

Πετρούλα Τσιούλου

«Μελέτη της φυσιολογίας του φαινομένου δεύτερου ωοθυλακικού κύματος: αξιολόγηση επιπέδων ελεύθερου κυτταρικού DNA σε ωοθυλακικό υγρό πτωχών απαντητριών, που προκύπτει από την λήψη ωαρίων κατά την ωχρινική φάση, σε φυσικούς κύκλους εξωσωματικής γονιμοποίησης»

Περίληψη

Η πτωχή ωοθηκική απόκριση αποτελεί μια καλά μελετημένη αιτία υπογονιμότητας, συνοδευόμενη από λίγα ώρια χαμηλής ποιότητας, γεγονός που οδηγεί σε κακή πρόγνωση των αποτελεσμάτων της εξωσωματικής γονιμοποίησης. Η ετερογένεια της ομάδας αυτής επιφέρει την απουσία ομοφωνίας αναφορικά με τη διάγνωση και τον ορισμό των πτωχών απαντητριών, κάτι που δυσκολεύει τη διαχείρισή τους. Πρόσφατα, η καινοτόμος προσέγγιση της διπλής ωοληψίας κατά τη διάρκεια ωοθυλακικής και ωχρινικής φάσης σε ένα έμμηνο κύκλο έχει εισαχθεί στην κλινική πρακτική της εξωσωματικής γονιμοποίησης. Η ομάδα μας πρότεινε το ακρωνύμιο LuPOR για να περιγράψει την πρακτική της ωοληψίας κατά την ωχρινική φάση. Αυτή βασίζεται σε προηγούμενες παρατηρήσεις σε ζωικά μοντέλα που αναφέρουν την ύπαρξη δύο ή τριών ωοθυλακικών κυμάτων κατά τη διάρκεια ενός έμμηνου κύκλου, το οποίο αντιβαίνει στην υπάρχουσα θεωρία της ωοθυλακιογένεσης. Το προαναφερθέν φαινόμενο είναι γνωστό ως «δεύτερο ωοθυλακικό κύμα» κι έχει εντοπιστεί και στις γυναίκες. Η τρέχουσα βιβλιογραφία εστιάζει στην διπλή διέγερση των ωοθηκών και στη διπλή ωοληψία στον ίδιο εμμηνορρυσιακό κύκλο, δείχνοντας παρόμοιες εμβρυολογικές παραμέτρους από δεδομένα των δυο φάσεων. Επιπλέον, μελέτες που συγκρίνουν την προσέγγιση της διπλής διέγερσης και ωοληψίας με το συμβατικό πρωτόκολλο αποκαλύπτουν ενθαρρυντικά αποτελέσματα αναφορικά με την πρώτη επιλογή, καθώς παρέχει ένα συγκεντρωτικό αριθμό διαθέσιμων ωαρίων σε συντομότερο χρονικό διάστημα. Ωστόσο, ελάχιστα είναι γνωστά σχετικά με την πρακτική της διπλής ωοληψίας κατά τη διάρκεια φυσικών κύκλων εξωσωματικής γονιμοποίησης, αλλά και για την υποκείμενη φυσιολογία του μηχανισμού του φαινομένου του δεύτερου ωοθυλακικού κύματος. Ταυτόχρονα, πολλοί βιοδείκτες έχουν προταθεί για την αξιολόγηση των ωαρίων και εμβρύων, με την καινοτόμο επιλογή του μη επεμβατικού βιοδείκτη του ελεύθερου κυτταρικού DNA (cfDNA) στο ωοθυλακικό υγρό να βρίσκεται στο επίκεντρο της έρευνας. Σκοπός της παρούσας προοπτικής μελέτης είναι να διερευνήσει για πρώτη φορά τη φυσιολογία του φαινομένου του δεύτερου ωοθυλακικού κύματος μέσω της αξιολόγησης των cfDNA επιπέδων στο ωοθυλακικό υγρό από την ωοθυλακική και ωχρινική φάση, σε φυσικούς κύκλους εξωσωματικής γονιμοποίησης. Το προαναφερθέν στοχεύει στο να αποκαλύψει μια πιθανή συσχέτιση του αριθμού και της ωριμότητας των ωαρίων, καθώς και του αριθμού των γονιμοποιημένων ζυγωτών έπειτα από την έγχυση. Ο πληθυσμός της μελέτης αποτελείται από 47 πτωχές απαντήτριες ηλικίας από 32 έως 48 ετών, που έχουν χαρακτηριστεί βάσει των κριτηρίων της Bologna και έχουν ενταχθεί βάσει αυστηρών κριτηρίων ένταξης και αποκλεισμού. Όλες οι γυναίκες ανιχνεύθηκαν με δεύτερο ωοθυλακικό κύμα κι έτσι υποβλήθηκαν σε δεύτερη ωοληψία του ίδιου έμμηνου κύκλου κατά τη διάρκεια φυσικών κύκλων εξωσωματικής γονιμοποίησης. Πραγματοποιήθηκε η προετοιμασία των δειγμάτων ωοθυλακικού υγρού και η επικείμενη απομόνωση του cfDNA, με σκοπό την ποσοτικοποίηση της συγκέντρωσης του cfDNA μέσω της μεθόδου αλυσιδωτής

αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (RT-PCR). Για την RT-PCR, επιλέξαμε τους εκκινητές ALU115 και ALU247, με τους πρώτους να ενισχύουν τόσο τα μικρά όσο και τα μεγάλα θραύσματα cfDNA, ενώ οι δεύτεροι μόνο τα μεγάλα. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της R γλώσσας προγραμματισμού. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η μέση τιμή των επιπέδων των ALU115 ήταν στατιστικά σημαντικά μικρότερη κατά την ωοθυλακική φάση σε σχέση με την ωχρινική (0.79 ± 0.72 vs 1.46 ± 1.59 ng/μl, p-value=0.02). Εστιάζοντας στα αποτελέσματα της ωοθυλακικής φάσης, αποκαλύφθηκε μια στατιστικώς σημαντική συσχέτιση των επιπέδων οιστραδιόλης ορού και συγκέντρωσης ALU115 concentration (p-value=0.04) καθώς και αρνητική συσχέτιση της ακεραιότητας του cfDNA με τα επίπεδα οιστραδιόλης (p-value=0.03). Το τελευταίο παρατηρήθηκε επίσης και στην ομάδα LuPOR (p-value=0.03). Καμία άλλη στατιστικώς σημαντική συσχέτιση δε βρέθηκε μεταξύ των συγκεντρώσεων ALU115, ALU247 και ακεραιότητας cfDNA με οποιαδήποτε παράμετρο που εξετάστηκε. Τέλος, βρέθηκε στατιστικά σημαντικός μικρότερος αριθμός ωαρίων κατά την ωοληψία (1.29 ± 0.58 vs 1.09 ± 0.28 , p-value=0.02) και ώριμων MII ωαρίων (0.77 ± 0.55 vs 1.08 ± 0.61 , p-value=0.02) αναφορικά με την ωοληψία ωοθυλακικής φάσης, ύστερα από σύγκρισή του με την LuPOR ομάδα. Ωστόσο, καμία στατιστικά σημαντική διαφορά δεν αποδείχθηκε ως προς τον αριθμό των γονιμοποιημένων ζυγωτών. Τα αποτελέσματα αυτά τονίζουν την ποιότητα και της ασφάλεια την ωοληψίας τόσο κατά την ωοθυλακική όσο και κατά την ωχρινική φάση, όπως αξιολογήθηκε μέσω του αποπρωτικού δείκτη του cfDNA. Επιπροσθέτως, ενισχύουν την εγκυρότητα της LuPOR πρακτικής, καθιστώντας την σαν μια εναλλακτική και πολλά υποσχόμενη πρακτική για την χρονοευαίσθητη ομάδα των πτωχών απαντητριών. Ωστόσο, είναι αναγκαία η διεξαγωγή επιπλέον τυχαιοποιημένων μελετών με σκοπό να ενδυναμώσουν τα αποτελέσματά μας σχετικά με την αξιοποίηση της LuPOR πρακτικής σε φυσικούς κύκλους εξωσωματικής γονιμοποίησης.

“Concurring on the physiology of the second follicular wave phenomenon: evaluation of cell-free DNA levels in follicular fluid of poor responders undergoing Luteal Phase Oocyte Retrieval (LuPOR) during natural IVF cycles”

ABSTRACT

Poor ovarian response represents an in-depth studied etiology of infertility, accompanied with low quantity and quality of oocytes that leads to poor prognosis of in vitro fertilization (IVF) outcomes. The heterogeneity of this group leads to the absence of consensus regarding diagnosis and definition of poor responders, which challenges their efficient management. Recently, the novel approach of double oocyte retrieval during both the follicular and luteal phases of a single menstrual cycle was introduced to IVF clinical practice. Our team introduced the acronym of LuPOR to describe the practice of luteal phase oocyte retrieval. This is based on previous observations in animal models reporting the existence of two or three follicular waves during a single menstrual cycle, which is averse to the prevailing theory of folliculogenesis. The aforementioned phenomenon is known as “Second Follicular Wave”, being also detected in women. Current literature mainly focuses on dual stimulation and dual oocyte retrieval in the same menstrual cycle, indicating similar embryological parameters stemming from data regarding both phases. Moreover,

studies that compared the approach of dual stimulation and oocyte retrieval to the conventional protocol, showed encouraging results with respect to the first option, providing a higher cumulative number of available oocytes in a shorter time frame. However, little is known about the practice of double oocyte retrieval during natural cycles, along with the underlying physiology with respect to the mechanism of the second follicular wave phenomenon. Concurrently, numerous biomarkers have been proposed to evaluate oocyte and embryo competency, with the novel option of the non-invasive biomarker of cell-free DNA (cfDNA) in follicular fluid (ff) to be at the spotlight of research. The aim of this prospective study is to uniquely investigate the physiology of the second follicular wave phenomenon, through the evaluation of ff cfDNA levels resulting from follicular and luteal phases of the same menstrual cycle, during natural IVF cycles. The aforementioned intents to reveal a potential association with the number and maturation status of corresponding oocytes, as well as the number of subsequent zygotes following insemination. The study population included 47 poor responders aged from 32 to 48 years, being characterized according to Bologna criteria, and enrolled based on strict inclusion and exclusion criteria. All women were detected with a second follicular wave and thus they underwent double oocyte retrieval in the same menstrual cycle during natural IVF cycles. The preparation of collected ff samples and the subsequent cfDNA extraction were conducted appropriately, resulting in cfDNA quantification through real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) method. For RT-PCR, we opted for ALU115 and ALU247 primer sets, with the first to amplify both short and long cfDNA fragments, while the second only the long ones. Statistical analysis was performed employing R statistical programming language. The results showed that the mean levels of ALU115 were statistically significant lower during FoPOR when compared to LuPOR (0.79 ± 0.72 vs 1.46 ± 1.59 ng/ μ l, p -value=0.02). Regarding FoPOR's group, a statistically significant positive correlation of serum estradiol levels and ALU115 concentration (p -value=0.04) was revealed, along with a negative correlation of cfDNA integrity and estradiol levels (p -value=0.03). The latter was also observed with respect to LuPOR's group (p -value=0.03). No other statistically significant difference was observed between ALU115, ALU247 and cfDNA integrity for any of the examined parameters. Finally, a statistically significant lower number of oocyte retrieved (1.29 ± 0.58 vs 1.09 ± 0.28 , p -value=0.02) and MII oocytes (0.77 ± 0.55 vs 1.08 ± 0.61 , p -value=0.02) regarding FoPOR were recorded when comparing FoPOR to LuPOR groups. However, no statistically significant difference was demonstrated regarding the number of 2PN zygotes. The aforementioned results highlight the quality and safety of performing retrieval in both the follicular and luteal phases, as evaluated through the apoptotic marker of ff cfDNA. Furthermore, they buttress the validity of LuPOR approach, rendering it as an alternative and highly-promising option for the time-sensitive poor responders. However, further randomized controlled trials are imperative to be conducted with the intent to strengthen our results regarding LuPOR practice during natural IVF cycles.