

Γενετικοί παράγοντες και η αντιμετώπιση της υπογονιμότητας

Δρ. Ελένη Κοντογιάννη

Εμβρυολόγος-Γενετιστής

Επιστημονική Διευθύντρια Ινστιτούτου Γυναικολογίας
και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής «IVF and Genetics»

Εχουν περάσει ήδη δύο δεκαετίες από τη γέννηση του πρώτου παιδιού με τη μέθοδο της εξωσωματικής γονιμοποίησης. Έκτοτε, η υποβοηθούμενη αναπαραγωγή έχει αναπτυχθεί ταχύτατα και έχει δημιουργήσει κλάδους για την αντιμετώπιση των περισσότερων προβλημάτων στειρότητας.

Η οφειλόμενη στον ανδρικό παράγοντα υπογονιμότητα ήταν μέχρι πρόσφατα ένα από τα άλυτα προβλήματα. Έγιναν διάφορες προσπάθειες με την ανάπτυξη τεχνικών για υποβοηθούμενη γονιμοποίηση στις περιπτώσεις που τα χαρακτηριστικά του σπέρματος ήταν τόσο φτωχά ώστε δεν μπορούσε να πραγματοποιηθεί φυσιολογική γονιμοποίηση (Baker et al, 1993).

Η εισαγωγή της μικροχειρουργικής ωαρίου (ICSI; Intracytoplasmic Sperm Injection) το 1992 υπήρξε επαναστατική για την αντιμετώπιση της ανδρικής στειρότητας (Palermo et al, 1992). Η τεχνική αυτή περιλαμβάνει την εισαγωγή ενός σπερματοζωαρίου απευθείας στο κυτταρόπλάσμα του ωαρίου (Van

Steirteghem et al, 1993a). Η αδυναμία του σπερματοζωαρίου να διαπεράσει τη διαφανή ζώνη ή τη μεμβράνη του κυτταροπλάσματος (ωλήθημα), που πιθανόν οφειλόταν σε ελαττωμένη κινητικότητα, μειωμένη ικανότητα πρόσδεσης στη διαφανή ζώνη είτε σε ανεπάρκεια ενζύμων για τη διάνοιξη της ζώνης, δεν αποτελεί πια εμπόδιο στη γονιμοποίηση. Η τεχνική αυτή είναι κατάλληλη για πολύ σοβαρές περιπτώσεις στειρότητας. Προτού εφαρμοστεί η ICSI, οι πιθανότητες γονιμοποίησης ήταν ελάχιστες εάν δεν υπήρχαν το λιγότερο 500.000 σπερματοζωάρια με αρίστη κινητικότητα (μετά την επεξεργασία). Σήμερα έχουν σημειωθεί εγκυμοσύνες ακόμα και σε περιπτώσεις που λίγα μόνο σπερματοζωάρια είχαν ανευρεθεί στο σπερματικό υγρό (Mansour et al, 1995).

Η τεχνική ICSI χρησιμοποιήθηκε σε ζευγάρια με επαναλαμβανόμενες αποτυχίες γονιμοποίησης *in vitro* ακόμα και όταν το σπέρμα είχε καλά χαρακτηρισικά και μπορούσε να χαρακτηριστεί φυσιολογικό (Sherins et al, 1995) σύμφωνα με τα κριτήρια της Παγκόσμιας Οργάνωσης Υγείας (World Health Organization).

Περιπτώσεις απόλυτης αποφρακτικής ή μη αποφρακτικής αζωοσπερμίας αντιμετωπίστηκαν με βιοψία σπερματοζωαρίων από ορχικό επιθήλιο (TESE; Testicular Sperm Extraction) ή επιδιδυμίδα (MESA; Micro Epididymal Sperm Aspiration) με υψηλά ποσοστά κύησης (Silber et al, 1994; Patrizio et al, 1995).

Η όλη διαδικασία είχε αρχικά δημιουργήσει ανησυχίες για πιθανότητες τραυματισμού του ωαρίου. Τα αποτελέσματα όμως δείχνουν ότι το ποσοστό των ωαρίων που καταστρέφονται από τη διαδικασία είναι μικρότερο από το 10%, εάν βεβαίως τύχουν σε έμπειρα χέρια (Van Steirteghem et al, 1993). Τα ποσοστά γονιμοποίησης κυμαίνονται γύρω στο 60%, χωρίς να επηρεάζει το εάν τα σπερματοζωάρια προήλθαν από βιοψία όρχεως, επιδιδυμίδας ή μετά από εκσπερμάτωση (Silber et al, 1994). Σχεδόν όλα τα ζευγάρια (περίπου 90%) που κάνουν εξωσωματική γονιμοποίηση με ICSI φτάνουν στο στάδιο της εμβρυομεταφοράς και τα ποσοστά εγκυμοσύνης είναι ισάξια ή και καλύτερα από αυτά της κλασικής εξωσωματικής γονιμοποίησης (Van Steirteghem et al, 1994).

Η επιτυχία της τεχνικής ICSI οδήγησε πολλούς να προβλέψουν ότι στο μέλλον πιθανόν όλες οι περιπτώσεις εξωσωματικής γονιμοποίησης θα γίνονται με ICSI και όχι με απλή ενσπερμάτωση των ωαρίων (Fishel et al, 1995).

Παρά την επιτυχία του ICSI και των συναφών τεχνικών, υπάρχουν ερωτήματα που μένει να απαντηθούν. Πιστεύεται ότι η περίπλοκη διαδικασία της φυσιολογικής γονιμοποίησης δρα σαν φραγμός για σπερματοζωάρια με ανώμαλο γενότυπο. Συνεπώς, όταν εισάγουμε μηχανικά ένα σπερματοζωάριο μέσα στο κυτταρόπλασμα του ωαρίου δρώντας με μόνο χαρακτηριστικό τη μορφολογία του, αυτοί οι επιλεκτικοί μηχανισμοί των σπερματοζωαρίων σταματούν να υπάρχουν (Coulam et al, 1996).

Επιπλέον ερωτηματικά δημιουργούνται από κυτταρογενετικές μελέτες που δείχνουν υψηλά ποσοστά χρωμοσωματικών ανωμαλιών, και ειδικά ισοζυγισμένων μετατοπίσεων, σε υπογόνιμους άνδρες. Όσο ελατώνονται οι δείκτες της ποιότητας του σπέρματος, τόσο αυξάνεται η πιθανότητα χρωμοσωματικής ανωμαλίας. Μήπως η προσπάθειά μας να βοηθήσουμε τους ασθενείς μας να αποκτήσουν παιδί θα έχει ως αποτέλεσμα αυτό το συγκεκριμένο παιδί να υποφέρει από μια συγγενή ανωμαλία; Μήπως θα ήταν λογικό να περιμένουμε υψηλά ποσοστά γενετικών ανωμαλιών σε απόγονους ασθενών που αδυνατούν να τεκνοποιήσουν φυσιολογικά; Μήπως υποβοηθούμε τη διαιώνιση ενός παθολογικού γενοτύπου, όπου η στειρότητα είναι απλώς η εκδήλωση του; (Voght et al, 1995).

Ας εξετάσουμε κατά πρώτον τη θεωρία της διαφανούς ζώνης και της κυτταρικής μεμβράνης του ωαρίου: δεν υπάρχουν μέχρι στιγμής στοιχεία που να υποστηρίζουν ότι αποτελούν φραγμό στη γονιμοποίηση από σπερματοζωάρια με γενετικές ανωμαλίες. Το DNA του σπερματοζωαρίου είναι μεταγραφικά ανενεργό, άρα θα ήταν δύσκολο να υποτεθεί ότι το ωάριο διαθέτει μηχανισμούς για την ανίχνευση της ύπαρξης μη φυσιολογικού DNA. Εάν ένας τέτοιος μηχανισμός υπήρχε, τότε θα είχε παρατηρηθεί παραμορφωμένη αναλογία διαχωρισμού (segregation ratio distortion) στη μεταβίβαση γενετικών ασθενειών. Οι ελάχιστες περιπτώσεις παραμορφωμένης αναλογίας διαχωρισμού συνήθως οφείλονται σε μη μεντελικούς τρόπους κληρονομικότητας, όπως η μιτοχον-

δριακή. Οπότε, για τις μονογονιδιακές ασθένειες, η επιλογή υπέρ του μη παθολογικού στο επίπεδο της γονιμοποίησης μπορεί να αποκλειστεί. Επίσης, σπερματοζώρια με ανευπλοειδίες είναι δυνατόν να γονιμοποιήσουν το ωάριο, γεγονός που πιστοποιείται από την ύπαρξη εμβρύων με ανευπλοειδία που προήλθαν από μη διαχωρισμό στα χρωμοσώματα του πατέρα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το σύνδρομο Klinefelter, όπου το επιπλέον Χ χρωμόσωμα είναι πατρικής προέλευσης στο 50% των περιπτώσεων. Συνεπώς, δεν υπάρχουν αρκετά δεδομένα που να τεκμηριώνουν τη διαδικασία επιλογής σπερματοζωαρίων στο επίπεδο της διαφανούς ζώνης.

Βάσιμα ερωτηματικά ανακύπτουν από τη συσχέτιση ανδρικής υπογονιμότητας και χρωμοσωματικών ανωμαλιών. Μια πρόσφατη μελέτη δείχνει ότι το ποσοστό των χρωμοσωματικών ανωμαλιών σε άνδρες με κανονικές παραμέτρους σπέρματος ήταν 2,2%, σε ασθενείς με ολιγοσπερμία 5,1%, με αζωοσπερμία 14,6% και με μη αποφρακτική αζωοσπερμία 20,3% (πίν. 1). Παρόλο που γνωρίζουμε ότι η γονιμοποίηση από σπερματοζώρια με χρωμοσωμικές ανωμαλίες είναι δυνατή, αγνοούμε εάν το ποσοστό των ανώμαλων σπερματοζωαρίων που πετυχαίνουν γονιμοποίηση είναι το ίδιο ή μειωμένο σε σχέση με τα φυσιολογικά. Άγνωστος είναι επίσης ο αριθμός των ζυγωτών με ανευπλοειδισμό μη συμβατό με τη ζωή, που αποβάλλονται στη αρχή της κύησης. Τα δεδομένα της Martin (1996) δείχνουν ότι ένας μη φυσιολογικός καρυότυπος (από ανάλυση περιφερικού αίματος) δεν συμβαδίζει πάντα με ανώμαλο γενότυπο των σπερματοζωαρίων: άντρες με γενετική σύσταση 47XYY παράγουν χρωμοσωμικά φυσιολογικά σπερματοζώρια. Το επιπλέον χρωμόσωμα φαίνεται ότι χάνεται κατά τη σπερματογένεση. Επίσης, ο καρυότυπος από κύτταρα περιφερικού αίματος δεν είναι πάντοτε αντιπροσωπευτικός της γενοτυπικής κατάστασης του ατόμου, λόγω των περιπτώσεων μωσαϊκισμού που μένουν αδιάγνωστες (Martin, 1996). Η παιδιατρική παρακολούθηση παιδιών που γεννήθηκαν μετά από ICSI είναι πολύ ενθαρρυντική: τα ποσοστά των γενετικών ανωμαλιών των παιδιών αυτών είναι παρόμοια με των παιδιών που γεννιούνται μετά από IVF (Bonduelle et al, 1999; Wennerholm et al, 2000). Παρ' όλα αυτά, τα αποτελέσματα κάθε νέας τεχνικής πρέπει να παρακολουθούνται μακροπρό-

θεσμα και να καταγράφονται σε βάση δεδομένων. Επίσης, είναι απαραίτητη η ενημέρωση των ασθενών σχετικά με την πρόσφατη ανακάλυψη και εφαρμογή της μεθόδου, τα στοιχεία που έχουν ήδη συγκεντρωθεί και την έλλειψη μακρόχρονης πείρας.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1

ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΙΚΕΣ ΑΝΩΜΑΛΙΕΣ

φυσιολογικές παράμετροι	2.2%.
ολιγοσπερμία	5.1%,
αζωοσπερμία	14.6%
μη αποφρακτική αζωοσπερμία	20.3%

(από Yoshida et al, 1996)

Προγεννητική διάγνωση για χρωμοσωματικές ανωμαλίες συνήθως προτείνεται εάν συντρέχουν διάφοροι παράγοντες –λ.χ. η ηλικία της μητέρας–, αλλά είναι αμφιλεγόμενο το εάν θα πρέπει να προταθεί με μόνη αιτιολογία την εφαρμογή ICSI. Οι υποψήφιοι ασθενείς για ICSI αποτελούν μια πολύ ετερογενή ομάδα, η οποία περιλαμβάνει περιπτώσεις ολιγοσπερμίας που οφείλονται σε απόφραξη έως και περιπτώσεις ισοζυγισμένων χρωμοσωματικών μετατοπίσεων, που έχουν ως αποτέλεσμα εμβρυϊκές ανωμαλίες. Κάθε περίπτωση πρέπει να αντιμετωπίζεται ξεχωριστά και τα ζευγάρια να κατανοούν τις επιπτώσεις μιας γενετικής επιβάρυνσης, το μέγεθος του κινδύνου και τις δυνατότητες πρόληψης.

Ακόμη κι αν προσφέραμε προγεννητική διάγνωση με ανάλυση καρυότυπου σε όλες τις γυναίκες που μένουν έγκυες μετά από IVF-ICSI, υπάρχει ένα ποσοστό μεταλλάξεων σημείου που προκαλούν στειρότητα, το οποίο θα έμενε αδιάγνωστο (Vogt et al, 1993; Wyrobek et al, 1995) καθώς και ένα ποσοστό ασθενών με μωσαϊκισμό, όπου ο καρυότυπος από το αίμα δεν θα ερχόταν σε συμφωνία με τον καρυότυπο των γαμετών (Martin, 1996). Θα μπορούσε ίσως να προταθεί έλεγχος για τις σημειακές μεταλλάξεις και καρυοτύπηση σπερμα-

τοζωαρίων. Μια τέτοια όμως στρατηγική θα αύξανε υπερβολικά το κόστος για τους ασθενείς, με αμφίβολη κλινική αξία. Σήμερα, με τις προόδους της Μοριακής Βιολογίας και της Γενετικής, έχουμε τα εργαλεία να ερευνήσουμε και να διαλευκάνουμε τα διλήμματα που προκαλεί η εφαρμογή των νέων τεχνολογιών αλλά και να βοηθήσουμε τους ασθενείς (παρέχοντάς τους σωστή πληροφόρηση) να πάρουν τη σωστή γι' αυτούς απόφαση.

Τα ανθρώπινα έμβρυα παρουσιάζουν υψηλό ποσοστό χρωμοσωμικών ανωμαλιών, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε πολλαπλές αποτυχημένες προσπάθειες εξωσωματικής γονιμοποίησης.

Η μέθοδος της προεμφυτευτικής διάγνωσης μπορεί να διαγνώσει μια γονιδιακή ανωμαλία πριν την εμφύτευση, επιτρέποντας έτσι τη μεταφορά μόνο των χρωμοσωμικά φυσιολογικών εμβρύων.

Ακολούθως αναφέρονται τα αποτελέσματα προεμφυτευτικού ελέγχου σε 28 ζευγάρια με: α) Επαναλαμβανόμενη αποτυχία εμφύτευσης μετά από επιτυχημένη γονιμοποίηση, β) Σοβαρή τερατό-ζωοσπερμία, γ) Φυσιολογικούς καρυοτύπους γονέων.

Εν προκειμένω, 28 ζευγάρια υποβλήθηκαν σε εξωσωματική γονιμοποίηση. Τα μισά από τα ωάρια γονιμοποιήθηκαν με σπέρμα δότη και τα άλλα μισά με το σπέρμα του συζύγου. Το FISH εφαρμόστηκε σε εμβρυϊκά βλαστομερίδια με ανιχνευτές (probes) για τα χρωμοσώματα 13, 18, 21, X,Y.

Το 82% των εμβρύων που προέκυψαν από σπέρμα δότη ήταν φυσιολογικά, συγκρινόμενα με το 31% των φυσιολογικών εμβρύων από το σπέρμα του συζύγου.

Περαπέραν ανάλυση των χρωμοσωμικά ανώμαλων εμβρύων που προέκυψαν από γονιμοποίηση με το σπέρμα του συζύγου έδειξαν αρκετά υψηλότερο ποσοστό χασοπικών εμβρύων από τα έμβρυα εκείνα που προήλθαν από γονιμοποίηση με σπέρμα δότη.

Σε τρεις περιπτώσεις, το FISH έδειξε ότι όλα τα έμβρυα που προέκυψαν από το σπέρμα του συζύγου είχαν γενετικές ανωμαλίες και δεν μπορούσαν να

μεταφερθούν στις μητέρες τους. Και τα τρία ζευγάρια είχαν χρωμοσωμικά φυσιολογικά έμβρυα με σπέρμα δότη και δύο εγκυμοσύνες προέκυψαν μετά από εμβρυομεταφορά αυτών των εμβρύων.

Συμπεραίνουμε ότι:

- ▶ Η προεμφυτευτική διάγνωση μπορεί να καθορίσει τους λόγους επαναλαμβανόμενης αποτυχίας των προσπαθειών εξωσωματικής γονιμοποίησης.
- ▶ Η μικρογονιμοποίηση δεν αποτελεί πανάκεια σε περιπτώσεις σοβαρής oligo-ασθενο-τερατο-ζωοσπερμίας (με φυσιολογικούς γονεϊκούς καρύοτυπους), σε συνδυασμό όμως με την προεμφυτευτική διάγνωση δίνεται κάποια ικανοποιητική λύση.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Baker H.W.G., Liu D.Y., Bourne H. and Lopata A., "Diagnosis of sperm defects in selecting patients for assisted fertilization", *Hum. Reprod.* 8(1993), 1779-1780.
- Bonduelle M., Camus M., De Vos A., Staessen C., Tournaye H. et al., "Seven years of intracytoplasmic sperm injection and follow-up of 1987 subsequent children", *Hum. Reprod.* 14(1999), 243-264.
- Coulam C.B., Opsahl M.S., Sherins R.J., Thorsell L.P., Dorfmann A. et al., "Comparisons of pregnancy loss patterns after intracytoplasmic sperm injection and other assisted reproductive technologies", *Fertil. Steril.* 65, 6(1996), 1157-1162.
- Fishel S., Green S., Bishop M., Thornton S., Hunter A. et al., "Injection of spermatid [letter]", *Lancet* 345 [8965] (1995), 1641-1642.
- Mansour R. T., Aboulghar M. A., Serour G. I. , Amin Y. M. and Ramzi A. M. "The effect of sperm parameters on the outcome of intracytoplasmic sperm injection", *Fertil. Steril.* 64(1995), 982-986.
- Palermo G., Joris H., Devroey P. and Van Steirteghem A.C., "Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte", *Lancet* 340(1992), 17-18.
- Patrizio P., Ord T., Balmaceda J.P. and Asch R.H., "Use of epididymal sperm for assisted reproduction in men with acquired, irreparable obstructive azoospermia", *Reprod. Fertil. Dev.* 7(1995), 841-845.

- Silber S., Nagy Z.P., Liu J., Godoy H., Devroey P. and Van Steirteghem A. C., "Conventional in-vitro fertilization versus intracytoplasmic sperm injection for patients requiring microsurgical sperm aspiration", *Hum. Reprod.* 9(1994), 1705-1709.
- Sherins R. J., Thorsell L. P., Dorfmann A., Dennison-Lagos L., Calvo L.P. et al., "Intracytoplasmic sperm injection facilitates fertilization even in the most severe forms of male infertility: pregnancy outcome correlates with maternal age and number of eggs available", *Fertil. Steril.* 64(1995), 369-375.
- Van Steirteghem A.C., Liu J., Joris H., Nagy Z., Janssenswillen C. et al., "Higher success rate by intracytoplasmic sperm injection than by subzonal insemination. Report of a second series of 300 consecutive treatment cycles", *Hum. Reprod.* 8(1993), 1055-1060.
- Van Steirteghem A.C., Nagy Z., Joris H., Liu J., Staessen C. et al., "High fertilization and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection", *Hum. Reprod.* 8(1993), 1061-1066.
- Van Steirteghem A., Nagy Z., Liu J., Joris H., Verheyen G. et al., "Intracytoplasmic sperm injection", *Baillieres. Clin. Obstet. Gynaecol.* 8(1994), 85-93.
- Vogt P.H., Edelmann A., Hirschman P. and Kohler M.R., "The azoospermia factor (AZF) of the human Y chromosome in Yq11 - function and analysis in spermatogenesis", *Reprod. Fertil. Dev.* 7(1995), 685-693.
- Wennerholm U.B., Bergh C., Hamberger L., Lundin K., Nilsson L. et al., "Incidence of congenital malformations in children born after ICSI", *Hum. Reprod.* 15(2000), 944-948.
- Wyrobek A., Lowe X., Pinkel D. and Bishop J., "Aneuploidy in late-step spermatids of mice detected by two-chromosome fluorescence in situ hybridization", *Mol. Reprod. Dev.* 40(1995), 259-266.
- Yoshida A., Miura K. and Shirai M., "Cytogenetic survey of 1007 infertile males", *Urol. Int.* 58(1996), 166-176.