

Αργυρώ Γλάβα

«Επίπεδα ελεύθερου κυτταρικού DNA (cell-free DNA) στο ωοθυλακικό υγρό φυσιολογικών και πτωχών απαντητριών σε φυσικούς κύκλους εξωσωματικής γονιμοποίησης»

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Μία από τις προκλήσεις στον χώρο της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής είναι η αύξηση του ποσοστού των καλής ποιότητας εμβρύων και των επιτυχημένων κυήσεων. Το ωοθυλακικό υγρό ως το άμεσο μικροπεριβάλλον του ωαρίου, του παρέχει όλα τα απαραίτητα συστατικά για να το κάνει ικανό προς γονιμοποίηση. Γι' αυτό και πολλές μελέτες εστιάζουν σε μη επεμβατικούς βιοδείκτες στο ωοθυλακικό υγρό το οποίο συλλέγεται από γυναίκες που προορίζονται για εξωσωματική γονιμοποίηση. Το cell free DNA στο ωοθυλακικό υγρό ξεκίνησε να μελετάται σαν ένας από αυτούς τους βιοδείκτες. Πρόκειται για τμήματα DNA χαμηλού μοριακού βάρους που απελευθερώνονται στο εξωκυττάριο περιβάλλον μέσω απόπτωσης ή νέκρωσης και οι υψηλές συγκεντρώσεις τους έχουν συνδεθεί με διάφορες παθολογικές καταστάσεις, κυρίως καρκίνο. Στην παρούσα προοπτική μελέτη μελετήθηκε το cell free DNA (cf-DNA) στο ωοθυλακικό υγρό πτωχών και καλών απαντητριών που ακολουθούν φυσικούς κύκλους εξωσωματικής γονιμοποίησης, με τη μέθοδο της Real Time PCR. Για το σκοπό αυτό επιλέχθηκαν δύο set primers οι ALU115 και ALU247 που ενισχύουν τμήματα μικρού και μεγάλου μήκους ή μόνο μεγάλου μήκους αντίστοιχα. Ο λόγος Q247/Q115 αντιπροσωπεύει το cf-DNA integrity (ακεραιότητα). Το εύρος αυτού του λόγου αντιστοιχεί είτε σε απόπτωση όταν πλησιάζει το 0 είτε σε νέκρωση όταν πλησιάζει το 1. Οι πτωχές απαντήτριες αποτελούν μια ιδιαίτερη ομάδα ασθενών, μια και συνήθως είναι αυξημένης ηλικίας (≥ 40) ή δεν αποκρίνονται στην ωοθηκική διέγερση. Έχουν εφαρμοστεί πολλές εναλλακτικές θεραπείες γονιμότητας γι' αυτή την κατηγορία γυναικών και μένει να εξακριβωθεί αν οι φυσικοί κύκλοι έχουν ευεργετικό αποτέλεσμα. Τα αποτελέσματα από την ποσοτικοποίηση του cf-DNA προτείνουν ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν ένας δείκτης απόπτωσης των ωαρίων και των κοκκωδών κυττάρων. Από τη σύγκριση των επιπέδων του cf-DNA μεταξύ των δύο ομάδων δε διαπιστώθηκε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά υποδεικνύοντας ότι τα ποσοστά απόπτωσης φαίνεται να είναι στα ίδια επίπεδα ανεξαρτήτως ωοθηκικού αποθέματος και απόκρισης. Το ALU115 συσχετίστηκε με τον αριθμό των ωοθυλακίων που παρατηρήθηκαν κατά το υπερηχογράφημα, ενώ το cf-DNA integrity συσχετίστηκε αρνητικά με τον αριθμό των MII ώριμων ωαρίων που συλλέχθηκαν. Επομένως, βιοδείκτες της νέκρωσης και της απόπτωσης φαίνεται ότι είναι στενά συνδεδεμένοι με το αποτέλεσμα των φυσικών κύκλων-όσον αφορά τον αριθμό και την ωριμότητα των ωαρίων. Αυτό είναι ένα εύρημα ανεξάρτητα από το αν ο πληθυσμός προέρχεται από καλές ή πτωχές απαντήτριες. Βέβαια περισσότερες τυχαιοποιημένες μελέτες πρέπει να γίνουν ούτως ώστε να εξακριβωθεί αν όντως η εφαρμογή των φυσικών κύκλων έχει ευεργετικά αποτελέσματα και ιδίως στην κατηγορία των πτωχών απαντητριών.

ABSTRACT

“Cell free DNA levels in follicular fluid of normal and poor responders undergoing natural cycles during IVF treatment”

One of the challenges in the field of assisted reproduction is to increase the number of good-quality embryos and successful pregnancy rate. Follicular fluid as the immediate microenvironment of the oocyte, provides it with all the necessary constituents to make it competent towards fertilization. For this purpose, numerous studies focus on non-invasive biomarkers in follicular fluid collected. Cell-free DNA in follicular fluid has been studied as one of these biomarkers. Cell-free DNA consists of low molecular weight DNA fragments released into the extracellular environment through apoptosis or necrosis and its high concentrations have been associated with various pathological conditions, particularly cancer. In this prospective study, cell free DNA (cf-DNA) was studied in follicular fluid of poor and normal responders following natural cycles of IVF using the Real Time PCR method. ALU115 and ALU247 were employed identifying shorter and longer, along with only longer cf-DNA fragments respectively. The ratio Q247/Q115 represents cf-DNA integrity. The range of the ratio corresponds to either apoptosis or necrosis depending on whether the ratio is closer to 0 or 1 respectively. Poor responders are a special group of patients, since they are usually of advanced age (≥ 40) or do not respond to ovarian stimulation. Many alternative fertility treatments have been implemented for this category of women and it remains to be determined whether natural cycles have a beneficial effect. Results from quantification of cf-DNA suggest that it can be used as an apoptosis biomarker of oocytes and granulosa cells. Comparison of cf-DNA levels between the two groups did not reveal any statistically significant difference indicating that apoptosis rates are at the same level independent of ovarian reserve and response. Based on our results ALU115 was correlated with the number of follicles as observed via ultrasonography, while cf-DNA integrity was found to be negatively correlated with the number of MII mature oocytes retrieved. Therefore, biomarkers of necrosis and apoptosis seem to be closely linked to the natural cycles' outcome- with respect to number and oocyte maturation status. This stands as a finding irrespectively of the population being of poor or normal response to stimulation. Of course, more randomized studies have to be conducted to ascertain whether the employment of natural cycles should be cemented as the optimal approach, particularly in the category of poor responders.