



**ΣΧΟΛΗ ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΜΑΙΕΥΤΙΚΗΣ**

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Κρυοσυντήρηση ωαρίων και υποβοηθούμενη
αναπαραγωγή. Ο ρόλος της μαίας»**

Φοιτήτρια: Ισαβέλλα Χριστιανίδη

ΑΜ: ΜΑ01467

Επιβλέπων καθηγητής κ. Όλγα Αντωνιάδου

Πτολεμαΐδα, 2023

Δήλωση περί μη λογοκλοπής

Δηλώνω ότι είμαι ο συγγραφέας της παρούσας εργασίας με τίτλο << Κρυσσυντήρηση ωαρίων και υποβοηθούμενη αναπαραγωγή. Ο ρόλος της μαιίας. >> που συντάχθηκε στα πλαίσια της πτυχιακής μου εργασίας και παραδόθηκε το μήνα Φεβρουάριο του 2023. Η αναφερόμενη εργασία δεν αποτελεί αντιγραφή ούτε προέρχεται από ανάθεση σε τρίτους. Οι πηγές που χρησιμοποιήθηκαν αναφέρονται σαφώς στη βιβλιογραφία και στο κείμενο ενώ κάθε εξωτερική βοήθεια, αν υπήρξε, αναγνωρίζεται ρητά.

Όνομα: ΧΡΙΣΤΙΑΝΙΔΗ ΙΣΑΒΕΛΛΑ

ΑΜ: ΜΑ01467

Ημερομηνία : 22/1/2023

Ευχαριστίες

Η παρούσα πτυχιακή εργασία με τίτλο «Κρυσσυντήρηση ωαρίων και υποβοηθούμενη αναπαραγωγή. Ο ρόλος της μαιίας» πραγματοποιήθηκε κατά το ακαδημαϊκό έτος 2021-2022 στο πλαίσιο των προπτυχιακών μου σπουδών , στο τμήμα Μαιευτικής, στο Πανεπιστήμιο Δυτικής Μακεδονίας, στη Πτολεμαΐδα.

Για την εξαιρετική συμβολή της, θα ήθελα να ευχαριστήσω βαθιά την επιβλέπουσα καθηγήτρια μου, κ. Όλια Αντωνιάδου καθώς και την βοήθεια της κ. Ελπίδας Βασιλείου , για τον χρόνο και την αφοσίωση που επέδειξαν στην ολοκλήρωση της διπλωματικής μου εργασίας καθώς επίσης και για την εξαιρετική συνεργασία μας .

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την στήριξη τους και ιδιαίτερα την νονά μου, η οποία αποτέλεσε έμπνευση στην επιλογή και στην ολοκλήρωση του θέματος που επέλεξα.

Περίληψη

Σε παγκόσμιο επίπεδο, σχεδόν 200 εκατομμύρια άνθρωποι είναι υπογόνιμοι, ενώ σύμφωνα με τα τελευταία δεδομένα, το 2018 πραγματοποιήθηκαν σχεδόν 2 εκατομμύρια κύκλοι υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Οι μέθοδοι της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής είναι η πρόκληση ωοθυλακιορηξίας, η τεχνητή σπερματέγχυση, η εξωσωματική γονιμοποίηση και η παρένθετη μητρότητα, ενώ οι τεχνικές είναι η ενδοσαλπγγική μεταφορά γαμετών και ζυγωτών, η υποβοηθούμενη εκκόλαψη και η κρυοσυντήρηση γενετικού υλικού. Αναφορικά με τα είδη κρυοσυντήρησης, μπορούν να κρυοσυντηρηθούν τα εξής: σπέρμα, ωάρια, έμβρυα, ορχικός ιστός, ωθητικός ιστός. Οι τεχνικές της κρυοσυντήρησης είναι η αργή κατάψυξη και η υαλοποίηση, με την τελευταία να είναι η πιο αποτελεσματική. Επιπλέον, υπάρχουν ορισμένα ηθικά ζητήματα στην ιατρικώς υποβοηθούμενη αναπαραγωγή, τα οποία αφορούν την ηλικία, την παρένθετη μητρότητα και την κρυοσυντήρηση. Συμπερασματικά, ο ρόλος της μαίας είναι ιδιαίτερα σημαντικός στην ψυχολογική υποστήριξη αναφορικά με την υπογονιμότητα και το άγχος που προκύπτει λόγω της διαδικασίας της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, στην ενημέρωση για τις τεχνικές, τις μεθόδους και τους κινδύνους της, αλλά και στην γεφύρωση του χάσματος μεταξύ των ιατρικών ορολογιών και της κατανόησης του ασθενούς.

Λέξεις κλειδιά: Μαία, Υποβοηθούμενη αναπαραγωγή, Κρυοσυντήρηση, Ωάρια, Υπογονιμότητα

Abstract

Globally, almost 200 million people are infertile, while according to the latest data, in 2018 almost 2 million cycles of assisted reproduction were performed. The methods of assisted reproduction are induction of ovulation, artificial insemination, in vitro fertilization and surrogacy, while the techniques are intratubal transfer of gametes and zygotes, assisted hatching and cryopreservation of genetic material. In terms of cryopreserved species, the following can be cryopreserved: sperm, ovum, embryos, testicular tissue, ovarian tissue. Cryopreservation techniques are slow freezing and vitrification, the latter being the most effective. In addition, there are some ethical issues in medically assisted reproduction, which involve age, surrogacy and cryopreservation. In conclusion, the role of the midwife is particularly important in providing psychological support regarding infertility and the stress that arises due to the process of assisted reproduction, in informing about its techniques, methods and risks, but also in bridging the gap between medical terminologies and patient understanding.

Key words: Midwifery, Assisted reproduction, Cryopreservation, Ovum, Infertility

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες	2
Περίληψη	3
Abstract	4
Περιεχόμενα	5
Κατάλογος Εικόνων	7
Εισαγωγή	8
Κεφάλαιο 1 - Υπογονιμότητα και Στείριότητα	10
1.1 Ορισμοί	10
1.2 Επιπολασμός υποβοηθούμενης αναπαραγωγής	11
1.3 Αίτια υπογονιμότητας	15
1.3.1 Γυναικεία	20
1.3.2 Ανδρική	24
1.4 Εργαστηριακή διερεύνηση και κλινική εξέταση	27
1.4.1 Γυναίκες	27
1.4.2 Άνδρες	28
Κεφάλαιο 2 - Μέθοδοι Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής	30
2.1 Πρόκληση ωοθυλακιορηξίας	30
2.2 Τεχνητή σπερματέγχυση	33
2.3 Εξωσωματική γονιμοποίηση	35
2.4 Παρένθετη μητρότητα	40
Κεφάλαιο 3 - Τεχνικές Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής	43
3.1 Ενδοσαλπγγική μεταφορά γαμετών	43
3.2 Ενδοσαλπγγική μεταφορά ζυγωτών	44

3.3 Υποβοηθούμενη εκκόλαψη	45
3.4 Κρυοσυντήρηση γεννητικού υλικού	45
Κεφάλαιο 4 - Η Κρυοσυντήρηση	51
4.1 Είδη κρυοσυντήρησης	51
4.1.1 Κρυοσυντήρηση σπέρματος	51
4.1.2 Κρυοσυντήρηση ωαρίων	55
4.1.3 Κρυοσυντήρηση εμβρύου	59
4.1.4 Κρυοσυντήρηση ορχικού ιστού	62
4.1.5 Κρυοσυντήρηση ωοθηκικού ιστού	64
4.2 Τεχνικές κρυοσυντήρησης	67
4.2.1 Αργή κατάψυξη	69
4.2.2 Υαλοποίηση	71
Κεφάλαιο 5 - Ηθικά Ζητήματα στην Ιατρικώς Υποβοηθούμενη Αναπαραγωγή	73
5.1 Ηλικία	73
5.2 Παρένθετη μητρότητα	74
5.3 Κρυοσυντήρηση	75
Επίλογος	76
Βιβλιογραφία	80

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1. Α) Συνολικός όγκος κύκλων υποβοηθούμενης αναπαραγωγής αυτόλογων ωοκυττάρων για την περίοδο 2004–2013 και Β) Αναλογία κύκλων υποβοηθούμενης αναπαραγωγής που χρησιμοποίησαν κατεψυγμένα-ξεψυγμένα έμβρυα που δημιουργήθηκαν από αυτόλογα ωάρια	13
Εικόνα 2. Κύκλοι υποβοηθούμενης αναπαραγωγής τα έτη 1991-2017	14
Εικόνα 3. Παγκόσμιος επιτολασμός κύκλων υποβοηθούμενης αναπαραγωγής το 2017	14
Εικόνα 4. Τέσσερις κοινοί κρυοπροστατευτικοί διεισδυτικοί παράγοντες: γλυκερόλη, διμεθυλοσουλφοξείδιο, αιθυλενογλυκόλη και προπυλενογλυκόλη	49
Εικόνα 5. Φυσικά συμβάντα και κρυοτραυματισμοί κυττάρων κατά την κατάψυξη και την απόψυξη	50
Εικόνα 6. Κρυοσυντήρηση σπέρματος	55
Εικόνα 7. Διαδικασία κρυοσυντήρησης ωαρίων	59
Εικόνα 8. Επιδράσεις της κρυοσυντήρησης σε γεννητικά κύτταρα και έμβρυα	62
Εικόνα 9. Η κρυοσυντήρηση ιστού ωαρίων και ωοθηκών ως επιλογές διατήρησης της γονιμότητας	66
Εικόνα 10. Καμπύλη ψύξης σε πρωτόκολλα αργής κατάψυξης για ανθρώπινο ωοθηκικό ιστό	67
Εικόνα 11. Σύγκριση μεθόδου αργής κατάψυξης και υαλοποίησης	68
Εικόνα 12. Κλινικές επιπτώσεις που σχετίζονται με τη βελτιστοποίηση της κρυοσυντήρησης στην εξωσωματική γονιμοποίηση	69
Εικόνα 13. Οι διακριτοί ρόλοι της μαίας στις μονάδες υποβοηθούμενης αναπαραγωγής	78

Εισαγωγή

Παγκοσμίως, περισσότερα από 186 εκατομμύρια άνθρωποι πάσχουν από υπογονιμότητα (Vander Borgh & Wyns, 2018) και έχουν πραγματοποιηθεί περισσότεροι από 4 εκατομμύρια κύκλοι υποβοηθούμενης αναπαραγωγής που ξεκίνησαν το 2008, το 2009 και το 2010, με αποτέλεσμα τη γέννηση πάνω από 1.144.800 μωρών που συλλήφθηκαν με τεχνολογία υποβοηθούμενης αναπαραγωγής μόνο κατά τη διάρκεια αυτής της τριετίας (Messerlian & Gaskins, 2017; Ishihara et al., 2015; Dyer et al., 2016).

Η κρυοσυντήρηση είναι η χρήση πολύ χαμηλών θερμοκρασιών για τη διατήρηση δομικά ανέπαφων ζωντανών κυττάρων και ιστών για μεγάλο χρονικό διάστημα. Η κρυοσυντήρηση γαμετών και εμβρύων είναι μια ουσιαστική πτυχή της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Η ευρεία εφαρμογή της επέτρεψε αυξημένη ασφάλεια και αποτελεσματικότητα των θεραπειών εξωσωματικής γονιμοποίησης. Το ποσοστό των κρυοσυντηρημένων κύκλων μεταφοράς εμβρύων σε σύγκριση με τους νέους κύκλους αυξάνεται στην Ευρώπη. Συνολικά έχει υπολογιστεί ότι οι κρυοσυντηρημένοι κύκλοι συνέβαλαν στο 32% των μεταφορών το 2011 σε σύγκριση με 28% το 2010. Σε ορισμένες χώρες, όπως η Ελβετία, η Φινλανδία, η Ολλανδία, η Σουηδία και η Ισλανδία, το ποσοστό των κρυοσυντηρημένων εμβρυομεταφορών είναι υψηλότερο από 50 %. Οι παρατηρούμενες διαφορές μεταξύ των ευρωπαϊκών χωρών οφείλονται κυρίως σε πολιτικές που απαιτούν χαμηλότερη σειρά μεταφοράς, οι οποίες, με τη σειρά τους, έχουν οδηγήσει σε περισσότερα υπεράριθμα έμβρυα διαθέσιμα για κρυοσυντήρηση (Rienzi et al., 2017).

Η εργασία αυτή στοχεύει να μελετήσει την κρυοσυντήρηση ωαρίων και την υποβοηθούμενη αναπαραγωγή, και να επισημάνει το ρόλο της μαιίας στην υποβοηθούμενη αναπαραγωγή. Η εργασία διαρθρώνεται σε 5 κεφάλαια. Στο πρώτο κεφάλαιο, γίνεται μια περιγραφή της υπογονιμότητας και της στειρότητας, αναλύοντας τους ορισμούς αυτών των δυο, τον επιπολασμό της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, τα αίτια υπογονιμότητας, και την εργαστηριακή διερεύνηση και κλινική εξέταση. Το δεύτερο κεφάλαιο αφορά τις μεθόδους υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Περιγράφονται η πρόκληση ωοθυλακιορηξίας, η τεχνητή

σπερματέγχυση, η εξωσωματική γονιμοποίηση και η παρένθετη μητρότητα. Στο τρίτο κεφάλαιο περιγράφονται οι τεχνικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, και συγκεκριμένα η ενδισαλπινγκική μεταφορά γαμετών και ζυγωτών, η υποβοηθούμενη εκκόλαψη και η κρυοσυντήρηση γενετικού υλικού. Στο τέταρτο κεφάλαιο παρουσιάζονται τα είδη και οι τεχνικές της κρυοσυντήρησης. Το πέμπτο και τελευταίο κεφάλαιο, αφορά τα ηθικά ζητήματα στην ιατρικών υποβοηθούμενη αναπαραγωγή, εστιάζοντας στην ηλικία, την παρένθετη μητρότητα και την κρυοσυντήρηση. Στον επίλογο γίνεται αναφορά στο ρόλο της μαίας στην υποβοηθούμενη αναπαραγωγή.

Κεφάλαιο 1 - Υπογονιμότητα και Στειρότητα

1.1 Ορισμοί

Η υπογονιμότητα ορίζεται ως η αδυναμία να πραγματοποιηθεί σύλληψη μετά από ένα χρόνο (ή και περισσότερο) που πραγματοποιείται σεξ χωρίς προφύλαξη (WHO, 2020). Σύμφωνα με το CDC (2022), καθώς η γονιμότητα μειώνεται με την ηλικία, για τις γυναίκες 35 ετών και άνω, η υπογονιμότητα μπορεί να οριστεί ως η αδυναμία σύλληψης μετά από 6 μήνες που πραγματοποιείται σεξ χωρίς προφύλαξη. Μια κοινή εσφαλμένη αντίληψη για τη υπογονιμότητα είναι ότι όλα τα υπογόνιμα άτομα είναι άτεκνα (Shreffler, Greil & McQuillan, 2017). Η υπογονιμότητα μπορεί να είναι πρωτοπαθής ή δευτεροπαθής. Πρωτοπαθής υπογονιμότητα είναι όταν μια εγκυμοσύνη δεν έχει επιτευχθεί ποτέ από ένα άτομο, και δευτερογενής υπογονιμότητα είναι όταν έχει επιτευχθεί τουλάχιστον μία προηγούμενη εγκυμοσύνη (WHO, 2020).

Αντίθετα, η στειρότητα είναι η φυσιολογική αδυναμία να πραγματοποιηθεί σεξουαλική αναπαραγωγή σε ένα ζωντανό ον. Είναι η αδυναμία παραγωγής βιολογικού παιδιού. Η στειρότητα μπορεί να χωριστεί σε τρεις υποτύπους: φυσική, κλινική και σκληρή. Η φυσική στειρότητα είναι η φυσιολογική αδυναμία του ζευγαριού να συλλάβει παιδί χωρίς ιατρική παρέμβαση (δηλαδή «φυσικά μέσα»). Η κλινική στειρότητα είναι η φυσιολογική αδυναμία του ζευγαριού να συλλάβει παιδί ακόμη και μετά από ιατρική παρέμβαση, συμπεριλαμβανομένης της χειρουργικής επέμβασης. Η κλινική στειρότητα είναι ένας υποτύπος της φυσικής στειρότητας, δεδομένου ότι η κλινική στειρότητα είναι φυσική στειρότητα για την οποία η θεραπεία της ασθενούς δεν θα οδηγήσει σε σύλληψη. Η σκληρή στειρότητα είναι η αδυναμία αξιοποίησης των διαθέσιμων θεραπειών λόγω εξωγενών παραγόντων όπως οικονομικοί, ψυχολογικοί ή φυσικοί παράγοντες. Η σκληρή στειρότητα είναι ένας υποτύπος της κλινικής στειρότητας (Roufman et al., 2021).

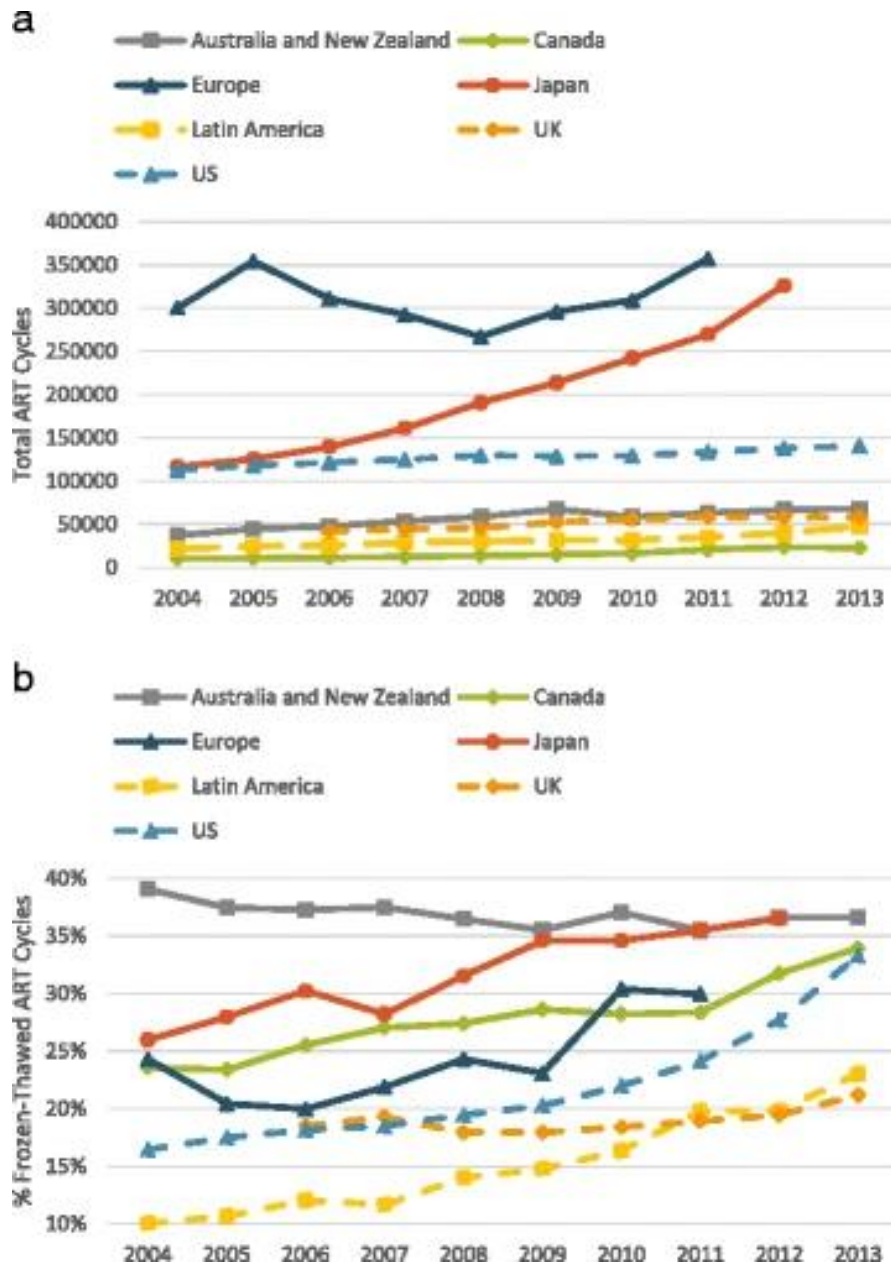
1.2 Επιπολασμός υποβοηθούμενης αναπαραγωγής

Παγκοσμίως, περισσότερα από 186 εκατομμύρια άνθρωποι πάσχουν από υπογονιμότητα, η πλειοψηφία των οποίων είναι κάτοικοι αναπτυσσόμενων χωρών. Ο επιπολασμός της υπογονιμότητας σε γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας έχει υπολογιστεί ότι είναι ένα στα επτά ζευγάρια στον δυτικό κόσμο και ένα στα τέσσερα ζευγάρια στις αναπτυσσόμενες χώρες. Σε ορισμένες περιοχές του κόσμου, συμπεριλαμβανομένης της Νότιας Ασίας, ορισμένες χώρες της υποσαχάριας Αφρικής, της Μέσης Ανατολής και της Βόρειας Αφρικής, της Κεντρικής και Ανατολικής Ευρώπης και της Κεντρικής Ασίας, τα ποσοστά υπογονιμότητας μπορεί να φτάσουν το 30%. Οι άντρες ευθύνονται αποκλειστικά για 20-30% των περιπτώσεων υπογονιμότητας. Η δευτερογενής υπογονιμότητα είναι η πιο κοινή μορφή γυναικείας υπογονιμότητας σε όλο τον κόσμο (Vander Borgh & Wyns, 2018).

Περίπου 5 εκατομμύρια μωρά έχουν γεννηθεί μέσω τεχνολογίας υποβοηθούμενης αναπαραγωγής από το 1978, αντιπροσωπεύοντας μεταξύ 1% και 4% όλων των γεννήσεων μεταξύ των χωρών παγκοσμίως. Κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου, ο αριθμός των κύκλων τεχνολογίας υποβοηθούμενης αναπαραγωγής αυξήθηκε σταθερά καθώς η ζήτηση για θεραπεία αυξήθηκε. Παγκοσμίως, αναφέρθηκαν περισσότεροι από 4 εκατομμύρια κύκλοι που ξεκίνησαν το 2008, το 2009 και το 2010, με αποτέλεσμα τη γέννηση πάνω από 1.144.800 μωρών που συλλήφθηκαν με τεχνολογία υποβοηθούμενης αναπαραγωγής μόνο κατά τη διάρκεια αυτής της τριετίας (Messerlian & Gaskins, 2017; Ishihara et al., 2015; Dyer et al., 2016).

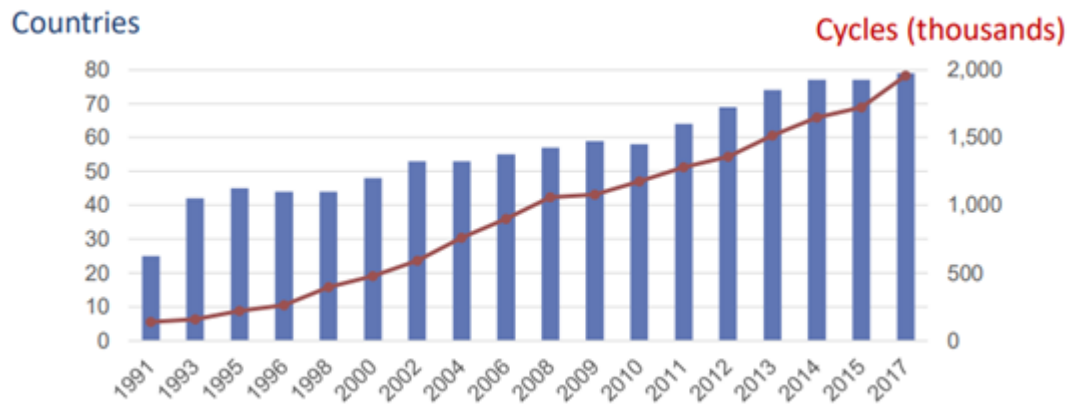
Ο Kushnir και οι συνεργάτες του (2017) διαπίστωσαν ότι κατά την περίοδο 2004-2013 οι μεταφορές μεμονωμένων εμβρύων και η χρήση κατεψυγμένων εμβρύων αυξήθηκαν παγκοσμίως. Το 2012, η χρήση των μεταφορών μεμονωμένων εμβρύων σε όλους τους κύκλους υποβοηθούμενης αναπαραγωγής ήταν υψηλότερη στην Ιαπωνία και την Αυστραλία/Νέα Ζηλανδία (82,6% και 76,3% αντίστοιχα) και χαμηλότερη στη Λατινική Αμερική (16,0%). Ενώ παρατηρήθηκαν σταδιακές βελτιώσεις στα ποσοστά των ζώντων γεννήσεων στις περισσότερες περιοχές, ορισμένες εμφάνισαν μείωση. Μέχρι το 2012-2013, τα ποσοστά ζωντανών γεννήσεων σε νέο κύκλο ήταν τα υψηλότερα στις ΗΠΑ (29%) και τα χαμηλότερα στην Ιαπωνία (5%).

Σύμφωνα με την τελευταία έκθεση της Διεθνούς Επιτροπής Παρακολούθησης Υποβοηθούμενων Αναπαραγωγικών Τεχνολογιών (ICMART, 2021), το 2017 πραγματοποιήθηκαν 1.955.908 κύκλοι υποβοηθούμενης αναπαραγωγής σε 79 χώρες, αντιπροσωπεύοντας μια αύξηση κατά 20,1% από το 2014. Περισσότεροι κύκλοι πραγματοποιήθηκαν στην Ευρώπη, και ακολουθεί η Ασία και η Νότια Αμερική. Οι περισσότεροι κύκλοι υποβοηθούμενης αναπαραγωγής το 2017 πραγματοποιήθηκαν στην Ιαπωνία (445.380 κύκλοι) και έπονται οι ΗΠΑ (180.462 κύκλοι), η Ρωσία (135.068 κύκλοι), η Ισπανία (119.460 κύκλοι), η Γαλλία (107.248 κύκλοι), η Γερμανία (99.466 κύκλοι), η Ιταλία (79.584 κύκλοι), η Αυστραλία (73.457 κύκλοι), το Ηνωμένο Βασίλειο (68.480 κύκλοι) και η Ινδία (63.469 κύκλοι). Η προτιμότερη μέθοδος υποβοηθούμενης αναπαραγωγής ήταν η τεχνητή σπερματέγχυση, και ακολουθεί η εξωσωματική γονιμοποίηση.



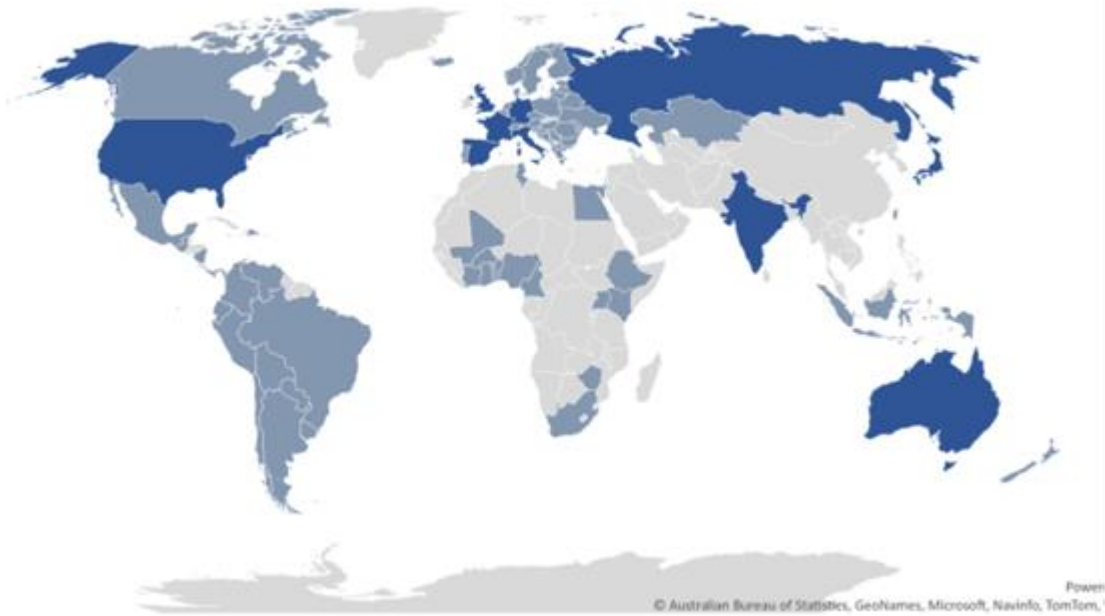
Εικόνα 1. Α) Συνολικός όγκος κύκλων υποβοηθούμενης αναπαραγωγής αυτόλογων ωοκυττάρων για την περίοδο 2004–2013 και Β) Αναλογία κύκλων υποβοηθούμενης αναπαραγωγής που χρησιμοποίησαν κατεψυγμένα-ξεψυγμένα έμβρυα που δημιουργήθηκαν από αυτόλογα ωάρια

(Πηγή: Kushnir, et al., 2017)



Εικόνα 2. Κύκλοι υποβοηθούμενης αναπαραγωγής τα έτη 1991-2017

(Πηγή: ICMART, 2021)



Εικόνα 3. Παγκόσμιος επιπολασμός κύκλων υποβοηθούμενης αναπαραγωγής το 2017

(Πηγή: ICMART, 2021)

1.3 Αίτια υπογονιμότητας

Η ανδρική υπογονιμότητα είναι υπεύθυνη για το 20-30% των περιπτώσεων υπογονιμότητας, ενώ το 20-35% οφείλεται σε γυναικεία υπογονιμότητα και το 25-40% οφείλεται σε συνδυασμένα προβλήματα και στα δύο μέρη. Στο 10-20% των περιπτώσεων, δεν εντοπίζεται αιτία. Η πιο κοινή αιτία γυναικείας υπογονιμότητας είναι τα προβλήματα ωορρηξίας, τα οποία γενικά εκδηλώνονται με αραιές ή απουσίες εμμηνορροϊκών περιόδων. Η ανδρική υπογονιμότητα οφείλεται συνήθως σε ελλείψεις στο σπέρμα και η ποιότητα του σπέρματος χρησιμοποιείται ως υποκατάστατο μέτρο της ανδρικής γονιμότητας (Cooper et al., 2010; Gurunath et al., 2011).

Ο υπογοναδοτροφικός υπογοναδισμός οδηγεί σε ανεπαρκή γοναδική διέγερση από την ωχρινοτρόπο ορμόνη και τη ωοθυλακιοτρόπο ορμόνη, είτε λόγω ανεπαρκούς/απουσίας έκκρισης ορμόνης απελευθέρωσης υποθαλαμικής γοναδοτροπίνης (GnRH) είτε λόγω μειωμένης υπόφυσης. Η κύρια αιτία της ανεπάρκειας GnRH είναι η αποτυχία μετανάστευσης του εκκριτικού νευρώνα GnRH στον πρόσθιο εγκέφαλο. Μπορεί να σχετίζεται με ανοσμία (σύνδρομο Kallmann) ή όχι (ιδιοπαθής υποθαλαμικός υπογοναδισμός). Ο γενετικός υπογοναδισμός απαντάται συχνότερα στους άνδρες παρά στις γυναίκες. Συγκεκριμένα, το σύνδρομο Kallmann έχει επιπολασμό 1/5000 με σαφή ανδρική επικράτηση (Hart, 2016; Valdes-Socin et al., 2014).

Ακόμη μια αιτία είναι η υπερπρολακτιναιμία. Η προλακτίνη αναστέλλει την έκκριση γοναδοτροπινών που οδηγεί σε ανωορρηξία. Στους άνδρες, η υπερπρολακτιναιμία προκαλεί χαμηλά επίπεδα τεστοστερόνης ορού, στειρότητα και σεξουαλική δυσλειτουργία (Hart, 2016). Σε μια μεγάλη σειρά 1607 ασθενών με υπερπρολακτιναιμία που υποβλήθηκαν σε ιατρική θεραπεία, ο υπολογιζόμενος επιπολασμός ήταν περίπου 10 ανά 100.000 στους άνδρες και 30 ανά 100.000 στις γυναίκες, με μέγιστο επιπολασμό για γυναίκες ηλικίας 25-34 ετών (Kars et al., 2009). Ο αναφερόμενος επιπολασμός του συμπτωματικού προλακτινώματος στον πληθυσμό κυμαίνεται από 6 έως 10 ανά 100.000 έως περίπου 50 ανά 100.000. Στη μελέτη τους, ο Souter και οι συνεργάτες του (2010) συμπεραίνουν ότι η υπερπρολακτιναιμία είναι σπάνια μεταξύ ασυμπτωματικών γυναικών με υπογονιμότητα (περίπου 5%).

Υπάρχουν επίσης και διαταραχές της ακτινωτής λειτουργίας. Η σάλπιγγα ως αγωγός μεταφοράς σπέρματος και εμβρύων βασίζεται στην αποτελεσματική ακτινωτή δραστηριότητα. Ενώ οι βλεφαρίδες της σάλπιγγας μπορεί να καταστραφούν από παθογόνα ή φλεγμονή, μια πρωτογενής διαταραχή της δομής και λειτουργίας των βλεφαρίδων (Πρωτοπαθής Δυσκινησία-ΠΔ) θα επηρεάσει επίσης τη μεταφορά των σαλπίγγων και θα προδιαθέσει την εκτοπική εμφύτευση του σάκου κύησης και την υπογονιμότητα. Οι περισσότεροι άνδρες με ΠΔ έχουν υπογονιμότητα δευτερογενή στην ακινησία του σπέρματος ως αποτέλεσμα ελαττωματικής κίνησης σπέρματος. Το ΠΔ είναι μια σπάνια, αυτοσωμική υπολειπόμενη διαταραχή με εκτιμώμενο επιπολασμό περίπου 1 στις 10.000 έως 40.000 γεννήσεις ζώντων. Ορισμένες γεωγραφικά απομονωμένες κοινότητες ή εθνοτικές ομάδες μπορεί να έχουν υψηλότερο επιπολασμό λόγω συγγένειας, όπως ο πληθυσμός Volendam στην Ολλανδία, ο βρετανικός ασιατικός πληθυσμός και οι κοινότητες Amish και Mennonite στις Ηνωμένες Πολιτείες (Vander Borgh & Wyns, 2018).

Επίσης, οι μεταλλάξεις στο γονίδιο CFTR επηρεάζουν τόσο την ανδρική όσο και τη γυναικεία γονιμότητα. Η κυστική ίνωση (ΚΙ) είναι μια κατάσταση που χαρακτηρίζεται από μη φυσιολογική έκκριση βλέννας. Αυτή η ασθένεια επηρεάζει πληθυσμούς σε όλο τον κόσμο, αλλά είναι πιο συχνή στους λευκούς της Βόρειας Ευρώπης (περίπου 1 στα 2500 άτομα) και στους Εβραίους Ασκενάζι (περίπου 1 στους 2270). Οι ΚΙ συνδέεται με τη γυναικεία υπογονιμότητα λόγω άμεσης επίδρασης στα επιθηλιακά κύτταρα της αναπαραγωγικής οδού. Η παχιά βλέννα του τραχήλου της μήτρας εμποδίζει τη διείσδυση του σπέρματος. Η επίδραση στη λειτουργία της κοιλότητας της μήτρας και της σάλπιγγας είναι λιγότερο σημαντική, αν και η επίδραση στον μεταβολισμό των διττανθρακικών μπορεί να οδηγήσει σε προβλήματα με τη χωρητικότητα του σπέρματος εντός της σάλπιγγας. Οι άνδρες που πάσχουν από κυστική ίνωση παρουσιάζουν συνήθως συγγενή απουσία του αγγείου. Η ανάπτυξη των όρχεων και η σπερματογένεση γενικά δεν επηρεάζονται (Schrijver, 2011; Ahmad, Ahmed & Patrizio, 2013).

Παράλληλα, οι μολυσματικοί παράγοντες έχουν διαφορετικούς τρόπους εξασθένησης της γονιμότητας. Στους άνδρες, μπορεί να βλάψουν τα όργανα, να βλάψουν τα κύτταρα μέσω μεσολαβητών της φλεγμονής, να δημιουργήσουν απόφραξη ή να συνδεθούν με τα σπερματοζωάρια. Στις γυναίκες, μπορεί να προκαλέσουν

φλεγμονώδη νόσο της πυέλου και απόφραξη των σαλπίνγων. Όπως αποδεικνύεται από τα ποσοστά επιτυχίας της εξωσωματικής γονιμοποίησης, το δυναμικό εμβρυοεμφυτεύσεως μειώνεται παρουσία υδροσαλπινγών. Ο πιο κοινός μολυσματικός παράγοντας που προκαλεί στειρότητα είναι τα χλαμύδια, με την υψηλότερη συχνότητα στους Ισπανόφωνους (33,3%). Επιδημιολογικά δεδομένα υποδηλώνουν συσχέτιση προηγούμενη λοίμωξη και υπογονιμότητα από *Chlamydia trachomatis* τόσο σε άνδρες όσο και σε γυναίκες αν και η επίδραση του *Chlamydia trachomatis* στην ανδρική γονιμότητα είναι αμφιλεγόμενη, πιθανώς λόγω μεθοδολογικών ζητημάτων σε μελέτες που έχουν αναφερθεί. Η γονόρροια *Neisseria* είναι ένα άλλο παθογόνο που μπορεί να επηρεάσει τη σάλπιγγα. Το 2008, ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας εκτίμησε ότι η υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης γονόρροιας ήταν στην περιοχή του Δυτικού Ειρηνικού (42 εκατομμύρια περιπτώσεις), στην περιοχή της Νοτιοανατολικής Ασίας (25,4 εκατομμύρια) και στην περιοχή της Αφρικής (21,1 εκατομμύρια). Στην Ευρωπαϊκή Περιφέρεια (53 χώρες), υπολογίστηκαν 3,4 εκατομμύρια περιπτώσεις γονόρροιας. Η γονόρροια μπορεί επίσης να βλάψει την ανδρική γονιμότητα προκαλώντας στενώσεις της ουρήθρας, ένα πρόβλημα που δεν φαίνεται να είναι πολύ σημαντικό στις ευρωπαϊκές χώρες (Hart, 2016; Vander Borght & Wyns, 2018).

Γενικά πιστεύεται ότι η σοβαρή συστηματική νοσηρότητα, όπως η σηψαιμία ή η σοβαρή νεφρική νόσος, θα αποτρέψει την εμβρυοεμφύτευση. Μια σειρά από ασθένειες όπως ο ασταθής διαβήτης η ανεξέλεγκτη κοιλιοκάκη που είναι πέντε φορές πιο διαδεδομένη σε γυναίκες που εμφανίζουν ανεξήγητη υπογονιμότητα ή επαναλαμβανόμενες αποβολές στο γενικό πληθυσμό, ανεπάρκεια βιταμίνης D, ενεργές αυτοάνοσες καταστάσεις και υποκλινικό υποθυρεοειδισμό φαίνεται επίσης να σχετίζονται με μειωμένη πιθανότητα σύλληψης. Ο κακός διαβητικός έλεγχος ($HbA1c \geq 7\%$) συσχετίστηκε σημαντικά με μειωμένη κινητικότητα του σπέρματος (μειωμένη προοδευτική κινητικότητα) και μη φυσιολογική μορφολογία του σπέρματος. Το μεταβολικό σύνδρομο είναι μια σύνθετη διαταραχή που αποτελείται από πολλαπλούς αλληλένδετους παράγοντες όπως η αντίσταση στην ινσουλίνη, η παχυσαρκία, η δυσλιπιδαιμία, η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, η αθηροσκληρωτική νόσος και η φλεγμονή χαμηλού βαθμού. Τελικά, αυτό μπορεί να οδηγήσει σε χαμηλό αριθμό σπερματοζωαρίων, μειωμένη κινητικότητα και ανωμαλία της μορφολογίας του

σπέρματος. Είναι γνωστό ότι η υπέρταση μπορεί να προκαλέσει στυτική δυσλειτουργία, είτε άμεσα είτε ως παρενέργεια της φαρμακευτικής αγωγής. Η παρουσία θυρεοειδικών αντισωμάτων σε μια γυναίκα με φυσιολογική λειτουργία του θυρεοειδούς πιστεύεται ότι σχετίζεται με δυσκολία σύλληψης, υποτροπιάζουσα αποτυχία εμφύτευσης εμβρύων και πρόωμη απώλεια εγκυμοσύνης, πιθανώς λόγω μη αναγνωρισμένης ανεπάρκειας θυρεοειδικών ορμονών ή αναυτοάνοσης αιτίας. Τα αυτοάνοσα νοσήματα μπορεί να επηρεάσουν την αναπαραγωγική ζωή και τη γονιμότητα και των δύο φύλων. Η χρόνια νεφρική ανεπάρκεια είναι επίσης γνωστό ότι επηρεάζει επιζήμια τη γονιμότητα (Hart, 2016; Vissenberg et al., 2015).

Επιπρόσθετα, είναι καλά τεκμηριωμένο ότι ο περιορισμός των θερμίδων και η υπερβολική άσκηση οδηγούν σε μείωση της συχνότητας της ωορρηξίας, κακή ανάπτυξη του ενδομητρίου και αμηνόρροια. Υπογονιμότητα μπορεί να παρατηρηθεί ακόμη και σε χαμηλά επίπεδα δραστηριότητας που προκαλούν ανωμαλίες της έκκρισης γοναδοτροπινών και διαταραχές ωορρηξίας χωρίς να προκαλούν αμηνόρροια (Hart, 2016). Υπάρχουν επίσης στοιχεία ότι η άσκηση επηρεάζει την ποιότητα του σπέρματος. Η έντονη προπόνηση μειώνει τη συγκέντρωση σπέρματος, το ποσοστό των κινητικών σπερματοζωαρίων και το ποσοστό των μορφολογικά φυσιολογικών σπερματοζωαρίων. Επιπλέον, ορισμένοι άνδρες που ασκούνται στον αθλητισμό μπορεί να λάβουν αναβολικά στεροειδή που αναστέλλουν τον άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-γοναδικής μοίρας και οδηγούν σε υπογοναδοτροπικό υπογοναδισμό, με αποτέλεσμα τη μερική ή πλήρη αναστολή της σπερματογένεσης (Józkow & Rossato, 2017).

Ακόμη μια αιτία είναι το στρες. Ο Gaskin και οι συνεργάτες του (2015) απέδειξαν, σε έναν πληθυσμό νοσηλευτών, ότι η εργασία για πάνω από 40 ώρες/εβδομάδα σχετίζεται με αυξημένο χρόνο σύλληψης, και μειωμένη γονιμότητα. Το ψυχικό στρες στους άνδρες επηρεάζει την ποιότητα του σπέρματος. Πράγματι, η σοβαρή κατάθλιψη φαίνεται να σχετίζεται με μειωμένα επίπεδα τεστοστερόνης, επηρεάζοντας έτσι τις παρακρινικές αλληλεπιδράσεις των όρχεων και τη σπερματογένεση (Józkow & Mędraś, 2012).

Ταυτόχρονα, το 13% των ανδρών και το 21% των γυναικών στον κόσμο ταξινομούνται ως παχύσαρκοι σύμφωνα με τον δείκτη μάζας σώματος. Οι γυναίκες

που είναι υπέρβαρες έχουν λιγότερες πιθανότητες να έχουν ωορρηξία και να συλλάβουν αυθόρμητα ακόμη και μετά από υποβοηθούμενη αναπαραγωγή. Κατά τη σύλληψη, έχουν επίσης αυξημένο κίνδυνο αποβολής και έχουν προδιάθεση για δυσμενή έκβαση της εγκυμοσύνης. Η παχυσαρκία μπορεί να επηρεάσει αρνητικά την ανδρική αναπαραγωγή από ενδοκρινικούς, γενετικούς και σεξουαλικούς μηχανισμούς (Vander Borcht & Wyns, 2018).

Το κάπνισμα έχει μια γνωστή επίδραση στη γονιμότητα τόσο στους άνδρες όσο και στις γυναίκες. Για μια καπνίστρια, κάθε στάδιο της αναπαραγωγικής λειτουργίας, η ωοθυλακιογένεση, η στεροειδογένεση, η μεταφορά εμβρύων, η ενδομήτρια δεκτικότητα, η αγγειογένεση του ενδομητρίου, η ροή αίματος της μήτρας και το μυομήτριο της μήτρας είναι μειωμένα, καθώς ο καπνός περιέχει βαρέα μέταλλα, πολυκυκλικούς υδρογονάνθρακες, και νιτροζαμίνες. Στους άνδρες, το κάπνισμα επηρεάζει αρνητικά την παραγωγή, την κινητικότητα και τη μορφολογία του σπέρματος και σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο βλάβης του DNA (Künzle et al., 2003).

Όσον αφορά την κατανάλωση μαριχουάνας, στις γυναίκες, έχει παρατηρηθεί διαταραγμένος έμμηνος κύκλος, μειωμένος αριθμός ωαρίων που συλλέγονται κατά τη διάρκεια της εξωσωματικής γονιμοποίησης και υψηλότερος κίνδυνος προωρότητας. Στους άνδρες, η κατανάλωση κάνναβης πολλές φορές την εβδομάδα για 5 χρόνια προκαλεί μείωση του εκσπερματιζόμενου όγκου, του αριθμού των σπερματοζωαρίων καθώς και αλλαγές στη μορφολογία και την κινητικότητα με την υπερδραστηριότητα του σπέρματος και τη μείωση της ικανότητας γονιμοποίησής τους (Wang, Dey & Maccarrone, 2006).

Ενώ το αλκοόλ είναι γνωστό τερατογόνο και θα πρέπει να αποφεύγεται κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, η επίδρασή του στη γονιμότητα είναι λιγότερο σαφής. Οι πιθανοί μηχανισμοί μέσω των οποίων το αλκοόλ μπορεί να επηρεάσει τη γονιμότητα περιλαμβάνουν μια σχετιζόμενη με το αλκοόλ αύξηση των οιστρογόνων που οδηγεί σε μειωμένη έκκριση ωοθυλακιοτρόπου ορμόνης και διαταραχή της ωορρηξίας. Οι περισσότερες μελέτες που περιελάμβαναν το αλκοόλ ως σημείο έρευνας απέτυχαν να δείξουν επίδραση στον αριθμό των σπερματοζωαρίων, τουλάχιστον μεταξύ εκείνων με μέτρια κατανάλωση αλκοόλ. Αντίθετα, σε χρόνιους καταναλωτές αλκοόλ,

υπάρχουν καλές ενδείξεις για εξασθένηση της σπερματογένεσης και μείωση του αριθμού των σπερματοζωαρίων και των επιπέδων τεστοστερόνης (Sharpe, 2010).

Συνοπτικά, αυτοί οι παράγοντες αυξάνουν τον κίνδυνο υπογονιμότητας και στα δυο φύλα:

- Ηλικία (άνω των 35 ετών για τις γυναίκες ή άνω των 40 ετών για τους άνδρες)
- Διαβήτης
- Διατροφικές διαταραχές, συμπεριλαμβανομένης της νευρικής ανορεξίας και της βουλιμίας
- Υπερβολική χρήση αλκοόλ
- Έκθεση σε περιβαλλοντικές τοξίνες, όπως μόλυβδος και φυτοφάρμακα
- Υπερβολική άσκηση
- Ακτινοθεραπεία ή άλλες θεραπείες για τον καρκίνο
- Σεξουαλικά μεταδιδόμενα νοσήματα
- Χρόνιες ασθένειες
- Κάπνισμα
- Στρες
- Κατάχρηση ουσιών

1.3.1 Γυναικεία

Το πρόβλημα με την καθυστερημένη τεκνοποίηση είναι ότι η μείωση της γονιμότητας αρχίζει ήδη περίπου στην ηλικία των 25-30 ετών. Επιπλέον, η μέση ηλικία κατά την τελευταία γέννηση για τις γυναίκες είναι 40-41 έτη στους περισσότερους πληθυσμούς φυσικής γονιμότητας. Αυτό υποδηλώνει ότι υπάρχει ένα αρκετά καθολικό πρότυπο μείωσης της γονιμότητας που σχετίζεται με την ηλικία. Οι Eijkemans και οι συνεργάτες του (2014) διαπίστωσαν ότι η σχετιζόμενη με την ηλικία απώλεια

γονιμότητας αυξάνεται αργά από 4,5% στην ηλικία των 25 ετών, 7% στην ηλικία των 30 ετών, 12% στην ηλικία 35 ετών και 20% σε ηλικία 38 ετών. Στη συνέχεια, αυξάνεται γρήγορα σε περίπου 50% στην ηλικία των 41 ετών, σχεδόν στο 90% στην ηλικία των 45 ετών και πλησιάζει το 100% στην ηλικία των 50 ετών. Η κυρίαρχη έννοια της μείωσης της γονιμότητας υποθέτει ότι η εξαρτώμενη από την ηλικία απώλεια γονιμότητας καθορίζεται από τη συνεχή εξάντληση των ωοκυττάρων που αποθηκεύονται και στις δύο ωοθήκες κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ζωής, οδηγώντας πρώτα σε μειωμένη γονιμότητα και στη συνέχεια στην εκπνοή της μια δεκαετία αργότερα κατά την έναρξη της εμμηνόπαυσης. Επιπλέον, είναι καλά τεκμηριωμένο ότι η ποιότητα των ωαρίων επιδεινώνεται επίσης με την προχωρημένη αναπαραγωγική ηλικία, εκτός από την πρόωρη συγκέντρωση ωοθυλακίων, τις αυξανόμενες διαταραχές ωορρηξίας, τη μειωμένη συχνότητα ωορρηξίας και την εξασθενημένη ωχρινική φάση, όλα οδηγώντας σε μειωμένα ποσοστά σύλληψης. Επιπλέον, πολλές γυναίκες πιστεύουν λανθασμένα ότι η εξωσωματική γονιμοποίηση μπορεί να αντιμετωπίσει τη μείωση της γονιμότητας που σχετίζεται με την προχωρημένη ηλικία (Schmidt, 2010).

Η πρόωρη ωοθηκική ανεπάρκεια εμφανίζεται σε περίπου 1% των γυναικών. Ορίζεται ως η διακοπή των εμμηνορροϊκών κύκλων κάτω των 40 ετών παρουσία αυξημένης FSH ορού που μετράται σε δύο διαφορετικές περιπτώσεις. Οι αιτίες μπορεί να είναι γενετικές, περιβαλλοντικές, μολυσματικές (π.χ. μετά από παρωτίτιδα), που σχετίζονται με αυτοάνοσες καταστάσεις, μεταβολικές (λόγω βιοχημικής βλάβης παρουσία γαλακτοζαιμίας) και επακόλουθη θεραπεία ή χειρουργική επέμβαση για τον καρκίνο. Ωστόσο, στην πλειονότητα των περιπτώσεων, η προέλευση παραμένει απροσδιόριστη. Πιθανώς η πιο κοινή γενετική αιτία είναι το σύνδρομο Turner. Μια άλλη κοινή γενετική αιτία οφείλεται στην εύθραυστη προμετάλλαξη της νοητικής καθυστέρησης X. Ενώ η πλήρης μετάλλαξη (> 200 επαναλήψεις CGG) προκαλεί νοητική υστέρηση και αυτισμό, η παρουσία 55 έως 200 τριπλών επαναλήψεων οδηγεί σε πρόωρη ωοθηκική ανεπάρκεια (Hart, 2016). Η πρόωρη ωοθηκική ανεπάρκεια χαρακτηρίζεται από μείωση του αριθμού των ανθρακικών ωοθυλακίων. Η μέτρηση της κυκλοφορούσας αντι-Mullerian ορμόνης (AMH) φαίνεται να αντικατοπτρίζει τον αριθμό των ανθρακικών και προαντρικών ωοθυλακίων που υπάρχουν στις ωοθήκες και απελευθερώνεται από τα κοκκιώδη κύτταρα. Η συγκέντρωσή της στον ορό είναι

επομένως ανάλογη με τον αριθμό των αναπτυσσόμενων ωοθυλακίων στις ωοθήκες, έτσι ώστε η AMH να θεωρείται ως δείκτης για τη διαδικασία γήρανσης των ωοθηκών. Ωστόσο, η μεταβλητότητα των μετρήσεων AMH μεταξύ των ατόμων είναι υψηλή, κυρίως λόγω της πολύ υψηλής μεταβλητότητας στον αριθμό των ωοθυλακίων του άντρου σε ομάδες ατόμων παρόμοιας ηλικίας (Dewailly et al., 2014).

Το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών (PCOS), μια ετερογενής πάθηση, είναι η πιο διαδεδομένη ενδοκρινική διαταραχή στις γυναίκες, που επηρεάζει το 5-10% του γυναικείου πληθυσμού. Το PCOS αποτελείται από δύο από τα ακόλουθα τρία κριτήρια, δηλαδή τη σπάνια απουσία ωορρηξίας (ολιγοσπανιομηνόρροια), μια μορφολογική περιγραφή των ωοθηκών με υπερηχογραφική εκτίμηση και υπερανδρογονισμό. Γυναίκες με PCOS έχουν επίσης σημαντικά αυξημένα επίπεδα AMH λόγω τόσο του αυξημένου αριθμού των μικρών ωοθυλακίων του άντρου όσο και των εγγενών χαρακτηριστικών των κοκκιωδών κυττάρων τους, τα οποία μπορεί να συμβάλλουν στην ανωορρηξία. Η παχυσαρκία έχει συσχετιστεί με επιδείνωση της μεταβολικής και ωορρηκτικής δυσλειτουργίας που σχετίζεται με το PCOS και η απώλεια βάρους βρέθηκε ότι αποκαθιστά την ωορρηξία και μειώνει τον υπερανδρογονισμό. Επιπλέον, η φυλετική/εθνοτική διακύμανση στους φαινοτύπους υποδηλώνει περαιτέρω ότι ο τρόπος ζωής και οι πολιτισμικοί παράγοντες είναι πιθανό να παίζουν ρόλο στις μεταβολικές συνέπειες του PCOS. Υπάρχουν επίσης ορισμένες ενδείξεις ότι η χαμηλή κοινωνικοοικονομική κατάσταση συνδέεται στενότερα με τους φαινοτύπους PCOS που χαρακτηρίζονται από μεταβολική δυσλειτουργία και ότι η συσχέτιση κοινωνικοοικονομικής κατάστασης-PCOS είναι πιο έντονη στις παχύσαρκες γυναίκες (Vander Borgh & Wyns, 2018).

Επιπλέον, η ενδομητρίωση είναι μια παθολογική φλεγμονώδης διαδικασία της πύελου που σχετίζεται με τη στειρότητα. Οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στη σχετιζόμενη με την ενδομητρίωση υπογονιμότητα ποικίλλουν από ανατομικές παραμορφώσεις λόγω συμφύσεων και ίνωσης σε ενδοκρινικές ανωμαλίες και ανοσολογικές διαταραχές. Όπως αποδεικνύεται από τα ποσοστά επιτυχίας της εξωσωματικής γονιμοποίησης, το δυναμικό εμβρυϊκής εμφύτευσης μειώνεται παρουσία ενδομητρίωσης. Ο πραγματικός επιπολασμός της ενδομητρίωσης σε γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας παραμένει αβέβαιος. Ο εκτιμώμενος συνολικός επιπολασμός των μελετών που βασίζονται στον πληθυσμό της ενδομητρίωσης κυμαίνεται από 0,8% έως 6%. Ωστόσο, στις

υπογόνιμες γυναίκες ο επιπολασμός φαίνεται να είναι σημαντικά υψηλότερος, κυμαινόμενος από 20% έως 50%, αλλά με σημαντικές διακυμάνσεις σε χρονικές περιόδους και με την ηλικία των ασθενών (Tanbo & Fedoresak, 2017).

Παράλληλα, τα λειομύματα είναι οι συνηθέστεροι καλοήθεις όγκοι στη γυναικεία αναπαραγωγική οδό. Παρόλο που ο ρόλος τους στη μη γονιμότητα είναι ακόμα αμφίβολος, τα μέχρι σήμερα στοιχεία δείχνουν ότι η ανατομική εντόπιση μπορεί να σχετίζεται με αναπαραγωγικά αποτελέσματα. Έχουν αναφερθεί αρκετοί πιθανοί μηχανισμοί σχετικά με τον τρόπο με τον οποίο τα λειομύματα μπορεί να επηρεάσουν τη γονιμότητα, όπως η ανατομική παραμόρφωση της ενδομήτριας κοιλότητας, η μη φυσιολογική συσταλτικότητα της μήτρας, η μειωμένη παροχή αίματος στο ενδομήτριο και η μεταβολή της ενδομήτριας δεκτικότητας. Τα ινομύματα της μήτρας είναι πιο διαδεδομένα στις έγχρωμες γυναίκες (Siristatidis et al., 2016).

Μειωμένη πιθανότητα εμβρυϊκής εμφύτευσης και πρόωμη απώλεια εγκυμοσύνης αναφέρθηκαν και οι δύο παρουσία ενδομητριακών πολυπόδων. Έχουν συσχετιστεί με μειωμένες συγκεντρώσεις μέσης εκκρίσεως της IGFBP-1, της TNF α και της οστεοποντίνης, δείκτες εμφύτευσης, οι οποίοι αποδείχθηκαν ότι αντιστρέφονται μετά από χειρουργική πολυπεκτομή (Ben-Nagi et al., 2009).

Συνοπτικά, αυτοί οι παράγοντες μπορούν να συμβάλουν στη γυναικεία υπογονιμότητα (Hart, 2016):

- Μη φυσιολογική εμμηνόρροια
- Αποφραγμένες σάλπιγγες
- Προηγούμενη έκτοπη εγκυμοσύνη
- Φλεγμονώδης νόσος της πυέλου
- Διαταραχές της υπόφυσης, όπως το σύνδρομο Cushing
- Σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών, κύστες ωοθηκών και πρωτοπαθής ωοθηκική ανεπάρκεια

- Προβλήματα της μήτρας, συμπεριλαμβανομένης της ενδομητρίωσης, των ινομυωμάτων της μήτρας και των πολύποδων της μήτρας

1.3.2 Ανδρική

Η δυσλειτουργία των όρχεων είναι η πιο συχνή αιτία διαταραγμένης σπερματογένεσης. Η δυσλειτουργία των όρχεων μπορεί περαιτέρω να υποδιαιρεθεί σε συγγενή, επίκτητη ή ιδιοπαθή ορχική ανεπάρκεια. Η συγγενής ανεπάρκεια μπορεί να εκδηλωθεί ως ανορχία, δυσγένεση των όρχεων και κρυσορχία. Οι γενετικές ανωμαλίες μπορούν επίσης να προκαλέσουν συγγενή ανεπάρκεια. Ορισμένες μελέτες έχουν αναφέρει ότι οι λευκοί άνδρες έχουν σημαντικά υψηλότερο κίνδυνο κρυσορχισμού από τους μαύρους. Οι δύο πιο συχνές γενετικές ανωμαλίες είναι το σύνδρομο Klinefelter (47 XXY) και οι μικροδιαγραφές του χρωμοσώματος Y (Jungwirth et al., 2012).

Ο επιπολασμός του συνδρόμου Klinefelter είναι περίπου 1 στους 1000 έως 1 στους 500 άνδρες. Οι ενήλικες ασθενείς με Klinefelter χαρακτηρίζονται από υπεργοναδοτροπικό υπογοναδισμό όπως αποδεικνύεται από χαμηλά έως χαμηλά φυσιολογικά επίπεδα τεστοστερόνης, υψηλά επίπεδα FSH και LH και μη ανιχνεύσιμα επίπεδα αναστολίνης Β ορού στους περισσότερους από τους ασθενείς. Τα άτομα με Klinefelter περιγράφονται παραδοσιακά ως υπογόνιμα λόγω της πλήρους απουσίας γεννητικών κυττάρων. Αν και η ανάλυση σπέρματος αποκαλύπτει συχνότερα αζωοσπερμία, ορισμένοι άνδρες μπορεί να έχουν μονές υπολειμματικές εστίες με σπερματογένεση. Πιστεύεται ότι ορισμένα σπερματογονίδια είναι ικανά να ολοκληρώσουν τη σπερματογενετική διαδικασία που οδηγεί στο σχηματισμό ώριμων σπερματοζωαρίων. Οι υποκείμενοι μηχανισμοί του εκφυλισμού των όρχεων είναι ελάχιστα κατανοητοί. Έχουν περιγραφεί οι διαφορετικές υποθέσεις σχετικά με την ανεπάρκεια των κυττάρων Leydig, το εξασθενημένο σωματικό περιβάλλον των όρχεων, τη δυσλειτουργική επικοινωνία μεταξύ σωματικών και γεννητικών κυττάρων, την ατελή αδρανοποίηση του χρωμοσώματος X καθώς και την διαταραγμένη αποπτωτική δραστηριότητα των κυττάρων Leydig και των κυττάρων

Sertoli. Αυξημένη έκφραση των γονιδίων X στα χρωμόσωμα που η απενεργοποίηση διαφυγής μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο (Akslaede et al., 2006).

Μικροδιαγραφές στην περιοχή AZF του χρωμοσώματος Y έχουν συσχετιστεί με αλλαγμένες παραμέτρους σπέρματος και ιστολογικά χαρακτηριστικά των όρχεων που κυμαίνονται από το σύνδρομο μόνο κυττάρων Sertoli (SCOS) έως την υποσπερματογένεση. Ενώ η περιοχή που καθορίζει το αρσενικό φύλο (SRY) βρίσκεται στο κοντό βραχίονα του χρωμοσώματος Y (Yp11), σημαντικά γονίδια που εμπλέκονται στη σπερματογένεση βρίσκονται στο εγγύς τμήμα του μακριού του βραχίονα (Yq11) που αναγνωρίζεται ως ο παράγοντας αζωοσπερμίας (AZF), περιοχή η οποία χωρίζεται στις υποπεριοχές AZFa, AZFb και AZFc. Μικροδιαγραφές χρωμοσώματος Y αναφέρονται στο 5-10% των υπογόνιμων

ανδρών. Η πιο κοινή μικροδιαγραφή εμφανίζεται στην υποπεριοχή AZFc και συνοδεύεται από διαγραφή γονιδίου DAZ και μέτρια έως σοβαρή ολιγοζωοσπερμία, ενώ οι μικροδιαγραφές στις υποπεριοχές AZFa και AZFb έχουν συσχετιστεί με αζωοσπερμία (Raicu et al., 2003; Asadi et al., 2017).

Η επίκτητη ανεπάρκεια των όρχεων μπορεί να προκύψει από τραύμα, δοκιμασία, ορχίτιδα, εξωγενείς παράγοντες (π.χ. φάρμακα), ενδογενείς παράγοντες (π.χ. συστηματικές ασθένειες, κισσοκήλη) ή χειρουργική επέμβαση που μπορεί να βλάψει την αγγειακή ανατομία των όρχεων. Η κισσοκήλη είναι παρούσα στο 11,7% των ανδρών με φυσιολογική ανάλυση σπέρματος και στο 25,4% των ανδρών με μη φυσιολογικό σπέρμα (Jungwirth et al., 2012). Ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο η κισσοκήλη μπορεί να προκαλέσει υπογονιμότητα είναι ακόμη άγνωστος. Ο ρινικός παράγοντας πιστεύεται ότι είναι υπεύθυνος για τις αρνητικές επιδράσεις στους όρχεις. Σε αυτό το πολύπλοκο παθοφυσιολογικό δίκτυο, το οξειδωτικό στρες φαίνεται να έχει κεντρικό ρόλο. Πράγματι, μπορεί να βλάψει τα γεννητικά κύτταρα άμεσα ή έμμεσα επηρεάζοντας τα μη σπερματογόνα κύτταρα και το βασικό έλασμα των σπερματοζωαρίων με αποτέλεσμα την πρόκληση απόπτωσης. Το αντιδραστικό είδος οξυγόνου και η μετατόπιση της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας οδηγεί σε οξείδωση των λιπαρών οξέων στις μεμβράνες των σπερματοζωαρίων προκαλώντας αλλαγές στη μορφολογία, την κινητικότητα και τις ικανότητες γονιμοποίησης του σπέρματος. Άλλοι πιθανοί παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί που εμπλέκονται στην

ανδρική υπογονιμότητα που προκαλείται από κισσοκήλη περιλαμβάνουν υπερθερμία του οσχέου, υποξία, παλινδρόμηση μεταβολιτών των νεφρών και των επινεφριδίων, ορμονικές ανισορροπίες και σχηματισμό αντισπερματικών αντισωμάτων (Jensen et al., 2017).

Συγγενής αμφοτερόπλευρη απουσία σπερματικών αγγείων (CBAVD) εντοπίζεται σε 1 στους 1600 άνδρες και στους περισσότερους άνδρες με κυστική ίνωση. Το σύνδρομο Young, που αναφέρεται επίσης ως σύνδρομο ιγμορίτιδας-στειρότητας, είναι ένας σπάνιος συνδυασμός συμπτωμάτων όπως βρογχεκτασίες, ρινοκολπίτιδα και αζωοσπερμία λόγω λειτουργικής απόφραξης της μεταφοράς του σπέρματος προς τα κάτω από την γεννητική οδό. Η απόφραξη του εκσπερματικού πόρου βρίσκεται σε 1-3% των περιπτώσεων ανεπάρκεια μετά τους όρχεις (Vander Borgh & Wyns, 2018). Αυτές οι αποφράξεις μπορούν να ταξινομηθούν ως κυστικές ή μεταφλεγμονώδεις. Η μεταφλεγμονώδης απόφραξη του πόρου της εκσπερμάτισης είναι συνήθως δευτερογενής στην ουρηθροπροστατίτιδα. Συγγενείς ή επίκτητες πλήρεις αποφράξεις των αγωγών εκσπερμάτωσης ή των σπερματοδόχων κυστιδίων συνδέονται συνήθως με χαμηλό όγκο σπέρματος, μειωμένη ή απουσία σπερματικής φρουκτόζης και όξινο pH του σπερματικού υγρού (Jungwirth et al., 2012).

Συνοπτικά, αυτοί οι παράγοντες μπορούν να προκαλέσουν ανδρική υπογονιμότητα (Okonofua et al., 2022):

- Διευρυμένες φλέβες (κισσοκήλη) στο όσχεο
- Υψηλή έκθεση σε θερμότητα στους όρχεις από στενά ρούχα ή συχνή χρήση υδρομασάζ και σάουνας
- Τραυματισμός στο όσχεο ή στους όρχεις
- Χαμηλός αριθμός σπερματοζωαρίων ή χαμηλή τεστοστερόνη (υπογοναδισμός)
- Χρήση αναβολικών στεροειδών
- Πρόωρη εκσπερμάτωση ή ανάδρομη εκσπερμάτωση (το σπέρμα ρέει πίσω στην ουροδόχο κύστη)
- Κρυψορχία

1.4 Εργαστηριακή διερεύνηση και κλινική εξέταση

1.4.1 Γυναίκες

Η διάγνωση της υπογονιμότητας ξεκινά με το ιατρικό ιστορικό και τη φυσική εξέταση. Ο πάροχος υγειονομικής περίθαλψης μπορεί να συνταγογραφήσει εξετάσεις, συμπεριλαμβανομένων των εξής (Walker & Tobler, 2022):

- Εργαστηριακές εξετάσεις
 - Έλεγχος ορμονών, για τη μέτρηση των επιπέδων των γυναικείων ορμονών σε συγκεκριμένες χρονικές στιγμές κατά τη διάρκεια ενός εμμηνορροϊκού κύκλου.
 - Μέτρηση της FSH και των οιστρογόνων της ημέρας 2 ή 3, για την αξιολόγηση του αποθέματος των ωοθηκών.
 - Μετρήσεις της λειτουργίας του θυρεοειδούς (ένα επίπεδο θυρεοειδοτρόπου ορμόνης μεταξύ 1 και 2 θεωρείται το βέλτιστο για σύλληψη).
 - Μέτρηση της προγεστερόνης στο δεύτερο μισό του κύκλου για επιβεβαίωση της ωορρηξίας.
 - Ορμόνη Anti-Müllerian για την εκτίμηση του αποθέματος των ωοθηκών.
- Εξέταση και απεικόνιση
 - Μια βιοψία ενδομητρίου, για την επαλήθευση της ωορρηξίας και την επιθεώρηση της επένδυσης της μήτρας.
 - Λαπαροσκόπηση, η οποία επιτρέπει στον πάροχο να επιθεωρήσει τα πυελικά όργανα.
 - Γονιμοσκόπηση, μια σχετικά νέα χειρουργική τεχνική που χρησιμοποιείται για έγκαιρη διάγνωση (και άμεση θεραπεία).

- Τεστ Παπανικολάου, για έλεγχο για σημάδια μόλυνσης.
- Πυελική εξέταση, για την αναζήτηση ανωμαλιών ή λοίμωξης.
- Μια μετασυνεστιακή εξέταση, η οποία γίνεται αμέσως μετά τη σεξουαλική επαφή για να ελέγξει για προβλήματα με το σπέρμα που επιβιώνει στον βλεννογόνο του τραχήλου της μήτρας (δεν χρησιμοποιείται συνήθως τώρα λόγω αναξιπιστίας του τεστ).
- Υστεροσαλιπγογραφία ή ηχοσαλιπγογραφία, για έλεγχο της βατότητας των σαλπίγγων.
- Ηχοϋστερογραφία για έλεγχο ανωμαλιών της μήτρας.

Επίσης, υπάρχουν τεχνικές γενετικού ελέγχου υπό ανάπτυξη για την ανίχνευση οποιασδήποτε μετάλλαξης σε γονίδια που σχετίζονται με τη γυναικεία υπογονιμότητα (Walker & Tobler, 2022).

Η αρχική διάγνωση και θεραπεία της υπογονιμότητας γίνεται συνήθως από μαιευτήρες, γυναικολόγους ή νοσηλευτές. Εάν οι αρχικές θεραπείες είναι ανεπιτυχείς, η παραπομπή γίνεται συνήθως σε γιατρούς που είναι εκπαιδευμένοι ως αναπαραγωγικοί ενδοκρινολόγοι. Οι ενδοκρινολόγοι αναπαραγωγής είναι συνήθως μαιευτήρες/γυναικολόγοι με προηγμένη εκπαίδευση στην αναπαραγωγική ενδοκρινολογία και τη στειρότητα (Hanson et al., 2017).

1.4.2 Άνδρες

Η διάγνωση της υπογονιμότητας ξεκινά με ένα ιατρικό ιστορικό και φυσική εξέταση από γιατρό, βοηθό ιατρού ή νοσηλευτή. Συνήθως απαιτούνται δύο ξεχωριστές αναλύσεις σπέρματος. Ο πάροχος μπορεί να συνταγογραφήσει εξετάσεις αίματος για να αναζητήσει ορμονικές ανισορροπίες, ιατρικές καταστάσεις ή γενετικά ζητήματα. Αναλυτικότερα (Barratt et al., 2017):

- Ανάλυση σπέρματος: Η λήψη δείγματος σπέρματος είναι το πρώτο βήμα στο σπερμοδιάγραμμα. Η βέλτιστη σεξουαλική αποχή για τη λήψη δείγματος

σπέρματος είναι 2-7 ημέρες. Ένα μόνο δείγμα σπέρματος δεν είναι καθοριστικό για τη διάγνωση υπογονιμότητας, επομένως δύο διαφορετικά δείγματα πρέπει να αναλυθούν με μεσοδιάστημα επτά ημερών έως τριών μηνών μεταξύ τους. Μετράται ο όγκος του δείγματος σπέρματος (πρέπει να είναι μεγαλύτερος από 1,5 ml), ο κατά προσέγγιση αριθμός των συνολικών σπερματοζωαρίων, η κινητικότητα του σπέρματος/προς τα εμπρός και το % του σπέρματος με φυσιολογική μορφολογία.

- Εξετάσεις αίματος: Η κοινή ορμονική εξέταση περιλαμβάνει τον προσδιορισμό των επιπέδων FSH και τεστοστερόνης. Ένα δείγμα αίματος μπορεί να αποκαλύψει γενετικά αίτια υπογονιμότητας, π.χ. Σύνδρομο Klinefelter, μικροδιαγραφή χρωμοσώματος Y ή κυστική ίνωση.
- Υπερηχογράφημα: Το υπερηχογράφημα οσχέου είναι χρήσιμο όταν υπάρχει υποψία για ορισμένες ιδιαίτερες ασθένειες. Μπορεί να ανιχνεύσει σημεία δυσγένεσης των όρχεων, η οποία συχνά σχετίζεται με εξασθενημένη σπερματογένεση και με υψηλότερο κίνδυνο καρκίνου των όρχεων. Το υπερηχογράφημα οσχέου μπορεί επίσης να ανιχνεύσει βλάβες στους όρχεις που υποδηλώνουν κακοήθεια. Η μειωμένη αγγείωση των όρχεων είναι χαρακτηριστική της συστροφής των όρχεων, ενώ η υπεραϊμία παρατηρείται συχνά στην επιδιδυμο-ορχίτιδα ή σε ορισμένες κακοήθεις καταστάσεις όπως το λέμφωμα και η λευχαιμία. Το υπερηχογράφημα του οσχέου και του ορθού είναι χρήσιμο για την ανίχνευση μονόπλευρης ή αμφοτερόπλευρης συγγενούς απουσίας του σπερματικού αγγείου, η οποία μπορεί να σχετίζεται με ανωμαλίες ή αγένεση της επιδιδυμίδας, των σπερματικών κυστιδίων ή των νεφρών και υποδεικνύει την ανάγκη για εξαγωγή σπερματοζωαρίων. Το υπερηχογράφημα του οσχέου και του ορθού διαδραματίζει βασικό ρόλο στην αξιολόγηση της αζωοσπερμίας.

Κεφάλαιο 2 - Μέθοδοι Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής

2.1 Πρόκληση ωοθυλακιορρηξίας

Η πρόκληση ωορρηξίας είναι η διέγερση της ωορρηξίας με φαρμακευτική αγωγή. Συνήθως χρησιμοποιείται με την διέγερση της ανάπτυξης των ωοθυλακίων για την αναστροφή της ανωορρηξίας ή της ολιγοωορρηξίας (Lindheim et al., 2018).

Τα κύρια φάρμακα πρόκλησης ωορρηξίας είναι (Weiss et al., 2014):

- Αντιοιστρογόνο, προκαλώντας αναστολή της αρνητικής ανάδρασης των οιστρογόνων στην υπόφυση, με αποτέλεσμα την αύξηση της έκκρισης της ωοθυλακιοτρόπου ορμόνης. Τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται για αυτό το αποτέλεσμα είναι κυρίως η κιτρική κλομιφαίνη και η ταμοξιφαίνη (και τα δύο είναι εκλεκτικοί ρυθμιστές των υποδοχέων οιστρογόνων), καθώς και η λετροζόλη (αναστολέας αρωματάσης).
- Θυλακιοτρόπος ορμόνη, που διεγείρει άμεσα τις ωοθήκες. Σε γυναίκες με ανωορρηξία, μπορεί να είναι μια εναλλακτική λύση μετά από 7 έως 12 απόπειρες κύκλους αντιοιστρογόνων (όπως αποδεικνύεται από την κιτρική κλομιφαίνη), καθώς οι τελευταίοι είναι λιγότερο ακριβοί και πιο εύκολοι στον έλεγχο.

Η κιτρική κλομιφαίνη είναι το φάρμακο που χρησιμοποιείται πιο συχνά για τη θεραπεία της ανωορρηξίας. Είναι ένας εκλεκτικός ρυθμιστής υποδοχέα οιστρογόνου, που επηρεάζει τον άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-γοναδικής μοίρας για να ανταποκρίνεται σαν να υπήρχε έλλειμμα οιστρογόνου στο σώμα, αυξάνοντας στην πραγματικότητα την παραγωγή ωοθυλακιοτρόπου ορμόνης. Είναι σχετικά εύκολο και βολικό στη χρήση. Η κλομιφαίνη φαίνεται να αναστέλλει τους υποδοχείς οιστρογόνων στον υποθάλαμο, αναστέλλοντας έτσι την αρνητική ανάδραση των οιστρογόνων στην παραγωγή ωοθυλακιοτρόπου ορμόνης. Μπορεί επίσης να οδηγήσει σε άμεση διέγερση του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης. Έχει επίσης επίδραση στην ποιότητα της βλέννας του τραχήλου της μήτρας και στον βλεννογόνο της μήτρας, που μπορεί να επηρεάσει τη διείσδυση και την επιβίωση του σπέρματος,

εξ ου και την πρόωμη χορήγησή του κατά τη διάρκεια του εμμηνορροϊκού κύκλου. Η κιτρική κλομιφαίνη είναι ένας πολύ αποτελεσματικός επαγωγέας ωορρηξίας και έχει ποσοστό επιτυχίας 67%. Ωστόσο, έχει ποσοστό επιτυχίας μόνο 37% στην πρόκληση εγκυμοσύνης. Αυτή η διαφορά μπορεί να οφείλεται στην αντι-οιστρογονική δράση που έχει η κιτρική κλομιφαίνη στο ενδομήτριο, στη βλέννα του τραχήλου της μήτρας, στη ροή του αίματος της μήτρας, καθώς και στην προκύπτουσα μείωση της κινητικότητας των σαλίγγων και στην ωρίμανση των ωαρίων (Lindheim et al., 2018).

Η λετροζόλη χρησιμοποιείται για τη διέγερση των ωοθηκών από γιατρούς γονιμότητας από το 2001 επειδή έχει λιγότερες παρενέργειες από την κλομιφαίνη και λιγότερες πιθανότητες πολύδυμης κύησης. Το Συνέδριο της Αμερικανικής Εταιρείας Αναπαραγωγικής Ιατρικής του 2005 δεν βρήκε διαφορά στις συνολικές ανωμαλίες, αλλά βρήκε σημαντικά υψηλότερο ποσοστό κινητικών και καρδιακών ανωμαλιών μεταξύ της ομάδας που έλαβε λετροζόλη σε σύγκριση με τη φυσική σύλληψη (Biljan, Hemmings & Brassard, 2005). Μια μεγαλύτερη μελέτη παρακολούθησης με 911 μωρά συνέκρινε εκείνα που γεννήθηκαν μετά από θεραπεία με λετροζόλη με αυτά που γεννήθηκαν μετά από θεραπεία με κλομιφαίνη. Αυτή η μελέτη δεν βρήκε επίσης σημαντική διαφορά στο ποσοστό των συνολικών ανωμαλιών, αλλά διαπίστωσε ότι οι συγγενείς καρδιακές ανωμαλίες ήταν σημαντικά υψηλότερες στην ομάδα της κλομιφαίνης σε σύγκριση με την ομάδα της λετροζόλης (Tulandi et al., 2006).

Η δοσολογία είναι γενικά 2,5 έως 7,5 mg ημερησίως για 5 ημέρες. Μια υψηλότερη δόση έως 12,5 mg την ημέρα έχει ως αποτέλεσμα αυξημένη ανάπτυξη των ωοθυλακίων και υψηλότερο αριθμό προβλεπόμενων ωορρηξιών, χωρίς επίσημα επίδραση στο πάχος του ενδομητρίου, και λαμβάνεται υπόψη σε όσους δεν ανταποκρίνονται επαρκώς σε χαμηλότερη δόση (Pritts et al., 2011).

Η ταμοξιφαίνη επηρεάζει τους υποδοχείς οιστρογόνων με παρόμοιο τρόπο όπως η κιτρική κλομιφαίνη. Συχνά χρησιμοποιείται για την πρόληψη και τη θεραπεία του καρκίνου του μαστού. Επομένως, μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία ασθενών που έχουν αντίδραση στην κιτρική κλομιφαίνη (Lindheim et al., 2018).

Τα σκευάσματα ωοθυλακιοτρόπου ορμόνης περιλαμβάνουν κυρίως αυτά που προέρχονται από τα ούρα γυναικών στην εμμηνόπαυση, καθώς και ανασυνδυασμένα

σκευάσματα. Τα ανασυνδυνασμένα σκευάσματα είναι πιο αγνά και χορηγούνται πιο εύκολα, αλλά είναι πιο ακριβά. Τα ουροποιητικά σκευάσματα είναι εξίσου αποτελεσματικά και λιγότερο δαπανηρά, αλλά δεν είναι τόσο βολικά στη χορήγηση όσο είναι διαθέσιμα σε φιαλίδια σε σχέση με τις συσκευές τύπου πένας για ένεση (Sharma & Balasundaram, 2022).

Η αντλία ορμόνης απελευθέρωσης γοναδοτροπίνης χρησιμοποιείται για την απελευθέρωση δόσεων με παλμικό τρόπο. Αυτή η ορμόνη συντίθεται από τον υποθάλαμο και προκαλεί την έκκριση ωοθυλακιοτρόπου ορμόνης από την υπόφυση. Η ορμόνη απελευθέρωσης γοναδοτροπίνης πρέπει να χορηγείται με παλμικό τρόπο ώστε να μιμείται την τυχαία έκκριση του υποθαλάμου προκειμένου να διεγείρει την υπόφυση να εκκρίνει ωχρινοτρόπο ορμόνη και ωοθυλακιοτρόπο ορμόνη. Η αντλία ορμόνης απελευθέρωσης γοναδοτροπίνης έχει το μέγεθος ενός κουτιού τσιγάρου και διαθέτει έναν μικρό καθετήρα. Σε αντίθεση με άλλες θεραπείες, η χρήση της αντλίας ορμόνης απελευθέρωσης γοναδοτροπίνης συνήθως δεν οδηγεί σε πολύδυμη κύηση. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο ότι οι γοναδοτροπίνες απουσιάζουν κατά την έναρξη της θεραπείας, και επομένως οι ορμόνες που απελευθερώνονται από την υπόφυση (ωχρινοτρόπος ορμόνη και ορμόνη διέγερσης των ωοθυλακίων) μπορούν ακόμα να συμμετέχουν στον αναδρομικό έλεγχο της έκκρισης γοναδοτροπινών, μιμούμενοι τον φυσικό κύκλο. Αυτή η θεραπεία μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για λιποβαρείς ή/και ανορεξικούς ασθενείς. Έχει επίσης χρησιμοποιηθεί σε ορισμένες περιπτώσεις υπερπρολακτιμηνίας (Messinies, 2005).

Αν και υπάρχουν πολλές πιθανές πρόσθετες διαγνωστικές και επεμβατικές τεχνικές, τα πρωτόκολλα για την πρόκληση ωορρηξίας γενικά αποτελούνται από (Lindheim et al., 2018):

- Καθορισμός της πρώτης ημέρας της τελευταίας εμμηνου ρύσεως, η οποία ονομάζεται ημέρα 1. Σε περίπτωση αμηνόρροιας, μπορεί να προκληθεί περίοδος με λήψη προγεστίνης από το στόμα για 10 ημέρες.
- Καθημερινή χορήγηση του σχήματος πρόκλησης ωορρηξίας, ξεκινώντας από την ημέρα 3, 4 ή 5, και συνήθως λαμβάνεται για 5 ημέρες.
- Σεξουαλική επαφή ή τεχνητή γονιμοποίηση μέχρι τη στιγμή της ωορρηξίας.

Η πρόκληση ωορρηξίας μπορεί να επαναλαμβάνεται κάθε εμμηνορροϊκό κύκλο. Για την κλομιφαίνη, η δόση μπορεί να αυξηθεί κατά 50 mg στους επόμενους κύκλους έως ότου επιτευχθεί η ωορρηξία. Ωστόσο, σε μια δόση 200 mg, περαιτέρω αυξήσεις είναι απίθανο να αυξήσουν τις πιθανότητες εγκυμοσύνης. Δεν συνιστάται από τον κατασκευαστή της κλομιφαίνης να χρησιμοποιείται για περισσότερους από 6 διαδοχικούς κύκλους. Σε γυναίκες με ανωοθυλακιορρηξία, συνιστώνται 7-12 απόπειρες αγωγών ανάδρασης της υπόφυσης (όπως αποδεικνύεται από την κιτρική κλομιφαίνη) πριν από τη μετάβαση σε γοναδοτροπίνες, καθώς οι τελευταίες είναι πιο ακριβές και λιγότερο εύκολο να ελεγχθούν (Sharma & Balasundaram, 2022).

Ο υπέρηχος και οι τακτικοί έλεγχοι ορμονών μετριάζουν τους κινδύνους σε όλη τη διαδικασία. Ωστόσο, εξακολουθούν να υπάρχουν ορισμένοι κίνδυνοι με τη διαδικασία. Το σύνδρομο υπερδιέγερσης των ωοθηκών εμφανίζεται στο 5-10% των περιπτώσεων. Τα συμπτώματα εξαρτώνται από το εάν η περίπτωση είναι ήπια, μέτρια ή σοβαρή και μπορεί να κυμαίνονται από φούσκωμα και ναυτία, έως δύσπνοια, υπεζωκοτική συλλογή και υπερβολική αύξηση βάρους (πάνω από 2 κιλά την ημέρα). Υπάρχει επίσης ο κίνδυνος να παραχθούν περισσότερα από ένα ωάρια, οδηγώντας σε δίδυμα ή τρίδυμα. Οι γυναίκες με σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών μπορεί να διατρέχουν ιδιαίτερο κίνδυνο. Η πολύδυμη κύηση συμβαίνει σε περίπου 15-20% των περιπτώσεων μετά από κύκλους που προκαλούνται με γοναδοτροπίνες, όπως η ανθρώπινη γοναδοτροπίνη της εμμηνόπαυσης και η ωοθυλακιοτρόπος ορμόνη. Οι κίνδυνοι που σχετίζονται με την πολύδυμη εγκυμοσύνη είναι πολύ υψηλότεροι από την μονήρη εγκυμοσύνη. Τα περιστατικά περιγεννητικού θανάτου είναι επτά φορές υψηλότερα στις γεννήσεις τρίδυμων και πέντε φορές υψηλότερα σε γεννήσεις δίδυμων από τους κινδύνους που σχετίζονται με μια μονήρη εγκυμοσύνη (Lindheim et al., 2018).

2.2 Τεχνητή σπερματέγχυση

Η τεχνητή σπερματέγχυση είναι η σκόπιμη εισαγωγή σπέρματος στον τράχηλο ή την κοιλότητα της μήτρας μιας γυναίκας με σκοπό την επίτευξη εγκυμοσύνης μέσω γονιμοποίησης in vivo με άλλα μέσα εκτός της σεξουαλικής επαφής ή της εξωσωματικής γονιμοποίησης. Οι διαθέσιμες τεχνικές περιλαμβάνουν την

ενδοτραχηλική σπερματέγχυση και την ενδομήτρια σπερματέγχυση. Το σπέρμα που χρησιμοποιείται είναι είτε φρέσκο, ωμό ή κατεψυγμένο (Ombelet & Van Robays, 2015).

Η ενδοτραχηλική σπερματέγχυση είναι η μέθοδος τεχνητής γονιμοποίησης που προσομοιώνει περισσότερο τη φυσική εκσπερμάτιση του σπέρματος από το πέος στον κόλπο κατά τη διάρκεια της σεξουαλικής επαφής. Είναι ανώδυνη και είναι η απλούστερη, ευκολότερη και πιο κοινή μέθοδος τεχνητής γονιμοποίησης που περιλαμβάνει την εισαγωγή σπέρματος στον κόλπο στην είσοδο του τραχήλου της μήτρας, συνήθως μέσω σύριγγας χωρίς βελόνα. Μετά τη σπερματέγχυση, το γόνιμο σπέρμα θα κολυμπήσει μέσω του τραχήλου της μήτρας στη μήτρα και από εκεί στις σάλπιγγες με φυσικό τρόπο σαν να είχε εναποτεθεί το σπέρμα στον κόλπο μέσω της σεξουαλικής επαφής. Επομένως, η γυναίκα συνιστάται να ξαπλώνει ακίνητη για περίπου μισή ώρα για να βοηθήσει τη σύλληψη. Μια γονιμοποίηση κατά τη διάρκεια ενός κύκλου είναι συνήθως αρκετή. Πρόσθετες γονιμοποιήσεις κατά τον ίδιο κύκλο μπορεί να μην βελτιώσουν τις πιθανότητες εγκυμοσύνης (Kop et al., 2018).

Η ενδομήτρια σπερματέγχυση περιλαμβάνει την έγχυση σπέρματος απευθείας στη μήτρα με έναν καθετήρα. Η σπερματέγχυση με αυτόν τον τρόπο σημαίνει ότι το σπέρμα δεν χρειάζεται να κολυμπήσει μέσω του τραχήλου της μήτρας ο οποίος είναι επικαλυμμένος με ένα στρώμα βλέννας. Αυτό το στρώμα βλέννας μπορεί να επιβραδύνει τη διέλευση του σπέρματος και μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα πολλά σπερματοζωάρια να αφανιστούν πριν εισέλθουν στη μήτρα. Το σπέρμα του δότη μερικές φορές ελέγχεται για διείσδυση βλέννας, εάν πρόκειται να χρησιμοποιηθεί για σπερματέγχυση ενδοτραχηλική, αλλά το σπέρμα του συντρόφου μπορεί ή δεν μπορεί να περάσει από τον τράχηλο της μήτρας. Σε γενικές γραμμές, η ενδομήτρια σπερματέγχυση θεωρείται συνήθως πιο αποτελεσματική από την ενδοτραχηλική σπερματέγχυση. Είναι σημαντικό να χρησιμοποιείται πλυμένο σπέρμα επειδή το άπλυτο σπέρμα μπορεί να προκαλέσει κράμπες της μήτρας, να αποβάλλει το σπέρμα και να προκαλέσει πόνο, λόγω της περιεκτικότητας σε προσταγλανδίνες. Η ανάπαυση για δεκαπέντε λεπτά μετά από μια ενδομήτρια σπερματέγχυση είναι η βέλτιστη για τη γυναίκα ώστε να αυξήσει το ποσοστό εγκυμοσύνης (Allahbadia, 2017).

Η ενδομήτρια σαλπυγοπεριτοναϊκή σπερματέγχυση περιλαμβάνει την έγχυση πλυμένου σπέρματος τόσο στη μήτρα όσο και στις σάλπιγγες. Στη συνέχεια, ο τράχηλος σφίγγεται για να αποφευχθεί η διαρροή στον κόλπο. Το σπέρμα αναμειγνύεται για να δημιουργηθεί ένας όγκος 10 ml, επαρκής για να γεμίσει την κοιλότητα της μήτρας, να περάσει από το διάμεσο τμήμα των σωλήνων και της αμπούλας, φτάνοντας τελικά στην περιτοναϊκή κοιλότητα όπου θα αναμειγνυόταν με το περιτοναϊκό και ωοθυλακικό υγρό. Η ενδομήτρια σαλπυγοπεριτοναϊκή σπερματέγχυση μπορεί να είναι χρήσιμο σε ανεξήγητη υπογονιμότητα, ήπια ή μέτρια ανδρική υπογονιμότητα και ήπια ή μέτρια ενδομητρίωση. Στη μη σαλπυγγική υπογονιμότητα, η αιμάτωση σπέρματος από σάλπιγγες μπορεί να είναι η προτιμώμενη τεχνική έναντι της ενδομήτριας σπερματέγχυσης (Mamas, 2006).

Τα ποσοστά επιτυχούς εγκυμοσύνης για τεχνητή γονιμοποίηση είναι 10-15% ανά εμμηνορροϊκό κύκλο με χρήση ενδοτραχηλικής σπερματέγχυσης, και 15-20% ανά κύκλο για ενδομήτρια σπερματέγχυση. Στην ενδομήτρια σπερματέγχυση, περίπου 60-70% έχει επιτύχει εγκυμοσύνη μετά από 6 κύκλους. Το ποσοστό εγκυμοσύνης εξαρτάται επίσης από τον συνολικό αριθμό σπερματοζωαρίων ή, πιο συγκεκριμένα, τον συνολικό αριθμό κινητών σπερματοζωαρίων, που χρησιμοποιείται σε έναν κύκλο (Allahbadia, 2017).

2.3 Εξωσωματική γονιμοποίηση

Η εξωσωματική γονιμοποίηση (IVF) είναι μια διαδικασία γονιμοποίησης όπου ένα ωάριο συνδυάζεται με σπέρμα έξω από το σώμα, *in vitro*. Η διαδικασία περιλαμβάνει παρακολούθηση και διέγερση της διαδικασίας ωορρηξίας μιας γυναίκας, απομάκρυνση ενός ωαρίου ή ωαρίων από τις ωοθήκες της γυναίκας και σπέρμα το/τα γονιμοποιεί σε ένα μέσο καλλιέργειας σε εργαστήριο. Αφού το γονιμοποιημένο ωάριο (ζυγώτης) υποβληθεί σε καλλιέργεια εμβρύου για 2-6 ημέρες, εμφυτεύεται στη μήτρα της γυναίκας, με σκοπό την επιτυχή εγκυμοσύνη (Kamath, et al., 2019).

Οι κύριοι πιθανοί παράγοντες που επηρεάζουν τα ποσοστά εγκυμοσύνης (και ζωντανής γέννησης) στην εξωσωματική γονιμοποίηση έχουν προταθεί ότι είναι η ηλικία της μητέρας, η διάρκεια της υπογονιμότητας ή της στειρότητας, το bFSH

(Follicle Stimulating Hormone, Bovine) και ο αριθμός των ωοκυττάρων, όλα που αντανakλούν τη λειτουργία των ωοθηκών. Η βέλτιστη ηλικία της γυναίκας είναι 23-39 χρόνια κατά τη διάρκεια της θεραπείας. Οι βιοδείκτες που επηρεάζουν τις πιθανότητες κύησης της εξωσωματικής γονιμοποίησης περιλαμβάνουν (van Loendersloot, et al., 2010; Zhao, et al., 2012; Broer, et al., 2013):

- Ο αριθμός των ωοθυλακίων, με υψηλότερη μέτρηση που δίνει υψηλότερα ποσοστά επιτυχίας.
- Επίπεδα αντι-Müllerian ορμονών, με υψηλότερα επίπεδα που υποδηλώνουν υψηλότερες πιθανότητες εγκυμοσύνης, καθώς και ζωντανής γέννησης μετά την εξωσωματική γονιμοποίηση, ακόμη και μετά την προσαρμογή για την ηλικία.
- Παράγοντες ποιότητας σπέρματος.
- Επίπεδο κατακερματισμού DNA.
- Οι γυναίκες με γονότυπους ειδικής ωοθήκης FMR1, συμπεριλαμβανομένου του het-norm / low, έχουν μειώσει σημαντικά τις πιθανότητες κύησης στην εξωσωματική γονιμοποίηση.
- Η αύξηση της προγεστερόνης την ημέρα της επαγωγής της τελικής ωρίμανσης σχετίζεται με χαμηλότερα ποσοστά εγκυμοσύνης σε κύκλους εξωσωματικής γονιμοποίησης σε γυναίκες που υποβάλλονται σε διέγερση των ωοθηκών χρησιμοποιώντας ανάλογα GnRH και γοναδοτροπίνες.
- Ένα πάχος ενδομητρίου μικρότερο από 7 mm μειώνει το ποσοστό εγκυμοσύνης κατά μια αναλογία πιθανότητας περίπου 0,4 σε σύγκριση με ένα πάχος άνω των 7 mm.

Θεωρητικά, η εξωσωματική γονιμοποίηση θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί συλλέγοντας το περιεχόμενο από σάλπιγγες ή μήτρα μιας γυναίκας μετά από φυσική ωορρηξία, αναμιγνύοντάς το με σπέρμα και επανατοποθετώντας το γονιμοποιημένο ωάριο στη μήτρα. Ωστόσο, χωρίς πρόσθετες τεχνικές, οι πιθανότητες εγκυμοσύνης θα ήταν εξαιρετικά μικρές. Οι επιπρόσθετες τεχνικές που χρησιμοποιούνται συνήθως στην εξωσωματική γονιμοποίηση περιλαμβάνουν υπερδιέγερση των ωοθηκών για τη

δημιουργία πολλαπλών ωαρίων, υπερηχογραφική καθοδήγηση διακολπικής ωοθήκης, συν-επώαση ωαρίων και σπέρματος, καθώς και καλλιέργεια και επιλογή των προκύπτοντων εμβρύων πριν από τη μεταφορά εμβρύου σε μήτρα (Nagy, et al., 2019).

Η υπερδιέγερση των ωοθηκών είναι η διέγερση για την πρόκληση ανάπτυξης πολλαπλών θυλακίων των ωοθηκών. Θα πρέπει να ξεκινά με πρόβλεψη απόκρισης π.χ. ηλικία, μέτρηση θυλακίων και επίπεδα αντι-Müllerian ορμόνης. Η προκύπτουσα πρόβλεψη π.χ. κακή ή υπερ-απόκριση στην υπερδιέγερση των ωοθηκών καθορίζει το πρωτόκολλο και τη δοσολογία για υπερδιέγερση των ωοθηκών. Η υπερδιέγερση των ωοθηκών περιλαμβάνει επίσης την καταστολή της αυθόρμητης ωορρηξίας, για την οποία διατίθενται δύο κύριες μέθοδοι: Χρησιμοποιώντας ένα (συνήθως μεγαλύτερο) πρωτόκολλο αγωνιστή GnRH ή ένα (συνήθως μικρότερο) πρωτόκολλο ανταγωνιστή GnRH. Σε ένα τυπικό πρωτόκολλο αγωνιστή GnRH την ημέρα κατά την οποία ξεκινά η θεραπεία υπερδιέγερσης και η αναμενόμενη ημέρα της μεταγενέστερης ανάκτησης ωαρίων μπορεί να επιλεγεί για να συμμορφώνεται με την προσωπική επιλογή, ενώ σε ένα πρωτόκολλο ανταγωνιστή GnRH πρέπει να προσαρμόζεται στην αυθόρμητη έναρξη της προηγούμενης εμμηνου ρύσεως. Από την άλλη πλευρά, το πρωτόκολλο ανταγωνιστή GnRH έχει χαμηλότερο κίνδυνο συνδρόμου υπερδιέγερσης των ωοθηκών (OHSS), το οποίο είναι μια απειλητική για τη ζωή επιπλοκή. Για την υπερδιέγερση των ωοθηκών, ενέσιμες γοναδοτροπίνες χρησιμοποιούνται γενικά υπό στενή παρακολούθηση. Αυτή η παρακολούθηση συχνά ελέγχει το επίπεδο της οιστραδιόλης και, μέσω της γυναικολογικής υπερηχογραφίας, της ανάπτυξης των ωοθυλακίων. Συνήθως θα χρειαστούν περίπου 10 ημέρες ενέσεων (Siristatidis et al., 2013; La Marca & Sunkara, 2014).

Επιπρόσθετα, υπάρχουν πολλές μέθοδοι που ονομάζονται φυσικός κύκλος IVF (Allersma, et al., 2013):

- Η εξωσωματική γονιμοποίηση δεν χρησιμοποιεί φάρμακα για υπερδιέγερση των ωοθηκών, ενώ μπορεί να εξακολουθούν να χρησιμοποιούνται φάρμακα για την καταστολή της ωορρηξίας.

- IVF χρησιμοποιώντας υπερδιέγερση των ωοθηκών, συμπεριλαμβανομένων των γοναδοτροπινών, αλλά με πρωτόκολλο ανταγωνιστή GnRH έτσι ώστε ο κύκλος να ξεκινά από φυσικούς μηχανισμούς.
- Παγωμένη μεταφορά εμβρύων, χρησιμοποιώντας υπερδιέγερση των ωοθηκών, ακολουθούμενη από κρυοσυντήρηση εμβρύου, ακολουθούμενη από μεταφορά εμβρύου σε έναν μεταγενέστερο, φυσικό κύκλο.

Όταν τα ωοθυλάκια έχουν φτάσει σε κάποιο βαθμό ανάπτυξης, πραγματοποιείται επαγωγή της τελικής ωρίμανσης των ωαρίων, γενικά με ένεση ανθρώπινης χοριακής γοναδοτροπίνης (hCG). Η hCG δρα ως ανάλογο της ωχρινοτρόπου ορμόνης και η ωορρηξία θα συνέβαινε μεταξύ 38 και 40 ωρών μετά από μία μόνο ένεση HCG, αλλά η ανάκτηση των ωαρίων πραγματοποιείται σε χρόνο συνήθως μεταξύ 34 και 36 ωρών μετά την ένεση hCG, δηλαδή, λίγο πριν από τη διάρρηξη των θυλάκων. Αυτό προσφέρει τον προγραμματισμό της διαδικασίας ανάκτησης των ωαρίων σε μια στιγμή που τα ωάρια είναι πλήρως ώριμα. Η ένεση HCG ενέχει κίνδυνο συνδρόμου υπερδιέγερσης των ωοθηκών. Η χρήση αγωνιστή GnRH αντί της hCG εξαλείφει το μεγαλύτερο μέρος του κινδύνου συνδρόμου υπερδιέγερσης των ωοθηκών, αλλά με μειωμένο ρυθμό παράδοσης εάν τα έμβρυα μεταφερθούν φρέσκα (Humaidan, et al., 2011).

Ακόμη μια μέθοδος είναι η ανάκτηση ωαρίων (ωοληψία). Τα ωάρια ανακτώνται από την ασθενή με τη χρήση μιας κοιλιακής τεχνικής που ονομάζεται διακολπική ανάκτηση ωαρίων, η οποία περιλαμβάνει βελόνα καθοδηγούμενη από υπερήχους που διαπερνά το κοιλιακό τοίχωμα για να φτάσει στις ωοθήκες. Μέσω αυτής της βελόνας τα θυλάκια μπορούν να αναρροφηθούν και το ωοθυλάκιο υγρό μεταφέρεται σε έναν εμβρυολόγο για να αναγνωρίσει τα ωάρια. Είναι σύνηθες να αφαιρούνται μεταξύ δέκα και τριάντα ωαρίων. Η διαδικασία ανάκτησης διαρκεί συνήθως μεταξύ 20 και 40 λεπτών, ανάλογα με τον αριθμό των ώριμων ωοθυλακίων και συνήθως γίνεται υπό συνειδητή καταστολή ή γενική αναισθησία (Nagy, et al., 2019).

Στην μικρογονιμοποίηση/ενδοωαριακή έγχυση σπερματοζωαρίου (ICSI-Intra Cytoplasmic Sperm Injection), τα αναγνωρισμένα ωάρια απογυμνώνονται από τα περιβάλλοντα κύτταρα και προετοιμάζονται για γονιμοποίηση. Μια επιλογή ωαρίων μπορεί να πραγματοποιηθεί πριν από τη γονιμοποίηση για την επιλογή ωαρίων που

μπορούν να γονιμοποιηθούν, όπως απαιτείται, είναι στη μεταφάση II. Υπάρχουν περιπτώσεις στις οποίες εάν τα ωοκύτταρα βρίσκονται στο στάδιο της μεταφάσης I, μπορούν να συνεχίσουν να καλλιεργούνται έτσι ώστε να υποβληθούν σε οπίσθια ένεση σπέρματος. Εν τω μεταξύ, το σπέρμα προετοιμάζεται για γονιμοποίηση αφαιρώντας ανενεργά κύτταρα και σπέρμα υγρού σε μια διαδικασία που ονομάζεται έκπλυση σπέρματος (Nagy, et al., 2019).

Στην συν-επώαση το σπέρμα και το ωάριο επωάζονται μαζί σε αναλογία περίπου 75.000: 1 σε ένα μέσο καλλιέργειας για να πραγματοποιηθεί η πραγματική γονιμοποίηση. Μια ανασκόπηση το 2013 κατέληξε στο συμπέρασμα ότι η διάρκεια αυτής της συν-επώασης περίπου 1 έως 4 ωρών έχει ως αποτέλεσμα σημαντικά υψηλότερα ποσοστά εγκυμοσύνης από 16 έως 24 ώρες. Στις περισσότερες περιπτώσεις, το ωάριο θα γονιμοποιηθεί κατά τη συν-επώαση. Σε ορισμένες περιπτώσεις, όπως χαμηλός αριθμός σπερματοζωαρίων ή κινητικότητα, ένα μόνο σπέρμα μπορεί να εγχυθεί απευθείας στο ωάριο χρησιμοποιώντας ενδοκυτταροπλασματική ένεση σπέρματος (ICSI). Το γονιμοποιημένο ωάριο μεταφέρεται σε ειδικό μέσο ανάπτυξης και αφήνεται για περίπου 48 ώρες έως ότου το ωάριο αποτελείται από έξι έως οκτώ κύτταρα (Zhang, et al.,2013).

Οι κύριες διάρκειες της καλλιέργειας του εμβρύου είναι μέχρι το στάδιο της διάσπασης (ημέρα δύο έως τέσσερις μετά από συν-επώαση) ή το στάδιο της βλαστοκύστης (ημέρα πέντε ή έξι μετά από συν-επώαση). Η καλλιέργεια εμβρύων έως ότου το στάδιο της βλαστοκύστης παρέχει σημαντική αύξηση του ποσοστού ζώντανών γεννήσεων ανά μεταφορά εμβρύου, αλλά επίσης παρέχει μειωμένο αριθμό εμβρύων που διατίθενται για μεταφορά και κρυοσυντήρηση εμβρύων, έτσι τα αθροιστικά ποσοστά κλινικής εγκυμοσύνης αυξάνονται με τη μεταφορά του σταδίου διάσπασης. Η μεταφορά της δεύτερης ημέρας αντί της τρίτης ημέρας μετά τη γονιμοποίηση δεν έχει διαφορές στο ποσοστό γεννήσεων. Υπάρχουν σημαντικά υψηλότερες πιθανότητες πρόωρου τοκετού (αναλογία πιθανότητας 1:3) και συγγενείς ανωμαλίες (αναλογία πιθανότητας 1:3) μεταξύ των γεννήσεων που έχουν καλλιεργηθεί από έμβρυα μέχρι το στάδιο της βλαστοκύστης σε σύγκριση με το στάδιο διάσπασης (Dar, et al., 2014).

2.4 Παρένθετη μητρότητα

Η παρένθετη μητρότητα είναι μια ρύθμιση, που συχνά υποστηρίζεται από μια νομική συμφωνία, σύμφωνα με την οποία μια γυναίκα συμφωνεί να εγκυμονήσει/γεννήσει για άλλο άτομο ή άτομα, τα οποία θα γίνουν οι γονείς του παιδιού μετά τη γέννηση. Οι άνθρωποι μπορεί να αναζητήσουν παρένθετη μητρότητα όταν η εγκυμοσύνη είναι ιατρικά αδύνατη, όταν οι κίνδυνοι εγκυμοσύνης είναι υψηλοί για την προβλεπόμενη μητέρα ή όταν ένας άγαμος άνδρας ή ένα αρσενικό ζευγάρι επιθυμεί να αποκτήσει παιδί. Στις ρυθμίσεις παρένθετης μητρότητας, μπορεί να εμπλέκεται χρηματική αποζημίωση ή όχι. Η λήψη χρημάτων για τη ρύθμιση είναι γνωστή ως εμπορική παρένθετη μητρότητα. Η νομιμότητα και το κόστος της παρένθετης μητρότητας ποικίλλει σε μεγάλο βαθμό μεταξύ δικαιοδοσιών, με αποτέλεσμα μερικές φορές να δημιουργούνται προβληματικές διεθνείς ή διακρατικές ρυθμίσεις παρένθετης μητρότητας (Bhatia et al., 2009).

Η παρένθετη μητρότητα μπορεί να είναι είτε παραδοσιακή είτε κύησης, τα οποία διαφοροποιούνται από τη γενετική προέλευση του ωαρίου. Η παρένθετη μητρότητα κύησης τείνει να είναι πιο συχνή από την παραδοσιακή παρένθετη μητρότητα και θεωρείται λιγότερο περίπλοκη από νομική άποψη (Van den Akker, 2007).

Μια παραδοσιακή παρένθετη μητρότητα (επίσης γνωστή ως μερική, φυσική ή ευθεία παρένθετη μητρότητα) είναι εκείνη όπου το ωάριο της παρένθετης μητέρας γονιμοποιείται από το σπέρμα του πατέρα ή του δότη. Η γονιμοποίηση του υποκατάστατου μπορεί να γίνει είτε μέσω σεξ (φυσική γονιμοποίηση) είτε με τεχνητή γονιμοποίηση. Η χρήση του σπέρματος ενός δότη έχει ως αποτέλεσμα ένα παιδί που δεν έχει γενετική σχέση με τον/τους επιδιωκόμενο/ους γονέα/είς. Εάν το σπέρμα του προβλεπόμενου πατέρα χρησιμοποιηθεί στη σπερματέγχυση, το προκύπτον παιδί σχετίζεται γενετικά με τον προβλεπόμενο πατέρα (Bhatia et al., 2009).

Η παρένθετη μητρότητα κύησης (επίσης γνωστή ως πλήρης παρένθετη μητρότητα) επιτεύχθηκε για πρώτη φορά τον Απρίλιο του 1986. Πραγματοποιείται όταν ένα έμβρυο που δημιουργήθηκε με τεχνολογία εξωσωματικής γονιμοποίησης εμφυτεύεται σε ένα υποκατάστατο, που μερικές φορές ονομάζεται φορέας κύησης. Η παρένθετη

μητρότητα κύησης έχει διάφορες μορφές και σε κάθε μορφή, το παιδί που προκύπτει είναι γενετικά άσχετο με το παρένθετο (Brinsden, 2003):

- Το έμβρυο δημιουργείται χρησιμοποιώντας το προβλεπόμενο σπέρμα του πατέρα και τα ωάρια της μητέρας.
- Το έμβρυο δημιουργείται χρησιμοποιώντας το προβλεπόμενο σπέρμα του πατέρα και ένα ωάριο δότη.
- Το έμβρυο δημιουργείται χρησιμοποιώντας το προβλεπόμενο ωάριο της μητέρας και το σπέρμα δότη.
- Ένα έμβρυο δότη μεταφέρεται σε ένα παρένθετο. Το προκύπτον παιδί είναι γενετικά άσχετο με τον ή τους επιδιωκόμενους γονείς.

Το έμβρυο που εμφυτεύεται στην παρένθετη μητρότητα κύησης αντιμετωπίζει τους ίδιους κινδύνους με όποιον κάνει εξωσωματική γονιμοποίηση. Οι προεμφυτευτικοί κίνδυνοι του εμβρύου περιλαμβάνουν ακούσιες επιγενετικές επιδράσεις, επίδραση των μέσων στα οποία καλλιεργείται το έμβρυο και ανεπιθύμητες συνέπειες επεμβατικού χειρισμού του εμβρύου. Συχνά, πολλαπλά έμβρυα μεταφέρονται για να αυξηθεί η πιθανότητα εμφύτευσης και εάν συμβούν πολλαπλές κυήσεις, τόσο η παρένθετη όσο και τα έμβρυα αντιμετωπίζουν υψηλότερους κινδύνους επιπλοκών (Simopoulou et al., 2018).

Τα υποκατάστατα κύησης έχουν μικρότερες πιθανότητες να έχουν υπερτασική διαταραχή κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης σε σύγκριση με τις μητέρες έγκυες με δωρεά ωαρίων. Αυτό οφείλεται πιθανώς στο ότι οι φορείς κύησης τείνουν να είναι πιο υγιείς και πιο γόνιμοι από τις γυναίκες που χρησιμοποιούν δωρεά ωαρίων. Οι φορείς κύησης έχουν επίσης χαμηλά ποσοστά προδρομικού πλακούντα (1,1-7,9%) (Söderström-Anttila et al., 2016).

Τα παιδιά που γεννήθηκαν με παρένθετη μητρότητα με μονήρη IVF έχει αποδειχθεί ότι δεν έχουν σωματικές ή ψυχικές ανωμαλίες σε σύγκριση με εκείνα τα παιδιά που γεννήθηκαν μέσω φυσικής σύλληψης. Ωστόσο, τα παιδιά που γεννιούνται με πολύδυμη κύηση σε φορείς κύησης συχνά καταλήγουν σε πρόωρο τοκετό, με αποτέλεσμα σωματικές ή/και ψυχικές ανωμαλίες (Simopoulou et al., 2018).

Μεταξύ των περιπτώσεων παρένθετης μητρότητας κύησης, μεταξύ 19-33% των παρένθετων μητρών κύησης θα μείνουν επιτυχώς έγκυες από εμβρυομεταφορά. Από αυτές τις περιπτώσεις, το 30–70% θα επιτρέψει στους επιδιωκόμενους γονείς να γίνουν γονείς του προκύπτοντος παιδιού. Για παρένθετες κυήσεις όπου γεννιέται μόνο ένα παιδί, το ποσοστό πρόωρων γεννήσεων στην παρένθετη μητρότητα είναι οριακά χαμηλότερο από τα μωρά που γεννήθηκαν με τυπική εξωσωματική γονιμοποίηση (11,5% έναντι 14%). Τα μωρά που γεννήθηκαν από παρένθετη μητρότητα έχουν επίσης παρόμοια μέση ηλικία κύησης με τα βρέφη που γεννήθηκαν μέσω εξωσωματικής γονιμοποίησης και δωρεάς ωαρίων (Bergh et al., 2016; Söderström-Anttila et al., 2016).

Ανθρωπολογικές μελέτες παρένθετων γυναικών έχουν δείξει ότι οι παρένθετες γυναίκες χρησιμοποιούν διάφορες τεχνικές αποστασιοποίησης καθ' όλη τη διάρκεια της παρένθετης εγκυμοσύνης, έτσι ώστε να διασφαλίζεται ότι δεν συνδέονται συναισθηματικά με το μωρό. Αν και τα υποκατάστατα κύησης γενικά αναφέρουν ότι είναι ικανοποιημένα με την εμπειρία τους ως παρένθετα, υπάρχουν περιπτώσεις στις οποίες δεν είναι. Οι ανεκπλήρωτες προσδοκίες συνδέονται με τη δυσαρέσκεια. Κάποιες γυναίκες δεν νιώθουν ένα συγκεκριμένο επίπεδο εγγύτητας με το ζευγάρι και άλλες δεν νιώθουν σεβασμό από το ζευγάρι. Ορισμένα υποκατάστατα κύησης αναφέρουν συναισθηματική δυσφορία κατά τη διαδικασία της παρένθετης μητρότητας. Τα υποκατάστατα κύησης μπορεί να αντιμετωπίσουν επιλόχεια κατάθλιψη (Van den Akker, 2007; Bergh et al., 2016).

Κεφάλαιο 3 - Τεχνικές Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής

3.1 Ενδοσαλπινγική μεταφορά γαμετών

Η ενδοσαλπινγική μεταφορά γαμετών είναι ένα εργαλείο τεχνολογίας υποβοηθούμενης αναπαραγωγής κατά της υπογονιμότητας. Τα ωάρια αφαιρούνται από τις ωοθήκες μιας γυναίκας και τοποθετούνται σε μία από τις σάλπιγγες, μαζί με το σπέρμα του άνδρα. Η τεχνική, που επιχειρήθηκε αρχικά από τους Steptoe και Edwards και αργότερα πρωτοστάτησε από τον ενδοκρινολόγο Ricardo Asch, επιτρέπει τη γονιμοποίηση να πραγματοποιηθεί μέσα στη μήτρα της γυναίκας (Edwards, 2001).

Με την πρόοδο της εξωσωματικής γονιμοποίησης, η διαδικασία αυτή χρησιμοποιείται λιγότερο καθώς τα ποσοστά εγκυμοσύνης στην εξωσωματική γονιμοποίηση τείνουν να είναι ίσα ή καλύτερα και δεν απαιτούν λαπαροσκόπηση όταν το ωάριο επανατοποθετείται (Sharif & Coomarasamy, 2012).

Χρειάζονται, κατά μέσο όρο, τέσσερις έως έξι εβδομάδες για να ολοκληρωθεί ένας κύκλος ενδοσαλπινγικής μεταφοράς γαμετών. Πρώτα, η γυναίκα πρέπει να πάρει ένα φάρμακο γονιμότητας για να διεγείρει την παραγωγή ωαρίων στις ωοθήκες. Ο γιατρός θα παρακολουθεί την ανάπτυξη των ωοθυλακίων και μόλις ωριμάσουν, θα γίνει ένεση στη γυναίκα με ανθρώπινη χοριακή γοναδοτροπίνη (hCG). Τα ωάρια θα συλλεχθούν περίπου 36 ώρες αργότερα, θα αναμειχθούν με το σπέρμα του άνδρα και θα τοποθετηθούν ξανά στις σάλπιγγες της γυναίκας χρησιμοποιώντας ένα λαπαροσκόπιο (Driscoll et al., 1996).

Μια γυναίκα πρέπει να έχει τουλάχιστον μια φυσιολογική σάλπιγγα για να είναι κατάλληλη η ενδοσαλπινγική μεταφορά γαμετών. Χρησιμοποιείται σε περιπτώσεις όπου το πρόβλημα γονιμότητας σχετίζεται με δυσλειτουργία του σπέρματος και όπου το ζευγάρι έχει ιδιοπαθή υπογονιμότητα. Ορισμένοι ασθενείς μπορεί να προτιμούν τη διαδικασία από την εξωσωματική γονιμοποίηση για ηθικούς λόγους, καθώς η γονιμοποίηση πραγματοποιείται εντός του σώματος. Πρόκειται για μια ημιεπεμβατική διαδικασία (Edwards, 2001).

Όπως συμβαίνει με τις περισσότερες διαδικασίες γονιμότητας, η επιτυχία εξαρτάται από την ηλικία του ζευγαριού και την ποιότητα των ωαρίων της γυναίκας. Υπολογίζεται ότι περίπου το 25–30% των κύκλων ενδοσαλπινγικής μεταφοράς γαμετών καταλήγουν σε εγκυμοσύνη, με το ένα τρίτο αυτών να είναι δίδυμα ή τρίδυμα κ.λπ. (Sharif & Coomarasamy, 2012).

3.2 Ενδοσαλπινγική μεταφορά ζυγωτών

Η ενδοσαλπινγική μεταφορά ζυγωτών είναι μια θεραπεία υπογονιμότητας που χρησιμοποιείται όταν μια απόφραξη στις σάλπιγγες εμποδίζει τη φυσιολογική σύνδεση του σπέρματος με το ωάριο. Τα ωάρια αφαιρούνται από τις ωοθήκες μιας γυναίκας και γονιμοποιούνται *in vitro*. Ο προκύπτων ζυγώτης τοποθετείται στη σάλπιγγα με τη χρήση λαπαροσκόπησης. Η διαδικασία είναι ένα spin-off της διαδικασίας ενδοσαλπινγικής μεταφοράς γαμετών. Τα ποσοστά εγκυμοσύνης και εμφύτευσης στους κύκλους ενδοσαλπινγικής μεταφοράς ζυγωτών είναι 52,3 και 23,2% αντίστοιχα (Toner, 2002).

Ο μέσος κύκλος ενδοσαλπινγικής μεταφοράς ζυγωτών διαρκεί πέντε εβδομάδες-έξι εβδομάδες για να ολοκληρωθεί. Πρώτα, η γυναίκα πρέπει να πάρει ένα φάρμακο γονιμότητας για να διεγείρει την παραγωγή ωαρίων στις ωοθήκες. Ο γιατρός θα παρακολουθεί την ανάπτυξη των ωοθυλακίων και μόλις ωριμάσουν, η γυναίκα θα λάβει μια ένεση που περιέχει ανθρώπινες χοριακές γοναδοτροπίνες (HCG ή hCG). Τα ωάρια θα συλλεχθούν περίπου 36 ώρες αργότερα, συνήθως με διακολπική ανάκτηση ωαρίων. Μετά τη γονιμοποίηση στο εργαστήριο, τα προκύπτοντα πρώιμα έμβρυα ή ζυγώτες τοποθετούνται στις σάλπιγγες της γυναίκας χρησιμοποιώντας λαπαροσκόπιο (Boldt et al., 1996).

Η ενδοσαλπινγική μεταφορά ζυγωτών έχει χρησιμοποιηθεί σε καταστάσεις υπογονιμότητας όπου τουλάχιστον μία από τις σάλπιγγες είναι φυσιολογική και άλλες θεραπείες έχουν αποτύχει (Toner, 2002).

3.3 Υποβοηθούμενη εκκόλαψη

Η υποβοηθούμενη εκκόλαψη είναι μια πρόσθετη διαδικασία που μπορεί να πραγματοποιηθεί σε ασθενείς που υποβάλλονται σε θεραπεία εξωσωματικής γονιμοποίησης. Μόλις δημιουργηθούν έμβρυα με χρήση εξωσωματικής γονιμοποίησης, το έμβρυο περιβάλλεται από ένα σκληρό εξωτερικό στρώμα κυττάρων που ονομάζεται διαφανής ζώνη. Ένα έμβρυο πρέπει να απελευθερωθεί από αυτή τη ζώνη προκειμένου να εμφυτευτεί στη μήτρα και να εξελιχθεί σε εγκυμοσύνη. Η υποβοηθούμενη εκκόλαψη είναι μια διαδικασία όπου μπορεί να βοηθηθεί το έμβρυο να εκκολαφθεί από τη διαφανή ζώνη του δημιουργώντας μια μικρή ρωγμή στη διαφανή ζώνη. Πιστεύεται ότι η υποβοηθούμενη εκκόλαψη μπορεί να βοηθήσει την εμφύτευση εμβρύου στη μήτρα, οδηγώντας σε υψηλότερα ποσοστά εγκυμοσύνης σε ορισμένους ασθενείς (Martins et al., 2011).

Η υποβοηθούμενη εκκόλαψη πραγματοποιείται γενικά την τρίτη ημέρα της ανάπτυξης του εμβρύου. Οι εμβρυολόγοι χρησιμοποιούν λέιζερ για να δημιουργήσουν μια πολύ μικρή τρύπα στη διαφανή ζώνη. Η υποβοηθούμενη εκκόλαψη μπορεί επίσης να γίνει σε προηγουμένως κατεψυγμένα και αποψυγμένα έμβρυα (Farquhar & Marjoribanks, 2018).

Η υποβοηθούμενη εκκόλαψη δεν συνιστάται για όλους τους ασθενείς, αλλά μπορεί να είναι χρήσιμη σε γυναίκες που είναι μεγαλύτερες (άνω των 37 ετών) ή που είχαν προηγούμενη αποτυχία της εξωσωματικής γονιμοποίησης. Υπάρχει ένας ελαφρώς αυξημένος κίνδυνος για πανομοιότυπα δίδυμα σε έμβρυα που έχουν υποβληθεί σε υποβοηθούμενη εκκόλαψη. Πολύ σπάνια, ένα έμβρυο μπορεί να καταστραφεί από την υποβοηθούμενη διαδικασία εκκόλαψης (Martins et al., 2011).

3.4 Κρυοσυντήρηση γεννητικού υλικού

Η κρυοσυντήρηση επιδιώκει να διατηρήσει ανέπαφα κύτταρα από αναπαραγωγικό υλικό και κυτταρικές σειρές, για πιθανή μελλοντική αναζωογόνηση και χρήση, σταματώντας τις μεταβολικές διεργασίες μέσω ειδικών πρωτοκόλλων ψύξης,

κατάψυξης και αποθήκευσης πολλαπλών σταδίων, τα οποία μπορεί να ποικίλλουν μεταξύ τύπου δείγματος και είδους.

Κοινές, αναγνωρισμένες τεχνολογίες υποβοηθούμενης αναπαραγωγής που χρησιμοποιούν κρυοσυντηρημένο αναπαραγωγικό υλικό είναι για παράδειγμα η τεχνητή γονιμοποίηση, η *in vitro* γονιμοποίηση και η εμβρυομεταφορά (Prieto et al., 2014; Adams, Cook & Ward, 2015).

Η κρυοσυντήρηση απαιτεί τη συλλογή, τη μεταφορά και τη συντήρηση του δείγματος να γίνεται σε συγκεκριμένο χρονικό διάστημα (συνήθως εντός 24-48 ωρών για τα σπερματοζώαρια ή τους ιστούς, αλλά λιγότερο για τα ωκύτταρα) προκειμένου να διατηρηθεί η βιωσιμότητα των κυττάρων. Πριν από την αποθήκευση σε υγρό άζωτο, οι γαμέτες, οι κυτταρικές σειρές ή τα έμβρυα πρέπει να προστατεύονται με εξειδικευμένα μέσα, που ονομάζονται κρυοπροστατευτικοί παράγοντες (CPAs), προκειμένου να αποφευχθεί η δομική βλάβη όπως αυτή από τους κρυστάλλους πάγου που σχηματίζονται κατά τη διαδικασία κατάψυξης. Επομένως, η προστασία και η κατάψυξη αυτών των δειγμάτων απαιτεί εξειδικευμένα και συχνά ειδικά για το είδος αντιδραστήρια, τεχνικές και τεχνογνωσία (Pegg, 2014).

Μετά την ανακάλυψη του μικροσκοπίου, ο Spallanzani παρατήρησε ότι το σπέρμα μπορούσε να διατηρήσει την κινητικότητα ακόμη και όταν εκτεθεί σε συνθήκες ψυχρής θερμοκρασίας το 1776. Η έρευνα για τις επιπτώσεις της κρυοσυντήρησης σε ζωντανό ιστό είχε τις ρίζες της στα τέλη του 1800 όταν οι επιστήμονες χρησιμοποίησαν αυτήν την τεχνολογία για να διατηρήσουν τόσο τα σπερματοζώαρια όσο και τα κόκκινα αιμοσφαίρια (RBCs). Κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου, η έρευνα έδειξε αδυναμίες στη διαδικασία που προκάλεσαν ασυνεπή αποτελέσματα και συχνή υπογονιμότητα που προκλήθηκε από πρόωμο εμβρυϊκό θάνατο. Μια σημαντική ανακάλυψη συνέβη τη δεκαετία του 1950 όταν ο James Lovelock ανακάλυψε ότι η διαδικασία κρυοσυντήρησης προκάλεσε οσμωτικό στρες στο κύτταρο με την άμεση κατάψυξη του υγρού που συνέβαλε άμεσα στον σχηματισμό κρυστάλλων πάγου στα κόκκινα αιμοσφαίρια. Το 1963, ο Mazur μπόρεσε να χαρακτηρίσει αυτή τη διαδικασία όταν απέδειξε ότι ο ρυθμός μεταβολής της θερμοκρασίας μέσα σε ένα μέσο που περιέχει κύτταρο έλεγχε την κίνηση του νερού σε μια κυτταρική μεμβράνη και επομένως τον βαθμό ενδοκυτταρικής κατάψυξης. Αυτό μαζί βοήθησε στη

βελτίωση της συνολικής κατανόησης του μηχανισμού που σχετίζεται με την κρυοπροστατευτική διαδικασία. Κατά τη δεκαετία του 1980, η έρευνα γύρω από τη διαδικασία κρυοσυντήρησης αποκάλυψε ότι η ταχύτητα με την οποία συνέβη η διαδικασία κατάψυξης και απόψυξης ήταν ο πιο σημαντικός παράγοντας για τον προσδιορισμό της επιβίωσης των κυττάρων. Αποδείχθηκε ότι μικρές, αργές αυξήσεις τόσο στη διαδικασία κατάψυξης όσο και στην απόψυξη εμπόδισαν τον γρήγορο σχηματισμό κρυστάλλων πάγου που αύξησαν τις διαλυμένες ουσίες που συνδέονται με τη μεμβράνη που σχετίζονται με τον πρώιμο κυτταρικό θάνατο. Μια άλλη αρχική πρόοδος στην κρυοσυντήρηση σημειώθηκε στα τέλη της δεκαετίας του 1940, όταν οι ερευνητές ανακάλυψαν ότι η χρήση της γλυκερίνης ως μέσου αύξησε τη δυνατότητα επιβίωσης των σπερματοζωαρίων σε θερμοκρασίες υπό κατάψυξη (-70°C). Η χρήση της γλυκερίνης ως μέσου χρησίμευσε αποτελεσματικά για την προστασία των κυττάρων από τον γρήγορο σχηματισμό κρυστάλλων πάγου κατά τη διάρκεια της διαδικασίας συντήρησης. Ένας συνήθως χρησιμοποιούμενος κρυοπροστατευτικός παράγοντας που χρησιμοποιείται σήμερα είναι το διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO), το οποίο προστίθεται στα κυτταρικά μέσα πριν από τη διαδικασία κατάψυξης. Το DMSO όταν προστίθεται στο κυτταρικό μέσο, συνήθως σε συγκέντρωση 2 M, αυξάνει το πορώδες της κυτταρικής μεμβράνης, το οποίο επιτρέπει στο νερό να ρέει πιο ελεύθερα μέσω της μεμβράνης. Επιπλέον, όπως και η γλυκερίνη, το DMSO πιστεύεται ότι βοηθά στην πρόληψη του σχηματισμού κρυστάλλων νερού αυξάνοντας τη συγκέντρωση της ενδοκυτταρικής διαλυμένης ουσίας, βοηθώντας έτσι στην υαλοποίηση του νερού σε χαμηλές θερμοκρασίες (Walters et al., 2009).

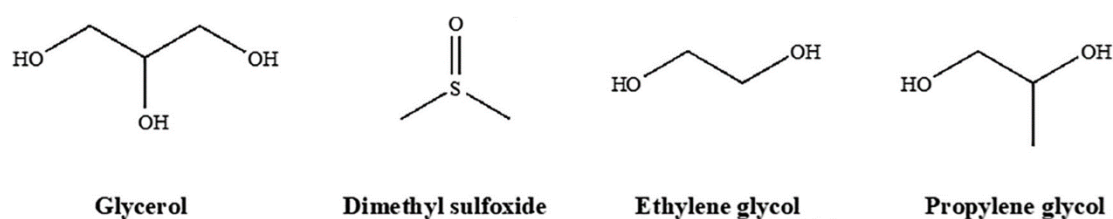
Για να κατανοηθεί πλήρως ο ρόλος των κρυοπροστατευτικών παραγόντων (CPAs), πρέπει πρώτα να κατανοηθούν οι επιπτώσεις των θερμοκρασιών κάτω από το μηδέν σε κατά τα άλλα υγιή ιστό. Η έκθεση των κυττάρων σε θερμοκρασίες κάτω των 0°C χωρίς τη βοήθεια κρυοπροστατευτικών είναι συνήθως θανατηφόρα. Δεδομένου ότι το νερό αποτελεί περίπου το 80% της μάζας των ιστών, η κατάψυξη του νερού, τόσο ενδοκυτταρικά όσο και εξωκυτταρικά, επιβάλλει τη μεγαλύτερη επίδραση στις επιβλαβείς βιοχημικές και δομικές αλλαγές που πιστεύεται ότι οδηγούν σε απροστάτευτο τραυματισμό κατά την κατάψυξη. Υπάρχουν δύο ανεξάρτητες θεωρίες που προσπαθούν να εξηγήσουν τις βλαβερές συνέπειες της κατάψυξης στα κύτταρα: (1) οι κρύσταλλοι πάγου διαταράσσουν μηχανικά τις κυτταρικές μεμβράνες

καθιστώντας έτσι αδύνατη τη λήψη δομικά ανέπαφων κυττάρων μετά την απόψυξη, και (2) θανατηφόρες αυξήσεις στη συγκέντρωση της διαλυμένης ουσίας συμβαίνουν στην υπόλοιπη υγρή φάση καθώς σχηματίζονται κρύσταλλοι πάγου ενδοκυτταρικά κατά την ψύξη. Είτε κυριαρχούν οι μηχανικές είτε οι οσμωτικές επιδράσεις της κατάψυξης, το τελικό αποτέλεσμα είναι το ίδιο. Η απροστάτευτη ψύξη και απόψυξη των κυττάρων είναι μια διαδικασία ασυμβίβαστη με τη ζωή. Για να μετριαστούν αυτές οι επιπτώσεις, πρέπει να πραγματοποιηθούν δύο προστατευτικές ενέργειες: χρήση κρυοπροστατευτικού και επιλογή κατάλληλου ρυθμού ψύξης και απόψυξης (Pegg, 2007).

Υπάρχουν επί του παρόντος ένας αριθμός παραγόντων διείσδυσης (PAs), όπως η γλυκερόλη (ο πρώτος παράγοντας που ανακαλύφθηκε), το διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO), η αιθυλενογλυκόλη (EG) και η προπανοδιόλη (προπυλενογλυκόλη). Η ικανότητα καθεμιάς από αυτές τις ενώσεις να προστατεύει ένα κύτταρο από τις μηχανικές και οσμωτικές επιδράσεις της κατάψυξης εξαρτάται από διάφορες ιδιότητες. Οι παράγοντες διείσδυσης πρέπει να είναι εξαιρετικά υδατοδιαλυτοί σε χαμηλές θερμοκρασίες, να μπορούν να διασχίζουν εύκολα τις βιολογικές μεμβράνες και, ιδανικά, να είναι ελάχιστα τοξικοί (Pegg, 2007).

Οι δομές τεσσάρων κοινών παραγόντων διείσδυσης των 100 που είναι γνωστές αναπαρίστανται στην κάτωθι εικόνα. Το σχετικά μικρό τους μέγεθος (συνήθως λιγότερο από 100 dalton) και η κάπως αμφίφιλη φύση τους τους επιτρέπει να διεισδύουν εύκολα στις κυτταρικές μεμβράνες όπου μπορούν να ασκήσουν τα αποτελέσματά τους. Η ικανότητα των δομών να δεσμεύουν υδρογόνο με το νερό ευθύνεται για ένα μεγάλο μέρος των προστατευτικών τους επιδράσεων. Κανονικά, καθώς το νερό παγώνει, η αναπτυσσόμενη κρυσταλλική δομή αποκλείει τις διαλυμένες ουσίες καθώς σχηματίζεται το πλέγμα του. Οι διαλυμένες ουσίες μετατοπίζονται στη φθίνουσα υγρή φάση, η οποία αυξάνει αποτελεσματικά τη συγκέντρωση της διαλυμένης ουσίας σε θανατηφόρα επίπεδα εντός του κυττάρου. Επειδή τα διεισδυτικά κρυοπροστατευτικά αλληλεπιδρούν ισχυρά με το νερό μέσω δεσμών υδρογόνου, το σημείο πήξης του νερού μειώνεται και λιγότερα μόρια νερού είναι διαθέσιμα για να αλληλεπιδράσουν μεταξύ τους για να σχηματίσουν κρίσιμες θέσεις πυρήνων που απαιτούνται για σχηματισμό κρυστάλλων. Ο σχηματισμός στερεού νερού με ακανόνιστη, άμορφη δομή είναι γνωστός ως υαλοποίηση και

επιτυγχάνεται με τη χρήση κρυοπροστατευτικού συνοδευόμενου από κατάλληλο ρυθμό ψύξης. Για να ελαχιστοποιηθεί η τοξικότητα, τα μείγματα υαλοποίησης προστίθενται συχνά σταδιακά σε θερμοκρασίες κοντά στους 0°C. Έτσι, η προσθήκη παραγόντων διείσδυσης κάτω από αυτές τις συνθήκες επιτρέπει την επιτυχή αποθήκευση των κυττάρων σε στερεά φάση στις υπερψυχρές θερμοκρασίες που απαιτούνται για να σταματήσουν οι βιοχημικές διεργασίες χωρίς το σχηματισμό πάγου (Bartolac et al., 2018).



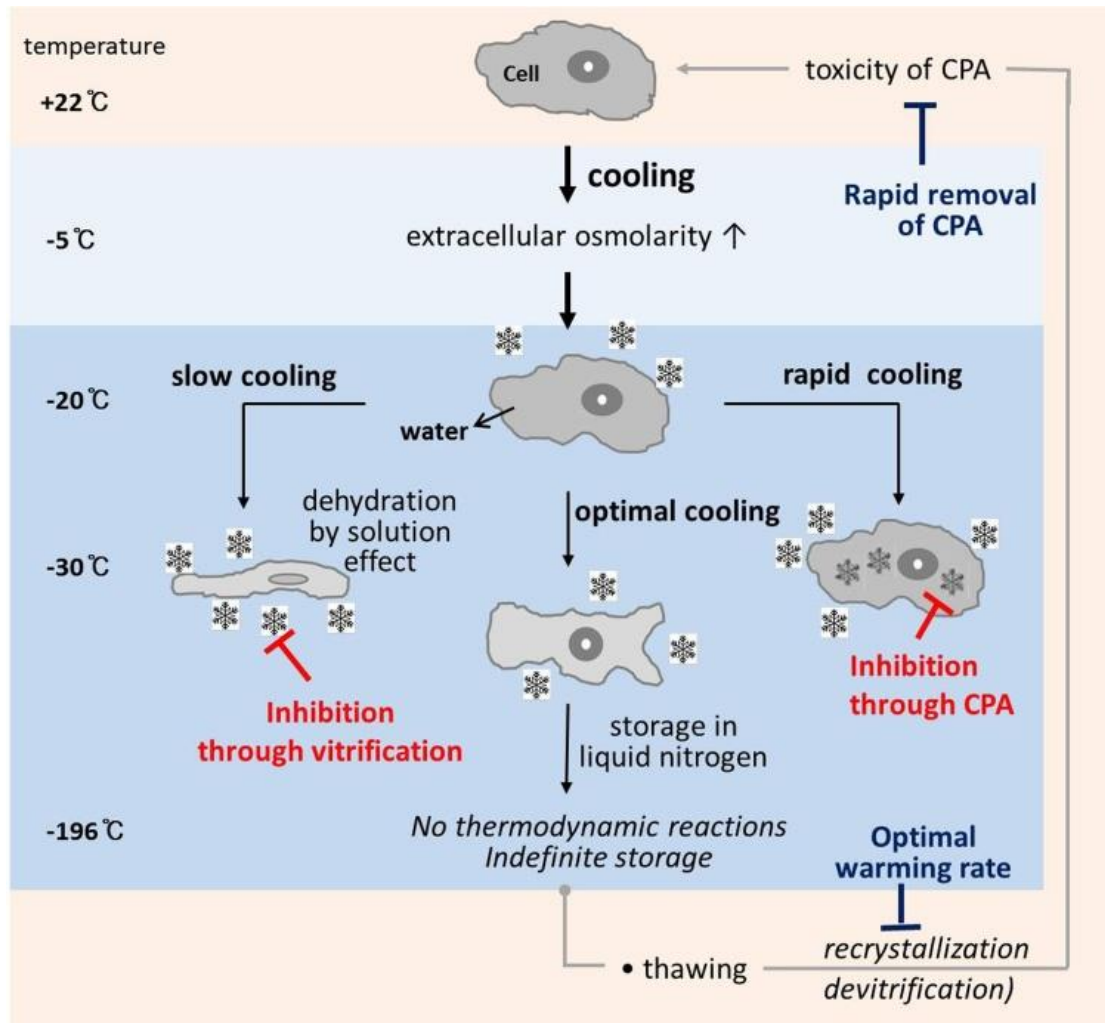
Εικόνα 4. Τέσσερις κοινί κρυοπροστατευτικοί διεισδυτικοί παράγοντες: γλυκερόλη, διμεθυλοσουλφοξείδιο, αιθυλενογλυκόλη και προπυλενογλυκόλη

(Πηγή: Whaley et al., 2021)

Εκτός από το ότι επιτρέπουν την υαλοποίηση, μερικοί παράγοντες διείσδυσης όπως το DMSO πιστεύεται ότι αυξάνουν την κυτταρική διαπερατότητα επηρεάζοντας τη δυναμική της μεμβράνης με τρόπο που εξαρτάται από τη συγκέντρωση. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις (5%), τα στοιχεία δείχνουν ότι το DMSO μειώνει το πάχος της μεμβράνης και, με τη σειρά του, αυξάνει τη διαπερατότητα της μεμβράνης. Σε κοινώς χρησιμοποιούμενες συγκεντρώσεις (10%), προκαλείται σχηματισμός πόρων νερού σε βιολογικές μεμβράνες. Ο σχηματισμός πόρων μπορεί να είναι πλεονεκτικός καθώς το ενδοκυτταρικό νερό μπορεί να αντικατασταθεί πιο εύκολα από κρυοπροστατευτικά που προάγουν την υαλοποίηση. Σε υψηλότερες, τοξικές συγκεντρώσεις (40%) ωστόσο, οι διπλές στοιβάδες λιπιδίων αρχίζουν να αποσυντίθενται. Είναι προφανές τότε ότι η επιλογή μιας κατάλληλης συγκέντρωσης κρυοπροστατευτικού είναι κρίσιμη για τη δομική ακεραιότητα και επομένως τη βιωσιμότητα των κυττάρων μετά την κατάψυξη (Gurtovenko & Anwar, 2007; He et al., 2012).

Η δεύτερη κατηγορία κρυοπροστατευτικών είναι οι μη διεισδυτικοί παράγοντες (NPAs). Όπως υποδηλώνει το όνομα, δεν διεισδύουν ενδοκυτταρικά και επομένως

ασκούν την προστατευτική τους επίδραση έξω από το κύτταρο. Είναι τυπικά μεγαλύτερα και ομοιοπολικά συνδεδεμένα είτε ως πολυμερή, είτε ως διμερή ή ως τριμερή. Μερικοί συνήθως χρησιμοποιούμενοι παράγοντες αυτής της κατηγορίας είναι: πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG), πολυβινυλοπυρρολιδόνη (PVP), ραφινόζη, σακχαρόζη και τρεαλόζη. Οι μη διεισδυτικοί παράγοντες προκαλούν υαλοποίηση με τον ίδιο μηχανισμό με τους παράγοντες διείσδυσης αλλά εξωκυτταρικά και σε μικρότερο βαθμό (Whaley et al., 2021).



Εικόνα 5. Φυσικά συμβάντα και κρυοτραυματισμοί κυττάρων κατά την κατάψυξη και την απόψυξη

(Πηγή: Jang et al., 2017)

Κεφάλαιο 4 - Η Κρυοσυντήρηση

4.1 Είδη κρυοσυντήρησης

Γενικά, η κρυοσυντήρηση είναι ευκολότερη για λεπτά δείγματα και κύτταρα, επειδή αυτά μπορούν να ψύχονται πιο γρήγορα και επομένως απαιτούν μικρότερες δόσεις κρυοπροστατευτικών. Τα είδη κρυοσυντήρησης που αφορούν την γονιμοποίηση/αναπαραγωγή είναι τα εξής (Whaley et al., 2021):

- Σπέρμα
- Ωάρια
- Έμβρυα
- Ορχικός ιστός
- Ωοθηκικός ιστός

Αξίζει να σημειωθεί, ότι άλλα είδη στα οποία μπορεί να γίνει κρυοσυντήρηση είναι: αίμα, ειδικά κύτταρα για μετάγγιση όπως αιμοπετάλια, βλαστοκύτταρα, ηπατοκύτταρα, γενετικό υλικό, αίμα ομφάλιου λώρου, δείγματα ιστών (Pegg, 2007).

Στη συνέχεια θα γίνει περιγραφή για κάθε ένα είδος κρυοσυντήρησης που σχετίζεται με τη γονιμοποίηση/αναπαραγωγή.

4.1.1 Κρυοσυντήρηση σπέρματος

Η κρυοσυντήρηση σπέρματος είναι μια αποτελεσματική μέθοδος διατήρησης της γονιμότητας στον άνθρωπο και είναι ιδιαίτερα χρήσιμη σε ασθενείς πριν από τη θεραπεία του καρκίνου (Yeste, 2016). Τα σπερματοζώαρια είναι τόσο επιδεκτικά σε αυτή τη μέθοδο αποθήκευσης που μια μελέτη ανέφερε ότι μια παρτίδα κυττάρων που διατηρήθηκαν για 21 χρόνια χρησιμοποιήθηκε για την επιτυχή γονιμοποίηση ενός ωοκυττάρου που τελικά είχε ως αποτέλεσμα μια ζωντανή γέννηση (Horne et al., 2004). Η μακροχρόνια αποθήκευση αυτών των κυττάρων συνήθως περιλαμβάνει

γλυκερίνη ως κρυοπροστατευτικό παράγοντα, και η αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκερίνης με σταθερό ρυθμό ψύξης έχει αποδειχθεί ότι αυξάνει τα ποσοστά επιβίωσης του σπέρματος. Για την κρυοσυντήρηση ανθρώπινων σπερματοζωαρίων, συνιστάται αρχικός ρυθμός ψύξης 0,5–1 °C/min κατά την κατάψυξη των κυττάρων από θερμοκρασία δωματίου στους 5 °C. Στη συνέχεια, συνιστάται αύξηση του ρυθμού κατάψυξης στους 10 °C/min κατά την ψύξη από 5 σε -80°C, για να μεγιστοποιηθεί η κρυοεπιβίωση του σπέρματος. Κατά την απόψυξη των δειγμάτων, προτείνονται ρυθμοί 43,5°C/min σε αέρα 20°C ή 55,2°C/min σε αέρα 35°C σε ξηρή επιφάνεια για να έχουν ως αποτέλεσμα τη βέλτιστη βιωσιμότητα και κινητικότητα του σπέρματος μετά την απόψυξη (Whaley et al., 2021).

Το πιο κοινό κρυοπροστατευτικό που χρησιμοποιείται για το σπέρμα είναι η γλυκερίνη (10% στο μέσο καλλιέργειας). Συχνά σακχαρόζη ή άλλοι δι-, τρισακχαρίτες προστίθενται στο διάλυμα γλυκερίνης. Τα κρυοπροστατευτικά μέσα μπορούν να συμπληρωθούν είτε με κρόκο αυγού είτε με λεκιθίνη σόγιας, με τα δύο να μην έχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους όσον αφορά την κινητικότητα, τη μορφολογία, την ικανότητα σύνδεσης με υαλουρονικό *in vitro* ή την ακεραιότητα του DNA μετά την απόψυξη (Reed et al., 2009).

Μπορούν να χρησιμοποιηθούν πρόσθετα κρυοπροστατευτικά για την αύξηση της βιωσιμότητας του σπέρματος και των ποσοστών γονιμότητας μετά την κατάψυξη. Η θεραπεία του σπέρματος με πρωτεΐνες που δεσμεύουν την ηπαρίνη πριν από την κρυοσυντήρηση έδειξε μειωμένο κρυοτραυματισμό και δημιουργία ROS. Η προσθήκη νευρικού αυξητικού παράγοντα ως κρυοπροστατευτικού μειώνει τα ποσοστά θανάτου των σπερματοζωαρίων και αυξάνει την κινητικότητα μετά την απόψυξη. Η ενσωμάτωση της χοληστερόλης στις κυτταρικές μεμβράνες του σπέρματος με τη χρήση κυκλοδεξτρινών πριν από την κατάψυξη αυξάνει επίσης τη βιωσιμότητα του σπέρματος (Patel et al., 2016; Saednia et al., 2015).

Το σπέρμα καταψύχεται χρησιμοποιώντας είτε μια μέθοδο ελεγχόμενου ρυθμού, αργής ψύξης (αργή προγραμματιζόμενη κατάψυξη ή SPF) είτε μια νεότερη διαδικασία κατάψυξης με φλας, γνωστή ως υαλοποίηση. Η υαλοποίηση παρέχει ανώτερη κινητικότητα και κρυοεπιβίωση μετά την απόψυξη από την αργή προγραμματιζόμενη κατάψυξη. Αυτή η τεχνική, που εφευρέθηκε από τους Ιάπωνες,

χρησιμοποιείται στα καλύτερα κέντρα σε όλο τον κόσμο. Είναι εξαιρετικά γρήγορο (-23000°C/min), με αποτέλεσμα να αποφεύγεται η εμφάνιση μικρών κρυστάλλων πάγου (Vutyavanich, Piromlertamorn & Nunta, 2010).

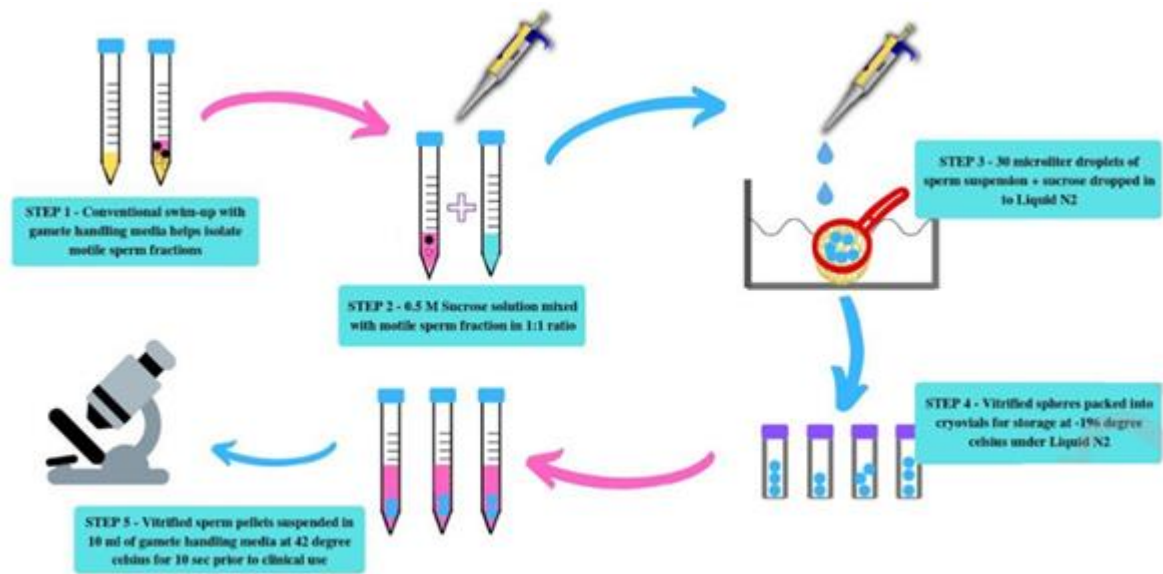
Η απόψυξη στους 40 °C φαίνεται να έχει ως αποτέλεσμα τη βέλτιστη κινητικότητα του σπέρματος. Από την άλλη πλευρά, η ακριβής θερμοκρασία απόψυξης φαίνεται να έχει ελάχιστη επίδραση στη βιωσιμότητα του σπέρματος, στην κατάσταση των ακροσωμάτων, στην περιεκτικότητα σε ATP και στο DNA (Calamera et al., 2010; Di Santo et al., 2012).

Όσον αφορά το επίπεδο κατακερματισμού του DNA του σπέρματος, μπορούν να πραγματοποιηθούν έως και τρεις κύκλοι κατάψυξης και απόψυξης χωρίς να προκληθεί επίπεδο κινδύνου σημαντικά υψηλότερο από ό,τι μετά από έναν μόνο κύκλο κατάψυξης και απόψυξης. Αυτό υπό τον όρο ότι τα δείγματα καταψύχονται εκ νέου στο αρχικό τους κρυοπροστατευτικό και δεν υφίστανται πλύση σπέρματος ή άλλη αλλοίωση στο ενδιάμεσο, και υπό την προϋπόθεση ότι διαχωρίζονται με φυγοκέντρηση πριν από τη χρήση στην τεχνολογία υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (Thompson et al., 2010).

Γενικά, οι βλάβες μετά την απόψυξη που είναι κοινές στο σπέρμα περιλαμβάνουν μειωμένη ακεραιότητα ακροσωμάτων, κινητικότητα, ικανότητα γονιμοποίησης και συνολική μείωση της βιωσιμότητας ανεξάρτητα από το είδος προέλευσης. Πιο συγκεκριμένα, η διαταραχή της χρωματίνης μέσω μετατοπίσεων πρωταμίνης, ο κατακερματισμός του DNA και οι βλάβες στα γονίδια που εμπλέκονται στην ικανότητα γονιμοποίησης και στην εμβρυϊκή ανάπτυξη (ADD1, ARNT, PEG1/MEST, SNORD116/PWSAS) είναι γνωστές συνέπειες της διαδικασίας κρυοσυντήρησης. Αν και ο ακριβής μηχανισμός είναι άγνωστος, το οξειδωτικό στρες που είναι συνηθισμένο κατά τη διαδικασία της κρυοψίας πιστεύεται ότι αποτελεί τη βάση του αυξημένου κατακερματισμού του DNA στο ανθρώπινο σπέρμα, με αποτέλεσμα τη μειωμένη τελική απόδοση και βιωσιμότητα (Anger et al., 2003; Valcarce et al., 2013; Thomson et al., 2009). Ο Yeste (2016) έχει προτείνει τη συμπλήρωση των μέσων κατάψυξης με βιταμίνη E, υποταυρίνη ή άλλα φυσικά αντιοξειδωτικά για να μετριαστούν τα οξειδωτικά αποτελέσματα. Ενώ έχουν τεκμηριωθεί γενετικές αλλοιώσεις στο σπέρμα που προκαλούνται από την

κρυογένεση, τα δεδομένα σχετικά με πιθανές επιγενετικές αλλαγές που μεταδίδονται από την κρυοσυντήρηση είναι περιορισμένα και δικαιολογούν περαιτέρω μελέτη (Yeste, 2016).

Επιπλέον, η κινητικότητα και η βιωσιμότητα του σπέρματος πριν από την κρυοψύξη μπορούν να βοηθήσουν στην πρόβλεψη των αποτελεσμάτων μετά την απόψυξη και της κρυοεπιβίωσης. Ο Degl'Innocenti και οι συνεργάτες του (2013) αξιολόγησαν αυτά τα χαρακτηριστικά σε δείγματα ασθενών με ολιγοσπερμία, καρκίνο και άλλες παθολογίες. Ανέφεραν ότι τα χαμηλότερα ποσοστά ανάκτησης σημειώθηκαν όταν οι προ-κρυοβασικοί αριθμοί, η κινητικότητα και η βιωσιμότητα έπεσαν κάτω από τις τιμές αναφοράς του πέμπτου εκατοστημρίου του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (ΠΟΥ) (39×10^6 σπερματοζώαρια ανά εκσπερμάτιση, συνολική κινητικότητα: 40%, προοδευτική κινητικότητα: 32% και βιωσιμότητα: 58%). Εκτός από τα εγγενή χαρακτηριστικά και την ποιότητα του δείγματος σπέρματος, η περίοδος διατήρησης του σπέρματος πριν από την κατάψυξη είναι κρίσιμη. Συνιστάται η επεξεργασία του δείγματος εντός μίας ώρας μετά την παράδοση για βέλτιστη κινητικότητα μετά την απόψυξη. Άλλοι παράγοντες που πρέπει να ληφθούν υπόψη περιλαμβάνουν την αρχική κινητικότητα του σπέρματος τουλάχιστον 55% μία ώρα μετά τον τοκετό με τα περισσότερα κύτταρα σε εμπρόσθια κινητικότητα, λιγότερο από 15% αποσύνθεση στην κινητικότητα του σπέρματος και καμία σημαντική μείωση στην προς τα εμπρός κινητικότητα 4 ώρες μετά τον τοκετό (WHO, 2010).



Εικόνα 6. Κρυοσυντήρηση σπέρματος

(Πηγή: Shah et al., 2019)

4.1.2 Κρυοσυντήρηση ωαρίων

Η κρυοσυντήρηση ωαρίων είναι μια αξιόπιστη μέθοδος για τη διατήρηση της γονιμότητας σε γυναίκες που υποβάλλονται σε θεραπεία για ιατρικές καταστάσεις όπως ο καρκίνος ή τα αυτοάνοσα νοσήματα. Η θεραπεία αυτών των ασθενειών θα μπορούσε να οδηγήσει σε ανεπάρκεια των ωοθηκών, γεγονός που υποδεικνύει τη σημασία της διατήρησης της γονιμότητας. Οι ηθικές και νομικές ανησυχίες σχετικά με την κρυοσυντήρηση εμβρύου έχουν οδηγήσει σε ερευνητικές προόδους στην κρυοσυντήρηση ωαρίων τα τελευταία χρόνια ως εναλλακτική προσέγγιση. Η κατάψυξη ωαρίων παρέχει αυτονομία στις γυναίκες, καθώς επιτρέπει την εκλεκτική διατήρηση της γονιμότητας σε σύγκριση με τη διατήρηση των εμβρύων. Επιπλέον, η κρυοσυντήρηση ωαρίων παρέχει στις γυναίκες που ανησυχούν για την αναπαραγωγική έκπτωση που σχετίζεται με την ηλικία, την επιλογή να καθυστερήσουν την εγκυμοσύνη (Rienzi & Ubaldi, 2015).

Η κρυοαποθήκευση ανθρώπινων ωαρίων πραγματοποιείται σχεδόν αποκλειστικά στο στάδιο της Μεταφάσης II όταν έχει ολοκληρωθεί η πυρηνική και η κυτταροπλασματική ωρίμανση. Ωστόσο, το μεγάλο μέγεθος, η υψηλή περιεκτικότητα

σε νερό και η μοναδική ενδοκυτταρική σύνθεση των ωοκυττάρων καθιστούν την κρυοσυντήρηση δύσκολη. Η βλάβη στις μειωτικές ατράκτους, τα νήματα ακτίνης και το DNA εκτός από τη διασπορά των χρωμοσωμάτων, τον αποπολυμερισμό μικροσωληνίσκων και τον αυξημένο ρυθμό πολυσπερμίας είναι μεταξύ των ειδικών προκλήσεων που προκύπτουν με τη διατήρηση των ωαρίων. Όπως και το σπέρμα, τα ωοκύτταρα φαίνεται επίσης να είναι επιρρεπή σε επιγενετικές αλλαγές ως αποτέλεσμα της αποθήκευσης σε χαμηλή θερμοκρασία, αν και η έρευνα σε αυτόν τον τομέα βρίσκεται σε εξέλιξη (Prentice & Anzar, 2011).

Επί του παρόντος, κυριαρχούν δύο προσεγγίσεις για την κρυοσυντήρηση ωαρίων. Περιλαμβάνουν αργή ψύξη (πρωτόκολλα κατάψυξης ισορροπίας) και υαλοποίηση (πρωτόκολλα εξαιρετικά γρήγορης ψύξης ή μη ισορροπίας). Εν συντομία, η αργή ψύξη περιλαμβάνει σταδιακή αφυδάτωση των κυττάρων με την προσθήκη χαμηλών συγκεντρώσεων ενός παράγοντα διείσδυσης όπως DMSO (συνήθως $\leq 1,5$ M) και ενός μη διεισδυτικού παράγοντα (συνήθως σακχαρόζη ή τρεαλόζη, $\leq 0,3$ M) με ελεγχόμενους αργούς ρυθμούς ψύξης. Μετά την ψύξη στους -150° C, τα κύτταρα αποθηκεύονται σε υγρό άζωτο στους -196° C μέχρι να χρειαστούν για χρήση. Για την απόψυξη των κυττάρων, διαλύματα με φθίνουσες συγκεντρώσεις NPAs χρησιμοποιούνται για να επιτευχθεί σταδιακή επανυδάτωση. Η κρυοεπιβίωση των ωαρίων έχει αυξηθεί με τη βελτίωση των πρωτοκόλλων αργής ψύξης, ειδικά με την εισαγωγή συγκεντρώσεων σακχαρόζης μεγαλύτερες από 0,1 M κατά την προκαταψυκτική αφυδάτωση. Ωστόσο, στοιχεία από την ευρεία πρακτική δείχνουν ότι τα ποσοστά επιβίωσης κυμαίνονται γύρω στο 70%-80% με αυτή τη μέθοδο (Edgar & Gook, 2012; Prentice & Anzar, 2011).

Τα πρωτόκολλα υαλοποίησης, ωστόσο, θεωρούνται επί του παρόντος η καλύτερη μέθοδος για την κρυοσυντήρηση των ωαρίων. Η πιο κοινή μέθοδος υαλοποίησης περιλαμβάνει τη σταδιακή προσθήκη CPA στα κρυομέσα. Στην πρώτη φάση ισορροπίας, τα ωοκύτταρα προστίθενται σε ένα διάλυμα που περιέχει 7,5% v/v EG και 7,5% v/v DMSO για 5 έως 15 λεπτά. Τα κύτταρα στη συνέχεια εκτίθενται σε ένα διάλυμα υαλοποίησης με 15% v/v EG και 15% v/v DMSO, συν 0,5 M σακχαρόζη. Μετά από μια σύντομη επώαση (≤ 1 λεπτό), τα κύτταρα αποθηκεύονται σε υγρό άζωτο στους -196° C. Η θέρμανση πρέπει να εκτελείται γρήγορα για να αποφευχθεί ο σχηματισμός κρυστάλλων πάγου και μετά τη σταδιακή απομάκρυνση του CPA, τα

κύτταρα θα πρέπει να επωάζονται σε μέσο καλλιέργειας μέχρι τη χρήση. Μια συστηματική ανασκόπηση ανέφερε ότι τα ποσοστά κρυοεπιβίωσης και γονιμοποίησης των ωαρίων ήταν υψηλότερα στα υαλοποιημένα ωάρια από τα ωοκύτταρα βραδείας ψύξης (Kuwayama, 2012). Η υαλοποίηση οδήγησε επίσης σε υψηλότερης ποιότητας έμβρυο (22,4% έναντι 8,0%) και υψηλότερο ποσοστό διάσπασης (ημέρα 2: 64,6% έναντι 47,7%) σε σύγκριση με την ψύξη με αργό ρυθμό. Επιπλέον, τα ποσοστά συνεχιζόμενης εγκυμοσύνης, εμβρύου κορυφαίας ποιότητας, διάσπασης εμβρύου και γονιμοποίησης δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ υαλοποιημένων και φρέσκων ωοκυττάρων. Αυτά τα ευρήματα υποδηλώνουν ότι η υαλοποίηση είναι η καλύτερη διαδικασία για την κρυοσυντήρηση των ωαρίων (Cobo & Diaz, 2011).

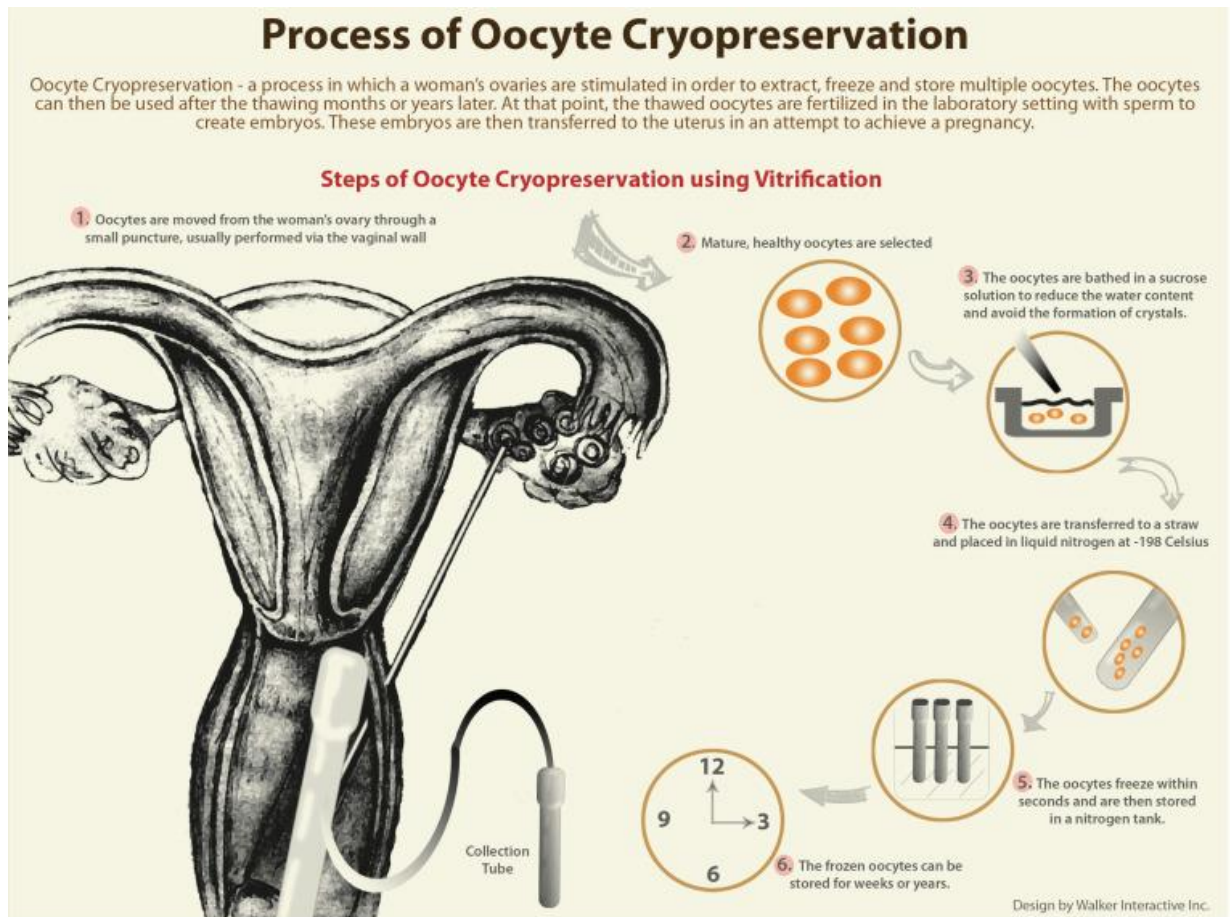
Επίσης, σε μια μετα-ανάλυση του 2013 περισσότερων από 2.200 κύκλων με κατεψυγμένα ωάρια, οι επιστήμονες βρήκαν ότι η πιθανότητα να γεννηθούν ζωντανά μετά από τρεις κύκλους ήταν 31,5% για τις γυναίκες που πάγωσαν τα ωάρια τους σε ηλικία 25 ετών, 25,9% στην ηλικία των 30 ετών και 19,3% στην ηλικία 35, και 14,8% στην ηλικία των 40 ετών (Cil, Bang & Oktay, 2013).

Το 2014, δημοσιεύτηκε μια συστηματική ανασκόπηση του Cochrane. Σύγκρινε την υαλοποίηση με την αργή κατάψυξη. Τα βασικά αποτελέσματα αυτής της ανασκόπησης έδειξαν ότι το κλινικό ποσοστό εγκυμοσύνης ήταν σχεδόν 4 φορές υψηλότερο στην ομάδα υαλοποίησης ωαρίων από ό,τι στην ομάδα αργής κατάψυξης, με μέτρια ποιότητα απόδειξης (Glujovsky et al., 2014).

Οι ιατρικοί κίνδυνοι που σχετίζονται με τη διέγερση των ωοθηκών και την ανάκτηση ωαρίων θα πρέπει να κοινοποιούνται σε όλες τις γυναίκες που αναζητούν κατάψυξη ωαρίων. Ίσως οι πιο σημαντικοί ιατρικοί κίνδυνοι που σχετίζονται με την κατάψυξη ωαρίων είναι αυτοί που μπορεί να προκύψουν από τη διέγερση των ωοθηκών, όπως το σύνδρομο υπερδιέγερσης των ωοθηκών. Το ήπιο έως μέτριο σύνδρομο υπερδιέγερσης των ωοθηκών περιλαμβάνει κόπωση, ναυτία, πονοκεφάλους, κοιλιακό άλγος, ευαισθησία στο στήθος και ευερεθιστότητα, αλλά αυτές οι ανεπιθύμητες ενέργειες μπορούν συνήθως να ελέγχονται καλά. Ωστόσο, 0,1%-2% των ασθενών μπορεί να εμφανίσουν σοβαρό σύνδρομο υπερδιέγερσης των ωοθηκών, με αποτέλεσμα θρόμβους αίματος, δύσπνοια, κοιλιακό άλγος, αφυδάτωση και έμετο που

απαιτούν εισαγωγή στο νοσοκομείο. Σε σπάνιες περιπτώσεις μπορεί να προκύψει θάνατος. Έχουν γίνει προτάσεις ότι η διέγερση των ωοθηκών μπορεί να αυξήσει τον κίνδυνο καρκίνου του μαστού, της μήτρας και άλλων μορφών καρκίνου. Ωστόσο, οι αναφορές για καρκίνο είναι περιορισμένες και αντικρουόμενες (Petropanagos et al., 2015).

Το κόστος της διαδικασίας κατάψυξης ωαρίων (χωρίς εμβρυομεταφορά) στις Ηνωμένες Πολιτείες, το Ηνωμένο Βασίλειο και άλλες ευρωπαϊκές χώρες κυμαίνεται μεταξύ 5.000 και 12.000\$. Αυτό δεν περιλαμβάνει τα φάρμακα γονιμότητας που εμπλέκονται στη διαδικασία, τα οποία μπορεί να κοστίζουν μεταξύ \$4.000 και \$5.000. Το κόστος αποθήκευσης ωαρίων μπορεί να κυμαίνεται από \$100 έως περισσότερα από \$1.000. Τα προσωρινά προγράμματα υγείας δεν καλύπτουν την κοινωνική κατάψυξη ωαρίων. Επιπλέον, καμία επαρχία δεν παρέχει χρηματοδότηση για εξωσωματική γονιμοποίηση μετά την κοινωνική κατάψυξη ωαρίων (Petropanagos et al., 2015).



Εικόνα 7. Διαδικασία κρυοσυντήρησης ωαρίων

(Πηγή: Stevenson, Hurt & Trotter, 2017)

4.1.3 Κρυοσυντήρηση εμβρύου

Η κρυοσυντήρηση εμβρύων είναι η διαδικασία διατήρησης ενός εμβρύου σε θερμοκρασίες κάτω από το μηδέν, γενικά σε ένα στάδιο εμβρυογένεσης που αντιστοιχεί στην προεμφυτευτική περίοδο, δηλαδή από τη γονιμοποίηση στο στάδιο της βλαστοκύστης. Η κρυοσυντήρηση εμβρύων είναι χρήσιμη για τα έμβρυα που έχουν απομείνει μετά από έναν κύκλο εξωσωματικής γονιμοποίησης, καθώς οι ασθενείς που αποτυγχάνουν να συλλάβουν μπορεί να μείνουν έγκυες χρησιμοποιώντας τέτοια έμβρυα χωρίς να χρειάζεται να περάσουν από έναν πλήρη κύκλο εξωσωματικής γονιμοποίησης. Ή, εάν συνέβαινε εγκυμοσύνη, θα μπορούσαν να επιστρέψουν αργότερα για άλλη εγκυμοσύνη. Ανταλλακτικά ωάρια ή έμβρυα που προκύπτουν από θεραπείες γονιμότητας μπορούν να χρησιμοποιηθούν για δωρεά

ωαρίων ή δωρεά εμβρύου σε άλλη γυναίκα ή ζευγάρι και τα έμβρυα μπορούν να δημιουργηθούν, να καταψυχθούν και να αποθηκευτούν ειδικά για μεταφορά και δωρεά χρησιμοποιώντας ωάρια και σπέρμα δότη (Konc et al., 2014).

Η κρυοσυντήρηση εμβρύου πραγματοποιείται γενικά ως συστατικό της εξωσωματικής γονιμοποίησης (η οποία γενικά περιλαμβάνει επίσης υπερδιέγερση των ωοθηκών, ανάκτηση ωαρίων και εμβρυομεταφορά). Η υπερδιέγερση των ωοθηκών γίνεται κατά προτίμηση χρησιμοποιώντας έναν αγωνιστή GnRH αντί για ανθρώπινη χοριακή γοναδοτροπίνη (hCG) για την τελική ωρίμανση των ωαρίων, καθώς μειώνει τον κίνδυνο συνδρόμου υπερδιέγερσης των ωοθηκών χωρίς ενδείξεις διαφοράς στο ποσοστό των ζώντων γεννήσεων (σε αντίθεση με τους νέους κύκλους όπου η χρήση αγωνιστή GnRH έχει χαμηλότερο ποσοστό ζώντων γεννήσεων) (Youssef et al., 2014).

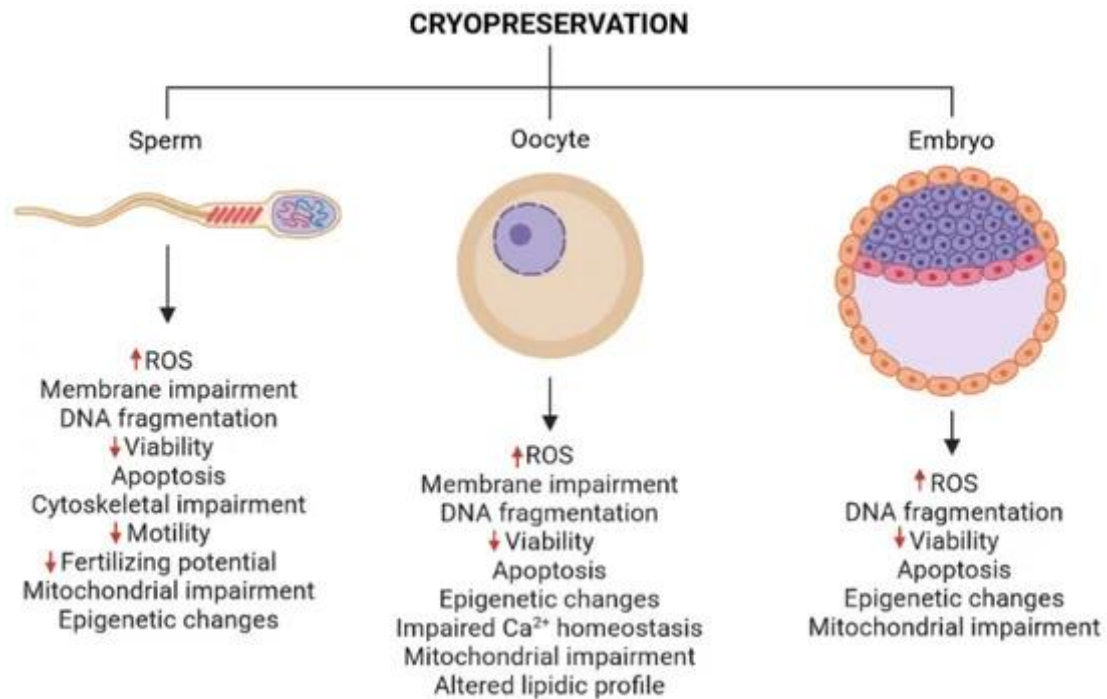
Οι κύριες τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την κρυοσυντήρηση εμβρύου είναι η υαλοποίηση έναντι της αργής προγραμματιζόμενης κατάψυξης (SPF). Μελέτες δείχνουν ότι η υαλοποίηση είναι ανώτερη ή ίση με το SPF όσον αφορά τα ποσοστά επιβίωσης και εμφύτευσης. Η υαλοποίηση φαίνεται να έχει ως αποτέλεσμα μειωμένο κίνδυνο βλάβης του DNA από την αργή κατάψυξη. Η υαλοποίηση εμποδίζει τους κρυστάλλους πάγου στους γαμέτες. Είναι τόσο γρήγορη (-23000 °C/min) που αυτοί οι κρύσταλλοι δεν εμφανίζονται. Από την άλλη, τα έμβρυα μπορούν να καταψυχθούν με SPF σε μέσα κατάψυξης αιθυλενογλυκόλης και να μεταφερθούν απευθείας στους λήπτες αμέσως μετά την απόψυξη με νερό χωρίς εργαστηριακή διαδικασία απόψυξης (Edgar & Gook, 2012).

Στην τρέχουσα κατάσταση της τεχνολογίας, τα πρώιμα έμβρυα που έχουν υποβληθεί σε εμφύτευση κρυοσυντήρησης με τον ίδιο ρυθμό όπως τα ισοδύναμα φρέσκα αντίστοιχα. Το αποτέλεσμα από τη χρήση κρυοσυντηρημένων εμβρύων ήταν ομοιόμορφα θετικό χωρίς αύξηση σε συγγενείς ανωμαλίες ή αναπτυξιακές ανωμαλίες, επίσης μεταξύ φρέσκων και κατεψυγμένων ωαρίων που χρησιμοποιούνται για ενδοκυτταροπλασματική ένεση σπέρματος (ICSI). Στην πραγματικότητα, τα ποσοστά εγκυμοσύνης αυξάνονται μετά από κατεψυγμένη εμβρυομεταφορά και τα περιγεννητικά αποτελέσματα επηρεάζονται λιγότερο, σε σύγκριση με την εμβρυομεταφορά στον ίδιο κύκλο με την υπερδιέγερση των

ωοθηκών. Το ενδομήτριο πιστεύεται ότι δεν είναι βέλτιστα προετοιμασμένο για εμφύτευση μετά από υπερδιέγερση των ωοθηκών και επομένως η κατεψυγμένη εμβρυομεταφορά είναι χρήσιμη για έναν ξεχωριστό κύκλο για να επικεντρωθεί στη βελτιστοποίηση των πιθανοτήτων επιτυχούς εμφύτευσης. Τα παιδιά που γεννήθηκαν από υαλοποιημένες βλαστοκύστες έχουν σημαντικά υψηλότερο βάρος γέννησης από εκείνα που γεννήθηκαν από μη κατεψυγμένες βλαστοκύστες. Για τα έμβρυα πρώιμης διάσπασης, τα κατεψυγμένα φαίνεται να έχουν τουλάχιστον το ίδιο καλό μαιευτικό αποτέλεσμα, μετρούμενο ως πρόωρο τοκετό και χαμηλό βάρος γέννησης για παιδιά που γεννήθηκαν μετά από κρυοσυντήρηση σε σύγκριση με παιδιά που γεννήθηκαν μετά από νέους κύκλους (Wennerholm et al., 2009).

Έχουν αναφερθεί εγκυμοσύνες από έμβρυα που αποθηκεύτηκαν για 27 χρόνια. Μια μελέτη με περισσότερα από 11.000 κρυοσυντηρημένα ανθρώπινα έμβρυα δεν έδειξε σημαντική επίδραση του χρόνου αποθήκευσης στην επιβίωση μετά την απόψυξη για κύκλους δωρεάς IVF ή ωαρίων ή για έμβρυα που είχαν καταψυχθεί στο προπυρηνικό στάδιο ή στα στάδια της διάσπασης. Επιπλέον, η διάρκεια αποθήκευσης δεν είχε σημαντική επίδραση στην κλινική εγκυμοσύνη, τις αποβολές, την εμφύτευση ή το ποσοστό ζώντων γεννήσεων, είτε από εξωσωματική γονιμοποίηση είτε από κύκλους δωρεάς ωαρίων (Konc et al., 2014; Riggs et al., 2012).

Μια μελέτη στη Γαλλία μεταξύ 1999 και 2011 κατέληξε στο αποτέλεσμα ότι η κατάψυξη εμβρύων πριν από τη χορήγηση γοναδοτοξικών παραγόντων χημειοθεραπείας σε γυναίκες προκάλεσε καθυστέρηση της θεραπείας στο 34% των περιπτώσεων και γέννηση ζωντανών στο 27% των επιζώντων περιπτώσεων που ήθελαν να μείνουν έγκυες, με τον χρόνο παρακολούθησης να κυμαίνεται μεταξύ 1 και 13 ετών (Courbiere et al., 2013).



Εικόνα 8. Επιδράσεις της κρυοσυντήρησης σε γεννητικά κύτταρα και έμβρυα

(Πηγή: Estudillo et al., 2021)

4.1.4 Κρυοσυντήρηση ορχικού ιστού

Η κρυοσυντήρηση του ιστού των όρχεων είναι μια πειραματική μέθοδος που χρησιμοποιείται για τη διατήρηση της γονιμότητας σε προ-εφηβικούς άντρες ή σε άνδρες που δεν μπορούν να παράγουν σπέρμα, ώστε να τους δοθεί η δυνατότητα να αποκτήσουν βιολογικά παιδιά. Η τρέχουσα θεραπεία πρώτης γραμμής για τη διατήρηση της γονιμότητας σε άνδρες που υποβάλλονται σε θεραπεία που βλάπτει τον ιστό των όρχεων είναι η κρυοσυντήρηση του σπέρματος. Στα αγόρια που δεν έχουν αρχίσει ακόμη να παράγουν σπέρμα αυτό δεν είναι δυνατό, επομένως η κρυοσυντήρηση του ιστού των όρχεων έχει προταθεί ως εναλλακτική θεραπεία. Αυτή η μέθοδος είναι ακόμα πειραματική και δεν είναι ευρέως διαθέσιμη κλινικά, και ο τρόπος αποκατάστασης της γονιμότητας με κρυοσυντηρημένο ιστό είναι άγνωστος και πειραματικός (Kilcoyne & Mitchell, 2019).

Για τα προεφηβικά αγόρια που υποβάλλονται σε χημειοθεραπεία ή οποιαδήποτε άλλη θεραπεία που μπορεί να είναι σημαντικά γοναδοτοξική, οι επιλογές διατήρησης της γονιμότητας περιλαμβάνουν την κρυοσυντήρηση του ιστού των όρχεων. Αυτή η

διαδικασία γίνεται ιδανικά πριν από την έναρξη οποιασδήποτε θεραπείας για να αποφευχθούν μεταλλαξιογόνες επιπτώσεις στα γεννητικά κύτταρα που διατηρούνται. Αυτές οι διαδικασίες εξακολουθούν να είναι πειραματικές και δεν έχουν ακόμη δημοσιευθεί σαφείς οδηγίες για την αποκατάσταση της γονιμότητας μετά την κρυοσυντήρηση του ορχικού ιστού (Picton et al., 2015).

Οι ιστοί των όρχεων ανακτώνται κατά τη διάρκεια της χειρουργικής επέμβασης και τοποθετούνται αμέσως σε μέσο μεταφοράς στους 4 – 8 °C για να μειωθεί η μόλυνση. Είναι δυνατή η κατάψυξη είτε ολόκληρου ιστού είτε κυτταρικών εναιωρημάτων από τον ορχικό ιστό που εξάγεται, αν και ολόκληρος ο ιστός διατηρεί την ικανότητα να ακολουθήσει μελλοντικές θεραπείες τόσο σε κύτταρα όσο και σε ιστούς και επομένως χρησιμοποιείται ευρύτερα. Ο ορχικός ιστός στη συνέχεια τοποθετείται σε κρυοσωλήνες, που συνήθως περιέχουν σακχαρόζη. Η κρυοσυντήρηση μπορεί να γίνει είτε με αργή κατάψυξη είτε με υαλοποίηση (Onofre et al., 2016).

Έχουν εντοπιστεί πολυάριθμες προκλήσεις στην κρυοσυντήρηση του ιστού των όρχεων, πολλές από τις οποίες οφείλονται στον πολύ μικρό ιστό που είναι διαθέσιμος για έρευνα και στην έλλειψη μακροχρόνιων μελετών. Βιοψίες όρχεων για κρυοσυντήρηση έχουν πραγματοποιηθεί σε πολλά ερευνητικά κέντρα που οδηγούν σε διαφοροποίηση στη διαδικασία και η βέλτιστη διαδικασία δεν έχει ακόμη καθοριστεί. Μετά τη βιοψία του ιστού για κρυοσυντήρηση πρέπει να μεταφερθεί. Ο ιστός πρέπει να παραμείνει βιώσιμος κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας. Υπάρχουν πολλές σημαντικές μεταβλητές όπως η θερμοκρασία, το μέγεθος της βιοψίας, ο χρόνος μεταφοράς και το μέσο αποθήκευσης. Όλα αυτά μπορεί να επηρεάσουν τη μελλοντική βιωσιμότητα του ιστού, αλλά επί του παρόντος δεν υπάρχουν μακροχρόνιες μελέτες ή βέλτιστες κατευθυντήριες γραμμές. Επίσης, ο σκοπός της κρυοσυντήρησης του ιστού των όρχεων είναι η παραγωγή βιώσιμου σπέρματος. Δεν έχει ακόμη δημιουργηθεί σπέρμα με χρήση ανθρώπινου κρυοσυντηρημένου ιστού όρχεων, επομένως δεν γνωρίζουμε αν αυτό θα ήταν επιτυχές. Ακόμη, η μόλυνση του ιστού των όρχεων για κρυοσυντήρηση από κακοήθη κύτταρα προκαλεί ανησυχία. Σε ένα μοντέλο τρωκτικού έχει αποδειχθεί ότι εάν υπάρχουν κακοήθη κύτταρα στον κρυοσυντηρημένο ιστό, μπορεί να προκαλέσει υποτροπή της κακοήθειας που μεταμοσχεύεται στον ξενιστή. Είναι σημαντικό να ληφθεί υπόψη η γενετική σταθερότητα των γαμετών που θα παραχθούν μετά τη μεταμόσχευση του

κρυοσυντηρημένου ιστού. Σε μελέτες σε ποντίκια έχουν παρατηρηθεί κάποιες επιγενετικές αλλαγές που φαίνεται να είναι ασήμαντες. Στην ανθρώπινη καλλιέργεια, παρατηρήθηκαν επιγενετικές αλλαγές στην κατάσταση μεθυλίωσης πολλών αποτυπωμένων γονιδίων, αλλά η σημασία αυτού δεν έχει ακόμη προσδιοριστεί (Kilcoyne & Mitchell, 2019; Onofre et al., 2016).

4.1.5 Κρυοσυντήρηση ωοθηκικού ιστού

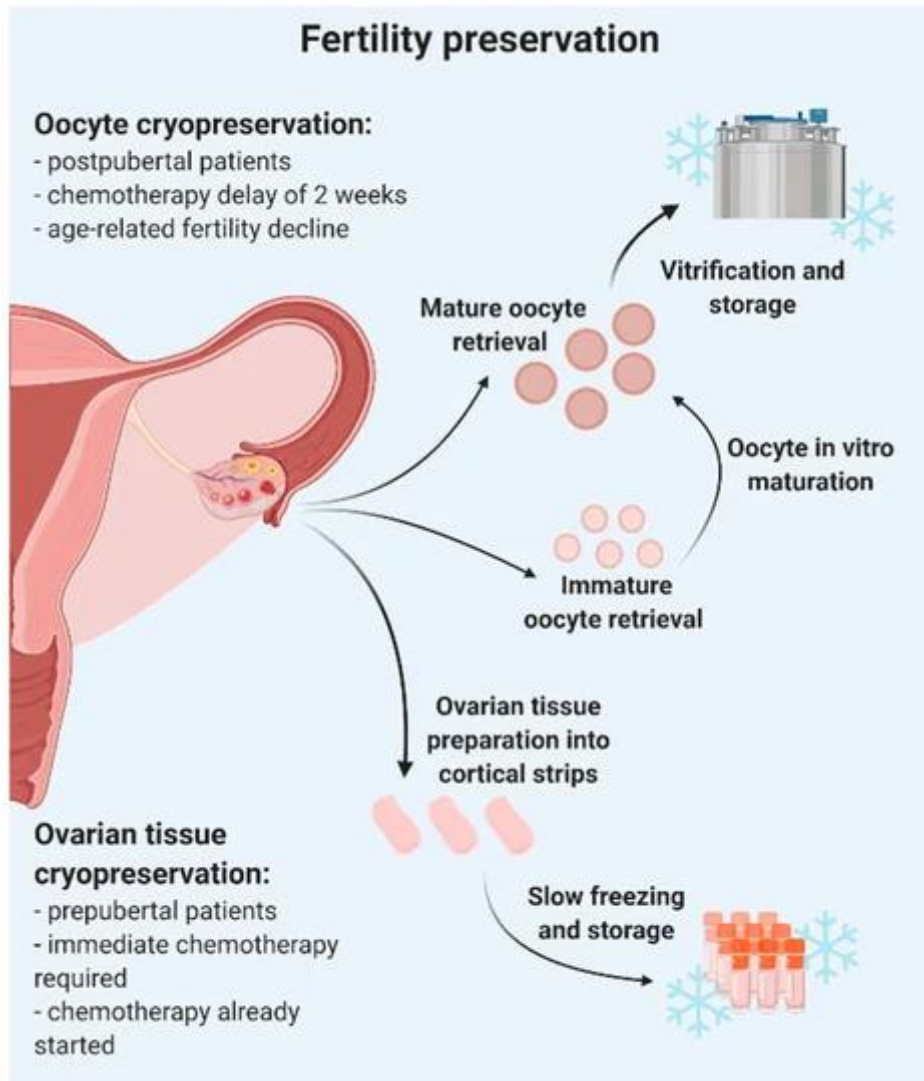
Η κρυοσυντήρηση του ωοθηκικού ιστού είναι η κρυοσυντήρηση του ιστού της ωοθήκης μιας γυναίκας. Η κρυοσυντήρηση του ωοθηκικού ιστού ενδιαφέρει γυναίκες που θέλουν διατήρηση της γονιμότητας πέρα από το φυσικό όριο ή των οποίων το αναπαραγωγικό δυναμικό απειλείται από τη θεραπεία του καρκίνου, για παράδειγμα σε αιματολογικές κακοήθειες ή καρκίνο του μαστού. Μπορεί να πραγματοποιηθεί σε προεφηβικά κορίτσια που διατρέχουν κίνδυνο για πρόωρη ωοθηκική ανεπάρκεια και αυτή η διαδικασία είναι τόσο εφικτή και ασφαλής όσο συγκρίσιμες χειρουργικές επεμβάσεις σε παιδιά (Rivas Leonel, Lucci & Amorim, 2019).

Η διαδικασία είναι να ληφθεί ένα μέρος της ωοθήκης και να πραγματοποιηθεί αργή κατάψυξη πριν την αποθήκευση σε υγρό άζωτο κατά τη διάρκεια της θεραπείας. Στη συνέχεια, ο ιστός μπορεί να αποψυχθεί και να εμφυτευτεί κοντά στη σάλπιγγα, είτε σε φυσική θέση είτε στο κοιλιακό τοίχωμα, όπου αρχίζει να παράγει νέα ωάρια, επιτρέποντας τη φυσιολογική σύλληψη. Έχει βρεθεί ότι η καλλιέργεια ενός αποψυγμένου εμβρυϊκού ωοθηκικού ιστού για λίγες ημέρες πριν από τη μεταμόσχευση μπορεί να είναι ευεργετική για την ανάπτυξη των ωοθυλακίων (Dolmans et al., 2021).

Οι λωρίδες φλοιώδους ωοθηκικού ιστού μπορούν επίσης να κρυοσυντηρηθούν, αλλά πρέπει να εμφυτευθούν εκ νέου στο σώμα για να επιτραπεί στα έγκλειστα ανώριμα ωοθυλάκια να ολοκληρώσουν την ωρίμανση τους. Η *in vitro* ωρίμανση έχει πραγματοποιηθεί πειραματικά, αλλά η τεχνική δεν είναι ακόμη κλινικά διαθέσιμη. Με αυτήν την τεχνική, ο κρυοσυντηρημένος ωοθηκικός ιστός θα μπορούσε ενδεχομένως να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή ωοκυττάρων που μπορούν να υποβληθούν απευθείας σε εξωσωματική γονιμοποίηση. Πιο πρόσφατα, ο άνθρωπος

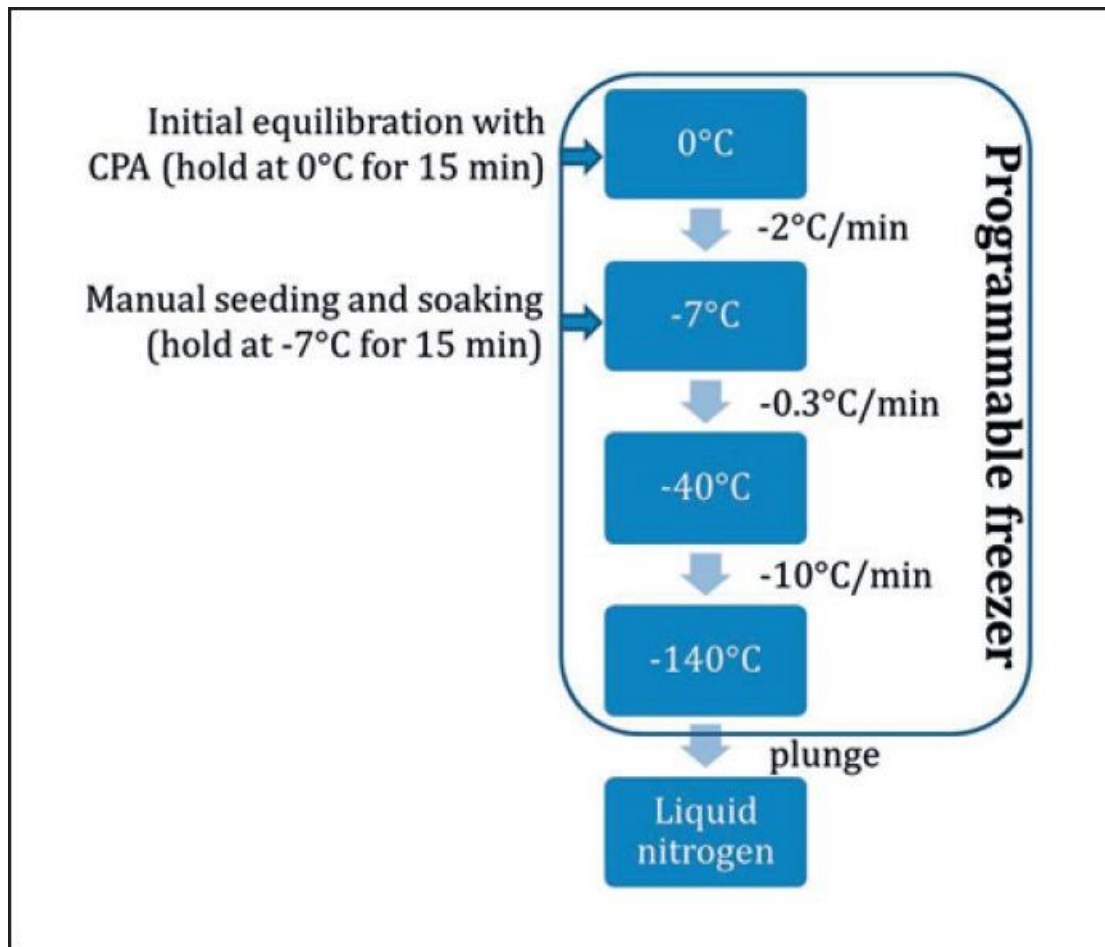
ωοθηκικός ιστός έχει επίσης κρυσυντηρηθεί μέσω υαλοποίησης. Μέχρι στιγμής, έχουν αναφερθεί μόνο 2 ζωντανές γεννήσεις μετά από κρυσυντήρηση ανθρώπινου ωοθηκικού ιστού χρησιμοποιώντας αυτή τη διαδικασία (Kawamura et al., 2013; Suzuki et al., 2015).

Γυναίκες με κακοήθη νοσήματα που υποβάλλονται σε θεραπεία με χρήση ακτινοβολίας ή γοναδοτοξικών φαρμάκων, έχουν αυξημένη πιθανότητα απώλειας της λειτουργίας των ωοθηκών με αποτέλεσμα την υπογονιμότητα. Ο φλοιώδης ιστός των ωοθηκών φιλοξενεί το μεγαλύτερο μέρος της δεξαμενής των ωοθυλακίων. Μόλις θεραπευθεί μια ασθενής από την κακοήθη νόσο του, ο ιστός μπορεί να αποψυχθεί και στη συνέχεια να μεταμοσχευθεί για τη δυνατότητα αποκατάστασης της λειτουργίας των ωοθηκών. Μετά την αυτόματη μεταμόσχευση, οι ασθενείς έδειξαν επανάληψη της δραστηριότητας των ωοθηκών για να συμπεριλάβει την πρώτη έμμηνου ρύση στις 14 έως 25 εβδομάδες και την ανάπτυξη των ωοθυλακίων 8 έως 21 εβδομάδες (Rivas Leonel, Lucci & Amorim, 2019).



Εικόνα 9. Η κρυοσυντήρηση ιστού ωαρίων και ωθηκών ως επιλογές διατήρησης της γονιμότητας

(Πηγή: Dolmans et al., 2021)



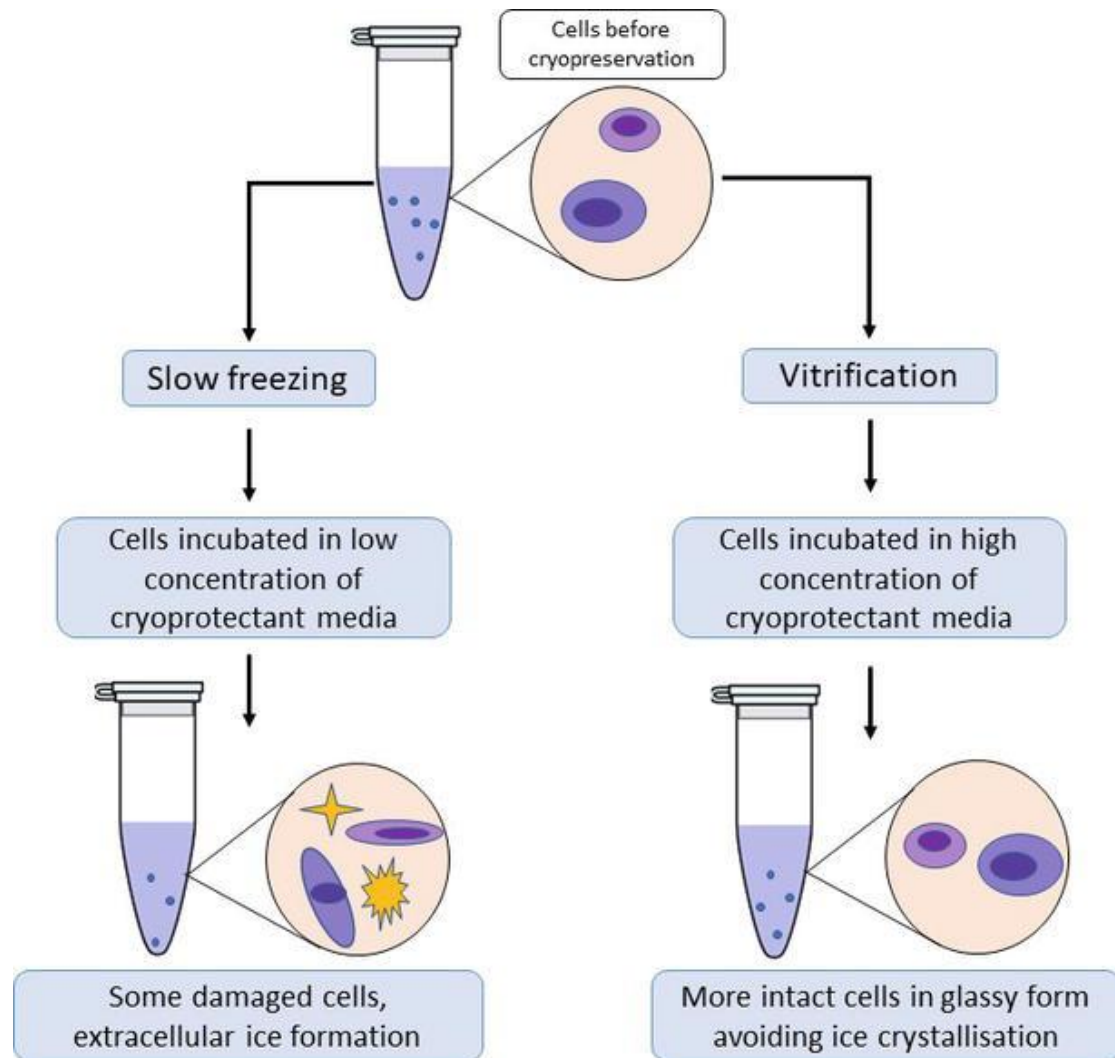
Εικόνα 10. Καμπύλη ψύξης σε πρωτόκολλα αργής κατάψυξης για ανθρώπινο ωθητικό ιστό

(Πηγή: Rivas Leonel, Lucci & Amorim, 2019)

4.2 Τεχνικές κρυοσυντήρησης

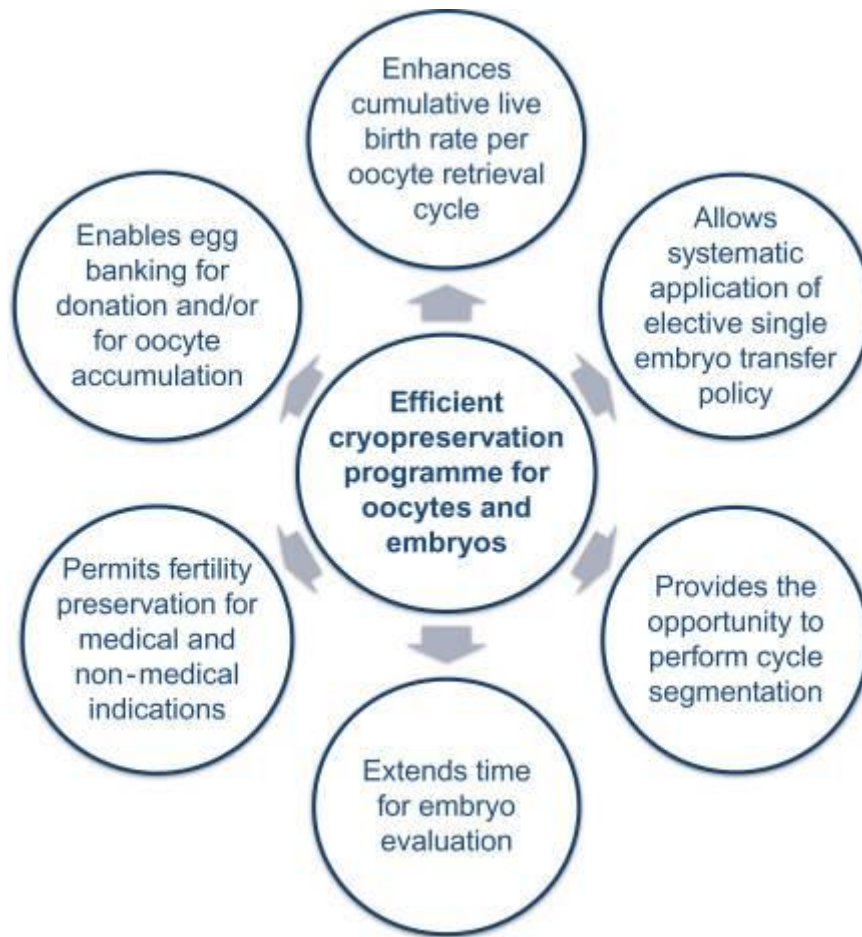
Οι δύο βασικές μέθοδοι κρυοσυντήρησης περιλαμβάνουν τη συμβατική αργή κατάψυξη και τη μέθοδο ταχείας κατάψυξης, γνωστή ως υαλοποίηση. Αυτά τα πρωτόκολλα απαιτούν διαφορετικές συγκεντρώσεις CPA και εφαρμόζουν διαφορετικούς ρυθμούς ψύξης. Τα κύρια βήματα στην κρυοσυντήρηση είναι (1) η ανάμειξη των CPA με κύτταρα ή ιστούς πριν από την ψύξη, (2) ψύξη των κυττάρων ή των ιστών σε χαμηλή θερμοκρασία και αποθήκευση τους, (3) θέρμανση των κυττάρων ή των ιστών, και (4) αφαίρεση των CPA από τα κύτταρα ή τους ιστούς μετά την απόψυξη. Η κατάλληλη χρήση των CPA είναι επομένως σημαντική για τη

βελτίωση της βιωσιμότητας του δείγματος που πρόκειται να κρυοσυντηρηθεί (Jang et al., 2017).



Εικόνα 11. Σύγκριση μεθόδου αργής κατάψυξης και υαλοποίησης

(Πηγή: Aljaser, 2022)



Εικόνα 12. Κλινικές επιπτώσεις που σχετίζονται με τη βελτιστοποίηση της κρυοσυντήρησης στην εξωσωματική γονιμοποίηση

(Πηγή: Rienzi et al., 2017)

4.2.1 Αργή κατάψυξη

Στη συμβατική αργή κατάψυξη, το υλικό ψύχεται σε θερμοκρασίες κάτω από το σημείο πήξης με ή χωρίς σπορά και στη συνέχεια, με ελεγχόμενο ρυθμό ψύξης, καταψύχεται αργά σε θερμοκρασία μεταξύ -35°C και -130°C πριν βυθιστεί σε υγρό άζωτο. Η αργή προγραμματιζόμενη κατάψυξη αναπτύχθηκε στις αρχές της δεκαετίας του 1970 και τελικά οδήγησε στην πρώτη γέννηση ανθρώπινου κατεψυγμένου εμβρύου το 1984. Ο αριθμός των ζώντων γεννήσεων από κατεψυγμένα έμβρυα «αργά κατεψυγμένα» υπολογίζεται σε περίπου 300.000 έως 400.000 ή το 20% των εκτιμώμενων 3 εκατομμυρίων γεννήσεων εξωσωματικής γονιμοποίησης. Έχει αποδειχθεί ότι ο βέλτιστος αρχικός ρυθμός ψύξης του δείγματος από τη θερμοκρασία

δωματίου στους 5°C είναι 0,5–1°C/min. Στη συνέχεια, το δείγμα καταψύχεται από 5°C έως -80°C με ρυθμό 1–10°C/min. Στη συνέχεια, το δείγμα βυθίζεται σε υγρό άζωτο στους -196°C (Konc et al., 2014).

Ωστόσο, για πολλά χρόνια, οι προσπάθειες κρυοσυντήρησης μεγάλων τμημάτων ιστού και ολόκληρων οργάνων ήταν αναποτελεσματικές λόγω προβλημάτων που σχετίζονται με τη μεταφορά θερμότητας και μάζας. Η μεταφορά θερμότητας μεταξύ της εξωτερικής περιοχής και του κέντρου μεγάλων τμημάτων ιστού δημιουργεί μη ομοιογενείς ρυθμούς ψύξης μεταξύ του πυρήνα και της περιφέρειας. Επιπλέον, μεγάλα βιολογικά δείγματα υποφέρουν από τη μακρά ισοθερμική περίοδο που προκαλείται από τη μαζική απελευθέρωση λανθάνουσας θερμότητας που εμφανίζεται κατά τη διαδικασία σχηματισμού πάγου. Το φαινόμενο της λανθάνουσας θερμότητας προκαλείται από την ενέργεια που δημιουργούνται από μόρια νερού όταν επανασυνδεθούν για να σχηματίσουν κρυστάλλους πάγου. Αυτή η ενέργεια απελευθερώνεται με τη μορφή θερμότητας, η οποία, με τη σειρά της, προκαλεί αύξηση της θερμοκρασίας των γύρω δομών. Η θερμότητα συνήθως μεταφέρεται στους κρυστάλλους πάγου που μόλις σχηματίστηκαν επειδή είναι κατασκευασμένοι από αγωγίμο υλικό. Η συνέπεια αυτής της φυσικής διαδικασίας είναι μια παροδική απόψυξη που ακολουθείται από εκ νέου κατάψυξη, σε μια ακολουθία που επαναλαμβάνεται αρκετές φορές στο πάχος του δείγματος ιστού, προκαλώντας σοβαρή κυτταρική βλάβη. Οι βλάβες συνήθως μειώνονται με τη διατήρηση της αναλογίας επιφάνειας προς όγκο τόσο υψηλή όσο το δυνατόν, έτσι ώστε η υπερβολική λανθάνουσα θερμότητα να αφαιρείται ρυθμίζοντας τον ρυθμό ψύξης με σκοπό την επίτευξη ομοιόμορφης κατάψυξης. Όσο μικρότερο είναι το δείγμα, τόσο πιο γρήγορα απομακρύνεται η θερμότητα που απελευθερώνεται από το εσωτερικό του τμήμα, ελαχιστοποιώντας έτσι τις ζημιές. Ωστόσο, η ανάγκη για όσο το δυνατόν μικρότερα δείγματα έρχεται σε αντίθεση με την απαίτηση να υπάρχει ένας καλά διατηρημένος μεγάλος πληθυσμός ωοθυλακίων κατά την απόψυξη. Είναι επίσης αδύνατο να μειωθεί η αναλογία επιφάνειας προς όγκο σε δείγματα όπως ολόκληρα όργανα όπως ολόκληρες ωοθήκες. Ως εκ τούτου, έπρεπε να εφαρμοστούν νέες στρατηγικές. Το πρόβλημα με τη μεταφορά μάζας πρέπει να αντιμετωπιστεί τόσο πριν από την κατάψυξη όσο και, αργότερα, μετά την απόψυξη. Πριν από την κατάψυξη, η χρήση διαλυμάτων κρυοπροστατευτικών ικανών να διεισδύσουν στον

ιστό σε αρκετό βάθος για να φτάσουν σε κάθε κύτταρο του ιστού δημιουργεί προστασία από τις ζημιές από πάγο. Μετά την απόψυξη, τα κρυοπροστατευτικά διαλύματα πρέπει στη συνέχεια να αφαιρεθούν πριν από τη μεταμόσχευση επειδή μπορεί να είναι τοξικά όταν ο ιστός ή το όργανο βρίσκεται σε φυσιολογική θερμοκρασία (Morris et al., 2006; Balasubramanian & Cogger, 2005; Koshimoto & Mazur, 2002).

4.2.2 Υαλοποίηση

Η υαλοποίηση είναι μια διαδικασία κατά την οποία αποφεύγεται ο σχηματισμός κρυστάλλων πάγου εκθέτοντας ιστούς ή κύτταρα σε υψηλές συγκεντρώσεις κρυοπροστατευτικών ακολουθούμενη από ταχεία ψύξη με βύθιση στο υγρό άζωτο σε θερμοκρασίες -210°C . Για πολλά χρόνια, αργή κατάψυξη και όχι υαλοποίηση, ήταν η μέθοδος εκλογής για την κρυοσυντήρηση εμβρύου. Το 1985, αναφέρθηκε η πρώτη επιτυχής υαλοποίηση εμβρύων ποντικού με τη χρήση δείγματος σχετικά μεγάλου όγκου. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η υαλοποίηση είναι η διαδικασία κατά την οποία ένα δείγμα στερεοποιείται χωρίς το σχηματισμό κρυστάλλων πάγου, καταλήγοντας έτσι σε μια υαλώδη άμορφη κατάσταση (Arav et al., 2002). Οι κύριοι παράγοντες που επηρεάζουν την πιθανότητα εμφάνισης υαλοποίησης είναι οι εξής (Arav & Patrizio, 2019):

- Όγκος δείγματος - όσο χαμηλότερος είναι ο όγκος, τόσο μεγαλύτερες είναι οι πιθανότητες να συμβεί υαλοποίηση.
- Ρυθμός ψύξης—καθώς αυξάνεται ο ρυθμός ψύξης, μειώνονται οι πιθανότητες να αναπτυχθεί ο πάγος σε μεγάλους κρυστάλλους.
- Ιξώδες δείγματος—όσο υψηλότερο είναι το ιξώδες του δείγματος, τόσο μεγαλύτερες είναι οι πιθανότητες να αποφευχθεί η κρυστάλλωση πάγου

Σύμφωνα μάλιστα με τους Arav και Patrizio (2019), η εξίσωση για την πιθανότητα εμφάνισης υαλοποίησης είναι η εξής:

$$\text{Πιθανότητα εμφάνισης υαλοποίησης} = \frac{\text{Ρυθμός ψύξης ή θέρμανσης} \times \text{Ιξώδες}}{\text{Όγκος}}$$

Το 1989, η μέθοδος «ελάχιστου μεγέθους σταγόνας» (MDS) αναπτύχθηκε από τον Arav. Ωστόσο, η υαλοποίηση ως μεθοδολογία για τη διατήρηση μεγάλων βιολογικών δειγμάτων όπως αγγειωμένα όργανα έχει πολλά μειονεκτήματα: χημική τοξικότητα και οσμωτικό σοκ μετά από έκθεση σε πολύ υψηλή (>50%) συγκεντρώσεις διαλυμάτων κρυοπροστατευτικών, κατάγματα που προκαλούνται στο στερεοποιημένο όργανο από τη διαδικασία υαλοποίησης, και απουαλοποίηση εάν η θερμοκρασία αποθήκευσης είναι πάνω από τη θερμοκρασία μετάπτωσης υάλου. Η υαλοποίηση είναι πλέον η μέθοδος επιλογής για τη διατήρηση ωαρίων και εμβρύων, αλλά σιγά σιγά κερδίζει αποδοχή και για τον γοναδικό ιστό. Ωστόσο, η διαδικασία είναι επαχθής, απαιτεί προσωπικό με υψηλή εξειδίκευση και δεν είναι τυποποιημένη, παράγοντας έτσι μεταβλητά αποτελέσματα (Arav & Patrizio, 2019).

Κεφάλαιο 5 - Ηθικά Ζητήματα στην Ιατρικώς Υποβοηθούμενη Αναπαραγωγή

5.1 Ηλικία

Ένα από τα ζητήματα που δημιουργούν ηθικούς προβληματισμούς στην ιατρικώς υποβοηθούμενη αναπαραγωγή είναι η ηλικία των γονέων, και ιδιαίτερα η ηλικία της μητέρας. Κυριαρχεί η άποψη ότι οι γονείς με προχωρημένη ηλικία δεν μπορούν αποτελεσματικά να ανταποκριθούν στα καθήκοντά τους ως γονείς. Ένα ακόμη ζήτημα που προκύπτει είναι το κατά πόσο χρονικό διάστημα το παιδί θα μπορεί να έχει δίπλα του τους γονείς. Αυτό το ζήτημα προκύπτει λόγω του προσδόκιμου ζωής και κυριαρχεί η άποψη ότι το παιδί δεν μπορεί πιθανώς να έχει τη φυσική παρουσία των γονέων του μέχρι την ενηλικίωση τουλάχιστον. Στην Ευρώπη, οι γυναίκες ζουν κατά μέσο όρο μέχρι τα 82 και οι άνδρες μέχρι τα 76. Άρα, θεωρείται λογική η χρήση της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής έως τα 50 έτη. Ωστόσο, προκύπτει και πάλι το ερώτημα για πόσα χρόνια θα μπορούν οι γονείς να αυτοεξυπηρετούνται ενώ παράλληλα έχουν την ευθύνη της ανατροφής ενός παιδιού. Επίσης, η ιατρικώς υποβοηθούμενη αναπαραγωγή εγκυμονεί και ορισμένους κινδύνους, οι οποίοι αυξάνονται με την ηλικία της γυναίκας. Έτσι, μπορεί να εμφανιστούν επιπλοκές τόσο στην κύηση όσο και στον τοκετό. Επιπλέον, αν και οι νέες ιατρικές τεχνολογίες μπορούν να εξασφαλίσουν σε μια γυναίκα που είναι στην εμμηνόπαυση ή και μετά την εμμηνόπαυση, να γίνει μητέρα, τίθεται το ηθικό ζήτημα ότι η τεκνοποίηση σε αυτή την προχωρημένη ηλικία αντιτίθεται με την ανθρώπινη φύση και τη ‘‘φυσιολογική’’ τεκνοποίηση, και προκύπτει το ερώτημα του κατά πόσο οι ιατροί έχουν το δικαίωμα να επέμβουν στην ανθρώπινη φύση, θέτοντας μάλιστα σε κίνδυνο τόσο τη γυναίκα όσο και το έμβρυο. Παρόλα αυτά, σύμφωνα με μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί, οι μητέρες προχωρημένης ηλικίας μπορούν ικανοποιητικά να εξασφαλίσουν τη σωστή και υγιή ανατροφή ενός παιδιού τόσο σε φυσικό/σωματικό επίπεδο όσο και σε ψυχολογικό (Κατσιμίγκας & Καμπά, 2010; Φράγκου & Γαλάνης, 2016; Boivin et al., 2009).

5.2 Παρένθετη μητρότητα

Η παρένθετη μητρότητα εγείρει πολλά ηθικά ζητήματα. Το πρώτο ζήτημα είναι το ότι η παρένθετη μητρότητα μπορεί να δημιουργήσει προβλήματα μεταξύ των συζύγων, να διαταράξει τη σχέση του ανδρόγυνου και να οδηγήσει σε διαζύγιο. Η παρένθετη μητρότητα αποτελεί μια εύθραυστη συναισθηματική κατάσταση που βιώνουν οι σύζυγοι. Μάλιστα, στην περίπτωση που μόνο ο ένας είναι ο φυσικός γονέας, αυτό οδηγεί σε μια μη ισοδύναμη σχέση με το παιδί, γεγονός που ενδεχομένως προκαλέσει συγκρούσεις, και κατά συνέπεια έχει αρνητικό αντίκτυπο στην ψυχική υγεία του παιδιού. Προβλήματα δημιουργούνται και με τη φέρουσα το έμβρυο μητέρα, αφού αναπτύσσεται μια σχέση μεταξύ εκείνης και του εμβρύου, η οποία δεν γίνεται να καταστραφεί. Η ευημερία του παιδιού ίσως κλονιστεί εάν αποχωριστεί από τη ζωή του τη γυναίκα που το εγκυμονούσε 9 μήνες. Αυτό δύναται να συμβεί γιατί κατά τη διάρκεια της κύησης, η γυναίκα μεταφέρει στο παιδί σημαντικά ενδοκρινικά και νευρολογικά χαρακτηριστικά, καθώς και χαρακτηριστικά της προσωπικότητας. Άλλο ένα ηθικό ζήτημα αφορά την εμπορευματοποίηση της τεκνοποίησης, αφού η παρένθετη μητρότητα αποτελεί μια οικονομική εκμετάλλευση της επιθυμίας ενός ζευγαριού να αποκτήσουν παιδί, αλλά και μια οικονομική εκμετάλλευση γυναικών που ανήκουν σε ευάλωτους πληθυσμούς (π.χ. πρόσφυγες, άτομα με κακή οικονομική κατάσταση), οι οποίες για οικονομικούς λόγους “αναγκάζονται” να γίνουν παρένθετες μητέρες. Ακόμη, μετά τον τοκετό, η γυναίκα είναι σε μια εύθραυστη συναισθηματική κατάσταση, και αυτό μπορεί να συντελέσει στο γεγονός να αρνηθεί εν τέλει να δώσει το παιδί στους γονείς. Ίσως βέβαια και οι γονείς αρνηθούν να πάρουν το παιδί, αν για παράδειγμα αυτό γεννηθεί με κάποιο πρόβλημα υγείας. Για αυτό μάλιστα στην πλειοψηφία των περιπτώσεων, επιλέγονται για παρένθετες μητέρες άτομα από το συγγενικό περιβάλλον, όπου μπορούν να είναι γνωστές όλες οι πληροφορίες σχετικά με την υγεία και την κληρονομικότητα. Αλλά και σε αυτήν την περίπτωση υπάρχουν προβλήματα. Η συγγενικότητα αυξάνει τον κίνδυνο για διαμάχες αφού συχνά οι γονείς αισθάνονται ότι απειλούνται αναφορικά με το ρόλο τους αφού το παιδί έρχεται συχνά σε επαφή με τη φυσική του μητέρα, ενώ επίσης φοβούνται ότι μπορεί να αποκαλυφθεί στο παιδί ποια είναι η φυσική του μητέρα. Όλα αυτά δημιουργούν ψυχολογικά προβλήματα στο παιδί και επιβαρύνουν συναισθηματικά το ανδρόγυνο. Τέλος, προκύπτει το ηθικό ζήτημα του κατά πόσο οι

γενετικοί γονείς έχουν το δικαίωμα να εισέλθουν στη ζωή της παρένθετης μητέρας. Δηλαδή, υπάρχουν περιπτώσεις όπου η έγκυος καπνίζει ή καταναλώνει αλκοόλ ή ακόμη και απειλεί με έκτρωση, έχοντας οικονομικά κίνητρα. Έτσι λοιπόν, επιβαρύνεται η υγεία του εμβρύου (Brezina & Zhao, 2012; Φράγκου & Γαλάνης, 2016).

5.3 Κρυοσυντήρηση

Τα ηθικά ζητήματα που αφορούν την κρυοσυντήρηση προκύπτουν κυρίως από το ερώτημα που σχετίζεται με τη μέγιστη δυνατή χρονική περίοδο που τα κρυοσυντηρημένα έμβρυα μπορούν να αποθηκευτούν και να συντηρηθούν. Η πλειοψηφία των επιτροπών δεοντολογίας προτείνουν η κρυοσυντήρηση να διαρκεί μέχρι 10 χρόνια. Αυτό βασίζεται στην άποψη ότι δεν είναι ακόμη πλήρως γνωστές οι επιπτώσεις μιας μακροχρόνιας κρυοσυντήρησης, ενώ επίσης μετά από 10 χρόνια τα άτομα που έχουν δώσει το γενετικό υλικό μπορεί να έχουν χωρίσει ή ακόμη και πεθάνει. Παράλληλα, προκύπτει το ζήτημα σχετικά με το τι θα γίνουν τα πλεονάζοντα έμβρυα που έχουν προκύψει και ποιος θα αποφασίσει εάν θα καταστραφούν ή εάν θα δοθούν για ερευνητικούς σκοπούς ή εάν θα δοθούν σε άλλο ζευγάρι που προσπαθεί να τεκνοποιήσει. Τα έμβρυα αυτά, αν και δημιουργούνται σε εργαστήριο, θεωρούνται κομμάτι του σώματος της γυναίκας, επομένως ουσιαστικά εκείνη έχει το δικαίωμα να αποφασίσει τι θα γίνουν τα έμβρυα. Παρόλα αυτά, υπάρχει και η άποψη κατά την οποία το έμβρυο θεωρείται άνθρωπος εν δυνάμει. Η άποψη αυτή κυριαρχεί, και με βάση αυτήν, η όποια χρήση του εμβρύου πρέπει να γίνεται πρωτίστως με σεβασμό στα δικαιώματα αυτής της μελλοντικής ανθρώπινης ύπαρξης. Επίσης, οι επιτροπές δεοντολογίες επισημαίνουν ότι τα έμβρυα αυτά δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται για κλωνοποίηση, χειραγώγηση ή μεταφορά σε άλλα είδη (The ESHRE Task Force on Ethics and Law, 2004; Φράγκου & Γαλάνης, 2016).

Επίλογος

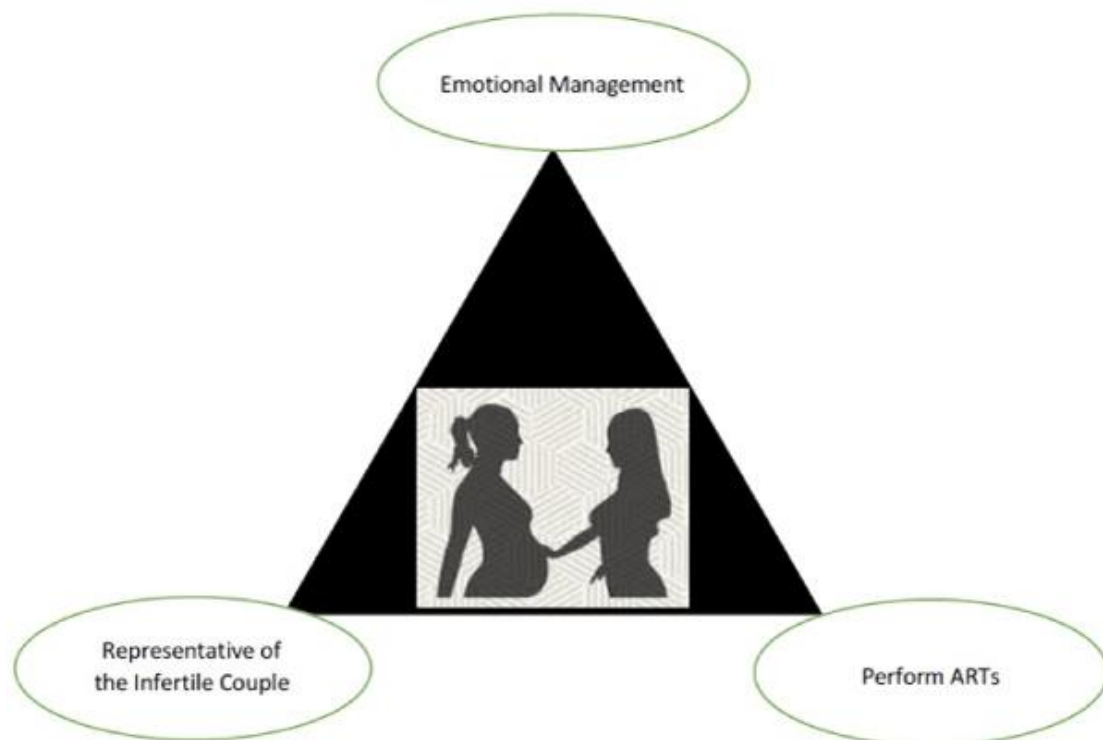
Ο ρόλος των μαιών στον τοκετό είναι καλά εδραιωμένος κατά τη διάρκεια των αιώνων. Οι μαιές ήταν, παραδοσιακά γυναίκες, που μπορούσαν να βοηθήσουν τις έγκυες γυναίκες σε όλη τη διάρκεια του τοκετού. Με τα χρόνια αυτό το επάγγελμα έχει εξελιχθεί και στις μέρες μας οι μαιές, άνδρες ή γυναίκες, είναι σε θέση να βοηθήσουν τις γυναίκες κατά την προγεννητική, μεταγεννητική και φυσικά κατά την περίοδο του τοκετού. Αυτοί οι επαγγελματίες υγείας παρέχουν υποστήριξη στις έγκυες γυναίκες όχι μόνο σωματικά αλλά και συναισθηματικά (Tsonis et al., 2019).

Η μαιά αναγνωρίζεται ως υπεύθυνος επαγγελματίας που εργάζεται σε συνεργασία με γυναίκες για να παρέχει την απαραίτητη υποστήριξη, φροντίδα και συμβουλές κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, του τοκετού και της περιόδου μετά τον τοκετό, για τη διενέργεια τοκετών με ευθύνη της μαιάς και την παροχή φροντίδας στο νεογέννητο και το βρέφος. Αυτή η φροντίδα περιλαμβάνει προληπτικά μέτρα, την προώθηση του φυσιολογικού τοκετού, την ανίχνευση επιπλοκών στη μητέρα και το παιδί, την πρόσβαση σε ιατρική περίθαλψη ή άλλη κατάλληλη βοήθεια και τη λήψη μέτρων έκτακτης ανάγκης. Η μαιά έχει ένα σημαντικό καθήκον στη συμβουλευτική και εκπαίδευση υγείας, όχι μόνο για τη γυναίκα, αλλά και μέσα στην οικογένεια και την κοινότητα. Αυτή η εργασία θα πρέπει να περιλαμβάνει προγεννητική εκπαίδευση και προετοιμασία για τη γονεϊκότητα και μπορεί να επεκταθεί στην υγεία των γυναικών, τη σεξουαλική ή αναπαραγωγική υγεία και τη φροντίδα των παιδιών (Wilson & Leese, 2013).

Οι μαιές διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο σε περιπτώσεις υπογονιμότητας και εμπλέκονται σε πολλές πτυχές των υπογόνιμων ζευγαριών. Αυτοί οι επαγγελματίες υγείας συμμετέχουν στη διαχείριση της υπογονιμότητας, στην ψυχολογική υποστήριξη του υπογόνιμου ζευγαριού και ο ρόλος τους θεωρείται καθοριστικός. Σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Ένωση, οι νομικές ρυθμίσεις για την τεχνολογία υποβοηθούμενης αναπαραγωγής απαιτούν, μεταξύ άλλων, την παρουσία τουλάχιστον μίας μαιάς με τουλάχιστον δύο χρόνια εμπειρία στον τομέα για τη σωστή λειτουργία μονάδας γονιμότητας και αναπαραγωγικής σωστά (Gameiro et al., 2015).

Τα θέματα υπογονιμότητας έχουν ισχυρή συσχέτιση με το άγχος, καθώς οι προσπάθειες αποτυχίας τρομοκρατούν τις γυναίκες που υποβάλλονται σε αυτή τη διαδικασία. Αυτή η κατάσταση απαιτεί επαγγελματική προσέγγιση και ευαισθητοποίηση των εμπλεκόμενων επαγγελματιών υγείας. Οι ασθενείς επιδιώκουν να κατανοήσουν τις ψυχολογικές παραμέτρους της πάθησης και οι μαιές ενσωματώνουν τέλεια αυτόν τον ρόλο. Στόχος της ενασχόλησής τους είναι η συνεχής υποστήριξη της υπογόνιμης γυναίκας καθώς και η συμβουλευτική του ζευγαριού σε όλη αυτή την εμπειρία. Μελέτες επιβεβαιώνουν ότι οι γυναίκες θυμούνται, πρώτα και κύρια, τις μαιές που τις στήριζαν και όχι το ιατρικό προσωπικό. Με άλλα λόγια, δεν αναπολούν το άτομο που έδωσε λύση στην κατάστασή τους, αλλά αυτό που τους καταλάβαινε από την αρχή. Τα υπογόνιμα ζευγάρια χωρίς την παρουσία μαιάς τείνουν να αισθάνονται λιγότερο ασφαλή. Οι μαιές φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στη διαχείριση του άγχους του υπογόνιμου ζευγαριού. Μέχρι πρόσφατα η κοινή πρακτική, κατά την αντιμετώπιση του στρες στην υπογονιμότητα, εμπλέκονταν ομάδες υποστήριξης με βάση την κλινική, ως πιο παραδοσιακή προσέγγιση, ατομική ψυχολογική υποστήριξη, συμβουλευτική και φυσικά διαδικτυακή αναζήτηση για τρέχοντα δεδομένα. Μελέτες έχουν δείξει ότι η μαιά μπορεί να ανταποκριθεί στα ανωτέρω. Αυτοί οι επαγγελματίες μπορούν να παρέχουν συναισθηματική υποστήριξη και πληροφορίες που βασίζονται σε στοιχεία, προσφέρουν επίσης καλύτερη επικοινωνία σεβόμενοι τις αξίες του ασθενούς (Warmelink et al., 2016; Tsonis et al., 2019).

Επίσης, η μαιά παίζει καθοριστικό ρόλο όταν πρόκειται να γεφυρώσει το χάσμα μεταξύ της δύσκολης ιατρικής ορολογίας και της κατανόησης των ασθενών. Η ιατρική ορολογία και οι συναισθηματικά αποστασιοποιημένες και απρόσωπες ιατρικές παρεμβάσεις αποτελούν απειλή για την επιτυχία των θεραπειών γονιμότητας. Οι γυναίκες είναι πιο πιθανό να συμμορφωθούν με τη θεραπεία που απαιτείται όταν είναι βέβαιες ότι κατανοούν την αναγκαιότητα της παρέμβασης. Οι μαιές είναι οι εκπρόσωποι των υπογόνιμων ζευγαριών. Η συζήτηση των ανησυχιών, η εξήγηση των θεραπειών και η παροχή σχολίων στους εμπλεκόμενους γιατρούς έχει ως αποτέλεσμα μια καλύτερη υπηρεσία υγειονομικής περίθαλψης (Allot, Payne & Dann, 2013).



Εικόνα 13. Οι διακριτοί ρόλοι της μαιάς στις μονάδες υποβοηθούμενης αναπαραγωγής

(Πηγή: Tsonis et al., 2019)

Η κρυοσυντήρηση είναι ένα ουσιαστικό συστατικό στη θεραπεία ασθενών που υποβάλλονται σε υποβοηθούμενη αναπαραγωγή και θα πρέπει να βελτιστοποιείται σε κάθε εργαστήριο εξωσωματικής γονιμοποίησης. Η υαλοποίηση είναι η καλύτερη στρατηγική για την κρυοσυντήρηση όλων των αναπτυξιακών σταδίων από το ώριμο ωάριο έως τα έμβρυα στο στάδιο της βλαστοκύστης. Καθώς αυτή η τεχνική αυξάνει σημαντικά τα ποσοστά κρυοεπιβίωσης ωαρίων και εμβρύων σε σύγκριση με την αργή κατάψυξη, έχει οδηγήσει σε βελτίωση των κλινικών αποτελεσμάτων σε κρυοσυντηρημένους κύκλους και επίσης έχει κάνει τη διατήρηση της γονιμότητας και τις τράπεζες ωαρίων δότη βιώσιμη επιλογή για τους ασθενείς. Επιπλέον, επιτρέπει την αξιόπιστη κατάτμηση του κύκλου της εξωσωματικής γονιμοποίησης αποσυνδέοντας προσωρινά τη διαδικασία διέγερσης από την εμβρυομεταφορά. Κατά συνέπεια, αυτό παρέχει επιπλέον χρόνο για νέες επεμβατικές και μη επεμβατικές μεθόδους επιλογής εμβρύου. Πιο πρόσφατες προσεγγίσεις όπως η ταξινόμηση κυττάρων με βάση τη νανοτεχνολογία μπορεί να προσφέρουν βελτιωμένη βιωσιμότητα μετά την κρυοσυντήρηση και θα μπορούσαν τελικά να γίνουν μέρος του

τυπικού περιβάλλοντος κρυοσυντήρησης. Η κατανόηση των αρχών πίσω από τη χημεία και τη βιολογία των διαδικασιών κατάψυξης και απόψυξης θα μπορούσε να επιτρέψει την ανάπτυξη πιο αποτελεσματικών διαδικασιών για την κρυοσυντήρηση των κυττάρων και να επεκτείνει περαιτέρω τις κλινικές τους εφαρμογές.

Συμπερασματικά, η κρυοσυντήρηση ωαρίων είναι μια αρκετά συνηθισμένη τεχνολογία υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, η οποία ωστόσο, όπως όλες οι άλλες τεχνολογίες υποβοηθούμενης αναπαραγωγής ενέχουν κινδύνους, πιθανότητες αποτυχίας, και υπάρχουν διάφορα είδη και τεχνικές. Είναι λοιπόν χρήσιμος ο ρόλος της μαιάς στην ψυχολογική υποστήριξη αναφορικά με την υπογονιμότητα και το άγχος που προκύπτει λόγω της κρυοσυντήρησης, στην ενημέρωση των ασθενών για τις τεχνικές, τις μεθόδους και τους κινδύνους της, αλλά και στην γεφύρωση του χάσματος μεταξύ των ιατρικών ορολογιών και της κατανόησης του ασθενούς. Παρόλα αυτά, καθίσταται επιτακτική η ανάγκη της διερεύνησης της σημαντικότητας και της αποτελεσματικότητας του ρόλου της μαιάς αναφορικά με την κρυοσυντήρηση, αλλά και την υποβοηθούμενη αναπαραγωγή γενικότερα, αφού η βιβλιογραφία είναι ισχνή. Κρίνεται επίσης αναγκαία η μελέτη αποτελεσματικών μαιευτικών παρεμβάσεων για τις τεχνολογίες υποβοηθούμενης αναπαραγωγής.

Βιβλιογραφία

- Adams, G.D., Cook, I., & Ward, K.R. (2015). The Principles of Freeze-Drying. *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols Methods in Molecular Biology*, 121-143.
- Ahmad, A., Ahmed, A., & Patrizio, P. (2013). Cystic fibrosis and fertility. *Current Opinion in Obstetrics & Gynecology*, 25(3), 167–172.
- Aksglaede, L., Wikström, A. M., Rajpert-De Meyts, E., Dunkel, L., Skakkebaek, N. E., & Juul, A. (2006). Natural history of seminiferous tubule degeneration in Klinefelter syndrome. *Human Reproduction Update*, 12(1), 39–48.
- Aljaser, F.S. (2022). *Cryopreservation Methods and Frontiers in the Art of Freezing Life in Animal Models* [online]. Retrieved from <https://www.intechopen.com/chapters/79909> [accessed 20/9/2022].
- Allahbadia, G. N. (2017). Intrauterine Insemination: Fundamentals Revisited. *Journal of Obstetrics and Gynaecology of India*, 67(6), 385–392.
- Allersma, T., Farquhar, C., & Cantineau, A. E. (2013). Natural cycle in vitro fertilisation (IVF) for subfertile couples. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2013(8), CD010550.
- Allot, L., Payne, D., & Dann, L. (2013). Midwifery and Assisted Reproductive Technologies. *New Zealand College of Midwives*, 47, 10-13.
- Anger, J. T., Gilbert, B. R., & Goldstein, M. (2003). Cryopreservation of sperm: indications, methods and results. *The Journal of Urology*, 170(4), 1079–1084.
- Arav, A., & Patrizio, P. (2019). Techniques of Cryopreservation for Ovarian Tissue and Whole Ovary. *Clinical Medicine Insights: Reproductive Health*, 13, 1179558119884945.
- Arav, A., Yavin, S., Zeron, Y., Natan, D., Dekel, I., & Gacitua, H. (2002). New trends in gamete's cryopreservation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 187(1-2), 77–81.

Asadi, F., Sadighi Gilani, M. A., Ghaheri, A., Roodgar Saffari, J., & Zamanian, M. (2017). The Prevalence of Y Chromosome Microdeletions in Iranian Infertile Men with Azoospermia and Severe Oligospermia. *Cell Journal*, 19(1), 27–33.

Balasubramanian, S. K., & Coger, R. N. (2005). Heat and mass transfer during the cryopreservation of a bioartificial liver device: a computational model. *ASAIO Journal*, 51(3), 184–193.

Barratt, C., Björndahl, L., De Jonge, C. J., Lamb, D. J., Osorio Martini, F., McLachlan, R., Oates, R. D., van der Poel, S., St John, B., Sigman, M., Sokol, R., & Tournaye, H. (2017). The diagnosis of male infertility: an analysis of the evidence to support the development of global WHO guidance-challenges and future research opportunities. *Human Reproduction Update*, 23(6), 660–680.

Bartolac, L. K., Lowe, J. L., Koustas, G., Grupen, C. G., & Sjöblom, C. (2018). Effect of different penetrating and non-penetrating cryoprotectants and media temperature on the cryosurvival of vitrified in vitro produced porcine blastocysts. *Animal Science Journal*, 89(9), 1230–1239.

Ben-Nagi, J., Miell, J., Yazbek, J., Holland, T., & Jurkovic, D. (2009). The effect of hysteroscopic polypectomy on the concentrations of endometrial implantation factors in uterine flushings. *Reproductive Biomedicine Online*, 19(5), 737–744.

Bergh, C., Romundstad, L.B., Aittomäki, K., Pinborg, A., Loft, A., Wennerholm, U.B., & Söderström-Anttila, V. (2016). Surrogacy: outcomes for surrogate mothers, children and the resulting families—a systematic review. *Human Reproduction Update*, 22 (2), 260–276.

Bhatia, K., Martindale, E.A., Rustamov, O., & Nysenbaum, A.M. (2009). Surrogate pregnancy: an essential guide for clinicians. *The Obstetrician & Gynaecologist*, 11 (1), 49–54.

Biljan, M.M., Hemmings, R., & Brassard, N. (2005). The Outcome of 150 Babies Following the Treatment With Letrozole or Letrozole and Gonadotropins. *Fertility and Sterility*, 84, 95.

Boivin, J., Rice, F., Hay, D., Harold, G., Lewis, A., van den Bree, M. M., & Thapar, A. (2009). Associations between maternal older age, family environment and parent and child wellbeing in families using assisted reproductive techniques to conceive. *Social Science & Medicine*, 68(11), 1948–1955.

Boldt, J., Schnarr, P., Ajamie, A., Ketner, J., Bonaventura, L., Colver, R., Reuter, L., & Jarrett, J. (1996). Success rates following intracytoplasmic sperm injection are improved by using ZIFT vs IVF for embryo transfer. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 13 (10), 782–785.

Brezina, P. R., & Zhao, Y. (2012). The ethical, legal, and social issues impacted by modern assisted reproductive technologies. *Obstetrics and Gynecology International*, 2012, 686253.

Brinsden, P.R. (2003). Gestational surrogacy. *Human Reproduction Update*, 9 (5), 483–491.

Broer, S. L., van Disseldorp, J., Broeze, K. A., Dolleman, M., Opmeer, B. C., Bossuyt, P., Eijkemans, M. J., Mol, B. W., Broekmans, F. J., & IMPORT study group (2013). Added value of ovarian reserve testing on patient characteristics in the prediction of ovarian response and ongoing pregnancy: an individual patient data approach. *Human Reproduction Update*, 19(1), 26–36.

Calamera, J.C., Buffone, M.G., Doncel, G.F., Brugo-Olmedo, S., de Vincentiis, S., Calamera, M.M., Storey, B.T., & Alvarez, J.G. (2010). Effect of thawing temperature on the motility recovery of cryopreserved human spermatozoa. *Fertility and Sterility*, 93 (3), 789–794.

CDC (2022). *Infertility FAQs* [online]. Retrieved from <https://www.cdc.gov/reproductivehealth/infertility/index.htm> [accessed 18/8/2022].

Cil, A.P., Bang, H., & Oktay, K. (2013). Age-specific probability of live birth with oocyte cryopreservation: An individual patient data meta-analysis. *Fertility and Sterility*, 100 (2), 492–499.

Cobo, A., & Diaz, C. (2011). Clinical application of oocyte vitrification: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Fertility and Sterility*, 96(2), 277–285.

Cooper, T.G., Noonan, E., von Eckardstein, S., Auger, J., Baker, H.W., Behre, H.M., Haugen, T.B., Kruger, T., Wang, C., Mbizvo, M.T., & Vogelsong, K.M. (2010). World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Human Reproduction Update*, 16 (3), 231–245.

Courbiere, B., Decanter, C., Bringer-Deutsch, S., Rives, N., Mirallié, S., Pech, J. C., De Ziegler, D., Carré-Pigeon, F., May-Panloup, P., Sifer, C., Amice, V., Schweitzer, T., Porcu-Buisson, G., Poirot, C., & French Study Group for Ovarian and Testicular Cryopreservation (GRECOT) (2013). Emergency IVF for embryo freezing to preserve female fertility: a French multicentre cohort study. *Human Reproduction*, 28(9), 2381–2388.

Dar, S., Lazer, T., Shah, P. S., & Librach, C. L. (2014). Neonatal outcomes among singleton births after blastocyst versus cleavage stage embryo transfer: a systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction Update*, 20(3), 439–448.

Deg'Innocenti, S., Filimberti, E., Magini, A., Krausz, C., Lombardi, G., Fino, M. G., Rastrelli, G., Maggi, M., & Baldi, E. (2013). Semen cryopreservation for men banking for oligospermia, cancers, and other pathologies: prediction of post-thaw outcome using basal semen quality. *Fertility and Sterility*, 100(6), 1555–63.

Dewailly, D., Andersen, C. Y., Balen, A., Broekmans, F., Dilaver, N., Fanchin, R., Griesinger, G., Kelsey, T. W., La Marca, A., Lambalk, C., Mason, H., Nelson, S. M., Visser, J. A., Wallace, W. H., & Anderson, R. A. (2014). The physiology and clinical utility of anti-Mullerian hormone in women. *Human Reproduction Update*, 20(3), 370–385.

Di Santo, M., Tarozzi, N., Nadalini, M., & Borini, A. (2012). Human Sperm Cryopreservation: Update on Techniques, Effect on DNA Integrity, and Implications for ART. *Advances in Urology*, 2012, 854837.

Dolmans, M.-M., Hossay, C., Nguyen, T.Y.T., & Poirot, C. (2021). Fertility Preservation: How to Preserve Ovarian Function in Children, Adolescents and Adults. *Journal of Clinical Medicine*, 10(22), 5247.

Driscoll, G. L., Tyler, J. P., Clark, L., & Bernstein, J. (1996). Transfer of gametes into the fallopian tubes--is choice of side important? *Human Reproduction*, 11(9), 1881–1883.

Dyer, S., Chambers, G. M., de Mouzon, J., Nygren, K. G., Zegers-Hochschild, F., Mansour, R., Ishihara, O., Banker, M., & Adamson, G. D. (2016). International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technologies world report: Assisted Reproductive Technology 2008, 2009 and 2010. *Human Reproduction*, 31(7), 1588–1609.

Edgar, D. H., & Gook, D. A. (2012). A critical appraisal of cryopreservation (slow cooling versus vitrification) of human oocytes and embryos. *Human Reproduction Update*, 18(5), 536–554.

Edwards, R.G. (2001). The bumpy road to human in vitro fertilization. *Nature Medicine*, 7 (10), 1091–1094.

Eijkemans, M. J., van Poppel, F., Habbema, D. F., Smith, K. R., Leridon, H., & te Velde, E. R. (2014). Too old to have children? Lessons from natural fertility populations. *Human Reproduction*, 29(6), 1304–1312.

Estudillo, E., Jiménez, A., Bustamante-Nieves, P.E., Palacios-Reyes, C., Velasco, I., & López-Ornelas, A. (2021). Cryopreservation of Gametes and Embryos and Their Molecular Changes. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(19), 10864.

Farquhar, C., & Marjoribanks, J. (2018). Assisted reproductive technology: an overview of Cochrane Reviews. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2018 (8), CD010537.

Gameiro, S., Boivin, J., Dancet, E., de Klerk, C., Emery, M., Lewis-Jones, C., Thorn, P., Van den Broeck, U., Venetis, C., Verhaak, C. M., Wischmann, T., & Vermeulen, N. (2015). ESHRE guideline: routine psychosocial care in infertility and medically

assisted reproduction-a guide for fertility staff. *Human Reproduction*, 30(11), 2476–2485.

Gaskins, A. J., Rich-Edwards, J. W., Lawson, C. C., Schernhammer, E. S., Missmer, S. A., & Chavarro, J. E. (2015). Work schedule and physical factors in relation to fecundity in nurses. *Occupational and Environmental Medicine*, 72(11), 777–783.

Glujovsky, D., Riestra, B., Sueldo, C., Fiszbajn, G., Repping, S., Nodar, F., Papier, S., & Ciapponi, A. (2014). Vitrification versus slow freezing for women undergoing oocyte cryopreservation. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 8 (9) D010047.

Gurtovenko, A. A., & Anwar, J. (2007). Modulating the structure and properties of cell membranes: the molecular mechanism of action of dimethyl sulfoxide. *The Journal of Physical Chemistry*, 111(35), 10453–10460.

Gurunath, S., Pandian, Z., Anderson, R.A., & Bhattacharya, S. (2011). Defining infertility--a systematic review of prevalence studies. *Human Reproduction Update*, 17 (5), 575–588.

Hanson, B., Johnstone, E., Dorais, J., Silver, B., Peterson, C. M., & Hotaling, J. (2017). Female infertility, infertility-associated diagnoses, and comorbidities: a review. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 34(2), 167–177.

Hart, R. J. (2016). Physiological Aspects of Female Fertility: Role of the Environment, Modern Lifestyle, and Genetics. *Physiological Reviews*, 96(3), 873–909.

He, F., Liu, W., Zheng, S., Zhou, L., Ye, B., & Qi, Z. (2012). Ion transport through dimethyl sulfoxide (DMSO) induced transient water pores in cell membranes. *Molecular Membrane Biology*, 29(3-4), 107–113.

Horne, G., Atkinson, A. D., Pease, E. H., Logue, J. P., Brison, D. R., & Lieberman, B. A. (2004). Live birth with sperm cryopreserved for 21 years prior to cancer treatment: case report. *Human Reproduction*, 19(6), 1448–1449.

Humaidan, P., Kol, S., Papanikolaou, E. G., & Copenhagen GnRH Agonist Triggering Workshop Group (2011). GnRH agonist for triggering of final oocyte

maturation: time for a change of practice? *Human Reproduction Update*, 17(4), 510–524.

ICMART (2021). *Preliminary World Report 2017* [online]. Retrieved from <https://www.icmartivf.org/wp-content/uploads/ICMART-ESHRE-WR2017-Preliminary.pdf> [accessed 14/8/2022].

Ishihara, O., Adamson, G. D., Dyer, S., de Mouzon, J., Nygren, K. G., Sullivan, E. A., Zegers-Hochschild, F., & Mansour, R. (2015). International committee for monitoring assisted reproductive technologies: world report on assisted reproductive technologies, 2007. *Fertility and Sterility*, 103(2), 402–413.

Jang, T. H., Park, S. C., Yang, J. H., Kim, J. Y., Seok, J. H., Park, U. S., Choi, C. W., Lee, S. R., & Han, J. (2017). Cryopreservation and its clinical applications. *Integrative Medicine Research*, 6(1), 12–18.

Jensen, C., Østergren, P., Dupree, J. M., Ohl, D. A., Sønksen, J., & Fode, M. (2017). Varicocele and male infertility. *Nature Reviews-Urology*, 14(9), 523–533.

Józków, P., & Mędraś, M. (2012). Psychological stress and the function of male gonads. *Endokrynologia Polska*, 63(1), 44–49.

Józków, P., & Rossato, M. (2017). The Impact of Intense Exercise on Semen Quality. *American Journal of Men's Health*, 11(3), 654–662.

Jungwirth, A., Giwercman, A., Tournaye, H., Diemer, T., Kopa, Z., Dohle, G., Krausz, C., & European Association of Urology Working Group on Male Infertility (2012). European Association of Urology guidelines on Male Infertility: the 2012 update. *European Urology*, 62(2), 324–332.

Kamath, M. S., Mascarenhas, M., Franik, S., Liu, E., & Sunkara, S. K. (2019). Clinical adjuncts in in vitro fertilization: a growing list. *Fertility and Sterility*, 112(6), 978–986.

Kars, M., Souverein, P. C., Herings, R. M., Romijn, J. A., Vandenbroucke, J. P., de Boer, A., & Dekkers, O. M. (2009). Estimated age- and sex-specific incidence and prevalence of dopamine agonist-treated hyperprolactinemia. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 94(8), 2729–2734.

Kawamura, K., Cheng, Y., Suzuki, N., Deguchi, M., Sato, Y., Takae, S., Ho, C. H., Kawamura, N., Tamura, M., Hashimoto, S., Sugishita, Y., Morimoto, Y., Hosoi, Y., Yoshioka, N., Ishizuka, B., & Hsueh, A. J. (2013). Hippo signaling disruption and Akt stimulation of ovarian follicles for infertility treatment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(43), 17474–17479.

Kilcoyne, K.R., & Mitchell, R.T. (2019). Fertility preservation: Testicular transplantation for fertility preservation: clinical potential and current challenges. *Reproduction*, 158 (5), 1-14.

Konc, J., Kanyó, K., Kriston, R., Somoskői, B., & Cseh, S. (2014). Cryopreservation of embryos and oocytes in human assisted reproduction. *BioMed Research International*, 2014, 307268.

Kop, P. A., Mochtar, M. H., O'Brien, P. A., Van der Veen, F., & van Wely, M. (2018). Intrauterine insemination versus intracervical insemination in donor sperm treatment. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 1(1), CD000317.

Koshimoto, C., & Mazur, P. (2002). Effects of warming rate, temperature, and antifreeze proteins on the survival of mouse spermatozoa frozen at an optimal rate. *Cryobiology*, 45(1), 49–59.

Künzle, R., Mueller, M. D., Hänggi, W., Birkhäuser, M. H., Drescher, H., & Bersinger, N. A. (2003). Semen quality of male smokers and nonsmokers in infertile couples. *Fertility and Sterility*, 79(2), 287–291.

Kushnir, V. A., Barad, D. H., Albertini, D. F., Darmon, S. K., & Gleicher, N. (2017). Systematic review of worldwide trends in assisted reproductive technology 2004–2013. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 15(1), 6.

Kuwayama, M. (2007). Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the Cryotop method. *Theriogenology*, 67(1), 73–80.

La Marca, A., & Sunkara, S. K. (2014). Individualization of controlled ovarian stimulation in IVF using ovarian reserve markers: from theory to practice. *Human Reproduction Update*, 20(1), 124–140.

- Lindheim, S. R., Glenn, T. L., Smith, M. C., & Gagneux, P. (2018). Ovulation Induction for the General Gynecologist. *Journal of Obstetrics and Gynaecology of India*, 68(4), 242–252.
- Mamas, L. (2006). Comparison of fallopian tube sperm perfusion and intrauterine tuboperitoneal insemination: a prospective randomized study. *Fertility and Sterility*, 85(3), 735–740.
- Martins, W. P., Rocha, I. A., Ferriani, R. A., & Nastri, C. O. (2011). Assisted hatching of human embryos: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Human Reproduction Update*, 17(4), 438–453.
- Messerlian, C., & Gaskins, A. J. (2017). Epidemiologic Approaches for Studying Assisted Reproductive Technologies: Design, Methods, Analysis and Interpretation. *Current Epidemiology Reports*, 4(2), 124–132.
- Messinis, I.E. (2005). Ovulation induction: a mini review. *Human Reproduction*, 20(10), 2688–2697.
- Morris, G. J., Acton, E., Faszer, K., Franklin, A., Yin, H., Bodine, R., Pareja, J., Zaninovic, N., & Gosden, R. (2006). Cryopreservation of murine embryos, human spermatozoa and embryonic stem cells using a liquid nitrogen-free, controlled rate freezer. *Reproductive Biomedicine Online*, 13(3), 421–426.
- Nagy, Z.P., Varghese, A.C., & Agarwal, A. (2019). *In Vitro Fertilization: A Textbook of Current and Emerging Methods and Devices* (2nd ed.). Berlin: Springer.
- Okonofua, F. E., Ntoimo, L., Omonkhua, A., Ayodeji, O., Olafusi, C., Unuabonah, E., & Ohenhen, V. (2022). Causes and Risk Factors for Male Infertility: A Scoping Review of Published Studies. *International Journal of General Medicine*, 15, 5985–5997.
- Ombelet, W., & Van Robays, J. (2015). Artificial insemination history: hurdles and milestones. *Facts, Views & Vision in ObGyn*, 7(2), 137–143.
- Onofre, J., Baert, Y., Faes, K., & Goossens, E. (2016). Cryopreservation of testicular tissue or testicular cell suspensions: a pivotal step in fertility preservation. *Human Reproduction Update*, 22(6), 744–761.

Patel, M., Gandotra, V.K., Cheema, R.S., Bansal, A.K., & Kumar, A. (2016). Seminal Plasma Heparin Binding Proteins Improve Semen Quality by Reducing Oxidative Stress during Cryopreservation of Cattle Bull Semen. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 29 (9), 1247–1255.

Pegg, D. E. (2014). Principles of Cryopreservation. *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols Methods in Molecular Biology*, 3–19.

Pegg, D.E. (2007). Principles of cryopreservation. In J.G. Day & G.N. Stacey (eds), *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols, Methods in Molecular Biology* (pp.39-75). Totowa: Humana Press.

Petropanagos, A., Cattapan, A., Baylis, F., & Leader, A. (2015). Social egg freezing: risk, benefits and other considerations. *Canadian Medical Association Journal*, 187 (9), 664–669.

Picton, H.M., Wyns, C., Anderson, R.A., Goossens, E., Jahnukainen, K., Kliesch, S., et al. (2015). A European perspective on testicular tissue cryopreservation for fertility preservation in prepubertal and adolescent boys. *Human Reproduction*, 30 (11), 2463–2475.

Prentice, J. R., & Anzar, M. (2010). Cryopreservation of Mammalian oocyte for conservation of animal genetics. *Veterinary Medicine International*, 2011, 146405.

Prieto, M. T., Sanchez-Calabuig, M. J., Hildebrandt, T. B., Santiago-Moreno, J., & Saragusty, J. (2014). Sperm cryopreservation in wild animals. *European Journal of Wildlife Research*, 60(6), 851–864.

Pritts, E.A., Yuen, A.K., Sharma, S., Genisot, R., & Olive, D.L. (2011). The Use of High Dose Letrozole in Ovulation Induction and Controlled Ovarian Hyperstimulation. *ISRN Obstetrics and Gynecology*, 2011, 1–4.

Purdy, P.H., & Graham, J.K. (2004). Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm. *Cryobiology*, 48 (1), 36–45.

Raicu, F., Popa, L., Apostol, P., Cimponeriu, D., Dan, L., Ilinca, E., Dracea, L. L., Marinescu, B., & Gavrilă, L. (2003). Screening for microdeletions in human Y

chromosome--AZF candidate genes and male infertility. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 7(1), 43–48.

Reed, M.L., Ezeh, P.C., Hamic, A., Thompson, D.J., & Caperton, C.L. (2009). Soy lecithin replaces egg yolk for cryopreservation of human sperm without adversely affecting postthaw motility, morphology, sperm DNA integrity, or sperm binding to hyaluronate. *Fertility and Sterility*, 92 (5), 1787–1790.

Rienzi, L., & Ubaldi, F. M. (2015). Oocyte versus embryo cryopreservation for fertility preservation in cancer patients: guaranteeing a women's autonomy. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 32(8), 1195–1196.

Rienzi, L., Gracia, C., Maggiulli, R., LaBarbera, A. R., Kaser, D. J., Ubaldi, F. M., Vanderpoel, S., & Racowsky, C. (2017). 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. *Human Reproduction Update*, 23(2), 139–155.

Riggs, R., Mayer, J., Dowling-Lacey, D., Chi, T. F., Jones, E., & Oehninger, S. (2010). Does storage time influence postthaw survival and pregnancy outcome? An analysis of 11,768 cryopreserved human embryos. *Fertility and Sterility*, 93(1), 109–115.

Rivas Leonel, E. C., Lucci, C. M., & Amorim, C. A. (2019). Cryopreservation of Human Ovarian Tissue: A Review. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 46(3), 173–181.

Royfman, R., Shah, T.A., Sindhvani, P., Nadiminty, N., & Avidor-Reiss, T. (2021). Sterility, an Overlooked Health Condition. *Women*, 1(1), 29-45.

Saeednia, S., Bahadoran, H., Amidi, F., Asadi, M.H., Naji, M., Fallahi, P., & Nejad, N.A. (2015). Nerve growth factor in human semen: Effect of nerve growth factor on the normozoospermic men during cryopreservation process. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 18 (3), 292–299.

Schmidt, L. (2010). Should men and women be encouraged to start childbearing at a younger age? *Expert Review of Obstetrics & Gynecology*, 5(2), 145-147.

- Schrijver, I. (2011). Mutation distribution in expanded screening for cystic fibrosis: making up the balance in a context of ethnic diversity. *Clinical Chemistry*, 57(6), 799–801.
- Shah, D., Rasappan, Shila, & Gunasekaran, K. (2019). A simple method of human sperm vitrification. *MethodsX*, doi:10.1016/j.mex.2019.09.022.
- Sharif, K., & Coomarasamy, A. (2012). *Assisted Reproduction Techniques: Challenges and Management Options*. UK: Wiley.
- Sharma, M., & Balasundaram, P. (2022). *Ovulation Induction Techniques*. Treasure Island: StatPearls Publishing.
- Sharpe, R. M. (2010). Environmental/lifestyle effects on spermatogenesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 365(1546), 1697–1712.
- Shreffler, K. M., Greil, A. L., & McQuillan, J. (2017). Responding to Infertility: Lessons From a Growing Body of Research and Suggested Guidelines for Practice. *Family Relations*, 66(4), 644–658.
- Simopoulou, M., Sfakianoudis, K., Tsioulou, P., Rapani, A., Anifandis, G., Pantou, A., Bolaris, S., Bakas, P., & Deligeoroglou, E. (2018). Risks in Surrogacy Considering the Embryo: From the Preimplantation to the Gestational and Neonatal Period. *BioMed Research International*, 2018, 6287507.
- Siristatidis, C., Sergentanis, T. N., Kanavidis, P., Trivella, M., Sotiraki, M., Mavromatis, I., Psaltopoulou, T., Skalkidou, A., & Petridou, E. T. (2013). Controlled ovarian hyperstimulation for IVF: impact on ovarian, endometrial and cervical cancer--a systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction Update*, 19(2), 105–123.
- Siristatidis, C., Vaidakis, D., Rigos, I., Chrelias, G., & Papantoniou, N. (2016). Leiomyomas and infertility. *Minerva Ginecologica*, 68(3), 283–296.
- Söderström-Anttila, V., Wennerholm, U.B., Loft, AA., Pinborg, AA., Aittomäki, K., Romundstad, L.B., & Bergh, C. (2016). Surrogacy: outcomes for surrogate mothers, children and the resulting families-a systematic review. *Human Reproduction Update*, 22 (2), 260–276.

Souter, I., Baltagi, L. M., Toth, T. L., & Petrozza, J. C. (2010). Prevalence of hyperprolactinemia and abnormal magnetic resonance imaging findings in a population with infertility. *Fertility and Sterility*, 94(3), 1159–1162.

Stevenson, E. L., Hurt, M. J., & Trotter, K. J. (2017). Oocyte Cryopreservation for Fertility Preservation in Healthy Women. *Nursing for Women's Health*, 21(5), 384–393.

Suzuki, N., Yoshioka, N., Takae, S., Sugishita, Y., Tamura, M., Hashimoto, S., Morimoto, Y., & Kawamura, K. (2015). Successful fertility preservation following ovarian tissue vitrification in patients with primary ovarian insufficiency. *Human Reproduction*, 30(3), 608–615.

Tanbo, T., & Fedorcsak, P. (2017). Endometriosis-associated infertility: aspects of pathophysiological mechanisms and treatment options. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*, 96(6), 659–667.

The ESHRE Task Force on Ethics and Law (2004). Taskforce 7: Ethical considerations for the cryopreservation of gametes and reproductive tissues for self use. *Human Reproduction*, 19(2), 460–462.

Thomson, L. K., Fleming, S. D., Aitken, R. J., De Iuliis, G. N., Zieschang, J. A., & Clark, A. M. (2009). Cryopreservation-induced human sperm DNA damage is predominantly mediated by oxidative stress rather than apoptosis. *Human Reproduction*, 24(9), 2061–2070.

Thomson, L. K., Fleming, S. D., Barone, K., Zieschang, J. A., & Clark, A. M. (2010). The effect of repeated freezing and thawing on human sperm DNA fragmentation. *Fertility and Sterility*, 93(4), 1147–1156.

Toner, J.P. (2002). Progress we can be proud of: U.S. trends in assisted reproduction over the first 20 years. *Fertility and Sterility*, 78 (5), 943–950.

Tsonis, O., Gkrozou, F., Siafaka, V., & Paschopoulos, M. (2019). The role of a midwife in assisted reproductive units. *Clinical Obstetrics, Gynecology and Reproductive Medicine*, 5, 1-4.

- Tulandi, T., Martin, J., Al-Fadhli, R., et al. (2006). Congenital malformations among 911 newborns conceived after infertility treatment with letrozole or clomiphene citrate. *Fertility and Sterility*, 85 (6), 1761–1765.
- Valcarce, D. G., Cartón-García, F., Riesco, M. F., Herráez, M. P., & Robles, V. (2013). Analysis of DNA damage after human sperm cryopreservation in genes crucial for fertilization and early embryo development. *Andrology*, 1(5), 723–730.
- Valdes-Socin, H., Rubio Almanza, M., Tomé Fernández-Ladreda, M., Debray, F. G., Bours, V., & Beckers, A. (2014). Reproduction, smell, and neurodevelopmental disorders: genetic defects in different hypogonadotropic hypogonadal syndromes. *Frontiers in Endocrinology*, 5, 109.
- Van den Akker, O.B.A. (2007). Psychological trait and state characteristics, social support and attitudes to the surrogate pregnancy and baby. *Human Reproduction*, 22 (8), 2287–2295.
- van Loendersloot, L. L., van Wely, M., Limpens, J., Bossuyt, P. M., Repping, S., & van der Veen, F. (2010). Predictive factors in in vitro fertilization (IVF): a systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction Update*, 16(6), 577–589.
- Vander Borcht, M., & Wyns, C. (2018). Fertility and infertility: Definition and epidemiology. *Clinical Biochemistry*, 62, 2–10.
- Vissenberg, R., Manders, V. D., Mastebroek, S., Fliers, E., Afink, G. B., Ris-Stalpers, C., Goddijn, M., & Bisschop, P. H. (2015). Pathophysiological aspects of thyroid hormone disorders/thyroid peroxidase autoantibodies and reproduction. *Human Reproduction Update*, 21(3), 378–387.
- Vutyavanich, T., Piromlertamorn, W., & Nunta, S. (2010). Rapid freezing versus slow programmable freezing of human spermatozoa. *Fertility and Sterility*, 93 (6), 1921–1928.
- Walker, M.H., & Tobler, K.J. (2022). *Female Infertility*. Treasure Island: StatPearls Publishing.

Walters, E.M., Benson, J.D., Woods, E.J., & Crister, J.K. (2009). The history of sperm cryopreservation. In A.A. Pacey & M.J. Tomlinson (eds), *Sperm Banking Theory and Practice* (pp. 1-17). London: Cambridge University Press.

Wang, H., Dey, S. K., & Maccarrone, M. (2006). Jekyll and hyde: two faces of cannabinoid signaling in male and female fertility. *Endocrine Reviews*, 27(5), 427–448.

Warmelink, J. C., Adema, W., Pranger, A., & de Cock, T. P. (2016). Client perspectives of midwifery care in the transition from subfertility to parenthood: a qualitative study in the Netherlands. *Journal of Psychosomatic Obstetrics and Gynaecology*, 37(1), 12–20.

Weiss, N. S., Braam, S., Konig, T. E., Hendriks, M. L., Hamilton, C. J., Smeenk, J. M. J., Koks, C. A. M., Kaaijk, E. M., Hompes, P. G. A., Lambalk, C. B., van der Veen, F., Mol, B. W. J., & van Wely, M. (2014). How long should we continue clomiphene citrate in anovulatory women? *Human Reproduction*, 29 (11), 2482–2486.

Wennerholm, U.B., Soderstrom-Anttila, V., Bergh, C., Aittomaki, K., Hazekamp, J., Nygren, K.G., Selbing, A., & Loft, A. (2009). Children born after cryopreservation of embryos or oocytes: A systematic review of outcome data. *Human Reproduction*, 24 (9), 2158–2172.

Whaley, D., Damyar, K., Witek, R. P., Mendoza, A., Alexander, M., & Lakey, J. R. (2021). Cryopreservation: An Overview of Principles and Cell-Specific Considerations. *Cell Transplantation*, 30, 963689721999617.

WHO (2010). *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen*. Geneva: WHO.

WHO (2020). *Infertility* [online]. Retrieved from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/infertility> [accessed 18/8/2022].

Wilson, C., & Leese, B. (2013). Do nurses and midwives have a role in promoting the well-being of patients during their fertility journey? A review of the literature. *Human Fertility*, 16(1), 2–7.

Yeste, M. (2016). Sperm cryopreservation update: Cryodamage, markers, and factors affecting the sperm freezability in pigs. *Theriogenology*, 85(1), 47–64.

Youssef, M.A.F.M., Van der Veen, F., Al-Inany, H., Mochtar, M., Griesinger, G., et al. (2014). Gonadotropin-releasing hormone agonist versus HCG for oocyte triggering in antagonist-assisted reproductive technology. *Cochrane Database Systematic Reviews*, 10, CD008046.

Zhang, X. D., Liu, J. X., Liu, W. W., Gao, Y., Han, W., Xiong, S., Wu, L. H., & Huang, G. N. (2013). Time of insemination culture and outcomes of in vitro fertilization: a systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction Update*, 19(6), 685–695.

Zhao, J., Zhang, Q., & Li, Y. (2012). The effect of endometrial thickness and pattern measured by ultrasonography on pregnancy outcomes during IVF-ET cycles. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 10, 100.

Κατσιμίγκας, Γ., & Καμπά, Ε. (2010). Ηθική-θεολογική και νομική θεώρηση της εξωσωματικής γονιμοποίησης. *Νοσηλευτική*, 49, 209–219.

Φράγκου, Δ., & Γαλάνης, Π. (2016). Ηθικά ζητήματα στην ιατρικώς υποβοηθούμενη αναπαραγωγή. *Αρχαία Ελληνικής Ιατρικής*, 33(5), 680-688.