

Systemy oceny kompetencji rozwojowej oocytów oraz zarodków ssaków oparte na technologii mikrofluidycznej typu Lab-on-Chip^{*)}

BARTOSZ KEMPISTY, RAFAŁ WALCZAK**, PAWEŁ ANTOSIK*,
PATRYCJA SZCZEPAŃSKA**, MAGDALENA WOŻNA*, DOROTA BUKOWSKA*,
KATARZYNA ZAORSKA, JAN DZIUBAN**, JĘDRZEJ M. JAŚKOWSKI*

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii Wydziału Lekarskiego II UM,
ul. Święcickiego 6, 60-781 Poznań

*Katedra Weterynarii Wydziału Hodowli i Biologii Zwierząt UP,
ul. Wojska Polskiego 52, 60-628 Poznań

**Zakład Mikroinżynierii i Fotowoltaiki Wydziału Elektroniki Mikrosystemów i Fotoniki Politechniki Wrocławskiej,
ul. Zygmunta Janiszewskiego 11/17, 50-372 Wrocław

Kempisty B., Walczak R., Antosik P., Szczepańska P., Woźna M.,
Bukowska D., Zaorska K., Dziuban J., Jaśkowski J. M.

Systems for evaluating the developmental competence of mammalian oocytes and embryos based on the Lab-on-Chip microfluidic technology

Summary

This review presents basic criteria for evaluating the developmental competence of oocytes and embryos, and contains a detailed description of the microfluidic-technology-based Lab-on-Chip.

The developmental competence of oocytes is acquired through a complex process associated with oocyte growth and maturation, the storage of large amounts of mRNA and proteins, and with the formation of proper cell morphology. The full maturation of oocytes is required for successful monospermic fertilization and embryonic preimplantation development. The morphology of the gamete is one of the most important factors influencing the developmental competence of the cell. There are several indicators for the assessment of oocyte morphology, most of them including the color and granularity of the cytoplasm.

Intensive research is under way to develop and introduce new non-invasive methods of oocyte and embryo quality assessment as a major factor in the improvement of assisted reproductive techniques. The Lab-on-Chip technology, as an independent micro-cytometric device, is a combination of reproductive biology techniques and micro-optic electronics. In the future, Lab-on-Chip systems may be used as an important diagnostic instrument for evaluating the quality of mammalian oocytes and embryos.

Keywords: developmental competence, oocyte and embryo quality, Lab-on-Chip technology

Kryteria oceny kompetencji rozwojowej oocytów i zarodków

W ciągu ostatnich 10 lat wyraźnie wzrosło zainteresowanie wykorzystywaniem technik wspomaganego rozrodu, szczególnie ze względu na powszechne stosowanie zapłodnienia *in vitro* u wielu gatunków ssaków oraz klonowanie zwierząt (16, 24, 32). Oocyty, z punktu widzenia łatwej dostępności oraz możliwości szerokiego wykorzystania w biologii rozrodu, stały się obiektem, któremu poświęca się szczególną uwagę (12). Jakość oocytów w znacznej mierze wpływa na skuteczność monospermicznego zapłodnienia, wczes-

ny rozwój zarodków oraz ich prawidłową implantację (9, 18, 25, 31). Określana jest ona, między innymi, poprzez ich zdolność do wzrostu i dojrzewania.

Dojrzewanie oocytów jest złożonym procesem, polegającym na wielu przemianach biochemicznych i ultrastrukturalnych, dzięki którym komórki te nabywają zdolności do zapłodnienia oraz późniejszego prawidłowego rozwoju zarodka (2, 20, 23, 35). Procesy związane ze wzrostem i dojrzewaniem oocytów polegają nie tylko na separacji chromosomów podczas dojrzewania jądrowego (11), ale i na właściwym ułożeniu organelli komórkowych (17), gromadzeniu dużych ilości mRNA, białek oraz ważnych czynników transkrypcyjnych (15, 20, 25). Matrycowy RNA oraz białka są niezbędnymi elementami dla prawidłowego

^{*)} Praca finansowana z grantu nr 2923/B/P01/2009/37 Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego oraz przez Unię Europejską z Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego, umowa nr POIG.01.03.01-00-014/08-00.

przebiegu procesu dojrzewania oocytów oraz rozwoju zarodka do stadium 8-komórkowego, po którym u bydła następuje aktywacja genomu zarodkowego i synteza nowych białek (3, 40). Stadium to określa się mianem aktywacji genomu zarodkowego (EGA – embryonic genome activation) (10, 27, 28). Ekspresja genów w tym stadium w znacznym stopniu wpływa na przedimplantacyjny rozwój zarodków. Wszystkie wymienione procesy związane ze wzrostem oraz dojrzewaniem oocytów, jak i rozwojem zarodków wpływają na zdolność tych komórek do osiągnięcia kompetencji rozwojowej (developmental competence) (9, 10, 19, 33).

Osiągnięcie przez oocyty kompetencji rozwojowej uzależnione jest od wielu czynników, wśród których wymienia się: zmagazynowanie odpowiedniej ilości mRNA i białek (29, 34, 43, 44) oraz właściwą morfologię tych komórek (9, 18, 35). Do kryteriów uwzględnianych podczas oceny morfologicznej zalicza się: strukturę komórek wzgórka jajonośnego (cumulus complex), zabarwienie oraz ziarnistość cytoplazmy, obecność ciała kierunkowego, strukturę przestrzeni periwitelinowej, osłonki przejrzystej (zona pellucida) oraz wrzeciona podziałowego (26, 41).

Biorąc pod uwagę powyższe wskaźniki i posługując się technikami mikroskopowymi oraz molekularnymi, możliwe jest określenie potencjału – kompetencji rozwojowej oocytów oraz zarodków. Wśród metod molekularnych należy wymienić genomikę, opierającą się na przesiewowych badaniach ekspresji genów. Techniki, którymi dysponuje, umożliwiają analizowanie całego transkryptomu badanych oocytów czy zarodków, jak również monitorowanie zmian ekspresji genów (8, 25, 31, 33). Dużym zapleczem metod służących analizie zarodków i oocytów dysponuje także transkryptomika (4, 22, 27, 33) oraz technologie proteomiczne znajdujące szerokie zastosowanie w określaniu potencjału rozwojowego oocytów oraz zarodków ssaków na podstawie analizy poszczególnych białek (1, 6, 14, 21). Jednakże wszystkie te techniki są inwazyjne i w efekcie końcowym prowadzą do zniszczenia komórki, dlatego też poszukuje się nowych metod nieinwazyjnej oceny jakości oraz kompetencji rozwojowej oocytów i zarodków ssaków, dzięki którym możliwe będzie określenie potencjału bez ich uszkodzenia.

Systemy Lab-on-Chip a ocena jakości oocytów oraz zarodków

Prawidłowa selekcja zarodków przed ich transferem do macicy biornicy jest istotnym zagadnieniem gospodarczym i naukowym. Tradycyjna metoda oceny jakości oocytów i zarodków bydłych polega na ocenie ich budowy morfologicznej podczas obserwacji pod mikroskopem optycznym (13). Uwzględniane są wówczas takie parametry, jak: kształt, jego regularność, ziarnistość i kolor (37-39), jednakże opis morfologiczny nie jest opisem obiektywnym, a tym samym nie daje

pełnej informacji odnośnie do jakości ocenianego oocytu/zarodka (7, 9). Morfologiczny opis jakości zarodków nie w pełni pokrywa się z uzyskiwanymi wynikami transferu, przebiegiem ciąży, a w konsekwencji narodzinami zdrowego potomstwa, charakteryzującego się wysokimi wskaźnikami hodowlanymi (5). Brak jest w chwili obecnej obiektywnych metod oceny jakości zarodków bydłych ze względu na brak instrumentów, umożliwiających przeprowadzenie takiej oceny. W dostępnej literaturze uwzględniane jest tylko jedno rozwiązanie techniczno-metodologiczne pozwalające na prowadzenie obiektywnej (parametrycznej) oceny jakości zarodków.

Urbanski i wsp. (42) zaproponowali określenie profilu metabolicznego pojedynczego zarodka mysiego z wykorzystaniem polimerowego zestawu lab-on-chip. Wyznaczenie profilu metabolicznego jednego zarodka jest czasochłonne (trwa około 3 godzin), a przeprowadzenie tego typu badania odbywać może się wyłącznie w specjalistycznym laboratorium. Co więcej, podczas badania analizie poddawane są płyny metaboliczne pobrane z hodowli *in vitro* zarodka, a nie sam zarodek. Z drugiej strony, nauka nie dysponuje innymi niż ocena budowy morfologicznej i analiza metabolizmu metodami nieinwazyjnej oceny jakości lub/i żywotności zarodków. Opracowanie systemu do szybkiej i taniej kwalifikacji zarodków ssaków rozpocząć należy od określenia nieinwazyjnej metodologii oceny jakości zarodków możliwej do zastosowania z wykorzystaniem lab-on-chipów. Należy również podkreślić fakt, że ta sama technika może zostać wykorzystana do oceny jakości oocytów, tym samym dając możliwość wyselekcjonowania tylko wysokiej jakości oocytów zanim zostaną one zapłodnione metodą *in vitro* (36, 45).

Koncepcja nowej metodologii oceny jakości oocytów/zarodków

Z przeprowadzonej analizy możliwych do pomiaru parametrów fizykochemicznych z wykorzystaniem lab-on-chipów oraz uwzględnieniem specyfiki pomiaru organizmu żywego (oocytu/zarodka) wynika, że z powodzeniem określić można parametry optyczne, elektryczne i mechaniczne zarodka. Podczas pomiarów optycznych analizowane jest spektrum absorpcji lub transmisji światła, a także fluorescencja (45). Ocena parametrów elektrycznych polega na analizie spektrum impedancyjnego w zakresie niskich i wysokich częstotliwości. Ponadto pomiary spektrum impedancyjnego powinny obejmować nie tylko sam oocyt/zarodek, ale również medium, w którym te komórki są utrzymywane, w konsekwencji, niestety, opóźnia to analizę uzyskanych wyników. Zastosowanie zmiennego pola elektromagnetycznego może mieć także szkodliwy wpływ na zarodek. Mechaniczna ocena jakości materiału biologicznego określana jest jako zdolność zarodka do deformacji, a następnie powrotu do kształtu pierwotnego. Przyjmuje się jednak, że pomiar elas-

tyczności zarodka może mieć raczej charakter uzupełniająca niż niosący właściwą informację na temat jego jakości (30). Reasumując, wydaje się zatem, że analiza parametrów optycznych ze względu na łatwość integracji elementów optycznych z lab-on-chipem stanowi najbardziej odpowiednią metodę służącą ocenie jakości zarodków lub/i oocytów. W chwili obecnej kompletny opis metodologii oraz końcowa pełna analiza otrzymanych wyników nie są dokładnie poznane ze względu na brak referencyjnych doniesień literaturowych na ten temat. Opisywana powyżej metoda polegająca na wykorzystaniu do tego celu systemów Lab-on-Chip jest zastosowana po raz pierwszy. W układzie systemu Lab-on-Chip przewiduje się pomiar spektrum absorpcji lub/i transmisji w zakresie promieniowania widzialnego (400-700 nm) (38, 39). Określone zostaną specyficzne długości fal (np. λ_1 , λ_2 itd.) i wartości absorpcji/transmisji dla tych długości ($I\lambda_1$, $I\lambda_2$ itd.) wybrane na podstawie przeprowadzonych doświadczeń własnych. Możliwe jest również wyznaczenie przesunięcia widmowego specyficznych punktów charakterystyki spektralnej ($\Delta\lambda_1$, $\Delta\lambda_2$ itd.), pola powierzchni wybranych pików, wskaźniki zróżniczkowane i inne parametry określające wartości spektralne. Warto poświęcić uwagi wydaje się również zastosowanie dostępnych zestawów do detekcji apoptozy, umożliwiających określenie żywotności zarodka na podstawie intensywności fluorescencji komórek. Przeprowadzanie pomiaru fluorescencji oraz wartości spektralnych odbywa się w środowisku zapewniającym jak najbardziej zbliżone warunki do hodowli oocytów/zarodków *in vitro* (np. holding medium), jak również ograniczającym oddziaływanie długotrwałego stresu (np. temperaturowego) na badany materiał biologiczny. Reakcja oocytu lub zarodka na zadany stres, skutkująca powrotem (lub jego brakiem) do stanu pierwotnego, może nieść ze sobą dodatkową informację na temat jego jakości i kompetencji rozwojowych. W konsekwencji przeprowadzonych badań uzyskuje się zestaw parametrów optycznych charakteryzujących w sposób obiektywny poszczególne oocyt/zarodek. Na podstawie zebranych danych przeprowadzana jest ocena jakości materiału biologicznego i jego klasyfikacja do jednej z grup morfologicznych. Możliwe jest również zastosowanie oceny morfologii zarodka i skorelowanie uzyskanych parametrów morfologicznych z danymi otrzymanymi z pomiarów spektrofotometrycznych/fluorymetrycznych (36, 39, 45).

Model Lab-on-Chipa – opis koncepcji demonstratora APOZAR

Demonstrator APOZAR zbudowany jest z trzech głównych części: lab-on-chipa do pomiarów spektrofotometrycznych i fluorymetrycznych; stacji dokującej lab-on-chipa oraz komputera przenośnego wraz ze specjalistycznym oprogramowaniem.

Lab-on-chip umieszczany jest w stacji dokującej, będącej podzespołem, umożliwiającym „kontakt” lab-

-on-chipa ze otoczeniem zewnętrznym (fluidycznym, elektrycznym, informatycznym). Do komory pomiarowej lab-on-chipa wprowadzany jest sklasyfikowany materiał biologiczny w postaci oocytu lub zarodka. Procedura umieszczania zarodka w lab-on-chipie jest metodą nieinwazyjną, umożliwia bowiem późniejsze zapłodnienie oocytu lub transfer zarodka do bioreactora. Wprowadzanie komórki do komory pomiarowej nadzorowane jest przez wbudowany w stację dokującą system wideo lub/i mikroskop, po czym następuje pomiar parametrów optycznych, według procedury wybranej przez operatora (38, 39). Pomiar spektrofotometryczny analizowane są z wykorzystaniem źródła światła widzialnego i miniaturowego spektrometru, jak również źródła wzbudzającego fluorescencję i detektora fluorescencji w przypadku pomiaru fluorymetrycznego. Pomiar parametrów optycznych nadzorowany jest przez komputer wyposażony w odpowiednie oprogramowanie. Po zakończeniu procedury pomiarowej, co sygnalizowane jest przez system informatyczny, oocyt/zarodek jest wyprowadzany z lab-on-chipa.

Czas trwania procedury pomiarowej trwa do kilku minut, w zależności od wybranej przez operatora opcji pomiarowej. Po zakończeniu analizy system informatyczny umożliwia wgląd we wszystkie parametry optyczne uzyskane w trakcie pomiaru lub określa jakość badanego materiału biologicznego według ustalonego algorytmu klasyfikacji (38, 39).

Podsumowanie

W pracy przedstawiono wybrane metody oceny kompetencji rozwojowej oocytów oraz zarodków ssaków. Szczególną uwagę skupiono na opisie nowej metody opartej na technologii mikrofluidycznej typu Lab-on-Chip. Metoda ta pozwala na szybką i obiektywną ocenę jakości zarówno oocytów, jak i zarodków, uwzględniając ich zdolność do absorbowania światła o określonej – specyficznej długości fali. Dzięki tej metodzie możliwe jest analizowanie wielu optycznych parametrów komórek. Wykonanie pomiarów spektralnych w korelacji ze wskaźnikami biologicznymi (jak zdolność do zapłodnienia czy zakończenie procesu dojrzewania) umożliwia określenie potencjału – kompetencji rozwojowej analizowanych komórek. W przyszłości system oparty na technologii mikrofluidycznej typu Lab-on-Chip może stać się istotnym uzupełnieniem powszechnie stosowanych metod diagnostycznych, jak również znacznie wzbogacić stosowane techniki wspomaganego rozrodu (46).

Piśmiennictwo

1. Aebbersold R., Mann M.: Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 2003, 422, 198-207.
2. Antosik P., Kempisty B., Bukowska D., Jackowska M., Włodarczyk R., Budna J., Brüßow K. P., Lianeri M., Jagodziński P. P., Jaśkowski J. M.: Follicular size is associated with the levels of transcripts and proteins of selected molecules responsible for the fertilization ability of oocytes of puberal gilts. *J. Reprod. Dev.* 2009, 55, 588-593.

3. *Antosik P., Kempisty B., Jackowska M., Bukowska D., Lianeri M., Brüssow K. P., Wozna M., Jaskowski J. M.*: The morphology of porcine oocytes is associated with zona pellucida glycoprotein 3 and integrin beta 2 protein levels. *Vet. Med.* 2010, 55, 154-162.
4. *Bachvarova R. F.*: A maternal tail of poly(A): the long and short of it. *Cell* 1992, 96, 895-897.
5. *Balaban B., Urman B.*: Effect of oocyte morphology on embryo development and implantation. *Reprod. Biomed. Online* 2006, 12, 608-615.
6. *Bhojwani M., Rudolph E., Kanitz W., Zuehlke H., Schneider F., Tomek W.*: Molecular analysis of maturation processes by protein and phosphoprotein profiling during in vitro maturation of bovine oocytes: a proteomic approach. *Cloning Stem Cells* 2006, 8, 259-274.
7. *Borini A., Lagalla C., Cattoli M., Sereni E., Sciajno R., Flamigni C., Cotichio G.*: Predictive factors for embryo implantation potential. *Reprod. Biomed. Online* 2005, 10, 653-668.
8. *Copp A. J.*: Death before birth: clues from gene knockouts and mutations. *Trends Genet.* 1995, 11, 87-93.
9. *Cotichio G., Sereni E., Serrao L., Mazzone S., Iadarola I., Borini A.*: What criteria for the definition of oocyte quality? *Ann. NY Acad. Sci.* 2004, 1034, 132-144.
10. *Duranton V., Renard J. P.*: The developmental competence of mammalian oocytes: a convenient but biologically fuzzy concept. *Theriogenology* 2001, 55, 1277-1289.
11. *First N. L., Leibfried-Rutledge M. L., Sirard M. A.*: Cytoplasmic control of oocyte maturation and species differences in the development of maturational competence. *Prog. Clin. Biol. Res.* 1988, 267, 1-46.
12. *Gajda B.*: Factors and methods of pig oocyte and embryo quality improvement and their application in reproductive biotechnology. *Reprod. Biol.* 2009, 9, 97-112.
13. *Goovaerts I. G., Leroy J. L., Jorssen E. P., Bols P. E.*: Noninvasive bovine oocyte quality assessment: possibilities of a single oocyte culture. *Theriogenology* 2010, 11 (Epub ahead of print).
14. *Görg A., Weiss W., Dümm M. J.*: Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* 2004, 4, 3665-3685.
15. *Gosden R. G.*: Oogenesis as a foundation for embryogenesis. *Mol. Cell Endocrinol.* 2002, 186, 149-153.
16. *Hoshi H.*: In vitro production of bovine embryos and their application for embryo transfer. *Theriogenology* 2003, 59, 675-685.
17. *Hytell P., Xia K. P., Smith S., Greve T.*: Ultrastructure of in vitro oocyte maturation in cattle. *J. Reprod. Fertil.* 1986, 78, 615-625.
18. *Jackowska M., Kempisty B., Antosik P., Bukowska D., Budna J., Lianeri M., Rosińska E., Wozna M., Jagodziński P. P., Jaskowski J. M.*: The morphology of porcine oocytes is associated with zona pellucida glycoprotein transcript contents. *Reprod. Biol.* 2009, 9, 79-85.
19. *Jaśkowski J. M., Kempisty B., Wozna M., Walczak R., Szczepańska P., Dziuban J., Antosik P.*: Wybrane metody oceny kompetencji rozwojowej oraz selekcji oocytów i zarodków bydłęcych. *Medycyna Wet.* 2010 [w druku].
20. *Kastrop P. M., Bevers M. M., Destrée O. H., Kruip T. A.*: Protein synthesis and phosphorylation patterns of bovine oocytes maturing in vivo. *Mol. Reprod. Dev.* 1991, 29, 271-275.
21. *Katz-Jaffe M. G., Gardner D. K.*: Embryology in the era of proteomics. *Theriogenology* 2007, 68, 125-130.
22. *Kempisty B., Antosik P., Bukowska D., Jackowska M., Lianeri M., Jaśkowski J. M., Jagodziński P. P.*: Analysis of selected transcript levels in porcine spermatozoa, oocytes, zygotes and two-cell stage embryos. *Reprod. Fertil. Dev.* 2008, 20, 513-518.
23. *Kempisty B., Antosik P., Bukowska D., Jackowska M., Lianeri M., Jaśkowski J. M., Jagodziński P. P.*: Assessment of zona pellucida glycoprotein and integrin transcript contents in porcine oocytes. *Reprod. Biol.* 2009, 9, 71-78.
24. *Kim M. J., Oh H. J., Park J. E., Hong S. G., Kang J. T., Koo O. J., Kang S. K., Jang G., Lee B. C.*: Influence of oocyte donor and embryo recipient conditions on cloning efficiency in dogs. *Theriogenology* 2010, 74, 473-478.
25. *Krisher R. L.*: The effect of oocyte quality on development. *J. Anim. Sci.* 2004, 82, 14-23.
26. *Lasiene K., Vitkus A., Valanciūte A., Lasys V.*: Morphological criteria of oocyte quality. *Medicina (Kaunas)* 2009, 45, 509-515.
27. *Memili E., First N. L.*: Zygotic and embryonic gene expression in cow: a review of timing and mechanisms of early gene expression as compared with other species. *Zygote* 2000, 8, 87-96.
28. *Misirlioglu M., Page G. P., Sagirkaya H., Kaya A., Parrish J. J., First N. L., Memili E.*: Dynamics of global transcriptome in bovine matured oocytes and preimplantation embryos. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2006, 103, 18905-18910.
29. *Mtango N. R., Potireddy S., Latham K. E.*: Oocyte quality and maternal control of development. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 2008, 268, 223-290.
30. *Murayama Y., Constantinou C. E., Omata S.*: Micro-mechanical sensing for the characterization of the elastic properties of the ovum via uniaxial measurement. *J. Biomech.* 2004, 37, 67-72.
31. *Patrizio P., Fragouli E., Bianchi V., Borini A., Wells D.*: Molecular methods for selection of the ideal oocyte. *Reprod. Biomed. Online* 2007, 15, 346-353.
32. *Rodriguez-Alvarez L., Cox J., Tovar H., Einspanier R., Castro F. O.*: Changes in the expression of pluripotency-associated genes during preimplantation and peri-implantation stages in bovine cloned and in vitro produced embryos. *Zygote* 2010, 30, 1-11.
33. *Rodriguez-Zas S. L., Schellander K., Lewin H. A.*: Biological interpretations of transcriptomic profiles in mammalian oocytes and embryos. *Reproduction* 2008, 135, 129-139.
34. *Sirard M. A.*: Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. *Theriogenology* 2001, 55, 1241-1254.
35. *Sirard M. A., Richard F., Blondin P., Robert C.*: Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology* 2006, 65, 126-136.
36. *Smith G. D., Takayama S.*: Gamete and embryo isolation and culture with microfluidics. *Theriogenology* 2007, 68, 190-195.
37. *Soom A. van, Mateusen B., Leroy J., De Kruif A.*: Assessment of mammalian embryo quality: what can we learn from embryo morphology? *Reprod. Biomed. Online.* 2003, 7, 664-670.
38. *Szczepańska P., Walczak R., Dziuban J., Jackowska M., Kempisty B., Jaskowski M. J., Bargiel S.*: Lab-on-chip quality classification of porcine/bovine oocytes. *Proc. Chemistry* 2009, 1, 341-344.
39. *Szczepańska P., Walczak R., Dziuban J., Kempisty B., Jackowska M., Antosik P., Jaśkowski J., Bargiel S.*: Ocena jakościowa komórek rozrodczych zwierząt hodowlanych z wykorzystaniem mikrocytometru typu lab-chip. *Elektronika* 2010, 6, 93-96.
40. *Telford N. A., Watson A. J., Schultz G. A.*: Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. *Mol. Reprod. Dev.* 1990, 26, 90-100.
41. *Ubbaldi F., Rienzi L.*: Morphological selection of gametes. *Placenta.* 2008, 29, 115-120.
42. *Urbanski J. P., Johnson M. T., Craig D. D., Potter D. L., Gardner D. K., Thorsen T.*: Noninvasive metabolic profiling using microfluidics for analysis of single preimplantation embryos. *Anal. Chem.* 2008, 80, 6500-6507.
43. *Watson A. J.*: Oocyte cytoplasmic maturation: a key mediator of oocyte and embryo developmental competence. *J. Anim. Sci.* 2007, 85, E1-3.
44. *Wrenzycki C., Herrmann D., Niemann H.*: Messenger RNA in oocytes and embryos in relation to embryo viability. *Theriogenology* 2007, 68, 77-83.
45. *Zeggari R., Wacogne B., Pieralli C., Roux C., Gharbi T.*: A full micro-fluidic system for single oocyte manipulation including an optical sensor for cell maturity estimation and fertilization indication. *Sensors and Actuators* 2007, 125, 664-671.
46. *Ziobler B. L., Mauk M. G., Falls E. M., Chen Z., Ziobler A. F., Bau H. H.*: Lab-on-a-chip for oral cancer screening and diagnosis. *Head Neck* 2008, 30, 111-121.

Adres autora: dr Bartosz Kempisty, ul. Świącickiego 6, 60-781 Poznań; e-mail: etok@op.pl