Journal of Cell and Tissue 14(2), Summer (2023) 141-152

Journal of Cell and Tissue
http://jct.araku.ac.ir

Evaluation of the causes of pre-implantation developmental arrest and ways to overcome it

Karami N[a], Hassani F [a*], Eftekhari-Yazdi P[b*], Taei A[c], Hassani SN [c]

[a] Faculty of New Biotechnology, University of Science and Culture, Tehran, Iran
[b] Department of Embryology, Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Reproductive Biomedicine, ACECR, Tehran, Iran.
[c] Department of Stem Cells and Developmental Biology, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, P.O. Box 19395-4644, Tehran, Iran

Use your device to scan and read the article online

Citation: Karami N, Hassani F, Eftekhari-Yazdi P, Taei A, Hassani SN. Evaluation of the causes of pre-implantation developmental arrest and ways to overcome it. Journal of Cell and Tissue . 2023; 14(2):141-152.

https://10.61186/JCT.14.2.141

KEYWORDS

Arrested Embryo
Embryonic Development
Fertilization in Vitro
Reproductive Techniques

ABSTRACT

Aim: In this review article, we intend to investigate and review the factors that lead to embryonic developmental arrest and explore different strategies to address this phenomenon. We aim to pave the way for further research in this field and enhance the efficiency of the IVF method for infertility treatment.

Introduction: To ensure proper embryonic development, embryos need to progress through their developmental stages unimpeded. Any disruptions in these stages including oocyte factors, sperm factors, and embryonic factors can result in infertility due to pre-implantation developmental arrest. Therefore, it can be very helpful to understand the effective factors behind this phenomenon.

Topic: Among couples attempting to conceive, infertility persists despite their best efforts. Couples are typically considered infertile if they have tried to conceive for twelve months without success and without using protection; but if the woman is over 37 years old, this twelve months will be reduced to six months. Assisted reproductive techniques (ART) encompass various methods that are aimed at aiding these couples in overcoming infertility. This definition includes any manipulation of embryos and eggs for infertility treatment. Assisted reproductive techniques include in vitro maturation (IVM), in vitro fertilization (IVF), and intracytoplasmic sperm injection (ICSI). Among these, IVF/ICSI is particularly effective in treating couples infertility. However, one common challenge in this process is embryonic developmental arrest during the pre-implantation stages, a primary cause of infertility in treatment cycles. Approximately 40 to 50 percent of IVF cycles do not progress to the blastocyst stage and arrest. This arrest characterized by a lack of cell division for at least 24 hours. Most embryonic arrests occur on the second and third day after fertilization, during the two to eight-cell stages. These arrested embryos retain their developmental potential, and their gene expression program related to their arrested stage remains

* Corresponding author. Tel: 021-23562000; Fax: 021-23562000
E-mail address: fatemehhasani99@yahoo.com, eftekhari@royaninstitute.org
DOI: : https://10.61186/JCT.14.2.140
Received: 27 Jun. 2023; Received in revised form: 3 Sep. 2023; Accepted: 5 Sep. 2023
Review Article
© Author

unaffected. Arrested embryos can be classified into three categories: those with impaired activation of the embryonic genome (EGA), those with low levels of glycolysis, and those with variable levels of oxidative phosphorylation. Solutions to overcome embryonic developmental arrest include maternal spindle transfer (MST)/nuclear transfer (NT), optimizing culture media, employing antioxidants, and synthesizing complementary RNA (cRNA)/small interfering RNA (siRNA).

Conclusion: Pre-implantation arrest can result from various factors, either of embryonic, maternal, and paternal origin. Among embryonic factors, disturbances in fields like gene expression, mitochondrial activity, methylation patterns, chromosomal abnormalities, small non-coding RNAs, and embryonic metabolic status have the most significant impact on embryonic arrest induction. Additionally, parental factors, like genetic factors, and infertility etiology can lead to embryonic developmental arrest. External factors, such as laboratory conditions, ART methods, and the role of the physician, also play a role in embryonic developmental arrest. While treatment studies for overcoming embryonic arrest are very limited, they are generally based on animal models, which is why it is necessary to conduct more studies and enter the human phase. A comprehensive understanding of the causes of embryonic arrest and solutions to address them can enhance infertility treatment technologies and improve the effectiveness of the IVF method for infertility treatment.

سلول و بافت، دوره ۱۴، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۲، صفحات ۱۴۱ تا ۱۵۲

سلول و بافت

بررسی علل توقف جنین‌های پیش از لانه‌گزینی و راه‌کارهای غلبه بر آن

نرگس کرامی[۱]، فاطمه حسنی[۱]*، پوپک افتخاری یزدی[۲]*، عادله طائی[۳]، سیده نفیسه حسنی[۳]

[۱]دانشکده علوم و فناوری‌های نوین زیستی، دانشگاه علم و فرهنگ، تهران، ایران

[۲] پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست‌شناسی و علوم پزشکی تولیدمثل جهاد دانشگاهی، مرکز تحقیقات پزشکی تولیدمثل، گروه جنین‌شناسی، تهران، ایران

[۳] پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست‌شناسی و فناوری سلول‌های بنیادی جهاددانشگاهی، مرکز تحقیقات علوم سلولی، گروه سلول‌های بنیادی و زیست‌شناسی تکوینی، تهران، ایران

واژگان کلیدی

جنین متوقف‌شده
تکوین جنینی
لقاح آزمایشگاهی
تکنیک‌های باروری

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۴/۶

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۶/۱۲

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۶/۱۴

چکیده

هدف: در این مطالعه به بررسی عوامل محرک توقف تکوین جنین و راه‌های مقابله با آن در راستای هموار ساختن راه برای تحقیقات در این زمینه و افزایش بازدهی روش IVF، پرداخته می‌شود.

مقدمه: لازمه داشتن یک جنین سالم، طی شدن صحیح مراحل تکوینی آن است. هر گونه اختلال در این مراحل می‌تواند باعث توقف تکوین پیش از لانه‌گزینی و ناباروری شود.

یکی از تکنیک‌های رایج کمک باروری، لقاح آزمایشگاهی (IVF) است که کاربرد فراوانی دارد؛ اما نزدیک به ۵۰ درصد از جنین‌های حاصل به مرحله بلاستوسیست نرسیده و دچار توقف می‌شوند که این توقف با عدم تقسیم سلولی به‌مدت حداقل ۲۴ ساعت مشخص می‌شود. جنین‌های متوقف شده را می‌توان به سه دسته تقسیم کرد: دسته اول، با اختلال در فعال شدن ژنوم جنینی؛ دسته دوم و سوم با سطوح پایین گلیکولیز و سطوح متغیر فسفریلاسیون اکسیداتیو شناخته می‌شوند.

نتیجه‌گیری: توقف تکوین پیش از لانه‌گزینی به دلایل مختلفی ایجاد می‌شود که ممکن است دارای منشا جنینی یا والدینی باشد. ازجمله راه‌کارهای غلبه بر این مشکل می‌توان به انتقال دوک مادری/ انتقال هسته‌ای، بهبود محیط کشت و استفاده از آنتی‌اکسیدانت‌ها، سنتز Small/ complementary RNA (cRNA) interfering RNA (siRNA) اشاره کرد. علاوه بر این، تاثیر عوامل بیرونی ازجمله شرایط آزمایشگاه، روش انجام فرایندهای کمک باروری (ART) و نقش پزشک باید در نظر گرفته شود. شناسایی کامل دلایل ایجاد کننده توقف تکوین جنینی و راه‌کارهای غلبه بر آن‌ها، می‌تواند باعث بهبود فناوری‌های مورد استفاده در درمان و افزایش بازدهی روش IVF شوند.

* نویسنده مسئول؛ تلفن: ۰۲۱-۲۳۵۶۲۰۰۰

آدرس پست الکترونیک: fatemehhasani99@yahoo.com, eftekhari@royaninstitute.org

۱- مقدمه

در میان زوج‌هایی که برای بارداری تلاش می‌کنند، زوج‌هایی هستند که با وجود تلاش‌های فراوان، نابارورند. به زوج‌هایی، نابارور گفته می‌شود که به‌مدت دوازده ماه به‌صورت مستمر و محافظت نشده برای بارداری تلاش کنند و موفق نشوند (۱). به روش‌هایی که برای کمک به درمان ناباروری این زوج‌ها به‌کار می‌رود، تکنیک‌های کمک باروری (ART) می‌گویند. به عبارتی، هرگونه دست‌کاری جنین و تخمک به‌منظور درمان ناباروری، جزو این تعریف محسوب می‌شود (۲).

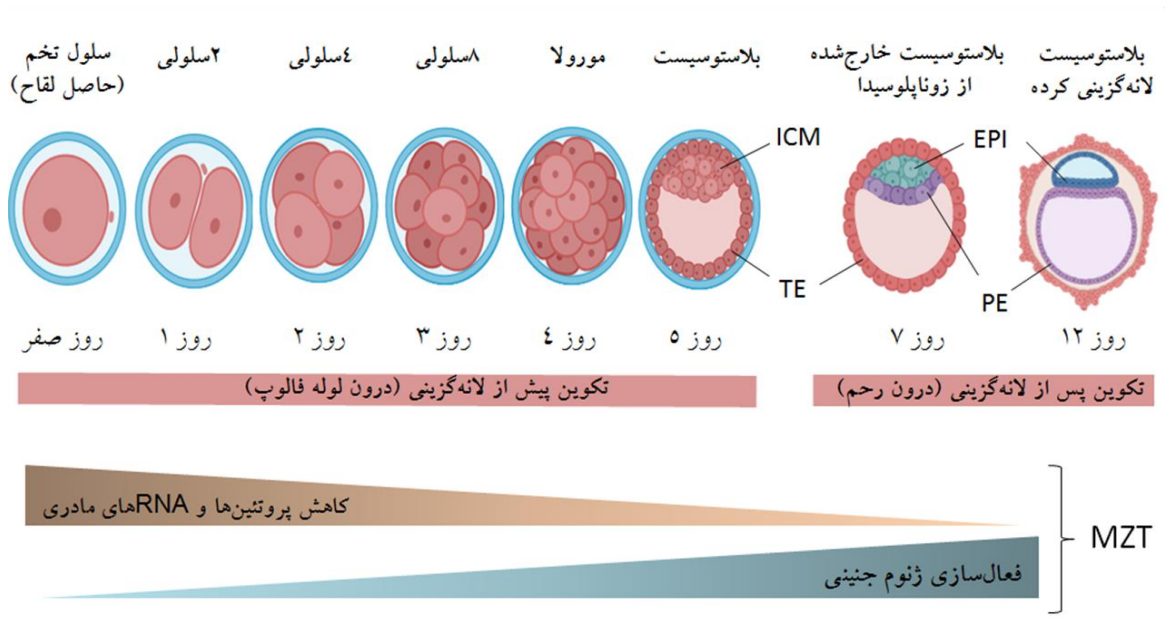
انواع مختلفی از تکنیک‌های کمک باروری از جمله بلوغ آزمایشگاهی (IVM)، لقاح آزمایشگاهی (IVF) و تزریق درون سیتوپلاسمی اسپرم (ICSI) وجود دارند که در میان آن‌ها، IVF/ICSI کاربرد و تاثیر بیشتری در درمان ناباروری دارند. در این روش، تخمدان با داروهای تحریک تخمک‌گذاری، تحریک شده و درنهایت تخمک‌های مناسب به‌روش بی‌هوشی بازیابی خواهند شد. با استفاده از این تخمک‌ها و اسپرم، لقاح آزمایشگاهی انجام و سلول تخم تشکیل می‌شود. سلول تخم پس از طی مراحل تکوینی مختلف، با توجه به وضعیت مادر منتقل می‌شود (۲).

پس از انجام لقاح، سلول تخم، وارد مرحله تسهیم می‌شود. در طول این فرایند، تقسیمات متوالی میتوزی، باعث تقسیم سلول تخم به سلول‌هایی کوچک‌تر و هسته‌دار به‌نام بلاستومر می‌شوند. طی تسهیم، حجم سیتوپلاسم افزایش نمی‌یابد، بلکه سلول‌های موجود به تعداد زیادی از سلول های کوچک‌تر تقسیم می‌شوند (۳). سپس، با فعال شدن ژنوم جنینی (Embryonic Genome Activation [EGA])، جنین تحت تسهیم‌های بعدی قرار گرفته که باعث افزایش تدریجی تعداد سلول‌ها می‌شود (۴).

با شروع تکوین، رونوشت‌های مادری باید به‌تدریج از بین بروند و رونوشت‌های جنینی جایگزین و فعال شوند. به این فرایند MZT (Maternal to Zygote Transition) می‌گویند که شامل دو مرحله است. در مرحله اول، mRNAها و پروتئین‌های مادری از بین می‌روند تا به جنین آسیب نرسانند؛ در مرحله دوم، بیان ژن‌هایی که برای فعال شدن ژنوم جنینی مورد نیاز است، آغاز می‌شود (۵) (شکل ۱).

زمانی‌که جنین به مرحله هشت سلولی (در موش) و هشت تا شانزده سلولی (در انسان) رسید، وارد مرحله مورولا شده و تحت تاثیر فرایند فشردگی قرار می‌گیرد؛ به‌طوری که دیگر مرز بلاستومرها قابل تشخیص نیست. اولین تصمیم سرنوشت سلولی در این مرحله گرفته می‌شود و باعث تمایز برخی از سلول‌ها به تروفواکتودرم و برخی دیگر به توده سلولی داخلی می‌شود (۶). تروفواکتودرم جفت و ساختارهای خارج جنینی و توده سلولی داخلی، سه لایه اصلی جنینی را تشکیل خواهند داد (۷). هم‌زمان با تشکیل مورولا، بلاستومرها موقعیت داخلی یا خارجی پیدا می‌کنند تا به‌ترتیب توده سلولی داخلی و تروفواکتودرم را تشکیل دهند (۸). تقریبا هم‌زمان با فشردگی، فرایند دیگری به‌نام قطبی‌شدگی نیز صورت می‌گیرد که طی این فرایند، بلاستومرها باید تقسیم شوند. هر بلاستومر به‌واسطه وجود مواد مختلف در دو طرف، دارای دو قسمت بالایی و قاعده جانبی است (۹). تقسیم در این مرحله، براساس نحوه قرار گرفتن صفحه تسهیم صورت می‌گیرد که درنهایت سلول‌ها یا موقعیت خارجی (برای تشکیل تروفواکتودرم) یا داخلی (برای تشکیل توده سلولی داخلی) پیدا می‌کنند (۱۰). پس از آن، مورولا همچنان به تقسیمات میتوزی ادامه می‌دهد و درنهایت تبدیل به بلاستوسیست می‌شود (۱۱).

دومین تصمیم سرنوشت سلولی، در مرحله بلاستوسیست نهایی و درون توده سلولی داخلی اتفاق می‌افتد که باعث ایجاد اندودرم اولیه و اپی‌بلاست می‌شود (۱۲). در ادامه بلاستوسیست، لانه‌گزینی خواهد کرد تا باقی مراحل تکوینی طی شده و جنینی کامل شکل بگیرد (شکل۱). در صورت اختلال در هر یک از مراحل فوق، جنین با توقف‌تکوین مواجه خواهد شد. در این مطالعه قصد داریم که به بررسی عوامل محرک توقف تکوین جنین و راه‌های مقابله با آن در راستای هموار ساختن راه برای تحقیقات در این زمینه و افزایش بازدهی روش IVF، بپردازیم.



شکل ۱: مراحل تکوین جنین پس از تخمک‌گذاری، در صورت وجود اسپرم، لقاح صورت گرفته و سلول‌تخم تشکیل خواهد شد. سپس سلول‌تخم وارد مراحل تسهیم می‌شود و درنهایت بلاستوسیست تشکیل شده و آماده لانه‌گزینی می‌شود (طراحی‌شده در سایت Biorender.com).

۲- نتایج

توقف تکوین جنینی

یکی از شایع‌ترین مشکلاتی که در فرایند IVF وجود دارد، توقف تکوین جنین در مراحل پیش از لانه‌گزینی است که از دلایل اصلی ناباروری در سیکل‌های درمان ناباروری به‌شمار می‌رود (۱۳). براساس مطالعات، حدود ۴۰ تا ۵۰ درصد از سیکل‌های IVF به مرحله بلاستوسیست نمی‌رسند و به عبارتی دچار توقف می‌شوند (۱۴). بیشترین توقف، در روز دو و سه پس از لقاح و در مراحل دو تا هشت سلولی اتفاق می‌افتد (۱۵, ۱۶).

براساس مطالعه‌ای که در سال ۲۰۲۱ توسط Yang و همکاران (۱۶) صورت گرفت، جنین‌های متوقف شده را می‌توان به سه دسته تقسیم کرد. این جنین‌ها، پتانسیل تکوینی خود را حفظ کرده و برنامه بیان ژنی مربوط به تکوین‌شان، تحت تاثیر پدیده توقف قرار نمی‌گیرد و ژن‌های مربوط به مرحله‌ای که در آن متوقف شده‌اند را به‌صورت طبیعی بیان می‌کنند. برای مثال جنین‌های متوقف شده نوع یک، شاخص‌های مربوط به مراحل چهار یا هشت سلولی مانند LIN28A، DIS3، REST و SNAPC1 را بیان می‌کنند. همچنین، نوع دو و سه، شاخص‌های مربوط به مراحل مورولا یا حتی بلاستوسیست مانند NANOG، ZFP42، DNMT3L و ESRRB را بیان می‌کنند. از سوی دیگر، برخلاف انتظار، بروز آنیوپلوئیدی در این جنین‌های متوقف شده نسبت به نمونه‌های طبیعی بسیار کم‌تر است.

جنین‌های متوقف شده نوع یک: این جنین‌ها از نظر مرحله تکوینی، نزدیک به مرحله چهار سلولی هستند و در فرایند MZT، دچار شکست می‌شوند. همان‌طور که اشاره شد، MZT، از دو فرایند مولکولی اصلی تشکیل شده است: ۱. موج اصلی فعال شدن ژنوم جنینی؛ ۲. پاک شدن رونوشت‌های مادری.

ژن‌های CNOT6L، PAN2 و BTG4 از جمله ژن‌های مادری هستند که باید از مرحله چهار سلولی تا هشت سلولی بیان‌شان کاهش یابد، اما در جنین‌های متوقف شده نوع یک، همچنان سطح بالایی از آن‌ها مشاهده می‌شود که نشان دهنده وجود نقص در پاک شدن رونوشت‌های مادری است. ژن DUX4، درست پیش از موج اصلی فعال شدن ژنوم سلول تخم (Zygonic Genome Activation [ZGA])، فعال می‌شود و در مرحله چهار سلولی، بیان بیشتری دارد. DUX4 می‌تواند ژن

ZSCAN را القا کند و باعث افزایش بیان میزان آن در مرحله هشت سلولی شود. اما در جنین‌های متوقف شده نوع یک، DUX4، بیان کم‌تری نسبت به چهار سلولی دارد؛ ZSCAN نیز بیان کمتری نسبت به مرحله هشت سلولی دارد که این موضوع، نشان دهنده وجود نقص در ZGA و به‌طور کلی در فرایند MZT است. علاوه بر موارد ذکر شده، بسیاری از تنظیم کننده‌های اپی‌ژنتیکی در این جنین‌ها از تنظیم خارج و بسیاری از آن‌ها مهار می‌شوند (۱۶).

جنین‌های متوقف شده نوع دو و سه: این جنین‌ها برخلاف نوع یک، مشکلی در MZT ندارند و از این مرحله گذر می‌کنند. آن‌ها به‌واسطه از تنظیم خارج شدن فرایندهای گلیکولیز، فسفریلاسیون اکسیداتیو و چرخه‌سلولی وارد یک وضعیت سکون و شبه‌پیری می‌شوند. میزان گلیکولیز در هر دو نوع دو و سه با کاهش مواجه می‌شود، این در حالی است که میزان فسفریلاسیون اکسیداتیو در نوع دو برخلاف نوع سه، بالاست. همچنین کاهش چشم‌گیری در ریبوزوم‌های بزرگ و کوچک و نوکلئوزوم‌ها نیز گزارش شده است که سبب کاهش فعالیت چرخه سلولی می‌شود (۱۶).

ژن CCNA2 که یک سایکلین نوع A است و باعث پیشرفت چرخه سلولی می‌شود، در این جنین‌ها بیان کمتری دارد. از سوی دیگر، مهار کننده‌های چرخه سلولی از جمله CDKN1A (P21)، بیان بیشتری دارند. این جنین‌ها سطح بالایی از فعال شدن P53 را از خود نشان می‌دهند که همین حالت در سلول‌های بنیادی خون‌ساز که وارد وضعیت سکون یا پیری می‌شوند نیز مشاهده شده است. همچنین، میزان بالای mRNA ژن FOX که باعث پیشرفت حالت سکون و پیری می‌شود، در این جنین‌ها گزارش شده است (۱۶).

دلایل ایجاد کننده توقف تکوین جنین پیش از لانه‌گزینی

دلایل متفاوتی ممکن است در تکوین جنین اختلال ایجاد کرده و باعث توقف آن شوند. این دلایل را می‌توان در سطوح مختلف جنینی و والدینی بررسی کرد.

۱. عوامل جنینی:

بیان ژن: جنین‌های متوقف شده در بیان برخی از ژن‌های مسئول رونویسی، ژن‌های دخیل در لقاح همچنین بیان ناکافی ژن‌های دخیل در سنتز پروتئین، یوبی‌کوئیتیناسیون و اتوفاژی، با مشکل روبه‌رو می‌شوند. این جنین‌ها نسبت به نمونه‌های طبیعی با کاهش بیان ژن‌های موثر در ترمیم DNA ازجمله BRCA1، TERF1، ERCC1 و XRCC1 مواجه می‌شوند. بیان ژن ITPR1 که باعث پیشرفت فرایند لقاح نیز می‌شود، در جنین‌های متوقف شده، اختلال دارد (۱۷). از سوی دیگر، میزان BMP15 که باعث کاهش سطح CX43 می‌شود و نقش موثری در پیشرفت رشد و لقاح جنین دارد، در جنین‌های متوقف شده، کاهش چشم‌گیری دارد (۱۸).

فعالیت میتوکندری: یکی از شاخص‌های مهم در پیشرفت تکوین جنین محسوب می‌شود. جنین‌هایی که مراحل تکوینی پیش از لانه‌گزینی را با موفقیت طی کرده‌اند و به بلاستوسیست رسیده‌اند، نسبت DNA میتوکندریایی به DNA ژنومی (mtDNA/gDNA) بالاتری دارند. همچنین این نسبت در جنین‌های روز سوم که به مرحله بلاستوسیست رسیده‌اند، در مقایسه با جنین‌های متوقف شده، بالاتر است (۱۸).

الگوهای متیلاسیون: ازجمله اختلالات گزارش شده دیگر، نقص در بیان ژن‌های دخیل در ایجاد الگوهای متیلاسیون مانند H19 است که در جنین‌های متوقف شده برخلاف جنین‌های طبیعی، سطح نامناسبی از بیان را در هر دو آلل پدری و مادری نشان می‌دهد. همچنین وضعیت متیلاسیون پروموترهای Nanog و Oct4 در جنین‌های متوقف شده، از حالت طبیعی خارج می‌شود. این وضعیت برای پروموتر Nanog، متیلاسیون اندک و برای پروموتر Oct4، متیلاسیون زیادی را نشان می‌دهد (۱۸).

ناهنجاری‌های کروموزومی: یکی از موضوعات مورد بحث در تکوین پیش از لانه‌گزینی، مربوط به اختلالات و ناهنجاری‌های کروموزومی است. برخی مطالعات اشاره به ارتباط بین آنیوپلوئیدی و توقف تکوین دارند (۱۹)، زیرا مشخص شده است که

جنین‌های پیش از لانه‌گزینی با کیفیت ضعیف، ناهنجاری‌های کروموزومی و آنیوپلوئیدی، دارای آسیب DNA بیشتری هستند؛ به همین دلیل، ژن‌های ترمیم‌کننده DNA فعال‌ترند و ژن‌های موثر در تقسیم سلولی در آن‌ها بیان کم‌تری دارند (۲۰). اما برخی دیگر از مطالعات، وجود ارتباط مستقیم بین این دو پدیده را رد کرده‌اند، زیرا در یکی از این مطالعات به رشد جنین‌های پیش از لانه‌گزینی دارای ناهنجاری کروموزومی تا مرحله بلاستوسیست اشاره شده است. اما این جنین‌ها با کاهش سرعت رشد و تکوین، مواجه می‌شوند. همچنین مطالعه‌ای دیگر نشان داده است که میزان آنیوپلوئیدی در جنین‌های متوقف شده نسب به جنین‌های طبیعی، کم‌تر است (۱۶). با این حال، بررسی‌های بیش‌تر در این زمینه با فنون مناسب‌تر، ضروری است.

RNAهای کوچک غیرکدکننده (SncRNA): مشخص شده است که بیان ۱۳ مورد از SncRNA که در فرایند MZT نقش دارند، در جنین‌های متوقف شده و بلاستوسیست‌ها متفاوت هستند (۲۱). همچنین، این SncRNAها، در تنظیم ژن‌های کدکننده تنظیم‌کننده‌های رونویسی، پروتئین‌های داربست و پروتئین‌های ناقل نقش دارند (۱۸).

وضعیت متابولیکی جنین: جنین حین رشد، موادی را به محیط کشت خود، ترشح می‌کند که می‌توانند به‌عنوان نشانگرهایی برای پتانسیل رشد جنین باشند. کاسپاز-۳ که در تمامی مراحل پیش از لانه‌گزینی بیان می‌شود، یکی از موادی است که در این ترشحات مشاهده شده است و نقش موثری در پیشبرد آپوپتوزیس دارد. سطح کاسپاز-۳ در جنین‌های متوقف شده نسبت به بلاستوسیت‌های طبیعی به‌طور معنی‌داری بالاتر گزارش شده است (۲۲) که این امر می‌تواند دلیل مشاهده آپوپتوزیس در جنین‌های متوقف شده را توجیه کند (۱۸).

از دیگر مواد یافت شده در محیط کشت جنین، می‌توان به اینترلوکین-۶ اشاره کرد. اینترلوکین-۶ در مراحل پیش از لانه‌گزینی و در اندومتریوم، بیان می‌شود و نقش مهمی در ایجاد فرایند هچینگ جنین‌ها دارد. جنین‌های متوقف شده نسبت به بلاستوسیست‌های طبیعی، سطوح کمتری از اینترلوکین-۶ را نشان دادند (۱۸).

میزان القا کننده متالوپروتئیناز ماتریکس خارج سلولی (EMMPRIN) که در هچینگ نقش دارد، در محیط کشت جنین‌های متوقف شده نسبت به جنین‌هایی که به مرحله بلاستوسیست می‌رسند، کم‌تر است (۱۸).

میزان متابولیسم جنین در طول تکوین، به‌تدریج افزایش می‌یابد. پیروات و گلوکز ازجمله موادی هستند که جنین برای تامین انرژی موردنیازش، آن‌ها را مصرف کرده و لاکتات تولید می‌کند. جنین‌های متوقف شده نسبت به جنین‌های طبیعی، میزان کمتری از پیروات و گلوکز محیط را مصرف و به‌دنبال آن میزان کم‌تری لاکتات به محیط خود آزاد می‌کنند (۲۳).

پروتئین هسته‌ای P27، عضوی از خانواده Cip/Kip است که توانایی مهار CDK (Cyclin-dependent kinases)ها را دارد. میزان بیان P27 در جنین‌های متوقف شده در مرحله چهار تا هشت سلولی نسبت به جنین‌های طبیعی، تا حدود دو برابر افزایش دارد (۲۴).

اسیدهای‌آمینه نیز در جنین‌های متوقف شده، الگوی دیگری را نسبت به نمونه‌های طبیعی دنبال می‌کنند. میزان اسیدهای‌آمینه گلوتامین، آسپاراژین، والین، آرژنین، لوسین و ایزولوسین در جنین‌های متوقف شده کمتر است. از سوی دیگر، اسیدهای آمینه گلیسین، آسپارتات، گلوتامات و آلانین تنها در این جنین‌های متوقف شده، مشاهده شده است که نمایان‌گر وضعیت بسیار فعال متابولیکی در آن‌هاست. این شواهد از فرضیه جنین آرام که به ارتباط مستقیم آسیب DNA با فعالیت ژن‌های ترمیم کننده DNA (۲۰) و اسیدهای‌آمینه اشاره دارد، حمایت می‌کند و اذعان می‌دارد که احتمال رسیدن جنین‌هایی با وضعیت متابولیکی بسیار فعال نسبت به جنین‌هایی با وضعیت متابولیکی آرام، به مرحله بلاستوسیست بیشتر است (۲۵).

از دیگر مشکلاتی که جنین‌های متوقف شده با آن روبه‌رو هستند، سطوح بالای گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive oxygen species [ROS]) است. تولید ROS می‌تواند توسط منابع مختلفی از جمله متابولیسم خود جنین یا محیط اطراف آن ایجاد

شود و باعث توقف تکوین جنین‌ها شود. یکی از دلایلی که باعث تولید میزان زیادی ROS در جنین‌ها می‌شود، فنون ART است (۱۸). در مقایسه‌ای که بین تولید ROS در روش IVF و ICSI انجام گرفت، تفاوت چندانی مشاهده نشد. تنها در روز یک و سه، سطح ROS در جنین‌های حاصل از IVF به‌طور معنی‌داری بالاتر از جنین‌های حاصل از ICSI بود (۲۶). به طور کلی کنترل سطوح ROS برای جلوگیری از توقف تکوین در شرایط آزمایشگاهی لازم است.

خصوصیات مورفولوژیکی جنین‌ها از مواردی است که به‌واسطه آن می‌توان تا حدودی نسبت به وضعیت تکوینی جنین‌ها پیش‌آگاهی پیدا کرد. به‌عنوان مثال هنگامی که واکوئل در روزهای چهار و پنج جنینی و بخصوص روز چهار مشاهده می‌شود، می‌تواند منجر به توقف تکوین شود (۲۷). تعداد بلاستومرها از جمله خصوصیات مورفولوژیکی مهم در جنین‌ها محسوب می‌شود. جنین‌هایی با کمتر از پنج بلاستومر در روز سه، به‌طور معنی‌داری شانس کمتری در تشکیل مورولا و بلاستوسیست، نسبت به جنین‌های دارای پنج یا بالای پنج بلاستومر دارند. علاوه بر این، قطعه‌قطعه شدن در جنین‌های سه روزه با کمتر از پنج بلاستومر، بیشتر گزارش شده است (۱۸). همچنین میزان کاسپاز-۳ در جنین‌های قطعه‌قطعه شده افزایش می‌یابد که خود می‌تواند در شرایطی باعث القای آپوپتوزیس و توقف تکوین جنین‌ها شود. با این‌حال، این ارتباط مستلزم مطالعات بیشتر است.

۲. عوامل مادری

ژنتیک تخمک: از مهم‌ترین عوامل مادری است که در تکوین جنین نقش مهمی را ایفا می‌کند. ژن PADI، نقشی موثر در تنظیم ساختار کروماتین دارد که دارای انواع مختلفی است و پروتامین را مورد هدف خود قرار می‌دهند. همچنین، PADI6 در EGA موثر است و نقص آن در جنین‌های موشی، باعث توقف در مرحله دو سلولی می‌شود (۱۸). علاوه بر این، جهش در ژن PADI6، باعث توقف تکوین جنین‌ها در مراحل دو تا پنج سلولی می‌شود (۱۳).

جهش در ژن TUBB8، که ایزوتایپ بتا- توبولین است، باعث اختلال در رفتار میکروتوبول‌ها، نقص در بلوغ و ساختار دوک‌میوزی و توقف تکوین در مراحل اولیه جنینی می‌شود (۱۸). این توقف بیشتر در سلول تخم و مرحله ۸ سلولی مشاهده می‌شود (۲۸).

از دیگر ژن‌های مادری، ZAR1 است که در گذار از تخمک به جنین، نقش دارد. موش‌های ماده‌ای که در این ژن اختلال دارند، نابارورند. بیشتر جنین‌های دارای $ZAR1^{-/-}$، به مرحله یک‌سلولی و تنها تعدادی به مرحله دوسلولی می‌رسند و دیگر نمی‌توانند مراحل بعدی تکوین را طی کنند و دچار توقف می‌شوند (۲۹).

فاکتورهای فولیکولی: نرخ رسیدن به بلاستوسیست در جنین‌های حاصل از تخمک‌های فولیکول‌های بزرگ‌تر نسبت به کوچک‌تر، بیشتر است. همچنین ژن PTGS2، در جنین‌های منشا گرفته از فولیکول‌های بزرگ افزایش بیان دارد (۳۰). در بررسی که روی مایع فولیکولی صورت گرفته بود، مشخص شد که میزان بیان IGFII و IGFBP در مایع فولیکولی جنین‌هایی که تا پیش از روز دو متوقف می‌شوند، نسبت به جنین‌های طبیعی کمتر است. همچنین میزان PAPP-A در جنین‌های متوقف شده، بیش‌تر است (۳۱).

ROS موجود در مایع فولیکولی، از عوامل تاثیرگذار بر شایستگی تخمک و درنهایت جنین است. مطالعات از وجود ارتباط میان سطح ROS و کیفیت ضعیف تخمک و شکست لقاح، حکایت دارد که درنهایت باعث توقف تکوین می‌شود (۱۸).

علت شناسی ناباروری: یکی از بیماری‌هایی که منجربه ناباروری زنان می‌شود، آندومتریوزیس است. آندومتریوز یک وضعیت التهابی مزمن است که با گذاشتن تاثیر روی تخمک‌ها، باروری زنان را تحت تاثیر قرار داده و می‌تواند ایجاد ناباروری کند. این بیماری از طریق ایجاد تنش اکسیداتیو و اختلال سیستم ایمنی، بر شایستگی تخمک و جنین، تاثیر می‌گذارد (۱۸).

برخی از زنان دارای ذخیره تخمدانی ضعیف (POF) هستند که معمولا با ناباروری مواجه‌اند. در این بیماران، نزدیک به نیمی از جنین‌ها در مرحله تسهیم، دچار بی‌نظمی می‌شوند که می‌تواند منجر به توقف تکوین آن‌ها شود (۳۲).

سن بالای مادر از دیگر عوامل تاثیرگذار بر شایستگی تخمک است. براساس مطالعات مختلف، با بالا رفتن سن مادر، ناهنجاری‌های کروموزومی جنین نیز بیشتر می‌شود. از سوی دیگر، پذیرش رحم و کیفیت جنین‌ها نیز کاهش می‌یابد (۱۸).

عوامل پدری

قطعه قطعه شدن DNA و تراکم کروماتین: یکی از عوامل تاثیرگذار بر کاهش باروری، قطعه‌قطعه شدن DNA است. جنین‌های حاصل از اسپرم‌های دارای DNA آسیب‌دیده نسبت به DNA سالم‌تر، از کیفیت و نرخ لانه‌گزینی کم‌تری برخوردارند که باعث افزایش میزان توقف تکوین جنین‌ها می‌شود (۳۳). درصورت بالا بودن ناهنجاری در تراکم کروماتین هسته‌ای اسپرم‌ها، میزان توقف‌تکوین و آنیوپلوئیدی در جنین‌های حاصله بالا می‌رود (۱۸).

فاکتورهای ژنتیکی: نقش استروژن در باروری مردان بسیار مهم است، زیرا درصورت اختلال در ژن گیرنده استروژن، با کاهش لقاح در مراحل ابتدایی تکوین مواجه خواهیم شد. پروتئین دیگری به‌نام PAWP که از عوامل فعال کننده تخمک است، علاوه بر تشکیل اسپرم‌های با کیفیت، همبستگی مثبت معنی‌داری را با رشد جنین نشان داده است. این پروتئین که نقشی ضروری در تحریک رشد جنین دارد و می‌تواند نوسانات یون کلسیم را در تخمک‌های پستانداران تحریک کند (۱۸).

علت‌شناسی ناباروری: آزواسپرمی که ممکن است منشاء پاتولوژیک، آناتومیک یا ژنتیکی داشته باشد، یکی از دلایل ناباروری مردان است. حدود ۵۰ درصد از جنین‌های حاصل از افراد آزواسپرم بین مراحل دو تا شش سلولی متوقف شده و به مورولا نمی‌رسند (۳۴). در مطالعه‌ی دیگری، که به مقایسه استفاده از روش TESE برای یافتن اسپرم در مردان دارای آزواسپرمی غیرانسدادی و انسدادی پرداخته شده بود، مشخص شد که جنین‌های حاصل از گروه دارای آزواسپرمی غیرانسدادی در مقایسه با انسدادی، در فرایند فشردگی با اختلال چشم‌گیری (۵۳ درصد درمقابل ۴ درصد) روبه‌رو می‌شوند که منجر به افزایش میزان جنین‌های متوقف شده در گروه غیرانسدادی نسبت به گروه دیگر می‌شود (۳۵).

در مردان مبتلا به آستنواسپرمی، میزان miRNA برای let-7b-5p، افزایش پیدا کرده بود. از سوی دیگر، این افزایش بیان در جنین‌های متوقف‌شده نیز مشاهده شد (۲۱). اما این ارتباطات هنوز مستلزم مطالعات بیشتر است.

علاوه بر سن بالای مادر، سن بالای پدر نیز بر تکوین جنین‌ها تاثیرگذار است چراکه در مردان بالای ۵۰ سال نرخ تشکیل بلاستوسیست با کاهش معنی‌داری را نشان می‌دهد (۳۶).

راه‌کارهای غلبه بر توقف تکوین جنینی:

دلایل توقف تکوین جنین و سازوکارهای درگیر در این توقف که در قسمت قبل بررسی شد، تا حدودی شناخته شده‌اند. اما راه‌کارهای مقابله با این مشکل، چندان شناخته شده نیستند. با این‌حال، در ادامه به برخی از این موارد اشاره خواهد شد.

۱. انتقال دوک مادری/ انتقال هسته‌ای: کیفیت تخمک می‌تواند تاثیر زیادی بر تکوین بگذارد، زیرا کیفیت پایین و ضعیف تخمک می‌تواند تکوین را متوقف کند (۳۷). نقص در سیستم سیتوپلاسمی تخمک از عواملی است که باعث کاهش کیفیت تخمک می‌شود (۳۸). مطالعاتی برای حل این مشکل از فنون انتقال دوک مادری(Maternal Spindle Transfer [MST]) (۳۹) و انتقال هسته‌ای (Nuclear Transfer [NT]) (۴۰) استفاده کرده‌اند. در یکی از این مطالعات، در روش MST، با افزودن دوک میوزی از تخمک‌هایی با قدرت باروری پایین (که معمولاً جنین‌های حاصل از آن‌ها دچار توقف می‌شوند) به سیتوپلاسم تخمک‌هایی با قدرت باروری طبیعی، نرخ تشکیل بلاستوسیت را در این تخمک‌ها تا ۱۰ برابر افزایش دادند. اما عکس این آزمایش، نتیجه‌ای نداشت که نشان از اهمیت سیتوپلاسم در ایجاد پتانسیل تخمک برای حمایت از رشد جنین در شرایط آزمایشگاهی دارد. بنابراین، جایگزینی سیتوپلاسم تخمک‌های شایسته به‌جای سیتوپلاسم تخمک‌هایی با کیفیت پایین می‌تواند از توقف تکوین جلوگیری کند (۳۹).

فرزندان سه والدی نیز تحت شرایط تقریبا مشابه با این روش‌ها به‌دنیا می‌آیند. جهش به ارث رسیده در DNA میتوکندری (mtDNA) از سوی مادر، می‌تواند باعث اختلالات میتوکندری شود. روش انتقال هسته‌ای دوک (Spindle Nuclear Transfer [SNT])، برای اولین بار در سال ۲۰۱۶ منجر به تولد نوزادی سالم شد. مادر این نوزاد به‌دلیل داشتن بیماری میتوکندریایی، دو فرزند قبلی خود را از دست داده بود. در این روش از فردی که دارای میتوکندری سالم است، دوک گرفته شده و به تخمک فردی که دارای mtDNA جهش یافته است، وارد می‌کنند. سپس تخمک دریافت کننده دوک، تحت IVF قرار گرفته و سلول تخم ایجاد می‌شود (۴۱).

مطالعاتی که بر روش انتقال اتولوگ میتوکندری انجام شده، گاهی موفقیت‌آمیز بوده و نتایج مطلوبی را به دنبال داشته است اما گاهی نیز از نظر آماری تفاوت معنی‌داری نداشته‌اند. به‌همین دلیل، این مطالعات هنوز مستلزم بررسی‌های بیشتری هستند (۴۲).

۲. بهبود محیط کشت و استفاده از آنتی‌اکسیدانت‌ها: با افزودن مواد مختلف به محیط کشت‌های موجود می‌توان باعث افزایش کیفیت و شایستگی تخمک و جنین شد. یکی از راه‌کارهای رایج، استفاده از آنتی‌اکسیدانت‌هاست. برای رسیدن به این هدف می‌توان با استفاده از آنتی‌اکسیدانت‌ها یا ترکیب آن‌ها با یکدیگر، کیفیت تخمک را افزایش داد. از جمله این آنتی‌اکسیدانت‌ها می‌توان به ملاتونین اشاره کرد که نتایج امیدوار کننده‌ای به‌دنبال داشته است (۴۳).

در مطالعه‌ای دیگر که فرایند گلیکولیز و فسفریلاسیون اکسیداتیو در جنین‌های متوقف شده دچار اختلال شده بودند، افزودن رزوراترول توانست تا هفت درصد از جنین‌ها را از حالت توقف به مرحله بلاستوسیست برساند. رزوراترول دارای دو خاصیت آنتی‌اکسیدانتی و فعال‌کنندگی SIRT1 است که در این مطالعه از طریق افزایش فعالیت SIRT1 توانست نتایج مطلوبی را ایجاد کند و برخی از اختلالات ایجاد شده در جنین‌های متوقف شده را مرتفع سازد (۱۶).

در تخمک‌های حاصل از افراد دارای سن‌بالا، مکان‌های اتصال اسپرم کاهش می‌یابد که درنهایت، باعث کاهش شایستگی تخمک در لقاح و مراحل بعدی تکوین می‌شود. مطالعه‌ای با استفاده از خاصیت آنتی‌اکسیدانتی رزوراترول، توانست با این کاهش مکان‌های اتصال اسپرم، مقابله کند و کیفیت این تخمک‌ها را بهبود ببخشد. این تخمک‌ها، مورفولوژی، دوک و توزیع میتوکندری مناسبی داشتند و سطح ROS و آپوپتوزیس در آن‌ها کاهش یافته بود (۴۴). به‌طور کلی، با استفاده از آنتی‌اکسیدانت‌های مختلف، می‌توان ROS موجود در سلول را کاهش داد و شرایط تخمک‌های پیر را بهبود بخشید.

از سوی دیگر، با بهبود وضعیت و کارایی میتوکندری می‌توان شایستگی تخمک را بهبود بخشید. کوآنزیم Q10، از موادی است که می‌تواند هم به‌عنوان منبع ROS و هم ماده‌ای که دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانتی است، درنظر گرفته شود که به نقش کلیدی آن در تعادل بین شرایط اکسیداتیو سلول اشاره دارد. این ماده، اثرات آنتی‌اکسیدانتی خود را از طریق از بین بردن مستقیم رادیکال‌های آزاد و افزایش فعالیت آنزیم های آنتی‌اکسیدانتی اعمال می‌کند. در صورت اضافه شدن کوآنزیم Q10 به محیط کشت، تخمک‌های نابالغ، توانایی مقابله با استرس‌اکسیداتیو، بهبود کیفیت میتوکندری و درنهایت تخمک را دارند. البته هنوز گزارشی از تاثیر مثبت این ماده بر نتایج بارداری، منتشر نشده است (۴۵).

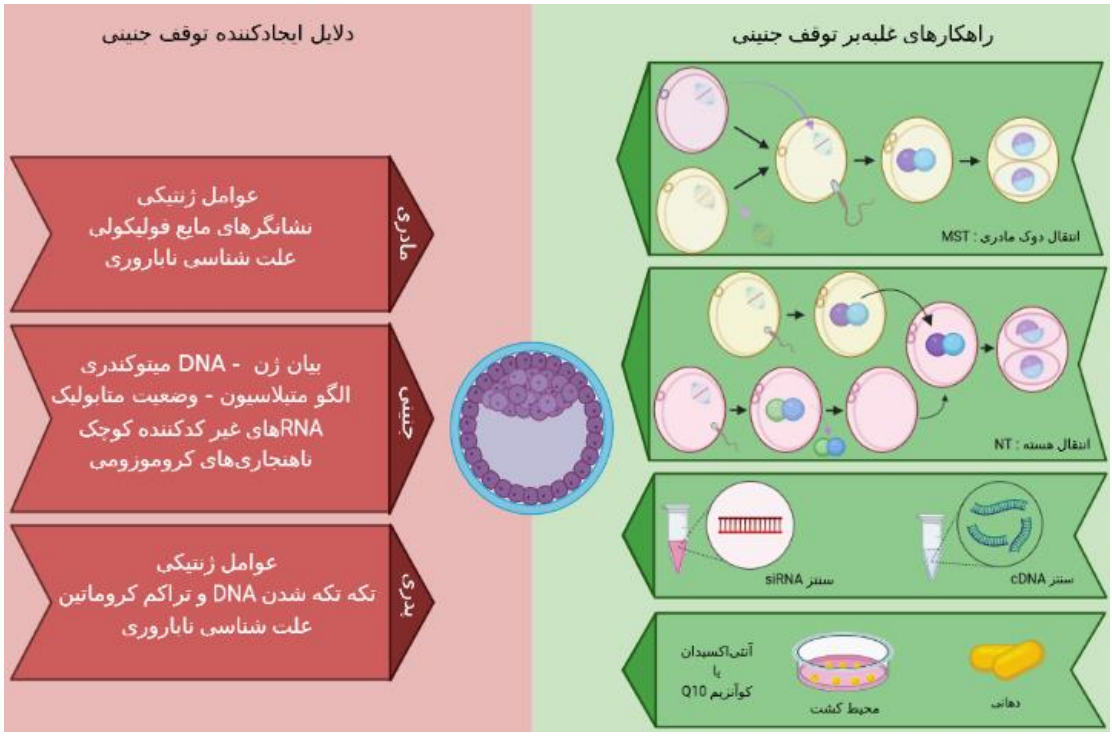
از سوی دیگر، تخمک‌های مسن در مقایسه با تخمک‌های جوان، کوآنزیم Q10 کمتری دارند. در مطالعه‌ای افزودن کوآنزیم Q10 به تخمک‌های موش‌های ۵۲ هفته‌ای باعث افزایش نرخ تخمک‌گذاری و کاهش پتانسیل غشا و تعداد کپی کمتر میتوکندری در مقایسه با گروه کنترل شد. با توجه به نتایج، مطالعه روی تاثیرات این ماده ضروری است (۴۶).

همچنین استفاده از محیط ISM1 در مقایسه با محیط MediCult برای سیکل‌های IVF/ICSI، توانست درصد جنین‌هایی با درجه عالی را افزایش دهد. از سوی دیگر، نرخ وزن و طول تولد نوزادان در گروه ISM1 بیشتر بود (۴۷).

۳. سنتز siRNA/cDNA با سنتز cDNA برای آن دسته از ژن‌هایی است که باعث توقف تکوین می‌شوند، توانستند ادامه تکوین جنین‌ها را مشاهده کنند. به‌عنوان مثال با سنتز cDNA برای ژن‌های KPNA7 و TUBB8 که باعث توقف‌تکوین پیش از لانه‌گزینی می‌شوند، توانستند با این توقف مقابله کنند (۴۸، ۴۹). بنابراین، استفاده از cDNA یا siRNA، به‌ترتیب برای افزایش فعالیت یک ژن لازم برای تکوین یا مهار یک ژن مضر برای تکوین، می‌تواند راهکار درمانی مناسب باشد که هنوز مستلزم مطالعات بیشتری است.

۳- بحث

این مطالعه گزارشی کلی مبنی بر عوامل موثر در توقف تکوین و راه‌های غلبه بر آن می‌باشد (شکل ۲). هدف این مطالعه کمک به جنین‌شناسان در درک بهتر این پدیده و نشان دادن تمرکز تحقیقات آینده بر این موضوع می‌باشد. توقف تکوین به‌دلایل مختلفی ایجاد می‌شود که ممکن است دارای منشا جنینی یا والدینی باشد (شکل ۲). درک محرک‌های توقف‌تکوین ممکن است باعث افزایش نرخ تشکیل بلاستوسیست شود؛ بنابراین، نرخ بارداری و به‌دنبال آن، نرخ تولد زنده نیز افزایش خواهند یافت. هم‌چنین شناسایی عوامل مولکولی موثر در توقف‌تکوین می‌تواند راه را برای یافتن درمان مناسب، هموار سازد. مطالعات درمانی برای غلبه بر توقف، بسیار محدود هستند و به‌طور عموم دارای جنبه حیوانی‌اند؛ بنابراین، نیاز به انجام مطالعات بیشتر و ورود به فاز انسانی بیش از پیش ضروری است. علاوه بر موارد ذکر شده، عوامل بیرونی از جمله شرایط آزمایشگاه، فنون، شرایط انجام فرایندهای ART و نقش پزشک باید در نظر گرفته شوند. شناسایی کامل دلایل ایجاد کننده توقف و راه‌کارهای غلبه بر آن‌ها می‌تواند باعث توسعه فناوری‌های مورد استفاده در درمان و افزایش بازدهی روش IVF شوند.



شکل ۲: عوامل ایجاد کننده توقف (سمت چپ) و راه‌کارهای مقابله با آن (سمت را ست). عوامل تحریک کننده توقف می‌توانند دارای منـ شا جنینی یا والدینی باشند. برای مقابله با این پدیده می‌توان از راه‌کارهای متنوعی از جمله MST، NT، سنتز cDNA و siRNA، بهبود محیط کشت و استفاده از آنتی‌اکسیدانت‌ها بهره برد (طراحی شده در سایت Biorender.com).

۴- تشکر و قدردانی

نگارندگان بر خود لازم می‌دانند که از بخش کتابخانه پژوهشگاه رویان، جهت در اختیار گذاشتن برخی از منابع این مطالعه، تشکر و قدردانی کنند.

۵- منابع

1. Anwar S, Anwar A. Infertility: A review on causes, treatment and management. Womens Health Gynecol. 2016;5:2-5.

2. Jain M, Singh M. Assisted reproductive technology (ART) techniques. StatPearls [Internet]: StatPearls Publishing; 2021.

3. Gilbert SF. An introduction to early developmental processes. Developmental Biology 6th edition: Sinauer Associates; 2000.

4. Li X-H, Li W-J, Ju J-Q, Pan M-H, Xu Y, Sun M-H, et al. CHK2 is essential for spindle assembly and DNA repair during the first cleavage of mouse embryos. Aging (Albany NY). 2020;12(11):10415.

5. Tadros W, Lipshitz HD. The maternal-to-zygotic transition: a play in two acts. Development. 2009;136(18):3033-42.

6. Paonessa M, Borini A, Coticchio G. Genetic causes of preimplantation embryo developmental failure. Molecular Reproduction and Development. 2021;88(5):338-48.

7. Nishioka N, Yamamoto S, Kiyonari H, Sato H, Sawada A, Ota M, et al. Tead4 is required for specification of trophectoderm in pre-implantation mouse embryos. Mechanisms of development. 2008;125(3-4):270-83.

8. Fleming TP. A quantitative analysis of cell allocation to trophectoderm and inner cell mass in the mouse blastocyst. Developmental biology. 1987;119(2):520-31.

9. Suzuki A, Ohno S. The PAR-aPKC system: lessons in polarity. Journal of cell science. 2006;119(6):979-87.

10. Korotkevich E, Niwayama R, Courtois A, Friese S, Berger N, Buchholz F, et al. The apical domain is required and sufficient for the first lineage segregation in the mouse embryo. Developmental cell. 2017;40(3۲۳۵-:(.۴۷e7.

11. Marikawa Y, Alarcón VB. Establishment of trophectoderm and inner cell mass lineages in the mouse embryo. Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research. 2009;76(11):1019-32.

12. Morris SA, Graham SJ, Jedrusik A, Zernicka-Goetz M. The differential response to Fgf signalling in cells internalized at different times influences lineage segregation in preimplantation mouse embryos. Open biology. 2013;3(11):130104.

13. Xu Y, Shi Y, Fu J, Yu M, Feng R, Sang Q, et al. Mutations in PADI6 cause female infertility characterized by early embryonic arrest. The American Journal of Human Genetics. 2016;99(3):744-52.

14. Alikani M, Calderon G, Tomkin G, Garrisi J, Kokot M, Cohen J. Cleavage anomalies in early human embryos and survival after prolonged culture in-vitro. Human reproduction. 2000;15(12):2634-43.

15. Munné S, Grifo J, Cohen J, Weier H. Chromosome abnormalities in human arrested preimplantation embryos: a multiple-probe FISH study. American journal of human genetics. 1994.150:(1)55;4

16. Yang Y, Shi L, Fu X, Ma G, Yang Z, Li Y, et al. Human embryos arrest in a quiescent-like state characterized by metabolic and zygotic genome activation problems. bioRxiv. 2021:2021.12. 19.473390.

17. Yanez LZ, Han J, Behr BB, Pera RAR, Camarillo DB. Human oocyte developmental potential is predicted by mechanical properties within hours after fertilization. Nature communications. 2016;7(1):10809.

18. Sfakianoudis K, Maziotis E, Karantzali E, Kokkini G, Grigoriadis S, Pantou A, et al. Molecular drivers of developmental arrest in the human preimplantation embryo: A systematic review and critical analysis leading to mapping future research. International journal of molecular sciences. 2021;22(15):8353.

19. Santos MA, Teklenburg G, Macklon NS ,Van Opstal D, Schuring-Blom GH, Krijtenburg P-J, et al. The fate of the mosaic embryo: chromosomal constitution and development of Day 4, 5 and 8 human embryos. Human reproduction. 2010;25(8):1916-26.

20. Bazrgar M, Gourabi H, Yazdi PE, Vazirinasab H, Fakhri M, Hassani F, et al. DNA repair signalling pathway genes are overexpressed in poor-quality pre-implantation human embryos with complex aneuploidy. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology. 2014;175:152-6.

21. Timofeeva A ,Drapkina Y, Fedorov I, Chagovets V, Makarova N, Shamina M, et al. Small noncoding RNA signatures for determining the developmental potential of an embryo at the morula stage. International journal of molecular sciences. 2020;21(24):9399.

22. Kaihola H, Yaldir FG, Bohlin T, Samir R, Hreinsson J, Åkerud H. Levels of caspase-3 and histidine-rich glycoprotein in the embryo secretome as biomarkers of good-quality day-2 embryos and high-quality blastocysts. PLoS One. 2019;14(12):e0226419.

23. Gott A, Hardy K, Winston R, Leese H. Non-invasive measurement of pyruvate and glucose uptake and lactate production by sigle human preimplantation embryos. Human reproduction. 1990;5(1):104-8.

24. Civico S, Agell N, Bachs O, Vanrell JA, Balasch J. Increased expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in cleavage-stage human embryos exhibiting developmental arrest. Molecular human reproduction. 2002;8(10):919-22.

25. Leese HJ, Sturmey RG, Baumann CG, McEvoy TG. Embryo viability and metabolism: obeying the quiet rules. Human Reproduction. 2007;22(12):3047-50.

26. Lan K-C, Lin Y-C, Chang Y-C, Lin H-J, Tsai Y-R, Kang H-Y. Limited relationships between reactive oxygen species levels in culture media and zygote and embryo development. Journal of assisted reproduction and genetics. 2019;36:325-34.

27. Ebner T, Moser M, Sommergruber M, Gaiswinkler U, Shebl O, Jesacher K, et al. Occurrence and developmental consequences of vacuoles throughout preimplantation development. Fertility and Sterility. 2005;83(6):1635-40.

28. Sha Q-Q, Zheng W, Wu Y-W, Li S, Guo L, Zhang S, et al. Dynamics and clinical relevance of maternal mRNA clearance during the oocyte-to-embryo transition in humans. Nature communications. 2020;11(1):4917.

29. Wu X, Viveiros MM, Eppig JJ, Bai Y, Fitzpatrick SL, Matzuk MM. Zygote arrest 1 (Zar1) is a novel maternal-effect gene critical for the oocyte-to-embryo transition. Nature genetics. 2003;33(2):187-91.

30. Kahraman S, Çetinkaya CP, Çetinkaya M, Tüfekçi MA, Ekmekçi CG, Montag M. Is there a correlation between follicle size and gene expression in cumulus cells and is gene expression an indicator of embryo development? Reproductive Biology and Endocrinology. 2018;16:1-10.

31. Wang T-H, Chang C-L, Wu H-M, Chiu Y-M, Chen C-K, Wang H-S. Insulin-like growth factor-II (IGF-II), IGF-binding protein-3 (IGFBP-3), and IGFBP-4 in follicular fluid are associated with oocyte maturation and embryo development. Fertility and sterility. 2006;86(5):1392-401.

32. Hojnik N, Vlaisavljević V, Kovačič B. Morphokinetic characteristics and developmental potential of in vitro cultured embryos from natural cycles in patients with poor ovarian response. BioMed Research International. 2016;2016.

33. Simon L, Murphy K, Shamsi M, Liu L, Emery B, Aston K, et al. Paternal influence of sperm DNA integrity on early embryonic development. Human Reproduction. 2014;29(11):2402-12.

34. Virant-Klun I, Tomaževič T, Zorn B, Bačer-Kermavner L, Mivšek J, Meden-Vrtovec H. Blastocyst formation—good indicator of clinical results after ICSI with testicular spermatozoa. Human Reproduction. 2003;18(5):1070-6.

35. Desai N, Gill P, Tadros NN, Goldberg JM, Sabanegh E, Falcone T. Azoospermia and embryo morphokinetics: testicular sperm-derived embryos exhibit delays in early cell cycle events and increased arrest prior to compaction. Journal of Assisted Reproduction and Genetics. 2018;35:1339-48.

36. Frattarelli JL, Miller KA, Miller BT, Elkind-Hirsch K, Scott Jr RT. Male age negatively impacts embryo development and reproductive outcome in donor oocyte assisted reproductive technology cycles. Fertility and sterility. 2008;90(1):97-103.

37. Hardy K, Spanos S, Becker D, Iannelli P, Winston R, Stark J. From cell death to embryo arrest: mathematical models of human preimplantation embryo development. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2001;98(4):1655-60.

38. Hoffmann S, Krl M, Polanski Z. Spindle assembly checkpoint-related meiotic defect in oocytes from LT/Sv mice has cytoplasmic origin and diminishes in older females. Reproduction. 2012;144(3):3.۳۱

39. Costa-Borges N, Spath K, Miguel-Escalada I, Mestres E, Balmaseda R, Serafín A, et al. Maternal spindle transfer overcomes embryo developmental arrest caused by ooplasmic defects in mice. Elife. 2020;9:e48591.

40. Tang M, Popovic M, Stamatiadis P ,Van der Jeught M, Van Coster R, Deforce D, et al. Germline nuclear transfer in mice may rescue poor embryo development associated with advanced maternal age and early embryo arrest. Human Reproduction. 2020;35(7):1562-77.

41. González Santos SP, Stephens N, Dimond R. Narrating the first “three-parent baby”: The initial press reactions from the United Kingdom, the United States, and Mexico. Science Communication. 2018;40(4):419-41.

42. Tilly JL, Woods DC. The obligate need for accuracy in reporting preclinical studies relevant to clinical trials: autologous germline mitochondrial supplementation for assisted human reproduction as a case study. Therapeutic Advances in Reproductive Health. 2020;14:2633494120917350.

43. Rodríguez-Varela C, Herraiz S, Labarta E. Mitochondrial enrichment in infertile patients: a review of different mitochondrial replacement therapies. Therapeutic advances in reproductive health. 2021;15:26334941211023544.

44. Sun Y-L, Tang S-B, Shen W, Yin S, Sun Q-Y. Roles of resveratrol in improving the quality of postovulatory aging oocytes in vitro. Cells. 2019;8(10):1132.

45. Rodríguez-Varela C, Labarta E. Does coenzyme Q10 supplementation improve human oocyte quality? International Journal of Molecular Sciences. 2021;22(17):9541.

46. Bentov Y, Casper RF. The aging oocyte—can mitochondrial function be improved? Fertility and sterility. 2013;99(1):18-22.

47. Hassani F, Eftekhari-Yazdi P, Karimian L, Valojerdi MR, Movaghar B, Fazel M, et al. The effects of ISM1 medium on embryo quality and outcomes of IVF/ICSI cycles. International journal of fertility & sterility. 2013;7(2):108.

48. Wang W, Miyamoto Y, Chen B, Shi J, Diao F, Zheng W, et al. Karyopherin α deficiency contributes to human preimplantation embryo arrest. The Journal of Clinical Investigation. 2023;133(2).

49. Jia Y, Li K, Zheng C, Tang Y, Bai D, Yin J, et al. Identification and rescue of a novel TUBB8 mutation that causes the first mitotic division defects and infertility. Journal of Assisted Reproduction and Genetics. 2020;37:2 713-22.