

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE, LÉKAŘSKÁ FAKULTA V PLZNI

Možnosti a význam prodloužené kultivace embryí

Autoreferát dizertační práce

MUDr. Petr Uher



Plzeň 2011

Dizertační práce byla vypracována v rámci doktorandského studijního programu na Gynekologicko – porodnické klinice FN Plzeň a Lékařské fakultě v Plzni.

Obor: Gynekologie a porodnictví

Předseda oborové rady: Doc.MUDr. Zdeněk Novotný, CSc.

Autor: MUDr. Petr Uher

Školitel: Doc. MUDr. Zdeněk Rokyta, CSc.

Oponenti: Prof. MUDr. Ladislav Pilka, CSc.

Prof. RNDr. MUDr. Jaroslav Slípka, DrSc.

Autoreferát byl rozeslán dne:

Obhajoba se koná dne: v hod.

kde

S dizertací je možno seznámit se na děkanátě Lékařské fakulty v Plzni, Univerzity Karlovy v Praze.

Abstrakt

Cílem dizertační práce je zdůraznit význam prodloužené kultivace embryí do stadia blastocyst a její vliv na úspěšnost asistované reprodukce, umožnění praeimplantační diagnostiky, analýzy kultivačních medií a derivace lidských embryonálních kmenových buněk.

Autor shrnuje současné literární poznatky v asistované reprodukci a rozebírá současné metody. Předkládá vlastní experimentální práce, ve kterých srovnává vlastní výsledky léčby neplodnosti s použitím prodloužené kultivace do blastocyst s výsledky jiných technik. Dále předkládá vlastní experimentální publikované práce využívající prodloužené kultivace pro preimplantační diagnostiku a její zdokonalení. Další experimentální práce se dotýkají možnosti derivace kmenových buněk.

Použití prodloužené kultivace do blastocyst přesvědčivě vede jak na základě vlastních experimentů, tak dle literárních poznatků k vyšší úspěšnosti léčby neplodnosti. Tato skutečnost je zvláště výrazná u matek vyššího věku. Dostatečná doba kultivace umožňuje nejenom jeho selekci, ale také biopsii a její genetické vyšetření. Dlouhodobá kultivace umožňuje též analýzu kultivačních medií, která spolu se zdokonalováním vyšetřovacích technik proteomiky, metabolomiky a respirační analýzy bude hrát v neinvazivním určení viability embrya významnou roli.

Současná sofistikovanost analýzy embryí vnesla do asistované reprodukce značné zvýšení úspěšnosti, stále však je neuspokojivé a diskutované narušení integrity embrya biopsií a zatím neuspokojivě diagnostikovatelný vliv mozaicismu. Výsledným řešením by měly být další experimenty, s cílem popsat právě viabilitu embrya, a tím neinvazivně vyselektovat nejlepší embryo pro single embryotransfer.

Abstract

The aim of this dissertation thesis is to emphasize the sense of extended cultivation of embryos to the stadium of blastocyst and its influence on success of assisted reproduction and facilitation of pre implantation diagnosis, analysis of cultivation media and derivation of human embryonic stem cells.

Author summarizes current literary findings in assisted reproduction and examines the currently used methods. Author also submits his own published experimental works, in which he compares his own results of infertility treatment with usage of extended cultivation to blastocyst with results of other techniques. Furthermore author submits his own published experimental works which are using extended cultivation for pre implantation diagnosis and its improvement. Another experimental works includes possibility of stem cells derivation.

Usage of extended cultivation to blastocyst convincingly leads, according to author's own experiments and simultaneously to available literary findings, to higher success of infertility treatment. This is especially significant by middle-aged mothers. Sufficient term of cultivation enables not just selection, but also biopsy and its generic treatment. Long-term cultivation also enables analysis of cultivation media – but these didn't met the expectations for increase of treatment successfulness.

Current sophistication of embryonic analysis brought into assisted reproduction significant increase of successfulness. But still remains a few critically discussed facts such as disruption of embryonic integrity when performing pre implantation genetic analysis and also yet unexplained influence of mosaicism on results of this technique. The resulting solution should be further experiments with aimed to describe viability of embryo and by that non-invasively select the best embryo for single-embryo-transfer.

Obsah

1	Úvod	7
2	Cíle práce	8
3	Souhrn současných poznatků.....	9
3.1	Vývoj embrya před implantací	9
3.1.1	Oocyt a zygota	9
3.1.2	Buněčné stádium embrya.....	10
3.1.3	Blastocysta.....	10
3.1.4	Implantace embrya.....	11
3.2	Prodloužená kultivace embrya – definice, historie. Význam a využití prodloužené kultivace.....	12
3.2.1	Dokonalejší selekce embryí s cílem zvyšování efektivity IVF.....	12
3.2.2	Analýza kultivačních médií s cílem zvyšování efektivity IVF	13
3.2.3	Preimplantační genetická diagnostika a preimplantační genetický screening.....	14
3.2.4	Derivace embryonálních kmenových buněk (EKB)	16
4	Souhrn vlastních výsledků.....	18
4.1.1	Studium interakcí embryonálních kmenových buněk a hematopoetických kmenových buněk	18
4.2	Jsou embrya vybraná 3. den kultivace dle morfologických kritérií shledána také jako geneticky vhodná k ET?.....	19
4.3	Přínos kultivace do stádia blastocyst pro zvýšení úspěšnosti léčení neplodnosti.....	20
4.4	Zvyšování efektivity a spolehlivosti PGS metodou rehybridizace pomocí subtelomerických sond.....	21
5	Závěry pro praxi a výhled do budoucna.....	24
6	Publikované práce	26
7	Literatura	27

Seznam použitých zkratk

aPLs	antifosfolipidové protilátky
AP	alkalická fosfatáza
ART	techniky asistované reprodukce
DIR	Deutsches IVF Register
DKB	dospělé kmenové buňky
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EKB	embryonální kmenové buňky
ELISA	enzymatická imunoanalýza
FSH	folikuly stimulující hormon
GnRH	gonadotropin-releasing hormon, uvolňovací hormon pro gonadotropiny
HKB	hematopoetické kmenové buňky
ICSI	intracytoplazmatická injekce spermie
IL	interleukin
IL-1	interleukin 1
IL-6	interleukin 6
IVF	in vitro fertilizace
LH	luteotropní hormon
LIF	leukemia inhibitory factor, leukemický inhibiční faktor
mEKB	myší embryonální kmenové buňky
mRNA	messengerová = informační ribonukleová kyselina
PB	polární tělísko
PCOS	syndrom polycystických ovárií
PGD	preimplantační genetická diagnostika
PGS	preimplantační genetický screening
ZP	zona pellucida

1 Úvod

Současné metody asistované reprodukce jsou vysoce sofistikované, přesto ale je efektivita léčby neplodnosti jen málo uspokojivá – procento embryí, jež se po transferu implantují, se pohybuje v nejlepších centrech mezi 20 až 30%. Z toho důvodu řada pracovišť i neplodných párů volí transfer více než jednoho embrya, což však vede k častému výskytu vícečetných těhotenství.

Aktuálním úkolem reprodukční medicíny je tedy zdokonalit metody evaluace embryí a vybírat tak životaschopné embryo s nejlepším vývojovým potenciálem, a pak pro jasně definované podskupiny optimálních pacientek provádět transfer pouze jednoho embrya. Tzv. single embryo transfer je jediná cesta k omezení vícečetných těhotenství, která jako závažná komplikace léčby neplodnosti ovlivňují jak matku, tak plody.

Názorů, jakým způsobem zdokonalovat výběr embrya, je mnoho – někteří autoři spoléhají pouze na výběr morfologicky nejlepších oocytů, jiní na prodlouženou kultivaci do stádia blastocyst, další doufají v pozitivní efekt preimplantačního genetického screeningu či analýzy různých predikčních faktorů z kultivačních médií.

Tato práce si klade za cíl popsat současný stav vědění na tomto poli medicíny a předložit některé aktuální výsledky našeho výzkumu v této oblasti.

2 Cíle práce

Tato práce si klade za cíl popsat nejpoužívanější a nejdiskutovanější současné techniky asistované reprodukce se zvláštním důrazem na potvrzení vhodnosti a užitečnosti dlouhodobé kultivace embryí do stadia blastocyst jak pro zvýšení úspěšnosti léčby sterility, tak pro možnost jejího využití pro praeimplantační genetické vyšetření.

Konkrétní cíle práce lze shrnout do čtyř oblastí:

1. Studium přínosu kultivace embrya do stádia blastocyst pro zvýšení úspěšnosti léčení neplodnosti.
2. Srovnání morfologických kritérií a genetické analýzy embryí.
3. Studium interakcí embryonálních kmenových buněk a hematopoetických kmenových buněk.
4. Zvyšování efektivity a spolehlivosti PGD/PGS metodou rehybridizace pomocí subtelomerických sond.

3 Souhrn současných poznatků

3.1 Vývoj embrya před implantací

3.1.1 Oocyt a zygota

Kmenové pohlavní buňky (oogonie) vstupují do prvního meiotického dělení během rané oogeneze. Před vstupem do prvního meiotického redukčního dělení je v oocytu diploidní sada chromozómů (chromozómy jsou běžně duplikované procesem zvaným replikace v syntetické fázi buněčného cyklu).

Dokončení meiózy je zastaveno ve stádiu profáze a to až do doby předovulačního zvýšení hladiny luteinizačního hormonu (LH), jenž iniciuje dokončení prvního meiotického dělení. Pod vlivem tzv. mitosis/meiosis promoting faktoru dojde k rozpuštění jaderné membrány a oocyt vstupuje do prvního redukčního dělení, při němž je vyloučeno první polární tělísko jako odpadní produkt. Tento proces se za fyziologických podmínek in vivo uskutečňuje uvnitř folikulu před tím, než dojde k ovulaci oocytu.

Následně po fertilizaci a aktivaci oocytu vstupuje oocyt do druhého meiotického dělení, ve kterém dojde k rozdělení duplikovaných chromatid haploidního oocytu. Jedna sada zůstane v oocytu a druhá je vyloučena jako druhé polární tělísko, dále potom dochází k formaci prvojader, kdy fyziologicky fertilizovaný oocyt obsahuje jedno prvojádře s genetickým materiálem od otce a druhým od matky. Toto stádium je definováno jako prezygota, jenž vstupuje do syngamie (= fúze prvojader = párování maternálních a paternálních chromozómů a syntéza DNA). Během těchto procesů dochází k častým chybám.

Bylo potvrzeno, že abnormální morfologie prvojader koreluje s nízkou hodnotou tvorby blastocyst, s tvorbou arestovaných, pomalu se vyvíjejících chromozomálně abnormálních embryí. Statistická analýza potvrdila silnou korelaci mezi morfologií prvojader a jadérek a aneuploidie v embryích i v jiných publikovaných studiích [Gianaroli et al., 2003; Gianaroli et al., 2007, 2007a].

3.1.2 Buněčné stádium embrya

První kroky embryogeneze jsou u savců řízeny genetickými informacemi získanými od matky a ovlivňovány epigenetickými faktory okolí. Exprese genomu vlastního embrya začíná u různých savčích druhů různě, u člověka je tento proces zatím ne zcela objasněn, ale předpokládá se, že k tomu dochází kolem třetího dne vývoje.

Kromě genetické regulace má významný vliv na vývoj embrya jeho okolí – např. koncentrace kyslíku, pH, hormonální prostředí atd. Bylo prokázáno, že epigenetické vlivy, působící v periimplantačním období, mohou ovlivnit jak prenatální, tak dokonce i postnatální vývoj [de Kloet et al., 2005].

V IVF praxi dobře se vyvíjející embrya dosáhnou 4 a 8 buněčného stádia v den 2 až v den 3. To znamená, že čas, který je u lidských embryí nutný k dokončení prvních tří buněčných cyklů, je v průměru 60 hod.. Opožděné a asynchronně se dělící embrya, a to jak rychleji tak pomaleji, jsou považována za embrya ne zcela optimální kvality, jež v menším procentu dosáhnou stádia blastocyst, než ta embrya, která se dělí synchronně [Sermon et al., 2004]. Dr. Kahraman [Kahraman et al., 2007] analyzovala hodnoty aneuploidií v pomalu a v normálně se vyvíjejících embryích. Pomalu se vyvíjející embrya měla hodnotu chromozomálních abnormalit 65% oproti 58% u normálně se vyvíjejících embryí.

3.1.3 Blastocysta

Ve stádiu moruly dochází ke kompaktaci a k dokončení aktivace embryonálního genomu. Rozdělení buněk v blastocystě do dvou linií – do embryoblastu a trofoblastu, je započato v raném osmibuněčném stádiu. Buňky jsou pak dále polarizovány, a to jak na membráně tak v cytosolu [Antzak et al. 1999]. Polarizace je regulována rozsahem kontaktů mezi blastomerami.

Kompaktace a následně kavitace je v savčím embryu základní jev, který vede k tvorbě trofoblastu (trofoektodermu), embryoblastu (inner cell mass = ICM) a blastocoely. Všechny procesy jsou prostorově a časově vzájemně závislé a

mezibuněčné aparáty, speciálně tight a gap junctions, jsou považovány za základní elementy v těchto mezibuněčných interakcích.

3.1.4 Implantace embrya

Implantace blastocysty je unikátní proces savčí reprodukce, jež vyžaduje přísně koordinovanou souhru mezi embryem a mateřskou dělohou.

Probíhá ve třech fázích označovaných jako apozice, adheze a invaze. Apozice znamená orientaci blastocysty v děložní dutině k endometriálnímu epitelu. V adhezivní fázi se blastocysta přichycuje a v invazivní pak embryonálním trofoblastem prorůstá do mateřské deciduy, přičemž spolupůsobí řada komplexních interakcí mezi adhezivními molekulami embryonální a mateřské tkáně.

Úspěšná implantace je podmíněna optimálně vyvinutým životaschopným embryem, adekvátně připraveným endometriem a jejich vzájemnou komunikací a recipročním ovlivňováním.

Morfologické a funkční změny endometria v průběhu menstruačního cyklu jsou regulovány ovariálními steroidními hormony. Jejich efekty, to znamená molekuly, jejichž expresi ovlivňují, a které pak zabezpečují vlastní morfologické a funkční změny endometria, nejsou přesně popsány. Mnoho z nich je známo, ale mnoho dalších se každým rokem objevuje v literatuře zcela nově.

Jak vyplývá z řady prací, je to především leukemický inhibiční faktor (LIF), interleukin 11 (IL-11) a triáda IL-12/IL-15/IL-18, které jsou těmi klíčovými signálními vektory, produkovanými endometriem [Stewart et al., 1992; Stewart, 1994, Kimber, 2005].

Pochopení dějů spojených s implantací embrya a porozumění komunikaci mezi embryem a endometriem v periimplantačním období je dnes jedním z hlavních problémů reprodukční biologie. K jeho řešení přispívá mimo jiné identifikace genů, sehrávajících klíčové role v regulaci a uskutečňování prvních fází embryogeneze.

3.2 Prodloužená kultivace embrya – definice, historie. Význam a využití prodloužené kultivace

Pojem „prodloužená kultivace embrya“ se v průběhu posledních 15 let postupně měnil a vyvíjel a kultivační doba, která tak byla označována, se prodlužovala. Dnes se pod prodlouženou kultivací rozumí kultivace embrya do stádia blastocytu, tedy 5 až 6 dní od zahájení IVF/ICSI/IMSI.

Od počátku 90. let minulého století se začali objevovat autoři [Lopata et al., 1996; Olivennes et al., 1994], kteří dokázali pěstovat embrya déle, než bylo původně možné a došli ve vývoji embrya až do stádia blastocytu. Nejprve se za tímto účelem používaly kultivační systémy využívající ko-kultivace s buňkami, které nahrazovaly embryu stimulační a růstové podněty, které jsou za normálních podmínek přítomné v okolí embrya v průběhu jeho *in vivo* vývoje. Tyto systémy však měly mnoho rizik – především přenos virů a prionů ze zvířecích tkání. Začátek 21. století je již charakterizován širokou škálou bezpečných a velmi kvalitních médií, jež poskytují embryím dostatečnou výživu i stimulaci [Summers et Biggers, 2003].

Od zavedení prodloužené kultivace byla očekávána především možnost dokonalejší selekce embryí dle morfologie. Cílem byla identifikace embryí s nejvyšším vývojovým potenciálem, zlepšení synchronizace stádia transferovaného embrya a stimulovaného endometria a tím pádem zvýšení úspěšnosti léčby neplodnosti.

3.2.1 Dokonalejší selekce embryí s cílem zvyšování efektivity IVF

Transfer blastocyst byl od začátku pokládán na vhodný nástroj pro zvyšování pregnancy rate (PR) a snižování frekvence vícečetných těhotenství [Garcia-Velasco et Simon, 2001; Mercader et al., 2003]. Procento vícečetných těhotenství po IVF je vysoké - v roce 2004 to bylo v Evropě 26,4% a v USA 35,5%. Z toho vyplývají zdravotní rizika pro děti i matku a také vzrůstající ekonomické náklady na zdravotní

péči [Society for Assisted Reproductive Technology and American Society for Reproductive Medicine, 2000; Papanikolaou et al., 2005].

Řada prací dokázala výhody kultivace do blastocyst a její vliv na efektivitu léčby neplodnosti. Současná reprodukční medicína se domnívá, že vyselektované blastocysty mají lepší vývojový potenciál a navíc pozdějším transferem (až 5. či 6. den) je vývoj embrya a připravenost endometria lépe synchronizován [Fanchin et al., 2001; Galan et al., 2000; Gardner et al., 2003].

3.2.2 Analýza kultivačních médií s cílem zvyšování efektivity IVF

Prodloužená kultivace embryí a selekce blastocyst značně zvedla úspěšnost IVF 23% (DIR) a přiblížila se skoro 50% [Zech et al., 2002]. Řada klinik však stále hledá cesty k dalšímu zvyšování PR a to přispívá k boomu vyšetřování prediktivních faktorů z kultivačních embryí, jejichž stanovování by korelovalo s vývojovým potenciálem embrya a tak zvýšilo efektivitu IVF.

Na konci 20. století, v době maximálního rozkvětu imunologie, podporovala široká vědecká obec hypotézy, v nichž významnou roli hrály různé působky a buňky imunitního systému. Imunologická složka etiologie a patogeneze neplodnosti byla pokládána za příčinu nejen idiopatické infertility, ale i endometriózy, nízké úspěšnosti IVF/ICSI, opakovaných spontánních potratů atd.

Ačkoliv bylo v mnoha případech prokázáno, že protilátky (např. antifosfolipidové) či imunocyty (např. NK buňky) hrají roli v patogenezi infertility, celkově je nutno říci, že imunoterapie zatím očekávání nesplnila a tyto identifikované faktory nepřispěly ani k lepší diagnostice.

Další imunogenetická vyšetření, která se provádějí v současnosti (např. stanovení leptinu či různých cytokinů a růstových faktorů v kultivačních médiích a folikulární tekutině jako predikce vývojového potenciálu a úspěšnosti implantace embrya), jsou již ve svých vyhlídkách a prognózách daleko střízlivější než ta, která byla prováděna a zaváděna v 80. a 90. letech 20. století. To je i případ cytokinu leukemického

inhibičního faktoru (LIF). Když byl poprvé popsán a byly publikovány první studie na lif-gen knock-out myších, byla očekávání velká - existovala hypotéza, že LIF bude ústředním regulátorem vývoje embrya a implantace, a bude potencionálním terapeutickým prostředkem. Bohužel, tyto naděje byly naplněny jen částečně – ve veterinární medicíně je LIF používán k optimalizaci vývoje embryí některých druhů, u myších embryonálních kmenových buněk (EKB) byl zjištěn jako nezbytný faktor pro udržení pluripotence buněk, ale v humánní medicíně jeho přínos tak zásadní není - LIF neudrží lidské EKB v nediferencovaném stavu a ani není jediným klíčovým faktorem ovlivňujícím implantaci embrya – je spíše jen zapojen do celé kaskády regulačních dějů.

A tak se výzkum pozvolna posunuje z „imuno-“ do „-genetické“ roviny a zvýšená pozornost je věnována zkoumání genetického pozadí infertility.

Naději představuje v současné době např. charakterizace transkriptomu v individuální buňce. Studium genové exprese byly nalezeny nové markery vztahující se k viabilitě embrya. Nejkomplexnější microarraye v současné době dovolují současné testování přibližně 30 000 genů, což je téměř celý genom [Wells, 2007a,b; Wilton, 2007; Huges, 2007]. Studie jsou prováděny s cílem vytvoření pokud možno jednoduchého testu, jenž umožní embryologům vybrat ze skupiny embryí vhodných k transferu to nejvíce životaschopné embryo. V současné době je technologie microarray analýzy jen málo využívaná k PGD/PGS, ale začlenění této technologie do IVF a PGD může vést ke zvýšení pregnancy rate, což by mohlo být prospěšné jak infertilním, tak PGD pacientům [Wells, 2007a,b; Cram, 2007].

3.2.3 Preimplantační genetická diagnostika a preimplantační genetický screening

Preimplantační genetická diagnostika (PGD) a preimplantační genetický screening (PGS) umožňují vyšetřit specifické vady v genetické výbavě embrya ještě před jeho implantací do děložní sliznice.

PGD byla poprvé provedena před 20 lety [Handyside et al., 1990,1992, Verlinski, 1990], jako alternativa prenatální diagnostiky. Od té doby se neustále vyvíjejí techniky pro molekulární a cytogenetickou analýzu na úrovni testování jedné buňky, což umožňuje v současné době vyšetření polárních tělísek z oocytů a zygoty, vyšetření buňky (blastomery) odebrané z embrya v buněčném stádiu nebo trofoektodermu z blastocysty [Sermon et al., 2004]. A tak se seznam onemocnění, která mohou být vyšetřena pomocí PGD, každý rok rozšiřuje.

PGD je zaměřena především na plodné páry, které mají vysoké genetické riziko, že jejich potomci budou poškozeni chorobou, jíž trpí jeden nebo oba rodiče, ať už se jedná o poruchu monogenně, chromozomálně či jinak vázanou. Mezi indikace k PGD tedy patří monogenní onemocnění, X-vázaná genetická onemocnění nebo autosomálně dominantní onemocnění s pozdním počátkem a plnou penetrací mutace - například Huntingtonova chorea a další neurodegenerativní onemocnění. Diskutována je diagnostika suspektních genů způsobujících onemocnění v pozdním věku a jejich dědičných podskupin (BRCA) a nebo PGD – HLA typizace v rodinách, kde není HLA kompatibilní sourozenec.

PGS je poskytován infertilním párům k detekci možných chromozomálních anomálií embrya, jež mohou vést k selhání léčby neplodnosti nebo k opakovaným spontánním potratům a to hlavně při vyšším věku matky nebo i otce a při poruchách spermatogeneze partnera. [Thornhill et al., 2005]

Výhody provedení PGD/PGS

Není žádných pochyb, že PGS snižuje opakované spontánní potraty, tzv. recurrent pregnancy loss (RPL) u idiopatických spontánních potratů (více jak 50% RPL je idiopatických) na 19,5% spontánních potratů oproti očekávaným 41% u pacientek s třemi až pěti potraty [Munné et al., 2007b]. Také u nosičů translokací snížilo PGS procento potratů na 12 % oproti 39 % ve skupině žen bez PGS [Munné et al., 2007a,c,d].

Další indikací k provedení PGS je porucha spermatogeneze, kterou trpí přibližně 15 - 20% mužů. U infertilních mužů s oligo-, astheno-, teratozoospermii je signifikantní nárůst aneuploidie přibližně 4 x oproti kontrolním (plodným) mužům [Martin et al., 2007]. Nejvíce je zvýšená frekvence aneuploidii chromozómů skupiny 21 a 22 a X - Y bivalentů, což bylo prokázáno jak karyotypováním, tak FISH analýzou.

PGS je považován za efektivní nástroj k selekci embryí vhodných pro transfer, zvyšující implantation i pregnancy rate, a to především ve skupině pacientek ve vyšším věku a ještě zřetelněji při opakovaných abortech a u partnerů s oligoastenozoospermii [Verlinsky et Kuliev, 2004; Munne et al., 2005; Gianaroli et al., 2005; Ferraretti et al., 2004].

UNESCO/IBC považuje screening aneuploidii za eticky akceptovatelný [UNESCO/IBC, 2003]. Zkušenosti se spolehlivostí, efektivností a bezpečností PGS neustále rostou, ale zdaleka ne všechny problémy jsou dořešeny [Briggs et al., 2000; Staessen et al., 2004].

ESHRE a PGDIS zařadili PGS do svých směrnic [Thornhill et al., 2005; PGDIS Guidelines, 2004], ale v poslední době je stále více voláno po randomizované studii, prokazující jak efektivitu metod, tak přínos PGS pro zvýšení health baby take home rate [task force ESHRE, 2009].

3.2.4 Derivace embryonálních kmenových buněk (EKB)

Totipotentní embryonální kmenové buňky (EKB) jsou nediferencované buňky, které se mohou vyvíjet v jakýkoli buněčný typ a jsou přechodně přítomny během embryogeneze v preimplantačních embryích a fetálních gonádách. Jejich linie tedy mohou být odvozeny buď z primordiálních germinálních buněk blastocyt, z vyvíjejících se gonád či z buněk germinálních tumorů. EKB mohou růst v kultuře bez ztráty totipotence, jsou schopné se nekonečně symetricky dělit bez diferenciaci, uchovávají si normální karyotyp a mohou se diferencovat v buňky ektodermu, entodermu či mezodermu, a to jak *in vitro*, tak i *in vivo*.

Odvození linií EKB u savců bylo poprvé demonstrováno u myší [Martin et al., 1981; Evans et al., 1981], pak u nehumánních primátů, kosmana a makaka rhesus a posléze u lidí [Thomson et al., 1998].

První linie lidských EKB byly odvozeny z embryoblastu normálních nadpočetných blastocyst darovaných páry, které podstoupily IVF léčbu a svá embrya již nehodlaly k léčbě využít, ani je nemínily dále uchovávat v zamraženém stavu. V současné době se kromě těchto vysoce kvalitních embryí používají embrya nízké kvality, jež by pro léčbu neplodnosti nebyla nikdy využita, geneticky abnormální embrya a embrya partenogenetická.

Multipotentní dospělé kmenové buňky (DKB) se *in vivo* účastní regenerace a hojení tkání [Bunting et Hawley, 2003]. Uskutečnění trans – a dediferenciace *in vitro* a její plné porozumění by mělo široké praktické použití v buněčné terapii [Heng et al., 2005; Pessina et Gribaldo, 2006].

K dediferenciaci se kromě kokultivačních technik používají i jiné metody - enukleace EKB a jejich následná fúze s DKB, permeabilizace buněčných membrán DKB následována opět buněčnou fúzí či použitím některých cytokinů a růstových faktorů [Heng et al., 2005; Skottman et al., 2006].

4 Souhrn vlastních výsledků

4.1.1 Studium interakcí embryonálních kmenových buněk a hematopoetických kmenových buněk

Cílem naší práce bylo optimalizovat podmínky kokultivačního *in vitro* systému, jež by umožnil dediferenciaci hematopoetických kmenových buněk (HKB), což by vedlo k jejich větší dostupnosti pro klinické použití.

Kokultivaci jsme prováděli na miskách Transwell® System (Corning, NY, USA). Ty umožňují pěstovat v jednom médiu buňky různého původu i vlastností, separované permeabilní membránou (póry průměru 0,4 µm). Uskutečnili jsme dva typy kokultivačních pokusů.

Experiment č. 1: Myší embryonální kmenové buňky (mEKB) (mEKB Sv129 poskytnuté Dr. L. Schoonjanssem, Univesity of Leuven, Belgie) byly pěstovány na podpůrných buňkách, kterými byly mitoticky inaktivované myší fibroblasty (MIMF). Tyto buňky byly uloženy v dolním kompartmentu. Lidské HKB [1×10^5 /ml] byly kultivovány v horním kompartmentu. Jako kontrola byly pěstovány podpůrné buňky bez mEKB v dolním kompartmentu, s HKB umístěnými v horním kompartmentu. Bohužel k detekci jakýchkoliv známek dediferenciace nedošlo. Jedinou změnou byl pokles intenzity hematopoetických markerů na HKB. Expres markeru CD45 byla stabilnější než exprese markerů CD34 a CD133, které vymizely velmi rychle.

Kokultivaci jsme prováděli i bez mEKB a zjistili jsme, že výsledek je stejný. To nás vedlo k domněnce, že možná podpůrné buňky překrývají vliv mEKB a v pokusu č. 2 jsme je tedy vyřadili.

Experiment č. 2: Myší EKB byly pěstovány bez podpůrných buněk. Stav jejich diferenciaci byl ověřen kontrolní detekcí AP, cytokeratinu a vimentinu. Neboť myší EKB nejsou bez podpůrných buněk či přidání LIF do média dlouhodobě stabilní, byly do dolního kompartmentu každý den dány čerstvé. Lidské HKB [1×10^5 /ml] byly kultivovány v horním kompartmentu.

Bohužel ani v tomto uspořádání kokultivačního systému nebyly detekovány žádné známky dediferenciace, jedinou změnou byl opět pokles hematopoetických markerů HKB buněk.

Možných příčin nezdaru našeho kokultivačního systému je několik. Jednou z nich může být fakt, že buňky byly poměrně vzdálené a tak naším dalším krokem v optimalizaci fungování systému je umožnit vzájemný buněčný kontakt EKB a DKB, což se již v některých jiných dediferenciačních experimentech osvědčilo [Badorff et al., 2003; Ball et al., 2004; Matsui et al., 1992; Mollah et al., 2002; Shambloott et al., 1998; Wurmser et al., 2004].

Hlavní problém ale bude pravděpodobně v tom, že byly použity buňky od různých živočišných druhů. To vede jednak k technickým komplikacím a také k ne zcela přirozenému prostředí pro oba typy buněk.

Ačkoliv mEKB a lidské EKB jsou obojí savčí, mají celou řadu rozdílných vlastností – reagují jinak na cytokiny, růstové faktory, exprimují různé geny apod. [Koestenbauer et al., 2006].

4.2 Jsou embrya vybraná 3. den kultivace dle morfologických kritérií shledána také jako geneticky vhodná k ET?

Od roku 2007 do února 2011 bylo provedeno preimplanatační genetické vyšetření z různých indikací u 470 pacientek. Z tohoto souboru jsme pro naši studii vybrali 30 pacientek, u kterých bylo 3. den více jak 7 embryí k dispozici jak pro genetické vyšetření, tak pro teoretický výběr embryí pro elektivní embryotransfer. PGD aneuploidíí bylo provedeno z indikace: pokročilý věk matky (nad 37 let) nebo otce (nad 50 let), dále u párů po opakovaném selhání léčby a u infertilních párů, či na přání rodičů. Toto vyšetření provádíme pomocí dvou metod. Jednak metodou FISH, která umožňuje vyloučit přítomnost aneuploidie a translokace u chromozómů, jednak metodou PCR, která slouží k vyloučení monogenetických onemocnění.

Po vyřazení embryí neschopných dalšího vývoje byla 3. den kultivace provedena biopsie jedné blastomery pro preimplantační genetickou diagnostiku. Vyšetřeno bylo celkem 7 chromozomů (X, Y, 13, 16, 18, 21, 22), jejichž fyziologie je z 80% signifikantní pro genetickou fyziologii celého embrya [Jobanputra et al., 2002]. Sledovali jsme, v kolika případech budou 3. den vybraná embrya shodná s těmi, která nevykazovala žádné genetické patologie a mohla tedy být vybrána pro embryotransfer.

Shoda mezi teoreticky vybranými embryi pro transfer v den 3 a geneticky zdravými embryi v den 5 byla v průměru 34%. Z toho vyplývá, že v našem souboru byla v 67% transferována zcela jiná embrya než by byla transferována v den 3.

I přes tuto skutečnost bylo v tomto souboru dosaženo úspěšnosti v průměru u 1,73 embryí, u 63% těhotenství po embryotransferu, respektive u 56% těhotenství celkově. Tato čísla jsou vysoká a potvrzují známou skutečnost vyšší pravděpodobnosti otěhotnění při vyšším počtu získaných vajíček

Studie potvrdila nedokonalost a snad i nemožnost výběru vhodných energeticky zdatných a geneticky zdravých embryí podle morfologických kritérií v den 3.

4.3 Přínos kultivace do stádia blastocyst pro zvýšení úspěšnosti léčení neplodnosti

V roce 2009 bylo v Institutu reprodukční medicíny a endokrinologie v Plzni provedeno 460 stimulovaných cyklů. Ve 408 cyklech jsme mohli provést embryotransfer v den 5. Naše výsledky PR/ET jsme porovnali s hodnotami udávanými německým registrem asistované reprodukce (DIR), kam mají všechna německá centra povinnost prospektivně hlásit všechny stimulované cykly. V těchto hlášených cyklech je prováděn embryotransfer v naprosté většině případů v den 3.

Soubor jsme rozdělili do skupin podle věku ženy, čímž jsme chtěli lépe znázornit význam kultivace do stádia blastocyst u žen vyššího věku. Výsledky ukazují

skoro dvakrát vyšší hodnotu PR/ET při zavedení embryí pátý den po jejich selekci pomocí kultivace do blastocyst oproti transferu neselektovaných embryí třetí den.

Zvláště je tento rozdíl zřetelný u starších žen, kde jsme ve věkové kategorii nad 40 let dosáhli 30% PR/ET oproti 15% v německém registru.

Dalším jasným přínosem kultivace do stadia blastocyst a možnosti selekce embryí je skutečnost, že i této významně vyšší PR po ET bylo dosaženo zavedením menšího počtu embryí, jen ve 11 % ze všech embryotransferů jsme zavedli 3 embrya vzhledem k 22% v souboru DIR.

Domníváme se, že naše výsledky dostatečně potvrdily vhodnost zavedení prodloužené kultivace embryí do stadia blastocyst a užitečnost jejich selekce pro zvýšení PR na ET a zároveň snížení počtu vícečetných těhotenství. Ještě většího přínosu by pravděpodobně dosáhla kombinace prodloužené kultivace s paralelním genetickým vyšetřením, které by ještě lépe vyselektovalo to nejen energeticky zdatné, ale i geneticky zdravé embryo.

4.4 Zvyšování efektivity a spolehlivosti PGS metodou rehybridizace pomocí subtelomerických sond

Cílem studie bylo analyzovat incidenci nereprezentativních, to znamená nejednoznačných a tedy non-informativních výsledků analýzy FISH na našem pracovišti a zhodnotit přínos třetího kola hybridizace pomocí subtelomerických sond v těchto nejasných případech. Smyslem práce je též demonstrovat zvýšení počtu normálních výsledků (počtu chromozomálně normálních embryí) při použití této metody re-hybridizace u vybraných kategorií nereprezentativních výsledků.

Od ledna do prosince 2007 byla na našem pracovišti vyšetřena na přítomnost aneuploíí embrya 88 neplodných párů, kteří se rozhodli pro PGS. Celkem bylo u těchto párů provedeno 95 cyklů a získáno 719 embryí k biopsii. Z toho bylo analyzováno 702 embryí.

Odběr vždy pouze jedné blastomery byl prováděn u embryí s optimálním vývojem, tzn. u těch, která 3. den vývoje dosáhla alespoň pětibuněčného stádia a byla zcela bez fragmentací či s fragmentací nižší než 25%.

K hodnocení výsledků jsme použili kritéria dle Munného [Munné et al., 1998, 2002b]. Embrya byla považována za normální tehdy, pokud byl přítomen signál dvou gonozómů a vždy páru chromozómů 13, 16, 18, 21 a 22. Jako „chaotická“ byla označena embrya s dvěma a více abnormálními výsledky. Jako „abnormální“ byla označena embrya s fragmentovaným chromatinem, to znamená, že bylo přítomno několik signálů, pocházejících z těchto fragmentů.

Po dvou kolech hybridizace bylo 52,7% blastomer zhodnoceno jako abnormální, 27,1% jako diploidní a 20,2% mělo nerepresentativní výsledek.

Nejasné výsledky byly analyzovány pomocí třetího kola hybridizace a tímto způsobem bylo objasněno 95,8% případů ($P < 0,001$).

Tato studie potvrdila, že nejčastější případ selhání hybridizace při námi používané metodice (PB panel) byla monosomie a překryv signálů, zvláště pak u chromozómů 18 a 16. Námi použitá hodnotící kritéria nejsou zcela optimální, neboť plně nevylučují subjektivitu v posouzení např. kvality chromatinu v jádře.

Na základě literatury a výše uvedených výsledků podporujeme strategii, která zahrnuje v prvním kole hybridizace 5 chromozómů - 13, 18, 21, X a Y (PGT panel) a v druhém kole chromozómy dva - 16 a 22 (CEP 16 a LSI 22). V případě nerepresentativních výsledků provádíme re-hybridizaci a domníváme se, že tato praxe by měla být zařazena do pokynů pro standardní laboratorní provádění tak, jak již bylo ostatně doporučeno i Mezinárodní společností pro PGD/PGS [PGDIS 2007] a povrženo mnoha studiemi, kromě té naší např. [Colls et al., 2007]. V naší studii bylo provedením re-hybridizace objasněno 95,8% nejasných případů. Výsledky prokázaly, že téměř polovina suspektních monosomií a více než 70% případů, kdy nebyl po dvou kolech přítomen žádný signál pro daný chromozóm, byly ve skutečnosti euploidie.

Testování 7 klíčových chromozómů a následné získání důvěryhodných výsledků je dle našeho názoru užitečnější než analýza většího počtu chromozómů, již však nelze důvěřovat a ani re-hybridizací potvrdit.

5 Závěry pro praxi a výhled do budoucna

Je prokázáno, že transfer embrya ve stádiu blastocysty zvyšuje efektivitu léčby neplodnosti a vytváří časový prostor pro provedení preimplantační genetické analýzy a pro vyšetření kultivačních médií za účelem ještě dokonalejší charakterizace životaschopnosti a implantačního potenciálu embrya.

Metoda prodloužené kultivace embryí *in vitro* je však též zcela nesporně přínosem pro studium mechanismů pluripotence, diferenciaci a dediferenciaci buněk a umožnila mimo jiné porozumění některým aspektům genetického pozadí časně embryogeneze a embryonálních diferenciacních mechanismů.

Naproti tomu však nezapomínejme, že stejně jako každá jiná manipulace *in vitro* či jako každá jiná terapeutická metoda může mít i své vedlejší účinky. Ačkoliv zatím žádný z níže hypotetizovaných problémů nebyl prokázán dostatečně velkou a randomizovanou multicentrickou studií, neměli bychom zůstat k možným nástrahám neteční.

Spekuluje se, že prodloužená kultivace embrya má **epigenetické vlivy** a může vést k poruchám imprintingu některých genů [Rinaudo et Schulz, 2004]. Mezi poruchy způsobené chybným imprintingem patří např. Beckwith-Wiedemannův a Angelmanův syndrom, které dle některých prací [De Rycke et al., 2002] jsou pravděpodobně častější v populaci dětí narozených po ART ve srovnání s populací dětí spontánně počatých.

Kromě toho byla vyslovena hypotéza o **zvýšeném výskytu monozygotických dvojčat** po transferu embrya ve stádiu blastocysty. Příčinou tohoto „vedlejšího účinku“ by mohly být mikromanipulace se ZP [Urman et al., 2002] a také prodloužený „pobyt“ embrya v médiu, jež pro něj není zcela optimálním prostředím – na rozdíl od přirozeného niveau mateřských tkání mu chybí některé růstové faktory a cytokiny a naopak glukóza může být přítomna v nadměrném množství, což vede ke zvýšené produkci volných kyslíkových radikálů a k metabolickému stresu pro embryo [Da Costa et al., 2001; Menezo et Sakkas, 2002; Unger et al., 2004; Milki et al., 2003a].

Otazník zůstává nad **rovnoměrností pohlaví** – bylo prokázáno, že embrya nesoucí gonozómy XY se vyvíjí rychleji než ta s gonozómy XX [Xu et al., 1992; Richter et al., 2006]. Tím by se dal pravděpodobně vysvětlit nálezn publikovaný v některých pracích popisujících dysbalanci pohlaví po ART s využitím prodloužené kultivace [Ménézo et al., 1999; Milki et al., 2003b; Luna et al., 2007; Kausche et al., 2001] ve prospěch potomků mužského pohlaví. Toto však musí být, stejně jako ostatní zatím spíše hypotetické vedlejší efekty prodloužené kultivace, ověřeno rozsáhlejšími, prospektivními a multicentrickými studii.

Znalost možnosti těchto rizik a nutnost potvrdit či vyvrátit výše zmíněná podezření vede řadu velkých světových center léčby neplodnosti k trvalému a dlouhodobému sledování populace dětí, jež se po léčbě u nich narodily [Verlinsky et al., 2004]. To může být jedna z cest, jak na alespoň některé zatím nezodpovězené otázky odpovědět.

Další vývoj ve využití prodloužené kultivace do stadia blastocyst se bude vyvíjet hlavně v oblasti neinvazivních metod zjišťující viabilitu nejlepšího embrya pro singel embryo transfer.

Neinvazivní techniky vyvíjející se v současnosti jsou metabolomika, proteomika a studium respiračního potenciálu jak gamet tak embryí. O těchto technikách bylo již dříve často referováno, ale až v dnešní době, kdy moderní biochemické metody umožňují detekci stopového množství metabolitů nebo aminokyselin se tyto techniky rozvíjejí a mohou k neinvazivnímu stanovení viability embrya přispět.

Progresivně se vyvíjí technika life cell monitoring, která se snaží objevit velice jemné zákonitosti a posloupnosti vývoje embryí. Naše současné znalosti vývoje a také selekce embryí vyplývají se sekvenčních pozorování a dlouhodobých zkušeností. Nevíme ale přesně, které dynamické poruchy ve vývoji mají větší či menší význam pro implantaci. Zaznamenání určitých změn v určitém čase a jejich vliv na implantaci můžeme vytvořit knihovnu určitých morfologických znaků mající významný vliv na kvalitu embrya a jeho implantaci. Tato technika může, podle mého názoru, významně přispět k zvýšení úspěšnosti léčby a je v současné době hlavním vědeckým programem našeho institutu.

6 Publikované práce

Houdek Z, Cendelin J, Kulda , Babuska V, Vozeh F, Hatina J, Kralickova M, Zech NH, Vesela I, Pachernik J, Uher P. The comparison of P19-derived neuroprogenitors and naive cells survival after intracerebellar application in B6CBA mice. *Folia biologica* (in press).

Uher P, Baborova P, Kralickova M, Zech MH, Verlinsky Y, Zech NH. Non-informative results and monosomies in PGD: the importance of a third round of re-hybridization. *Reprod Biomed Online*. 2009 Oct;19(4):539-46. IF=3,21, citováno 3x

Uher P, Baborova P, Huttelova R, Kralickova M, Vanderzwalmen P, Zech N. Methodological aspects of attempts to trans-differentiate adult stem cells into embryonic-like cells in vitro. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2008 Dec;152(2):231-3.

Vanderzwalmen P, Hiemer A, Rubner P, Bach M, Neyer A, Stecher A, Uher P, Zintz M, Lejeune B, Vanderzwalmen S, Cassuto G, Zech NH. Blastocyst development after sperm selection at high magnification is associated with size and number of nuclear vacuoles. *Reprod Biomed Online*. 2008 Nov;17(5):617-27. IF=3,21, citováno 15x

Uher P, Hüttelová R, Králíková M, Novotný Z, Rokyta Z, Vanderzwalmen P, Zech N. How can the haematopoietic stem cells from the umbilical cord blood be de-differentiated in vitro? Our first results using the co-cultivation systems. *Ceska Gynekol*. 2007 Aug;72(4):280-3.

Kralickova M, Sima R, Vanecek T, Sima P, Rokyta Z, Ulcova-Gallova Z, Sucha R, Uher P, Hes O. Leukemia inhibitory factor gene mutations in the population of infertile women are not restricted to nulligravid patients. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2006 Aug;127(2):231-5. Epub 2006 Mar 20. IF=0,955, citováno 8x

7 Literatura

- Antzak M. a VanBlerkom J.: Temporal and spatial aspects of fragmentation in early human embryos: possible effect on developmental competence and association with the differential elimination of regulatory proteins from polarized domains. *Hum Reprod* 1999; 14(2): 429-447.
- Baart EB, Martini E, van den Berg I, Macklon NS, Galjaard RJ, Fauser BC, Van Opstal D. Preimplantation genetic screening reveals a high incidence of aneuploidy and mosaicism in embryos from young women undergoing IVF. *Hum Reprod*. 2006 Jan;21(1):223-33. Epub 2005 Sep 9.
- Badorff C, Brandes RP, Popp R, Rupp S, Urbich C, Aicher A, Fleming I, Busse R, Zeiher AM, Dimmeler S. Transdifferentiation of blood-derived human adult endothelial progenitor cells into functionally active cardiomyocytes. *Circulation*. 2003 Feb 25;107(7):1024-32.
- Ball SG, Shuttleworth AC, Kielty CM. Direct cell contact influences bone marrow mesenchymal stem cell fate. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004 Apr;36(4):714-27.
- Bielanska M, Tan SL, Ao A. Chromosomal mosaicism throughout human preimplantation development in vitro: incidence, type, and relevance to embryo outcome. *Hum Reprod*. 2002 Feb;17(2):413-9.
- Briggs DA, Power NJ, Lamb V, Rutherford AJ, Gosden RG. Amplification of DNA sequences in polar bodies from human oocytes for diagnosis of mitochondrial disease. *Lancet*. 2000 Apr 29;355(9214):1520-1.
- Bunting KD, Hawley RG. Integrative molecular and developmental biology of adult stem cells. *Biol Cell*. 2003 Dec;95(9):563-78.
- Colls P, Escudero T, Cekleniak N, Sadowy S, Cohen J, Munné S. Increased efficiency of preimplantation genetic diagnosis for infertility using "no result rescue". *Fertil Steril*. 2007 Jul;88(1):53-61. Epub 2007 Feb 12.
- Cram D. (2007) Blastocyst biopsy for developmental competence. 7th Preimplantation Genetic Diagnosis International Society Conference, Melbourne
- da Costa AL AL, Abdelmassih S, de Oliveira FG, Abdelmassih V, Abdelmassih R, Nagy ZP, Balmaceda JP. Monozygotic twins and transfer at the blastocyst stage after ICSI. *Hum Reprod*. 2001 Feb;16(2):333-6.
- de Kloet, E.R., Sibug, R.M., Helmerhorst, F.M. et al. Stress, genes and the mechanism of programming the brain for later life. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 2005, roč. 29, č. 2, s. 271-281.
- De Rycke M, Liebaers I, Van Steirteghem A. Epigenetic risks related to assisted reproductive technologies: risk analysis and epigenetic inheritance. *Hum Reprod*. 2002 Oct;17(10):2487-94.

-
- Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 1981 Jul 9;292(5819):154-6.
 - Fanchin R, Ayoubi JM, Righini C, Olivennes F, Schönauer LM, Frydman R. Uterine contractility decreases at the time of blastocyst transfers. *Hum Reprod*. 2001 Jun;16(6):1115-9.
 - Ferraretti AP, Magli MC, Kopcow L, Gianaroli L. Prognostic role of preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy in assisted reproductive technology outcome. *Hum Reprod*. 2004 Mar;19(3):694-9. Epub 2004 Jan 29.
 - Galán A, O'Connor JE, Valbuena D, Herrer R, Remohí J, Pampfer S, Pellicer A, Simón C. The human blastocyst regulates endometrial epithelial apoptosis in embryonic adhesion. *Biol Reprod*. 2000 Aug;63(2):430-9.
 - Garcia-Velasco JA, Simón C. Blastocyst transfer: does it really affect the outcome? *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2001 Jun;13(3):299-304.
 - Gardner DK, Surrey E, Minjarez D, Leitz A, Stevens J, Schoolcraft WB. Single blastocyst transfer: a prospective randomized trial. *Fertil Steril*. 2004 Mar;81(3):551-5.
 - Gardner DK, Lane M, Stevens J, Schoolcraft WB. Changing the start temperature and cooling rate in a slow-freezing protocol increases human blastocyst viability. *Fertil Steril*. 2003 Feb;79(2):407-10.
 - Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Lappi M, Borghi E, Ermini B. Oocyte euploidy, pronuclear zygote morphology and embryo chromosomal complement. *Hum Reprod*. 2007 Jan;22(1):241-9. Epub 2006 Aug 26.
 - Gianaroli L. (2007a) Identification of the genetically normal oocytes when few are permitted to be fertilized. 7th Preimplantation Genetic Diagnosis International Society Conference, Melbourne
 - Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Tabanelli C, Trengia V, Farfalli V, Cavallini G. The beneficial effects of preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy support extensive clinical application. *Reprod Biomed Online*. 2005 May;10(5):633-40.
 - Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Fortini D, Grieco N. Pronuclear morphology and chromosomal abnormalities as scoring criteria for embryo selection. *Fertil Steril*. 2003 Aug;80(2):341-9.
 - Handyside AH, Lesko JG, Tarín JJ, Winston RM, Hughes MR. Birth of a normal girl after in vitro fertilization and preimplantation diagnostic testing for cystic fibrosis. *N Engl J Med*. 1992 Sep 24;327(13):905-9.
 - Handyside AH, Kontogianni EH, Hardy K, Winston RM. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature*. 1990 Apr 19;344(6268):768-70.

-
- Heng BC, Haider HK, Sim EK, Cao T, Tong GQ, Ng SC. Comments about possible use of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes to direct autologous adult stem cells into the cardiomyogenic lineage. *Acta Cardiol.* 2005 Feb;60(1):7-12.
 - Huges M. (2007) Microarrays for PGD of single gene and chromosome disorders. 7th Preimplantation Genetic Diagnosis International Society Conference, Melbourne
 - Jobanputra V, Roy KK, Kucheria K. Prenatal detection of aneuploidies using fluorescence in situ hybridization: a preliminary experience in an Indian set up. *J Biosci.* 2002 Mar;27(2):155-63.
 - Kahraman S. (2007) Embryo development and chromosomal abnormalities. 7th Preimplantation Genetic Diagnosis International Society Conference, Melbourne
 - Kausche A, Jones GM, Trounson AO, Figueiredo F, MacLachlan V, Lolatgis N. Sex ratio and birth weights of infants born as a result of blastocyst transfers compared with early cleavage stage embryo transfers. *Fertil Steril.* 2001 Oct;76(4):688-93.
 - Kimber SJ. Leukaemia inhibitory factor in implantation and uterine biology. *Reproduction.* 2005 Aug;130(2):131-45.
 - Koestenbauer S, Zech NH, Juch H, Vanderzwalmen P, Schoonjans L, Dohr G. Embryonic stem cells: similarities and differences between human and murine embryonic stem cells. *Am J Reprod Immunol.* 2006 Mar;55(3):169-80.
 - Lopata A. Implantation of the human embryo. *Hum Reprod.* 1996 Sep;11 Suppl 1:175-84.
 - Luna M, Duke M, Copperman A, Grunfeld L, Sandler B, Barritt J. Blastocyst embryo transfer is associated with a sex-ratio imbalance in favor of male offspring. *Fertil Steril.* 2007 Mar;87(3):519-23. Epub 2006 Nov 21.
 - Martin R. H. (2007) Aneuploidy in human spermatogenesis. 7th Preimplantation Genetic Diagnosis International Society Conference, Melbourne
 - Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981 Dec;78(12):7634-8.
 - Matsui Y, Zsebo K, Hogan BL. Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell.* 1992 Sep 4;70(5):841-7.
 - Ménézo YJ, Sakkas D. Monozygotic twinning: is it related to apoptosis in the embryo? *Hum Reprod.* 2002 Jan;17(1):247-8.

-
- Ménézo YJ, Chouteau J, Torelló J, Girard A, Veiga A. Birth weight and sex ratio after transfer at the blastocyst stage in humans. *Fertil Steril*. 1999 Aug;72(2):221-4.
 - Mercader A, Garcia-Velasco JA, Escudero E, Remohí J, Pellicer A, Simón C. Clinical experience and perinatal outcome of blastocyst transfer after coculture of human embryos with human endometrial epithelial cells: a 5-year follow-up study. *Fertil Steril*. 2003 Nov;80(5):1162-8.
 - Milki AA, Jun SH, Hinckley MD, Behr B, Giudice LC, Westphal LM. Incidence of monozygotic twinning with blastocyst transfer compared to cleavage-stage transfer. *Fertil Steril*. 2003a Mar;79(3):503-6.
 - Milki AA, Jun SH, Hinckley MD, Westphal LW, Giudice LC, Behr B. Comparison of the sex ratio with blastocyst transfer and cleavage stage transfer. *J Assist Reprod Genet*. 2003b Aug;20(8):323-6.
 - Mollah ZU, Aiba S, Manome H, Yoshino Y, Tagami H. Cord blood CD34+ cells differentiate into dermal dendritic cells in co-culture with cutaneous fibroblasts or stromal cells. *J Invest Dermatol*. 2002 Mar;118(3):450-60.
 - Munné S. (2007a) Outcome of preimplantation genetic diagnosis for translocations and inversions. 7th Preimplantation Genetic Diagnosis International Society Conference, Melbourne
 - Munné S, Chen S, Colls P, Garrisi J, Zheng X, Cekleniak N, Lenzi M, Hughes P, Fischer J, Garrisi M, Tomkin G, Cohen J. Maternal age, morphology, development and chromosome abnormalities in over 6000 cleavage-stage embryos. *Reprod Biomed Online*. 2007b May;14(5):628-34.
 - Munné S, Fischer J, Escudero A, Warner A, Colls P, Cohen J. New recommendations for male factor and repeated pregnancy loss patients who are considering IVF and are at high risk of having translocations. *Fertil Steril* 2007c; 88 (1): 86.
 - Munne S, Garrisi J, Barnes F, Werlin L, Schoolcraft W, Kaplan B. Reduced spontaneous abortion and increased live birth rate after PGD for advanced maternal age. *Fertil Steril* 2007d; 88:85– 86.
 - Munné S, Chen S, Fischer J, Colls P, Zheng X, Stevens J, Escudero T, Oter M, Schoolcraft B, Simpson JL, Cohen J. Preimplantation genetic diagnosis reduces pregnancy loss in women aged 35 years and older with a history of recurrent miscarriages. *Fertil Steril*. 2005 Aug;84(2):331-5.
 - Munné S, Sandalinas M, Escudero T, Márquez C, Cohen J. Chromosome mosaicism in cleavage-stage human embryos: evidence of a maternal age effect. *Reprod Biomed Online*. 2002b May-Jun;4(3):223-32.
 - Munné S, Magli C, Bahçe M, Fung J, Legator M, Morrison L, Cohert J, Gianaroli L. Preimplantation diagnosis of the aneuploidies most commonly found in spontaneous abortions and live births: XY, 13, 14, 15, 16, 18, 21, 22. *Prenat Diagn*. 1998 Dec;18(13):1459-66.

-
- Nardo LG, Nikas G, Makrigiannakis A. Molecules in blastocyst implantation. Role of matrix metalloproteinases, cytokines and growth factors. *J Reprod Med.* 2003 Mar;48(3):137-47.
 - Olivennes F, Hazout A, Lelaidier C, Freitas S, Fanchin R, de Ziegler D, Frydman R. Four indications for embryo transfer at the blastocyst stage. *Hum Reprod.* 1994 Dec;9(12):2367-73.
 - Papanikolaou EG, D'haeseleer E, Verheyen G, Van de Velde H, Camus M, Van Steirteghem A, Devroey P, Tournaye H. Live birth rate is significantly higher after blastocyst transfer than after cleavage-stage embryo transfer when at least four embryos are available on day 3 of embryo culture. A randomized prospective study. *Hum Reprod.* 2005 Nov;20(11):3198-203. Epub 2005 Jul 29.
 - Pessina A, Gribaldo L. The key role of adult stem cells: therapeutic perspectives. *Curr Med Res Opin.* 2006 Nov;22(11):2287-300.
 - PGDIS- Preimplantation Genetic Diagnosis International Society: guidelines for good practice in PGD. *Reprod Biomed Online* 2004;9 (4): 430-434.
 - Richter KS, Anderson M, Osborn BH. Selection for faster development does not bias sex ratios resulting from blastocyst embryo transfer. *Reprod Biomed Online.* 2006 Apr;12(4):460-5.
 - Rinaudo P, Schultz RM. Effects of embryo culture on global pattern of gene expression in preimplantation mouse embryos. *Reproduction.* 2004 Sep;128(3):301-11.
 - Sermon K., Van Steirteghem A.: Preimplantation genetic diagnosis. *Lancet* 2004;363: 1633-41.
 - Shambloott MJ, Axelman J, Wang S, Bugg EM, Littlefield JW, Donovan PJ, Blumenthal PD, Huggins GR, Gearhart JD. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Nov 10;95(23):13726-31.
 - Skottman H, Dilber MS, Hovatta O. The derivation of clinical-grade human embryonic stem cell lines. *FEBS Lett.* 2006 May 22;580(12):2875-8. Epub 2006 Apr 7.
 - Staessen C, Platteau P, Van Assche E, Michiels A, Tournaye H, Camus M, Devroey P, Liebaers I, Van Steirteghem A. Comparison of blastocyst transfer with or without preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in couples with advanced maternal age: a prospective randomized controlled trial. *Hum Reprod.* 2004 Dec;19(12):2849-58. Epub 2004 Oct 7.
 - Stewart CL. Leukaemia inhibitory factor and the regulation of pre-implantation development of the mammalian embryo. *Mol Reprod Dev.* 1994 Oct;39(2):233-8.

-
- Stewart CL, Kaspar P, Brunet LJ, Bhatt H, Gadi I, Köntgen F, Abbondanzo SJ. Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. *Nature*. 1992 Sep 3;359(6390):76-9.
 - Summers MC, Biggers JD. Chemically defined media and the culture of mammalian preimplantation embryos: historical perspective and current issues. *Hum Reprod Update*. 2003 Nov-Dec;9(6):557-82.
 - Tabibzadeh S. Molecular control of the implantation window. *Hum Reprod Update*. 1998 Sep-Oct;4(5):465-71.
 - Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998 Nov 6;282(5391):1145-7.
 - Thornhill AR, deDie-Smulders CE, Geraedts JP, Harper JC, Harton GL, Lavery SA, Moutou C, Robinson MD, Schmutzler AG, Scriven PN, Sermon KD, Wilton L; ESHRE PGD Consortium. ESHRE PGD Consortium 'Best practice guidelines for clinical preimplantation genetic diagnosis (PGD) and preimplantation genetic screening (PGS)'. *Hum Reprod*. 2005 Jan;20(1):35-48. Epub 2004 Nov 11.
 - Unger S, Hoopmann M, Bald R, Foth D, Nawroth F. Monozygotic triplets and monozygotic twins after ICSI and transfer of two blastocysts: case report. *Hum Reprod*. 2004 Jan;19(1):110-3.
 - Urman B, Balaban B, Alatas C, Aksoy S, Mumcu A, Isiklar A. Zona-intact versus zona-free blastocyst transfer: a prospective, randomized study. *Fertil Steril*. 2002 Aug;78(2):392-6.
 - Verlinsky Y, Kuliev A. Preimplantation diagnosis for aneuploidies in assisted reproduction. *Minerva Ginecol*. 2004 Jun;56(3):197-203.
 - Verlinsky Y, Cohen J, Munne S, Gianaroli L, Simpson JL, Ferraretti AP, Kuliev A. Over a decade of experience with preimplantation genetic diagnosis: a multicenter report. *Fertil Steril*. 2004 Aug;82(2):292-4.
 - Verlinsky Y, Ginsberg N, Lifchez A, Valle J, Moise J, Strom CM. Analysis of the first polar body: preconception genetic diagnosis. *Hum Reprod*. 1990 Oct;5(7):826-9.
 - Vogiagis D, Marsh MM, Fry RC, Salamonsen LA. Leukaemia inhibitory factor in human endometrium throughout the menstrual cycle. *J Endocrinol*. 1996 Jan;148(1):95-102.
 - Wells D. (2007a) Microarray analysis for preimplantation screening. 7th Preimplantation Genetic Diagnosis International Society Conference, Melbourne
 - Wells D. (2007b) Evaluation of comparative genomic hybridization for the preimplantation genetic screening (PGS) of human blastocyst. 7th Preimplantation Genetic Diagnosis International Society Conference, Melbourne

-
- Wilton L, Williamson R, McBain J, Edgar D, Voullaire L. Birth of a healthy infant after preimplantation confirmation of euploidy by comparative genomic hybridization. *N Engl J Med*. 2001 Nov 22;345(21):1537-41.
 - Wurmser AE, Nakashima K, Summers RG, Toni N, D'Amour KA, Lie DC, Gage FH. Cell fusion-independent differentiation of neural stem cells to the endothelial lineage. *Nature*. 2004 Jul 15;430(6997):350-6.
 - Xu KP, Yadav BR, King WA, Betteridge KJ. Sex-related differences in developmental rates of bovine embryos produced and cultured in vitro. *Mol Reprod Dev*. 1992 Apr;31(4):249-52.
 - Zech H, Vanderzwalmen P, Zech N, Pfau K, Schwärzler P. Blastozystenkultur - praktisches Vorgehen - Untersuchungen zum "Fetal Outcome". *J Fertil Repro* 2002; 12 (2): 6-9.

-
- ESHRE Task Force on Ethics and Law, Pennings G, de Wert G, Shenfield F, Cohen J, Tarlatzis B, Devroey P. Providing infertility treatment in resource-poor countries. *Hum Reprod*. 2009 May;24(5):1008-11. Epub 2009 Feb 3.
 - UNESCO:
International Bioethics Committee(IBC): Report on PGD and Germ-Line Intervention 2003
 - ASRM- American Society for Reproductive Medicine, www.asrm.org