



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

Εθνικών και Καποδιστριακών
Πανεπιστήμιων Αθηνών

ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837



ΕΡ- 17. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΓΟΝΙΔΙΑΚΩΝ ΠΑΡΑΛΛΑΓΩΝ ΩΣ ΔΕΙΚΤΕΣ ΤΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΕΜΒΡΥΟΥ ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

Γ. Κάκουρου¹, Ε. Φυλακτού¹, Χ. Βρεττού¹, Μαμά Θ¹, Ε. Τσορβά², Χ. Ωραιοπούλου³, Δ.
Χριστόπικου², Σ. Ζαχαρία², Μ. Μωυσίδου³, Α. Χατζηπαρασίδου³, Ι.Ρ. Traeger-Συνοδινού¹

1. Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα, Ελλάδα, 2. “Εμβρυογένεσις” Ιατρική Μονάδα Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής, Αθήνα, Ελλάδα, 3. “Embryolab Fertility Clinic” Μονάδα Ιατρικώς Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής, Καλαμαριά, Θεσσαλονίκη, Ελλάδα

ΕΙΣΑΓΩΓΗ/ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Παρά τις εξελίξεις στο χώρο της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (ART) τα τελευταία 40 χρόνια, τα ποσοστά επιτυχίας της εξακολουθούν να παραμένουν χαμηλά με <30% των κύκλων να οδηγούν σε γέννηση νεογνού. Πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν ότι το γενετικό προφίλ της υποψήφιας μητέρας μπορεί να επηρεάζει την ποιότητα των ωαρίων και εμβρύων της και να συμβάλλει στην πρόβλεψη της πιθανότητας καλής έκβασης μιας προσπάθειας ART.

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η ανάπτυξη μεθοδολογίας για διερεύνηση επιλεγμένων γονιδίων με σκοπό την ανάδειξη γονιδιωματικών δεικτών που θα χρησιμεύσουν ως προγνωστικά εργαλεία της ART.

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



Επιχειρησιακό Πρόγραμμα
Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού,
Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση
Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



«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»

ΥΛΙΚΟ

- **Δείγμα περιφερικού αίματος** από: **61 γόνιμες γυναίκες** που ξεκίνησαν κύκλο IVF προκειμένου να πραγματοποιηθεί Προεμφυτευτική Γενετική Διάγνωση (ΠΓΔ) και **13 υπογόνιμες γυναίκες** που κατέφυγαν στην IVF με σκοπό τον Προεμφυτευτικό Γενετικό Έλεγχο (ΠΓΕ) για τον εντοπισμό ευπλοειδικών εμβρύων
- **Στοιχεία εμβρυολογικής αξιολόγησης** από τους παραπάνω κύκλους αναδρομικής μελέτης: 83 κύκλοι ΠΓΔ και 13 κύκλοι ΠΓΕ

ΕΠΙΛΟΓΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

- Βάσει της βιβλιογραφίας επιλέχθηκαν οι κωδικοποιούσες περιοχές 18 γονιδίων (AIRE, AMH, AURKA, AURKB, AURKC, FSHR, HSPA4L, HUWE1, INTU, KHDC3L, LARP1B, MFSD8, MTHFR, PGRMC2, PLK4, SENP7, SLC25A31, WBP1) και 9 στοχευμένες παραλλαγές (rs175080 (MLH3), rs2305957 (HSPA4L), rs1799963 (F2), rs6025 (F5), rs1799768 (SERPIN1), rs5918 (ITGB3), rs5985 (F13A1), rs1805087 (MTR), rs1801394 (MTRR)) που πιθανά διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο κατά την προεμφυτευτική ανάπτυξη των εμβρύων ή έχουν συσχετιστεί με την ποιότητά τους.
- Για το σχεδιασμό του συγκεκριμένου πάνελ (εξώνια και παρακείμενες ιντρονικές περιοχές) χρησιμοποιήθηκε η υπηρεσία QIAseq™ Targeted DNA Custom Panel Builder της εταιρείας Qiagen. Ο εμπλουτισμός της βιβλιοθήκης πραγματοποιήθηκε με το Qiaseq™ Targeted Custom Panel της εταιρείας Qiagen και η αλληλούχιση πραγματοποιήθηκε με το σύστημα Miseq Reagent Nano kit v2 της Illumina.
- Για τον ποσοτικό προσδιορισμό του DNA (δείγματος και βιβλιοθήκης) χρησιμοποιήθηκε ο αναλυτής Qubit Fluorimeter (Invitrogen) και για τον ποιοτικό έλεγχο το σύστημα Bioanalyzer 2100 (Agilent).
- Η ανάλυση/αξιολόγηση των παραλλαγών πραγματοποιήθηκε με τα λογισμικά Qiaseq DNA V3 panel analysis και VarAFT 2.13

ΠΡΟΚΑΤΑΡΚΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Κατόπιν συλλογής των στοιχείων εμβρυολογικής παρακολούθησης δημιουργήθηκαν οι παρακάτω ομάδες στις οποίες θα μελετηθούν τυχόν διαφορές στις παραλλαγές που εντοπίζονται από το NGS.

Ομάδα Α: γόνιμες γυναίκες,

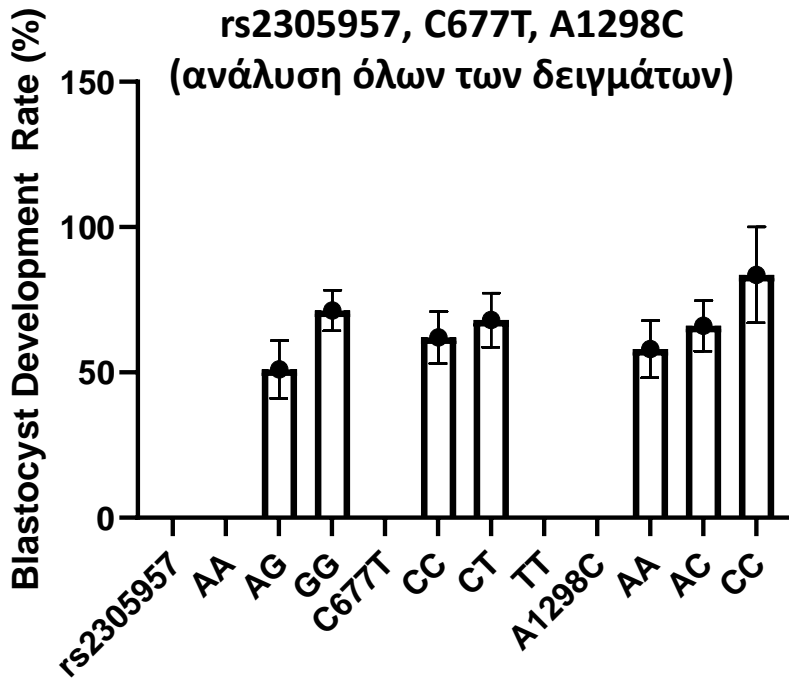
Ομάδα Β: υπογόνιμες γυναίκες (κατόπιν αξιολόγησης στη μονάδα ιατρικώς υποβοηθούμενης αναπαραγωγής)

Υπο-Ομάδα Α-Γ: γόνιμες γυναίκες <37 χρονών που υπόκεινται σε IVF με σκοπό την ΠΓΔ, με συλλογή >4 ωαρίων κατόπιν ωθηκικής διέγερσης, με **>60%** των γονιμοποιημένων ωαρίων (2PN) να φτάσουν στο στάδιο της βλαστοκύστης την 5^η ημέρα της ανάπτυξης (blastocyst development rate)

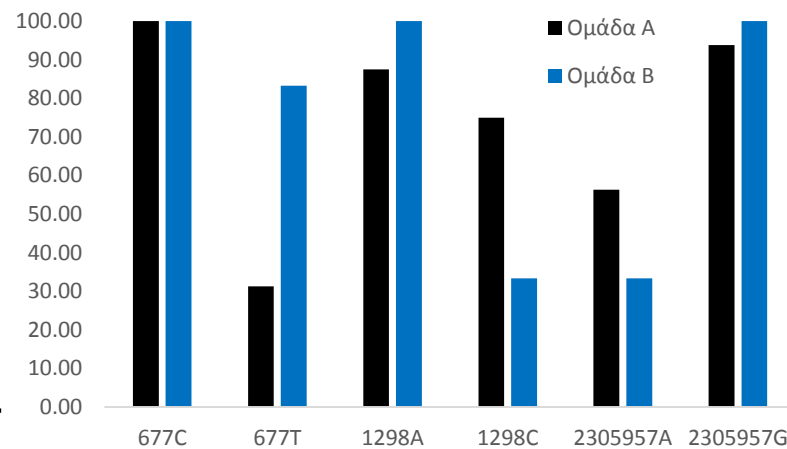
Υπο-Ομάδα Α-Δ: γόνιμες γυναίκες <37 χρονών που υπόκεινται σε IVF με σκοπό την ΠΓΔ, με συλλογή >4 ωαρίων κατόπιν ωθηκικής διέγερσης, με **<30%** των γονιμοποιημένων ωαρίων (2PN) να φτάσουν στο στάδιο της βλαστοκύστης (5^η ημέρα).

- Μέχρι στιγμής έχουν αναλυθεί τα αποτελέσματα από 24 γυναίκες.
- Η κάλυψη των περιοχών ήταν τουλάχιστον 20x σε όλα τα δείγματα και όλες τις στοχευμένες κωδικοποιούσες περιοχές.
- Εντοπίστηκαν 88 συνολικά γονιδιακές παραλλαγές σε 16 από τα 18 εξεταζόμενα γονίδια (μία έως οκτώ παραλλαγές στο κάθε γονίδιο) που θα μελετηθούν στις παραπάνω ομάδες. Η αρχική ανάλυση επικεντρώθηκε στους πολυμορφισμούς MTHFR:c.677C>T, MTHFR:c.1298A>C και rs2305759 στο χρωμόσωμα 4 που έχουν συσχετιστεί με την ποιότητα των εμβρύων σε υπογόνιμες γυναίκες. Λόγω του μικρού δείγματος δεν είναι εφικτή ακόμα η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων.

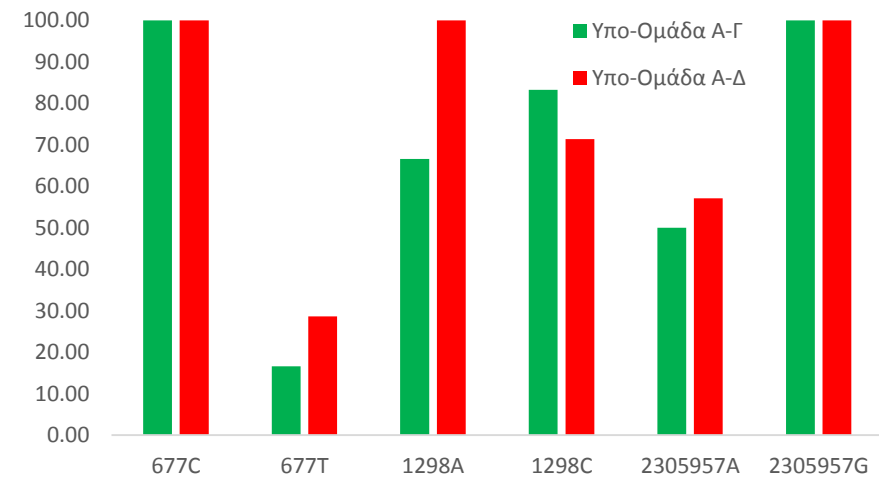
Ποσοστό εμβρύων στο στάδιο της βλαστοκύστης (5η ημέρα) για τους πολυμορφισμούς rs2305957, C677T, A1298C (ανάλυση όλων των δειγμάτων)



Συχνότητα αλληλομόρφων στις ομάδες A και B για τους πολυμορφισμούς C677T, A1298C, rs2305957



Συχνότητα αλληλομόρφων στις υπο-ομάδες A-Γ και A-Δ για τους πολυμορφισμούς C677T, A1298C, rs2305957



ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ:

Τα προκαταρκτικά πορίσματα της μελέτης, αποδεικνύουν ότι το NGS αποτελεί μια οικονομική και αξιόπιστη προσέγγιση για τον έλεγχο παραλλαγών σε πολλές γονιδιακές περιοχές ταυτόχρονα. Η διερεύνηση του γενετικού προφίλ γυναικών στα γονίδια/παραλλαγές που επελέγησαν πιθανά δύναται να συντελέσει στην πρόβλεψη της επιτυχίας μιας προσπάθειας IVF και επομένως στον καθορισμό των αναπαραγωγικών επιλογών του ζευγαριού.