مقاله مروری

مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)
جلد۱۲، شماره ۳، پاییز ۱۴۰۰

یافته‌های نوین در ارزیابی غیر تهاجمی کیفیت جنین

ام‌البنین بدری صیقل‌دهی .B.Sc[۱]، هما محسنی کوچصفهانی .Ph.D[۱]، ناهید نصیری .M.Sc[۲]، مریم شاهوردی .Ph.D[۲]، مریم هزاوه‌ای .Ph.D[۲*]، عبدالحسین شاهوردی .Ph.D[۲*]

۱- دانشگاه خوارزمی، دانشکده علوم زیستی، گروه علوم جانوری، ، تهران، ایران
۲- مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی تولید مثل، گروه جنین شناسی، پژوهشگاه رویان، تهران، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: m_hezavehi@royaninstitute.org ، Shahverdi@royaninstitute.org

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۶/۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۸/۱۱

چکیده

هدف: در روش‌های کمک باروری انتخاب یک جنین با کیفیت بسیار مهم و مستلزم دسترسی به یک روش استاندارد است. امروزه روش‌های مختلفی جهت ارزیابی جنین‌های آزمایشگاهی وجود دارد. در روز سوم و پنجم تکوین، ارزیابی ریخت شناسی براساس میزان کلیواژ، شکل و تقارن بلاستومرها انجام می‌شود، هم‌چنین در روش تشخیص ژنتیکی پیش از لانه‌گزینی، جنین‌ها از نظر وجود بیماری‌های ژنتیکی مورد ارزیابی قرار می‌گیرند، تا در نهایت جنین مناسب برای انتقال به‌رحم مادر انتخاب شود. از آن‌جایی‌که دستیابی به یک روش کم خطر و با دقت بالا برای انتخاب جنین با کیفیت از اهمیت به‌سزایی برخوردار است، اخیرا ارزیابی متابولیسم جنین با تجزیه و تحلیل مواد جذب و ترشح شده توسط جنین‌ها در محیط کشت، به‌عنوان یک روش غیرتهاجمی مطرح شده است که می‌تواند همراه با ارزیابی مورفولوژیکی، چگونگی رشد و نمو جنین را بادقت بیش‌تری پیش‌بینی کند. بر این اساس در این مطالعه مروری روایتی، ارزیابی جنین‌ها براساس ارتباط متابولیسم جنین و کیفیت آن به‌عنوان یک روی‌کرد نوین مورد بحث قرار گرفته است.

واژگان کلیدی: ارزیابی غیرتهاجمی جنین، مورفولوژی جنین، متابولیسم جنین

مقدمه

یکی از عوامل بسیار مهم در موفقیت روش‌های کمک باروری یا ART (Assisted reproductive technology)، ایجاد جنین های با کیفیت بالا در آزمایشگاه است (۱). اگرچه نسبت به دهه‌های گذشته، روش لقاح آزمایشگاهی یا IVF (In vitro fertilization) بهبود یافته است، اما موفقیت آن در تکوین صحیح جنین و تولد زنده در هر انتقال تنها حدود۳۰ درصد است (۲). بنابراین برای رسیدن به‌یک بارداری موفق، لازم است جنین‌هایی با کیفیت بالا جهت انتقال به‌رحم مادر انتخاب شوند. امروزه روش‌های مختلفی جهت ارزیابی جنین‌های آزمایشگاهی وجود دارد. در روش تشخیص ژنتیکی پیش از لانه‌گزینی یا PGD (Preimplantation Genetic Diagnosis) ، یک‌پارچگی کروموزومی جنین‌ها بررسی می‌شود. این آزمایش ژنتیکی شامل تکنیک‌های متعددی است که با نمونه‌برداری از اجسام قطبی در مرحله‌ی کلیواژ (روز سوم) و یا از سلول‌های تروفواکتودرم در مرحله‌ی بلاستوسیست (روز پنجم یا ششم) صورت می‌گیرد و برای شناسایی انواع ناهنجاری‌های ژنتیکی مانند اختلالات وابسته به جنسیت، اختلالات تک‌ژنی، و اختلالات کروموزومی مناسب است. از آن جایی‌که در این روش، در اولین روزهای رشد، حذف یک یا دو سلول از جنین صورت می‌گیرد، ممکن است سبب آسیب‌های تاثیرگذاری در مراحل بعدی تکوین آن شود. علاوه‌براین، این روش پر هزینه و زمان‌بر نیز می‌باشد. ازطرفی، جنین‌هایی با مورفولوژی مناسب، می‌توانند دارای اختلالات کروموزومی باشند، بنابراین این روش نیز حائز اهمیت می‌باشد. دسته دیگری از روش‌های ارزیابی، بررسی مورفولوژیکی جنین است. این روش، معمول‌ترین راه برای نمره‌دهی به‌جنین می‌باشد، که براساس آن در روز سوم و پنجم تکوینی، میزان کلیواژ، شکل و تقارن بلاستومرها و میزان خرده‌های سیتوپلاسمی (فرگمنت‌ها)، مورد بررسی قرار می‌گیرند (۳). از آن جایی‌که ارزیابی ریخت‌شناسی، برای انتخاب جنین مناسب به‌تنهایی کافی نمی‌باشد (۴)، اخیرا، سنجش متابولیکی جنین به‌عنوان یک روش غیرتهاجمی، مطرح شده است که می‌تواند همراه با ارزیابی مورفولوژیکی، امکان انتخاب دقیق‌تر جنین های مناسب را به‌وجود آورد. طبق مطالعه‌های انجام شده، جنین‌های موفق در لانه‌گزینی، دارای میزان متابولیسم متفاوتی از اسیدهای آمینه، کربوهیدرات‌ها و اکسیژن مصرفی نسبت به جنین‌های بی‌کیفیت می‌باشند (۵). بنابراین شناخت مسیرهای اصلی متابولیسم و آنالیز آن می‌تواند برای انتخاب جنین‌های با کیفیت حائز اهمیت باشد. بنابراین، هدف این از این مقاله مروری، بررسی انواع روش‌های ارزیابی غیرتهاجمی کیفیت جنین می‌باشد. بر این اساس، برای این مقاله مروری از اطلاعات و داده‌های مرتبط و حاصل از جستجوی پایگاه داده PubMed و موتور جستجوگر Google Scholar تا ۲۰۲۱، استفاده شده است.

ارزیابی ریخت شناسی در سنجش کیفیت جنین: کیفیت یک جنین با شاخص‌های مورفولوژیکی آن در ارتباط است، لذا ارزیابی ریخت شناسی آن، متداول‌ترین روش برای سنجش کیفیت و نرخ بقای جنین می‌باشد (۶). این روش در تمام مراحل رشد جنین از مرحله پیش هسته تخمک تا کلیواژ و بلاستوسیست به‌کار برده می‌شود (۷و۸). در بررسی مورفولوژی، دو روز بعد از لقاح می‌توان تعداد، اندازه و شکل بلاستومرهای درحال تقسیم و هم‌چنین جهت هندسی آن‌ها نسبت به یکدیگر را مشاهده نمود (۹). هم‌چنین پارامترهایی مانند بازه‌ی زمانی کلیواژ، میزان تکه‌تکه شدن بلاستومر و زمان اولین تقسیم میتوز زیگوت نیز مورد ارزیابی قرار می‌گیرند (۱۰). تاکنون چندین استراتژی جهت انتخاب جنین آزمایشگاهی با کیفیت مناسب پیشنهاد شده است، که می‌توان به‌سیستم‌های درجه‌بندی مورفولوژیکی در زمان‌های ۲۰ ، ۲۸ ، ۴۴ و ۶۸ ساعت بعد از لقاح اشاره کرد.

ارزیابی مورفولوژیکی جنین در ۱۶ تا ۱۸ ساعت بعد از لقاح: در روز دوم بعد از لقاح، جنین‌هایی با میزان لانه‌گزینی بالا، دارای افزایش در تعداد بلاستومرها و ناپدید شدن زود هنگام هسته‌ها می‌باشند. هم‌چنین در دو بلاستومر تشکیل شده بعد از اولین تقسیم، بین میزان بارداری بالا و هم‌زمانی در ظهور مجدد هسته، یک رابطه مستقیم وجود دارد (۱۱). به‌طورکلی زمان اولین تقسیم، شاخص مهمی جهت تایید تکوین صحیح و کیفیت در جنین‌های زود شکاف نسبت به دیر شکاف است. اخیرا مورفولوژی پیش هسته‌های زیگوت مانند تعداد و نوع توزیع هسته‌ها، و زمان تجزیه هسته‌ای، در پیش‌بینی لانه‌گزینی و بارداری بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند.

تاکنون چندین روش برای امتیاز دهی جنین در مرحله هسته‌ای پیشنهاد شده است که تعداد و موقعیت اجسام پیش‌ساز هستکی یا NPBs (Nucleolar precursor bodies) را در هر پیش هسته، مورد سنجش قرار می‌دهند. یکی از این نوع روش‌ها، طبقه‌بندی زیگوت‌ها براساس روشTesarik and Greco می‌باشد (۱۲). هم‌چنین روش طبقه‌بندی Brezinova و همکاران (۱۳)، بر اساس دو الگوی متفاوت (O and Other) مطرح شده است، که براساس آن مورفولوژی پیش هسته و بازه زمانی زود شکاف را ۱۶تا ۲۰ ساعت بعد از لقاح مورد ارزیابی قرار می‌دهد. الگو "O" شامل زیگوت‌هایی است که دارای تعداد مشابهی از اجسام پیش‌ساز هستکی کوچک می‌باشند و به‌صورت یکنواخت در پیش‌هسته‌ها توزیع شده‌اند و یا دارای اجسام پیش‌ساز هستکی بزرگ هستند که به‌صورت قطبی در دو پیش هسته توزیع شده‌اند. در الگوی "Other" زیگوت‌هایی با ترازهای غیرمتقارن از اجسام پیش‌ساز هستکی امتیازدهی می‌شوند، براساس آن تعداد برابر NPB در دو پیش هسته بسیار ضروری است. معیار دوم، زمان اولین تقسیم میتوزی است. این وقایع ۲۳ تا ۲۷ ساعت بعد از لقاح بررسی می‌شود و جنین های دارای دو بلاستومر به‌عنوان جنین‌های زود شکاف (Early cleavage) و جنین‌هایی که هنوز تقسیم اول را انجام نداده‌اند، به‌عنوان جنین‌های دیر شکاف (No early cleavage) درنظر گرفته می‌شوند. گزارش شده است که موفقیت جنین‌های EC در بارداری و لانه‌گزینی بیش‌تر از جنین‌های دیر شکاف می‌باشد. معیار سوم، وجود یا عدم وجود هاله سیتوپلاسمی است. جنین‌های با کیفیت بالا باید هاله‌ی سیتوپلاسمی داشته باشند، در غیر این صورت سرعت تکوین کاهش یافته و درجه تکه‌های سیتوپلاسمی (فرگمنته) افزایش می‌یابد. طبقه‌بندی زیگوت‌ها براساس روش اسکات که به‌سیستم امتیازدهی"Z" نیز معروف می‌باشد، روش دیگر امتیازدهی می‌باشد (۱۴) که براساس اندازه و تراز پیش هسته‌ها و هم‌چنین تعداد و توزیع NPBs می‌باشد. در این روش، Z1، زیگوت‌ها با تعداد مساوی NPB تراز شده در محل اتصال پیش هسته‌ها می‌باشند. Z2، زیگوت‌ها با تعداد و اندازه برابر هستک‌ها هستند که به‌طور مساوی بین دو هسته پراکنده شده‌اند. Z3، در یک هسته تعداد و اندازه NPBها مساوی و در هسته دیگر نامساوی می‌باشد، و Z4، زیگوت با پیش‌هسته‌هایی در حاشیه و با اندازه‌های متفاوت از هم جدا شده‌اند. روش بعدی برای طبقه‌بندی کیفی جنین در مرحله دو پیش‌هسته‌ای (2PN)، توسط Senn و همکاران (۱۵) مطرح شده است. در این روش زیگوت‌ها را براساس مجاورت، جهت‌گیری و مرکزیت پیش هسته‌ها، هاله سیتوپلاسمی، تعداد و قطبیت NPB درجه‌بندی می‌کنند.

سیستم درجه‌بندی ساده، روش دیگری است که از اعتبار بالینی بالایی برخوردار است. براساس این سیستم، در درجه A، بلاستوسیست منبسط شده و اندازه آن از جنین در مرحله کلیواژ بزرگ‌تر می‌باشد، زونا پلوسیدای آن نازک شده و دارای توده سلولی داخلی شفاف و تروفواکتودرم منسجم است. در درجه B، بلاستوسیست کاملا تشکیل شده و حاوی توده سلولی داخلی شفاف و تروفواکتودرم منسجم است، اما زوناپلوسیدا نازک نشده است. در درجه C، بلاستوسیست با توده سلولی داخلی کوچک، فاقد و یا دارای تروفواکتودرم نامنظم با سلول‌های دژنره شده می‌باشد. همچنین تشکیل حفره و فشردگی بین سلول‌های جنین دیده می‌شود، که میزان موفقیت در بارداری، لانه‌گزینی و تولد زنده را کاهش می‌دهد (۱۶).

ارزیابی مورفولوژیکی جنین‌ها در روز سوم بعد از لقاح: جنین‌ها ۴۸ ساعت بعد از لقاح، ۲ تا ۴ سلولی می‌شوند و ۷۲ ساعت بعد از لقاح، باید ۷ تا ۱۰سلول داشته باشند. علاوه‌بر تعداد و نظم بلاستومرها، فاکتورهای دیگری مانند حفره سیتوپلاسمی، عدم وجود واکوئول، دانه دانه شدن و ضخامت زونا پلوسیدا نیز مهم می‌باشند (۱۷). Wong و همکاران (۱۸) پیشنهاد کردند با تجزیه و تحلیل زمان در ۴۸ ساعت اول تکوین، می‌توان پتانسیل رشد و نمو جنین را تا مرحله‌ی بلاستوسیت تعیین کرد. هم‌چنین Depa-Martynow و همکاران (۱۹) ، ارزیابی خود را در روز سوم یا ۶۸ ساعت بعد از لقاح، براساس درجه تکه تکه شدن سیتوپلاسمی و تعداد بلاستومرها مطرح کردند. در این روش بلاستومرها باید متقارن باشند، زیرا بلاستومرهای نامتقارن تاثیر منفی بر لانه‌گزینی می‌گذارند (۲۰). برای یک لانه گزینی موفق، تقارن بلاستومر، عدم وجود بلاستومرهای چند هسته‌ای و همچنین قطعات تکه تکه شده در روزهای دوم و سوم بعد از لقاح باید کمتر از ۲۰ درصد باشد (۲۱). براساس این ارزیابی، درجه A شامل جنین‌هایی با حداقل ۷ بلاستومر و حداکثر ۲۰ درصد قطعه قطعه شدن سیتوپلاسمی می‌باشند. درجه B، جنین‌هایی حاوی ۷ تا ۹ بلاستومر و بیش‌تر از ۲۰ درصد تکه تکه شدن را دارند. درجه C، ۴ تا ۶ بلاستومر و حداکثر ۲۰درصد تکه تکه شدن و درجه D، جنین دارای ۴ تا ۶ بلاستومر است و درجه تکه تکه شدن بیش‌تر از ۲۰ درصد می باشد که این گروه بی‌کیفیت‌ترین جنین، را شامل می‌شود. به‌طور کلی، وجود چهار سلول در روز دوم و هشت سلول در روز سوم، و هم‌چنین عدم وجود پلاستومرهای چند هسته‌ای و میزان قطعه قطعه شدن سیتوپلاسمی کم‌تر از ۲۰ درصد، نشان‌دهنده جنین باکیفیت می‌باشد (۲۲).

ارزیابی مورفولوژیکی جنین‌ها در مرحله‌ی بلاستوسیست: ۴ تا ۵ روز بعد از لقاح، تشکیل بلاستوسیست آغاز می‌شود، که در این مرحله تعداد سلول‌ها افزایش یافته و تقسیم و تمایز سلولی نیز انجام می‌شود. سه ساختار متمایز در بلاستوسیست شامل توده سلولی داخلی، تروفواکتودرم و حفره بلاستوسل برای ارزیابی کیفیت جنین وجود دارد (۷). بلاستوسیست‌هایی که دارای ویژگی‌هایی مانند، سلول‌های متقارن با اندازه‌های یکسان، کروی شکل و هم‌چنین دارای رنگ و بافت یک‌نواختی می‌باشند، بلاستوسیست با کیفیت عالی هستند. بلاستوسیست‌ها با کیفیت خوب دارای ویژگی‌هایی مانند، مقدار کمی بیرون‌زدگی در بلاستومرها، شکل نامنظم، تعداد کمی وزیکول هستند و بلاستوسیست‌های نسبتا خوب، مقدار بیش‌تری بیرون زدگی در بلاستومر، حاوی وزیکول در سیتوپلاسم و دارای تعدادی سلول تخریب شده هستند و درنهایت بلاستوسیست‌های ضعیف حاوی تعداد زیادی بیرون زدگی در بلاستومرها، دارای تعداد زیادی وزیکول‌های بزرگ و سلول‌های تحلیل‌رفته می‌باشند، اندازه‌ی سلول‌ها نیز متفاوت است. برای امتیازدهی بلاستوسیست براساس درجه انبساط آن‌ها روش گاردنر و همکاران پیشنهاد شده است. بر این اساس، در رتبه یک، جنین‌ها بلاستوسل تشکیل نمی‌دهند، در رتبه دو، حفره بلاستوسل بیش از نیمی از حجم جنین را در برمی‌گیرد و اگر حفره به‌طور کامل جنین را پر کند رتبه سه محسوب می‌شود. در رتبه چهار، بلاستوسیست منبسط شده و حفره بزرگ‌تر از جنین می‌شود و در رتبه پنج، پوسته بلاستوسیت نازک می‌شود و هچینگ صورت می‌گیرد، و درنهایت اگر به‌طور کامل از پوسته خارج شود، رتبه شش در نظر گرفته می‌شود.

در روش دوم، درجه‌بندی بلاستوسیست براساس توده سلولی داخلی است. به این‌صورت‌که در رتبه A، تعداد زیادی سلول به‌طور محکم به‌هم متصل شده‌اند، در رتبه B، چندین سلول به‌صورت سست به‌هم متصل شده‌اند. رتبه C، تعداد سلول‌ها بسیار کم است، و در رتبه D، سلول‌ها از پوسته اطراف خود بیرون زده‌اند. هم‌چنین بلاستوسیست‌ها براساس لایه تروفواکتودرم نیز درجه‌بندی می‌شوند. براین‌اساس در رتبه A، بسیاری از سلول‌ها یک لایه منسجم را تشکیل می‌دهند. رتبهB ، تعداد کمی از سلول‌ها تشکیل یک اپی‌تلیوم سست را می‌دهند، و در رتبه C، تعداد سلول‌های بزرگ بسیار کم می‌باشد. درنهایت بالاترین

امتیاز، مربوط به‌جنینی خواهد بود که دارای بیش‌ترین انبساط، تعداد زیادی بلاستومر با اندازه یکسان در لایه تروفواکتودرم و یک توده سلولی داخلی با تعداد زیادی سلول باشد، که به‌صورت منظم و محکم کنار هم قرار گرفته‌اند (۷).

سایر روش‌های امتیازدهی به‌جنین: دو روش درجه‌بندی تدریجی یا GES (Graduated embryo score) و تجمعی یا CES (Cumulative embryo score) نیز برای ارزیابی و امتیازدهی به‌جنین مطرح می‌باشند. Fisch و همکاران (۲۳) براساس روش تدریجی GES جنین‌ها را در چهار مرحله ارزیابی می‌کنند. مرحله اول ۱۶تا ۱۸ ساعت بعد از لقاح می‌باشد، که در آن هاله سیتوپلاسمی، واکوئول، اندازه و تراز هسته‌ای، حالت جسم قطبی و درجه قطعه قطعه شدن مورد ارزیابی قرار می‌گیرند. ۲۷ تا ۲۵ ساعت بعد از لقاح، سرعت کلیواژ، بلاستومرها، غشا پرونوکلئوس‌ها، و درجه تکه‌تکه شدن و در نهایت در ۴۶ تا ۶۷ ساعت بعد از لقاح، تعداد بلاستومرها و مورفولوژی آن‌ها مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. این روش با رشد بلاستوسیست و میزان بارداری در ارتباط می‌باشد (۲۴). روش تجمعی(CES) نیز یک سیستم امتیازدهی ریاضی می‌باشد، که توسط Steer و همکاران (۲۵) پیشنهاد شده است. در این روش، امتیاز هر جنین در روز انتقال از ضرب درجه مورفولوژیکی جنین در تعداد بلاستومرها به‌دست می‌آید و بهترین نتیجه زمانی به‌دست می‌آید که CES حداکثر ۴۲ باشد. اگر میزان CES بیش‌تر از این مقدار باشد، میزان موفقیت در بارداری را افزایش نمی‌دهد بلکه نرخ چند قلویی را بالا می‌برد.

ارزیابی متابولیکی در سنجش کیفیت جنین: اخیرا علاوه بر ارزیابی مورفولوژیکی، ارزیابی متابولیسم جنین جهت انتخاب جنین با کیفیت مناسب مطرح شده است. مطالعه متابولومیکسی قبل از لانه‌گزینی، امکان بررسی فعالیت سلول‌های جنین را در طی یک بازه زمانی خاص از تکوین فراهم می‌کند (۲۶). بنابراین تجزیه و تحلیل متابولیسم می‌تواند به‌عنوان یک نشان‌گر بسیار ارزش‌مند برای تعیین کیفیت و زنده‌مانی جنین درنظر گرفته شود. براساس گزارش‌ها، تنها ۲۰ درصد از جنین‌هایی که براساس معیارهای مورفولوژیکی انتخاب شده‌اند، می‌توانند منجر به‌لانه‌گزینی موفق شوند، به‌همین‌دلیل روش متابولومیکس می‌تواند یک روش تکمیلی برای انتخاب جنین مناسب درنظر گرفته شود (۲۷). جنین نیاز به‌جذب برخی مواد به‌عنوان سوبسترا دارد و بسیاری از مواد را نیز به‌فضای خارج سلولی ترشح می‌کند، در نتیجه در محیط کشت اطراف خود تغییراتی را ایجاد می‌کند (۲۸). بنابراین جمع‌آوری محیط کشت و تجزیه و تحلیل آن می‌تواند منجر به‌اطلاعات مفیدی در رابطه با تنفس سلولی در طی کشت جنین شود. بااستفاده از روش متابولومیک، متابولیت‌هایی چون کربوهیدرات‌ها، گلوکز، لاکتات، پیرووات، آمینو اسیدها همراه با آمونیوم، کربوکسیلیک اسیدها، اسیدهای چرب و نوکلئوتیدها را می‌توان مورد بررسی قرار داد (۲۹). فاکتورهای موثر بر پروفایل‌های متابولومیکی جنین شامل، مرحله رشد و تکوین جنین، ترکیب محیط کشت، تفاوت در غلظت و نوع مواد مغذی، منبع آلبومین، میزان تجمع آمونیوم و غلظت اکسیژن می‌باشند (۰۳). تاکنون در جنین‌های انسانی بررسی چندین فاکتور خاص مانند، لپتین و آنتی‌ژن G لکوسیت انسانی محلول، به‌عنوان نشان‌گرهای زیستی مناسب برای لانه‌گزینی موفق پیشنهاد شده‌اند، اما مهم‌ترین نشان‌گر زیستی، شامل جذب و ترشح کربوهیدرات‌ها و آمینواسیدهای محیط کشت می‌باشد که انرژی کافی را برای بقا و تکثیر انواع سلول‌های جنینی فراهم می‌کنند. هم‌چنین عوامل دیگری مانند میزان اسیدیته (Hp) و غلظت اکسیژن مورد استفاده، می‌توانند عمل‌کرد متابولیکی جنین را تغییر دهند (۶).

ارتباط متابولیسم اسیدهای آمینه و تکوین جنین

آمینواسیدها تنظیم کننده‌های اصلی رشد و نمو جنینی می‌باشند و استرس‌های ناشی از محیط کشت را کاهش می‌دهند. آمینواسیدها با عمل‌کردهای مختلفی مانند متابولیکی، پیش‌سازهای بیوسنتزی، تنظیم کننده pH، آنتی‌اکسیدانتی، تمایز و انرژی، به‌هومئوستاز جنین کمک می‌کنند. هم‌چنین آمینواسیدها می‌توانند به‌عنوان اسمولیت‌ها و شلاتورها به‌حساب بیایند (۶). براین‌اساس، شاهوردی و همکاران (۳۱) گزارش کردند، محیط‌های کشت مختلف، دارای غلظت‌های متفاوتی از

آمینواسیدها هستند که می‌توانند اثرات متفاوتی را بر روند تکوین جنین‌های موشی بگذارند. علاوه بر این مطالعات نشان داده‌اند که محیط کشت می‌تواند بر چگونگی رشد اندام‌های جنینی نیز اثر گذار باشد (۳۲). در واقع سیستم‌های محیط کشت از طریق تغییر در فعالیت‌های متابولیکی می‌توانند کیفیت رشد و نرخ بقای جنین را تحت تاثیر قرار دهند. از طرفی، نوع و مقدار آمینواسیدها به‌عنوان بخشی از متابولوم جنین درنظر گرفته می‌شوند و از طریق آنالیز آن‌ها می‌توان پتانسیل تشکیل بلاستوسیست، کیفیت جنین، میزان بارداری و تولد زنده را پیش‌بینی کرد (جدول ۱) (۲۸). چگونگی جذب وترشح آمینواسیدها در محیط کشت جنین‌های انسانی که تا مرحله بلاستوسیست پیش‌رفته‌اند، نسبت به آن‌هایی که قادر به‌تکامل نبوده‌اند، الگوی بسیار متفاوتی را نشان می‌دهد. جنین‌های موفق در لانه‌گزینی، بیش‌تر اسیدآمینه لوسین را مصرف و آلانین را تولید می‌کنند که از طریق آمونیاک و انتقال با پیروات مشتق می‌شود (۳۳). درحالی‌که در جنین‌های موش بیش‌ترین اسید آمینه مصرفی آسپارتات می‌باشد (۳۴)، که منجر به‌تنظیم متابولیسم کربوهیدرات‌ها می‌شود. با بررسی میزان جذب به‌دفع آمینواسیدهایی چون آلانین، آرژنین، گلایسین، متیونین و آسپاراژین می‌توان تشکیل بلاستوسیست را بیش از ۹۵ درصد پیش‌بینی نمود (۳۵). بنابراین آنالیز پروفایل آمینواسیدی به‌عنوان یک روش غیرتهاجمی می‌تواند برای انتخاب جنین با کیفیت مناسب حایز اهمیت باشد، که منجر به‌موفقیت در لقاح آزمایشگاهی و از بین بردن انتقال‌های چند قلویی می‌شود. Brison و همکاران (۵) با بررسی غلظت آمینواسیدها در محیط جنین‌های دوسلولی، به‌این نتیجه رسیدند که آمینو اسیدهای آسپارژین، گلایسین و لوسین برای بارداری و تولد زنده بسیار مهم می‌باشند. گزارش شده است که جنین‌هایی که میزان جذب به‌دفع آمینواسید کم‌تری دارند، فعالیت متابولیکی و در نتیجه استرس‌های فیزیولوژیکی وارد شده بر آن‌ها نیز کم‌تر می‌شود، به‌همین‌دلیل جنین‌های موفقی برای لانه‌گزینی به‌حساب می‌آیند (۳۵). جنین‌های موفق، جذب بیش‌تر آسپارتات را نیز نشان می‌دهند، زیرا این اسیدآمینه برای فعالیت شاتل مالات_ آسپارتات در بلاستوسیست ضروری است و انرژی مورد نیاز جنین توسط این شاتل فراهم می‌شود (۳۵). طبق گزارش Houghton و همکاران (۳۳) جنین‌هایی که دارای ترشح بسیار بالای آلانین در روزهای دوم و سوم تکوین به‌محیط اطراف بوده‌اند، موفق به‌تشکیل بلاستوسیست نشده‌اند. نسبت جذب به‌دفع آمینواسیدهای آسپارتات، گلایسین و لوسین در مرحله کلیواژ جنین‌های انسانی با نرخ بقای آن‌ها دارای ارتباط معنی‌دار می‌باشد. هم‌چنین گزارش شده است جنین‌هایی که زود شکاف می‌باشند، مصرف بالاتری از متیونین، آسپاراژین و آرژنین را دارا می‌باشند، درنتیجه دارای میزان جذب به‌دفع آمینواسید بیش‌تری در مقایسه با جنین‌های دیرشکاف می‌باشند. اسیدآمینه گلوتامین در بیوسنتز نقش دارد و جنین تا قبل از مرحله بلاستوسیست از آن به‌عنوان منبع انرژی استفاده می‌کند (۳۶). هم‌چنین در بلاستوسیست انسانی مصرف آرژنین، سرین، متیونین، والین و لوسین قابل‌توجه می‌باشد (۳۷).

در مرحله دوسلولی و بلاستوسیست، با افزایش متابولیسم جنین، اسیدهای آمینه به‌مرور زمان و به‌صورت وابسته به‌دما تجزیه می‌شوند و سطح آمونیوم (وابسته به‌غلظت آمینواسیدها)، در محیط اطراف جنین افزایش می‌یابد. سطح بالای آمونیوم در محیط کشت جنینی، غلظت الفا_گلوتارات را با تبدیل به‌گلوتامات کاهش داده و منجر به‌تخلیه شدید ATP در سلول می‌شود. هم‌چنین سبب کاهش فعالیت گلیکولیتیک از طریق فعال کردن آنزیم فسفوفروکتوکیناز می‌شود، که در مراحل اولیه کلیواژ بسیار مضر است. آمونیوم می‌تواند pH داخل سلولی را بالا برده و بر بیان ژن و فعالیت‌های متابولیکی جنین تاثیر بگذارد. گزارش شده است، آمینواسید آلانین به‌عنوان محصول ترانس آمیناسیون پیرووات، می‌تواند منجر به‌جذب آمونیوم شود (۳۸ و ۳۹). بنابراین می‌توان از طریق تعیین سطح آمونیوم تولید شده توسط بلاستوسیست، میزان گردش آمینو اسیدها را به‌صورت غیرمستقیم اندازه‌گیری نمود. لازم به‌ذکر است که کاهش قابل توجه گلوتامین در محیط کشت، در روزهای دوم و سوم بعد از لقاح و هم‌چنین در مرحله ۸ سلولی تا مرحله مورولا منجر به‌ازدست دادن توانایی تشکیل بلاستوسیست می‌شود. از طرفی،

جنین‌های ناموفق تولید آلانین بسیار بیش‌تری نسبت به‌جنین‌های موفق دارند، زیرا آلانین وسیله‌ای برای دفع آمونیاک از طریق آنزیم گلوتامات دهیدروژناز و آلانین ترنس آمیناز می‌باشد (۳۳).

جدول۱: ارتباط متابولیسم آمینواسیدها با چگونگی تکوین جنین

منابع	تغیرات متابولیت اسیدهای آمینه در محیط کشت	مرحله تکوین جنین	نتیجه
(۳۳)	کاهش در جذب گلوتامین،آرژنین و متیونین و کاهش در دفع آسپارژین و آلانین	۳-۲ روز بعد از لقاح	تکوین بلاستوسیست
	کاهش در جذب سرین و کاهش در دفع گلایسین و آلانین	مرحله۸ سلولی	تکوین بلاستوسیست
(۵)	کاهش گلایسین و لوسین- افزایش سطح آسپارژین	روز دوم بعد از لقاح	بارداری و تولد زنده
(۳۶)	افزایش سطح گلوتامات	روز سوم بعد از لقاح	بارداری و تولد زنده

کربوهیدرات‌ها

علاوه‌بر آمینواسیدها، جنین قبل از لانه‌گزینی از کربوهیدرات‌ها نیز به‌عنوان منبع انرژی استفاده می‌کند و میزان مصرف آن‌ها و تولید متابولیت‌ها، از پارامترهای بسیار مهم در رابطه با کیفیت و قدرت بقای جنین می‌باشند (جدول۲). جنین در مراحل اولیه رشد (مرحله ۱ تا ۸ سلولی) از پیرووات و در مرحله بعد از تشکیل مورولا، از گلوکز به‌عنوان منبع اصلی انرژی استفاده می‌کند. در واقع در مراحل قبل و بعد از تشکیل مورولا در جنین یک تغییر متابولیسمی از کربوکسیلیک اسید به‌گلوکز رخ می‌دهد (۲۸). اگرچه گلوکز ماده مغذی و اصلی بلاستوسیست است ولی جنین ظرفیت قابل‌توجهی برای استفاده از پیرووات را نیز دارد (۴۰) و درغیاب گلوکز، بلاستوسیست با افزایش جذب پیرووات تاحدودی می‌تواند این کمبود را جبران کند. به‌این پدیده انعطاف‌پذیری بلاستوسیست گفته می‌شود (۳۴). هرچند، کمبود گلوکز درنهایت می‌تواند منجر به‌کاهش کیفیت و نرخ بقای جنین شود. در محیط کشت جنینی، برخی از کربوهیدرات‌ها مانند پیرووات به‌عنوان آنتی‌اکسیدانت عمل می‌کنند و با کاهش رادیکال‌های آزاد اکسیژنی سبب افزایش کیفیت جنین می شوند (۴۱). براین‌اساس، مصرف پیرووات توسط جنین‌هایی که لانه گزینی موفقی دارند، بسیار کمتر از جنین‌هایی است که در لانه گزینی موفق نبوده‌اند (۴۲). هم‌چنین مطالعات نشان داده‌اند، علاوه‌بر کربوهیدرات‌ها، افزودن مکمل‌هایی مانند زعفران که خاصیت آنتی‌اکسیدانتی دارند، نیز می‌تواند سبب بهبود تکوین جنین‌های موشی گردد (۴۳). در مرحله بلاستوسیست، مهم‌ترین عمل‌کرد برای جنین، تبدیل پیرووات به لاکتات در سلول‌ها است که به‌دلیل بازسازی NAD^+ برای استفاده بعدی در مسیر گلیکولیز بی‌هوازی می‌باشد. مطالعات نشان داده‌اند که افزایش شیب لاکتات در محیط کشت جنین (حدود ۲۳ میلی‌مول) در مرحله کلیواژ منجر به‌افزایش زنده‌مانی آن می‌شود و در مرحله بعد از تشکیل مورولا، غلظت پایین‌تر لاکتات (۵ میلی‌مول) کیفیت و نرخ بقای جنین را افزایش می‌دهد (۴۴).

ارتباط متابولیسم گلوکز با تکوین جنین

گلوکز ماده مغذی اولیه بلاستوسیست می‌باشد، و به‌صورت اکسیداتیو و ازطریق گلیکولیز بی‌هوازی و هم‌چنین ازطریق مسیر پنتوز فسفات متابولیزه می‌شود، و مقدار آن در طی تکوین افزایش می‌یابد (۳۴). بنابراین میزان تکوین جنین‌ها برای رسیدن به بلاستوسیست، توسط میزان گلوکز و اسیدهای آمینه تعیین می‌شود. Menke و همکاران (۴۵) مشاهده کردند که بلاستوسیست موش در محیط کشت ساده (فاقد آمینواسیدها) توانایی اکسیداسیون گلوکز را از دست می‌دهد. در متابولیسم، گلوکز به پیرووات و سپس به لاکتات تبدیل می‌شود، درنتیجه با اندازه‌گیری میزان ترشح لاکتات، می‌توان نتیجه گرفت گلوکز کافی به‌طور مدام متابولیزه می‌شود. در مرحله بلاستوسیست، مصرف اکسیژن جنین افزایش می‌یابد، این افزایش مربوط به‌فعالیت شاتل مالات-آسپارتات (MAS) و تقاضا برای تبدیل NADH به ATP در داخل میتوکندری می‌باشد (۳۴). بلاستوسیست توانایی ایجاد یک ریز محیط با لاکتات بالا و pH پایین را دارا می‌باشد، و از این ویژگی برای تسهیل در روند لانه گزینی استفاده می‌کند. با توجه به مطالعات حاضر، بلاستوسیست‌هایی که سرعت مصرف گلوکز آن‌ها بیش از ۵ میلی‌گرم در ساعت باشد، تکوین بهتری در محیط کشت و بدن مادر دارند. اگر در مرحله بلاستوسیست، فعالیت گلیکولیتیک افزایش یابد کیفیت، میزان تکوین جنین و توانایی آن در لانه گزینی به‌طور قابل توجهی کاهش می‌یابد. در جنین‌های موفق، حتی در حضور اکسیژن کافی، بلاستوسیست تقریبا نیمی از گلوکز مصرفی را به‌لاکتات تبدیل می‌کند. لاکتات به‌راحتی در محیط داخل بلاستوسل آزاد شده و یک ریز محیط در اطراف جنین ایجاد می‌کند. در مطالعه دیگری، گزارش شده است که جنین‌های موفق، جذب گلوکز بیش‌تر و فعالیت گلیکولیتیک کم‌تری را در مرحله بلاستوسیست نسبت به کلیواژ نشان می‌دهند. بعد از مرحله مورولا، متابولیسم و جذب گلوکز یک مارکر مناسب برای سنجش زنده‌مانی جنین می‌باشد. در روز چهارم بعد از لقاح، مصرف گلوکز نسبت به‌جنین‌هایی که به‌مرحله بلاستوسیست رسیده‌اند، دو برابر بیش‌تر است. ازآن‌جایی‌که در مرحله کلیواژ، بیوسنتز و میزان تنفس بسیار پایین می‌باشد، جنین از گلوکز به‌عنوان منبع انرژی استفاده نمی‌کند، ولی در مرحله بعد از تشکیل مورولا، با فعال شدن ژنوم جنینی، میزان فعالیت بیوسنتزی و هم‌چنین ظرفیت تنفسی جنین افزایش یافته و از گلوکز به‌عنوان منبع انرژی استفاده می‌کند.

جدول ۲: تغییرات متابولیسم پیرووات، گلوکز و لاکتات در طی تکوین جنینی

منابع	تغیرات متابولیت کربوهیدرات ها	مرحله تکوین جنین	نتیجه
(۲۷)	افزایش جذب پیرووات	۴ روز بعد از لقاح	تکوین بلاستوسیست
	افزایش جذب گلوکز و پیروات	۵ روز بعد از لقاح	تکوین بلاستوسیست
(۲۷)	افزایش جذب پیرووات و تولید لاکتات	۲روز بعد از لقاح	تکوین بلاستوسیست
	افزایش جذب پیرووات و گلوکز و تولید لاکتات	۵ روز بعد از لقاح	تکوین بلاستوسیست
(۴۲)	کاهش جذب پیروات	۳-۲ روز بعد از لقاح	بارداری
(۲۷)	جذب متوسط پیروات	۲ روز بعد از لقاح	بارداری
(۴۰)	افزایش جذب پیروات و گلوکز	۴ روز بعد از لقاح	تکوین بلاستوسیست
(۳۶)	افزایش جذب پیروات و گلوکز	۳-۲ روز بعد از لقاح	بارداری و تولد زنده

اکسیژن

نوسانات دمایی، محیط گازی و تغییر در سطح CO_2 به‌طور مستقیم برروی pH تاثیر می‌گذارد، که می‌تواند اثر منفی بررشد بلاستوسیست و تعداد بلاستومرها داشته باشد (۴۶). اکسیژن یکی از عمده‌ترین عواملی است که می‌تواند عملکرد جنین را قبل از لانه گزینی کنترل کند و تاثیر بسزایی بر بیان ژن، فعالیت متابولیکی، پروتئوم و انرژی می‌گذارد (۴۷). مصرف اکسیژن در طی تکوین قبل از لانه گزینی تغییر می‌یابد و مسیرهای مناسب برای تولید انرژی را تنظیم می‌کند (۶). مطالعات نشان داده‌اند، رشد و نمو جنین در محیطی که غلظت اکسیژن حدود ۵ تا ۷ درصد می‌باشد در مقایسه با اکسیژن اتمسفری با غلظت ۲۰ درصد، به‌طور قابل توجهی بهتر است (۴۸). اکسیژن اتمسفری به‌عنوان یک استرس، دارای اثرات مضر در طی مرحله‌ی کلیواژ است، که می‌تواند بر بیان ژن در مرحله بلاستوسیست و پروتئوم جنینی اثر بگذارد و منجر به اختلال در متابولیسم جنین (استفاده از آمینواسیدها و کربوهیدرات‌ها) شود (۶). قبل از لانه‌گزینی، پارامترهای فیزیولوژیکی مانند کربوهیدرات‌ها و گردش آمینواسیدها به‌طور مستقیم با توانایی رشد جنین پستانداران در محیط کشت، کیفیت و زنده‌مانی آن‌ها تحت تاثیر غلظت نسبی اکسیژن می‌باشد، و با رشد و زنده‌مانی جنین مرتبط می‌باشد (۴۹). اکسیژن اتمسفری باعث افزایش نسبت جذب به ترشح آمینواسیدها در طول مرحله کلیواژ و بازجذب پیرووات، هم‌چنین کاهش جذب/ترشح آمینواسیدها و بازجذب گلوکز در مرحله بعد از تراکم می‌شود، که قدرت زنده‌مانی جنین را کاهش می‌دهد، هم‌چنین اکسیژن اتمسفری از جذب گلوکز توسط بلاستوسیست جلوگیری می‌کند (۳۵). اکسیژن بر توانایی بلاستوسیست موش در تنظیم آمونیوم تاثیر می‌گذارد. در محیط کشت، اکسیژن در حضور آمونیوم الگوی متابولیسم اسیدهای آمینه را به‌طور چشم‌گیری تغییر می‌دهد و در مرحله ۲ تا ۸ سلولی یک رابطه معکوس بین آن و جذب پیروات توسط جنین به‌وجود می‌آورد و اکسیداسیون پیرووات را در مرحله دو سلولی تحت تاثیر قرار می‌دهد (۵۰). جنین در مرحله کلیواژ نسبت به تغییرات اکسیژن بسیار حساس می‌باشد. داده‌ها نشان می‌دهند، در مرحله کلیواژ زنده‌مانی جنین‌های انسانی با افزایش مصرف اکسیژن همراه می‌باشد که نشان دهنده افزایش میزان تنفس می‌باشد. زمانی‌که در مرحله مورولا و بلاستوسیست، مصرف اکسیژن به ۵ درصد برسد و میزان مصرف گلوکز توسط جنین افزایش یابد، جنین لانه‌گزینی موفقی خواهد داشت. رشد جنین در محیطی که حاوی اکسیژن ۲۰ درصد می‌باشد باعث تاخیر در کلیواژ شده و منجر به‌از دست دادن بقا در مراحل بعدی می‌شود (۵۱). در جنین‌های کشت داده شده در محیطی با اکسیژن ۲۰ درصد، افزایش جذب آمینواسیدهایی مانند، آلانین، آسپارتات، گلوتامین، گلوتامات، گلایسین و سرین مشاهده شده است، درحالی‌که در محیط با اکسیژن ۵ درصد، آسپارتات، گلوتامین و سرین توسط جنین در محیط ترشح می‌شوند، زیرا آسپارتات منجر به‌تنظیم متابولیسم کربوهیدرات‌ها ازطریق شاتل مالات_آسپارتات می‌شود، ولی در اکسیژن با غلظت ۲۰ درصد با افزایش فعالیت این شاتل، میزان مصرف آسپارتات زیاد شده و فعالیت گلیکولیز نیز افزایش می‌یابد. در مرحله بلاستوسیست، جنین‌های موش گلوتامین تولید می‌کنند، در مرحله بعد از تشکیل مورولا، تولید آلانین و گلوتامین توسط جنین، توانایی آن را در دفع یون سمی آمونیوم نشان می‌دهد. در مرحله بعد از تشکیل مورولا، اکسیژن با غلظت ۵ درصد منجر به‌افزایش جذب گلوکز در محیط کشت جنین می‌شود، که نشان‌دهنده بهبود در رشد جنین می‌باشد (۴۹). مطالعات نشان می‌دهند، فعالیت گلیکولیتیک در بلاستوسیست‌های موش که قادر به تولید جنین‌های زنده بودند (در اکسیژن با غلظت ۵ درصد) ۸۸ درصد و آن‌هایی که قادر به‌تولید جنین‌های زنده نبودند (در اکسیژن با غلظت ۲۰ درصد)، ۱۶۰ درصد گزارش شده است (۴۸).

تفاوت متابولومیکس در جنین نر و ماده

علاوه‌بر ارتباط متابولومیکی جنین با کیفیت آن، مطالعات گزارش کرده‌اند، بین جنین‌های ماده و نر نیز تفاوت‌های متابولومیکسی وجود دارد. به‌عنوان مثال، در جنین‌های ماده، مصرف گلوکز و آمینواسیدها نسبت به جنین‌های نر تفاوت وجود دارد،که منعکس‌کننده حضور دو کروموزوم X فعال قبل از لانه‌گزینی در جنین ماده می‌باشد. طبق مطالعات انجام شده، جنین‌های ماده آرژنین، گلوتامات و متیونین بیش‌تری مصرف و گلایسین بیش‌تری تولید می‌کنند. در مقابل جنین‌های نر فنیل آلانین، تایروزین و والین بیش‌تری مصرف می‌کنند (۵۲). هم‌چنین غلظت آنزیم‌های مرتبط با کروموزوم X نیز می‌تواند منجر به ایجاد تفاوت‌هایی در استفاده از مواد مغذی و متابولیسم انرژی شود، مانند آنزیم گلوکز -۶- فسفات دهیدروژناز (G6PD) که مسیر اصلی متابولیسم گلوکز را از طریق مسیر پنتوز فسفات کاتالیز می‌کند (۵۳). هم‌چنین در مرحله کلیواژ، آنزیم هیپوگزانتین_گوانین فسفوریبوزیل ترنسفراز (HGPRT) و فسفوگلیسرات کیناز (PGK) در جنین‌های ماده به‌میزان دو برابر نسبت به‌جنین‌های نر بیان می‌شود. جنین‌های ماده mRNAهای بیش‌تری برای پروتئین آپوپتوزی مهاری مرتبط با X (XIAP) دارند (۵۲). بیان افتراقی ژن‌های مرتبط با کروموزوم X در متابولیسم گلوکز مانند تنظیم کننده آپوپوتوزیس BAX، سوپراکسید دیسموتاز میتوکندریایی (MnSOD) و گلوکز ۶ فسفات دهیدروژناز(G6PD) توسط کروموزوم X رمزگذاری می‌شود که در جنین‌های ماده به‌دلیل حضور دو کروموزوم X مقدار آن دو برابر می‌شود (۵۴). افزایش میزان مصرف گلوکز در روزهای چهارم و پنجم در جنین‌های ماده نسبت به نر دیده شده است، متابولیسم گلوکز منجر به ایجاد رادیکال‌های آزاد اکسیژنی یا ROS (Reactive oxygen species) می‌شود و آنتی‌اکسیدانت‌ها بر افزایش آن‌ها غلبه کرده و به‌همین‌دلیل غلظت آن‌ها در جنین ماده کم‌تر می‌شود (۵۵).

چالش ارزیابی‌های متابولیکی در سنجش کیفیت جنین

علی‌رغم این‌که در حال حاضر بهترین روش برای ارزیابی پروفایل‌های متابولیکی، استفاده از طیف سنجی محیط مصرفی می‌باشد، اما این روش با چالش‌هایی همراه می‌باشد. نصب و استفاده از دستگاه‌های آزمایشگاهی نیاز به‌یک آموزش گسترده دارد و هم‌چنین هزینه‌های هنگفتی برای تعمیر و نگه‌داری سیستم‌ها وجود دارد. از طرفی، زمان زیادی برای جمع‌آوری نمونه‌ها و بارگذاری آن‌ها در دستگاه نیاز است و تفسیر نتایج حاصل می‌تواند برای کلینیک‌های بسیار شلوغ چالش برانگیز باشد. علاوه‌براین، هر الگوریتم تکوین یافته که از یک نتیجه انتخاب می‌شود، تنها مربوط به‌کیفیت جنین می‌باشد و نمی‌تواند اطلاعاتی از نمره‌دهی مورفولوژی بلاستوسیست، لانه‌گزینی، و تولد زنده دهد. بنابراین ازآن‌جایی‌که تعریف یک جنین با کیفیت عالی براساس معیارهای مختلف، متغیر می‌باشد ممکن است نتایج متفاوتی نیز درپی داشته باشد. یک نگرانی دیگر آن است که تکوین یک الگوریتم ممکن است داده جنین‌های با کیفیت را باتوجه به‌دلایلی که به‌زنده ماندن تخمک و جنین مرتبط نمی‌باشد، حذف کند. در نتیجه دامنه تحمل مدل را کاهش داده و دقت آن را نیز کم‌تر کند و به‌دلیل ارائه نادرست الگوریتم‌ها، منجر به‌حذف جنین‌هایی شود که کاملا قادر به‌رشد می‌باشند. بنابراین هم‌چنان این سوال باقی است که چگونه می‌توان این روش را در یک سیستم فشرده قرار داد، بدون این‌که اعتبار، حساسیت و دقت سیستم اصلی از دست برود (۲۸).

نتیجه‌گیری

میزان موفقیت لقاح آزمایشگاهی به توانایی در انتخاب یک جنین واحد با حداکثر پتانسیل رشد برای لانه گزینی بستگی دارد. در حال حاضر بی خطرترین روش، ارزیابی مورفولوژیکی جنین می‌باشد که با وجود سیستم‌های درجه‌بندی جنین، منجر به پیشرفت قابل توجهی در میزان بارداری و کاهش بارداری‌های چندگانه شده است. اما متاسفانه دقت این روش به اندازه

کافی نمی‌باشد و دارای قدرت پیش‌بینی متوسط می‌باشد .از این رو اخیرا محققان روش‌های غیر تهاجمی دیگری مانند ارزیابی متابولیکی جنین را مطرح کرده‌اند که در آن متابولیت‌های متفاوتی مانند پیرووات، لاکتات، گلوکز، آمینواسیدها و اکسیژن مورد ارزیابی قرار می‌گیرند. از آنجایی‌که، میزان غظت نسبی مواد مغذی موجود در محیط به طور مستقیم بر متابولیسم جنین اثر می‌گذارد، علاوه بر این، جنین با متابولیسم خود منجر به تغییراتی در ترکیبات موجود در محیط کشت اطراف خود می‌شود، در نتیجه نمی‌توان محیط کشت را به عنوان یک سیستم ایستا در نظر گرفت (۳۱). بر این اساس، چگونگی استفاده جنین از کربوهیدرات‌ها و اسیدهای آمینه، با توانایی رشد جنین در محیط در ارتباط می‌باشد (۳۲)، امید است در آینده، با کامل کردن روش‌های ارزیابی بتوان با انتخاب جنین با کیفیت، میزان موفقیت بارداری را افزایش و از بارداری چند قلویی جلوگیری کرد.

منابع

1. Milewski R, Ajduk A. Time-lapse imaging of cleavage divisions in embryo quality assessment. Reproduction. 2017;154(2): 37-53.
2. Kupka MS, Ferraretti AP, de Mouzon J, Erb K, et al. Assisted reproductive technology in Europe, 2010: results generated from European registers by ESHRE†. Hum Reprod. 2014;29(10):2099-113.
3. Lee Y, Thouas G, Gardner D. Developmental kinetics of cleavage stage mouse embryos are related to their subsequent carbohydrate and amino acid utilization at the blastocyst stage. Hum. Reprod. 2015;30(3):543-52.
4. Ferrick L, Lee Y, Gardner D. Metabolic activity of human blastocysts correlates with their morphokinetics, morphological grade, KIDScore and artificial intelligence ranking. Hum Reprod. 2020;35(9): 2004-2016.
5. Brison DR, Houghton F, Falconer D, Roberts S, et al. Identification of viable embryos in IVF by non-invasive measurement of amino acid turnover. Hum. Reprod. 2004;19(10):2319-24.
6. Gardner DK, Wale PL. Analysis of metabolism to select viable human embryos for transfer. Fertil. Steril. 2013;99(4):1062-72.
7. Gardner DK, Lane M, Stevens J, Schlenker T, et al. Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer. Fertil. Steril. 2000;73(6):1155-8.
8. Scott L, Finn A, O'leary T, McLellan S, et al. Morphologic parameters of early cleavage-stage embryos that correlate with fetal development and delivery: prospective and applied data for increased pregnancy rates. Hum. Reprod. 2007;22(1):230-40.
9. Paternot G, Devroe J, Debrock S, D'Hooghe TM, et al. Intra-and inter-observer analysis in the morphological assessment of early-stage embryos. Reprod. Biol. Endocrinol. 2009;7(1):1-6.
10. Meseguer M, Herrero J, Tejera A, Hilligsøe KM, et al. The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. Hum. Reprod. 2011;26(10):2658-71.
11. Lemmen JG, Agerholm I, Ziebe S. Kinetic markers of human embryo quality using time-lapse recordings of IVF/ICSI-fertilized oocytes. Reprod Biomed Online. 2008;17(3):385-91.
12. Salumets A, Hydén-Granskog C, Suikkari A-M, Tiitinen A, et al. The predictive value of pronuclear morphology of zygotes in the assessment of human embryo quality. Human Reproduction. 2001;16(10):2177-81.

13. Brezinova J, Oborna I, Svobodova M, Fingerova H. Evaluation of day one embryo quality and IVF outcome–a comparison of two scoring systems. Reproductive Biology and Endocrinology. 2009;7(1):1-6.
14. Nasiri N, Eftekhari-Yazdi P. An overview of the available methods for morphological scoring of pre-implantation embryos in in vitro fertilization. Cell J. 2015;16(4):392.
15. Senn A, Urner F, Chanson A, Primi MP, et al. Morphological scoring of human pronuclear zygotes for prediction of pregnancy outcome. Hum Reprod. 2006;21(1):234-9.
16. Richardson A, Brearley S, Ahitan S, Chamberlain S, et al. A clinically useful simplified blastocyst grading system. Reprod. Biomed. Online .2015;31(4):523-30.
17. Gardner DK, Truong TT. Culture of the Mouse Preimplantation Embryo. Methods Mol Biol. 2019;2006:13-32.
18. Wong CC, Loewke KE, Bossert NL, Behr B, et al. Non-invasive imaging of human embryos before embryonic genome activation predicts development to the blastocyst stage. Nat. Biotechnol. 2010;28(10):1115-21.
19. Depa-Martynow M, Jedrzejczak P, Pawelczyk L. Pronuclear scoring as a predictor of embryo quality in in vitro fertilization program. Folia Histochem Cytobiol. 2007;45(I):85-9.
20. Ziebe S, Lundin K, Loft A, Bergh C, et al. FISH analysis for chromosomes 13, 16, 18, 21, 22, X and Y in all blastomeres of IVF pre-embryos from 144 randomly selected donated human oocytes and impact on pre-embryo morphology. Hum. Reprod. 2003;18(12):2575-81.
21. Sakkas D, Gardner DK. Noninvasive methods to assess embryo quality. Curr. Opin. Obstet. 2005;17(3):283-8.
22. Desai NN, Goldstein J, Rowland DY, Goldfarb JM. Morphological evaluation of human embryos and derivation of an embryo quality scoring system specific for day 3 embryos: a preliminary study. Hum. Reprod .2000;15(10):2190-6.
23. Fisch J D, Rodriguez H, Ross R, Overby G, Sher G .The Graduated Embryo Score (GES) predicts blastocyst formation and pregnancy rate from cleavage-stage embryos. Hum. Reprod. 2001;16(9):1970-5.
24. Abe H, Matsuzaki S, Hoshi H. Ultrastructural differences in bovine morulae classified as high and low qualities by morphological evaluation. Theriogenology. 2002;57(4):1273-83.
25. Steer C, Mills C, Tan S, Campbell S, et al. The cumulative embryo score: a predictive embryo scoring technique to select the optimal number of embryos to transfer in an in-vitro fertilization and embryo transfer programme. Hum. Reprod . 1992;7(1):117-9.
26. Singh R, Sinclair K. Metabolomics: approaches to assessing oocyte and embryo quality. Theriogenology. 2007;68:S56-S62.
27. Botros L, Sakkas D, Seli E. Metabolomics and its application for non-invasive embryo assessment in IVF. Mol. Hum. Reprod. 2008;14(12):679-90.
28. Nel-Themaat L, Nagy ZP. A review of the promises and pitfalls of oocyte and embryo metabolomics. Placenta. 2011;32:S257-S63.
29. Thompson JG, Brown HM, Sutton-McDowall ML. Measuring embryo metabolism to predict embryo quality. Reprod. Fertil. Dev. 2016;28(2):41-50.
30. Gardner DK, Meseguer M, Rubio C, Treff NR. Diagnosis of human preimplantation embryo viability. Hum Reprod Update. 2015;21(6):727-47.
31. Shahverdi AH, Movahedin M, Rezazadeh Valogerdi M, Kazemi Ashtiani S. Evaluation of embryonic development before implantation of NMRI mice in different culture media. Cell J. 2005;4(32):232-7.
32. Shahverdi GH, Hosseini A, Kazemi Ashtiani S. Evaluation of embryonic development of the knee joint of Syrian mice in culture medium. Iran J Vet Med. 1998;1(2):37-41.

33. Houghton FD, Hawkhead JA, Humpherson PG, Hogg JE, et al. Non-invasive amino acid turnover predicts human embryo developmental capacity. Hum. Reprod .2002;17(4):999-1005.
34. Gardner DK, Harvey AJ. Blastocyst metabolism. Reprod Fertil Dev.2015;27(4):638-54.
35. Gardner DK, Meseguer M, Rubio C, Treff NR. Diagnosis of human preimplantation embryo viability. Hum. Reprod .update. 2015;21(6):727-47.
36. Scott R, Seli E, Miller K, Sakkas D, et al. Noninvasive metabolomic profiling of human embryo culture media using Raman spectroscopy predicts embryonic reproductive potential: a prospective blinded pilot study. Fertil. Steril. 2008;90(1):77-83.
37. Humpherson P, Leese H, Sturmey R. Amino acid metabolism of the porcine blastocyst. Theriogenology. 2005;64(8):1852-66.
38. Orsi NM, Leese HJ. Ammonium exposure and pyruvate affect the amino acid metabolism of bovine blastocysts in vitro. Reprod. 2004;127(1):131-40.
39. Lane M, Gardner DK. Ammonium induces aberrant blastocyst differentiation, metabolism, pH regulation, gene expression and subsequently alters fetal development in the mouse. Biol. Reprod. 2003;69(4):1109-17.
40. Gardner DK, Lane M, Stevens J, Schoolcraft WB. Noninvasive assessment of human embryo nutrient consumption as a measure of developmental potential. Fertil. Steril.2001;76(6):1175-80.
41. Gardner DK, Pool TB, Lane M. Embryo nutrition and energy metabolism and its relationship to embryo growth, differentiation, and viability. Semin Reprod Med. 2000;18(2):205-18.
42. Zhao Q, Yin T, Peng J, Zou Y, et al. Noninvasive metabolomic profiling of human embryo culture media using a simple spectroscopy adjunct to morphology for embryo assessment in in vitro fertilization (IVF). Int J Mol Sci. 2013;14(4):6556-70.
43. Tavana S, Eimani H, Azarnia M, Shahverdi A, et al. Effects of saffron (Crocus sativus L.) aqueous extract on in vitro maturation, fertilization and embryo development of mouse oocytes. Cell J. 2012;13(4):259.
44. Gardner DK, Wale PL, Collins R, Lane M. Glucose consumption of single post-compaction human embryos is predictive of embryo sex and live birth outcome. Hum reprod. 2011;26(8):1981-6.
45. Menke TM, Mclaren A. Mouse blastocysts grown in vivo and in vitro: carbon dioxide production and trophoblast outgrowth. Reprod. 1970;23(1):117-27.
46. Zhang JQ, Li XL, Peng Y, Guo X, et al. Reduction in exposure of human embryos outside the incubator enhances embryo quality and blastulation rate. Reprod. Biomed. Online. 2010;20(4):510-5.
47. Wale PL, Gardner DK. Oxygen affects the ability of mouse blastocysts to regulate ammonium. Biol. Reprod. 2013;89(3):1-10.
48. Wale PL, Gardner DK. Oxygen regulates amino acid turnover and carbohydrate uptake during the preimplantation period of mouse embryo development. Biol Reprod. 2012;87(1):24, 1-8.
49. Wale PL, Gardner DK. Oxygen affects the ability of mouse blastocysts to regulate ammonium. Biol Reprod. 2013;89(3):75.
50. Lane M, Gardner DK. Understanding cellular disruptions during early embryo development that perturb viability and fetal development. Reprod Fertil Dev. 2005;17(3):371-8.
51. Wale PL, Gardner DK. Oxygen regulates amino acid turnover and carbohydrate uptake during the preimplantation period of mouse embryo development. Biol. Reprod. 2012;87(1):1-8.

52. Gardner DK, Larman MG, Thouas GA. Sex-related physiology of the preimplantation embryo. Mol Hum Reprod. 2010;16(8):539-47.
53. Nasiri N, Karimian L, Hassani F, Gourabi H, et al. Total Antioxidant Capacity; A Potential Biomarker for Non-Invasive Sex Prediction in Culture Medium of Preimplantation Human Embryos. C J. 2019;21(3):253.
54. Kalisch-Smith J, Simmons D, Pantaleon M, Moritz K. Sex differences in rat placental development: from pre-implantation to late gestation. Biol. Sex Differ. 2017;8(1):1-13.
55. Lane M, McPherson NO, Fullston T, Spillane M, et al. Oxidative stress in mouse sperm impairs embryo development, fetal growth and alters adiposity and glucose regulation in female offspring. PLoS One. 2014;9(7):e100832.

Journal of Cell & Tissue (JCT)
Autumn 2021; 12(3)

Review article

New Findings in Non-invasive Assessment of Embryo Quality

Badri seighaldehi O[1] M.Sc., Mohseni Kouchesfahani H[1] Ph.D., Nasiri N[2] M.Sc., Shahverdi M[2] Ph.D., Hezavehei M[2*] Ph.D., Shahverdi A. H[2]* Ph. D

1. Department of Animal Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran
2. Department of Embryology, Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Reproductive Biomedicine, ACECR, Tehran, Iran

* Email corresponding author: Shahverdi@royaninstitute.org, m_hezavehi@royaninstitute.org

Received: 25 Agu. 2021 Accepted: 2 Nov. 2021

Abstract

Aim: In assisted reproductive techniques, the selection of a good quality embryo is an important goal, which requires access to a standard method. Today, there are several methods for evaluating in vitro embryos. The morphological evaluation is based on the cleavage rate, shape and symmetry of the blastomeres in the day 3 and day 5 of development. Also, in the preimplantation genetic diagnosis (PGD) method, embryos are evaluated for genetic diseases, to finally are selected a suitable embryo for transfer to the mother's uterus. Since it is important to achieve a low-risk, and high-precision method for selecting of good quality embryos. Recently, the evaluation of embryonic metabolism using analyzing of the material absorbed and secreted by embryos in culture medium, as a non-invasive assessment, has been proposed, that can predict the embryo growth and development more accurately along with morphological evaluation. Therefore, in this narrative review study, relationship between embryo metabolism and its quality has been discussed as a new approach.

Keywords: Non-invasive assessment of embryo, Embryo morphology, Embryo metabolism