



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

Διευθυντής : ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ Ι. ΔΑΠΟΝΤΕ, Αναπλ. Καθηγητής

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

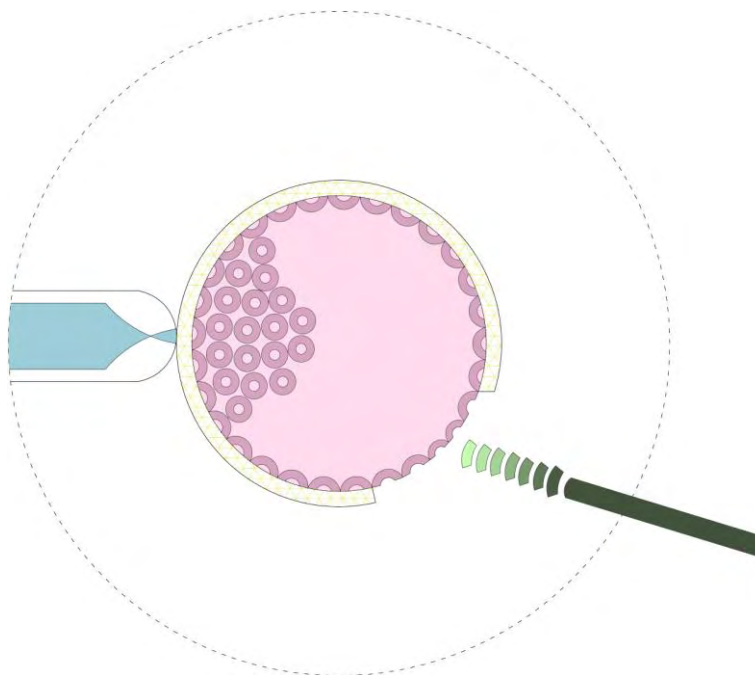
Διευθυντής: Καθηγητής ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΒΑΜΒΑΚΟΠΟΥΛΟΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ»

Διευθυντής ΠΜΣ : ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ Ι. ΔΑΠΟΝΤΕ, Αναπλ. Καθηγητής

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Ο ρόλος της υποβοηθούμενης εκκόλαψης στην εμφυτευτική ικανότητα των
εμβρύων



Μπάκαβου Ελένη
Βιολόγος

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των απαιτήσεων για την απόκτηση του Μεταπτυχιακού
Διπλώματος Ειδίκευσης
ΛΑΡΙΣΑ Οκτώβριος 2017

Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Εξεταστικής Επιτροπής:

**1^{ος} Εξεταστής
(Επιβλέπων)**

Μαρία Σάτρα
ΕΔΙΠ τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

2^{ος} Εξεταστής

Ιωάννης Παναγιωτίδης
Εμβρυολόγος, Θεσσαλονίκη

3^{ος} Εξεταστής

Αλέξανδρος Δαπόντε
Αναπληρωτής καθηγητής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Παναγιωτίδη για την ουσιαστική και ολοκληρωμένη καθοδήγηση καθ' όλη τη διάρκεια της παρούσας μελέτης, για τον χρόνο που μου αφιέρωσε και τις πληροφορίες που μου μετέδωσε. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Σάτρα, η οποία στάθηκε για μένα πολύτιμη βοηθός και συμπαραστάτης κατά τη διεξαγωγή της εργασίας. Κλείνοντας οφείλω ένα τεράστιο ευχαριστώ, το οποίο δεν είναι αρκετό, στους γονείς μου καθώς και στην αδερφή μου Βίκυ για την ηθική και ψυχολογική συμπαράσταση.

Ο ρόλος της υποβοηθούμενης εκκόλαψης στην εμφυτευτική ικανότητα των εμβρύων

ΜΠΑΚΑΒΟΥ ΕΛΕΝΗ

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Ιατρικής, 2017

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ Ι. ΔΑΠΟΝΤΕ

ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΜΑΙΕΥΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπων: **Μαρία Σάτρα**
ΕΔΙΠ τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Σύμβουλος : **Ιωάννης Παναγιωτίδης**
Εμβρυολόγος, Θεσσαλονίκη

Μέλος : **Αλέξανδρος Δαπόντε**
Αναπληρωτής καθηγητής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Περίληψη

Βλαστοκύστη ονομάζεται το στάδιο του εμβρύου μετά από 5 ημέρες ανάπτυξης, και είναι δείγμα ομαλής εξέλιξης και υψηλής δυναμικής ενός εμβρύου. Μια ώριμη βλαστοκύστη χαρακτηρίζεται από τη διόγκωσή της, τη λέπτυνση της διαφανούς ζώνης, την έσω κυτταρική μάζα, το τροφεκτόδερμα και το βλαστοκόκκο. Η επιτυχία της εμφύτευσης εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, ένας από τους οποίους είναι η ικανότητα του εμβρύου να εκκολάπτεται από την διάφανη ζώνη του (al-Nuaiim LA κ.α., 2002). Η εκκόλαψη είναι αποτέλεσμα του πολλαπλασιασμού των κυττάρων και της αυξημένης εσωτερικής υδροστατικής πίεσης, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την επέκταση της βλαστοκύστης (expanded blastocyst) και τη λέπτυνση της διάφανης ζώνης (al-Nuaiim LA κ.α., 2002, Miyata H κ.α., 2010). Αυτή η διαδικασία συμβαίνει σε συνδυασμό με την έκκριση λυσινών-πρωτεϊνών από τα κύτταρα του τροφοκτοδέρματος (TE) και / ή τη μήτρα, ώστε να αποικοδομείται η διάφανη ζώνη (Hammadeh ME κ.α., 2011) και τα κύτταρα του τροφοκτοδέρματος να αλληλεπιδρούν με το ενδομήτριο και να επιτελείται η εμφύτευση. Ωστόσο μερικά έμβρυα αδυνατούν να εμφυτευτούν. Η ελαστικότητα και η λέπτυνση της διάφανης ζώνης είναι θεμελιώδους σημασίας για την επιτυχή εκκόλαψη, η οποία είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την εμφύτευση (Cohen J κ.α., 1991, Hammadeh ME κ.α., 2011). Η σκλήρυνση της διάφανης ζώνης προκαλείται από: παρατεταμένη καλλιέργεια, μη βέλτιστες συνθήκες καλλιέργειας, αυξημένη ηλικία γυναίκας, κρυοσυντήρηση κ.α. Στα έμβρυα με σκληρή διάφανη ζώνη πραγματοποιείται υποβοηθούμενη εκκόλαψη (assisted hatching AH). Στην τεχνική αυτή δημιουργείται στη διαφανή ζώνη μια μικρή οπή ή μια λέπτυνση, από όπου το έμβρυο θα μπορέσει να εξέλθει και έτσι να εμφυτευτεί στη μήτρα. Η πιο διαδεδομένη μέθοδος υποβοηθούμενης εκκόλαψης είναι η χρήση λέιζερ. Η υποβοηθούμενη εκκόλαψη ενδείκνυται για: α) φρέσκα έμβρυα με προηγούμενες αποτυχημένες προσπάθειες εξωσωματικής γονιμοποίησης β) γυναίκες ηλικίας άνω των 37 ετών γ) περιπτώσεις κακής ποιότητας ωαρίων καθώς και σε περιπτώσεις χαμηλών αποθεμάτων ωαρίων στις ωοθήκες (FSH υψηλή, AMH χαμηλή) δ) περιπτώσεις όπου τα έμβρυα έχουν πεπαχυμένη διάφανη ζώνη ε) περιπτώσεις όπου τα έμβρυα έχουν σκληρή διάφανη ζώνη-κρυοσυντηρημένα έμβρυα. Ένα σύνολο ερευνών υποδηλώνει ότι η υποβοηθούμενη εκκόλαψη μπορεί να βελτιώσει τα ποσοστά εμφύτευσης και κλινικής εγκυμοσύνης. Ωστόσο, μη σημαντικά αποτελέσματα παρατηρήθηκαν στο ποσοστό ζώντων γεννήσεων και αποβολών. Συγκεκριμένα, η υποβοηθούμενη εκκόλαψη με τη χρήση λέιζερ αυξάνει τα ποσοστά εμφύτευσης αλλά ωστόσο αυξάνει και τα ποσοστά πολύδυμων κυήσεων. Το ίδιο συμβαίνει και με τις περιπτώσεις πλήρους αφαίρεσης της διάφανης ζώνης.

Summary

The term blastocyst describes a certain stage of embryo after 5 days of development and it is an indication of normal embryo development. The fully grown blastocyst is characterized by expansion, thinning of the zona pellucida, inner cell mass, trophoctoderm and blastocoel. The success of implantation depends on many factors, one of which is the ability of the embryo to hatch from its zona pellucida (al-Nuaim LA et al., 2002). Hatching is a result of cell proliferation and increased internal hydrostatic pressure, which results in the expansion of blastocyst (expanded blastocyst) and the thinning of the zona pellucida (al-Nuaim LA κ.α., 2002, Miyata H κ.α., 2010). This process occurs in combination with the secretion of lysins - 'proteases' produced by the cleaved embryo (trophoectoderm) and/or the uterus, all assist in zona dissolution (Hammadeh ME κ.α., 2011), so that the trophoectoderm cells interact with endometrial cells and implantation occurs. However, some embryos are unable to implant. Elasticity and thinning of the zona pellucida are fundamental for successful hatching, which is a prerequisite for implantation (Cohen J κ.α., 1991, Hammadeh ME κ.α., 2011). The hardening of the zona pellucida caused by: prolonged culture, non-optimal culture conditions, increased age of woman, cryopreservation etc. In embryos with harder zona pellucida take place assisted hatching (AH). In this technique a small hole or thinning is created in the zona pellucida, from where the embryo will be able to exit and thus implant in the uterus. The most common assisted hatching method is the use of laser. Assisted hatching is indicated for: a) fresh embryos with previous failed IVF cycles b) women aged over 37 c) poor oocyte's quality or low oocyte's stocks in the ovaries (high FSH levels or low AMH) d) cases with embryos with thick zona pellucida e) cases with embryos with harder zona pellucida- cryopreserved embryos. Several studies suggest that assisted hatching can improve implantation rates and clinical pregnancy rates. However, non-significant results were observed in live birth and miscarriage. Specifically, laser assisted hatching increases implantation rates but also increases multiple pregnancy rates. The same is occurred with the full removal of the zona pellucida.

Περιεχόμενα

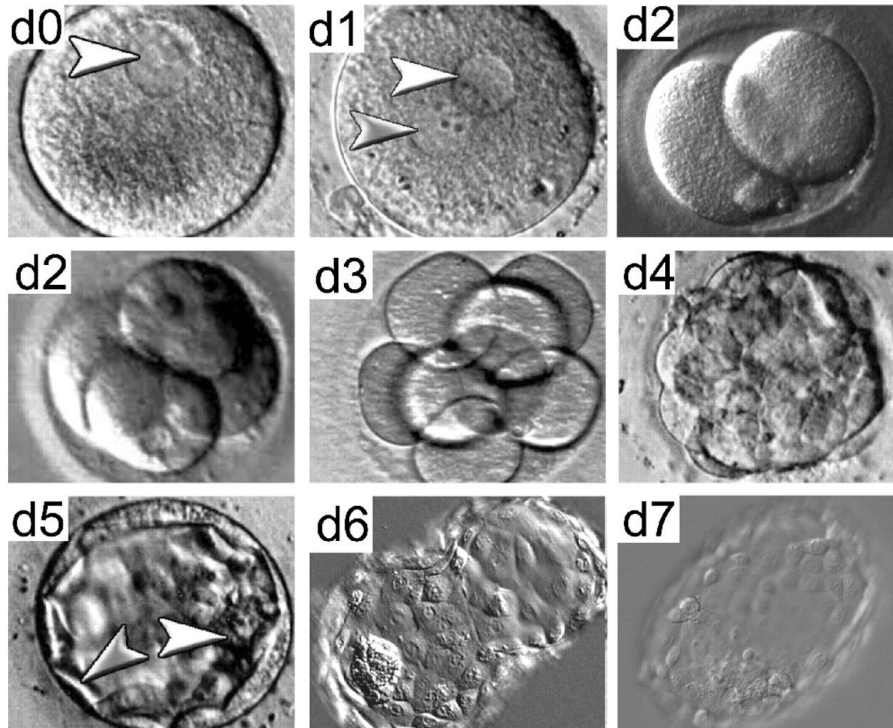
Κεφάλαιο 1	Εισαγωγή.....	7
1.1	Προεμφυτευτική ανάπτυξη εμβρύου.....	7
1.2	Δομή βλαστοκύστης	8
1.3	Αξιολόγηση βλαστοκύστης.....	10
Κεφάλαιο 2	Υποβοηθούμενη εκκόλαψη.....	12
2.1	Εκκόλαψη βλαστοκύστης	12
2.2	Μέθοδοι υποβοηθούμενης εκκόλαψης	13
2.3	Περιπτώσεις όπου πραγματοποιείται η υποβοηθούμενη εκκόλαψη.....	14
2.4	Παράγοντες που επηρεάζουν την εκκόλαψηΣφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.18	
Κεφάλαιο 3	Ποσοστά υποβοηθούμενης εκκόλαψης	21
3.1	Υποβοηθούμενη εκκόλαψη και ποσοστά κλινικής εγκυμοσύνης.....	21
3.2	Πολύδυμες κυήσεις	23
3.3	Ποσοστά εμφύτευσης.....	24
3.4	Ποσοστά ζώντων γεννήσεων/Αποβολές	25
Κεφάλαιο 4	Σύνοψη-Συμπεράσματα	26
Βιβλιογραφία		28

Κεφάλαιο 1

Εισαγωγή

1.1. Προεμφυτευτική ανάπτυξη εμβρύου

Η ανάπτυξη αρχίζει μερικές ώρες μετά τη δημιουργία του ζυγώτη. Η γονιμοποίηση λαμβάνει χώρα όταν το ωάριο ενεργοποιείται από την είσοδο ενός σπερματοζωαρίου (d0). Η επιβεβαίωση της γονιμοποίησης χαρακτηρίζεται από την παρουσία δύο προπυρήνων αλλά και την φλοιώδη αντίδραση με αύξηση του ενδοκυττάριου ασβεστίου λόγω της εξωκυττάρωσης των φλοιωδών κοκκίων. Επιπρόσθετα έχουμε την ολοκλήρωση της δεύτερης μειωτικής διαίρεσης και την απελευθέρωση του δεύτερου πολικού σωματίου (d2). Εντός του πυρήνα υπάρχουν δομές γνωστές ως πυρηνίσκοι. Οι προπυρήνες θα πρέπει να είναι έκκεντροι, ίδιου μεγέθους με ίδιου αριθμού και μεγέθους πυρηνίσκων (Instambul Consensus Workshop, 2011). Ο ζυγώτης διαιρείται (μιτωτικά) σε δύο θυγατρικά κύτταρα που ονομάζονται βλαστομερίδια (d2). Οι επόμενες διαιρέσεις ακολουθούν γρήγορα σχηματίζοντας μικρότερα βλαστομερίδια: η διεργασία αυτή ονομάζεται αυλάκωση (d3). Το σχετικό μέγεθος των βλαστομεριδίων σε ένα έμβρυο καθορίζεται και από το στάδιο διαίρεσης και από το ρυθμό διαίρεσης. Τα βλαστομερίδια εμβρύων με 2,4,8 κύτταρα θα πρέπει να είναι ισομεγέθη (συγκεκριμένου σταδίου). Την τέταρτη ημέρα της ανάπτυξης το ανθρώπινο έμβρυο φαίνεται σαν μια δυσδιάκριτη μάζα από κύτταρα και ονομάζεται μορίδιο (d4). Το μορίδιο αποτελείται από 16-32 κύτταρα και όλα τα βλαστομερίδια θα πρέπει να περιλαμβάνονται στην διαδικασία της συμπύκνωσης. Συμπύκνωση είναι ο σχηματισμός δομικών συνδέσεων μεταξύ των βλαστομεριδίων (συνδέσεις χάσματος, συνδέσεις προσκόλλησης, στενές συνδέσεις) (Trownson AO κ.α., 1974). Σε αυτή τη διαδικασία παίρνει μέρος η κυτταρική πρωτεΐνη προσκόλλησης E-καδερίνη. Την πέμπτη ημέρα σχηματίζεται η βλαστοκύστη(d5). Η βλαστοκύστη αποτελείται από την έσω κυτταρική μάζα, το τροφοεκτόδερμα και το βλαστόκοιλο. Τα κύτταρα της έσω κυτταρικής μάζας πρέπει να είναι πολλά και στενά συνδεδεμένα μεταξύ τους ενώ τα κύτταρα του τροφοεκτοδέρματος πρέπει να δημιουργούν ένα συνεχές επιθήλιο. Η διάφανη ζώνη λεπταίνει και το έμβρυο εκκολάπτεται από αυτή (d6) ώσπου την ημέρα 7 είναι έτοιμο να εμφυτευτεί στο ενδομήτριο (d7) (Εικόνα 1).



Εικόνα 1: Στάδια ανάπτυξης ανθρώπινου εμβρύου πριν από την εμφύτευση από την ημέρα (day) 0 έως την ημέρα 7. Μετά τη γονιμοποίηση, τα έμβρυα υποβάλλονται σε μια σειρά μιτωτικών κυτταρικών διαιρέσεων. Τα βέλη στα d0 και d1 δείχνουν προπυρήνες. Την 4η ημέρα (d4), ξεκινάει η συμύκνωση με αποτέλεσμα το σχηματισμό του μοριδίου που αποτελείται από βλαστομερίδια σε μια συμπαγή συστάδα που περιέχεται μέσα στη διάφανη ζώνη. Η βλαστοκύστη, η οποία σχηματίζεται την 5η ημέρα (d5), είναι μια δομή γεμάτη με υγρό που αποτελείται από μια εσωτερική κυτταρική μάζα (άσπρο βέλος) και το τροφοεκτόδεμα (γκρίζο βέλος). Την ημέρα 6 (d6), η εκκολαπτόμενη βλαστοκύστης βγαίνει από τη διάφανη ζώνη και είναι έτοιμη να εμφυτευτεί στο τοίχωμα της μήτρας την ημέρα 7 (d7).

1.2. Δομή βλαστοκύστης

Η βλαστοκύστη σχηματίζεται την πέμπτη ημέρα και περιέχει δύο τύπους κυττάρων (watson και barcroft, 2001)(Εικόνα 2) :

α) Την εξωτερική στοιβάδα, τροφοεκτόδεμα ή τροφοβλάστη (TE) που περιβάλλει τη βλαστική κοιλότητα ή βλαστοκοίλη, η οποία περιέχει το βλαστικό υγρό. Από τα τροφοεκτοδερμικά κύτταρα θα προκύψουν οι εξωεμβρυικές υποστηρικτικές δομές (πλακούντας και εμβρυικές μεμβράνες).

β) Μια μάζα εσωτερικών κυττάρων, την έσω κυτταρική μάζα (ICM) ή εμβρυοβλάστη, η οποία είναι τοποθετημένη μέσα στην βλαστική κοιλότητα, σε επαφή με το τοίχωμα του τροφοεκτοδέρματος. Εφόσον η βλαστοκύστη προσομοιάζει με κοίλη σφαίρα, η εμβρυοβλάστη αναπτύσσεται ως μια ομάδα κυττάρων στον ένα πόλο (εμβρυικός πόλος), ενώ ο αντίθετος πόλος καλείται αντεμβρυικός.

Επιπρόσθετα, η βλαστοκύστη χαρακτηρίζεται από την λέπτυνση της διάφανης ζώνης και το βλαστόκοιλο.

γ) Το ανθρώπινο ωκύτταρο και το πρώιμο έμβρυο περιβάλλεται από τη διάφανη ζώνη (13-15 μm), η οποία αποτελείται από γλυκοπρωτεΐνες και υδατάνθρακες (Bleil JD κ.α., 1980). Η διάφανη ζώνη είναι διπλή, το εξωτερικό στρώμα της είναι παχύ, ενώ το εσωτερικό είναι λεπτό αλλά ανθεκτικό (Tucker MJ κ.α., 1993). Έχει δομική και λειτουργική σημασία για το κύτταρο κατά τη διάρκεια της γονιμοποίησης και της προεμφυτευτικής ανάπτυξης. Πιο συγκεκριμένα, πριν τη γονιμοποίηση, συμβάλλει στην αλληλεπίδραση με τα σπερματοζωάρια, στην επαγωγή της ακροσωμικής αντίδρασης καθώς επίσης προωθεί τη σύντηξη με το ωκύτταρο (Van Duin M κ.α., 1994). Μετά τη γονιμοποίηση εμποδίζει την πολυσπερμία, αποτρέπει το διαχωρισμό των ελεύθερων βλαστομεριδίων κατά τη μετακίνηση του εμβρύου στον ωαγωγό και εμποδίζει την επαφή με άλλα κύτταρα όπως λευκοκύτταρα, επιθηλιακά κύτταρα κ.α. (Modliniski JA κ.α., 1970). Η διάφανη ζώνη είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της ακεραιότητας του εμβρύου πριν τη συμπύκνωση, μετά από αυτή η διάφανη ζώνη σκληραίνει, και αυτό αποδεικνύεται από μια αυξημένη αντίσταση στη διάσπαση της από διάφορους χημικούς παράγοντες (Bleil JD κ.α., 1980). Μόλις όμως το έμβρυο γίνει βλαστοκύστη (D5), ένας συνδυασμός από λυσίνες – πρωτεάσες παραγόμενες από το έμβρυο και τη μήτρα διασπούν τη διάφανη ζώνη (Gordon JW κ.α., 1993, Schiew MC κ.α., 1995, Letterie GS κ.α., 1991). Επιπλέον, η φυσική επέκταση της εμβρυϊκής μάζας μειώνει το πάχος της ζώνης κατά την προετοιμασία για εκκόλαψη (διευρυμένες βλαστοκύστες-expanded blastocyst) (Cohen J, κ.α., 1991), έτσι ώστε τα κύτταρα του τροφοεκτοδέρματος αλληλεπιδρούν με το ενδομήτριο και επιτελείται η εμφύτευση.

δ) Ο σχηματισμός του βλαστούκουλου δημιουργείται από την ενεργοποίηση των διαύλων μεμβράνης όπως το $\text{Na}^+ / \text{K}^+ \text{-ATPase}$ ένζυμο, οι οποίοι αυξάνουν τη συγκέντρωση άλατος μέσα στο έμβρυο, προσελκύοντας νερό μέσω όσμωσης (Watson et al., 2004). Αυτή η αυξημένη πίεση υγρού αυξάνει προοδευτικά το μέγεθος του βλαστούκουλου από την πρώιμη έως την διευρυμένη βλαστοκύστη (expanded) και τέλος την εκκολαπτόμενη βλαστοκύστη (hatching). Κατά τη διάρκεια του σχηματισμού και της επέκτασης του βλαστούκουλου, το αυξημένο υγρό σε συνδυασμό με τον μεγαλύτερο αριθμό κυττάρων μεγεθύνουν τη βλαστοκύστη (διευρυμένη βλαστοκύστη) και παράλληλα, τα κύτταρα του τροφοεκτοδέρματος (TE) παράγουν λυσίνες όπου προάγουν τη λέπτυνση της διάφανης ζώνης και την τελική εκκόλαψη της βλαστοκύστης.



Εικόνα 2: Δομή της βλαστοκύστης.

1.3. Αξιολόγηση βλαστοκύστης

Κάθε βλαστοκύστη κατηγοριοποιείται σε πρώιμη, πλήρη, διευρυμένη, εκκολαπτόμενη ή εκκολαφθείσα βλαστοκύστη ανάλογα με το πάχος της διάφανης ζώνης και σε συνάρτηση με τη διόγκωση και το μέγεθος της βλαστικής κοιλότητας (Dokras κ.α., 1993)(Εικόνα 3).

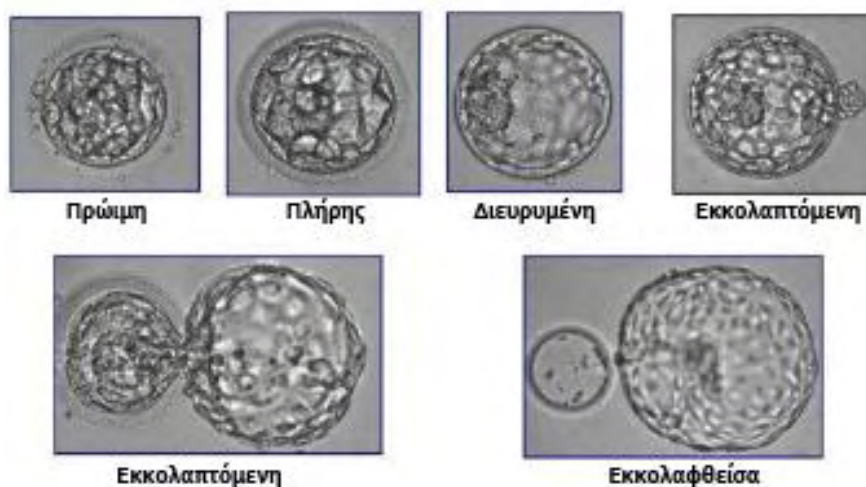
α)Πρώιμη βλαστοκύστη (Early blastocyst) (αριθμός 1 ή 2): η βλαστική κοιλότητα καταλαμβάνει όγκο λιγότερο από τον μισό του αρχικού όγκου του γονιμοποιημένου ωαρίου. Τα κύτταρα της έσω κυτταρικής μάζας αρχίζουν μόλις να διακρίνονται.

β)Πλήρης βλαστοκύστη (Full blastocyst) (αριθμός 3): η βλαστική κοιλότητα καταλαμβάνει όγκο ίσο ή μεγαλύτερο από τον αρχικό όγκο του γονιμοποιημένου ωαρίου. Τα κύτταρα της έσω κυτταρικής μάζας είναι διακριτά.

γ)Διευρυμένη βλαστοκύστη (Expanded blastocyst) (αριθμός 4): η βλαστική κοιλότητα καταλαμβάνει ολοκληρωτικά τον όγκο του γονιμοποιημένου ωαρίου και παρατηρείται λείπτυνση της διαφανούς ζώνης.

δ)Εκκολαπτόμενη βλαστοκύστη (Hatching blastocyst) (αριθμός 5): δημιουργείται ρήγμα στη διάφανη ζώνη, που περιβάλλει τη βλαστοκύστη και τα τροφοεκτοδερμικά κύτταρα εξορμούν από αυτή.

ε)Εκκολαφθείσα βλαστοκύστη (Hatched blastocyst) (αριθμός 6): όλα τα κύτταρα της βλαστοκύστης έχουν εξέλθει της διαφανούς ζώνης.



Εικόνα 3: Τα διαφορετικά στάδια ανάπτυξης των βλαστοκύστεων .

Έσω κυτταρική μάζα

Η έσω κυτταρική μάζα έχει κατηγοριοποιηθεί σε τρία μορφολογικά κριτήρια:

Κατηγορία A: περιλαμβάνει πολλά κύτταρα τα οποία είναι στενά συνδεδεμένα μεταξύ τους.

Κατηγορία B: περιλαμβάνει λίγα κύτταρα που είναι χαλαρά συνδεδεμένα.

Κατηγορία C: περιλαμβάνει πολύ λίγα κύτταρα που είναι πολύ χαλαρά συνδεδεμένα μεταξύ τους.

Τροφοβλάστη

Τα κύτταρα της τροφοβλάστης έχουν βαθμολογηθεί όπως και αυτά της έσω κυτταρικής μάζας με βάση τον αριθμό τους και τη συνεκτικότητά τους σε τρεις διαφορετικούς βαθμούς:

Κατηγορία Α: περιλαμβάνει πολλά κύτταρα που δημιουργούν ένα συνεχές επιθήλιο.

Κατηγορία Β: περιλαμβάνει μερικά κύτταρα με λιγότερο συνεκτικούς δεσμούς και άρα σχετικά ασυνεχές επιθήλιο.

Κατηγορία C: πολύ λίγα και μεγάλα κύτταρα που προσπαθούν να σχηματίσουν ένα επιθήλιο.

Την 5η ημέρα η ιδανική βλαστοκύστη αξιολογείται ως 4AA (διευρυμένη βλαστοκύστη με άριστη έσω κυτταρική μάζα και τροφοβλάστη), ενώ την 6η ημέρα ως 5AA (εκκολαπτόμενη βλαστοκύστη) με άριστη έσω κυτταρική μάζα και τροφοβλάστη). Κατά γενική ομολογία, όταν μια βλαστοκύστη παρουσιάζει διάταξη, ομοιογενή τροφοβλάστη και ευκρινή, συμπαγή έσω κυτταρική μάζα την πέμπτη ημέρα μετά τη γονιμοποίηση έχει αυξημένες πιθανότητες να εμφυτευθεί και αξιολογείται ως 4AA (Gardner κ.α.,1998)(Εικόνα 4).

Έσω κυτταρική μάζα	A πολλά κύτταρα σε πυκνή διάταξη	B αρκετά κύτταρα σε αραιή διάταξη	C λίγα ή ελάχιστα κύτταρα
Τροφο-εκτόδερμα	A πολλά κύτταρα που σχηματίζουν ένα συμπαγές	B λίγα κύτταρα που σχηματίζουν ένα αραιό	C λίγα ή ελάχιστα κύτταρα
Διευρυμένη βλαστοκύστη 4 cyst			

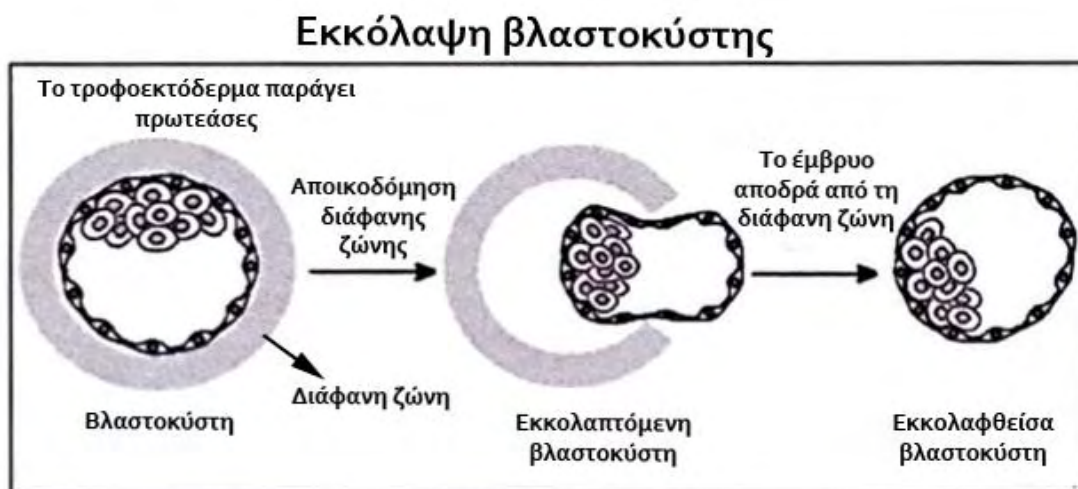
Εικόνα 4: Αξιολόγηση βλαστοκύστεων ημέρα 5.

Κεφάλαιο 2

Υποβοηθούμενη εκκόλαψη

2.1. Εκκόλαψη βλαστοκύστης

Η εκκόλαψη είναι αποτέλεσμα του πολλαπλασιασμού των κυττάρων και της αυξημένης εσωτερικής υδροστατικής πίεσης, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την επέκταση της βλαστοκύστης (expanded blastocyst) και τη λέπτυνση της διάφανης ζώνης (al-Nuaim LA κ.α., 2002, Miyata H κ.α., 2010). Αυτή η διαδικασία συμβαίνει σε συνδυασμό με την έκκριση λυσινών-πρωτεασών από τα κύτταρα τροφοεκτοδέρματος (TE) και / ή τη μήτρα, ώστε να αποικοδομείται η διάφανη ζώνη (Hammadeh ME κ.α., 2011) και τα κύτταρα του τροφοεκτοδέρματος να αλληλεπιδρούν με το ενδομήτριο και να επιτελείται η εμφύτευση (Εικόνα 5,6). Είναι γνωστό ότι η εκκόλαψη επιτελείται μετά από μια σειρά συσπάσεων (κατάρρευση και επανεπέκταση βλαστοκύστης). Η κατάρρευση της βλαστοκύστης (collapsed blastocyst) είναι ένα φαινόμενο συστολής που προκαλείται από εκροή υγρού του βλαστοκόιλου λόγω των χαλαρών δεσμών των κυττάρων του τροφοεκτοδέρματος. Η κατάρρευση και η επέκταση της βλαστοκύστης καθώς και η λέπτυνση της διάφανης ζώνης συμβαίνει πριν την εκκόλαψη (Biggers κ.α., 1998, Glass κ.α., 1973, Gonzales και Bavister, 1995). Ωστόσο μερικά έμβρυα αδυνατούν να εκκολαπτούν με αποτέλεσμα να μην επιτελείται εμφύτευση. Σε αυτά τα έμβρυα πραγματοποιείται υποβοηθούμενη εκκόλαψη (assisted hatching AH). Στην τεχνική αυτή δημιουργείται στη διαφανή ζώνη μια μικρή οπή ή μια λέπτυνση, από όπου το έμβρυο θα μπορέσει να εξέλθει και έτσι να εμφυτευτεί στη μήτρα. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, στο περιβάλλον της μήτρας, κατά την έκτη περίπου μέρα μετά τη γονιμοποίηση, η διαφανή ζώνη διασπάται, ώστε να έρθει σε επαφή το έμβρυο με το ενδομήτριο και να ξεκινήσει η διαδικασία της εμφύτευσης. Κάποιες φορές όμως, η διαφανής ζώνη δρα σαν «παγίδα» για το ίδιο το έμβρυο, εμποδίζοντάς το να απαλλαγεί από αυτή και να εμφυτευθεί.



Εικόνα 5: Σχηματική αναπαράσταση εκκόλαψης ανθρώπινης βλαστοκύστης.



Εκκολαπτόμενη βλαστοκύστη



Εκκολαφθείσα βλαστοκύστη

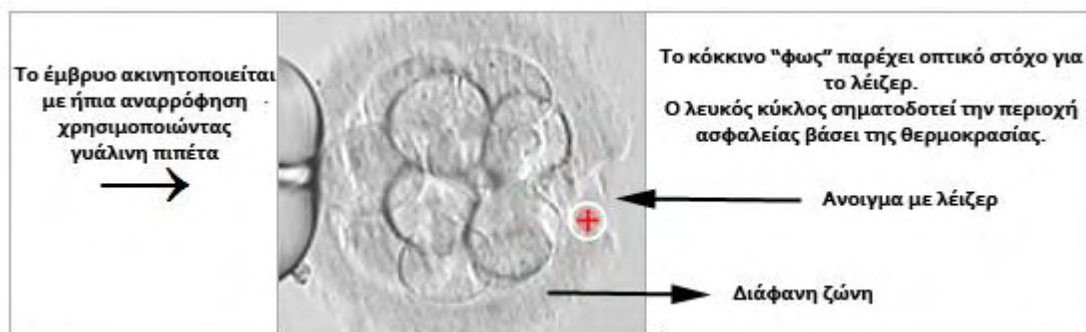
1. Βλαστοκύστη

2. Κενή διάφανη ζώνη

Εικόνα 6: Εκκολαπτόμενη και εκκολαφθείσα βλαστοκύστη.

2.2. Μέθοδοι υποβοηθούμενης εκκόλαψης

Η διαδικασία της υποβοηθούμενης εκκόλαψης γενικά εκτελείται πριν από την εμβρυομεταφορά (ET) την ημέρα 3, 5 ή 6 μετά τη γονιμοποίηση χρησιμοποιώντας διάφορες μεθόδους. Αυτές οι μέθοδοι υποβοηθούμενης εκκόλαψης περιλαμβάνουν τη δημιουργία ανοίγματος στην περιοχή είτε με όξινο *Tyrode's* διάλυμα (χημική υποβοηθούμενη εκκόλαψη) (Hurst BS κ.α., 1998, Lanzendorf SE κ.α., 1998), με γυάλινη μικροβελόνα (μηχανική υποβοηθούμενη εκκόλαψη) (Hellebaut S κ.α. 1996), είτε λέιζερ (Obruca A κ.α., 1994), ή με τη χρήση θρυψίνης (ενζυμική υποβοηθούμενη εκκόλαψη) (Perona και Wassarman, 1986) ή τη χρήση ενός πιεζοηλεκτρικού μικροεπεξεργαστή (Nakayama T κ.α., 1999). Ο πιο διαδεδομένος τρόπος ωστόσο είναι η χρήση λέιζερ καθώς πρόσφατα δεδομένα έδειξαν υψηλότερο ποσοστό εμφύτευσης, ποσοστό κλινικής εγκυμοσύνης και ποσοστό γεννήσεων (Hanying Zhou κ.α., 2014). Τα πλεονεκτήματα υποβοηθούμενης εκκόλαψης είναι ότι: α) απαιτεί λιγότερα έμβρυα για εμβρυομεταφορά και β) αυξάνει τα ποσοστά εμφύτευσης ενώ τα μειονεκτήματα ότι: α) απαιτεί συγκεκριμένες δεξιότητες για να εκτελεστεί και β) αυξάνει τα ποσοστά πολύδυμων κυήσεων. Σε σύγκριση με άλλες μεθόδους, η υποβοηθούμενη εκκόλαψη με λέιζερ είναι η πιο δημοφιλής και ιδανική τεχνολογία (Εικόνα 7). Στην τεχνική αυτή το έμβρυο ακινητοποιείται σε μια πιπέτα συγκράτησης (holding pipette) και κατόπιν το λέιζερ χρησιμοποιείται για να κάνει ένα άνοιγμα. Αυτό το άνοιγμα θα βοηθήσει το έμβρυο να εκκολαπτεί από την περιοχή κατά τη διάρκεια της εμφύτευσης. Ωστόσο, ένα πιθανό πρόβλημα με τη χρήση του λέιζερ είναι η θέρμανση των κυττάρων του εμβρύου πλησίον της θέσης παραβίασης στη διάφανη ζώνη (Lanzendorf κ.α., 2011). Παρόλα αυτά η μέθοδος αυτή εξοικονομεί χρόνο και έτσι τα έμβρυα βρίσκονται εκτός του κλιβάνου για λιγότερο χρόνο σε σχέση με τις άλλες μεθόδους (Wan κ.α., 2014, Li D κ.α., 2016).



Εικόνα 7: Υποβοηθούμενη εκκόλαψη με λέιζερ.

2.3. Περιπτώσεις όπου πραγματοποιείται η υποβοηθούμενη εκκόλαψη

Η μέθοδος της υποβοηθούμενης εκκόλαψης πραγματοποιείται στις εξής περιπτώσεις :

α) Σε φρέσκα έμβρυα με προηγούμενες αποτυχημένες προσπάθειες εξωσωματικής γονιμοποίησης. Η επαναλαμβανόμενη ανεξήγητη αποτυχία της εξωσωματικής γονιμοποίησης σχετίζεται με μειωμένη πιθανότητα εγκυμοσύνης σε μεταγενέστερους κύκλους θεραπείας. Τα ποσοστά εμφύτευσης και κλινικής εγκυμοσύνης φαίνεται να αυξάνονται σημαντικά με την υποβοηθούμενη εκκόλαψη για γυναίκες με ανεξήγητη αποτυχία εμφύτευσης σε τουλάχιστον δύο ή περισσότερους προηγούμενους κύκλους IVF (Sallam HN κ.α., 2003, Hammadeh ME κ.α., 2011). Άλλη έρευνα έδειξε πως η υποβοηθούμενη εκκόλαψη σε φρέσκα έμβρυα που μεταφέρθηκαν σε γυναίκες με επαναλαμβανόμενες προηγούμενες αποτυχίες εξωσωματικής γονιμοποίησης συσχετίστηκε με μια κλινικά σημαντική βελτίωση του ποσοστού κλινικής εγκυμοσύνης (Wellington P. Martins κ.α., 2011).

β) Σε γυναίκες ηλικίας άνω των 37 ετών. Σύμφωνα με μελέτες, η προχωρημένη μητρική ηλικία επηρεάζει την πιθανότητα εκκόλαψης εμβρύων λόγω της σκλήρυνσης της διάφανης ζώνης (Hornig SG, 2002) και η υποβοηθούμενη εκκόλαψη μπορεί να βελτιώσει τα ποσοστά εμφύτευσης και κλινικής εγκυμοσύνης (Ali J κ.α., 2003). Συγκεκριμένα η σκλήρυνση προκαλείται λόγω ενδοκρινικών αλλαγών σχετιζόμενων με την ηλικία ή/και απουσίας λυσινών από περιβάλλοντες ιστούς (Dokras A κ.α., 1991, Tucker MJ κ.α., 1996).

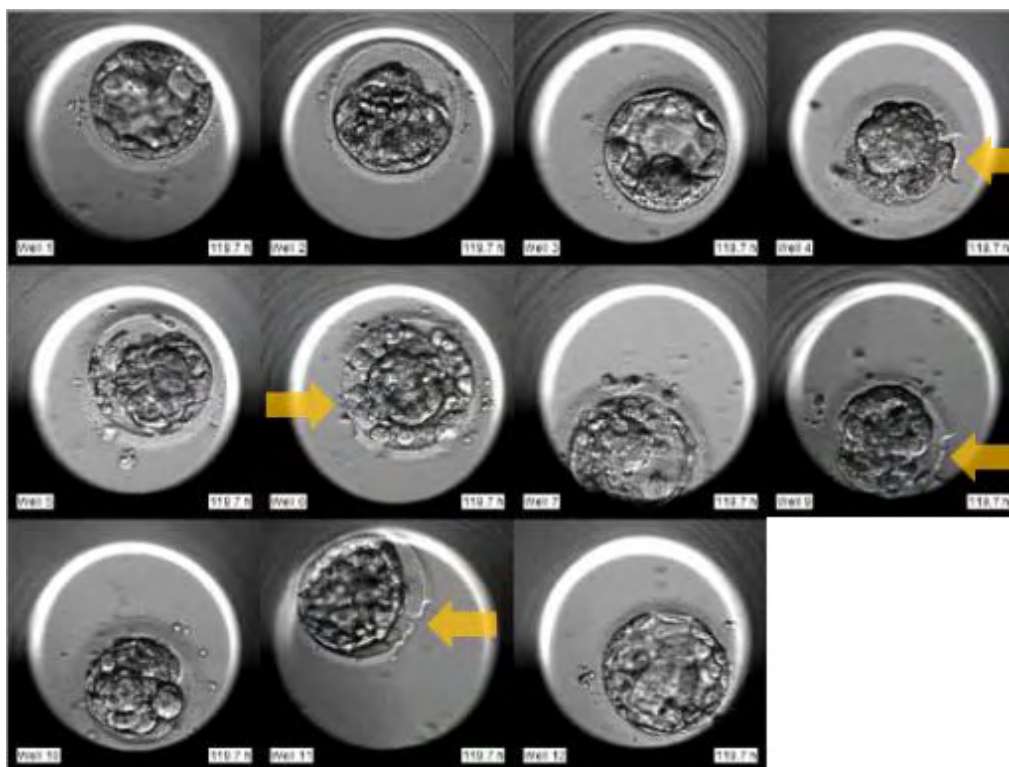
γ) Σε περιπτώσεις κακής ποιότητας ωαρίων καθώς και σε περιπτώσεις χαμηλών αποθεμάτων ωαρίων στις ωοθήκες (FSH υψηλή, AMH χαμηλή). Σε γυναίκες με υψηλά επίπεδα ωοθυλακιοτρόπου ορμόνης (FSH) και χαμηλά επίπεδα αντιμυλλέριαν ορμόνης (AMH) επιτελείται υποβοηθούμενη εκκόλαψη. Υψηλά επίπεδα ωοθυλακιοτρόπου ορμόνης (FSH) καθώς και χαμηλά επίπεδα της αντιμυλλέριαν ορμόνης (AMH) είναι ένας προγνωστικός δείκτης για πρωτοπαθή ωοθηκική ανεπάρκεια (primary ovarian insufficiency). Τα επίπεδα της AMH στο αίμα μιας γυναίκας είναι σήμερα από τους πιο αξιόπιστους δείκτες των αποθεματικών των ωοθηκών της σε ωάρια.

δ) Σε περιπτώσεις όπου τα έμβρυα έχουν πεπαχυμένη διάφανη ζώνη. Μερικά έμβρυα μπορεί να έχουν εγγενώς πεπαχυμένη διάφανη ζώνη ή μπορεί να συμβεί πάχυνση αυτής κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας ή μετά την κρυοσυντήρηση των

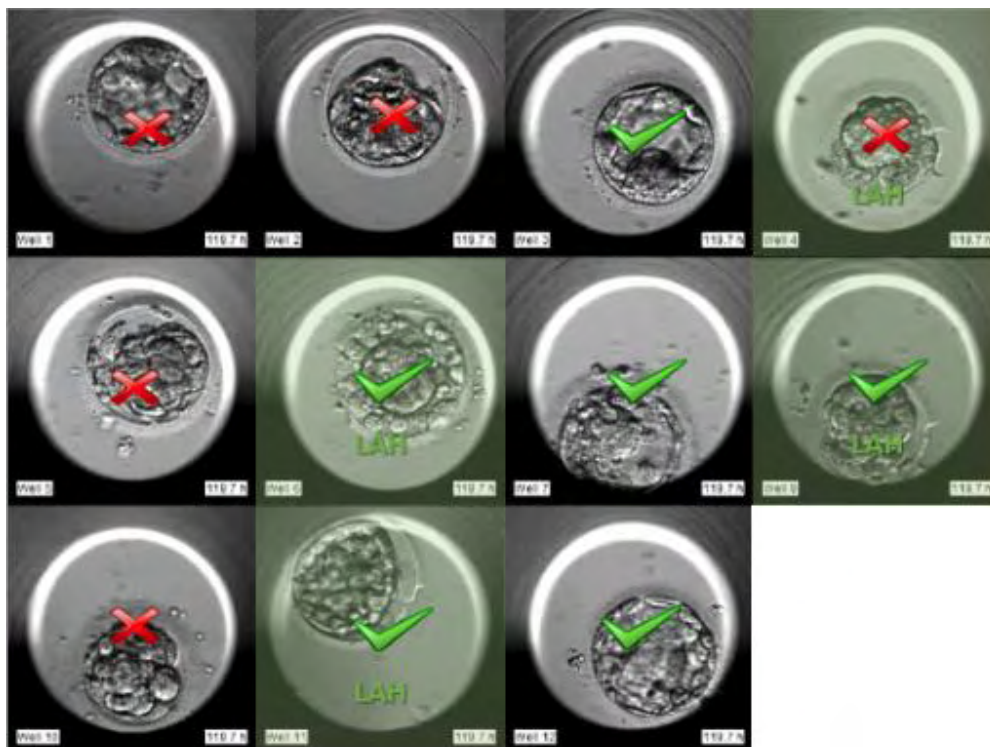
εμβρύων (Schiewe MC κ.α., 1995). Επίσης η αυξημένη ηλικία της γυναίκας σχετίζεται με το αυξημένο πάχος της διάφανης ζώνης (Nawroth κ.α., 2001).

ε) Σε περιπτώσεις όπου τα έμβρυα έχουν σκληρή διάφανη ζώνη- κρυοσυντηρημένα έμβρυα. Η Ελαστικότητα και η λέπτυνση της διάφανης ζώνης είναι θεμελιώδους σημασίας για την επιτυχή εκκόλαψη, η οποία είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την εμφύτευση (Cohen J κ.α., 1991, Hammadeh ME κ.α., 2011). Ωστόσο μερικοί παράγοντες προκαλούν σκλήρυνση της διάφανης ζώνης με αποτέλεσμα να μην επιτελείται εμφύτευση. Η κρυοσυντήρηση σκληραίνει τη διάφανη ζώνη (Carroll J κ.α., 1990). Συγκεκριμένα τα κρυοπροστατευτικά είναι αυτά που προκαλούν την αύξηση του ασβεστίου και επακόλουθα τη σκλήρυνση. Τα διμεθυλ-σουλφοξείδιο (DMSO), αιθυλενογλυκόλη(EG) και 1,2- προπανεδιόλη(1,2 – propanediol-PrOH) όλα αυξάνουν το ενδοκυτταρικό ασβέστιο σε ωοκύτταρα ποντικού. Απομακρύνοντας το εξωκυτταρικό ασβέστιο από το θρεπτικό καλλιέργειας είναι δυνατό να μειωθεί το ποσοστό της απελευθέρωσης του ασβεστίου από τα EG και PrOH. Το DMSO εισέρχεται μέσα στο ωοκύτταρο και απελευθερώνει ασβέστιο πιθανά διαρρηγνύοντας τις μεμβράνες ενδοκυτταρικών οργανιδίων αποθηκών ασβεστίου όπως τα μιτοχόνδρια και το ενδοπλασματικό δίκτυο (Larman κ.α., 2006, Larman κ.α., 2007, Vincent C, κ.α., 1990, Vincent C κ.α., 1991). Επιπρόσθετα πρόσφατη έρευνα σε ωοκύτταρα βοοειδών έδειξε πως η κρυοσυντήρηση μεταβάλλει την δευτεροταγή δομή των πρωτεϊνών της διάφανης ζώνης με επακόλουθη τη σκλήρυνσή της. Συγκεκριμένα παρατηρείται μια αύξηση της περιεκτικότητας σε β-φύλλων εις βάρος των α-ελίκων καθώς και στη διαμόρφωση λιπιδίων και υδατανθράκων της διάφανης ζώνης (Giulia Rusciano,2017). Πρόσφατο άρθρο προτείνει πως η υποβοηθούμενη εκκόλαψη σε κατεψυγμένα έμβρυα ειδικά γυναικών άνω των 37 πρέπει να είναι μια στρατηγική ρουτίνας σε κύκλους εξωσωματικής πριν γίνει η εμβρυομεταφορά (Katalin Kanayo, 2016).

Σε μια κλινική μελέτη (Ιωάννης Παναγιωτίδης, Ιάκεντρο, 2017) 50 κρυοσυντηρημένες, καλής ποιότητας βλαστοκύστες D5 (δωρεά για έρευνα), αποψύχθηκαν με σκοπό τη μελέτη της ικανότητας για εκκόλαψη μετά τη χρήση ή μη λέιζερ και εκτιμήθηκε το ποσοστό εκκόλαψης. Συγκεκριμένα στις μισές βλαστοκύστες εφαρμόστηκε υποβοηθούμενη εκκόλαψη με λέιζερ ενώ οι άλλες μισές αφέθηκαν να εκκολαφθούν αυθόρμητα. Μέτα την πάροδο 48 ωρών παρατηρήθηκε ότι τα έμβρυα που υπέστησαν υποβοηθούμενη εκκόλαψη με λέιζερ κατάφεραν να εξορμήσουν γρηγορότερα από την τεχνητή οπή ενώ τα έμβρυα που αφέθηκαν να εκκολαφθούν αυθόρμητα μετά από επαναλαμβανόμενες συστολές και επανεπεκτάσεις καθυστέρησαν ή απέτυχαν πλήρως να εκκολαφθούν. Συνολικά, το 73% των βλαστοκύστεων μετά τη χρήση λέιζερ κατάφεραν να εκκολαφθούν πλήρως μετά από 1 έως 9 ώρες ενώ μόνο το 37,5% των βλαστοκύστεων χωρίς τη βοήθεια υποβοηθούμενης εκκόλαψης κατόρθωσε να εκκολαφθεί σε 28 έως 46 ώρες (εικόνα 8-10).



Εικόνα 8: Δέκα βλαστοκύστες D5 που χρησιμοποιήθηκαν για την έρευνα, τα κίτρινα βέλη δείχνουν τη θέση διάνοιξης της διάφανης ζώνης με λέιζερ (Ι. Παναγιωτίδης, 2017).

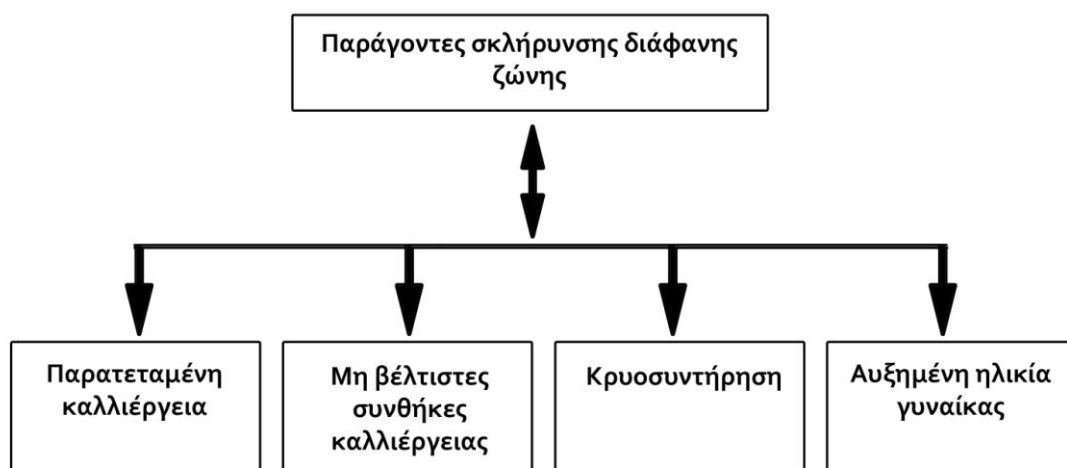


Εικόνα 9: Τρία από τα τέσσερα έμβρυα υφιστάμενα υποβοηθούμενη εκκόλαψη με λέιζερ κατάφεραν να εκκολαφθούν ενώ τρία μόνο από τα επτά που δεν είχαν υποστεί υποβοηθούμενη εκκόλαψη εκκολάφθηκαν. Το πράσινο σημάδι επιλογής υποδηλώνει την επιτυχία εκκόλαψης ενώ το κόκκινο χ την αποτυχία εκκόλαψης (Ι. Παναγιωτίδης, 2017).

Embryos (n)	Hatched	Failed
LAH (26)	73% (19)	27% (7)
Control (24)	37,5% (9)	62,5% (15)

Εικόνα 10: Το 73% των βλαστοκύστεων που υπέστησαν υποβοηθούμενη εκκόλαψη με λέιζερ κατάφεραν να εκκολαφθούν ενώ 27% απέτυχαν. Αντίθετα, μόνο το 37,5% των εμβρύων εκκολάφθηκαν αυθόρμητα ενώ το 62,5% απέτυχε να εκκολαφθεί (Ι. Παναγιωτίδης, 2017).

Η παρατεταμένη καλλιέργεια ανθρώπινων εμβρύων σε τεχνικές συνθήκες καλλιέργειας σκληραίνει τη διάφανη ζώνη, επιδρά στην αρχιτεκτονική τους και στην ικανότητα της βλαστοκύστης για εμφύτευση (Jelinkova κ.α., 2003, Cohen κ.α., 1990). Από την άλλη, μια άλλη μελέτη επίσης δείχνει πως η παρατεταμένη καλλιέργεια οδηγεί στην εμβρυομεταφορά ενός εμβρύου εντελώς εκκολαπτόμενο από τη διάφανη ζώνη (Hardarson T κ.α., 2012). Χωρίς την προστασία της ζώνης, το έμβρυο θα μπορούσε να είναι ευάλωτο στο τραυματισμό κατά τη διάρκεια της διαδικασίας της μεταφοράς και των χειρισμών στο εργαστήριο (Jorge Rodriguez-Purata κ.α., 2016). Επιπρόσθετα, μη βέλτιστες συνθήκες καλλιέργειας μπορούν να προκαλέσουν μείωση παραγωγής λυσίνης από το τροφοεκτόδερμα κάτω από το όριο που απαιτείται για την λέπτυνση της διάφανης ζώνης και την επακόλουθη εμφύτευσή της βλαστοκύστης (Schiewe κ.α., 1995). Τέλος, αυξημένη ηλικία της γυναίκας οδηγεί σε σκλήρυνση της διάφανης ζώνης λόγω ενδοκρινικών αλλαγών σχετιζόμενων με την ηλικία ή/και απουσίας λυσινών από περιβάλλοντες ιστούς, οι οποίοι μπορούν να δράσουν σε έμβρυα in vivo (Dokras A κ.α., 1991, Tucker MJ κ.α., 1996)(Εικόνα 11).



Εικόνα 11: Σχηματική αναπαράσταση των παραγόντων που προκαλούν σκλήρυνση της διάφανης ζώνης.

2.4. Παράγοντες που επηρεάζουν την εκκόλαψη

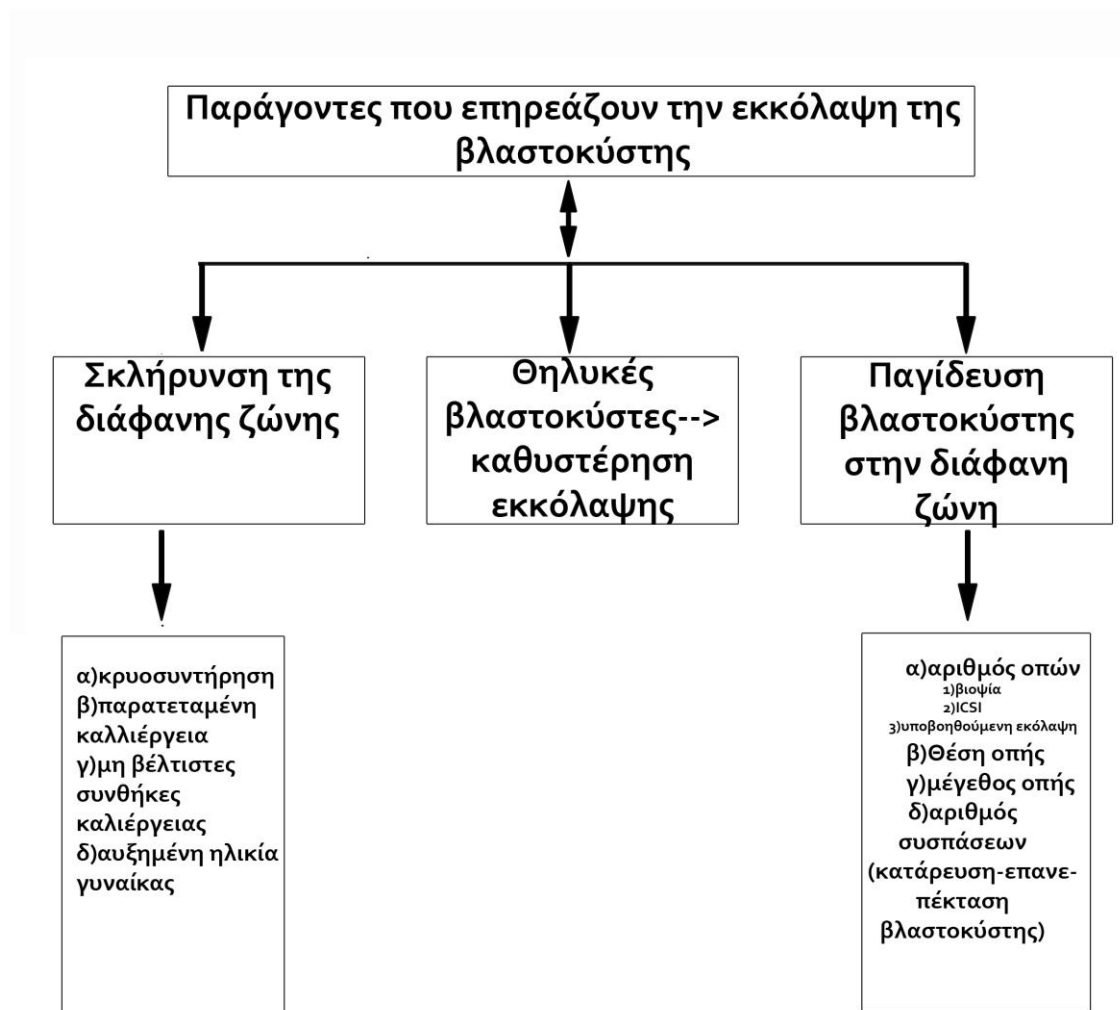
Όπως προαναφέρθηκε η σκλήρυνση της διάφανης ζώνης επηρεάζει την εκκόλαψη της βλαστοκύστης. Ωστόσο υπάρχουν και άλλοι παράγοντες. Πρόσφατα στοιχεία δείχνουν ότι τα ανθρώπινα θηλυκά έμβρυα υποβάλλονται σε απενεργοποίηση των χρωμοσωμάτων X κατά το στάδιο των 8 κυττάρων μέχρι το Στάδιο της βλαστοκύστης, στάδιο που παίρνει κάποιο χρόνο. Επομένως οι θηλυκές βλαστοκύστες μπορεί να είναι λιγότερο εκτεταμένες από τις αρσενικές αλλά εξίσου βιώσιμες με αποτέλεσμα να καθυστερεί η εκκόλαψη τους (Van den Berg IM κ.α., 2009).

Η υποβοηθούμενη εκκόλαψη (ΑΗ), υποστηρίζεται ως ένας τρόπος αύξησης της εμφύτευσης και των ποσοστών κλινικής εγκυμοσύνης (Usanee Sanmee κ.α., 2016). Ωστόσο, μπορεί να υπάρχει αδυναμία εκκόλαψης και με αυτόν τον τρόπο καθώς μπορεί να έχουμε την εμφάνιση δύο ή περισσότερων θέσεων εκκόλαψης (Fong CY κ.α., 2001) που μπορεί να προκύψει σε βλαστοκύστες που παράγονται από ICSI (7μm) λόγω ελλιπούς κλεισίματος της ζώνης που δημιουργήθηκε από τη πιπέτα κατά τη μικροέγχυση (Fong CY κ.α., 1997). Επίσης, έμβρυα που δημιουργήθηκαν με ICSI αδυνατούν να δημιουργήσουν επαρκή υδροστατική πίεση και προσοδευτική διεύρυνση της βλαστοκύστης (Kirkegaard K κ.α., 2013). Έτσι κατά την εκκόλαψη, οδηγούμαστε στην παγίδευση (trapping) της βλαστοκύστης εντός της διάφανης ζώνης. Επιπρόσθετα, η βλαστοκύστη δεν προσπαθεί απαραίτητως να αποδράσει από τη τεχνητή ζώνη (laser ΑΗ), μπορεί να προσπαθεί να εκκολαφθεί από μια άλλη περιοχή (Cohen J κ.α., 1990), άνοιγμα που μπορεί να προκληθεί από βιοψία (Kirkegaard K, κ.α., 2013) ή ICSI (Fong CY, κ.α., 1997). Επομένως, το έμβρυο προσπαθεί να εκκολαφθεί ταυτόχρονα από όλες τις θέσεις με αποτέλεσμα τον εγκλωβισμό του. Αυτές οι απόπειρες εκκόλαψης δικαιολογούν γιατί ο χρόνος εκκόλαψης αυτών των βλαστοκύστεων επεκτείνεται (Tim Schimmel κ.α., 2014).

Επιπλέον εγκλωβισμός μπορεί να προκληθεί και από τη θέση διάνοιξης της διάφανης ζώνης. Μελέτες έχουν δείξει ότι η φυσική θέση εκκόλαψης στους

ανθρώπους είναι κοντά στην έσω κυτταρική μάζα (ICM)(Gonzales DS κ.α., 1996, Veeck LL κ.α., 2003). Μερικές μελέτες ανέφεραν ότι η διάνοιξη της διάφανης ζώνης απέναντι από την ICM προκάλεσε περισσότερη παγίδευση ανθρώπινων βλαστοκύστεων από ότι η διάνοιξη που πραγματοποιήθηκε κοντά στην ICM (Ebner T κ.α., 2007, Miyata H κ.α., 2010, Usanee Sanmee κ.α., 2016). Από την άλλη αποτελέσματα μελέτης του 2003 (Xinling Ren κ.α., 2013) υποστηρίζουν ότι η θέση υποβοηθούμενης εκκόλαψη με λείζερ, είτε κοντά είτε αντίθετα από την ICM, δεν είχε καμία επίδραση στα ποσοστά εμφύτευσης, κλινικής εγκυμοσύνης και τα ποσοστά ζώντων γεννήσεων μετά τη μεταφορά κρυοσυντηρημένης βλαστοκύστης. Επιπρόσθετα το μέγεθος της οπής επηρεάζει την εκκόλαψη. Στην έρευνα του Miyata H, (Miyata H κ.α., 2010) η οπή που δημιουργήθηκε ήταν 20 μm αντίθετα σε αυτή του Xinling Ren (Xinling Ren κ.α., 2013) 50 μm και άρα μικρότερες πιθανότητες παγίδευσης της βλαστοκύστης μέσα στη διάφανη ζώνη.

Το έμβρυο προκειμένου να αποδράσει από τη διάφανη ζώνη επιτελεί μια σειρά συσπάσεων (contractions). Μελέτη που έγιναν σε καλλιεργημένες βλαστοκύστες κουνελιού (Lewis και Gregory, 1929) έδειξε ότι οι βλαστοκύστες συρρικνώθηκαν επανειλημμένα και επανεπεκτείνονταν καθόλη τη διάρκεια ανάπτυξης της βλαστοκύστης εκτός από το στάδιο της πρώιμης βλαστοκύστης. Μελέτες υποδηλώνουν ότι αδύναμες συσπάσεις βλαστοκύστεων ποντικίου διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην εκκόλαψη, ενώ οι ισχυρές έχουν ως αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της εκκόλαψης (Niimura S κ.α., 2003). Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι τα έμβρυα που δεν εμφανίζουν ισχυρές συστολές θα πρέπει να προτιμώνται για τη μεταφορά ώστε να αυξηθεί το ποσοστό εμφύτευσης. Όλα αυτά σε συνδυασμό με ότι η βλαστοκύστη κάνει 2 με 3 προσπάθειες απελευθέρωσης (2-3 συστολές) (Marcos J κ.α., 2013), χάνει ενέργεια και εγκλωβίζεται στην διάφανη ζώνη αδυνατώντας να βγει, μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ίσως θα πρέπει μετά τη δημιουργία της τεχνητής οπής να αναρροφάται λίγο το έμβρυο με την πιπέτα και μετά να μεταφέρεται στη γυναίκα ώστε να δημιουργείται μια συγκεκριμένη οδός (οπή) που πρέπει να ακολουθήσει το έμβρυο. Η απογύμνωση του εμβρύου από τη διάφανη ζώνη δεν ενδείκνυται καθώς αυτή καθορίζει την επικοινωνία ανάμεσα στο ενδομήτριο και στο έμβρυο αν και πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν το αντίθετο (Satoshi Ueno κ.α., 2016) (Εικόνα 12).



Εικόνα 12: Σχηματική αναπαράσταση των παραγόντων που επηρεάζουν την εκκόλαψη της βλαστοκύστης.

Κεφάλαιο 3

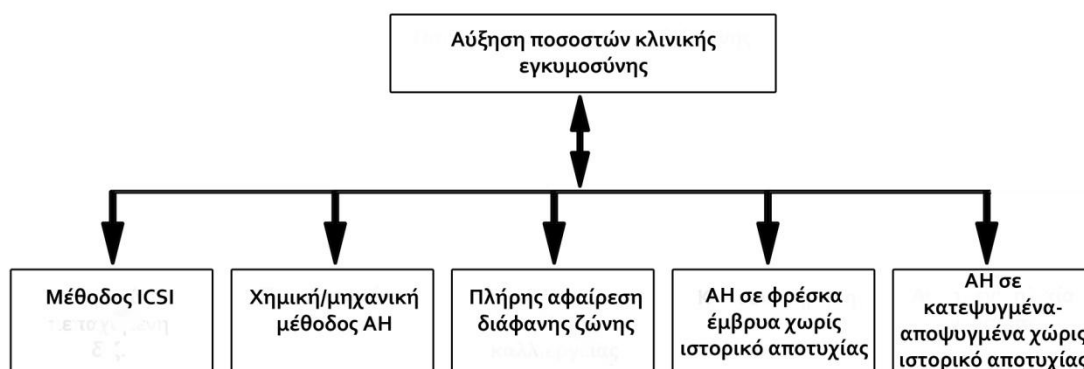
Ποσοστά υποβοηθούμενης εκκόλαψης

3.1. Υποβοηθούμενη εκκόλαψη και ποσοστά κλινικής εγκυμοσύνης

Η πιο πρόσφατη μετά ανάλυση (Li D κ.α., 2016), συμπεριλαμβανομένων 36 κλινικών δοκιμών με 6,459 συμμετεχόντων προτείνει ότι σε γυναίκες που υποβλήθηκαν σε υποβοηθούμενη εκκόλαψη των εμβρύων τους, συσχετίστηκε μια σημαντική αύξηση των ποσοστών κλινικής εγκυμοσύνης και πολύδυμης εγκυμοσύνης. Κλινική εγκυμοσύνη ορίζεται ως: Οι σάκοι κύησης με καρδιακή δραστηριότητα που παρατηρούνται στο υπερηχογράφημα την 6η εβδομάδα περίπου αμηνόρροιας ορίζεται ως επιβεβαίωση της κλινικής εγκυμοσύνης (Chimote κ.α., 2013). Τριάντα έξι κλινικές δοκιμές διερεύνησαν την επίδραση της υποβοηθούμενης εκκόλαψης στην κλινική εγκυμοσύνη (Li D κ.α., 2016). Σε γυναίκες που υποβλήθηκαν σε υποβοηθούμενη εκκόλαψη των εμβρύων τους, συσχετίστηκε μια σημαντική αύξηση των ποσοστών κλινικής εγκυμοσύνης. Συγκεκριμένα μελέτες αξιολόγησαν τις επιδράσεις των διαφορετικών μεθόδων υποβοηθούμενης εκκόλαψης (χημική, μηχανική, λέιζερ), διαπιστώνοντας ότι γυναίκες που υποβλήθηκαν σε χημική ή μηχανική υποβοηθούμενη εκκόλαψη συσχετίστηκαν με σημαντική αύξηση της κλινικής εγκυμοσύνης (χημική (OR= 1.26), μηχανική (OR= 1.68), OR:λόγος πιθανοτήτων). Παρόλα αυτά προηγούμενες μελέτες πρότειναν μικρή διαφορά στα αποτελέσματα λόγω της μεθόδου (Martins κ.α., 2011, Balaban κ.α., 2002). Όσον αφορά τη μέθοδο σύλληψης (μέθοδος ICSI - ενδοκυταροπλασματική έγχυση σπέρματος, IVF- γονιμοποίηση in vitro, γυναίκες που υποβλήθηκαν σε ICSI και μετά υποβοηθούμενη εκκόλαψη, συσχετίστηκαν με σημαντική αύξηση της κλινικής εγκυμοσύνης (ICSI (OR= 1.34) και IVF (OR= 1.12)). Επιπρόσθετα οι ομάδες ασθενών που κατέδειξαν βελτίωση στα ποσοστά κλινικής εγκυμοσύνης ήταν εκείνες με πλήρη αφαίρεση της διάφανης ζώνης κατά την υποβοηθούμενη εκκόλαψη, εκείνες όπου μεταφέρθηκαν φρέσκα έμβρυα με ιστορικό αποτυχίας καθώς και κατεψυγμένα-αποψυγμένα χωρίς ιστορικό αποτυχίας. Επιπρόσθετα, δύο προηγούμενες αναλύσεις έδειξαν ότι η υποβοηθούμενη εκκόλαψη φαίνεται να προσφέρει μια σημαντικά αυξημένη πιθανότητα επίτευξης κλινικής εγκυμοσύνης, ειδικά σε γυναίκες με προηγούμενη επαναλαμβανόμενη αποτυχία ή με κατεψυγμένα- αποψυγμένα έμβρυα (Carney κ.α., 2012, Martins κ.α., 2011). Ένα σύνολο ερευνών υποδηλώνει ότι η υποβοηθούμενη εκκόλαψη μπορεί να βελτιώσει τα ποσοστά κλινικής εγκυμοσύνης, ιδιαίτερα σε ασθενείς με κακή πρόγνωση (Pfeifer κ.α., 2014) (Εικόνα 13, πίνακας 1).

Κλινική εγκυμοσύνη	Αριθμός μελετών	OR (95% CI)	I ² τιμή (%)	P _h [*]
Συνολικά	36	1.16 (1.00–1.36)	48.3	<0.01
Υποβοηθούμενη εκκόλαψη				
Χημική	12	1.26 (1.01–1.57)	17.0	0.28
Λείζερ	18	1.03 (0.81–1.30)	60.0	<0.01
Μηχανική	6	1.68 (1.17–2.42)	0	0.44
Μέθοδος γονιμοποίησης				
ICSI	9	1.34 (1.03–1.75)	15.1	0.31
IVF	14	1.12 (0.88–1.44)	45.0	0.04
Και τα δύο ή άγνωστο	13	1.13 (0.83–1.55)	62.4	<0.01
Αριθμός συμμετεχόντων στην ομάδα υποβοηθούμενη εκκόλαψη				
≥ 100	13	1.16 (0.94–1.44)	61.5	<0.01
<100	23	1.16 (0.90–1.49)	39.6	0.03
Τρόπος υποβοηθούμενης εκκόλαψης				
Λέπτυνση διάφανης ζώνης	13	1.01 (0.77–1.31)	51.2	0.02
Δημιουργία οπής	12	1.10 (0.83–1.45)	48.9	0.03
Πλήρης αφαίρεση διάφανης ζώνης	10	1.50 (1.07–2.10)	39.1	0.10
Επέκταση διάφανης ζώνης	1	1.50 (0.90–2.49)	N/A	N/A
Κατάσταση των μεταφερόμενων εμβρύων				
Φρέσκα έμβρυα	29	1.12 (0.94–1.33)	46.9	<0.01
Κρυοσυντηρημένα- αποψυγμένα ή άγνωστο	8	1.45 (0.96–2.18)	52.5	0.04
Με προηγούμενο ιστορικό αποτυχίας				
Ναι ή άγνωστο	16	1.21 (0.89–1.64)	60.0	<0.01
Όχι	21	1.18 (0.98–1.40)	33.9	0.07
Κατάσταση των μεταφερόμενων εμβρύων και με προηγούμενο ιστορικό αποτυχίας				
Φρέσκα έμβρυα χωρίς ιστορικό αποτυχίας	18	1.11 (0.92–1.33)	28.7	0.12
Φρέσκα έμβρυα με ιστορικό αποτυχίας	9	1.39 (1.01–1.90)	35.4	0.14
Κρυοσυντηρημένα-αποψυγμένα έμβρυα χωρίς ιστορικό αποτυχίας	4	1.75 (1.22–2.52)	16.7	0.31

Πίνακας 1: Η επίδραση της υποβοηθούμενης εκκόλαψης στην κλινική εγκυμοσύνη (Li D κ.α., 2016). Συντομογραφίες: OR:αναλογία πιθανοτήτων, CL:διάστημα εμπιστοσύνης, P-τιμή για ετερογένεια, N/A: μη διαθέσιμο.



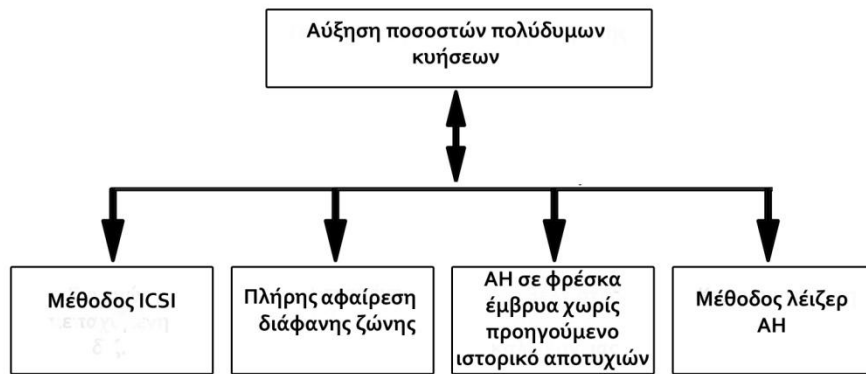
Εικόνα 13: Σχηματική αναπαράσταση των παραγόντων που προκαλούν αύξηση των ποσοστών κλινικής εγκυμοσύνης σε σχέση με την υποβοηθούμενη εκκόλαψη.

3.2. Πολύδυμες κύσεις

Είκοσι κλινικές δοκιμές διερεύνησαν την επίδραση της υποβοηθούμενης εκκόλαψης στην πολλαπλή εγκυμοσύνη (Li D κ.α., 2016). Γυναίκες που υποβλήθηκαν στη μέθοδο ICSI, εκείνες στις οποίες έγινε ολική αφαίρεση της διάφανης ζώνης, οι οποίες δεν είχαν προηγούμενο ιστορικό αποτυχιών, στις οποίες μεταφέρθηκαν φρέσκα έμβρυα χωρίς ιστορικό αποτυχιών καθώς και εκείνες που υποβλήθηκαν υποβοηθούμενη εκκόλαψη με λέιζερ (laser AH) συνδέθηκαν με μια σημαντική αύξηση στο ποσοστό πολύδυμης εγκυμοσύνης. Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι ο τεχνητός χειρισμός της διάφανης ζώνης με λέιζερ συσχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο δίδυμης μονοζυγωτικής κύησης (MZ) (Hershlag A κ.α., 1999, Schieve LA κ.α., 2000, Pfeifer κ.α., 2014) (Εικόνα 14, πίνακας 2).

Πολύδυμη κύηση	Αριθμός μελετών	OR (95% CI)	I ² τιμή (%)	P _h [*]
Συνολικά	20	1.50 (1.11–2.01)	44.0	0.02
Υποβοηθούμενη εκκόλαψη				
Χημική	11	1.31 (0.86–2.00)	53.7	0.02
Λέιζερ	6	1.87 (1.33–2.63)	0	0.68
Μηχανική	3	1.94 (0.43–8.69)	64.4	0.06
Μέθοδος γονιμοποίησης				
ICSI	9	1.68 (1.07–2.64)	36.3	0.13
IVF	4	1.91 (0.86–4.25)	51.3	0.10
Και τα δύο ή άγνωστο	7	1.14 (0.69–1.89)	49.1	0.07
Αριθμός συμμετεχόντων στην ομάδα υποβοηθούμενη εκκόλαψη				
≥ 100	9	1.50 (0.99–2.25)	66.9	<0.01
<100	11	1.53 (0.98–2.38)	0	0.47
Τρόπος υποβοηθούμενης εκκόλαψης				
Λέπτυνση διάφανης ζώνης	5	1.57 (0.75–3.33)	75.2	<0.01
Δημιουργία οπής	10	1.32 (0.95–1.82)	5.4	0.39
Πλήρης αφαίρεση διάφανης ζώνης	4	2.64 (1.02–6.85)	30.9	0.23
Επέκταση διάφανης ζώνης	1	1.53 (0.85–2.76)	N/A	N/A
Κατάσταση των μεταφερόμενων εμβρύων				
Φρέσκα έμβρυα	18	1.52 (1.10–2.10)	46.3	0.02
Κρυοσυντηρημένα- αποψυγμένα ή άγνωστο	4	1.80 (0.90–3.62)	70.5	0.02
Με προηγούμενο ιστορικό αποτυχίας				
Ναι ή άγνωστο	8	1.41 (0.82–2.43)	45.8	0.07
Όχι	13	1.62 (1.12–2.33)	44.4	0.04
Κατάσταση των μεταφερόμενων εμβρύων και με προηγούμενο ιστορικό αποτυχίας				
Φρέσκα έμβρυα χωρίς ιστορικό αποτυχίας	11	1.38 (1.01–1.90)	24.2	0.21
Φρέσκα έμβρυα με ιστορικό αποτυχίας	3	1.92 (0.88–4.20)	0	0.64
Κρυοσυντηρημένα- αποψυγμένα έμβρυα χωρίς ιστορικό αποτυχίας	3	2.39 (0.90–6.33)	76.2	0.02

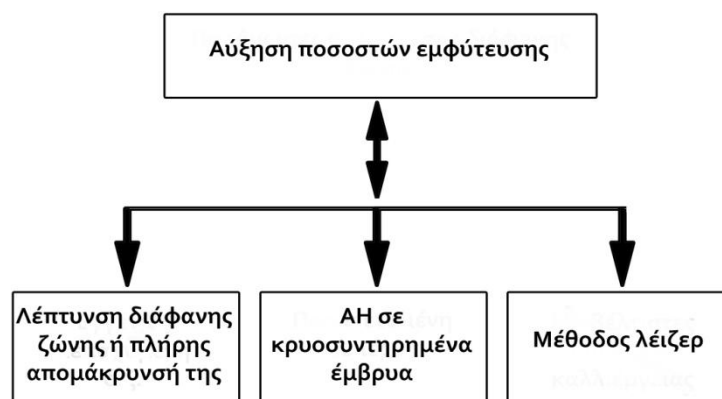
Πίνακας 2: Η επίδραση της υποβοηθούμενης εκκόλαψης στην πολλαπλή εγκυμοσύνη (Li D κ.α., 2016). Συνοτομογραφίες: OR:αναλογία πιθανοτήτων, CI:διάστημα εμπιστοσύνης, P-τιμή για ετερογένεια, N/A: μη διαθέσιμο.



Εικόνα 14: Σχηματική αναπαράσταση των παραγόντων που προκαλούν αύξηση των ποσοστών πολύδυμων κυήσεων σε σχέση με την υποβοηθούμενη εκκόλαψη.

3.3. Ποσοστά εμφύτευσης

Ποσοστό εμφύτευσης (IR) ορίζεται ως: Συνολικός αριθμός σάκων κύησης/Συνολικός αριθμός εμβρύων που μεταφέρθηκαν $\times 100$ (Chimote κ.α., 2013). Η λέπτυνση της διάφανης ζώνης παρά η πλήρης διάτρησή αυτής έδειξε ότι αυξάνει (i) την εκκόλαψη των βλαστοκύστεων (Blake κ.α., 2001) και (ii) το ποσοστό εμφύτευσης (Antinori κ.α., 1996, Mantoudis κ.α., 2001). Από την άλλη νέες μελέτες προτείνουν πως η πλήρης απομάκρυνση της διάφανης ζώνης δεν επηρεάζει τη βιωσιμότητα της βλαστοκύστης και είναι επωφελής για την προσκόλληση της και την ανάπτυξή στο ενδομήτριο όπως εκτιμήθηκε σε ένα *in vitro* μοντέλο. Πιο συγκεκριμένα μια κατεψυγμένη βλαστοκύστη έχει μεγαλύτερες πιθανότητες να προσκολληθεί στο ενδομήτριο μετά την πλήρη αφαίρεση της διάφανης ζώνης (Satoshi Ueno κ.α., 2016). Η μέθοδος με λέιζερ παρουσιάζει υψηλότερο ποσοστό εμφύτευσης (Hanying Zhou κ.α., 2014). Μια άλλη μελέτη έδειξε ότι το ποσοστό εμφύτευσης είναι σημαντικά υψηλότερο σε αποψυγμένα έμβρυα που υποβάλλονταν σε υποβοηθούμενη εκκόλαψη πριν από τη μεταφορά, σε σύγκριση με αυτά που δεν υποβάλλονταν (Gabrielsen κ.α., 2004) (Εικόνα 15).



Εικόνα 15: Σχηματική αναπαράσταση των παραγόντων που προκαλούν αύξηση των ποσοστών εμφύτευσης σε σχέση με την υποβοηθούμενη εκκόλαψη.

3.4. Ποσοστά ζώντων γεννήσεων/Αποβολές

Ποσοστό ζώντων γεννήσεων ορίζεται ως: Συνολικός αριθμός των βρεφών που γεννήθηκαν /Συνολικός αριθμός εμβρύων που μεταφέρθηκαν (Chimote κ.α., 2013). Δεκαπέντε κλινικές δοκιμές διερεύνησαν την επίδραση της υποβοηθούμενης εκκόλαψης στο ποσοστό ζώντων γεννήσεων (Li D κ.α., 2016). Δεκαεπτά κλινικές δοκιμές διερεύνησαν την επίδραση της υποβοηθούμενης εκκόλαψης στις αποβολές (Li D κ.α., 2016). Ωστόσο, μη σημαντικά αποτελέσματα παρατηρήθηκαν στο ποσοστό ζώντων γεννήσεων και στα ποσοστά αποβολών σε γυναίκες που υποβλήθηκαν σε υποβοηθούμενη εκκόλαψη σε σύγκριση με εκείνες που δεν υποβλήθηκαν (Li D κ.α., 2016).

Κεφάλαιο 4

Σύνοψη-Συμπεράσματα

Στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση του ρόλου της υποβοηθούμενης εκκόλαψης στην εμφυτευτική ικανότητα των εμβρύων. Για το σκοπό αυτό, αρχικά εξετάστηκε σε ποιες περιπτώσεις ενδείκνυται η υποβοηθούμενη εκκόλαψη, οι οποίες είναι: α) σε φρέσκα έμβρυα με προηγούμενες αποτυχημένες προσπάθειες εξωσωματικής γονιμοποίησης β) σε γυναίκες ηλικίας άνω των 37 ετών γ) σε περιπτώσεις κακής ποιότητας ωαρίων καθώς και σε περιπτώσεις χαμηλών αποθεμάτων ωαρίων στις ωοθήκες (FSH υψηλή, AMH χαμηλή) δ) σε περιπτώσεις όπου τα έμβρυα έχουν πεπαχυμένη διάφανη ζώνη ε) σε περιπτώσεις όπου τα έμβρυα έχουν σκληρή διάφανη ζώνη-κρυοσυντηρημένα έμβρυα. Επιπλέον παρουσιάστηκαν άλλες δύο, ζ) σε περιπτώσεις όπου δημιουργούνται δύο ή περισσότερες θέσεις εκκόλαψης και η) σε περιπτώσεις όπου το έμβρυο εμφανίζει παραπάνω από 2-3 συστολές.

Η υποβοηθούμενη εκκόλαψη πρέπει να πραγματοποιείται σε βλαστοκύστες όπου δημιουργούνται δύο ή περισσότερες θέσεις εκκόλαψης (Fong CY κ.α., 2001). Οι οπές αυτές μπορεί να προκληθούν από ICSI (Fong CY κ.α., 1997), από βιοψία (Kirkegaard K κ.α., 2013) ή λόγω της μεθόδου υποβοηθούμενης εκκόλαψης όπου δημιουργείται μια τεχνητή οπή. Το έμβρυο προσπαθεί να αποδράσει όχι απαραίτητα από μία θέση διάνοιξης με αποτέλεσμα να δημιουργούνται πολλαπλές θέσεις διαφυγής από τη διάφανη ζώνη και τελικά να εγκλωβίζεται σε αυτή.

Επιπρόσθετα, το έμβρυο κάνει 2 με 3 προσπάθειες απελευθέρωσης (2-3 συστολές) (Marcos J κ.α., 2013), χάνει ενέργεια αδυνατώντας να βγει από τη διάφανη ζώνη ή ακόμα και στην περίπτωση που καταφέρει να εκκολαφθεί, να μην μπορέσει τελικά να εμφυτευθεί.

Στη συνέχεια, εξετάστηκε κατά πόσο η υποβοηθούμενη εκκόλαψη επιδρά στα ποσοστά εμφύτευσης, κλινικής εγκυμοσύνης και ποσοστά πολύδυμων κύσεων. Ωστόσο, μη σημαντικά αποτελέσματα παρατηρήθηκαν στα ποσοστά ζώντων γεννήσεων και στα ποσοστά αποβολών. Πιο συγκεκριμένα, η μέθοδος υποβοηθούμενης εκκόλαψης σε κρυοσυντηρημένα έμβρυα, σε φρέσκα έμβρυα με προηγούμενες αποτυχημένες προσπάθειες εξωσωματικής γονιμοποίησης, σε γυναίκες ηλικίας άνω των 37 ετών, σε περιπτώσεις όπου τα έμβρυα έχουν πεπαχυμένη διάφανη ζώνη αυξάνει τα ποσοστά εμφύτευσης και κλινικής εγκυμοσύνης. Μια άλλη έρευνα δείχνει ότι το ½ των κύκλων εξωσωματικής στην Ιαπωνία που κατέληξαν σε εγκυμοσύνη υποβλήθηκαν σε υποβοηθούμενη εκκόλαψη, με μια ανοδική τάση από το 2010. Η ίδια έρευνα καταδεικνύει ότι η υποβοηθούμενη εκκόλαψη είναι μια ασφαλής τεχνική που δεν αυξάνει τους κινδύνους σημαντικών συγγενών ή χρωμοσωμικών ανωμαλιών (Junna Jwa κ.α., 2015).

Η μέθοδος λέιζερ αυξάνει τα ποσοστά εμφύτευσης ωστόσο και τα ποσοστά πολύδυμης κύησης (Li D κ.α., 2016). Συγκεκριμένα έχει αναφερθεί ότι ο τεχνητός χειρισμός της διάφανης ζώνης με λέιζερ συσχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο δίδυμης μονοζυγωτικής κύησης (MZ) (Hershlag A κ.α., 1999, Schieve LA κ.α., 2000, Pfeifer κ.α., 2014). Οι πολύδυμες κύσεις θεωρούνται κύσεις υψηλού κινδύνου καθώς σχετίζονται με αυξημένη περιγεννητική νοσηρότητα και θνησιμότητα. Ενώ τα

ποσοστά εμφύτευσης αυξάνονται με τη μέθοδο λέιζερ, τα ποσοστά κλινικής εγκυμοσύνης φαίνεται να αυξάνονται με μηχανική/χημική μέθοδο υποβοηθούμενης εκκόλαψης (Li D κ.α., 2016).

Νέες μελέτες υποστηρίζουν πως μια κατεψυγμένη βλαστοκύστη έχει μεγαλύτερες πιθανότητες να προσκολληθεί στο ενδομήτριο μετά την πλήρη αφαίρεση της διάφανης ζώνης (Satoshi Ueno κ.α., 2016). Χωρίς την προστασία της ζώνης, το έμβρυο θα μπορούσε να είναι ευάλωτο στο τραυματισμό κατά τη διάρκεια της διαδικασίας της μεταφοράς και των χειρισμών στο εργαστήριο (Jorge Rodriguez-Purata κ.α., 2016). Επιπρόσθετα, τελευταίες μελέτες παρουσιάζουν πως η πλήρης αφαίρεση της διάφανης ζώνης αυξάνει τα ποσοστά εμφύτευσης και κλινικής εγκυμοσύνης ωστόσο και τα ποσοστά πολύδυμων κυήσεων (Li D κ.α., 2016), γεγονός που όπως προαναφέρθηκε αποτελεί 'επιπλοκή' της εξωσωματικής γονιμοποίησης καθώς προκαλεί αύξηση της πιθανότητας πρόωρου τοκετού.

Τέλος, η υποβοηθούμενη εκκόλαψη σε κατεψυγμένα έμβρυα αυξάνει το ποσοστό εμφύτευσης και κλινικής εγκυμοσύνης χωρίς να επηρεάζει το ποσοστό πολύδυμων κυήσεων (Li D κ.α., 2016). Μελέτη έδειξε ότι το ποσοστό εμφύτευσης είναι σημαντικά υψηλότερο σε αποψυγμένα έμβρυα που υποβάλλονταν σε υποβοηθούμενη εκκόλαψη πριν από τη μεταφορά, σε σύγκριση με αυτά που δεν υποβάλλονταν (Gabrielsen κ.α., 2004). Κάτι τέτοιο είναι αναμενόμενο καθώς όπως ήδη προαναφέρθηκε η κρυοσυντήρηση σκληραίνει τη διάφανη ζώνη (Carroll J κ.α., 1990). Τα κρυοπροστατευτικά αυξάνουν το ενδοκυτταρικό ασβέστιο (Larman κ.α., 2006, Larman κ.α., 2007, Vincent C, κ.α., 1990, Vincent C κ.α., 1991) και μεταβάλουν την δευτεροταγή δομή των πρωτεϊνών της διάφανης ζώνης (Giulia Rusciano, 2017). Πρόσφατο άρθρο προτείνει πως η υποβοηθούμενη εκκόλαψη σε κατεψυγμένα έμβρυα ειδικά γυναικών άνω των 37 πρέπει να είναι μια στρατηγική ρουτίνας σε κύκλους εξωσωματικής πριν γίνει η εμβρυομεταφορά (Katalin Kanayo, 2016).

Συνοψίζοντας, η υποβοηθούμενη εκκόλαψη και συγκεκριμένα η χρήση λέιζερ συμβάλλει στην πλήρη εκκόλαψη της βλαστοκύστης από τη διάφανη ζώνη και στη συνέχεια στην εμφύτευση της βλαστοκύστης στο ενδομήτριο. Τελευταίες μελέτες δείχνουν πως η πλήρης αφαίρεση της διάφανης ζώνης ενδείκνυται για την επιτυχή εμφύτευση της βλαστοκύστης ενώ άλλες μελέτες υποστηρίζουν το αντίθετο. Τέλος, η ομοφωνία της επιστημονικής κοινότητας υποστηρίζει πως η υποβοηθούμενη εκκόλαψη πρέπει απαραίτητα να συμβαίνει σε κρυοσυντηρημένα έμβρυα πριν την εμβρυομεταφορά.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1.Ali J, Rahbar S, Burjaq H, Sultan AM, Al Flamerzi M, Shahata MA. Routine laser assisted hatching results in significantly increased clinical pregnancies. J Assist Reprod Genet. 2003;20:177–181
- 2.Alireza Ghannadi, Marjaneh Kazerooni, Fatemeh Jamalzadeh, Sahar Amiri, Parifar Rostami, Forouzan Absalan, The effects of laser assisted hatching on pregnancy rates, Iran J Reprod Med. 2011 Spring; 9(2): 95–98
- 3.Al-Nuaim LA, Jenkins JM. Assisted hatching in assisted reproduction. BJOG. 2002;109:856–862
- 4.Antinori, S., Selman, H. A., Caffa, B., Panci, C., Dani, G. L. & Versaci, C. Zona opening of human embryos using a non-contact UV laser for assisted hatching in patients with poor prognosis of pregnancy. Hum Reprod 11, 2488–2492 (1996)
5. Balaban B, Urman B, Alatas C, Mercan R, Mumcu A, Isiklar A. A comparison of four different techniques of assisted hatching. Hum Reprod 2002;17:1239–43
- 6.Barcroft LC, Offenbergh H, Thomsen P, Watson AJ. Aquaporin proteins in murine trophectoderm mediate transepithelial water movements during cavitation. Dev Biol. 2003; 256:342–35
- 7.Bell CE, Calder MD, Watson AJ. Genomic RNA profiling and the programme controlling preimplantation mammalian development. Mol Hum Reprod. 2008; 14:691–701
- 8.Biggers JD. Reflections on the culture of the preimplantation embryo. Int J Dev Biol 1998;42:879–884.
- 9.Blake, D. A., Forsberg, A. S., Johansson, B. R. & Wikland, M. Laser zona pellucida thinning—an alternative approach to assisted hatching. Hum Reprod 16, 1959–1964 (2001)
- 10.Bleil JD, Wassarman PN. Structure and function of the zona pellucida: identification and characterisation of the proteins of the mouse oocytes zona pellucida. Dev Biol. 1980;76:185–202
- 11.Carney, S. K. *et al.* Assisted hatching on assisted conception (*in vitro* fertilisation (IVF) and intracytoplasmic sperm injection (ICSI)). *Cochrane Database Syst Rev* 12, D1894 (2012)
- 12.Carroll J, Depypene H, Mathews CD. Freeze–thaw induced changes of the zona pellucida explains decreased rates of fertilisation in frozen–thawed mouse oocytes. J Reprod Fertil. 1990;90:547–53
- 13.Chimote NN, Nath NM, Mehta BN. Transfer of spontaneously hatching or hatched blastocyst yields better pregnancy rates than expanded blastocyst transfer. J Hum Reprod Sci 2013;6:183-8.
14. Cohen J, Elsner C, Kort H, Malter H, Massey J, Mayer MP, et al. Impairment of the hatching process following IVF in the human and improvement of implantation by assisted hatching using micromanipulation. Hum Reprod 1990;5:7–13
- 15.Cohen J. Assisted hatching of human embryos. J In Vitro Fertil Embryo Transf. 1991;8:179–90
16. Cohen J, Alikani M, Trowbridge J, Rosenwaks Z. Implantation enhancement by selective assisted hatching using zona drilling of human embryos with poor prognosis. Hum Reprod 1992;7:685–91
- 17.Dokras A, Sargent IL, Ross C, Gardner RL, Barlow DU. The human blastocyst: morphology and human chorionic gonadotrophin secretion *in vitro*. Hum Reprod. 1991;6:1143–51.
- 18.Dokras A, Sargent IL, Barlow DH., Human blastocyst grading: an indicator of developmental potential?, Hum Reprod. 1993 Dec;8(12):2119-27
- 19.Ebner T. Embryo development and assessment of viability. In: Gardner DK, editor. *In vitro fertilization: a practical approach*. New York: Informa Healthcare; 2007. pp. 199–220
20. Edwards JH, Yuncken C, Rushton DI, Richards S, Mittwoch U. Three cases of triploidy in man. Cytogenetics. 1967;6:81–104

21. Feenan K, Herbert M., Can 'abnormally' fertilized zygotes give rise to viable embryos?, *Hum Fertil (Camb)*. 2006 Sep;9(3):157-69
22. Fong CY, Bongso A, Ng SC, Anandakumar C, Trounson A, Ratnam S. Ongoing normal pregnancy after transfer of zona-free blastocysts: implications for embryo transfer in the human. *Hum Reprod* 1997; 12:557– 560
23. Fong CY, Bongso A, Sathananthan H, Ho J, Ng SC. Ultrastructural observations of enzymatically treated human blastocysts: zona-free blastocyst transfer and rescue of blastocysts with hatching difficulties. *Hum Reprod* 2001;16:540 – 546
24. Gabrielsen I. Agerholm B. Toft F. Hald K. Petersen J. Aagaard B. Feldinger S. Lindenberg J. Fedder, Assisted hatching improves implantation rates on cryopreserved–thawed embryos. A randomized prospective study, *Human Reproduction*, Volume 19 October 2004, 2258–2262
25. Gardner DK, Schoolcraft WB, Wagley L, Schlenker T, Stevens J, Hesla J. A prospective randomized trial of blastocyst culture and transfer in in-vitro fertilization. *Hum Rprod* 1998; 13:3434-40
26. Giulia Rusciano, Carolina De Canditiis, Gianluigi Zito⁴, Marcello Rubessa, Maria Serena Roca, Rosa Carotenuto, Antonio Sasso, Bianca Gasparrini, Raman-microscopy investigation of vitrification-induced structural damages in mature bovine oocytes, *PLoS ONE* 2017 12(5): e0177677
27. Glass RH, Lin TP, Florence J. Mouse blastocyst re-expansion following puncture and treatment with inhibitors. *J Reprod Fertil* 1973;35:533–536.
28. Gonzales DS, Bavister BD. Zona pellucida escape by hamster blastocysts in vitro is delayed and morphologically different compared with zona escape in vivo. *Biol Reprod* 1995;52:470–480
29. Gonzales DS, Jones JM, Pinyopummintr T, Carnevale EM, Ginther OJ, Shapiro SS, et al. Trophoctoderm projections: a potential means for locomotion, attachment and implantation of bovine, equine and human blastocysts. *Hum Reprod*. 1996;11:2739–2745
30. Gordon JW, Dapunt U. A new mouse model for embryos with a hatching deficiency and its use to elucidate the mechanism of blastocyst hatching. *Fertil Steril*. 1993;59:1296–301
31. Hammadeh ME, Fischer-Hammadeh C, Ali KR, Assisted hatching in assisted reproduction: a state of the art, *J Assist Reprod Genet*. 2011;28(2):119-28
32. Hanying Zhou, Wanqiu Zao, Wei Zhang, Juanzi Shi, Wenhao Shi, No adverse effects were identified on the perinatal outcomes after laser assisted hatching treatment, *Reproductive BioMedicine Online* (2014) 29, 692–698
33. Hardarson T, Van Landuyt L, Jones G. The blastocyst. *Hum Reprod* 2012; 27:i72–i91
34. Hellebaut S, De Sutter P, Dozortsev D, Onghena A, Qian C, Dhont M. Does assisted hatching improve implantation rates after in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection in all patients? A prospective randomized study. *J Assist Reprod Genet* 1996;13:19–22
35. Hershlag A, Paine T, Cooper GW, Scholl GM, Rawlinson K, Kvapil G. Monozygotic twinning associated with mechanical assisted hatching. *Fertil Steril* 1999;71:144–6
36. Horng SG, Chang CL, Wu HM, Wang CW, Cheng CK, Huang HY, et al. Laser-assisted hatching of embryos in women of advanced age after in vitro fertilization: a preliminary report. *Chang Gung Med J*. 2002;25:531–537
37. Huisman GJ, Fauser BC, Eijkemans MJ, Pieters MH. Implantation rates after in vitro fertilization and transfer of a maximum of two embryos that have undergone three to five days of culture. *Fertil Steril*. 2000;73:117–122
38. Hurst BS, Tucker KE, Awoniyi A, Schlaff WD. Assisted hatching does not enhance IVF success in good-prognosis patients. *J Assist Reprod Genet* 1998;15:62–4
39. Igashira, J. Otsuki, K. Furuhashi, Y. Katada, T. Sumimoto, K. Kishi, M. Matsuura, M. Mukai, C. Sumi, Y. Tsuji, Y. Matsumoto, S. Koeguchi, M. Shiotani The difference in size

between single pronuclei after ICSI and after IVF Hanabusa Women's Clinic, Kobe Hyogo, Japan, 2016 O-42

40.Jelinkova, L., Pavelkova, J., Strehler, E., Paulus, W., Zivny,J. & Stersik, K. Improved implantation rate after chemical removal of the zona pellucida. *Fertil. Steril.* 2003; 79, 1299–302

41.Jorge Rodriguez-Purata, Julian Gingold , Joseph Lee , Michael Whitehouse , Richard Slifkin , Christine Briton-Jones , Alan Copperman, and Benjamin Sandler, Hatching status before embryo transfer is not correlated with implantation rate in chromosomally screened blastocysts, *Hum Reprod.* 2016;31(11):2458-2470.

42.Jwa J, Jwa SC, Kuwahara A, Yoshida A, Saito H, Risk of major congenital anomalies after assisted hatching: analysis of three-year data from the national assisted reproduction registry in Japan, *Fertil Steril.* 2015 Jul;104(1):71-8

43.Kato, Y. and Nagao, Y. Effect of PVP on sperm capacitation status and embryonic development in cattle. *Theriogenology.* 2009; 72: 624–635

44.Kim J, Gye MC, Kim MK. Role of occludin, a tight junction protein, in blastocoel formation, and in the paracellular permeability and differentiation of trophectoderm in preimplantation mouse embryos. *Mol Cells* 2004; 17:248–254

45.Kirkegaard K, Hindkjaer JJ, Ingerslev HJ. Hatching of in vitro fertilized human embryos is influenced by fertilization method. *Fertil Steril.* 2013; 100:1277–1282

46.Laeno AM, Tamashiro DA, Alarcon VB. Rho-associated kinase activity is required for proper morphogenesis of the inner cell mass in the mouse blastocyst. *Biol Reprod.* 2013; 89:122

47. Lanzendorf SE, Nehchiri F, Mayer JF, Oehninger S, Muasher SJ. A prospective, randomized, double-blind study for the evaluation of assisted hatching in patients with advanced maternal age. *Hum Reprod* 1998; 13:409–13

48. Lanzendorf, S. E., Ratts, V. S., Moley, K. H., Goldstein, J. S., Dahan, M. H. & Odem, R. R. A randomized, prospective study comparing laser-assisted hatching and assisted hatching using acidified medium. *Fertil Steril* 2007, 1450–1457

49. Larman, M.G., Sheehan, C.B., and Gardner, D.K. Calcium-free vitrification reduces cryoprotectant-induced zona pellucida hardening and increases fertilization rates in mouse oocytes. *Reproduction.* 2006; 131: 53–61

50.Larman, M.G., Katz-Jaffe, M.G., Sheehan, C.B., and Gardner, D.K. 1,2-propanediol and the type of cryopreservation procedure adversely affect mouse oocyte physiology. *Hum Reprod.* 2007; 22: 250–259

51.Letterie GS. Assisted hatching: relative techniques and clinical outcomes. *Assist Reprod Rev.* 1997;8:116–25

52.Lewis WH, Gregory PW. Cinematographs of living developing rabbit-eggs. *Science* 1929;69:226–229

53. Li D Yang DL, An J, Jiao J, Zhou YM, Wu QJ, Wang XX., Effect of assisted hatching on pregnancy outcomes: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials, *Sci Rep.* 2016 Aug 9;6:31228

54.Malcuit, C., Kurokawa, M., and Fissore, R.A. Calcium oscillations and mammalian egg activation. *J Cell Physiol.* 2006; 206: 565–573

55. Mansour RT, Rhodes CA, Aboulghar MA, Serour GL, Kamal A. Transfer of zona-free embryos improves outcome in poor prognosis patients: A prospective randomized controlled study. *Hum Reprod.* 2000;15:1061–1064

56. Mantoudis E, Podsiadly BT, Gorgy A, Venkat G, Craft IL. A comparison between quarter, partial and total laser assisted hatching in selected infertility patients. *Hum Reprod* 2001;16:2182–6

57. Marcos J, Pérez-Albalá S, Mifsud A, Molla M, Landeras J, Meseguer M. Collapse of blastocysts is strongly related to lower implantation success: a time-lapse study. *Hum Reprod*. 2015; 30:2501–2508
58. Martins, W. P., Rocha, I. A., Ferriani, R. A. & Nastri, C. O. Assisted hatching of human embryos: a systematic review and metaanalysis of randomized controlled trials. *Hum Reprod Update* 17, 438–453 (2011)
59. Miyata H, Matsubayashi H, Fukutomi N, Matsuba J, Koizumi A, Tomiyama T. Relevance of the site of assisted hatching in thawed human blastocysts: a preliminary report. *Fertil Steril*. 2010;94:2444–2447
60. Miyazaki, S., Shirakawa, H., Nakada, K., and Honda, Y. Essential role of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor/ Ca^{2+} release channel in Ca^{2+} waves and Ca^{2+} oscillations at fertilization of mammalian eggs. *Dev Biol*. 1993; 158: 62–78
61. Mingzhao Li, Wanqiu Zhao, Xia Xue, Silin Zhang, Wenhao Shi, and Juanzi Shi, Three pro-nuclei (3PN) incidence factors and clinical outcomes: a retrospective study from the fresh embryo transfer of in vitro fertilization with donor sperm (IVF-D), *Int J Clin Exp Med*. 2015; 8(8): 13997–14003
62. Mingzhao Li, Xia Xue, Wanqiu Zhao, Wei Li & Juanzi Shi, Effects of high three pro-nuclei (3PN) proportion incidence on clinical outcomes in the fresh cleavage-stage and blastocyst-stage embryo transfer (ET) cycles, *Gynecol Endocrinol*. 2017;33(1):5356
63. Mio Y, Iwata K, Yumoto K, Maeda K. Human embryonic behavior observed with time-lapse cinematography. *J Health Med Inform*. 2014; 5:143
64. Munné S, Cohen J., Chromosome abnormalities in human embryos. *Hum Reprod Update*. 1998;4(6):842-55
65. Modliniski JA. The role of the zona pellucida in the development of mouse eggs in vivo. *J Embryol Exp Morphol*. 1970;23:539–51
66. Nakayama T, Fujiwara H, Yamada S, Tastumi K, Honda T, Fujii S. Clinical application of a new assisted hatching method using a piezomicromanipulator for morphologically low-quality embryos in poor prognosis infertile patients. *Fertil Steril* 1999;71:1014–8
67. Nawroth, F., Muller, P., Wolf, C. & Sudik, R. (2001). Is the zona pellucida thickness of metaphase-II oocytes in an IVF/ICSI program influenced by the patient's age? *Gynecol. Obstet. Invest*. 52, 55–8
68. Niebuhr E. Triploidy in man. Cytogenetical and clinical aspects. *Humangenetik*. 1974;21:103–25
69. Niimura S. Time-lapse videomicrographic analyses of contractions in mouse blastocysts. *J Reprod Dev*. 2003; 49:413–423
70. Obruca A, Strohmer H, Sakkas D, Menezo Y, Kogosowski A, Barak Y, et al. Use of lasers in assisted fertilization and hatching. *Hum Reprod* 1994;9: 1723–6
71. Onodera Y, Takahashi K, Goto M, Anzai M¹, Ono N, Shirasawa H, Sato W, Miura H, Sato N, Sato A, Kumazawa Y, Terada Y, The location of "8"-shaped hatching influences inner cell mass formation in mouse blastocysts, *PLoS One*. 2017 ;12(4):e0175150
72. Perona, R. and Wassarman, P.M. 1986. Mouse blastocysts hatch in vitro by using a trypsin-like proteinase associated with cells of mural trophoblast. *Developmental Biology* .114, 42–52
73. Pfeifer, S. et al. Role of assisted hatching in *in vitro* fertilization: a guideline. *Fertil Steril* 102, 348–351 (2014)
73. Richter KS, Harris DC, Daneshmand ST, Shapiro BS. Quantitative grading of a human blastocyst: optimal inner cell mass size and shape. *Fertil Steril*. 2001; 76:1157–1167

- 74.**Rita de Cassia Savio Figueira, Amanda Souza Setti, Daniela Paes Almeida Ferreira Braga, Assumpto Iaconelli Jr., M.D, and , Blastocyst Morphology Holds Clues Concerning The Chromosomal Status of The Embryo *Int J Fertil Steril*. 2015 Jul-Sep; 9(2): 215–220
- 75.**Rosen MP, Shen S, Dobson AT, Fujimoto VY, McCulloch CE, Cedars MI. Triploidy formation after intracytoplasmic sperm injection may be a surrogate marker for implantation. *Fertil Steril*. 2006;85:384–90
- 76.**Sachs AR, Politch JA, Jackson KV, Racowsky C, Hornstein MD, Ginsburg ES. Factors associated with the formation of triploid zygotes after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*. 2000;73:1109–14
- 77.**Sallam HN, Sadek SS, Agameya AF, Assisted hatching--a meta-analysis of randomized controlled trials, *J Assist Reprod Genet*. 2003 Aug; 20(8):332-42
- 78.**Satoshi Ueno, et al., Complete zona pellucida removal from vitrified-warmed human blastocysts facilitates earlier in-vitro attachment and outgrowth, *Reproductive BioMedicine Online* (2016)
- 79.** Schieve LA, Meikle SF, Peterson HB, Jeng G, Burnett NM, Wilcox LS. Does assisted hatching pose a risk for monozygotic twinning in pregnancies conceived through in vitro fertilization? *Fertil Steril* 2000;74: 288–94
- 80.**Schiewe MC, Araujo E, Asch RH, Balmaceda JP. Enzymatic characterization of zona pellucida hardening in human eggs and embryos. *J Assist Reprod Genet*. 1995;12:2–7
- 81.**Schiewe MC, Hazeleger NL, Sclimenti C, Balmaceda JP. Physical characterisation of blastocyst hatching mechanisms by use of a mouse anti-hatching mode. *Fertil Steril*. 1995;63:288–94
- 82.** Tim Schimmel, Jacques Cohen, Helen Saunders, and Mina Alikani , Laser-assisted zona pellucida thinning does not facilitate hatching and may disrupt the *in vitro* hatching process: a morphokinetic study in the mouse, *Hum Reprod*. 2014; 29(12): 2670–2679
- 83.** Trounson AO, Moore NW. The survival and development of sheep eggs following complete or partial removal of the zona pellucida. *J Reprod Fertil*. 1974;41:97–108
- 84.**Tsukita S, Katsuno T, Yamazaki Y, Umeda K, Tamura A, Tsukita S. Roles of ZO-1 and ZO-2 in establishment of the belt-like adherens and tight junctions with paracellular permselective barrier function. *Ann N Y Acad Sci*. 2009; 1165:44–52
- 85.**Tucker MJ, Luecke NM, Wiker SR, Wright G. Chemical removal of the outside of the zona pellucida of day 3 human embryos has no impact on implantation rate. *J Assist Reprod Genet*. 1993;10:187–91
- 86.**Tucker MJ, Morton PC, Wright G, Ingargiola PE, Sweitzer CL, Elsner CW, et al. Enhancement of outcome from intracytoplasmic sperm injection: does coculture or assisted hatching improve implantation rates? *Hum Reprod*. 1996;11:2434–7
- 87.**Usanee Sanmee, Waraporn Piromlertamorn, and Teraporn Vutyavanich' The effect of the site of laser zona opening on the complete hatching of mouse blastocysts and their cell numbers, *Clin Exp Reprod Med*. 2016 Sep; 43(3): 152–156.
- 88.**Van Duin M, Polman JE, DeBreet IT, et al. Recombinant human zona pellucida protein zona pellucida3 produced by Chinese hamster ovary cells induces the human sperm acrosome reaction and promotes sperm–egg fusion. *Biol Reprod*. 1994;5:607–17
- 89.**Van den Berg IM, Laven JS, Stevens M, Jonkers I, Galjaard RJ, Gribnau J, van Doorninck JH. X chromosome inactivation is initiated in human preimplantation embryos. *Am J Hum Genet* 2009;84:771– 779
- 90.**Veeck LL, Zaninovic N. An atlas of human blastocysts. London: Informa Healthcare; 2003.
- 91.**Vincent C, Pickering SJ & Johnson MH 1990 The hardening effect of dimethyl sulphoxide on the mouse zona pellucida requires the presence of an oocyte and is associated with a reduction in the number of cortical granules present. *Journal of Reproduction and Fertility* 89 253–259

- 92.** Vincent C, Turner K, Pickering SJ & Johnson MH 1991 Zona pellucida modifications in the mouse in the absence of oocyte activation. *Molecular Reproduction and Development* 28 394–404
- 93.** Wan, C. Y. *et al.* Laser-assisted hatching improves clinical outcomes of vitrified-warmed blastocysts developed from low-grade cleavage-stage embryos: a prospective randomized study. *Reprod Biomed Online* 28, 582–589 (2014)
- 94.** Watson AJ. The cell biology of blastocyst development. *Mol Reprod Dev.* 1992; 33:492–504
- 95.** Watson AJ, Barcroft LC., Regulation of blastocyst formation, *Front Biosci.* 2001 May 1;6:D708-30
- 96.** Watson AJ, Natale DR, Barcroft LC. Molecular regulation of blastocyst formation. *Anim Reprod Sci* 2004;82–83:583–592
- 97.** Zech NH, Lejeune B, Zech H, Vanderzwalmen P. Vitrification of hatching and hatched human blastocysts: effect of an opening in the zona pellucida before vitrification. *Reprod Biomed Online.* 2005;11(3):355-61