

Konu 7

Embriyo Kokültürü

Uzm. Biyolog. Necati FINDIKLI
Dr. Süha SÖNMEZ

Yardımcı reme teknikleri (YÜT) uygulamalarında günümüzde elde edilen başarı oranları gerçekleştirilen ardışık taze ve dondurulmuş embriyo transferi sonrasında %30-%50 arasında değişmektedir. Bununla birlikte belirli bir hasta grubunda 2'den fazla ardışık YÜT uygulamaları sonrasında tanımlanmış bir neden olmaksızın gebelik elde edilemediği görülmektedir. Adı geçen hastalarda uygulanmaya çalışılan güncel yaklaşımların ve tekniklerin pek çoğu farklı klinik yaklaşımların yanında mevcut embriyo kalitesinin artırılmasına yöneliktir.

Embriyo kokültür teknikleri insan embriyoları üzerinde 1990'lı yılların sonlarına doğru özellikle blastosist gelişimi amaçlanarak uygulanmaya başlanmış, artan embriyo kalitesi ile birlikte daha yüksek gebelik ve implantasyon oranları elde edilebildiğinin gösterilmesi sonrasında özellikle başarısız sonuç alınan olgularda alternatif bir yöntem olarak uygulanmıştır. Sonraki yıllarda özellikle ardışık kültür ortamlarının geliştirilmesi ile kokültür yerini bu ortamlara bırakmış gibi görünse de günümüzde farklı klinikler gerçekleştirdikleri farklı kokültür teknikleri ile embriyo kalitesinde iyileşme gözlediklerini ve bu iyileşmenin de gebelik oranlarına olumlu yansıdağını bildirmektedirler.

Bu bölümde embriyo kokültür tekniklerinin tarihsel gelişimi belirtilmekte ve mevcut yayınlanmış bilimsel veriler ışığında YÜT uygulamalarındaki rolü tartişılmaktadır.

Embriyo kokltr

Kısaca somatik hücrelerin embriyo gelişimine destek amaçlı kullanımı olarak ta tanımlanan kokültür yaklaşımları konusunda literatürde göze çarpan ilk çalışma fare embriyoları üzerinde tuba organ kültürü kullanılarak Biggers ve arkadaşları tarafından gerçekleştiren çalışmadır (1). Bu yaklaşımları daha sonra sığır embriyolarında trofoblastik vesiküller ve tuba epitelyum hücreleri kullanılarak geliştirilmiştir. Günümüze kadar olan süreçte embriyo kültüründe somatik kokültür yöntemleri bufalo, deve, kedi, sığır, köpek, keçi, at, maymun, fare, domuz, tavşan, sıçan, koyun gibi pek çok farklı hayvan embriyo kültür sisteminde ve insan embriyo kültüründe uygulanmıştır (2).

Fare ve sığır embriyolarının tuba hücreleri ile kültürü sonrası gerçekleştirilen ilk kokültür çalışmalarında in vivo parametrelerine yakın hücre sayısı ile klivaj ve canlılık oranları elde edildiği bildirilmiştir (3) (4). In-vivo ortamda döllenmiş sığır embriyolarının tuba epitelyum hücreleri üzerinde büyütülmeleri sonrası gözlenen gelişim özelliklerinin in-vivo gelişen embriyolara göre kıyaslanabilir olduğu belirtilmiştir (5). Öte yandan kokültür kullanılarak adı geçen çalışmalar gibi belirgin fayda gözlenmeyen hatta zararlı etkilerinin olabileceğini belirten çalışmalar da mevcuttur (6) (7). Embriyo gelişimi yönünden farklı sonuçların elde ediliyor olması kokltrn çalışmalarda belirtilmiş olan olası embriyotrofik etkilerinin ayrıca somatik hücre kaynağı (8), kullanılan bazal kültür ortamı (9), kültür metodu, şartları ve kokltrn zamanlaması (10) (11) (12), serumun ve farklı katkı ürünlerinin varlığı (13) (14) gibi değişik parametrelere bağlı olduğunu göstermektedir.

Neden kokültür?

Dünyada ve ülkemizde halen çok sayıda klinik ağırlıklı olarak klivaj aşaması embriyo transferi stratejilerini takip etmektedir. Erken

Kattal ve arkadaşları gerçekleştirdikleri meta-analizde, çalışmanın gerçekleştirildiği 2006 yılına kadar yayınlanmış prospektif randomize kokültür uygulamalarını değerlendirmişler ve çalışmanın kriterlerine dahil edilme özelliği gösteren çalışmaların klinik sonuçlarını karşılaştırmışlardır. Değerlendirme sonrası kokültür uygulamalarının klinik gebelik ve implantasyon oranları üzerinde anlamlı olarak bir artış sağladığı belirtilmektedir (43). Bununla birlikte çalışmaya dahil edilmiş olan araştırmaların tümü 2000 yılı öncesine ait olduğundan günümüz uygulamalarında tercih edilen konvansiyonel kültür ortamları ile detaylı ve etkili bir kıyaslama yapmak mümkün olamamaktadır.

İnsan embriyolarında kokültür uygulamaları konusunda son yıllarda gerçekleştirilmiş çalışmalar genellikle geçmişte konvansiyonel kültür ortamlarının kullanıldığı fakat gebelik elde edilemeyen hasta grubunda son uygulamalarında kokültür yöntemi tercih edilmiş hasta popülasyonu üzerinedir (44) (39) (45). Çalışmaların sonunda son denemeler içerisinde kokültür kullanılan siklusların embriyo kalitesinde artış gözlemlendiği ve transfer sonrası yüksek gebelik elde edildiği bildirilmektedir. Ayrıca yakın zaman içerisinde gerçekleştirilen çalışmalar endometriyal kokültür yönteminin özellikle gebelik sonrası canlı doğum sonuçlarının da uygulamalara destek verici şekilde güvenli olduğunu işaret etmektedir (46) (39).

Sonuç

Yayınlanmış geçmiş ve güncel çalışmaların ışığında embriyo kokültür yönteminin yeni bir yaklaşım olmadığı, fakat geçmiş yıllarda elde edilen tecrübelerle dayanarak özellikle güncel klinik pratikte belirli bir hasta popülasyonu üzerinde (tekrarlayan YÜT başarısızlığı, tekrarlayan kötü embriyo kalitesi vb.) YÜT uygulamalarında başarıyı artırıcı ve etkili bir yaklaşım olarak kullanılabileceği söylenebilir.

Bununla birlikte kokültür uygulamaları içerisinde dahil edilecek hasta grubunun seçimi ile laboratuvarın bu konudaki altyapısı ve deneyimi yaklaşımın etkinliğin anlaşılması açısından en önemli kriterler olarak karşımıza çıkmak-

tadır. Ayrıca kokültür tekniklerinin özellikle günümüzde rutinde kullanılan konvansiyonel embriyo kültür ortamları ile karşılaştırıldığı çalışmaların yetersizliği nedeni ile kokültür tekniklerinin YÜT uygulamalarındaki başarıyı artırıcı bir faktör olarak etkinliği halen tartışmalı bir konu olmaya devam etmektedir.

KAYNAKLAR

1. Biggers JD, Gwatkin RB, Brinster RL. Development of mouse embryos in organ cultures of fallopian tubes on a chemically defined medium. *Nauchni Tr Vissh Med Inst Sofiia*. 1962, Cilt 194, s. 747-749.
2. Orsi NM, Reischl JB. Mammalian embryo co-culture: Trials and tribulations of a misunderstood method. *Theriogenology*. 2007, Cilt 67, s. 441-458.
3. Eyestone WH, First NL. Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviductal tissue or in conditioned medium. *J Reprod Fertil*. 1989, Cilt 85, s. 715-720.
4. Sakkas D, Batt PA, Cameron AW. Development of preimplantation goat (*Capra hircus*) embryos in vivo and in vitro. *J Reprod Fertil*. 1989, Cilt 87, s. 359-365.
5. Ellington JE, Farrell PB, Foote RH. Comparison of six-day bovine embryo development in uterine tube (oviduct) epithelial cell co-culture versus in vivo development in the cow. *Theriogenology*. 1990, Cilt 34, s. 837-844.
6. Rief S, Sinowatz F, Stojkovic M, Einspanier R ve ark. Effects of a novel co-culture system on development, metabolism and gene expression of bovine embryos produced in vitro. *Reproduction*. 2002, Cilt 124, s. 543-556.
7. Bernardini ML, Flechon JE, Delouis C. Influence of culture system and oxygen tension on the development of ovine zygotes matured and fertilized in vitro. *J Reprod Fertil*. 1996, Cilt 106, s. 161-167.
8. Galli C, Duchi R, Crotti G ve ark. Bovine embryo technologies. *Theriogenology*. 2003, Cilt 59, s. 599-616.
9. Izquierdo D, Villamediana P, Paramio MT. Effect of culture media on embryo development from prepubertal goat IVM-IVF oocytes. *Theriogenology*. 1999, Cilt 52, s. 847-861.
10. Yang BK, Yang X, Foote RH. Early development of IVM/IVF bovine embryos cultured with or without somatic cells in a simple serum-free medium with different concentrations of CO₂ and O₂. *J Reprod Dev*. 1994, Cilt 40, s. 197-205.
11. Desai NN, Goldfarb JM. Co-cultured human emb-

- ryos may be subjected to widely different microenvironments: pattern of growth factor/cytokine release by Vero cells during the co-culture interval. *Hum Reprod.* 1998, Cilt 13, s. 1600-1605.
12. Sherbahn R, Frasor J, Radwanska E ve ark. Comparison of mouse embryo development in open and microdrop co-culture systems. *Hum Reprod.* 1996, Cilt 11, s. 2223-2229.
 13. Fukui Y, McGowan LT, James RW ve ark. Factors affecting the in-vitro development to blastocysts of bovine oocytes matured and fertilized in vitro. *J Reprod Fertil.* 1991, Cilt 92, s. 125-131.
 14. Rizos D, Gutierrez-Adan A, Perez-Garnelo S ve ark. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: Implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. *Biol Reprod.* 2003, Cilt 68, s. 236-243.
 15. Gardner DK, Vella P, Lane M ve ark. Culture and transfer of human blastocysts increases implantation rates and reduces the need for multiple embryo transfers. *Fertil Steril.* 1998, Cilt 69, s. 84-88.
 16. Feng HL, Wen XH, Amet T ve ark. Effect of different co-culture systems in early human embryo development. *Hum Reprod.* 1996, Cilt 11, s. 1525-1528.
 17. Bongso A, Soon-Chye N, Sathananthan AH ve ark. Improved quality of human embryos when cocultured with human ampullary cells. *Hum Reprod.* 1989, Cilt 4, s. 706-713.
 18. Menezo YJR, Guerlin JF, Czyba JC. Improvement of human early embryo development in vitro by coculture on human monolayer of Vero cells. *Biol Reprod.* 1990, Cilt 42, s. 301-306.
 19. Menezo YJR, Hazout A, Dumant M. Coculture of embryos on Vero cells and transfer of blastocysts in human. *Hum Reprod.* 1992, Cilt 7, s. 101-106.
 20. Wiemer KE, Hoffman DI, Maxson WS ve ark. Embryonic morphology and rate of implantation of human embryos following co-culture on bovine oviductal epithelial cells. *Hum Reprod.* 1993, Cilt 8, s. 91-101.
 21. Menezo Y, Veiga A, Benkhalifa M. Improved methods for blastocyst formation and culture. *Hum Reprod.* 1998, Cilt 13, s. 256-265.
 22. Fong CY, Bongso A. Comparison of human blastulation rates and total cell number in sequential culture media with and without co-culture. *Hum Reprod.* 1998, Cilt 14, s. 774-781.
 23. Behr B, Pool TB, Milki AA ve ark. Preliminary clinical experience with human blastocyst development in vitro without co-culture. *Hum Reprod.* 1999, Cilt 14, s. 454-457.
 24. Scholtes M, Zeilmaker G. A prospective randomized study of embryo transfer results after 3 or 5 days of embryo culture in in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 1996, Cilt 65, s. 1245-1248.
 25. Urman B, Balaban B. Is there still a place for co-cultures in the era of sequential media? *Reprod Biomed Online.* 2005, Cilt 10, s. 492-496.
 26. Tsai FC, Gardner DK. Nicotinamide, a component of complex culture media, inhibits mouse embryo development in vitro and reduces subsequent developmental potential after transfer. *Fertil Steril.* 1994, Cilt 61, s. 376-382.
 27. DK., Gardner. Changes in requirements and utilization of nutrients during mammalian preimplantation embryo development and their significance in embryo culture. *Theriogenology.* 1998, Cilt 49, s. 83-102.
 28. Spandorfer SD, Barmat LI, Navarro J ve ark. Importance of the biopsy date in autologous endometrial cocultures for patients with multiple implantation failures. *Fertil Steril.* 2002, Cilt 77, s. 1209-1213.
 29. Spandorfer SD, Neuer A, Liu HC ve ark. Interleukin-1 levels in the supernatant of conditioned media of embryos grown in autologous endometrial coculture: Correlation with outcome after in vitro fertilization. *Am J Reprod Immunol.* 1999, Cilt 43, s. 6-11.
 30. Spandorfer SD, Navarro J, Levy D ve ark. Autologous endometrial coculture in patients with in vitro fertilization (IVF) failure: Correlations of outcome with leukemia inhibiting factor (LIF) production. *Am J Reprod Immunol.* 2001, Cilt 46, s. 375-380.
 31. CE., Rexroad. Co-culture of domestic animal embryos. *Theriogenology.* 1989, Cilt 31, s. 105-114.
 32. Smith S, Schmidt M, Purwantara B ve ark. Oviduct epithelial cell co-culture of early porcine embryos. *Acta Vet scand.* 1992, Cilt 33, s. 349-355.
 33. Wiemer KE, Cohen J, Wiker SR ve ark. Coculture of human zygotes on fetal bovine uterine fibroblasts: embryonic morphology and implantation. *Fertil Steril.* 1989, Cilt 52, s. 503-508.
 34. Xu J, Cheung TM, Chan ST ve ark. Human oviductal cells reduce the incidence of apoptosis in cocultured mouse embryos. *Fertil Steril.* 2000, Cilt 74, s. 1215-1219.
 35. Desai N, Goldfarb J. Co-cultured human embryos may be subjected to widely different microenvironments: Pattern of growth factor/cytokine release by Vero cells during the co-culture interval. *Hum Reprod.* 1998, Cilt 13, s. 1600-1605.
 36. Vanroose G, Van Soom A, de Kruif A. From coculture to defined medium: state of the art and practical considerations. *Reprod Domest Anim.* 2001, Cilt 36, s. 25-28.
 37. Desai NN, Kennard EA, Kniss DA ve ark. Novel human endometrial cell line promotes blastocyst development. *Fertil Steril.* 1994, Cilt 61, s. 760-766.
 38. Rubio C, Simon C, Mercader A ve ark. Clinical experience employing coculture of human embryos with autologous human endometrial epithelial cells. *Hum Reprod.* 2000, Cilt 15, s. 31-38.

39. Desai N, Abdelhafez F, Bedaiwy MA ve ark. Live births in poor prognosis IVF patients using a novel non-contact human endometrial co-culture system. *Reprod Biomed Online*. 2008, Cilt 16, s. 869-874.
40. Jayot S, Parneix I, Verdaguer S ve ark. Coculture of embryos on homologous endometrial cells in patients with repeated failures of implantation. *Fertil Steril*. 1995, Cilt 63, s. 109-114.
41. Spandorfer SD, Barmat L, Navarro J ve ark. Autologous endometrial coculture in patients with a previous history of poor quality embryos. *J Assist Reprod Genet*. 2002, Cilt 19, s. 309-312.
42. Simon C, Mercader A, Garcia-Velasco J ve ark. Coculture of human embryos with autologous human endometrial epithelial cells in patients with implantation failure. *Clin Endocrinol Metab*. 1999, Cilt 84, s. 2638-2646.
43. Kattal N, Cohen J, Barmat LI. Role of coculture in human in vitro fertilization: A meta-analysis. *Fertil Steril*. 2008, Cilt 90, s. 1069-1076.
44. Spandorfer SD, Pascal P, Parks J ve ark. Autologous endometrial coculture in patients with IVF failure: Outcome of the first 1030 cases. *J Reprod Med*. 2004, Cilt 49, s. 463-467.
45. Eyherremedy V, Raffo FGE, Papayannis M ve ark. Beneficial effect of autologous endometrial cell coculture in patients with repeated implantation failure. *Fertil Steril*. (Corrected proof, ahead of publication), 2009.
46. Mercader A, Garcia-Velasco JA, Escudero E ve ark. Clinical experience and perinatal outcome of blastocyst transfer after coculture of human embryos with human endometrial epithelial cells: A 5-year follow-up study. *Fertil Steril*. 2003, Cilt 80, s. 1162-1168.