άλλοι ισχυρίζονται ότι η τεχνική ICSI δίνει καλύτερα ποσοστά γονιμοποίησης και καλύτερης ποιότητας έμβρυα. Επιπλέον, προτείνεται ότι ανεξαρτήτως της αιτίας υπογονιμότητας (με εξαίρεση τον ανδρικό παράγοντα), η επιτυχία της IVF είναι πιο σίγουρη εάν τα μισά ωάρια υποβάλλονταν σε ICSI (Khamsi *et al.* 2001) .

Ειδικότερα, οι Bhattacharya και άλλοι σύγκριναν τις τεχνικές IVF και ICSI ως προς τη θεραπεία της υπογονιμότητας που δεν οφείλονταν στον ανδρικό παράγοντα (Bhattacharya *et al.* 2001). Στη μελέτη αυτή συμμετείχαν 415 ζευγάρια των οποίων η αιτία της υπογονιμότητας ήταν ο σαλπινγικός παράγοντας, η ανεξήγητη υπογονιμότητα, η ενδομητρίωση, οι διαταραχές ωοθυλακιορρηξίας και ο ήπιος ανδρικός παράγοντας, ενώ αποκλείστηκαν οι περιπτώσεις όπου υπήρχε σοβαρός ανδρικός παράγοντας.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το ποσοστό γονιμοποίησης ανά ανακτώμενο ωάριο ήταν σημαντικά μεγαλύτερο μετά από IVF σε σχέση μετά από ICSI (58% έναντι 47%). Επιπλέον το ποσοστό εμφύτευσης με IVF ήταν υψηλότερο σε σχέση με αυτό που επιτεύχθηκε με ICSI (30% έναντι 22%). Τέλος το ποσοστό εγκυμοσύνης ήταν ελαφρώς μεγαλύτερο μετά από IVF. Παρόλα αυτά δεν σημειώθηκε καμία διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων ως προς το ρυθμό διαίρεσης ή την αξιολόγηση των εμβρύων.

Από την ανάλυση των υποομάδων των ζευγαριών με ανεξήγητη υπογονιμότητα δε σημειώθηκε καμία διαφορά στα ποσοστά εγκυμοσύνης (IVF 32% και ICSI 38%), ενώ τα ποσοστά γονιμοποίησης ήταν μεγαλύτερα μετά από IVF (61%) από ότι μετά από ICSI (50%).

Τα ζευγάρια που είχαν διαγνωστεί με ήπιο ανδρικό παράγοντα παρουσίασαν ποσοστό εγκυμοσύνης 26% μετά από IVF και 22% μετά από ICSI. Το ποσοστό γονιμοποίησης ήταν και για τα δύο γκρουπ 55%.

Την ίδια χρονιά οι Khamsi και άλλοι μελέτησαν το ποσοστό γονιμοποίησης και την ποιότητα των εμβρύων σε 35 ασθενείς με μη ανδρικό παράγοντα των οποίων τα μισά ωάρια των γυναικών υπεβλήθησαν στην τεχνική IVF και τα άλλα μισά στην τεχνική ICSI (Khamsi *et al.* 2001). Η μελέτη αυτή κατέληξε σε ακριβώς αντίθετα αποτελέσματα από την προηγούμενη. Η διαφορά στο ποσοστό γονιμοποίησης μεταξύ της απλής IVF (57.2%) και της ICSI (71.3%) ήταν στατιστικά σημαντική. Επιπλέον, μετά την IVF προέκυψαν 47.1% καλής ποιότητας έμβρυα, ενώ από την ICSI 64.4% καλής ποιότητας έμβρυα.

2.5 Προηγούμενη αποτυχία γονιμοποίησης με IVF

Η αποτυχία γονιμοποίησης με την κλασική IVF ή το χαμηλό ποσοστό γονιμοποίησης (20%) σε προηγούμενους κύκλους IVF με φαινομενικά φυσιολογικό σπέρμα μπορεί να οφείλεται σε κάποια δυσλειτουργία του ωαρίου ή σε κάποιον ήπιο ανδρικό παράγοντα υπογονιμότητας. Επίσης, η αποτυχία γονιμοποίησης μπορεί να εξηγηθεί από την αδυναμία διείσδυσης του σπερματοζωαρίου στη διάφανη ζώνη και της ενεργοποίησης του ωαρίου.

Αρχικά, χρησιμοποιούνταν οι μέθοδοι PZD και SUZI προκειμένου να ξεπεραστούν τα χαμηλά ποσοστά γονιμοποίησης. Όμως οι τεχνικές αυτές είχαν μικρή επιτυχία και οδηγούσαν σε υψηλά ποσοστά πολυσπερμίας. Καθώς η τεχνική της μικρογονιμοποίησης επιτυγχάνει υψηλά ποσοστά γονιμοποίησης ακόμη και όταν η ποιότητα των σπερματοζωαρίων είναι εξαιρετικά χαμηλή, έχει καθιερωθεί ως θεραπεία όταν προηγούνται αποτυχίες γονιμοποίησης με την κλασική IVF. Ωστόσο, παραμένει αμφιλεγόμενο εάν είναι αποτελεσματική όταν η αποτυχία γονιμοποίησης απορρέει από ωαρική δυσλειτουργία.

Η μέθοδος ICSI φαίνεται να αποτελεί μια αποτελεσματική θεραπεία μετά από αποτυχία γονιμοποίησης με IVF στην ανεξήγητη υπογονιμότητα αλλά και στην υπογονιμότητα που οφείλεται σε στάδιο I ενδομητρίωση (Omland *et al.* 2006). Σε

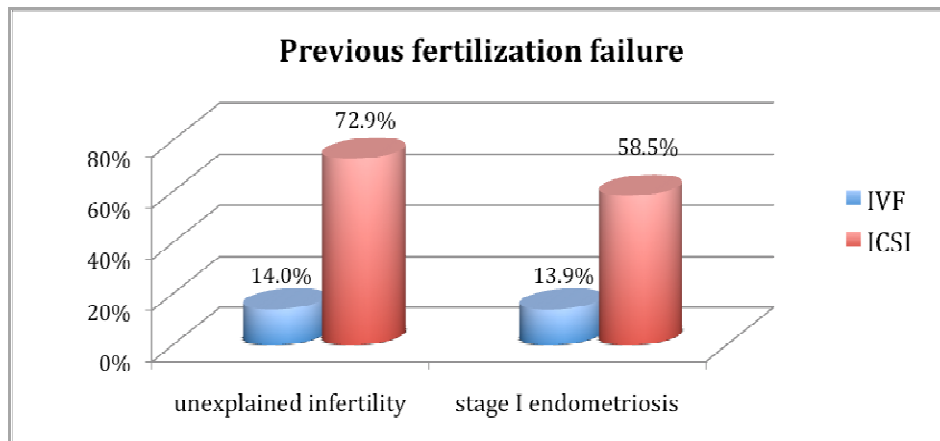
αυτήν την μελέτη οι δύο ομάδες ασθενών μετά από τουλάχιστον ένα κύκλο IVF με λιγότερο από 20% διπλοειδή γονιμοποιημένα ωάρια και φυσιολογικό σπέρμα υπεβλήθησαν σε ICSI.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι και οι δύο ομάδες ασθενών βελτίωσαν τα ποσοστά γονιμοποίησής τους με τη μέθοδο ICSI συγκρινόμενα με τα αντίστοιχα ποσοστά της IVF (Εικόνα 7). Ωστόσο, τα ποσοστά γονιμοποίησης στην ομάδα με ενδομητρίωση (43 ασθενείς) ήταν σημαντικά χαμηλότερα σε σχέση με αυτά της ομάδας με ανεξήγητη υπογονιμότητα (48 ασθενείς), παρόλο που η τελευταία ομάδα εμφάνισε μεγαλύτερο ποσοστό αποτυχίας γονιμοποίησης στον κύκλο με IVF (75% έναντι 48.8%).

Στην κλασική IVF, δεν υπάρχει επιλογή των ωαρίων που θα γονιμοποιηθούν. Όταν εφαρμόζεται η τεχνική ICSI, τα ωάρια απογυμνώνονται από τα κοκκώδη κύτταρα πριν την έγχυση του σπερματοζωαρίου, επιτρέποντας μια πιο λεπτομερή εξέταση του ωαρίου σε σχέση με την IVF. Έτσι, η μείωση στο ποσοστό γονιμοποίησης μετά από εφαρμογή IVF, μπορεί να οφείλεται στο ότι τα ωάρια δεν βρίσκονται στο στάδιο MII. Κάτι τέτοιο δεν μπορεί να συμβεί στην τεχνική ICSI, καθώς μόνο τα ωάρια MII υποβάλλονται στη διαδικασία της μικρογονιμοποίησης.

Καθώς η μικρογονιμοποίηση καταλήγει σε υψηλά ποσοστά γονιμοποίησης ακόμα και με σπέρμα χαμηλής ποιότητας, το ICSI μπορεί επίσης να αποκαλύπτει έναν μικρό ανδρικό παράγοντα υπογονιμότητας αυξάνοντας τα ποσοστά γονιμοποίησης στα ζευγάρια με μη ανδρικό παράγοντα. Έτσι, τα παραπάνω αποτελέσματα οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι ίσως υπάρχει κάποιος ανδρικής αιτιολογίας παράγοντας που ξεπερνιέται με την μικρογονιμοποίηση.

Η συμμετοχή ενός ωαρικού παράγοντα που προκαλεί χαμηλό ποσοστό γονιμοποίησης είναι πιο πιθανή στην ομάδα με ενδομητρίωση σε σύγκριση με την ομάδα της ανεξήγητης υπογονιμότητας. Άλλωστε η σχέση μεταξύ της ενδομητρίωσης και της υπογονιμότητας είναι περίπλοκη. Η φτωχή ποιότητα ωαρίων από γυναίκες με ενδομητρίωση έχει προταθεί ως πιθανή αιτία για τη χαμηλή ικανότητα γονιμοποίησης και εμφύτευσης και δεν μπορεί πιθανότατα να ξεπερασθεί με τη μικρογονιμοποίηση. Η μειωμένη ποιότητα ωαρίων ακόμα και στη χαμηλή περιτοναϊκή ενδομητρίωση τεκμηριώνεται από το χαμηλό ποσοστό γονιμοποίησης που προέκυψε σε αυτή τη μελέτη.

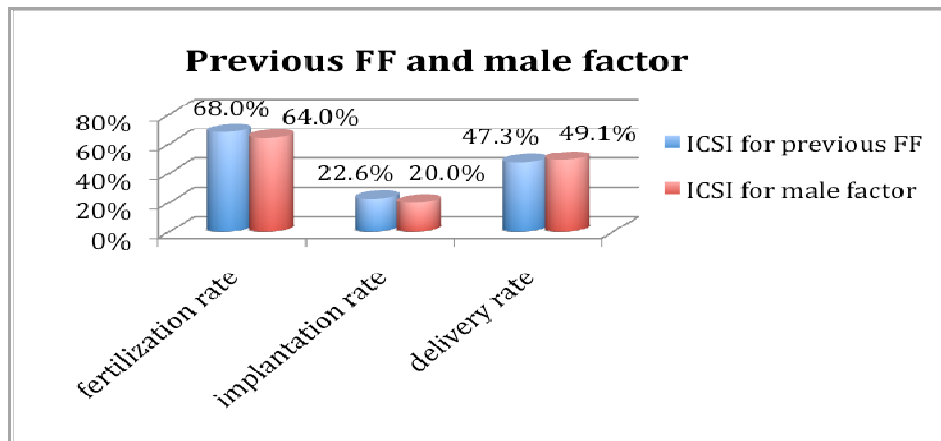


Εικόνα 7. Ποσοστά γονιμοποίησης μεταξύ των μεθόδων IVF και ICSI στην ανεξήγητη υπογονιμότητα και στο στάδιο I ενδομητρίωσης (τροποποίηση από Omland *et al.* 2006).

Παρόλα αυτά δεν σημειώθηκε καμία διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων όσον αφορά το ποσοστό εγκυμοσύνης (34.1% στην ανεξήγητη υπογονιμότητα έναντι 32.5% στην ενδομητρίωση) και το ποσοστό εμφύτευσης (26.3% στην ανεξήγητη υπογονιμότητα έναντι 29.9% στην ενδομητρίωση). Η εργασία αυτή καταλήγει στο συμπέρασμα ότι και οι δύο ομάδες επωφελούνται από την μικρογονιμοποίηση μετά από αποτυχία γονιμοποίησης με IVF.

Στο συμπέρασμα ότι η μικρογονιμοποίηση ξεπερνά την προηγούμενη αποτυχία γονιμοποίησης με IVF κατέληξε μία ακόμα έρευνα (Benadiva *et al.* 1999). Στη μελέτη αυτή, οι ασθενείς χωρίστηκαν σε δύο ομάδες. Το πρώτο γκρουπ περιελάμβανε 25 ζευγάρια με φυσιολογικές παραμέτρους σπέρματος που είχαν προηγούμενη αποτυχία γονιμοποίησης (<20%) με την IVF και η αιτία υπογονιμότητας ήταν η ενδομητρίωση, ο σαλπινγικός παράγοντας, η ανοωθυλακιορρηξία και ιδιοπαθή προβλήματα. Η δεύτερη ομάδα περιελάμβανε 87 ασθενείς με ανδρικό παράγοντα υπογονιμότητας. Και οι δύο ομάδες υπεβλήθησαν στην τεχνική ICSI.

Με την τεχνική ICSI επιτεύχθηκε γονιμοποίηση σε όλους τους ασθενείς που είχαν προηγούμενη αποτυχία γονιμοποίησης. Το ποσοστό γονιμοποίησης, εμφύτευσης και εγκυμοσύνης δεν διέφερε μεταξύ των δύο ομάδων (Εικόνα 8). Συνολικά, το 72% των ασθενών με προηγούμενη ανεξήγητη αποτυχία γονιμοποίησης είχαν μια επιτυχή εγκυμοσύνη μετά από μικρογονιμοποίηση. Επιπλέον, σε κανέναν από τους ασθενείς με προηγούμενη αποτυχία γονιμοποίησης με IVF δεν παρατηρήθηκε αποτυχία γονιμοποίησης μετά από ICSI.



Εικόνα 8. Σύγκριση αποτελεσμάτων ICSI μεταξύ ασθενών με προηγούμενη αποτυχία γονιμοποίησης με IVF και ασθενών με ανδρικό παράγοντα (τροποποίηση από Benadiva *et al.* 1999).

Στην πρώτη ομάδα υπήρχαν ασθενείς με πλήρη αποτυχία γονιμοποίησης (0%) στην πρώτη προσπάθεια με κλασική IVF και ασθενείς που είχαν ποσοστό γονιμοποίησης $\leq 20\%$ αλλά >0 . Μετά την εφαρμογή της ICSI δεν διαπιστώθηκαν διαφορές μεταξύ των δύο υπο-ομάδων, ως προς το ποσοστό γονιμοποίησης (69% έναντι 66%), εμφύτευσης (20.4% έναντι 25.8%) ή εγκυμοσύνης (45.4% έναντι 50%).

Οι ασθενείς που δεν έχουν κανένα γονιμοποιημένο ωάριο μετά από IVF μπορεί να έχουν ένα πιο βαθύ και λιγότερο εμφανές πρόβλημα στα ωάρια ή στο σπέρμα από ότι οι ασθενείς που έχουν $<20\%$ γονιμοποιημένα ωάρια. Με την ICSI έγινε εφικτό να ξεπερασθεί εξίσου η ιδιοπαθής ανώμαλη αλληλεπίδραση μεταξύ ωαρίου-σπερματοζωαρίου και στις δύο υπο-ομάδες ζευγαριών.

Συνοπτικά, η τεχνική της μικρογονιμοποίησης μπορεί να ξεπεράσει μια πιθανή ανωμαλία γαμετών που υποκρύπτεται είτε στο σπέρμα είτε στο ωάριο, επιτυγχάνοντας παρόμοια ποσοστά γονιμοποίησης, εμφύτευσης και εγκυμοσύνης με τα αντίστοιχα των ασθενών με μη φυσιολογικές παραμέτρους σπέρματος. Ασθενείς με ανεξήγητη αποτυχία γονιμοποίησης θα πρέπει να συμβουλευονται ότι ένας δεύτερος κύκλος με ICSI σχετίζεται με υψηλή πιθανότητα επιτυχίας.

Τα αποτελέσματα της παραπάνω μελέτης έρχονται σε αντίθεση με μία παρόμοια έρευνα που εξέτασε την τεχνική ICSI σε 258 ασθενείς με σοβαρό ανδρικό παράγοντα και σε 189 ζευγάρια που είχαν προηγούμενη αποτυχία γονιμοποίησης με IVF και φυσιολογικές παραμέτρους σπέρματος (Gabrielsen *et al.* 1996). Καταγράφηκε σημαντική διαφορά στα ποσοστά γονιμοποίησης και στο ρυθμό διαίρεσης των εμβρύων μεταξύ των δύο ομάδων ασθενών. Ο λόγος για τα πολύ

χαμηλά ποσοστά γονιμοποίησης και εμφύτευσης στην ομάδα με προηγούμενη αποτυχία γονιμοποίησης μπορεί να οφείλεται σε κάποιον παράγοντα του ωαρίου. Έτσι, η τεχνική της μικρογονιμοποίησης ίσως δεν μπορεί να ξεπεράσει τα προβλήματα των ζευγαριών με ανεξήγητη αποτυχία γονιμοποίησης μετά την εφαρμογή της κλασικής IVF, αφού σε αυτήν την ομάδα επιτεύχθηκε ποσοστό γονιμοποίησης 14% έναντι 45% για τη θεραπεία του ανδρικού παράγοντα με ICSI.

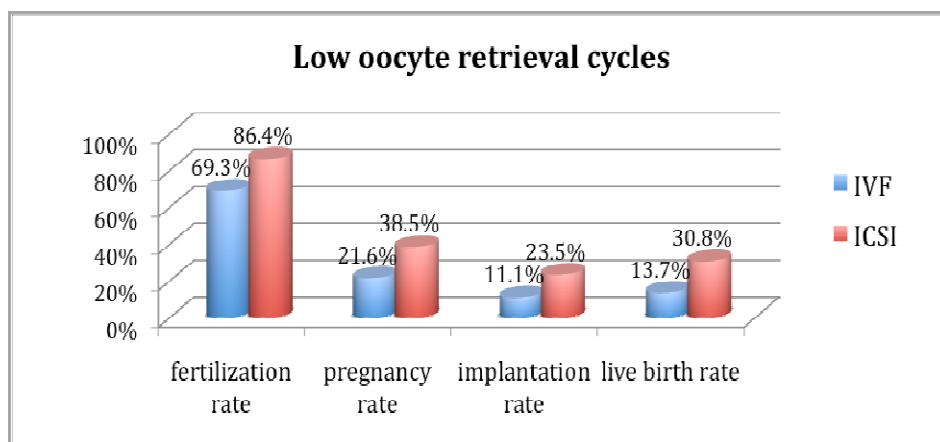
2.6 Μικρός αριθμός ωαρίων σε κύκλους ωοληψίας

Στην τεχνολογία της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής γίνονται σημαντικές προσπάθειες για διέγερση των ωοθηκών με εξωγενή χορήγηση γονδοτροφινών με απώτερο στόχο τη συλλογή μεγάλου αριθμού ωαρίων για IVF και τη δυνατότητα επιλογής του καλύτερου ποιοτικά εμβρύου για μεταφορά (Ou *et al.* 2010). Ωστόσο, διαφορετικές γυναίκες απαντούν διαφορετικά στην ωοθηκική διέγερση με γοναδοτροφίνες. Για το λόγο αυτό, στις ασθενείς που είναι πτωχές απαντήτριες προτείνεται η εφαρμογή της τεχνικής ICSI, ώστε να αποφευχθεί η αποτυχία γονιμοποίησης και η επακόλουθη έλλειψη εμβρύων για μεταφορά (Ou *et al.* 2010). Όμως παρόλο που ένα υποσύνολο του πληθυσμού μπορεί να επωφελούνταν από αυτήν την τεχνική, δεν έχει αποδειχθεί ότι είναι αποτελεσματική σε ζευγάρια των οποίων η υπογονιμότητα δεν οφείλεται σε ανδρικό παράγοντα (Ou *et al.* 2010).

Σε ζευγάρια με εξαιρετικά μικρό αριθμό ωαρίων (≤ 3) μετά από ωοληψία συγκρίθηκαν τα κλινικά αποτελέσματα μεταξύ των μεθόδων IVF και ICSI (Ou *et al.* 2010). Όσον αφορά τις παραμέτρους του σπέρματος, ήταν φυσιολογικές ή οριακές (borderline) σύμφωνα με τον ΠΟΥ και δεν υπήρχαν αντισπερμικά αντισώματα. Τα 211 ζευγάρια που συμπεριλήφθηκαν σ' αυτή τη μελέτη χωρίστηκαν σε δύο ομάδες, όπου στη μία εφαρμόστηκε η μέθοδος IVF και στην άλλη η μέθοδος ICSI.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το ποσοστό γονιμοποίησης ήταν σημαντικά υψηλότερο με την τεχνική της μικρογονιμοποίησης από ότι με την κλασική IVF (86.4% έναντι 69.3%). Το ποσοστό ακύρωσης κύκλου και η πλήρης αποτυχία γονιμοποίησης ήταν συγκρίσιμα μεταξύ των δύο ομάδων. Το ποσοστό εγκυμοσύνης και γέννησης ζώντος νεογνού ανά μεταφορά και το ποσοστό εμφύτευσης ήταν

μεγαλύτερα με την τεχνική ICSI σε σχέση με την IVF, αλλά δεν αποτελούν στατιστικά σημαντικές διαφορές (Εικόνα 9).



Εικόνα 9. Σύγκριση κλινικών αποτελεσμάτων μεταξύ IVF και ICSI σε κύκλους ωοληψίας με μικρό αριθμό ωαρίων (τροποποίηση από Ou *et al.* 2010).

Συνοψίζοντας, η τεχνική ICSI προσφέρει υψηλότερα ποσοστά γονιμοποίησης σχέση με την IVF σε κύκλους ωοληψίας με μικρό αριθμό ωαρίων, αλλά αυτό δεν αντανakλά την ποιότητα των εμβρύων ούτε το δυναμικό της εγκυμοσύνης. Επιπλέον, δεν μπορεί να αποτρέψει την ακύρωση ενός κύκλου ούτε την πλήρη αποτυχία γονιμοποίησης.

2.7 Πτωχή ποιότητα ωαρίων

Η ποιότητα των ωαρίων αποτελεί ένα σημαντικό προγνωστικό παράγοντα για την επιτυχία των τεχνικών υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Έχει διαπιστωθεί ότι απαραίτητη προϋπόθεση για την ανάπτυξη ενός καλής ποιότητας εμβρύου με την κλασική IVF είναι η ύπαρξη ενός καλής ποιότητας ωαρίου. Ωστόσο, κάτι τέτοιο δεν είναι αναγκαίο στην περίπτωση που εφαρμόζεται η τεχνική ICSI.

Για το λόγο αυτό, ωάρια σχετικά χαμηλής ποιότητας, περικλείοντας και εκείνα που παράγουν μεγαλύτερης ηλικίας γυναίκες και γυναίκες με χαμηλή γονιμότητα ωοθηκών (π.χ. γυναίκες με ενδομητρίωση), αποτελούν καλή ένδειξη για την εφαρμογή της μεθόδου ICSI. Επιπλέον, ασθενείς των οποίων τα ωάρια γονιμοποιούνται αλλά αναπτύσσονται πάντα σε χαμηλής ποιότητας έμβρυα με την κλασική IVF ενδείκνυνται για την τεχνική ICSI (Saito *et al.* 2000).

Προκειμένου να διαπιστωθούν τα παραπάνω, μελετήθηκε η σχέση μεταξύ της ποιότητας των ωαρίων - όπως αυτή προσδιορίζεται από τον αριθμό των αποπτωτικών κοκκωδών κυττάρων - και της πρόγνωσης των ωαρίων, όταν αυτά γονιμοποιούνται με την τεχνική ICSI ή την κλασική IVF (Saito *et al.* 2000). Τα ωάρια που περιβάλλονται από κοκκώδη κύτταρα με χαμηλό ρυθμό απόπτωσης έχουν καλή πρόγνωση (Saito *et al.* 2000).

Στη μελέτη αυτή 40 ασθενείς υπεβλήθησαν στη μέθοδο ICSI και 40 ζευγάρια στην απλή IVF. Τα ωάρια που χρησιμοποιήθηκαν και στις δύο μεθόδους δεν διέφεραν ποιοτικά. Τα αποπτωτικά κύτταρα προσδιορίστηκαν από την ύπαρξη κατατμημένου κυτταροπλάσματος και πυκνωτικών πυρήνων, αφού είχαν βαφτεί με χρωστικές ουσίες και έπειτα από παρατήρησή τους σε μικροσκόπιο φθορισμού.

Ο αριθμός των αποπτωτικών κοκκωδών κυττάρων στα ωάρια που γονιμοποιήθηκαν με IVF ήταν σημαντικά μικρότερος από ότι των ωαρίων που γονιμοποιήθηκαν με ICSI (17% έναντι 30%). Επιπλέον, ο αριθμός των αποπτωτικών κοκκωδών κυττάρων στα ωάρια που αναπτύχθηκαν σε καλής ή μέτριας ποιότητας έμβρυα μετά από IVF ήταν σημαντικά χαμηλότερος από ότι αυτά των ωαρίων που αναπτύχθηκαν σε καλής ή μετριας ποιότητας έμβρυα μετά από ICSI (14% έναντι 29%). Τέλος, το ποσοστό εγκυμοσύνης ήταν παρόμοιο μεταξύ των δύο μεθόδων (18% με IVF έναντι 21% με ICSI).

Υπάρχουν δύο υποθέσεις που μπορούν να εξηγήσουν γιατί ο αριθμός των αποπτωτικών κοκκωδών κυττάρων στα ωάρια που γονιμοποιήθηκαν με IVF είναι χαμηλότερος από τον αντίστοιχο των ωαρίων που γονιμοποιήθηκαν με ICSI. Η πρώτη υπόθεση είναι ότι η IVF απαιτεί φυσιολογικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ ωαρίου και σπερματοζωαρίου που μπορεί να επιτευχθεί μόνο με καλής ποιότητας ωάρια (π.χ. ωάρια με μικρότερο αριθμό αποπτωτικών κοκκωδών κυττάρων). Αντιθέτως, η μέθοδος ICSI παρακάμπτει αυτούς τους φυσιολογικούς φραγμούς και γι' αυτό δεν απαιτεί καλής ποιότητας ωάρια (Saito *et al.* 2000).

Η δεύτερη υπόθεση σχετίζεται με τον αριθμό των σπερματοζωαρίων που έρχονται σε επαφή με το ωάριο. Για να γονιμοποιηθεί ένα ανθρώπινο ωάριο με IVF χρειάζεται μια συγκέντρωση κινητών σπερματοζωαρίων της τάξης των 50.000-100.000/ml. Εξαιτίας της υψηλής συγκέντρωσης διαφόρων ενζύμων που παράγονται

από ένα μεγάλο αριθμό σπερματοζωαρίων και της μεγάλης διάρκειας της έκθεσης σε αυτά τα ένζυμα, η τεχνική IVF θεωρείται επεμβατική για τα ωάρια (Saito *et al.* 2000).

Αντιθέτως, επειδή στη μέθοδο ICSI μόνο ένα σπερματοζωάριο εισέρχεται στο ωάριο, η τεχνική αυτή είναι πιο κοντά στο φυσιολογικό κανόνα από ότι η IVF όσον αφορά τον αριθμό των σπερματοζωαρίων στον οποίο εκτίθεται το ωάριο. Επιπλέον, τα ένζυμα που παράγονται από το μοναδικό σπερματοζωάριο έχουν πολύ μικρότερη επίδραση στο ωάριο. Όμως, η είσοδος της πιπέτας ICSI μέσα στο ωάριο δεν παύει να είναι κι αυτή επεμβατική. Συνολικά, η τεχνική αυτή αναμένεται να δίνει καλύτερης ποιότητας έμβρυα με καλύτερη πρόγνωση.

2.8 Ανδρικός-Ανοσολογικός παράγοντας υπογονιμότητας

Στο σπερματικό πλάσμα ορισμένων ανδρών πολλές φορές παρατηρείται η παρουσία αντισωμάτων εναντίον των αντιγόνων των σπερματοζωαρίων, τα οποία προκαλούν συγκόλληση ή ακινητοποίησή τους και δυσχεραίνουν την είσοδό τους στην τραχηλική βλέννη. Τα αντισπερμικά αντισώματα επηρεάζουν και άλλες λειτουργικές ιδιότητες των σπερματοζωαρίων, όπως την δυνητικότητα της εισόδου τους στο ωάριο.

Τα αντισπερματικά αντισώματα, ως πιθανή αιτία υπογονιμότητας, περιγράφηκαν για πρώτη φορά το 1954 από τους Wilson και Rümke. Η επίπτωση που έχουν αυτά στη γονιμότητα του άνδρα εξαρτάται από την πυκνότητα και το είδος τους. Τα αντισώματα αυτά είναι κυρίως των τάξεων IgA και IgG και προέρχονται συνήθως από την κυκλοφορία με διήθηση μέσω του προστάτη και σπανιότερα από τοπική παραγωγή. Η παραγωγή τους ευνοείται όταν συνυπάρχουν διάφοροι προδιαθεσικοί παράγοντες, όπως απόφραξη της εκφορητικής γεννητικής οδού.

Η παρουσία των αντισπερματικών αντισωμάτων στο σπέρμα μπορεί να αποτελεί βασική αιτία υπογονιμότητας. Αν το ποσοστό των σπερματοζωαρίων που φέρουν τέτοιου είδους αντισώματα είναι πολύ υψηλό, τότε η κλασική IVF δεν θα δίνει καλά αποτελέσματα (Nagy *et al.* 1995).

Αντιθέτως, το ποσοστά γονιμοποίησης, εμβρυικής ανάπτυξης και εγκυμοσύνης μετά την εφαρμογή της τεχνικής ICSI, δεν επηρεάζονται από τα επίπεδα

των αντισπερμικών αντισωμάτων, ούτε από τη θέση τους πάνω στα σπερματοζωάρια, ούτε από τον τύπο της ανοσοσφαιρίνης, ενώ σε *in vivo* συνθήκες οι IgA υποστηρίζεται ότι σχετίζονται πιο πολύ με την υπογονιμότητα. Για τον λόγο αυτό, όταν άλλες μέθοδοι αποτυγχάνουν να θεραπεύσουν τον σοβαρό ανδρικό ανοσολογικό παράγοντα, η μέθοδος ICSI θα πρέπει να αποτελεί πρώτη γραμμή θεραπείας (Nagy *et al.* 1995).

Στη μελέτη των Nagy και άλλων έλαβαν μέρος 37 ασθενείς με $\geq 80\%$ των σπερματοζωαρίων τους να έχουν αντισπερμικά αντισώματα και κάποιοι από αυτούς δεν κατάφεραν να επωφεληθούν με την κλασική IVF σε προηγούμενους κύκλους (Nagy *et al.* 1995). Όλοι υπεβλήθησαν στην τεχνική ICSI με ποσοστό γονιμοποίησης 75.7% έναντι 13% με την κλασική IVF. Η μελέτη αυτή κατέληξε στο συμπέρασμα ότι, σε αντίθεση με την κλασική IVF, η παρουσία των αντισπερματικών αντισωμάτων δεν παρεμβαίνει στη διαδικασία γονιμοποίησης όταν το σπερματοζωάριο εναποτίθεται μέσα στο κυτταρόπλασμα του ωαρίου.

Επιπλέον διαπιστώθηκε ότι όσο αυξάνεται το ποσοστό των αντισπερματικών αντισωμάτων αυξάνεται και το ποσοστό γονιμοποίησης. Μία πιθανή εξήγηση θα μπορούσε να είναι ότι η ανοσοσφαιρίνες κατά των σπερματοζωαρίων διευκολύνουν την ακροσωμική αντίδραση και κατ'επέκταση το ποσοστό γονιμοποίησης. Επίσης, ασθενείς θετικοί στο MAR-test είχαν υψηλότερο ποσοστό γονιμοποίησης αλλά χαμηλότερης ποιότητας έμβρυα σε σύγκριση με ασθενείς αρνητικούς στην ίδια δοκιμασία. Ωστόσο τα ποσοστά εγκυμοσύνης δεν φάνηκε να επηρεάζονται. Συμπεραίνεται ότι είτε υπάρχει άμεση επίδραση των αντισπερμικών αντισωμάτων πάνω στο έμβρυο μετά την ενδοωαρική έγχυση του σπερματοζωαρίου, είτε έμμεση επίδραση που σχετίζεται με την αλλαγή του σπερματοζωαρίου.

2.9 Απουσία ακροσώματος (globozoospermia)

Τα στρογγυλοκέφαλα σπερματοζωάρια αποτελούν μια σπάνια μορφή τερατοζωοσπερμίας, όπου απουσιάζει το ακρόσωμα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τα σπερματοζωάρια να αδυνατούν να συνδεθούν ή να διεισδύσουν στη διάφανη ζώνη του ωαρίου και να μην μπορεί να επιτευχθεί γονιμοποίηση με την κλασική IVF. Οι ασθενείς αυτοί θεωρούνται υπογόνιμοι παρά το γεγονός ότι μπορεί η συγκέντρωση

των σπερματοζωαρίων και η κινητικότητα τους να είναι φυσιολογική και η μόνη επιλογή θεραπείας είναι η εφαρμογή της μικρογονιμοποίησης (Liu *et al.* 1995).

Υποστηρίζεται ότι εάν ξεπεραστεί η ανικανότητα των στρογγυλοκέφαλων σπερματοζωαρίων να διαπερνούν τα ωάρια εφαρμόζοντας την τεχνική ICSI, τότε αυτά έχουν την ικανότητα να συμμετέχουν στα αρχικά στάδια της γονιμοποίησης. Τα αποτελέσματα 11 κύκλων ICSI σε 7 ζευγάρια με 100% απουσία ακροσώματος έδειξαν φυσιολογική γονιμοποίηση (μόνο στο 19% των MII ωαρίων), διαίρεση εμβρύου και εγκυμοσύνης σε μερικούς ασθενείς (Liu *et al.* 1995).

Στην ίδια μελέτη, σε προκλινικά πειράματα, το ποσοστό γονιμοποίησης (37%) με στρογγυλοκέφαλα σπερματοζωάρια ήταν επίσης πολύ χαμηλότερο σε σύγκριση με τα αντίστοιχα ποσοστά που προκύπτουν από άλλου τύπου μορφολογικές ανωμαλίες των σπερματοζωαρίων. Αυτό μπορεί να σχετίζεται άμεσα με την απουσία του ακροσώματος ή να οφείλεται στην ποιότητα των ωαρίων της συγκεκριμένης μελέτης.

2.10 Σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών (PCOS)

Το σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών είναι ένα ετερογενές σύνδρομο που χαρακτηρίζεται από διαταραχές ωοθυλακιορρηξίας (ολιγο-και/ή ανωοθυλακιορρηξία), υπερανδρογοναιμία και πολυκυστική υφή ωοθηκών με τη χρήση υπερήχου. Το ενδοκρινολογικό προφίλ αυτών των γυναικών χαρακτηρίζεται από υψηλά επίπεδα LH, αυξημένα ανδρογόνα και υπερινσουλιναιμία. Ωστόσο, ο μηχανισμός με τον οποίο η ενδοκρινική ανισορροπία στο σύνδρομο PCOS προκαλεί μείωση της ποιότητας των ωαρίων, δεν είναι πλήρως κατανοητός.

Το χαμηλότερο ποσοστό γονιμοποίησης με την κλασική IVF στο σύνδρομο PCOS, που μπορεί να οφείλεται στη φτωχή ποιότητα των ωαρίων οδήγησε στην εφαρμογή της τεχνικής ICSI, η οποία ξεπέρασε την πλήρη αποτυχία γονιμοποίησης και αύξησε τα ποσοστά γονιμοποίησης (Hwang *et al.* 2005). Εξαιτίας του γεγονότος ότι η τεχνική ICSI παρακάμπτει την αλληλεπίδραση σπερματοζωαρίου και διάφανης ζώνης, τα αποτελέσματα της μελέτης των Hwang και άλλων υπαινίσσονται την ύπαρξη κάποιας ανωμαλίας στη διάφανη ζώνη των ωαρίων που προέρχονται από ασθενείς με σύνδρομο PCOS.

Στη μελέτη αυτή συγκρίθηκαν οι τεχνικές IVF και ICSI σε 60 ασθενείς με σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών και φυσιολογικό σπέρμα (Hwang *et al.* 2005). Τα μισά ωάρια των ζευγαριών υπεβλήθησαν στην μέθοδο IVF και τα άλλα μισά στην τεχνική ICSI (split). Το ποσοστό γονιμοποίησης (2 προπυρήνες/ωάριο) ήταν σημαντικά υψηλότερο με τη μέθοδο ICSI (72.3%) σε σύγκριση με την κλασική IVF (44.8%). Δεν σημειώθηκε καμία αποτυχία γονιμοποίησης με την τεχνική της μικρογονιμοποίησης ενώ κάτι τέτοιο συνέβη στο 15% των ασθενών που υπεβλήθησαν σε IVF. Όσον αφορά την εμβρυική μορφολογία και το ρυθμό ανάπτυξης 42 ώρες μετά τη γονιμοποίηση, δεν υπήρχε καμία διαφορά μεταξύ των δύο μεθόδων.

3. Οι νέες τάσεις στην εφαρμογή των μεθόδων ICSI και IVF

Σε ετήσια βάση η ESHRE συγκεντρώνει δεδομένα από χώρες τις Ευρώπης, τα οποία αφορούν μεταξύ των άλλων τις μεθόδους IVF και ICSI. Με αυτόν τον τρόπο συλλέγονται πληροφορίες σχετικά με τον αριθμό των κύκλων και τα ποσοστά εγκυμοσύνης ύστερα από την εφαρμογή των μεθόδων IVF και ICSI.

Παρατηρώντας το χρονικό διάστημα 1999-2005 στον Πίνακα 2 και στην Εικόνα 11, γίνεται αντιληπτό ότι παρόλο που οι κύκλοι IVF στην Ευρώπη παραμένουν σε σχετικά σταθερά επίπεδα, οι κύκλοι ICSI έχουν αυξηθεί ραγδαία. Επιπλέον τα ποσοστά εγκυμοσύνης ανά εμβρυομεταφορά έχουν αυξηθεί (Εικόνα 10), χωρίς όμως να παρατηρείται σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο μεθόδων ως προς αυτά τα ποσοστά, παρά μόνο μία παράλληλη και σταδιακή αύξηση του ποσοστού εγκυμοσύνης και με τις δύο τεχνικές στη διάρκεια 1999-2005.

Μέχρι και το 2001, οι κύκλοι IVF ξεπερνούσαν τους κύκλους ICSI, ενώ από το 2002 έως και το 2005 πήρε προβάδισμα η τεχνική της μικρογονιμοποίησης. Έτσι, ενώ το 1999 οι κύκλοι IVF κάλυπταν το 56.6% των κύκλων IVF/ICSI και οι κύκλοι ICSI αποτελούσαν μόνο το 43.4% των κύκλων, το 2005 οι κύκλοι IVF άγγιξαν μόλις το 37% των κύκλων IVF/ICSI, ενώ οι κύκλοι ICSI έφτασαν το 63%. Αυτή η αυξανόμενη χρήση της τεχνικής της μικρογονιμοποίησης δεν μπορεί να εξηγηθεί από μία παρόμοια αύξηση της ανδρικής υπογονιμότητας, παρά από μία συχνότερη εφαρμογή της σε περιπτώσεις μικτής αιτίας υπογονιμότητας.

Κατά τα πρώτα χρόνια της μικρογονιμοποίησης στη διάρκεια του 1990, η αύξηση της χρήσης της μεθόδου ICSI, θα μπορούσε να εξηγηθεί από το γεγονός ότι τα κέντρα υπογονιμότητας έπρεπε να καθιερώσουν την τεχνική στα εργαστήρια τους και να την ενσωματώσουν στην κλινική εφαρμογή (Andersen *et al.* 2008a). Η αύξηση του ποσοστού των κύκλων που διεξάγονται με την τεχνική ICSI θα μπορούσε να προκληθεί από μία μείωση του ποσοστού θεραπειών που οφείλονται σε άλλα αιτία υπογονιμότητας (Andersen *et al.* 2008a).

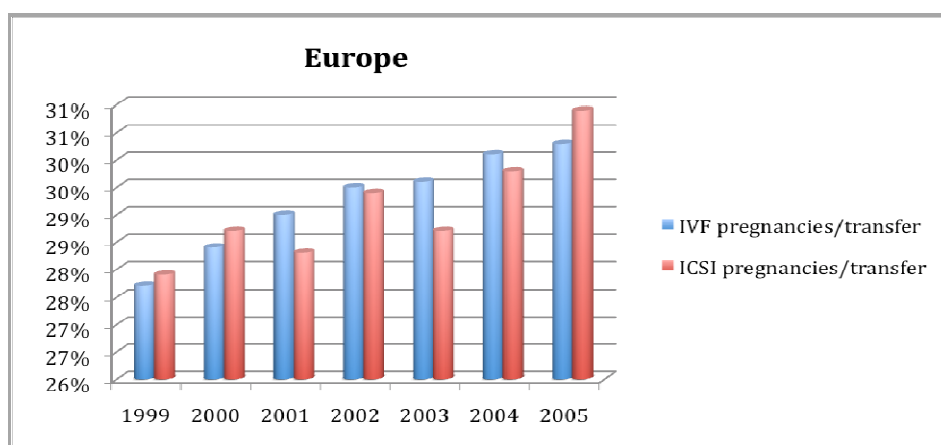
Σύμφωνα με τις αναφορές της ESHRE, η μικρογονιμοποίηση χρησιμοποιείται σε μεγάλο βαθμό για άλλες ενδείξεις πέρα από αυτές που σχετίζονται με τον ανδρικό παράγοντα υπογονιμότητας. Δεδομένα από το 2004 δείχνουν ότι μεταξύ των ζευγαριών που υποβάλλονται στην τεχνική ICSI, μόνο το 27.6% έχει ανδρικό παράγοντα, ενώ το 38.4% έχει ποικίλες αιτίες υπογονιμότητας και το 11.7% έχει ανεξήγητη υπογονιμότητα (Andersen *et al.* 2008a). Επίσης, η αύξηση της εφαρμογής της ICSI έχει συσχετιστεί με την αύξηση των συνολικών ποσοστών εγκυμοσύνης για την τεχνολογία της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (Andersen *et al.* 2008).

Ένας άλλος πιθανός λόγος για την ευρεία εφαρμογή της μικρογονιμοποίησης μπορεί να είναι η μείωση της ποιότητας του σπέρματος με περισσότερους άνδρες στο φάσμα των υπογόνιμων (Andersen *et al.* 2008a). Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι στις περισσότερες χώρες της δυτικής Ευρώπης οι άνδρες αναβάλλουν την αναπαραγωγική τους ηλικία (αυξάνεται η ηλικία των ανδρών). Μια άλλη εξήγηση αποτελεί η αυξανόμενη εφαρμογή της ICSI στον ήπιο ανδρικό παράγοντα (Andersen *et al.* 2008).

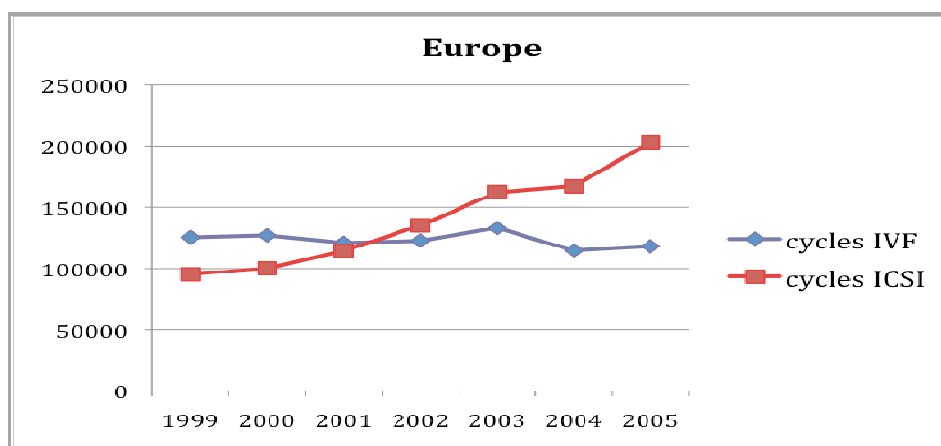
Επίσης, μείωση του αριθμού και της ποιότητας των ωαρίων που σχετίζονται με την αυξανόμενη ηλικία της μητέρας μπορεί να είναι ένας σημαντικός παράγοντας στον οποίο μπορεί να αποδοθεί η αύξηση της εφαρμογής ICSI (Andersen *et al.* 2008a). Τέλος, ο φόβος μιας επαναλαμβανόμενης αποτυχίας γονιμοποίησης (<20-25%) με την κλασική IVF στον μη ανδρικό παράγοντα, ώθησε πολλά κέντρα να καταλήξουν στην εφαρμογή της ICSI σε μεταγενέστερους κύκλους (Andersen *et al.* 2008a).

Πίνακας 2. Σύγκριση IVF και ICSI ως προς τον αριθμό των κύκλων και το ποσοστό εγκυμοσύνης την περίοδο 1999-2005 στην Ευρώπη.

| year | cycles IVF | cycles ICSI | IVF pregnancies/transfer | ICSI pregnancies/transfer | |
|------|------------|-------------|--------------------------|---------------------------|------------------------------|
| 1999 | 125370 | 95221 | 27.7% | 27.9% | Nygren & Andersen 2002 |
| 2000 | 126961 | 99976 | 28.4% | 28.7% | Andersen <i>et al.</i> 2004 |
| 2001 | 120946 | 114378 | 29.0% | 28.3% | Andersen <i>et al.</i> 2005 |
| 2002 | 122634 | 135048 | 29.5% | 29.4% | Andersen <i>et al.</i> 2006 |
| 2003 | 132932 | 162149 | 29.6% | 28.7% | Andersen <i>et al.</i> 2007 |
| 2004 | 114672 | 167192 | 30.1% | 29.8% | Andersen <i>et al.</i> 2008b |
| 2005 | 118074 | 203329 | 30.3% | 30.9% | Andersen <i>et al.</i> 2009 |



Εικόνα 10. Ποσοστά εγκυμοσύνης/εμβρυομεταφορά μετά από IVF και ICSI στην Ευρώπη κατά τη διάρκεια 1999-2005 (τροποποίηση από Nygren & Andersen 2002, Andersen *et al.* 2004-2009).



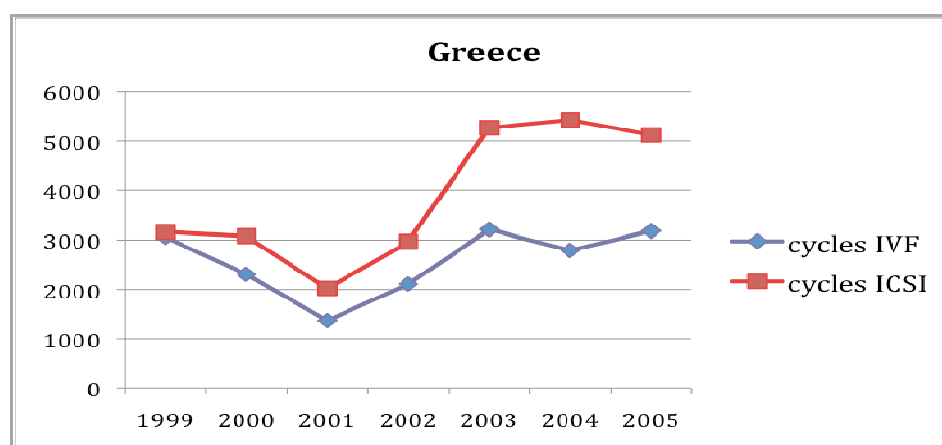
Εικόνα 11. Αριθμός κύκλων IVF και ICSI στην Ευρώπη κατά τη διάρκεια 1999-2005 (τροποποίηση από Nygren & Andersen 2002, Andersen *et al.* 2004-2009).

Τα αντίστοιχα δεδομένα που αφορούν μόνο την Ελλάδα στη διάρκεια του 1999-2005 παρουσιάζονται στον Πίνακα 3 και στις Εικόνες 12 και 13. Στη διάρκεια του 1999-2005, σε αντίθεση με την υπόλοιπη Ευρώπη, οι κύκλοι ICSI είχαν από την αρχή μικρό προβάδισμα σε σχέση με τους κύκλους IVF και με το πέρας των ετών η διαφορά αυτή αυξήθηκε κατά πολύ.

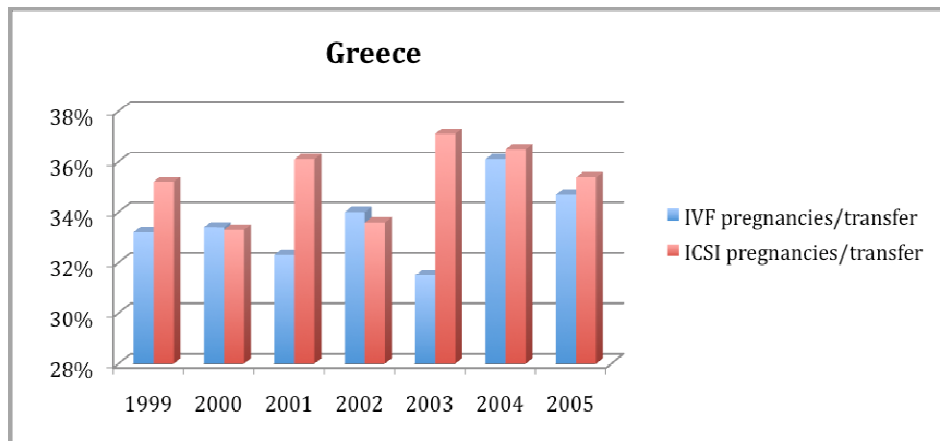
Τα ποσοστά εγκυμοσύνης ανά εμβρυομεταφορά αυξήθηκαν ελαφρώς, χωρίς όμως να παρατηρείται σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο μεθόδων ως προς αυτά τα ποσοστά, παρά μόνο μία παράλληλη και σταδιακή αύξηση του ποσοστού εγκυμοσύνης και με τις δύο τεχνικές.

Πίνακας 3. Σύγκριση IVF και ICSI ως προς τον αριθμό των κύκλων και το ποσοστό εγκυμοσύνης την περίοδο 1999-2005 στην Ελλάδα.

| year | cycles IVF | cycles ICSI | IVF pregnancies/transfer | ICSI pregnancies/transfer | |
|------|------------|-------------|--------------------------|---------------------------|------------------------------|
| 1999 | 3057 | 3158 | 33.2% | 35.2% | Nygren & Andersen 2002 |
| 2000 | 2310 | 3075 | 33.4% | 33.3% | Andersen <i>et al.</i> 2004 |
| 2001 | 1371 | 2022 | 32.3% | 36.1% | Andersen <i>et al.</i> 2005 |
| 2002 | 2112 | 2963 | 34.0% | 33.6% | Andersen <i>et al.</i> 2006 |
| 2003 | 3207 | 5267 | 31.5% | 37.1% | Andersen <i>et al.</i> 2007 |
| 2004 | 2793 | 5425 | 36.1% | 36.5% | Andersen <i>et al.</i> 2008b |
| 2005 | 3178 | 5122 | 34.7% | 35.4% | Andersen <i>et al.</i> 2009 |



Εικόνα 12. Αριθμός κύκλων IVF και ICSI στην Ελλάδα κατά τη διάρκεια 1999-2005 (τροποποίηση από Nygren & Andersen 2002, Andersen *et al.* 2004-2009).



Εικόνα 13. Ποσοστά εγκυμοσύνης/εμβρυομεταφορά μετά από IVF και ICSI στην Ελλάδα κατά τη διάρκεια 1999-2005 (τροποποίηση από Nygren & Andersen 2002, Andersen *et al.* 2004-2009).

4. Γενετικές επιπτώσεις και επιπλοκές της τεχνικής ICSI έναντι της κλασικής IVF

Η αυξανόμενη χρήση των ορμονικών παρασκευασμάτων (π.χ. για τη διέγερση των ωοθηκών, την υποστήριξη της ωχρινής φάσης, κ.λ.π.) και οι μικροχειρισμοί των εμβρύων (π.χ. μικρογονιμοποίηση, υποβοηθούμενη εκκόλαψη, κ.λ.π.) έχουν προκαλέσει ανησυχίες σχετικά με τις δυσμενείς επιπτώσεις για τις υπογόνιμες γυναίκες και τη μακροπρόθεσμη υγεία των παιδιών που γεννιούνται με υποβοηθούμενη αναπαραγωγή (Al-Fifi *et al.* 2009).

Παρά τη γρήγορη αποδοχή που έλαβε η τεχνική ICSI, υπάρχουν λίγα δεδομένα για τα μακροπρόθεσμα αποτελέσματα που μπορεί να έχει πάνω στα παιδιά που προκύπτουν μετά την εφαρμογή της (Bowen *et al.* 1998). Η μέθοδος αυτή περιλαμβάνει γονιμοποίηση με έγχυση ενός μόνο σπερματοζωαρίου μέσα στο ωάριο, συχνά με σπερματοζωάρια που έχουν χαμηλή κινητικότητα και κακή μορφολογία (Bowen *et al.* 1998). Αυτές οι δυσλειτουργίες μπορεί να αντανakλούν ανωμαλίες στο σπερματοζωάριο και κατ'επέκταση η χρήση αυτού στην εξωσωματική να οδηγήσει σε αυξημένο ποσοστό ανωμαλιών στο παιδί (Bowen *et al.* 1998).

Επιπλέον, υπογόνιμοι άνδρες με ολιγοζωοσπερμία ή αζωοσπερμία έχουν ένα αυξημένο ποσοστό χρωμοσωμικών ανωμαλιών, συμπεριλαμβάνοντας ελλείψεις στο χρωμόσωμα Y και ανώμαλο καρυότυπο (El-Toukhy & Braudew 2002), τα οποία μπορούν να μεταφερθούν στα παιδιά τους. Με την επιλογή του ενός σπερματοζωαρίου στην τεχνική ICSI παρακάμπτεται η συνήθης διαδικασία της

φυσικής επιλογής, η οποία συμβαίνει τόσο στη φυσική σύλληψη όσο και στην απλή IVF, οδηγώντας σε μεγαλύτερη πιθανότητα γονιμοποίησης με ανώμαλο σπερματοζώριο (Bowen *et al.* 1998).

Επίσης, μπορούν να προκύψουν ανευπλοειδίες των φυλετικών χρωμοσωμάτων εξαιτίας της έγχυσης σπερματοζωαρίου από άνδρες που πάσχουν από το σύνδρομο Klinefelter ή έχουν μωσαϊκισμό Klinefelter (Persson *et al.* 1996). Έτσι, υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της ανδρικής υπογονιμότητας, της έγχυσης ανευπλοειδικού σπερματοζωαρίου με την τεχνική ICSI και της ανάπτυξης απογόνου με ανευπλοειδία, και ειδικότερα ανευπλοειδία των φυλετικών χρωμοσωμάτων (Persson *et al.* 1996). Ένας αυξημένος κίνδυνος για εμφάνιση ανευπλοειδίας των φυλετικών χρωμοσωμάτων μπορεί να ανακύψει και στις περιπτώσεις που η τεχνική TESE χρησιμοποιείται σε ασθενείς με μη αποφρακτική αζωοσπερμία, λόγω της χρωμοσωμικής φύσης της συγκεκριμένης παθολογίας. Ακόμη, τα σπερματοζώρια των ανδρών με ιδιοπαθή υπογονιμότητα θα μπορούσαν να αυξήσουν το ποσοστό γέννησης ανευπλοειδικών παιδιών με την εφαρμογή της τεχνικής ICSI (Persson *et al.* 1996).

Τελικά, η μέθοδος ICSI περιλαμβάνει διακοπή της συνέχειας της κυτταρικής μεμβράνης του ωαρίου και εισαγωγή ξένου υλικού στο ωάριο μαζί με το σπερματοζώριο. Παραμένει άγνωστο εάν αυτή η διακοπή έχει επιπτώσεις στο ωάριο και στην ανάπτυξη του εμβρύου (Bowen *et al.* 1998).

Τα διαθέσιμα γενετικά δεδομένα από τη μία πλευρά φαίνονται ανησυχητικά, όμως με έναν πιο βαθύ προβληματισμό είναι πιθανόν να μην είναι τόσο αξιόλογα και ως εκ τούτου είναι λιγότερο απογοητευτικά (Persson *et al.* 1996).

Στη φυσική σύλληψη ή στην απλή IVF, το σπερματοζώριο πρέπει να διαπεράσει τη διαφανή ζώνη και την κυτταρική μεμβράνη του ωαρίου και θεωρητικά είναι πιθανό ότι ένα σπερματοζώριο που φέρει μικρές γενετικές ανωμαλίες θα είναι λιγότερο ικανό να εκπληρώσει αυτήν την αποστολή σε σχέση με ένα σπερματοζώριο που δεν έχει ανωμαλίες (Bowen *et al.* 1998).

Αυτό που παραμένει ακόμα άγνωστο είναι εάν αυτή η τάση εμφάνισης συγγενών και χρωμοσωμικών ανωμαλιών και άλλων επιπλοκών (πολύδυμες κυήσεις) στα παιδιά από εξωσωματική, σχετίζεται με την τεχνική γονιμοποίησης, με μητρικούς

και πατρικούς παράγοντες ή κρυμμένους γενετικούς παράγοντες που ενεργοποιούνται στη διάρκεια της γονιμοποίησης στο εργαστήριο (Al-Fifi *et al.* 2009).

Σύμφωνα με τον Persson και άλλους (Persson *et al.* 1996), οι ανευπλοειδίες των φυλετικών χρωμοσωμάτων στα παιδιά που προκύπτουν από την τεχνική ICSI δεν σχετίζονται με το διαδικαστικό κομμάτι της συγκεκριμένης μεθόδου, αλλά με τις χρωμοσωμικές ανωμαλίες και το μωσαϊκισμό που υπάρχει μέσα στον ανδρικό πληθυσμό που υποβάλλεται στην τεχνική της μικρογονιμοποίησης.

Το 1998 έγινε μια προοπτική μελέτη που σύγκρινε τα ιατρικά και αναπτυξιακά αποτελέσματα σε 1 έτους παιδιά που προέκυψαν από τις μεθόδους ICSI (89 παιδιά), IVF (84 παιδιά), αλλά και από φυσιολογική σύλληψη (80 παιδιά) (Bowen *et al.* 1998). Χρησιμοποιήθηκαν οι δείκτες διανοητικής ανάπτυξης (MDI-mental development index), οι οποίοι αξιολογούν τη μνήμη, την ικανότητα επίλυσης προβλημάτων και τις γλωσσικές δεξιότητες και οι δείκτες ψυχοκινητικής ανάπτυξης (PDI-psychomotor development index), οι οποίοι αξιολογούν κινητικές δεξιότητες. Ο μέσος βαθμός για τους δύο δείκτες είναι το 100, ενώ η επίδοση των παιδιών στις κλίμακες ταξινομείται ως εξής: ≥ 115 ως επιταχυμένη επίδοση, 85-114 ως εντός των φυσιολογικών ορίων, 70-84 ως ελαφρώς καθυστερημένη επίδοση και ≤ 69 ως εξαιρετικά καθυστερημένη επίδοση.

Στην προκειμένη μελέτη, παρόλο που τα περισσότερα παιδιά που είχαν προκύψει από ICSI βρίσκονταν εντός των φυσιολογικών ορίων MDI, σαν ομάδα είχαν χαμηλότερη βαθμολόγηση (95.9) σε σχέση με τα παιδιά που προέκυψαν από IVF (101.8) ή φυσιολογική σύλληψη (102.5). Επιπλέον, υπήρχε αυξημένο ποσοστό παιδιών ICSI στην κατηγορία «ελαφρώς καθυστερημένη επίδοση» (15%) σύμφωνα με το MDI σε σύγκριση με παιδιά από IVF και φυσιολογική σύλληψη (2% και 1% αντίστοιχα). Έτσι, σημειώθηκε σημαντική διαφορά μεταξύ των παιδιών που είχαν προκύψει από ICSI, IVF και από φυσιολογική σύλληψη ως προς την αξιολόγηση της διανοητικής ανάπτυξης.

Σύμφωνα με τη μελέτη αυτή, πιθανές αιτίες για τη χαμηλότερη επίδοση μεταξύ των παιδιών ICSI αποτελούν παράγοντες που σχετίζονται με γενετικές ανωμαλίες στα σπερματοζώαρια, όπως επίσης και παράγοντες που έχουν σχέση με την τεχνική ICSI. Επιπλέον, η ήπια καθυστέρηση στην ανάπτυξη που εντοπίστηκε σε κάποια παιδιά της μελέτης μπορεί να οφείλονται σε χρωμοσωμικές ανωμαλίες. Αυτές

οι αναπτυξιακές διαφορές ήταν υψηλότερες στα αγόρια από ότι στα κορίτσια στην ομάδα ICSI και αυτό ενισχύει την πιθανότητα μεταφοράς χρωμοσωμικών ανωμαλιών από τον πατέρα στον γιο. Η ελλιπής ή διαταραγμένη αποτύπωση μπορεί να είναι μια ακόμα πηγή ανησυχίας στη χρήση ανώμαλων σπερματοζωαρίων.

Αντιθέτως, ως προς τον δείκτη ψυχοκινητικής ανάπτυξης PDI δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά μεταξύ των ομάδων. Επιπλέον, μεταξύ των παιδιών από ICSI, IVF ή από φυσιολογική σύλληψη δεν υπήρχε σημαντική διαφορά στο ποσοστό μείζονων δυσπλασιών ή προβλημάτων υγείας (5%, 4% και 5% τα αντίστοιχα ποσοστά). Στα παιδιά που είχαν προκύψει από τη μικρογονιμοποίηση σημειώθηκαν οι εξής δυσπλασίες: πολύπλοκες συγγενείς καρδιακές νόσοι, δυσμορφία ποδιών που απαιτούσε χειρουργική διόρθωση και απόφραξη του ουρητήρα. Στα παιδιά που είχαν προκύψει από απλή IVF καταγράφηκαν οι εξής δυσπλασίες: πολύπλοκες συγγενείς καρδιακές νόσοι, κρανιοστένωση και υποσπαδίαση. Τέλος, στα παιδιά που είχαν προκύψει με φυσική σύλληψη σημειώθηκαν οι εξής δυσπλασίες: δυσμορφία ποδιών, κολπικά διαφράγματα και κρανιοστένωση.

Το 2009 πραγματοποιήθηκε μία αναδρομική μελέτη που σύγκρινε 253 γυναίκες, οι οποίες συνέλαβαν με την τεχνική ICSI με 349 γυναίκες που είχαν φυσική σύλληψη στη διάρκεια 2003-2007 (Al-Fifi *et al.* 2009). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι με την τεχνική της μικρογονιμοποίησης το ποσοστό των δίδυμων (24.51% έναντι 1.43%) και τρίδυμων κυήσεων (3.95% έναντι 0%) ήταν υψηλότερο σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Επιπλέον, το ποσοστό των καισαρικών τομών ήταν μεγαλύτερο στην ομάδα ICSI.

Η παιδιατρική εξέταση των νεογέννητων μωρών αποκάλυψε ένα παρόμοιο ποσοστό συγγενών ανωμαλιών μεταξύ των δύο ομάδων γυναικών, που κυμαίνονταν από ήπιες ανωμαλίες έως πολλαπλές σε αρκετά όργανα.

Ωστόσο, οι πολύδυμες κυήσεις θεωρούνται επιπλοκή της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, καθώς σχετίζονται με αυξημένο ποσοστό πρόωρου τοκετού αλλά και με μητρικές, νεογνικές και περιγεννητικές επιπλοκές (Al-Fifi *et al.* 2009).

Το 2005 έγινε μία μετα-ανάλυση μόνο προοπτικών μελετών, οι οποίες περιείχαν δεδομένα σχετικά με γενετικές ανωμαλίες (λειτουργικές και ανατομικές

δυσμορφίες) στα μωρά που είχαν προέλθει από εγκυμοσύνες ICSI και απλή IVF (Lie *et al.* 2005). Θεωρητικά, με την απουσία της φυσικής επιλογής κατά τη γονιμοποίηση στη μέθοδο ICSI, οποιαδήποτε δομική βλάβη που έχει προκληθεί από τη μέθοδο χειρισμού ή ακόμα η μεταφορά γονιδίων που δεν έχουν περάσει φυσιολογικά στο παιδί, θα μπορούσε να αυξήσει την πιθανότητα προβλημάτων υγείας στα παιδιά αυτά.

Σε αυτήν τη μετα-ανάλυση βρέθηκε ότι ο συνολικός κίνδυνος μιας δυσπλασίας κατά τη γέννηση ήταν 1.12 φορές μεγαλύτερος για την τεχνική ICSI σε σύγκριση με την απλή IVF. Αυτό δείχνει ότι η τεχνική της μικρογονιμοποίησης δεν αντιπροσωπεύει μια μεγάλη αύξηση του κινδύνου γενετικών ανωμαλιών εκτός από τους κινδύνους που συνεπάγεται στην εξωσωματική γονιμοποίηση γενικά.

Σε μία άλλη αναδρομική μελέτη, προκειμένου να εκτιμηθεί η ασφάλεια της τεχνικής ICSI, αναλύθηκαν δεδομένα από τα πρώιμα στάδια εγκυμοσύνων που είχαν προκύψει από τις δύο μεθόδους ICSI (50 εγκυμοσύνες) και IVF (226 εγκυμοσύνες) (Govaerts *et al.* 1996). Στη διάρκεια των 7 πρώτων εβδομάδων μετά την ωοληψία πραγματοποιήθηκαν συγκρίσεις που αφορούσαν τα επίπεδα της οιστραδιόλης και της HCG στο πλάσμα, την παρουσία λεκιθικού ασκού, εμβρύου και καρδιακής δραστηριότητας. Επιπλέον, εφαρμόστηκε προγεννητικός έλεγχος με λήψη τροφοβλάστης (CVS) ή αμνιοπαρακέντηση και μετά τη γέννηση των παιδιών πραγματοποιήθηκε κλινική εξέταση.

Τα ποσοστά των αποβολών και των πολύδυμων κυήσεων ήταν παρόμοια μεταξύ των δύο τεχνικών, ICSI (9% και 24% αντίστοιχα) και IVF (18% και 29% αντίστοιχα). Δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ποσοστών των θεραπευτικών εκτρώσεων για τις ομάδες ICSI και IVF (4.4% και 1.5% αντίστοιχα), οι οποίες επιτελέστηκαν μετά από διάγνωση μυελομηνιγγοκήλης, εμβρυικών δυσμορφιών, κυστικής ίνωσης και ολιγοάμνιου. Το υπό εξέταση δείγμα ήταν αρκετά μικρό για να αποφασιστεί αν αυτή η αύξηση των εμβρυικών δυσμορφιών μετά από ICSI ήταν σημαντική. Παρόλα αυτά, το ποσοστό 4.4% δείχνει ότι αυτές οι γενετικές ανωμαλίες μπορεί να είναι λίγο πιο συχνές μετά την εφαρμογή της μεθόδου ICSI.

Οι συγκεντρώσεις της οιστραδιόλης και της HCG ήταν παρόμοιες και στις δύο μεθόδους. Οι παρατηρούμενες διαφορές ως προς την παρουσία εμβρυικού σάκου και εμβρύου μεταξύ της μικρογονιμοποίησης (53% και 26%) και της απλής IVF

(26% και 9%) δεν ήταν σημαντικές. Κάθε εγκυμοσύνη που συνεχιζόταν είχε εμβρυϊκή καρδιακή δραστηριότητα στην 7 εβδομάδα κύησης.

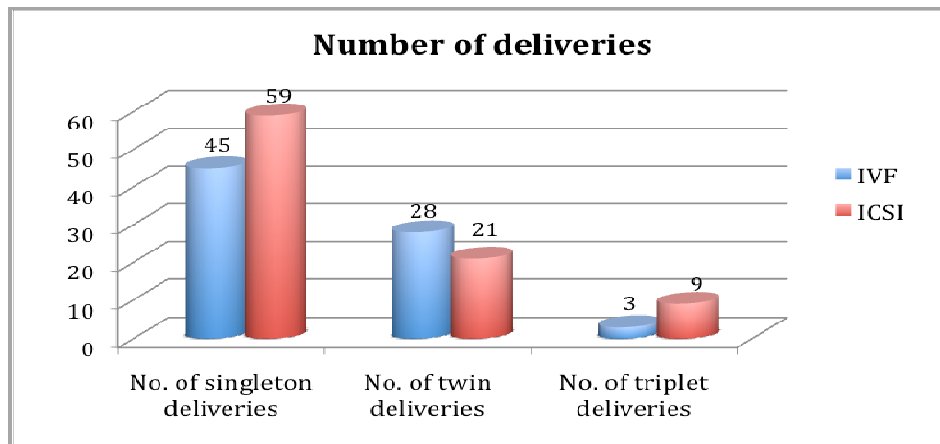
Όλα αυτά ενισχύουν την άποψη ότι οι εγκυμοσύνες που προκύπτουν από την εφαρμογή της μικρογονιμοποίησης εξελίσσονται φυσιολογικά και η ανδρική υπογονιμότητα οφείλεται εν μέρει στο γενετικό υπόβαθρο ακόμα και όταν ο καρυότυπος είναι φυσιολογικός (Govaerts *et al.* 1996).

5. ICSI έναντι IVF ως προς τα χαρακτηριστικά της εγκυμοσύνης και τα περιγεννητικά αποτελέσματα

Καθώς η τεχνική της μικρογονιμοποίησης δεν περιλαμβάνει φυσική επιλογή του σπερματοζωαρίου και υπερπηδά όλα τα γνωστά στάδια της γονιμοποίησης υπάρχουν ανησυχίες σχετικά με την επίπτωση που μπορεί να έχει η μέθοδος αυτή πάνω στην ποιότητα του εμβρύου και στο αποτέλεσμα της κύησης.

Μία αναδρομική μελέτη που έγινε το 2000, συμπεριέλαβε 200 ασθενείς, οι οποίοι είχαν συλλάβει την περίοδο 1996-1997, 100 με τη μέθοδο ICSI και 100 με την απλή IVF (Orvieto *et al.* 2000).

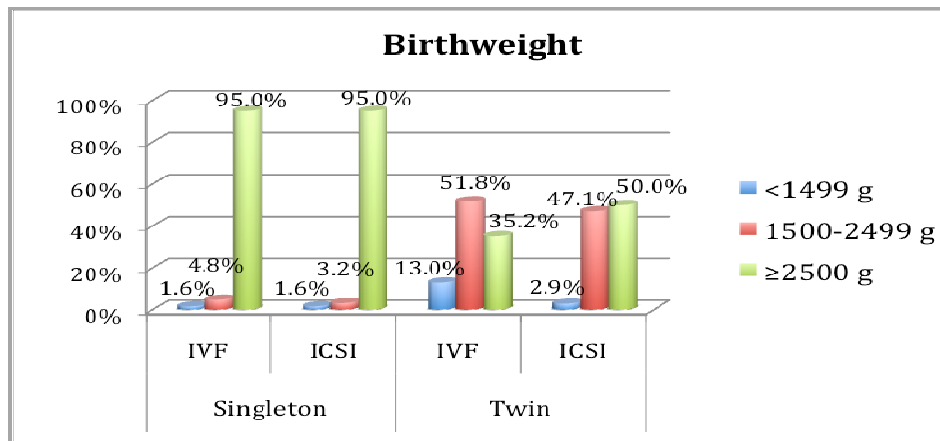
Οι γυναίκες που υπεβλήθησαν στην τεχνική ICSI ήταν σημαντικά νεότερες από εκείνες στην ομάδα του IVF (μέσος όρος ηλικίας 31.3 έναντι 33.4 αντίστοιχα). Επιπλέον, οι εγκυμοσύνες που προέκυψαν από μικρογονιμοποίηση είχαν χαμηλότερο ποσοστό αποβολών σε σχέση με αυτές που προέκυψαν από απλή IVF (11% έναντι 24% αντίστοιχα). Αυτό το εύρημα πιθανότατα μπορεί να αποδοθεί στη μικρότερη ηλικία της ομάδας ICSI και ειδικότερα στην έλλειψη συμπαραγόντων υπογονιμότητας (όπως δυσπλασίες της μήτρας και ιστορικό πυελικής φλεγμονής) στη συντριπτική πλειοψηφία αυτών. Μεταξύ των 238 παιδιών που γεννήθηκαν συνολικά, περιλαμβάνονται 104 μονήρεις κύσεις (45 IVF, 59 ICSI), 49 δίδυμες κύσεις (28 IVF, 21 ICSI) και 12 τρίδυμες κύσεις (3 IVF, 9 ICSI), όπως φαίνεται στην Εικόνα 14.



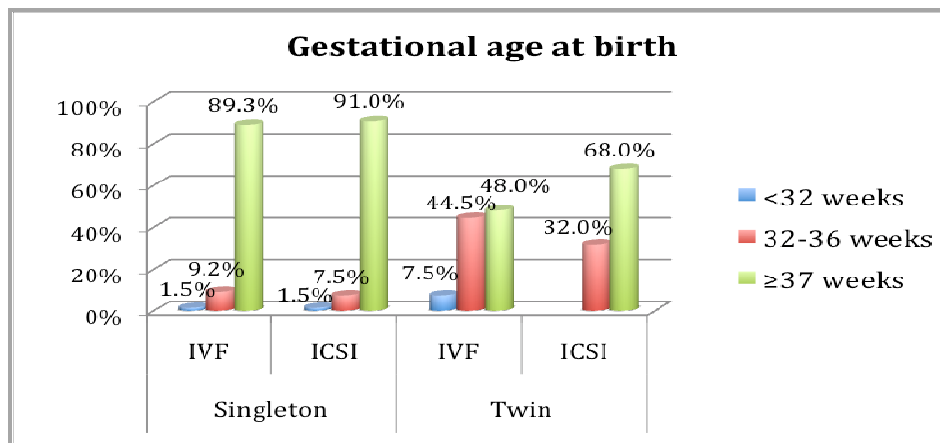
Εικόνα 14. Αριθμός μονήρων, δίδυμων και τρίδυμων κήσεων μετά από IVF και ICSI (τροποποίηση από Orvieto *et al.* 2000).

Σε μία αναδρομική μελέτη, συγκρίθηκαν 145 εγκυμοσύνες που είχαν προκύψει από την τεχνική ICSI με 145 εγκυμοσύνες από κλασική IVF στη διάρκεια 1993-1996 (Govaerts *et al.* 1998). Το ποσοστό των αμβλώσεων (11% στην ομάδα ICSI έναντι 15% στην ομάδα IVF), αλλά και το ποσοστό των πολύδυμων κήσεων (35% στην ομάδα ICSI έναντι 31% στην ομάδα IVF) ήταν παρόμοιο και με τις δύο μεθόδους.

Τα αποτελέσματα για τις μονήρεις (67 ICSI έναντι 66 IVF) και τις δίδυμες (34 ICSI έναντι 27 IVF) κήσεις μετά από ICSI και IVF συγκρίθηκαν ξεχωριστά (Εικόνες 15 και 16). Για τις μονήρεις κήσεις δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά ως προς την προωρότητα, το βάρος γέννησης και την ηλικία κύησης μεταξύ των δύο μεθόδων. Για τις δίδυμες κήσεις, η ηλικία κύησης για την ομάδα ICSI ήταν μία εβδομάδα αργότερα σε σχέση με την ομάδα IVF και για το λόγο αυτό το βάρος γέννησης στα δίδυμα που προέκυψαν από ICSI ήταν σημαντικά υψηλότερο σε σχέση με το αντίστοιχο των διδύμων από IVF.



Εικόνα 15. Βάρος γέννησης σε μονήρης και δίδυμες κύσεις μετά από IVF και ICSI (τροποποίηση από Govaerts *et al.* 1998).



Εικόνα 16. Ηλικία κύησης σε μονήρης και δίδυμες κύσεις μετά από IVF και ICSI (τροποποίηση από Govaerts *et al.* 1998).

Επιπλέον, στις μονήρεις κύσεις δεν υπήρχαν παθολογικές διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων. Οι επιπλοκές αυτές αφορούσαν τον πρόωρο τοκετό που απαιτεί νοσηλεία, αιμορραγία μετά από αποκόλληση του πλακούντα και υπέρταση που σχετίζεται με προεκλαμψία. Ωστόσο, και στις δύο ομάδες, περισσότερες επιπλοκές παρουσιάστηκαν στις δίδυμες κύσεις σε σύγκριση με τις μονές. Ο αριθμός των καισαρικών τομών ήταν παρόμοιος μεταξύ των ομάδων ICSI και IVF για τις μονήρεις (21% και 17% αντίστοιχα) και τις δίδυμες κύσεις (41% και 33% αντίστοιχα). Τέλος, στη μελέτη αυτή, δεν παρατηρήθηκαν περισσότερες συγγενής δυσπλασίες και ανωμαλίες καρυότυπου κι αυτό συνηγορεί υπέρ της ασφάλειας της τεχνικής ICSI.

6. ICSI έναντι IVF ως προς την αναπτυξιακή πορεία των εμβρύων *in vitro*

Θεωρητικά, τόσο η τεχνική της μικρογονιμοποίησης όσο και η πιθανότητα έγχυσης ενός ανώμαλου σπερματοζωαρίου μπορούν να επηρεάσουν το ωάριο και ακολούθως την ποιότητα του εμβρύου. Στη διάρκεια της μικρογονιμοποίησης, δεν μπορεί να αποφευχθεί η έγχυση μικρής ποσότητας διαλύματος (πχ PVP) μέσα στο ωάριο, το οποίο δυνητικά περιέχει επιβλαβή στοιχεία. Επίσης, στη διάρκεια της τεχνικής ICSI μπορεί να προκληθεί καταστροφή κυτταροπλασματικών δομών από μια τραυματική έγχυση σπερματοζωαρίου. Εν όψει όλων αυτών, μπορεί να υποτεθεί ότι τα ζυγωτά που προκύπτουν από την τεχνική ICSI εμφανίζουν υψηλότερο ποσοστό κατεστραμμένων κυττάρων και κατά συνέπεια έχουν μειωμένη εμβρυική ανάπτυξη σε σχέση με τα αντίστοιχα ζυγωτά IVF.

Για το λόγω αυτό πραγματοποιήθηκε μια αναδρομική μελέτη των 1628 κύκλων εξωσωματικής γονιμοποίησης και συγκρίθηκαν τα έμβρυα που προέξυψαν μετά την εφαρμογή των μεθόδων ICSI και IVF (Dumoulin *et al.* 2000). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το ποσοστό γονιμοποίησης ήταν σημαντικά χαμηλότερο στην ομάδα ICSI σε σύγκριση με την ομάδα IVF. Τη δεύτερη μέρα ανάπτυξης (Day 2), τα έμβρυα που είχαν προέλθει από την τεχνική ICSI ήταν σημαντικά πιο ανεπτυγμένα, ενώ την τρίτη μέρα (Day 3) η διαφορά αυτή είχε εξαφανιστεί.

Επιπλέον, τα αποτελέσματα που αφορούσαν τα ποσοστά εμφύτευσης και εγκυμοσύνης ήταν καλύτερα στην ομάδα ICSI. Από την άλλη πλευρά, η εμβρυική ανάπτυξη των πλεοναζόντων εμβρύων (ίδιας μορφολογικής ποιότητας) μέχρι το στάδιο της βλαστοκύστης ήταν σημαντικά χαμηλότερη στην ομάδα ICSI σε σχέση με την ομάδα IVF.

Το προβάδισμα της εμβρυικής ανάπτυξης στην ομάδα ICSI κατά τη δεύτερη μέρα, μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι ο ρυθμός διαίρεσης και η ανάπτυξη μέχρι το στάδιο των 2 κυττάρων λαμβάνει χώρα αρκετές ώρες νωρίτερα μετά την τεχνική ICSI σε σύγκριση με την απλή IVF, καθώς η φύση της τεχνικής επιτρέπει την υπερπήδηση κάποιων χρονοβόρων διαδικασιών που συμβαίνουν κατά την IVF.

Όσον αφορά το λόγο για τον οποίο παρατηρήθηκε χαμηλότερη εμβρυική ανάπτυξη μέχρι το στάδιο της βλαστοκύστης από τα έμβρυα της ομάδας ICSI, είναι

πιθανώς ότι τα σπερματοζωάρια που χρησιμοποιήθηκαν στην τεχνική επιλέχθηκαν από έναν πληθυσμό σπερματοζωαρίων με σχετικά υψηλότερο ποσοστό καταταμήσεων DNA και χρωμοσωμικών ανωμαλιών, και/ή ότι μερικά ωάρια τραυματίστηκαν εξαιτίας της επεμβατικής τεχνικής.

Το γεγονός ότι τα ποσοστά εμφύτευσης και εγκυμοσύνης ήταν υψηλότερα με την τεχνική ICSI από τα αντίστοιχα ποσοστά της τεχνικής IVF, μπορεί να εξηγηθεί από την πιθανόν μεγαλύτερη γονιμότητα των γυναικών στην ομάδα ICSI σε σχέση με τις γυναίκες της ομάδας IVF. Αυτό συμβαίνει διότι οι ασθενείς που υποβάλλονται στη μικρογονιμοποίηση, επιλέγονται εξαιτίας του σοβαρού ανδρικού παράγοντα και αναμένεται οι γυναίκες αυτών των ζευγαριών να έχουν φυσιολογική γονιμότητα.

7. Συμπεράσματα

Μέχρι την εποχή που ανακαλύφθηκε η τεχνική της μικρογονιμοποίησης, η κλασική IVF αποτελούσε τη μέθοδο θεραπείας για τη γυναικεία υπογονιμότητα, όπως αυτή που οφείλεται σε βλάβη των σαλπίγγων, με ποσοστά εγκυμοσύνης περίπου 28-30% και ποσοστό γονιμοποίησης 68%. Πάνω από μία δεκαετία η τεχνική αυτή είχε ευρεία εφαρμογή ακόμα και σε ζευγάρια που αντιμετώπιζαν ανδρικό παράγοντα υπογονιμότητας. Όμως τα ποσοστά γονιμοποίησης (23%) ήταν εξαιρετικά χαμηλά και ζευγάρια με <500000 σπερματοζωάρια/εκσπερμάτιση αδυνατούσαν να θεραπευτούν με αυτή τη μέθοδο.

Το πρόβλημα της αποτυχίας γονιμοποίησης με την κλασική IVF ή του χαμηλού ποσοστού γονιμοποίησης (<20%), σε περιπτώσεις ανδρικού παράγοντα υπογονιμότητας ήρθε να λύσει η μέθοδος HIC-IVF. Παρόλα αυτά, τα ποσοστά γονιμοποίησης δεν έφτασαν σε αποδεκτά επίπεδα και από την άλλη πλευρά υπήρχε ο κίνδυνος της πολυπλοειδίας, λόγω της υψηλότερης συγκέντρωσης των σπερματοζωαρίων.

Στα μέσα της δεκαετίας του 1980 άρχισαν να εφαρμόζονται οι μέθοδοι μικροχειρισμού γαμετών ZD, PZD και SUZI που στόχευαν στο να ξεπεραστεί το εμπόδιο της πρόσβασης του σπερματοζωαρίου στο κυτταρόπλασμα του ωαρίου δηλαδή, η διάφανη ζώνη και η κυτταρική μεμβράνη. Οι τεχνικές αυτές έβρισκαν

εφαρμογή όταν ο αριθμός των σπερματοζωαρίων ήταν <50000/εκσπερμάτιση, όταν είχαν προηγηθεί επαναλαμβανόμενες αποτυχίες γονιμοποίησης με IVF και σε περιπτώσεις ήπιου ανδρικού παράγοντα υπογονιμότητας. Παρόλα αυτά, όλες αυτές οι μέθοδοι είχαν σοβαρά μειονεκτήματα: 1) είναι δύσκολο να προβλεφθεί εκ των προτέρων ποια τεχνική θα είναι η ιδανικότερη για τον κάθε ασθενή, 2) τα ποσοστά γονιμοποίησης και πολυσπερμίας ποικίλουν και είναι απρόβλεπτα και 3) κάποιοι ασθενείς εξακολουθούν να παραμένουν αθεράπευτοι σε όλες αυτές τις μεθόδους θεραπείας.

Η μέθοδος της μικρογονιμοποίησης αρχικά σχεδιάστηκε για να θεραπεύσει εκείνους που υπέφεραν από σοβαρό ανδρικό παράγοντα ή εκείνους των οποίων η υπογονιμότητα δεν οφείλονταν σε ανδρικό παράγοντα αλλά είχαν αποτυχημένες προσπάθειες με την κλασική IVF (Orvieto *et al.* 2000, El-Leissy 2005). Έτσι, η τεχνική ICSI από το 1992 αντικατέστησε σταδιακά όλες τις άλλες μεθόδους μικροχειρισμού γαμετών και κατάφερε να εξασφαλίσει υψηλά ποσοστά γονιμοποίησης και εγκυμοσύνης.

Τα ποσοστά επιτυχίας με την τεχνική ICSI είναι γενικά υψηλότερα από αντίστοιχα ποσοστά με τη μέθοδο IVF όταν χρησιμοποιούνται στη θεραπεία του ανδρικού παράγοντα. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί από τα εξής:

α) Οι γυναίκες που υποβάλλονται στην τεχνική της μικρογονιμοποίησης είναι συνήθως μικρότερης ηλικίας σε σύγκριση με αυτές που ακολουθούν την απλή IVF, οι οποίες συνήθως έχουν λάβει αρκετά χρόνια θεραπείας για σαλπιγγικούς παράγοντες (Aboulghar *et al.* 1996a).

β) Οι γυναίκες που υποβάλλονται στην τεχνική ICSI έχουν μία υγιή πύελο χωρίς προηγούμενο ιστορικό λοίμωξης και συμφύσεων.

γ) Εφαρμόζοντας την μέθοδο ICSI, η οποία απαιτεί τη διάνοιξη μιας οπής στη διάφανη ζώνη με τη βοήθεια μικροπιπέττας, γίνεται πιο εύκολα η εκκόλαψη και η εμφύτευση της βλαστοκύστης (Aboulghar *et al.* 1996a).

Για όλους τους παραπάνω λόγους, σε περιπτώσεις σοβαρού ανδρικού παράγοντα υπογονιμότητας, εφαρμόζεται ως πρώτη γραμμή θεραπείας η τεχνική ICSI. Από την άλλη πλευρά, ότα υπάρχει ήπιος ανδρικός παράγοντας, όπως ήπια

ΟΤΑ, προτείνεται η μέθοδος split IVF/ICSI στον πρώτο κύκλο, προκειμένου να αποφευχθεί η πλήρης αποτυχία γονιμοποίησης με την απλή IVF.

Παράλληλα, η τεχνική ICSI εφαρμόζεται σε περιπτώσεις που $\geq 80\%$ των σπερματοζωαρίων φέρουν αντισπερμικά αντισώματα ή όταν απουσιάζει το ακρόσωμα (globozoospermia). Επιπλέον, μπορεί να εφαρμοστεί σε μεγάλης ηλικίας γυναίκες με πτωχή ποιότητα ωαρίων, σε γυναίκών που πάσχουν από PCOS και σε αυτές που αποτελούν πτωχές απαντήτριες (≤ 3 ώρια σε κάθε κύκλο ωοληψίας) και ταυτόχρονα συντρέχει ήπιος ανδρικός παράγοντας, προκειμένου να αποφευχθεί η αποτυχία γονιμοποίησης με IVF. Τέλος, η τεχνική της μικρογονιμοποίησης εφαρμόζεται όταν υπάρχει προηγούμενη αποτυχία με την κλασική IVF.

Ωστόσο, σε περιπτώσεις βλάβης των σαλίγγων, τα αποτελέσματά της ICSI δεν είναι καλύτερα από εκείνα της απλής IVF και έτσι προτιμάται η κλασική IVF. Επιπλέον, στην ανεξήγητη υπογονιμότητα, δεν υπάρχουν διαφορές στα ποσοστά γονιμοποίησης μεταξύ των μεθόδων IVF και ICSI αλλά υπάρχει κίνδυνος αποτυχίας γονιμοποίησης με την απλή IVF και γι' αυτό το λόγο προτείνεται η διαδικασία split IVF/ICSI όταν είναι εφικτό.

Από την άλλη πλευρά, έχουν αυξηθεί οι ανησυχίες ότι οι γενετικοί παράγοντες που σχετίζονται με την ανδρική υπογονιμότητα μπορεί να μεταφερθούν στην επόμενη γενιά με την τεχνική ICSI και να αυξηθεί το ποσοστό των χρωμοσωμικά ανώμαλων απογόνων (El-Leissy 2005).

Αυτό μπορεί να συμβεί με πολλούς τρόπους (El-Leissy 2005):

- 1) Παρακάμπτοντας τους μηχανισμούς φυσικής επιλογής έναντι των παθολογικά ή γενετικά ανώμαλων σπερματοζωαρίων.
- 2) Με τη γονιμοποίηση χρωμοσωμικά ανώμαλων ωαρίων, αφού το μόνο κριτήριο επιλογής στη συγκεκριμένη τεχνική είναι η φαινομενικά φυσιολογική εμφάνιση του ωαρίου, η οποία είναι αρκετά υποκειμενική.
- 3) Το μεταβαλλόμενο περιβάλλον ή η μηχανική και χημική καταστροφή του ωαρίου, το οποίο μπορεί να οδηγήσει σε διαταραχές της μείωσης και μίτωσης.

- 4) Πολλές χημικές και περιβαλλοντικές τοξίνες, οι οποίες μπορεί να οδηγήσουν σε μεταλλάξεις, καταλήγοντας σε γενετικές ασθένειες που είναι ορατές κατά τη γέννηση.
- 5) Με ένα ανώριμο σπερματοζώαριο, στο οποίο η διαδικασία της πυρηνικής ωρίμανσης μπορεί να μην έχει ολοκληρωθεί.

Λαμβάνοντας υπόψιν τη μεγαλύτερη επιτυχία της τεχνικής ICSI όταν συγκρίνεται με την κλασική IVF στη θεραπεία του ανδρικού παράγοντα έναντι των πιθανών επιβλαβών αποτελεσμάτων που μπορεί να προκύψουν από την εφαρμογή της, η ICSI θα πρέπει να αποτελεί θεραπεία επιλογής στις περιπτώσεις σοβαρού ανδρικού παράγοντα ή μετά από αποτυχία με την κλασική IVF στις περιπτώσεις σαλπινγικού παράγοντα και ανεξήγητης υπογονιμότητας (El-Leissy 2005).

Επιπλέον, σύμφωνα με τις ετήσιες αναφορές της ESHRE από το 1999-2005, το ποσοστό εγκυμοσύνης μεταξύ των τεχνικών IVF και ICSI ήταν παρόμοιο και δεν καταγράφηκε κάποια σημαντική διαφορά. Για το λόγο αυτό και όσο υφίστανται θέματα ασφάλειας και κόστους, η τεχνική ICSI δεν μπορεί να αντικαταστήσει την κλασική IVF. Αντιθέτως, θα πρέπει να υπάρχουν σαφή κριτήρια επιλογής της. Στις περιπτώσεις οριακής oligo-ασθενο-τερατοζωοσπερμίας και ανεξήγητης υπογονιμότητας η διαδικασία split IVF/ICSI θα μπορούσε να μειώσει τα ποσοστά αποτυχίας γονιμοποίησης μετά από IVF, ενώ με τη βελτίωση των δοκιμασιών ελέγχου της γονιμοποιητικής ικανότητας του σπέρματος και την εφαρμογή τους σε επίπεδο ρουτίνας μπορεί να επιλέγεται ορθότερα η εφαρμογή της IVF ή της ICSI σε κάθε δεδομένο περιστατικό.

8. Βιβλιογραφία

Aboulghar M.A., Mansour R.T., Serour G.I. et al 1996a. Prospective controlled randomized study of in-vitro fertilization versus intracytoplasmic sperm injection in the treatment of tubal factor infertility with normal semen parameters. *Fertility Sterility* 66:753-756

Aboulghar M.A., Mansour R.T., Serour G.I., Sattar M.A. & Amin Y.M. 1996b. Intracytoplasmic Sperm Injection and Conventional in Vitro Fertilization for Sibling Oocytes in Cases of Unexplained Infertility and Borderline Semen. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 13:38-42

Al-Fifi S., Al-Binali A., Al-Shahrani M., Shafiq H., Bahar M., Almushait M., Sobandi L., Eskandar M. 2009. Congenital anomalies and other perinatal outcomes in ICSI vs. naturally conceived pregnancies: a comparative study. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 26:377–381

Andersen N.A., Carlsen E. & Loft A. 2008a. Trends in the use of intracytoplasmic sperm injection marked variability between countries. *Human Reproduction Update* 14:593–604

Andersen N.A., Gianaroli L. & Nygren K.G. 2004. Assisted reproductive technology in Europe, 2000. Results generated from European registers by ESHRE. *Human Reproduction* 19:490-503

Andersen N.A., Gianaroli L., Felberbaum R., de Mouzon J. & Nygren K.G. 2005. Assisted reproductive technology in Europe, 2001. Results generated from European registers by ESHRE. *Human Reproduction* 20:1158–1176

Andersen N.A., Gianaroli L., Felberbaum R., de Mouzon J. & Nygren K.G. 2006. Assisted reproductive technology in Europe, 2002. Results generated from European registers by ESHRE. *Human Reproduction* 21:1680–1697

Andersen N.A., Goossens V., Bhattacharya S., Ferraretti A.P., de Mouzon K.J., Nygren K.G. 2009. Assisted reproductive technology and intrauterine inseminations in Europe, 2005: results generated from European registers by ESHRE. *Human Reproduction* 24:1267–1287

Andersen N.A., Goossens V., Ferraretti A.P., Bhattacharya S., Felberbaum R., de Mouzon J., Nygren K.G. 2008b. Assisted reproductive technology in Europe, 2004: results generated from European registers by ESHRE. *Human Reproduction* 23:756–771

Andersen N.A., Goossens V., Gianaroli L., Felberbaum R., de Mouzon J. & Nygren K.G. 2007. Assisted reproductive technology in Europe, 2003. Results generated from European registers by ESHRE. *Human Reproduction* 22:1513–1525

Benadiva C.A., Nulsen J., Siano L., Jennings J., Givargis H.B. & Maier D. 1999. Intracytoplasmic sperm injection overcomes previous fertilization failure with conventional in vitro fertilization. *Fertility and Sterility* 72:1041– 1044

- Bhattacharya S., Hamilton M.P.R., Shaaban M., Khalaf Y., Seddler M., Ghobara T., Braude P., Kennedy R., Rutherford A., Hartshorne G. & Templeton A. 2001. Conventional in-vitro fertilisation versus intracytoplasmic sperm injection for the treatment of non-male-factor infertility: a randomised controlled trial. *Lancet* 357: 2075–2079
- Bowen J.R., Gibson F.L., Leslie G.I. & Saunders D.M. 1998. Medical and developmental outcome at 1 year for children conceived by intracytoplasmic sperm injection. *Lancet* 351: 1529–1534
- Calderón G., Beril I., Aran B. et al 1995. Intracytoplasmic sperm injection versus conventional in-vitro fertilization: first results. *Human Reproduction* 10:2835-2839
- Cowan D.B., Santis M., Keefe T., Hargreaves C.A., Howell R.J.S. & Homa S.T. 1996. A bridge to intracytoplasmic sperm injection — high insemination concentrations benefit patients who have a reduced chance of fertilization with standard in-vitro fertilization. *Human Reproduction* 11:1985-1989
- Dumoulin J.C.M., Coonen E., Bras M., van Wissen L.C.P, Ignoul-Vanvuchelen R., Bergers-Jansen M.J., Derhaag J.G., Geraedts J.P.M. & Evers J.L.H. 2000. Comparison of in-vitro development of embryos originating from either conventional in-vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction* 15:402-409
- Edirisinghe R.W., Junk S., Yovich J.M., Bootsma B. & Yovich J.L. 1995. Andrology: Sperm Stimulants Can Improve Fertilization Rates in Male-Factor Cases Undergoing IVF to the Same Extent as Micromanipulation by Partial Zona Dissection (PZD) or Subzonal Sperm Insemination (SUZI): A Randomized Controlled Study. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 12:312-318
- El-Leissy M. 2005. Should We Do Routine or Selective ICSI? *ASJOG* 2:242-243
- El-Toukhy T. & Braudew P. 2002. Male infertility and ICSI. *Current Obstetrics & Gynaecology* 12:276-285
- Fishel S., Dowell K., Lisi F. & Rinaldi L. 1994. Subzonal insemination and zona breaching techniques for assisting conception in vitro. *Baillière's Clinical Obstetrics and Gynaecology* 8:65-84
- Gabrielsen A., Petersen K., Mikkelsen A.L. & Lindenberg S. 1996. Intracytoplasmic sperm injection does not overcome an oocyte defect in previous fertilization failure with conventional in-vitro fertilization and normal spermatozoa. *Human Reproduction* 11:1963-1965
- Govaerts I., Devreker F., Koenig I., Place I., Van den Bergh M. & Englert Y. 1998. Comparison of pregnancy outcome after intracytoplasmic sperm injection and in-vitro fertilization. *Human Reproduction* 13:1514–1518
- Govaerts L., Koenig I., Van den Bergh M., Bertrand E., Revelard Ph. & Englert Y. 1996. Is intracytoplasmic sperm injection (ICSI) a safe procedure? What do we learn from early pregnancy data about ICSI? *Human Reproduction* 11:440-443

Hall J., Fishel S., Green S., Fleming S., Hunter A., Stoddart N., Dowell K. & Thornton S. 1995. Intracytoplasmic sperm injection versus high insemination concentration in-vitro fertilization in cases of very severe teratozoospermia. *Human reproduction* 10: 493 – 496

Hwang J.L., Seow K.M., Lin Y.H., Hsieh B.C., Huang L.W., Chen H.J., Huang S.C., Chen C.Y., Chen P.H. & Tzeng C.R. 2005. IVF versus ICSI in sibling oocytes from patients with polycystic ovarian syndrome: a randomized controlled trial. *Human Reproduction* 20:1261–1265

Inge G.B., Brinsden P.R. & Elder K.T. 2005. Oocyte number per live birth in IVF: were Steptoe and Edwards less wasteful? *Human Reproduction* 20:588–592

Irvine D.S. 1994. Assisted reproduction and the male. *Current obstetrics and gynaecology* 4:129-136

Jaroudi K., Al-Hassan S., Al-Sufayan H., Al-Mayman H., Qeba M. & Coskun S. 2003. Intracytoplasmic Sperm Injection and Conventional In Vitro Fertilization Are Complementary Techniques in Management of Unexplained Infertility. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 20:377-381

Joris H., Nagy Z., Van de Velde H., De Vos A. & Van Steirteghem A. 1998. Intracytoplasmic sperm injection: laboratory set-up and injection procedure. *Human Reproduction* 13:76-86

Kastrop P.M.M., Weima S.M., Van Kooij R.J. & Te Velde E.R. 1999. Comparison between intracytoplasmic sperm injection and in-vitro fertilization (IVF) with high insemination concentration after total fertilization failure in a previous IVF attempt. *Human Reproduction* 14:65–69

Khamsi F., Yavas Y., Roberge S., Wong J.C., Lacanna I.C. & Endman M. 2001. Intracytoplasmic sperm injection increased fertilization and good-quality embryo formation in patients with non-male factor indications for in vitro fertilization: a prospective randomized study. *Fertility Sterility* 75:342–347

Lie R.T., Lyngstadaas A., Ørstavik K.H., Bakketeig L.S., Jacobsen G. & Tanbo T. 2005. Birth defects in children conceived by ICSI compared with children conceived by other IVF-methods; a meta-analysis. *International Journal of Epidemiology* 34:696–701

Liu J., Nagy Z., Joris H., Tournaye H., Devroey P. & Van Steirteghem A. 1995. Andrology: Successful fertilization and establishment of pregnancies after intracytoplasmic sperm injection in patients with globozoospermia. *Human Reproduction* 10: 626 - 629

Nagy Z.P., Verheyen G., Liu J., Joris H., Janssenswillen C., Wisanto A., Devroey P. & Van Steirteghem A.C. 1995. Andrology: Results of 55 intracytoplasmic sperm injection cycles in the treatment of male-immunological infertility. *Human Reproduction* 10: 1775 - 1780

Nygren K.G. & Nyboe Andersen A. 2002. Assisted reproductive technology in Europe, 1999. Results generated from European registers by ESHRE. *Human Reproduction* 17:3260–3274

Omland A.K., Bjercke S., Ertzeid G., Fedorcsák P., Oldereid N.B., Storeng R., Åbyholm T. & Tanbo T. 2006. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in unexplained and stage I endometriosis-associated infertility after fertilization failure with in vitro fertilization (IVF). *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 23:351–357

Orvieto R., Ben-Rafael Z., Ashkenazi J., Yoeli R., Messing B., Perri T., Shalev Y. & Bar-Hava I. 2000. Outcome of Pregnancies Derived from Assisted Reproductive Technologies: IVF versus ICSI. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 17:385–387

Ou Y.C., Lan K.C., Huang F.J., Kung F.T., Lan T.H. & Chang S.Y. 2010. Comparison of in vitro fertilization versus intracytoplasmic sperm injection in extremely low oocyte retrieval cycles. *Fertility Sterility* 93:96–100

Palermo G., Joris H., Devroey P. & Van Steirteghem A.C. 1992. "Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte". *Lancet* 340:17-18

Payne D., Flaherty S.P., Jeffrey R., Warnes G.M. & Matthews C.D. 1994. Andrology: Successful treatment of severe male factor infertility in 100 consecutive cycles using intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction* 9: 2051 – 2057

Persson J.W., Peters G.B. & Saunders D.M. 1996. Genetic consequences of ICSI. Is ICSI associated with risks of genetic disease? Implications for counselling, practice and research. *Human Reproduction* 11:921-932

Plachot M., Belaisch-Allart J., Mayenga J.M., Chouraqui A., Tesquier L. & Serkine A.M. 2002. Outcome of conventional IVF and ICSI on sibling oocytes in mild male factor infertility. *Human Reproduction* 17:362-369

Saito H., Saito T., Kaneko T., Sasagawa I., Kuramoto T. & Hiroi M. 2000. Relatively poor oocyte quality is an indication for intracytoplasmic sperm injection. *Fertility and Sterility* 73:465–469

Short communication 2006. A prospective randomized trial of conventional in vitro fertilization versus intracytoplasmic sperm injection in unexplained infertility. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 23:137-140

Shveiky D., Simon A., Gino H., Safran A., Lewin A., Reubinoff B., Laufer N. & Revel A. 2006. Sibling oocyte submission to IVF and ICSI in unexplained infertility patients: a potential assay for gamete quality. *Reproductive BioMedicine Online* 12:371-374

Svalander P., Wikland M., Jakobsson A.H. & Forsberg A.S. 1994. Male-factor infertility: Subzonal Insemination (SUZI) or in Vitro Fertilization (IVF) in Microdroplets for the Treatment of Male-Factor Infertility. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 11:149-155

Tournaye H., Devroey P., Camus M., Staessen C., Bollen N., Smitz J. & van Steirteghem A.C. 1992. Comparison of in-vitro fertilization in male and tubal infertility: a 3 year survey. *Human Reproduction* 7:218-222

Van Steirteghem A. 1994. IVF and micromanipulation techniques for male-factor infertility. *Current opinion in obstetrics and gynecology* 6:173-177

Veeck L.L. 1999. An atlas of human gametes and conceptuses: an illustrated reference for assisted reproductive technology. Parthenon Publishing Group. (κεφάλαιο 10 σελ. 76-77)

Vela G., Luna M., Sandler B. & Copperman A.B. 2009. Advances and Controversies in Assisted Reproductive Technology. *Mount Sinai Journal of Medicine* 76:506–520

Wen S.W., Leader A., White R.R., Léveillé M.C., Wilkie V., Zhou J. & Walker M.C. 2010. A comprehensive assessment of outcomes in pregnancies conceived by in vitro fertilization/ intracytoplasmic sperm injection. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* doi:10.1016/j.ejogrb.2010.02.028