

Nový pohľad na hodnotenie kvality embryí z kultivačného média

Zuzana Badovská^{1,2}, Silvia Toporcerová^{2,3,4}, Miroslava Popelková⁴, Marek Kl'oc^{2,5}, Dana Glovová⁴, Dominika Remešová⁴, Katarína Balasičová⁴, Miroslava Rabajdová^{1,5}

¹Ústav lekárskej a klinickej biochémie, Lekárska fakulta, UPJŠ Košice

²Medirex, a. s., Pezinok

³Gynekologicko-pôrodnická klinika, Lekárska fakulta UPJŠ Košice

⁴GynCare, a. s., Košice

⁵SAFTRA-BioMAI, UPJŠ Košice

Biomarkery vylučované embryami v kultivačnom médiu majú potenciál na hodnotenie kvality embryí a potenciálu implantácie pri oplodnení *in vitro*. Kvalita kultivačných médií je kritickým faktorom v reprodukčnej medicíne, ktorý ovplyvňuje úspešnosť IVF procesu. Ideálne biomarkery by mali byť neinvazívne, stabilné, špecifické pre embryá a ľahko detegovateľné. Kultivačné médium blastocysty (SBM) ponúka neinvazívny, dostupný materiál na analýzu. Štúdie skúmajú SBM prostredníctvom proteomiky a metabolomiky, pričom identifikujú proteíny a metabolity ako potenciálne markery kvality embryí.

Kľúčové slová: biomarkery, kvalita embrya, *in vitro* fertilizácia, kultivačné médium embrya

A New Perspective on Assessing Embryo Quality from Spent Blastocyst Media

Biomarkers secreted by embryos in the culture medium can assess embryo quality and implantation potential in *in vitro* fertilization. The quality of culture media is a critical factor in reproductive medicine that affects the success of the IVF process. Ideal biomarkers should be non-invasive, stable, embryo-specific and easily detectable. Blastocyst culture medium (SBM) offers a non-invasive, readily available material for analysis. Studies are investigating SBM through proteomics and metabolomics, identifying proteins and metabolites as potential markers of embryo quality.

Keywords: biomarkers, embryo quality, *in vitro* fertilization, spent blastocyst media

NewsLab, 2023; roč. 14 (2): 127-130

Embryo vylučuje do extracelulárneho prostredia niektoré látky (tzv. sekretóm), ktoré by mohli mať vlastnosti potenciálnych biomarkerov. Extracelulárnym prostredím pre včasné embryo v rámci jeho kultivácie v procese *in vitro* fertilizácie je kultivačné médium. Na kvalitu kultivačných médií sa v reprodukčnej medicíne kladú veľmi vysoké nároky, optimálne kultivačné médium je jedným z najdôležitejších faktorov ovplyvňujúcich kvalitu a úspešnosť liečby neplodnosti. Ideálny embryonálny biomarker by mal byť neinvazívny, stabilný, špecifický k embryu a ľahko detegovateľný. Navyše odber kultivačného média blastocysty (SBM, spent blastocyst medium), v ktorom sa predimplantačné embryo vyvíja, predstavuje neinvazívny spôsob a je ľahko zberateľným biologickým materiálom⁽¹⁾.

Proteomika SBM

Proteomika predstavuje štúdium proteínov translatovaných zo špecifických génových produktov. Proteóm zahŕňa všetky translatované proteíny v bunke v určitom čase a za istých podmienok, zatiaľ čo sekretóm embrya zahŕňa proteíny sekretované počas embryonálneho vývoja. Analýzy kultivačného média embryí odhalili sekreciu niektorých proteínov, konkrétne receptor 1 faktora nekrotizujúceho tumor (TNFR-1), interleukínu-6 (IL-6), vaskulárneho endotelového rastového faktora (VEGFA), induktora metaloproteinázy ex-

tracelulárneho matrixu (EMMPRIN), placentárneho rastového faktora (PLGF), adhéznej molekuly epitelových buniek (EpCAM) a kaspázy 3, ako aj spotrebu niekoľkých proteínov embryom, a to C-X-C motív chemokínového ligandu 13 (CXCL13), faktora kmeňových buniek (SCF), makrofágového zápalového proteínu 1 β (MIP-1 β) a proteínu α stimulujúceho makrofágy (MSP- α)⁽²⁾. Jedným z proteínov vyskytujúcich sa v kultivačnom médiu je sérový albumín, ktorý však môže brániť analýze iných proteínov s podobnou molekulovou hmotnosťou (60 – 70 kDa) vyskytujúcich sa v médiu⁽³⁾.

Potenciálne biomarkery v sekretóme embrya

Rozdielne proteínové profily v sekretóme kultivačného média embrya predpokladali rozdiely v kvalite blastocysty. Ľudský leukocytový antigén (HLA-G) pozitívne koreluje s implantáciou embrya a výsledkom tehotenstva. HLA-G ako jeden z potenciálnych študovaných biomarkerov má dôležitú úlohu pri imunologickej tolerancii medzi matkou a plodom. Je exprimovaný bunkami extravilózneho trofoblastu a má úlohu pri sekrecii cytokínov v rámci invázie buniek trofoblastu v procese implantácie⁽⁴⁾. Napriek tomu HLA-G nie je využívaným biomarkerom v klinickej praxi.

Autori Cortezzi a kol.⁽⁵⁾ identifikovali niekoľko proteínov prítomných v sekretóme embrya, z ktorých 15 predstavovalo pozitívne prediktory pre tehotenstvo a 10 asociovalo s ne-

Tabuľka 1. Typy RNA produkované bunkami a ich hlavné funkcie⁽¹⁵⁾

Typ RNA	Názov RNA	Funkcia
Housekeeping ncRNA		
rRNA	ribozómová	tvorba základnej štruktúry ribozómov a katalýza syntézy proteínov
tRNA	transferová	dôležitá úloha pri proteosyntéze ako adaptéry medzi mRNA a aminokyselinami
snRNA	malá jadrová	úloha pri rôznych jadrových procesoch vrátane splicingu prekurzorovej mRNA
snoRNA	malá jadriková	pomáha pri spracovaní a chemickej modifikácii rRNA
Regulačné ncRNA		
miRNA	mikro	regulácia génovej expzieie zablokovaním translácie špecifických mRNA a následná degradácia
siRNA	malá interferujúca	zablokovanie génovej expzieie priamou degradáciou špecifickej mRNA a zachovanie kompaktnosti chromatinovej štruktúry
piRNA	piwi-interagujúca	väzba na piwi proteíny a ochrana zárodočnej línie pred transponovateľnými prvkami
lncRNA	dlhá nekódujúca	tzv. lešenie, regulácia množstva bunkových procesov vrátane inaktívácie chromozómu X
circRNA	cirkulujúca	inhibícia aktivity miRNA

gatívnym výsledkom tehotenstva. Najviac reprezentatívnym proteínom s pozitívnym výsledkom tehotenstva bol Jumonji proteín (JARID2), ktorý je súčasťou komplexu histónovej metyltransferázy podieľajúcej sa na regulácii génov pre embryonálny vývoj. Čoraz viac pozornosti sa upriamilo na úlohu apolipoproteínu A1 (ApoA1) v skorom embryonálnom vývoji. Jeho zvýšená koncentrácia bola prítomná v SBM 4-5-dňových embryí, ktoré boli charakterizované vyšším morfológickým stupňom vývoja. V ďalšej štúdií bola expresia ApoA1 zvýšená v sekretóme 2-3-dňového embrya, avšak znížená v médiu v súvislosti s úspešným tehotenstvom⁽⁶⁾. Predpokladalo sa, že rôzne izoformy hCG vyskytujúce sa v sekretóme embrya, by mohli predpovedať úspešnosť embryonálneho transferu alebo aj abnormálne embryá. Koncentrácia HCG v SBM pozitívne koreluje so statusom skorého embryonálneho vývoja aj s implantačným potenciálom⁽⁷⁾. Embryo vyvíjajúce sa do štádia blastocysty je charakteristické zvýšenou hladinou expzieie EMMPRIN, stimulujúceho fibroblasty na syntetizovanie MMP, v porovnaní s embryami, ktoré sa nevyvinuli. Hladina kaspázy-3 bola nižšia pri blastocystách vyššej kvality. Zvýšená hladina expzieie VEGF-A, IL-6 a EMMPRIN korelovali s kratším časom tvorby moruly⁽⁸⁾.

Metabolomika SBM

Koncentrácie všetkých metabolitov v kultivačnom médiu embryí skúma metabolomika. Metabolity, ktoré sa menia v dôsledku metabolických a environmentálnych zmien, predstavujú výborný indikátor bunkovej aktivity a taktiež môžu predstavovať potenciálne biomarkery pre výber viabilného embrya s najvyššou úspešnosťou pre transfer⁽⁹⁾. Zistené koncentrácie niektorých metabolitov (2-metylglutarát, 3-aminoizobutyrate, 3-hydroxyizovalerát, acetát, acetoacetát, alanín, citrát, formiát, glutamát, glycin, laktát, tryptofan) v kultivačnom médiu embrya preukázali výrazne rozdiely medzi embryami, ktoré boli úspešne implantované, a tými, ktoré neboli. V ďalšej štúdií bola pozorovaná významne zvýšená spotreba pyruvátu a laktátu v SBM blastocyst, ktoré neboli schopné adherovať. Takisto bol u nich pozorovaný nižší pomer pyruvátu/alanínu⁽¹⁰⁾.

Embryo vyvíjajúce sa v kultivačnom médiu využíva pre svoj rast niektoré aminokyseliny prítomné v médiu a niektoré aminokyseliny do média vylučuje. Tento obrat aminokyselín bol považovaný za vhodnú metódu pri výbere embrya pre trans-

fer. Vysokokvalitné embryá v štádiu blastocysty spotrebovali väčšie množstvo leucínu a produkovali väčšie množstvo alanínu v porovnaní s embryami nízkej kvality. Obrat troch aminokyselín (asparagínu, glycinu a leucínu) významne koreloval s klinickým tehotenstvom⁽¹¹⁾. „Fingerprint“ aminokyselín z kultivačného média embrya môže slúžiť na určenie jeho implantačného potenciálu. V ďalšej štúdií⁽¹²⁾ boli v kultivačnom médiu 3-dňového embrya prítomné aminokyseliny serín, histidín, kyselina asparagová a alanín, ktoré preukazovali významné rozdiely v koncentrácii medzi skupinami s pozitívnym a negatívnym výsledkom tehotenstva. Metabolické profilovanie kultivačných médií odhalilo vyššiu spotrebu prolínu, treonínu, lyzínu, metionínu, tyrozínu a fenylalanínu embryami s nižším vývojovým potenciálom. V SBM s výsledným úspešným tehotenstvom bol pozorovaný významne nižší podiel pyruvátu a treonínu v porovnaní s kontrolným médiom bez kultivácie embrya⁽¹³⁾. Profilovanie metabolomu kultivačného média embrya vyžaduje citlivé nástroje na detekciu malých zmien, ale nezaručuje predikciu implantačného potenciálu embrya^(10,14).

Transkriptomika SBM – malé nekódujúce RNA

RNA molekuly okrem toho, že sú nosičmi genetickej informácie potrebnej na špecifikáciu poradia aminokyselín počas proteosyntézy (mRNA), zohrávajú v bunkách mnoho úloh (**tabuľka 1**). RNA bez kódujúceho potenciálu, teda nekódujúce RNA (ncRNA) molekuly, sú finálne produkty ostatných génov. Na rozdiel od kódujúcich RNA nekódujú proteíny, čo však neznamená, že nemajú svoju funkciu v bunkách. Tieto RNA hrajú dôležitú úlohu pri regulácii génovej expzieie, ako aj ochrane genómu pred vírusmi a transponovateľnými prvkami. Po prvýkrát boli ncRNA objavené v roku 1869⁽¹⁵⁾.

Malé nekódujúce RNA (sncRNA) vrátane miRNA, siRNA a piRNA regulujú génovú expresiu prostredníctvom párovania s cieľovými RNA molekulami a môžu spôsobiť inhibíciu translácie alebo degradáciu RNA, ako aj tvorbu heterochromatínu na DNA, čo ovplyvňuje transkripciu⁽¹⁵⁾. Za posledné roky pribudli štúdie opisujúce dôležitú úlohu sncRNA vrátane mikroRNA (miRNA), malých interferujúcich RNA (siRNA) a piwi-interagujúcich RNA (piRNA) v reprodukčnom systéme. Pochopením ich funkcie v rámci gametogenézy a embryogenézy by mohlo pomôcť pri možných príčinách neúspešnej implantácie v IVF procese⁽¹⁴⁾.

MiRNA z kultivačného média ako biomarker kompetencie embryí

MiRNA je evolučne konzervovaná rodina malých nekódujúcich RNA a je dôležitá pri regulácii množstva biologických procesov, akými sú proliferácia, diferenciácia, angiogenéza, migrácia, apoptóza a karcinogenéza. Ich dôležitou úlohou je tzv. gene silencing, utišovanie génov priamym naviazaním na špecifické molekuly mRNA, čím umožnia ich degradáciu, resp. utlmenie translácie. MikroRNA, ktoré sa spájajú s procesmi diferenciácie blastocysty, sú špecifické produkty embrya, pričom najväčším zdrojom miRNA v SBM sú práve bunky TE⁽¹⁶⁾. Kultivačné médium, kde sa embryo vyvíja, predstavuje ľahko dostupný biologický materiál. MiRNA profil z kultivačného média by mohol predstavovať prediktívny biomarker klinického výstupu pri IVF cykloch⁽¹⁾. Zygota aj maturovaný oocyt majú podobný miRNA profil, čo znamená, že miRNA zygoty sú matersky zdedené. Hneď po prvom delení embrya (2-bunkové štádium) je až 60 % materských miRNA transkriptov downregulovaných. Úloha materských miRNA vo vývoji embrya ešte síce nebola preukázaná, je zrejme, že zohrávajú svoju úlohu pri vývoji úspešného embrya alebo aj určovania pohlavia⁽¹⁷⁾.

Ideálny embryonálny biomarker by mal mať nasledovné charakteristiky: neinvazivnosť, stabilita v priebehu času, špecifita k embryu a ľahká detekcia určenia kompetentného embrya⁽¹⁾. Pri poruchách reprodukcie, keď sú v bunkách niektoré dráhy deregulované, dochádza k zmene expresie miRNA, ktoré tieto dráhy regulujú. Už McCallie a kol.⁽¹⁸⁾ poukázali na netypický miRNA profil z blastocýst od neplodných žien. Práve preto by mohol zmenený miRNA profil obsahovať vlastnosti charakteristické pre molekulový biomarker nekompetentného embrya.

Viac ako 2 500 miRNA molekúl sa zúčastňuje na väčšine biologických procesov vrátane regulačných dráh v skorom embryonálnom vývoji, z toho 130 miRNA je exprimovaných v ľudských blastocýstách⁽¹⁹⁾. Autori Capalbo a kol.⁽¹⁾ po prvýkrát využili potenciál kvantifikácie miRNA v ľahko dostupnom biologickom materiáli, t. j. v kultivačnom médiu blastocysty (SBM – spent blastocyst medium) a vyzdvihli potenciál miRNA ako biomarkera pre štúdium selekcie embryí. Charakterizovali dve miRNA so zvýšenou expresiou (96 %) pri implantovaných blastocýstách, miR-20a a miR-30c.

LITERATÚRA

1. Capalbo A, Ubaldi FM, Cimadomo D, et al. MicroRNAs in spent blastocyst culture medium are derived from trophectoderm cells and can be explored for human embryo reproductive competence assessment. *Fertil Steril.* 2016; 105(1): 225-235.e1-3. doi: 10.1016/j.fertnstert.2015.09.014
2. Bori L, Dominguez F, Fernandez EI, et al. An artificial intelligence model based on the proteomic profile of euploid embryos and blastocyst morphology: a preliminary study. *Reproductive BioMedicine Online.* 2021; 42(2): 340-350. doi: 10.1016/j.rbmo.2020.09.031
3. Rødgaard T, Heegaard PMH, Callesen H. Non-invasive assessment of in-vitro embryo quality to improve transfer success. *Reprod Biomed Online.* 2015; 31(5): 585-592. doi: 10.1016/j.rbmo.2015.08.003
4. Zhuang B, Shang J, Yao Y. HLA-G: An Important Mediator of Maternal-Fetal Immune-Tolerance. *Front Immunol.* 2021; 12: 744324. doi: 10.3389/fimmu.2021.744324

piRNA z kultivačného média ako biomarker kompetencie embryí

Piwi-interagujúce RNA (piRNA) sa zaraďujú medzi sncRNA molekuly eukaryotických organizmov, špecificky sa vyskytujúce v zárodočnej línii, blokujúce pohyb transponovateľných elementov. Úlohou piRNA je regulácia génovej expresie degradáciou mRNA alebo génovým utlmením. PiRNA interagujú s proteínom PIWI a zohrávajú úlohu pri fyziologických procesoch – spermatogenéza, vývoj folikulov a embryonálny vývoj, ale aj pri patofyziologických procesoch – angiogenéza, apoptóza, zápal, proliferácia a diferenciácia⁽¹⁵⁾.

Autori štúdie Timofeeva a kol.⁽²⁰⁾ skúmali piRNA a miRNA molekuly v súvislosti s morfológickým statusom embrya a jeho implantačným potenciálom. Zistili rozdiely v expresii piRNA (piR-16735, piR-17716, piR-19675, piR-20326, piR-20401) a miRNA (let-7 b-5p, let-7i-5p) v závislosti od kvality embrya. Ďalej identifikovali vysoko exprimované sncRNA (piR-11291, piR-1311, piR-15026, piR-15462, piR-16735, piR-19122, piR-19675, piR-20381, piR-4880) v kultivačnom médiu vo fáze moruly, ktoré ovplyvňujú expresiu génov patriacich do rôznych funkčných kategórií.

Záver

Na záver možno konštatovať, že vylučovanie látok embryami do extracelulárneho prostredia, predstavuje perspektívny zdroj potenciálnych biomarkerov. Kultivačné médium používané v rámci *in vitro* fertilizačného procesu zohráva kľúčovú úlohu v oblasti reprodukčnej medicíny a vyžaduje vysoké štandardy kvality. Ideálny embryonálny biomarker by mal byť neinvazívny, stabilný, špecifický pre embryá a ľahko identifikovateľný. Využitie kultivačného média blastocysty (SBM) poskytuje neinvazívny a dostupný materiál na analýzu. Štúdie, ktoré sa zaoberajú proteomikou, metabolomikou a transkriptomikou, identifikovali proteíny, metabolity a malé nekódujúce RNA v SBM ako potenciálne ukazovatele kvality embryí.

Podakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: Podpora výskumno-vývojových kapacít zameraných na digitálnu transformáciu klinických a laboratórnych postupov pri poskytovaní zdravotnej starostlivosti, kód ITMS: 313011BW3, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

5. Cortezzi SS, Garcia JS, Ferreira CR, et al. Secretome of the preimplantation human embryo by bottom-up label-free proteomics. *Anal Bioanal Chem.* 2011; 401(4): 1331-1339. doi: 10.1007/s00216-011-5202-1
6. Deutsch DR, Fröhlich T, Otte KA, et al. Stage-specific proteome signatures in early bovine embryo development. *J Proteome Res.* 2014; 13(10): 4363-4376. doi: 10.1021/pr500550t
7. Parvanov D, Nikolova D, Ganeva R, et al. Unbalanced human embryos secrete more hyperglycosylated human chorionic gonadotropin (hCG-H) than balanced ones. *J Assist Reprod Genet.* 2020; 37(6): 1341-1348. doi: 10.1007/s10815-020-01776-9
8. Lindgren KE, Gülen Yaldir F, Hreinsson J, et al. Differences in secretome in culture media when comparing blastocysts and arrested embryos using multiplex proximity assay. *Ups J Med Sci.* 2018; 123(3): 143-152. doi: 10.1080/03009734.2018.1490830

9. Leary C, Sturmey RG. Metabolic profile of in vitro derived human embryos is not affected by the mode of fertilization. *Molecular Human Reproduction*. 2020; 26(4): 277-287. doi: 10.1093/molehr/gaaa015
10. D'Souza F, Uppangala S, Asampille G, et al. Spent embryo culture medium metabolites are related to the in vitro attachment ability of blastocysts. *Sci Rep*. 2018; 8(1): 17025. doi: 10.1038/s41598-018-35342-2
11. Gardner DK, Wale PL. Analysis of metabolism to select viable human embryos for transfer. *Fertility and Sterility*. 2013; 99(4): 1062-1072. doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.12.004
12. Huo P, Zhu Y, Liang C, et al. Non-invasive Amino Acid Profiling of Embryo Culture Medium Using HPLC Correlates With Embryo Implantation Potential in Women Undergoing in vitro Fertilization. *Front Physiol*. 2020; 11: 405. doi: 10.3389/fphys.2020.00405
13. Cheredath A, Uppangala S, C. S A, et al. Combining Machine Learning with Metabolomic and Embryologic Data Improves Embryo Implantation Prediction. *Reprod Sci*. 2022; 30(3): 984-994. doi: 10.1007/s43032-022-01071-1
14. Timofeeva AV, Chagovets VV, Drapkina YS, et al. Cell-Free, Embryo-Specific sncRNA as a Molecular Biological Bridge between Patient Fertility and IVF Efficiency. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019; 20(12): 2912. doi: 10.3390/ijms20122912
15. Loganathan T, Doss C GP. Non-coding RNAs in human health and disease: potential function as biomarkers and therapeutic targets. *Funct Integr Genomics*. 2023; 23(1): 33. doi: 10.1007/s10142-022-00947-4
16. Cimadomo D, Rienzi L, Gianciani A, et al. Definition and validation of a custom protocol to detect miRNAs in the spent media after blastocyst culture: searching for biomarkers of implantation. *Hum Reprod*. 2019; 34(9): 1746-1761. doi: 10.1093/humrep/dez119
17. Gross N, Kropp J, Khatib H. MicroRNA Signaling in Embryo Development. *Biology (Basel)*. 2017; 6(3): 34. doi: 10.3390/biology6030034
18. McCallie B, Schoolcraft WB, Katz-Jaffe MG. Aberration of blastocyst microRNA expression is associated with human infertility. *Fertil Steril*. 2010; 93(7): 2374-2382. doi: 10.1016/j.fertnstert.2009.01.069
19. Borges Jr. E, Setti AS, Braga DPAF, et al. miR-142-3p as a biomarker of blastocyst implantation failure – A pilot study. *JBRA Assist Reprod*. 2016; 20(4): 200-205. doi: 10.5935/1518-0557.20160039
20. Timofeeva A, Drapkina Y, Fedorov I, 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. doi: 10.3390/ijms21249399

RNDr. Zuzana Badovská, PhD.

Ústav lekárskej a klinickej biochémie, LF UPJŠ

Trieda SNP 1, 040 11 Košice

e-mail:zuzana.badovska@upjs.sk