



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ –
ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΣΤΗ ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΑ –
ΠΕΡΙΓΕΝΝΗΤΙΚΗ ΙΑΤΡΙΚΗ»

Διευθυντής ΠΜΣ : Καθηγητής ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ Ι. ΔΑΠΟΝΤΕ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

PGD ΣΕ ΟΛΟΥΣ ΤΟΥΣ ΚΥΚΛΟΥΣ ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗΣ
ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ;

ΦΤΕΡΓΙΩΤΗ ΓΕΩΡΓΙΑ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

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

ΛΑΡΙΣΑ

Νοέμβριος 2022

"Βεβαιώνω ότι η παρούσα διπλωματική εργασία είναι αποτέλεσμα δικής μου δουλειάς και δεν αποτελεί προϊόν αντιγραφής. Στις δημοσιευμένες ή μη δημοσιευμένες πηγές έχω χρησιμοποιήσει εισαγωγικά και όπου απαιτείται έχω παραθέσει τις πηγές τους στο τμήμα της βιβλιογραφίας.

Υπογραφή: "

Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Εξεταστικής Επιτροπής:

1^{ος} Εξεταστής **Γεώργιος-Σπυρίδων Ανυφαντής**, Αναπληρωτής
Καθηγητής Εμβρυολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (Επιβλέπων)

2^{ος} Εξεταστής **Αλέξανδρος Δαπόντε**, Καθηγητής Μαιευτικής
και Γυναικολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (Σύμβουλος)

3^{ος} Εξεταστής **Χριστίνα Μεσσήνη**, Λέκτορας Μαιευτικής και
Γυναικολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (Μέλος)

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι να μελετήσει την αποτελεσματικότητα της Προεμφυτευτικής Γενετικής Διάγνωσης για Ανευπλοειδίες (PGT-A) και να διερευνήσει περαιτέρω, ποια ηλικιακή ομάδα ωφελείται περισσότερο από την πραγματοποίηση της μεθόδου και ποιο στάδιο βιοψίας του εμβρύου κρίνεται αποτελεσματικότερο. Για το σκοπό αυτό, επιλέχθηκαν μετα-αναλύσεις που περιλαμβάνουν μεγάλο όγκο δεδομένων και παρέχουν επικαιροποιημένα στοιχεία για την αποτελεσματικότητα της PGT-A στην κλινική πράξη. Σε αυτές περιλαμβάνονται αναλύσεις ανά εμβρυομεταφορά (ET) και ανά ασθενή, βασιζόμενες σε μελέτες που κάνουν χρήση του Περιεκτικού Χρωμοσωμικού Ελέγχου (CCS). Από τις εργασίες αυτές προκύπτει ότι η PGT-A σε συνδυασμό με την CCS, σε έμβρυα σταδίου βλαστοκύστης, μπορεί να βελτιώσει τα κλινικά αποτελέσματα και τα ποσοστά live-birth (LB) σε γυναίκες ηλικίας άνω των 35 ετών. Παρά το γεγονός ότι η PGT-A δεν φαίνεται να βελτιώνει την κλινική εγκυμοσύνη, ωστόσο, μειώνει τα ποσοστά των αποβολών. Βάσει των παραπάνω, λοιπόν, η PGT-A είναι δυνατόν να θεωρεί ως ένα μέσο που εξασφαλίζει περισσότερες πιθανότητες να εξελιχθεί μια εγκυμοσύνη σε live-birth (LB) παρά σε αποβολή, στην ηλικιακή ομάδα άνω των 35. Σε ότι αφορά τον γενικό πληθυσμό, η PGT-A δεν βελτιώνει τα ποσοστά live-birth (LB) ανά ασθενή, γεγονός που συνεπάγεται ότι δεν θα πρέπει να εφαρμόζεται καθολικά ως μια πρόσθετη εξέταση στο πλαίσιο της εξωσωματικής γονιμοποίησης, παρά μόνο όταν κρίνεται αναγκαίο.

Λέξεις κλειδιά

PGD, PGT-A, CCS, Systematic reviews, live-birth rate

ABSTRACT

The purpose of this work is to study the effectiveness of Preimplantation Genetic Testing for Aneuploidy (PGT-A) and to further investigate, through the relevant literature review, which age group benefits more from the implementation of the method, and which stage of embryo biopsy is considered more effective. For this purpose, a number of meta-analyses were chosen, as it includes a large amount of updated data on the effectiveness of PGT-A in clinical practice. These studies include analyses by embryo transfer (ET) and analyses by patients, based on studies using Comprehensive Chromosomal Screening (CCS). These analyses suggest that PGT-A in combination with CCS, in blastocyst-stage embryos, may improve clinical outcomes and live birth (LB) rates in women over 35 years of age. Although PGT-A does not appear to improve clinical pregnancy, it does reduce miscarriage rates. Based on the above, PGT-A can be considered as a means that ensures more chances of a live-birth (LB) developing pregnancy rather than a miscarriage, in the age group over 35. As far as the general population is concerned, PGT-A does not improve live-birth (LB) rates per patient, which denotes that it should not be universally applied as an additional test in the context of IVF, except when deemed necessary.

Λέξεις κλειδιά

PGD, PGT-A, CCS, Systematic reviews, live-birth rate

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

| | |
|--|----|
| ΠΕΡΙΛΗΨΗ | 4 |
| ABSTRACT | 5 |
| ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ | 6 |
| ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ | 7 |
| ΕΙΣΑΓΩΓΗ | 8 |
| 1. ΣΤΑΔΙΑ ΒΙΟΨΙΑΣ..... | 9 |
| 1.1. Βιοψία Σταδίου Αυλάκωσης | 10 |
| 1.2. Βιοψία Σταδίου Βλαστοκύστης | 10 |
| 2. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΒΙΟΨΙΑΣ ΕΜΒΡΥΟΥ..... | 11 |
| 2.1. Φθορίζων in-situ Υβριδισμός - FISH | 11 |
| 2.2. Περιεκτικός Χρωμοσωμικός Έλεγχος -CCS..... | 12 |
| 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΤΑ- ΑΝΑΛΥΣΕΩΝ..... | 14 |
| 3.1. Ανάλυση ανά ασθενή | 14 |
| 3.2. Ανάλυση ανά εμβρυομεταφορά (ΕΤ)..... | 16 |
| 3.3. Βιοψία PGT-A σε διαφορετικές ημέρες (D5 vs D3) | 18 |
| 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ | 19 |
| 4.1. Ανάλυση ανά ασθενή και ανά εμβρυομεταφορά (ΕΤ) | 19 |
| 4.2. Σύγκριση D3 VS D5 | 21 |
| 4.3. Σύγκριση φρέσκων VS κρυοσυντηρημένων εμβρύων | 22 |
| 4.4. Σύγκριση αποτελεσμάτων μεταξύ μελετών..... | 23 |
| 4.5. Σκέψεις και περιορισμοί στην αξιολόγηση της PGT-A | 24 |
| ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ | 26 |
| ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ | 28 |

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

aCGH, array Comparative Genomic Hybridization

CCS, Comprehensive Chromosome Screening

CLB, Cumulative Live-Birth Rates

CPR, Clinical Pregnancy Rates

D3, Day 3

D5, Day 5

ET, Embryo Transfer

FISH, Fluorescent in situ Hybridization

MR, Miscarriage Rates

NGS, Next-Generation Sequencing

OPR, Ongoing Pregnancy Rates

PGT-A, Preimplantation Genetic Testing for Aneuploidy

qPCR, quantitative Polymerase Chain Reaction

RCTs, Randomized Controlled Trials

SNP, Single-Nucleotide Polymorphism

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η Προεμφυτευτική Γενετική Διάγνωση είναι η εξέταση που πραγματοποιείται στα έμβρυα πριν τη μεταφορά και εμφύτευσή τους στη μήτρα της γυναίκας, μέσω των τεχνικών της Ιατρικώς Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής. Η εφαρμογή της έχει σκοπό, αφού διακρίνει τα υγιή έμβρυα από αυτά που φέρουν είτε χρωμοσωμικές ανωμαλίες είτε προβλήματα στη γονιδιακή αλληλουχία, να μεταφερθούν στη μήτρα μόνο τα υγιή έμβρυα. Η Προεμφυτευτική Γενετική Διάγνωση διακρίνεται σε Προεμφυτευτική Γενετική Διάγνωση για κληρονομικά νοσήματα - PGD (Preimplantation Genetic Diagnosis) ή PGT-M για μονογονιδιακά νοσήματα (Preimplantation Genetic Testing for Monogenic Disorders) και Προεμφυτευτική Γενετική Διάγνωση για Ανευπλοειδίες (PGT-A Preimplantation Genetic Testing for Aneuploidy) ή PGS (Preimplantation Genetic Screening).

Η Προεμφυτευτική Γενετική Διάγνωση για Ανευπλοειδίες (PGT-A) αποτελεί την πλέον καθοριστική τεχνική για την επιλογή του κατάλληλου-ευπλοειδικού εμβρύου. Οι εμβρυϊκές ανευπλοειδίες προκαλούν αποβολές αρχόμενων κυήσεων σε ποσοστό 50% και αυξάνονται όσο αυξάνεται η ηλικία της μητέρας. Συνεπώς, συστήνεται κυρίως όταν η μητρική ηλικία είναι αυξημένη, όταν υπάρχουν επαναλαμβανόμενες αποτυχίες εμφύτευσης ή επαναλαμβανόμενες αποβολές καθώς επίσης και σε περιπτώσεις ανδρικής υπογονιμότητας (Goossens, et al.,2009, Twisk, et al.,2006).

Στην παρούσα εργασία μελετάται η αποτελεσματικότητα της Προεμφυτευτικής Γενετικής Διάγνωσης για Ανευπλοειδίες (PGT-A) και διερευνάται περαιτέρω, μέσω της βιβλιογραφικής ανασκόπησης, ποια ηλικιακή ομάδα ωφελείται περισσότερο από την πραγματοποίηση της τεχνικής και ποιο στάδιο βιοψίας κρίνεται αποτελεσματικότερο.

Βιβλιογραφικά, παρατηρούνται δύο σχολές σκέψης αναφορικά με το «πότε» και «πως» πρέπει να χρησιμοποιείται η PGT-A. Αποτελεί μια πολύπλοκη διαδικασία, γεγονός που δυσκολεύει τη λήψη μιας κοινώς αποδεκτής απόφασης για το ποια είναι η βέλτιστη πρακτική.

Η βιοψία διακρίνεται με βάση το στάδιο στο οποίο γίνεται η λήψη των κυττάρων σε βιοψία σταδίου τροφοεκτοδέρματος και βιοψία σταδίου αυλάκωσης (Fiorentino, et al.,2013, Rubio et al., 2017). Η βιοψία στο στάδιο της αυλάκωσης ενέχει τον κίνδυνο να φτάσουν λιγότερα έμβρυα στο στάδιο της βλαστοκύστης, λόγω περιορισμένου αριθμού κυττάρων για βιοψία (Cimadomo, et al.,2016), ενώ στη βιοψία τροφοεκτοδέρματος υπάρχει αφθονία κυττάρων από τα οποία μπορεί να γίνει επιλογή, εξασφαλίζοντας μια πιο έγκυρη διάγνωση (Cimadomo, et al.,2016).

Αναφορικά με την ημέρα βιοψίας, ημέρα 3 ή ημέρα 5, παρατηρείται έντονη διαμάχη, ενώ πρόσφατα δεδομένα υποστηρίζουν το στάδιο της βλαστοκύστης σε συνδυασμό με Περιεκτικό Χρωμοσωμικό Έλεγχο (CCS) (Gleicher & Orvieto, 2017).

Αρκετές μετα-αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με σκοπό να διερευνηθεί το όφελος από την PGT-A. Δύο από τις τρεις μετα-αναλύσεις καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι η χρήση της τεχνικής FISH συσχετίστηκε με χαμηλότερα ποσοστά κύησης και live birth, σε σύγκριση με συμβατικούς κύκλους (Twisk, et al., 2016, Checa, et al., 2009, Mastenbroek, et al., 2011). Αντιθέτως, παρατηρήθηκε ότι η PGT-A που συνδυάζεται με CCS μπορεί να βελτιώσει το ποσοστό της κύησης αλλά και των γεννήσεων (Dahdouh, et al.,2015, Natsuaki & Dimler, 2018).

1. ΣΤΑΔΙΑ ΒΙΟΨΙΑΣ

Η Προεμφυτευτική Γενετική Διάγνωση για ανευπλοειδίες (PGS) πραγματοποιείται σε ζευγάρια που υποβάλλονται στις μεθόδους της Εξωσωματικής Γονιμοποίησης (IVF) καθώς η τεχνική προϋποθέτει τη βιοψία κυττάρων του εμβρύου, πριν την εμφύτευσή του στη μήτρα (Dahdouh, et al., 2015). Η βιοψία διακρίνεται με βάση το στάδιο στο οποίο γίνεται η λήψη των κυττάρων σε: α) βιοψία πρώτου πολικού σωματίου (PB1) ή βιοψία δεύτερου πολικού σωματίου (PB2) από το ωκύτταρο, β) βιοψία στο στάδιο αυλάκωσης του εμβρύου και γ) βιοψία στο στάδιο της βλαστοκύστης. Αφού πραγματοποιηθεί η γενετική ανάλυση των εμβρυικών κυττάρων, ο

εμβρυολόγος αποφασίζει ποιο από τα έμβρυα είναι υγιές, ώστε να μεταφερθεί στη μήτρα της γυναίκας.

1.1. Βιοψία Σταδίου Αυλάκωσης

Η βιοψία στο στάδιο της αυλάκωσης πραγματοποιείται την τρίτη ημέρα μετά τη γονιμοποίηση, όταν το έμβρυο αποτελείται από 6 έως 8 κύτταρα. Αφού γίνει μια οπή στη διάφανη ζώνη, γίνεται λήψη ενός ή δύο βλαστομεριδίων, στα οποία πραγματοποιείται η γενετική ανάλυση, ώστε να εκτιμηθεί αν το έμβρυο είναι υγιές ή όχι και να μεταφερθεί ή μη στη μήτρα. Η εμβρυομεταφορά πραγματοποιείται την τρίτη ή τέταρτη μέρα της γονιμοποίησης, πριν φτάσει το έμβρυο στο στάδιο της βλαστοκύστης.

Μειονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι ο περιορισμένος αριθμός γενετικού υλικού προς εξέταση, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε μη έγκυρη διάγνωση και ψευδώς θετικά ή αρνητικά αποτελέσματα σε περίπτωση που ανιχνευθεί μωσαϊσμός. Υπάρχουν περιπτώσεις που ένα έμβρυο χαρακτηρίζεται ως μωσαϊκό στο στάδιο της αυλάκωσης, και διαφοροποιείται μετέπειτα στο στάδιο της βλαστοκύστης, ως ευπλοειδικό (Van Echten-Arends, et al., 2011). Ακόμη ένα μειονέκτημα της βιοψίας στο στάδιο της αυλάκωσης είναι ότι αποτελεί μια περισσότερο επεμβατική μέθοδο, ιδιαίτερα όταν λαμβάνονται δύο βλαστομερίδια, με πιθανό αποτέλεσμα την καθυστέρηση της ανάπτυξης του εμβρύου στο στάδιο της βλαστοκύστης, μειώνοντας πιθανώς τα ποσοστά της εμφύτευσης (Chen, et al., 2014, Dokras, 2018).

1.2. Βιοψία Σταδίου Βλαστοκύστης

Η βιοψία στο στάδιο της βλαστοκύστης πραγματοποιείται την πέμπτη ή έκτη μέρα μετά τη γονιμοποίηση. Η βλαστοκύστη αποτελείται εξωτερικά από ένα στρώμα κυττάρων -το τροφοεκτόδερμα- και εσωτερικά, από την εσωτερική κυτταρική μάζα. Σ' αυτό το στάδιο το έμβρυο αποτελείται συνολικά από 100 έως 200 κύτταρα και η βιοψία πραγματοποιείται σε 5 με 10 κύτταρα

του τροφοεκτοδέρματος, στα οποία γίνεται η γενετική ανάλυση. Ο αυξημένος αριθμός κυττάρων διασφαλίζει μεγαλύτερη ακρίβεια στη διάγνωση σε σχέση με αυτή του σταδίου αυλάκωσης, καθώς παρέχει περισσότερο γενετικό υλικό για ανάλυση. Επιπλέον, σημαντικό πλεονέκτημα της μεθόδου είναι ότι παρουσιάζεται χαμηλότερο ποσοστό μωσαϊκισμού. Φυσικά, εσφαλμένη διάγνωση μπορεί να πραγματοποιηθεί και στο στάδιο της βλαστοκύστης, λόγω μωσαϊκισμού, αν και κάτι τέτοιο – η ασυμφωνία μεταξύ τροφοεκτοδέρματος και εσωτερικής κυτταρικής μάζας φαίνεται να είναι σπάνια (Sachdev, et al.,2020).

2. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΒΙΟΨΙΑΣ ΕΜΒΡΥΟΥ

Ο Προεμφυτευτικός Γενετικός Έλεγχος βασίζεται σε τεχνικές που αναλύουν το σύνολο των χρωμοσωμάτων ή συγκεκριμένο αριθμό χρωμοσωμάτων. Ο Προεμφυτευτικός Γενετικός Έλεγχος που βασίζεται στην ανάλυση του συνόλου των χρωμοσωμάτων συσχετίζεται με αυξημένα ποσοστά κλινικής εγκυμοσύνης (CPR) και live-birth (LBR).

Ο Περιεκτικός Χρωμοσωμικός Έλεγχος (Comprehensive Chromosome Screening–CCS) περιλαμβάνει τεχνολογίες μικροσυστοιχιών με πολυμορφισμό ενός νουκλεοτιδίου (Single Nucleotide Polymorphism–SNP), συγκριτικό γενωμικό υβριδισμό με μικροσυστοιχίες (Comparative Genome Hybridization arrays - aCGH), ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (quantitative Polymerase Chain Reaction-qPCR) και αλληλουχία επόμενης γενιάς (Next Generation Sequencing-NGS) (Chen, et al., 2014, Geraedts, Sermon, 2016).

2.1. Φθορίζων in-situ Υβριδισμός - FISH

(Fluorescent in situ Hybridization)

Η μέθοδος αυτή αποτέλεσε την πρώτη μέθοδο για την ανίχνευση ανευπλοειδιών. Εφαρμόζεται σε ένα μόνο κύτταρο, για να ανιχνεύσει

ανευπλοειδίες σε συγκεκριμένα χρωμοσώματα κατά την 3^η ημέρα της γονιμοποίησης του εμβρύου. Πραγματοποιείται μέσω σημασμένων ανιχνευτών που προσδένονται σε συγκεκριμένες αλληλουχίες του γονιδιώματος και εκπέμπουν χρώματα φθορισμού. Είναι μια γρήγορη και οικονομική μέθοδος που μπορεί να εφαρμοστεί σε αρκετές περιπτώσεις, ωστόσο, ένα από τα μειονεκτήματά της είναι ότι δεν μπορεί να εφαρμοστεί στο στάδιο της βλαστοκύστης. Σήμερα, αν και μπορεί να εφαρμοστεί και σε βλαστοκύστες, η χρήση της περιορίζεται στη διάγνωση μη ισορροπημένων χρωμοσωμάτων σε περιπτώσεις δομικών ανωμαλιών.

2.2. Περιεκτικός Χρωμοσωμικός Έλεγχος -CCS

(Comprehensive Chromosome Screening)

Πολυμορφισμοί Ενός Νουκλεοτιδίου με Μικροσυστοιχίες –SNP (Single Nucleotide Polymorphisms Microarrays).

Η ανάλυση μικροσυστοιχιών εφαρμόζεται για την ανίχνευση πολυμορφισμών. Οι πολυμορφισμοί ενός νουκλεοτιδίου αποτελούν παραλλαγές σε ένα μόνο ζεύγος βάσεων του γονιδιώματος και αφορούν την πιο κοινή παραλλαγή του. Εμφανίζονται τουλάχιστον στο 1% του πληθυσμού, χωρίς να συνδέονται με μονογονιδιακές ασθένειες. Η ανάλυσή τους εφαρμόζεται για την ανίχνευση ανευπλοειδιών, ανωμαλιών ενός γονιδίου, καθώς επίσης και για τον εντοπισμό του γονικού απλοτύπου που μεταφέρθηκε στο έμβρυο (Chen, et al., 2014, Sermon, 2017). Ωστόσο, αποτελεί μια τεχνική που απαιτεί υψηλό κόστος και αρκετό χρόνο.

Συγκριτικός Γενωμικός Υβριδισμός με Μικροσυστοιχίες - aCGH (array Comparative Genome Hybridization)

Ο Συγκριτικός Γενωμικός Υβριδισμός αποτελεί τη μέθοδο που συγκρίνει το γονιδίωμα του προς εξέταση ατόμου με το γονιδίωμα ενός ατόμου με φυσιολογικό καρυότυπο. Τα δύο δείγματα που σημαίνονται με διαφορετική χρωστική, υβριδίζονται σε μια συστοιχία που περιέχει 12 χιλιάδες ανιχνευτές DNA κατά μήκος του γονιδιώματος και κατόπιν αναλύεται και καταμετράται η

ένταση των σημάτων υβριδισμού σε κάθε ανιχνευτή (Dahdouh, et al, Sermon, 2017). Για μεγαλύτερη ακρίβεια, χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια η aCGH, η οποία βασίζεται σε μικροσυστοιχίες και ανιχνεύει μη ισορροπημένες χρωμοσωμικές μεταθέσεις. Αποτελεί μία αξιόπιστη και σχετικά γρήγορη μέθοδο, καθώς αναλύει όλα τα χρωμοσώματα σε 24 ώρες (Chen et al.,2014).

Ποσοτική Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης - qPCR (quantitative Polymerase Chain Reaction)

Μία άλλη αξιόπιστη, γρήγορη και οικονομική μέθοδος για την ανάλυση και των 24 χρωμοσωμάτων είναι με την Ποσοτική Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης. Εφαρμόζεται σε βιοψίες τροφοεκτοδέρματος, όχι όμως βλαστομεριδίων ή πολικών σωματίων. Προκειμένου να ανιχνευτούν οι ανευπλοειδίες, ενισχύεται ένα δείγμα DNA σε δύο τουλάχιστον ακολουθίες σε κάθε βραχίονα χρωμοσώματος, κι έτσι εντοπίζεται αύξηση ή μείωση του αριθμού των χρωμοσωμάτων. Αποτελεί μέθοδο που δίνει αυξημένα ποσοστά εμφύτευσης και live-birth καθώς και μειωμένα ποσοστά λάθους ανά ευπλοειδικό έμβρυο (Dahdouh, et al, Sermon, 2017).

Αλληλουχία Επόμενης Γενιάς - NGS (Next Generation Sequencing)

Η αλληλουχία επόμενης γενιάς αποτελεί μια νέα μέθοδο που περιλαμβάνει ενίσχυση ολόκληρου του γονιδιώματος. Περιλαμβάνει δύο τεχνικές: την ThermoFisher Ion PGM και την Illumina Mi Seq που έχουν τη δυνατότητα εντοπισμού ανευπλοειδίων, μωσαϊσμού, μονογονεϊκών ασθενειών. Υπερτερεί σε σχέση με την aCGH καθώς είναι πιο οικονομική, ανιχνεύει χρωμοσωμικό μωσαϊσμό στη βλαστοκύστη με μεγαλύτερη ευαισθησία, ανιχνεύει τμηματικές ανωμαλίες και κληρονομικές ασθένειες και μπορεί να εξετάζει πολλά δείγματα ταυτόχρονα (Dokras, 2018).

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΤΑ- ΑΝΑΛΥΣΕΩΝ

Προκειμένου να αποτιμηθεί η αποτελεσματικότητα της PGT-A στην κλινική πράξη, κρίθηκε αναγκαία η μελέτη των πιο πρόσφατων αναλύσεων, που βασίζονται τόσο στην εφαρμογή του CCS όσο και στη μέθοδο της υαλοποίησης/κατάψυξης.

Ύστερα από ενδελεχή έλεγχο της βιβλιογραφίας, συμπεριλήφθηκαν στην ανάλυση συνολικά 10 μελέτες. Ο πληθυσμός αφορούσε γυναίκες που υποβλήθηκαν σε IVF/ICSI με ή χωρίς τη διενέργεια της PGT-A πριν την εμβρυομεταφορά (ΕΤ). Επιπλέον, συμπεριλήφθηκαν τόσο φρέσκα όσο και κρυοσυντηρημένα έμβρυα, εκτιμώντας πως τα τελευταία έχουν αντίστοιχη αποτελεσματικότητα και κλινικά αποτελέσματα με τα φρέσκα. Ο έλεγχος ανευπλοειδίας πραγματοποιήθηκε και στα 24 χρωμοσώματα.

Στα κύρια αποτελέσματα κάποιων αναλύσεων (Simoroulou, et al., 2021) περιλαμβάνονται τα Ποσοστά live-birth ανά ασθενή και τα Ποσοστά αποβολών ανά κλινική εγκυμοσύνη. Στα Δευτερεύοντα αποτελέσματα περιλαμβάνονται: Ποσοστά προχωρημένης εγκυμοσύνης ανά ασθενή, Ποσοστά κλινικής εγκυμοσύνης ανά ασθενή, Ποσοστά live-birth ανά ασθενή, Ποσοστά live-birth ανά ΕΤ, Ποσοστά προχωρημένης εγκυμοσύνης ανά ΕΤ, Ποσοστό κλινικής εγκυμοσύνης ανά ΕΤ, Αθροιστικά Ποσοστά live-birth ανά ΕΤ.

3.1. Ανάλυση ανά ασθενή

Ποσοστά live-birth ανά ασθενή

Έξι μελέτες κατέγραψαν τα αποτελέσματά τους σχετικά με τα ποσοστά live-birth ανά ασθενή (LBR, Πίνακας 1). Τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα δεν έδειξαν στατιστικά σημαντική διαφορά σε ότι αφορά τα ποσοστά live-birth, μετά από την εφαρμογή της PGT-A. Από την ανάλυση υποομάδων δεν

φάνηκε να υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά για τις γυναίκες 35 ετών και κάτω, όταν κάνουν χρήση της PGT-A. Στις γυναίκες άνω των 35 ετών η PGT-A βελτίωσε τα ποσοστά live-birth.

Ποσοστά αποβολών ανά κλινική εγκυμοσύνη

Από τη ανάλυση επτά μελετών παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντικό χαμηλότερο ποσοστό αποβολών (MR, Πίνακας 1), μετά από την εφαρμογή της PGT-A. Η ανάλυση υποομάδων δεν έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά σε καμία από τις δύο ηλικιακές ομάδες.

Ποσοστό προχωρημένης και κλινικής εγκυμοσύνης ανά ασθενή

Για το ποσοστό προχωρημένης εγκυμοσύνης (OPR, Πίνακας 1) εξετάστηκαν μόνο τρεις μελέτες, οι οποίες δεν έδειξαν στατιστικά σημαντική διαφορά ανά ασθενή, μετά από την εφαρμογή της PGT-A. Αντίστοιχα ήταν και τα αποτελέσματα σχετικά με το ποσοστό κλινικής εγκυμοσύνης (CPR, Πίνακας 1). Η ανάλυση εννέα μελετών δεν έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά, για καμία από τις δύο υποομάδες.

Αθροιστικά Ποσοστά live-birth ανά ασθενή

Τα αθροιστικά ποσοστά live-birth ανά ασθενή βελτιώθηκαν μετά την εφαρμογή της PGT-A, σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (CLP, Πίνακας 1). Ανάλυση υποομάδων δεν πραγματοποιήθηκε λόγω του περιορισμένου αριθμού μελετών(4).

Πίνακας 1 Συγκεντρωτικά αποτελέσματα μετα-ανάλυσης ανά ασθενή (Simopoulou et al,2021)

| | Αριθμός μελετών | Αριθμός ασθενών | RISK RATIO RR | Ηλικιακή ομάδα < 35 | Ηλικιακή ομάδα > 35 |
|-----|-----------------|-----------------|---------------|---------------------|---------------------|
| LBR | 6 | 1513 | 1,15 | 0,97 | 1,29 |
| MR | 7 | 912 | 0,36 | 0,86 | 0,24 |
| OPR | 3 | 933 | 1,31 | - | - |
| CPR | 9 | 1824 | 1,14 | 0,96 | 1,07 |
| CLB | 4 | 580 | 1,36 | - | - |

3.2. Ανάλυση ανά εμβρυομεταφορά (ET)

Ποσοστά live-birth ανά ET

Αποτελέσματα σχετικά με τα ποσοστά live-birth ανά κύκλο αναφέρθηκαν σε έξι μελέτες (LBR, Πίνακας 2). Από αυτά δεν προέκυψε στατιστικά σημαντική αύξηση στην προχωρημένη εγκυμοσύνη. Ωστόσο, κρίθηκε σημαντικό το γεγονός ότι η PGT-A βελτίωσε τα ποσοστά live-birth στις γυναίκες άνω των 35 ετών, χωρίς να παρατηρείται σημαντική διαφορά στις γυναίκες κάτω των 35.

Ποσοστό προχωρημένης και κλινικής εγκυμοσύνης ανά ET

Στατιστικά σημαντική ήταν και η βελτίωση, μετά από την εφαρμογή της PGT-A, σε ότι αφορά τα ποσοστά προχωρημένης και κλινικής εγκυμοσύνης, ύστερα από την ανάλυση τριών και εννέα μελετών αντίστοιχα (OPR, CPR Πίνακας 2). Από την ανάλυση υποομάδων δεν φάνηκε να υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά για τις γυναίκες 35 ετών και κάτω, ενώ στις γυναίκες άνω των 35 ετών τα ποσοστά κλινικής εγκυμοσύνης βελτιώθηκαν.

Αθροιστικά Ποσοστά live-birth ανά ET

Τέσσερις μελέτες κατέγραψαν αποτελέσματα σχετικά με τα αθροιστικά ποσοστά live-birth ανά ασθενή (CLB, Πίνακας 2). Τα αθροιστικά ποσοστά live-birth ανά κύκλο βελτιώθηκαν στατιστικά σημαντικά με την PGT-A, σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Ανάλυση υποομάδων δεν πραγματοποιήθηκε λόγω του περιορισμένου αριθμού μελετών.

Πίνακας 2 Συγκεντρωτικά αποτελέσματα μετα-ανάλυσης ανά εμβρυομεταφορά (ET)(Simopoulou et al, 2021)

| | Αριθμός μελετών | Αριθμός ET | RISK RATIO RR | Ηλικιακή ομάδα < 35 | Ηλικιακή ομάδα > 35 |
|-----|-----------------|------------|---------------|---------------------|---------------------|
| LBR | 6 | 1334 | 1,32 | 0,94 | 1,51 |
| OPR | 3 | 859 | 1,36 | - | - |
| CPR | 9 | 1673 | 1,28 | 1,02 | 1,29 |
| CLB | 4 | 629 | 1,87 | - | - |

3.3. Βιοψία PGT-A σε διαφορετικές ημέρες (D5 vs D3)

Ποσοστά live-birth ανά ασθενή

Προκειμένου να διαπιστωθεί ποιο στάδιο βιοψίας κρίνεται αποτελεσματικότερο, αξιολογήθηκαν ασθενείς και έγινε σύγκριση μεταξύ δύο διαφορετικών ημερών βιοψίας, σύμφωνα με τα ακόλουθα ζεύγη: D5 βιοψία vs D3, D5 βιοψία vs ομάδα ελέγχου, D3 βιοψία vs ομάδα ελέγχου. Από την ανάλυση δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ημερών βιοψίας, σε κανένα από τα τρία ζεύγη.

Ποσοστά live-birth ανά ET

Αντίστοιχη μεθοδολογία εφαρμόστηκε για να διαπιστωθεί αν υπάρχει διαφορά μεταξύ των δύο ημερών βιοψίας στα ποσοστά live-birth ανά εμβρυομεταφορά. Πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση των κύκλων εμβρυομεταφοράς και σύγκριση των δύο διαφορετικών ημερών βιοψίας, σύμφωνα με τα ακόλουθα ζεύγη: D5 βιοψία vs D3, D5 βιοψία vs ομάδα ελέγχου, D3 βιοψία vs ομάδα ελέγχου. Από την ανάλυση δεν προέκυψε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ημερών βιοψίας (D5 vs D3), ούτε και μεταξύ της D3 βιοψίας και της ομάδας ελέγχου (D3 βιοψία vs ομάδα ελέγχου). Ωστόσο, κατά τη D5 η PGT-A είχε στατιστικά σημαντικά αυξημένο ποσοστό live-birth σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (D5 βιοψία vs ομάδα ελέγχου).

Σχετικά με τα ποσοστά προχωρημένης εγκυμοσύνης, κλινικής εγκυμοσύνης, αποβολών και αθροιστικών ποσοστών live-birth, δεν πραγματοποιήθηκε κάποια ανάλυση γιατί μόνο μία έρευνα δημοσιοποίησε αποτελέσματα ακολουθώντας PGT-A και βιοψία την D3, ενώ δεν κατέγραψε καμία έρευνα τη σύγκριση βιοψίας D5 vs D3.

Φρέσκα vs κρυοσυντηρημένα έμβρυα ανά ET

Η σύγκριση μεταξύ φρέσκων και κρυοσυντηρημένων εμβρύων πραγματοποιήθηκε μόνο για την ηλικιακή ομάδα 35 ετών και άνω. Μόνο τέσσερις μελέτες πληρούσαν τα κριτήρια. Τα αποτελέσματα τεσσάρων μελετών έδειξαν ότι η PGT-A βελτίωσε το ποσοστό live-birth μόνο όταν η εμβρυομεταφορά αφορούσε κρυοσυντηρημένο έμβρυο. Στις περιπτώσεις που η PGT-A διενεργήθηκε σε φρέσκο έμβρυο, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

4.1. Ανάλυση ανά ασθενή και ανά εμβρυομεταφορά (ET)

Το ποσοστό live-birth ανά ασθενή και το ποσοστό αποβολών ανά κλινική εγκυμοσύνη αποτελούν σημαντικούς δείκτες προκειμένου να διατυπωθεί μια αρχική εκτίμηση για το κατά πόσο η διενέργεια της PGT-A είναι αποτελεσματική. Οι μετρήσεις δείχνουν ότι η PGT-A δεν βελτιώνει το ποσοστό live-birth ανά ασθενή στο γενικό πληθυσμό. Θα μπορούσε λοιπόν κανείς, να αναλογιστεί εύλογα, πως η εφαρμογή της μεθόδου στις νεότερες γυναίκες δεν προσφέρει κάποιο πλεονέκτημα. Αντίθετα, σε γυναίκες που ανήκουν στην ηλικιακή ομάδα άνω των 35 η PGT- A φαίνεται να βελτιώνει το ποσοστό live-birth ανά ασθενή.

Σε ότι αφορά το ποσοστό αποβολών ανά κλινική εγκυμοσύνη, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωσή του στο γενικό πληθυσμό. Ωστόσο, από την ανάλυση των επιμέρους ομάδων δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά. Κάτι τέτοιο μας κάνει να είμαστε πιο προσεκτικοί, ιδιαίτερα σε ότι αφορά τις μετρήσεις και τα επιμέρους χαρακτηριστικά τους. Παρατηρούμε λοιπόν, ότι το διάστημα εμπιστοσύνης για την ηλικιακή ομάδα άνω των 35 ετών, είναι μεγάλο, ενώ το μέγεθος του δείγματος είναι μικρό. Επομένως, η απουσία αυτής της αναμενόμενης

σημαντικής διαφοράς για τη συγκεκριμένη ηλικιακή ομάδα θα μπορούσε να αποδοθεί εν μέρει, στο μικρότερο μέγεθος δείγματος. Βέβαια, το τελευταίο δεν μπορεί να αποτελεί το μοναδικό παράγοντα ερμηνείας, όπως και μία αποβολή δεν μπορεί να έχει μία και μόνο αιτιολογία. Η αποβολή αποτελεί ένα πιο σύνθετο κλινικό γεγονός, η αιτιολογία του οποίου μπορεί να είναι πολυπαραγοντική. Επομένως, προκειμένου να εξαχθούν έγκυρα αποτελέσματα απαιτείται ακόμα μεγαλύτερο δείγμα ατόμων για μελέτη.

Στη συνέχεια υπολογίστηκε το ποσοστό προχωρημένης κύησης ανά ασθενή, χωρίς να παρατηρείται βελτίωσή του μετά τη διενέργεια της PGT-A. Περαιτέρω ανάλυση των δύο ηλικιακών ομάδων δεν πραγματοποιήθηκε, προφανώς λόγω του περιορισμένου αριθμού μελετών. Αντίστοιχα και το ποσοστό κλινικής κύησης δεν βελτιώθηκε μετά την εφαρμογή της PGT-A, για καμία από τις δύο ηλικιακές ομάδες.

Συμπερασματικά η PGT-A δεν βελτιώνει το ποσοστό κλινικής εγκυμοσύνης σε καμία από τις δύο ηλικιακές ομάδες, ωστόσο, βελτιώνει το ποσοστό των αποβολών και το ποσοστό live-birth στην ομάδα άνω των 35 ετών. Επομένως, με τη μείωση των αποβολών φαίνεται να ευνοείται η διατήρηση μιας εγκυμοσύνης που οδηγεί σε γέννηση για την ομάδα άνω των 35 ετών.

Τελευταίο ποσοστό στην ανάλυση ανά ασθενή ήταν το αθροιστικό ποσοστό live-birth, το οποίο βελτιώθηκε στατιστικά σημαντικά μετά την PGT-A, κάτι που μπορεί να φαίνεται παράδοξο, καθώς θα περιμέναμε το ποσοστό αυτό να είναι τουλάχιστον ίσο, ανά ασθενή, μεταξύ αυτών που υποβλήθηκαν ή μη σε PGT-A. Το αποτέλεσμα αυτό θα μπορούσε να υποδηλώνει τη δυσκολία εφαρμογής του συγκεκριμένου δείκτη στην κλινική πράξη, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε περαιτέρω αποκλίσεις μεταξύ των δημοσιευμένων μελετών που αφορούν τον ορισμό καθεαυτού. Κάτι τέτοιο μπορεί να οφείλεται στα διαφορετικά πρωτόκολλα και τις στρατηγικές που ακολουθούνται μεταξύ των μελετών. Επιπλέον, ιδιαίτερη σημασία θα πρέπει να δοθεί στο γεγονός ότι δεν μεταφέρονται πάντοτε όλα τα έμβρυα, ενισχύοντας ακόμη περισσότερο τις διαφορές μεταξύ των μελετών και δικαιολογώντας τη δευτερεύουσα σημασία που λαμβάνει το αθροιστικό ποσοστό live-birth στις περισσότερες μελέτες.

Από την άλλη πλευρά, αναλύοντας τα δεδομένα κύκλων PGT-A που ολοκλήρωσαν τη διαδικασία εμβρυομεταφοράς (ET) κατά την οποία

ταυτοποιήθηκε τουλάχιστον ένα ευπλοειδικό έμβρυο, φαίνεται να παρουσιάζεται μια βελτίωση στα ποσοστά live-birth. Η PGT-A δεν βελτίωσε τα ποσοστά live-birth στις νεότερες γυναίκες αλλά στην ομάδα άνω των 35 ετών, όπου παρατηρήθηκαν αυξημένα ποσοστά σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Βελτίωση παρουσίασαν και τα ποσοστά προχωρημένης και αθροιστικής εγκυμοσύνης ανά εμβρυομεταφορά μετά τη διενέργεια της PGT-A. Επίσης, αντίστοιχα ήταν και τα ποσοστά κλινικής εγκυμοσύνης, τόσο στο γενικό πληθυσμό, όσο και σε γυναίκες άνω των 35 ετών. Σε γυναίκες ηλικίας 35 ετών και κάτω δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά.

Τα βελτιωμένα αποτελέσματα της εφαρμογής PGT-A σχετικά με το αθροιστικό ποσοστό live birth αποδεικνύουν την αποτελεσματικότητα της PGT-A σε κύκλους με αφθονία εμβρύων. Παρατηρήθηκε ότι η διενέργεια της PGT-A είχε σημαντικά βελτιωμένα κλινικά αποτελέσματα, όταν η ανάλυση πραγματοποιούνταν ανά εμβρυομεταφορά. Από την άλλη πλευρά, όταν μεταφέρουμε έμβρυα τα οποία δεν έχουν ελεγχθεί χρωμοσωμικά και η μεταφορά βασίζεται σε μορφολογικά κριτήρια και μόνο, είναι λογικό ότι θα απαιτούνται περισσότερες μεταφορές εμβρύων για την επίτευξη του ίδιου κλινικού αποτελέσματος. Το τελευταίο ισχύει πράγματι, όταν συγκρίνουμε κύκλους με PGT-A και χωρίς PGT-A. Οι μετα-ανάλυσεις δείχνουν πως βελτιώνεται το αθροιστικό ποσοστό live birth όταν διενεργείται PGT-A. Στην κλινική πράξη, κάτι τέτοιο δεν ευνοεί τις ασθενείς που έχουν μικρό αριθμό εμβρύων, γιατί δεν έχουν τη δυνατότητα πολλαπλών εμβρυομεταφορών. Ένα ερώτημα που προκύπτει επομένως είναι κατά πόσο υπάρχουν τα δεδομένα που να υποστηρίζουν ένα ελάχιστο επαρκή αριθμό εμβρύων, ως ένα όριο, που θα εξασφαλίζει τη βέλτιστη εφαρμογή της PGT-A.

4.2. Σύγκριση D3 VS D5

Σε ότι αφορά τη διερεύνηση δημοσιεύσεων που συγκρίνουν τις διαφορετικές ημέρες βιοψίας, D3 με D5, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ημερών βιοψίας (Simopoulou et al. 2021).

Αυτό που κρίθηκε στατιστικά σημαντικό ήταν το αυξημένο ποσοστό live-birth, ανά εμβρυομεταφορά, μόνο για την ομάδα βιοψίας D5. Επιπρόσθετα, στην ίδια μετα-ανάλυση δεν ήταν δυνατό να εξαχθούν αποτελέσματα σχετικά με τα ποσοστά προχωρημένης εγκυμοσύνης, κλινικής αποβολής και αθροιστικού ποσοστού live birth μετά τη διενέργεια της PGT-A, καθώς μόνο μία μελέτη σύγκρινε τη βιοψία D3 με την ομάδα ελέγχου.

4.3. Σύγκριση φρέσκων VS κρυοσυντηρημένων εμβρύων

Σε ότι αφορά τη σύγκριση μεταξύ φρέσκων και κρυοσυντηρημένων εμβρύων, αυτή περιλαμβάνει μόνο μία ηλικιακή ομάδα άνω των 35 ετών προκειμένου να εξαχθούν πιο έγκυρα αποτελέσματα. Ο λόγος που έγινε επιλογή μόνο αυτής της ομάδας είναι γιατί μόνο αυτή παρουσίασε στατιστικά σημαντική διαφορά στα ποσοστά, μετά από την PGT-A, γεγονός που δικαιολογεί την επιλογή της για τη σύγκριση μεταξύ των εμβρύων. Άλλωστε, για την ηλικιακή ομάδα άνω των 35, η διενέργεια της PGT-A μπορεί να είναι περισσότερο αποτελεσματική γι' αυτό και κρίθηκε πως η επιλογή της θα συμβάλει στο καλύτερο δυνατό αποτέλεσμα.

Ιδιαίτερα σημαντικό και αναμφίβολα σημείο που περιορίζει την αντικειμενική παρουσίαση των αποτελεσμάτων, όταν συγκρίνουμε φρέσκα με κρυοσυντηρημένα έμβρυα, είναι ότι οι μελέτες που πραγματοποιούν την εμβρυομεταφορά σε φρέσκα έμβρυα διενεργούν τη βιοψία την D3, ενώ σε κατεψυγμένα έμβρυα διενεργείται την D5. Το τελευταίο αποτελεί μια εργαστηριακή πρακτική που δύσκολα μπορεί να ξεπεραστεί ώστε να έχουμε ασφαλή συμπεράσματα.

Αναγνωρίζοντας τα παραπάνω και λαμβάνοντας υπόψη τις διαφοροποιήσεις μεταξύ φρέσκων και κρυοσυντηρημένων εμβρύων, στην κλινική πράξη παρατηρείται μια προτίμηση στα κρυοσυντηρημένα έμβρυα, η οποία μπορεί να αποδίδεται αφενός στη νέα τεχνική κρυοσυντήρησης - την υαλοποίηση- η οποία φέρει εξαιρετικά αποτελέσματα και αφετέρου στο ότι η

βιοψία βλαστοκύστης αναγνωρίζεται ευρέως ως η καλύτερη ημέρα επιλογής, γεγονός που αποδεικνύεται και στην παρούσα μελέτη.

Επιπλέον, εξετάζοντας πότε η PGT-A κρίνεται αποτελεσματικότερη, όταν διενεργείται σε φρέσκο ή σε κρυοσυντηρημένο έμβρυο, θα πρέπει να έχουμε στο μυαλό μας ότι αναφερόμαστε σε μια πολύπλοκη κλινική διαδικασία, για την αποτίμηση της οποίας και των αποτελεσμάτων της θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη τόσο η κατάσταση του αποψυγμένου εμβρύου, όσο και η ενδομήτρια δεκτικότητα. Βιβλιογραφικά παρατηρούνται διαφορετικές προσεγγίσεις σχετικά με το ποια είναι η καλύτερη επιλογή. Έτσι, από τη μία πλευρά διατυπώνεται η άποψη ότι η μεταφορά κατεψυγμένων εμβρύων επιτρέπει τη βέλτιστη δεκτικότητα του ενδομητρίου και τον καλύτερο συγχρονισμό, χωρίς όμως να ευνοεί την εμφύτευση του εμβρύου (Boynukalin, et al., 2020). Από την άλλη, υποστηρίζεται πως μπορεί η τεχνική της υαλοποίησης να έχει καλύτερα αποτελέσματα από αυτή της αργής κατάψυξης, ωστόσο ο αριθμός των εμβρύων για μεταφορά μπορεί είναι μικρότερος σε σύγκριση με τη μεταφορά φρέσκων εμβρύων, καθώς δεν επιβιώνουν όλα τα έμβρυα μετά την απόψυξη (Rienzi, et al., 2017).

4.4. Σύγκριση αποτελεσμάτων μεταξύ μελετών

Οι περισσότερες μετα-αναλύσεις συμφωνούν, τόσο στην ανάλυση που πραγματοποιήθηκε ανά ασθενή, όσο και στην ανάλυση ανά εμβρυομεταφορά. Ειδικότερα, σε ότι αφορά τα ποσοστά live-birth ανά ασθενή, μετά τη διενέργεια της PGT-A, δεν φαίνεται να βελτιώνονται τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα, γεγονός που συμφωνεί με τις πρόσφατες συστηματικές ανασκοπήσεις και μετα-αναλύσεις (Twisk, et al., 2006, Checa, et al., 2009, Mastenbroek, et al., 2004). Παρόμοια ήταν τα αποτελέσματα και με μελέτες που πραγματοποίησαν ανάλυση μόνο ανά εμβρυομεταφορά (Simoroulou, et al., 2021, Dahdouh, et al., 2015, Natsuaki & Dimler, 2018).

Επίσης, το γεγονός ότι μόνο η βιοψία τροφοεκτοδέρματος βελτιώνει στατιστικά σημαντικά το ποσοστό live-birth, φαίνεται να συμβαδίζει με αρκετές μελέτες που παρουσιάζουν αντίστοιχη βελτίωση της βιοψίας

τροφοεκτοδέρμστος (Prates, et al., 2013), η ερμηνεία της οποίας ενδέχεται να σχετίζεται με την απομάκρυνση μικρότερου ποσοστού κυττάρων.

Σε ότι αφορά τις διαφοροποιήσεις μεταξύ των μελετών, παρατηρείται ότι κάποιες μετα-αναλύσεις περιλαμβάνουν περισσότερους δείκτες (RCT) που βασίζονται αποκλειστικά στον Περιεκτικό Χρωμοσωμικό Έλεγχο (CCS) και κατ' επέκταση στον αποκλεισμό δεδομένων που αφορούν στην εφαρμογή της τεχνικής FISH. Επομένως, τα παραπάνω δικαιολογούν και πιθανές αποκλίσεις από μελέτες που εφαρμόζουν την τελευταία τεχνική, γεγονός που θα πρέπει να λάβουμε υπόψη μας όταν ερμηνεύουμε ή συγκρίνουμε τα αποτελέσματα παρόμοιων μελετών. Η Τεχνική FISH, σε αντίθεση με τον Περιεκτικό Χρωμοσωμικό Έλεγχο (CCS), δεν βελτίωσε τα ποσοστά εγκυμοσύνης ούτε τα ποσοστά live-birth, κάτι που φαίνεται εύλογο, αν αναλογιστούμε ότι δεν αξιολογούνται όλα τα χρωμοσώματα. Για το λόγο αυτό, αποκλείστηκαν από την έρευνα μελέτες που συμπεριέλαβαν τη FISH και επιλέχθηκαν μελέτες που χρησιμοποίησαν μόνο τεχνικές του CCS (PCR, aCGH, NGS).

4.5. Σκέψεις και περιορισμοί στην αξιολόγηση της PGT-A

Κατά το σχεδιασμό μιας μελέτης έχει μεγάλη σημασία να επιβεβαιώνονται τα οριστικά αποτελέσματα, παραθέτοντας τον αριθμό των εμβρύων ανά κύκλο, μαζί με τον αριθμό των κυττάρων που αφαιρέθηκαν για την πλοειδική ανάλυση. Μέρος του σχεδιασμού θα πρέπει να αποτελεί μια τυχαιοποίηση βασισμένη σε υπολογιστή που θα χρησιμοποιεί τυχαίους αλγόριθμους, με ηλικιακή βαθμίδωση (εφόσον χρησιμοποιούνται περισσότερες από μία ηλικιακές ομάδες).

Ιδιαίτερη έμφαση θα πρέπει να δοθεί στην αποφυγή αποκλίσεων μεταξύ των ορισμών γεγονός που παρατηρείται στις μελέτες και μπορεί να οδηγήσει σε αμφισβητήσιμα αποτελέσματα. Είναι σημαντικό λοιπόν, να καθορίζονται με σαφήνεια οι όροι που αναφέρονται ευρέως στις μελέτες που αφορούν το πεδίο της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής.

Επιπλέον, πρέπει να επισημανθεί ότι προκειμένου να είναι αποτελεσματική η ανάλυση, το δείγμα του πληθυσμού θα πρέπει να είναι ποσοτικά επαρκές. Σε πολλές μετα-ανάλυσεις παρατηρήθηκε περιορισμένος αριθμός μελετών που περιλαμβάνουν τα κατάλληλα κριτήρια ένταξης σ' αυτήν, με αποτέλεσμα να εξαχθούν και περιορισμένα αποτελέσματα – ειδικά σε ότι αφορά την ανάλυση υποομάδων. Ωστόσο, μια μετα-ανάλυση περιλαμβάνει αυστηρά RCTs για την εφαρμογή πλήρους χρωμοσωμικού ελέγχου καθώς και σύγκριση μεταξύ των ημερών βιοψίας (Simorouliou et al. 2021). Σε αυτήν την μετα-ανάλυση, εξετάζοντας την αποτελεσματικότητα της PGT-A στο γενικό πληθυσμό, παρατηρείται ακόμη ένας περιορισμός, καθώς η πλειοψηφία των γυναικών που συμμετείχαν σ' αυτή τη μελέτη είναι κάτω των 35 ετών, ηλικία που δεν είναι αντιπροσωπευτική των γυναικών που υποβάλλονται συνήθως σε PGT-A.

Ιδιαίτερη προσοχή, όταν ερμηνεύουμε τα αποτελέσματα μιας έρευνας θα πρέπει να δίνουμε στο γεγονός ότι η πλειοψηφία των μελετών πραγματοποιεί διπλή μεταφορά εμβρύου, πρακτική που παρέχει βελτιωμένα ποσοστά live-birth και εγκυμοσύνης (McLernon, et al.,2016, Kamath,et al.,2020), οδηγώντας σε δίδυμη εγκυμοσύνη. Οι πρόσφατες οδηγίες της ASRM¹ προτείνουν τη μεταφορά ενός μόνο εμβρύου σε ασθενής που έχουν τουλάχιστον δύο καλής ποιότητας έμβρυα και είναι κάτω των 38 ετών. Στην περίπτωση της PGT-A οι οδηγίες της ASRM προτείνουν τη μεταφορά ενός μόνο εμβρύου ανεξάρτητα από την ηλικία των ασθενών (ESHRE,2000). Έχει ειπωθεί ότι η μονή εμβρυομεταφορά σε συνδυασμό με PGT-A, μπορεί να παρέχει παρόμοια ποσοστά live-birth με τη διπλή χωρίς PGT-A (Forman,et al,2013). Προκειμένου να εξαχθεί με ασφάλεια το συμπέρασμα αναφορικά με την αποτελεσματικότητα της PGT-A, στο μέλλον, οι μελέτες θα πρέπει να περιλαμβάνουν RCTs με μονή εμβρυομεταφορά τόσο στην ομάδα PGT-A όσο και στην ομάδα ελέγχου. Σήμερα, η πλειονότητα των μελετών περιλαμβάνει ασθενείς με τουλάχιστον δύο έμβρυα καλής ποιότητας.

¹ American Society for Reproductive Medicine

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Οι μετα-αναλύσεις δείχνουν ότι η PGT-A σε συνδυασμό με τη διενέργεια Περιεκτικού Χρωμοσωμικού Ελέγχου (CCS), σε έμβρυα σταδίου βλαστοκύστης, μπορεί να βελτιώσει τα κλινικά αποτελέσματα και τα ποσοστά live-birth σε γυναίκες ηλικίας άνω των 35 ετών. Παρά το γεγονός ότι η PGT-A δεν φαίνεται να βελτιώνει την κλινική εγκυμοσύνη, ωστόσο, μειώνει τα ποσοστά αποβολών. Βάσει των παραπάνω, λοιπόν, η PGT-A είναι δυνατόν να θεωρεί ως ένα μέσο που εξασφαλίζει περισσότερες πιθανότητες να εξελιχθεί μια εγκυμοσύνη σε live-birth παρά σε αποβολή, στην ηλικιακή ομάδα άνω των 35.

Σε ότι αφορά το γενικό πληθυσμό, τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η PGT-A δεν βελτίωσε τα ποσοστά live-birth ανά ασθενή. Επομένως, οι ακριβείς προϋποθέσεις που θα δικαιολογούσαν τη διενέργεια της PGT-A στο γενικό πληθυσμό, θα πρέπει να διερευνηθούν περαιτέρω στο πλαίσιο μελλοντικών τυχαιοποιημένων μελετών ώστε να επιβεβαιωθεί η ευεργετική της επίδραση.

Αναμφίβολα, καθοριστικός παράγοντας και βασικό κριτήριο για την εφαρμογή της τεχνικής είναι η ηλικία της μητέρας, καθώς τα ποσοστά ανευπλοειδίας αυξάνονται όταν η ηλικία της είναι άνω των 35 ετών. Ωστόσο, υπάρχουν κι άλλα χαρακτηριστικά που αξίζει να διερευνηθούν. Από τη σκοπιά ενός κύκλου εξωσωματικής, ο αριθμός και η ποιότητα των διαθέσιμων εμβρύων για βιοψία μπορεί να είναι καθοριστικός παράγοντας για να αποφασιστεί αν η PGT-A είναι ωφέλιμη. Επίσης, από τη σκοπιά της μητέρας, το μειωμένο απόθεμα ωοθηκών (Shahine, et al.,2016), οι αυτοάνοσες διαταραχές (Dabi,et al.,2016) και ο τρόπος ζωής (Jurewicz,et al.,2014), αποτελούν παράγοντες που έχουν συσχετιστεί με υψηλότερο κίνδυνο εμφάνισης ανευπλοειδίας. Σε ότι αφορά τον ανδρικό παράγοντα και τη συσχέτισή του με ανευπλοειδίες, από τη βιβλιογραφία δεν προκύπτουν σαφή αποτελέσματα που να συστήνουν τη διενέργεια της PGT-A. Απαιτούνται, λοιπόν, περισσότερες μελέτες για τη διερεύνηση και αξιολόγηση εκείνων των χαρακτηριστικών των ζευγαριών για τα οποία η PGT-A είναι ευεργετική.

Η ανάπτυξη ενός αλγόριθμου που θα βοηθάει στον καθορισμό του βέλτιστου πληθυσμού για την εφαρμογή της PGT-A μπορεί να είναι κλινικής σημασίας και είναι κάτι στο οποίο οφείλουμε να προσβλέπουμε στο μέλλον,

ιδιαίτερα στην εποχή της εξατομικευμένης ιατρικής. Η διενέργεια της PGT-A μπορεί να αποτελεί αναγκαιότητα για ζευγάρια που έχουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ανευπλοειδιών, ωστόσο, δεν θα πρέπει να εφαρμόζεται καθολικά, ως μια πρόσθετη εξέταση στο πλαίσιο της εξωσωματικής γονιμοποίησης, παρά μόνο αν υπάρχουν οι κατάλληλες προϋποθέσεις και τα δεδομένα για να την υποστηρίξουν.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Boynukalin FK, Turgut NE, Gultomruk M, Ecemis S, Yarkiner Z, Findikli N, et al. Impact of elective frozen vs. fresh embryo transfer strategies on cumulative live birth: do deleterious effects still exist in normal & hyper responders? PLOS ONE Public Libr Sci. 2020;15:e0234481

Checa MA, Alonso-Coello P, Sola I, Robles A, Carreras R, Balasch J. IVF/ICSI with or without preimplantation genetic screening for aneuploidy in couples without genetic disorders: a systematic review and meta-analysis. J Assist Reprod Genet. 2009;26:273–83.

Chen C-K, Yu H-T, Soong Y-K, Lee C-L. New perspectives on preimplantation genetic diagnosis and preimplantation genetic screening. Elsevier. 2014;53:146-150.

Cimadomo D, Capalbo A, Ubaldi FM, Scarica C, Palagiano A, Canipari R, et al. The impact of biopsy on human embryo developmental potential during preimplantation genetic diagnosis. Biomed Res Int. 2016;2016:1–10.

Dabi Y, Guterman S, Jani JC, Letourneau A, Demain A, Kleinfinger P, et al. Autoimmune disorders but not heparin are associated with cell-free fetal DNA test failure. J Transl Med [Internet]. 2018;16 Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6276207/>.

Dahdouh EM, Balayla J, Garcia-Velasco JA. Impact of blastocyst biopsy and comprehensive chromosome screening technology on preimplantation genetic screening: a systematic review of randomized controlled trials. Reprod BioMed Online. 2015;30:281–9.

Dahdouh EM, Balayla J, Audibert F, Genetics Committee, Wilson RD, Audibert F, Brock JA, Campagnolo C, Carroll J, Chong K, Gagnon A, Johnson JA, MacDonald W, Okun N, Pastuck M, Vallée-Pouliot K. Technical Update: Preimplantation Genetic Diagnosis and Screening. J ObstetGynaecol Can.2015;37(5):451–463

Fiorentino FRL, Bono S, Capalbo A, Spizzichino L, Baroni E, Harton G, et al. Preimplantation genetic screening on day 3 embryos using array comparative genomic hybridization in patients with advanced maternal age: a prospective double blinded randomized controlled trial. Hum Reprod (Oxford, England). 2013.

Forman EJ, Hong KH, Ferry KM, Tao X, Taylor D, Levy B, et al. In vitro fertilization with single euploid blastocyst transfer: a randomized controlled trial. *Fertil Steril*. 2013;(100):100–107.e1.

Geraedts J, Sermon K. Preimplantation genetic screening 2.0: the theory. *MolHumReprod*. 2016;22(8):839-844.

Gleicher N, Orvieto R. Is the hypothesis of preimplantation genetic screening (PGS) still supportable? A review. *J Ovarian Res*. 2017;10:21.

Jurewicz J, Radwan M, Sobala W, Radwan P, Jakubowski L, Hawuła W, et al. Lifestyle factors and sperm aneuploidy. *Reprod Biol*. 2014;14:190–9.

Kamath MS, Mascarenhas M, Kirubakaran R, Bhattacharya S. Number of embryos for transfer following in vitro fertilisation or intra-cytoplasmic sperm injection. *Cochrane Database of Systematic Reviews* [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 2020 [cited 2021 Apr 3]; Available from: 10.1002/14651858.CD003416.pub5/full

Lawrenz B, El Khatib I, Liñán A, Bayram A, Arnanz A, Chopra R, et al. The clinicians' dilemma with mosaicism—an insight from inner cell mass biopsies. *Hum Reprod*. 2019;34:998–1010.

McLernon DJ, Harrild K, Bergh C, Davies MJ, de Neubourg D, Dumoulin JCM, et al. Clinical effectiveness of elective single versus double embryo transfer: meta-analysis of individual patient data from randomised trials. *BMJ* [Internet]. 2010;341 Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3006495/>

Multiple gestation pregnancy. The ESHRE Capri Workshop Group. *Hum Reprod*. 2000;15:1856–64.

Natsuaki MN, Dimler LM. Pregnancy and child developmental outcomes after preimplantation genetic screening: a meta-analytic and systematic review. *World J Pediatr*. 2018;14:555–69.

Penzias A, Bendikson K, Butts S, Coutifaris C, Falcone T, Fossum G, et al. The use of preimplantation genetic testing for aneuploidy (PGT-A): a committee opinion. *Fertil Steril*. 2018;109:429–36.

Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Electronic address: ASRM@asrm.org, Practice Committee of the Society for Assisted Reproductive Technology. Guidance on the limits to the number of embryos to transfer: a committee opinion. *Fertil Steril*. 2017;107:901–3.

Prates R, Jordan A, Goodall N-N, Tortoriello D, Kiltz R, Jaroudi S. Multiple advantages of blastocyst versus cleavage stage biopsy for preimplantation genetic diagnosis (PGD) of single gene disorders. *Fertil Steril*. 2013;100:S84

Rienzi L, Gracia C, Maggiulli R, LaBarbera AR, Kaser DJ, Ubaldi FM, et al. Oocyte, embryo and blastocyst cryopreservation in ART: systematic review and meta-analysis comparing slow-freezing versus vitrification to produce evidence for the development of global guidance. *Hum Reprod Update*. 2017;23:139–55.

Rubio CBJ, Rodrigo L, Castillon G, Guillen A, Vidal C, Giles J, et al. In vitro fertilization with preimplantation genetic diagnosis for aneuploidies in advanced maternal age: a randomized, controlled study. *Fertil Steril*. (no pagination. 2017.

Sachdev NM, McCulloh DH, Kramer Y, Keefe D, Grifo JA. The reproducibility of trophoctoderm biopsies in euploid, aneuploid, and mosaic embryos using independently verified next-generation sequencing (NGS): a pilot study. *J Assist Reprod Genet*. 2020;37: 559–71.

Shahine LK, Marshall L, Lamb JD, Hickok LR. Higher rates of aneuploidy in blastocysts and higher risk of no embryo transfer in recurrent pregnancy loss patients with diminished ovarian reserve undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 2016;106:1124–8.

Simopoulou M, Sfakianoudis K. , Maziotis E, Tsioulou P, Grigoriadis S, Rapani A, Giannelou P, Asimakopoulou M, Kokkali G, Amelia Pantou A, Nikolettos K, Vlahos N, Pantos K.: PGT-A: who and when? A systematic review and network meta-analysis of RCTs . *J. of Assis. Reprod. and Genet*(2021) 38:1939–1957

Twisk M, Mastenbroek S, van Wely M, Heineman MJ, Van der Veen F, Repping S. Preimplantation genetic screening for abnormal number of chromosomes (aneuploidies) in in vitro fertilisation or intracytoplasmic sperm injection. *Cochrane Database Syst Rev*. 2006.

Tiegs AW, Tao X, Zhan Y, Whitehead CV, Seli E, Patounakis G, et al. A multi-center, prospective, blinded, non-selection study evaluating the predictive value (PV) of an aneuploid diagnosis with PGT-A and the impact of biopsy. *Fertil Steril*. Elsevier. 2020;114: e30

Van Echten-Arends J, Mastenbroek S, Sikkema-Raddatz B, Korevaar JC, Heineman MJ, van der Veen F, et al. Chromosomal mosaicism in human preimplantation embryos: a systematic review. *Hum Reprod Update*. 2011;17:620–7.

Weissman A, Shoham G, Shoham Z, Fishel S, Leong M, Yaron Y. Chromosomal mosaicism detected during preimplantation genetic screening: results of a worldwide Web-based survey. *Fertil Steril.* 2017;107:1092–7.