ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΓΟΝΙΔΙΑΚΩΝ ΠΑΡΑΛΛΑΓΩΝ ΥΠΟΨΗΦΙΩΝ ΜΗΤΕΡΩΝ ΩΣ ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΑ ΕΡΓΑΛΕΙΑ ΤΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΩΑΡΙΩΝ ΚΑΙ ΕΜΒΡΥΩΝ ΚΑΙ ΤΗΣ ΠΙΘΑΝΟΤΗΤΑΣ ΕΜΦΥΤΕΥΣΗΣ

ΓΕΩΡΓΙΑ ΚΑΚΟΥΡΟΥ, MSc, PhD

Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής,

Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

τ. Συντονίστρια της Ομάδας «Γενετική της Αναπαραγωγής» του

European Society for Human Reproduction and Embryology (ESHRE)

EMAIL: **gkakourou@med.uoa.gr**

20ο Πανελλήνιο Συνέδριο Περιγεννητικής Ιατρικής

18-20 Οκτωβρίου 2019

Μέγαρο Διεθνές Συνεδριακό Κέντρο Αθηνών

Η υποβοηθούμενη αναπαραγωγή σήμερα

- **Εξωσωματική γονιμοποίηση από το 1977-σήμερα:**
  - **> 8.000.000 μωρά**

    International Committee for Monitoring ART (ICMART)

	IVF %	ICSI %
Επίτευξη εγκυμοσύνης/ Ωοληψία	29.3	27.2
Γέννηση Νεογνού/ Ωοληψία	22.3	20.1

De Geyter et al., Hum Reprod., 2018; 33(9):1586-1601

Ανάγκη εύρεσης μεθοδολογιών (ιδανικά μη επεμβατικών) για τον εντοπισμό εμβρύων με μεγαλύτερη βιωσιμότητα

✓**Μεταφορά ενός εμβρύου**

✓**Γέννηση <u>ενός υγιούς</u> παιδιού**

Σχετικές μελέτες

- Προεμφυτευτικός έλεγχος χρωμοσωμάτων
- Διερεύνηση γονιδιακού, μεταγραφικού, πρωτεωμικού ή μεταβολομικού προφίλ σε:
  - Ωοθηλακικό υγρό
  - Ωάρια και κοκκιώδη κύτταρα
  - Έμβρυα
  - Καλλιεργητικά υλικά
- Μορφοκινητική παρατήρηση των εμβρύων μεμικρο-κάμερες (“timelapse”).
- Μιτοχονδριακό DNA εμβρύων και κοκκιωδών κυττάρων
- **Γενετικό προφίλ υποψήφιων γονέων**

Γενετικό προφίλ και έκβαση της IVF

- Γενετικό προφίλ υποψήφιας μητέρας
  - Αιτιολογία υπογονιμότητας

Harper et al, Eur J Hum Genet. **2018**;26(1):12-33

- **Γονιδιακοί νουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί:**
  - RFLPs, Indels, Επαναλήψεις
  - **Πολυμορφισμοί ενός νουκλεοτιδίου (Single Nucleotide Polymorphisms- SNPs)**

Ευρήματα (μελέτες στον άνθρωπο)

- **Υπογονιμότητα:** AURKB, SYCP3, TUSC1, DPF3, TP53, PCI, ZP-3
- **Ανταπόκριση στο πρωτόκολλο διέγερσης:** FSHR, β-LH, VDR, ESR1, ESR2, BMP15
- **Ποιότητα ωαρίων/επιτυχία γονιμοποίησης:** TUBB8, IZUMO1R
- **Παράμετροι σπέρματος:** MTHFR, TAS2Rs/TAS1R, GNAT3, MLH3
- **Ανάπτυξη εμβρύων/ανευπλοειδίες:** FMR1, FSHR, AURKA, AURKB, AURKC, MLH3, MTHFR, HUWE1, AIRE, ECAT1, MAD2, BUBR1, PLK4 (πιθανά)
- **Επιτυχία εμφύτευσης:** LHCGR, FSHR, LHR, , LH beta, FMR1, TP53, HDM2, MTHFR, 5-HTTLPR, 5-HT1A, PR BPL, VEGFA, PGR, LIF, LEPR, TP63, ESR1, IGF1R, HLA-G, (**FII, FV, PAI-I, ITGB3, FGB, MTHFR, MTR, MTRR, ITGA2, GP1BA, AGT, AGTR1, GSTP**), ALPP
- **Επαναλαμβανόμενες αποβολές:** MTHFR, MMP-10, FGA
- **Επιτυχία IVF:** FII, FV, PAI-I, ITGB3, FGB, MTHFR, MTR, MTRR, ITGA2, GP1BA, MTHFR, AGT, AGTR1, GSTP

Χρωμοσωμικές Ανωμαλίες και Προεμφυτευτική ανάπτυξη εμβρύων

1) Μελέτη ευρείας γονιδιακής συσχέτισης (Genome Wide Association Study (GWAS)) σε γυναίκες που υπόκεινται σε ΠΓΕ: συσχέτιση γονιδιακής παραλλαγής στο χρωμόσωμα 4, **rs2305957**, (περιοχή 600kbp, q28.1-q28.2)

Μιτωτικές και σύνθετες ανευπλοειδίες και

- Μικρότερος αριθμός εμβρύων στο στάδιο της βλαστοκύστης

McCoy et al., Science., 2015; 348(6231):235-8.

2) Πολυμορφισμοί MTHFR: c.677C>**T** και c.1298A>**C**

αυξημένα ποσοστά ανευπλοειδίας (**μειωτικής**)

αδυναμία εμφύτευσης

Enciso et al., Hum Genet., 2016; 135(5):555-568

Ομάδες ασθενών και επιλογή SNPs

1) Υπογόνιμες γυναίκες/ζευγάρια

- Σύνθετη και πολύπλοκη ασθένεια που είναι δύσκολο να μελετηθεί
- Η IVF εφαρμόζεται και στο γόνιμο πληθυσμό για άλλους λόγους που πλέον δε σχετίζονται με υπογονιμότητα, όπως σε περιπτώσεις που έχει προηγηθεί **κρυοσυντήρηση ωοθηκικού/ορχικού ιστού, κατάψυξη ωαρίων, σπέρματος,για κοινωνικούς ή ιατρικούς λόγους ή προκειμένου να πραγματοποιηθεί Προεμφυτευτική Γενετική Διάγνωση**

2) Μελέτη μεμονωμένων SNPs

Σκοπός της μελέτης

- Ανάπτυξη μεθοδολογίας για διερεύνηση **επιλεγμένων γονιδίων** και γονιδιακών δεικτών **σε γόνιμες γυναίκες** που υπόκεινται σε ART-ΠΓΑ

- Έχουν αντίκτυπο οι γονιδιακές παραλλαγές c.677C>T, c.1298A>C και rs2305957 στην προεμφυτευτική ανάπτυξη του εμβρύου γόνιμων γυναικών όπως συμβαίνει στις υπογόνιμες?

- Ποιά άλλα γονίδια μπορεί να επηρεάσουν την ανάπτυξη σε γόνιμες γυναίκες?

- Άδεια από Επιτροπή Βιοηθικής & Δεοντολογίας της Ιατρικής Σχολής και Εθνική Αρχή Ιατρικώς Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής.
- Οι γυναίκες που περιλαμβάνονται στη μελέτη έλαβαν σχετική ενημέρωση και έδωσαν τη συγκατάθεσή τους για τη συλλογή υλικού.

Μεθοδολογία

- **Επιλογή Γονιδίων** που πιθανά διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο κατά την προεμφυτευτική ανάπτυξη των εμβρύων ή έχουν συσχετιστεί με την ποιότητά τους
  - **18 ΓΟΝΙΔΙΑ**
    AIRE, AMH, AURKA, AURKB, AURKC, FSHR, HSPA4L, HUWE1, INTU, KHDC3L, LARP1B, MFSD8, MTHFR, PGRMC2, PLK4, SENP7, SLC25A31, WBP1
  - **9 ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΕΣ ΠΑΡΑΛΛΑΓΕΣ**
    rs175080 (MLH3), rs2305957 (HSPA4L), rs1799963 (F2), rs6025 (F5), rs1799768 (SERPIN1), rs5918 (ITGB3), rs5985 (F13A1), rs1805087 (MTR), rs1801394 (MTRR)

Μεθοδολογία

- Σχεδιασμός πάνελ για ανάλυση εξωνίων και παρακείμενων ιντρονικών περιοχών με την τεχνολογία αλληλούχισης επόμενης γενιάς (NGS)
  - **Σχεδιασμός πάνελ- εμπλουτισμός βιβλιοθήκης**: QIAseq™ Targeted DNA Custom Panel, Qiagen, σύστημα Miseq Reagent Nano kit v2 της Illumina
  - **Ποσοτικός προσδιορισμός DNA** (δείγματος και βιβλιοθήκης): αναλυτής Qubit Fluorimeter, Invitrogen
  - **Ποιοτικός έλεγχος**: σύστημα Bioanalyzer 2100, Agilent
  - **Ανάλυση/αξιολόγηση**: λογισμικά Qiaseq DNA V3 panel analysis και VarAFT 2.13

ΥΛΙΚΟ

- **Δείγμα περιφερικού αίματος** από:
  - **88 γόνιμες γυναίκες** που πραγματοποίησαν **107** κύκλους IVF προκειμένου να πραγματοποιηθεί Προεμφυτευτική Γενετική Ανάλυση για 15 μονογονιδιακά νοσήματα στο Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής και

    (απουσία οποιασδήποτε ένδειξης υπογονιμότητας, ιστορικό εγκυμοσύνης, φυσιολογικό σπέρμα, ηλικία)
  - **13 υπογόνιμες γυναίκες** που κατέφυγαν στην IVF με σκοπό τον Προεμφυτευτικό Γενετικό Έλεγχο για τον εντοπισμό ευπλοειδικών εμβρύων
  - **Έμβρυα** ακατάλληλα για εμβρυομεταφορά (παθολογικά ή κακής ποιότητας)

- Χαρακτηριστικά ασθενών και στοιχεία κύκλων IVF (αναδρομικά και προοπτικά) και **εμβρυολογικής αξιολόγησης** όπως:
  - πρωτόκολλο διέγερσης, αριθμός ωαρίων, μορφολογική και μορφοκινητική αξιολόγηση

ΠΡΟΚΑΤΑΡΚΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

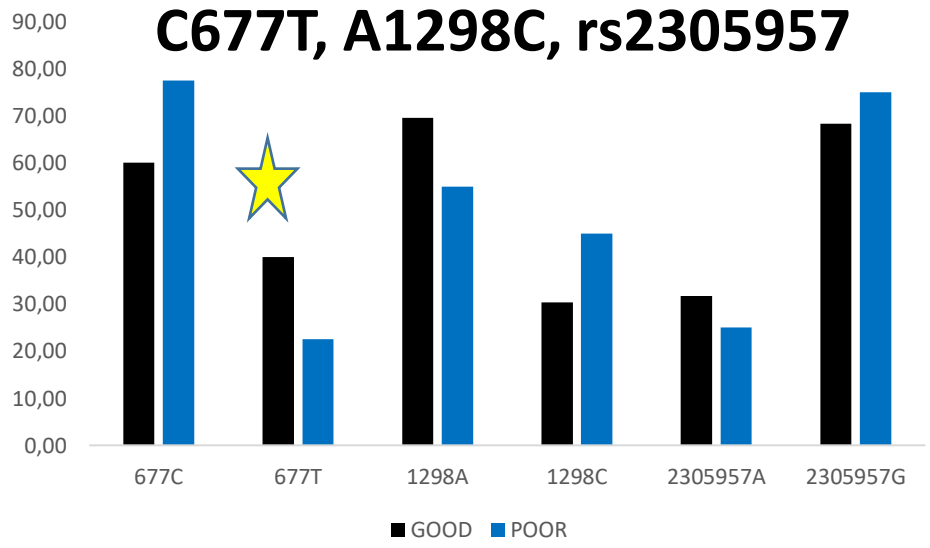
- Η κάλυψη των περιοχών **ήταν τουλάχιστον 20x** σε όλα τα δείγματα και όλες τις στοχευμένες κωδικοποιούσες περιοχές.

- Εντοπίστηκαν **121 συνολικά γονιδιακές παραλλαγές** (μία έως έντεκα παραλλαγές στο κάθε γονίδιο)

- Δημιουργήθηκαν οι παρακάτω ομάδες στις οποίες θα μελετηθούν τυχόν διαφορές στις παραλλαγές που εντοπίζονται από το NGS
  - Αριθμός ωαρίων, ποσοστό γονιμοποιημένων ωαρίων
  - Ποσοστό γονιμοποιημένων ωαρίων (2PN) να φτάσουν στο στάδιο της βλαστοκύστης την 5^{η} ημέρα της ανάπτυξης (blastocyst development rate)

ΠΡΟΚΑΤΑΡΚΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Συχνότητα αλληλομόρφων στις ομάδες Α και Β για τους πολυμορφισμούς C677T, A1298C, rs2305957



- **Αναμενόμενη συχνότητα αλληλομόρφων στο υπό εξέταση δείγμα σε σχέση με το γενικό πληθυσμό**
- **<u>Πιθανή σημασία αλληλομόρφου Τ του πολυμορφισμού rs1801133 στην ανάπτυξη των εμβρύων</u>**

- **Δεν έχει επαληθευτεί το εύρημα σχετικά με τον πολυμορφισμό rs2305759 στο χρωμόσωμα 4 στο δικό μας γόνιμο πληθυσμό**
  ανάλυση γονιδίων *INTU, SLC25A31, HSPA4L, PLK4, MFSD8, LARP1B, PGRMC2* και σύγκριση με υπογόνιμο πληθυσμό
- **Διερεύνηση 122 SNPs σε βάσεις δεδομένων**
  FII: Rs1799963, **KHDC3L**: rs561930, rs564533, **FSHR**: rs6166

Συμπεράσματα-Μελλοντικές Προοπτικές

- Τα προκαταρκτικά πορίσματα της μελέτης, αποδεικνύουν ότι το NGS αποτελεί μια **αξιόπιστη προσέγγιση** για τον έλεγχο παραλλαγών σε πολλές γονιδιακές περιοχές ταυτόχρονα
- **Ίδρυση και εμπλουτισμός βάσης δεδομένων**
- Το απαραίτητο μέγεθος δείγματος για το κάθε μέρος της μελέτης, προκειμένου να εξασφαλιστεί ισχύς της μελέτης 80%-90%, θα υπολογιστεί από το Κέντρο Κλινικής Επιδημιολογίας & Έκβασης Νοσημάτων, χρησιμοποιώντας βιβλιογραφικά δεδομένα και υποθέσεις.
- Ερωτήματα:
  - Ποιά από αυτά τα γονίδια έχουν σημαντικό ρόλο κατά την προεμφυτευτική ανάπτυξη?
  - Περαιτέρω διερεύνηση των γονοτύπων στα έμβρυα

Σας ευχαριστώ για την προσοχή σας

- **Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής**, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών: ***Μαμά Θ., Βρεττού Χ., Joanne Traeger-Συνοδινού***
- **Μονάδα Ενδοκρινολογίας, Μεταβολισμού και Διαβήτη**, Α' Παιδιατρική Κλινική, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών: ***Φυλακτού Ε.***
- **Μονάδες Ιατρικώς Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής**
  - «Εμβρυογένεσις», Αθήνα: ***Τσορβά Ε., Ζαχαρία Σ., Χριστόπικου Δ.***
  - «Embryolab Fertility Clinic», Θεσσαλονίκη: ***Ωραιοπούλου Χ.,Μωυσίδου Μ., Χατζηπαρασίδου Α.***
  - «Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής», Πανεπιστημιακή Μαιευτική και Γυναικολογική Κλινική, Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Ιωαννίνων: ***Χατζή Ε., Γεωργίου Γ.***
- **Κέντρο επιδημιολογίας CLEO Research**: ***Κουρλαμπά Γ.***
- **Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών:**

Η μεταδιδακτορική έρευνα υλοποιήθηκε με υποτροφία του ΙΚΥ η οποία χρηματοδοτήθηκε από την Πράξη «Ενίσχυση Μεταδιδακτόρων Ερευνητών/Ερευνητριών» από τους πόρους του ΕΠ «ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΔΥΝΑΜΙΚΟΥ, ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗ» με άξονες προτεραιότητας 6, 8, 9 και συγχρηματοδοτείται από το Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο- ΕΚΤ και το ελληνικό δημόσιο