

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
« ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ »**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

« Τα Metabolomics ως δείκτης ποιότητας των εμβρύων. »

**ΚΡΑΝΙΑ ΦΩΤΕΙΝΗ
ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΟΣ ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΣΤΡΙΑ**

**ΛΑΡΙΣΑ
Σεπτέμβριος 2010**

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟΣ ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΙΩΑΝΝΗΣ Ε. ΜΕΣΣΗΝΗΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπων: Γεώργιος- Σπυρίδων Ανυφαντής, Βιολόγος Επιστημονικός Συνεργάτης
Ιατρικής Σχολής Παν. Θεσσαλίας.

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Γεώργιος- Σπυρίδων Ανυφαντής, Βιολόγος Επιστημονικός Συνεργάτης Ιατρικής
Σχολής Παν. Θεσσαλίας.

Κωνσταντίνος Νταφόπουλος, Επίκουρος Καθηγητής Μαιευτικής & Γυναικολογίας
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Ασπασία Τσέζου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής Πανεπιστημίου
Θεσσαλίας

Τα Metabolomics ως δείκτης ποιότητας των εμβρύων.

Περίληψη

Η υπογονιμότητα επηρεάζει ολοένα και περισσότερα ζευγάρια τα οποία καταφεύγουν στην υποβοηθούμενη αναπαραγωγή. Αν και τα ποσοστά επιτυχίας των ART κύκλων αγγίζουν αυτά των φυσιολογικών, η επιθυμία των κέντρων IVF να βελτιώσουν τα ποσοστά εγκυμοσύνης έχει ως αποτέλεσμα τη μεταφορά περισσότερων του ενός εμβρύων, με επικείμενο κίνδυνο τις πολύδυμες κυήσεις. Ο μεγάλος περιορισμός των κλινικών IVF για τη μεταφορά ενός αλλά υγιούς εμβρύου είναι η αδυναμία τους να προβλέψουν ποιο από τα έμβρυα είναι βιώσιμα και ικανά να εμφυτευτούν και να καταλήξουν σε υγιές νεογνό. Εδώ και χρόνια η επιλογή των εμβρύων στηρίζεται στην μορφολογία τους, όμως η δυναμική αυτής της μεθόδου είναι περιορισμένη. Προσφάτως, αναπτύχθηκαν οι νέες τεχνολογίες των Omics με τις οποίες ο εμβρυολόγος μπορεί να επιλέξει τα καλύτερα έμβρυα προς μεταφορά. Στόχος τους είναι να ορίσουν το φαινότυπο ενός εμβρύου (φυσιολογικός ή όχι) με τη βοήθεια βιοδεικτών και να γεφυρώσουν το κενό μεταξύ γονότυπου και φαινότυπου. Από αυτές ξεχωρίζουν τα Metabolomics. Είναι μια πρωτοπόρος μέθοδος για την εκτίμηση της βιωσιμότητας των εμβρύων καθώς είναι μη επεμβατική και έχει τη δυνατότητα να εφαρμοστεί σε κλινικό επίπεδο. Στηρίζονται στη φασματομέτρηση μικροποσότητας καλλιεργητικού υλικού μέσα στο οποίο αναπτύσσονται τα έμβρυα και από το προκύπτον φάσμα εκπομπής δίνονται πληροφορίες σχετικά με το μεταβολικό προφίλ του εμβρύου. Με τη βοήθεια ισχυρών εργαλείων στατιστικής και βιοπληροφορικής προκύπτει ο δείκτης βιωσιμότητας των εμβρύων ο οποίος είναι αποδεδειγμένα μεγαλύτερος σε κείνα τα έμβρυα που τελικώς καταλήγουν σε εγκυμοσύνη. Επιπλέον, τα Metabolomics μπορούν να εφαρμοστούν για την εκτίμηση της βιωσιμότητας τόσο γαμετών όσο και κρυοσυντηρημένων εμβρύων. Επομένως αδιαμφισβήτητα αποτελούν ένα ισχυρό διαγνωστικό εργαλείο για την επιλογή εκείνου του εμβρύου/ ωαρίου με τις καλύτερες προοπτικές επιβίωσης.

Περιεχόμενα

Εισαγωγή.....	
Σημαντικότητα αξιολόγησης εμβρύων.....	
Αξιολόγηση in vitro αναπτυσσόμενων εμβρύων.....	
Omics και αξιολόγηση εμβρύων.....	
Αξιολόγηση της βιωσιμότητας των εμβρύων με τη χρήση των genomics. Ανάλυση γονιδιώματος: μελετώντας το περιεχόμενο DNA των κυττάρων.....	
Transcriptomic Analysis: Μελέτη του εκφραζόμενου RNA στα κύτταρα.....	
Μη επεμβατικές μέθοδοι αξιολόγησης εμβρύων.....	
Proteomic analysis.....	
Soluble Human Leukocyte Antigen- G (sHLA-G): ένας εναλλακτικός υποψήφιος εκκρινόμενος βιο δείκτης.....	
Metabolomics.....	
Η ανάλυση του μεταβολισμού του εμβρύου καθορίζει τη βιωσιμότητά του.....	
Μεταβολίτες, πιθανοί βιο-δείκτες της βιωσιμότητας του εμβρύου.....	
Πυροσταφυλικό.....	
Γλυκόζη.....	
Αμινοξέα.....	
Κατανάλωση Οξυγόνου.....	
Ωστόσο, γιατί όλα τα παραπάνω δεν εφαρμόζονται ακόμα?.....	
Metabolomics και ανάλυση του καλλιεργητικού μέσου.....	
Μελέτες που επιβεβαιώνουν ότι η μεταβολική ανάλυση του καλλιεργητικού υλικού δείχνει τη βιωσιμότητα ενός εμβρύου.....	
Συζήτηση.....	
Βιβλιογραφία.....	

Εισαγωγή

Η υπογονιμότητα ορίζεται ως η αδυναμία πραγματοποίησης κύησης μετά την παρέλευση ενός έτους κανονικών σεξουαλικών σχέσεων και μια σειρά επιδημιολογικών μελετών έδειξαν ότι το ποσοστό υπογόνιμων ζευγαριών κατά την αναπαραγωγική ηλικία ανέρχεται στο 15-20% (Society for Assisted Reproductive Technology SART, 2008). Ανάμεσα σε όλες τις θεραπευτικές προσεγγίσεις που προσφέρονται στα υπογόνιμα ζεύγη, εκείνες τις υποβοηθούμενης αναπαραγωγής σχετίζονται με τα υψηλότερα ποσοστά επιτυχίας. Ένα στα οχτώ ζευγάρια λοιπόν είναι υπογόνιμα και για όλους η μόνη ελπίδα είναι η IVF, με την βοήθεια της οποίας σήμερα είναι καταγεγραμμένο το 1% όλων των γεννήσεων σε πολλές χώρες (ESHRE 2001, Human Fertilisation and Embryology Authority, 2002). Η διαδικασία είναι γνωστή και αφορά την λήψη ώριμων ωαρίων από τις ωοθήκες της γυναίκας κατόπιν διέγερσής τους με γοναδοτροφίνες, την γονιμοποίηση των ωαρίων *in vitro* και την επιστροφή των εμβρύων στην ενδομητρική κοιλότητα της γυναίκας ή και δωρεά σε μια άλλη γυναίκα.

Πολύ σύντομα μετά την πρώτη επιτυχή εγκυμοσύνη με IVF από τους Steptoe και Edwards το 1978, που πραγματοποιήθηκε σε φυσικό κύκλο (Steptoe P.C και Edwards R.G, 1978), τα πρωτόκολλα ωοθηκικής διέγερσης συνεχώς βελτιωνόταν έτσι ώστε σε κάθε κύκλο να λαμβάνονται όσο το δυνατόν περισσότερα ωάρια (Trousoun A. et al, 1981). Η ραγδαία ανάπτυξη των γοναδοτροφινών (καθαρισμένων ή ανασυνδυασμένων) βοήθησε στην βελτίωση των πρωτοκόλλων καθώς και η χρήση των GnRH αναλόγων τα οποία συντελούν στην καταστολή της υποθαλαμικής εκλυόμενης ορμόνης GnRH αποτρέποντας έτσι την πρόωμη ωχρινοποίηση των ωοθυλακίων από το ενδογενές κύμα της LH. Μόλις ένα ωοθυλάκιο αναπτυχθεί κατάλληλα τότε χορηγείται η χοριακή γοναδοτροφίνη hCG (human chorionic gonadotrophin), η οποία προκαλεί την ωρίμανση του ωαρίου και 36 ώρες μετά την χορήγησή της με τη βοήθεια υπερηχογραφήματος γίνεται η αναρρόφηση του ωοθυλακίου. Η γονιμοποίηση του ωαρίου στη συνέχεια από τον εμβρυολόγο γίνεται *in vitro* είτε με τη συμβατική γονιμοποίηση IVF είτε εγχέοντας ένα σπερματοζώαριο στο κυτταρόπλασμα του ωαρίου (ICSI, intracytoplasmic sperm injection). Συμπερασματικά λοιπόν, τόσο η βελτιστοποίηση των πρωτοκόλλων διέγερσης όσο

και των μεθόδων γονιμοποίησης μας έδωσε τη δυνατότητα για μεγάλη διαθεσιμότητα εμβρύων προς μεταφορά ενδομητρίως.

Η σύγχρονη τεχνολογία της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (Assisted Reproductive Technologies, ART) έχει καταφέρει να δημιουργεί ένα μεγάλο αριθμό εμβρύων ανά κύκλο με αποτέλεσμα να είναι επιτακτική η ανάγκη για αξιολόγηση αυτών και μεταφορά των καλύτερων αναπτυξιακά αλλά και «υγιέστερων» εμβρύων. Μέχρι τώρα στηριζόμενοι στα μορφολογικά χαρακτηριστικά των εμβρύων οδηγούμαστε στη μεταφορά εκείνων που είναι καλύτερα μορφολογικά άρα και εκείνων με την καλύτερη αναπτυξιακή πορεία και δυναμική. Όμως αυτή η προσέγγιση δεν είναι τόσο ικανοποιητική καθώς η αδυναμία της ακριβούς αξιολόγησης των βιώσιμων εμβρύων έχει αναδείξει κάποια προβλήματα τα οποία είναι πολύ σημαντικό να αποφευχθούν.

Σημαντικότητα αξιολόγησης εμβρύων

Αρχικά, περισσότερα από τα 8 στα 10 μεταφερόμενα έμβρυα αποτυγχάνουν να εμφυτευτούν στο ενδομήτριο και συνολικά οι 2 από τους 3 κύκλους ART δεν πετυχαίνουν εγκυμοσύνη (SART Centers for disease control, USA, 2008) (σχήμα 1). Τα παραπάνω χαμηλά ποσοστά εμφύτευσης επιβαρύνουν τα υπογόνιμα ζευγάρια σωματικά, ψυχολογικά αλλά και οικονομικά. Μια πιθανή εξήγηση για τις περιπτώσεις αποτυχίας των ART κύκλων στηρίζεται πιθανότατα στην έλλειψη μεθόδων αξιολόγησης και επιλογή εκείνων των εμβρύων με την καλύτερη αναπτυξιακή πορεία. Ως αποτέλεσμα αυτού, τα περισσότερα κέντρα εξωσωματικής μεταφέρουν περισσότερα του ενός έμβρυα αυξάνοντας την πιθανότητα και το ρίσκο για πολύδυμες κηύσεις. Τα ποσοστά των πολύδυμων κηύσεων από ICSI / IVF στην Ευρώπη και στις ΗΠΑ είναι 22,7% και 31,7% αντίστοιχα (Andersen et al, 2008). Μετά από φυσιολογική σύλληψη το ποσοστό είναι 1-2 % αποκαλύπτοντας έτσι ένα μεγάλο πρόβλημα που έχει προκύψει από την μεταφορά πολλών εμβρύων ανά κύκλο. Οι πολύδυμες κηύσεις είναι τεκμηριωμένος παράγοντας κινδύνου τόσο για την ίδια την μητέρα αλλά κυρίως για τα νεογνά. Σε αυτές τις κηύσεις υπάρχει αυξημένος κίνδυνος, συγκεκριμένα πενταπλάσιος σε σχέση με τις μονήρεις κηύσεις, για πρόωρο τοκετό καθώς και χαμηλό βάρος γέννησης του νεογνού. Το 50% των διδύμων έχουν

βάρος γέννησης <2500 g σε σύγκριση με το 6% των νεογνών από μονήρη κύηση (Andersen et al, 2008). Άλλες συνέπειες για τα νεογνά είναι αυξημένα ποσοστά θνησιμότητας, συγγενείς ανωμαλίες που είναι αυξημένες κατά 29-41% σε σχέση με τα φυσιολογικά παιδιά (Sutcliffe A.G et al, 2007) και αναπηρίες σε εκείνα που τελικά επιβιώνουν, όπως εγκεφαλική παράλυση, ύποπτη αναπτυξιακή καθυστέρηση, συγγενείς δυσπλασίες και άλλα. Είναι λογικό ότι όσο αυξάνεται ο αριθμός των κυοφορούμενων εμβρύων τόσο πιο δυσχερείς είναι οι συνέπειες των πολύδυμων κύσεων (σχήμα 2). Βέβαια και οι μητέρες που κυοφορούν πολύδυμα έχουν 2 με 4 φορές αυξημένο κίνδυνο για υπέρταση κατά την κύηση και αιμορραγία μετά τον τοκετό (Luke B. et al, 2007).

Όλες οι παραπάνω επιπλοκές που φέρουν οι πολύδυμες κύσεις σαφώς επιβαρύνουν οικονομικά το κάθε σύστημα υγείας φτάνοντας τα έξοδα σε 1 δισεκατομμύριο το χρόνο μόνο για τις ΗΠΑ (Bromer JG. και Seli E., 2008). Επομένως, η μείωση των πολύδυμων με την παράλληλη αύξηση του ποσοστού εγκυμοσύνης ανά κύκλο είναι ο ιδανικός στόχος για τη θεραπεία υπογονιμότητας και οπωσδήποτε οποιαδήποτε βελτίωση στις μεθόδους αξιολόγησης των μεταφερόμενων εμβρύων θα ήταν ευεργετική. Επομένως, η IVF κοινότητα είχε να αποφασίσει ανάμεσα σε δύο σημαντικές επιλογές. Η πρώτη είναι η εφαρμογή λιγότερων επιθετικών πρωτοκόλλων έτσι ώστε να παραχθούν όσο το δυνατόν λιγότερα ωάρια προς γονιμοποίηση. Η δεύτερη προσέγγιση είναι η βελτίωση της διαδικασίας επιλογής των καλύτερων εμβρύων έτσι ώστε η μεταφορά ενός και μόνο καλού εμβρύου να έχει μεγαλύτερη πιθανότητα εμφύτευσης. Το δεύτερο σενάριο είναι σαφώς πολύ πιο ιδανικό. Για το λόγο αυτό πολλές χώρες οδηγήθηκαν στην θέσπιση αυστηρών νομοθετικών διατάξεων με σεβασμό στην IVF, περιορίζοντας τον αριθμό των ωαρίων που γονιμοποιούνται άρα ή και των μεταφερόμενων εμβρύων. Σε πολλές χώρες όπως το Βέλγιο, η Σουηδία, η Φιλανδία και η Ολλανδία εφαρμόζεται η μεταφορά ενός και μόνο εμβρύου (εκτός και αν πρόκειται για ιδιαίζουσα περίπτωση που αποκλείει το ενδεχόμενο πολύδυμης κύησης), το λεγόμενο SET, single embryo transfer (Thurin A. et al, 2004 / Lukassen H.G et al, 2005).

Clinic Summary Report

Treatment Type	Procedure Frequency	Diagnosis Frequency					
IVF	>99%	ICSI	64%	Tubal factor	8%	Other factor	8%
GIFT	<1%	Unstimulated	1%	Ovulatory dysfunction	7%	Unknown factor	13%
ZIFT	<1%	PGD	4%	Diminished ovarian reserve	11%	Multiple factors	
				Endometriosis	4%	Female only	11%
				Uterine factor	1%	Female and male	18%
				Male factor	19%		

Select Year: 2008

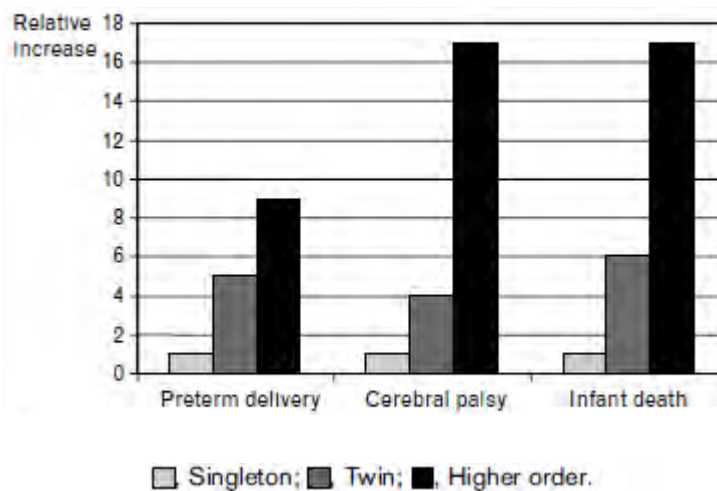
Total Cycles: 140,795

Select Diagnosis: All Diagnoses

Select Treatment Type: Fresh Embryos from Patient's Oocytes

Fresh Embryos From Non-Donor Oocytes	<35	35-37	38-40	41-42	>42
Number of cycles	39,325	21,529	20,204	9,179	6,106
Percentage of cycles resulting in pregnancies	47.5	37.9	30.1	20.4	8.7
Percentage of cycles resulting in live births	41.2	31.0	22.1	12.3	4.1
(Reliability Range)	(40.8 - 41.7)	(30.4 - 31.6)	(21.5 - 22.6)	(11.6 - 12.9)	(3.6 - 4.6)
Percentage of retrievals resulting in live births	44.5	34.8	25.9	14.9	5.2
Percentage of transfers resulting in live births	47.2	37.3	28.1	16.7	6.8
Percentage of cycles with elective single embryo transfer	5.2	3.2	1.0	0.5	0.3
Percentage of cancellations	7.2	11.0	14.9	17.8	21.2
Implantation rate	34.1	24.7	16.7	9.3	4.0
Average number of embryos transferred	2.2	2.4	2.7	3.2	3.3
Percentage of live births with twins	33.2	28.0	23.4	15.4	11.6
Percentage of live births with triplets or more	1.8	2.0	1.7	0.6	0.4

Σχήμα 1. Συνοπτικά αποτελέσματα των κλινικών IVF στις ΗΠΑ 2008. Πηγή : <http://www.sart.org/>



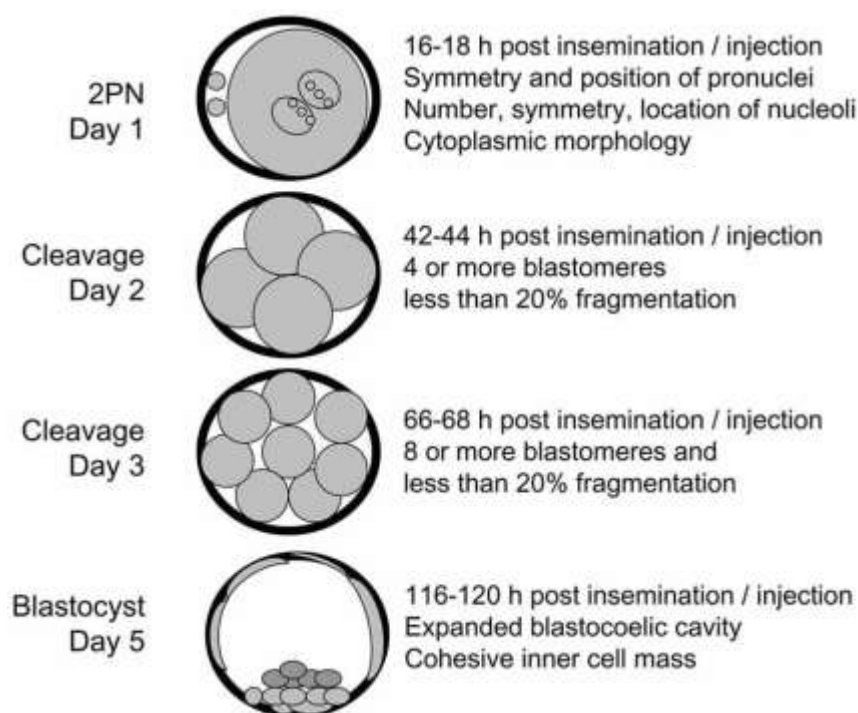
Σχήμα 2. Επιπλοκές κυμημάτων πολύδυμων κηήσεων. Δίδυμες και πολύδυμες κηήσεις σχετίζονται με αυξημένους κινδύνους πρόωρων γεννήσεων, εγκεφαλικής παράλυσης και θάνατο του νεογνού σε σχέση με τις μονήρεις κηήσεις. Πηγή: Bromer JG. και Seli E., 2008.

Αξιολόγηση in vitro αναπτυσσόμενων εμβρύων

Στην πραγματικότητα ο παράγοντας που καθορίζει την αναπτυξιακή δυναμική ενός εμβρύου είναι η ποιότητα των γαμετών από τους οποίους προέρχεται. Έχει υπολογιστεί ότι ένα 25% των ωαρίων που προκύπτουν από τη διέγερση είναι ανευπλοειδικά λόγω της αυξημένης ηλικίας των γυναικών από τις οποίες προέρχονται (Van Blerkom J. et al, 1994). Επομένως η αιτία που πολλά από τα έμβρυα που προκύπτουν από την IVF δεν καταφέρνουν να φτάσουν στο στάδιο της βλαστοκύστης δεν οφείλεται μόνο σε παράγοντες του περιβάλλοντος που καλλιεργούνται αλλά και στην γενετική τους σύσταση. Με δεδομένο λοιπόν ότι τα έμβρυα είναι φυσιολογικά γενετικά, το περιβάλλον στο οποίο καλλιεργούνται παίζει πολύ σημαντικό ρόλο. Βέβαια, πρέπει να τονιστεί ότι και οι ευνοϊκότερες συνθήκες να υπάρχουν, αυτό δεν βελτιώνει την αναπτυξιακή δυναμική του εμβρύου αυτού κάθε αυτού. Όμως καθώς το έμβρυο αναπτύσσεται, το καλλιεργητικό μέσο πρέπει να του παρέχει όλα τα απαραίτητα θρεπτικά μέσα. Ενώσω το έμβρυο αναπτύσσεται συμβαίνουν δραματικές αλλαγές στην φυσιολογία του, οι οποίες απαιτούν και διαφορετικές ανάγκες σε όλα τα στάδιά του. Γι αυτό τα καλλιεργητικά μέσα πρέπει να παρέχουν, όσο το δυνατόν, παρόμοιο περιβάλλον με αυτό του γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος, αλλά και να μειώνει όσο είναι δυνατόν το στρες που προκαλείται από τις ουσίες που εκκρίνονται από τα κύτταρα. Αλλαγές στο pH, την οσμωτική πίεση και διαταραχές στον ενεργό μεταβολισμό μπορεί να είναι στρεσογόνες για το έμβρυο. Βελτιώνοντας, λοιπόν, όσο το δυνατόν όλες αυτές τις παραμέτρους έγινε εφικτό ένα μεγάλο ποσοστό των εμβρύων να φτάνουν σε βλαστοκύστη. Η ταυτοποίηση των βιώσιμων εμβρύων απαιτεί την ταυτοποίηση κάποιων σημαντικών παραμέτρων, που στην περίπτωση των ανθρώπινων εμβρύων πρέπει να είναι και μη επεμβατικές. Έχοντας περάσει 32 χρόνια μετά την επιτυχή γονιμοποίηση των Steptoe και Edwards, η αξιολόγηση των εμβρύων στηρίζεται στην εκτίμηση των μορφολογικών παραμέτρων χρησιμοποιώντας την οπτική μικροσκοπία. Κατά την πάροδο των τριών αυτών δεκαετιών καμία σημαντική αλλαγή δεν έχει γίνει στο πως οι εμβρυολόγοι εκτιμούν τα έμβρυα. Ωστόσο η πρόβλεψη της βιωσιμότητας των εμβρύων και η επιτυχία της IVF έχει παραμείνει περιορισμένη. Η ικανότητα της σωστής εκτίμησης της βιωσιμότητας των εμβρύων είναι κρίσιμη καθώς τα περισσότερα ζεύγη που

ακολουθούν IVF έχουν να αντιμετωπίσουν τον μεγάλο αριθμό διαθέσιμων εμβρύων προς μεταφορά ή κρυοσυντήρηση.

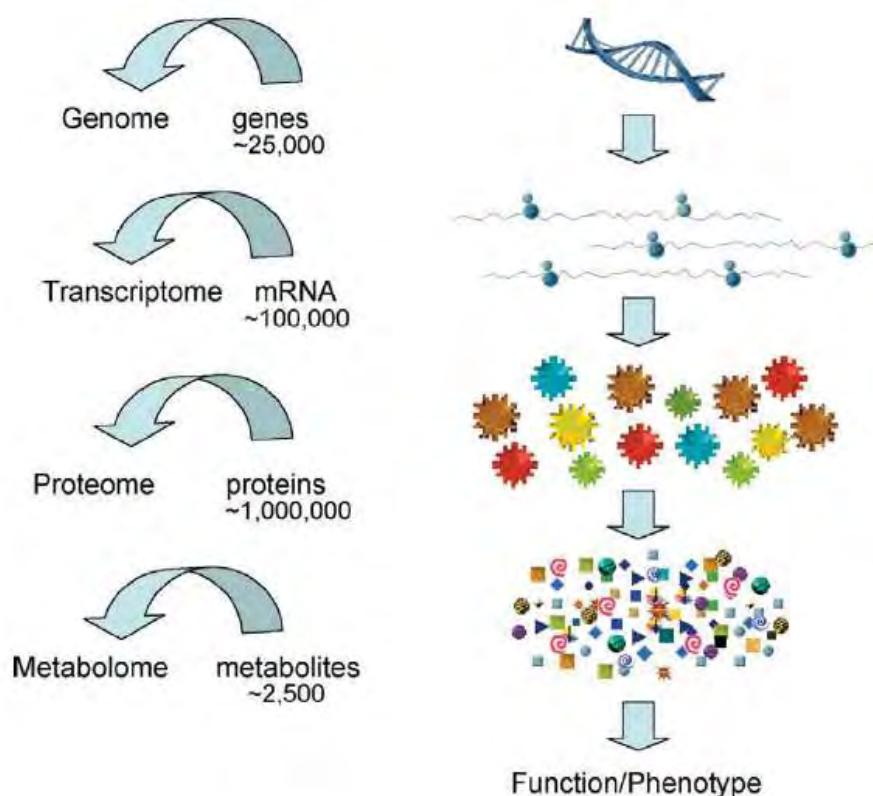
Η πιο διαδεδομένη προσέγγιση ελέγχου των εμβρύων στηρίζεται στην παρατήρηση των γαμετών και των εμβρύων σε διαφορετικά στάδια ανάπτυξης χρησιμοποιώντας ανάστροφο μικροσκόπιο. Η συσχέτιση ανάμεσα στη μορφολογία και στο στάδιο αυλάκωσης με την βιωσιμότητα των εμβρύων έχει καθιερωθεί από πολύ νωρίς (Edwards R.G et al, 1984). Από τότε έχουν αναπτυχθεί διάφορες μορφολογικές παράμετροι που σχετίζονται με τα στάδια των δύο προπυρήνων, της αυλάκωσης και της βλαστοκύστης και η παρατήρησή τους παρέχει σπουδαίες πληροφορίες για την αναπτυξιακή δυναμική των εμβρύων (Gardner D.K et al, 1999). Κάποια από τα κριτήρια του κάθε σταδίου αναδεικνύονται στο σχήμα 3 (Aydiner F. et al, 2010). Συνδυάζοντας όλα τα παραπάνω κριτήρια κατά την ανάπτυξη του κάθε εμβρύου παρέχεται μια ικανοποιητική αναπτυξιακή δυναμική του εμβρύου και μπορεί να βοηθήσει αξιοπρεπώς στην επιτυχία της IVF (Lan K.C et al, 2003). Παρά την περιορισμένη διαγνωστική αξία που παρέχει η παραπάνω αξιολόγηση των εμβρύων έχει ένα σαφές προβάδισμα των άλλων μεθόδων: είναι απλή, γρήγορη και μη επεμβατική. Όμως οι μέθοδοι επιλογής με βάση τη μορφολογία είναι καθαρά υποκειμενική και οι αποκλίσεις που παρατηρούνται σε κάθε εργαστήριο ανάλογα με τον παρατηρητή περιορίζουν την δυναμική της τεχνικής αυτής.



Σχήμα 3. Παρατίθενται τα διάφορα μορφολογικά κριτήρια που χρησιμοποιούνται ευρέως για την ταυτοποίηση των υψηλής ποιότητας εμβρύων στα διαφορετικά στάδια της διαίρεσης της προεμφυτευτικής ανάπτυξης. Πηγή: Aydiner F. et al, 2010

Omics και αξιολόγηση εμβρύων

Ο ιδανικός τρόπος για την κατανόηση της εμβρυογένεσης είναι η τεχνολογία των Omics. Πρόκειται για πολλά υποσχόμενες και πρωτοπόρες στρατηγικές που στηρίζονται σε μια γενικότερη μοριακή ανάλυση του ωαρίου (και των σωματικών κυττάρων που το περιβάλλουν) καθώς και του περιβάλλοντος (καλλιεργητικό υλικό) μέσα στο οποίο αναπτύσσεται το έμβρυο, καταλήγοντας έτσι σε εκείνο που είναι καλύτερο αναπτυξιακά και μπορεί να οδηγήσει σε εγκυμοσύνη. Μετά την εμφάνιση της τεχνολογίας των Omics (genomics, transcriptomics, proteomics και metabolomics) (σχήμα 4) έχει αλλάξει ο τρόπος μελέτης της φυσιολογίας των θηλαστικών και αποτελούν ένα σημαντικό διαγνωστικό εργαλείο για την επιλογή εκείνου του εμβρύου/ ωαρίου με τις καλύτερες προοπτικές επιβίωσης (Brison D., 2007 / Seli E. et al, 2010).



Σχήμα 4. Από τα γονίδια και το γονιδίωμα στους μεταβολίτες και στο μεταβόλομα (metabolome), και η συσχέτισή τους με τη λειτουργία και το φαινότυπο. Τα

διαφορετικά στάδια που μελετάει η τεχνολογία των Omics. Σκοπός του: με τη μελέτη της συστηματικής βιολογίας να ορίσει το φαινότυπο και να γεφυρώσει το κενό μεταξύ γονότυπου και φαινοτύπου. Πηγή: Symposium: Innovative techniques in human embryo viability assessment. Nagy Z.P et al, 2008.

*Αξιολόγηση της βιωσιμότητας των εμβρύων με τη χρήση των **genomics**. Ανάλυση γονιδιώματος: μελετώντας το περιεχόμενο DNA των κυττάρων*

Το DNA είναι αυτό που καθορίζει την αλληλουχία των μεταγράφων, της πρωτεϊνικής σύνθεσης και γενικά του φαινοτύπου. Επομένως η ύπαρξη γενετικών δεικτών μπορεί να καθορίσει τη βιωσιμότητα ενός εμβρύου με το να αναλυθεί το DNA αυτού κάθε αυτού του εμβρύου. Παρόλα αυτά δεν έχουν ακόμα ταυτοποιηθεί τέτοιου είδους μεταλλαγές στο DNA που να σχετίζονται με αυξημένη βιωσιμότητα. Αν και η ανάλυση του DNA δεν έχει αποδώσει ικανοποιητικά αποτελέσματα για την αξιολόγηση της βιωσιμότητας, ο αριθμός και η ακεραιότητα των χρωμοσωμάτων σαφώς και καθορίζουν την βιωσιμότητα των εμβρύων.

Ένα εργαλείο που χρησιμοποιείται για τη διάκριση ενός βιώσιμου από ένα μη βιώσιμο έμβρυο είναι ο έλεγχος για τυχόν ανευπλοειδία, το οποίο συχνά αναφέρεται και ως προεμφυτευτική γενετική σάρωση (preimplantation genetic screening, PGS) κατά την οποία σαρώνεται ολόκληρο το γονιδίωμα και ελέγχονται όλα τα χρωμοσώματα (Wells D. et al, 2002). Η European Society for Human Reproduction and Embryology (ESHRE) την ονόμασε έτσι για να διακρίνεται από την προεμφυτευτική γενετική διάγνωση (preimplantation genetic diagnosis, PGD), η οποία πραγματοποιείται για ασθενείς με υψηλό κίνδυνο μετάδοσης μια γενετικής ή χρωμοσωμικής ανωμαλίας στους απογόνους τους, συμπεριλαμβανομένου των μονογονιδιακών ανωμαλιών (αυτοσωμικές υπολειπόμενες ή επικρατείς και φυλοσύνδετες διαταραχές) αλλά και χρωμοσωμικών διαταραχών (μεταθέσεις, αντιστροφές και άλλα).

Με κάποιες εξαιρέσεις, πολλά ανευπλοειδή έμβρυα έχουν φυσιολογική μορφολογία (Munne S. et al, 1994) και για το λόγο αυτό οι συνήθεις μέθοδοι

αξιολόγησης που διεξάγονται από τα κέντρα IVF πριν τη μεταφορά του εμβρύου δεν μπορούν να ανιχνεύσουν τέτοιων ειδών ανωμαλίες (Marquez C. et al, 2000). Με την PGD, αν και επεμβατική μέθοδος, μπορεί να αναλυθεί η βιωσιμότητα είτε του εμβρύου είτε του ωαρίου. Κατά τη μέθοδο αυτή πραγματοποιείται βιοψία του πρώτου πολικού σωματίου προτού γίνει η γονιμοποίησή του ή του βλαστομεριδίου (μπορεί και δύο) από κάθε έμβρυο στο στάδιο των 8 κυττάρων ή ακόμη και αφαίρεση κυττάρων του τροφοεξωδέρματος στο στάδιο της βλαστοκύστης (Donoso et al, 2007). Η βιοψία του πολικού σωματίου έχει ένα πολύ μεγάλο προτέρημα στο ότι με μια σχετικά μη επεμβατική μέθοδο εξασφαλίζει το γενετικό προφίλ του ώριμου ωαρίου (μετάφαση II). Παρόλα αυτά η μέθοδος είναι φανερό ότι μειονεκτεί στο γεγονός ότι δεν παρέχει πληροφορίες σχετικά με το προκύπτον έμβρυο μετά τη γονιμοποίηση. Ένα ακόμη μειονέκτημα είναι ότι η αφαίρεση του πολικού σωματίου και η ρήξη της διαφανούς ζώνης απαιτεί αρκετά εκπαιδευμένο προσωπικό που δεν είναι πάντα διαθέσιμο στα IVF εργαστήρια. Από την άλλη, η βιοψία βλαστομεριδίων στο στάδιο των 8 κυττάρων πλεονεκτεί στο ότι η αξιολόγηση γίνεται αφότου έχει ολοκληρωθεί η ενεργοποίηση του εμβρυϊκού γονιδιώματος. Ωστόσο, η αφαίρεση κυττάρων σε αυτό το στάδιο είναι σαφώς πολύ επεμβατική (Cohen et al, 2007), αν και έρευνες έχουν δείξει ότι μετά από αυτήν την επέμβαση 6/8 ή και 7/8 έμβρυα φτάνουν στο στάδιο της βλαστοκύστης (Hardy et al, 1990). Παρόλα αυτά δεν γνωρίζουμε αν αυτή η τεχνική είναι ασφαλής και αν έχει μακροπρόθεσμες επιπτώσεις για την μετέπειτα εξέλιξη του εμβρύου. Η βιοψία κυττάρων του τροφοεξωδέρματος είναι σαφώς λιγότερο επεμβατική καθώς τα κύτταρα της εσωτερικής κυτταρικής μάζας (inner cell mass, ICM) δεν συλλέγονται. Βέβαια, οι πληροφορίες που μας δίδονται για την υγεία του εμβρύου που προκύπτει από την ICM είναι ακόμη υπό αμφισβήτηση και βεβαίως απαιτεί και ένα μεγάλο αριθμό εμβρύων που θα καταφέρουν να φτάσουν στο στάδιο της βλαστοκύστης. Αμέσως μετά την αφαίρεση του/των κυττάρου/ων, χρησιμοποιούνται τεχνικές ανάλυσης του γονιδιώματος όπως in situ υβριδισμό με τη βοήθεια φθορισμού (FISH), Comparative Genomic Hybridization (CGH), microarrays ή και Single Nucleotide Polymorphism (SNP)-based arrays. Αποφεύγοντας λοιπόν την μεταφορά ανευλοειδικών εμβρύων αφού έχει προηγηθεί PGS, έχει αποδειχτεί ότι εκτός του ότι μειώνει τον κίνδυνο ενός τρισωμικού απογόνου, αυξάνει το ποσοστό εμφύτευσης και μειώνει τις αυτόματες αποβολές. Για το λόγο αυτό αποτελεί ένα σπουδαίο εργαλείο για τη διαλογή εκείνων των εμβρύων που είναι χρωμοσωμικά φυσιολογικά.

Συμπερασματικά λοιπόν PGS ή και PGD πρέπει να εφαρμόζονται μόνο όταν υπάρχει διαθεσιμότητα εμβρύων προς μεταφορά, διότι αποτελούν επεμβατικές μεθόδους και μπορεί να προκαλέσουν βλάβη στο έμβρυο (Munne S. et al, 2003). Αυτές οι προσεγγίσεις εκτός του ότι κοστίζουν, είναι επεμβατικές και πολύπλοκες, δεν μπορούν επίσης να εφαρμοστούν σε κλινικό επίπεδο καθώς η διαδικασία είναι χρονοβόρα και τα έμβρυα πρέπει να κρυσταλλωθούν μέχρις ότου ολοκληρωθεί η διάγνωση.

Transcriptomic Analysis: Μελέτη του εκφραζόμενου RNA στα κύτταρα

Στην ουσία, το μεταγράφομα (transcriptome) είναι το περιεχόμενο RNA ενός κυττάρου. Η ανάλυση του transcriptome μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να δείξει ποια γονίδια μεταφράζονται και σε τι επίπεδο. Προφανώς, αυτού του είδους η ανάλυση επηρεάζεται από την ποιότητα του RNA που έχει απομονωθεί και όπως είναι γνωστό το RNA είναι πολύ ευαίσθητο από τη δράση των νουκλεασών (αποικοδομείται εύκολα και γρήγορα αμέσως μετά την λύση του κυττάρου), άρα είναι πολύ σημαντικές οι τεχνικές απομόνωσής τους. Αμέσως μετά πραγματοποιείται αντίστροφη μεταγραφή του και ανάλυση με τη βοήθεια της PCR.

Ένας μικρός αριθμός δημοσιεύσεων έχουν προτείνει μια σειρά πιθανών εκφραζόμενων γονιδίων που ενδεχομένως να δρουν ως μάρτυρες για τη βιωσιμότητα των εμβρύων, για παράδειγμα ο insulin-like growth factor-1 (Kowalik A. et al, 1999), η ιντερλευκίνη-1 (Krussel et al, 1998) καθώς και διάφορα ρυθμιστικά μόρια κυτταρικής προσκόλλησης και απόπτωσης. Ωστόσο, η ταυτοποίηση τέτοιων μικρών μορίων εκτός του ότι είναι δύσκολο να εφαρμοστεί σε κλινικό επίπεδο, υπάρχουν και αντιφάσεις στο να επιλέξουν ποια από αυτά τα μόρια όντως σχετίζονται με τη βιωσιμότητα. Απαιτείται λοιπόν μια συστηματική βιολογική προσέγγιση όπου θα αναλύεται ολόκληρο το μεταγραφικό προφίλ καθώς θα ελέγχονται συνολικά όλοι αυτοί οι μάρτυρες και έτσι θα δίδεται μια πλήρη εικόνα για τη βιωσιμότητα του εμβρύου. Η cDNA microarray τεχνολογία μπορεί να δώσει λύση σε αυτό καθώς θα εξετάζει το συνολικά μεταγραφόμενο DNA. Βέβαια γίνεται αντιληπτό πως όλο αυτό δεν είναι εφαρμόσιμο κλινικά και χρησιμοποιείται μόνο για ερευνητικούς σκοπούς.

Συμπερασματικά λοιπόν, όλες αυτές οι τεχνικές είναι επεμβατικές, ενέχουν κινδύνους για το έμβρυο και προκειμένου να χρησιμοποιηθούν σε κλινικό επίπεδο πρέπει να είναι κλινικά πολύ αποτελεσματικές και πολύτιμες προκειμένου να αντισταθμίσουν το ρίσκο που έχουν. Από όλες τις τεχνολογίες, η Transcriptomic ανάλυση φαίνεται να είναι η πιο πολλά υποσχόμενη για κλινική εφαρμογή καθώς η υψηλή ευαισθησία της PCR και των cDNA arrays δίνει τη δυνατότητα ανάλυσης ακόμη και σε επίπεδο ενός κυττάρου. Παρόλα αυτά το mRNA δεν είναι αυτό που δρα μέσα στο κύτταρο αλλά μεταφράζεται σε λειτουργικό προϊόν δηλαδή σε πρωτεΐνες ή μεταβολίτες. Επομένως, το πρωτεϊνικό ή το μεταβολικό προφίλ του εμβρύου θα παρέχει όλους εκείνους τους μάρτυρες που θα αντικατοπτρίζουν με μεγαλύτερη σαφήνεια τον φαινότυπο (φυσιολογικό ή όχι) του εμβρύου. Οποιαδήποτε πάντως προσέγγιση θα πρέπει να είναι μη επεμβατική και να μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην κλινική ρουτίνα.

Μη επεμβατικές μέθοδοι αξιολόγησης εμβρύων

Ο περιορισμός που προκύπτει από την αξιολόγηση των εμβρύων με βάση τη μορφολογία, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, έστρεψε τους επιστήμονες σε άλλες μη επεμβατικές μεθόδους οι οποίες στηρίζονται στο μεταβολισμό του εμβρύου. Όλες αυτές οι ερευνητικές προσεγγίσεις στηρίζονται στην υπόθεση ότι «ένα έμβρυο που καταλήγει σε εγκυμοσύνη, μεταβάλλει το περιβάλλον μέσα στο οποίο αναπτύσσεται με διαφορετικό τρόπο από ότι ένα μη βιώσιμο έμβρυο». Όμως οι μέθοδοι αυτές εξελίσσονται συνεχώς και από την στοχευμένη ανάλυση μεταβολιτών (η ανάλυση περιορίζεται σε ένα ή κάποιους καθορισμένους μεταβολίτες) για διαγνωστικούς σκοπούς, έχουν μεταβεί στην ανάλυση ολόκληρου του μεταβολικού προφίλ του εμβρύου (αναζήτηση συγκεκριμένων μεταβολιτών αλλά και ενδιαμέσων μορίων). Η αρχή των μεθόδων αυτών στηρίζεται στην παρακολούθηση της πρόσληψης θρεπτικών ουσιών, που περιέχονται στο περιβάλλον καλλιεργητικό υλικό, από το έμβρυο και στην ανίχνευση εκκρινόμενων μεταβολιτών και ουσιών μέσα στο θρεπτικό υλικό (Sakkas D. et al, 2005). Για τον υπολογισμό τέτοιων αλλαγών στο καλλιεργητικό υλικό, οι μη επεμβατικές τεχνικές πρέπει να πληρούν τα κριτήρια

εκείνα τα οποία θα τις καταστήσουν ικανές να εφαρμοστούν σε κλινικές IVF (Sakkas D. et al, 2008). Τα κριτήρια αυτά είναι:

1. Η ικανότητα μέτρησης αυτών των αλλαγών χωρίς να βλάπτεται το έμβρυο.
2. Η δυνατότητα μέτρησης των αλλαγών γρήγορα.
3. Η μέτρηση των αλλαγών να είναι σταθερή (επαναληψιμότητα αποτελεσμάτων) και ακριβής.

Proteomic analysis

Η ανάλυση της πρωτεϊνικής σύστασης (proteome) του εμβρύου αποτελεί μια πρόκληση καθώς χρειάζεται να αναλυθεί ένας αρκετά μεγάλος αριθμός μορίων τα οποία βρίσκονται στο καλλιεργητικό υλικό και σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Σε αντίθεση με το mRNA εδώ δεν υπάρχουν αντίστοιχες μέθοδοι ενίσχυσης – εμπλουτισμού των πρωτεϊνών προς ανάλυση. Ο Katz-Jaffe (2009) και οι συνεργάτες του πρότειναν ότι τα βιώσιμα έμβρυα διαθέτουν ένα και μοναδικό proteome και ενδεχομένως κάποιες από αυτές τις πρωτεΐνες εκκρίνονται στο περιβάλλον καλλιεργητικό μέσο, συμβάλλοντας στο secretome. Ουσίες όπως ο παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (platelet activating factor, PAF) (O'Neill, 2005) και η λεπτίνη (Gonzalez et al, 2000) εκκρίνονται στο καλλιεργητικό μέσο και μπορεί να αποτελέσουν δείκτη ποιότητας των εμβρύων.

Στη μελέτη των Sakkas D. et al φάνηκε αδιαμφισβήτητα ότι ένας διαλυτός παράγοντας που απελευθερώνεται από ανθρώπινες βλαστοκύστες, επάγει την έκφραση των HOXA10 γονιδίων σε κυτταρική σειρά Ishikawa (επιθηλιακά κύτταρα ενδομητρίου) (Sakkas D. et al, 2003). Τα γονίδια HOXA10 παίζουν σημαντικό ρόλο στην εμφύτευση του εμβρύου και γενικά στην υποδεκτικότητα του ενδομητρίου. Μελετήθηκε το ενδεχόμενο αυτή η επαγωγή να επηρεάζεται από τη χοριακή γοναδοτροφίνη, αλλά κατόπιν πειραμάτων δεν φάνηκε καμία επίδραση στην έκφραση. Παρόλα αυτά, η ανίχνευση αυτού του εκκρινόμενου μορίου φανερώνει όχι μόνο την ικανότητα του εμβρύου να καταλήξει σε βλαστοκύστη αλλά και μεγάλη πιθανότητα εμφύτευσής του.

Ο Katz-Jaffe και οι συνεργάτες του χρησιμοποίησαν για την ανάλυση του secretome τη φασματοσκοπία μάζας MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight), η οποία ταυτοποιεί διαφορετικά πρωτεϊνικά προφίλ για

κάθε στάδιο ανάπτυξης του εμβρύου (Katz-Jaffe et al, 2005). Βρέθηκε ότι το προφίλ της έκφρασης των πρωτεϊνών είναι τόσο διαφορετικό μεταξύ αρχικών και προχωρημένων βλαστοκύστεων όσο διαφορετικό είναι αυτό των αναπτυσσόμενων βλαστοκύστεων και των εκφυλισμένων εμβρύων.

Soluble Human Leukocyte Antigen- G (sHLA-G) : ένας εναλλακτικός υποψήφιος εκκρινόμενος βιο δείκτης.

Τα γονίδια του μείζονος συστήματος ιστοσυμβατότητας τύπου I (HLA I) κωδικοποιούν τις αντιγονικές ιδιότητες στην επιφάνεια των κυττάρων. Διακρίνονται σε κλασσικές και μη κλασσικές τάξεις. Ιδιαίτερη σημασία για την ανοσοβιολογία της κύησης έχουν τα HLA – C, HLA – E, και πρωτεύοντα ρόλο το HLA – G, το οποίο εκφράζεται μόνο στον πλακουντιακό ιστό. Συγκεκριμένα, το τελευταίο εκφράζεται στα κύτταρα της τροφοβλάστης, τόσο λαχνικά όσο και εξωλαχνικά, όπου δηλαδή έρχονται σε επαφή μητέρα και έμβρυο.

Στη διάρκεια της εγκυμοσύνης η πλακουντιακή έκφραση του HLA – G μειώνεται εμφανίζοντας τη μεγαλύτερη συγκέντρωση της στο πρώτο τρίμηνο της κύησης. Έχει βρεθεί ότι η χοριακή κυτταροτροφοβλάστη στην αρχική της ανάπτυξη εκφράζει διαλυτά s mRNA 1 (Le Bouteiller et al, 2003). Αρχικά, το συγκεκριμένο μόριο μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο στην επίκτητη ανοσία με το αναγνωρίζει τα CD8 T κύτταρα και να τα οδηγεί στη μετατροπή τους σε κατασταλτικά. Ομοίως επηρεάζει και την φυσική ανοσία. Το HLA – G1 αλληλεπιδρά με διάδοχους NK κυτταρικούς υποδοχείς συμπεριλαμβανομένου των KIR2DL4, ILT2, ILT4, CD160. Αν και αυτή η αλληλεπίδραση θα έπρεπε να πυροδοτήσει CD160 – κατευθυνόμενη NK αντίδραση, εν τέλει δεν το προκάλεσε (Le Bouteiller et al, 2003). Ακόμα, έχει ανοσοκατασταλτική λειτουργία προκαλώντας απόπτωση των CD8+ T κυττάρων μέσω του CD95/CD95 συνδέτη μονοπατιού (Solier et al, 2002). Τελευταίες μελέτες έδειξαν πως το παραπάνω μόριο είναι ένας αγγειογενετικός αναστολέας και μπορεί να ελέγξει μία πιθανή αγγειακή αναδιαμόρφωση. Όπως βλέπουμε το HLA – G παίζει ιδιαίτερο ρόλο στην ανοσολογική ανοχή του εμβρύου από τη μητέρα και έτσι είναι βασικός παράγων της μη απόρριψης του κυήματος.

Οι Jurisicova και συνεργάτες κατάφεραν να ανιχνεύσουν τόσο mRNA όσο και πρωτεΐνη HLA-G σε ανθρώπινα έμβρυα στο στάδιο αυλάκωσης και βλαστοκύστης (Jurisicova A. et al, 1996). Αργότερα ανιχνεύθηκε sHLA-G και στο καλλιεργητικό

υλικό των εμβρύων (Menicucci A. et al, 1999). Ο Fuzzi και οι συνεργάτες του με τη βοήθεια της ELISA μελέτησαν την ύπαρξη του sHLA-G στο θρεπτικό μέσο και τη συνέκριναν με την μορφολογία του εμβρύου αλλά και το ποσοστό κύησης. Σχετικά με το πρώτο δεν βρέθηκε καμία συσχέτιση αλλά αντίθετα παρατήρησαν ότι σε όλες τις προκύπτουσες εγκυμοσύνες είχαν μεταφερθεί έμβρυα στον οποίο το θρεπτικό περιέχονταν sHLA-G (Noci I. et al, 2005). Ακολούθησαν και άλλες μετα-αναλύσεις οι οποίες αποδεικνύουν ότι η παρουσία του sHLA-G σχετίζεται με αυξημένη εμβρυική βιωσιμότητα και βελτιωμένα ποσοστά κύησης. Επομένως, το sHLA-G θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως πιθανός δείκτης της εμβρυικής ανάπτυξης και ιδιαίτερα στην περίπτωση εκείνη που έχουμε να επιλέξουμε ανάμεσα σε έμβρυα ίδιας μορφολογίας.

Metabolomics

Η ανάλυση του μεταβολισμού του εμβρύου καθορίζει τη βιωσιμότητά του

Ο σωστός μεταβολισμός είναι απαραίτητος για ένα έμβρυο πριν την εμφύτευσή του προκειμένου να παραμείνει βιώσιμο και να καταλήξει επιτυχώς σε μια εγκυμοσύνη. Ως αποτέλεσμα αυτού, έχουν μελετηθεί εκτενώς θρεπτικές ουσίες και μεταβολίτες του καλλιεργητικού περιβάλλοντος του εμβρύου ώστε να αποτελέσουν δείκτες- μάρτυρες της βιωσιμότητάς του (Nagy Z.P, 2009).

Ένα σημαντικό γεγονός της ανάπτυξης του προεμφυτευόμενου εμβρύου είναι ο μεταβολισμός του καρβοξυλικού οξέως σε γλυκόζη, ο οποίος πραγματοποιείται περί την χρονική περίοδο της σύμπτυξης. Αυτό το φαινόμενο αποτελεί ένα από τα καλύτερα χαρακτηρισμένα φαινόμενα της εμβρυικής μεταβολικής ρύθμισης (Leese H.G et al, 1995). Τόσο η αερόβια (κύκλος του Crebs) όσο και η αναερόβια γλυκόλυση (Embden Meyerhof οδός) είναι σημαντικές για την απόκτηση της απαιτούμενης ενέργειας κατά την προεμφυτευτική ανάπτυξη. Στα αρχικά στάδια ανάπτυξης κυριαρχεί ο μεταβολισμός του καρβοξυλικού οξέος, όπου πυροσταφυλικό και γαλακτικό οξύ αποτελούν τις κύριες πηγές ενέργειας του εμβρύου, σε αντίθεση με τη γλυκόζη της οποίας η πρόσληψη είναι ελάχιστη (Biggers et al, 1967 / Gardner and

Leese, 1988). Όσο προχωράει η ανάπτυξη του εμβρύου (από το στάδιο των προπυρήνων έως αυτό τη σύμπτυξης), η πρόσληψη της γλυκόζης αυξάνεται, όπου στο στάδιο της βλαστοκύστης ο μεταβολισμός της κυριαρχεί. Αυτή η αύξηση της κατανάλωσης προς τα τελευταία στάδια ανάπτυξης του εμβρύου έχει παρατηρηθεί και σε άλλα είδη εκτός του ανθρώπου, όπως το πρόβατο, το γουρούνι, την αγελάδα, το ποντίκι και τον αρουραίο (Brison και Leese, 1991 / Leese και Barton, 1984).

Αυτές οι αλλαγές στη κατανάλωση θρεπτικών ουσιών από το έμβρυο αντικατοπτρίζονται και *in vivo* καθώς το έμβρυο περιηγείται στο γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα. Πιο αναλυτικά, πριν την σύμπτυξη το έμβρυο αλληλεπιδρά με το σαλπγγικό περιβάλλον το οποίο περιέχει σχετικά υψηλές ποσότητες πυροσταφυλικού και γαλακτικού αλλά χαμηλές ποσότητες γλυκόζης. Από την άλλη, το αντίστροφο συμβαίνει στο περιβάλλον της μήτρας (υψηλές ποσότητες γλυκόζης και χαμηλό πυροσταφυλικό), όπου καταλήγει το έμβρυο στο στάδιο της βλαστοκύστης (Gardner et al, 1996 / Leese et al, 2001).

Επιπλέον, διάφορα αμινοξέα είναι επίσης σημαντικά για τη βέλτιστη ανάπτυξη του εμβρύου καθώς προσφέρουν ένα ευρύ φάσμα λειτουργιών όπως η πρωτεϊνική σύνθεση, ο μεταβολισμός, η ρύθμιση του pH και λειτουργούν ως ενεργειακά υποστρώματα (Bavister, 1995 / Gardner και Lane, 1997).

Συμπερασματικά, η φυσιολογική ανάπτυξη του εμβρύου απαιτεί βασικά θρεπτικά συστατικά, των οποίων η αποικοδόμηση δημιουργεί μεταβολίτες που αντικατοπτρίζουν την δραστηριότητα και την αποτελεσματικότητα του εμβρυικού μεταβολισμού (σχήμα 5). Στηριζόμενοι σε αυτές τις παρατηρήσεις, οι πλειοψηφία των ερευνητών προτείνουν ότι αλλαγές στα επίπεδα των θρεπτικών ουσιών ή και μεταβολιτών αποτελούν μάρτυρες της βιωσιμότητας του εμβρύου (Σχήμα 6).



Σχήμα 5. έμβρυο και μεταβολίτες στο καλλιεργητικό του μέσο. Εικόνα από διαδίκτυο.

Μεταβολίτες, πιθανοί βιο-δείκτες της βιωσιμότητας του εμβρύου

Πυροσταφυλικό

Η πρόσληψη του πυροσταφυλικού από τα έμβρυα έχει εξεταστεί ως ένας πιθανός δείκτης της βιωσιμότητας του εμβρύου και της ανάπτυξής του, ιδιαίτερα στο στάδιο της αυλάκωσης. Από πολύ νωρίς ο Hardy και οι Gott ανέφεραν αυξημένη πρόσληψη πυροσταφυλικού από εκείνα τα ανθρώπινα έμβρυα που καταλήγουν σε βλαστοκύστη (Hardy K. et al, 1989 / Gott A.L et al, 1990). Αργότερα οι Conaghan και συνεργάτες παρατήρησαν μια αντίστροφη συσχέτιση πρόσληψης πυροσταφυλικού και βιωσιμότητας στα έμβρυα σταδίου 2-8 κυττάρων (Conaghan J. et al, 1993a / 1993b). Όμως μία ακόμη δημοσίευση των Turner και συνεργατών, διαπίστωσε ότι υπάρχει μια μεγάλη διακύμανση στην πρόσληψη πυροσταφυλικού από τα έμβρυα, η οποία όμως μειωνόταν σε κείνα τα έμβρυα που ήταν ικανά να εμφυτευτούν (Turner K. et al, 1994). Είναι πολύ ενδιαφέρον ότι αν και οι μελέτες αυτές διεξήχθησαν κάτω από τις ίδιες συνθήκες (ίδια ερευνητική ομάδα από το εργαστήριο στο οποίο επικεφαλής ήταν ο Henry Leese), ωστόσο έδειξαν διαφορετικά αποτελέσματα. Ενδεχομένως να υπάρχουν διαφορές στη σύσταση των καλλιεργητικών υλικών που εξηγεί αυτές τις διακυμάνσεις. Πιο πρόσφατα, όμως, ο Gardner και οι συνεργάτες έδειξαν ότι τα έμβρυα 4 κυττάρων που τελικά φτάνουν σε βλαστοκύστη απαιτούν την πρόσληψη υψηλότερων επιπέδων πυροσταφυλικού (Gardner D.K et al, 2001). Τα αποτελέσματα δεν δείχνουν ξεκάθαρα τη σύνδεση πρόσληψης πυροσταφυλικού και αποτελέσματος, οπότε δεν φαίνεται να αποτελεί ένα αξιόπιστο βιο δείκτη για τη βιωσιμότητα ενός εμβρύου.

Γλυκόζη

Σε αντίθεση με τα παραπάνω, καθώς το έμβρυο μεταβαίνει από το στάδιο του μοριδίου σε αυτό της βλαστοκύστης αυξάνονται σημαντικά τα ποσά της γλυκόζης που καταναλώνονται και έτσι ενδεχομένως να μπορεί να διακριθεί και η βιωσιμότητά του (Devreker F. et al, 2007). Αρχικά το φαινόμενο αυτό μελετήθηκε σε άλλα

θηλαστικά όπως βοοειδή και ποντίκια στα οποία βρέθηκε ότι αυτά που τελικά εμφυτεύονται έχουν μια σημαντική αύξηση στην πρόσληψη της γλυκόζης σε σχέση με αυτά διακόπτεται η ανάπτυξή τους (Renard et al, 1980 / Gardner and Leese, 1987). Οι μελέτες συνεχίστηκαν και σε ανθρώπινα έμβρυα που αν και έδειχναν ότι δεν ισχύουν τα παραπάνω αποτελέσματα, ενδεχομένως να οφειλόταν στο γεγονός ότι το καλλιεργητικό μέσο που χρησιμοποιούσαν δεν περιείχε πυροσταφυλικό, γαλακτικό, αμινοξέα με αποτέλεσμα να προκαλείται μεταβολικό στρες στα έμβρυα (Gott et al, 1990 / Hardy et al, 1989 / Jones et al, 2001). Αφού χρησιμοποιήθηκαν πιο ανεπτυγμένα καλλιεργητικά υλικά, προσφάτως, παρατηρήθηκε ότι η κατανάλωση της γλυκόζης στα έμβρυα 4 ημερών είναι μεγαλύτερη σε εκείνα που τελικώς θα καταλήξουν σε βλαστοκύστες (Gardner D.K et al, 2001). Οι τιμές είναι ενδεικτικές του κάθε σταδίου και μπορούν να αξιολογήσουν το έμβρυο ως προς τη βιωσιμότητά του.

Σε όλες τις παραπάνω μελέτες που περιγράφηκαν, πραγματοποιήθηκαν ενζυμικές δοκιμασίες για τον υπολογισμό των μεταβολιτών. Αυτές οι τεχνικές αν και είναι πολύ ακριβείς, τεχνικά είναι πολύπλοκες και δεν είναι κατάλληλες για να εφαρμοστούν κλινικά. Πολύ πρόσφατα μια ελπιδοφόρα τεχνική, ενζυμικές δοκιμές με τη χρήση φθορισμού (microfluorometric enzymatic assays), ίσως βοηθήσουν στην μέτρηση αυτών των ουσιών ταχύτατα χρησιμοποιώντας πολύ μικρούς όγκους καλλιεργητικού (Urbanski et al, 2008). Η μέθοδος είναι ταχύτατη, πολύ εύκολη διότι το μόνο που απαιτείται είναι η προσθήκη του ενζύμου σε κάθε δείγμα και είναι αυτοματοποιημένη.

Αμινοξέα

Η μελέτη των αλλαγών των αμινοξέων μέσα στο καλλιεργητικό υλικό έχουν ξεκινήσει σχετικά πρόσφατα, καθώς το 2002 πρώτος ο Houghton και οι συνεργάτες του, εφαρμόζοντας HPLC παρατήρησαν τις αλλαγές στην έκκριση αλλά και πρόσληψη των αμινοξέων σε έμβρυα διαφορετικών σταδίων ανάπτυξης (Houghton et al, 2002). Πιο αναλυτικά βρέθηκε ότι, προσλαμβάνονται χαμηλότερα επίπεδα γλουταμίνης, αργινίνης και μεθειονίνης από τα έμβρυα Day 2 ή 3 σε σχέση με αυτά που φτάνουν βλαστοκύστη. Παρομοίως, παρατηρείται χαμηλότερη απελευθέρωση

αλανίνης και ασπαραγίνης. Από την άλλη έμβρυα σταδίου 8 κυττάρων και μετά καταναλώνουν λιγότερο σερίνη και απελευθερώνουν λιγότερο αλανίνη και γλυκίνη. Σε μια δημοσίευση, ο Leese και οι συνεργάτες, το 2008, διατύπωσαν την υπόθεση του «ήρεμου» εμβρύου, κατά την οποία ένα έμβρυο θεωρείται καλύτερο αναπτυξιακά όταν τόσο η κατανάλωση όσο και η απελευθέρωση των αμινοξέων στο καλλιεργητικό υλικό βρίσκονται στα χαμηλότερα δυνατά επίπεδα (Leese et al, 2008).

Στη μελέτη του Brison et al τα γονιμοποιημένα ωάρια (ζυγωτά) καλλιεργήθηκαν μόνα τους για 24 ώρες σε 4 μl υλικό που περιείχε μείγμα αμινοξέων και μεταφέρθηκαν την Day 2. Το εναπομένον καλλιεργητικό υλικό μετά την εμβρυομεταφορά αναλύθηκε με HPLC. Κατόπιν, παρατήρησαν ότι μείωση σε γλυκίνη και λευκίνη καθώς και αύξηση στα επίπεδα της ασπαραγίνης σχετίζονται με έμβρυα που καταλήγουν σε εγκυμοσύνη (Brison et al, 2004). Τέλος επιβεβαίωσαν τα παραπάνω, ότι δηλαδή ένα έμβρυο με μεγαλύτερη βιωσιμότητα έχει χαμηλότερο ή πιο ήρεμο μεταβολισμό των αμινοξέων απ' ότι αυτά που καταστέλλουν την ανάπτυξή τους.

Μια ακόμη πολύ χρήσιμη έρευνα που χρησιμοποίησε NMR έδειξε ότι υψηλά επίπεδα γλουταμικού οξέος βρέθηκαν σε καλλιεργητικό υλικό εμβρύων (Day 3) που τελικά κατέληξαν σε εγκυμοσύνη (Seli et al, 2008). Τέλος, έγινε μια προσπάθεια για συσχέτιση των επιπέδων των αμινοξέων με την πλοειδή κατάσταση. Εξετάζοντας το καλλιεργητικό υλικό εμβρύων 2 με 3 ημερών, η κατανάλωση της ασπαραγίνης, της γλυκίνης και της βαλίνης είναι σημαντικά διαφορετική σε γενετικώς φυσιολογικά απ' ότι τα μη φυσιολογικά έμβρυα. Μετά την 3^η- 4^η μέρα καλλιέργειας αλλάζει το προφίλ της σερίνης, της λευκίνης και της λυσίνης ανάμεσα στις δύο αυτές ομάδες (Picton H.M. et al, 2010).

Κατανάλωση Οξυγόνου

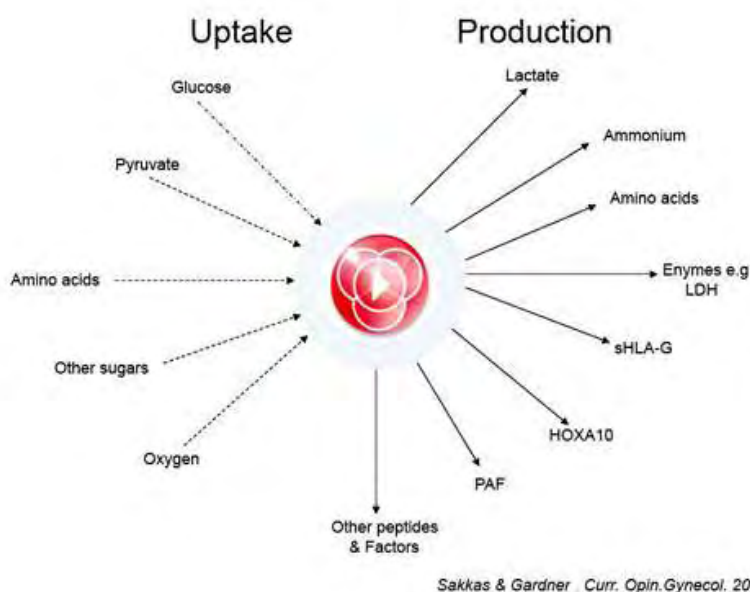
Η πιο σφαιρική ένδειξη της ικανότητας του εμβρύου να παράγει ATP μπορεί να φανεί από την μέτρηση της κατανάλωσης του οξυγόνου. Μελέτες σε ποντίκια έδειξαν ότι η κατανάλωση οξυγόνου είναι παρόμοια σε έμβρυα από το στάδιο του ενός κυττάρου έως το μορίδιο και αυξάνεται δραματικά στο στάδιο της βλαστοκύστης (Houghton F.D. et al, 1996). Μετά την εμφύτευσή του τα επίπεδα

ξαναπέφτουν, φτάνοντας στα αρχικά επίπεδα. Η κατανάλωση του οξυγόνου αναμφισβήτητα αντανακλά τον μεταβολισμό του εμβρύου και γι αυτό μελετήθηκε ως ένας πιθανός βιο δείκτης της βιωσιμότητας του εμβρύου.

Για την μέτρηση της εμβρυικής κατανάλωσης οξυγόνου υπάρχουν διάφορες μέθοδοι επεμβατικές και μη. Οι επεμβατικές μέθοδοι, όπως ultramicrofluorescence, μικροφωτοφασματομετρία και άλλες είναι δύσκολες τεχνικές και περιλαμβάνουν τη χρήση ραδιενεργών ουσιών ή μη, γεγονός που τις καθιστούν ακατάλληλες για κλινική εφαρμογή. Πολύ πιο ευαίσθητες μέθοδοι είναι οι μη επεμβατικές όπως η τεχνολογία Unisense Nanorespirometer με την βοήθεια της οποίας παρατηρήθηκε μεγαλύτερη κατανάλωση οξυγόνου σε έμβρυα βοοειδών καλύτερης μορφολογίας (Lopes A.S. et al, 2007). Μια παραλλαγή της παραπάνω τεχνικής είναι η Embryo Nanorespirometer η οποία ανίχνευσε μια σημαντική αύξηση του αναπνευστικού ποσοστού σε καλής ποιότητας βλαστοκύστες. Βέβαια οι παραπάνω δοκιμές έχουν εφαρμοστεί σε έμβρυα ζωικών μοντέλων, επομένως εκκρεμούν ακόμα δοκιμές σε ανθρώπινα έμβρυα και στη συνέχεια να δοκιμαστούν σε κλινική ρουτίνα.

Ωστόσο, γιατί όλα τα παραπάνω δεν εφαρμόζονται ακόμα?

Οι μελέτες που περιγράφηκαν πιο πάνω, οι οποίες χρησιμοποιούν ένα μεγάλο αριθμό τεχνολογιών, προτείνουν ότι υπάρχουν μεταβολικές διαφορές μεταξύ των εμβρύων και διαφέρουν ως προς την ικανότητά τους να καταλήξουν σε εγκυμοσύνη. Ωστόσο, η εφαρμογή αυτών των τεχνολογιών σε κλινικό επίπεδο παραμένουν περιορισμένες για διάφορους λόγους. Πολλές από αυτές απαιτούν πολύπλοκο εξοπλισμό αλλά και ένα εξαιρετικά εκπαιδευμένο προσωπικό κάτι το οποίο είναι απαγορευτικό για πολλές IVF κλινικές. Επίσης, ορισμένες από αυτές δεν μπορούν να παράγουν αποτελέσματα σε σύντομο χρονικό διάστημα και δεν μπορούν να εφαρμοστούν στο περιορισμένο, αποδεκτό χρονικό «παράθυρο» έως τη μεταφορά του εμβρύου σε φυσικό κύκλο. Καμία από αυτές τις μεθόδους δεν έχουν εφαρμοστεί σε πραγματικά δείγματα καλλιεργητικών μέσων. Για το λόγο αυτό, είναι επιτακτική η ανάγκη για μια αξιόπιστη τεχνολογία η οποία να μπορεί να προβλέπει, μη επεμβατικά και ταχέως, τη βιωσιμότητα όλων των διαθέσιμων εμβρύων (Botros L. et al, 2008).



Σχήμα 6. Ρυθμός κατανάλωσης θρεπτικών στοιχείων καθώς και ρυθμός παραγωγής μεταβολιτών. Μέτρηση αυτών των ουσιών με μη επεμβατικές μεθόδους βοηθούν στην επιλογή των καλύτερων αναπτυξιακά εμβρύων. Πηγή: φαίνεται στο σχήμα.

Metabolomics και ανάλυση του καλλιεργητικού μέσου

Η τεχνολογία των Metabolomics αποτελεί μια πολυπαραγοντική επιστήμη καθώς για την πραγματοποίησή της απαιτείται η συνεργασία πολλών επιστημόνων όπως βιολόγων, χημικών και ειδικών σε θέματα πληροφορικής. Εφαρμόζοντας μια ποικιλία σφαιρικών αλλά στοχευόμενων μεθόδων, αποκτούνται δεδομένα τα οποία δίνουν όσο το δυνατόν ολοκληρωμένη εικόνα σχετικά το μεταβολικό προφίλ. Ως metabolome ορίζεται το σύνολο των μικρομοριακών (<1000 Da) μη πρωτεϊνικών συνθετικών στα οποία συμπεριλαμβάνονται μεταβολικά ενδιάμεσα (αμινοξέα, νουκλεοτίδια, λιπίδια), τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP), ορμόνες, άλλα σηματοδοτικά μόρια καθώς και δευτερευόντων μεταβολιτών που βρίσκονται στο περιβάλλον βιολογικό μέσο (Pasikanti et al, 2008). Οι χαμηλού μοριακού βάρους μεταβολίτες αντιπροσωπεύουν τα τελικά προϊόντα ενός κυτταρικού μονοπατιού

καθώς έτσι αποκαλύπτεται η απάντηση του βιολογικού συστήματος σε μια ποικιλία γενετικών, θρεπτικών και περιβαλλοντικών παραγόντων. Η λέξη Metabolomics ορίζεται ως η δυναμική ποσοτικοποίηση όλων των χαμηλού μοριακού βάρους μορίων (<1000 Da) που υπάρχουν στα κύτταρα σε ένα συγκεκριμένο φυσιολογικό και αναπτυξιακό στάδιο (Goodacre R. et al, 2004). Οι τεχνικές των Metabolomics ανιχνεύουν τις προσωρινές αλλαγές στις συγκεντρώσεις των ενδοκυττάρων μεταβολιτών, που γίνονται από διαδικασίες όπως η κυτταρική σηματοδότηση. Προκειμένου να εξεταστεί ο μεταβολισμός του κυττάρου πρέπει να σταματήσει όσο πιο γρήγορα γίνεται, έτσι ώστε να σταματήσουν όλες οι ενζυμικές αντιδράσεις. Δείγματα ιστού πρέπει ταχύτατα να καταψύχονται και απότομα να τερματιστεί ο μεταβολισμός. Οι μεταβολίτες στη συνέχεια μπορεί να απομονωθούν χρησιμοποιώντας κρύα μεθανόλη ή αιθανόλη, χλωροφόρμιο και άλλα διαλύματα.

Στο ανθρώπινο γονιδίωμα υπάρχουν πάνω από 25.000 γονίδια, τα οποία κωδικοποιούν περίπου 100.000-200.000 μετάγραφα και 1 εκατομμύριο πρωτεΐνες. Από την άλλη υπάρχουν λιγότερο από 3000 μεταβολίτες (Botros L. et al, 2008), με αποτέλεσμα η ανάλυσή τους να γίνεται συντομότερα σε σχέση με αυτή του γονιδιώματος.

Οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται στα metabolomics περιλαμβάνουν μη οπτική και οπτική φασματοσκοπία. Στη μη οπτική φασματοσκοπία ανήκουν τεχνικές όπως ο πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός (nuclear magnetic resonance spectroscopy, NMR) και η φασματοσκοπία μάζας (MS) οι οποίες μπορούν να συνδυαστούν με μεθόδους διαχωρισμού όπως η υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC). Στις οπτικού τύπου φασματοσκοπίες περιλαμβάνονται η υπερέρυθρη και η Raman φασματοσκοπίες (Botros L. et al, 2008). Πλεονέκτημα των τελευταίων είναι ότι δεν απαιτείται προετοιμασία του δείγματος αλλά ούτε και διαχωρισμός μετά την ανάλυση με χρωματογραφία, μειώνοντας έτσι τόσο την πολυπλοκότητα της μεθόδου καθώς και το κόστος της (Niranjanakumari S. et al, 2002).

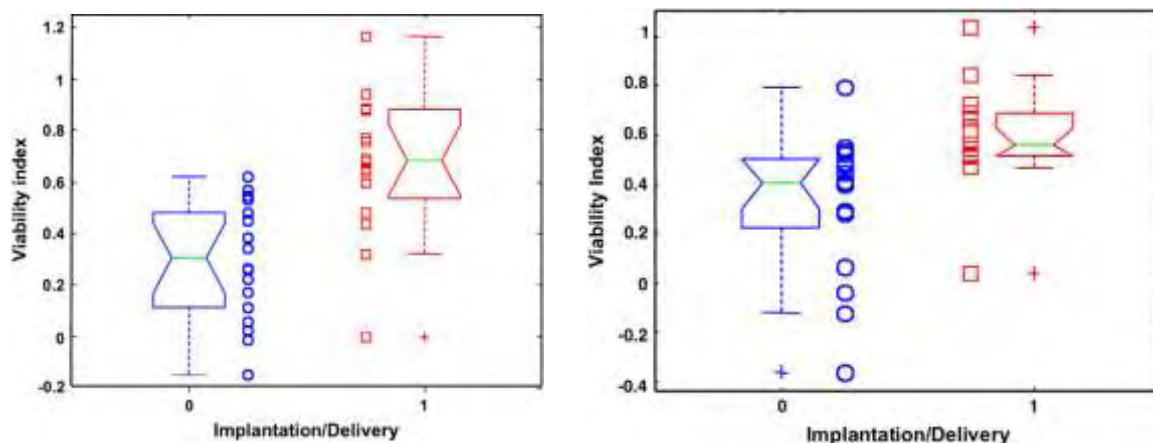
Το σχέδιο για την μέτρηση του metabolome πρέπει να γίνεται αμερόληπτα, με μεγάλη ευαισθησία και να έχει τη δυνατότητα να αναλύει ένα μεγάλο αριθμό μεταβολιτών. Παρόλη τη μεγάλη επιτυχία της ανάπτυξης των τεχνολογιών metabolomics, δεν είναι ακόμα δυνατό να διακριθεί από ένα μόνο αναλυτή η μεγάλη ποικιλία των πολύπλοκων μεταβολιτών. Οι τεχνικές που συνηθέστερα χρησιμοποιούνται είναι το NMR ή η MS και μπορεί να συνδυαστούν με

χρωματογραφία. Τα αποτελέσματα της ανίχνευσης των μεταβολιτών όλου του κυττάρου ή οργανισμού επεξεργάζονται με τη χρήση ισχυρών εργαλείων στατιστικής ή βιοπληροφορικής. Πρόσφατα, αυτές οι τεχνικές χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση του καλλιεργητικού μέσου με βάση το metabolome για την ανίχνευση της βιωσιμότητας ενός εμβρύου.

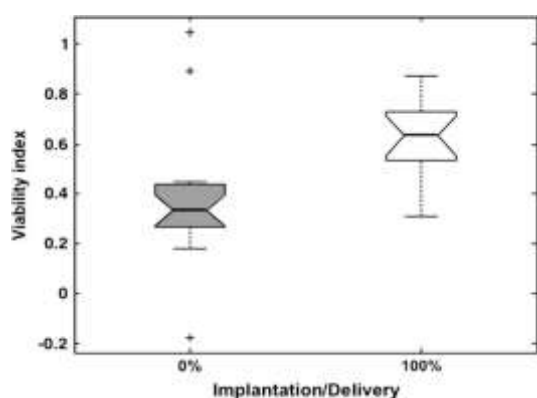
Μια πρώτη εφαρμογή των Metabolomics, στην οποία χρησιμοποιήθηκε Raman ή NIR φασματοσκοπία, πραγματοποιήθηκε από τους Seli et al (2007), κατά την οποία μελετήθηκε το καλλιεργητικό υλικό εμβρύων που μεταφέρθηκαν τη Day 3 και των οποίων η έκβαση ήταν γνωστή. Τα φάσματα του κάθε δείγματος που λήφθηκαν από κάθε φασματόμετρο αναλύθηκαν με τη βοήθεια γενετικών αλγορίθμων (χρησιμοποιήθηκαν πολλές μεταβλητές) και βρέθηκε ο δείκτης βιωσιμότητας για το καθένα. Κατόπιν έγινε σύγκριση του προκύπτοντος δείκτη με την γνωστή, από την αρχή, έκβαση του εμβρύου. Το αποτέλεσμα αυτής της μελέτης έδειξε ότι ο δείκτης βιωσιμότητας ήταν υψηλότερος για εκείνα τα έμβρυα που εμφυτεύονται και καταλήγουν σε εγκυμοσύνη απ' ότι εκείνων που δεν εμφυτεύτηκαν (σχήμα 7). Να σημειωθεί πως κατά τη φασματομέτρηση των δύο ομάδων (στη μια RAMAN και στην άλλη με NIR φασματοσκοπία) παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ εμφυτευμένων και μη εμβρύων. Στη μεν ανάλυση κατά RAMAN, το καλλιεργητικό υλικό των εμφυτευμένων εμβρύων βρέθηκαν υψηλές ποσότητες ομάδων -SH και χαμηλές -CH και -NH. Στην NIR φασματοσκοπία, αντίθετα, βρέθηκαν υψηλότερα επίπεδα -OH και χαμηλά -CH και -NH. Όλες αυτές οι χημικές ομάδες είναι βιο δείκτες του οξειδωτικού στρες του εμβρύου και σαφώς επηρεάζει τη βιωσιμότητά του (Agarwal A. et al, 2005). Η RAMAN φασματοσκοπία έχει 86% και 76,5% ευαισθησία και ειδικότητα αντίστοιχα, ενώ η NIR φασματοσκοπία έχει 75% και 83,3% ομοίως. Επιπλέον, το τεστ έγινε ταχύτατα (<1 λεπτό για κάθε δείγμα) και απαιτούνταν <15μl όγκος καλλιεργητικού. Τα ίδια αποτελέσματα έδειξε και η μέτρηση του δείκτη βιωσιμότητας με τη βοήθεια του NMR (σχήμα 8) (Seli E. et al, 2008).

Η πάνω μελέτη συμπεριλήφθηκε και σε τυφλή μελέτη, η οποία συνέλεξε Day 3 και Day 5 καλλιεργητικό υλικό διαφορετικών IVF μονάδων (Scott R. et al, 2008). Αυτό σημαίνει πως οι συνθήκες καλλιέργειας είναι διαφορετικές (όγκος και τύπος καλλιεργητικού υλικού). Χρησιμοποιήθηκε το ίδιο σκεπτικό μεταβολικής ανάλυσης (RAMAN και αντίστοιχος αλγόριθμος) και βρέθηκε ότι ο δείκτης βιωσιμότητας ήταν

αυξημένος στα έμβρυα που τελικά εμφυτεύτηκαν (ισχύει το ίδιο και για τα Day 3 και Day 5 έμβρυα).



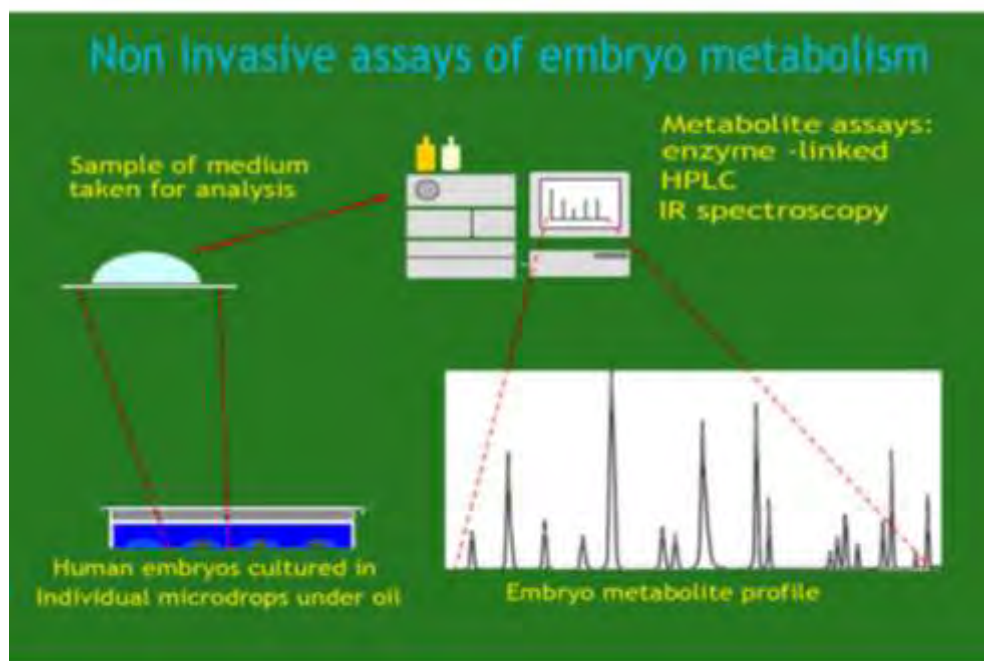
Σχήμα 7. Στο αριστερό διάγραμμα box plots φαίνονται οι δείκτες βιωσιμότητας των εμβρύων με τη βοήθεια της NIR φασματοσκοπίας. Με μπλε χρώμα ταξινομούνται τα έμβρυα που δεν εμφυτεύτηκαν ενώ με κόκκινο αυτά που επιτυχώς εμφυτεύτηκαν. Στο δεξί διάγραμμα τα αντίστοιχα αποτελέσματα με τη RAMAN φασματοσκοπία. Είναι σαφές ότι ο δείκτης βιωσιμότητας είναι μεγαλύτερος στα έμβρυα που τελικά εμφυτεύτηκαν. Πηγή από δημοσίευση Seli E. et al, 2007.



Σχήμα 8. Box plots δείκτη βιωσιμότητας υπολογισμένου με την εφαρμογή ^1H NMR σε δείγμα από το καλλιεργητικό υλικό των εμβρύων. Τα λευκά κουτιά είναι αυτά που τελικά εμφυτεύτηκαν. Πηγή: δημοσίευση Seli E. 2008.

Μελέτες που επιβεβαιώνουν ότι η μεταβολική ανάλυση του καλλιεργητικού υλικού δείχνει τη βιωσιμότητα ενός εμβρύου.

Κοινό των μελετών που ακολουθούν είναι ότι πραγματοποιήθηκαν σε κέντρα που μεταφέρουν σε κάθε κύκλο ένα και μοναδικό έμβρυο (Single Embryo Transfer, SET) (Hardarson et al, 2008 / Seli E. et al, 2008b / Vergouw et al, 2008). Σε αυτές τις μελέτες αναλύθηκε με NIR το καλλιεργητικό υλικό μέσα στο οποίο καλλιεργήθηκαν έμβρυα για 2 (n= 121, Seli et al, 2008b και n =29, Vergouw et al, 2008), για 3 (n =304, Vergouw et al, 2008) και για 5 μέρες (n =137, Hardarson et al, 2008). Οι μελέτες πραγματοποιήθηκαν σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων, και τα αποτελέσματα αυτών έδειξαν ότι ο μέσος όρος του δείκτη βιωσιμότητας είναι αυξημένος (στατιστικά σημαντικός) σ' εκείνα τα έμβρυα που καταλήγουν σε εγκυμοσύνη (ανίχνευση καρδιακής λειτουργίας εμβρύου). Επίσης φάνηκε ότι το μεταβολικό προφίλ του εμβρύου είναι ανεξάρτητο με την μορφολογία του (Hardarson et al, 2008 / Seli et al, 2008b / Vergouw et al, 2008), δίνοντας ισχυρό προβάδισμα των Metabolomics στην αξιολόγηση των εμβρύων. Παρόλα αυτά οι Seli et al (2008b) πρότειναν ότι ο συνδυασμός μορφολογίας και Metabolomics ίσως βελτιώσει την ταυτοποίηση εκείνων των εμβρύων με υψηλή ικανότητα εμφύτευσης.



Σχήμα 9. Η διαδικασία που ακολουθείται στην μεταβολική ανάλυση. Αφαίρεση μικροποσότητας από το μέσο στο οποίο καλλιεργείται το κάθε έμβρυο και προσθήκη στον αναλυτή (φασματόμετρο). Από το φάσμα παίρνουμε πληροφορίες σχετικά με το μεταβολικό του προφίλ. Πηγή: διάλεξη Brison D. στο συνέδριο της ESHRE 2009 “Current developments in embryo selection”.

Συζήτηση

Η τεχνολογία της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής αποτελεί την πιο αποτελεσματική επιλογή για τα υπογόνιμα ζευγάρια και γι αυτό χρησιμοποιείται ευρέως. Ο πρωτεύων της στόχος είναι να πετύχει μια βιώσιμη αλλά και μονήρη εγκυμοσύνη, δημιουργώντας βιώσιμα έμβρυα και επιλέγοντας το καλύτερο προς μεταφορά. Για το σκοπό αυτό, πρόσφατα έχουν πραγματοποιηθεί πολλές ενέργειες προκειμένου να βρεθεί μια πρωτοπόρος και ταυτόχρονα μη επεμβατική μέθοδος που να επιλέγει το καλύτερο αναπτυξιακά έμβρυο. Εκτός από την μελέτη των μορφολογικών χαρακτηριστικών του εμβρύου, που παραδοσιακά χρησιμοποιούνται για την αξιολόγησή τους, η εξέταση των βιολογικών παραγόντων που περιέχονται μέσα στο καλλιεργητικό υλικό εμπεριέχει σημαντικές πληροφορίες για την βιωσιμότητα του εμβρύου και την αναπαραγωγική του δυναμική.

Η τεχνολογία των Metabolomics αποτελεί ένα σημαντικό εργαλείο το οποίο επιτρέπει τη γρήγορη, φθηνή, εύχρηστη και κυρίως τη μη επεμβατική αξιολόγηση του εμβρύου πριν από τη μεταφορά του. Είναι αξιοσημείωτο, πως η εφαρμογή αυτών των τεχνικών σε κλινικό επίπεδο είναι εφικτή καθώς πληροί όλες τις προϋποθέσεις. Η εύρεση κριτηρίων επιλογής στηριζόμενοι στο μεταβολικό προφίλ ενδεχομένως να επιτρέψει την μείωση του αριθμού των εμβρύων που μεταφέρονται. Ως συνέπεια αυτού, μπορεί να οδηγηθούμε στην μεταφορά ενός και μοναδικού εμβρύου SET, μειώνοντας βέβαια το ποσοστό των πολύδυμων κήσεων και παράλληλα διατηρώντας (ή και αυξάνοντας) τα ποσοστά εγκυμοσύνης.

Επιπροσθέτως, είναι ελπιδοφόρα η εφαρμογή των Metabolomics και στην εκτίμηση της βιωσιμότητας των γαμετών. Για παράδειγμα, μπορεί να εφαρμοστεί ως ένα γρήγορο διαγνωστικό τεστ για την ανδρική υπογονιμότητα. Επίσης η ικανότητα να καθορίζεται η βιωσιμότητα του ωοκυττάρου πριν από τη γονιμοποίηση αναμένεται

να βοηθήσει στην δημιουργία καλύτερων αναπτυξιακά εμβρύων. Σε συγκεκριμένες χώρες της Ευρώπης, όπως η Γερμανία και η Ιταλία, όπου υπάρχουν αυστηρές νομοθεσίες σχετικά με τον αριθμό των ωαρίων που μπορούν να γονιμοποιηθούν, η επιλογή των βιώσιμων ωαρίων θα μπορούσε να διατηρήσει υψηλά τα ποσοστά επιτυχίας της IVF. Εκτός από τα παραπάνω, τα Metabolomics μπορούν να εφαρμοστούν ακόμα και στην περίπτωση των κύκλων που χρησιμοποιούν κρυοσυντηρημένα έμβρυα, διαλέγοντας εκείνα τα έμβρυα με τον καλύτερο δείκτη βιωσιμότητας.

Είναι σημαντικό να έχουμε υπόψη ότι χρησιμοποιώντας όλες αυτές τις τεχνικές δεν μας δίνεται η δυνατότητα να αλλάξουμε ή να βελτιώσουμε την βιωσιμότητα ενός εμβρύου παρά μόνο να γίνει μια εκτίμηση αυτής. Όλη αυτή η τεχνολογία πρέπει να μελετηθεί εκτενώς και να γίνουν προοπτικές τυχαιοποιημένες κλινικές μελέτες που να αποδεικνύουν τα αυξημένα επίπεδα εμφύτευσης και εγκυμοσύνης από τα επιλεχθέντα έμβρυα. Τέλος για κάθε τεχνολογία που προορίζεται για κλινική εφαρμογή από διάφορα ART κέντρα, πρέπει να αναθεωρηθούν οι προκύπτουσες διαφορές στο χρόνο, τύπο και όγκο καλλιέργειας των εμβρύων. Είναι όμως γεγονός ότι πολύ σύντομα θα προκύψουν εξαιρετικά αποτελέσματα σχετικά με την τεχνολογία των Metabolomics τα οποία θα αποτελέσουν ένα ανεκτίμητο εργαλείο στα χέρια των εμβρυολόγων.

Βιβλιογραφία

- Agrawal A, B.B., Burns DH, Nagy P, Sakkas D, Scott R. (2006) Metabolomic biomarkers of oxidative stress in ART: A rapid, non-invasive methodology to assess the selective viable gametes and embryos from their non-viable cohorts. In: Proceedings of the Second international conference on cryopreservation of human oocyte;
- Andersen, A.N., Goossens, V., Ferraretti, A.P., Bhattacharya, S., Felberbaum, R., de Mouzon, J. & Nygren, K.G. (2008) Assisted reproductive technology in Europe, 2004: results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod*, **23**, 756-771.
- Aydiner, F., Yetkin, C.E. & Seli, E. (2010) Perspectives on emerging biomarkers for non-invasive assessment of embryo viability in assisted reproduction. *Curr Mol Med*, **10**, 206-215.
- Bavister, B.D. (1995) Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. *Hum Reprod Update*, **1**, 91-148.
- Biggers, J.D., Whittingham, D.G. & Donahue, R.P. (1967) The pattern of energy metabolism in the mouse oocyte and zygote. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **58**, 560-567.
- Botros, L., Sakkas, D. & Seli, E. (2008) Metabolomics and its application for non-invasive embryo assessment in IVF. *Mol Hum Reprod*, **14**, 679-690.
- Botros, L., Sakkas, D. & Seli, E. (2008) Metabolomics and its application for non-invasive embryo assessment in IVF. *Mol Hum Reprod*, **14**, 679-690.
- Brison, D.R., Hollywood, K., Arnesen, R. & Goodacre, R. (2007) Predicting human embryo viability: the road to non-invasive analysis of the secretome using metabolic footprinting. *Reprod Biomed Online*, **15**, 296-302.
- Brison, D.R., Houghton, F.D., Falconer, D., Roberts, S.A., Hawkhead, J., Humpherson, P.G., Lieberman, B.A. & Leese, H.J. (2004) Identification of viable embryos in IVF by non-invasive measurement of amino acid turnover. *Hum Reprod*, **19**, 2319-2324.
- Brison, D.R. & Leese, H.J. (1991) Energy metabolism in late preimplantation rat embryos. *J Reprod Fertil*, **93**, 245-251.
- Brison, D.R. lecture in Origio symposium, ESHRE 2009, Amsterdam. Current developments in embryo selection.
- Brison, D.R., Hollywood, K., Arnesen, R., Goodacre, R. (2010) Predicting human embryo viability: the road to non-invasive analysis of the secretome using metabolic footprinting. . *Reprod Biomed Online*, **15**, No 3, 296-302.

- Bromer, J.G. & Seli, E. (2008) Assessment of embryo viability in assisted reproductive technology: shortcomings of current approaches and the emerging role of metabolomics. *Curr Opin Obstet Gynecol*, **20**, 234-241.
- Cohen, J. (2007) Infertile couples, assisted reproduction and increased risks to the children. *Reprod Biomed Online*, **15**, 245-246.
- Conaghan, J., Handyside, A.H., Winston, R.M. & Leese, H.J. (1993) Effects of pyruvate and glucose on the development of human preimplantation embryos in vitro. *J Reprod Fertil*, **99**, 87-95.
- Conaghan, J., Hardy, K., Handyside, A.H., Winston, R.M. & Leese, H.J. (1993) Selection criteria for human embryo transfer: a comparison of pyruvate uptake and morphology. *J Assist Reprod Genet*, **10**, 21-30.
- Devreker, F. (2007) Uptake and release of metabolites in human preimplantation embryos. 325-336.
- Donoso, P., Staessen, C., Fauser, B.C. & Devroey, P. (2007) Current value of preimplantation genetic aneuploidy screening in IVF. *Hum Reprod Update*, **13**, 15-25.
- Edwards, R.G., Fishel, S.B., Cohen, J., Fehilly, C.B., Purdy, J.M., Slater, J.M., Steptoe, P.C. & Webster, J.M. (1984) Factors influencing the success of in vitro fertilization for alleviating human infertility. *J In Vitro Fert Embryo Transf*, **1**, 3-23.
- Fuzzi, B., Rizzo, R., Criscuoli, L., Noci, I., Melchiorri, L., Scarselli, B., Bencini, E., Menicucci, A. & Baricordi, O.R. (2002) HLA-G expression in early embryos is a fundamental prerequisite for the obtainment of pregnancy. *Eur J Immunol*, **32**, 311-315.
- Gardner, D.K. & Lane, M. (1997) Culture and selection of viable blastocysts: a feasible proposition for human IVF? *Hum Reprod Update*, **3**, 367-382.
- Gardner, D.K., Lane, M., Calderon, I. & Leeton, J. (1996) Environment of the preimplantation human embryo in vivo: metabolite analysis of oviduct and uterine fluids and metabolism of cumulus cells. *Fertil Steril*, **65**, 349-353.
- Gardner, D.K., Lane, M., Stevens, J. & Schoolcraft, W.B. (2001) Noninvasive assessment of human embryo nutrient consumption as a measure of developmental potential. *Fertil Steril*, **76**, 1175-1180.
- Gardner, D.K. & Leese, H.J. (1987) Assessment of embryo viability prior to transfer by the noninvasive measurement of glucose uptake. *J Exp Zool*, **242**, 103-105.
- Gardner, D.K. & Leese, H.J. (1988) The role of glucose and pyruvate transport in regulating nutrient utilization by preimplantation mouse embryos. *Development*, **104**, 423-429.

- Gardner, D.K.a.S., W.B., (1999) Towards Reproductive Certainty: Fertility and Genetics Beyond. In vitro culture of human blastocysts., 378-388.
- Gonzalez, R.R., Caballero-Campo, P., Jasper, M., Mercader, A., Devoto, L., Pellicer, A. & Simon, C. (2000) Leptin and leptin receptor are expressed in the human endometrium and endometrial leptin secretion is regulated by the human blastocyst. *J Clin Endocrinol Metab*, **85**, 4883-4888.
- Goodacre, R., Vaidyanathan, S., Dunn, W.B., Harrigan, G.G. & Kell, D.B. (2004) Metabolomics by numbers: acquiring and understanding global metabolite data. *Trends Biotechnol*, **22**, 245-252.
- Gott, A.L., Hardy, K., Winston, R.M. & Leese, H.J. (1990) Non-invasive measurement of pyruvate and glucose uptake and lactate production by single human preimplantation embryos. *Hum Reprod*, **5**, 104-108.
- Hardarson, T., Hanson, C., Lundin, K., Hillensjo, T., Nilsson, L., Stevic, J., Reismer, E., Borg, K., Wikland, M. & Bergh, C. (2008) Preimplantation genetic screening in women of advanced maternal age caused a decrease in clinical pregnancy rate: a randomized controlled trial. *Hum Reprod*, **23**, 2806-2812.
- Hardy, K., Hooper, M.A., Handyside, A.H., Rutherford, A.J., Winston, R.M. & Leese, H.J. (1989) Non-invasive measurement of glucose and pyruvate uptake by individual human oocytes and preimplantation embryos. *Hum Reprod*, **4**, 188-191.
- Hardy, K., Martin, K.L., Leese, H.J., Winston, R.M. & Handyside, A.H. (1990) Human preimplantation development in vitro is not adversely affected by biopsy at the 8-cell stage. *Hum Reprod*, **5**, 708-714.
- Houghton, F.D., Hawkhead, J.A., Humpherson, P.G., Hogg, J.E., Balen, A.H., Rutherford, A.J. & Leese, H.J. (2002) Non-invasive amino acid turnover predicts human embryo developmental capacity. *Hum Reprod*, **17**, 999-1005.
- Houghton, F.D., Thompson, J.G., Kennedy, C.J. & Leese, H.J. (1996) Oxygen consumption and energy metabolism of the early mouse embryo. *Mol Reprod Dev*, **44**, 476-485.
- Jones, G.M., Trounson, A.O., Vella, P.J., Thouas, G.A., Lolatgis, N. & Wood, C. (2001) Glucose metabolism of human morula and blastocyst-stage embryos and its relationship to viability after transfer. *Reprod Biomed Online*, **3**, 124-132.
- Juriscova, A., Casper, R.F., MacLusky, N.J., Mills, G.B. & Librach, C.L. (1996) HLA-G expression during preimplantation human embryo development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 161-165.
- Katz-Jaffe, M.G., Linck, D.W., Schoolcraft, W.B. & Gardner, D.K. (2005) A proteomic analysis of mammalian preimplantation embryonic development. *Reproduction*, **130**, 899-905.

- Katz-Jaffe, M.G., McReynolds, S., Gardner, D.K. & Schoolcraft, W.B. (2009) The role of proteomics in defining the human embryonic secretome. *Mol Hum Reprod*, **15**, 271-277.
- Kowalik, A., Liu, H.C., He, Z.Y., Mele, C., Barmat, L. & Rosenwaks, Z. (1999) Expression of the insulin-like growth factor-1 gene and its receptor in preimplantation mouse embryos; is it a marker of embryo viability? *Mol Hum Reprod*, **5**, 861-865.
- Krussel, J.S., Simon, C., Rubio, M.C., Pape, A.R., Wen, Y., Huang, H.Y., Bielfeld, P. & Polan, M.L. (1998) Expression of interleukin-1 system mRNA in single blastomeres from human preimplantation embryos. *Hum Reprod*, **13**, 2206-2211.
- Lan, K.C., Huang, F.J., Lin, Y.C., Kung, F.T., Hsieh, C.H., Huang, H.W., Tan, P.H. & Chang, S.Y. (2003) The predictive value of using a combined Z-score and day 3 embryo morphology score in the assessment of embryo survival on day 5. *Hum Reprod*, **18**, 1299-1306.
- Le Bouteiller, P., Legrand-Abravanel, F. & Solier, C. (2003) Soluble HLA-G1 at the materno-foetal interface--a review. *Placenta*, **24 Suppl A**, S10-15.
- Leese, H.J. (1995) Metabolic control during preimplantation mammalian development. *Hum Reprod Update*, **1**, 63-72.
- Leese, H.J. & Barton, A.M. (1984) Pyruvate and glucose uptake by mouse ova and preimplantation embryos. *J Reprod Fertil*, **72**, 9-13.
- Leese, H.J., Baumann, C.G., Brison, D.R., McEvoy, T.G. & Sturmey, R.G. (2008) Metabolism of the viable mammalian embryo: quietness revisited. *Mol Hum Reprod*, **14**, 667-672.
- Leese, H.J., Tay, J.I., Reischl, J. & Downing, S.J. (2001) Formation of Fallopian tubal fluid: role of a neglected epithelium. *Reproduction*, **121**, 339-346.
- Lopes, A.S., Madsen, S.E., Ramsing, N.B., Lovendahl, P., Greve, T. & Callesen, H. (2007) Investigation of respiration of individual bovine embryos produced in vivo and in vitro and correlation with viability following transfer. *Hum Reprod*, **22**, 558-566.
- Lukassen, H.G., Braat, D.D., Wetzels, A.M., Zielhuis, G.A., Adang, E.M., Scheenjes, E. & Kremer, J.A. (2005) Two cycles with single embryo transfer versus one cycle with double embryo transfer: a randomized controlled trial. *Hum Reprod*, **20**, 702-708.
- Luke, B. & Brown, M.B. (2007) Contemporary risks of maternal morbidity and adverse outcomes with increasing maternal age and plurality. *Fertil Steril*, **88**,

283-293.

- Marquez, C., Sandalinas, M., Bahce, M., Alikani, M. & Munne, S. (2000) Chromosome abnormalities in 1255 cleavage-stage human embryos. *Reprod Biomed Online*, **1**, 17-26.
- Menicucci, A., Noci, I., Fuzzi, B., Criscuoli, L., Scarselli, G., Baricordi, O. & Mattiuz, P.L. (1999) Non-classic sHLA class I in human oocyte culture medium. *Hum Immunol*, **60**, 1054-1057.
- Munne, S., Alikani, M. & Cohen, J. (1994) Monospermic polyploidy and atypical embryo morphology. *Hum Reprod*, **9**, 506-510.
- Munne, S., Sandalinas, M., Escudero, T., Velilla, E., Walmsley, R., Sadowy, S., Cohen, J. & Sable, D. (2003) Improved implantation after preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *Reprod Biomed Online*, **7**, 91-97.
- Nagy, Z.P., Sakkas, D. & Behr, B. (2008) Symposium: innovative techniques in human embryo viability assessment. Non-invasive assessment of embryo viability by metabolomic profiling of culture media ('metabolomics'). *Reprod Biomed Online*, **17**, 502-507.
- Nagy, Z.P. (2009) Metabolomic testing as a method of predicting IVF success. *Expert Rev. Obstet. Gynecol.* **4(4)**, 351-353.
- Niranjanakumari, S., Lasda, E., Brazas, R. & Garcia-Blanco, M.A. (2002) Reversible cross-linking combined with immunoprecipitation to study RNA-protein interactions in vivo. *Methods*, **26**, 182-190.
- Noci, I., Fuzzi, B., Rizzo, R., Melchiorri, L., Criscuoli, L., Dabizzi, S., Biagiotti, R., Pellegrini, S., Menicucci, A. & Baricordi, O.R. (2005) Embryonic soluble HLA-G as a marker of developmental potential in embryos. *Hum Reprod*, **20**, 138-146.
- O'Neill, C. (2005) The role of paf in embryo physiology. *Hum Reprod Update*, **11**, 215-228.
- Pasikanti, K.K., Ho, P.C. & Chan, E.C. (2008) Gas chromatography/mass spectrometry in metabolic profiling of biological fluids. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, **871**, 202-211.
- Picton, H.M., Elder, K., Houghton, F.D., Hawkhead, J.A., Rutherford, A.J., Hogg, J.E., Leese, H.J., Harris, S.E. Association between amino acid turnover and chromosome aneuploidy during human preimplantation embryo development in vitro. *Mol Hum Reprod*, **16(8)**, 557-69.
- Renard, J.P., Philippon, A. & Menezo, Y. (1980) In-vitro uptake of glucose by bovine blastocysts. *J Reprod Fertil*, **58**, 161-164.

- Sakkas, D. & Gardner, D.K. (2005) Noninvasive methods to assess embryo quality. *Curr Opin Obstet Gynecol*, **17**, 283-288.
- Sakkas, D., Lu, C., Zulfikaroglu, E., Neuber, E. & Taylor, H.S. (2003) A soluble molecule secreted by human blastocysts modulates regulation of HOXA10 expression in an epithelial endometrial cell line. *Fertil Steril*, **80**, 1169-1174.
- Sakkas, D., Morita, H., Yamashita, N., Kato, O., Botros, L., Roos, P., & Seli, E. (2008) Evaluation of Embryo Quality by Metabolomics: A New Strategy to Aid Single Embryo Transfer. *J. Mamm. Ova Res*, **25**, 26-31.
- SART 2006 Assisted Reproductive Technology Success Rates. National Summary and Fertility Clinic Reports. Centers for Disease Control, USA. See: <http://www.sart.org/>
- Scott, R., Seli, E., Miller, K., Sakkas, D., Scott, K. & Burns, D.H. (2008) Noninvasive metabolomic profiling of human embryo culture media using Raman spectroscopy predicts embryonic reproductive potential: a prospective blinded pilot study. *Fertil Steril*, **90**, 77-83.
- Seli, E., Botros, L., Sakkas, D. & Burns, D.H. (2008) Noninvasive metabolomic profiling of embryo culture media using proton nuclear magnetic resonance correlates with reproductive potential of embryos in women undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril*, **90**, 2183-2189.
- Seli, E., Robert, C. & Sirard, M.A. (2010) OMICS in assisted reproduction: possibilities and pitfalls. *Mol Hum Reprod*, **16**, 513-530.
- Seli, E., Sakkas, D., Scott, R., Kwok, S.C., Rosendahl, S.M. & Burns, D.H. (2007) Noninvasive metabolomic profiling of embryo culture media using Raman and near-infrared spectroscopy correlates with reproductive potential of embryos in women undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril*, **88**, 1350-1357.
- Solier, C., Aguerre-Girr, M., Lenfant, F., Campan, A., Berrebi, A., Rebmann, V., Grosse-Wilde, H. & Le Bouteiller, P. (2002) Secretion of pro-apoptotic intron 4-retaining soluble HLA-G1 by human villous trophoblast. *Eur J Immunol*, **32**, 3576-3586.
- Stephens, P.C. & Edwards, R.G. (1978) Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet*, **2**, 366.
- Sutcliffe, A.G. & Ludwig, M. (2007) Outcome of assisted reproduction. *Lancet*, **370**, 351-359.
- Thurin, A., Hausken, J., Hillensjo, T., Jablonowska, B., Pinborg, A., Strandell, A. & Bergh, C. (2004) Elective single-embryo transfer versus double-embryo transfer in in vitro fertilization. *N Engl J Med*, **351**, 2392-2402.
- Trounson, A.O., Leeton, J.F., Wood, C., Webb, J. & Wood, J. (1981) Pregnancies in humans by fertilization in vitro and embryo transfer in the controlled

ovulatory cycle. *Science*, **212**, 681-682.

Turner, K., Martin, K.L., Woodward, B.J., Lenton, E.A. & Leese, H.J. (1994) Comparison of pyruvate uptake by embryos derived from conception and non-conception natural cycles. *Hum Reprod*, **9**, 2362-2366.

Urbanski, J.P., Johnson, M.T., Craig, D.D., Potter, D.L., Gardner, D.K. & Thorsen, T. (2008) Noninvasive metabolic profiling using microfluidics for analysis of single preimplantation embryos. *Anal Chem*, **80**, 6500-6507.

Van Blerkom, J., Davis, P.W. & Merriam, J. (1994) A retrospective analysis of unfertilized and presumed parthenogenetically activated human oocytes demonstrates a high frequency of sperm penetration. *Hum Reprod*, **9**, 2381-2388.

Vergouw, C.G., Botros, L.L., Roos, P., Lens, J.W., Schats, R., Hompes, P.G., Burns, D.H. & Lambalk, C.B. (2008) Metabolomic profiling by near-infrared spectroscopy as a tool to assess embryo viability: a novel, non-invasive method for embryo selection. *Hum Reprod*, **23**, 1499-1504.

Wells, D., Escudero, T., Levy, B., Hirschhorn, K., Delhanty, J.D. & Munne, S. (2002) First clinical application of comparative genomic hybridization and polar body testing for preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *Fertil Steril*, **78**, 543-549.

Ιστοσελίδες:

<http://www.ncbi.nlm.nih.org/>

<http://www.sart.org/>