

STANOVENÍ VÝVOJOVÉHO POTENCIÁLU LIDSKÝCH EMBRYÍ POMOCÍ OMICKÝCH DISCIPLÍN

ALEŠ MÁDR^a, ZDENĚK GLATZ^a
a IGOR CRHA^b

^a Ústav biochemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kamenice 5, 625 00 Brno;

^b Gynekologicko-porodnická klinika, Lékařská fakulta, Masarykova univerzita a Fakultní nemocnice Brno, Obilní trh 11, 602 00 Brno
175764@mail.muni.cz

Došlo 17.3.17, přijato 3.4.17.

Klíčová slova: asistovaná reprodukce, lidské embryo, mimotělní oplodnění, genomika, transkriptomika, proteomika, metabolomika

Obsah

1. Úvod
2. Genomika
 - 2.1. Fluorescenční *in situ* hybridizace
 - 2.2. Komparativní genomová hybridizace
 - 2.3. Jednonukleotidový polymorfismus
 - 2.4. Kvantitativní PCR
 - 2.5. Sekvenování druhé generace
3. Transkriptomika
4. Proteomika
5. Metabolomika
 - 5.1. Necílená metabolomika
 - 5.2. Cílená metabolomika
6. Závěr

1. Úvod

Neplodnost je Světovou zdravotnickou organizací definována jako nemoc reprodukčního systému projevující se neschopností otěhotnět během 12 měsíců pravidelného, nechráněného pohlavního styku¹. Jedná se o celosvětový problém, který se týká přibližně 15 % párů v reprodukčním věku. Odborná léčba neplodnosti v sobě zahrnuje změnu životního stylu (např. redukce hmotnosti, omezení kouření a příjmu alkoholu), hormonální terapii, chirurgický zákrok (např. zajištění průchodnosti vejcovodů, odstranění ložisek endometriózy) a techniky asistované reprodukce (ART). Společným rysem ART je manipulace se zárodečnými buňkami za účelem překonání bariéry děložního hrdla (nitroděložní inseminace), mimotělního oplodnění (kultivace se spermii, intracytoplasmatická injekce spermií) a uchování v zamrazeném stavu (zachování reprodukčních funkcí u pacientů podstupujících

cích léčbu cytotoxickými léky, dárcovský program).

Mimotělní oplodnění neboli *in vitro* fertilizace (IVF) je bezpochyby nejúčinnější a nejspěšnější léčba neplodnosti. Význam IVF pro léčbu neplodnosti lze doložit udělením Nobelovy ceny za fyziologii a lékařství v roce 2010 jejímu průkopníkovi Robertovi Geoffreymu Edwardsovi². Cyklus IVF zahrnuje několik kroků, jako jsou hormonální stimulace ženy podporující dozrání více oocytů v jednom menstruačním cyklu, odběr folikulární tekutiny obsahující zralé i nezralé oocyty, IVF zralých oocytů a kultivace vzniklých embryí po dobu maximálně 5 dnů. Časový rámec vývoje embrya *in vitro* je vymezen potřebou embrya implantovat se do děložní sliznice. *In vitro* embryonální vývoj tedy pokrývá období vývoje, ke kterému standardně dochází v průběhu transportu embrya vejcovodem do dělohy, a v děloze před implantací embrya do děložní sliznice.

V České republice se rodí více jak 2 % dětí díky IVF, z toho přibližně 16 % jsou dvojčata³. Řádově vyšší četnost mnohočetného těhotenství u pacientek podstupujících léčbu pomocí IVF je způsobena přenosem dvou i více embryí současně do dělohy za účelem zvýšení úspěšnosti otěhotnění. Mnohočetné těhotenství však s sebou nese rizika závažných zdravotních komplikací pro matku i dítě, jako jsou hypertenze, nízká porodní váha, vyšší perinatální úmrtnost a pravděpodobnost mozkové obrny⁴. Dlouhodobým trendem je proto snížit počet přenesených embryí a minimalizovat tak rizika spojená s mnohočetným těhotenstvím. Díky pokroku v oblasti kultivace embryí a možnosti zamrazení embryí bez výrazného ovlivnění jejich životaschopnosti je možné zavést pouze jedno embryo do dělohy v jednom menstruačním cyklu. V případě neuchycení embrya v děloze nebo samovolného potratu lze v dalším menstruačním cyklu přenést zamrazené embryo bez nutnosti podstoupit celý cyklus IVF. Tento přístup sice snižuje zdravotní rizika spojená s hormonální stimulací a mnohočetným těhotenstvím, nicméně otěhotnění může předcházet několik neúspěšných pokusů, které neplodné páry snažící se o početí dítěte pociťují jak po stránce finanční, tak emoční⁵.

Úspěšnost implantace embrya do dělohy lze zvýšit výběrem embrya s nejvyšším vývojovým potenciálem. V současnosti je zavedeným způsobem hodnocení kvality embryí stanovení morfologie pomocí mikroskopie, případně stanovení abnormalit v počtu chromosomů. Morfologické hodnocení kvality embryí je standardní metodou využívající světelný mikroskop, jehož nevýhody jsou v posledních 10 letech často skloňovány. Při sledování embrya pod mikroskopem dochází ke krátkodobé změně kultivačních podmínek, během vývoje embrya je učiněno pouze několik měření v intervalech, mezi kterými se může stav embrya několikrát změnit, a hodnocení kvality em-

brya je výrazně ovlivněno zkušeností embryologa⁶. Některé nevýhody eliminovaly techniky umožňující časosběrné snímání mikroskopického obrazu embrya. Jedná se o inverzní digitální mikroskopy umístěné v kultivační komoře, které v pravidelných intervalech automaticky snímají mikroskopický obraz embrya. Tím lze přesněji sledovat kinetiku embryonálního vývoje bez změny kultivačních podmínek. Sebelepší morfologické a morfokinetické techniky ale nedokáží změnit skutečnost, že morfologie je vzdáleným obrazem fyziologie a její korelace s kvalitou embrya je značně omezená⁵. Proto se vývoj orientoval na hledání biomarkerů reprezentujících kvalitu embrya, a to na všech úrovních omických disciplín.

2. Genomika

Numerické chromosomální abnormality neboli aneuploidie se považují za nejvýznamnější geneticky podmíněný faktor ovlivňující vývojový potenciál embrya. Aneuploidie embrya je pozorována až v 65 % případů spontánních potratů v prvním trimestru těhotenství⁷ a obecně vysoká míra incidence aneuploidie u lidí je důvodem nízké úspěšnosti přirozeného rozvinutí těhotenství i u zdravých plodných párů v rámci jednoho menstruačního cyklu (~25 %)⁸. Spojitost aneuploidie embrya s nízkou úspěšností cyklu IVF byla postulována začátkem 80. let 20. století⁹ a s využitím molekulárních cytogenetických metod byla jednoznačně potvrzena¹⁰.

Vzhledem k tomu, že chromosomální složení buňky nemá morfologicky zřetelné projevy a chromosomy jsou exkluzivně intracelulární útvary, pro stanovení ploidie je nezbytné přistoupit k biopsii. Biopsie je invazivní procedura, která může negativně ovlivnit následný vývoj embrya, avšak negativní dopad záleží na typu biopsie a množství získaných buněk. Nejčastěji se provádí biopsie jedné nebo dvou blastomerů u embrya v osmibuněčném stádiu 3. den od oplodnění. I když jsou blastomery morfologicky totožné a považovány za totipotentní, jsou již předurčeny k vzniku plodu nebo plodových obalů¹⁰. Klinické studie ukázaly, že biopsií jedné blastomery se snižuje úspěšnost implantace embrya do dělohy o 39 %, u biopsie dvou blastomerů o dalších 40 % (cit.¹¹).

Morfologicky rozlišitelné zárodečné buňky se objevují při vzniku blastocysty (5. den od oplodnění). Biopsií několika buněk trofoektodermy, jež je základem pro vznik plodových obalů, se negativní dopady biopsie na následný vývoj embrya výrazně snižují. Minimální dopad na vývoj embrya mají také biopsie polárních tělísek sekundárního oocyty nebo zygoty, které obsahují genetický materiál vyloučený z oocyty při 1. a 2. meiotickém dělení v průběhu zrání primárního oocyty, resp. fertilizaci sekundárního oocyty. Stanovením chromosomálního složení polárních tělísek lze však odhalit aneuploidii vzniklou pouze během meiotického dělení (~60 % případů)¹⁰.

Ve většině případů se biopsií získá pouze jedna buňka, tudíž genetická analýza je komplikována malým množstvím DNA, chromosomální mozaikou a fází buněčného

cyklu, které v případě diagnostiky populace buněk nemají takový význam. Klasické stanovení karyotypu buňky, jež je založeno na přípravě preparátu chromosomů ve stádiu metafáze a jejich následném barvení, nelze spolehlivě využít k diagnostice karyotypu embrya. Většina získaných blastomerů je ve stádiu interfáze a přípravě kvalitního metafázového chromosomálního preparátu brání vysoká koncentrace glykogenu přítomná v zárodečných buňkách^{7,10}.

2.1. Fluorescenční *in situ* hybridizace

První úspěšná metoda umožňující stanovení aneuploidie lidských embryí využívala principu fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH)¹². Metoda FISH je založena na hybridizaci komplementárního, fluorescenčně značeného oligonukleotidu na chromosomální preparát. Hybridizace probíhá i na chromosomech ve stádiu interfáze, a kromě stanovení ploidie se využívá také k diagnostice geneticky podmíněných nemocí. Vyjma náročné přípravy vzorku DNA je metoda FISH limitována omezeným počtem spektrálně odlišných fluoroforů vhodných ke značení oligonukleotidů. Různé oligonukleotidy značené stejným fluoroforem lze použít při vymytí předchozího oligonukleotidu, ale správnost stanovení s každým hybridizačním cyklem klesá v důsledku denaturace DNA⁷.

Přestože se metoda FISH používá v klinické praxi 20 let, poslední studie poukazují na technické nedostatky této metody. Metodou FISH se standardně sleduje 5 chromosomů s nejvyšší frekvencí aneuploidie, díky čemuž lze zachytit aneuploidii jen u 22 % aneuploidních buněk¹⁰. Příprava chromosomálního preparátu se nezdaří přibližně v 10 % pokusů a správnost hybridizace se pohybuje v rozmezí 92–99 % pro každý typ značeného oligonukleotidu. Významným jevem ovlivňujícím správnost určení aneuploidie je vysoká frekvence chromosomální mozaiky (stav, kdy některé blastomery jsou euploidní, jiné aneuploidní v jednom embryu) u embryí ve stádiu rýhování (~50 %)¹³ a k neúspěchu metody FISH je nutné přičíst i negativní dopad biopsie blastomerů. Objektívni nedostatky metody FISH potvrdily i klinické studie, které vyvrátily přínos stanovení aneuploidie pomocí této metody u pacientek s dobrou prognózou¹³. U pacientek s vyšší frekvencí aneuploidie (věk >35 let) dokonce snižuje pravděpodobnost donošení plodu o 30 % (cit.¹⁴).

Nové metody genetické diagnostiky by proto měly sledovat všech 23 párů chromosomů a ideálně zvládnout stanovení ploidie v čase umožňujícím současně biopsii buněk trofoektodermy u embrya ve stádiu blastocysty a implantaci euploidního embrya v rámci stejného menstruačního cyklu. Biopsií trofoektodermy se nejen snižují negativní dopady biopsie, ale embrya ve stádiu blastocysty vykazuje také nižší míru chromosomální mozaiky¹⁰.

2.2. Komparativní genomová hybridizace

První metodou umožňující stanovení všech 23 párů chromosomů (22 autosomálních, X a Y) u lidských embryí byla metafázová komparativní genomová hybridizace

(mCGH)⁸. Základem metody mCGH je fragmentace DNA vzorku a označení vzniklých fragmentů typicky zeleným fluoroforem (fluorescein). Paralelně je připraven referenční vzorek DNA chromosomálně zdravého jedince, jenž je označen typicky červeným fluoroforem (rhodamin). Označené fragmenty vzorku a referenčního vzorku se smíchají a nechají se hybridizovat na metafázovém chromosomálním preparátu zdravého jedince. Poměr zelené a červené fluorescence pak určuje relativní zisk nebo ztrátu chromosomu⁷. Metoda mCGH byla původně vyvinuta ke studiu nádorových buněk, u kterých lze poměrně snadno získat větší množství DNA. Minimální množství DNA potřebné ke spolehlivému určení aneuploidie pomocí mCGH se pohybuje okolo 1 µg, zatímco množství DNA v jedné buňce je přibližně 5–10 pg. Pro zavedení mCGH k diagnostice lidských embryí bylo nutné prvně vyřešit otázku amplifikace DNA celého genomu (WGA). První úspěšně použitou metodou WGA byla polymerázová řetězová reakce (PCR) s využitím degenerovaných oligonukleotidových primerů⁸.

Širšímu uplatnění mCGH v klinické praxi bránila dlouhá doba hybridizace (~3 dny), která kolidovala s časovým rámcem *in vitro* vývoje embrya. Bylo proto nutné vyvinout šetrnou metodu zamrazování embryí a provádět implantaci embryí do dělohy v následujícím menstruačním cyklu. Úpravou metody mCGH bylo docíleno zkrácení celkové doby stanovení na 12 hodin, avšak do klinické praxe se rozšířila alternativní metoda CGH využívající hybridizace na DNA čípech (aCGH). Princip metody aCGH je stejný jako u mCGH, k hybridizaci značených fragmentů DNA však slouží podložní sklíčko s navázanými fragmenty chromosomů nebo oligonukleotidů, nikoli metafázový chromosomální preparát. Jelikož konkrétní DNA sekvence nejsou na čipu rozmístěny náhodně, ale v definované mřížce, vyhodnocení lze snadno automatizovat¹⁵.

2.3. Jednonukleotidový polymorfismus

Jiná forma hybridizačních DNA čipů je založena na detekci jednonukleotidových polymorfismů (SNP). SNP jsou odchylky v sekvenci úseků DNA v jedné bázi, které se v populaci vyskytují s četností >1 %. V lidské populaci se nachází přibližně 40 milionů SNP, díky čemuž lze stanovením SNP jednoznačně identifikovat jedince, diagnostikovat geneticky podmíněné nemoci a stanovit ploidii buněk. Postup stanovení aneuploidie u lidských embryí se liší oproti mCGH/aCGH v tom, že vzorek i referenční vzorek jsou značeny stejným fluoroforem a nehybridizují na čipu současně. Aneuploidii lze určit porovnáním intenzity fluorescence vzorku s intenzitou fluorescence u referenčního vzorku, případně rekonstrukcí haplotypu embrya, jsou-li známy haplotypy rodičů a blízkých příbuzných¹⁵.

2.4. Kvantitativní PCR

Kvantitativní PCR (qPCR) využívá exponenciálního nárůstu množství DNA v rámci jednoho cyklu PCR.

Množství počáteční DNA tak lze snadno kvantifikovat. Exponenciální nárůst však časem ustane v důsledku spotřeby činidel a akumulace vedlejších produktů reakce. Pro správnou kvantifikaci je nutné množství DNA stanovovat průběžně v každém cyklu PCR a ke kvantifikaci použít exponenciální fázi nárůstu DNA. Detekce DNA využívá fluorescence činidel vmezezených do dvoušroubovice DNA (ethidium bromid; SYBR Green 1). Druhou možností je vazba fluorescenčně značeného oligonukleotidu o sekvenci komplementární k cílové sekvenci a využití principu Försterova rezonančního přenosu energie (FRET). Kromě ovlivnění FRET hybridizací s cílovou sekvencí se také využívá exonukleasové aktivity *Taq* DNA polymerasy, která hydrolyzuje oligonukleotid, jenž hybridizuje se sekvencí na templátové DNA ve směru replikace¹⁶. Tuto možnost využívá validovaná metoda pro stanovení ploidie všech chromosomů lidských embryí pomocí qPCR. Pro zajištění vyšší správnosti stanovení jsou sledovány 4 sekvence na každém chromosomu a ve 4 opakováních. Protokol vyžaduje 384-jamkovou qPCR, která je bez předchozí WGA vhodná pouze v případě biopsie trofoektodermu (~30 pg DNA). Výhodou však je, že výsledky lze získat do 4 hodin a metodu qPCR lze jednoduše rozšířit i o stanovení geneticky podmíněných nemocí¹⁷.

2.5. Sekvenování druhé generace

Sekvenování druhé generace (NGS) lze popsat jako sekvenování fragmentů DNA vzorku náhodně rozmístěných na sekvenačním čipu. Postup NGS v sobě zahrnuje náhodnou fragmentaci DNA na fragmenty o délce 100 až 200 párů bází. Fragmenty jsou následně spojeny se spojovací sekvencí (adaptor), která slouží k uchycení fragmentů DNA na sekvenačním čipu nebo mikročástici na principu hybridizace s komplementární sekvencí. Poté může být DNA amplifikována, a to včetně spojovací sekvence, díky čemuž vznikají na sekvenačním čipu diskrétní oblasti, které obsahují stejnou kopii DNA. Alternativně vznikají mikročástice pokryté kopiemi DNA, jež zapadnou do mikrojamek na sekvenačním čipu. Samotné sekvenování probíhá postupným opakováním přidávání fluorescenčně značených nukleotidů, syntézy DNA, zaznamenání fluorescence v celé ploše sekvenačního čipu a chemickým odštěpením fluoroforu. Jiné možnosti detekce syntézy DNA využívají chemiluminiscence závislé na uvolnění pyrofosfátu anebo změny pH registrované polovodiči. Sekvence fragmentů DNA jsou poté srovnány s referenčním genomem¹⁸. Jelikož by měl být počet sekvencí příslušících jednomu chromosomu úměrný počtu kopií chromosomu, NGS lze použít ke stanovení ploidie buněk. Výhodou NGS je, že není nutné sekvenovat celý genom a na jednom sekvenačním čipu lze sekvenovat současně více vzorků. V tomto případě je spojovací sekvence rozšířena o sekvenci sloužící k jednoznačné identifikaci příslušného vzorku DNA. Metoda NGS se již osvědčila jako nový funkční nástroj pro studium ploidie v reprodukční medicíně¹⁹.

3. Transkriptomika

Invazivita genomiky a postavení genů vzhledem k fenotypu iniciovaly hledání nových biomarkerů vývojového potenciálu embryí, jež by bylo možné stanovit neinvazivně, a které by poskytovaly informace o aktuálním stavu buňky. Postavením nejbližší genomice je transkriptomika, která studuje transkriptom. Ten je definován jako soubor RNA vzniklý přepisem DNA. Nejedná se pouze o mRNA, jež kódují primární strukturu proteinů, ale i o řadu molekul RNA, které nekódují proteiny, ale mají regulační funkce. Transkriptom buňky je z podstaty dynamický a odráží funkci buňky a buněčnou odpověď na vnitřní a vnější podněty. Z chemického hlediska jsou RNA příbuzné DNA, a proto lze ke studiu transkriptomu použít principiálně totožné metody jako pro studium genomu, jako jsou hybridizační čipy, qPCR anebo princip NGS (nazývá se RNA-seq²⁰). Rozdíl spočívá v amplifikaci, kde je prvním krokem reverzní transkripcí za vzniku komplementární DNA (cDNA). Dalším rozdílem je proměnlivý počet kopií RNA v buňce, který může vést ke zkeslení relativního zastoupení RNA při nelineární amplifikaci pomocí PCR²¹. Lineární amplifikace je založena na *in vitro* transkripci s využitím T7 RNA polymerasy, pro kterou cDNA slouží jako templát pro syntézu antisense RNA (RNA s komplementární sekvencí k mRNA). V průběhu amplifikace se množství templátu nemění (na rozdíl od PCR), a tím je splněn základní předpoklad pro lineární amplifikaci²².

Stanovení mRNA je invazivní metoda, které bylo použito pro pochopení genové exprese v různých fázích vývoje embrya^{23,24}. Využití mRNA k rutinní diagnostice omezuje její nízká stabilita, která vyžaduje čisté prostředí, zkušený tým pracovníků a standardizovanou přípravu vzorku. MikroRNA (miRNA) je oproti mRNA mnohem stabilnější díky tvorbě komplexů s některými proteiny a enkapsulaci do extracelulárních vezikulů (exosomů). Jedná se o krátké molekuly RNA (~22 nukleotidů), které se podílejí na post-transkripční regulaci genové exprese, a jež jsou zapojeny do klíčových buněčných procesů, jako jsou diferenciace, proliferace a apoptóza²⁵. Rozdílná exprese miRNA byla pozorována v závislosti na ploidii embrya²⁶ a mezi embryi úspěšně a neúspěšně implantovanými do dělohy²⁷. V druhém případě byly indikativní dvě miRNA (miR-20a, miR-30c), které jsou zapojeny do procesu proliferace buněk děložní sliznice a mohou být způsobem komunikace embrya s děložní sliznicí²⁷.

4. Proteomika

Proteomika se zabývá identifikací a kvantifikací všech proteinů biologického systému (proteom). Tradiční metodou pro studium proteomu je dvourozměrná (2D) gelová elektroforéza. Tato metoda využívá dvě v principu separace odlišné techniky, kde se v prvním kroku separace proteiny separují v gradientu pH pomocí izoelektrické fokusace a poté podle velikosti na principu síťového efektu

gelu. Proteiny se na gelu vizualizují stříbrem nebo jinými značkami, přičemž kvantitativním údajem je intenzita zbarvení a kvalitativním údajem je pozice proteinu v ploše gelu²⁸. K identifikaci proteinů se využívá hmotnostní spektrometrie (MS), kterou je možné spojit i s jinými separačními technikami (např. HPLC) anebo s přímou ionizační pevné fáze laserem (techniky MALDI a SELDI)²⁹. 2D gelová elektroforéza se však pro svou náročnost a zejména vysoké nároky na množství vzorku pro studium lidských embryí nevyužila³⁰. První práce pojednávající o studiu lidského embryonálního proteomu byla založena na laserové desorpci/ionizaci usnadněné povrchem v kombinaci s průletovým hmotnostním analyzátozem (SELDI-TOF). Jednalo se o studii založenou na lyzi embryí ve stádiu blastocysty, která prokázala, že morfologicky stejná embrya jsou proteomicky odlišná³⁰. Navazující studie se soustředily na neinvazivní způsob stanovení, a to analýzou proteinů vylučovaných embryem do svého okolí^{31,32}. Studie sekretovaných proteinů jsou ztíženy přítomností balastních proteinů v kultivačním médiu, jež se do kultivačního média dostávají společně s lidským sérovým albuminem. Bylo stanoveno, že 3–8 % hmotnosti proteinu v kultivačním médiu tvoří až 110 různých proteinů, které mohou být falešně považovány za biomarkery kvality embryí³³.

Nejzajímavější výsledky poskytla práce Poliho a spol., která byla zacílena na studium proteomu blastocoelu. Blastocoel je kavita u expandované blastocysty naplněná tekutinou, do které jsou aktivně vylučovány proteiny. Jelikož je tento prostor fyzicky oddělen od okolního prostředí buňkami trofoektodermu, studie nejsou limitovány přítomností balastních proteinů v kultivačním médiu. Punkce blastocoelu je minimálně invazivní procedura, kdy se pomocí mikromanipulátoru do kapiláry nasaje ~5 nl tekutiny blastocoelu. Způsobený objemový kolaps blastocysty nemá prokázáný negativní dopad na následující vývoj blastocysty. Během 5 hodin většina embryí získá svůj původní objem a pokračuje opuštěním glykoproteinového embryonálního obalu (*zona pellucida*), jež je nezbytné k implantaci embrya do děložní sliznice. Objemový kolaps blastocysty navíc snižuje rizika spojená se zamrazováním embryí. Menší objem kapaliny usnadňuje difuzi kryoprotektantů, čímž se snižuje pravděpodobnost buněčné destrukce vyvolané tvorbou ledových krystalů. Analýza proteinů byla založena na separaci pomocí nanoHPLC s MS detekcí na principu elektrostatické orbitální pasti (Orbitrap), přičemž v tekutině blastocoelu bylo identifikováno 288 proteinů, z nichž 182 bylo potvrzeno na úrovni mRNA³⁴.

5. Metabolomika

Metabolismus představuje vrcholnou úroveň biologického systému, v níž metabolity jsou podstatou biologické funkce, jež poukazují na fyziologický, patofyziologický a vývojový stav biologického systému³⁵. V hierarchii omických disciplín je metabolomika nejbližší fenotypu,

kde hladiny metabolitů jsou v konkrétním čase aktuálním projevem komplexních funkcí na genomické, transkriptomické a proteomické úrovni a odpovědí na vnější podněty³⁶. Metabolomika je definována jako souborná kvalitativní a kvantitativní analýza všech metabolitů biologického systému³⁷, avšak diverzita fyzikálně-chemických vlastností metabolitů, jejich široké koncentrační rozsahy a rozdílná stabilita činí zmíněnou definici metabolomiky v praxi nedosažitelnou. Z toho důvodu byly zavedeny různé strategické přístupy, které se zmíněné definici metabolomiky více či méně přibližují³⁸. S ohledem na studovaný soubor metabolitů a použité analytické techniky lze metabolomiku rozdělit na *cílenou* a *necílenou*. Oba přístupy jsou ve vzájemném komplementárním postavení, ve kterém necílená metabolomika hypotézu zavádí a cílená metabolomika hypotézu potvrzuje³⁹.

5.1. Necílená metabolomika

Necílená metabolomika se zaměřuje na stanovení širokého spektra metabolitů, jejichž výběr je vymezen pouze volbou úpravy vzorku a možnostmi zvolené analytické techniky. Jedná se o techniky, které jsou z principu nespécifické, jako jsou nukleární magnetická rezonance (NMR), MS anebo vibrační spektroskopie. V metabolomických studiích se nejčastěji využívá protonová NMR (¹H-NMR), jež se vyznačuje vysokou citlivostí a širokým pokrytím metabolitů díky přirozenému zastoupení vhodného isotopu vodíku ¹H (>99,9%) a výskytu vodíku ve většině organických molekul. ¹H-NMR byla využita k necílené metabolomice založené na statistickém zpracování naměřených spekter. Rozlišení vzorků kultivačních médií mezi úspěšně a neúspěšně implantovanými embryi nebylo docíleno patrně v důsledky vysoké míry biologické variability a nedostatečné citlivosti NMR⁴⁰. Jinou strategii zvolili Wallaceová a spol., kteří se zaměřili na identifikaci nových biomarkerů souvisejících s úspěšností otěhotnění a popsali 12 metabolitů, z nichž 7 bylo ve vztahu k úspěšnosti otěhotnění doposud neznámých⁴¹.

Pro stanovení spekter kultivačních médií byly také aplikovány Ramanova spektroskopie a infračervená spektroskopie v blízké oblasti (NIR). Spektra se lišila mezi embryi úspěšně a neúspěšně implantovanými do dělohy a byly odvozeny matematické modely umožňující předvídat úspěšnost implantace na základě Ramanových a NIR spekter⁴². Navázaly studie, které potvrdily platnost odvozených modelů^{43,44} a byla založena společnost Molecular Biometrics (Norwood, MA, USA), jež vyvinula praktický NIR spektroskop se zabudovaným modelem predikce úspěšnosti implantace embrya⁴⁵. Nicméně nedávná metaanalýza 4 randomizovaných kontrolních studií poukázala na to, že výběr embrya pomocí NIR nezvyšuje frekvenci donošených dětí na cyklus IVF a vyvinutý NIR spektroskop byl stažen z prodeje⁴⁶.

Zatímco spektroskopické techniky (NMR, vibrační spektroskopie) jsou založeny na měření fyzikálních jevů vzniklých interakcí molekul s elektromagnetickým záře-

ním, MS stanovuje molekulární složení vzorku. Oproti NMR vykazuje vyšší citlivost, ale kvantifikace je komplikována proměnlivou účinností ionizace zejména u ionizace složitých směsí. Často se proto před MS předřazuje separační technika, která komplexitu vzorku vstupujícího do iontového zdroje snižuje⁴⁷. Cortezzi a spol. aplikovali MS s přímým nástřikem zředěného vzorku kultivačního média s ionizační elektrosprejem ke klasifikaci vzorků kultivačních médií od úspěšně a neúspěšně implantovaných embryí. S využitím chemometrických přístupů odvodili funkční predikční model, jež dokázal zlepšit výběr embrya s nejvyšším implantačním potenciálem na základě MS spektra. Spektra se lišila zejména při pohledu na méně zastoupené ionty, z nichž některé aminokyseliny a mastné kyseliny byly identifikovány jako možné biomarkery implantačního potenciálu embrya⁴⁸.

5.2. Cílená metabolomika

Cílená metabolomika využívá citlivé a selektivní analytické techniky k přesné kvantifikaci určité skupiny metabolitů. Navazuje na necílené metabolomické studie k ověření diagnostických vlastností potenciálních biomarkerů nebo je výběr metabolitů vymezen na skupinu metabolitů, jež vystupují v zájmové metabolické dráze. Obecně je cílená metabolomika orientována hypotézou založenou na předem získaných informacích³⁹.

Aplikace cílené metabolomiky ke stanovení kvality lidských embryí se opírá o znalosti embryonálního metabolismu u různých modelových organismů, v mnoha případech s potvrzenou platností i u lidských embryí. Klíčovým zlomem embryonálního metabolismu je aktivace embryonálního genomu v období osmibuněčného stádia. V ranějších vývojových stádiích embryo spoléhá na proteiny a mRNA mateřského původu a vykazuje omezenou metabolickou aktivitu, jež se projevuje malou mírou biosyntézy (embryonální masa je neměnná), respirace a využívání glukosy. Hlavním zdrojem energie jsou v tomto období pyruvát a některé aminokyseliny, jejichž metabolity vstupují do Krebsova cyklu, a energie ve formě ATP je převážně generována oxidativní fosforylací⁴⁹. Embryonálním nárokům na živiny je přizpůsobeno i složení tekutiny vejcovodu a sekretu děložní sliznice, jež zajišťuje vystavení embrya protichůdným gradientům pyruvátu a glukosy při jeho transportu vejcovodem do dělohy. Přesný mechanismus aktivace embryonálního genomu zatím zůstává neobjasněn. Možným spouštěcím mechanismem může být hypoxický šok (nedostatek O₂) vyvolaný omezenou difúzí O₂ embryonální masou a jeho spotřebou okolními embryonálními buňkami. Aktivní transkripcie embryonálního genomu je podstatná pro syntézu enzymů glykolytické dráhy, jež se stává nejvýznamnější metabolickou dráhou generující ATP a NADH u embryí ve fázi blastocysty⁵⁰.

Energetický metabolismus buňky je nezbytný k udržení stálosti vnitřního prostředí, pro biosyntézu a buněčné dělení, a tak lze očekávat, že změny energetického metabolismu budou ve vztahu s vývojovým potenciálem embryí. Již první studie pozorovaly nižší spotřebu

pyruvátu^{51,52} a glukosy⁵² u embryí degenerujících a neschopných se vyvinout do stádia blastocysty. Pyruvát a glukosa byly stanoveny pomocí enzymových redoxních reakcí (laktátdehydrogenasa; hexokinasa/glukosa-6-fosfátdehydrogenasa), ve kterých vystupuje redoxní pár NAD(P)⁺/NAD(P)H. Aktivita reakce se projevuje změnou fluorescence NAD(P)H (λ_{ex} 340 nm, λ_{em} 460 nm). Aby metabolické změny byly měřitelné, kultivace embryí probíhaly v mikroobjemových kapkách média (<10 μ l) pod vrstvou parafinového oleje, jenž je propustný pro plyny, ale zabraňuje odpařování vody. V obdobných objemech pod olejovou vrstvou probíhaly i enzymové reakce a fluorescence byla zaznamenávána fluorescenčním mikroskopem. Zájem o tuto metodu byl oživen s iniciativou zvýšit úspěšnost otěhotnění⁵³ s navazující studií podtrhující významnou korelaci mezi spotřebou glukosy a pohlavím embrya⁵⁴. V krátkém období vývoje embrya časovaném od aktivace embryonálního genomu do 5. dne od oplodnění embryo postrádá regulaci transkripce obou X chromosomů, jež se projevuje násobnou transkripcí genů kódovaných na X chromosomech. Vyšší spotřebu glukosy u embryí ženského pohlaví lze vysvětlit vyšší syntézou X-vázané glukosa-6-fosfátdehydrogenasy, která je enzymem limitujícím rychlost pentosofosfátového cyklu⁵⁵. Měření mikroskopické fluorescence NAD(P)H je úspěšnou, avšak pracnou a časově náročnou metodou nevhodnou pro zavedení do klinické praxe. Nevýhody této metody podnítily vývoj automatických mikrofluidních systémů^{56,57} a metody využívající kapilární elektroforézy⁵⁸.

Aminokyseliny plní řadu klíčových funkcí nejen v průběhu rané embryogeneze. Jsou biosyntetickými prekurzory, zdrojem energie a regulátory energetického metabolismu, osmolyty a pufrů. *In vitro* stimulují vývoj a diferenciaci, a jsou proto základní složkou kultivačních médií⁴⁹. Dusíkový metabolismus savčích buněk je založen na syntéze močoviny v ornitinovém cyklu, který není v raném embryu aktivní. Embryonální katabolismus aminokyselin je tedy spojen s uvolňováním toxického amoniaku, jehož produkce je snižována transaminačními reakcemi zejména pyruvát/alanin a vylučováním alaninu do okolního prostředí⁵⁹. Houghtonová a spol. měřili 18 aminokyselin v kultivačním médiu získaném po kultivaci lidských embryí pomocí HPLC s fluorescenční detekcí. Pozorovali rozdílný metabolismus aminokyselin mezi embryi vyvíjejícími se do stádia blastocysty a embryi zastavenými ve vývoji⁶⁰. Navazující studie doložila vztah mezi metabolizmem aminokyselin a úspěšným donošením plodu⁶¹. Na základě výsledků těchto studií lze usuzovat, že měřením metabolismu aminokyselin je možné předvídat vývoj embrya. Diagnostický význam aminokyselin prohloubila rozsáhlá práce Pictonové a spol., jež se mimo jiné zaměřila na vliv ploidie 6 chromosomů. Vzhledem k tomu, že geny kódující proteiny zapojené do transportu a metabolismu aminokyselin se nacházejí na více chromosomech, numerické chromosomální abnormality se projevují násobnou syntézou těchto proteinů a přímo ovlivňují kinetiku metabolismu aminokyselin⁶². Variabilita metabolismu aminokyselin

a jejich potenciál k určení vývojové kompetence embrya inicioval vývoj nových metod pro stanovení aminokyselin založených na kapilární elektroforéze⁶³ a HPLC⁶⁴.

Další zajímavou skupinou metabolitů jsou mastné kyseliny, které jsou nedílnou součástí lipidů. Lipidy ovlivňují fyzikální vlastnosti buněčné membrány, jako jsou fluidita a permeabilita, a tyto vlastnosti jsou nezbytné k udržení buněčné funkce. Celkový povrch buněčné membrány embryonálních buněk se s každým buněčným dělením zvyšuje, a proto embryo vyžaduje aktivní syntézu mastných kyselin a lipidů, případně jejich aktivní příjem z okolí. První studie využívala monoizotopicky (¹³C) značené mastné kyseliny palmitovou (neesenciální) a linolovou (esenciální) přidané do kultivačního média. Studie byla destruktivní s využitím GC-MS a extrakcí lipidů z kultivačních médií a embryí. Výsledky odhalily preferenční příjem kyseliny palmitové ve fázi rýhování, jež se ve fázi blastocysty snižuje na bazální úroveň a výrazně narůstá příjem kyseliny linolové⁶⁵. Ke stejným závěrům lze dojít i neinvazivním měřením mastných kyselin v kultivačním médiu pomocí HPLC-MS⁶⁶. Preferenční příjem kyseliny palmitové v raném vývojovém stádiu může souviset s dominantním postavením Krebsova cyklu a oxidativní fosforylace v energetickém metabolismu embrya. Mastné kyseliny mohou být metabolizovány β -oxidací na acetyl-CoA, který přímo vstupuje do Krebsova cyklu. Vyšší příjem esenciálních mastných kyselin u embryí ve fázi blastocysty může souviset s jinými nároky na fluiditu membrány u diferencujících se buněk⁶⁶. Určení kvality embryí na základě stanovení mastných kyselin je však zatím hypotetické.

6. Závěr

Lidská embrya jsou obtížně studovanými subjekty nejen z etického hlediska. Genetické a transkriptomické studie jsou invazivní a výrazně zatíženy genetickou mozaikou, neinvazivní proteomické a metabolické studie vyžadují vysoce citlivé techniky pro měření změn v kultivačním médiu a při interpretaci výsledků je nutné zohlednit mnohočetný vliv vnějších a vnitřních faktorů na vývoj embrya. Vyjma aneuploidie nebyl doposud identifikován jednoznačný biomarker vývojové kompetence embrya. To lze přisoudit mnoha fyziologickým stavům, které může embryo zaujmout, a proto se zdá být nutností sledovat současně více biomarkerů. Ucelené analytické platformy, jež by mohly být zavedeny do klinické praxe, by mohly znamenat revoluci v porozumění fyziologii embrya. Po předchozích nezdarech s technikami FISH a NIR však nelze očekávat náhlé zavádění nových technik do klinické praxe. Nové techniky musí mít prokázaný diagnostický přínos ideálně ve vztahu k frekvenci donošených plodů na cyklus IVF. Přesto se jedná o zajímavou oblast studia, kde řešení mnoha otázek může stimulovat vývoj nových technik a přístupů, jež budou posouvat hranice současných analytických možností.

Práce vznikla díky finanční podpoře obdržené od Grantové agentury České republiky (projekt GBP206/12/G014).

Seznam zkratk

¹ H-NMR	protonová nukleární magnetická rezonance
2D	dvourozměrná
aCGH	komparativní genomová hybridizace na DNA čípech
ART	techniky asistované reprodukce
cDNA	komplementární DNA
FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
FRET	Försterův rezonanční přenos energie
IVF	mimotělní oplodnění
mCGH	metafázová komparativní genomová hybridizace
miRNA	mikroRNA
MS	hmotnostní spektrometrie
NGS	sekvenování druhé generace
NIR	infračervená spektroskopie v blízké oblasti
NMR	nukleární magnetická rezonance
PCR	polymerázová řetězová reakce
qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce
SELDI	laserová desorpce/ionizace usnadněná povrchem
SNP	jednonukleotidové polymorfismy
TOF	průletový hmotnostní analyzátor
WGA	amplifikace DNA celého genomu

LITERATURA

- Zegers-Hochschild F., Adamson G. D., de Mouzon J., Ishihara O., Mansour R., Nygren K., Sullivan E., Vanderpoel S.: *Fertil. Steril.* 92, 1520 (2009).
- The official web site of the Nobel prize: <http://www.nobelprize.org> (cit. 1.2.2017).
- Calhaz-Jorge C., de Geyter C., Kupka M. S., de Mouzon J., Erb K., Mocanu E., Motrenko T., Scaravelli G., Wyns C., Goossens V.: *Hum. Reprod.* 31, 1638 (2016).
- Crosignani P. G., Rubin B. L.: *Hum. Reprod.* 15, 1856 (2000).
- Gardner D. K., Meseguer M., Rubio C., Treff N. R.: *Hum. Reprod. Update* 21, 727 (2015).
- Nel-Themaat L., Nagy Z. P.: *Placenta* 32, S257 (2011).
- Wells D., Alfarawati S., Fragouli E.: *Mol. Hum. Reprod.* 14, 703 (2008).
- Wells D., Delhanty J. D. A.: *Mol. Hum. Reprod.* 6, 1055 (2006).
- Angell R. R., Aitken R. J., van Look P. F. A., Lumsden M. A., Templeton A. A.: *Nature* 303, 336 (1983).
- Franasiak J. M., Scott R. T.: *Trends Mol. Med.* 20, 499 (2014).
- Scott R. T., Upham K. M., Forman E. J., Zhao T., Treff N. R.: *Fertil. Steril.* 100, 624 (2013).
- Delhanty J. D. A., Griffin D. K., Handyside A. H., Harper J., Atkinson G. H. G., Pieters M. H. E. C., Winston R. M. L.: *Hum. Mol. Genet.* 2, 1183 (1993).
- Mastenbroek S., Twisk M., van der Veen F., Repping S.: *Hum. Reprod. Update* 17, 454 (2011).
- Mastenbroek S., Twisk M., van Echten-Arends J., Sikkema-Raddatz B., Korevaar J. C., Verhoeve H. R., Vogel N. E. A., Arts E. G. J. M., de Vries J. W. A., Bossuyt P. M., Buys C. H. C. M., Heineman M. J., Repping S., van der Veen F.: *N. Engl. J. Med.* 357, 9 (2007).
- Handyside A. H.: *Fertil. Steril.* 100, 59 (2013).
- Arya M., Shergill I. S., Williamson M., Gommersall L., Arya N., Patel H. R.: *Expert Rev. Mol. Diagn.* 5, 209 (2005).
- Treff N. R., Tao X., Ferry K. M., Su J., Taylor D., Scott R. T.: *Fertil. Steril.* 97, 819 (2012).
- Shendure J., Ji H.: *Nat. Biotechnol.* 26, 1135 (2008).
- Fiorentino F., Biricik A., Bono S., Spizzichino L., Cotroneo E., Cottone G., Kokocinski F., Michel C.-E.: *Fertil. Steril.* 101, 1375 (2014).
- Wang Z., Gerstein M., Snyder M.: *Nat. Rev. Genet.* 10, 57 (2009).
- Macaulay I. C., Voet T.: *PLoS Genet.* 10, e1004126 (2014).
- Peano C., Severgnini M., Cifola I., De Bellis G., Battaglia C.: *Expert Rev. Mol. Diagn.* 6, 465 (2006).
- Li S. S.-L., Liu Y.-H., Tseng C.-N., Singh S.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 340, 48 (2006).
- Kakourou G., Jaroudi S., Tulay P., Heath C., Serhal P., Harper J. C., SenGupta S. B.: *Fertil. Steril.* 99, 803 (2013).
- Galliano D., Pellicer A.: *Fertil. Steril.* 101, 1531 (2014).
- Rosenbluth E. M., Shelton D. N., Wells L. M., Sparks A. E. T., Van Voorhis B. J.: *Fertil. Steril.* 101, 1493 (2014).
- Capalbo A., Ubaldi F. M., Cimadomo D., Noli L., Khalaf Y., Farcomeni A., Ilic D., Rienzi L.: *Fertil. Steril.* 105, 225 (2016).
- López J. L.: *J. Chromatogr. B* 849, 190 (2007).
- Pandey A., Mann M.: *Nature* 405, 837 (2000).
- Katz-Jaffe M. G., Gardner D. K., Schoolcraft W. B.: *Fertil. Steril.* 85, 101 (2006).
- Katz-Jaffe M. G., Schoolcraft W. B., Gardner D. K.: *Fertil. Steril.* 86, 678 (2006).
- Cortezzi S. S., Garcia J. S., Ferreira C. R., Braga D. P. A. F., Figueira R. C. S., Iaconelli A., Souza G. H. M. F., Borges E., Eberlin M. N.: *Anal. Bioanal. Chem.* 401, 1331 (2011).
- Dyrlund T. F., Kirkegaard K., Poulsen E. T., Sanggaard K. W., Hindkjaer J. J., Kjems J., Enghild J. J., Ingerslev H. J.: *Hum. Reprod.* 29, 2421 (2014).
- Poli M., Ori A., Child T., Jaroudi S., Spath K., Beck M., Wells D.: *EMBO Mol. Med.* 7, 1465 (2015).
- Ryan D., Robards K.: *Anal. Chem.* 78, 7954 (2006).
- Nielsen J., Oliver S.: *Trends Biotechnol.* 23, 544 (2005).

37. Fiehn O.: *Plant Mol. Biol.* 48, 155 (2002).
38. Musilová J., Glatz Z.: *Chem. listy* 105, 745 (2011).
39. Johnson C. H., Ivanisevic J., Siuzdak G.: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 17, 459 (2016).
40. Kirkegaard K., Svane A. S. P., Nielsen J. S., Hindkjaer J. J., Nielsen N. C., Ingerslev H. J.: *Hum. Reprod.* 29, 2413 (2014).
41. Wallace M., Cottell E., Cullinane J., McAuliffe F. M., Wingfield M., Brennan L.: *Syst. Biol. Reprod. Med.* 60, 58 (2014).
42. Seli E., Sakkas D., Scott R., Kwok S. C., Rosendahl S. M., Burns D. H.: *Fertil. Steril.* 88, 1350 (2007).
43. Scott R., Seli E., Miller K., Sakkas D., Scott K., Burns D. H.: *Fertil. Steril.* 90, 77 (2008).
44. Vergouw C. G., Botros L. L., Roos P., Lens J. W., Schats R., Hompes P. G. A., Burns D. H., Lambalk C.: *Hum. Reprod.* 23, 1499 (2008).
45. Uyar A., Seli E.: *Semin. Reprod. Med.* 32, 141 (2014).
46. Vergouw C. G., Heymans M. W., Hardarson T., Sfontouris I. A., Economou K. A., Ahlstrom A., Rogberg L., Lainas T. G., Sakkas D., Kieslinger D. C., Kostelijk E. H., Hompes P. G. A., Schats R., Lambalk C. B.: *Hum. Reprod.* 29, 455 (2014).
47. Nicholson J. K., Lindon J. C.: *Nature* 455, 1054 (2008).
48. Cortezzi S. S., Cabral E. C., Trevisan M. G., Ferreira C. R., Setti A. S., Braga D. P. A. F., Figueira R. C. S., Iaconelli A., Eberlin M. N., Borges E.: *Reproduction* 145, 453 (2013).
49. Gardner D. K., Lane M.: *Hum. Reprod. Update* 3, 367 (1997).
50. Seli E., Robert C., Sirard M.-A.: *Mol. Hum. Reprod.* 16, 513 (2010).
51. Leese H. J., Hooper M. A. K., Edwards R. G., Ashwood-Smith M. J.: *Hum. Reprod.* 1, 181 (1986).
52. Hardy K., Hooper M. A., Handyside A. H., Rutherford A. J., Winston R. M., Leese H. J.: *Hum. Reprod.* 4, 188 (1989).
53. Gardner D. K., Lane M., Stevens J., Schoolcraft W. B.: *Fertil. Steril.* 76, 1175 (2001).
54. Gardner D. K., Wale P. L., Collins R., Lane M.: *Hum. Reprod.* 26, 1981 (2011).
55. Gardner D. K., Larman M. G., Thouas G. A.: *Mol. Hum. Reprod.* 16, 539 (2010).
56. Urbanski J. P., Johnson M. T., Craig D. D., Potter D. L., Gardner D. K., Thorsen T.: *Anal. Chem.* 80, 6500 (2008).
57. Heo Y. S., Cabrera L. M., Bormann C. L., Smith G. D., Takayama S.: *Lab Chip* 12, 2240 (2012).
58. Mádr A., Celá A., Klejdus B., Pelcová M., Crha I., Žáková J., Glatz Z.: *Electrophoresis* 36, 1244 (2015).
59. Orsi N. M., Leese H. J.: *Reproduction* 127, 131 (2004).
60. Houghton F. D., Hawkhead J. A., Humpherson P. G., Hogg J. E., Balen A. H., Rutherford A. J., Leese H. J.: *Hum. Reprod.* 17, 999 (2002).
61. Brison D. R., Houghton F. D., Falconer D., Roberts S. A., Hawkhead J., Humpherson P. G., Lieberman B. A., Leese H. J.: *Hum. Reprod.* 19, 2319 (2004).
62. Picton H. M., Elder K., Houghton F. D., Hawkhead J. A., Rutherford A. J., Hogg J. E., Leese H. J., Harris S. E.: *Mol. Hum. Reprod.* 16, 557 (2010).
63. Celá A., Mádr A., Dědová T., Pelcová M., Jeřeta M., Žáková J., Crha I., Glatz Z.: *Electrophoresis* 37, 2305 (2016).
64. Drábková P., Andrllová L., Kandár R.: *Biomed. Chromatogr.* 31, e3800 (2017).
65. Haggarty P., Wood M., Ferguson E., Hoad G., Srikantharajah A., Milne E., Hamilton M., Bhattacharya S.: *Hum. Reprod.* 21, 766 (2006).
66. Yagi A., Miyanaga S., Shrestha R., Takeda S., Kobayashi S., Chiba H., Kamiya H., Hui S.-P.: *Clin. Chim. Acta* 456, 100 (2016).

A. Mádr^a, Z. Glatz^a, and I. Crha^b (^a *Department of Biochemistry, Faculty of Science, Masaryk University, Brno,* ^b *Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine and University Hospital of Masaryk University, Brno*): **‘Omics’ Techniques: Genomics, Transcriptomics, Proteomics and Metabolomics in Embryo Developmental Capacity Assessment**

This review defines limits of currently used techniques to assess developmental capacity of human embryos in assisted reproduction and provides an overview of techniques assessing embryo’s physiology on levels of genomics, transcriptomics, proteomics and metabolomics. Basic principles of respective techniques are included. Discovered biomarkers are discussed with respect to biochemical functions and their prognostic values of embryonal development.