

# Embrionális tápoldat DNS tartalmának mikroszatellita

## elemzése: lehetőségek és nehézségek

Rideg Orsolya<sup>1,2,3</sup>, Fekete Csaba<sup>2,4</sup>, Tóth Zsuzsanna<sup>2,4</sup>, Bihari Zoltán<sup>5</sup>,  
Nagy Gergely<sup>6</sup>, Várnagy Ákos<sup>2,3,7</sup>, Bódis József<sup>2,3,7</sup>, Kovács L. Gábor<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Pécsi Tudományegyetem, Laboratóriumi Medicina Intézet

<sup>2</sup>Pécsi Tudományegyetem, Szentágothai János Kutató Központ

<sup>3</sup>MTA-PTE Humán Reprodukciós Kutatócsoport

<sup>4</sup>Pécsi Tudományegyetem, Általános és Környezeti Mikrobiológiai Tanszék

<sup>5</sup>Bay Zoltán Alkalmazott kutatásiközhasznú Nonprofit Kft; Medicinális Informatikai Osztály

<sup>6</sup>Pécsi Tudományegyetem, Igazságügyi Orvostani Intézet

<sup>7</sup>Pécsi Tudományegyetem Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika

### Összefoglalás

A fejlődő világ országaiban mind a meddő párok, mind az asszisztált reprodukciós kezelésre jelentkezők száma folyamatos emelkedést mutat, a kezelés eredményessége azonban még a 30-34 éves korcsoportban sem haladja meg a 30%-ot. A korábban alkalmazott, és jelentős perinatális komplikációt eredményező többes embriótranszfer helyett, ma a leginkább életképes embrió szelekciója a cél. Ennek algoritmusá kizárólag, morfológia mutatók elemzésén alapul, amelynek hatékonysága vitatható. Ismert, hogy a preembrió életközegét adó tápoldat, korai embriogenezis során felszabaduló szabad DNS-t tartalmaz, amelynek analízise kivételesen értékes információt adhat az embrió viabilitásáról. Munkánk során az in vitro fertilizációs protokollnak megfelelően érett oocytákat fertilizáltunk; majd a preembriókat egyenként inkubáltuk. A vizsgálatba vont 50 preembrió morfológiai jellemzőik alapján az ICSI-t követő 3. nap vagy 5. nap transzferáltuk. Az embriók inkubációs oldatából szabad DNS-t extraháltunk, amelynek mennyiségét UV/VIS spektroszkópiával és mikrofluid alapú metodikával határoztuk meg. A szabad DNS genetikai profilját mikroszatellita analízis, multiplex PCR alapú eljárással vizsgáltuk; a DNS degradáltságának mértékét a DNS fragmentációs indexszel fejeztük ki. Eredményeink alapján statisztikailag szignifikáns, lineáris kapcsolatot tudtunk kimutatni az embrió inkubációs ideje (3-5 nap) és a tápoldat szabad DNS tartalma között. Mindazonáltal a szabad DNS mennyisége nem korrelált sem az embrió fragmentáltságának mértékével, sem a belső sejtréteg vastagsággal, sem a trofektodermával. Eredményeink igazolták, hogy a DNS degradáció csökkentheti a mennyiségi analízis pontosságát és egyben rávilágítottak a standardizált metodikák fontosságára. Az embrionális tápoldat DNS tartalmának vizsgálata nagy lehetőségeket rejt a non-invazív preimplantációs genetikai diagnosztika területén. Reményeink szerint eredményeink hozzájárulhatnak standardizált, non-invazív molekuláris algoritmusok kidolgozásához; növelve a legéletképesebb embrió szelekciójának valószínűségét.

**Kulcsszavak:** non-invazív eljárás, sejtmentes szabad DNS, mikroszatellita elemzés, DNS fragmentációs index, ART - ICSI

# **Microsatellite analysis of the DNS-content of embryonal medium: opportunities and challenges**

## **Summary**

In the developing countries both infertility and the number of patient applying for assisted reproductive procedures are increasing, however, the success rate - even at an age of 30-34 years-, is only around 30%. Since transferring of multiple embryos increases the risk for adverse perinatal outcomes, improving reliability of implantation-competent embryos is increasingly emphasized in clinical practice. Currently, selection of embryos for transfer is largely based on morphological evaluation, however, visual assessment of embryo quality remains problematic. In our study, after oocyte insemination preembrios were cultured individually and then morphologically scored. The concentration of cell - free total DNA in the culture media was determined by UV/Vis spectrophotometry and microfluidic technology. Samples were assessed for DNA fragmentation using PCR-based short tandem repeat profiling and the extent of DNA degradation was expressed in terms of DNA fragmentation index. Statistically significant linear relationship was found between days of incubation (day 3 and day 5 after ICSI) and amounts of DNA recovered from the spent embryo culture media. However, neither the DNA concentration, nor the degree of embryo fragmentation, nor the grade of trophoctoderm and the inner cell mass of the blastocyst showed satisfactory correlations. Our data raise the possibility that fragmentation of DNA affects the accuracy of the DNA quantitation. Non-invasive profiling of human embryo culture media is a relatively new and promising area of preimplantation genetics. Our data emphasize the belief that introduction of DNA fragmentation assays to the non-invasive methodology of assisted reproductive technology can assist to improve current embryo selection methods.

**Keywords:** non-invasive method, cell-free total DNA, STR profiling, DNA fragmentation index, ART - ICSI

## **Irodalom:**

1. Macaldowie, A., Y. A. Wang, et al. "Assisted reproductive technology in Australia and New Zealand 2010." Assisted reproduction technology series. **2012**; 16.
2. Cummins JM, Breen TM, Harrison KL, et al. A formula for scoring human embryo growth rates in in vitro fertilization: its value in predicting pregnancy and in comparison with visual estimates of embryo quality. *Journal of In Vitro Fertilization and Embryo Transfer* **1986**; 3:284–295.
3. Steer CV, Mills CL, Tan SL, 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. *Human Reproduction* **1992**; 7:117–119.
4. Dennis SJ, Thomas MA, Williams DB, et al. Embryo morphology score on day 3 is predictive of implantation and live birth rates. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* **2006**; 23:171–175.
5. Vernon M, Stern JE, Ball GD, et al. Utility of the national embryo morphology data collection by the Society for Assisted Reproductive Technologies (SART): correlation between day-3 morphology grade and live-birth outcome. *Fertility and Sterility* **2011**; 95:2761–2763.
6. Baxter Bendus AE, Mayer JF, Shipley SK, et al. Interobserver and intraobserver variation in day 3 embryo grading. *Fertility and Sterility* 2006; 86:1608–1615.
7. Brezinova J, Oborna I, Svobodova M, et al. Evaluation of day one embryo quality and IVF outcome – a comparison of two scoring systems. *Reproductive Biology and Endocrinology* **2009**; 3:7–9.
8. Racowsky C, Vernon M, Mayer J, et al. Standardization of grading embryo morphology. *Fertility and Sterility* **2010**; 94:1152–1153.
9. Balaban B, Brison D, Calderón G, et al. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Human Reproduction* **2011**; 26:1270–1283.
10. Machtinger R, Racowsky C. Morphological systems of human embryo assessment and clinical evidence. *Reproductive BioMedicine Online* **2013**; 26:210–221.
11. Nicoli A, Palomba S, Capodanno F, et al. Pronuclear morphology evaluation for fresh in vitro fertilization (IVF) and intracytoplasmic sperm injection (ICSI) cycles: a systematic review. *Journal of Ovarian Research* **2013**; 6:64.
12. Brown R, Harper J. The clinical benefit and safety of current and future assisted reproductive technology. *Reproductive BioMedicine Online* **2012**; 25:108–117.
13. Palmer SS, Barnhart KT. Biomarkers in reproductive medicine: the promise, and can it be fulfilled? *Fertility and Sterility* **2013**; 99:954–962.
14. Botros L, Sakkas D, Seli E. Metabolomics and its application for non-invasive embryo assessment in IVF. *Molecular Human Reproduction* **2008**; 14: 679–690.
15. Nagy ZP, Sakkas D, Behr B. Symposium: innovative techniques in human embryo viability assessment. Non-invasive assessment of embryo viability by metabolomic profiling of culture media ('metabolomics'). *Reproductive Biomedicine Online*. **2008**; 17:502–507.
16. Sturmey RG, Brison DR, Leese HJ. Symposium: innovative techniques in human embryo viability assessment. Assessing embryo viability by measurement of amino acid turnover. *Reproductive Biomedicine Online* **2008**; 17:486–496.
17. Seli E, Robert C, Sirard MA. OMICS in assisted reproduction: possibilities and pitfalls. *Molecular Human Reproduction* **2010**; 16:513–530.

18. Stigliani S, Anserini P, Venturini PL, Scaruffi P. Mitochondrial DNA content in embryo culture medium is significantly associated with human embryo fragmentation. *Human Reproduction* **2013**; 28:2652–2660.
19. Chiu RW, Akolekar R, Zheng YW, et al. Non-invasive prenatal assessment of trisomy 21 by multiplexed maternal plasma DNA sequencing: large scale validity study. *British Medical Journal* **2011**; 342: c7401.
20. Palomaki GE, Kloza EM, Lambert-Messerlian GM, et al. DNA sequencing of maternal plasma to detect Down syndrome: an international clinical validation study. *Genetics in Medicine* **2011**; 13:913–920.
21. Bustamante-Aragonés A, Rodríguez de Alba M, Perlado S, et al. Non-invasive prenatal diagnosis of single-gene disorders from maternal blood. *Gene* **2012**; 504:144–149.
22. Fan HC, Gu W, Wang J, et al. Non-invasive prenatal measurement of the fetal genome. *Nature* **2012**; 487:320–324.
23. Fairbrother G, Johnson S, Musci TJ, et al. Clinical experience of noninvasive prenatal testing with cell-free DNA for fetal trisomies 21, 18, and 13, in a general screening population. *Prenatal Diagnosis* **2013**; 33:580–583.
24. Wright CF, Wei Y, Higgins JP, et al. Non-invasive prenatal diagnostic test accuracy for fetal sex using cell-free DNA a review and meta-analysis. *BMC Research Notes* **2012**; 5:476.
25. Finning K, Martin P, Summers J, et al. Effect of high throughput RHD typing of fetal DNA in maternal plasma on use of anti-RhD immunoglobulin in RhD negative pregnant women: prospective feasibility study. *British Medical Journal* **2008**; 336:816–818.
26. Bódis J, Várnagy A, Sulyok E, Kovács GL, Martens-Lobenhoffer J, Bode-Böger SM. Negative association of L-arginine methylation products with oocyte numbers. *Human Reproduction* **2010**; 25:3095–3100.
27. Sakkas D. and Gardner DK. Noninvasive methods to assess embryo quality. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology* **2005**; 17:283–288.
28. Ajduk A, Zernicka-Goetz M. Quality control of embryo development. *Molecular Aspects of Medicine* **2013**; 34:903–918.
29. Zhao Q, Yin T, Peng J, 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). *International Journal of Molecular Sciences* **2013**; 14:6556–6570.
30. Lonergan P, Fair T, Corcoran D, et al. Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. *Theriogenology* **2006**; 65:137–152.
31. Vajta G, Rienzi L, Cobo A, et al. Embryo culture: can we perform better than nature? *Reproductive Biomedicine Online* **2010**; 20:453–469.
32. Devonshire AS, Whale AS, Gutteridge A, et al. Towards standardisation of cell-free DNA measurement in plasma: controls for extraction efficiency, fragment size bias and quantification. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2014**, Epub ahead of print: DOI 10.1007/s00216-014-7835-3.
33. Jorgez CJ, Dang DD, Simpson JL, et al. Quantity versus quality: Optimal methods for cell-free DNA isolation from plasma of pregnant women. *Genetics in Medicine* **2006**; 8:615–619.
34. Sedlackova T, Repiska G, Celec P, et al. Fragmentation of DNA affects the accuracy of the DNA quantitation by the commonly used methods. *Biological Procedures Online* **2013**; 15:5