

İN VİTRO FERTİLİZASYONDA EMBRYO GELİŞİMİ VE CANLILIĞIN DEĞERLENDİRİLMESİ

Nazlı ÇİL¹

GİRİŞ

İmplantasyon öncesi döneminde oluşan hassas yapılar insan gelişiminin en dinamik dönemlerinden birini oluşturur. Yaşamın ilk beş günü boyunca, tek hücreli döllenmiş oosit yalnızca görünümünde değil, aynı zamanda altta yatan genetik kontrol ve fizyolojisinde de kayda değer değişikliklere uğrar. Pronükleer oosit, MII oositin kendisi gibi, düşük bir metabolik hıza gerek duyar, sınırlı oksijen tüketir ve glikoz kullanmak için çok az kapasiteye sahiptir. Bu düşük oksidatif durum ve dolayısıyla reaktif oksijen türlerinin oluşumundaki azalma, hücre içi yapı ve fonksiyona zararı asgariye indirmek ve kromozomal DNA'nın bütünlüğünü korumak için bir aracı temsil eder (1). Gelişimin ilk iki günü için embriyo, ağırlıklı olarak, oosit olgunlaşması sırasında sentezlenen maternal olarak türetilmiş stabil mRNA'ların ve proteinlerin kontrolü altındadır. Pronükleer oositinin başarılı bir şekilde gelişebilmesi, hasta özellikleri (genetik, diyet, yaşam tarzı, kötü alışkanlıkları) gibi IVF kliniğinin kontrolü dışındaki birçok faktöre bağlıdır. IVF kliniğinde ise hastaya verilen tedavi, laboratuvar kalite kontrolü ve uygun embriyo kültür sistemi dahil olmak üzere çeşitli faktörler vardır. Embriyoların gelişmesini sağlamak için klinik ve laboratuvar sistemlerinin uygun bir şekilde kurulmuş olması, in vitro fertilizasyon (IVF) / intraitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) ile oluşturulan döllenmiş oositlerin gelişimsel yeterliliğini değerlendirmek çok önemlidir. Üremeye

yardımcı tedavi yöntemlerinin amacı, tek bir embriyonun transferinden sonra tek bir sağlıklı bebeğin teslimine odaklanmıştır. Her bir embriyonun kaderiyle ilgili daha net ve doğru kararlar vermek için, burada insan embriyosunun gelişimi ve fizyolojisi hakkında bilgiler verilmiştir. Özellikle, embriyo gelişiminden bahsedip, seçim için embriyo morfolojisi, morfokinetiği ve metabolizmasını kullanmanın göreceli değerleri sunulmaktadır. Bu tür parametrelerin daha net anlaşılmasıyla embriyo canlılığının değerlendirilmesi ve dolayısıyla transfer ve dondurarak saklama için embriyoların seçimiyle ilgili doğru kararlar alabiliriz.

EMBRYO GELİŞİMİ

Fertilizasyon

İnsan gelişimi bir oositin fertilize olması ile başlar (2). Fertilizasyon, oosit ve sperm temasıyla başlayıp sperm oosit içine girmesiyle onu aktive eden, çekirdek ve tüm sitoplazma komponentlerinin katılımıyla gerçekleşen karmaşık moleküler olaylar dizisidir (3). Sperm akrozomundan salınan hyaluronidaz enzimi aktive olarak oosit korona radiatasındaki folliküler hücreleri birbirinden ayırır. Zona pellusidayı ortaya çıkarır Korona radiatanın delinmesinde tubal mukozal enzimler ve sperm kuyruk hareketi önemli rol oynar. Esteraz, akrozin ve nöraminidaz enzimleri akrozomdan salınarak zona pellusidayı eritir, sperm oosit içine girer. Bir sperm zona pellusidayı geçerse, zona pellusidanın özellikleri değişir,

¹ Doktor Öğretim Üyesi, Pamukkale Üniversitesi, ncil@pau.edu.tr

geniş bir araştırma konusu olmuştur. Bir NI-PGT testinin başarısını belirleyen iki temel husus vardır; 1) kültür koşullarındaki embriyoloji parametreleri ve 2) SM numunelerinin işlenmesi için kullanılan moleküler yöntemler. NI-PGT tahlilinde bulunan DNA'nın orijininin ne olduğu kafa karıştırıcı olabilir. Konvansiyonel IVF kültürlerinde mikrobiyal kontaminasyon sıklıkta <% 1 gerçekleştiği bildirilmiştir, ancak ilginç olarak, ICSI'nin döllenmiş embriyo kültürlerinde kontaminasyona hiç rastlanılmamıştır (39) Vera-Rodriguez ve ark. çok yüksek düzeyde maternal DNA kontaminasyonu olduğunu ve SM'deki DNA fraksiyonunun sadece % 8'i embriyonik olduğunu bildirmişlerdir (40). Karşıt görüş olarak da ancak uygun kültür ortamında ve amplifikasyon yöntemleriyle SM ve karşılık gelen trofoektoderm biyopsileri arasında genel ploidi uyum oranlarıyla yüksek oranda seks kromozomları elde edilmiştir (72% - 95%) (39).

Mitokondriyal DNA (mtDNA)

Bir biyopsi materyalinde bulunan mtDNA moleküllerinin sayısı embriyo üreme yeterliliği için bir belirteç olarak önerilmiştir. Önemli derecede yüksek mtDNA konsantrasyonunun anöploidi ve düşük implantasyon yetenekleriyle ilişkili olduğu gösterilmiştir. Ancak bu parametreler embriyo implantasyon potansiyelini tanımlamada düşük hassasiyet göstermiştir. Bununla birlikte, embriyo canlılığının moleküler markörlerinin tanımlanması alan için çok önemlidir ve gelecekteki çalışmalarda ilave bulgular ile doğrulanması halinde ilk bulgular desteklenirse, mtDNA bu amaç için kullanılabilir(35)

Tam Zamanlı Görüntüleme (Time -lapse Imaging)

Time-lapse Imaging embriyoların sürekli ve invazif olmayan değerlendirilmesi için yeni bir teknoloji olarak ortaya çıkmıştır (41). Bu sistemle embriyolar inkübatör dışına çıkarılmadan tüm gelişim aşamaları, gelişim hızı izlenebilmektedir. Sonuçta gelişim potansiyeli en yüksek embriyolar transfer için seçilebilmektedir. Bir diğer avantaj embriyoları inkübatör dışına çıkarmadan, kültür şartlarını bozmadan, sürekli takibini yapabilmektir (42-44). Time-lapse Imaging yardımı ile embriyo implantasyon potansiyelinin morfokinetik belirteçlerini belirlemek veya preimplantasyon ge-

lişimi biyolojisinin beklenmedik yönlerini ortaya çıkarmak amacıyla birçok çalışma yapılmıştır (45). Üremeye yardımcı tedavi laboratuvarlarında kullanılan Time-lapse Imaging teknolojisinin embriyo değerlendirme için yeni yaklaşımlar ve kavramlar önererek, insan morfokinetik haritasının daha ince detaylarla yeniden çizilebilmesi için çalışmalar devam etmektedir.

SONUÇ

Embriyo morfolojisi, genetiği, morfokinetiği ve metabolizması, insan embriyosunun gelişim potansiyeli ile ilişkilidir. Bütün bu embriyo canlılık ve gelişim kriterleri etrafında gelecekte algoritmalar oluşturmak akıllıca olacaktır. Bu teknolojiler, embriyoların sadece yaşayabilirliği açısından sıralanmasını kolaylaştırmakla kalmayacak, aynı zamanda transferlerin taze ya da dondurulmuş embriyodan olsun ya da olmasın hamile kalınmasını önemli ölçüde sağlayacaktır. Yeni moleküler yaklaşımların getirilmesiyle daha doğru ve uygun hale getirilen pre-implantasyon genetik testlerin yaygın olarak tanıtılması, euploid embriyoların tanımlanmasını sağlayacaktır.

Anahtar Kelimeler: Oosit, In Vitro Fertilizasyon, Canlılık, Embriyo

KAYNAKÇA

1. Gardner D, Montag M. (2017) Human Embryo Development and Assessment of Viability. Gardner D, Simón C (Eds) , Handbook of In Vitro Fertilization (4nd ed.pp.181-198). Boca Raton, FL : CRC Press.
2. Çelik Ö.(2011) Yardımcı Üreme Teknikleri Temel Klinik ve Embriyolojik Uygulamalar Adana: Nobel Kitapevi
3. Acosta AA. Process of fertilization in the human and its abnormalities: diagnostic and therapeutic possibilities. Obstet Gynecol Surv. 1994;49:567-76.
4. Moore K.L, Persaud T.V.N. (2009) Klinik Yönleriyle İnsan Embriyolojisi (Prof. Dr. Hakkı Dalçık, Mehmet Yıldırım Çev. Ed.) İstanbul:Nobel Tıp Kitabevleri.
5. Delilbaşı L. (2008) İn Vitro Fertilizasyon (IVF) Laboratuvar Yöntemleri. Ankara: Güneş Tıp Kitabevleri.
6. Sadler TW (2004) Langman's Medical Embryology., First Week of Development: Ovulation to Implantation. Pp:35-37. Baltimore,USA: Lippincott Williams and Wilkins.
7. Delilbaşı L, Balaban B, Ayaş B. (2000). Gametler (Sperm ve oosit) Fertilizasyon ve Embriyoner Gelişim. Sero Yayınları, 1. Baskı.
8. Braude P, Bolton V, Moore S. Human gene expression first occurs between the 4 and 8 cell stages of preimplantation development. Nature, 1988;332;459-461 12.

9. Tesarik J, Greco E. The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology. *Hum Reprod.*1999;14:1318-1323. 29.
10. Gardner D, Balaban B. Assessment of human embryo development using morphological criteria in an era of time-lapse, algorithms and 'OMICS': is looking good still important? *Molecular Human Reproduction.*2016;22,-No.10 pp. 704-718, 2016.doi:10.1093/molehr/gaw057
11. Garello C, Baker H, Rai J et al. Pronuclear orientation, polar body placement, and embryo quality after intracytoplasmic sperm injection and in-vitro fertilization: further evidence for polarity in human oocytes? *Hum Reprod.*1999; 14(10):2588-95.
12. Ebner T, Moser M, Sommergruber M, et al. Presence, but not type or degree of extension, of a cytoplasmic halo has a significant influence on preimplantation development and implantation behaviour. *Human Reproduction.*2003;18:11:2406-2412.
13. Racowsky C, Jackson KV, Cekleniak NA et al. The number of eight-cell embryos is a key determinant for selecting day 3 or day 5 transfer. *Fertil Steril.*2000;73(3):558-64
14. Shapiro BS, Harris DC, Richter KS. Predictive value of 72-hour blastomere cell number on blastocyst development and success of subsequent transfer based on the degree of blastocyst development. *Fertil Steril.*2000;73(3):582-6.
15. Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Human Reproduction.* 2011; 26, 1270-1283. Doi:10.1093/humrep/der037
16. Gardner DK, Schoolcraft WB. Culture and transfer of human blastocysts. *Curr Opin Obstet Gynecol.*1999; 11(3), 307-11.
17. Scott R, Zhang M, Seli E. Metabolism of the oocyte and the preimplantation embryo: implications for assisted reproduction *Curr Opin Obstet Gynecol.*2018;30(3), 163-170. Doi: 10.1097/GCO.0000000000000455.
18. Botros L, Sakkas D, Seli E. Metabolomics and its application for non-invasive embryo assessment in IVF. *Mol Hum Reprod.*2008; 14(12), 679-690. Doi: 10.1093/molehr/gan066
19. Hardy K, Hooper MA, Handyside AH et al. Non-invasive measurement of glucose and pyruvate uptake by individual human oocytes and preimplantation embryos. *Hum Reprod.*1989;4,188-191.Doi: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a136869
20. Gott AL, Hardy K, Winston RML et al. Non-invasive measurement of pyruvate and glucose uptake and lactate production by single human preimplantation embryos. *Human Reprod.* 1990;5,104-108 Doi:10.1093/oxfordjournals.humrep.a137028
21. Conaghan J, Handyside AH, Winston RM. Effects of pyruvate and glucose on the development of human preimplantation embryos in vitro. *J Reprod Fertil.*1993;99(1),87-95. Doi: 10.1530/jrf.0.0990087
22. Conaghan J, Hardy K, Handyside A. Selection criteria for human embryo transfer: a comparison of pyruvate uptake and morphology. *J Assist Reprod Genet.*1993;10(1),21-30. Doi: 10.1007/bf01204436
23. Turner K, Martin KL, Woodward BJ. Comparison of pyruvate uptake by embryos derived from conception and non-conception natural cycles. *Hum Reprod.*1994; 9 (12), 2362-2366 Doi: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a138453.
24. Gardner DK, Lane M, Stevens J. Noninvasive assessment of human embryo nutrient consumption as a measure of developmental potential. *Fertil Steril.*2001;76 (6), 1175-1180 Doi: 10.1016/s0015-0282(01)02888-6.
25. Devreker, F.(2007). Uptake and release of metabolites in human preimplantation embryos. Kay Elder, Jaques Cohen (ed). *Human Preimplantation Embryo Selection* (s.179-188). London, UK: Informa Healthcare Taylor and Francis.
26. Gardner DK, Leese HJ. Assessment of embryo viability prior to transfer by the noninvasive measurement of glucose uptake. *J Exp Zool.* 1987;242:103-105.
27. Houghton FD, Hawkhead JA, Humpherson PG, et al. Noninvasive amino acid turnover predicts human embryo developmental capacity. *Hum Reprod.*2002;17:999-1005.
28. Brison D, Houghton F, Falconer D, et al. Identification of viable embryos in IVF by noninvasive measurement of amino acid turnover. *Hum Reprod* 2004;19:2319-2324.
29. Seli E, Botros L, Sakkas D, et al. Noninvasive metabolomic profiling of embryo culture media using proton nuclear magnetic resonance correlates with reproductive potential of embryos in women undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril.*2008; 90:2183-2189.
30. Picton HM, Elder K, Houghton FD, et al. Association between amino acid turnover and chromosome aneuploidy during human preimplantation embryo development in vitro. *Mol Hum Reprod.* 2010,16(8):557-69.
31. Sturmey RG, Bermejo-Alvarez P, Gutierrez-Adan A, et al. Amino acid metabolism of bovine blastocysts: A biomarker of sex and viability. *Mol Reprod Dev.* 2010;77(3):285-96
32. Houghton FD, Leese HJ. Metabolism and developmental competence of the preimplantation embryo. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2004; 115(Suppl 1):S92-6
33. Tejera A, Herrero J, Vilorio T, et al. Time dependent O₂ consumption patterns determined optimal time ranges for selecting viable human embryos. *Fertil Steril.* 2012;98(4):849-57.
34. Practice Committees of the American Society for Reproductive Medicine and the Society for Assisted Reproductive Technology. The use of preimplantation genetic testing for aneuploidy (PGT-A): a committee opinion. *Fertil Steril.* 2018 Mar;109(3):429-436. doi: 10.1016/j.fertnstert.2018.01.002.
35. Poli M, Girardi L, Fabiani M, et al. Past, Present, and Future Strategies for Enhanced Assessment of Embryo's Genome and Reproductive Competence in Women of Advanced Reproductive Age *Front Endocrinol (Lausanne).* 2019;19:10:154.
36. Homer HA. Preimplantation genetic testing for aneuploidy (PGT-A): The biology, the technology and the clinical outcomes. *Aust N Z J Obstet Gynaecol.* 2019;59(2):317-324.
37. Jiao J, Shi B, Sagnelli M, et al. Minimally invasive preimplantation genetic testing using blastocyst culture medium. *Hum Reprod.* 2019;8;34(7):1369-1379

38. Stigliani, S., Anserini, P., Venturini, P.L., et al. Mitochondrial DNA content in embryo culture medium is significantly associated with human embryo fragmentation. *Human Reproduction* 2013; 28: 2652–2660
39. Babariya D. Non-invasive preimplantation genetic testing for aneuploidy (NI PGT-A) RBMO 2019;38:S1 doi: 10.1016/j.rbmo.2019.03.019
40. Vera-Rodriguez, M., Diez-Juan, A., JimenezAlmazan, J. et al. Origin and composition of cell-free DNA in spent medium from human embryo culture during preimplantation development. *Human Reproduction* 2018; 33: 745–756
41. Magata F, Ideta A, Okubo H, et al. Growth potential of bovine embryos presenting abnormal cleavage observed through time lapse cinematography. *Theriogenology*. 2019;133:119-124.
42. Kieslinger DC, De Gheselle S, Lambalk CB, et al. Embryo selection using time-lapse analysis (Early Embryo Viability Assessment) in conjunction with standard morphology: a prospective two-center pilot study. *Hum Reprod.* 2016 ;31(11):2450-2457.
43. Liu Y, Feenan K, Chapple V et al. Assessing efficacy of day 3 embryo time-lapse algorithms retrospectively: impacts of dataset type and confounding factors. *Hum Fertil (Camb)*. 2019;22(3):182-190. doi: 10.1080/14647273.2018.1425919.
44. Liu Y, Sakkas D, Afnan M et al. Time lapse videography for embryo selection/de-selection: a bright future or fading star? *Hum Fertil (Camb)* 2019;9:1-7. doi:10.1080/14647273.2019.1598586.
45. Coticchio G, Mignini Renzini M, Novara PV et al. Focused time lapse analysis reveals novel aspects of human fertilization and suggests new parameters of embryo viability. *Hum Reprod.* 2018 ;1;33(1):23-31. doi: 10.1093/humrep/dex344.