



Ludmila Voložonoka

Sievietes reproduktīvās mazspējas iemesli un genomiskās pieejas to risināšanai

Promocijas darba kopsavilkums zinātniskā doktora grāda
“zinātnes doktors (*Ph.D.*)” iegūšanai

Nozare – medicīnas bāzes zinātnes,
tai skaitā farmācija
Apakšnozare – medicīniskā ģenētika

Rīga, 2021



RĪGAS STRADIŅA
UNIVERSITĀTE

Ludmila Voložonoka

ORCID 0000-0003-0413-1481

Sievietes reproduktīvās mazspējas iemesli
un genomiskās pieejas to risināšanai

Promocijas darba kopsavilkums zinātniskā doktora grāda
“zinātnes doktors (*Ph.D.*)” iegūšanai

Nozare – medicīnas bāzes zinātnes, tai skaitā farmācija
Apakšnozare – medicīniskā ģenētika

Rīga, 2021

Promocijas darbs izstrādāts Rīgas Stradiņa universitātē, Molekulārās ģenētikas zinātniskajā laboratorijā, kā arī klīnikā “IVF Rīga”, Latvijā

Promocijas darba vadītājas:

Dr. med. docente **Anna Miskova**,
Rīgas Stradiņa universitāte, Latvija

Dr. med. **Inga Kempa**,
Rīgas Stradiņa universitāte, Latvija

Zinātniskā konsultante:

Dr. med. **Linda Gailīte**,
Rīgas Stradiņa universitāte, Latvija

Oficiālais recenzents:

Dr. biol. profesors **Edvīns Miklaševičs**,
Rīgas Stradiņa universitāte, Latvija

Ph.D. **Kristina Rull**,
Tartu Universitāte, Igaunija

Profesors **Andres Saluments**,
Tartu Universitāte, Igaunija

Promocijas darbs tiks aizstāvēts medicīnas bāzes zinātnes, tai skaitā farmācijas promocijas padomes atklātā sēdē 2021. gada 3. novembrī plkst. 12.00 tiešsaistes platformā *Zoom*.

Ar promocijas darbu var iepazīties RSU bibliotēkā un RSU tīmekļa vietnē:
<https://www.rsu.lv/promocijas-darbi>

Promocijas padomes sekretāre:

Dr. med. asociētā profesore **Zanda Daneberga**

Saturs

Darbā izmantotie saīsinājumi	5
Ievads	6
Darba mērķis	7
Darba uzdevumi	7
Darba hipotēze	8
Darba novitāte	8
Ētika	9
1. Literatūras apskats	10
1.1. Sievietes reproduktīvās mazspējas ģenētiskie iemesli	10
1.2. Ģenētiskā testēšana diagnostikas ietvaros	15
1.2.1. Pirmsimplantācijas embriju ģenētiskā testēšana	16
1.2.2. Pārtraukušās grūtniecības ģenētiskā testēšana	16
1.3. Literatūras apskats: kopsavilkums	17
2. Divu pilna genoma amplifikācijas tehniku veikspējas salīdzinājums pirmsimplantācijas embriju ģenētiskajā testēšanā	18
2.1. Ievads	18
2.2. Materiāli un metodes	20
2.2.1. Pirmsklīniska sagatavošanās PGT ciklam	20
2.2.2. Klīnisko gadījumu analīze	20
2.3. Rezultāti	26
2.3.1. Divu pilnu genomu amplifikācijas metožu salīdzinājums	26
3. Mātes šūnu kontaminācijas izraisītas nepareizas diagnozes mazināšana agrīnas grūtniecības zaudēšanas ģenētiskajā testēšanā	30
3.1. Ievads	30
3.2. Materiāli un metodes	32
3.2.1. Pacienti un pārtraukušās grūtniecības materiāla hromosomu analīze	32
3.2.2. Mātes šūnu kontaminācijas ģenētiskās testēšanas protokola izstrāde	32
3.3. Rezultāti	33
3.3.1. Vizuāla pārtraukušās grūtniecības materiāla novērtēšana un mātes šūnu kontaminācijas ģenētiskā testēšana	33
3.3.2. Hromosomu analīze ar salīdzinošo genoma hibridizāciju uz mikročipiem	33
3.3.3. Augsta mātes šūnu kontaminācijas riska pārtraukušās grūtniecības materiāla analīze	34
4. Dzemdes kakla nepietiekamības izraisītu priekšlaicīgu dzemdību ģenētiskā etioloģija: sistemātiska gēnu analīze un pacientu nākamās paaudzes sekvencēšanas datu interpretācija	36

4.1. Ievads	36
4.2. Materiāli un metodes	38
4.2.1. Dzemdes kakla bioloģijā iesaistīto gēnu identificēšana	38
4.2.2. Nākamās paaudzes sekvencēšana pacientiem ar dzemdes kakla nepietiekamību	39
4.3. Rezultāti	41
4.3.1. Gēnu analīze: gēni, kas saistīti ar dzemdes kakla nepietiekamību, galvenokārt ir sindromiski	41
4.3.2. Pacientu nākamās paaudzes sekvencēšanas datu analīze	42
4.3.3. Molekulāro gēnu ceļu bagātināšanas analīze	43
5. Kopīgā diskusija	50
5.1. Labākās tehnoloģijas izvēle pirmsimplantācijas ģenētiskajai testēšanai	50
5.2. Pārtraukušās grūtniecības materiāla ģenētiskās testēšanas uzticamības uzlabošana	51
5.3. Dzemdes kakla nepietiekamības ģenētiskās etioloģijas atšifrēšana	53
5.4. Ieteikumi sievietes reproduktīvās mazspējas ģenētiskajai novērtēšanai pētījumos un klīnikā	56
5.5. Nobeiguma piezīmes	57
Secinājumi	59
Publikācijas un ziņojumi par promocijas darba tēmu	60
Literatūras saraksts	62
Pateicības	76
Pielikumi	78

Darbā izmantotie saīsinājumi

ACMG	Amerikas medicīniskās ģenētikas koledža (angl. <i>American college of Medical Genetics</i>)
DNS	Dezoksiribonukleīnskābe
EDS	Elersa-Danlo sindroms
FSH	Folikulu stimulējošais hormons
GnRH	Gonadotropīnu atbrīvojošais hormons
HGNC	HUGO gēnu nomenklatūra
LH	Luteinizējošais hormons
MDA	Phi-29 polimerāzes pilna genoma amplifikācijas metode (angl. <i>multiple displacement amplification</i>)
nt	Nukleotīds
OMIM	Interneta katalogs Mendeļa iedzimšanai cilvēkā (angl. <i>Online Mendelian inheritance in man</i>)
PĶR	Polimerāzes ķēdes reakcija
PĢT	Pirmsimplantācijas ģenētiskā testēšana
PĢT-A	Pirmsimplantācijas ģenētiskā testēšana aneiploīdijām
PĢT-M	Pirmsimplantācijas ģenētiskā testēšana monogēnajām saslimšanām
PVO	Pasaules Veselības organizācija
VCF	Fails ar sasauktiem gēnu variantiem (angl. <i>variant called file</i>)
VUS	Neskaidras nozīmes variants (angl. <i>variant of unknown significance</i>)

Ievads

Sievietes reproduktīvā mazspēja ir globāla problēma, kurai ir nozīmīgas medicīniskas, sociālas un finansiālas sekas, dažās valstīs tā skar 16,2% sieviešu (Inhorn & Patrizio, 2014; Maddirevula et al., 2020; Singh, 2004). Pastāv vairākas reproduktīvās mazspējas, tajā skaitā neauglības, definīcijas, piemēram, PVO neauglību definē kā “reproduktīvās sistēmas slimību, ko raksturo klīniskas grūtniecības neiestāšanās regulāra neaizsargāta dzimumakta rezultātā 12 vai vairāku mēnešu ilgā periodā”. Šajā darbā tiek lietots termins “sievietes neauglība” kā nespēja ieņemt bērnu un plašāks jēdziens “sievietes reproduktīvā mazspēja” kā nespēja ieņemt un / vai iznēsāt grūtniecību līdz termiņam.

Ģenētiskā patoloģija tiek atzīta par nozīmīgu sievietes reproduktīvās mazspējas iemeslu visos galvenajos veiksmīgas apaugļošanās un grūtniecības progresa faktoru līmeņos, sākot ar embrionālo, mātes (piemēram, endometrija) un kopīgo – placentas faktoru. Sievietes neauglības ģenētisko cēloņu meklēšana aizsākās 20. gadsimta piecdesmito gadu beigās, kad ar kariotipēšanas palīdzību tika atklāts Tērnera sindroms (Ford et al., 1959), un turpinās līdz šai dienai, pateicoties jaunu molekulāro metožu attīstībai un tehnoloģiskajiem sasniegumiem. Tomēr joprojām salīdzinoši maz ir zināms par vairuma sievietes neauglības gadījumu ģenētisko izcelsmi, diemžēl vēl mazāk tiek ieviests klīniskajā praksē, kavējot individualizētas ārstēšanas progresu reproduktīvajā medicīnā.

Bez šaubām, 21. gadsimtu klīniskajā medicīnā un jo īpaši zinātnē var uzlūkot kā genomikas gadsimtu, jo galvenie sasniegumi bija iespējami, pateicoties slimību molekulāro mehānismu atklāšanai. Ģenētiskie testi kļūst arvien pieprasītāki arī sievietes reproduktīvās mazspējas diagnosticēšanas un vadīšanas ietvaros. Diemžēl bieži vien var novērot atpalikšanu starp datiem, kurus iegūst, pateicoties jaunākajām tehnoloģijām, un to klīnisko interpretāciju

un lietojamību, kas ir saistīts ar katras ģenētiskās metodes īpatnībām, kā arī zināšanu trūkumu par molekulāro un ģenētisko sievietes reproduktīvās mazspējas patofizioloģiju. Viss minētais iztrūkstošu un / vai nepilnvērtīgu vadlīniju kontekstā, kas regulētu sievietes reproduktīvās ģenētikas jomu, palielina nepareizas pacientu vadības, psiholoģiskā sloga un pārmērīgu izmaksu risku pacientiem, viņu ģimenes locekļiem un pēcnācējiem.

Darba mērķis

Demonstrēt mūsdienīgu genomisko tehnoloģiju lietošanu dažādās sievietes reproduktīvās mazspējas stadijās reālos klīniskajos vai pētījumu scenārijos, lai palielinātu pāra iespējas ieņemt veselu bērnu, uzlabotu ģenētiskās testēšanas uzticamību agrīnas grūtniecības zaudēšanas gadījumā un atklātu dzemdes kakla nepietiekamības ģenētisko etioloģiju.

Darba uzdevumi

1. Izstrādāt pirmsimplantācijas ģenētiskās testēšanas protokolus un salīdzināt divu pilna genoma amplifikācijas metožu veiktsēju dažādu embrija patoloģiju analīzes ietvaros.
2. Izstrādāt mātes šūnu kontaminācijas novērtēšanas protokolu agrīni pārtraukušās grūtniecības materiāla ģenētiskajai testēšanai.
3. Veikt dzemdes kakla funkcionēšanā iesaistīto gēnu sistemātisku analīzi, lai veicinātu nākamās paaudzes sekvencēšanas datu interpretāciju pacientiem ar dzemdes kakla nepietiekamību.

4. Izmantojot nākamās paaudzes sekvenčēšanu pacientu kohortā ar dzemdes kakla nepietiekamības izraisītām priekšlaicīgām dzemdībām, raksturot stāvokļa ģenētisko etioloģiju un identificēt gēnu variantus palielinošus dzemdes kakla nepietiekamības attīstības varbūtību.

Darba hipotēze

Mūsdienīgas ģenētiskās tehnoloģijas var veiksmīgi lietot dažādu ģenētisko patoloģiju, kas ietekmē sievietes reproduktīvo potenciālu, ticamai novērtēšanai, savukārt ģenētiskās testēšanas labas prakses vadlīniju un gēnu klīniskās validitātes novērtējuma trūkums traucē uzkrāto zināšanu klīnisko lietojamību sievietes reproduktīvās ģenētikas jomā.

Darba novitāte

Darbs, kas ir aprakstīts 2. nodaļā, atspoguļo individualizētu pirmsimplantācijas embriju ģenētiskās testēšanas protokolu izstrādi un šādas testēšanas ieviešanu Latvijā, kā arī apraksta divu plaši izmantoto pilna genoma amplifikācijas metožu veiktspējas salīdzinājumu, kas tika veikts pirmo reizi. Darbs, kas ir aprakstīts 3. nodaļā, ir veltīts zināmai mātes šūnu kontaminācijas problēmai pārtraukušās grūtniecības ģenētiskajā testēšanā un piedāvā pārstrādātu vienkāršu vizuālās un tehnoloģiskās materiāla novērtēšanas un apstrādes protokolu, kas spēj veiksmīgi risināt problēmu. Darbs 4. nodaļā ne tikai apraksta nākamās paaudzes sekvenčēšanas lietošanas rezultātus pacientiem ar izolētu dzemdes kakla nepietiekamību, kas tika veikts pirmo reizi, bet arī ietver visaptverošu un sistemātisku literatūras un gēnu analīzi par šo tēmu, kas arī tika veikts pirmo reizi.

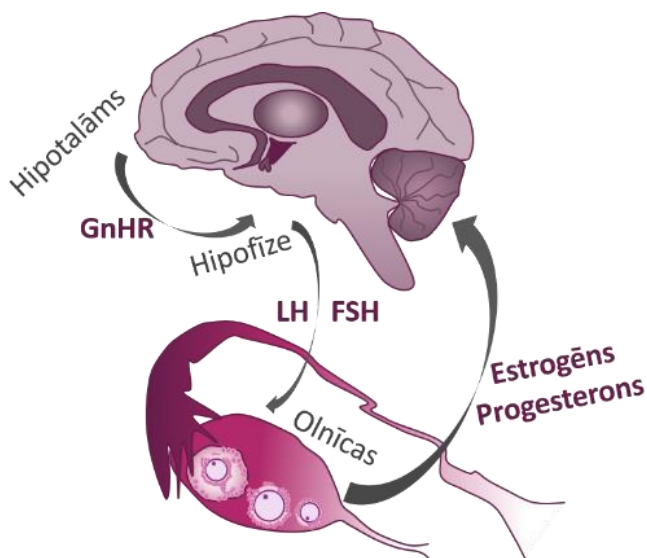
Ētika

Šis pētījums ir saskaņā ar Helsinku ētikas principu deklarāciju, to ir apstiprinājusi Latvijas centrālās medicīnas ētikas komiteja (lūdzu, skatiet 1. un 2. pielikumus darba beigās).

1. Literatūras apskats

1.1. Sievietes reproduktīvās mazspējas ģenētiskie iemesli

Sievietes gonādu attīstību un pareizu funkcionēšanu un līdz ar to sievietes reproduktīvo funkciju kopumā galvenokārt regulē koordinēta hipotalāma-hipofīzes-gonādu ass darbība. Hipofīzes aktivitāte tiek stimulēta, pateicoties gonadotropīnu atbrīvojošam hormonam, ko producē hipotalāma neironi. Savukārt gonadotropīniem – folikulu stimulējošam hormonam (FSH) – un luteinizējošam hormonam (LH), kurus sintezē gonadotropās šūnas priekšējā hipofīzē, pieder centrālā loma folikuloģenēzes un ovulācijas regulācijā. FSH ir nepieciešams, lai katru mēnesi iesaistītu un stimulētu attīstošās folikulu kohortas, bet LH aktivitāte mediē folikulu nobriešanas pēdējās stadijas un iniciē notikumu virkni, nodrošinošu pašu ovulāciju (McGee & Hsueh, 2000). Folikulu nobriešanas gala stadijās granulozās folikulu šūnas kļūst ligandjutīgas, pateicoties LH / horiona gonadotropīna receptoru attīstībai (Mitra et al., 2014). Rezultātā dzimumsteroīdi realizē hipotalāma un hipofīzes regulāciju, pateicoties atgriezeniskajai saitei (sk. 1.1. attēlu). Defekti vairākos gēnos, kas nodrošina hipotalāma-hipofīzes-gonādu ass darbību, ir aprakstīti kā sievietes reproduktīvās mazspējas iemesli (Beau et al., 1998; Layman, 2013).



1.1. attēls. **Shematiskais hipotalāma-hipofīzes-gonādu ass darbības principa attēlojums sievietes organismā** (L. Voložonokas shēma)

Hipotalāms producē gonadotropīnu atbrīvojošo hormonu (GnRH), kas stimulē luteinizējošā hormona (LH) un folikulu stimulējošā hormona (FSH) produkciju priekšējā hipofīzes daivā; LH un FSH ietekmē estrogēna un progesterona produkciju olnīcās, kuri realizē atgriezenisko saiti uz hipotalāmu un hipofīzi.

Zems gonadotropīnu līmenis plazmā, kā arī atgriezeniskās regulācijas pārrāvums sievietei izpaužas kā krūts dziedzeru attīstības traucējums / trūkums un hipostrogēns menstruāciju trūkums un norāda uz to, ka defekts ir hipotalāma vai hipofīzes līmenī (parasti gonadotropīna atbrīvojošā hormona darbības traucējums). Ja pacienta oža nav traucēta, tad šādu stāvokli dēvē par hipogonadotropo hipogonādismu, papildus ožas traucējums liecina par Kalmana sindromu. Pretēju stāvokli – hipergonadotropo hipogonādismu – raksturo palielināti FSH un LH līmeņi, liecinot par to, ka defekts ir gonādu (sievietes organismā olnīcu) līmenī. Aizdomās par hipergonadotropo hipogonādismu ir jāatceras par Tērnera sindromu, ko izraisa X hromosomas monosomija vai mozaīkveida monosomija (ICD-10 Q96.9) (Layman, 2013).

Attīstoties mākslīgās apaugļošanas tehnoloģijām un pateicoties to plašajam lietojumam visā pasaulē, oocītu attīstības, apaugļošanās un embrija attīstības agrīnais periods var tikt detalizēti novērots un pētīts, veicinot jaunu fenotipu un gēnu atklāšanu, kas izraisa sievietes reproduktīvo mazspēju (Sang et al., 2019). 1.1. tabulā ir apkopoti gēni, kas iesaistīti sievietes reproduktīvās mazspējas attīstībā pirmsgonādu līmenī, gonādu līmenī, kā arī gēni, kas ietekmē sievietes reprodukciju, darbojoties ārpus hipotalāma-hipofīzes-gonādu ass.

Ar sievietes reproduktīvo mazspēju saistītie gēni

Fenotips	Apraksts	Gēns	Atsauce
Hipogonadotropais hipogonādisms	Hipotālāma-hipofīzes-gonādu ass disfunkcija dēļ traucējuma hipofīzes vai hipotalāma līmenī.	<i>GNRHR</i> [HGNC:4421] <i>FSHB</i> [HGNC:3964] <i>LHB</i> [HGNC:6584]	(Beau et al., 1998; de Roux et al., 1997; Layman et al., 1997)
Priekšlaicīgs olnīcu izsīkums	Olnīcu folikulu izsīkums vai disfunkcija ar menstruācijas pārtraukšanos līdz 40 gadu vecumam.	<i>STAG3</i> [HGNC:11356] <i>FMR1</i> [HGNC:3775] <i>SYCE1</i> [HGNC:28852] <i>MCM9</i> [HGNC:21484] <i>MCM8</i> [HGNC:16147] <i>GDF9</i> [HGNC:4224] <i>BMP15</i> [HGNC:1068]	(Le Quesne Stabej et al. 2016; Wood-Trager et al., 2014; AlAsiri et al., 2015; Y. X. Zhang et al., 2020; Tenenbaum-Rakover et al., 2015; França et al., 2018; Laisue et al., 2006; Kovanci et al., 2007; Norling et al., 2014)
Tukšo folikulu sindroms	Fenotips, ko raksturo tukšu folikulu (bez olšūnas) veidošanās, ko klasiski novēro pēc cilvēka hormona gonadotropīna β stimulācijas maksliģās apgaļošanas cikla ietvaros.	<i>LHCGR</i> [HGNC:6585]	(Coulam, Bustillo and Schulman, 1986; Yariz et al., 2011; Awonuga et al., 1998; Yuan et al., 2017)
Ooītu spīdīgā apvalka (<i>zona pellucida</i>) trūkums	Ooītu veidošanās bez glikoproteīnu slāņa – spīdīgā apvalka, ko var novērot maksliģās apgaļošanas cikla ietvaros.	<i>ZP1</i> [HGNC:13187] <i>ZP2</i> [HGNC:13188] <i>ZP3</i> [HGNC:13189] <i>ZP4</i> [HGNC:15770]	(H.-L. Huang et al., 2014). (T. Chen et al., 2017; P. Yang et al., 2017). (Dai et al., 2019; Sun et al., 2019)
Ooītu nobriešanas apstāšanās	Ooītu bojāeja kādā no attīstības stadijām (mejoze I vai II), ko var novērot maksliģās apgaļošanas cikla ietvaros.	<i>TUBB8</i> [HGNC:20773] <i>PATL2</i> [HGNC:33630]	(B. Chen et al., 2017; Feng et al., 2016; L. Huang et al., 2017; Z. Liu et al., 2020; A. C. Wang et al., 2018; Wu et al., 2019)

1.1. tabulas turpinājums

Fenotips	Apraksts	Gēns	Atsauce
Neizdevusies oocīta apaugļošana	Neizdevusies oocīta apaugļošana, ko var novērot mākslīgās apaugļošanas cikla ietvaros.	<i>TLE6</i> [HGNC:30788] <i>WEE2</i> [HGNC:19684] <i>REC114</i> [HGNC:25065]	(Alazami et al., 2015; Lin et al., 2020; Sang et al., 2018; X. Yang et al., 2019; Zhao et al., 2019)
Agriņa embrija attīstības apstāšanās	Pirmsimplantācijas embrija bojājuma un / vai nespēja veidot blastocistu.	<i>PAD16</i> [HGNC:20449] <i>NLRP2</i> [HGNC:22948] <i>NLRP5</i> [HGNC:21269]	(Mu et al., 2019; Xu et al., 2016)
Molārā grūtniecība	Ekstraembrionālā trofoblasta pārmērīga augšana ar vienlaicīgu embrija agrīnu bojājumu.	<i>NLRP7</i> [HGNC:22947] <i>KHDC3L</i> [HGNC:33699] <i>MEI1</i> [HGNC:28613] <i>C11orf80</i> [HGNC:26197] <i>REC114</i> [HGNC:25065]	(Parry et al., 2011; Rezaei et al., 2016; van den Veyver and Al-Hussaini, 2006; Murdoch et al., 2006; Nguyen et al., 2018)
Policistisko olnīcu sindroms	Sindromu raksturo daudzas mazas cistas u.c. izpausmes dēļ hormonu darbības traucējumiem. Ar gēnu variantiem ir saistīta tikai stāvokļa sindromiskās formas.	<i>CYP11A1</i> [HGNC:2590] <i>CYP21A2</i> [HGNC:2600] <i>CYP11B1</i> [HGNC:2591]	(Unluturk et al., 2007; Gaasenbeek et al., 2004; Witchel and Aston, 2000; Reichman et al., 2014)
Dzemes leiomioma	Labdabīgs dzemdes gludās muskulatūras audzējs. Ar noteiktiem gēnu variantiem ir saistīts tikai stāvokļa sindromiskās formas.	<i>FH</i> [HGNC:3700] <i>COL4A5</i> [HGNC:2207] <i>COL4A6</i> [HGNC:2208]	(Tomlinson et al., 2002; Zhou et al., 1993)
Spontāns olnīcu hiperstimulācijas sindroms	Sindroms attīstās grūtniecības pirmajā trimestrī bez eksogēnas gonadotropīnu lietošanas.	<i>FSHR</i> [HGNC:3969]	(Montanelli et al., 2004; Smits et al., 2003; Vasseur et al., 2003)
Mīllera vadu attīstības anomālija	Iedzimta maksts un / vai dzemdes aplāzija.	<i>WN74</i> [HGNC:12783] <i>HNF1B</i> [HGNC:11630] <i>LHX1</i> [HGNC:6593]	(Philibert et al., 2008; Williams et al., 2017)

1.2. Ģenētiskā testēšana diagnostikas ietvaros

Zinātniskie pētījumi ir brīvi, izvēloties konkrētas pētīšanas metodes, izstrādājot secinājumus, kā arī tiem nav atbildības pacientu priekšā, turpretī ģenētiskās testēšanas galvenie uzdevumi diagnostikas ietvaros ir diezgan stingri: noskaidrot patieso slimības ģenētisko cēloni / risku; skaidri noteikt testēšanas metodoloģijas ierobežojumus; identificēt radniekus ar paaugstinātu konkrētā stāvokļa attīstības risku; identificēt stāvokļus, kas var iedzimt pēcnācējiem; identificēt stāvokļus, pakļaujamus mērķa terapijai; un, kas īpaši attiecas uz cilvēka reprodukciju, optimizēt mākslīgās apaugļošanas lietošanu.

Šobrīd ir izveidotas rekomendācijas ģenētiskajam preconcepcijas nesēju skrīningam, ieskaitot tā piemērošanai mākslīgās apaugļošanas ietvaros (Edwards et al., 2015), taču pastāv zināms vadlīniju vai komitejas atzinumu trūkums par ģenētisko testēšanu sievietes reprodūktīvās mazspējas gadījumā. Līdz ar to klīnikā tikai ļoti ierobežots skaits specifisku ģenētisko izmeklējumu tiek piemērots, lai analizētu hromosomālās aberācijas vai viena gēna defektus, kas var būt saistīti ar sievietes reprodūktīvajiem fenotipiem (Cariati et al., 2019). Piemēram, klasiski tiek nozīmēta kariotipēšana, lai atklātu tādas hromosomālās izmaiņas kā, piemēram, Tērnera sindroms vai diferencētu Svaiera sindromu fenotipiskās sievietēs ar kariotipu 46,XY. Turklāt kariotipēšana ir praktiski vienīgā metode, kas piemērojama, lai atklātu līdzsvarotas kariotipa izmaiņas; kā zināms, strukturālas hromosomu aberācijas atrod ~5% sieviešu ar nesindromisku reprodūktīvo mazspēju (Gekas et al., 2001). Nākamā labi zināmā ģenētiskā izmeklēšana ar stabilu lomu sievietes neauglībā ir CGG atkārtojumu ekspansijas analīze gēnā *FMRI*, kas ir saistīta ar priekšlaicīgu olnīcu izsīkšanu.

Papildus pastāv daži ģenētiskie testi, piemērojami kādai specifiskai problēmai sievietes reprodūktoloģijā vai reprodūktīvo tehnoloģiju ietvaros.

1.2.1. Pirmsimplantācijas embriju ģenētiskā testēšana

Sieviešu daudzums vecumā no 15 līdz 49 gadiem, kuras jebkad ir izmantojušas mākslīgās apaugļošanas pakalpojumus, Amerikas Savienotajās Valstīs ir 12,7%. Aptuveni 1,9% no visiem zīdaiņiem, kas katru gadu dzimuši ASV, tiek ieņemti, izmantojot mākslīgo apaugļošanu (Singh, 2004). Kopš piedzimusi Luīze Brauna – pasaules pirmais “mēģenes zīdains” – 1978. gadā (Stephoe & Edwards, 1978), reproduktīvās tehnoloģas ir ievērojami uzlabojušās tehnoloģiski un metodoloģiski. Dzimstības rādītāji, izmantojot *in vitro* apaugļošanu, svārstās no 27% līdz 55% atkarībā no pacienta vecuma grupas un izmantotās metodes (Dahdouh et al., 2015). Neveiksmīga neauglības ārstēšana ir viena no galvenajām klīniskās reprodukcijas problēmām. Viens no galvenajiem reproduktīvo tehnoloģiju sasniegumiem ir pirmsimplantācijas embriju ģenētiskā testēšana (PĢT), kas tagad rutīni tiek izmantota, lai analizētu embriju ģenētisko profilu. Sākotnēji PĢT tika ieviesta, lai analizētu embrijus no zināmiem monogēno traucējumu nesējiem (PĢT-M), bet vēlāk attīstījās, lai pārbaudītu visu hromosomu komplektu kā embriju selekcijas rīku ar cerību palielināt dzimstību pēc embrija pārneses (PĢT-A) (Theobald et al., 2020).

1.2.2. Pārtraukušās grūtniecības ģenētiskā testēšana

Vairākas pieejas un metodes tiek lietotas pārtraukušās grūtniecības materiāla ģenētiskajai testēšanai, ieskaitot klasiskās citoģenētikas tehnikas (kariotipēšana, fluorescentā *in situ* hibridizācija), uz PĶR balstītas metodes un genomiskās tehnoloģijas, kā salīdzinošā genoma hibridizācija uz mikročipiem vai nākamās paaudzes sekvenčēšana. Visām tām ir ierobežojumi, piemēram, veiksmīgas kariotipēšanas priekšnoteikums ir dzīvotspējīgu horija audu klātbūtne primārajā bioloģiskajā materiālā (Lomax et al., 2000). Būtiski, ka visas metodes var izdot maldinošus rezultātus, ja mātes šūnu kontaminācija paraugā

netiek ņemta vērā. Mātes šūnu kontaminācijas problēma pārtraukušās grūtniecības materiāla testēšanā ir aprakstīta laboratorijas praksē (Jarrett et al., 2001; Shen et al., 2016), tomēr tā joprojām rada apgrūtinājumu analīžu interpretēšanā un rezultātu ziņošanā, un metodes, kas dod iespēju atpazīt un risināt šo jautājumu konvencionāli, nav plaši adaptētas, kā redzam no zinātniskās literatūras.

1.3. Literatūras apskats: kopsavilkums

Pēdējās desmitgadēs ir gūti zināmi panākumi sieviešu reproduktīvās mazspējas molekulārā un ģenētiskā profila atšifrēšanā. Tomēr šo zināšanu izmantošana klīniskajā praksē joprojām ir apgrūtināta un sadrumstalota (Cariati et al., 2019), ko varētu skaidrot ar: i) plašu un dažkārt pārklājošos reproduktīvo fenotipu spektru un to heterogenitāti, ii) plašo genomisko tehnoloģiju un testēšanas pieeju klāstu, no kuriem katrs ir saistīts ar dažādiem ierobežojumiem un īpatnībām. Līdz ar to pētījuma mērķis ietvēra izstrādāt uzticamus protokolus, kas balstītos uz modernu genomisko tehnoloģiju izmantošanu noteiktos sievietes reprodukcijas fenotipos / stadijās, pārvarēt šo tehnoloģiju trūkumus un demonstrēt to piemērotu izmantošanu reālos klīniskajos vai pētījumu scenārijos.

Tādējādi 2. darba nodaļa tika veltīta daudzfaktoru pirmsimplantācijas embriju testēšanas protokolu izstrādei, kurā tika parādīts divu pilna genoma amplifikācijas metožu veikspējas salīdzinājums dažādu genoma struktūru testēšanā ar četrām dažādām tehnoloģijām. Darba 3. nodaļa tika veltīta mātes šūnu kontaminācijas novērtēšanas protokola izstrādei un ieteikumu formulēšanai, lai uzlabotu dažādas kvalitātes pārtraukušās grūtniecības materiāla apstrādes darbplūsmu preanalītiskajos un analītiskajos posmos. Visbeidzot 4. darba nodaļā tika analizēts nesindromiskas dzemdes kakla nepietiekamības ģenētiskais profils, izmantojot nākamās paaudzes sekvencēšanu.

2. Divu pilna genoma amplifikācijas tehniku veiktspējas salīdzinājums pirmsimplantācijas embriju ģenētiskajā testēšanā

Publicēts kā:

Ludmila Volozonoka, Dmitry Perminov, Liene Korņejeva, Baiba Alksere, Natālija Novikova, Evija Jokste Pīmane, Arita Blumberga, Inga Kempa, Anna Miskova, Linda Gailīte, Violeta Fodina, 2020. Performance comparison of two whole genome amplification techniques in frame of multifactor preimplantation genetic testing. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 35(8), 1457–1472. DOI: 10.1007/s10815-018-1187-4.

Personīgais ieguldījums:

Mans personīgais ieguldījums šajā darbā ietver embriju testēšanas protokolu izstrādi, testēšanai izmantojamo metožu izvēli, praktisko izmeklējumu veikšanu trim ģimenēm no deviņām, datu interpretāciju, pilna genoma amplifikācijas metožu salīdzināšanu, publikācijas uzrakstīšanu. Lūdzu, skatiet visu līdzautoru parakstītus apliecinājumus dotās publikācijas izmantošanai manā promocijas darbā (3. pielikums).

2.1. Ievads

Pirmsimplantācijas ģenētiskā testēšana ir alternatīva prenatālajai testēšanai pāriem ar paaugstinātu risku kādas ģenētiskās patoloģijas nodošanai pēcnācējiem. Laika gaitā PGT ir piedzīvojusi nozīmīgas metodoloģijas izmaiņas, sākot no polārķermenīšu un blastomēru analīzes līdz tagad plaši lietojamai trofektodermas biopsijai ar tai sekojošu blastocistas sasaldēšanu (Renwick et al., 2006). Taču, neskatoties uz tehnoloģiskajiem uzlabojumiem, PGT protokolu izstrāde ir sarežģīta amplifikācijas neizdošanās dēļ, parauga kontaminācijas un alēles / lokusa izkrišanas fenomena dēļ, tas raksturīgs visiem vienas vai dažu

šūnu PĶR testiem, tā ietekmējot PĢT testēšanas sistēmas drošumu. Alēles izkrišanas incidence variē, bet ārkārtas gadījumos tā ir skārusi 20% amplifikāciju un pagātnē izraisījusi vairākas nepareizas diagnozes (Capalbo et al., 2016). Pilna genoma amplifikācijas metodes izvēle arī nav viennozīmīga problēmu turpmāko testēšanas metožu interpretācijā dēļ, piemēram, īso tandēma atkārtojumu analīzē ar fluorescento PĶR vai salīdzinošās genoma hibridizācijas uz mikročipiem (Rechitsky et al., 2015). Šobrīd ir pieejamas vairākas pilna genoma amplifikācijas metodes (Zheng et al., 2011), piemēram, deģenerētu oligonukleotīdu praimeru metode (Telenius et al., 1992) vai praimeru pagarināšanas tehnoloģija (L. Zhang et al., 1992). Līderpozīcijas tirgū ieņem *Rubicon Genomics* izstrādāta SurePlex PĶR tehnoloģija (S. U. Chen et al., 2008; Uda et al., 2007) un izotermālas (ne PĶR) Phi-29 polimerāzes sintēzes metode MDA (angl. *multiple displacement amplification*) (Handyside et al., 2004). *Taq* DNS polimerāzes izmantošana PĶR metodēs limitē fragmentu garumu līdz 3kb. Savukārt Phi-29 polimerāze ģenerē fragmentus līdz 100 kb, un tai piemīt 3'→5' eksonukleāzes kļūdu nolasīšanas aktivitāte. Abām metodēm ir priekšrocības un trūkumi, līdz ar to nav skaidrs, kuras izvēli varētu prioritizēt, izstrādājot PĢT protokolos (Zheng et al., 2011). Arī PĢT savas specifikas dēļ, neskatoties uz atzītiem metodes lietošanas ieguvumiem, joprojām nav standartizēta un regulēta metode salīdzinājumā ar citām testēšanas metodēm (Harton et al., 2011).

Nemot vērā iepriekš minēto informāciju, šā pētījuma mērķis bija izstrādāt individualizētu efektīvu un uzticamu daudzfaktoru embriju testēšanas protokolu un demonstrēt divu pilnas genoma amplifikācijas metožu veikspējas salīdzinājumu četrās dažādās tehnoloģijās – nosakot īsos tandēma atkārtojumus, Sangera sekvencēšanā, salīdzinošajā genoma hibridizācijā uz mikročipiem un SNaPshot tehnoloģijā.

2.2. Materiāli un metodes

2.2.1. Pirmsklīniska sagatavošanās PĢT ciklam

Deviņi pāri ar apstiprinātu viena gēna patoloģiju tika konsultēti par PĢT procedūru, olnīcu stimulāciju, olšūnu aspirāciju un mākslīgo apagļošanu. Saistītie mikrosatelītu marķieri, kas atrodas blakus interesējošajam gēnam, tika lokalizēti caur Kalifornijas Universitātes Santa Kruzas genoma pārlūkprogrammu (<https://genome-preview.ucsc.edu/index.html>). Visiem lokusiem tika dizainēti praimeru divpakāpju multipleksa PĢR testēšanas sistēmai, praimeru specifiskums tika nodrošināts, izmantojot “Primer-BLAST” (Ye et al., 2012). No PĢT ģimenes locekļu perifērajām asinīm tika izolēta DNS, izmantojot standarta procedūru [Qiagen]. Analizējot mikrosatelītus, tika sastādīti ģimenes haplotipi. Kartā ģimenē 6–13 (8.1 ± 2.5) informatīvi vai pusinformatīvi marķieri tika atlasīti turpmākai embriju analīzei (sk. 2.1. tabulu). Slimību izraisošā ģimenes varianta apstiprināšana tika veikta, izmantojot Sangera sekvencēšanu (Sambrook & W Russell, 2001) viena nukleotīda variācijas gadījumā un izmantojot fragmentu garuma analīzi trinukleotīdu ekspansijas gadījumā [Applied Biosystems, ASV].

2.2.2. Klīnisko gadījumu analīze

Visu iegūto embriju trofektodermas biopsijas DNS materiāls tika pavairots, izmantojot pilna genoma amplifikāciju – daļai tika lietota MDA tehnoloģija [Illumina, ASV] un daļai SurePlex [Illumina, ASV] (sk. 2.2. tabulu). Embriju haplotipēšanai izmantoja marķierus, atlasītus iepriekšējā solī, mutācijas lokusa analīzi veica, izmantojot Sangera vai SnaPshot analīzi [Applied Biosystems, ASV]. *HTT* gēna (OMIM:613004) CAG atkārtojumu skaits (RCV000030659, HGVS nomenklatūra – NM_002111.6(HTT):c.53_55[(41_?)] (p.Gln40(41_?)) tika noteikts ar kapilāra elektroforēzes metodi. Embriju

hromosomu analīze tika veikta, ievērojot ražotāja [24Sure, Illumina, ASV] protokolu.

PĢT rezultāti

Ģimene	Informatīvo mikrosatelītu skaits	Analizēto embriju skaits	Slimo embriju skaits	Nesēju embriju skaits	Savvaļas tipa embriju skaits	Salīdzinošā genoma hibridizācija uz mikročipiem	Aneiploīdiju testēšanas rezultāts	PĢT cikla rezultāts
<i>HIT</i>	13/6	7	1; 0,14	NA	6; 0,85	Tika veikta diviem embrijiem	1 aneiploīds, 1 eiploīds	Dzimis vesels bērns
<i>ACTA2</i>	18/7	9	4; 0,44	NA	5; 0,55	Tika veikta visiem savvaļas tipa embrijiem	4 eiploīdi, 1 aneiploīds	Klīniska grūtniecība
<i>TPPI</i>	15/10	3	1; 0,33	1; 0,33	1; 0,33	Tika veikta vienam embrijam	Eiploīds	Klīniska grūtniecība
<i>ALOX12B</i>	15/13	12	3; 0,25	7; 0,58	2; 0,17	Tika veikta vienam embrijam	Eiploīds	Dzimis vesels bērns
<i>DMD-1</i>	21/11	9	4; 1,5	1; 0,11	4; 0,44	Tika veikta visiem embrijiem pirms PĢT cikla	5 eiploīdi, 4 aneiploīdi	Dzimis vesels bērns, otrā embrija pāmeše - > neizdevusies implantācija

2.1. tabulas turpinājums

Ģimene	Informatīvo mikrosatelītu skaits	Analizēto embriju skaits	Slimo embriju skaits	Nesēju embriju skaits	Savvaļas tipa embriju skaits	Salīdzinošā genoma hibridizācija uz mikročipiem	Aneiploīdiju testēšanas rezultāts	PĢT cikla rezultāts	
<i>DMD-2</i>	16/7	17	3; 0,18	5; 0,29	9; 0,52	Tika veikta visiem savvaļas tipa embrijiem	6 eiploīdi, 3 aneiploīdi	Gaida embrija transfēru	
<i>GLB1</i>	15/8	5	0; 0	4; 0,8	1; 0,2	Tika veikta visiem embrijiem	2 eiploīdi, 3 aneiploīdi	Gaida embrija transfēru	
<i>MTM1</i>	14/7	Neviens oocīts nebija veiksmīgi apaugļots							
<i>KRT14</i>	17/7	Olnīcu stimulācija tiek plānota							
—	Vidēji:	9,5							

SurePlex un MDA pilna genoma amplifikācijas tehniku salīdzināšana

Ģimene	Sangera sekvencēšana	SnapShot analīze	Mikrosatelītu analīze	Mikrosatelītu lokusa izkrišana (%)	Salīdzinošā genoma hibridizācija uz mikročipiem	Pavisam analizētie embriji
<i>HTT</i>	–	–	7 MDA	4,5	2 MDA	7 MDA
<i>ACTA2</i>	4 MDA; 5 SurePlex	–	4 MDA; 5 SurePlex	1,5	3 MDA; 2 SurePlex	4 MDA; 5 SurePlex
<i>TPPI</i>	3 MDA	–	3 MDA	1,4	1 MDA	3 MDA
<i>ALOX12B</i>	12 MDA	12 MDA	12 MDA	2,8	2 MDA	12 MDA
<i>DMD-1</i>	–	–	9 SurePlex	13,3	9 SurePlex	9 SurePlex
<i>DMD-2</i>	8 MDA; 9 SurePlex	8 MDA; 9 SurePlex	8 MDA; 9 SurePlex	4,7	3 MDA; 5 SurePlex	8 MDA; 9 SurePlex
<i>GLBI</i>	5 MDA	–	5 MDA	2,0	5 MDA	5 MDA
Materiāls ziedots zinātnēi	–	11 SurePlex	–	–	11 SurePlex	11 SurePlex

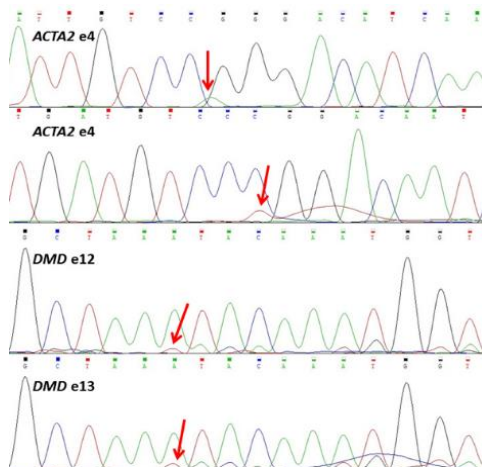
2.2. tabulas turpinājums

Ģimene	Sangera sekvenčšana	SnapShot analīze		Mikrosatelītu analīze		Mikrosatelītu lokusa izkrišana (%)	Salīdzinošā genoma hibridizācija uz mikročipiem	Pavisam analizētie embriji
		20	Noturīgi rezultāti	39	Skaidras elektroferogrammas			
MDA:	32 1 x alēles izkrišana (TPP). Novērota daļēja alēļu izkrišana	20	Noturīgi rezultāti	39	Skaidras elektroferogrammas	2,98	17 Grūti analizējami profili, izšķirtspēja: veselas hromosomas, ~30 % paraugu jāatkārto	39
SurePlex:	14 Novērojama daļēja alēļu izkrišana	20	Neizde-vusies reakcija vai neskaids rezultāts > 60% gadījumū	23	Grūti analizējamās elektroferogrammas	6,5	27 Tīri profili, izšķirtspēja: ~5Mb	34
KOPĀ:	46	40	–	62	–	Vidēji 4,74	44	73

2.3. Rezultāti

2.3.1. Divu pilna genoma amplifikācijas metožu salīdzinājums

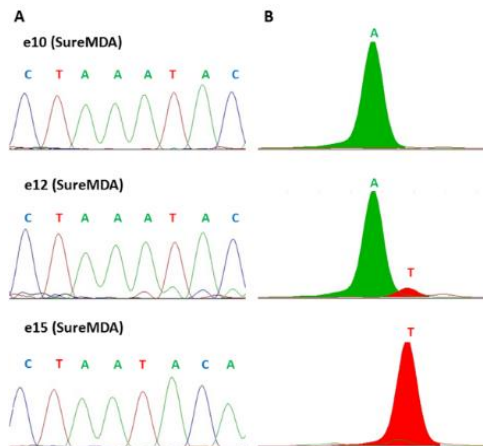
Abas pilna genoma amplifikācijas metodes tika analizētas, izmantojot četras dažādas tehnoloģijas – Sangeru sekvencēšanu, SNaPshot analīzi, fragmentu garuma analīzi un salīdzinošo genoma hibridizāciju uz mikročipiem (sk. 2.2. tabulu). Mūsu rezultāti parāda, ka abas metodoloģijas rezultējas daļējā alēļu izkrišanās, ja tiek veikta Sangeru sekvencēšana (sk. 2.1. attēlu). Slimību izraisīto alēļu vājo amplifikāciju var atšķirt kā zema līmeņa pīķi citādi skaidrā profilā (nav fona). Viens *TPPI* paraugs rezultējās pilnīgā varianta alēļu izkrišanās, neskatoties uz divpakāpju amplifikācijas pieeju.



2.1. attēls. Sangera sekvencēšanas profili ar dažādām pilna genoma amplifikācijas metodēm

ACTA2 embrijs e4 tika amplificēts ar SurePlex (augšējā secība iegūta ar tiešo praimeru, apakšējā ar reverso). Sarkanās bultiņas norāda uz varianta alēles daļēju izkrišanu. Dotā embrija haplotipa analīze atbilst heterozigotam genotipam. DMD- 2 embriji e12 un e13 tika amplificēti ar MDA metodi. Abas elektroferogrammas attēlo secības, iegūtas ar tiešo praimeru. Sarkanās bultiņas norāda uz varianta alēles daļēju izkrišanu – viena nukleotīda delēciju. Izmainītā alēle ir nosakāma tikai kā vājš pīķis, kas līdzīgs fonam. Doto embriju haplotipa analīze atbilst heterozigotam genotipam.

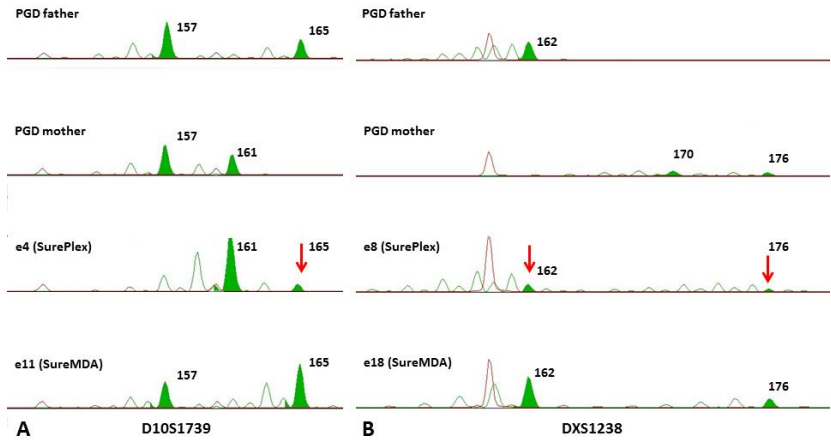
Tālāk mēs bijām ieinteresēti salīdzināt abu amplifikatoru veikumu, izmantojot SNaPshot genotipēšanas tehnoloģiju (sk. 2.2. attēlu). MDA produkts uzrādīja ar Sangera sekvencēšanu salīdzināmus rezultātus, visi genotipi sakrita, savukārt SurePlex produkta testēšana atkārtoti neuzrādīja interpretējamus profilus vairāk nekā 60% gadījumos (dati nav attēloti).



2.2. attēls. **DMD-2 embriju rezultāti**

MDA tehnoloģijas veikums Sangera sekvencēšanā (A) un SnaPshot tehnoloģijā (B). Profili pilnībā sakrīt, heterozigots embrijs e12 uzrāda daļēju alēles izkrišanu abos gadījumos.

Dažādas abu amplifikācijas metožu dabas dēļ tie rezultējās pilnīgi atšķirīgos elektroferogrammu profilos, genotipējot mikrosatelītus ar PĶR fragmentu garuma noteikšanas metodi, ko redz kapilāra elektroforēzē (sk. 2.3. attēlu). Izteikti artificiāli pīķi parādās polimerāzes enzīma “slīdēšanas” SurePlex amplifikācijas laikā un tam sekojošas pārākuma amplifikācijas nepareiza garuma fragmentos. Šādos gadījumos izšķirt īsto embrija genotipu iespējams tikai, paralēli analizējot arī vecāku genomisko DNS.



2.3. attēls. Mikrosatelītu D10S17390 (A) un DXS1238 (B) genotipēšana, izmantojot kapilāra elektroforēzi

Īsteno alēļu daļēja izkrišana, izmantojot SurePlex metodi, ir parādīta ar sarkanām bultiņām, lielākā daļa izteikto pīku ir artefakti.

3. Mātes šūnu kontaminācijas izraisītas nepareizas diagnozes mazināšana agrīnas grūtniecības zaudēšanas ģenētiskajā testēšanā

Publicēts kā:

Ludmila Volozonoka, Linda Gailite, Dmitrijs Perminov, Liene Kornejeva, Violeta Fodina, Inga Kempa, and Anna Miskova, 2020. Reducing misdiagnosis caused by maternal cell contamination in genetic testing for early pregnancy loss. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 66(6), 410-420. doi: 10.1080/19396368.2020.1827081.

Personīgais ieguldījums:

Mans personīgais ieguldījums šajā darbā ietver pētījuma dizaina izstrādi, visu paraugu praktisku testēšanu, datu interpretāciju, publikācijas uzrakstīšanu. Lūdzu, skatiet visu līdzautoru parakstītus apliecinājumus dotās publikācijas izmantošanai manā promocijas darbā (4. pielikums).

3.1. Ievads

Grūtniecības zaudēšana ir traumējoša pieredze pacientam, kā arī ir klīniska problēma dzemdniecības un ginekoloģijas praksē. Novērojams, ka pārtraukušos grūtniecību skaits pieaug, īpaši attīstītajās valstīs, kur palielinās vidējais iedzīvotāju vecums un attiecīgi palielinās vidējais grūtnieces vecums (Heazell et al., 2018). Galvenā loma pārtraukušās grūtniecības etioloģijā ir augļa hromosomālajām aberācijām, lielākā daļa augļu ar mainītu kariotipu iet bojā pirmajās grūtniecības nedēļās (Davis et al., 2017; Romero et al., 2015). Konceptijas produktu analīze ir klīniski svarīga, lai noskaidrotu agrīnas grūtniecības zaudēšanas cēloni un pielāgotu klīnisko taktiku nākamajā dabiskajā vai asistētā grūtniecības ieņemšanā. Pašlaik ir pieejamas dažādas metodes

hromosomu aneiploīdiju un strukturālo pārkārtojumu noteikšanai koncepcijas materiālā. Visām metodēm ir zināmi trūkumi, taču visas tehnoloģijas var izdot maldinošus rezultātus, ja netiek ņemta vērā mātes DNS kontaminācija (parasti dēvēta par mātes šūnu kontamināciju). Literatūrā ir aprakstīta tendence palielinātam normālas sievietes kariotipa ziņojumu daudzumam salīdzinājumā ar normāla vīrieša kariotipa ziņojumiem (Bell et al., 1999; Jarrett et al., 2001; Lathi et al., 2014). Tomēr ne visas laboratorijas risina šo svarīgo jautājumu un pievēršas tā etioloģijai (Nikitina et al., 2005).

Lai gan pastāv vairāki izskaidrojumi mainītam dzimumu sadalījumam pārtraukušās grūtniecības materiālā (Jarrett et al., 2001) kā, piemēram, neatpazīta molāra 46,XX grūtniecība, ar X-sistītas letālas mutācijas, kā arī dzimumhromosomu analīzes neizdošanās hromosomu preparātos (Eiben et al., 1990; Hassold et al., 1983), pētījumi demonstrē, ka līdz pat 59% normāla sievietes kariotipa gadījumu ir saistāmi ar mātes šūnu kontamināciju (Jarrett et al., 2001; Lathi et al., 2014; Romero et al., 2015). No literatūras var secināt, ka pastāv ierobežota izpratne par koncepcijas materiāla analīzei izmantoto metodiku tehniskajiem ierobežojumiem un kritiskajiem aspektiem materiāla testēšanā. Līdz ar to darba mērķis ir izstrādāt koncepcijas produktu testēšanas protokolu, kā arī formulēt materiāla apstrādes, testēšanas un ziņošanas ieteikumus.

3.2. Materiāli un metodes

3.2.1. Pacienti un pārtraukušās grūtniecības materiāla hromosomu analīze

Pētījumā tika iekļautas pacientes ar grūtniecības pārtraukšanos pirms 13. grūtniecības nedēļas. Kopumā pētījumā tika iekļauti 86 paraugi. Mātes šūnu kontaminācijas ģenētiskai analīzei perifēro asiņu paraugi tika iegūti no 47 sievietēm. Primārā bioloģiskā materiāla parauga vizuālais izskats tika reģistrēts šādi: “labas kvalitātes horions” – ja vizualizēja tipisku horija bārkstiņu morfoloģiju; “nekvalitatīvs horions” – ja novēroja audu macerācijas pazīmes un tikai dažas bārkstiņas; “horiju nevizualizē” – ja horija bārkstiņas nesaskatīja. Hromosomu analīzi veica visiem paraugiem ar salīdzinošo genoma hibridizāciju uz mikročipiem, ievērojot ražotāja protokolu [24sure; Illumina, ASV].

3.2.2. Mātes šūnu kontaminācijas ģenētiskās testēšanas protokola izstrāde

Mātes šūnu kontaminācijas testēšanas sistēma iekļāva 14 mikrosatelītu, *AMEL* un *SRY* reģionu analīzi ar fluorescento PĶR. Visi 47 DNS paraugu pāri tika testēti, rezultāti klasificēti šādi: “kontaminācijas pazīmes” – ja elektroferogrammā detektēja trīs pīķus (vai divus, ja māte vai auglis bija homozigots); “tikai mātes genoms” – ja perifēro asiņu parauga genotips pilnībā sakrita ar pārtraukušās grūtniecības materiāla genotipu; “nav kontaminācijas” – ja augļa genotipu varēja detektēt kā otru alēli, atšķirīgu no mātes alēles.

3.3. Rezultāti

3.3.1. Vizuāla pārtraukušās grūtniecības materiāla novērtēšana un mātes šūnu kontaminācijas ģenētiskā testēšana

Par koncepcijas paraugu uzskata tādu materiālu, kas nesatur identificējamu augļa daļas (piemēram, nabas saite, amnions), bet drīzāk sastāv no horija bārkstiņām, membrānveida materiāla (Jarrett et al., 2001) un citiem nenoteiktas izcelsmes audiem. Vizuāli pārbaudot primāro materiālu ($n = 86$), tika iegūti šādi novērojumi: 55 bija labas kvalitātes paraugi, 19 bija nekvalitatīvi horiji ar audu macerācijas pazīmēm un 12 paraugos nevarēja vizualizēt audus ar tipisku horija morfoloģiju – atzīmēti kā “nav horiona”. Trīsdesmit trijos paraugos (70,2%) no 47 mātes šūnu kontaminācija netika detektēta, viens no tiem bija “nekvalitatīvs horions”, bet pārējie bija labas kvalitātes horiji. Astoņi paraugi (17,0%) demonstrēja kontaminācijas pazīmes, seši no tiem bija “nekvalitatīvi horioni” un divi neuzrādīja horija klātbūtni. Seši paraugi (12,8%) uzrādīja tikai mātes genomu, trīs no tiem bija “nekvalitatīvi horioni” un trīs bija bez horiona. Tika aprēķināts, ka izstrādātās sistēmas varbūtība būt neinformatīvai, t.i., uzrādīt nepatiesu rezultātu, ka augļa paraugs satur tikai mātes genomu, ir $1,9E-08$. Tādējādi varēja pieņemt, ka izstrādātais protokols nodrošina ticamus rezultātus un to var izmantot ar lielu pārliecību.

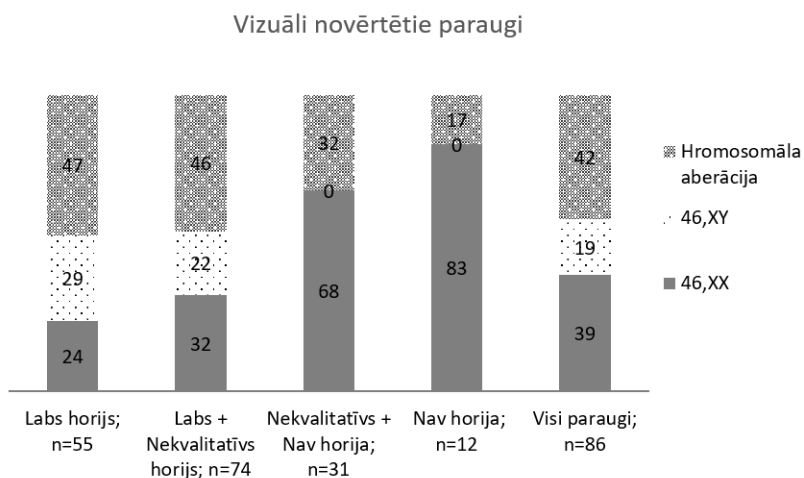
3.3.2. Hromosomu analīze ar salīdzinošo genoma hibridizāciju uz mikročipiem

Kopumā 34 paraugi uzrādīja normālu sievietes kariotipu un 16 – normālu vīrieša kariotipu (dzimumu attiecība 2,1:1). Pārējie 36 paraugi (41,9%) uzrādīja kādu hromosomālu patoloģiju, 12 no tiem saturēja XX dzimumhromosomas un

11 saturēja XY dzimumhromosomas (dzimumu attiecība 1:0,9), 13 paraugos tika atklāta dzimumhromosomu patoloģija.

3.3.3. Augsta mātes šūnu kontaminācijas riska pārtraukušās grūtniecības materiāla analīze

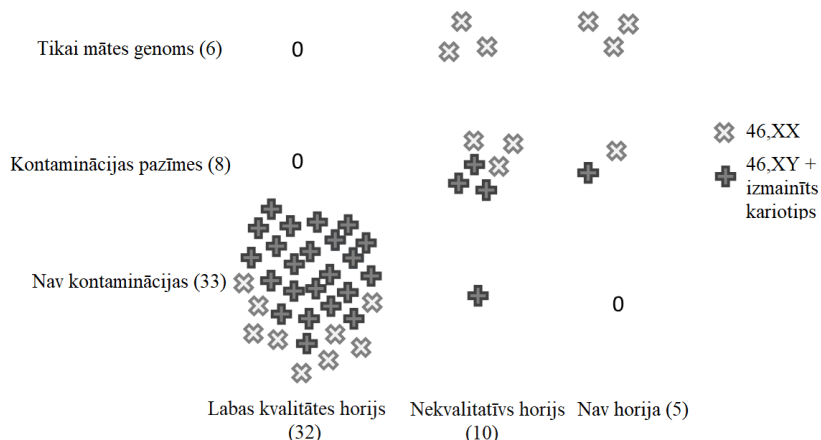
Katrs 46,XX kariotipa rezultāts ir jāuztver piesardzīgi, jo tas var rasties, analizējot mātes šūnas, īpaši neapmierinošas vizuālās kvalitātes paraugos. Kā redzams no 3.1. attēla, jo sliktāka ir analizējamā parauga vizuālā kvalitāte, jo lielāka ir 46,XX paraugu proporcija un jo zemāka ir 46,XY un aneiploīdo paraugu daļa.



3.1. attēls. Kariotipa rezultātu sadalījums dažādas vizuālās kvalitātes paraugos

Šūnu / audu izcelsme ar 46,XY kariotipu vai jebkādu hromosomālu anomāliju (n = 28) ir neapšaubāma (t.i., augļa). 3.2. attēls vizuāli atspoguļo to, ka lielākā daļa šo gadījumu (82,1%) koncentrējās paraugos ar labu vizuālo

kvalitāti bez mātes šūnu kontaminācijas. Tomēr četri gadījumi (14,3%) tika konstatēti starp zemas kvalitātes paraugiem, trijos no tiem bija atrastas arī kontaminācijas pazīmes. Balstoties uz standarta kritērijiem, kompromitētās vizuālās kvalitātes paraugi tiktu izmesti (Romero et al., 2015), jo dzīvotspējīgu šūnu klātbūtne ir izšķiroša citoģenētiskajai analīzei, arī parafīna paraugiem pirms DNS ekstrakcijas parasti bija nepieciešams patologa slēdziens par augļa šūnu klātbūtni. Šeit mēs parādām, kā vienkāršs un ātrs mātes šūnu kontaminācijas novērtēšanas solis var glābt daļu no sliktajiem paraugiem un palielināt korekto diagnožu skaitu.



3.2. attēls. **Paragu sadalījums atkarībā no vizuālās kvalitātes un mātes šūnu kontaminācijas klātbūtnes**

4. Dzemes kakla nepietiekamības izraisītu priekšlaicīgu dzemdību ģenētiskā etioloģija: sistemātiska gēnu analīze un pacientu nākamās paaudzes sekvenčēšanas datu interpretācija

Publicēts kā:

Ludmila Volozonoka, Dmitrijs Rots, Inga Kempa, Anna Kornete, Dace Rezeberga, Linda Gailite, Anna Miskova, 2020. Genetic landscape of preterm birth due to cervical insufficiency: Comprehensive gene analysis and patient next-generation sequencing data interpretation. *PLoS one*, 15(3), e0230771. doi: 10.1371/journal.pone.0230771.

Personīgais ieguldījums:

Mans personīgais ieguldījums šajā darbā ietver pētījuma dizaina izstrādi, sistemātisku literatūras un gēnu analīzi, nākamās paaudzes sekvenčēšanas datu interpretāciju, publikācijas uzrakstīšanu. Lūdzu, skatiet visu līdzautoru parakstītus apliecinājumus dotās publikācijas izmantošanai manā promocijas darbā (5. pielikums).

4.1. Ievads

Medicīniskais stāvoklis dzemdniecībā, kad dzemes kakls spontāni sāk atvērties un kļūst plānāks bez dzemdību pazīmēm un simptomiem, ir dzemes kakla nepietiekamība. Dzemes kaklam, kā audi ir bagāti ar kolagēnu, grūtniecības laikā jāpaliek noslēgtam, taču vienlaikus jāveic pakāpeniska fizioloģiskā pārveidošana, lai sagatavotos dzemdībām (Word et al., 2007). Dzemes kakla nepietiekamības gadījumā tas nespēj uzturēt progresējošas grūtniecības spiedienu. Klīniski nozīmīga izolēta dzemes kakla nepietiekamība novērojama apmēram 1–2% no visām grūtniecībām, bet ir saistīta ar

5–15% grūtniecības zaudējumiem otrajā trimestrī (Mingione et al., 2003; SW Wang et al., 2016). Rutīnu dzemdes kakla mērīšanu 2011. gadā ieteica Globālā alianse priekšlaicīgu dzemdību un nedzīvi dzimušu bērnu novēršanai (Goldenberg et al., 2012), jo īss dzemdes kakls ir labākais spontāno dzemdību prognozēšanas faktors (Di Renzo, 2015).

Epidemioloģiskie dati rāda, ka augļiem / jaundzimušajiem ar Elersa-Danlo sindromu, *osteogenesis imperfecta* un ierobežojošo dermapātiju ir paaugstināts nelabvēlīgu grūtniecības iznākumu risks, tostarp pārtraukušās grūtniecības, priekšlaicīgs auglūdzens pūšļa plīsuma, kā arī dzemdes kakla nepietiekamības (Anum et al., 2009; Young et al., 2007).

Bez šaubām, mūsu pašreizējā izpratne par cilvēka dzemdes kakla pārveidošanos grūtniecības laikā ir ierobežota (Vink & Myers, 2018). Tas var būt par iemeslu ar dzemdes kakla nepietiekamību pētīto gēnu nobīdei un pārsteidzoši mazajam informācijas daudzumam, kas pašlaik ir zināms par dzemdes kakla patoloģiskas pārveidošanās ģenētiku grūtniecības laikā.

Ņemot vērā to, ka gēnu varianti, kurus var atklāt ar genoma asociācijas pētījumiem, parasti izskaidro tikai mazu daļu no kompleksu slimību iedzimstamības (Asimit & Zeggini, 2010), pastāv hipotēze, ka retie varianti vairākos gēnos, kas iesaistīti priekšlaicīgu dzemdību attīstībā, var kumulatīvi ietekmēt predispozīciju grūtniecības atrisināšanai pirms laika (Bezold et al., 2013; Strauss et al., 2018). Mēs nolēmām pārbaudīt šo hipotēzi, veicot nākamās paaudzes sekvencēšanu pacientēm ar izolētu nesindromisku dzemdes kakla nepietiekamību. Tā kā trūkst zināšanu par dzemdes kakla darbībā iesaistītajiem gēniem, mēs veicām sistemātisku literatūras analīzi, lai atlasītu visus iespējamus gēnus, saistītus ar dzemdes kakla funkciju. Ņemot vērā aprakstīto dzemdes kakla nepietiekamības iedzimstamību, galvenie jautājumi, kuriem mēs pievērsāmies šajā pētījumā, bija šādi: i) vai ir gēni, kas ir primāri saistīti ar dzemdes kakla

nepietiekamību, un, ja ir, tad kāda ir to loma? un ii) cik daudz izolētas nesindromiskas dzemdes kakla nepietiekamības gadījumu var būt attiecināmi uz ģenētiskajām variācijām?

4.2. Materiāli un metodes

4.2.1. Dzemdes kakla bioloģijā iesaistīto gēnu identificēšana

Literatūras meklēšana tika veikta saskaņā ar PRISMA vadlīnijām (Moher et al., 2009). Iekļaušanas kritēriji: pētījums publicēts recenzētā žurnālā; pētījums demonstrē oriģinālus datus; pētījums koncentrējas uz dzemdes kakla nepietiekamības un / vai priekšlaicīgu dzemdību ģenētiskā cēloņa atrašanu; pētījums izmanto dzemdes kakla audus funkcionālajai gēnu analīzei, lai pētītu dzemdes kakla nobriešanu, dzemdes kakla nepietiekamību un / vai priekšlaicīgas dzemdības. Tika iekļauti tikai cilvēku pētījumi.

Izslēgšanas kritēriji: pētījums koncentrējas uz spontāno abortu un / vai pirmo grūtniecības trimestri; pētījums koncentrējas uz mikroRNS, lncRNS, brīvi cirkulējošo DNS, ribosomu DNS, dzemdes kakla un maksts mikrobiomu, vēža analīzi; pētījums neanalizē cilvēka datus; pētījums nav pieejams angļu valodā. Pamatojoties uz datiem, kas iegūti no visiem iekļautajiem pētījumiem un papildu gēnu meklējumiem, mēs izveidojām trīs dažādus gēnu sarakstus atbilstoši to saistībai ar dzemdes kakla ģenētiku.

4.2.2. Nākamās paaudzes sekvencēšana pacientiem ar dzemdes kakla nepietiekamību

Pacienti

Pētījums iekļāva 21 kaukāziešu tautības sievieti ar nesāpīgu dzemdes kakla atvēršanos pašreizējās grūtniecības laikā un / vai pozitīvu grūtniecības zaudēšanu un / vai priekšlaicīgām dzemdībām anamnēzē dzemdes kakla nepietiekamības dēļ un bez kontrakcijām viena augļa grūtniecībā (sk. 4.1. tabulu).

4.1. tabula

Pacientu demogrāfiskās un klīniskās īpašības

Vecums, gadi	35 ± 4,8
Svars, kg	73,2 ± 16,7
Augums, m	1,7 ± 0,05
ĶMI, kg / m²	26 ± 5,5
VG	4,5 ± 2,5
CG	1,0 ± 1,1
VG-CG	3,5 ± 2,2
AGP	0,5 ± 0
VGP + PD	1,9 ± 1,7
DKG, cm	1,53 ± 0,5

* ĶMI – ķermeņa masas indekss; VG – visas grūtniecības; CG – citas grūtniecības, ieskaitot legālo abortu, indicēto medicīnisko abortu; VG-CG – visas grūtniecības, atskaitot citas grūtniecības; AGP – agrīna grūtniecības zaudēšana (< 12 nedēļas); VGP + PD – vēlīna grūtniecības zaudēšana (> 12 nedēļas, < 22 nedēļas) un priekšlaicīgas dzemdības (< 37 nedēļas); DKG – dzemdes kakla garums.

Nākamās paaudzes sekvenčēšana, bioinformātikas analīze un variantu filtrēšana

Nākamās paaudzes sekvenčēšanai tika izmantots Illuminas *TruSight One Sequencing Panel Capture* reaģentu komplekts [ASV]. Nolasījumu kartēšanai un variantu sasaukšanai tika izmantota *Sentieon's DNaseq* (Freed et al., 2017; Kendig et al., 2019) FASTQ uz VCF analīze, kas implementēta DNAnexus mākoņserverī [ASV]. Pirmais variantu filtrs atlasīja nesinonīmus eksonu variantus un splaisa-saita variantus ($\pm 10\text{nt}$) kanoniskajā (garākajā) transkriptā. Tika iekļauti varianti ar alēles biežumu $< 1\%$ datubāzēs “1000 Genomes”, “ExAC” un “gnomAD”. Otrais variantu filtrs atlasīja variantus, pārklātus ar vismaz 10 nolasījumiem, ar varianta alēles biežumu vismaz 25%, un izslēdza zināmus variantus, marķētus kā “neitrāls” (angl. *benign*) un “visdrīzāk neitrāls” (angl. *likely benign*) klīniskajās datubāzēs.

Variantu klasifikācija, prioritizācija un gēnu bagātināšanas analīze

Ģenētiskie varianti tika prioritizēti, izmantojot trīs sistemātiskajā gēnu analīzē izveidotos gēnu sarakstus. Varianti, kas atrasti gēnos no pirmā un otrā saraksta, prioritizēti, tāpēc tika rūpīgi apakatīti, lai identificētu tos variantus, kas, visticamāk, veicina pacientu fenotipa attīstību. Katra šī saraksta varianta patogenitāti vērtēja trīs neatkarīgi zinātnieki saskaņā ar Amerikas Medicīniskās ģenētikas koledžas vadlīnijām (Richards et al., 2015). Lai iegūtu objektīvu informāciju par ceļu bagātināšanu gēnos, kuriem mūsu kohortā ir reti varianti ar *in silico* paredzētu ietekmi uz gēna funkciju, mēs anotējām gēnus, izmantojot ConsensusPathDB datubāzi (Kamburov et al., 2013).

4.3. Rezultāti

4.3.1. Gēnu analīze: gēni, kas saistīti ar dzemdes kakla nepietiekamību, galvenokārt ir sindromiski

Kopumā tikai 12 gēni tika primāri saistīti ar dzemdes kakla nepietiekamību (sk. 4.2. tabulu), no tiem seši bija sindromiski, t.i., *COL1A1* un *COL3A1* izraisa Elersa-Danlo sindromu (EDS); *FBNI* izraisa Marfāna sindromu; *ZMPSTE24* un *LMNA* izraisa ierobežojošo dermopātiju; *MATR3* izraisa miopātiju. *COL3A1* bija vienīgais gēns ar zināmu gēna-fenotipa saistību, kā parādīts cilvēka fenotipa ontoloģijas apzīmējumā “Dzemdes kakla nepietiekamība” (HP:0030009), kā arī “Priekšlaicīgas dzemdības dēļ dzemdes kakla nepietiekamības vai membrānas trausluma” (HP:0005267), “Dzemdes plīsums” (HP:0100718) un “Dzemdes prolaps” (HP:0000139), un ir zināms, ka tas izraisa asinsvadu tipa EDS (OMIM:130050).

4.2. tabula

Gēni, kas primāri saistīti ar dzemdes kakla nepietiekamību (pirmais gēnu saraksts)

Gēns	Asociācijas no literatūras un papildu meklējumiem
<i>COL1A1</i>	Elersa-Danlo sindroms; dzemdes kakla nepietiekamība; priekšlaicīgas dzemdības; priekšlaicīgs augļūdens pūšļa plīsums; dzemdes kakla fizioloģiskā sagatavošanās; fizioloģiska grūtniecība.
<i>COL3A1</i>	Elersa-Danlo sindroms; dzemdes kakla nepietiekamība HP:0030009 / priekšlaicīgas dzemdības dzemdes kakla nepietiekamības vai membrānas trausluma dēļ HP:0005267 / dzemdes plīsums HP:0100718 / dzemdes prolaps HP:0000139; priekšlaicīgs augļūdens pūšļa plīsums; priekšlaicīgas dzemdības; dzemdes kakla fizioloģiskā sagatavošanās; fizioloģiska grūtniecība; priekšlaicīgas dzemdes kontrakcijas.
<i>FBNI</i>	Marfāna sindroms; dzemdes kakla nepietiekamība; priekšlaicīgs augļūdens pūšļa plīsums; priekšlaicīgas dzemdes kontrakcijas.

4.2. tabulas turpinājums

Gēns	Asociācijas no literatūras un papildu meklējumiem
<i>HIF1A</i>	Dzemes kakla nepietiekamība; dzemes kakla fizioloģiskā sagatavošanās; fizioloģiska grūtniecība.
<i>IL10</i>	Dzemes kakla nepietiekamība; priekšlaicīgas dzemdības.
<i>IL1B</i>	Dzemes kakla nepietiekamība; priekšlaicīgas dzemdības; dzemes kakla fizioloģiskā sagatavošanās; fizioloģiska grūtniecība.
<i>IL6</i>	Dzemes kakla nepietiekamība; priekšlaicīgas dzemdības; dzemes kakla fizioloģiskā sagatavošanās; fizioloģiska grūtniecība.
<i>LMNA</i>	Ierobežojoša dermatopātija; priekšlaicīgas dzemdības dzemes kakla nepietiekamības vai membrānas trausluma dēļ HP:0005267; priekšlaicīgs membrānu plīsums HP:0001788.
<i>MATR3</i>	Miopātija MATR3 mutāciju dēļ; dzemes kakla nepietiekamība.
<i>MBL2</i>	Dzemes kakla nepietiekamība; priekšlaicīgas dzemdības.
<i>TGFB1</i>	Dzemes kakla nepietiekamība; priekšlaicīgas dzemdības; dzemes kakla fizioloģiskā sagatavošanās; fizioloģiska grūtniecība.
<i>ZMPSTE24</i>	Ierobežojoša dermatopātija; priekšlaicīgas dzemdības dzemes kakla nepietiekamības vai membrānas trausluma dēļ HP:0005267; priekšlaicīgs augļūdens pūšļa plīsums; priekšlaicīgas dzemdības.

4.3.2. Pacientu nākamās paaudzes sekvencēšanas datu analīze

Divdesmit heterozigotiski varianti, kas atrasti 14 no mūsu pacientiem (67%) no pirmā un otrā gēnu sarakstiem, tika pakļauti tuvākai analīzei, jo, pamatojoties uz zināšanām, tika uzskatīts, ka tie, visticamāk, veicina pacientu fenotipa attīstību (sk. 4.3. tabulu). Tika atrasti 14 varianti desmit gēnos, kas izraisa EDS, *osteogenesis imperfecta* vai Betlema miopātiju.

Galū galā, pamatojoties uz visaptverošu variantu patogenitātes, tostarp zināmu gēna-slimības / gēna-fenotipa asociāciju, gēnu ekspresijas dzemes kaklā un konkrētu gēnu slimību mehānismiem u.tml. novērtēšanu, mēs piešķirām variantam varbūtību pacienta fenotipa attīstības ieguldījumā (sk. 4.3. tabulas

pēdējo kolonnu). Varianta ieguldījums fenotipa attīstībā tika klasificēts kā *maz ticams ieguldījums* (n = 7), ja tas tika klasificēts kā neitrāls / visdrīzāk neitrāls saskaņā ar manuālo variantu patogenitātes novērtēšanu, neekspresējās vai vāji ekspresējās dzemdes kaklā vai arī tā zināmās gēna-slimības / gēna-fenotipa asociācijas neatbilda interesējošajam fenotipam. Variantam ir *nepieciešama papildu izmeklēšana* (n = 13), ja tas, pamatojoties uz novērtētajiem kritērijiem, parādīja teorētisku potenciālu palielināt uzņēmību pret interesējošā fenotipa attīstību, taču ir nepieciešams vairāk datu, lai atzītu variantu kā nepārprotami iesaistītu dzemdes kakla nepietiekamības attīstībā.

4.3.3. Molekulāro gēnu ceļu bagātināšanas analīze

Lai noteiktu, vai gēniem ar retiem variantiem mūsu pacientu kohortā ir fenotipam atbilstoša molekulāro ceļu bagātināšanās, mēs anotējām visus gēnus (n = 694), izmantojot ConsensusPathDB mijiedarbības datubāzi (Kamburov et al., 2013), izmantojot TruSight gēnu sarakstu kā fonu (n = 4810). Analīze atklāja izteiktu pārstāvniecību ceļos, kas saistīti ar audu mehānisko un biomehānisko izturību (kolagēni un proteoglikāni, integrīni). Tika novērota bagātināšana ne tikai ar ekstracelulāro matricu saistītajos ceļos, bet arī šūnas saziņā ar ekstracelulāro matricu (piemēram, hemidesmosomas, fokālā adhēzija) un bazālās membrānas komponentos (laminīni). Turklāt vairāki šeit identificētie ceļi sakrīt ar tiem, kas ir bagātināti gēnos, kuri pētīti saistībā ar dzemdes kakla ģenētiku, kā parādīts mūsu literatūras analīzē.

Dzemdē kakla nepietiekamības attīstību potenciāli veicinošu ģenētisko variantu analīze mūsu pacientiem

Paraugs	Gēns	Genotips (ietekme uz olbaltumvielu, ja zināms)	Klasifikācija pēc ACMG kritērijiem	Komentāri	Ieguldījums dzemdē kakla nepietiekamības fenotipā
1	<i>MYO1F</i> (rs200225777)	NM_012335.4:c.[2461G > A];[=] (NP_036467.2:p.Gly817Arg)	Nav piemērojams ^a (PP3; BP6)	Slimības mehānisms nav zināms, un nav zināms asociētais fenotips; visdrīzāk, recesīvs iedzimšanas tips.	Maz ticams ieguldījums
2	<i>FKBP14</i> (rs5422254849)	NM_017946.c.[496_498del];[=] (NP_060416.1:p.Lys166del)	VUS (PP3; PM4; PM1)	Patogēnie varianti ģenā izraisa EDS, kas saistīts ar dzemdē kakla nepietiekamību; visdrīzāk, recesīvs iedzimšanas tips.	Nepieciešama papildu izmeklēšana
3	<i>B4GALT7</i> (rs142476892)	NM_007255.c.[277C > T];[=] (NP_009186.1:p.His93Tyr)	VUS (PP3; PM1)	Patogēnie varianti ģenā izraisa EDS; VUS iepriekš konstatēti EDS pacientiem; visdrīzāk, recesīvs iedzimšanas tips.	Nepieciešama papildu izmeklēšana
	<i>COL1A2</i>	NM_000089.c.[1808C > T];[=] (NP_000080.2:p.Thr603Ile)	VUS (PP3; PM2)	Patogēnie varianti ģenā izraisa EDS, kas saistīts ar dzemdē kakla nepietiekamību; izteikta ekspresija dzemdē kaklā; visdrīzāk, dominants iedzimšanas tips.	Nepieciešama papildu izmeklēšana

4.3. tabulas turpinājums

Paraugs	Gēns	Genotips (ietekme uz olbaltumvielu, ja zināms)	Klasifikācija pēc ACMG kritērijiem	Komentāri	Ieguldījums dzemdes kakla nepietieka mības fenotipā
4	<i>COL1A1</i> (rs778463556)	NM_000088:c.[1663C > T];[=] (NP_000079.2:p.Pro555Ser)	LP (PP3; PM5; PP2; PM2)	Patogēnie varianti gēnā izraisa EDS; izteikta ekspresija dzemdes kaklā; visdrīzāk, dominants iedzimšanas tips.	Nepieciešama papildu izmeklēšana
5	<i>COL12A1</i> (rs201988277)	NM_004370.6:[c.7853C > T];[=] (NP_004361.3:p.Thr1454Met)	VUS (PP3)	Patogēnie varianti gēnā izraisa Elersa-Danlo / Betlema miopātijai līdzīgu sindromu, kas saistīts gan ar saistaudu patoloģijām, gan ar muskuļu vājumu. Visdrīzāk, dominants iedzimšanas tips.	Nepieciešama papildu izmeklēšana
6	<i>COL1A1</i> (rs537060488)	NM_000088:c.[529G > A];[=] (NP_000079.2:p.Val177Met)	VUS (PP2)	Patogēnie varianti gēnā izraisa EDS; izteikta ekspresija dzemdes kaklā; visdrīzāk, dominants iedzimšanas tips.	Nepieciešama papildu izmeklēšana
	<i>CHST14</i> (rs144629123)	NM_130468:c.[635T > C];[=] (NP_569735.1:p.Val212Ala)	VUS (PP3; PM1; BS2)	Izteikta ekspresija dzemdes kaklā; patogēnie varianti gēnā izraisa EDS; visdrīzāk, dominants iedzimšanas tips.	Nepieciešama papildu izmeklēšana

4.3. tabulas turpinājums

Paraugs	Gēns	Genotips (īetekme uz olbaltumvielu, ja zināms)	Klasifikācija pēc ACMG kritērijiem	Komentāri	Ieguldījums dzemdes kakla nepietiekamības fenotipā
6	<i>GK</i> (rs371481560)	NM_000167:c.1989G > A];[=] (NP_976325.1:p.Arg330His)	VUS (PP3; PM1)	Ar GK gēnu saistīts slimības fenotips nepārkļājas ar interesējošo fenotipu; vāja ekspresija dzemdes kaklā; ar X saistīts recesīvs.	Maz ticams ieguldījums
7	<i>MYO1F</i> (rs761308378)	NM_001348355:c.[2270G > A];[=] (NP_036467.2:p.Arg757Gln)	Nav piemērojams ^a (PP3)	Slimības mehānisms nav zināms, un nav zināms gēna fenotips. Visdrīzāk, recesīvs iedzimšanas tips.	Maz ticams ieguldījums
8	<i>COL4A3</i> (rs765655100)	NM_000091.4:c.[5010_*14del];[=] (NP_000082.2:p.His1670_Ter1671delinsXaa)	LP (PP3; PM1; PM4;PM2)	Lokalizēts gēna galā (stop-kodona zudums); vāja ekspresija dzemdes kaklā; dominants vai recesīvs.	Maz ticams ieguldījums
8	<i>TNXB</i>	NM_001365276:c.[3793G > A];[=] (NP_001352205.1:p.Gly1265Arg)	VUS (PP3;PM2; BPI)	Gēns ir saistīts ar EDS hipermobilo tipu; visdrīzāk, recesīvs iedzimšanas tips.	Nepieciešama papildu izmeklēšana

4.3. tabulas turpinājums

Paraugs	Gēns	Genotips (ietekme uz olbaltumvielu, ja zināms)	Klasifikācija pēc ACMG kritērijiem	Komentāri	Ieguldījums dzemdes kakla nepietiekamības fenotipā
9	<i>B4GAL17</i> (rs142476892)	NM_007255:c.[277C > T];[=] (NP_009186.1:p.His93Tyr)	VUS (PP3;PM1)	Patogēnie varianti gēnā izraisa EDS; VUS iepriekš konstatēts EDS pacientiem; visdrīzāk, recesīvs iedzimšanas tips.	Nepieciešama papildu izmeklēšana
	<i>TNXB</i> (rs141190850)	NM_001365276:c.[2030A > G];[=] (NP_061978.6:p.Glu677Gly)	VUS (PP3; BP1)	Gēns ir saistīts ar EDS hipermobilo tipu; visdrīzāk, recesīvs iedzimšanas tips.	Nepieciešama papildu izmeklēšana
10	<i>PLOD1</i> (rs772861343)	NM_000302:c.[475G > A];[=] (NP_001303249.1:p.Gly159Se)	VUS (PP3; PM2)	Patogēnie varianti gēnā izraisa EDS; VUS iepriekš konstatēts EDS pacientiem; izteikta ekspresija dzemdes kaklā; visdrīzāk, recesīvs iedzimšanas tips.	Nepieciešama papildu izmeklēšana
	<i>P3HI</i> (rs371232413)	NM_001146289:c.[1720 + 4G > A];[=]	VUS	Patogēnie varianti gēnā, kas izraisa <i>Osteogenesis imperfecta</i> , kas klīniski saistīta ar dzemdes kakla nepietiekamību; ietekme uz splaisingu nav skaidra.	Nepieciešama papildu izmeklēšana

4.3. tabulas turpinājums

Paraugs	Gēns	Genotips (ietekme uz olbaltumvielu, ja zināms)	Klasifikācija pēc ACMG kritērijiem	Komentāri	Ieguldījums dzemdes kakla nepietiekamības fenotipā
12	<i>P3HI</i> (rs371232413)	NM_001146289:c.[1720 + 4G > A];[=]	VUS	Patogēnie varianti gēnā, kas izraisa <i>Osteogenesis imperfecta</i> , kas klīniski saistīta ar dzemdes kakla nepietiekamību; ietekme uz splaisingu nav skaidra; visdrīzāk, recesīvs iedzimšanas tips.	Nepieciešama papildu izmeklēšana
	<i>C1S</i> (rs148105120)	NM_001734:c.[100A > G];[=] (NP_001725.1:p.Ser34Gly)	VUS (PP3; BS1)	Saisīts ar EDS, bet saistība ar slimību ir apšaubāma (viens <i>missense</i> variants ziņots publikācijā); visdrīzāk, recesīvs iedzimšanas tips.	Maz ticams ieguldījums
	<i>MYOIF</i> (rs747756979)	NM_001348355:c.[1170 + 4C > T];[=]	Nav piemērojams ^a (BP4)	Slimības mehānisms nav zināms, un nav zināms gēna fenotips. Variants neietekmē splaisingu; visdrīzāk, recesīvs iedzimšanas tips.	Maz ticams ieguldījums

4.3. tabulas turpinājums

Paraugs	Gēns	Genotips (ietekme uz olbaltumvielu, ja zināms)	Klasifikācija pēc ACMG kritērijiem	Komentāri	Ieguldījums dzemdes kakla nepietiekamības fenotipā
13	<i>ADRB2</i> (rs753894727)	NM_000024:c.[1072G > C];[=] (NP_000015.1:p.Gly358Arg)	Nav piemērojams ^a (BP1; BP4)	Gēns nav saistīts ar fenotipu; pētījumā, no kura tiek iegūta informācija, analizēja tikai polimorfismus un neatrada nekādu saistību ar dzemdes kakla nepietiekamību; visdrīzāk, dominants iedzimšanas tips.	Maz ticams ieguldījums

* ^a Nav piemērojams – ja slimības mehānisms nav zināms vai fenotips nav zināms; VUS – neskaitīdas nozīmes variants (angl. *variant of unknown significance*), LP – visdrīzāk, patogēns (angl. *likely pathogenic*).

5. Kopīgā diskusija

5.1. Labākās tehnoloģijas izvēle pirmsimplantācijas ģenētiskajai testēšanai

Šīs disertācijas pirmajā praktiskajā darbā, kas aprakstīts 2. nodaļā, tika apskatīta embriju pirmsimplantācijas analīze pāriem ar paaugstinātu risku bērna piedzimšanai ar monogēnu patoloģiju. Papildus uzdevumam uzturēt visaugstākos PGT drošības standartus mēs izvirzījām mērķi sasniegt vēlamu grūtniecību katram no pāriem. Tā kā tirgū nebija pieejamas nevienas PGT sistēmas, mēs visu testēšanas protokolu izstrādājām no nulles, jau pašā sākumā saskaroties ar izaicinājumu izvēlēties pareizos rīkus, t.i., reaģentus un metodes. Tāpēc mēs nolēmām i) salīdzināt divas populārākās pilna genoma amplifikācijas metodes un ii) detalizēti dalīties savā praktiskajā pieredzē ar tiem, kas saskaras ar to pašu izaicinājumu. Rezultātā mēs bijām apmierināti ar savu sniegumu, jo astoņiem pāriem no deviņiem piedzima veseli bērni, kas tika apstiprināti arī postnatāli. Tikai vienā gadījumā (*MTMI*) neviena olšūna netika veiksmīgi apaugļota, limitējot pāra iespējas ieņemt veselu bērnu. Trīs embriju pārnesšanas rezultējās neveiksmīgā implantācijā, padarot kopējo dzimstību uz embrija pārnesei par 72,7%, kas joprojām pārsniedz vidējo ziņoto literatūrā (Butler et al., 2019; Theobald et al., 2020). Nelielais aplūkoto gadījumu skaits apgrūtina iespējas prognozēt augsta dzimstības līmeņa tendenci ilgtermiņā, taču mēs to saistām ar visu pārnesto embriju galvenā neizdevušās embrija implantācijas faktora izslēgšanu (aneuploīdu embriju daudzums bija 37,5%). Tomēr tiek uzsvērts, lai noteiktu PGT-A klīnisko efektu PGT-M cikliem, ir nepieciešami randomizēti kontrolēti pētījumi (Toft et al., 2020).

No 73 aprādātiem embrijiem 39 tika amplificēti, izmantojot MDA, bet 34 – SurePlex amplifikācijas sistēmu, lai novērtētu divu pilna genoma amplifikācijas metožu veikumu četrās dažādās tehnoloģijās un izvēlētos vispiemērotāko. Mūsu rezultāti vēlreiz apstiprina zināmu faktu, ka MDA amplifikācija ir piemērota viena vai dažu lokusu analīzei, kā mēs parādījām, neatkarīgi no izmantotās tehnoloģijas, savukārt SurePlex pilnībā atbilst tādu genomisko tehnoloģiju lietošanas prasībām kā salīdzinošā genoma hibridizācija uz mikročipiem vai nākamās paaudzes sekvenčēšana. Kaut gan tikai divās ģimenēs mēs varējām vienlaikus izmantot abas pilna genoma amplifikācijas metodes, mēs uzskatām šādu pieeju par praktisku un pragmatisku. Tas ļauj iegūt daudzpusīgāku PĢT pieredzi, jo hromosomu analīze uz mikročipiem, izmantojot MDA, ir iespējama tikai aptuveni divās trešdaļās gadījumu un tikai pilnām hromosomām, bet ne daļējām kopiju skaita variācijām. Savstarpējā metožu validācija deva mums iespēju secināt, ka abus amplifikatorus var izmantot jebkurai turpmākai embriju analīzes tehnoloģijai ar pietiekami labu jutību, ja PĢT-M labās prakses vadlīnijas tiek ievērotas (Hellani et al., 2004; Piyamongkol et al., 2003). Galu galā mūsu centieni ļauj pielāgot izstrādāto testēšanas sistēmu praktiski jebkurai viena gēna patoloģijai.

5.2. Pārtraukušās grūtniecības materiāla ģenētiskās testēšanas uzticamības uzlabošana

Nākamais praktiskais darbs, kas aprakstīts 3. nodaļā – koncepcijas produktu ģenētiskā testēšana augļa hromosomālo patoloģiju izslēgšanai –, tika iniciēts klīniskas nepieciešamības rezultātā. Neskatoties uz pretrunīgi vērtēto koncepcijas produktu ģenētiskās testēšanas statusu (Carp, 2007), pastāv scenāriji, kuros zināšanas par augļa kariotipu palīdz klīniskai pacienta vadīšanai (Lathi et al., 2012), jo jebkura prognoze ir empīriskā, ja bojāgājušā augļa

kariotips ir nezināms. Tomēr pastāvošā mātes šūnu kontaminācijas problēma var apdraudēt visu nodomu nodrošināt labāko aprūpi šiem pacientiem.

Tā kā salīdzinošā genoma hibridizācija uz mikročipiem tika parādīta kā avārijas kariotipēšanas metodika pārtraukušās grūtniecības materiāla analīzē (Kudesia et al., 2014), mēs to izvēlējāmies kā vispiemērotāko instrumentu klīniskai lietošanai. Tomēr drīz pēc ieviešanas mēs saskārāmies ar palielinātu šķietami normālas sievietes kariotipa skaitu testēšanas pārskatos. Šādi koncepcijas produktu testēšana parāda, kā mūsdienīgu tehnoloģiju lietojums var sagādāt vilšanos, ja to izmanto, neizprotot konkrētās metodikas īpatnības un / vai konkrētā bioloģiskā materiāla specifiku. Tas stimulēja mūs izstrādāt vienkāršu protokolu, kas varētu atpazīt mātes šūnu kontaminācijas klātbūtni ikvienā paraugā.

Darba rezultātā tika izstrādāts mātes šūnu kontaminācijas noteikšanas protokols, kurš ir zemu resursu papildinājums jebkuram koncepcijas produktu testēšanas protokolam laboratorijā un kuram ir būtisks potenciāls uzlabot klīnisko vadību pacientiem ar agrīnu grūtniecības zaudēšanu. Mēs piedāvājam jaunu polimorfu īsu tandēma atkārtojumu marķieru komplektu, kas būtu tikpat uzticams kā komerciāli pieejamie komplekti (piemēram, *Identifiler* no *ThermoFisher*), un tas ir arī lēts risinājums, kas dažās valstīs var būt svarīgs apsvērums. Mūsu pieeja izmantot salīdzinošo genoma hibridizāciju uz mikročipiem apvienojumā ar mātes šūnu kontaminācijas noteikšanu ir alternatīva starp polimorfismu mikročipiem (angl. *SNParrays*), kas spēj konstitucionāli noteikt mātes šūnu kontamināciju (Lathi et al., 2014), taču to izmantošana ir dārga un darbietilpīga, un citoģenētisko testēšanu, kas ir zelta standarts koncepcijas produktu analīzē, taču atstāj ievērojamu daļu paraugu bez rezultāta zaudētas šūnu dzīvotspējas dēļ. Mūsu praktiskie ieteikumi par mātes šūnu kontaminācijas samazināšanu būs noderīgi tiem, kas tikai ievieš koncepcijas produktu ģenētisko testēšanu.

5.3. Dzemes kakla nepietiekamības ģenētiskās etioloģijas atšifrēšana

Priekšlaicīgas dzemdības tiek uzskatītas par multifaktoriālu jeb kompleksu saslimšanu. No ģenētiskās epidemioloģijas ir zināms, ka būtiska šādu slimību etioloģijas daļa slēpjas kompleksā ģenētikā (Polychronakos, 2008). Multifaktoriālu slimību gēnu identificēšana lielā mērā tika meklēta, izmantojot populāciju pētījumu metodes, piemēram, genoma asociāciju pētījumus (angl. *genome wide association studies*), galvenokārt to objektīvā un no hipotēzes brīva rakstura dēļ (Agler & Divaris, 2020). Diemžēl šādai pieejai nav izdevies identificēt biežas alēles kā ticamus priekšlaicīgu dzemdību marķierus.

Stāvoklis, kas klīniski asociēts ar priekšlaicīgām dzemdībām, ir dzemes kakla nepietiekamība. Mēs mēģinājām atklāt tā ģenētisko etioloģiju, lietojot nākamās paaudzes sekvencēšanu 21 klīniski labi raksturotai pacientei ar dzemes kakla nepietiekamību. Būtiski atzīmēt, ka šī pētījuma tēma radās no klīniskas nepieciešamības, jo iespējas laikus prognozēt un novērst šā stāvokļa sekas pašlaik ir ļoti ierobežotas tā neskaidrā rakstura dēļ (Artymuk et al., 2019).

Tā kā ar dzemes kakla darbību saistīto zināmo gēnu skaits mūsu pētījuma sākumā bija saskaitāms uz vienas rokas pirkstiem, nopietni limitējot nākamās paaudzes sekvencēšanas datu analīzes iespējas mūsu pacientiem, mēs apbruņojāmies ar *a priori* zināšanām, veicot visaptverošu un sistemātisku gēnu analīzi. Kopumā identificējām 12 gēnus, kas primāri saistīti ar dzemes kakla nepietiekamību, no kuriem seši (*COL1A1*, *COL3A1*, *FBN1*, *LMNA*, *MATR3*, *ZMPSTE24*) izraisa kolagenopātiju sindromus, savukārt *MBL2* deficīts ir saistīts ar uzņēmību pret autoimūnām un infekcijas slimībām, *IL6*, *IL1B*, *IL10* – visi ir iekaisuma procesa mediatori, *TGFBI* regulē šūnu proliferāciju un augšanu un *HIF1A* ir transkripcijas faktors. Tālāk mēs identificējām 91 gēnu, kas potenciāli ir saistīts ar dzemes kakla nepietiekamību (otrais gēnu saraksts). Abi gēnu saraksti tika izmantoti sekvencēšanas datu analīzei. Pēc rūpīgas identificēto

variantu analīzes mēs izdalījām 13 gēnu variantus ar *in silico* paredzētu ietekmi uz gēna funkciju 10 pacientiem. Būdami uzmanīgi ar variantu interpretāciju, mēs tos nosaucām par “variantiem, kas uzrāda teorētisku potenciālu palielināt uzņēmību dzemdes kakla nepietiekamības attīstībai, kam nepieciešama turpmāka izpēte”. Būtiski, ka 11 varianti tika atrasti gēnos, kas saistīti ar EDS attīstību, un divi – gēnos, kas izraisa *osteogenesis imperfecta*.

Lai arī kolagēna loma jau sen ir saistīta ar dzemdes kakla nepietiekamības attīstību, tiešo pierādījumu no klīniskajiem pētījumiem trūka. Mēs bijām pirmie, kas mēģināja pētīt retos variantus un parādīja to lomu šī fenotipa attīstībā, jo iepriekš tika aprakstītas tikai asociācijas ar kolagēna gēnu polimorfismiem. Svarīgi, ka šāda retu variantu ietekme, ko nevar atklāt, veicot genoma asociācijas pētījumus, tika prognozēta jau sen (Levy et al., 2007; Polychronakos, 2008).

Pēc mūsu manuskripta publicēšanas nāca klajā vēl viens jauns pētījums, kura mērķis bija identificēt molekulāros mehānismus, caur kuriem dzemdes kakla atvēršanās tiek realizēta progesterona un interleikīna IL-1 β ietekmē (Kniss & Summerfield, 2020), un kura rezultāti netieši atbalstīja arī mūsu atradnes. Pierādījumi par progesterona terapeitisko lietderību priekšlaicīgas dzemdes kakla nobriešanas un priekšlaicīgu dzemdību novēršanā sievietēm riska grupā ir labi aprakstīti (Conde-Agudelo & Romero, 2016). Progesterona receptoru signalizācija ir pamatā daudziem fizioloģiskajiem procesiem, kas vērsti pret dzemdes kakla pirmstermiņa paplašināšanos (Word et al., 2007). Tomēr joprojām pastāv neatbildēti jautājumi par progesterona darbības molekulārajiem un ģenētiskajiem mehānismiem. Pētījuma autori izmantoja cilvēka dzemdes kakla stromas fibroblastu primārās kultūras modeli, tie tika stimulēti ar progesteronu, interleikīnu-1 β vai abu vielu kombināciju. Rezultāti parādīja, ka interleikīns-1 β inducēja ekstracelulārā matricsa proteīnus, to degradējošo enzīmu un glikozaminoglikānu biosintēzē iesaistīto enzīmu diferenciālu ekspresiju. Konkrēti tika parādīta *COL3A1* [HGNC:2201] iesaistīšanās, kas ir

vienīgais gēns ar reģistrētu saistību ar dzemdes kakla nepietiekamību, kā arī *ELN* [HGNC:3327], *COL4A1* [HGNC:2202], *HAS2* [HGNC:4819] – visi gēni ir iekļauti mūsu gēnu sarakstos – un *B4GALTI* [HGNC:924], *CHST11* [HGNC:17422], *EXT1* [HGNC:3512], *FUT8* [HGNC:4019] un *HS3ST3B1* [HGNC:5198] – visi mazākā vai lielākā mērā ir iesaistīti ārpusšūnu matricas darbībā, audu mehāniskajā un biomehāniskajā izturībā (Kniss & Summerfield, 2020). Šie atklājumi atkārtο mūsu molekulāro ceļu bagātināšanas analīzes secinājumus par kolagēnu saistīto ceļu nozīmi dzemdes kakla pārveidošanā, kā arī sniedz ieskatu šo notikumu kontrolē ar progesterona starpniecību (Kniss & Summerfield, 2020).

Vienlaikus ar mūsu manuskriptu iznāca vēl viens interesants Ben-Zvi un kolēģu pētījums par dzemdes kakla nepietiekamības saistību ar iegurņa orgānu prolapsu un urīna nesaturēšanu (Ben-Zvi et al., 2020). Viņu analīze parādīja, ka sievietēm ar dzemdes kakla nepietiekamību anamnēzē bija lielāks iegurņa orgānu prolapsu un urīna nesaturēšanas gadījumu skaits (izredžu koeficients 12,8), demonstrējot, ka abiem stāvokļiem ir līdzīgs patofizioloģiskais mehānisms (Ben-Zvi et al., 2020). Patiešām ir pierādījumi, ka iegurņa orgānu un to atbalstošo audu integritāti galvenokārt uztur fibrilārās ārpusšūnu matricas sastāvdaļas (Carley & Schaffer, 2000; X. Liu et al., 2006).

Tāpat kā novājināti saistaudi rezultējas dzemdes kakla nepietiekamībā, tie nevar pienācīgi atbalstīt iegurņa pamatnē balstošos orgānus, rezultējoties iegurņa orgānu prolapsā un urīna nesaturēšanā (Ben-Zvi et al., 2020). Tā kā mēs bijām iedvesmoti ar mūsu pilotpētījuma sākotnējiem rezultātiem, tika nolemts turpināt veikt pētījumu par dzemdes kakla nepietiekamības kolagenopātisko dabu (FLPP projekts Nr. 2020/1-0042, 2021-2023). Pašlaik tiek izstrādāts pētījuma dizains, tas ietver arī visaptverošu ar kolagēnu saistīto pacientu fenotipisko pazīmju novērtēšanu, ieskaitot iegurņa orgānu prolapsu un urīna simptomu novērtēšanu. Mēs gaidām rezultātus un iespēju tos salīdzināt ar Ben-Zvi atradnēm.

5.4. Ieteikumi sievietes reproduktīvās mazspējas ģenētiskajai novērtēšanai pētījumos un klīnikā

1. Lai droši sasaistītu pašlaik identificētos gēnus ar sievietes reproduktīvās mazspējas fenotipiem un izmantotu tos kā diagnostikas marķierus klīniskajā praksē, jāveic standartizēta gēnu-slimību klīniskās validitātes novērtēšana.
2. Lai veicinātu sievietes reprodukcijas jomas attīstību un stimulētu personalizētas ārstēšanas piemērošanu tajā, jāatjaunina ģenētiskās testēšanas labās prakses vadlīnijas traucētas sievietes reprodukcijas gadījumā.
3. Ģenētiskai konsultēšanai vajadzētu pavadīt jebkuru ģenētisko testēšanu un, vēlams, reproduktīvo tehnoloģiju lietošanu, nodrošinot informētu reproduktīvo lēmumu pieņemšanu, lai izvairītos no nelabvēlīgiem reproduktīviem rezultātiem pacientiem un viņu pēcnācējiem.
4. Pētījumos un klīniskajā vidē būtu jāveic rūpīga pacienta fenotipēšana, lai nošķirtu pacientus ar sagaidāmiem ģenētiskiem defektiem no tiem, kuru fenotips ir attiecināms uz ārējiem faktoriem, tādējādi palielinot iespēju atklāt noteiktus ģenētiskos marķierus.
5. Labi raksturotu gēnu paneļu ieviešana klīniskajā praksē atvieglos traucētas sievietes reprodukcijas ģenētisko cēloņu identificēšanu, izvairoties no nevajadzīgas izmeklēšanas un manipulācijām, samazinot laiku līdz piemērotākam reproduktīvajam risinājumam.

5.5. Nobeiguma piezīmes

Sievietes reproduktīvās mazspējas jumta saucējs aptver ļoti dažādus un atšķirīgus fenotipus, kurus visus var ietekmēt indivīda ģenētiskais fons. Ģenētiskā testēšana kļūst aizvien pieprasītāka gandrīz katrā neveiksmīgas sievietes reprodukcijas posmā, sākot no traucētas olnīcu funkcijas un neveiksmīgiem mēģinājumiem ieņemt bērnu un beidzot ar zaudētu grūtniecību. Dažas genomiskās tehnoloģijas ir piemērotas, lai apmierinātu augošās jomas prasības, – katra šīs disertācijas nodaļa demonstrē, kā konkrētu metodi var droši izmantot reproduktīvā jautājumā. Līdz ar to izvirzītā darba hipotēze – mūsdienīgas ģenētiskās tehnoloģijas var tikt veiksmīgi izmantotas dažādu ģenētisko variāciju ietekmējošu sievietes reproduktīvo potenciālu drošai novērtēšanai – ir apstiprināta.

Es paredzu, ka gēnu skaits, kas atklāts līdz šim, pēc gaidītā sistemātiskā gēnu-slimības klīniskās validitātes novērtējuma būs pamats mērķa gēnu paneļu ieviešanai tuvākajā nākotnē. Kopā ar atjauninātām labās prakses vadlīnijām un piemērotu ģenētisko konsultēšanu tam vajadzētu palielināt pozitīvu diagnožu skaitu un individualizētu reproduktīvo tehnoloģiju izmantošanu, uzlabojot reproduktīvās medicīnas vispārējo kvalitātes līmeni. Paredzēts, ka sievietes reprodukcijas fenotipi, kas kavē izraisošā gēnu varianta dabisku nodošanu nākamajai paaudzei, ir ļoti heterogēni (Laissue, 2015). Pelēm vairāk nekā 500 gēnu ir saistīti ar sievietes neauglību, tuvākajos gados daudz vairāk gēnu tiks atklāti cilvēkam (Harper et al., 2018). Lai to panāktu, nepieciešama dažādu pārdomātu genomisko pieeju un izsmalcinātu pētījuma dizainu izmantošana lielās pacientu grupās ar genomisko variāciju funkcionālu validāciju.

Svarīgi ir tas, ka, pētot populācijas ar inbrīdingu un bez tā, jāpiemēro dažādas pieejas. Inbrīdās populācijās lielākā daļa izraisīto gēnu variantu ir bialēliski gēnu traucējumi, turpretī populācijās bez raksturīgās tuvradnieciskās

krustošanās var sagaidīt dažādu ģenētisko mehānismu kombināciju. Es ticu, ka lielā skaitā gadījumu *de novo* varianti var būt atbildīgi par sievietes reproduktīvo fenotipu attīstību autbrīdīga populācijās, lai gan šī aizraujošā hipotēze ir pienācīgi jāpēta. Turklāt uz šo hipotēzi netieši norāda daži novērojumi, kuri tika iegūti līdz ar ExAC konsorcijs datubāzes analīzi. Respektīvi, cilvēka genomā ir identificēti 3230 gēni, kas ir jutīgi pret funkcijas zudumu, un 72% no tiem nav saistīta cilvēka slimības fenotipa. Šie gēni ne obligāti ir slimības gēni, bet, iespējams, norāda uz gēniem, kuros heterozigotisks funkcijas zudums ir reproduktīvi neizdevīgs cilvēces vēstures gaitā (Lek et al., 2016).

Līdz šim kopējais identificēto gēnu skaits ar asociētu slimības fenotipu sasniedz vairāk nekā 4000 (OMIM, 2020). Kopumā cilvēka genomā ir vairāk nekā 20 000 gēnu, tas nozīmē, ka variantiem vairāk nekā 16 000 gēnos bez zināmas klīniskas nozīmes joprojām ir potenciāls būt iesaistītiem sievietes reprodukcijā kā atsevišķam cēlonim vai kompleksā ar citiem gēnu variantiem.

Liels skaits fenotipiskās daudzveidības, kas tagad slēpta mūsu acīm, un tās ģenētiskā izcelsme vēl tikai tiks atklāta. Piemēram, 30% grūtniecību tiek zaudētas laikā starp embrija implantāciju un grūtniecības sesto nedēļu (Jeve & Davies, 2014; Nybo Andersen et al., 2000), šobrīd šis laika posms ir pilnīgi nepieejams analīzei, tāpat kā embrija-endometrija mijiedarbība. Tāpat nav pētījumu, kas koncentrētos uz mozaïcisma iedarbību uz sievietes reproduktīvajiem fenotipiem. Vai tas varētu izskaidrot daļu no priekšlaicīgas olnīcu izsīkšanas fenotipa?

Es ticu, ka turpmākajos gados jaunu gēnu skaits, kas izskaidros sieviešu reproduktīvo mazspēju, strauji palielināsies. Molekulārā un ģenētiskā pacienta fenotipa izpratne sniegs vēl nebijušu iespēju noteikt jaunus mērķus terapijai vai sievietes reproduktīvās funkcijas preventīvai saglabāšanai, izvirzot personalizētu terapiju reproduktīvās medicīnas priekšplānā.

Secinājumi

1. MDA pilna genoma amplifikācijas metode piemērojama viena vai dažu lokusu analīzei, savukārt SurePlex tehnoloģija atbilst genomisko tehnoloģiju prasībām; vienlaikus izmantojot abus amplifikatorus, var veikt daudzpusīgu un drošu pirmsimplantācijas ģenētisko testēšanu, lai atlasītu embrijus bez viena gēna un hromosomālām patoloģijām, veicinot vesela bērna ieņemšanu.
2. Četrpadsmit mikrosatelītu lokusu analīzes protokols mātes šūnu kontaminācijas noteikšanai kombinācijā ar salīdzinošo genoma hibridizāciju uz mikročipiem novērš nepareizu diagnožu rašanos agrīni pārtraukušās grūtniecības materiāla ģenētiskajā testēšanā un ietekmē klīnicistu un pacientu informētu lēmumu pieņemšanu turpmākas taktikas izvēlē.
3. Sistemātiskā literatūras un gēnu analīzē tika identificēti 12 primāri ar dzemdes kakla nepietiekamību saistīti gēni, no kuriem lielākā daļa izraisa kolagenopātijas, tādējādi efektīvi veicinot pacientu nākamās paaudzes sekvencēšanas datu analīzi.
4. Molekulāro gēnu ceļu bagātināšanas analīze un stingra nākamās paaudzes sekvencēšanā identificēto gēnu un gēnu variantu atlases stratēģija atklāja paaugstinātu gēnu variācijas slogu molekulārajos ceļos, kas saistīti ar audu mehānisko un biomehānisko izturību, un lokalizēja 13 variantus gēnos, kuri izraisa kolagenopātijas un potenciāli palielina dzemdes kakla nepietiekamības atīstības varbūtību.

Publikācijas un ziņojumi par promocijas darba tēmu

Zinātniskās publikācijas izdevumos, kas iekļauti starptautiskajās datubāzēs (Web of Science, SCOPUS, ERIH PLUS)

1. Perminovs, D., **Voložonoka, L.**, Korņejeva, L., Jokste-Pīrmāne, E., Blumberga, A., Krasucka, S., Seimuškina, N., Kovaļova, I. and Fodina, V., 2017. First preimplantation genetic testing case for monogenic disease in Latvia. *Gynecological Endocrinology*, 33(sup1), 47–49.
2. **Voložonoka, L.**, Perminovs, D., Korņejeva, L., Alkšere, B., Novikova, N., Pīrmāne, E. J., Blumberga, A., Kempa, I., Miskova, A., Gailīte, L. and Fodina, V., 2018. Performance comparison of two whole genome amplification techniques in frame of multifactor preimplantation genetic testing. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 35(8), 1457–1472.
3. **Voložonoka, L.**, Rots, D., Kempa, I., Kornete, A., Rezeberga, D., Gailīte, L. and Miskova, A., 2020. Genetic landscape of preterm birth due to cervical insufficiency: Comprehensive gene analysis and patient next-generation sequencing data interpretation. *PLoS one*, 15(3), e0230771.
4. **Voložonoka, L.**, Gailīte, L., Perminovs, D., Korņejeva, L., Fodina, V., Kempa, I. and Miskova, A., 2020. Reducing misdiagnosis caused by maternal cell contamination in genetic testing for early pregnancy loss. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 66(6), 410-420.
5. **Ludmila Voložonoka**, Anna Miskova, Liene Korņejeva, Inga Kempa, Veronika Bargatina, Linda Gailīte. A systematic review and standartized clinical validity assessment of genes involved in female reproductive failure. Submitted to *Human Reproduction*.

Zinātniskās publikācijas Latvijas izdevumos

1. **Voložonoka, L.**, Korņejeva, L., Miskova, A., Fodina, V., 2015. Preimplantation Genetic Screening – Summary of First Results in Patients with Complicated Reproductive History. *Riga Stradins University Scientific Proceedings*. (1), 241–45.

Uzstāšanās starptautiskās zinātniskās konferencēs

1. **Voložonoka, L.**, Korņejeva, L., Novikova, N., Fodina, V. Benefits of combined preimplantation genetic screening and endometrial receptivity assessment on IVF outcome for complicated reproductive history patients. *49th European Human Genetics Conference*. Barcelona, Spain. May 21–24, 2016. (Stenda referāts).

2. **Voložonoka, L.**, Fodina, V., Korņejeva, L. Molecular karyotyping of products of conception – evaluation of performance and capacity. *ESHRE 32nd Annual Meeting*. Helsinki, Finland. 3–6 July 2016. (Stenda referāts).
3. **Voložonoka, L.**, Perminovs, D., Korņejeva, L., Kempa, I., Miskova, A., Šterna, O., Fodina, V. Preimplantation genetic testing of monogenic diseases and aneiploīdies using single blastocyst biopsy approach. *European Human Genetics Conference*. Copenhagen, Denmark, May 27–30, 2017. (Stenda referāts).
4. **Voložonoka, L.**, Perminovs, D., Korņejeva, L., Alkšere, B., Kempa, I., Miskova, A., Gailīte, L., Fodina, V. Development and application of individualized customizable preimplantation genetic testing algorithm. *Balkan Journal of Medical Genetics, ICGEB Workshop Next generation diagnostics*, Vol 21, 2018, Supplement 1:71. (Stenda referāts).
5. **Voložonoka, L.**, Kornete, A., Krūmiņa, Z., Rota, A., Gailīte, L., Kempa, I., Rezeberga, D., Miskova, A. Clinical Characterization and Collagenopathic Phenotyping in Preterm Birth due to Cervical Insufficiency. *Knowledge for Use in Practice*. Riga, Latvia, 24–26 March 2021. (Mutisks ziņojums).

Uzstāšanās vietējas nozīmes zinātniskās konferencēs

1. **Voložonoka, L.** Clinical application of embryo preimplantation genetic testing by comparative genomic hybridization on microchips in frame of reproductive medicine. *Latvian Obstetrics and Gynecology Specialist Congress*. Riga, Latvia, October 16–18, 2014. (Mutisks ziņojums).
2. **Voložonoka, L.**, Miskova, A. Assessing molecular karyotyping applicability in recurrent early pregnancy loss etiology determination. *Latvian Obstetrics and Gynecology Specialist Congress*. Riga, Latvia, October 16–18, 2014. (Tēzes).
3. **Voložonoka, L.**, Korņejeva, L., Miskova, A., Fodina, V. Embryo preimplantation genetic screening effectiveness in ART cycles for the patients with burdened reproductive history – first results. *Rīga Stradiņš University scientific conference*. Riga, Latvia, March 26–27, 2015. (Stenda referāts).
4. **Voložonoka, L.** Array Comparative Genomic Hybridization application in reproductive genetics. *The Second Annual International Reproductive, Genetic & Biotechnology Conference*. Riga, Latvia, 14 October 2016. (Mutisks ziņojums).
5. **Voložonoka, L.**, Gailīte, L., Miskova, A., Kempa, I. Next generation sequencing identifies pathogenic variants in genes involved in collagen production in patients with preterm birth due to precocious cervical ripening. *RSU Research Week 2019. Knowledge For Use In Practice*. Riga, Latvia, April 1–3, 2019. (Stenda referāts).

Literatūras saraksts

1. Agler, C. S. and Divaris, K. 2020. Sources of bias in genomics research of oral and dental traits: [special issue of community dental health, to be disseminated at 'Random and systematic bias in population oral health research' IADR symposium, March 2020, Washington DC.]. *Community Dental Health*, 37(1), 102–106. https://doi.org/10.1922/CDH_SpecialIssue_Divaris05.
2. AlAsiri, S., Basit, S., Wood-Trageser, M. A., Yatsenko, S. A., Jeffries, E. P., Surti, U., Ketterer, D. M., Afzal, S., Ramzan, K., Faiyaz-Ul Haque, M., Jiang, H., Trakselis, M. A. and Rajkovic, A. 2015. Exome sequencing reveals MCM8 mutation underlies ovarian failure and chromosomal instability. *Journal of Clinical Investigation*, 125(1), 258–262. <https://doi.org/10.1172/JCI178473>.
3. Alazami, A. M., Awad, S. M., Coskun, S., Al-Hassan, S., Hijazi, H., Abdulwahab, F. M., Poizat, C. and Alkuraya, F. S. 2015. TLE6 mutation causes the earliest known human embryonic lethality. *Genome Biology*, 16(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s13059-015-0792-0>.
4. Anum, E. A., Hill, L. D., Pandya, A. and Strauss, J. F. 2009. Connective Tissue and Related Disorders and Preterm Birth: Clues to Genes Contributing to Prematurity. *Placenta*, 30(3), 207–215. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2008.12.007>.
5. Artyemuk, N. V., Belokrinickaya, T. E., Zaharova, U. A., Ksenofontova, O. L., Kulikov, A. V., Leshenko, O. Y., Martirosyan, S. V., Oboskalova, T. A., Olenev, A. S., Perevozkina, O. V., Radzinskiy, V. E., Salimova, I. V., Sevostyanova, O. Y., Simonovskaya, N. Y. Tetrushvili, N. K., and Shifman, E. M. 2019. Истмико-цервикальная недостаточность: распространенность и клинико-анамнестические особенности. Cervical Insufficiency. Clinical Recommendations Treatment Protocol. *Акушерство и Гинекология: Новости, Мнения, Обучение*, 3(25).
6. Asimit, J. and Zeggini, E. 2010. Rare variant association analysis methods for complex traits. *Annual Review of Genetics*, 44, 293–308. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-102209-163421>.
7. Awonuga, A., Govindbhai, J., Zierke, S. and Schnauffer, K. 1998. Continuing the debate on empty follicle syndrome: Can it be associated with normal bioavailability of β -human chorionic gonadotrophin on the day of oocyte recovery? *Human Reproduction*, 13(5), 1281–1284. <https://doi.org/10.1093/humrep/13.5.1281>.
8. Beau, I., Touraine, P., Meduri, G., Gougeon, A., Desroches, A., Matuchansky, C., Milgrom, E., Kuttann, F. and Misrahi, M. 1998. A novel phenotype related to partial loss of function mutations of the follicle stimulating hormone receptor. *Journal of Clinical Investigation*, 102(7), 1352–1359. <https://doi.org/10.1172/JCI3795>.

9. Bell, K. A., van Deerlin, P. G., Haddad, B. R. and Feinberg, R. F. 1999. Cytogenetic diagnosis of “normal 46,XX” karyotypes in spontaneous abortions frequently may be misleading. *Fertility and Sterility*, 71(2), 334–341. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(98\)00445-2](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(98)00445-2).
10. Ben-Zvi, M., Herman, H. G., Bar, J., Condrea, A. and Ginath, S. 2020. Are women with cervical incompetence at a higher risk of experiencing urinary and pelvic organ prolapse symptoms? *International Urogynecology Journal*, 31(2), 385–389. <https://doi.org/10.1007/s00192-019-03979-w>.
11. Bezold, K. Y., Karjalainen, M. K., Hallman, M., Teramo, K. and Muglia, L. J. 2013. The genomics of preterm birth: From animal models to human studies. *Genome Medicine*, 5(4). <https://doi.org/10.1186/gm438>.
12. Butler, R., Nakhuda, G., Guimond, C., Jing, C., Lee, N., Hitkari, J., Tallon, N., Taylor, B. and Yuzpe, A. 2019. Analysis of PGT-M and PGT-SR outcomes at a Canadian fertility clinic. *Prenatal Diagnosis*, 39(10), 866–870. <https://doi.org/10.1002/pd.5496>.
13. Capalbo, A., Rienzi, L. and Ubaldi, F. M. 2016. New approaches for multifactor preimplantation genetic diagnosis of monogenic diseases and aneuploidies from a single biopsy. *Fertility and Sterility*, 105(2), 297–298. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.10.039>.
14. Cariati, F., D’Argenio, V. and Tomaiuolo, R. 2019. The evolving role of genetic tests in reproductive medicine. In *Journal of Translational Medicine*, 17(1), 1– 33. <https://doi.org/10.1186/s12967-019-2019-8>.
15. Carley, M. E. and Schaffer, J. 2000. Urinary incontinence and pelvic organ prolapse in women with Marfan or Ehlers-Danlos syndrome. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 182(5), 1021–1023. <https://doi.org/10.1067/mob.2000.105410>.
16. Carp, H. J. A. 2007. Recurrent pregnancy loss: Causes, controversies and treatment. *Recurrent Pregnancy Loss: Causes, Controversies and Treatment*. CRC press; 2014(Dec 10). <https://doi.org/10.1080/14647270701712928>.
17. Chen, B., Zhang, Z., Sun, X., Kuang, Y., Mao, X., Wang, X., Yan, Z., Li, B., Xu, Y., Yu, M., Fu, J., Mu, J., Zhou, Z., Li, Q., Jin, L., He, L., Sang, Q. and Wang, L. 2017. Biallelic Mutations in PATL2 Cause Female Infertility Characterized by Oocyte Maturation Arrest. *American Journal of Human Genetics*, 101(4), 609–615. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2017.08.018>.
18. Chen, S. U., Su, Y. N., Fang, M. Y., Chang, L. J., Tsai, Y. Y., Lin, L. T., Lee, C. N. and Yang, Y. S. 2008. PGD of β -thalassaemia and HLA haplotypes using OmniPlex whole genome amplification. *Reproductive BioMedicine Online*, 17(5), 699–705. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)60319-7](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)60319-7).

19. Chen, T., Bian, Y., Liu, X., Zhao, S., Wu, K., Yan, L., Li, M., Yang, Z., Liu, H., Zhao, H. and Chen, Z. J. 2017. A Recurrent Missense Mutation in ZP3 Causes Empty Follicle Syndrome and Female Infertility. *American Journal of Human Genetics*, 101(3), 459–465. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2017.08.001>.
20. Conde-Agudelo, A. and Romero, R. 2016. Vaginal progesterone to prevent preterm birth in pregnant women with a sonographic short cervix: Clinical and public health implications. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 214(2), 235–242. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2015.09.102>.
21. Coulam, C. B., Bustillo, M. and Schulman, J. D. 1986. Empty follicle syndrome. *Fertility and Sterility*, 46(6), 1153–1155. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)49898-5](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)49898-5).
22. Dahdouh, E. M., Balayla, J., Audibert, F., Wilson, R. D., Brock, J. A., Campagnolo, C., Carroll, J., Chong, K., Gagnon, A., Johnson, J. A., MacDonald, W., Okun, N., Pastuck, M. and Vallée-Pouliot, K. 2015. Technical Update: Preimplantation Genetic Diagnosis and Screening. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada*, 37(5), 451–463. [https://doi.org/10.1016/S1701-2163\(15\)30261-9](https://doi.org/10.1016/S1701-2163(15)30261-9).
23. Dai, C., Hu, L., Gong, F., Tan, Y., Cai, S., Zhang, S., Dai, J., Lu, C., Chen, J., Chen, Y., Lu, G., Du, J. and Lin, G. 2019. ZP2 pathogenic variants cause in vitro fertilization failure and female infertility. *Genetics in Medicine*, 21(2), 431–440. <https://doi.org/10.1038/s41436-018-0064-y>.
24. Davis, A. R., Horvath, S. K. and Castaño, P. M. 2017. Trends in gestational age at time of surgical abortion for fetal aneuploidy and structural abnormalities. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 216(3), 278.e1-278.e5. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2016.10.031>.
25. De Roux, N., Young, J., Misrahi, M., Genet, R., Chanson, P., Schaison, G. and Milgrom, E. 1997. A Family with Hypogonadotropic Hypogonadism and Mutations in the Gonadotropin-Releasing Hormone Receptor. *New England Journal of Medicine*, 337(22), 1597–1603. <https://doi.org/10.1056/nejm199711273372205>.
26. Di Renzo, G. C. 2015. Best practice in maternal-fetal medicine. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*, 128(1), 80–82. <https://doi.org/10.1016/j.ijgo.2014.10.011>.
27. Edwards, J. G., Feldman, G., Goldberg, J., Gregg, A. R., Norton, M. E., Rose, N. C., Schneider, A., Stoll, K., Wapner, R. and Watson, M. S. 2015. Expanded carrier screening in reproductive medicine—points to consider. *Obstetrics and Gynecology*, 125(3), 653–662. <https://doi.org/10.1097/AOG.0000000000000666>.

28. Eiben, B., Bartels, I., Bahr-Porsch, S., Borgmann, S., Gatz, G., Gellert, G., Goebel, R., Hammans, W., Hentemann, M., Osmer, R., Rauskolb, R. and Hansmann, I. 1990. Cytogenetic analysis of 750 spontaneous abortions with the direct-preparation method of chorionic villi and its implications for studying genetic causes of pregnancy wastage. *American Journal of Human Genetics*, 47(4), 656–663.
29. Feng, R., Yan, Z., Li, B., Yu, M., Sang, Q., Tian, G., Xu, Y., Chen, B., Qu, R., Sun, Z., Sun, X., Jin, L., He, L., Kuang, Y., Cowan, N. J. and Wang, L. 2016. Mutations in TUBB8 cause a multiplicity of phenotypes in human oocytes and early embryos. *Journal of Medical Genetics*, 53(10), 662–671. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2016-103891>.
30. Ford, C. E., Jones, K. W., Polani, P. E., de Almeida, J. C. and Briggs, J. H. 1959. a Sex-Chromosome Anomaly in a Case of Gonadal Dysgenesis Turner'S Syndrome. *The Lancet*, 273(7075), 711–713. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(59\)91893-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(59)91893-8).
31. França, M. M., Funari, M. F. A., Nishi, M. Y., Narcizo, A. M., Domenice, S., Costa, E. M. F., Lerario, A. M. and Mendonca, B. B. 2018. Identification of the first homozygous 1-bp deletion in GDF9 gene leading to primary ovarian insufficiency by using targeted massively parallel sequencing. *Clinical Genetics*, 93(2), 408–411. <https://doi.org/10.1111/cge.13156>.
32. Freed, D., Aldana, R., Weber, J. A. and Edwards, J. S. 2017. The Sentieon Genomics Tools - A fast and accurate solution to variant calling from next-generation sequence data. *BioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/115717>.
33. Gaasenbeek, M., Powell, B. L., Sovio, U., Haddad, L., Gharani, N., Bennett, A., Groves, C. J., Rush, K., Goh, M. J., Conway, G. S., Ruokonen, A., Martikainen, H., Pouta, A., Taponen, S., Hartikainen, A. L., Halford, S., Järvelin, M. R., Franks, S. and McCarthy, M. I. 2004. Large-Scale Analysis of the Relationship between CYP11A Promoter Variation, Polycystic Ovarian Syndrome, and Serum Testosterone. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 89(5), 2408–2413. <https://doi.org/10.1210/jc.2003-031640>.
34. Gekas, J., Thepot, F., Turleau, C., Siffroi, J. P., Dadoune, J. P., Briault, S., Rio, M., Bourouillou, G., Carré-Pigeon, F., Wasels, R., Benzacken, B., Montagnon, M., Rives, N., Clotteau, L., Malingue, M. C., Darabi, P., Poitot, C., Baverel, F., Lesourd, S., Cartault, F. 2001. Chromosomal factors of infertility in candidate couples for ICSI: An equal risk of constitutional aberrations in women and men. *Human Reproduction*, 16(1), 82–90. <https://doi.org/10.1093/humrep/16.1.82>.
35. Goldenberg, R. L., Gravett, M. G., Iams, J., Papageorghiou, A. T., Waller, S. A., Kramer, M., Culhane, J., Barros, F., Conde-Agudelo, A., Bhutta, Z. A., Knight, H. E. and Villar, J. 2012. The preterm birth syndrome: Issues to consider in creating a classification system. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 206(2), 113–118. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2011.10.865>.

36. Handyside, A. H., Robinson, M. D., Simpson, R. J., Omar, M. B., Shaw, M. A., Grudzinskas, J. G. and Rutherford, A. 2004. Isothermal whole genome amplification from single and small numbers of cells: A new era for preimplantation genetic diagnosis of inherited disease. *Molecular Human Reproduction*, 10(10), 767–772. <https://doi.org/10.1093/molehr/gah101>.
37. Harper, J. C., Aittomäki, K., Borry, P., Cornel, M. C., de Wert, G., Dondorp, W., Geraedts, J., Gianaroli, L., Ketterson, K., Liebaers, I., Lundin, K., Mertes, H., Morris, M., Pennings, G., Sermon, K., Spits, C., Soini, S., van Montfoort, A. P. A., Veiga, A., Macek, M. 2018. Recent developments in genetics and medically assisted reproduction: From research to clinical applications. *European Journal of Human Genetics*, 26(1), 12–33. <https://doi.org/10.1038/s41431-017-0016-z>.
38. Harton, G. L., de Rycke, M., Fiorentino, F., Moutou, C., Sengupta, S., Traeger-Synodinos, J. and Harper, J. C. 2011. ESHRE PGD consortium best practice guidelines for amplification-based PGD. *Human Reproduction*, 26(1), 33–40. <https://doi.org/10.1093/humrep/deq231>.
39. Hassold, T., Quillen, S. D. and Yamane, J. A. 1983. Sex ratio in spontaneous abortions. *Annals of Human Genetics*, 47(1), 39–47. <https://doi.org/10.1111/j.1469-1809.1983.tb00968.x>.
40. Heazell, A. E. P., Newman, L., Lean, S. C. and Jones, R. L. 2018. Pregnancy outcome in mothers over the age of 35. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, 30(6), 337–343. <https://doi.org/10.1097/GCO.0000000000000494>.
41. Hellani, A., Coskun, S., Tbakhi, A. and Al-Hassan, S. 2004. The Preimplantation Genetic Diagnosis International Society PGDIS): Guidelines for good practice in PGD. *Reproductive BioMedicine Online*, 9(4), 430–434. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)61279-5](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)61279-5).
42. Huang, H.-L., Lv, C., Zhao, Y.-C., Li, W., He, X.-M., Li, P., Sha, A.-G., Tian, X., Papasian, C. J., Deng, H.-W., Lu, G.-X. and Xiao, H.-M. 2014. Mutant ZP1 in Familial Infertility. *New England Journal of Medicine*, 370(13), 1220–1226. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1308851>.
43. Huang, L., Tong, X., Luo, L., Zheng, S., Jin, R., Fu, Y., Zhou, G., Li, D. and Liu, Y. 2017. Mutation analysis of the TUBB8 gene in nine infertile women with oocyte maturation arrest. *Reproductive BioMedicine Online*, 35(3), 305–310. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2017.05.017>.
44. Inhorn, M. C. and Patrizio, P. 2014. Infertility around the globe: New thinking on gender, reproductive technologies and global movements in the 21st century. *Human Reproduction Update*, 21(4), 411–426. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmv016>.

45. Jarrett, K. L., Michaelis, R. C., Phelan, M. C., Vincent, V. A. and Best, R. G. 2001. Microsatellite analysis reveals a high incidence of maternal cell contamination in 46,XX products of conception consisting of villi or a combination of villi and membranous material. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 185(1), 198–203. <https://doi.org/10.1067/mob.2001.114692>.
46. Jeve, Y. B. and Davies, W. 2014. Evidence-based management of recurrent miscarriages. *Journal of Human Reproductive Sciences*, 7(3), 159–169. <https://doi.org/10.4103/0974-1208.142475>.
47. Kamburov, A., Stelzl, U., Lehrach, H. and Herwig, R. 2013. The ConsensusPathDB interaction database: 2013 Update. *Nucleic Acids Research*, 41(1), 793–800. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1055>.
48. Kendig, K. I., Baheti, S., Bockol, M. A., Drucker, T. M., Hart, S. N., Heldenbrand, J. R., Hernaez, M., Hudson, M. E., Kalmbach, M. T., Klee, E. W., Mattson, N. R., Ross, C. A., Taschuk, M., Wieben, E. D., Wiepert, M., Wildman, D. E. and Mainzer, L. S. 2019. Sentieon DNaseq variant calling workflow demonstrates strong computational performance and accuracy. *Frontiers in Genetics*, 10(JUL), 736. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00736>.
49. Kniss, D. A. and Summerfield, T. L. 2020. Progesterone Receptor Signaling Selectively Modulates Cytokine-Induced Global Gene Expression in Human Cervical Stromal Cells. *Frontiers in Genetics*, 2020(11). <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00883>.
50. Kovanci, E., Rohozinski, J., Simpson, J. L., Heard, M. J., Bishop, C. E. and Carson, S. A. 2007. Growth differentiating factor-9 mutations may be associated with premature ovarian failure. *Fertility and Sterility*, 87(1), 143–146. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2006.05.079>.
51. Kudesia, R., Li, M., Smith, J., Patel, A. and Williams, Z. 2014. Rescue karyotyping: A case series of array-based comparative genomic hybridization evaluation of archival conceptual tissue. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 12(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-12-19>.
52. Laissue, P. 2015. Aetiological coding sequence variants in non-syndromic premature ovarian failure: From genetic linkage analysis to next generation sequencing. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 411, 243–257. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.05.005>.
53. Laissue, P., Christin-Maitre, S., Touraine, P., Kuttann, F., Ritvos, O., Aittomaki, K., Bourcigaux, N., Jacquesson, L., Bouchard, P., Frydman, R., Dewailly, D., Reyss, A. C., Jeffery, L., Bachelot, A., Massin, N., Fellous, M. and Veitia, R. A. 2006. Mutations and sequence variants in GDF9 and BMP15 in patients with premature ovarian failure. *European Journal of Endocrinology*, 154(5), 739–744. <https://doi.org/10.1530/eje.1.02135>.

55. Lathi, R. B., Gustin, S. L. F., Keller, J., Maisenbacher, M. K., Sigurjonsson, S., Tao, R. and Demko, Z. 2014. Reliability of 46,XX results on miscarriage specimens: A review of 1,222 first-trimester miscarriage specimens. *Fertility and Sterility*, 101(1), 178–182. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.09.031>.
56. Lathi, R. B., Loring, M., Massie, J. A. M., Demko, Z. P., Johnson, D., Sigurjonsson, S., Gemelos, G. and Rabinowitz, M. 2012. Informatics enhanced SNP microarray analysis of 30 miscarriage samples compared to routine cytogenetics. *PLoS ONE*, 7(3), p.e31282. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031282>.
57. Layman, L. C. 2013. The genetic basis of female reproductive disorders: Etiology and clinical testing. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 370(1–2), 138–148. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.02.016>.
58. Layman, L. C., Lee, E.-J., Peak, D. B., Namnoum, A. B., Vu, K. V., van Lingen, B. L., Gray, M. R., McDonough, P. G., Reindollar, R. H. and Jameson, J. L. 1997. Delayed Puberty and Hypogonadism Caused by Mutations in the Follicle-Stimulating Hormone β -Subunit Gene. *New England Journal of Medicine*, 337(9), 607–611. <https://doi.org/10.1056/nejm199708283370905>.
59. Le Quesne-Stabej, P., Williams, H. J., James, C., Tekman, M., Stanescu, H. C., Kleta, R., Ocaka, L., Lescai, F., Storr, H. L., Bitner-Glindzicz, M., Bacchelli, C., Conway, G. S. and Sgene, G. O. 2016. STAG3 truncating variant as the cause of primary ovarian insufficiency. *European Journal of Human Genetics*, 24(1), 135–138. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2015.107>.
60. Lek, M., Karczewski, K. J., Minikel, E. V., Samocha, K. E., Banks, E., Fennell, T., O'Donnell-Luria, A. H., Ware, J. S., Hill, A. J., Cummings, B. B., Tukiainen, T., Birnbaum, D. P., Kosmicki, J. A., Duncan, L. E., Estrada, K., Zhao, F., Zou, J., Pierce-Hoffman, E., Berghout, J., Williams, A. L. 2016. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature*, 536(7616), 285–291. <https://doi.org/10.1038/nature19057>.
61. Levy, S., Sutton, G., Ng, P. C., Feuk, L., Halpern, A. L., Walenz, B. P., Axelrod, N., Huang, J., Kirkness, E. F., Denisov, G., Lin, Y., MacDonald, J. R., Pang, A. W. C., Shago, M., Stockwell, T. B., Tsiamouri, A., Bafna, V., Bansal, V., Kravitz, S. A., Venter, J. C. 2007. The diploid genome sequence of an individual human. *PLoS Biology*, 5(10), 2113–2144. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050254>.
62. Lin, J., Xu, H., Chen, B., Wang, W., Wang, L., Sun, X. and Sang, Q. 2020. Expanding the genetic and phenotypic spectrum of female infertility caused by TLE6 mutations. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 37(2), 437–442. <https://doi.org/10.1007/s10815-019-01653-0>.
63. Liu, X., Zhao, Y., Pawlyk, B., Damaser, M. and Li, T. 2006. Failure of elastic fiber homeostasis leads to pelvic floor disorders. *American Journal of Pathology*, 168(2), 519–528. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2006.050399>.

65. Liu, Z., Zhu, L., Wang, J., Luo, G., Xi, Q., Zhou, X., Li, Z., Yang, X., Duan, J., Jin, L. and Zhang, X. 2020. Novel homozygous mutations in *PATL2* lead to female infertility with oocyte maturation arrest. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 37(4), 841–847. <https://doi.org/10.1007/s10815-020-01698-6>.
66. Lomax, B., Tang, S., Separovic, E., Phillips, D., Hillard, E., Thomson, T. and Kalousek, D. K. 2000. Comparative genomic hybridization in combination with flow cytometry improves results of cytogenetic analysis of spontaneous abortions. *American Journal of Human Genetics*, 66(5), 1516–1521. <https://doi.org/10.1086/302878>.
67. Maddirevula, S., Awartani, K., Coskun, S., AlNaim, L. F., Ibrahim, N., Abdulwahab, F., Hashem, M., Alhassan, S. and Alkuraya, F. S. 2020. A genomics approach to females with infertility and recurrent pregnancy loss. *Human Genetics*, 139(5), 605–613. <https://doi.org/10.1007/s00439-020-02143-5>.
68. McGee, E. A. and Hsueh, A. J. W. 2000. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocrine Reviews*, 21(2), 200–214. <https://doi.org/10.1210/er.21.2.200>.
69. Mingione, M. J., Scibetta, J. J., Sanko, S. R. and Phipps, W. R. 2003. Clinical outcomes following interval laparoscopic transabdominal cervico-isthmic cerclage placement: Case series. *Human Reproduction*, 18(8), 1716–1719. <https://doi.org/10.1093/humrep/deg345>.
70. Mitri, F., Bentov, Y., Behan, L. A., Esfandiari, N. and Casper, R. F. 2014. A novel compound heterozygous mutation of the luteinizing hormone receptor – Implications for fertility. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 31(7), 787–794. <https://doi.org/10.1007/s10815-014-0249-5>.
71. Moher, D., Liberati, A., Tetzlaff, J. and Altman, D. G. 2009. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *Journal of Clinical Epidemiology*, 62(10), 1006–1012. <https://doi.org/10.1016/j.jclinepi.2009.06.005>.
72. Montanelli, L., Delbaere, A., di Carlo, C., Nappi, C., Smits, G., Vassart, G. and Costagliola, S. 2004. A mutation in the follicle-stimulating hormone receptor as a cause of familial spontaneous ovarian hyperstimulation syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 89(3), 1255–1258. <https://doi.org/10.1210/jc.2003-031910>.
73. Mu, J., Wang, W., Chen, B., Wu, L., Li, B., Mao, X., Zhang, Z., Fu, J., Kuang, Y., Sun, X., Li, Q., Jin, L., He, L., Sang, Q. and Wang, L. 2019. Mutations in *NLRP2* and *NLRP5* cause female infertility characterised by early embryonic arrest. *Journal of Medical Genetics*, 56(7), 471–480. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2018-105936>.
74. Murdoch, S., Djuric, U., Mazhar, B., Seoud, M., Khan, R., Kuick, R., Bagga, R., Kircheisen, R., Ao, A., Ratti, B., Hanash, S., Rouleau, G. A. and Slim, R. 2006. Mutations in *NALP7* cause recurrent hydatidiform moles and reproductive wastage in humans. *Nature Genetics*, 38(3), 300–302. <https://doi.org/10.1038/ng1740>.

75. Nguyen, N. M. P., Ge, Z. J., Reddy, R., Fahiminiya, S., Sauthier, P., Bagga, R., Sahin, F. I., Mahadevan, S., Osmond, M., Breguet, M., Rahimi, K., Lapensee, L., Hovanes, K., Srinivasan, R., van den Veyver, I. B., Sahoo, T., Ao, A., Majewski, J., Taketo, T. and Slim, R. 2018. Causative Mutations and Mechanism of Androgenetic Hydatidiform Moles. *American Journal of Human Genetics*, 103(5), 740–751. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2018.10.007>.
76. Nikitina, T. V., Lebedev, I. N., Sukhanova, N. N., Sazhenova, E. A. and Nazarenko, S. A. 2005. A mathematical model for evaluation of maternal cell contamination in cultured cells from spontaneous abortions: Significance for cytogenetic analysis of prenatal selection factors. *Fertility and Sterility*, 83(4), 964–972. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2004.12.009>.
77. Norling, A., Hirschberg, A. L., Rodriguez-Wallberg, K. A., Iwarsson, E., Wedell, A. and Barbaro, M. 2014. Identification of a duplication within the GDF9 gene and novel candidate genes for primary ovarian insufficiency (POI) by a customized high-resolution array comparative genomic hybridization platform. *Human Reproduction*, 29(8), 1818–1827. <https://doi.org/10.1093/humrep/deu149>.
78. Nybo Andersen, A. M., Wohlfahrt, J., Christens, P., Olsen, J. and Melbye, M. 2000. Maternal age and fetal loss: Population based register linkage study. *British Medical Journal*, 320(7251), 1708–1712. <https://doi.org/10.1136/bmj.320.7251.1708>.
79. OMIM. 2020. *OMIM Gene Map Statistics*. Online Mendelian Inheritance in Man. <https://www.omim.org/statistics/geneMap>.
80. Parry, D. A., Logan, C. V., Hayward, B. E., Shires, M., Landolsi, H., Diggle, C., Carr, I., Rittore, C., Touitou, I., Philibert, L., Fisher, R. A., Fallahian, M., Huntriss, J. D., Picton, H. M., Malik, S., Taylor, G. R., Johnson, C. A., Bonthron, D. T. and Sheridan, E. G. 2011. Mutations causing familial biparental hydatidiform mole implicate C6orf221 as a possible regulator of genomic imprinting in the human oocyte. *American Journal of Human Genetics*, 89(3), 451–458. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.08.002>.
81. Philibert, P., Biason-Lauber, A., Rouzier, R., Pienkowski, C., Paris, F., Konrad, D., Schoenle, E. and Sultan, C. 2008. Identification and functional analysis of a new WNT4 gene mutation among 28 adolescent girls with primary amenorrhea and Müllerian duct abnormalities: A French collaborative study. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 93(3), 895–900. <https://doi.org/10.1210/jc.2007-2023>.
82. Piyamongkol, W., Bermúdez, M. G., Harper, J. C. and Wells, D. 2003. Detailed investigation of factors influencing amplification efficiency and allele drop-out in single cell PCR: Implications for preimplantation genetic diagnosis. *Molecular Human Reproduction*, 9(7–8), 411–420. <https://doi.org/10.1093/molehr/gag051>.
83. Polychronakos, C. 2008. Common and rare alleles as causes of complex phenotypes. *Current Atherosclerosis Reports*, 10(3), 194–200. <https://doi.org/10.1007/s11883-008-0031-1>.

84. Rechitsky, S., Pakhalchuk, T., San Ramos, G., Goodman, A., Zlatopolsky, Z. and Kuliev, A. 2015. First systematic experience of preimplantation genetic diagnosis for single-gene disorders, and/or preimplantation human leukocyte antigen typing, combined with 24-chromosome aneuploidy testing. *Fertility and Sterility*, 103(2), 503–512. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.11.007>.
85. Reichman, D. E., White, P. C., New, M. I. and Rosenwaks, Z. 2014. Fertility in patients with congenital adrenal hyperplasia. *Fertility and Sterility*, 101(2), 301– 309. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.11.002>.
86. Renwick, P. J., Trussler, J., Ostad-Saffari, E., Fassihi, H., Black, C., Braude, P., Ogilvie, C. M. and Abbs, S. 2006. Proof of principle and first cases using preimplantation genetic haplotyping - A paradigm shift for embryo diagnosis. *Reproductive BioMedicine Online*, 13(1), 110–119. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)62024-X](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)62024-X).
87. Rezaei, M., Nguyen, N. M. P., Foroughinia, L., Dash, P., Ahmadvour, F., Verma, I. C., Slim, R. and Fardaei, M. 2016. Two novel mutations in the KHDC3L gene in Asian patients with recurrent hydatidiform mole. *Human Genome Variation*, 3(1), 1–5. <https://doi.org/10.1038/hgv.2016.27>.
88. Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., Grody, W. W., Hegde, M., Lyon, E., Spector, E., Voelkerding, K. and Rehm, H. L. 2015. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in Medicine*, 17(5), 405–424. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>.
89. Romero, S. T., Geiersbach, K. B., Paxton, C. N., Rose, N. C., Schisterman, E. F., Branch, D. W. and Silver, R. M. 2015. Differentiation of genetic abnormalities in early pregnancy loss. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, 45(1), 89–94. <https://doi.org/10.1002/uog.14713>.
90. Sambrook, J. and W Russell, D. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 999.
91. Sang, Q., Li, B., Kuang, Y., Wang, X., Zhang, Z., Chen, B., Wu, L., Lyu, Q., Fu, Y., Yan, Z., Mao, X., Xu, Y., Mu, J., Li, Q., Jin, L., He, L. and Wang, L. 2018. Homozygous Mutations in WEE2 Cause Fertilization Failure and Female Infertility. *American Journal of Human Genetics*, 102(4), 649–657. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2018.02.015>.
92. Sang, Q., Zhang, Z., Shi, J., Sun, X., Li, B., Yan, Z., Xue, S., Ai, A., Lyu, Q., Li, W., Zhang, J., Wu, L., Mao, X., Chen, B., Mu, J., Li, Q., Du, J., Sun, Q., Jin, L., Wang, L. 2019. A pannexin 1 channelopathy causes human oocyte death. *Science Translational Medicine*, 11(485). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aav8731>.

93. Sermon, K. 2017. Novel technologies emerging for preimplantation genetic diagnosis and preimplantation genetic testing for aneuploidy. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 17(1), 71–82. <https://doi.org/10.1080/14737159.2017.1262261>.
94. Shen, J., Wu, W., Gao, C., Ochin, H., Qu, D., Xie, J., Gao, L., Zhou, Y., Cui, Y. and Liu, J. 2016. Chromosomal copy number analysis on chorionic villus samples from early spontaneous miscarriages by high throughput genetic technology. *Molecular Cytogenetics*, 9(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s13039-015-0210-z>.
95. Singh, J. 2004. Centers for disease control and prevention. *Indian Journal of Pharmacology*, 36(4), 268–269.
96. Smits, G., Olatunbosun, O., Delbaere, A., Pierson, R., Vassart, G. and Costagliola, S. 2003. Ovarian Hyperstimulation Syndrome Due to a Mutation in the Follicle-Stimulating Hormone Receptor. *New England Journal of Medicine*, 349(8), 760–766. <https://doi.org/10.1056/nejmoa030064>.
97. Steptoe, P. C. and Edwards, R. G. 1978. Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet*, 2(8085), 366. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(78\)92957-4](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(78)92957-4).
98. Strauss, J. F., Romero, R., Gomez-Lopez, N., Haymond-Thornburg, H., Modi, B. P., Teves, M. E., Pearson, L. N., York, T. P. and Schenkein, H. A. 2018. Spontaneous preterm birth: advances toward the discovery of genetic predisposition. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 218(3), 294–314.e2. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2017.12.009>.
99. Sun, L., Fang, X., Chen, Z., Zhang, H., Zhang, Z., Zhou, P., Xue, T., Peng, X., Zhu, Q., Yin, M., Liu, C., Deng, Y., Hu, H. and Li, N. 2019. Compound heterozygous ZP1 mutations cause empty follicle syndrome in infertile sisters. *Human Mutation*, 40(11), 2001–2006. <https://doi.org/10.1002/humu.23864>.
100. Telenius, H., Carter, N. P., Bebb, C. E., Nordenskjöld, M., Ponder, B. A. J. and Tunnacliffe, A. 1992. Degenerate oligonucleotide-primed PCR: General amplification of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics*, 13(3), 718–725. [https://doi.org/10.1016/0888-7543\(92\)90147-K](https://doi.org/10.1016/0888-7543(92)90147-K).
101. Tenenbaum-Rakover, Y., Weinberg-Shukron, A., Renbaum, P., Lobel, O., Eideh, H., Gulsuner, S., Dahary, D., Abu-Rayyan, A., Kanaan, M., Levy-Lahad, E., Bercovich, D. and Zangen, D. 2015. Minichromosome maintenance complex component 8 (MCM8) gene mutations result in primary gonadal failure. *Journal of Medical Genetics*, 52(6), 391–399. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2014-102921>.
102. Theobald, R., SenGupta, S. and Harper, J. 2020. The status of preimplantation genetic testing in the UK and USA. *Human Reproduction Oxford, England*, 35(4), 986–998. <https://doi.org/10.1093/humrep/deaa034>.

103. Toft, C. L. F., Ingerslev, H. J., Kesmodel, U. S., Diemer, T., Degn, B., Ernst, A., Okkels, H., Kjartansdóttir, K. R. and Pedersen, I. S. 2020. A systematic review on concurrent aneuploidy screening and preimplantation genetic testing for hereditary disorders: What is the prevalence of aneuploidy and is there a clinical effect from aneuploidy screening? *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*, 99(6), 696–706. <https://doi.org/10.1111/aogs.13823>.
104. Tomlinson, I. P. M., Alam, N. A., Rowan, A. J., Barclay, E., Jaeger, E. E. M., Kellsell, D., Leigh, I., Gorman, P., Lamlum, H., Rahman, S., Roylance, R. R., Olpin, S., Bevan, S., Barker, K., Hearle, N., Houlston, R. S., Kiuru, M., Lehtonen, R., Karhu, A., Aaltonen, L. A. 2002. Germline mutations in FH predispose to dominantly inherited uterine fibroids, skin leiomyomata and papillary renal cell cancer the multiple leiomyoma consortium. *Nature Genetics*, 30(4), 406–410. <https://doi.org/10.1038/ng849>.
105. Uda, A., Tanabayashi, K., Fujita, O., Hotta, A., Yamamoto, Y. and Yamada, A. 2007. Comparison of whole genome amplification methods for detecting pathogenic bacterial genomic DNA using microarray. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 60(6), 355–361.
106. Unluturk, U., Harmanci, A., Kocaeft, C. and Yildiz, B. O. 2007. The genetic basis of the polycystic ovary syndrome: A literature review including discussion of PPAR- γ . In *PPAR Research, 2007*(Oct). <https://doi.org/10.1155/2007/49109>.
107. Van den Veyver, I. B. and Al-Hussaini, T. K. 2006. Biparental hydatidiform moles: A maternal effect mutation affecting imprinting in the offspring. *Human Reproduction Update*, 12(3), 233–242. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmk005>.
108. Vanneste, E., Voet, T., Le Caignec, C., Ampe, M., Konings, P., Melotte, C., Debrock, S., Amyere, M., Vikkula, M., Schuit, F., Fryns, J. P., Verbeke, G., D’Hooghe, T., Moreau, Y. and Vermeesch, J. R. 2009. Chromosome instability is common in human cleavage-stage embryos. *Nature Medicine*, 15(5), 577–583. <https://doi.org/10.1038/nm.1924>.
109. Vanneste, E., Voet, T., Melotte, C., Debrock, S., Sermon, K., Staessen, C., Liebaers, I., Fryns, J. P., D’Hooghe, T. and Vermeesch, J. R. 2009. What next for preimplantation genetic screening? High mitotic chromosome instability rate provides the biological basis for the low success rate. *Human Reproduction*, 24(11), 2679–2682. <https://doi.org/10.1093/humrep/dep266>.
110. Vasseur, C., Rodien, P., Beau, I., Desroches, A., Gérard, C., de Poncheville, L., Chaplot, S., Savagner, F., Croué, A., Mathieu, E., Lahlou, N., Descamps, P. and Misrahi, M. 2003. A Chorionic Gonadotropin–Sensitive Mutation in the Follicle-Stimulating Hormone Receptor as a Cause of Familial Gestational Spontaneous Ovarian Hyperstimulation Syndrome. *New England Journal of Medicine*, 349(8), 753–759. <https://doi.org/10.1056/nejmoa030065>.
111. Vink, J. and Myers, K. 2018. Cervical alterations in pregnancy. In *Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology*, 52, 88–102. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2018.03.007>.

112. Wang, A. C., Zhang, Y. S., Wang, B. S., Zhao, X. Y., Wu, F. X., Zhai, X. H., Sun, J. X. and Mei, S. Y. 2018. Mutation analysis of the TUBB8 gene in primary infertile women with arrest in oocyte maturation. *Gynecological Endocrinology*, 34(10), 900–904. <https://doi.org/10.1080/09513590.2018.1464138>.
113. Wang, S. W., Ma, L. L., Huang, S., Liang, L. and Zhang, J. R. 2016. Role of cervical cerclage and vaginal progesterone in the treatment of cervical incompetence with/without preterm birth history. *Chinese Medical Journal*, 129(22), 2670–2675. <https://doi.org/10.4103/0366-6999.193451>.
114. Williams, L. S., Demir Eksi, D., Shen, Y., Lossie, A. C., Chorich, L. P., Sullivan, M. E., Phillips, J. A., Erman, M., Kim, H. G., Alper, O. M. and Layman, L. C. 2017. Genetic analysis of Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome in a large cohort of families. *Fertility and Sterility*, 108(1), 145–151.e2. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.05.017>.
115. Witchel, S. F. and Aston, C. E. 2000. The role of heterozygosity for CYP21 in the polycystic ovary syndrome. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*, 13(suppl. 5), 1315–1317.
116. Wood-Trageser, M. A., Gurbuz, F., Yatsenko, S. A., Jeffries, E. P., Kotan, L. D., Surti, U., Ketterer, D. M., Matic, J., Chipkin, J., Jiang, H., Trakselis, M. A., Topaloglu, A. K. and Rajkovic, A. 2014. MCM9 mutations are associated with ovarian failure, short stature, and chromosomal instability. *American Journal of Human Genetics*, 95(6), 754–762. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2014.11.002>.
117. Word, R. A., Li, X. H., Hnat, M. and Carrick, K. 2007. Dynamics of cervical remodeling during pregnancy and parturition: Mechanisms and current concepts. *Seminars in Reproductive Medicine*, 25(1), 69–79. <https://doi.org/10.1055/s-2006-956777>.
118. Wu, L., Chen, H., Li, D., Song, D., Chen, B., Yan, Z., Iyu, Q., Wang, L., Kuang, Y., Li, B. and Sang, Q. 2019. Novel mutations in PATL2: expanding the mutational spectrum and corresponding phenotypic variability associated with female infertility. *Journal of Human Genetics*, 64(5), 379–385. <https://doi.org/10.1038/s10038-019-0568-6>.
119. Xu, Y., Shi, Y., Fu, J., Yu, M., Feng, R., Sang, Q., Liang, B., Chen, B., Qu, R., Li, B., Yan, Z., Mao, X., Kuang, Y., Jin, L., He, L., Sun, X. and Wang, L. 2016. Mutations in PADI6 Cause Female Infertility Characterized by Early Embryonic Arrest. *American Journal of Human Genetics*, 99(3), 744–752. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.06.024>.
120. Yang, P., Luan, X., Peng, Y., Chen, T., Su, S., Zhang, C., Wang, Z., Cheng, L., Zhang, X., Wang, Y., Chen, Z. J. and Zhao, H. 2017. Novel zona pellucida gene variants identified in patients with oocyte anomalies. *Fertility and Sterility*, 107(6), 1364–1369. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.03.029>.

121. Yang, X., Shu, L., Cai, L., Sun, X., Cui, Y. and Liu, J. 2019. Homozygous missense mutation Arg207Cys in the WEE2 gene causes female infertility and fertilization failure. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 36(5), 965–971. <https://doi.org/10.1007/s10815-019-01418-9>.
122. Yariz, K. O., Walsh, T., Uzak, A., Spiliopoulos, M., Duman, D., Onalan, G., King, M. C. and Tekin, M. 2011. Inherited mutation of the luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor (LHCGR) in empty follicle syndrome. *Fertility and Sterility*, 96(2). <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.05.057>.
123. Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S. and Madden, T. L. 2012. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, 13(134), 1–11. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>.
124. Young, N. K., Dae, H. J., Su, J. J., Moon, S. S., Mi, S. K. and Ki, T. K. 2007. Complete chorioamniotic membrane separation with fetal restrictive dermopathy in two consecutive pregnancies. *Prenatal Diagnosis*, 27(4), 352–355. <https://doi.org/10.1002/pd.1673>.
125. Yuan, P., He, Z., Zheng, L., Wang, W., Li, Y., Zhao, H., Zhang, V. W., Zhang, Q. and Yang, D. 2017. Genetic evidence of genuine empty follicle syndrome: A novel effective mutation in the LHCGR gene and review of the literature. *Human Reproduction*, 32(4), 944–953. <https://doi.org/10.1093/humrep/dex015>.
126. Zhang, L., Cui, X., Schmitt, K., Hubert, R., Navidi, W. and Arnheim, N. 1992. Whole genome amplification from a single cell: Implications for genetic analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(13), 5847–5851. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.13.5847>.
127. Zhang, Y. X., He, W. Bin, Xiao, W. J., Meng, L. L., Tan, C., Du, J., Lu, G. X., Lin, G. and Tan, Y. Q. 2020. Novel loss-of-function mutation in MCM8 causes premature ovarian insufficiency. *Molecular Genetics and Genomic Medicine*, 8(4), e1165. <https://doi.org/10.1002/mgg3.1165>.
128. Zhao, S., Chen, T., Yu, M., Bian, Y., Cao, Y., Ning, Y., Su, S., Zhang, J. and Zhao, S. 2019. Novel WEE2 gene variants identified in patients with fertilization failure and female infertility. *Fertility and Sterility*, 111(3), 519–526. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2018.11.018>.
129. Zheng, Y. M., Wang, N., Li, L. and Jin, F. 2011. Whole genome amplification in preimplantation genetic diagnosis. *Journal of Zhejiang University: Science B*, 12(1), 1–11. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1000196>.
130. Zhou, J., Mochizuki, T., Smeets, H., Antignac, C., Laurila, P., de Paepe, A., Tryggvason, K. and Reeders, S. T. 1993. Deletion of the paired $\alpha 5(IV)$ and $\alpha 6(IV)$ collagen genes in inherited smooth muscle tumors. *Science*, 261(5125), 1167–1169. <https://doi.org/10.1126/science.8356449>.

Pateicības

Es vēlos izteikt sirsnīgu pateicību manām zinātniskajām vadītājām **Annai Miskovai**, **Ingai Kempai** un **Lindai Gailītei**. Esmu ļoti pateicīga jums visām, ka uzticējāties man un uzņēmāt mani kā savu studentu jau pirms vairāk nekā pieciem gadiem. Cienījamā **Anna**, liels paldies jums, ka piedāvājāt man šo iespēju kļūt par doktorantu, par Jūsu lieliskajām pētījumu idejām un piemēru, kā būt supersievietei. Cienījamā **Ingā**, liels jums paldies, ka vienmēr palīdzējāt sekot līdzī un nokārtot visas formālās un papīrsaistības ar universitāti un iemācījāt man vienmēr ievērot laika limitus. Paldies, ka, neskatoties uz attālumu, Jūs vienmēr bijāt ļoti tuvu. Cienījamā **Linda**, liels paldies par Jūsu laipno atsaucību, par visām Jūsu atbildēm uz maniem daudzajiem jautājumiem un lielisko uzmundrinājumu, ko Jūs vienmēr sniedzat, un galvenokārt – par iespēju kļūt par daļu no Jūsu laboratorijas.

Es vēlētos teikt lielu paldies savam recenzentam prof. **Edvīnam Miklaševičam**, liels paldies par Jūsu laiku, pavadītu, lasot un labojot manu darbu, un par vērtīgajiem komentāriem un padomiem. Pateicos promocijas darba apspriešanas komisijas organizētājiem un dalībniekiem par promocijas darba izvērtēšanu un sniegtajiem vērtīgajiem ieteikumiem. Esmu pateicīga, ka iegūstu savu doktora grādu tieši Rīgas Stradiņa universitātē, un lepojos, ka šo universitāti sauca par savu *alma mater*, es novēlu tai un visam tās akadēmiskajam personālam labklājību un izaugsmi.

Es vēlētos pateikties savai pirmajai vadītājai **Natālijai Proņinai**, kura iepazīstināja mani ar cilvēka ģenētikas pasauli. Es vienmēr būšu jums pateicīga par manas intereses attīstīšanu ģenētikas jomā, par lielisko atmosfēru un atbalstu, ko Jūs sniedzāt Bērnu universitātes slimnīcas DNS laboratorijā. Mana otrā izcilā skolotāja ģenētikas pasaulē ir brīnišķīgā **Liene Korņejeva**. Liels paldies par to,

ka vienmēr dalījāties ar zināšanām, par Jūsu nedziestošo azartu un daudzu konferenču laikā piedzīvoto jautrību.

Esmu pateicīga, ka man bija iespēja strādāt Dr. **Violetas Fodinas** uzraudzībā klīnikā “IVF Rīga”, liels paldies par mana profesionālā un arī ģeogrāfiskā redzesloka paplašināšanu, kā arī par iespēju būt daļai no pirmsimplantācijas embriju ģenētiskās testēšanas ieviešanas Latvijā.

Lielisks draugs, Bioloģijas fakultātes laboratorijas partneris un kolēģis **Dmitrijs Perminovs**, liels paldies par visiem profesionāli un draudzīgi kopā pavadītajiem laikiem. Īpašs paldies par laikiem, kad mēs plānojām un izstrādājām embriju analīzes eksperimentus, kas rezultējās mūsu pirmajā publikācijā. Pateicos par uzaicinājumu kļūt par E. Gulbja laboratorijas komandas daļu. Es novēlu Tev lielisku profesionālo karjeru un visu to labāko ar Tavu doktora disertāciju.

Tāpat es vēlētos pateikties par lielisku iepazīšanos ar **Gitu Tauriņu**. Vēl 2013. gadā viņa nostiprināja manu pārliecību, ka ģenētiķi vienmēr ir visinteresantākās personības. Liels paldies, ka iesaistīji mani darbā ar studentiem RSU, kur es laimīgi pavadīju gandrīz četrus gadus kā nepilna laika molekulārās ģenētikas praktisko nodarbību pasniedzēja. Es gribētu teikt lielu paldies **Dmitrijam Rotam**, kurš man palīdzēja darbā ar dzemdes kakla nepietiekamību. Liels paldies par Tavu ieguldījumu un lieliskajiem padomiem. Novēlu brīnišķīgu nobeigumu Tavām doktora studijām Nīderlandē un veiksmīgu atgriešanos Latvijā, lai arī turpmāk attīstītu ģenētikas sfēru šeit.

Liels paldies visiem maniem draugiem, kuri atbalstīja un uzmundrināja mani šajā ceļā uz doktora grādu. Īpašs paldies manam vīram **Vladislavam Ivanovam**, paldies par Tavu nebeidzamo atbalstu un ticību man. Un vislielākais paldies manai dārgajai mammai par mīlestību un atbalstu, kas vienmēr man palīdzēja manas dzīves gaitās

Pielikumi

Centrālās medicīnas ētikas komitejas apstiprinājums veikt pētījumu “Neauglības ģenētiskās etioloģijas iemeslu izpēte”

Centrālā medicīnas ētikas komiteja

Brīvības iela 72, Rīga, LV-1011 • Tālrunis: 67876182 • Fakss: 67876071 • E-pasts: vm@vm.gov.lv

Rīgā

14.04.2016. Nr.1/16-04-14

Rīgas Stradiņa Universitātes
Molekulārās Ģenētikas
Zinātniskajai laboratorijai

*Atzinums par pētījuma pieteikumu
“Neauglības ģenētiskās etioloģijas
iemeslu izpēte”*

Centrālā medicīnas ētikas komiteja 2015.gada 22.septembrī izskatīja Rīgas Stradiņa Universitātes Molekulārās Ģenētikas Zinātniskās laboratorijas iesniegto pētījuma pieteikumu “Neauglības ģenētiskās etioloģijas iemeslu izpēte”.

Pamatojoties uz Centrālās medicīnas ētikas komitejas 2015.gada 22.septembra sēdes protokola Nr.6 punktu Nr.3 – pieteikuma projektu konceptuāli atbalstīt, bet, lai saņemtu apstiprinājumu, veikt precizējumus un labojumus projekta pieteikuma dokumentācijā – un iesniegtajiem pieteikuma projekta precizējumiem un labojumiem, tiek izsniegts atzinums, ka Rīgas Stradiņa Universitātes Molekulārās Ģenētikas Zinātniskās laboratorijas pētījuma pieteikums “Neauglības ģenētiskās etioloģijas iemeslu izpēte” nav pretruna ar bioētikas normām.

Centrālās medicīnas ētikas
komitejas priekšsēdētāja



E.Polc

Centrālās medicīnas ētikas komitejas apstiprinājums veikt pētījumu “Istmocervikālās nepietiekamības ģenētiskās etioloģijas iemeslu izpēte”

Centrālā medicīnas ētikas komiteja

Brīvības iela 72, Rīga, LV-1011 • Tālr. 67876182 • Fakss 67876071 • E-pasts: vm@vm.gov.lv

Rīgā

21.03.2018. Nr.2/18-03-21

Rīgas Stradiņa universitātes
Molekulārās Ģenētikas Zinātniskajai laboratorijai

*Atzinums par pētījumu
„Istmocervikālās nepietiekamības
ģenētiskās etioloģijas iemeslu izpēte”*


Centrālā medicīnas ētikas komiteja 2018.gada 18.janvārī ir izskatījusi Rīgas Stradiņa Universitātes Molekulārās Ģenētikas Zinātniskās laboratorijas iesniegto pētījumu „Istmocervikālās nepietiekamības ģenētiskās etioloģijas iemeslu izpēte”.

Pamatojoties uz Centrālās medicīnas ētikas komitejas 2018.gada 18.janvāra sēdes protokola Nr.2018-1 punktu Nr.5 un iesniegtajiem labojumiem, tiek izsniegts atzinums, ka Rīgas Stradiņa Universitātes Molekulārās Ģenētikas Zinātniskās laboratorijas pētījums „Istmocervikālās nepietiekamības ģenētiskās etioloģijas iemeslu izpēte” nav pretrunā ar bioētikas normām.

Centrālās medicīnas ētikas
komitejas priekšsēdētājs

 V.Silis

Visu līdzautoru piekrišana publikācijas “Performance comparison of two whole genome amplification techniques in frame of multifactor preimplantation genetic testing” izmantošanai Ludmilas Voložonokas promoocijas darbā (autoru secībā kā publikācijā)

 RĪGAS STRADIŅA
UNIVERSITĀTE

Veidlapa Nr. PR-11
APSTIPRINĀTA
ar Rīgas Stradiņa universitātes rektora
21.01.2021. rīkojuma Nr. S-13/9/2021

Rīgas Stradiņa universitātes
Doktorantūras nodaļas deķānam

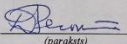
Publikācijas līdzautors (-i) Dmitrijs Perminovs
(vārds, uzvārds)

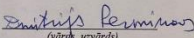
Tālr. +37122177137
E-pasts dmitrij.perminov@inbox.lv

**APLIECINĀJUMS LĪDZAUTORU PIEKRIŠANAI PAR PROMOCIJAS
DARBĀ IZMANTOTO PUBLIKĀCIJU IZMANTOŠANU**
Rīgā

08.03.2021.

Piekrītu publikācijas “Performance comparison of two whole genome amplification techniques in frame of multifactor preimplantation genetic testing” izmantošanai zinātniskā grāda pretendenta Ludmilas Voložonokas promocijas darba “Causes and genomic approaches to female reproductive failure” aizstāvēšanai promocijas padomē zinātņu doktora grāda iegūšanai.

Līdzautors (-i) 
(paraksts)


(vārds, uzvārds)

3. pielikuma turpinājums



RĪGAS STRADIŅA
UNIVERSITĀTE

Veidlapa Nr. PR-11

APSTIPRINĀTA
ar Rīgas Stradiņa universitātes rektora
21.01.2021. rīkojumu Nr. 5-1/39/2021

Rīgas Stradiņa universitātes
Doktorantūras nodaļas dekānam

Publikācijas līdzautors (-i) Liene Korņejeva
(vārds, uzvārds)

Tālrunis: +37126548489

E-pasts: Liene.Kornejeva@ivfriga.lv

APLIECINĀJUMS LĪDZAUTORU PIEKRIŠANAI PAR PROMOCIJAS DARBĀ IZMANTOTO PUBLIKĀCIJU IZMANTOŠANU

Rīgā

07.06.2021

Piekrītu publikācijas "*Performane comparison of two whole genome amplification techniques in frame of multifactor preimplantation genetic testing*" izmantošanai zinātniskā grāda pretendenta Ludmila Voložonoka promocijas darba "Sievietes reproduktīvās mazspējas iemesli un genomiskās pieejas to risināšanai" (angl. "*Causes and genomic approaches to female reproductive failure*") aizstāvēšanai promocijas padomē zinātņu doktora grāda iegūšanai.

Līdzautors (-i)


(paraksts)

(vārds, uzvārds)

3. pielikuma turpinājums



RĪGAS STRADIŅA
UNIVERSITĀTE

Veidlapa Nr. PR-11

APSTIPRINĀTA
ar Rīgas Stradiņa universitātes rektora
21.01.2021. rīkojumu Nr. 5-1/39/2021

Rīgas Stradiņa universitātes
Doktorantūras nodaļas dekanam

Publikācijas līdzautors (-i) Baiba Alkšere
(vārds, uzvārds)

Tālr. +37120139280

E-pasts baiba.alksere@gmail.com

APLIECINĀJUMS LĪDZAUTORU PIEKRIŠANAI PAR PROMOCIJAS DARBĀ IZMANTOTO PUBLIKĀCIJU IZMANTOŠANU

Rīgā

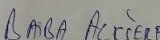
07.06.2021

Piekrītu publikācijas "*Performane comparison of two whole genome amplification techniques in frame of multifactor preimplantation genetic testing*" izmantošanai zinātniskā grāda pretendenta Ludmila Voložonoka promocijas darba "Sievietes reproduktīvās mazspējas iemesli un genomiskās pieejas to risināšanai" (angl. "*Causes and genomic approaches to female reproductive failure*") aizstāvēšanai promocijas padomē zinātnu doktora grāda iegūšanai.

Līdzautors (-i)



(pāraksts)



(vārds, uzvārds)

3. pielikuma turpinājums



RĪGAS STRADIŅA
UNIVERSITĀTE

Veidlapa Nr. PR-11

APSTIPRINĀTA
ar Rīgas Stradiņa universitātes rektora
21.01.2021. rīkojumu Nr. 5-1/39/2021

**Rīgas Stradiņa universitātes
Doktorantūras nodaļas dekānam**

Publikācijas līdzautors Natālija Novikova
(-i)

(vārds, uzvārds)

Tālr. +37127731090

E-pasts natalija.novikova19@gmail.com

**APLIECINĀJUMS LĪDZAUTORU PIEKRIŠANAI PAR PROMOCIJAS
DARBĀ IZMANTOTO PUBLIKĀCIJU IZMANTOŠANU**
Rīgā

10.06.2021

Piekrītu publikācijas "*Performance comparison of two whole genome amplification techniques in frame of multifactor preimplantation genetic testing*" izmantošanai zinātniskā grāda pretendenta Ludmila Voložonoka promocijas darba "Sievietes reproduktīvās mazspējas iemesli un genomiskās pieejas to risināšanai" (angl. "*Causes and genomic approaches to female reproductive failure*") aizstāvēšanai promocijas padomē zinātnu doktora grāda iegūšanai.

Līdzautors (-i)

(paraksts)

N. Ghebedeva

(vārds, uzvārds)

(ex. Novikova)

3. pielikuma turpinājums



RĪGAS STRADIŅA
UNIVERSITĀTE

Veidlapa Nr. PR-11

APSTIPRINĀTA
ar Rīgas Stradiņa universitātes rēķonu
21.01.2021. rīkojumu Nr. 5-1/39/2021

Rīgas Stradiņa universitātes
Doktorantūras nodaļas dekānam

Publikācijas līdzautors (-i) Evija Pimane
(vārds, uzvārds)

Tālr. +37129833445

E-pasts epimane@inbox.lv

APLIECINĀJUMS LĪDZAUTORU PIEKRIŠANAI PAR PROMOCIJAS DARBĀ IZMANTOTO PUBLIKĀCIJU IZMANTOŠANU

Rīgā

10.06.2021

Piekrītu publikācijas "*Performance comparison of two whole genome amplification techniques in frame of multifactor preimplantation genetic testing*" izmantošanai zinātniskā grāda pretendenta Ludmila Voložonoka promocijas darba "*Sievietes reprodaktīvās mazspējas iemesli un genomiskās pieejas to risināšanai*" (angl. "*Causes and genomic approaches to female reproductive failure*") aizstāvēšanai promocijas padomē zinātnu doktora grāda iegūšanai.

Līdzautors (-i)

E. Pimane
(paraksts)

Evija Pimane
(vārds, uzvārds)

3. pielikuma turpinājums



RĪGAS STRADIŅA
UNIVERSITĀTE

Veidlapa Nr. PR-11

APSTIPRINĀTA
ar Rīgas Stradiņa universitātes rektora
21.01.2021. rīkojumu Nr. 5-1/39/2021

**Rīgas Stradiņa universitātes
Doktorantūras nodaļas dekānam**

Publikācijas līdzautors (-i) Arita Blumberga
(vārds, uzvārds)

Tālr. +37126088104

E-pasts aritablumberga@gmail.com


APLIECINĀJUMS LĪDZAUTORU PIEKRIŠANAI PAR PROMOCIJAS DARBĀ IZMANTOTO PUBLIKĀCIJU IZMANTOŠANU

Rīgā

10.06.2021

Piekrītu publikācijas "*Performance comparison of two whole genome amplification techniques in frame of multifactor preimplantation genetic testing*" izmantošanai zinātniskā grāda pretendenta Ludmila Voložonoka promocijas darba "Sievietes reproduktīvās mazspējas iemesli un genomiskās pieejas to risināšanai" (angl. "*Causes and genomic approaches to female reproductive failure*") aizstāvēšanai promocijas padomē zinātni doktora grāda iegūšanai.

Līdzautors (-i)


(paraksts)

ARITA BLUMBERGA
(vārds, uzvārds)

3. pielikuma turpinājums



RĪGAS STRADIŅA
UNIVERSITĀTE

Veidlapa Nr. PR-11

APSTIPRINĀTA
ar Rīgas Stradiņa universitātes rektora
21.01.2021. rīkojumu Nr. 5-1/39/2021

**Rīgas Stradiņa universitātes
Doktorantūras nodaļas dekānam**

Publikācijas līdzautors (-i) Inga Kempa
(vārds, uzvārds)

Tālr. +37126679671

E-pasts Inga.Kempa@rsu.lv

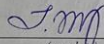
**APLIECINĀJUMS LĪDZAUTORU PIEKRIŠANAI PAR PROMOCIJAS
DARBĀ IZMANTOTO PUBLIKĀCIJU IZMANTOŠANU**

Rīgā

10.06.2021.

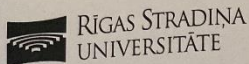
Piekrītu publikācijas "*Performance comparison of two whole genome amplification techniques in frame of multifactor preimplantation genetic testing*" izmantošanai zinātniskā grāda pretendenta Ludmilas Voložonokas promocijas darba "*Sievietes reprodiktīvās mazspējas iemesli un genomiskās pieejas to risināšanai*" (angl. "*Causes and genomic approaches to female reproductive failure*") aizstāvēšanai promocijas padomē zinātnu doktora grāda iegūšanai.

Līdzautors (-i)


(paraksts)

INGA KEMPA
(vārds, uzvārds)

3. pielikuma turpinājums



RĪGAS STRADIŅA
UNIVERSITĀTE

Veidlapa Nr. PR-11

APSTIPRINĀTA
ar Rīgas Stradiņa universitātes rektora
21.01.2021. rīkojumu Nr. 5-1/39/2021

**Rīgas Stradiņa universitātes
Doktorantūras nodaļas dekānam**

Publikācijas līdzautors (-i) Anna Miskova
(vārds, uzvārds)

Tālr. +37120271072

dr.anna.miskova@gmail.co

E-pasts m

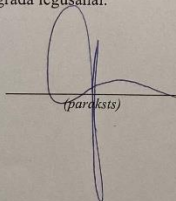
APLIECINĀJUMS LĪDZAUTORU PIEKRIŠANAI PAR PROMOCIJAS DARBĀ IZMANTOTO PUBLIKĀCIJU IZMANTOŠANU

Rīgā

10.06.2021

Piekrītu publikācijas "*Performance comparison of two whole genome amplification techniques in frame of multifactor preimplantation genetic testing*" izmantošanai zinātniskā grāda pretendenta Ludmila Voložonoka promocijas darba "*Sievietes reproduktīvās mazspējas iemesli un genomiskās pieejas to risināšanai*" (angl. "*Causes and genomic approaches to female reproductive failure*") aizstāvēšanai promocijas padomē zinātņu doktora grāda iegūšanai.

Līdzautors (-i)


(paraksts)

Dr. med. **Anna Miskova**
Dzemdību centra vadītāja
ID 68300037517

(vārds, uzvārds)

3. pielikuma turpinājums



Veidlapa Nr. PR-11
APSTIPRINĀTA
ar Rīgas Stradiņa universitātes rektora
21.01.2021. rīkojumu Nr. 5-1/39/2021

**Rīgas Stradiņa universitātes
Doktorantūras nodaļas dekānam**

Publikācijas līdzautors (-i) Linda Gailīte
(vārds, uzvārds)

Tālr. +37129435971

E-pasts Linda.Gailite@rsu.lv

**APLIECINĀJUMS LĪDZAUTORU PIEKRIŠANAI PAR PROMOCIJAS
DARBĀ IZMANTOTO PUBLIKĀCIJU IZMANTOŠANU**

Rīgā

07.06.2021

Piekrītu publikācijas "*Performane comparison of two whole genome amplification techniques in frame of multifactor preimplantation genetic testing*" izmantošanai zinātniskā grāda pretendenta Ludmila Voložonoka promocijas darba "Sievietes reproduktīvās mazspējas iemesli un genomiskās pieejas to risināšanai" (angl. "*Causes and genomic approaches to female reproductive failure*") aizstāvēšanai promocijas padomē zinātnu doktora grāda iegūšanai.

Līdzautors (-i)

(paraksts)

Linda Gailīte

(vārds, uzvārds)

3. pielikuma turpinājums



Veidlapa Nr. PR-11
APSTIPRINĀTA
ar Rīgas Stradiņa universitātes rektora
21.01.2021. rīkojumu Nr. 5-1/39/2021

**Rīgas Stradiņa universitātes
Doktorantūras nodaļas dekānam**

Publikācijas līdzautors (-i) Violeta Fodina
(vārds, uzvārds)

Tālr. +37126441369

E-pasts Violeta.Fodina@ivfriga.eu

**APLIECINĀJUMS LĪDZAUTORU PIEKRIŠANAI PAR PROMOCIJAS
DARBĀ IZMANTOTO PUBLIKĀCIJU IZMANTOŠANU**

Rīgā

10.06.2021

Piekrītu publikācijas "*Performance comparison of two whole genome amplification techniques in frame of multifactor preimplantation genetic testing*" izmantošanai zinātniskā grāda pretendenta Ludmila Voložonoka promocijas darba "Sievietes reproduktīvās mazspējas iemesli un genomiskās pieejas to risināšanai" (angl. "*Causes and genomic approaches to female reproductive failure*") aizstāvēšanai promocijas padomē zinātnu doktora grāda iegūšanai.

Līdzautors (-i)


(paraksts)


(vārds, uzvārds)

Visu līdzautoru piekrišana publikācijas “Reducing misdiagnosis caused by maternal cell contamination in genetic testing for early pregnancy loss” izmantošanai Ludmilas Voložonoka promocijas darbā (autoru secībā kā publikācija)



RĪGAS STRADIŅA
UNIVERSITĀTE

Veidlapa Nr. PR-11
APSTIPRINĀTA
ar Rīgas Stradiņa universitātes rektora
21.01.2021. rīkojumu Nr. S-1/19/2021

**Rīgas Stradiņa universitātes
Doktorantūras nodaļas dekānam**

Publikācijas līdzautors (-i) Linda Gailite
(vārds, uzvārds)

Tālr. +37129435971

E-pasts Linda.Gailite@rsu.lv

**APLIECINĀJUMS LĪDZAUTORU PIEKRIŠANAI PAR PROMOCIJAS
DARBĀ IZMANTOTO PUBLIKĀCIJU IZMANTOŠANU**
Rīgā

07.06.2021

Piekrītu publikācijas “*Reducing misdiagnosis caused by maternal cell contamination in genetic testing for early pregnancy loss.*” izmantošanai zinātniskā grāda pretendenta Ludmila Voložonoka promocijas darba “Sievietes reprodūktīvās mazspējas iemesli un genomiskās pieejas to risināšanai” (angl. “*Causes and genomic approaches to female reproductive failure*”) aizstāvēšanai promocijas padomē zinātnu doktora grāda iegūšanai.

Līdzautors (-i)

(paraksts)

Linda Gailite

(vārds, uzvārds)

4. pielikuma turpinājums



RĪGAS STRADIŅA
UNIVERSITĀTE

Veidlapa Nr. PR-11

APSTIPRINĀTA
ar Rīgas Stradiņa universitātes rektora
21.01.2021. rīkojumu Nr. 5-1/39/2021

**Rīgas Stradiņa universitātes
Doktorantūras nodaļas dekānam**

Publikācijas līdzautors (-i) Dmitrijs Perminovs
(vārds, uzvārds)

Tālr. +37122177137

E-pasts Dmitrij.Perminov@inbox.lv

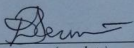
**APLIECINĀJUMS LĪDZAUTORU PIEKRIŠANAI PAR PROMOCIJAS
DARBĀ IZMANTOTO PUBLIKĀCIJU IZMANTOŠANU**

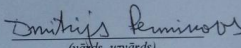
Rīgā

15.06.2021

Piekrītu publikācijas "*Reducing misdiagnosis caused by maternal cell contamination in genetic testing for early pregnancy loss*" izmantošanai zinātniskā grāda pretendenta Ludmila Voložonoka promocijas darba "Sievietes reproduktīvās mazspējas iemesli un genomiskās pieejas to risināšanai" (angl. "*Causes and genomic approaches to female reproductive failure*") aizstāvēšanai promocijas padomē zinātņu doktora grāda iegūšanai.

Līdzautors (-i)


(paraksts)


(vārds, uzvārds)

4. pielikuma turpinājums



RĪGAS STRADIŅA
UNIVERSITĀTE

Veidlapa Nr. PR-11

APSTIPRINĀTA
ar Rīgas Stradiņa universitātes rektora
21.01.2021. rīkojumu Nr. 5-1/39/2021

**Rīgas Stradiņa universitātes
Doktorantūras nodaļas dekānam**

Publikācijas līdzautors (-i) Liene Korņejeva
(vārds, uzvārds)

Tālr. +37126548489

E-pasts Liene.Kornejeva@ivfriga.lv


APLIECINĀJUMS LĪDZAUTORU PIEKRIŠANAI PAR PROMOCIJAS DARBĀ IZMANTOTO PUBLIKĀCIJU IZMANTOŠANU

Rīgā

07.06.2021

Piekrītu publikācijas "*Reducing misdiagnosis caused by maternal cell contamination in genetic testing for early pregnancy loss*" izmantošanai zinātniskā grāda pretendenta Ludmila Voložonoka promocijas darba "Sievietes reprodiktīvās mazspējas iemesli un genomiskās pieejas to risināšanā" (angl. "*Causes and genomic approaches to female reproductive failure*") aizstāvēšanai promocijas padomē zinātņu doktora grāda iegūšanai.

Līdzautors (-i)


(paraksts)

LIENE KORŅEJEVA
(vārds, uzvārds)

4. pielikuma turpinājums



Veidlapa Nr. PR-11

APSTIPRINĀTA
ar Rīgas Stradiņa universitātes rektora
21.01.2021. rīkojumu Nr. 5-1/39/2021

**Rīgas Stradiņa universitātes
Doktorantūras nodaļas dekānam**

Publikācijas līdzautors (-i) Violeta Fodina
(vārds, uzvārds)

Tālr. +37126441369

E-pasts Violeta.Fodina@ivfriga.eu

**APLIECINĀJUMS LĪDZAUTORU PIEKRIŠANAI PAR PROMOCIJAS
DARBĀ IZMANTOTO PUBLIKĀCIJU IZMANTOŠANU**
Rīgā

10.06.2021

Piekrītu publikācijas "*Reducing misdiagnosis caused by maternal cell contamination in genetic testing for early pregnancy loss*" izmantošanai zinātniskā grāda pretendenta Ludmila Voložonoka promocijas darba "Sievietes reproduktīvās mazspējas iemesli un genomiskās pieejas to risināšanai" (angl. "*Causes and genomic approaches to female reproductive failure*") aizstāvēšanai promocijas padomē zinātnu doktora grāda iegūšanai.

Līdzautors (-i)


(paraksts)


(vārds, uzvārds)

4. pielikuma turpinājums



RĪGAS STRADIŅA
UNIVERSITĀTE

Veidlapa Nr. PR-11

APSTIPRINĀTA
ar Rīgas Stradiņa universitātes rektora
21.01.2021. rīkojumu Nr. 5-1/39/2021

**Rīgas Stradiņa universitātes
Doktorantūras nodaļas dekānam**

Publikācijas līdzautors (-i) Inga Kempa
(vārds, uzvārds)

Tālr. +37126679671

E-pasts Inga.Kempa@rsu.lv

**APLIECINĀJUMS LĪDZAUTORU PIEKRIŠANAI PAR PROMOCIJAS
DARBĀ IZMANTOTO PUBLIKĀCIJU IZMANTOŠANU**

Rīgā

10.06.2021.

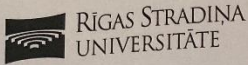
Piekrītu publikācijas "*Reducing misdiagnosis caused by maternal cell contamination in genetic testing for early pregnancy loss*" izmantošanai zinātniskā grāda pretendenta Ludmilas Voložonokas promocijas darba "Sievietes reproduktīvās mazspējas iemesli un genomiskās pieejas to risināšanai" (angl. "*Causes and genomic approaches to female reproductive failure*") aizstāvēšanai promocijas padomē zinātņu doktora grāda iegūšanai.

Līdzautors (-i)

J. m
(paraksts)

INGA KEMPA
(vārds, uzvārds)

4. pielikuma turpinājums



RĪGAS STRADIŅA
UNIVERSITĀTE

Veidlapa Nr. PR-11

APSTIPRINĀTA
ar Rīgas Stradiņa universitātes rektora
21.01.2021. rīkojumu Nr. 5-1/39/2021

Rīgas Stradiņa universitātes Doktorantūras nodaļas dekānam

Publikācijas līdzautors (-i) Anna Miskova
(vārds, uzvārds)

Tālr. +37120271072
dr.anna.miskova@gmail.co

E-pasts m

APLIECINĀJUMS LĪDZAUTORU PIEKRIŠANAI PAR PROMOCIJAS DARBĀ IZMANTOTO PUBLIKĀCIJU IZMANTOŠANU

Rīgā

10.06.2021

Piekrītu publikācijas "*Reducing misdiagnosis caused by maternal cell contamination in genetic testing for early pregnancy loss*" izmantošanai zinātniskā grāda pretendenta Ludmila Voložonoka promocijas darba "Sievietes reprodūktīvās mazspējas iemesli un genomiskās pieejas to risināšanai" (angl. "*Causes and genomic approaches to female reproductive failure*") aizstāvēšanai promocijas padomē zinātņu doktora grāda iegūšanai.

Līdzautors (-i)

(paraksts)

Dr. med. **Anna Miskova**
Dzemdību centra vadītāja
ID **83302037677**
(vārds, uzvārds)

Visu līdzautoru piekrišana publikācijas “Genetic landscape of preterm birth due to cervical insufficiency: Comprehensive gene analysis and patient next-generation sequencing data interpretation” izmantošanai Ludmilas Voložonokas promoocijas darbā (autoru secībā kā publikācijā)



Veidlapa Nr. PR-11
APSTIPRINĀTA
ar Rīgas Stradiņa universitātes rektora
21.01.2021. rīkojuma Nr. 5-1/39/2021

Rīgas Stradiņa universitātes
Doktorantūras nodaļas dekānam

Publikācijas līdzautors (-) Dmitrijs Rots
(vārds, uzvārds)

Tālr. +37122185802

E-pasts Dmitrijs.Rots@gmail.com

**APLIECINĀJUMS LĪDZAUTORU PIEKRIŠANAI PAR PROMOCIJAS
DARBĀ IZMANTOTO PUBLIKĀCIJU IZMANTOŠANU**
Rīgā

07.06.2021

Piekritu publikācijas “*Genetic landscape of preterm birth due to cervical insufficiency: Comprehensive gene analysis and patient next-generation sequencing data interpretation.*” izmantošanai zinātniskā grāda pretendenta Ludmila Voložonoka promocijas darba “Sievietes reproduktīvās mazspējas iemesli un genomiskās pieejas to risināšanai” (angl. “*Causes and genomic approaches to female reproductive failure*”) aizstāvēšanai promocijas padomē zinātnu doktora grāda iegūšanai.

Līdzautors (-i)

Paraksts, kas veido divus savstarpēji saistītus apļus, kas atbilst Dmitrija Rots vārdam un uzvārdam.

(paraksts)

Dmitrijs Rots

(vārds, uzvārds)

5. pielikuma turpinājums



RĪGAS STRADIŅA
UNIVERSITĀTE

Veidlapa Nr. PR-11

APSTIPRINĀTA
ar Rīgas Stradiņa universitātes rektora
21.01.2021. rīkojumu Nr. 5-1/39/2021

**Rīgas Stradiņa universitātes
Doktorantūras nodaļas dekānam**

Publikācijas līdzautors (-i) Inga Kempa
(vārds, uzvārds)

Tālr. +37126679671

E-pasts Inga.Kempa@rsu.lv

APLIECINĀJUMS LĪDZAUTORU PIEKRIŠANAI PAR PROMOCIJAS DARBĀ IZMANTOTO PUBLIKĀCIJU IZMANTOŠANU

Rīgā

10.06.2021.

Piekrītu publikācijas "*Genetic landscape of preterm birth due to cervical insufficiency: Comprehensive gene analysis and patient next-generation sequencing data interpretation*" izmantošanai zinātniskā grāda pretendenta Ludmilas Voložonokas promocijas darba "Sievietes reproduktīvās mazspējas iemesli un genomiskās pieejas to risināšanai" (angl. "*Causes and genomic approaches to female reproductive failure*") aizstāvēšanai promocijas padomē zinātnu doktora grāda iegūšanai.

Līdzautors (-i)

J. Mj
(paraksts)

INGA KEMPA
(vārds, uzvārds)

5. pielikuma turpinājums

**Rīgas Stradiņa universitātes
Doktorantūras nodaļas dekānam**

Publikācijas līdzautors (-i) Anna Kornete
(vārds, uzvārds)

Tālr. +37128312094

E-pasts Anna.Kornete@rsu.lv

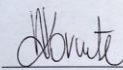
**APLIECINĀJUMS LĪDZAUTORU PIEKRIŠANAI PAR PROMOCIJAS
DARBĀ IZMANTOTO PUBLIKĀCIJU IZMANTOŠANU**

Rīgā

07.06.2021

Piekrītu publikācijas "*Genetic landscape of preterm birth due to cervical insufficiency: Comprehensive gene analysis and patient next-generation sequencing data interpretation.*" izmantošanai zinātniskā grāda pretendenta Ludmila Voložonoka promocijas darba "Sievietes reproduktīvās mazspējas iemesli un genomiskās pieejas to risināšanai" (angl. "*Causes and genomic approaches to female reproductive failure*") aizstāvēšanai promocijas padomē zinātnu doktora grāda iegūšanai.

Līdzautors (-i)


(paraksts)

Anna Kornete

(vārds, uzvārds)

5. pielikuma turpinājums



RĪGAS STRADIŅA
UNIVERSITĀTE

Veidlapa Nr. PR-11

APSTIPRINĀTA
ar Rīgas Stradiņa universitātes rektora
21.01.2021. rīkojumu Nr. 5-1/39/2021

**Rīgas Stradiņa universitātes
Doktorantūras nodaļas dekānam**

Publikācijas līdzautors (-i) Prof. Dace Rezeberga
(vārds, uzvārds)

Tālr. +37129415195

E-pasts Dace.Rezeberga@rsu.lv

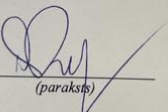
APLIECINĀJUMS LĪDZAUTORU PIEKRIŠANAI PAR PROMOCIJAS DARBĀ IZMANTOTO PUBLIKĀCIJU IZMANTOŠANU

Rīgā

10.06.2021

Piekrītu publikācijas "*Genetic landscape of preterm birth due to cervical insufficiency: Comprehensive gene analysis and patient next-generation sequencing data interpretation*" izmantošanai zinātniskā grāda pretendenta Ludmila Voložonoka promocijas darba "Sievietes reproduktīvās mazspējas iemesli un genomiskās pieejas to risināšanai" (angl. "*Causes and genomic approaches to female reproductive failure*") aizstāvēšanai promocijas padomē zinātnu doktora grāda iegūšanai.

Līdzautors (-i)


(paraksts)

profesore
Dace Rezeberga

(vārds, uzvārds)

5. pielikuma turpinājums



RĪGAS STRADIŅA
UNIVERSITĀTE

Veidlapa Nr. PR-11

APSTIPRINĀTA
ar Rīgas Stradiņa universitātes rektora
21.01.2021. rīkojumu Nr. 5-1/39/2021

Rīgas Stradiņa universitātes Doktorantūras nodaļas dekānam

Publikācijas līdzautors (-i) Linda Gailite
(vārds, uzvārds)

Tālr. +37129435971

E-pasts Linda.Gailite@rsu.lv

APLIECINĀJUMS LĪDZAUTORU PIEKRIŠANAI PAR PROMOCIJAS DARBĀ IZMANTOTO PUBLIKĀCIJU IZMANTOŠANU

Rīgā

07.06.2021

Piekrītu publikācijas "*Genetic landscape of preterm birth due to cervical insufficiency: Comprehensive gene analysis and patient next-generation sequencing data interpretation.*" izmantošanai zinātniskā grāda pretendenta Ludmila Voložonoka promocijas darba "Sievietes reproduktīvās mazspējas iemesli un genomiskās pieejas to risināšanai" (angl. "*Causes and genomic approaches to female reproductive failure*") aizstāvēšanai promocijas padomē zinātņu doktora grāda iegūšanai.

Līdzautors (-i)

A handwritten signature in blue ink, appearing to be "Linda Gailite".

(paraksts)

Linda Gailite

(vārds, uzvārds)

5. pielikuma turpinājums



RĪGAS STRADIŅA
UNIVERSITĀTE

Veidlapa Nr. PR-11

APSTIPRINĀTA
ar Rīgas Stradiņa universitātes rektora
21.01.2021. rīkojumu Nr. 5-1/39/2021

Rīgas Stradiņa universitātes
Doktorantūras nodaļas dekānam

Publikācijas līdzautors (-i) Anna Miskova
(vārds, uzvārds)

Tālr. +37120271072

E-pasts dr.anna.miskova@gmail.co

m

APLIECINĀJUMS LĪDZAUTORU PIEKRIŠANAI PAR PROMOCIJAS DARBĀ IZMANTOTO PUBLIKĀCIJU IZMANTOŠANU

Rīgā

10.06.2021

Piekrītu publikācijas "*Genetic landscape of preterm birth due to cervical insufficiency: Comprehensive gene analysis and patient next-generation sequencing data interpretation*" izmantošanai zinātniskā grāda pretendenta Ludmila Voložonoka promocijas darba "Sievietes reproduktīvās mazspējas iemesli un genomiskās pieejas to risināšanai" (angl. "*Causes and genomic approaches to female reproductive failure*") aizstāvēšanai promocijas padomē zinātņu doktora grāda iegūšanai.

Līdzautors (-i)

(paraksts)

Dr. med. **Anna Miskova**
Dzemdību centra vadītāja
ID 68300037517

(vārds, uzvārds)