



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

«ΣΥΓΧΡΟΝΙΣΜΟΣ ΩΟΦΥΛΑΚΙΚΗΣ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ

ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΙΕΓΕΡΣΗ ΩΟΘΗΚΩΝ»

ΦΩΤΕΙΝΗ ΧΙΝΤΖΙΟΥ

ΕΙΔΙΚΕΥΟΜΕΝΗ ΙΑΤΡΟΣ ΜΑΙΕΥΤΙΚΗΣ-ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΑΣ

ΛΑΡΙΣΑ

Σεπτέμβριος 2015

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ

ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ Ι. ΔΑΠΟΝΤΕ

ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπουσα: Χριστίνα Μεσσήνη

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή : Χριστίνα Μεσσήνη

Αλέξανδρος Δαπόντε

Κωνσταντίνος Νταφόπουλος

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

“Κάποια μέρα κοιτάζοντας πίσω, τα χρόνια που αγωνίστηκες θα σου φαίνονται τα πιο ωραία”.

Ζίγκμουντ Φρόυντ, 1856-1939

Η πορεία του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών «Βιολογία της Αναπαραγωγής» ήταν για εμένα μία μοναδική εμπειρία και η παρούσα διπλωματική εργασία είναι το επισφράγισμά της. Αισθάνομαι την ανάγκη να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στον αναπληρωτή καθηγητή Μαιευτικής-Γυναικολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και Διευθυντή του Μεταπτυχιακού Προγράμματος κο Αλέξανδρο Δαπόντε που, χάρη στην εμπειρία του και την επιστημονική του κατάρτιση, με βοήθησε να αποκομίσω πολύτιμες γνώσεις.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον αναπληρωτή καθηγητή Μαιευτικής-Γυναικολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κο Κωνσταντίνο Νταφόπουλο για την επιστημονική του συμβολή στην εκπόνηση αυτής της εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς την κα Χριστίνα Μεσσήνη, Λέκτορα της Μαιευτικής-Γυναικολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και επιβλέπουσα της παρούσας διπλωματικής εργασίας, γιατί πέρα από τις σημαντικές παρατηρήσεις της στο παρόν πόνημα, υπήρξε για εμένα πηγή έμπνευσης και στήριγμα για την επιτυχημένη ολοκλήρωση της εργασίας αυτής.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Από το 1978, που οι Patrick Steptoe και Robert Edwards πέτυχαν την πρώτη γέννηση παιδιού με τη μέθοδο της εξωσωματικής γονιμοποίησης, έως σήμερα, η τεχνολογία της IVF (In Vitro Fertilization) παρουσιάζει μία αλματώδη εξέλιξη. Όλο και περισσότερα υπογόνιμα ζευγάρια καταφεύγουν σε αυτήν και για αυτόν το λόγο, γίνεται πλέον επιτακτική η ανάγκη να βρεθούν νέοι τρόποι, που θα βελτιώσουν την αποτελεσματικότητα της IVF και θα οδηγήσουν σε μεγαλύτερα ποσοστά επιτυχούς κύησης.

Η μέθοδος της εξωσωματικής γονιμοποίησης περιλαμβάνει την ωθηκική διέγερση, την ωοληψία και τη γονιμοποίηση των ωαρίων από σπερματοζωάρια στο εργαστήριο. Η διέγερση των ωοθηκών, χρησιμοποιώντας διάφορα πρωτόκολλα και συνδυασμούς φαρμάκων, αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους παράγοντες, που θα κρίνει την έκβαση της IVF. Επιπλέον, καθίσταται σαφές, ότι ένας ικανός αριθμός ωοθυλακίων αυξάνει τις πιθανότητες για περισσότερα ώριμα ωάρια κατά την ωοληψία και, συνεπώς, τη δυνατότητα για «καλής ποιότητας» έμβρυα μετά τη γονιμοποίησή τους στο εργαστήριο. Με βάση τα παραπάνω, όσο περισσότερα ωοθυλάκια παρουσιάζουν μια συντονισμένη ανάπτυξη, τόσο αυξάνεται η δυνατότητα ωρίμανσης μεγαλύτερου αριθμού ωαρίων κατά την ωοθηκική διέγερση.

Στην παρούσα εργασία παρατίθενται οι μελέτες, που έχουν γίνει τα τελευταία χρόνια σε ανθρώπους και σε ζώα, σχετικά με τις μεθόδους που μπορούν να εφαρμοστούν, ώστε να επιτευχθεί όσο το δυνατόν μεγαλύτερος συγχρονισμός της ωρίμανσης μεταξύ των ωοθυλακίων κατά τη διέγερση των ωοθηκών. Στο τέλος, με βάση τα αποτελέσματα των ερευνών, προτείνεται ένα πρωτόκολλο, που μπορεί να βελτιώσει το συγχρονισμό της ωοθυλακικής ωρίμανσης κατά την ωοθηκική διέγερση.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ:

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

1.1	Στάδια της ωοθυλακικής ωρίμανσης.....	6
1.2	Ορμόνες που συμμετέχουν στο γεννητικό κύκλο.....	10
1.3	Η επίδραση των ορμονικών μεταβολών στα ωοθυλάκια κατά το γεννητικό κύκλο.....	11
1.4	Ελεγχόμενη διέγερση των ωοθηκών.....	13
1.5	Φαρμακευτικές ουσίες που χρησιμοποιούνται στην ωοθηκική διέγερση.....	13
1.5.1	Κιτρική Κλομιφαίνη.....	14
1.5.2	Αναστολείς Αρωματάσης.....	15
1.5.3	Γοναδοτροφίνες.....	15
1.6	Πρωτόκολλα ωοθηκικής διέγερσης.....	15
1.6.1	Μακρύ πρωτόκολλο (Long).....	15
1.6.2	Βραχύ πρωτόκολλο (Short).....	16
1.6.3	Πρωτόκολλο ανταγωνιστών.....	17

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

2.1	Εισαγωγή.....	19
2.2	Ο ρόλος των οιστρογόνων στο συγχρονισμό των ωοθυλακίων.....	19
2.3	Συγχρονισμός ωοθυλακικής ωρίμανσης in vivo με τη χρήση της Σιλοσταζόλης (CLZ).....	21
2.4	Βελτίωση της ωοθυλακικής ωρίμανσης με τη χρήση του παράγοντα Insulin-Transferin-Selenium (ITS).....	22

2.5	Ο ρόλος της μελατονίνης στην ωρίμανση των ωαρίων.....	23
2.6	Η χορήγηση της οιστραδιόλης κατά την ωχρινική φάση του γεννητικού κύκλου και ο ρόλος των αντισυλληπτικών στο συγχρονισμό της ωοθυλακικής ωρίμανσης.....	24
2.7	Η πρόωρη έναρξη χορήγησης του GnRH ανταγωνιστή κατά την ελεγχόμενη διέγερση των ωοθηκών.....	26
2.7.1	Πρωτόκολλο πρόωρης έναρξης GnRH ανταγωνιστή (Early GnRH Antagonist Start Protocol).....	29
2.7.2	Τροποποιημένο πρωτόκολλο πρόωρης έναρξης GnRH ανταγωνιστή (Modified Early Antagonist Start Protocol).....	30
2.8	Ο ρόλος του συγχρονισμού της ωοθυλακικής ωρίμανσης σε πτωχής απόκρισης γυναίκες (poor responders).....	31
2.8.1	Η χορήγηση οιστραδιόλης και GnRH ανταγωνιστή κατά την ωχρινική φάση	31
2.8.2	Συγχρονισμός της έναρξης της ωοθηκικής διέγερσης με το «κύμα» στρατολόγησης των ωοθυλακίων (follicular wave).....	32

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

3.1	Εισαγωγή.....	34
3.2	Σκοπός της μελέτης.....	34
3.3	Υλικό και μέθοδος.....	35
3.4	Αποτελέσματα.....	37
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	38

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

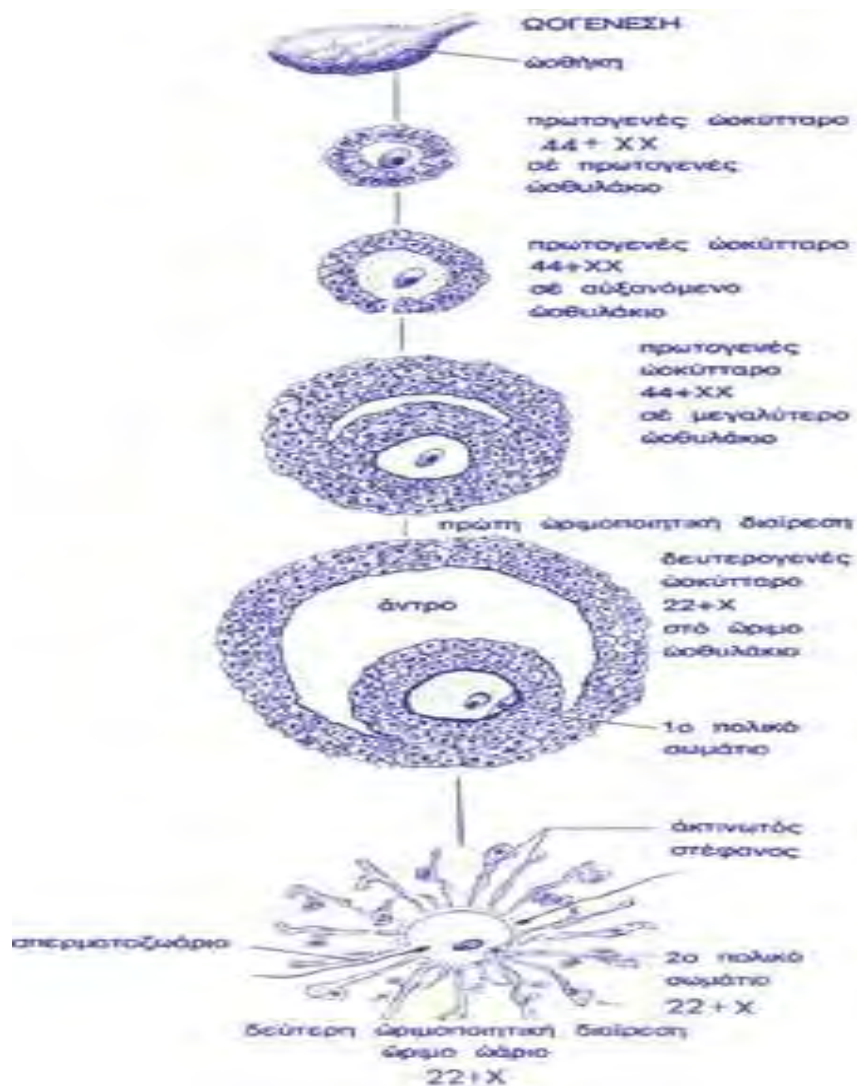
1.1 ΣΤΑΔΙΑ ΤΗΣ ΩΟΘΥΛΑΚΙΚΗΣ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ

Το ωοθυλάκιο αποτελεί τη βασική λειτουργική μονάδα της ωοθήκης. Στην ωοθήκη βρίσκονται ωοθυλάκια σε διάφορα στάδια ανάπτυξης (αρχέγονα, πρωτογενή, δευτερογενή). Η εμβρυολογική μορφή των ωοθυλακίων, από την οποία προκύπτουν οι υπόλοιπες μορφές, ονομάζεται **αρχέγονο ωοθυλάκιο**. Το αρχέγονο ωοθυλάκιο με διάμετρο 30-60 μm βρίσκεται στο φλοιό της ωοθήκης και αποτελείται στο κέντρο του από ένα ωάριο ή ωοκύτταρο με διπλοειδή αριθμό χρωμοσωμάτων, καθώς η μειωτική του διαίρεση έχει ανασταλεί στο στάδιο της πρόφασης της πρώτης μειωτικής διαίρεσης. Το ωοκύτταρο αυτό περιβάλλεται από έναν στοίχο επιπέδων κυττάρων (προκοκκώδη κύτταρα) και μία βασική μεμβράνη, που χωρίζει το σύμπλεγμα ωάριο-κοκκώδη κύτταρα από τον πέριξ ιστό. Στο στάδιο του αρχέγονου ωοθυλακίου τα προκοκκώδη κύτταρα δεν εμφανίζουν δραστηριότητα, μέχρις ότου το ωάριο περιβληθεί από τη διάφανη ζώνη, οπότε και μετατρέπονται σε τυπικά κοκκώδη κύτταρα με το κυβοειδές επιθήλιο.

Με την έναρξη της εφηβείας υπάρχουν περίπου 300.000 - 400.000 αρχέγονα ωοθυλάκια. Κατά τη διάρκεια της αναπαραγωγικής ηλικίας της γυναίκας ένα μέρος από αυτά θα οδηγηθεί σε ατρησία, ενώ τα υπόλοιπα θα συνεχίσουν να εξελίσσονται κανονικά και να μετατρέπονται αρχικά σε πρωτογενή και αργότερα σε δευτερογενή ωοθυλάκια. Τελικά μόνο 300 - 400 ωοθυλάκια αναμένεται να ωριμάσουν πλήρως και να φτάσουν σε ωοθυλακιόρρηξη, ενώ τα υπόλοιπα θα εκφυλισθούν και κατά την εμμηνόπαυση θα παραμείνουν μόνο περί τα 1000 ωοθυλάκια, τα οποία είναι ανενεργά.

Το αρχέγονο ωοθυλάκιο αναπτυσσόμενο εξελίσσεται στο **πρωτογενές ωοθυλάκιο**, το οποίο έχει διάμετρο μεγαλύτερη των 60μm. Το πρωτογενές ωοθυλάκιο αποτελείται: από ένα πλήρως αναπτυγμένο ωάριο, πέριξ του οποίου υπάρχει η διαφανής ζώνη, από μία ή δύο στοιβάδες κυβοειδών κοκκωδών κυττάρων και από μία βασική μεμβράνη γύρω από τα κοκκώδη κύτταρα, που ονομάζεται μεμβράνη κοκκωδών κυττάρων.

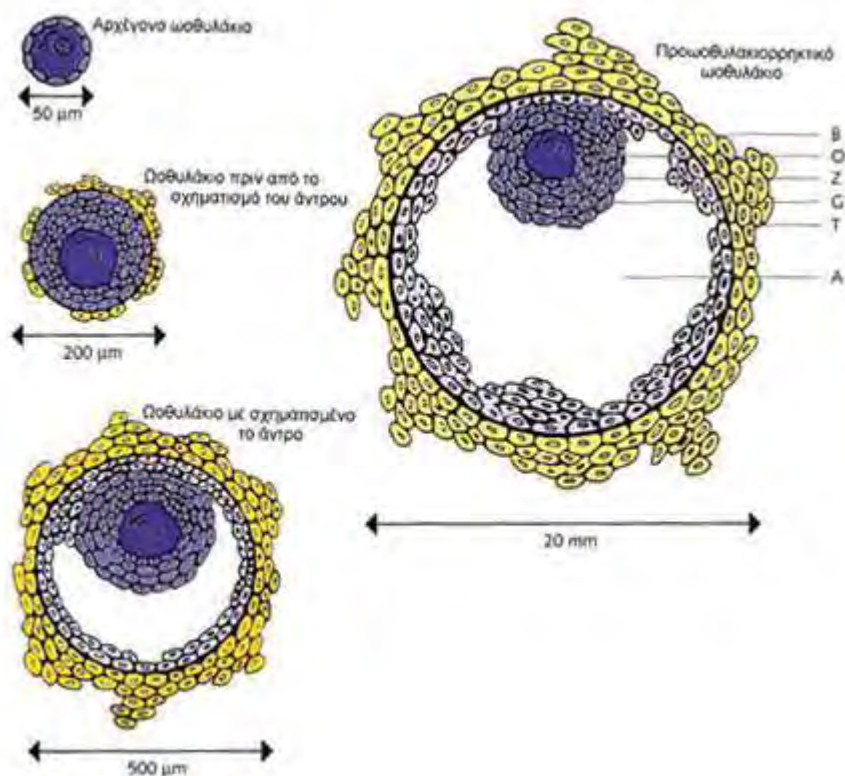
Η περαιτέρω ανάπτυξη του πρωτογενούς ωοθυλακίου οδηγεί στο **δευτερογενές ωοθυλάκιο**, με διάμετρο περίπου 120μm. Σε αυτήν τη φάση της ωοθυλακικής ανάπτυξης, τα κοκκώδη κύτταρα πολλαπλασιάζονται και διαφοροποιούνται σε κύτταρα της κοκκώδους στιβάδας έσωθεν της βασικής μεμβράνης και σε κύτταρα της έσω και έξω θήκης του ωοθυλακίου. Με την έκκριση βλεννοπολυσακχαριδών από τα κοκκώδη κύτταρα σχηματίζεται η μεμβράνη που περιβάλλει το ωάριο (διαφανής ζώνη). Κυτταροπλασματικές προσεκβολές των κοκκωδών κυττάρων διεισδύουν τη διαφανή ζώνη και δημιουργούν ένα είδος επικοινωνίας με τη μεμβράνη του ωοκυττάρου, μεταφέροντας έτσι πληροφορίες ή τροφικά στοιχεία στο ωάριο.



Εικόνα 1: Ωογένεση

Η ανάπτυξη της έσω θήκης, που έχει αρχίσει ήδη από το στάδιο του πρωτογενούς ωοθυλακίου, γίνεται κατά κύριο λόγο στη μυελώδη μοίρα της ωοθήκης, στην οποία το δευτερογενές ωοθυλάκιο μεταναστεύει από τη φλοιώδη μοίρα και έχει σπουδαία λειτουργική σημασία, καθώς στα κύτταρά της εμφανίζονται υποδοχείς της LH. Ταυτόχρονα, με την ανάπτυξη της έσω θήκης επιτυγχάνεται και η αγγείωσή της, ενώ η κοκκώδης στοιβάδα, όπου εμφανίζονται υποδοχείς της FSH, στερείται αγγείων. Τέλος η έσω θήκη περιβάλλεται από την έξω θήκη, η οποία προέρχεται από τα κύτταρα του στρώματος και δεν εμφανίζει σπουδαία λειτουργική σημασία.

Περαιτέρω ανάπτυξη έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία στο κέντρο του ωοθυλακίου μίας κοιλότητας, που καλείται άντρο του ωοθυλακίου. Το άντρο περιέχει το ωοθυλακικό υγρό, το οποίο διαχωρίζει τα κύτταρα που περιβάλλουν το ωοκύτταρο από τα υπόλοιπα κοκκώδη κύτταρα, σχηματίζοντας τον ωοφόρο δίσκο και τον ακτινωτό στέφανο. Μέχρι την εμφάνιση του άντρου, η έναρξη της ωρίμανσης των αρχέγονων ωοθυλακίων ελέγχεται και κατευθύνεται από ενδοωοθητικούς παράγοντες και δεν επηρεάζεται από τις γοναδοτροφίνες FSH και LH.



Εικόνα 2: Σχηματική παράσταση των ωοθυλακίων από το αρχέγονο έως το γρααφιανό

B= βασική μεμβράνη

O= ωάριο

Z= διαφανής ζώνη

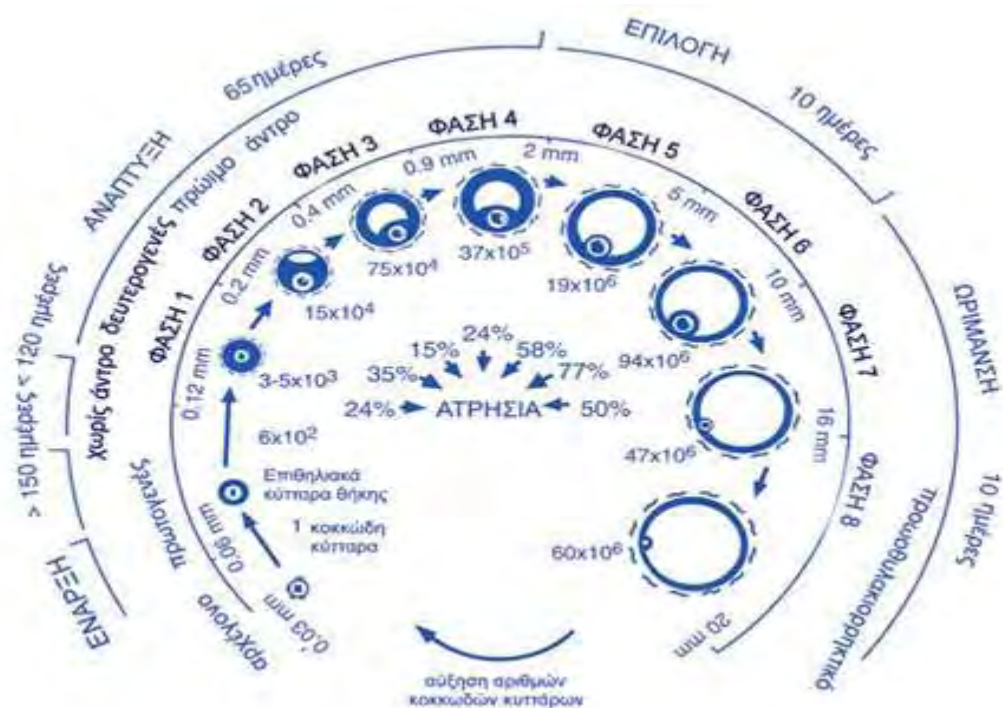
G= κοκκιώδη κύτταρα

T= κύτταρα της θήκης

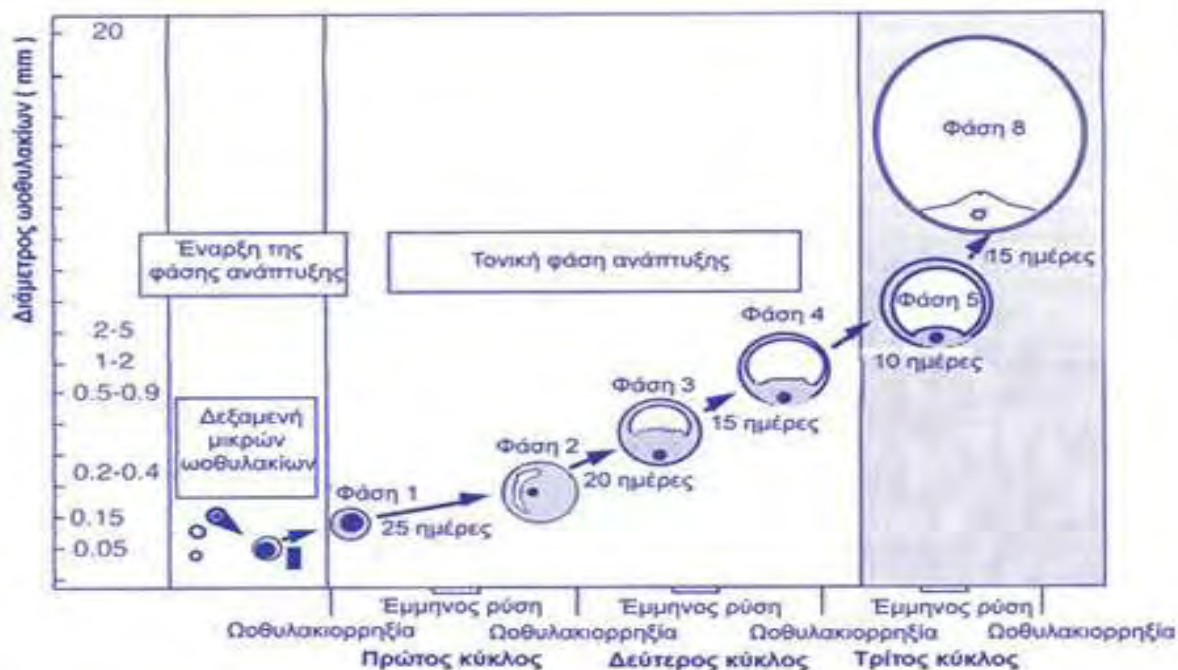
A= άντρο του ωοθυλακίου

Ανάλογα με το κατά πόσο στο δευτερογενές ωοθυλάκιο έχει σχηματιστεί η κοιλότητα (άντρο) ή όχι, αυτό διακρίνεται σε προκοιλοτικό (preantral) και σε κοιλοτικό (antral). Τα ωοθυλάκια, εκτός από την παραπάνω αδρή ταξινόμηση, διακρίνονται σε οκτώ κατηγορίες, ανάλογα με τον αριθμό των κοκκωδών κυττάρων και το μέγεθος του ωοθυλακίου, από το προκοιλοτικό έως το προωοθυλακιόρρηκτο, οι οποίες διαρκούν περίπου τρεις γεννητικούς κύκλους.

Έτσι, η κατηγορία 1 περιλαμβάνει το ώριμο δευτερογενές προκοιλοτικό ωοθυλάκιο (χωρίς άντρο), η κατηγορία 2 το πρώιμο κοιλοτικό (με άντρο), η κατηγορία 5 το κοιλοτικό μεγέθους 5mm και η κατηγορία 8 το προωοθυλακιόρρηκτο ωοθυλάκιο (18-20μm). Οι ενδιάμεσες κατηγορίες περιλαμβάνουν ωοθυλάκια σε ενδιάμεσο βαθμό εξέλιξης. Η ανάπτυξη του ωοθυλακίου από το ώριμο προκοιλοτικό (κατηγορία 1) στο μικρότερο κοιλοτικό (περίπου 150μm, κατηγορία 2) χρειάζεται περίπου 25 ημέρες, ενώ η ανάπτυξη μέχρι το μέγεθος των 2-5mm (κατηγορία 5) είναι σχετικά βραδεία (περίπου 70 ημέρες). Η ωρίμανση του ωοθυλακίου από την κατηγορία 5 στην κατηγορία 8 (τελευταίες 15 ημέρες) αντιστοιχούν στην ωοθυλακική φάση του γεννητικού κύκλου και εξαρτάται αποκλειστικά από τις γοναδοτροφίνες [49].



Εικόνα 3: Τα στάδια της ανάπτυξης του ωοθυλακίου από το αρχέγονο έως το γραφιανό κατά Gougeon et al., 1986.



Εικόνα 4: Χρονική πορεία της ανάπτυξης του ωοθυλακίου.

1.2 ΟΡΜΟΝΕΣ ΠΟΥ ΣΥΜΜΕΤΕΧΟΥΝ ΣΤΟ ΓΕΝΝΗΤΙΚΟ ΚΥΚΛΟ

Ο γεννητικός κύκλος δηλώνει ένα σύνολο ορμονικών μεταβολών κυκλικά επαναλαμβανόμενων. Οι μεταβολές αυτές είναι το αποτέλεσμα της αρμονικής συνεργασίας του υποθαλάμου, της υπόφυσης και των ωοθηκών μέσω των μηχανισμών παλίνδρομης αλληλορύθμισης. Έτσι η λειτουργία των γονάδων ρυθμίζεται από συγκεκριμένη περιοχή του εγκεφάλου, τον υποθάλαμο, ο οποίος εκκρίνει την ορμόνη απελευθέρωσης των γοναδοτροφινών, GnRH (Gonadotropin-Releasing hormone). Κατόπιν η GnRH επιδρά στη υπόφυση, η οποία εκκρίνει δύο κύριες ορμόνες, τις γοναδοτροφίνες. Εκτός από τις γοναδοτροφίνες, από την υπόφυση εκκρίνονται επίσης η αυξητική ορμόνη, η προλακτίνη, καθώς και ορμόνες για τη ρύθμιση της λειτουργίας του θυρεοειδούς αδένος, των επινεφριδίων και των γονάδων.

Συγκεκριμένα από τις γοναδοτροφίνες, η FSH (ωοθυλακιότροπος ορμόνη, follicle-stimulating hormone) είναι υπεύθυνη για την ανάπτυξη και στρατολόγηση των ωοθυλακίων και την επιλογή του ενός ωοθυλακίου προς ωοθυλακιορρηξία. Άλλη σημαντική δράση της είναι η σύνθεση οιστρογόνων από ανδρογόνα μέσω του ενζύμου της αρωματάσης. Από την άλλη η LH (ωχρινοποιητική ορμόνη, luteinizing hormone) προάγει τη σύνθεση ανδρογόνων από τα κύτταρα της έσω θήκης, καθώς και την τελική ωρίμανση του ωοκυττάρου, την πρόκληση της ωοθυλακιορρηξίας και το σχηματισμό και διατήρηση του ωχρού σωματίου.

Η παραγωγή ορμονών από την ωοθήκη εξαρτάται κυρίως από την επίδραση της FSH και της LH, ως συνέπεια των μηχανισμών της ανάδρομης αλληλορύθμισης (feedback). Έτσι, η μείωση της στάθμης των οιστρογόνων και της προγεστερόνης στο αίμα προς το τέλος της δεύτερης φάσης του κύκλου οδηγεί στην πριν από την έμμηνου ρύση αύξηση της FSH (διακυκλική αύξηση ή «παράθυρο» της FSH), λόγω άρσης της αρνητικής επίδρασης που ασκούσαν τα στεροειδή στο υποθαλαμο-υποφυσιακό σύστημα. Η μετέπειτα μείωση της FSH μετά το πρώτο ήμισυ της ωοθυλακικής φάσης του κύκλου οφείλεται στην αρνητική επίδραση που ασκεί η αυξανόμενη στάθμη της οιστραδιόλης. Η μεσοκύκλια εκκριτική αιχμή της LH και της FSH οφείλεται στην προηγηθείσα αύξηση (αιχμή) της οιστραδιόλης και προκαλείται με μηχανισμό θετικής επίδρασης με τη συνεργιστική δράση της GnRH. Η μετά τη μεσοκύκλια εκκριτική αιχμή ελάττωση της στάθμης των γοναδοτροφινών και η διατήρησή τους σε χαμηλά επίπεδα κατά τη δεύτερη φάση του κύκλου οφείλεται στην αύξηση της οιστραδιόλης και της προγεστερόνης κατά τη φάση αυτή (αρνητικός μηχανισμός παλίνδρομης αλληλορύθμισης) [49].

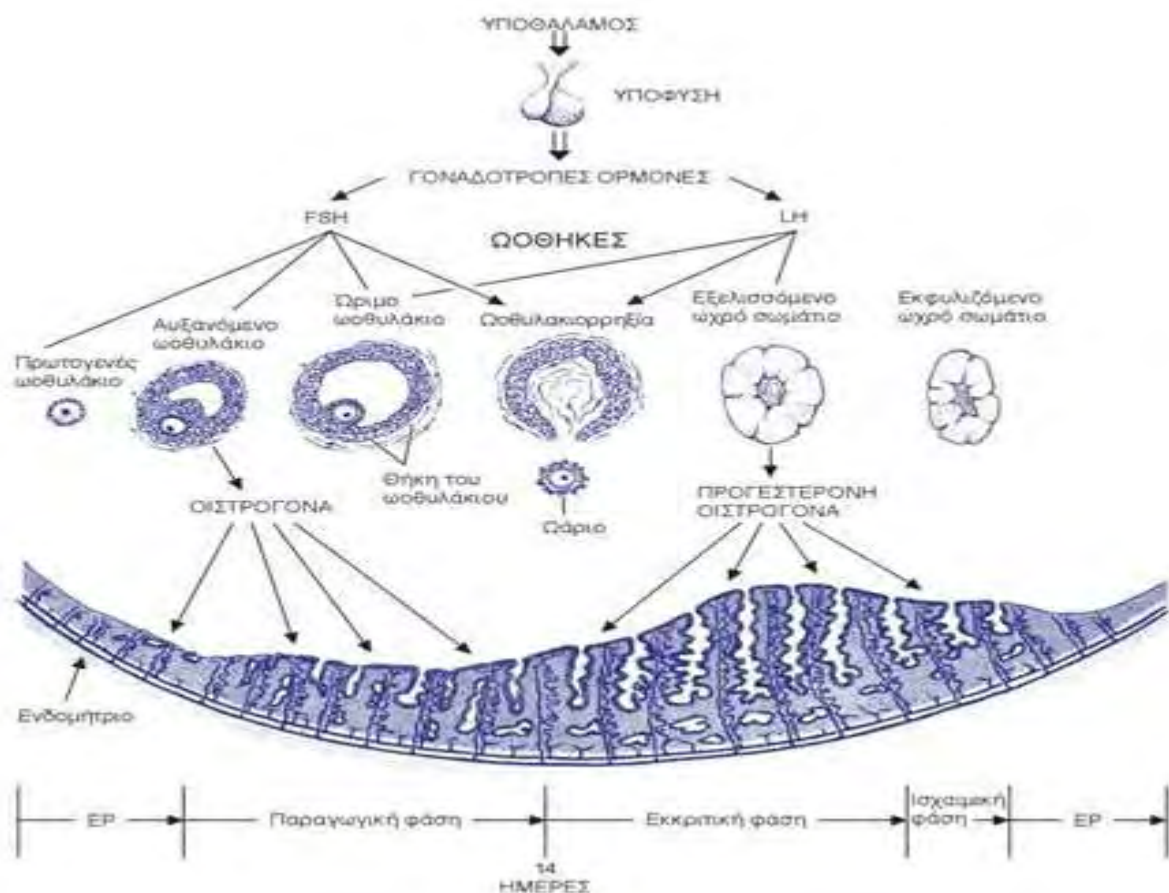
1.3 Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΟΡΜΟΝΙΚΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΩΝ ΣΤΑ ΩΟΘΥΛΑΚΙΑ ΚΑΤΑ ΤΟΝ ΓΕΝΝΗΤΙΚΟ ΚΥΚΛΟ

Η διακυκλική αύξηση της FSH, που ξεκινά 2-3 ημέρες πριν από την αναμενόμενη έμμηνο ρύση είναι υπεύθυνη για την επιλογή και ωρίμανση του ωοθυλακίου στο φυσιολογικό γεννητικό κύκλο. Συγκεκριμένα, κατά τη χρονική αυτή περίοδο υπάρχουν στις ωοθήκες αρκετά ωοθυλάκια μεγέθους 2-5mm περίπου, τα οποία στρατολογούνται. Ένα όμως από αυτά τελικά θα επιλεγεί. Η στρατολόγηση των ωοθυλακίων και η επιλογή του ενός εξαρτώνται αποκλειστικά από την FSH. Έτσι, κατά τη διακυκλική περίοδο, το ωοθυλάκιο που έχει το μεγαλύτερο αριθμό υποδοχέων FSH στα κοκκώδη κύτταρα, δηλαδή το πιο ευαίσθητο στην FSH, θα αρωματοποιήσει πρώτο τα ανδρογόνα σε οιστρογόνα. Εάν η οιστρογονοποίηση αυτή δεν επικρατήσει, τότε το περιβάλλον του ωοθυλακίου είναι κυρίως ανδρογονοποιημένο και το ωοθυλάκιο δεν μπορεί να ωριμάσει περαιτέρω, οπότε καθίσταται άτρητο και σταδιακά εξαφανίζεται στο στρώμα της ωοθήκης.

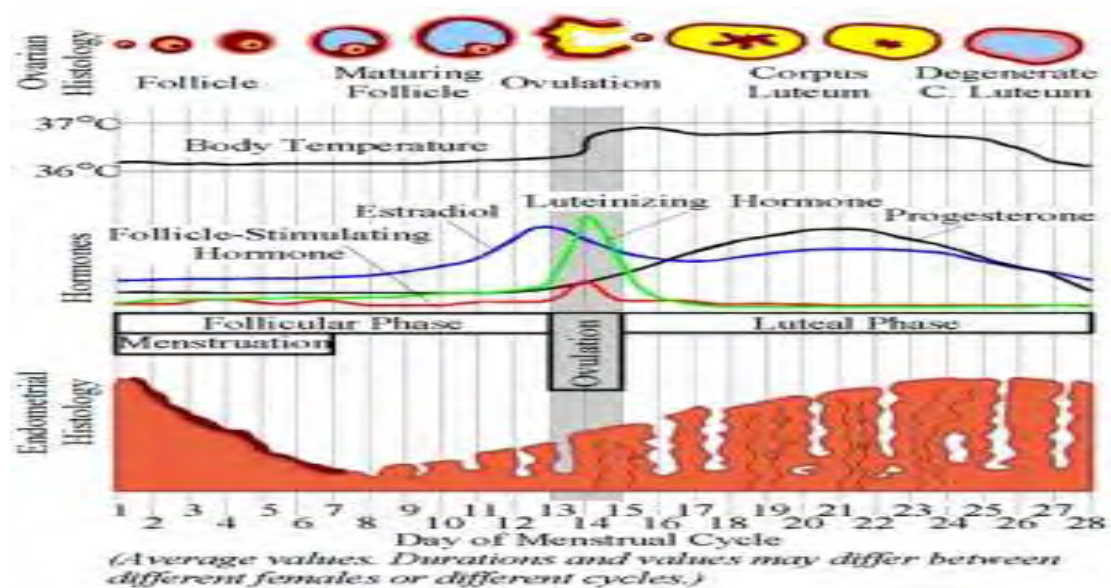
Το ωοθυλάκιο που θα επιλεγεί ονομάζεται **επικρατούν ή κυρίαρχο** και η ανάπτυξή του θα συνεχιστεί μέχρι το στάδιο του ώριμου **γραφιανού ή προωοθυλακιορρηκτικού**. Η αύξηση αυτή του ωοθυλακίου γίνεται με τη βοήθεια της FSH αλλά και της LH (στο δεύτερο ήμισυ της ωοθυλακικής φάσης), η οποία LH πολλαπλασιάζει τα κοκκώδη κύτταρα και αρωματοποιεί τα ανδρογόνα σε οιστρογόνα. Η ωοθυλακιορρηξία συμβαίνει τουλάχιστον 36 ώρες μετά από την έναρξη της εκκριτικής αιχμής της LH. Οι μεταβολές, που συμβαίνουν στο τοίχωμα του ωοθυλακίου υπό την επίδραση της LH, περιλαμβάνουν σημαντική υπεραιμία και οίδημα, λόγω της αυξημένης αιματικής ροής και της διαπερατότητας των τριχοειδών.

Μετά την ωοθυλακιορρηξία και υπό την επίδραση της LH, τα κοκκώδη κύτταρα του ραγέντος ωοθυλακίου ωχρινοποιούνται και σχηματίζουν το **ωχρο σωμάτιο**. Το ωχρο σωμάτιο, που παράγει άφθονες ποσότητες προγεστερόνης και σε μικρότερο βαθμό οιστραδιόλης, αποτελείται από τα ωχρινοποιημένα κοκκώδη κύτταρα, από τριχοειδή αγγεία και συνδετικό ιστό. Η λειτουργική ζωή του ωχρού σωματίου διαρκεί περίπου 14 ημέρες. Μετά το διάστημα αυτό, εφ' όσον δεν υπάρξει γονιμοποίηση, αυτό εκφυλίζεται (ωχρινόλυση) και αντικαθίσταται από ουλώδη ανάγγειο ιστό, που καλείται **λευκό σωμάτιο**.

Σε ορισμένες περιπτώσεις είναι δυνατόν το ωχρο σωμάτιο να μετατραπεί σε αιμορραγικό ωχρο σωμάτιο. Σε περίπτωση κύησης, το ωχρο σωμάτιο παραμένει βιολογικά ενεργό για περίπου 6-8 εβδομάδες υπό την επίδραση της χοριακής γοναδοτροφίνης, που παράγεται από τη συγκυτιοτροφοβλάστη του κυήματος, οπότε καλείται ωχρο σωμάτιο της κύησης και συνεχίζει να παράγει προγεστερόνη [43, 49].



Εικόνα 5: Η σχέση υποθαλάμου – υπόφυσης – ωοθήκης και η επίδραση των ωοθηκικών ορμονών στο ενδομήτριο κατά τη διάρκεια του γεννητικού κύκλου.



Εικόνα 6: Τα επίπεδα των ορμονών κατά τη διάρκεια του γεννητικού κύκλου.

1.4 ΕΛΕΓΧΟΜΕΝΗ ΔΙΕΓΕΡΣΗ ΤΩΝ ΩΟΘΗΚΩΝ

Η ελεγχόμενη διέγερση των ωοθηκών ή COS (Controlled Ovarian Stimulation) επιτυγχάνεται με το συνδυασμό φαρμάκων και τη δημιουργία των κατάλληλων θεραπευτικών πρωτοκόλλων, μέσω της χρήσης των γοναδοτροφινών και των GnRH-αναλόγων. Η COS συνέβαλε ουσιαστικά στη βελτίωση των μεθόδων της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής και στη δραματική αύξηση των ποσοστών επιτυχούς κύησης μετά από IVF (in vitro fertilization). Στόχος της ελεγχόμενης διέγερσης των ωοθηκών είναι η δημιουργία ικανού αριθμού ωοθυλακίων και η αποφυγή της πρόωρης και άκαιρης ρήξης αυτών πριν την ωοληψία (μέσω της αιχμής της LH) και άρα την απώλεια των ωαρίων.

Σε γυναίκες που δεν έχουν ωορρηξία τακτικά ή με ανωοθυλακιωρρηκτικούς κύκλους, όπως οι γυναίκες με σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών (ωοθηκική διαταραχή τύπου II κατά WHO) καθώς και στον υπογοναδοτροφικό υπογοναδισμό (ωοθηκική διαταραχή τύπου I κατά WHO), ο στόχος της φαρμακευτικής θεραπείας είναι να προκαλέσει την ανάπτυξη και την απελευθέρωση ενός ώριμου ωαρίου. Για το λόγο αυτό και η θεραπεία ονομάζεται **πρόκληση ωοθυλακιωρρηξίας**.

Σε αντίθεση, ο στόχος της θεραπείας για τις γυναίκες με τακτική έμμηνο ρύση, όπως σε γυναίκες με ενδομητρίωση, καθώς και σε ανεξηγήτου αιτιολογίας υπογονιμότητα ή σε υπογονιμότητα λόγω ήπιου ανδρικού παράγοντα είναι να επάγει την ανάπτυξη πολλαπλών ωοθυλακίων με την επακόλουθη απελευθέρωση πολλαπλών ωαρίων. Η ήπια ωοθηκική διέγερση στην περίπτωση αυτή δηλαδή γίνεται με στόχο την **ελεγχόμενη ανάπτυξη των ωοθυλακίων**.

1.5 ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ ΣΤΗΝ ΩΟΘΗΚΙΚΗ ΔΙΕΓΕΡΣΗ

Ο γενικός κανόνας με τον οποίο επιλέγουμε το κατάλληλο για κάθε ασθενή θεραπευτικό πρωτόκολλο ωορρηξίας βασίζεται στην εξατομίκευση της θεραπείας. Δεν υπάρχουν καθορισμένα πρωτόκολλα για όλες τις ασθενείς. Το κατάλληλο ανά ασθενή πρωτόκολλο προσδιορίζεται από τη μελέτη, ανάλυση και αξιολόγηση του συνδυασμού των κάτωθι κλινικών πληροφοριών:

- α) Ηλικία της ασθενούς,
- β) Μέτρηση FSH 2^η – 3^η ημέρα του εμμηνορρυσιακού κύκλου (παλαιότερα ινχιμπίνης, πιο πρόσφατα AMH),
- γ) Αριθμός των ωοθυλακίων στις δύο ωοθήκες την 3^η μέρα του εμμηνορρυσιακού κύκλου με τη χρήση των υπερήχων (antral follicular count),
- δ) Αιτία της υπογονιμότητας,

ε) Προηγθέν ιστορικό θεραπείας της υπογονιμότητας.

Ωστόσο, στην εφαρμογή τους, τα πρωτόκολλα αυτά δεν είναι άκαμπτα, γιατί κάθε οργανισμός αντιδρά διαφορετικά στα φάρμακα.

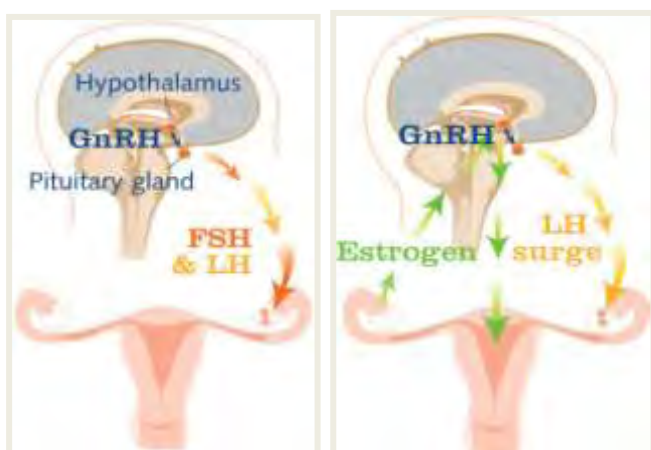
1.5.1 ΚΙΤΡΙΚΗ ΚΛΟΜΙΦΕΝΗ

Η φαρμακευτική ουσία που συνήθως χρησιμοποιείται ως πρώτη επιλογή για την πρόκληση ωοθυλακιορρηξίας είναι η κιτρική κλομιφένη. Δρα στην μήτρα και στον κόλπο ως αντισιοτρογόνο (κατηγορία των SERM) και προσδένεται στους οιστρογονικούς υποδοχείς στον υποθάλαμο και στην υπόφυση. Έτσι αναστέλλεται ο αρνητικός μηχανισμός παλίνδρομης αλληλορύθμισης με αποτέλεσμα την αύξηση της έκκρισης της GnRH και κατ' επέκταση των γοναδοτροφινών από την υπόφυση. Αυτό οδηγεί σε αύξηση του εύρους των ώσεων FSH - LH σε γυναίκες με ανωοθυλακιορρηξία και σε αύξηση της συχνότητας των ώσεων FSH - LH σε γυναίκες με ωοθυλακιορρηξία [44].

Χορηγείται για 5 ημέρες με έναρξη από την 2^η ημέρα του κύκλου με δισκία από του στόματος και αρχική δόση 50 mg/ημέρα με σταδιακή αύξηση της δόσης επί μη απόκρισης που δεν θα πρέπει να ξεπερνά τα 250 mg ημερησίως. Ως ανεπιθύμητες δράσεις έχουν αναφερθεί η κεφαλαλγία, οπτικές διαταραχές και εξάψεις.



Εικόνα 7: Η χορήγηση της κιτρικής κλομιφαίνης.



Εικόνα 8: Η επίδραση της κιτρικής κλομιφαίνης στον άξονα υποθάλαμος-υπόφυση-ωοθήκες.

1.5.2 ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΑΡΩΜΑΤΑΣΗΣ

Η δράση των αναστολέων αρωματάσης (λετροζόλη, αναστραζόλη) βασίζεται στην αναστολή μετατροπής των ανδρογόνων σε οιστρογόνα με αποτέλεσμα την αύξηση της FSH με την μείωση των οιστρογόνων μέσω του feedback και την διέγερση των ωοθηκών. Τα πλεονεκτήματα των παραπάνω φαρμακευτικών ουσιών είναι ότι τα παραγόμενα από το αναπτυσσόμενο ωοθυλάκιο οιστρογόνα, μέσω του feedback, εμποδίζουν την υπέρμετρη έκκριση FSH (αφού οι υποδοχείς, σε αντίθεση με την κλομιφαίνη είναι ελεύθεροι), και έτσι προάγεται η μόνο-ωοθυλακιόρρηξια, καθώς επίσης δεν επιδρούν δυσμενώς στο ενδομήτριο [45].

Χορηγούνται για 5 ημέρες από την 2^η- 3^η έως την 6^η-7^η ημέρα του κύκλου σε από του στόματος δισκία των 2,5 mg. Επισήμως δεν έχουν λάβει έγκριση για την θεραπεία της υπογονιμότητας.

1.5.3 ΓΟΝΑΔΟΤΡΟΦΙΝΕΣ

Οι γοναδοτροφίνες που χρησιμοποιούνται για την ωοθηκική διέγερση χωρίζονται σε αυτές των ούρων που είναι η ανθρώπινη μετεμνηνοπαυσιακή γοναδοτροφίνη (HMG), η κεκαθαρμένη HMG, η κεκαθαρμένη FSH και η HCG (Pregnyl) και στις ανασυνδυασμένες γοναδοτροφίνες, που είναι η FSH (πχ. φολλιτροπίνη-β, Puregon, Organon), η LH και η HCG.

1.6 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ ΩΟΘΗΚΙΚΗΣ ΔΙΕΓΕΡΣΗΣ

Τα πρωτόκολλα των γοναδοτροφινών μαζί με τα GnRH ανάλογα έτυχαν ευρείας αποδοχής και σήμερα τα περισσότερα προγράμματα IVF χρησιμοποιούν τα πρωτόκολλα αυτά ως μέθοδο διέγερσης των ωοθηκών. Ανάλογα με τις ιδιαιτερότητες της κάθε γυναίκας και σύμφωνα με την κρίση του ιατρού, επιλέγεται το καταλληλότερο, το οποίο προσαρμόζεται κατά τη διάρκεια της θεραπείας ανάλογα με τα αποτελέσματα. Στόχος όλων των πρωτοκόλλων κατά τη διάρκεια της διέγερσης είναι να παραχθεί και στη συνέχεια να συλλεγεί ένας ικανοποιητικός αριθμός ωαρίων (από 4 έως 15).

1.6.1 ΜΑΚΡΥ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ (Long)

Το μακρύ πρωτόκολλο ή GnRH agonist down regulation protocol που χρησιμοποιεί τα συναγωνιστικά ανάλογα της GnRH, διαρκεί περίπου έναν μήνα και διακρίνεται σε δύο φάσεις. Η πρώτη φάση της απευαισθητοποίησης της υπόφυσης (pituitary desensitization) και της κατ' επέκταση καταστολής της παραγωγής γοναδοτροφινών διαρκεί περίπου 10-14 ημέρες. Στη φάση αυτή η χορήγηση των GnRH αγωνιστών έχει ως αποτέλεσμα, μετά από μία αρχική αύξηση της παραγωγής των

γοναδοτροφινών (flare-up φαινόμενο), την απευαισθητοποίηση της υπόφυσης. Με την κατάληψη των υποδοχέων της GnRH από το ανάλογο και με την ελάττωση του αριθμού των υποδοχέων στα γοναδοτρόφα κύτταρα της υπόφυσης επιτυγχάνεται η καταστολή (down-regulation) των γοναδοτρόφων κυττάρων της υπόφυσης, με αποτέλεσμα να καταστέλλεται η ωθητική λειτουργία.

Η έναρξη του GnRH αναλόγου (Arvekar, Daronda, Superfact, Gonapeptyl) μπορεί να γίνει την 21^η ημέρα σε κανονικό κύκλο 28 ημερών, την 2^η ημέρα του κύκλου ή τρεις ημέρες πριν το τέλος αγωγής με αντισυλληπτικά χάπια.

Η δεύτερη φάση του πρωτοκόλλου είναι αυτή της διέγερσης των ωθητικών και ξεκινά όταν κριθεί ότι η καταστολή είναι επαρκής, ενώ διαρκεί περίπου 10-14 ημέρες. Επιτυγχάνεται με τη χορήγηση φαρμακευτικώς παρασκευαζόμενων γοναδοτροφινών (Puregon, Gonal-F, Altermon, Merional, Menopur) υπό τη συνεχιζόμενη καταστολή της λειτουργίας της υπόφυσης, δηλαδή της λήψης αναλόγου έως το τέλος της θεραπείας [46].

1.6.2 ΒΡΑΧΥ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ (SHORT)

Το βραχύ πρωτόκολλο ή flare-up GnRH protocol διαρκεί σχεδόν το μισό χρόνο από το μακρύ (10-15 ημέρες). Επιλέγεται κυρίως για τις γυναίκες με πτωχή απόκριση των ωθητικών στην πρόκληση πολλαπλής ανάπτυξης ωθυλακίων ή σε μεγαλύτερης ηλικίας γυναίκες (>39 ετών). Εδώ οι φάσεις καταστολής και διέγερσης γίνονται σχεδόν ταυτόχρονα. Συγκεκριμένα, η έναρξη του αγωνιστή της GnRH γίνεται συνήθως την 1^η-2^η ημέρα του κύκλου και η έναρξη των φαρμακευτικών γοναδοτροφινών την 2^η-3^η ημέρα του κύκλου.

Σε αυτό το πρωτόκολλο οι ωθήκες πυροδοτούνται από τις γοναδοτροφίνες με τρεις τρόπους με αποτέλεσμα να στρατολογούνται περισσότερα ωθυλάκια και να λαμβάνονται περισσότερα ωάρια κατά την ωληψία. Η πυροδότηση αυτή επιτυγχάνεται πρώτον με την αυξημένη ενδογενή FSH, που φυσιολογικά αυξάνεται στην αρχή του κύκλου, δεύτερον με την περαιτέρω αύξηση της ενδογενούς FSH που προκαλείται από τη διεγερτική δράση του GnRH αγωνιστή στην υπόφυση και τρίτον με τις φαρμακευτικές γοναδοτροφίνες που χορηγούνται εξωγενώς.

Τις τελευταίες ημέρες του βραχέος πρωτοκόλλου ασκείται η κατασταλτική δράση του GnRH αγωνιστή στην υπόφυση. Παραλλαγές του αποτελούν το υπερ-βραχύ, το Microflare (microdose flare) κ.α., ανάλογα με τη διάρκεια θεραπείας [46].

1.6.3 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΩΝ

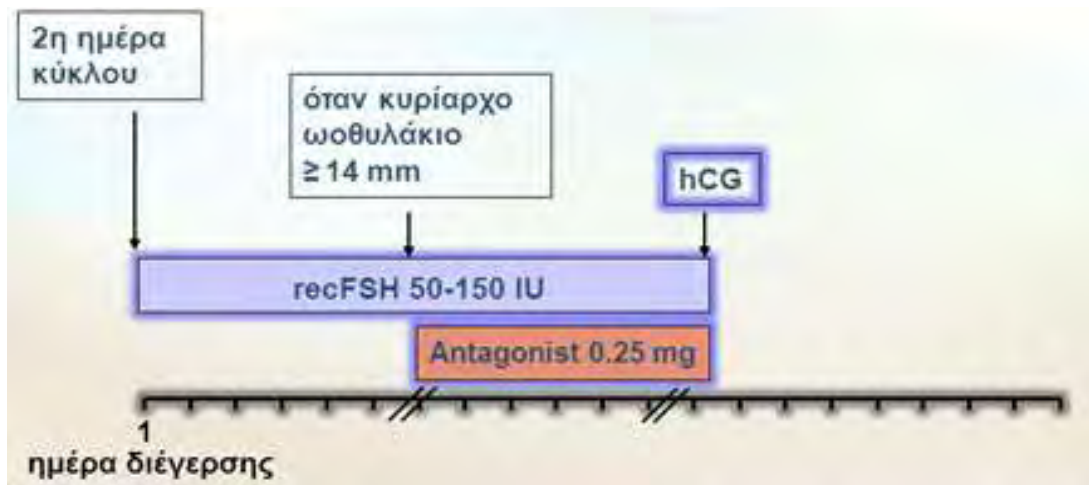
Στο πρωτόκολλο γοναδοτροφινών - ανταγωνιστών η διέγερση με γοναδοτροφίνες αρχίζει τη 2^η ή 3^η ημέρα του κύκλου και ακολουθεί η χορήγηση του ανταγωνιστικού αναλόγου της GnRH. Η έναρξη της χορήγησης του ανταγωνιστή γίνεται είτε την 5^η ή 6^η και σπανίως την 1^η ημέρα της διέγερσης με γοναδοτροφίνες (fixed πρωτόκολλο ανταγωνιστή), είτε με βάση υπερηχογραφικά και ορμονικά κριτήρια κατά τη διάρκεια της θεραπείας (flexible πρωτόκολλο ανταγωνιστή). Η διάρκεια του συγκεκριμένου πρωτοκόλλου υπολογίζεται περίπου σε 8-12 ημέρες.

Η δράση του βασίζεται στη σύνδεση των ανταγωνιστών με τους υποδοχείς της GnRH και στην επακόλουθη καταστολή της υπόφυσης, λόγω κατάληψης και όχι λόγω μείωσης του αριθμού των υποδοχέων GnRH. Η καταστολή επιτυγχάνεται σχεδόν αμέσως μετά τη χορήγησή τους με τελικό αποτέλεσμα την ελάττωση της παραγωγής των γοναδοτροφινών FSH και LH [47].

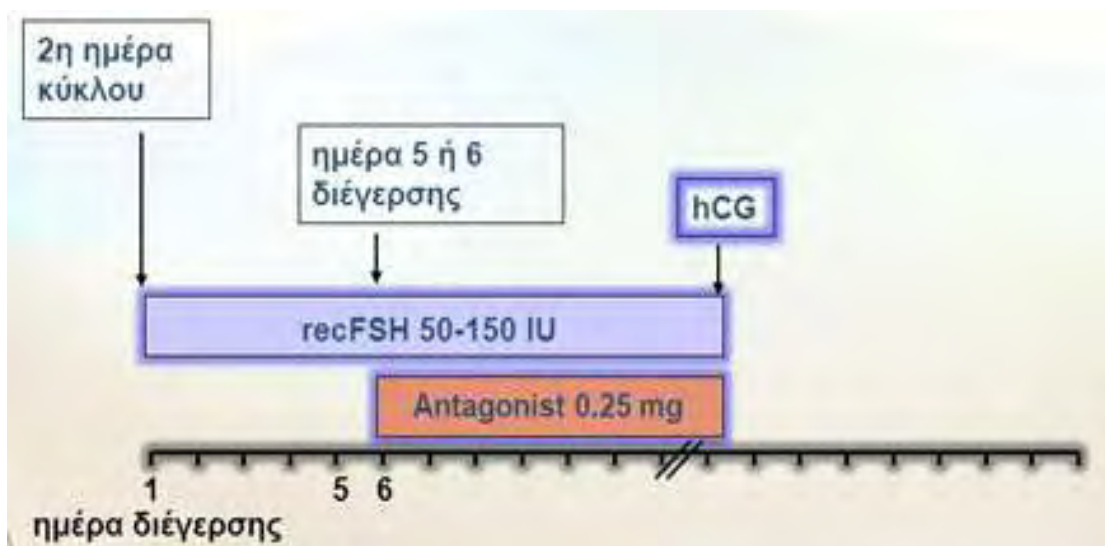
Είναι γνωστό ότι τα πρωτόκολλα των ανταγωνιστών είναι φιλικά προς τον ασθενή (patient friendly), λόγω των παρακάτω πλεονεκτημάτων:

- Απαιτούνται λιγότερες ενέσεις και μικρότερη συνολική δόση γοναδοτροφινών, με συνέπεια να ελαχιστοποιείται η πιθανότητα σοβαρών επιπλοκών, όπως το σύνδρομο υπερδιέγερσης ωοθηκών (OHSS).
- Έχουν μικρότερη διάρκεια θεραπείας.
- Η διάρκεια του GnRH αναλόγου είναι μικρότερη σε σύγκριση με τα υπόλοιπα πρωτόκολλα.
- Προσφέρονται για τροποποιημένους φυσικούς κύκλους, λόγω της εύκολης εφαρμογής τους και για πρωτόκολλα ήπιας διέγερσης.
- Δεν έχουν παρενέργειες (εξάψεις, εφιδρώσεις, νευρικότητα, αϋπνία κ.α.)

Flexible πρωτόκολλο ανταγωνιστή



Fixed πρωτόκολλο ανταγωνιστή



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η μελέτη του συγχρονισμού της ωοθυλακικής ωρίμανσης μετά από ωοθηκική διέγερση αποτελεί αντικείμενο πρόκλησης στις μέρες μας. Ο συντονισμός της ανάπτυξης των ωαρίων σε οποιοδήποτε στάδιο της ωοθυλακικής ωρίμανσης οδηγεί σε μεγαλύτερο αριθμό ώριμων ωαρίων και κατ' επέκταση σε αυξημένα ποσοστά γονιμοποίησης. Πρόσφατα έχουν γίνει έρευνες, κυρίως σε ζώα, σχετικά με τα φαρμακευτικά παρασκευάσματα και τον τρόπο χορήγησής τους, έτσι ώστε να διεγείρουμε τις ωοθήκες επιτυγχάνοντας ταυτόχρονα τον μεγαλύτερο δυνατό συγχρονισμό της ανάπτυξης των ωαρίων. Η μελέτη, λοιπόν, αυτών των αποτελεσμάτων ίσως μας βοηθήσει να εξελίξουμε στο μέλλον τα μέχρι τώρα πρωτόκολλα που χρησιμοποιούνται για την ωοθηκική διέγερση με απώτερο στόχο τα υψηλότερα ποσοστά κλινικής κύησης.

2.2 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ ΣΤΟ ΣΥΓΧΡΟΝΙΣΜΟ ΤΩΝ ΩΟΘΥΛΑΚΙΩΝ

Πρόσφατη μελέτη που έγινε σε προεφηβικά ποντίκια αξιολόγησε την απόκριση των ωοθυλακίων μετά από ελεγχόμενη διέγερση των ωοθηκών με γοναδοτροφίνες, τον συγχρονισμό της πολλαπλής ωοθυλακικής ανάπτυξης μετά από διέγερση με οιστρογόνα, τη μελλοντική αναπαραγωγική δυναμική τους, καθώς και το ενδεχόμενο εμφάνισης του συνδρόμου υπερδιέγερσης των ωοθηκών (PCOS) κατά την ενηλικίωσή τους. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν συγχρονισμό της ωοθυλακικής ανάπτυξης μετά την οιστρογονική διέγερση σε προεφηβικά ποντίκια, χωρίς να επηρεάζεται το αναπαραγωγικό αποτέλεσμα των ωαρίων τους και χωρίς να παραμένουν τα συμπτώματα που προκαλεί το PCOS κατά την ενήλικη ζωή. [1]

Συγκεκριμένα, η παρατήρηση στις ωοθήκες μετά την οιστρογονική διέγερση αποκάλυψε ότι ο αριθμός των δευτερογενών ωοθυλακίων (tertiary follicles) αυξήθηκε, αποδεικνύοντας έναν συγχρονισμό στην ωοθυλακική ανάπτυξη συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου. Όταν το μοντέλο των ποντικών, στο οποίο εφαρμόστηκε η διέγερση με οιστρογόνα, εκτράφηκε μέχρι την ενηλικίωση, καμία εμφανής διαφορά δεν βρέθηκε στην ανάπτυξη των ωοθυλακίων και στην ωορρηξία, σε σύγκριση με την ομάδα που δεν έλαβε οιστρογόνα.

Σύμφωνα με μία άλλη μελέτη σε αγελάδες, η ποιότητα της κοκκώδους στιβάδας επηρεάζεται αρνητικά από την παρουσία πολλών κυρίαρχων ωοθυλακίων (co-dominant), που οδηγούν σε χαμηλότερα ποσοστά βιώσιμων εμβρύων και σε υψηλότερο ποσοστό εκφυλισμένων κοκκωδών κυττάρων [2]. Όπως είναι γνωστό, η ανάπτυξη των ωοθυλακίων ξεκινά με την αύξηση της FSH και της LH κατά την ωχρινική φάση στο τέλος του γεννητικού κύκλου και τα αναπτυσσόμενα ωοθυλάκια αποτελούν την κύρια πηγή οιστρογόνων. Το κυρίαρχο ωοθυλάκιο παράγει οιστραδιόλη διεγείροντας έτσι τη δική του ανάπτυξη, ενώ την ίδια στιγμή (υπό την

επίδραση του άξονα υποθαλάμου - υπόφυσης) αναστέλλει την ανάπτυξη άλλων ωοθυλακίων, που καθίστανται άτρητα. Η ανάπτυξη των κυρίαρχων ωοθυλακίων οδηγεί σε μεγαλύτερα ποσά οιστρογόνων και προκαλεί, μέσω της FSH, αναστολή της ανάπτυξης των μικρότερων κοιλοτικών ωοθυλακίων με το μηχανισμό της αρνητικής παλινδρομής αλληλορύθμισης της υπόφυσης (που μειώνει την FSH). Αυτό αποδεικνύει ότι η αύξηση των οιστρογόνων στον ορό διατηρεί το κυρίαρχο ωοθυλάκιο και αναστέλλει την ανάπτυξη των μικρών κοιλοτικών [3].

Ωστόσο, οι λόγοι για τους οποίους τα οιστρογόνα, χορηγούμενα εξωγενώς, προκαλουν τη συγχρονισμένη ανάπτυξη περισσότερων ωοθυλακίων, θα μπορούσε να αποδοθεί σε ενδο-ωοθηκικά μονοπάτια σηματοδότησης. Συνήθως, το αρνητικό feedback των οιστρογόνων στην υποθαλαμική έκκριση της FSH, οδηγεί σε αναστολή της ανάπτυξης των ωοθυλακίων και όχι στην προώθηση αυτής. Έτσι, η συγχρονισμένη ωοθυλακική ανάπτυξη, που προκαλείται από την εξωγενή χορήγηση των οιστρογόνων, δεν είναι εφικτή, λόγω της δράσης των οιστρογόνων στον υποθάλαμο (αρνητικό feedback), αλλά φαίνεται να επιδρούν άμεσα στις ωοθήκες. Τα επίπεδα των οιστρογόνων στον ορό δεν αυξήθηκαν σημαντικά στα μοντέλα ποντικών, στα οποία χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά το συνθετικό ανάλογο οιστρογόνων DES (δισυλβιστιλβεστρόλη). Αυτό υποδηλώνει ότι το αρνητικό feedback των εξωγενώς χορηγούμενων οιστρογόνων στον υποθάλαμο δεν είναι σημαντικό και πιθανότατα τα οιστρογόνα δρουν απευθείας στις ωοθήκες, ώστε να προκαλέσουν τη συντονισμένη ανάπτυξη των ωοθυλακίων. Ακόμη τα οιστρογόνα μπορεί να αυξήσουν την ευαισθησία της FSH, επιδρώντας στη ρύθμιση της έκφρασης των υποδοχέων της FSH στα ωοθυλάκια και να προωθήσουν έτσι την ωοθυλακική ανάπτυξη σε χαμηλές συγκεντρώσεις FSH. Τα ανοσοϊστοχημικά αποτελέσματα, όσον αφορά την κατανομή των υποδοχέων FSH, LH και λεπτίνης στα ωοθυλάκια μετά την οιστρογονική θεραπεία, κατέδειξαν ότι οι υποδοχείς της FSH αυξήθηκαν στα ωάρια και στα δευτερογενή ωοθυλάκια, ενισχύοντας έτσι την άποψη ότι τα οιστρογόνα προωθούν απευθείας την ωοθυλακική ανάπτυξη ανεξάρτητα από τον άξονα υποθαλάμου - υπόφυσης. Μία άλλη μελέτη που έγινε σε ωοθυλάκια ψαριών *in vitro* κατέδειξε ότι η 17-β οιστραδιόλη ήταν η κύρια ενδοκρινής ορμόνη που ρύθμιζε ποικιλοτρόπως την έκφραση των υποδοχέων της FSH και της LH [1].

Ωστόσο, ο αυξημένος αριθμός των δευτερογενών ωοθυλακίων που προκλήθηκε από την εξωγενή χορήγηση οιστρογόνων, δεν ανταποκρίθηκε στις κλασικές θεραπείες ωοθηκικής διέγερσης, σε αντίθεση με τα ωοθυλάκια, στα οποία δεν υπήρξε οιστρογονική χορήγηση και απάντησαν ικανοποιητικά σε αυτές. Αυτό ίσως εξηγείται από το γεγονός ότι οι υποδοχείς FSH, LH και λεπτίνης διατηρήθηκαν σε υψηλότερα επίπεδα στα ωοθυλάκια της πειραματικής ομάδας. Όσον αφορά τα ωάρια μετά την ωοληψία, δεν παρατηρήθηκε καμία αξιόλογη μεταβολή στα κοκκώδη κύτταρα, καθώς και στη γονιμοποίηση και τη μετέπειτα *in vitro* ωρίμανση τους μέχρι το στάδιο της βλαστοκύστης. Ωστόσο, δεν έχει προσδιοριστεί αν υπήρξε κάποια επίδραση στα γονιμοποιημένα ωάρια κατά το στάδιο της εμφύτευσης, καθώς και στα μετέπειτα στάδια της κύησης. Γεγονός πάντως είναι ότι τα ωάρια μετά την οιστρογονική διέγερση, που υποβλήθηκαν σε *in vitro* γονιμοποίηση και εμβρυομεταφορά στο

στάδιο των δύο κυττάρων (στις σάλπιγγες) και στο στάδιο της βλαστοκύστης (στο ενδομήτριο) οδήγησαν σε φυσιολογικά έμβρυα. Αυτό καταδεικνύει ότι η χορήγηση οιστρογόνων δεν κατέστρεψε τα ωάρια.

Συμπερασματικά, η θεραπεία με οιστρογόνα σε προεφηβικά ποντίκια είχε ως αποτέλεσμα το συγχρονισμό της ωοθυλακικής ανάπτυξης μέχρι το πρώιμο στάδιο του δευτερογενούς ωοθυλακίου. Επιπλέον, η οιστρογονική διέγερση δεν επηρέασε την εξελικτική πορεία των ωοθυλακίων και οδήγησε σε φυσιολογικά έμβρυα μετά από την τεχνητή γονιμοποίηση των ωαρίων τους [1].

2.3 ΣΥΓΧΡΟΝΙΣΜΟΣ ΩΟΘΥΛΑΚΙΚΗΣ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ IN VIVO ME ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΣΙΛΟΣΤΑΖΟΛΗΣ (CLZ)

Η συγχρονισμένη ωρίμανση των ωαρίων in vitro έχει αποδειχθεί ότι οδηγεί σε μεγαλύτερα ποσοστά επιτυχίας IVF (in vitro fertilization) συγκριτικά με ωάρια που ωρίμασαν in vitro χωρίς συγχρονισμό, χωρίς ωστόσο να ξεπερνούν εκείνα τα ποσοστά γονιμοποίησης, όπου τα ωάρια ωριμάζουν in vivo χωρίς συγχρονισμό. Προκειμένου λοιπόν να μελετηθεί ο in vivo ωοθυλακικός συγχρονισμός, χρησιμοποιήθηκε ένας αναστολέας της φωσφοδιεστεράσης 3A, της σιλοσταζόλης (CLZ).

Αξίζει να σημειωθεί εδώ ότι η σιλοσταζόλη (Pletal) είναι ένα παράγωγο της κινολινόνης και έχει εγκριθεί στις ΗΠΑ από το 1999 για τη θεραπεία των συμπτωμάτων της διαλείπουσας χωλότητας. Η αγγειοδιασταλτική και αντιαιμοπεταλιακή δράση της σιλοσταζόλης οφείλεται κυρίως στην αναστολή της φωσφοδιεστεράσης 3 (PDE 3) και μετέπειτα στην αύξηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων του κυκλικού AMP (c-AMP). Συγχρόνως, αναστέλλει την πρόσληψη της αδενοσίνης από τα κύτταρα. Έχει αναφερθεί, επίσης, ότι η σιλοσταζόλη μειώνει τα τριγλυκερίδια και αυξάνει τα επίπεδα της HDL-χοληστερόλης στο αίμα.

Στα ποντίκια η σιλοσταζόλη, έχει βρεθεί ότι αναστέλλει την ωρίμανση των ωαρίων in vivo και in vitro, ασκώντας ανασταλτική δράση στη διαδικασία της μείωσης και αποδεικνύοντας, έτσι, τη δυνατότητα χρήσης της και ως αντισυλληπτικό.

Στη συγκεκριμένη μελέτη, χορηγήθηκε CLZ από του στόματος σε ποντίκια με δοσολογία 7,5 mg, έτσι ώστε να προκληθεί διέγερση των ωοθηκών και ωορρηξία σε ωάρια που βρίσκονται σε διάφορα στάδια ανάπτυξης ανάλογα με τη συχνότητα και τη διάρκεια χορήγησης. Συγκεκριμένα, χορηγήθηκε CLZ σε ωάρια ποντικών στο στάδιο του GV (germinal vesicle), καθώς και στο στάδιο MI (μείωση I) σε in vitro συνθήκες και in vivo (στις σάλπιγγες). Μετά την ωορρηξία, τα ωάρια συλλέχθηκαν για να γονιμοποιηθούν με IVF. Τα αποτελέσματα της μελέτης κατέδειξαν ότι ωάρια που συλλέχθηκαν από MI ωοθυλάκια μετά την ωρίμανση σε in vitro συνθήκες ή in vivo είχαν παρόμοια ποσοστά ωρίμανσης με την ομάδα ελέγχου, αλλά καλύτερα ποσοστά γονιμοποίησης IVF στο στάδιο των 2-4 κυττάρων. Ίδια αποτελέσματα είχαν και τα GV ωάρια που ωρίμασαν in vitro. Ωστόσο, τα ωάρια GV που ωρίμασαν in vivo με CLZ είχαν σημαντικά χαμηλότερα ποσοστά γονιμοποίησης μετά από IVF συγκριτικά με

την ομάδα ελέγχου. Αυτή η μελέτη οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η διέγερση με CLZ είναι σε θέση να συγχρονίσει την ωοθυλακική ωρίμανση και να βελτιώσει τα ποσοστά επιτυχίας της τεχνητής γονιμοποίησης σε ποντίκια [5].

Η CLZ πιθανόν να μπορεί να έχει παρόμοιες επιδράσεις και στα ανθρώπινα ωάρια, αφού έχει αναφερθεί ότι η *in vitro* ωρίμανση των ανθρώπινων ωαρίων βελτιώνεται με τη χρήση άλλων αναστολέων φωσφοδιεστεράσης 3A. Η ικανότητα ενός κλινικά ελεγχμένου αναστολέα φωσφοδιεστεράσης να βελτιώσει τα ποσοστά γονιμοποίησης ωαρίων των ποντικών, μας επιτρέπει να ελέγξουμε στο μέλλον την πιθανότητα ένταξης της CLZ σε προγράμματα διέγερσης ωοθηκών, αφού προσαρμοστεί σε ανθρώπινες δόσεις. Αυτό ίσως βελτιώσει τα αποτελέσματα της εξωσωματικής γονιμοποίησης.

2.4 ΒΕΛΤΙΩΣΗ ΤΗΣ ΩΟΘΥΛΑΚΙΚΗΣ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ INSULIN-TRANSFERIN-SELENIUM (ITS)

Τα αποτελέσματα της μελέτης για τη χορήγηση του Insulin-Transferin-Selenium ως μέσο για τη διέγερση ωοθηκών των χοίρων κατέδειξε ότι αυτό ενισχύει τα ποσοστά ωρίμανσης του πυρήνα και του κυτταροπλάσματος των ωαρίων *in vitro*, καθώς και το συγχρονισμό αυτών [6].

Η γλουταθειόνη (GSH) είναι η κύρια μη-πρωτεϊνική σουλφυδριλική ένωση που περιέχεται σε κύτταρα θηλαστικών και συμβάλλει στη μείωση των ελεύθερων ριζών οξυγόνου στα ωάρια, περιορίζοντας έτσι την οξειδωτική καταστροφή των κυττάρων τους. Οι Tatamoto et.al. ανακάλυψαν ότι αντιοξειδωτικές ουσίες, όπως η GSH, η τρανσφερίνη και το σελήνιο ενισχύουν σε μεγάλο βαθμό την ωρίμανση των ωοκυττάρων μέσω της προστασίας των μιτοχονδρίων, μειώνουν την πολυσπερμία και αυξάνουν τον σχηματισμό προπυρήνων. Η προσθήκη του ITS θα μπορούσε να αυξήσει σημαντικά το περιεχόμενο της γλουταθειόνης. Επιπλέον, το ITS με δράση παρόμοια με της ινσουλίνης αυξάνει την αναπτυξιακή δυναμική των ωαρίων. Παρά το γεγονός ότι με την ορμονική διέγερση των ωαρίων των χοίρων με hCG και eCG, το ποσοστό ωρίμανσής τους αυξήθηκε στο 50%, η προσθήκη του ITS βελτίωσε ακόμα περισσότερα τα ποσοστά της ωοθυλακικής ωρίμανσης [48].

Ένας ακόμη παράγοντας που επηρεάζει την ωρίμανση των ωαρίων και τη μετέπειτα εμβρυϊκή ανάπτυξη είναι η ποιότητα του κυτταροπλάσματος στην *in vitro* maturation των ωαρίων. Στη συγκεκριμένη μελέτη βρέθηκε ότι το ITS ενισχύει την κυτταροπλασματική ωρίμανση, συμβάλλοντας ευνοϊκά στην κατανομή των κοκκωδών κυττάρων στο φλοιό της ωοθήκης.

2.5 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΑΤΟΝΙΝΗΣ ΣΤΗΝ ΩΡΙΜΑΝΣΗ ΤΩΝ ΩΑΡΙΩΝ

Προκειμένου να εξεταστούν οι πιθανές ευνοϊκές επιδράσεις της μελατονίνης στην *in vitro* ωοθυλακική ωρίμανση των βοοειδών, ωάρια στο στάδιο του GV επωάστηκαν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις μελατονίνης. Η ενδογενής συγκέντρωση μελατονίνης στο ωοθυλακικό υγρό των βοοειδών είναι περίπου 1011M. Η προσθήκη μελατονίνης σε κατάλληλες συγκεντρώσεις προώθησε σημαντικά την ωοθυλακική ωρίμανση. Επιπλέον, ο μέσος αριθμός κυττάρων/βλαστοκύστης, καθώς και η εμβρυϊκή ανάπτυξη βελτιώθηκαν σε μεγάλο βαθμό. Οι πιο αποτελεσματικές συγκεντρώσεις μελατονίνης κυμαίνονται από 109 έως 107M ενισχύοντας το ρυθμό διαίρεσης των κυττάρων και το ποσοστό σχηματισμού βλαστοκύστης, γεγονός που σημαίνει καλύτερη μίτωση και καλύτερα αποτελέσματα κατά την εμφύτευση. Σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις μελατονίνης (103M) η ωρίμανση των ωαρίων επιβραδύνεται, όπως συμβαίνει και με τα ανθρώπινα λευχαιμικά κύτταρα [7].

Τα γονίδια MT1 και MT2 που εκφράζουν τους υποδοχείς μελατονίνης, εντοπίστηκαν σε κοκκώδη κύτταρα, κύτταρα θήκης και σε ωοκύτταρα. Τα ευεργετικά αποτελέσματά της στην ωοθυλακική ωρίμανση των βοοειδών οφείλονται στη μεμβράνη των υποδοχέων της μελατονίνης, καθώς ο ανταγωνιστής του υποδοχέα της (IHK7) προωθεί την ωρίμανση, σε αντίθεση με τον ανταγωνιστή (luzindole) που την αναστέλλει. Οι έρευνες αποκάλυψαν ότι η προσθήκη μελατονίνης κατά τη διάρκεια της ωοθυλακικής ωρίμανσης των βοοειδών αυξάνει τη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων που σχετίζονται με την ωοθυλακική ωρίμανση (GDF9, MARF1, DNMT1a), την έκφραση των γονιδίων των κοκκωδών κυττάρων (PTX3, HAS1/2), καθώς και των παραγόντων LHR1/2 και EGFR που εμπλέκονται στη μεταγωγή σήματος και την επιγενετική ρύθμιση [7].

Είναι γνωστό ότι πολλοί ιστοί και κύτταρα παράγουν μελατονίνη, όπως τα αστροκύτταρα, γλοιοκύτταρα, λεμφοκύτταρα, ηπατοκύτταρα, κύτταρα του παγκρέατος, των όρχεων, του θύμου, του αμφιβληστροειδούς, και του μυελού των οστών. Η μελατονίνη που περιέχεται στο ωοθυλακικό υγρό μπορεί να συντίθεται από τα ωοκύτταρα, προκειμένου να προστατεύονται από το οξειδωτικό stress και άλλους περιβαλλοντικούς παράγοντες, συμβάλλοντας έτσι στη διατήρηση της ποιότητας των ωαρίων. Όταν η μελατονίνη χρησιμοποιήθηκε θεραπευτικά, βελτίωσε την ποιότητα των ωαρίων και τη διαδικασία της μείωσης κατά την *in vitro* ωρίμανση των ωαρίων των χοίρων, των βοοειδών και των ποντικών.

Συνοψίζοντας, σύμφωνα με τις μελέτες που περιγράφηκαν παραπάνω, η χορήγηση των οιστρογόνων, της σιλοσταζόλης (CLZ), του παράγοντα ITS (insulin-transferrin-selenium), καθώς και της μελατονίνης, οδήγησαν στη βελτίωση της συγχρονισμένης ωοθυλακικής ωρίμανσης στα ζώα. Παρακάτω περιγράφονται οι μελέτες, όσον αφορά το συγχρονισμό της ωοθυλακικής ανάπτυξης στον άνθρωπο.

2.6 Η ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΤΗΣ ΟΙΣΤΡΑΔΙΟΛΗΣ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΩΧΡΙΝΙΚΗ ΦΑΣΗ ΤΟΥ ΓΕΝΝΗΤΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΣΥΛΛΗΠΤΙΚΩΝ ΣΤΟ ΣΥΓΧΡΟΝΙΣΜΟ ΤΗΣ ΩΟΘΥΛΑΚΙΚΗΣ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ

Μία τυχαιοποιημένη προοπτική μελέτη, στην οποία συμμετείχαν 90 γυναίκες, διερεύνησε εάν η χορήγηση της οιστραδιόλης (E2) κατά την ωχρινική φάση (από την 20η ημέρα του κύκλου έως τη 2η ημέρα του επόμενου), μειώνει τις διαφορές στο μέγεθος μεταξύ των ωοθυλακίων και εάν ενισχύει την απόκριση των ωοθηκών στο πρωτόκολλο της rec FSH με GnRH ανταγωνιστή. Το αποτέλεσμα ήταν ότι παρατηρήθηκαν μικρότερα ωοθυλάκια την 8η ημέρα της διέγερσης, καθώς και λιγότερες αποκλίσεις ως προς το μέγεθός τους στην ομάδα όπου χορηγήθηκε οιστραδιόλη. Αυτό είχε ως συνέπεια να δημιουργηθούν περισσότερα ωοθυλάκια διαμέτρου ≥ 16 mm, περισσότερα ώριμα ωάρια και στη συνέχεια περισσότερα έμβρυα στην πειραματική ομάδα [8].

Η παρούσα μελέτη είχε ως στόχο να αμφισβητήσει την υπόθεση ότι η ασύγχρονη ανάπτυξη των κοιλοτικών ωοθυλακίων είναι αποτέλεσμα της σταδιακής αύξησης των επιπέδων της FSH κατά την όψιμη ωχρινική φάση. Επιπλέον, αφορμή ήταν η πτωχότερη ωοθηκική απόκριση, που παρατηρείται στο πρωτόκολλο με GnRH ανταγωνιστή, συγκριτικά με το μακρύ πρωτόκολλο του GnRH αγωνιστή, ώστε να βελτιωθούν τα αποτελέσματα της διέγερσης με GnRH ανταγωνιστή. Σε άλλες μελέτες έχει αναφερθεί επίσης ότι η χορήγηση οιστραδιόλης κατά την ωχρινική φάση μειώνει το ρυθμό ανάπτυξης των πρώιμων κοιλοτικών ωοθυλακίων και περιορίζει τις διαφορές στο μέγεθος των πρωτογενών κοιλοτικών ωοθυλακίων [9, 10].

Σύμφωνα με την μελέτη, η θεραπεία με οιστραδιόλη στην ωχρινική φάση μειώνει σημαντικά το ρυθμό ανάπτυξης πολλαπλών ωοθυλακίων σε απάντηση στη rec FSH. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε βραδύτερη αύξηση στα επίπεδα της E2 κατά τη διάρκεια της COH (Controlled Ovarian Hyperstimulation) και μείωση του μεγέθους των κοιλοτικών ωοθυλακίων την 8η ημέρα της διέγερσης, εκεί όπου χορηγήθηκε E2. Ακόμη στην ομάδα αυτή (που χορηγήθηκε E2) χρειάστηκε μεγαλύτερο χρονικό διάστημα μέχρι τη χορήγηση του GnRH ανταγωνιστή και της HCG, έως ότου δηλαδή τα ωοθυλάκια επιτύχουν την τελική ωρίμανση. Αυτά τα αποτελέσματα μπορεί να οφείλονται σε μια συνολική μείωση του μεγέθους των πρωτογενών κοιλοτικών ωοθυλακίων, κατά την έναρξη της διέγερσης με rec FSH, όπως αποδείχθηκε.

Επιπλέον, η χορήγηση E2 στην ωχρινική φάση προώθησε το συγχρονισμό της ωοθυλακικής ανάπτυξης κατά τη διάρκεια της COH, όπως επιβεβαιώνεται και από την περιορισμένη ανομοιογένεια του μεγέθους των ωοθυλακίων την 8η ημέρα, καθώς

και από την αύξηση του αριθμού των ωοθυλακίων που ωρίμασαν. Οι παραπάνω ωοθυλακικές επιδράσεις οδήγησαν σε σημαντικά αυξημένο αριθμό βιώσιμων ωαρίων και διαθέσιμων εμβρύων, πιθανότατα λόγω της δυνατότητας επιλογής περισσότερων γονιμοποιημένων ωαρίων και «καλής ποιότητας» εμβρύων. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα τα βελτιωμένα ποσοστά κύησης, που παρατηρήθηκαν [11, 12].

Άλλη μία μελέτη που έλαβε χώρα στη Γαλλία, στην οποία συμμετείχαν 60 γυναίκες, κατέδειξε, εκτός των άλλων, ότι η χορήγηση E2 κατά την ωχρινική φάση δεν επηρέασε τη διάρκεια του γεννητικού κύκλου των γυναικών, ούτε υπήρξε κάποια μεταβολή στην έμμηνο ρύση. Επιπλέον, τα επίπεδα της FSH στον ορό την ημέρα μετά τη λήψη της οιστραδιόλης ήταν σημαντικά χαμηλότερα ($<4,5$ mIU/ml) σε σύγκριση με γυναίκες που δεν έλαβαν (>7 mIU/ml). Αξίζει, τέλος, να σημειωθεί ότι η χορήγηση E2 οδήγησε σε μία σημαντική μείωση των επιπέδων της ανασταλτίνης B (inhibin B) στον ορό (<34 pg/ml) σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (>71 pg/ml). Αν και οι μηχανισμοί που εμπλέκονται σε αυτό το φαινόμενο, είναι ασαφείς, είναι κατανοητό ότι η μείωση του μέσου μεγέθους των ωοθυλακίων, που προκαλεί η οιστραδιόλη, καθώς και η μειωμένη έκκριση της FSH συνέβαλαν στη μείωση της inhibin B στον ορό, σε επίπεδα όμοια με αυτά που συναντώνται κατά τη διάρκεια της ωχρινικής φάσης του κύκλου [18, 19].

Οι αλλαγές στη δυναμική των ωοθυλακίων και ο συγχρονισμός της ανάπτυξής τους, ως συνέπεια της κατασταλτικής δράσης της FSH στην ωχρινική φάση, εξηγούν τα καλύτερα αποτελέσματα έκβασης, που έχει το μακρύ πρωτόκολλο με GnRH αγωνιστές συγκριτικά με το πρωτόκολλο των GnRH ανταγωνιστών ή το βραχύ πρωτόκολλο των GnRH αγωνιστών. Πράγματι, όπως και στην πειραματική ομάδα της E2, έτσι και στο μακρύ πρωτόκολλο με GnRH αγωνιστή, απαιτείται μεγαλύτερη διάρκεια διέγερσης και παράγονται περισσότερα ωάρια και έμβρυα, συγκριτικά με τα πρωτόκολλα που στερούνται ελέγχου της FSH στην ωχρινική φάση. Αυτό σημαίνει ότι υπάρχουν διαφορές στα χαρακτηριστικά των αναπτυσσόμενων κοιλοτικών ωοθυλακίων μεταξύ των δύο μοντέλων, κατά την έναρξη της διέγερσης (COH). Η ωχρινική χορήγηση E2 παρουσιάζει ορισμένα πλεονεκτήματα σε σχέση με το μακρύ πρωτόκολλο του GnRH αγωνιστή, όπως η απλότητα στην εφαρμογή, οι λιγότερες παρενέργειες και η μη καταστολή της ενδογενούς γοναδοτροφίνης στην πρώιμη ωοθυλακική φάση κατά την ελεγχόμενη διέγερση των ωοθηκών [10, 13, 14, 15].

Τα στοιχεία της μελέτης ενισχύουν την άποψη της συνδυασμένης χρήσης αντισυλληπτικών από του στόματος, ως μέσο βελτίωσης των αποτελεσμάτων της ελεγχόμενης διέγερσης των ωοθηκών. Πράγματι, τα από του στόματος αντισυλληπτικά μπορούν να ασκήσουν παρόμοια δράση με την ωχρινική χορήγηση της E2, λόγω της ισχυρής anti-FSH δράσης που παρατηρείται και επηρεάζει το συγχρονισμό της πρώιμης ωοθυλακικής ανάπτυξης. Σύμφωνα με τα παραπάνω, αναφέρεται μια αύξηση του αριθμού των ώριμων ωοθυλακίων και ωαρίων σε κύκλους με κιτρική κλομφαίνη, όπου έχει προηγηθεί θεραπεία με από του στόματος

αντισυλληπτικά σε σύγκριση με γυναίκες που δεν έλαβαν. Ωστόσο, τα από του στόματος αντισυλληπτικά, που λαμβάνονται σε κύκλους διέγερσης, παρουσιάζουν κάποια μειονεκτήματα συγκριτικά με την ωχρινική χορήγηση E2. Συγκεκριμένα: α) απαιτείται μακρά διάρκεια θεραπείας, β) ίσως έχουμε αναβολή του κύκλου διέγερσης λόγω εμμήνου ρύσης, που μπορεί να συμβεί και γ) συνοδεύονται από πολλές ανεπιθύμητες ενέργειες. Επιπλέον, η κατάλληλη χρονική στιγμή έναρξης της εξωγενούς γοναδοτροφίνης, όταν έχει προηγηθεί λήψη αντισυλληπτικών από του στόματος ή E2, δεν έχει διευκρινιστεί ακόμη. Οι περισσότεροι συγγραφείς προτείνουν την έναρξη της γοναδοτροφίνης 2 ή 3 ημέρες μετά τη διακοπή των αντισυλληπτικών. Ωστόσο, στην παρούσα μελέτη η χορήγηση της rec FSH ξεκίνησε την επόμενη ημέρα μετά τη διακοπή της E2, ώστε να εκμεταλλευτούμε το γεγονός της καταστολής της δράσης της FSH κατά την ωχρινική φάση και να ευνοηθεί ο συγχρονισμός των ωοθυλακίων. Ίσως αξίζει να μελετηθεί στο μέλλον η έναρξη της γοναδοτροφίνης και μετά τη διακοπή των από του στόματος αντισυλληπτικών [16, 17].

Συμπερασματικά, η χορήγηση E2 στην ωχρινική φάση μειώνει το ρυθμό ανάπτυξης των ωοθυλακίων, βελτιώνει την ομοιογένεια, όσον αφορά στο μέγεθος των κοιλοτικών ωοθυλακίων και αυξάνει τον αριθμό των ωοθυλακίων, που φτάνουν σε ταυτόχρονη ωρίμανση [8]. Αυτό θα μπορούσε να αποτελέσει το έναυσμα, ώστε να γίνουν περισσότερες έρευνες σχετικά με τη χορήγηση GnRH αγωνιστή ή αντισυλληπτικών από του στόματος με εναλλακτικούς τρόπους, προκειμένου να υπάρξει συγχρονισμός στην ανάπτυξη περισσότερων ωοθυλακίων για τη βελτίωση των αποτελεσμάτων της ελεγχόμενης διέγερσης ωοθηκών. Ωστόσο, είναι ανάγκη να γίνουν περισσότερες έρευνες για να επιβεβαιωθεί κατά πόσο ο συγχρονισμός της ωοθυλακικής ανάπτυξης, που προκαλείται από την ωχρινική χορήγηση της οιστραδιόλης, βελτιώνει τα ποσοστά εγκυμοσύνης κατά την IVF χρησιμοποιώντας το πρωτόκολλο του GnRH ανταγωνιστή ή το βραχύ πρωτόκολλο του GnRH αγωνιστή.

2.7 Η ΠΡΩΩΡΗ ΕΝΑΡΞΗ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ ΤΟΥ GnRH ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΗ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΕΛΕΓΧΟΜΕΝΗ ΔΙΕΓΕΡΣΗ ΤΩΝ ΩΟΘΗΚΩΝ

Μία μεγάλη τυχαιοποιημένη, αναδρομική μελέτη, στην οποία συμμετείχαν 218 υπογόνιμες γυναίκες, που υπεβλήθησαν σε IVF (In Vitro Fertilization) κατά το διάστημα 2011-2013, αξιολόγησε εάν η πρόωρη έναρξη ενός GnRH ανταγωνιστή μπορεί να οδηγήσει σε καλύτερο συγχρονισμό της ωοθυλακικής ανάπτυξης και σε βελτίωση των κλινικών ποσοστών της κύησης. Συγκεκριμένα, στην αρχική ομάδα (Cohort I) συμπεριλήφθηκε ένα σύνολο από 68 κύκλους IVF, στους 34 από τους οποίους εφαρμόστηκε το συμβατικό πρωτόκολλο με GnRH ανταγωνιστή (Conventional GnRH antagonist protocol) και στους υπόλοιπους 34 κύκλους το πρωτόκολλο πρόωρης έναρξης GnRH ανταγωνιστή (Early GnRH antagonist start protocol). Στη δεύτερη ομάδα (Cohort II) συμπεριλήφθηκε ένα σύνολο από 150 κύκλους εμβρυομεταφοράς, στους 43 από τους οποίους εφαρμόστηκε το συμβατικό πρωτόκολλο με GnRH ανταγωνιστή, σε 34 κύκλους το τροποποιημένο πρόωρης

έναρξης GnRH ανταγωνιστή πρωτόκολλο (Modified early GnRH antagonist start protocol) και σε 73 κύκλους το μακρύ πρωτόκολλο του GnRH ανταγωνιστή [20].

Παρακάτω περιγράφονται αναλυτικά τα πρωτόκολλα που χρησιμοποιήθηκαν:

- Conventional GnRH antagonist multi-dose flexible protocol: Η έναρξη της rec FSH έγινε την 3η ημέρα της περιόδου με αρχική ημερήσια δόση 225 ή 300 IU (ανάλογα με την ηλικία, το BMI και τα επίπεδα της AMH στον ορό), που κατόπιν ρυθμίστηκε ανάλογα με την απόκριση των ωοθηκών. Ο GnRH ανταγωνιστής (0,25 mg/ημέρα, Cetrotide) προστέθηκε, όταν η διάμετρος του επικρατούντος ωοθυλακίου έφτασε τα 12 mm.
- Early GnRH antagonist start protocol: Για τη διέγερση των ωοθηκών χρησιμοποιήθηκε rec FSH (Gonal-F), που ξεκίνησε την 3η ημέρα του κύκλου. Ο GnRH ανταγωνιστής ξεκίνησε τη 2η ημέρα του κύκλου. Η τελική ωρίμανση των ωαρίων πυροδοτήθηκε (triggering) με μια εφ' άπαξ δόση rec- HCG (Ovidrel), όταν η μέση διάμετρος του κυρίαρχου ωοθυλακίου ήταν ≥ 18 mm. Η ωοληψία με την καθοδήγηση υπερήχου έγινε 36 ώρες μετά τη χορήγηση της rec HCG. Έμβρυα μεταφέρθηκαν την 3η ημέρα της ανάπτυξης (cleavage stage). Η υποστήριξη της ωχρινικής φάσης (LPS, luteal phase support) έγινε με καθημερινή χορήγηση 50 mg προγεστερόνης (P4, progesterone in oil) ενδομυϊκά, που ξεκίνησε από την ημέρα της ωοληψίας έως την 6η-8η εβδομάδα κύησης. Η πρωταρχική παράμετρος που αξιολογήθηκε ήταν ο αριθμός των ώριμων ωαρίων, που ελήφθησαν κατά την ωοληψία.
- Modified early GnRH antagonist start protocol: Ο GnRH ανταγωνιστής (Cetrotide 0,25 mg/ημέρα) ξεκίνησε τη 2η ημέρα του κύκλου και η διέγερση με rec FSH ξεκίνησε μία ημέρα μετά την έναρξη του ανταγωνιστή. Την 5η ημέρα της διέγερσης ο τύπος γοναδοτροφίνης από rec FSH άλλαξε σε υψηλά κεκαθαυμένη ανθρωπίνο γοναδοτροφίνη μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών (highly purified human menopause gonadotropin, HP-HMG, Menopur), έτσι ώστε να αντισταθμιστεί η καταστολή της ενδογενούς LH που προκλήθηκε από την πρόωρα προσθήκη του ανταγωνιστή. Για την τελική ωρίμανση των ωαρίων χορηγήθηκαν 250μg rec HCG, όταν το μέγεθος του κυρίαρχου ωοθυλακίου ήταν ≥ 18 mm. Η υποστήριξη της ωχρινικής φάσης (LPS) έγινε με καθημερινή χορήγηση προγεστερόνης (progesterone in oil) ενδομυϊκά, που ξεκίνησε από την ημέρα της ωοληψίας. Επίσης προστέθηκε GnRH αγωνιστής (triptorelin 0,1 mg, Decareptyl) εφ' άπαξ 3 ημέρες μετά την εμβρυομεταφορά για την υποστήριξη της ωχρινικής φάσης [20].

Στην πρώτη ομάδα ασθενών (Cohort I), οι τιμές της οιστραδιόλης E2 την ημέρα χορήγησης της HCG (2,53 pg/ml vs. 3,43 pg/ml) και ο συνολικός αριθμός των ωαρίων κατά την ωοληψία (11,4 vs. 14,4) έτειναν να είναι υψηλότερα στους κύκλους της πρόωρης έναρξης ανταγωνιστή. Ωστόσο, καμία από αυτές τις διαφορές δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Επιπλέον, ο αριθμός των ώριμων ωαρίων ήταν σημαντικά υψηλότερος στο πρωτόκολλο πρόωρης έναρξης GnRH ανταγωνιστή (11,9) σε σχέση με το συμβατικό πρωτόκολλο του ανταγωνιστή (8,2). Επίσης ο λόγος του αριθμού

των ώριμων ωαρίων προς τον συνολικό αριθμό των ωαρίων ήταν σημαντικά υψηλότερος στους κύκλους πρόωρης έναρξης του ανταγωνιστή (82,6% vs. 71,9%). Το ποσοστό κλινικής κύησης (CPR, Clinical Pregnancy Rate) δεν έδειξε σημαντική διαφορά ανάμεσα στα δύο πρωτόκολλα [20].

Στη δεύτερη ομάδα ασθενών (Cohort II), όπου συγκρίθηκαν το τροποποιημένο πρωτόκολλο πρόωρης έναρξης ανταγωνιστή και το συμβατικό πρωτόκολλο του GnRH ανταγωνιστή, οι τιμές της οιστραδιόλης E2 την ημέρα χορήγησης HCG, ο αριθμός των ωαρίων που ελήφθησαν κατά την ωοληψία, καθώς και ο αριθμός των ώριμων ωαρίων ήταν υψηλότερα στο πρώτο σε σχέση με το δεύτερο, αλλά όχι στατιστικά σημαντικά. Το ίδιο και το ποσοστό κλινικής κύησης CPR, το οποίο στο τροποποιημένο πρωτόκολλο πρόωρης έναρξης ανταγωνιστή ήταν συγκρίσιμο με το CPR στο μακρύ πρωτόκολλο του GnRH ανταγωνιστή [20].

Η ιδέα της έρευνας για την πρόωρη έναρξη του GnRH ανταγωνιστή κατά τη διέγερση των ωοθηκών βασίστηκε στην πρόκληση της καταστολής της διακυκλικής αύξησης της FSH. Όπως αναφέρθηκε στο πρώτο κεφάλαιο, σε γυναίκες με κανονικό κύκλο η στρατολόγηση των ωοθυλακίων ξεκινά με τη διακυκλική αύξηση της ενδογενούς FSH. Η FSH με τη σειρά της διεγείρει τη στρατολόγηση των ωοθυλακίων και τελικά οι αντισταθμιστικοί μηχανισμοί “feedback” ανάμεσα στον άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης και στα ωοθυλάκια οδηγούν στην επιλογή του κυρίαρχου ωοθυλακίου και στην ωορρηξία, ενώ τα υπόλοιπα ωοθυλάκια που έχουν στρατολογηθεί, υφίστανται ατρησία. Η αύξηση της FSH αρχίζει από το τέλος της ωχρινικής φάσης του προηγούμενου κύκλου, εξαιτίας της υποστροφής του ωχρού σωματίου και της επακόλουθης μείωσης της παραγωγής οιστρογόνων [21, 22].

Κατά την ελεγχόμενη διέγερση των ωοθηκών, με την εξωγενή χορήγηση των γοναδοτροφινών, εξασφαλίζεται η ανάπτυξη πολλαπλών ωοθυλακίων. Με αυτόν τον τρόπο, αποφεύγεται η ατρησία μίας ομάδας ωοθυλακίων και τα κοιλοτικά ωοθυλάκια αναμένεται να αναπτυχθούν συντονισμένα, ώστε να ολοκληρωθεί η ταυτόχρονη ωρίμανσή τους. Στους συμβατικούς κύκλους με GnRH ανταγωνιστή, η διέγερση αρχίζει την 2η ή 3η ημέρα του κύκλου, χωρίς να γίνει η καταστολή της διακυκλικής αύξησης της FSH, που οδηγεί στη στρατολόγηση των ωοθυλακίων. Έτσι, η χορήγηση της FSH εξωγενώς προκαλεί ακόμη περισσότερη ωοθυλακική ανάπτυξη των ήδη στρατολογημένων ωοθυλακίων, καθώς και τη στρατολόγηση επιπλέον ωοθυλακίων, που βρίσκονται σε πιο πρώιμα στάδια ανάπτυξης. Κατόπιν, κατά τη χορήγηση της HCG, μία ομάδα ωοθυλακίων δεν θα έχει συγχρονιστεί με τα ωοθυλάκια, που στρατολογήθηκαν κατά τη διακυκλική αύξηση της FSH.

Η χρονική περίοδος, όπου γίνεται η διακυκλική αύξηση της FSH διαφέρει μεταξύ των γυναικών. Συνήθως, εμφανίζεται από την 8η έως τη 18η ημέρα μετά το peak (αιχμή) της LH, καθώς και κατά την πρώιμη ωοθυλακική φάση. Έχει αποδειχθεί ότι τα επίπεδα της FSH αυξάνονται από 4 IU/L στα 14 IU/L κατά τη διακυκλική της αύξηση. Ως εκ τούτου, είναι δύσκολο να εκτιμηθεί η ακριβής χρονική στιγμή της αιχμής της FSH και είναι αδύνατο να προσδιοριστεί το peak (αιχμή) με μία μόνο εξέταση αίματος. Επιπλέον, πιστεύεται ότι η αιχμή της FSH συμβαίνει λίγες ημέρες μετά την έναρξη της διακυκλικής της αύξησης, η οποία έχει παρατηρηθεί ότι πραγματοποιείται τις πρώτες ημέρες της εμμήνου ρύσης. Έτσι, ξεκινώντας τη χορήγηση του GnRH ανταγωνιστή όσο το δυνατόν νωρίτερα (μετά την έμμηνο ρύση), δηλαδή από τη δεύτερη ημέρα του κύκλου, μπορεί να αποτραπεί το peak (αιχμή) της FSH στα στρατολογημένα ωοθυλάκια [23].

2.7.1 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΠΡΟΩΡΗΣ ΕΝΑΡΞΗΣ GnRH ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΗ (Early GnRH Antagonist Start Protocol)

Όπως έδειξε η προηγούμενη έρευνα, ο μέσος αριθμός των ωαρίων, καθώς και αυτών που βρισκόταν στη μετάφαση II, ήταν σημαντικά υψηλότερος στους κύκλους της πρόωρης χορήγησης του GnRH ανταγωνιστή σε σχέση με το συμβατικό πρωτόκολλο του GnRH ανταγωνιστή. Αυτό αντανάκλα μια πιο συντονισμένη ανάπτυξη των ωοθυλακίων, που προκύπτει ενδεχομένως από τη βελτίωση της ομοιογένειας των κοιλοτικών ωοθυλακίων (antral follicles) με την καταστολή της ενδογενούς FSH, λόγω της πρώιμης έναρξης του ανταγωνιστή. Η αυξημένη διάρκεια της διέγερσης των ωοθηκών προκύπτει από τη μακρύτερη πορεία ανάπτυξης των κοιλοτικών ωοθυλακίων, αφού δεν προετοιμάστηκαν με την αύξηση της FSH. Επιπλέον, η έναρξη του GnRH ανταγωνιστή στο πρώτο ήμισυ της ωοθυλακικής φάσης την 3η ημέρα φαίνεται ότι βελτιώνει τη διαδικασία της μείωσης των ωαρίων, καθώς και την επάρκεια αυτών που λαμβάνονται κατά την ωοληψία [24].

Παρά το γεγονός ότι αυξήθηκε ο αριθμός των ώριμων ωαρίων στους κύκλους της πρόωρης έναρξης του ανταγωνιστή σε σχέση με τους συμβατικούς κύκλους με GnRH ανταγωνιστή, εντούτοις τα ποσοστά της κύησης δεν βελτιώθηκαν. Στους συμβατικούς κύκλους του ανταγωνιστή τα επίπεδα της LH παραμένουν μη κατασταλμένα και επιπλέον, η παραγωγή της οιστραδιόλης E2 ενισχύεται κατά την πρώιμη ωοθυλακική φάση. Έτσι λοιπόν, η υψηλή έκθεση σε LH και E2 συσχετίστηκε με τα χαμηλά ποσοστά κύησης, που συμβαίνουν σε αυτούς τους κύκλους, καταδεικνύοντας ότι τα χαμηλότερα επίπεδα LH και E2 κατά την πρώιμη χορήγηση του ανταγωνιστή, μπορεί να έχουν θετική επίπτωση στα αποτελέσματα της IVF. Επιπλέον, το Cetorelix acetate (GnRH ανταγωνιστής) έχει αποδειχθεί ότι επάγει την ταχεία, παροδική και εξαρτώμενη από τη δόση, μείωση των ενδογενών γοναδοτροφινών, που είναι ταχύτερη και πιο έντονη για την LH παρά για την FSH. Προηγούμενες έρευνες αναφέρουν σημαντική πτώση της LH μετά την πρόωρη χορήγηση του ανταγωνιστή τη 2η ημέρα του κύκλου. Τα επίπεδα της LH μειώνονται από τα 4,8 IU/L στο 1IU/L, και συνεπώς παραμένουν χαμηλά κατά τη διέγερση. Έτσι, καταλήγουμε ότι η παρατεταμένη χορήγηση του GnRH ανταγωνιστή μπορεί στην

πραγματικότητα να οδηγήσει σε βαθιά καταστολή της LH, η οποία θα μπορούσε να επηρεάσει δυσμενώς την έκβαση της IVF [25, 26].

2.7.2 ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΠΡΟΩΡΗΣ ΕΝΑΡΞΗΣ GnRH ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΗ (Modified Early GnRH Antagonist Start Protocol)

Το ποσοστό κλινικής κύησης (CPR) αυξήθηκε κατά 10% με τη μετάβαση από τη rec FSH στη HP-HMG την 5η ημέρα της διέγερσης (modified early GnRH start protocol) συγκριτικά με τους συμβατικούς κύκλους ανταγωνιστή, χωρίς όμως να είναι στατιστικά σημαντική η αύξηση. Η HP-HMG έχει δράση FSH και LH σε αναλογία 1:1. Συνεπώς, η μεγαλύτερη δραστηριότητα της LH προέρχεται κυρίως από την HCG. Η χρήση της HP-HMG κατά τη διέγερση των ωοθηκών, ακολουθούμενη από την καταστολή της LH, αναμένεται να αυξήσει έμμεσα την ποιότητα των εμβρύων και/ή την υποδεκτικότητα του ενδομητρίου, καθώς συνδυάζει τη δραστηριότητα της LH και της FSH. Επιπλέον, η αύξηση των επιπέδων της προγεστερόνης (P4), που ανιχνεύτηκαν κατά τη διέγερση (COS, Controlled Ovary Stimulation) πριν τη χορήγηση της HCG συσχετίζονται με τα χαμηλά ποσοστά κύησης, πιθανώς λόγω της μειωμένης υποδεκτικότητας του ενδομητρίου, που προκαλείται από την πρόωμη έκθεσή του στην προγεστερόνη. Αξίζει να σημειωθεί εδώ ότι σημαντική αδυναμία της μελέτης ήταν η έλλειψη πληροφοριών σχετικά με τα επίπεδα της LH και P4, κατά τη διάρκεια της διέγερσης (COS) [27-32].

Άλλη μία προσθήκη, που έγινε στο τροποποιημένο πρωτόκολλο του ανταγωνιστή (modified early GnRH start protocol), ήταν η χορήγηση του GnRH αγωνιστή, ως συμπλήρωμα για την υποστήριξη της ωχρινικής φάσης (LPS) στην προσπάθεια να βελτιωθούν τα ποσοστά κύησης.

Συμπερασματικά, η χρήση του τροποποιημένου πρωτοκόλλου πρόωρης έναρξης GnRH ανταγωνιστή (modified early GnRH antagonist start protocol), που βελτίωσε τα ποσοστά της κύησης, χωρίς βέβαια στατιστικά σημαντική διαφορά, θα μπορούσε να αποτελέσει στο μέλλον μία ελκυστική εναλλακτική για τα συμβατικά πρωτόκολλα με ανταγωνιστή. Ως πλεονεκτήματα του παραπάνω πρωτοκόλλου αναφέρονται τα εξής:

- Μπορεί να γίνει η έναρξη κατά τη διάρκεια του τρέχοντος, χωρίς η γυναίκα να περιμένει τον επόμενο κύκλο και χωρίς να εγκαταλείπεται η προσπάθεια, λόγω της εμμήνου ρύσης.
- Βελτιώνει το ενδοκρινικό περιβάλλον της πρόωμης ωοθυλακικής φάσης, μειώνοντας τα επίπεδα της LH. Όταν χρειάζεται υποστήριξη με LH, αυτή παρέχεται με τη χορήγηση HP-HMG.
- Η πρόωρη προσθήκη του ανταγωνιστή μπορεί να εμποδίσει τις πρόωρες αιχμές της LH σε επιλεγμένους ασθενείς [20].

2.8 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΣΥΓΧΡΟΝΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΩΟΘΥΛΑΚΙΚΗΣ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ ΣΕ ΠΤΩΧΗΣ ΑΠΟΚΡΙΣΗΣ ΓΥΝΑΙΚΕΣ (POOR RESPONDERS)

Δυστυχώς σήμερα 34 χρόνια μετά τον ορισμό του Garcia, δεν υπάρχει παγκοσμίως αποδεκτός ορισμός για τη «μειωμένη», «πτωχή», «κακή» ή «μη απάντηση» των ωοθηκών στη διέγερση. Οι ασθενείς αυτές έχουν χαμηλότερο ποσοστό κυήσεων συγκρινόμενες με τις «φυσιολογικές» απαντήτριες [33].

Έχουν χρησιμοποιηθεί πολυάριθμα κριτήρια για να χαρακτηρίσουν την «κακή» απόκριση:

1. 3 ή <5 ωοθυλάκια την ημέρα χορήγησης της HCG.
2. $E2 < 300$ pg/ml και < 500 pg/ml την ημέρα χορήγησης της HCG.
3. $E2 = 100$ pg/ml την 5η ημέρα της διέγερσης.
4. Αύξηση της FSH την 3η ημέρα > 7 mIU/ml ή > 15 mIU/ml.
5. Ιστορικό ακύρωσης 1 ή 2 κύκλων IVF.
6. Ανάγκη για αυξημένη ποσότητα γοναδοτροφινών (> 3300 IU) ή αύξηση της ημερήσιας δόσης των γοναδοτροφινών (> 300 IU/ημέρα) και παρατεταμένη διάρκεια χορήγησής τους.

2.8.1 Η ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΟΙΣΤΡΑΔΙΟΛΗΣ ΚΑΙ GnRH ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΗ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΩΧΡΙΝΙΚΗ ΦΑΣΗ

Μία αναδρομική μελέτη, στην οποία συμμετείχαν 130 γυναίκες πτωχής απόκρισης (poor responders), σύγκρινε τα αποτελέσματα της IVF χρησιμοποιώντας το πρωτόκολλο με Microdose λευπρολίδη (ML), που είναι ένας GnRH αγωνιστής. Σε αυτό το πρωτόκολλο προηγήθηκε χορήγηση αντισυλληπτικών από του στόματος (OCP, Oral Contraceptive Pill) στη μια ομάδα γυναικών και στην άλλη ομάδα χρησιμοποιήθηκε οιστραδιόλη E2 συνδυασμένη με GnRH ανταγωνιστή, προκειμένου να επιτευχθεί συγχρονισμός των ωοθυλακίων πριν από την ελεγχόμενη διέγερση των ωοθηκών (COS). Τα ποσοστά κύησης στην ομάδα, όπου εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο OCP/ML ήταν σημαντικά υψηλότερα συγκριτικά με την άλλη ομάδα (40% vs. 15%). Επιπλέον, στην ομάδα που χορηγήθηκαν αντισυλληπτικά παρατηρήθηκε μεγαλύτερος αριθμός ωαρίων κατά την ωοληψία, καθώς και βελτιωμένα ποσοστά εμφύτευσης, χωρίς όμως στατιστικά σημαντική διαφορά. Συμπερασματικά, η χορήγηση οιστραδιόλης και GnRH ανταγωνιστή πριν από την ωοθηκική διέγερση δε φαίνεται να βελτιώνει τα αποτελέσματα της IVF στο ML (Microdose Leuprolide) πρωτόκολλο συγκριτικά με το κλασσικό OCP πρωτόκολλο στις «πτωχές» απόκρισης γυναίκες (poor responders)[34].

Μία άλλη αναδρομική μελέτη σύγκρινε τον αριθμό των ωαρίων, που λαμβάνονται κατά την ωοληψία στις «πτωχές» απόκρισης γυναίκες μετά από ωοθηκική διέγερση χρησιμοποιώντας επιθέματα (patch) οιστραδιόλης συνδυασμένα με GnRH

ανταγωνιστή (LPA protocol) και το βραχύ πρωτόκολλο με GnRH αγωνιστή (Microdose flare-up protocol), που ήταν η ομάδα ελέγχου. Τα αποτελέσματα σχετικά με τον αριθμό των ωαρίων που ελήφθησαν, καθώς και τον αριθμό των ώριμων ωαρίων και το ποσοστό της ωοθυλακικής ωρίμανσης, ήταν παρόμοια στις δύο ομάδες. Ωστόσο, στην ομάδα, όπου εφαρμόστηκε το LPA πρωτόκολλο, τα ποσοστά εμφύτευσης και κλινικής κύησης (clinical pregnancy rate) ήταν περίπου 50 % υψηλότερα συγκριτικά με το Microdose flare-up protocol, χωρίς όμως στατιστικά σημαντική διαφορά. Παρά το γεγονός ότι τα αποτελέσματα της μελέτης δεν οδήγησαν σε αυξημένο αριθμό ωαρίων και ωοθυλακικό συγχρονισμό με το πρωτόκολλο της οιστραδιόλης και του GnRH ανταγωνιστή (LPA), ωστόσο τα υψηλότερα ποσοστά εμφύτευσης και κύησης που παρατηρήθηκαν, χρήζουν περαιτέρω έρευνάς στο μέλλον [35].

2.8.2 Ο ΣΥΓΧΡΟΝΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΝΑΡΞΗΣ ΤΗΣ ΩΟΘΗΚΙΚΗΣ ΔΙΕΓΕΡΣΗΣ ΜΕ ΤΟ «ΚΥΜΑ» ΣΤΡΑΤΟΛΟΓΗΣΗΣ ΤΩΝ ΩΟΘΥΛΑΚΙΩΝ (FOLLICULAR WAVE)

Στη Μονάδα Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής του Πανεπιστημίου Saskatchewan σε συνεργασία με το Κέντρο Γονιμότητας του Βανκούβεν κατά το διάστημα 2007-2010, μελετήθηκαν 80 γυναίκες ηλικίας ≤ 43 ετών με προηγούμενο ιστορικό πτωχής απόκρισης στην ωοθηκική διέγερση. Σε αυτή την προοπτική, τυχαιοποιημένη μελέτη ελέγχθηκε εάν και κατά πόσο ο συγχρονισμός ενός αριθμού ωοθυλακίων, κατά την έναρξη της ωοθηκικής διέγερσης, θα μπορούσε να βελτιώσει τα αποτελέσματα της IVF ή της ICSI (Intra Cytoplasmic Sperm Injection) στις γυναίκες αυτές. Χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο του GnRH ανταγωνιστή. Σε κάθε ασθενή χορηγήθηκαν 225 IU rec FSH (Gonal F) δύο φορές ημερησίως την 1η ημέρα (πειραματική ομάδα, ωοθηκική διέγερση συγχρονισμένη με την αναμενόμενη ημέρα της στρατολόγησης των ωοθυλακίων) ή την 4η ημέρα (ομάδα ελέγχου, χωρίς ωοθυλακικό συγχρονισμό). Τα αποτελέσματα της μελέτης κατέδειξαν ότι ο συγχρονισμός της έναρξης της ωοθηκικής διέγερσης με την αναμενόμενη εμφάνιση του «κύματος» στρατολόγησης των ωοθυλακίων (follicular wave), οδήγησε σε αύξηση του αριθμού των κυρίαρχων ωοθυλακίων και των επιπέδων της οιστραδιόλης στον ορό, καθώς και σε μία αυξημένη τάση ανάπτυξης ώριμων ωαρίων κατά την ωοληψία στις γυναίκες «πτωχής» απόκρισης [36].

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, κατά τη διάρκεια του φυσικού γεννητικού κύκλου ένας αριθμός κοιλοτικών ωοθυλακίων διαμέτρου >5 mm στρατολογείται, ώστε να ωριμάσει περαιτέρω. Αυτό συνεπάγεται ότι κάθε ωοθυλάκιο και κατ' επέκταση κάθε γυναίκα χρειάζεται μία μέση τιμή FSH, πάνω από την οποία τα κοιλοτικά ωοθυλάκια στρατολογούνται. Ο χρόνος που απαιτείται, ώστε η FSH να υπερβεί το σημείο αυτό, καθορίζει και τον αριθμό των κυρίαρχων ωοθυλακίων, που θα υποστούν περαιτέρω ωρίμανση και τελικά, ωορρηξία. Η διάρκεια που απαιτείται, ώστε η FSH να ξεπεράσει αυτό το όριο, είναι μικρή, όταν αφορά ένα μόνο κυρίαρχο ωοθυλάκιο στο φυσικό κύκλο. Αντίθετα, η εξωγενής χορήγηση FSH κατά τη διέγερση των ωοθηκών,

παρατείνει αυτό το διάστημα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να επιλεγούν πολλαπλά κυρίαρχα ωοθυλάκια προς ωορρηξία και ,φυσικά, προς ωοληψία. Έτσι, ο χρόνος έναρξης, η δοσολογία, καθώς και η διάρκεια χορήγησης της FSH είναι καθοριστικοί παράγοντες για τον έλεγχο του αριθμού των κυρίαρχων ωοθυλακίων, που θα αναπτυχθούν κατά την ωοθηκική διέγερση [37-39].

Με βάση τη μελέτη, συμπεραίνουμε ότι τα ισχύοντα πρωτόκολλα ορθώς ξεκινούν την εφαρμογή τους τη 2η-3η ημέρα της ωοθυλακικής φάσης. Ο αριθμός των ωοθυλακίων, που επιλέγονται προς ωρίμανση κατά την ωοθηκική διέγερση, ενισχύεται ακόμη περισσότερο στην πρώιμη ωοθυλακική φάση (4η ημέρα της εμμήνου ρύσης), καθώς έχει ήδη ξεκινήσει η αύξηση της FSH.

Παρά την αύξηση των κυρίαρχων ωοθυλακίων μετά τον συγχρονισμό, η ποιότητα των ώριμων ωαρίων και των εμβρύων δε βελτιώθηκε. Επιπλέον, τα ποσοστά της εμφύτευσης, καθώς και της βιοχημικής και κλινικής κύησης ήταν χαμηλότερα, όταν η rec FSH χορηγήθηκε την 1η ημέρα (μετά τον συγχρονισμό) συγκριτικά με την 4η ημέρα (χωρίς να προηγηθεί συγχρονισμός). Με βάση τα παραπάνω, μπορούμε να εξαγάγουμε το συμπέρασμα, ότι η ποιότητα των ωοθυλακίων είναι πολύ σημαντικότερη από την ποσότητα αυτών, ώστε να επιτευχθεί κύηση σε IVF ή ICSI. Αυτό ίσως εξηγεί και την όλο και πιο διαδεδομένη εφαρμογή IVF σε φυσικό κύκλο, καθώς και την εφαρμογή των πρωτοκόλλων ήπιας διέγερσης ειδικά σε γυναίκες «πτωχής» απόκρισης [40-42].

Επιπλέον, το χρονικό διάστημα από την 1η ημέρα της περιόδου μέχρι την ημέρα της εμβρυομεταφοράς ήταν μεγαλύτερο στις γυναίκες, όπου η έναρξη της FSH έγινε την 4η ημέρα σε σχέση με την 1η ημέρα έναρξης. Έτσι, μπορούμε να υποθέσουμε ότι ο σημαντικότερος παράγοντας που οδηγεί σε κύηση, είναι η ανάπτυξη του ενδομητρίου και όχι ο αριθμός των κυρίαρχων ωοθυλακίων. Ωστόσο, αξιολογήθηκε θετικά η ικανοποιητική απόκριση των ωοθηκών στη διέγερση στις γυναίκες με προηγούμενο ιστορικό «πτωχής» απόκρισης.

Ίσως στο μέλλον γίνουν μεγαλύτερες έρευνες πάνω σε αυτό το θέμα, καθώς η συγκεκριμένη μελέτη περιορίστηκε σε ένα μικρό δείγμα (80 γυναίκες) και χρησιμοποίησε μόνο το πρωτόκολλο των GnRH ανταγωνιστών για την ωοθηκική διέγερση. Είναι, λοιπόν, πιθανό ότι αυτό το «επιθετικό» πρωτόκολλο διέγερσης, που χρησιμοποιήθηκε, να οδήγησε στην αυξημένη απάντηση των ωοθηκών. Επιπλέον, ίσως η μεγαλύτερη ποσότητα FSH που χορηγήθηκε αθροιστικά στην ομάδα της 1ης ημέρας έναρξης, να προκάλεσε τον αυξημένο αριθμό των κυρίαρχων ωοθυλακίων, που αναπτύχθηκαν. Τέλος, αξ σημειωθεί ότι τη χρονική περίοδο που διεξήχθη η μελέτη, ο ορισμός της «πτωχής» απόκρισης στην ωοθηκική διέγερση, δεν ήταν ξεκάθαρος με τη χρήση της AMH (Anti-Mullerian hormone) και του AFC (Antral Follicular Count), όπως στις μέρες μας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η διακυκλική αύξηση της FSH («παράθυρο» της FSH), που συμβαίνει στο φυσικό κύκλο κατά την ωχρινική φάση και συγκεκριμένα 2-3 ημέρες πριν από την αναμενόμενη έμμηνο ρύση έως τις πρώτες 5-6 ημέρες της ωοθυλακικής φάσης του επόμενου κύκλου, είναι καθοριστικής σημασίας για τη μετέπειτα ωρίμανση των ωοθυλακίων. Κατά τη φάση αυτή, τα ωοθυλάκια μεγέθους 2-5 mm στρατολογούνται και ένα μόνο ωοθυλάκιο θα επικρατήσει και θα υποστεί περαιτέρω ωρίμανση, ενώ τα υπόλοιπα καθίστανται άτρητα.

Όλες οι παραπάνω μελέτες που έγιναν σε ανθρώπους, μελέτησαν τους τρόπους, με τους οποίους θα περιοριστεί αυτή η διακυκλική αύξηση της FSH, που οδηγεί στην ωρίμανση μιας ομάδας μόνο ωοθυλακίων. Ακόμη, αναζητήθηκαν μέθοδοι, ώστε να αποτραπεί το peak (αιχμή) της FSH, που συμβαίνει στα στρατολογημένα ωοθυλάκια και οδηγεί στην τελική επιλογή του ενός. Επιπλέον, είναι σαφές ότι όσο περισσότερο διαρκεί η σταδιακή αύξηση της FSH, τόσο μεγαλύτερος αριθμός ωοθυλακίων, που βρίσκονται σε διαφορετικά στάδια ανάπτυξης, έχει τη δυνατότητα να ωριμάσει. Όλα τα παραπάνω θα οδηγήσουν στην ομοιογένεια των κοιλοτικών ωοθυλακίων και στο συγχρονισμό της ανάπτυξής τους.

Με βάση τα στοιχεία που αναφέρθηκαν στην παρούσα εργασία, γίνεται παρακάτω μία προσπάθεια σχεδιασμού ενός πρωτοκόλλου, που θα βελτιώσει τη συγχρονισμένη ωοθυλακική ανάπτυξη κατά τη διέγερση των ωοθηκών, με απώτερο σκοπό τη λήψη μεγαλύτερου αριθμού ώριμων ωαρίων.

3.2 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Το αντικείμενο της μελέτης που προτείνεται, είναι να καθοριστεί εάν και κατά πόσο η εξωγενής χορήγηση της FSH με αυξομειώσεις των ημερήσιων δόσεων αυτής, μπορεί να προκαλέσει το συγχρονισμό της ωοθυλακικής ωρίμανσης στα πλαίσια της εξωσωματικής γονιμοποίησης. Είναι κατανοητό, σύμφωνα με όσα περιγράφηκαν παραπάνω, ότι ο χρόνος έναρξης, η δοσολογία και η διάρκεια χορήγησης της FSH είναι καθοριστικοί παράγοντες, προκειμένου να επιτευχθεί συντονισμένη ωοθυλακική ανάπτυξη.

3.3 ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

Στη παρούσα μελέτη θα συμπεριληφθούν 30 γυναίκες, που θα υποβληθούν σε εξωσωματική γονιμοποίηση λόγω ανεξήγητης υπογονιμότητας ή υπογονιμότητας εξαιτίας σαλπιγγικού ή ανδρικού παράγοντα. Τα κριτήρια επιλογής των ασθενών θα είναι γυναίκες με φυσιολογικό κύκλο και με φυσιολογικές τιμές FSH και LH την 2^η ή 3^η μέρα του κύκλου.

Ως κριτήρια αποκλεισμού θα οριστούν: οι διαταραχές της εμμήνου ρύσεως, το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών (PCOS), καθώς και οι γυναίκες πτωχής απόκρισης στην ωοθηκική διέγερση (poor responders).

Όλες οι γυναίκες θα μελετηθούν σε ένα κύκλο η κάθε μία. Ως πρωτόκολλο διέγερσης θα χρησιμοποιηθεί το μακρύ πρωτόκολλο με τη χρήση GnRH αγωνιστή.

Και στις 3 ομάδες θα πραγματοποιηθεί καταστολή της υπόφυσης και των ωοθηκών με τη χορήγηση GnRH αγωνιστή. Μετά την καταστολή, θα χορηγηθεί μία δόση FSH για τη διέγερση των ωοθηκών. Η δόση αυτή της FSH την 1^η ημέρα της διέγερσης θα είναι ανάλογα με την ηλικία της γυναίκας. Συγκεκριμένα:

- 300IU για γυναίκες <35 ετών
- 450IU για γυναίκες ≥35 ετών

Την 2^η ημέρα δεν θα χορηγηθεί FSH. Στη συνέχεια, οι γυναίκες θα χωρισθούν σε τρεις ομάδες:

Ομάδα 1

Από την 3^η ημέρα της διέγερσης και μέχρι τη χορήγηση της χοριακής γοναδοτροφίνης (hCG), η ημερήσια δόση της FSH θα ρυθμίζεται ανάλογα με την ηλικία. Συγκεκριμένα:

- 100IU για γυναίκες <35 ετών
- 150IU για γυναίκες ≥35 ετών

Ομάδα 2

Την 3^η και 4^η μέρα

- 150IU για γυναίκες <35 ετών
- 200IU για γυναίκες ≥35 ετών

Την 5^η και 6^η μέρα

- 100IU για γυναίκες <35 ετών
- 150IU για γυναίκες ≥35 ετών

Την 7^η και 8^η μέρα

- 50IU για γυναίκες <35 ετών
- 100IU για γυναίκες ≥35 ετών

Από την 9^η ημέρα της διέγερσης και μέχρι τη χορήγηση της χοριακής γοναδοτροφίνης (hCG), η δόση της FSH θα είναι 50IU ημερησίως, ανεξάρτητα από την ηλικία της γυναίκας.

Ομάδα 3

Οι δόσεις της FSH θα είναι ανεξάρτητες της ηλικίας και συγκεκριμένα για την 3^η και 4^η ημέρα η δόση της FSH θα είναι 50IU ημερησίως. Από την 5^η ημέρα και μέχρι τη χορήγηση της χοριακής γοναδοτροφίνης (hCG), η δόση της FSH θα είναι ανάλογα με την τιμή της οιστραδιόλης στο αίμα και θα καθορίζονται ως εξής:

A. E2 <400 pg/ml 5^η μέρα → 150 IU

6^η και 7^η μέρα → 50 IU ημερησίως

8^η μέρα → 150 IU

9^η και 10^η μέρα → 50 IU ημερησίως

11^η μέρα → 150 IU

12^η μέρα και μέχρι τη hCG → 50 IU ημερησίως

B. E2 400-600 pg/ml 5^η μέρα → 100 IU

6^η και 7^η μέρα → 50 IU ημερησίως

8^η μέρα → 100 IU

9^η και 10^η μέρα → 50 IU ημερησίως

11^η μέρα → 100 IU

12^η μέρα και μέχρι τη hCG → 50 IU ημερησίως

Γ. E2 600-800 pg/ml 5^η μέρα → 50 IU

6^η και 7^η μέρα → 25 IU ημερησίως

8^η μέρα → 50 IU

9^η και 10^η μέρα → 25 IU ημερησίως

11^η μέρα → 50 IU

12^η μέρα και μέχρι τη hCG → 25 IU ημερησίως

Δ. E2 >800 pg/ml 5^η, 6^η και 7^η μέρα → 25 IU ημερησίως
8^η μέρα → όχι FSH
9^η και 10^η μέρα → 25 IU ημερησίως
11^η μέρα → όχι FSH
12^η μέρα και μέχρι τη hCG → 25 IU ημερησίως

Αιμοληψίες θα γίνονται καθημερινά στις γυναίκες από την 1^η ημέρα έναρξης της FSH (09.00) μέχρι την ημέρα χορήγησης της hCG.

Υπερηχογραφικός έλεγχος θα διενεργείται σε όλες τις γυναίκες την 1^η ημέρα πριν την έναρξη της FSH και από την 8^η ημέρα και ανά 2 με 3 ημέρες, όπου θα μετρούνται όλα τα ωοθυλάκια σε 2 διαστάσεις και θα σημειώνεται ο μέσος όρος.

3.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Θα γίνει ανάλυση των δεδομένων όσον αφορά στο μέγεθος και τον αριθμό των ωοθυλακίων σε κάθε ομάδα καθώς και σύγκριση των αποτελεσμάτων μεταξύ των τριών ομάδων. Παράλληλα, θα γίνει σύγκριση των μεταβολών των βασικών ορμονών στα δείγματα αίματος που θα ληφθούν (FSH, LH, E2).

ΘΕΩΡΗΤΙΚΗ ΒΑΣΗ ΤΟΥ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ

Το προτεινόμενο πρωτόκολλο αποτελεί θεωρητική προσέγγιση συγχρονισμού της πολλαπλής ωοθυλακικής ωρίμανσης κατά την ωθητική διέγερση. Στηρίζεται στο φυσιολογικό τρόπο μεταβολών της στάθμης της FSH στο αίμα στο γεννητικό κύκλο, με τη διακυκλική της αύξηση και τη μείωση της στη συνέχεια. Έτσι, προτείνεται οι δόσεις της FSH στην αρχή της διέγερσης να είναι μεγαλύτερες και στη συνέχεια να μειώνονται με μικρές αυξομειώσεις, ώστε τα στρατολογούμενα κάθε φορά ωοθυλάκια από τη μικρή αύξηση της FSH στη συνέχεια να γίνονται άτρητα, λόγω της μείωσης της δόσης. Στο παρελθόν, έγινε αντίστοιχη προσπάθεια καταγραφής πρωτοκόλλου συγχρονισμού ωοθυλακικής ωρίμανσης στα πλαίσια του παρόντος ΠΜΣ με διαφορετική προσέγγιση, η οποία όμως δεν κατέληξε στην πραγματοποίηση του (Αλέξανδρος Μωραϊτης). Έτσι, λόγω έλλειψης δεδομένων αλλά και της διαφαινόμενης σημασίας του, κρίθηκε ενδιαφέρον το θέμα του συγχρονισμού της ωοθυλακικής ωρίμανσης να επανεξετασθεί.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1) Bi Wu, Yan Shi, Xia Gong, Lin Yu, Qiuju Chen, Jian Wang, Zhaogui Sun.
Evaluation of follicular synchronization caused by estrogen administration and its reproductive outcome.
PLoS One. 2015 May 26;10(5):e0127595
- 2) Viana JH, Palhao MP, Siqueira LG, Fonseca JF, Camargo LS.
Ovarian follicular dynamics, follicle deviation and oocyte yield in Gyr breed (Bos indicus) cows undergoing repeated ovum pick-up.
Theriology. 2010;73(7):966-72
- 3) Baird DT, Baker TG, Mc Natty KP, Neal P.
Relationship between the secretion of the corpus luteum and the length of the follicular phase of the ovarian cycle.
Journal of Reproduction and Fertility. 1975;45(3)
- 4) Champman JC, Min S, Kunaporn S, Shah S, Kaiki-Astara A, Michael SD.
The differential effect of injecting estradiol-17 beta, testosterone and hydrocortisone during the immune adaptive period on the fertility of female mice.
Am J Reprod Immunol. 2001;46(4):288-97
- 5) Taiyeb AM, Muhsen-Alanssari SA, Dees WL, Ridha-Albartzanchi MT, Kraemer DC.
Improvement in in vitro fertilization outcome following in vivo synchronization of oocyte maturation in mice.
Exp Biol Med (Maywood). 2015 Apr;240(4):519-26
- 6) Hu J, Ma X, Bao JC, Li W, Cheng D, Gao Z, Lei A, Yang C
Insylin-transferrin-selenium (ITS) improves maturation of porcine oocytes in vitro.
Zygote. 2011 Aug;19(3):191-7
- 7) Tian X, Wang F, He C, Zhang L, Tan D, Reiter RJ, Xu J, Ji P, Liu G.
Beneficial effects of melatonin on bovine oocytes maturation: a mechanistic approach.
J Pineal Res, 2014 Oct;57(3):239-47
- 8) Fanchin R, Salomon L, Castelo-Branco A, Olivenness F, Frydman N, Frydman R.
Luteal estradiol pre-treatment coordinates follicular growth during controlled ovarian hyperstimulation with GnRH antagonists.
Human Reprod. 2003 Dec;18(12):2698-703

- 9) Fanchin R, Cunha-Filho J.S., Schonauer L.M., Righini C, de Ziegler D. and Frydman, R. (2003b).
Luteal estradiol administration strengthens the relationship between day 3 follicle-stimulating hormone and inhibin B levels and ovarian follicular status.
Fertil Steril, 79, 585-589
- 10) Al-Inany, H. and Alboulghar, M. (2001)
Gonadotrophin- releasing hormone antagonists for assisted conception.
Cochrane Database Syst. Rev., 4.
- 11) Devreker F, Pogonici E, De Martelaer V, Renelard P, Van den Bergh M and Englert Y (1999)
Selection of good embryos for transfer depends on embryo cohort size : implications for the mild ovarian stimulation debate.
Hum. Reprod ;14, 3002-3008
- 12) Opsahl M.S, Blauer K.L, Brack S.H, Lincoln S.R, Thorsell L. and Sherins, R.J. (2001)
The number of embryos available for transfer predicts successful pregnancy outcome in women over 39 years with normal ovarian hormonal reserve testing.
J. Assist. Reprod. Genet; 18, 551-556
- 13) Borm G. and Mannaerts B. (2000)
Treatment with the gonadotrophin-releasing hormone antagonist ganirelix in women undergoing ovarian stimulation with recombinant follicle stimulating hormone is effective, safe and convenient: results of a controlled, randomized, multicentre trial.
The European Orgalutran Study Group. Hum. Reprod; 15, 1490-1498
- 14) Cramer D.W, Powers D.R, Oskowitz S.P, Liberman R.F, Hornstein M.D, McShane P.M and Barbieri R.L (1999)
Gonadotropin-releasing hormone agonist use in assisted reproduction cycles: the influence of long and short regimens on pregnancy rates.
Ferti. Steril., 72, 83-89
- 15) Tan S.L, Kingsland C, Campbell S, Mills C, Bradfield J, Alexander N, Yovich J and Jacobs H.S. (1992)
The long protocol of administration of gonadotropin-releasing hormone agonist is superior to the short protocol for ovarian stimulation for in vitro fertilization.
Ferti. Steril., 57, 810-814
- 16) Gonen Y, Jacobson W and Casper R.F. (1990)
Gonadotropin suppression with oral contraceptives before in vitro fertilization. Fertil. Steril., 53, 282-287

- 17) Schoolcraft W, Schlenker T, Gee M, Stevens J. and Wagley L. (1997)
Improved controlled ovarian hyperstimulation in poor responder in in vitro fertilization patients with a microdose follicle-stimulating hormone flare, growth hormone protocol.
Fertil. Steril.,67,93-97
- 18) Fanchin R, Cunha-Filho JS, Schnaeuer LM, Kadock IJ, Cohen-Bacri P, Frydman R.
Coordination of early antral follicles by luteal estradiol administration provides a basis for alternative controlled ovarian hyperstimulation regimens.
Fertil. Steril. 2003 Feb;79(2):316-21
- 19) Groome NP, Illingworth PJ, O' Brien M, Pai R, Rodger FE, Mather JP, et al.
Measurement of dimeric inhibin B throughout the human menstrual cycle.
J Clin Endocrinol Metab 1996;81:1401-5
- 20) Chan Woo Park, Yu Im Hwang, Hwa Seon Koo, Inn Soo Kang, Kwang Moon Yang and In Ok Song.
Early gonadotropin-releasing hormone antagonist start improves follicular synchronization and pregnancy outcome as compared to the conventional antagonist protocol.
Clin Exp Reprod Med. 2014 Dec;41(4):158-164
- 21) Roseff SJ, Bangah ML, Kettel LM, Vale W, Rivier J, Burger HG, et al.
Dynamic changes in circulating inhibin levels during the luteal-follicular transition of the human menstrual cycle.
J Clin Endocrinol Metab. 1989;69:1033-1039
- 22) le Nestour E, Marraoui J, Lahlou N, Roger M, de Ziegler D, Bouchard P.
Role of estradiol in the rise in follicle-stimulating hormone levels during the luteal-follicular transition.
J Clin Endocrinol Metab. 1993;77:439-442
- 23) Hall JE, Schoenfeld DA, Martin KA, Crowley WF, Jr.
Hypothalamic gonadotropin-releasing hormone secretion and follicle-stimulating hormone dynamics during the luteal-follicular transition.
J Clin Endocrinol Metab. 1992;74:600-607
- 24) Younis JS, Soltsman S, Izhaki I, Radin O, Bar-Ami S, Ben-Ami M.
Early and short follicular gonadotropin-releasing hormone antagonist supplementation improves the meiotic status and competence of retrieved oocytes in in vitro fertilization-embryotransfer cycles.
Fertil Steril. 2010;94:1350-1355

- 25) Kolibianakis EM, Albano C, Camus M, Tournaye H, Van Steirteghem AC, Devroey P.
Relationship between LH and estradiol in IVF cycles before GnRH antagonist initiation.
Reprod Biomed Online. 2003;7:190-193
- 26) Kolibianakis EM, Albaano C, Kahn J, Camus M, Tournaye H, Van Steirtghem AC, et al.
Exposure to high levels of luteinizing hormone and estradiol in the early follicular phase of gonadotropin-releasing hormone antagonist cycles is associated with a reduced chance of pregnancy.
Fertil Steril. 2003;79:873-880
- 27) Wolfenson C, Groisman J, Couto AS, Hedenfalk M, Cortvrindt RG, Smitz JE, et al.
Batch-to-batch consistency of human-derived gonadotropin preparations compared with recombinant preparations.
Reprod Biomed Online. 2005;10:442-454
- 28) Andersen AN, Devroey P, Arce JC.
Clinical outcome following stimulation with highly purified hMG or recombinant FSH in patients undergoing IVF: a randomized assessor-blind controlled trial.
Hum Reprod 2006;21:3217-3227
- 29) Smitz J, Andersen AN, Devroey P, Arce JC. MERIT Group.
Endocrine profile in serum and follicular fluid differs after ovarian stimulation with HP-hMG or recombinant FSH in IVF patients.
Hum Reprod. 2007;22:676-687
- 30) Ziebe S, Lundin K, Janssens R, Helmggaard L, Arce JC. MERIT (Melanotrophin vs Recombinant FSH in in vitro Fertilization Trial) Group.
Influence of ovarian stimulation with HP-HMG or recombinant FSH on embryo quality parameters in patients undergoing IVF.
Hum Reprod 2007;22:2404-2413
- 31) de Ziegler D, Bijaoui G, Chapron C.
Pre- HCG elevation of plasma progesterone: good, bad or otherwise.
Hum Reprod Update.2008;14:393
- 32) Kyrou D, Kolibianakis EM, Fateini HM, Camus M, Tournaye H, Tarlatzis BC, et al.
High exposure to progesterone between the end of menstruation and the day of triggering final oocyte maturation is associated with a decrease probability of pregnancy in patients treated by in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. Fertil Steril. 2011;96:884-888

- 33) Garcia J.E, Jones G.S, Acosta A.A and Wright G. (1983)
HMG/HCG follicular maturation for oocytes aspiration :phase II, 1981
Fertil Steril ;39,174-179
- 34) Elassar A, Nulsen J, Engmann L, Benadiva C.
Estradiol and antagonist pretreatment prior to microdose leuprolide in in vitro fertilization . Does it improve IVF outcomes in poor responders as compared to oral contraceptive pill?
J Reprod Med. 2015 May-Jun;60(5-6):199-204
- 35) Ata B, Zeng X, Son WY, Holzer H, Tan SL.
Follicular synchronization using transdermal estradiol patch and GnRH antagonists in the luteal phase: does it increase oocyte yield in poor responders to gonadotropin stimulation for in vitro fertilization (IVF)? A comparative study with microdose flare-up protocol.
Gynecol Endocrinol. 2011 Nov;27(11):876-9
- 36) Baerwald, Anderson P, Yuzpe A, Case A, Fluker M.
Synchronization of ovarian stimulation with follicle wave emergence in patients undergoing in vitro fertilization with a prior suboptimal response: a randomized, controlled trial.
Fertil Steril. 2012 Oct;98(4):881-7
- 37) Baird D.
A model for follicular selection and ovulation: lessons from superovulation.
J Steroid Biochem 1987;27:15–23.
- 38) Schipper I, Hop S, Fauser B.
The follicle-stimulating hormone (FSH) threshold/window concept examined by different interventions with exogenous FSH during the follicular phase of the normal menstrual cycle: duration, rather than magnitude, of FSH increase affects follicle development.
J Clin Endocrinol Metab 1998;83:1292–8.
- 39) Penarrubia J, Fabregues F, Manau D, Creus M, Carmona F, Casamitjana R, et al.
Previous cycle cancellation due to poor follicular development as a predictor of ovarian response in cycles stimulated with gonadotrophin-releasing hormone agonist-gonadotrophin treatment.
Hum Reprod 2005;20:622–8
- 40) Aanesen A, Nygren KG, Nylund L.
Modified natural cycle IVF and mild IVF: a 10 year Swedish experience.
Reprod Biomed Online 2010;20:156–62. 25.

- 41) Li J, Xu Y, Zhou G, Guo J, Xin N.
Natural cycle IVF/IVM may be more desirable for poor responder patients after failure of stimulated cycles.
J Assist Reprod Genet 2011;28:791–5.
- 42) Nargund G. Natural-cycle/mild IVF: a science-based and patient-centered approach for the future.
Womens Health (Lond Engl) 2008;4:327–8
- 43) R.H.F. Hunter
Physiology of the graafian follicle and ovulation.
- 44) E. Kousta, DM White and S. Franks
Modern use of clomiphene citrate in induction of ovulation.
Hum. Reprod. Update (1997) 3 (4): 359-365
- 45) Antonio Requena, Julio Herrero, Jose Landeras, Esperanza Navarro, Jose L. Neyro, Juan J. Espinos, Francesc Fabregues and Maria Grana-Barcia.
Use of letrozole in assisted reproduction: a systematic review and meta-analysis.
Hum. Reprod. Update (2008) 14 (6): 571-582
- 46) Chun Mg, MRCOG; Geoffrey Trew, MRCOG
Endocrinological insights into different in vitro fertilization treatment aspects; IVF protocols using gonadotrophin-releasing hormone agonist.
- 47) B.C Tarlatzis, B.C Fauser, E.M Kolibianakis, K. Diedrich, P. Devroey and, On Behalf of the Brussels GnRH Antagonist Consensus Workshop Group.
GnRH antagonists in ovarian stimulation for IVF.
Hum. Reprod. Update 12(4):333-340
- 48) Tatemoto H, Muto N, Sunagawa I, Shinjo A, Nakada T.
Protection of porcine oocytes against cell damage caused by oxidative stress during in vitro maturation: role of superoxide dismutase activity in porcine follicular fluid.
Biol. Reprod. 2004 Oct;71(4): 1150-7
- 49) Επίτομη Μαιευτική και Γυναικολογία 2010, Ι. Μεσσήνης