



Σχολή Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας  
Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών



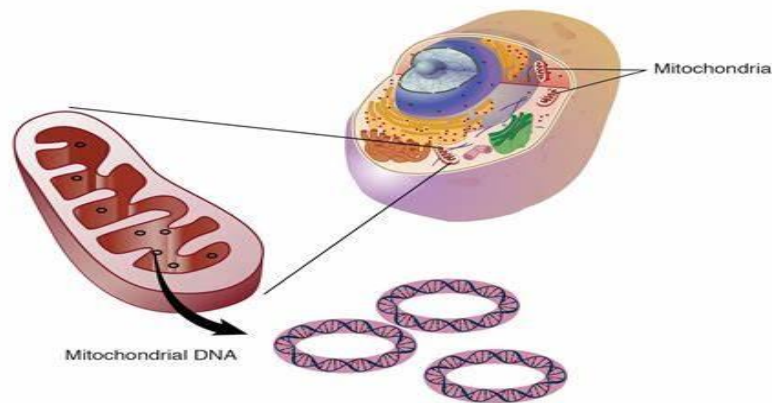
Εργαστήριο Χημείας, Βιοχημείας, Κοσμητολογίας

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

## Μεταφορά μητρικής ατράκτου και προπυρηνική μεταφορά στην υποβοηθούμενη αναπαραγωγή

GRADUATE THESIS

## Maternal spindle transfer and pronuclear transfer in assisted reproduction



ΟΝΟΜΑ ΦΟΙΤΗΤΗ/NAME OF STUDENT

**Ιωάννα Γεωργιάκη**

Ioanna Georgilaki

ΟΝΟΜΑ ΕΙΣΗΓΗΤΗ/NAME OF THE SUPERVISOR

**Ευστάθιος Μιχαλόπουλος**

Eustathios Michalopoulos

ΑΙΓΑΛΕΩ/AIGALEO 2024



Faculty of Health and Caring Professions  
Department of Biomedical Sciences



Laboratory of Chemistry, Biochemistry, Cosmetology

GRADUATE THESIS

## **Maternal spindle transfer and pronuclear transfer in assisted reproduction**

IOANNA GEORGILAKI

20678036

[Joanna.georgilaki1@gmail.com](mailto:Joanna.georgilaki1@gmail.com)

FIRST SUPERVISOR

EUSTATHIOS MICHALOPOULOS

SECOND SUPERVISOR

PETROS KARKALOUSOS

THIRD SUPERVISOR

MARIA TRAPALI

AIGALEO 2024

II

## Επιτροπή εξέτασης

15/07/2024

	Ονόματα εξεταστών	Υπογραφή
1 <sup>ος</sup> Εξεταστής	Ευστάθιος Μιχαλόπουλος	
2 <sup>ος</sup> Εξεταστής	Πέτρος Καρκαλούσος	
3 <sup>ος</sup> Εξεταστής	Μαρία Τράπαλη	

## **Δήλωση συγγραφέα προπτυχιακής διπλωματικής εργασίας**

Η κάτωθι υπογεγραμμένη Ιωάννα Γεωργιλιάκη του Χρήστου, με αριθμό μητρώου 2068036, φοιτήτρια του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών της Σχολής Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, δηλώνω ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της πτυχιακής/διπλωματικής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος. Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Όνομα φοιτήτριας

Ιωάννα Γεωργιλιάκη

Υπογραφή φοιτήτριας

## **Ευχαριστίες**

Καθόλη την πορεία εκπόνησης της προπτυχιακής διπλωματικής εργασίας μου οι καθηγητές μου ήταν ενεργά παρόντες προσφέροντάς μου πολύτιμη καθοδήγηση με την εμπειρία τους. Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον επιβλέποντα καθηγητή μου κ Ευστάθιο Μιχαλόπουλο για την αμείωτη προθυμία, υπομονή και καθοριστική βοήθεια του με σκοπό το βέλτιστο αποτέλεσμα. Ευχαριστώ τους καθηγητές μου κ Πέτρο Καρκαλούσο και κ Μαρία Τράπαλη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξαν, την επικοινωνία μας και τα σαφή σχόλιά τους. Είμαι ευγνώμων για τις πλούσιες γνώσεις που μου προσφέρατε κατά την τετραετή φοίτηση μου οι οποίες θα με βοηθήσουν στην μετέπειτα ακαδημαϊκή και επαγγελματική μου πορεία.

Θα ήθελα παράλληλα να ευχαριστήσω θερμά την οικογένεια και τις φίλες μου για την αληθινή υποστήριξη και ενθάρρυνση που μου έδειξαν σε όλη την διάρκεια των σπουδών μου. Η συμβολή σας ήταν ανεκτίμητη δίνοντάς μου δύναμη για συνεχή εξέλιξη.

## **Αφιερώσεις**

‘Ο πιο ευτυχισμένος - είτε πλούσιος είτε φτωχός - είναι αυτός που βρίσκει γαλήνη στο σπίτι του’ . Το να ανήκεις σε μία οικογένεια που σε αγαπά και σε στηρίζει είναι η μεγαλύτερη ευλογία της ζωής. Αφιερώνω την εργασία μου σε εσάς που με στοργή και θαλπωρή με κάνατε τον άνθρωπο που είμαι σήμερα.

## Περίληψη

Η παρούσα διπλωματική εργασία βασίζεται σε τεκμηριωμένες βιβλιογραφικές πηγές και στοχεύει στην ανάδειξη των τεχνικών μιτοχονδριακής αντικατάστασης οι οποίες προλαμβάνουν την κληρονόμηση μιτοχονδριακών νοσημάτων από την μητέρα στο νεογνό. Τα μιτοχόνδρια αποτελούν ενδοκυτταρικά οργανίδια όλων των ευκαρυωτικών κυττάρων και αποβλέπουν στην σύνθεση μορίων τριφωσφορικής αδενοσίνης μέσω της αερόβιας διαδικασίας της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, εξασφαλίζοντας έτσι την ενέργεια του κυττάρου. Οι μιτοχονδριακές ασθένειες αποτελούν γενετικές παθήσεις που πλήττουν μεγάλο ποσοστό του ανθρώπινου πληθυσμού και μπορεί να οφείλονται είτε σε διαταραχή του πυρηνικού γονιώματος των μιτοχονδρίων, είτε του αυτόνομου μιτοχονδριακού. Οι επιστήμονες έχουν ανακαλύψει πάνω από 300 διαφορετικά είδη γενετικά και κλινικά διακριτών μιτοχονδριακών διαταραχών, πολλές από τις οποίες είναι θανατηφόρες. Οι μιτοχονδριακές ασθένειες μπορεί να οφείλονται σε λόγους όπως μεταλλάξεις, γήρανση και φάρμακα, ενώ προκαλούν σοβαρά συμπτώματα ακόμα και σύνδρομα. Αυτά περιλαμβάνουν νεφρικά, γαστρεντερικά και καρδιολογικά προβλήματα, νόσους Parkinson και Alzheimer, οπτική νευροπάθεια, εγκεφαλικά προβλήματα όπως επιληψία, σχιζοφρένεια, ημικρανίες, άνοια και εγκεφαλικά επεισόδια, διαβήτη, κώφωση και πολλά άλλα υψηλής σοβαρότητας προβλήματα υγείας. Οι νόσοι των μιτοχονδρίων δεν διορθώνονται με αποτελεσματική θεραπεία, αλλά μπορούν να προληφθούν μέσω των αναδυόμενων τεχνικών μιτοχονδριακής αντικατάστασης (MRTs). Οι MRTs περιλαμβάνουν εργαστηριακές τεχνικές όπως η μεταφορά μητρικής ατράκτου και η προπυρηνική μεταφορά και πραγματοποιούνται μόνο σε περίπτωση που η μέλλουσα μητέρα πάσχει από ασθένεια που οφείλεται στο ανεξάρτητο μιτοχονδριακό γονιδίωμα (mtDNA). Μέσω της παροχής φυσιολογικών ωαρίων μίας δότριας, το αναδιαμορφωμένο ωάριο αποτελείται από το πυρηνικό γονιδίωμα του ζευγαριού που επιθυμεί να τεκνοποιήσει, και τα φυσιολογικά μιτοχόνδρια της δότριας. Η ασφάλεια και η αποτελεσματικότητα των μεθόδων δεν είναι πλήρως διευκρινισμένες, καθώς οι τεχνικές αποτελούν σχετικά νέα επιστημονική εξέλιξη με τις κλινικές δοκιμές τους να είναι περιορισμένες. Όπως και σε όλες τις καινοτόμες μεθόδους υπάρχουν οι υποστηρικτές αλλά και οι διαφωνούντες οι οποίοι στηρίζονται σε

διάφορους βιοηθικούς, επιστημονικούς, κοινωνικούς και οικονομικούς λόγους. Παράλληλα τα νομοθετικά πλαίσια των MRTs διαφοροποιούνται σε κάθε χώρα παγκοσμίως ενισχύοντας τον ιατρικό τουρισμό προς τις χώρες με λιγότερο αυστηρά μέτρα όπως η Ελλάδα. Πληθώρα στατιστικών ερευνών αποδεικνύει όλα τα θεωρητικά δεδομένα και προκύπτουν νέα συμπεράσματα.

Λέξεις κλειδιά : υποβοηθούμενη αναπαραγωγή, μιτοχονδριακές ασθένειες, θεραπείες μιτοχονδριακής αντικατάστασης, δωρεά μιτοχονδρίων.



## **Abstract**

This diploma thesis is based on documented bibliographic sources and aims to highlight mitochondrial replacement techniques that prevent the inheritance of mitochondrial diseases from mother to newborn. Mitochondria are intracellular organelles of all eukaryotic cells and aim at the synthesis of adenosine triphosphate molecules through the aerobic process of oxidative phosphorylation, thus ensuring the energy of the cell. Mitochondrial diseases are genetic diseases that affect a large percentage of the human population and may be due either to disturbance of the nuclear genome of the mitochondria or the autonomic mitochondrial. Scientists have discovered over 300 different kinds of genetically and clinically distinct mitochondrial disorders, many of which are fatal. These can be due to reasons such as mutations, aging and medications, and cause severe symptoms and even syndromes. These include kidney, gastrointestinal and heart problems, Parkinson's and Alzheimer's diseases, optic neuropathy, brain problems such as epilepsy, schizophrenia, migraines, dementia and strokes, diabetes, deafness and many other high-severity health problems. Mitochondrial diseases are not corrected with effective treatment, but can be prevented through emerging mitochondrial replacement techniques (MRTs). MRTs include laboratory techniques such as maternal spindle transfer and pronuclear transfer and are performed only if the expectant mother suffers from disease due to the independent mitochondrial genome (mtDNA). Through the provision of normal eggs of a donor, the remodeled egg consists of the nuclear genome of the couple wishing to have children, and the normal mitochondria of the donor. The safety and efficacy of the methods are not fully elucidated, as the techniques are a relatively new scientific development with their clinical trials being limited . As in all innovative methods, there are supporters and dissidents who are based on various bioethical, scientific, social and economic reasons. At the same time, the legislative frameworks of MRTs vary in each country worldwide, enhancing medical tourism to countries with less stringent measures such as Greece. Numerous statistical surveys prove all theoretical data and new conclusions emerge.

Key words: assisted reproduction, mitochondrial diseases, mitochondrial replacement therapies, mitochondrial donation.

## Πίνακας Περιεχομένων

Δήλωση συγγραφέα προπτυχιακής διπλωματικής εργασίας.....	iv
Ευχαριστίες.....	v
Αφιερώσεις.....	vi
Περίληψη.....	vii
Abstract.....	ix
Συνοτομογραφίες.....	xiii
Πρόλογος.....	1
Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή.....	4
1.1. Φυσιολογία γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος.....	4
1.2. Φυσιολογική γονιμοποίηση ωαρίου.....	9
1.3. Τεχνικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής.....	11
Κεφάλαιο 2: Τα μιτοχόνδρια και οι γενετικές βλάβες τους.....	15
2.1. Οι λειτουργίες και η δομή των μιτοχονδρίων.....	15
2.2. Γενετικές βλάβες μιτοχονδρίων: είδη, αίτια και θεραπεία.....	17
2.3. Προγεννητικός έλεγχος για μιτοχονδριακές νόσους.....	21
Κεφάλαιο 3: Αναλυτική περιγραφή και σύγκριση των μεθόδων.....	23
3.1. Μεταφορά μητρικής ατράκτου.....	23
3.1.1. Περιληπτική διαδικασία.....	23
3.1.2. Εργαστηριακές τεχνικές.....	24
3.2. Προπυρηνική μεταφορά.....	39
3.2.1. Περιληπτική διαδικασία.....	39
3.2.2. Εργαστηριακές τεχνικές.....	40
3.3. Σύγκριση των δυο μεθόδων.....	42
Κεφάλαιο 4: Πλαίσια τεχνικών μιτοχονδριακής αντικατάστασης.....	46
4.1. Νομοθετικά πλαίσια MRTs Παγκοσμίως.....	46
4.2. Ασφάλεια και αποτελεσματικότητα των μεθόδων.....	50
4.3. Βιοηθικά ζητήματα.....	52
4.4. Επιλογή φύλου.....	54
4.5. Οικονομικά ζητήματα.....	55
4.6. Κοινωνικά ζητήματα.....	56
4.7. Επιστημονικά ζητήματα.....	56

4.8. Ανωνυμία δότης στην δωρεά μιτοχονδρίων.....	58
4.9. Η σημασία των γενετικά συγγενών παιδιών .....	59
Κεφάλαιο 5: Έρευνες και στατιστική προσέγγιση μεθόδων.....	60
5.1. Έρευνα 1 <sup>η</sup> : Οι γενετικοί σύμβουλοι.....	60
5.2. Έρευνα 2 <sup>η</sup> : Γυναίκες-φορείς μεταλλάξεων mtDNA αλλά και δότριες μιτοχονδρίων.....	63
5.3. Έρευνα 3 <sup>η</sup> : Στατιστικά στοιχεία απεικόνισης μειωτικής ατράκτου με Polyscore.....	66
5.4. Έρευνα 4 <sup>η</sup> : Ποιοτική μελέτη για τη νομιμοποίηση της δωρεάς μιτοχονδρίων .....	70
Συμπεράσματα .....	72
Αναφορές .....	75
Πηγές Εικόνων .....	85

## Συντομογραφίες

	<b>Αγγλική ορολογία</b>	<b>Ελληνική ορολογία</b>
<b>ART</b>	Assisted reproduction techniques	Τεχνικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής
<b>CBS</b>	Chorionic villus sampling	Λήψη χοριακών λαχνών
<b>DNA</b>	Deoxyribonucleic Acid	Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration	Υπηρεσία τροφίμων και φαρμάκων
<b>FRDA</b>	Friedreich's Ataxia	Αταξία Φρίντριχ
<b>FSH</b>	Follicle stimulation hormone	Ωοθυλακιοτρόπος ορμόνη
<b>GnRH</b>	Gonadotropin-Releasing Hormone	Εκλυτική ορμόνη των γοναδοτροπινών
<b>GVBD</b>	Germinal vesicle breakdown	Διάσπαση βλαστικών κυστιδίων
<b>HCG</b>	Human chorionic gonadotropin	Ανθρώπινη χοριακή γοναδοτροπίνη
<b>HFEA</b>	Human Fertilization and Embryology Authority	Αρχή Ανθρώπινης Γονιμοποίησης και Εμβρυολογίας
<b>HSA</b>	Human serum albumin	Ανθρώπινη αλβουμίνη ορού
<b>ICSI</b>	Intra-cytoplasmic sperm injection	Ενδοκυτταροπλασματική έγχυση

σπέρματος

<b>IM</b>	Internal membrane	Εσωτερική μεμβράνη
<b>IU</b>	International units	Διεθνείς μονάδες
<b>KSS</b>	Kearns-Sayre Syndrome	Σύνδρομο Kearns
<b>LH</b>	Luteinizing hormone	Ωχρινοτρόπος ορμόνη
<b>LHON</b>	Leber's hereditary optic neuropathy	Κληρονομική οπτική νευροπάθεια Λέμπερ
<b>MAP</b>	Microtubule Associated Proteins	Πρωτεΐνες σχετιζόμενες με μικροσωλινίσκους
<b>MCA</b>	Metabolomic Analysis	Μεταβολομικές αναλύσεις
<b>MELLAS</b>	Mitochondrial Encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes	Μιτοχονδριακή εγκεφαλοπάθεια, γαλακτική οξέωση και επεισόδια τύπου εγκεφαλικού
<b>MERRF</b>	Myoclonic epilepsy with ragged red fibers	Μυοκλινική επιληψία με τραχιές κόκκινες ίνες
<b>MIDs</b>	Mitochondrial Disorders	Μιτοχονδριακές Διαταραχές
<b>MPF</b>	Megakaryocyte potentiating factor	Παράγοντας ενίσχυσης μεγακαρυοκυττάρων
<b>MRTs</b>	Mitochondrial replacement therapy	Θεραπεία μιτοχονδριακής υποκατάστασης

<b>MST</b>	Maternal spindle transfer	Μεταφορά μητρικής ατράκτου
<b>MtDNA</b>	Mitochondrial DNA	Μιτοχονδριακό DNA
<b>NASEM</b>	National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine	Εθνικές Ακαδημίες Επιστημών, Μηχανικής και Ιατρικής
<b>Ndna</b>	Nuclear DNA	Πυρηνικό DNA
<b>OM</b>	Outer membrane	Εξωτερική μεμβράνη
<b>OXPHOS</b>	Oxidative phosphorylation	Οξειδωτική Φωσφορυλίωση
<b>PNT</b>	Pronuclear transfer	Προπυρηνική μεταφορά
<b>PGD</b>	Preimplanation genetic testing	Προεμφυτευτική γενετική διάγνωση

## Πρόλογος

Στη παρούσα διπλωματική εργασία αναλύονται τόσο χαρακτηριστικά των μιτοχονδρίων και τον μιτοχονδριακών διαταραχών, όσο και οι διαδικασίες μιτοχονδριακής αντικατάστασης και συγκεκριμένα η μεταφορά μητρικής ατράκτου και η προπυρηνική μεταφορά στο επίπεδο της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής . Οι αναδυόμενες τεχνικές αφορούν στην αποφυγή κληροδότησης μιτοχονδριακών νοσημάτων από την μητέρα στο έμβρυο.

Τα μιτοχόνδρια είναι ενδοκυτταρικά οργανίδια που παρέχουν κυτταρική ενέργεια με τη μορφή τριφωσφορικής αδενοσίνης που παράγεται μέσω οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Οι μιτοχονδριακές διαταραχές ή αλλιώς διαταραχές mtDNA κληρονομούνται αποκλειστικά από την μητέρα και προκύπτουν λόγω μεταλλάξεων στο μιτοχονδριακό DNA ή μεταλλάξεων στο πυρηνικό DNA οι οποίες εμπλέκονται στη λειτουργία των μιτοχονδρίων. Έχει πλέον αναγνωριστεί ότι επίκτητες μεταλλάξεις mtDNA μπορεί να οφείλονται σε χρόνιες ασθένειες που συνδυάζονται με την ηλικία όπως οι καρδιαγγειακές παθήσεις, ο διαβήτης και η νόσος Parkinson (Amato P, 2014).

Οι μιτοχονδριακές παθήσεις προκαλούν συνήθως σοβαρά κλινικά συμπτώματα στους πάσχοντες αφού προσβάλλονται οι ιστοί που απαιτούν υψηλή ενέργεια όπως η καρδιά, ο εγκέφαλος, το ήπαρ, το κεντρικό νευρικό σύστημα και οι σκελετικοί μύες (Neurane, 2014). Τα συμπτώματα είναι κλινικά ετερογενή και μπορεί να περιλαμβάνουν μυϊκή αδυναμία, καρδιακή νεφρική και ηπατική ανεπάρκεια, κώφωση και τύφλωση (Amato P, 2014). Η πρόληψη μετάδοσης των mtDNA νοσημάτων είναι εξέχουσας σημασίας καθώς δεν υπάρχει διαδεδομένη αποδοτική θεραπεία (Neurane, 2014).

Οι θεραπείες μιτοχονδριακής υποκατάστασης σε ζυγωτά ή ωάρια, περιλαμβάνουν την προπυρηνική μεταφορά (PNT) και τη μεταφορά μητρικής ατράκτου (MST) αντίστοιχα. Συνοπτικά αφορούν την μεταφορά του πυρηνικού DNA από ένα ωάριο με παθογόνο mtDNA σε ένα ωάριο δότη με πυρήνα χωρίς παθογόνο mtDNA (Sendra L, 2021).

Αναφορικά με την μεταφορά μητρικής ατράκτου, περιλαμβάνει την αφαίρεση των πυρηνικών χρωμοσωμάτων σε σχηματισμό ατράκτου τόσο από το ωάριο της υγιούς δότριας όσο και από το ωάριο της γυναίκας με την μιτοχονδριακή νόσο και την μετέπειτα εισαγωγή του πυρηνικού χρωμοσώματος της μητέρας στο ωάριο της δότριας (Liao,



2023). Έχουν πλέον γεννηθεί πολλοί απόγονοι στους οποίους μέσω γενετικής ανάλυσης δεν διαπιστώθηκε mtDNA δότη ατράκτου, επιδεικνύοντας αποτελεσματική μιτοχονδριακή αντικατάσταση. Η τεχνική απαιτεί μεγάλες οικονομικές δαπάνες λόγω της χρήσης εξειδικευμένου εξοπλισμού. Η μεταφορά ατράκτου θα πρέπει να πραγματοποιείται κάτω από εξαιρετικά ρυθμιζόμενες περιβαλλοντικές συνθήκες με ελάχιστο κίνδυνο βλάβης (Reznichenko, 2016).

Η προπυρηνική μεταφορά συνοπτικά περιλαμβάνει τη γονιμοποίηση του ωαρίου της γυναίκας με την μιτοχονδριακή ασθένεια με το σπερματοζωάριο του άντρα, τη δημιουργία ζυγωτού και την μετέπειτα εισαγωγή των 2 προπυρήνων σε ωάριο υγιούς δότριας που έχει αφαιρεθεί ο πυρήνας. Το υγιές πλέον ζυγωτό εμφυτεύεται στην μήτρα της μητέρας (Hyslop, 2016). Η μεταφορά προπυρήνων στον άνθρωπο μπορεί να προκαλέσει μια βιώσιμη εγκυμοσύνη με φυσιολογικό καρυότυπο και ελάχιστη ετεροπλασία mtDNA (Zhang, 2016).

Σκοπός της εργασίας είναι η αναλυτική μελέτη των μιτοχονδρίων και των ανωμαλιών τους, η ανάλυση των δυο διαδικασιών, η εύρεση των διαφορών μεταξύ τους, καθώς και τα προτερήματα και μειονεκτήματα της κάθε τεχνικής. Στόχος της μάλιστα είναι η διερεύνηση δυσμενών επιπτώσεων στο έμβρυο, η ανάλυση των διαφόρων ζητημάτων των τεχνικών μιτοχονδριακής αντικατάστασης, όπως τα βιοηθικά, τα επιστημονικά, τα οικονομικά και τα κοινωνικά, η διερεύνηση της ασφάλειας και αποτελεσματικότητας των μεθόδων, καθώς μάλιστα η παράθεση στοιχείων από διάφορες έρευνες.

Αναλυτικότερα, το 1<sup>ο</sup> κεφάλαιο θα αφορά την εισαγωγή στο θέμα της εργασίας καθιστώντας πιο κατανοητές τις έννοιες. Θα διατυπωθούν περιληπτικά βασικές γνώσεις αναφορικά με το γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα, τη γονιμοποίηση και τις τεχνικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, ευνοώντας τον αναγνώστη. Στο 2<sup>ο</sup> κεφάλαιο θα αναλυθούν λεπτομερώς χαρακτηριστικά των μιτοχονδρίων, των γενετικών νόσων που προκαλούν, καθώς επιπλέον και στοιχεία για τον προγεννητικό έλεγχο. Στο 3<sup>ο</sup> κεφάλαιο θα μελετηθούν οι δυο τεχνικές και συγκεκριμένα τα βήματα που πρέπει να ακολουθήσει το εργαστήριο, το ζευγάρι και η δότρια. Θα γίνει ταυτόχρονα σύγκριση των μεθόδων ανακαλύπτοντας προτερήματα και μειονεκτήματα για την κάθε μία. Στο 4<sup>ο</sup> κεφάλαιο θα ακολουθήσει παράθεση διαφόρων πλαισίων των θεραπειών. Πιο αναλυτικά θα τονιστούν ζητήματα ηθικότητας, αποτελεσματικότητας και ασφάλειας, θα μελετηθούν η

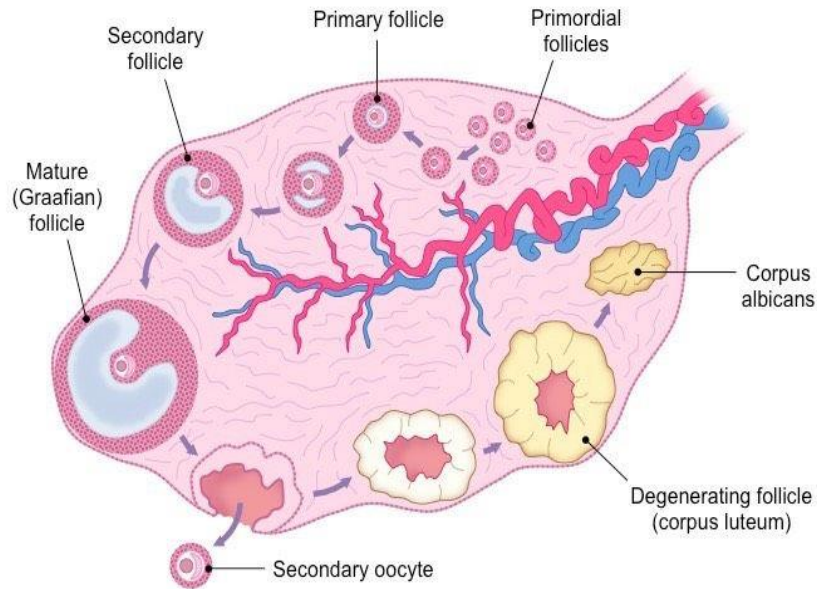
ανωνυμία δότριας, η αξία των γενετικά συγγενών παιδιών, η δυνατότητα επιλογής φύλου και άλλα. Στο 5<sup>ο</sup> κεφάλαιο θα παρατεθούν στατιστικά στοιχεία, γραφήματα και παραδείγματα όσον αφορά στις μεθόδους. Στο κεφάλαιο αυτό θα φανεί στατιστικά η επιτυχία τους μέχρι στιγμής καθώς είναι τεχνικές που διαρκώς εξελίσσονται. Οι έρευνες αφορούν τόσο τα ζευγάρια, όσο και της δότριες, τους γενετικούς συμβούλους και τον λαό.

## Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή

### 1.1. Φυσιολογία γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος

Το αναπαραγωγικό σύστημα της γυναίκας βρίσκεται μέσα στην πυελική κοιλότητα και σχηματίζεται δομικά από τα εσωτερικά και τα εξωτερικά γεννητικά όργανα. Τα εσωτερικά γεννητικά όργανα περιλαμβάνουν τις ωοθήκες, τις σάλπιγγες, τη μήτρα και τον κόλπο. Τα εξωτερικά γεννητικά όργανα περιλαμβάνουν το αιδοίο και συγκεκριμένα την κλειτορίδα, τα χείλη του αιδοίου, το ηβικό ανάχωμα-mons pubis, τον υμένα και τους αδένες του Bartholin (Ellis, 2013).

Στα εσωτερικά όργανα, οι ωοθήκες είναι ζευγαρωμένα ωοειδή όργανα 6 με 8 γραμμάρια το κάθε ένα, που βρίσκονται στην λεκάνη. Οι ωοθήκες αποτελούνται από ωοθυλάκια γεμάτα υγρό που συντελούν στην ωρίμανση των ωαρίων και παράγουν ορμόνες όπως η αντιμυλλέριος ορμόνη (AMH) που παράγεται από τα κοκκιώδη κύτταρα στα ωοθυλάκια των ωοθηκών και δείχνει το ωοθηκικό απόθεμα (Hirshfield, 1997). Τα κύτταρα που απαρτίζουν τα ωοθυλάκια είναι τα ωοκύτταρα-ωάρια, τα κοκκιώδη κύτταρα granulosa και τα κύτταρα theca των εσωτερικών και εξωτερικών στοιβάδων τους (O'Shea, 1981). Τα ωοθυλάκια ανάλογα με το στάδιο ωρίμανσής τους διαχωρίζονται σε πρωτογενή, δευτερογενή, τριτογενή και ώριμα ωοθυλάκια πριν την ωοθυλακιορρηξία. Ουλακιογένεση ονομάζεται η διαδικασία παραγωγής σταθερού αριθμού ωοθυλακίων τα οποία ωριμάζουν κατά τη διάρκεια κάθε αναπαραγωγικού κύκλου την κατάλληλη στιγμή της ωορρηξίας (Hirshfield, 1997). Οι λειτουργίες των ωοθηκών είναι δύο: Αρχικά προάγουν την ωογένεση, δηλαδή τον πολλαπλασιασμό και ωρίμανση των θηλυκών γαμετών-ωαρίων και παράλληλα παράγουν ορμόνες του φύλου δηλαδή οιστρογόνα και προγεστερόνη. Τα κύτταρα των ωοθηκών είναι σημαντικά στην παραγωγή οιστρογόνων, τα οποία διεγείρουν την ανάπτυξη των γυναικείων αναπαραγωγικών οργάνων και συμβάλλουν στην ανάπτυξη των γυναικείων χαρακτηριστικών όπως των μαστών. Η προγεστερόνη προκαλεί εκκριτικές αλλαγές στο ενδομήτριο που προετοιμάζουν την μήτρα για εγκυμοσύνη καθώς και τον μαστικό αδένα για γαλουχία κατά την εγκυμοσύνη. Η λειτουργία των ωοθηκών ελέγχεται από τις γοναδοτροπίνες, δηλαδή την ωχρινοτρόπο ορμόνη (LH) και την ωοθηλακιοτρόπο ορμόνη (FSH) που εκκρίνονται από την υπόφυση (Rehfeld, 2017).



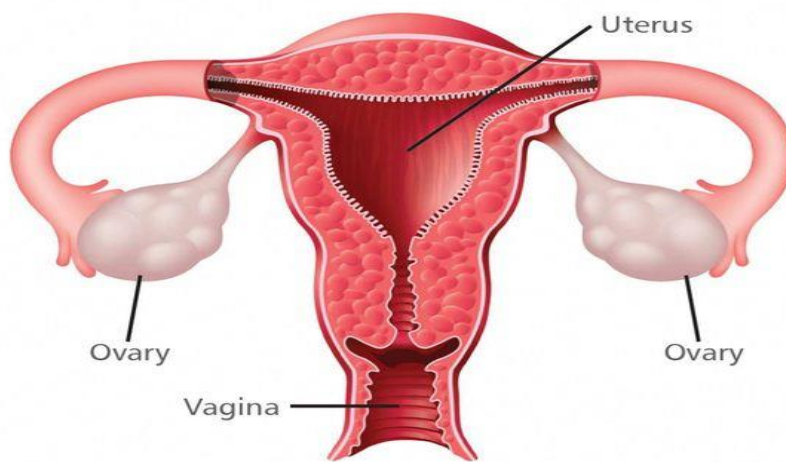
Εικόνα 1: Η διαδικασία της ανάπτυξης ενός ωοθυλακίου και η απόπτωσή του. Παρουσιάζεται το ωοθυλάκιο στη πρωτογενή, τη δευτερογενή, τη τριτογενή και τη τελική ώριμη φάση του που απελευθερώνει στην σάλπιγγα το ωάριο. Υστερα μετατρέπεται στο ωχρό σωματίο και αποδομείται. Πηγή : <https://i.pinimg.com/736x/d4/4f/bc/d44fbcd2a4a686404e91eda62e98ad9c.jpg>, 12/05/2024

Οι σάλπιγγες είναι ζευγαρωμένα σωληνοειδή όργανα και συγκεκριμένα μυϊκοί σωλήνες μήκους 10-12 εκατοστά. Η βασική λειτουργία των οργάνων είναι να μεταφέρουν το ωάριο από την ωθήκη στην κοιλότητα της μήτρας. Η γονιμοποίηση ωστόσο και η αρχική εμβρυική ανάπτυξη λαμβάνει συνήθως χώρα στην μία από τις δύο σάλπιγγες (Rehfeld, 2017).

Η μήτρα είναι ένα κοίλο μυώδες όργανο σε σχήμα αχλαδιού με πάχος τοιχώματος περίπου 1,5 εκατοστά. Είναι το σημαντικότερο γυναικείο αναπαραγωγικό όργανο καθώς παρέχει διατροφική υποστήριξη, απομάκρυνση τοξινών και μηχανική προστασία στο αναπτυσσόμενο έμβρυο. Οι συστολές μάλιστα του μυϊκού τοιχώματος της μήτρας βοηθούν στην ώθηση του εμβρύου κατά τον τοκετό. Αποτελείται ανατομικά από το ενδομήτριο, το μυομήτριο και το περιμήτριο. Η σημαντικότερη λειτουργία της είναι να δέχεται ένα γονιμοποιημένο ωάριο που εγκαθίσταται στο ενδομήτριο, και να του παρέχει τροφή από αιμοφόρα αγγεία. Κατά τη γόνιμη περίοδο μιας γυναίκας, δηλαδή περίπου κατά την 11<sup>η</sup> μέχρι την 17<sup>η</sup> ημέρα ενός κύκλου 28 ημερών το ενδομήτριο περνά από κυκλικές αλλαγές κάθε μήνα προετοιμάζοντας την εμφύτευση ενός εμβρύου. Οι αλλαγές σχετίζονται με την ανάπτυξη των ωοθυλακίων στις ωθήκες και επηρεάζονται από τις ορμόνες του φύλου των ωοθηκών. Ο τράχηλος της μήτρας

είναι το κάτω στενό τμήμα το οποίο ενώνεται με το άνω μέρος του κόλπου (Dedon, 2020).

Ο κόλπος είναι ένας ινομυϊκός σωλήνας μήκους 7 με 10 εκατοστά, ο οποίος συνδέει το εξωτερικό περιβάλλον με τον τράχηλο της μήτρας. Αποτελεί παράλληλα το μέρος στο οποίο εκσπερματώνει ο άνδρας κατά τον οργασμό με σκοπό μία επακόλουθη εγκυμοσύνη (Rehfeld, 2017).



*Εικόνα 2: Η ανατομία των εσωτερικών οργάνων του γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος. Παρουσιάζονται ο κόλπος, οι ωοθήκες, η μήτρα και οι σωληνοειδείς σάλπιγγες. Πηγή: <https://i.pinimg.com/564x/2c/98/3c/2c983c2b002af98f0f853acf80e0bbbfb.jpg>, 12/05/2024*

Αναφορικά με τα εξωτερικά όργανα, η κλειτορίδα βρίσκεται στην κορυφή του αιδοίου και αποτελείται από τα σηραγγώδη σώματα που βοηθούν στη στύση γεμίζοντας με αίμα κατά τη σεξουαλική διέγερση. Τα μεγάλα και μικρά χείλη είναι πτυχές που προστατεύουν τον προθάλαμο του κόλπου από ξηρότητα λοιμώξεις και ερεθισμό. Το mons rubis είναι μια στρογγυλεμένη μάζα λιπώδους ιστού που βρίσκεται πάνω από την ηβική σύμφυση των ηβικών οστών και σχηματίζει το πρόσθιο τμήμα του αιδοίου. Ο υμένας είναι ένα λεπτό κομμάτι βλεννογόνου συνδετικού ιστού που περιβάλλει ή καλύπτει εν μέρει το κολπικό άνοιγμα. Οι αδένες Bartholin είναι δυο σύνθετοι αδένες μεγέθους μπιζελιού που βρίσκονται πίσω αριστερά και πίσω δεξιά από το άνοιγμα του κόλπου και λειτουργούν εκκρίνοντας βλέννα για να λιπαίνουν τον κόλπο (Ramírez-González, 2016).

Ο εμμηνορροϊκός κύκλος μιας γυναίκας αποτελεί μία σειρά φυσικών αλλαγών στις δομές του γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος και στην παραγωγή ορμονών.

Όσον αφορά στις εκκρινόμενες ορμόνες, κυριαρχεί ένα πολύπλοκο σύστημα ανατροφοδότησης μεταξύ υπόφυσης, υποθαλάμου και ωθηκών. Συγκεκριμένα ο υποθάλαμος εκκρίνει κατά ώσεις μία μικρή πεπτιδική ορμόνη, την εκλυτική ορμόνη των γοναδοτροπινών (GnRH) η οποία με την σειρά της προκαλεί την πρόσθια υπόφυση να απελευθερώσει FSH και LH (Prior, 2020).

Οι κύκλοι είναι δυο: ο κύκλος των ωθηκών και της μήτρας. Ο κύκλος των ωθηκών περιλαμβάνει την παραγωγή και την απελευθέρωση των ωαρίων από τις ωθήκες με την ταυτόχρονη παραγωγή οιστρογόνων και προγεστερόνης. Ο κύκλος της μήτρας περιλαμβάνει την προετοιμασία της ώστε να υποδεχτεί το έμβρυο. Οι δυο κύκλοι είναι συντονισμένοι, επαναλαμβάνονται κάθε 21 με 35 μέρες και διαρκούν φυσιολογικά 30 με 45 χρόνια. Η πρώτη ημέρα του κύκλου είναι και η πρώτη ημέρα της περιόδου της γυναίκας. Περίπου την 14<sup>η</sup> ημέρα, ένα ωάριο απελευθερώνεται από την ωθήκη.

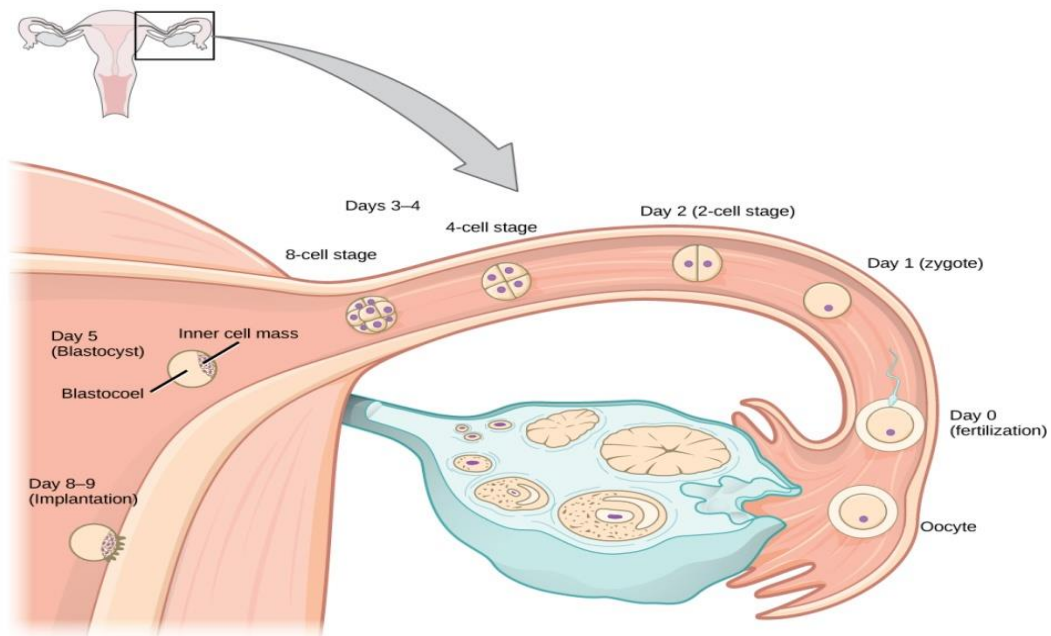
Αναφορικά με τον κύκλο των ωθηκών, περιλαμβάνει όλες τις αλλαγές που λαμβάνουν χώρα στα ωθυλάκια των ωθηκών. Αποτελείται από την ωθυλακική φάση, την ωορρηξία και την ωχρινική φάση:

Η ωθυλακική φάση είναι η πρώτη σε έναν ωθηκικό κύκλο και τελειώνει όταν ωριμάσουν τα ωθυλάκια. Συνήθως μόνο ένα ωθυλάκιο ωριμάζει πλήρως και απελευθερώνει το ωάριό του. Επομένως μόνο ένα ωάριο γονιμοποιείται και τα υπόλοιπα απορρίπτονται σαν πολικά σώματα. Η ωθυλακική φάση διαρκεί περίπου 14 ημέρες για τις γυναίκες ηλικίας 18 με 25 ετών και μειώνεται σημαντικά με την ηλικία (Schmerler, 2011). Τις πρώτες ημέρες του κύκλου, αυξάνεται η FSH και μερικά ωθυλάκια διεγείρονται. Έτσι κατά την θυλακιογένεση, δηλαδή την ταυτόχρονη ωρίμανση των ωθυλακίων, αυτά ανταγωνίζονται μεταξύ τους για το ποιο θα κυριαρχήσει. Το ωθυλάκιο με τους περισσότερους FSH υποδοχείς θα συνεχίσει να ωριμάζει περεταίρω με την βοήθεια της LH. Τα υπόλοιπα ωθυλάκια που δεν κυριάρχησαν πεθαίνουν με μία διαδικασία γνωστή ως ατρησία των ωθυλακίων (Tortora, 2017).

Η ωορρηξία είναι η 2<sup>η</sup> φάση κατά την οποία το κυρίαρχο ωάριο απελευθερώνεται από τα ωθυλάκια στη σάλπιγγα 10 με 12 ώρες μετά από την κορύφωση της LH. Η LH ξεκινά την ωορρηξία περίπου την ημέρα 14 του κύκλου και διεγείρει το σχηματισμό του ωχρού σωματίου (Reed, 2018). Εάν ένα ωάριο γονιμοποιηθεί, ωριμάζει σε ωοειδές και εμποδίζει αυτόματα όλα τα υπόλοιπα

σπερματοζωάρια να εισέλθουν σε αυτό. Το γονιμοποιημένο ωάριο ξεκινά την εμβρυική ανάπτυξη. Χρειάζεται 3 ημέρες για να φτάσει από την σάλπιγγα στην μήτρα και άλλες 3 για να γίνει εμφύτευση στο ενδομήτριο. Όταν κατά την εμφύτευση φτάσει στο στάδιο της βλαστοκύστης ξεκινά η εγκυμοσύνη (Tortora, 2017).

Στην ωχρινική φάση οι FSH και LH της υπόφυσης προκαλούν όλα τα υπόλοιπα μέρη του ωχρού σωματίου του οποίου γονιμοποιήθηκε το ωάριο, δηλαδή του κυρίαρχου, να μετατραπούν στο ωχρό σωματίο που παράγει προγεστερόνη. Οι ορμόνες που παράγονται από το ωχρό σωματίο προκαλούν την πτώση των LH και FSH με αποτέλεσμα αυτό να ατροφεί. Στη συνέχεια η πτώση των επιπέδων προγεστερόνης προκαλεί εμμηνόρροια και την έναρξη του επόμενου κύκλου (Ugwumadu, 2014).



*Εικόνα 3: Στην δεξιά ωοθήκη παρουσιάζονται τα ωοθυλάκια τα οποία ωριμάζουν μέσω θυλακιογένεσης. Κατά την ωορρηξία το κυρίαρχο ωοθυλάκιο μεταναστεύει από την ωοθήκη στη σάλπιγγα που είναι δυνατή η γονιμοποίησή του. Το ζυγωτό αναπτύσσεται μέσω κυτταρικής διαίρεσης, την πέμπτη μέρα λαμβάνει την μορφή βλαστοκύστης και ύστερα εμφυτεύεται στο ενδομήτριο. Πηγή: [https://opentextbc.ca/biology/wp-content/uploads/sites/96/2015/03/Figure\\_43\\_07\\_01.jpg](https://opentextbc.ca/biology/wp-content/uploads/sites/96/2015/03/Figure_43_07_01.jpg), 12/05/2024*

Αναφορικά με τον κύκλο της μήτρας περιλαμβάνει τις αλλαγές στην επένδυση του ενδομητρίου της μήτρας. Αποτελείται από την εμμηνόρροια, την πολλαπλασιαστική φάση και την εκκριτική φάση:

Η εμμηνόρροια που ονομάζεται επίσης και έμμηνος ρύση ή περίοδος, ξεκινά κάθε μήνα με την πτώση των επιπέδων οιστρογόνων και προγεστερόνης και την

απελευθέρωση προσταγλανδίνων που συστέλλουν τις σπειροειδείς αρτηρίες (Johnson, 2007).

Η πολλαπλασιαστική φάση είναι η δεύτερη φάση του κύκλου της μήτρας όπου τα οιστρογόνα προκαλούν την ανάπτυξη της επένδυσης της μήτρας. Καθώς ωριμάζουν τα ωοθυλάκια παράγουν μεγάλες ποσότητες οιστραδιόλης, επομένως το τελικό τμήμα της ωοθυλακικής φάσης αντιστοιχεί στη πολλαπλασιαστική φάση του κύκλου της μήτρας. Στην φάση αυτή αυξάνονται οι πιθανότητες γονιμοποίησης καθώς λόγω των αυξημένων οιστρογόνων, τα κύτταρα του τραχήλου παράγουν τραχηλική βλέννα με υψηλό pH πιο φιλικό προς το σπέρμα (Tortora, 2017).

Η εκκριτική αντιστοιχεί στην ωχρινική φάση του κύκλου των ωοθηκών και περιλαμβάνει την παραγωγή προγεστερόνης από το ωχρό σωματίο, η οποία βοηθά το ενδομήτριο να υποδεχτεί και να εμφυτεύσει την βλαστοκύστη (Lessey, 2019).

## **1.2. Φυσιολογική γονιμοποίηση ωαρίου**

Με τον όρο γονιμοποίηση εννοούμε την ένωση του πυρήνα σπέρματος πατρικής προέλευσης με πυρήνα ωαρίου μητρικής προέλευσης για να σχηματιστεί ο πρωτεύοντας πυρήνας ενός εμβρύου. Πραγματοποιείται σύντηξη του κληρονομικού υλικού δυο διαφορετικών γαμετών καθένας από τους οποίους φέρει το ήμισυ του αριθμού των χρωμοσωμάτων που είναι τυπικά για το είδος (Monroy, 2024).

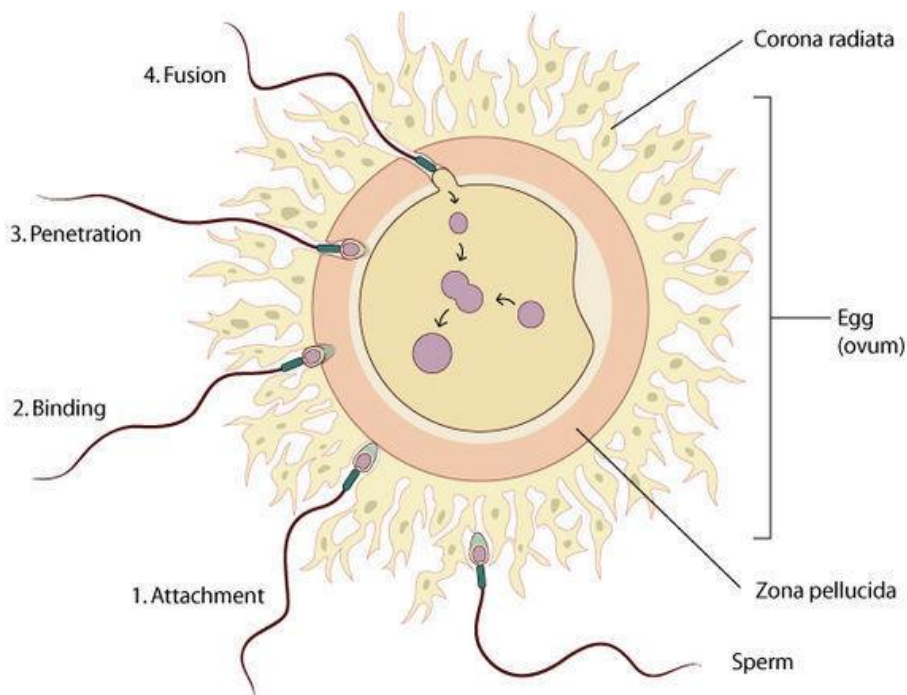
Κατά τη διάρκεια εκσπερμάτωσης εκατοντάδες εκατομμύρια σπερματοζωάρια απελευθερώνονται στον κόλπο. Κατά την διείσδυσή τους εκατομμύρια ξεπερνάνε την οξύτητα του κόλπου (pH περίπου 3,8) και άλλα τόσα εμποδίζονται μετέπειτα από την τραχηλική βλέννα και τα τραχηλικά φαγοκύτταρα. Τα σπερματοζωάρια που καταφέρνουν να ξεπεράσουν τους φραγμούς συναντούν στη μήτρα το ωάριο και γονιμοποιούνται. Εάν ωστόσο δεν συναντήσουν κάποιο ωάριο, οι σωλήνες της μήτρας τα κρατάνε ζωντανά για 3 με 5 ημέρες, επιτρέποντας την γονιμοποίηση να συμβεί ακόμη και αν η σεξουαλική επαφή πραγματοποιηθεί λίγες ημέρες πριν από την ωορρηξία. Το σπέρμα πρέπει να υποβληθεί στην διαδικασία της χωρητικότητας ώστε να μπορέσει να γονιμοποιήσει το ωάριο. Τα υγρά του συστήματος της γυναίκας βελτιώνουν την κινητικότητα των σπερματοζωαρίων υποβοηθώντας τη διαδικασία χωρητικότητας.



Προκειμένου το σπέρμα να διεισδύσει στο ωάριο κατά μήκος του σωλήνα της μήτρας, πρέπει να ξεπεράσει τα δύο προστατευτικά στρώματα του ωαρίου: το παχύ εξωτερικό στρώμα κοκκιωδών κυττάρων *corona radiata* και *cumulus granulosa*, καθώς και την υποκείμενη διάφανη ζώνη, μία γλυκοπρωτεϊνική μεμβράνη που περιβάλλει τη μεμβράνη πλάσματος του κυττάρου (Lindsay M. Biga, 2019). Τα κοκκιώδη κύτταρα *cumulus granulosa* και *corona radiata* αποτελούν το εξωτερικό κυτταρικό στρώμα του ωαρίου και σχηματίζονται από κύτταρα ωοθυλακίων που προσκολλώνται στο ωάριο πριν απελευθερωθεί από το ωοθυλάκιο (Rienzi L. B., 2012). Μέσω του ακροσώματος, το οποίο είναι μια εξέχουσα θέση στο πρόσθιο άκρο των σπερματοζωαρίων, απελευθερώνονται πεπτικά ένζυμα και βοηθούν το σπέρμα να διεισδύσει από την διαφανή ζώνη του ωαρίου. Τέλος, ένα σπερματοζωάριο έρχεται σε επαφή με υποδοχείς δέσμευσης σπέρματος στη μεμβράνη πλάσματος του ωαρίου, με αποτέλεσμα να συγχωνεύονται οι δυο μεμβράνες πλάσματος σπερματοζωαρίου και ωαρίου, με το κυρίαρχο σπερματοζωάριο να εισέρχεται στο ωάριο.

Το σπερματοζωάριο στη συνέχεια απελευθερώνει τον απλοειδή πυρήνα του στο ωάριο. Η δομή της μεμβράνης του ωαρίου αλλάζει σε απόκριση (φλοιώδης αντίδραση), εμποδίζοντας οποιαδήποτε περαιτέρω διείσδυση από άλλο σπέρμα και σχηματίζοντας μια μεμβράνη. Η γονιμοποίηση ολοκληρώνεται με την ενοποίηση των απλοειδών πυρήνων των δύο γαμετών, παράγοντας ένα διπλοειδές ζυγωτό (Lindsay M. Biga, 2019).

Κάθε φυσιολογικό γονιμοποιημένο ωάριο έχει 46 χρωμοσώματα, 23 από το σπέρμα δηλαδή τον πατέρα και 23 από το ωάριο δηλαδή την μητέρα. Στη φυσική σύλληψη οι μιτωτικές διαιρέσεις της εμβρυογένεσης αρχίζουν καθώς το έμβρυο ξεκινά να ταξιδεύει από τη σάλπιγγα. Περίπου μια εβδομάδα μετά τη γονιμοποίηση, το έμβρυο φτάνει στη μήτρα, όπου ενσωματώνεται και συνεχίζει την ανάπτυξη μέχρι τη γέννηση (Rice, 2012).



Εικόνα 4: Εμφανίζονται τα βήματα φυσιολογικής γονιμοποίησης ενός ωαρίου. Το σπέρμα προσκολλάται (1), δεσμεύει (2), και διεισδύει (3) στην διάφανη ζώνη. Όταν το σπερματοζώαριο συγχωνεύεται με τη μεμβράνη, το γενετικό υλικό του άντρα απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα του ωαρίου. Η γονιμοποίηση (4) συμβαίνει όταν το γενετικό υλικό άντρα και γυναίκας συγχωνεύονται. Πηγή: [https://static.sciencelearn.org.nz/images/images/000/001/226/full/fertilisation\\_oversize20160620-8734-nj07co.jpg?1674165727](https://static.sciencelearn.org.nz/images/images/000/001/226/full/fertilisation_oversize20160620-8734-nj07co.jpg?1674165727), 13/05/2024

### 1.3. Τεχνικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής

Από την πρώτη γέννηση παιδιού με εξωσωματική γονιμοποίηση, την Louise Brown το 1978, ο τομέας της τεχνολογίας υποβοηθούμενης αναπαραγωγής έχει εξελιχθεί με ραγδαίους ρυθμούς. Η γυναίκα είχε έναν μη διεγερμένο εμμηνορροϊκό κύκλο και οι γιατροί πραγματοποίησαν λαπαροσκοπική ανάκτηση ενός μόνο ωαρίου από την μία ωθήκη. Το ωάριο στη συνέχεια γονιμοποιήθηκε in vitro και μεταφέρθηκε ως έμβρυο στη μήτρα της. Οι τεχνικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (ART) περιλαμβάνουν όλες τις θεραπείες γονιμότητας στις οποίες οι γαμέτες (ωάριο και σπέρμα) χειρίζονται έξω από το ανθρώπινο σώμα με στόχο την επίτευξη υγιούς σύλληψης. Οι συνήθεις διαδικασίες ART περιλαμβάνουν εξωσωματική γονιμοποίηση (IVF) με ή χωρίς ενδοκυτταροπλασματική έγχυση σπέρματος (ICSI), μεταφορά φρέσκων ή κατεψυγμένων εμβρύων και εξωσωματική γονιμοποίηση με ωάρια δότη (Talaulikar, 2013).

Οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται συνήθως στην εξωσωματική γονιμοποίηση περιλαμβάνουν τη διακολλική ωληψία και την εμβρυομεταφορά. Στην 1<sup>η</sup> τεχνική μια μικρή βελόνα εισάγεται μέσω του πίσω μέρους του κόλπου και καθοδηγείται μέσω υπερήχων στα ωοθυλάκια των ωοθηκών για τη συλλογή του υγρού που περιέχει τα ωάρια. Στην 2<sup>η</sup> ένα ή περισσότερα έμβρυα τοποθετούνται στη μήτρα της γυναίκας με σκοπό την επίτευξη εγκυμοσύνης. Λιγότερο συχνά χρησιμοποιούμενες τεχνικές στην εξωσωματική γονιμοποίηση είναι η ενδοσαλπινγική μεταφορά ζυγών, η υποβοηθούμενη εκκόλαψη ζώνης, η κυτταροπλασματική μεταφορά, η δωρεά σπέρματος και ωαρίων και η αυτόλογη συγκαλλιέργεια ενδομητρίου. Οι ART μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε συμφωνίες παρένθετης μητρότητας, για διατήρηση της γονιμότητας, όπως πριν από τη γοναδοτοξική θεραπεία, ή σε ασθενείς που επιθυμούν να καθυστερήσουν την τεκνοποίηση για προσωπικούς τους λόγους.

Άλλες τεχνικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής περιλαμβάνουν την αναπαραγωγική χειρουργική και την κρυοσυντήρηση. Η αναπαραγωγική χειρουργική αντιμετωπίζει αποφράξεις σαλπίνγων, σπερματικού πόρου ή αντιστροφή βαζεκτομής, ενώ στην κρυοσυντήρηση καταψύχονται αναπαραγωγικοί ιστοί, ωάρια ή σπέρμα για μετέπειτα εξωσωματική γονιμοποίηση (Illmensee, 2009).

Αναφορικά με τις αντενδείξεις των ART, ορισμένες μητρικές παθήσεις, ιδιαίτερα καρδιοαναπνευστικές όπως η πνευμονική υπέρταση και η καρδιακή ανεπάρκεια, είναι σχετικά αντενδεικνυόμενες καταστάσεις για εγκυμοσύνη. Θα πρέπει λοιπόν να διεξάγεται συμβουλευτική και αξιολόγηση πριν από τη σύλληψη για τον έλεγχο τέτοιων καταστάσεων.

Η εξωσωματική γονιμοποίηση, η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη τεχνολογία υποβοηθούμενης αναπαραγωγής περιλαμβάνει διάφορα βήματα συμπεριλαμβανομένης της ελεγχόμενης διέγερσης των ωοθηκών, της ωληψίας, της γονιμοποίησης, της καλλιέργειας εμβρύων και της εμβρυομεταφοράς. Ο προεμφυτευτικός γενετικός έλεγχος και η ενδοκυτταροπλασματική έγχυση σπέρματος μπορούν επίσης να συμπεριληφθούν στη διαδικασία. Η κρυοσυντήρηση με υαλοποίηση χρησιμοποιείται στη συνέχεια για την κατάψυξη πλεοναζόντων εμβρύων ή για τη διατήρηση της γονιμότητας ωαρίων ή εμβρύων (Jain, 2023).



Εικόνα 5: Τα στάδια της εξωσωματικής γονιμοποίησης: διέγερση ωοθηκών, ωληψία και προετοιμασία σπέρματος, γονιμοποίηση, καλλιέργεια, εμφυσημεταφορά και επακόλουθη εγκυμοσύνη. Πηγή: <https://i.pinimg.com/736x/c8/da/0e/c8da0edc4a065d6ab946c170a27e4be6.jpg>, 13/05/2024

Η ART ανήκει κυρίως στον τομέα της αναπαραγωγικής ενδοκρινολογίας και υπογονιμότητας. Ορισμένες μορφές ART ωστόσο μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε γόνιμα ζευγάρια για γενετικούς σκοπούς συμπεριλαμβανομένων της μεταφοράς μητρικής ατράκτου και της προπυρηνικής μεταφοράς που είναι θεραπείες μιτοχονδριακής αντικατάστασης (Illmensee, 2009).

Η μεταφορά μητρικής ατράκτου και η προπυρηνική μεταφορά είναι διαδικασίες εξωσωματικής γονιμοποίησης επομένως αντί το ωάριο να γονιμοποιείται με το σπερματοζώαριο στο φυσικό περιβάλλον που είναι η σάλπιγγα της γυναίκας, γονιμοποιείται τεχνητά στο εργαστήριο. Η εξωσωματική γονιμοποίηση τριών γονέων, που χαρακτηρίζει τις τεχνικές αυτές, δεν ενδείκνυται για ζευγάρια που έχουν θέματα υπογονιμότητας όπως κακή ποιότητα ωαρίων ή σπέρματος αλλά αφορά ζευγάρια με ιστορικό μιτοχονδριακών ασθενειών που είναι πιθανό να τις μεταδώσουν στα παιδιά τους. Οι θεραπείες απαιτούν μία τρίτη συμβολή υγιών μιτοχονδρίων ώστε να αντικαταστήσουν τα ελαττωματικά στα ωάρια της μέλλουσας μητέρας. Πριν την έναρξη

των πρωτοκόλλων και των διαδικασιών εξωσωματικής γονιμοποίησης πραγματοποιείται έλεγχος συμπεριλαμβανομένου του ιατρικού ιστορικού του ζευγαριού, της φυσικής εξέτασης, της αξιολόγησης του δείκτη μάζας σώματος, του επιπέδου της αντιμυλλέριου ορμόνης και του αριθμού των ωοθυλακίων. Παράλληλα ακολουθεί γραπτή συγκατάθεση από την δότρια ωαρίων ότι τα ωάρια της θα γονιμοποιηθούν με σπερματοζώαρια του μέλλοντος πατέρα (Wang, 2006).

## Κεφάλαιο 2: Τα μιτοχόνδρια και οι γενετικές βλάβες τους

### 2.1. Οι λειτουργίες και η δομή των μιτοχονδρίων

Τα μιτοχόνδρια είναι ενδοκυτταρικά οργανίδια που βρίσκονται σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα και είναι γνωστά ως μονάδες παραγωγής ενέργειας του κυττάρου, καθώς παράγουν το μεγαλύτερο μέρος της ενέργειας με τη μορφή τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) που έχει ανάγκη το κύτταρο για την εκτέλεση διαδικασιών όπως η κυτταρική διαίρεση, η ανάπτυξη και ο θάνατος των κυττάρων. Πρωταρχικός ρόλος τους είναι η αερόβια κυτταρική αναπνοή, δηλαδή η οξειδωτική φωσφορυλίωση (OXPHOS), η οποία παράγει τελικά καύσιμο για τις διάφορες δραστηριότητες του κυττάρου από την τροφή που τρώμε. Τα μιτοχόνδρια επομένως ικανοποιούν τις μεταβολικές ανάγκες του κυττάρου και συνδράμουν στην ανοσία. Έτσι όταν τα κύτταρα λειτουργούν σωστά, πραγματοποιείται και η σωστή λειτουργία των ιστών, οι οποίοι απαρτίζονται από αυτά. Τα μιτοχόνδρια περιλαμβάνουν το δικό τους γονιδίωμα (mtDNA), αντανakλώντας την βακτηριακή εξελικτική προέλευσή τους. Τα μόρια mtDNA αναπαράγονται ανεξάρτητα από το γονιδίωμα του ξενιστή, και το κάθε μόριο mtDNA κωδικοποιεί 37 γονίδια (13 γονίδια για πολυπεπτίδια, 22 γονίδια για μεταφορά RNA και δύο γονίδια για ριβοσωμικά RNA) που είναι ζωτικής σημασίας για την παραγωγή κυτταρικής ενέργειας και τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο-απόπτωση (Tachibana, 2018). Όλες οι υπόλοιπες μιτοχονδριακές πρωτεΐνες κωδικοποιούνται από το πυρηνικό γονιδίωμα και στη συνέχεια εισάγονται στα μιτοχόνδρια ώστε να εκτελέσουν ορθά τις λειτουργίες τους. Η αποτελεσματική λοιπόν λειτουργία τους καθορίζεται από δυο γονιδιώματα : το πυρηνικό και το μητρικά κληρονομικό μιτοχονδριακό. Η μιτοχονδριακή βιογένεση χρειάζεται συντονισμό της πυρηνικής και μιτοχονδριακής κωδικοποιημένης γονιδιακής έκφρασης, ώστε να διασφαλιστεί η σωστή συναρμολόγηση και λειτουργία ενός μεγάλου εύρους πρωτεϊνών που αποτελούν τη μιτοχονδριακή αναπνευστική αλυσίδα. (Annesley, 2019).

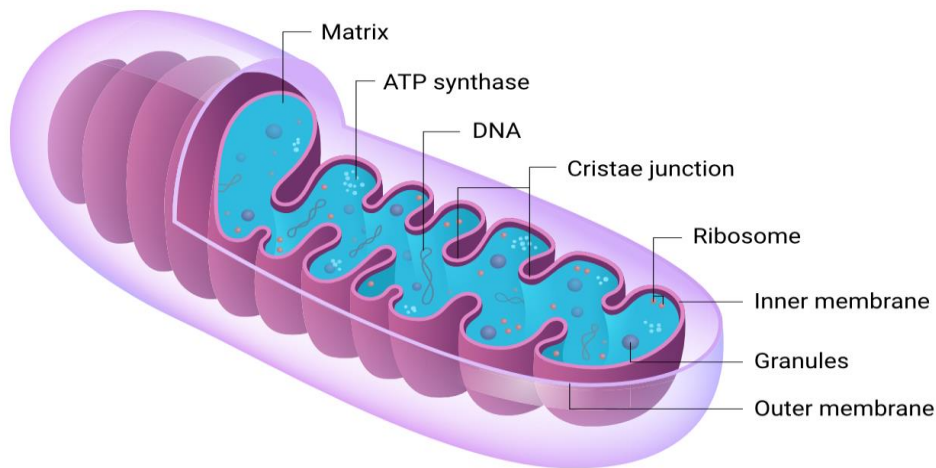
Το μιτοχονδριακό σχήμα καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό από μια ισορροπία μεταξύ γεγονότων σχάσης και σύντηξης. Η ισορροπία αυτή διατηρεί σταθερό το μιτοχονδριακό γονιδίωμα, τη βιοενεργειακή λειτουργικότητα και τον αριθμό οργανιδίων. Μια ανισορροπία στα γεγονότα σχάσης και σύντηξης οδηγεί σε μια σαφή

αλλαγή στη μορφολογία και τη βιωσιμότητα του οργανιδίου. Η μιτοχονδριακή σχάση καθίσταται κρίσιμη για τη βιογένεση και την κληρονομικότητα των οργανιδίων. Σε περίπτωση που αφεθεί ανεξέλεγκτη προκαλεί ετερογενή πληθυσμό οργανιδίων, αυξημένη ικανότητα παραγωγής αντιδραστικών ειδών οξυγόνου και μεγάλα ποσοστά κυτταρικής απόπτωσης. Μέσω αυτοφαγίας μάλιστα, στη διαδικασία της σχάσης αφαιρούνται γερασμένα ή κατεστραμμένα μιτοχόνδρια. Η μιτοχονδριακή σύντηξη είναι απαραίτητη για τη διατήρηση ενός ομοιογενούς πληθυσμού οργανιδίων και εξασφαλίζει τη συμπλήρωση του mtDNA (Osellame, 2012).

Τα μιτοχόνδρια διαδραματίζουν διαφορετικούς ρόλους στην κυτταρική φυσιολογία όχι μόνο για την παροχή ενέργειας στο κύτταρο αλλά και για την αποθήκευση μιας σημαντικής ποσότητας ασβεστίου, την ρύθμιση των σημάτων ασβεστίου, την διατήρηση του οξειδοαναγωγικού δυναμικού, την παραγωγή θερμότητας, ελευθέρων ριζών, καθώς και για την εισαγωγή κυττάρων στην απόπτωση. Μία μιτοχονδριακή μετάλλαξη μπορεί εύκολα να επηρεάσει κάποιες από αυτές τις λειτουργίες και συνεπώς τους ιστούς που εξαρτώνται από αυτήν. Η μελέτη των μιτοχονδριακών ασθενειών έχει δείξει ότι μπορούν να επηρεάσουν αρκετούς ιστούς καθώς σχεδόν όλοι περιέχουν μιτοχόνδρια. Μπορούν έτσι να προκληθούν νευρομυϊκά ή μη συμπτώματα όπως μιτοχονδριακή μυοπάθεια, εγκεφαλοπάθεια, γαστρεντερικές παθήσεις και περιφερική νευροπάθεια (Mazat, 2001).

Αναφορικά με την δομή τους, τα μιτοχόνδρια είναι αρκετά μεγάλες (1-2  $\mu\text{m}$ ), επιμήκεις σωληνοειδείς δομές που περιβάλλονται από δύο μεμβράνες: την εξωτερική μεμβράνη (OM) και την εσωτερική μεμβράνη (IM). Το κενό μεταξύ τους ονομάζεται διαμεμβρανικός χώρος και έχει την ίδια σύσταση με το κυτταρόπλασμα. Η εσωτερική μεμβράνη σχηματίζει αναδιπλώσεις *cristae* και στο εσωτερικό της βρίσκεται το στρώμα. Έχουν παρατηρηθεί σωληνοειδείς, ελασματώδεις και ακόμη και τριγωνικές μεμβράνες *cristae*. Το στρώμα είναι το σημαντικότερο μέρος του μιτοχονδρίου καθώς περιέχει το μιτοχονδριακό DNA και τα ένζυμα του οξειδωτικού μεταβολισμού. Στο στρώμα εισάγονται τα λιπαρά οξέα και το πυροσταφυλικό οξύ από το κυτταρόπλασμα, μετατρέπονται σε ακέτυλο συνένζυμο Α που οξειδώνεται σε διοξείδιο του άνθρακα ( $\text{CO}_2$ ) μέσω του κύκλου του Krebs και τελικά παράγονται ενεργειακά μόρια NADH και FADH<sub>2</sub>. Τα τελευταία παράγουν ATP. Οι μεταβολές των μιτοχονδριακών δομών, στις οποίες συχνά παρατηρούνται εγκλείσματα ή συσσωματώματα στη μιτοχονδριακή μήτρα,

είναι γνωστές για σοβαρές ασθένειες στους ανθρώπους όπως η νόσος Alzheimer και το σύνδρομο Barth (Zick, 2009).



Εικόνα 6: Η βασική δομή των μιτοχονδρίων. Παρουσιάζονται η εξωτερική μεμβράνη, η εσωτερική μεμβράνη με τις αναδιπλώσεις *cristae* καθώς και ο διαμεμβρανικός χώρος μεταξύ τους. Στη μήτρα-στρώμα βρίσκονται τα ριβοσώματα, τα ένζυμα και το μιτοχονδριακό DNA. Πηγή: <https://www.mereseach.org.uk/wiped-out/>, 14/05/2024

## 2.2. Γενετικές βλάβες μιτοχονδρίων: είδη, αίτια και θεραπεία

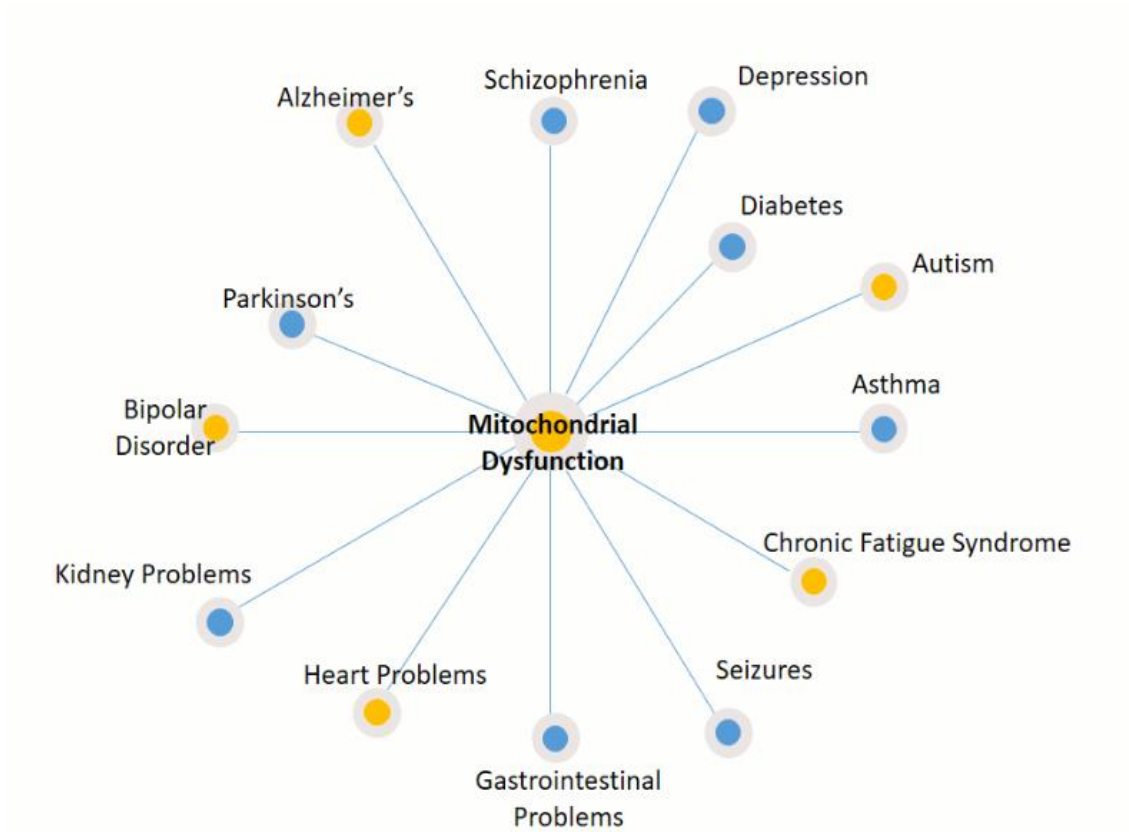
Τα περισσότερα ανθρώπινα κύτταρα περιέχουν εκατοντάδες μιτοχόνδρια, κάθε ένα από τα οποία περιλαμβάνει 2 έως 10 mtDNA. Κάθε κύτταρο επομένως αποτελείται από χιλιάδες αντίγραφα γονιδίων που κωδικοποιούν τις υπομονάδες του mtDNA συμπλόκων οξειδωτικής φωσφορλίωσης. Έτσι όταν υπάρχει μετάλλαξη mtDNA δεν την φέρουν απαραίτητα όλα τα μόρια mtDNA. Παρατηρείται λοιπόν μεγάλη ετεροπλασία η οποία ορίζεται ως το ποσοστό του μεταλλαγμένου mtDNA επί των συνολικών μορίων mtDNA. Η ετεροπλασία δεν είναι ίδια σε όλα τα κύτταρα τους ιστούς, και σε όλα τα μέλη της ίδιας οικογένειας. Οι παραλλαγές της, συνέβαλαν στην ανάγκη έκφρασης των μεταλλάξεων του mtDNA σε ποσοτικούς όρους, οδηγώντας στην εξέταση ανάλυσης μεταβολικού ελέγχου (MCA) και στην δημιουργία της έννοιας του κατωφλιού, ως ένδειξη της έντασης του μιτοχονδριακού ελαττώματος. Η ετερογένεια στην κατανομή των μεταλλαγμένων



mtDNA είναι μια εύλογη εξήγηση για τους ευρέως ποικίλους φαινοτύπους σε ασθενείς με μιτοχονδριακές διαταραχές (Mazat, 2001). Αντιθέτως με την ετεροπλάσια, στην οποία ένα κύτταρο, ιστός ή άτομο περιέχει περισσότερους από έναν γονότυπους mtDNA, η ομοπλάσια αφορά την κατάσταση στην οποία όλα τα αντίγραφα του μιτοχονδριακού γονιδιώματος είναι πανομοιότυπα. Έτσι όταν σε ένα κύτταρο το ποσοστό μεταλλαγμένου mtDNA είναι 70%, και του μη μεταλλαγμένου είναι 30% υπάρχει ετεροπλάσματικό mtDNA. Όταν αντιθέτως το κύτταρο αποτελείται από 100% μεταλλαγμένο mtDNA είναι ομοπλάσματικό (Claiborne A. E., 2016).

Ασυμπτωματικές μητέρες με χαμηλά επίπεδα μετάλλαξης mtDNA μπορεί να αποκτήσουν συμπτωματικά παιδιά με πολύ υψηλά επίπεδα λόγω ενός γενετικού φαινομένου γνωστού ως «γενετική συμφόρηση mtDNA». Η συμφόρηση είναι πιθανό να εμφανίζεται κατά τη διάρκεια του σχηματισμού και των αρχικών διαιρέσεων των αρχέγονων γεννητικών κυττάρων όταν οι αριθμοί αντιγράφων mtDNA μειώνονται σε λιγότεροι από 200 ανά κύτταρο. Αυτή η μείωση του αριθμού των αντιγράφων, μαζί με τον τυχαίο διαχωρισμό των μορίων mtDNA στα θυγατρικά κύτταρα, μπορεί να οδηγήσει σε μια σημαντικά ασύμμετρη κατανομή της μετάλλαξης όταν σχηματίζονται ώριμα ωάρια (Nesbitt, 2014). Κατά συνέπεια, μέσα σε μια οικογένεια με παθογόνο μετάλλαξη mtDNA, μπορεί να υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός γυναικών «υψηλού κινδύνου», οι οποίες θα πρέπει να θεωρούνται υποχρεωτικοί φορείς ακόμη και με αρνητικό γενετικό έλεγχο στο αίμα (Engelstad K. , 2016).

Οι επιστήμονες έχουν ταξινομήσει πάνω από 300 διαφορετικά είδη γενετικά και κλινικά διακριτών μιτοχονδριακών διαταραχών (Naviaux, 2004). Η βλάβη στα μιτοχόνδρια θεωρείται πλέον ότι παίζει ρόλο στην παθογένεση ενός ευρέος φάσματος μη σχετιζόμενων νόσων όπως η σχιζοφρένεια, η διπολική νόσος, η άνοια, η νόσος του Alzheimer, η επιληψία, οι ημικρανίες, τα εγκεφαλικά επεισόδια, ο νευροπαθητικός πόνος, η νόσος του Parkinson, η αταξία, το παροδικό ισχαιμικό επεισόδιο, η καρδιομυοπάθεια, η στεφανιαία νόσος, το σύνδρομο χρόνιας κόπωσης, η ινομυαλγία, η μελαγχρωστική αμφιβληστροειδοπάθεια, ο διαβήτης, η ηπατίτιδα C και η πρωτοπαθής χολική κίρρωση. (Neustadt, 2008). Οι μιτοχονδριακές διαταραχές κληρονομούνται από τη μητέρα και επηρεάζονται εξίσου άνδρες και γυναίκες. Εξαιρεση αποτελεί η κληρονομική οπτική ατροφία του Leber (LHON), η οποία παρατηρείται πολύ συχνότερα στους άνδρες παρά στις γυναίκες (Graeber, 1998).



Εικόνα 7: Κοινές ασθένειες που οφείλονται σε μιτοχονδριακές δυσλειτουργίες.  
 Πηγή: <https://reliqendx.com/wp-content/uploads/2019/06/reli.png>, 14/05/2024

Μιτοχονδριακή βλάβη μπορεί να προκληθεί λόγω διαφόρων λόγων. Τα φάρμακα έχουν πλέον αναγνωριστεί σαν σοβαρή αιτία μιτοχονδριακής διαταραχής και κυρίως οι κατηγορίες ψυχοτρόπων φαρμάκων, τα φάρμακα που προκαλούν λεκέδες και τα αναλγητικά. Αναλυτικότερα προκαλούν μιτοχονδριακή δυσλειτουργία μέσω της αναστολής οξειδωσης λιπαρών οξέων, αλλοίωσης των μιτοχονδριακών μεμβρανών, εξασθένησης της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, παραγωγής αντιδραστικών ριζών οξυγόνου και διαφόρων μεταβολιτών. Τα φάρμακα με ακεταμινοφαίνη, δοξορουβικίνη και αμιωδαρόνη, οι νουκλεοσιδικοί αναστολείς της ανάστροφης μεταγραφάσης, οι στατίνες και το βαλπροϊκό οξύ είναι μερικά από αυτά. Είναι μάλιστα πιθανή η απόσυρση των φαρμάκων αυτών από την αγορά λόγω της τοξικότητάς τους. (Massart, 2018)

Οι μεταλλάξεις του mtDNA αποτελούν σημαντική αιτία μιτοχονδριακών διαταραχών στους ανθρώπους και συνδέονται με κοινές νευροεκφυλιστικές διαταραχές και γήρανση. Το πιο γνωστό γενετικό ελάττωμα που προκαλεί μιτοχονδριακή νόσο είναι

μια μετάλλαξη σε ένα γονίδιο που κωδικοποιεί μια δομική υπομονάδα OXPHOS. Ωστόσο, οι μιτοχονδριακές ασθένειες μπορούν επίσης να προκύψουν μέσω μειωμένης συντήρησης του mtDNA, ελαττωμάτων στους μιτοχονδριακούς παράγοντες μετάφρασης και διαφόρων πιο έμμεσων μηχανισμών (Ylikallio, 2012). Η ανεπάρκεια φραταξίνης, μιας πρωτεΐνης που εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια, λόγω μετάλλαξης και συγκεκριμένα τριπλής επέκτασης (GAA) εντός του πρώτου εσωνίου προκαλεί την αταξία του Friedreich (FRDA), μια προοδευτική νευροεκφυλιστική ασθένεια (Karthikeyan, 2003). Στη μιτοχονδριακή εγκεφαλομυοπάθεια με γαλακτική οξέωση και επεισόδια τύπου εγκεφαλικού επεισοδίου (MELAS) οι περισσότερες μεταλλάξεις είναι αλλαγές μονής βάσης εντός του γονιδίου tRNA-Leu. Σημειακές μεταλλάξεις στη μυοκλονική επιληψία (MERRF) εμφανίζονται συνήθως εντός του γονιδίου tRNA-Lys, αλλά παρατηρούνται και μεταλλάξεις του γονιδίου tRNA-Leu. Επιπλέον, οι ελλείψεις μιτοχονδριακού DNA είναι η αιτία που προκαλεί το σύνδρομο Kearns-Sayre (KSS) (Graeber, 1998).

Όσον αφορά στην γήρανση, η αύξηση της ηλικίας στα θηλαστικά συσχετίζεται με τη συσσώρευση σωματικών μεταλλάξεων mtDNA, μείωση της λειτουργίας της αναπνευστικής αλυσίδας και επομένως κυτταρική απόπτωση. Μελέτες σε ποντίκια με μεταλλαγμένο mtDNA έδειξαν ότι τα αυξημένα επίπεδα μεταλλάξεων προκαλούν άμεσα εικόνα γήρανσης με συμπτώματα οστεοπόρωσης, γκριζαρίσματος μαλλιών, τριχόπτωσης, απώλειας βάρους και μείωσης γονιμότητας (Trifunovic, 2008).

Η θεραπεία μιτοχονδριακών ασθενειών είναι μία πρόκληση για την επιστήμη, δεδομένου ότι υπάρχει μόνο συμπτωματική θεραπεία διαθέσιμη. Η συμπτωματική θεραπεία επικεντρώνεται στην ανακούφιση των συμπτωμάτων μιας πάθησης χωρίς απαραίτητα να αντιμετωπίζει την υποκείμενη αιτία της. Αυτή η προσέγγιση στοχεύει στη βελτίωση της άνεσης και της ποιότητας ζωής του ασθενούς με τη διαχείριση των εκδηλώσεων της νόσου. Η συμπτωματική θεραπεία των μιτοχονδριακών ασθενειών βασίζεται σε βασικά φάρμακα, μεταγγίσεις αίματος, αιμοκάθαρση, επεμβατικά μέτρα, χειρουργική επέμβαση, διαιτητικά μέτρα και φυσιοθεραπεία. Η φαρμακευτική αγωγή ταξινομείται ως ειδική (θεραπεία της επιληψίας, κεφαλαλγίας, άνοιας, δυστονίας, σύνδρομο Parkinson, επεισόδια τύπου εγκεφαλικού επεισοδίου ή μη νευρολογικές εκδηλώσεις), μη ειδική (αντιοξειδωτικά, δότες και δέκτες ηλεκτρονίων, εναλλακτικές πηγές ενέργειας) ή περιοριστική (αποφυγή φαρμάκων που είναι γνωστό ότι είναι τοξικά για μιτοχονδριακές λειτουργίες). Τα επεμβατικά μέτρα περιλαμβάνουν την εμφύτευση

βηματοδότη ή εμφυτεύσιμου απινιδωτή καρδιομετατροπέα. Διαιτητικά μέτρα προσφέρονται για διαβήτη, υπερλιπιδαιμία ή επιληψία. Η θεραπεία πρέπει να εξατομικεύεται λόγω των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών της μιτοχονδριακής γενετικής. Απαιτούνται μελλοντικές μελέτες, συμπεριλαμβανομένης της ανάπτυξης ζωικών μοντέλων, για να προωθηθεί η κατανόηση της παθογένειας των μιτοχονδριακών νόσων (Finsterer, 2010).

Οι καινοτόμες εργαστηριακές διαδικασίες προπυρηνικής μεταφοράς και μεταφοράς ατράκτου, αφορούν την αποφυγή μετάδοσης μιτοχονδριακών νοσημάτων από την μητέρα στο έμβρυο. Είναι δυνατή λοιπόν με την εξέλιξη της τεχνολογίας η γέννηση υγιών απογόνων, από μητέρα-φορέα μιτοχονδριακών βλαβών με συμπτώματα που τονίστηκαν προηγουμένως, ή ακόμα και χωρίς κάποιο σύμπτωμα (Reznichenko, 2016).

### **2.3. Προγεννητικός έλεγχος για μιτοχονδριακές νόσους**

Οι μιτοχονδριακές παθήσεις είναι γενετικά και κλινικά ετερογενείς καταστάσεις που επηρεάζουν ποσοστό νεογνών μεγαλύτερο από 1 στα 7.500 προκαλώντας έτσι μεγάλη νοσηρότητα. Η γενετική συμβουλευτική σε οικογένειες με ιστορικό μιτοχονδριακής νόσου είναι απαραίτητη καθώς προσφέρει γνώσεις στους γονείς για την μετάδοση και την πρόληψη των ασθενειών αυτών. Οι μελλοντικοί γονείς δικαιούνται να πληροφορούνται σχετικά με τα πρότυπα κληρονομικότητας μιτοχονδριακών ασθενειών, τις διαθέσιμες επιλογές αναπαραγωγικού και προγεννητικού ελέγχου στις μιτοχονδριακές νόσους, καθώς και για τους επικείμενους κινδύνους.

Στόχος του προγεννητικού διαγνωστικού ελέγχου στις μιτοχονδριακές διαταραχές, είναι ο εντοπισμός εμβρύων που φέρουν μεταλλάξεις που θα προκαλέσουν σοβαρή νόσο του νεογνού και πιθανόν τερματισμό της κύησης σε πρώιμο στάδιο. Το μεγαλύτερο ποσοστό των γονέων που παραπέμπουν σε προγεννητικό έλεγχο, είχαν στο παρελθόν κύηση με έμβρυο που ήταν προσβεβλημένο με μιτοχονδριακή νόσο της μητέρας.

Δυο από τις μεθόδους που χρησιμοποιούνται στον προγεννητικό έλεγχο είναι η λήψη χοριακών λαχνών και η αμνιοπαρακέντηση στις οποίες διαπιστώνονται με ποικιλία

μοριακών τεχνικών η παρουσία ή απουσία μιτοχονδριακών γονιδιακών μεταλλάξεων. Η αξιολόγηση της κατάστασης μετάλλαξης κατά τη διάρκεια διαγνωστικού ελέγχου βιοψίας χοριακών λαχνών (CVS) εκτελείται στις 11 με 14 εβδομάδες κύησης και είναι η διαδικασία που προσφέρεται συχνότερα σε γυναίκες που κινδυνεύουν να αποκτήσουν παιδί που πάσχει από μιτοχονδριακή διαταραχή οφειλομένη σε mtDNA. Η αμνιοπαρακέντηση, βασίζεται στην αναρρόφηση κυτταρικού υλικού από τον αμνιακό σάκο αλλά μπορεί να είναι λιγότερο αξιόπιστη στην ανίχνευση και ποσοτικοποίηση μεταλλάξεων mtDNA. Τείνει να προσφέρεται περισσότερο σε γυναίκες που επιθυμούν προγεννητικό έλεγχο σε αργότερο στάδιο της εγκυμοσύνης (15 με 20 εβδομάδες κύησης) ή όπου μια μετάλλαξη πυρηνικού γονιδιώματος nDNA είναι υπεύθυνη για τη μιτοχονδριακή νόσο. Οι τεχνικές προγεννητικού ελέγχου οφείλονται σε μικρό ποσοστό για αποβολές εμβρύων. Συγκεκριμένα η βιοψία λαχνών προκαλεί 2% πιθανότητα αποβολής ενώ η αμνιοπαρακέντηση 1%.

Για τις γυναίκες που γνωρίζουν πως πάσχουν από μεταλλάξεις mtDNA στον προγεννητικό έλεγχο είναι σημαντικό να λαμβάνονται υπόψη παράγοντες όπως η ετεροπλασία της μετάλλαξης mtDNA, τα επίπεδα κατωφλιού, η φαινοτυπική έκφραση της μετάλλαξης σε συγγενείς της μητέρας και η συσχέτιση μεταξύ γονοτύπου και φαινοτύπου. Με την γνώση των παραπάνω παραμέτρων, ο γιατρός θα είναι σε θέση να παρέχει χρήσιμες γενετικές συμβουλές.

Είναι απαραίτητο να παρέχονται πληροφορίες από γενετικούς συμβούλους σχετικά με τις διαθέσιμες αναπαραγωγικές τεχνικές σε οικογένειες που έχουν ιστορικό μιτοχονδριακής νόσου. Αυτές περιλαμβάνουν την προγεννητική διάγνωση με CVS ή αμνιοπαρακέντηση, την δωρεά ωαρίων και σπέρματος, την υιοθεσία ή τις τεχνικές για την πρόληψη μιτοχονδριακών μεταλλάξεων όπως η μεταφορά μητρικής ατράκτου και η προπυρηνική μεταφορά (Nesbitt, 2014).

## **Κεφάλαιο 3: Αναλυτική περιγραφή και σύγκριση των μεθόδων**

### **3.1. Μεταφορά μητρικής ατράκτου**

#### **3.1.1. Περιληπτική διαδικασία**

Μια από τις εξελισσόμενες τεχνικές μιτοχονδριακής υποκατάστασης είναι η μεταφορά μητρικής ατράκτου. Η τεχνική χρησιμοποιείται ευρύτερα στην κλινική πράξη σε σχέση με τη μεταφορά προπυρηνίων, λόγω των υψηλότερων ποσοστών επιτυχίας (75% έναντι 62% αντίστοιχα). Η περιοχή στο ωάριο που περιέχει την πυκνή συλλογή γενετικών πληροφοριών είναι γνωστή ως ίνα ατράκτου, από την οποία η διαδικασία πήρε το όνομά της (Amato P, 2014).

Στην τεχνική αυτή, τα πυρηνικά χρωμοσώματα, τα οποία ομαδοποιούνται σε σχηματισμό ατράκτου, αφαιρούνται τόσο από ένα ωάριο που παρέχεται από μια γυναίκα-δότηρα με φυσιολογικό mtDNA όσο και από το ωάριο της μητέρας με το παθολόγο mtDNA. Η γυναίκα που παρέχει ωάρια δεν πρέπει να έχει προσωπικό ή οικογενειακό ιστορικό ή γενετικές ενδείξεις ότι έχει μεταλλαγμένο, παθολόγο mtDNA. Το ωάριο της μητέρας που περιέχει το μεταλλαγμένο mtDNA απορρίπτεται. Τα πυρηνικά χρωμοσώματα της προβλεπόμενης μητέρας εισάγονται στο παρεχόμενο ωάριο δότηρας, το οποίο θα περιέχει μη παθολόγο mtDNA. Το ωάριο στη συνέχεια γονιμοποιείται με το σπέρμα του προβλεπόμενου πατέρα ή άλλου άνδρα. Μετά τη γονιμοποίηση, το έμβρυο αναπτύσσεται σε καλλιέργεια και υποβάλλεται σε διαγνωστικές εξετάσεις για να εξασφαλιστεί η ποιότητα και η βιωσιμότητά του. Με τη διαδικασία προεμφυτευτικής γενετικής διάγνωσης (PGD) επιβεβαιώνεται ότι το έμβρυο έχει αποδεκτά χαμηλά ή μη ανιχνεύσιμα επίπεδα των παθολόγων μορίων mtDNA. Τα προκύπτοντα έμβρυα καταψύχονται έως ότου τα αποτελέσματα των δοκιμών επιβεβαιώσουν την καταλληλότητα για μεταφορά και στη συνέχεια μεταφέρονται στη μήτρα της μητέρας ή του φορέα κύησης (Claiborne, 2016).

### 3.1.2. Εργαστηριακές τεχνικές

Τα βήματα για να επιτευχθεί μία επιτυχημένη μεταφορά μητρικής ατράκτου, περιλαμβάνουν την ελεγχόμενη διέγερση των ωοθηκών, την ωοληψία, την προετοιμασία σπέρματος, την προετοιμασία ωαρίων, την απεικόνιση ατράκτου σε Polscope, την ενδοκυτταροπλασματική έγχυση σπέρματος, την καλλιέργεια εμβρύων, τον προεμφυτευτικό γενετικό έλεγχο και την εμβρυομεταφορά. Η διέγερση ωοθηκών και η ωοληψία πραγματοποιούνται τόσο από την μέλλουσα μητέρα όσο και από την δότρια (Jain, 2023).

#### **Διέγερση ωοθηκών:**

Το πρώτο βήμα που εκτελείται σε ένα ζευγάρι ώστε να ξεκινήσει η διαδικασία της εξωσωματικής γονιμοποίησης είναι η διέγερση των ωοθηκών της γυναίκας. Η διέγερση των ωοθηκών εφαρμόζεται με στόχο την αύξηση του αριθμού των ωαρίων της μητέρας προκειμένου να υπάρχουν σε επαρκή αριθμό στην εξωσωματική γονιμοποίηση (IVF) για να επιλεγούν ένα ή περισσότερα έμβρυα καλής ποιότητας για μεταφορά. Η επιλογή περισσότερων του ενός ωαρίων δίνει τη δυνατότητα κατάψυξής τους, για να αυξηθούν οι μελλοντικές πιθανότητες εγκυμοσύνης χωρίς την ανάγκη επανάληψης της διαδικασίας.

Κατά την διάρκεια ενός κύκλου εξωσωματικής γονιμοποίησης οι γιατροί χορηγούν στις μέλλουσες μητέρες φάρμακα για την διέγερση των ωοθηκών τους ώστε να παράγουν αρκετά ωάρια. Τα φάρμακα συνήθως συνταγογραφούνται από τον πάροχο υγειονομικής περίθαλψης. Οι διάφοροι συνδυασμοί των φαρμάκων αυτών ονομάζονται πρωτόκολλα. Τα συνηθέστερα πρωτόκολλα είναι το μακρύ και το βραχύ, στα οποία χρησιμοποιούνται τα ίδια φάρμακα σε διαφορετικές δόσεις και περιόδους χορήγησης. Πέρα από τα δυο πιο συνηθισμένα πρωτόκολλα, χρησιμοποιούνται επίσης το πρωτόκολλο της μίας ένεσης και τα πρωτόκολλα ήπιας διέγερσης όπως ο τροποποιημένος φυσικός κύκλος. Η επιλογή του ιδανικού πρωτόκολλου για κάθε γυναίκα βασίζεται στην ηλικία, στην ανταπόκριση των ωοθηκών και στην πορεία προηγούμενων προσπαθειών.

Σχετικά με το μακρύ πρωτόκολλο, η καταστολή των ωοθηκών ξεκινάει ή την 21<sup>η</sup> ή την 2<sup>η</sup> μέρα ενός κανονικού κύκλου 28 ημερών. Χορηγούνται ανάλογα της GnRH και

συγκεκριμένα τριπτορελίνη, βουσερελίνη, λευπρολίνη, σετρορελίξη και γκανιρελίξη. Με τα φάρμακα αυτά η υπόφυση μπλοκάρεται και αυτόματα σταματά η έκκριση ορμονών LH και FSH. Έτσι, εμποδίζεται η ωρίμανση των ωοθυλακίων και αποφεύγεται η ωοθυλακιόρρηξια πριν από την ημέρα της ωοληψίας (1<sup>η</sup> φάση της θεραπείας). Η χορήγηση των αναλόγων διαρκεί από 10 μέχρι 15 ημέρες, δηλαδή έως ότου γίνει η ένεση με ωοθυλακιοτρόπο ορμόνη. Μετά το πέρας των 2 αυτών εβδομάδων ελέγχονται τα επίπεδα τις οιστραδιόλης στο αίμα μέσω υπερηχογραφικού ελέγχου. Αν η καταστολή των ωοθηκών δεν είναι επαρκής συνεχίζεται η λήψη αναλόγου για 7 ημέρες ακόμα. Αν η καταστολή είναι ικανοποιητική, ξεκινά η διέγερση των ωοθηκών με χορήγηση συνθετικών ωοθυλακιοτρόπων ορμονών (2<sup>η</sup> φάση θεραπείας). Οι υποφυσιακές αυτές ορμόνες βρίσκονται σε φάρμακα όπως η θυάκιοτροπίνη αλφα και βητα η μενοτροπίνη και η θυλακιοτρόπος ορμόνη. Ύστερα από 5 ημέρες γίνεται ξανά έλεγχος για οιστραδιόλη και επαναλαμβάνεται κάθε 2 με 3 μέρες. Καθ' αυτή τη διάρκεια, το 1<sup>ο</sup> φάρμακο δηλαδή το ανάλογο χορηγείται κανονικά. Η συνεχής υπερηχογραφική παρακολούθηση βοηθά τον γιατρό να προσαρμόζει τις κατάλληλες δόσεις φαρμάκων για κάθε γυναίκα ελέγχοντας την πορεία διέγερσης. Κατά την ωοθηκική διέγερση αυξάνεται η διάμετρος των ωοθυλακίων καθώς και η οιστραδιόλη αίματος. Όταν τα ωοθυλάκια αποκτήσουν μέγεθος μεγαλύτερο των 17 mm και η οιστραδιόλη έχει τιμές 150 με 200 pg/ml για κάθε ένα ωοθυλάκιο χορηγείται η χοριακή γοναδοτροπίνη (hCG). Η ένεση της hCG πρέπει να γίνεται μετά τα μεσάνυχτα και 32 με 36 ώρες πριν από την ωοληψία. Μετά την ένεση σταματά η λήψη όλων των προηγούμενων φαρμάκων.

Αναφορικά με το βραχύ πρωτόκολλο η καταστολή και η διέγερση των ωοθηκών πραγματοποιούνται σχεδόν ταυτόχρονα. Η λήψη του φαρμάκου καταστολής αρχίζει την 2<sup>η</sup> ημέρα του κύκλου, ενώ του φαρμάκου διέγερσης την 3<sup>η</sup>. Η μέτρηση επιπέδων οιστραδιόλης και ο υπερηχογραφικός έλεγχος γίνεται την ημέρα που ξεκινά η καταστολή καθώς και την 6<sup>η</sup> ημέρα των ενέσεων. Τα φάρμακα αυτά χορηγούνται περίπου 15 μέρες. Αργά το βράδυ χορηγείται hCG και σε 32 με 36 ώρες πραγματοποιείται υπερηχογραφική ωοληψία με καθοδηγούμενη διακολπική αναρρόφηση (Revelli, 2014).

### **Ωοληψία:**

Το αμέσως επόμενο βήμα μετά την διέγερση ωοθηκών είναι η ωοληψία. Πρόκειται για μια χειρουργική τεχνική που χρησιμοποιείται από έμπειρους γιατρούς για την εξαγωγή



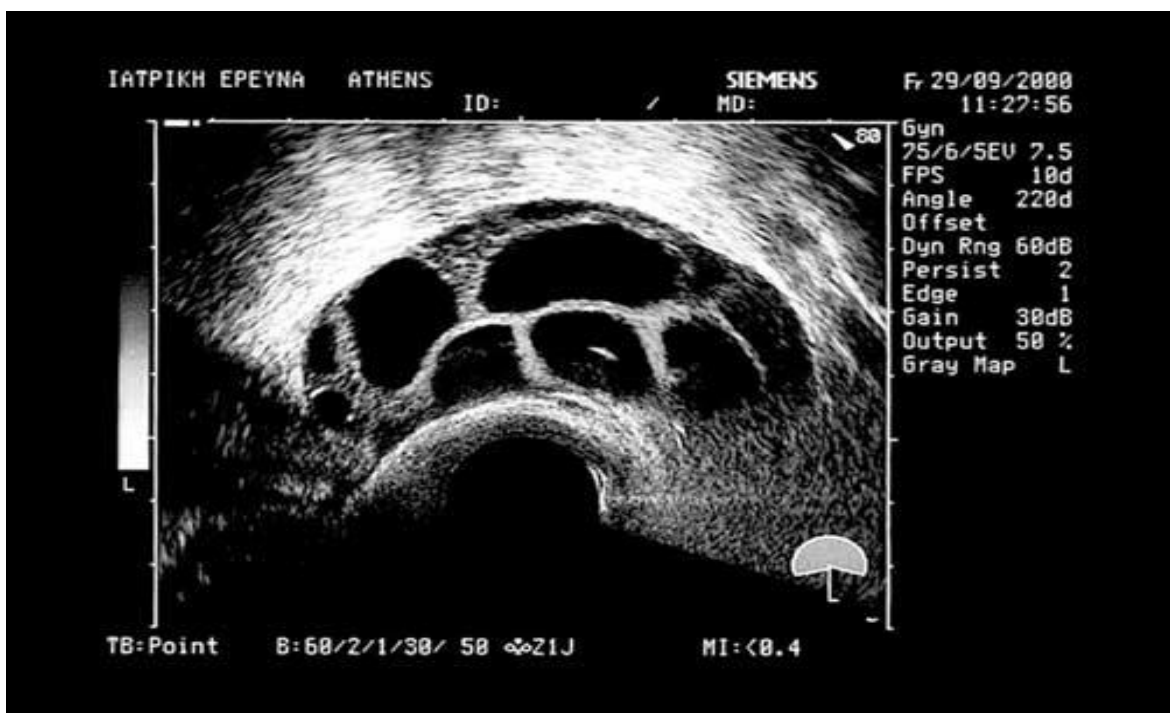
ώριμων ωαρίων απευθείας από τις ωοθήκες των γυναικών υπό την καθοδήγηση απεικόνισης υπερήχων. Η υπερηχογραφική τεχνική, σε σχέση με την παλιά λαπαροσκοπική, έχει αυξήσει τον αριθμό των αντλούμενων ωαρίων καθώς και τα ποσοστά επιτυχούς γονιμοποίησης. Είναι μάλιστα ασφαλέστερη και λιγότερο δαπανηρή. Ο αριθμός των ωαρίων που λαμβάνονται σχετίζονται με το μέγεθος της διέγερσης των ωοθηκών, με τον τύπο της βελόνας αναρρόφησης (στενή ή ευρεία οπή, μονό ή διπλό κανάλι), με τον τύπο της αναισθησίας (τοπική ή γενική), με το εάν η αναρρόφηση είναι απλή ή με ωοθυλακική έξαψη, καθώς επιπλέον με την εμπειρία του γιατρού.

Αναφορικά με τις διαφορετικές πιέσεις συλλογής, χαμηλότερες πιέσεις αναρρόφησης έχουν το βέλτιστο αποτέλεσμα καθώς τα ωάρια απογυμνώνονται από κύτταρα cumulus σε πιο υψηλές πιέσεις. Σχετικά με το μέγεθος της βελόνας, οι μικρότερες (20 gauge) προκαλούν μία λιγότερο επώδυνη και πιο άνετη διαδικασία συλλογής από τις μεγαλύτερες (15 gauge), παρά την ανάγκη για περισσότερες παρακεντήσεις ωοθηκών και τον μεγαλύτερο χρόνο ωοληψίας. Οι βελόνες διπλού αυλού επιτρέπουν ταυτόχρονα την αναρρόφηση και την έκπλυση εάν είναι επιθυμητό. Ωστόσο η έκπλυση των ωοθυλακίων απαιτεί περισσότερο χρόνο και δεν φαίνεται να βελτιώνει τα αποτελέσματα της διαδικασίας (Leung, 2016).

Η διακολπική υπερηχογραφικά καθοδηγούμενη ωοληψία είναι μία χειρουργική επέμβαση που ολοκληρώνεται σε ιατρικό γραφείο σε χρόνο από 20 μέχρι 30 λεπτά και ξεκινάει 32 με 36 ώρες μετά την λήψη χοριακής γοναδοτροπίνης. Για την προετοιμασία της, η γυναίκα που θα υποστεί την επέμβαση θα πρέπει να έχει σταματήσει να τρώει και να πίνει από την προηγούμενη νύχτα. Την ημέρα της επέμβασης ένας επαγγελματίας υγείας χορηγεί με ορό στο αίμα της γυναίκας φάρμακα που αποτρέπουν τον πόνο ώστε να μην αισθάνεται δυσφορία. Αντιθέτως με την λαπαροσκόπηση η οποία απαιτούσε γενικευμένη αναισθησία, στην διακολπική ωοληψία είτε χορηγείται στην ασθενή ελαφρά αναισθησία με μέθη από έμπειρο αναισθησιολόγο, είτε δεν χορηγείται καμία αναισθησία με την γυναίκα να έχει τις αισθήσεις της.

Τα βήματα της διαδικασίας περιλαμβάνουν τα εξής: Αρχικά η γυναίκα ξαπλώνει με τα δύο πόδια λυγισμένα και ο επαγγελματίας υγείας ξεπλένει τον κόλπο της με αποστειρωμένο νερό. Εισάγει έναν καθετήρα υπερήχων ενδοκολπικά ο οποίος παρουσιάζει τα ωοθυλάκια που είναι γεμάτα υγρό. Με την καθοδήγηση του καθετήρα ο γιατρός τοποθετεί μία λεπτή βελόνα στον κόλπο της γυναίκας και στις ωοθήκες για

άντληση των ωαρίων. Η βελόνα, η οποία είναι προσαρμοσμένη σε μία συσκευή αναρρόφησης, εισέρχεται στα ωοθυλάκια και αναρροφά απαλά το θυλακιώδες υγρό με τα ώριμα ωάρια. Το υγρό παραδίδεται γρήγορα στους εμβρυολόγους που αναζητούν τα ωάρια. Μετά το τέλος της διαδικασίας η ασθενής θα πρέπει να μείνει στον χώρο της κλινικής για περίπου μία ώρα ώστε να αναρρώσει. Ορισμένες ήπιες παρενέργειες είναι πιθανόν να εμφανιστούν μετά την επέμβαση στις γυναίκες, συμπεριλαμβανομένου του πόνου και της αιμορραγίας λόγω των διατρήσεων στις ωοθήκες. Γι αυτό το λόγο η ασθενής οφείλει να αποφύγει δραστηριότητες υψηλής έντασης (Lane, 2020).



Εικόνα 8: Υπερηχογραφικά κατευθυνόμενη διακολπική ωοληψία. Στο μεσαίο ωοθυλάκιο φαίνεται το λευκό άκρο της βελόνας ωοληψίας η οποία αναρροφά το ωοθυλακικό υγρό. Πηγή: <https://www.eugonia.com.gr/el/eksosomatiki/diakikasia/ooolipsia/ti-einai-kai-pos-ginetai>, 14/05/2024

Τα αρχικά πρωτόκολλα MST χρησιμοποιώντας πρόσφατα ωάρια απαιτούσαν τόσο από τις μέλλουσες μητέρες όσο και από τις δότριες ωαρίων να υποβληθούν σε διέγερση ωοθηκών και ωοληψία την ίδια ημέρα, με τον ίδιο αριθμό ωαρίων. Ωστόσο η ανταπόκριση στις γοναδοτροπίνες είναι διαφορετική για κάθε γυναίκα και οι διαφορές στα στάδια του εμμηνορροϊκού κύκλου είναι εμφανείς. Έτσι έχει εξελιχθεί η τεχνική ψύξης των ωαρίων για εφαρμογή τους στην MST, η οποία χρησιμοποιείται σε αρκετές περιπτώσεις. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι τα κρυοσυντηρημένα ανθρώπινα

ωάρια μετάφασης II χρησιμοποιούνται στην εξωσωματική γονιμοποίηση με την ίδια αποτελεσματικότητα όπως τα φρέσκα ωάρια (Forman, 2012).

### **Προετοιμασία σπέρματος:**

Την ημέρα της ωοληψίας των γυναικών γίνεται ταυτόχρονα η συλλογή και επεξεργασία του σπέρματος του άνδρα. Συνίσταται σεξουαλική αποχή 3 με 5 ημέρες σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (ΠΟΥ) 2010, ώστε η ποιότητα του σπέρματος να είναι η βέλτιστη. Τα δείγματα διατηρούνται στους 37 βαθμούς Κελσίου για 20 με 30 λεπτά ώστε να υγροποιηθούν και στη συνέχεια αξιολογούνται σε μικροσκόπιο αντίθετης φάσης (Baldini D, 2020).

Για τις μεθόδους εξωσωματικής γονιμοποίησης όπως η μεταφορά μητρικής ατράκτου, το σπερματικό υγρό πρέπει να διαχωριστεί από τα σπερματοζωάρια και τα βιώσιμα σπερματοζωάρια με φυσιολογική μορφολογία και κινητικότητα να ανακτηθούν από τον πληθυσμό των σπερματοζωαρίων. Οι διαδικασίες πρέπει να είναι ασφαλείς, εύκολες στην εκτέλεση και οικονομικά αποδοτικές. Ο διαχωρισμός των σπερματοζωαρίων από το σπερματικό υγρό γίνεται με μια τεχνική πλύσης. Χρησιμοποιούνται 10 μl εναιωρήματος σπερματοζωαρίων προκειμένου να εκτιμηθεί η συγκέντρωση και η κινητικότητά τους, με τις μεθόδους μετανάστευσης ή κολύμβησης. Ύστερα μελετάται η μορφολογία με βάση τα κριτήρια του Kruger (Nasr-Esfahani, 2012). Το δείγμα τοποθετείται σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να είναι έτοιμο για ενδοκυτταροπλασματική έγχυση σπέρματος (ICSI). Η περίοδος επώασης του παρασκευάσματος σπερματοζωαρίων διαρκεί από 2 έως 12 ώρες (Rienzi, 1998).

### **Προετοιμασία ωαρίων και παρακολούθηση ατράκτου σε Polscope:**

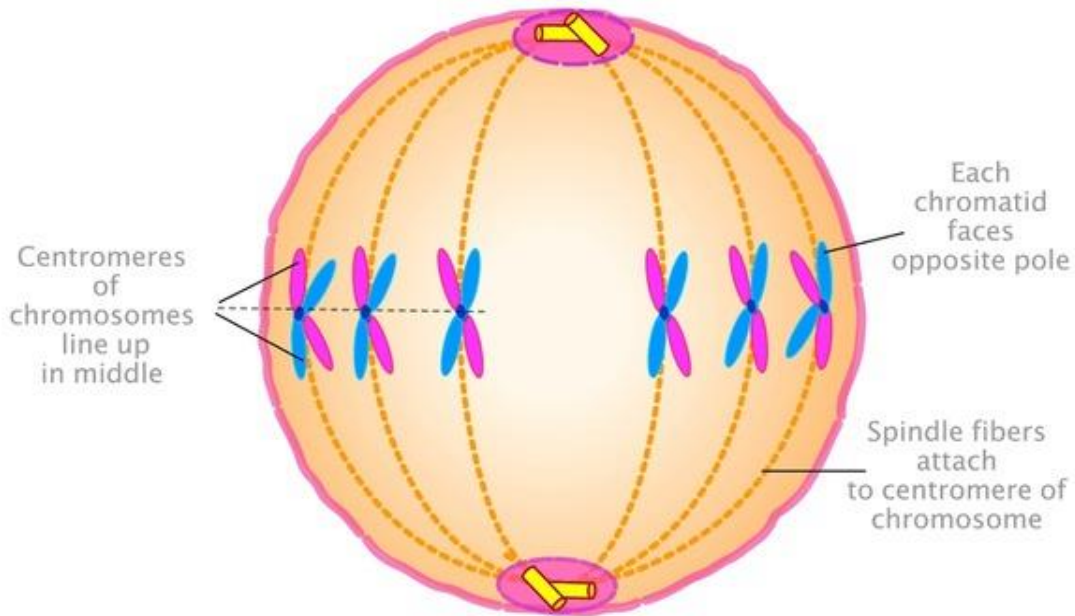
Το ακριβώς επόμενο βήμα για μία επιτυχημένη MST είναι η προσεκτική προετοιμασία των ωαρίων. Οι εμβρυολόγοι μελετούν το ωοθυλακικό υγρό και ξεκινούν τη διαδικασία εκπυρήνωσης των ωαρίων. Αρχικά, απογυμνώνουν τα ωάρια, από κύτταρα cumulus granulosa και corona radiata με αναρρόφηση με ήπια πιπέτα προκειμένου να διευκολυνθεί τόσο η αξιολόγηση της πυρηνικής ωριμότητας όσο και η ακριβής εκτίμηση της μορφολογίας του πρώτου πολικού σωματίου. Κατά τη διάρκεια της γονιμοποίησης τα σπερματοζωάρια πρέπει να διασπάσουν το στρώμα των κυττάρων αυτών και να

φτάσουν στο εσωτερικό του ωαρίου. Αυτό επιτυγχάνεται με την απογύμνωσή τους, με σύντομη έκθεση σε ρυθμιστικό μέσο HEPES που περιέχει υαλουρονιδάση η οποία διασπά το υαλουρονικό οξύ που συγκρατεί τα κύτταρα μεταξύ τους. Τα απογυμνωμένα ωάρια αξιολογούνται στη συνέχεια για να εκτιμηθεί το στάδιο μειωτικής ωρίμανσής τους (Monroy A. , 2024).

Κατά τη διάρκεια της ωορρηξίας της γυναίκας, η αύξηση της οιστραδιόλης, ακολουθούμενη από αύξηση των γοναδοτροπινών FSH και LH προκαλεί το πρωτογενές ωάριο να συνεχίσει και να ολοκληρώσει τη μειωτική διαίρεση, δημιουργώντας το δευτερογενές ωάριο, το οποίο ξεκινά τη δεύτερη μειωτική διαίρεση. Οι αλλαγές στη δραστηριότητα του παράγοντα που προάγει την ωρίμανση (MPF), των κινασών c-mos και των πρωτεϊνών που σχετίζονται με μικροσωληνίσκους (MAP) ελέγχουν την κυτταρική μείωση προωθώντας τη συμπίκνωση χρωμοσωμάτων, τη διάσπαση βλαστικών κυστιδίων (GVBD) και το σχηματισμό ατράκτου, οι οποίες συμβαίνουν σταδιακά. Η διαδικασία αυτή καταλήγει σε ένα ωάριο στη μετάφαση της δεύτερης μειωτικής διαίρεσης (Cohen, 2004). Στην μεταφάση II, ο πυρήνας του ωαρίου δεν ανιχνεύεται και τα χρωμοσώματα βρίσκονται εντός της μειωτικής ατράκτου, στο πιο συμπυκνωμένο και περιτυλιγμένο στάδιο τους. Η έλλειψη μάλιστα πυρηνικού φακέλου καθιστά δύσκολη την παρατήρηση του πυρηνικού nDNA σε αυτή τη φάση (Sharma, 2013). Τα ωάρια που βρίσκονται στη μετάφαση II απελευθερώνουν ένα πολικό σωματίο (PB) ενώ τα ωάρια μετάφασης I δεν απελευθερώνουν πολικό σωματίο. Η εκπομπή πολικών σωμάτων συμβαίνει σε ωάρια και είναι μια ακραία μορφή άνισης κυτταρικής διαίρεσης (McDougall, 2020). Η τεχνική μεταφοράς μητρικής ατράκτου πρέπει να πραγματοποιείται όταν τα πυρηνικά χρωμοσώματα των ωαρίων βρίσκονται στο στάδιο μετάφασης II του κυτταρικού κύκλου (Sendra, 2021).

Στην μεταφορά ατράκτου, η υπερυμπήκνωση των χρωμοσωμάτων σε αυτή τη φάση τα βοηθά να είναι ευδιάκριτα σε μικροσκόπιο πολωμένου φωτός χάρη στις ιδιότητες των μικροσωληνίσκων. Οι μικροσωληνίσκοι είναι δομές που εκτείνονται και από τα δύο διπλά κεντροσώματα στους αντίθετους πόλους του κυττάρου και προσκολλώνται στα συμπυκνωμένα χρωμοσώματα. Τα χρωμοσώματα έτσι βρίσκονται σε ομοιόμορφη ευθυγράμμιση στο ισημερινό επίπεδο του ωαρίου λόγω των δυνάμεων έλξης των μικροσωληνίσκων οι οποίοι συνδέονται με το κεντρομερίδιο των χρωμοσωμάτων (Sharma, 2013).

## Metaphase



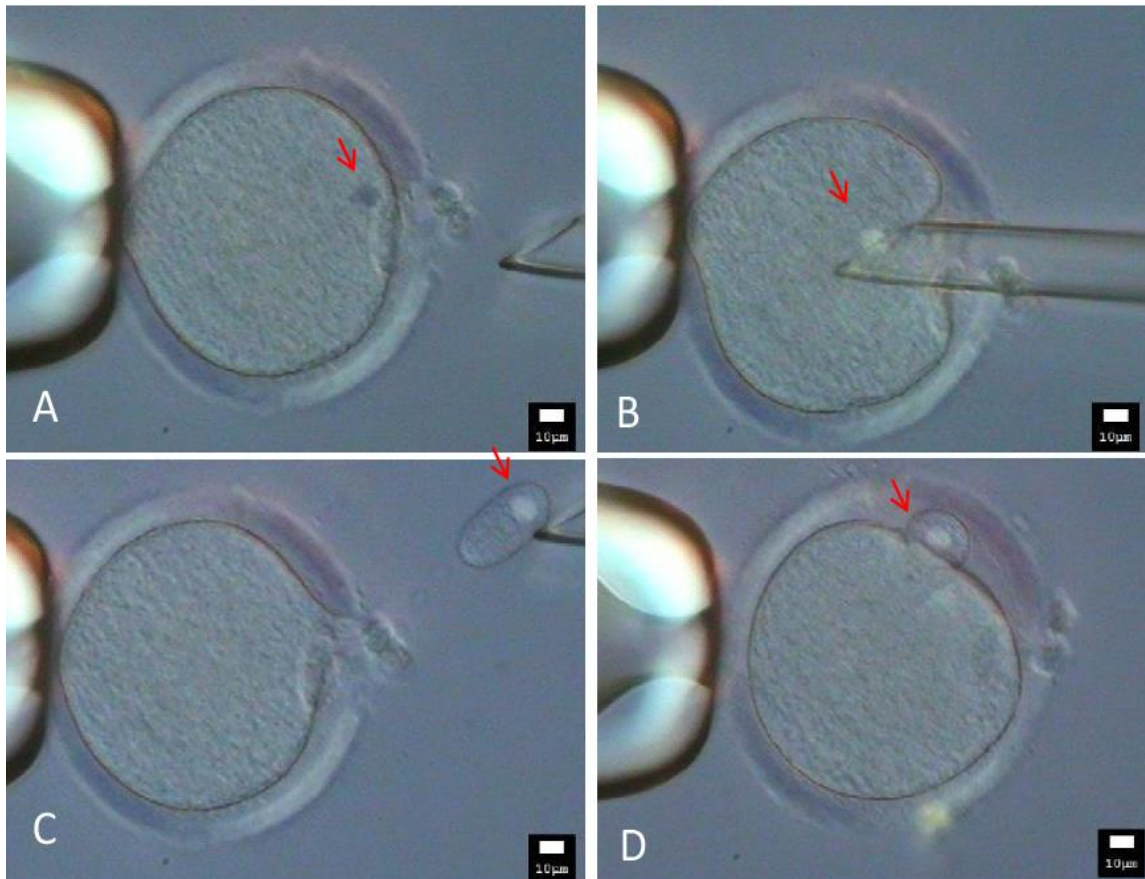
Εικόνα 9: Κύτταρο κατά την μετάφαση της δεύτερης μειωτικής διαίρεσης. Εμφανίζονται τα δυο κεντριόλια στους αντίθετους πόλους του ωαρίου, τα οποία μέσω των μικροσωληνίσκων-ινών ατράκτου συνδέονται με τα κεντρομερή των χρωμοσωμάτων. Πηγή: <https://www.shutterstock.com/image-vector/metaphase-phase-stages-mitosis-meiosis-600nw-2261350893.jpg>, 14/05/2024

Στην μητρική μεταφορά ατράκτου, λίγο πριν από τον χειρισμό, περίπου 10 λεπτά, τόσο το ωάριο της δότριας όσο και της μητέρας επωάζονται σε 10 μl μέσο που περιέχει κυτταροσκελετικούς αναστολείς όπως καταχολασίνη B σε συγκέντρωση 5 μg/ml προκειμένου να καταστεί το κυτταρόπλασμα και η κυτταρική μεμβράνη λιγότερο άκαμπτα και λιγότερο επιρρεπή σε λύση κατά τη μεταφορά του καρυοπλάστη (Craven L. T., 2010). Τα ωάρια τοποθετούνται σε διαφορετικές σταγόνες, στο ίδιο γυάλινο τρυβλίο. Για τα επόμενα 10 με 15 λεπτά τα ωάρια με τους αναστολείς καλύπτονται με ορυκτέλαιο και διατηρούνται στους 37 βαθμούς Κελσίου. Το γυάλινο τρυβλίο στη συνέχεια τοποθετείται στο κέντρο του ανεστραμμένου μικροσκοπίου Polscope (Craven L. T., 2010). Τα ωάρια που απελευθερώνουν το πρώτο πολικό σώμα μετάφασης II χρησιμοποιούνται αμέσως για παρατήρηση μειωτικής ατράκτου και αξιολόγηση μορφολογίας PB1, ενώ ωάρια χωρίς πολικό σώμα μετάφασης I καλλιεργούνται *in vitro* για επιπλέον περίοδο 3 ωρών και χρησιμοποιούνται για τη μελέτη μόνο εάν ωριμάσουν (McDougall, 2020).

Σε αντίθεση με τη μικροσκοπία φθορισμού, η απεικόνιση με LC Polscope δεν απαιτεί επεμβατικές προπαρασκευαστικές τεχνικές, όπως καθήλωση και χρώση, και η άτρακτος μπορεί να απεικονιστεί σε ζωντανά ωάρια, επιτρέποντας έτσι την καλύτερη αξιολόγηση του μειωτικού σταδίου των ωαρίων (Hyun, 2007). Το LC Polscope είναι ένα αναστραμμένο μικροσκόπιο εξοπλισμένο με πολωμένο φως birefringence, σε συνδυασμό με ηλεκτρονικό σύστημα ανάλυσης εικόνας. Αφού το γυάλινο τρυβλίο τοποθετηθεί στο κέντρο της πλάκας του μικροσκοπίου, ακολουθεί βαθμονόμηση του μικροσκοπίου σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Η μητρική άτρακτος μελετάται σε μεγέθυνση 400 X, ενώ η θέση το εμβადό και το μήκος της καταγράφονται στο σύστημα ανάλυσης εικόνας για μετέπειτα μελέτη.

Με τη βοήθεια του πολωμένου φωτός, το ωάριο της δότριας ακινητοποιείται με την πιπέτα συγκράτησης. Ύστερα η διαφανής ζώνη ανοίγει σε ένα σημείο με μικροχειρουργικό λέιζερ, μία πιπέτα βιοψίας 15-20μm εισάγεται μέσω της διαφανούς ζώνης και η άτρακτος και το γύρω κυτταρόπλασμα αφαιρούνται από το ωάριο ως καρυοπλάστης δεσμευμένος με μεμβράνη (Craven L. T., 2010). Η άτρακτος η οποία αφαιρέθηκε από το ωάριο της δότριας απορρίπτεται. Ωστόσο, πέρα από την αφαίρεση της ατράκτου, πρέπει να αφαιρείται και το πρώτο πολικό σωματίο του ωαρίου της δότριας για να μην προκαλέσει μετέπειτα δυσλειτουργίες (Reznichenko, 2016).

Ακολουθεί η ίδια διαδικασία αφαίρεσης ατράκτου στο ωάριο της μέλλουσας μητέρας. Μέσω λέιζερ ανοίγει μία οπή στη διάφανη ζώνη, εισέρχεται η πιπέτα αναρρόφησης, ανναροφά την άτρακτο και στη συνέχεια τη μεταφέρει στο εκπυρωμένο ωάριο της δότριας (Craven L. T., 2010). Δημιουργείται έτσι ένα νέο ωάριο τριών γονέων, το οποίο ύστερα γίνεται απλοειδές με τη διείδυση του σπέρματος και την απελευθέρωση του δεύτερου πολικού σωματίου PB2. Μόνο μορφολογικά φυσιολογικά ώριμα ωάρια με ορατό πρώτο πολικό σώμα υποβάλλονται σε μικροέγχυση ICSI (Gardner, 1999).



Εικόνα 10: Μεταφορά ατράκτου από το ώριο μετάφασης II της ασθενούς στο κυτταρόπλασμα ωαρίου δότριας: Α) Το ώριο της ασθενούς ακινητοποιείται από μια πιπέτα συγκράτησης και προσεγγίζεται από μια πιπέτα μεταφοράς. Β) Αναρρόφηση ατράκτου σε πιπέτα βιοψίας. Γ) Η άτρακτος αφαιρείται από το ώριο της ασθενούς. Δ) μεταφορά της αφαιρεθείσας ατράκτου στον κυτταροπλασματικό χώρο του ωαρίου της δότριας. Τα βέλη απεικονίζουν τον άξονα. Πηγή: [Zhang, J., Liu, H., Luo, S., Lu, Z., Chavez-Badiola, A., Liu, Z., Yang, M., Merhi, Z., Silber, S.J., Munné, S., Konstantinidis, M., Wells, D., Tang, J.J., & Huang, T. \(2017\). Live birth derived from oocyte spindle transfer to prevent mitochondrial disease. \*Reproductive biomedicine online\*, 34 4, 361-368., 14/05/2024](#)

### Ρύθμιση συστήματος ICSI και διαδικασία:

Το ρομποτικό σύστημα ICSI αποτελείται από τα εξής εξαρτήματα: ένα πρότυπο ανεστραμμένο μικροσκόπιο, μια κάμερα, μια εσωτερική συσκευή για τη συγκράτηση πολλαπλών ωαρίων, μια εσωτερική αντλία κενού για παροχή πίεσης μεταξύ -2,5 kPa και 2,5 kPa για συγκράτηση και απελευθέρωση ωαρίων, ένα εργαλείο περιστροφής για τον προσανατολισμό των ωαρίων, μια μικροπιπέτα ICSI γεμάτη με ορυκτέλαιο ελεγχόμενη από υπολογιστή, ένα μηχανοκίνητο μικροχειριστή για την τοποθέτηση της μικροπιπέτας ICSI (30° γωνία κλίσης) για να διεισδύσει διαγώνια στα ωάρια, ένα όργανο θέρμανσης για τη διατήρηση των ωαρίων και του σπέρματος στα 37 βαθμούς και έναν κεντρικό

υπολογιστή για τον έλεγχο πολλαπλών συσκευών και την επεξεργασία εικόνων σε πραγματικό χρόνο (Lu, 2011).

Το επόμενο λοιπόν βήμα της προετοιμασίας ωαρίων, είναι η ενδοκυτταροπλασματική έγχυση σπέρματος, η οποία αποτελεί πλέον μία καθιερωμένη και επιτυχημένη τεχνολογία τεχνητής αναπαραγωγής. Πριν από την έναρξη της θεραπείας ICSI, οι ασθενείς υπογράφουν ένα έντυπο συγκατάθεσης, το οποίο περιλαμβάνει την παροχή άδειας για προγεννητική διάγνωση με αμνιοπαρακέντηση ή λήψη χοριακών λαχνών. Η ICSI πραγματοποιείται 40 με 41 ώρες μετά την χορήγηση hCG (Cohen Y. , 2004) και περίπου 30 λεπτά μετά την δημιουργία του ανασυντηθημένου ωαρίου μέσω Polscope (Gardner, 1999).

Αναφορικά με τα βήματα της τεχνικής, αρχικά ένας χειριστής εναποθέτει σπέρμα και ωάρια στην ειδικά αναπτυγμένη συσκευή συγκράτησης κυττάρων. Όταν τα ωάρια με το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας τους, τοποθετηθούν στη συσκευή, συγκρατούνται ή απελευθερώνονται με την εφαρμογή αρνητικής ή θετικής πίεσης μέσω του σφραγισμένου θαλάμου. Ο χειριστής επιλέγει το σπερματοζώαριο που θα κάνει την έγχυση και μέσω του υπολογιστή κάνει κλικ κοντά στην κεφαλή του. Το σύστημα παρακολουθεί την κίνηση του επιλεγμένου σπέρματος και χτυπά αυτόματα την ουρά του για ακινητοποίηση. Η ακινητοποίηση γίνεται σε σε πολυβινυλοπυρρολιδόνη και στην αναρρόφηση με βελόνα, αναρροφάται πρώτα η ουρά. Μετά την αναρρόφηση του σπέρματος στη μικροπιπέτα, το ωάριο εισάγεται στο οπτικό πεδίο και ακινητοποιείται χρησιμοποιώντας μια πιπέτα συγκράτησης. Εάν χρειαστεί, το ωάριο περιστρέφεται για να μετακινηθεί το πολικό σώμα μακριά από το σημείο διείσδυσης για να αποφευχθεί βλάβη στην άτρακτο. Το σύστημα εκτελεί διείσδυση στη διαφανή ζώνη και τη μεμβράνη του ωαρίου, εναπόθεση σπερματοζωαρίων και συστολή μικροπιπέτας μέσω ελέγχου υπολογιστή (Lu, 2011).

### **In vitro καλλιέργεια και ταξινόμηση εμβρύων:**

Για να επιτευχθεί επιτυχημένη εγκυμοσύνη, τα γονιμοποιημένα πλέον ωάρια τριών γονέων μετά την μικρογονιμοποίηση καλλιεργούνται in vitro σε κατάλληλα θρεπτικά υλικά. Ωστόσο δεν είναι ακόμα σαφές πώς η σύνθεση των θρεπτικών μέσων επηρεάζει την ποιότητα των εμβρύων και τα ποσοστά επιτυχίας της εξωσωματικής γονιμοποίησης.



Δεν είναι μάλιστα γνωστό ποιο μέσο καλλιέργειας οδηγεί στα υψηλότερα ποσοστά επιτυχίας. Σήμερα, τα μέσα καλλιέργειας για έμβρυα μπορούν να χρησιμοποιηθούν είτε ως διαδοχικό σύστημα, με διαφορετικές συνθέσεις για τις ημέρες 0-3 και 3-6, είτε ως ενιαίο μέσο που χρησιμοποιείται για ολόκληρη την περίοδο καλλιέργειας. Τα μέσα καλλιέργειας πρέπει να χρησιμοποιούνται όπως προβλέπεται από τον κατασκευαστή, ωστόσο, σε πολλά εργαστήρια χρησιμοποιούνται συνδυασμοί μέσων από διαφορετικούς κατασκευαστές, καθιστώντας δυσκολότερη την αξιολόγηση των πιθανών επιπτώσεων. Τα κύρια συστατικά που χρησιμοποιούνται στα μέσα καλλιέργειας είναι τα εξής: υδατάνθρακες, αμινοξέα, EDTA, βιταμίνες, νουκλεοτίδια, στεροειδή, αυξητικοί παράγοντες και κυτοκίνες, Η ανθρώπινη λευκωματίνη ορού (HSA) και τα σύνθετα συμπληρώματα πρωτεΐνης που περιέχουν HSA και συνδυασμό άλφα και βήτα σφαιρινών, είναι μακρομόρια που μπορούν να δράσουν ως επιφανειοδραστική ουσία και ως πηγή αζώτου. (Sunde, 2016).

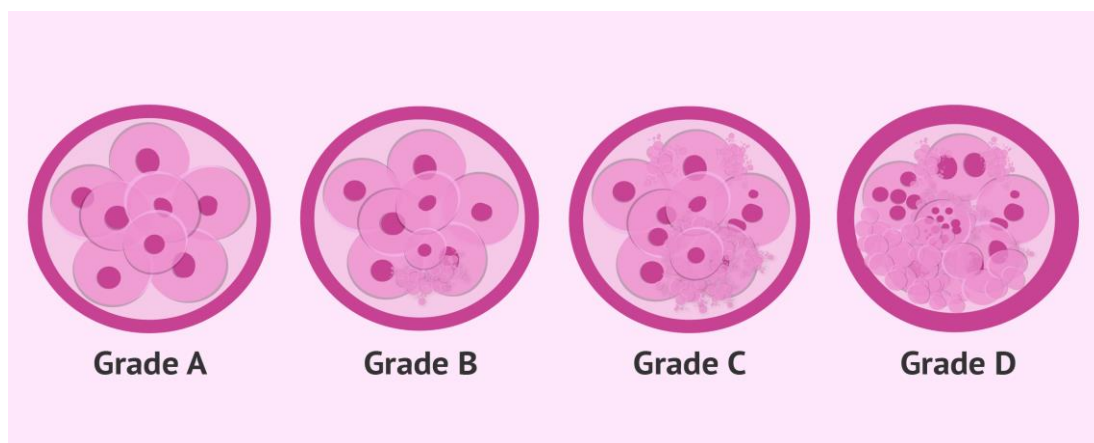
Οι περιβαλλοντικές μεταβλητές που τις διαχειρίζονται τα εργαστήρια, αποτελούν καθοριστικό παράγοντα της αποτελεσματικότητας του θρεπτικού μέσου. Αυτές περιλαμβάνουν την τάση οξυγόνου, το pH, τη σταθερότητα της θερμοκρασίας και την ωσμωτικότητα. Σχετικά με το οξυγόνο, απαιτείται η χρήση του σε χαμηλά ποσοστά καθ' όλη τη διάρκεια της περιόδου καλλιέργειας μέχρι την 5<sup>η</sup> ημέρα. Σε μελέτες ζώων έχουν εμφανιστεί πολλά οφέλη της χαμηλής συγκέντρωσης οξυγόνου (5% με 6%), σε σύγκριση με ατμοσφαιρική συγκέντρωση που είναι περίπου 21%. Αναφορικά με την θερμοκρασία, μπορεί να επηρεάσει τη σταθερότητα της μειωτικής ατράκτου και ενδεχομένως τον μεταβολισμό του εμβρύου. Η θερμοκρασίας πρέπει να κυμαίνεται γύρω στους 37°C. Ωστόσο, η βέλτιστη θερμοκρασία για την καλλιέργεια ανθρώπινων εμβρύων παραμένει άγνωστη. Το pH των μέσων προσδιορίζεται κυρίως από τη συγκέντρωση διττανθρακικών και CO<sub>2</sub> στο θρεπτικό μέσο. Δεν έχει προσδιοριστεί βέλτιστο pH για καλλιέργεια ανθρώπινων εμβρύων καθώς εξαρτάται από άλλους παράγοντες (Swain, 2016). Σχετικά με την ωσμωτικότητα, τα περισσότερα από τα μέσα έχουν σχεδιαστεί για να εμπίπτουν σε ένα εύρος 275 με 290 mOsm, μη γνωρίζοντας την βέλτιστη ωσμωτικότητα ανάπτυξης (Sunde, 2016).

Τα ωάρια παρακολουθούνται με τη χρήση εκκολαπτηρίου time-lapse για τον προσδιορισμό του προπυρηνικού σχηματισμού και των διαιρέσεων διάσπασης. Το σύστημα καταγράφει την εξέλιξη του εμβρύου 24 ώρες το 24ωρο. Κατά τη διάρκεια της

καλλιέργειας στον επωαστήρα time-lapse, λαμβάνονται και αναλύονται ψηφιακές εικόνες χρησιμοποιώντας λογισμικά. Τα ζυγωτά με δύο προπυρήνες, ομοιόμορφο διαυγές κυτταρόπλασμα και δύο πολικά σωματίδια είναι αυτά που θεωρούνται φυσιολογικά γονιμοποιημένα (Tomari, 2018).

Όταν πραγματοποιείται σύντηξη των δυο προπυρήνων, το έμβρυο ξεκινά διαδοχικές διαιρέσεις. Την 2<sup>η</sup> ημέρα της εμβρυϊκής ανάπτυξης έχουν συμβεί οι δυο πρώτες διαιρέσεις και το έμβρυο έχει 4 κύτταρα ή βλαστομερίδια. Την 3<sup>η</sup> ημέρα το έμβρυο έχει 8 κύτταρα. Τα έμβρυα αυτά είναι ικανά να εμφυτευτούν. Ωστόσο τις περισσότερες φορές συνεχίζουν την ανάπτυξή τους μέχρι την ημέρα 5 ή 6 που αποκτούν το στάδιο της βλαστοκύστης. Η βλαστοκύστη αποτελείται από περίπου 200 κύτταρα που αναδιοργανώνονται γύρω από μία κοιλότητα και αποτελούν εσωτερική κυτταρική μάζα (Yang, 2018).

Ένα καλής ποιότητας έμβρυο ορίζεται αυτό που έχει τον σωστό αριθμό κυττάρων που αντιστοιχεί στην ημέρα της ανάπτυξής του. Όπως εφαρμόζεται σήμερα, το έμβρυο που εμφυτεύεται στην μήτρα, επιλέγεται με κριτήρια μορφολογικής διαβάθμισης. Στο στάδιο της διάσπασης, αξιολογείται ο αριθμός των κυττάρων, η συμμετρία τους, η παρουσία κυτταρικών θραυσμάτων, το πάχος της διάφανης ζώνης και η παρουσία κενотоπιών. Στο στάδιο της βλαστοκύστης δηλαδή την ημέρα 5 και 6 της καλλιέργειας, οι παράμετροι που αξιολογούνται είναι η επέκταση της βλαστοκύστης, η εσωτερική κυτταρική μάζα και η εμφάνιση του τροφοεκτοδέρματος. Το τροφοεκτόδερμα θεωρείται ο πρόδρομος του μελλοντικού πλακούντα και είναι τύπος κυττάρου που αποτελείται η βλαστοκύστη (Coughlan, 2018).



*Εικόνα 10: Σύγκριση της ποιότητας διαφόρων εμβρύων μετά την καλλιέργειά τους. Τα έμβρυα βαθμού A θεωρούνται εξαιρετικής ποιότητας, επομένως η δυνατότητα εμφύτευσης είναι μέγιστη. Το*

*ποσοστό κατακερματισμού είναι αμεληταίο, τα βλαστομερίδια παρόμοιου μεγέθους, η διάφανη ζώνη κανονικού πάχους ενώ τα πολυπύρρηνα κύτταρα απουσιάζουν. Τα έμβρυα βαθμού D ωστόσο είναι κακής ποιότητας με μεγάλο ποσοστό κατακερματισμού, πλήθος πολυπύρρητων, ασύμμετρα βλαστομερή, παχιά διαφανής ζώνη και μεγάλα κενोटόπια. Πηγή : <https://babygest.com/en/embryo-grading/>, 15/05/2024*

## **Προεμφυτευτικός γενετικός έλεγχος (PGD):**

Το επόμενο αν και προαιρετικό στάδιο για την επιτυχία της MST είναι ο προεμφυτευτικός γενετικός έλεγχος ο οποίος αφορά την ανίχνευση ανωμαλιών στα έμβρυα πριν την εμφύτευσή τους στην μήτρα. Ο προεμφυτευτικός γενετικός έλεγχος αφορά τη βιοψία του εμβρύου και είναι τριών τύπων: PGD-A, PGD-M και PGD-SR. Το PGD-A αφορά την ανίχνευση ανευπλοειδίας, το PGD-M εξετάζει κοινές διαταραχές όπως κάποιες νόσους και μεταλλάξεις, ενώ το PGD-SR σημαίνει έλεγχος για δομικές ανακατατάξεις. Η PGD-M είναι η προσέγγιση που χρησιμοποιείται για τη διάγνωση της μιτοχονδριακής νόσου και έτσι η PGD χρησιμοποιείται συμβατικά για μονογονιδιακές διαταραχές. Τα αποτελέσματα είναι συνήθως διαθέσιμα εντός 10-14 ημερών μετά τη βιοψία. Καθ' αυτή την διάρκεια, τα έμβρυα καταψύχονται μέχρι τα αποτελέσματα των δοκιμών επιβεβαιώσουν την καταλληλότητα για μεταφορά και εμφύτευση στην μήτρα της ασθενούς (Claiborne, 2016).

Η PGD βασίζεται στη γενετική ανάλυση ενός ή περισσότερων κυττάρων που λαμβάνονται από έμβρυα στο στάδιο της διάσπασης ή στο στάδιο της βλαστοκύστης. Αυτή η προσέγγιση επιτρέπει την επιλογή εμβρύων χωρίς μεταλλάξεις ή εμβρύων με χαμηλό φορτίο μετάλλαξης, πριν από τη μεταφορά τους στη μήτρα. Η επιλογή εμβρύων με χαμηλά επίπεδα μετάλλαξης έχει επιτρέψει σε πολλά παιδιά να γεννηθούν υγιή. Αν και ο έλεγχος είναι χρήσιμος για τη μείωση ή εξάλειψη κληροδότησης μιτοχονδριακών ασθενειών από τη μητέρα στο νεογνό, υπάρχουν και αρκετοί περιορισμοί. Έτσι, η προεμφυτευτική γενετική διάγνωση δεν είναι διαθέσιμη για γυναίκες που φέρουν ομοπλαστικές μεταλλάξεις mtDNA. Παράλληλα υπάρχει πιθανότητα λανθασμένης διάγνωσης μιτοχονδριακής νόσου λόγω διακύμανσης στα επίπεδα του ετεροπλασματικού mtDNA μεταξύ βλαστομερών.

Αρκετές μελέτες έχουν αποδείξει ότι η ανευπλοειδία των εμβρύων είναι ο σημαντικότερος λόγος αποτυχίας της εξωσωματικής γονιμοποίησης, ενισχύοντας τη σημασία του προεμφυτευτικού γενετικού ελέγχου για ανευπλοειδίας ως μεθόδου επιλογής χρωμοσωμικά υγιών εμβρύων. Οι ανευπλοειδίες στα ανθρώπινα έμβρυα

συσχετίζονται αυστηρά με την ηλικία της γυναίκας και προέρχονται από χρωμοσωμικά σφάλματα που μπορεί να συμβούν σε διάφορα επίπεδα. Μειωτικά σφάλματα συμβαίνουν κατά τη διάρκεια της ωογένεσης και μετά τη γονιμοποίηση. Οι ανευπλοειδίες του σπέρματος, που γενικά συσχετίζονται με την ποιότητα του σπέρματος και τον κατακερματισμό του DNA, είναι λιγότερο συχνές σε σύγκριση με τα ωάρια, αλλά η επίπτωσή τους στο έμβρυο αναφέρεται ότι είναι υψηλή. Οι τεχνικές του PGD περιλαμβάνουν: βιοψία πολικού σώματος, βιοψία βλαστομερών, βιοψία τροφοεκτοδέρματος και μη επεμβατική PGD. Ο προεμφυτευτικός γενετικός έλεγχος απαιτείται να πραγματοποιείται στις περιπτώσεις προχωρημένης ηλικίας μητέρας, επαναλαμβανόμενης απώλειας κύησης και επαναλαμβανόμενης αποτυχίας εμφύτευσης. Ταυτόχρονα οφείλει να γίνεται και σε δότριες ωαρίων (PGD-A) καθώς μπορούν να παράγουν ένα σημαντικό ποσοστό ανευπλοειδών εμβρύων. Τον τελευταίο καιρό έχει εξελιχθεί η εκτέλεση ανάλυσης διπλού παράγοντα (PGD-A και PGD-M) με στόχο να βελτιωθεί ο ρυθμός εμφύτευσης επιλέγοντας δυνητικά ευπλοειδή έμβρυα απαλλαγμένα από μεταλλάξεις υπεύθυνες για μιτοχονδριακές νόσους (Greco, 2020).

### **Μεταφορά εμβρύων:**

Η εμφύτευση εμβρύων είναι ένα από τα πιο κρίσιμα σημεία σε κάθε πρόγραμμα εξωσωματικής γονιμοποίησης. Εμφύτευση είναι η διαδικασία κατά την οποία το γονιμοποιημένο ωάριο μετά την είσοδό του στη κοιλότητα της μήτρας έρχεται σε επαφή με το ενδομήτριο και στη συνέχεια με τα αγγεία της μήτρας. Περίπου το 80% των γυναικών που υποβάλλονται σήμερα σε εξωσωματική γονιμοποίηση ή ενδοκυτταροπλασματική έγχυση σπέρματος φτάνουν στο στάδιο της εμβρυομεταφοράς με καλής ποιότητας έμβρυα. Ωστόσο, μόνο ένα μικρό ποσοστό αυτών των γυναικών θα προχωρήσει στη συνέχεια για να επιτύχει μια κλινική εγκυμοσύνη, και ακόμη λιγότερες θα επιτύχουν μια ζωντανή γέννηση. Αυτό καθιστά τη φάση της εμβρυομεταφοράς το τελικό και λιγότερο επιτυχημένο βήμα στην τεχνολογία υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Πράγματι, εκτιμάται ότι έως και το 85% των αντικατασταθέντων εμβρύων αποτυγχάνουν να εμφυτευτούν, παρά την επιλογή φαινομενικά φυσιολογικών εμβρύων για μεταφορά. Αυτή η αποτυχία μπορεί να οφείλεται στην έλλειψη καλής ποιότητας εμβρύων, στην έλλειψη δεκτικότητας της μήτρας ή στην ίδια την τεχνική της εμβρυομεταφοράς. Οι συσπάσεις της μήτρας, η βακτηριακή μόλυνση και η αποβολή

αίματος ή βλέννας αποτελούν παράγοντες πιθανής ανεπιτυχής εμβρυομεταφοράς. Είναι γενικά αποδεκτό ότι μια εύκολη μεταφορά εμβρύου χωρίς τραύματα, είναι απαραίτητη για την επιτυχή εμφύτευση (Matorras, 2002). Είναι πιθανό ότι η ελαχιστοποίηση του τραύματος του ενδομητρίου θα μπορούσε να μειώσει τις συσπάσεις του μυομητρίου, οι οποίες με τη σειρά τους θα μπορούσαν να ενισχύσουν την εμφύτευση (Brown, 2016).

Η δοκιμαστική μεταφορά είναι μία διαδικασία που γίνεται 1 έως 2 μήνες πριν από τον κύκλο εξωσωματικής γονιμοποίησης και επιτρέπει στον ιατρό να μετρήσει το βάθος και την κατεύθυνση της κοιλότητας της μήτρας λόγω της μεγάλης μεταβλητότητας στην ανατομία του τραχήλου σε κάθε γυναίκα.

Ο καθετήρας εμβρυομεταφοράς μπορεί να εισαχθεί με δυο τρόπους: τυφλά με «κλινικό άγγιγμα» ή με υπερηχογραφική καθοδήγηση. Η χρήση υπερήχων στο στάδιο της εμβρυομεταφοράς βοηθά στην ταυτοποίηση του τραχήλου της μήτρας και της ενδομητρικής κοιλότητας, διευκολύνοντας έτσι την ατραυματική διείσδυση του καθετήρα στη μήτρα, ελαχιστοποιώντας το τραύμα του ενδομητρίου. Παράλληλα διευκολύνει την τοποθέτηση των εμβρύων στο επιθυμητό σημείο. Τα δευτερεύοντα πλεονεκτήματα αφορούν τον αποκλεισμό υγρού στην ενδομητρική κοιλότητα και την εκτίμηση των ωοθηκών.

Η εμβρυομεταφορά μπορεί να συμβεί είτε πρώιμα στο στάδιο της διάσπασης είτε στο στάδιο της βλαστοκύστης δηλαδή την 5<sup>η</sup> ημέρα της καλλιέργειας. Υψηλότερα ποσοστά εμφύτευσης ωστόσο παρατηρούνται στο στάδιο της βλαστοκύστης. Λόγω της μεγάλης διαμέτρου των βλαστοκύστεων ο ρυθμός έκτοπης κύησης μπορεί να μειωθεί. Η δεκτικότητα της μήτρας ενισχύεται στο στάδιο αυτό, με τις συσπάσεις της να μειώνονται. Σε ζωικά μοντέλα, τα ποσοστά αποβολής εμβρύων ελαχιστοποιούνται καθώς αυξάνεται το διάστημα μεταξύ ωορρηξίας και μεταφοράς. Αυτό το εύρημα έχει αποδοθεί σε υψηλότερα επίπεδα προγεστερόνης, τα οποία με τη σειρά τους αναστέλλουν τις συσπάσεις της μήτρας.

Ορισμένες επιπλοκές της εμβρυομεταφοράς μπορεί να αποτελούν η λοίμωξη της πυέλου και το τραύμα στα ίδια τα έμβρυα λόγω συμπίεσης τους από αίμα βλέννα ή ιστό του ενδομητρίου. Η έκτοπη ή εξωμήτριος κύηση, δηλαδή η προσκόλληση του εμβρύου έξω από την μήτρα είναι επίσης πιθανή (Schoolcraft, 2001).

Το πρωτόκολλο μεταφοράς εμβρύων περιλαμβάνει τα εξής βήματα : Αρχικά γίνεται διακοιλιακή υπερηχογραφική καθοδήγηση με πλήρη την ουροδόχο κύστη της

γυναίκας και τοποθέτηση του κοιλιακού speculum για διεύρυνση του κόλπου. Ύστερα ακολουθεί πλύση του τραχήλου με φυσιολογικό ορό για απομάκρυνση της περίσσειας βλέννας. Ο καθετήρας φορτώνεται με το έμβρυο και περνά στην ενδομητρική κοιλότητα. Η άκρη του καθετήρα τοποθετείται στο άνω ή μεσαίο τρίτο της ενδομητρικής κοιλότητας καθώς υπάρχουν κάποιες ενδείξεις ότι αυτή η θέση βελτιώνει τα ποσοστά εγκυμοσύνης. Πραγματοποιείται προσεκτική έγχυση του εμβρύου σε κατάλληλη απόσταση με βάση τους υπερήχους και μετέπειτα έλεγχος του καθετήρα από τον υπεύθυνο εμβρυολόγο για αίμα, βλέννα ή κατακρατημένα έμβρυα. Δεν υπάρχουν ενδείξεις για ανάπαυση στο κρεβάτι μετά την εμβρυομεταφορά (Jain M. , 2023).

## **3.2. Προπυρηνική μεταφορά**

### **3.2.1. Περιληπτική διαδικασία**

Η προπυρηνική μεταφορά αποτελεί μία σημαντική προσέγγιση με την οποία εκτελείται η θεραπεία μιτοχονδριακής υποκατάστασης. Πραγματοποιείται μετά την γονιμοποίηση και οι δυο ζυγωτές αναπτύσσονται *in vitro*. Το ένα γονιμοποιημένο ωάριο-ζυγωτό ανήκει στους βιολογικούς γονείς με προπυρήνες και ελαττωματικά μιτοχόνδρια, ενώ το άλλο ζυγωτό ανήκει στην δότρια με προπυρήνες και υγιή μιτοχόνδρια. Το σπέρμα που γονιμοποιεί τα 2 ωάρια είναι από το ίδιο άτομο. Οι προπυρήνες των βιολογικών γονέων αφαιρούνται από το ζυγωτό και μεταμοσχεύονται στο ζυγωτό της δότριας από το οποίο έχουν ήδη αφαιρεθεί η προπυρήνες οι οποίοι και απορρίπτονται. Τελικά δημιουργείται ένα αναδιαμορφωμένο ζυγωτό με προπυρήνες των μελλοντικών γονέων και μιτοχόνδρια υγιούς δότριας. Το γονιμοποιημένο ωάριο καλλιεργείται σε συγκεκριμένα θρεπτικά υλικά και συνθήκες και ύστερα από τους προεμφυτευτική γενετική διάγνωση για μιτοχονδριακές μεταλλάξεις, εμφυτεύεται στο ενδομήτριο της μήτρας (Sharma H. S., 2020).

### **3.2.2. Εργαστηριακές τεχνικές**

#### **Διέγερση ωοθηκών, ωοληψία και προετοιμασία ανδρικού σπέρματος:**

Πρωταρχικά και απαραίτητα βήματα για την μέθοδο είναι η διέγερση ωοθηκών ασθενούς και δότριας με ορμόνες ώστε να παράγουν πολλά ωάρια, η ωοληψία με υπερηχογραφικά καθοδηγούμενη αναρρόφηση ωοθυλακίων και η λήψη και προετοιμασία του ανδρικού σπέρματος για σπερματέγχυση. Τα τρία βήματα πραγματοποιούνται με τον ίδιο τρόπο και στην μεταφορά ατράκτου αλλά και στην μεταφορά προπυρήνων (Jain M. , 2023).

#### **Προετοιμασία ωαρίων:**

Τα ληφθέντα ωάρια τόσο της μέλλουσας μητέρας όσο και της δότριας, προετοιμάζονται αφαιρώντας αρχικά τα κύτταρα cumulus και corona radiata του περιβλήματος των ωαρίων με υαλουρονιδάση. Με αυτό τον τρόπο στην μετέπειτα σπερματέγχυση τα σπερματοζωάρια θα μπορούν να διεισδύσουν στο εσωτερικό του ωαρίου. Σε συνέχεια της προετοιμασίας των ωαρίων, τόσο στην μεταφορά πυρηνίων όσο και στην μεταφορά ατράκτου, τα χρωμοσώματά τους πρέπει να βρίσκονται υπερσυμπυκνωμένα σε σχηματισμό ατράκτου στο ισημερινό επίπεδο. Επομένως η διαδικασία προπυρηνικής μεταφοράς όπως και μεταφοράς μητρικής ατράκτου πρέπει να πραγματοποιείται όταν τα ωάρια βρίσκονται στο στάδιο δυο της δεύτερης μειωτικής διαίρεσής τους δηλαδή στην μετάφαση II. Τα δυο ωάρια είναι έτοιμα να γονιμοποιηθούν για να γίνει η προπυρηνική μεταφορά (Monroy A. , 2024).

#### **Ενδοκυτταροπλασματική έγχυση σπέρματος:**

Τα ωάρια δότριας και μέλλουσας μητέρας στη συνέχεια είναι έτοιμα να γονιμοποιηθούν με ενδοκυτταροπλασματική έγχυση σπέρματος. Το σπέρμα που γονιμοποιεί τα ωάρια των δυο γυναικών με το φυσιολογικό και μη φυσιολογικό mtDNA είναι του ίδιου άνδρα, και κατά πάσα πιθανότητα του πατέρα. Η ενδοκυτταροπλασματική έγχυση σπέρματος γίνεται με την ίδια διαδικασία που μελετήθηκε προηγουμένως, απλώς σε αυτή την τεχνική πραγματοποιείται και στο ωάριο της γυναίκας αλλά και της δότριας. Τα γονιμοποιημένα πλέον ωάρια είναι σε θέση να υποστούν την μεταφορά πυρηνίων.

### **Προπυρηνική μεταφορά:**

Τα φυσιολογικά ζυγωτά, που εμφανίζουν δυο προπυρήνες και δυο πολικά σωματία μετά την γονιμοποίηση τους, υποβάλλονται σε μεταφορά πυρηνίων. Το κυτταρόπλασμα του ωαρίου της δότριας πρέπει να βρίσκεται στο ίδιο στάδιο με αυτό του ωαρίου του ζευγαριού, σε αυτό του προπυρήνα. Η PNT πραγματοποιείται είτε 16 με 20 ώρες μετά την ICSI (αργή PNT) είτε 8 με 10 ώρες μετά από ICSI (γρήγορη PNT). Οι χειρισμοί πραγματοποιούνται χρησιμοποιώντας ανεστραμμένο μικροσκόπιο εξοπλισμένο με σύστημα μικροχειρισμού και στόχο-λείζερ, κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες θερμοκρασίας οξυγόνου και διοξειδίου του άνθρακα (Hyslop L. A., 2016).

Οι διαδικασίες PNT χρειάζονται περίπου 15 λεπτά για να ολοκληρωθούν και περιελάμβαναν τα ακόλουθα βήματα: Οι ζυγωτές στους οποίους είναι ορατά δύο πολικά σωματία τοποθετούνται σε μέσο εκπυρήνωσης με κυτταροσκελετικούς αναστολείς αμέσως πριν από το χειρισμό ή για 30 λεπτά πριν από το χειρισμό για βελτιωμένη αφαίρεση καρυοπλαστών, στους 37 βαθμούς Κελσίου. Το μέσο περιλαμβάνει νοκοδαζόλη (10 µg/ml) για πολυμερισμό των μικροσωληνίσκων και κυτοχαλασίνη Β (5 µg/ml), για απενεργοποίηση του κυτταροσκελετού ακτίνης. Αυτό αυξάνει την ελαστικότητα του κυτταροπλάσματος για την πρόληψη της λύσης των ωαρίων κατά τη διάρκεια της εκπυρήνωσης. Οι προπυρήνες ακινητοποιούνται με πιπέτα συγκράτησης και μέσω του μικροχειρουργικού λείζερ δημιουργείται μία οπή στη διάφανη ζώνη. Μια προσαρμοσμένη πιπέτα βιοψίας με εσωτερική διάμετρο περίπου 25µm εισάγεται κάτω από τη διαφανή ζώνη των ζυγωτών. Οι προπυρήνες και το κυτταρόπλασμα που τους περιβάλλει αναρροφούνται με την πιπέτα βιοψίας ως καρυοπλάστες συδεδεμένοι με μεμβράνη. Έπειτα, γίνεται αφαίρεση των προπυρήνων και στα 2 ζυγωτά δότριας και βιολογικής μητέρας είτε ως δύο μεμονωμένοι προπυρηνικοί καρυοπλάστες είτε ως ένας μόνο καρυοπλάστης που περιέχει και τους δύο προπυρήνες. Οι προπυρήνες του ζυγωτού της δότριας απορρίπτονται, ενώ οι προπυρήνες του ζευγαριού που επιθυμεί να τεκνοποιήσει μεταφέρονται στο εκπυρωμένο ζυγωτό της δότριας. Δημιουργείται έτσι ένα νέο ζυγωτό με το πυρηνικό γονιδίωμα του ζευγαριού και το φυσιολογικό mtDNA δότριας (Craven, 2010).



### **Καλλιέργεια και ταξινόμηση εμβρύων:**

Τα αναδιαμορφωμένα ζυγωτά καλλιεργούνται σε τρυβλείο, με διαφορετική συγκέντρωση θρεπτικών συστατικών και σε διαφορετικές συνθήκες σε κάθε εργαστήριο σύμφωνα με το πρωτόκολλό του. Η καλλιέργεια παρακολουθείται με σύστημα Time lapse και λαμβάνονται διαρκείς εικόνες για να αναλύεται η εξέλιξή της (Tomari, 2018).

Τα έμβρυα ταξινομούνται χρησιμοποιώντας τα συστήματα ταξινόμησης εμβρύων και βλαστοκύστεων της Εθνικής Υπηρεσίας Εξωτερικής Αξιολόγησης της Ποιότητας του Ηνωμένου Βασιλείου. Οι βλαστοκύστες λαμβάνουν τριψήφιο αριθμό ο οποίος αφορά τις εξής βαθμολογίες:

Βαθμολογία 1-6 για την έκταση της επέκτασης της βλαστοκύστης, 1-5 για την εμφάνιση της εσωτερικής κυτταρικής μάζας και 1-3 για την εμφάνιση του τροφεκτοδέρματος. Ο βαθμός ύστερα μετατρέπεται σε κατηγορία ποιότητας (Hyslop L. A., 2016).

### **Προεμφυτευτικός γενετικός έλεγχος και μεταφορά εμβρύου:**

Ένα έμβρυο που έχει οριστεί ως καλής ποιότητας, υποβάλλεται σε προεμφυτευτικό γενετικό έλεγχο όπως ακριβώς και στη διαδικασία μεταφοράς ατράκτου (Greco, 2020) και στη συνέχεια εμφυτεύεται στη μήτρα της μητέρας ώστε να επιτευχθεί εγκυμοσύνη (Jain M. , 2023).

## **3.3. Σύγκριση των δυο μεθόδων**

Τόσο η μεταφορά ατράκτου μετάφασης II όσο και η μεταφορά προπυρηνίων είναι τεχνικά εφικτές και επιτυγχάνουν τον στόχο τους. Το ερώτημα ωστόσο ποια τεχνική από τις δυο είναι προτιμότερη να πραγματοποιούν οι γονείς, είναι ακόμα αναπάντητο. Οι εργαστηριακές τεχνικές έχουν πολλά κοινά σημεία και ίδιο σκοπό. Ωστόσο σε πολλά βήματα διαφέρουν, καθιστώντας την κάθε μέθοδο ξεχωριστή.

Η κύρια διάκριση μεταξύ των δυο τεχνικών αφορά το μέρος του μητρικού ωαρίου που μεταφέρεται στο ωάριο της δότριας. Στην προπυρηνική μεταφορά, μεταφέρεται ο προπυρήνας ενώ στη μεταφορά ατράκτου, μεταφέρεται η άτρακτος. Η διαφορά στην τεχνική επηρεάζει άμεσα τη χρονική στιγμή που εκτελείται η πυρηνική

μεταφορά σε κάθε διαδικασία. Η μεταφορά του προπυρήνα γίνεται λίγο μετά τη γονιμοποίηση, ενώ η ατρακτοειδής μεταφορά γίνεται πριν τη γονιμοποίηση (Craven L. E., 2011).

Σημαντικό πλεονέκτημα της προπυρηνικής έναντι της μεταφοράς ατράκτου είναι ότι οι προπυρήνες μπορούν να απεικονιστούν πιο εύκολα από τους άξονες, χρησιμοποιώντας ένα συμβατικό ανεστραμμένο μικροσκόπιο σε αντίθεση με το PoIScore που απαιτείται για την μεταφορά μητρικής ατράκτου. Παράλληλα για την μεταφορά προπυρήνων μπορεί να εφαρμοστεί και κλασική τεχνική εξωσωματικής γονιμοποίησης IVF εάν το επιτρέπουν οι παράμετροι του σπέρματος και δεν απαιτείται απαραίτητα ενδοκυτταροπλασματική έγχυση σπέρματος όπως στην μεταφορά ατράκτου (Reznichenko, 2016).

Μία μεγάλη διαφορά των μεθόδων, αφορά στην προεφυτευτική διάγνωση, που πλεονέκτημα εμφανίζει η μεταφορά ατράκτου. Η προπυρηνική μεταφορά συνεπάγεται στη μεταφορά μητρικού και πατρικού γενετικού υλικού στο ωάριο δότριας, πράγμα το οποίο μπορεί να οδηγήσει σε περεταίρω ανωμαλίες στο ληφθέν έμβρυο. Η μεταφορά ατράκτου περιλαμβάνει τη μεταφορά μόνο μητρικού γενετικού υλικού, μειώνοντας τον κίνδυνο κληρονομικών ελαττωμάτων στο έμβρυο.

Προτέρημα μάλιστα της μεταφοράς ατράκτου μεταφάσης II είναι πως πραγματοποιείται σε προγενέστερο στάδιο και ο καρυοπλάστης είναι μικρότερος από ότι στην προπυρηνική μεταφορά, με δυνατότητα μικρότερης μεταφοράς mtDNA στο ωάριο δότριας. Σε πρόσφατη έρευνα, κατά μέσο όρο, το 1% της μιτοχονδριακής ετεροπλασίας ανιχνεύθηκε σε έμβρυα και απογόνους μεταφοράς ατράκτου πιθήκου και ανθρώπου. Σε ανθρώπινα έμβρυα μεταφοράς προπυρήνων, διαπιστώθηκε ποσοστό μεταφοράς έως και 2%. Επιπλέον, παρατηρήθηκε σημαντική ποσότητα μιτοχονδριακής ετεροπλασίας μεταξύ βλαστομερών του ίδιου εμβρύου (Craven L. E., 2011).

Η τεχνική μεταφοράς προπυρηνίων σε ωάρια εμφανίζει και αρκετούς περιορισμούς. Αρχικά, παρόλο που η τεχνική έχει δοκιμαστεί σε πολλά γονιμοποιημένα ωάρια, υπάρχει ελαφρώς μεγαλύτερη πιθανότητα ο προπυρήνας να μην αναπτυχθεί σωστά σε σύγκριση με την μετεγχειρητική γονιμοποίηση στη διαδικασία μεταφοράς ατράκτου. Αυτή η διαφορά συμβαίνει επειδή είναι δύσκολο να προσδιοριστεί ο σωστός χρόνος όταν ο προπυρήνας είναι έτοιμος για εξαγωγή. Αυτό δεν αποτελεί πρόβλημα με τη μεταφορά της μητρικής ατράκτου καθώς η άτρακτος μπορεί να εξαχθεί ανά πάσα

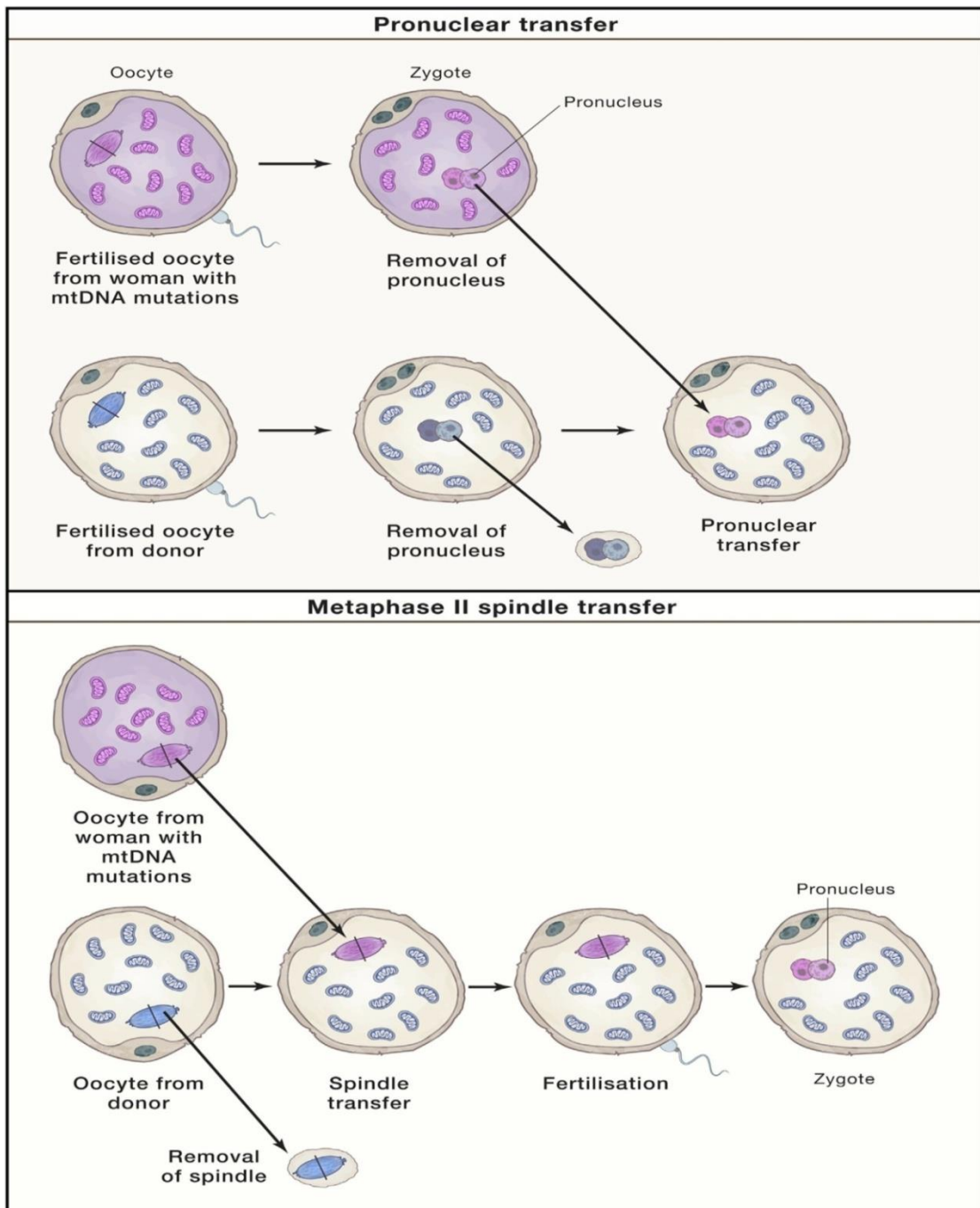
στιγμή κατά τη διάρκεια της ζωής του ωαρίου (Liu, 2015). Ένα ηθικής απόψεως μειονέκτημα στην μεταφορά προπυρηνίων συγκριτικά με την μεταφορά ατράκτου είναι ότι οι προπυρήνες των ωαρίων της δότριας, απορρίπτονται προκειμένου να εισαχθούν στα ωάρια οι προπυρήνες του ζευγαριού που εκτελεί την τεχνική. Χάνεται έτσι το πυρηνικό γενετικό υλικό ζυγωτών-εμβρύων τα οποία υπό άλλες συνθήκες μέσω εγκυμοσύνης θα γεννιόντουσαν (Reznichenko, 2016).

Αρκετά μειονεκτήματα ωστόσο εμφανίζει και η μεταφορά ατράκτου σε ωάρια. Η πρώτη δυσχέρεια είναι όπως τονίστηκε και πριν ότι τα ωάρια μπορούν να γονιμοποιηθούν μόνο με ICSI. Η μέθοδος παράλληλα είναι πιο δαπανηρή, λόγω του γεγονότος ότι η άτρακτος μπορεί να απεικονιστεί μόνο χρησιμοποιώντας εξειδικευμένο εξοπλισμό που συνδέεται με ένα σύστημα απεικόνισης που χρησιμοποιεί πολωμένο φως birefringence. Το σύμπλεγμα χρωμοσώματος-ατράκτου είναι μια εύθραυστη δομή που πρέπει να αντιμετωπίζεται με τη μέγιστη προσοχή, καθώς το DNA δεν είναι τόσο σταθερό όσο στους προπυρήνες. Ένα άλλο μειονέκτημα είναι ότι η σκέδαση χρωμοσωμάτων μπορεί να συμβεί κατά τη διάρκεια της μεταφάσης II. Αυτή η ένδειξη βλάβης της ατράκτου έχει διαπιστωθεί ότι συμβαίνει ως αποτέλεσμα της διακύμανσης της θερμοκρασίας και της προχωρημένης ηλικίας της μητέρας. Η μεταφορά ατράκτου πρέπει να πραγματοποιείται υπό εξαιρετικά ρυθμιζόμενες περιβαλλοντικές συνθήκες με ελάχιστο κίνδυνο βλάβης, αλλιώς υπάρχει σοβαρός κίνδυνος ανευπλοειδίας κατά τη διάρκεια του χειρισμού της ατράκτου (Reznichenko, 2016).

Τόσο η προπυρηνική όσο και η ατρακτοειδής μεταφορά απαιτούν να συγχρονίζονται οι κύκλοι διέγερσης ωοθηκών ώστε η ωοληψία να γίνεται την ίδια ημέρα και στις δυο γυναίκες. Λόγω της διακύμανσης των ορμονών όμως σε κάθε γυναίκα αυτό είναι δύσκολο. Είναι πιθανό έτσι να χρειαστεί να κρυοσυντηρηθούν τα ωάρια ή τα ζυγωτά μέχρι τη μεταφορά του πυρηνικού γονιδιώματος. Η κρυοσυντήρηση ζυγωτών είναι μια μακροχρόνια καθιερωμένη διαδικασία στην υποβοηθούμενη σύλληψη. Ωστόσο, οι τεχνικές υαλοποίησης για την επιτυχή αποθήκευση ανθρώπινων ωαρίων μεταφάσης II αποτελούν σχετικά πρόσφατη εξέλιξη στην κλινικά υποβοηθούμενη αναπαραγωγή καθιστώντας τη λιγότερο γνώριμη προς τους επαγγελματίες υγείας (Amato P, 2014).

Η επιλογή της τεχνικής που θα χρησιμοποιηθεί από το ζευγάρι, εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένης της εμπειρογνωμοσύνης του εμβρυολόγου

που διεξάγει τη διαδικασία και της νομικής στάσης της χώρας στην οποία πρόκειται να πραγματοποιηθεί η διαδικασία. Ανεξάρτητα από την τεχνική που χρησιμοποιείται, η μακροχρόνια παρακολούθηση κάθε παιδιού που γεννιέται από τη διαδικασία είναι σημαντική και θα πρέπει να πραγματοποιείται για την περαιτέρω αξιολόγηση της ασφάλειας της τεχνικής (Rai, 2018).



Εικόνα 11: Τεχνικές δωρεάς μιτοχονδρίων (MD) (Α) Μεταφορά μητρικής ατράκτου (MST). Β) Προπυρηνική μεταφορά (PNT). Πηγή: Russell, O.M., Gorman, G.S., Lightowlers, R.N. and Turnbull, D.M., 2020. Mitochondrial diseases: hope for the future. *Cell*, 181(1), pp.168-188., 15/05/2024

## **Κεφάλαιο 4: Πλαίσια τεχνικών μιτοχονδριακής αντικατάστασης**

### **4.1. Νομοθετικά πλαίσια MRTs Παγκοσμίως**

Το νομοθετικό πλαίσιο που ακολουθείται στις θεραπείες αντικατάστασης μιτοχονδρίων στην υποβοηθούμενη αναπαραγωγή διαφοροποιείται από χώρα σε χώρα σε όλο τον κόσμο. Στα μεγαλύτερα και οικονομικά ισχυρότερα μέρη του κόσμου οι MRTs δεν έχουν αναπτυχθεί μέχρι σήμερα όπως θα έπρεπε. Λίγες είναι οι χώρες που ασχολούνται τακτικά με τις θεραπείες εκτελώντας αυστηρές έρευνες, δημόσιες συζητήσεις και επιστημονικές γνωμοδοτήσεις (Sharma H. , 2020).

#### **Ηνωμένο Βασίλειο**

Οι MRTs έλαβαν επιτυχή έγκριση από το κοινοβούλιο του Ηνωμένου Βασιλείου τον Φεβρουάριο του 2015, κατατάσσοντάς την στην πρώτη χώρα παγκοσμίως που ενέκρινε νομικά τις MRTs (Sharma H. , 2020).

Οι σχετικοί κανονισμοί περί ανθρώπινης γονιμοποίησης και εμβρυολογίας τέθηκαν σε ισχύ στις 29 Οκτωβρίου 2015. Οι κανονισμοί εγκρίθηκαν μετά από μακροχρόνιες διαδικασίες δημόσιων διαλόγων και διαβουλεύσεων σε ολόκληρο το Ηνωμένο Βασίλειο. Από το 2016 και μετά, ομάδες εμπειρογνομόνων δημοσιεύουν καινοτόμες εκθέσεις για την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα των MRT. Οι κανονισμοί του Ηνωμένου Βασιλείου επιτρέπουν μόνο δύο τύπους MRT: Τα PNT και MST. Οι μόνες περιπτώσεις υπό τις οποίες επιτρέπονται τα MST και PNT είναι εκείνες στις οποίες υπάρχει ιδιαίτερος κίνδυνος οποιοδήποτε έμβρυο να γεννηθεί με μιτοχονδριακές ανωμαλίες που προκαλούνται από κληρονομούμενη μιτοχονδριακή νόσο της μητέρας.

Οι MRTs στο Ηνωμένο Βασίλειο εκτελούνται μόνο σε κλινικές γονιμότητας με συγκεκριμένη άδεια. Οι κλινικές έχουν υποχρέωση να ζητούν άδεια από την Επιτροπή Αδειών της Αρχή Ανθρώπινης Γονιμοποίησης και Εμβρυολογίας (HFEA) και κάθε γυναίκα που θα μπορούσε να επωφεληθεί από μια διαδικασία MRT χρειάζεται έγκριση της υπόθεσής της από την Επιτροπή Θεσμοθετημένων Εγκρίσεων της HFEA. Τον Φεβρουάριο

του 2018, οι δύο πρώτες γυναίκες έλαβαν έγκριση για να υποβληθούν σε διαδικασία MRT.

Οι κυρίαρχοι λόγοι που νομιμοποίησαν τις MRTs στο Ηνωμένο Βασίλειο ήταν δυο: Ο πρώτος ήταν ο ισχυρισμός των υποστηρικτών ότι υπάρχει σημαντική διάκριση μεταξύ του πυρηνικού DNA (το οποίο προσδίδει προσωπικά χαρακτηριστικά) και του mtDNA (το οποίο δεν προσδίδει). Ο δεύτερος ήταν ο ισχυρισμός ότι, στις MRT, δεν συμβαίνει τροποποίηση του DNA, δεδομένου ότι η διαδικασία αφορά αντικατάσταση χρωμοσωμικού DNA.

Οι κανονισμοί του Ηνωμένου Βασιλείου τονίζουν ότι ο δότης μιτοχονδριακών ωαρίων δεν είναι νόμιμος γονέας, ότι τα παιδιά που γεννιούνται με MRTs δεν υποχρεούνται να υποβάλλονται σε μακροχρόνια παρακολούθηση και ότι τα παιδιά μπορούν να λάβουν μόνο μη αναγνωρίσιμες πληροφορίες σχετικά με την δώτρια μιτοχονδρίων (Cohen I. G.-G., 2020).

## **Ηνωμένες Πολιτείες**

Οι Ηνωμένες Πολιτείες έχουν υιοθετήσει μια αρκετά περιοριστική προσέγγιση για τις MRTs, η οποία φαίνεται απίθανο να αλλάξει στο σύντομο μέλλον. Η έρευνα στον τομέα της μιτοχονδριακής μεταφοράς έχει επηρεαστεί από την άσχημη εμπειρία των ΗΠΑ με τη χρήση κυτταροπλασματικής μεταφοράς κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του 1990. Η τεχνολογία αυτή αναπτύχθηκε για να βοηθήσει τις γυναίκες που είχαν προβλήματα εμφύτευσης και αφορούσε την έγχυση μικρής ποσότητας κυτταροπλάσματος, συμπεριλαμβανομένων των μιτοχονδρίων, από έναν υγιή νεαρό δότη στο ωάριο της μητέρας. Η τεχνική ωστόσο σταμάτησε να εφαρμόζεται, λόγω παιδιών γεννημένων με χρωμοσωμική ανωμαλία και ένα άλλο διαγνωσμένο με διάχυτη αναπτυξιακή διαταραχή.

Οι ΗΠΑ σε αντίθεση με το Ηνωμένο Βασίλειο δεν διαθέτουν ειδικευμένο οργανισμό υπεύθυνο για την υποβοηθούμενη αναπαραγωγή, έχουν δώσει λιγότερη έμφαση στη δημόσια διαβούλευση και έχουν βασιστεί κυρίως στις συνεδριάσεις εμπειρογνομώνων. Η Αμερικανική υπηρεσία τροφίμων και φαρμάκων (FDA) , καθιστά τον κατεξοχήν αρμόδιο όσον αφορά στις MRTs. Το 2014 ο FDA συγκάλεσε συνάντηση για να συζητήσει τη μεταφορά μιτοχονδρίων, αλλά δεν είχε επαρκή στοιχεία ότι οι τεχνικές ήταν ασφαλείς. Το 2016 αποφασίστηκε ότι με την επιφύλαξη ορισμένων περιορισμών, η

MRT θα μπορούσε να είναι δεοντολογικά δικαιολογημένη λόγω της αύξησης των αναπαραγωγικών τεχνικών για τις γυναίκες με ελαττωματικό mtDNA. Οι περιορισμοί περιελάμβαναν ότι πρώτον οι MRTs έπρεπε να πραγματοποιούνται μόνο σε γυναίκες με σοβαρή μιτοχονδριακή ασθένεια, άποψη με την οποία συμφωνεί το Ηνωμένο Βασίλειο και δεύτερον έπρεπε να αφορά μόνο την μεταφορά αρσενικών εμβρύων με την οποία διαφωνεί κάθετα το Ηνωμένο Βασίλειο. Η επιλογή του αρσενικού φύλου από τις ΗΠΑ βασίζεται σε ανησυχίες σχετικά με τη μετάδοση της βλαστικής σειράς (Castro, 2016).

Η ιδέα των συστάσεων ωστόσο δεν συνέχισε λόγω της νομοθετικής και εκτελεστικής δράσης. Το Κογκρέσο ψήφισε, και ο Πρόεδρος Ομπάμα υπέγραψε νόμο, που αποκλείει αποτελεσματικά οποιεσδήποτε κλινικές δοκιμές για MRTs στις Ηνωμένες Πολιτείες (Cohen I. G.-G., 2020).

Είναι πιθανό οι δοκιμές θεραπειών μιτοχονδριακής υποκατάστασης να ξεκινήσουν στις ΗΠΑ με δυο προϋποθέσεις: Πρώτον ο FDA να αναθεωρήσει τις απόψεις του σχετικά με την ασφάλειά τους και δεύτερον το Κογκρέσο να αναστείλει την τρέχουσα απαγόρευση στον FDA για ερευνητική χρήση ανθρώπινων εμβρύων (Castro, 2016).

## **Καναδάς**

Σύμφωνα με τον νόμο περί υποβοηθούμενης ανθρώπινης αναπαραγωγής του 2004, η MRT θεωρείται ποινικό αδίκημα στον Καναδά. Ο νόμος απαγορεύει κάθε πρακτική που εισάγει κληρονομικές αλλαγές στη βλαστική σειρά. Αυτό ισχύει τόσο για ερευνητικά όσο και για κλινικά πλαίσια. Το νομικό πλαίσιο υποστηρίζει πως κανένα πρόσωπο δεν μπορεί να τροποποιήσει εν γνώσει του το γονιδίωμα ενός εμβρύου *in vitro*, έτσι ώστε η αλλοίωση να μπορεί να μεταδοθεί στους απογόνους». Όποιος παραβιάσει αυτή την απαγόρευση τιμωρείται με πρόστιμο μέχρι 500 000 £ άρα 582.000€ ή φυλάκιση έως και 10 χρόνια (Noohi, 2021).

## **Αυστραλία**

Στην Αυστραλία, η συχνότητα εμφάνισης μεταλλάξεων mtDNA προβλέπεται να είναι τουλάχιστον 1:250, με πολλές οικογένειες να έχουν διαγνωστεί και πολλές όχι. Στην Αυστραλία, ο νόμος του 2002 περί απαγόρευσης της ανθρώπινης κλωνοποίησης για αναπαραγωγή απαγορεύει τη δημιουργία ανθρώπινου εμβρύου που περιέχει γενετικό

υλικό από περισσότερα από δύο πρόσωπα και απαγορεύει μάλιστα την τροποποίηση του γονιδιώματος ενός ανθρώπινου κυττάρου, όταν η αλλοίωση αυτή κληρονομείται μέσω της βλαστικής σειράς. Ωστόσο η καινούρια νομοθεσία του Ηνωμένου Βασιλείου το 2015, επηρέασε την Αυστραλιανή ερευνητική κοινότητα και ξεκίνησαν οι έρευνες. Η Αυστραλία πλέον έχει την κλινική και επιστημονική εμπειρογνωμοσύνη για να εισαγάγει τη δωρεά μιτοχονδρίων στο σύστημα Υγείας και προβλέπονται στο σύντομο μέλλον ιστορικές αλλαγές τις νομοθεσίας της (Dziadek, 2022).

## **Γερμανία**

Στην Γερμανία τα σημεία του νόμου είναι αντικρουόμενα και ερμηνεύονται διαφορετικά, αλλά σε γενικές γραμμές η μιτοχονδριακή αντικατάσταση απαγορεύεται. Η Γερμανία δεν διαθέτει ισχυρές διατάξεις που να ρυθμίζουν τις MRTs. Η ποινική ευθύνη των τεχνικών κρίνεται σύμφωνα με τον γερμανικό νόμο για την προστασία των εμβρύων. Σύμφωνα με τον Γερμανικό νόμο, όποιος μεταβιβάζει σε μια γυναίκα ένα ξένο μη γονιμοποιημένο ωάριο ή προσπαθεί να γονιμοποιήσει τεχνητά ένα ωάριο για άλλο σκοπό από την επίτευξη εγκυμοσύνης της γυναίκας από την οποία προήλθε το ωάριο, δηλαδή της δότριας στη προκειμένη περίπτωση, τιμωρείται με φυλάκιση έως και τριών ετών ή πρόστιμο. Ένα ωάριο θεωρείται ξένο σύμφωνα με τους Γερμανικούς κανονισμούς αν δεν προέρχεται από τη γυναίκα για την οποία προορίζεται. Σε περίπτωση που δεχτούμε ότι το πυρηνικό DNA από μόνο του καθορίζει αν το ωάριο είναι ξένο, τότε οι MRTs δεν παραβιάζουν το γερμανικό νόμο. Με βάση το δεύτερο μέρος του νόμου, η μεταφορά μητρικής ατράκτου δεν απαγορεύεται, ενώ η μεταφορά PNT απαγορεύεται βάσει του άρθρου 1 παράγραφος 2 καθώς η εγκυμονούσα δεν είναι η δότρια η οποία παράγει το ωάριο (Cohen I. G.-G., 2020).

## **Ελλάδα, Ουκρανία και Μεξικό**

Οι παραπάνω, αποτελούν χώρες στις οποίες διαπιστώνονται φαινόμενα ιατρικού τουρισμού, καθώς τα νομικά τους πλαίσια σχετικά με την αναπαραγωγή είναι λιγότερο αυστηρά και επιτρέπουν τις MRTs για κλινική εφαρμογή (Cohen I. G.-G., 2020). Ενώ ο πρωταρχικός στόχος των MRTs είναι να αποτρέψουν τη μετάδοση μιτοχονδριακών ασθενειών στις μελλοντικές γενιές, η τεχνική θα μπορούσε επίσης να χρησιμοποιηθεί σε



άλλα μη θεραπευτικά πλαίσια, όπως η «θεραπεία της στειρότητας» και η λεσβιακή μητρότητα, όπου μπορεί να προτιμάται η διατήρηση γενετικών δεσμών και με τις δύο μητέρες (Noohi, 2021). Στην Ελλάδα τον Απρίλιο του 2019 σημειώθηκε η πρώτη γέννηση παιδιού παγκοσμίως με μεταφορά μητρικής ατράκτου, για αντιμετώπιση υπογονιμότητας. Η τεχνική επιτεύχθηκε σε συνεργασία με επιστημονική ομάδα της Ισπανίας και εγκρίθηκε από την Εθνική Αρχή Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής και το θεσμικό συμβούλιο αξιολόγησης του Μαιευτηρίου ΙΑΣΩ. Η MST λοιπόν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία προβλημάτων υπογονιμότητας που σχετίζονται με κακή ποιότητα ωαρίων. Οι γυναίκες πρέπει να είναι κάτω των 40 ετών, να έχουν διαγνωστεί με προβλήματα υπογονιμότητας λόγω κακής ποιότητας ωαρίων και να είχαν τουλάχιστον δύο αποτυχημένες προσπάθειες εξωσωματικής γονιμοποίησης. Στην Ουκρανία το 2017 καταγράφηκε η πρώτη γέννηση κοριτσιού μέσω μεταφοράς προπυρήνων για την αντιμετώπιση υπογονιμότητας του ζευγαριού και όχι λόγω μιτοχονδριακής νόσου της μητέρας. Στο Μεξικό πραγματοποιήθηκε η πρώτη παγκόσμια γέννηση παιδιού μέσω MST προκειμένου να αποφευχθεί μιτοχονδριακή διαταραχή (Cohen I. G.-G., 2020).

## **4.2. Ασφάλεια και αποτελεσματικότητα των μεθόδων**

Όσον αφορά στην ασφάλεια των θεραπειών για τα παιδιά που έχουν συλληφθεί με MRT και έχουν τρεις γενετικούς συνεισφέροντες, δύο είναι οι κυρίαρχες ανησυχίες. Η πρώτη ανησυχία αναφέρεται στο ότι τα παιδιά που έχουν συλληφθεί με MRT είναι πιθανό να βιώσουν κάποια μορφή ψυχοκοινωνικής διαταραχής ως αποτέλεσμα των γενετικών τους δεσμών με τρία άτομα. Η ανάπτυξη της ταυτότητάς τους και η ψυχοκοινωνική τους εξέλιξη είναι πιθανό να επηρεάζονται, παρόλο που αυτός ο ισχυρισμός ασφάλειας είναι αμφισβητήσιμος. Η δεύτερη ανησυχία περιλαμβάνει ότι η σωματική ευεξία των παιδιών που έχουν γεννηθεί με τέτοια θεραπεία είναι πιθανό να υποφέρει λόγω των τριών συνεισφερόντων. Έτσι υπάρχει πιθανότητα το mtDNA της δότριας να αποτύχει να λειτουργεί ομαλά με τα πυρηνικά γονίδια των γονέων. Εάν το mtDNA αποδειχτεί ασυμβίβαστο με το πυρηνικό DNA το παιδί μπορεί να υποφέρει από επιπλοκές στην υγεία του. Μία επιπλέον ανησυχία είναι ότι κατά τη διάρκεια των PNT και MST μερικά

από τα μιτοχόνδρια της μητέρας με την νόσο θα μπορούσαν να μεταφερθούν στο εμφυτευόμενο έμβρυο. Η μεταφορά μιας πολύ μικρής ποσότητας νοσούντος mtDNA μπορεί να αποτελέσει κίνδυνο για το έμβρυο, είναι πιθανό μάλιστα να επηρεάσει σοβαρά την υγεία των μετέπειτα απογόνων του (Appleby, 2015).

Ένα γεγονός το οποίο σχετίζεται άμεσα με τις ανησυχίες για την ασφάλεια των MRTs είναι ότι για να πραγματοποιηθούν χρησιμοποιούνται διαφορετικά υλικά από ότι στην κλασική IVF. Για παράδειγμα, στη μεταφορά προπυρηνίων χρησιμοποιείται νοκοδαζόλη ώστε να διατηρηθεί ο κυτταρικός σκελετός μετά την διείσδυση των προπυρήνων. Τα μέσα χρησιμοποιούνται στην έρευνα εδώ και πολλά χρόνια. Στην κλινική ωστόσο πράξη οι γνώσεις μας για αυτά είναι περιορισμένες. Η δοσολογία των παραγόντων σχετίζεται άμεσα με τις συνέπειες, οπότε οι παρενέργειες πολύ πιθανό να επιλύονται. Παράλληλα υπάρχει η δυνατότητα να αφαιρεθούν τα γονιμοποιημένα ζυγωτά από την γυναίκα και να μην της προκαλέσουν περεταίρω προβλήματα.

Η αποτελεσματικότητα των μεθόδων οφείλεται στις γνώσεις, την προηγούμενη εμπειρία και τη δεξιοτεχνία του επιστήμονα που τις χειρίζεται. Η μιτοχονδριακή ετεροπλασία εξαρτάται πολύ περισσότερο από τον σωστό χειρισμό του επιστήμονα παρά από την τεχνική (Brandt, 2016).

Η μακροπρόθεσμη παρακολούθηση των παιδιών που γεννιούνται είναι ζωτικής σημασίας για την επιβεβαίωση της ασφάλειας και της αποτελεσματικότητας της δωρεάς μιτοχονδρίων. Τόσο οι ασθενείς όσο και οι οικογένειές τους ενθαρρύνονται να παρακολουθούνται από ομάδες επιστημόνων ξεκινώντας από τους προγεννητικούς ελέγχους κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης μέχρι τη λεπτομερή νευροαναπτυξιακή αξιολόγηση του παιδιού σε ηλικία 18 μηνών. Τα παιδιά μπορούν να συνεχίσουν να εξετάζονται από παιδίατρο ειδικό στις μιτοχονδριακές νόσους μέχρι την ηλικία των 5 ετών κατόπιν αιτήματος από τους γονείς. Παρέχονται έτσι τόσο στους γονείς όσο και στην επιστήμη μακροπρόθεσμα δεδομένα σχετικά με το νευροαναπτυξιακό αποτέλεσμα (Craven L. M., 2018).

### 4.3. Βιοηθικά ζητήματα

Οι MRTs εγείρουν μία σειρά βασικών βιοηθικών ζητημάτων. Αρχικά, λόγω της μεγάλης ανάγκης για έρευνες και κλινικές εφαρμογές, η αύξηση του αριθμού των δωτών ωαρίων θα ήταν εξέχουσας σημασίας. Η αύξηση αυτή προϋποθέτει την εφαρμογή κανονισμού που εγγυάται την ασφάλεια και ευημερία της δότριας προσφέροντάς της την κατάλληλη υποστήριξη και περιορίζοντας τον αριθμό των δωρεών ανά δότη ώστε να αποφευχθεί το σύνδρομο υπερδιέγερσης ωοθηκών. Η διέγερση των ωοθηκών θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί καταχρηστικά για επαγγελματικούς σκοπούς. Λόγω του κινδύνου εξαναγκασμού και εκμετάλλευσης ορισμένων γυναικών, απαιτείται να θεσπιστούν κανονισμοί προστασίας τους.

Ένα από τα κυριότερα ηθικά ζητήματα των μεθόδων είναι ότι τα παιδιά που γεννιούνται με την χρήση τους έχουν γενετικό δεσμό με τρία άτομα: τους γονείς και την δότρια. Στην πραγματικότητα, λαμβάνοντας υπόψη το ελάχιστο ποσοστό DNA που συνεισφέρουν τα μιτοχόνδρια (0,1%), δεν φαίνεται λογικό να θεωρείται ο δότης ως τρίτος πρόγονος (ή δεύτερη μητέρα). Όσον αφορά στο πιθανό ενδιαφέρον του παιδιού να επικοινωνήσει με τον δότη ή το αντίστροφο, οι τεχνικές δωρεάς μιτοχονδρίων πρέπει να ρυθμίζονται νομικά, έτσι ώστε να διασφαλίζονται θέματα εμπιστευτικότητας και πιθανής επαφής με τους δότες (Gómez-Tatay, 2017).

Ένα επιπλέον ηθικό και ταυτόχρονα νομικό ζήτημα σχετίζεται με την πιθανότητα γέννησης παιδιού με μη βέλτιστη υγεία λόγω μιτοχονδριακής διαταραχής, στο οποίο ωστόσο εφαρμόστηκε MRT. Υπάρχει η πιθανότητα το ζευγάρι που γέννησε το παιδί να ασκήσει επιτυχώς αγωγή εναντίον εκείνων που παρείχαν τη θεραπεία η οποία δεν πέτυχε; Η απάντηση είναι όχι, καθώς αρχικά τα νομοθετικά πλαίσια περιλαμβάνουν την ανάγκη για το άτομο να δείξει ότι έχει υποστεί τόσο σοβαρή βλάβη που θα ήταν καλύτερα να μην έχει γεννηθεί. Επίσης, το παιδί που γεννήθηκε με την μιτοχονδριακή βλάβη δεν γνωρίζει πως θα γεννιόταν εάν δεν είχε εφαρμοστεί σε αυτό η θεραπεία. Άρα δεν μπορούν να ισχυριστούν ότι υπέστη βλάβη από τη χρήση της. Επιπλέον οι τεχνολογίες βρίσκονται ακόμα σε πειραματικό στάδιο με πιθανότητα να αποβεί επικίνδυνη για το έμβρυο ανεξαρτήτως από το πόσο καλά εφαρμόζεται. Είναι επιλογή των γονέων να προσχωρήσουν στη θεραπεία παρόλο που γνωρίζουν το πειραματικό στάδιό της.

Η καταστροφή ορισμένων ωαρίων ή εμβρύων κατά τις μιτοχονδριακές θεραπείες αποτελεί ένα μεγάλο ηθικό πρόβλημα. Στη μεταφορά μητρικής ατράκτου καταστρέφονται μη γονιμοποιημένα ωάρια ενώ στην προπυρηνική μεταφορά καταστρέφονται γονιμοποιημένα έμβρυα. Η ηθική συνέπεια των πράξεων αξιολογείται με βάση την ηθική αξία που δίνεται στο έμβρυο. Με βάση τη λογική, το ζευγάρι αποδέχεται έμμεσα την καταστροφή των ωαρίων-εμβρύων προκαλώντας μία εκ προθέσεως καταστροφή ανθρώπινων εμβρύων (Palacios-González, 2017). Η φιλελεύθερη, η συντηρητική και η σταδιακή, αποτελούν τρεις απόψεις με τις οποίες καταλήγουμε στην ηθική αξία των ανθρώπινων εμβρύων. Με βάση την φιλελεύθερη άποψη, και οι δυο τεχνικές θεωρούνται ηθικά ισοδύναμες. Υποστηρίζεται ότι τα ανθρώπινα έμβρυα δεν έχουν ηθική αξία διότι δεν είναι πρόσωπα τα οποία έχουν γεννηθεί και το ότι ανήκουν στο ανθρώπινο είδος δεν τους προσφέρει πλεονέκτημα. Η άποψη αυτή λοιπόν υποστηρίζει ότι η καταστροφή ωαρίων και εμβρύων και στις δυο τεχνικές θεωρείται ηθικά αμελητέα (Sinnott-Armstrong, 1999). Η συντηρητική άποψη έχει υποστηρικτές του εντελώς αντίθετου άκρου και υποστηρίζει πως τα έμβρυα έχουν πολύ μεγάλη ηθική αξία και η εκ προθέσεως καταστροφή τους ομοιάζει με ανθρωποκτονία. Η σταδιακή άποψη θεωρεί πως η ηθική αξία του εμβρύου μεγαλώνει όσο αυξάνονται και οι μήνες της εγκυμοσύνης. Επομένως ένα έμβρυο γονιμοποιημένο ή μη που δεν έχει καν εμφυτευτεί στην μήτρα της μητέρας έχει ελάχιστη ηθική αξία. Με βάση τις παραπάνω παραδοχές, λαμβάνοντας υπόψη ότι οι MRTs είναι ο μοναδικός τρόπος μία γυναίκα να αποκτήσει έναν υγιή απόγονο, η μεταφορά μητρικής ατράκτου είναι ηθικά προτιμότερη (Scott, 2008).

Επί του παρόντος δεν υπάρχουν στοιχεία που να καταδεικνύουν εάν πιο ασφαλής είναι η μεταφορά μητρικής ατράκτου ή η προπυρηνική μεταφορά. Η απόφαση για την χρησιμοποίηση μίας τεχνικής λαμβάνεται τόσο από την κλινική όσο και από τους γονείς. Πολλοί ασθενείς προτιμούν να επιλέγουν την MST έναντι της PNT για θρησκευτικούς λόγους για να αποφύγουν την καταστροφή ενός ζυγωτού. Οι έρευνες ωστόσο που βελτιώνουν το MST συντελούν στην καταστροφή πολλών εμβρύων. Επίσης η βιοψία στο στάδιο της βλαστοκύστης για τον προεμφυτευτικό γενετικό έλεγχο οδηγεί στην καταστροφή εμβρύων που κρίνονται ακατάλληλα για μεταφορά ή κρυοσυντήρηση. Επομένως η δωρεά μιτοχονδρίων θα μπορούσε να εγείρει λιγότερες ηθικές ανησυχίες

από ότι η PGD εάν επέτρεπε τη δημιουργία και την καταστροφή λιγότερων εμβρύων (Craven L. M., 2018).

#### **4.4. Επιλογή φύλου**

Ένα επιπλέον θέμα που σχετίζεται με την ηθική προσέγγιση των μεθόδων είναι η επιλογή φύλου κατά την οποία Ηνωμένο Βασίλειο και ΗΠΑ έχουν διαφορετικές απόψεις. Στην Αμερική, η επιτροπή των Εθνικών Ακαδημιών Επιστήμης, Μηχανικής και Ιατρικής (NASEM) υποστηρίζει τον περιορισμό των αρχικών κλινικών ερευνών στον άνθρωπο σε αρσενικά έμβρυα. Το επιχείρημα των ΗΠΑ για αυτή την σκέψη είναι ότι επειδή η μιτοχονδριακή κληρονομικότητα είναι αποκλειστικά μητρικής προέλευσης η χρήση μόνο αρσενικών εμβρύων εμποδίζει τις τεχνικές μιτοχονδριακής μεταφοράς να είναι μια γενετική τροποποίηση «βλαστικής σειράς» με τους επακόλουθους θεωρητικούς κινδύνους για τις μελλοντικές γενιές. Ωστόσο, η Αρχή Ανθρώπινης Γονιμοποίησης και Εμβρυολογίας του Ηνωμένου Βασιλείου (HFEA) στράφηκε εναντίον της πολιτικής άποψης των αρσενικών εμβρύων με το σκεπτικό ότι η επιλογή φύλου μετά από μιτοχονδριακή αντικατάσταση θα ήταν μία επιπλέον παρέμβαση για τα έμβρυα μέσω της επιπλέον βιοψίας που απαιτείται για την επιλογή φύλου, προκαλώντας τους επιπλέον κινδύνους. Η HFEA λοιπόν δίνει προτεραιότητα στους βραχυπρόθεσμους κινδύνους ενώ η NASEM δίνει μεγαλύτερη έμφαση στους μακροπρόθεσμους κινδύνους και τη «γονιδιακή δεξαμενή». Ένας επιπλέον κίνδυνος με την επιλογή αρσενικών γαμετών είναι ότι λόγω της μείωσης των διαθέσιμων ωαρίων από τη δότρια μόνο στα αρσενικούς γαμέτες, υπάρχει ο κίνδυνος αποτυχίας της εξωσωματικής γονιμοποίησης.

Τόσο η HFEA όσο και η NASEM υποστηρίζουν ότι η θεραπείες αποκατάστασης μιτοχονδρίων είναι μια μορφή κληρονομικής τροποποίησης. Στο Ηνωμένο Βασίλειο πιστεύουν πως οι MRTs έχουν επιπτώσεις στη βλαστική σειρά, απορρίπτουν όμως ότι σχετίζονται με γενετική τροποποίηση. Για αυτούς η γενετική τροποποίηση περιλαμβάνει κληρονομική τροποποίηση μόνο πυρηνικού DNA. Η Αμερική αντίστοιχα θεωρεί ότι η γενετική τροποποίηση είναι «αλλαγές στο γενετικό υλικό μέσα σε ένα κύτταρο» και η τροποποίηση της βλαστικής σειράς είναι «ανθρώπινη κληρονομική γενετική τροποποίηση». Ισχυρίζονται έτσι ότι οι MRTs περιλαμβάνουν γενετική τροποποίηση,

αποτελούν όμως τροποποίηση βλαστικής σειράς μόνο εάν χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή θηλυκών απογόνων» (Newson, 2016).

#### **4.5. Οικονομικά ζητήματα**

Από τις πολύ σημαντικές παραμέτρους που εξετάζει ένα ζευγάρι πριν προχωρήσει σε MRT είναι τα θέματα κόστους και χρηματοδότησης τους. Οι κανονισμοί που έχει δημοσιεύσει το Τμήμα Υγείας του Ηνωμένου Βασιλείου εκτιμάνε το κόστος των MRTs: Κάθε κύκλος θεραπείας αντικατάστασης μιτοχονδρίων χρησιμοποιεί πόρους ισοδύναμους με δυο γύρους τυπικής εξωσωματικής γονιμοποίησης (λόγω της ανάγκης ωοληψίας τόσο από την μητέρα όσο και από την δότρια) και επιπλέον ένα γύρο προεμφυτευτικής γενετικής διάγνωσης για τον έλεγχο παρουσίας ευρημάτων μιτοχονδριακής νόσου στο εμφυτευόμενο έμβρυο. Έτσι το εκτιμώμενο κόστος κάθε γύρου MRTs είναι 20.000 £ άρα περίπου 23.000 €. Ωστόσο, η επιτυχής σύλληψη αναμένεται να απαιτήσει τέσσερις κύκλους, καθώς το ποσοστό επιτυχίας εκτιμάται ότι είναι 25% ανά κύκλο. Επομένως το εκτιμώμενο κόστος μιας επιτυχούς θεραπείας που θα οδηγήσει σε γέννηση εάν οι γυναίκες δεν παρουσιάσουν κάποιο πρόβλημα γονιμότητας είναι 80.000 £ άρα περίπου 93.000 €. Το τελικό κόστος ποικίλει ανάλογα με τον πάροχο και την θεραπεία.

Διαπιστώνουμε λοιπόν πως το κόστος είναι πολύ υψηλό έως και εξωπραγματικό για πολλά ζευγάρια ειδικά εάν οι MRTs δεν χρηματοδοτούνται από το Εθνικό Σύστημα Υγείας. Αρκετά είναι τα ζευγάρια που ενώ έχουν γεννήσει υγιές παιδί, στο παρελθόν όμως είχαν χάσει παιδί λόγω μιτοχονδριακής διαταραχής, επιλέγουν να παραβλέψουν το τελευταίο βήμα του PGD πριν της εμφύτευσης, λόγω κόστους 7.000-13.000 £ ανά κύκλο άρα 8.000-15.000€. Η PGD χρηματοδοτείται από το σύστημα Υγείας μόνο υπό συγκεκριμένες περιπτώσεις. Η χρηματοδότηση δεν είναι εφικτή εάν το ζευγάρι είχε ήδη προηγούμενο υγιές παιδί, πράγμα που συνέβη στις παραπάνω περιπτώσεις. Οι οικονομικές πτυχές και τα θέματα χρηματοδότησης MRTs απαιτείται να συζητηθούν περισσότερο ώστε να είναι πιο ευνοϊκές για τους απλούς πολίτες (Herbrand, 2017).

## 4.6. Κοινωνικά ζητήματα

Η πρόσβαση στις θεραπείες μιτοχονδριακής υποκατάστασης σχετίζεται άμεσα με κοινωνικές αξίες όπως η ισότητα των πολιτών σε ιατρικές θεραπείες. Οι MRTs είναι οικονομικά δαπανηρές θεραπείες που συνήθως προτιμούν πολίτες με μεγαλύτερη οικονομική αποκατάσταση, που έχουν πρόσβαση στην ασφάλιση υγείας, και τα οικονομικά μέσα για την πληρωμή υπηρεσιών που δεν καλύπτονται από ασφάλιση. Είναι γεγονός ότι οι γυναίκες χαμηλής κοινωνικοοικονομικής κατάστασης περιθωριοποιούνται από τις αναπαραγωγικές θεραπείες θεωρώντας τον εαυτό τους ξένο προς όλες αυτές. Η πραγματοποίηση θεραπείας πέρα από την οικονομική ευχέρεια απαιτεί επίσης παρατεταμένη παραμονή μακριά από την εργασία και την οικογενειακή ζωή. Οι περισσότερες αναπτυγμένες τεχνολογίες είναι πιο άμεσα διαθέσιμες σε άτομα υψηλής κοινωνικοοικονομικής κατάστασης, με αποτέλεσμα οι MRTs να πλήττουν περαιτέρω την ισότητα μίας κοινωνίας (Claiborne A. E., 2016).

Ένα επιπλέον σοβαρό κοινωνικό ζήτημα αφορά την εκτεταμένη χρήση των MRTs συμπεριλαμβανομένης της χρήσης τους για επιστημονικά αναπόδεικτους ή δυνητικούς σκοπούς βελτίωσης. Η γυναικεία ιδιοπαθής ή σχετιζόμενη με την ηλικία υπογονιμότητα είναι υποψήφιος λόγος για εκτεταμένη χρήση MRTs, και διευρύνει σημαντικά την ομάδα ενδιαφερομένων. Οι μελέτες που απαιτούνται να επιτευχθούν για την εισαγωγή νέων μεθόδων στο χώρο υγείας είναι πληθώρες και απαιτούν πολύ χρόνο και εξειδίκευση. Πρωτού αποφασιστεί οποιαδήποτε θεραπεία πρέπει να διερευνηθεί εάν προσαρμόζεται σε ηθικά, κοινωνικά και πολιτικά θέματα (National Academies of Sciences, 2016).

## 4.7. Επιστημονικά ζητήματα

Οι ερευνητικοί σκοποί για τους οποίους επιτρέπεται η έρευνα εμβρύων περιλαμβάνουν την ανάπτυξη θεραπειών για σοβαρές ασθένειες ή άλλες σοβαρές ιατρικές καταστάσεις όπως η δωρεά μιτοχονδρίων για αποφυγή μετάδοσης της νόσου mtDNA. Πειράματα επανειλημμένα δείχνουν πως οι διαδικασίες που εφαρμόζονται σε έμβρυα ποντικών διαφέρουν σε πολλά σημεία από τα ανθρώπινα έμβρυα, τονίζοντας έτσι την

αναγκαιότητα έρευνας ανθρώπινων εμβρύων πριν από κλινικές εφαρμογές. Η έρευνα σε μη φυσιολογικά γονιμοποιημένα έμβρυα περιορίζεται λόγω του ότι τα μη φυσιολογικά έμβρυα έχουν περιορισμένη ικανότητα ανάπτυξης, καθιστώντας δύσκολη την αξιολόγηση τόσο της ασφάλειας όσο και της αποτελεσματικότητας της τεχνικής.

Η δημιουργία ανθρώπινων εμβρύων για ερευνητικούς σκοπούς επιτρέπεται στο Ηνωμένο Βασίλειο, μία από τις λίγες χώρες που το επιτρέπουν από το νόμο. Υποστηρίζεται πως η γονιμοποίηση των δωρηθέντων ωαρίων ειδικά για ερευνητικούς σκοπούς θα πρέπει να επιτρέπεται προκειμένου να αποφεύγεται ο περιορισμός της έρευνας σε εφεδρικά έμβρυα όπως τα μη φυσιολογικά γονιμοποιημένα. Η χρήση ανθρώπινων εμβρύων στον τομέα της έρευνας αυξάνει την εγκυρότητα των μελετών και τα στατιστικά στοιχεία των επιστημόνων για τις μεθόδους.

Η πλειοψηφία των εμβρύων που χρησιμοποιούνται στην έρευνα δωρίζονται από ασθενείς που υποβάλλονται σε θεραπεία γονιμότητας. Πρόκειται για γυναίκες που δωρίζουν τα μισά από τα ωάρια που συλλέγονται κατά τη διάρκεια ενός κύκλου εξωσωματικής γονιμοποίησης είτε για μείωση του κόστους θεραπείας τους στον ιδιωτικό τομέα είτε για έναν επιπλέον κύκλο εξωσωματικής γονιμοποίησης εάν δεν καταφέρουν να έχουν επιτυχή σύλληψη στους κύκλους που προσφέρει το Εθνικό Σύστημα Υγείας (NHS).

Μία δεύτερη πηγή ανθρώπινων ωαρίων για τη μελέτη δωρεάς μιτοχονδρίων είναι οι δότες ωαρίων που δεν είναι ασθενείς και ζουν στη βορειοανατολική Αγγλία, οι οποίοι δωρίζουν τα ωάρια τους αποκλειστικά για αυτόν το ερευνητικό σκοπό. Περιλαμβάνει μία πολύ δεσμευτική πολύπλοκη και χρονοβόρα διαδικασία κατά την οποία έχει κριθεί ηθικά αποδεκτό να παρέχεται στις δώτριες ωαρίων η κατάλληλη οικονομική αποζημίωση για το χρόνο και την ταλαιπωρία τους. Εξάλλου η οικονομική αυτή ενίσχυση αποτελεί σημαντικό κίνητρο για τις γυναίκες. Ο ρόλος των δωτών ωαρίων στην έρευνα είναι αξιοσημείωτος και χωρίς αυτές, οι τεχνικές δεν θα είχαν φτάσει στο ερευνητικό επίπεδο που βρίσκονται σήμερα (Craven L. M., 2018).

Η κύριες ανησυχίες και ενστάσεις της ιατρικής κοινότητας είναι οι εξής : Αρχικά οι θεραπείες μιτοχονδριακής υποκατάστασης αφενός δεν διασφαλίζουν στα σίγουρα την πρόληψη κάποιας μιτοχονδριακής διαταραχής και αφετέρου δεν τις θεραπεύουν από τη στιγμή που τις φέρει κάποιος φορέας. Ταυτόχρονα, η διαδικασία συνήθως οδηγεί σε μια μεγάλη ποικιλία ετεροπλάσματικών φορτίων mtDNA στα νεογνά που μειώνουν τα



αποτελέσματα. Επιπλέον η αβεβαιότητα πολλών ειδικών λόγω ελλιπών γνώσεων θα μπορούσε να βλάψει τρία άτομα: το νεογνό, την μητέρα και την δότρια. Παράλληλα, η μιτοχονδριακή ασυμβατότητα δότριας και ασθενούς μπορεί να προκαλέσει ανεπανόρθωτες βλάβες στην υγεία του νεογνού (Sharma H. , 2020).

#### **4.8. Ανωνυμία δότριας στην δωρεά μιτοχονδρίων**

Πολλές δικαιοδοσίες δίνουν στους γενετικούς απογόνους των δοτών ωαρίων και σπέρματος το δικαίωμα άντλησης και ταυτοποίησης πληροφοριών για τους αντίστοιχους δότες τους αφότου οι απόγονοι φτάσουν στην ηλικία των 18 ετών. Το ερώτημα του εάν τα παιδιά που γεννιούνται με MRTs πρέπει να έχουν παρόμοια δικαιώματα, εξαρτάται από το εάν η μιτοχονδριακή δωρεά μοιάζει περισσότερο με την δωρεά ωαρίων, αίματος, ή οργάνων και ιστών. Η ρυθμιστική αρχή γονιμότητας του Ηνωμένου Βασιλείου έχει συμβουλέψει πως οι δότες μιτοχονδρίων οφείλουν να έχουν παρόμοια δικαιώματα με αυτά των δοτών ιστών.

Κάποιες από τις διαφορές μεταξύ κλασικών δοτών ωαρίων και δοτών μιτοχονδρίων, οι οποίες δικαιολογούν τη μη παροχή δικαιώματος γνώσης στα παιδιά που γεννούνται με MRTs είναι οι εξής: Πρώτον στην κλασική δωρεά γαμετών, οι απόγονοι είναι πιθανό να έχουν πολύ παρόμοια εξωτερικά χαρακτηριστικά με τους δότες τους. Αυτό δεν ισχύει για τη μεταφορά μιτοχονδρίων καθώς παρέχουν ελάχιστη ποσότητα γονιδιώματος στον απόγονο. Δεύτερον, το πυρηνικό DNA είναι συστατικό της γενετικής ταυτότητας ενός ατόμου, ενώ το μιτοχονδριακό δεν είναι. Η προσωπική ταυτότητα ενός παιδιού που έχει γεννηθεί με κλασική δωρεά γαμετών επηρεάζεται στο μέγιστο καθώς κληρονομεί χαρακτηριστικά από τον δότη του. Τρίτον η απαγόρευση αποκάλυψης του δότη στη δωρεά γαμετών συνεπάγεται σοβαρή εξαπάτηση σε αντίθεση με την δωρεά μιτοχονδρίων. Αυτό συμβαίνει διότι όταν τα παιδιά που συλλαμβάνονται με κλασική δωρεά γαμετών δεν ενημερώνονται για το γεγονός, αυτό μπορεί να συνεπάγεται σαν μεταβίβαση ενός από τους κοινωνικούς γονείς του ως γενετικού γονέα.

Ενάντια στα παραπάνω, δεν γνωρίζουμε επακριβώς τον ρόλο του μιτοχονδριακού DNA στην σωματική ανθρώπινη ανάπτυξη. Εάν μέσω μελετών κάποια στιγμή προκύψει πως το mtDNA συνεισφέρει στην ανάπτυξη και έχει μεγαλύτερο

βιολογικό ρόλο από ότι πιστεύουμε τώρα, μπορεί να χορηγηθεί το δικαίωμα στους απογόνους να γνωρίσουν τον δότη τους (Newson A. , 2016).

#### **4.9. Η σημασία των γενετικά συγγενών παιδιών**

Για ένα μεγάλο εύρος γυναικών, η σημασία της κυοφορίας και την γέννησης συγγενών παιδιών σε σύγκριση με τεχνικές κλασικής εξωσωματικής γονιμοποίησης και υιοθεσίας, είναι ανεκτίμητη. Πολλές από αυτές θα έθεταν τους εαυτούς τους σε κίνδυνο, όπως για παράδειγμα δέκα νεαρές γυναίκες που τέθηκαν σε κίνδυνο μέσω της εγγραφής και συναίνεσής τους σε μια μελέτη μεταμόσχευσης μήτρας, μια πολύωρη χειρουργική διαδικασία στην κλινική του Κλίβελαντ, μιας πόλης των ΗΠΑ. Μία από αυτές της γυναίκες υποβλήθηκε σε 9ωρη χειρουργική επέμβαση τον Φεβρουάριο του 2016 η οποία ωστόσο απέτυχε λόγω μόλυνσης απαιτώντας πρόσθετη χειρουργική επέμβαση για την αφαίρεση της εμφυτευμένης μήτρας (Pomrei, 2019).

Η γενετική συγγένεια των παιδιών με τους δυο γονείς τους, είναι μέρος της αντίληψης κάποιων ανθρώπων για τον παραδοσιακό σχηματισμό οικογένειας. Η φυσική μάλιστα ομοιότητα των παιδιών με τους γονείς τους έχει μεγάλη ψυχολογική και κοινωνική σημασία. Σε μία έρευνα που διεξήχθη σε γυναίκες-φορείς μιτοχονδριακών νόσων, το 52% θεώρησε ότι η κατοχή γενετικά συγγενών απογόνων ήταν «πολύ σημαντική», το 43% ως «κάπως σημαντική» και το 5% ως «μη σημαντική» (Claiborne A. E., 2016).

Αν και τα παιδιά που γεννιούνται με MRTs δεν κληρονομούν το mtDNA από τις μητέρες τους, η θεραπεία βοηθά τις γυναίκες να εκπληρώσουν μία βαθιά ριζωμένη επιθυμία τους να φέρουν στη ζωή ένα παιδί που φέρει μια σύνδεση nDNA μαζί τους. Η επαγγελματική επιτροπή, αναλαμβάνει να μελετήσει το ιστορικό και τις εξετάσεις μιας γυναίκας, να συνομιλήσει μαζί της και να κρίνει εάν υπάρχει δυνατότητα πραγματοποίησης μιτοχονδριακής αποκατάστασης. Σεβόμενοι πάντα την μεγάλη επιθυμία της γυναίκας να τεκνοποιήσει, οι επαγγελματίες οφείλουν να ελέγξουν και άλλες παραμέτρους θέτοντας σε προτεραιότητα την υγεία του εμβρύου (National, 2016).

## Κεφάλαιο 5: Έρευνες και στατιστική προσέγγιση μεθόδων

### 5.1. Έρευνα 1<sup>η</sup>: Οι γενετικοί σύμβουλοι

Η πρώτη ερευνητική μελέτη πραγματοποιήθηκε στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής και αφορά την εμπειρία, τις γνώσεις και τις απόψεις των γενετικών συμβούλων σχετικά με τις MRTs. Παράλληλα υπογραμμίζει την ανάγκη για αυξημένη εκπαίδευση σχετικά με τις θεραπείες στην κοινότητα γενετικής συμβουλευτικής. Ενώ η MRT εγκρίθηκε για χρήση στο Ηνωμένο Βασίλειο το 2015, η απαγόρευση της χρηματοδότησης του Κογκρέσου για έρευνα σχετικά με την «κληρονομική γενετική τροποποίηση» τη κατέστησε μη διαθέσιμη εντός των συνόρων των ΗΠΑ. Στην έρευνα, αξιολογείται η άποψη της κοινής γνώμης σχετικά με την απόφαση αυτή. Εκτιμάται μάλιστα εάν υπάρχει αλλαγή στις γνώσεις, τα συναισθήματα και την άνεση των γενετικών συμβούλων μετά την παροχή βασικών πληροφοριών σχετικά με την τεχνική της MRT, τους κινδύνους και τα παραδείγματα περιπτώσεων.

Ο πληθυσμός-στόχος για τη μελέτη ήταν 135 γενετικοί σύμβουλοι στη Βόρεια Αμερική. Το ερωτηματολόγιο που συντάχθηκε από την ερευνητική ομάδα περιλάμβανε αρχικά δημογραφικά στοιχεία. Στη συνέχεια είχε ερωτήσεις για την εμπειρία των γενετικών συμβούλων σχετικά με τις μιτοχονδριακές διαταραχές, τις γνώσεις τους για τις θεραπείες μιτοχονδριακής αντικατάστασης, την άνεση και σιγουριά τους να συμβουλεύουν τα ζευγάρια για αυτές καθώς και τις ανησυχίες τους. Οι συμμετέχοντες στο τέλος έλαβαν βασικές πληροφορίες σχετικά με τις τεχνικές MRTs, την απαγόρευση τους από τον FDA στις Ηνωμένες Πολιτείες και την πρώτη περίπτωση όπου η MRT χρησιμοποιήθηκε κλινικά. Μετά την παροχή πληροφοριών, ζητήθηκε από τους συμμετέχοντες να δηλώσουν το επίπεδο συμφωνίας τους σχετικά με το εάν πρέπει να προσφέρονται κλινικές δοκιμές και εάν οι MRTs εμπίπτουν στην κατηγορία της κληρονομικής γενετικής τροποποίησης, δεδομένου ότι δεν επιχειρεί να αλλάξει τα γονίδια ούτε στον πυρήνα ούτε στα μιτοχόνδρια.

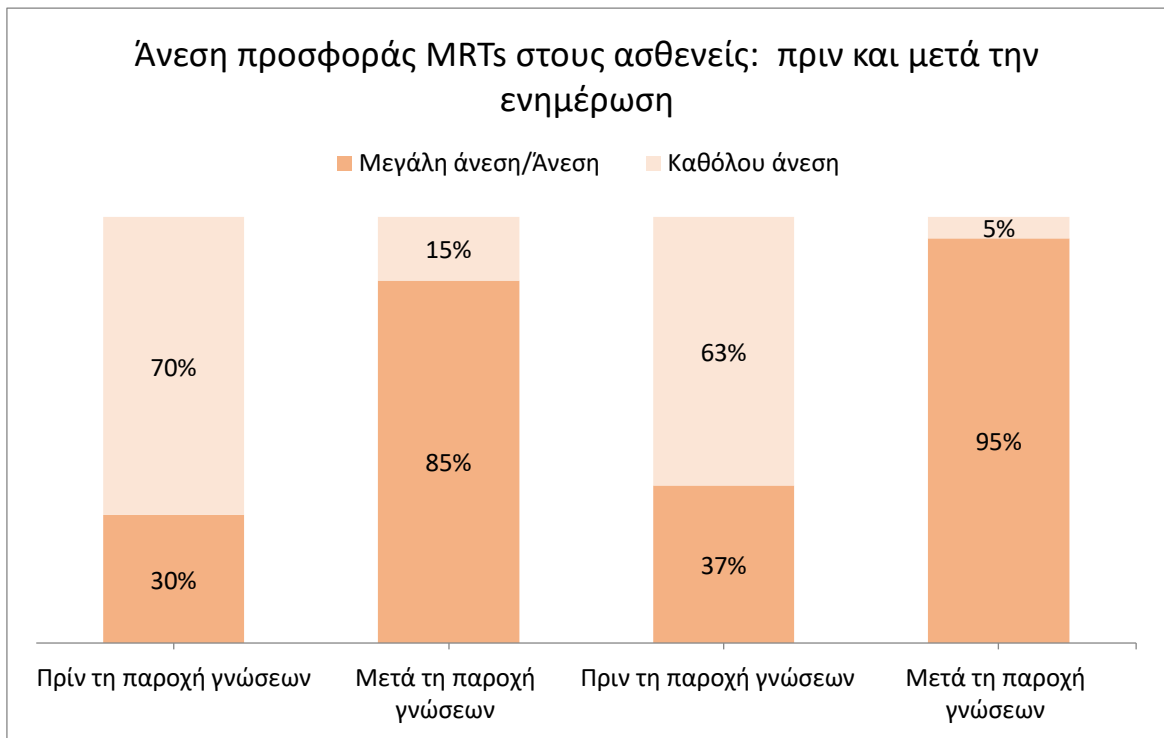
## Αποτελέσματα

Οι περισσότεροι συμμετέχοντες στατιστικά, ήταν γυναίκες (95,6%), λευκοί (96,3%) με μέση ηλικία  $34,49 \pm 9,72$  έτη.

Το πρώτο κομμάτι τις έρευνας αφορούσε την εμπειρία τους με τις μιτοχονδριακές παθήσεις. Το 55% των συμμετεχόντων είχαν παράσχει γενετική συμβουλευτική σε ασθενείς σχετικά με μιτοχονδριακές διαταραχές τα τελευταία 5 χρόνια. Ωστόσο μόνο το 12,5% ανέφερε πως οι ασθενείς ρωτούσαν συγκεκριμένα για τις MRTs ως επιλογή. Οι περισσότεροι συμμετέχοντες (72,2%) ήταν πολύ σίγουροι για την ικανότητά τους να συζητούν για το πρότυπο κληρονομικότητας των μιτοχονδριακών διαταραχών με τους ασθενείς, ενώ το 58% ήταν σίγουροι για την ικανότητά τους να συμβουλεύουν τους ασθενείς σχετικά με την ομοπλασία και την ετεροπλασία.

Το δεύτερο μέρος αφορούσε τις βασικές γνώσεις τους για τις MRTs. Το 94 % ανέφερε ότι είχαν ακούσει τον όρο «μωρό τριών γονέων» ενώ το 64% τον όρο «θεραπεία μιτοχονδριακής υποκατάστασης» αν και οι δύο όροι αντιπροσωπεύουν την ίδια τεχνική. Στους πρώτους το 70% ήταν αρκετά εξοικειωμένο με τον όρο ενώ στους δεύτερους μόλις το 58%. Όλοι οι συμμετέχοντες απάντησαν σωστά σε τουλάχιστον μία ερώτηση γνώσης και περισσότεροι από τους μισούς συμμετέχοντες απάντησαν σωστά σε όλες τις ερωτήσεις γνώσης. Οι περισσότεροι συμμετέχοντες γνώριζαν ότι η MRT ήταν διαθέσιμη σε άλλες χώρες (93%), ενώ το 26% των συμμετεχόντων δεν γνώριζε ότι το μωρό τριών γονέων και το MRT αντιπροσωπεύουν την ίδια τεχνική.

Το τρίτο μέρος αφορούσε την άνεση τους να ενημερώνουν για τα MRT, τη συμφωνία η διαφωνία τους για τις τεχνικές καθώς και τις ανησυχίες τους.



*Γράφημα 1: Άνεση σχετικά με την ενημέρωση για θεραπείες μιτοχονδριακής υποκατάστασης (MRTs). Οι δυο πρώτες στήλες αφορούν το MRT ως επιλογή εκτός των Ηνωμένων Πολιτειών ενώ οι δυο δεύτερες ως επιλογή εάν εγκριθεί στις Ηνωμένες Πολιτείες.*

Οι σύμβουλοι ρωτήθηκαν εάν οι MRTs θα πρέπει να εγκριθουν για κλινική χρήση στις Ηνωμένες Πολιτείες. Πριν την ενημέρωσή τους, το 36% συμφωνούσαν απόλυτα, το 8% διαφωνούσαν και οι υπόλοιποι αβέβαιοι. Μετά την ενημέρωσή τους το ποσοστό που συμφωνούσε κατέβηκε στο 28%, αυτό που διαφωνούσε ανέβηκε στο 22% και οι υπόλοιποι αβέβαιοι. Ύστερα ρωτήθηκαν εάν οι MRTs πρέπει να προσφέρονται σε όποιους θέλουν να το χρησιμοποιήσουν. Πριν την ενημέρωσή τους, το 17% συμφωνούσαν απόλυτα, το 56% διαφωνούσαν και οι υπόλοιποι αβέβαιοι. Μετά την ενημέρωσή τους το ποσοστό που συμφωνούσε παρέμεινε 17%, που διαφωνούσε ανέβηκε στη συντριπτική πλειοψηφία του 65% και οι υπόλοιποι αβέβαιοι. Στην ερώτηση εάν οι MRTs πρέπει να προσφέρονται μόνο σε γυναίκες υψηλού κινδύνου να αποκτήσουν παιδί με μιτοχονδριακή νόσο, το 85% ήταν απολύτως σύμφωνοι τόσο πριν όσο και μετά την προσφορά γνώσεων από την ερευνητική ομάδα. Αναφορικά με τις ανησυχίες τους, οι παρακάτω κυριάρχησαν :

- Υψηλό κόστος θεραπείας εκτός των Ηνωμένων Πολιτειών.
- Αβεβαιότητα για την ασφάλεια των MRT.

- περιορισμένη προσωπική γνώση ασθενών.

Οι συμμετέχοντες ενημερώθηκαν ότι η απαγόρευση του FDA για τις θεραπείες οφείλεται στους περιορισμούς χρηματοδότησης του Κογκρέσου για κληρονομικές γενετικές τροποποιήσεις. Ωστόσο, στην παρούσα μελέτη το 76% θεώρησαν ότι η MRT δεν εμπίπτει στην κατηγορία της κληρονομικής γενετικής τροποποίησης. Μετά την παροχή πληροφοριών σχετικά με το MRT, το 81% συμφώνησε απόλυτα ότι η MRT θα πρέπει να εγκριθεί από το FDA για κλινικές δοκιμές στις Ηνωμένες Πολιτείες, αλλά το 50% δεν ήταν σίγουρο.

### **Συμπεράσματα**

Αυτή η μελέτη είναι η πρώτη που διερευνά τις εμπειρίες, τις γνώσεις και τις απόψεις των γενετικών συμβούλων προς την MRT. Τα αποτελέσματα καταδεικνύουν την ανάγκη για περισσότερη εκπαίδευση σχετικά με την MRT μεταξύ των γενετικών συμβούλων και δείχνουν με βεβαιότητα ότι η παροχή εκπαίδευσης βοηθά στην ενημέρωση και, ως εκ τούτου, αλλάζει τις απόψεις των συμμετεχόντων. Αν και οι μισοί δεν ήταν βέβαιοι για την κλινική χρήση των θεραπειών στις ΗΠΑ, η πλειοψηφία υποστήριξε τις κλινικές δοκιμές. Η έγκριση από τον FDA των κλινικών δοκιμών στις Ηνωμένες Πολιτείες θα μπορούσε να παρέχει τα απαιτούμενα μακροπρόθεσμα δεδομένα σχετικά με την ασφάλεια, την αποτελεσματικότητα και την παρακολούθηση των παιδιών που γεννιούνται μέσω MRT. Η μεγαλύτερη ανησυχία των συμβούλων αφορά το πολύ υψηλό κόστος των θεραπειών. Τα θετικά αποτελέσματα στις κλινικές δοκιμές του MRT θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε ασφαλιστική κάλυψη, καθιστώντας το μια οικονομικά εφικτή επιλογή για ζευγάρια που διατρέχουν κίνδυνο να αποκτήσουν παιδί με μιτοχονδριακή νόσο (Aryamvally, 2021).

## **5.2. Έρευνα 2<sup>η</sup>: Γυναίκες-φορείς μεταλλάξεων mtDNA αλλά και δότριες μιτοχονδρίων**

Η παρούσα έρευνα πραγματοποιήθηκε το 2016 και χωρίστηκε σε δυο μέρη. Το πρώτο με θέμα τις θεραπείες μιτοχονδριακής αποκατάστασης αφορούσε γυναίκες που

διατρέχουν κίνδυνο να φέρουν μεταλλάξεις σημείων mtDNA και κατά συνέπεια να γεννήσουν απόγονο με μιτοχονδριακή νόσο. Οι γυναίκες-φορείς των μεταλλάξεων mtDNA συγκεντρώθηκαν μέσω της Κοινοπραξίας Μιτοχονδριακής Νόσου της Βόρειας Αμερικής, του Ιδρύματος Ηνωμένων Μιτοχονδριακών Νόσων και αφού δήλωσαν τη συγκατάθεσή τους απάντησαν στις ερωτήσεις του ερωτηματολογίου.

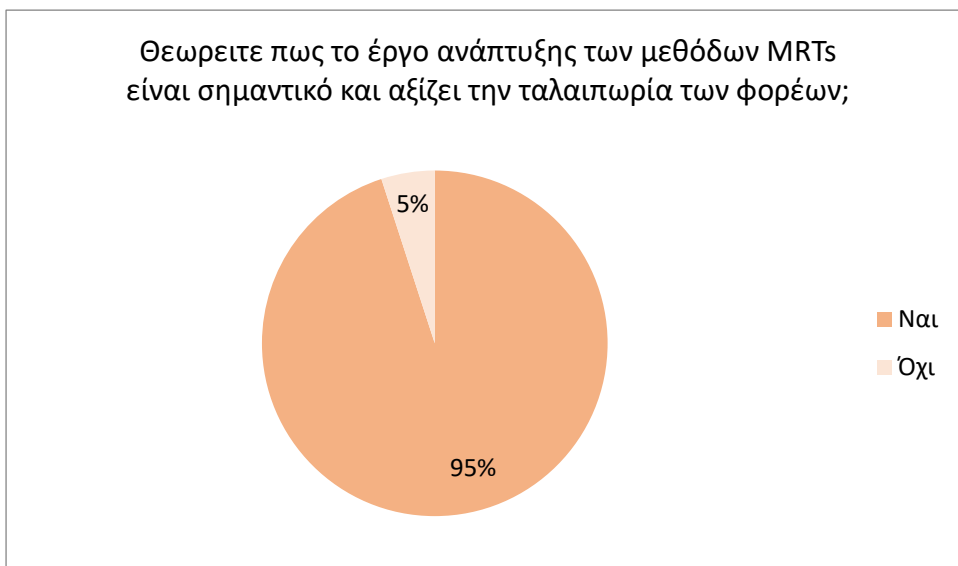
Το δεύτερο μέρος με θέμα ξανά τις θεραπείες μιτοχονδριακής υποκατάστασης αφορούσε υγιείς δότριες ωαρίων, ώστε να εκτιμηθεί εάν υποστηρίζουν την δωρεά, για την ανάπτυξη των θεραπειών και την δημιουργία εμφυτεύσιμου εμβρύου.

Τα αποτελέσματα ερμηνεύτηκαν από μια διεπιστημονική ομάδα που περιελάμβανε ιατρούς ερευνητές μιτοχονδριακών νόσων , κλινικό ιατρό εξωσωματικής γονιμοποίησης, βιολόγο βλαστικών κυττάρων ,κλινικό νευρολόγο ,δύο κλινικούς συντονιστές και τη βιοστατιστική ομάδα.

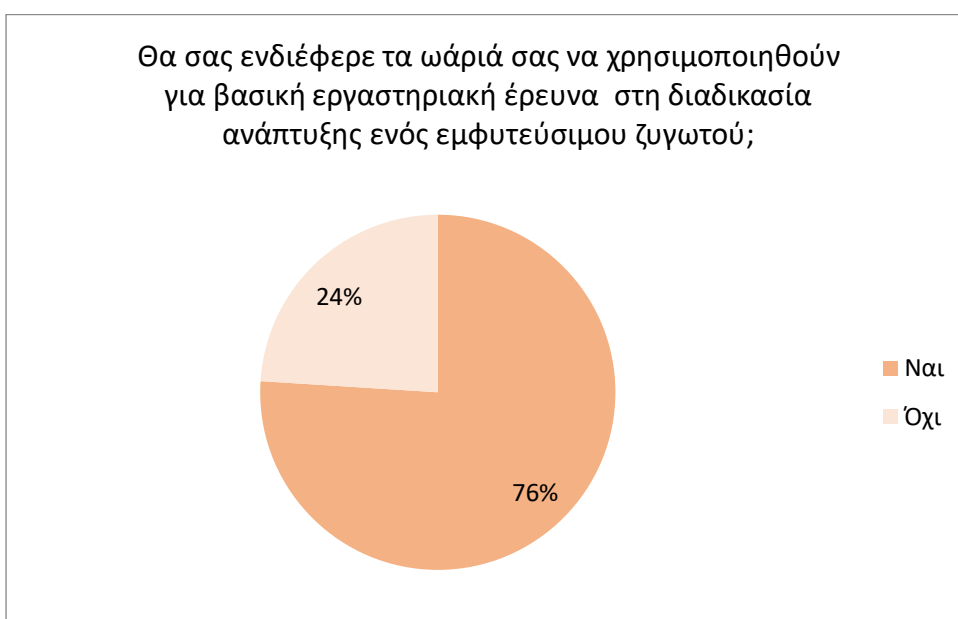
## **Αποτελέσματα**

Η έρευνα φορέων μιτοχονδριακών νόσων απαντήθηκε από 92 γυναίκες που ήταν ή κινδύνευαν να είναι φορείς νόσου. Μεταξύ των φορέων διαπιστώθηκαν 13 μεταλλάξεις από τις οποίες η πιο κοινή μπορεί να προκαλέσει μια σοβαρή νευρολογική διαταραχή γνωστή ως μιτοχονδριακή εγκεφαλομυοπάθεια, γαλακτική οξέωση και επεισόδια τύπου εγκεφαλικού επεισοδίου, συνήθως στην παιδική ηλικία ή στην πρώιμη ενήλικη ζωή.

Οι γυναίκες που βρίσκονταν σε αναπαραγωγική ηλικία, ρωτήθηκαν εάν είχαν σκεφτεί ποτέ να μην κάνουν παιδιά λόγω της μιτοχονδριακής τους ασθένειας και το 78% απάντησε θετικά. Παράλληλα, 73% των γυναικών που ήδη είχαν παιδιά διότι δεν γνώριζαν πριν ότι ήταν φορείς, δήλωσαν πως αν το γνώριζαν θα σκεφτόντουσαν να μην τεκνοποιήσουν, λόγω ανησυχίας της υγείας των παιδιών τους. Το 95% του συνόλου των γυναικών υποστήριξε τις MRTs και το 76% ενδιαφερόντουσαν να χρησιμοποιηθούν τα ωάρια τους για εργαστηριακή έρευνα. Η πλειοψηφία του 90% δήλωσε πως θα επιθυμούσαν να χρησιμοποιήσουν μία από τις τεχνικές μεταφοράς μητρικής ατράκτου ή προπυρηνικής μεταφοράς για να αποκτήσουν παιδιά.



Γράφημα 2: Ερώτηση στις γυναίκες-φορείς μιτοχονδριακών νόσων σχετικά με την σπουδαιότητα των MRTs.



Γράφημα 3: : Ερώτηση στις γυναίκες-φορείς μιτοχονδριακών νόσων σχετικά με το ενδιαφέρον τους για χρήση των ωαρίων τους σε ερευνητικό επίπεδο.

Η έρευνα σε δότριες μιτοχονδρίων απαντήθηκε από 112 γυναίκες που είχαν δωρίσει ωάρια μέσω μεγάλης κλινικής εξωσωματικής γονιμοποίησης. Από τις 112 δότριες ωαρίων, οι 103 (92%) δήλωσαν ότι θα δωρίσουν ωάρια για βασική εργαστηριακή έρευνα κατά την οποία δεν παράγονται βιώσιμα έμβρυα, ενώ οι 97 (87%) απάντησαν ότι θα δωρίσουν ωάρια για την παραγωγή εμφυτεύσιμων εμβρύων.



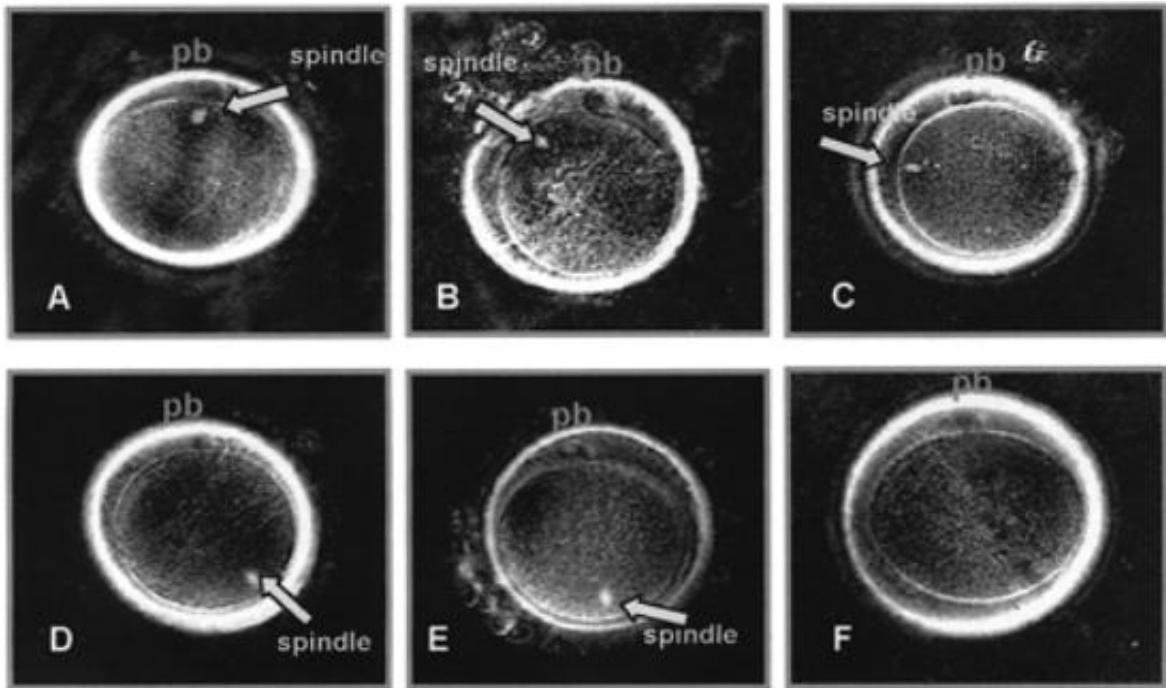
## Συμπεράσματα

Ένας περιορισμός της έρευνας είναι ότι διεξήχθη σε μία επιλεγμένη ομάδα ατόμων και συγκεκριμένα γυναίκες που ήταν πιθανό να φέρουν, ή έφεραν μεταλλάξεις mtDNA. Οι γυναίκες αυτές είναι πιθανό να έχουν επηρεαστεί από τη μετάλλαξη ή να έχουν δει από πρώτο χέρι τις καταστροφικές συνέπειες αυτών των μεταλλάξεων στα παιδιά τους. Αυτή η μελέτη καταδεικνύει το υψηλό επίπεδο ενδιαφέροντος για την ανάπτυξη αυτών των μεθόδων μεταξύ των γυναικών που πάσχουν από τις ασθένειες ή που κινδυνεύουν να φέρουν μεταλλάξεις mtDNA και την προθυμία των περισσότερων δοτών να παρέχουν ωάρια για την ανάπτυξη των θεραπειών. Λαμβάνοντας υπόψη το μεγάλο ενδιαφέρον των φορέων, τη σοβαρή αναπηρία και θνησιμότητα που φέρουν οι μιτοχονδριακές νόσοι, καθώς και την έλλειψη άλλων μεθόδων πρόληψης καθώς πρόκειται για γενετική ασθένεια, είναι απαραίτητο να διεξαχθούν πιο διεξοδικές μελέτες για την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα των μεθόδων μιτοχονδριακής αντικατάστασης (Engelstad, 2016).

### 5.3. Έρευνα 3<sup>η</sup>: Στατιστικά στοιχεία απεικόνισης μειωτικής ατράκτου με Polscope

Συλλέχθηκαν ωάρια από τις ωοθήκες 77 γυναικών φορέων, μέσης ηλικίας 32 ετών, ύστερα από συγκατάθεσή τους. Αρχικά η διέγερση ωοθηκών προκλήθηκε με γοναδοτροπίνες (μενοτροπίνη και ανταγωνιστή GnRH) χρησιμοποιώντας βραχύ ή μακρύ πρωτόκολλο. Όταν τα ωοθυλάκια έφτασαν στα 18mm χορηγήθηκε hCG. Ανακτήθηκαν ωάρια διακολπικά 36 ώρες μετά την χορήγηση και απογυμνώθηκαν από cumulus και corona radiata με επώαση σε υαλουρονιδάση. Μετά από 3 με 4 ώρες 626 ωάρια στη μετάφαση II που είχαν εξωθήσει το πρώτο πολικό σωματίο εξετάστηκαν από το Polscope. Ανάλογα με την γωνία που εμφάνιζε η άτρακτος με το PB1, τα ωάρια χωρίστηκαν σε 6 ομάδες:

A: ωάρια με άτρακτο ακριβώς κάτω από το PB1 , B: γωνία 0° έως 60° , Γ: 60° έως 120° , Δ: 120° έως 180° , E: 180° , Z: ωάρια χωρίς εμφανή άτρακτο.



Εικόνα 11: Μητρική άτρακτος σε ζωντανά ανθρώπινα ωάρια στο στάδιο μετάφασης II με Polscope λίγο πριν την μικρογονιμοποίηση. Παρουσιάζονται οι 6 ομάδες. Πηγή: Moon, J.-H., Hyun, C.-S., Lee, S.-W., Son, W.-Y., Yoon, S.-H., Lim, J.-H. (2003) 'Visualization of the metaphase II meiotic spindle in living human oocytes using the Polscope enables the prediction of embryonic developmental competence after ICSI', Human Reproduction, 18(4), pp. 817–820. DOI: 10.1093/humrep/deq165, 15/05/2024

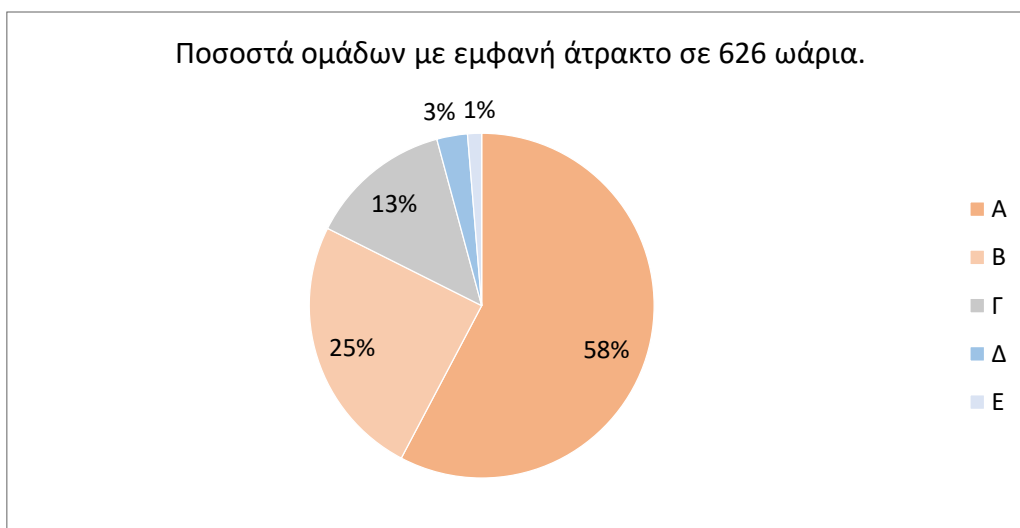
Κατά την ICSI στα ωάρια με εμφανή άτρακτο έγινε έγχυση σπέρματος σε οποιοδήποτε σημείο ανεξάρτητα από το που βρίσκεται το PB1, αρκεί να μην επιβαρυνθεί η άτρακτος. Κατά την ICSI στα ωάρια με μη εμφανή άτρακτο τοποθετήθηκαν τα πολικά σωμάτια σε θέση 6 ή 12 η ώρα.

Η γονιμοποίηση των ωαρίων αξιολογήθηκε 18 ώρες μετά την ICSI. Ωάρια με 2 εμφανείς προπυρήνες και δεύτερο πολικό σωμάτιο καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο μέχρι την 3<sup>η</sup> ημέρα που αξιολογήθηκε η ανάπτυξη των εμβρύων. Για την διευκόλυνση της έρευνας ορίστηκαν τα εξής :

- Ωάρια καλής ποιότητας : τουλάχιστον έξι βλαστομερίδια, <20% απύρρηνα θραύσματα, όχι εμφανείς μορφολογικές ανωμαλίες.
- Ωάρια κακής ποιότητας : πολυπυρήνωση βλαστομερών, κακή κυτταρική προσκόλληση, άνιση κυτταρική διαίρεση, κυτταροπλασματικές ανωμαλίες.

## Αποτελέσματα

Με βάση την απεικόνιση στο Polscope, η άτρακτος ήταν εμφανής στο 83,5% των ωαρίων και μη εμφανής στο 16,5%. Τα ποσοστά κατανομής των ωαρίων στις ομάδες φαίνονται παρακάτω:



Γράφημα 4: Ποσοστιαία απεικόνιση των ομάδων με ευδιάκριτη μητρική άτρακτο.

Μετά την ICSI, δεν υπήρχε σημαντική διαφορά στα ωάρια με εμφανή και μη εμφανή άτρακτο τα οποία σχημάτισαν 2 πολικά σωμάτια. Ωστόσο παρουσιάστηκαν πολυπυρηνικοί σχηματισμοί ( 3 και 4 προπυρήνες ) σε υψηλότερο ποσοστό στα ωάρια με μη ορατή άτρακτο. Σε επόμενο βήμα διαπιστώθηκε πως τα ποσοστά γονιμοποίησης στις 5 ομάδες ωαρίων με άτρακτο ήταν παρόμοια και κυμαινόντουσαν από 74 μέχρι 84%. Σημαντικό εύρημα ήταν πως ύστερα από την καλλιέργεια, το ποσοστό εμβρύων χωρίς άτρακτο εμφάνισε πολύ υψηλό ποσοστό κακής ποιότητας (65%) έναντι του 35% αυτών με εμφανή άτρακτο.

## Συμπεράσματα

Η παραπάνω μελέτη δείχνει πως η θέση της ατράκτου μετάφασης II σε ζωντανά ανθρώπινα ωάρια απεικονίζεται με το Polscope και βοηθά στην πρόβλεψη της ανάπτυξης του εμβρύου μετά από μικρογονιμοποίηση ICSI.

Έρευνες επιστημόνων έχουν δείξει πως ορισμένες περιβαλλοντικές αλλαγές ή ερεθίσματα, προκαλούν τον αποπολυμερισμό των μικροσωληνίσκων και συνεπώς βλάβη στην άτρακτο. Έτσι μία αλλαγή στη θερμοκρασία περιβάλλοντος θα μπορούσε να εξαφανίσει προσωρινά της μειωτική άτρακτο και να προκαλέσει κακή ποιότητα εμβρύων λόγω χρωμοσωμικών ανωμαλιών. Αυτό εξηγεί το αποτέλεσμα ότι τα ποσοστά γονιμοποίησης και ανάπτυξης ήταν πολύ χαμηλότερα στα ωάρια χωρίς από τα ωάρια με ορατή άτρακτο. Στην παραπάνω έρευνα η θερμοκρασία ήταν στους 37 βαθμούς Κελσίου για 4 ώρες επομένως κάποιος άλλος παράγοντας προκάλεσε την πρόωρη εξαφάνιση των ατράκτων.

Ο υψηλός αριθμός πολυπυρηνικού σχηματισμού σε ωάρια χωρίς άτρακτο μπορεί να οφείλεται στο ότι έγινε διασπορά των χρωμοσωμάτων της ατράκτου σε ομάδες και μετέπειτα σχηματισμός πολυπυρήνων ο καθένας με απλοειδή αριθμό χρωμοσωμάτων.

Το γεγονός πως η άτρακτος σε κάθε ωάριο βρίσκεται σε διαφορετική γωνία από το πρώτο πολικό σωματίο μπορεί να εξηγηθεί. Το πρώτο πολικό σωματίο δεν παραμένει συνδεδεμένο με το ωάριο λόγω της αφαίρεσης των κυττάρων cumulus. Επομένως αυτό περιστρέφεται ελεύθερα. Μία άλλη πιθανότητα είναι ότι η θέση της ατράκτου αλλάζει λόγω της ρευστότητας στην περιοχή της μεμβράνης όπου συνδέεται ο άξονας.

Το ποσοστό εμβρύων υψηλής ποιότητας ήταν μεγαλύτερο σε ωάρια με ορατή από ότι σε ωάρια με μη ορατή άτρακτο. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο ότι τα ωάρια χωρίς αμφίπλευρη άτρακτο, τα οποία έχουν χαμηλή ανάπτυξη, να έχουν πολλές χρωμοσωμικές ανωμαλίες που ίσως προκαλούν διακοπή του κυτταρικού κύκλου. Είναι πιθανό η άτρακτος να μην εμφανίζεται στο μικροσκόπιο φθορισμού διότι δεν βρίσκεται ακριβώς στη φάση μετάφασης II αλλά λίγο πιο πριν η πιο μετά (προμετάφαση II ή τελόφαση ). Επομένως εκεί μπορεί να συμβεί βλάβη μέσω της ICSI και να προκαλέσει κακής ποιότητας ωάρια (Moon, 2003).

#### **5.4. Έρευνα 4<sup>η</sup>: Ποιοτική μελέτη για τη νομιμοποίηση της δωρεάς μιτοχονδρίων**

Η έρευνα που διεξήχθη, βασιζόταν στις μαρτυρίες γυναικών αναπαραγωγικής ηλικίας που κινδύνευαν να αποκτήσουν παιδί με μιτοχονδριακή νόσο και πραγματοποιήθηκε μετά τη νομιμοποίηση της δωρεάς μιτοχονδρίων στο Ηνωμένο Βασίλειο. Με τη συμβολή της έρευνας, λήφθηκαν δεδομένα για δυο ερευνητικά προγράμματα με διαφορετικούς στόχους. Ο στόχος του πρώτου προγράμματος ήταν να διερευνηθούν οι ατομικές και οικογενειακές εμπειρίες κατά τη διάρκεια διάγνωσης και ασθένειας. Ο σκοπός του δεύτερου προγράμματος ήταν να μελετηθούν οι προοπτικές της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής και ειδικά της εξωσωματικής γονιμοποίησης που αφορά την δωρεά μιτοχονδρίων. Τα δυο έργα απαίτησαν συνεντεύξεις 22 γυναικών αναπαραγωγικής ηλικίας 18 με 45 ετών (11 στο ένα έργο και 11 στο άλλο) που έφεραν μητρικά κληρονομικές μιτοχονδριακές μεταλλάξεις και διέτρεχαν κίνδυνο μετάδοσης μιτοχονδριακών διαταραχών στα παιδιά τους. Οι γυναίκες ήταν διαφορετικών οικονομικών, κοινωνικών, μορφωτικών και επαγγελματικών επιπέδων.

Μεταξύ των 22 γυναικών μόνο 3 δεν υποστήριξαν τη νομιμοποίηση της δωρεάς μιτοχονδρίων. Από αυτές η μία δεν είχε καθόλου γνώσεις για το θέμα και η άλλη δεν το υποστήριξε λόγω θρησκευτικών πεποιθήσεων.

Οι ιστορίες των γυναικών αναδεικνύουν τις διάφορες πτυχές της ελπίδας που προσφέρει η δωρεά μιτοχονδρίων και οι μετέπειτα τεχνικές για την πρόληψη μιτοχονδριακών ασθενειών στους απογόνους. Αναπτύχθηκαν οι εξής τίτλοι: ελπίδα για τον εαυτό μας, ελπίδα για την οικογένεια και ελπίδα για την κοινωνία.

Δυο μόλις γυναίκες που συμμετείχαν στην μελέτη υποστήριξαν πως η νομιμοποίηση των MRTs θα έφερε ελπίδα στους εαυτούς τους να γεννήσουν υγιές παιδί. Η καθημερινή ταλαιπωρία με υψηλή κόπωση και χαμηλά ποσοστά ενέργειας πυροδοτεί την ελπίδα στον ίδιο τους τον εαυτό να αποκτήσουν υγιή έμβρυα που δεν θα βιώσουν παρόμοιες καταστάσεις. Για πολλές άλλες γυναίκες, οι τεχνικές προσφέρουν την ελπίδα τόσο στα παιδιά τους όσο και στις θυγατρικές γενιές αυτών να προστατευτούν από τον ιατρικό κίνδυνο. Η πλειοψηφία ωστόσο των συμμετεχόντων γυναικών τόνισε την ελπίδα για την ευρύτερη κοινωνία, καθώς η δωρεά μιτοχονδρίων

και οι επακόλουθες τεχνικές αντικατάστασής τους μειώνουν τον ψυχολογικό και σωματικό πόνο των ανθρώπων.

Οι περισσότερες από τις γυναίκες όχι μόνο υποστήριξαν την νομιμοποίηση της δωρεάς μιτοχονδρίων αλλά ήταν ενεργά μέλη στις σχετικές δημόσιες συζητήσεις. Συγκεκριμένα, παρακολουθούσαν τις συζητήσεις μέσω τηλεόρασης και ραδιοφώνου, συναντούσαν τους αντίστοιχους βουλευτές, ήταν ομιλητές σε δημόσιες εκδηλώσεις, βρίσκονταν στο Κοινοβούλιο κατά την ψηφοφορία, συμμετείχαν σε κοινωνικά προγράμματα για τη συλλογή χρημάτων, ενημέρωναν τα μέσα μαζικής ενημέρωσης για τις εμπειρίες τους, και λίγες συνέβαλαν στην έρευνα μέσω δωρεάς των ωαρίων τους.

Οι γυναίκες τόνιζαν συνεχώς κατά τη διάρκεια της μελέτης τα έντονα συναισθήματά τους, τη συγκίνηση που βίωναν κατά τις διαδικασίες διεκδίκησης των δικαιωμάτων τους, το πάθος, τον ενθουσιασμό, την θέληση και την ελπίδα. Οι προσωπικές τους εμπειρίες και γνώσεις για το θέμα τις καθιστούσαν παρούσες σε όλες τις δημόσιες διαδικασίες προωθώντας τη δωρεά μιτοχονδρίων και τις νέες τεχνολογίες (Herbrand C. R., 2018).

## Συμπεράσματα

Οι μιτοχονδριακές διαταραχές δεν είναι σπάνιες, αλλά αντιθέτως αποτελούν μία από τις πιο κοινές ομάδες γενετικών ασθενειών. Ο όρος μιτοχονδριακές ασθένειες αναφέρεται σε διαταραχές που αφορούν την μιτοχονδριακή αναπνευστική αλυσίδα η οποία βρίσκεται υπό τον διπλό έλεγχο του μιτοχονδριακού γονιδιώματος (mtDNA) και του πυρηνικού γονιδιώματος (nDNA). Δεδομένου ότι τα μιτοχόνδρια υπάρχουν σε όλα τα κύτταρα με εξαίρεση τα ερυθρά αιμοσφαίρια, τα κλινικά συμπτώματα εμφανίζονται σε όλα τα όργανα, αλλά κυρίως σε αυτά με υψηλές ενεργειακές απαιτήσεις, όπως ο εγκέφαλος, οι σκελετικοί μύες και η καρδιά (Craven L. A., 2017). Οι επιστήμονες έχουν ανακαλύψει πάνω από 300 διαφορετικά είδη γενετικά και κλινικά διακριτών μιτοχονδριακών διαταραχών (Naviaux, 2004) όπως προβλήματα στην καρδιά, τα νεφρά και το γαστρεντερικό σύστημα, κατάθλιψη και ημικρανίες, σχιζοφρένεια, επιληψίες, διπολική διαταραχή, νόσοι Parkinson και Alzheimer, σύνδρομο χρόνιας κούρασης και άλλα πολλά. Ο τομέας των μιτοχονδριακών ασθενειών είναι περίπλοκος λόγω της συμβολής των δυο διαφορετικών γονιδιωμάτων, των ποικίλων ετεροπλασματικών μεταλλάξεων, το ευρύ φάσμα συμπτωμάτων καθώς και της απουσίας θεραπείας (Craven L. A., 2017).

Οι μιτοχονδριακές ασθένειες κληρονομούνται αποκλειστικά από την μητέρα και είναι πιθανό να προκαλέσουν στα έμβρυα ανεπανόρθωτες έως και θανατηφόρες βλάβες. Λόγω της εξέλιξης ωστόσο της επιστημονικής έρευνας, οι οικογένειες μπορούν να επιλέξουν ανάμεσα σε ένα ευρύ φάσμα αναπαραγωγικών τεχνικών για να προστατεύσουν το παιδί τους. Αυτές περιλαμβάνουν την προγεννητική διάγνωση, την προεμφυτευτική γενετική διάγνωση, την υιοθεσία τις τεχνικές μιτοχονδριακής αντικατάστασης μέσω δωρεάς μιτοχονδρίων, ή την κλασική εξωσωματική γονιμοποίηση μέσω δωρεάς ωαρίων. Στις δυο πρώτες τεχνικές δεν πραγματοποιείται κάποια εργαστηριακή διαδικασία η οποία θα παρέχει στο έμβρυο ένα υγιές μιτοχονδριακό DNA, αλλά μέσω βιοψίας σε διαφορετικό στάδιο στην κάθε τεχνική, διαπιστώνεται η πιθανότητα το παιδί να γεννηθεί με μιτοχονδριακή νόσο, η σοβαρότητά της, οι πιθανές μεταλλάξεις που την προκάλεσαν και διάφορα άλλα (Craven L. A., 2017). Οι τεχνικές ωστόσο μιτοχονδριακής αντικατάστασης, που περιλαμβάνουν την μεταφορά ατράκτου

της μητέρας και την προπυρηνική μεταφορά, αφορούν διαδικασίες που μέσω μίας υγιούς δότριας μπορούν να προκύψουν έμβρυα που δεν φέρουν την μιτοχονδριακή νόσο της μητέρας. Ο περιορισμός των τεχνικών αυτών ωστόσο είναι ότι αφορούν μόνο γυναίκες με προσβεβλημένο το μιτοχονδριακό γονιδίωμά τους και όχι το πυρηνικό (Falk, 2016).

Οι τεχνικές αντικατάστασης των μιτοχονδρίων είναι μια βιώσιμη εναλλακτική λύση για τις γυναίκες που φέρουν μεταλλάξεις mtDNA και επιθυμούν να έχουν γενετικά συγγενείς και υγιείς απογόνους. Οι υπόλοιπες εναλλακτικές όπως η γονιμοποίηση μέσω δωρεάς ωαρίων και η υιοθεσία, δεν προωθούν την γενετική συγγένεια μεταξύ μητέρας και εμβρύου (Sendra L, 2021). Μέσω των εξελισσόμενων αυτών τεχνικών δίνεται η δυνατότητα σε πολλές οικογένειες να αποκτήσουν υγιείς απογόνους, με μηδενική ή ελάχιστη μετάδοση της μιτοχονδριακής ασθένειας. Τόσο η μεταφορά μητρικής ατράκτου όσο και η προπυρηνική μεταφορά επιτελούν τον ίδιο σκοπό, διαφέρουν ωστόσο σε αρκετά σημεία συμπεριλαμβανομένων των εργαστηριακών διαδικασιών και των ηθικών, νομικών, επιστημονικών και οικονομικών ζητημάτων. Οι τεχνικές και δεοντολογικές διαφορές μεταξύ των τεχνικών MRTs μπορεί να επηρεάσουν την απόφαση χρήσης μιας μεθόδου έναντι μιας άλλης, αλλά επί του παρόντος, δεν υπάρχουν στοιχεία που να υποδηλώνουν ότι είτε το MST είτε το PNT είναι προτιμότερα.

Κάθε οικογένεια με ιστορικό μιτοχονδριακής νόσου αντιμετωπίζει μία δύσκολη επιλογή σχετικά με το αν θα χρησιμοποιήσουν MRTs ή όχι. Δεν πρέπει ωστόσο να τους αφαιρείται το δικαίωμα να έχουν αυτή την επιλογή. Για την αντικατάσταση των μιτοχονδρίων, υπάρχουν τέσσερις μεγάλες προκλήσεις: ηθική, νομιμότητα, ασφάλεια και αποτελεσματικότητα (Richardson, 2015). Αναφορικά με την ηθική το κυριότερο πρόβλημα που καλούνται να αντιμετωπίσουν οι οικογένειες στις MRTs ανάλογα με την τεχνική, είναι η απόρριψη είτε γενετικού υλικού της δότριας, είτε γονιμοποιημένου ζυγωτού δότριας και πατέρα. Απορρίπτεται έτσι γενετικό υλικό το οποίο θα μπορούσε να εξελιχθεί σε έμβρυο και να γεννηθεί ένας υγιής απόγονος (Craven L. M., 2018). Σχετικά με την νομιμότητα, η κάθε χώρα έχει θεσπίσει διαφορετικούς νόμους και κανονισμούς για τις τεχνικές, απαγορεύοντας σε πολλές χώρες την πραγματοποίηση τόσο κλινικών εφαρμογών όσο και δοκιμών (Sharma H. , 2020). Η ασφάλεια και η αποτελεσματικότητα είναι παράμετροι που ακόμα μελετώνται και βελτιώνονται μέσω της συνεχής εφαρμογής των τεχνικών (Appleby, 2015).



Η πρόθεση των τεχνικών δεν είναι να θεραπεύσει άρρωστους ανθρώπους, αλλά να παράγει νέα άτομα *in vitro*. Το γεγονός αυτό απαιτεί από τις τεχνικές να είναι όσο περισσότερο ακριβείς και ασφαλείς γίνεται. Λαμβάνοντας υπ όψιν ότι πολλές πτυχές της βιολογίας του μιτοχονδριακού DNA έχουν μείνει ανεξερεύνητες, κρίνεται σκόπιμη η διεξαγωγή τακτικών ερευνών σε ζωικά μοντέλα σχετικά με την επικοινωνία μιτοχονδρίων-πυρήνα, τη μετάδοση του mtDNA στους και τα συμπτώματα των μιτοχονδριακών ασθενειών. Ύστερα οι τεχνικές μιτοχονδριακής αντικατάστασης θα γίνουν ακόμα πιο κατανοητές στους επιστήμονες. Δεδομένου ότι οι μελέτες σε ζώα έχουν περιορισμούς στην πρόβλεψη των αποτελεσμάτων στους ανθρώπους, η επακόλουθη έρευνα σε ανθρώπους θα ήταν απαραίτητη (Gómez-Tatay, 2017).

## Αναφορές

1. Amato, P., Tachibana, M., Sparman, M., & Mitalipov, S. (2014). Three-parent in vitro fertilization: gene replacement for the prevention of inherited mitochondrial diseases. *Fertility and Sterility*, 101(1), 31-35. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.11.030>
2. Annesley, S. J., & Fisher, P. R. (2019). Mitochondria in health and disease. *Cells*, 8(7), 680.
3. Appleby, J. B. (2015). 'The ethical challenges of the clinical introduction of mitochondrial replacement techniques', *Medicine, Health Care and Philosophy*, 18(4), pp. 501-514. DOI: 10.1007/s11019-015-9656-3.
4. Aryamvally, A., Myers, M. F., Huang, T., Slone, J., Pilipenko, V., & Hartmann, J. E. (2021). 'Mitochondrial replacement therapy: Genetic counselors' experiences, knowledge, and opinions', *Journal of Genetic Counseling*, 30(3), pp. 828-837.
5. Baldini D, L., Baldini, A., Silvestris, E., Vizziello, G., Ferri, D., & Vizziello, D. (2020). A fast and safe technique for sperm preparation in ICSI treatments within a randomized controlled trial (RCT). *Reproductive Biology and Endocrinology*, 18(1), 88. doi: 10.1186/s12958-020-00642-8.
6. Brandt, R. (2016). 'Mitochondrial donation and 'the right to know'', *Journal of Medical Ethics*, 42, pp. 678–684.
7. Brown, J., Buckingham, K., Buckett, W., & Abou-Setta, A. M. (2016). Ultrasound versus 'clinical touch' for catheter guidance during embryo transfer in women. *\*Cochrane Database of Systematic Reviews\**, (3).
8. Castro, R. J. (2016). 'Mitochondrial replacement therapy: the UK and US regulatory landscapes', *Journal of Law and the Biosciences*, 3(3), pp. 726-735. DOI: 10.1093/jlb/lsw051.
9. Claiborne, A., English, R., Kahn, J., & National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine. (2016). 'Do Ethical, Social, and Policy Considerations Preclude MRT?', in *Mitochondrial Replacement Techniques: Ethical, Social, and Policy Considerations*. National Academies Press (US).

10. Claiborne, A., English, R., & Kahn, J. (Eds.). (2016). *Mitochondrial Replacement Techniques: Ethical, Social, and Policy Considerations*. Washington (DC): National Academies Press (US). Chapter 1, Introduction.
11. Cohen, I. G., Adashi, E. Y., Gerke, S., Palacios-González, C., & Ravitsky, V. (2020). The Regulation of Mitochondrial Replacement Techniques Around the World. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*. doi:10.1146/annurev-genom-111119-101815
12. Cohen, Y., Malcov, M., Schwartz, T., Mey-Raz, N., Carmon, A., Cohen, T., Lessing, J. B., Amit, A., & Azem, F. (2004). Spindle imaging: a new marker for optimal timing of ICSI? *Human Reproduction*, 19(3), 649-654. doi: 10.1093/humrep/deh113.
13. Coughlan, C. (2018). What to do when good-quality embryos repeatedly fail to implant. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 53, 48-59.
14. Craven, L., Alston, C. L., Taylor, R. W., & Turnbull, D. M. (2017). 'Recent advances in mitochondrial disease', *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 18, pp. 257-275.
15. Craven, L., Elson, J. L., Irving, L., Tuppen, H. A., Lister, L. M., Greggains, G. D., Byerley, S., Murdoch, A. P., Herbert, M., & Turnbull, D. (2011). Mitochondrial DNA disease: new options for prevention. *Human Molecular Genetics*, 20(R2), R168–R174.
16. Craven, L., Rai, P.K., Hoogewijs, K., Russell, O. M., & Lightowlers, R. N. (2018). Advances in methods for reducing mitochondrial DNA disease by replacing or manipulating the mitochondrial genome. *Essays Biochem.*, 62(3), 455-465. doi: 10.1042/EBC20170113.
17. Craven, L., Tuppen, H. A., Greggains, G. D., Harbottle, S. J., Murphy, J. L., Cree, L. M., Murdoch, A. P., Chinnery, P. F., Taylor, R. W., Lightowlers, R. N., Herbert, M., & Turnbull, D. M. (2010). Pronuclear transfer in human embryos to prevent transmission of mitochondrial DNA disease. *Nature*, 465(7294), 82-85. doi: 10.1038/nature08958.
18. Dedov, I. I., Melnichenko, G. A., & Fadeev, V. F. (2020). Anatomy of the female reproductive system. *Physiology of the reproductive system. Male reproductive system*.
19. Dziadek, M. A. and Sue, C. M. (2022). 'Mitochondrial donation: is Australia ready?', *Med J Aust*, 216(3), pp. 118-121. DOI: 10.5694/mja2.51309.
20. Ellis, H., & Mahadevan, V. (2013). *Clinical anatomy: applied anatomy for students and junior doctors* (13th ed.). Chichester, West Sussex, UK: Wiley-Blackwell. ISBN 978-1-118-37376-7.

21. Engelstad, K., Sklerov, M., Kriger, J., Sanford, A., Grier, J., Ash, D., Egli, D., DiMauro, S., Thompson, J. L. P., Sauer, M. V., & Hirano, M. (2016). Attitudes toward prevention of mtDNA-related diseases through oocyte mitochondrial replacement therapy. *Human Reproduction*, 31(5), 1058–1065. doi:10.1093/humrep/dew033
22. Falk, M. J., Decherney, A., & Kahn, J. P. (2016). 'Mitochondrial Replacement Techniques— Implications for the Clinical Community', *New England Journal of Medicine*, 374(12), pp. 1103-1106. DOI: 10.1056/NEJMp1600893.
23. Finsterer, J. (2010). Treatment of mitochondrial disorders. *European Journal of Paediatric Neurology*, 14(1), 29-44.
24. Forman, E. J., Li, X., Ferry, K. M., Scott, K., Treff, N. R., & Scott, R. T. Jr. (2012). Oocyte vitrification does not increase the risk of embryonic aneuploidy or diminish the implantation potential of blastocysts created after intracytoplasmic sperm injection: a novel, paired randomized controlled trial using DNA fingerprinting. *Fertility and Sterility*, 98(3), 644-649. doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.04.028.
25. Gardner, D. K., & Schoolcraft, W. B. (1999). In vitro culture of human blastocysts. In *Toward reproductive certainty: Fertility and genetics beyond 1999* (pp. 378–388). London: Parthenon Publishing.
26. Gómez-Tatay, L., Hernández-Andreu, J. M., & Aznar, J. (2017). Mitochondrial modification techniques and ethical issues. *Journal of Clinical Medicine*, 6(3), 25. doi:10.3390/jcm6030025.
27. Graeber, M. B., & Müller, U. (1998). Recent developments in the molecular genetics of mitochondrial disorders. *Journal of the Neurological Sciences*, 153(2), 251-263.
28. Greco, E., Litwicka, K., Minasi, M. G., Cursio, E., Greco, P. F., & Barillari, P. (2020). Preimplantation genetic testing: where we are today. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(12), 4381.
29. Guanglun, M. M., Yang, H., & Yan, W. (2017, October). Building resilience of students with disabilities in China: The role of inclusive education teachers. *Teacher and Teaching Education*, pp. 125-134.
30. Herbrand, C. (2017). 'Mitochondrial replacement techniques: who are the potential users and will they benefit?', *Bioethics*, 31(1), pp. 46-54.

31. Herbrand, C., & Dimond, R. (2018). 'Mitochondrial donation, patient engagement and narratives of hope', *Sociology of Health & Illness*, 40(4), pp. 623-638.
  
32. Hirshfield, A. N. (1997). Overview of ovarian follicular development: considerations for the toxicologist. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 29(1), 10-15.
  
33. Hyslop, L.A., Blakeley, P., Craven, L., Richardson, J., Fogarty, N.M., Fragouli, E., Lamb, M., Wamaitha, S.E., Prathalingam, N., Zhang, Q. and O'Keefe, H., (2016). Towards clinical application of pronuclear transfer to prevent mitochondrial DNA disease. *Nature*, 534(7607), pp.383-386.
  
34. Hyun, C. S., Cha, J. H., Son, W. Y., Yoon, S. H., Kim, K. A., & Lim, J. H. (2007). 'Optimal ICSI timing after the first polar body extrusion in in vitro matured human oocytes', *Human Reproduction*, 22(7), pp. 1991-1995. DOI: 10.1093/humrep/dem124.
  
35. Illmensee, K., Levanduski, M., Vidali, A., Husami, N., & Goudas, V. T. (February 2009). "Human embryo twinning with applications in reproductive medicine". *Fertility and Sterility*, 93(2), 423–7. doi:10.1016/j.fertnstert.2008.12.098.
  
36. Jain, M., & Singh, M. (2023, June 7). Assisted Reproductive Technology (ART) Techniques. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK576409/>
  
37. Johnson, M. H. (2007). \*Essential Reproduction\*. Malden, Massachusetts: Wiley-Blackwell. ISBN 978-1-4051-1866-8. OCLC 76074156.
  
38. Karthikeyan, G., Santos, J. H., Graziewicz, M. A., Copeland, W. C., Isaya, G., Houten, B. V., & Resnick, M. A. (2003). Reduction in frataxin causes progressive accumulation of mitochondrial damage. *Human Molecular Genetics*, 12(24), 3331-3342.
  
39. Lane, A. (2020, December 14). Transvaginal Ultrasound-Guided Oocyte Retrieval. *Embryo Project Encyclopedia*. ISSN: 1940-5030. Retrieved from <https://hdl.handle.net/10776/13201>
  
40. Lessey, B. A., & Young, S. L. (April 2019). "What exactly is endometrial receptivity?". *Fertility and Sterility (Review)*, 111(4), 611–617. doi:10.1016/j.fertnstert.2019.02.009.
  
41. Leung, A. S., Dahan, M. H., & Tan, S. L. (2016). Techniques and technology for human oocyte collection. *Expert Review of Medical Devices*, 13(8), 701-703.

42. Liao, X., Li, W., Lin, K., Jin, W., Zhang, S., Wang, Y., Ma, M., Xie, Y., Yu, W., Yan, Z. and Gao, H., (2023). Significant decrease of maternal mitochondria carryover using optimized spindle-chromosomal complex transfer. *PLoS Biology*, 21(10), p.e3002313.
43. Lindsay M. Biga, Staci Bronson, Sierra Dawson, Amy Harwell, Robin Hopkins, Joel Kaufmann, Mike LeMaster, Philip Matern, Katie Morrison-Graham, Kristen Oja, Devon Quick, Jon Runyeon, OSU OERU, OpenStax. (2019) . *Anatomy & Physiology*. Licensed under a Creative Commons Attribution-ShareAlike 4.0 International License, except where otherwise noted.
44. Liu, H. (2015). The In Vitro Development of Human Zygote Reconstructed by Pronuclear Transfer. *Fertility & Sterility*. (online report). Retrieved from <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&AuthType=ip,uid&db=ap...>
45. Lu, Z., Zhang, X., Leung, C., Esfandiari, N., Casper, R. F., & Sun, Y. (2011). Robotic ICSI (intracytoplasmic sperm injection). *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 58(7), 2102-2108.
46. Massart, J., Borgne-Sanchez, A., & Fromenty, B. (2018). Drug-induced mitochondrial toxicity. In *Mitochondrial Biology and Experimental Therapeutics* (pp. 269-295).
47. Mazat, J. P., Rossignol, R., Malgat, M., Rocher, C., Faustin, B., & Letellier, T. (2001). What do mitochondrial diseases teach us about normal mitochondrial functions... that we already knew: threshold expression of mitochondrial defects. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1504(1), 20-30.
48. McDougall, A., Hebras, C., Pruliere, G., Burgess, D., Costache, V., Dumollard, R., & Chenevert, J. (2020). Role of PB1 Midbody Remnant Creating Tethered Polar Bodies during Meiosis II. *Genes*, 11(12), 1394.
49. Monroy, A. (2024, March 28). Fertilization. *Encyclopedia Britannica*. URL: <https://www.britannica.com/science/fertilization-reproduction>
50. Moon, J.-H., Hyun, C.-S., Lee, S.-W., Son, W.-Y., Yoon, S.-H., Lim, J.-H. (2003). 'Visualization of the metaphase II meiotic spindle in living human oocytes using the Polscope enables the prediction of embryonic developmental competence after ICSI', *Human Reproduction*, 18(4), pp. 817–820. DOI: 10.1093/humrep/deg165.
51. Nasr-Esfahani, M. H., Deemeh, M. R., & Tavalae, M. (2012). New era in sperm selection for ICSI. *International Journal of Andrology*, 35(4), 475-484.

52. National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine. (2016). *Mitochondrial Replacement Techniques: Ethical, Social, and Policy Considerations*. Washington, DC: The National Academies Press. DOI: 10.17226/21871.
53. Naviaux, R. K. (2004). 'Developing a systematic approach to the diagnosis and classification of mitochondrial disease', *Mitochondrion*, 4, pp. 351-361.
54. Nesbitt, V., Alston, C. L., Blakely, E. L., Fratter, C., Feeney, C. L., Poulton, J., Brown, G. K., Turnbull, D. M., Taylor, R. W., & McFarland, R. (2014). A national perspective on prenatal testing for mitochondrial disease. *European Journal of Human Genetics*, 22(11), 1255-1259.
55. Neupane, J., Vandewoestyne, M., Ghimire, S., Lu, Y., Qian, C., Van Coster, R., Gerris, J., Deroo, T., Deforce, D., De Sutter, P., & Heindryckx, B. (2014). Assessment of nuclear transfer techniques to prevent the transmission of heritable mitochondrial disorders without compromising embryonic development competence in mice. *Mitochondrion*, 18, 27-33.
56. Neustadt, J., & Pieczenik, S. R. (2008). Medication-induced mitochondrial damage and disease. *Molecular Nutrition & Food Research*, 52(7), 780-788.
57. Newson, A. J., Wilkinson, S., & Wrigley, A. (2016). Ethical and legal issues in mitochondrial transfer. *EMBO Molecular Medicine*. doi:10.15252/emmm.201606281.
58. Noohi, F., Li, M. and Joly, Y. (2021). 'Clinical translation of mitochondrial replacement therapy in Canada: a qualitative study of stakeholders' attitudes', *FACETS*, 6(1), pp. 449-464.
59. Osellame, L. D., Blacker, T. S., & Duchon, M. R. (2012). Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 26(6), 711-723.
60. O'Shea, J. D. (1981). 'Structure-function relationships in the wall of the ovarian follicle', *Australian Journal of Biological Sciences*, 34(4), pp. 379-394.
61. Palacios-González, C. (2017). 'Are there moral differences between maternal spindle transfer and pronuclear transfer?', *Medicine, Health Care and Philosophy*, 20, pp. 503–511.

62. Pompei, M., & Pompei, F. (2019). 'Overcoming bioethical, legal, and hereditary barriers to mitochondrial replacement therapy in the USA', *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 36(3), pp. 383-393. DOI: 10.1007/s10815-018-1370-7.
63. Prior, J. C. (2020). "The menstrual cycle: its biology in the context of silent ovulatory disturbances". In Ussher, J. M., Chrisler, J. C., & Perz, J. (Eds.), *Routledge International Handbook of Women's Sexual and Reproductive Health* (1st ed., pp. xxx-xxx). Abingdon, Oxon: Routledge. ISBN 978-1-138-49026-0. OCLC 1121130010.
64. Rai, P. K., Craven, L., Hoogewijs, K., Russell, O. M., & Lightowlers, R. N. (2018). Advances in methods for reducing mitochondrial DNA disease by replacing or manipulating the mitochondrial genome. *Essays Biochem.*, 62(3), 455-465. doi: 10.1042/EBC20170113.
65. Ramírez-González, J.A., Vaamonde-Lemos, R., Cunha-Filho, J.S., Varghese, A.C. and Swanson, R.J., (2016). Overview of the female reproductive system. Exercise and human reproduction: induced fertility disorders and possible therapies, pp.19-46.
66. Reed, B. F., Carr, B. R., Feingold, K. R., et al. (2018). "The Normal Menstrual Cycle and the Control of Ovulation". *Endotext* (Review). PMID: 25905282. Archived from the original on 28 May 2021. Retrieved 8 January 2021.
67. Rehfeld, A., Nylander, M., & Karnov, K. (2017). The Female Reproductive System. In *Compendium of Histology: A Theoretical and Practical Guide* (pp. 541-568).
68. Revelli, A., Chiadò, A., Dalmasso, P., Stabile, V., Evangelista, F., Basso, G., & Benedetto, C. (2014). "Mild" vs. "long" protocol for controlled ovarian hyperstimulation in patients with expected poor ovarian responsiveness undergoing in vitro fertilization (IVF): a large prospective randomized trial. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 31, 809-815.
69. Reznichenko, A. S., Huyser, C., & Pepper, M. S. (2016). Mitochondrial transfer: Implications for assisted reproductive technologies. *Applied & Translational Genomics*, 11, 40-47.
70. Rice, L. L. (2012). Overview of human fertilization and egg activation. *AMWA Journal: American Medical Writers Association Journal*, 27(3).
71. Rienzi, L., Balaban, B., Ebner, T., & Mandelbaum, J. (2012). 'The oocyte', *Human Reproduction*, 27(suppl\_1), pp. i2-i21.



72. Rienzi, L., Ubaldi, F., Anniballo, R., Cerulo, G., & Greco, E. (1998). Preincubation of human oocytes may improve fertilization and embryo quality after intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction*, 13, 1014–1019
73. Richardson, J., Irving, L., Hyslop, L. A., Choudhary, M., Murdoch, A., Turnbull, D. M., & Herbert, M. (2015). Concise reviews: assisted reproductive technologies to prevent transmission of mitochondrial DNA disease. *Stem Cells*, 33(3), 639-645.
74. Rodríguez-Varela, C., Herraiz, S., & Labarta, E. (2021). Mitochondrial enrichment in infertile patients: a review of different mitochondrial replacement therapies. *Therapeutic Advances in Reproductive Health*, 15, 26334941211023544.
75. Schmerler, S., & Wessel, G. M. (2011). Polar bodies--more a lack of understanding than a lack of respect. *Molecular Reproduction and Development*, 78(1), 3-8. doi: 10.1002/mrd.21266.
76. Schoolcraft, W. B., Surrey, E. S., & Gardner, D. K. (2001). Embryo transfer: techniques and variables affecting success. *Fertility and Sterility*, 76(5), 863-870.
77. Scott, I. & Logan, D. C. (2008). 'Mitochondrial morphology transition is an early indicator of subsequent cell death in Arabidopsis', *New Phytologist*, 177, pp. 90–101.
78. Sendra, L., García-Mares, A., Herrero, M. J., & Aliño, S. F. (2021). 'Mitochondrial DNA Replacement Techniques to Prevent Human Mitochondrial Diseases', *International Journal of Molecular Sciences*, 22(2), p. 551. DOI: 10.3390/ijms22020551.
79. Sharma, H., Singh, D., Mahant, A., Sohal, S. K., Kesavan, A. K., & Samiksha. (2020). Development of mitochondrial replacement therapy: A review. *Heliyon*, 6(9), e04643. doi: 10.1016/j.heliyon.2020.e04643.
80. Sharma, R. K., Azeem, A., & Agarwal, A. (2013). Spindle and chromosomal alterations in metaphase II oocytes. *Reproductive Sciences*, 20(11), 1293-1301.
81. Sinnott-Armstrong, W. (1999). 'Some Varieties of Particularism', *Metaphilosophy*, 30, pp. 1–12.
82. Sunde, A., Brison, D., Dumoulin, J., Harper, J., Lundin, K., Magli, M. C., Van den Abbeel, E., & Veiga, A. (2016). Time to take human embryo culture seriously. *Human Reproduction*, 31(10), 2174-2182.

83. Swain, J. E., Carrell, D., Cobo, A., Meseguer, M., Rubio, C., & Smith, G. D. (2016). Optimizing the culture environment and embryo manipulation to help maintain embryo developmental potential. *Fertility and Sterility*, 105(3), 571-587.
84. Tachibana, M., Kuno, T., & Yaegashi, N. (2018). 'Mitochondrial replacement therapy and assisted reproductive technology: A paradigm shift toward treatment of genetic diseases in gametes or in early embryos', *Reproductive Medicine and Biology*, 17(4), pp. 421-433. DOI: 10.1002/rmb2.12230.
85. Tachibana, M., Sparman, M., Sritanandomchai, H., Ma, H., Clepper, L., Woodward, J., Li, Y., Ramsey, C., Kolotushkina, O., & Mitalipov, S. (2009). 'Mitochondrial gene replacement in primate offspring and embryonic stem cells', *Nature*, 461(7262), pp. 367-372. DOI: 10.1038/nature08368.
86. Talaulikar, V. S., & Arulkumaran, S. (2013). Maternal, perinatal and long-term outcomes after assisted reproductive techniques (ART): implications for clinical practice. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 170(1), 13-19.
87. Tomari, H., Honjo, K., Kunitake, K., Aramaki, N., Kuhara, S., Hidaka, N., Nishimura, K., Nagata, Y., & Horiuchi, T. (2018). Meiotic spindle size is a strong indicator of human oocyte quality. *Reproductive Medicine and Biology*, 17(3), 268-274.
88. Tortora, G. (2017). *Tortora's Principles of Anatomy & Physiology*. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc. ISBN 978-1-119-38292-8. OCLC 990424568.
89. Trifunovic, A., & Larsson, N. G. (2008). Mitochondrial dysfunction as a cause of ageing. *Journal of Internal Medicine*, 263(2), 167-178.
90. Ugwumadu, A. (2014). *Basic Sciences for Obstetrics and Gynaecology: Core Material for MRCOG*. Oxford, England: Oxford University Press. ISBN 978-0-19-953508-8. OCLC 889303297.
91. Wang, J., & Sauer, M. V. (2006). In vitro fertilization (IVF): a review of 3 decades of clinical innovation and technological advancement. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 2(4), 355-364.
92. Yang, L., Cai, S., Zhang, S., Kong, X., Gu, Y., Lu, C., Dai, J., Gong, F., Lu, G., & Lin, G. (2018). 'Single embryo transfer by Day 3 time-lapse selection versus Day 5 conventional morphological selection: a randomized, open-label, non-inferiority trial', *Human Reproduction*, 33(5), pp. 869-876. DOI: 10.1093/humrep/dey047.

93. Ylikallio, E., & Suomalainen, A. (2012). Mechanisms of mitochondrial diseases. *Annals of Medicine*, 44(1), 41-59.
94. Zhang, J., Zhuang, G., Zeng, Y., Grifo, J., Acosta, C., Shu, Y., & Liu, H. (2016). Pregnancy derived from human zygote pronuclear transfer in a patient who had arrested embryos after IVF. *Reproductive Biomedicine Online*, 33(4), 529-533.
95. Zick, M., Rabl, R., & Reichert, A. S. (2009). Cristae formation—linking ultrastructure and function of mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1793(1), 5-19.

## Πηγές Εικόνων

### Εικόνα 1

<https://i.pinimg.com/736x/d4/4f/bc/d44fbc2a4a686404e91eda62e98ad9c.jpg>

### Εικόνα 2

<https://i.pinimg.com/564x/2c/98/3c/2c983c2b002af98f0f853acf80e0bbbf.jpg>.

### Εικόνα 3

[https://opentextbc.ca/biology/wpcontent/uploads/sites/96/2015/03/Figure\\_43\\_07\\_01.jpg](https://opentextbc.ca/biology/wpcontent/uploads/sites/96/2015/03/Figure_43_07_01.jpg)

### Εικόνα 4

[https://static.sciencelearn.org.nz/images/images/000/001/226/full/fertilisation\\_oversize20160620-8734-nj07co.jpg?1674165727](https://static.sciencelearn.org.nz/images/images/000/001/226/full/fertilisation_oversize20160620-8734-nj07co.jpg?1674165727)

### Εικόνα 5

<https://i.pinimg.com/736x/c8/da/0e/c8da0edc4a065d6ab946c170a27e4be6.jpg>

### Εικόνα 6

<https://www.mereseach.org.uk/wiped-out/>

### Εικόνα 7

<https://religendx.com/wp-content/uploads/2019/06/reli.png>

### Εικόνα 8

<https://www.eugonia.com.gr/el/eksosomatiki/diadikasia/oolipsia/ti-einai-kai-pos-ginetai>

### Εικόνα 9

<https://www.shutterstock.com/image-vector/metaphase-phase-stages-mitosis-meiosis-600nw-2261350893.jpg>

### Εικόνα 10

Zhang, J., Liu, H., Luo, S., Lu, Z., Chavez-Badiola, A., Liu, Z., Yang, M., Merhi, Z., Silber, S.J., Munné, S., Konstantinidis, M., Wells, D., Tang, J.J., & Huang, T. (2017). Live birth derived from oocyte spindle transfer to prevent mitochondrial disease. *Reproductive biomedicine online*, 34 4, 361-368 .

### Εικόνα 11

Russell, O.M., Gorman, G.S., Lightowlers, R.N. and Turnbull, D.M., 2020. Mitochondrial diseases: hope for the future. *Cell*, 181(1), pp.168-188.

### Εικόνα 12

Moon, J.-H., Hyun, C.-S., Lee, S.-W., Son, W.-Y., Yoon, S.-H., Lim, J.-H. (2003) 'Visualization of the metaphase II meiotic spindle in living human oocytes using the Polscope enables the prediction of embryonic developmental competence after ICSI', *Human Reproduction*, 18(4), pp. 817–820. DOI: 10.1093/humrep/deg165.