



DERLEME  
REVIEW

MCBU-SBED, 2017, 4(1): 567-570

# İnsan Blastosöl Sıvısında Yeni Bir İnvaziv Yöntem: Blastosentez Yöntemi İle İnsan Blastokistlerindeki Blastosöl Sıvısından Preimplantasyon Genetik Tanı Analizi

Remziye KENDİRCİ<sup>1</sup>, H.Seda VATANSEVER<sup>1,2</sup>

Gönderim Tarihi / Received: 08.12.2016

Kabul Tarihi / Accepted: 15.12.2016

<sup>1</sup>Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Manisa, Türkiye

<sup>2</sup>Yakın Doğu Üniversitesi, Deneysel Sağlık Bilimleri Araştırma Merkezi, Lefkoşa, Kuzey Kıbrıs

\*Sorumlu Yazar / Corresponding Author: H.Seda VATANSEVER, e-mail: sedavatansever@yahoo.com

## ÖZ

Bu derlemede; vitrifikasyonda blastosöl sıvısının (blastokistlere ait sıvı) (BS) aspire edilmesi ile blastokistin gelişimini, hayatta kalma oranını ve implantasyon başarısını etkileyip etkilemediği tartışılacaktır. Blastosöl sıvısında mevcut olan genetik ürün gerçekten embriyo genomunu yansıtmadığı tartışma konusudur. Preimplantasyon genetik tanı (PGT) analizi için blastosöl sıvıdan elde edilen bilgi gerçekten polar cisimcik (PB), blastomer veya trofoektoderm biyopsisinden elde edilen DNA ile uyumlu sonuçları verip vermediği bilinmemektedir.

Embriyoda kavitasyon gelişimi dördüncü günde gerçekleşir. Bu süreçte iç hücre kitlesi (IHK) ve trofoektoderm (TE) hücreleri farklılaşmaya başlar. TE hücreleri blastosöl boşluğuna sodyum iyonu ile birlikte blastosöl sıvı depolamaya başlar. Bu sıvı ile blastokist hacmi genişler. Blastokistin genişleme derecesi, hücre sayısı, iç hücre kitlesi ve ilkel trofoblast hücreleri ile uyum halinde beşinci ve altıncı günde en ileri seviyeye ulaşır.

Yardımcı üreme tekniklerinde embriyoların dondurulması sıklıkla kullanılmaktadır. Embriyo dondurma çoklu embriyo transferi ihtiyacını ortadan kaldırarak çoğul gebelik oranını azaltır. Bununla beraber transfer edilmeyen veya edilemeyen embriyolarında bir sonraki süreçte kullanılmak üzere dondurulmasında doğurganlık potansiyelinin korunması adına önemlidir.

Yapılan çalışmalarda blastosöl sıvısının hızlıca azaltılması ile oluşturulan dondurmada buz kristali oluşumunun azaldığı ve embriyo canlılığının olumlu etkilendiği görülmüştür. Bunun sebebinin kriyoprotektif ajanların daha az blastosöl sıvısıyla maruziyetinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca blastosöl sıvısının aspirasyonu ile hücre dışı ve hücre içi dinamik denge eşitlenerek kriyoprotektif ajanlardan daha az etkilendiği düşünülmektedir.

Ayrıca infertilite tedavisinde in vitro fertilizasyon (IVF) kullanım oranı %1-5 'dir. Ancak, bunlardan sadece küçük bir oranı sağlıklı bir gebelik için gerekli olan genetik ve metabolik gereksinimlere sahiptirler. Embriyo yeterlilik değerlendirmesi için günümüzde kullanılan morfolojik skorlama tekniği yetersizdir. Klinik embriyoloji başarı oranlarını artırmak için; embriyoların implantasyon öncesi blastosöl sıvısı analizleri; polar cisim, blastomer veya trofoektoderm biyopsilerine alternatif yeni bir yöntem olarak öne çıkmaktadır.

Blastokistlerden blastosöl sıvısı aspire edilmesi için zona pellucidaya tek bir lazer darbesi TE ve IHK zarar vermeden lazerin oluşturduğu ısı etkisiyle bir delik açarak buradan rutin IVF kliniklerinde kullanılan intrastoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) cihazı yardımı ile blastosentez adı verilen yöntem ile aspire edilir.

**Anahtar Kelimeler:** Blastokist, Blastosöl, Blastosentez

## ABSTRACT

In this review; it will be discussed that blastocyst fluid (BF) aspiration during vitrification may affect blastocyst development, survival rate and implantation success. It has been a matter of discussion whether the genetic product that present in the blastosol fluid really reflects the embryo genome. The information obtained from blastocyst fluid for preimplantation genetic diagnosis (PGD) analysis is indeed compatible with the DNA obtained from polar body (PB), blastomer or trophoctoderm biopsy did not yield.

Cavitation development in the embryo occurs on the fourth day. During this process, inner cell mass (ICM) and trophoctoderm (TE) cells start to differentiate. TE cells begin blastocyst fluid storage with sodium ion in the blastocoele cavity. This fluid expands the blastocyst volume. The blastocyst progresses to the most advanced level on the fifth and sixth day in agreement with the expansion grade, cell number, inner cell mass and primitive trophoblast cells.

Freezing of embryos is frequently used in assisted reproductive technology. Embryo freezing reduces the rate of multiple pregnancy by eliminating the need for multiple embryo transfers. However, it is important to preserve untransferred or non transferred embryos with freezing for using in the next step to maintain fertility potential.

Published data showed that the rapid reduction of blastocyst fluid decrease the crystal ice formation during freezing which affects the embryo viability positively. The reason for the positive affect could be exposure of cryoprotective agents to less blastocyst fluid. In addition, aspiration of blastocyst fluid is equalizing the extracellular and intracellular dynamic equilibrium which causes the less cryoprotective agents affection.

Moreover, in vitro fertilization (IVF) rate is 1-5% in infertility treatment. However, only a small proportion of these have genetic and metabolic needs for a healthy pregnancy. The morphological scoring technique used today for embryo competence assessment is inadequate. To increase clinical embryology success rates; pre implantation blastocyst fluid analysis of embryos; polar body, blastomer or trophoctoderm biopsies emerging as a new method.

In order to aspiration of the blastocyst fluid from the blastocysts, a single laser pulse to the zona pellucida with heat generated laser opens a hole without harming it and blastocyst fluid is aspirated by the method called blastosynthesis with the aid of intracytoplasmic sperm injection (ICSI) device, which is routinely used in IVF clinics.

**Keywords:** Blastocyst, Blastocoele, Blastosynthesis

## GİRİŞ

İnsan embriyogenezi kompleks bir süreci içerir. Embriyonik genom aktivasyon farklılaşması ile üç morfolojik bileşen oluşur: iç hücre kitlesi (IHK) veya gelecekteki fetüs, trofoektoderm (TE) ve blastosel sıvı (BS). Embriyogeneze IHK ve TE araştırmaları çok fazla bulunmasına rağmen, BS ile ilgili çalışmalar yeterli düzeyde değildir. Yapılan bir çalışmada blastosöl sıvısı aspire edilmiş ve birden çok metabolik proteinler tespit edilmiş ve embriyo metabolizması ile ilişkili olduğu ileri sürülmüştür (1). Embriyonun farklılaşma ve kendini yenileme süreçleri, birçok proteinler tarafından yönlendirilir ve blastosöl sıvısında hem proteinlerin varlığı hemde metabolitlerin varlığı şaşırtıcı değildir (1). Blastosöl sıvısındaki proteinler embriyo gelişimi sırasında hücrel süreçleri destekleyen ve hücre göçünde rol alan proteinler olduğu düşünülmektedir (2). Kontrollü over stimülasyonu (KOS) IVF siklusunda bozulmuş endometrial reseptivite ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (3). IVF tedavilerinde embriyo gelişim hızı ve implantasyon arasında pozitif bir korelasyon olduğu rapor edilmiştir. Endometrial reseptivite üzerinde KOS'un olumsuz etkileri göz önüne alındığında, dondurulup çözülmüş embriyo transferi IVF sonuçlarını iyileştirmek için alternatif bir seçenektir (4). Dondurulmuş çözülmüş embriyo transferinde elde edilen ilk başarılı gebelik 1983 yılında Trounson ve Mohr tarafından bildirilmiştir (5). O zamandan beri, yardımcı üreme tekniklerindeki standart prosedür teknolojisi ile embriyo dondurulması klinik haline gelmiştir. Günümüzde, embriyo transferlerinin yaklaşık %31'i dondurulmuş çözülmüş embriyolardan meydana gelir (6). Yardımcı üreme tekniklerindeki standart prosedüre göre insan embriyoları üç temel yöntemler kullanarak dondurulmaktadır; yavaş dondurma, ultra hızlı dondurma ve vitrifikasyon (7). Vitrifikasyonun, yavaş dondurma ve ultra hızlı dondurmaya oranla buz kristallerinin oluşumunun daha az olması, azaltılmış kriyoprotektan madde kullanılması, hücrel travma oranının daha az olması, maliyetin az olması gibi birçok avantajı vardır. Ancak yinede birçok faktör ve teknik vitrifikasyon sonuçlarını ve embriyonik parametreleri etkileyebilir. Yapılan bir çalışmada embriyo gelişiminin farklı aşamalarında dondurulan embriyolarda görülen klinik sonuçlar değişkenlik göstermiştir (8). Örneğin zigot, bölünme aşamasındaki embriyo ve blastokist başarılı bir şekilde vitrifiye olmuştur, ancak artmış gebelik oranı blastokistte elde edilmiştir (9). Bununla birlikte, dondurulmuş çözülmüş blastokistlerde genişletilmiş blastosöl içeriği nedeniyle hayatta kalma oranlarında azalma görülmüştür. Blastokistlerdeki blastosöl sıvısı hacminin az olması vitrifikasyonun olumsuz sonuçlarını önlediği görülmüştür. Özellikle yeniden genişleme, hücre çoğalması ve DNA bütünlüğünün korunduğu görülmüştür (10). Vitrifikasyon sırasında yapay olarak blastosöl çöküşünü sağlamak buz kristali oluşumunu önlediği ve embriyonun hayatta kalma oranını artırdığı için, ileride embriyo dondurmada yaygın olarak kullanılabilir bir yöntemdir (11). Bu amaçla yapay blastosöl çöküşü blastosentez, mikroiğne ile delme, lazer ışını ile delme gibi farklı yöntemlerle yapılabilir (12). Yapılan bir çalışmada blastosöl sıvısının tamamen çıkarılmasından sonra dondurulup çözdürülen ve kültüre devam edilen

embriyoların zona pellucidalarını hala koruduğu, zamanla yeniden genişleme ile düzgün morfoloji kazandıkları görülmüştür. Blastosentezden beş saat sonra 31 embriyonun; 28 i (% 90,3) tamamen yeniden genişlemiş, üç embriyo (% 9,7) ise kısmen yeniden genişlemiş olduğu görülmüştür. Blastosentezden 24 saat sonra 30 embriyonunda tamamının yeniden genişlemiş olduğu gösterilmiştir.

Blastosentezden sonra embriyoların dondurulup çözdürülmesi sonucunda; embriyo sağ kalımı ve yeniden genişlemesi kontrol grubuyla karşılaştırılmıştır. Blastosentez yapılmadan sadece dondurulup çözdürülen embriyoların sağ kalımı, blastosentez yapıp dondurulup çözdürülen embriyolara göre daha az bulunmuştur. Ayrıca sadece dondurulup çözdürülen embriyolar ile blastosentez yapıp dondurulup çözdürülen embriyoların yeniden genişlemesi karşılaştırıldığında, blastosentez grubunda yeniden genişlemenin daha fazla olduğu görülmüştür (13).

Blastokist değerlendirme aşamasında morfolojik skorlama tekniği embriyo seçiminde kullanılmaktadır ancak morfolojik olarak iyi kalitede olan bir embriyoda implantasyon başarısızlığı görülebilir (14). Bu tutarsızlık morfolojik değerlendirmenin anöploidi blastokistleri temsil edemediğini göstermektedir (15). Bir çalışmada morfolojik olarak en kaliteli seçilen blastokistte yapılan bir çalışmada %56 anöploidi oranına sahip olduğu rapor edilmiştir (14).

Polar cisimcik den PGT analizi ile embriyonun sadece mitotik hatalardan kaynaklanan anöploidi durumu analiz edilebilmektedir. Bunun aksine, blastomer biyopsisi doğrudan embriyonun genetik değerlendirmesini yapar. TE biyopsisi de gelişimin beşinci ve altıncı günlerinde en güvenilir sonucu verir. Ancak yardımcı üreme tekniklerinde embriyo transferi dördüncü günden sonra yapılması tercih edilmemektedir. Bu nedenle, embriyo değerlendirilmesinde yeni minimal invaziv yöntemler geliştirilmesi gereklidir.

## TARTIŞMA

Vitrifikasyon sırasında blastosöl büyük bir miktarı buz kristali oluşturabilir. Yapılan bir çalışmada blastosölin lazerle indüklenen yapay çekme yöntemi ile eldesi ve daha sonra blastokistlerin vitrifikasyon başarısı, hayatta kalma oranı, implantasyon ve klinik gebelik başarıları müdahale edilmemiş blastokistlerle karşılaştırılması amaçlanmıştır. Sonuçta çalışma grubunun hayatta kalma oranının kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek olduğu bulunmuştur (%97,3 ve %74,9; p> 0.01). Klinik gebelik ve implantasyon oranları karşılaştırıldığında, çalışma grubunun kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek olduğu bulunmuştur (klinik gebelik; %67,2, %41,1, implantasyon; %39,1, %24,5). Bu çalışma sonucu in vitro olarak vitrifikasyon öncesi lazer darbesi ile blastokistlerin içerdiği blastosöl sıvısının eldesi blastokistlerin hayatta kalma, klinik gebelik ve implantasyon oranlarını önemli ölçüde arttırdığı gösterilmiştir (16).

Yapılan diğer bir çalışmada ise blastosöl sıvısı aspire edilen blastokistler ile blastosöl sıvısına müdahale edilmemiş normal blastokistlerin dondurulup çözdürülmesi sonucunda blastokistlerde görülen, yeniden blastosöl sıvısı oluşturma oranı, hayatta kalma oranı karşılaştırılmıştır. Sadece dondurulup çözdürülen embriyolar ile blastosentez yapıp dondurulup çözdürülen embriyoların yeniden genişlemesi karşılaştırıldığında, blastosentez grubunda yeniden genişlemenin kontrol grubuna göre anlamlı oranda farklı olmasının nedeni olarak; sağlıklı embriyolarda blastokistin çözünmesinden sonra normal embriyonik hayattaki yapısını alması için blastosöl sıvısının yeniden toplanmasını gerçekleştirmesi ve blastosöl bileşiminin hızlı bir şekilde canlı embriyoların içinde yeniden oluştuğunu gösterilmesi olarak yorumlanmıştır. Blastosentez yapmadan sadece dondurulup çözdürülen embriyoların sağ kalımı, blastosentez yapıp dondurulup çözdürülen embriyolara göre daha az bulunmasının nedeni olarak ise; vitrifikasyonda kullanılan malzemeler her ne kadar buz kristali oluşumunu engelliyor ise de temel olarak blastosöl ile kriyoprotektif ajanlar arasında bir difüzyon söz konusu olmasıdır. Vitrifikasyonun zamanının tam ayarlanamaması buz kristali oluşumuna sebep olacağı gibi, hücre organellerine, çekirdek ve hücre zarlarına zarar vererek hücrenin apoptoza gitmesine neden olabilir; oysaki blastosentez yapılan grupta, blastosöl içeriği tamamen alındığı için kriyoprotektif ajanlar ile difüzyon yapma zorunluluğu ortadan kalkıp, hücre sağ kalım oranı artmaktadır şeklinde yorumlanmıştır (13).

Reproductive Medicine (ASRM)'nin 2013 yılındaki yıllık toplantısında, blastosöl sıvısından PGT analizi için karşılaştırmalı genomik hibridizasyon mikroarray'ler (aCGH) kullanılabileceği rapor edilmiştir. Bu toplantıda; 32 embriyodan BS-DNA elde edilmiş ve polimorfik lokus uyumu belirlemek için eşleştirilmiş 11 örnekte DNA kullanımı ile ilgili sekiz kromozom açıklanmıştır (17). Blastokistlerden PB veya tek blastomer izole edilmiş ve bunu BS ile karşılaştırmışlardır. BS-DNA tespiti sonucunda PB veya blastomer hücreler arasında %94,9 uyum tespit edilmiştir. Bu sonuç ile PGD için blastosöl sıvısının kullanılabileceği düşünülmüştür. Bu ön çalışmalardan tutarsız ve çelişkili sonuçlar da elde edilmiştir. Ancak devam eden çalışmalarda bunun çalışma tekniği ve blastokistler arasında kontrollü bir seçim yapılamadığından kaynaklandığı düşünülmüştür.

PGD analizi embriyonun karyotipini tanımlamak için kullanılmaktadır ancak analiz için her bir blastomer ayrı ayrı test edilemez, bu da analiz edilmemiş blastomer ve embriyolarda farklı sonuçlar ihtimalini gözönüne alınmasını düşündürür.

Ayrıca 51 embriyo üzerinde yapılan diğer bir çalışmada; trofoektoderm biyopsisi, polar cisimcik biyopsisi veya blastomer biyopsisinden elde edilen kromozom analizi sonuçları, blastosöl sıvısından elde edilen DNA ile karşılaştırılmıştır ve %77 oranında başarılı tüm genom amplifikasyonu görülmüştür. Ayrıca blastosöl sıvısının %95 oranında blastomer biyopsisi ile uyumlu olduğu görülmüştür. Blastosöl sıvısı trofoektoderm biyopsisi ile karşılaştırıldığında ise %97 uyumlu oldukları

gösterilmiştir (18). Aynı grup tarafından yapılan bir başka çalışma ise 116 blastokist üzerinde yapılan polar cisimcik ve blastomer biyopsisinin önceki sonuçlarını (19) trofoektoderm ve blastosöl sıvı analizini de eklemiştir. Sonuçta %97 oranında trofoektoderm biyopsisi ile uyumlu sonuçlar elde edilmiştir. Tüm bu sonuçlardan yola çıkılarak PGT analizi için blastosöl sıvısının analizi yeni ve alternatif bir yol olarak görünmektedir.

BS-DNA eldesi PGT analizi için daha az invaziv bir yöntemdir. Yapılan bir çalışmada 60 embriyodan IHK-TE ve BS-DNA'dan elde edilen aCGH karyotip sonuçları karşılaştırılmıştır. Bunların sadece %31 inde karyotip kromozom analizi uyumsuz olmuştur. Moleküler analizler göstermiştir ki, embriyo farklılaşması sırasında, BS ve IHK-TE çeşitli hücre tiplerinin anöploid durumuna ilişkin bilgi sağlamaktadır. İki farklı kaynaktan elde edilen verilerin %97,4 oranında uyumlu olduğu görülmüştür (20).

## KAYNAKLAR

1. D'Alessandro, A., G. Federica, S. Palini, et al. A mass spectrometry-based targeted metabolomics strategy of human blastocoele fluid: a promising tool in fertility research. *Molecular BioSystems*. 2012;8(4):953-958.
2. Jensen, P. L., H. C. Beck, J. Petersen, et al. Proteomic analysis of human blastocoele fluid and blastocyst cells. *Stem cells and development*. 2012;22(7):1126-1135.
3. Shapiro, B. S., S. T. Daneshmand, F. C. Garner, et al. Evidence of impaired endometrial receptivity after ovarian stimulation for in vitro fertilization: a prospective randomized trial comparing fresh and frozen-thawed embryo transfer in normal responders. *Fertility and sterility*. 2011;96(2):344-348.
4. Roque, M., M. Valle, F. Guimarães, et al., Freeze-all policy: fresh vs. frozen-thawed embryo transfer. *Fertility and sterility*. 2015;103(5):1190-1193.
5. Trounson, A. and L. Mohr, Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. *Nature*. 1983;305(5936):707-709.
6. Sullivan, E. A., F. Zegers-Hochschild, R. Mansour, et al. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technologies (IHKART) world report: assisted reproductive technology. *Human Reproduction*. 2004;28(5):1375-1390
7. AbdelHafez, F. F., N. Desai, A. M. Abou-Setta, et al. Slow freezing, vitrification and ultra-rapid freezing of human embryos: a systematic review and meta-analysis. *Reproductive biomedicine online*. 2010;20(2):209-222.
8. Pavone, M. E., J. Innes, J. Hirshfeld-Cytron, et al. Comparing thaw survival, implantation and live birth rates from cryopreserved zygotes, embryos and blastocysts. *Journal of human reproductive sciences*. 2011;4(1):23-28.
9. Ozmen, B., S. Askan, Y. Mohammed and D. Klaus. Current data on the vitrification of human embryos: Which one is the best; zygote, cleavage or blastocyst stage. *J Turkish-German Gynecol Assoc*. 2007;8(2):218-226.
10. Desai, N., J. Szeptycki, M. Scott, F. F. AbdelHafez and J. Goldfarb. Artificial collapse of blastocysts before vitrification: mechanical vs. laser technique and effect on survival, cell number, and cell death in early and expanded blastocysts. *Cell Preservation Technology*. 2008;6(3):181-190.
11. Mukaida, T., C. Oka, T. Goto and K. Takahashi. Artificial shrinkage of blastocoeles using either a micro-needle or a laser pulse prior to the cooling steps of vitrification improves survival rate and pregnancy outcome of vitrified human blastocysts. *Human Reproduction*. 2006;21(12):3246-3252.
12. Li, Z., Y. Wang, W. Ledger, D. Edgar and E. Sullivan. Clinical outcomes following cryopreservation of blastocysts by vitrification or slow freezing: a population-based cohort study. *Human Reproduction*. 2014;29(12):2794-2801.

13. Poli, M., A. Ori, T. Child, et al. Characterization and quantification of proteins secreted by single human embryos prior to implantation. *EMBO Mol Med.* 2015;7(11):1465-1479.
14. Capalbo, A., L. Rienzi, D. Cimadomo, et al. Correlation between standard blastocyst morphology, anöploidi and implantation: an observational study in two centers involving 956 screened blastocysts. *Human Reproduction.* 2014;29(6): 1173-1181.
15. Farfalli, V., M. Magli, A. Ferraretti and L. Gianaroli et al. Role of ananöploidi on embryo implantation. *Gynecologic and obstetric investigation.* 2007;64(3):161-165.
16. Darwish, E. and Y. Magdi. Artificial shrinkage of blastocoel using a laser pulse prior to vitrification improves clinical outcome. *J Assist Reprod Genet.* 2016;33(4):467-471.
17. Poli, M., S. Jaroudi, J. Sarasa, et al. The blastocoel fluid as a source of DNA for preimplantation genetic diagnosis and screening. *Fertility and Sterility.* 2013;100(3):37.
18. Taylor, T. H., S. A. Gitlin, J. L. Patrick, et al. The origin, mechanisms, incidence and clinical consequences of chromosomal mosaicism in humans. *Human reproduction update.* 2014;20(4):571-581
19. Magli, M. C., A. Pomante, G. Cafueri, et al. Preimplantation genetic testing: polar bodies, blastomeres, trophoctoderm cells, or blastocoelic fluid? *Fertility and sterility.* 2016;105(3):676-683.
20. Tobler, K. J., Y. Zhao, R. Ross, et al. Blastocoel fluid from differentiated blastocysts harbors embryonic genomic material capable of a whole-genome deoxyribonucleic acid amplification and comprehensive chromosome microarray analysis. *Fertil Steril.* 2015;104(2):418-425.

<http://edergi.cbu.edu.tr/ojs/index.php/cbusbed> isimli yazarın CBU-SBED başlıklı eseri bu Creative Commons Atıntı-Gayriticari 4.0 Uluslararası Lisansı ile lisanslanmıştır.

