

# Inimese embrüonaalse arengu paradoksid

Ants Kurg

Tartu Ülikooli Molekulaar-ja Rakubioloogia Instituut  
Biotehnoloogia õppetool

Vabariiklik bioloogiaolümpiaad, 8. märts 2015

# Inimesed on suhteliselt viljatu liik

- Rasestumise võimalus menstruaaltsükli kohta on 1:3

- Rasestumise sagedus:

3 kuud - 60%

6 kuud - 75%

12 kuud - 85%

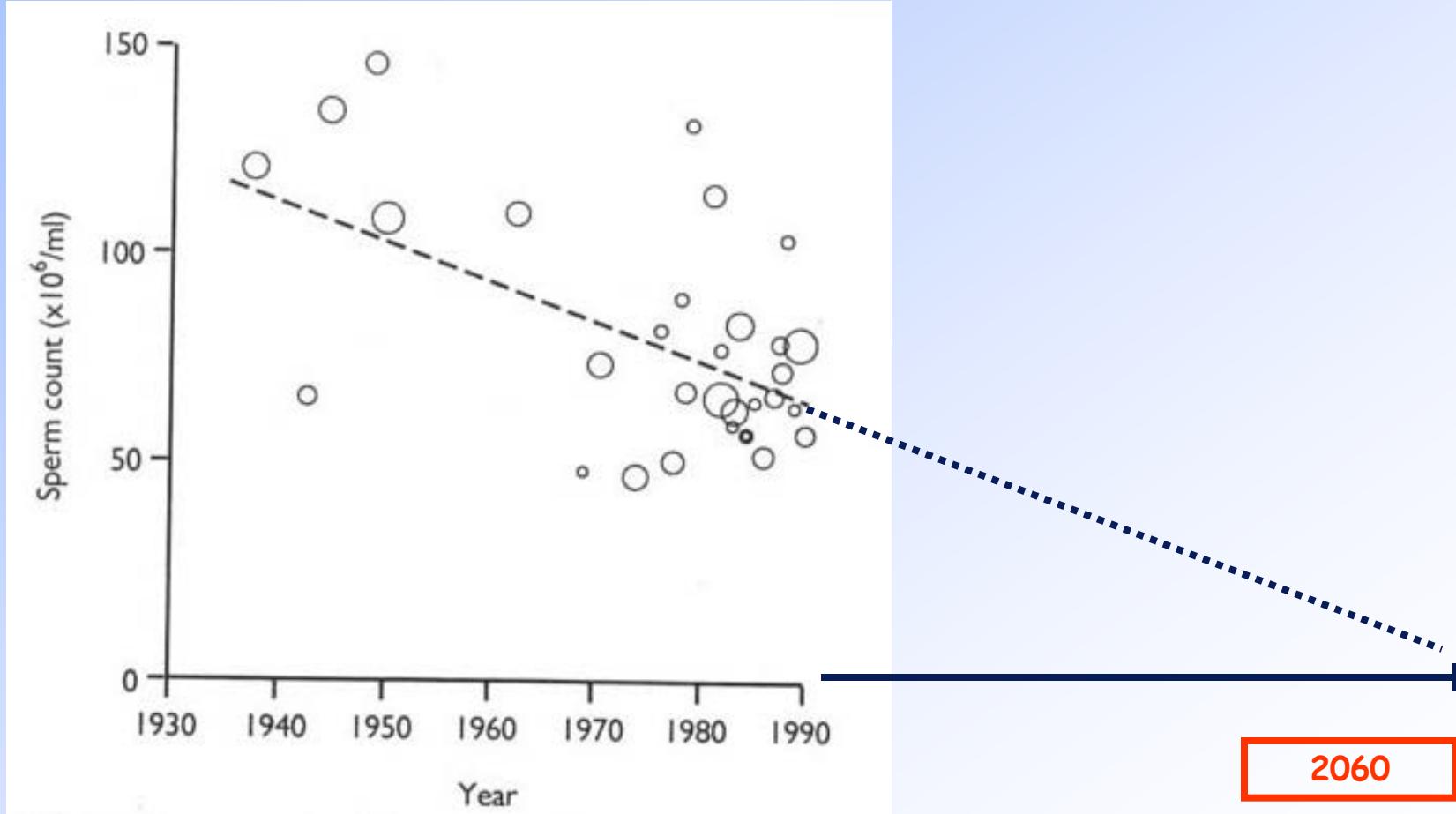
24 kuud - 95%



*Viljatud paarid*

- Keskmine raseduseni jõudmise aeg 3-4 kuud
- Viljatus on probleemiks 10% paaridest
- *In vitro* viljastamine (*in vitro* fertilization (IVF)) on aktiivselt kasutuses viljatuse raviks

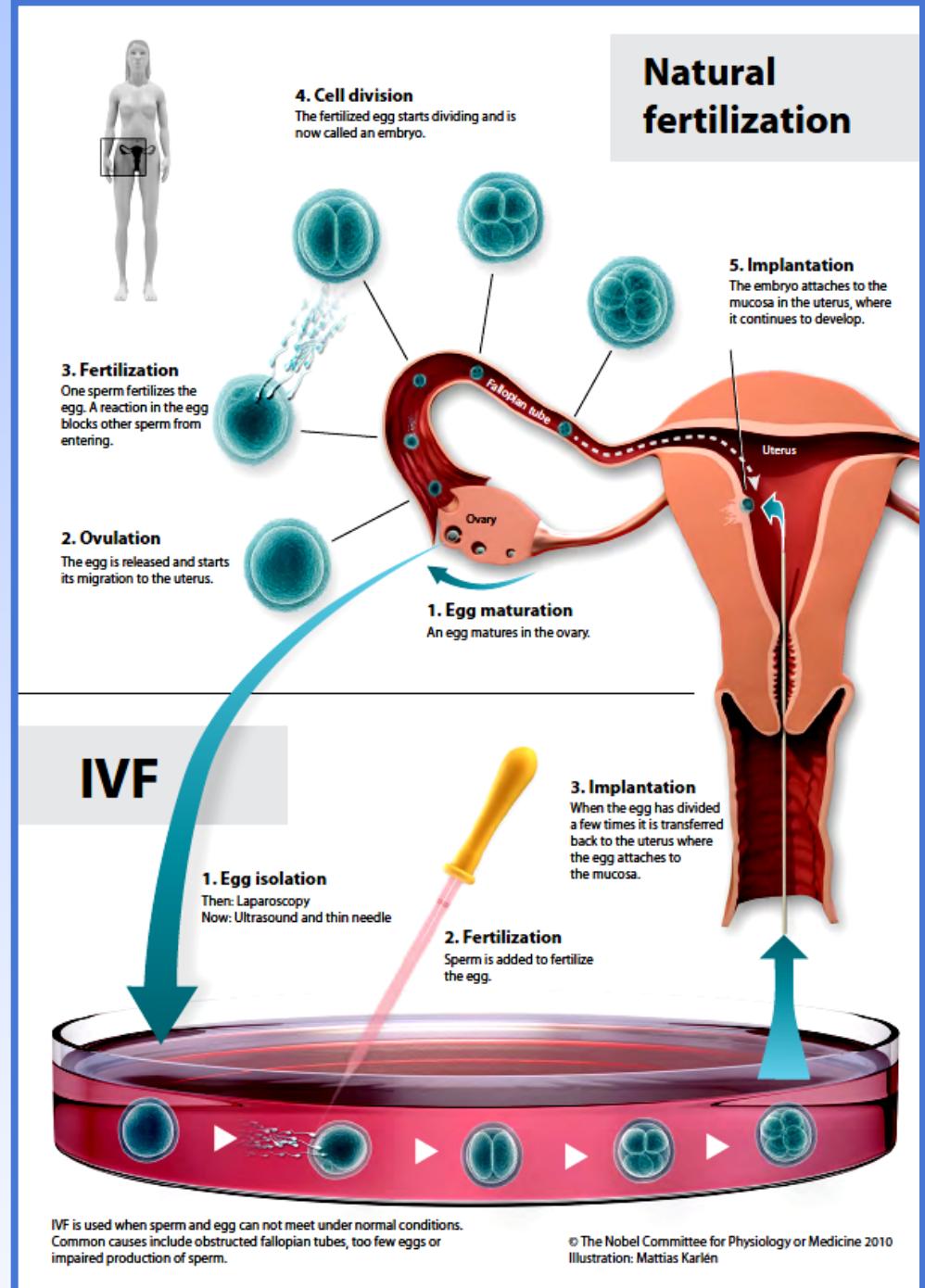
# Meeste viljakuse langus



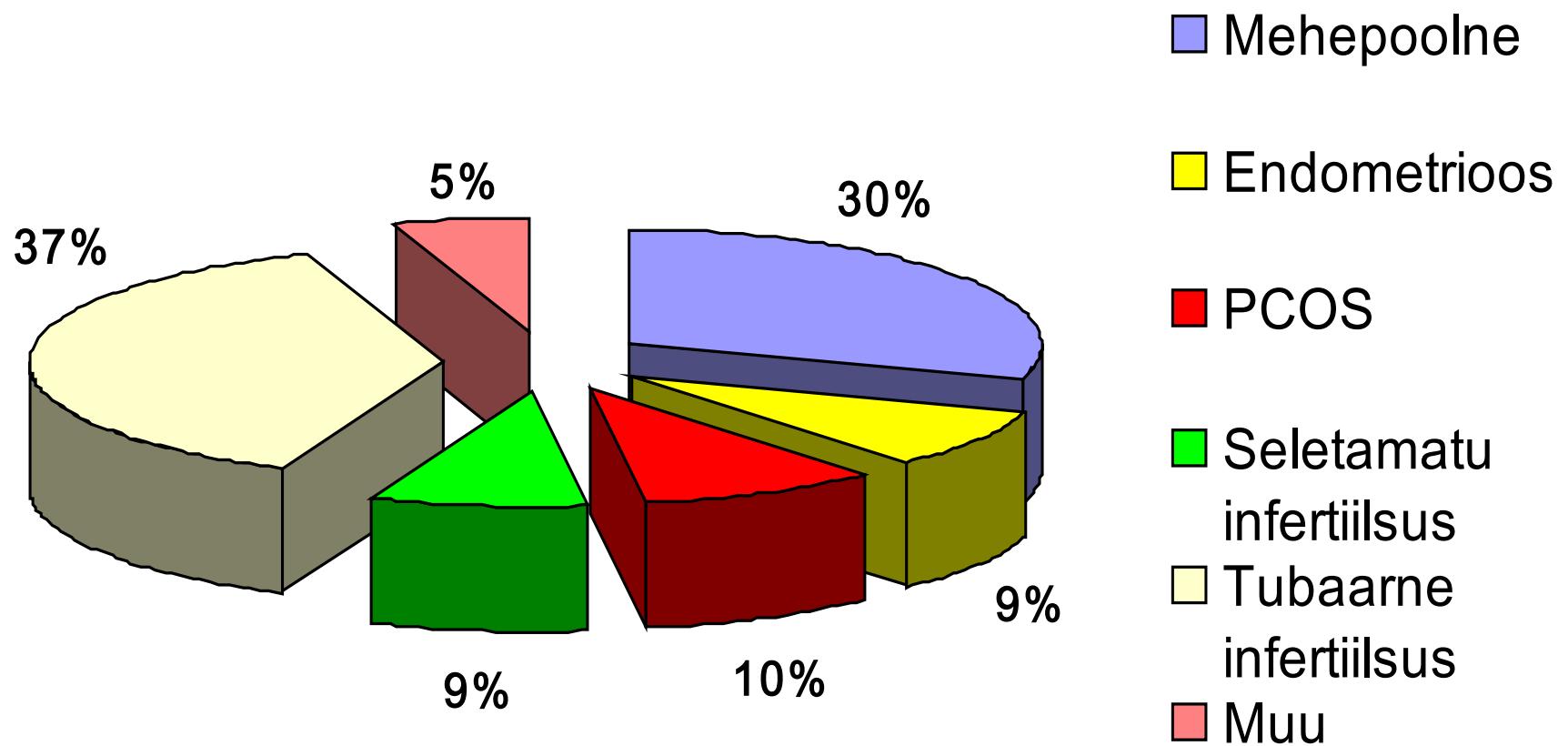


# Nobeli Füsioloogia ja Meditiini preemia 2010

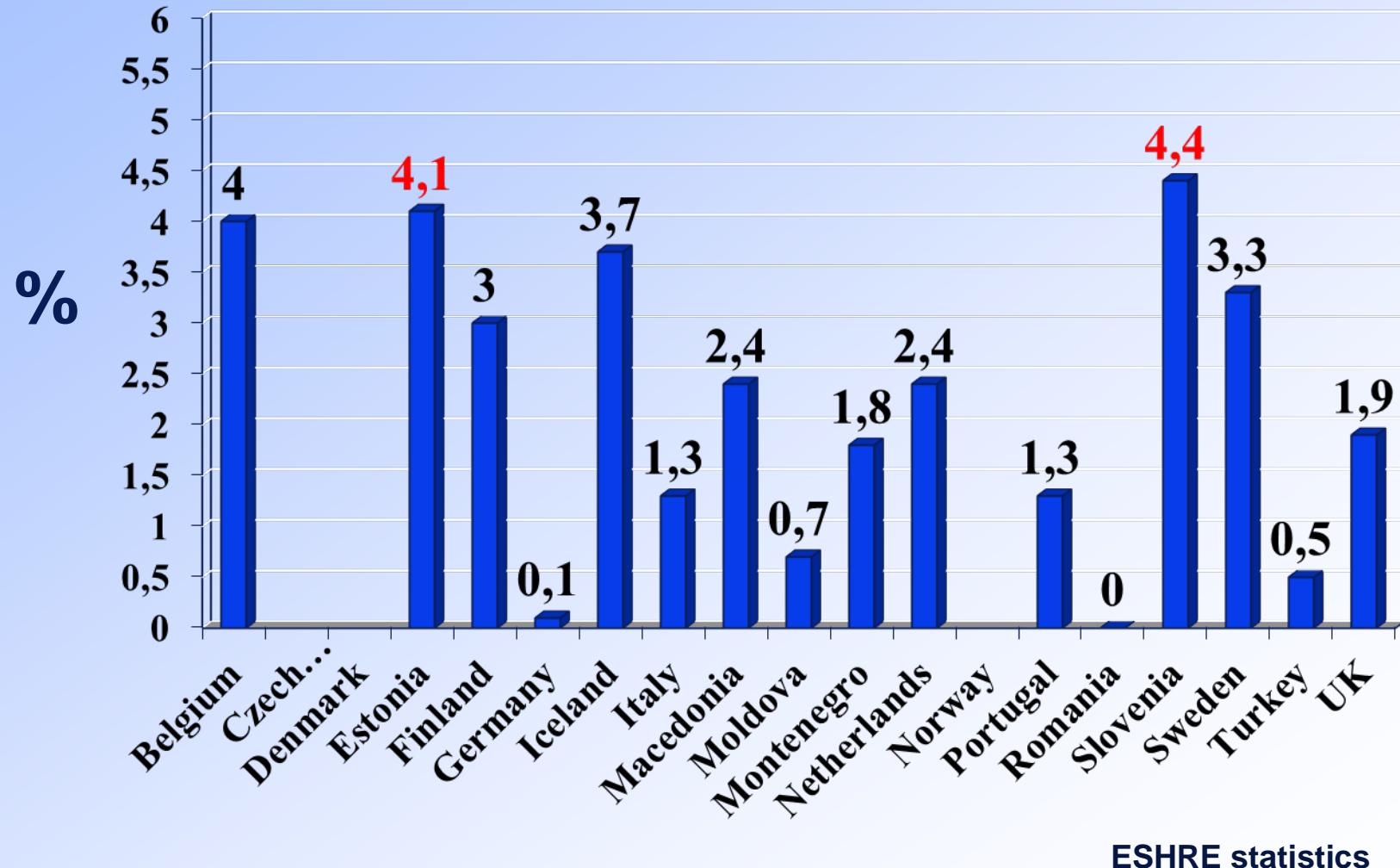
## *Robert G. Edwards*



# IVF näidustused Eestis



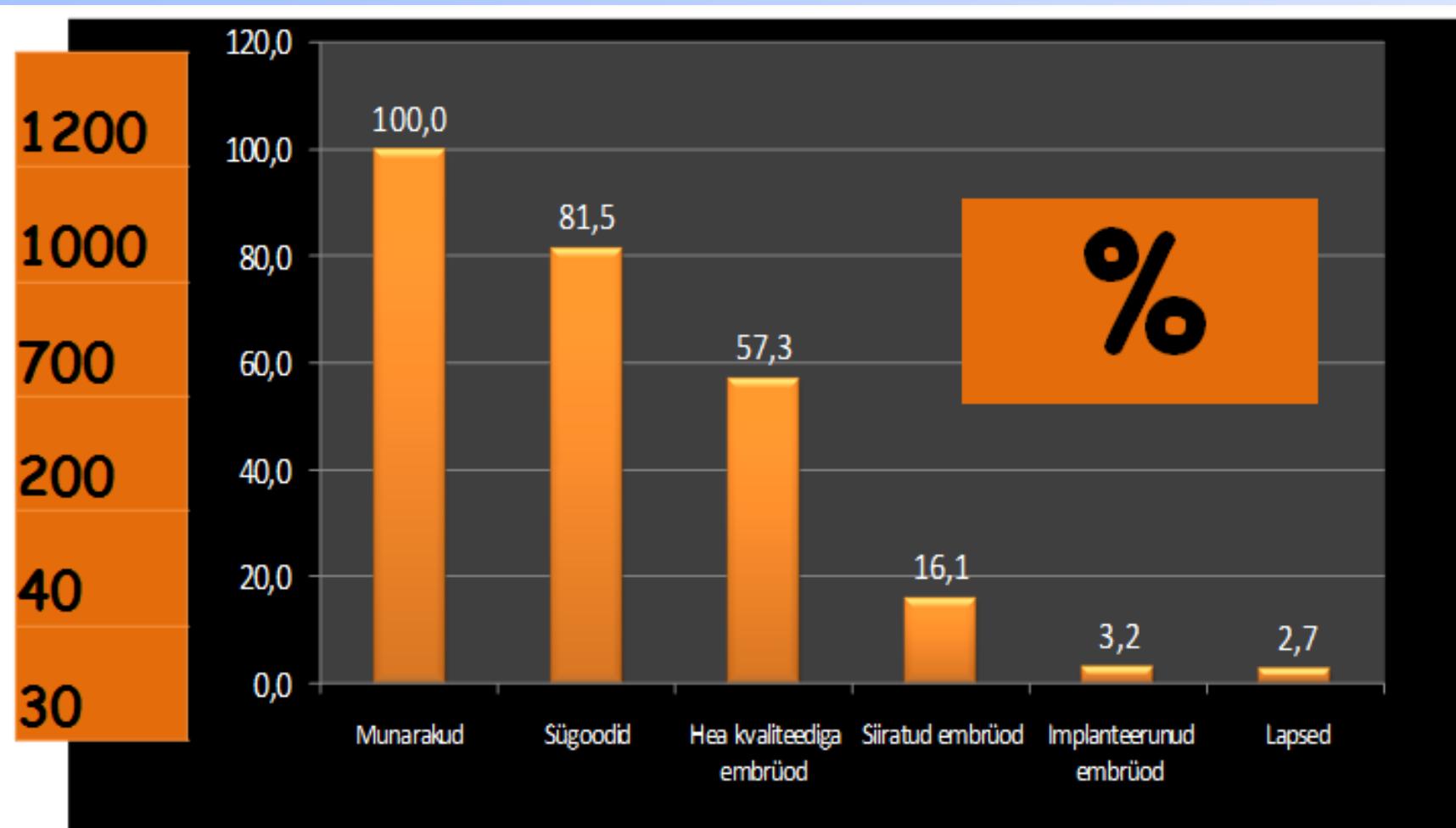
# IVF lapsed % (2008)



# IVF-i peamised puudused

- ◆ IVF-i protseduur ja rasestumise tulemused on jäänud peaaegu muutumatuteks 30 aasta jooksul. Kliiniline rasestumine ainult 25-30%.
- ◆ Parimate embrüode valik on piiratud – puuduvad selged kriteeriumid ülekandeks kõige sobivamate embrüode valikuks. Ühe embrüö ülekanne on piiratud.
- ◆ Liialt palju mitmikuid, 25-30%.
- ◆ Vähe võimalusi aidata paare korduva IVF-i ebaõnnestumise korral
- ◆ Piiratud võimalused endomeetriumi kvaliteedi analüüsimiseks ja moduleerimiseks
- ◆ Ootsüütide piiratud arv ja IVF patsientide kõrge vanus
- ◆ IVF-i kompliklatsioonid, nagu näit. munasarjade hüperstimultsiooni sündroom
- ◆ Doonor ootsüütide ja embrüode piiratud kättesaadavus
- ◆ Liialt kallis

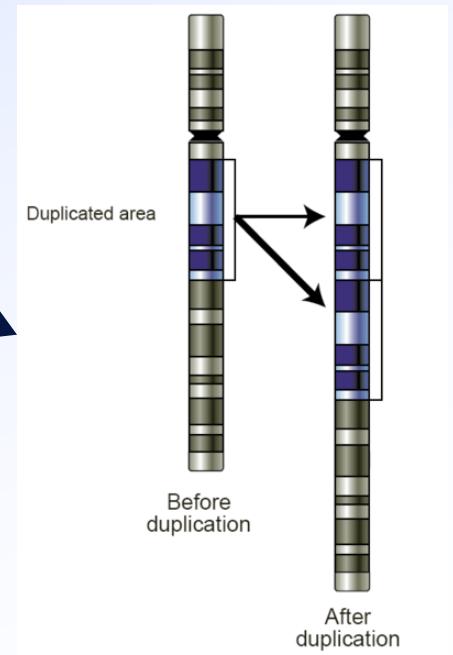
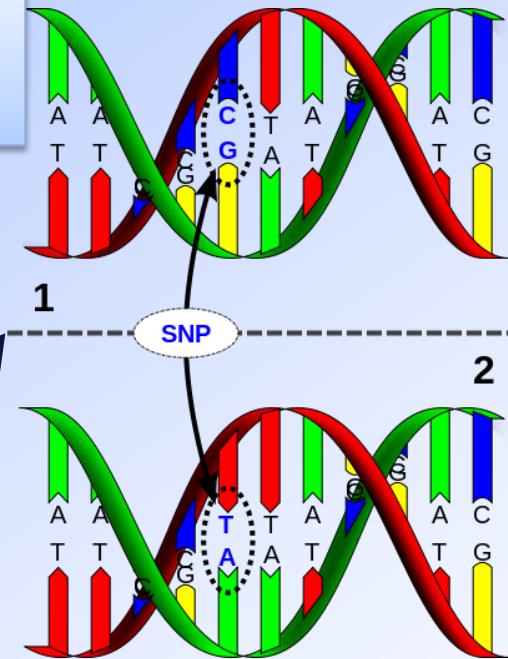
# IVF on ebaefektiivne



# Viimased saavutused

## ◆ Inimese Genoomi Projekt – HGP, 2000

- 46 kromosoomi, XX ja XY
- ca 25 000 geeni
- 50 miljonit ühenukleotiidset polümorphismi (SNPs)
- CNVs – DNA koopiaarvu variatsioonid (12% genoomist)
- Geeni ja kromosoomide mutatsioonid



Naiste ja meeste viljakuse/  
viljatuse fenotüübidi

# Viimased saavutused

Kõrge läbilaskevõimega  
**OOMIKA** meetodid  
geneetika, epigeneetika  
transkriptoomika,  
proteoomika ja  
metaboloomika  
uurингuteks



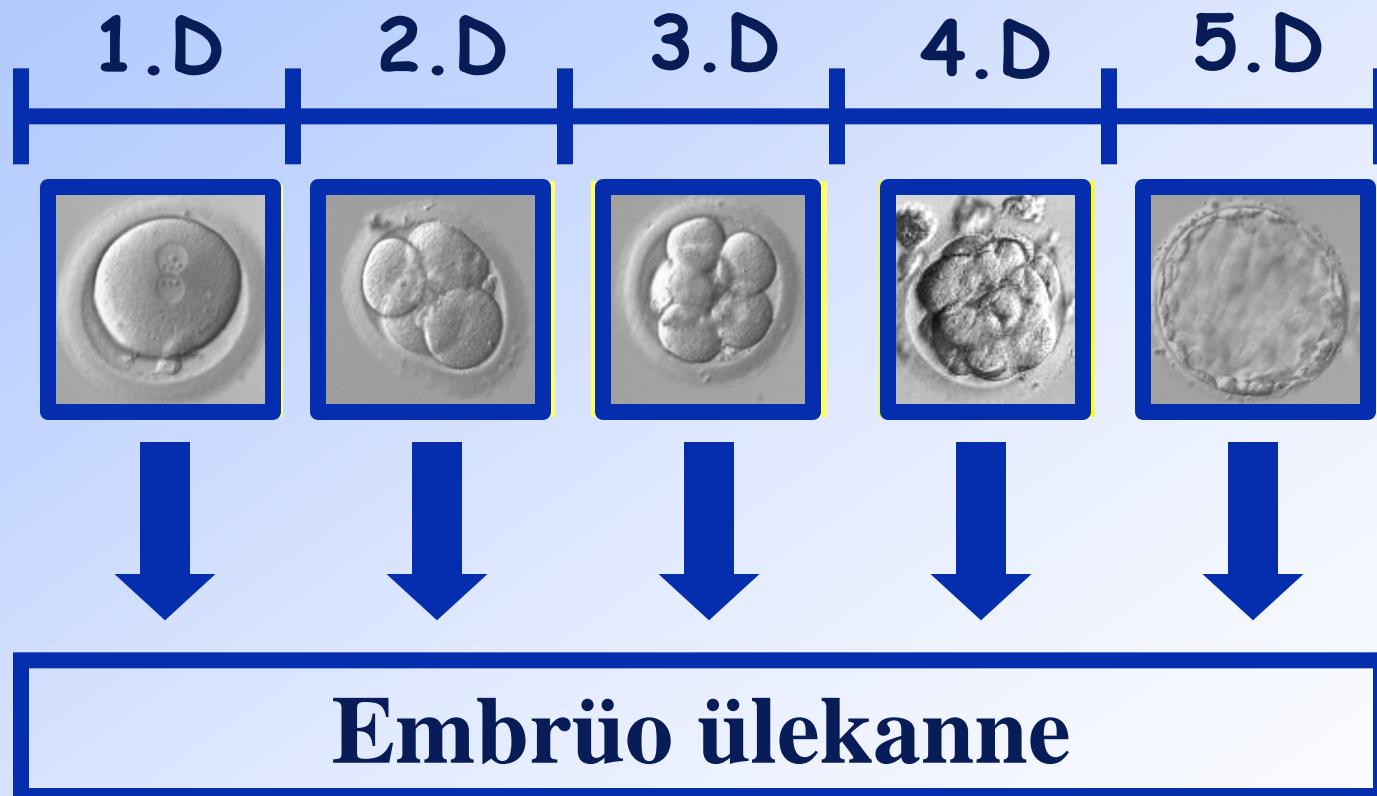
METABOLOOMIKA

PROTEOOMIKA

TRANSKRIP-  
TOOMIKA

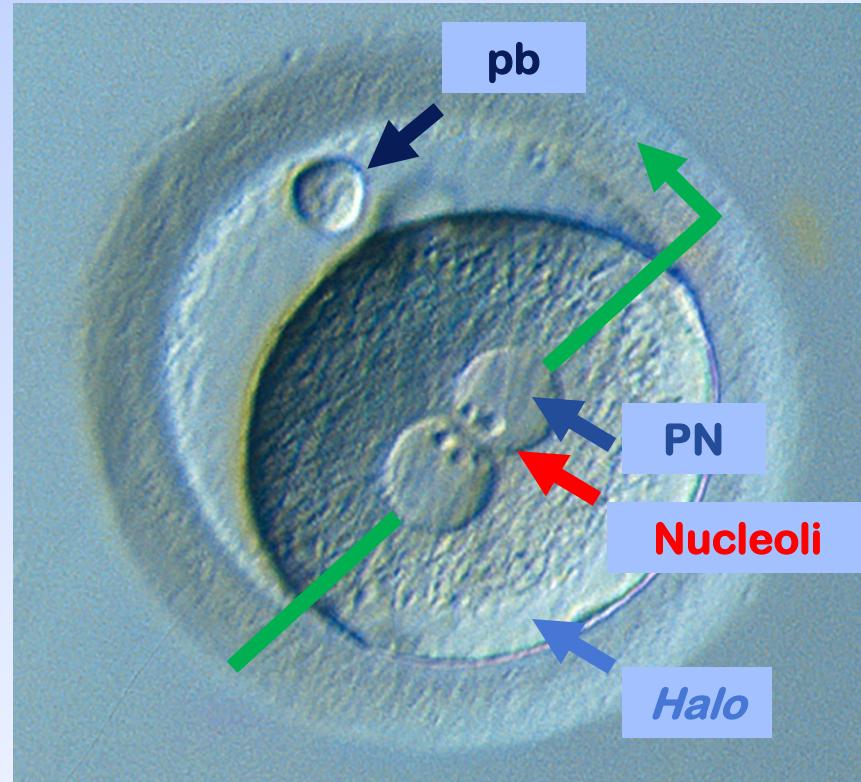
**GENEETIKA**  
Geenid, geenide  
variatsioonid DNA  
modifikatsioonid

# Embrüo kultuurid



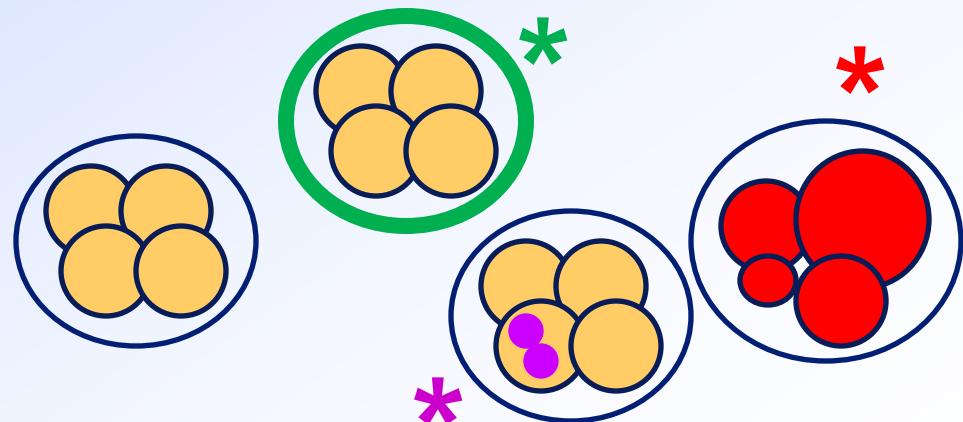
# Embrüo morfoloogia - sügoot

- 12-18 t peale viljastamist
- Polaarkehade ilmumine (pb)
- Pronukleuse (PN) morfoloogia
- **Tuumakese ilmumine**
- PN ja pb samal joonel
- Tsütoplasma „halo” olemasolu

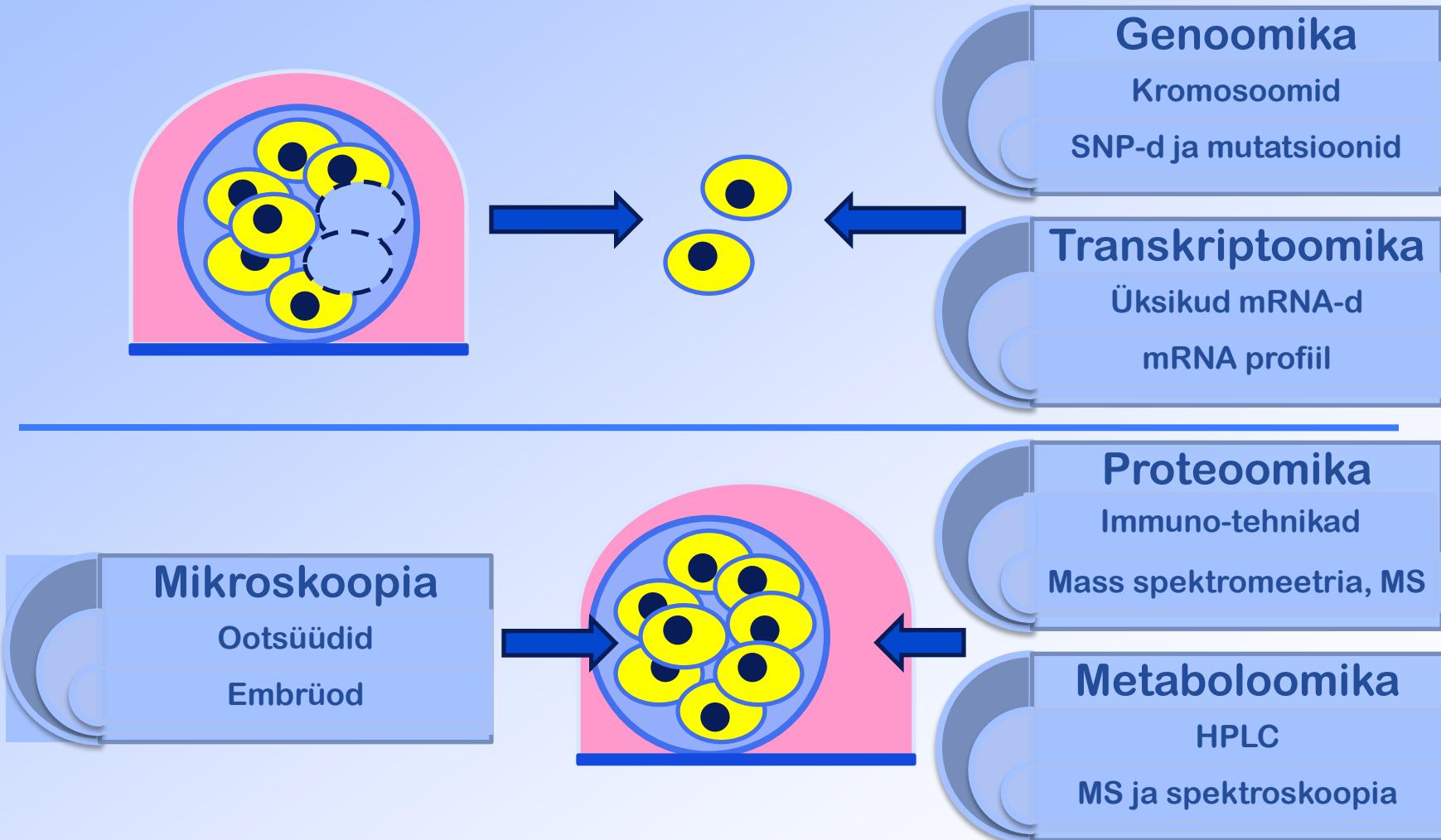


# Embrüo morfoloogia – 2/3 päev

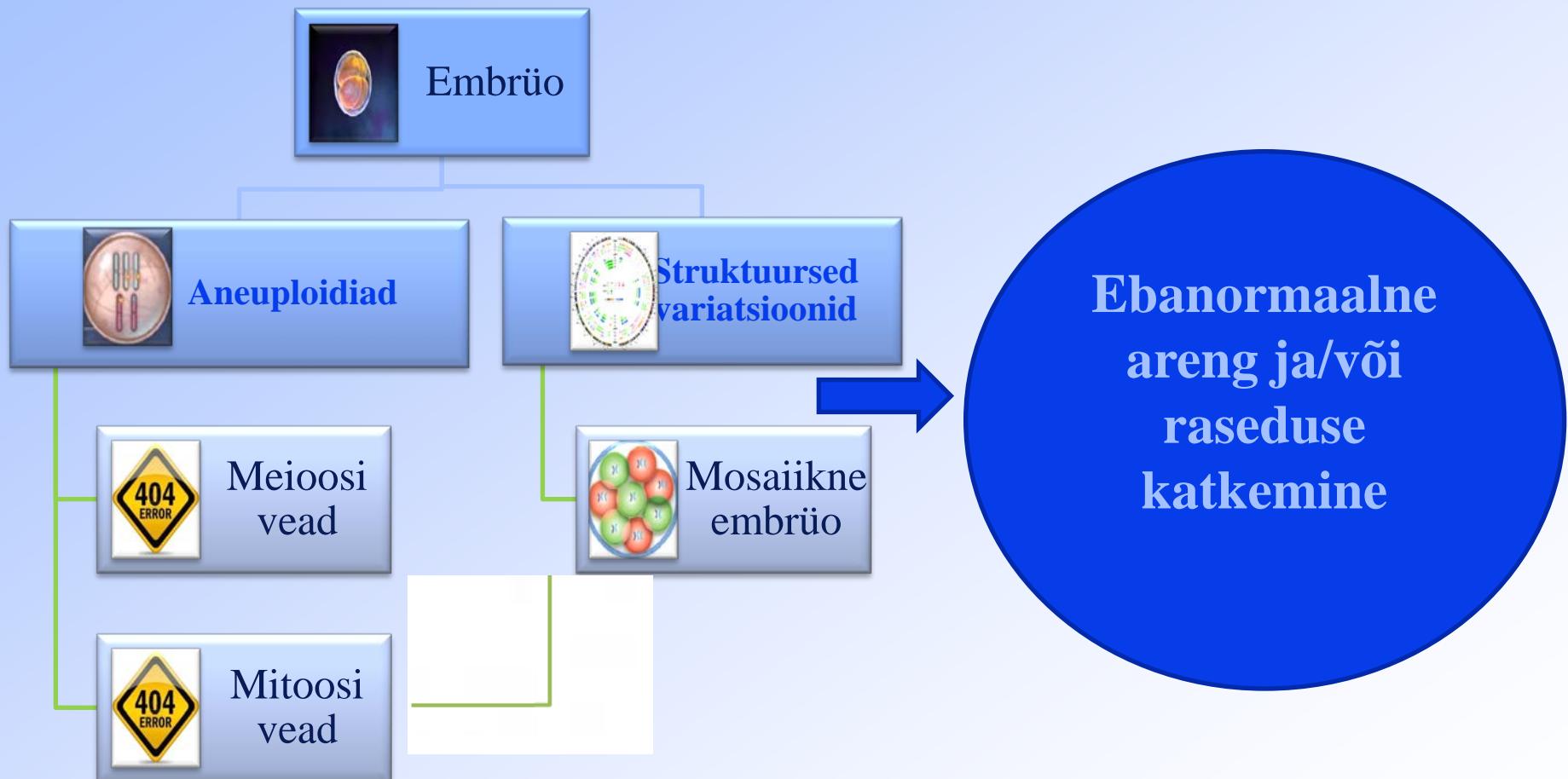
- Embrüo morfoloogia:
  - Fragmentatsioon (apoptoos)
  - Blastomeeride kuju ja suurus & jagunemise kiirus
  - Zona Pellucida paksus
  - Multinukleaarsed blastomeerid
- Fragmentatsioon ↑ ja follikulaarne hüpksia ↑
- Fragmentatsioon ↑ ja kromosoomide defektid ↑
- Fragmenteerunud embrüod:
  - Vähem rasedusi
  - Rohkem kaasasündinud vigu?



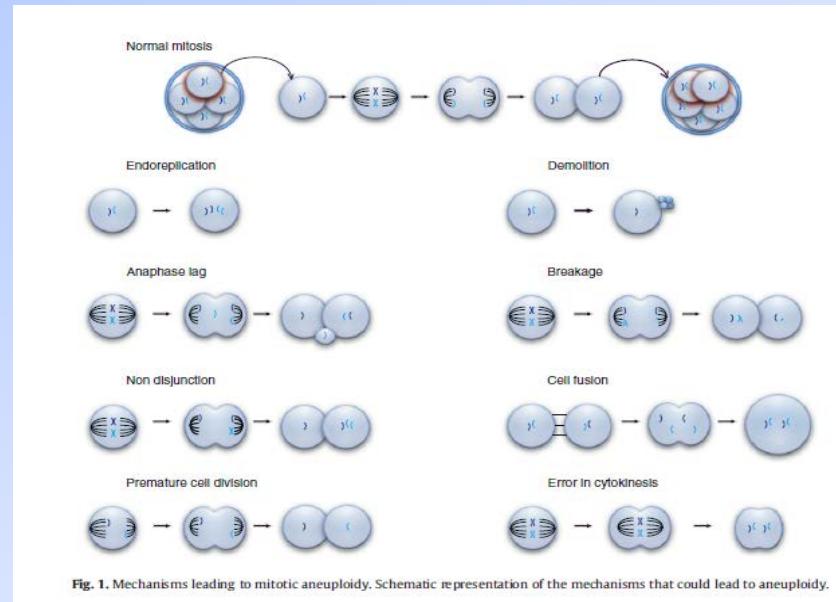
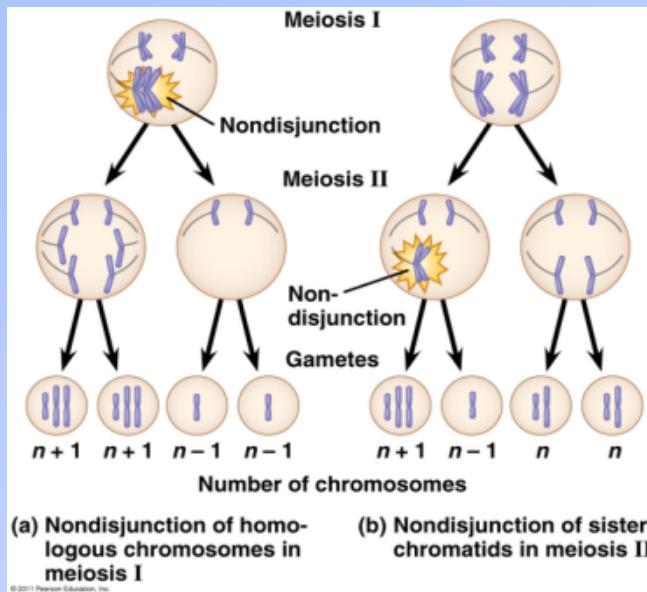
# Embrüode valik ja OOMIKA



# Mis embrüos juhtub?



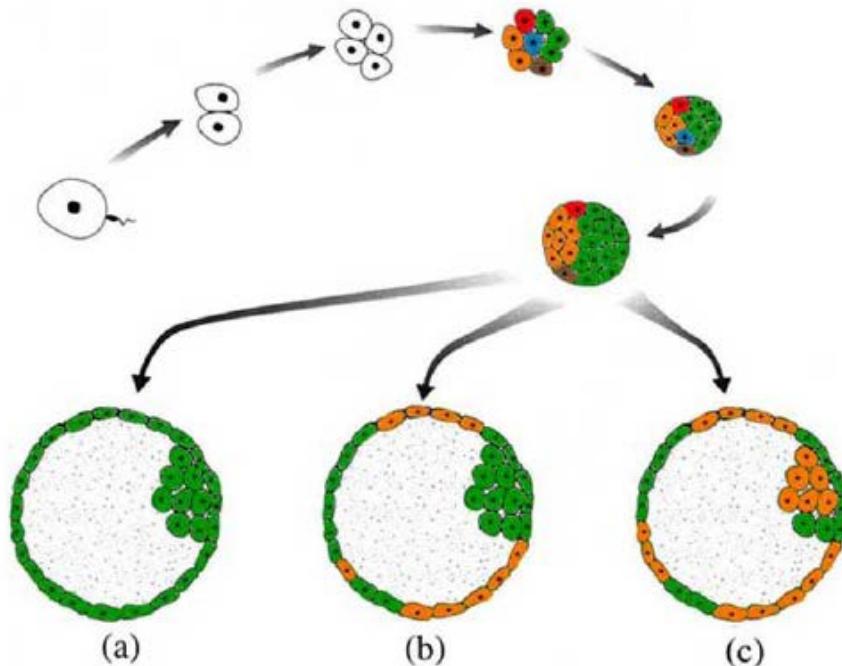
# Meioosi vead vs mitoosi vead



Mantikou et al, 2012

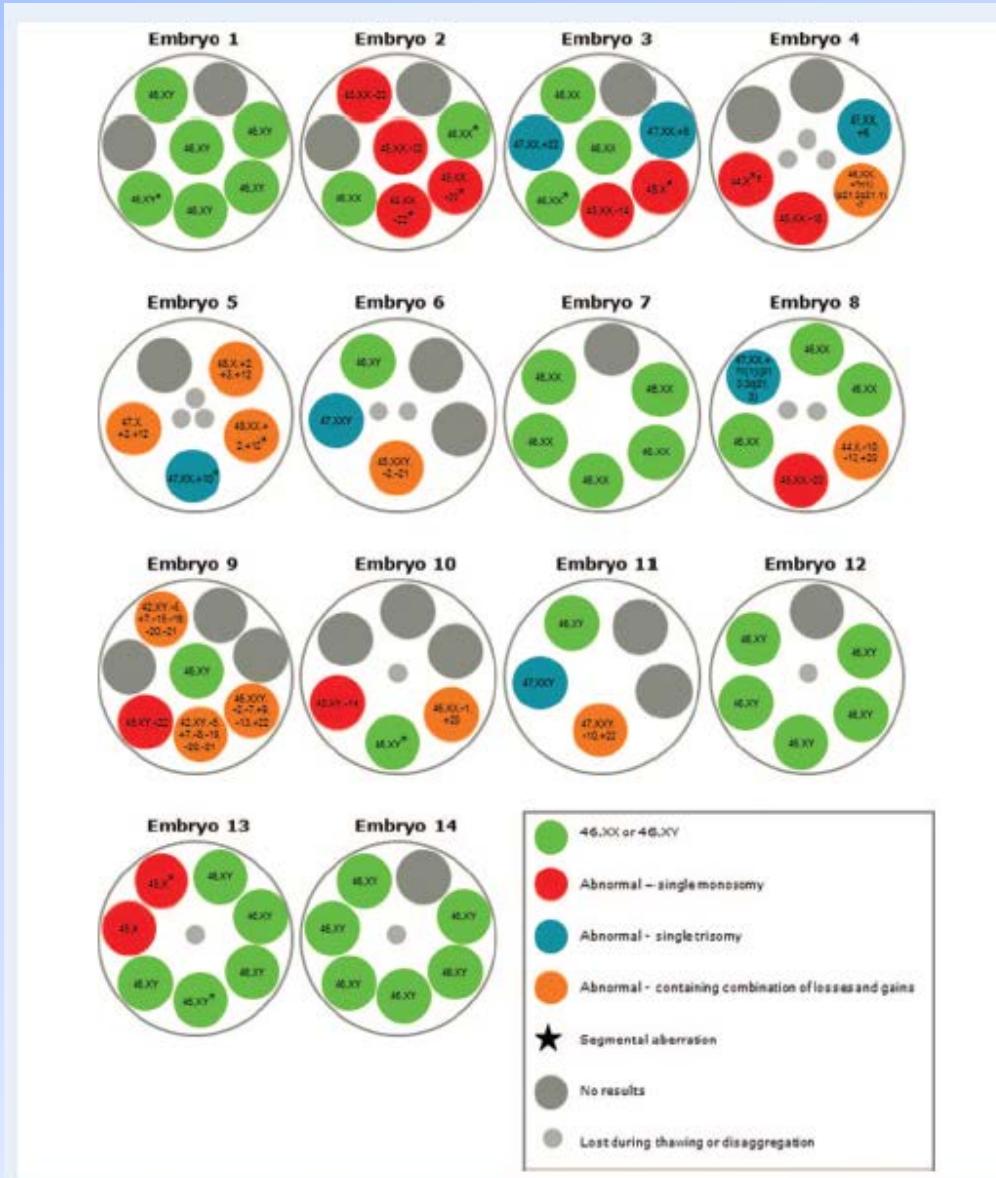
- 1/3 embrüodest on kromosomaalse defektiga
- enamasti leiab aset idurakkudes
- aneuploidiate teke munarakkudes on sagedam →
- aneuploidiate sagedus tõuseb ema vanusega
- mitootilised vead võivad olla vastutavad mosaiisuse tekke eest

# Mosaiiksus



Robberecht et al, 2010

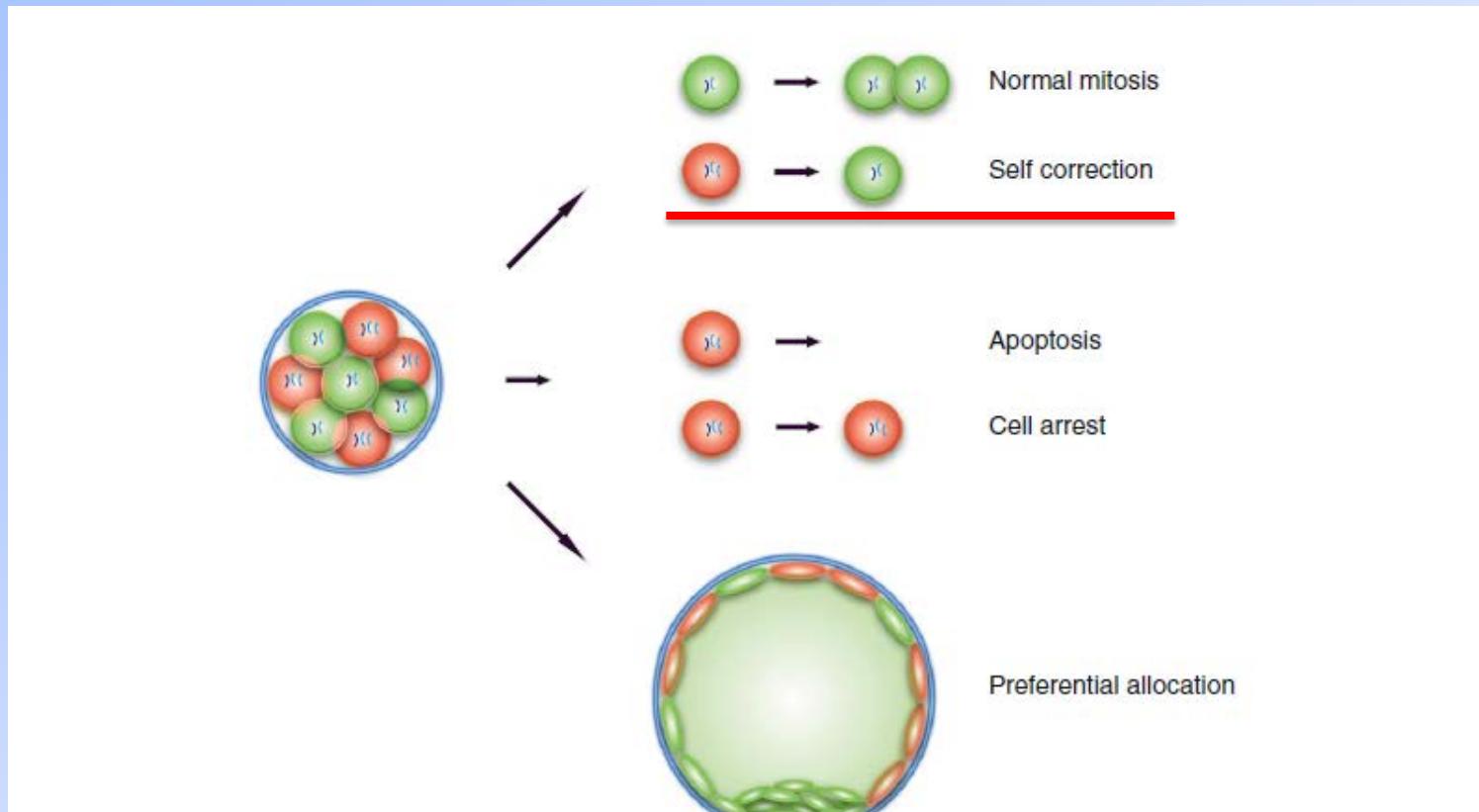
- 45-70% embrüodest sisaldab kromosomaalseid aberatsioone vähemalt ühes rakus
- Kui kombineerida sama embrüo erinevate blastomeeride tulemused , siis esineb mosaiksust 25% kuni enam kui 60% embrüodest



Mertzanidou et al, 2012



# Mis siis saab?



**Fig. 2.** Fate of mitotic aneuploidy. Schematic representation of the proposed mechanisms regarding the fate of aneuploid (red) and diploid (green) cells within human preimplantation embryos.

Mantikou et al, 2012

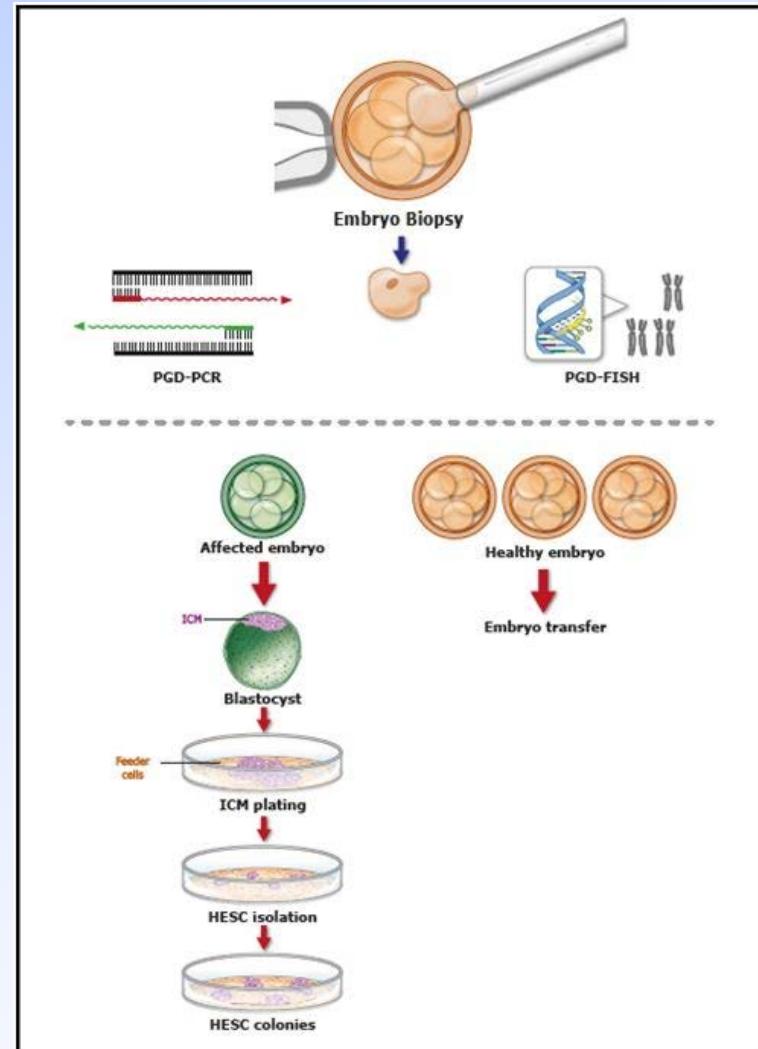


# Preimplantatiivne geneetiline diagnostika?

- PGD võimaldab ära hoida raseduse katkestamist  
Embrüo ühe-kahe raku biopsia 3 arengupäeval
  - Blastomeere diagnoositakse spetsiifiliste geneetiliste haiguste suhtes

PGD-FISH- kromosomaalsed aberatsioonid

PGD-PCR – monogeensed haigused

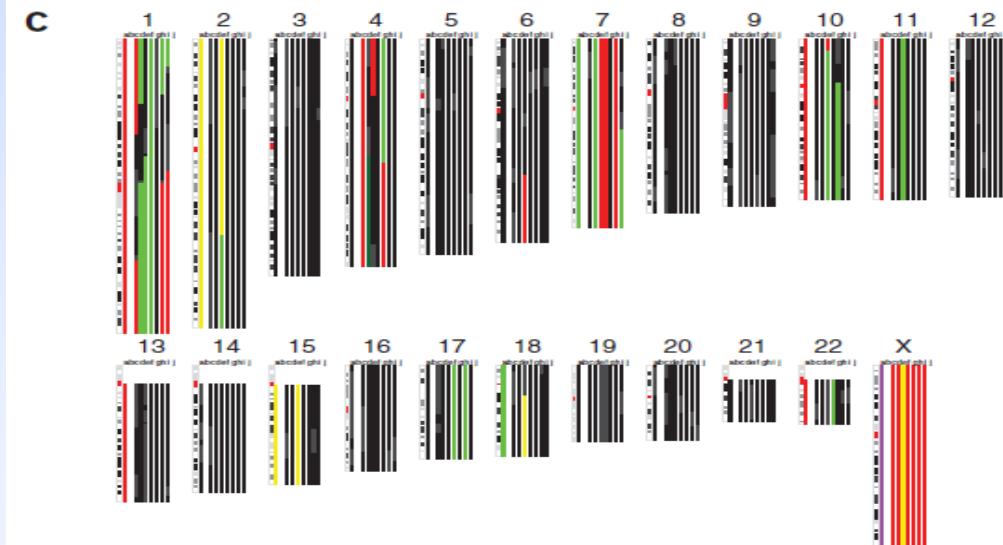
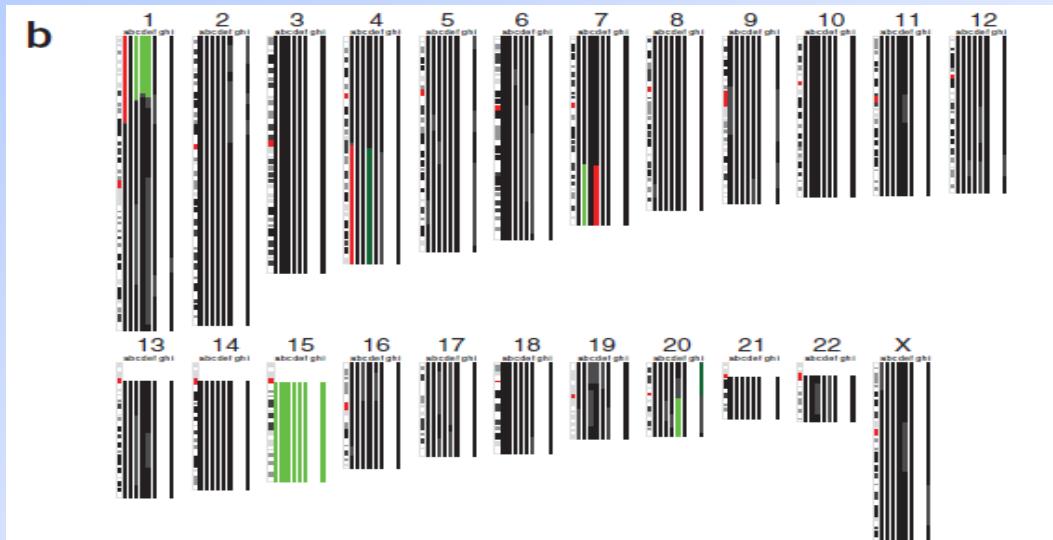


# PGD: SNP array tehnoloogia abil

(1) Katab kõik 24 kromosoomi

(2) Lihtsam ja objektiivsem  
interpretatsioon

(3) Võimaldab uurida ainult  
meid huvitavat indiviidi



# Veise embrüod kui inimese embrüonaalse arengu mudel

- ◆ Analüüsida veise erinevate arenguastmete embrüoid kromosomaalsete aberratsioonide suhtes
- Farmiloomade kohta on väga vähe andmeid
- Meetodi arendamine
- Bioeetika



# Materjalid ja metoodika

Embrüo Biopsia

- Embrüode kogumine ja biopsia mikromanipulaatori abil (Eesti Maaülikool, Vaterinaarmeditsiini ja Loomakasvatuse Instituut, prof. Ülle Jaakma labor)

DNA  
amplifitseerimine  
ja puhastamine

- Multiple Displacement Amplification (MDA) - REPLI-g Single Cell Kit(Qiagen)
- High Pure PCR Product Purification Kit (Roche)

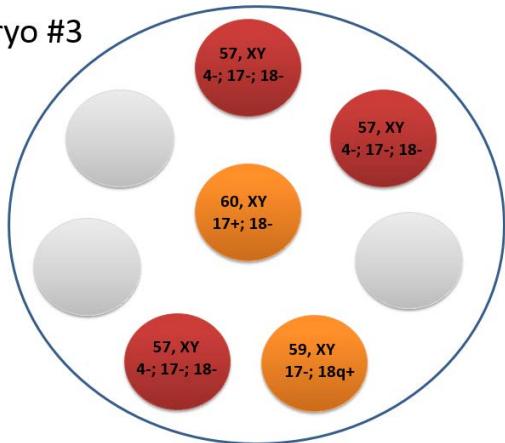
DNA kiibi  
andmete analüüs

- Illumina's BovineSNP-50, BovineHD Genotyping BeadChip (KU Leuven)

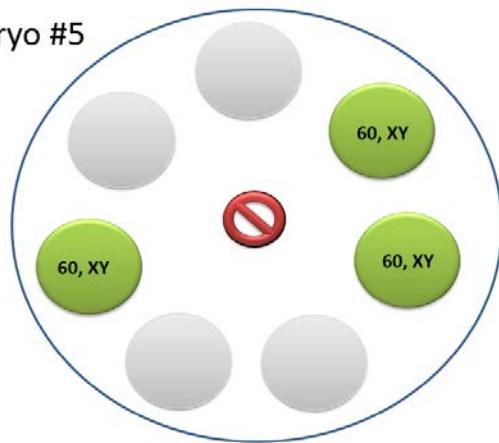


# Tulemused

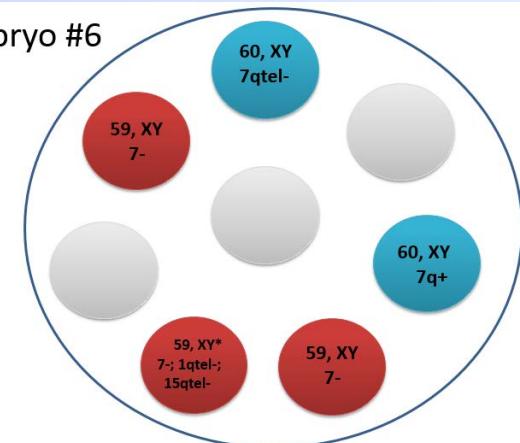
- Embryo #3



- Embryo #5



- Embryo #6



Abnormal - monosomy  
 Abnormal - combination of loss and gain  
 No results

Normal - 60, XY  
 No results  
 Lost during biopsy

Abnormal - monosomy  
 Other chromosomal aberration (loss/gain of telomeres or long/short arms)  
 No results  
\* additional qtel loss



Dr. Sven Parkel  
Dr. Ott Scheler  
Dr. Olga Žilina  
Olga Tšuiko  
Margit Nõukas  
Martin Sauk  
Kati Hensen  
Triin Kitsemets  
Katre Teearu  
Merle Külaots



Prof. Andres Metspalu  
Dr. Lili Milani  
Dr. Reedik Mägi  
Mart Kals  
Viljo Soo

Prof. Mait Remm  
Dr. Lauris Kaplinski

Prof. Margus Pooga  
Janeli Pae



Prof. Katrin Õunap  
Dr. Tiiia Reimand  
Prof. Helle Karro  
Dr. Kadri Haller-Kikkatalo

Competence Centre on  
**Health Technologies**

Prof. Andres Salumets



Prof. Ülle Jaakma  
Monika Nõmm



**KU LEUVEN**

Prof. Joris Vermeesch  
Prof. Thierry Voet  
Dr. Eftychia  
Dimitriadou