

# **BAŞLIK: PREİMLANTASYON GENETİK TESTİ: POLAR CİSİMLER Mİ, BLASTOMERLER Mİ, TROFO-EKTODERMİK HÜCRELER Mİ, VEYA BLASTOSELİK SIVI MI?**

## **ORİJİNAL BAŞLIK: PREIMPLANTATION GENETIC TESTING: POLAR BODIES, BLASTOMERES, TROPHECTODERM CELLS, OR BLASTOCOELIC FLUID?**

**Fertil Steril 2016;105:676–83. 2016 by American Society for Reproductive Medicine.**

**Çeviren:** Doç.Dr. Özlem Moraloğlu Tekin/Op.Dr. Selen Yaman  
Kadın Hast. ve Doğum uzmanı  
Zekai Tahir Burak Kadın Sağlığı ve EAH

**YAZARLAR:** M. Cristina Magli, M.Sc., Alessandra Pomante, Ph.D., Giulia Cafueri, B.Sc., Marzia Valerio, B.Sc., Andor Crippa, Ph.D., Anna P. Ferraretti, M.D., and Luca Gianaroli, M.D.

**ÇALIŞMA MERKEZİ:** SISMER, Reproductive Medicine Unit, Bologna, Italy

### **GİRİŞ:**

Kompaktlaştıktan sonra embryo, hücrelerin iç hücre tabakası (ICM) ve trofoektoderm (TE) farklılaştığı ve ayrılarak uzak yerlere göç ettiği bir süreçle bir kavite oluşturmaya başlar. Normal bir embyonik gelişimde, düzgün bir embryonun oluşumu için TE hücreleri plasenta ve amniyonu oluşturacak olan ekstra embryonik dokuların oluşumunu sağlarken, ICM ler farklılaşmamış embryonik kök hücrelerden ibarettir (1). TE hücrelerinin polarizasyonu ve birbirleriyle bağlantılarının sağlanmasından sonra TE hücrelerinden sıvı transportu ile blastoselik sıvı toplanması başlar (2,3). Kavitasyonun ilerlemesi ile olduğu kadar sıvı toplanması ve sürekli hücre bölünmesi ile de blastokist genişler ve zona pellucida (ZP) incilir. Tam bu noktada ZP dada oluşan doğal bir açıklıktan embrioyu implantasyona hazır hale getirecek olan hatching gerçekleşir.

Blastoselik sıvı (BF), ICM'nin gelişmesini destekleyen doğal medyumdur ve yolk sak'ın oluşumunu sağlar(1,4). Farklılaşma ve yenilenme proteinlerle olduğundan (5) BF'lerde metabolit ve protein saptanması da sürpriz değildir (6,7). BF'da ısı şok proteinleri, ZP proteinleri, vit D bağlayıcı protein, retinol bağlayıcı proteinleri ile silyer fonksiyonlardan sorumlu proteinler gibi 286 çeşit proteinler vardır(7). 8 tanesinin henüz görevi bilinmemektedir. Bu bulgular, BF proteinlerinin blastokist hücrelerinden transsellüler transportla ve/veya iç hücre kütle(ICM) ya da TE hücre bileşenlerinden salınmasından köken aldığını düşündürmektedir(8). BF'nın hücre göçüne kompartman sağlamaktan ziyade, embriyo gelişimi esnasındaki hücre gelişimininde kritik rol oynadığına inanılmaktadır(9).

BF'larında proteinlerin yanı sıra nereden köken aldığı halen araştırılmakta olan DNA'da bulunur (10-12) . Serbest yada mikropartüküller haldedir ve hücre ölümü ya da çoğalması esnasında vezüküller halinde ortaya çıkar(13). Formu ne olursa olsun, bu DNA amplifiye ve analiz edilirse genetik hastalık/kromozomal anomalilerden sorumlu mutasyonların Preimplantasyon genetik tarama(PGS)/ Preimplantasyon genetik tanı(PGD) programlarında tanımlaması mümkündür(11,12).

İlk verilerini bir rapor ile sunduğumuz çalışmamızda, 51 test edilen blastosel sıvısının 39'unda DNA'yı %76 verimlilikle saptayarak anoploidi analizinde faydalanabildik(12).

Bu çalışmada, deneyimlerimizi genişleterek, 1) BF larında DNA varlığının sağlanmasını yapmayı, 2) Polar cisimleri(PB)/Blastomer/TE hücrelerinden elde edilen kromozomal durum ile BF larından elde edilenleri kıyaslamayı, 3) Segmental anormalliklerin BF dan elde edilip edilemeyeceğini araştırmayı hedefledik.

## **MATERYAL-METOD:**

### **Çalışma planı;**

Anne yaşı 38.1±3.2 yaş olan 51 çiftin halihazırda 24 kromozom array komparatif genomik hibridizasyonda(-CGH) PB leri olan (21 hasta) ve PGD/PGS de blastomeri olan 30 hasta- incelendi.

PGS endikasyonları ileri anne yaşı(n=26) tekrarlayan IVF başarısızlığı(n=13)

PGD endikasyonları 12 hasta translokasyon (1'i Robertsonian) ve resiprokal translokasyon(n=11)

Bu çalışmanın ilk amacı 116 blastokistin BF sında DNA varlığını tespit etmektir. İkinci amacı, 70 amplifiye BF nın kromozomal analizinde sonuçların PB veya Blastomer ve TE hücreleri ile kıyaslanması. Sonuncu ve üçüncü amacı, 16 BF'sının segmental anomaliler açısından taranmasıdır.

Çalışmaya fazla sayıda blastokisti olup kromozom analizi için onay vermiş hastalardan alınan ve PB veya blastomer analizi ile önceden kromozomal durumu belirlenmiş olan blastokistler dahil edildi. Bu blastokistler 2 tipti: 1) dondurulması planlanan ve öploid olanlar. BF aspire edildikten sonra kollabe olan blastokist hemen vitrifikasyona alındı.; ve 2) anöploid olan ve bu nedenle transfer edilmeyecek blastokistler. BF aspire edildikten sonra, kromozom analizi için ayrılan tekrar genişleyen blastokistlerden biyopsi ile TE hücreleri alındı. Ulusal yönetmeliğe göre araştırma için embriyo donasyonuna izin verilmediğinden, boş embriyolar (WE) ancak genişletilmiş kültürde non-viable hale geldikten sonra test edildi(14).

### **Biopsi Prosedürü:**

PB1 ve PB2 biyopsileri ZP nın mekanik açılmasından sonra sırayla alındı, PB1 intrasitoplasmik sperm injeksiyonundan (ICSI) hemen önce, PB2 6-9 saat sonra çıkarıldı. Blastomer biyopsileri (ICSI)'dan 62-64 saat sonra, düzgün gelişen embriyonun 6-8 hücre evresinde yapıldı(14). ZP'ya laserle küçük bir delik açılarak buradan nücleuslu blastomer aspire edildi. TE biyopsisi laser ile 3-5 hücre kesilip çıkarılmak suretiyle gerçekleştirildi. Her bir biyopsi materyali 0.2 ml buzlu fosfatlı-salin tampon içeren polymerase chain reaction (PCR) tüplerine aktarıldı ve -80-C de kromozomal analize kadar saklandı(15).

BF ları genişlemiş blastokistten ICSI pipeti ile hiç bir hücre aspire etmemeye özen göstererek aspire edildi. Yaklaşık her bir blastokistten aspire edilen 0.01 ml BF sıvısı boş bir buzlu PCR tüpüne aktarılarak-80-C de kromozomal analize kadar saklandı.

Non-viabl blastokist vakalarında, WE 1 ml buzlu tampon içeren PCR tüpüne aktarılarak yukarıdaki süreçler uygulandı.

### **Tüm genomik amplifikasyon (WGA) ve array-CGH:**

WGA sınıf-2 laminar flow kabiniinde PCR kullanılarak gerçekleştirildi(SurePlex, Illumina). Amplifikasyonlar; 'güçlü' , 'zayıf' ve 'elde edilemedi' şeklinde derecelendirildi. Amplifiye

edilen DNA'lar 24- kromozom için a-CGH ile analiz edildi(24Sure Microarray, Illumina) Oosit vey embiryonun öploid/anöploid durumları tahmin edildi(16). Her bir kromozom için anöploidi tarandı ve rapor edildi. Resiprokal translokasyon taşıyıcıları için spesifik bir kit kullanıldı(24Sure PGD Microarray, Illumina). BF'ları ve TE hücrelerinin tüm analizleri önceki sonuçlardan haberdar olmayan operatörlerce yapıldı.

### **Kromozomal Durum Değerlendirilmesi**

Kromozomal durum 70 BF'nda ve ilgili PB'ler veya Blastomer ve TE hücrelerinde değerlendirildi. Farklı evrelerden elde edilen sonuçların değerlendirilmesinde ilk gösterge ploid durumuydu. İkinci gösterge kromozom uyumuydu. Sonuncu ise boş uyumluluktaki bu gösterge, gelişiminin farklı safhalarında segmental anomaliler de dahil olmak üzere kromozom anomalilerinin dağılımı hakkında bilgi sağlar.

### **SONUÇLAR**

BF sı 116 blastokistten aspire edildi. WGA sonrası 95 örnekte (82%) DNA amplifikasyonu mevcuttu ki bunların 85'i güçlü, 10 tanesi zayıf amplifikasyondur. BF nda DNA varlığını saptayabilmek için olası kriterleri araştırmak için, sonuç için geçen süre, blastokist morfolojisi ve biyopsi günü analiz edildi. Sonuç için geçen süreye göre sıralandığında, bir öğrenme eğrisi olduğu ve son toplanan örneklerde amplifikasyon hızında belirgin bir artış olduğu görüldü (Fig. 1A). Blastokist morfolojisi ve biyopsi günü kombine analiz edildiğinde, 5. gündeki genişlemiş blastokistlerden elde edilen BF larında DNA elde etme şansı en yüksek bulundu (Fig. 1B).

DNA amplifikasyonu pozitif olan 95 örneğin 87 sine a-CGH uygulandı ve bunlardan 82 si güçlü, 5 zayıf amplifikasyondur. 82 örnekten (94%) tanımlayıcı sonuç elde edildi ki bunlardan 80 i güçlü (80/82, 98%), 2 si zayıf (2/5, 40%) amplifikasyonlu DNA lardandı.

### **BF ile PB, Blastomer ve TE hücrelerinden elde edilen kromozomal durum arasındaki uyum**

70 blastokistte, BF ve biyopsi ile alınan(PB veya blastomer ve TE) kromozom verisi elde edildi. Toplanan sonuçlar ve karşılaştırmaları tablo1 ve tablo 2 de verilmiştir (Supplemental Table 1 and Supplemental Table 2).

PB ve Blastomer sonuçlarına göre, 11 embiryo öploid ve 59 u anöploiddi. BF %94.3(66/70) ploid uyumu gösterdi, fals pozitiflik yoktu(11 öploid embiryonun hepsi BF de de öploiddi), 4 fals negative vardı(59 anöploidin 4 tanesi BF de öploiddi). Sensivite ve spesivite 0.93 ve 1, doğruluk 0.94, pozitif testi öngörme değeri 1, ve negative testi öngörme değeri 0.73 dü.

TE analizinin sonucunda 14 öploid ve 55 anöploid saptandı. BF 1 fals pozitiflik ve 1 fals negatiflikle %97.1(67/69) ploid uyumu gösterdi. Sensivite ve spesivite 0.98 ve 0.93, doğruluk 0.97, pozitif testi öngörme değeri 0.98, ve negative testi öngörme değeri 0.93 dü. Tablo 1 ploid uyumsuzluğu olan vakaları detaylı bir şekilde göstermektedir. BF de %5.7 oranla diskordan kromozom analizi mevcuttu.BF ve TE arasında 2 diskordan ploid mevcuttu.

BF-PBs kromozom konkordansı %97.9

BF-Blastomer kromozom konkordansı %97.7

BF-TE kromozom konkordansı %98.4

Toplam konkordans %73.5 , %81, %81 tüm embriyolar için idi.

Konkordans sonuçları Tablo 3'de detayları ile verilmiştir ve Şekil 1 de özetlenmiştir.

### **Segmental Anormallikler**

Analiz edilen 16 blastokistte, segmental anomali varlığı hem PBs de(n=3) hem blastomerde (n=13 şekil 2) tespit edildi. Bunlardan 9 u resiprokal taşıyıcı anne baba embriyosuydu, geri kalanı ise normal karyotipli anne baba embriyosuydu.

Translokasyon taşıyıcılarının 9 embriyosu kromozom translokasyonu bakımından dengesiz olduğu için blastomerle tanı aldı (Tablo 2). Tüm vakalarda, 7'si tam konkordans ile segmental anomaliye BFde de rastlandı (Şekil 2a) 2si ise parsiyel konkordans gösterdi. TE ve WE sonuçlarına bakıldığında bir TE öploidiydi. Bu nedenle TE temelli segmental anomali tanısı yanlış negatif çıktı.

Normal karyotipli anne-babadan elde edilen 7 embriyoda 3 segmental anomali PB (Şek 2B) tarafından, 4ü blastomerler (Tablo 2) tarafından öngörüldü. Hepsi BF, TE ve WE tarafından doğrulandığında 5 sette tam konkordans görüldü. Kalan 2 sette konkordans parsiyeldi.

### **TARTIŞMA**

Blastokist kültürü günümüzde artık yaygın olarak canlı embriyoların etkin seçimi için ART'de yaygın kullanılmaktadır. İlave avantajı, tek gen hastalıkları ve translokasyonların hem PGS ve PGD için TE biyopsisini imkan vermektedir. Bu yaklaşım, embriyo canlılığının korunma ve PGS ile ilişkili en güvenilir sonuçları sağlayacak gibi görünüyor(17,20).

Blastokist biyopsisinin en önemli avantajı, embriyonik kütleyle dokunmadan embriyo benzeri çok sayıda hücre alınabilmesidir. Bu nedenle, eğer boş değilse işlemin invaziv oluşu blastomer biyopsisi ile karşılaştırıldığında düşük derece mozaisizm açısından kesinlikle yararlıdır(21,22). Blastosentez, yani blastokoelik boşluktaki sıvının aspirasyonu, blastokist bütünlüğü üzerinde daha düşük etki ile biyopsi prosedürünü temsil eder.

Çalışmamızla alakalı ilk bulgu geçtiğimiz yıl alınan örneklerde %100'e yakın DNA tespit etmemizdir (çalışmanın ilk amacı). İncelenen 116 BF DNA'sına baktığımızda, bizim performansımızda önemli iyileşmeye yol açan bir öğrenme eğrisi deneyimi olduğu açıktır (Şekil 1). Bu ilerleme nedenlerini belirlemek için, gelişim zamanına göre blastokist evresini içeren çeşitli faktörler değerlendirildi. 5. günde genişlemiş kaviteli blastokistler BF'den yüksek ihtirmalle başarılı DNA amplifikasyon göstermektedir. Özellikle çoğu vakada amplifikasyonun başarısız olduğunu düşünürsek DNA'nın yok gibi görünmesi sürpriz değildir fakat yüksek fragmente 15 dk agaroz jel ile elektroforez desteklenmektedir(12). Apoptozis ile ölü hücrelerden türetilen küçük DNA fragmanlarının blastokist içindeki BF'de bulunduğunu varsayabiliriz bu işlem daha iyi kalitede blastokistlerin izlenmesi olarak bilinir(23). DNA miktarının çok küçük olması nedeniyle amplifikasyonun başarısız olması da mümkündür. Bu düşünceyle biz farklı protokolle amplifikasyonu geliştirmeye çalışıyoruz. Ek nokta olarak, tüpleme kesinlikle önemlidir ve inanıyoruz ki, soğuk PCR tüpleri içine ICSI pipetinden alınan BFnin doğrudan transferi en yüksek DNA sağlayan yaklaşımdır.

Bu oluştuktan sonra BF'den kabul edilebilir bir oranda DNA yeniden kazanmak mümkündü, bir sonraki adım blastokist kromozom durumunu değerlendirirken güvenilirliğini doğrulamak oldu (çalışmamızın ikinci amacı). Bu nedenle, biz referans örneklerini iki tipte seçtik: [1] daha önceki aşamalarda, bizim PGS veya translokasyon programı için PGDlerden PB'lar veya

blastomer biyopsi sonuçları ve [2] bu türde TE örneklerinden biyopsi sonuçları PGD ve PGS için en yaygın kullanılan stratejiyi sunar. Bazı vakalarda WE (ICM ve TE hücreleri birlikte) analiz ettiğimizde, bazı mitotik anomali formlarının karşılıklı ve dolayısıyla belirgin kromozomların karışık öploidi durumunun farkına vardık. BF'ler ile üretilenlerle ne PB'lerin ne de blastomerlerin sonuçlarının karşılaştırılması ilk aşamalarda yapılan biyopsilerin tahmin gücünü destekleyen gelişmekte olan blastokist üzerine sahip olduğu zaman ploidi uyumu yüksek derecede bulundu. Bu erken dönemde yapılan biyopsinin zayıf prediktif değerini gösteren diğer raporların tersidir(24,25). Bizim çalışmamızda altını çizmek istiyoruz ki, tüm embriyoların düzenli gelişimleri vardı ve ne spermin ne de erken bölünme gibi postzigotik anormalliklerin artacağı ciddi erkek faktörü vakası içermiyordu(26,27). Bu strateji doğrultusunda, mayotik anormallikler (her iki PB değerlendirilmesi şartıyla) ve ilk mitoz sırasında çıkan anormalliklerin erken aşamalarında bulunması muhtemeldir(28,29). Bununla beraber günümüzde genel eğilim PGS ve PGD için TE biopsisi yapmak yönünde olduğundan biz de BF sonuçlarının değerlendirilmesinde referans olarak TE hücrelerinden elde ettiğimiz sonuçları aldık. Tablo3 de görüldüğü gibi ploidi uyumu 97.1% (67/69) olup, herbir kromozom için 98.4% dü. Vakaların büyük çoğunluğunda BF ve TE sonuçları (81%, 56/69) tam uyumlu, (16%, 11/ 69) parsiyel uyumlu olup BF nin TE kromozom durumunu iyi bir şekilde yansıttığının göstergesidir. Parsiyel kromozomal uyumun sorumlusu BF ya da TE lerdeki anöploid hücrelerin alınması olabilir ve hem mitotic hem de mayotik bölünmede hatalara neden olan mozaizm buna sebep olabilir(30,31). Mozaizmin BF daki klinik ve biyolojik etkileri net çalışılmamış olsa da blastokist için implantasyon oranlarını düşürdüğü gösterilmiştir(32). Kendi deneyimlerimize göre mozaizm a-CGH kullanımı ile çoğu zaman öngörülebilirle beraber daha kesin yöntem next generation sequencing (NGS) dir. Bu nedenle BF dan gelecekte daha fazla elde edeceğimizi ümit ettiğimiz DNA ekstraktlarında NGS yapmak gelecek planlarımızda yer almaktadır. BF larında segmental anormallikleri saptamak çalışmamızın üçüncü amacıydı (Şekil2). Analiz edebildiğimiz çift sayısı sınırlı olsa da(n 1/4 16), vakaların tümünde PB ve Blastomerden elde ettiğimiz sonuçlarla BF dan aldığımız sonuçların tümünde ploidi uyumu gördük. Daha da önemlisi tüm BF larında segmental anormalliklerin çok daha erken evrede saptandığı görüldü. Diğer araştırmacılar da kromozom analizi için BF dan DNA elde ettiklerini göstermişlerdir. Her ne kadar amplifikasyon oranları bizim çalışmamızla uyumlu olsa da (12) öngörme oranları bizimkinden oldukça düşüktür. Bu farklılığı açıklayacak pekçok neden vardır. Öncelikle, biz düzgün gelişen embriyolarla çalıştık(14) diğer araştırmacılar genelde kötü gelişen donasyon embriyolarla yapmışlar(33,34). İlaveten biz sistematik olarak WE ları tek referans olarak almamaya özen gösterdik zira bilindiği üzere bunlarda mozaizm sık olup teşhiste atlamaya neden olabilir(31,34).

Sonuç olarak, bu çalışmanın sonuçları traslokasyon için PGS veya PGD de BF dan elde edilecek DNA kullanımını kuvvetle desteklemektedir. Önemli bir nokta da BF aspirasyonunun diğer alternatif yöntemlerden daha az invaziv olması ve ucuz olmasıdır. Yüksek maliyetli embriyo biyopsileri gerektirmemektedir ve lazer ekipmanına da gerek yoktur. Tabii ki örneklerin büyük çoğunluğunda a-CGH analizine uygun DNA eldesi optimize edilmelidir. Halihazırda BF da proteom içeriğini göstermeyi amaçlayan çalışmalar devam etmektedir(7,38). BF dan embriyonik orjinli moleküllerin analizini sağlayacak tekniklerin geliştirilmesi, embriyo viabilitesini değerlendirmede yeni bir metodolojinin kapılarını açabilir.

