



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

*ΜΕΤΡΗΣΗ ΕΛΕΥΘΕΡΟΥ DNA ΣΤΟ ΩΘΟΥΛΑΚΙΚΟ ΥΓΡΟ ΓΥΝΑΙΚΩΝ ΠΟΥ ΥΠΟΒΑΛΛΟΝΤΑΙ
ΣΕ IVF/ICSI ΚΑΙ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΤΗ ΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΤΗΝ ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΤΩΝ
ΕΜΒΡΥΩΝ*

ΔΗΜΟΠΟΥΛΟΥ ΜΑΡΙΑ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ



ΛΑΡΙΣΑ
Σεπτέμβριος 2013

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟΣ ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΙΩΑΝΝΗΣ Ε. ΜΕΣΣΗΝΗΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπων: ΑΝΥΦΑΝΤΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ, ΚΛΙΝΙΚΟΣ ΕΜΒΡΥΟΛΟΓΟΣ

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΙΩΑΝΝΗΣ Ε. ΜΕΣΣΗΝΗΣ

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΒΑΜΒΑΚΟΠΟΥΛΟΣ



ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Πριν την παρουσίαση της διπλωματικής μου εργασίας, η οποία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιολογίας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, και στη μονάδα υποβοηθούμενης αναπαραγωγής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω θερμά όσους με βοήθησαν, με συμβούλευσαν και μου συμπαραστάθηκαν όλο αυτό το διάστημα.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κ. Ανυφαντή Γεώργιο, κλινικό εμβρυολόγο της Μ.Υ.Α. του Νοσοκομείου Λάρισας, για την επιστημονική καθοδήγηση και την πολύτιμη βοήθειά του.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στον καθηγητή μου, κ. Ιωάννη Ε. Μεσσήνη, επιστημονικό υπεύθυνο και μέλος της συμβουλευτικής επιτροπής του μεταπτυχιακού προγράμματος, για την καθοδήγησή του καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου. Ευχαριστώ, τον καθηγητή κ. Νικόλαο Βαμβακόπουλο, για την επιστημονική του καθοδήγηση και την φιλοξενία στο εργαστήριό του, στο τμήμα της Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Ευχαριστώ, τα μέλη του εργαστηρίου Βιολογίας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, κ. Σπύρο Κουρή και κ. Μαρία Σάτρα για τη βοήθεια και τη συνεργασία που έδειξαν, μέσα σε ένα ευχάριστο και φιλικό περιβάλλον, καθώς επίσης και την κ. Τάση Τζαβέλα.

Τέλος, θα ήταν παράλειψή μου να μην απευθύνω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένειά μου, για τη συμβολή και τη στήριξή της, σε αυτή μου την προσπάθεια, καθώς και στους φίλους μου.

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	5
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	6
1. Ωοθυλάκιο	6
2. Ωοθυλακιογένεση.....	7
3. Απόπτωση.....	9
4. Ανάγκη για προγνωστικούς δείκτες	10
5. Ωοθυλακικό υγρό	11
6. Ελεύθερο DNA (Cell Free DNA)	13
6.1. Γενικά	13
6.2. Ελεύθερο DNA και καρκίνος.....	14
6.3. Ελεύθερο DNA και εξωσωματική γονιμοποίηση (IVF)	15
ΣΚΟΠΟΣ	18
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	19
1. Βιολογικό υλικό.....	19
2. Υλικά (χημικές ουσίες και αντιδραστήρια).....	19
3. Απομόνωση των δειγμάτων ωοθυλακικού υγρού.....	19
4. Πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε.....	20
5 Real Time PCR	20
5.1. Αρχή μεθόδου	20
5.2. RT PCR ανάλυση.....	22
6. Ηλεκτροφόρηση	24
6.1. Αρχή μεθόδου.....	24
6.2. Ηλεκτροφόρηση προϊόντος PCR σε πήκτωμα αγαρόζης.....	25
7. Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων	26
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	27
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	30
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	32

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

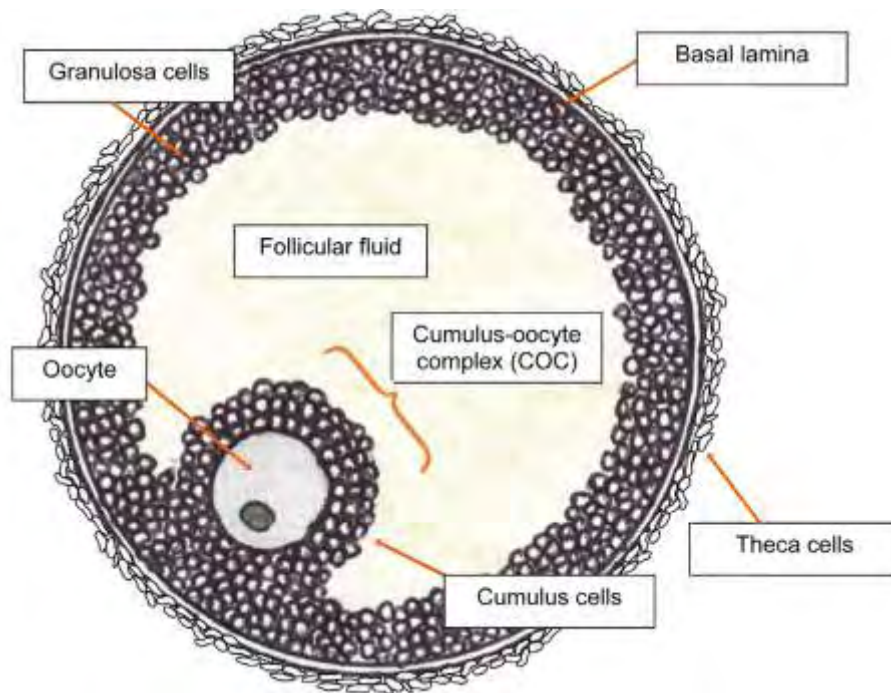
Το ωοθυλακικό υγρό παρουσιάζει πρόσφορο έδαφος έρευνας καθώς παρέχει το μικροπεριβάλλον, που καθίσταται απαραίτητο για την ανάπτυξη των ωαρίων και επομένως, μερικά βιοχημικά χαρακτηριστικά του ίσως παίζουν καθοριστικό ρόλο στην ποιότητα του ωαρίου αλλά και στο δυναμικό του για επιτυχία γονιμοποίησης και εμβρυικής ανάπτυξης. Το ελεύθερο DNA από την άλλη πλευρά, που είναι τμήματα DNA, τα οποία απελευθερώνονται από τον πυρήνα εξαιτίας αποπτωτικών ή νεκρωτικών διαδικασιών, έχει βρεθεί στο πλάσμα ασθενών και υγιών πληθυσμών, όμως, σε υψηλά επίπεδα, κυρίως στις παθολογικές καταστάσεις. Εφόσον τα υψηλά επίπεδα αποπτωτικών κοκκωδών κυττάρων, (άρα και η πιθανή απελευθέρωση εξ' αυτών ελεύθερου DNA) έχουν συσχετιστεί με χαμηλής ποιότητας ωάρια και μειωμένες αναπτυξιακές δυνατότητες θεωρήθηκε σκόπιμο να ελεγχθεί η έκφραση του ελεύθερου DNA στο ωοθυλακικό υγρό γυναικών που υποβάλλονται σε εξωσωματική γονιμοποίηση. Επίσης, στόχο της παρούσας ερευνητικής προσπάθειας αποτέλεσε η διερεύνηση πιθανής κλινικής αξίας των επιπέδων του, σε σχέση με την ποιότητα των εμβρύων και την έκβαση της κύησης. 84 δείγματα ωοθυλακικού υγρού απομονώθηκαν από γυναίκες που υποβλήθηκαν σε θεραπεία IVF, φυγοκεντρήθηκαν, υπέστησαν αραίωση και βρασμό, και προκειμένου να αξιολογηθούν τα επίπεδα έκφρασης του ελεύθερου DNA πραγματοποιήθηκε PCR πραγματικού χρόνου, RT-PCR. Από τα αποτελέσματα των πειραμάτων της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας, έγινε φανερό πως όταν το ωοθυλακικό υγρό περιέχει υψηλά επίπεδα ελεύθερου DNA ο αριθμός των ωαρίων, που συλλέγονται κατά την ωοληψία ήταν μικρός και κακής ποιότητας. Όσον αφορά τα ποσοστά θετικού τεστ κύσεως (Positive hCG) και κλινικής κύησης ήταν παρόμοια και στις 2 ομάδες.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Ωοθυλάκιο

Υπάρχουν διάφορες μορφές ωοθυλακίων. Η αρχική μορφή από την οποία προκύπτουν οι υπόλοιπες είναι το *αρχέγονο ωοθυλάκιο* που αποτελείται από το ωοκύτταρο, το οποίο και περιβάλλεται από ένα στοίχο επίπεδων κυττάρων. Το *πρωτογενές ωοθυλάκιο* περιέχει μια στοιβάδα κυβοειδών κοκκιωδών κυττάρων που περιβάλλουν το ωάριο. Τα σημαντικότερα γεγονότα που συμβαίνουν στο πρωτογενές ωοθυλάκιο είναι η έκφραση του υποδοχέα της FSH και η ανάπτυξη και διαφοροποίηση του ωαρίου. Το ωάριο μεγαλώνει σε διάμετρο (μέχρι 120 μm) και αναπτύσσει τη διαφανή ζώνη. Το πρωτογενές ωοθυλάκιο μετατρέπεται σε *δευτερογενές* με πολλαπλασιασμό των κοκκιωδών κυττάρων, που σχηματίζουν πολλές στοιβάδες γύρω από το ωάριο και επιπλέον, η σημαντική αλλαγή που χαρακτηρίζει το ωοθυλάκιο είναι η απόκτηση θήκης. Η στοιβάδα των κοκκιωδών κυττάρων ονομάζεται κοκκώδης στοιβάδα και πέριξ αυτής σχηματίζεται η βασική μεμβράνη, η οποία περιβάλλεται από μια δεύτερη στοιβάδα κυττάρων, τη λεγόμενη έσω θήκη. Στο στάδιο αυτό της ανάπτυξης, αρχίζει και ο σχηματισμός της κοιλότητας ή άντρου του ωοθυλακίου και το ωοθυλάκιο ονομάζεται αρχόμενο κοιλотικό (Κρεατσάς, 2009).

Τα κοιλотικά ωοθυλάκια χαρακτηρίζονται από την παρουσία του άντρου, όπως αναφέρθηκε, μια κοιλότητα γεμάτη με υγρό, το ωοθυλακικό υγρό, το οποίο προέρχεται από την κυκλοφορία του αίματος καθώς και από στοιχεία που εκκρίνονται από τα σωματικά κύτταρα (κοκκώδη-granulosa cells, κύτταρα θήκης-theca cells, κύτταρα του ωοφόρου δίσκου-cumulus cells) του ωοθυλακίου. Το ωοθυλακικό υγρό περιέχει μια ποικιλία μορίων, όπως στεροειδείς και πρωτεϊνικές ορμόνες, ένζυμα και ηλεκτρολύτες. Μέσα σε αυτό το υγρό αναπτύσσεται το ωοκύτταρο και μέσω αυτού επιτυγχάνεται η επικοινωνία μεταξύ των διάφορων τύπων κυττάρου του ωοθυλακίου. Υπάρχουν 2 τύποι κοκκιωδών: *τα τοιχωματικά κοκκώδη* κύτταρα που παρεμβάλλονται μεταξύ άντρου και βασικής μεμβράνης και ο *εξειδικευμένος τύπος κοκκιωδών*, που σχηματίζουν τον ωοφόρο δίσκο από τον οποίο και περιβάλλεται το ωοκύτταρο. Κάθε ωοθυλάκιο περιβάλλεται από τη βασική μεμβράνη, το εξειδικευμένο τμήμα εξωκυττάριας ύλης, η οποία χωρίζει το εσωτερικό του ωοθυλακίου από το τρίτο τύπο σωματικών κυττάρων, *τα κύτταρα θήκης*, το στρώμα κυττάρων που αποτελούν το εξωτερικό όριο του ωοθυλακίου (Hennet ML et al., 2012). (Εικόνα 1) Το πρωοθυλακιορρηκτικό ωοθυλάκιο είναι αυτό που θα υποστεί την ωοθυλακιορρηξία, απελευθερώνοντας το ωοκύτταρο και μετατρέπεται στη συνέχεια σε ωχρο σωματίο.



Εικόνα 1: Σχηματική αναπαράσταση ενός ώριμου γραφιανού ωοθυλακίου (κατηγορίας 8 – προωοθυλακιόρρηκτικό) (Hennet ML et al., 2012)

2. Ωοθυλακιόγνεση

Η ωοθυλακιόγνεση αποτελεί μια περίπλοκη διαδικασία με την οποία ένα μόνο ωοθυλάκιο επιλέγεται σε κάθε κύκλο ώστε να αναπτυχθεί πλήρως, δημιουργώντας έτσι ένα ώριμο ωάριο. Αρχίζει με την στρατολόγηση ενός αρχέγονου ωοθυλακίου και την είσοδο του σε μια εξελικτική πορεία με τελική κατάληξη την ατρησία ή την ωοθυλακιόρρηξία. Η διαδικασία της ωοθυλακιόγνεσης στη γυναίκα είναι μια μακρά διαδικασία, και απαιτείται σχεδόν ένας χρόνος για ένα αρχέγονο ωοθυλάκιο να αναπτυχθεί και να εξελιχθεί μέχρι το στάδιο της ωοθυλακιόρρηξίας.

Η τελευταία φάση της ωοθυλακιόγνεσης εξαρτάται αποκλειστικά από τις γοναδοτροφίνες. Τα κυκλοφορούντα επίπεδα της FSH υποστηρίζουν την ανάπτυξη μιας ομάδας κοιλοτικών ωοθυλακίων μέχρι που το μεγαλύτερο ωοθυλάκιο, που φέρει τους περισσότερους υποδοχείς FSH, αρχίζει να παράγει οιστραδιόλη (καταστολέας της FSH) και μεταβαίνει στο στάδιο που εξαρτάται από την LH, η οποία θα προκαλέσει στο τέλος και την ωοθυλακιόρρηξία (Hennet ML et al., 2012). Αυτό το ωοθυλάκιο είναι το κυρίαρχο και το στάδιο αυτό της ωρίμανσης του ωοθυλακίου: επιλογή (follicle selection). Καθώς τα επίπεδα της FSH πέφτουν, τα υπόλοιπα κοιλοτικά ωοθυλάκια οδηγούνται σε ατρησία και μόνο το κυρίαρχο είναι το μόνο ικανό για να υποστεί ωοθυλακιόρρηξία.

Πιο συγκεκριμένα, η ωοθυλακιογένεση/ η ωρίμανση των ωοθυλακίων περιλαμβάνει δύο κύριες φάσεις: τη στρατολόγηση (recruitment) και την επιλογή (selection). Η στρατολόγηση διακρίνεται στην *αρχική*, η οποία γίνεται στο στάδιο του αρχέγονου ωοθυλακίου και στην *κυκλική*, η οποία γίνεται στην αρχή της ωοθυλακικής φάσης κάθε κύκλου. Η *αρχική στρατολόγηση* (initial recruitment) αναφέρεται στην εξέλιξη του ωοθυλακίου από αρχέγονο σε δευτερογενές, που ξεκινά πολύ πριν και διατηρείται κατά τη διάρκεια της αναπαραγωγικής ζωής. Στο στάδιο του άντρου τα περισσότερα ωοθυλάκια υφίστανται ατρησία. Η *κυκλική στρατολόγηση* (cyclic recruitment) αρχίζει μετά την ήβη και είναι το αποτέλεσμα της αύξησης των επιπέδων της FSH στη διάρκεια κάθε αναπαραγωγικού κύκλου, και αναφέρεται στην εξέλιξη του ωοθυλακίου που έχει άντρο σε ώριμο γραφιανό ωοθυλάκιο.

Σε αντίθεση με την αρχική στρατολόγηση, η κυκλική στρατολόγηση των ωοθυλακίων στη γυναίκα εξαρτάται αποκλειστικά από τις γοναδοτροφίνες, όπως αναφέρθηκε. Γίνεται υπό την επίδραση της διακυκλικής αύξησης της FSH με σκοπό την επιλογή του κυρίαρχου ή επικρατούντος ωοθυλακίου, το οποίο επρόκειτο να υποστεί την ωοθυλακιορρηξία (επιλογή). Τα ωοθυλάκια, τα οποία στρατολογούνται, και έχουν τη δυνατότητα να συγκεντρώνουν την FSH στο ωοθυλακικό τους υγρό. Μέσω υποδοχέων της στα κύτταρα αυτά, η FSH διεγείρει την στεροειδογένεση.

Η παραγωγή της αρωματάσης, γίνεται υπό την επίδραση της FSH. Εάν δεν υπάρξει σημαντική επίδραση της FSH και σχηματισμός αρωματάσης τα ανδρογόνα μετατρέπονται σε 5α – αναχθέντα ανδρογόνα μέσω του ενζύμου 5α-αναγωγάση, το οποίο αναστέλλει την παραγωγή της αρωματάσης. Επομένως, η παραγωγή των οιστρογόνων και άρα η οιστρογονοποίηση του ωοθυλακίου αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την περαιτέρω ανάπτυξη του ωοθυλακίου.

Υπό την επίδραση όλων αυτών των παραγόντων, τα ωοθυλάκια που συγκεντρώνουν ικανές ποσότητες FSH και ικανό αριθμό υποδοχέων της ορμόνης αυτής είναι σε θέση να παράγουν αρωματάση, η οποία αρωματοποιεί ανδρογόνα σε οιστρογόνα και έτσι το περιβάλλον του οιστρογονοποιείται. Τα ωοθυλάκια αυτά «διασώζονται» για περαιτέρω ανάπτυξη ενώ τα ωοθυλάκια, που δεν συγκεντρώνουν ικανά επίπεδα FSH λόγω επικράτησης της 5α αναγωγάσης, έχουν περιβάλλον ανδρογονικό και μετατρέπονται σε άτρητα.

Τα ανδρογόνα αυξάνουν την απόπτωση, ενώ τα οιστρογόνα την ελαττώνουν. Παρά το γεγονός ότι τα ανδρογόνα ασκούν αποπτωτική δράση στα ωοθυλάκια, εντούτοις, έχει διαπιστωθεί ότι όταν η συγκέντρωσή τους στο ωοθυλακικό υγρό είναι χαμηλή μπορεί να ευνοούν την ωοθυλακική ωρίμανση μέσω διευκόλυνσης των δράσεων της FSH στα κοκκώδη κύτταρα. Συνεπώς, κατά την κυκλική στρατολόγηση και επιλογή του ωοθυλακίου, οι χαμηλές ποσότητες ανδρογόνων μέσα στο ωοθυλακικό περιβάλλον διευκολύνουν την ωρίμανση του ωοθυλακίου.

Η ωοθυλακική ανάπτυξη εν κατακλείδι, είναι μια αυστηρά ρυθμιζόμενη διαδικασία, η οποία εξαρτάται από την ισορροπία μεταξύ τοπικά παραγόμενων αυξητικών παραγόντων (όπως IGF-I, EGF, bFGF) του ωοθυλακίου καθώς και από τις κυκλοφορούσες ορμόνες. Ωστόσο, ο μειούμενος αριθμός των ωοθυλακίων σε κάθε αναπτυξιακό στάδιο υποδηλώνει πως ο έλεγχος μεταξύ ωοθυλακικής επιβίωσης ή ατρησίας διαφέρει από στάδιο σε στάδιο. Τα ωοθυλάκια δεν είναι ίδια μεταξύ τους καθώς, τόσο η ευαισθησία στην απόπτωση αλλά και οι ρυθμιστές της ωοθυλακικής επιβίωσης, αλλάζουν κατά τη διάρκεια των διαφορετικών σταδίων της ανάπτυξης (*Markström et al., 2002*).

3. Απόπτωση

Η απόπτωση, ή αλλιώς προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος, είναι ο πλέον σημαντικός τρόπος κυτταρικού θανάτου στους ζώντες ιστούς, που στόχο έχει τη ρύθμιση της εμβρυικής ανάπτυξης και της ομοιόστασης των ιστών, μεταξύ των άλλων ιστών και της ωοθήκης (*José de los Santos M et al., 2000*). Η απόπτωση ξεκινά πολύ πριν τα σημάδια γίνουν εμφανή μορφολογικά (*Baka S et al., 2006*).

Η μορφή απόπτωσης που παρατηρείται στα ωοθυλάκια, καλείται ατρησία και είναι ο κυτταρικός θάνατος των ωοθυλακίων που δεν υπέστησαν ωοθυλακιορρηξία. Η αποπτωτική αυτή διαδικασία, συμβαίνει σε όλα τα στάδια της ωοθυλακικής ωρίμανσης, είναι ορμονικά ρυθμιζόμενη και διαφορετικοί παράγοντες καθορίζουν την απόφαση επιβίωσης ή θανάτου στα διαφορετικά στάδια της ωοθυλακικής ανάπτυξης (*Markström et al., 2002*).

Ένα ατρητικό ωοθυλάκιο μπορεί να μη φανεί αρχικά καθώς δεν έχουν καταστραφεί όλα τα κύτταρά του. Όμως, καθώς εξελίσσεται προς τα τελευταία στάδιά της τα κοκκώδη κύτταρα πεθαίνουν, με αναρρόφηση του ωοθυλακικού υγρού στη συνέχεια και τέλος καταστροφή του ωοκυττάρου (*Irving-Rodgers et al., 2001*).

Οι αλλαγές στο ωοθυλακικό υγρό ή στα κύτταρα του ωοθυλακίου, οι προκαλούμενες από την απόπτωση, μπορούν να επηρεάσουν και το αποτέλεσμα μιας προσπάθειας IVF. Το αναπτυξιακό δυναμικό των κυττάρων που προέρχονται από ατρητικά ωοθυλάκια είναι φτωχό, καθώς μερικοί από τους παράγοντες που σχετίζονται με φυσιολογική ωοθυλακική ανάπτυξη, όπως η αγγείωση του ωοθυλακίου, το ενδοωοθυλακικό περιεχόμενο οξυγόνο και η μιτοχονδριακή λειτουργία, έχουν υποστεί αλλαγές λόγω της απόπτωσης (*Baka S et al., 2006, Blerkom V et al., 2004*).

Κατά την ωοληψία, καθώς αναρροφάται το ωοθυλάκιο, στο ωοθυλακικό υγρό συναντώνται τα τοιχωματικά κοκκώδη κύτταρα και γύρω από το ωάριο τα κοκκώδη κύτταρα του ωοφόρου δίσκου (COC complex). Βρέθηκε πως η περιοχή που φέρει τα τοιχωματικά κοκκώδη χαρακτηρίζεται από υψηλότερη παρουσία αποπτωτικών

σωματίων συγκριτικά με αυτά που συναντώνται στο COC complex (Krysko DV et al., 2008). Τα κοκκώδη κύτταρα των ωοθυλακίων που αναπτύχθηκαν σε ωάρια καλής ποιότητας, παρουσίασαν σημαντικά χαμηλότερη συχνότητα εμφάνισης αποπτωτικών σωματίων, σε σύγκριση με την παρουσία των αποπτωτικών σωματίων στα ωοθυλάκια, τα ωοκύτταρα των οποίων ήταν κακής ποιότητας. Γενικά, τα αποτελέσματα έδειξαν πως τα χαμηλότερα επίπεδα των αποπτωτικών σωματίων, γενικά στο ωοθυλάκιο, σχετίζονται με καλύτερη έκβαση της αναπτυξιακής πορείας του ωοκυττάρου, ανεξαρτήτως της διαφοράς που παρατηρείται μεταξύ τοιχωματικών και κοκκωδών κυττάρων του COC complex (Nakahara K et al., 1997).

4. Ανάγκη για προγνωστικούς δείκτες

Στόχο των κέντρων εξωσωματικής γονιμοποίησης αποτελεί η όσο το δυνατόν καλύτερη ανάπτυξη των εμβρύων *in vitro*, ώστε να επιτευχθεί αύξηση στα ποσοστά γέννησης ζώντων νεογνών (live birth rates) (Baka S et al., 2006). Γι' αυτό ακριβώς το λόγο γίνεται προσπάθεια εύρεσης μορίων δεικτών ικανών να προβλέπουν την ποιότητα των ωαρίων, άρα και την εν δυνάμει αναπτυξιακή τους πορεία σε έμβρυα ικανά προς επίτευξη κύησης. Κλασσικές μέθοδοι αξιολόγησης της ποιότητας των ωαρίων στηρίζονταν σε μορφολογικά κριτήρια, ωστόσο η χρήση τους δε μπορεί να προβλέψει την αναπτυξιακή πορεία του ωαρίου (Ebner T et al., 2003) και ανέκυψε ανάγκη για πιο αντικειμενικούς και ακριβείς δείκτες, όπως για παράδειγμα, τα κύτταρα που περιβάλλουν το ωάριο και το ωοθυλακικό υγρό.

Είναι πλέον κοινώς αποδεκτό ότι η επικοινωνία ωοκυττάρου-ωοθυλακίου είναι διπλής κατεύθυνσης και θεμελιώδους σημασίας για τη σωστή λειτουργία και ανάπτυξη. Τα κοκκώδη κύτταρα είναι απαραίτητα για την ωοθυλακιογένεση, καθώς παράγουν παράγοντες σημαντικούς (όπως στεροειδή και αυξητικούς παράγοντες) για την ωοθυλακική ωρίμανση. Επιπρόσθετα, για μια ικανοποιητική ωοθυλακική απάντηση στις γοναδοτροφίνες είναι απαραίτητος ο κατάλληλος αριθμός κοκκωδών κυττάρων, που καθορίζεται από το ρυθμό πολλαπλασιασμού και προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, απόπτωση. Για αυτό ακριβώς, θεωρείται απόλυτα λογικό η απόπτωση των κοκκωδών κυττάρων αλλά και τα χαρακτηριστικά του ωοθυλακικού υγρού να αποτελούν προγνωστικούς δείκτες του αναπτυξιακού δυναμικού των ωοκυττάρων. Οι παράγοντες των κοκκωδών κυττάρων και αυτοί που εκκρίνονται στο ωοθυλακικό υγρό είναι ιδανική πηγή μη επεμβατικών προγνωστικών παραγόντων (Krysko DV et al., 2008).

5. Ωοθυλακικό υγρό

Το ωοθυλακικό υγρό παρέχει το μικροπεριβάλλον, που καθίσταται απαραίτητο για την ανάπτυξη των ωαρίων και είναι παράγωγο της μεταφοράς των συστατικών από το πλάσμα του αίματος, που διαπερνούν το ωοθυλακικό φραγμό (blood follicular barrier) αλλά και παράγωγο των κοκκωδών κυττάρων και των κυττάρων θήκης μέσω ενεργής έκκρισης. Είναι λογικό να σκεφτεί κανείς πως μερικά βιοχημικά χαρακτηριστικά του ωοθυλακικού υγρού παίζουν καθοριστικό ρόλο στην ποιότητα του ωαρίου αλλά και στο δυναμικό του για επιτυχία γονιμοποίησης και εμβρυικής ανάπτυξης. Μπορεί να γίνει εύκολα διαθέσιμο καθώς αναρροφάται ταυτοχρόνως με το ωάριο κατά την ωοληψία. Όμως, για να μπορέσουμε να συσχετίσουμε την ποιότητα του ωαρίου με τις ουσίες που συναντώνται στο ωοθυλακικό καθίσταται αναγκαία η αναρρόφηση κάθε φορά ενός μόνο ωοθυλακίου. Επίσης, δεν είναι ξεκάθαρο αν οι συγκεντρώσεις μιας ουσίας που συναντάται στο ωοθυλακικό υγρό, σχετίζονται με την ποιότητα του ωαρίου ή με τα γενικότερα χαρακτηριστικά του ασθενούς, όπως ηλικία, είδος ωοθυλακικής διέγερσης και κάπνισμα (Revelli A *et al.*, 2009).

Τα χημικά συστατικά του ωοθυλακικού υγρού μπορούν να ταξινομηθούν στις παρακάτω κατηγορίες: α) ορμόνες, β) αυξητικοί παράγοντες της οικογένειας TGF-beta, γ) άλλοι αυξητικοί παράγοντες και ιντερλευκίνες, δ) αντι-αποπτωτικοί παράγοντες, ε) πρωτεΐνες, πεπτίδια και αμινοξέα, στ) δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive oxygen species, ROS) ζ) σάκχαρα, η) προστανοειδή.

Ορμόνες – Γοναδοτροφίνες, GH, PRL

Υψηλές συγκεντρώσεις των FSH, hCG και LH φάνηκε πως προάγουν την ωρίμανση των ωαρίων και σχετίζονται με έμβρυα καλής ποιότητας που έχουν πολλές πιθανότητες επιτυχούς γονιμοποίησης (Enien *et al.*, 1998, Revelli A *et al.*, 2009). Βρέθηκε πως η LH του ωοθυλακικού υγρού ήταν υψηλότερη στα ωοθυλάκια που περιείχαν ωάρια που κατέληξαν σε επιτυχείς προσπάθειες IVF. Γενικά, φαίνεται πως οι γοναδοτροφίνες παίζουν σημαντικό ρόλο στην έκκριση αρκετών ουσιών από τα κοκκώδη κύτταρα (όπως το υαλουρονικό οξύ) και επομένως επηρεάζουν την ωοθυλακική ανάπτυξη και ωρίμανση. Ίσως δρουν συνεργιστικά με την οιστραδιόλη ώστε να βελτιώσουν την κυτταροπλασματική ωρίμανση του ωαρίου και μέσω έκκρισης του κυκλικού AMP (cAMP), ελέγχουν και τη μείωση του. Υψηλά επίπεδα γοναδοτροφινών θα μπορούσαν να βελτιώσουν τις παραπάνω διαδικασίες και να οδηγήσουν σε καλύτερα ωάρια, έμβρυα και κατ' επέκταση και βελτιωμένα ποσοστά κύησης (Mendoza C *et al.*, 2002).

Όσον αφορά τις συγκεντρώσεις της αυξητικής ορμόνης και της προλακτίνης, που παρατηρήθηκαν στο ωοθυλακικό υγρό γυναικών που υποβάλλονται σε προσπάθειες εξωσωματικής τα αποτελέσματα ήταν αντιφατικά μεταξύ των ερευνών.

Οιστρογόνα-Προγεστερόνη και ανδρογόνα

Είναι γνωστό πως το οιστρογονικό περιβάλλον στο ωοθυλάκιο σχετίζεται με καλή αναπτυξιακή πορεία αυτού καθώς δε θα οδηγηθεί σε ατρησία. Επίσης, η οιστραδιόλη βελτιώνει την κυτταροπλασματική ωρίμανση των ωαρίων. Αυξημένα επίπεδα οιστραδιόλης (E2) και η αναλογία E2/P στο ωοθυλακικό υγρό υποδηλώνουν πιο εξελιγμένο στάδιο ωοθυλακικής ανάπτυξης και σχετίζονται και με μεγαλύτερη πιθανότητα επίτευξης κύησης, κάτι που όμως δεν επιβεβαιώθηκε από όλες τις έρευνες (Revelli A *et al.*, 2009). Όσον αφορά την προγεστερόνη του ωοθυλακικού υγρού, ενώ τα υψηλά επίπεδα της δρουν θετικά για το ωάριο και την επακόλουθη εμφύτευση και ανάπτυξή του, υπερβολική έκθεση σε αυτή σχετίζεται με έμβρυα που γονιμοποιήθηκαν ανώμαλα και δίνουν γένεση σε πολυπύρηννα έμβρυα. Το όριο στις συγκεντρώσεις της προγεστερόνης στο ωοθυλακικό υγρό, που θα συμβεί αυτό δεν έχει καθοριστεί ακόμα. Το ανδρογονικό περιβάλλον, όπως έχει αναφερθεί, σχετίζεται με πτωχή ποιότητα ωαρίων και συγκεκριμένα με ωάρια που τείνουν να έχουν χαμηλά ποσοστά φυσιολογικής διαίρεσης και ίσως να οδηγηθούν και σε ατρησία. Παρόλα αυτά μια ποσότητα ενδοωοθυλακικών ανδρογόνων είναι απαραίτητη για ευνοϊκή ωοθυλακική ανάπτυξη.

Αυξητικοί παράγοντες της οικογένειας TGF-beta

Οι ινχιπίνες παράγονται από τα κοκκώδη κύτταρα και τα επίπεδα τους στο ωοθυλακικό υγρό αντανakλούν τον αριθμό και την ενεργότητα των κοκκωδών κυττάρων του κάθε ωοθυλακίου. Η inhibin A στο ωοθυλακικό υγρό αυξάνει ενώ η inhibin B μειώνεται κατά την ωοθυλακική φάση (Wen X *et al.*, 2006). Υψηλά επίπεδα και των 2 συνδέονται με την πιθανότητα να πάρεις ωάρια κατά την ωοληψία όχι όμως με την ποιότητα που θα έχουν αυτά. Άρα είναι δείκτες της ωοθυλακικής απάντησης και όχι της ποιότητας των εμβρύων ή ωαρίων (Revelli A *et al.*, 2009).

Υψηλότερα επίπεδα του BMP-15 παρατηρήθηκαν στο ωοθυλακικό υγρό γονιμοποιημένων ωαρίων και με φυσιολογική διαίρεση σε σύγκριση με τις συγκεντρώσεις αυτού του μορίου σε μη γονιμοποιημένα και μη διαιρεμένα ωάρια.

Ιντερλευκίνες

Υψηλότερα επίπεδα της IL-1 beta του ωοθυλακικού υγρού συνδέθηκαν με φυσιολογική γονιμοποίηση αλλά τα επίπεδα αυτής της ιντερλευκίνης ήταν χαμηλότερα στο ωοθυλακικό υγρό των ωοθυλακίων που περιείχαν ωάρια ικανά να δημιουργήσουν καλά έμβρυα άρα και επιτυχημένη προσπάθεια IVF (Mendoza C *et al.*, 2002). Είναι πιθανό, λοιπόν, ότι η IL-1 beta οδηγεί σε κυτταροπλασματική ωρίμανση και φυσιολογική γονιμοποίηση αλλά δεν παίζει κάποιο ρόλο στην μετά την γονιμοποίηση, ανάπτυξη του εμβρύου (Revelli A *et al.*, 2009).

Δραστικές μορφές οξυγόνου, Reactive Oxygen Species (Ros)

Το οξειδωτικό στρες, ίσως, προκαλεί καταστροφή στο DNA και το ερέθισμα για απόπτωση. Πράγματι, τα ωοθυλάκια που υπόκεινται σε συνθήκες υποξίας περιέχουν ωάρια με υψηλή συχνότητα ανωμαλιών της μιτωτικής ατράκτου και επακόλουθη αυξημένη πιθανότητα ανευπλοειδίας του εμβρύου. Τέτοια ωοθυλάκια δίνουν γένεση συνήθως σε έμβρυα με πολυπύρρηνα βλαστομερίδια. Γενικότερα, χαμηλά επίπεδα Ros στο ωοθυλακικό υγρό ίσως αντιπροσωπεύουν ένα πιθανό θετικό δείκτη που να προβλέπει επιτυχία στην IVF, καθώς τα υψηλά Ros επίπεδα αντανακλούν ποικιλία παθολογικών καταστάσεων που επηρεάζουν τη γονιμότητα (Revelli A *et al.*, 2009).

Υπερβολική παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου στο μικροπεριβάλλον του ωοθυλακικού υγρού μπορεί να προκαλεί την απόπτωση στο ωοθυλάκιο πριν γίνει η γονιμοποίηση και επομένως, επηρεάζει αρνητικά την ωοθυλακική ωρίμανση. Σημαντικά αυξημένες συγκεντρώσεις αυτού βρέθηκαν στο ωοθυλακικό υγρό γυναικών με ενδομητρίωση ή υδρόσάλπιγγα, καταστάσεις που σχετίζονται με ωάρια χαμηλού δυναμικού για επιτυχή γονιμοποίηση.

Η ομοκυστεΐνη (HCY), μη πρωτεϊνικό αμινοξύ και μεταβολίτης της μεθειονίνης, παρατηρήθηκε στο ωοθυλακικό υγρό και βρέθηκε πως μόνο τα ωάρια που εκτίθενται σε χαμηλές συγκεντρώσεις HCY, έχουν καλύτερη ποιότητα και βαθμό ωρίμανσης. Εφόσον, το φολικό οξύ μειώνει τις συγκεντρώσεις της ομοκυστεΐνης στο ωοθυλακικό υγρό αλλά και στον ορό, αυτό μπορεί να εξηγήσει και το θετικό αποτέλεσμα της χορήγησης φολικού οξέος πριν τη θεραπεία IVF.

6. Ελεύθερο DNA (Cell Free DNA)

6.1. Γενικά

Το ελεύθερο DNA (cfDNA) είναι τμήματα DNA, τα οποία απελευθερώνονται από τον πυρήνα εξαιτίας αποπτωτικών ή νεκρωτικών διαδικασιών (Jahr *et al.*, 2001) και έχει βρεθεί στο πλάσμα τόσο ασθενών όσο και υγιών πληθυσμών. Ο χρόνος κάθαρσης αυτού από την κυκλοφορία του αίματος είναι πολύ γρήγορος καθώς το DNA είναι ευαίσθητο στις νουκλεάσες του πλάσματος, όπως η DNAase 1. Παρόλα αυτά βρίσκεται, σε υψηλά επίπεδα σε ποικιλία παθολογικών καταστάσεων, όπως στο έμφραγμα του μυοκαρδίου, στον καρκίνο, στο εγκεφαλικό και στη σήψη (Destouni *et al.*, 2009, Gormally E *et al.*, 2006).

Επιπρόσθετα, έχει βρεθεί ελεύθερο εμβρυικό DNA στην κυκλοφορία του αίματος (πλάσμα και ορός) εγκύων γυναικών (Illanes S *et al.*, 2007, Lo YM *et al.*, 1998) και όταν παρουσιαστεί αυξημένο σχετίζεται με παθολογικές καταστάσεις κατά τη

διάρκεια της εγκυμοσύνης, όπως η εμβρυική ανευπλοϊδία, ανωμαλίες του πλακούντα (*Bianchi DW, 2004*) και η προεκλαμψία (*Hahn et al., 2011, Pan PD et al., 2005*). Το ελεύθερο εμβρυικό DNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν μέθοδος μη παρεμβατικού προγεννητικού ελέγχου. Επίσης, οι συγκεντρώσεις του cfDNA φάνηκε να σχετίζονται με το αν η έγκυος γυναίκα καπνίζει (*Urato et al., 2008*). Όμως, οι *Lapaire et al., 2007* δε βρήκαν συσχέτιση του καπνίσματος με τις συγκεντρώσεις του ελεύθερου εμβρυικού DNA στην κυκλοφορία του αίματος της μητέρας ή με τις συγκεντρώσεις του μητρικού cfDNA στο μητρικό πλάσμα.

Βρέθηκε cfDNA και στο σπέρμα στη μελέτη των *Chou JS et al., 2011* και μόνο το χαμηλού μοριακού βάρους ελεύθερο DNA (περίπου 1Kb) του σπερματικού πλάσματος σχετίστηκε με παραμέτρους του σπέρματος, όπως η γονιμοποιητική του ικανότητα. Αύξηση, λοιπόν, αυτού συνδέθηκε με τη σπερματική λειτουργία, καθιστώντας το cfDNA έναν πιθανό δείκτη των προβλημάτων που σχετίζονται με τη γονιμότητα στο ανδρικό αναπαραγωγικό σύστημα.

6.2. Ελεύθερο DNA και καρκίνος

Σημαντικά υψηλότερα επίπεδα του ελεύθερου DNA βρέθηκαν στον ορό ασθενών με καρκίνο ήδη από το 1977 και παρουσιάστηκαν πιο αυξημένα (κατά μέσο όρο 209 +/- 39 ng/ml) στους ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο συγκριτικά με αυτούς χωρίς μετάσταση (100 +/- 30 ng/ml). Μετά τη θεραπεία με ακτινοβολία σε ασθενείς με λέμφωμα, καρκίνο πνεύμονα, ωοθηκών, μήτρας και καρκίνο του τραχήλου, τα επίπεδα έπεσαν κατακόρυφα από 66 σε 90% ενώ σε γλοίωμα, καρκίνο μαστού και εντέρου τα επίπεδα του ελεύθερου DNA μειώθηκαν μόνο στο 16 με 33%. Γενικώς, η μείωση στη συγκέντρωσή του αντανακλά το μέγεθος του όγκου και τη μείωση του πόνου. Αντίθετα, όταν τα επίπεδα του DNA είτε αυξάνονταν είτε παρέμεναν αμετάβλητα παρατηρούνταν έλλειψη ανταπόκρισης στη θεραπεία (*Leon SA et al 1977*).

Αυξημένα επίπεδα CFDNA, λοιπόν, παρατηρήθηκαν σε όλους τους καρκίνους: λεμφώματα καρκινώματα, λευχαιμία (*Wu TL et al., 2002*). Επιπλέον, μεταλλάξεις στο CFDNA χαρακτηρίζουν ποικιλία καρκινικών τύπων (όπως πνεύμονα, εντέρου, παγκρέατος) και DNA αλλαγές έχουν αναφερθεί που περιλαμβάνουν σημειακές μεταλλάξεις και επιγενετικές τροποποιήσεις όπως, υπερμεθυλώσεις του DNA. Στις πιο πολλές περιπτώσεις, αυτές οι αλλαγές ήταν πανομοιότυπες με αυτές που συναντώνται στον ιστό του όγκου του ασθενούς, κάτι που υποστηρίζει μια πιθανή προέλευση του CFDNA από τον όγκο (*Gormally E et al., 2006*). Όμως, σύμφωνα με την έρευνα του *Jahr S et al., 2001*, όταν το ποσοστό του CFDNA από τον όγκο είναι υψηλό η συνολική ποσότητα του CFDNA είναι χαμηλή ενώ όταν η συνολική ποσότητα του CFDNA είναι υψηλή το ποσοστό του CFDNA από τον όγκο (tumor

cfDNA) είναι χαμηλό και υπέθεσαν, λοιπόν, πως η πλειοψηφία του ελεύθερου DNA προέρχεται από τα υγιή κύτταρα που περιβάλλουν τον όγκο παρά από τα νεοπλαστικά κύτταρα.

Σημαντικά υψηλότερες ποσότητες CFDNA παρατηρούνταν στους ασθενείς στα τελευταία στάδια της ασθένειας καθώς και σε περιπτώσεις μετάστασης, όπως αναφέρθηκε (*Gormally E et al., 2006*). Το ηλεκτροφορητικό πρότυπο του ελεύθερου DNA από τους ασθενείς με καρκίνο παρουσιαζόταν καταταμημένο σε μικρότερα κομμάτια (100 bp) κάτι που δε συνέβαινε σε CFDNA από φυσιολογικά άτομα (*Wu TL et al., 2002*).

Αφού πλέον το cfDNA χρησιμοποιείται ως δείκτης στον καρκίνο είναι επίσης γνωστό και ως circulating tumor DNA (ctDNA), το οποίο ανευρίσκεται και σε ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου. Υπάρχουν διάφορες υποθέσεις σχετικά με την προέλευσή του και ίσως γίνεται εμφανές μετά από νέκρωση ενός ιστού, απόπτωση ή ακόμα και μέσω ενεργής έκκρισής του (*Gormally E et al., 2006*) αλλά ακόμα ο ακριβής μηχανισμός παραμένει άγνωστος. Η ανίχνευση και ο χαρακτηρισμός των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων (circulating tumor cells) και του ελεύθερου DNA σε ασθενείς με καρκίνο του παχέως εντέρου δε θα βελτιώσει μόνο την κατανόηση της ανάπτυξης της μετάστασης, αλλά μπορεί επίσης να αντικαταστήσει τη χρήση άλλων βιοδεικτών (*Kin C et al., 2013*).

6.3. Ελεύθερο DNA και εξωσωματική γονιμοποίηση (IVF)

Στο 2^ο τρίμηνο στις εγκυμοσύνες μετά από IVF παρατηρούνται αυξημένα επίπεδα HCG, που πιθανώς οδηγούν και σε λανθασμένο συμπέρασμα για σύνδρομο Down. Αυξημένα επίπεδα του εμβρυικού cfDNA στη μητρική κυκλοφορία έχουν συσχετιστεί με αυξημένα επίπεδα της HCG. Στην έρευνα που διεξήχθη από τους *Pan PD et al., 2005* συγκρίθηκαν τα επίπεδα του cfDNA σε εγκυμοσύνες από IVF με φυσιολογικές εγκυμοσύνες προκειμένου να ελεγχθεί αν είναι πιο ανεβασμένα στις περιπτώσεις τις προερχόμενες από υποβοηθούμενη αναπαραγωγή. Συγκρίθηκαν και με τους δείκτες του 3^{ου} τριμήνου (alpha-fetoprotein, estriol, HCG and inhibin A). Βρέθηκε πως τα επίπεδα του cfDNA, δεν επηρεάζονται από την IVF, και είναι τελικά ανεξάρτητα από τους κλασσικούς βιοχημικούς δείκτες (π.χ. την HCG) (*Farina et al., 2003*). Το ελεύθερο DNA φαίνεται να αποτελεί ένα επιπλέον ανεξάρτητο δείκτη (screening marker), που προέρχεται από περισσότερους του ενός ιστούς, κάτι που υποστηρίζεται περαιτέρω και από πρόσφατη έρευνα που καταλήγει ότι η μάζα του πλακούντα δεν συσχετίζεται με τα cfDNA επίπεδα (*Watanagana et al., 2005*). Αυτό έρχεται σε αντίφαση με τη θεωρία που υποστήριζε πως το cfDNA συνεχώς απελευθερώνεται στην μητρική κυκλοφορία από τον πλακούντα, όπως η HCG (*Ohashi et al., 2002*). Ωστόσο, η έλλειψη συσχέτισης μεταξύ cfDNA και των serum markers δεν αποκλείει κατ'ανάγκη την προέλευση από τον ίδιο ιστό (π.χ. το cfDNA

μπορεί να συσχετίζεται με τον αριθμό των κυττάρων, ενώ οι δείκτες του ορού, serum markers, μπορεί να συσχετίζονται με το επίπεδο της έκφρασης), και απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση του θέματος.

Η εύρεση εμβρυοτοξικών παραγόντων στην κυκλοφορία του αίματος ασθενών με επαναλαμβανόμενες αποτυχίες IVF και καθ' ἑξίν αποβολές οδήγησε τους ερευνητές να εξετάσουν τις συγκεντρώσεις του cfDNA στις γυναίκες που υποβάλλονται σε θεραπεία IVF με χρήση ηλεκτροφόρησης του ορού (capillary electrophoresis in serum) μια εβδομάδα μετά την εμβρυομεταφορά (Hart *et al.*, 2005), αλλά δε βρέθηκε κάποια σχέση μεταξύ των συγκεντρώσεων cfDNA στον ορό και των ποσοστών σύλληψης. Μια πρόσφατη μελέτη επομένως εξέτασε τις συγκεντρώσεις του ελεύθερου DNA στο πλάσμα του αίματος γυναικών που υποβάλλονται σε IVF – εμβρυομεταφορά με τη χρήση μια νέας, πιο ευαίσθητης μεθόδου μέτρησης του ελεύθερου DNA στο πλάσμα (SYBR gold fluorescent-stained direct assay) (Czamanski-Cohen *J et al.*, 2013).

Κατά τη διάρκεια της θεραπείας IVF έγιναν μετρήσεις της μέσης συγκέντρωσης του cfDNA σε τρία διαφορετικά χρονικά σημεία. Μεταξύ όλων των συμμετεχόντων δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές. Ωστόσο, την ημέρα του τεστ κνήσεως, 14 ημέρες μετά την εμβρυομεταφορά, οι μέσες συγκεντρώσεις του cfDNA στο πλάσμα ασθενών που υποβάλλονται σε εξωσωματική γονιμοποίηση-εμβρυομεταφορά, ήταν στατιστικώς σημαντικά πιο αυξημένες στις γυναίκες που δεν ήταν έγκυες, σε σύγκριση με εκείνες που είχαν συλλάβει. Το cfDNA του πλάσματος ίσως αντανakλά την παρουσία παραγόντων που ενδέχεται να εμποδίζουν την εμφύτευση του εμβρύου. Περαιτέρω έρευνες απαιτούνται για να καθοριστεί η χρησιμότητα του cfDNA ως βιολογικού δείκτη της εξωσωματικής γονιμοποίησης και να εξεταστούν υποκείμενες παθολογικές καταστάσεις, ως ενδεχόμενες πηγές αυξημένων συγκεντρώσεων cfDNA στο πλάσμα (Czamanski-Cohen *J et al.*, 2013).

Η διαφορά στις 2 μελέτες έγκειται στο γεγονός ότι στη δεύτερη χρησιμοποιήθηκε μια πιο ευαίσθητη, τεχνική η SYBR Gold Nucleic Acid Gel Stain, που μπορεί να ανιχνεύσει cfDNA, ποικιλίας μεγεθών ακόμα και 12–18 base pairs. Ενώ η μελέτη που διεξήχθη από τους Hart *et al.*, 2005 χρησιμοποίησε capillary electrophoresis για να μετρηθούν οι συγκεντρώσεις του cfDNA, μέθοδος όχι τόσο ευαίσθητη ώστε να αναγνωρίσει τόσο μικρά τμήματα DNA (το μικρότερο ήταν 1 Kb). Επιπρόσθετα, οι μετρήσεις γίνονταν 1 εβδομάδα αργότερα και όχι 2 μετά την ET. Το ερώτημα που ανακύπτει είναι αν υπάρχει μια παθολογία που να προκαλεί τα υψηλά επίπεδα cfDNA καθώς και την υπογονιμότητα, όμως επειδή οι δοκιμές αυτές δεν είναι ιστοειδικές δε μπορεί να καθοριστεί και η προέλευση του ελεύθερου DNA. Ωστόσο, τα υψηλά επίπεδά του είναι πολύ πιθανό να είναι αποτέλεσμα αυξημένης αποπτωτικής διαδικασίας (Beck *et al.*, 2009).

Υπάρχουν μαρτυρίες που συνδέουν την έκβαση της IVF και των αποπτωτικών διαδικασιών. Οι Liu and Li (2010) έδειξαν πως το οξειδωτικό στρες στα κοκκώδη

κύτταρα είχε ως αποτέλεσμα αποτυχία της εμβρυομεταφοράς και επίσης ο υψηλός αποπτωτικός ρυθμός συνδέθηκε με πτωχή ποιότητα ωαρίων. Επιπρόσθετα, άλλη έρευνα που εξέτασε τον αποπτωτικό ρυθμό έδειξε πως τα κοκκώδη κύτταρα γυναικών με ενδομητρίωση και εκείνα που εκτίθενται σε σπερματοζώαρια έχουν υψηλότερα ποσοστά απόπτωσης. Επίσης, τα κοκκώδη κύτταρα εμβρύων φτωχής ποιότητας παρουσίαζαν υψηλότερα ποσοστά απόπτωσης από αυτά των εμβρύων καλής ποιότητας (*Diaz-Fontdevila M et al., 2009, Czamanski-Cohen J et al., 2013*).

ΣΚΟΠΟΣ

Όπως έχει αναφερθεί, ο κυτταρικός θάνατος οδηγεί στην απελευθέρωση νουκλεϊκών οξέων (ελεύθερο DNA) στην περιφερική κυκλοφορία του ατόμου. Τα ελεύθερα νουκλεϊκά οξέα έχουν ανιχνευθεί στο πλάσμα υγιών καθώς και ασθενών και προέρχονται από κύτταρα που καταστρέφονται στα πλαίσια της ομοιόστασης αλλά και της νόσου, αντίστοιχα. Τα επίπεδα του ελεύθερου DNA στο πλάσμα έχουν συσχετισθεί με τη βαρύτητα και την πρόγνωση διαφόρων παθολογικών καταστάσεων και μπορεί να αποτελέσουν δείκτη παρακολούθησης της ανταπόκρισης των ασθενών στη φαρμακευτική αγωγή, όπως για παράδειγμα στους ασθενείς με καρκίνο (*Gormally et al., 2006*).

Υψηλά επίπεδα αποπτωτικών κοκκωδών κυττάρων σχετίζονται με χαμηλής ποιότητας ωάρια και μειωμένες αναπτυξιακές δυνατότητες. Σε αντίθεση, χαμηλά επίπεδα των αποπτωτικών κυττάρων σχετίζονται με καλή ποιότητα εμβρύων (*Host et al., 2000*). Επιπλέον, το ωοθυλακικό υγρό των ωοθυλακίων παρέχει το μικροπεριβάλλον για τη σωστή ανάπτυξη των ωαρίων, περιέχοντας ένα πολύπλοκο μείγμα πρωτεϊνών, αποπτωτικών παραγόντων και διάφορα άλλα συστατικά που δύναται να επηρεάσουν το αναπτυξιακό πρότυπο του ωοκυττάρου. Για αυτό ακριβώς το λόγο πολλές έρευνες στόχευουν στην εύρεση ενός βιοδείκτη στο ωοθυλακικό υγρό που να μπορεί να προβλέψει την ποιότητα του ωαρίου και κατ' επέκταση και των εμβρύων (*Baka S et al., 2006, Revelli A et al., 2008*).

Λαμβάνοντας υπ' όψιν τα παραπάνω, στόχο της παρούσας ερευνητικής προσπάθειας αποτέλεσε ο προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης του ελεύθερου DNA στο ωοθυλακικό υγρό γυναικών που υποβάλλονται σε εξωσωματική γονιμοποίηση, και η διερεύνηση πιθανής κλινικής αξίας των επιπέδων του cell free DNA που να σχετίζεται με την ποιότητα των εμβρύων και την έκβαση της κύησης.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Βιολογικό υλικό

Συλλέχθηκαν 84 δείγματα ωοθυλακικού υγρού γυναικών που υποβάλλονταν στη διαδικασία εξωσωματικής γονιμοποίησης στη μονάδα υποβοηθούμενης αναπαραγωγής του Γενικού Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας. Τα δείγματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν για τη μέτρηση του ελεύθερου DNA με τη βοήθεια της Real time PCR, (RT-PCR). Καταγράφηκαν επιπλέον, για τα δείγματα των γυναικών αυτών, στοιχεία που αφορούσαν το δείκτη μάζας σώματος (BMI), την ηλικία τους, την μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε (ICSI ή IVF), τον αριθμό των ωαρίων που συλλέχθηκαν και το στάδιο ωρίμανσης τους. Επιπρόσθετα, για κάθε δείγμα καταγραφόταν το ποσοστό γονιμοποίησης (fertilization rate), το ποσοστό φυσιολογικής διαίρεσης (Cleavage rate) και η συνολική βαθμολογία των εμβρύων (CES), το μέσο σκορ της ποιότητας των εμβρύων (MSEQ), και τέλος ο μέσος αριθμός των εμβρύων που μεταφέρθηκαν (MSET) (Anifandis *et al*, 2010).

2. Υλικά (χημικές ουσίες και αντιδραστήρια)

- (QIAGEN)
QuantiFast SYBR Green PCR Kit
- (INvitrogen)
Λειοφιλομένοι primers 1. GAPDH F, MW 7433,8μg/μmole, 35nmole
2. GAPDH R MW 7305,3μg/μmole, 43nmole

- (INvitrogen)
Life technologies AGAROSE, ELECTROPHORESIS GRADE
- (INvitrogen)
Ethidium Bromide Solution 10ml (10mg/ml)
- (QIAGEN)
DNA/RNA Free water
- (QIAGEN)
GelPilot, 100bp Ladder, 600μl
- (QIAGEN)
GelPilot, Loading Dye 5x

- (Lonza AccuGENE)
10x TBE Buffer
0,89 M Tris-Borate, 0,02M EDTA - pH 8,3

3. Απομόνωση των δειγμάτων ωοθυλακικού υγρού

Μετά το πέρας της ωοληψίας, αφού απομονωθούν τα ωοθυλάκια που συγκεντρώνονται μέσα στο ωοθυλακικό υγρό, αυτό συλλέγεται σε αποστειρωμένα δοχεία (urobox) και διατηρείται στους 4° C για 1-2 ώρες. Αποφεύγεται περαιτέρω παραμονή του καθώς η περίσσεια αίματος από την ωοληψία και παραγόντων που περιέχονται σε αυτό, αλλά και η πιθανή απόπτωση των κυττάρων, ενδέχεται να αλλοιώσουν το αποτέλεσμα των πειραμάτων με ανεπιθύμητη για παράδειγμα αύξηση του ελεύθερου DNA. Στη συνέχεια, 1ml ωοθυλακικού υγρού απομονώνεται σε eppendorfs και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 2000 στροφές για 10 λεπτά. Τέλος, το υπερκείμενο (ωοθυλακικό υγρό) φυλάσσεται στο -20° C για περαιτέρω ανάλυση.

4. Πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε

Με αυτό τον τρόπο συλλέχθηκαν τα 84 δείγματα ωοθυλακικού υγρού και η διαδικασία στη συνέχεια είχε ως εξής:

- i. Απόψυξη σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 10 λεπτά
- ii. Ανάδευση με vortex
- iii. 1/5 αραιώση για κάθε δείγμα (δηλαδή σε ένα νέο eppendorf τοποθετούσαμε 40λ H₂O και 10λ δείγμα)
- iv. Μετά την αραιώση των δειγμάτων ακολουθούσε βρασμός στο 100° C για 10 λεπτά

Σημείωση: Ο βρασμός πραγματοποιείται για να κατακρημνιστούν, να μετουσιωθούν οι πρωτεΐνες, καθώς, ως γνωστόν, είναι αναστολείς του πολλαπλασιασμού του DNA αφού καταλαμβάνουν τις θέσεις των primers.

- v. Αφού ολοκληρωθεί και ο βρασμός, 5λ από το υπερκείμενο του κάθε δείγματος (το υπό εξέταση δείγμα μας) προστίθενται σε ειδικά αποστειρωμένο PCR tube που περιέχει το μίγμα των απαραίτητων συστατικών για τη Real time PCR (βλέπε 5.2 Ανάλυση Real time PCR).

5. Real-time polymerase chain reaction (RT PCR)

5.1. Αρχή μεθόδου

Για να πραγματοποιηθεί μια αντίδραση PCR απαιτείται δείγμα DNA, 2 εναρκήρια ολιγονουκλεοτίδια συμπληρωματικά προς την αλληλουχία που θα πολλαπλασιαστεί (primers), dNTPs, που παρέχουν τα 4 τριφωσφορικά νουκλεοτίδια, μια θερμοάαντοχη πολυμεράση και ιόντα μαγνησίου στο διάλυμα της αντίδρασης. Η αντίδραση διεξάγεται κάτω από τεράστιες μεταβολές της θερμοκρασίας. Υψηλή θερμοκρασία

απαιτείται για την αποδιάταξη των 2 αλυσίδων του DNA (melt), μείωση της θερμοκρασίας στη συνέχεια για να συνδεθούν οι εκκινητές στις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες (annealing) και μετά σε μια θερμοκρασία βέλτιστη για την πολυμεράση στην οποία και γίνεται η επιμήκυνση του επιθυμητού τμήματος με την ενσωμάτωση των dNTPs (elongation). Επιπλέον, μια PCR πραγματικού χρόνου απαιτεί ένα φθορίζον μόριο, που εκπέμπει φθορισμό μόλις προσδεθεί στο παραγόμενο προϊόν (Kubista *et al.*, 2006).

Η μέθοδος βασίζεται λοιπόν, στην ιχνηθέτηση των προϊόντων της PCR με φθορίζοντα μόρια και τη μέτρηση της έντασης φθορισμού, ο οποίος εκπέμπεται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης. Μια αντίδραση PCR μπορεί να θεωρηθεί ότι αποτελείται από 3 φάσεις: α) τη φάση θορύβου β) την λογαριθμική ή εκθετική φάση (exponential phase) και γ) τη φάση κορεσμού ή αλλιώς πλατώ (Εικόνα 2). Η φάση της εκθετικής ανάπτυξης ξεκινά μόλις συσσωρευτεί επαρκής ποσότητα προϊόντος έτσι ώστε να είναι ανιχνεύσιμο πάνω από το θόρυβο. Η φάση κορεσμού θα επέλθει όταν κάποιο συστατικό της αντίδρασης έχει εξαντληθεί (φθορίζον μόριο, dNTPs, ή primers) (Kubista *et al.*, 2001). Αυτό καθορίζεται κυρίως από την ποσότητα του primer στο μείγμα της αντίδρασης (master mix) (<http://www.rt-pcr.com/>, Ponchel F *et al.*, 2003).

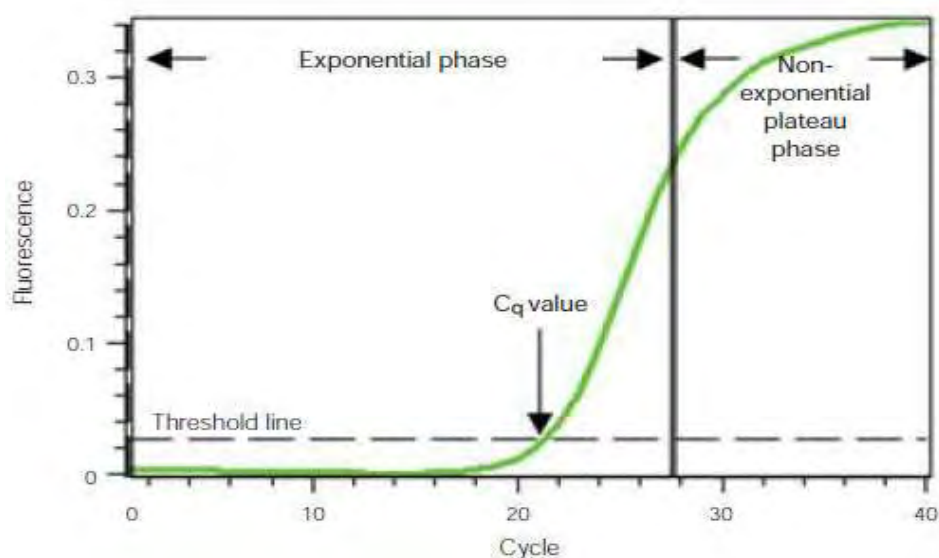
Κατά την αντίδραση PCR σε πραγματικό χρόνο οι τιμές φθορισμού κατάγραφονται κατά τη διάρκεια κάθε κύκλου και αντιπροσωπεύουν το ποσόν του προϊόντος που έχει ενισχυθεί μέχρι το σημείο εκείνο της αντίδρασης. Τα δείγματα προς ανάλυση παρακολουθούνται με την βοήθεια αυτοποιημένου μηχανήματος ειδικού για την Real time PCR που είναι συνδεδεμένο με υπολογιστή και το οποίο παρέχει την δυνατότητα ανάλυσης και ποσοτικοποίησης του σήματος ανίχνευσης του DNA μετά από κάθε κύκλο της αντίδρασης (Houghton S *et al.*, 2006).

Όσο περισσότερο υπόστρωμα υπάρχει κατά την έναρξη της αντίδρασης τόσο μικρότερος αριθμός κύκλων θα απαιτείται για να οδηγηθούμε στο σημείο στο οποίο το σήμα φθορισμού καταγράφεται ως σημαντικά πιο αυξημένο από το σημείο θορύβου C_p , crossing point ή αλλιώς CT value (Εικόνα 2) και είναι ανάλογο της αρχικής ποσότητας του DNA που υπήρχε στο δείγμα. Μικρότερα C_p υποδεικνύουν δείγματα με μεγαλύτερες αρχικές ποσότητες γενετικού υλικού (<http://realtimepcr.dk/principle/>, Ponchel F *et al.*, 2003).

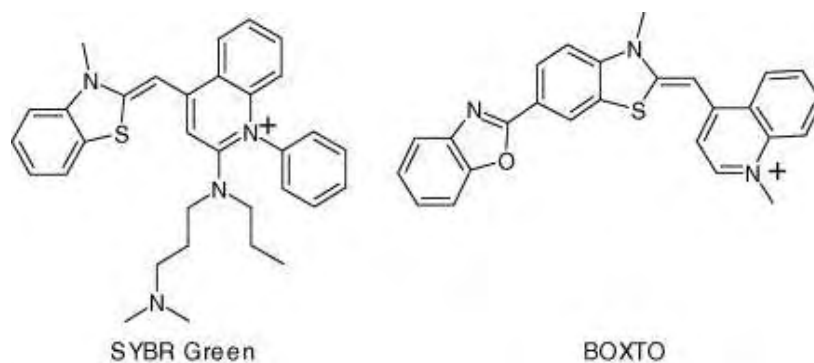
Υπάρχουν διάφορα φθορίζοντα μόρια με πιο δημοφιλή τις ασύμμετρες κβανίνες, SYBR Green I και BOXT0 (Εικόνα 3) οι οποίες δεν εκπέμπουν φθορισμό ελεύθερες σε διάλυμα, αλλά μόνο όταν προσδεθούν στο DNA (Zipper *et al.*, 2004). Η ένταση του φθορισμού τους αυξάνει καθώς αυξάνει η ποσότητα του σχηματιζόμενου προϊόντος όχι όμως αναλογικά εξαιτίας του ότι τα φθορίζοντα αυτά μόρια εξαρτώνται από την αναλογία βαφή/προσδεδεδεμένες βάσεις (dye:base binding ratio), η οποία και μειώνεται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης. Επίσης εξαρτάται και από την αλληλουχία DNA και είναι γνώστό πως οι ασύμμετρες κβανίνες είναι μη ειδικά φθορίζοντα μόρια στη real-time PCR και δίνουν σήμα φθορισμού στην παρουσία

οποιασδήποτε αλληλουχίας δίκλωνου DNA (non-specific fluorescent dyes) σε αντίθεση με τους ειδικούς προς συγκεκριμένη αλληλουχία ανιχνευτές, (sequence-specific DNA probes), όπως είναι οι TaqMan probes. Άρα προϊόντα primer-dimer θα μπορεί να περιπλέξουν το αποτέλεσμα του πειράματος, κάτι που όμως εύκολα επιβεβαιώνεται με ένα τζελ ηλεκτροφόρησης (<http://www.rt-pcr.com/>, Kubista et al., 2006, <http://pathmicro.med.sc.edu/pcr/realtime-home.htm>)

Τέλος, το σημαντικό πλεονέκτημα της PCR πραγματικού χρόνου είναι ότι ο ποσοτικός προσδιορισμός γίνεται στη λογαριθμική φάση της αντίδρασης και επομένως δεν επηρεάζεται από κάποιο αντιδραστήριο που πιθανώς ελλατώνεται κατά τη φάση κορεσμού, γεγονός το οποίο δημιουργεί συστηματικό σφάλμα και καθιστά την ποσοτικοποίηση, που βασίζεται σε μετρήσεις της συνολικής απόδοσης του προϊόντος (ανάλυση τελικού σημείου με συμβατική PCR) ουσιαστικά αναξιόπιστες (Kubista et al., 2006).



Εικόνα 2: Χαρακτηριστική απεικόνιση μιας αντίδρασης RT PCR



Εικόνα 3: Χρωστικές προσδεόμενες στο DNA (DNA-binding dyes)

5.2 RT-PCR Ανάλυση

Το πείραμα μας διεξήχθη με τη SYBR Green, η οποία φθορίζει έντονα μόνο παρουσία δίκλωνου DNA και ασθενώς απουσία αυτού. Αυτό συμβαίνει γιατί ναι μεν προσδένεται και σε μονόκλιωνα μόρια, αλλά στα δίκλιωνα προσδένεται με μεγαλύτερη συγγένεια και έτσι φθορίζει περισσότερο (<http://pathmicro.med.sc.edu/pcr/realtime-home.htm>).

Τελικό βήμα της πειραματικής διαδικασίας αποτέλεσε η διεξαγωγή της Real-Time PCR. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν είναι το Quantifast SYBR Green PCR Master Mix της εταιρείας Qiagen.

Σε ειδικό σωλήνα τύπου Eppendorf προετοιμάστηκε το μίγμα αντίδρασης που περιείχε:

- 5μl του υπό εξέταση δείγματος
- 10μl SYBR green mix,
- 3 μl primer mix (1,5μl forward primer, 1,5μl reverse primer)
- 3μl απεσταγμένο νερό

Τελικός όγκος ήταν λοιπόν τα 21 μl. Γενικά η πραγματικού χρόνου PCR με χρήση SYBR Green από 10-25 μl βγάζει καλές μετρήσεις. Αποκλίσεις δεν έχουν τόσο μεγάλη ευαισθησία.

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για να ελέξουμε την παρουσία του ελεύθερου DNA ήταν συμπληρωματικοί προς τμήμα του γονιδίου της αφυδρογονάσης της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης (GAPDH). Επιλέχθηκε αυτό το γονίδιο καθώς εκφράζεται σε όλα τα ζωντανά κύτταρα. Με τους συγκεκριμένους primers, το προϊόν της GAPDH που αναμέναμε ήταν στις 183bp.

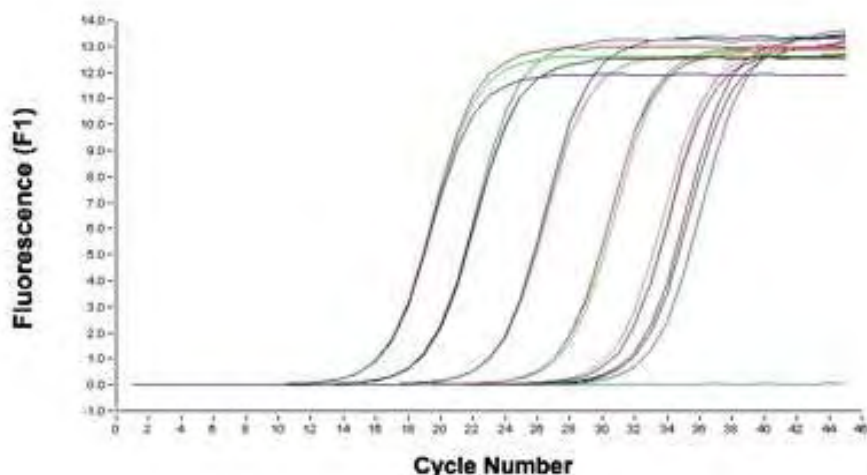
Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε παρουσιάζεται αναλυτικά στον πίνακα 1:

Βήμα	Λειτουργία	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος
Hold I	Αποδιάταξη DNA (Denaturation)	95	3 min
Cycling	Η σύνδεση των εκκινητών με τις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στο DNA (Primer annealing)	95	10 seconds
		55	10 s
		72	20 s
Hold II	Επιμήκυνση των συνδεδεμένων εκκινητών και σύνθεση DNA (Extension)	72	5 min
Melt		65 → 95	1 ^ο στάδιο: 30 sec Σταδιακή αύξηση 1°C/sec

Πίνακας 1: Πρόγραμμα της RT-PCR

Ο συνολικός χρόνος για 45 κύκλους ποσοτικής RT-PCR είναι 130 λεπτά. Τα αποτελέσματα της ποσοτικής RT-PCR προβάλλονται με χαρακτηριστικό γράφημα στον υπολογιστή με τη βοήθεια του προγράμματος rotor gene Corbett. (Εικόνα 4)

Σημείωση: Το threshold ορίστηκε στα 0,02. Είναι μια γραμμή που ορίζεται αυθαίρετα, προκειμένου να καθοριστεί το CT (<http://www.rt-pcr.com/>). Συνήθως είναι κοντά στη βάση της καμπύλης, αλλά θα πρέπει όμως να είναι αρκετά ψηλά ώστε να είναι σίγουρο ότι οι αντιδράσεις από εκεί και πάνω που θα χει καθοριστεί το CT είναι λόγω πολλαπλασιασμού και δεν είναι θόρυβος. Χρησιμοποιείται το ίδιο threshold για όλα τα δείγματα στο ίδιο πείραμα (<http://pathmicro.med.sc.edu/pcr/realtime-home.htm>).



Εικόνα 4: Χαρακτηριστική απεικόνιση των αποτελεσμάτων της RT- PCR με χρήση rotor gene Corbett software

6. Ηλεκτροφόρηση

6.1. Αρχή μεθόδου

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια μέθοδος διαχωρισμού μορίων ή σωματιδίων με πολλές εφαρμογές στην μοριακή βιολογία, βιοχημεία, πρωτεϊνική χημεία, εγκληματολογία κ.α. Χρησιμοποιείται κυρίως για τον προσδιορισμό της καθαρότητας ενός δείγματος, ποιοτικό και ποσοτικό έλεγχο, προσδιορισμό μοριακού βάρους (M.B.) ενώ ως δείγματα μπορεί να είναι οτιδήποτε μπορεί να φέρει φορτίο: πρωτεΐνες, πεπτίδια, νουκλεϊκά οξέα (DNA, RNA), αμινοξέα, φαρμακευτικές ουσίες, οργανικά οξέα και βάσεις και πολλά άλλα.

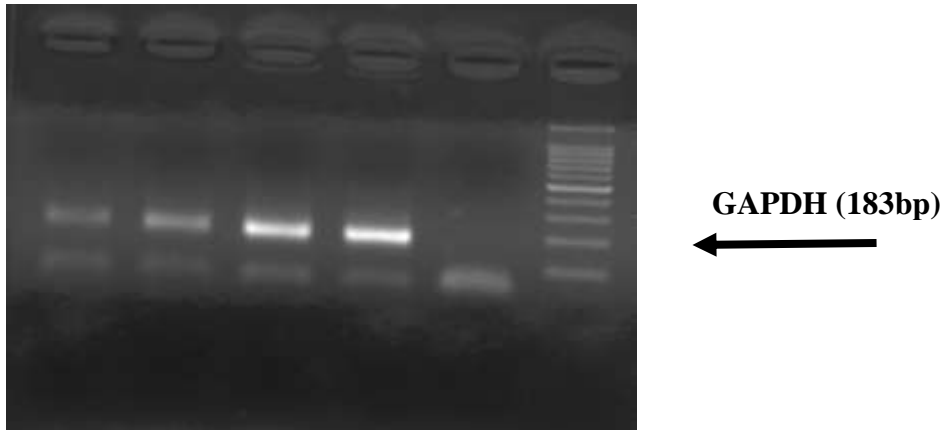
Κατά την ηλεκτροφόρηση διοχετεύεται ηλεκτρικό ρεύμα μέσω ηλεκτροδίων σε ένα μέσο (πηκτή ή και χαρτί) που πάνω του έχει τοποθετηθεί (ή /και ενσωματωθεί) σε ένα σημείο το προς ανάλυση δείγμα. Τα φορτισμένα μόρια και σωματίδια βρίσκονται μέσα σε υδάτινα διαλύματα και κάτω από την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου, κινούνται προς την κατεύθυνση του ηλεκτροδίου με το αντίθετο φορτίο. Όμως, κινούνται προς τα ηλεκτρόδια με ταχύτητες διαφορετικές ανάλογα με το φορτίο τους και αντιστρόφως ανάλογες με το μέγεθος τους. Έτσι, τα περισσότερα φορτισμένα και μικρότερα μόρια απομακρύνονται περισσότερο από το αρχικό σημείο, ενώ τα μεγαλύτερα και λιγότερο φορτισμένα λιγότερο, οπότε επέρχεται διαχωρισμός

Για την εμφάνιση των προϊόντων της RT-PCR πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πηκτές αγαρόζης 2 % w/v κατ' όγκον και σε τάση 100 V. Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA στηρίζεται στο γεγονός ότι σε ουδέτερο pH είναι αρνητικά φορτισμένο. Επομένως, αν τοποθετηθούν τμήματα DNA στην κάθοδο (-), θα μετακινηθούν προς την άνοδο (+). Η ηλεκτροφορητική ικανότητά του κατά μήκος των πηκτωμάτων εξαρτάται κυρίως από το μοριακό μέγεθος του DNA και τη συγκέντρωση της αγαρόζης. Η ταχύτητα μετακίνησης του DNA είναι αντιστρόφως ανάλογη του μεγέθους των κλασμάτων DNA που ηλεκτροφορούνται καθώς και αντιστρόφως ανάλογη της συγκέντρωσης του πηκτώματος. Τέλος, χρησιμοποιώντας πηκτώματα διαφορετικών συγκεντρώσεων μπορεί να διαχωριστεί μεγάλο εύρος μεγεθών DNA. Με συγκέντρωση 2 % γίνεται διαχωρισμός γραμμικών τμημάτων DNA μήκους 0,1 – 3 Kb. (*Εργαστηριακό ασκήσεις, φυλλάδιο Κλινικής Χημείας, Πάτρα 2005*).

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, οι πηκτές φωτογραφήθηκαν με ψηφιακή μηχανή πάνω από λάμπα UV (παρατήρηση του πηκτώματος στο υπεριώδες).

6.2. Ηλεκτροφόρηση προϊόντος PCR σε πήκτωμα αγαρόζης

Η επιβεβαίωση του προϊόντος της RT-PCR και η εξακρίβωση ότι επεκτάθηκε το επιθυμητό τμήμα DNA, γίνεται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτές αγαρόζης 2 % w/v κατ' όγκον και σε τάση 149 V και χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο. Συγκεκριμένα, θέλαμε να ελέξουμε ότι το προϊόν που πήραμε ήταν το σωστό και όχι δίκλωνο μόριο primer – dimer. Αφού, όπως είναι γνωστό, το μειονέκτημα αυτής της χρωστικής είναι ότι προσδένεται σε οποιοδήποτε δίκλωνο μόριο DNA και εκπέμπει φθορισμό (εικόνα 5).



Εικόνα 5: Ηλεκτροφόρηση σε αгарόζη των προϊόντων της RT-PCR. Στα 4 πηγαδάκια φαίνεται η GAPDH, το 5ο είναι το blank (φαίνονται τα primer- dimer) και το 6ο αριστερά ο μάρτυρας (ladder) που δείχνει τα μοριακά βάρη.

7. Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων

Για την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα SPSS.17. Η συσχέτιση των παραμέτρων έγινε χρησιμοποιώντας το δείκτη συσχέτισης Pearson, ενώ με χρήση t-test συγκρίθηκαν οι διαφορές των παραμέτρων μεταξύ των 2 ομάδων. Η σύγκριση των ποσοστών κύησης μεταξύ των 2 ομάδων έγινε με το chi-square test.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Για τον υπολογισμό του ελεύθερου DNA πήραμε ως δείγμα αναφοράς αυτό που χρειάστηκε τους περισσότερους κύκλους PCR πραγματικού χρόνου για να δώσει φθορισμό, δηλαδή το δείγμα που περιείχε το λιγότερο DNA. Επειδή αυτό το δείγμα προερχόταν από ένα συγκεκριμένο άτομο που είχε συλλεχθεί συγκεκριμένος όγκος ωοθυλακικού υγρού και είχε ένα συγκεκριμένο αριθμό ωαρίων, οι κύκλοι από την PCR διαιρέθηκαν με τον παράγοντα που προέκυψε, πολλαπλασιάζοντας τον όγκο του ωοθυλακικού υγρού επί τον αριθμό των ωαρίων. Συγκεκριμένα, ο μεγαλύτερος κύκλος PCR $Ct=29.68$ διαιρέθηκε με 10, καθώς το δείγμα είχε 10 ml (όγκος ωοθυλακικού υγρού) X 1 (αριθμός ωαρίων) = 10. Άρα, ο λόγος $29.68/10 = 2.968$ θεωρήθηκε ως το ελεύθερο DNA του δείγματος αναφοράς μας. Τα υπόλοιπα δείγματα που είχαν μικρότερους κύκλους και άρα περισσότερο DNA υπολογίστηκαν με βάση το δείγμα αναφοράς μας, προσαρμόζοντας τον αριθμό των ωαρίων και τον όγκο του ωοθυλακικού τους υγρού. Παρατίθενται στη συνέχεια τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης

	ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ
Αριθμός περιπτώσεων	84
Ηλικία γυναίκας (έτη)	$36,1 \pm 0,6$
Δείκτης μάζας σώματος (kg/m^2)	$25,8 \pm 0,6$
CoCs	$5,7 \pm 0,5$
FR (%)	$69,6 \pm 3,2$
CR (%)	$81,8 \pm 3,5$
CES	$25,8 \pm 2,5$
MSEQ	$8,1 \pm 0,4$
MSET	$9 \pm 0,4$
ff o/c-free DNA	3.56 ± 1.03
Θετικό τεστ hCG (%)	26.2%
Κλινική κήση (%)	21.4%

Πίνακας 2: Παρουσιάζονται οι μέσες τιμές (\pm το τυπικό σφάλμα της μέσης τιμής) για όλες τις παραμέτρους που καταγράφησαν από τα 84 δείγματα ωοθυλακικού υγρού γυναικών που υποβλήθηκαν σε IVF/ICSI-ET

Επόμενο βήμα ήταν να γίνει ο διαχωρισμός των γυναικών της μελέτης σε δύο ομάδες. Ορίσαμε 2 ομάδες με ίδιο αριθμό περιστατικών ώστε να μπορέσουν να συγκριθούν μεταξύ τους, και ο διαχωρισμός έγινε χρησιμοποιώντας την τιμή που αντιστοιχούσε στο 50% των δειγμάτων και στη συγκεκριμένη περίπτωση ήταν το 0.73 (Πίνακας 4). Με χρήση της εφαρμογής t-test του στατιστικού προγράμματος SPSS, ελέγχθηκε αν οι μέσες τιμές των δύο αυτών ομάδων έχουν στατιστικά σημαντική διαφορά όσον αφορά, το δείκτη μάζας σώματος, την ηλικία, τον αριθμό των κοκκωδών κυττάρων, το ποσοστό γονιμοποίησης, το ποσοστό φυσιολογικής διαίρεσης, το συνολικό σκορ των εμβρύων, το μέσο αριθμό των εμβρύων που μεταφέρθηκαν και τα ποσοστά κλινικής κύησης. Τα αποτελέσματα δίνονται στους παρακάτω πίνακες 4, και 5.

Statistics

timi totalff		
N	Valid	83
	Missing	1
Mean		3,5610
Percentiles	25	,2500
	50	,7300
	75	3,0400

Πίνακας 4: Καταγράφονται η μέση τιμή του ωοθυλακικού και πως προέκυψε η τιμή 0,73, όπου το 50% των δειγμάτων μας βρίσκεται πάνω από αυτή την τιμή και το υπόλοιπο 50% κάτω από αυτή.

	FF o/c-free DNA \leq 0.73	FF o/c-free DNA $>$ 0.73	P value
Αριθμός περιπτώσεων	42	41	
Ηλικία γυναίκας (έτη)	36.8 \pm 0.8	37.29 \pm 0.7	0.04
Δείκτης μάζας σώματος (kg/m²)	25.55 \pm 0.7	26.2 \pm 0.8	NS
CoCs	9.16 \pm 0.7	2.19 \pm 0.2	0.00
FR (%)	69.38 \pm 3.3	69.51 \pm 5.5	NS
CR (%)	82.25 \pm 3.7	80.95 \pm 8.7	0.048
CES	39.14 \pm 3.1	11.97 \pm 1.5	0.00
MSEQ	8.25 \pm 0.4	7.86 \pm 0.6	NS
MSET	9.96 \pm 0.5	7.96 \pm 0.6	0.018
Θετικό τεστ hCG (%)	28.6%	24.4%	NS
Κλινική κύηση (%)	23.8%	24.4%	NS

Πίνακας 5: Χαρακτηριστικά των γυναικών, σύμφωνα με την αναλογία ωοθυλακικού υγρού προς ελεύθερο DNA, όπου: **CoCs** (cumulus oocyte complex), τα κοκκώδη κύτταρα, **FR**, (Fertilization rate), ποσοστό γονιμοποίησης, **CR**, (Cleavage rate), ποσοστό φυσιολογικής διαίρεσης, **CES**, (Cumulative Embryo Score), συνολικό σκορ των εμβρύων, **MSEQ**, (Mean Score of Embryo Quality), μέσο σκορ της ποιότητας των εμβρύων, **MSET**, (Mean Score of Embryo Transfer), μέσος αριθμός των εμβρύων που μεταφέρθηκαν, **FF o/c-free DNA**, (follicular fluid oocyte/cumulus-free DNA)

Το FF o/c-free DNA είναι το ελεύθερο DNA των δειγμάτων, που υπολογίστηκαν με βάση το δείγμα αναφοράς μας, προσαρμόζοντας τον αριθμό των ωαρίων και τον όγκο του ωοθυλακικού τους υγρού.

Από τον παραπάνω πίνακα, διαπιστώνουμε ότι ο αριθμός των ωαρίων (CoCs), η συνολική βαθμολογία των εμβρύων (CES) αλλά και η ποιότητα των μεταφερόμενων εμβρύων (MSET) διέφερε σημαντικά μεταξύ των δύο ομάδων. Επίσης, διαπιστώνουμε ότι ούτε το θετικό τεστ κήσεως ούτε το ποσοστό κλινικής κήσης δεν διαφέρουν μεταξύ των 2 ομάδων.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στο προηγούμενο κεφάλαιο, όπου και παρατέθηκαν τα αποτελέσματα των πειραμάτων της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας, έγινε φανερό πως όταν το ωοθυλακικό υγρό περιέχει υψηλά επίπεδα ελεύθερου DNA (ff o/c-free DNA > 0.73), ο αριθμός των ωαρίων, που συλλέγονται κατά την ωοληψία είναι μικρός (2 ωάρια) (βλέπε Πίνακα 5). Αυτό το συμπέρασμα έρχεται σε αντίφαση με το τι θα ανέμενε κανείς να συμβεί. Το ελεύθερο DNA απελευθερώνεται κυρίως από τα ωάρια και δευτερευόντως από τα κοκκώδη που περιβάλλουν το αναπτυσσόμενο ωάριο, επομένως θα ήταν λογικό να είναι σε υψηλότερα επίπεδα όταν περισσότερα ωάρια συλλεχθούν κατά την ωοληψία. Ένας μηχανισμός που πιθανόν εξηγεί αυτά τα αποτελέσματα είναι το γεγονός ότι η διέγερση των ωοθηκών ενεργοποιεί το αποπτωτικό μονοπάτι σε πολλά στρατολογημένα ωοθυλάκια, κατά τη διάρκεια μιας προσπάθειας IVF. Συμπερασματικά, όσο περισσότερο το ελεύθερο DNA τόσο περισσότερο ενεργοποιείται το αποπτωτικό μονοπάτι οδηγώντας είτε σε αποπτωτικά ωάρια είτε σε περιορισμένο αριθμό αυτών. Φαίνεται, λοιπόν, τα υψηλά επίπεδά του να επηρεάζουν άμεσα την ανάπτυξη του εμβρύου, την ποιότητά του και άρα και την πιθανότητα εμφύτευσης. Από τα αποτελέσματα των πειραμάτων φάνηκε λοιπόν, πως η ομάδα με τα υψηλότερα επίπεδα ελεύθερου DNA (ff o/c-free DNA > 0.73), παρουσιάζει σημαντικά χαμηλότερη ποιότητα εμβρύων (7.96 ± 0.6) με $p=0.018$ σε σχέση με την ποιότητα των εμβρύων της άλλης ομάδας (9.96 ± 0.5), που έχει λιγότερο ελεύθερο DNA. Τα μέχρι τώρα δεδομένα, που έχουν δημοσιευθεί σε σχετικά πρόσφατη μελέτη, (Liu and Li, 2010) ενισχύουν τις υποθέσεις μας, καθώς η αποπτωτική διαδικασία στα κοκκώδη κύτταρα έχει βρεθεί πως, μέσω του οξειδωτικού στρες, έχει αρνητική επίδραση στην έκβαση του IVF και όσο υψηλότερος ο αποπτωτικός ρυθμός τόσο πιο κακής ποιότητας και τα ωάρια. Επομένως, τα κοκκώδη κύτταρα των ωαρίων κακής ποιότητας έχουν υψηλότερους αποπτωτικούς ρυθμούς σε σύγκριση με αυτά καλύτερης ποιότητας. Τα παραπάνω συμφωνούν απόλυτα με τα αποτελέσματα μας, αφού όπου παρατηρήθηκαν υψηλά επίπεδα του ελεύθερου DNA (δηλαδή υψηλός αποπτωτικός ρυθμός) καταλήξαμε σε περιορισμένο αριθμό ωαρίων και στη συνέχεια σε έμβρυα πτωχής ποιότητας, κάτι που φαίνεται από τη βαθμολογία των εμβρύων για εμβρυομεταφορά (MSET).

Όμως, παραμένει αδιευκρίνιστο αν το ελεύθερο DNA παίζει ενεργό ή παθητικό ρόλο στην έκβαση του IVF καθώς δεν υπάρχουν μελέτες μέχρι τώρα. Το μόνο που έχει αναφερθεί είναι πως το αυξημένο ελεύθερο DNA στο πλάσμα, σχετίζεται με σημαντικά χαμηλά ποσοστά κύησης σε γυναίκες που υποβάλλονται σε διαδικασίες εξωσωματικής γονιμοποίησης και εμβρυομεταφοράς (Czamanski-Cohen et al., 2013). Σε αυτή την έρευνα το ελεύθερο DNA μετρήθηκε στον ορό και όχι στο ωοθυλακικό υγρό, που είναι το κυρίως περιβάλλον των ωαρίων. Ακόμα, τα ποσοστά θετικής hCG ή κλινικής κύησης ήταν παρόμοια και στις 2 ομάδες (σε αυτές με ελεύθερο DNA ≤ 0.73 και σε αυτές με ελεύθερο DNA > 0.73). Το γεγονός ότι τα ποσοστά ήταν

συγκρίσιμα μεταξύ των εγκύων και μη, γυναικών, στηρίζει εμμέσως πως η πιθανότητα σύλληψης μετά από εξωσωματική γονιμοποίηση δεν εξαρτάται από το ελεύθερο DNA, υποδεικνύοντας ότι ο ρόλος του είναι πιο παθητικός παρά ενεργητικός στη έκβαση του IVF.

Το παράδοξο όμως, που ανακύπτει σε σχέση με τα ποσοστά κύησης στις 2 ομάδες είναι γιατί η πρώτη ομάδα είχε σχετικά χαμηλό ποσοστό κύησης, μη αναμενόμενο δεδομένου του μεγάλου αριθμού ωαρίων που είχαν συλλεχθεί (9.16 ± 0.7) (βλέπε Πίνακα 5) και επιπλέον, γιατί η άλλη ομάδα παρουσίασε σχετικά υψηλό ποσοστό κύησης, παρόμοιο με την πρώτη, με μόνο 2 ώρια κατά μέσο όρο, μετά την ωοληψία. Σύμφωνα με τις παραπάνω παρατηρήσεις, φαίνεται πως ο μεγάλος αριθμός των παραγόμενων ωαρίων της πρώτης ομάδας, δεν αντανακλά αντίστοιχα και καλή ποιότητα ωαρίων. Ίσως, λοιπόν, το ελεύθερο DNA (όταν είναι ≤ 0.73) να διαδραματίζει τελικά αρνητικό ρόλο στην ποιότητα των παραγόμενων ωαρίων με τέτοιο τρόπο όμως που η έναρξη της απόπτωσης δεν είναι εμφανής. Και όπως έχει αναφερθεί, η απόπτωση ξεκινά πολύ πριν τα σημάδια γίνουν εμφανή μορφολογικά (*Baka S et al., 2006*) έτσι και ένα ατρητικό ωοθυλάκιο μπορεί να μη φανεί αρχικά καθώς δεν έχουν καταστραφεί όλα τα κύτταρά του. Όσον αφορά τώρα τα σχετικά υψηλά ποσοστά κύησης στη δεύτερη ομάδα, με 2 ώρια κατά μέσο όρο μετά την ωοληψία, ο ρόλος του ελεύθερου DNA είναι πιο εμφανής εφόσον τα υψηλά επίπεδά του, φαίνεται πως δεν επιτρέπουν την παραγωγή πολλών ωαρίων και η παραγωγή τους περιορίζεται σε 1-2, τα οποία φαίνεται να είναι καλύτερης ποιότητας για επιτυχή γονιμοποίηση και ανάπτυξη.

Συμπερασματικά, η μελέτη δείχνει ότι όταν τα επίπεδα του ελεύθερου DNA στο ωοθυλακικό υγρό είναι υψηλά (>0.73), τότε ο αριθμός των παραγόμενων ωαρίων είναι σχετικά μικρός και η ποιότητα των παραγόμενων εμβρύων είναι φτωχή. Βέβαια, αν και, σύμφωνα με τα αποτελέσματα, τα υψηλά επίπεδα του ελεύθερου DNA μπορεί να επηρεάζουν τα εμβρυολογικά χαρακτηριστικά, δεν φαίνεται να επηρεάζουν την έκβαση της κύησης.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ελληνική Βιβλιογραφία

Γεώργιος Κ. Κρεατσάς, Σύγχρονη Γυναικολογία και Μαιευτική, 2^η έκδοση, Εκδόσεις Π.Χ. ΠΑΣΧΑΛΙΔΗΣ, Ιατρική Βιβλιοθήκη, 2009, σ. 96-106

Δεστούνη Ασπασία, Μελέτη της κλινικής σημασίας του ελεύθερου DNA (Free-DNA) στο περιφερικό αίμα σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις, Αθήνα 2009

Εργαστηριακές Ασκήσεις Κλινικής Χημείας, Πάτρα, 2005

Web pages

<http://realtimemcr.dk/principle/>

<http://pathmicro.med.sc.edu/pcr/realtime-home.htm>

<http://www.rt-pcr.com/>

Ξενόγλωσση Βιβλιογραφία

Anifandis G, Dafopoulos K, Messini CI, Chalvatzas N, Messinis IE, Effect of the position of the polar body during ICSI on fertilization rate and embryo development. *Reprod Sci.* 2010; 17(9):849-53.

Baka S, Malamitsi-Puchner A, Novel follicular fluid factors influencing oocyte developmental potential in IVF: a review. *Reprod Biomed Online* 2006;12(4):500-6.

Beck J, Urmovitz HB, Riggert J, Clerici M, Schütz E, Profile of the circulating DNA in apparently healthy individuals. *Clin Chem.* 2009; 55(4):730-8.

Chou JS, Jacobson JD, Patton WC, King A, Chan PJ, Modified isocratic capillary electrophoresis detection of cell-free DNA in semen. *J Assist Reprod Genet.* 2004; 21(11):397-400.

Destouni A, Vrettou C, Antonatos D, Chouliaras G, Traeger-Synodinos J, Patsilinos S, Kitsiou-Tzeli S, Tsigas D, Kanavakis E, Cell-free DNA levels in acute myocardial infarction patients during hospitalization. *Acta Cardiol.* 2009; 64(1):51-7.

Díaz-Fontdevila M, Pommer R, Smith R, Cumulus cell apoptosis changes with exposure to spermatozoa and pathologies involved in infertility. *Fertil Steril* 2009; 91(5 Suppl):2061-8.

Ebner T, Moser M, Sommergruber M, Tews G, Selection based on morphological assessment of oocytes and embryos at different stages of preimplantation development: a review. *Hum Reprod Update* 2003; 9(3):251-62.

Enien WM, Chantler E, Seif MW, Elstein M, Human ovarian granulosa cells and follicular fluid indices: the relationship to oocyte maturity and fertilization in vitro. *Hum Reprod*, 1998; 13: 1303-1306.

Farina A, LeShane ES, Lambert-Messerlian GM, Canick JA, Lee T, Neveux LM, Palomaki GE and Bianchi DW, Evaluation of cell-free fetal DNA as a second-trimester maternal serum marker of Down syndrome pregnancy. *Clin Chem* 2003; 49: 239–242.

Gormally E, Caboux E, Vineis P, Hainaut P, Circulating free DNA in plasma or serum as biomarker of carcinogenesis: Practical aspects and biological significance. *Mutat Res.* 2007; 635(2-3):105-17.

Hahn S, Rusterholz C, Hösli I, Lapaire O, Cell-free nucleic acids as potential markers for preeclampsia. *Placenta* 2011; 32 Suppl:S17-20.

Hart EA, Patton WC, Jacobson JD, King A, Corselli J, Chan PJ, Luteal phase serum cell-free DNA as a marker of failed pregnancy after assisted reproductive technology. *J Assist Reprod Genet.* 2005; 22(5):213-7.

Hennet ML, Combelles CM, The antral follicle: a microenvironment for oocyte differentiation. *Int J Dev Biol.* 2012; 56 (10-12) : 819-31.

Host E, Mikkelsen AL, Lindenberg S, Apoptosis in human cumulus cells in relation to maturation stage and cleavage of the corresponding oocyte. *Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica*, 2000; 79: 936-940.

Houghton S. and Cockerill F, RealTime PCR: Overview and applications. *Surgery* 2006; Vol 139, No 1,1-5.

Illanes S, Denbow M, Kailasam C, Finning K, Soothill PW, Early detection of cell-free fetal DNA in maternal plasma. *Early Hum Dev.* 2007; 83(9):563-6.

Irving-Rodgers HF, van Wezel IL, Mussard ML, Kinder JE, Rodgers RJ, Atresia revisited: two basic patterns of atresia of bovine antral follicles. *Reproduction_2001*; 122(5):761-75.

Jahr S, Hentze H, Englisch S et al, DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res.* 2001; 61(4): 1659–1665.

José de los Santos M, Anderson DJ, Racowsky C, Hill JA, Presence of Fas-Fas ligand system and bcl-2 gene products in cells and fluids from gonadotropin-stimulated human ovaries. *Biol Reprod.* 2000; 63(6):1811-6.

Kin C, Kidess E, Poultsides GA, Visser BC, Jeffrey SS, Colorectal cancer diagnostics: biomarkers, cell-free DNA, circulating tumor cells and defining heterogeneous populations by single-cell analysis. *Expert Rev Mol Diagn.* 2013; 13(6):581-99.

Krysko DV, Diez-Fraile A, Criel G, Svistunov AA, Vandenabeele P, D'Herde K, Life and death of female gametes during oogenesis and folliculogenesis. *Apoptosis* 2008; 13(9):1065-87.

Kubista M, Andrade J.M, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, Sindelka R, Sjöback R, Sjögreen B, Strömbom L, Ståhlberg A, Zoric A, The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine* 2006; 27:95-125.

Lapaire O, Volgmann T, Huang D, Hahn S, Holzgreve W, Zhong XY, Maternal smoking: effect on circulating cell-free fetal and total DNA levels in maternal plasma from the second trimester. *Obstet Gynecol.* 2007; 110(6):1358-63.

Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ, Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res.* 1977; 37(3):646-50.

Liu J, Li Y, Effect of oxidative stress and apoptosis in granulosa cells on the outcome of IVF-ET. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2010; 35(9):990-4.

Lo YM, Tein TK, Lau TK, Haines CJ, Leung TN, Poon PM, Wainscoat JS, Johnson PJ, Chang AM, Hjelm NM, Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: Implications for non-invasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet.* 1998; 62:768-775.

Markström E, Svensson ECh, Shao R, Svanberg B, Billig H, Survival factors regulating ovarian apoptosis -- dependence on follicle differentiation. *Reproduction* 2002; 123(1):23-30.

Mendoza C, Ruiz-Requena E, Ortega E, Cremades N, Martinez F, Bernabeu R, Greco E, Tesarik J, Follicular fluid markers of oocyte developmental potential. *Hum Reprod* 2002; 17: 1017-1022.

Nakahara K, Saito H, Saito T, Ito M, Ohta N, Takahashi T, Hiroi M, The incidence of apoptotic bodies in membrana granulosa can predict prognosis of ova from patients participating in in vitro fertilization programs. *Fertil Steril* 1997; 68(2):312-7.

Ohashi Y, Miharu N, Honda H, Samura O and Ohama K, Correlation of fetal DNA and human chorionic gonadotropin concentrations in second trimester maternal serum. *Clin Chem* 2002; 48: 386-388.

Pan PD, Peter I, Lambert-Messerlian GM, Canick JA, Bianchi DW, Johnson KL., Cell-free fetal DNA levels in pregnancies conceived by IVF. *Hum Reprod.* 2005; 20(11): 3152-6.

Ponchel F, Toomes C, Bransfield K, Leong FT, Douglas SH, Field SL, Bell SM, Combaret V, Puisieux A, Mighell AJ, Robinson PA, Inglehearn CF, Isaacs JD, Markham AF, Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: An alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. *BMC Biotechnology* 2003; 3:18.

Revelli A, Delle Piane L, Casano S, Molinari E, Massobrio M, Rinaudo P, Follicular fluid content and oocyte quality: from single biochemical markers to metabolomics. *Reprod Biol Endocrinol.* 2009; 7:40.

Rodgers RJ, Irving-Rodgers HF, Formation of the ovarian follicular antrum and follicular fluid. *Biol Reprod.* 2010; 82(6):1021-9.

Urato AC, Peter I, Canick J, Lambert-Messerlian G, Pulkkinen A, Knight G, Jeong YJ, Johnson KL, Bianchi DW, Smoking in pregnancy is associated with increased total maternal serum cell-free DNA levels. *Prenat Diagn.* 2008; 28(3):186-90.

Van Blerkom J, Mitochondria in human oogenesis and preimplantation embryogenesis: engines of metabolism, ionic regulation and developmental competence. *Reproduction.* 2004; 128(3):269-80.

Wataganara T, LeShane ES, Farina A, Messerlian GM, Lee T, Canick JA and Bianchi DW, Maternal serum cell-free fetal DNA levels are increased in cases of trisomy 13 but not trisomy 18. *Hum Genet* 2003; 112: 204–208.

Wen X, Tozer AJ, Butler SA, Bell CM, Docherty SM, Iles RK, Follicular fluid levels of inhibin A, inhibin B, and activin A levels reflect changes in follicle size but are not independent markers of the oocyte's ability to fertilize. *Fertil Steril* 2006; 85: 1723-1729.

Wu TL, Zhang D, Chia JH, Tsao K-, Sun CF, Wu JT, Cell-free DNA: measurement in various carcinomas and establishment of normal reference range. *Clin Chim Acta.* 2002;321(1-2):77-87.

Zipper H, Brunner H, Bernhagen J, Vitzthum F, Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Res.* 2004; 32 (12):103.

